(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国 际 局

(43) 国际公布日
2020 年 6 月 11 日 (11.06.2020)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2020/114479 A1

(51) 国际专利分类号:
A61K 39/395 (2006.01) *C07K 16/30* (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2019/123555

(22) 国际申请日: 2019 年 12 月 6 日 (06.12.2019)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811491691.4 2018年12月7日 (07.12.2018) 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)。

(72) 发明人: 应华 (YING, Hua); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。 张玲 (ZHANG, Ling); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。 杨筱莹 (YANG, Xiaoying); 中国上海市闵行区文井路279号, Shanghai 200245 (CN)。 葛虎 (GE, Hu); 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 (DavidW.Cheng), 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, JO, JP, KE, KG, KH, KN, KP, KR, KW, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。

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

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

WO 2020/114479 A1

(54) **Title:** MULTISPECIFIC PROTEIN MOLECULE

(54) 发明名称: 多特异性蛋白分子

(57) **Abstract:** Involved is a multispecific protein molecule. Specifically involved is a multispecific protein molecule having a new structural form. A multispecific antibody can be simultaneously bound to CD3 and other tumor-associated antigens, and is bound to and activates a CD3 positive T cell while bound to a tumor-associated antigen expression cell, and thereby promoting the killing of the T cell on the tumor cell specificity expressing the tumor-associated antigen. Also provided are the preparation and application of a multispecific antibody.

(57) 摘要: 涉及多特异性蛋白分子。具体涉及一种具有新的结构形式多特异性抗体。多特异性抗体能够同时与CD3和其他肿瘤相关抗原相结合, 结合肿瘤相关抗原表达细胞的同时, 结合并激活CD3阳性的T细胞, 进而促进T细胞对表达肿瘤相关抗原的肿瘤细胞特异性的杀伤。同时还提供多特异性抗体的制备及应用。

多特异性蛋白分子

技术领域

本发明涉及多特异性抗体，如结合 CD3 和肿瘤相关抗原的多特异性抗体。

背景技术

这里的陈述仅提供与本发明有关的背景信息，而不必然地构成现有技术。

CD3 是由四条不同的链组成的 T 细胞共受体（Wucherpfennig, K.W.等（2010）“Structural Biology Of The T cell Receptor: Insights Into Receptor Assembly, Ligand Recognition, And Initiation Of Signaling,”Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2（4）:a005140；1-14 页；Chetty,R.等（1994）“CD3:Structure, Function, And Role Of Immunostaining In Clinical Practice,”J.Pathol.173（4）:303-307；Guy,C.S.等（2009）“Organization Of Proximal Signal Initiation At The TCR:CD3 Complex,”Immunol.Rev.232（1）:7-21）。

在哺乳动物中，CD3 多亚基形成的复合物与 T 细胞受体（TCR）的分子缔合，以便在 T 淋巴细胞中产生激活信号（Smith-Garvin,J.E.等（2009）“T Cell Activation,”Annu.Rev.Immunol.27:591-619）。在没有 CD3 的情况下，TCR 不能适当组装并且降解（Thomas,S.等（2010）“Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T cell Receptor Gene Transfer,”Immunology 129（2）:170-177）。研究发现 CD3 结合所有成熟的 T 细胞的膜，并且几乎不与其他细胞类型结合（Janeway,C.A.等（2005）:Immunobiology:The Immune System In Health And Disease,”第六版，Garland Science Publishing, NY, pp.214-216；Sun,Z.J.等（2001）“Mechanisms Contributing To T Cell Receptor Signaling And Assembly Revealed By The Solution Structure Of An Ectodomain Fragment Of The CD3ε:γHeterodimer,”Cell 105（7）:913-923；Kuhns, M.S.等（2006）“Deconstructing The Form And Function Of The TCR/CD3 Complex,”Immunity. 2006 Feb，24（2）:133-139）。

T 细胞上 T 细胞受体（TCR）复合物的恒定的 CD3ε 信号传导组分已经被用作靶，以促使在 T 细胞和肿瘤细胞之间形成免疫学突触。CD3 和肿瘤抗原的共接合（co-engagement）激活了 T 细胞，引起表达肿瘤抗原的肿瘤细胞的裂解（Baeuerle 等（2011）“Bispecific T Cell Engager For Cancer Therapy,” In: Bispecific Antibodies, Kontermann, R.E.（Ed.） Springer- Verlag；2011:273-287）。该方法允许双特异性抗体以对肿瘤细胞的高特异性与 T 细胞小室（compartment）全面相互作用并且广泛适用于大量的细胞表面肿瘤抗原。

B7H3 是 B7 家族的成员之一，属于Ⅰ型跨膜蛋白，包含氨基端的一个信号肽，一个细胞外的免疫球蛋白样可变区（IgV）和恒定区（IgC）、一个跨膜区和一个含有 45 个氨基酸的胞质尾区（Tissue Antigens. 2007 Aug;70（2）:96-104）。目前，B7H3 主要存在 2 种剪切体，B7H3a 和 B7H3b。B7H3a 胞外段由 IgV-IgC 2 个免疫球蛋

白结构域组成，又称为2IgB7H3，而B7H3b胞外段由IgV-IgC-IgV-IgC 4个免疫球蛋白结构域组成，又称为4IgB7H3。

B7H3蛋白质在正常组织、细胞中不表达或极低表达，却高表达于多种肿瘤组织，并与肿瘤的进展、患者的生存及预后密切相关。临床上已经报道，B7H3在许多癌症类型中、特别是在非小细胞肺癌、肾癌、泌尿道上皮癌、结直肠癌、前列腺癌、多形性胶质母细胞瘤、卵巢癌和胰腺癌中过表达（Lung Cancer. 2009 Nov;66（2）: 245-249；Clin Cancer Res. 2008 Aug 15;14（16）:5150-5157）。此外，也有文献报道，在前列腺癌中，B7H3 的表达强度与临床病理学恶性（诸如肿瘤体积、前列腺外侵袭或Gleason评分）正相关，且也与癌症进展相关（Cancer Res. 2007 Aug 15;67（16）:7893-7900）。类似地，在多形性胶质母细胞瘤中，B7H3 的表达与无事件存活负相关，且在胰腺癌中，B7H3 的表达与淋巴结转移和病理学进展相关。因此，B7H3被认为是一种新的肿瘤标志物和潜在的治疗靶点。

现有技术中公开了一些 CD3 抗体分子，如 OKT3、UCHT-1、SP34（Silvana Pessano et al. The EMBO Journal. 1985,4（2）:337-344），同时，如CN103703024、WO2017055389、CN102171248等也公开了一些CD3抗体分子。但在药物研发时，仍需开发具有更加安全和有效的CD3抗体分子。

发明内容

一方面，本公开提供一种多特异性蛋白分子，其包含第一多肽链和第二多肽链，其中：

所述第一多肽链从氨基末端至羧基末端依次包含针对第一靶抗原的第一结合区、针对第二靶抗原的第二结合区和第一Fc区，

所述第二多肽链从氨基末端至羧基末端依次包含针对第三靶抗原的第三结合区和第二Fc区，

所述第二结合区和/或第三结合区不包含抗体的恒定区结构域，

所述第一多肽链和所述第二多肽链链内各区域由肽键和/或接头连接。

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子的抗原结合区，具体是所述第一结合区、和/或所述第二结合区、和/或所述第三结合区是单链抗体（scFv）。

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子的所述第二靶抗原为CD3，且所述第一靶抗原和第三靶抗原为相同或不同的肿瘤相关抗原（TAA）；或所述第一靶抗原为 CD3，且所述第二靶抗原和第三靶抗原为相同或不同的肿瘤相关抗原（TAA）。

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子的所述肿瘤相关抗原（TAA）选自AFP、ALK、B7H3、BAGE蛋白质、BCMA、BIRC5（存活素）、BIRC7、β-连环蛋白（β-catenin）、brc-ab1、BRCA1、BORIS、CA9、CA125、碳酸酐酶IX、半胱天冬酶-8（caspase-8）、CALR、CCR5、CD19、CD20（MS4A1）、CD22、

CD30、CD33、CD38、CD40、CD123、CD133、CD138、CDK4、CEA、Claudin 18.2、周期素-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EpCAM、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGE 蛋白（例如 GAGE-1、-2）、GD2、GD3、GloboH、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3（glypican-3）、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、IL13Rα2、LMP2、κ-Light、LeY、MAGE 蛋白（例如 MAGE-1、-2、-3、-4、-6 和-12）、MART-1、间皮素（mesothelin）、ML-IAP、MOv-γ、Muc1、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、Muc16（CA-125）、MUM1、NA17、NKG2D、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ESO1、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA（FOLH1）、RAGE 蛋白质、Ras、RGS5、Rho、ROR1、SART-1、SART-3、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TGF-β、TMPRSS2、汤-诺氏抗原（Thompson-nouvelle antigen；Tn）、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶和尿溶蛋白-3 和 5T4（Trophoblast glycoprotein）。优选地，所述肿瘤相关抗原（TAA）选自 B7H3、BCMA、CEA、CD19、CD20、CD38、CD138、Claudin18.2、PSMA 和间皮素。更优选

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子的所述第一多肽链具有如下式 I 的结构：

V_a1-L1-V_b1-L2-V_c2-L2-V_d2-L4-Fc1 式 I，

所述第二多肽链具有如下式 II 的结构：

V_e3-L5-V_f3-L6-Fc2 式 II，

所述 V_a1、V_b1、V_c2、V_d2、V_e3 和 V_f3 为抗体的轻链可变区或重链可变区，且所述 V_a1 和 V_b1，所述 V_c2 和 V_d2，与所述 V_e3 和 V_f3 分别不同时为轻链可变区或不同时为重链可变区。

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子的第一多肽链具有如下所示的结构：

VH_{TAA}-L1-VL_{TAA}-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-Fc1，

VH_{TAA}-L1-VL_{TAA}-L2-VL_{CD3}-L3-VH_{CD3}-L4-Fc1，

VL_{TAA}-L1-VH_{TAA}.L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-Fc1，

VL_{TAA}-L1-VH_{TAA}-L2-VL_{CD3}-L3-VH_{CD3}-L4-Fc1，

VH_{CD3}-L1-VL_{CD3}-L2-VH_{TAA}-L3-VL_{TAA}-L4-Fc1，

VH_{CD3}-L1-VL_{CD3}-L2-VL_{TAA}-L3-VH_{TAA}-L4-Fc1，

VL_{CD3}-L1-VH_{CD3}-L2-VH_{TAA}-L3-VL_{TAA}-L4-Fc1 或

VL_{CD3}-L1-VH_{CD3}-L2-VL_{TAA}-L3-VH_{TAA}-L4-Fc1；

且所述第二多肽链具有如下所示的结构：

VL_{TAA}-L5-VH_{TAA}-L6-F_C2 或 VH_{TAA}-L5-VL_{TAA}-L6-F_C2。

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子的第一多肽链具有 VL_{TAA}-L1-VH_{TAA}.L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-Fc1 的结构，且所述的第二条链具有

VL_{TAA}-L5-VH_{TAA}-L6-F_C2 的结构。

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子的第一多肽链具有 VH_{CD3}-L1-VL_{CD3}-L2-VL_{TAA}-L3-VH_{TAA}-L4-Fc1 的结构，且所述的第二条链具有 VH_{TAA}-L5-VL_{TAA}-L6-F_C2 的结构。

在一些实施方式中，其中所述的 TAA 为 B7H3。

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子的所述第一 Fc 区和所述第二 Fc 区是相同的 Fc 或不同的 Fc。优选地，所述第一 Fc 区为 knob-Fc，所述第二 Fc 区为 hole-Fc；或所述第一 Fc 区为 hole-Fc，所述第二 Fc 区为 knob-Fc。

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子的所述第一 Fc 区的羧基端连接 His 标签（His tag）或第二 Fc 区的羧基端连接 His tag。

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子中针对 CD3 的抗原结合区包含抗体轻链可变区和重链可变区，其中所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：48、49 和 50 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，且所述重链可变区包含选自以下 i）至 v）任一项的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3：

i）分别如 SEQ ID NO：37、38 和 39 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

ii）分别如 SEQ ID NO：37、40 和 41 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

iii）分别如 SEQ ID NO：37、40 和 42 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

iv）分别如 SEQ ID NO：37、40 和 43 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3；

或

v）分别如 SEQ ID NO：37、47 和 45 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子中针对 CD3 的抗原结合区包含如 SEQ ID NO：36 所示的轻链可变区和/或选自如 SEQ ID NO：29、30、31、32 和 35 中任一项所示的重链可变区。

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子中针对 CD3 的抗原结合区包含如 SEQ ID NO：55、56、57、58、61、62、63、64、65 或 68 所示的 scFv。

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子中所述肿瘤相关抗原为 B7H3，针对 B7H3 的抗原结合区包含抗体轻链可变区和重链可变区，其中所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：12、13 和 14 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，且所述重链可变区包含分别如 SEQ ID NO：9、10 和 11 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3。

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子中针对 B7H3 的抗原结合区包含：如 SEQ ID NO：8 所示的轻链可变区和/或如 SEQ ID NO：7 所示的重链可变区；或如 SEQ ID NO：16 所示的轻链可变区和/或如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区。

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子中针对 B7H3 的抗原结合区包含如 SEQ ID NO：51、52、53 或 54 所示的 scFv。

在一些实施方式中，其中所述的多特异性蛋白分子包含第一多肽链和第二多肽链，所述第一多肽链选自氨基酸序列如 SEQ ID NO：72、73、74、75、76、77、78、79、80、83、84、85、86 或 87 所示的多肽，和/或所述第二多肽链选自氨基酸序列如 SEQ ID NO：71、88 或 70 所示的多肽。

在一些实施方式中，其中多特异性蛋白分子包含第一多肽链和第二多肽链，所述第二多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：71、88 或 70 所示，且：

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：72 所示；

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：73 所示；

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：74 所示；

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：75 所示；

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：76 所示；

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：77 所示；

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：78 所示；

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：79 所示；

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：80 所示；

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：83 所示；

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：84 所示；

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：85 所示；

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：86 所示；或者

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：87 所示。

在一些实施方式中，其中多特异性蛋白分子包含第一多肽链和第二多肽链，所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：73 所示，且所述第二多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：71 所示。

在一些实施方式中，其中多特异性蛋白分子包含第一多肽链和第二多肽链，所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：78 所示，且所述第二多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：71 所示。

在一些实施方式中，其中多特异性蛋白分子包含第一多肽链和第二多肽链，所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：76 所示，且所述第二多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：71 所示。

在另一方面，本公开涉及一种药物组合物，其含有治疗有效量的根据如前所述的多特异性蛋白分子，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。优选地，所述治疗有效量为单位剂量的组合物中含有 0.1-3000mg（更优选为 1-1000mg）的如前所述的多特异性蛋白分子。

在另一方面，本公开涉及一种分离的核酸分子，其编码如前所述的多特异性蛋白分子。

在另一方面，本公开涉及一种重组载体，其包含如前所述的分离的核酸分子。

在另一方面，本公开涉及一种用如前所述的重组载体转化的宿主细胞，所述宿主细胞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或昆虫细胞。

在另一方面，本公开涉及用于生产如前所述的多特异性蛋白分子的方法，所述方法包括将如前所述的宿主细胞在培养基中进行培养以形成并积累如前所述的多特异性蛋白分子，以及从培养物回收所述多特异性蛋白分子的步骤。

在另一方面，本公开涉及作为药物的如前所述的多特异性蛋白分子或如前所述的药物组合物，或如前所述的分离的核酸分子，优选所述药物为激活 T 细胞的药物，更优选所述药物为治疗癌症的药物、或治疗自身免疫性或炎性疾病的药物。

在另一方面，本公开涉及如前所述的多特异性蛋白分子或如前所述的药物组合物，或如前所述的分离的核酸分子在制备激活 T 细胞的药物中的用途。

在另一方面，本公开涉及如前所述的多特异性蛋白分子或如前所述的药物组合物，或如前所述的分离的核酸分子在制备治疗癌症、或治疗自身免疫性或炎性疾病的药物中的用途。

在另一方面，本公开涉及一种激活 T 细胞的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如前所述的多特异性蛋白分子或如前所述的药物组合物，或如前所述的分离的核酸分子。

在另一方面，本公开涉及一种治疗癌症或自身免疫性或炎性疾病的方法，所述方法包括向受试者施用治疗有效量的如前所述的多特异性蛋白分子或如前所述的药物组合物，或如前所述的分离的核酸分子。优选地，所述方法包括向受试者施用包含单位剂量的组合物中含有 0.1-3000mg 的如前所述的多特异性蛋白分子，或如前所述的药物组合物，或如前所述的分离的核酸分子。

在一些实施方式中，前面任一所述癌症选自癌瘤，淋巴瘤，胚细胞瘤（blastoma），肉瘤，和白血病或淋巴样恶性。所述癌症的更具体的例子包括鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌（NSCLC）、头和颈鳞状细胞癌（HNSCC）、神经胶质瘤、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤（DLBCL）、滤泡性淋巴瘤、急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、急性髓细胞样白血病（AML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、慢性髓细胞样白血病（CML）、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤（MCL）、小淋巴细胞性淋巴瘤（SLL）、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、髓样细胞白血病-1 蛋白（Mcl-1）、骨髓异常增生综合征（MDS）、胃肠（道）癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑素瘤、软骨肉瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、结肠癌、肝细胞癌（HCC）、透明细胞肾细胞癌（RCC）、头和颈癌、咽喉癌、肝胆癌（hepatobiliary cancer）、中枢神经系统癌、食管癌、恶性胸膜间皮瘤、

全身性轻链淀粉样变性、淋巴浆细胞性淋巴瘤（lymphoplasmacytic lymphoma）、骨髓异常增生综合征、骨髓增生性肿瘤、神经内分泌肿瘤、梅克尔细胞癌、睾丸癌和皮肤癌。在一些实施方案中，其中所述的癌症为 B7-H3 阳性细胞相关的癌症；优选为乳腺癌、卵巢癌、前列腺癌、胰腺癌、肾癌、肺癌、肝癌、胃癌、结肠癌、膀胱癌、食管癌、宫颈癌、胆囊癌、胶质母细胞瘤和黑色素瘤。

在一些实施方式中，前面任一所述自身免疫性疾病或炎性疾病选自：类风湿关节炎、牛皮癣、克罗恩病、强硬性脊柱炎、多发性硬化症、I 型糖尿病、肝炎、心肌炎、Sjogren 综合征、移植排斥后的自体免疫性溶血性贫血、水疱性类天疱疮、格雷夫氏病、桥本甲状腺炎、系统性红斑狼疮（SLE）、重症肌无力、天疱疮、恶性贫血。

附图说明

图 1A 和图 1B：图 1A 为双价双特异性抗体示意图，图 1B 为单价双特异性抗体示意图。

图 2A 至图 2D：流式细胞术对抗体与表达或不表达相应抗原的细胞结合活性检测。图 2A 为不同抗体与表达人 B7H3 的 A498 细胞的结合活性检测，图 2B 为不同抗体与过表达人 B7H3 的 CT26 细胞的结合活性检测，图 2C 为不同抗体与不表达人 B7H3 的 CT26 细胞的结合活性检测，结果显示各抗体均不与不表达人 B7H3 的 CT26 细胞结合，图 2D 为不同抗体与表达 CD3 的 Jurkat 重组细胞结合活性检测。图 2A 至图 2D 中纵坐标表示荧光信号的几何平均值。

图 3A 至图 3B：含有不同 CD3 scFv 的双特异性抗体对 A498 的杀伤活性检测。图 3A 为 B7H3 单价双特异性抗体的杀伤活性。图 3B 为 B7H3 双价双特异抗体的杀伤活性。除了 155、156、185 和 186 对 A498 的杀伤活性较弱之外，其余双特异抗体，无论 B7H3 单价还是双价，均显示出较明显的杀伤活性。

图 4A 至图 4B：含有相同 CD3 scFv 的 B7H3 单双价双特异性抗体对 A498 杀伤活性比较。图 4A 为含 HRH1 的 B7H3 单价（181）和双价（131）双特异抗体的杀伤活性比较。图 4B 为含 HRH7 的 B7H3 单价（187）和双价（177）的杀伤活性比较。实验结果均显示 B7H3 双价双特异性抗体较 B7H3 单价双特异性抗体都具有明显的 A498 杀伤活性，同时，B7H3 双价双特异性抗体较 B7H3 单价双特异性抗体的杀伤活性显著增强。

图 5A 至图 5C：含有相同 CD3 重链可变区，不同结构顺序的 B7H3 双价双特异性抗体对 A498 的杀伤活性检测。图 5A 为含 HRH2 的第一多肽链排列顺序不同的（AFF1、AFF2、AFF3、AFF4）B7H3 双价双特异性抗体间的杀伤活性比较。图 5B 为含 HRH2 的第二多肽链排列顺序不同的（AFF3、AFF3-B）B7H3 双价双特异性抗体间的杀伤活性比较。结果显示序列相同，VH 和 VL 排列顺序不同的 B7H3 双价双特异性抗体均具有显著的 A498 细胞杀伤活性，并且不同结构顺序的

分子间杀伤活性相近。图 5C 为包含相同 B7H3 scFv 和 CD3 scFv 的不同结构的双特异性抗体的杀伤活性比较，三个待测双特异抗体 127 与 201、202 均可在体外杀伤 A498 肿瘤细胞活性，其中双特异性抗体 127 的杀伤活性优于 201 和 202。

图 6A 至图 6B：不同抗体对 Jurkat 重组细胞的激活检测。图 6A 是抗体在含 A498 细胞的情况下，抗体介导的 B7H3 靶点特异的 Jurkat 重组细胞激活；图 6B 是抗体在不含 A498 细胞的情况下，介导的非 B7H3 靶点特异的 Jurkat 重组细胞激活。图 6A 和图 6B 中的图例所指示的抗体一致。

图 7A 至图 7B：含有相同 CD3scFv 不同价双特异性抗体对 Jurkat 重组细胞的激活检测。图 7A 是 B7H3 单/双价双特异性抗体在含 A498 细胞的情况下，抗体介导的 B7H3 靶点特异的 Jurkat 重组细胞激活；图 7B 是 B7H3 单/双价双特异性抗体在不含 A498 细胞的情况下，介导的非 B7H3 靶点特异的 Jurkat 重组细胞激活。

图 8A 至图 8C：不同抗体在有 A498 细胞存在时，刺激 PBMC 产生 B7H3 靶点特异的细胞因子分泌测试。图 8A 为不同抗体刺激 PBMC 的 IFNγ 分泌水平比较，图 8B 为不同抗体刺激 PBMC 的 TNFα 分泌水平比较，图 8C 为不同抗体刺激 PBMC 的 IL-2 分泌水平比较。图 8A-图 8C 显示 118、127 和 132 抗体能显著刺激 PBMC 产生 B7H3 靶点特异的细胞因子分泌。图 8A 至图 8C 中的图例所指示的抗体一致。

图 9A 至图 9C：不同抗体在 CHOK1 细胞（不表达 B7H3）存在时，刺激 PBMC 产生非 B7H3 靶点特异的细胞因子分泌测试。图 9A 为不同抗体刺激 PBMC 分泌的 IFNγ 水平比较，图 9B 为不同抗体刺激 PBMC 分泌的 TNFα 水平比较，图 9C 为不同抗体刺激 PBMC 分泌细胞的 IL-2 水平比较。图 9A-图 9C 显示 118、127 和 132 抗体不能刺激 PBMC 进行非 B7H3 靶点特异的细胞因子分泌，具有很强的安全性。图 9A 至图 9C 中的图例所指示的抗体一致。

图 10A 至图 10E：双特异抗体在人 PBMC 重建的小鼠 A498 模型中的抗肿瘤疗效检测。图 10A 为低剂量 B7H3 双价双特异性抗体的抑瘤活性检测，低剂量的 118 和 119 抗体仍显示出一定的抑瘤活性，并且显示出一定的剂量依赖性。图 10B 为 0.3mpk 和 0.6mpk 剂量 B7H3 双价双特异性抗体的抑瘤活性检测，113 抗体显示出剂量依赖的肿瘤体内抑制活性。图 10C 为 0.12mpk 和 0.36mpk 剂量 B7H3 双价双特异性抗体的抑瘤活性检测，两剂量下 118 抗体显示出显著的抑瘤活性。图 10D 为 0.36mpk 剂量下 B7H3 双价双特异性抗体的抑瘤活性检测，126、127 和 128 抗体均显示出显著的抑瘤活性。图 10E 为 127 抗体在不同剂量和不同给药频次下的抑瘤活性。图 10A 至图 10E 中，Vehicle 表示 PBS 给药的阴性对照组。

图 11A 至图 11B：双特异抗体在 hCD3 KI 小鼠模型中的抗肿瘤疗效。图 11A 和图 11B 分别为 118 和 132 在 hCD3 KI 小鼠模型中的抑瘤效果。

发明详述

术语

本公开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。

术语“多特异性蛋白分子”指能够与两个或两个以上的目标抗原或目标抗原表位特异性结合的蛋白分子。能够对两个目标抗原或目标抗原表位特异性结合的蛋白分子称为双特异性蛋白分子，包含抗体或抗体的抗原结合片段（如单链抗体）的“双特异性蛋白分子”在本文中可以与“双特异性抗体”互换。

术语针对抗原的“结合区”或“结合区域”是指在多特异性蛋白分子或在抗体分子中，能够与抗原特异性结合的区域或部分（part），抗原结合区可以是能直接与抗原结合的配体结合结构域部分、也可以是能直接与抗原结合的包含抗体可变区的结构域。

术语“抗体（antibody，Ab）”包含任何包括至少一个与具体抗原（例如 CD3）特异性结合或相互作用的互补决定区（CDR）的抗原结合分子或分子复合物。术语“抗体”包含：包括通过双硫键相互连接的四条多肽链，二条重（H）链和二条轻（L）链的免疫球蛋白分子以及其多聚体（例如 IgM）。各重链包含重链可变区（文中缩写为 HCVR 或 VH）和重链恒定区。这一重链恒定区包含三个区（结构域），CH1、CH2 和 CH3。各轻链包含轻链可变区（文中缩写为 LCVR 或 VL）和轻链恒定区。轻链恒定区包含一个区（结构域，CL1）。VH 和 VL 区可进一步细分为高变区，称为互补决定区（CDR），其间散布着较保守性区域，称为框架区（framework region, FR，也称骨架区、构架区）。各 VH 和 VL 是由三个 CDR 和四个 FR 所组成，以下列顺序由氨基端排列到羧基端：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。在本公开的不同实施例中，抗 CD3 抗体（或其抗原结合部分）、抗 B7H3 抗体（或其抗原结合部分）或抗其他目标抗原的 FR 可与人类生殖系序列相同，或可经自然或人工修饰。抗体可以是不同亚类（subclass）的抗体，例如，IgG（例如，IgG1、IgG2、IgG3、或 IgG4 亚类）、IgA1、IgA2、IgD、IgE 或 IgM 抗体。

术语“抗体”还包含完全抗体分子的抗原结合片段。术语抗体的“抗原结合部分”、“抗原结合结构域”、“抗原结合片段”等，如文中所用，包含任何与抗原特异性结合形成复合物的天然生成、酶制得、合成或基因工程改造的多肽或糖蛋白。抗体的抗原结合片段可使用任何适合的标准技术，例如蛋白质水解消化作用或涉及编码抗体可变区和（视需要）恒定区的 DNA 操作和表达的重组基因工程技术，来源于例如全抗体分子。这一 DNA 是已知的和/或可容易地从例如市售来源、DNA 资料库（包含，例如噬菌体-抗体资料库）取得或可经合成。这一 DNA 可用化学或通过使用分子生物技术来定序和操作，例如将一个或多个可变和/或恒定区排列成适合的配置，或导入密码子，产生半胱氨酸残基、修饰、增添或删除氨基酸等。

抗原结合片段的非限定示例包含：（i）Fab 片段；（ii）F（ab′）2 片段；（iii）Fd 片段；（iv）Fv 片段；（v）单链 Fv（scFv）分子；（vi）dAb 片段。其它工程改造分子，例如区域特异性抗体、单域抗体、区域删除抗体、嵌合抗体、CDR-植入

抗体、双抗体、三抗体、四抗体、微抗体、纳米抗体（例如单价纳米抗体、双价纳米抗体等）、小模块免疫医药（SMIP）和鲨可变 IgNAR 区，也涵盖在文中所用的“抗原结合片段”的词语内。

抗体的抗原结合片段典型地将包含至少一个可变区。可变区可以是任何大小或氨基酸组成的区域且一般将包含与一个或多个框架序列相邻或在其框架内的 CDR。在具有 VH 区与 VL 区结合的抗原结合片段中，VH 和 VL 区可以任何适合的排列位于彼此相对处。例如可变区可为二聚化并含有 VH-VL 或 VL-VH 二聚体。

在某些实施例中，抗体的抗原结合片段在任何可变区和恒定区的配置中，可变区和恒定区可直接彼此相连接或可通过完整或部分的绞链或连接子区相连接。绞链区可由至少 2 个（例如 5、10、15、20、40、60 或更多个）氨基酸所组成，使其在单一多肽分子中于相邻的可变和/或恒定区之间产生柔性和半柔性连结。再者，在本发明的抗体的抗原结合片段可包含以非共价彼此相互连结和/或与一个或多个单体 VH 或 VL 区相连结（例如以双硫键）的任何上列的可变区和恒定区配置的同源二聚体或异源二聚体（或其它多聚体）。

“鼠源抗体”在本公开中为根据本领域知识和技能制备的来源于小鼠的单克隆抗体。制备时用抗原注射试验对象，然后分离表达具有所需序列或功能特性的抗体的杂交瘤，当所注射的试验对象为小鼠时，所产生的抗体为鼠源抗体。

“嵌合抗体（chimeric antibody）”，是将鼠源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。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。在本公开一个优选的实施方案中，所述的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（如 YTE 突变或回复突变，L234A 和/或 L235A 突变，或 S228P 突变）的 IgG1、IgG2 或 IgG4 重链恒定区变体。

术语“人源化抗体（humanized antibody）”，包括 CDR 移植抗体（CDR-grafted antibody），是指将动物来源抗体，例如鼠源抗体的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架区（或构架区，framework region）中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量异源蛋白成分，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（在因特网 http://www.vbase2.org/获得），以及在 Kabat，E.A.等人，1991 Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版中找到。为避免免疫原性下降的同时，引起的活性下降，可对所述的人抗体可变区框架序列进行最少的反向突变或回复突变，以保

持活性。本公开的人源化抗体也包括进一步由噬菌体展示对 CDR 进行亲和力成熟后的人源化抗体。

由于抗原的接触残基，CDR 的移植可由于与抗原接触的构架残基而导致产生的抗体或其抗原结合片段对抗原的亲和力减弱。此类相互作用可以可能是体细胞高度突变的结果。因此，可能仍然需要将此类供体构架氨基酸移植至人源化抗体的构架。来自非人抗体或其抗原结合片段的参与抗原结合的氨基酸残基可通过检查动物单克隆抗体可变区序列和结构来鉴定。CDR 供体构架中与种系不同的各残基可被认为是相关的。如果不能确定最接近的种系，那么可将序列与亚类共有序列或具有高相似性百分数的动物抗体序列的共有序列相比较。稀有构架残基被认为可能是体细胞高度突变的结果，从而在结合中起着重要作用。

在本公开一个的实施方案中，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。

“人抗体”与“人源抗体”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这些细胞系中包含靶向的内源性重链和轻链基因座破坏。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。

“单克隆抗体”是指从基本上均质抗体的群体获得的抗体，即除可能的变体抗体（例如含有天然存在的突变或在制造单克隆抗体制剂的期间产生的突变，这些变体通常以少量存在）之外，构成所述群体的个别抗体相同和/或结合相同表位。与通常包含针对不同决定簇（表位）的不同抗体的多克隆抗体制备物不同，单克隆抗体制备物（制剂）的每个单克隆抗体是针对抗原上的单一决定簇的。因此，修饰语“单克隆”指示如从基本上均质抗体群体获得的抗体的特性，且不应解释为需要通过任何特定方法来制造抗体。例如，根据本公开使用的单克隆抗体可通过各种技术制备，所述技术包括但不限于杂交瘤方法、重组 DNA 方法、噬菌体展示方法以及利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转基因动物的方法，此类方法以及用于制备单克隆抗体的其他示例性方法在本文中进行描述。

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。该术语特别指重链包含 Fc 区的抗体。

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，通过合成的接头连接它们，从而使得其能够产生为其中 VL 和 VH 区配对形成单价分子的单个蛋白质链（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）。此类单链抗体也意欲包括在术语抗体的“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的片段。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。

抗原结合片段还可并入至包含一对串联 Fv 片段（VH-CH1-VH-CH1）的单链分子中，该对串联 Fv 片段连同互补轻链多肽一起形成一对抗原结合区（Zapata 等人,1995 Protein Eng.8（10）:1057-1062；及美国专利 US5641870）。

Fab 是通过用蛋白酶木瓜蛋白酶（切割 H 链的 224 位的氨基酸残基）处理 IgG 抗体分子所获得的片段中的具有约 50,000Da 的分子量并具有抗原结合活性的抗体片段，其中 H 链 N 端侧的约一半和整个 L 链通过二硫键结合在一起。

F（ab'）2是通过用胃蛋白酶消化IgG铰链区中两个二硫键的下方部分而获得的分子量为约100,000Da并具有抗原结合活性并包含在铰链位置相连的两个Fab区的抗体片段。

Fab'是通过切割上述F（ab'）2的铰链区的二硫键而获得的分子量为约50,000Da并具有抗原结合活性的抗体片段。Fab'可以通过用还原剂例如二硫苏糖醇处理特异性识别并结合抗原的F（ab'）2来生产。

此外，可以通过将编码抗体的 Fab'片段的 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中并将载体导入到原核生物或真核生物中以表达 Fab'来生产所述 Fab'。

术语“单链抗体”、“单链 Fv”或“scFv”意指包含通过接头连接的抗体重链可变结构域（或区域；VH）和抗体轻链可变结构域（或区域；VL）的分子。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH_2-VL-接头-VH-COOH 或 NH_2-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成，例如使用 1-4 个（包括 1 个、2 个、3 个或 4 个）重复的变体（Holliger 等人（1993），Proc Natl Acad Sci USA. 90: 6444-6448）。可用于本公开的其他接头由 Alfthan 等人（1995），Protein Eng. 8:725-731，Choi 等人（2001），Eur J Immuno.31:94-106，Hu 等人（1996），Cancer Res.56:3055-3061，Kipriyanov 等人（1999），J Mol Biol. 293:41-56 和 Roovers 等人（2001），Cancer Immunol Immunother. 50:51-59.描述。

“多特异性抗体”是指包含两个或更多个抗原结合结构域，能够结合两个或更多个不同的表位（例如，两个、三个、四个或更多个不同的表位），表位可以在相同或不同的抗原上的抗体。多特异性抗体的示例包括结合两个不同表位的“双特异性抗体”。

术语肿瘤相关抗原的“双价双特异性抗体”是指双特异性抗体中针对某个肿瘤相关抗原靶点具有两个抗原结合区，例如B7H3双价双特异性抗体指在该双特异性抗体中包含两个针对B7H3的抗原结合区。术语“单价双特异性抗体”是指双特异性抗体中针对某个靶点只有一个抗原结合区，例如B7H3单价双特异性抗体指在该双特异性抗体中包含一个针对B7H3的抗原结合区。

“Linker”或“接头”或“连接子”或用于连接两个蛋白质结构域中间的“L1”指用于连接蛋白质结构域的连接性多肽序列，通常具有一定的柔性，linker的使用不会使蛋白质结构域原有的功能丧失。

双抗体（diabody）是指scFv被二聚体化的抗体片段，是具有二价抗原结合活性的抗体片段。在二价抗原结合活性中，两个抗原可以是相同或不同的。

dsFv是通过将其中每个VH和VL中的一个氨基酸残基被半胱氨酸残基取代的多肽经由半胱氨酸残基之间的二硫键相连而获得的。可以按照已知方法（Protein Engineering.7:697（1994））基于抗体的三维结构预测来选择被半胱氨酸残基取代的氨基酸残基。

本公开一些实施例中抗原结合片段可以通过以下步骤来生产：获得本公开的特异性识别并结合抗原的单克隆抗体的 VH 和/或 VL 及所需的其他结构域的编码 cDNA，构建编码抗原结合片段的 DNA，将所述 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中，然后将所述表达载体导入到原核生物或真核生物中以表达抗原结合片段。

"Fc 区"可以是天然序列 Fc 区或变体 Fc 区。虽然免疫球蛋白重链的 Fc 区的边界可能变化，但人 IgG 重链 Fc 区通常被定义成从位置 Cys226 上的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基端。Fc 区中的残基的编号为如 Kabat 中的 EU 索引的编号。Kabat 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md.,1991。免疫球蛋白的 Fc 区通常具有两个恒定区结构域 CH2 和 CH3。文中“第一 Fc”也称作“Fc1”，第二 Fc 也称作“Fc2”。

“V_a1-L1-V_b1-L2-V_c2-L2-V_d2-L4-Fc1”与“V_e3-L5-V_f3-L6-Fc2”中 V_a1、V_b1、V_c2、V_d2、V_e3 和 V_f3 为抗体的轻链可变区或重链可变区，V_a1 和 V_b1 结合第一抗原（第一靶抗原）表位，V_c2 和 V_d2 结合第二抗原（第二靶抗原）表位，V_e3 和 V_f3 结合第三抗原（第三靶抗原）表位，第一抗原表位、第二抗原表位和第三抗原表位可以相同或不同。

类似“VH_{TAA}-L1-VL_{TAA}-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-Fc1”中，VH_{TAA} 和 VL_{TAA} 表示抗体可变区结合肿瘤相关抗原的表位，VH_{CD3} 和 VL_{CD3} 表示抗体可变区结合 CD3 的表位。

本公开“knob-Fc”指在抗体 Fc 区包含 T366W 的点突变，以形成类似 knob 的空间结构。相对应地，“hole-Fc”指在抗体 Fc 区包含 T366S，L368A，Y407V 的点突

变，以形成类似 hole 的空间结构。Knob-Fc 和 hole-Fc 由于空间位阻的原因，更易形成异二聚体。为进一步地促进异二聚体的形成，还可在 knob-Fc 和 hole-Fc 分别引入 S354C 和 Y349C 的点突变，通过二硫键进一步促进异二聚体的形成。同时，为消除或减弱抗体 Fc 引起的 ADCC 效应，还可向 Fc 引入的 234A 和 235A 的取代突变。例如，本公开优选的 knob-Fc 和 hole-Fc 分别如 SEQ ID NO：69 和 70 所示。在双特异性抗体中，knob-Fc 或 hole-Fc 既可以作为第一多肽链的 Fc 区域，也可以作为第二多肽链的 Fc 区域，在同一双特异性抗体中，第一多肽链和第二多肽链的 Fc 区不同时为 knob-Fc 或 hole-Fc。

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基础上发生 1 个或数个氨基酸的插入、缺失或替换。

抗体的“可变区”是指单独的或组合的抗体轻链的可变区（VL）或抗体重链的可变区（VH）。如在本领域中已知的，重链和轻链的可变区各自由通过 3 个互补决定区（CDR）（也称为高变区）连接的 4 个框架区（FR）组成。每一条链中的 CDR 通过 FR 紧密地保持在一起并且与来自另一条链的 CDR 一起促成抗体的抗原结合部位的形成。存在至少 2 个用于确定 CDR 的技术：（1）基于跨种序列变异性的方法（即，Kabat 等 Sequences of Proteins of Immunological Interest, （第 5 版，1991, National Institutes of Health, Bethesda MD））；和（2）基于抗原-抗体复合物的晶体学研究的方法（Al-Lazikani 等，J. Molec. Biol. 273:927-948 （1997））。如本文中所用，CDR 可指由任一方法或由两种方法的组合确定的 CDR。

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“CDR”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。所述 6 个 CDR 的最常用的定义之一由 Kabat E.A.等人，(1991)Sequences of proteins of immunological interest.NIH Publication91-3242）提供。如本文中一些实施方式中使用的，CDR 可以以 Kabat 规则（Kabat 等 Sequences of Proteins of Immunological Interest, （第 5 版，1991, National Institutes of Health, Bethesda MD））定义轻链可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3（LCDR1、LCDR2、LCDR3），以及重链可变结构域的 CDR1、CDR2 和 CDR3（HCDR1、HCDR2、HCDR3），例如在对本公开中 CD3 抗体 CDR 的定义。在另一些实施方式中，还可以采用 IMGT 等规则进行抗体的 CDR 的定义，例如在对 B7H3 抗体 CDR 即采用的是 IMGT 规则进行定义。

“抗体恒定区结构域”指来源于抗体的轻链和重链的恒定区的结构域，包括 CL 和来源于不同类抗体的 CH1、CH2、CH3 和 CH4 结构域。抗体中用于连接重链 CH1 和 CH2 结构域的铰链区（hinge region）不属于本公开所定义的“抗体恒定

区结构域”的范畴。

术语“肿瘤抗原”是指由肿瘤细胞产生的物质，任选是蛋白质，包括“肿瘤相关抗原”或“TAA”（其是指在肿瘤细胞中产生的且与相应的正常组织相比在癌症中差异表达的蛋白质）以及“肿瘤特异性抗原”或“TSA”（其是指在肿瘤细胞中产生的且与相应的正常组织相比在癌症中特异性表达或异常表达的肿瘤抗原）。

“肿瘤相关抗原”的非限定示例包含，例如 AFP、ALK、B7H3、BAGE 蛋白质、BCMA、BIRC5（存活素）、BIRC7、β-连环蛋白（β-catenin）、brc-ab1、BRCA1、BORIS、CA9、CA125、碳酸酐酶 IX、半胱天冬酶-8（caspase-8）、CALR、CCR5、CD19、CD20（MS4A1）、CD22、CD30、CD33、CD38、CD40、CD123、CD133、CD138、CDK4、CEA、Claudin 18.2、周期素-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EpCAM、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGE 蛋白（例如 GAGE-1、-2）、GD2、GD3、GloboH、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3（glypican-3）、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、IL13Rα2、LMP2、κ-Light、LeY、MAGE 蛋白（例如 MAGE-1、-2、-3、-4、-6 和-12）、MART-1、间皮素（mesothelin）、ML-IAP、MOv-γ、Muc1、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、Muc16（CA-125）、MUM1、NA17、NKG2D、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ESO1、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA（FOLH1）、RAGE 蛋白质、Ras、RGS5、Rho、ROR1、SART-1、SART-3、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TGF-β、TMPRSS2、汤-诺氏抗原（Thompson-nouvelle antigen；Tn）、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶和尿溶蛋白-3、5T4（Trophoblast glycoprotein）。

“CD3”，指表达在 T 细胞上作为多分子 T 细胞受体（TCR）的部分的抗原，且其是由下列四条受体链中的二条链所形成的同源二聚体或异源二聚体所组成：CD3-ε、CD3-δ、CD3-ζ 和 CD3-γ。人类 CD3-ε（hCD3ε）包含 UniProtKB/Swiss-Prot：P07766.2 中所述的氨基酸序列。人类 CD3-δ（hCD3δ 包含 UniProtKB/Swiss-Prot：P04234.1 中所述的氨基酸序列。因此，除非明确地指出是来自非人类物种，例如“小鼠 CD3”、“猴 CD3”等，否则“CD3”一词指人类 CD3。

“表位”或“抗原决定簇”是指抗原上免疫球蛋白或抗体特异性结合的部位。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 或更小的亲和力（KD）结合。

术语“亲和力”是指在单一表位处，抗体与抗原之间相互作用的强度。在各抗原位点内，抗体“臂”的可变区通过弱非共价力与抗原在多个氨基酸位点处相互作用；

相互作用愈大，亲和力愈强。如本文所用，抗体或其抗原结合片段（例如 Fab 片段）的术语“高亲和力”通常是指具有 $1E^{-9}M$ 或更小的 K_D（例如 $1E^{-10}M$ 或更小的 K_D、$1E^{-11}M$ 或更小的 K_D、$1E^{-12}M$ 或更小的 K_D、$1E^{-13}M$ 或更小的 K_D、$1E^{-14}M$ 或更小的 K_D 等）的抗体或抗原结合片段。

术语"KD"或“K_D”是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。通常，抗体以小于大约 $1E^{-8}M$，例如小于大约 $1E^{-9}M$、$1E^{-10}M$ 或 $1E^{-11}M$ 或更小的解离平衡常数（KD）结合抗原，例如，如使用表面等离子体共振（SPR）技术在 BIACORE 仪中测定的。KD 值越小，亲和力越大。

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，但优选是双链 DNA。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。

术语"载体"意指能够递送一个或多个目标基因或序列并且优选地在宿主细胞中表达其的构建体。载体的示例包括，但不限于，病毒载体、裸露 DNA 或 RNA 表达载体、质粒、粘粒或噬菌体载体、与阳离子凝聚剂缔合的 DNA 或 RNA 表达载体、包封在脂质体中的 DNA 或 RNA 表达载体和某些真核生物细胞诸如生产细胞。

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，鼠可以用抗原或其片段免疫，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。本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，从网站 http://www.imgt.org/得到，或者从免疫球蛋白杂志，2001ISBN012441351 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）、HEK293 细胞（非限制性实施例如 HEK293E 细胞）和 NS0 细胞。

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。作为一种可选的现有技术，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。通过表达与抗原特异性结

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蛋白 A 或蛋白 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。

“给予”和“处理”当应用于动物、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。“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。“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，例如包含本公开实施例的任一种化合物的组合物，所述患者具有一种或多种疾病症状，而已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有测量的程度。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。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。尽管本公开的实施方案（例如治疗方法或制品）可能无法在缓解每个目标疾病症状方面都有效，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。

“氨基酸保守修饰”或“氨基酸保守取代”指蛋白质或多肽中的氨基酸被具有相似特征（例如电荷、侧链大小、疏水性/亲水性、主链构象和刚性等）的其他氨基酸取代，从而使得在不改变蛋白质或多肽的生物活性或其他所需特性（例如抗原亲和力和/或特异性）的情况下，可以经常进行改变。本领域技术人员认识到，通常，多肽的非必需区域中的单个氨基酸取代基本上不改变生物活性（参见，例如，Watson 等人，（1987）Molecular Biology of the Gene, The Benjamin/Cummings Pub. Co., 第 224 页（第 4 版））。此外，结构上或功能上相似的氨基酸的取代不太可能破坏生物活性。示例性保守取代于下表“示例性氨基酸保守取代”中陈述。

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”、“有效剂量”是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，诸如减少各种本公开靶抗原相关病症的发病率或改善所述病症的一个或多个症状，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/或延缓患者的本公开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”、“同一性”在本文中可以互换，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。

“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发生，该说明包括该事件或环境发生或不发生的场合。例如，“任选包含 1-3 个抗体重链可变区”意味着特定序列的抗体重链可变区可以但不必须存在。

“药物组合物”表示含有一种或多种本公开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。

术语“癌症”、“癌的”或“恶性的”指或描述哺乳动物中一般以不受调节的细胞生长为特征的生理状况。癌症的例子包括但不限于癌瘤，淋巴瘤，胚细胞瘤（blastoma），肉瘤，和白血病或淋巴样恶性。这种癌症的更具体的例子包括鳞状细胞癌、骨髓瘤、小细胞肺癌、非小细胞肺癌（NSCLC）、头和颈鳞状细胞癌（HNSCC）、神经胶质瘤、何杰金淋巴瘤、非何杰金淋巴瘤、弥漫性大 B-细胞淋巴瘤（DLBCL）、滤泡性淋巴瘤、急性成淋巴细胞性白血病（ALL）、急性髓细胞样白血病（AML）、慢性淋巴细胞性白血病（CLL）、慢性髓细胞样白血病（CML）、原发性纵隔大 B-细胞淋巴瘤、套细胞淋巴瘤（MCL）、小淋巴细胞性淋巴瘤（SLL）、富含 T-细胞/组织细胞的大 B-细胞淋巴瘤、多发性骨髓瘤、髓样细胞白血病-1 蛋白（Mcl-1）、骨髓异常增生综合征（MDS）、胃肠（道）癌、肾癌、卵巢癌、肝癌、成淋巴细胞性白血病、淋巴细胞白血病、结肠直肠癌、子宫内膜癌、肾癌、前列腺癌、甲状腺癌、黑素瘤、软骨肉瘤、神经母细胞瘤、胰腺癌、多形性成胶质细胞瘤、胃癌、骨癌、尤因氏肉瘤、子宫颈癌、脑癌、胃癌、膀胱癌、肝细胞瘤、乳腺癌、

结肠癌、肝细胞癌（HCC）、透明细胞肾细胞癌（RCC）、头和颈癌、咽喉癌、肝胆癌（hepatobiliary cancer）、中枢神经系统癌、食管癌、恶性胸膜间皮瘤、全身性轻链淀粉样变性、淋巴浆细胞性淋巴瘤（lymphoplasmacytic lymphoma）、骨髓异常增生综合征、骨髓增生性肿瘤、神经内分泌肿瘤、梅克尔细胞癌、睾丸癌和皮肤癌。

“炎性病症”是指其中过度或不受调节的炎症反应导致过度炎性症状、宿主组织损伤或组织功能丧失的任何疾病、病症或综合征。“炎性疾病”也是指由白细胞或嗜中性粒细胞趋化性的汇集而介导的病理状态。

“炎症”是指由于组织损伤或破坏而引起的局部保护性反应，其用来破坏、削弱或杜绝（隔离）有害物质和受伤组织。炎症与白细胞或中性粒细胞趋化性的汇集显著相关。炎症可以由病原生物体和病毒以及非感染性原因引起，所述非感染性原因如创伤或心肌梗塞后的再灌注或中风、对外源性抗原的免疫应答和自身免疫应答。

“自身免疫性疾病”是指其中组织损伤与体液或细胞介导的对身体自身成分的反应相关的任何一组疾病。自身免疫疾病的非限制性示例包括类风湿关节炎、牛皮癣、克罗恩病、强硬性脊柱炎、多发性硬化症、I 型糖尿病、肝炎、心肌炎、Sjogren 综合征、移植排斥后的自体免疫性溶血性贫血、水疱性类天疱疮、格雷夫氏病、桥本甲状腺炎、系统性红斑狼疮（SLE）、重症肌无力、天疱疮、恶性贫血等。

此外，本公开另一方面涉及用于免疫检测或测定目标抗原的方法、用于免疫检测或测定目标抗原的试剂、用于免疫检测或测定表达目标抗原的细胞的方法和用于诊断与目标抗原阳性细胞相关的疾病的诊断剂，其包含本公开的特异性识别并结合目标抗原的单克隆抗体或抗体片段作为活性成分。

在本公开中，用于检测或测定目标抗原的量的方法可以是任何已知方法。例如，它包括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示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。

上述与目标抗原阳性细胞相关的疾病可以通过用本公开的单克隆抗体或抗体片段检测或测定表达目标抗原的细胞来诊断。

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。

在本公开中，对用于检测或测定目标抗原的活体样品没有特别限制，只要它具有包含表达目标抗原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，含有本公开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发明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发明，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，本发明的其他特点、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发明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发明的优选实施方式。这些实施例不应以任何方式理解为限制本发明的范围，本发明的范围由权利要求书限定。

具体实施方式

抗体的制备和筛选

制备单克隆抗体的方法是本领域已知的。可采用的一种方法是 Kohler,G.等人，（1975）“Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of PredefinedSpecificity,”Nature256:495-497 的方法或其修改形式。典型地，单克隆抗体在非人物种，诸如小鼠中形成。通常，小鼠或大鼠被用于免疫，但其他动物，如兔、羊驼也可被使用。通过用免疫原性量的包含人 CD3 或其他目标抗原（如人 B7H3）的细胞、细胞提取物或蛋白制剂免疫小鼠来制备抗体。免疫原可以是但不限于，原代细胞、培养的细胞系、癌性细胞、核酸或组织。

在一个实施方案中，通过使用过量表达目标抗原作为免疫原的宿主细胞获得与目标抗原结合的单克隆抗体。此类细胞包括，例如且不限于，人 T 细胞、过表达人 B7H3 的细胞。

为了监测抗体应答，可从动物获得小的生物样品（例如，血液）并测试针对免疫原的抗体滴度。可移除脾和/或一些大的淋巴结并离解为单细胞。如需要，可通过（在非特异性粘附细胞去除之后）将细胞悬液施加至抗原涂覆的平板或孔筛选脾细胞。表达膜结合的抗原特异性的免疫球蛋白的 B 细胞，将与平板结合，并不会被剩余的悬液冲洗掉。随后，可将所得 B 细胞或所有离解的脾细胞与骨髓瘤细胞（例如，X63-Ag8.653 和来自 SaIk Institute,Cell Distribution Center,San Diego,CA 的细胞）融合。聚乙二醇（PEG）可被用于融合脾或淋巴细胞与骨髓瘤细胞以形成杂交瘤。随后在选择性培养基（例如，次黄嘌呤、氨喋呤、胸苷培养基，另外称为“HAT 培养基”）中培养杂交瘤。随后，通过有限稀释将所得杂交瘤铺板，并使

用例如FACS（荧光激活细胞分选术）或免疫组织化学（IHC）筛选分析与免疫原特异性结合的抗体的产生。随后，体外（例如，在组织培养瓶或中空纤维反应器）或体内（例如，在小鼠中作为腹水）培养选择分泌单克隆抗体-的杂交瘤。

作为细胞融合技术的另一个替代方式，可使用Epstein-Barr病毒（EBV）永生化的B细胞以制备本发明的单克隆抗体。如需要，增殖并亚克隆杂交瘤，并通过传统的分析方法（例如，FACS、IHC、放射免疫分析、酶免疫分析、荧光免疫分析，等）分析上清液的抗免疫原活性。

在另一个替代方式中，可通过本领域已知的任何方法（例如，人源化、使用转基因小鼠制备全人抗体、噬菌体展示技术，等）测序和重组制备抗目标抗原（如CD3、B7H3）单克隆抗体和任何其他等同抗体。在一个实施方案中，抗目标抗原（如CD3、B7H3）单克隆抗体被测序且随后多核苷酸序列被克隆进入载体用于表达或增殖。编码目的抗体的序列可被保持在宿主细胞中的载体中且随后该宿主细胞可被增殖并冷冻用于以后使用。

抗CD3单克隆抗体和任何其他等同抗体的多核苷酸序列可被用于遗传操作以产生“人源化”抗体，以改进抗体的亲和力或其他特征。人源化抗体的一般原理包括保留抗体的抗原结合部分的基本序列，同时将该抗体的非人剩余部分置换为人抗体序列。存在人源化单克隆抗体的四个一般步骤。这些步骤为：（1）确定起始抗体轻链和重链可变结构域的核苷酸和预测的氨基酸序列，（2）设计人源化抗体，即，决定在人源化过程中使用哪一个抗体构架区，（3）实际的人源化方法/技术和，（4）人源化抗体的转染和表达。参见，例如，美国专利号US4816567、US5807715、US5866692和US6331415。

1. B7H3抗体的制备和筛选

利用人PBMC、脾脏、淋巴结组织分离B细胞，并提取RNA，构建天然单链噬菌体抗体库。将构建的天然单链噬菌体抗体文库经过包装形成噬菌体颗粒后，采用液相法进行淘筛，噬菌体与生物素化的B7H3液相结合，再采用链霉亲和素磁珠分离。为了获得与人B7H3结合的阳性序列，采用生物素化的人B7H3进行淘筛，挑取若干个单克隆菌落包装成噬菌体单链抗体，用于噬菌体ELISA测试。分别测试单克隆噬菌体与人B7H3和鼠B7H3的结合活性，经筛选获得B7H3抗体。

检测用B7H3相关抗原如下所示：

检测用人B7H3抗原

商业化产品（SinoBiological cat# 11188-H08H）

序列如下：

LEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEG
QDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVS
LQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTG
NVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQR
SPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVH

SFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGS
AAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGV
PLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTI
TGQPMT-*HHHHHH*

SEQ ID NO：1

注释：划横线部分为 B7H3 胞外区；斜体部分为 His 标签（His-tag）。

检测用猴B7H3抗原

商业化产品（SinoBiological cat#90806-C08H）

序列如下：

LEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGR
DQGSAYANRTALFLDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQV
AAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGAPLTGNVT
TSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSITITPQRSPTG
AVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEG
RDQGSAYANRTALFLDLLAQGNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQ
VAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGAPLTGNV
TTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMT
FPPE-*HHHHHH*

SEQ ID NO：2

注释：划横线部分为 B7H3 胞外区；斜体部分为 His 标签。

检测用鼠 B7H3 抗原

商业化产品（SinoBiological cat# 50973-M08H）

序列如下：

VEVQVSEDPVVALVDTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGR
DQGSAYSNRTALFPDLLVQGNASLRLQRVRVTDEGSYTCFVSIQDFDSAAVSLQV
AAPYSKPSMTLEPNKDLRPGNMVTITCSSYQGYPEAEVFWKDGQGVPLTGNVT
TSQMANERGLFDVHSVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPLTF-
HHHHHH

SEQ ID NO：3

注释：划横线部分为 B7H3 胞外区；斜体部分为 His 标签。

人B7H3全长氨基酸序列

MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCCSFS
PEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGQDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASL
RLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVT
ITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSILRVVLGAN
GTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSF
SPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFPDLLAQGNASL
RLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDTVT
ITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVLGAN

GTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFV
CWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHSDSKEDDGQEIA

SEQ ID NO：4

注释：

双横线部分为信号肽（Signal peptide: 1 – 28）；

划横线部分为 B7H3 胞外区（Extracellular domain：29-466），其中 29-139 为 Ig-like V-type 1 Domain，145 – 238 为 Ig-like C2-type 1 Domain；243-357 为 Ig-like V-type 2 Domain，363 – 456 为 Ig-like C2-type 2 Domain；

点划线部分为跨膜区部分（Transmembrane domain: 467-487）；

斜体部分为胞内区（Cytoplasmic domain: 488-534）。

猴B7H3全长氨基酸序列

MLHRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLRCSF
SPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFLDLLAQGNAS
LRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGDT
VTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGAPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLRVVL
GANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSITITPQRSPTGAVEVQVPEDPVVALVGTDATL
RCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYANRTALFLDLLAQ
GNASLRLQRVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLR
PGDTVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGAPLTGNVTTSQMANEQGLFDVHSVLR
VVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLSVCLVAL
LVALAFV*CWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHSDSKEDDG QELA*

SEQ ID NO：5

注释：

双横线部分为信号肽（Signal peptide: 1 – 28）；

划横线部分为 B7H3 胞外区（Extracellular domain：29-466），其中 29-139 为 Ig-like V-type 1 Domain，145 – 238 为 Ig-like C2-type 1 Domain；243-357 为 Ig-like V-type 2 Domain，363 – 456 为 Ig-like C2-type 2 Domain；

点划线部分为跨膜区部分（Transmembrane domain: 467-487）；

斜体部分为胞内区（Cytoplasmic domain: 488-534）。

>鼠B7H3全长氨基酸序列

MLRGWGGPSVGVCVRTALGVLCLCLTGAVEVQVSEDPVVALVDTDATLRCSFS
PEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYSNRTALFPDLLVQGNASLR
LQRVRVTDEGSYTCFVSIQDFDSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKDLRPGNMVT
ITCSSYQGYPEAEVFWKDGQGVPLTGNVTTSQMANERGLFDVHSVLRVVLGAN
GTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPLTFPPEALWVTVGLSVCLVVLLVALAFV
CWRKIKQSCEEENAGAEDQDGDGEGSKTALRPLKPSENKEDDGQEIA

SEQ ID NO：6

注释：

双横线部分为信号肽（Signal peptide: 1 – 28）；
划横线部分为 B7H3 胞外区（Extracellular domain：29-248）；
点划线部分为跨膜区部分（Transmembrane domain: 249-269）；
斜体部分为胞内区（Cytoplasmic domain: 270-316）。

筛选获得的 B7H3 抗体 h1702 序列及其经 IMGT 编号规则定义的 CDR 序列如下所示：

>h1702 VH
*QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAAS*GFIFSSSA*MHWVRQAPGKGLEWVAV*ISYDGSNK*YYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC*ARSARLYASFDY*WGQG ALVTVSS*

SEQ ID NO：7

>h1702 VL
*QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLS*SGSVSTSHY*PSWYQQTPGQAPRMLIY*NTN*TRS SGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYC*AIHVDRDIWV*FGGGTKLTVL*

SEQ ID NO：8

注：顺序为FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为FR序列，下划线为CDR序列。

表 1 B7H3 抗体 h1702 的轻链、重链 CDR 序列表

抗体	重链		轻链	
h1702	HCDR1	GFIFSSSA SEQ ID NO：9	LCDR1	SGSVSTSHY SEQ ID NO：12
	HCDR2	ISYDGSNK SEQ ID NO：10	LCDR2	NTN SEQ ID NO：13
	HCDR3	ARSARLYASFDY SEQ ID NO：11	LCDR3	AIHVDRDIWV SEQ ID NO：14

为了进一步提高双特异性抗体的性能，在B7H3抗体h1702的VH和VL中分别进行半胱氨酸取代突变，在轻链可变区中引入G103C（氨基酸自然顺序编号，在SEQ ID NO：16的第103位）突变，在重链可变区中引入G44C（氨基酸自然顺序编号，在SEQ ID NO：15的第44位）突变，以形成一对二硫键，突变后的抗B7H3单链抗体的重链和轻链可变区序列如下所示：

B7H3 VH44C:

QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKCLEWVAV ISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYA SFDYWGQGALVTVSS

SEQ ID NO：15

B7H3 VL103C:

QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIY

NTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGCGT KLTVL

SEQ ID NO：16

2. CD3 抗体的制备和筛选

在鼠源 CD3 抗体基础上，经突变、建库、人源化改造及筛选等手段可获得人源化的 CD3 抗体。

CD3 抗原相关序列信息如下

检测用人CD3抗原

商业化产品（SinoBiological cat#CT038-H2508H）

序列如下：

人CD3ε（Human CD3ε）

DGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGS DEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMD-*HHH HHH*

SEQ ID NO：17

注释：

划横线部分为 CD3ε 胞外区（Extracellular domain：23-126）；斜体部分为 His 标签

Human CD3δ

FKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDI YKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVA *DYKDDDDK*

SEQ ID NO：18

注释：

划横线部分为 CD3δ 胞外区（Extracellular domain：22-105）；斜体部分为 Flag 标签。

检测用猴 CD3 抗原

商业化产品（Acro biosystem cat# CDD-C52W4-100ug）

序列如下：

猴 CD3ε

QDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLGSEAQWQHNGKNKEDSGDRLFL PEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASHHLYLKARVCENCMEMD-*HHHHHH*

SEQ ID NO：19

注释：

划横线部分为 CD3ε 胞外区（Extracellular domain：22-117）；斜体部分为 His 标签

猴 CD3δ

FKIPVEELEDRVFVKCNTSVTWVEGTVGTLLTNNTRLDLGKRILDPRGIYRCNG TDIYKDKESAVQVHYRMCQNCVELDPATLA- *DYKDDDDK*

SEQ ID NO：20

注释：

划横线部分为 CD3δ 胞外区（Extracellular domain：22-105）；斜体部分为 Flag 标签

检测用鼠 CD3 抗原

商业化产品（SinoBiological cat# CT033-M2508H）序列如下：

鼠 CD3ε

DDAENIEYKVSISGTSVELTCPLDSDENLKWEKNGQELPQKHDKHLVLQDFSEV EDSGYYVCYTPASNKNTYLYLKARVCEYCVEVD-*HHHHHH*

SEQ ID NO：21

注释：

划横线部分为 CD3ε 胞外区（Extracellular domain：22-108）；斜体部分为 His 标签

鼠 CD3δ

FKIQVTEYEDKVFVTCNTSVMHLDGTVEGWFAKNKTLNLGKGVLDPRGIYLC NGTEQLAKVVSSVQVHYRMCQNCVELDSGTMA *DYKDDDDK*

SEQ ID NO：22

注释：

划横线部分为 CD3δ 胞外区（Extracellular domain：22-105）；斜体部分为 Flag 标签

人CD3ε全长氨基酸序列

MQSGTHWRVLGLCLLSVGVWGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYP GSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPED ANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVYYWS*KNRKAKAKP VTRGAGAGGRQRGQNKERP PPVPNPDYEP IRKGQRDLYSGLNQRRI*

SEQ ID NO：23

注释：

双横线部分为信号肽（Signal peptide: 1 – 22）；

划横线部分为 CD3ε 胞外区（Extracellular domain：23-126），其中 32-112 为 Ig-like Domain；

点划线部分为跨膜区部分（Transmembrane domain: 127-152）；

斜体部分为胞内区（Cytoplasmic domain: 153-207）。

人CD3δ全长氨基酸序列

MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELEDRVFVNCNTSITWVEGTVGTLLSDIT RLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTD VIATLLLALGVFCFA*GHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGN WARNK*

SEQ ID NO：24

注释：

双横线部分为信号肽（Signal peptide: 1 – 21）；

划横线部分为 CD3δ 胞外区（Extracellular domain：22-105）；
点划线部分为跨膜区部分（Transmembrane domain: 106-126）；
斜体部分为胞内区（Cytoplasmic domain: 127-171）。
猴CD3ε全长氨基酸序列
MQSGTRWRVLGLCLLSIGVWGQDGNEEMGSITQTPYQVSISGTTVILTCSQHLG
SEAQWQHNGKNKEDSGDRLFLPEFSEMEQSGYYVCYPRGSNPEDASHHLYLK
ARVCENCMEMDVMAVATIVIVDICITLGLLLL*VYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAG*
GRQRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQQDLYSGLNQRRI

SEQ ID NO：25

注释：
双横线部分为信号肽（Signal peptide: 1 – 21）；
划横线部分为 CD3ε 胞外区（Extracellular domain：22-117）；
点划线部分为跨膜区部分（Transmembrane domain: 118-138）；
斜体部分为胞内区（Cytoplasmic domain: 139-198）。
猴CD3δ全长氨基酸序列
MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPVEELEDRVFVKCNTSVTWVEGTVGTLLTN
NTRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESAVQVHYRMCQNCVELDPATLAGII
VTDVIATLLLALGVFCFA*GHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRDRDDAQYSRL*
GGNWARNK

SEQ ID NO：26

注释：
双横线部分为信号肽（Signal peptide: 1 – 21）；
划横线部分为 CD3δ 胞外区（Extracellular domain：22-105）；
点划线部分为跨膜区部分（Transmembrane domain: 106-126）；
斜体部分为胞内区（Cytoplasmic domain: 127-171）。
鼠CD3ε全长氨基酸序列
MRWNTFWGILCLSLLAVGTCQDDAENIEYKVSISGTSVELTCPLDSDENLKWE
KNGQELPQKHDKHLVLQDFSEVEDSGYYVCYTPASNKNTYLYLKARVCEYCV
EVDLTAVAIIIIVDICITLGLLMVIYYWS*KNRKAKAKPVTRGTGAGSRPRGQNKER*
PPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRAV

SEQ ID NO：27

注释：
双横线部分为信号肽（Signal peptide: 1-21）；
划横线部分为 CD3ε 胞外区（Extracellular domain：22-108）；
点划线部分为跨膜区部分（Transmembrane domain: 109-134）；
斜体部分为胞内区（Cytoplasmic domain: 135-189）。

鼠CD3δ全长氨基酸序列

MEHSGILASLILIAVLPQGSPFKIQVTEYEDKVFVTCNTSVMHLDGTVEGWFAK NKTLNLGKGVLDPRGIYLCNGTEQLAKVVSSVQVHYRMCQNCVELDSGTMAG VIFIDLIATLLLALGVYCFA*GHETGRPSGAAEVQALLKNEQLYQPLRDREDTQYSRL GGNWPRNKKS*

SEQ ID NO：28

注释：

双横线部分为信号肽（Signal peptide: 1 – 21）；

划横线部分为 CD3δ 胞外区（Extracellular domain：22-105）；

点划线部分为跨膜区部分（Transmembrane domain: 106-126）；

斜体部分为胞内区（Cytoplasmic domain: 127-173）。

经过反复分析和优化，获得一系列抗CD3的人源化抗体序列，重链可变区序列如下：

表 2 CD3 人源化抗体重链可变区序列表

名称	序列号	序列
HRH-1	*29*	*EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN*KYAMN*WVRQAPGKG LEWVA*RIRSKANNYATYYADSVKD*RFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVR*HGNFGNSYISYWAY*WGQGTLVTVSS*
HRH-2	*30*	*EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN*KYAMN*WVRQAPGKG LEWVA*RIRSKYNNYATYYADSVKD*RFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVR*HGNFGN*PYISYWAY*WGQGTLVTVSS*
HRH-3	31	*EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN*KYAMN*WVRQAPGKG LEWVA*RIRSKYNNYATYYADSVKD*RFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVR*HGNFGNEYISYWAY*WGQGTLVTVSS*
HRH-4	32	*EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN*KYAMN*WVRQAPGKG LEWVA*RIRSKYNNYATYYADSVKD*RFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVR*HGNFGNSYISYW*DY*WGQGTLVTVSS*
HRH-5	33	*EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN*KYAM*SWVRQAPGKG LEWVA*RIRSKYNNYATYYADSVKD*RFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVR*HGNFGNSYISYWAY*WGQGTLVTVSS*
HRH-6	34	*EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN*KYAMN*WVRQAPGKG LEWVA*RIR*N*KYNNYAT*E*YADSVKD*RFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVR*HGNFGNSYISYWAY*WGQGTLVTVSS*
HRH-7	35	*EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN*KYAMN*WVRQAPGKG LEWVA*RIRSKYNNYAT*E*YAA*SVKD*RFTISRDDSKNTAYLQMNNLK TEDTAVYYCVR*HGNFGNSYISYWAY*WGQGTLVTVSS*

轻链可变区序列如下：

>HRL

*QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTC*GSSTGAVTSGNYPN*WVQQKPGQAPRGLIG*GTKFL
AP*GTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYC*VLWYSNRWV*FGGGTKLTVL*

SEQ ID NO：36

注：顺序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4，序列中斜体为 FR 序列，下划线为 CDR 序列。此处和下表 3 中 CD3 人源化抗体的轻链和重链可变区中的 CDR（LCDR1-LCDR3 和 HCDR1-HCDR3）氨基酸残基在数量和位置上符合已知的 Kabat 编号规则。

表 3 CD3 抗体 CDR 序列表

抗体可变区	重链CDR		抗体可变区	轻链CDR	
HRH-1	HCDR1	KYAMN SEQ ID NO：37	HRL	LCDR1	GSSTGAVTSGNYPN SEQ ID NO：48
	HCDR2	RIRSKANNYATYYADSVKD SEQ ID NO：38		LCDR2	GTKFLAP SEQ ID NO：49
	HCDR3	HGNFGNSYISYWAY SEQ ID NO：39		LCDR3	VLWYSNRWV SEQ ID NO：50
HRH-2	HCDR1	KYAMN SEQ ID NO：37			
	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD SEQ ID NO：40			
	HCDR3	HGNFGNPYISYWAY SEQ ID NO：41			
HRH-3	HCDR1	KYAMN SEQ ID NO：37			
	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD SEQ ID NO：40			
	HCDR3	HGNFGNEYISYWAY SEQ ID NO：42			
HRH-4	HCDR1	KYAMN SEQ ID NO：37			
	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD SEQ ID NO：40			
	HCDR3	HGNFGNSYISYWDY SEQ ID NO：43			
HRH-5	HCDR1	KYAMS			

		SEQ ID NO：44		
	HCDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD SEQ ID NO：40		
	HCDR3	HGNFGNSYISYWAY SEQ ID NO：45		
HRH-6	HCDR1	KYAMN SEQ ID NO：37		
	HCDR2	RIRNKYNNYATEYADSVKD SEQ ID NO：46		
	HCDR3	HGNFGNSYISYWAY SEQ ID NO：45		
HRH-7	HCDR1	KYAMN SEQ ID NO：37		
	HCDR2	RIRSKYNNYATEYAASVKD SEQ ID NO：47		
	HCDR3	HGNFGNSYISYWAY SEQ ID NO：45		

单链抗体的构建和制备

来源自上述 B7H3 抗体的轻重链可变区和来源于 CD3 抗体的轻重链可变区可分别经连接后形成针对 B7H3 的 scFv 和针对 CD3 的 scFv，其中接头（linker）可选自本领域内公知的接头序列，示例性的接头可选自：（GGGGS）n 或（GGGGS）n GGG，其中 n 可为 1、2、3 或 4。

示例性的抗 B7H3 的 scFv 如下：

表 4 不同抗 B7H3 单链抗体（scFv）序列表

单链抗体名称（结构形式）	序列（SEQ ID NO：）
B7H3-scFv 1（VL_{B7H3}-linker-VH_{B7H3}）	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTVL*GGGGSGGGGSGGGGS*QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYASFDYWGQGALVTVSS（SEQ ID NO：51）
B7H3-scFv 2（VH_{B7H3}-linker-VL_{B7H3}）	QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYASFDYWGQGALVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGS*QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGN

	KAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTVL （SEQ ID NO：52）
B7H3-scFv3 （VL_{B7H3}-linker-VH_{B7H3}）	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTP GQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADD ESDYYCAIHVDRDIWVFGCGTKLTVL*GGGGSGGGGSGGGGS* QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAP GKCLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARSARLYASFDYWGQGALVTVSS （SEQ ID NO：53）
B7H3-scFv4 （VH_{B7H3}-linker-VL_{B7H3}）	QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAP GKCLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQ MNSLRAEDTAVYYCARSARLYASFDYWGQGALVTVSS*GGG* *GSGGGGSGGGGS*QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVS TSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGN KAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGCGTKLTVL （SEQ ID NO：54）

示例性的抗 CD3 的 scFv 如下：

表 5 不同抗 CD3 单链抗体（scFv）序列表

抗 CD3 scFv 名称（结构形式）	序列（SEQ ID NO：）
CD3-scFv1H （VH_{CD3}-linker-VL_{CD3}）	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRSKANNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS*GGGGSG* *GGGSGGGGS*QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL （SEQ ID NO :55）
CD3-scFv2H （VH_{CD3}-linker-VL_{CD3}）	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNPYISYWAYWGQGTLVTVSS*GGGGSG* *GGGSGGGGS*QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL （SEQ ID NO :56）
CD3-scFv3H （VH_{CD3}-linker-VL	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSS*GGGGSG*

$_{CD3}$）	*GGGSGGGGS*QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL （SEQ ID NO :57）
CD3-scFv4H （ VH $_{CD3}$-linker-VL $_{CD3}$）	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWDYWGQGTLVTVSS*GGGGS* *GGGGSGGGGS*QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYP NWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSG VQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL （SEQ ID NO :58）
CD3-scFv5H （ VH $_{CD3}$-linker-VL $_{CD3}$）	*EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFN*KYAM*SWVRQAPGKGLE* *WVA*RIRSKYNNYATYYADSVKD*RFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTED* *TAVYYCVR*HGNFGNSYISYWAY*WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGG* *GGS*QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKP GQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAE YYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL （SEQ ID NO :59）
CD3-scFv6H （ VH $_{CD3}$-linker-VL $_{CD3}$）	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRNKYNNYATEYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS*GGGGSG* *GGGSGGGGS*QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL （SEQ ID NO :60）
CD3-scFv7H （ VH $_{CD3}$-linker-VL $_{CD3}$）	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATEYAASVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNN LKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS*GGGGSG* *GGGSGGGGS*QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPN WVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGV QPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVL （SEQ ID NO :61）
CD3-scFv1L （ VL $_{CD3}$-linker-VH $_{CD3}$）	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVL*GGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKANNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO :62）
CD3-scFv2L	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQ

（VL$_{CD3}$-linker-VH$_{CD3}$）	APRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVL*GGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNPYISYWAYWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO :63）
CD3-scFv3L（VL$_{CD3}$-linker-VH$_{CD3}$）	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVL*GGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO :64）
CD3-scFv4L（VL$_{CD3}$-linker-VH$_{CD3}$）	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVL*GGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYISYWDYWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO :65）
CD3-scFv5L（VL$_{CD3}$-linker-VH$_{CD3}$）	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVL*GGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMSWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO :66）
CD3-scFv6L（VL$_{CD3}$-linker-VH$_{CD3}$）	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVL*GGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RNKYNNYATEYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS （SEQ ID NO :67）
CD3-scFv7L（VL$_{CD3}$-linker-VH$_{CD3}$）	QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQ APRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYY CVLWYSNRWVFGGGTKLTVL*GGGGSGGGGSGGGGS*EVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARI RSKYNNYATEYAASVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAV YYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSS

	（SEQ ID NO :68）

双特异性抗体的构建和制备B7H3双价双特异性抗体和B7H3单价双特异性抗体

本公开的一些实施方式中B7H3双价双特异抗体的结构如图1A所示，其C末端可以连接His标签，也可以不连接His标签。采用含Fc的两条链非对称结构设计，共有两个B7H3抗原结合域和一个CD3抗原结合域，其中B7H3抗原结合域在两条链上各一个，抗原结合域均为scFv的形式。Fc区能维持抗体正常半衰期和良好稳定性，两条链的设计大大降低了错配的几率，提高了样品的均一性和目的抗体的得率。具体的双特异性抗体的分子结构（Format）见下表6，此外，本公开一些实施方式中使用的 B7H3 单价双特异性抗体的分子结构在第二多肽链中仅有Fc结构域，不包含抗原结合结构域，结构示意见图1B。

表6 双特异性抗体的结构示意表

分子结构名称	第一多肽链排列顺序	第二多肽链排列顺序
AFF1	VH_{B7H3}-L1-VL_{B7H3}-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-$Fc1$	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-$Fc2$
AFF2	VH_{B7H3}-L1-VL_{B7H3}-L2-VL_{CD3}-L3-VH_{CD3}-L4-$Fc1$	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-$Fc2$
AFF3	VL_{B7H3}-L1-VH_{B7H3}-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-$Fc1$	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-$Fc2$
AFF4	VL_{B7H3}-L1-VH_{B7H3}-L2-VL_{CD3}-L3-VH_{CD3}-L4-$Fc1$	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-$Fc2$
AFF5	VH_{CD3}-L1-VL_{CD3}-L2-VH_{B7H3}-L3-VL_{B7H3}-L4-$Fc1$	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-$Fc2$
AFF6	VH_{CD3}-L1-VL_{CD3}-L2-VL_{B7H3}-L3-VH_{B7H3}-L4-$Fc1$	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-$Fc2$
AFF7	VL_{CD3}-L1-VH_{CD3}-L2-VH_{B7H3}-L3-VL_{B7H3}-L4-$Fc1$	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-$Fc2$
AFF8	VL_{CD3}-L1-VH_{CD3}-L2-VL_{B7H3}-L3-VH_{B7H3}-L4-$Fc1$	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-$Fc2$
AFF1-B	VH_{B7H3}-L1-VL_{B7H3}-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-$Fc1$	VH_{B7H3}-L5-VL_{B7H3}-L6-$Fc2$
AFF2-B	VH_{B7H3}-L1-VL_{B7H3}-L2-VL_{CD3}-L3-VH_{CD3}-L4-$Fc1$	VH_{B7H3}-L5-VL_{B7H3}-L6-$Fc2$
AFF3-B	VL_{B7H3}-L1-VH_{B7H3}-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-$Fc1$	VH_{B7H3}-L5-VL_{B7H3}-L6-$Fc2$
AFF4-B	VL_{B7H3}-L1-VH_{B7H3}-L2-VL_{CD3}-L3-VH_{CD3}-L4-$Fc1$	VH_{B7H3}-L5-VL_{B7H3}-L6-$Fc2$
AFF5-B	VH_{CD3}-L1-VL_{CD3}-L2-VH_{B7H3}-L3-VL_{B7H3}-L4-$Fc1$	VH_{B7H3}-L5-VL_{B7H3}-L6-$Fc2$
AFF6-B	VH_{CD3}-L1-VL_{CD3}-L2-VL_{B7H3}-L3-VH_{B7H3}-L4-$Fc1$	VH_{B7H3}-L5-VL_{B7H3}-L6-$Fc2$
AFF7-B	VL_{CD3}-L1-VH_{CD3}-L2-VH_{B7H3}-L3-VL_{B7H3}-L4-$Fc1$	VH_{B7H3}-L5-VL_{B7H3}-L6-$Fc2$
AFF8-B	VL_{CD3}-L1-VH_{CD3}-L2-VL_{B7H3}-L3-VH_{B7H3}-L4-$Fc1$	VH_{B7H3}-L5-VL_{B7H3}-L6-$Fc2$
AF1	VH_{B7H3}-L1-VL_{B7H3}-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-$Fc1$	Fc2
AF2	VH_{B7H3}-L1-VL_{B7H3}-L2-VL_{CD3}-L3-VH_{CD3}-L4-$Fc1$	Fc2
AF3	VL_{B7H3}-L1-VH_{B7H3}-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-$Fc1$	Fc2
AF4	VL_{B7H3}-L1-VH_{B7H3}-L2-VL_{CD3}-L3-VH_{CD3}-L4-$Fc1$	Fc2
AF5	VH_{CD3}-L1-VL_{CD3}-L2-VH_{B7H3}-L3-VL_{B7H3}-L4-$Fc1$	Fc2
AF6	VH_{CD3}-L1-VL_{CD3}-L2-VL_{B7H3}-L3-VH_{B7H3}-L4-$Fc1$	Fc2

AF7	VL_{CD3}-L1-VH_{CD3}-L2-VH_{B7H3}-L3-VL_{B7H3}-L4-Fc1	Fc2
AF8	VL_{CD3}-L1-VH_{CD3}-L2-VL_{B7H3}-L3-VH_{B7H3}-L4-Fc1	Fc2

注：此表第一多肽链或第二多肽链的羧基端可以连接 His 标签，也可以不连接 His 标签。L1、L2、L3、L4、L5 和 L6 表示接头，用于连接各抗原结合结构域以及 Fc 区。

表 7 接头（linker）序列的选择

接头	结构或序列
L1	（GGGGS）n 或 （GGGGS）n GGG
L2	（GGGGS）n
L3	（GGGGS）n
L4	GGGDKTHTCPPCP（SEQ ID NO：98）
L5	（GGGGS）n
L6	GGGDKTHTCPPCP（SEQ ID NO：98）

其中 n 选自 1、2、3 或 4；优选的，L1 中的 n 为 2 或 3，更优选为 3；L2 中的 n 为 1 或 2，更优选为 1；L3 或 L5 中的 n 为 3。可选地，用于连接抗原结合结构域以及 Fc 区的接头可选自其他任何可用于连接抗体功能结构域的接头，而不仅限于上述序列所限制的接头。

上述表 6 中的 Fc1 和 Fc2 可为相同序列的 Fc，也可分别为 knob-Fc 和 hole-Fc 或分别为 hole-Fc 和 knob-Fc，在本公开一些实施例中，knob-Fc 和 hole-Fc 的序列优选表 8 所示序列：

表 8 不同 Fc 序列表

名称	SEQ ID NO	序列
knob-Fc	69	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
hole-Fc	70	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

上述轻重链可变区、单链抗体、双特异性抗体可通过 VH 和/或 VL 及所需的其他结构域的编码 cDNA，构建编码上述多肽或抗原结合片段的 DNA，将所述 DNA 插入到原核生物表达载体或真核生物表达载体中，然后将所述表达载体导入到原

核生物或真核生物中以表达所述多肽或抗原结合片段。

实施例 1、双特异性抗体分子及阳性对照分子、阴性对照分子的制备

根据本公开双特异性抗体分子的设计方法，设计并制备具体双特异性抗体分子，示例性分子氨基酸序列如下表 9 所示：

表 9 双特异性抗体序列表

抗体名称（结构名称）	第一多肽链（SEQ ID NO）	第二多肽链（SEQ ID NO）
113（AFF3-2）	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTVL*GGGGSGGGGSGGGGS*QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYASFDYWGQGALVTVSS*GGGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNPYISYWAYWGQGTLVTVSS*GGGGSGGGGS GGGGS*QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCP*APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*HHHHHH （SEQ ID NO：72）	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTVL*GGGGS GGGGSGGGGS*QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYASFDYWGQGALVTVSSGGGDKTHTCPPCP*APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE*
118（AFF6-3）	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPED	

	EAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSQ TVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYP SWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSI LGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWV FGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQS GGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQ APGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLY ASFDYWGQGALVTVSSGGGDKTHTCPPCP*APE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*HHHHHH （SEQ ID NO：73）	*VKFNWYVDGV EVHNAKTKPR EEQYNSTYRVV SVLTVLHQDW LNGKEYKCKV SNKALPAPIEK TISKAKGQPRE PQVCTLPPSR EEMTKNQVSL SCAVKGFYPS DIAVEWESNG QPENNYKTTP PVLDSDGSFF LVSKLTVDKSR WQQGNVFSCS VMHEALHNHY TQKSLSLSPGK* （SEQ ID NO：71）
119 （AFF6-3 L1D （GS））	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYA MNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYAD SVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVY YCVRHGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSGG GGSGGGGSGGGQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLT CGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGT KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEA EYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSQTV VTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPS WYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSIL GNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVF GGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQS GGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQ APGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLY ASFDYWGQGALVTVSSGGGDKTHTCPPCP*APE AAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSF FLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT QKSLSLSPGK*HHHHHH	

	（SEQ ID NO：74）	
126（AFF6-2）	EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNPYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYASFDYWGQGALVTVSSGGGDKTHTCPPCP*APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*HHHHHH （SEQ ID NO：75）	
127（AFF3-3）	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYASFDYWGQGALVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL	

	WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCP*APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*HHHHHH （SEQ ID NO：76）	
128 （AFF3-2(L2)$_2$）	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYASFDYWGQGALVTVSSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNPYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCP*APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*HHHHHH （SEQ ID NO：77）	
132 （AFF3-3SS）	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGCGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKCLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSA	

	RLYASFDYWGQGALVTVSSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCP*AP* *EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS* *HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY* *RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT* *ISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLV* *KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGS* *FFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYT* *QKSLSLSPGK*HHHHHH （SEQ ID NO：78）	
131 （AFF3- 1）	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSH YPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFS GSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDI WVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQL VQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSA RLYASFDYWGQGALVTVSSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKANNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCP*AP* *EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS* *HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY* *RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK* *TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCL* *VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG* *SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY* *TQKSLSLSPGK*HHHHHH	

	（SEQ ID NO：79）	
154（AFF3-4）	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSH YPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFS GSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDI WVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQL VQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSA RLYASFDYWGQGALVTVSSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNSYISYWDYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGG SGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTG AVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPG TPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCP*AP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK*HHHHHH （SEQ ID NO：80）	
156（AFF3-6）	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSH YPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFS GSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDI WVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQL VQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSA RLYASFDYWGQGALVTVSSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRNKYNNYATEYADSVKDRFT ISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL	

	WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCP*APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*HHHHHH （SEQ ID NO：81）	
155 （AFF3-5）	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYASFDYWGQGALVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMSWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCP*APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*HHHHHH （SEQ ID NO：82）	
177 （AFF3-7）	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSA	

	RLYASFDYWGQGALVTVSSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATEYAASVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNSYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCP*AP* *EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS* *HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY* *RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK* *TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCL* *VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG* *SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY* *TQKSLSLSPGK*HHHHHH （SEQ ID NO：83）	
172 （AFF2- 3）	QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSA MHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARSARLYASFDYWGQGALVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSS GSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSS GVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCA IHVDRDIWVFGGGTKLTVLGGGGSQTVVTQEP SLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQ KPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKA ALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGT KLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGK GLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDD SKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNE YISYWAYWGQGTLVTVSSGGGDKTHTCPPCP*A* *PEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV* *SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY* *RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK* *TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCL* *VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG* *SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY* *TQKSLSLSPGK*HHHHHH	

	（SEQ ID NO：84）	
171（AFF1-3）	QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSA MHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARSARLYASFDYWGQGALVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSS GSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSS GVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCA IHVDRDIWVFGGGTKLTVLGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCP*AP EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCL VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY TQKSLSLSPGK*HHHHHH （SEQ ID NO：85）	
161（AFF1-2）	QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSA MHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSV KGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC ARSARLYASFDYWGQGALVTVSSGGGGSGGG GSGGGGSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSS GSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSS GVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCA IHVDRDIWVFGGGTKLTVLGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNPYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL	

	WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCP*APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*HHHHHH （SEQ ID NO：86）	
162 （AFF2-2）	QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYASFDYWGQGALVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTVLGGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNPYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGDKTHTCPPCP*APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK*HHHHHH （SEQ ID NO：87）	
142 （AFF3-3B）	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSA	QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGR

	RLYASFDYWGQGALVTVSSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCP*AP* *EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS* *HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY* *RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK* *TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCL* *VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG* *SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY* *TQKSLSLSPGK*HHHHHH （SEQ ID NO：76）	FTISRDNSKN TLYLQMNSLR AEDTAVYYC ARSARLYASF DYWGQGALV TVSSGGGGSG GGGSGGGGS QTVVTQEPSF SVSPGGTVTL TCGLSSGSVS TSHYPSWYQ QTPGQAPRM LIYNTNTRSS GVPDRFSGSI LGNKAALTIT GAQADDESD YYCAIHVDR
143 （AFF3-2B）	QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSH YPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFS GSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDI WVFGGGTKLTVLGGGGSGGGGSGGGGSQVQL VQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHW VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRF TISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSA RLYASFDYWGQGALVTVSSGGGGSEVQLVESG GGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQ APGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGN FGNPYISYWAYWGQGTLVTVSSGGGGSGGGGS GGGGSQTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGA VTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGT PARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVL WYSNRWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCP*AP* *EAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVS* *HEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY* *RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK* *TISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCL* *VKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDG* *SFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHY* *TQKSLSLSPGK*HHHHHH	DIWVFGGGT KLTVLGGGD KTHTCPPCP*A* *PEAAGGPSVF* *LFPPKPKDTL* *MISRTPEVTCV* *VVDVSHEDPE* *VKFNWYVDGV* *EVHNAKTKPR* *EEQYNSTYRVV* *SVLTVLHQDW* *LNGKEYKCKV* *SNKALPAPIEK* *TISKAKGQPRE* *PQVCTLPPSR* *EEMTKNQVSL* *SCAVKGFYPS* *DIAVEWESNG* *QPENNYKTTP* *PVLDSDGSFF* *LVSKLTVDKSR* *WQQGNVFSCS* *VMHEALHNHY* *TQKSLSLSPGK*

	（SEQ ID NO：72）	（SEQ ID NO：88）
181（AF3-1）	SEQ ID NO：79	SEQ ID NO：70
182（AF3-2）	SEQ ID NO：72	
183（AF3-3）	SEQ ID NO：76	
184（AF3-4）	SEQ ID NO：80	
185（AF3-5）	SEQ ID NO：82	
186（AF3-6）	SEQ ID NO：81	
187（AF3-7）	SEQ ID NO：83	

注：上表 B7H3 双价双特异性抗体分子 113、118、119、126、127、128、131、132、154、155、156、161、162、171、172 和 177 的第二多肽链均为 SEQ ID NO：71 所示的 VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-hole-Fc；B7H3 单价双特异性抗体分子 181-187 的第二多肽链均为 SEQ ID NO：70 所示的 hole-Fc。

本公开中使用的阴性对照（NC1、NC2、NC3）及阳性对照（MGD009）的双特异性抗体的氨基酸序列如下：

NC1：B7H3 结合域被替换成非相关抗体（抗荧光素抗体，anti-fluorescein），但保留 CD3 结合域），其氨基酸序列参照文献：The anti-fluorescein antibody used to form the control DART diabody was antibody 4-4-20（Gruber. M.*et al.*（1994）.

链 1（VH_{CD3}-VL_{CD3}-VL_{ctrl}-VH_{ctrl}-knob-Fc）

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRS
KYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGN
EYISYWAYWGQGTLVTVSS*GGGGSGGGGSGGGGS*QTVVTQEPSLTVSPGGTVTL
TCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKA
ALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTKLTVLGGGGSDIQMTQSPSSVS
ASVGDRVTITCRASQDIANYLSWYQQKPGKSPKLLIYGTSNLEVGVPSRFSGSRS

GTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDKEFPRTFGGGTKVEIK*GGGGSGGGGSGGGGS*
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYYMAWVRQAPGKGLEWVTSISY
EGDITYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCASQTLRESFDY
WGQGTLVTVSSGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT
CVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ
DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVS
LWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRW
QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHH

SEQ ID NO：89

链 2（VL_{ctrl}-VH_{ctrl}-hole-Fc）
DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIANYLSWYQQKPGKSPKLLIYGTSNLE
VGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDKEFPRTFGGGTKVEIKGGG
GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYYMAWVRQA
PGKGLEWVTSISYEGDITYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATY
YCASQTLRESFDYWGQGTLVTVSSGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP
SREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：90

NC2: 保留 B7H3 结合域，仅是 CD3 结合域被替换成抗 fluorescein 的非相关抗体

链 1（VH_{ctrl}-VL_{ctrl}-VL_{B7H3}-VH_{B7H3}-knob-Fc）
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYYMAWVRQAPGKGLEWVTSISY
EGDITYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATYYCASQTLRESFDY
WGQGTLVTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQ
DIANYLSWYQQKPGKSPKLLIYGTSNLEVGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDF
ATYYCLQDKEFPRTFGGGTKVEIKGGGGSQTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSS
GSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTNTRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGA
QADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLTVL*GGGGSGGGGSGGGGS*QVQLVQS
GGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYY
VDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYASFDYWGQGA
LVTVSSGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHH

SEQ ID NO：91

链 2（VL_{B7H3}-linker-VH_{B7H3}-linker-Fc）
QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTN
TRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLT

VLGGGGSGGGGSGGGGSQVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHW
VRQAPGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAE
DTAVYYCARSARLYASFDYWGQGALVTVSSGGGDKTHTCPPCP*APEAAGGPSVF*
LFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYN
STYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPSR
EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTV
DKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：92

注：顺序为 VL_{B7H3}-linker-VH_{B7H3}-linker-Fc。序列中下划线部分为 B7H3 抗体序列，斜体部分为 hole-Fc 序列。

NC3

链 1（VL_{ctrl}-VH_{ctrl}-VH_{CD3}-VL_{CD3}-knob-Fc-His tag）

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIANYLSWYQQKPGKSPKLLIYGTSNLE
VGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDKEFPRTFGGGTKVEIKGGG
GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYYMAWVRQA
PGKGLEWVTSISYEGDITYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATY
YCASQTLRESFDYWGQGTLVTVSS*GGGGS*EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAA
SGFTFNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDS
KNTAYLQMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGN*E*YISYWAYWGQGTLVTVSS*GGGG*
*SGGGGSGGGGS*QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKP
GQAPRGLIGGTKFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSN
RWVFGGGTKLTVLGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE
VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH
QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQV
SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR
WQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHH

SEQ ID NO：93

链 2（VL_{ctrl}-VH_{ctrl}-hole-Fc）

DIQMTQSPSSVSASVGDRVTITCRASQDIANYLSWYQQKPGKSPKLLIYGTSNLE
VGVPSRFSGSRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCLQDKEFPRTFGGGTKVEIKGGG
GSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSHYYMAWVRQA
PGKGLEWVTSISYEGDITYYGDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTATY
YCASQTLRESFDYWGQGTLVTVSSGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKP
KDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNST
YRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP
SREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLV
SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：94

阳性对照 MGD009 包含三条链，制备及氨基酸序列参照已公开专利申请 WO2017030926A1，其氨基酸序列如下：

链 1 （B7H3VL-CD3VH-Fc）

DIQLTQSPSFLSASVGDRVTITCKASQNVDTNVAWYQQKPGKAPKALIYSASYR
YSGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPFTFGQGTKLEIKGG
GSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRQAPGKGLE
WVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYC
VRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLVTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALEKEVAA
LEKEVAALEKGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC
VVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD
WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
WCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：95

链 2（CD3VL-B7H3VH）

QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGT
NKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAEDEADYYCALWYSNLWVFGGGTK
LTVLGGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQ
APGKGLEWVAYISSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRDEDTA
VYYCGRGRENIYYGSRLDYWGQGTTVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEK
VAALKEKVAALKE

SEQ ID NO：96

链 3（Fc）

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
RYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：97

201（DART-Fc三链结构）201链1（B7H3VL-CD3VH-E-Fc）

QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTN
TRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLT
VLGGGSGGGGEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKYAMNWVRQAP
GKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNNLKTEDT
AVYYCVRHGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSGGCGGGEVAALEKEVAALE
KEVAALEKEVAALEKGGGDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRT
PEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV
LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKN
QVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALH NHYTQKSLSLSPGKHHHHHH

SEQ ID NO：99

201 链 2（CD3VL-B7H3VH-K）

QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGT
KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTK
LTVLGGGGSGGGGQVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQ
APGKGLEWVAVISYDGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTA
VYYCARSARLYASFDYWGQGALVTVSSGGCGGGKVAALKEKVAALKEKVAA
LKEKVAALKE

SEQ ID NO：100

201 链 3

DKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF
NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK
ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEW
ESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHN
RYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO：97

202（四链结构，其中四条链的物质的量比例关系是链 1:链 2:链 3:链 4=1:2:1:1）

202 链 1（B7H3VH-CH1-Fc）

QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISY
DGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYASF
DYWGQGALVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNG
KEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCREEMTKNQVSLWCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNV
FSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKHHHHHH

SEQ ID NO：101

202 链 2（B7H3VL-CL）

QTVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCGLSSGSVSTSHYPSWYQQTPGQAPRMLIYNTN
TRSSGVPDRFSGSILGNKAALTITGAQADDESDYYCAIHVDRDIWVFGGGTKLT
VLRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRG
EC

SEQ ID NO：102

202 链 3（B7H3VH-CH1-CD3VH-CL）

QVQLVQSGGGVVQPGTSLRLSCAASGFIFSSSAMHWVRQAPGKGLEWVAVISY
DGSNKYYVDSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARSARLYASF
DYWGQGALVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS
WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKV
DKKVEPKSCDGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFNKY
AMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYL
QMNNLKTEDTAVYYCVRHGNFGNEYISYWAYWGQGTLVTVSSASVAAPSVFI
FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD
STYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECDKTHTCPPCP

APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVE
VHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVCTLPPSREEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPEN
NYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK

SEQ ID NO：103

202 链 4（CD3VL-CH1）
QTVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGT
KFLAPGTPARFSGSLLGGKAALTLSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGTK
LTVLSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTS
GVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
C

SEQ ID NO：104

实施例 2、CD3-B7H3 双特异性抗体的表达与纯化

表达双特异性抗体的质粒（链 1：链 2 为 1：1）转染 HEK293E 细胞，6 天后收集表达上清，高速离心去除杂质。澄清的上清用 Ni Sepharose excel 柱（GE Healthcare）进行纯化。用 PBS 冲洗柱子，至 A280 读数降至基线，再用 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，最后用含有 300mM 咪唑的 PBS 溶液洗脱目的蛋白，并收集洗脱峰。洗脱样品适当浓缩后，利用 550 缓冲液（10mM 乙酸, pH5.5, 135mM NaCl）平衡好的凝胶层析 Superdex200（GE）进一步纯化，收集目的峰。样品经脱盐柱或超滤离心管换液至 559 缓冲液中（10mM 乙酸, pH5.5, 9%蔗糖），分装后于-80 度冻存。

测试例 1、BIAcore 检测双特异抗体对 B7H3 和 CD3 的亲和力实验

抗体对 B7H3 和 CD3 亲和力的检测，采用捕获（capture）抗体的形式。用偶联有 Anti-Human IgG Antibody （Cat.#BR-1008-39, Lot. # 10260416, GE）的 CM5 生物传感芯片（Cat. # BR-1005-30, GE） 或 Protein A （Cat. # 29127556, GE） 生物传感芯片亲和捕获 BsAb，然后于芯片表面流经各抗原，用 Biacore T200 仪器实时检测反应信号获得结合和解离曲线。在每个实验循环解离完成后，用再生缓冲液 Glycine1.5（Cat# BR100354，GE）或 3 M $MgCl_2$（来自 Human antibody capture kit，Cat.#BR100839, GE）将芯片洗净再生。实验结束后用 GE Biacore T200 Evaluation version 3.0 软件以（1:1）Langmuir 模型拟合数据，得出亲和力数值。

固定不同 V 区的排列顺序，采用不同 CD3 抗体 VH 序列时，双特异抗体对 CD3 的亲和力略有不同，当采用 HRH-6 和 HRH-5 序列时，抗体与 CD3 的亲和力最弱，在 Biacore 上无法检测到与 CD3 的结合。

表 10 AFF3 结构的双特异性抗体的抗原亲和力 Biacore 检测结果

双特异性抗体	所包含 CD3 VH	BIAcore KD（M）
131	HRH-1	4.07E-08
113	HRH-2	7.72E-08

127	HRH-3	9.72E-08
154	HRH-4	6.97E-08
156	HRH-6	不结合
155	HRH-5	不结合
177	HRH-7	1.62E-07

示例性的选择包含 HRH3 作为 CD3 抗原结合结构域的重链可变区的抗体进行测试，其中测试抗体 118，127，132 与人（human） B7H3 和 human CD3 的亲和力分别为 10^{-9} 和 10^{-8}M 水平，与 MGD009 的亲和力相当，且与猴（cyno）B7H3 和 human CD3 均具有很强的交叉结合活性。

表 11 包含 HRH3 的不同结构顺序双特异性抗体的抗原亲和力 Biacore 检测结果

抗体	亲和力（M）			
	人 B7H3	猴 B7H3	人 CD3	猴 CD3
MGD009	1.96E-09	2.65E-09	7.81E-08	4.94E-09
118	5.33E-09	7.31E-09	6.61E-08	1.59E-09
127	4.29E-09	5.61E-09	8.47E-08	1.24E-09
132	5.35E-09	6.90E-09	8.53E-08	8.13E-10

测试例 2、细胞水平抗体结合能力测定

采用 FACS 的方法对双特异抗体与细胞表面抗原结合能力进行检测。对细胞表面抗原 B7H3 和 CD3 的结合，分别用 A498（ATCC，HTB-44），CT26/hB7H3（在鼠细胞 CT26 中过表达人 B7H3 的重组细胞系，内部构建，CT26 来源于中科院细胞库，TCM37）和 Jurkat 重组细胞系（Jurkat 细胞来源于 ATCC，PTS-TIB-152，重组细胞系是在 Jurkat 细胞基础上过表达荧光素酶（luciferase）基因，在基因上游插入 NFAT 的应答元件）。

在 96 孔 U 型底板（corning, 3795）中加入 FACS 缓冲液（buffer）（98% PBS, 2% FBS）重悬的细胞，并加入梯度稀释的抗体，4℃孵育 1h， FACS 缓冲液清洗 2 次，随后每孔加入 APC anti-human IgG Fc Antibody（biolegend，Cat# 409306, 1:50 稀释），4℃孵育 30min，清洗 2 次后用 FACS 缓冲液重悬细胞，最后用 FACS CantoII（BD）读取荧光信号值。

结果显示，B7H3 双价的双特异抗体 118、127 和 132 以及阴性对照抗体 NC2（保留 B7H3 结合域，仅是 CD3 结合域被替换成非相关抗体）均能与高表达 B7H3 的 A498 细胞系结合（见图 2A），呈梯度依赖效应，结合能力强于 MGD009，且是 B7H3 靶点特异的，阴性对照抗体 NC1（B7H3 结合域被替换成非相关抗体，但保留 CD3 结合域）不与 A498 结合。同样地，双特异抗体 118、127 和 132，MGD009 以及 NC2 与 CT26/hB7H3 有强结合（见图 2B），而不与未表达 B7H3 的 CT26 细胞系（见图 2C）结合，也充分说明测试的双特异抗体特异地与细胞膜表面 B7H3 靶

点结合。抗体 118、127 和 132 与 MGD009 结合能力的差别，在 B7H3 过表达细胞系 CT26/hB7H3 上比 A498 细胞系上更加明显，预示着 B7H3 双价的双特异抗体，相比起 B7H3 单价的双特异抗体 MGD009，在高表达 B7H3 细胞上的结合优势更为显著，会有更好的安全窗口。

双特异抗体 118、127 和 132 以及阴性对照抗体 NC1 均能与 Jurkat 重组细胞系结合（见图 2D），呈梯度依赖效应。其中 118 和 NC1 与 Jurkat 重组细胞结合能力与 MGD009 相当，而 127 和 132 的结合能力略弱，可能由于 CD3 结合域在 B7H3 结合域和 FC 之间，与 Jurkat 重组细胞结合受到一定空间位阻的影响。不含 CD3 结合域的阴性对照抗体 NC2 不与 Jurkat 重组细胞结合，说明双特异抗体与 Jurkat 的结合是 CD3 靶点特异的。

测试例 3、体外 PBMC 杀伤实验

双特异抗体介导的 PBMC 对肿瘤细胞的杀伤实验通过定量检测细胞增殖情况来实现的。利用 Cell Titer-glo 检测细胞中 ATP 的含量，而 ATP 是活细胞新陈代谢的一个指标，直接与培养物中的细胞数量成正比。

共用了四种不同的靶细胞（target cell，T），包括三种不同 B7H3 表达水平的肿瘤细胞系（A498，U87（中科院细胞库，TCHu138），Detroit562（ATCC，CCL-138）），和一种不表达 B7H3 的阴性对照细胞系 CHOK1（ATCC, CCL-61）。效应细胞（effector cell, E）是来自健康志愿者的 PBMC。将靶细胞接种在 96 孔板中，过夜培养，次日，每孔加入等量的新鲜抽提的 PBMC 和梯度稀释的待测双特异抗体（最高终浓度为 300nM，1：3 稀释），或 PBS （对照（control），有效应细胞和靶细胞，无抗体）。设置空白对照 （blank，只有培养基，没有细胞或抗体），E:T 的比例，对于 A498，U87，Detroit562 和 CHOK1 细胞，分别为 10:1，5:1，5:1，5:1。培养 48 小时，用 Cell Titer-glo 检测（参照说明书），酶标仪读取信号值，并最终换算成抑制率，用 Graphpad Prism 5 对数据进行处理分析。

抑制率%（Inhibition %）= 100%-（信号值$_{样本}$-信号值$_{空白}$）/（信号值$_{对照}$-信号值$_{空白}$）

（Inhibition %=100%-（$Signal_{sample}$- $Signal_{blank}$）/（$Signal_{control}$-$Signal_{blank}$））

3.1 含不同亲和力 CD3 抗原结合结构域的抗体比较

使用不同亲和力的 CD3 scFv，构建的不同双特异抗体，呈现出不同的体外靶细胞杀伤疗效（见图 3A 和图 3B），以分别含有 HRH5 和 HRH6 的双特异性抗体 155、156、185 和 186 的杀伤疗效最弱，这点与 Biacore 亲和力的检测结果一致。

3.2 B7H3 单价和双价双特异性抗体的比较

对于含有不同抗 CD3 抗体重链可变区的 scFv 构建成的双特异性抗体，以 AFF3（该结构示例性抗体为 131 和 177）和 AF3（该结构示例性抗体为 181 和 187）结构比较为例（见图 4A 和图 4B），CD3-B7H3 的 AFF3 结构 B7H3 双价双特异性抗体，比 AF3 结构的 B7H3 单价双特异性抗体，在体外细胞杀伤活性上明显增强。

这一点适用于所有含不同 CD3 VH 的双特异性抗体。

表 12 抗体结构顺序

结构名称	第一多肽链	第二多肽链
AFF3	VL_{B7H3}-L1-VH_{B7H3}-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-Fc_1	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-Fc_2
AF3	VL_{B7H3}-L1-VH_{B7H3}-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-Fc_1	Fc2

3.3 B7H3 双价双特异性抗体不同结构排序分子结构对肿瘤杀伤活性的影响

对具有相同抗原结合结构域组件不同结构顺序的 B7H3 双价双特异性抗体分子 161、162、113 和 126（见图 5A），以及 113 与 143（见图 5B）的肿瘤细胞杀伤活性进行平行试验，上述分子都使用 HRH2 作为 CD3 抗原结合结构域中的重链可变区。结果显示，不同结构顺序的 B7H3 双价特异性抗体分子对 A498 细胞均有显著的杀伤作用。其中 161、162、113 和 126 的杀伤活性与 MGD009 的杀伤活性相当或略优于 MGD009。不同结构排列顺序对 B7H3 双价双特异性抗体的肿瘤细胞杀伤活性影响不大。

表 13 不同试验抗体的结构比较表

抗体	结构名称	第一多肽链	第二多肽链
161	AFF1-2	VH_{B7H3}-L1-VL_{B7H3}-L2-VH_{CD3}（HRH2）-L3-VL_{CD3}-L4-Fc1	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-Fc2
162	AFF2-2	VH_{B7H3}-L1-VL_{B7H3}-L2-VL_{CD3}-L3-VH_{CD3}（HRH2）-L4-Fc1	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-Fc2
113	AFF3-2	VL_{B7H3}-L1-VH_{B7H3}-L2-VH_{CD3}（HRH2）-L3-VL_{CD3}-L4-Fc1	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-Fc2
126	AFF6-2	VH_{CD3}（HRH2）-L1-VL_{CD3}-L2-VL_{B7H3}-L3-VH_{B7H3}-L4-Fc1	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-Fc2
143	AFF3-2B	VL_{B7H3}-L1-VH_{B7H3}-L2-VH_{CD3}（HRH2）-L3-VL_{CD3}-L4-Fc1	VH_{B7H3}-L5-VL_{B7H3}-L6-Fc2

3.4 双特异抗体对不同 B7H3 表达水平的肿瘤细胞系均有杀伤疗效

测试了三个待测双特异抗体 118、127 和 132 在 A498、U87 和 Detroit562 肿瘤细胞系上的体外杀伤效果。杀伤疗效与 B7H3 表达水平呈正相关，例如 118 在 A498、U87 和 Detroit562 上的 EC50 分别为 0.34、2.4 和 14.5nM。三个抗体分子均显示出这一趋势。所有双特异抗体对 B7H3 阴性的对照细胞系 CHOK1 均没有杀伤，且阴性对照双特异抗体 NC1 在所有靶细胞系上也没有杀伤效果，这两点共同说明细胞杀伤需要通过双特异抗体将效应细胞重定向到 B7H3 阳性的靶细胞，进行靶点特异性杀伤。

表 14 待测双特异抗体介导的 PBMC 重定向杀伤不同靶细胞系

细胞系	B7H3 表达	118		127		132		NC1	
		IC50（nM）	Emax（%）	IC50（nM）	Emax（%）	IC50（nM）	Emax（%）	IC50（nM）	Emax（%）
A498	高	0.34	65.9	2.4	67.5	2.94	66.4	>300	20.9
U87	中	2.4	67.2	8.2	69.5	11.9	67.6	>300	3.8
Detroit562	低	14.5	39.24	15.8	26.46	15.7	15.23	>300	0.95
CHOK1	阴性	>300	1.83	>300	3.91	>300	0.00	>300	0.81

3.5 不同结构双特异性抗体对 A498 细胞的杀伤比较

测试了三个待测双特异抗体 127 与 201、202 在 A498 肿瘤细胞系上的体外杀伤效果。结果显示（见图 5C）三个结构的双特异性抗体均有肿瘤的杀伤活性，其中双特异性抗体 127 的杀伤活性优于 201 和 202。

测试例 4、体外 T 细胞活化实验

双特异抗体对 T 细胞的活化功能的检测，是利用 Jurkat 重组细胞系，在有或没有 A498 肿瘤细胞系存在的情况下，检测 Jurkat 被激活后 NFAT 驱动的荧光素酶报告基因 （luciferase） 的表达。

接种 A498 细胞于 96 孔细胞培养板上（1×10^5/ml，100 μL/孔），放置于 37°C，5%CO_2 培养箱培养 20-24 h。次日，移除细胞培养上清后，向每孔加入 90μl 的 Jurkat 重组细胞悬液 （5.5×10^5/ml），和 10μl 梯度稀释的待测双特异抗体 （最高 500nM 的终浓度，1：3 梯度稀释），并设置阴性对照 （对照（control），有 A498 和 Jurkat 重组细胞，无抗体）和空白对照 （blank，只有培养基，没有细胞或抗体），置于 37°C，5%CO_2 培养箱培养 5-6 h。非肿瘤细胞特异的 Jurkat 重组细胞活化，则是直接向空白 96 孔培养板中加入 Jurkat 重组细胞和待测抗体。共培养结束后，每孔中加入 100μl 的 Bright-Glo Reagent（Bright-Glo™ Luciferase Assay System，Promega, Cat#: E2620），置于室温放置 5-10 min，使用多功能酶标仪读取化学发光信号值，荧光增强倍数（Fold increase）的计算公式为：增强倍数=（（信号值$_{样本}$-信号值$_{空白}$）/（信号值$_{对照}$-信号值$_{空白}$）

（Fold increase= （$Signal_{sample}$-$Signal_{blank}$）/（$Signal_{control}$-$Signal_{blank}$））

4.1 不同排列顺序的 B7H3 双价分子均能有效激活 T 细胞

将 B7H3 双价双特异性抗体 118、127 和 132 分别在 A498 存在或或不存在的情况下检测 Jurkat 重组细胞的激活情况，以验证双特异性抗体对 T 细胞的特异性和非特异性激活效果。结果显示，不同排列顺序的 B7H3 双价双特异抗体 118、127 和 132 在肿瘤细胞系 A498 存在的情况下（见图 6A），都能有效地激活 Jurkat 重组细胞系，显著地诱导荧光素酶的表达，因为阴性对照抗体 NC1 不能诱导荧光素酶的表达，可以证明 Jurkat 重组细胞的激活是 B7H3 靶点特异的。 Jurkat 重组细胞的激活，需要通过双特异抗体共募集表达 CD3 的 Jurkat 重组细胞和表达 B7H3 的

肿瘤细胞才能实现，在只有 Jurkat 重组细胞，没有 A498 细胞时（见图 6B），荧光素酶的表达非常低，只有在最高的几个抗体浓度点能检测到一些弱信号。

表 15 抗体结构顺序

抗体	第一多肽链	第二多肽链
118	VH_{CD3}（HRH3） -L1-VL_{CD3}-L2-VL_{B7H3}-L3-VH_{B7H3}-L4-Fc	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-Fc
127	VL_{B7H3}-L1-VH_{B7H3}- L2-VH_{CD3}（HRH3）- L3 -VL_{CD3}-L4-Fc	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-Fc
132	VL_{B7H3}-L1-VH_{B7H3}-L2 -VH_{CD3}（HRH3） -L3-VL_{CD3}-L4-Fc	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L5-Fc

4.2 B7H3 单价和双价双特异性抗体的比较

双价 CD3-B7H3 双特异性抗体较 B7H3 单价的双特异抗体，在靶点特异的 T 细胞激活明显增强，这与测试例 3 中，B7H3 双价比 B7H3 单价分子的体外肿瘤杀伤能力增强相一致。与此同时，非靶点特异的 T 细胞激活保持不变。因此，B7H3 双价分子（131）比 B7H3 单价分子（181）具有更强的药效（见图 7A），但因 T 细胞非特异激活而带来的副作用并没有增强（见图 7B）。

表 16 抗体结构

抗体	第一多肽链	第二多肽链
131	VL_{B7H3}-L1-VH_{B7H3}-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-Fc_C1	VL_{B7H3}-L5-VH_{B7H3}-L6-Fc_C2
181	VL_{B7H3}-L1-VH_{B7H3}-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-Fc_C1	Fc2

测试例 5、体外细胞因子分泌实验

效应细胞在双特异抗体的介导下重定向靶细胞，在杀伤靶细胞的同时，释放细胞因子。其中细胞因子分泌是通过 ELISA 的方法定量检测细胞培养上清中的细胞因子含量，包括 IL2、IFNγ、TNFα。

实验设计和所用抗体与测试例 4 所描述相同，在体外杀伤实验的终点收集细胞培养上清，至 96 孔板中（Corning#3795），放置-20℃保存备用。ELISA 实验时，取出冻存的培养上清，室温融化，3500rpm，离心 10mins，收集上清用于 ELISA 实验。ELISA 步骤详见试剂盒中的说明书 （Human IL-2 ELISA kit、Human IFN-γ ELISA Kit、Human TNF-α ELISA kit、欣博盛, Cat # EHC003.96、EHC102g.96, EHC103a.96）。

结果表明，测试双特异抗体在 PBMC 和 B7H3 阳性的靶细胞 A498 共存在时（参见图 8A-图 8C），均能有效诱导 PBMC 分泌 IL2、IFNγ 和 TNFα，其中以 MGD009 和 118 所诱导的细胞因子分泌水平最高，其次为 127 和 132，而阴性对照抗体 NC1 所诱导的细胞因子分泌不在检测灵敏度范围内。在 PBMC 和 B7H3 阴性细胞 CHOK1 共存在时（参见图 9A-图 9C），MGD009 在最高的三个浓度点能明显地诱导 IFNγ 和 TNFα 的释放，而待测的三个双特异抗体，118、127 和 132 则不能诱导 IFNγ 和 TNFα 的释放，预示着三个待测双特异抗体相比起 MGD009，在非靶点特

异的细胞因子分泌上具有更好的安全性。

测试例 6、人 PBMC 重建的小鼠 A498 模型的药效实验

本测试例利用人 PBMC 重建的 NOG 小鼠（北京维通利华实验动物有限公司）A498 模型（ATCC）来评价本发明测试 CD3-B7H3 双特异性抗体在小鼠体内的抗肿瘤疗效。

将 A498 细胞 5×10^6 个细胞/小鼠/100μl（含 50% matrigel）接种于 NOG 小鼠右肋部皮下，当荷瘤小鼠肿瘤体积达到 130-150mm^3 左右时将小鼠随机分组，每组 5-6 只，并将分组当天定义为该实验第 0 天。于第 0 天或第 1 天将新鲜抽提的 2 名志愿者的 PBMC 以 1:1 比例混合，以 5×10^6 个细胞/100μl 注射到 NOG 小鼠腹腔，并开始腹腔注射各抗体，每周 2 次，共给药 6 次，每周 2 次监测肿瘤体积、动物重量并记录数据。Vehicle 是以 PBS 缓冲液代替抗体给药的阴性对照组。

抗体 118 和 119 在较低的剂量下（图 10A）已经呈现出一定的抑瘤疗效，且呈剂量依赖效应。其中抗体 118 在实验终点时（第 20 天），0.01mpk 和 0.03mpk 剂量下的抑瘤率（TGI）分别为 22.17%和 60.39%。

抗体 113 在第 14 天时，已经显示出一定的抑瘤效果，0.6mpk 和 0.3mpk 剂量组（图 10B）抑瘤率分别达到 70.05%（$p<0.05$）和 60.78%（$p<0.05$），至第 20 天时，抑瘤效果继续增强且呈剂量依赖性，抑瘤率分别为大于 100%（$p<0.001$）和 77.92%（$p<0.05$）。

在 0.12mpk 和 0.36mpk 剂量条件下（图 10C），抗体 118 在第 12 天时，0.12mpk 和 0.36mpk 的剂量已经分别可以达到 39.18%和 57.44%（$p<0.001$），至第 21 天时的抑瘤率分别增至 81.72%（$p<0.01$）和大于 100%（$p<0.001$），其中 0.36mpk 剂量下，甚至有一只小鼠的肿瘤完全消退（1/6）。

在 0.36mpk 剂量条件下（图 10D），抗体 126 在第 21 天时抑瘤率达到 47.78%（$p<0.01$）。抗体 128 在第 19 天已经显示出显著抑瘤效果（TGI=56.37%），至 Day21 时，抑瘤率升至 69.28%（$p<0.001$）。抗体 127mpk，在第 12 天抑瘤率达到 76.20%（$p<0.001$），至第 21 天时，抑瘤效果继续增强，抑瘤率大于 100%（$p<0.001$），5 只动物中，有 3 只的肿瘤体积与分组时相比，发生了回缩，另外 2 只的肿瘤完全消退。

抗体 127 的抗肿瘤活性，在另一次实验中得到了重复（图 10E），第 14 天时的抑瘤率达到 90.6% （$p<0.001$），至第 17 天时抑瘤率增到 95.80%（$p<0.001$）。127 在较低剂量（0.12mpk）以及较低频率给药（每周 1 次，127-0.36mpk-qw）时仍旧有效，在第 17 天的抑瘤率分别达到 51.37%（$p<0.001$）和 96.20%（$p<0.001$）。

测试例 7、hCD3 KI 小鼠模型的药效实验

本实验在 Balb/c-hCD3 小鼠皮下接种 CT26-hB7H3 肿瘤细胞系（CT26 细胞来源于中科院细胞库，TCM37，经过表达 hB7H3，获得 CT26-hB7H3 细胞），来评价本发明 CD3-B7H3 双特异性抗体在小鼠体内对肿瘤生长的抑制作用。

雌性hCD3E Balb/c转基因小鼠，购自南大模式所（合格证编号201801374/5/6，许可证SCXK（苏）2015-0001）。

将CT26-hB7H3细胞8×10^5个细胞/小鼠/100μl接种于hCD3小鼠右肋部皮下。当荷瘤小鼠肿瘤体积达到约80-120mm^3左右时将小鼠随机分组，每组7只。将分组当天定义为该实验第0天，并开始腹腔注射各抗体，每周2次，共给药5次，每周2次监测肿瘤体积、动物重量并记录数据。Vehicle是以PBS缓冲液代替抗体给药的阴性对照组。

结果显示，抗体118在1mpk剂量下在初次给药后即显示出较强药效（图11A），第13天抑瘤率为38.34%（$p<0.05$）。

抗体132在3.6mpk剂量下具有抑制肿瘤生长的趋势（图11B），第13天抑瘤率达到26.35%。

测试例8、大鼠体内PK实验

本实验在SD大鼠尾静脉注射CD3-B7H3双特异性抗体，检测不同时间点大鼠血清中的抗体浓度，以此来评价CD3-B7H3双特异性抗体在SD大鼠体内的代谢。

大鼠尾静脉注射受试药物 3mg/kg，给药体积为 5mL/kg。于给药前及给药后5min、8h、1 d、2 d、4 d、7 d、10d、14 d、21d、28 d各时间点采血。采用ELISA方法检测血清中的抗体浓度，分别使用两种不同的ELISA方法，B7H3抗原（1μg/mL）或者CD3抗原（1μg/mL） 铺板，anti-human Fc-HRP（abcam, ab98624）作为二抗。采用Winnolin软件计算受试药物的药动学参数,所得主要药动学参数见表17。

抗体118、127和132在B7H3抗原结合区域的半衰期在4.9-8.1天，略长于MGD009，达到普通IgG抗体水平，CD3抗原结合区域的半衰期为3.2-5.6天。其中，抗体118在B7H3和CD3两个不同抗原结合区域的动力学参数相差不大，说明该分子在体内的完整性较好，半衰期分别为4.9和4.4天。抗体127在B7H3和CD3两个不同抗原结合区域的半衰期分别为4.9和3.2天，在暴露量和清除速率上相差较为明显，以CD3部分较差，由于CD3部分在该分子结构的内部，更可能由于CD3部分结合功能变弱而不是分子断裂造成。抗体132是在抗体127分子序列的基础上，在B7H3 scFv内部加入了一对二硫键，此改造大大提高了分子的半衰期（65-75%），在暴露量和清除速率上也有较大的改善。

表17 大鼠体内的主要药动学参数表

统计	118		127		132		MGD009
	B7H3包被	CD3包被	B7H3包被	CD3包被	B7H3包被	CD3包被	B7H3包被
$AUC_{0-\infty}$（μg/ml*h）	4797±603	3059±227	3328 ±171	437 ±37	5182±122	1634 ±654	2994±244
$t_{1/2}$（h）	117±16	106±11	118 ±6	76 ±5	196 ±5	134 ±13	94.7±11.1
$t_{1/2}$（d）	4.9±0.7	4.4±0.4	4.9 ±0.3	3.2 ±0.2	8.1±0.2	5.6 ±0.5	3.95±0.46

权利要求书：

1. 一种多特异性蛋白分子，其包含第一多肽链和第二多肽链，其中：

所述第一多肽链从氨基末端至羧基末端依次包含针对第一靶抗原的第一结合区、针对第二靶抗原的第二结合区和第一 Fc 区，

所述第二多肽链从氨基末端至羧基末端依次包含针对第三靶抗原的第三结合区和第二 Fc 区，

所述第二结合区和/或第三结合区不包含抗体的恒定区结构域，

所述第一多肽链和所述第二多肽链链内各区域由肽键和/或接头连接。

2. 根据权利要求 1 所述的多特异性蛋白分子，其中所述第一结合区、和/或所述第二结合区、和/或所述第三结合区是单链抗体。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的多特异性蛋白分子，其中所述第二靶抗原为 CD3，且所述第一靶抗原和第三靶抗原为相同或不同的肿瘤相关抗原；或

所述第一靶抗原为 CD3，且所述第二靶抗原和第三靶抗原为相同或不同的肿瘤相关抗原。

4. 根据权利要求 1 至 3 任一项所述的多特异性蛋白分子，其中所述肿瘤相关抗原选自 AFP、ALK、B7H3、BAGE 蛋白质、BCMA、BIRC5、BIRC7、β-连环蛋白、brc-ab1、BRCA1、BORIS、CA9、CA125、碳酸酐酶 IX、半胱天冬酶-8、CALR、CCR5、CD19、CD20、CD22、CD30、CD33、CD38、CD40、CD123、CD133、CD138、CDK4、CEA、Claudin 18.2、周期素-B1、CYP1B1、EGFR、EGFRvIII、ErbB2/Her2、ErbB3、ErbB4、ETV6-AML、EpCAM、EphA2、Fra-1、FOLR1、GAGE 蛋白、GD2、GD3、GloboH、磷脂酰肌醇蛋白聚糖-3、GM3、gp100、Her2、HLA/B-raf、HLA/k-ras、HLA/MAGE-A3、hTERT、IL13Rα2、LMP2、κ-Light、LeY、MAGE 蛋白、MART-1、间皮素、ML-IAP、MOv-γ、Muc1、Muc2、Muc3、Muc4、Muc5、CA-125、MUM1、NA17、NKG2D、NY-BR1、NY-BR62、NY-BR85、NY-ESO1、OX40、p15、p53、PAP、PAX3、PAX5、PCTA-1、PLAC1、PRLR、PRAME、PSMA、RAGE 蛋白质、Ras、RGS5、Rho、ROR1、SART-1、SART-3、STEAP1、STEAP2、TAG-72、TGF-β、TMPRSS2、汤-诺氏抗原、TRP-1、TRP-2、酪氨酸酶、尿溶蛋白-3 和 5T4。

5. 根据权利要求 1 至 4 任一项所述的多特异性蛋白分子，其中所述第一多肽链具有如下式 I 的结构：

V_a1-L1-V_b1-L2-V_c2-L2-V_d2-L4-Fc1 式 I，

所述第二多肽链具有如下式 II 的结构：

V_e3-L5-V_f3-L6-Fc2 式 II，

所述 V_a1、V_b1、V_c2、V_d2、V_e3 和 V_f3 为抗体的轻链可变区或重链可变区，且所述 V_a1 和 V_b1，所述 V_c2 和 V_d2，与所述 V_e3 和 V_f3 分别不同时为轻链可变区或不同时为重链可变区。

6. 根据权利要求 1 至 5 任一项所述的多特异性蛋白分子，所述第一多肽链具有如下所示的结构：

VH_{TAA}-L1-VL_{TAA}-L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-Fc1，

VH_{TAA}-L1-VL_{TAA}-L2-VL_{CD3}-L3-VH_{CD3}-L4-Fc1，

VL_{TAA}-L1-VH_{TAA}.L2-VH_{CD3}-L3-VL_{CD3}-L4-Fc1，

VL_{TAA}-L1-VH_{TAA}-L2-VL_{CD3}-L3-VH_{CD3}-L4-Fc1，

VH_{CD3}-L1-VL_{CD3}-L2-VH_{TAA}-L3-VL_{TAA}-L4-Fc1，

VH_{CD3}-L1-VL_{CD3}-L2-VL_{TAA}-L3-VH_{TAA}-L4-Fc1，

VL_{CD3}-L1-VH_{CD3}-L2-VH_{TAA}-L3-VL_{TAA}-L4-Fc1 或

VL_{CD3}-L1-VH_{CD3}-L2-VL_{TAA}-L3-VH_{TAA}-L4-Fc1；

且所述第二多肽链具有如下所示的结构：

VL_{TAA}-L5-VH_{TAA}-L6-F_C2 或 VH_{TAA}-L5-VL_{TAA}-L6-F_C2。

7. 根据权利要求 1 至 6 任一项所述的多特异性蛋白分子，其中所述第一 Fc 区和所述第二 Fc 区是相同的 Fc 或不同的 Fc；

优选地，所述第一 Fc 区为 knob-Fc，所述第二 Fc 区为 hole-Fc；或

所述第一 Fc 区为 hole-Fc，所述第二 Fc 区为 knob-Fc。

8. 根据权利要求 1 至 7 任一项所述的多特异性蛋白分子，其中所述第一 Fc 区的羧基端连接 His 标签或第二 Fc 区的羧基端连接 His 标签。

9. 根据权利要求 1 至 8 任一项所述的多特异性蛋白分子，其中针对 CD3 的抗原结合区包含抗体轻链可变区和重链可变区，其中所述轻链可变区包含分别如 SEQ ID NO：48、49 和 50 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，和所述重链可变区为选自以下 i）至 v）任一项的重链可变区：

i) 包含分别如 SEQ ID NO：37、38 和 39 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区；

ii) 包含分别如 SEQ ID NO：37、40 和 41 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区；

iii) 包含分别如 SEQ ID NO：37、40 和 42 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区；

iv) 包含分别如 SEQ ID NO：37、40 和 43 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3

的重链可变区；或

v) 包含分别如 SEQ ID NO：37、47 和 45 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的重链可变区。

10. 根据权利要求 9 所述的多特异性蛋白分子，其中针对 CD3 的抗原结合区包含如 SEQ ID NO：36 所示的轻链可变区，和/或选自如 SEQ ID NO：29、30、31、32 和 35 中任一项所示的重链可变区。

11. 根据权利要求 10 所述的多特异性蛋白分子，其中针对 CD3 的抗原结合区包含如 SEQ ID NO：55、56、57、58、61、62、63、64、65 或 68 所示的单链抗体。

12. 根据权利要求 1 至 11 任一项所述的多特异性蛋白分子，其中所述肿瘤相关抗原为 B7H3，针对 B7H3 的抗原结合区包含抗体轻链可变区和重链可变区，其中：

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

13. 根据权利要求 12 所述的多特异性蛋白分子，其中针对 B7H3 的抗原结合区包含：

如 SEQ ID NO：8 所示的轻链可变区和/或如 SEQ ID NO：7 所示的重链可变区；

或如 SEQ ID NO：16 所示的轻链可变区和/或如 SEQ ID NO：15 所示的重链可变区。

14. 根据权利要求 13 所述的多特异性蛋白分子，其中针对 B7H3 的抗原结合区包含如 SEQ ID NO：51、52、53 或 54 所示的单链抗体。

15. 根据权利要求 1 至 14 任一项所述的多特异性蛋白分子，包含第一多肽链和第二多肽链，所述第一多肽链选自氨基酸序列如 SEQ ID NO：72、73、74、75、76、77、78、79、80、83、84、85、86 或 87 所示的多肽，和/或所述第二多肽链选自氨基酸序列如 SEQ ID NO：71、88 或 70 所示的多肽。

16. 一种多特异性蛋白分子，包含第一多肽链和第二多肽链，所述第二多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：71、88 或 70 所示，和：

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：72 所示；

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：73 所示；

所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：74 所示；
所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：75 所示；
所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：76 所示；
所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：77 所示；
所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：78 所示；
所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：79 所示；
所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：80 所示；
所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：83 所示；
所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：84 所示；
所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：85 所示；
所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：86 所示；或者
所述第一多肽链的氨基酸序列如 SEQ ID NO：87 所示。

17. 一种药物组合物，其含有治疗有效量的根据权利要求 1 至 16 任一项所述的多特异性蛋白分子，以及一种或多种药学上可接受的载体、稀释剂、缓冲剂或赋形剂。

18. 一种分离的核酸分子，其编码权利要求 1 至 16 任一项所述的多特异性蛋白分子。

19. 一种重组载体，其包含权利要求 18 所述的分离的核酸分子。

20. 一种用如权利要求 19 所述的重组载体转化的宿主细胞，所述宿主细胞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或昆虫细胞。

21. 用于生产如权利要求 1 至 16 任一项所述的多特异性蛋白分子的方法，所述方法包括将权利要求 20 所述的宿主细胞在培养基中进行培养以形成并积累权利要求 1 至 16 任一项所述的多特异性蛋白分子，以及从培养物回收所述多特异性蛋白分子的步骤。

22. 作为药物的如权利要求 1 至 16 任一项所述的多特异性蛋白分子或权利要求 17 所述的药物组合物，或权利要求 18 所述的分离的核酸分子；优选所述药物为激活 T 细胞的药物，更优选所述药物为治疗癌症、自身免疫性疾病或炎性疾病的药物。

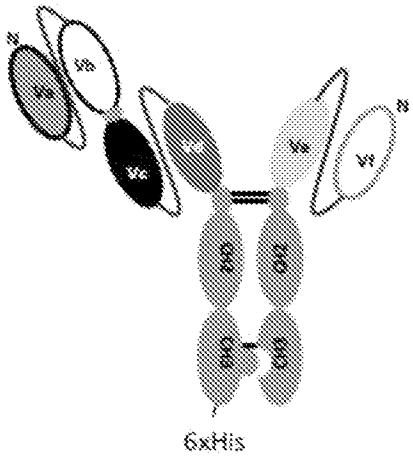

6xHis

图 1A

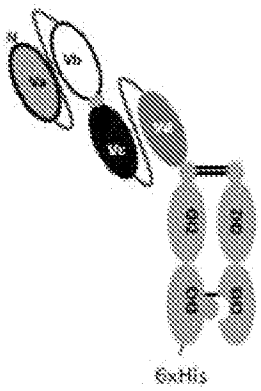

6xHis

图 1B

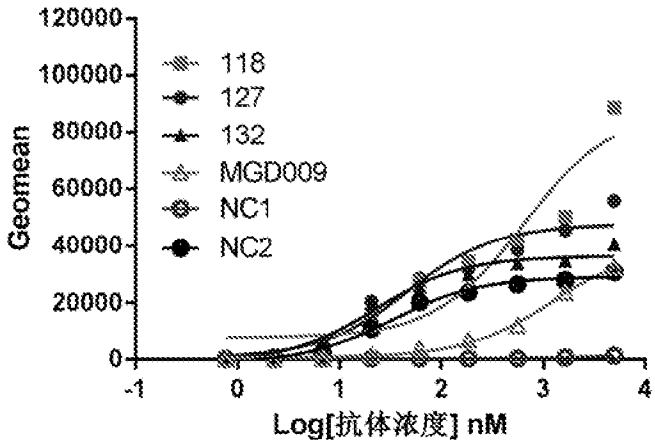

120000
100000
80000
60000
40000
20000
0
Geomean
118
127
132
MGD009
NC1
NC2
-1
0
1
2
3
4
Log[抗体浓度] nM

图 2A

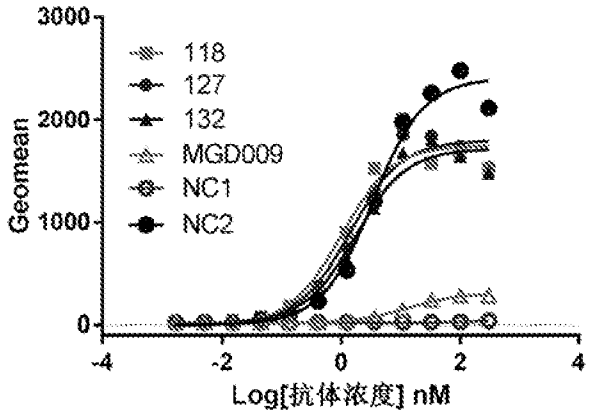

3000
2000
1000
0
Geomean
118
127
132
MGD009
NC1
NC2
-4
-2
0
2
4
Log[抗体浓度] nM

图 2B

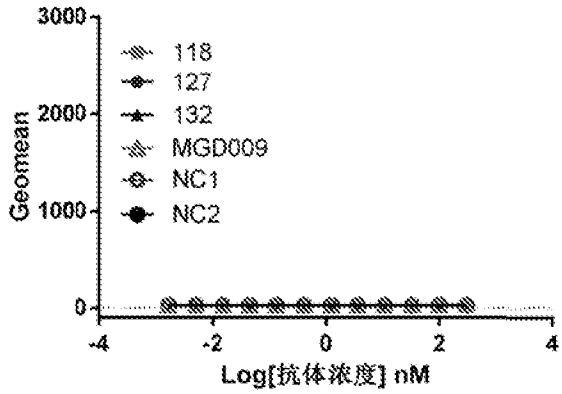

3000
2000
1000
0
Geomean
118
127
132
MGD009
NC1
NC2
-4
-2
0
2
4
Log[抗体浓度] nM

图 2C

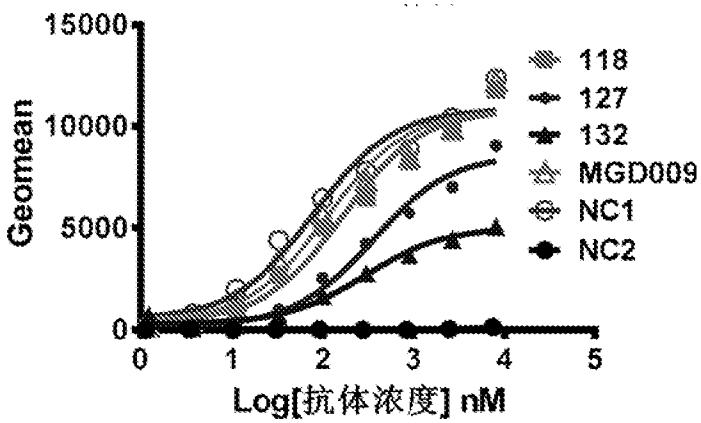

15000
10000
5000
0
Geomean
118
127
132
MGD009
NC1
NC2
0
1
2
3
4
5
Log[抗体浓度] nM

图 2D

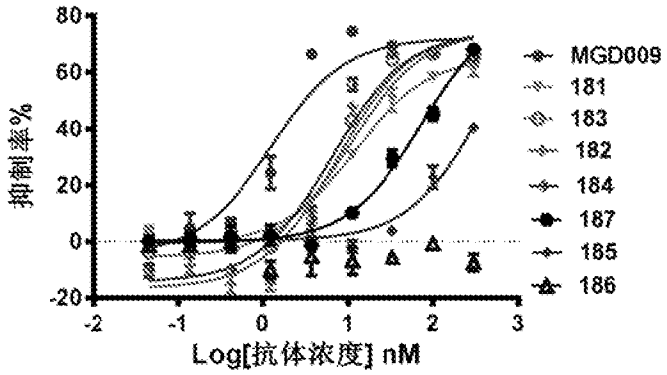


图 3A

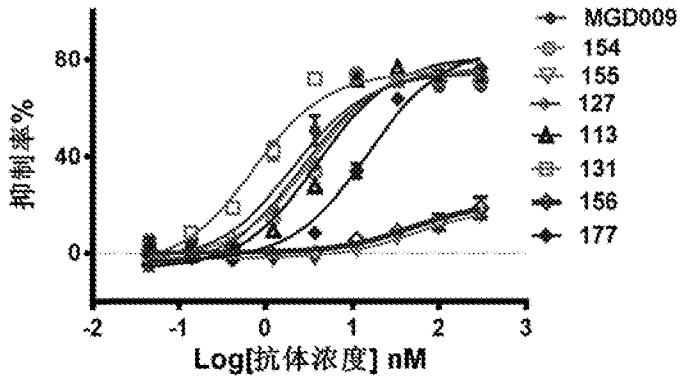


图 3B

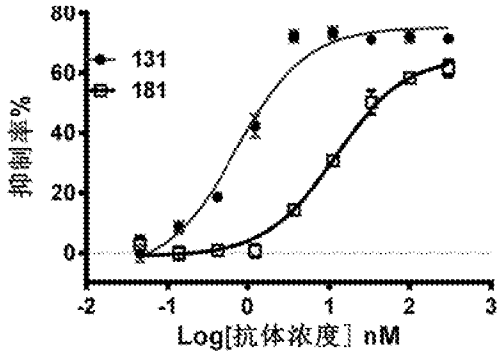


图 4A

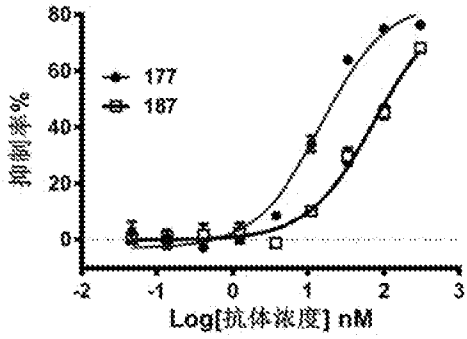


图 4B

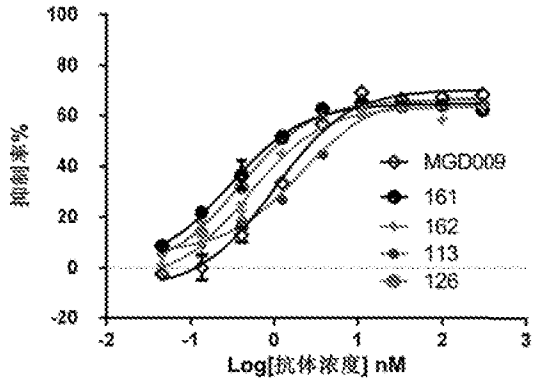

100
80
60
40
20
0
-20
-2
-1
0
1
2
3
抑制率%
Log[抗体浓度] nM
MGD009
161
162
113
126

图 5A

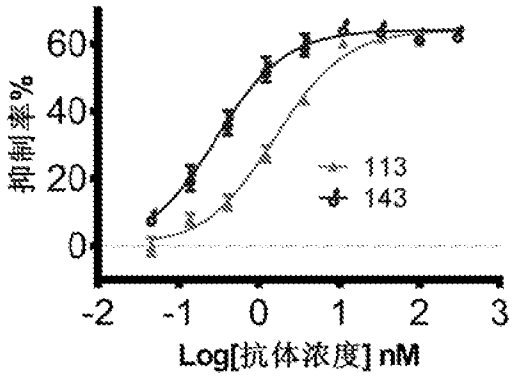

60
40
20
0
-2
-1
0
1
2
3
抑制率%
Log[抗体浓度] nM
113
143

图 5B

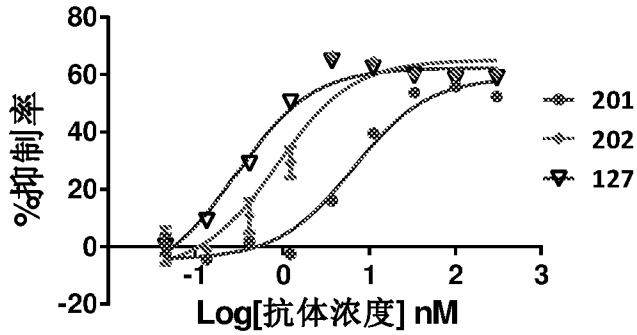

80
60
40
20
0
-20
-1
0
1
2
3
%抑制率
Log[抗体浓度] nM
201
202
127

图 5C

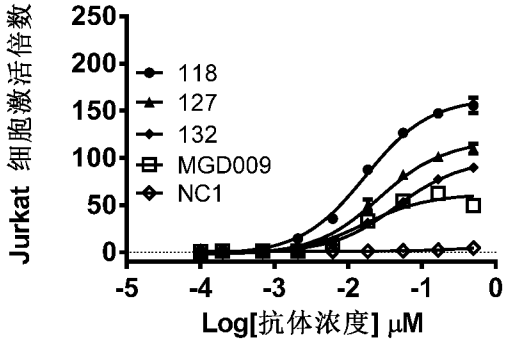


图 6A

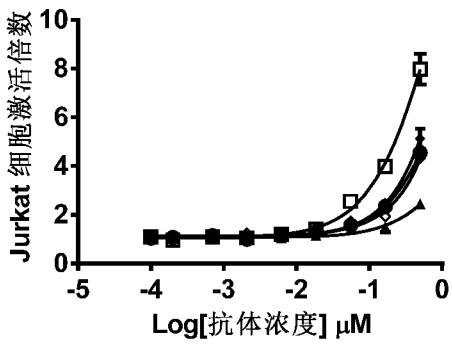


图 6B

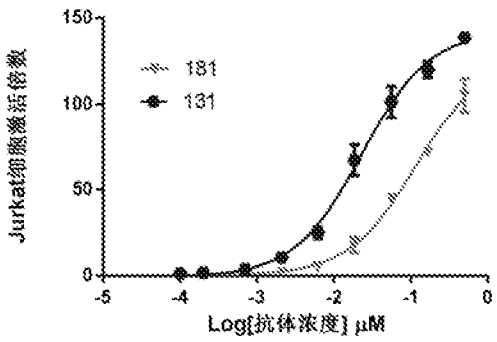


图 7A

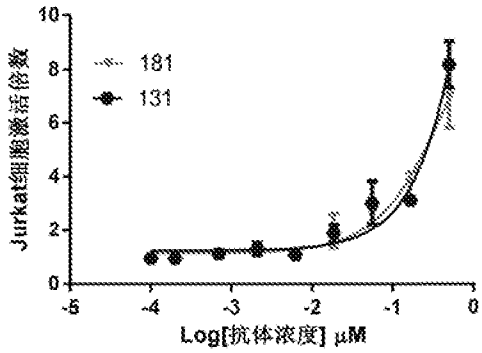


图 7B

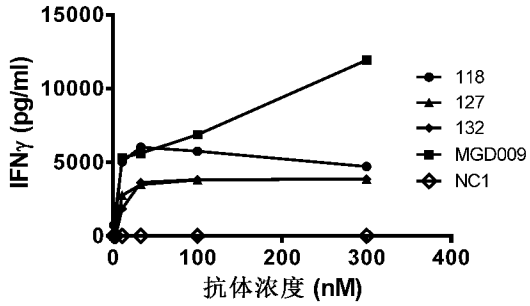


图 8A

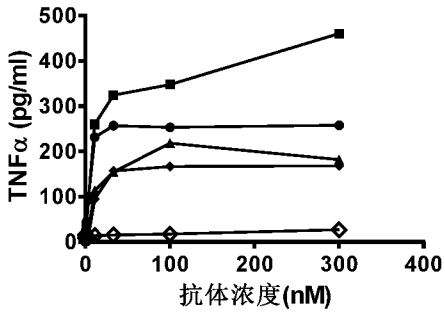


图 8B

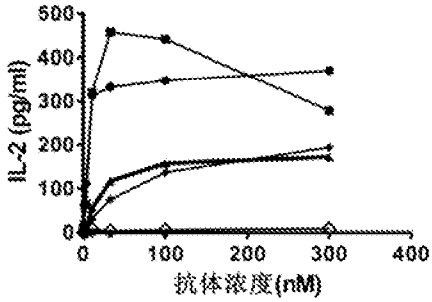


图 8C

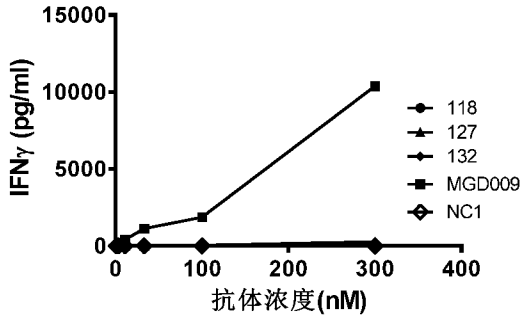


图 9A

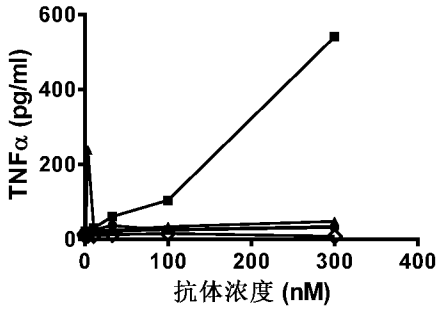


图 9B

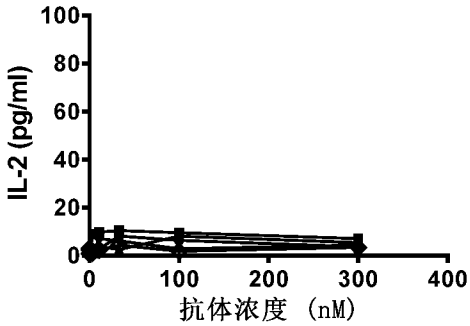


图 9C

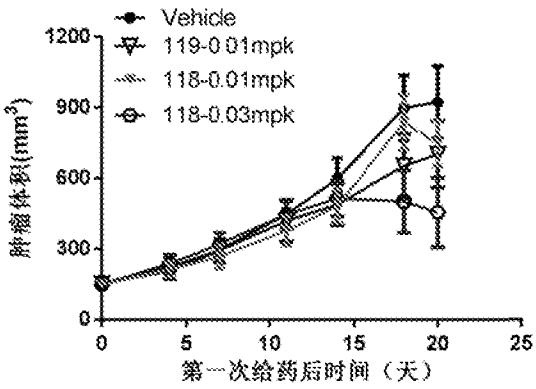


图 10A

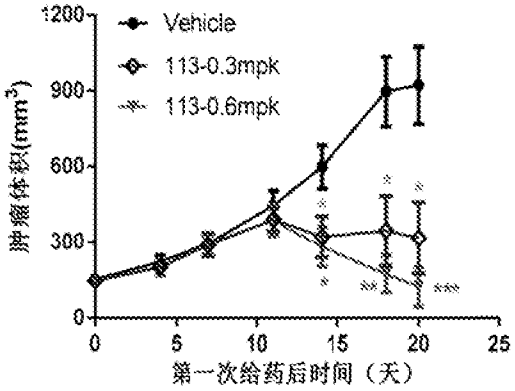


图 10B

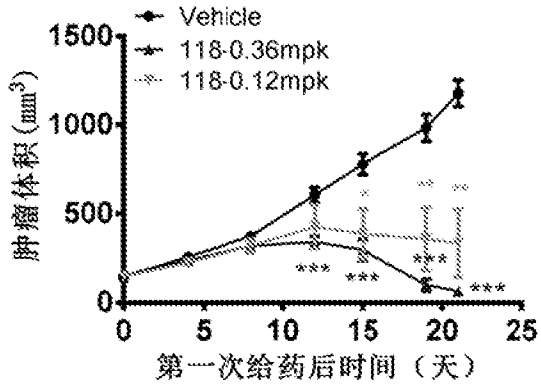


图 10C

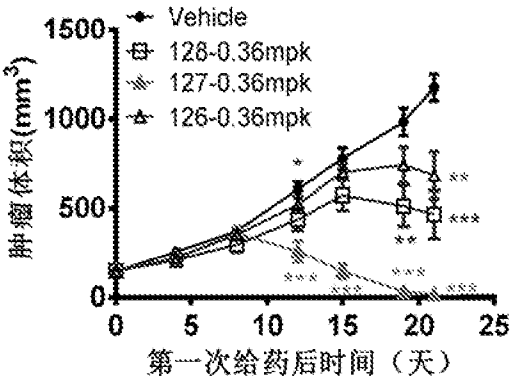


图 10D

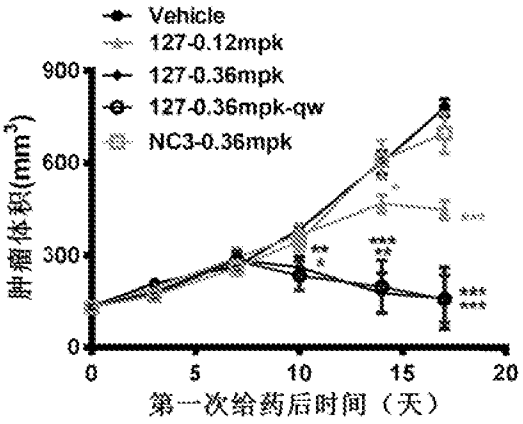


图 10E

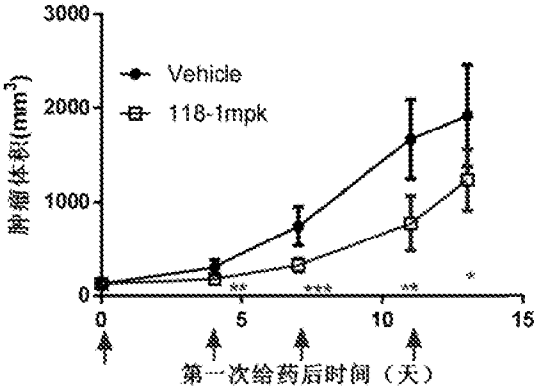

3000
2000
1000
0
肿瘤体积(mm3)
Vehicle
118-1mpk
**
***
**
*
0
5
10
15
第一次给药后时间（天）

图 11A

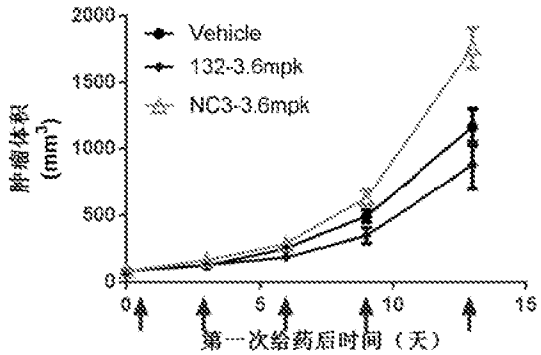

2000
1500
1000
500
0
肿瘤体积
(mm3)
Vehicle
132-3.6mpk
NC3-3.6mpk
0
5
10
15
第一次给药后时间（天）

图 11B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2019/123555

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61K 39/395(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/30(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, CNTXT, SIPOABS, DWPI, WOTXT, USTXT, EPTXT, CNKI, 万方数据库, WANFANG, Google, STN, EBI, NCBI: CD3, B7H3, 多特异性抗体, 双特异性抗体, 单链抗体, scFv, 异二聚体, multispecific, bispecific, Fc, heteromultimer, SEQ ID NOs: 7-87

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 103429737 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 04 December 2013 (2013-12-04) description, embodiments 1 and 2, figure 17, and SEQ ID NOs: 77 and 78	1-11, 17-22
Y	CN 103429737 A (CHUGAI PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 04 December 2013 (2013-12-04) description, embodiments 1 and 2, figure 17, and SEQ ID NOs: 77 and 78	12-22
Y	CN 107921130 A (MACROGENICS INC.) 17 April 2018 (2018-04-17) description, paragraphs 296-391	12-22
Y	WO 2018177393 A1 (JIANGSU HENGRUI MEDICINE CO., LTD. et al.) 04 October 2018 (2018-10-04) description, embodiment 3	12-22
X	CN 105377889 A (XENCOR INC.) 02 March 2016 (2016-03-02) description, paragraphs 16-18 and 217, and figure 1	1-11, 17-22
Y	CN 105377889 A (XENCOR INC.) 02 March 2016 (2016-03-02) description, paragraphs 16-18 and 217, and figure 1	12-22

☑ Further documents are listed in the continuation of Box C. ☑ See patent family annex.

* Special categories of cited documents:
"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance
"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date
"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)
"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means
"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed
"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention
"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone
"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art
"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search	Date of mailing of the international search report
17 February 2020	**06 March 2020**

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

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 104640562 A (ZYMEWORKS INC.) 20 May 2015 (2015-05-20) entire document	1-22
A	CN 108218993 A (LI, Huashun) 29 June 2018 (2018-06-29) entire document	1-22
A	CN 101802010 A (FRIEDRICH ALEXANDER UNIVERSITY) 11 August 2010 (2010-08-11) entire document	1-22
A	CN 102844442 A (ONCOMED PHARMACEUTICALS, INC.) 26 December 2012 (2012-12-26) entire document	1-22
A	CN 1603345 A (INSTITUTE OF BASIC MEDICAL SCIENCES OF THE ACADEMY OF MILITARY MEDICAL SCIENCES OF THE PEOPLE'S LIBERATION ARMY) 06 April 2005 (2005-04-06) entire document	1-22
A	解志刚等 (XIE, Zhigang et al.). "基因工程双特异性抗体构建模式研究进展 (Construction Formats of Engineered Bispecific Antibodies)" *军事医学科学院院刊 (Bulletin of the Academy of Military Medical Sciences),* Vol. vol. 28, No. 4, 31 August 2004 (2004-08-31), pp. 375-378	1-22

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/123555

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	103429737	A	04 December 2013	KR	20190028811	A	19 March 2019
				KR	20130130765	A	02 December 2013
				EP	2647707	A1	09 October 2013
				RU	2013129694	A	10 January 2015
				AU	2011337697	B2	27 October 2016
				MX	2013006100	A	15 July 2013
				AU	2017200565	A1	23 February 2017
				BR	112013013311	A2	19 September 2017
				JP	2018093879	A	21 June 2018
				TR	201815863	T4	21 November 2018
				PT	2647707	T	15 November 2018
				AU	2017200999	B2	18 April 2019
				JP	6278598	B2	14 February 2018
				RU	2018126811	A3	07 May 2019
				EP	2647707	A4	30 April 2014
				KR	101960109	B1	20 March 2019
				SG	10201506840 Q	A	29 October 2015
				CN	109160951	A	08 January 2019
				HR	P20181615	T1	14 December 2018
				TW	I638833	B	21 October 2018
				TW	201940517	A	16 October 2019
				JP	WO2012073985	A1	19 May 2014
				AR	084053	A1	17 April 2013
				RU	2663123	C2	01 August 2018
				SI	2647707	T1	31 December 2018
				AU	2017200999	A1	09 March 2017
				DK	2647707	T3	19 November 2018
				EP	2647707	B1	12 September 2018
				LT	2647707	T	12 November 2018
				EP	3434767	A1	30 January 2019
				ES	2693232	T3	10 December 2018
				AU	2011337697	A1	04 July 2013
				MX	349057	B	07 July 2017
				TW	201249872	A	16 December 2012
				CA	2819530	A1	07 June 2012
				TW	201716443	A	16 May 2017
				RU	2018126811	A	13 March 2019
				PL	2647707	T3	28 February 2019
				WO	2012073985	A1	07 June 2012
				SG	190726	A1	31 July 2013
				US	2014112914	A1	24 April 2014
CN	107921130	A	17 April 2018	JP	2018523686	A	23 August 2018
				CA	2995709	A1	23 February 2017
				KR	20180038045	A	13 April 2018
				PE	10662018	A1	04 July 2018
				IL	257562	D0	30 April 2018
				AU	2016307955	A1	08 March 2018
				CO	2018001485	A2	10 July 2018
				PH	12018500363	A1	10 September 2018
				CR	05.01.2018	A	12 June 2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/123555

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
				PE	20181066	A1	04 July 2018
				WO	2017030926	A1	23 February 2017
				TW	201718652	A	01 June 2017
				EP	3337507	A4	24 April 2019
				US	2019002563	A1	03 January 2019
				CL	2018000422	A1	10 August 2018
				MX	2018001954	A	09 November 2018
				ZA	201800955	B	28 November 2018
				EA	201890443	A1	28 September 2018
				EP	3337507	A1	27 June 2018
WO	2018177393	A1	04 October 2018	CN	109937212	A	25 June 2019
				CA	3056474	A1	04 October 2018
				KR	20190134614	A	04 December 2019
				AU	2018243123	A1	26 September 2019
				TW	201837056	A	16 October 2018
CN	105377889	A	02 March 2016	EP	2951203	A2	09 December 2015
				WO	2014145806	A3	26 February 2015
				CA	2902739	A1	18 September 2014
				WO	2014145806	A2	18 September 2014
				HU	E044689	T2	28 November 2019
				JP	2016514463	A	23 May 2016
				AU	2014232501	B2	07 March 2019
				EP	2951203	B1	22 May 2019
				KR	20150129685	A	20 November 2015
				JP	6594855	B2	23 October 2019
				EP	3587448	A1	01 January 2020
				AU	2019203977	A1	27 June 2019
				IL	241431	D0	30 November 2015
				LT	2951203	T	10 September 2019
				DK	2951203	T3	12 August 2019
				AU	2014232501	A1	17 September 2015
				HR	P20191470	T1	10 January 2020
CN	104640562	A	20 May 2015	AU	2013289883	A1	19 February 2015
				RU	2650868	C2	17 April 2018
				US	2014154253	A1	05 June 2014
				EP	2872170	A2	20 May 2015
				AU	2013289883	B2	01 November 2018
				JP	2015528003	A	24 September 2015
				WO	2014012085	A3	27 March 2014
				WO	2014012085	A2	16 January 2014
				CA	2878843	A1	16 January 2014
				US	2019248897	A1	15 August 2019
				RU	2015102193	A	27 August 2016
				HK	1207575	A1	05 February 2016
				BR	112015000798	A2	27 June 2017
				KR	20150036606	A	07 April 2015
				EP	2872170	A4	22 June 2016
				WO	2014012085	A9	19 March 2015
CN	108218993	A	29 June 2018	None			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2019/123555

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	101802010	A	11 August 2010	EP	2185595	B1	10 December 2014
				AU	2008274494	B2	30 January 2014
				CN	101802010	B	13 November 2013
				US	2010291112	A1	18 November 2010
				EP	2014680	A1	14 January 2009
				EP	2185595	A1	19 May 2010
				AU	2008274494	A1	15 January 2009
				ES	2532381	T3	26 March 2015
				CA	2694721	A1	15 January 2009
				WO	2009007124	A1	15 January 2009
CN	102844442	A	26 December 2012	US	8551715	B2	08 October 2013
				US	8945878	B2	03 February 2015
				AU	2011215685	A1	30 August 2012
				SG	10201503736 X	A	29 June 2015
				KR	20120117931	A	24 October 2012
				US	9023621	B2	05 May 2015
				IL	221349	D0	31 October 2012
				US	9873726	B2	23 January 2018
				SG	183196	A1	27 September 2012
				NZ	601743	A	28 November 2014
				EP	2534257	B1	27 September 2017
				AU	2011215685	B2	20 August 2015
				US	2014005076	A1	02 January 2014
				MX	2012009175	A	17 December 2012
				US	2015315565	A1	05 November 2015
				JP	2013519379	A	30 May 2013
				CA	2789446	A1	18 August 2011
				JP	6034696	B2	30 November 2016
				US	2014005077	A1	02 January 2014
				WO	2011100566	A2	18 August 2011
				EP	2534257	A4	20 November 2013
				CN	102844442	B	07 September 2016
				WO	2011100566	A3	06 October 2011
				JP	2017014220	A	19 January 2017
				EP	2534257	A2	19 December 2012
				US	2011287979	A1	24 November 2011
				US	9422546	B2	23 August 2016
				US	2017002054	A1	05 January 2017
CN	1603345	A	06 April 2005	CN	1326881	C	18 July 2007

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/123555

A. 主题的分类

A61K 39/395(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C07K 16/30(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,CNTXT,SIPOABS,DWPI,WOTXT,USTXT,EPTXT,CNKI,万方数据库,Google，STN，EBI，NCBI:CD3，B7H3，多特异性抗体，双特异性抗体，单链抗体，scFv，异二聚体，multispecific，bispecific，Fc，heteromultimer，SEQ ID NOs:7-87

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 103429737 A (中外制药株式会社) 2013年 12月 4日 (2013-12-04) 说明书实施例1-2、图17、SEQ ID NOs:77-78	1-11，17-22
Y	CN 103429737 A (中外制药株式会社) 2013年 12月 4日 (2013-12-04) 说明书实施例1-2、图17、SEQ ID NOs:77-78	12-22
Y	CN 107921130 A (宏观基因有限公司) 2018年 4月 17日 (2018-04-17) 说明书第296-391段	12-22
Y	WO 2018177393 A1 (江苏恒瑞医药股份有限公司等) 2018年 10月 4日 (2018-10-04) 说明书实施例3	12-22
X	CN 105377889 A (XENCOR股份有限公司) 2016年 3月 2日 (2016-03-02) 说明书第16-18、217段，图1	1-11，17-22
Y	CN 105377889 A (XENCOR股份有限公司) 2016年 3月 2日 (2016-03-02) 说明书第16-18、217段，图1	12-22
A	CN 104640562 A (酵活有限公司) 2015年 5月 20日 (2015-05-20) 全文	1-22

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 引用文件的具体类型：

“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件

“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利

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

“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件

“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件

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

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

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

“&” 同族专利的文件

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2020年 2月 17日	2020年 3月 6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 武雪梅 电话号码 86-(10)-53961961

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2019/123555

C. 相关文件

类 型*	引用文件，必要时，指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 108218993 A (李华顺) 2018年 6月 29日 (2018 - 06 - 29) 全文	1-22
A	CN 101802010 A (费里德瑞奇亚历山大大学) 2010年 8月 11日 (2010 - 08 - 11) 全文	1-22
A	CN 102844442 A (昂考梅德药品有限公司) 2012年 12月 26日 (2012 - 12 - 26) 全文	1-22
A	CN 1603345 A (中国人民解放军军事医学科学院基础医学研究所) 2005年 4月 6日 (2005 - 04 - 06) 全文	1-22
A	解志刚等. "基因工程双特异性抗体构建模式研究进展" 军事医学科学院院刊, 第28卷, 第4期, 2004年 8月 31日 (2004 - 08 - 31), 第375-378页	1-22

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/123555

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	103429737	A	2013年 12月 4日	KR	20190028811	A	2019年 3月 19日
				KR	20130130765	A	2013年 12月 2日
				EP	2647707	A1	2013年 10月 9日
				RU	2013129694	A	2015年 1月 10日
				AU	2011337697	B2	2016年 10月 27日
				MX	2013006100	A	2013年 7月 15日
				AU	2017200565	A1	2017年 2月 23日
				BR	112013013311	A2	2017年 9月 19日
				JP	2018093879	A	2018年 6月 21日
				TR	201815863	T4	2018年 11月 21日
				PT	2647707	T	2018年 11月 15日
				AU	2017200999	B2	2019年 4月 18日
				JP	6278598	B2	2018年 2月 14日
				RU	2018126811	A3	2019年 5月 7日
				EP	2647707	A4	2014年 4月 30日
				KR	101960109	B1	2019年 3月 20日
				SG	102015068400	A	2015年 10月 29日
				CN	109160951	A	2019年 1月 8日
				HR	P20181615	T1	2018年 12月 14日
				TW	I638833	B	2018年 10月 21日
				TW	201940517	A	2019年 10月 16日
				JP	WO2012073985	A1	2014年 5月 19日
				AR	084053	A1	2013年 4月 17日
				RU	2663123	C2	2018年 8月 1日
				SI	2647707	T1	2018年 12月 31日
				AU	2017200999	A1	2017年 3月 9日
				DK	2647707	T3	2018年 11月 19日
				EP	2647707	B1	2018年 9月 12日
				LT	2647707	T	2018年 11月 12日
				EP	3434767	A1	2019年 1月 30日
				ES	2693232	T3	2018年 12月 10日
				AU	2011337697	A1	2013年 7月 4日
				MX	349057	B	2017年 7月 7日
				TW	201249872	A	2012年 12月 16日
				CA	2819530	A1	2012年 6月 7日
				TW	201716443	A	2017年 5月 16日
				RU	2018126811	A	2019年 3月 13日
				PL	2647707	T3	2019年 2月 28日
				WO	2012073985	A1	2012年 6月 7日
				SG	190726	A1	2013年 7月 31日
				US	2014112914	A1	2014年 4月 24日
CN	107921130	A	2018年 4月 17日	JP	2018523686	A	2018年 8月 23日
				CA	2995709	A1	2017年 2月 23日
				KR	20180038045	A	2018年 4月 13日
				PE	10662018	A1	2018年 7月 4日
				IL	257562	D0	2018年 4月 30日
				AU	2016307955	A1	2018年 3月 8日
				CO	2018001485	A2	2018年 7月 10日
				PH	12018500363	A1	2018年 9月 10日
				CR	20180105	A	2018年 6月 12日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/123555

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)
				PE	20181066	A1	2018年 7月 4日
				WO	2017030926	A1	2017年 2月 23日
				TW	201718652	A	2017年 6月 1日
				EP	3337507	A4	2019年 4月 24日
				US	2019002563	A1	2019年 1月 3日
				CL	2018000422	A1	2018年 8月 10日
				MX	2018001954	A	2018年 11月 9日
				ZA	201800955	B	2018年 11月 28日
				EA	201890443	A1	2018年 9月 28日
				EP	3337507	A1	2018年 6月 27日
WO	2018177393	A1	2018年 10月 4日	CN	109937212	A	2019年 6月 25日
				CA	3056474	A1	2018年 10月 4日
				KR	20190134614	A	2019年 12月 4日
				AU	2018243123	A1	2019年 9月 26日
				TW	201837056	A	2018年 10月 16日
CN	105377889	A	2016年 3月 2日	EP	2951203	A2	2015年 12月 9日
				WO	2014145806	A3	2015年 2月 26日
				CA	2902739	A1	2014年 9月 18日
				WO	2014145806	A2	2014年 9月 18日
				HU	E044689	T2	2019年 11月 28日
				JP	2016514463	A	2016年 5月 23日
				AU	2014232501	B2	2019年 3月 7日
				EP	2951203	B1	2019年 5月 22日
				KR	20150129685	A	2015年 11月 20日
				JP	6594855	B2	2019年 10月 23日
				EP	3587448	A1	2020年 1月 1日
				AU	2019203977	A1	2019年 6月 27日
				IL	241431	D0	2015年 11月 30日
				LT	2951203	T	2019年 9月 10日
				DK	2951203	T3	2019年 8月 12日
				AU	2014232501	A1	2015年 9月 17日
				HR	P20191470	T1	2020年 1月 10日
CN	104640562	A	2015年 5月 20日	AU	2013289883	A1	2015年 2月 19日
				RU	2650868	C2	2018年 4月 17日
				US	2014154253	A1	2014年 6月 5日
				EP	2872170	A2	2015年 5月 20日
				AU	2013289883	B2	2018年 11月 1日
				JP	2015528003	A	2015年 9月 24日
				WO	2014012085	A3	2014年 3月 27日
				WO	2014012085	A2	2014年 1月 16日
				CA	2878843	A1	2014年 1月 16日
				US	2019248897	A1	2019年 8月 15日
				RU	2015102193	A	2016年 8月 27日
				HK	1207575	A1	2016年 2月 5日
				BR	112015000798	A2	2017年 6月 27日
				KR	20150036606	A	2015年 4月 7日
				EP	2872170	A4	2016年 6月 22日
				WO	2014012085	A9	2015年 3月 19日
CN	108218993	A	2018年 6月 29日	无			

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2019/123555

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	101802010	A	2010年 8月 11日	EP	2185595	B1	2014年 12月 10日
				AU	2008274494	B2	2014年 1月 30日
				CN	101802010	B	2013年 11月 13日
				US	2010291112	A1	2010年 11月 18日
				EP	2014680	A1	2009年 1月 14日
				EP	2185595	A1	2010年 5月 19日
				AU	2008274494	A1	2009年 1月 15日
				ES	2532381	T3	2015年 3月 26日
				CA	2694721	A1	2009年 1月 15日
				WO	2009007124	A1	2009年 1月 15日
CN	102844442	A	2012年 12月 26日	US	8551715	B2	2013年 10月 8日
				US	8945878	B2	2015年 2月 3日
				AU	2011215685	A1	2012年 8月 30日
				SG	10201503736X	A	2015年 6月 29日
				KR	20120117931	A	2012年 10月 24日
				US	9023621	B2	2015年 5月 5日
				IL	221349	D0	2012年 10月 31日
				US	9873726	B2	2018年 1月 23日
				SG	183196	A1	2012年 9月 27日
				NZ	601743	A	2014年 11月 28日
				EP	2534257	B1	2017年 9月 27日
				AU	2011215685	B2	2015年 8月 20日
				US	2014005076	A1	2014年 1月 2日
				MX	2012009175	A	2012年 12月 17日
				US	2015315565	A1	2015年 11月 5日
				JP	2013519379	A	2013年 5月 30日
				CA	2789446	A1	2011年 8月 18日
				JP	6034696	B2	2016年 11月 30日
				US	2014005077	A1	2014年 1月 2日
				WO	2011100566	A2	2011年 8月 18日
				EP	2534257	A4	2013年 11月 20日
				CN	102844442	B	2016年 9月 7日
				WO	2011100566	A3	2011年 10月 6日
				JP	2017014220	A	2017年 1月 19日
				EP	2534257	A2	2012年 12月 19日
				US	2011287979	A1	2011年 11月 24日
				US	9422546	B2	2016年 8月 23日
				US	2017002054	A1	2017年 1月 5日
CN	1603345	A	2005年 4月 6日	CN	1326881	C	2007年 7月 18日