



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 110872356 B

(45) 授权公告日 2023.06.13

(21) 申请号 201811028689.3

WO 03030835 A2,2003.04.17

(22) 申请日 2018.09.03

WO 2005040220 A1,2005.05.06

(65) 同一申请的已公布的文献号

WO 2006091209 A2,2006.08.31

申请公布号 CN 110872356 A

WO 2017132279 A1,2017.08.03

WO 2011069104 A2,2011.06.09

(43) 申请公布日 2020.03.10

车耀健等.抗EGFR/CD3双特异性抗体的制备与功能的初步研究.《福建医科大学学报》.CNKI, 2017,第51卷(第6期),第369-374页.

(73) 专利权人 广西慧宝源健康产业有限公司

地址 535000 广西壮族自治区钦州市民安街76号

吴中杰等.抗CD3-EGFR双特异性抗体标记DC-CIK免疫细胞的制备及其临床安全性研究.《浙江临床医学》.万方,2018,第20卷(第4期),

专利权人 强普生技股份有限公司

桂林商源植物制品有限公司

Ursula Reusch等.Anti-CD3 × Anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR)

(72) 发明人 季匡华 王愈善 江欣倩 黄逸君

詹姆斯周

Bispecific Antibody Redirects T-Cell Cytolytic Activity to EGFR-Positive

(51) Int.Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

C12N 15/13 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

Cancers In vitro and in an Animal Model.

《Clinical Cancer Research》.pubmed,2006,第12卷(第1期),

Ulrich Brinkmann等.The making of bispecific antibodies.《mAbs》.pubmed,2017,第9卷(第2期),

(56) 对比文件

CN 106632681 A,2017.05.10

CN 104774268 A,2015.07.15

CN 104583230 A,2015.04.29

CN 101041080 A,2007.09.26

CN 106999468 A,2017.08.01

WO 2016054520 A2,2016.04.07

US 2015166661 A1,2015.06.18

WO 2013092720 A1,2013.06.27

Binyam Bezabeh等.Insertion of scFv into the hinge domain of full-length IgG1 monoclonal antibody results in tetravalent bispecific molecule with robust properties.《mAbs》.pubmed,2016,第9卷(第2期),

审查员 蒋超

权利要求书1页 说明书19页

序列表12页 附图3页

(54) 发明名称

双特异性抗体及其使用方法

链恒定区,VH' 是第二单克隆抗体的重链可变区,VL' 是第二单克隆抗体的轻链可变区,而且TM是跨膜蛋白结构域。本发明的双特异性抗体尤其能持久保持对T细胞的亲和性,可用于加强对癌细胞的杀伤效果。

(57) 摘要

本发明提供一种双特异性抗体,其包括第一肽链VL-CK-TM和第二肽链VH-CH1-VH'-VL',其中,VH是第一单克隆抗体的重链可变区,VL是第一单克隆抗体的轻链可变区,CH1是第一单克隆抗体的重链恒定区1,CK是第一单克隆抗体的轻

CN 110872356 B

1. 一种抗CD3和EGFR的双特异性抗体,其具有下式结构,

VL-CK-TM

|

VH-CH1-VH'-VL'

其中,VH是第一单克隆抗体的重链可变区,

VL是第一单克隆抗体的轻链可变区,

CH1是第一单克隆抗体的重链恒定区1,

CK是第一单克隆抗体的轻链恒定区,其中CH1和CK通过二硫键|连接,

VH' 是第二单克隆抗体的重链可变区,

VL' 是第二单克隆抗体的轻链可变区,

TM是跨膜蛋白结构域,和

-表示直接肽键连接或通过连接肽连接,

其中,

VL-CK的氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示,VH-CH1的氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示,跨膜蛋白结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,而且VH' -VL' 的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示;或者,

VL-CK的氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示,VH-CH1的氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示,跨膜蛋白结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示,而且VH' -VL' 的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示。

2. 分离的核酸,其编码权利要求1所述的双特异性抗体。

3. 表达载体,其包含权利要求2所述的核酸。

4. 权利要求3所述的表达载体,其为质粒。

5. 宿主细胞,其包含权利要求3或4所述的表达载体,或者被权利要求3或4所述的载体转染。

6. 权利要求5所述的宿主细胞,其为哺乳动物细胞。

7. 生产权利要求1所述的双特异性抗体的方法,其包括以下步骤:

(a) 培养权利要求5或6所述的宿主细胞;和,

(b) 从步骤(a)获得的培养物中收集权利要求1所述的双特异性抗体。

8. 药物组合物,其包括权利要求1所述的双特异性抗体和药学上可接受的辅料。

9. 权利要求1所述的双特异性抗体在制备治疗癌症的药物中的用途。

10. 权利要求9所述的用途,其中癌症选自大肠癌、直肠癌、咽喉癌、头颈部癌、肺癌、胃癌、乳癌、胰脏癌、子宫颈癌、卵巢癌、摄护腺癌及前列腺癌。

双特异性抗体及其使用方法

技术领域

[0001] 本发明属于抗体工程领域,具体而言,本发明涉及一种双特异性抗体及其应用,该双特异性抗体效果优异,尤其对T细胞的亲和性的持久保持的效果优异。

背景技术

[0002] 抗体又称免疫球蛋白(Ig)。天然抗体含有四条异源性多肽链,其中分子量较大的两条链称为重链(HC),而分子量较小的两条链称为轻链(LC)。轻链和重链中靠近N端氨基酸序列变化较大的区域称为可变区,即轻链可变区(VL)和重链可变区(VH),分别占重链和轻链的1/4和1/2,VL和VH各自包括了三个互补决定区(CDR),即VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3以及VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3;将靠近C端的氨基酸序列相对稳定的区域,称为恒定区,其中重链恒定区分三段,依次分别是重链恒定区1(CH1)、重链恒定区2(CH2)和重链恒定区3(CH3),CH1与轻链恒定区(CL,也称CK)通过二硫键连接。

[0003] 天然的单克隆抗体特异性结合一个抗原靶点,而双特异性抗体(BsAb)是可以与两个不同抗原靶点特异性结合的抗体融合体。双特异性抗体目前研究较多的有两类,分别为串联scFv与双特异性四价抗体(Tand-Abs)。

[0004] 例如,中国专利申请CN104892765A公开了一种抗CD3抗原和Her-2抗原的双特异性抗体,包括2条相同的轻链序列和2条不同的重链序列,可以分别识别乳腺癌细胞表面的Her-2抗原和T细胞表面的CD3抗原,能够显著增强抗体介导的T细胞杀伤肿瘤靶细胞的活性;

[0005] 中国专利申请CN106831996A提供了新型双特异性抗体,其包含针对人CD3E的抗原结合部和/或针对HER2的抗原结合部;

[0006] 中国专利申请CN104829728A公开了一种双特异性抗体HER2XCD3,其由单价单元和单链单元组成,其中单价单元针对免疫细胞的表面抗原CD3具有特异性结合能力,单链单元针对肿瘤细胞表面抗原HER2具有特异性结合能力,并且单链单元包含与Fc片段融合的单链可变片段;

[0007] 中国专利申请CN106632681A公开了抗EGFR和抗CD3双特异抗体,其能够特异性结合肿瘤细胞表面抗原表皮生长因子受体和免疫细胞表面抗原分化簇3,其中抗CD3抗体的单链抗体ScFv位于抗EGFR抗体恒定区的C末端;

[0008] 中国专利申请CN104774268A公开了一种双特异性抗体EGFR×CD3,其由单价单元和单链单元组成,其中单价单元针对免疫细胞的表面抗原CD3具有特异性结合能力,单链单元针对肿瘤细胞表面抗原EGFR具有特异性结合能力,并且单链单元包含与Fc片段融合的单链可变片段;

[0009] 中国专利申请CN104829729A公开了一种携带抗Her2/CD3双特异抗体,其包括第一抗体段和第二抗体段,所述第一抗体段为抗肿瘤抗原抗体段,第二抗体段为抗人CD3分子抗体段,利用过继转输的T细胞携带并在体内持续表达该抗体蛋白,从而使该双特异性抗体在体内发挥杀伤作用的同时,伴随足量的T效应细胞,更优化了效应发挥的效率。

[0010] 然而,现有技术没有启示获得本发明的包括跨膜结构域的特定串联方式连接的双特异抗体。令人意外的是,本发明人设计的本发明的双特异抗体的效果优异,尤其是能够持久保持与T细胞黏附的效果,更有利于实际应用。

[0011] 发明简述

[0012] 本发明提供了新的双特异性抗体及其重组DNA技术的中间产物、制备方法和治疗方面的用途等。

[0013] 具体而言,在第一方面,本发明提供了具有下式结构的双特异性抗体,

VL-CK-TM

[0014]

VH-CH1-VH'-VL'

[0015] 其中,VH是第一单克隆抗体的重链可变区,

[0016] VL是第一单克隆抗体的轻链可变区,

[0017] CH1是第一单克隆抗体的重链恒定区1,

[0018] CK是第一单克隆抗体的轻链恒定区,其中CH1和CK通过二硫键(|)连接,

[0019] VH' 是第二单克隆抗体的重链可变区,

[0020] VL' 是第二单克隆抗体的轻链可变区,

[0021] TM是跨膜蛋白结构域,和,

[0022] -表示直接肽键连接或通过连接肽连接。

[0023] 第一单克隆抗体和第二单克隆抗体所针对的抗原靶点是不相同的。优选在本发明第一方面的双特异性抗体中,第一单克隆抗体和第二单克隆抗体中的一个特异结合T细胞。更优选其中,特异结合T细胞的CD3抗原。

[0024] 也优选在本发明第一方面的双特异性抗体中,第一单克隆抗体和第二单克隆抗体中的另一个特异结合病原。更优选其中,第一单克隆抗体和第二单克隆抗体中的另一个特异结合肿瘤或癌细胞,例如肿瘤或癌细胞的特异性抗原或过表达抗原,例如表皮生长因子受体、癌胚抗原或前列腺特定膜抗原。

[0025] 优选在本发明第一方面的双特异性抗体中,跨膜蛋白结构域是白细胞分化抗原的跨膜结构域,例如可以是细胞黏附分子-1、CD48或CD80的跨膜结构域。更优选其中,跨膜蛋白结构域的氨基酸序列如SEQ ID NO:1、2或3所示。

[0026] 优选在本发明第一方面的双特异性抗体中,VL或VL' 包含氨基酸序列如SEQ ID NO:4、5、6或11所示的融合肽中的轻链可变区或氨基酸序列如SEQ ID NO:10、13、14或15所示的融合肽中的轻链可变区中的VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3。

[0027] 也优选在本发明第一方面的双特异性抗体中,VH或VH' 包含氨基酸序列如SEQ ID NO:7、8、9或12所示的融合肽中的重链可变区或氨基酸序列如SEQ ID NO:10、13、14或15所示的融合肽中的重链可变区中的VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3。

[0028] 在本发明的具体实施方式中,VL-CK的氨基酸序列如SEQ ID NO:4、5、6或11所示,其中前三者分别是特异结合表皮生长因子受体、癌胚抗原和前列腺特定膜抗原的单克隆抗体的VL-CK;后者是特异结合T细胞的CD3抗原的单克隆抗体的VL-CK。

[0029] 在本发明的具体实施方式中,VH-CH1的氨基酸序列如SEQ ID NO:7、8、9或12所示,其中前三者分别是特异结合表皮生长因子受体、癌胚抗原和前列腺特定膜抗原的单克隆抗

体的VH-CH1；后者是特异结合T细胞的CD3抗原的单克隆抗体的VH-CH1。

[0030] 在本发明的具体实施方式中，VH' -VL' 的氨基酸序列如SEQ ID NO:10、13、14或15所示，其中前者是特异结合T细胞的CD3抗原的单克隆抗体的VH' -VL' ；后三者分别是特异结合表皮生长因子受体、癌胚抗原和前列腺特定膜抗原的单克隆抗体的VH' -VL' 。

[0031] 在本发明的具体实施方式中，连接肽可以是GGGSGGG、VEGGSGGSGGSGGSGGVD或(GGGGS)_n，其中n=1~5。

[0032] 在第二方面，本发明提供了分离的核酸，其编码本发明第一方面的双特异性抗体。

[0033] 在第三方面，本发明提供了载体，其包含本发明第二方面的核酸。优选本发明第三方面的载体是质粒。

[0034] 在第四方面，本发明提供了宿主细胞，其包含本发明第三方面的载体，或者被本发明第三方面的载体转染。优选本发明第四方面的宿主细胞是哺乳动物细胞。

[0035] 在第五方面，本发明提供了生产本发明第一方面的双特异性抗体的方法，其包括以下步骤：

[0036] (a) 培养本发明第四方面的宿主细胞；和。

[0037] (b) 从步骤(a)获得的培养物中收集本发明第一方面的双特异性抗体。

[0038] 在第六方面，本发明提供了药物组合物，其包括本发明第一方面的双特异性抗体和药学上可接受的辅料。本发明第六方面的药物组合物用于治疗第一单克隆抗体或第二单克隆抗体所治疗的疾病，例如肿瘤或癌症。

[0039] 在第七方面，本发明提供了本发明第一方面的双特异性抗体在制备治疗第一单克隆抗体或第二单克隆抗体所治疗的疾病的药物中的用途；相应地，本发明也提供了治疗第一单克隆抗体或第二单克隆抗体所治疗的疾病的方法，其包括向有需要的个体施用有效量的本发明第一方面的双特异性抗体。

[0040] 优选在本发明第七方面的用途或方法中，第一单克隆抗体或第二单克隆抗体所治疗的疾病是肿瘤或癌症。更优选其中肿瘤或癌症选自大肠癌、直肠癌、咽喉癌、头颈部癌、肺癌、胃癌、乳癌、胰脏癌、子宫颈癌、卵巢癌、摄护腺癌及前列腺癌。

附图说明

[0041] 图1为实施例1的双特异性抗体A的构建体示意图。

[0042] 图2为实施例1的双特异性抗体A的结构示意图。

[0043] 图3为实施例1的双特异性抗体B的构建体示意图。

[0044] 图4为实施例1的T细胞黏合时间试验的实验结果图。

[0045] 图5为实施例2的双特异性抗体C的构建体示意图。

[0046] 图6为实施例2的双特异性抗体C的结构示意图。

[0047] 图7为实施例2的双特异性抗体D的构建体示意图。

[0048] 图8为实施例2的T细胞黏合时间试验的实验结果图。

[0049] 发明详述

[0050] 本发明的双特异性抗体由两条肽链组成，包括第一肽链和第二肽链，其中第一肽链的结构如VL-CK-TM所示，第二肽链的结构如VH-CH1-VH' -VL' 所示，其中，VH是第一单克隆抗体的重链可变区，VL是第一单克隆抗体的轻链可变区，CH1是第一单克隆抗体的重链恒定

区1,CK是第一单克隆抗体的轻链恒定区,VH' 是第二单克隆抗体的重链可变区,VL' 是第二单克隆抗体的轻链可变区,TM是跨膜蛋白结构域,而且-表示直接肽键连接或通过连接肽连接。

[0051] 在本文中,“第一”和“第二”在修饰相同的产品的时候,是为了区分所修饰的产品,即第一产品和第二产品是不同的,但是不对产品本身的结构和/或组成构成限定。例如,第一单克隆抗体和第二单克隆抗体是不同的单克隆抗体。

[0052] 在本文中,单克隆抗体由一对轻链和一对重链组成,该四条链是通过二硫键相互连接。其中,每条重链通常包含重链可变区和重链恒定区。重链恒定区通常包含三个域,即CH1、CH2、和CH3;每条轻链通常包含轻链可变区和轻链恒定区。每个可变区通常包含三个互补决定区,其是序列上和/或结构上确定的环的形式上高度可变的区域,其被更加保守的四个框架区(FR) 隔开,即每个可变区从氨基端到羧基端以以下的顺序排列:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。

[0053] 本文中的CDR序列可以根据IMGT规则确定(Brochet X.,Nucleic Acids Research,2008,36:W503-508和Lefranc MP.,Nucleic Acids Research,1999,27:209-212),也可以根据由Kabat等人(Sequences of Proteins of Immunological Interest,5th Ed.Public Health Service,National Institutes of Health,Bethesda,MD.1991)描述的方法进行。对于给定的抗体可变区可以确定残基的Kabat编号。

[0054] 优选在本发明第一方面的双特异性抗体中,第一单克隆抗体和第二单克隆抗体中的一个特异结合T细胞,如特异结合T细胞的CD3抗原;而第一单克隆抗体和第二单克隆抗体中的另一个特异结合病原,优选特异结合肿瘤或癌细胞,例如肿瘤或癌细胞的特异性抗原或过表达抗原,例如表皮生长因子受体(EGFR)、癌胚抗原(CEA)或前列腺特定膜抗原(PSMA)。本发明第一方面的双特异性抗体的药用用途主要由特异结合病原的单克隆抗体片段确定,另一个特异结合T细胞的单克隆抗体片段起到持久保持与T细胞黏附的效果,从而促进相应的药用效果。

[0055] 在本发明的具体实施方式中,VL包含氨基酸序列如SEQ ID NO:4、5或6所示的融合肽中的轻链可变区或氨基酸序列如SEQ ID NO:13、14或15所示的融合肽中的轻链可变区中的VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3的时候,则VL' 包含氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示的融合肽中的轻链可变区或氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示的融合肽中的轻链可变区中的VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3;反之亦然,VL包含氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示的融合肽中的轻链可变区或氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示的融合肽中的轻链可变区中的VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3的时候,则VL' 包含氨基酸序列如SEQ ID NO:4、5或6所示的融合肽中的轻链可变区或氨基酸序列如SEQ ID NO:13、14或15所示的融合肽中的轻链可变区中的VL-CDR1、VL-CDR2和VL-CDR3。

[0056] 在本发明的具体实施方式中,VH包含氨基酸序列如SEQ ID NO:7、8或9所示的融合肽中的重链可变区或氨基酸序列如SEQ ID NO:13、14或15所示的融合肽中的重链可变区中的VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3的时候,VH' 包含氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示的融合肽中的重链可变区或氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示的融合肽中的重链可变区中的VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3;反之亦然,VH包含氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示的融合肽中的重链可变区或氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示的融合肽中的重链可变区中的VH-CDR1、VH-

CDR2和VH-CDR3的时候,VH' 包含氨基酸序列如SEQ ID NO:7、8或9所示的融合肽中的重链可变区或氨基酸序列如SEQ ID NO:13、14或15所示的融合肽中的重链可变区中的VH-CDR1、VH-CDR2和VH-CDR3。

[0057] 在本文中,跨膜蛋白结构域或跨膜结构域指的是多肽或蛋白质上的区域,该区域结构在膜中热力学稳定,并且通常包括跨膜蛋白的单一跨膜 α 螺旋,主要由疏水氨基酸组成。本发明优选的跨膜蛋白结构域是是白细胞分化抗原的跨膜结构域(CD),例如可以是细胞黏附分子-1(ICAM-1,也称CD54)、CD48或CD80的跨膜结构域。

[0058] 在本文中,连接肽指的是插入双特异性抗体各可变区、恒定区和跨膜蛋白结构域之间为各区域或结构域提供足够的可动性以提供双特异性抗体结合功能的一个或多个氨基酸残基。连接肽通常包括柔性氨基酸残基,如Gly,在本发明的双特异性抗体中,各连接肽是独立的,可以具有相同的序列和/或长度,也可以互不相同。

[0059] 本发明第二方面的核酸通常是两条,即第一核酸和第二核酸,分别编码本发明的双特异性抗体中的第一肽链和第二肽链。第一核酸和第二核酸优选构建在同一构建体上,由同一载体表达。当然,尽管不优选,第一核酸和第二核酸也可以分别构建在不同载体上,分别表达,然后再组合在一起。

[0060] 在本文中,载体优选是表达载体,包括SV40的衍生物、细菌质粒、噬菌体DNA、杆状病毒、酵母质粒、衍生自质粒和噬菌体DNA的组的载体、和病毒核酸(RNA或DNA)载体等。适于在细菌细胞中表达的载体包括已经商用的BlueScript(Stratagene)、pIN载体(Van Heeke, J Biol Chem, 264, 5503-5509(1989))和pET载体(Novagen, Madison WI)等;适于在酵母系统中表达的载体是包含组成型或诱导型启动子的载体;优选的表达载体适于在哺乳动物细胞中表达,例如本发明具体实施方式中所采用的表达载体。

[0061] 表达载体可以包含或相关于任何合适的启动子、增强子和其它促进表达的元件。这类元件的实例包括强表达启动子(例如,人CMV IE启动子/增强子以及RSV、SV40、SL3-3、MMTV、和HIV LTR启动子),polyA终止序列、用于在大肠杆菌中的质粒产物的复制起始区、作为选择标志物的抗生素抗性基因、和/或方便的克隆位点。

[0062] 表达载体可以位于宿主细胞中和/或经由载体将本发明第二方面的核酸递送(如,转染)至宿主细胞中。宿主细胞的实例包括酵母、细菌、和哺乳动物细胞,如CHO或HEK细胞。在本发明的具体实施方式中,编码本发明的双特异性抗体的核酸转染入Expi293F细胞中。

[0063] 培养本发明第四方面的宿主细胞,并分离、纯化培养获得的培养物,可以获得本发明第一方面的双特异性抗体。分离纯化的方法包括层析法、磁珠分离法或胶体过滤法。

[0064] 在本文中,药学上可接受的辅料指指酌情使用至哺乳动物(特别是人)时不产生副作用、过敏或其他不良反应的药用辅料,包括非毒性固体或液体填充剂、稀释剂、封装材料或制剂辅料等。合适的填充剂、溶剂和/或赋形剂的实例包括水、氨基酸、盐水、磷酸盐缓冲盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等的一种或多种,以及其组合。也优选本发明的药物组合物中包括等渗剂,如糖、多元醇或氯化钠。另外优选本发明的药物组合物还可包含抗氧化剂(如,色胺)和稳定剂(如,吐温-20)。

[0065] 药物组合物的形式、施用途径、剂量和方案自然取决于待治疗的病况、疾病的严重性、患者的年龄、重量和性别等。本发明的药物组合物可配制用于局部、口服、肠胃外、鼻内、静脉内、肌肉内、皮下或眼内施用等。优选本发明的药物组合物是注射剂,如等渗、无菌的水

溶液,或其干燥(特别是冷冻干燥)的组合物。干燥的组合物在添加无菌水或生理盐水时可构成可注射溶液。

[0066] 本发明的双特异性抗体在本发明的药物组合物中可以以盐形式存在。药学上可接受的盐包括酸加成盐,相应的无机酸包括盐酸或磷酸,相应的机酸包括乙酸、草酸、酒石酸等。药学上可接受的盐还可以包括与蛋白质上游离羧基基团形成的盐,相应的无机碱包括钠,钾、铵、钙或铁的氢氧化物,相应的有机碱包括异丙胺、三甲胺、甘氨酸、组氨酸等。

[0067] 在本文中,个体指的是人或非人哺乳动物,优选是人,包括男人、女人和儿童。非人哺乳动物优选是药物试验用动物,如大鼠、小鼠、兔、猫、狗、猴和马等。

[0068] 在本文中,治疗指对具有给定疾病的受试者给药后逆转、减轻、抑制该疾病得一种或多种病症或病况的进展。因此,治疗不仅指导致疾病完全治愈的治疗,还指减缓疾病进展和/或延长受试者生存率的治疗。

[0069] 在本文中,有效量指以合理的收益/风险比治疗达到足以治疗相应疾病的所需的药物量。本发明的双特异性抗体或本发明的药物组合物的每日总用量将由医师在安全医学判断范围内决定。用于任何特定患者的特定的治疗上的有效量将取决于多种因素,包括待治疗的病症和病症的严重性;采用的特定多肽的活性;采用的特定组合物;患者的年龄、体重、基本健康、性别和饮食;施用时间;施用途径和采用的多肽的排泄率;治疗持续时间;与采用的多肽组合或同时使用的药物等医学领域已知的因素。

[0070] 本发明引用了公开文献,这些文献是为了更清楚地描述本发明,它们的全文内容均纳入本文进行参考,就好像它们的全文已经在本文中重复叙述过一样。

[0071] 为了便于理解,以下将通过具体的实施例和附图对本发明进行详细地描述。需要特别指出的是,这些描述仅仅是示例性的描述,并不构成对本发明范围的限制。依据本说明书的论述,本发明的许多变化、改变对所属领域技术人员来说都是显而易见了。

具体实施方式

[0072] 以下通过实施例进一步说明本发明的内容。如未特别指明,实施例中所用的技术手段为本领域技术人员所熟知的常规手段和市售的常用仪器、试剂,可参见《抗体工程(第二版)》(北京大学医学出版社)、《分子克隆实验指南(第3版)》(科学出版社)、《微生物学实验(第4版)》(高等教育出版社)以及相应仪器和试剂的厂商说明书等参考。

[0073] 实施例1本发明的双特异性抗体A的制备及其效果实验

[0074] 按照常规重组DNA技术制备,简而言之,首先构建含有如图1所示之构建体的质粒(pLNCX,可购自Clontech公司),其中:在质粒带有的先导序列(Leader seq)和内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)之间依次插入编码抗表皮生长因子受体的轻链可变区和轻链恒定区(α -Tumor VL-CK,其氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示)、连接肽(linker,氨基酸序列为GGGSGGGSGGGGS)和细胞黏附分子-1(Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1)结构域D1-D2-D3(ICAM1-D1-3,其氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示)的DNA,在质粒带有的第二个先导序列(Leader seq)后依次插入编码抗表皮生长因子受体的重链可变区和CH1(α -Tumor VH-CH1,其氨基酸序列如SEQ ID NO:7所示)、连接肽(linker,氨基酸序列为GGGSGGG)、抗T细胞的CD3抗原(anti-CD3)的重链可变区(α -CD3 VH)、连接肽(scFv linker)、抗T细胞的CD3抗原(anti-CD3)的轻链可变区(α -CD3 VL)和组

氨酸标签(6His)的DNA,其中 α -CD3 VH-scFv linker和 α -CD3 VL的完整的氨基酸序列如SEQ ID NO:10所示。

[0075] 接著,将上述构建的阳性质体转染入Expi293F细胞(可购自Thermo Fisher Scientific公司),用细胞培养液Expi293TMExpression Medium(可购自Thermo Fisher Scientific公司)于37℃、二氧化碳浓度5%的条件下进行悬浮培养,并透过继代培养(subculture)方式来使Expi293F细胞培养液中的Expi293F细胞个数维持在 $3-5 \times 10^6$ cells/ml。经培养7天后,用超声波破碎细胞,以1000rpm离心10分钟收集细胞上清液,以镍亲和性层析法(Nickel Affinity Chromatography)从前述之上清液中纯化出Expi293F细胞所表达的双特异性抗体A。

[0076] 经鉴定, α -Tumor VL-CK的轻链恒定区与 α -Tumor VH-CH1的CH1之间通过二硫键共价相连成完整的双特异性抗体。该双特异性抗体A表达后的结构如图2所示。

[0077] 另外,如图3所示,按照基本相同于上述的方法构建并制备作为对照的双特异性抗体B,与双特异性抗体A相比,所不同仅在于不带有细胞黏附分子-1(Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1)结构域D1-D2-D3(ICAM1-D1-3)。

[0078] 对双特异性抗体A和B进行针对T细胞的黏合时间试验,具体而言,首先,准备6个250ml细胞培养瓶,各个细胞培养瓶中分别加入20ml的无血清细胞培养液AIM V(可购自ThermoFisher Scientific公司),接著,在其中三个细胞培养瓶内的细胞培养液中加上浓度为5mg/mL的双特异性抗体A作为实验组样本,并在另外三个细胞培养瓶内的细胞培养液中加上浓度为5mg/mL的双特异性抗体B作为对照组样本。上述的6个细胞培养瓶放入细胞培养箱中,于37℃、二氧化碳浓度5%的条件下进行培养,并且在培养后0小时、培养后24小时、培养后48小时以及培养后72小时这4个时间点,分别从实验组的细胞液样本及对照组的细胞液样本中取出分析样本,将实验组的分析样本及对照组的分析样本以荧光二级抗体抗人类IgG荧光异硫氰酸盐(anti-human IgG-FITC)进行染色,并将经染色后的分析样本放入流式细胞仪中,由于anti-human IgG-FITC会与双特异性抗体A及双特异性抗体B结合,因此透过检测T细胞以及被anti-human IgG-FITC标记的T细胞,可以得知实验组及对照组中的T细胞是否与其对应的双特异性抗体製备黏合。

[0079] 实验结果如图4所示,双特异性抗体A(EGFR_CD3+ICAM1)及双特异性抗体B(EGFR_CD3)与T细胞的亲和程度虽然都随时间而下降,但是在培养后24小时、培养后48小时以及培养后72小时这3个时间点,双特异性抗体A与T细胞的亲和程度都显著高于双特异性抗体B与T细胞的亲和程度。由上述实施例1之双特异性抗体A对T细胞黏合时间试验的实验结果可知,能够稳定免疫突触结构的ICAM-1之结构域D1-D2-D3有助于双特异性抗体A提高对于T细胞的亲和性。

[0080] 实施例2本发明的双特异性抗体C的制备及其效果实验

[0081] 按照常规重组DNA技术制备,简而言之,首先构建含有如图5所示之构建体的质粒(pLNCX,可购自Clontech公司),其中:在质粒带有的先导序列(Leader seq)和内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site, IRES)之间依次插入编码抗T细胞的CD3抗原(anti-CD3)的轻链可变区和轻链恒定区(α -CD3 VL-CK,其氨基酸序列如SEQ ID NO:11所示)、连接肽(linker,氨基酸序列为GGGSGGGSGGGGS)和细胞黏附分子-1(Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1)结构域D1-D2-D3(ICAM1-D1-3,其氨基酸序列如SEQ ID NO:

1所示)的DNA,在质粒带有的第二个先导序列(Leader seq)后依次插入编码抗T细胞的CD3抗原(anti-CD3)的重链可变区和CH1(α -CD3 VH-CH1,其氨基酸序列如SEQ ID NO:12所示)、连接肽(linker,氨基酸序列为GGGSGGG)、抗表皮生长因子受体抗体的重链可变区(α -EGFR VH)、连接肽(scFv linker)、抗表皮生长因子受体抗体的轻链可变区(α -EGFR VL)和组氨酸标签(6His)的DNA,其中 α -EGFR VH、scFv linker和 α -EGFR VL的完整的氨基酸序列如SEQ ID NO:13所示。

[0082] 接著,按照与实施例1相同的方式通过Expi293F细胞和镍亲和性层析法制备出双特异性抗体C。

[0083] 经鉴定, α -CD3 VL-CK的轻链恒定区与 α -CD3 VH-CH1的CH1之间通过二硫键共价相连成完整的双特异性抗体。该双特异性抗体C表达后的结构如图6所示。

[0084] 另外,如图7所示,按照基本相同于上述的方法构建并制备作为对照的双特异性抗体D,与双特异性抗体C相比,所不同仅在于不带有细胞黏附分子-1(Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1)结构域D1-D2-D3(ICAM1-D1-3)。

[0085] 对双特异性抗体A和B进行针对T细胞的黏合时间试验按照实施例1所述的试验方法进行。实验结果如图8所示,双特异性抗体C(EGFR_CD3+ICAM1)及双特异性抗体D(EGFR_CD3)与T细胞的亲和程度虽然都随时间而下降,但是在培养后24小时、培养后48小时以及培养后72小时这3个时间点,双特异性抗体C与T细胞的亲和程度都显著高于双特异性抗体D与T细胞的亲和程度。由上述实施例2之双特异性抗体C对T细胞黏合时间试验的实验结果并结合实施例1的结果,可知,不论是使VL-CK及VH-CH对目标细胞具有结合特异性,且使VH-VL对T细胞具有结合特异性,或是使VL-CK及VH-CH对T细胞具有结合特异性,且使VH-VL对目标细胞具有结合特异性,皆不影响具有跨膜蛋白的双特异性抗体对于T细胞的亲和性之提高。

序列表

<110> 广西慧宝源健康产业有限公司；强普生技股份有限公司；桂林商源植物制品有限公司
 <120> 双特异性抗体及其使用方法
 <130> CN, PCT
 <160> 15
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> ICAM1 domain
 <400> 1

[0086] Gln Thr Ser Val Ser Pro Ser Lys Val Ile Leu Pro Arg Gly Gly Ser
 1 5 10 15
 Val Leu Val Thr Cys Ser Thr Ser Cys Asp Gln Pro Lys Leu Leu Gly
 20 25 30
 Ile Glu Thr Pro Leu Pro Lys Lys Glu Leu Leu Leu Pro Gly Asn Asn
 35 40 45
 Arg Lys Val Tyr Glu Leu Ser Asn Val Gln Glu Asp Ser Gln Pro Met
 50 55 60
 Cys Tyr Ser Asn Cys Pro Asp Gly Gln Ser Thr Ala Lys Thr Phe Leu
 65 70 75 80
 Thr Val Tyr Trp Thr Pro Glu Arg Val Glu Leu Ala Pro Leu Pro Ser
 85 90 95
 Trp Gln Pro Val Gly Lys Asn Leu Thr Leu Arg Cys Gln Val Glu Gly
 100 105 110
 Gly Ala Pro Arg Ala Asn Leu Thr Val Val Leu Leu Arg Gly Glu Lys
 115 120 125

Glu Leu Lys Arg Glu Pro Ala Val Gly Glu Pro Ala Glu Val Thr Thr
 130 135 140
 Thr Val Leu Val Arg Arg Asp His His Gly Ala Asn Phe Ser Cys Arg
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Asp Leu Arg Pro Gln Gly Leu Glu Leu Phe Glu Asn Thr
 165 170 175
 Ser Ala Pro Tyr Gln Leu Gln Thr Phe Val Leu Pro Ala Thr Pro Pro
 180 185 190
 Gln Leu Val Ser Pro Arg Val Leu Glu Val Asp Thr Gln Gly Thr Val
 195 200 205
 Val Cys Ser Leu Asp Gly Leu Phe Pro Val Ser Glu Ala Gln Val His
 210 215 220
 Leu Ala Leu Gly Asp Gln Arg Leu Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Asn
 225 230 235 240
 Asp Ser Phe Ser Ala Lys Ala Ser Val Ser Val Thr Ala Glu Asp Glu
 245 250 255
 Gly Thr Gln Arg Leu Thr Cys Ala Val Ile Leu Gly Asn Gln
 260 265 270

<210> 2

<211> 252

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> CD48 domain

<400> 2

Met Cys Ser Arg Gly Trp Asp Ser Cys Leu Ala Leu Glu Leu Leu Leu
 1 5 10 15
 Leu Pro Leu Ser Leu Leu Val Thr Ser Ile Gln Gly His Leu Val His
 20 25 30
 Met Thr Val Val Ser Gly Ser Asn Val Thr Leu Asn Ile Ser Glu Ser
 35 40 45
 Leu Pro Glu Asn Tyr Lys Gln Leu Thr Trp Phe Tyr Thr Phe Asp Gln
 50 55 60
 Lys Ile Val Glu Trp Asp Ser Arg Lys Ser Lys Tyr Phe Glu Ser Lys
 65 70 75 80
 Phe Lys Gly Arg Val Arg Leu Asp Pro Gln Ser Gly Ala Leu Tyr Ile
 85 90 95
 Ser Lys Val Gln Lys Glu Asp Asn Ser Thr Tyr Ile Met Arg Val Leu
 100 105 110
 Lys Lys Thr Gly Asn Glu Gln Glu Trp Lys Ile Lys Leu Gln Val Leu
 115 120 125
 Asp Pro Val Pro Lys Pro Val Ile Lys Ile Glu Lys Ile Glu Asp Met
 130 135 140
 Asp Asp Asn Cys Tyr Leu Lys Leu Ser Cys Val Ile Pro Gly Glu Ser

[0087]

145 150 155 160
 Val Asn Tyr Thr Trp Tyr Gly Asp Lys Arg Pro Phe Pro Lys Glu Leu
 165 170 175
 Gln Asn Ser Val Leu Glu Thr Thr Leu Met Pro His Asn Tyr Ser Arg
 180 185 190
 Cys Tyr Thr Cys Gln Val Ser Asn Ser Val Ser Ser Lys Asn Gly Thr
 195 200 205
 Val Cys Leu Ser Pro Pro Cys Thr Leu Gly Lys Lys Asp Pro Trp Glu
 210 215 220
 Leu Arg Gly Ala Gln Gly Asn Trp Ser Cys Phe Glu Gln Arg Lys Ala
 225 230 235 240
 Gly Gly Pro Ile Gln Pro Pro Cys Thr Val Trp Trp
 245 250

<210> 3
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> CD80 domain
 <400> 3

Val Ile His Val Thr Lys Glu Val Lys Glu Val Ala Thr Leu Ser Cys
 1 5 10 15
 Gly His Asn Val Ser Val Glu Glu Leu Ala Gln Thr Arg Ile Tyr Trp
 20 25 30
 Gln Lys Glu Lys Lys Met Val Leu Thr Met Met Ser Gly Asp Met Asn
 35 40 45
 Ile Trp Pro Glu Tyr Lys Asn Arg Thr Ile Phe Asp Ile Thr Asn Asn
 50 55 60
 Leu Ser Ile Val Ile Leu Ala Leu Arg Pro Ser Asp Glu Gly Thr Tyr
 65 70 75 80
 Glu Cys Val Val Leu Lys Tyr Glu Lys Asp Ala Phe Lys Arg Glu His
 85 90 95
 Leu Ala Glu Val Thr Leu Ser Val Lys Ala Asp Phe Pro Thr Pro Ser
 100 105 110
 Ile Ser Asp Phe Glu Ile Pro Thr Ser Asn Ile Arg Arg Ile Ile Cys
 115 120 125
 Ser Thr Ser Gly Gly Phe Pro Glu Pro His Leu Ser Trp Leu Glu Asn
 130 135 140
 Gly Glu Glu Leu Asn Ala Ile Asn Thr Thr Val Ser Gln Asp Pro Glu
 145 150 155 160
 Thr Glu Leu Tyr Ala Val Ser Ser Lys Leu Asp Phe Asn Met Thr Thr
 165 170 175
 Asn His Ser Phe Met Cys Leu Ile Lys Tyr Gly His Leu Arg Val Asn
 180 185 190

[0088]

Gln Thr Phe Asn Trp Asn Thr Thr Lys Gln Glu His Phe Pro Asp Asn
 195 200 205

<210> 4

<211> 108

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> anti EGFR_VL-CK

<400> 4

Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn
 20 25 30

Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile
 35 40 45

Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser
 65 70 75 80

Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr
 85 90 95

[0089]

Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 5

<211> 109

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> anti CEA_VL-CK

<400> 5

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Thr Val Ser Ala Asn
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 85 90 95

Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 6
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> anti PSMA_VL-CK
 <400> 6
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 20 25 30
 Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

[0090]

<210> 7
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> anti EGFR_VH-CH1
 <400> 7
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
 115

<210> 8
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> anti CEA_VH-CH1
 <400> 8
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Val Trp Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Asp Glu Ala Met Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

[0091]

<210> 9
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> anti PSMA VH-CH1
 <400> 9
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Glu Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 100 105 110

Val Ser Ser
 115
 <210> 10
 <211> 226
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> anti CD3_VH-VL
 <400> 10
 Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 [0092] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala
 115 120 125
 Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala
 130 135 140
 Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr
 145 150 155 160
 Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val
 165 170 175
 Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
 180 185 190
 Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
 195 200 205
 Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
 210 215 220
 Lys Arg
 225
 <210> 11
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> anti CD3 VL-CK
 <400> 11
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
 85 90 95
 Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
 100 105

<210> 12
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

[0093]

<220>
 <223> anti CD3 VH-CH1
 <400> 12
 Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 20 25 30
 Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 13
 <211> 227
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>

<223> anti EGFR_VH-VL
 <400> 13
 Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 1 5 10 15
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 20 25 30
 Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 35 40 45
 Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 50 55 60
 Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 65 70 75 80
 Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Asp Ile Leu Leu Thr Gln Ser Pro Val
 115 120 125
 Ile Leu Ser Val Ser Pro Gly Glu Arg Val Ser Phe Ser Cys Arg Ala
 130 135 140
 Ser Gln Ser Ile Gly Thr Asn Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Thr Asn
 145 150 155 160
 [0094] Gly Ser Pro Arg Leu Leu Ile Lys Tyr Ala Ser Glu Ser Ile Ser Gly
 165 170 175
 Ile Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu
 180 185 190
 Ser Ile Asn Ser Val Glu Ser Glu Asp Ile Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln
 195 200 205
 Gln Asn Asn Asn Trp Pro Thr Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu
 210 215 220
 Leu Lys Arg
 225
 <210> 14
 <211> 230
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> anti CEA_VH-VL
 <400> 14
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Gly Met Asn Val Trp Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45
 Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Asp Glu Ala Met Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser
 115 120 125
 Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
 130 135 140
 Lys Ala Ser Gln Thr Val Ser Ala Asn Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys
 145 150 155 160
 Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Leu Ala Ser Tyr Arg Tyr
 165 170 175
 Arg Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
 180 185 190
 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr
 195 200 205
 Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr
 210 215 220
 Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 225 230
 <210> 15
 <211> 223
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence
 <220>
 <223> anti PSMA_VH-VL
 <400> 15
 Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 20 25 30
 Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60
 Glu Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

[0095]

[0096]

Ala	Ala	Gly	Trp	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr
		100						105						110	
Val	Ser	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala
		115						120					125		
Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Asp	Val
		130					135					140			
Gly	Thr	Ala	Val	Asp	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys
		145				150				155					160
Leu	Leu	Ile	Tyr	Trp	Ala	Ser	Thr	Arg	His	Thr	Gly	Val	Pro	Asp	Arg
				165					170						175
Phe	Thr	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser
			180					185						190	
Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Asp	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Tyr	Asn	Ser
			195					200					205		
Tyr	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg	
		210					215					220			

[0001] <110> 广西慧宝源健康产业有限公司;强普生技股份有限公司;桂林商源植物制品有限公司
[0002] <120> 双特异性抗体及其使用方法
[0003] <130> CN,PCT
[0004] <160> 15
[0005] <170> PatentIn version 3.5
[0006] <210> 1
[0007] <211> 270
[0008] <212> PRT
[0009] <213> Artificial Sequence
[0010] <220>
[0011] <223> ICAM1 domain
[0012] <400> 1
[0013] Gln Thr Ser Val Ser Pro Ser Lys Val Ile Leu Pro Arg Gly Gly Ser
[0014] 1 5 10 15
[0015] Val Leu Val Thr Cys Ser Thr Ser Cys Asp Gln Pro Lys Leu Leu Gly
[0016] 20 25 30
[0017] Ile Glu Thr Pro Leu Pro Lys Lys Glu Leu Leu Leu Pro Gly Asn Asn
[0018] 35 40 45
[0019] Arg Lys Val Tyr Glu Leu Ser Asn Val Gln Glu Asp Ser Gln Pro Met
[0020] 50 55 60
[0021] Cys Tyr Ser Asn Cys Pro Asp Gly Gln Ser Thr Ala Lys Thr Phe Leu
[0022] 65 70 75 80
[0023] Thr Val Tyr Trp Thr Pro Glu Arg Val Glu Leu Ala Pro Leu Pro Ser
[0024] 85 90 95
[0025] Trp Gln Pro Val Gly Lys Asn Leu Thr Leu Arg Cys Gln Val Glu Gly
[0026] 100 105 110
[0027] Gly Ala Pro Arg Ala Asn Leu Thr Val Val Leu Leu Arg Gly Glu Lys
[0028] 115 120 125
[0029] Glu Leu Lys Arg Glu Pro Ala Val Gly Glu Pro Ala Glu Val Thr Thr
[0030] 130 135 140
[0031] Thr Val Leu Val Arg Arg Asp His His Gly Ala Asn Phe Ser Cys Arg
[0032] 145 150 155 160
[0033] Thr Glu Leu Asp Leu Arg Pro Gln Gly Leu Glu Leu Phe Glu Asn Thr
[0034] 165 170 175
[0035] Ser Ala Pro Tyr Gln Leu Gln Thr Phe Val Leu Pro Ala Thr Pro Pro
[0036] 180 185 190
[0037] Gln Leu Val Ser Pro Arg Val Leu Glu Val Asp Thr Gln Gly Thr Val

[0038]	195	200	205
[0039]	Val Cys Ser Leu Asp Gly Leu Phe Pro Val Ser Glu Ala Gln Val His		
[0040]	210	215	220
[0041]	Leu Ala Leu Gly Asp Gln Arg Leu Asn Pro Thr Val Thr Tyr Gly Asn		
[0042]	225	230	235
[0043]	Asp Ser Phe Ser Ala Lys Ala Ser Val Ser Val Thr Ala Glu Asp Glu		
[0044]	245	250	255
[0045]	Gly Thr Gln Arg Leu Thr Cys Ala Val Ile Leu Gly Asn Gln		
[0046]	260	265	270
[0047]	<210> 2		
[0048]	<211> 252		
[0049]	<212> PRT		
[0050]	<213> Artificial Sequence		
[0051]	<220>		
[0052]	<223> CD48 domain		
[0053]	<400> 2		
[0054]	Met Cys Ser Arg Gly Trp Asp Ser Cys Leu Ala Leu Glu Leu Leu Leu		
[0055]	1	5	10
[0056]	Leu Pro Leu Ser Leu Leu Val Thr Ser Ile Gln Gly His Leu Val His		
[0057]	20	25	30
[0058]	Met Thr Val Val Ser Gly Ser Asn Val Thr Leu Asn Ile Ser Glu Ser		
[0059]	35	40	45
[0060]	Leu Pro Glu Asn Tyr Lys Gln Leu Thr Trp Phe Tyr Thr Phe Asp Gln		
[0061]	50	55	60
[0062]	Lys Ile Val Glu Trp Asp Ser Arg Lys Ser Lys Tyr Phe Glu Ser Lys		
[0063]	65	70	75
[0064]	Phe Lys Gly Arg Val Arg Leu Asp Pro Gln Ser Gly Ala Leu Tyr Ile		
[0065]	85	90	95
[0066]	Ser Lys Val Gln Lys Glu Asp Asn Ser Thr Tyr Ile Met Arg Val Leu		
[0067]	100	105	110
[0068]	Lys Lys Thr Gly Asn Glu Gln Glu Trp Lys Ile Lys Leu Gln Val Leu		
[0069]	115	120	125
[0070]	Asp Pro Val Pro Lys Pro Val Ile Lys Ile Glu Lys Ile Glu Asp Met		
[0071]	130	135	140
[0072]	Asp Asp Asn Cys Tyr Leu Lys Leu Ser Cys Val Ile Pro Gly Glu Ser		
[0073]	145	150	155
[0074]	Val Asn Tyr Thr Trp Tyr Gly Asp Lys Arg Pro Phe Pro Lys Glu Leu		
[0075]	165	170	175
[0076]	Gln Asn Ser Val Leu Glu Thr Thr Leu Met Pro His Asn Tyr Ser Arg		

[0077]		180		185		190											
[0078]	Cys	Tyr	Thr	Cys	Gln	Val	Ser	Asn	Ser	Val	Ser	Ser	Lys	Asn	Gly	Thr	
[0079]				195											200		205
[0080]	Val	Cys	Leu	Ser	Pro	Pro	Cys	Thr	Leu	Gly	Lys	Lys	Asp	Pro	Trp	Glu	
[0081]				210											215		220
[0082]	Leu	Arg	Gly	Ala	Gln	Gly	Asn	Trp	Ser	Cys	Phe	Glu	Gln	Arg	Lys	Ala	
[0083]				225											230		235
[0084]	Gly	Gly	Pro	Ile	Gln	Pro	Pro	Cys	Thr	Val	Trp	Trp					
[0085]															245		250
[0086]	<210>																3
[0087]	<211>																208
[0088]	<212>																PRT
[0089]	<213>																Artificial Sequence
[0090]	<220>																
[0091]	<223>																CD80 domain
[0092]	<400>																3
[0093]	Val	Ile	His	Val	Thr	Lys	Glu	Val	Lys	Glu	Val	Ala	Thr	Leu	Ser	Cys	
[0094]																	
[0095]	Gly	His	Asn	Val	Ser	Val	Glu	Glu	Leu	Ala	Gln	Thr	Arg	Ile	Tyr	Trp	
[0096]																	
[0097]																	
[0098]																	
[0099]	Ile	Trp	Pro	Glu	Tyr	Lys	Asn	Arg	Thr	Ile	Phe	Asp	Ile	Thr	Asn	Asn	
[0100]																	
[0101]	Leu	Ser	Ile	Val	Ile	Leu	Ala	Leu	Arg	Pro	Ser	Asp	Glu	Gly	Thr	Tyr	
[0102]																	
[0103]	Glu	Cys	Val	Val	Leu	Lys	Tyr	Glu	Lys	Asp	Ala	Phe	Lys	Arg	Glu	His	
[0104]																	
[0105]	Leu	Ala	Glu	Val	Thr	Leu	Ser	Val	Lys	Ala	Asp	Phe	Pro	Thr	Pro	Ser	
[0106]																	
[0107]	Ile	Ser	Asp	Phe	Glu	Ile	Pro	Thr	Ser	Asn	Ile	Arg	Arg	Ile	Ile	Cys	
[0108]																	
[0109]	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Pro	Glu	Pro	His	Leu	Ser	Trp	Leu	Glu	Asn	
[0110]																	
[0111]	Gly	Glu	Glu	Leu	Asn	Ala	Ile	Asn	Thr	Thr	Val	Ser	Gln	Asp	Pro	Glu	
[0112]																	
[0113]	Thr	Glu	Leu	Tyr	Ala	Val	Ser	Ser	Lys	Leu	Asp	Phe	Asn	Met	Thr	Thr	
[0114]																	
[0115]	Asn	His	Ser	Phe	Met	Cys	Leu	Ile	Lys	Tyr	Gly	His	Leu	Arg	Val	Asn	

[0116]		180		185		190										
[0117]	Gln	Thr	Phe	Asn	Trp	Asn	Thr	Thr	Lys	Gln	Glu	His	Phe	Pro	Asp	Asn
[0118]			195						200					205		
[0119]	<210>	4														
[0120]	<211>	108														
[0121]	<212>	PRT														
[0122]	<213>	Artificial Sequence														
[0123]	<220>															
[0124]	<223>	anti EGFR_VL-CK														
[0125]	<400>	4														
[0126]	Asp	Ile	Leu	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Val	Ile	Leu	Ser	Val	Ser	Pro	Gly
[0127]	1				5					10					15	
[0128]	Glu	Arg	Val	Ser	Phe	Ser	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Gly	Thr	Asn
[0129]					20				25					30		
[0130]	Ile	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Arg	Thr	Asn	Gly	Ser	Pro	Arg	Leu	Leu	Ile
[0131]					35				40					45		
[0132]	Lys	Tyr	Ala	Ser	Glu	Ser	Ile	Ser	Gly	Ile	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
[0133]			50				55					60				
[0134]	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Ser	Ile	Asn	Ser	Val	Glu	Ser
[0135]	65					70					75				80	
[0136]	Glu	Asp	Ile	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Asn	Asn	Trp	Pro	Thr
[0137]						85				90					95	
[0138]	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Lys	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg				
[0139]						100					105					
[0140]	<210>	5														
[0141]	<211>	109														
[0142]	<212>	PRT														
[0143]	<213>	Artificial Sequence														
[0144]	<220>															
[0145]	<223>	anti CEA_VL-CK														
[0146]	<400>	5														
[0147]	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly
[0148]	1				5						10				15	
[0149]	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Thr	Val	Ser	Ala	Asn
[0150]											20				25	
[0151]	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile
[0152]					35						40			45		
[0153]	Tyr	Leu	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr	Arg	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly
[0154]					50						55			60		

[0155] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 [0156] 65 70 75 80
 [0157] Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys His Gln Tyr Tyr Thr Tyr Pro Leu
 [0158] 85 90 95
 [0159] Phe Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 [0160] 100 105
 [0161] <210> 6
 [0162] <211> 108
 [0163] <212> PRT
 [0164] <213> Artificial Sequence
 [0165] <220>
 [0166] <223> anti PSMA_VL-CK
 [0167] <400> 6
 [0168] Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
 [0169] 1 5 10 15
 [0170] Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Gly Thr Ala
 [0171] 20 25 30
 [0172] Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 [0173] 35 40 45
 [0174] Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 [0175] 50 55 60
 [0176] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 [0177] 65 70 75 80
 [0178] Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
 [0179] 85 90 95
 [0180] Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 [0181] 100 105
 [0182] <210> 7
 [0183] <211> 119
 [0184] <212> PRT
 [0185] <213> Artificial Sequence
 [0186] <220>
 [0187] <223> anti EGFR_VH-CH1
 [0188] <400> 7
 [0189] Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 [0190] 1 5 10 15
 [0191] Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 [0192] 20 25 30
 [0193] Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu

[0194]	35	40	45
[0195]	Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr		
[0196]	50	55	60
[0197]	Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe		
[0198]	65	70	75
[0199]	Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala		
[0200]	85	90	95
[0201]	Arg Ala Leu Thr Tyr Tyr Asp Tyr Glu Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly		
[0202]	100	105	110
[0203]	Thr Leu Val Thr Val Ser Ala		
[0204]	115		
[0205]	<210> 8		
[0206]	<211> 121		
[0207]	<212> PRT		
[0208]	<213> Artificial Sequence		
[0209]	<220>		
[0210]	<223> anti CEA_VH-CH1		
[0211]	<400> 8		
[0212]	Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ser Glu Leu Lys Lys Pro Gly Ala		
[0213]	1	5	10
[0214]	Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr		
[0215]	20	25	30
[0216]	Gly Met Asn Val Trp Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met		
[0217]	35	40	45
[0218]	Gly Trp Ile Asn Thr Lys Ser Gly Glu Ala Thr Tyr Val Glu Glu Phe		
[0219]	50	55	60
[0220]	Lys Gly Arg Phe Val Phe Ser Leu Asp Thr Ser Val Ser Thr Ala Tyr		
[0221]	65	70	75
[0222]	Leu Gln Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys		
[0223]	85	90	95
[0224]	Ala Arg Trp Asp Phe Tyr Asp Tyr Val Asp Glu Ala Met Tyr Trp Gly		
[0225]	100	105	110
[0226]	Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser		
[0227]	115	120	
[0228]	<210> 9		
[0229]	<211> 115		
[0230]	<212> PRT		
[0231]	<213> Artificial Sequence		
[0232]	<220>		

[0233] <223> anti PSMA VH-CH1
 [0234] <400> 9
 [0235] Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 [0236] 1 5 10 15
 [0237] Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Glu Tyr
 [0238] 20 25 30
 [0239] Thr Ile His Trp Val Lys Gln Ala Ser Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
 [0240] 35 40 45
 [0241] Gly Asn Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0242] 50 55 60
 [0243] Glu Asp Arg Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 [0244] 65 70 75 80
 [0245] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0246] 85 90 95
 [0247] Ala Ala Gly Trp Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr
 [0248] 100 105 110
 [0249] Val Ser Ser
 [0250] 115
 [0251] <210> 10
 [0252] <211> 226
 [0253] <212> PRT
 [0254] <213> Artificial Sequence
 [0255] <220>
 [0256] <223> anti CD3_VH-VL
 [0257] <400> 10
 [0258] Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 [0259] 1 5 10 15
 [0260] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 [0261] 20 25 30
 [0262] Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0263] 35 40 45
 [0264] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0265] 50 55 60
 [0266] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0267] 65 70 75 80
 [0268] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0269] 85 90 95
 [0270] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 [0271] 100 105 110

[0272]	Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala
[0273]	115 120 125
[0274]	Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala
[0275]	130 135 140
[0276]	Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr
[0277]	145 150 155 160
[0278]	Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val
[0279]	165 170 175
[0280]	Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr
[0281]	180 185 190
[0282]	Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
[0283]	195 200 205
[0284]	Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu
[0285]	210 215 220
[0286]	Lys Arg
[0287]	225
[0288]	<210> 11
[0289]	<211> 107
[0290]	<212> PRT
[0291]	<213> Artificial Sequence
[0292]	<220>
[0293]	<223> anti CD3 VL-CK
[0294]	<400> 11
[0295]	Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
[0296]	1 5 10 15
[0297]	Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
[0298]	20 25 30
[0299]	Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
[0300]	35 40 45
[0301]	Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser
[0302]	50 55 60
[0303]	Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
[0304]	65 70 75 80
[0305]	Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
[0306]	85 90 95
[0307]	Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg
[0308]	100 105
[0309]	<210> 12
[0310]	<211> 119

[0311] <212> PRT
 [0312] <213> Artificial Sequence
 [0313] <220>
 [0314] <223> anti CD3 VH-CH1
 [0315] <400> 12
 [0316] Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
 [0317] 1 5 10 15
 [0318] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr
 [0319] 20 25 30
 [0320] Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 [0321] 35 40 45
 [0322] Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe
 [0323] 50 55 60
 [0324] Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 [0325] 65 70 75 80
 [0326] Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 [0327] 85 90 95
 [0328] Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly
 [0329] 100 105 110
 [0330] Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 [0331] 115
 [0332] <210> 13
 [0333] <211> 227
 [0334] <212> PRT
 [0335] <213> Artificial Sequence
 [0336] <220>
 [0337] <223> anti EGFR_VH-VL
 [0338] <400> 13
 [0339] Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Pro Gly Leu Val Gln Pro Ser Gln
 [0340] 1 5 10 15
 [0341] Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Asn Tyr
 [0342] 20 25 30
 [0343] Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
 [0344] 35 40 45
 [0345] Gly Val Ile Trp Ser Gly Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Thr Pro Phe Thr
 [0346] 50 55 60
 [0347] Ser Arg Leu Ser Ile Asn Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val Phe Phe
 [0348] 65 70 75 80
 [0349] Lys Met Asn Ser Leu Gln Ser Asn Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala

[0389]		100		105		110													
[0390]	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Gln	Ser			
[0391]			115					120					125						
[0392]	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys			
[0393]		130						135					140						
[0394]	Lys	Ala	Ser	Gln	Thr	Val	Ser	Ala	Asn	Val	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys			
[0395]	145						150					155				160			
[0396]	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Leu	Ala	Ser	Tyr	Arg	Tyr			
[0397]				165						170						175			
[0398]	Arg	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe			
[0399]				180						185						190			
[0400]	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr			
[0401]			195						200							205			
[0402]	Cys	His	Gln	Tyr	Tyr	Thr	Tyr	Pro	Leu	Phe	Thr	Phe	Gly	Gln	Gly	Thr			
[0403]		210							215							220			
[0404]	Lys	Leu	Glu	Ile	Lys	Arg													
[0405]	225															230			
[0406]	<210>	15																	
[0407]	<211>	223																	
[0408]	<212>	PRT																	
[0409]	<213>	Artificial Sequence																	
[0410]	<220>																		
[0411]	<223>	anti PSMA_VH-VL																	
[0412]	<400>	15																	
[0413]	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Gln	Ser	Gly	Ala	Glu	Val	Lys	Lys	Pro	Gly	Ala			
[0414]	1			5						10					15				
[0415]	Ser	Val	Lys	Ile	Ser	Cys	Lys	Thr	Ser	Gly	Tyr	Thr	Phe	Thr	Glu	Tyr			
[0416]				20						25					30				
[0417]	Thr	Ile	His	Trp	Val	Lys	Gln	Ala	Ser	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile			
[0418]			35							40					45				
[0419]	Gly	Asn	Ile	Asn	Pro	Asn	Asn	Gly	Gly	Thr	Thr	Tyr	Asn	Gln	Lys	Phe			
[0420]		50								55					60				
[0421]	Glu	Asp	Arg	Ala	Thr	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr			
[0422]	65						70				75				80				
[0423]	Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys			
[0424]				85						90					95				
[0425]	Ala	Ala	Gly	Trp	Asn	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Val	Thr			
[0426]				100						105					110				
[0427]	Val	Ser	Ser	Asp	Ile	Val	Met	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala			

[0428]	115	120	125
[0429]	Ser Val Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val		
[0430]	130	135	140
[0431]	Gly Thr Ala Val Asp Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys		
[0432]	145	150	155
[0433]	Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg		
[0434]	165	170	175
[0435]	Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser		
[0436]	180	185	190
[0437]	Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser		
[0438]	195	200	205
[0439]	Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg		
[0440]	210	215	220

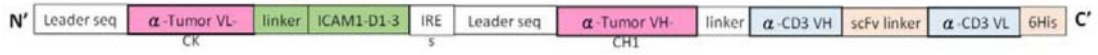


图1

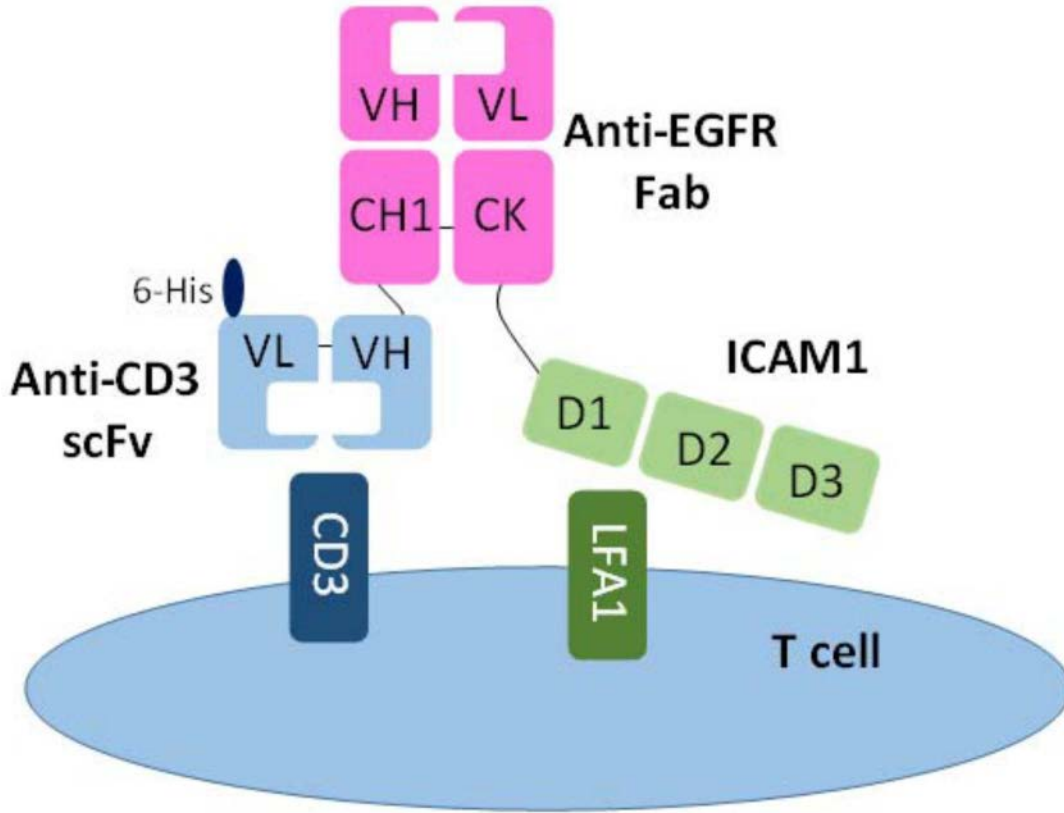


图2

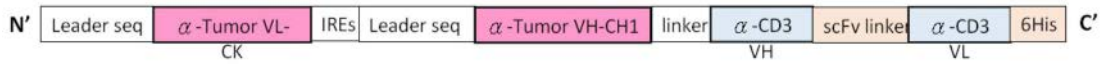


图3

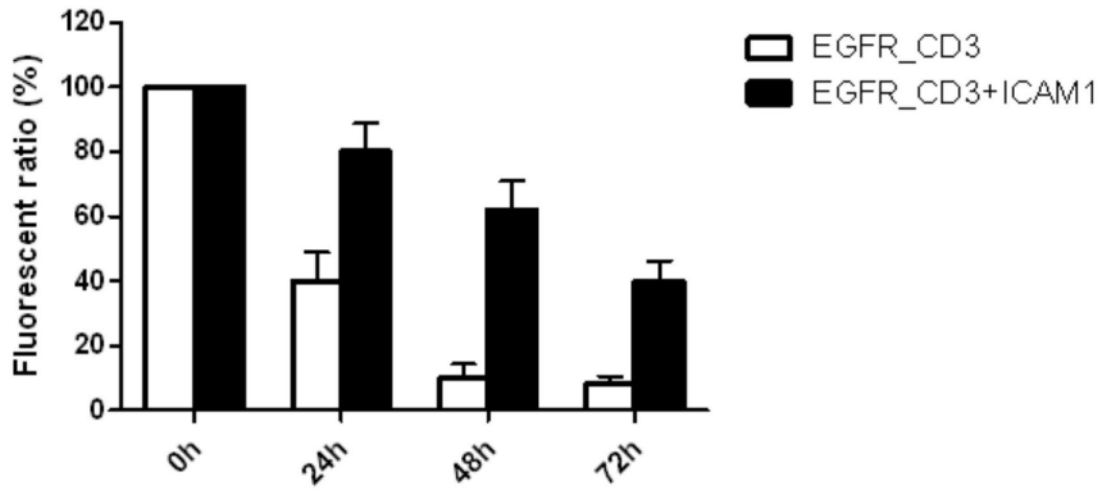


图4



图5

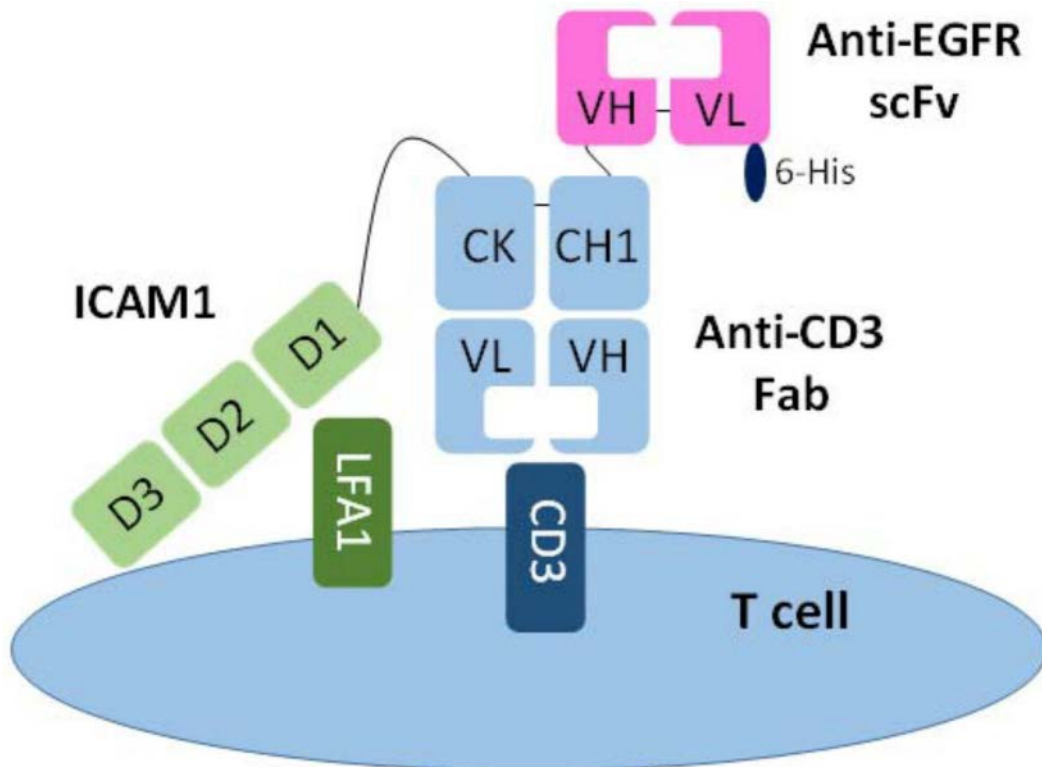


图6



图7

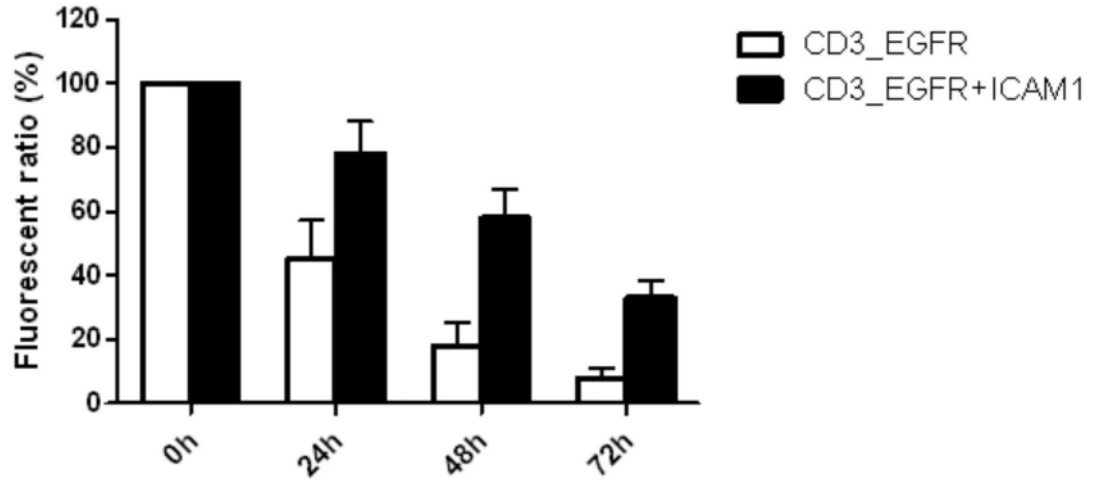


图8