

一组 B7H3 单克隆抗体及其医药用途

相关申请的交叉引用

本申请要求于 2021 年 06 月 09 日提交中国专利局的申请号为
5 202110639996.0、名称为“一组 B7H3 单克隆抗体及其医药用途”的中国专利
申请的优先权，并将其全部内容通过引用结合在本申请中。

技术领域

本发明属于肿瘤抗体治疗以及分子免疫学治疗领域，涉及 B7H3 抗体及其用途。具体地，本发明涉及到多种 B7H3 单克隆抗体。

10 背景技术

B7H3 也被称为 CD276，是一种 I 型跨膜蛋白（Chapoval A. I., et al., (2001), Nat. Immunol. 2:269）。在小鼠中，B7H3 由 9 号染色体编码；而在人类中，由 15 号染色体编码。B7H3 与其它 B7 家族配体具有 20–27% 的氨基酸同源性（Sun M., et al., (2002), J. Immunol. 168:6294; Loos M., (2010),
15 Clin. Dev. Immunol. 2010:683875）。在蛋白质组成、结构方面，鼠类的 B7H3 仅具 2 个 IgB7H3 类型（由细胞外的一对 IgV 和 IgC 组成）；而人类的 B7H3 具 4 个 IgB7H3 类型，几乎是完全相同的 IgV-IgC 串联性重复（Sun M., et al., (2002), J. Immunol. 168:6294; Steinberger P., et al., (2004), J. Immunol. 172:2352）。虽然 B7H3 的 mRNA 存在于一些正常组织中，如肝脏、小肠、
20 胰腺、睾丸、心脏和结肠等组织，B7H3 蛋白在正常组织中相对少见（Greenwald R. J., et al., (2005), Annu. Rev. Immunol. 23:515-48）。B7H3 mRNA 和蛋白质之间的这种差异性也许反映了转录后紧密调控机制的存在（Hofmeyer K. A., et al., (2008), Proc. Natl. Acad. Sci. 105:10277; Calabro L., et al., (2011), J. Cell Physiol. 226:2595）。总体上，B7H3 仅存在于一些非免疫性成纤维细胞、内皮细胞和成骨细胞，以及一些免疫细胞，如 B 细胞，T
25

细胞，单核细胞，树突状细胞或 NK 细胞；B7H3 的表达可由粒细胞-巨噬细胞的 CSF 或脂多糖刺激诱导产生 (Suh W. K., et al., (2003), Nat. Immunol. 4:899; Chapoval A. I., et al., (2001), Nat. Immunol. 2: 269; Greenwald R. J. et al., (2005), Annu. Rev. Immunol. 23:515)。

- 5 B7H3 属于重要的免疫检查点蛋白。虽然初步研究曾显示 B7H3 对 T 细胞有刺激作用，可在一定程度上促进 CD4 + 和 CD8 + T 细胞的增殖、增强 T 淋巴细胞的细胞毒性及刺激干扰素- γ (IFN- γ) 的产生 (Chapoval A. I., et al., (2001), Nat. Immunol. 2: 269)，并且 B7H3 的缺失可减轻同种异体心脏移植的慢性排斥作用 (Wang L. et al., (2005), Eur. J. Immunol. 35:428)。然而，
- 10 更多的研究表明，B7H3 有着显著的免疫抑制作用。例如，B7H3 可显著抑制 CD3 抗体或同种异体 DC 细胞对 T 细胞的激活作用，而 B7H3 阻断抗体可有效逆转这种抑制作用 (Prasad D. V. R., et al., (2004), J. Immunol. 173:2500)。B7H3 蛋白的结构信息揭示了 B7H3 IgV 域中的 FG 环可能对 T 细胞抑制起着关键作用 (Vigdorovich V., et al., (2013), Structure 21:707)。另
- 15 外除了 T 细胞，B7H3 可能还对天然杀伤细胞 (NK) 有着抑制作用 (Castriconi R., et al., (2004), Proc. Natl. Acad. Sci. 101:12640)。可能的机理涉及调节性 T 细胞 (Tregs) 诱发树突状细胞 (DC) B7H3 的表达，以致于抑制 DC 细胞对 T 淋巴细胞的刺激作用 (Mahnke K., et al., (2007), Eur. J. Immunol. 37:2117)。在小鼠模型中，缺乏 B7H3 的小鼠会出现较严重的气
- 20 道炎症，并且也会使某些自体免疫性疾病如实验性自身免疫应变性脑脊髓炎等更早地发生 (Suh W. K., et al., (2003), Nat. Immunol. 4: 899)。

- 在许多恶性肿瘤中，B7H3 的表达水平相当高，例如黑色素瘤 (Wang J., et al., (2013), J. Invest. Dermatol. 133:2050)、白血病 (Hu Y., et al., (2015), Hematology 20:187; Sun J., et al., (2014), OncoTargets Ther. 7:1979)、前列腺癌 (Zang X., et al., (2007), Proc. Natl. Acad. Sci. 104:19458)、卵巢癌 (Zang X., et al., (2010), Mod. Pathol. 23:1104) 和胰腺癌 (Chen Y., et al., (2014), OncoTargets Ther. 7:1465-72) 等。虽然正常和肿瘤组织中都有 B7H3 mRNA 的存
- 25

在, 但 B7H3 蛋白仅在肿瘤细胞中有较高水平; 这种差异可能与 miRNA-29 调控机制有关, 如在正常或肿瘤组织以及癌细胞系中, 有研究表明 miRNA-29 与 B7H3 蛋白水平呈现了反比关系 (Xu H., et al., (2009), *Cancer Res.* 69:6275)。在肿瘤病人中, B7H3 的异常表达与不良预后、肿瘤分级
5 水平和转移程度增加、治疗抗性、肿瘤病人总体存活率下降有着比较密切的关系 (Picarda E., et al., (2016), *Clin. Cancer Res.* 22:3425)。

B7H3 对 T 细胞、NK 和 DC 细胞的抑制作用会显著促进肿瘤细胞的免疫逃逸; 另外, B7H3 对肿瘤细胞的增殖、迁移、侵袭、血管生成、上皮到间质转化 (EMT)、癌干性和 Warburg 效应、以及肿瘤细胞耐药性等也有着重要作用。B7H3 的增加可促进 Bcl-2 和 Bcl-xl 的表达, 通过 JAK2-STAT3
10 信号途径的激活从而增强肿瘤细胞抗细胞凋亡的活性 (Zhang T., et al., (2015), *World J. Gastroenterol.* 21:1804)。同时, AKT、ERK、以及 JAK2/STAT3 途径的激活可诱导与肿瘤细胞转移有关的蛋白因子表达, 包括 MMP2、MMP9 和 CXCR4 等, 从而增强肿瘤细胞的迁移力和侵袭力 (Tekle
15 C., et al., (2013), *Int. J. Cancer* 130:2282; Li Y., et al., (2017), *Oncotarget* 8:71725; Wang L., et al., (2013), *PLoS One* 8: e70689; Liu F., et al., (2015), *Mol. Med. Rep.* 12:5455)。多项研究表明, 肿瘤内皮细胞的 B7H3 也可基于 TLR4 依赖性机制诱导 NF- κ B 的活化, 使得 VEGF 和 IL-8 的表达水平显著增加 (Tekle C., et al., (2012), *Int. J. Cancer* 130:2282), 从而促进肿瘤的侵袭作
20 用和血管生成 (Ferrara N., et al., (2002), *Nat. Rev. Cancer* 2:795)。另一方面, B7H3 也可通过降低 E-钙粘蛋白以及增加 N-钙粘蛋白、波形蛋白、CD133 以及 CD44 的表达, 起到调节肿瘤细胞 EMT 和肿瘤干细胞活性的作用 (Jiang B., et al., (2016), *Oncotarget* 731755)。由于 B7H3 可激活 STAT3 信号传导, 从而增加己糖激酶 2 的表达, 所以 B7H3 也有促进肿瘤细胞有氧
25 糖酵解的作用 (Shi T., et al., (2019), *Cell Death Dis.* 10:308)。同时, B7H3 通过抑制转录因子 NRF2 的活性, 致使活性氧 (ROS) 和 HIF1a 水平升高, 从而进一步增强肿瘤细胞的有氧糖酵解作用, 促进肿瘤细胞的生长 (Lim S.,

et al., (2016), *Cancer Res.* 76:2231)。越来越多的研究表明, 抑制或降低 B7H3 的表达可增加肿瘤细胞对一些药物的反应, 如抑制 DNA 复制的药物 (包括烷基化药物) 以及抑制 PI3K / Akt / mTOR 和 Ras / Raf / MEK 信号蛋白的药物 (Flem-Karlsen K., et al., (2017), *Pigment Cell Melanoma Res.* 30:467; 5 Kasten B. B., et al., (2017), *Nucl. Med. Biol.* 47:23; Liu H., et al., (2011), *Mol. Cancer Ther.* 10:960)。

把肿瘤细胞移植在缺失 B7H3 的小鼠中或对肿瘤小鼠进行 B7H3 抗体处理, 肿瘤的生长会受到明显的抑制 (Cai D., et al., (2020), *Cell. Mol. Immunol.* 17:227; Lee Y. H., et al., (2017), *Cell Res.* 27:1034), 说明阻断 B7H3 的信号 10 传导可用于肿瘤治疗。此外, 通过与抗 PD-1 抗体的联用, 产生对 B7H3 和 PD-1 的双重阻断, 产生协同性的抗肿瘤效果 (Lee Y. H., et al., (2017), *Cell Res.* 27:1034)。由于正常组织和肿瘤组织在 B7H3 表达水平上的显著差异, 可以通过 B7H3 抗体的 ADCC 效应或毒素偶联来有效地杀死肿瘤细胞, 而对正常组织不导致太大的影响 (Koenig S., et al., (2014), *Medicographia* 36: 15 285)。总之, 根据当前的研究信息, B7H3 是一个比较有希望的癌症治疗靶点。

发明内容

本发明通过杂交瘤技术获得了一组抗 B7H3 单克隆抗体, 这些抗体具较高的 B7H3 亲和力、显著的细胞内吞作用 (可通过与毒素偶联选择性地毒杀 20 或抑制肿瘤)、显著的抗体依赖性细胞毒性 (ADCC)、或能有效地阻断 B7H3 引起的免疫抑制作用; 本发明成功地对其中 6 个候选抗体进行了人源化改造。所述抗体在制备应用于抑制癌细胞及调节 B7H3 的作用、水平以及增强机体免疫力的相关药物, 尤其是治疗癌症相关药物方面具有广阔的应用前景。

25 本发明提供的鼠源或人源化 B7H3 抗体或功能性片段, 其包括了重链序列和轻链序列。抗人 B7H3 鼠源抗体, 重链可变区、轻链可变区的氨基酸序

列信息如下：7F5 重链可变区、轻链可变区的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：1、2； 9C8 重链可变区、轻链可变区的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：3、4； 5B6 重链可变区、轻链可变区的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：5、6； 7C9 重链可变区、轻链可变区的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：7、8； 2A9 重链可变区、轻链可变区的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：9、10； 4F11 重链可变区、轻链可变区的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：11、12； 15A2 重链可变区、轻链可变区的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：13、14； 7B7 重链可变区、轻链可变区的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：15、16； 7E6 重链可变区、轻链可变区的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：17、18； 2E10 重链可变区、轻链可变区的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：19、20； 2F12 重链可变区、轻链可变区的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：21、22； 2F7 重链可变区、轻链可变区的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：23、24； 13A2 重链可变区、轻链可变区的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：25、26； 14B3 重链可变区、轻链可变区的氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：27、28。

15 以上抗体重链、轻链的 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列信息如下：
7F5 重链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：29、30、31，其轻链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：32、33、34； 9C8 重链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：35、36、37，其轻链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：38、39、40； 5B6 重链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：41、42、43，其轻链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：44、45、46； 7C9 重链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：47、48、49，其轻链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：50、51、52； 2A9 重链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：53、54、55，其轻链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：56、57、58； 4F11 重链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：59、60、61，其轻链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：

62、63、64；15A2 重链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：65、66、67，其轻链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：68、69、70；7B7 重链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：71、72、73，其轻链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：74、75、76；7E6 重链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：77、78、79，其轻链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：80、81、82；2E10 重链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：83、84、85，其轻链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：86、87、88；2F12 重链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：89、90、91，其轻链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：92、93、94；2F7 重链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：95、96、97，其轻链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：98、99、100；13A2 重链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：101、102、103，其轻链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：104、105、106。14B3 重链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：107、108、109，其轻链 CDR1、CDR2、CDR3 氨基酸序列分别为 SEQ ID NO：110、111、112。

进一步，抗人 B7H3 抗体或片段经过改造后，成为人源化抗体。

抗人 B7H3 人源化抗体 2A9 重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO：113，其轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO：114；人源化抗体 4F11 重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO：115，其轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO：116；人源化抗体 9C8 重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO：117，其轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO：118；人源化抗体 15A2 重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO：119，其轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO：120；人源化抗体 5B6 重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO：121，其轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO：122；人源化抗体 7B7 重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO：123，其轻链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO：124。

表达载体，包含上述抗体的核酸分子。

药物组合物，其包含上述的抗体或其功能片段，以及药用载体。

上述的抗体或其功能性片段，核酸分子、表达载体、宿主细胞、药物组合物在制备 B7H3 免疫功能药物的用途。

- 5 本专利采用哺乳动物细胞表达系统制备重组的 B7H3 受体蛋白作为抗原，免疫小鼠后，将小鼠脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合获得杂交瘤细胞。通过对大量杂交瘤细胞进行多次克隆及筛选，得到多个单克隆杂交瘤细胞株。这些杂交瘤细胞株可以分泌产生与 B7H3 受体特异性结合的单克隆抗体(图 1、图 2)，这些单克隆抗体中，部分具有明显的被细胞内吞的作用(图 3、
- 10 图 4)、部分具有促进人免疫细胞分泌细胞因子如 IFN- γ 的作用(图 5)、以及部分具有明显的介导 ADCC 的作用(图 6、图 7、图 8)，其中部分单克隆抗体可被用于将来的 ADC，ADCC 以及 B7H3 拮抗剂的开发。进一步地，通过 RT-PCR (Reverse Transcription-Polymerase Chain Reaction，逆转录聚合酶链式反应) 克隆编码抗体轻链和重链可变区的基因，采用互补决定
- 15 簇嫁接方法(complementarity-determining regions graft, CDR-graft)构建人源化抗体。体外功能实验表明，人源化 B7H3 抗体能特异性地结合 B7H3 受体蛋白(图 9、图 10)，同时保持了明显的被细胞内吞的作用(图 11)及偶联 MMAE 毒素后，对 Calu-6 肿瘤细胞有着明显的毒杀作用(图 12)、介导 ADCC 的作用(图 13)、介导 NK92MI-hCD16 细胞对 Jurkat-B7H3 和 PC9
- 20 细胞的 ADCC 毒杀作用(图 14)、以及促进人免疫细胞产生和分泌细胞因子如 IFN- γ 的作用(图 15)。本专利中采用的阳性对照抗体来自专利 US8802091 和 WO2017180813A1。

附图说明

- 25 为了更清楚地说明本发明具体实施方式或现有技术中的技术方案，下面将对具体实施方式或现有技术描述中所需要使用的附图作简单地介绍，显而易见地，下面描述中的附图是本发明的一些实施方式，对于本领域普

通技术人员来讲，在不付出创造性劳动的前提下，还可以根据这些附图获得其他的附图。

图 1(a-b): 用 ELISA 方法测定 B7H3 杂交瘤单克隆抗体与 B7H3-hFc 蛋白的结合特性;

5 图 2(a-b): 用 FACS 方法测定 B7H3 杂交瘤单克隆抗体与 PC9 细胞的结合特性;

图 3(a-b): 用 FACS 测定 B7H3 杂交瘤抗体被 Jurkat-B7H3 细胞内吞的活性;

图 4(a-b): 用 FACS 测定 B7H3 杂交瘤抗体被 PC9 细胞内吞的活性;

10 图 5(a-b): B7H3 杂交瘤抗体对人的 PBMC 细胞 IFN- γ 分泌的促进作用;

图 6(a-b): 用报告基因方法测试 B7H3 杂交瘤或嵌合抗体所介导的对 Jurkat-B7H3 细胞的 ADCC 作用;

图 7(a-b): 用报告基因方法测试一些 B7H3 嵌合抗体所介导的对 PC9 肿瘤细胞的 ADCC 作用;

15 图 8: 用报告基因方法测试一些 B7H3 嵌合抗体所介导的对 DLD1 肿瘤细胞的 ADCC 作用;

图 9: 用 ELISA 方法测定人源化 B7H3 单克隆抗体与 B7H3-His 蛋白的结合特性;

20 图 10: 用 FACS 方法测定人源化 B7H3 单克隆抗体与 PC9 细胞中 B7H3 蛋白的结合特性;

图 11: 用 FACS 测定人源化 B7H3 单克隆抗体被 PC9 细胞内吞的作用;

图 12: 人源化 B7H3 抗体 ADC 对 Calu-6 肿瘤细胞的毒杀作用;

图 13(a-b): 用报告基因方法测试人源化 B7H3 抗体对 Jurkat-B7H3 和 PC9 细胞的 ADCC 作用;

图 14 (a-b): 人源化 B7H3 抗体介导 NK92MI-hCD16 细胞对 Jurkat-B7H3 和 PC9 细胞的 ADCC 毒杀作用;

图 15: 人源化 B7H3 单克隆抗体对人的 PBMC 细胞 IFN- γ 产生和分泌的促进作用。

5 具体实施方式

本文使用的术语“抗体”以它的最广泛意义使用, 包括包含一个或更多个特异性结合抗原的抗原结合结构域的免疫球蛋白或其他类型分子, 为对特定抗原表现出结合特异性的蛋白质或多肽。抗体的具体实例可包括完整抗体(例如经典四链抗体分子)、单链抗体、单域抗体、双特异性抗体、多
10 特异性抗体等。经典抗体分子通常为由 2 个相同重链和 2 个相同轻链通过二硫键相互连接组成的四聚体。根据氨基酸序列的保守性差异, 将重链和轻链分为位于氨基端的可变区(V)和位于羧基端的恒定区(C)。可变区用于识别和结合抗原, 恒定区(如 Fc 片段)用于启动下游效应, 比如抗体依赖性细胞介导的细胞毒作用(ADCC)。在重链和轻链的可变区内, 分别有三个局部
15 区域的氨基酸组成和排列顺序具有更高的变异程度, 为抗体与抗原结合的关键位置, 因而也称为互补决定区(CDR)。CDR 的氨基酸序列可以使用本领域公认的编号方案, 例如 Kabat、Chothia、IMGT、AbM 或 Contact 容易地确定。

抗体的“抗原结合片段”指抗体分子中参与抗原特异性结合的氨基酸
20 片段, 例如, F(ab')₂、Fab 以及 scFv 中的一种。

EC₅₀ (concentration for 50% of maximal effect)指引起 50%最大效应的浓度。在酶联免疫吸附测定(ELISA)中用于表示抗体分子与对应抗原的结合能力时, 可指产生最大检测信号(如比色或荧光强度)一半时的抗体分子浓度。EC₅₀ 值越低, 则与抗原的结合亲和力越大。

25 本发明涉及 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段, 包括重链和轻链, 所述重链的 CDR1 氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 29、35、41、47、53、59、

- 65、71、77、83、89、95、101、107 中的一种；所述重链的 CDR2 氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 30、36、42、48、54、60、66、72、78、84、90、96、102、108 中的一种；所述重链的 CDR3 氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 31、37、43、49、55、61、67、73、79、85、91、97、103、109 中的一种；
- 5 所述轻链的 CDR1 氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 32、38、44、50、56、62、68、74、80、86、92、98、104、110 中的一种；所述轻链的 CDR2 氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 33、39、45、51、57、63、69、75、81、87、93、99、105、111 中的一种；所述轻链的 CDR3 氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 34、40、46、52、58、64、70、76、82、88、94、100、106、112 中的一种；
- 10 其中所述抗原结合片段的重链和轻链包含分别跨越所述抗体的重链和轻链的 CDR1 到 CDR3 的氨基酸序列。

本发明提供的 B7H3 抗体或其抗原结合片段，其包括重链 CDR 和轻链 CDR，所述重链 CDR 和轻链 CDR 具有选自 a~n 所示 CDR 组合中的一组或多组：

组合名称	重链 CDR1	重链 CDR2	重链 CDR3	轻链 CDR1	轻链 CDR2	轻链 CDR3
a	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
b	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:40
c	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46
d	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:52
e	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:55	SEQ ID NO:56	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:58
f	SEQ ID NO:59	SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:61	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:63	SEQ ID NO:64
g	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:68	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:70
h	SEQ ID NO:71	SEQ ID NO:72	SEQ ID NO:73	SEQ ID NO:74	SEQ ID NO:75	SEQ ID NO:76
i	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:78	SEQ ID NO:79	SEQ ID NO:80	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:82
g	SEQ ID NO:83	SEQ ID NO:84	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:88

k	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:90	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:92	SEQ ID NO:93	SEQ ID NO:94
l	SEQ ID NO:95	SEQ ID NO:96	SEQ ID NO:97	SEQ ID NO:98	SEQ ID NO:99	SEQ ID NO:100
m	SEQ ID NO:101	SEQ ID NO:102	SEQ ID NO:103	SEQ ID NO:104	SEQ ID NO:105	SEQ ID NO:106
n	SEQ ID NO:107	SEQ ID NO:108	SEQ ID NO:109	SEQ ID NO:110	SEQ ID NO:111	SEQ ID NO:112

o

在一些实施方式中，所述重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 1、3、5、7、9、11、13、15、17、19、21、23、25、27 中的一种；
所述轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 2、4、6、8、10、12、14、
5 16、18、20、22、24、26、28 中的一种。

在一些实施方式中，所述 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区和轻链可变区选自 A~N 所示可变区组合中的一组或多组：

组合名称	重链可变区	轻链可变区
A	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2
B	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4
C	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
D	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8
E	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10
F	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
G	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14
H	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:16
I	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
J	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20
K	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22
L	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24
M	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26

N	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:28
---	--------------	--------------

。

根据本领域技术人员所常规理解的，抗体或其抗原结合片段的功能性变体也在本发明范围内，本文所用的术语“功能性变体”指，在母体蛋白分子(例如天然蛋白分子)基础上引入一个或多个氨基酸插入、缺失或替换后
5 所获得的变体分子，其仍然保留了母体蛋白分子的至少部分功能(尤其是所关注的功能，例如与对应抗原的结合能力)。

对于 CDR 区而言，本发明的功能性变体所包含重链互补决定区以及轻链互补决定区，与 a~n 所示互补决定区组合中的任一组相比，分别包含至多 3 个氨基酸的突变(例如 1 个、2 个或 3 个氨基酸的置换、缺失或添加或
10 其任意组合)；优选地，所述突变为保守突变。

对于可变区而言，在一些实施方式中，本发明的功能性变体包含重链可变区，所述重链可变区的氨基酸序列包含与组合 A~N 中所示重链可变区序列中任意一个具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列。在一些实施方式中，本发明的功能性
15 性变体包含轻链可变区，所述轻链可变区的氨基酸序列包含与组合 A~N 中所示轻链可变区序列中任意一个具有至少 80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的序列。术语“同一性”指两氨基酸或核苷酸序列(例如查询序列和参照序列)之间一致性程度的量，一般以百分比表示。通常，在计算两氨基酸或核苷酸序列之间的一致性百分比之前，先进行序列比对(alignment)并引入缺口(gap) (如果有的话)。如果在某个比对位置，两序列中的氨基酸残基或碱基相同，则认为两序列在该位置一致或匹配；两序列中的氨基酸残基或碱基不同，则认为在该位置不一致或错配。在一些算法中，用匹配位置数除以比对窗口中的位置总数以获得序列一致性。在另一些算法中，还将缺口数量和/或缺口长度考虑在内。
20 常用的序列对比算法或软件包括 DANMAN、CLUSTALW、MAFFT、BLAST、
25

MUSCLE 等。出于本发明的目的，可以采用公开的比对软件 BLAST (可从 <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/> 获得)，通过使用缺省设置来获得最佳序列比对并计算出两氨基酸或核苷酸序列之间的序列一致性。

功能性变体保留特异性结合 B7H3 的能力。所属领域技术人员将能够使用熟知的技术确定如本文所阐明的抗原结合分子的合适变体。在某些实施方案中，所属领域技术人员可鉴别抗体或其抗原结合片段中对于特异性结合 B7H3 的活性而言不重要的区来改变而不破坏活性的合适区域。

在一些实施方式中，所述 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段是鼠源或人源化的。

10 在一些实施方式中，所述重链可变区和轻链可变区经过人源化。

在一些实施方式中，所述重链和轻链经过人源化。

术语“人源化抗体(humanized antibody)”，也称为 CDR 移植抗体 (CDR-grafted antibody)，是指将第一动物源性的 CDR 序列移植到人的抗体可变区框架，即不同类型的人种系抗体构架序列中产生的抗体。可以克服嵌合抗体由于携带大量鼠蛋白成分，从而诱导的异源性反应。此类构架序列可以从包括种系抗体基因序列的公共 DNA 数据库或公开的参考文献获得。如人重链和轻链可变区基因的种系 DNA 序列可以在“VBase”人种系序列数据库(www.mrccpe.com.ac.uk/vbase) 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反向突变或回复突变，以保持活性。本发明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。在本发明一个优选的实施方案中，第一动物源性为鼠源。

25 在一些实施方式中，所述重链和轻链经过人源化；所述人源化后的重链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 113、115、117、119、121、123 中的一种；所述人源化后的轻链可变区的氨基酸序列选自 SEQ ID NO: 114、

116、118、120、122、124 中的一种。

在一些实施方式中，所述人源化后的重链可变区和轻链可变区选自 1~6 所示可变区组合中的一组或多组：

组合名称	重链可变区	轻链可变区
1	SEQ ID NO:113	SEQ ID NO:114
2	SEQ ID NO:115	SEQ ID NO:116
3	SEQ ID NO:117	SEQ ID NO:118
4	SEQ ID NO:119	SEQ ID NO:120
5	SEQ ID NO:121	SEQ ID NO:122
6	SEQ ID NO:123	SEQ ID NO:124

。

- 5 在一些实施方式中，所述重链和轻链经过人源化；所述人源化后的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 113；所述人源化后的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 114。

在一些实施方式中，所述的 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段具有人 IgG1 的恒定区。

- 10 本发明还涉及 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段在制备如下药物中的用途：调节 B7H3 活性或 B7H3 水平的药物、具明显的细胞内吞作用（可通过毒素偶联选择性地毒杀或抑制肿瘤等）、或显著的抗体依赖性细胞毒性（ADCC）、或具阻断 B7H3 在免疫抑制中作用从而增强机体免疫的药物、促进 T 淋巴细胞的药物或者提高 T 淋巴细胞中细胞因子如 IFN- γ 产生的药物。
- 15

本发明还涉及一种单克隆抗体偶联物，包括单克隆抗体和偶联部分，其中，所述单克隆抗体为如上所述的一组 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段，所述偶联部分为选自放射性核素、药物、毒素、细胞因子、细胞因子受体片段、酶、荧光素和生物素中的一种或多种。

本发明还涉及如上所述的单克隆抗体偶联物在制备如下药物中的用途：调节 B7H3 活性或 B7H3 水平的药物、具明显的细胞内吞作用的药物（可通过毒素偶联选择性地毒杀或抑制肿瘤等）、具显著抗体依赖性细胞毒性（ADCC）的药物、或具阻断 B7H3 在免疫抑制中作用从而增强机体免疫的
5 药物、促进 T 淋巴细胞的药物或者提高 T 淋巴细胞中细胞因子如 IFN- γ 产生的药物。

本发明还涉及如上所述的单克隆抗体偶联物在制备预防和/或治疗和/或辅助治疗肿瘤的药物中的用途。

本发明还涉及表达载体，包含上述抗体的核酸分子。

10 本发明还涉及表达载体，包含上述 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段的核酸分子。

术语“载体(vector)”是指，可将多聚核苷酸插入其中的一种核酸运载工具。当载体能使插入的多核苷酸编码的蛋白获得表达时，载体称为表达载体。载体可以通过转化，转导或者转染导入宿主细胞，使其携带的遗传
15 物质元件在宿主细胞中获得表达。载体是本领域技术人员公知的，包括但不限于：质粒；噬菌粒；柯斯质粒；人工染色体，例如酵母人工染色体(YAC)、细菌人工染色体(BAC)或 P1 来源的人工染色体(PAC)；噬菌体如 λ 噬菌体或 M13 噬菌体及动物病毒等。可用作载体的动物病毒包括但不限于，逆转录酶病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒(如单纯疱疹病毒)、
20 痘病毒、杆状病毒、乳头瘤病毒、乳头多瘤空泡病毒(如 SV40)。在一些实施方式中，本发明所述载体中包含基因工程中常用的调控元件，例如增强子、启动子、内部核糖体进入位点（IRES）和其他表达控制元件（例如转录终止信号，或者多腺苷酸化信号和多聚 U 序列等）。

在本发明中，载体可以为组合物，例如为多种质粒的混合物，不同质
25 粒负载抗体或其抗原结合片段的一部分。

本发明还涉及药物组合物，其包含上述的抗体或其功能片段（中的至

少一种)，以及药用载体。

如本文所用，“药用载体”包括当与活性组分组合时允许所述组分保持生物学活性并且与受试者的免疫系统不发生反应的任何材料。实例包括但不限于标准药物载剂(诸如磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液(诸如油/水乳液))
5 和各种类型的润湿剂中的任一者。包含此类载剂的组合物通过熟知的常规方法来配制(参见例如，Remington's Pharmaceutical Sciences,第 18 版，A.Gennaro 编,Mack PublishingCo.,Easton,PA,1990; 和 Remington,The Science and Practice of Pharmacy,第 21 版,Mack Publishing,2005)。

本发明还涉及上述的抗体或其功能性片段，核酸分子、表达载体、宿主细胞、药物组合物在制备 B7H3 免疫功能药物的用途。
10

下面将结合实施例对本发明的实施方案进行详细描述：

实施例 1

产生抗 B7H3 抗体的小鼠免疫和细胞融合

15 用人源 B7H3 (NCBI Reference Sequence: NM_001024736.2) 胞外区与 mFc 融合蛋白 (B7H3-ECD-mFc) 作为抗原，与等体积完全弗氏佐剂 (Sigma, Cat. No.: F5581) 充分乳化后，经皮下免疫 6-8 周龄 Balb/c 小鼠 (购自昭衍 (苏州) 新药研究中心有限公司)，抗原免疫量为 50 μ g/只。随后每隔 2 周，用相同剂量的抗原与不完全弗氏佐剂 (Sigma, Cat. No.: F5506) 充分乳
20 化后，经皮下免疫小鼠三次。三次免疫后测定小鼠血清效价，融合前 3 天通过腹腔注射进行一次加强免疫。以 PEG Hybri-Max (Sigma, Cat. No.: 7181) 作为融合剂，将小鼠脾脏细胞与 SP2/0 细胞按照 4:1 比例混合，将融合的细胞加入到 96 孔板中 (1×10^5 个/孔)，每孔含有 0.1 mL 1 $\times$ HAT (Invitrogen, Cat. No.: 21060-017) 培养基。在第 3 天加入 0.1 mL HT (Invitrogen, Cat. No.:
25 11067-030) 培养基，在第 7 天吸掉 96 孔板中的培养基，补加 0.2 mL 新鲜 HT 培养基。第 9 天收取上清液进行各种筛选和测试。

实施例 2

杂交瘤抗体的抗原结合力以及亚克隆

杂交瘤抗体的结合力测试包括 ELISA 和 FACS，以及采用有限稀释法的亚克隆：

1) 用 ELISA 筛选 B7H3 结合阳性克隆：用 50 μ L B7H3-hFc（终浓度：2 μ g/mL）包被 96 孔 ELISA 板（Corning, Cat. No.: 9018），室温过夜；用洗涤缓冲液（PBS+0.05%Tween20）洗涤 3 次后，加入封闭缓冲液（PBS+2%BSA (Sigma, Cat. No.: V90093)）室温孵育 1 小时，用洗涤缓冲液洗涤 ELISA 板 3 次；加入杂交瘤上清液，室温孵育 1 小时，洗涤 3 次；每孔加入 100 μ L 的 10000 倍稀释的 HRP 偶联羊抗鼠 IgG 二抗（Thermo, Cat. No.: 31432），室温避光孵育 1 小时，洗涤 3 次；每孔加入 100 μ L TMB（北京百奥赛博，Cat. No.: ES-002），室温孵育显色 2 分钟，加入 100 μ L/孔的终止液（2N H₂SO₄）终止显色反应，用酶标仪（Tecan Spark）读取各孔 OD450 数值。

2) 用 FACS 筛选 B7H3 结合阳性克隆：取 50 μ L 在上述检测中呈阳性的杂交瘤上清或纯化的杂交瘤抗体与 50 μ L 293T-B7H3 细胞混合（ 2×10^5 个/孔），加至 96 孔 U 底细胞板中 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时，用 FACS 缓冲液（PBS+3%FCS）洗涤并离心两次，加入 400 倍稀释的 PE 标记的羊抗鼠二抗（Biolegend, Cat. No.: 405307），4 $^{\circ}$ C 避光孵育 30 分钟，用 FACS 缓冲液洗涤并离心两次，用 BD Accuri C6 流式细胞仪检测细胞在 PE 通道信号值。

3) 亚克隆：采用有限稀释法进行亚克隆 - 对在上述 ELISA 和 FACS 检测中呈阳性的多克隆杂交瘤细胞进行亚克隆，随后再重复采用 ELISA 和 FACS 方法进行检测筛选，获得阳性杂交瘤单克隆。

抗体纯化、浓度测定及内毒素测定：

将阳性单克隆杂交瘤细胞置于 50 mL 无血清培养基中（Invitrogen, Cat.

No.: 12045-076) 培养 8-9 天后, 离心收取上清液。用 Protein A 亲和层析纯化单克隆抗体, 纯化后的抗体样品经超滤离心管 (Millipore, Cat. No.: ACS500024) 换液浓缩后, 用 BCA 方法测定蛋白浓度, 用鲎试剂 (厦门鲎试剂生物科技股份有限公司) 检测纯化的抗体样品的内毒素含量。

5 用 ELISA 和 FACS 检测纯化的抗体样品与 B7H3 的结合能力, 结果如图 1(a-b)、图 2(a-b)和表 1。所选杂交瘤抗体都具较高的亲和力。

表 1, B7H3 杂交瘤单克隆抗体与 B7H3 抗原结合力 EC₅₀ 值。

抗体 参数	7F5	9C8	5B6	7C9	2A9	4F11	15A2	7B7	7E6	2E10	2F12	2F7	13A2	14B3
ELISA EC ₅₀ (ng/mL)	5.76	10.45	4.93	9.9	6.24	5.11	1.51	9.7	4.49	6.7	na	2.78	0.52	9.1
FACS EC ₅₀ (ng/ml)	197	86.1	71.3	103.5	186.5	83.4	6.2	179.2	52.6	234	217	177	100.7	248.5

实施例 3

10 杂交瘤单克隆抗体的细胞内吞作用和 B7H3 阻断作用的测试

对抗体的细胞内吞噬作用分析: 在 96 孔板中, 每孔加入 50 μ L 2×10^6 /ml PC9 细胞, 以及 50 μ L 标记的 B7H3 抗体, 将 96 孔细胞培养板置于 4 $^{\circ}$ C 孵育 1 小时, 用 FACS buffer 洗涤 2 次后加入 PH 依赖性荧光染料 CypHer5E (GE, Cat. No.: PA15401) 标记的 Goat anti-mFc (Jackson, Cat. No.: 115-005-071) 二抗, 4 $^{\circ}$ C 孵育 0.5 小时, 洗涤 2 次后加入培养基 (1640+10%FBS), 放置培养箱中孵育 3 小时, 离心去培养基, 于 PH9.0 的 PBS 中重悬, 用 BD C6 流式细胞仪检测 PC9 细胞的 CypHer5E 信号, 计算 B7H3 抗体进入细胞内部的效率。如图 3(a-d)和图 4(a-d)所示, Jurkat-B7H3 和 PC9 细胞对 B7H3 抗体, 包括 15A2, 5B6, 7C9, 2F7, 7B7, 2E10, 4F11 等, 具有显著的内吞活性。

20 测试 B7H3 杂交瘤抗体对人 PBMC 细胞分泌细胞因子的影响: 在 96 孔 (Corning, Cat. No.: 3799) 加入用完全培养基 (RPMI1640+10%FCS) 重悬的 PBMC 细胞 (TPCS, Cat. No.: PB025C), 再加入 40 ng/mL OKT3 (eBioscience, Cat. No.: 16-0037-85), 置 37 $^{\circ}$ C 孵育 72 小时。活化的 PBMC 细

胞计数后，用完全培养基重悬（ 2.5×10^5 细胞/mL）。在 96 孔板中，每孔加入 100 μ L PBMC 细胞，50 μ L 不同浓度的 B7H3 抗体（起始浓度为 20 μ g/mL，10 倍系列稀释），将 96 孔细胞培养板（Corning, Cat. No.: 3599）置于 37°C，5% CO₂ 培养箱中孵育 48 小时，收集上清液。用 IFN- γ ELISA 试剂盒（R&D Systems, Cat. No.: DY285）检测细胞因子的浓度。如图 5 所示，B7H3 抗体包括 5B6，2F12，2F7，15A2，13A2，14B3，4F11，2A9 等能够显著促进 PBMC 细胞分泌 IFN- γ 。

实施例 4

10 B7H3 抗体可变区基因克隆和测序

用 TRIzol (Cwbiotech, Cat. No.: CW0580) 裂解 B7H3 单克隆杂交瘤细胞株，提取杂交瘤细胞总 RNA。用 HiFi Script cDNA 合成试剂盒（Cwbiotech, Cat. No.: CW2569）将杂交瘤细胞的 RNA 反转录为 cDNA。以 cDNA 为模板，用简并引物通过 PCR 方法(Kettleborough et al., (1993), Eur J Immunology 23: 206-211; Strebe, et al., (2010), Antibody Engineering 1:3-14) 扩增抗体的重链和轻链的可变区基因。将 PCR 扩增产物连接到 T/A 载体后，转化 DH5a 感受态细胞，涂板并置 37°C 过夜培养。从培养板上挑取单克隆，扩大培养后抽提质粒，测定抗体的基因序列。根据抗体的基因序列，分析其互补决定簇（CDR）和骨架区。B7H3 抗体序列编号如表 2 所示，具体序列信息见序列表。

表 2. B7H3 抗体序列编号说明

SEQ ID NO.	具体描述		具体氨基酸序列
	抗体	序列描述	
1	7F5	重链可变区氨基酸序列	EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKTSGFNKAYYIHVVKQ RPEQGLEWIGWIDPENGNTFYDPKFQKGASITADTSSNTA YLQLSSLTSEDAAVYYCTRSSTRLRPFQYWGQGTTLVSS
2	7F5	轻链可变区氨基酸序列	DIVMTQAAFSNPVTLGTSASISCRSSKSLHNSNGITYLYW YLQKSGQSPQLLIYQMSNLASGVPDFRFSSTSGSGTDFTLRIS RVEAEDVGYYCAQNLELYTFGGGKLEIK
3	9C8	重链可变区氨基酸序列	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTIHVVKQS HGKSLEWIGGINPNSGGTTYNLKFKGKATLTVDKSSSTVY MELRSLTSEDSAVYYCARKEGFFTTDYWGQGTTLVSS

4	9C8	轻链可变区氨基酸序列	QTVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSLSYIHWHYRQKSG TSPKRWIYDTSNLTATGVPVRFSGSGSGTSYSLTISSMEAED AATYYCQQWHYNNPTFGGGTKLEIK
5	5B6	重链可变区氨基酸序列	QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFITYTIHWVKQ RPGQGLEWIGYINPTSDYANFNQKFKDKATLTADKSSRTA YMQLSLTSEDSAVYYCARWGTTFVQFYFDYWGQGTTL TVSS
6	5B6	轻链可变区氨基酸序列	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASQSLSYINWYQLKPG SSPKPWYATSSLQSGVPARFSGSASGTSYSLTISRVEAEDA ATYFCQHWSSDPPTIGGGTKLEIK
7	7C9	重链可变区氨基酸序列	EVQLQQSGTELVKPGALVKLSCKASALNIKDFYMHVVK QRPERGLEWIGWIDPDNGNTIYDPKFGKASITADISSSTA YLQLSSLTSEDYAVYYCARSSSTRQRPFDYWGQGTTLTVSS
8	7C9	轻链可变区氨基酸序列	DIVMTQSHKVMSTSVGDRVSITCKASQDVRTGVAWYQQ KPGQSPKLLIYSAFYRYTGVDPDRFTVSGSGADFTFTITSVQ AEDLAVYYCQQYYSIPWTFGGGGTKLEIK
9	2A9	重链可变区氨基酸序列	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYIMHWVKQ SRGKSLEWIGGINPNSGGTTYNEKFKGKATLTVDKSASTA YMELRSLTSEDSAIYYCARRMPYWFYFDVWGAGTTTVTS S
10	2A9	轻链可变区氨基酸序列	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYIHWHYRQKSG TSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEA DAATYYCQQWVSNPLTFGAGTKLELK
11	4F11	重链可变区氨基酸序列	EVQLQQSGPELVKPGASVKLSCKTSGYTFTEYIMHWVKQ SHGKSLEWIGGINPNTGGITYNQKFKDKATLTVDKSSSTA YMELRSLTSDDSAVYFSARAGGNFLWYFDVWGAGTTVT VSS
12	4F11	轻链可变区氨基酸序列	QIVLTQSPATMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHWYQQKS DMSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLAISSMEA EDAATYYCQQWNSNPLTFGTGKLELK
13	15A2	重链可变区氨基酸序列	QVQLQQSGPEVVKPGALVRISCKASGYTFTSYDINWVKQ RPGQGLEWIGWIDPDGDGSKYNEKFKGKATLTADKSSST AYMQFSSLTSENSAVYFCVRRGFDYWGQGTTLTVSS
14	15A2	轻链可变区氨基酸序列	QILLTQSPAIMASAPGEKVTMTCTSSSVSYLHWFQKPG SSPKLWIHDTNLTASGFPARFSGSGSGTSYSLIISMEAED AATYYCHQRSSYPWTFGGGGTKLEIK
15	7B7	重链可变区氨基酸序列	EVKLVESGGGLVLRPGGSLKLSAASGFTFSSYAVSWVRQT PEKRLEWVASISGGGIYIYPDSVKGRFTISRDNAKNNLY LQMNSLTPDDTALYCARHGGAGYFDYWGQGTTLTVSS
16	7B7	轻链可变区氨基酸序列	DSLMTQSPASLSASVGETVTITCRGSESVHSLAWYQQK QGKSPQLLVYNAKTLQSGVPSRFSGSGSGTQFSLRINSLQ PEDFGTYCYCQHYGSPWTFGGGGTILEIK
17	7E6	重链可变区氨基酸序列	QVQLQQSGPELVKPGVSVKISCKGSGYTFTDYAMHWVK QSHAKSLEWIGVINSYYGNTHYNQKFKGKATMTVDKSSS TAYMELARLTSEDSAIYYCARAGGYSYSSYRPFAYW GQGTLLIVSA
18	7E6	轻链可变区氨基酸序列	DIQMTQSPASQASLGEVITITCLASQTIGTWLAWYQQKP GKSPQLLIYAATNLADGVPSRFSGSGSGTKFSFKISLQAE DFVSYCYCQLYSTPYTFGGGGTKLEIK
19	2E10	重链可变区氨基酸序列	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYTMHWVKQ SHGKNLEWIGGINTDNGGTTYQKFKDKATLTVDRSSSTA YMVLRSLTSEDSAVYYCARSFNNYGPWFAYWGQGALV TVSA
20	2E10	轻链可变区氨基酸序列	DIVMTQSHKFMSTSIGDRVSITCKASQDVRSAAWYQQRP GQSPKLLIYWASTRHTGVPARFTGSGSGTDYTLTINNVS EDLAGYFCQQYSSYFTFGGGTKLEKK
21	2F12	重链可变区氨基酸序列	EVQLQQSGPELVKSGASVNISCKTSGYTFTEYTMHWVKL SHGKSLEWIGGINPNNGGTTYNQKFKGKATLTVDKSSSTA YMELRSLTSEDSAVYYCARRGRWPPDWYFDVWGAGTTV TVSS
22	2F12	轻链可变区氨基酸序列	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSLSYMHWYQQKS GTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMEA DAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK
23	2F7	重链可变区氨基酸序列	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYIYWLKQ RPGQGLEWIGGKPSNGDTNFAKFMNKATLTVDKSSSTA YMQLSLTSEDSAIYYCTRFFYGSPYDFDVWGAGTTTVTV

			SS
24	2F7	轻链可变区氨基酸序列	NIVMTQSPKSMMAVGERVTLTCKASENV DTHVSWYQQ KPEQSPTLLMYGTSNRFTGVPDRFTGSGSATDFTLTISVQ AEDLADYHCGQSYRYPYTFGGGKLEIK
25	13A2	重链可变区氨基酸序列	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYVMHWVKQ RHGQSLEWIGGINPNTGGTTYNQKFEGKATLTVDKSSSA YMEFRSLTSEDSAVYYCARRMPFGISAMDYWGQTSVT VSS
26	13A2	轻链可变区氨基酸序列	QIVLTQSPAIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYIHWFOQKSG TSPKRWISETSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSMGAED AATYYCHQWISYPPTFGAGTKLELK
27	14B3	重链可变区氨基酸序列	QVQLQQSGPELVKPGVSVKISCKGSGYTFTDHAHWVKQ SHAKSLEWIGVINTYSGNTNFNQKLKGKATMTVDKSSST AYMELARLTSEDSAIYYCARGAHSSGYPYWFYFDVWGAG TTVTVSS
28	14B3	轻链可变区氨基酸序列	QIVLSQSPAILASASAGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKP GSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISRVEAE DAATYYCQQWSTNPFTFGSGTKLEMK
29	7F5	重链 CDR1 区 氨基酸序列	AYYIH
30	7F5	重链 CDR2 区 氨基酸序列	WIDPENGNTFYDPKFQG
31	7F5	重链 CDR3 区 氨基酸序列	SSTRLRPFYD
32	7F5	轻链 CDR1 区 氨基酸序列	RSSKSLHSNGITYLY
33	7F5	轻链 CDR2 区 氨基酸序列	QMSNLAS
34	7F5	轻链 CDR3 区 氨基酸序列	AQNLELYT
35	9C8	重链 CDR1 区 氨基酸序列	EYTIH
36	9C8	重链 CDR2 区 氨基酸序列	GINPNSSGGTTYNLKFKG
37	9C8	重链 CDR3 区 氨基酸序列	KEGFFTTDY
38	9C8	轻链 CDR1 区 氨基酸序列	SASSLSYIH
39	9C8	轻链 CDR2 区 氨基酸序列	DTSNLAT
40	9C8	轻链 CDR3 区 氨基酸序列	QQWHYNPPT
41	5B6	重链 CDR1 区 氨基酸序列	TYTIH
42	5B6	重链 CDR2 区 氨基酸序列	YINPTSDYANFNQKFKD
43	5B6	重链 CDR3 区 氨基酸序列	WGTTVFQFYFDY
44	5B6	轻链 CDR1 区 氨基酸序列	RASQSLSYIN
45	5B6	轻链 CDR2 区 氨基酸序列	ATSSLQS
46	5B6	轻链 CDR3 区 氨基酸序列	QHWSSDPPT
47	7C9	重链 CDR1 区 氨基酸序列	DFYMH
48	7C9	重链 CDR2 区 氨基酸序列	WIDPDNGNTIYDPKFQG
49	7C9	重链 CDR3 区 氨基酸序列	SSTRQRPFDY
50	7C9	轻链 CDR1 区 氨基酸序列	KASQDVRTGVA
51	7C9	轻链 CDR2 区 氨基酸序列	SAFYRYT
52	7C9	轻链 CDR3 区 氨基酸序列	QQYYSIPWT
53	2A9	重链 CDR1 区 氨基酸序列	EYIMH
54	2A9	重链 CDR2 区 氨基酸序列	GINPNSSGGTTYNEKFKG
55	2A9	重链 CDR3 区 氨基酸序列	RMPYWFYFDV
56	2A9	轻链 CDR1 区 氨基酸序列	SASSSVSYIH
57	2A9	轻链 CDR2 区 氨基酸序列	DTSKLAS
58	2A9	轻链 CDR3 区 氨基酸序列	QQWVSNPLT
59	4F11	重链 CDR1 区 氨基酸序列	EYIMH
60	4F11	重链 CDR2 区 氨基酸序列	GINPNTGGITYNQKFKD
61	4F11	重链 CDR3 区 氨基酸序列	AGGNFLWYFDV
62	4F11	轻链 CDR1 区 氨基酸序列	SASSSVSYMH

63	4F11	轻链 CDR2 区 氨基酸序列	DTSKLAS
64	4F11	轻链 CDR3 区 氨基酸序列	QQWNSNPLT
65	15A2	重链 CDR1 区 氨基酸序列	SYDIN
66	15A2	重链 CDR2 区 氨基酸序列	WIDPGDGSTKYNEKFKG
67	15A2	重链 CDR3 区 氨基酸序列	RGFDY
68	15A2	轻链 CDR1 区 氨基酸序列	RTSSSVSYLH
69	15A2	轻链 CDR2 区 氨基酸序列	DTSNLAS
70	15A2	轻链 CDR3 区 氨基酸序列	HQRSSYPWT
71	7B7	重链 CDR1 区 氨基酸序列	SYAVS
72	7B7	重链 CDR2 区 氨基酸序列	SISGGGIYIYPDSVKG
73	7B7	重链 CDR3 区 氨基酸序列	HGGAGYFDY
74	7B7	轻链 CDR1 区 氨基酸序列	RGSSEVHSLA
75	7B7	轻链 CDR2 区 氨基酸序列	NAKTLQS
76	7B7	轻链 CDR3 区 氨基酸序列	QQHYGSPPW
77	7E6	重链 CDR1 区 氨基酸序列	DYAMH
78	7E6	重链 CDR2 区 氨基酸序列	VINSYYGNTHYNQKFKG
79	7E6	重链 CDR3 区 氨基酸序列	AGGYSYGSSYPDRFAY
80	7E6	轻链 CDR1 区 氨基酸序列	LASQTIGTWLA
81	7E6	轻链 CDR2 区 氨基酸序列	AATNLAD
82	7E6	轻链 CDR3 区 氨基酸序列	QQLYSTPYT
83	2E10	重链 CDR1 区 氨基酸序列	EYTMH
84	2E10	重链 CDR2 区 氨基酸序列	GINTDNGGTTYQKFKD
85	2E10	重链 CDR3 区 氨基酸序列	SFNNYGPWFAY
86	2E10	轻链 CDR1 区 氨基酸序列	KASQDVRSVA
87	2E10	轻链 CDR2 区 氨基酸序列	WASTRHT
88	2E10	轻链 CDR3 区 氨基酸序列	QQYSSYFT
89	2F12	重链 CDR1 区 氨基酸序列	ENTMH
90	2F12	重链 CDR2 区 氨基酸序列	GINPNNGGTTYNQKFKG
91	2F12	重链 CDR3 区 氨基酸序列	RGRWPPDWYFDV
92	2F12	轻链 CDR1 区 氨基酸序列	SASSLSYMH
93	2F12	轻链 CDR2 区 氨基酸序列	DTSKLAS
94	2F12	轻链 CDR3 区 氨基酸序列	QQWSSNPLT
95	2F7	重链 CDR1 区 氨基酸序列	SYIY
96	2F7	重链 CDR2 区 氨基酸序列	GIKPSNGDTNFNAKFMN
97	2F7	重链 CDR3 区 氨基酸序列	FFYGSPYDFDV
98	2F7	轻链 CDR1 区 氨基酸序列	KASENVDTHTVS
99	2F7	轻链 CDR2 区 氨基酸序列	GTSNRFT
100	2F7	轻链 CDR3 区 氨基酸序列	GQSYRYPYT
101	13A2	重链 CDR1 区 氨基酸序列	EYVMH
102	13A2	重链 CDR2 区 氨基酸序列	GINPNTGGTTYNQKFEG
103	13A2	重链 CDR3 区 氨基酸序列	RMPFGISAMDY
104	13A2	轻链 CDR1 区 氨基酸序列	SASSSVSYIH
105	13A2	轻链 CDR2 区 氨基酸序列	ETSKLAS
106	13A2	轻链 CDR3 区 氨基酸序列	HQWISYPPT
107	14B3	重链 CDR1 区 氨基酸序列	DHAIH
108	14B3	重链 CDR2 区 氨基酸序列	VINTYSGNTNFNQKLKG
109	14B3	重链 CDR3 区 氨基酸序列	GAHSSGYPYWYFDV
110	14B3	轻链 CDR1 区 氨基酸序列	RASSSVSYMH

111	14B3	轻链 CDR2 区 氨基酸序列	ATSNLAS
112	14B3	轻链 CDR3 区 氨基酸序列	QQWSTNPFT

实施例 5

杂交瘤单克隆抗体的 ADCC 活性测试

用报告基因（Reporter）法测试抗体的 ADCC 活性：以 293T-B7H3、
5 PC9 或 DLD1 肿瘤细胞为靶向细胞，Jurkat-mCD16.2-NF-kB 或 Jurkat-hCD16-NF-kB 细胞为效应细胞，利用 mCD16.2 或 hCD16 介导的转录因子 NF-kB 的活化信号筛选 ADCC 阳性克隆。取 50μL 在上述 ELISA 和 FACS 检测中呈阳性的杂交瘤抗体与 25μL 的 293T-B7H3、PC9 或 DLD1 肿瘤细胞（ 7.5×10^4 个/孔）混合，加至 96 孔板，再加入 25μL
10 Jurkat-mCD6.2-NF-kB 细胞（ 2.5×10^4 个/孔），混匀，置于 37℃培养箱中孵育 4 小时。每孔加入 25 μL 预热的 Bright-Glo 溶液(Promega, Cat. No.: E2620)，室温避光静置 3 分钟，用酶标仪（Tecan Spark）测定各样品的冷光（Luminescence）信号值。

由于杂交瘤抗体中，小鼠的 IgG1 抗体没有 ADCC 活性。经基因测序后，
15 我们确认了 14 个杂交瘤抗体中，9 个是以小鼠 IgG1 为基础的，5 个是以 IgG2b 或 IgG2a 为基础的(见表 3)。图 6a 显示了杂交瘤抗体基于 Jurkat-B7H3 为靶向细胞的 ADCC 报告基因测试结果。跟预期的一样，5 个以 IgG2b 或 IgG2a 为基础的杂交瘤抗体具 ADCC 活性，而 9 个以小鼠 IgG1 为基础的，没有活性。因此对于 9 个以小鼠 IgG1 为基础的杂交瘤抗体，我们作 Fc
20 的替换，把这些抗体变成了以人源 IgG1 为基础的嵌合抗体，如图 6b 所示。图 7 和图 8 反映的是基于 PC9 或 DLD1 肿瘤细胞为靶向细胞的 ADCC 报告基因测试结果，抗体的形式是以人源 IgG1 为基础的嵌合抗体。综合 ADCC 报告基因的测试结果，ADCC 活性相对较强的包括 9C8，5B6，7C9，F5，7E6，2A9，4F11 等。

25 表 3，B7H3 杂交瘤抗体的 Fc 类型

Abs	2A9	13A2	4F11	9C8	5B6	7E6	7F5	2F7	7C9	2E10	7B7	14B3	2F12	15A2
Fc	IgG2b	IgG2b	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG1	IgG2b	IgG1	IgG2a	IgG2b	IgG1	IgG1	IgG1

实施例 6

人源化 B7H3 抗体 2A9 、 4F11、 9C8、 15A2、 5B6 和 7B7

综合杂交瘤抗体的各方面特性,我们挑选了 6 个 B7H3 抗体,包括 2A9 、
5 4F11、 9C8、 15A2、 5B6 和 7B7, 进行了人源化改造。

采用互补决定簇嫁接法进行 B7H3 抗体的人源化改造。首先,在 IMGT 数据库中分别搜寻与鼠源 2A9 、 4F11、 9C8、 15A2、 5B6 和 7B7 抗体的轻、重链可变区序列同源性最高的人胚系抗体(germline antibody)序列。2A9 抗体轻链可变区人源化选取的胚系为 IGKV3-11*01, 重链可变区人源化选取
10 IGHV1-2*02。4F11 抗体轻链可变区人源化选取的胚系为 IGKV3-11*01, 重链可变区人源化选取 IGHV1-2*02。9C8 抗体轻链可变区人源化选取的胚系为 IGKV3-11*01, 重链可变区人源化选取 IGHV1-46*01。15A2 抗体轻链可变区人源化选取的胚系为 IGKV3-11*01, 重链可变区人源化选取
15 IGHV1-8*01。5B6 抗体轻链可变区人源化选取的胚系为 IGKV1-39*01, 重链可变区人源化选取 IGHV1-69*02。7B7 抗体轻链可变区人源化选取的胚系为 IGKV1-39*01, 重链可变区人源化选取 IGHV3-21*01。保留鼠源抗体的 CDR 区,将鼠源抗体的框架区(framework)序列用人胚系抗体的框架区序列置换。建立鼠源抗体的结构模型,逐个对比人源抗体与相应鼠源抗体框架区中每个位点的氨基酸,如果框架区的某个位点采用人的氨基酸序列没有导致 CDR 区域空间结构的破坏或改变,则该位点使用人的氨基酸序列,
20 否则在该位点使用对应的鼠源序列(即回复突变为鼠源序列)。

根据结构模拟,将 2A9 抗体人源化重链的第 24 位 Ala 回复突变为 Thr, 第 48 位 Met 回复突变为 Ile, 第 67 位 Val 回复突变为 Ala, 第 69 位 Met 回复突变为 Leu, 第 71 位 Arg 回复突变为 Val, 第 73 位 Thr 回复突变为 Lys。
25 将 2A9 抗体人源化轻链的第 46 位 Leu 回复突变为 Arg, 第 47 位 Leu 回复

突变为 Trp, 第 48 位 Ile 回复突变为 Val, 第 71 位 Phe 回复突变为 Tyr。将 4F11 抗体人源化重链的第 24 位 Ala 回复突变为 Thr, 第 48 位 Met 回复突变为 Ile, 第 67 位 Val 回复突变为 Ala, 第 69 位 Met 回复突变为 Leu, 第 71 位 Arg 回复突变为 Val, 第 73 位 Thr 回复突变为 Lys。将 4F11 抗体人源化轻链的第 46 位 Leu 回复突变为 Arg, 第 47 位 Leu 回复突变为 Trp, 第 48 位 Ile 回复突变为 Val, 第 71 位 Phe 回复突变为 Tyr。将 9C8 抗体人源化重链的第 48 位 Met 回复突变为 Ile, 第 67 位 Val 回复突变为 Ala, 第 69 位 Met 回复突变为 Leu, 第 71 位 Arg 回复突变为 Val, 第 73 位 Thr 回复突变为 Lys。将 9C8 抗体人源化轻链的第 2 位 Ile 回复突变为 Thr, 第 46 位 Leu 回复突变为 Arg, 第 47 位 Leu 回复突变为 Trp, 第 71 位 Phe 回复突变为 Tyr。将 15A2 抗体人源化重链的第 48 位 Met 回复突变为 Ile, 第 67 位 Val 回复突变为 Ala, 第 69 位 Met 回复突变为 Leu, 第 71 位 Arg 回复突变为 Ala, 第 73 位 Thr 回复突变为 Lys。将 15A2 抗体人源化轻链的第 36 位 Tyr 回复突变为 Phe, 第 47 位 Leu 回复突变为 Trp, 第 49 位 Tyr 回复突变为 His, 第 58 位 Ile 回复突变为 Phe, 第 71 位 Phe 回复突变为 Tyr。将 5B6 抗体人源化重链的第 27 位 Gly 回复突变为 Tyr, 第 30 位 Ser 回复突变为 Ile, 第 48 位 Met 回复突变为 Ile, 第 67 位 Val 回复突变为 Ala, 第 69 位 Ile 回复突变为 Leu。将 5B6 抗体人源化轻链的第 46 位 Leu 回复突变为 Arg, 第 47 位 Leu 回复突变为 Pro, 第 66 位 Gly 回复突变为 Ala, 第 71 位 Phe 回复突变为 Tyr, 第 98 位 Phe 回复突变为 Ile。将 7B7 抗体人源化重链的第 49 位 Ser 回复突变为 Ala。将 7B7 抗体人源化轻链的第 2 位 Ile 回复突变为 Ser, 第 48 位 Ile 回复突变为 Val。

人源化抗体重链和轻链的可变区氨基酸序列号分别为 SEQ ID NO: 113 和 SEQ ID NO: 114。4F11 人源化抗体重链和轻链的可变区氨基酸序列号分别为 SEQ ID NO: 115 和 SEQ ID NO: 116。9C8 人源化抗体重链和轻链的可变区氨基酸序列号分别为 SEQ ID NO: 117 和 SEQ ID NO: 118。15A2 人源化抗体重链和轻链的可变区氨基酸序列号分别为 SEQ ID NO: 119 和

SEQ ID NO: 120。5B6 人源化抗体重链和轻链的可变区氨基酸序列号分别为 SEQ ID NO: 121 和 SEQ ID NO: 122。7B7 人源化抗体重链和轻链的可变区氨基酸序列号分别为 SEQ ID NO: 123 和 SEQ ID NO: 124。将以上人源化抗体构建为 IgG1 亚型。人源化抗体的重链和轻链的可变区氨基酸序列信息见表 4。

合成编码 2A9、4F11、9C8、15A2、5B6 和 7B7 人源化抗体轻链和重链的核酸序列，并插入到表达载体 pcDNA3.1。用 0.1 mg 抗体轻链和 0.1 mg 抗体重链表达质粒共转染 200 mL 的 293 细胞（细胞密度为 $1 \times 10^6/\text{mL}$ ），在 37°C 摇瓶振荡培养 6 天，离心收集上清液，用 Protein A 纯化人源化抗体，纯化后的人源化抗体进行活性检测。

表 4. B7H3 人源化抗体的序列表。

SEQ ID NO.	具体描述		具体氨基酸序列
	人源化抗体	序列描述	
113	hu2A9	人源化重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTEYIMH WVRQAPGQGLEWIGGINPNSGGTTYNEKFKGRATLT VDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARRMPYWFYFDV WGQGTMTVTVSS
114		人源化轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYIHWHYQQK PGQAPRRWVYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDYTLTISS LEPEDFAVYYCQQWVSNPLTFGQGTKLEIK
115	hu4F11	人源化重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKTSGYTFTEYIMH WVRQAPGQGLEWIGGINPNTGGITYNQKFKDRATLT VDKSISTAYMELSRLRSDDTAVYYCARAGGNFLWYF DVWGQGTMTVTVSS
116		人源化轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMHWHYQQ KPGQAPRRWLYDTSKLASGIPARFSGSGSGTDYTLTI SSLEPEDFAVYYCQQWNSNPLTFGQGTKLEIK
117	hu9C8	人源化重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYTIH WVRQAPGQGLEWIGGINPNSGGTTYNLKFKGRATLT VDKSTSTVYMELSSRLRSEDVAVYYCARKEGFFTDY WGQGTMTVTVSS
118		人源化轻链	ETVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSLSYIHWHYQQK PGQAPRRWIYDTSNLATGIPARFSGSGSGTDYTLTISS LEPEDFAVYYCQQWHYNPPTFGGGTKVEIK
119	hu15A2	人源化重链	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYDIN WVRQATGQGLEWIGWIDPGDGSTKYNEKFKGRATLT ANKSISTAYMELSSRLRSEDVAVYYCVRRGFDYWGQG TLTVTVSS
120		人源化轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRTSSSVSYLHWFQQK PGQAPRLWIHDTSNLASGFARFSGSGSGTDYTLTISS LEPEDFAVYYCHQRSSYPWTFGGGTKVEIK
121	hu5B6	人源化重链	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYTFITYTIHW VRQAPGQGLEWIGYINPTSDYANFNQKFKDRATLTA DKSTSTAYMELSSRLRSEDVAVYYCARWGTTFVQFYF DYWGQGTMTVTVSS
122		人源化轻链	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSLSYINWHYQQK PGKAPKPIYATSSLQSGVPSRFSGSASGTDYTLTISS LQPEDFATYYCQHWSSDPPTIGGGTKVEIK
123	hu7B7	人源化重链	EVQLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSSYAVSWV

			RQAPGKGLEWVASISGGGIYIYPDSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHGGAGYFDYW GQGTLLTVSS
124	hu7B7	人源化轻链	DSQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRGSESVHSYLAWY QQKPGKAPKLLVYNNAKTLQSGVPSRFSGSGSGTDFT LTISSLQPEDFATYYCQGHYGSPPWTFGGGTKVEIK

实施例 7

人源化 B7H3 抗体与 B7H3 的结合作用

用 ELISA、FACS 检测人源化 B7H3 抗体样品与 B7H3 蛋白的结合活性，
5 具体方法参考实施例 2。人源化抗体 hu2A9、hu4F11、hu5B6、hu9C8、hu15A2 和 hu7B7 的测定结果见表 5-6 和图 9-10。总体上，本发明的抗体经人源化后，保持了人源化前的高抗原亲和力的作用，尤其是 hu15A2、hu7B7 和 hu5B6。

表 5. 用 ELSIA 检测人源化 B7H3 抗体与 B7H3-mFc 蛋白的结合作用

抗体 EC ₅₀	hu2A9	hu4F11	hu5B6	hu9C8	hu15A2	hu7B7
(ng/mL)	17.49	40.55	12.73	19.90	3.84	6.35

10 表 6. 用 FACS 测定人源化 B7H3 抗体和细胞表面 B7H3 的结合作用

抗体 EC ₅₀	hu2A9	hu4F11	hu5B6	hu9C8	hu15A2	Hu7B7
(ng/mL)	140.4	126.7	62.05	79.0	14.3	11.34

实施例 8

人源化 B7H3 抗体细胞内吞作用的检测

具体测定方法参考实施例 3。结果如表 7 和图 11 所示；PC9 细胞对人
15 源化 B7H3 抗体具有显著的内吞作用。与阳性对照(MacroGenics 的 MGA018 和 MSKCC 的 8H9)比较,本发明抗体的细胞内吞作用比 8H9 强不少;另外, hu15A2 和 hu7B7 也胜过 MGC018。

表 7. PC9 肿瘤细胞对人源化 B7H3 抗体的内吞作用

抗体 EC ₅₀	hu2A9	hu4F11	Hu5B6	hu9C8	hu15A2	Hu7B7	MGC018	8H9
(ng/mL)	118.8	88.4	48.88	61.68	29.9.7	16.45	38.16	172.9

实施例 9

与毒素偶联的人源化 B7H3 抗体 (B7H3-ADC) 对 Calu-6 肿瘤细胞的毒杀作用

- 5 通过化学偶联方法, 将 Vc-MMAE 偶联到 B7H3 抗体上。按 3:1 摩尔比用 TCEP 还原 B7H3 抗体, 在 37℃ 孵育 45 分钟, 通过超滤去除 TCEP。用 0.5ml PBS 重悬抗体, 加入 B7H3 抗体 6 倍摩尔数的 Vc-MMAE, 于 4℃ 孵育 120 分钟, 用超滤去除未偶联的 Vc-MMAE, 检测抗体浓度备用。将 100μl PC9 (每孔 5000 细胞) 和 100μl 梯度稀释的 B7H3-ADC 加入到 96 孔板。
- 10 在 37℃ 孵育 5 天后, 每孔加入 xμl CellTiter-Glo, 检测荧光强度, 计算抗体抑制肿瘤细胞增殖的能力。结果如图 12 和表 8 所示, 人源化 B7H3 抗体偶联 MMAE 毒素后对 Calu-6 肿瘤细胞具有显著的毒杀作用; 比 MacroGenics 的阳性对照 (MGC018-MMAE) 具更强的活性。

表 8. 人源化 B7H3 抗体与 MMAE 的偶联物对 Calu-6 肿瘤细胞的毒杀作用

抗体 EC ₅₀	hu7B7-M MAE	hu15A2-M MAE	hu5B6-M MAE	hu2A9-M MAE	hu4F11-M MAE	hu9C8-M MAE	MGC018-M MAE
(p M)	4.877	5.003	4.909	11.45	8.295	16.82	23.37

15

实施例 10

人源化 B7H3 抗体 ADCC 作用的检测

具体测定方法参考实施例 5。结果如表 9 和图 13, 展示了人源化 B7H3 抗体具显著的 ADCC 活性。MGA271 (MG-Ab) 是 MacroGenics 的抗体;

与之相比较，人源化 9C8、5B6、2A9 和 4F11 抗体具更小的 EC₅₀ 值相，反映了更好的 ADCC 活性。

表 9. 人源化 B7H3 抗体的 ADCC 作用

内吞 EC ₅₀ \ 抗体		hu2A9	hu4F11	Hu5B6	hu9C8	MGA271
Jurkat-B7H3	EC ₅₀ (ng/mL)	43.03	54.79	26.72	32.68	116
PC9		88.72	190.4	74.50	70.86	295.3

5 **实施例 11**

人源化 B7H3 抗体介导 NK92MI-hCD16 细胞对 Jurkat-B7H3 和 PC9 细胞的 ADCC 毒杀作用

采用 NK92MI-hCD16 模拟 NK 细胞来评估 B7H3 抗体的杀伤肿瘤活性。将 25 μl 用 CFSE 染色的 PC9(每孔 0.5×10⁵ 细胞)和 25 μl NK92MI-hCD16
10 （每孔 1×10⁵ 细胞）混合，加入 50 μl 梯度稀释的 B7H3 抗体。在 37℃ 下孵育 4 小时后，每孔加入 5 μl 7-AAD，室温孵育 10 分钟，将 96 孔板离心去上清液重悬后，使用流式细胞仪检测 CFSE 和 7-AAD 双阳性的细胞在 CFSE 阳性细胞的比例，得出 B7H3 抗体介导的 NK 细胞杀伤活性。结果如图 14 所示，人源化 B7H3 抗体 9C8、5B6、2A9 和 4F11 可明显引起
15 NK92MI-hCD16 细胞对 PC9 肿瘤细胞的 ADCC 杀伤作用。

实施例 12

人源化 B7H3 抗体对人 PBMC 细胞分泌细胞因子的促进作用

具体测定方法参考实施例 3。结果如图 15 所示，人源化 B7H3 抗体 5B6、
20 2A9 和 4F11 有显著促进人 PBMC 细胞分泌 IFN-γ 的作用。

以上仅为本发明的较佳实施例而已，不能以此限定本发明的保护范围，

即大凡依本发明权利要求书及实用新型内容所做的简单的等效变化与修改，皆仍属于本发明专利申请的保护范围。

权 利 要 求 书

1. B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段,其包括重链 CDR 和轻链 CDR,所述重链 CDR 和轻链 CDR 具有选自 a~n 所示 CDR 组合中的一组或多组:

组合名称	重链 CDR1	重链 CDR2	重链 CDR3	轻链 CDR1	轻链 CDR2	轻链 CDR3
a	SEQ ID NO:29	SEQ ID NO:30	SEQ ID NO:31	SEQ ID NO:32	SEQ ID NO:33	SEQ ID NO:34
b	SEQ ID NO:35	SEQ ID NO:36	SEQ ID NO:37	SEQ ID NO:38	SEQ ID NO:39	SEQ ID NO:40
c	SEQ ID NO:41	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:43	SEQ ID NO:44	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:46
d	SEQ ID NO:47	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:49	SEQ ID NO:50	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:52
e	SEQ ID NO:53	SEQ ID NO:54	SEQ ID NO:55	SEQ ID NO:56	SEQ ID NO:57	SEQ ID NO:58
f	SEQ ID NO:59	SEQ ID NO:60	SEQ ID NO:61	SEQ ID NO:62	SEQ ID NO:63	SEQ ID NO:64
g	SEQ ID NO:65	SEQ ID NO:66	SEQ ID NO:67	SEQ ID NO:68	SEQ ID NO:69	SEQ ID NO:70
h	SEQ ID NO:71	SEQ ID NO:72	SEQ ID NO:73	SEQ ID NO:74	SEQ ID NO:75	SEQ ID NO:76
i	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:78	SEQ ID NO:79	SEQ ID NO:80	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:82
g	SEQ ID NO:83	SEQ ID NO:84	SEQ ID NO:85	SEQ ID NO:86	SEQ ID NO:87	SEQ ID NO:88
k	SEQ ID NO:89	SEQ ID NO:90	SEQ ID NO:91	SEQ ID NO:92	SEQ ID NO:93	SEQ ID NO:94
l	SEQ ID NO:95	SEQ ID NO:96	SEQ ID NO:97	SEQ ID NO:98	SEQ ID NO:99	SEQ ID NO:100
m	SEQ ID NO:101	SEQ ID NO:102	SEQ ID NO:103	SEQ ID NO:104	SEQ ID NO:105	SEQ ID NO:106
n	SEQ ID NO:107	SEQ ID NO:108	SEQ ID NO:109	SEQ ID NO:110	SEQ ID NO:111	SEQ ID NO:112

。

5 2. 根据权利要求 1 所述的 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段,其包括重链可变区和轻链可变区,所述重链可变区和轻链可变区选自 A~N 所示可变区组合中的一组或多组:

组合名称	重链可变区	轻链可变区
A	SEQ ID NO:1	SEQ ID NO:2
B	SEQ ID NO:3	SEQ ID NO:4

C	SEQ ID NO:5	SEQ ID NO:6
D	SEQ ID NO:7	SEQ ID NO:8
E	SEQ ID NO:9	SEQ ID NO:10
F	SEQ ID NO:11	SEQ ID NO:12
G	SEQ ID NO:13	SEQ ID NO:14
H	SEQ ID NO:15	SEQ ID NO:16
I	SEQ ID NO:17	SEQ ID NO:18
J	SEQ ID NO:19	SEQ ID NO:20
K	SEQ ID NO:21	SEQ ID NO:22
L	SEQ ID NO:23	SEQ ID NO:24
M	SEQ ID NO:25	SEQ ID NO:26
N	SEQ ID NO:27	SEQ ID NO:28

。

3. 根据权利要求 2 所述的 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段，所述重链可变区和轻链可变区经过人源化。

4. 根据权利要求 3 所述的 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段，所述
5 人源化后的重链可变区和轻链可变区选自 1~6 所示可变区组合中的一组或多组：

组合名称	重链可变区	轻链可变区
1	SEQ ID NO:113	SEQ ID NO:114
2	SEQ ID NO:115	SEQ ID NO:116
3	SEQ ID NO:117	SEQ ID NO:118
4	SEQ ID NO:119	SEQ ID NO:120
5	SEQ ID NO:121	SEQ ID NO:122
6	SEQ ID NO:123	SEQ ID NO:124

。

5. 根据权利要求 4 所述的 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段，其具有人 IgG1 的恒定区。

6. 权利要求 1-5 任一项所述的 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段在制备如下药物中的用途：调节 B7H3 活性或 B7H3 水平的药物、具明显的细胞内吞作用（可通过毒素偶联选择性地毒杀或抑制肿瘤等）、或显著的抗体依赖性细胞毒性（ADCC）、或具阻断 B7H3 在免疫抑制中作用从而增强机体免疫的药物、促进 T 淋巴细胞的药物或者提高 T 淋巴细胞中细胞因子如 IFN- γ 产生的药物。

7. 一种单克隆抗体偶联物，包括单克隆抗体和偶联部分，其中，所述单克隆抗体为权利要求 1-5 任一项所述的 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段，所述偶联部分为选自放射性核素、药物、毒素、细胞因子、细胞因子受体片段、酶、荧光素、和生物素中的一种或多种。

8. 权利要求 7 中所述的单克隆抗体偶联物在制备如下药物中的用途：调节 B7H3 活性或 B7H3 水平的药物、具明显的细胞内吞作用的药物（可通过毒素偶联选择性地毒杀或抑制肿瘤等）、具显著抗体依赖性细胞毒性（ADCC）的药物、或具阻断 B7H3 在免疫抑制中作用从而增强机体免疫的药物、促进 T 淋巴细胞的药物或者提高 T 淋巴细胞中细胞因子如 IFN- γ 产生的药物。

9. 权利要求 7 中所述的单克隆抗体偶联物在制备预防和/或治疗和/或辅助治疗肿瘤的药物中的用途。

10. 表达载体，其包含权利要求 1-5 任一项所述的 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段的核酸分子。

11. 药物组合物，其包含权利要求 1-5 任一项所述的 B7H3 单克隆抗体或其抗原结合片段，以及药用载体。