

(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
2020年3月12日 (12.03.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/047818 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 16/46 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C07K 16/30 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 15/85 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/104518

(22) 国际申请日: 2018年9月7日 (07.09.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201811028689.3 2018年9月3日 (03.09.2018) CN

(71) 申请人: 广西慧宝源健康产业有限公司 (GUANGXI HEBABIZ HEALTH INDUSTRIES CO., LTD) [US/CN]; 中国广西壮族自治区钦州市民安街76号詹姆斯周, Guangxi 535000 (CN)。 强普生技股份有限公司 (JOHNPRO BIOTECH INC.) [CN/CN]; 中国台湾省台北市大同区南京西路163号2楼之98王愈善, Taiwan 000103 (CN)。 桂林商源植物制品有限公司 (SOURCING BIZ GUILIN INC.) [US/CN]; 中国广西壮族自治区桂林市灵川区八里街开发区詹姆斯周, Guangxi 541213 (CN)。

(72) 发明人: 季匡华 (CHI, Kwan-Haw); 中国台湾省台北市士林区后港街118号2楼王愈善, Taiwan 000103 (CN)。 王愈善 (WANG, Yu-Sam); 中国台湾省台北市士林区后港街118号2楼, Taiwan 000103 (CN)。 江欣倩 (CHIANG, Hsin-Chien); 中国台湾省台北市士林区后港街118号2楼王愈善, Taiwan 000103 (CN)。 黄逸君 (HUANG, Yi-Chun); 中国台湾省台北市士林区后港街118号2楼王愈善, Taiwan 000103 (CN)。 周詹姆斯 (ZHOU, James); 美国康涅狄格州韦斯特波特里士满威尔大道36, Connecticut 06880 (US)。

(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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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)。

根据细则4.17的声明:

— 发明人资格 (细则4.17(iv))

本国际公布:

— 包括国际检索报告 (条约第21条(3))。

(54) Title: BISPECIFIC ANTIBODY AND USE METHOD THEREFOR

(54) 发明名称: 双特异性抗体及其使用方法

(57) Abstract: The present invention provides a bispecific antibody, comprising a first peptide chain VL-CK-TM and a second peptide chain VH-CH1-VH'-VL', wherein VH is a heavy chain variable region of a first monoclonal antibody, VL is a light chain variable region of the first monoclonal antibody, CH1 is a heavy chain constant region 1 of the first monoclonal antibody, CK is a light chain constant region of the first monoclonal antibody, VH' is a heavy chain variable region of a second monoclonal antibody, VL' is a light chain variable region of a second monoclonal antibody, and TM is a transmembrane protein domain.

(57) 摘要: 本发明提供了一种双特异性抗体, 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。

WO 2020/047818 A1

双特异性抗体及其使用方法

技术领域

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

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。

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)。

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；

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；

中国专利申请 CN104829728A 公开了一种双特异性抗体 HER2 X 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 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；

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；

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；

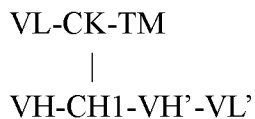
中国专利申请 CN104829729A 公开了一种携带抗 Her2/CD3 双特异抗体，其包括第一抗体段和第二抗体段，所述第一抗体段为抗肿瘤抗原抗体段，第二抗体段为抗人 CD3 分子抗体段，利用过继转输的 T 细胞携带并在体内持续表达该抗体蛋白，从而使该双特异性抗体在体内发挥杀伤作用的同时，伴随足量的 T 效应细胞，更优化了效应发挥的效率。

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。

发明简述

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。

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，



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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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'。

在本发明的具体实施方式中，连接肽可以是 GGGSGGG、VEGGSGGSGGSGGSGGV D 或(GGGGS) n ，其中 $n=1\sim 5$ 。

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。

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。

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。

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：

- (a) 培养本发明第四方面的宿主细胞；和
- (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。

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。

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。

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

图 1 为实施例 1 的双特异性抗体 A 的构建体示意图。

图 2 为实施例 1 的双特异性抗体 A 的结构示意图。

图 3 为实施例 1 的双特异性抗体 B 的构建体示意图。

图 4 为实施例 1 的 T 细胞黏合时间试验的实验结果图。

图 5 为实施例 2 的双特异性抗体 C 的构建体示意图。

图 6 为实施例 2 的双特异性抗体 C 的结构示意图。

图 7 为实施例 2 的双特异性抗体 D 的构建体示意图。

图 8 为实施例 2 的 T 细胞黏合时间试验的实验结果图。

发明详述

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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。

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、包封材料或制剂辅料等。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还可包含抗氧化剂（如，色胺）和稳定剂（如，吐温-20）。

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。

本发明的双特异性抗体在本发明的药物组合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。

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。

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。

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。

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。

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

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。

实施例 1 本发明的双特异性抗体 A 的制备及其效果实验

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抗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 GGGGSGGGGSGGGGS)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抗体的重链可变区和 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。

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 Expi293™ Expression Medium（可购自 Thermo

Fisher Scientific 公司) 于 37°C、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。

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。

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)。

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 5 mg/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 5 mg/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°C、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。

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。

实施例 2 本发明的双特异性抗体 C 的制备及其效果实验

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。

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。

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。

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)。

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

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

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

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

<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

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 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 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>

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

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

权利要求书

1, 具有下式结构的双特异性抗体,



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。

2, 权利要求 1 所述的双特异性抗体, 其中, 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, 优选特异结合 T 细胞的 CD3 抗原; 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, 更优选特异结合表皮生长因子受体、癌胚抗原或前列腺特定膜抗原。

3, 权利要求 1 所述的双特异性抗体, 其中, 跨膜蛋白结构域是白细胞分化抗原的跨膜结构域, 优选是细胞黏附分子-1、CD48 或 CD80 的跨膜结构域, 更优选跨膜蛋白结构域的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1、2 或 3 所示。

4, 权利要求 1 所述的双特异性抗体, 其中, VL-CK 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 4、5、6 或 11 所示。

5, 权利要求 1 所述的双特异性抗体, 其中, VH-CH1 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 7、8、9 或 12 所示。

6, 权利要求 1 所述的双特异性抗体, 其中, VH'-VL' 的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 10、13、14 或 15 所示。

7, 重组 DNA 技术的中间产物, 其为:

- (1) 分离的核酸, 其编码权利要求 1-6 中任一项所述的双特异性抗体;
- (2) 载体 (优选为质粒), 其包含上述 (1) 所述的核酸; 或,

(3) 宿主细胞（优选为哺乳动物细胞），其包含上述（2）所述的载体，或者被上述（2）所述的载体转染。

8, 生产权利要求 1-6 中任一项所述的双特异性抗体的方法，其包括以下步骤：

(a) 培养权利要求所述 7 宿主细胞；和。

(b) 从步骤(a)获得的培养物中收集权利要求 1-6 中任一项所述的双特异性抗体。

9, 药物组合物，其包括权利要求 1-6 中任一项所述的双特异性抗体和药学上可接受的辅料。

10, 权利要求 1-6 中任一项所述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，优选其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。

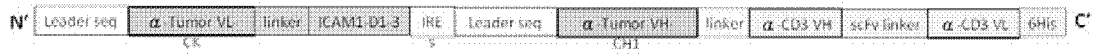


图 1

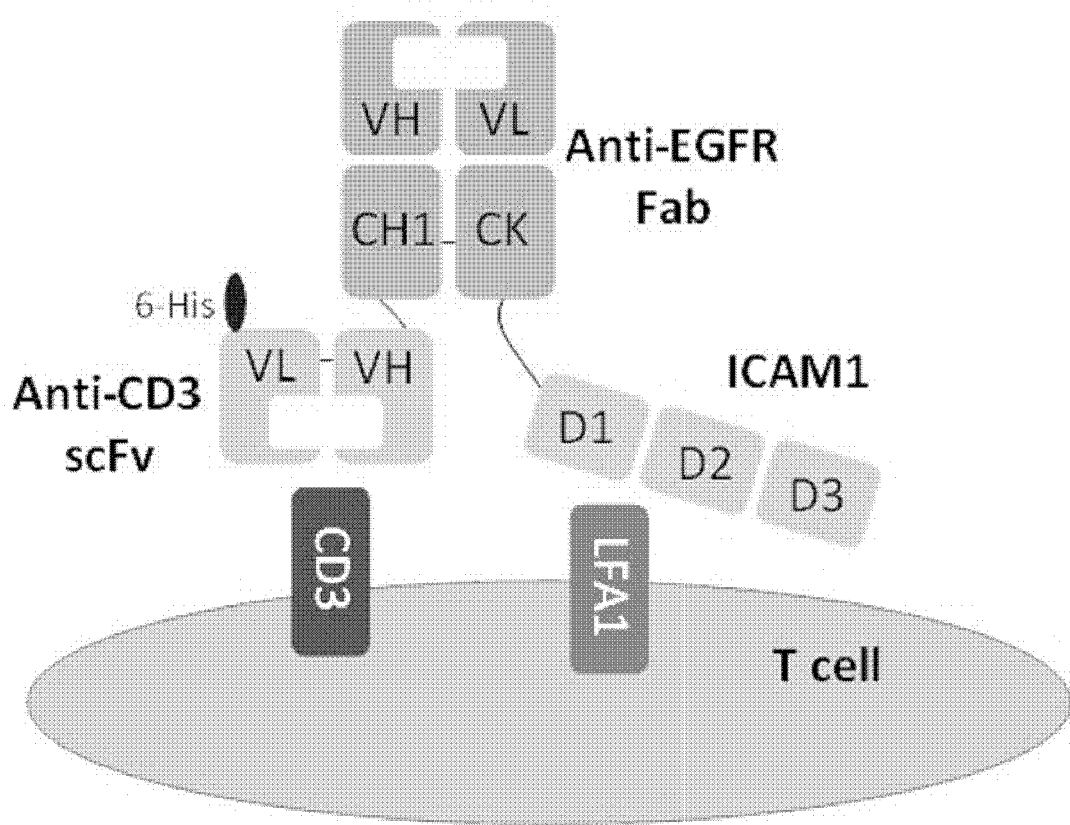


图 2

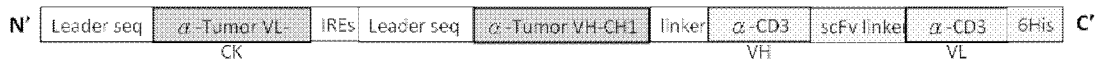


图 3

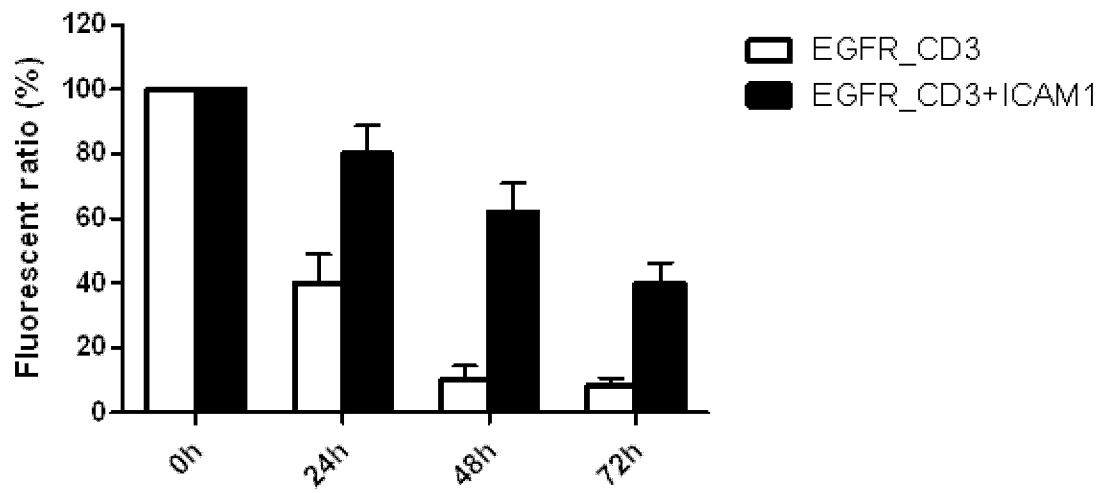


图 4

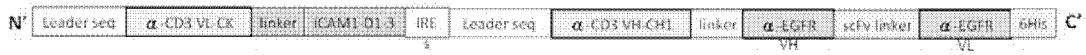


图 5

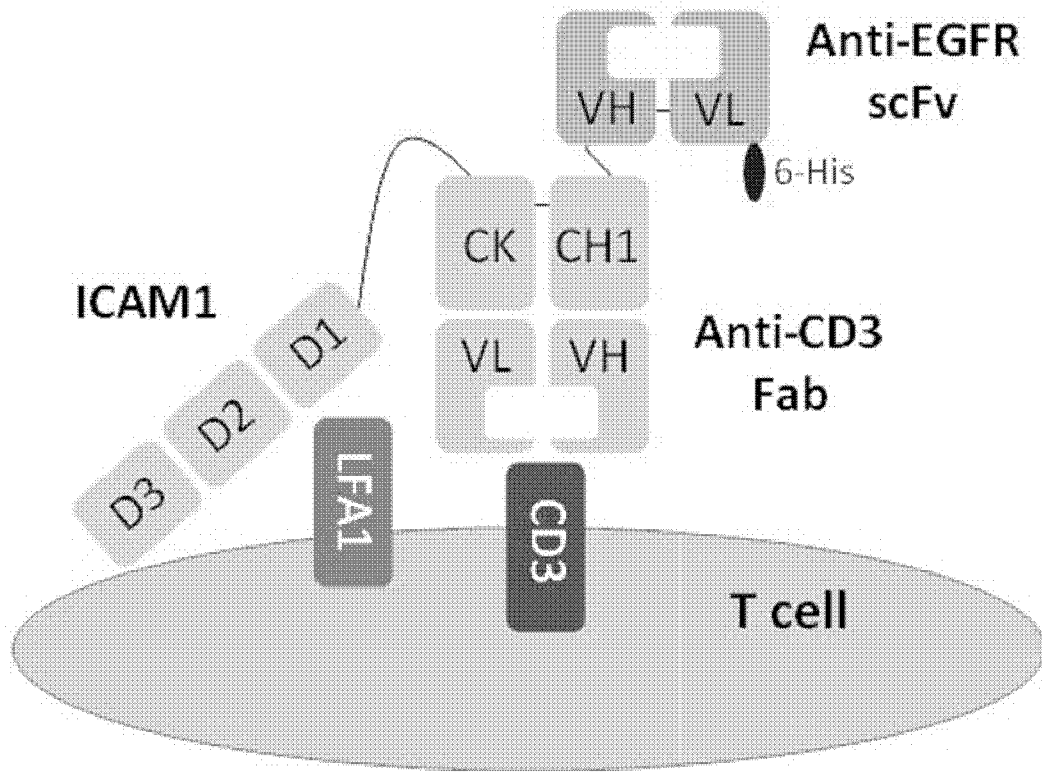


图 6

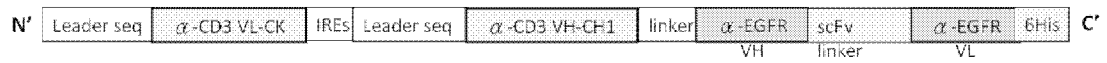


图 7

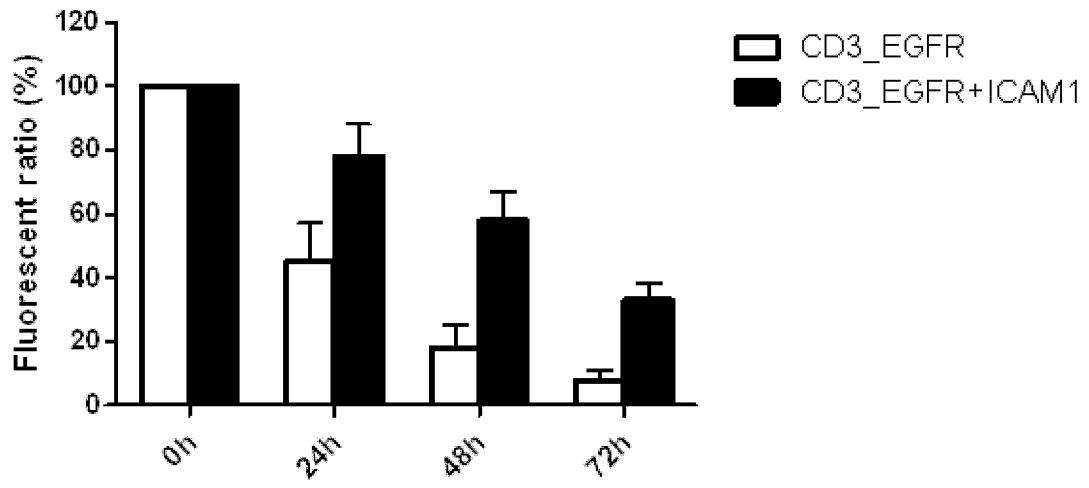


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/104518

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER		
C07K 16/46(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(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, C12N, A61K, A61P		
Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched		
Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used) CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, 万方, WANFANG, ISI Web of Knowledge, BAIDU: 双特异性抗体, bispecific antibody, 跨膜结构域, transmembrane domain, 细胞黏附分子-1, Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1, CD48, CD80, CD3, 表皮生长因子受体, EGFR, 癌胚抗原, CEA, carcinoembryonic antigen, 前列腺特定膜抗原, PSMA, prostate specific membrane antigen.		
C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	MULLER, N. "A bispecific transmembrane antibody simultaneously targeting intra- and extracellular epitopes of the epidermal growth factor receptor inhibits receptor activation and tumor cell growth" <i>International Journal of Cancer</i> , Vol. 134, No. 11, 07 November 2013 (2013-11-07), pp. 2547-2559	1-10
A	CN 104774268 A (WUHAN YZY BIOPHARMA CO., LTD.) 15 July 2015 (2015-07-15) see entire document	1-10
A	CN 106632681 A (BEIJING DONGFANG BIOTECH CO., LTD.; BEIJING JINGYI TAI XIANG TECH DEV CO., LTD.) 10 May 2017 (2017-05-10) see entire document	1-10
A	WO 2017132279 A1 (GENENTECH INC. ET AL.) 03 August 2017 (2017-08-03) see entire document	1-10
A	CN 104011080 A (F. HOFFMANN-LA ROCHE LTD.) 27 August 2014 (2014-08-27) see entire document	1-10
<input type="checkbox"/> Further documents are listed in the continuation of Box C. <input checked="" type="checkbox"/> See patent family annex.		
* Special categories of cited documents: "A" document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance "E" earlier application or patent but published on or after the international filing date "L" document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified) "O" document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means "P" document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed "T" later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention "X" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone "Y" document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art "&" document member of the same patent family		
Date of the actual completion of the international search 02 April 2019		Date of mailing of the international search report 30 May 2019
Name and mailing address of the ISA/CN National Intellectual Property Administration, PRC (ISA/ CN) No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088 China		Authorized officer
Facsimile No. (86-10)62019451		Telephone No.

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
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/104518

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	104774268	A	15 July 2015	CN	104774268	B	28 September 2018
CN	106632681	A	10 May 2017	CA	3032560	A1	19 April 2018
				CN	106632681	B	14 November 2017
				WO	2018068652	A1	19 April 2018
WO	2017132279	A1	03 August 2017	EP	3408671	A1	05 December 2018
				CN	109073635	A	21 December 2018
				WO	2017132279	A8	28 June 2018
CN	104011080	A	27 August 2014	RU	2625033	C2	11 July 2017
				KR	20140107295	A	04 September 2014
				BR	112014013035	A2	09 October 2018
				MX	2014007262	A	01 August 2014
				US	2015038354	A1	05 February 2015
				CA	2854246	A1	27 June 2013
				CN	104011080	B	20 October 2017
				HK	1200849	A1	14 August 2015
				JP	2015503907	A	05 February 2015
				EP	2794662	A1	29 October 2014
				RU	2014129736	A	20 February 2016
				SG	11201403445Y	A	30 July 2014
				WO	2013092720	A1	27 June 2013

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/46(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; C12N 15/85(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(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</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K, C12N, 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))</p> <p>CNABS, CPRSABS, DWPI, SIPOABS, CNKI, 万方, ISI Web of Knowledge, BAIDU和检索词: 双特异性抗体, bispecific antibody, 跨膜结构域, transmembrane domain, 细胞黏附分子-1, Intercellular Adhesion Molecule 1, ICAM-1, CD48, CD80, CD3, 表皮生长因子受体, EGFR, 癌胚抗原, CEA, carcinoembryonic antigen, 前列腺特定膜抗原, PSMA, prostate specific membrane antigen.</p>																				
<p>C. 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>Nina Muller. "A bispecific transmembrane antibody simultaneously targeting intra- and extracellular epitopes of the epidermal growth factor receptor inhibits receptor activation and tumor cell growth" 《International Journal of Cancer》, 第134卷, 第11期, 2013年 11月 7日 (2013 - 11 - 07), 第2547-2559页</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104774268 A (武汉友芝友生物制药有限公司) 2015年 7月 15日 (2015 - 07 - 15) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 106632681 A (北京东方百泰生物科技有限公司, 北京精益泰翔技术发展有限公司) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2017132279 A1 (GENENTECH INC等) 2017年 8月 3日 (2017 - 08 - 03) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 104011080 A (弗哈夫曼-拉罗切有限公司) 2014年 8月 27日 (2014 - 08 - 27) 参见全文</td> <td>1-10</td> </tr> </tbody> </table> <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 "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>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	Nina Muller. "A bispecific transmembrane antibody simultaneously targeting intra- and extracellular epitopes of the epidermal growth factor receptor inhibits receptor activation and tumor cell growth" 《International Journal of Cancer》, 第134卷, 第11期, 2013年 11月 7日 (2013 - 11 - 07), 第2547-2559页	1-10	A	CN 104774268 A (武汉友芝友生物制药有限公司) 2015年 7月 15日 (2015 - 07 - 15) 参见全文	1-10	A	CN 106632681 A (北京东方百泰生物科技有限公司, 北京精益泰翔技术发展有限公司) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 参见全文	1-10	A	WO 2017132279 A1 (GENENTECH INC等) 2017年 8月 3日 (2017 - 08 - 03) 参见全文	1-10	A	CN 104011080 A (弗哈夫曼-拉罗切有限公司) 2014年 8月 27日 (2014 - 08 - 27) 参见全文	1-10
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	Nina Muller. "A bispecific transmembrane antibody simultaneously targeting intra- and extracellular epitopes of the epidermal growth factor receptor inhibits receptor activation and tumor cell growth" 《International Journal of Cancer》, 第134卷, 第11期, 2013年 11月 7日 (2013 - 11 - 07), 第2547-2559页	1-10																		
A	CN 104774268 A (武汉友芝友生物制药有限公司) 2015年 7月 15日 (2015 - 07 - 15) 参见全文	1-10																		
A	CN 106632681 A (北京东方百泰生物科技有限公司, 北京精益泰翔技术发展有限公司) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 参见全文	1-10																		
A	WO 2017132279 A1 (GENENTECH INC等) 2017年 8月 3日 (2017 - 08 - 03) 参见全文	1-10																		
A	CN 104011080 A (弗哈夫曼-拉罗切有限公司) 2014年 8月 27日 (2014 - 08 - 27) 参见全文	1-10																		
国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期																			
2019年 4月 2日	2019年 5月 30日																			
ISA/CN的名称和邮寄地址	授权官员																			
中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	马振莲 电话号码 62412131																			

第1栏 核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

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

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/104518

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	104774268	A	2015年 7月 15日	CN	104774268	B	2018年 9月 28日
CN	106632681	A	2017年 5月 10日	CA	3032560	A1	2018年 4月 19日
				CN	106632681	B	2017年 11月 14日
				WO	2018068652	A1	2018年 4月 19日
WO	2017132279	A1	2017年 8月 3日	EP	3408671	A1	2018年 12月 5日
				CN	109073635	A	2018年 12月 21日
				WO	2017132279	A8	2018年 6月 28日
CN	104011080	A	2014年 8月 27日	RU	2625033	C2	2017年 7月 11日
				KR	20140107295	A	2014年 9月 4日
				BR	112014013035	A2	2018年 10月 9日
				MX	2014007262	A	2014年 8月 1日
				US	2015038354	A1	2015年 2月 5日
				CA	2854246	A1	2013年 6月 27日
				CN	104011080	B	2017年 10月 20日
				HK	1200849	A1	2015年 8月 14日
				JP	2015503907	A	2015年 2月 5日
				EP	2794662	A1	2014年 10月 29日
				RU	2014129736	A	2016年 2月 20日
				SG	11201403445Y	A	2014年 7月 30日
				WO	2013092720	A1	2013年 6月 27日