

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2022年6月30日 (30.06.2022)



(10) 国际公布号
WO 2022/135467 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/28 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2021/140449

(22) 国际申请日: 2021年12月22日 (22.12.2021)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202011544445.8 2020年12月23日 (23.12.2020) CN

(71) 申请人: 信达生物制药(苏州)有限公司 (INNOVENT BIOLOGICS (SUZHOU) CO., LTD.)
[CN/CN]; 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 李莉(LI, Li); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。 付凤根(FU, Fenggen); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。 倪海晴(NI, Haiqing); 中国江苏省苏州市苏州工业园区东平街168号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 北京市中咨律师事务所(ZHONGZI LAW OFFICE); 中国北京市西城区平安里西大街26号新时代大厦7层, Beijing 100034 (CN)。

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

(84) 指定国(除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ,

NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

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

(54) Title: ANTI-B7-H3 ANTIBODY AND USES THEREOF

(54) 发明名称: 抗B7-H3抗体及其用途

(57) Abstract: Related are a novel antibody specifically binding with B7-H3, an antigen-binding fragment of the antibody, and a composition comprising the antibody or the antigen-binding fragment thereof. Related are nucleic acids encoding the antibody or the antigen-binding fragment thereof, a host cell comprising the nucleic acids, and relevant uses. In addition, related are therapeutic and diagnostic uses of the antibody and the antigen-binding fragment thereof.

(57) 摘要: 涉及特异性结合B7-H3的新型抗体及其抗原结合片段和含有所述抗体或其抗原结合片段的组合物。涉及编码所述抗体或其抗原结合片段的核酸、包含所述核酸的宿主细胞, 以及相关用途。此外, 涉及这些抗体或其抗原结合片段的治疗和诊断用途。



WO 2022/135467 A1

抗 B7-H3 抗体及其用途

技术领域

本发明涉及特异性结合 B7-H3 的新型抗体及其抗原结合片段和含有所述抗体或其抗原结合片段的组合物。此外，本发明涉及编码所述抗体或其抗原结合片段的核酸、包含所述核酸的宿主细胞，以及相关用途。此外，本发明涉及这些抗体或其抗原结合片段的治疗和诊断用途。

背景技术

B7-H3(又称为 CD276)是一种 I 型跨膜糖蛋白，和 PD-L1 结构非常类似，同属于 B7/CD28 超家族。B7-H3 在转录水平上(RNA)广泛表达于淋巴组织和非淋巴器官，但是 B7-H3 的蛋白表达却非常的局限，主要表达在激活的树突状细胞、单核细胞、T 淋巴细胞、B 淋巴细胞、Nk 淋巴细胞上，而在其他正常组织中表达量则非常低。最近发现 B7-H3 在多种实体瘤上高表达，例如在肺癌，胃癌，胰腺癌，前列腺癌，肾癌，卵巢癌，子宫内膜癌，结直肠癌，肝癌和乳腺癌中高表达，其过度表达与生存，预后或肿瘤分级密切相关。除了在肿瘤上高表达之外，B7-H3 可能有类似 PD-L1 介导的 T 细胞抑制信号的功能。有人提出 B7-H3 具有共刺激和共抑制功能，这取决于肿瘤特异性，微环境因素和信号强度。除了其作为免疫调节剂的作用，B7-H3 与增强癌症的转移和血管生成有关。

由于 B7-H3 表达主要限于肿瘤，因此，B7-H3 是一个非常重要的肿瘤相关抗原，可以作为潜在广谱免疫疗法的靶点。

发明内容

本发明提供了抗 B7-H3 抗体及其编码基因与应用。本发明人通过杂交瘤筛选、嵌合抗体构建、人源化，获得了具有高亲和力和特异性的本发明抗人 B7-H3 抗体。

在一个方面，本发明提供了一种新的结合 B7-H3 分子的抗体或其抗原结合片段。

在一些实施方案中，本发明的抗 B7-H3 抗体具有以下一个或多个特性：

- (i) 以高亲和力与人和食蟹猴 B7-H3 结合；
- (ii) 与细胞表面的 B7-H3 有效结合；
- (iii) 与可溶性 B7-H3 有效结合；

- (iv) 有效激活 ADCC 效应;
- (v) 有效抑制或减缓体内肿瘤的生长和发展。

在一些实施方案中, 本发明的抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 (VH), 其中所述 VH 包含

- (i) 表 B 所列任一抗体的 VH 中所含的三个互补决定区域 (CDR); 或
- (ii) 表 A 所列任一抗体的三个重链互补决定区域 (CDR); 或
- (iii) 与表 B 所列任一抗体的 VH 序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中; 或
- (iv) 与表 B 所列任一抗体的 VH 序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性, 且包含所述序列的相应 CDR 的序列。

在一些实施方案中, 本发明的抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段包含轻链可变区 (VL), 其中所述 VL 包含:

- (i) 表 B 所列任一抗体的 VL 中所含的三个互补决定区域 (CDR); 或
- (ii) 表 A 所列任一抗体的三个轻链互补决定区域 (CDR); 或
- (iii) 与表 B 所列任一抗体的 VL 序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中; 或
- (iv) 与表 B 所列任一抗体的 VL 序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 同一性, 且包含所述序列的相应 CDR 的序列。

在一些实施方案中, 本发明的抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段包含重链可变区 VH 和/或轻链可变区 VL, 其中

- (a) 所述 VH 包含
 - (i) 表 B 所列任一抗体的 VH 中所含的三个互补决定区域 (CDR); 或
 - (ii) 表 A 所列任一抗体的三个重链互补决定区域 (CDR); 或
 - (iii) 与表 B 所列任一抗体的 VH 序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中; 或

(iv) 与表 B 所列任一抗体的 VH 序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性，且包含所述序列的相应 CDR 的序列；

和/或

(b)所述 VL 包含：

(i) 表 B 所列任一抗体的 VL 中所含的三个互补决定区域 (CDR)；或

(ii) 表 A 所列任一抗体的三个轻链互补决定区域 (CDR)；或

(iii) 与表 B 所列任一抗体的 VL 序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中；或

(iv) 与表 B 所列任一抗体的 VL 序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或 100%同一性，且包含所述序列的相应 CDR 的序列。

在一些实施方案中，本发明提供了结合 B7-H3 的抗体或其抗原结合片段，包含：SEQ ID NO: 16、18、20 或 22 中任一项所示的重链可变区的 HCDR1、2 和 3 序列，和/或 SEQ ID NO: 17、19、21 或 23 中任一项所示的轻链可变区之一的 LCDR1、2 和 3 序列，或所述 CDR 序列组合的变体。

在另一些实施方案中，本发明提供了结合 B7-H3 的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 或 8 中任一项所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2、7、9 或 14 中任一项所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 或 10 中任一项所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，LCDR1 包含 SEQ ID NO: 4、11 或 15 中任一项所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，LCDR2 包含 SEQ ID NO: 5 或 12 中任一项所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，LCDR3 包含 SEQ ID NO: 6 或 13 中任一项所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方案中，本发明提供了结合 B7-H3 分子的抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 VH 和/或轻链可变区 VL，其中，

1) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:16 所示的 VH 中所含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，并且所述 VL 包含 SEQ ID NO:17 所示的 VL 中所含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；

2) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:18 所示的 VH 中所含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，并且

所述 VL 包含 SEQ ID NO:19 所示的 VL 中所含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3;

3) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:20 所示的 VH 中所含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 并且所述 VL 包含 SEQ ID NO:21 所示的 VL 中所含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3; 或

4) 所述 VH 包含 SEQ ID NO:22 所示的 VH 中所含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 并且所述 VL 包含 SEQ ID NO:23 所示的 VL 中所含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

在一些实施方案中, 本发明提供了抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 VH 和/或轻链可变区 VL, 其中,

(i) 所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3, 其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 或 8 中任一项所示的氨基酸序列或由所述序列组成; HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2、7、9、14 中任一项所示的氨基酸序列或由所述序列组成; HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 或 10 中任一项所示的氨基酸序列或由所述序列组成;

和/或

(ii) 其中所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3, 其中 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 4、11 或 15 中任一项所示的氨基酸序列或由所述序列组成; LCDR2 包含 SEQ ID NO: 5 或 12 中任一项所示的氨基酸序列或由所述序列组成; LCDR3 包含 SEQ ID NO: 6 或 13 中任一项所示的氨基酸序列或由所述序列组成。

在一些实施方案中, 本发明提供了抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段, 其包含:

- 1) HCDR1, 其包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
HCDR2, 其包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
HCDR3, 其包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
LCDR1, 其包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
LCDR2, 其包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
- 2) HCDR1, 其包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
HCDR2, 其包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
HCDR3, 其包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
LCDR1, 其包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
LCDR2, 其包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;

- 3) HCDR1, 其包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
HCDR2, 其包含 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
HCDR3, 其包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
LCDR1, 其包含 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
LCDR2, 其包含 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
- 4) HCDR1, 其包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
HCDR2, 其包含 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
HCDR3, 其包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
LCDR1, 其包含 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
LCDR2, 其包含 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成;
LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列, 或由所述序列组成。

在一些实施方案中, 本发明提供了抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 VH 和/或轻链可变区 VL, 其中,

(a) 重链可变区 VH

(i) 包含与 SEQ ID NO: 16、18、20 或 22 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由其组成, 且包含所述序列的相应 CDR 序列; 或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 16、18、20 或 22 中任一项所示的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 16、18、20 或 22 中任一项所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中;

和/或

(b) 轻链可变区 VL

(i) 包含与 SEQ ID NO: 17、19、21 或 23 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由其组成, 且包含所述序列的相应 CDR 序列;

(ii) 包含 SEQ ID NO: 17、19、21 或 23 中任一项所示的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 17、19、21 或 23 中任一项所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换,

更优选氨基酸保守置换)的氨基酸序列,优选地,所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

在一些实施方案中,本发明提供了抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段,其包含

1) 包含与 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链可变区 VH,和包含与 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 VL;

2) 包含与 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链可变区 VH,和包含与 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 VL;

3) 包含与 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链可变区 VH,和包含与 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 VL;

4) 包含与 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链可变区 VH,和包含与 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链可变区 VL。

在一些实施方案中,本发明提供了结合 B7-H3 的抗体或其抗原结合片段,其包含

1) 包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或由其组成的重链可变区 VH,和包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或由其组成的轻链可变区 VL;

2) 包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或由其组成的重链可变区 VH,和包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或由其组成的轻链可变区 VL;

3) 包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列或由其组成的重链可变区 VH,和包含 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列或由其组成的轻链可变区 VL;

4) 包含 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列或由其组成的重链可变区 VH,和包含 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列或由其组成的轻链可变区 VL。

在一些实施方案中,本发明提供了抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段,其包含重链和/或轻

链，其中

(a) 重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 24、26、28 或 30 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性且包含所述序列相应 CDR 序列的氨基酸序列或由其组成；

(ii) 包含 SEQ ID NO: 24、26、28 或 30 中任一项所示的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 24、26、28 或 30 中任一项所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列，优选地，所述氨基酸改变不发生在重链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在重链可变区中；

和/或

(b) 轻链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 25、27、29 或 31 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性且包含所述序列相应 CDR 序列的氨基酸序列或由其组成；

(ii) 包含 SEQ ID NO: 25、27、29 或 31 中任一项所示的氨基酸序列或由其组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 25、27、29 或 31 中任一项所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列，优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链可变区中。

在一些实施方案中，本发明提供了抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段，其包含

1) 包含与 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列的重链，和包含与 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列的轻链；

2) 包含与 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列的重链，和包含与 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列的轻链；

3) 包含与 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列的重链，和包含与 SEQ ID NO:29 所示的氨

氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链；

4) 包含与 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的重链，和包含与 SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列的轻链。

在一些实施方案中，本发明提供了结合 B7-H3 的抗体或其抗原结合片段，其包含

1) 包含 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列或由其组成的轻链；

2) 包含 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列或由其组成的轻链；

3) 包含 SEQ ID NO:28 所示氨基酸序列或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO:29 所示氨基酸序列或由其组成的轻链；

4) 包含 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列或由其组成的重链，和包含 SEQ ID NO:31 所示氨基酸序列或由其组成的轻链。

在一些实施方案中，本发明的抗 B7-H3 抗体是 IgG1 形式的抗体、IgG2 形式的抗体、IgG3 形式的抗体或 IgG4 形式的抗体；优选地，抗 B7-H3 抗体是 IgG1 形式的抗体。

在一些实施方案中，抗 B7-H3 抗体是单克隆抗体。

在一些实施方案中，抗 B7-H3 抗体是嵌合抗体，在优选实施方案中，抗 B7-H3 抗体是来源化的抗体。本发明的抗 B7-H3 抗体还涵盖其抗体片段，优选地选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂、Fv、单链抗体(例如 scFv)、单结构域抗体、双抗体(dAb)或线性抗体。

在一些实施方案中，本发明提供了编码抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段的分离的核酸，包含所述核酸的载体，包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。

在一些实施方案中，本发明提供了制备抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括在适于表达编码本发明所述的核酸的条件下培养本发明所述的宿主细胞。在另一个实施方案中，本发明提供了由上述方法制备的抗 B7-H3 抗体及其抗原结合片段。

在一些实施方案中，本发明提供了包含抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段的免疫缀合物和药物组合物。

在一些实施方案中，本发明还提供了利用抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物或药物组合物在制备用于预防和/或治疗 B7-H3 相关疾病或病症(例如肿瘤)的药物中的应用。

在一些实施方案中，本发明还提供了预防和/或治疗 B7-H3 相关疾病或病症（例如肿瘤）的方法，所述方法包括向受试者施用有效量的本发明结合 B7-H3 的抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物或药物组合物。

本发明还涉及检测样品中 B7-H3 分子的方法，所述方法包括(a) 使本发明所述的抗体或其抗原结合片段与样品接触；以及(b)检测样品中是否形成抗体或其抗原结合片段与 B7-H3 分子的复合物。

另一个方面，本发明还涉及诊断受试者表达 B7-H3 分子的肿瘤的方法，所述方法包括(a) 获取受试者的样品；(b) 使本发明所述的抗体或其抗原结合片段与样品接触；以及(c)检测样品中是否形成抗体或其抗原结合片段与 B7-H3 分子的复合物。

附图说明

结合以下附图一起阅读时，将更好地理解以下详细描述的本发明的优选实施方案。出于说明本发明的目的，图中显示了目前优选的实施方案。然而，应当理解本发明不限于图中所示实施方案的精确安排和手段。

图 1. 抗体结合过表达人 B7H3 的 CHOS 细胞的 FACS 检测结果

图 2: 抗体 ADCC 活性检测结果

图 3: 抗体体内抗肿瘤结果，其中图 3a: 荷瘤小鼠的肿瘤体积变化，图 3b-3c: 荷瘤小鼠体重变化

具体实施方式

I. 定义

在下文详细描述本发明前，应理解本发明不限于本文中描述的特定方法学、方案和试剂，因为这些可以变化。还应理解本文中使用的术语仅为了描述具体实施方案，而并不意图限制本发明的范围，其仅会由所附权利要求书限制。除非另外定义，本文中使用的所有技术和科学术语与本发明所属领域中普通技术人员通常的理解具有相同的含义。

为了解释本说明书，将使用以下定义，并且只要适当，以单数形式使用的术语也可以包括复数，并且反之亦然。要理解，本文所用的术语仅是为了描述具体的实施方案，并且不意欲是限制性的。

术语“约”在与数字数值联合使用时意为涵盖具有比指定数字数值小 5% 的下限和比指定数字数值大 5% 的上限的范围内的数字数值。

术语“和/或”意指当用于连接两个或多个可选项时，应理解为意指可选项中的任一项或可选项中的任意两项或更多项。

术语“包含”或“包括”意指包括所述的要素、整数或步骤，但是不排除任意其它要素、整数或步骤。在本文中，当使用术语“包含”或“包括”时，除非另有指明，否则也涵盖由所述及的要素、整数或步骤组合的情形。例如，当提及“包含”某个具体序列的抗体可变区时，也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

术语“抗体”在本文中以最广意义使用并且涵盖多种抗体结构物，包括但不限于单克隆抗体、多克隆抗体、重组抗体、人源化抗体、嵌合抗体、多特异性抗体(例如，双特异性抗体)、单链抗体、完整抗体或其显示出所需的抗原结合活性的抗体片段。完整抗体通常将包含至少两条全长重链和两条全长轻链，但在某些情况下可包括较少的链，例如骆驼中天然存在的抗体可仅包含重链。

术语“抗原结合片段”(在本文中可与“抗体片段”和“抗原结合部分”互换使用)，指与完整抗体不同的分子，其包含完整抗体的一部分且结合完整抗体所结合的抗原。抗原结合片段的例子包括但不限于 Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; 双抗体(diabodies, dAb); 线性抗体; 单链抗体(例如 scFv); 单结构域抗体(单域抗体); 双价或双特异性抗体的抗原结合片段; 骆驼科抗体; 和表现出所需的结合抗原(例如 B7-H3)能力的其它片段。

“亲和力”或“结合亲和力”指反映结合对子的成员之间相互作用的固有结合亲和力。分子 X 对其配偶物 Y 的亲和力可以通常由平衡解离常数(KD)代表，平衡解离常数是解离速率常数和结合速率常数(分别是 k_{dis} 和 k_{on})的比值。亲和力可以由本领域已知的常见方法测量。用于测量亲和力的一个具体方法是本文中的 ForteBio 动力学结合测定法。

术语“Fc 区”在本文中用于定义免疫球蛋白重链的 C 端区域，所述区域包含至少一部分的恒定区。该术语包括天然序列 Fc 区和变体 Fc 区。在某些实施方案中，人 IgG 重链 Fc 区通常从 Cys226 或 Pro230 延伸至重链的羧基端。然而，Fc 区的 C 端赖氨酸(Lys447)可以存在或者可以不存在。除非另外说明，Fc 区或恒定区中的氨基酸残基的编号是根据 EU 编号系统，其也被称为 EU 索引，如在 Kabat 等，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed.Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 中所述。

术语“可变区”或“可变结构域”是指参与抗体与抗原结合的抗体重或轻链的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域通常具有相似的结构，其中每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个互补决定区(参见，例如，Kindt 等 Kuby Immunology, 6th ed., W.H.Freeman and Co.91 页(2007))。单个 VH 或 VL 结构域可以足以给予抗原结合特异性。此外，可以使用来自与特定抗原结合的抗体的 VH 或 VL 结构域分别筛选互补 VL 或 VH 结构域的文库来分离结合所述抗原的抗体，参见，例如，Portolano 等，J.Immunol.150: 880-887(1993); Clarkson 等，Nature 352: 624-628(1991)。

“互补决定区”或“CDR 区”或“CDR”或“高变区”(在本文中与超变区“HVR”可以互换使用),是抗体可变结构域中在序列上高度可变并且形成在结构上确定的环(“超变环”)和/或含有抗原接触残基(“抗原接触点”)的区域。CDR 主要负责与抗原表位结合。重链和轻链的 CDR 从 N-端开始顺序编号,通常称作 CDR1、CDR2 和 CDR3。位于抗体重链可变结构域内的 CDR 也称作 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3,而位于抗体轻链可变结构域内的 CDR 则称作 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。在一个给定的轻链可变区或重链可变区氨基酸序列中,可以采用本领域公知的多种方案确定其 CDR 序列,例如, Kabat 互补决定区(CDR)是基于序列变异性确定的并且是最常用的(Kabat 等人, Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991))。而 Chothia 指的是结构环的位置(Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM CDR 是 Kabat CDR 和 Chothia 结构环之间的折中,并且由 Oxford Molecular 的 AbM 抗体建模软件使用。“接触性”(Contact) CDR 基于对可获得的复杂晶体结构的分析。根据不同的 CDR 确定方案,这些 CDR 中的每一个 HVR/CDR 的残基如下所述。

CDR	Kabat 方案	AbM 方案	Chothia 方案	Contact 方案
LCDR1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
LCDR2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
LCDR3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
HCDR1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B
(Kabat 编号系统)				
HCDR1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Chothia 编号系统)				
HCDR2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
HCDR3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101
(Kabat 编号系统)				

CDR 也可以是根据 Kabat 编号系统位于如下 Kabat 残基位置的 CDR 序列:

VL 中的位置 24-36 或 24-34 (LCDR1), 位置 46-56 或 50-56 (LCDR2), 和位置 89-97 或 89-96 位置(LCDR3); 和 VH 中的位置 26-35 或 27-35B (HCDR1), 位置 50-65 或 49-65 (HCDR2), 和位置 93-102、94-102 或 95-102 (HCDR3)。

在一个实施方案中, 本发明抗体的 HCDR1 通过 AbM 规则确定边界, HCDR2、HCDR3 及 LCDR 通过 Kabat 规则确定边界, 例如下文表 A 所示。

CDR 也可以基于与参考 CDR 序列(例如本发明示例性 CDR 之任一)具有相同的 Kabat 编号位置而确定。

除非另有说明, 否则在本发明中, 当提及抗体可变区中的残基位置(包括重链可变区残基和轻链可变区残基)时, 是指根据 Kabat 编号系统(Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版, Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)) 的编号位置。

除非另有说明, 否则在本发明中, 术语“CDR”或“CDR 序列”涵盖以上述任一种方式确定的 CDR 序列。

然而, 应该注意, 基于不同的指派系统获得的同一抗体的可变区的 CDR 的边界可能有所差异。即不同指派系统下定义的同一种抗体可变区的 CDR 序列有所不同。因此, 在涉及用本发明定义的具体 CDR 序列限定抗体时, 所述抗体的范围还涵盖了这样的抗体, 其可变区序列包含所述的具体 CDR 序列, 但是由于应用了不同的方案(例如不同的指派系统规则或组合)而导致其所声称的 CDR 边界与本发明所定义的具体 CDR 边界不同。

具有不同特异性(即, 针对不同抗原的不同结合位点)的抗体具有不同的 CDR。然而, 尽管 CDR 在抗体与抗体之间是不同的, 但是 CDR 内只有有限数量的氨基酸位置直接参与抗原结合。使用 Kabat, Chothia, AbM、Contact 和 North 方法中的至少两种, 可以确定最小重叠区域, 从而提供用于抗原结合的“最小结合单位”。最小结合单位可以是 CDR 的一个子部分。正如本领域技术人员明了, 通过抗体的结构和蛋白折叠, 可以确定 CDR 序列其余部分的残基。因此, 本发明也考虑本文所给出的任何 CDR 的变体。例如, 在一个 CDR 的变体中, 最小结合单位的氨基酸残基可以保持不变, 而根据 Kabat 或 Chothia 定义的其余 CDR 残基可以被保守氨基酸残基替代。

术语“抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”指其中结合到某些细胞毒性细胞(例如 NK 细胞, 嗜中性粒细胞和巨噬细胞)上存在的 Fc 受体(FcR)上的分泌型免疫球蛋白使得这些细胞毒性效应细胞能够特异性结合携带抗原的靶细胞, 随后用细胞毒素杀死靶细胞的细胞毒性形式。介导 ADCC 的主要细胞 NK 细胞只表达 Fc γ RIII, 而单核细胞表达 Fc γ RI, Fc γ RII 和 Fc γ RIII。为了评估目的分子的 ADCC 活性, 可进行体外 ADCC 测定法, 或者可在体内评估目的分子的 ADCC 活性, 例如在动物模型中。本文实施例中提供了用于评估 ADCC 活性的一种示例性测定法。

术语“功能性 Fc 区”指这样的 Fc 区, 其拥有天然序列 Fc 区的“效应器功能”。示例性的“效应器功能”包括 C1q 结合; CDC; Fc 受体结合; ADCC; 吞噬作用; 细胞表面受体(例如 B 细胞受体; BCR)下调等。此类效应器功能一般要求 Fc 区与结合结构域(例如抗体可变域)联

合，而且可以使用多种测定法来评估，例如本文所公开的那些。

本文所述的术语“治疗剂”涵盖在预防或治疗肿瘤（例如癌症）中有效的任何物质，包括化疗剂、细胞毒性剂、疫苗、其它抗体、抗感染活性剂、小分子药物或免疫调节剂。

本文使用的术语“免疫调节剂”指抑制或调节免疫应答的天然或合成活性剂或者药物。免疫应答可以是体液应答或细胞应答。

术语“有效量”指本发明的抗体或其片段或缀合物或组合物这样的量或剂量，其以单一或多次剂量施用患者后，在需要治疗或预防的患者中产生预期效果。针对治疗或预防的目的，可以将“有效量”区分为“治疗有效量”和“预防有效量”。有效量可以由作为本领域技术人员的主治医师通过考虑以下多种因素而容易地确定：诸如哺乳动物的物种、大小、年龄和一般健康、涉及的具体疾病、疾病的程度或严重性、个体患者的应答、施用的具体抗体、施用模式、施用制剂的生物利用率特征、选择的给药方案、和任何伴随疗法的使用。

在一个实施方式中，相比较于对照，有效量的本发明 B7-H3 抗体优选地抑制可度量参数(例如肿瘤生长率，肿瘤体积等)至少约 20%、更优选地至少约 40%。

术语“宿主细胞”、“宿主细胞系”和“宿主细胞培养物”可交换地使用且是指其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“转化的细胞”，其包括最初原代转化的细胞和来源于其的后代，而不考虑传代的数目。后代在核酸内容上可能与亲本细胞不完全相同，而是可以包含突变。本文中包括在最初转化的细胞中筛选或选择的具有相同功能或生物学活性的突变体后代。

术语“嵌合抗体”是指可变区序列源自一物种、恒定区序列源自另一物种的抗体，例如，其中可变区序列源自小鼠抗体、恒定区序列源自人抗体的抗体。

术语“人源化抗体”是指将源自其他哺乳动物物种例如小鼠种系的抗原结合位点接到人免疫球蛋白序列上的抗体。人源化抗体是一种嵌合分子，该嵌合分子通常使用重组技术制备，可以在人构架序列内进行额外的构架区修饰。抗原结合位点可以包含融合到恒定区的完整可变域，或仅包含嫁接到可变域中的合适框架序列上的互补决定区。在一些实施方案中，人源化抗体将包含基本上所有的至少一个、通常两个可变结构域，其中所有或基本上所有的 CDR(例如，6 个 CDR)对应于非人抗体的那些，并且所有或基本上所有的 FR 对应于人抗体的那些。人源化抗体任选可以包含至少一部分的来源于人抗体的抗体恒定区。抗体(例如非人抗体)的“人源化形式”是指已经进行了人源化的抗体。

术语“免疫缀合物”是与一个或多个其它物质(包括但不限于细胞毒性剂或标记)缀合的抗体。

本文所使用的术语“标记”是指被直接或间接缀合或融合至试剂(诸如多核苷酸探针或抗

体) 并且促进其所缀合或融合的试剂的检测的化合物或组合物。标记本身可以是可检测的(例如, 放射性同位素标记或荧光标记)或在酶促标记的情况下可以催化可检测的底物化合物或组合物的化学改变。术语旨在涵盖通过将可检测物质偶联(即, 物理连接)至探针或抗体来直接标记探针或抗体以及通过与直接标记的另一种试剂反应来间接标记探针或抗体。间接标记的实例包括使用荧光标记的二级抗体进行的一级抗体的检测和具有生物素的 DNA 探针的末端标记, 使得其可以用荧光标记的链霉抗生素蛋白来检测。

术语“个体”或“受试者”包括哺乳动物。哺乳动物包括但不限于, 家养动物(例如, 牛, 羊, 猫, 狗和马), 灵长类动物(例如, 人和非人灵长类动物如猴), 兔, 以及啮齿类动物(例如, 小鼠和大鼠)。在一些实施方案中, 个体或受试者是人。

术语“分离的”抗体是这样的抗体, 其已经与其天然环境的组分分离。在一些实施方案中, 将抗体纯化至超过 95% 或 99% 纯度, 如通过例如电泳(例如, SDS-PAGE, 等电聚焦(IEF), 毛细管电泳)或层析(例如, 离子交换或反相 HPLC)确定的。

“分离的编码抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段的核酸”是指一个或多个核酸分子, 其编码抗体重链或轻链(或其抗原结合片段), 包括在单一载体或分开的载体中的这样的核酸分子, 以及存在于宿主细胞中的一个或多个位置处的这样的核酸分子。

如下进行序列之间序列同一性的计算。

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, 可以为了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)。在一个优选实施方案中, 为比较目的, 所比对的参考序列的长度是至少 30%、优选地至少 40%、更优选地至少 50%、60% 和甚至更优选地至少 70%、80%、90%、100% 的参考序列长度。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。

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。在一个优选实施方案中, 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 <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。在又一个优选的实施方案中, 使用 GCG 软件包中的 GAP 程序(在 <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 Blossum 62 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，可以进一步使用本文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，以例如鉴定其它家族成员序列或相关序列。

术语“药用辅料”指与活性物质一起施用的稀释剂、佐剂(例如弗氏佐剂(完全和不完全的))、赋形剂、载体或稳定剂等。

术语“药物组合物”指这样的组合物，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，并且不包含对施用所述组合物的受试者具有不可接受的毒性的另外的成分。

用于本文时，“治疗”指减缓、中断、阻滞、缓解、停止、降低、或逆转已存在的症状、病症、病况或疾病的进展或严重性。

用于本文时，“预防”包括对疾病或病症或特定疾病或病症的症状的发生或发展的抑制。在一些实施方式中，具有癌症家族病史的受试者是预防性方案的候选。通常，在癌症的背景中，术语“预防”是指在癌症的病征或症状发生前，特别是在具有癌症风险的受试者中发生前的药物施用。

术语“载体”当在本文中使用时是指能够增殖与其相连的另一个核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及结合到已经引入其的宿主细胞的基因组中的载体。一些载体能够指导与其可操作相连的核酸的表达。这样的载体在本文中被称为“表达载体”。

术语“受试者/患者样品”指从患者或受试者得到的组织或细胞样品集合。组织或细胞样品的来源可以是实体组织（例如来自新鲜的、冷冻的和/或保存的器官或组织样品或活检样品或穿刺样品）；血液或任何血液组分；体液（诸如脑脊液、羊膜液(羊水)、腹膜液(腹水)、或间隙液）；来自受试者的妊娠或发育任何时间的细胞。

II. 抗体

除非另外说明，术语“B7-H3”、“B7H3”和“CD276”在本文中可互换使用。B7-H3 是属于 B7/CD28 超家族成员的 I 型跨膜糖蛋白，与 PD-L1 的胞外结构域在序列上相似。B7-H3 具有 316 个氨基酸，其中包含一个推定的由 28 个氨基酸组成的信号肽，一个 217 个氨基酸组成的胞外区以及一个跨膜区和一个 45 个氨基酸组成的胞质结构域，分子量约为 45-66 kDa。在人体中，由于外显子复制，B7-H3 的胞外结构可以为 IgV-IgC 样结构域 (2Ig-B7-H3)，或者为 IgV-IgC-IgV-IgC 样结构域 (4Ig-B7-H3)。食蟹猴 B7-H3 的序列与其人类对应物具有约 90% 的同源性。

本文所用的术语“抗 B7-H3 抗体”、“抗 B7-H3”、“B7-H3 抗体”或“抗 B7-H3 的抗体”是指这样的抗体，所述抗体或其抗原结合片段能够以足够的亲合力结合 B7-H3 蛋白。所述抗体可以用作靶向 B7-H3 中的诊断剂和/或治疗剂。

在一些实施方案中，本发明的抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段以足够的亲和力结合 B7-H3（例如人或食蟹猴 B7-H3），例如，以下述平衡解离常数(K_D)与 B7-H3 结合，所述 $K_D \leq 1\mu\text{M}$ ， $\leq 100\text{nM}$ ， $\leq 10\text{nM}$ ， $\leq 1\text{nM}$ ， $\leq 0.1\text{nM}$ ， $\leq 0.01\text{nM}$ ，或 $\leq 0.001\text{nM}$ （例如 10^{-7}M 以下，例如 10^{-7}M 至 10^{-10}M ）。在一些实施方案中，B7-H3 为人或食蟹猴 B7-H3。在一些实施方案中，抗体结合亲和力是使用生物光干涉测量测定的，例如在生物光干涉测量中，抗体以大约 $1 \times 10^{-7}\text{M}$ 或更低、大约 $5 \times 10^{-8}\text{M}$ 或更低、大约 $1 \times 10^{-8}\text{M}$ 或更低、大约 $5 \times 10^{-9}\text{M}$ 或更低的 K_D 、大约 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 或更低的 K_D 、大约 $1 \times 10^{-10}\text{M}$ 或更低的 K_D ，与人 B7-H3 结合。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段结合细胞表面表达的 B7-H3。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段可以诱导 ADCC 效应。在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段可以抑制和/或减小体内肿瘤的生长和/或体积。

在一些实施方案中，本发明的结合 B7-H3 的抗体或其抗原结合片段包含重链可变区(VH)和/或轻链可变区(VL)，其中所述 VH 和 VL 包含选自表 A 所示的 6 个 CDR 的组合。

在本发明的一个实施方案中，本文所述的氨基酸改变包括氨基酸的置换、插入或缺失。优选的，本文所述的氨基酸改变为氨基酸置换，优选地保守置换。

在优选的实施方案中，本发明所述的氨基酸改变发生在 CDR 外的区域（例如在 FR 中）。更优选地，本发明所述的氨基酸改变发生在重链可变区外和/或轻链可变区外的区域。

在一些实施方案中，置换为保守性置换。保守置换是指一个氨基酸经相同类别内的另一氨基酸置换，例如一个酸性氨基酸经另一酸性氨基酸置换，一个碱性氨基酸经另一碱性氨基酸置换，或一个中性氨基酸经另一中性氨基酸置换。示例性的置换如下表所示：

原始残基	示例性置换	优选的保守氨基酸置换
Ala (A)	Val、Leu、Ile	Val
Arg (R)	Lys、Gln、Asn	Lys
Asn (N)	Gln、His、Asp、Lys、Arg	Gln
Asp (D)	Glu、Asn	Glu
Cys (C)	Ser、Ala	Ser
Gln (Q)	Asn、Glu	Asn
Glu (E)	Asp、Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn、Gln、Lys、Arg	Arg
Ile (I)	Leu、Val、Met、Ala、Phe、正亮氨酸	Leu

Leu (L)	正亮氨酸、Ile、Val、Met、Ala、Phe	Ile
Lys (K)	Arg、Gln、Asn	Arg
Met (M)	Leu、Phe、Ile	Leu
Phe (F)	Trp、Leu、Val、Ile、Ala、Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val、Ser	Ser
Trp (W)	Tyr、Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp、Phe、Thr、Ser	Phe
Val (V)	Ile、Leu、Met、Phe、Ala、正亮氨酸	Leu

在某些实施方案中，置换发生在抗体的 CDR 区。通常，获得的变体相对于亲本抗体在某些生物学特性方面(例如，增加的亲和力)具有修饰(例如，改善)和/或将具有亲本抗体的基本上保留的某些生物学特性。示例性置换变体是亲和力成熟抗体。

在某些实施方案中，本文中所提供的抗体经改变以增加或降低抗体经糖基化的程度。对抗体的糖基化位点的添加或缺失可通过改变氨基酸序列以便产生或移除一或多个糖基化位点而方便地实现。当抗体包含 Fc 区时，可以改变附着于其的糖类。在一些应用中，除去不想要的糖基化位点的修饰是有用的，例如除去岩藻糖模块以提高抗体依赖性细胞介导的细胞毒性细胞毒性(ADCC)功能(参见 Shield 等(2002)JBC277:26733)。在其它应用中，可以进行半乳糖苷化修饰以修饰补体依赖性细胞毒性(CDC)。

在某些实施方案中，可在本文中所提供抗体的 Fc 区中引入一个或多个氨基酸修饰，以此产生 Fc 区变体。Fc 区变体可包括在一或多个氨基酸位置处包含氨基酸修饰(例如置换)的人 Fc 区序列(例如人 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4Fc 区)。关于 Fc 变体的实例参见美国专利号 7,332,581，美国专利号 6,737,056，美国专利号 6,737,056；WO 2004/056312 和 Shields 等人，J. Biol. Chem. 9(2):6591-6604(2001)，美国专利号 6,194,551、WO 99/51642 和 Idusogie 等人 J. Immunol. 164:4178-4184(2000)，美国专利号 7,371,826，Duncan&Winter,Nature 322:738-40(1988)；美国专利号 5,648,260；美国专利号 5,624,821；和 WO 94/29351。

在某些实施方案中，可能需要产生经半胱氨酸工程改造的抗体，例如“硫代 MAb”，其中抗体的一或多个残基经半胱氨酸残基置换。可以如，例如美国专利号 7,521,541 中所述地生成半胱氨酸改造的抗体。

在某些实施方案中，本文中所提供的抗体可进一步经修饰为含有本领域中已知且轻易获得的其它非蛋白质部分。适合抗体衍生作用的部分包括，但不限于，水溶性聚合物。水溶性聚合物的非限制性实例包括，但不限于，聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纤维素、葡聚糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯烷酮、聚-1,3-二烷、聚-1,3,6-三烷、乙烯/马来酸酐共聚物、聚

氨基酸(均聚物或无规共聚物)、及葡聚糖或聚(n-乙烯基吡咯烷酮)聚乙二醇、丙二醇均聚物、聚环氧丙烷/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇、及其混合物。

III. 本发明的核酸以及包含其的载体和宿主细胞

本发明提供编码以上任何抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段的核酸。还提供包含所述核酸的载体。在一个实施方案中，载体是表达载体。

本发明还提供了包含所述核酸或所述载体的宿主细胞。在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自大肠杆菌细胞、哺乳动物细胞(例如 CHO 细胞或 293 细胞)或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。在另一个实施方案中，宿主细胞是原核的。在一个实施方案中，宿主细胞选自大肠杆菌。

如本领域技术人员明了的，因为密码子简并性，每一个抗体或多肽氨基酸序列可以由多种核酸序列编码。

可以采用本领域熟知的方法，通过从头固相 DNA 合成或通过 PCR 诱变编码结合 B7-H3 的抗体或其抗原结合片段的序列，产生这些多核苷酸序列。

在一个实施方案中，提供包含本发明核酸的一个或多个载体。在一个实施方案中，载体是表达载体，例如真核表达载体。载体包括但不限于病毒、质粒、粘粒、λ 噬菌体或酵母人工染色体(YAC)。

在一个实施方案中，提供包含所述载体的宿主细胞。用于克隆或表达编码抗体的载体的适当宿主细胞包括本文描述的原核或真核细胞。例如，抗体可在细菌中产生，特别当不需要糖基化和 Fc 效应子功能时。对于抗体片段和多肽在细菌中的表达，见，例如，美国专利号 5,648,237，5,789,199 和 5,840,523，还见 Charlton, *Methods in Molecular Biology*, 卷 248(B.K.C.Lo, 编辑, Humana Press, Totowa, NJ, 2003), 第 245-254 页，其描述抗体片段在大肠杆菌中的表达。在表达后，抗体可以从可溶级分中的细菌细胞糊状物分离，并且可以进一步纯化。

在一个实施方案中，宿主细胞是真核的。在另一个实施方案中，宿主细胞选自酵母细胞、哺乳动物细胞或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。例如，真核微生物诸如丝状真菌或酵母是关于编码抗体的载体的合适克隆或表达宿主。例如，糖基化途径已经进行“人源化”的真菌和酵母菌株导致产生具有部分或完全人糖基化模式的抗体。参见 Gemgross, *Nat.Biotech.*22: 1409-1414(2004), 和 Li 等, *Nat.Biotech.*24: 210-215(2006)。适于表达糖基化抗体的宿主细胞也衍生自多细胞生物体(无脊椎动物和脊椎动物)。也可以将脊椎动物细胞用作宿主。例如，可以使用被改造以适合于悬浮生长的哺乳动物细胞系。有用哺乳动物宿主细胞系的其它实例是用 SV40 转化的猴肾 CV1 系(COS-7); 人胚肾系(293HEK 或 293 细胞，如例如 Graham 等, *J.Gen Virol.* 36 : 59(1977) 中所描述的) 等。其它有用的哺乳动物宿主细胞系包

括中国仓鼠卵巢(CHO) 细胞, 包括 DHFR-CHO 细胞(Urlaub 等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 77 : 216(1980)) ; 以及骨髓瘤细胞系如 Y0, NS0 和 Sp2/0。关于适合产生抗体的某些哺乳动物宿主细胞系的综述见例如 Yazaki 和 Wu, Methods in Molecular Biology, 卷 248 (B.K.C.Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ), 第 255-268 页(2003)。

IV. 本发明的抗体分子的生产 and 纯化

在一个实施方案中, 本发明提供制备抗 B7-H3 抗体或其片段(优选抗原结合片段)的方法, 其中所述方法包括在适于表达编码所述抗体或其片段(优选抗原结合片段)的核酸的条件下培养所述宿主细胞, 以及任选地分离所述抗体或其片段。在某个实施方案中, 所述方法还包括从宿主细胞回收抗 B7-H3 抗体或其片段。

V. 多特异性抗体

在再一方面, 本发明提供特异性地结合 B7-H3 的多特异性(包括双特异性)抗体分子。在一个实施方案中, 在多特异性抗体中, 本发明的抗体(或其抗原结合片段)形成针对 B7-H3 的第一结合特异性。

在一个实施方案中, 结合特异性由抗体的“结合位点”或“抗原结合位点”(抗体分子中与抗原实际结合的区域)提供。在一个优选的实施方案中, 抗原结合位点由抗体轻链可变结构域(VL)和抗体重链可变结构域(VH)组成的 VH/VL 对构成。因此, 在一个实施方案中, “多特异性”抗体是具有至少两个抗原结合位点的抗体, 所述至少两个抗原结合位点中的每一个抗原结合位点可以与相同抗原的不同表位或与不同抗原的不同表位结合。

有关多特异性抗体及其制备, 可以参见例如 WO 2009/080251、WO 2009/080252、WO 2009/080253、WO 2009/080254、WO 2010/112193、WO 2010/115589、WO 2010/136172、WO 2010/145792 和 WO 2010/145793 中的描述。

VI. 免疫缀合物

在一些实施方案中, 本发明提供了通过将本发明抗体缀合于异源分子而产生的免疫缀合物。在一些实施方案中, 异源分子例如治疗剂或诊断剂, 如细胞毒性剂或化疗剂。细胞毒性剂包括任何对细胞有害的药剂。适合于形成免疫缀合物的细胞毒性剂的例子是本领域中已知的。

可以使用接头来共价连接缀合物的不同实体。适宜的接头包括化学接头或肽接头。有利地的是, 接头是利于多肽在递送至靶位点后释放的“可裂解接头”。例如, 可以使用酸不稳定性接头、肽酶敏感性接头、光不稳定性接头、二甲基接头或含二硫化物的接头 (Chari 等, Cancer Research 52 (1992) 127-131; US 5,208,020)。

在一些实施方案中, 本发明的抗体可以与诊断剂或可检测剂缀合。这类缀合物可以作为临

床检验方法的部分(如确定特定疗法的效力),用于监测或预测疾病或病症的发作、形成、进展和/或严重性。可以通过将抗体与可检测剂偶联实现这类诊断和检测,所述可检测剂包括但不限于多种酶,如但不限于辣根过氧化物酶;辅基,如但不限于链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;荧光物质;发光物质;放射性物质;和用于各种正电子发射成像术中的正电子发射金属和非放射性顺磁金属离子。

在一些实施方案中,所述免疫缀合物用于预防或治疗肿瘤。在一些实施方案中,肿瘤为癌症。

VII. 药物组合物、药物制剂和组合产品

本发明还包括包含抗 B7-H3 抗体或其免疫缀合物或多特异性抗体的组合物(包括药物组合物或药物制剂)和包含编码抗 B7-H3 抗体或其免疫缀合物或多特异性抗体的多核苷酸的组合物。这些组合物还可以任选地包含合适的药用辅料,如本领域中已知的药用载体、药用赋形剂,包括缓冲剂。

本发明的药物组合物或制剂还可以与一种或多种其它活性成分组合,所述活性成分是被治疗的特定适应症所需的,优选具有不会不利地影响彼此的互补活性的那些活性成分。

因此,在一个方面,本发明也提供了药物组合产品。在一个实施方案中,所述组合产品包含配制在相同药物组合物或制剂中的本发明抗体、免疫缀合物或多特异性抗体与第二治疗剂。在另一实施方案中,所述组合产品包含分开包含在不同的药物组合物或制剂中的本发明的抗体、免疫缀合物或多特异性抗体与第二治疗剂。第二治疗剂可以在本发明抗体施用之前、同时(例如在相同制剂中或在不同制剂中)、或之后施用。

本发明的药物组合物、制剂和组合产品可以在制品中提供,用于本文所述的疾病和/或病症的治疗、预防和/或诊断。制品可以包含容器和标签或包装说明书。合适的容器包括例如瓶、注射器、IV 输液袋等。容器可以由玻璃或塑料等多种材料制成。在一个实施方案中,制品可以包含(a)容纳有本发明抗体或抗体片段、免疫缀合物或多特异性抗体的第一容器;和任选地(b)容纳有第二治疗剂的第二容器。此外,制品也可以包含从商业和用户角度看期望的其它材料,包括缓冲液、可药用稀释剂,如无菌注射用水、针头、注射器、注射泵等。

VIII 应用

本发明一方面提供了预防和/或治疗 B7-H3 相关疾病或病症(例如癌症)的方法,包括向受试者施用有效量的本发明的抗 B7-H3 的抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物或药物组合物。

受试者可以是哺乳动物,例如,灵长类,优选地,高级灵长类,例如,人类。在一个实施方案中,受试者患有本文所述疾病或具有患有本文所述疾病的风险。在某些实施方案中,受试

者接受或已经接受过其它治疗，例如化疗治疗和/或放射疗法。在其它方面，本发明提供抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段、免疫缀合物或药物组合物在生产或制备药物中的应用，所述药物用于预防和/或治疗本文提及的 B7-H3 相关疾病或病症。

在一些实施方案中，本发明的抗体或其抗原结合片段或免疫缀合物或组合物或产品会延迟病症和/或与病症相关的症状的发作。

本发明的抗体(以及包含其的药物组合物或免疫缀合物，以及任何另外的治疗剂)可以通过任何合适的方法给药，包括肠胃外给药，肺内给药和鼻内给药，并且，如果局部治疗需要，病灶内给药。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给药。在一定程度上根据用药是短期或长期性而定，可通过任何适合途径，例如通过注射，例如静脉内或皮下注射用药。本文中涵盖各种用药时程，包括，但不限于，单次给药或在多个时间点多次给药、推注给药及脉冲输注。

为了预防或治疗疾病，本发明的抗体的合适剂量(当单独或与一种或多种其他的治疗剂组合使用时)将取决于待治疗疾病的类型、抗体的类型、疾病的严重性和进程、所述抗体是以预防目的施用还是以治疗目的施用、以前的治疗、患者的临床病史和对所述抗体的应答，和主治医师的判断力。所述抗体以一次治疗或经过一系列治疗合适地施用于患者。

在上述本发明方法中，可以替代本发明抗体或抗原结合部分，施用本发明的组合物、多特异性抗体或免疫缀合物。或者，在这些方法中，除了施用本发明抗体或抗原结合部分，还可以进一步施用本发明的组合物、多特异性抗体或免疫缀合物。

IX. 用于诊断和检测的方法和组合物

在某些实施方案中，本文中提供的任何抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段可以用于检测 B7-H3 在生物样品中的存在。在一个实施方案中，基于检测结果用于对疾病的诊断或者辅助诊断。术语“检测”用于本文中时，包括定量或定性检测，示例性的检测方法可以涉及免疫组织化学、免疫细胞化学、流式细胞术(例如，FACS)、抗体分子复合的磁珠、ELISA 测定法、PCR-技术(例如，RT-PCR)。在某些实施方案中，生物样品是血、血清或生物来源的其它液体样品。在某些实施方案中，生物样品包含细胞或组织。在一些实施方案中，生物样品来自过度增生性或癌性病灶。

在一个实施方案中，本发明提供检测生物样品中 B7-H3 的方法和试剂盒。在某些实施方案中，B7-H3 是人 B7-H3 或食蟹猴 B7-H3。在某些实施方案中，所述方法包括将生物样品与如本文所述的抗 B7-H3 抗体在允许抗体与 B7-H3 结合的条件下接触，并检测是否形成抗 B7-H3 抗体和 B7-H3 的复合物。该方法可以是体外或体内方法。在一些实施方案中，样品来自癌症

患者。所述样品可以是组织活检物、组织切片、体液例如血液、血浆、或血清。

在一些实施方案中，提供了一种治疗 B7-H3 相关疾病或病症（例如癌症或肿瘤）的方法，所述方法包括：向受试者施用治疗有效量的抗 B7-H3 抗体。在另一个实施方案中，所述方法还包括向受试者施用一种或多种其它疗法。

在一个实施方案中，抗 B7-H3 抗体被用于选择适合利用抗 B7-H3 抗体治疗的受试者，例如其中 B7-H3 是用于选择所述受试者的生物标记物。在一个实施方案中，可以使用本发明抗体诊断肿瘤，例如评价(例如，监测)对象中本文所述疾病的治疗或进展、其诊断和/或分期。在一个实施方案中，通过采用本申请的抗 B7-H3 抗体来确定多种组织（例如卵巢、肺、乳腺、前列腺、肾、胰脏、甲状腺、脑等组织）中是否存在癌细胞。采用本申请的抗 B7-H3 抗体可以用来确定从实体瘤释放进入循环血液中的癌细胞的存在与否以及 B7-H3 的水平，循环中的 B7-H3 抗原可以是完整的 B7-H3 分子，或者是其片段。检测方法例如通过 FACS 方法进行。

在某些实施方案中，提供标记的抗 B7-H3 抗体。标记包括但不限于，被直接检测的标记或部分(如荧光标记、发色团标记、电子致密标记、化学发光标记和放射性标记)，以及被间接检测的部分，如酶或配体，例如，通过酶促反应或分子相互作用。

X. 本发明的示例性抗 B7-H3 抗体

表 A 本发明示例抗体的 CDR 的氨基酸序列

抗体名称	VH CDR1 (AbM)	VH CDR2 (Kabat)	VH CDR3 (Kabat)	VL CDR1 (Kabat)	VL CDR2 (Kabat)	VL CDR3 (Kabat)
20G5/ ch20 G5	GYTFTEY IMH (SEQ ID NO:1)	GINPNNGGTT YNQKFKD (SEQ ID NO: 2)	RTPPWTF AV (SEQ ID NO: 3)	SASSSVSYI H (SEQ ID NO: 4)	DTSRLAS (SEQ ID NO: 5)	QQWSSAP LT (SEQ ID NO:6)
Hz20 G5		GINPGTGGTT YNQKFKD (SEQ ID NO: 7)				
19A2/ ch19 A2	GYIFTSY WIH (SEQ ID NO: 8)	RIYPGTDSTFY NEKFKG (SEQ ID NO:9)	ITASDWY FDV (SEQ ID NO: 10)	SVSSSVNSN YLY (SEQ ID NO:11)	GTSNLAS (SEQ ID NO: 12)	YQWSSYP FT (SEQ ID NO:13)
Hz19 A2		RIYPGTESTFY NEKFKG (SEQ ID NO: 14)				

表 B. 本发明示例抗体的重链可变区(VH) 和轻链可变区 (VL)

抗体名称	VH 蛋白质	VL 蛋白质
19A2 / ch19A2	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCK TSGYIFTSYWIHWIKQRSGQGLE WIARIYPGTDSTFYNEKFKGRATL TADKSSSTVYLQLNSLKSEDSAV YFCHFITASDWYFDVWGAGTTVT VSS (SEQ ID NO: 16)	DIVLTQSPAIMASAPGKVTLTCSVSSS VNSNYLYWYQQKPGSSPKLWIYGTSN LASGVPARFSGSGSGPSYSLTISSMEAE DAASYFCYQWSSYPFTFGSGTKLEIK (SEQ ID NO: 17)
20G5 / ch20G5	EVQLQQSVPELVKPGASVKISCKT SGYTFTEYIMHWVKQSHGKNLE WIGGINPNNGGTTYNQKFKDKAT LTVDKSSSTAYMELHNLTSEDSA VYYCTRRTPPWVHFAVWGAGTSL TVSS (SEQ ID NO: 18)	DIVLTQSPTIMASAPGKVTMTCSASSS VSYIHWYQQKSGTSPKRWIFDTSRLAS GVPARFSGSGSGTSSYSLTISSMEAEDAA TYYCQQWSSAPLTFGTGTTLELK (SEQ ID NO: 19)
Hz19A2	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYIFTSYWIHWVRQAPGQGLE WMGRIYPGTESTFYNEKFKGRVT MTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAV YYCHFITASDWYFDVWGQGLT VSS (SEQ ID NO: 20)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSVSSSV QSNYLYWYQQKPGQAPRLLIYGTSNLA SGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAV YYCYQWSSYPFTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 21)
Hz20G5	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCK ASGYTFTEYIMHWVRQAPGQRLE WMGGINPGTGGTTYNQKFKDRV TITVDTASAYMELSSLRSEDVAV YYCTRRTPPWVHFAVWGQGLTV SS (SEQ ID NO: 22)	DIQLTQSPSFLSASVGDRTITCSASSSV SYIHWYQQKPGKAPKRWIYDTSRLASG VPSRFSGSGSGTEFTLTISLQPEDFATY YCQQWSSAPLTFGGGGTKVEIK (SEQ ID NO: 23)

表 C. 本发明部分示例序列

序列名称	序列
Hz19A2-H C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYIFTSYWIHWVRQAPGQGLEWMG RIYPGTESTFYNEKFKGRVTMTRDTSTSTVYMELSSLRSEDVAVYYCHFITAS DWYFDVWGQGLTIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH KPSNTKVDKKEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPE EVTCCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLT VLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDEL KNQVSLTCLVKGFIYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLT VDKSRWQQGNVVFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 24)
Hz19A2-L C	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSVSSSVQSNYLYWYQQKPGQAPRLLIYGTS NLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEPEDFAVYYCYQWSSYPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF

	NRGEC (SEQ ID NO: 25)
Hz20G5-H C	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTEYIMHWVRQAPGQRLEWMG GINPGTGGTTYNQKFKDRVTITVDTSASTAYMELSSLRSEDNAVYYCTRRTPP WHFAVWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 26)
Hz20G5-L C	DIQLTQSPSFLSASVGDRVITICSASSSVSYIHWYQQKPGKAPKRWIYDTSRL ASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPEDFATYYCQQWSSAPLTFGGGTKEIKR TVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 27)
19A2-HC / ch19A2-H C	EVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKTSGYIFTSYWIHWIKQRSGQGLEWIARIY PGTDSTFYNEKFKGRATLTADKSSSTVYLQLNSLKSSEDAVYFCHFITASDW YFDVWGAGTTVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPV TVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVT CVVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLH QDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ VSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS RWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 28)
19A2-LC / ch19A2-L C	DIVLTQSPAIMASAPGEKVTLTCSVSSSVNSNYLYWYQQKPGSSPKLWIYGT SNLASGVPARFSGSGGPSYSLTISSMEAEDAASYFCYQWSSYPFTFGSGTK LEIKRTVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTK SFNRGEC(SEQ ID NO: 29)
20G5-HC / ch20G5-H C	EVQLQQSVPELVKPGASVKISCKTSGYTFTEYIMHWVKQSHGKNLEWIGGI NPNNGGTTYNQKFKDKATLTVDKSSSTAYMELHNLTSESDAVYYCTRRTPP WHFAVWGAGTSLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEP VTVSWNSGALTSQVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKP SNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKN QVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVD KSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 30)
20G5-LC / ch20G5-L C	DIVLTQSPTIMASAPGEKVTMTCSASSSVSYIHWYQQKSGTSPKRWIFDTSRL ASGVPARFSGSGGTSYSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSAPLTFGTGTTLEL KRTVAAPSVEFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSG NSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSF NRGEC (SEQ ID NO: 31)

<p>人 4Ig-B7H3</p>	<p>MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCC SFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGDQDQGSAYANRTALFPDLLAQ GNASLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKD LRPGDVTITCSSYQGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDV HSILRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHSSVTITPQRSPTGAVEVQVPEDPV VALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQGSAYA NRTALFPDLLAQGNASLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYS KPSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQ MANEQGLFDVHSLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTF PPEALWVTVGLSVCLIALLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEGS KTALQPLKHSDSKEDDGQEIA (SEQ ID NO: 32)</p>
<p>人 2Ig-B7H3</p>	<p>MLRRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLCC SFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFAEGDQDQGSAYANRTALFPDLLAQ GNASLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKD LRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGVPLTGNVTTSQMANEQGLFDVH SVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPPEALWVTVGLS VCLIALLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEGSKTALQPLKHSDS KEDDGQEIA (SEQ ID NO: 33)</p>
<p>食 蟹 猴 B7H3</p>	<p>MLHRRGSPGMGVHVGAALGALWFCLTGALEVQVPEDPVVALVGTDATLRC SFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQDQGSAYANRTALFLDLLAQ GNASLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSKPSMTLEPNKD LRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGAPLTGNVTTSQMANEQGLFDVH SVLRVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSITITPQRSPTGAVEVQVPEDPVV ALVGTDATLRCSFSPEPGFSLAQLNLIWQLTDTKQLVHSFTEGRDQDQGSAYAN RTALFLDLLAQGNASLRLQVRVADEGSFTCFVSIRDFGSAAVSLQVAAPYSK PSMTLEPNKDLRPGDVTITCSSYRGYPEAEVFWQDGQGAPLTGNVTTSQM ANEQGLFDVHSLRVVVLGANGTYSCLVRNPVLQQDAHGSVTITGQPMTFPP EALWVTVGLSVCLVALLVALAFVCWRKIKQSCEEENAGAEDQDGEGEGSKT ALQPLKHSDSKEDDGQELA (SEQ ID NO: 34)</p>
<p>MGA271 VH</p>	<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSFGMHWVRQAPGKGLEWVAYI SSDSSAIYYADTVKGRFTISRDNKNSLYLQMNSLRDEDTAVYYCGRGRENI YYGSRLDYWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 35)</p>
<p>MGA271 VL</p>	<p>DIQLTQSPSFLSASVGDRTVITCKASQNVDTNVAWYQQKPGKAPKALIYSAS YRYSRVSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQYNNYPFTFGQGTKLE IK (SEQ ID NO: 36)</p>
<p>人 IgG1-CH</p>	<p>ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSQVHT FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCD KTHITCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDI AVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO: 37)</p>
<p>人 κ-CL</p>	<p>RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS</p>

QESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC (SEQ ID NO: 38)
--

实施例

描述以下实施例以辅助对本发明的理解。不意在且不当以任何方式将实施例解释成限制本发明的保护范围，根据本申请说明书的描述，本领域技术人员可以进行多种修改。

除非明确指明相反，否则本发明的实施将采用本领域技术内的常规化学、生物化学、有机化学、分子生物学、微生物学、重组 DNA 技术、遗传学、免疫学和细胞生物学的方法。这些方法的描述可以参见，例如，Sambrook 等人，Molecular Cloning:A Laboratory Manual (第 3 版，2001)；Sambrook 等人，Molecular Cloning:A Laboratory Manual (第 2 版,1989)；Maniatis 等人，Molecular Cloning:A Laboratory Manual (1982)；Ausubel 等人，Current Protocols in Molecular Biology (John Wiley 和 Sons,2008 年 7 月更新)；Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,Greene Pub.Associates 和 Wiley-Interscience；Glover,DNA Cloning:A Practical Approach,vol.I&II (IRL Press,Oxford,1985)；Anand,Techniques for the Analysis of Complex Genomes, (Academic Press,New York,1992)；Transcription and Translation (B.Hames&S.Higgins,Eds.,1984)；Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning (1984)；Harlow 和 Lane,Antibodies, (Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1998) Current Protocols in Immunology Q.E.Coligan, A.M.Kruisbeek, D.H.Margulies, E.M.Shevach 和 W.Strober,eds.,1991)；Annual Review of Immunology；以及期刊专著如 Advances in Immunology。

实施例 1、杂交瘤细胞的制备

免疫动物

根据常规方法，使用重组的人 4Ig-B7H3 蛋白 (SEQ ID NO: 32) (SINO BIOLOGICAL, 货号 11188-H08H) 免疫 Bal b/c 小鼠 (北京维通利华)，将重组人 4Ig-B7H3 蛋白 (每只小鼠 50ug) 与 TiterMax (Sigma,货号 T2684-1ML) 佐剂等体积混匀后，每两周皮下注射一次，共免疫 5 次。

细胞融合

当血清效价满足要求后，按照常规方法，摘取小鼠的脾脏制备 B 淋巴细胞悬液，然后与 SP2/0 骨髓瘤细胞 (ATCC,CRL-1581) 以 1:2~1:1 的比例混合后进行电融合。将融合后的细胞从电极皿中转移入 50ml 离心管中，用筛选培养基 (配置组成如表 1 所示) 稀释细胞获得细胞

悬液（浓度 $1\sim 2\times 10^4$ 个细胞/ml）。向 96 孔板中每孔加入 100 μ l 细胞悬液。融合后第 5 天更换新鲜筛选培养基。根据细胞生长状态，培养 10 天（或更久）后进行流式细胞仪（FACS）检测，筛选阳性克隆。

表 1: 筛选培养基

名称	组成	配制方法
筛选培养基	RPMI-1640 (Hyclone)	90%
	FBS(Hyclone)	10%
	HAT medium (Gibco)	1 \times
	GlutaMAX™ Supplement (Gibco)	1 \times

高通量筛选杂交瘤细胞

通过流式细胞仪（FACS）筛选特异性表达抗 B7H3 抗体的杂交瘤细胞。简言之，将表达人 B7H3 的 CHO 细胞（CHO-huB7H3）计数，稀释至 1×10^6 个细胞/ml，然后向 U 型底 96 孔板各孔中加入 100 μ l，500 g 离心 5 min，去除细胞培养基。之后将上述杂交瘤 96 孔板中的各个培养上清和阳性对照抗体（MGA271）分别加入含有 CHO 细胞的 U 型板中并重悬细胞，每孔 100 μ l，冰上静置 30min。再 500g 离心 5min 以去除上清，然后用 PBS 溶液洗细胞 1 次。500 g 离心 5min 以去除 PBS 溶液。向每孔加入 100 μ l 抗鼠 Fab 的 FITC 标记的二抗（1:500 稀释于 PBS 溶液中），向阳性对照抗体培养孔中加入 100 μ l 抗人 Fab 的 FITC 标记的二抗。冰上避光孵育 30 min，500g 离心 5min 以去除上清，PBS 溶液洗细胞 1 次。之后用 50 μ l PBS 溶液重悬细胞，进行 FACS 检测，筛选获得阳性克隆。

将获得的阳性克隆，采用表达食蟹猴 B7H3 (SEQ ID NO: 34) 的 CHO 细胞 (CHO-cynoB7H3)，通过上述同样的方法进行复筛，共获得 2 株与人 B7H3 和猴 B7H3 都结合的杂交瘤细胞：19A2 和 20G5。

采用生物膜薄层干涉测定技术 (ForteBio) 测定所获得的 2 株杂交瘤细胞株与抗原的亲合力，获得的 KD 值如表 2 所示。

表 2: ForteBio 亲和力测定结果

杂交瘤克隆号	人 4Ig-B7H3	食蟹猴 B7H3
19A2	9.87E-10	9.77E-10
20G5	3.62E-10	5.90E-10

阳性杂交瘤细胞的亚克隆

根据细胞结合以及亲和力测定的结果，将上述克隆进行亚克隆。

具体步骤如下：将筛选培养基中的 HAT 更换成 HT (Gibco, Cat#11067-030) 获得基础培养基，每孔 200 μ l 加入 96 孔板。将上述融合筛选出的阳性杂交瘤细胞，按约 1×10^5 个细胞/ml 的密度，每孔 300 μ l 加入到 96 孔板第一排中，充分混匀。取第 1 排细胞悬液 100 μ l 加入第 2 排，充分混匀后取 100 μ l 加入下一排，重复上述步骤，直至最后一排，静置 15 min。显微镜下观察计数，取 100 个细胞对应的体积加入 20 ml 如上所述的基础培养基中，并混匀铺板，每孔 200 μ l。两天后显微镜下观察，判断并标记出单克隆孔。待每孔细胞汇合度达到 50% 以上，采用上述高通量的 FACS 筛选方法进行检测，挑出目标阳性孔，将获得的细胞克隆冻存。

本发明所用的阳性对照抗体为 MGA271，也称作 Enoblituzumab (来源于 MacroGenics US20160264672A1)。

实施例 2. 嵌合抗体的制备

利用分子生物学技术，对实施例 1 中获得的杂交瘤阳性克隆进行抗体轻重链基因序列的调取，并利用其构建人鼠嵌合抗体。

1. 杂交瘤测序

提取新鲜培养的约 5×10^6 个杂交瘤细胞的 RNA，利用 PrimeScript II 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Takara) 反转录获得 cDNA。步骤如下：

配制表 3 的反应体系 I

表 3:

名称	使用量
Oligo dT 引物	1 μ l
dNTP	1 μ l
模板 RNA(上述获得的 RNA)	5 μ g
无 RNase ddH ₂ O	补至 10 μ l

65°C 温育 5 min 后，迅速置冰上冷却。将反应体系 I 加入到下列反转录体系 (表 4) 中，总量为 20 μ l:

表 4: 反转录体系

名称	使用量
反应体系 I	10 μ l
5 \times PrimeScript II Buffer	4 μ l
RNase 抑制剂 (40U/ μ l)	0.5 μ l (20 U)
PrimeScript II RTase (200U/ μ l)	1 μ l (200U)
无 RNase ddH ₂ O	补至 20 μ l

缓慢混匀后按下列条件进行反转录翻译：42°C 60 min \rightarrow 95°C 5 min，然后放冰上冷却，获得 cDNA。

将 cDNA 连接到 T 载体，之后采用 Mighty TA-cloning Kit 试剂盒 (Takara)，通过 PCR 分别从获得的 cDNA 扩增抗体的重链和轻链可变区，PCR 反应体系如表 5 所示。

表 5:

名称	使用量
TaKaRa EX Tag HS	0.25 μ l
Primer Mix 1 (表 7)	1 μ l
Primer Mix 2 (表 8)	1 μ l
cDNA	1 μ l
10 \times Ex Tag 缓冲液	5 μ l
dNTP Mixture (每种 2.5 mM)	4 μ l
无 RNase ddH ₂ O	补至 50 μ l

PCR 反应条件如表 6 所示。

表 6:

94 $^{\circ}$ C	5 min	}	30 个循环
94 $^{\circ}$ C	30 s		
55 $^{\circ}$ C	30 s		
72 $^{\circ}$ C	60 s		
72 $^{\circ}$ C	5 min		

取 4.5 μ l 上述 PCR 反应获得的 PCR 产物，加入 0.5 μ l pMD20-T 载体(Takara)，5 μ l Ligation Mighty Mix(Takara)，轻轻混匀，于 37 $^{\circ}$ C 反应 2 h，获得连接产物。

转化细胞:

将 5 μ l 获得的连接产物加入到大肠杆菌 TOP10 感受态细胞 (天根生化科技 (北京) 有限公司) 中，混匀后冰上孵育 30 min。42 $^{\circ}$ C 热激 90 s 后迅速冰上冷却 2 min，向 EP 管中补加 900 μ l LB 培养基 (生工生物工程 (上海) 股份有限公司)，37 $^{\circ}$ C，220 rpm 摇床培养 1 h。3000 g 离心 2 min，吸除 800 μ l 上清，用剩余的培养基将菌体重悬并涂布在氨苄青霉素抗性的平板上。于 37 $^{\circ}$ C 培养过夜，挑克隆测序。

2. 构建嵌合抗体

PCR 扩增已经测序的实施例 1 中杂交瘤细胞产生的抗 B7H3 抗体 VH 及 VL 区：上下游引物序列见表 7 及表 8。

表 7. 小鼠抗体重链可变区(VH)引物(Primer Mix 1)

引物名称	序列 (5'-3')	比例 (%)
OVH1	SAGGTCCAGCTGCAGCAGYYTGG (SEQ ID NO: 39)	28.6

OVH2	CAGGTRCAGCTGAAGSAGTCAGG (SEQ ID NO: 40)	10.7
OVH3	GAKGTGCAGCTTCAGCAGTCRGG (SEQ ID NO: 41)	8.9
OVH5	GAVGTGAWGCTGGTGGAGTCTGR (SEQ ID NO: 42)	7.1
OVH11	GAAGTGCAGCTGTTGGAGACTGG (SEQ ID NO: 43)	3.6
OVH14	GAGGTTTCAGCTGCAGCAGTCTGK (SEQ ID NO: 44)	16.1
OVH15	CAGGTTACCTACAACAGTCTGG (SEQ ID NO: 45)	3.5
REVESE-6	CTGAGGARACGGTGACCG (SEQ ID NO: 46)	6
REVESE-4	CTGAGGAGACTGTGAGAGWGGT (SEQ ID NO: 47)	4
REVESE-2-1	CTGAGGAGACGGTGACTGAGGT (SEQ ID NO: 48)	2
REVESE-2-2	CTGCAGAGACAGTGACCAGAGT (SEQ ID NO: 49)	2
水		q.s.

按上述比例混合后，获得 Primer Mix 1 用于后续 VH 的 PCR 扩增。

表 8. 小鼠抗体的轻链可变区(VL)引物(Primer Mix 2):

引物名称	序列(5'-3')	比例 (%)
IGKV1	GATGYTKTGATGACCCAACTCCA (SEQ ID NO: 50)	17.65
IGKV2-109	GATATTGTGATGACGCAGGCTGCA (SEQ ID NO: 51)	5.88
IGKV2-112	GATATTGTGATAACCCAGGATGAA (SEQ ID NO: 52)	5.88
IGKV3-7	GACATTGTGCTAACACAGTCTCCT (SEQ ID NO: 53)	2.94
IGKV3-1-5.10	RACATTGTGCTSACCCAATCTCCA (SEQ ID NO: 54)	29.41
IGKV5-48	GACATCTTGCTGACTCAGTCTCCA (SEQ ID NO: 55)	2.94
IGKV6-13	GACATTGTGATGACCCAGTCTCAA (SEQ ID NO: 56)	2.94
IGKV6-32	AGTATTGTGATGACCCAGACTCCC (SEQ ID NO: 57)	2.94
IGKV14	GACATCMAGATGACMCAGTCTCCA (SEQ ID NO: 58)	11.76
IGKV4-51.86	GAAAATGTGCTCACYCAGTCTCCA (SEQ ID NO: 59)	2.94
IGKV7-33	GACATTGTGATGACTCAGTCTCCA (SEQ ID NO: 60)	2.94
IGKV9-123	GACATCCAGATGATTCAGTCTCCA (SEQ ID NO: 61)	2.94
IGKV9-124	GACATCCAGATGACCCAGTCTCCA (SEQ ID NO: 62)	2.94
IGKV10-95	GATATCCAGATGACACAGACTACT (SEQ ID NO: 63)	2.94
IGKV11-125	GATGTCCAGATGATTCAGTCTCCA (SEQ ID NO: 64)	2.94
mK-Rev	TACAGTTGGTGCAGCATCAG (SEQ ID NO: 65)	

按上述比例混合后，获得 Primer Mix 2 用于后续 VL 的 PCR 扩增。

PCR 体系如表 9 所示。

表 9:

名称	使用量
2×Prime STAR HS (Premix)	25 µl
Primer Mix*	2 µl
质粒模板	0.5 µl
dNTP Mixture (2.5 mM each)	4 µl
RNase free ddH ₂ O	补至 50 µl

*对于 VH 链扩增，应用 Primer Mix 1；对于 VL 链扩增，应用 Primer Mix 2。

切胶回收 PCR 扩增产物。

同源重组反应：

同源重组体系如表 10 所示。

表 10:

名称	使用量
回收片段	1 μ l
pTT5 载体	2 μ l
5 \times Buffer (Takara)	2 μ l
同源重组酶 (Takara)	1 μ l
ddH ₂ O	补至 10 μ l

37°C反应 30 min，获得重组产物。重组产物转化 TOP10 感受态，并挑取单克隆测序，选择包含插入方向正确的质粒的克隆作为阳性克隆，保存阳性克隆，由此获得嵌合抗体的重组质粒。抽提制备一定量的重组质粒，用于抗体的表达。

本发明共获得 2 个嵌合抗体 (ch19A2 和 ch20G5)，其 CDR 序列、轻链可变区和重链可变区序列与表 A-B 中杂交瘤细胞的相应序列相同，所述嵌合抗体优选的轻链和重链的氨基酸序列在表 C 中示出。

3. 嵌合抗体的表达和纯化

根据所需转染体积传代 HEK293 细胞 (Invitrogen)，转染前一天将细胞密度调整至 1.5×10^6 个细胞/ml。转染当天细胞密度约为 3×10^6 个细胞/ml。取终体积 1/10 (v/v) 的 Opti-MEM 培养基 (Gibco 货号: 31985-070) 作为转染缓冲液，加入上述构建的重组表达质粒，混匀，用 0.22 μ m 的滤头过滤备用。加合适的聚乙烯亚胺(PEI) (Polysciences, 23966) 到上一步的质粒中(质粒与 PEI 的质量比例为 1:3)，混匀后室温孵育 10 min，获得 DNA/PEI 混合物。将 DNA/PEI 混合物轻柔倒入 HEK293 细胞并混匀，在 37°C，8% CO₂ 的条件下培养 24h 后，补加终浓度为 2 mM 的 VPA (Sigma, 货号: P4543-100G)，及 2% (v/v) 的 Feed 溶液 (1 g/L Phytone Peptone + 1g/L Difco Select Phytone)，继续培养 6 天。

在细胞培养后，细胞培养液以 13000 rpm 离心 20 min，收集上清，根据制造商的说明书，用预装柱 Hitrap Mabselect Sure (GE, 11-0034-95) 纯化上清液，并测定浓度。取 100 μ g 纯化后蛋白，调整浓度至 1 mg/mL，使用凝胶过滤色谱柱 SW3000 (TOSOH 货号: 18675) 测定蛋白质纯度，结果表明获得了高纯度的嵌合抗体。

实施例 3 生物膜薄层干涉技术测定本发明的嵌合抗体与抗原的结合动力学

采用生物膜薄层干涉测定技术(ForteBio)测定本发明抗体结合人 B7H3 的平衡解离常数 (KD)。ForteBio 亲和力测定按照现有的方法 (Estep, P 等人, High throughput solution Based measurement of antibody-antigen affinity and epitope binning. MAbs, 2013.5(2): 第 270-8 页)进行。

简言之, AMQ (Pall, 1506091) (用于样品检测) 或 AHQ (Pall, 1502051) (用于阳性对照检测) 传感器在分析缓冲液中线下平衡 30 分钟, 然后线上检测 60 秒建立基线, 在线加载如上所述获得的经纯化的抗体至 AHQ 传感器 (ForteBio) 上进行 ForteBio 亲和测量。再将具有加载的抗体的传感器暴露于抗原 (包括人 4Ig-B7H3、人 2Ig-B7H3 (ACRO, 货号 B73-H52E2) 及食蟹猴 B7H3(SINO BIOLOGICAL, 货号 90806-C02H-50), 之后将传感器转移至分析缓冲液用于解离速率测量。使用 ForteBio 分析软件分析 KD 值。

抗体亲和力的检测结果如表 11 所示:

表 11. ForteBio 检测抗原抗体结合的亲和力 (平衡解离常数 KD)

抗体	人 4Ig-B7H3	人 2Ig-B7H3	食蟹猴 B7H3
Ch19A2	3.62E-10	5.74E-09	5.90E-10
Ch20G5	2.36E-10	3.18E-09	7.13E-10
MGA271	6.36E-10	1.87E-07	1.66E-09

从上述亲和力数据可以看出, 我们通过杂交瘤获得的嵌合抗体, 与人 B7H3 蛋白具有良好的亲和力, 并且对食蟹猴 B7H3 也保持很高的亲和力。与对照组的 MGA271 相比, 本研究的抗体有更高的亲和力。

实施例 4 嵌合抗体的人源化

根据常规方法, 将实施例 2 得到的嵌合抗体进行人源化。由此获得人源化抗体: hz20G5, hz19A2, 其 CDR 序列、轻链可变区和重链可变区序列, 轻链和重链的氨基酸序列参见表 A-C。

实施例 5 ForteBio 测定人源化抗体与抗原的亲和力

如实施例 3 所述, 采用 ForteBio 测定法测定实施例 4 获得的人源化抗体结合抗原(人 B7H3 和食蟹猴 B7H3) 的亲和力, 以平衡解离常数 (KD) 表示。结果如表 12 所示。

表 12. ForteBio 检测抗原抗体结合的亲和力常数(M)

抗体	人 4Ig-B7H3	人 2Ig-B7H3	食蟹猴 B7H3
HZ20G5	3.71E-10	6.30E-09	4.60E-10
HZ19A2	6.01E-10	1.04E-08	9.68E-10

MGA271	9.39E-10	7.82E-07	1.87E-09
--------	----------	----------	----------

从表 12 可以看出：人源化后的抗体对抗原 B7H3 依然具有高的亲和力，其与相应的嵌合抗体具有针对抗原 B7H3 相当的平衡解离常数 K_D 。此外，本申请获得的人源化抗体比对照抗体 MGA271 具有更高的结合抗原亲和力，尤其针对人 2Ig-B7-H3，本申请的抗体的亲和力相比较于 MGA271 提高了 20-100 倍。

实施例 6 人源化抗体结合过表达人和食蟹猴 B7H3 的 CHO-S 细胞

为了验证本发明的抗体是否可以和细胞表面表达的抗原结合，利用流式细胞技术检测了本申请人源化抗体和过表达人 B7H3 和食蟹猴 B7H3 的细胞的结合情况。

过表达 B7H3 的细胞构建

使用 ExpiCHO™ Expression System Kit (Invitrogen, 目录号: A29133), 根据制造商的说明书实施如下操作: 将编码人 4Ig-B7H3 (uniprot: Q5ZPR3, SEQ ID NO:32), 人 2Ig-B7H3 (uniprot: Q5ZPR3-2, SEQ ID NO:33) 和食蟹猴 B7H3 (NCBI: XP_015308534.1, SEQ ID NO:34) 的 cDNA 克隆到 pCHO1.0 载体 (Invitrogen) 上, 之后转染 CHO-S 细胞, 产生过表达人 4Ig-B7H3, 人 2Ig-B7H3 和食蟹猴 B7H3 的 CHO-S 细胞: CHOS-hB7H3-4Ig, CHOS-hB7H3-2Ig, CHOS-cyno B7H3。

简言之:

1) 用 PBS 溶液稀释 CHOS-hB7H3-4Ig, CHOS-hB7H3-2Ig, CHOS-cyno B7H3 细胞至 2×10^6 个/ml, 向 U 型底 96 孔板各孔中加入 100 μ l, 加入三倍梯度稀释的抗体。

2) 将上述混合物在冰上孵育 30 分钟。400 g 离心 5 分钟, 去除上清, 用 PBS 溶液洗涤细胞, 移除未结合的抗体。每孔加入 100 μ l 1:200 稀释的 PE 缀合的抗人 Fc 抗体 (SouthernBiotech), 冰上避光孵育 30 分钟。400 g 离心 5 分钟, 去除上清。用 PBS 洗涤细胞 2 次, 移除未结合的 PE 缀合的抗人 Fc 抗体。用 100 μ l PBS 重悬细胞, 通过 FACS 检测抗体与细胞的结合。

检测结果如图 1 所示, 对于过表达人 4Ig-B7H3 的细胞, 本申请人源化抗体总体上的亲和力与阳性对照 MGA271 相当。对于过表达人 2Ig-B7H3 的细胞, hz19A2 抗体的亲和力与 MGA271 相当, 而 hz 20G5 的亲和力明显高于 MGA271。可见, 本申请的抗体在细胞水平上体现出了显著提升的抗原结合能力。

实施例 7 抗体依赖细胞介导的细胞毒作用 (ADCC)

本实施例研究了所获得抗体介导 ADCC 效应进而清除肿瘤细胞的作用。本研究使用

Promega 的 Jurkat-ADCCNF-AT luciferase 效应细胞株 (以下简称 ADCC 效应细胞), 通过检测 NF-AT 信号的激活情况, 从而检测抗体的 ADCC 活性。具体实验过程如下:

1) 细胞准备

对细胞 CHO-hB7H3-4Ig 和 ADCC 效应细胞进行细胞计数。离心去上清, 细胞用 PBS 洗涤两次, 用检测培养基 (5% low IgG 血清的 1640 培养基 (Gibco) 重悬, 调整 ADCC 效应细胞浓度为 1×10^7 个/ml, 调整 CHO-hB7H3-4Ig 细胞浓度为 1×10^6 个/ml。将两种细胞按照 1:1 混合, 最终 ADCC 效应细胞与 CHO-hB7H3-4Ig 细胞的比为 10:1。

2) 铺板: 将混合后的细胞铺 96 孔板, 每孔 100 μ l, 第一孔补加 50 μ l 细胞。

3) 依次加入本发明的不同浓度梯度的抗体: 起始孔终浓度为 30 nM, 之后三倍稀释, 共 10 个梯度。

4) 37°C 培养箱中孵育 7 小时。

5) 7 小时后, 取出 96 孔板, 每孔加入解冻的 Luciferase 测试试剂 100 μ l。室温孵育 20 分钟。用酶标仪检测。用 GraphPad 软件拟合浓度依赖的曲线。

检测结果如图 2 所示, 本申请获得的人源化抗体和嵌合抗体均可以有效激活 NF-AT 信号, 该信号是 ADCC 激活的下游信号通路, 由此本申请的抗体具有优良的 ADCC 杀伤能力。此外, 本申请获得的人源化抗体与相应的嵌合抗体的 ADCC 活性相当。

实施例 8: 本申请抗体分子的体内抗肿瘤作用

本实施例在荷瘤小鼠模型中研究了本申请所获得的抗 B7H3 抗体分子的体内抗肿瘤作用。

实验采用 SPF 等级的雌性 C.B-17-SCID 小鼠 (18-20g), 购自北京维通利华实验动物技术有限公司, 合格证编号为 NO. 1100112011025061。

将 A375 细胞 (ATCC, CRL-1619) 进行常规传代培养用于后续体内实验。离心收集细胞, 以 PBS(1 \times)分散 A375 细胞, 制备成细胞浓度为 2.5×10^7 个/ml 的细胞悬液。在第 0 天取 0.2 ml 细胞悬液皮下接种至 C.B-17 SCID 小鼠右侧腹部区域中来建立 A375 荷瘤小鼠模型。

接种肿瘤细胞第 0 天将所有小鼠进行随机分组 (每组 8 只小鼠), 分别在接种后第 0、4、7、11 天给药小鼠, 给药剂量, 给药方式以及相应抗体如表 13 所示。

表 13.

组别	给药剂量	给药方式
h-IgG1	10mg/kg	腹腔注射
hz19A2	10mg/kg	腹腔注射
hz20G5	10mg/kg	腹腔注射

接种第 5 天后检测各只小鼠瘤体积，每周 2 次监测小鼠瘤体积与体重，监测至 14 天后结束。接种后第 14 天计算相对肿瘤抑制率（TGI%），计算公式如下：

$TGI\% = 100\% * (\text{对照组肿瘤体积} - \text{治疗组肿瘤体积}) / (\text{对照组肿瘤体积} - \text{对照组给药前肿瘤体积})$ 。

肿瘤体积测定：采用游标卡尺测定肿瘤的最大长轴（L）和最大宽轴（W），肿瘤体积按公式 $V = L * W^2 / 2$ 进行计算。

肿瘤抑制率结果如图 3a 和表 14 所示：在接种后第 14 天，与 h-IgG1 对照组对比，人源化抗体 hz19A2 和 hz20G5 对肿瘤的抑制率分别为 62.4%、46.0%。由此表明，本申请获得的人源化抗 B7H3 抗体（hz19A2 和 hz20G5）具有优良的抗肿瘤作用。

表 14. 第 14 天肿瘤抑制率

组别	肿瘤体积(mm ³)	肿瘤抑制率 (%)
h-IgG1,10mg/kg	389.52	N/A
hz19A2,10mg/kg	194.82	62.4
hz20G5,10mg/kg	246.05	46.0

此外，本实验还监测了小鼠的体重变化，结果如图 3b-3c 所示，在整个给药期间，实验组和对照组小鼠的体重无显著差异。

权利要求

1. 结合 B7-H3 的抗体或其抗原结合片段，其包含

- 1) 如 SEQ ID NO:16 所示的 VH 中所含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及如 SEQ ID NO:17 所示的 VL 中所含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；
- 2) 如 SEQ ID NO:18 所示的 VH 中所含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及如 SEQ ID NO: 19 所示的 VL 中所含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；
- 3) 如 SEQ ID NO:20 所示的 VH 中所含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及如 SEQ ID NO:21 所示的 VL 中所含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3；或
- 4) 如 SEQ ID NO:22 所示的 VH 中所含的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，以及如 SEQ ID NO:23 所示的 VL 中所含的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

2. 结合 B7-H3 的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区 VH 和/或轻链可变区 VL，其中，

(i) 所述 VH 包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，其中 HCDR1 包含 SEQ ID NO: 1 或 8 中任一项所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；HCDR2 包含 SEQ ID NO: 2、7、9、14 中任一项所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；HCDR3 包含 SEQ ID NO: 3 或 10 中任一项所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

和/或

(ii) 其中所述 VL 包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中 LCDR1 包含 SEQ ID NO: 4、11 或 15 中任一项所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；LCDR2 包含 SEQ ID NO: 5 或 12 中任一项所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；LCDR3 包含 SEQ ID NO: 6 或 13 中任一项所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

3. 根据权利要求 2 所述的抗体或其抗原结合片段，其包含重链可变区的 3 个互补决定区 HCDR，以及轻链可变区的 3 个互补决定区 LCDR，其中：

- 1) HCDR1，其包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
HCDR2，其包含 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
HCDR3，其包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
LCDR1，其包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
LCDR2，其包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
LCDR3，其包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；
- 2) HCDR1，其包含 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

- HCDR2, 其包含 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
 LCDR1, 其包含 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
 LCDR2, 其包含 SEQ ID NO:5 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
 LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 6 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
- 3) HCDR1, 其包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
 HCDR2, 其包含 SEQ ID NO:9 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
 LCDR1, 其包含 SEQ ID NO:11 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
 LCDR2, 其包含 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
 LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成; 或
- 4) HCDR1, 其包含 SEQ ID NO:8 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
 HCDR2, 其包含 SEQ ID NO:14 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
 HCDR3, 其包含 SEQ ID NO:10 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
 LCDR1, 其包含 SEQ ID NO:15 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
 LCDR2, 其包含 SEQ ID NO:12 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成;
 LCDR3, 其包含 SEQ ID NO: 13 所示的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

4. 权利要求 1 至 3 中任一项的抗体或其抗原结合片段, 其包含重链可变区 VH 和/或轻链可变区 VL, 其中,

(a) 重链可变区 VH

(i) 包含与 SEQ ID NO: 16、18、20 或 22 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或 99% 同一性的氨基酸序列或由其组成, 且包含所述序列的相应 CDR 序列; 或者

(ii) 包含 SEQ ID NO: 16、18、20 或 22 中任一项所示的氨基酸序列或由其组成; 或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 16、18、20 或 22 中任一项所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个 (优选不超过 10 个, 更优选不超过 5、4、3、2、1 个) 的氨基酸改变 (优选氨基酸置换, 更优选氨基酸保守置换) 的氨基酸序列或由其组成, 优选地, 所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中;

和/或

(b) 轻链可变区 VL

(i) 包含与 SEQ ID NO: 17、19、21 或 23 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由其组成, 且包含所述序列的相应 CDR 序列;

- (ii) 包含 SEQ ID NO: 17、19、21 或 23 中任一项所示的氨基酸序列或由其组成；或者
- (iii) 包含与 SEQ ID NO: 17、19、21 或 23 中任一项所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或由其组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在 CDR 区中。

5. 根据权利要求 4 所述的抗体或其抗原结合片段，其包含

- 1) 包含与 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区 VH，和包含与 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区 VL；
- 2) 包含与 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区 VH，和包含与 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区 VL；
- 3) 包含与 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区 VH，和包含与 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区 VL；或
- 4) 包含与 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链可变区 VH，和包含与 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链可变区 VL。

6. 权利要求 1 至 5 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含选自以下的重链可变区和轻链可变区

- 1) 包含 SEQ ID NO:16 所示的氨基酸序列或其氨基酸组成的重链可变区 VH，和包含 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列或其氨基酸组成的轻链可变区 VL；
- 2) 包含 SEQ ID NO:18 所示的氨基酸序列或其氨基酸组成的重链可变区 VH，和包含 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列或其氨基酸组成的轻链可变区 VL；
- 3) 包含 SEQ ID NO:20 所示的氨基酸序列或其氨基酸组成的重链可变区 VH，和包含 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列或其氨基酸组成的轻链可变区 VL；或
- 4) 包含 SEQ ID NO:22 所示的氨基酸序列或其氨基酸组成的重链可变区 VH，和包含 SEQ ID NO:23 所示的氨基酸序列或其氨基酸组成的轻链可变区 VL。

7. 权利要求 1 至 6 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其包含重链和/或轻链，其中

(a) 重链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 24、26、28 或 30 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性且包含所述序列相应 CDR 序列的氨基酸序列或其组成；

(ii) 包含 SEQ ID NO: 24、26、28 或 30 中任一项所示的氨基酸序列或其组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 24、26、28 或 30 中任一项所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或其组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在重链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在重链可变区中；

和/或

(b) 轻链

(i) 包含与 SEQ ID NO: 25、27、29 或 31 中任一项所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性且包含所述序列相应 CDR 序列的氨基酸序列或其组成；

(ii) 包含 SEQ ID NO: 25、27、29 或 31 中任一项所示的氨基酸序列或其组成；或者

(iii) 包含与 SEQ ID NO: 25、27、29 或 31 中任一项所示的氨基酸序列相比具有 1 个或多个（优选不超过 20 个或 10 个，更优选不超过 5、4、3、2、1 个）的氨基酸改变（优选氨基酸置换，更优选氨基酸保守置换）的氨基酸序列或其组成，优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链的 CDR 区中，更优选地，所述氨基酸改变不发生在轻链可变区中。

8. 根据权利要求 7 所述的抗体或其抗原结合片段，其包含

1) 包含与 SEQ ID NO:24 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链，和包含与 SEQ ID NO:25 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链；

2) 包含与 SEQ ID NO:26 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链，和包含与 SEQ ID NO:27 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链；

3) 包含与 SEQ ID NO:28 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链，和包含与 SEQ ID NO:29 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97%、98%或99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链；

4) 包含与 SEQ ID NO:30 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链，和包含与 SEQ ID NO:31 所示的氨基酸序列具有至少 85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%同一性的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链。

9. 根据权利要求 8 所述的抗体或其抗原结合片段，其包含

1) 包含 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链，和包含 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链；

2) 包含 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链，和包含 SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链；

3) 包含 SEQ ID NO:28 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链，和包含 SEQ ID NO:29 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链；

4) 包含 SEQ ID NO:30 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的重链，和包含 SEQ ID NO:31 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的轻链。

10. 权利要求 1-9 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是 IgG1, IgG2, IgG3 或 IgG4 形式的抗体或其抗原结合片段，优选是 IgG1 形式的抗体，更优选包含人 IgG1 Fc 区。

11. 权利要求 1-10 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗体是单克隆抗体、嵌合抗体或人源化抗体。

12. 权利要求 1-11 中任一项的抗体或其抗原结合片段，其中所述抗原结合片段是选自以下的抗体片段：Fab、Fab'、Fab'-SH、Fv、单链抗体例如 scFv、(Fab')₂ 片段、单结构域抗体、双抗体(dAb)或线性抗体。

13. 一种分离的核酸，其编码前述权利要求任一项的抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段。

14. 一种载体，其包含权利要求 13 的核酸，优选地所述载体是表达载体。

15. 一种宿主细胞，其包含权利要求 13 的核酸或权利要求 14 的载体，优选地，所述宿主细胞是原核的或真核的，更优选是大肠杆菌细胞、哺乳动物细胞（例如 293 细胞或 CHO 细胞）或适用于制备抗体或其抗原结合片段的其它细胞。

16. 制备抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段的方法，所述方法包括在适于表达编码前述权利要求 1-12 中任一项的抗体或其抗原结合片段的核酸的条件下培养权利要求 15 的宿主细胞，任选地分离所述抗体或其抗原结合片段，任选地所述方法还包括从所述宿主细胞回收所述抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段。

17. 由权利要求 16 所述的方法制备的抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段。

18. 免疫缀合物，其包含与治疗剂或诊断剂缀合的前述权利要求 1-12 或 17 中任一项的抗体或其抗原结合片段。

19. 药物组合物，其包含前述权利要求 1-12 或 17 中任一项的抗体或其抗原结合片段或权利要求 18 的免疫缀合物，以及任选地药用辅料。

20. 权利要求 1-12 或 17 中任一项的抗体或其抗原结合片段或权利要求 18 的免疫缀合物或权利要求 19 的药物组合物在制备用于治疗 and/或诊断癌症或者肿瘤的药物中的用途，优选地，所述肿瘤为实体瘤。

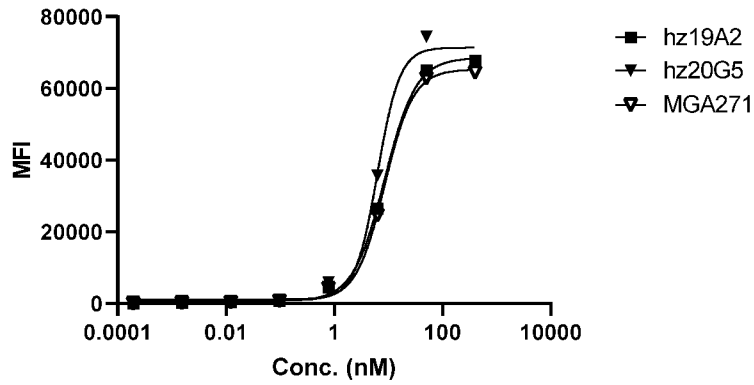
21. 在受试者中预防或治疗与 B7-H3 相关疾病或病症例如癌症的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的前述权利要求 1-12 或 17 中任一项的抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 18 的免疫缀合物、或权利要求 19 的药物组合物。

22. 检测样品中 B7-H3 的方法，所述方法包括

(a) 将样品与前述权利要求 1-12 或 17 中任一项的抗 B7-H3 抗体或其抗原结合片段、或权利要求 18 的免疫缀合物接触；和

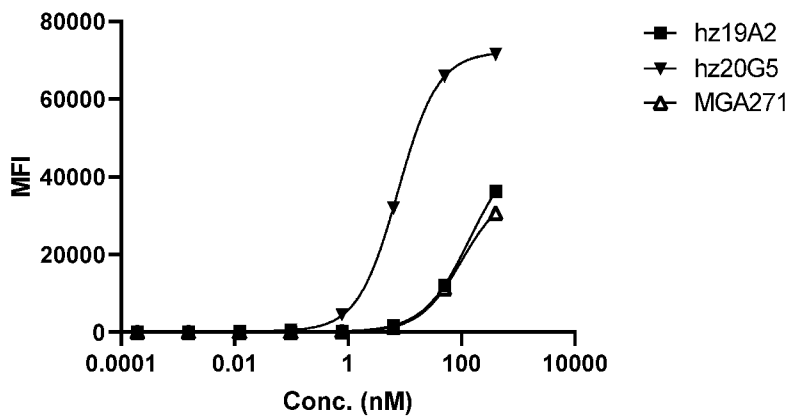
(b) 检测所述抗体或其抗原结合片段或免疫缀合物和 B7-H3 间的复合物的形成；任选地，抗体是被可检测地标记的。

CHOS hB7H3(4lg) 细胞水平亲和力



	hz19A2	hz20G5	MGA271
EC50	8.505	6.281	8.536

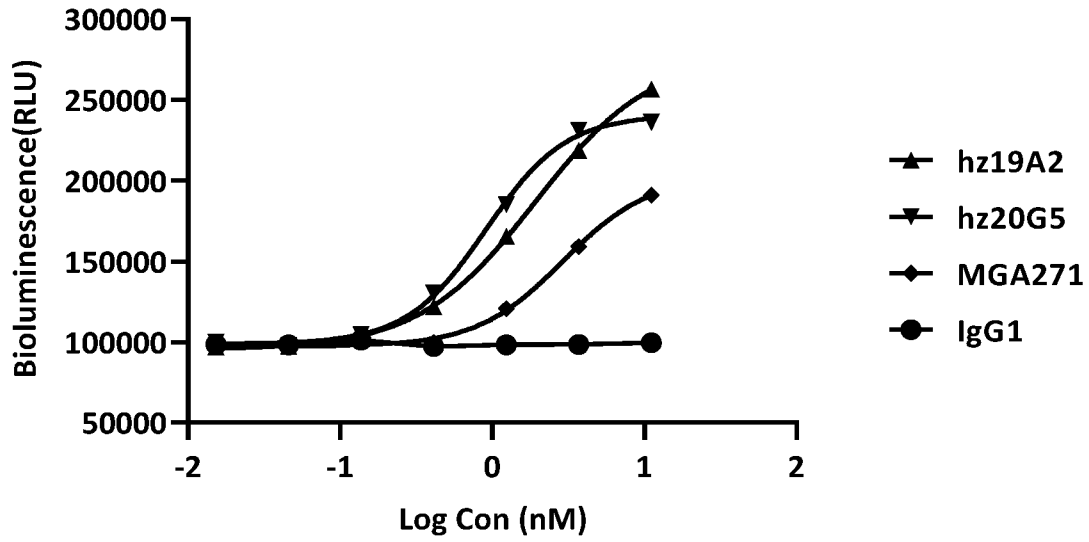
CHOS hB7H3(2lg) 细胞水平亲和力



	hz19A2	hz20G5	MGA271
EC50	138.5	7.538	100.3

图 1

抗体依赖细胞介导的细胞毒作用



	hz19A2	hz20G5	MGA271
EC50	1.920	0.9106	2.906

图 2

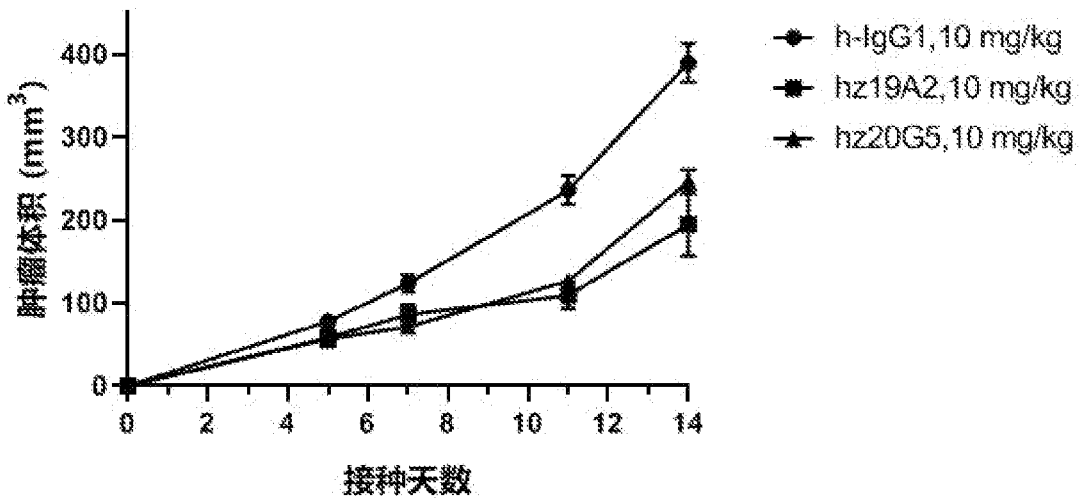


图 3a

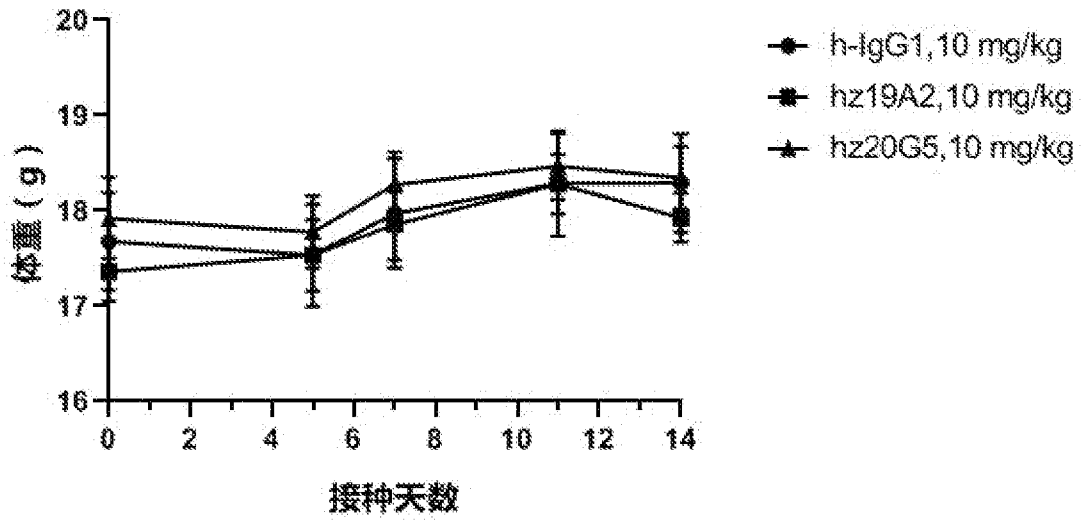


图 3b

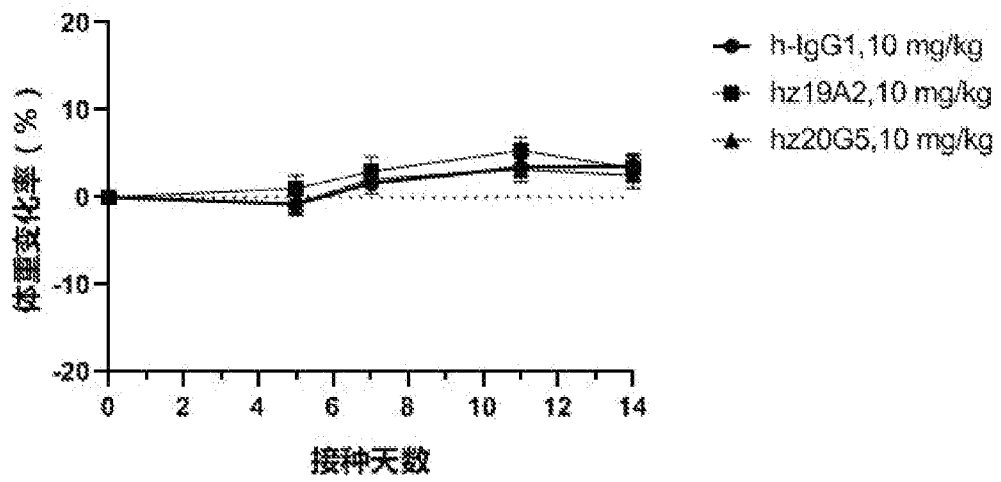


图 3c

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/140449

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; 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, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, JPTXT, KRTXT, CNKI, 万方数据资源系统, WANFANG DATA RESOURCE SYSTEM, PubMed, ScienceDirect, GenBank, EBI-EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统, Chinese Patent Biological Sequence Retrieval System: 申请人/发明人, CDR序列, 重链和轻链可变区, 重链和轻链序列检索; B7-H3, B7H3, CD276, B7RP-2, B7 homology 3 protein, 抗体, 嵌合抗体, 人源化, 免疫缀合物, 药物组合物, 癌症, antibody, chimeric antibody, humanized antibody, composition, cancer.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 109963870 A (ABBVIE INC.) 02 July 2019 (2019-07-02) entire document	1-22
A	WO 2020151384 A1 (SUZHOU BRIGHT SCISTAR ANTIBODY BIOTECHNOLOGY CO., LTD.) 30 July 2020 (2020-07-30) entire document	1-22
A	CN 111944050 A (SUZHOU PULEKANG PHARMACEUTICAL TECHNOLOGY CO., LTD.) 17 November 2020 (2020-11-17) entire document	1-22
A	CA 2834136 A1 (DAIICHI SANKYO CO., LTD.) 01 November 2012 (2012-11-01) entire document	1-22
A	US 2013149236 A1 (MACROGENICS, INC.) 13 June 2013 (2013-06-13) entire document	1-22
A	US 2019338030 A1 (FULL SPECTRUM GENETICS, INC.) 07 November 2019 (2019-11-07) entire document	1-22

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

* Special categories of cited documents:

"A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

"E" earlier application or patent but published on or after the international filing date

"L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

"O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

"P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

"T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

"X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

"Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

"&" document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

08 March 2022

Date of mailing of the international search report

22 March 2022

Name and mailing address of the ISA/CN

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

Authorized officer

Facsimile No. (86-10)62019451

Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/140449

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:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2021/140449

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.: 21
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
 - [1] Claim 21 relates to a method for preventing or treating B7-H3 related diseases or disorders, such as cancer, in a subject, which belongs to a disease treatment method, and thus belongs to the disease treatment method defined in PCT rule 39.1(iv). The present report is made on the basis of amending claim 21 to be a claim for drug preparation.

2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:

3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/140449

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	109963870	A	02 July 2019	JP	2021006527	A	21 January 2021
				PE	20190177	A1	01 February 2019
				DK	3458479	T3	08 February 2021
				CL	2018003520	A1	15 March 2019
				PL	3458479	T4	26 July 2021
				PL	3458479	T3	26 July 2021
				BR	112018075626	A2	19 March 2019
				UA	124198	C2	04 August 2021
				RS	61828	B1	30 June 2021
				AU	2017279550	A1	03 January 2019
				KR	20190015755	A	14 February 2019
				DO	P2018000276	A	31 December 2018
				SG	10201914119 T	A	27 February 2020
				MX	2018015271	A	12 August 2019
				CR	20180603	A	29 July 2019
				SG	11201811193 T	A	30 January 2019
				IL	263600	D0	31 January 2019
				CL	2019002250	A1	25 October 2019
				US	2017355769	A1	14 December 2017
				US	10640563	B2	05 May 2020
				WO	2017214335	A1	14 December 2017
				WO	2017214335	A4	08 March 2018
				LT	3458479	T	25 February 2021
				PT	3458479	T	01 March 2021
				JP	2019528240	A	10 October 2019
				JP	6751165	B2	02 September 2020
				CA	3027045	A1	14 December 2017
				HU	E053356	T2	28 June 2021
				PH	12018502601	A1	30 September 2019
				EC	SP19000282	A	31 January 2019
				UY	37278	A	31 January 2018
				SI	3458479	T1	31 August 2021
				US	2021171637	A1	10 June 2021
				HR	P20210170	T1	19 March 2021
				ES	2861499	T3	06 October 2021
				EP	3458479	A1	27 March 2019
				EP	3458479	B1	04 November 2020
				TW	201809003	A	16 March 2018
				CO	2018013471	A2	28 December 2018
				EP	3835322	A2	16 June 2021
				EP	3835322	A3	06 October 2021
				RU	2018146948	A	14 July 2020
				RU	2018146948	A3	17 June 2021
				RU	2764651	C2	19 January 2022
WO	2020151384	A1	30 July 2020	CN	109851673	A	07 June 2019
CN	111944050	A	17 November 2020	None			
CA	2834136	A1	01 November 2012	HU	E038685	T2	28 November 2018
				US	2013078234	A1	28 March 2013
				US	9371395	B2	21 June 2016
				CA	2834136	C	17 April 2018

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/140449

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		MX 370696 B	19 December 2019
		ES 2667568 T3	11 May 2018
		JP WO2012147713 A1	28 July 2014
		JP 5917498 B2	18 May 2016
		EP 2703486 A1	05 March 2014
		EP 2703486 A4	25 February 2015
		EP 2703486 B1	07 March 2018
		PT 2703486 T	18 May 2018
		CO 6811812 A2	16 December 2013
		ZA 201307983 B	27 January 2016
		TW 201249869 A	16 December 2012
		TW I561531 B	11 December 2016
		JP 2016165294 A	15 September 2016
		JP 6224759 B2	01 November 2017
		DK 2703486 T3	28 May 2018
		RU 2013152164 A	27 May 2015
		RU 2668170 C2	26 September 2018
		KR 20140033018 A	17 March 2014
		KR 102030987 B1	11 November 2019
		MX 2013012285 A	21 November 2013
		MX 344773 B	06 January 2017
		SG 194620 A1	30 December 2013
		CN 103687945 A	26 March 2014
		IL 229061 D0	31 December 2013
		IL 229061 A	28 February 2019
		SI 2703486 T1	31 May 2018
		US 2016368990 A1	22 December 2016
		TR 201808018 T4	21 June 2018
		PL 2703486 T3	31 July 2018
		HR 2703486 T1	01 June 2018
		RS 57279 B1	31 August 2018
		LT 2703486 T	25 May 2018
		NZ 616809 A	28 August 2015
		AU 2012248470 A1	21 November 2013
		AU 2012248470 B2	27 October 2016
		AU 2001248470 A1	01 November 2001
		WO 2012147713 A1	01 November 2012
US 2013149236 A1	13 June 2013	CN 102892426 A	23 January 2013
		CL 2018002380 A1	07 December 2018
		CN 106279416 A	04 January 2017
		CR 20120450 A	27 December 2012
		GE P20166442 B	10 March 2016
		SI 2542256 T1	29 November 2019
		JO 3538 B1	05 July 2020
		HR P20191483 T1	15 November 2019
		PE 20170779 A1	04 July 2017
		PT 2542256 T	05 September 2019
		NZ 701539 A	24 April 2015
		BR 112012022210 A2	05 September 2017
		BR 112012022210 B1	17 August 2021

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2021/140449

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		NZ 705128 A	24 April 2015
		SG 183847 A1	30 October 2012
		RS 59269 B1	31 October 2019
		TW 201617096 A	16 May 2016
		TW I639441 B	01 November 2018
		US 9150656 B2	06 October 2015
		TW 201707724 A	01 March 2017
		TW I645858 B	01 January 2019
		SA 114350709 B1	31 August 2015
		US 2020377612 A1	03 December 2020
		TW 201130514 A	16 September 2011
		TW I551296 B	01 October 2016
		MA 34062 B1	05 March 2013
		SG 10201604336V A	28 July 2016
		ME 03447 B	20 January 2020
		US 2015274838 A1	01 October 2015
		US 9714295 B2	25 July 2017
		CL 2012002433 A1	22 March 2013
		DK 2542256 T3	26 August 2019
		US 2015259434 A1	17 September 2015
		US 9714296 B2	25 July 2017
		CL 2016000284 A1	02 September 2016
		PL 2542256 T3	31 January 2020
		EP 2982380 A1	10 February 2016
		EP 2982380 B1	01 September 2021
		JP 2013520994 A	10 June 2013
		JP 5998060 B2	28 September 2016
		CL 2018002383 A1	07 December 2018
		TW 201439120 A	16 October 2014
		TW I551611 B	01 October 2016
		AU 2011223782 A1	20 September 2012
		AU 2011223782 B2	18 September 2014
		GE P201706660 B	25 April 2017
		EP 2542256 A2	09 January 2013
		EP 2542256 A4	12 February 2014
		EP 2542256 B1	22 May 2019
US 2019338030 A1	07 November 2019	US 10865245 B2	15 December 2020

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2021/140449

<p>A. 主题的分类 C07K 16/28(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i; A61K 39/00(2006.01)i</p> <p>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</p>																							
<p>B. 检索领域 检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号) C07K; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用)) CNABS, DWPI, SIPOABS, CNTXT, WOTXT, EPTXT, USTXT, JPTXT, KRTXT, CNKI, 万方数据资源系统, PubMed, ScienceDirect, GenBank, EBI-EMBL, STN, 中国专利生物序列检索系统: 申请人/发明人, CDR序列, 重链和轻链可变区, 重链和轻链序列检索; B7-H3, B7H3, CD276, B7RP-2, B7 homology 3 protein, 抗体, 嵌合抗体, 人源化, 免疫缀合物, 药物组合物, 癌症, antibody, chimeric antibody, humanized antibody, composition, cancer.</p>																							
<p>G. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>CN 109963870 A (艾伯维公司) 2019年7月2日 (2019 - 07 - 02) 全文</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2020151384 A1 (苏州旭光科星抗体生物科技有限公司) 2020年7月30日 (2020 - 07 - 30) 全文</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 111944050 A (苏州普乐康医药科技有限公司) 2020年11月17日 (2020 - 11 - 17) 全文</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CA 2834136 A1 (DAIICHI SANKYO CO. LTD.) 2012年11月1日 (2012 - 11 - 01) 全文</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2013149236 A1 (MACROGENICS, INC.) 2013年6月13日 (2013 - 06 - 13) 全文</td> <td>1-22</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>US 2019338030 A1 (FULL SPECTRUM GENETICS, INC.) 2019年11月7日 (2019 - 11 - 07) 全文</td> <td>1-22</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	CN 109963870 A (艾伯维公司) 2019年7月2日 (2019 - 07 - 02) 全文	1-22	A	WO 2020151384 A1 (苏州旭光科星抗体生物科技有限公司) 2020年7月30日 (2020 - 07 - 30) 全文	1-22	A	CN 111944050 A (苏州普乐康医药科技有限公司) 2020年11月17日 (2020 - 11 - 17) 全文	1-22	A	CA 2834136 A1 (DAIICHI SANKYO CO. LTD.) 2012年11月1日 (2012 - 11 - 01) 全文	1-22	A	US 2013149236 A1 (MACROGENICS, INC.) 2013年6月13日 (2013 - 06 - 13) 全文	1-22	A	US 2019338030 A1 (FULL SPECTRUM GENETICS, INC.) 2019年11月7日 (2019 - 11 - 07) 全文	1-22
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
A	CN 109963870 A (艾伯维公司) 2019年7月2日 (2019 - 07 - 02) 全文	1-22																					
A	WO 2020151384 A1 (苏州旭光科星抗体生物科技有限公司) 2020年7月30日 (2020 - 07 - 30) 全文	1-22																					
A	CN 111944050 A (苏州普乐康医药科技有限公司) 2020年11月17日 (2020 - 11 - 17) 全文	1-22																					
A	CA 2834136 A1 (DAIICHI SANKYO CO. LTD.) 2012年11月1日 (2012 - 11 - 01) 全文	1-22																					
A	US 2013149236 A1 (MACROGENICS, INC.) 2013年6月13日 (2013 - 06 - 13) 全文	1-22																					
A	US 2019338030 A1 (FULL SPECTRUM GENETICS, INC.) 2019年11月7日 (2019 - 11 - 07) 全文	1-22																					
<p><input 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。</p>																							
<p>* 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</p> <p>“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</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2022年3月8日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2022年3月22日</p>																						
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>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</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>授权官员</p> <p>高雅</p> <p>电话号码 53961943</p>																						

第I栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:
- 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： 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21涉及在受试者中预防或治疗与B7-H3相关疾病或病症例如癌症的方法，属于疾病的治疗方法，因而属于PCT细则39.1(iv)规定的疾病的治疗方法。本报告基于权利要求21修改为制备药物权利要求而作出。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索，具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/140449

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	109963870	A	2019年7月2日	JP	2021006527	A	2021年1月21日
				PE	20190177	A1	2019年2月1日
				DK	3458479	T3	2021年2月8日
				CL	2018003520	A1	2019年3月15日
				PL	3458479	T4	2021年7月26日
				PL	3458479	T3	2021年7月26日
				BR	112018075626	A2	2019年3月19日
				UA	124198	C2	2021年8月4日
				RS	61828	B1	2021年6月30日
				AU	2017279550	A1	2019年1月3日
				KR	20190015755	A	2019年2月14日
				DO	P2018000276	A	2018年12月31日
				SG	10201914119T	A	2020年2月27日
				MX	2018015271	A	2019年8月12日
				CR	20180603	A	2019年7月29日
				SG	11201811193T	A	2019年1月30日
				IL	263600	D0	2019年1月31日
				CL	2019002250	A1	2019年10月25日
				US	2017355769	A1	2017年12月14日
				US	10640563	B2	2020年5月5日
				WO	2017214335	A1	2017年12月14日
				WO	2017214335	A4	2018年3月8日
				LT	3458479	T	2021年2月25日
				PT	3458479	T	2021年3月1日
				JP	2019528240	A	2019年10月10日
				JP	6751165	B2	2020年9月2日
				CA	3027045	A1	2017年12月14日
				HU	E053356	T2	2021年6月28日
				PH	12018502601	A1	2019年9月30日
				EC	SP19000282	A	2019年1月31日
				UY	37278	A	2018年1月31日
				SI	3458479	T1	2021年8月31日
				US	2021171637	A1	2021年6月10日
				HR	P20210170	T1	2021年3月19日
				ES	2861499	T3	2021年10月6日
				EP	3458479	A1	2019年3月27日
				EP	3458479	B1	2020年11月4日
				TW	201809003	A	2018年3月16日
				CO	2018013471	A2	2018年12月28日
				EP	3835322	A2	2021年6月16日
				EP	3835322	A3	2021年10月6日
				RU	2018146948	A	2020年7月14日
				RU	2018146948	A3	2021年6月17日
				RU	2764651	C2	2022年1月19日
WO	2020151384	A1	2020年7月30日	CN	109851673	A	2019年6月7日
CN	111944050	A	2020年11月17日	无			
CA	2834136	A1	2012年11月1日	HU	E038685	T2	2018年11月28日
				US	2013078234	A1	2013年3月28日
				US	9371395	B2	2016年6月21日
				CA	2834136	C	2018年4月17日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/140449

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)
		MX 370696 B	2019年12月19日
		ES 2667568 T3	2018年5月11日
		JP W02012147713 A1	2014年7月28日
		JP 5917498 B2	2016年5月18日
		EP 2703486 A1	2014年3月5日
		EP 2703486 A4	2015年2月25日
		EP 2703486 B1	2018年3月7日
		PT 2703486 T	2018年5月18日
		CO 6811812 A2	2013年12月16日
		ZA 201307983 B	2016年1月27日
		TW 201249869 A	2012年12月16日
		TW I561531 B	2016年12月11日
		JP 2016165294 A	2016年9月15日
		JP 6224759 B2	2017年11月1日
		DK 2703486 T3	2018年5月28日
		RU 2013152164 A	2015年5月27日
		RU 2668170 C2	2018年9月26日
		KR 20140033018 A	2014年3月17日
		KR 102030987 B1	2019年11月11日
		MX 2013012285 A	2013年11月21日
		MX 344773 B	2017年1月6日
		SG 194620 A1	2013年12月30日
		CN 103687945 A	2014年3月26日
		IL 229061 D0	2013年12月31日
		IL 229061 A	2019年2月28日
		SI 2703486 T1	2018年5月31日
		US 2016368990 A1	2016年12月22日
		TR 201808018 T4	2018年6月21日
		PL 2703486 T3	2018年7月31日
		HR P20180640 T1	2018年6月1日
		RS 57279 B1	2018年8月31日
		LT 2703486 T	2018年5月25日
		NZ 616809 A	2015年8月28日
		AU 2012248470 A1	2013年11月21日
		AU 2012248470 B2	2016年10月27日
		AU 2001248470 A1	2001年11月1日
		WO 2012147713 A1	2012年11月1日
US 2013149236 A1	2013年6月13日	CN 102892426 A	2013年1月23日
		CL 2018002380 A1	2018年12月7日
		CN 106279416 A	2017年1月4日
		CR 20120450 A	2012年12月27日
		GE P20166442 B	2016年3月10日
		SI 2542256 T1	2019年11月29日
		JO 3538 B1	2020年7月5日
		HR P20191483 T1	2019年11月15日
		PE 20170779 A1	2017年7月4日
		PT 2542256 T	2019年9月5日
		NZ 701539 A	2015年4月24日
		BR 112012022210 A2	2017年9月5日
		BR 112012022210 B1	2021年8月17日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2021/140449

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)
		NZ 705128 A	2015年4月24日
		SG 183847 A1	2012年10月30日
		RS 59269 B1	2019年10月31日
		TW 201617096 A	2016年5月16日
		TW I639441 B	2018年11月1日
		US 9150656 B2	2015年10月6日
		TW 201707724 A	2017年3月1日
		TW I645858 B	2019年1月1日
		SA 114350709 B1	2015年8月31日
		US 2020377612 A1	2020年12月3日
		TW 201130514 A	2011年9月16日
		TW I551296 B	2016年10月1日
		MA 34062 B1	2013年3月5日
		SG 10201604336V A	2016年7月28日
		ME 03447 B	2020年1月20日
		US 2015274838 A1	2015年10月1日
		US 9714295 B2	2017年7月25日
		CL 2012002433 A1	2013年3月22日
		DK 2542256 T3	2019年8月26日
		US 2015259434 A1	2015年9月17日
		US 9714296 B2	2017年7月25日
		CL 2016000284 A1	2016年9月2日
		PL 2542256 T3	2020年1月31日
		EP 2982380 A1	2016年2月10日
		EP 2982380 B1	2021年9月1日
		JP 2013520994 A	2013年6月10日
		JP 5998060 B2	2016年9月28日
		CL 2018002383 A1	2018年12月7日
		TW 201439120 A	2014年10月16日
		TW I551611 B	2016年10月1日
		AU 2011223782 A1	2012年9月20日
		AU 2011223782 B2	2014年9月18日
		GE P201706660 B	2017年4月25日
		EP 2542256 A2	2013年1月9日
		EP 2542256 A4	2014年2月12日
		EP 2542256 B1	2019年5月22日
US 2019338030 A1	2019年11月7日	US 10865245 B2	2020年12月15日