

# (12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织  
国际局

(43) 国际公布日  
2023年1月12日 (12.01.2023)



(10) 国际公布号  
**WO 2023/280297 A1**

(51) 国际专利分类号:

*C07K 16/28* (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)  
*C12N 15/13* (2006.01) *A61P 35/02* (2006.01)  
*C12N 15/62* (2006.01) *A61P 37/02* (2006.01)  
*A61K 39/395* (2006.01)

PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, WS, ZA, ZM, ZW。

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/104564

(22) 国际申请日: 2022年7月8日 (08.07.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:  
202110780438.6 2021年7月9日 (09.07.2021) CN

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

(71) 申请人: 江苏先声药业有限公司 (JIANGSU SIMCERE PHARMACEUTICAL CO., LTD.) [CN/CN]; 中国江苏省南京玄武区玄武大道699-18号, Jiangsu 210042 (CN)。

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

(72) 发明人: 辛莲 (XIN, Lian); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。王琼 (WANG, Qiong); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。杨翠青 (YANG, Cuiqing); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。曹卓晓 (CAO, Zhuoxiao); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。唐任宏 (TANG, Renhong); 中国上海市浦东新区芙蓉花路118弄, Shanghai 201318 (CN)。任晋生 (REN, Jinsheng); 中国江苏省Nanjing玄武区玄武大道699-18号, Jiangsu 210042 (CN)。

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

(54) Title: CD19 ANTIBODY AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: CD19抗体及其应用

(57) Abstract: A CD19 antibody and an application thereof, an antibody or antigen binding fragment specifically binding to human CD19, a multi-characteristic antigen binding molecule, a chimeric antigen receptor, an immune effector cell, a nucleic acid molecule, a vector, a cell, a preparation method, a pharmaceutical composition, a pharmaceutical use, and a disease treatment method. The present invention has great significance for the development of drugs for treating CD19-related diseases.

(57) 摘要: CD19抗体及其应用, 特异性结合人CD19的抗体或抗原结合片段、多特性抗原结合分子、嵌合抗原受体、免疫效应细胞、核酸分子、载体、细胞、制备方法、药物组合物、制药用途和疾病的治疗方法, 对于开发治疗CD19相关疾病的药物具有重要意义。



WO 2023/280297 A1

## CD19 抗体及其应用

本公开要求于 2021 年 7 月 9 日、向中国专利局提交的、发明名称为“CD19 抗体及其应用”、申请号为 202110780438.6 的中国发明专利申请的优先权，该申请的全文通过引用的方式结合至本公开。

### 技术领域

本公开涉及抗体领域，具体而言，涉及 CD19 抗体及其应用。

### 背景技术

CD19 抗原属于免疫球蛋白超家族，是一个 95kDa 的 I 型跨膜糖蛋白，具有单个跨膜结构域，胞质 C 末端以及细胞外 N 末端。细胞外结构域由两个 C2 型 Ig 样结构域组成，高度保守的胞质结构域由 242 个氨基酸以及 C 末端附近 9 个酪氨酸残基组成。CD19 在固有 B 细胞信号传导阈值的建立过程中发挥重要作用，这一作用是通过调节 B 细胞受体依赖性和非依赖性的信号传导来完成。CD19 通过与其它的 B 细胞受体或者表面分子相互作用来直接或者间接招募和结合各种下游蛋白激酶，包括 Src 家族（Lyn, Fyn），Ras 家族，Abl, Btk，衔接子分子（Vav, Grb2）和 PI3K 蛋白激酶。CD19 与补体受体 CD21，四跨膜蛋白 CD81（TAPA-1）和 CD225 一起，是成熟 B 细胞表面上多分子复合物的主要信号传导成分。

CD19 在正常 B 细胞，以及滤泡树突细胞中特异性表达，而不表达于多能血液干细胞。在 B 淋巴细胞生成过程中，CD19 的细胞表面表达最早发生在免疫球蛋白基因重排时，其细胞表面表达水平的高度调控贯穿整个 B 细胞发育成熟过程，直至终末分化的浆细胞丢失表达。CD19 也表达于大多数的 B 细胞淋巴瘤，套细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、毛细胞性白血病以及一部分急性髓细胞性白血病。

B 细胞通过分泌抗体以及与 T 细胞相互作用和产生趋化因子以及细胞因子，提供适应性免疫系统的体液免疫成分，从而在宿主防御中发挥关键作用。B 细胞亚群，特别是浆细胞和浆母细胞，长期以来被认为是抗体产生的主要来源。B 细胞与许多自身免疫性疾病的发病机制有关，包括中枢神经系统 (CNS) 疾病、多发性硬化症 (MS) 和视神经脊髓炎谱系疾病 (NMOSD)。在实验动物和人类中 CD19 的缺失会导致体液反应受损，导致对感染的易感性增加。而人 CD19 的过表达会导致皮肤紧致 (TSK/+) 小鼠（人类系统性硬化症 (SSc) 的模型）发生自身免疫性疾病。目前已经有一些靶向 CD19 的抗体在进行自身免疫性疾病相关的临床试验。XmAb5871 已完成中重度类风湿关节炎的 Ib/IIa 期临床试验，并进入治疗 IgG4 相关疾病和系统性红斑狼疮 (SLE) 的 II 期开发。

综上，CD19 可以作为治疗 B 细胞相关白血病和自身免疫性疾病的标志性靶点。需要与人 CD19 具有良好亲和力的抗体。

### 发明内容

本公开提供特异性结合人 CD19 的抗体或抗原结合片段、多特异性抗原结合分子、嵌合

抗原受体、免疫效应细胞、核酸分子、载体、细胞、制备方法、药物组合物、制药用途和疾病的治疗方法，其与人 CD19 具有良好的结合能力，改善人 CD19 相关的检测、治疗或其他与人 CD19 结合相关的应用。

在第一方面，本公开公开一种特异性结合人 CD19 的抗体或抗原结合片段，所述抗体或抗原结合片段包含重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1-3，所述轻链可变区包含 LCDR1-3，

所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 115、121、127、133、139、145、151、157、163、169、175、181、187、193、199、205、211、217、223、229、235、241、247、253、259、265、271、277、283、289、295、301、307、313、319、325、331、337、343、349、355、361、367、373、379、385、391、397、403、409、415、421 或 427 任一项所示序列，或与其相比具有至少 70% 同一性或至多 3 个突变的序列；

所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 116、122、128、134、140、146、152、158、164、170、176、182、188、194、200、206、212、218、224、230、236、242、248、254、260、266、272、278、284、290、296、302、308、314、320、326、332、338、344、350、356、362、368、374、380、386、392、398、404、410、416、422 或 428 任一项所示序列，或与其相比具有至少 70% 同一性或至多 3 个突变的序列；

所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 117、123、129、135、141、147、153、159、165、171、177、183、189、195、201、207、213、219、225、231、237、243、249、255、261、267、273、279、285、291、297、303、309、315、321、327、333、339、345、351、357、363、369、375、381、387、393、399、405、411、417、423 或 429 任一项所示序列，或与其相比具有至少 70% 同一性或至多 3 个突变的序列；

所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 118、124、130、136、142、148、154、160、166、172、178、184、190、196、202、208、214、220、226、232、238、244、250、256、262、268、274、280、286、292、298、304、310、316、322、328、334、340、346、352、358、364、370、376、382、388、394、400、406、412、418、424 或 430 任一项所示序列，或与其相比具有至少 70% 同一性或至多 3 个突变的序列；

所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 119、125、131、137、143、149、155、161、167、173、179、185、191、197、203、209、215、221、227、233、239、245、251、257、263、269、275、281、287、293、299、305、311、317、323、329、335、341、347、353、359、365、371、377、383、389、395、401、407、413、419、425 或 431 任一项所示序列，或与其相比具有至少 70% 同一性或至多 3 个突变的序列；

和所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 120、126、132、138、144、150、156、162、168、174、180、186、192、198、204、210、216、222、228、234、240、246、252、258、264、270、276、282、288、294、300、306、312、318、324、330、336、342、348、354、360、366、372、378、384、390、396、402、408、414、420、426 或 432 任一项所示序列，或与其相比具有至少 70% 同一性或至多 3 个突变的序列。

在一些具体的实施方式中，所述 HCDR1-3 包含 SEQ ID NO: 115-117、121-123、127-129、

133-135、139-141、145-147、151-153、157-159、163-165、169-171、175-177、181-183、187-189、193-195、199-201、205-207、211-213、217-219、223-225、229-231、235-237、241-243、247-249、253-255、259-261、265-267、271-273、277-279、283-285、289-291、295-297、301-303、307-309、313-315、319-321、325-327、331-333、337-339、343-345、349-351、355-357、361-363、367-369、373-375、379-381、385-387、391-393、397-399、403-405、409-411、415-417、421-423 或 427-429 所示序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；和/或，

所述 LCDR1-3 包含 SEQ ID NO: 118-120、124-126、130-132、136-138、142-144、148-150、154-156、160-162、166-168、172-174、178-180、184-186、190-192、196-198、202-204、208-210、214-216、220-222、226-228、232-234、238-240、244-246、250-252、256-258、262-264、268-270、274-276、280-282、286-288、292-294、298-300、304-306、310-312、316-318、322-324、328-330、334-336、340-342、346-348、352-354、358-360、364-366、370-372、376-378、382-384、388-390、394-396、400-402、406-408、412-414、418-420、424-426 或 430-432 所示序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列。

在一些具体的实施方式中，所述抗体或抗原结合片段包含所述重链可变区和所述轻链可变区，所述 HCDR1-3 和所述 LCDR1-3 包含选自下组的序列：

- (1) SEQ ID NO: 115-120 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (2) SEQ ID NO: 121-126 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (3) SEQ ID NO: 127-132 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (4) SEQ ID NO: 133-138 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (5) SEQ ID NO: 139-144 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (6) SEQ ID NO: 145-150 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (7) SEQ ID NO: 151-156 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (8) SEQ ID NO: 157-162 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (9) SEQ ID NO: 163-168 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (10) SEQ ID NO: 169-174 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (11) SEQ ID NO: 175-180 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (12) SEQ ID NO: 181-186 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (13) SEQ ID NO: 187-192 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (14) SEQ ID NO: 193-198 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (15) SEQ ID NO: 199-204 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (16) SEQ ID NO: 205-210 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (17) SEQ ID NO: 211-216 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (18) SEQ ID NO: 217-222 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (19) SEQ ID NO: 223-228 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (20) SEQ ID NO: 229-234 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；

- (21) SEQ ID NO: 235-240 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (22) SEQ ID NO: 241-246 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (23) SEQ ID NO: 247-252 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (24) SEQ ID NO: 253-258 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (25) SEQ ID NO: 259-264 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (26) SEQ ID NO: 265-270 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (27) SEQ ID NO: 271-276 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (28) SEQ ID NO: 277-282 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (29) SEQ ID NO: 283-288 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (30) SEQ ID NO: 289-294 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (31) SEQ ID NO: 295-300 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (32) SEQ ID NO: 301-306 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (33) SEQ ID NO: 307-312 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (34) SEQ ID NO: 313-318 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (35) SEQ ID NO: 319-324 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (36) SEQ ID NO: 325-330 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (37) SEQ ID NO: 331-336 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (38) SEQ ID NO: 337-342 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (39) SEQ ID NO: 343-348 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (40) SEQ ID NO: 349-354 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (41) SEQ ID NO: 355-360 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (42) SEQ ID NO: 361-366 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (43) SEQ ID NO: 367-372 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (44) SEQ ID NO: 373-378 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (45) SEQ ID NO: 379-384 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (46) SEQ ID NO: 385-390 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (47) SEQ ID NO: 391-396 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (48) SEQ ID NO: 397-402 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (49) SEQ ID NO: 403-408 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (50) SEQ ID NO: 409-414 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (51) SEQ ID NO: 415-420 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (52) SEQ ID NO: 421-426 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (53) SEQ ID NO: 427-432 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列。

在一些具体的实施方式中，所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、439-442 任一项所述序列，或其相比具有至少 70% 同一性或至多 15 个氨基酸差异的序列；

所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、436、437 或 438 任一项所述序列，或其相比具有至少 70% 同一性或至多 15 个氨基酸差异的序列。

在一些具体的实施方式中，所述至少 70% 同一性优选为至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性；所述至多 3 个突变优选为至多 3、2、1 或 0 个突变；所述至多 15 个突变优选为至多 15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 或 0 个突变；优选地，所述突变为插入、缺失或替换，所述替换优选为保守氨基酸替换，所述突变优选为回复突变或热点突变。

在一些具体的实施方式中，所述抗体或抗原结合片段还包含重链恒定区和/或轻链恒定区；

优选地，所述重链恒定区选自 IgG，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4；所述 IgG 可选自人 IgG，例如人 IgG1 或人 IgG4；所述轻链恒定区选自  $\kappa$  链或  $\lambda$  链，优选为  $\kappa$  链；

优选地，所述重链恒定区可选自 SEQ ID NO: 433 或 448；

优选地，所述轻链恒定区可选自 SEQ ID NO: 434-435 或 449。

在一些具体的实施方式中，所述抗体或抗原结合片段选自单克隆抗体、多克隆抗体、天然抗体、工程化抗体、单特异性抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）、单价抗体、多价抗体、完整抗体、完整抗体的片段、裸抗体、缀合抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、scFv、双抗体（diabody）或单域抗体。

在一些具体的实施方式中，所述抗体或抗原结合片段还包括缀合物；所述缀合物可选自治疗剂或示踪剂，所述治疗剂可选自放射性同位素、化疗药或免疫调节剂，所述示踪剂可选自放射学造影剂、顺磁离子、金属、荧光标记、化学发光标记、超声造影剂和光敏剂。

在一些具体的实施方式中，所述抗体或抗原结合片段与人 CD19 结合的 KD 值小于 1 E-08M、1E-09M、1E-10M 或 1E-11M；优选地，所述抗体或抗原结合片段还结合猴 CD19，更优选地，所述抗体或抗原结合片段与猴 CD19 结合的 KD 值小于 1E-8M、1E-9M、1E-10M、1E-11M 或 1E-12M。

在第二方面，本公开还公开一种多特异抗原结合分子，所述多特异性抗原结合分子至少包括第一抗原结合模块和第二抗原结合模块，所述第一抗原结合模块包含前述的抗体或抗原结合片段，所述第二抗原结合模块结合与第一抗原结合模块不同的其他靶点或结合相同靶点的不同表位；优选地，所述第二抗原结合模块为抗体或抗原结合片段；

优选地，所述其他靶点选自下组：（1）肿瘤特异性抗原（TSA）或肿瘤相关抗原（TAA）；

(2) 免疫检查点；(3) 募集和/或激活免疫细胞的靶点。

在第三方面，本公开还公开一种嵌合抗原受体（CAR），所述嵌合抗原受体至少包括细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域，所述细胞外抗原结合结构域包括前述抗体或抗原结合片段或多特异性抗原结合分子。

在第三方面，本公开还公开一种免疫效应细胞，所述免疫效应细胞表达前述嵌合抗原受体和/或包含编码前述嵌合抗原受体的核酸分子；

优选地，所述免疫效应细胞选自 T 细胞、NK 细胞（natural killer cell）、NKT 细胞（natural killer T cell）、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或肥大细胞，更优选地，所述 T 细胞选自细胞毒性 T 细胞、调节性 T 细胞或辅助性 T 细胞；

优选地，所述免疫效应细胞为自体免疫效应细胞或同种异体免疫效应细胞。

在第四方面，本公开还公开一种分离的核酸分子，所述核酸分子编码前述抗体或抗原结合片段、多特异性抗原结合分子或嵌合抗原受体。

在第五方面，本公开还公开一种载体（vector），所述载体包括前述核酸分子。

在第六方面，本公开还公开一种细胞，所述细胞包含前述载体。

在第七方面，本公开还公开一种制备前述抗体、抗原结合片段或多特异性抗原结合分子的方法，所述方法包括：（1）培养前述细胞和/或（2）分离所述细胞表达的抗体或抗原结合片段，或多特异性抗原结合分子。

在第八方面，本公开还公开一种制备前述免疫效应细胞的方法，所述方法包括将编码前述嵌合抗原受体的核酸分子导入所述免疫效应细胞，和/或启动所述免疫效应细胞表达所述嵌合抗原受体。

在第九方面，本公开还公开一种药物组合物，所述药物组合物包含前述抗体或抗原结合分子、多特异性抗原结合分子、免疫效应细胞、核酸分子、载体、细胞或根据前述方法制备得到的产品；优选地，所述组合物还包含药学上可接受的运载体（carrier）、稀释剂或助剂。

在第十方面，本公开还公开前述的抗体或抗原结合片段、多特异性抗原结合分子、免疫效应细胞、核酸分子、载体、细胞、药物组合物、或根据前述方法制备得到的产品，在制备用于治疗 CD19 相关疾病的药物中的用途；优选地，所述 CD19 相关疾病选自或自身免疫性疾病；更优选地，所述肿瘤选自淋巴瘤或白血病，例如 B 细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤，所述自身免疫性疾病选自神经系统自身免疫性疾病，类风湿，系统性红斑狼疮、IgG4 相关疾病、多发性硬化症或视神经脊髓炎谱系疾病。

在第十一方面，本公开还公开一种治疗 CD19 相关疾病的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的药物，所述药物包括前述的抗体或抗原结合片段、多特异性抗原结合分子、免疫效应细胞、核酸分子、载体、细胞、药物组合物、或根据前述方法制备得到的产品，优选地，所述 CD19 相关疾病选自肿瘤或自身免疫性疾病；更优选地，所述肿瘤选自淋巴瘤或白血病，例如 B 细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤，所述自身免疫性疾病选自神经系统自身免疫性疾病，类风湿，系统性红斑狼疮、IgG4 相关疾病、多发性硬化症

或视神经脊髓炎谱系疾病。

在第十二方面，本公开还公开前述的抗体或抗原结合片段、多特异性抗原结合分子、免疫效应细胞、核酸分子、载体、细胞、药物组合物、或根据前述方法制备得到的产品，用于治疗 CD19 相关疾病的药物，优选地，所述 CD19 相关疾病选自肿瘤或自身免疫性疾病；更优选地，所述肿瘤选自淋巴瘤或白血病，例如 B 细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤，所述自身免疫性疾病选自神经系统自身免疫性疾病，类风湿，系统性红斑狼疮、IgG4 相关疾病、多发性硬化症或视神经脊髓炎谱系疾病。

本公开所述 CD19 抗体及其抗原结合片段与人 CD19 具有良好的结合能力，其中，部分抗体还能够交叉结合猴 CD19，对开发 CD19 相关的抗体产品或细胞治疗产品具有重要意义，具有良好的应用前景。

### 术语定义和说明

除非本公开另外定义，与本公开相关的科学和技术术语应具有本领域普通技术人员所理解的含义。

此外，除非本文另有说明，本文单数形式的术语应包括复数形式，复数形式的术语应包括单数形式。更具体地，如在本说明书和所附权利要求中所使用的，除非另外明确指出，否则单数形式“一种”和“这种”包括复数指示物。

本文术语“包括”、“包含”和“具有”之间可互换使用，旨在表示方案的包含性，意味着所述方案可存在除所列出的元素之外的其他元素。同时应当理解，在本文中使用“包括”、“包含”和“具有”描述，也提供“由……组成”方案。示例性地，“一种组合物，包括 A 和 B”，应当理解为以下技术方案：由 A 和 B 组成的组合物，以及除 A 和 B 外，还含有其他组分的组合物，均落入前述“一种组合物”的范围内。

术语“和/或”在本文使用时，包括“和”、“或”和“由所属术语链接的要素的全部或任何其他组合”的含义。

本文术语“特异性结合”是指抗原结合分子（例如抗体）通常以高亲和力特异性结合抗原和实质上相同的抗原，但不以高亲和力结合不相关抗原。亲和力通常以平衡解离常数（equilibrium dissociation constant, KD）来反映，其中较低 KD 表示较高亲和力。以抗体为例，高亲和力通常指具有约  $10^{-7}$  M 或更低、约  $10^{-8}$  M 或更低、约  $1 \times 10^{-9}$  M 或更低、约  $1 \times 10^{-10}$  M 或更低、 $1 \times 10^{-11}$  M 或更低或  $1 \times 10^{-12}$  M 或更低的 KD。KD 计算方式如下： $KD = Kd/Ka$ ，其中 Kd 表示解离速率，Ka 表示结合速率。可采用本领域周知的方法测量平衡解离常数 KD，如表面等离子共振（例如 Biacore）或平衡透析法测定，示例性地，可参见本文实施例 8 所示 KD 值获得方法。

本文术语“抗原结合分子”按最广义使用，是指特异性结合抗原的分子。示例性地，抗原结合分子包括但不限于抗体或抗体模拟物。“抗体模拟物”是指能够与抗原特异性结合，但与抗体结构无关的有机化合物或结合域，示例性地，抗体模拟物包括但不限于 affibody、affitin、affilin、经设计的锚蛋白重复蛋白(DARPin)、核酸适体或 Kunitz 型结构域肽。

本文术语“抗体”按最广义使用，是指包含来自免疫球蛋白重链可变区的足够序列和/或



来自免疫球蛋白轻链可变区的足够序列，从而能够特异性结合至抗原的多肽或多肽组合。本文“抗体”涵盖各种形式和各种结构，只要它们展现出期望的抗原结合活性。本文“抗体”包括具有移植的互补决定区(CDR)或 CDR 衍生物的替代蛋白质支架或人工支架。此类支架包括抗体衍生的支架(其包含引入以例如稳定化抗体三维结构的突变)以及包含例如生物相容性聚合物的全合成支架。参见，例如 Korndorfer et al., 2003, *Proteins: Structure, Function, and Bioinformatics*, 53(1):121-129(2003); Roque et al., *Biotechnol. Prog.* 20:639-654(2004)。此类支架还可以包括非抗体衍生的支架，例如本领域已知可用于移植 CDR 的支架蛋白，包括但不限于肌腱蛋白、纤连蛋白、肽适体等。

本文“抗体”包括一种典型的“四链抗体”，其属于由两条重链(HC)和两条轻链(LC)组成的免疫球蛋白；重链是指这样的多肽链，其在 N 端到 C 端的方向上由重链可变区(VH)、重链恒定区 CH1 结构域、铰链区(HR)、重链恒定区 CH2 结构域、重链恒定区 CH3 结构域组成；并且，当所述全长抗体为 IgE 同种型时，任选地还包括重链恒定区 CH4 结构域；轻链是在 N 端到 C 端方向上由轻链可变区(VL)和轻链恒定区(CL)组成的多肽链；重链与重链之间、重链与轻链之间通过二硫键连接，形成“Y”字型结构。由于免疫球蛋白重链恒定区的氨基酸组成和排列顺序不同，故其抗原性也不同。据此，可将本文“免疫球蛋白”分为五类，或称为免疫球蛋白的同种型，即 IgM、IgD、IgG、IgA 和 IgE，其相应的重链分别为 $\mu$ 链、 $\delta$ 链、 $\gamma$ 链、 $\alpha$ 链和 $\epsilon$ 链。同一类 Ig 根据其铰链区氨基酸组成和重链二硫键的数目和位置的差别，又可分为不同的亚类，如 IgG 可分为 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4，IgA 可分为 IgA1 和 IgA2。轻链通过恒定区的不同分为 $\kappa$ 链或 $\lambda$ 链。五类 Ig 中每类 Ig 都可以有 $\kappa$ 链或 $\lambda$ 链。

本文“抗体”还包括不包含轻链的抗体，例如，由单峰驼(*Camelus dromedarius*)、双峰驼(*Camelus bactrianus*)、大羊驼(*Lama glama*)、原驼(*Lama guanicoe*)和羊驼(*Vicugna pacos*)等产生的重链抗体(heavy-chain antibodies, HCAbs)以及在鲨等软骨鱼纲中发现的免疫球蛋白新抗原受体(Ig new antigen receptor, IgNAR)。

本文“抗体”可以来源于任何动物，包括但不限于人和非人动物，所述非人动物可选自灵长类动物、哺乳动物、啮齿动物和脊椎动物，例如骆驼科动物、大羊驼、原驼、羊驼、羊、兔、小鼠、大鼠或软骨鱼纲(例如鲨)。

本文“抗体”包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、单特异性抗体、多特异性抗体(例如双特异性抗体)、单价抗体、多价抗体、完整抗体、完整抗体的片段、裸抗体、缀合抗体、嵌合抗体、人源化抗体或全人抗体。

本文术语“单克隆抗体”是指从基本上同质的抗体群体获得的抗体，即，除了可能的变异体(例如含有天然存在的突变或在制剂的生产过程中产生，此类变体通常以少量存在)之外，包含所述群体的各个抗体是相同的和/或结合相同的表位。与通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的多克隆抗体制剂相反，单克隆抗体制剂中的每种单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。本文修饰语“单克隆”不应解释为需要通过任何特定方法产生所述抗体或抗原结合分子。举例来说，单克隆抗体可通过多种技术制得，包括(但不限于)杂交瘤技术、重组 DNA 方法、噬菌体库展示技术和利用含有全部或部分人免疫球蛋白基因座的转殖基因动物的方法和其它本领域已知的方法。

本文术语“天然抗体”是指通过多细胞生物体的免疫系统制造和配对的抗体。本文术语

“工程化抗体”的抗体是指通过基因工程、抗体工程等技术获得的非天然抗体，示例性地，“工程化抗体”包括人源化抗体、小分子抗体（例如 scFv 等）、双特异性抗体等等。

本文术语“单特异性”是指表示具有一个或多个结合位点，其中每个结合位点结合相同抗原的相同表位。

本文术语“多特异性抗体”是指具有至少两个抗原结合位点，所述至少两个抗原结合位点中的每一个抗原结合位点与相同抗原的不同表位或与不同抗原的不同表位结合。因此，诸如“双特异性”、“三特异性”、“四特异性”等术语是指抗体/抗原结合分子可以结合的不同表位的数目。

本文术语“价”表示抗体/抗原结合分子中规定数目的结合位点的存在。因此，术语“单价”、“二价”、“四价”和“六价”分别表示抗体/抗原结合分子中一个结合位点、两个结合位点、四个结合位点和六个结合位点的存在。

本文“全长抗体”、“完好抗体”和“完整抗体”在本文中可互换使用，是指具有基本上与天然抗体结构相似的结构。

本文“抗原结合片段”和“抗体片段”在本文中可互换使用，其不具备完整抗体的全部结构，仅包含完整抗体的局部或局部的变体，所述局部或局部的变体具备结合抗原的能力。本文“抗原结合片段”或“抗体片段”包括但不限于 Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、scFv、双抗体（diabody）和单域抗体。

完整抗体的木瓜蛋白酶消化生成两个同一的抗原结合片段，称作“Fab”片段，每个含有重和轻链可变域，还有轻链的恒定域和重链的第一恒定域(CH1)。如此，本文术语“Fab 片段”指包含轻链的 VL 域和恒定域(CL)的轻链片段，和重链的 VH 域和第一恒定域(CH1)的抗体片段。Fab'片段因在重链 CH1 域的羧基末端增加少数残基而与 Fab 片段不同，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。Fab'-SH 是其中恒定域的半胱氨酸残基携带游离巯基的 Fab' 片段。胃蛋白酶处理产生具有两个抗原结合位点(两个 Fab 片段)和 Fc 区的一部分的 F(ab')<sub>2</sub> 片段。

本文术语“Fd”是指由 VH 和 CH1 结构域组成的抗体。本文术语“Fv”是指由单臂 VL 和 VH 结构域组成的抗体片段。Fv 片段通常被认为是，能形成完整的抗原结合位点的最小抗体片段。一般认为，六个 CDR 赋予抗体的抗原结合特异性。然而，即便是一个可变区(例如 Fd 片段，其仅仅含有三个对抗原特异的 CDR)也能够识别并结合抗原，尽管其亲和力可能低于完整的结合位点。

本文术语“scFv”（single-chain variable fragment）是指包含 VL 和 VH 结构域的单个多肽链，其中所述 VL 和 VH 通过接头(linker)相连(参见，例如，Bird 等人，Science 242:423-426(1988)；Huston 等人，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:5879-5883(1988)；和 Pluckthun，The Pharmacology of Monoclonal Antibodies，第 113 卷，Roseburg 和 Moore 编，Springer-Verlag，纽约，第 269-315 页(1994))。此类 scFv 分子可具有一般结构：NH<sub>2</sub>-VL-接头-VH-COOH 或 NH<sub>2</sub>-VH-接头-VL-COOH。合适的现有技术接头由重复的 GGGGS 氨基酸序列或其变体组成。例如，可使用具有氨基酸序列(GGGGS)<sub>4</sub>的接头，但也可使用其变体(Holliger 等人(1993)，Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448)。可用于本公开的其他接头由 Alfthan 等人(1995)，Protein

Eng.8:725-731, Choi 等人(2001), Eur.J.Immunol.31:94-106, Hu 等人(1996), Cancer Res.56:3055-3061, Kipriyanov 等人(1999), J.Mol.Biol.293:41-56 和 Roovers 等人(2001), Cancer Immunol.描述。在一些情况下, scFv 的 VH 与 VL 之间还可以存在二硫键, 形成二硫键连接的 Fv (dsFv)。

本文术语“双抗体(diabody)”, 其 VH 和 VL 结构域在单个多肽链上表达, 但使用太短的连接体以致不允许在相同链的两个结构域之间配对, 从而迫使结构域与另一条链的互补结构域配对并且产生两个抗原结合部位(参见, 例如,Holliger P.等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:6444-6448(1993), 和 Poljak R.J.等人,Structure 2:1121-1123(1994))。

本文术语“单域抗体”(single domain antibody,sdAb)、“VHH”和“纳米抗体(nanobody)”具有相同的含义并可互换使用, 指克隆抗体重链的可变区, 构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体, 它是具有完整功能的最小的抗原结合片段。通常先获得天然缺失轻链和重链恒定区 1(CH1)的抗体后, 再克隆抗体重链的可变区, 构建仅由一个重链可变区组成的单域抗体。单域抗体可以衍生自骆驼科重链抗体或软骨纲鱼类 IgNAR。

本文术语“裸抗体”是指不与治疗剂或示踪剂缀合的抗体; 术语“缀合抗体”是指与治疗剂或示踪剂缀合的抗体。

本文术语“嵌合抗体(Chimeric antibody)”是指, 这样的抗体, 其轻链或/和重链的一部分源自一个抗体(其可以源自某一特定物种或属于某一特定抗体类或亚类), 且轻链或/和重链的另一部分源自另一个抗体(其可以源自相同或不同的物种或属于相同或不同的抗体类或亚类), 但无论如何, 其仍保留对目标抗原的结合活性(U.S.P 4,816,567 to Cabilly et al.; Morrison et al.,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,81:6851 6855(1984))。例如, 术语“嵌合抗体”可包括这样的抗体(例如人鼠嵌合抗体), 其中抗体的重链和轻链可变区来自第一抗体(例如鼠源抗体), 而抗体的重链和轻链恒定区来自第二抗体(例如人抗体)。

本文术语“人源化抗体”是指, 经基因工程改造的非人源抗体, 其氨基酸序列经修饰以提高与人源抗体的序列的同源性。通常而言, 人源化抗体的全部或部分 CDR 区来自于非人源抗体(供体抗体), 全部或部分的非 CDR 区(例如, 可变区 FR 和/或恒定区)来自于人源免疫球蛋白(受体抗体)。人源化抗体通常保留或部分保留了供体抗体的预期性质, 包括但不限于, 抗原特异性、亲和性、反应性、提高免疫细胞活性的能力、增强免疫应答的能力等。

本文术语“全人抗体”是指具有其中 FR 和 CDR 二者都源自人种系免疫球蛋白序列的可变区的抗体。此外, 如果抗体包含恒定区, 则恒定区也源自人种系免疫球蛋白序列。本文全人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如, 通过体外随机或位点特异性诱变或通过体内体细胞突变引入的突变)。然而, 本文“全人抗体”不包括其中来源于另一个哺乳动物物种(例如小鼠)的种系的 CDR 序列已被移植到人框架序列上的抗体。

本文术语“可变区”是指抗体重链或轻链中牵涉使抗体结合抗原的区域, “重链可变区”与“VH”、“HCVR”可互换使用, “轻链可变区”与“VL”、“LCVR”可互换使用。天然抗体的重链和轻链的可变域(分别是 VH 和 VL)一般具有相似的结构, 每个域包含四个保守的框架区(FR)和三个高变区(HVR)。参见例如 Kindt et al.,Kuby Immunology,6th ed.,W.H.Freeman and Co.,p.91(2007)。单个 VH 或 VL 域可足以赋予抗原结合特异性。本文术语“互补决定区”

与“CDR”可互换使用，通常指重链可变区（VH）或轻链可变区（VL）的高变区（HVR），该部位因在空间结构上可与抗原表位形成精密的互补，故又称为互补决定区，其中，重链可变区 CDR 可缩写为 HCDR，轻链可变区 CDR 可缩写为 LCDR。本术语“构架区”或“FR 区”可互换，是指抗体重链可变区或轻链可变区中除 CDR 以外的那些氨基酸残基。通常典型的抗体可变区由 4 个 FR 区和 3 个 CDR 区按以下顺序组成：FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。

对于 CDR 的进一步描述，参考 Kabat 等人, *J. Biol. Chem.*, 252:6609-6616 (1977); Kabat 等人, 美国卫生与公共服务部, “Sequences of proteins of immunological interest ” (1991); Chothia 等人, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987); Al-Lazikani B. 等人, *J. Mol. Biol.*, 273: 927-948 (1997); MacCallum 等人, *J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996); Abhinandan 和 Martin, *Mol. Immunol.*, 45: 3832-3839 (2008); Lefranc M.P. 等人, *Dev. Comp. Immunol.*, 27: 55-77 (2003); 以及 Honegger 和 Plückthun, *J. Mol. Biol.*, 309:657-670 (2001)。“CDR”可由 Kabat 编号系统加以定义，工具网站包括 abYsis 网站([www.abysis.org/abysis/sequence\\_input/key\\_annotation/key\\_annotation.cgi](http://www.abysis.org/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi))

本文术语“Kabat 编号系统”通常是指由 Elvin A. Kabat 提出的免疫球蛋白比对及编号系统(参见, 例如 Kabat et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991)。

本文术语“重链恒定区”是指抗体重链的羧基端部分，其不直接参与抗体与抗原的结合，但是表现出效应子功能，诸如与 Fc 受体的相互作用，其相对于抗体的可变结构域具有更保守的氨基酸序列。“重链恒定区”至少包含：CH1 结构域，铰链区，CH2 结构域，CH3 结构域，或其变体或片段。“重链恒定区”包括“全长重链恒定区”和“重链恒定区片段”，前者具有基本上与天然抗体恒定区基本相似的结构，而后者仅包括“全长重链恒定区的一部分”。示例性地，典型的“全长抗体重链恒定区”由 CH1 结构域-铰链区-CH2 结构域-CH3 结构域组成；当抗体为 IgE 时，其还包括 CH4 结构域；当抗体为重链抗体时，则其不包括 CH1 结构域。示例性地，典型的“重链恒定区片段”可选自 CH1、Fc 或 CH3 结构域。

本文术语“轻链恒定区”是指抗体轻链的羧基端部分，其不直接参与抗体与抗原的结合，所述轻链恒定区可选自恒定 $\kappa$ 结构域或恒定 $\lambda$ 结构域。

本文术语“Fc”是指完整抗体经木瓜蛋白酶水解而成的抗体羧基端部分，典型地，其包含抗体的 CH3 和 CH2 结构域。Fc 区包括例如天然序列 Fc 区、重组 Fc 区和变体 Fc 区。尽管免疫球蛋白重链的 Fc 区的边界可以略微变化，但是人 IgG 重链的 Fc 区通常被定义为从 Cys226 位置的氨基酸残基或从 Pro230 延伸至其羧基末端。Fc 区的 C 末端赖氨酸(根据 Kabat 编号系统的残基 447)可以例如在抗体的产生或纯化过程中，或通过对编码抗体重链的核酸重组工程化而除去，因此，Fc 区可包括或不包括 Lys447。

本文术语“保守氨基酸”通常是指属于同一类或具有类似特征（例如电荷、侧链大小、疏水性、亲水性、主链构象和刚性）的氨基酸。示例性地，下述每组内的氨基酸属于彼此的保守氨基酸残基，组内氨基酸残基的替换属于保守氨基酸的替换：

示例性地，以下六组是被认为是互为保守性置换的氨基酸的实例：

1) 丙氨酸(A)、丝氨酸(S)、苏氨酸(T)；

2) 天冬氨酸(D)、谷氨酸(E)；

- 3)天冬酰胺(N)、谷氨酰胺(Q);
- 4)精氨酸(R)、赖氨酸(K)、组氨酸(H);
- 5)异亮氨酸(I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(M)、缬氨酸(V); 和
- 6)苯丙氨酸(F)、酪氨酸(Y)、色氨酸(W)。

本文术语“同一性”可通过以下方式计算获得：为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的“同一性”百分数，将所述序列出于最佳比较目的比对(例如，可以为最佳比对而在第一和第二氨基酸序列或核酸序列之一或二者中引入空位或可以为比较目的而抛弃非同源序列)。随后比较在对应氨基酸位置或核苷酸位置处的氨基酸残基或核苷酸。当第一序列中的位置由第二序列中对应位置处的相同氨基酸残基或核苷酸占据时，则所述分子在这个位置处是相同的。

考虑到为最佳比对这两个序列而需要引入的空位的数目和每个空位的长度，两个序列之间的同一性百分数随所述序列共有的相同位置变化而变化。

可以利用数学算法实现两个序列间的序列比较和同一性百分数的计算。例如，使用已经集成至 GCG 软件包的 GAP 程序中的 Needleman 和 Wunsch((1970)J.Mol.Biol.48:444-453)算法(在 [www.gcg.com](http://www.gcg.com) 可获得)，使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵和空位权重 16、14、12、10、8、6 或 4 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6，确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。又例如，使用 GCG 软件包中的 GAP 程序(在 [www.gcg.com](http://www.gcg.com) 可获得)，使用 NWSgapdna.CMP 矩阵和空位权重 40、50、60、70 或 80 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6，确定两个核苷酸序列之间的同一性百分数。特别优选的参数集合(和除非另外说明否则应当使用的一个参数集合)是采用空位罚分 12、空位延伸罚分 4 和移码空位罚分 5 的 Blossum62 评分矩阵。

还可以使用 PAM120 加权余数表、空位长度罚分 12，空位罚分 4，利用已经并入 ALIGN 程序(2.0 版)的 E.Meyers 和 W.Miller 算法,((1989)CABIOS,4:11-17)确定两个氨基酸序列或核苷酸序列之间的同一性百分数。

额外地或备选地，可以进一步使用本公开所述的核酸序列和蛋白质序列作为“查询序列”以针对公共数据库执行检索，以例如鉴定其他家族成员序列或相关序列。例如，可以使用 Altschul 等人,(1990)J.Mol.Biol.215:403-10 的 NBLAST 及 XBLAST 程序(版本 2.0)执行此类检索。BLAST 核苷酸检索可以用 NBLAST 程序，评分=100、字长度=12 执行，以获得与本公开核酸(SEQ ID NO:1)分子同源的核苷酸序列。BLAST 蛋白质检索可以用 XBLAST 程序、评分=50、字长度=3 执行，以获得与本公开蛋白质分子同源的氨基酸序列。为了出于比较目的获得带空位的比对结果，可以如 Altschul 等人,(1997)Nucleic Acids Res.25:3389-3402 中所述那样使用空位 BLAST。当使用 BLAST 和空位 BLAST 程序时，可以使用相应程序(例如，XBLAST 和 NBLAST)的默认参数。参见 [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)。

本文术语“嵌合抗原受体 (CAR)”是指经改造以在免疫效应细胞上表达并且特异性结合抗原的人工细胞表面受体，其包含至少(1)细胞外抗原结合结构域，例如抗体的可变重链或轻链，(2)锚定 CAR 进入免疫效应细胞的跨膜结构域，和(3)胞内信号传导结构域。CAR 能够利用细胞外抗原结合结构域以非 MHC 限制性的方式将 T 细胞和其它免疫效应细胞重定向至所选择的靶标，例如癌细胞。

本文术语“核酸”包括包含核苷酸的聚合物的任何化合物和/或物质。每个核苷酸由碱基，特别是嘌呤或嘧啶碱基(即胞嘧啶(C)、鸟嘌呤(G)、腺嘌呤(A)、胸腺嘧啶(T)或尿嘧啶(U))、糖

(即脱氧核糖或核糖)和磷酸基团组成。通常,核酸分子由碱基的序列描述,由此所述碱基代表核酸分子的一级结构(线性结构)。碱基的序列通常表示为 5' 至 3'。在本文中,术语核酸分子涵盖脱氧核糖核酸(DNA),包括例如互补 DNA(cDNA)和基因组 DNA、核糖核酸(RNA),特别是信使 RNA(mRNA)、DNA 或 RNA 的合成形式,以及包含两种或更多种这些分子的混合的聚合物。核酸分子可以是线性的或环状的。此外,术语核酸分子包括有义链和反义链二者,以及单链和双链形式。而且,本文所述的核酸分子可含有天然存在的或非天然存在的核苷酸。非天然存在的核苷酸的例子包括具有衍生的糖或磷酸骨架键合或化学修饰的残基的修饰的核苷酸碱基。核酸分子还涵盖 DNA 和 RNA 分子,其适合作为载体用于在体外和/或体内,例如在宿主或患者中,直接表达本公开的抗体。此类 DNA(例如 cDNA)或 RNA(例如 mRNA)载体可以是未修饰的或修饰的。例如,可以对 mRNA 进行化学修饰以增强 RNA 载体的稳定性和/或被编码分子的表达,从而可以将 mRNA 注入到受试者内以在体内产生抗体(参见例如 Stadler 等人, Nature Medicine 2017, published online 2017 年 6 月 12 日, doi: 10.1038/nm.4356 或 EP 2 101 823 B1)。本文“分离的”核酸指已经与其天然环境的组分分开的核酸分子。分离的核酸包括在下述细胞中含有的核酸分子,所述细胞通常含有该核酸分子,但该核酸分子存在于染色体外或存在于不同于其天然染色体位置的染色体位置处。

本文术语“载体”是指能够扩增与其连接的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制型核酸结构的载体以及整合入已引入该载体的宿主细胞的基因组中的载体。某些载体能够指导与它们可操作连接的核酸的表达。这样的载体在本文中称为“表达载体”。

本文术语“宿主细胞”是指细胞中引入外源核酸的细胞,包括这种细胞的后代。宿主细胞包括“转化体”和“经转化的细胞”,其包括原代的经转化的细胞和来源于其的后代,而不考虑传代的次数。后代在核酸内容物上可能与亲本细胞不完全相同,而是可以包含突变。本文中包括具有与在初始转化的细胞中筛选或选择的相同功能或生物学活性的突变体后代。

本文术语“药物组合物”是指这样的制剂,其以允许包含在其中的活性成分的生物学活性有效的形式存在,并且不含有对施用所述药物组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。本文所述药物组合物可包括多种活性成分,示例性地,除本公开第一方面至第六方面所述抗体或抗原结合片段、多特异性抗原结合分子、免疫效应细胞、核酸分子、载体、细胞或根据第七方面至第八方面所述方法制备得到的产品外,所述药物组合物还可以包括其他活性成分,例如化疗药物或免疫检查点抑制剂。

本文术语“治疗”是指外科手术或药物处理(surgical or therapeutic treatment),其目的是预防、减缓(减少)治疗对象中不希望的生理变化或病变,如癌症的进展。有益的或所希望的临床结果包括但不限于症状的减轻、疾病程度减弱、疾病状态稳定(即,未恶化)、疾病进展的延迟或减慢、疾病状态的改善或缓和、以及缓解(无论是部分缓解或完全缓解),无论是可检测的或不可检测的。需要治疗的对象包括已患有病症或疾病的对象以及易于患上病症或疾病的对象或打算预防病症或疾病的对象。当提到减缓、减轻、减弱、缓和、缓解等术语时,其含义也包括消除、消失、不发生等情况。

本文术语“受试者”是指接受对如本公开所述的特定疾病或病症的治疗的生物体。对象和患者的实例包括接受疾病或病症治疗的哺乳动物,如人、灵长类动物(例如,猴)或非灵长类哺乳动物。

本文术语“有效量”指单独给予或与另一治疗剂组合给予细胞、组织或对象时能有效防止或缓解疾病病症或该疾病进展的治疗剂用量。“有效量”还指足以缓解症状，例如治疗、治愈、防止或缓解相关医学病症，或治疗、治愈、防止或缓解这些病症的速度增加的化合物用量。当将活性成分单独给予个体时，治疗有效剂量单指该成分。当应用某一组合时，治疗有效剂量指产生治疗作用的活性成分的组合用量，而无论是组合、连续或同时给予。

本文术语“癌症”指向或描述哺乳动物中典型地以不受调节的细胞生长为特征的生理状况。此定义中包括良性和恶性癌症。本文术语“肿瘤”或“瘤”是指所有赘生性(neoplastic)细胞生长和增殖,无论是恶性的还是良性的,及所有癌前(pre-cancerous)和癌性细胞和组织。术语“癌症”和“肿瘤”在本文中提及时并不互相排斥。

本文术语“EC50”是指半最大有效浓度，其包括在指定暴露时间之后诱导基线与最大值之间的半途响应的抗体浓度。EC50本质上代表其中观察到其最大作用的50%的抗体浓度，可通过本领域已知方法测量。

## 附图说明

图1为人CD19 exon1-3-his 蛋白样品 SDS-PAGE 还原胶和非还原胶检测结果，泳道 M 为蛋白 marker，泳道 1 为非还原条件，泳道 2 为还原条件；

图2为 FMC63 抗体和 9G8 抗体检测 Raji 细胞 CD19 表达量的 FACS 结果，其中 A 为 FMC63 抗体的检测结果，B 为 9G8 抗体的检测结果；

图3为转染人 CD19 的 CHO-K1 细胞 FACS 筛选检测结果；

图4为 9G8 抗体检测转染猴 CD19 的 HEK293T 细胞的 FACS 结果；

图5为 ELISA 检测 CD19 嵌合抗体与人 CD19-His 蛋白的结合反应；

图6为 FACS 检测 CD19 嵌合抗体与 Raji 细胞的结合反应；

图7为 FACS 检测 CD19 嵌合抗体与 CHO-K1-人 CD19 的结合反应；

图8A为 FACS 检测 CD19 嵌合抗体与 MOLT-4、Raji 细胞的结合反应；

图8B为 FACS 检测 CD19 嵌合抗体与 MOLT-4、Raji 细胞的结合反应；

图9A为 FACS 检测 CD19 嵌合抗体与 CHO-K1、CHO-K1-人 CD19 细胞的结合反应；

图9B为 FACS 检测 CD19 嵌合抗体与 CHO-K1、CHO-K1-人 CD19 细胞的结合反应；

图10为 ELISA 检测 CD19 嵌合抗体与猴 CD19-his 蛋白的结合反应；

图11为 FACS 检测 CD19 嵌合抗体与 HEK293T-猴 CD19 细胞的结合反应；

图12A为 FACS 检测 CD19 嵌合抗体与 HEK293T、HEK293T-猴 CD19 细胞的结合反应；

图12B为 FACS 检测 CD19 嵌合抗体与 HEK293T、HEK293T-猴 CD19 细胞的结合反应

图13为 FACS 检测 CD20 抗体和 1nM 嵌合抗体双染色食蟹猴外周血单核细胞散点图，CD20 为 B 细胞标记物，图中所示比例为嵌合抗体标记的阳性细胞占 CD20 阳性细胞比例，抗 CD19 对照抗体为 9G8，阴性对照为 hIgG1；

图14为 ELISA 检测 CD19 嵌合抗体与人 CD19 exon1-3-his 蛋白的结合反应；

图 15 为 ELISA 检测 F3.121.4 人源化抗体与人 CD19 蛋白的结合反应；  
图 16A 为 FACS 检测 F3.121.4 人源化抗体与 CHO-K1-人 CD19 细胞的结合反应；  
图 16B 为 FACS 检测 F3.121.4 人源化抗体与 CHO-K1 细胞的结合反应；  
图 16C 为 FACS 检测 F3.121.4 人源化抗体与 Raji 细胞的结合反应；  
图 16D 为 FACS 检测 F3.121.4 人源化抗体与 MOLT-4 细胞的结合反应。

## 具体实施方式

下面结合具体实施例来进一步描述本公开，本公开的优点和特点将会随着描述而更为清楚。实施例中未注明具体条件者，按照常规条件或制造商建议的条件进行。所用试剂或仪器未注明生产厂商者，均为可以通过市售购买获得的常规产品。

本公开实施例仅是范例性的，并不对本公开的范围构成任何限制。本领域技术人员应该理解的是，在不偏离本公开的精神和范围下可以对本公开技术方案的细节和形式进行修改或替换，但这些修改和替换均落入本公开的保护范围内。

### 实施例 1 CD19 抗原以及阳性抗体的制备

#### 1.1 人 CD19 exon1-3-His 标签蛋白的制备

将含有编码人 CD19 exon1-3 氨基酸序列（NP\_001171569.1 所示序列的第 20 位 Pro 至第 186 位 Gln）且带有 His 标签的核苷酸序列克隆到 pTT5 载体（由通用生物系统安徽有限公司完成）并按已建立的标准分子生物学方法制备质粒。具体方法参见 Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition* (Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press)。对 HEK293E 细胞（购自苏州益研生物科技有限公司）进行瞬时转染(PEI, Polysciences, 货号: 24765-1)并使用 FreeStyle TM 293(ThermoFisher scientific, 货号: 12338018)在 37°C 下进行扩大培养。6 天后收集细胞培养液，离心去除细胞成分，获得含人 CD19 exon1-3 的培养上清液。将培养上清液上样到镍离子亲和层析柱 HisTrap™ Excel (GE Healthcare, 货号: GE17-3712-06)，同时用紫外 (UV) 检测仪监测紫外吸收值 (A280nm) 的变化。上样后用 20mM PB, 0.5M NaCl (pH7.4) 清洗镍离子亲和层析柱直到紫外吸收值回到基线，然后用 buffer A: 20mM PB, 0.5M NaCl (pH7.4) 和 buffer B : 20mM PB, 0.5M NaCl, 500mM 咪唑进行梯度洗脱 (2%, 4%, 8%, 16%, 50%, 100%)，收集从镍离子亲和层析柱上洗脱下来的带 His 标签的人 CD19 exon1-3 蛋白，用 PBS 磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 在 4°C 透析过夜。透析后的蛋白经 0.22μm 滤膜无菌过滤后分装于 -80°C 保存，即获得纯化的人 CD19 exon1-3 蛋白，SDS-PAGE 还原胶和非还原胶检测样品目的条带如图 1 所示。

#### 1.2 人 CD19 对照抗体的制备

FMC63 和 9G8 克隆是识别人 CD19 的抗体，两者的抗原结合表位位于近膜端。FMC63 克隆的重链可变区和轻链可变区序列根据专利 WO2016033570A1 获得，9G8 克隆的重链可变区和轻链可变区序列根据专利 WO2018083535A1 获得。由泰州市百英生物科技有限公司将 FMC63 和 9G8 克隆的轻链可变区序列分别克隆到包含信号肽和人、鼠源抗体 IgG1 的轻链恒定区的表达载体 pcDNA3.4-B1HLK，重链可变区序列分别克隆到包含信号肽和人、鼠源抗体



IgG1 的重链恒定区的表达载体 pcDNA3.4-B1HH1, 获得 FMC63-hIgG1、FMC63-mIgG1 和 9G8-hIgG1、9G8-mIgG1, 对应的氨基酸序列信息如下表 1 所示。并按已建立的标准分子生物学方法制备质粒。具体方法参见 Sambrook, J., Fritsch, E. F., and Maniatis, T. (1989). *Molecular Cloning: A Laboratory Manual, Second Edition* ( Plainview, New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press。将表达载体按照 PEI (购自 Polysciences, 货号: 24765-1) 说明书瞬时转染 HEK293E 细胞 (购自苏州益研生物科技有限公司), 并使用 FreeStyle™ 293 (Thermofisher scientific, 货号: 12338018) 在 37°C 下连续培养 5 天, 离心去除细胞成分, 获得含抗体的培养上清液。将培养上清液上样到蛋白 A 层析柱 (蛋白 A 填料 AT Protein A Diamond 和层析柱 BXK16/26 均购自博格隆, 货号分别为: AA0273 和 B-1620), 使用 PBS 磷酸盐缓冲液 (pH7.4) 清洗后再用 20 mM PB, 1M NaCl (pH 7.2) 进行清洗, 最后使用 pH3.4 的柠檬酸缓冲液洗脱, 收集从蛋白 A 层析柱上洗脱下来的带 Fc 标签的抗体, 用 1/10 体积的 pH8.0 的 1M Tris 中和, 用 PBS 在 4°C 条件透析过夜, 透析后的蛋白经 0.22µm 滤膜无菌过滤后分装于 -80°C 保存。

表 1 对照抗体序列信息

序列名称	氨基酸序列
FMC63-h IgG1 重链	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVSSASTKGPSVF PLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSL GTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKC KVSNAKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQP ENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:1)
FMC63-mIgG1 重链	EVKLQESGPGLVAPSQSLSVTCTVSGVSLPDYGVSWIRQPPRKGLEWLGVWGSSETTYNSALKS RLTIKDNSKSQVFLKMNSLQTDDTAIYYCAKHYYYGGSYAMDYWGQGTSTVSSAKTTPPSVY PLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSSTW PSETVTCNVAHPASSTKVDKKIIPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTIITLTPKVTCCVVDI SKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAP IEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPI MDTDGSYFVYSKLVNMQSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK (SEQ ID NO: 2)
FMC63-h IgG1 轻链	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNMFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 3)
FMC63-mIgG1 轻链	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDISKYLNWYQQKPDGTVKLLIYHTSRLHSGVPSRFSGSG SGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGTKLEITRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVC FLNMFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSYSMSSTLTITKDEYERHNSYTCETH KTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO: 4)
9G8-hIgG1 重链	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWGMGIIYPGDSSTRYSPSFQ GQVTISADKSIQAYLQWSSLKASDTAMYCYCARGVSGIYNLHGFDIHWGQGTLTVTSSASTKGPSV FPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHNKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE VTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQ PENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 5)

9G8-mIgG1 重链	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKGLEWMGHIYPGDS DTRYSPSFQ GQVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMY YCARGVSGIYNLHGFDIWGQGLT VTVSSAKTTPPSV YPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVPSST WPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVL TITLTPKVT CVVV DISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSEL PIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFP APIEKTISKTKGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNT QPIMDTDGSYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTTEKSLSHSPGK (SEQ ID NO: 6)
9G8-hIgG1 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGRFGSPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPRKAVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDESTYSLSTLTL SKADYEEKHKVYACEVTH QGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 7)
9G8-mIgG1 轻链	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLNWYQQKPGKAPKLLIYAASSLQSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISLQPEDFATYYCQQGRFGSPFTFGQGTKVEIKRADAAPT VSIFFPSSEQLTSGGASVVC FLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDESTYSMSSTLTLTKDEYERHNSYTC EATH KTSTSPIVKSFN RNEC (SEQ ID NO: 8)

**实施例 2 内源表达细胞株的鉴定、过表达人 CD19 以及猴 CD19 的细胞株构建和鉴定**

**2.1 内源性表达 CD19 细胞株的鉴定**

将 Raji 细胞（购自武汉大学中国典型培养物保藏中心）在 T-25 细胞培养瓶中扩大培养至对数生长期，离心弃去培养基上清，细胞沉淀用 PBS 洗涤 2 次。用 FMC63-mIgG1 和 9G8-mIgG1 抗体作为一抗，Alexa Fluor 647 标记的二抗（Jackson，货号：115-605-003）进行 FACS（FACS Canto™，购自 BD 公司）检测。结果如表 2、图 2 所示，Raji 细胞均可与 FMC63-mIgG1 和 9G8-mIgG1 结合。

表 2 内源细胞系 Raji 细胞的 FACS 检测结果

序号	抗体名称	细胞平均荧光强度	
		IgG 亚型对照	CD19 抗体
1	FMC63-mIgG1	72	23402
2	9G8-mIgG1	72	14600

**2.2 CHO-K1 稳转人 CD19 单克隆细胞株的制备**

编码人 CD19 全长氨基酸序列（NCBI: NP\_001761.3）的核苷酸序列被克隆到 pcDNA3.1 载体并制备质粒（由通用生物系统（安徽）有限公司完成）。对 CHO-K1 细胞系（购自中国科学院上海生命科学研究院）进行质粒转染（Lipofectamine® 3000 Transfection Kit，购自 Invitrogen，货号：L3000-015）后，在含 10 μg/ml 嘌呤霉素和含 10%（v/v）胎牛血清的 DMEM/F12 培养基中选择性培养 2 周，用 FMC63-mIgG1 抗体作为一抗，Alexa Fluor 647 标记的二抗（Jackson，货号：115-605-003）在流式细胞仪 FACS AriaII（BD Biosciences）上分选阳性单克隆细胞到 96 孔板，并置于 37°C，5%（v/v）CO<sub>2</sub> 细胞培养箱中培养，大约 2 周后选择部分单克隆孔进行扩增。对扩增后的克隆经流式细胞分析法进行筛选。选择长势较好、荧光强度较高的单克隆细胞系继续扩大培养并液氮冻存。

具体结果如表 3 和图 3 所示，IgG 亚型对照为鼠 IgG1 对照。结果表明已制得人 CD19 高表达水平的 CHO-K1 单克隆细胞株：CHO-K1-人 CD19-2C8、CHO-K1-人 CD19-1C4、CHO-K1-

人 CD19-2G4、以及 CHO-K1-人 CD19 1C9，后续实验选择了克隆 CHO-K1-人 CD19-2C8，如无特别说明，后续实施例中采用的 CHO-K1-人 CD19 细胞均为 CHO-K1-人 CD19-2C8。

表 3 人 CD19 蛋白的 CHO-K1 稳转细胞系 FACS 检测结果

序号	稳定转染细胞系克隆号	细胞平均荧光强度	
		IgG 亚型对照	CD19 抗体
1	CHO-K1-人 CD19-2C8	50	131224
2	CHO-K1-人 CD19-1C4	50	45781
3	CHO-K1-人 CD19-2G4	50	44900
4	CHO-K1-人 CD19-1C9	50	31058

### 2.3 HEK293T 稳转猴 CD19 细胞株的制备

编码猴 CD19 全长氨基酸序列 (NCBI: XM\_005591542.1) 的核苷酸序列被克隆到 pcDNA3.1 载体 (购自 Thermofisher scientific) 并制备质粒。对 HEK293T 细胞系用 FuGENE® HD (Promega, 货号: #E2311) 进行质粒转染后, 在含 10 $\mu$ g/ml puromycin、10% (v/v) 胎牛血清的 DMEM 培养基中选择性培养 2 周, 用有限稀释法在 96 孔培养板中进行亚克隆, 并置于 37 $^{\circ}$ C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> 培养, 大约 2 周后选择部分多克隆孔扩增到 6 孔板中。对扩增后的克隆用具有猴交叉活性的 CD19 抗体 9G8-mIgG1 抗体作为一抗, Alexa Fluor 647 标记的二抗 (Jackson, 货号: 115-605-003) 进行 FACS 筛选, 选择长势较好、荧光强度高的细胞系继续扩大培养并液氮冻存。结果如表 4 和图 4 所示, 表明已筛选获得过表达猴 CD19 的阳性细胞峰, 可用于检测抗体的交叉活性。

表 4 猴 CD19 蛋白的 HEK293T 稳转细胞系 FACS 检测结果

序号	稳定转染细胞系克隆号	细胞平均荧光强度	
		IgG 亚型对照	CD19 抗体
1	HEK293T-猴 CD19	62	66503

### 实施例 3 抗人 CD19 杂交瘤单克隆抗体的制备

#### 3.1 动物免疫

抗人 CD19 单克隆抗体通过免疫小鼠产生。实验用 6~8 周龄 BALB/c AnNCr1 小鼠 (购自北京维通利华公司) 或 SJL/ JorllcoCr1 小鼠 (购自上海斯莱克公司), 雌性。饲养环境: SPF 级。小鼠购进后, 实验室环境饲养 1 周, 12/12 小时光/暗周期调节, 温度 20-25 $^{\circ}$ C; 湿度 40-60%。将已适应环境的小鼠按以下方案免疫。免疫抗原为人 CD19(aa20~291)- huFc 蛋白购自 ACRO Biosystems (货号: CD9-H5251) 或人 CD19 蛋白的 CHO-K1 稳转细胞株。蛋白组初次免疫时, 免疫原用 TiterMax (购自 Sigma, 货号: T2684) 乳化后皮下 (SC) 与腹腔 (IP) 分别注射 0.1ml, 即每只小鼠注射 50 $\mu$ g 免疫原; 加强免疫时, 免疫原用 Imject Alum Adjuvant (购自 Thermofisher scientific, 货号: 77161) 皮下多点注射 0.1ml, 即每只小鼠注射 25  $\mu$ g 免疫原。细胞组初次免疫时, TiterMax 与生理盐水乳化后腹腔注射 0.1ml, 15 分钟后腹腔注射 0.1ml 细胞悬液, 即每只小鼠注射 1E7 细胞; 加强免疫时, 腹腔注射细胞量为 1E7 的细胞悬液。免疫频次每周一次, 于第-3, 19, 34, 47 天取血, 用 ELISA、FACS 方法检测小鼠血清抗体滴

度。蛋白组和细胞组小鼠血清对免疫原均有不同程度的结合，呈现抗原抗体反应。表 5-6 为编号为 708、709、711、712 的小鼠在第 47 天的血清抗体效价检测结果，空白对照为 1% (w/v) BSA。

表 5 ELISA 检测免疫后 Balb/c 小鼠血清抗体效价

OD <sub>450</sub> 批次	血清稀释度											
	1:100	1:300	1:900	1:2700	1:8100	1:24300	1: 72900	1: 218700	1: 656100	1: 1968300	1: 5904900	空白 对照
708	2.93	2.62	2.40	1.97	1.25	0.69	0.30	0.15	0.10	0.09	0.10	0.09
709	2.54	2.52	2.48	2.33	1.98	1.53	0.83	0.37	0.19	0.11	0.10	0.09
711	2.60	2.50	2.39	2.27	1.83	1.37	0.66	0.32	0.15	0.10	0.09	0.08
712	2.58	2.51	2.33	2.13	1.64	1.08	0.49	0.24	0.13	0.10	0.08	0.08

表 6 FACS 检测免疫后 Balb/c 小鼠血清抗体效价

MFI 批次	血清稀释度											
	1:100	1:300	1:900	1:2700	1:8100	1:24300	1: 72900	1: 218700	1: 656100	1: 1968300	1: 5904900	空白 对照
708	813	876	625	400	213	146	111	101	98	94	95	95
709	3146	2341	1491	1029	598	306	185	124	107	100	95	98
711	1813	1478	982	637	337	193	134	108	99	103	95	95
712	2371	1655	1041	621	354	193	129	107	103	97	94	94

### 3.2 脾细胞融合和杂交瘤筛选

选择血清中抗体滴度高并且滴度趋于平台的小鼠进行脾细胞融合。在进行脾细胞融合前 3 天冲击免疫，皮下、腹膜内(IP)按 50 $\mu$ g/只注射由生理盐水配制的抗原溶液。

加入 ACK Lysing Buffer (购自 Gibco, 货号: A1049201), 裂解脾细胞中掺杂的红细胞, 获得脾细胞悬液。用 DMEM (购自 Gibco, 货号: 10566016) 基础培养基在 1500 r/min 转速下离心清洗细胞 3 次, 然后按活细胞数目 2:1 比率与小鼠骨髓瘤细胞 SP2/0 (购自 ATCC, CRL-1581) 混合, 采用 BTX ECM2001+高效电融合方法(参见 METHODS IN ENZYMOLOGY, VOL. 220) 进行细胞融合。融合后的细胞稀释到含 20%胎牛血清 (ExCell Bio, 货号 FSD500)、1 $\times$ HAT (购自 Sigma, 货号: H0262) 的 DMEM 培养基中。按 2 $\times$ 10<sup>4</sup>/200 $\mu$ l/孔加入到 96 孔细胞培养板中, 5% CO<sub>2</sub>, 37 $^{\circ}$ C 条件下培养。14 天后用 ELISA 筛选融合细胞的上清, 将阳性克隆扩增到 24 孔板扩大培养, 培养基为含 10% (v/v) 胎牛血清和 1 $\times$ HT (购自 Sigma, 货号: H0137) 的 DMEM, 培养条件为 37 $^{\circ}$ C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub>。培养 3 天后取 24 孔板中扩大培养的培养液, 离心收集上清液, 对上清液进行抗体亚型分析, 用 ELISA、FACS 确定对人 CD19 蛋白和人 CD19 阳性细胞的结合活性 (结合活性的检测方法参照实施例 5.1-5.2)。

根据 24 孔板筛选结果, 挑选 ELISA 和 FACS 实验均为阳性的杂交瘤细胞, 用 Medium D (购自 STEMCELL, 货号: 03810) 在 6 孔板进行亚克隆, 亚克隆 7 天左右挑取单克隆于含 10%FBS、1 $\times$ HT 的 DMEM 培养基中, 37 $^{\circ}$ C, 5%CO<sub>2</sub> 条件下培养 2 天, 用 ELISA 进行初步筛选, 挑选阳性单克隆扩增到 24 孔板继续培养, 2 天后用 ELISA、FACS 确定抗原结合阳性活性, 挑选出最优的克隆, 并于含 10% (v/v) FBS 的 DMEM 培养基中 (购自 Gibco) 在 37 $^{\circ}$ C, 5% (v/v) CO<sub>2</sub> 条件下将该最优的克隆进行扩大培养, 液氮冻存即得本公开杂交瘤细胞。

实施例 4 杂交瘤阳性克隆轻重链可变区氨基酸序列测定和嵌合抗体的制备

4.1 杂交瘤抗体序列信息

收集对数生长期杂交瘤细胞，用 Trizol(Invitrogen,Cat No.15596-018)充分裂解细胞后于 -80℃ 保存待测。样品委托苏州金唯智生物科技有限公司完成杂交瘤阳性克隆轻重链可变区氨基酸序列测定，获得 53 个克隆，具体序列如表 7 所示：

表 7 杂交瘤阳性克隆重链可变区和轻链可变区序列

序列名称	氨基酸序列
F1mab003VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYFTFDYVMHWVRQTPGGQLEWIGYFNPYNDGTNYN EKFKVKATLTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGVYYYGRDFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 9)
F1mab003VL	DVVLTTQTPSLPVS LGDQASISCRSSQSLNSNGNSYLNWYLQKPGQSPQLLIYRVSNRFSGLV DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCLQITHVPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 10)
F2.15.26VH	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTDYGVSWIRQSPGKGLEWLGVIWGS GDTYYNSVLE SRLSINKDNSKNQVFLKMNSLQTDDAAMYFCAKHSY YGGSFAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 11)
F2.15.26VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGKTLPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 12)
F3.3.10VH	DVQLQESGPG LAKLSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWMGHISYDGNNNYNPS LKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCARENYSNYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 13)
F3.3.10VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVKSSYTYIHWYQQKPGQPPKLLIKYASILQSGV PARF SGSGSGTDFTLNFHPVEEEDTATYYCQHSWEIPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 14)
F3.5.1VH	QAQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSGSWMNWVQQRPGKGLEWIGRIYPGDGDTYYNG KFKDKAILTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAQLRYRYVMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 15)
F3.5.1VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVSIHGSHLMHWYQQKPGQPRLLIYAASNLESGV PAR FSGSGSETDFTLNIHPVEEEDAATYFCQQGKDPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 16)
F3.13.2VH	DVQLQESGPG LMKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWMGYISYDGSNNYNPS LKNRFSITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCARRKLTGGPYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 17)
F3.13.2VL	DIVLTQSPASLAVTLGQRATISCRASESVSFHGFHIMHWYQQKPGQPPKLLIYAASHLVSGV PDR FSGSGSETDFTLNIHPVEEEDAAAYFCQQSVDPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 18)
F3.23.10VH	EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASDYSFTDYNMNWVKQSN GASLEWIGIINPNFGSTSYNQKF K GKATLTV DQSSSTAFMQLNSLTSEDSAVYYCARSEYYGSSGFAYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO: 19)
F3.23.10VL	DVVVTQTPSLPVSFGDQVVISCRSSQSLVNSYGNTYLSWY LHKPGQSPQLLIYGISNRFSGV PD RFSGSGSGTDFTLKITTIKPEDLGMYYCLQGTHQPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 20)
F3.40.14VH	QAQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSGSWMNWVQQRPGKGLEWIGRIYPGDGDTYYSG KFKDKAILTADTSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCAQLRSRYVMDYWGQGASVTVSS (SEQ ID NO: 21)
F3.40.14VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVSIHGTHLMHWYQQKPGQPRLLIYAASNLESGV PAR FSGSGSETDFTLNIHPVEEEDAATYFCQQGIDDPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 22)
F3.64.4VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYFTFDYHINWVKQSHGKSPEWIGDINPNNGGTTYNQK FKDKATLTVDKSSSTAFMELRSLTSEDSAVYYCARFITTVVAWYFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 23)

F3.64.4VL	DIQMTQSPASLSVSVGETVTITCRASENIYSNLAWYQQKQGKSPQLLVYAATNLADGVPSRFSG SGSGTQYSLKINSLQSEDFGNYYCQRFWDTPRTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 24)
F3.74.4VH	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFTDYEMHWVKQTPVHGLEWIGGIAPETGLTTYNQ KFEDKAILTADKSSRTAYMELRSLTSEDSAVYFCNPNNYGLWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 25)
F3.74.4VL	DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLDSDGKTYLNLWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPD RVTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHTFPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 26)
F3.77.6VH	EFQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYSFTDYNMNWVKQSNGKSLEWIGTINPNYITSYNQKF K GKATLTVDQSSSTAYMQLNSLTSEDSAVYYCAGDYKGYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 27)
F3.77.6VL	DVVMTQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQNLSDGKTYLNLWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVP DRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGLYYCWQGTHTFPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 28)
F3.81.2VH	QVQLQQPGAELVMPGASVKLSCKASAYTFTNYWMHWVKQRPGHGLEWIGEIDPSDSYTDYN QNFKAKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARLMGRYFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 29)
F3.81.2VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSAVAWYQQKPGQSPKLLINSASYRYTGVPDRFT GSGSGTDFTFITISSVQAEDLAVYYCQQHYSSTPLTFGAGTKLELR (SEQ ID NO: 30)
F3.83.9VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWMGYISYDGGNNYNPS LKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYFCAREDYSNWYFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 31)
F3.83.9VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSKSSYSYMHWYQQKPGQSPKLLIKYASILKSGVPAR FSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDTATYYCQHSWEIPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 32)
F3.109.1VH	EVQLQQSGAELVRPGSSVKMSCKTSGYFTSYGINWVKQRPQGQLEWIGYIYIGNDYTEFNEK FKGKATLTSSTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYFCARFYNSDPMDYWGHTSVTVSS (SEQ ID NO: 33)
F3.109.1VL	DVVMTQTPLTSLVSIQGPASISCKSSQSLNSDGTFLNLWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPD RFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHTFPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 34)
F3.113.16VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWVKQRPQGQLEWIGEIDPSDSYINYNQ KFKGKATLTADTSSSTAYMQLSSLTYEDSAVYYCARPVTVPWYFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 35)
F3.113.16VL	EIVLTQSPTTMAASPGEKITITCSATSSISSNYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGSG SGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSAIPRIFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 36)
F3.114.12VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLTCSVTGYSITSGYDWNWIRQFPGNKLEWMGYISYDGNKNNYNPS LRNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCARRDLRGYFDVWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 37)
F3.114.12VL	DIVLTQSPATLSVTPGDRVSLSCRASQSSISNYLHWYQQKSHEPRLLIKAYSLSISGIPSRFSGSGS GTDFTLINSVETEDFGVYFCQQSNSWPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 38)
F3.118.14VH	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCASGYTFPDYIEHWVKQTPVHGLEWIGAIIDPETGGIGYNQK FTGKAMLTADKSSSTAYMELRSLTSEDSAVYFCTRNYGSRWGQGSTLTVSS (SEQ ID NO: 39)
F3.118.14VL	DVVMTQTPLTSLVTIGQSASISCKSSQSLLESDGKTYLNLWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPD RFTGSASGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHTFPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 40)
F3.121.4VH	QVQLQQPGAELVVPGTSVKLSCKASGYTFTNYWMHWVKQRPQGQLEWIGEIDPSDNYANYN QEFQGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSDDSAVYYCARHDGYFGALDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 41)
F3.121.4VL	EIVLTQSPTTMAASPGEKITITCSASSISSNYLHWYQQKPGFSPKFLIYRTSNLASGVPARFSGSG SGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQASSIPRMFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 42)
F3.124.7VH	EVQLQQSGPVLVKPGASVKMSCKASGYTFTDYMNWVKQRHGKSLEWIGISNPYNGGTSYN QKFKDKATLTVDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCAREGGTAQPTSGMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 43)

F3.124.7VL	NIMMTQSPSSLA VSAGEKVTMSCKSSQSVLYSSNQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSVQPEDPAVYYCHQYRSSYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 44)
F3.126.15VH	QVQLQQPGAELVMPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGQLEWIGEIDPSDYSYTTYNQNFKGKATLTVDISTSTAYIQLSNLTSEDSAVYYCARLTGNYYHYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 45)
F3.126.15VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVSPA VAWYQQRPGQCPKLLIFSSSYRSTGVPDRFTGSGSGTDFTFITISSVQAEDLAVYYCQQHYSLPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 46)
F3.133.14VH	QVQLQQPGAELVMPGASVKLSCKASGYTFTNYWMHWVKQRPQGQLEWIGEIDPSDY YANYNQKFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSHYYANSYNYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 47)
F3.133.14VL	EIELTQSPTTMAASPGEKITITCSASSISSDYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGLPARFSGSGTYSYSLTIGTMEAEDEVATYYCQQGSSVPRMLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 48)
F3.148.10VH	EVQLQQSGAELVRPGSSVTMSCKTSGYFTFTNYGINWVKQRPQGQLEWIGYIFIGNDYTEYNEKFKGKATLTSDTSSSTAYMQLSSLTSEDSAIYFCTRFYSNYYGMDPWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 49)
F3.148.10VL	DVVMQTPLTSLVTIGQPASISCKSSQSLHSDGKTYLNWLLQRPQGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEVLGVYYCWQGTTFPPTFGAGTKLEMK (SEQ ID NO: 50)
F4.4.6VH	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPQGQLEWIGAIYPGDGDSRYTQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCARSTTVLGNFEYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 51)
F4.4.6VL	QIVLTQSPA IMSALPGEKVTMTCSASSSVSSMHWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTYSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 52)
F4.15.9VH	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSSWMNWLKQRPQGQLEWIGRIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLTSVDSAVYFCARGITITITIAWFASWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO: 53)
F4.15.9VL	QIVLSQSPTILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHWYQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPPRFSGSGSGTYSYSLTISRVAEDAATYYCQQWSSDPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 54)
F4.18.13VH	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSFWMNWVKQRPGEQLEWIGRIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADDSSTAYMQLSSLTSVDSAVYFCAREVIAAVVTTDFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 55)
F4.18.13VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRTSQDISNYLNWYLQKPDGTVKLLIYYTSGLHSGVPSRFSGSGSGTDYSLTISNLEPEDIATYFCQQGKTLPTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 56)
F4.21.2VH	QVQLKQSGPGLVQPSQSL SITCTVSGFSLSTYG VHWVRQSPGRGLEWLGVWIGGTTDYNAAFISRLTISKDNSRGQVFFKMDSLQANDTAIYYCARKGYK YDGGYYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 57)
F4.21.2VL	DIQMTQSSSYLSVSLGGRVTITCKASDHINNWLAWYQQKPGNAPWLLISGATSLETGVPSRFSGSGSGKDYTLSSSLQTEDVATYYCQQYWSTPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 58)
F4.22.6VH	QVQLQQSGPELVKPGASVKISCKASGYAFSSFWMNWVKQRPQGQLEWIGRIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSSTAYMHLSSLTSVDSAVYFCTRSVITAVVDWYFDVWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 59)
F4.22.6VL	QIVLSQSPAILSASPGEKVTLTCRASSSVNFMHWYQQKPGSSPKPWYATSNLASGAPARFSGSGSGTYSYSLTISRVEAEDAAAYCQQWSSYPIFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 60)
F4.33.12VH	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKGSGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIYPGDGDTNYNGKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARAGFYGSDSSMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 61)
F4.33.12VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNFGISFMNWFQQKPGQPPKLLIYAASNQSGGVPARFSGSGSGTDFSLNIHPMEADDTAMYFCQQSKEVPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 62)

F4.35.5VH	EIQLQQSGPELVKPGASVKVSCASGYAFTSYNMYWVKQSHGKSLEWIGYIDPYNGDTRYNQ KFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCTRSGTGRDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 63)
F4.35.5VL	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSISYMFWFQKPGSSPRLLIYDTSSLASGVPVRFSGSGS GTSYTLTISRMEAEDAATYYCQQWSNYPYTFGGGTKLEMK (SEQ ID NO: 64)
F4.37.6VH	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSFWMQWLKQRPQGQLEWIGTIYPGDGDTRYTQ KFKGKATLTADKSSNTAYMQLSSLASEDSAVYYCARGALSNYGGFAYWGQGTTLTVSA (SEQ ID NO: 65)
F4.37.6VL	NIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGHSMHWYQKPGQPPKLLIYLASNLESGVPAR FSGSGSRTDFLTIDPVEADDAATYYCQQNNEPWTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 66)
F4.41.1VH	QVQLQQSGAELVRPGTSVKVSCASGYAFTNYLIEWVKQRPQGQLEWIGVINPGSGDTLYNEK FKGKATLTADKSSSTAYMQLSGLTSDVSAIYFCARSPITTIVADYFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 67)
F4.41.1VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYLNWYQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSRFGSGS GSGADYSLTISNLEQEDIATYFCQQGKTLPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 68)
F4.48.12VH	QMQLKESGPGLVAPSQSLSITCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKLEWLVWVWGSSTFYNSALT SRLSISKDNSKSQVFLKMNSLQTADTAMYFCAKHHYYGGSFAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 69)
F4.48.12VL	DIQMTQASSSLASLGDRVTISCKTSQDISNYLNWYQKPDGTFKLLIHYTSRLHSGVPSRFGSGS GSGSDYSLTISNLEREDIATYFCQQGNSLPTFGGGTKLEMK (SEQ ID NO: 70)
F4.49.11VH	DVQLRASGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEWVWGCISYDGTNNYNPS LKNRISFTRDTSKNQFFLNLSVTTEDSATYYCARRVYYRYDGVVDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 71)
F4.49.11VL	ENVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYIHWYQKKSSTAPKLWIYDTSKLASGVPGRFGSGS RSRNSYSLTISSMEAEDVATYYCFQGGSYPLTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 72)
F4.58.6VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPQGQLEWIGEIDPDSYSNYNQ KFKGKATLTVDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSNYGSSYGYFDVWGAGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 73)
F4.58.6VL	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSVSSSLSYMHWYQKPGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFGSGS GSGTSYSLTISSMEAEDAATYYCHQRSSYPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 74)
F4.78.1VH	QVQIQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTNYWMQWIKQRPQGQLEWIGAIYPGDGDTRYTQ KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLASEDSAVYYCAREEVWSPYGM DYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 75)
F4.78.1VL	QIVLTQSPAIMASASPGEKVTITCSASSSVSYMGWFQKPGTSPKLWIYSTSNLASGVPARFGSGS SGTSYSLTISRMEAEDAATYYCQQRSIYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 76)
F4.82.11VH	QVTLKESGPGILQASQTLSLTCSFSGFSLSTFGIGVGVWRQPSGKLEWLAHIWVNDKFFNTT LKNRLLSKDPSNNQVFLKIASVDTADTATYYCARSRSALITGLYAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 77)
F4.82.11VL	DIQMTQTPSSLSASLGDRVTISCRSSQDISNYVNWYQKPDGTVKVLINYSRLHSGVPSRFGSGS GSGTDYSLTISNLEQEDIASYFCQQGFTLPTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 78)
F4.96.6VH	EIQLQQSGPELVKPGASVKVSCASGYAFSAIYNIYWVKQSHGKSLEWIGYIDPYNSGTTYNQK FRGKATLTVDKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVYYCTRGDAMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 79)
F4.96.6VL	EILLTQSPAIIAASPGEKVTITCSASSGVIYMNWYQKPGSSPKIWIYDVSTLASGVPARFGSGSGS GTSFSFTINSMEAEDVATYYCQQRSSYPYTFGGGTKLEIK (SEQ ID NO: 80)
F4.107.12VH	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYVLHWVVRQKPGQGLEWIGYFNPNYNDGTEYNE KFKGKAILTSDKSSSTAYMELNSLTSEDSAVYYCVGGTYYYGSSYPFAYWGQGTTLTVTVST (SEQ ID NO: 81)



F4.107.12VL	DVVMTQISLSLPVSLGDQASISCRSSQSLIHSNGNTYLQWYLQKPGQSPKLLIYK VSNRLSGVP DRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLG VYFCSQSTHVPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 82)
F4.125.12VH	EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYTMSWVRQTPEKRLEWVAFISSGGGHINYPDTV KGRFTISRDNANTLYLQMSLKS EDTAMY CARHSY WFFD VWGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 83)
F4.125.12VL	DVQITQSPSYLAASPGETITINCRASKNIDTYLAWYQEKPGKTNKLLIYSGSTLQSGIPSRFRGGG SGTDFLTICSLPEPDFAMYYCQQHNEYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 84)
F4.145.9VH	EVQLVESGGGLVKPGGSLKLSCAAAGFAFSSYDMSWVRQIPEKRLEWVAYISAGGGNTYFLDT VKGRFTISRDHAKNTLSLQMSLKS EDTAMYFCVRHGDY YRYFYAMDYWGQGS SVTVSS (SEQ ID NO: 85)
F4.145.9VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVSITCKASQDVGTAVAWSQQKPGQSPKLLIYWASTRHTGVPDRFT GSGSGTDFLTISNVQSEDLADYFCQQFVTYPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 86)
F4.152.7VH	QVQLQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIG EIDPSD SYTNYNQ KFKGKATLTADKSSSTAYMQLSGLTSEDSAVYHCARGGDYDGY YVMDYWGQGS SVTVSS (SEQ ID NO: 87)
F4.152.7VL	EIVLTQSPPTMAASPGEKITITCSASSISSNYLHWYQQKPGFSPKLLIYRTSNLASGV PARFSGSG SGTSYSLTIGTMEADDVATYYCQQGSYIPRIFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 88)
F4.180.1VH	EVQLQQAPELVKPGASVKMSCKTSGYFTENIIHWVKQTHGKSLEWIGINPDNGGTSYHQK KGRFTLTIDKSSSTAYMELRSLTSDDSAVFFCARQAPLYWYFDI WGAGTTVTVSS (SEQ ID NO: 89)
F4.180.1VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASEVDSYGNLSMHWFQQKPGQPRLLIYRASNLESGIPARF SSGSGRDTFTLTITPVEADDVATYYCQQSNEDPWF TFGGKLEIK (SEQ ID NO: 90)
F4.191.1VH	QVQLQPGAELVRPGASVKLSCKASGYTFTSYWINWVKQRPGQGLEWIGNIHPSDSYTNYNQ KFKDKATLTVDKSSSTAYMQFSSPTSEDSAVYYCTREDDY YGSNYDAMDYWGQGS SVTVSS (SEQ ID NO: 91)
F4.191.1VL	DIVMTQSHKFMSTSVGDRVNITCKASQDVGSSVAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRHAGVPDRFT GSGSGADFTLTISNVQSEDLADYFCQQYSTYPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 92)
F4.272.13VH	QVQLKESGPGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTDYGVSWIRQPPGKLEWLGVIWGSETTFYNSALKS RLSISKDNSKSQLFLQMNSLQADDTAIYYCAKHHYYGGSF SMDYWGQGS SVTVSS (SEQ ID NO: 93)
F4.272.13VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDINNYL NWYQQKPDGTVKFLIYYTSRLHSGVPSRFSG SSGT DYSLTISDLEQEDIATYFCQQGNTLPYTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 94)
F4.276.12VH	EIQLQQSGPELVKPGASVKV SCKASGYAFSAYNMYWVKQSHGKSLEWIGYIDPYNGGTNYNQ KFKGKATLTVDKSSSTAYMHLNSLTSEDSAVYYCARDGYEVTYWGQGLVTVSA (SEQ ID NO: 95)
F4.276.12VL	QIVLTQSPALMSASLGEEITLCSASSSVTYMHWSQQKSGTSPRLLIYSTSNLASGVPSRFSGSGS GTFYSLTISSVEAEDAADY YCHQWSSYPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 96)
F5.2.9VH	QVTLKESGPGILQPSQTL SLTCSFSGFSLSTFGLGVGWVRQPSGKLEWLAHIWDDDKY YNP ALKSRVTVSKETSKNQVFFKIANVDTADSATYYCARLSRGLRRDVVYAMDHWGQGS SVTVSS (SEQ ID NO: 97)
F5.2.9VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDISNYL NWYQQKPDGSKLLISYVSR LQSGVPSRFRGS GSGT DYSLTISNLDQEDIATYFCQQGIAFPYTFGGGKLDIK (SEQ ID NO: 98)
F5.3.6VH	DVQLQESGPGLVKPSQSQSLTCSVTGYSITSGYYWNWIRQFPGNKLEW MGYISYDGSNNYNPS LKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTEDT VTY YCARAPLTGDRYWFYD VWGTGTTVTVSS (SEQ ID NO: 99)
F5.3.6VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASQSVSTSSYSYMHWYQQKPGQTPKLLIKYASNLKSGV PARFSGSGGTDFLTNIHPVEEEDTATYYCQHSWEIPPTFGGKLEIK (SEQ ID NO: 100)

F5.7.1VH	QVTLKESGPGILQPSQTL SLTCSFSGFSLTTFGMGVGWIRQPSGKGLEWLTHIWWDDDKYYNPA LK SRLTISKDTSKNQVFLRIANVDTADTATYYCARVITGVPYFDYWGGTTLTVSS (SEQ ID NO: 101)
F5.7.1VL	ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSSVSSSYLYWYQKSGASPCLWISSTSNLASGVPARFS GSGSGTSYSLTINSVEAEDAATYYCQQYSGYPWTFGGGKLEIK (SEQ ID NO: 102)
F5.8.6VH	QVQLHQPGAELVMPGASVTL SCKASGYTFTSYWMHWVKQRPGQGLEWIGEIDPSDSYTTYDQ KFKGKATLTVDKFSSTAYMQFSSLTSEDSAVYYCARLTGNHLDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 103)
F5.8.6VL	DIVMTQSHKFMSSSVGDRVSITCKASQDVSPAVAWYQKPGQSPKLLIYSTSYRNTGVPDRFTG SGSGTDFTFITSSVQAEDLAVYYCQQHYIPLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 104)
F5.10.6VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTDYISITSGYYWTWIRQFPGNKLEWMGYISYDGTNYNPSL KNRFSITRDTSKNQFFLKLNSVIIEDTATYYCARDRMSTTWYFDVWGTGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 105)
F5.10.6VL	DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGISFMHWYQKPGQPPKLLIYRASKTESGIPARF SGSGSRDFTLTINPVEITDDVATYYCQQSNKYPRTFGGGKVEIK (SEQ ID NO: 106)
F5.11.2VH	EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTSSYGMWVRQTPDKRLEWVATISHGGSYTHYPDS VKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLKSEDTAMYYCVRLPITVEAPYFFDYWGQGTTLTVSS (SEQ ID NO: 107)
F5.11.2VL	DIQMTQTTSSLSASLGDRVTISCRASQDIRNYLNWYQKPDGTVKLLIYYSILHSGVPSRFSGS GSGTDYSLTINNLEQEDVATYFCQQGNTLYTFGGGTEVELR (SEQ ID NO: 108)
F6.2.9VH	QVQLQQSGAELVKPGASVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPGKGLEWIGQIYPGDGTNYN GKFKGKATLTADKSSSTGYMQLSSLTSEDSAVYFCARSRITSVVDWYFDVWGTGTTTVTVSS (SEQ ID NO: 109)
F6.2.9VL	QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYMHYQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGS GSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWSSNPPTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 110)
F6.5.20VH	QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSYWMQWVKQRPGQGLEWIGEIDPSDSYTNYNQ KFKGKASLTVDTSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARWGLLRNYYVMDYWGQGTSTVTVSS (SEQ ID NO: 111)
F6.5.20VL	EIVLTQSPPTMAASPGEKITITCSASSISSNYLHWYQKPGFSPKLLIYRTSNLASGVPARFSGS SGTSYSLTIGTMEAEDVATYYCQQGSSIPRMLTFGAGTKLELK (SEQ ID NO: 112)
F6.12.12VH	DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVTGYISITSGYYWIWIRQFPGNKLEWMGYISYDASNKYKPSL KNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTAEDTATYFCAREDLRGYFDVWGTGTSVTVSS (SEQ ID NO: 113)
F6.12.12VL	DIVLTQSPASLAVSLGRRATISCRASQSVSTSGFSYMHYQKPGQPPNLLIKYASILQSGVPARF SGSGSGTDFILNIHPVEDVDTATYYCQHSWGIPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 114)

采用 Kabat 编号规则分析前述 53 个克隆重链可变区和轻链可变区的 CDR ([http://www.abysis.org/abysis/sequence\\_input/key\\_annotation/key\\_annotation.cgi](http://www.abysis.org/abysis/sequence_input/key_annotation/key_annotation.cgi)), 具体结果详见表 8。

表 8 抗体重链/轻链可变区 CDR

抗体名称	CDR1	CDR2	CDR3
F1mab003VH	DYVMH (SEQ ID NO:115)	YFNPYNDGTNYNEKFKV (SEQ ID NO: 116)	GVYYYGRDFDY (SEQ ID NO: 117)
F1mab003VL	RSSQSLENSNGNSYLN (SEQ ID NO: 118)	RVSNRFS (SEQ ID NO: 119)	LQITHVPWT (SEQ ID NO: 120)
F2.15.26VH	DYGVS (SEQ ID NO: 121)	VIWGS GDTYYNSVLES (SEQ ID NO: 122)	HSYYGGSFAMDY (SEQ ID NO: 123)
F2.15.26VL	RASQDISNYLN	YTSRLHS	QQGKTL PWT

抗体名称	CDR1	CDR2	CDR3
	(SEQ ID NO: 124)	(SEQ ID NO: 125)	(SEQ ID NO: 126)
F3.3.10VH	SGYYWN (SEQ ID NO: 127)	HISYDGNNNYNPSLKN (SEQ ID NO: 128)	ENYSNYYFDY (SEQ ID NO: 129)
F3.3.10VL	RASQSVSKSSYTYIH (SEQ ID NO: 130)	YASILQS (SEQ ID NO: 131)	QHSWEIPYT (SEQ ID NO: 132)
F3.5.1VH	GSWMN (SEQ ID NO: 133)	RIYPGDGDYTYNGKFKD (SEQ ID NO: 134)	LRYRYVMDY (SEQ ID NO: 135)
F3.5.1VL	RASESVSIHGSHLMH (SEQ ID NO: 136)	AASNLES (SEQ ID NO: 137)	QQGIKDPYT (SEQ ID NO: 138)
F3.13.2VH	SGYYWN (SEQ ID NO: 139)	YISYDGSNNYNPSLKN (SEQ ID NO: 140)	RKLTGGPYFDY (SEQ ID NO: 141)
F3.13.2VL	RASESVSFHGFHIMH (SEQ ID NO: 142)	AASHLVS (SEQ ID NO: 143)	QQSVDPWT (SEQ ID NO: 144)
F3.23.10VH	DYNMN (SEQ ID NO: 145)	IINPNFGSTSYNQKFKG (SEQ ID NO: 146)	SEYYGSSGFAY (SEQ ID NO: 147)
F3.23.10VL	RSSQSLVNSYGNTYLS (SEQ ID NO: 148)	GISNRFS (SEQ ID NO: 149)	LQGTHQPWT (SEQ ID NO: 150)
F3.40.14VH	GSWMN (SEQ ID NO: 151)	RIYPGDGDYTYSGKFKD (SEQ ID NO: 152)	LRSRYVMDY (SEQ ID NO: 153)
F3.40.14VL	RASESVSIHGTHLMH (SEQ ID NO: 154)	AASNLES (SEQ ID NO: 155)	QQGIDDPYT (SEQ ID NO: 156)
F3.64.4VH	DYHIN (SEQ ID NO: 157)	DINPNNGGTTYNQKFKD (SEQ ID NO: 158)	FITTVVAWYFDV (SEQ ID NO: 159)
F3.64.4VL	RASENIYSNLA (SEQ ID NO: 160)	AATNLAD (SEQ ID NO: 161)	QRFWDTPRT (SEQ ID NO: 162)
F3.74.4VH	DYEMH (SEQ ID NO: 163)	GIAPETGLTTYNQKFED (SEQ ID NO: 164)	NNYGL (SEQ ID NO: 165)
F3.74.4VL	KSSQSLLDSDGKTYLN (SEQ ID NO: 166)	LVSKLDS (SEQ ID NO: 167)	WQGTHFPWT (SEQ ID NO: 168)
F3.77.6VH	DYNMN (SEQ ID NO: 169)	TINPNYITSYNQKFKG (SEQ ID NO: 170)	DYKGY (SEQ ID NO: 171)
F3.77.6VL	KSSQNLDSGKTYLN (SEQ ID NO: 172)	LVSKLDS (SEQ ID NO: 173)	WQGTHFPWT (SEQ ID NO: 174)
F3.81.2VH	NYWMH (SEQ ID NO: 175)	EIDPSDSYTDYNQNFKA (SEQ ID NO: 176)	LMGRYFDV (SEQ ID NO: 177)
F3.81.2VL	KASQDVSAAVA (SEQ ID NO: 178)	SASYRYT (SEQ ID NO: 179)	QQHYSTPLT (SEQ ID NO: 180)
F3.83.9VH	SGYYWN (SEQ ID NO: 181)	YISYDGGNNYNPSLKN (SEQ ID NO: 182)	EDYSNWWYFDV (SEQ ID NO: 183)
F3.83.9VL	RASQSVSKSSYSYMH (SEQ ID NO: 184)	YASILKS (SEQ ID NO: 185)	QHSWEIPWT (SEQ ID NO: 186)
F3.109.1VH	SYGIN (SEQ ID NO: 187)	YIYIGNDYTEFNEKFKG (SEQ ID NO: 188)	FYSNSDPMDY (SEQ ID NO: 189)
F3.109.1VL	KSSQSLNDSGKTFLN (SEQ ID NO: 190)	LVSKLDS (SEQ ID NO: 191)	WQGTHFPLT (SEQ ID NO: 192)
F3.113.16VH	NYWMQ (SEQ ID NO: 193)	EIDPSDSYINYNQKFKG (SEQ ID NO: 194)	PVTVPWYFDV (SEQ ID NO: 195)

抗体名称	CDR1	CDR2	CDR3
F3.113.16VL	SATSSISSNYLH (SEQ ID NO: 196)	RTSNLAS (SEQ ID NO: 197)	QQGSAIPRIFT (SEQ ID NO: 198)
F3.114.12VH	SGYDWN (SEQ ID NO: 199)	YISYDGNKNNYNPSLRN (SEQ ID NO: 200)	RDLRGYFDV (SEQ ID NO: 201)
F3.114.12VL	RASQISISNYLH (SEQ ID NO: 202)	YASLSIS (SEQ ID NO: 203)	QQSNSWPLT (SEQ ID NO: 204)
F3.118.14VH	DYEIH (SEQ ID NO: 205)	AIDPETGGIGYNQKFTG (SEQ ID NO: 206)	NYGSR (SEQ ID NO: 207)
F3.118.14VL	KSSQSLLES DGKTYLN (SEQ ID NO: 208)	LVSKLDS (SEQ ID NO: 209)	WQGTHFPWT (SEQ ID NO: 210)
F3.121.4VH	NYWMH (SEQ ID NO: 211)	EIDPSDNYANYNQEFQG (SEQ ID NO: 212)	HDGYFGALDY (SEQ ID NO: 213)
F3.121.4VL	SASSSISNYLH (SEQ ID NO: 214)	RTSNLAS (SEQ ID NO: 215)	QQASSIPRMFT (SEQ ID NO: 216)
F3.124.7VH	DYYMN (SEQ ID NO: 217)	ISNPYNGGTSYNQKFKD (SEQ ID NO: 218)	EGGTAQPTSGMDY (SEQ ID NO: 219)
F3.124.7VL	KSSQSVLYSSNQKNYLA (SEQ ID NO: 220)	WASTRES (SEQ ID NO: 221)	HQYRSSYT (SEQ ID NO: 222)
F3.126.15VH	SYWMH (SEQ ID NO: 223)	EIDPSDSYTTYNQNFKG (SEQ ID NO: 224)	LTGNYIHY (SEQ ID NO: 225)
F3.126.15VL	KASQDVSPA (SEQ ID NO: 226)	SSSYRST (SEQ ID NO: 227)	QQHYSLPLT (SEQ ID NO: 228)
F3.133.14VH	NYWMH (SEQ ID NO: 229)	EIDPSDYANYNQKFKG (SEQ ID NO: 230)	SHYYANSYNY (SEQ ID NO: 231)
F3.133.14VL	SASSSISDYLH (SEQ ID NO: 232)	RTSNLAS (SEQ ID NO: 233)	QQGSSVPRMLT (SEQ ID NO: 234)
F3.148.10VH	NYGIN (SEQ ID NO: 235)	YIFIGNDYTEYNEKFKG (SEQ ID NO: 236)	FYSNYYGMDP (SEQ ID NO: 237)
F3.148.10VL	KSSQSLHSDGKTYLN (SEQ ID NO: 238)	LVSKLDS (SEQ ID NO: 239)	WQGTHFPPT (SEQ ID NO: 240)
F4.4.6VH	SYWMQ (SEQ ID NO: 241)	AIYPGDGDSRYTQKFKG (SEQ ID NO: 242)	STTTVLGNNFEY (SEQ ID NO: 243)
F4.4.6VL	SASSSVSSMH (SEQ ID NO: 244)	DTSKLAS (SEQ ID NO: 245)	QQWSSNPWT (SEQ ID NO: 246)
F4.15.9VH	SSWMN (SEQ ID NO: 247)	RIYPGDGDNTYNGKFKG (SEQ ID NO: 248)	GITTIITIAWFAS (SEQ ID NO: 249)
F4.15.9VL	RASSSVSYM (SEQ ID NO: 250)	ATSNLAS (SEQ ID NO: 251)	QQWSSDPWT (SEQ ID NO: 252)
F4.18.13VH	SFWMN (SEQ ID NO: 253)	RIYPGDGDNTYNGKFKG (SEQ ID NO: 254)	EVIAAVVTTDFDY (SEQ ID NO: 255)
F4.18.13VL	RTSQDISNYLN (SEQ ID NO: 256)	YTSGLHS (SEQ ID NO: 257)	QQGKTLPYT (SEQ ID NO: 258)
F4.21.2VH	TYGVH (SEQ ID NO: 259)	VIWIGGTTDYNAAFIS (SEQ ID NO: 260)	KGYYKYDGGYYYAMDY (SEQ ID NO: 261)
F4.21.2VL	KASDHINWLA (SEQ ID NO: 262)	GATSLET (SEQ ID NO: 263)	QQYWSTPLT (SEQ ID NO: 264)
F4.22.6VH	SFWMN	RIYPGDGDNTYNGKFKG	SVITAVVDWYFDV

抗体名称	CDR1	CDR2	CDR3
	(SEQ ID NO: 265)	(SEQ ID NO: 266)	(SEQ ID NO: 267)
F4.22.6VL	RASSSVNFMH (SEQ ID NO: 268)	ATSNLAS (SEQ ID NO: 269)	QQWSSYPIFT (SEQ ID NO: 270)
F4.33.12VH	SYWMN (SEQ ID NO: 271)	QIYPGDGDTNYNGKFKG (SEQ ID NO: 272)	AGFYYGSDSSMDY (SEQ ID NO: 273)
F4.33.12VL	RASESVDNFGISFMN (SEQ ID NO: 274)	AASNQGS (SEQ ID NO: 275)	QQSKEVPYT (SEQ ID NO: 276)
F4.35.5VH	SYNMY (SEQ ID NO: 277)	YIDPYNGDTRYNQKFKG (SEQ ID NO: 278)	SGTGRDY (SEQ ID NO: 279)
F4.35.5VL	SASSSISYMF (SEQ ID NO: 280)	DTSSLAS (SEQ ID NO: 281)	QQWSNYPYT (SEQ ID NO: 282)
F4.37.6VH	SFWMQ (SEQ ID NO: 283)	TIYPGDGDTRYTQKFKG (SEQ ID NO: 284)	GALSNYGGFAY (SEQ ID NO: 285)
F4.37.6VL	RASESVDSYGHFSFMH (SEQ ID NO: 286)	LASNLES (SEQ ID NO: 287)	QQNNEPWT (SEQ ID NO: 288)
F4.41.1VH	NYLIE (SEQ ID NO: 289)	VINPGSGDTLYNEKFKG (SEQ ID NO: 290)	SPPITTIVADYFDY (SEQ ID NO: 291)
F4.41.1VL	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 292)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 293)	QQGKTLPYT (SEQ ID NO: 294)
F4.48.12VH	DYGVS (SEQ ID NO: 295)	VIWGSSTFYNSALTS (SEQ ID NO: 296)	HHYYGGSFAMDY (SEQ ID NO: 297)
F4.48.12VL	KTSQDISNYLN (SEQ ID NO: 298)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 299)	QQGNSLPYT (SEQ ID NO: 300)
F4.49.11VH	SGYYWN (SEQ ID NO: 301)	CISYDGTNNYNPSLKN (SEQ ID NO: 302)	RVYYRYDGVVDY (SEQ ID NO: 303)
F4.49.11VL	SASSSVSYIH (SEQ ID NO: 304)	DTSKLAS (SEQ ID NO: 305)	FQGSYPLT (SEQ ID NO: 306)
F4.58.6VH	SYWMH (SEQ ID NO: 307)	EIDPDSYSYNYNQKFKG (SEQ ID NO: 308)	SNYGSYGYFDV (SEQ ID NO: 309)
F4.58.6VL	SVSSLSYMH (SEQ ID NO: 310)	DTSKLAS (SEQ ID NO: 311)	HQRSSYPT (SEQ ID NO: 312)
F4.78.1VH	NYWMQ (SEQ ID NO: 313)	AIYPGDGDTRYTQKFKG (SEQ ID NO: 314)	EEVWSPYGM DY (SEQ ID NO: 315)
F4.78.1VL	SASSSVSYMG (SEQ ID NO: 316)	STSNLAS (SEQ ID NO: 317)	QQRSIYPLT (SEQ ID NO: 318)
F4.82.11VH	TFGIGVG (SEQ ID NO: 319)	HIWWNDNKFFNTLKN (SEQ ID NO: 320)	SRSALITTGLYAMDY (SEQ ID NO: 321)
F4.82.11VL	RSSQDISNYVN (SEQ ID NO: 322)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 323)	QQGFTLPYT (SEQ ID NO: 324)
F4.96.6VH	AYNIY (SEQ ID NO: 325)	YIDPYNSGTTYNQKFRG (SEQ ID NO: 326)	DGDAMDY (SEQ ID NO: 327)
F4.96.6VL	SASSGVIYMN (SEQ ID NO: 328)	DVSTLAS (SEQ ID NO: 329)	QQRSSYPYT (SEQ ID NO: 330)
F4.107.12VH	SYVLH (SEQ ID NO: 331)	YFNPYNDGTEYNEKFKG (SEQ ID NO: 332)	GTYYYGSSYPFAY (SEQ ID NO: 333)
F4.107.12VL	RSSQSLIHSNGNTYLQ (SEQ ID NO: 334)	KVSNRLS (SEQ ID NO: 335)	SQSTHVPYT (SEQ ID NO: 336)

抗体名称	CDR1	CDR2	CDR3
F4.125.12VH	TYTMS (SEQ ID NO: 337)	FISSGGGHINYPDTVKG (SEQ ID NO: 338)	HSYWFFDV (SEQ ID NO: 339)
F4.125.12VL	RASKNIDTYLA (SEQ ID NO: 340)	SGSTLQS (SEQ ID NO: 341)	QQHNEYPLT (SEQ ID NO: 342)
F4.145.9VH	SYDMS (SEQ ID NO: 343)	YISAGGGNTYFLDVTGK (SEQ ID NO: 344)	HGDYYRYFYAMDY (SEQ ID NO: 345)
F4.145.9VL	KASQDVGTA (SEQ ID NO: 346)	WASTRHT (SEQ ID NO: 347)	QQFVTPYT (SEQ ID NO: 348)
F4.152.7VH	SYWMH (SEQ ID NO: 349)	EIDPSDSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 350)	GGDYDGYVMDY (SEQ ID NO: 351)
F4.152.7VL	SASSISSNYLH (SEQ ID NO: 352)	RTSNLAS (SEQ ID NO: 353)	QQGSYIPRIFT (SEQ ID NO: 354)
F4.180.1VH	ENIIH (SEQ ID NO: 355)	GINPDNGGTSYHQKFKG (SEQ ID NO: 356)	QAPLYWYFDI (SEQ ID NO: 357)
F4.180.1VL	RASEVDSYGNLSMH (SEQ ID NO: 358)	RASNLES (SEQ ID NO: 359)	QQSNEDPWT (SEQ ID NO: 360)
F4.191.1VH	SYWIN (SEQ ID NO: 361)	NIHPSDSYTNYNQKFKD (SEQ ID NO: 362)	EDYYYGSNYDAMDY (SEQ ID NO: 363)
F4.191.1VL	KASQDVGSSVA (SEQ ID NO: 364)	WASTRHA (SEQ ID NO: 365)	QQYSTYPLT (SEQ ID NO: 366)
F4.272.13VH	DYGVS (SEQ ID NO: 367)	VIWGSETTFYNSALKS (SEQ ID NO: 368)	HHYYGGSFSDY (SEQ ID NO: 369)
F4.272.13VL	RASQDINNYLN (SEQ ID NO: 370)	YTSRLHS (SEQ ID NO: 371)	QQGNTLPYT (SEQ ID NO: 372)
F4.276.12VH	AYNMY (SEQ ID NO: 373)	YIDPYNGGTYNPNQKFKG (SEQ ID NO: 374)	DGYEVTY (SEQ ID NO: 375)
F4.276.12VL	SASSSVTYMH (SEQ ID NO: 376)	STSNLAS (SEQ ID NO: 377)	HQWSSYPWT (SEQ ID NO: 378)
F5.2.9VH	TFGLGVG (SEQ ID NO: 379)	HIWWDDDKYYNPALKS (SEQ ID NO: 380)	LSRGLRRDVVYAMDH (SEQ ID NO: 381)
F5.2.9VL	RASQDISNYLN (SEQ ID NO: 382)	YVSRLQS (SEQ ID NO: 383)	QQGIAFPYT (SEQ ID NO: 384)
F5.3.6VH	SGYYWN (SEQ ID NO: 385)	YISYDGSNNYNPNSLKN (SEQ ID NO: 386)	APLTGDRYWFYFDV (SEQ ID NO: 387)
F5.3.6VL	RASQSVSTSSYSYMH (SEQ ID NO: 388)	YASNLKS (SEQ ID NO: 389)	QHSWEIPT (SEQ ID NO: 390)
F5.7.1VH	TFGMGVG (SEQ ID NO: 391)	HIWWDDDKYYNPALKS (SEQ ID NO: 392)	VITGVPYFDY (SEQ ID NO: 393)
F5.7.1VL	RASSVSSSYLY (SEQ ID NO: 394)	STSNLAS (SEQ ID NO: 395)	QQYSGYPWT (SEQ ID NO: 396)
F5.8.6VH	SYWMH (SEQ ID NO: 397)	EIDPSDSYTTYDQKFKG (SEQ ID NO: 398)	LTGNHLDY (SEQ ID NO: 399)
F5.8.6VL	KASQDVSPA (SEQ ID NO: 400)	STSYRNT (SEQ ID NO: 401)	QQHYSIPT (SEQ ID NO: 402)
F5.10.6VH	SGYYWT (SEQ ID NO: 403)	YISYDGSNTYNPNPNSLKN (SEQ ID NO: 404)	DRMSTTWYFDV (SEQ ID NO: 405)
F5.10.6VL	RASEVDNYGISFMH	RASKTES	QQSNKYPT

抗体名称	CDR1	CDR2	CDR3
	(SEQ ID NO: 406)	(SEQ ID NO: 407)	(SEQ ID NO: 408)
F5.11.2VH	SYGMS (SEQ ID NO: 409)	TISHGGSYTHYPDSVKG (SEQ ID NO: 410)	LPITTV EAPYFFDY (SEQ ID NO: 411)
F5.11.2VL	RASQDIRNYLN (SEQ ID NO: 412)	YTSILHS (SEQ ID NO: 413)	QQGNTLYT (SEQ ID NO: 414)
F6.2.9VH	SYWMN (SEQ ID NO: 415)	QIYPGDGDTNYNGKFKG (SEQ ID NO: 416)	SRITSVVDWYFDV (SEQ ID NO: 417)
F6.2.9VL	RASSSVSYM H (SEQ ID NO: 418)	ATSNLAS (SEQ ID NO: 419)	QQWSSNPPT (SEQ ID NO: 420)
F6.5.20VH	SYWMQ (SEQ ID NO: 421)	EIDPSDSYTNYNQKFKG (SEQ ID NO: 422)	WGLLRNYVMDY (SEQ ID NO: 423)
F6.5.20VL	SASSSISSNYLH (SEQ ID NO: 424)	RTSNLAS (SEQ ID NO: 425)	QQGSSIPRMLT (SEQ ID NO: 426)
F6.12.12VH	SGYYWI (SEQ ID NO: 427)	YISYDASNKYKPSLKN (SEQ ID NO: 428)	EDLRGYFDV (SEQ ID NO: 429)
F6.12.12VL	RASQSVSTSGFSYMH (SEQ ID NO: 430)	YASILQS (SEQ ID NO: 431)	QHSWGIPFT (SEQ ID NO: 432)

#### 4.2 嵌合抗体的制备

由泰州市百英生物科技有限公司将前述 53 个克隆的重链可变区序列克隆到包含信号肽和人源抗体 IgG1 的重链恒定区的表达载体 pcDNA3.4-B1HH1 (重链恒定区序列 SEQ ID NO: 433)，将轻链为 Kappa 链的克隆的轻链可变区序列克隆到包含信号肽和人源抗体 IgG1 的 Kappa 轻链恒定区的表达载体 pcDNA3.4-B1HLK (轻链恒定区序列 SEQ ID NO: 434)，将轻链为 Lambda 链的轻链可变区克隆到包含信号肽和人源抗体 IgG1 的 Lambda 轻链恒定区的表达载体 pcDNA3.4-BIHL5 (轻链恒定区序列 SEQ ID NO: 435)，获得人鼠嵌合抗体的表达载体并参照实施例 1.2 的方法制备抗体。重、轻链恒定区序列信息如下所示：

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 433)。

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSST LTLKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 434)。

GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNKYYAASSY LSLTPEQWKS HRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS (SEQ ID NO: 435)。

#### 实施例 5 CD19 嵌合抗体的鉴定

##### 5.1 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测嵌合抗体与人 CD19 蛋白的结合

将人 CD19-his 蛋白(购自 ACROBiosystems, 货号: CD9-H52H2)用 PBS 稀释到终浓度 4  $\mu\text{g/mL}$ , 然后以 100 $\mu\text{l}$ /孔加到 96 孔 ELISA 板。用塑料膜封好 4 $^{\circ}\text{C}$  孵育过夜, 第二天用 PBS 洗板 2 次, 加入封闭液[PBS +2% (w/w) BSA]室温封闭 2 小时。倒掉封闭液, 以 50 $\mu\text{l}$ /孔加入 100nM 梯度稀释的 CD19 嵌合抗体或对照抗体。37 $^{\circ}\text{C}$  孵育 2 小时后, 用 PBS 洗板 3 次。加入





表 10. ELISA 检测嵌合抗体与人 CD19 蛋白的结合反应

OD450 抗体名称	抗体浓度 (nM)							
	100	10	1.00	0.10	0.01	0.001	0.0001	空白对照
F1-mab003	1.98	1.72	1.58	1.09	0.28	0.08	0.06	0.06
F2.15.26	1.54	1.40	1.30	0.80	0.18	0.07	0.05	0.06
F3.3.10	0.59	0.42	0.21	0.08	0.05	0.05	0.05	0.05
F3.5.1	2.01	1.75	1.38	0.50	0.11	0.06	0.05	0.05
F3.13.2	0.45	0.29	0.18	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05
F3.23.10	2.14	1.85	1.27	0.39	0.09	0.06	0.05	0.06
F3.40.14	1.19	1.01	0.42	0.11	0.06	0.05	0.05	0.05
F3.64.4	0.83	1.00	1.06	0.55	0.13	0.06	0.05	0.05
F3.74.4	2.96	2.64	2.32	1.02	0.21	0.07	0.05	0.05
F3.77.6	2.94	2.98	2.69	1.33	0.30	0.08	0.05	0.15
F3.81.2	1.40	1.05	0.74	0.24	0.07	0.05	0.05	0.05
F3.83.9	0.94	0.60	0.36	0.11	0.06	0.05	0.05	0.06
F3.109.1	2.98	2.92	2.62	1.18	0.24	0.07	0.05	0.05
F3.113.16	0.38	0.34	0.26	0.11	0.06	0.05	0.05	0.05
F3.114.12	0.61	0.46	0.24	0.08	0.05	0.05	0.05	0.05
F3.118.14	3.21	2.90	2.27	1.02	0.19	0.07	0.05	0.05
F3.121.4	0.82	1.04	0.88	0.50	0.11	0.06	0.05	0.05
F3.124.7	2.75	2.63	2.60	2.08	0.81	0.18	0.08	0.06
F3.126.15	0.70	0.46	0.20	0.07	0.05	0.05	0.05	0.05
F3.133.14	1.62	1.87	1.59	0.58	0.12	0.07	0.05	0.05
F3.148.10	3.01	2.94	2.66	0.98	0.22	0.07	0.05	0.05
FMC63	1.35	1.43	1.33	0.81	0.21	0.08	0.06	0.05
hIgG1	0.08	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.04	0.05

## 5.2 流式细胞实验 (FACS) 检测嵌合抗体与不同 CD19 表达细胞的结合

将所需细胞在 T-75 细胞培养瓶中扩大培养至对数生长期。对于贴壁细胞 CHO-K1 吸除培养基，用 PBS 缓冲液洗涤 2 次，然后用胰酶消化细胞，终止消化后用 PBS 缓冲液洗涤细胞 2 次；对于悬浮细胞 Raji 直接离心弃去培养基上清，细胞沉淀用 PBS 洗涤 2 次。对上一步的细胞进行细胞计数后将细胞沉淀用 [PBS + 2% (w/w) BSA] 封闭液重悬至  $2 \times 10^6$  个细胞/ml，按 50  $\mu$ l/孔加入到 96 孔 FACS 反应板中，按 50  $\mu$ l/孔加入待测样品，冰上孵育 2 小时。用 PBS 缓冲液离心洗涤 3 次，加入 50  $\mu$ l/孔 Alexa Fluor 647 标记的二抗（购自 Jackson Immuno，货号：109-605-088），冰上孵育 1 小时。用 PBS 缓冲液离心洗涤 5 次，用 FACS (FACS Canto<sup>TM</sup>，购自 BD 公司) 检测和分析结果。通过软件 (FlowJo) 进行数据分析，得到细胞的平均荧光强度 (MFI)。再通过软件 (GraphPad Prism8) 分析，进行数据拟合，计算 EC50 值。分析结果如表 11 以及图 6-7 所示，嵌合抗体均可结合 Raji 细胞和 CHO-K1-人 CD19 细胞表面的人 CD19 蛋白。使用同样的方法同时检测了嵌合抗体与内源 CD19 阴性的细胞 MoLT4 细胞（购自 ATCC，CRL-1582）以及 CHO-K1 细胞的结合，结果如图 8A-8B、9A-9B 所示，所有嵌合抗体均不结合 MoLT4 细胞以及 CHO-K1 细胞，具有很好的特异性。

表 11. FACS 检测嵌合抗体与 Raji 和 CHO-K1-人 CD19 细胞的结合反应

抗体名称	Raji	CHO-K1-人 CD19
------	------	---------------

	最大平均荧光强度	Ec50(nM)	最大平均荧光强度	Ec50(nM)
F1-mab003	33119	0.57	66886	0.69
F2.15.26	29188	0.53	60386	0.71
F3.3.10	29731	2.90	48331	1.90
F3.5.1	24846	1.47	49924	2.49
F3.13.2	27124	5.24	43895	2.46
F3.23.10	14876	4.77	50411	3.59
F3.40.14	27003	2.59	49094	6.00
F3.64.4	35797	0.43	63727	0.61
F3.74.4	30072	3.41	3848	4.55
F3.77.6	27416	1.62	4993	3.13
F3.81.2	31265	0.68	59550	1.27
F3.83.9	29681	1.75	52231	1.34
F3.109.1	29926	0.44	3977	0.57
F3.113.16	28820	0.96	34114	0.39
F3.114.12	28655	3.34	50448	2.32
F3.118.14	25898	8.38	3382	18.02
F3.121.4	32899	0.31	53703	0.30
F3.124.7	19120	2.46	47489	1.35
F3.126.15	30253	1.18	56743	2.47
F3.133.14	34425	0.93	63055	0.82
F3.148.10	31796	0.28	4699	0.26
F4.4.6	26023	0.56	14826	0.08
F4.15.9	31255	0.71	20531	0.17
F4.18.13	35189	1.31	51550	0.60
F4.21.2	30806	2.69	52607	1.02
F4.22.6	27259	0.67	14690	0.10
F4.33.12	28242	2.60	52468	1.47
F4.35.5	25022	0.69	50040	1.08
F4.37.6	24606	0.51	8487	~0.035
F4.41.1	23428	1.02	48631	1.49
F4.48.12	29304	0.55	52723	0.48
F4.49.11	20285	6.21	44151	3.10
F4.58.6	26054	1.31	56739	1.09
F4.78.1	36926	1.52	44268	0.51
F4.82.11	16604	0.85	25999	0.32
F4.96.6	25703	0.74	52038	1.16
F4.107.12	26659	0.60	59936	0.77
F4.125.12	27141	0.51	51838	0.48
F4.145.9	19978	0.78	48541	0.84
F4.152.7	26038	0.76	58864	0.78
F4.180.1	23666	0.96	49608	1.24
F4.191.1	32270	1.89	26491	0.34
F4.272.13	27578	0.81	55315	0.77
F4.276.12	23464	0.78	50192	1.05
F5.2.9	17598	2.79	33972	1.02
F5.3.6	22385	3.19	46881	3.62
F5.7.1	28747	1.13	56215	1.54
F5.8.6	27270	1.26	53607	3.50
F5.10.6	22107	1.34	47670	2.60

抗体名称	Raji		CHO-K1-人 CD19	
	最大平均荧光强度	Ec50(nM)	最大平均荧光强度	Ec50(nM)
F5.11.2	16600	23.43	46606	14.67
F6.2.9	21477	0.98	10293	弱结合
F6.5.20	28636	0.17	48296	~0.17
F6.12.12	43284	5.25	63253	0.84
FMC63	33996	0.29	62943	0.49
hIgG1	435	阴性	99	阴性

## 实施例 6 嵌合抗体的种属交叉结合活性检测

### 6.1 ELISA 检测嵌合抗体与不同种属 CD19 蛋白的结合

为检测嵌合抗体的种属交叉活性，将商品化的鼠 CD19（ACROBiosystems，货号：50510-M08H）和猴 CD19（ACROBiosystems，货号：90051-C08H）分别包被 ELISA 板，参照实施例 5.1 的方法进行 ELISA 检测。嵌合抗体与鼠 CD19 蛋白在 ELISA 水平无结合。

嵌合抗体与猴 CD19 的 ELISA 结果如图 10 和表 12 所示，结果表明 F5.11.2、F3.77.6、F3.118.14、F3.124.7、F3.148.10 与猴 CD19 蛋白有结合活性。hIgG1 为阴性对照，NB151-89 为能结合猴 CD19-His 蛋白的阳性血清。

表 12 ELISA 检测嵌合抗体与猴 CD19 蛋白的结合反应

抗体名称	抗体浓度 (nM)							空白对照
	100	10	1.00	0.10	0.01	0.001	0.0001	
F5.11.2	1.16	1.25	0.71	0.12	0.06	0.06	0.06	0.06
F3.77.6	2.49	2.51	2.27	1.48	0.38	0.11	0.07	0.07
F3.118.14	2.75	2.40	2.05	1.11	0.24	0.10	0.07	0.07
F3.124.7	1.93	2.04	1.93	1.44	0.41	0.12	0.08	0.07
F3.148.10	2.47	1.93	0.78	0.13	0.07	0.06	0.06	0.06
NB151-89	1.93	2.15	2.00	1.29	0.52	0.27	0.22	0.07
hIgG1	0.11	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06

### 6.2 FACS 检测嵌合抗体与猴 CD19 表达细胞的结合

将 HEK293T-猴 CD19 细胞参照实施例 5.2 的方法进行 FACS 检测与数据分析。分析结果如表 13-14 以及图 11 所示，除了 F3.23.10, F3.40.14, F3.74.4, F3.109.1, F3.113.16, F3.121.4, F3.148.10, F4.4.6, F4.33.12, F4.35.5, F4.37.6, F4.41.1, F4.58.6, F4.96.6, F4.145.9, F4.152.7, F4.180.1, F4.276.12, F5.7.1 和 F6.5.20 外，其余嵌合抗体与过表达猴 CD19 的 293T 细胞均有结合活性，EC50 显示结合活性最高达到 0.73nM。使用同样的方法同时检测了嵌合抗体与 HEK293T 细胞的结合，结果如图 12A-12B 所示所有嵌合抗体均不结合 HEK293T 细胞。

表 13 FACS 检测 CD19 抗体与 293T-猴 CD19 细胞的结合反应

抗体名称	293T-猴 CD19	
	最大平均荧光强度	Ec50 (nM)
F1-mab003	75050	1.76
F2.15.26	28708	16.68

抗体名称	293T-猴 CD19	
	最大平均荧光强度	Ec50 (nM)
F3.3.10	173329	2.08
F3.5.1	79963	6.11
F3.13.2	66411	2.64
F3.23.10	77	不结合
F3.40.14	281	不结合
F3.64.4	98360	3.99
F3.74.4	121	不结合
F3.77.6	178868	6.45
F3.81.2	152647	3.44
F3.83.9	198489	1.12
F3.109.1	148	不结合
F3.113.16	176	不结合
F3.114.12	210030	1.56
F3.118.14	156008	9.64
F3.121.4	80	不结合
F3.124.7	112207	1.27
F3.126.15	175195	5.57
F3.133.14	138298	2.47
F3.148.10	177	不结合
9G8	85742	3.00
hIgG1	90	阴性

表 14 FACS 检测 CD19 抗体与 293T-猴 CD19 细胞的结合反应

抗体名称	293T-猴 CD19	
	最大平均荧光强度	Ec50 (nM)
F4.4.6	662	不结合
F4.15.9	14750	弱结合
F4.18.13	19701	26.17
F4.21.2	39235	9.10
F4.22.6	7380	~ 129.2
F4.33.12	50	不结合
F4.35.5	70	不结合
F4.37.6	58	不结合
F4.41.1	545	不结合
F4.48.12	14334	183.90
F4.49.11	73507	3.08
F4.58.6	81	不结合
F4.78.1	57041	0.73
F4.82.11	66592	1.18
F4.96.6	73	不结合
F4.107.12	69545	1.24
F4.125.12	4080	弱结合
F4.145.9	108	不结合

抗体名称	293T-猴 CD19	
	最大平均荧光强度	Ec50 (nM)
F4.152.7	58	不结合
F4.180.1	94	不结合
F4.191.1	59560	1.14
F4.272.13	40481	3.86
F5.2.9	81524	2.82
F5.3.6	26083	20.67
F5.7.1	938	不结合
F5.8.6	43844	5.70
F5.10.6	99874	4.98
F5.11.2	80550	13.00
F4.276.12	597	不结合
F6.2.9	2133	85.98
F6.5.20	531	不结合
F6.12.12	99105	0.94
9G8	28850	3.64
hIgG1	90	阴性

### 6.3 FACS 检测嵌合抗体与食蟹猴（拉丁名：*Macaca fascicularis*）外周血 B 细胞的结合

从新鲜食蟹猴外周血（购自上海美迪西生物医药股份有限公司）中按照 *Ficoll-Paque Plus*（购自 GE Healthcare，货号：171440-02）说明书提取猴外周血单核细胞，细胞悬液离心后以含 1%BSA 的 PBS 重悬细胞后计数，同时加入有猴 CD20 交叉结合活性的鼠源抗体 Brilliant Violet 605 anti-human CD20（货号：302334，购自 Biolegend）和待测嵌合抗体（1nM、10nM 和 100nM）。室温孵育 1 小时。清洗细胞三次后加入 APC 标记的二抗 anti-human IgG Fc（货号：409306，购自 Biolegend），避光室温孵育 30 分钟后清洗细胞 5 次，用含 1%BSA 的 PBS 轻轻重悬细胞，用 FACS（FACS Canto™，购自 BD 公司）检测和分析，其中 CD20 作为 B 细胞的标记物，对 CD20 阳性的 B 细胞群进行圈门，分析其中嵌合抗体标记的阳性细胞所占比例，分别计算 100nM、10nM 和 1nM 浓度下的嵌合抗体处理的嵌合抗体阳性细胞群占 B 细胞群的比例，具体结果如表 15 和图 13 所示。由结果可知，F1-mab003，F3.3.10，F3.83.9，F3.114.12，F3.124.7，F3.126.15，F4.49.11，F4.78.1，F4.82.11，F4.107.12，F5.2.9，F5.10.6，F5.11.2 和 F6.12.12 即使在 1nM 低浓度条件下依然与食蟹猴 B 细胞有较高比例的结合，且相比于阳性抗体 9G8 有相当或者更好的结合活性；其它抗体与食蟹猴 CD19 无结合或者相对较弱结合。

表 15. FACS 检测嵌合抗体与食蟹猴 B 细胞的结合反应

抗体名称	抗体浓度		
	100nM	10nM	1nM
	嵌合抗体阳性细胞占 B 细胞的比例 (%)		
F1-mab003	59	32	15
F2.15.26	22	6	2
F3.3.10	99	91	38
F3.5.1	23	15	6
F3.13.2	8	3	1
F3.23.10	12	1	2
F3.40.14	5	1	1

抗体名称 \ 抗体浓度	100nM	10nM	1nM
	嵌合抗体阳性细胞占 B 细胞的比例 (%)		
F3.64.4	9	2	1
F3.74.4	1	1	1
F3.77.6	56	18	4
F3.81.2	38	16	7
F3.83.9	99	97	58
F3.109.1	1	1	1
F3.113.16	6	1	1
F3.114.12	99	90	40
F3.118.14	79	25	6
F3.121.4	2	2	1
F3.124.7	92	65	23
F3.126.15	49	27	16
F3.133.14	7	1	1
F3.148.10	7	1	1
F4.4.6	3	2	2
F4.15.9	10	2	1
F4.18.13	21	8	2
F4.21.2	18	3	2
F4.22.6	12	2	2
F4.33.12	2	1	1
F4.35.5	3	2	1
F4.37.6	6	2	2
F4.41.1	2	2	1
F4.48.12	22	8	1
F4.49.11	98	96	67
F4.58.6	4	2	1
F4.78.1	74	29	21
F4.82.11	99	98	97
F4.96.6	1	2	1
F4.107.12	67	35	20
F4.125.12	7	3	1
F4.145.9	7	3	1
F4.152.7	3	2	2
F4.180.1	9	3	2
F4.191.1	50	15	3
F4.272.13	9	2	1
F4.276.12	2	1	2
F5.2.9	98	98	93
F5.3.6	12	7	2
F5.7.1	20	11	2
F5.8.6	18	13	5
F5.10.6	99	97	61
F5.11.2	76	34	12
F6.2.9	20	5	1
F6.5.20	14	3	3
F6.12.12	97	97	91
9G8	71	14	3
hIgG1	1	1	1

## 实施例 7 CD19 抗体亲和力测定

### 7.1 嵌合抗体与人 CD19-His 蛋白亲和力测定

使用 Protein A 芯片 (GE Healthcare; 29-127-558) 捕获抗人 CD19 抗体。样品和运行缓冲液是 HBS-EP+(10mM HEPES, 150mM NaCl, 3mM EDTA, 0.05% surfactant P20) (GE Healthcare; BR-1006-69)。流经池设置为 25°C。样品块设置为 16°C。两者都用运行缓冲液预处理。在每一个循环中, 首先用 Protein A 芯片捕获待测抗体, 然后注入单一浓度的 CD19 抗原蛋白, 记录抗体和抗原蛋白的结合和解离过程, 最后用 Glycine pH1.5 (GE Healthcare; BR-1003-54) 完成芯片再生。通过注射溶液中不同浓度的重组人 CD19-His 持续 240 秒来测量结合, 其中流速为 30 $\mu$ l/分钟, 从 200nM 起始 (测试的实际浓度见详细结果), 以 1: 1 稀释, 总共 5 个浓度。监测解离相长达 600 秒, 并通过从样品溶液切换到运行缓冲液触发。通过用 10mM 甘氨酸溶液(pH 1.5)以 30 $\mu$ l/分钟的流速洗涤 30 秒, 再生表面。通过减去从山羊抗人 Fc 表面获得的响应来校正本体折射率(Bulk refractive index)差异。也减去空白注射(=双重参照)。为了计算表观 KD 和其他动力学参数, 使用 Langmuir 1: 1 模型。嵌合抗体与人 CD19-His 蛋白的结合速率 ( $k_a$ )、解离速率 ( $k_d$ ) 及结合亲和力 (KD) 如表 16 所示, 其中抗体 FMC63 作为对照。

表 16. SPR(biacore)检测嵌合抗体与人 CD19 的亲和力

抗体名称	$k_a$ (1/Ms)	$k_d$ (1/s)	KD (M)
F1-mab003	4.50E+05	1.11E-04	2.47E-10
F2.15.26	2.73E+05	2.29E-04	8.39E-10
F3.3.10	7.34E+04	6.21E-04	8.47E-09
F3.5.1	1.56E+05	8.47E-05	5.43E-10
F3.13.2	6.47E+04	5.26E-04	8.13E-09
F3.23.10	3.54E+04	1.86E-04	5.24E-09
F3.40.14	8.43E+04	1.43E-04	1.70E-09
F3.64.4	1.91E+05	3.13E-04	1.64E-09
F3.74.4	4.71E+04	8.79E-04	1.87E-08
F3.77.6	8.44E+04	1.69E-04	2.00E-09
F3.81.2	1.35E+05	1.04E-04	7.66E-10
F3.83.9	8.51E+04	3.12E-04	3.67E-09
F3.109.1	1.90E+05	1.08E-03	5.67E-09
F3.113.16	8.48E+04	1.05E-03	1.24E-08
F3.114.12	7.70E+04	4.65E-04	6.03E-09
F3.118.14	5.39E+04	3.26E-04	6.05E-09
F3.121.4	3.27E+05	3.75E-04	1.15E-09
F3.124.7	6.93E+04	1.38E-04	1.99E-09
F3.126.15	6.13E+04	7.99E-04	1.30E-08
F3.133.14	9.08E+04	8.84E-05	9.74E-10
F3.148.10	2.24E+05	1.19E-03	5.32E-09
F4.4.6	2.01E+05	1.90E-03	9.47E-09
F4.15.9	3.48E+05	9.49E-04	2.72E-09
F4.18.13	4.72E+05	1.71E-04	3.62E-10
F4.21.2	1.85E+05	1.67E-04	9.04E-10
F4.22.6	2.48E+05	1.47E-03	5.94E-09
F4.33.12	1.31E+05	4.52E-04	3.45E-09

抗体名称	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
F4.35.5	2.29E+05	3.51E-03	1.53E-08
F4.37.6	3.59E+05	3.27E-03	9.11E-09
F4.41.1	1.79E+05	2.39E-03	1.34E-08
F4.48.12	2.64E+05	1.29E-04	4.87E-10
F4.49.11	7.30E+04	1.28E-03	1.76E-08
F4.58.6	1.43E+05	2.00E-03	1.39E-08
F4.78.1	1.84E+05	1.70E-04	9.26E-10
F4.82.11	3.41E+04	7.74E-04	2.27E-08
F4.96.6	2.47E+05	9.18E-04	3.71E-09
F4.107.12	2.00E+05	2.17E-04	1.09E-09
F4.125.12	2.78E+05	2.04E-04	7.34E-10
F4.145.9	1.61E+05	5.91E-04	3.68E-09
F4.152.7	2.64E+05	8.90E-05	3.37E-10
F4.180.1	2.37E+05	8.52E-05	3.59E-10
F4.191.1	2.05E+05	3.88E-04	1.90E-09
F4.272.13	2.21E+05	6.51E-05	2.94E-10
F4.276.12	2.43E+05	8.10E-04	3.33E-09
F5.2.9	2.57E+04	4.02E-04	1.57E-08
F5.3.6	3.51E+04	1.22E-04	3.49E-09
F5.7.1	1.92E+05	2.25E-04	1.18E-09
F5.8.6	1.81E+05	1.08E-03	5.98E-09
F5.10.6	8.21E+04	1.51E-04	1.84E-09
F5.11.2	3.66E+04	6.15E-05	1.68E-09
F6.2.9	1.52E+05	3.30E-03	2.17E-08
F6.5.20	3.55E+05	1.87E-03	5.28E-09
F6.12.12	1.67E+05	2.45E-04	1.46E-09
FMC63	1.82E+05	3.33E-04	1.83E-09

## 7.2 嵌合抗体与猴 CD19-His 蛋白亲和力测定

参照实施例 7.1 的方法对嵌合抗体抗体与猴 CD19(ACROBiosystems, 货号: 90051-C08H) 蛋白进行亲和力测定, 结果如表 17 所示。

表 17. SPR(biacore)检测嵌合抗体抗体与猴 CD19 的亲和力

抗体名称	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
F3.77.6	1.84E+04	1.40E-07	7.59E-12
F3.118.14	1.67E+04	9.72E-08	5.83E-12
F3.124.7	7.00E+04	5.62E-05	8.03E-10
NB151-89	2.82E+04	6.55E-06	2.33E-10

## 实施例 8 嵌合抗体与抗原结合区域的鉴定

CD19 蛋白胞外有 4 个外显子 (exons), 其中 exon1-3 位于远膜端, exon4 位于近膜端, FMC63 的抗原结合表位是 CD19 蛋白膜外区的近膜端 (exon4)。为了鉴定嵌合抗体的抗原结合表位分布, 参照实施例 5.1 中的 ELISA 方法, 将人 CD19 exon 1-3-His(远膜端)以 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  包被, 如图 14 和表 18 所示, 除 F3.23.10, F3.74.4, F3.77.6, F3.109.1, F3.118.14, F3.124.7, F3.148.10, F5.11.2 以外其余抗体均与人 CD19 exon 1-3-His 没有结合活性, 如实施例 5.1 所示,



除 F3.3.10, F3.13.2, F3.113.16, F6.2.9 与人 CD19-His 为弱结合外, 其余嵌合抗体与人 CD19-His 有很好的结合活性。可以将抗体分为两类: 第一类与人 CD19 exon 1-3-His 不结合, 与人 CD19-His 有结合活性, 结合表位位于非远膜端, 如 F1-mab003; 第二类与人 CD19 exon 1-3-His 有结合活性且与人 CD19-His 有很好的结合活性, 结合表位位于远膜端, 如 F3.23.10。

表 18 ELISA 方法对嵌合抗体进行表位分类

抗体名称	结合区域	
	CD19 exon 1-3	CD19 全长蛋白
F1-mab003	-	+
F2.15.26	-	+
F3.3.10	-	弱结合
F3.5.1	-	+
F3.13.2	-	弱结合
F3.23.10	+	+
F3.40.14	-	+
F3.64.4	-	+
F3.74.4	+	+
F3.77.6	+	+
F3.81.2	-	+
F3.83.9	-	+
F3.109.1	+	+
F3.113.16	-	弱结合
F3.114.12	-	+
F3.118.14	+	+
F3.121.4	-	+
F3.124.7	+	+
F3.126.15	-	+
F3.133.14	-	+
F3.148.10	+	+
F4.4.6	-	+
F4.15.9	-	+
F4.18.13	-	+
F4.21.2	-	+
F4.22.6	-	+
F4.33.12	-	+
F4.35.5	-	+
F4.37.6	-	+
F4.41.1	-	+
F4.48.12	-	+
F4.49.11	-	+
F4.58.6	-	+
F4.78.1	-	+
F4.82.11	-	+
F4.96.6	-	+
F4.107.12	-	+
F4.125.12	-	+
F4.145.9	-	+
F4.152.7	-	+
F4.180.1	-	+

抗体名称	结合区域	
	CD19 exon 1-3	CD19 全长蛋白
F4.191.1	-	+
F4.272.13	-	+
F4.276.12	-	+
F5.2.9	-	+
F5.3.6	-	+
F5.7.1	-	+
F5.8.6	-	+
F5.10.6	-	+
F5.11.2	+	+
F6.2.9	-	弱结合
F6.5.20	-	+
F6.12.12	-	+
FMC63	-	+
NB151-89	+	+
hIgG1	-	-

## 实施例 9 抗人 CD19 嵌合抗体的人源化

### 9.1 嵌合抗体的人源化设计

通过比对 IMGT (<http://imgt.cines.fr>) 人类抗体重轻链可变区种系基因数据库, 分别挑选与鼠源抗体同源性高的重链和轻链可变区种系基因作为模板, 将鼠源抗体的 CDR 分别移植到相应的人源模板中, 形成次序为 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4 的可变区序列。根据需要, 将骨架序列中关键氨基酸回复突变为鼠源抗体对应的氨基酸, 以保证原有的亲和力, 即得到人源化单克隆抗体。其中抗体的 CDR 氨基酸残基由 kabat 编号系统确定并注释。

#### 9.1.1 F3.121.4 的人源化

鼠源抗体 F3.121.4 的人源化轻链模板为 IGKV6-21\*01/IGKV3-11\*01 和 IGKJ2\*01, 人源化重链模板为 IGHV1-3\*01 和 IGHJ6\*01, 将鼠源抗体 F3.121.4 的 CDR 分别移植到其人源模板中, 即获得对应的人源化版本。根据需要, 将 F3.121.4 的人源化抗体的 FR 区序列中关键氨基酸进行回复突变为鼠源抗体对应的氨基酸, 以保证原有的亲和力, 如抗体存在易发生化学修饰的位点, 对这些位点进行突变以消除修饰风险。具体回复突变设计见表 19。

表 19 F3.121.4 的人源化抗体回复突变设计

VL		VH	
L1	Graft(IGKV3-11*01) + L46F	H1	Graft(IGHV1-3*01) + R71V,T73K
L2	Graft(IGKV6-21*01)	H2	Graft(IGHV1-3*01) + R44G,R71V,T73K
L3	Graft(IGKV6-21*01) + L46F,K49Y	H3	Graft(IGHV1-3*01) + A40R,R44G,R71V,T73K
		H4	Graft(IGHV1-3*01) + V5Q,A40R,R44G,R71V,T73K

注: Graft 代表将鼠源抗体 CDR 植入人种系模板 FR 区序列; L46F 表示将 Graft 第 47 位 L 突变成 F, 其它依此类推。回复突变氨基酸的编号为 Kabat 编号。

F3.121.4 人源化抗体可变区具体序列如下所示, 其中, 下划线表示经 Kabat 编号系统确定的 CDR 区, 带字符边框为回复突变:

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSISSNYLHWYQQKPGQAPRFLIYRTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTL  
TISSLEPEDFAVYYCQQASSIPRMFTFGQGTKLEIK (F3.121.4.VL1, SEQ ID NO: 436)。

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSISSNYLHWYQQKPDQSPKLLIKRTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQASSIPRMFTFGQGTKLEIK (F3.121.4.VL2, SEQ ID NO: 437)。

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCSASSSISSNYLHWYQQKPDQSPKFLIYRTSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCQQASSIPRMFTFGQGTKLEIK (F3.121.4.VL3, SEQ ID NO: 438)。

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQRLEWMGEIDPSDNYANYNQEFQGRVTITVDK[SASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARHDGYFGALDYGWGQTTVTVSS (F3.121.4.VH1, SEQ ID NO: 439)。

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQAPGQGLEWMGEIDPSDNYANYNQEFQGRVTITVDK[SASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARHDGYFGALDYGWGQTTVTVSS (F3.121.4.VH2, SEQ ID NO: 440)。

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQRPQG[GLEWMGEIDPSDNYANYNQEFQGRVTITVDK[SASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARHDGYFGALDYGWGQTTVTVSS (F3.121.4.VH3, SEQ ID NO: 441)。

EVQLQ[QSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYWMHWVRQRPQG[GLEWMGEIDPSDNYANYNQEFQGRVTITVDK[SASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARHDGYFGALDYGWGQTTVTVSS (F3.121.4.VH4, SEQ ID NO: 442)。

人源化模板序列如下所示：

EIVLTQSPDFQSVTPKEKVTITCRASQSIGSSSLHWYQQKPDQSPKLLIKYASQSFSGVPSRFSGSGSGTDFTLTINSLEAEDAATYYCHQSSSLP (IGKV6-21\*01, SEQ ID NO: 443)。

EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAITGIPARFSGSGSGTDFTLTISSELEPEDFAVYYCQQRSNWP (IGKV3-11\*01, SEQ ID NO: 444)。

FGQGTKLEIK (IGKJ2\*01, SEQ ID NO: 445)。

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTSYAMHWVRQAPGQRLEWMGWINAGNGNTKYSQKFQGRVTITRDTSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCAR (IGHV1-3\*01, SEQ ID NO: 446)。

WGQTTVTVSS (IGHJ6\*01, SEQ ID NO: 447)。

本公开分别从上述 F3.121.4 的人源化抗体轻链和重链可变区的回复突变设计中，选择不同的轻链和重链序列进行交叉组合，最终获得多种 F3.121.4 人源化抗体，详见表 20。

表 20 F3.121.4 人源化抗体可变区组合

Fv	F3.121.4.VH1	F3.121.4.VH2	F3.121.4.VH3	F3.121.4.VH4
F3.121.4.VL1	F3.121.4-L1H1	F3.121.4-L1H2	F3.121.4-L1H3	F3.121.4-L1H4
F3.121.4.VL2	F3.121.4-L2H1	F3.121.4-L2H2	F3.121.4-L2H3	F3.121.4-L2H4
F3.121.4.VL3	F3.121.4-L3H1	F3.121.4-L3H2	F3.121.4-L3H3	F3.121.4-L3H4

### 9.2 F3.121.4 人源化抗体制备

由泰州市百英生物科技有限公司将 F3.121.4 人源化抗体的重链可变区序列克隆到包含信号肽和鼠源抗体 IgG1 的重链恒定区的表达载体 pcDNA3.4-B1HH1 (重链恒定区序列 SEQ ID NO: 448)，轻链可变区序列克隆到包含信号肽和鼠源抗体 IgG1 的轻链恒定区的表达载体 pcDNA3.4-B1HLK (轻链恒定区序列 SEQ ID NO: 449)，获得 F3.121.4 人源化抗体的表达载体，并按实施例 1.2 所示方法制备人源化抗体。抗体重链、轻链恒定区序列如下所示：

AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTVNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTV

PSSTWPSETVTCNVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLTTITLTPKVTCCVVVDISKD  
DPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTKGRP  
KAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYFVYSKLVNQKS  
NWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK (SEQ ID NO: 448)。

RADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFPKIDINVKWKIDGSRQNGVLNSWTDQDSKDYSSMSS  
TLTLTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC (SEQ ID NO: 449)。

**实施例 10 F3.121.4 人源化抗体的鉴定**

**10.1 酶联免疫吸附实验 (ELISA) 检测人源化抗体与 CD19 蛋白的结合**

参照实施例 5.1 的方法进行 ELISA 检测与数据分析(使用的二抗购自 Jackson Immuno, 货号: 115-035-003)。分析结果如表 21 和图 15 所示, 结果表明 F3.121.4 人源化抗体均能与人 CD19 在 ELISA 水平结合。如无特别说明, 实施例 10-13 在人源化抗体鉴定或检测过程中使用的对照抗体 mIgG1 为针对鸡卵溶菌酶的抗体 anti-hel-mIgG1 (购自百英, 货号: B118301), FMC63 抗体为实施例 1.2 制备的 FMC63-mIgG1, 9G8 为实施例 1.2 制备的 9G8-mIgG1。

表 21 ELISA 检测 F3.121.4 人源化抗体与人 CD19 蛋白的结合反应

抗体名称 \ OD450	抗体浓度 (nM)							空白对照
	100	10	1.00	0.10	0.01	0.001	0.0001	
F3.121.4-L1H1	2.84	2.64	2.73	1.79	0.44	0.16	0.12	0.12
F3.121.4-L1H2	3.00	2.58	2.68	1.70	0.39	0.13	0.10	0.11
F3.121.4-L1H3	3.09	2.49	2.55	1.61	0.42	0.14	0.10	0.11
F3.121.4-L1H4	2.67	2.55	2.51	1.56	0.39	0.13	0.10	0.11
F3.121.4-L2H1	2.57	2.45	2.42	1.52	0.38	0.13	0.10	0.11
F3.121.4-L2H2	2.55	2.41	2.42	1.51	0.37	0.13	0.10	0.11
F3.121.4-L2H3	2.32	2.33	2.47	1.55	0.39	0.14	0.10	0.11
F3.121.4-L2H4	2.34	2.27	2.36	1.53	0.39	0.14	0.10	0.10
F3.121.4-L3H1	2.17	2.37	2.42	1.62	0.39	0.14	0.10	0.11
F3.121.4-L3H2	2.28	2.30	2.36	1.60	0.42	0.14	0.10	0.11
F3.121.4-L3H3	2.19	2.22	2.28	1.65	0.43	0.15	0.10	0.11
F3.121.4-L3H4	2.31	2.26	2.31	1.68	0.51	0.16	0.11	0.12
F3.121.4	0.82	1.04	0.88	0.50	0.11	0.06	0.05	0.05
FMC63	3.19	2.82	2.87	1.72	0.44	0.17	0.13	0.13
mIgG1	0.17	0.10	0.08	0.08	0.08	0.08	0.09	0.10

**10.2 流式细胞实验 (FACS) 检测人源化抗体与不同 CD19 表达细胞的结合**

参照实施例 5.2 的方法进行 FACS 检测与数据分析(使用的二抗购自 Jackson Immuno, 货号: 115-605-003)。分析结果如表 22 和图 16A-16D 所示, 表 22 说明, F3.121.4 人源化抗体均可结合 Raji 细胞和 CHO-K1-人 CD19 细胞 (2C8) 表面的人 CD19 蛋白(表 22, 图 16A、16C)。使用同样的方法同时检测了 F3.121.4 人源化抗体与 CHO-K1 细胞以及内源 CD19 阴性的细胞 MOLT-4 细胞 (购自 ATCC, CRL-1582) 的结合, 结果如图 16B、16D 所示, F3.121.4 人源化抗体均不结合 MoLT4 细胞以及 CHO-K1 细胞, 具有很好的特异性。

表 22 FACS 检测 F3.121.4 人源化抗体与 Raji 和 CHO-K1-人 CD19 细胞的结合反应

抗体名称	Raji		CHO-K1-人 CD19	
	最大平均荧光强度	Ec50 (nM)	最大平均荧光强度	Ec50 (nM)
F3.121.4-L1H1	30482	0.43	51573	1.18
F3.121.4-L1H2	31691	0.43	54215	1.23
F3.121.4-L1H3	31994	0.46	54364	1.10
F3.121.4-L1H4	31574	0.44	54655	1.19
F3.121.4-L2H1	29125	0.38	53162	1.08
F3.121.4-L2H2	30122	0.41	52206	1.14
F3.121.4-L2H3	29557	0.45	52161	1.17
F3.121.4-L2H4	29242	0.37	51985	1.13
F3.121.4-L3H1	32010	0.38	53467	1.13
F3.121.4-L3H2	32206	0.42	52103	1.08
F3.121.4-L3H3	32225	0.45	51804	1.16
F3.121.4-L3H4	32465	0.43	50473	1.05
F3.121.4	32899	0.31	53703	0.30
FMC63	28813	0.78	55117	1.60
mIgG1	651	阴性	82	阴性

### 实施例 11 种属交叉结合活性检测

参照实施例 6.1 的方法进行 ELISA 检测与数据分析。分析结果说明 F3.121.4 人源化抗体与鼠 CD19 蛋白以及猴 CD19 蛋白在 ELISA 水平均无结合。

参照实施例 6.2 的方法进行 FACS 检测与数据分析。分析结果说明 F3.121.4 人源化抗体与 293T-猴 CD19 细胞无结合。

### 实施例 12 F3.121.4 人源化抗体的亲和力测定

参照实施例 7.1 的方法进行 SPR(biacore)检测与数据分析。结果如表 23 所示，F3.121.4 人源化抗体与人 CD19 的亲和力都在 1 E-08M 以上。

表 23. SPR(biacore)检测 F3.121.4 人源化抗体与人 CD19 的亲和力

抗体名称	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
F3.121.4-L1H1	1.21E+05	3.45E-06	2.84E-11
F3.121.4-L1H2	1.18E+05	6.84E-08	5.80E-13
F3.121.4-L1H3	1.23E+05	6.17E-07	5.02E-12
F3.121.4-L1H4	9.11E+04	1.86E-08	2.05E-13
F3.121.4-L2H1	1.30E+05	1.86E-04	1.43E-09
F3.121.4-L2H2	1.34E+05	1.95E-04	1.46E-09
F3.121.4-L2H3	1.37E+05	1.88E-04	1.38E-09
F3.121.4-L2H4	1.22E+05	1.86E-04	1.53E-09
F3.121.4-L3H1	1.30E+05	3.18E-05	2.44E-10
F3.121.4-L3H2	1.13E+05	5.65E-09	4.98E-14
F3.121.4-L3H3	1.18E+05	1.04E-06	8.80E-12
F3.121.4-L3H4	1.12E+05	2.51E-05	2.25E-10
F3.121.4	3.27E+05	3.75E-04	1.15E-09
FMC63	1.82E+05	3.33E-04	1.83E-09

**实施例 13 F3.121.4 人源化抗体与抗原结合区域的鉴定**

为鉴定 F3.121.4 人源化抗体的抗原结合表位分布，参照实施例 5.1 中的 ELISA 方法，将人 CD19 exon 1-3-His（远膜端）以 2  $\mu\text{g}/\text{mL}$  包被，如表 24 所示，F3.121.4 人源化抗体与人 CD19 exon 1-3-His 蛋白均无结合活性。因此可判断 F3.121.4 人源化抗体与嵌合抗体 F3.121.4 均属于非远膜端。

表 24. ELISA 方法检测 F3.121.4 人源化抗体与人 CD19 exon 1-3-His 蛋白

OD450 抗体名称	抗体浓度 (nM)							空白对照
	100	10	1.00	0.10	0.01	0.001	0.0001	
F3.121.4-L1H1	0.11	0.08	0.08	0.07	0.06	0.06	0.07	0.08
F3.121.4-L1H2	0.09	0.06	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.07
F3.121.4-L1H3	0.09	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
F3.121.4-L1H4	0.08	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
F3.121.4-L2H1	0.09	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
F3.121.4-L2H2	0.09	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
F3.121.4-L2H3	0.08	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
F3.121.4-L2H4	0.08	0.05	0.04	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
F3.121.4-L3H1	0.09	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
F3.121.4-L3H2	0.12	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.07
F3.121.4-L3H3	0.08	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.06
F3.121.4-L3H4	0.11	0.07	0.06	0.06	0.06	0.06	0.06	0.07
F3.121.4	0.07	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05	0.05
NB151-89	3.01	2.74	2.54	1.41	0.31	0.11	0.08	0.07
mIgG1	0.11	0.06	0.06	0.06	0.05	0.06	0.06	0.06

## 权利要求书

1. 一种特异性结合人 CD19 的抗体或抗原结合片段，其中，所述抗体或抗原结合片段包含重链可变区和/或轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1-3，所述轻链可变区包含 LCDR1-3，

所述 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 115、121、127、133、139、145、151、157、163、169、175、181、187、193、199、205、211、217、223、229、235、241、247、253、259、265、271、277、283、289、295、301、307、313、319、325、331、337、343、349、355、361、367、373、379、385、391、397、403、409、415、421 或 427 任一项所示序列，或与其相比具有至少 70% 同一性或至多 3 个突变的序列；

所述 HCDR2 包含 SEQ ID NO: 116、122、128、134、140、146、152、158、164、170、176、182、188、194、200、206、212、218、224、230、236、242、248、254、260、266、272、278、284、290、296、302、308、314、320、326、332、338、344、350、356、362、368、374、380、386、392、398、404、410、416、422 或 428 任一项所示序列，或与其相比具有至少 70% 同一性或至多 3 个突变的序列；

所述 HCDR3 包含 SEQ ID NO: 117、123、129、135、141、147、153、159、165、171、177、183、189、195、201、207、213、219、225、231、237、243、249、255、261、267、273、279、285、291、297、303、309、315、321、327、333、339、345、351、357、363、369、375、381、387、393、399、405、411、417、423 或 429 任一项所示序列，或与其相比具有至少 70% 同一性或至多 3 个突变的序列；

所述 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 118、124、130、136、142、148、154、160、166、172、178、184、190、196、202、208、214、220、226、232、238、244、250、256、262、268、274、280、286、292、298、304、310、316、322、328、334、340、346、352、358、364、370、376、382、388、394、400、406、412、418、424 或 430 任一项所示序列，或与其相比具有至少 70% 同一性或至多 3 个突变的序列；

所述 LCDR2 包含 SEQ ID NO: 119、125、131、137、143、149、155、161、167、173、179、185、191、197、203、209、215、221、227、233、239、245、251、257、263、269、275、281、287、293、299、305、311、317、323、329、335、341、347、353、359、365、371、377、383、389、395、401、407、413、419、425 或 431 任一项所示序列，或与其相比具有至少 70% 同一性或至多 3 个突变的序列；

和所述 LCDR3 包含 SEQ ID NO: 120、126、132、138、144、150、156、162、168、174、180、186、192、198、204、210、216、222、228、234、240、246、252、258、264、270、276、282、288、294、300、306、312、318、324、330、336、342、348、354、360、366、372、378、384、390、396、402、408、414、420、426 或 432 任一项所示序列，或与其相比具有至少 70% 同一性或至多 3 个突变的序列。

2. 根据权利要求 1 所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述 HCDR1-3 包含 SEQ ID NO: 115-117、121-123、127-129、133-135、139-141、145-147、151-153、157-159、163-165、169-171、175-177、181-183、187-189、193-195、199-201、205-207、211-213、217-219、223-225、229-231、235-237、241-243、247-249、253-255、259-261、265-267、271-273、277-279、283-285、289-291、

295-297、301-303、307-309、313-315、319-321、325-327、331-333、337-339、343-345、349-351、355-357、361-363、367-369、373-375、379-381、385-387、391-393、397-399、403-405、409-411、415-417、421-423 或 427-429 所示序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；和/或，

所述 LCDR1-3 包含 SEQ ID NO: 118-120、124-126、130-132、136-138、142-144、148-150、154-156、160-162、166-168、172-174、178-180、184-186、190-192、196-198、202-204、208-210、214-216、220-222、226-228、232-234、238-240、244-246、250-252、256-258、262-264、268-270、274-276、280-282、286-288、292-294、298-300、304-306、310-312、316-318、322-324、328-330、334-336、340-342、346-348、352-354、358-360、364-366、370-372、376-378、382-384、388-390、394-396、400-402、406-408、412-414、418-420、424-426 或 430-432 所示序列，或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列。

3. 根据权利要求 2 所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述抗体或抗原结合片段包含所述重链可变区和所述轻链可变区，所述 HCDR1-3 和所述 LCDR1-3 包含选自下组的序列：

- (1) SEQ ID NO: 115-120 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (2) SEQ ID NO: 121-126 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (3) SEQ ID NO: 127-132 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (4) SEQ ID NO: 133-138 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (5) SEQ ID NO: 139-144 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (6) SEQ ID NO: 145-150 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (7) SEQ ID NO: 151-156 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (8) SEQ ID NO: 157-162 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (9) SEQ ID NO: 163-168 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (10) SEQ ID NO: 169-174 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (11) SEQ ID NO: 175-180 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (12) SEQ ID NO: 181-186 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (13) SEQ ID NO: 187-192 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (14) SEQ ID NO: 193-198 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (15) SEQ ID NO: 199-204 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (16) SEQ ID NO: 205-210 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (17) SEQ ID NO: 211-216 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (18) SEQ ID NO: 217-222 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (19) SEQ ID NO: 223-228 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (20) SEQ ID NO: 229-234 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (21) SEQ ID NO: 235-240 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；
- (22) SEQ ID NO: 241-246 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列；



- (23) SEQ ID NO: 247-252 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (24) SEQ ID NO: 253-258 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (25) SEQ ID NO: 259-264 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (26) SEQ ID NO: 265-270 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (27) SEQ ID NO: 271-276 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (28) SEQ ID NO: 277-282 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (29) SEQ ID NO: 283-288 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (30) SEQ ID NO: 289-294 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (31) SEQ ID NO: 295-300 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (32) SEQ ID NO: 301-306 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (33) SEQ ID NO: 307-312 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (34) SEQ ID NO: 313-318 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (35) SEQ ID NO: 319-324 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (36) SEQ ID NO: 325-330 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (37) SEQ ID NO: 331-336 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (38) SEQ ID NO: 337-342 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (39) SEQ ID NO: 343-348 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (40) SEQ ID NO: 349-354 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (41) SEQ ID NO: 355-360 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (42) SEQ ID NO: 361-366 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (43) SEQ ID NO: 367-372 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (44) SEQ ID NO: 373-378 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (45) SEQ ID NO: 379-384 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (46) SEQ ID NO: 385-390 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (47) SEQ ID NO: 391-396 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (48) SEQ ID NO: 397-402 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (49) SEQ ID NO: 403-408 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (50) SEQ ID NO: 409-414 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (51) SEQ ID NO: 415-420 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (52) SEQ ID NO: 421-426 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列;
- (53) SEQ ID NO: 427-432 或与其相比具有至少 70%同一性或至多 3 个突变的序列。

4. 根据权利要求 1~3 任一项所述的抗体或抗原结合片段,其中,所述重链可变区包含 SEQ ID NO: 9、11、13、15、17、19、21、23、25、27、29、31、33、35、37、39、41、43、45、47、49、51、53、55、57、59、61、63、65、67、69、71、73、75、77、79、81、83、85、

87、89、91、93、95、97、99、101、103、105、107、109、111、113、439-442 任一项所述序列，或其相比具有至少 70%同一性或至多 15 个氨基酸差异的序列；

所述轻链可变区包含 SEQ ID NO: 10、12、14、16、18、20、22、24、26、28、30、32、34、36、38、40、42、44、46、48、50、52、54、56、58、60、62、64、66、68、70、72、74、76、78、80、82、84、86、88、90、92、94、96、98、100、102、104、106、108、110、112、114、436、437 或 438 任一项所述序列，或其相比具有至少 70%同一性或至多 15 个氨基酸差异的序列。

5. 根据权利要求 1~4 任一项所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述至少 70%同一性优选为至少 75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100%同一性；所述至多 3 个突变优选为至多 3、2、1 或 0 个突变；所述至多 15 个突变优选为至多 15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1 或 0 个突变；优选地，所述突变为插入、缺失或替换，所述替换优选为保守氨基酸替换，所述突变优选为回复突变或热点突变。

6. 根据权利要求 1~5 任一项所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述抗体或抗原结合片段还包含重链恒定区和/或轻链恒定区；

优选地，所述重链恒定区选自 IgG，例如 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4；所述 IgG 可选自人 IgG，例如人 IgG1 或人 IgG4；所述轻链恒定区选自κ链或λ链，优选为κ链；

优选地，所述重链恒定区可选自 SEQ ID NO: 433 或 448；

优选地，所述轻链恒定区可选自 SEQ ID NO: 434-435 或 449。

7. 根据权利要求 1-6 任一项所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述抗体或抗原结合片段选自单克隆抗体、多克隆抗体、天然抗体、工程化抗体、单特异性抗体、多特异性抗体（例如双特异性抗体）、单价抗体、多价抗体、完整抗体、完整抗体的片段、裸抗体、缀合抗体、嵌合抗体、人源化抗体、全人抗体、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')<sub>2</sub>、Fd、Fv、scFv、双抗体（diabody）或单域抗体。

8. 根据权利要求 1-7 任一项所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述抗体或抗原结合片段还包括缀合物；所述缀合物可选自治疗剂或示踪剂，所述治疗剂可选自放射性同位素、化疗药或免疫调节剂，所述示踪剂可选自放射学造影剂、顺磁离子、金属、荧光标记、化学发光标记、超声造影剂和光敏剂。

9. 根据权利要求 1-8 任一项所述的抗体或抗原结合片段，其中，所述抗体或抗原结合片段与人 CD19 结合的 KD 值小于 1 E-08M、1E-09M、1E-10M 或 1E-11M；优选地，所述抗体或抗原结合片段还结合猴 CD19，更优选地，所述抗体或抗原结合片段与猴 CD19 结合的 KD 值小于 1E-8M、1E-9M、1E-10M、1E-11M 或 1E-12M。

10. 一种多特异抗原结合分子，其中，所述多特异性抗原结合分子至少包括第一抗原结合模块和第二抗原结合模块，所述第一抗原结合模块包含权利要求 1-10 任一项所述的抗体或抗原结合片段，所述第二抗原结合模块结合与第一抗原结合模块不同的其他靶点或结合相同靶点的不同表位；优选地，所述第二抗原结合模块为抗体或抗原结合片段；

优选地，所述其他靶点选自下组：（1）肿瘤特异性抗原（TSA）或肿瘤相关抗原（TAA）；

(2) 免疫检查点；(3) 募集和/或激活免疫细胞的靶点。

11. 一种嵌合抗原受体 (CAR)，其中，所述嵌合抗原受体至少包括细胞外抗原结合结构域、跨膜结构域和胞内信号传导结构域，所述细胞外抗原结合结构域包括权利要求 1-9 任一项所述抗体或抗原结合片段或权利要求 10 所述多特异性抗原结合分子。

12. 一种免疫效应细胞，其中，所述免疫效应细胞表达权利要求 11 所述嵌合抗原受体和/或包含编码权利要求 11 所述嵌合抗原受体的核酸分子；

优选地，所述免疫效应细胞选自 T 细胞、NK 细胞 (natural killer cell)、NKT 细胞 (natural killer T cell)、单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞或肥大细胞，更优选地，所述 T 细胞选自细胞毒性 T 细胞、调节性 T 细胞或辅助性 T 细胞；

优选地，所述免疫效应细胞为自体免疫效应细胞或同种异体免疫效应细胞。

13. 一种分离的核酸分子，其中，所述核酸分子编码权利要求 1-9 所述抗体或抗原结合片段、权利要求 10 所述多特异性抗原结合分子或权利要求 11 所述嵌合抗原受体。

14. 一种载体 (vector)，其中，所述载体包括权利要求 13 所述核酸分子。

15. 一种细胞，其中，所述细胞包含权利要求 14 所述载体。

16. 一种制备权利要求 1-9 所述抗体或抗原结合片段，或权利要求 10 所述多特异性抗原结合分子的方法，其中，所述方法包括：(1) 培养权利要求 15 所述细胞和/或 (2) 分离所述细胞表达的抗体或抗原结合片段，或多特异性抗原结合分子。

17. 一种制备权利要求 12 所述免疫效应细胞的方法，其中，所述方法包括将编码权利要求 11 所述嵌合抗原受体的核酸分子导入所述免疫效应细胞，和/或启动所述免疫效应细胞表达所述嵌合抗原受体。

18. 一种药物组合物，其中，所述药物组合物包含权利要求 1-9 任一项所述抗体或抗原结合分子，或权利要求 10 所述多特异性抗原结合分子，或权利要求 12 所述免疫效应细胞，或权利要求 13 所述核酸分子，或权利要求 14 所述载体，或权利要求 15 所述细胞，或根据权利要求 16-17 任一项所述方法制备得到的产品；优选地，所述组合物还包含药学上可接受的运载体 (carrier)、稀释剂或助剂。

19. 权利要求 1-9 任一项所述的抗体或抗原结合片段、权利要求 10 所述的多特异性抗原结合分子、权利要求 12 所述的免疫效应细胞、权利要求 13 所述的核酸分子、权利要求 14 所述的载体、权利要求 15 所述的细胞、权利要求 18 所述的药物组合物、或根据权利要求 16-17 任一项所述方法制备得到的产品，在制备用于治疗 CD19 相关疾病的药物中的用途；优选地，所述 CD19 相关疾病选自肿瘤或自身免疫性疾病；更优选地，所述肿瘤选自淋巴瘤或白血病，例如 B 细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤，所述自身免疫性疾病选自神经系统自身免疫性疾病，类风湿，系统性红斑狼疮、IgG4 相关疾病、多发性硬化症或视神经脊髓炎谱系疾病。

20. 一种治疗 CD19 相关疾病的方法，其中，所述方法包括向受试者施用有效量的药物，所述药物包括权利要求 1-9 任一项所述的抗体或抗原结合片段、权利要求 10 所述的多特异性抗原结合分子、权利要求 12 所述的免疫效应细胞、权利要求 13 所述的核酸分子、权利要求 14

所述的载体、权利要求 15 所述的细胞、权利要求 18 所述的药物组合物、或根据权利要求 16-17 任一项所述方法制备得到的产品，优选地，所述 CD19 相关疾病选自肿瘤或自身免疫性疾病；更优选地，所述肿瘤选自淋巴瘤或白血病，例如 B 细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤，所述自身免疫性疾病选自神经系统自身免疫性疾病，类风湿，系统性红斑狼疮、IgG4 相关疾病、多发性硬化症或视神经脊髓炎谱系疾病。

21. 权利要求 1-9 任一项所述的抗体或抗原结合片段、权利要求 10 所述的多特异性抗原结合分子、权利要求 12 所述的免疫效应细胞、权利要求 13 所述的核酸分子、权利要求 14 所述的载体、权利要求 15 所述的细胞、权利要求 18 所述的药物组合物、或根据权利要求 16-17 任一项所述方法制备得到的产品，其中，用于治疗 CD19 相关疾病的药物，优选地，所述 CD19 相关疾病选自肿瘤或自身免疫性疾病；更优选地，所述肿瘤选自淋巴瘤或白血病，例如 B 细胞淋巴瘤、急性淋巴细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病、非霍奇金淋巴瘤、套细胞淋巴瘤、滤泡性淋巴瘤、弥漫性大 B 细胞淋巴瘤或多发性骨髓瘤，所述自身免疫性疾病选自神经系统自身免疫性疾病，类风湿，系统性红斑狼疮、IgG4 相关疾病、多发性硬化症或视神经脊髓炎谱系疾病。

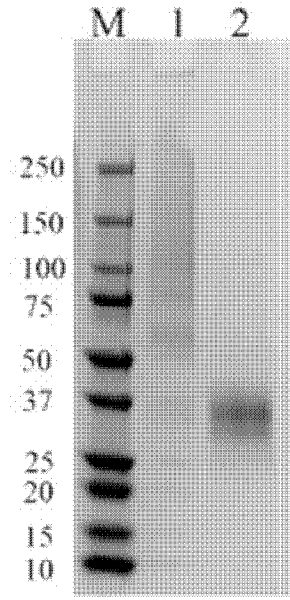


图 1

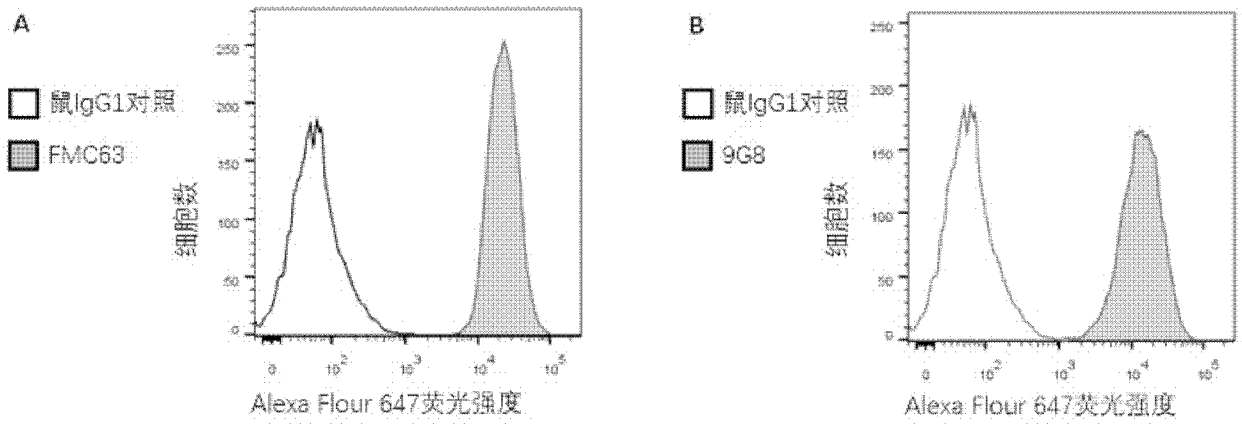


图 2

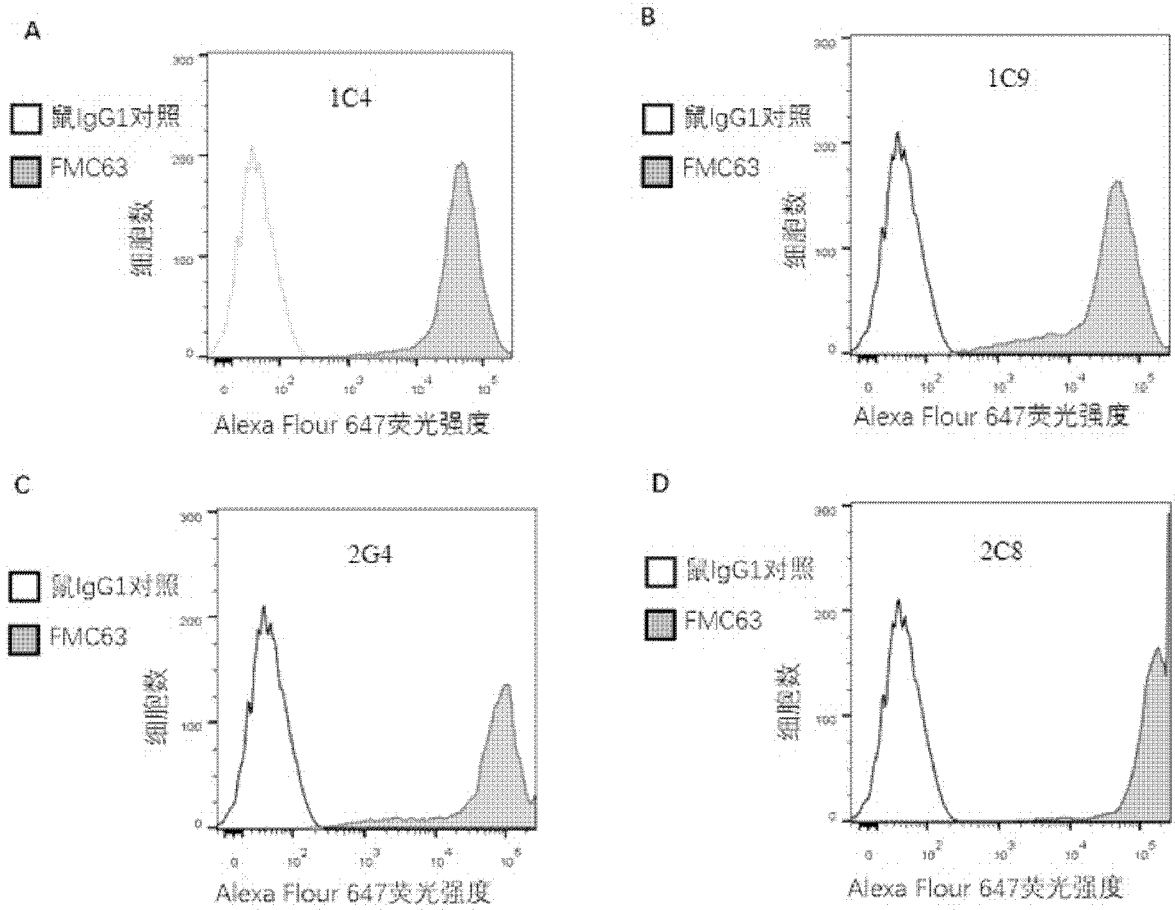


图 3

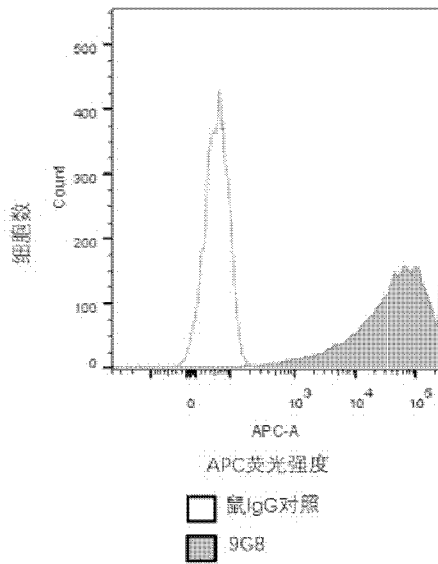


图 4

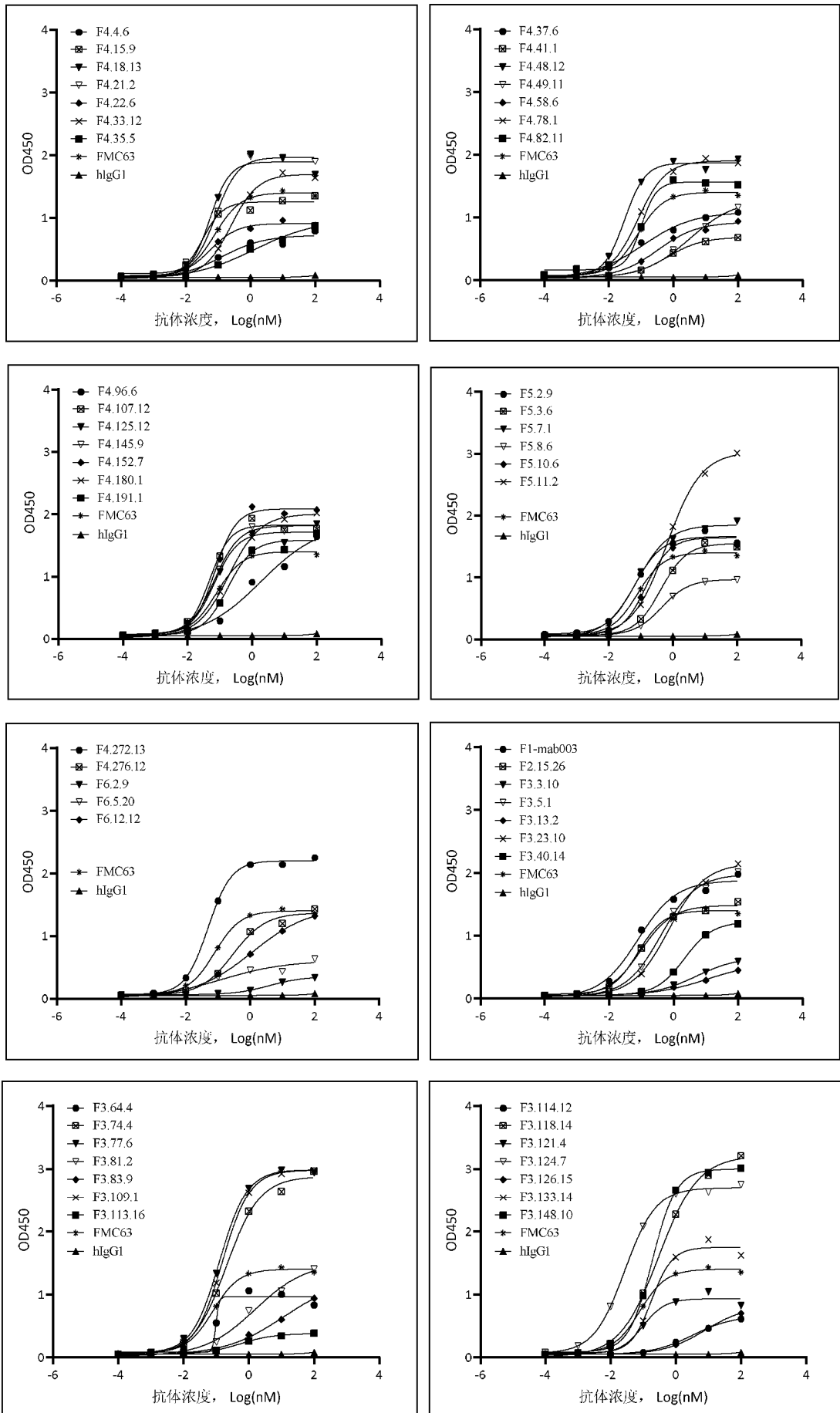


图 5

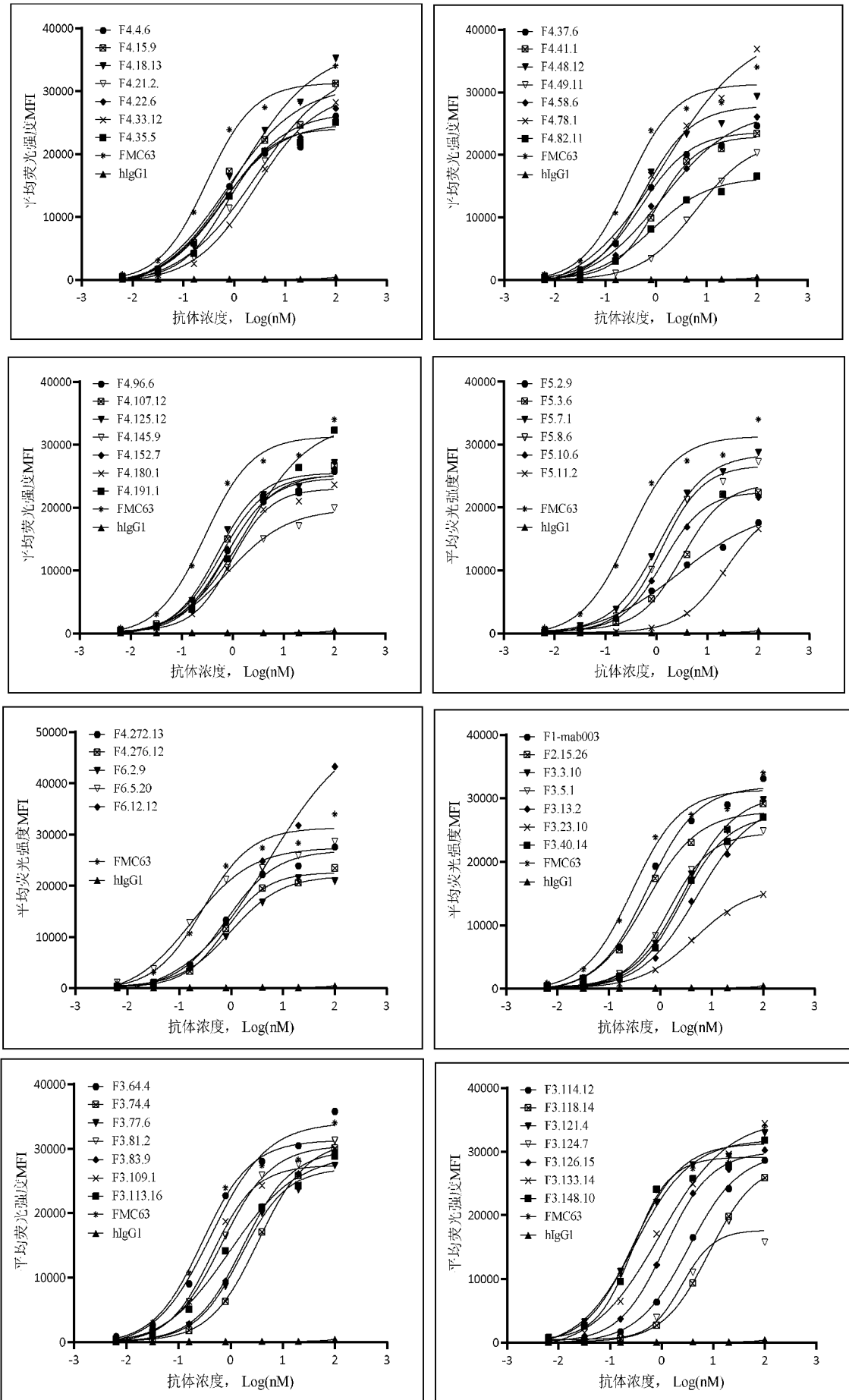


图6



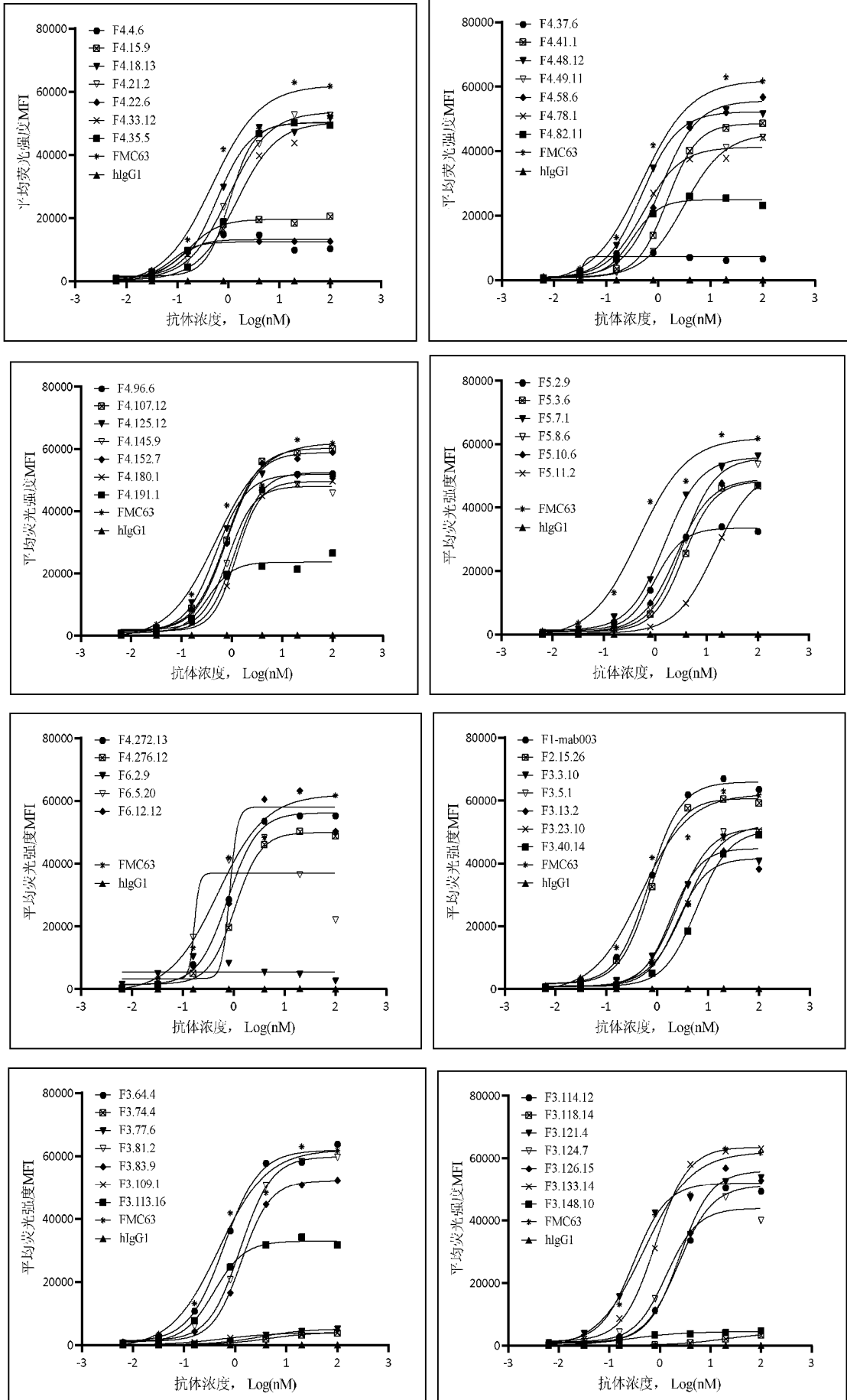


图 7

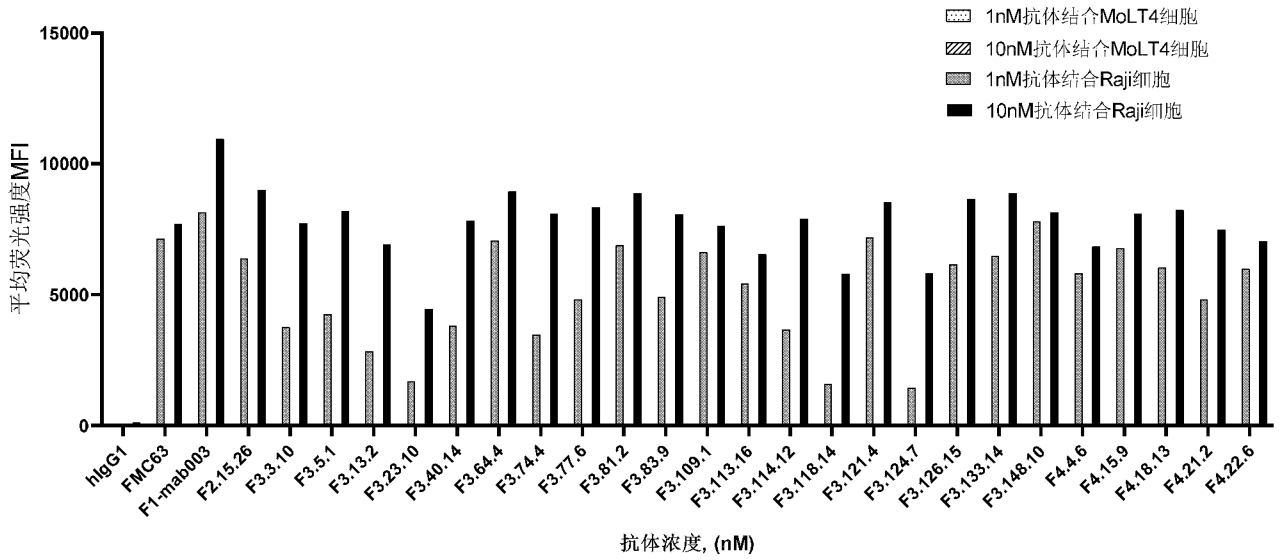


图 8A

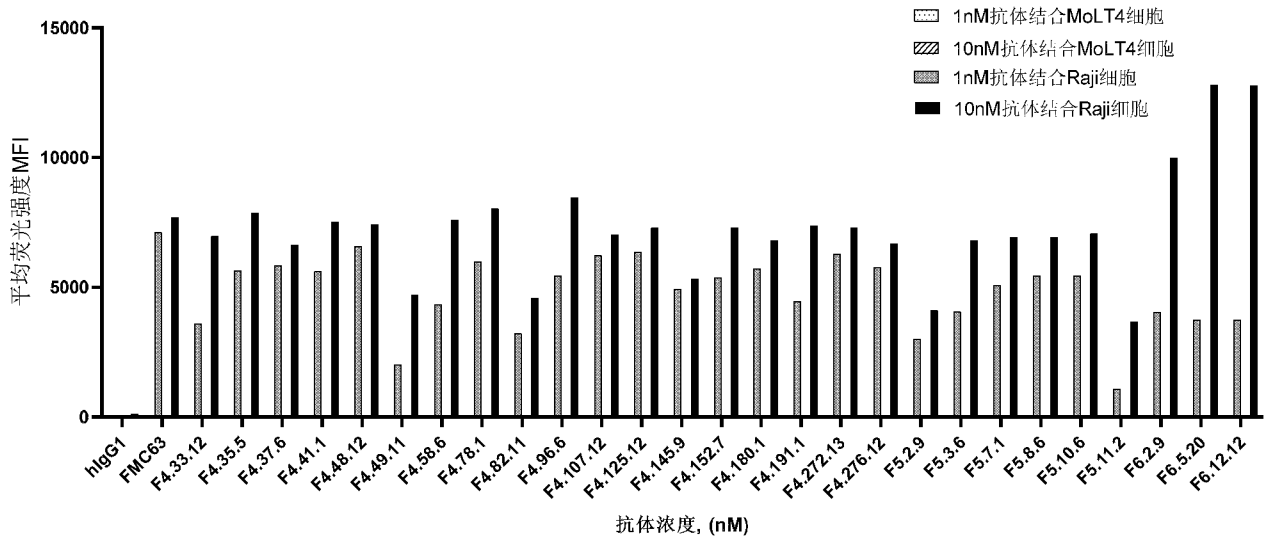


图 8B

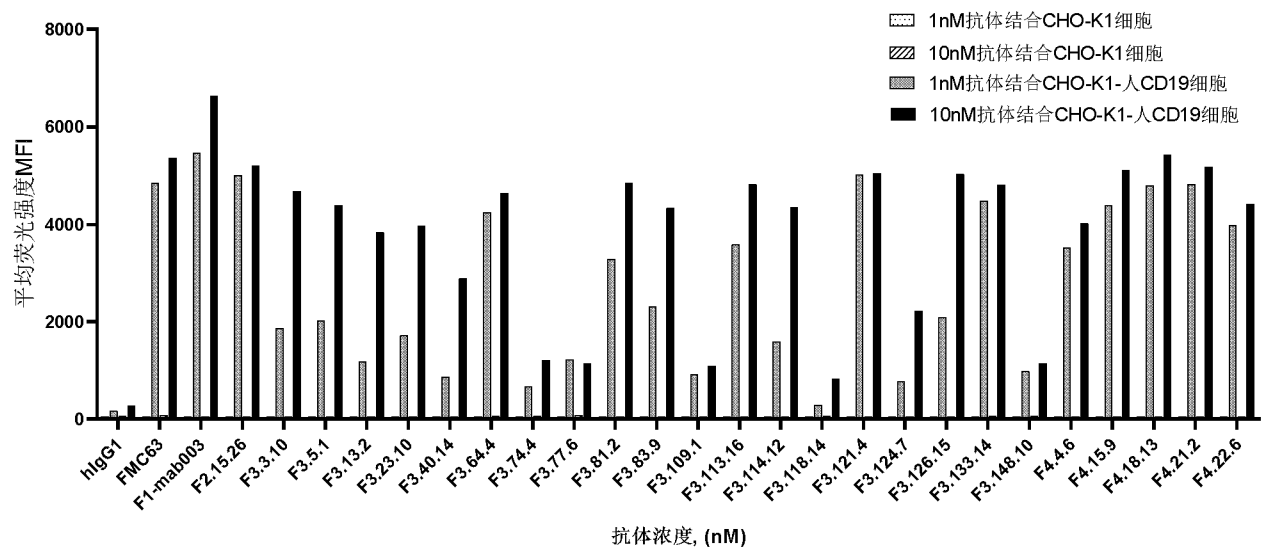


图 9A

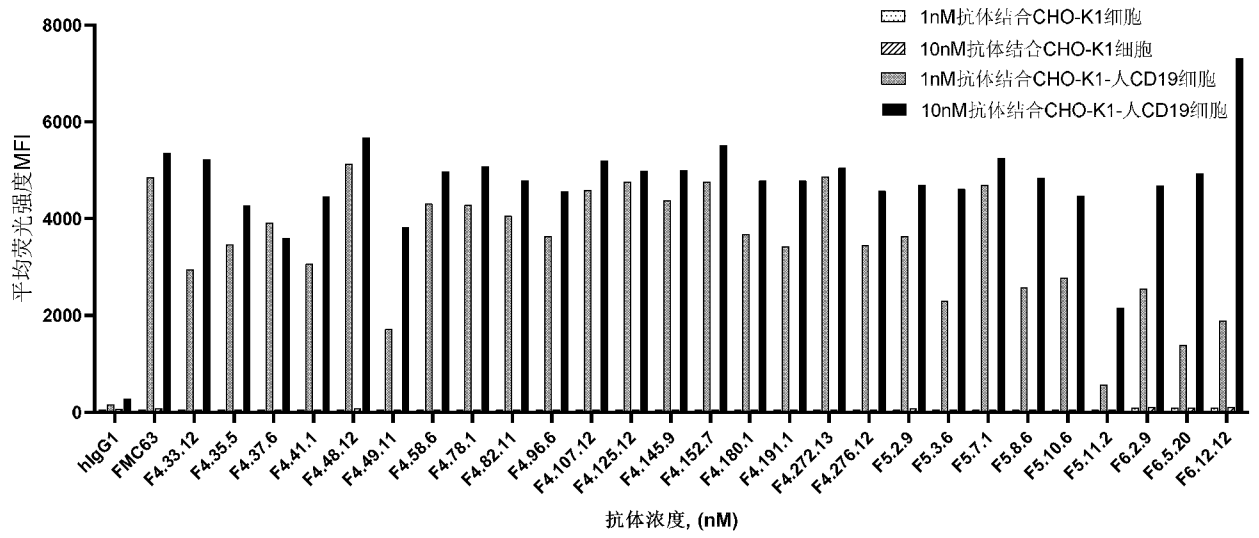


图 9B

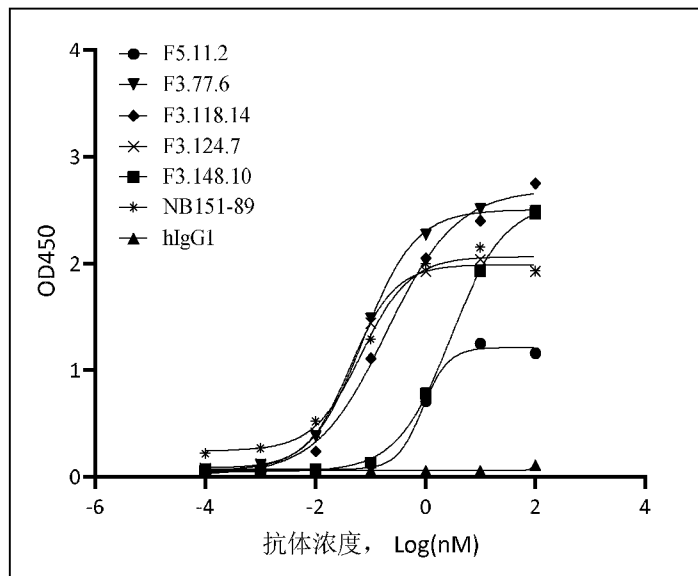


图 10

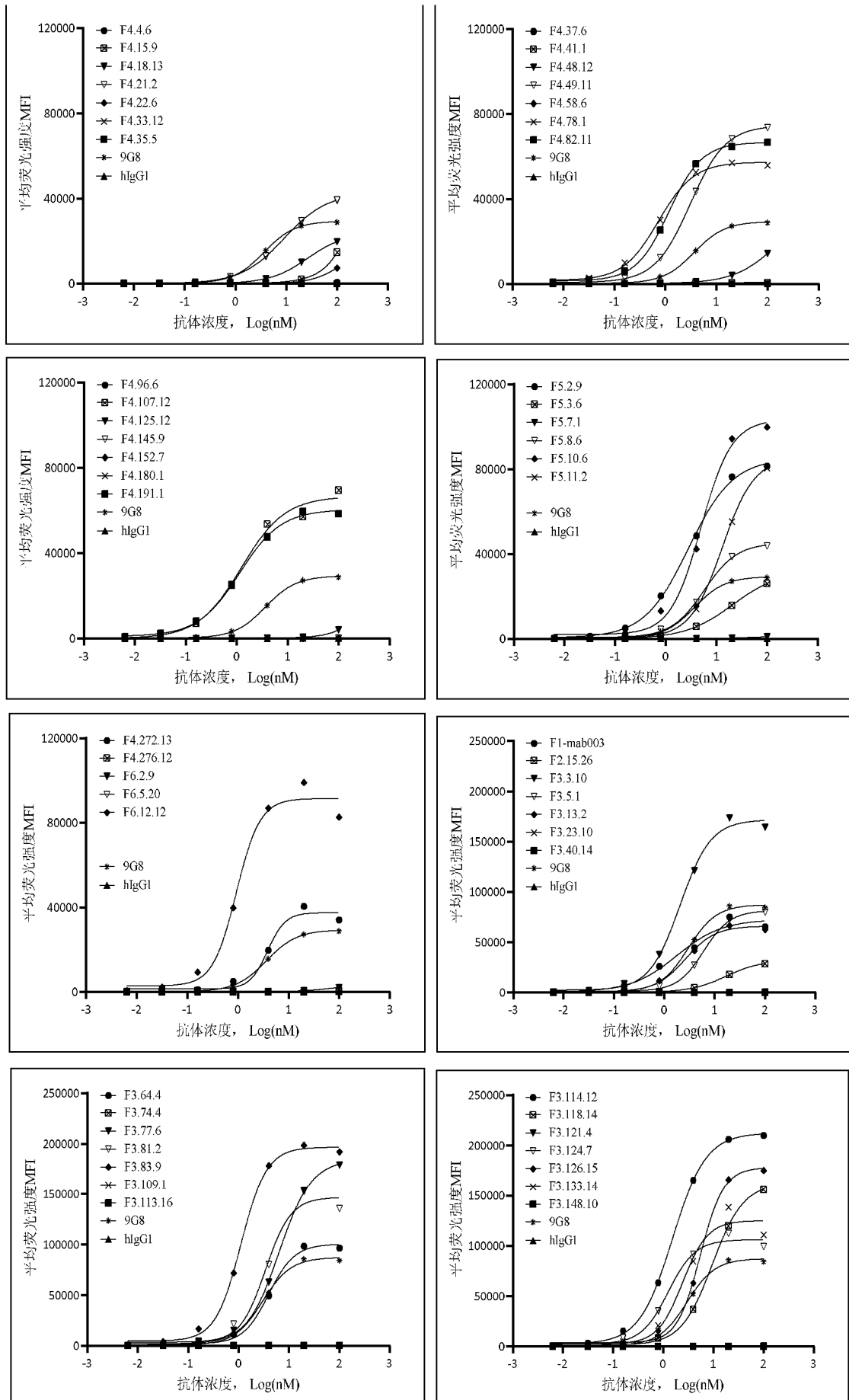


图 11

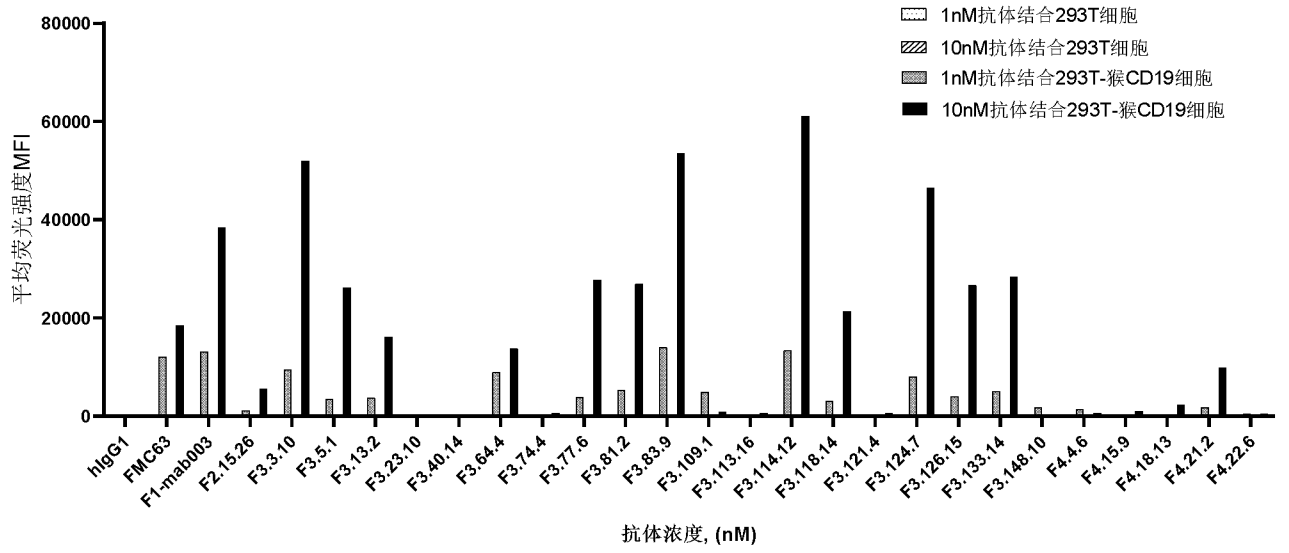


图 12A

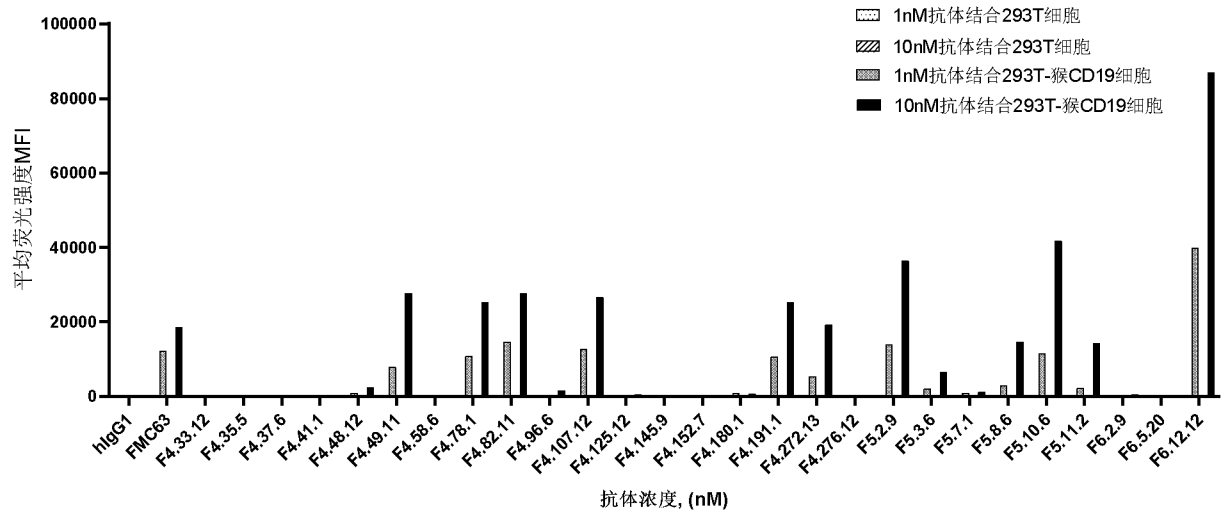
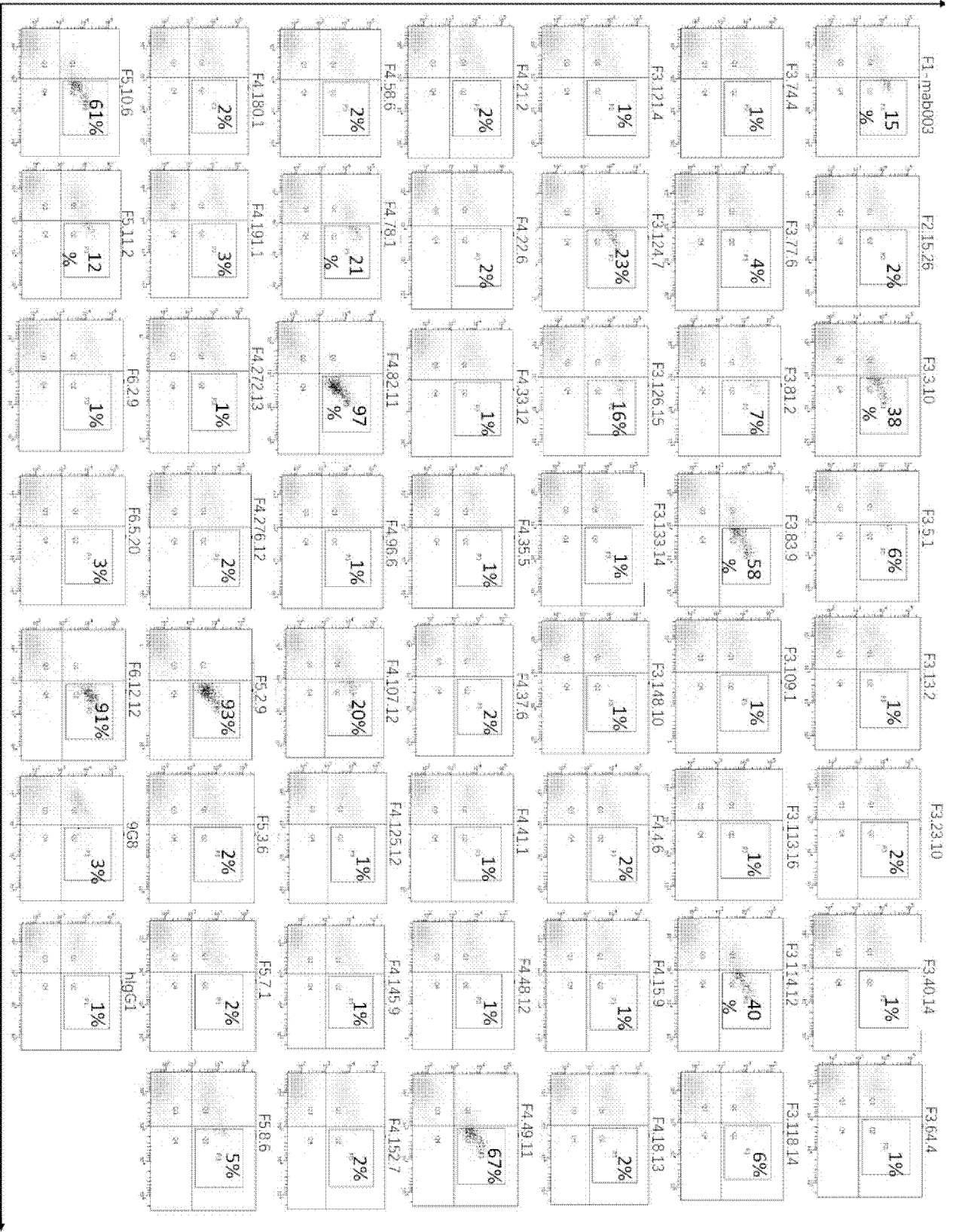


图 12B

BV-605荧光强度

APC荧光强度



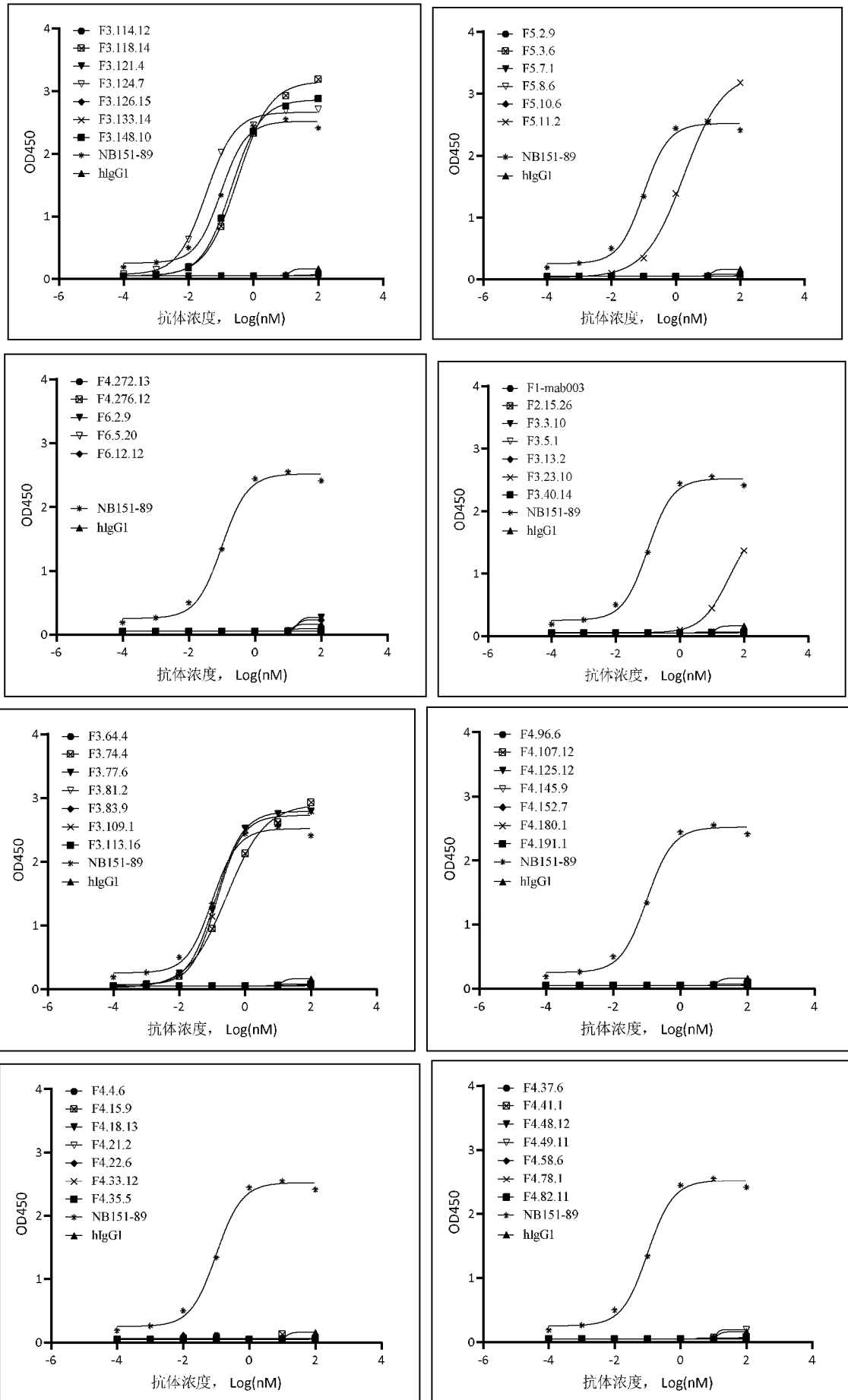


图 14

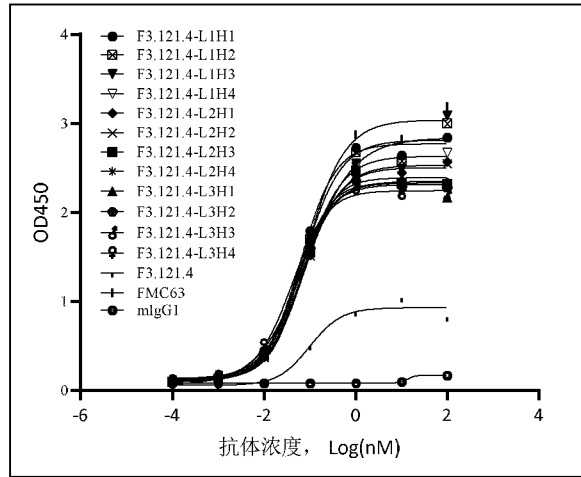


图 15

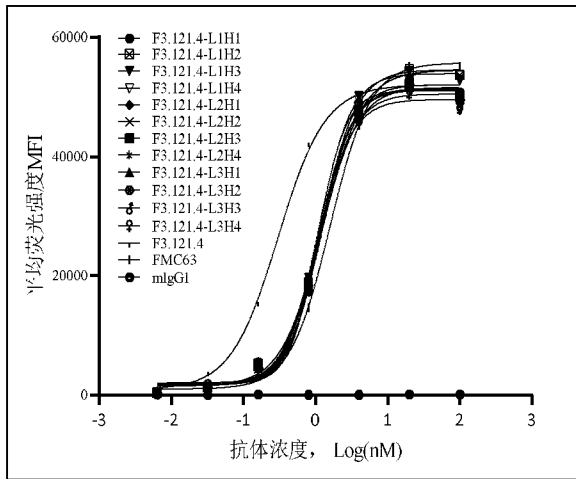


图 16A

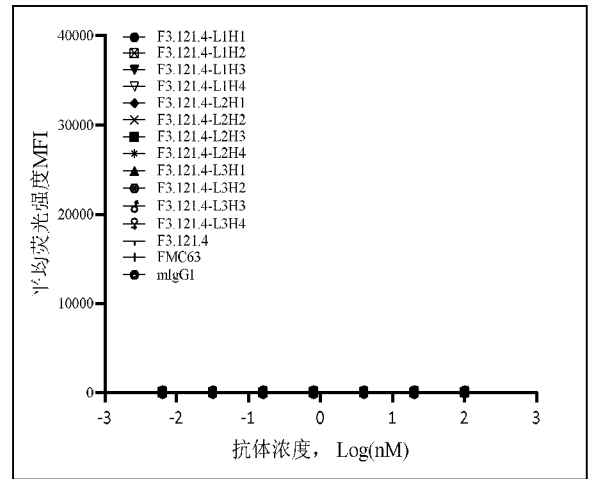


图 16B

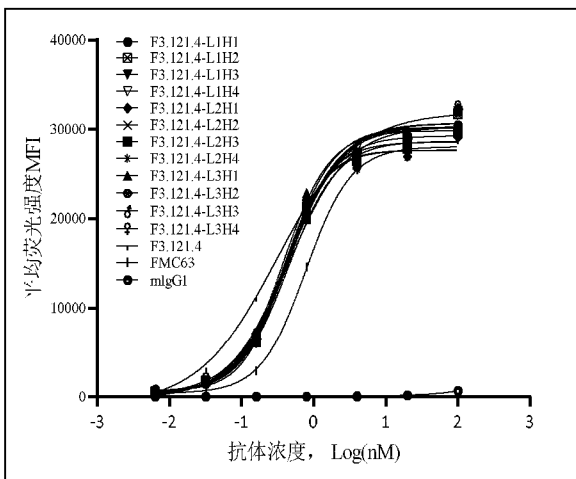


图 16C

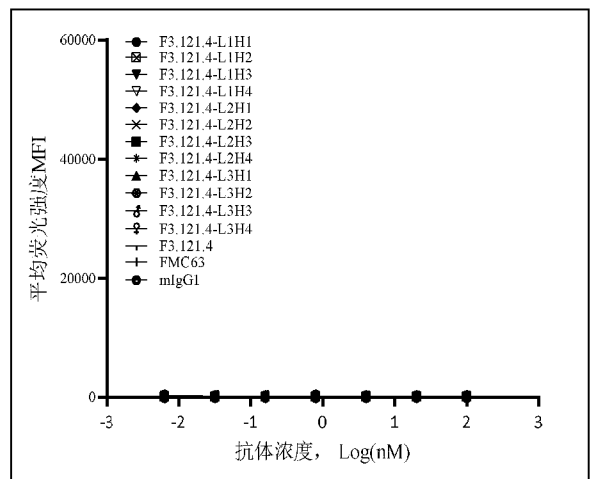


图 16D



## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/104564

<b>A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER</b>		
C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i		
According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC		
<b>B. FIELDS SEARCHED</b>		
Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols) C07K;C12N;A61K;A61P;		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, VEN, CNKI, CNTXT, USTXT, EPTXT, PUBMED, ISI WEB, NCBI, EMBL-EBI, STNnext, 百度, BAIDU: 申请人/发明人, 抗原结合蛋白, 抗体, antibody, CD19, anti-CD19, 可变区, variable region, CDR, 肿瘤, 癌症, tumor, cancer, SEQ ID NOs: 9-432		
<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	WO 2019/057100 A1 (WUXI BIOLOGICS (SHANGHAI) CO., LTD.) 28 March 2019 (2019-03-28) description, table 5, paragraphs [00045] -[00057], [000115], and [000216]	1-21
X	CN 111253487 A (GUANGDONG HEC PHARMACEUTICAL CO., LTD.) 09 June 2020 (2020-06-09) claims 1-39, and description, paragraph [0095]	1-21
X	WO 2020236792 A1 (NOVARTIS AG) 26 November 2020 (2020-11-26) claims 1-203	1-21
X	CN 107531793 A (EUREKA THERAPEUTICS INC.) 02 January 2018 (2018-01-02) claims 1-41	1-21
X	WO 2016033570 A1 (JUNO THERAPEUTICS INC.) 03 March 2016 (2016-03-03) claims 1-64	1-21
A	CN 107793480 A (SHANGHAI GENBASE BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 13 March 2018 (2018-03-13) description, paragraphs [0031]-[0072]	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search <b>02 September 2022</b>		Date of mailing of the international search report <b>23 September 2022</b>
Name and mailing address of the ISA/CN <b>China National Intellectual Property Administration (ISA/CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088, China</b> Facsimile No. (86-10)62019451		Authorized officer  Telephone No.

## INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

**PCT/CN2022/104564**

<b>C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT</b>		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	HAMMER, O. "CD19 as an Attractive Target for Antibody-based Therapy." <i>MAbs.</i> , Vol. 4, No. 5, 31 October 2012 (2012-10-31), pp. 571-577	1-21
<hr/>		

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

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

**Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)**

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1.  Claims Nos.: **20-21**  
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:  
  - [1] Claims 20-21 relate to a method for treating CD19-associated diseases, belonging to methods for treating diseases as defined in PCT Rule 39.1(iv). The present report was conducted on the basis of a corresponding pharmaceutical use of a CD19 antibody.
2.  Claims Nos.:  
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3.  Claims Nos.:  
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2022/104564**

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2019/057100	A1	28 March 2019	AU	2018336520	A1	19 March 2020
				RU	2020114161	A	22 October 2021
				TW	201920281	A	01 June 2019
				IL	273389	A	31 May 2020
				US	2020289563	A1	17 September 2020
				EP	3684820	A1	29 July 2020
				CN	109535253	A	29 March 2019
				CA	3074524	A1	28 March 2019
				JP	2020534012	A	26 November 2020
				BR	112020005402	A2	29 September 2020
				SG	11202001817 P	A	30 March 2020
				KR	20200055758	A	21 May 2020
CN	111253487	A	09 June 2020	WO	2020114358	A1	11 June 2020
WO	2020236792	A1	26 November 2020	KR	20220010544	A	25 January 2022
				BR	112021023048	A2	19 April 2022
				AU	2020279974	A1	18 November 2021
				CR	20210576	A	15 December 2021
				EC	SP21083044	A	30 December 2021
				UY	38701	A	31 December 2020
				CN	113874398	A	31 December 2021
				CA	3138360	A1	26 November 2020
				JP	2022533843	A	26 July 2022
				SG	11202111281 T	A	30 December 2021
				PE	20220568	A1	20 April 2022
				US	2021139585	A1	13 May 2021
				EP	3972998	A1	30 March 2022
				IL	287479	A	01 December 2021
				CU	20210096	A7	06 June 2022
				TW	202100559	A	01 January 2021
				CO	2021015544	A2	30 November 2021
CN	107531793	A	02 January 2018	JP	2018537520	A	20 December 2018
				WO	2017066136	A2	20 April 2017
				MX	2018004515	A	15 April 2019
				US	2019315859	A1	17 October 2019
				JP	2022003061	A	11 January 2022
				CN	114470193	A	13 May 2022
				KR	20180083859	A	23 July 2018
				AU	2016339832	A1	19 April 2018
				SG	10201913902 R	A	30 March 2020
				IL	258332	A	31 May 2018
				CN	114470192	A	13 May 2022
				RU	2018117413	A	21 November 2019
				CA	3001910	A1	20 April 2017
				SG	11201803054 U	A	30 May 2018
				EP	3362479	A2	22 August 2018
				TW	201726166	A	01 August 2017
				PH	12018500810	A1	29 October 2018
				US	2018134787	A1	17 May 2018
WO	2016033570	A1	03 March 2016	TW	201625686	A	16 July 2016
				CN	114106181	A	01 March 2022

**INTERNATIONAL SEARCH REPORT**  
**Information on patent family members**

International application No.

**PCT/CN2022/104564**

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		KR 20170057298 A	24 May 2017
		US 2020172630 A1	04 June 2020
		NZ 729478 A	27 May 2022
		IL 250831 D0	30 April 2017
		CA 2962915 A1	03 March 2016
		RU 2020144342 A	18 February 2021
		AU 2021203056 A1	24 June 2021
		AU 2015308648 A1	02 March 2017
		MA 40497 A	05 July 2017
		SG 11201701297 W A	30 March 2017
		BR 112017003505 A2	12 December 2017
		ES 2833010 T3	14 June 2021
		PH 12017500268 A1	03 July 2017
		CU 20170023 A7	08 August 2017
		EP 3805267 A1	14 April 2021
		MX 2017002459 A	19 May 2017
		EP 3186280 A1	05 July 2017
		RU 2017110044 A	28 September 2018
		JP 2020182454 A	12 November 2020
		SA 517380971 B1	19 April 2021
		CN 106922147 A	04 July 2017
		US 2016152723 A1	02 June 2016
		JP 2017526370 A	14 September 2017
		TW 202210521 A	16 March 2022
<hr/>			
CN	107793480	A	13 March 2018
CN	107793478	A	13 March 2018
<hr/>			

<b>A. 主题的分类</b> C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(2006.01)i; C12N 15/62(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 35/02(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i 按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类		
<b>B. 检索领域</b> 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K;C12N;A61K;A61P; 包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献 在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, VEN, CNKI, CNTXT, USTXT, EPTXT, PUBMED, ISI WEB, NCBI, EMBL-EBI, STNext, 百度, 申请人/发明人, 抗原结合蛋白, 抗体, antibody, CD19, anti-CD19, 可变区, variable region, CDR, 肿瘤, 癌症, tumor, cancer, SEQ ID NOs:9-432		
<b>C. 相关文件</b>		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
X	WO 2019/057100 A1 (WUXI BIOLOGICSSHANGHAICO., LTD.) 2019年3月28日 (2019 - 03 - 28) 说明书表5, 第[00045] - [00057]、[000115]、[000216]段	1-21
X	CN 111253487 A (广东东阳光药业有限公司) 2020年6月9日 (2020 - 06 - 09) 权利要求1-39, 说明书第[0095]段	1-21
X	WO 2020236792 A1 (NOVARTIS AG) 2020年11月26日 (2020 - 11 - 26) 权利要求1-203	1-21
X	CN 107531793 A (优瑞科生物技术公司) 2018年1月2日 (2018 - 01 - 02) 权利要求1-41	1-21
X	WO 2016033570 A1 (JUNO THERAPEUTICS, INC.) 2016年3月3日 (2016 - 03 - 03) 权利要求1-64	1-21
A	CN 107793480 A (上海吉倍生物技术有限公司) 2018年3月13日 (2018 - 03 - 13) 说明书第[0031]-[0072]段	1-21
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型: “A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 “E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 “L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) “O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 “P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 “T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 “X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 “Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 “&” 同族专利的文件		
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期	
2022年9月2日	2022年9月23日	
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员	
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	靳春鹏 电话号码 86-(10)-53961947	

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	HAMMER, O. "CD19 as an attractive target for antibody-based therapy." MABS., 第4卷, 第5期, 2012年10月31日 (2012 - 10 - 31), 第571-577页	1-21



## 第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1. c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- a.  作为国际申请的一部分提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式
  - 纸件或图形文件形式
- b.  根据细则13之三. 1(a) 仅为国际检索目的以附件C/ST. 25文本文件形式与国际申请同时提交的:
- c.  仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的:
- 附件C/ST. 25文本文件形式(细则13之三. 1(a))
  - 纸件或图形文件形式(细则13之三. 1(b)和行政规程第713段)
2.  另外, 在提交/提供了多个版本或副本的序列列表的情况下, 提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围(如适用)的所需声明。
3. 补充意见:

## 第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1.  权利要求： 20-21  
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：  
[1] 权利要求20-21涉及用于治疗CD19相关疾病的方法，属于PCT细则39.1(iv)规定的疾病的治疗方法，本报告基于CD19抗体的相应制药用途作出。
2.  权利要求：  
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3.  权利要求：  
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/104564

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2019/057100	A1	2019年3月28日	AU	2018336520	A1	2020年3月19日
				RU	2020114161	A	2021年10月22日
				TW	201920281	A	2019年6月1日
				IL	273389	A	2020年5月31日
				US	2020289563	A1	2020年9月17日
				EP	3684820	A1	2020年7月29日
				CN	109535253	A	2019年3月29日
				CA	3074524	A1	2019年3月28日
				JP	2020534012	A	2020年11月26日
				BR	112020005402	A2	2020年9月29日
				SG	11202001817P	A	2020年3月30日
				KR	20200055758	A	2020年5月21日
CN	111253487	A	2020年6月9日	WO	2020114358	A1	2020年6月11日
WO	2020236792	A1	2020年11月26日	KR	20220010544	A	2022年1月25日
				BR	112021023048	A2	2022年4月19日
				AU	2020279974	A1	2021年11月18日
				CR	20210576	A	2021年12月15日
				EC	SP21083044	A	2021年12月30日
				UY	38701	A	2020年12月31日
				CN	113874398	A	2021年12月31日
				CA	3138360	A1	2020年11月26日
				JP	2022533843	A	2022年7月26日
				SG	11202111281T	A	2021年12月30日
				PE	20220568	A1	2022年4月20日
				US	2021139585	A1	2021年5月13日
				EP	3972998	A1	2022年3月30日
				IL	287479	A	2021年12月1日
				CU	20210096	A7	2022年6月6日
				TW	202100559	A	2021年1月1日
				CO	2021015544	A2	2021年11月30日
CN	107531793	A	2018年1月2日	JP	2018537520	A	2018年12月20日
				WO	2017066136	A2	2017年4月20日
				MX	2018004515	A	2019年4月15日
				US	2019315859	A1	2019年10月17日
				JP	2022003061	A	2022年1月11日
				CN	114470193	A	2022年5月13日
				KR	20180083859	A	2018年7月23日
				AU	2016339832	A1	2018年4月19日
				SG	10201913902R	A	2020年3月30日
				IL	258332	A	2018年5月31日
				CN	114470192	A	2022年5月13日
				RU	2018117413	A	2019年11月21日
				CA	3001910	A1	2017年4月20日
				SG	11201803054U	A	2018年5月30日
				EP	3362479	A2	2018年8月22日
				TW	201726166	A	2017年8月1日
				PH	12018500810	A1	2018年10月29日
				US	2018134787	A1	2018年5月17日
WO	2016033570	A1	2016年3月3日	TW	201625686	A	2016年7月16日

国际检索报告  
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/104564

检索报告引用的专利文件	公布日 (年/月/日)	同族专利	公布日 (年/月/日)
		CN 114106181 A	2022年3月1日
		KR 20170057298 A	2017年5月24日
		US 2020172630 A1	2020年6月4日
		NZ 729478 A	2022年5月27日
		IL 250831 D0	2017年4月30日
		CA 2962915 A1	2016年3月3日
		RU 2020144342 A	2021年2月18日
		AU 2021203056 A1	2021年6月24日
		AU 2015308648 A1	2017年3月2日
		MA 40497 A	2017年7月5日
		SG 11201701297W A	2017年3月30日
		BR 112017003505 A2	2017年12月12日
		ES 2833010 T3	2021年6月14日
		PH 12017500268 A1	2017年7月3日
		CU 20170023 A7	2017年8月8日
		EP 3805267 A1	2021年4月14日
		MX 2017002459 A	2017年5月19日
		EP 3186280 A1	2017年7月5日
		RU 2017110044 A	2018年9月28日
		JP 2020182454 A	2020年11月12日
		SA 517380971 B1	2021年4月19日
		CN 106922147 A	2017年7月4日
		US 2016152723 A1	2016年6月2日
		JP 2017526370 A	2017年9月14日
		TW 202210521 A	2022年3月16日
CN 107793480 A	2018年3月13日	CN 107793478 A	2018年3月13日