

含有衔接器的药物治疗剂的开发和应用

5 技术领域

本公开涉及一种双特异性抗体及其用途，特别是结合 CD20 和 CD3 的双特异性抗体及其用途。

背景技术

CD20 是一种在 B 淋巴细胞表面表达的糖基化膜蛋白，除了前体 B 细胞和终末期的浆细胞，人 B 细胞在几乎整个分化周期均表达 CD20 抗原 (Tedder 等, J. Immunol. 135(2): 973-979, 1985)。CD20 也是一种 B 细胞肿瘤相关抗原，在 95% 以上的 B 细胞非霍奇金淋巴瘤 (B-NHL) 和其他 B 细胞恶性肿瘤中表达 (Anderson 等, Blood 63(6): 1424-1433, 1984)。1997 年，针对 CD20 的嵌合抗体 Rituximab 批准上市，接受 Rituximab 和其他药物联合治疗后，患者的 5 年存活率平均可达 60-70%。第二代 CD20 抗体 Ofatumumab (Teeling 等, Blood 104(6): 1793-800, 2004) 和第三代 CD20 抗体 obinutuzumab、Ocrelizumab 等被开发用于慢性淋巴细胞白血病或多发性硬化症的治疗。尽管 CD20 单抗对多数 B-NHL 患者有疗效，但仍有 10% 以上的患者属于原发难治性病例。另外，Rituximab 治愈患者中，约 30-40% 患者会在 2-3 年内出现复发，并对现有治疗产生耐药，平均生存期仅 6.3 个月。因此，急需针对这部分患者的需求开发具有新机制的治疗药物。

T 细胞双特异抗体 (或称 T 细胞衔接器)，是一种人为构建的特殊抗体分子，可通过其一端识别靶细胞表面抗原 (抗原臂)，通过另一端结合 T 细胞 CD3 受体 (CD3 臂)。利用靶向 CD3 ϵ 链的抗体，以一种类似于 TCR/肽/HLA 的方式，使 T 细胞上的 CD3 发生聚集，从而活化 T 细胞并杀伤肿瘤。上世纪 80 年代，即有报道利用双特异抗体杀伤肿瘤细胞 (Nature. 1985 Apr 18-24; 314(6012):628-31; Nature. 1985 Jul 25-31; 316(6026):354-6)，2005 年 Gall 等报道利用 CD20 $\times$ CD3 双特异抗体杀伤 Rituximab 耐药的肿瘤细胞 (2005 Experimental Hematology 33: 452)；类似的报道还有，Stanglmaier 等从小鼠和大鼠 IgG 构建的双特异抗体 Bi20/FBTA05 (Int. J. Cancer: 123, 1181, 2008)，Wu 等开发的新型 DVD-Ig 抗体 (Nat Biotechnol. 25: 1290-1297, 2007)；Sun 等基于 CD3 抗体 UCHT1 开发的 CD20-TDB 双特异抗体 (Science translational medicine. 2015; 7:287ra270-287ra270) 和 Smith 等基于 VelocImmune 小鼠开发的 REGN1979 (Clin Trans Immunol. 2015;4:e31) 等。

CD20 $\times$ CD3 双特异性分子是靶向 B 细胞上表达的 CD20 和 T 细胞上存在的 CD3 ϵ 链 (CD3 ϵ) 的 T 细胞双特异性 (TCB) 抗体。CD20 $\times$ CD3 双特异性分子的作用机制包含同时结合 CD20+B 细胞和 CD3+T 细胞，引起 T 细胞活化和 T 细胞介导的 B 细胞杀伤。

正常免疫应答过程中，TCR 以低亲和力 (约 1-100 μ M) 结合感染或突变细胞上的外源肽-人白细胞抗原复合物 (HLA)，通过 CD3 将活化信号传导到核内，激活转录因子及其下游蛋白 (细胞因子、颗粒酶、穿孔素等) 的表达，其中 TCR 复合物产生的信号强度将决定 T 细胞的命运。信号传导复合物的 ϵ 、 γ 、 δ 以及 ζ 亚基彼此缔合以形成 CD3 ϵ - γ 异源二聚体、CD3 ϵ - δ 异源二聚体以及 CD3 ζ - ζ 同源二聚体。而早期开发的 CD3 双特异抗体，多基于 OKT3、L2K、UCHT1 和 TR66 等少数鼠源抗体，亲和力较高。在临床研究发现，CD3 抗体的亲和力过强将导致 T 细胞过度活化，并释放大量细胞因子，形成细胞因子风暴综合征；同时，高亲和力也会导致双特异抗体在二级淋巴器官的富集，减低了在肿瘤组织的暴露。抗体 Fc 部分与 Fc γ 受体的结合能力是另一个对影响药物安全的重要因素，由于 Fc γ 受体在多种正常组织表达，双特异抗体通过 Fc 与细胞膜上的 Fc γ 受体结合后，可导致另一端结合的 CD3 受体因 Fc γ 受体聚集而交联活化，从而产生严重的脱靶毒性，例如：早期上市的 catumaxomab 由于 Fc 段与肝脏 Kupffer 细胞表达的 Fc γ 受体结合，引发了快速的细胞因子释放。通过使用 Fc γ 受体结合能力较弱的人 IgG2 亚型或 IgG4 亚型，或者进一步在 CH2 相应位点进行氨基酸替换，如：Armour 等将 IgG1 和 IgG4 的第 233-236 位点 (EU 序列编号) 替换成 IgG2 相应序列，减少了和 Fc γ 受体的结合 (Eur. J. Immunol. 1999)，Newman 等在 IgG4 引入突变 Ser228Pro 和 Leu235Glu，稳定 IgG4 结构同时减少与 Fc γ 受体的结合 (Clin Immunol. 2001)，Idusogie 等发现将 Asp270、Lys322、Pro329 或 Pro331 分别替换成 Ala，可减少 IgG1 与补体 C1q 的结合 (J Immunol. 2000) 等。

45 发明内容

为了解决现有技术中存在的问题，本公开提供了一种新型 CD20-CD3 κ 双特异抗体，采用全长 IgG 构型，通过引入电荷及亲和力优化，使 κ 双特异抗体优先定位到 CD20+肿瘤组织，低浓度下即可募集活化 T 细胞，对靶细胞产生有效杀伤，无靶细胞存在时不激活 T 细胞；同时， κ 双特异抗体不与 Fc γ RI、Fc γ RIIA 和 Fc γ RIIIA 等受体结合，减低了产生细胞因子风暴的风险。药效试验证实，这种新型 CD20-CD3 κ 双特异抗体在极低剂量，即可抑制肿瘤生长，有效抑制免疫重建小鼠移植瘤的生长；在食蟹猴体内进行的毒理研究也显示，动物对新型 CD20-CD3 κ 双特异抗体耐受良好，低剂量条件下即可有效清除 B 细胞，新型 CD20-CD3 κ 双特异抗体的疗效和安全性均优于同类抗体。

因此，在一方面，本公开提供了一种双特异性抗体或其抗原结合部分。

在一方面，本公开提供了编码如前述方面的双特异性抗体或其抗原结合部分的核酸。

在一方面，本公开提供了包含前述方面的核酸的载体。

在一方面，本公开提供了包含前述方面的核酸或载体的细胞。

根据前述任一方面的抗体或其抗原结合部分,其中所述抗体或其抗原结合部分是人源化的。

在一方面,本公开提供了包含如前述任一方面的抗体或其抗原结合部分或其编码核酸和药学上可接受的载体的药物组合物或试剂盒。

在一方面,本公开提供了包含共价附着至治疗部分的前述任一方面所述的抗体或其抗原结合部分、双特异性或多特异性分子的抗体-药物偶联物。

在一方面,本公开提供了治疗与 CD20 相关病症的方法,其包括下述步骤:向所述哺乳动物施用治疗有效量的前述任一方面的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、细胞和/或药物组合物。

在一方面,本公开提供了前述任一方面的抗体或其抗原结合片段、核酸、载体、细胞和/或药物组合物在制备用于治疗哺乳动物中与 CD20 相关病症的药物或试剂盒中的用途。

本公开的抗体可以用于多种应用,包括检测 CD20 蛋白,诊断、治疗或预防与 CD20 相关的疾病。

附图说明

图 1 示出了流式细胞检测人和猴 CD20 稳转细胞,人 CD20 稳转细胞 (CHO-hCD20-3G6) 和猴 CD20 稳转细胞 (CHO-cyCD20-1G9) 均表达高水平的 CD20。

图 2 示出了 CD3 $\epsilon\gamma$ -Fc 重组蛋白的 SDS-PAGE 结果。

图 3 示出了人源化 CD3 抗体与 CD3 $\epsilon\gamma$ -Fc 重组蛋白的结合。

图 4 示出了人源化 CD3 抗体与 Jurkat 细胞的结合。

图 5 示出了人源化 CD20 抗体与 Raji 细胞的结合。

图 6 示出了人源化 CD20 抗体与 Daudi 细胞的结合。

图 7 示出了 CD20 $\times$ CD3 抗体组合与 Raji 细胞的结合。

图 8 示出了 CD20 $\times$ CD3 抗体组合与 Jurkat 细胞的结合。

图 9 示出了不同 CD20 $\times$ CD3 抗体组合对 Raji 细胞的杀伤活性和 T 细胞的激活,其中,图 9A 示出了不同 CD20 $\times$ CD3 抗体组合介导的 TDCC 杀伤作用;图 9B 示出了在 TDCC 杀伤过程中,CD20 $\times$ CD3 抗体组合可刺激 T 细胞活化标志物 CD69 和 CD25 上调。

图 10 示出了不同 CD20 $\times$ CD3 抗体组合对 NFAT 通路的特异性激活。

图 11 示出了本公开的 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体。

图 12 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体的毛细管电泳结果。

图 13 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体的纯化。

图 14 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体的质谱结果。

图 15 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体与 CD20 稳转细胞的结合。

图 16 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体高亲和力结合 CD20⁺肿瘤细胞。

图 17 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体与人和食蟹猴 CD3 $\epsilon\gamma$ 重组抗原的结合。

图 18 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体与 Jurkat 细胞的结合。

图 19 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体与人外周血 T 细胞的结合。

图 20 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对 Nalm-6 细胞的杀伤和 T 细胞的活化,其中,图 20A 显示对 Nalm-6 细胞的杀伤,图 20B 显示对 T 细胞的活化。

图 21 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对 TMD-8 细胞的杀伤和 T 细胞的活化,其中,图 21A 显示对 TMD-8 细胞的杀伤,图 21B 显示对 T 细胞的活化。

图 22 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对 Toledo 细胞的杀伤和 T 细胞的活化,其中,图 22A 显示对 Toledo 细胞的杀伤,图 22B 显示对 T 细胞的活化。

图 23 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对 T 细胞信号通路的活化。

图 24-26 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体激活细胞因子的释放,其中,图 24 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对 Raji 细胞的 TDCC 活性及过程中 T 细胞的活化;图 25 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对自体 B 细胞的清除及过程中 T 细胞的活化;图 26 示出了对 Raji 细胞的杀伤和对自体 B 细胞的清除过程中相关细胞因子的释放。

图 27 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对免疫缺陷型小鼠皮下 Raji 移植瘤模型的抑制作用。

图 28-29 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对人 PBMC 与 Raji 混合接种免疫缺陷型小鼠皮下接瘤模型的抑制作用,其中图 29 示出了低剂量组治疗效果的对比。

图 30 示出了 CD20 $\times$ CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体给药后食蟹猴 B 细胞被快速清除。

具体实施方式

I. 定义

在本公开中,除非另有说明,否则本文中使用的科学和技术名词具有本领域技术人员所通常理解的含义。并且,本文中所用的蛋白质和核酸化学、分子生物学、细胞和组织培养、微生物学、免疫学相关术语和实验室操作步骤均为相应领域内广泛使用的术语和常规步骤。同时,为了更好地理解本公开,下面提供相关术语的定义和解释。

CD20(也称作 B 淋巴细胞抗原 CD20, B 淋巴细胞表面抗原 B1, Leu-16, Bp35, BM5, 和 LF5; 人蛋白质在 UniProt 数据库条目 P11836 中表征)是一种在前 B 和成熟 B 淋巴细胞上表达的具有大约 35kD 分子量的疏水性跨膜蛋白(Valentine, M.A. et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 11282-11287; Tedder, T.F. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 85

(1988) 208-212; Stamenkovic, I. et al., J. Exp. Med. 167 (1988) 1975-1980; Einfeld, D.A. et al., EMBO J. 7 (1988) 711-717; Tedder, T.F. et al., J. Immunol. 142 (1989) 2560-2568)。相应的人基因是跨膜4域，亚家族A，成员1，也称作MS4A1。此基因编码跨膜4A基因家族的一个成员。此初生蛋白质家族的成员特征在于共同的结构特征和相似的内含子/外显子剪接边界且在造血细胞和非淋巴样组织中展示独特的表达样式。此基因编码在B细胞发育和分化成浆细胞中发挥作用的B淋巴细胞表面分子。在一簇家族成员中，此家族成员定位于11q12。此基因的可变剪接产生编码同一蛋白质的两种转录物变体。

如本文中使用的，术语“CD20”指来自任何脊椎动物来源，包括哺乳动物，诸如灵长动物(例如人)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)的任何天然CD20，除非另外指明。该术语涵盖“全长”，未加工的CD20以及源自细胞中加工的任何形式的CD20。该术语还涵盖CD20的天然发生变体，例如剪接变体或等位变体。在一个实施方案中，CD20是人CD20。一种示例性人CD20的氨基酸序列显示于SEQ ID NO:1。

术语“抗CD20抗体”和“结合CD20的抗体”指能够以足够亲和力结合CD20，使得该抗体作为诊断剂和/或治疗剂在靶向CD20中是有用的抗体。在一个实施方案中，抗CD20抗体对无关非CD20蛋白的结合程度小于该抗体对CD20的结合的约10%，如通过例如放射免疫测定法(RIA)测量的。在某些实施方案中，结合CD20的抗体具有 $\leq 1\mu\text{M}$ ， $\leq 100\text{nM}$ ， $\leq 10\text{nM}$ ， $\leq 1\text{nM}$ ， $\leq 0.1\text{nM}$ ， $\leq 0.01\text{nM}$ ，或 $\leq 0.001\text{nM}$ (例如 10^{-8}M 或更低，例如 10^{-8}M 至 10^{-13}M ，例如 10^{-9}M 至 10^{-13}M)的解离常数(K_d)。在某些实施方案中，抗CD20抗体结合在来自不同物种的CD20间保守的CD20表位。

“CD3”指来自任何脊椎动物来源，包括哺乳动物，诸如灵长动物(例如人)，非人灵长动物(例如食蟹猴)和啮齿动物(例如小鼠和大鼠)的任何天然CD3，除非另外指明。该术语涵盖“全长”未加工的CD3以及源自细胞中加工的任何形式的CD3。该术语还涵盖CD3的天然发生变体，例如剪接变体或等位变体。在一个实施方案中，CD3是人CD3，特别是人CD3的厄普西隆亚基(CD3 ϵ)。人CD3 ϵ 的氨基酸序列显示于UniProt (www.uniprot.org)登录号P07766(版本144)，或NCBI (www.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_000724.1。食蟹猴[Macaca fascicularis]CD3 ϵ 的氨基酸序列显示于NCBI GenBank no.BAB71849.1。

术语“细胞表面”的使用是根据其在本领域的正常含义，因此包括可通过与蛋白和其它分子结合而接近的细胞外部。

如本文使用的和除非另作说明，术语“约”或“大约”是指在给定值或范围的加或减10%之内。在需要整数的情况下，该术语是指在给定值或范围的加或减10%之内、向上或向下舍入到最接近的整数。

就抗体链多肽序列而言，短语“基本相同”可理解为表现出与参照多肽序列至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的抗体链。就核酸序列而言，该术语可理解为表现出与参照核酸序列至少大于60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性的核苷酸序列。

序列“相同性”或“同一性”具有本领域公认的含义，并且可以利用公开的技术计算两个核酸或多肽分子或区域之间序列相同性的百分比。可以沿着多核苷酸或多肽的全长或者沿着该分子的区域测量序列相同性。虽然存在许多测量两个多核苷酸或多肽之间的相同性的方法，但是术语“相同性”是技术人员公知的(Carrillo, H. & Lipman, D., SIAM J Applied Math 48:1073 (1988))。

“取代型”变体是天然序列中至少一个氨基酸残基被除去并被不同的氨基酸插入其相同位置的变体。所述取代可为单个的，其中该分子中仅有一个氨基酸被取代；或可为多个的，其中该相同分子有两个或更多的氨基酸被取代。多个取代可位于连续的位点。同样，一个氨基酸可被多个残基取代，其中这样的变体包括取代和插入二者。“插入型”变体是一个或多个氨基酸被插入到紧邻一段天然序列某个特定位置处的氨基酸的变体。紧邻氨基酸意指与该氨基酸的 α -羧基或 α -氨基官能团连接。“缺失型”变体是天然氨基酸序列中一个或多个氨基酸被除去的变体。通常情况下，缺失型变体在其分子的特定区域内有一个或两个氨基酸被缺失。

就抗体的可变结构域而言，术语“可变”系指抗体之间有广泛序列差异的相关分子的某些部分，且被用于针对其特异靶的特定抗体的特异识别和结合。但是，可变性在抗体的整个可变结构域内不是均匀分布的。可变性集中在被称为互补决定区域(CDRs；即CDR1、CDR2和CDR3)或超变区的三个区段，它们均位于轻链和重链的可变结构域内。可变结构域内保守程度更高的部分被称为构架(FR)区或构架序列。天然重链和轻链的每个可变结构域均包括四个FR区，其主要采用 β -折叠构型，它们籍三个CDRs连接起来，CDRs形成环，所述环连接 β -折叠结构并在某些情形下形成部分的 β -折叠结构。每条链的CDRs通常被FR区在邻近连接起来，并且借助于来自其它链的CDR，有助于抗体靶结合位点(表位或决定簇)的形成。正如本文所使用，免疫球蛋白氨基酸残基的编号是依据Kabat等人的免疫球蛋白氨基酸残基编号系统而进行的，除非另有说明。一个CDR可具有特异结合关联表位的能力。

如本文所用，抗体的“抗体片段”或“抗原结合片段”指全长抗体的任何部分，其少于全长，但是至少包含结合抗原的所述抗体的部分可变区(例如一个或多个CDR和/或一个或多个抗体结合位点)，并且因此保留结合特异性以及所述全长抗体的至少部分特异性结合能力。因此，抗原结合片段指包含与衍生抗体片段的抗体结合相同抗原的抗原结合部分的抗体片段。抗体片段包括通过酶促处理全长抗体所产生的抗体衍生物，以及合成产生的衍生物，例如重组产生的衍生物。抗体包括抗体片段。抗体片段的实例包括但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂、单链Fv(scFv)、Fv、dsFv、双抗体、Fd和Fd'片段以及其他片段，包括修饰的片段。所述片段可以包括连接在一起的多条链，例如通过二硫键和/或通过肽接头。抗体片段一般包含至少或约50个氨基酸，并且典型至少或约200个氨基酸。抗原结合片段包括任何抗体片段，其在被插入抗体框架(例如通过置换相应区域)时获得免疫特异性地结合(即表现出至少或至少约 10^7 - 10^8M^{-1} 的 K_a)抗原的抗体。“功能片段”或“抗CD20抗体的类似物”是可防止或实质降低所述受体结合配体或启

动信号转导的能力的片段或类似物。正如本文所使用, 功能片段一般与“抗体片段”含义相同, 且就抗体而论, 可指能防止或实质降低所述受体结合配体或启动信号转导的能力的片段, 例如 Fv、Fab、F(ab')₂ 等等。“Fv”片段由一条重链的可变结构域和一条轻链的可变结构域籍非共价结合方式而形成的二聚体 (V_H-V_L 二聚体) 组成。在该构型中, 每个可变结构域的三个 CDRs 相互作用, 以确定 V_H-V_L 二聚体表面上的靶结合位点, 与完整抗体的情况一样。所述

5 六个 CDRs 共同赋予完整抗体的靶结合特异性。但是, 即使是单个可变结构域 (或仅包括 3 个靶特异的 CDRs 的 Fv 的一半), 仍可具有识别和结合靶的能力。

如本文中所用, 术语“双特异性” (Bispecific antibody, BsAb) 指抗体和/或抗原结合分子能够特异性结合两种不同的抗原性决定簇, 通常, 双特异性抗体和/或抗原结合分子包含两种抗原结合位点, 其中每种特异性于不同的抗原性决定簇。在某些实施方案中, 所述双特异性抗体和/或抗原结合分子能够同时结合两种抗原决定簇, 特别是在两种不

10 同的细胞上表达的两种抗原性决定簇。

如本文所用, “单克隆抗体”指相同抗体的群体, 表示单克隆抗体群体中的每个单独的抗体分子与其他抗体分子相同。这种特性与抗体的多克隆群体的特性相反, 所述抗体的多克隆群体包含具有多种不同序列的抗体。单克隆抗体可以通过许多公知的方法来制备 (Smith et al. (2004) J.Clin.Pathol.57, 912-917; 和 Nelson et al., J Clin Pathol(2000), 53, 111-117)。例如, 单克隆抗体可以通过永生 B 细胞来制备, 例如通过与骨髓瘤细胞融合以产生杂交瘤细胞系或者通过用诸如 EBV 的病毒感染 B 细胞。重组技术还可以用来在体外通过用携带编码抗体的核苷酸的人工序列的质粒转化宿主细胞来从宿主细胞的克隆群体制备抗体。

如本文中所用, 术语“杂交瘤”或“杂交瘤细胞”指由融合产抗体的淋巴细胞和不产抗体的癌细胞而产生的细胞或细胞系 (通常为骨髓瘤或淋巴瘤细胞)。如本领域普通技术人员所知的, 杂交瘤可增殖并持续供应产生特定单克隆抗体。用于产生杂交瘤的方法为本领域已知的。当提及术语“杂交瘤”或“杂交瘤细胞”时, 其还包括杂交瘤的亚克隆

20 和后代细胞。

如本文所用, 全长抗体是具有两条全长重链 (例如 V_H-CH1-CH2-CH3 或 V_H-CH1-CH2-CH3-CH4) 和两条全长轻链 (V_L-CL) 和铰链区的抗体, 例如通过抗体分泌 B 细胞天然产生的抗体以及合成产生的具有相同结构域的抗体。

术语“嵌合抗体”是指这样的抗体, 其中可变区序列源自一个物种, 恒定区序列源自另一物种, 如其中可变区序列源自小鼠抗体及恒定区序列源自人抗体的抗体。

25 “人源化”抗体是指非人 (例如小鼠) 抗体形式, 其是嵌合的免疫球蛋白、免疫球蛋白链或者其片段 (如 Fv、Fab、Fab', F(ab')₂ 或者抗体的其它抗原结合亚序列), 含有源自非人免疫球蛋白的最小序列。优选地, 人源化抗体是人免疫球蛋白 (接受者抗体), 其中接受者抗体的互补决定区 (CDR) 的残基由来自具有希望的特异性、亲和性和能力的非人物种 (供体抗体) 如小鼠、大鼠或者兔的 CDR 残基置换。

此外, 在人源化中, 还可能对 V_H 和/或 V_L 的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 区内的氨基酸残基进行突变, 由此改善抗体的一或多种结合特性 (例如亲和性)。可进行例如 PCR 介导的突变引入突变, 其对抗体结合或其它功能特性的影响可利用本文所述的体外或体内测试评估。通常, 引入保守性突变。此类突变可为氨基酸取代、添加或缺失。另外, CDR 内的突变通常不超过一个或两个。因此, 本公开所述人源化抗体还涵盖 CDR 内包含 1 或 2 两个氨基酸突变的抗体。

如本文所用, 术语“CDR”指互补决定区 (complementarity-determining region), 已知抗体分子的每个重链和轻链具有 3 个 CDR。CDR 也称作高变区, 且存在于抗体的每个重链和轻链的可变区中, 在 CDR 的一级结构中具有非常高的变异性位点。本说明书中, 重链的 CDR 由来自重链的氨基端序列的氨基端的 CDR1、CDR2、CDR3 表示, 轻链的 CDR 由来自轻链的氨基端序列的氨基端的 CDR1、CDR2、CDR3 表示。这些位点在三级结构中彼此临近, 并决定抗体所结合的抗原的特异性。

如本文所用, 术语“表位”指抗体的互补位结合的抗原上的任何抗原决定簇。表位决定簇通常包含分子的化学活性表面分型, 例如氨基酸或糖侧链, 并且通常具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。

如本文所用, 关于抗体或其抗原结合片段的“特异性结合”或“免疫特异性地结合”在本文中可交换使用, 并且指抗体或抗原结合片段通过抗体和抗原的抗体结合位点之间的非共价相互作用与同种抗原形成一个或多个非共价键的能力。所述抗原可以是分离的抗原或存在于肿瘤细胞。通常, 免疫特异性地结合 (或特异性结合) 抗原的抗体是以约或 1×10⁷M⁻¹ 或 1×10⁸M⁻¹ 或更大的亲和常数 K_a (或者 1×10⁻⁷M 或 1×10⁻⁸M 或更低的解离常数 (K_d)) 结合所述抗原。亲和常数可以通过抗体反应的标准动力学方法来测定, 例如, 免疫测定、表面等离子共振 (SPR) (Rich and Myszk (2000) Curr. Opin.Biotechnol 11:54; Englebienne (1998) Analyst. 123:1599)、等温滴定热法 (ITC) 或本领域已知的其他动力学相互作用测定; 还参见描述用于计算抗体的结合亲和力的示例性 SPR 和 ITC 方法的美国专利第 7, 229, 619 号)。用于实时检测和监测结合速率的仪器和方法是已知的, 并且可商购 (参见, BiaCore 2000, Biacore AB, Upsala, Sweden and GE Healthcare Life Sciences; Malmqvist (2000) Biochem.Soc.Trans. 27:335)。

如本文所用, 术语“多核苷酸”和“核酸分子”指包含至少两个连接的核苷酸或核苷酸衍生物的寡聚体或聚合物, 包括通常通过磷酸二酯键连接在一起的脱氧核糖核酸 (DNA) 和核糖核酸 (RNA)。如本文所使用, 术语“核酸分子”意欲包括 DNA 分子及 RNA 分子。核酸分子可为单链或双链, 且可为 cDNA。

如本文所用, 分离的核酸分子是从存在于核酸分子的天然来源中的其他核酸分子分离的核酸分子。诸如 cDNA 分子的“分离的”核酸分子可以在通过重组技术制备时基本上不含其他细胞物质或培养基, 或者在化学合成时基本上不含化学前体或其他化学成分。本文所提供的示例性分离的核酸分子包括编码所提供的抗体或抗原结合片段的分离的核酸分子。

如本文所用, 关于核酸序列、区域、元件或结构域的“可操作地连接”表示核酸区域互相功能相关。例如, 启动

子可以可操作地连接至编码多肽的核酸，从而所述启动子调控或介导所述核酸的转录。

亦提供本文所述序列中所述序列的“保守序列修饰”，即不消除由核苷酸序列编码或含有氨基酸序列的抗体与抗原的结合的核苷酸及氨基酸序列修饰。这些保守序列修饰包括保守核苷酸及氨基酸取代以及核苷酸及氨基酸添加及缺失。例如，可通过本领域已知的标准技术（例如定点诱变及 PCR 介导的诱变）将修饰引入本文所述的序列表中。保守序列修饰包括保守氨基酸取代，其中氨基酸残基被替换为具有类似侧链的氨基酸残基。具有类似侧链的氨基酸残基的家族是本领域中已有定义的。这些家族包括具有碱性侧链的氨基酸（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、具有酸性侧链的氨基酸（例如天冬氨酸、谷氨酸）、具有不带电极性侧链的氨基酸（例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、色氨酸）、具有非极性侧链的氨基酸（例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、甲硫氨酸）、具有 β 分枝侧链的氨基酸（例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸）及具有芳香族侧链的氨基酸（例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸）。因此，抗 CD20 抗体中的预测的非必需氨基酸残基优选被来自同一侧链家族的另一氨基酸残基替代。鉴定不消除抗原结合的核苷酸及氨基酸保守取代的方法为本领域所熟知（例如，参见 Brummell et al., *Biochem. J.* 32: 1180-1187 (1993); Kobayashi et al., *Protein Eng.* 12(10): 879-884 (1999); Burks et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94: 412-417 (1997)）。

作为另一选择，在另一实施方案中，可通过例如饱和诱变沿抗 CD20 抗体编码序列的全部或一部分随机引入突变，且可针对改良的结合活性筛选所得经修饰抗 CD20 抗体。

如本文所用，“表达”指通过多核苷酸的转录和翻译产生多肽的过程。多肽的表达水平可以利用本领域已知的任何方法来评价，包括例如测定从宿主细胞产生的多肽的量的方法。这类方法可以包括但不限于通过 ELISA 定量细胞裂解物中的多肽，凝胶电泳之后考马斯蓝染色，Lowry 蛋白测定以及 Bradford 蛋白测定。

如本文所用，“宿主细胞”是用于接受、保持、复制和扩增载体的细胞。宿主细胞还可以用来表达载体所编码的多肽。当宿主细胞分裂时，载体中所含的核酸复制，从而扩增核酸。宿主细胞可以是真核细胞或原核细胞。合适的宿主细胞包括但不限于 CHO 细胞、各种 COS 细胞、HeLa 细胞、HEK 细胞例如 HEK 293 细胞。

如本文所用，“载体”是可复制的核酸，当载体转化入适当的宿主细胞时，可以从该载体表达一种或多种异源蛋白。关于载体包括那些通常通过限制酶切割和连接可以将编码多肽或其片段的核酸引入其中的载体。关于载体还包括那些包含编码多肽的核酸的载体。载体用来将编码多肽的核酸引入宿主细胞，用于扩增核酸或者用于表达/展示核酸所编码的多肽。载体通常保持游离，但是可以设计为使基因或其部分整合入基因组的染色体。还考虑人工染色体的载体，例如酵母人工载体和哺乳动物人工染色体。这类媒介物的选择和用途是本领域技术人员公知的。

如本文所用，载体还包括“病毒载体”或“病毒的载体”。病毒的载体是工程化的病毒，其可操作地连接至外源基因以将外源基因转移（作为媒介物或穿梭（shuttle））入细胞。

如本文所用，“表达载体”包括能够表达 DNA 的载体，所述 DNA 与诸如启动子区的能够影响这类 DNA 片段表达的调控序列可操作地连接。这类额外的片段可以包括启动子和终止子序列，并且任选地可以包括一个或多个复制起点、一个或多个选择标记、增强子、多腺苷酸化信号等。表达载体一般来源于质粒或病毒 DNA，或者可以包含这两者的元件。因此，表达载体指重组 DNA 或 RNA 构建体，例如质粒、噬菌体、重组病毒或其他载体，当引入适当的宿主细胞时，导致克隆 DNA 的表达。适当的表达载体是本领域技术人员公知的，并且包括在真核细胞和/或原核细胞中可复制的表达载体以及保持游离的表达载体或者整合入宿主细胞基因组的表达载体。

如本文所用，“治疗”患有疾病或疾病状况的个体表示所述个体的症状部分或全部缓解，或者在治疗后保持不变。因此，治疗包括预防、治疗和/或治愈。预防指防止潜在疾病和/或防止症状恶化或疾病发展。治疗还包括所提供的任何抗体或其抗原结合片段以及本文所提供的组合物的任何药学用途。

如本文所用，“疗效”表示由个体的治疗所导致的效果，其改变、通常改良或改善疾病或疾病状况的症状，或者治愈疾病或疾病状况。

如本文所用，“治疗有效量”或“治疗有效剂量”指施用于对象之后至少足以产生疗效的物质、化合物、材料或包含化合物的组合物的量。因此，其为防止、治愈、改善、阻滞或部分阻滞疾病或病症的症状所必需的量。

如本文所用，“预防有效量”或“预防有效剂量”指在施用于对象时会具有预期的预防效果的物质、化合物、材料或包含化合物的组合物的量，例如，防止或延迟疾病或症状的发生或复发，减少疾病或症状发生或复发的可能性。完全预防有效剂量不必通过施用一个剂量发生，并且可以仅在施用一系列剂量之后发生。因此，预防有效量可以在一次或多次施用中施用。

如本文中所使用的，术语“患者”是指哺乳动物，例如人。

II. 具体实施方案详述

在一方面，本公开提供了一种双特异性抗体或其抗原结合部分，其包含结合到靶细胞表面上的 CD20 的第一结合结构域和结合到 T 细胞表面上的 CD3 的第二结合结构域，其中，所述第一结合结构域包含第一轻链和第一重链，所述第一轻链包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 56、57、58、61、62、63 或其任何变体的轻链 CDR，和/或所述第一重链包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 66、67、68、71、76、77、78、85 或其任何变体的重链 CDR。

根据前一方面的抗体或其抗原结合部分，其中，所述第一结合结构域的第一轻链包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 56、61 或其任何变体的轻链 CDR1，选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 57、62 或其任何变体的轻链 CDR2，选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 58、63 或其任何变体的轻链 CDR3；和/或所述第一结合结构域的第一重链包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 66、76 或其任何变体的重链 CDR1，选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 67、77 或其任何变体的重链 CDR2，选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 68、71、78、85 或其任何变体的重链 CDR3。

根据前一方面的抗体或其抗原结合部分,其中,所述第一结合结构域包含选自下列的轻链和重链的 CDR 组合:

(1) 分别包含 SEQ ID NO: 56-58 的第一轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和/或分别包含 SEQ ID NO: 66-68 的第一重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列。

5 (2) 分别包含 SEQ ID NO: 56-58 的第一轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和/或分别包含 SEQ ID NO: 66、67、71 的第一重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列。

(3) 分别包含 SEQ ID NO: 61-63 的第一轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和/或分别包含 SEQ ID NO: 76-78 的第一重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列。

(4) 分别包含 SEQ ID NO: 61-63 的第一轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和/或分别包含 SEQ ID NO: 76、77、85 的第一重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列。

10 根据前一方面的抗体或其抗原结合部分,其中,所述第一结合结构域包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 54、59 或其任何变体的轻链可变区,和/或选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 64、69、72、74、79、81、83 或其任何变体的重链可变区。

在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 54 或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 64 或其任何变体的第一重链可变区。

15 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 54 或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 69 或其任何变体的第一重链可变区。

在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 54 或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 72 或其任何变体的第一重链可变区。

20 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 59 或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 74 或其任何变体的第一重链可变区。

在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 59 或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 79 或其任何变体的第一重链可变区。

在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 59 或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 81 或其任何变体的第一重链可变区。

25 在一些实施方案中,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 59 或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 83 或其任何变体的第一重链可变区。

根据前一方面的抗体或其抗原结合部分,所述第二结合结构域包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 7、14 或其任何变体的第二轻链 CDR1,选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 8、15、20 或其任何变体的第二轻链 CDR2,选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 9、21 或其任何变体的第二轻链 CDR3;和/或选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 26、31、46 或其任何变体的第二重链 CDR1,选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 27、47 或其任何变体的第二重链 CDR2,选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 28、34、37、40、43 或其任何变体的第二重链 CDR3。

30 在一些实施方案中,所述第二结合结构域包含第二轻链和第二重链,所述第二结合结构域包含选自下列的轻链和重链的 CDR 组合:

35 (1) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 26、27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(2) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(3) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、34 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

40 (4) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、37 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(5) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、40 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

45 (6) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、43 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(7) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 46、47、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(8) 分别包含 SEQ ID NO: 14、15、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 26、27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

50 (9) 分别包含 SEQ ID NO: 14、15、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(10) 分别包含 SEQ ID NO: 14、15、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、34 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

55 (11) 分别包含 SEQ ID NO: 14、15、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、37 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(12) 分别包含 SEQ ID NO: 14、15、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、40 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(13) 分别包含 SEQ ID NO: 14、15、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、43 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(14) 分别包含 SEQ ID NO: 14、15、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 46、47、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

5 (15) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 26、27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(16) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

10 (17) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、34 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(18) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、37 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(19) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、40 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

15 (20) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、43 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(21) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 46、47、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

20 (22) 分别包含 SEQ ID NO: 7、20、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 26、27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(23) 分别包含 SEQ ID NO: 7、20、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(24) 分别包含 SEQ ID NO: 7、20、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、34 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

25 (25) 分别包含 SEQ ID NO: 7、20、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、37 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(26) 分别包含 SEQ ID NO: 7、20、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、40 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

30 (27) 分别包含 SEQ ID NO: 7、20、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、43 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(28) 分别包含 SEQ ID NO: 7、20、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 46、47、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列。

35 在一些实施方案中, 所述第二结合结构域包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 5、10、12、16、18、22 或其任何变体的轻链可变区, 和/或选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 24、29、32、35、38、41、44、48、50、52 或其任何变体的重链可变区。

在一些实施方案中, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 5 或其任何变体的第二轻链可变区, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 48 或其任何变体的第二重链可变区。

在一些实施方案中, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 5 或其任何变体的第二轻链可变区, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 50 或其任何变体的第二重链可变区。

40 在一些实施方案中, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 10 或其任何变体的第二轻链可变区, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 50 或其任何变体的第二重链可变区。

在一些实施方案中, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 12 或其任何变体的第二轻链可变区, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 50 或其任何变体的第二重链可变区。

45 在一些实施方案中, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 18 或其任何变体的第二轻链可变区, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 24 或其任何变体的第二重链可变区。

在一些实施方案中, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 18 或其任何变体的第二轻链可变区, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 48 或其任何变体的第二重链可变区。

在一些实施方案中, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 18 或其任何变体的第二轻链可变区, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 50 或其任何变体的第二重链可变区。

50 根据前一方面的抗体或其抗原结合部分, 其中, 所述第一轻链包含选自 SEQ ID NO: 88、96、100、102、110、118 或其任何变体的轻链, 所述第一重链包含选自 SEQ ID NO: 86、94、98、104、112、120 或其任何变体的重链。

根据前一方面的抗体或其抗原结合部分, 其中, 所述第二轻链包含选自 SEQ ID NO: 92、106、114 或其任何变体的轻链, 所述第二重链包含选自 SEQ ID NO: 90、108、116 或其任何变体的重链。

55 在一些实施方案中, 所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 88 或其任何变体的第一轻链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 86 或其任何变体的第一重链。

在一些实施方案中, 所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 96 或其任何变体的第一轻链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 94 或其任何变体的第一重链。

在一些实施方案中, 所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 100 或其任何变体的第一轻链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 98 或其任何变体的第一重链。

在一些实施方案中, 所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 102 或其任何变体的第一轻链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 104 或其任何变体的第一重链。

5 在一些实施方案中, 所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 110 或其任何变体的第一轻链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 112 或其任何变体的第一重链。

在一些实施方案中, 所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 118 或其任何变体的第一轻链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 120 或其任何变体的第一重链。

10 在一些实施方案中, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 92 或其任何变体的第二轻链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 90 或其任何变体的第二重链。

在一些实施方案中, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 106 或其任何变体的第二轻链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 108 或其任何变体的第二重链。

在一些实施方案中, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 114 或其任何变体的第二轻链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 116 或其任何变体的第二重链。

15 在一些实施方案中, 所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 88 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 86 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 92 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 90 或其任何变体的第二重链。

20 在一些实施方案中, 所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 96 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 94 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 92 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 90 或其任何变体的第二重链。

在一些实施方案中, 所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 100 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 98 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 92 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 90 或其任何变体的第二重链。

25 在一些实施方案中, 所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 102 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 104 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 106 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 108 或其任何变体的第二重链。

在一些实施方案中, 所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 110 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 112 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 114 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 116 或其任何变体的第二重链。

30 在一些实施方案中, 所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 118 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 120 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 114 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 116 或其任何变体的第二重链。

35 在一些实施方案中, 所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 110 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 112 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 106 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 108 或其任何变体的第二重链。

在一些实施方案中, 所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 102 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 104 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 114 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 116 或其任何变体的第二重链。

40 结合 CD20 的抗体或其抗原结合部分, 其与前述任一方面的抗体或其抗原结合部分具有至少大于 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高的序列同一性。

编码如前述任一方面的抗体或其抗原结合部分的核酸, 或与其具有至少大于 60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或更高的序列同一性的核酸分子。

在一些实施方案中, 所述第一轻链可变区的编码核酸选自 SEQ ID NO: 55、60 或其任何变体的核酸序列。

45 在一些实施方案中, 所述第一重链可变区的编码核酸选自 SEQ ID NO: 65、70、73、75、80、82、84 或其任何变体的核酸序列。

在一些实施方案中, 所述第二轻链可变区的编码核酸选自 SEQ ID NO: 6、11、13、17、19、23 或其任何变体的核酸序列。

在一些实施方案中, 所述第二重链可变区的编码核酸选自 SEQ ID NO: 25、30、33、36、39、42、45、49、51、53 或其任何变体的核酸序列。

50 在一些实施方案中, 所述第一轻链的编码核酸选自 SEQ ID NO: 89、97、101、103、111、119 或其任何变体的核酸序列。

在一些实施方案中, 所述第一重链的编码核酸选自 SEQ ID NO: 87、95、99、105、113、121 或其任何变体的核酸序列。

在一些实施方案中, 所述第二轻链的编码核酸选自 SEQ ID NO: 93、107、115 或其任何变体的核酸序列。

55 在一些实施方案中, 所述第二重链的编码核酸选自 SEQ ID NO: 91、109、117 或其任何变体的核酸序列。

包含前述核酸的载体。

包含前述核酸或载体的细胞。

包含前述双特异性抗体或其抗原结合部分、核酸、载体和/或细胞的组合物。

包含共价附着至治疗部分的前述双特异性抗体或其抗原结合部分的抗体-药物偶联物。

优选地,所述治疗部分选自细胞毒性部分、化疗剂、细胞因子、免疫抑制剂、免疫刺激剂、裂解肽或放射性同位素。

5 本公开的抗体在各种 CD20 被不利地表达或发现的疾病中可用作治疗或诊断工具。

在一个与 CD20 相关的疾病实施方案中,CD20 在患病组织或器官的细胞中的表达与在健康组织或器官中的状态相比有所增加。增加是指增加至少 10%、特别是至少 20%、至少 50%、至少 100%、至少 200%、至少 500%、至少 1000%、至少 10000% 或甚至更多。在一个实施方案中,表达仅在患病组织中发现,而在相应健康组织中的表达受阻抑。根据本公开,与 CD20 相关的疾病包括 B 细胞疾病,例如 B 细胞增殖性病症,特别是 CD20 阳性 B 细胞

10

病症。“B 细胞增殖性病症”意味着如下疾病,其中患者中 B 细胞的数目与健康受试者中 B 细胞的数目相比增多,特别是其中 B 细胞数目的增多是疾病的起因或标志。“CD20 阳性 B 细胞增殖性病症”是如下 B 细胞增殖性病症,其中 B 细胞,特别是恶性 B 细胞(在正常 B 细胞以外)表达 CD20。

15 例示性 B 细胞增殖性病症包括非霍奇金淋巴瘤(NHL),急性淋巴细胞性白血病(ALL),慢性淋巴细胞性白血病(CLL),弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL),滤泡性淋巴瘤(FL),套细胞淋巴瘤(MCL),边缘区淋巴瘤(MZL),以及一些类型的多发性骨髓瘤(MM)和霍奇金淋巴瘤(HL)。

本公开的方法可应用于多种疾病的治疗,取决于所使用的治疗剂。然而,该方法在治疗 B 细胞增殖性病症,特别是 CD20 阳性 B 细胞病症中特别有用,其中(CD20 阳性)B 细胞大量(即与健康受试者相比,罹患病症的受试者中存在数目增多的 B 细胞)存在。如此,在一个实施方案中,疾病是 B 细胞增殖性病症,特别是 CD20 阳性 B 细胞病

20

症。在一些实施方案中,该治疗剂包含指明用于治疗癌症的抗体。在一个实施方案中,该治疗剂指明用于治疗癌症。在一个实施方案中,该癌症是 B 细胞增殖性病症。在一个实施方案中,该癌症是 CD20 阳性 B 细胞增殖性病症。在一个实施方案中,该癌症选自非霍奇金淋巴瘤(NHL),急性淋巴细胞性白血病(ALL),慢性淋巴细胞性白血病(CLL),弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL),滤泡性淋巴瘤(FL),套细胞淋巴瘤(MCL),边缘区淋巴瘤(MZL),多发性

25

骨髓瘤(MM),和霍奇金淋巴瘤(HL)组成的组。在一个实施方案中,该治疗剂是免疫治疗剂。

在一些实施方案中,该治疗剂包含特异性结合活化性 T 细胞抗原的抗体。

在一个实施方案中,该治疗剂包含特异性结合 CD3,特别是 CD3e 的抗体。

在一个特定的实施方案中,疾病是 NHL,特别是复发性/顽固性(r/r)NHL。在一个实施方案中,疾病是 DLBCL。在一个实施方案中,疾病是 FL。在一个实施方案中,疾病是 MCL。在一个实施方案中,疾病是 MZL。

30 用本公开的 CD20 抗体治疗的疾病和症状方法包括下述步骤:向所述哺乳动物施用治疗有效量的前述任一方面

的抗体或其抗原结合片段或核酸分子或载体或细胞或药物组合物。在一些实施方案中,本公开提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用能够结合 CD20 的抗体,其中施用所述抗体以提供至少 40 μ g/ml 的血清水平。在不同实施方案中,施用所述抗体以提供至少 50 μ g/ml、至少 150 μ g/ml、至少 300 μ g/ml、至少 400 μ g/ml 或至少 500 μ g/ml 的血清水平。在不同实施方案中,施用所述抗体以提供

35

不超过 800 μ g/ml、700 μ g/ml、600 μ g/ml、550 μ g/ml 或 500 μ g/ml 的血清水平。在一个实施方案中,所提供的血清水平为 40 μ g/ml 至 700 μ g/ml,优选为 40 μ g/ml 至 600 μ g/ml,优选为 50 μ g/ml 至 500 μ g/ml,如 150 μ g/ml 至 500 μ g/ml 或者 300 μ g/ml 至 500 μ g/ml。如本说明书中使用的术语“血清水平”,其意指所讨论的物质在血清中的浓度。在一个实施方案中,提供所述血清水平至少 7 天或至少 14 天。在一个实施方案中,所述方法包括施用至少 300mg/m² 的抗体

40

剂量,如至少 600mg/m²,且优选至多 1500mg/m²,至多 1200mg/m² 或至多 1000mg/m²。在一些实施方案中,本公开提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用能够结合 CD20 的抗体,其中

以至少 300mg/m²,如至少 600mg/m²,且优选至多 1500mg/m²,至多 1200mg/m² 或至多 1000mg/m² 的剂量施用所述抗体。在一些实施方案中,本公开提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用能够结合 CD20 的抗体,其中

45

所述患者的至少 50%,优选为 60%、70%、80% 或 90% 的癌细胞为 CD20 阳性和/或所述患者的至少 40%,优选为 50% 或 60% 的癌细胞为 CD20 的表面表达阳性。在该方面,本公开还提供治疗或预防癌症疾病的方法,所述方法包括:a.鉴定显示至少 50%,优选为 60%、70%、80% 或 90% 的 CD20 阳性癌细胞和/或至少 40%,优选为 50% 或 60% 的癌细胞的

50

患者,所述癌细胞为 CD20 的表面表达阳性;以及 b.向所述患者施用能够结合 CD20 的抗体。在一个实施方案中,所述患者的至少 95% 或至少 98% 的癌细胞为 CD20 阳性的。在一个实施方案中,所述患者的至少 70%、至少 80% 或至少 90% 的癌细胞为 CD20 的表面表达阳性。

在本文所述的任何方面的方法的一个实施方案中,癌症疾病的治疗结果是实现病情稳定。在一个实施方案中,病情稳定实现至少 2 个月、至少 3 个月或至少 6 个月。

在一些实施方案中,本公开提供实现癌症患者的病情稳定的方法,其包括向所述患者施用能够结合 CD20 的抗

体。在一个实施方案中,病情稳定实现至少 2 个月、至少 3 个月或至少 6 个月。

在本文所述的任何方面的方法的一个实施方案中,以单剂量或多剂量施用抗体。

55

在一些实施方案中,本公开提供治疗或预防癌症疾病的方法,其包括向患者施用能够结合 CD20 的抗体,其中

以多剂量施用所述抗体。

如果根据本公开以多次剂量施用所述抗体,则优选以至少 3 次剂量、至少 4 次剂量、至少 5 次剂量、至少 6 次

剂量、至少 7 次剂量、至少 8 次剂量、至少 9 次剂量或至少 10 次剂量且优选至多 30 次剂量、25 次剂量、20 次剂量、15 次剂量或 10 次剂量施用所述抗体。优选以至少 7 天、至少 10 天、至少 14 天或至少 20 天的时间间隔施用所述抗体的剂量。优选以 7 至 30 天、10 至 20 天且优选为约 14 天的时间间隔施用所述抗体的剂量。

5 在一个实施方案中，施用所述抗体以便提供至少 40 μ g/ml 的血清水平。在不同实施方案中，施用所述抗体以便提供至少 50 μ g/ml、至少 150 μ g/ml、至少 300 μ g/ml、至少 400 μ g/ml 或至少 500 μ g/ml 的血清水平。在不同实施方案中，施用所述抗体以便提供不超过 800 μ g/ml、700 μ g/ml、600 μ g/ml、550 μ g/ml 或 500 μ g/ml 的血清水平。在一个实施方案中，所提供的血清水平为 40 μ g/ml 至 700 μ g/ml，优选为 40 μ g/ml 至 600 μ g/ml，优选为 50 μ g/ml 至 500 μ g/ml，如 150 μ g/ml 至 500 μ g/ml 或 300 μ g/ml 至 500 μ g/ml。在一个实施方案中，提供所述血清水平至少 7 天或至少 14 天。在一个实施方案中，所述方法包括施用至少 300mg/m²，如至少 600mg/m² 且优选至多 1500mg/m²、至多 1200mg/m² 或至多 1000mg/m² 的抗体的剂量。

10 前述任一方面的抗体或其抗原结合片段或核酸分子或载体或细胞或药物组合物在制备用于治疗哺乳动物中 CD20 相关病症的药物中的用途。

根据前述任一方面，任选地，所述抗体偶联其他药物，例如带标记或具有细胞毒性的缀合物。

15 在一方面，本公开还包括试剂盒，例如所述试剂盒包括本公开的抗体、其片段、同源物、其衍生物等，例如带标记或具有细胞毒性的缀合物，以及抗体使用说明、杀死特定类型细胞的缀合物等等。该说明书可包括在体外、体内或离体使用抗体、缀合物等的指导。抗体可以是液体形式或固体，通常是冻干的。该试剂盒可包含其它适宜的试剂，如缓冲液、重构溶液以及为了预定用途的其它必要成分。考虑了以预定量包装好的试剂组合与用于其用途的说明书，所述用途例如用于治疗用途或用于进行诊断测定。当抗体是带标记的时，例如用酶标记的，那么该试剂盒可包括底物和酶所需的辅因子（例如提供可检测生色团或荧光团的底物前体）。此外，其它添加剂，如稳定剂、缓冲液（例如封闭缓冲液或裂解缓冲液）等也可包括在内。多种试剂的相对量可以改变而提供试剂溶液的浓缩物，这就提供了用户灵活性、节省空间、节省试剂等。这些试剂也可以干粉形式提供，通常是冻干形式，包括赋形剂，它在溶解时可提供具有适当浓度的试剂溶液。

前述任一方面的抗体或其功能片段或核酸分子或载体或细胞或药物组合物或试剂盒在制备用于抑制 CD20 结合的试剂中的用途。

25 此外，本公开的抗体还可用于免疫测定、纯化方法以及其它用到免疫球蛋白或其片段的方法。此类用途在本领域为人所熟知。

相应地，本公开还提供包含本公开的抗 CD20 的抗体或其片段的组合物，所述抗体方便地和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合，这是本领域的常规做法。

30 本公开所使用的术语“药物组合物”系指多种制备物的制剂。含有治疗有效量的多价抗体的制剂为无菌液体溶液、液体悬浮剂或冻干形式，任选地包含稳定剂或赋形剂。

本公开的抗体可以作为单独施用的组合物使用，或与其它活性剂联合使用。

在一些实施方案中，本公开的人源化抗体与治疗部分（即药物）偶联。治疗部分可以是例如细胞毒素、化疗剂、细胞因子、免疫抑制剂、免疫刺激剂、裂解肽或放射性同位素。此类偶联物在本文中称为“抗体-药物偶联物”或“ADC”。

35 在一些实施方案中，抗体与细胞毒性部分偶联。细胞毒性部分可以例如选自以下：紫杉醇；细胞松弛素 B；短杆菌肽 D；溴化乙锭；吐根碱；丝裂霉素；依托泊苷；替尼泊苷；长春新碱；长春碱；秋水仙碱；多柔比星；柔红霉素；二羟基蒽二酮；微管蛋白抑制剂如美登素或其类似物或衍生物；抗有丝分裂剂如单甲基奥瑞他汀 E 或 F 或其类似物或衍生物；海兔毒素 10 或 15 或其类似物；伊立替康或其类似物；米托蒽醌；光辉霉素；放线菌素 D；1-脱氧肾上腺素；糖皮质激素；普鲁卡因；丁卡因；利多卡因；普萘洛尔；嘌呤霉素；卡奇霉素或其类似物或衍生物；抗代谢药，如甲氧苄啶、6 巯基嘌呤、6 巯鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5 氟尿嘧啶、癸二喹、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨或克拉屈滨；烷化剂，如二氯甲基二乙胺、硫代嘌呤、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀（BSNU）、洛莫司汀（CCNU）、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、达卡巴嗪（DTIC）、丙卡巴嗪、丝裂霉素 C；铂类衍生物，如顺铂或卡铂；多卡霉素 A、多卡霉素 SA、雷切霉素（CC-1065）或其类似物或衍生物；抗生素，如放线菌素、博来霉素、柔红霉素、多柔比星、伊达比星、光霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普力霉素、安定霉素（AMC）；吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓（PDB）；白喉毒素及相关分子如白喉 A 链及其活性片段和杂合分子、蓖麻毒素如蓖麻毒素 A 或去糖基化蓖麻毒素 A 链毒素、霍乱毒素、志贺样毒素如 SLT I、SLT II、SLT IIV、LT 毒素、C3 毒素、志贺毒素、百日咳毒素、破伤风毒素、大豆 Bowman-Birk 蛋白酶抑制剂、假单胞菌外毒素、阿罗林、皂草素、蒺藜根毒素、胶凝蛋白、相思豆毒素 A 链、蒺藜根毒素 A 链、 α -sarcosine、油桐（*Aleurites fordii*）蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白如 PAPI、PAPII 和 PAP-S、苦瓜（*Momordica charantia*）抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草（*saponaire officinalis*）抑制剂、白树毒素、丝裂霉素、局限曲菌素、酚霉素和依诺霉素毒素；核糖核酸酶（RNase）；DNase I、葡萄球菌内毒素 A；商陆抗病毒蛋白；白喉毒素和假单胞菌内毒素。

50 在一些实施方案中，抗体与奥瑞他汀或其肽类似物、衍生物或前药偶联。已经表明，奥瑞他汀干扰微管动力学、GTP 水解以及核和细胞分裂并具有抗癌和抗真菌活性。例如，奥瑞他汀 E 可以与对乙酰基苯甲酸或苯甲酰基戊酸反应，分别产生 AEB 和 AEVB。其他典型的奥瑞他汀衍生物包括 AFP、MMAF（单甲基奥瑞他汀 F）和 MMAE（单甲基奥瑞他汀 E）。合适的奥瑞他汀和奥瑞他汀的类似物、衍生物和前药，以及用于将奥瑞他汀与 Ab 偶联的合适接头描述于例如美国专利号 5,635,483、5,780,588 和 6,214,345 以及国际专利申请公开 WO02088172、WO2004010957、WO2005081711、WO2005084390、WO2006132670、WO03026577、WO200700860、WO207011968 和 WO205082023。

在一些实施方案中, 抗体与吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓(PDB)或其类似物、衍生物或前药偶联。合适的PDB 以及PDB 衍生物和相关技术描述于例如 Hartley J.A.等, *Cancer Res* 2010; 70(17):6849-6858; Antonow D.等, *Cancer J* 2008; 14(3):154-169; Howard P.W.等, *Bioorg Med Chem Lett* 2009; 19:6463-6466 和 Sagnou 等, *Bioorg MedChem Lett* 2000; 10(18):2083-2086。

5 在一些实施方案中, 抗体与选自以下的细胞毒性部分偶联: 蒽环类抗生素、美登素、卡奇霉素、多卡霉素、雷切霉素(CC-1065)、海兔毒素 10、海兔毒素 15、伊立替康、单甲基奥瑞他汀 E、单甲基奥瑞他汀 F、PDB, 或它们任何的类似物、衍生物或前药。

10 在一些实施方案中, 抗体与蒽环类抗生素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中, 抗体与美登素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中, 抗体与卡奇霉素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中, 抗体与多卡霉素或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中, 抗体与雷切霉素(CC-1065)或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中, 抗体与海兔毒素 10 或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中, 抗体与海兔毒素 15 或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中, 抗体与单甲基奥瑞他汀 E 或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中, 抗体与单甲基奥瑞他汀 F 或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中, 抗体与吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓或其类似物、衍生物或前药偶联。在一些实施方案中, 抗体与伊立替康或其类似物、衍生物或前药偶联。

15 在一些实施方案中, 抗体与细胞因子(例如 IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、GM-CSF、CD40L、Flt3 配体、干细胞因子、安西司亭和 TNF α)偶联。

20 在一些实施方案中, 抗体与放射性同位素或含放射性同位素的螯合物偶联。例如, 抗体可以与允许抗体与放射性同位素络合的螯合剂接头(例如 DOTA、DTPA 或塞西坦)偶联。抗体还可以或可选地包含一个或多个放射性标记的氨基酸或其他放射性标记的分子或与之偶联。放射性同位素的非限制性实例包括 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{213}Bi 、 ^{225}Ac 和 ^{227}Th 。为了治疗目的, 可以使用发射 β 或 α 颗粒辐射的放射性同位素, 例如 ^{131}I 、 ^{90}Y 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{67}Cu 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 和 ^{212}Pb 。

25 将分子与抗体偶联的技术是本领域熟知的。通常, 核酸分子分别通过 N-羧基琥珀酰亚胺酯或马来酰亚胺官能团与抗体上的赖氨酸或半胱氨酸共价连接。据报道, 使用工程化半胱氨酸或整合非天然氨基酸的偶联方法可改进偶联物的同质性。特别地, 本领域技术人员还可以预期用含酰基供体谷氨酰胺的标签(例如含有 Gin 肽的标签或 Q-标签)或通过多肽工程(例如通过多肽上的氨基酸缺失、插入、取代或突变)产生反应性的内源性谷氨酰胺工程化的含 Fc 多肽。然后, 转谷氨酰胺酶可与胺供体剂(例如, 包含或连接于反应性胺的小分子)共价交联, 以形成稳定且均质的工程化含 Fc 多肽偶联物群, 其中胺供体剂通过含酰基供体谷氨酰胺标签或可接近/暴露/反应性的内源性谷氨酰胺位点特异性地与含 Fc 多肽偶联(WO2012059882)。

30 应当理解, 根据所述实施方案的治疗剂将与合适的药学上可接受的载体、赋形剂、以及其它被掺入制剂中以提供改善的转移、递送、耐受性等的试剂一同施用。大量适当的制剂可见于所有药物化学工作者已知的药典中: Remington's Pharmaceutical Sciences (第 15 版, Mack Publishing Company, Easton, Pa. (1975)), 特别是其中 Blaug、Seymour 的第 87 章。这些制剂包括例如粉末、糊剂、膏剂、凝胶剂、蜡、油、脂质、含脂质(阳离子或阴离子)载体(例如 LipofectinTM)、DNA 缀合物、无水吸浆、水包油和油包水乳液、乳液聚乙二醇(各种分子量的聚乙二醇)、半固态凝胶以及含有聚乙二醇的半固态混合物。任何前述混合物均可适用于根据本公开的治疗或疗法, 条件是制剂中的活性成分不被制剂灭活并且制剂在生理学上是相容的并耐受给药途径。

35 在一个实施方案中, 可将所述抗体用作治疗剂。此类试剂将通常用于治疗、缓解和/或预防受试者的与异常 CD20 表达、活性和/或信号传导相关的疾病或病理。可使用标准方法通过鉴定受试者, 例如患有(或处于风险或发展)与异常 CD20 表达、活性和/或信号传导相关的疾病或障碍, 例如 CD20 相关病症的患者来实施治疗方案。将抗体制剂, 优选对其靶抗原具有高特异性和高亲和性的抗体制剂施用给受试者并且将通常因其与靶标结合而产生效应。施用的抗体可消除或抑制或妨碍靶标(例如 CD20)的表达、活性和/或信号传导功能。施用的抗体可消除或抑制或妨碍靶标(例如 CD20)与其所天然结合的内源性的配体结合。例如, 抗体与靶标结合并调节、阻断、抑制、减少、拮抗、中和或以其它方式妨碍 CD20 表达、活性和/或信号传导。在一些实施方案中, 为治疗与异常 CD20 表达相关的疾病或障碍, 可将具有重链和轻链 CDR 的抗体施用给受试者。

45 在另一个实施方案中, 针对 CD20 的抗体可用于本领域中已知的与 CD20 定位和/或定量相关的方法(例如, 用于测定适当生理样品中的 CD20 和/或 CD20 的水平, 用于诊断方法, 用于蛋白成像等等)。在一个给定实施方案中, 对 CD20 或其衍生物、片段、类似物或同系物具有特异性的、包含源于抗体的抗原结合结构域的抗体, 被用作药理学活性化合物(下文称为“治疗剂”)。

50 在另一个实施方案中, 可通过标准技术例如免疫亲和、色谱或免疫沉淀, 使用对 CD20 具有特异性的抗体来分离 CD20 多肽。针对 CD20 蛋白质的抗体(或其片段)可用于检测生物样品中的蛋白质。在一些实施方案中, 在生物样品中可检测 CD20 作为临床测试过程的一部分, 例如, 用于确定给定治疗方案的功效。将抗体偶联(即物理连接)到可检测物质可有利于检测。可检测物质的示例包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料和放射性材料。合适的酶的示例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶; 合适的辅基复合物的示例包括链霉素和素/生物素和亲和素/生物素; 合适的荧光材料的示例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪荧光素、丹磺酰氯或藻红蛋白; 发光材料的一个示例包括鲁米诺; 生物发光材料的示例包括荧光素酶、荧光素和水母蛋白, 并且合适放射性材料的示例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{35}S 或 ^3H 。

在另一个实施方案中, 根据本公开的抗体可用作检测样品中 CD20 或其蛋白质片段存在的试剂。在一些实施方案中, 抗体包含可检测标记。抗体为多克隆抗体, 或更优选单克隆抗体。使用完整的抗体或其片段 (例如 Fab、scFv 或 F(ab')₂)。关于抗体的术语“标记”旨在包括通过将可检测物质偶联 (即物理连接) 到该抗体来直接标记该抗体, 以及通过与直接标记的另一种试剂反应来间接标记该抗体。间接标记的示例包括使用荧光标记的第二抗体检测第一抗体, 以及用生物素进行末端标记抗体, 以便能够用荧光标记的链霉亲和素进行检测。术语“生物样品”旨在包括从受试者分离的组织、细胞和生物学流体, 以及受试者体内存在的组织、细胞和流体。因此, 使用的术语“生物样品”包括血液和血液中的级分或组分, 包括血清、血浆、或淋巴液。换言之, 所述实施方案的检测方法可用于在体外及体内检测生物样品中的分析物 mRNA、蛋白质或基因组 DNA。例如, 分析物 mRNA 体外检测技术包括 Northern 杂交和原位杂交。分析物蛋白质体外检测技术包括酶联免疫吸附测定 (ELISA)、Western 印迹、免疫沉淀、以及免疫荧光。分析物基因组 DNA 体外检测技术包括 Southern 杂交。用于进行免疫测定的过程描述于例如“ELISA: Theory and Practice: Methods in Molecular Biology”, 第 42 卷, J.R.Crowther (编辑) Human Press, Totowa, N.J., 1995; “Immunoassay”, E.Diamandis 和 T.Christopoulos, Academic Press, Inc., San Diego, Calif., 1996; 以及“Practice and Theory of Enzyme Immunoassays”, P.Tijssen, Elsevier Science Publishers, Amsterdam, 1985。此外, 分析物蛋白质的体内检测技术包括向受试者体内导入标记的抗分析物蛋白抗体。例如, 可以用放射性标记标记抗体, 然后通过标准成像技术检测受试者体内该放射性标记物的存在和位置。

可将本文所述抗体和其衍生物、片段、类似物和同系物掺入适于施用的药物组合物中。制备此类组合物所涉及的原理和考虑事项以及选择组分的指南在本领域中是熟知的, 例如参见 Remington's Pharmaceutical Sciences: The Science And Practice Of Pharmacy 第 19 版 (Alfonso R.Gennaro 等人编辑) Mack Pub.Co., Easton, Pa.: 1995; Drug Absorption Enhancement: Concepts, Possibilities, Limitations, And Trends, Harwood Academic Publishers, Langhorne, Pa., 1994; 以及 Peptide And Protein Drug Delivery (Advances In Parenteral Sciences, 第 4 卷), 1991, M.Dekker, New York。

此类组合物通常包含抗体和药学上可接受的载体。当使用抗体片段时, 与靶蛋白结合结构域特异性结合的最小抑制片段可为优选的。例如, 基于抗体的可变区序列, 可以设计保留结合靶蛋白质序列能力的肽分子。此类肽可化学合成和/或通过重组 DNA 技术产生 (参见例如 Marasco 等人, Proc. Natl. Acad. Sci.USA, 90:7889-7893 (1993))。

如本文所用, 术语“药学上可接受的载体”旨在包括与药物给药相容的任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延缓剂等。合适的药学上可接受的载体描述于最新版的 Remington's Pharmaceutical Sciences 中, 这是本领域的标准参考书目, 其以引用方式并入本文。此类载体或稀释剂的优选示例包括但不限于水、盐水、林格氏溶液、葡萄糖溶液和 5% 的人血清白蛋白。也可以使用脂质体和非水性载体, 例如固定化油。将此类介质和试剂用于药物活性物质是本领域熟知的。除去任何常规的介质或试剂与抗体不相容之外, 设想其在组合物中的用途。

将所述实施方案的药物组合物配制成与其预期施用途径相容。给药途径的示例包括肠胃外, 例如静脉内、皮内、皮下、经口 (例如吸入)、经皮 (即局部的)、经粘膜和直肠给药。用于肠胃外、皮内或皮下施用的溶液或悬浮液可包括以下组分: 注射用无菌稀释剂例如水、盐溶液、固定油、聚乙二醇类、甘油、丙二醇或其它合成溶剂; 抗菌剂, 例如苯醇或对羟基苯甲酸甲酯; 抗氧化剂, 例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠; 螯合剂, 例如乙二胺四乙酸 (EDTA); 缓冲剂, 例如乙酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐、以及调节渗透压的试剂, 例如氯化钠或右旋糖。pH 可用酸或碱进行调节, 例如盐酸或氢氧化钠。可将肠胃外制剂包装在安瓿、一次性注射器或玻璃或塑料制多剂量小瓶内。

适于注射用途的药物组合物包括无菌水性溶液 (在此是水溶性的) 或分散体以及用于即时制备无菌注射液或分散体的无菌粉末。对于静脉内施用, 合适的药学上可接受的载体包括生理盐水、抑菌水、Cremophor EL™ (BASF, Parsippany, N.J.) 或磷酸盐缓冲盐水 (PBS)。在所有情况下, 组合物必须是无菌的并且应当为流动性达到易于注射的程度。其在制造和储存条件下必须是稳定的并且必须能防止微生物例如细菌和真菌的污染作用。载体可以是含有例如水、乙醇、多元醇 (例如, 甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等) 的溶剂或分散介质, 及其适宜的混合物。例如通过利用涂层例如卵磷脂, 在分散体情况下维持所需颗粒尺寸, 以及利用表面活性剂, 可以保持适宜的流动性。对微生物作用的防止可以通过各种抗菌剂和抗真菌剂例如对羟基苯甲酸酯、氯代丁醇、苯酚、抗坏血酸、硫柳汞等来实现。在许多情况下, 将优选在组合物中包含等渗剂, 例如糖、多元醇 (诸如甘露糖醇、山梨醇)、氯化钠。注射用组合物的延长吸收可通过在所述组合物中包含延缓吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来达到。

根据需要, 可以通过将抗体以所需量掺入具有上文所列成分中的一种或组合 (按需要) 的合适溶剂中来制备无菌注射溶液, 然后过滤消毒。一般来讲, 通过将抗体掺入含有碱性分散介质和上文所列那些中的所需其它成分的不菌载体中来制备分散体。就用于制备无菌注射溶液的无菌粉末而言, 制备方法是获得粉末的真空干燥和冷冻干燥, 该粉末包含活性成分和任何另外的期望成分, 它们来自前述的这些成分的无菌过滤溶液。

对于吸入给药, 从包含合适推进剂如二氧化碳等气体的加压容器或分配器或者喷雾器以气溶胶喷雾形式递送化合物。

还可以通过经粘膜或透皮方式全身给药。对于经粘膜或透皮给药, 在制剂中使用适于渗透屏障的渗透剂。此类渗透剂通常在本领域是通常所知的, 并且包括如用于经粘膜给药的去污剂、胆盐和夫西地酸衍生物。经粘膜给药可以通过使用喷雾剂或栓剂来实现。对于透皮给药, 可将一种或多种所述抗体配制成如本领域通常所知的膏剂、软膏、凝胶、或霜膏。

还可将化合物以栓剂 (例如, 具有常规栓剂基质, 如可可脂或其它甘油酯) 或滞留性灌肠剂形式进行制备以用于经直肠递送。

在一个实施方案中,所述抗体可用防止其不被身体迅速消除的载体制备,例如缓释/控释制剂,包括植入体和微胶囊化递送体系。可使用可生物降解、可生物相容的聚合物,例如乙烯-乙酸乙烯酯、聚酐、聚乙醇酸、胶原、聚乳酸和聚乳酸。用于制备此类制剂的方法对于本领域技术人员而言是显而易见的。

尤其有利的是以剂量单位形式配制肠胃外组合物以易于施用和剂量的一致性。如本文所用,剂量单位形式是指用于待治疗的受试者,适合作为单位剂量的物理上可分离的单位;每个单位含有经计算与所需药物载体结合产生期望治疗效果的预定量的一种或多种所述抗体。所述实施方案的剂量单位形式的规格由以下指示并直接取决于:抗体的独特特征和待实现的具体治疗效果,和用于治疗个体的此类抗体的调配领域中固有的局限性。

所述药物组合物可与给药说明书一起放于容器、包装、或分配器中。

本文所述制剂还可根据要治疗的具体情况而包含多于一种所述抗体,优选具有互补活性但对彼此无负面影响的。另选地或除此之外,组合物可例如包含增强其功能的试剂,诸如细胞毒素试剂、细胞因子、化学治疗剂、或生长抑制剂。此类分子以对预期目的有效的量适当地联合存在。例如,可以在试剂盒中联合存在,也可以在使用中联合存在。

在一个实施方案中,一种或多种所述抗体可在联合治疗中施用,即与其它试剂例如治疗剂(其可用于治疗病理学病症或障碍,例如各种形式的癌症、自身免疫性障碍和炎症疾病)联合。术语“联合”在本文中是指将试剂基本上同步地,同时地或顺次地给予。如果顺次给予,则在开始施用第二种化合物时,两种化合物中的第一种仍优选在治疗位点处以有效浓度被检测到。在一种情况下,“联合”也可以是在试剂盒中同时包含本公开的抗体和其他治疗剂。

例如,联合治疗可包含本文所述一种或多种抗体与一种或多种附加治疗剂(例如一种或多种细胞因子和生长因子抑制剂、免疫抑制剂、抗炎剂、代谢抑制剂、酶抑制剂、和/或细胞毒素或细胞生长抑制剂,如下更详述的)共同配制和/或共同施用。此类联合治疗可有利地利用较低剂量的施用的治疗剂,因而避免了与各种单一疗法相关的可能毒性或并发症。

在一个实施方案中,抗 CD20 抗体的施用和治疗剂的施用可以降低该受试者中的 B 细胞的数目。

在一个实施方案中,与相应的不施用抗 CD20 抗体的治疗方案相比该治疗方案有效降低该受试者中与该 T 细胞活化性治疗剂的施用相关的细胞因子释放。

为了达到清楚和简洁描述的目的,本文中作为相同的或分开的一些实施方案的一部分来描述特征,然而,将要理解的是,本公开的范围可包括具有所描述的所有或一些特征的组合的一些实施方案。

实施例 1: CD20 稳转细胞和 CD3 重组抗原

1. 人或猴 CD20 稳转细胞株的构建

构建含有人 CD20 或食蟹猴 (*Cynomolgus monkey*) CD20 全长序列 (cDNA 购自 Sino Biological, HG11007-UT, CG90052-G) 的慢病毒载体质粒,用慢病毒包装试剂盒 (Lenti-Pac HIV Expression Packaging Kit, Gene Copoeia, #HPK-LvTR-20), 将构建好的慢病毒质粒和包装质粒共转染 HEK293T 细胞, 48 小时后收取上清。取 10 μ L 含有慢病毒颗粒的培养上清, 加入对数生长期的 CHO 细胞, 2 天后, 加入 10 μ g/mL puromycin 进行筛选。抗性克隆通过有限稀释法, 进一步得到高表达人或猴 CD20 的稳转细胞株 CHO-人 CD20 (克隆 3G6) 和 CHO-食蟹猴 CD20 (克隆 1G9)。

图 1 显示, 利用 APC 标记的 CD20 抗体 (BioLegend #302309) 进行流式细胞检测, 相对于未转染的 CHO 细胞, 人 CD20 稳转细胞 (CHO-hCD20-3G6) 和猴 CD20 稳转细胞 (CHO-cyCD20-1G9) 均表达高水平的 CD20。

2. 人或猴 CD3 γ 异源二聚体的构建

合成人 CD3 γ (UniProt P09693, Gln₂₃-Asn₁₁₆) 和 CD3 ϵ (UniProt P07766, Gln₂₃-Asp₁₂₆) 胞外区核苷酸序列, C 端分别与人 IgG Fc hole 或 Fc knob 融合, 表达形成人 CD3 γ -Fc 异源二聚体 (人 CD3 γ IgG Fc (hole) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 1 所示, 人 CD3 ϵ IgG Fc (knob) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 2 所示); 同样合成食蟹猴 CD3 γ (UniProt Q95LI7, Gln₂₃-Asn₁₁₀) 和 CD3 ϵ (UniProt Q95LI5, Gln₂₂-Asp₁₁₇), C 端与食蟹猴 IgG Fc hole 或 Fc knob 融合, 表达形成食蟹猴 CD3 γ -Fc 异源二聚体 (食蟹猴 CD3 γ IgG Fc (hole) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 3 所示, 食蟹猴 CD3 γ IgG Fc (knob) 的氨基酸序列如 SEQ ID NO. 4)。将表达 CD3 γ -Fc 和 CD3 ϵ -Fc 的重组质粒与 3mg/mL PEI (Polysciences, #24765-2) 混合, 共转染 HEK293E 细胞 (培养基 OPM-293 CD03 DPM), 37°C 120rpm 5%CO₂ 培养 7 天后, 收集培养基上清液, 经 Protein A 亲和层析纯化, 得到人或食蟹猴 CD3 γ -Fc 重组蛋白, SDS-PAGE 纯度高于 95% (图 2)。

实施例 2: CD3 人源化抗体

鼠源杂交瘤 CD3 抗体 (EMBO J.1985.4(2): 337-344; J.Immunol.1986.137(4): 1097-1100; J.Exp.Med.1991.174: 319-326; J.Immunol.1991.147(9): 3047-52) 识别人和猴 CD3 受体, 其序列如下:

抗 CD3 鼠单抗轻链氨基酸序列 (SEQ ID NO. 122):

QAVVTQESALTTSPGETVTLTCR**SSITGAVTTTSNYAN**WVQKPDHLFTGLIG**GTNKRAP**GVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTE
DEAIYFCA**LWYSNLWV**FGGGTKLTVL

抗 CD3 鼠单抗重链氨基酸序列 (SEQ ID NO. 123):

EVQLVESGGGLVQPKGSLKLSKAASGFTFN**TYAMN**WVRQAPGKLEWVAR**IRSKYNNYATYYADS**VKDRFTISRDDSQSILYL
QMNNLKTEDTAMYYCVR**HGNFGNSYVSWFAY**WGQGTLLVTVSS

将抗 CD3 鼠单抗原人源化, 选择同源性最高的人胚系基因 IMGT_hVL7-43 进行轻链 CDR 移植, FM4 选用人 IGLJ3*02; 选择人 IMGT_hVH3-73 进行重链 CDR 移植, FM4 选用人 IGHJ4*01。设计共得到不同的重链变体和轻链变体 (表 1、2)。

表 1、CD3 人源化抗体的轻链可变区序列

CD3 人源化抗体	SEQ ID NOs: 5-23				
	LCVR		LCDR1	LCDR2	LCDR3
	氨基酸	核苷酸	氨基酸	氨基酸	氨基酸
	序列	序列	序列	序列	序列
hVL1	5	6	7	8	9
hVL2	10	11	7	8	9
hVL3	12	13	14	15	9
hVL4	16	17	14	15	9
hVL5	18	19	7	8	21
hVL6	22	23	7	20	21

hVL1:

5 QAVVTQEPSTLVSPGGTVTTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAA
 LTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

hVL2:

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAA
 LTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

hVL3:

10 EAVVTQEPSTLVSPGGTVTTLTESSDGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKEAPWTPARFSGSLLGGKAA
 LTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

hVL4:

QAVVTQEPSTLVSPGGTVTTLTESSDGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKEAPWTPARFSGSLLGGKAA
 LTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL

hVL5:

15 QAVVTQEPSTLVSPGGTVTTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAA
 LTITGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL

hVL6:

20 QAVVTQEPSTLVSPGGTVTTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIYGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAA
 LTLSGAQAEDEAEYYCVLWYSNLWVFGGGTKLTVL

表 2、CD3 人源化抗体的重链可变区序列

CD3 人源化抗体	SEQ ID NOs:24-53				
	HCVR		HCDR1	HCDR2	HCDR3
	氨基酸	核苷酸	氨基酸	氨基酸	氨基酸
	序列	序列	序列	序列	序列
hVH1	24	25	26	27	28
hVH2	29	30	31	27	28
hVH3	32	33	31	27	34
hVH4	35	36	31	27	37
hVH5	38	39	31	27	40
hVH6	41	42	31	27	43
hVH7	44	45	46	47	28
hVH8	48	49	26	27	28
hVH9	50	51	26	27	28
hVH10	52	53	26	27	28

hVH1:

25 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGSYVSWFAYWGQGTlVTVSS

hVH2:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGSYVSWFAYWGQGTlVTVSS

hVH3:

30 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGSYVSWFAYWGQGTlVTVSS

hVH4:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFNGSYVSWFAYWGQGTlVTVSS

hVH5:

35 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMNWVRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGDSYVSWFAYWGQGTlVTVSS

hVH6:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSTYAMN WVRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGTSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

hVH7:

5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSDYAMN WVRKAPGKGLEWVSRIRSKYNNYATYYADSVEDRFTISRDDSKN
 TLYLQMNSLRAEDTAVYYCVRHGNFGTSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

hVH8:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN
 SLYLQMNSLKTEDTAVYYCARHGNFGTSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

hVH9:

10 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRKAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN
 SLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGTSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

hVH10:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMN WVRKAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKN
 SLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGTSYVSWFAYWGQGLTVTVSS

15 将轻、重链人源化变体分别进行全序列合成后，克隆到含有抗体 lambda 轻链恒定区或人 IgG4 重链恒定区
 CHI-CH3 的真核表达载体，共转染 HEK293E 细胞，37°C 120rpm 5%CO₂ 培养 5-6 天后，收集培养基上清液，通过
 Protein A 层析柱进行纯化。

ELISA 亲和力测定

20 包被入 CD3 ϵ y 蛋白，4°C 过夜。2%脱脂牛奶封闭后，每孔加入不同稀释倍数的 CD3 抗体，孵育 1 小时；二抗
 加入 HPR 标记的山羊抗人 IgG Fc，TMB 溶液显色后，以浓硫酸终止反应并在 450nm 处读出吸光度（结果如图 3 所
 示）。

图 3 显示与人 CD3 ϵ y 蛋白结合的抗 CD3 人源化抗体组合（包括 aCD3-hVH8/VL1、aCD3-hVH9/VL1、
 aCD3-hVH9/VL2、aCD3-hVH9/VL3、aCD3-hVH1/VL5、aCD3-hVH8/VL5、aCD3-hVH9/VL5），CD3 人源化抗体高
 亲和力结合 CD3 ϵ y 重组蛋白。

25 **Jurkat T 细胞亲和力测定**

取对数生长期的 Jurkat 细胞，3%BSA 封闭 30 分钟，以每孔 5×10^4 细胞加入 96 孔 U 型板，离心弃上清，每孔
 加入 50 μ L 梯度稀释的抗体（抗体浓度从 30 μ g/mL 起，3 倍稀释 5 个梯度），4°C 孵育 1 小时。洗去一抗后，二抗加
 入 1:300 稀释的 Alexa Fluoro647 标记的山羊抗人 IgG Fc (Jackson ImmunoResearch, 109-606-170)，4°C 孵育 45 分钟，
 洗涤后每孔重悬于 50 μ L PBS 进行 FACS (iQue, Intellicyt) 检测（结果如图 4 所示）。

30 图 4 显示与 Jurkat 细胞结合的抗 CD3 人源化抗体组合，其中 CD3 人源化抗体 hVH9/VL5 (aCD3-hVH9/VL5)
 以中度亲和力结合 Jurkat 细胞。

实施例 3: CD20 人源化抗体

鼠源 CD20 抗体或对照抗体参考文献 US5736137、US8529902 合成，其可变区氨基酸序列如下：

35 CD20-2B8:

QIVLSQSPAILASAPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFFQKPGSSPKPWIYATSNLASGVFVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAA
 TYCQQTWSNPFTFGGKLEIK
 QVQLQPGAEIVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQL
 SSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSA

40 CD20-2F2:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDF
 AVYYCQQRSNWPITFGGKTRLEIK
 EVQLVSGGGLVHPGGSLRLSCTGSGFTFSYHAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNSGSIYADSVKGRFTISRDNVKNLSYLQMN
 NSLRAEDTALYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGTITVTVSS

45 CD20-11B8:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRTGIPARFSGSGSGTDFTLTISLEPEDF
 AVYYCQQRSDWPLTFGGKTKVEIK
 EVQLVSGGGLVHPGGSLRLSCTGSGFTFSYHAMHWVRQAPGKGLEWVSTIIGTGGVTTYADSVKGRFTISRDNVKNLSYLQMN
 SLRAEDMAVYYCARDYYGAGSFYDGLYGMVWGQGTITVTVSS

50 通过 CDR 移植和点突变，对 CD20 抗体进行优化设计并降低等电点：移植鼠源或对照 CD20 抗体的轻链 CDR
 到人抗体胚系基因 Vk3-20 框架上，Joint 区采用人 KJ2*01；重链 CDR 移植到人 VH1-69 或 VH3-23 框架上，并引入
 LyS77Asn 等突变以降低 Fv 区域电荷密度，Joint 区采用人 HJ4*01，分别获得人源化 Mab001 抗体、Mab002 抗体、
 Mab003 抗体、Mab004 抗体、Mab005 抗体、Mab006 抗体、Mab007 抗体（表 3、4）。

55 将轻链可变区克隆到含有 kappa 轻链恒定区的真核表达载体，将重链可变区克隆到含有 IgG4 CHI-3 恒定区的
 真核表达载体。转染 HEK293E 细胞，表达 5-6 天后收取培养上清，Protein A 亲和层析纯化，通过 Nanodrop 分光光
 度计和理论吸光度值确定抗体浓度。

表 3、人源化 CD20 抗体的轻链可变区序列

CD20 人源化抗体	SEQ ID NOs: 54-63				
	LCVR		LCDRI	LCDR2	LCDR3
	氨基酸	核苷酸	氨基酸	氨基酸	氨基酸

	序列	序列	序列	序列	序列
Mab001	54	55	56	57	58
Mab002	54	55	56	57	58
Mab003	54	55	56	57	58
Mab004	59	60	61	62	63
Mab005	59	60	61	62	63
Mab006	59	60	61	62	63
Mab007	59	60	61	62	63

表 4、人源化 CD20 抗体的重链可变区序列

CD20 人源化抗体	SEQ ID NOs: 64-85				
	HCVR		HCDR1	HCDR2	HCDR3
	氨基酸	核苷酸	氨基酸	氨基酸	氨基酸
	序列	序列	序列	序列	序列
Mab001	64	65	66	67	68
Mab002	69	70	66	67	71
Mab003	72	73	66	67	68
Mab004	74	75	76	77	78
Mab005	79	80	76	77	78
Mab006	81	82	76	77	78
Mab007	83	84	76	77	85

- Mab001 抗体轻链可变区(VK)氨基酸序列如 SEQ ID NO. 54 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 55 所示,其 CDR1、
 5 CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO. 56-58 所示。
 EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSC**RASSSVSYIH**WFQKPGQAPRPLIY**ATSNLAS**GIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFA
 VYYC**QQWTSNPPT**FGQGTKLEIK
- Mab001 抗体重链可变区(VH)氨基酸序列如 SEQ ID NO. 64 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 65 所示,其 CDR1、
 10 CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO. 66-68 所示。
 QQVLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFT**SYNMH**WVRQAPGQGLEWMG**AIYPGNGDTSYNQKFQG**RVTLTADKSSSTAYMEL
 SSLRSEDVAVYYCAR**STYYGGDWYFNV**WGQGLTVTVSS
- Mab002 抗体轻链可变区(VK)氨基酸序列如 SEQ ID NO. 54 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 55 所示,其 CDR1、
 15 CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO. 56-58 所示。
 EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSC**RASSSVSYIH**WFQKPGQAPRPLIY**ATSNLAS**GIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFA
 VYYC**QQWTSNPPT**FGQGTKLEIK
- Mab002 抗体重链可变区(VH)氨基酸序列如 SEQ ID NO. 69 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 70 所示,其 CDR1、
 20 CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO. 66、67、71 所示。
 QQVLVQSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFT**SYNMH**WVRQAPGQGLEWMG**AIYPGNGDTSYNQKFQG**RVTLTADKSSSTAYMEL
 SSLRSEDVAVYYCAR**STYYGGDWYFDY**WGQGLTVTVSS
- Mab003 抗体轻链可变区(VK)氨基酸序列如 SEQ ID NO. 54 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 55 所示,其 CDR1、
 25 CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO. 56-58 所示。
 EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSC**RASSSVSYIH**WFQKPGQAPRPLIY**ATSNLAS**GIPDRFSGSGSGTDYTLTISRLEPEDFA
 VYYC**QQWTSNPPT**FGQGTKLEIK
- Mab003 抗体重链可变区(VH)氨基酸序列如 SEQ ID NO. 72 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 73 所示,其 CDR1、
 30 CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO. 66-68 所示。
 EVQLVSGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFT**SYNMH**WVRQAPGQGLEWMG**AIYPGNGDTSYNQKFQG**RVTLTADKSSSTAYMEL
 SSLRSEDVAVYYCAR**STYYGGDWYFNV**WGQGLTVTVSS
- Mab004 抗体轻链可变区(VK)氨基酸序列如 SEQ ID NO. 59 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 60 所示,其 CDR1、
 35 CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO. 61-63 所示。
 EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSC**RASQSVSSYLA**WYQQKPGQAPRLIY**DASNRAT**GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF
 AVYYC**QQRSNWPI**TFGQGTKLEIK
- Mab004 抗体重链可变区(VH)氨基酸序列如 SEQ ID NO. 74 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 75 所示,其 CDR1、
 40 CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO. 76-78 所示。
 EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFND**YAMH**WVRQAPGKGLEWVS**TISWN**SGSIGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM
 NSLRSEDVAVYYCAK**DIQYGN**YYYGMDVWGQGLTVTVSS
- Mab005 抗体轻链可变区(VK)氨基酸序列如 SEQ ID NO. 59 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 60 所示,其 CDR1、
 45 CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO. 61-63 所示。
 EIVLTQSPGTLTSLSPGERATLSC**RASQSVSSYLA**WYQQKPGQAPRLIY**DASNRAT**GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF
 AVYYC**QQRSNWPI**TFGQGTKLEIK
- Mab005 抗体重链可变区(VH)氨基酸序列如 SEQ ID NO. 79 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 80 所示,其 CDR1、
 50 CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO. 76-78 所示。
 EVQLLES GGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFND**YAMH**WVRQAPGKGLEWVS**TISWN**SGSIGYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQM

NSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGLTVTVSS

Mab006 抗体轻链可变区(VK)氨基酸序列如 SEQ ID NO. 59 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO.60 所示,其 CDR1、CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO. 61-63 所示。

5 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDE
AVYYCQQRSNWPITFGQGTKLEIK

Mab006 抗体重链可变区(VH)氨基酸序列如 SEQ ID NO. 81 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 82 所示,其 CDR1、CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO. 76-78 所示。

10 EVQLLESQGGGVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVS TISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM
NSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGLTVTVSS

Mab007 抗体轻链可变区(VK)氨基酸序列如 SEQ ID NO. 59 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO.60 所示,其 CDR1、CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO. 61-63 所示。

15 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDE
AVYYCQQRSNWPITFGQGTKLEIK

Mab007 抗体重链可变区(VH)氨基酸序列如 SEQ ID NO. 83 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 84 所示,其 CDR1、CDR2 和 CDR3 如 SEQ ID NO. 76、77、85 所示。

EVQLLESQGGGVQPGGSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVS TISWNSGSGIGYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM
NSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGLTVTVSS

人源化 CD20 抗体与肿瘤细胞的结合

20 取对数生长期的淋巴瘤细胞系 Raji 和 Daudi 细胞,加入 200 μ g/mL 鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch) 封闭 30 分钟。在 96 孔 U 型板中,每孔加入 5×10^4 个细胞和 50 μ L 梯度稀释的抗体(起始浓度 200nM,5 倍稀释,共 8 个梯度),冰上孵育 45 分钟。洗涤后,每孔加入 50 μ L Alexa Fluor647 标记的山羊抗人 IgG Fc (1:300 稀释),冰上孵育 45 分钟。加入 60 μ L/孔 PI (Sigma, P4170),孵育 5 分钟,用流式细胞仪 (iQue Screener) 进行检测。图 5 显示人源化 CD20 抗体与 Raji 细胞的结合;图 6 显示人源化 CD20 抗体与 Daudi 细胞的结合。

25 实施例 4: 人源化 CD20 抗体与 CD3 抗体的组合筛选

1. 抗体组合筛选的双功能抗体

30 选取通过等电点优化得到的人源化 CD20 抗体 Mab002、Mab005 和 Mab007,与人源化 CD3 抗体构建双特异抗体。参考 Schaefer W 等 (PNAS, 2011),对人源化 CD20 抗体与 CD3 抗体的组合进行筛选:将人源化 CD20 抗体的轻链可变区克隆到含有 kappa 轻链恒定区的真核表达载体,将重链可变区克隆到含有突变的人 IgG4 恒定区真核表达载体;将人源化 CD3 抗体的轻链可变区克隆到含有 lambda 轻链恒定区以及重链铰链区和恒定区 CH2、CH3 的真核表达载体,将 CD3 抗体的重链可变区克隆到含有人 CH1 恒定区的真核表达载体,将编码轻、重链基因的 4 种质粒按 1:1:1:1 比率混合,转染 HEK293E 细胞,表达 5-6 天后收取培养上清,通过 Protein A 亲和层析纯化。SEC-HPLC 显示,按该方法制备的双功能抗体 Mab002 $\times$ CD3、Mab005 $\times$ CD3 和 Mab007 $\times$ CD3 中单体含量大于 55%,用于下述靶细胞结合和杀伤作用的相对活性评价。

35 用于抗体组合筛选的双功能抗体序列见表 5。

表 5、抗体组合筛选的双功能抗体序列

双功能抗体名称	CD20 抗体	CD3 抗体
Mab002 $\times$ CD3, SEQ ID NO. 86-93, 在 CD20 抗原臂和 CD3 臂引入电荷变异体: VK _{CD20} : Gln ₃₇ Lys; VH _{CD20} : Gln ₃₉ Glu; VL _{CD3} : Gln ₄₀ Glu; VH _{CD3} : Gln ₃₉ Lys	链 1:其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 86 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 87 所示 QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCK ASGYTFTSYNMHWVREAPQGGL WMGAIYPNGDTSYNQKFQGRVT LTADKSSSTAYMELSSLRSEDTAVY YCARSTYYGGDWYFDYWGQGLT VTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVEDYFPEPVTVSWNSG ALTSQGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTYTCNVDHKPSNTK VDERVESKYGPCCPPCPAPEFEGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSEQEDPEVQFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQFASTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSI EKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQEE MTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVE WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSF FLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLGLGK* 链 2:其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 88	链 3:其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 90 所示,其编码核酸如 SEQ ID NO. 91 所示 QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNANWVQEKPGQAPRG LIGGTNKRAPWTPARFSGSLGKG AALTITGAQAEDEAEYYCVLWYSN LWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECSESK YGPPCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVSEQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSLGK* 链 4:其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 92

	所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 89 所示 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SSSVSYIHWFQKKPGQAPRPLIYAT SNLASGIPDRFSGSGSGTDYTLTIS RLEPEDFAVYYCQQWTSNPPTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDKKL KSGTASVVCLLNNFYPREAKVQW KVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC*	所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 93 所示 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEW VGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCVRHGNGFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTK VDKRV*
Mab005xCD3, SEQ ID NO. 90-97, 在 CD20 抗原臂和 CD3 臂引入电荷变异体: VK _{CD20} : Gln ₃₈ Lys; VH _{CD20} : Gln ₃₉ Glu; VL _{CD3} : Gln ₄₀ Glu; VH _{CD3} : Gln ₃₉ Lys	链 1: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 94 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 95 所示 EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNDYAMHWVREAPGKGLE WVSTISWNSGSIYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKDIQYGNYYYGMDVWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNT KVDERVERESKYGPCCPPCPAPEFEG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFASTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQ EEMTKNQVSLTSCAVKGFPYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQEGNVSFCS VMHEALHNHYTQKSLSLSLGK* 链 2: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 96 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 97 所示 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSYLAWYQKKPGQAPRLIY DASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFG QGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDKK LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*	链 3: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 90 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 91 所示 QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNANWVQKPGQAPRG LIGGTNKRAPWTPARFSGSLGKG AALTITGAQAEDAEEYCVLWYSN LWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECSESK YGPCCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQEGNVSFCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSLGK* 链 4: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 92 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 93 所示 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWVRKAPGKGLEW VGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCVRHGNGFGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTK VDKRV*
Mab007xCD3, SEQ ID NO. 98-101, 90-93, 在 CD20 抗原臂和 CD3 臂引入电荷变异体: VK _{CD20} : Gln ₃₈ Lys; VH _{CD20} : Gln ₃₉ Glu; VL _{CD3} : Gln ₄₀ Glu; VH _{CD3} : Gln ₃₉ Lys	链 1: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 98 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 99 所示 EVQLLESGGGVVQPGGSLRLSCA ASGFTFNDYAMHWVREAPGKGLE WVSTISWNSGSIYADSVKGRFTIS RDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVY YCAKDIQYGNYYYGMDYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTS ESTAALGCLVEDYFPEPVTVSWNS GALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNT KVDERVERESKYGPCCPPCPAPEFEG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTC VVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVE	链 3: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 90 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 91 所示 QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSS TGAVTTSNANWVQKPGQAPRG LIGGTNKRAPWTPARFSGSLGKG AALTITGAQAEDAEEYCVLWYSN LWVFGGGTKLTVLGQPKAAPSVTL FPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGA VTVAWKADSSPVKAGVETTPPSKQ SNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSY SCQVTHEGSTVEKTVAPTECSESK YGPCCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKP KDTLMISRTPEVTCVVVDVVSQEDP EVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE

	VHNAKTKPREEQFASTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYCKVSNKGLPS SIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQ EEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDG SFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLGLGK* 链 2：其氨基酸序列如 SEQ ID NO.100 所示，其编码核酸如 SEQ ID NO. 101 所示 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRA SQSVSSYLAWYQKPGQAPRLIY DASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLT ISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFG QGKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDKK LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKD STYLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC*	QFASTYRVVSVLTVLHQDWLNGK EYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLW CLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQ KSLSLSLGLGK* 链 4：其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 92 所示，其编码核酸如 SEQ ID NO. 93 所示 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAA SGFTFNTYAMNWRKAPGKGLEW VGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTI SRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVY YCYVRHGFNGNSYVSWFAYWGQGT LVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSVKNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV TVPSSSLGKTKYTCNVDHKPSNTK VDKRV*
--	--	---

2. 对 CD20+细胞和 Jurkat 细胞的识别

取对数生长期的 Raji 细胞和人外周白血血病 T 细胞系 Jurkat 细胞，加入 200μg/mL 鼠 IgG 封闭 30 分钟。在 96 孔 U 型板中，每孔加入 5×10⁴ 个细胞，和 50μL 梯度稀释的抗体（起始浓度 1800nM，5 倍稀释，共 8 个梯度），冰上孵育 45 分钟。洗去一抗后，每孔加入 50μL Alexa Fluoro647 标记的山羊抗人 IgG Fc（1:300 稀释），冰上孵育 45 分钟，加入 60μL/孔 PI，孵育 5 分钟，用流式细胞仪进行检测。

图 7 显示 CD20×CD3 抗体组合与 Raji 细胞的结合；图 8 显示 CD20×CD3 抗体组合与 Jurkat 细胞的结合。

3. T 细胞依赖的细胞毒实验（TDCC）

取新鲜分离得到的 PBMC 和处于对数生长期的 Raji 细胞混合（效应/靶细胞=10:1），每孔加入 50μL 梯度稀释的抗体（起始浓度 66.7nM，10 倍稀释，8 个梯度），5%CO₂ 37℃培养 24 小时。培养结束后，1000rpm 离心 3 分钟，取上清检测 LDH 释放，将 50μL 上清转移至黑色酶标板，加入 50μL/孔 LDH 检测底物，10 分钟后终止反应并检测（Biotek Synergy HT），按下述公式计算杀伤率：弃去上清后，将孔内剩余细胞用 4%小牛血清清洗 2 次后，加入 100μg/mL 人 IgG 封闭 10 分钟，加入 T 细胞早期活化标记 CD69 和后期标记 CD25 检测抗体（CD25-PE，CD4-APC，CD69-FITC 和 CD8-APC），冰上孵育 20 分钟。孵育结束后，每孔加入 200μL 4%小牛血清清洗 3 次，弃上清，加入 60μL/孔 PI（1：200 稀释），置于冰上孵育 5 分钟，用流式细胞仪（BD FACS celesta）进行检测。

杀伤率计算公式如下：

$$\text{杀伤率(\%)} = \frac{\text{实验孔} - \text{靶细胞自发}}{\text{靶细胞最大释放} - \text{靶细胞自发}} \times 100\%$$

图 9A 显示不同 CD20×CD3 抗体组合介导的对 Raji 细胞的 TDCC 杀伤作用；图 9B 显示在 TDCC 杀伤过程中，CD20×CD3 抗体组合可刺激 T 细胞上调活化标志物 CD69 和 CD25。

4. T 细胞信号通路的活化

将荧光素酶报告质粒 pGL4.30[luc2P/NFAT-RE/Hygro]（Promega，E8481）转染 Jurkat 细胞，添加 200μg/ml 潮霉素 B 进行筛选，获得 Jurkat-NFAT luc 稳转报告细胞。将 CD20+靶细胞、CD20×CD3 抗体和 Jurkat-NFAT-luc 报告细胞共孵育，CD20×CD3 抗体结合靶细胞后，另一端与 Jurkat 细胞表面 CD3 受体结合，引起 CD3 胞内信号基序聚集，活化信号通过 NFAT 通路传递到核内，最终导致报告基因荧光素酶的表达上调。分别取对数生长期的 Jurkat-NFAT-luc 报告细胞和 Raji 细胞，1000rpm 离心 10 分钟，弃上清，重悬细胞至 2×10⁶ 个细胞/ml。按 50μL/孔加入 Raji 细胞悬液至 96 孔板，300g 离心 5 分钟，弃上清；加入 50μL/孔 Jurkat-NFAT-luc 细胞悬液，以及 50μL 梯度稀释的抗体（起始浓度 20μg/ml，10 倍稀释，10 个梯度），5%CO₂，37℃培养 6 小时。培养结束后，按照 ONE-Glo Luciferase Assay System（Promega）说明书操作，每孔加入 100μL 检测试剂，室温放置 3 分钟，检测荧光信号（Biotek Synergy HT）。

图 10 显示，与 Raji 细胞共孵育时，各组 CD20×CD3 抗体均可激活 Jurkat 细胞的 NFAT 信号通路，而在无靶细胞存在时，CD20×CD3 抗体不激活 Jurkat 细胞的 NFAT 信号通路。

实施例 5：构建不同类型轻链形成的 CD20×CD3 κλ 双特异抗体

以人源化 CD3 臂（λ 轻链和配对重链）和人源化 CD20 抗原臂（κ 轻链和配对重链），构建具有天然 IgG 构型的新型 CD20×CD3 κλ 双特异抗体。在自由组合情况下，κ 轻链或 λ 轻链通常倾向于与同源的重链进行配对，因此，构建了 CD20×CD3 κλ.001，保留 CD3 臂和 CD20 抗原臂的天然序列；同时，为进一步减少可能产生的错配，在 κ 和 λ 轻链与同源重链配对基础上，引入稳定 Fv 的电荷变异性（Tan 等，1998），或在 C_{H1}/C_κ 之间引入互补电荷对 Glu₁₂₃Lys/Gln₁₂₄Lys 和 Lys₅₁₅₂Glu/Lys₅₂₁₈Glu，共设计并构建了下述 5 种 CD20×CD3 κλ 双特异抗体：

- (1) CD20×CD3 κ 0.001 保留 CD3 臂和 CD20 抗原臂的天然序列；
- (2) CD20×CD3 κ 0.002 同时在 CD20 抗原臂和 CD3 臂引入电荷变异体 (V_{KCD20}: Gln₃₈Lys; VH_{CD20}: Gln₃₉Glu; V_{λCD3}: Gln₄₀Glu; VH_{CD3}: Gln₃₉Lys)；
- (3) CD20×CD3 κ 0.003 基于 CD20×CD3 κ 0.002, 在 CH1/C_K 之间增加互补电荷对 (V_K-C_K_{CD20}: Gln₃₈Lys/Glu₁₂₃Lys/Gln₁₂₄Lys; V_H-C_H_{1CD20}: Gln₃₉Glu/Lys₁₅₂Glu/Lys₂₁₈Glu; V_{λCD3}: Gln₄₀Glu; VH_{CD3}: Gln₃₉Lys)；
- (4) CD20×CD3 κ 0.004 在 CD20 抗原臂引入稳定 Fv 的电荷变异体 (V_{KCD20}: Gln₃₈Lys; VH_{CD20}: Gln₃₉Glu)；
- (5) CD20×CD3 κ 0.005 在 CD3 臂引入电荷变异体 (V_{λCD3}: Gln₄₀Glu; VH_{CD3}: Gln₃₉Lys)。
- CD20×CD3 κ 双特异抗体的 Fc 部分采用人 IgG4 knob-into-hole 结构, 以实现异源二聚体配对 (Atwell 等, 1997), 并且通过突变 Ser₂₂₈Pro、Leu₂₃₅Glu 和 Pro₃₂₉Ala, 保持铰链区稳定并减弱与 Fc γ 受体和 C1q 的相互作用。图 11 示出了新型 CD20×CD3 κ 双特异抗体。
- CD20×CD3 κ 双特异抗体的序列见表 6。

表 6、CD20×CD3 κ 双特异抗体的序列

CD20 臂	CD3 臂
CD20×CD3 κ 0.001 (SEQ ID NO. 102-109):	
κ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 102 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 103 所示 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSYLAWEYQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC* 重链 1: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 104 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 105 所示 EVQLLESGGGVVPQGGSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWN SSGISYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRLHEDTAVYYCAKDQYGNYYG MDYWGQGTITLVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPCFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTITLVHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLASIEKTSKAKGQPREPQVCTLPSPQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SLGK*	λ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 106 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 107 所示 QAVVTQEPSTLSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAED EAEYYCVLWYNSLWVFGGGTKLTVLGQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSYCVTHEGSTVEKTVAPTECS* 重链 2: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 108 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 109 所示 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTITLVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPCFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTITLVHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLGK*
CD20×CD3 κ 0.002 (SEQ ID NO. 110-117): V _{KCD20} : Gln ₃₈ Lys; VH _{CD20} : Gln ₃₉ Glu; V _{λCD3} : Gln ₄₀ Glu; VH _{CD3} : Gln ₃₉ Lys	
κ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 110 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 111 所示 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSYLAWEYQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQRSNWPITFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSYLSLSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC* 重链 1: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 112 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 113 所示 EVQLLESGGGVVPQGGSLRLSCAASGFTFNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWNS SSGISYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQ MNSLRLHEDTAVYYCAKDQYGNYYG MDYWGQGTITLVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPAPCFEGGSPVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVSVLTITLVHQLDNLNGKEYKCKVSNKGLASSIEKTSKAKGQPREPQVYTLPPCQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLGK*	λ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 114 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 115 所示 QAVVTQEPSTLSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQAED EAEYYCVLWYNSLWVFGGGTKLTVLGQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSYCVTHEGSTVEKTVAPTECS* 重链 2: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 116 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 117 所示 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNHWVRQAPGKGLEWVGRIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLY

NSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYYGMD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSG ALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPCCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASS IEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SLGK*	LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSG ALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTTKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPCCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLASSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQ EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLGK*
CD20×CD3 κ _{2.003} (SEQ ID NO. 114-121): Vκ-Cκ _{CD20} : Gln ₃₈ Lys\Glu ₁₂₃ Lys\Gln ₁₂₄ Lys; V _H -C _H I _{CD20} : Gln ₃₉ Glu\Glu ₁₅₂ Glu\Glu ₂₁₈ Glu; Vλ _{CD3} : Gln ₄₀ Glu; V _H CD ₃ : Gln ₃₉ Lys	
κ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 118 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 119 所示 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SYLAWYQKQPGQAPRLIYDASNRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQRSNWPITFGQGTKEIKRTVAAPSFI FPPSDK ~~KL~~ KS ~~GT~~ ASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC*	λ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 114 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 115 所示 QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAV TTSNYANWVQKQPGQAPRGLIGGTNKR APWTPARFSGSLLGGKAALTTGAQAED EAEYYCVLWYNSLWVFGGGTKLTVLGQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS*
重链 1: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 120 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 121 所示 EVQLLESGGGVVPQGGSLRLSCAASGFT FNDYAMHWVREAPGKGLEWVSTISWNS GSIGYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM NSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYYGMD YWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVEDYFPEPVTWNSG ALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTTKTYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGPCCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLASS IEKTISKAKGQPREPQVCTLPSSQEEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSL SLGK*	重链 2: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 116 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 117 所示 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWRKAPGKGLEWVGRIRSK YNNYATYADSVKDRFTISRDDSKNSLY LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTWNSG ALTSKVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLGTTKTYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGPCCPPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLASSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCQ EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQEGNVFSCSVMEALHNHYT QKSLSLSLGK*
CD20×CD3 κ _{2.004} (SEQ ID NO. 106-113): Vκ _{CD20} : Gln ₃₈ Lys; V _H CD ₂₀ : Gln ₃₉ Glu	
κ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 110 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 111 所示 EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVS SYLAWYQKQPGQAPRLIYDASNRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQRSNWPITFGQGTKEIKRTVAAPSFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG LSSPVTKSFNRGEC*	λ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 106 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 107 所示 QAVVTQEPSTLVSPGGTVTLTCSRSTGAV TTSNYANWVQKQPGQAPRGLIGGTNKR APWTPARFSGSLLGGKAALTTGAQAED EAEYYCVLWYNSLWVFGGGTKLTVLGQ PKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVETTTTPS KQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSRSYSC QVTHEGSTVEKTVAPTECS*
重链 1: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 112 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 113 所示 EVQLLESGGGVVPQGGSLRLSCAASGFT FNDYAMHWVREAPGKGLEWVSTISWNS GSIGYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQM	重链 2: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 108 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 109 所示 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFT FNTYAMNWRQAPGKGLEWVGRIRSK YNNYATYADSVKDRFTISRDDSKNSLY

NSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYYGMD YWGQGT _{LV} TVSSASTKGPSVFPLAPCSR STSESTAALGCLVKDYFPEPVT _{SV} WNSG ALTS _{GV} H _{TF} PAVLQSSGLYSLSSV _{TV} PS SSLG _{TK} TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESK YGP _{PC} PPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDT LMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLT _{VL} HQDWLNGKEYKCKVSNKGLASS IEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQEEMTK NQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYK _{TP} PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQEGNVFSCSV _M HEALHNHYTQKSLSL SLGK*	LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGT _{LV} TVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT _{SV} WNSGALTS _{GV} H _{TF} PAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLG _{TK} TYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGP _{PC} PPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVS _{VL} TVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLASSIEKTISKAKGQPREPQVY _{TL} PPCQ EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYK _{TP} PPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQEGNVFSCSV _M HEALHNHYT QKSLSLSLGK*
CD20×CD3 κλ005 (SEQ ID NO. 102-105、114-117) : V _{λCD3} : Glu ₄₀ Glu; VH _{CD3} : Glu ₃₉ Lys	
κ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 102 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 103 所示 EIVLTQSPG _{TL} SLSPGERATLSCRASQSVS SYLAWYQQKPGQAPRLIYDASNRATGI PDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYC QQRSNWPIITFGQGT _{KL} EIKRTVAAPS _{VI} FPPSDEQLKSGTASV _{VC} LLNNFYPREAK VQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDS TYSLSSTLTLSKADY _E KKH _V YACEVTHQG LSSPVT _{KS} FN _R GEC* 重链 1: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 104 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 105 所示 EVQLLESGGGV _V QPGGSLRLS _{CA} ASGFT FNDYAMHWVRQAPGKGLEWVSTISWN SGSIGYADSVKGRFTISRDN _{SK} N _{TL} YLQ MNSLRAEDTAVYYCAKDIQYGNYYYG MDYWGQGT _{LV} TVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT _{SV} W NSGALTS _{GV} H _{TF} PAVLQSSGLYSLSSV _{TV} VPSSSLG _{TK} TYTCNVDHKPSNTKVDKRV ESKYGP _{PC} PPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVV SVLT _{VL} HQDWLNGKEYKCKVSNKGLAS SIEKTISKAKGQPREPQVCTLPSPQEEMT KNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYK _{TP} PPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSR WQEGNVFSCSV _M HEALHNHYTQKSLSL SLGK*	λ 轻链: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 114 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 115 所示 QAVVTQEP _{SL} TVSPGGT _{VT} LTCSRSTGAV TTSNYANWVQEKPGQAPRGLIGGTNKR APWTPARFSGSL _{LG} GKAAL _{TI} TGAQAE DAEYYCVLWYSNLWVFGGGTK _{LT} VLGQ PKAAPSV _{TL} FPPSSEELQANKATLVCLIS DFYPGAVTVAWKADSSPVKAGVET _{TP} PS KQSNNKYAASSYLSLTPEQW _{KS} SHRSYSC QVTHEGSTVEK _{TV} APTECS* 重链 2: 其氨基酸序列如 SEQ ID NO. 116 所示, 其编码核酸如 SEQ ID NO. 117 所示 EVQLVESGGGLV _V QPGGSLRLS _{CA} ASGFT FNTYAMNWVRKAPGKGLEWVGRIRSK YNNYATYYADSVKDRFTISRDD _{SK} N _{SL} LQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYV SWFAYWGQGT _{LV} TVSSASTKGPSVFPLA PCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT _{SV} W NSGALTS _{GV} H _{TF} PAVLQSSGLYSLSSV VTVPSSSLG _{TK} TYTCNVDHKPSNTKVDK RVESKYGP _{PC} PPCPAPEFEGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEV QFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTY RVVS _{VL} TVLHQDWLNGKEYKCKVSNK GLASSIEKTISKAKGQPREPQVY _{TL} PPCQ EEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWES NGQPENNYK _{TP} PPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQEGNVFSCSV _M HEALHNHYT QKSLSLSLGK*

CD20×CD3 κλ 双特异抗体的表达和纯化

5 将编码相应抗体片段的质粒, 按 κ 轻链: λ 轻链: 重链 1: 重链 2 = 2:2:1:1 的比率混合, 与 3mg/mL PEI 混合后, 共同转染 CHO-S 细胞, 在 500mL CD CHO AGT 培养基 (Gibco#12490-001) 37°C 5%CO₂ 150rpm 培养, 分别在瞬转第 2、4 和 6 天, 加入 4% CHO Feed C+补料 (Gibco #A25031-05)。当细胞活率降至 85%左右, 收获发酵液, 过滤后经 Protein A 亲和层析纯化。浓缩换液到 PBS 中, 测定吸光度 (Nanodrop), 通过理论消光系数计算蛋白浓度。
SEC-HPLC 和毛细管电泳检测显示, CD20×CD3 κλ 双特异抗体单体纯度均接近或高于 90% (表 7), 其中 κλ 轻链的比率接近 1:1 (图 12)。

表 7、CD20×CD3 κλ 双特异抗体的纯度 (SEC-HPLC)

κλ 双特异抗体	SEC-HPLC (%)		
	聚体	单体	片段
CD20×CD3 κλ001	4.1	92.5	3.5
CD20×CD3 κλ002	4.6	90.8	4.5
CD20×CD3 κλ003	3.1	88.3	8.6
CD20×CD3 κλ004	4.8	91.1	4.0

CD20×CD3 κλ005	6.0	90.5	3.5
----------------	-----	------	-----

使用 Capto S ImpAct 离子交换层析, 对 CD20×CD3 κλ 双特异抗体进一步精制纯化, 通过梯度洗脱, 合并洗脱峰, SEC-HPLC 单体含量显示高于 99% (图 13)。CD20×CD3 κλ002 和 CD20×CD3 κλ003 纯化样品中, 轻链错配比率极低 (<1%), 未检测到 CD3 同源二聚体或 CD20 同源二聚体 (图 14)。

5 实施例 6: CD20×CD3 κλ 双特异抗体的结合活性

分别通过检测与 CD20 过表达稳转细胞或 CD20+肿瘤细胞的结合, 确定双特异抗体 CD20 抗原臂的亲合力, 通过检测与 CD3 重组抗原、Jurkat 细胞或新鲜分离的外周血 T 细胞的结合, 确定双特异抗体 CD3 臂的亲合力。检测结果显示, 新型 CD20×CD3 κλ 双特异抗体与肿瘤细胞的亲合力高于与 T 细胞的亲合力约 3~5 倍。阳性对照抗体 bsAB1 按文献 US20170174781 合成并表达制备。

10 1. CD20×CD3 κλ 双特异抗体与人和猴 CD20 稳转细胞的结合

取对数生长期的实施例 1 制备的 CHO-人 CD20 和 CHO-猴 CD20 稳转细胞, 用 4% 小牛血清 (Hyclone, SH30626.06) 调整细胞至 5×10^5 个细胞/ml, 加入 100μl/孔细胞悬液至 96 孔 U 型板, 300g 离心 5 分钟, 弃上清, 每孔加入 100μL 梯度稀释的抗体 (起始浓度 1800nM, 3 倍稀释, 12 个梯度), 4°C 孵育 60 分钟。二抗加入 50μL/孔 Alexa Fluoro647 标记的山羊抗人 IgG Fc (1:300 稀释), 冰上孵育 20 分钟, 洗 1 次后加入 50μL/孔 PI 溶液 (1:300), 孵育 5 分钟, 用流式细胞仪进行检测。

图 15 和表 8 显示, CD20×CD3 κλ 双特异抗体高亲和力结合细胞 CD20 受体, 在人和猴 CD20 稳转细胞上的亲和力相当。

表 8、CD20×CD3 κλ 双特异抗体和 CD20 稳转细胞的结合

EC50	人 CD20-CHO	猴 CD20-CHO
CD20×CD3 κλ001	10 nM	12 nM
CD20×CD3 κλ002	9 nM	8 nM
CD20×CD3 κλ003	7 nM	8 nM
CD20×CD3 κλ004	8 nM	10 nM
CD20×CD3 κλ005	9 nM	14 nM
KLH×CD3	不结合	不结合

2. CD20×CD3 κλ 双特异抗体与人和猴 CD20+肿瘤细胞的结合

取对数生长期的 SU-DHL-4、Raji 和 NALM-6 细胞, 加入 200μg/mL 鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-005-03) 冰浴封闭 30 分钟, 用 4% 小牛血清调整细胞至 5×10^5 细胞/ml, 每孔 100μL 加入 96 孔 U 型板, 300g 离心 5 分钟, 弃上清, 每孔加入 100μL 梯度稀释的抗体 (起始浓度 1800nM, 3 倍稀释, 12 个梯度), 4°C 孵育 60 分钟。洗去一抗, 加入 50μL/孔 Alexa Fluoro647 标记的山羊抗人 IgG Fc (1:300 稀释), 冰上孵育 20 分钟, 洗 1 次后加入 50μL/孔 PI, 孵育 5 分钟, 用流式细胞仪进行检测。

检测结果见图 16 和表 9, CD20×CD3 κλ 双特异抗体高亲和力结合 CD20+肿瘤细胞 SU-DHL-4、Raji 和 NALM-6。

表 9、CD20×CD3 κλ 双特异抗体和 CD20+肿瘤细胞的结合

EC ₅₀ (nM)	SU-DHL-4	Raji	NALM-6
CD20×CD3 κλ002	7	23	10
CD20×CD3 κλ003	6	25	8
bsAB1	19	115	48
KLH×CD3	不结合	不结合	不结合

3. CD20×CD3 κλ 双特异抗体与人和猴 CD3 重组抗原的结合

包被 1μg/mL 的人或猴 CD3γ/ε 重组抗原, 4°C 过夜。脱脂牛奶封闭后, 每孔加入 100μL 抗体 (起始浓度 60μg/mL, 3 倍稀释, 共 12 个梯度), 室温孵育 1 小时。二抗每孔加入 100μL 山羊抗人 F(ab)₂ (1:4000 稀释), 室温孵育 1 小时。TMB 显色 10 分钟, 加入 50μL 浓硫酸终止反应, 酶标仪读数 OD450nm, 使用 Graphpad 软件进行三参数拟合曲线。

检测结果见图 17, CD20×CD3 κλ 双特异抗体识别人和食蟹猴 CD3εγ 重组抗原, 亲和力相当。

4. CD20×CD3 κλ 双特异抗体与 CD3 重组抗原的亲和力测定

将 10μg/mL 人或猴 CD3εγ 重组抗原通过氨基偶联结合到 CM5 芯片 (GE healthcare), 控制抗原结合量约 200RU。基线平稳后, 将梯度稀释的抗体 (从 10μg/mL 起, 2 倍稀释 7 个梯度), 以 30μL/min 的流速流过芯片, 结合时间 350 秒, 解离时间 600 秒。用 Biacore T200 evaluation 软件以 1:1 结合模型, 拟合得到动力学常数。亲和力测定结果见表 10。

表 10、CD20×CD3 κλ 双特异抗体与 CD3 重组抗原的亲和力

KD(nM)	人 CD3εγ	猴 CD3εγ
CD20×CD3 κλ002	24.2	31.5
CD20×CD3 κλ003	26.4	34.3
KLH×CD3	21.6	21.6

5. CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体与 Jurkat 细胞的结合

取对数生长期的 Jurkat 细胞，加入 200 μ g/mL 鼠 IgG (Jackson ImmunoResearch, 115-005-03)，冰浴 30 分钟。用 4% 小牛血清调整细胞至 5×10⁵ 细胞/mL，每孔 100 μ L 加入 96 孔 U 型板，300g 离心去上清，每孔加入 100 μ L 梯度稀释的抗体 (起始浓度 1800nM，3 倍稀释，12 个梯度)，4℃ 孵育 60 分钟。二抗加入 50 μ L/孔 Alexa Fluoro647 标记的山羊抗人 IgG Fc (1:300 稀释)，冰上孵育 20 分钟，洗 1 次后加入 50 μ L/孔 PI，孵育 5 分钟，用流式细胞仪 (BD C6) 进行检测。

检测结果如图 18 和表 11，CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体以中等亲和力结合人白血病 T 细胞系 Jurkat 细胞，EC₅₀ 约 71-120 nM，低于 CD20 抗原臂与 CD20 受体的结合力约 10 倍。

表 11、CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体和 Jurkat 细胞的结合

EC50	Jurkat
CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 002	71nM
CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 003	120nM
bsAB1	ND
KLH×CD3	33nM

ND: 高浓度条件下未达到饱和

6. CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体与人或食蟹猴外周血 T 细胞的结合

取新鲜人或食蟹猴外周血，通过 Ficoll.Paque Plu (GE, 17-1440-03) 分离得到 PBMC。将 PBMC 用 4% 小牛血清 (Hyclone, SH30626.06) 调整细胞至 5×10⁵ 个细胞/mL，100 μ L/孔加入 96 孔 U 型板，离心弃上清，每孔加入 100 μ L 梯度稀释的抗体 (起始浓度 1800nM，3 倍稀释，11 个梯度)，4℃ 孵育 60 分钟。二抗加入 50 μ L/孔 Alexa Fluoro647 标记的山羊抗人 IgG Fc (1:300 稀释)，冰浴 20 分钟，洗 1 次后加入 50 μ L/孔 PI，孵育 5 分钟，用流式细胞仪 (BD C6) 进行检测。

检测结果见图 19 和表 12，CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体识别人或食蟹猴外周血 CD4⁺T 和 CD8⁺T 细胞，与人 T 细胞亲和力约 65-98nM，与食蟹猴 T 细胞亲和力约 89-124nM，亲和力相当，均弱于 CD20 抗原臂与 CD20 受体的结合力约 10 倍，有利于双特异抗体优先富集到肿瘤细胞。

表 12、CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体和外周血 T 细胞的结合

EC50 (nM)	人 CD4 ⁺ T	人 CD8 ⁺ T	猴 CD4 ⁺ T	猴 CD8 ⁺ T
CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 002	73	98	97	124
CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 003	69	65	89	120
bsAB1	25	22	ND	150
KLH-CD3	62	65	69	85

ND: 高浓度条件下未达到饱和

实施例 7: CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体介导的 TDCC

取新鲜分离得到的 PBMC 分别与处于对数生长期的靶细胞 NALM-6、TMD-8 和 Toledo 细胞混合，效应/靶细胞 =8:1，每孔加入 50 μ L 梯度稀释的抗体 (抗体浓度从 66.7nM 起，10 倍稀释，8 个梯度)，5%CO₂ 37℃ 培养 24 小时。培养结束后，将 50 μ L 上清转移至新的黑色酶标板，加入 50 μ L/孔 LDH 检测底物，10 分钟后终止反应并检测 LDH 释放；孔内剩余细胞用 4% 小牛血清清洗 2 次后，加入 100 μ g/mL 人 IgG 孵育 10 分钟，再加入 T 细胞活化检测抗体 (CD25-PE，CD4-APC，CD69-FITC 和 CD8-APC)，冰上孵育 20 分钟。洗涤弃上清，加入 60 μ L/孔 PI，置于冰上孵育 5 分钟，用流式细胞仪进行检测。

图 20A、20B 分别显示 CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对人 B 淋巴白血病细胞 Nalm-6 的杀伤和对 T 细胞的活化。图 21A、21B 分别显示 CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对 TMD-8 细胞的杀伤和对 T 细胞的活化。图 22A、22B 分别显示 CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对 Toledo 细胞的杀伤和对 T 细胞的活化。对于 CD20 表达水平不同的肿瘤细胞 Nalm-6、TMD-8 和 Toledo，CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 002 和 CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 003 均可介导 T 细胞产生有效杀伤，杀伤活性与对照抗体 bsAB1 相当或略强，且对 T 细胞的激活作用较后者更为温和。

实施例 8: CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对 T 细胞活化通路的激活

取对数生长期的 Jurkat-NFAT-luc 报告细胞和 CD20 阳性靶细胞 (SU-DHL-4、Raji 和 NALM-6 细胞)，离心弃上清，重悬至 2×10⁶ 个细胞/mL。50 μ L/孔接种靶细胞至 96 孔板，300g 离心 5 分钟弃上清，50 μ L/孔接种 Jurkat-NFAT-luc 报告细胞至 96 孔板，每孔加入 50 μ L 梯度稀释的 CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体或对照抗体 KLH×CD3 (起始浓度 20 μ g/mL，10 倍稀释，10 个梯度)，5%CO₂，37℃ 培养 6 小时。培养结束后，按照 ONE-Glo Luciferase Assay System 说明书，每孔加入 100 μ L 检测试剂，室温放置 3 分钟，于酶标仪 (Biotek Synergy HT) 检测。

检测结果见图 23 和表 13，CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体以不同 CD20 表达水平的肿瘤细胞为靶细胞时，均可激活 T 细胞的 NFAT 信号通路。

表 13、CD20×CD3 $\kappa\lambda$ 双特异抗体对 T 细胞 NFAT 通路的激活

EC ₅₀ (nM)	SU-DHL-4	Raji	NALM-6
CD20×CD3 κλ.002	0.10	0.02	0.14
CD20×CD3 κλ.003	0.11	0.02	0.14
KLH×CD3	-	-	-

实施例 9: CD20×CD3 κλ 双特异抗体激活细胞因子的释放

在介导对 B-NHL 肿瘤细胞 Raji 或自身 B 细胞杀伤过程中,CD20×CD3 κλ 双特异抗体可激活 T 细胞并刺激 PBMC 中相关细胞因子的释放。将每孔 2×10⁵ 个新鲜的 PBMC, 与 1×10⁵ 个 Raji 细胞和 50μL 梯度稀释的抗体 (起始浓度 66.7nM, 10 倍稀释, 8 个梯度) 混合, 5%CO₂, 37°C 培养 24 小时。通过微量样本多指标流式蛋白定量技术 (cytometric bead array, CBA), 测定培养上清中的 IL-2、IL-6、IFN-γ 和 TNF-α 等含量。弃去孔内上清后, 将孔内剩余细胞用 4% 小牛血清清洗 2 次后, 加入 100μg/mL 人 IgG 封闭 10 分钟, 再加入 T 细胞活化检测抗体 (CD25-PE, CD4-APC, CD69-FITC 和 CD8-APC), 冰上孵育 20 分钟。洗涤弃上清, 加入 60μL/孔 PI, 孵育 5 分钟, 用流式细胞仪 (BD FACS celesta) 检测 CD4+ 和 CD8+ T 细胞的活化标志。对自身 B 细胞的杀伤试验步骤同上, 但孵育时不加入 Raji 细胞。

图 24 显示 CD20×CD3 κλ 双特异抗体对 Raji 细胞的 TDCC 活性及过程中 T 细胞的活化。图 25 显示 CD20×CD3 κλ 双特异抗体对自体 B 细胞的清除及过程中 T 细胞的活化。图 26 显示对 Raji 细胞的杀伤或对自体 B 细胞的清除过程中相关细胞因子的释放。当 CD20×CD3 κλ 双特异抗体与 CD20 高表达的 Raji 细胞和 PBMC 共孵育时, 或仅与 PBMC 孵育时, 其介导的对 Raji 细胞或自身 B 细胞的杀伤活性与对照抗体 bsAB1 相当或略强, 但在 TDCC 过程中对 T 细胞的激活作用相对更为温和, 标志物 CD69 和 CD25 的表达上调显著低于或不高于对照抗体, 同样刺激细胞因子 IL-6、INF-γ、IL-2 和 TNF-α 的分泌量显著低于或不高于后者, 而 IL-6 和 INF-γ 等的大量释放可引发严重的细胞因子风暴综合征。

实施例 10: CD20×CD3 κλ 双特异抗体与 Fcγ 受体的结合

将 50μg/ml His-Tag 抗体通过氨基偶联到 CM5 芯片, 分别捕获带有 His 标签的 FcγRI、FcγRIIA_{H131} 和 FcγRIIIA_{V158} 重组蛋白 (Sino Biological, #10256-H08H/10374-H08H1/10389-H08H1), 捕获时间 40 秒, 流速 10μL/min, 基线平稳后, 将梯度稀释的抗体 (起始浓度 37.5μg/mL, 2 倍稀释) 以 30μL/min 的流速流过芯片, 结合时间 120 秒, 解离时间 200 秒, 用 Biacore evaluation 软件拟合得到亲和力和常数。

由表 14 可见, CD20×CD3 κλ 双特异抗体与 FcγRI、FcγRIIA_{H131} 和 FcγRIIIA_{V158} 均无结合; 野生型 IgG4 对照抗体以较强亲和力结合 FcγRI, 与 FcγRIIA_{H131} 有微弱结合。

表 14、CD20×CD3 κλ 双特异抗体与 Fcγ 受体的亲和力

KD	FcγRI	FcγRIIA _{H131}	FcγRIIIA _{V158}
CD20×CD3 κλ.002	不结合	不结合	不结合
CD20×CD3 κλ.003	不结合	不结合	不结合
IgG4 同型对照	14nM	微弱	不结合

实施例 11: 免疫重建小鼠皮下 Raji 移植瘤模型

选择 6-8 周雌性 B-NGD 小鼠 (百奥赛图生物科技有限公司), 皮下接种 3×10⁶ Raji 细胞, 待肿瘤长至 60mm³ 时, 随机分组, 分别设定为给药组 3.0mg/kg、给药组 0.6mg/kg、给药组 0.12mg/kg 和阴性对照组 KLH×CD3 3mg/kg。每只小鼠尾静脉注射 1×10⁷ 个 PBMC 细胞, 3 天后开始第一次小鼠给药, 给药间隔为 5 天一次, 共给药 3 次。监测小鼠肿瘤体积及小鼠体重, 实验结束后断颈处死小鼠, 取瘤称重并记录。

结果见图 27, CD20×CD3 κλ 双特异抗体的体内药效呈现剂量相关性, 中剂量和高剂量抑瘤率分别为 82% 和 89%。荷瘤小鼠对以上剂量耐受良好, 无体重减轻等不良反应。图 28 显示, 低剂量组 (0.12mg/kg) CD20×CD3 κλ.002 在 4 只小鼠实现肿瘤抑制 (n=5)。

实施例 12: 免疫缺陷型小鼠皮下 Raji 与人 PBMC 混合接种模型

选择 6-8 周雌性 B-NGD 小鼠 (百奥赛图生物科技有限公司), 将 Raji (3×10⁶ 个) 和人 PBMC (5×10⁶ 个) 混合后接种于小鼠皮下, 待肿瘤成瘤体积到达 60-100mm³ 时, 随机分组。分别设定为给药组 3.0mg/mL、给药组 0.6mg/mL、给药组 0.12mg/mL 和阴性对照组 KLH×CD3 3mg/kg。给药间隔为 5 天一次, 共给药 2 次。监测小鼠肿瘤体积及小鼠体重, 实验结束后断颈处死小鼠, 取瘤称重并记录。

结果见图 29, CD20×CD3 κλ 双特异抗体的体内药效呈现剂量相关性, 低、中和高剂量抑瘤率分别为 65%、98% 和 162%, 高、中剂量组肿瘤完全抑制或消退。

实施例 13: CD20×CD3 κλ 双特异抗体在食蟹猴中的药效

将 8 只食蟹猴分配至 4 个剂量组, 每个剂量组由 2 只猴子组成, 雌雄各半。各剂量组接受的给药剂量分别为 0.3、1、3 mg/kg (每周 1 次, 给药 3 周, 共 4 次给药) 和 1 mg/kg (单次给药) CD20×CD3 κλ.002 双特异抗体, 给药方案见表 15。给药期及恢复期, 各组所有猴一般状况良好, 未见毒性反应, 未见死亡或濒死。各剂量组体温未见明显异常改变, II 导联心电图波形正常, 其心率、R-R 间期、P-R 间期、QT 间期、QRS 时限、收缩压、舒张压等指标未

见明显异常。在给药后不同时间点，通过流式细胞技术分析外周血中 B 和 T 细胞群体数量的变化，B 细胞使用细胞表面标记物 CD20 鉴定（CD20+细胞），T 细胞使用 CD3 鉴定（CD3+细胞）。给药后 8 小时，外周血中 B 被快速清除，24 小时已低于检测下限（图 30）。

表 15、CD20×CD3 κλ 双特异抗体给药方案

5	组别	剂量	给药途径及频率	性别	动物号
	低剂量组	0.3 mg/kg	IV，每周 1 次/3 周 D1、D8、D15、D22	雄	2016221
				雌	2016222
10	中剂量组	1 mg/kg	IV，每周 1 次/3 周 D1、D8、D15、D22	雄	2016223
				雌	2016224
15	高剂量组	3 mg/kg	IV，每周 1 次/3 周 D1、D8、D15、D22	雄	2016225
				雌	2016226
	中剂量组	1 mg/kg	IV，D1 单次给药	雌	2016227
20				雄	2016228

权 利 要 求 书

1. 一种双特异性抗体或其抗原结合部分,其包含结合到靶细胞表面上的 CD20 的第一结合结构域和结合到 T 细胞表面上的 CD3 的第二结合结构域,其中,所述第一结合结构域包含第一轻链和第一重链,所述第一结合结构域包含选自下列的轻链和重链的 CDR 组合:

(1) 分别包含 SEQ ID NO: 56、57、58 的第一轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 66、67、68 的第一重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(2) 分别包含 SEQ ID NO: 56、57、58 的第一轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 66、67、71 的第一重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(3) 分别包含 SEQ ID NO: 61、62、63 的第一轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 76、77、78 的第一重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(4) 分别包含 SEQ ID NO: 61、62、63 的第一轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 76、77、85 的第一重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列。

2. 根据权利要求 1 所述的双特异性抗体或其抗原结合部分,其中,所述第一结合结构域包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 54、59 或其任何变体的轻链可变区,和选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 64、69、72、74、79、81、83 或其任何变体的重链可变区;

优选地,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 54 或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 64 或其任何变体的第一重链可变区;

优选地,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 54 或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 69 或其任何变体的第一重链可变区;

优选地,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 54 或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 72 或其任何变体的第一重链可变区;

优选地,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 59 或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 74 或其任何变体的第一重链可变区;

优选地,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 59 或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 79 或其任何变体的第一重链可变区;

优选地,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 59 或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 81 或其任何变体的第一重链可变区;

优选地,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 59 或其任何变体的第一轻链可变区,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 83 或其任何变体的第一重链可变区。

3. 根据权利要求 1 或 2 所述的双特异性抗体或其抗原结合部分,其中,所述第二结合结构域包含第二轻链和第二重链,所述第二结合结构域包含选自下列的轻链和重链的 CDR 组合:

(1) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 26、27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(2) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(3) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、34 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(4) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、37 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(5) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、40 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(6) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、43 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(7) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 46、47、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(8) 分别包含 SEQ ID NO: 14、15、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 26、27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(9) 分别包含 SEQ ID NO: 14、15、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(10) 分别包含 SEQ ID NO: 14、15、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、34 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(11) 分别包含 SEQ ID NO: 14、15、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、37 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

(12) 分别包含 SEQ ID NO: 14、15、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列,和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、40 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;

- (13) 分别包含 SEQ ID NO: 14、15、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、43 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;
- (14) 分别包含 SEQ ID NO: 14、15、9 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 46、47、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;
- 5 (15) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 26、27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;
- (16) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;
- (17) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、10 27、34 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;
- (18) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、37 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;
- (19) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、40 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;
- 15 (20) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、43 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;
- (21) 分别包含 SEQ ID NO: 7、8、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 46、47、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;
- (22) 分别包含 SEQ ID NO: 7、20、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 26、20 27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;
- (23) 分别包含 SEQ ID NO: 7、20、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;
- (24) 分别包含 SEQ ID NO: 7、20、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、34 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;
- 25 (25) 分别包含 SEQ ID NO: 7、20、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、37 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;
- (26) 分别包含 SEQ ID NO: 7、20、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、27、40 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;
- (27) 分别包含 SEQ ID NO: 7、20、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 31、30 27、43 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列;
- (28) 分别包含 SEQ ID NO: 7、20、21 的第二轻链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列, 和分别包含 SEQ ID NO: 46、47、28 的第二重链 CDR1、CDR2 及 CDR3 序列。
4. 根据权利要求 1-3 任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合部分, 其中, 所述第二结合结构域包含选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 5、10、12、16、18、22 或其任何变体的轻链可变区, 和选自氨基酸序列 SEQ ID NO: 24、29、35 32、35、38、41、44、48、50、52 或其任何变体的重链可变区;
- 优选地, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 5 或其任何变体的第二轻链可变区, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 48 或其任何变体的第二重链可变区;
- 优选地, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 5 或其任何变体的第二轻链可变区, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 50 或其任何变体的第二重链可变区;
- 40 优选地, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 10 或其任何变体的第二轻链可变区, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 50 或其任何变体的第二重链可变区;
- 优选地, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 12 或其任何变体的第二轻链可变区, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 50 或其任何变体的第二重链可变区;
- 优选地, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 18 或其任何变体的第二轻链可变区, 和氨基酸序列 45 SEQ ID NO: 24 或其任何变体的第二重链可变区;
- 优选地, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 18 或其任何变体的第二轻链可变区, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 48 或其任何变体的第二重链可变区;
- 优选地, 所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 18 或其任何变体的第二轻链可变区, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 50 或其任何变体的第二重链可变区。
- 50 5. 根据权利要求 1-4 任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合部分, 其中, 所述第一轻链包含选自 SEQ ID NO: 88、96、100、102、110、118 或其任何变体的轻链, 所述第一重链包含选自 SEQ ID NO: 86、94、98、104、112、120 或其任何变体的重链。
6. 根据权利要求 1-5 任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合部分, 其中, 所述第二轻链包含选自 SEQ ID NO: 92、106、114 或其任何变体的轻链, 所述第二重链包含选自 SEQ ID NO: 90、108、116 或其任何变体的重链;
- 55 优选地, 所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 88 或其任何变体的第一轻链, 和氨基酸序列 SEQ ID NO: 86 或其任何变体的第一重链;
- 优选地, 所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 96 或其任何变体的第一轻链, 和氨基酸序列 SEQ ID

- NO: 94 或其任何变体的第一重链;
优选地,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 100 或其任何变体的第一轻链,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 98 或其任何变体的第一重链;
优选地,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 102 或其任何变体的第一轻链,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 104 或其任何变体的第一重链;
5 优选地,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 110 或其任何变体的第一轻链,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 112 或其任何变体的第一重链;
优选地,所述第一结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 118 或其任何变体的第一轻链,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 120 或其任何变体的第一重链;
10 优选地,所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 92 或其任何变体的第二轻链,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 90 或其任何变体的第二重链;
优选地,所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 106 或其任何变体的第二轻链,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 108 或其任何变体的第二重链;
优选地,所述第二结合结构域包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 114 或其任何变体的第二轻链,和氨基酸序列 SEQ ID NO: 116 或其任何变体的第二重链;
15 更优选地,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 88 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 86 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 92 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 90 或其任何变体的第二重链;
更优选地,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 96 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 94 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 92 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 90 或其任何变体的第二重链;
20 更优选地,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 100 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 98 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 92 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 90 或其任何变体的第二重链;
更优选地,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 102 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 104 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 106 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 108 或其任何变体的第二重链;
25 更优选地,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 110 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 112 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 114 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 116 或其任何变体的第二重链;
30 更优选地,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 118 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 120 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 114 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 116 或其任何变体的第二重链;
更优选地,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 110 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 112 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 106 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 108 或其任何变体的第二重链;
35 更优选地,所述的双特异性抗体包含氨基酸序列 SEQ ID NO: 102 或其任何变体的第一轻链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 104 或其任何变体的第一重链、氨基酸序列 SEQ ID NO: 114 或其任何变体的第二轻链以及氨基酸序列 SEQ ID NO: 116 或其任何变体的第二重链。
40 7. 编码根据 1-6 任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合部分的核酸;
优选地,所述第一轻链可变区的编码核酸选自 SEQ ID NO: 55、60 或其任何变体的核酸序列;
优选地,所述第一重链可变区的编码核酸选自 SEQ ID NO: 65、70、73、75、80、82、84 或其任何变体的核酸序列;
45 优选地,所述第二轻链可变区的编码核酸选自 SEQ ID NO: 6、11、13、17、19、23 或其任何变体的核酸序列;
优选地,所述第二重链可变区的编码核酸选自 SEQ ID NO: 25、30、33、36、39、42、45、49、51、53 或其任何变体的核酸序列;
优选地,所述第一轻链的编码核酸选自 SEQ ID NO: 89、97、101、103、111、119 或其任何变体的核酸序列;
优选地,所述第一重链的编码核酸选自 SEQ ID NO: 87、95、99、105、113、121 或其任何变体的核酸序列;
50 优选地,所述第二轻链的编码核酸选自 SEQ ID NO: 93、107、115 或其任何变体的核酸序列;
优选地,所述第二重链的编码核酸选自 SEQ ID NO: 91、109、117 或其任何变体的核酸序列。
8. 含有权利要求 7 所述核酸的载体。
9. 含有权利要求 7 所述的核酸或权利要求 8 所述载体的细胞。
10. 一种组合物,其包含权利要求 1-6 任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合部分、权利要求 7 所述的核酸、权利要求 8 所述的载体和/或权利要求 9 所述的细胞。
55 11. 一种抗体-药物偶联物,其包含共价附着至治疗部分的权利要求 1-6 任一项所述的双特异性抗体或其抗原结合部分;
优选地,所述治疗部分选自细胞毒性部分、化疗剂、细胞因子、免疫抑制剂、免疫刺激剂、裂解肽或放射性同

位素；

- 优选地，所述细胞毒性部分选自以下：紫杉醇；细胞松弛素 B；短杆菌肽 D；溴化乙锭；吐根碱；丝裂霉素；依托泊苷；替尼泊苷；长春新碱；长春碱；秋水仙碱；多柔比星；柔红霉素；二羟基蒽二酮；微管蛋白抑制剂如美登素或其类似物或衍生物；抗有丝分裂剂如单甲基奥瑞他汀 E 或 F 或其类似物或衍生物；海兔毒素 10 或 15 或其类似物；伊立替康或其类似物；米托蒽醌；光辉霉素；放线菌素 D；1-脱氢鞣酮；糖皮质激素；普鲁卡因；丁卡因；利多卡因；普萘洛尔；嘌呤霉素；卡奇霉素或其类似物或衍生物；抗代谢药，如甲氧嘌呤、6 巯基嘌呤、6 硫鸟嘌呤、阿糖胞苷、氟达拉滨、5 氟尿嘧啶、癸二喹、羟基脲、天冬酰胺酶、吉西他滨或克拉屈滨；烷化剂，如二氯甲基二乙胺、硫代嘌呤、苯丁酸氮芥、美法仑、卡莫司汀(BSNU)、洛莫司汀(CCNU)、环磷酰胺、白消安、二溴甘露醇、链脲佐菌素、达卡巴嗪(DTIC)、丙卡巴嗪、丝裂霉素 C；铂类衍生物，如顺铂或卡铂；多卡霉素 A、多卡霉素 SA、雷切霉素(CC-1065)或其类似物或衍生物；抗生素，如放线菌素、博来霉素、柔红霉素、多柔比星、伊达比星、光霉素、丝裂霉素、米托蒽醌、普力霉素、安定霉素(AMC)；吡咯并[2,1-c][1,4]-苯并二氮杂卓(PDB)；白喉毒素及相关分子如白喉 A 链及其活性片段和杂合分子、蓖麻毒素如蓖麻毒素 A 或去糖基化蓖麻毒素 A 链毒素、霍乱毒素、志贺样毒素如 SLT I、SLT II、SLT IV、LT 毒素、C3 毒素、志贺毒素、百日咳毒素、破伤风毒素、大豆 Bowman-Birk 蛋白酶抑制剂、假单胞菌外毒素、阿罗林、皂草素、莨菪根毒素、胶凝蛋白、相思豆毒素 A 链、莨菪根毒素 A 链、 α -sarcin、油桐(Aleurites fordii)蛋白、石竹素蛋白、美洲商陆蛋白如 PAPI、PAPII 和 PAP-S、苦瓜(momordica charantia)抑制剂、泻果素、巴豆毒素、肥皂草(saponaia officinalis)抑制剂、白树毒素、丝裂霉素、局限曲菌素、酚霉素和依诺霉素毒素；核糖核酸酶(RNase)；DNase I、葡萄球菌内毒素 A；商陆抗病毒蛋白；白喉毒素和假单胞菌内毒素；

- 优选地，所述细胞因子选自 IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-18、IL-23、IL-24、IL-27、IL-28a、IL-28b、IL-29、KGF、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、GM-CSF、CD40L、Flt3 配体、干细胞因子、安西司亭和 TNF α ；
- 20 优选地，所述放射性同位素选自 ^3H 、 ^{14}C 、 ^{15}N 、 ^{35}S 、 ^{67}Cu 、 ^{90}Y 、 ^{99}Tc 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{211}At 、 ^{212}Bi 、 ^{212}Pb 、 ^{213}Bi 、 ^{225}Ac 和 ^{227}Th 。

12. 一种试剂盒，其含权利要求 1-6 任一项所述的特异性抗体或其抗原结合部分、权利要求 7 所述的核酸、权利要求 8 所述的载体、权利要求 9 所述的细胞、权利要求 10 所述的组合物和/或权利要求 11 的抗体-药物偶联物。

13. 含权利要求 1-6 任一项所述的特异性抗体或其抗原结合部分、权利要求 7 所述的核酸、权利要求 8 所述的载体、权利要求 9 所述的细胞、权利要求 10 所述的组合物和/或权利要求 11 的抗体-药物偶联物在制备用于诊断、治疗或预防与 CD20 相关病症的药物或试剂盒中的用途；优选地，与 CD20 相关的疾病包括 B 细胞疾病，例如 B 细胞增殖性病症，特别是 CD20 阳性 B 细胞病症；

- 优选地，所述疾病选自非霍奇金淋巴瘤(NHL)，急性淋巴细胞性白血病(ALL)，慢性淋巴细胞性白血病(CLL)，弥漫性大 B 细胞淋巴瘤(DLBCL)，滤泡性淋巴瘤(FL)，套细胞淋巴瘤(MCL)，边缘区淋巴瘤(MZL)，以及多发性骨髓瘤(MM)和霍奇金淋巴瘤(HL)。