

(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
2013 年 10 月 10 日 (10.10.2013)



(10) 国际公布号
WO 2013/149526 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 14/705 (2006.01) C07K 16/30 (2006.01)
C07K 16/28 (2006.01) A61K 39/395 (2006.01)
C07K 16/46 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2013/072098
- (22) 国际申请日: 2013 年 3 月 4 日 (04.03.2013)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201210094008.X 2012 年 4 月 1 日 (01.04.2012) CN
- (71) 申请人: 上海益杰生物技术有限公司 (SHANGHAI YIJIE BIOTECHNOLOGY CO., LTD) [CN/CN]; 中国上海市桂平路 333 号 6 号楼 300 室, Shanghai 200032 (CN)。
- (72) 发明人: 李宗海 (LI, Zonghai); 中国上海市徐汇区斜土路 2200 弄 25 号, Shanghai 200032 (CN)。 蒋华 (JIANG, Hua); 中国上海市徐汇区斜土路 2200 弄 25 号, Shanghai 200032 (CN)。 石必枝 (SHI, Bizhi); 中国上海市徐汇区斜土路 2200 弄 25 号, Shanghai 200032 (CN)。 王华茂 (WANG, Huamao); 中国上海市徐汇区斜土路 2200 弄 25 号, Shanghai 200032 (CN)。 孔娟 (KONG, Juan); 中国上海市徐汇区斜土路 2200 弄 25 号, Shanghai 200032 (CN)。 高慧萍 (GAO,

Huiping); 中国上海市徐汇区斜土路 2200 弄 25 号, Shanghai 200032 (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, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IS, JP, KE, KG, KM, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LT, 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, 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, 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, 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))。



WO 2013/149526 A1

(54) Title: MULTI-FUNCTIONAL ANTIBODY POLYPEPTIDE FOR CRYPTIC EPITOPE OF EPIDERMAL GROWTH FACTOR RECEPTOR AND T CELL ANTIGEN

(54) 发明名称: 针对表皮生长因子受体隐蔽表位和 T 细胞抗原的多功能抗体多肽

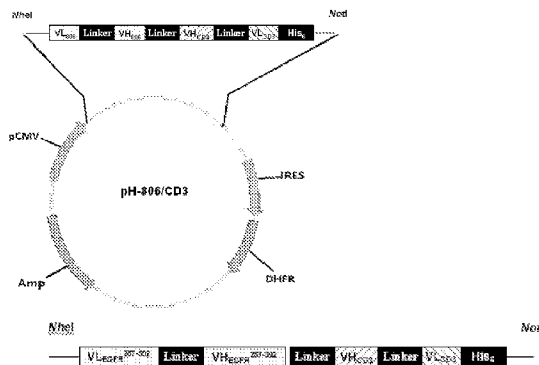


图 1 / Fig. 1

(57) Abstract: Multi-functional antibody polypeptide comprises: (a) a first functional domain, specifically recognizing a cryptic epitope formed by 287th to 302nd amino acid sequences of the EGFR, shown as SEQ ID NO:1 and (b) a second functional domain, specifically recognizing the surface antigen of a human T cell.

(57) 摘要: 一种多功能抗体多肽, 包括: (a) 第一功能域, 其特异性识别 EGFR 的第 287-302 位氨基酸序列形成的隐蔽表位, 如 SEQ ID NO:1 所示, (b) 第二功能域, 其特异性识别人 T 细胞表面抗原。

针对表皮生长因子受体隐蔽表位和T细胞抗原的多功能抗体多肽

技术领域

本发明涉及生物学领域。更具体地，本发明涉及能识别并结合表皮生长因子受体(EGFR)的隐蔽表位和T细胞抗原的多功能抗体多肽。本发明还涉及编码该抗体多肽的核苷酸序列，含有该核苷酸序列的载体，含有所述载体的宿主细胞等。本发明还涉及所述多功能抗体多肽在制备抗肿瘤药物和制备诊断治疗和/或预防肿瘤的试剂盒中的应用。

背景技术

已有文献表明，表皮生长因子受体(EGFR)在多种类型的人类实体瘤中过表达。这些肿瘤包括肺癌、结肠癌、乳腺癌、胃癌、脑癌、膀胱癌、头颈部肿瘤、卵巢癌、食管癌、肝癌、肾癌和前列腺癌。开发针对表皮生长因子受体家族的抗体药物为治疗这些肿瘤提供了机会。

有至少两个针对EGFR的抗体药物已经用于临床肿瘤治疗中，例如爱必妥®(Erbix, 又称Cetuximab)和帕尼单抗(Panitumumab)。但是这些抗体的应用受到一些限制。这是因为一方面EGFR在很多人体实体脏器如皮肤和肝脏中均有表达，导致上述抗体药物可能在人体内给药后被这些脏器所吸收(Baselga J et al. Phase I studies of anti-epidermal growth factor receptor chimeric antibody C225 alone and in combination with cisplatin. *J. Clin. Oncol.* 2000 Feb;18(4):904-14. 和 Faillot T et al. A phase I study of an anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody for the treatment of malignant gliomas. *Neurosurgery.* 1996 Sep;39(3):478-83.)。另一方面，这些抗体对正常表达EGFR的组织非特异性作用，可能导致在使用抗体药物如Erbix时，产生副作用如皮疹(Agero AL, et al, *Dermatologic side effects associated with the epidermal growth factor receptor inhibitors.* *J Am Acad Dermatol.* 2006 Oct;55(4):657-70.)等，严重的可导致患者不得不停用药物。

为了减少现有EGFR抗体由于与正常组织的EGFR结合造成的副作用，人们筛选了多种针对肿瘤特异性EGFR表位的单克隆抗体，如针对de2-7EGFR(又称为EGFRvIII)

由于缺失了EGFR的第2-7个外显子的267个氨基酸所产生的铰链部位（junction）LEEKKGNY的抗体，参见专利PCT/US2004/020295公开的抗体131；又如针对EGFR的隐蔽表位（cryptic epitope）的抗体mAb806，CH12等，参见美国专利申请US2011/0076232A1和W0/2011/035465。当EGFR被激活、过表达、或突变时，可能导致该隐蔽表位（287CGADSYEMEEDGVRKC302）的暴露并与针对该表位的抗体，如mAb806，结合（Garrett TP et al. Antibodies specifically targeting a locally misfolded region of tumor associated EGFR. Proc Natl Acad Sci U S A. 2009;106(13):5082-7.）。这些抗体在动物实验中都显出一定的抗肿瘤效果，并且显示出比之前的抗EGFR抗体更好的肿瘤特异性。抗体mAb806抗体所衍生的人鼠嵌合抗体ch806在临床I期试验中表现出很强的肿瘤靶向性，而且没有观察到明显的皮肤毒性（Scott AM, Lee FT et al, A phase I clinical trial with monoclonal antibody ch806 targeting transitional state and mutant epidermal growth factor receptors. Proc Natl Acad Sci U S A. 2007 Mar 6;104(10):4071-6.）。在5 mg/m²的剂量下ch806就可以显示出在肿瘤部位的吸收。而之前的其它抗EGFR抗体要显示出在肿瘤部位的吸收大概需要10到20倍的剂量（Divgi CR et al. Phase I and imaging trial of indium 111-labeled anti-epidermal growth factor receptor monoclonal antibody 225 in patients with squamous cell lung carcinoma. J Natl Cancer Inst. 1991 Jan 16;83(2):97-104.）。这表明mAb806的衍生抗体由于不与正常组织EGFR结合，所以有更好的药理学分布。但这并不代表它的用药最小剂量是5mg/m²。事实上，806抗体在动物药效学研究时，较有效的剂量是1mg/小鼠（该剂量约相当于50mg/kg）（Rushika M. Perera, et al. Treatment of Human Tumor Xenografts with Monoclonal Antibody 806 in Combination with a Prototypical Epidermal Growth Factor Receptor Specific Antibody Generates Enhanced Antitumor Activity. Clin Cancer Res 2005;11(17) 6390-9）。此外针对上述表位的这些抗体，如CH12，对另外一些形式的表达EGFR（比如T790M突变的EGFR）的肿瘤却没有太明显效果。上述T790M突变经常出现在一种与EGFR相关的肺腺癌使用小分子酪氨酸酶抑制剂治疗一段时间后（Xu Y et al, Acquired resistance of lung adenocarcinoma to EGFR-tyrosine kinase inhibitors gefitinib and erlotinib. Cancer Biol Ther. 2010 Apr;9(8):572-82. Epub 2010 Apr 26）。

如何改造这些抗体，提高其抗肿瘤活性（即降低最小作用剂量），并扩展其抗肿瘤作用的范围是有价值的。

一种感兴趣的提高抗体的抗肿瘤活性的方式是构建双功能抗体。能特异性识别EGFR和CD3抗原的双功能抗体在现有技术中已有描述，其一部分功能域特异性针对EGFR，另一部分功能域特异性针对T细胞的CD3抗原。采用Cetuximab或Panitumumab抗体与抗CD3抗体所构建的双功能抗体显示出很好的抗肿瘤活性，但是在灵长类动物实验中，发现这些双功能抗体较强的针对表达EGFR的正常细胞或组织的毒性作用(Lutterbuese R, Raum T et.al T cell-engaging BiTE antibodies specific for EGFR potently eliminate KRAS- and BRAF-mutated colorectal cancer cells.ProcNatlAcadSci U.S.A. 2010;107(28):12605-10.)。

双功能抗体的制备技术尽管已经存在，但对制成的双功能抗体的各个功能域是否能保留原有的抗原结合特异性，以及更进一步是否形成肿瘤杀伤活性是不确定的，这是由于生物学实验的复杂性的本质所决定的。

本领域还需要针对EGFR相关肿瘤的既具有提高的肿瘤杀伤生物学活性，也具有提高的肿瘤识别特异性的双功能抗体。本发明实现了这一目的。

发明内容

本申请的第一方面涉及一种多功能抗体多肽，其包括

- (a) 第一功能域，其特异性识别EGFR的第287-302位氨基酸序列形成的隐蔽表位，如SEQ ID NO:1所示，
- (b) 第二功能域，其特异性识别人T细胞表面抗原。

本申请的第二方面涉及一种编码所述多肽的核苷酸序列。

本申请的第三方面涉及一种包含所述核苷酸序列的载体。

本申请的第四方面涉及包含所述载体的真核宿主细胞或原核宿主细胞。

本申请的第五方面涉及所述的多肽在制备诊断，治疗和/或预防肿瘤的药物中的应用。

本发明中所使用的术语的含义如下：

“特异性识别”和特异性的程度可以通过经典的免疫学技术来判断，包括但不限于免疫印迹，免疫亲和层析，流式细胞分析等。在本发明中，特异性识别优选通过流式细胞技术来确定，而具体情况下特异性识别的标准可由本领域一般技术人员根据其掌握的本领域常识来判断。

“功能域”指的是能够特异性识别抗原的抗体或抗体片段，包括完整抗体，单

链抗体 (scFV), Fd片段, Fab片段, F(ab')₂片段, 单结构域抗体片段, 分离的CDR片段, 及其衍生物。

“完整抗体”由两个同样的重链和轻链组成, 各条链分别包含一个可变区 (V区) 和一个或多个恒定区 (C区)。可变区负责与抗原结合, 而恒定区主要负责结合效应分子。在各可变区有三个具有高度多样性的柔性的环, 称作互补决定区 (CDR), 其主要负责识别抗原。可变区的其他部分包含刚性的β片层并支持所谓的框架区 (FRs)。CDR和FR间隔排列形成三明治结构。

“单链抗体 (scFV) 片段”指的是通过基因工程构建的抗体片段, 其是有通过接头 (linker) 连接的重链可变区 (V_H) 和轻链可变区 (V_L) 的重组蛋白, 接头使得这两个结构域相关联以形成抗原结合位点。ScFV的大小一般是一个完整抗体的1/6。

“Fd片段”指的是由重链V_H和C_{H1}组成抗体片段。

“Fab片段”指的是由Fd片段 (由重链V_H和C_{H1}组成) 和整条轻链通过链间二硫键形成的异二聚物。“Fab抗体”的大小是完整抗体的1/3, 其只包含一个抗原结合位点。

“F(ab')₂片段”指的是包含两个相连的Fab片段的二价片段。

“单结构域抗体”由重链可变区或轻链可变区组成。由于该抗体片段只由一个结构域组成, 所以得名。该片段的大小是一个完整抗体的1/12。

“抗体的衍生物”包括例如当通过噬菌体展示技术获得所述抗体的衍生物时, 可使用如BIAcore系统中使用的表面等离子共振技术来增加与EGFR或CD3抗原表位结合的噬菌体抗体的效率 (Schier, 人抗体杂交瘤7 (1996), 97-105; Malmberg, 免疫学方法杂志183 (1995), 7-13)。还包括, 例如WO 89/09622中描述的嵌合抗体的产生的方法, EP-A10239400和WO90/07861中描述的人源化抗体产生的方法, WO91/10741, WO94/02602和WO96/33735中有描述的产生异种抗体例如小鼠中的人抗体的方法。

本发明使用的抗体或其片段可单独或联合使用本领域已知的常规技术, 例如氨基酸缺失、插入、取代、增加、和/或重组以及/或其他修饰方法作进一步修饰。根据一种抗体的氨基酸序列在其DNA序列中引入这种修饰的方法对本领域技术人员来说是众所周知的; 见例如, Sambrook, 分子克隆: 实验手册, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y.。所指的修饰优选在核酸水平上进行。

本发明使用的抗体或抗体片段可以是人源化的, 嵌合的或鼠源的。

附图说明

图1 上半部分为pH-806/CD3表达载体结构示意图，下半部分为插入的基因片段的放大示意图

图2 pH-7B3/CD3表达载体结构示意图

图3A 纯化的双功能抗体多肽的十二烷基硫酸钠-聚丙烯酰胺凝胶电泳（SDS-PAGE）检测，M为分子量标记（SDS-聚丙烯酰胺凝胶电泳小分子量标准蛋白质由上海升正生物技术有限公司提供），第一栏为806/CD3，第二栏为7B3/CD3。

图3B 纯化的双功能抗体多肽的蛋白质杂交检测第一栏为806/CD3，第二栏为7B3/CD3。

图4A 通过荧光激活细胞分选仪（FACS）显示的三种双功能单链抗体(NGR/CD3, 7B3/CD3和806/CD3)与U87 MG肿瘤细胞的特异性结合的测定

图4B 通过荧光激活细胞分选仪（FACS）显示的三种双功能单链抗体(NGR/CD3, 7B3/CD3和806/CD3)与U87 MG-EGFRvIII肿瘤细胞的特异性结合的测定

图4C 通过荧光激活细胞分选仪（FACS）显示的三种双功能单链抗体(NGR/CD3, 7B3/CD3和806/CD3)与A431肿瘤细胞的特异性结合的测定

图4D 通过荧光激活细胞分选仪（FACS）显示的三种双功能单链抗体(NGR/CD3, 7B3/CD3和806/CD3)与U87 MG-de4 EGFR肿瘤细胞的特异性结合的测定

图4E 通过荧光激活细胞分选仪（FACS）显示的三种双功能单链抗体(NGR/CD3, 7B3/CD3和806/CD3)与NCI-H1650肿瘤细胞的特异性结合的测定

图4F 通过荧光激活细胞分选仪（FACS）显示的三种双功能单链抗体(NGR/CD3, 7B3/CD3和806/CD3)与NCI-H1975肿瘤细胞的特异性结合的测定

图4G 通过荧光激活细胞分选仪（FACS）显示的三种双功能单链抗体(NGR/CD3, 7B3/CD3和806/CD3)与Jurkat肿瘤细胞的特异性结合的测定

图4H 通过荧光激活细胞分选仪（FACS）显示的三种双功能单链抗体(NGR/CD3, 7B3/CD3和806/CD3)与PBMC细胞的特异性结合的测定

图5A 806/CD3的抗原结合表位分析（ELISA）

图5B 7B3/CD3的抗原结合表位分析（ELISA）

图6A 系列梯度稀释的三种双功能单链抗体(NGR/CD3, 7B3/CD3和806/CD3)诱导的T细胞对U87 MG肿瘤细胞的杀伤率比较。

图6B 系列梯度稀释的三种双功能单链抗体(NGR/CD3, 7B3/CD3和806/CD3)诱导的T细胞对U87 MG-EGFRvIII肿瘤细胞的杀伤率比较。

图6C 系列梯度稀释的三种双功能单链抗体(NGR/CD3, 7B3/CD3和806/CD3)诱导的T细胞对A431肿瘤细胞的杀伤率比较。

图6D 系列梯度稀释的三种双功能单链抗体(NGR/CD3, 7B3/CD3和806/CD3)诱导的T细胞对U87 MG-de4 EGFR肿瘤细胞的杀伤率比较。

图6E 系列梯度稀释的三种双功能单链抗体(NGR/CD3, 7B3/CD3和806/CD3)诱导的T细胞对NCI-H1650肿瘤细胞的杀伤率比较。

图6F 系列梯度稀释的三种双功能单链抗体(NGR/CD3, 7B3/CD3和806/CD3)诱导的T细胞对NCI-H1975肿瘤细胞的杀伤率比较。

图7 NOD/SCID荷瘤 (U87 MG-EGFRvIII) 小鼠模型显示的不同浓度双功能抗体 (7B3/CD3和806/CD3)治疗组和对照组的抗肿瘤活性测定

图8 NOD/SCID荷瘤 (NCI-H1975) 小鼠模型显示的不同浓度双功能抗体 (7B3/CD3)治疗组和对照组的抗肿瘤活性测定

图9A-9C 806/CD3和ch806对三种不同肿瘤细胞系的杀伤率比较

图10A-B 基因工程表达的806/CD3双功能抗体的凝胶过滤层析曲线

具体实施方式

本发明提供针对一系列肿瘤的多功能抗体, 所述一系列肿瘤包括包含扩增的EGFR基因的肿瘤以及表达变异的EGFR, 如表达缺失第2-7外显子的de2-7EGFR的肿瘤, 包括但不限于肺癌、结肠癌、乳腺癌、胃癌、脑癌、膀胱癌、头颈部肿瘤、卵巢癌、肾癌和前列腺癌。该多功能抗体包含一个特异性识别包含有扩增的EGFR基因或具有突变的EGFR基因的肿瘤表达的EGFR的第287-302位氨基酸序列形成的隐蔽表位, 如SEQ ID NO:1所示, 和一个识别人T细胞表面抗原的第二功能域。

本发明的多功能抗体能够在非常低的浓度, 如100pg/mL - 1ng/mL下在体外和体内诱导针对肿瘤细胞的T细胞杀伤毒性。即使在使用较低的效应细胞(E):靶细胞(T)比率, 如10: 1时, 也能观察到相关肿瘤细胞系的特异性裂解, 而无需任何其他形式的T细胞预刺激。本发明针对的相关肿瘤细胞包括表达突变的EGFR如de2-7EGFR、表达扩增的EGFR的上述肿瘤细胞可以从商业来源获得, 例如NCI-1650, NCI-1975, A431, 得自美国典藏培养物中心 (American Type Culture Collection, ATCC), 又例如U87 MG-EGFRvIII, 其是稳定表达EGFRvIII的U87 MG细胞系, 其构建方法参见文献(Jiang H, J Biol. Chem., 2011,286(7): 5913-20), U87 MG也可以得自ATCC。

此外, 本发明的多功能抗体几乎不会和EGFR没有扩增或没有突变的细胞 (如U87 MG) 结合。由本发明的多功能抗体制备的抗肿瘤药物具有改善的体内肿瘤靶向性, 降低对正常组织的杀伤。

本发明的第一功能域特异性识别如SEQ ID NO:1所示的氨基酸序列形成的隐蔽表位。特异性识别上述隐蔽表位（如人野生型EGFR第287-302位氨基酸所包含的表位）的抗体已有公开，例如美国专利申请US2011/0076232A1和WO/2011/035465所述mAb806，及其衍生抗体，和中国专利申请CN101602808A所述的12H23及其衍生抗体。此外，制备其他特异性针对上述隐蔽表位的抗体可以根据本领域已知的方法来进行。本发明的第一功能域能特异性与表达多拷贝EGFR的肿瘤和表达变异的EGFR如de2-7EGFR的肿瘤结合。

本发明的第二功能域包括特异性识别人T细胞抗原的抗体和抗体片段。所述T细胞表面抗原包括但不限于CD3，CD16，CD28。优选地，该T细胞表面抗原是CD3。CD3是T细胞表达的抗原。它是多分子T细胞受体复合物(T cell receptor complex, TCR)的一部分，含有三条不同链CD3 ϵ ，CD3 δ ，CD3 γ 。将CD3簇集于T细胞上（例如通过固定的抗CD3抗体）可导致T细胞活化，这类似于T细胞受体的结合，但不依赖于其克隆的类型特异性。实际上，大多数抗CD3抗体识别的是CD3 ϵ 链。这种双功能抗体杀伤肿瘤细胞主要是通过刺激免疫系统来完成的，而且不受主要组织相容性抗原(MHC)限制。当双功能抗体中的抗CD3抗体部分和T细胞表面的CD3结合时可以产生杀伤肿瘤细胞的效应。

在本发明的一个实施方案中，第一功能域包含至少一个具有选自如下序列SEQ ID NO. 2，SEQ ID NO. 3和SEQ ID NO.4的抗EGFR抗体重链可变区的互补决定区（CDR）。优选地，第一功能域是顺序包含上述三个CDR的整个重链可变区。

在本发明的另一个实施方案中，第一功能域包含至少一个具有选自如下序列SEQ ID NO. 5，SEQ ID NO. 6和SEQ ID NO.7的抗EGFR抗体轻链可变区的互补决定区（CDR）。优选地，第一功能域是顺序包含上述三个CDR的轻链可变区。

更优选地，第一功能域是包含顺序连接的上述整个重链可变区和整个轻链可变区的单链抗EGFR单体。

在本发明的另一个实施方案中，其中第二功能域为单链抗CD3抗体。

本发明多功能抗体的两个功能域可以包含两个不同的单链抗体，因此该抗体又称作单链双功能抗体。在一个实施方案中，所述的双功能抗体多肽具有如SEQ ID NO. 8所示的氨基酸序列。在另一个实施方案中，所述的双功能抗体多肽具有如SEQ ID NO. 9所示的氨基酸序列。

在本发明的另一个实施方案中还包含位于所述第一和第二功能域之间或位于

第一或第二功能域内部的不同互补决定区之间的接头。所述多肽接头优选包括几个亲水性肽键氨基酸，其长度足够跨越一个含所述结合位点的所述功能域的C末端和另一个含所述结合位点的所述功能域的N末端之间的距离，所以当本发明多功能抗体置于水溶液中时能呈现适合于结合的构象。优选的，所述多肽接头包括多个甘氨酸、丙氨酸和/或丝氨酸残基。在本发明的一个特定优选例中，本发明多肽中的所述多肽接头的氨基酸序列(GlyGlyGlyGlySer)_n，其中n为1到5的整数，优选n为1到3，更优选n为3。

当第一和第二功能域各自含两个和两个以上可变区(V_H, V_L)时，优选地，在这可变区之间通过上述多肽接头连接。本发明多肽中的连接所述多肽接头的氨基酸序列(Gly Gly Gly Gly Ser)_n，其中n为1到5的整数，优选n为1到3，更优选n为1。

本发明抗体的所述第一和第二功能域可以是相同或不同抗体的一对V_H-V_L，V_H-V_H，或V_L-V_L功能域。V_H和V_L功能域的顺序对本发明不是确定的，当其顺序倒转，通常不会有产生功能损失。重要的是，V_H和V_L功能域的排列使抗原结合位点可以正确折叠，从而形成的多功能抗体具有特异性识别和结合多种抗原的功能。

在本发明多肽的一个优选例中，所述功能域的安排顺序为V_L_{EGFR}-V_H_{EGFR}-V_H_{CD3}-V_L_{CD3}。

在本发明的另一方面，涉及上述所述的多肽的核苷酸序列。在一个实施方案中，本方面涉及编码SEQ ID NO. 8所示的氨基酸序列的核苷酸序列SEQ ID NO. 10。在另一个实施方案中，本方面涉及编码SEQ ID NO. 9所示的氨基酸序列的核苷酸序列SEQ ID NO. 11。

在本发明的另一方面，涉及包含有编码上述多肽的核苷酸序列的载体。所述载体可以是真核细胞载体或原核细胞载体，只要所述载体满足：(a)其编码序列包含复制起始的序列，使得该载体能够在宿主细胞中得以复制，(b)其包含有编码筛选标记的基因序列，该基因编码的蛋白是该宿主细胞在特定的选择培养基中生存和生长所必需的。在宿主细胞如果没有被转染或转化包含该基因的载体的情况下，宿主细胞不能在特定选择培养基中生存。典型的筛选标记基因编码的蛋白包括具有对抗生素或毒素具有耐受性的蛋白，抗生素或毒素包括例如氨苄青霉素、卡那霉素、四环素、新霉素、潮霉素、氨甲蝶呤等；补偿营养缺陷的相关蛋白，供应培养基中不存在的关键营养成分，例如编码D-丙氨酸消旋酶基因。采用抗性筛选的例子包括，通过转染包含新霉素抗性基因的外源载体，使宿主细胞获得在含有药物新霉素或G418的培

培养基的情况下，继续生存生长。另外一个例子是在哺乳动物细胞例如中国仓鼠卵巢细胞（CHO）中使用二氢叶酸还原酶（DHFR）筛选标记，哺乳动物细胞宿主细胞是指DHFR缺陷型的细胞，不含二氢叶酸还原酶基因，不能合成核酸，必须在含有HT的培养基里生长。在利用载体转染宿主细胞时，可以通过上述培养基条件的选择筛选得到同时包含目的基因和DHFR基因的外源载体的阳性克隆。（c）其编码序列包含启动子的序列，（d）表达载体还可能包括其它组成序列，包括信号肽序列、转录终止序列、增强子序列等，优选地，本发明的载体为真核细胞载体。优选地，本发明的载体为来自用于抗体真核表达的的pH载体，其包含了CMV的启动子、内部核糖体进入位点序列（Internal ribosome entry site, IRES）、DHFR筛选标记等元件。氨甲喋呤（MTX）是DHFR的抑制剂，可阻碍其作用。当细胞培养基内含有MTX时，DHFR被抑制，通过反馈调节，使得该基因自我扩增，连带其上下游基因都会扩增，如此目的基因也得到扩增，即可提高目的蛋白的表达量。

在本发明的另一方面，涉及包含有所述载体的宿主细胞，用于表达所需的多功能抗体多肽。与使用的载体相适应，本发明的宿主细胞可以是任意的原核宿主细胞或真核宿主细胞。真核宿主细胞，包括酵母、昆虫细胞、植物细胞，哺乳动物细胞等可以是优选的，因为真核细胞存在复杂的目的蛋白的翻译后修饰（例如糖基化），越来越多的被用于规模化的培养。常用的宿主细胞系包括猴肾细胞（COS-7 ATCC CRL 1651）、人胚胎肾细胞293及其亚克隆细胞系，幼仓鼠肾细胞（BHK, ATCC CCL10），中国仓鼠卵巢细胞（CHO）等。优选地，本发明的真核宿主细胞是中国仓鼠卵巢细胞。

在本发明的另一方面，涉及所述的多功能抗体多肽在制备治疗，诊断和/或预防肿瘤的药物中的应用。

实施例

实施例1

抗人EGFR第287-302位氨基酸的隐蔽表位的单链抗体序列和抗人CD3单链抗体序列的扩增

1.1 抗人EGFR第287-302位氨基酸隐蔽表位的单链抗体VH和VL序列的扩增

抗人EGFR第287-302位氨基酸所包含的隐蔽表位的单链抗体可以是1) 806抗体的VH和VL，其核苷酸序列分别如US7589180B2中的SEQ ID NO. 1和SEQ ID NO.3

所示，或者2) 7B3抗体的VH和VL，其核苷酸序列分别如SEQ ID NO.13和SEQ ID NO.14所示。

806抗体的VL和VH基因分别通过PCR方法得到，VL基因是利用引物5'L806-2和3'L806；VH基因是利用引物5'H806和3'H806。

7B3抗体的VL或VH基因分别通过PCR方法得到，VL基因是利用引物5'L7B3-2和3'L7B3；VH基因是利用引物5'H7B3和3'H7B3。

扩增806抗体的VL区所用的引物

5'L806-2: gttgctttggttccaggtgcaagatgtgacatcctgatgaccca (SEQ ID NO. 15)

3'L806: ccgccagaccacctccgctgaaccgctccaccacgttgattccagcttgg(SEQ ID NO. 16)

扩增806抗体的VH区所用的引物

5'H806: gcggaggtggctctggcgggtggcggatcggccgatgtgcagcttcagga (SEQ ID NO. 17)

3'H806: ggatccaccacctcctgcagagacagtac (SEQ ID NO. 18)

扩增7B3抗体的VL区所用的引物

5'L7B3-2: gttgctttggttccaggtgcaagatgtgatattcagatgacc(SEQ ID NO. 19)

3'L7B3: acctccgctgaaccgctccacctgaacgtttaattccac (SEQ ID NO. 21)

扩增7B3抗体的VH区所用的引物

5'H7B3: ttcaggcggaggtggctctggcgggtggcggatcggatgtgcagctg (SEQ ID NO. 22)

3'H7B3: ggatccaccacctccgctgctcacggtcac (SEQ ID NO. 23)

1.2 抗人CD3单链抗体VH和VL序列的扩增

鼠抗人CD3抗体的VH和VL基因的核苷酸序列得自US7112324B1中所示的序列SEQ ID NO. 9 (847-1203) 和SEQ ID NO.9 (1258-1575) 通过PCR方法扩增抗人CD3抗体的VL和VH结构域的核苷酸序列，使用的引物如下。

扩增抗人CD3抗体的VH区所用的引物

5'HCD3: ggaggtggtgatccgatcaaaactgcagc(SEQ ID NO. 24)

3'HCD3: cactccaccagaacctccactccacctcgactgaggagactgtgag(SEQ ID NO. 25)

扩增抗人CD3抗体的VL区所用的引物

5'LCD3: ctggtggaagtggaggttcaggtggagtcgacgacattcagc(SEQ ID NO. 26)

3'LCD3: ctatgcccgcctaataatgatgatggtgatgatgtttcagctcca(SEQ ID NO. 27)

实施例2

包含编码806/CD3单链双功能抗体的核苷酸序列的表达载体的构建

上述PCR扩增得到的806抗体VH和VL区的核苷酸序列与编码接头1氨基酸(GlyGlyGlyGlySer)₃以及编码接头2氨基酸(GlyGlyGlyGlySer)的核苷酸序列通过融合PCR(fusion-PCR)方式扩增得到VL₈₀₆-接头1-VH₈₀₆-接头2；而上述PCR扩增得到的及抗人CD3抗体VH和VL区的核苷酸序列与编码接头3氨基酸VE(GGS)₄GG的核苷酸序列通过融合PCR(fusion-PCR)方式分别扩增得到VH_{CD3}-接头3-VL_{CD3}。

然后将上述扩增产物再通过融合PCR方式扩增得到单链双功能抗体的核苷酸序列，其连接顺序如下：

[VL₈₀₆-接头1-VH₈₀₆-接头2-VH_{CD3}-接头3-VL_{CD3}]

然后通过如下的引物对上述接头连接后的序列([VL₈₀₆-接头1-VH₈₀₆-接头2-VH_{CD3}-接头3-VL_{CD3}])进行第三轮扩增，以在N末端添加信号肽序列和引入限制性内切酶NheI的位点，以及在C末端添加组氨酸标签并引入限制性内切酶NotI位点。

5' L806-1: ctagctagccaccatggtgtccacagctcagttccttgattcttgttgctttggtttc(SEQ ID NO. 28)

3' LCD3: ctatgcgccgcctaataatgatgatggtgatggttcagctcca(SEQ ID NO. 27)

扩增得到的序列SEQ ID NO: 10用限制性内切酶NheI/NotI-HF同时酶切，按照酶供应商(New England Biolabs, NEB)建议的反应条件在缓冲液2中进行双酶切。表达pH载体(参见WO/2011/035465实施例7和图15)也用限制性内切酶NheI/NotI-HF进行同样的酶切。然后按照酶供应商(NEB)建议的反应条件用T4 DNA连接酶连接双酶切后SEQ ID NO: 10的片段和pH/DHFR载体片段。由此得到编码806/CD3单链双功能抗体多肽的核苷酸序列被克隆到载体中。所得含有806/CD3单链双功能抗体多肽的新载体命名为pH/806/CD3，其详细结构如图1所示。

实施例3

包含编码双功能抗体7B3/CD3的核苷酸序列的表达载体的构建

上述PCR扩增得到的7B3抗体VH和VL区的核苷酸序列与编码接头1氨基酸(GlyGlyGlyGlySer)₃以及编码接头2氨基酸(GlyGlyGlyGlySer)的核苷酸序列通过融合PCR(fusion-PCR)方式扩增得到VL_{7B3}-接头1-VH_{7B3}-接头2；而上述PCR扩增得到的及抗人CD3抗体VH和VL区的核苷酸序列与编码接头3氨基酸VE(GGS)₄GG的核苷酸序列通过融合PCR(fusion-PCR)方式分别扩增得到VH_{CD3}-接头3-VL_{CD3}。

然后通过如SEQ ID NO: 20和29所示的引物对上述连接好的序列[VL7B3-接头1-VH7B3-接头2]进一步扩增以在N末端添加引入信号肽序列和NheI位点, 和在C端引入BamHI位点。该进一步扩增的序列SEQ ID NO:12通过NheI和BamHI酶切, 按照酶供应商 (NEB) 建议的反应条件在缓冲液2中进行。

5' L7B3-1: ctagctagccaccatgggtgccacagctcagttccttgattcttggcttgggttc (SEQ ID NO. 20)
3' H7B3-2: tcttccagttcagcccctgactgctgcagttgatatcggatccaccacctcgg
(SEQ ID NO. 29)

上述实施例2中构建的载体pH-806/CD3通过同样的NheI和BamHI酶切反应。将酶切后得到的长片段与SEQ ID NO:12连接, 由此编码7B3/CD3单链双功能抗体多肽的核苷酸序列SEQ ID NO: 11被克隆到载体中, 新载体命名为pH-7B3/CD3, 其详细结构如图2所示

实施例4

单链双功能抗体806/CD3和7B3/CD3的表达和纯化

表达载体pH-806/CD3和pH-7B3/CD3分别根据FreeStyle MAX Reagent 转染试剂 (来自Invitrogen) 说明书操作步骤转染到中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞中, 然后根据OptiCHO™ 蛋白表达试剂盒 (来自Invitrogen) 筛选稳定的克隆。分别转染有上述表达载体之一的CHO细胞的稳定克隆在摇瓶中37℃, 130rpm培养7天, 所用培养基为CD OptiCHO (来自Gibco)。通过离心获得培养上清, 然后储存于-20℃。

按照生产商提供的方法步骤, 采用组氨酸亲和层析柱 (His Trap HP column, 来自GE Healthcare) 进行蛋白纯化。具体而言, 层析柱用缓冲液A (20mM sodium phosphate pH 7.4, 0.4M NaCl) 平衡, 然后PBS透析后的将细胞培养上清 (500 mL上清) 加入到层析柱上 (1 mL), 流速为3ml/min。然后用5倍体积的缓冲液A和10倍体积的含有50mM咪唑的缓冲液A清洗柱子, 以去除杂蛋白。结合的目的蛋白用添加250mM咪唑的同样缓冲液A进行洗脱。所有的纯化步骤都在4℃下操作。

纯化的806/CD3和7B3/CD3蛋白通过还原性SDS-PAGE进行检测, 如图3A所示这两个单链双功能抗体分子的分子量均在60kD左右, 符合根据氨基酸序列计算得到的806/CD3和7B3/CD3的分子量。

另外通过抗组氨酸抗体对纯化的蛋白进行蛋白杂交 (Western blot), 其结果如

图3B表明得到的蛋白都具有组氨酸标记，其分子量均在60 kD左右。

经ELISA检测转染的CHO细胞上清中806/CD3和7B3/CD3的浓度约为3mg/L。在280nm波长下检测纯化的蛋白浓度为0.5mg/L。

经组氨酸亲和层析柱一步纯化法得到的单链双功能抗体进一步采用凝胶过滤层析法进行单体和聚体的分离。具体而言，预装柱superdex 200 10/300 GL（来自GE Healthcare）用2倍柱体积的PBS缓冲液平衡，样品经上样环上样500 μ l，流速为0.4ml/min，然后用1倍柱体积的PBS进行洗脱。结果如图10A显示二聚体蛋白在13ml出现峰值，单体蛋白在15ml出现峰值。单体蛋白经凝胶过滤层析进行纯度分析具体步骤同上，结果如图10B显示其纯度大于95%。

实施例5

双功能抗体的抗原结合特异性及表位分析

5.1 抗原特异性分析

通过荧光激活细胞分选仪（FACS，通常又称为流式细胞仪）（FACScalibur，由BD公司提供）分析单链双功能抗体7B3/CD3和806/CD3各自与EGFR的结合能力。

具体方法如下：

1. 取对数生长期的如表1所列各肿瘤细胞接种到6cm平皿中，接种细胞密度约为90%，37 $^{\circ}$ C孵箱过夜培养。
2. 使用10mM的EDTA消化细胞，200g \times 5min离心收集细胞。以 $1\times 10^6\sim 1\times 10^7$ /mL的浓度重悬于1%含小牛血清的磷酸盐缓冲液（NBS PBS）中，按100ul/管的量加入流式专用管中。
3. 200g \times 5min离心，弃上清。
4. 两个实验组分别加入待测抗体7B3/CD3和806/CD3，同时一个对照组加入抗体NGR/CD3作为阴性对照，另一个对照组为不加抗体的PBS空白对照。各抗体的终浓度均为20 μ g/ml，每管加入100ul。冰浴，45分钟。
5. 每管加入2ml 1%NBS PBS，以200g \times 5min离心，共二遍。
6. 弃上清，加入1:50稀释的小鼠抗组氨酸标签抗体（来自上海睿星基因技术有限公司），每管加入100ul。冰浴，45分钟。
7. 每管加入2ml 1%NBS PBS，以200g \times 5min离心，共二遍。
8. 弃上清，加入1:50稀释的FITC荧光标记的羊抗小鼠抗体（来自上海康成生

物工程有限公司)，每管加入100ul。冰浴，45分钟。

9. 每管加入2ml 1%NBS PBS，以200g×5min离心，共二遍。
10. 弃上清，重悬于300ul 1%NBS PBS中，流式细胞仪检测。
11. 应用流式细胞仪数据分析软件WinMDI 2.9分析数据。

如图4B-4C所示，本发明的绿色所显示的双功能抗体7B3/CD3的荧光峰和蓝色所显示的双功能抗体806/CD3的荧光峰，与阴性对照(NGR/CD3)和空白对照(PBS)相比有显著的差异，表明其均具有和U87 MG-EGFRvIII以及A431细胞高效结合的能力。如图4D-4F所示，本发明的两个双功能抗体也能和U87 MG-de4 EGFR, NCI-1650及NCI-1975结合，但效率不如与U87 MG-EGFRvIII或A431的结合。

如图4A所示，这两个抗体(7B3/CD3和806/CD3)都几乎不能与U87 MG细胞结合。这些结果表明7B3/CD3和806/CD3可以特异性地和突变的人EGFR及过表达的EGFR的肿瘤细胞结合，而几乎不与正常表达EGFR的组织结合。

图4G显示，本发明的双功能抗体(7B3/CD3和806/CD3)和阴性对照抗体(NGR/CD3)以基本相同的水平与表达有CD3的Jurkat细胞(人外周血白血病T细胞)高效结合。图4H显示，本发明的双功能抗体(7B3/CD3和806/CD3)和阴性对照抗体(NGR/CD3)以相似的水平与人外周血单核细胞(PBMC)高效结合。图4G和4H表明本发明的7B3/CD3和806/CD3双功能抗体可以特异性地与T细胞表面的CD3抗原结合。

综上所述，图4A-4H显示出本发明的双功能抗体(7B3/CD3和806/CD3)特异性地与表达突变的人EGFR及过表达的EGFR的肿瘤细胞结合的能力，同时能够特异性地与表达CD3的效应细胞(T细胞)结合。

5.2 抗原表位分析

根据已有文献已经表明806单克隆抗体(mAb 806)可以与EGFR的隐蔽表位CC16多肽(²⁸⁷CKGYEDSRVMEAGDEC³⁰²) (Johns TG, et al., J. Biol. Chem. 2004; 279(29):30375-84.) 结合。一般认为单克隆抗体转变成单链抗体应该不会改变其抗原结合表位特异性，为了进一步验证本发明的双功能抗体可以与该隐蔽表位结合，本实验利用含有该表位的两个重组蛋白作为抗原，进行ELISA检测。

实验步骤如下：

1) 蛋白包被：三种抗原rEGFRvIIIex (EGFRvIII的胞外结构域蛋白，其制备方法参见专利WO/2011/035465)，N12-CC16重组蛋白(M13噬菌体pIII蛋白的结构域

N1N2与CC16的融合多肽，其制备方法参见Jiang H, et al., J Biol. Chem., 2011,286(7): 5913-20)及BSA(购自上海生物工程有限公司)对照蛋白，分别以50ng/孔(1ng/ μ l, 50 μ l/孔)的量被用于包被96孔板的各孔，在37 $^{\circ}$ C下孵育2h。

2) 封闭：用0.1M的磷酸缓冲液(PBS)洗涤3次，然后加入5%PBS 脱脂奶粉(光明乳业股份有限公司)在37 $^{\circ}$ C封闭2h。

3) 将待检测抗体806/CD3、7B3/CD3用5% PBS 脱脂奶粉稀释成2ng/ μ l，每孔50 μ l，37 $^{\circ}$ C孵育1h。

4) PBST(PBS+0.05%Tween20)洗涤3次后，加入以1:1000稀释至50 μ l/孔的抗6 \times His-鼠单抗(购自上海睿星基因技术有限公司)，在37 $^{\circ}$ C孵育1h。

5) PBST洗涤3次，加入以1:2000稀释的羊抗鼠IgG-HRP(购自Santa Cruz公司)，在37 $^{\circ}$ C孵育1h。

6) 显色：PBST洗涤5次，加ABTS显色液100 μ L/孔，37 $^{\circ}$ C避光显色10min。

检测：使用Bio-Rad Model 680酶标仪，在波长405nm下检测吸光度值。

结果：

如图5A-5B所示：双功能抗体806/CD3及7B3/CD3分别都可以与N12-CC16(CC16多肽融合表达于M13噬菌体pIII蛋白的N1N2结构域的羧基端)及rEGFRvIIIex特异性结合。这两个抗体与上述两个抗原的结合强度比其与BSA的非特异性结合有非常显著的差异。

由于这两个抗原共有的EGFR氨基酸序列只有CC16多肽序列，因此双特异性抗体806/CD3及7B3/CD3结合的表位都是CC16多肽，即(287 CKGYEDSRVMEAGDEC 302)。

实施例6

单链双功能抗体806/CD3和7B3/CD3的生物学活性分析-对各种肿瘤细胞的细胞毒性

外周血单核细胞(PBMC)用Ficoll(来自Biochrom)密度梯度离心方法，按照标准步骤从健康人供主的血液中分离。离心后，用浓度为0.1M的磷酸盐缓冲液(PBS)洗涤细胞然后重悬于RPMI 1640完全培养基(Gibco)，将细胞浓度调整到 5×10^5 /mL。PBMC用作细胞毒性实验中的效应细胞。不同的肿瘤细胞作为靶细胞(target cells)。用RPMI 1640完全培养基将靶细胞浓度调整到 5×10^4 /mL。同样体积的靶细胞和效应

细胞混合，使效应细胞：靶细胞(E:T)比值为10:1。

将混合后的细胞悬液以75 μ L/孔的体积加到96孔板中。然后各孔分别添加25 μ L从1000ng/mL到0.1ng/mL的十倍系列梯度稀释的下列试剂：

- 1) 7B3/CD3单链双功能抗体
- 2) 806/CD3单链双功能抗体
- 3) RPMI 1640完全培养基（背景对照）
- 4) NGR/CD3单链双功能抗体（阴性对照, NGR为新生血管靶向肽，其与EGFR没有交叉结合位点。其根据常规方法制备）

在 37℃，5% CO₂的培养箱中孵育40小时后，根据生产商的操作说明，用CytoTox96[®]非放射性细胞毒性检测试剂盒（Non-Radioactive Cytotoxicity Assay kit, 来自Promega）检测抗体的细胞毒作用。

CytoTox 96[®]非放射性细胞毒性检测是基于比色法的检测方法，可替代⁵¹Cr释放法。CytoTox 96[®]检测定量地测量乳酸脱氢酶（LDH）。LDH是一种稳定的胞质酶，在细胞裂解时会释放出来，其释放方式与⁵¹Cr在放射性分析中的释放方式基本相同。释放出的LDH培养基上清中，可通过30分钟偶联的酶反应来检测，在酶反应中LDH可使一种四唑盐（INT）转化为红色的甲臃（formazan）。生成的红色产物的量与裂解的细胞数成正比。

如下表1所列举的六种与EGFR有关的肿瘤细胞被用来分别分析本发明的两种双功能抗体7B3/CD3和806/CD3，以及作为对照的EGFR不相关的NGR/CD3单链双功能抗体介导的T细胞肿瘤杀伤能力。

肿瘤细胞的杀伤率（即，细胞毒性%）是根据CytoTox96[®]非放射性细胞毒性检测G1780产品使用说明书提供的下列公式计算的：

$$\text{细胞毒性}\% = \frac{\text{实验} - \text{效应细胞自发} - \text{靶细胞自发}}{\text{靶细胞最大} - \text{靶细胞自发}} \times 100$$

其中：

“实验”指的是加入抗体/效应细胞/靶细胞的实验孔所产生的LDH释放值，

“效应细胞自发”指的是效应细胞自发产生的LDH释放，

“靶细胞自发”是指细胞不受其他因素处理时产生的LDH释放，

“靶细胞最大”是用0.8%Triton X-100处理后靶细胞完全裂解所产生的LDH释放，

“靶细胞最大-靶细胞自发”代表着细胞受外界处理后完全裂解所产生的LDH释放。

表1

肿瘤细胞系	特征	1000ng/ml 7B3/CD3抗体的细 胞毒性%	1000ng/ml 806/CD3抗体的细 胞毒性%	1000ng/ml NGR/CD3抗体的 细胞毒性%
U87 MG	表达低水平的内源性EGFR	1.3	9.4	3.49
U87 MG-EGFRvIII,	表达缺失外显子2-7的EGFR 的U87 MG细胞	72.6	97.9	10.5
U87 MG-de4 EGFR	表达缺失第4外显子的 EGFR的U87 MG细胞	23.3	28.7	8.33
A431	过表达内源性EGFR	47.2	55.2	6.09
NCI-H1975	含有 L858R/T790M 突变的 EGFR	75.2	50	11.5
NCI-H1650	EGFR 的 19 号外显子存在 19E746-A750缺失	52	69.4	3.05

上述表1的结果表明表达突变的EGFR和/或过表达EGFR的肿瘤细胞如A431, U87 MG-de4 EGFR等, 都会被双功能特异性抗体7B3/CD3或806/CD3导向的T细胞特异性杀伤。

具体而言, 在用7B3/CD3处理的上述肿瘤细胞组中, 最小的特异性细胞毒性%为23.3, 最大可达75.2; 在806/CD3处理的上述肿瘤细胞组中, 最小的特异性细胞毒性%为28.7, 最大可达为97.9。

而上述双功能特异性抗体7B3/CD3或806/CD3对表达低水平内源性正常EGFR的肿瘤细胞, 如U87 MG的细胞毒性%非常低, 分别为1.3和9.4, 显著低于对上述表达突变EGFR和/或过表达EGFR的肿瘤细胞的细胞毒性%。

更具体的, 7B3/CD3, 806/CD3和对照抗体NGR/CD3在不同浓度下对各种肿瘤的细胞毒性%结果如下列表2-7所示。

表2

ng/ml	U87 MG		
	NGR/CD3	7B3/CD3	806/CD3
1000	3.49±1.59	1.33±2.00	9.42±6.45
100	4.78±1.61	1.16±4.82	9.33±4.37
10	5.63±3.15	1.85±3.18	8.95±1.50
1	5.16±3.41	0.04±1.02	4.03±1.44
0.1	5.47±2.45	0.04±1.26	5.12±3.79

表3

ng/ml	U87 MG-EGFRvIII		
	NGR/CD3	7B3/CD3	806/CD3
1000	10.51±2.47	72.64±3.09	97.90±4.18
100	4.95±1.41	64.36±1.64	92.98±3.67
10	3.74±2.79	58.29±3.92	89.36±1.28
1	3.19±2.39	46.93±2.76	66.30±8.24
0.1	0.91±1.07	6.17±3.22	36.07±6.77

表4

ng/ml	U87 MG-de4 EGFR		
	NGR/CD3	7B3/CD3	806/CD3
1000	8.33±1.34	23.33±2.68	28.69±7.22
100	9.49±2.23	19.51±4.58	31.09±1.57
10	6.05±0.94	13.09±5.15	18.43±3.33
1	10.07±4.14	5.60±2.93	10.18±2.87
0.1	7.66±0.74	10.57±2.05	5.16±3.01

表5

ng/ml	A431		
	NGR/CD3	7B3/CD3	806/CD3
1000	6.09±3.19	47.23±2.23	55.19±2.15
100	5.26±3.07	45.70±1.65	48.77±5.11
10	4.76±2.94	38.73±2.93	40.38±5.16
1	0.20±1.41	36.79±2.44	34.71±4.75
0.1	1.60±0.91	13.03±3.11	10.87±1.09

表6

ng/ml	NCI-H1975		
	NGR/CD3	7B3/CD3	806/CD3
1000	11.57±5.32	75.22±4.51	49.62±0.76
100	9.41±4.88	70.26±5.72	35.87±1.55
10	8.54±4.78	41.67±1.05	15.37±3.51
1	7.15±3.88	6.67±1.22	5.48±4.97
0.1	7.33±3.79	1.10±1.27	4.35±3.53

表7

ng/ml	NCI-H1650		
	NGR/CD3	7B3/CD3	806/CD3
1000	3.05±0.72	51.97±4.84	69.43±7.97
100	5.90±2.57	43.25±9.84	61.86±3.89
10	3.66±0.63	35.60±6.59	48.10±1.63
1	4.95±1.09	16.38±2.99	20.67±4.27
0.1	3.27±2.49	9.13±1.96	4.26±1.98

据上述表2-7和图6A-6F的细胞毒性%数据和所使用的双功能抗体的浓度，采用GraphPad Prism 5软件（GraphPad Software inc., San Diego, USA）分析程序计算得到各双功能抗体针对肿瘤细胞杀伤的EC₅₀值（半最大效应浓度 concentration for 50% of maximal effect）。

例如，对U87 MG-EGFRvIII细胞而言，7B3/CD3单链双功能抗体的EC₅₀值为2.15ng/ml，而806/CD3单链双功能抗体的EC₅₀值为0.29ng/ml。

对NCI-H1975细胞而言，7B3/CD3单链双功能抗体的EC₅₀值为53.6ng/ml，而806/CD3单链双功能抗体的EC₅₀值为1000ng/ml。

上述本发明双功能抗体所显示的针对各种肿瘤细胞系的低EC₅₀值结果表明其具有显著提高的抗肿瘤生物学活性。

实施例7

双功能抗体的荷瘤小鼠体内抗肿瘤活性

6-10周龄的免疫缺陷的NOD/SCID小鼠（由上海斯莱克实验动物有限责任公司提供）用于构建人EGFR相关肿瘤的异种移植模型，其遗传学特征是缺乏T细胞，B

细胞，NK细胞以及巨噬细胞功能。

治疗组 (n=6) 小鼠右侧皮下接种混合细胞悬液，该悬液由1:1体积比例混合的细胞浓度为 1×10^6 的U87 MG-EGFRvIII 或 NCI-H1975肿瘤细胞与细胞浓度为 1×10^6 的未刺激的PBMC制成。

在U87 MG-EGFRvIII/PBMC接种1小时后，小鼠被分别静脉内给药0.4mg/kg/d和0.04mg/kg/d的7B3/CD3以及0.04mg/kg 806/CD3，该给药重复连续5天。

在NCI-H1975/PBMC接种1小时后，小鼠被分别静脉内给药0.4mg/kg/d和0.04mg/kg/d的7B3/CD3，该给药重复连续10天。

对照组包括两个PBS介质给药的组，即对照组1，只注射肿瘤细胞的组；和对照组2，注射肿瘤细胞和PBMC的组，以评估PBMC效应细胞诱导的非特异性杀伤效果。

在指定日用卡尺测量肿瘤的大小，肿瘤体积是根据下列公式计算：

$$\text{肿瘤体积} = \frac{\text{长度} \times \text{宽度} \times \text{宽度}}{2}$$

小鼠模型中肿瘤体积的减小被设定为各单链双功能抗体的肿瘤抑制效果的依据。下表中对各肿瘤的抑制率的计算是根据如下公式：

$$\text{肿瘤的抑制率} = 1 - \frac{\text{治疗组的肿瘤体积}}{\text{对照组 2 的肿瘤体积}} \times 100\%$$

表7

治疗组	对U87 MG-EGFRvIII的抑制率	对NCI-H1975的抑制率
806/CD3		
0.4mg/kg/d	-	-
0.04mg/kg/d	74%	-
7B3/CD3		
0.4mg/kg/d	80%	87%
0.04mg/kg/d	35.3%	35%

如图7所示，在U87 MG-EGFRvIII荷瘤小鼠模型中，对照组2（即只注射人类外周血淋巴细胞和肿瘤细胞，而没有双特异抗体的组中）的小鼠与对照组1（即只注射肿瘤细胞的组）相比，没有观察到有显著干预U87 MG-EGFRvIII肿瘤的生长。

而806/CD3抗体在浓度0.04mg/kg/d和7B3/CD3在浓度0.4mg/kg/d时都表现出强

烈抑制U87 MG-EGFRvIII生长的能力，在细胞接种后的第23天，它们的抑制率分别为74%和80%(和对照组2相比, $p < 0.05$)。而在较低剂量的7B3/CD3 (0.04mg/kg/d)，肿瘤生长抑制率为35.3% (和对照组2相比)。

如图8显示，在NCI-1975荷瘤小鼠模型中，观察到对照组2与对照组1相比，有一定的干预NCI-1975肿瘤生长的效果，但效果低于0.04mg/kg/d剂量7B3/CD3治疗的小鼠，和明显低于0.4mg/kg/d剂量7B3/CD3治疗的小鼠。

7B3/CD3治疗的小鼠与对照组1和2相比，表现出剂量依赖性的抗肿瘤生长的效应。在接受0.4mg/kg/d剂量组的6只小鼠中有1只在细胞接种后第30天还没有成瘤，而0.04mg/kg/d剂量组的小鼠全部成瘤。和对照组2相比，这两组的肿瘤抑制效果分别为：0.4mg/kg/d剂量组，87% ($p < 0.05$) 和0.04mg/kg/d剂量组，35% ($p < 0.05$)。

实施例8

本发明的单链双功能抗体806/CD3和人源化单克隆抗体ch806的生物学活性分析-对各种肿瘤细胞的细胞毒性

本实验包含两个实验组，即806/CD3处理的三种肿瘤细胞和ch806处理的三种肿瘤细胞，涉及的相关实验材料的制备基本同实施例6所述，除了(1)人源化单克隆抗体ch806，其制备方法如下：按照CN 102405235A公开的序列人工合成编码ch806抗体重链和轻链可变区的核酸，然后在重链编码序列两端添加NheI 和ApaI 酶切位点，在轻链编码序列的两端添加EcoRV和BsiwI酶切位点，接着参考如CN101602808B，尤其实施例7中的描述将上述重链可变区和轻链可变区分别装入表达载体pH和pK，构建得到pH-ch806和pK-ch806。然后根据脂质体转染方法将pH-ch806和pK-ch806共转染CHO-DG44细胞 (Invitrogen)，经过MTX筛选，挑选出高表达抗体的阳性克隆，同时进行细胞驯化，使细胞株逐步适应无血清培养。对驯化成功得到的CHO-ch806细胞进行无血清培养，收集无血清培养上清进行protein A(Code No.17-5280-02,GE Healthcare Life Sciences)亲和纯化，即可得到纯化ch806抗体蛋白。(2) U87 MG EGFR细胞，其是过表达EGFR的U87 MG细胞株，其构建方法参见文献(Wang H, Neoplasia, 2011, 13(5): 461-471.)，U87 MG可以得自ATCC。

将如实施例6第一段和第二段所述之制备的混合后的肿瘤细胞悬液以75 μ L/孔的体积加到96孔板中。然后各孔分别添加25 μ L从20nM到0.0002nM的十倍系列梯度稀释的下列试剂：双功能抗体806/CD3和人源化抗体ch806。

对上述抗体进行抗肿瘤细胞毒性实验的方法和步骤同实施例6中所述。下面表

8-10记载的是双功能抗体806/CD3和人源化抗体ch806对三种不同肿瘤细胞系的细胞毒性的百分比。

表8

nM	U87 MG	
	806/CD3	ch806
20	10.52±0.83	4.18±0.72
2	9.25±1.87	0.28±1.28
0.2	6.72±2.52	0.07±1.05
0.02	4.52±2.92	0.71±0.56
0.002	1.34±2.80	0.71±0.72
0.0002	0.75±1.23	0.96±0.91

表9

nM	U87 MG EGFR	
	806/CD3	ch806
20	47.91±5.54	4.92±1.24
2	43.30±3.51	0.49±0.53
0.2	18.05±5.05	0.37±0.34
0.02	2.94±5.70	1.31±1.35
0.002	1.98±3.59	0.61±1.37
0.0002	0.60±2.60	1.89±1.22

表10

nM	U87 MG EGFRvIII	
	806/CD3	ch806
20	88.70±2.40	36.32±3.83
2	82.42±1.09	22.33±2.85
0.2	63.66±0.69	15.55±3.26
0.02	36.45±0.37	0.76±2.69
0.002	9.50±0.13	0.62±0.58
0.0002	2.36±0.54	0.41±0.19

据上述表8-10和图9A-9C的细胞毒性%数据和所使用的双功能抗体的浓度，采用GraphPad Prism 5软件（GraphPad Software inc., San Diego, USA）分析程序计算得到双功能抗体和单克隆抗体针对肿瘤细胞杀伤的EC50值。

在U87 MG-EGFRvIII细胞中，806/CD3单链双功能抗体的EC50值为0.136nM，而ch806单克隆抗体的EC50值为40.79nM。在U87 MG-EGFR细胞中，806/CD3单链双功能抗体的EC50值为23.43nM，而ch806单克隆抗体的EC50值为6476.08nM。这显示本发明的单链双功能抗体806/CD3对肿瘤细胞的细胞毒性相比人源化单克隆抗体ch806对肿瘤细胞的细胞毒性有非常显著的提高。

表 11 本发明氨基酸序列和核苷酸序列描述：

SEQ ID NO: 1	EGFR 287-302 位隐蔽表位氨基酸序列	SEQ ID NO: 15	5'L806-2
SEQ ID NO: 2	7B3 VH CDR1 氨基酸序列	SEQ ID NO: 16	3'L806
SEQ ID NO: 3	7B3 VH CDR2 氨基酸序列	SEQ ID NO: 17	5'H806-2
SEQ ID NO: 4	7B3 VH CDR3 氨基酸序列	SEQ ID NO: 18	3'H806
SEQ ID NO: 5	7B3 VL CDR1 氨基酸序列	SEQ ID NO: 19	5'L7B3-2
SEQ ID NO: 6	7B3 VL CDR2 氨基酸序列	SEQ ID NO: 20	5'L7B3-1
SEQ ID NO: 7	7B3 VL CDR3 氨基酸序列	SEQ ID NO: 21	3'L7B3
SEQ ID NO: 8	806/CD3 单链双功能抗体氨基酸序列，即 [V _{L806} -接头-V _{H806} -接头-V _{HCD3} -接头-V _{LCD3}]	SEQ ID NO: 22	5'H7B3
SEQ ID NO: 9	7B3/CD3 单链双功能抗体氨基酸序列，即 [V _{L7B3} -接头-V _{H7B3} -接头-V _{HCD3} -接头-V _{LCD3}]	SEQ ID NO: 23	3'H7B3
SEQ ID NO: 10	806/CD3 单链双功能抗体核苷酸序列	SEQ ID NO: 24	5'HCD3
SEQ ID NO: 11	7B3/CD3 单链双功能抗体核苷酸序列	SEQ ID NO: 25	3'HCD3
SEQ ID NO: 12	7B3 单链抗体核苷酸序列 [VL7B3-接头-VH7B3-接头]核苷酸序列	SEQ ID NO: 26	5'LCD3
SEQ ID NO: 13	7B3 VH 核苷酸序列	SEQ ID NO: 27	3'LCD3
SEQ ID NO: 14	7B3 VL 核苷酸序列	SEQ ID NO: 28	5'H806-1
		SEQ ID NO: 29	3'H7B3-2

权利要求书

1. 一种多功能抗体多肽，包括：
 - (a) 第一功能域，其特异性识别EGFR的第287-302位氨基酸序列形成的隐蔽表位，如SEQ ID NO:1所示，
 - (b) 第二功能域，其特异性识别人T细胞表面抗原。
2. 权利要求1所述的多肽，其中第一功能域包含至少一个具有选自如下序列SEQ ID NO. 2, SEQ ID NO. 3和SEQ ID NO.4的抗EGFR抗体重链可变区的互补决定区（CDR）。
3. 权利要求1或2所述的多肽，其中第一功能域包含至少一个具有选自如下序列SEQ ID NO. 5, SEQ ID NO. 6和SEQ ID NO.7的抗EGFR抗体轻链可变区的互补决定区（CDR）。
4. 权利要求1所述的多肽，其中第二功能域为单链抗CD3抗体。
5. 权利要求1所述的多肽，还包含位于所述第一和第二功能域之间或位于第一或第二功能域内部互补决定区之间的接头。
6. 权利要求5所述的多肽，其中所述接头的序列为（GlyGlyGlyGlySer） n ，其中 n 为1到5的整数。
7. 权利要求6所述的多肽，其中 $n=3$ 。
8. 权利要求1-7之一所述的多肽，其中第一或第二功能域选自完整抗体，单链抗体(scFV)，Fab片段，Fd片段，Fv片段，F(ab')₂片段和其衍生物。
9. 权利要求1所述的多肽，其中第一和/或第二功能域是人源化的，嵌合的或鼠源的。
10. 权利要求1所述的多肽，具有如SEQ ID NO. 8所示的氨基酸序列。

11. 权利要求1所述的多肽，具有如SEQ ID NO. 9所示的氨基酸序列。
12. 编码权利要求1-11任一所述的多肽的核苷酸序列。
13. 编码权利要求10所述的多肽的核苷酸，其具有如SEQ ID NO. 10所示的核苷酸序列。
14. 编码权利要求11所述的多肽的核苷酸，其具有如SEQ ID NO. 11所示的核苷酸序列。
15. 包含有权利要求12-14之一所述核苷酸序列的载体。
16. 权利要求15所述的载体，其为带有DHFR营养缺陷性选择标记的载体。
17. 权利要求16所述的载体，其为pH载体。
18. 包含有权利要求15或16所述的载体的真核宿主细胞或原核宿主细胞。
19. 权利要求18所述的真核宿主细胞，其为中国仓鼠卵巢细胞。
20. 权利要求1-11任一所述的多肽在制备诊断，治疗和/或预防肿瘤的药物中的应用。

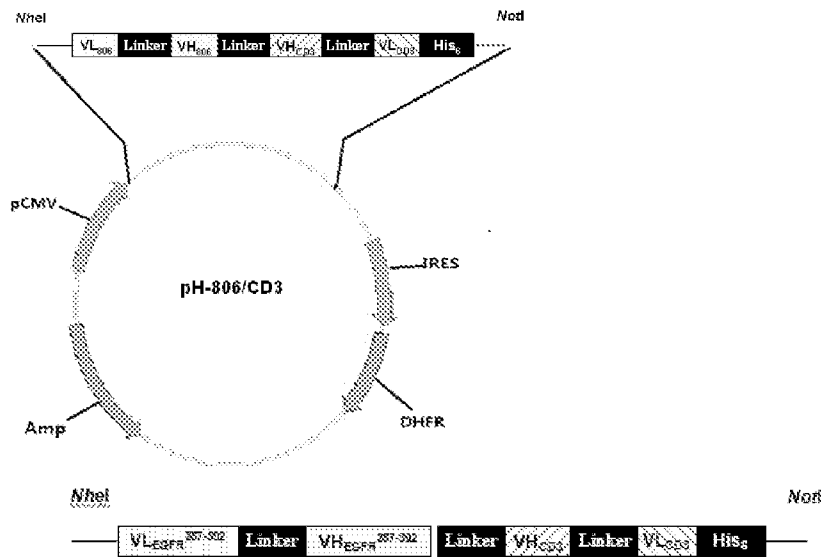


图1

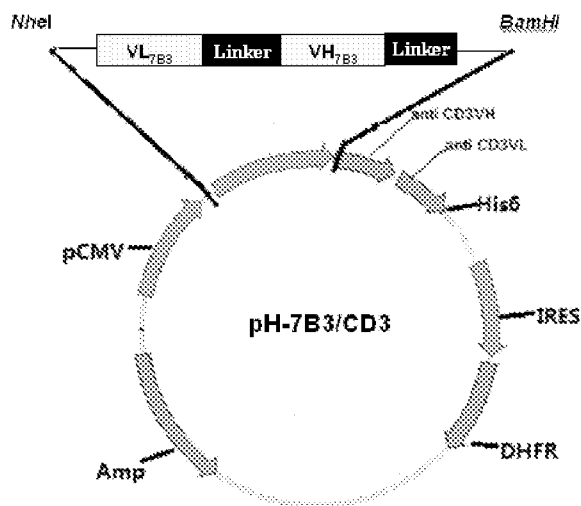


图2

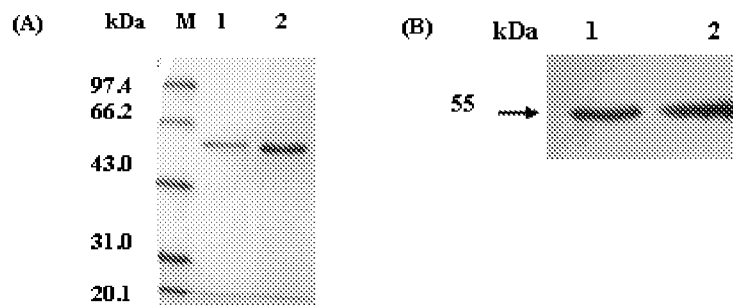


图3A-3B

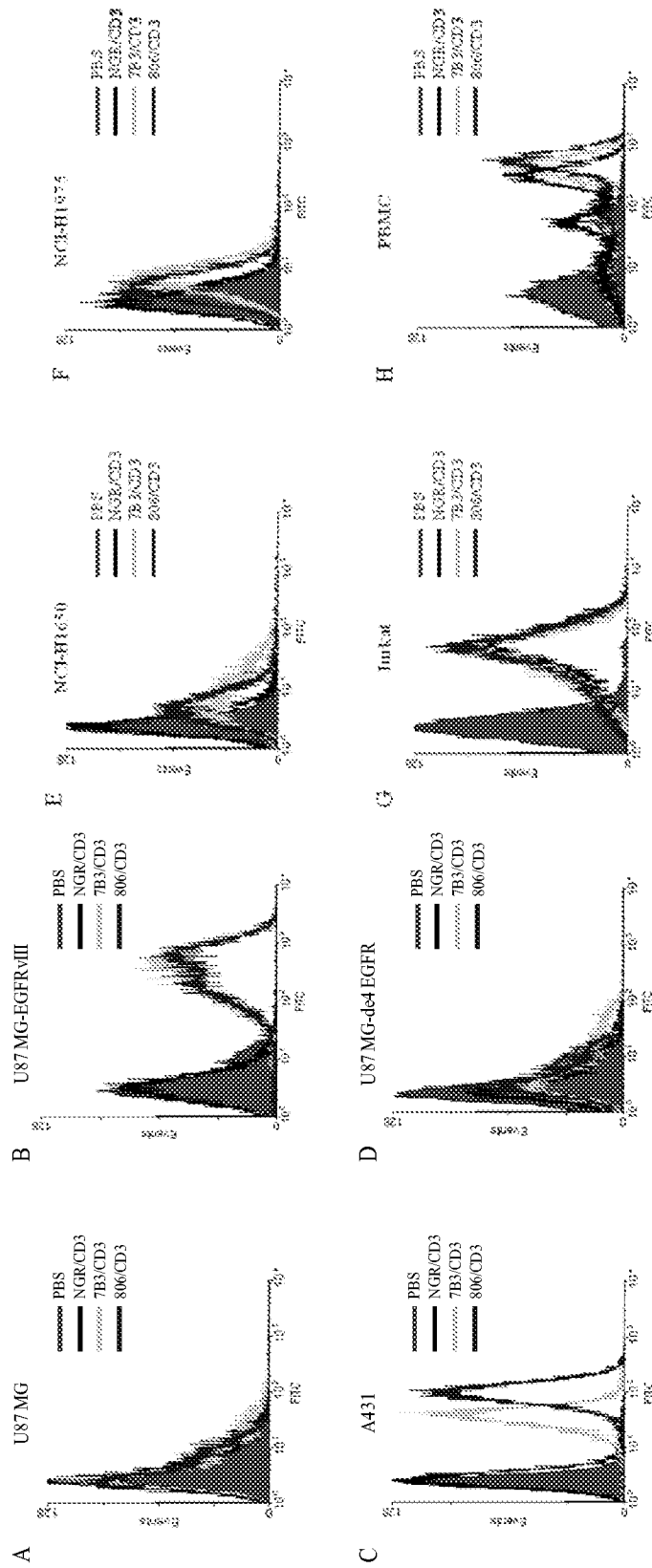


图 4A-4H

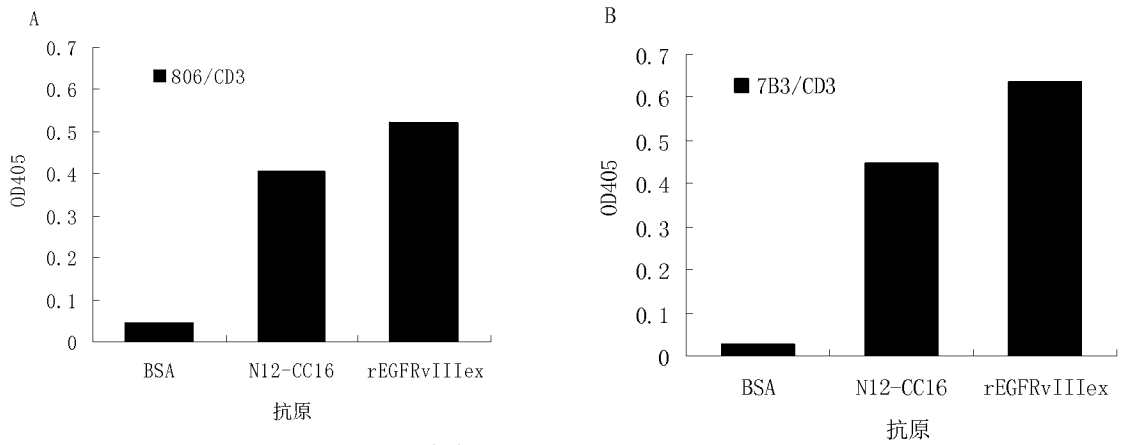


图5 A-B

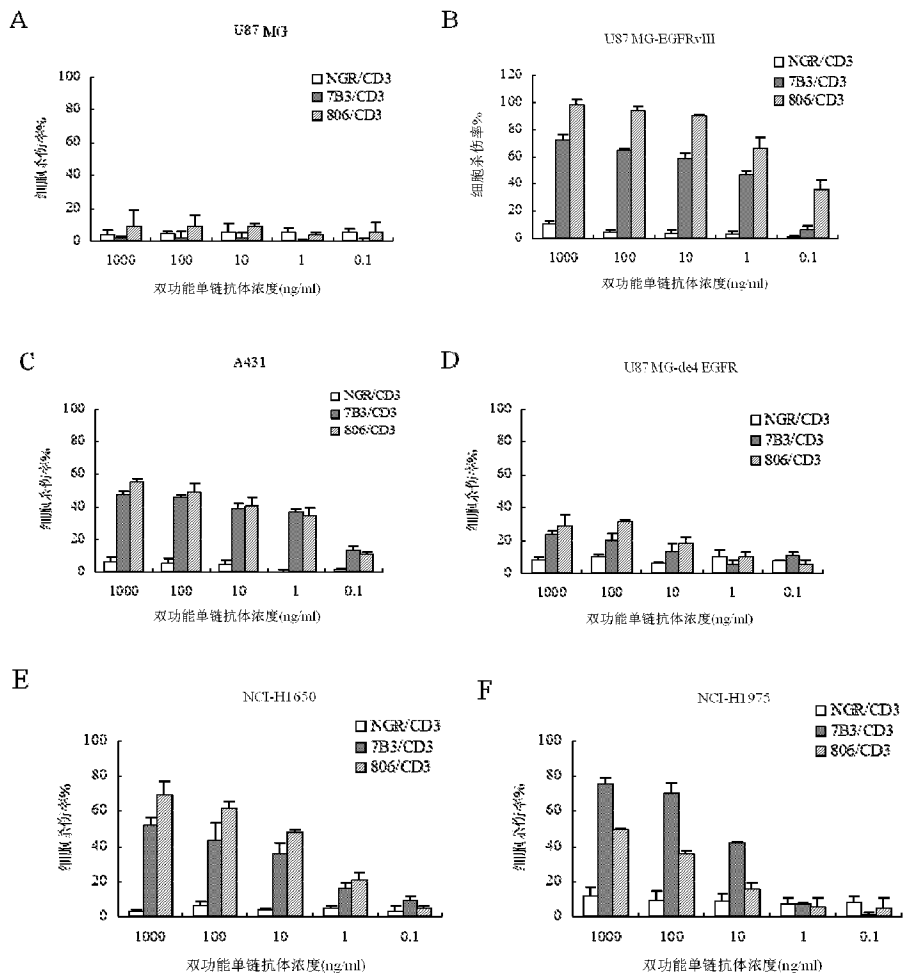


图6A-6F

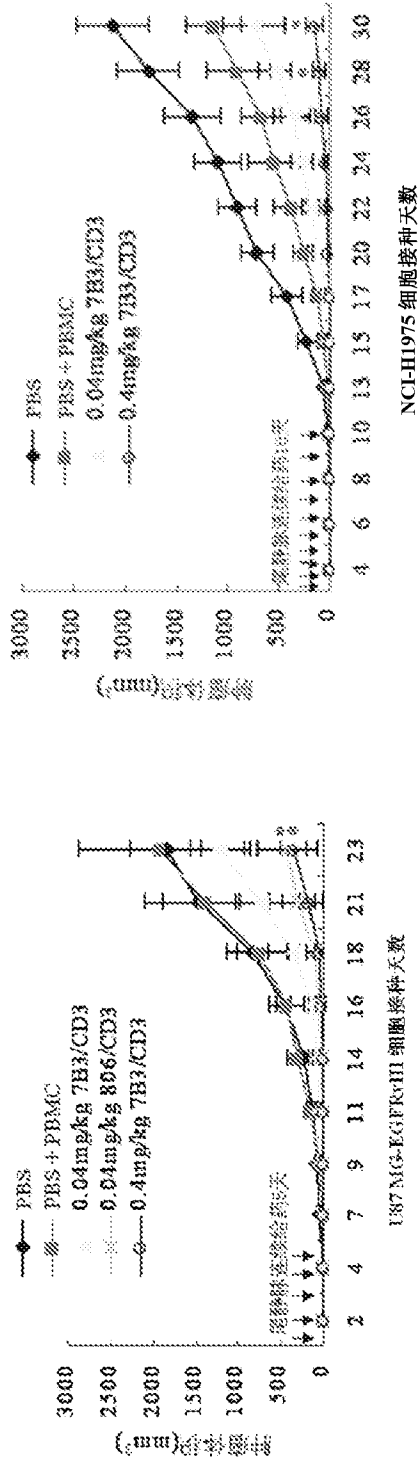


图7

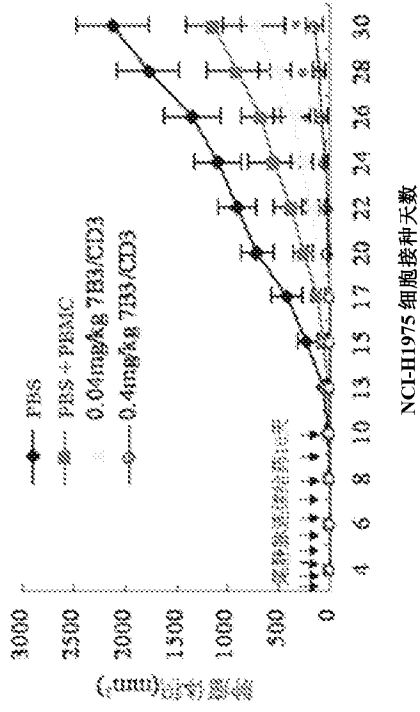


图8

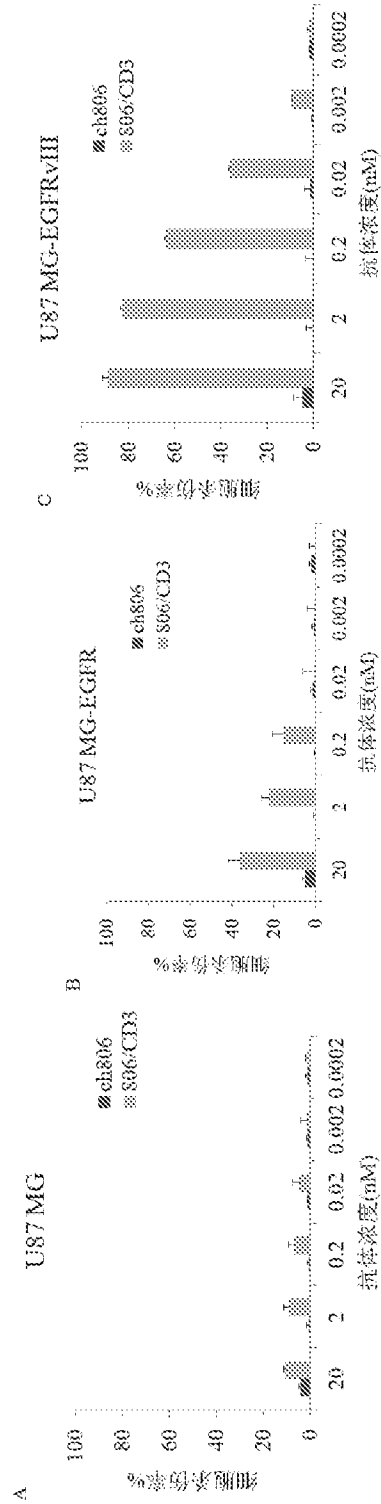


图9A-C

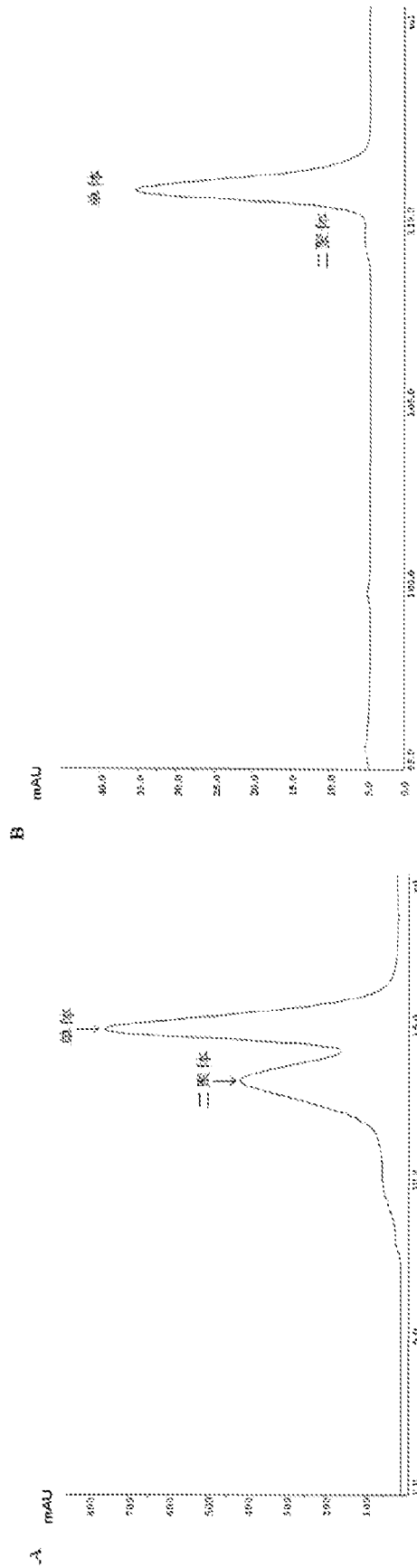


图 10A-B

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2013/072098

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

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)

IPC: C07K 14/-; C07K 16 /-; A61K 39 /-; A61P 35 /-

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)

WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, WANFANG DATA, google, ISI web of Knowledge, Elsevier Science Direct, Genbank, EBI,
Bio-Sequence Database of Chinese Patent

EGFR, epidermal growth factor receptor, EGF receptor, T cell, CD3, 7B3, 806, mAb, antibody, bispecific, multifunctional,
antigen, cryptic epitope, SEQ ID NO: 1-14

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 101687915 A (MICROMET AG) 31 March 2010 (31.03.2010) claims 1-3, 12-13, 16-20 and 26, description, page 29, the second paragraph from the bottom to page 31, the first paragraph, page 32, line 1 to page 46, line 6	1, 4-9, 12, 15-20
Y	WO 2010/096434 A2 (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 26 August 2010 (26.08.2010) description, paragraphs [0253], [0270], [0712]-[0713] and figure 65	1, 4-9, 12, 15-20
Y	PFOSSER, A. et al., Role of target antigen in bispecific-antibody-mediated killing of human glioblastoma cells: a pre-clinical study, Int. J. Cancer, 09 February 1999 (09.02.1999) vol. 80, no. 4, page 612 to page 616, especially page 612, right column, the first paragraph	1, 4-9, 12, 15-20

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

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“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)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“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</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&”document member of the same patent family</p>
--	--

Date of the actual completion of the international search
13 May 2013 (13.05.2013)

Date of mailing of the international search report
13 June 2013 (13.06.2013)

Name and mailing address of the ISA/CN
The State Intellectual Property Office, the P.R.China
6 Xitucheng Rd., Jimen Bridge, Haidian District, Beijing, China
100088
Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer
CHEN, Zhongwei
Telephone No. (86-10) 62414097

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2013/072098

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	REUSCH, U. et al., Anti-CD3×Anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Bispecific Antibody Redirects T-Cell Cytolytic Activity to EGFR-Positive Cancers <i>In vitro</i> and in an Animal Model, Clin. Cancer Res, 01 January 2006 (01.01.2006) vol. 12, no. 1, page 183 to page 190, especially page 184, left column, the last paragraph	1, 4-9, 12, 15-20
Y	US 2011/0076232 A1 (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 31 March 2011 (31.03.2011) description, paragraph [0024] and SEQ ID NO: 14	1, 4-9, 12, 15-20
A	HENION, P. D. et al., Avian Transitin Expression Mirrors Glial Cell Fate Restrictions During Neural Crest Development, Dev. Dyn, May 2000, vol. 218, no. 1, page 150 to page 159	1-20

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2013/072098

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 101687915 A	31.03.2010	WO 2008/119567 A2	09.10.2008
		WO 2008/119567 A3	09.10.2008
		WO 2008/119567 A8	09.10.2008
		AU 2008234020 A1	09.10.2008
		AU 2008234020 B2	09.10.2008
		CA 2683370 A1	09.10.2008
		EP 2155783 A2	24.02.2010
		KR 20100016206 A	12.02.2010
		US 2010/0150918 A1	17.06.2010
		JP 2010524851 A	22.07.2010
		JP 2010524851 A5	19.05.2011
		RU 2009136912 A	10.05.2011
		US 8077311 B1	13.12.2011
		NZ 580755 A	25.05.2012
		EP 2520590 A2	07.11.2012
		EP 2520590 A3	07.11.2012
		WO 2008/119566 A2	09.10.2008
		WO 2008/119566 A3	09.10.2008
		WO 2008/119565 A2	09.10.2008
		WO 2008/119565 A3	09.10.2008
		CA 2682626 A1	09.10.2008
		AU 2008234019 A1	09.10.2008
		KR 20100016199 A	12.02.2010
		EP 2155788 B1	24.02.2010
		CN 101675077 A	17.03.2010
		MX 2009010611 A	26.03.2010
		MX 2009010610 A	08.06.2010
		US 2010/0150918 A1	17.06.2010
		JP 2010524435 A	22.07.2010
		JP 2010524435 A5	19.05.2011
		US 2010/0183615 A1	22.07.2010
		RU 2009136913 A	20.06.2011
		NZ 580746 A	25.05.2012
		SG 182234 A1	30.07.2012
PT 2155788 E	24.02.2010		
US 2012/0244162 A1	27.09.2012		
DK 2155788 T3	08.10.2012		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2013/072098

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
WO 2010/096434 A2	26.08.2010	RS 52492 B	28.02.2013
		ES 2390243 T3	07.11.2012
		SI 2155788 T1	30.11.2012
		HK 1141299 A1	07.12.2012
		HR P20120759 T1	31.10.2012
		EP 2520590 A2	07.11.2012
		US 2010/0056762 A1	04.03.2010
		WO 2010/096434 A3	26.08.2010
		EP 2398828 A2	28.12.2011
		US 2012/0183471 A1	19.07.2012
		JP 2012518039 A	09.08.2012
		JP 2012518039 A5	04.04.2013
		AU 2010216168 A1	29.09.2011
		CA 2752584 A1	26.08.2010
		CN 102405235 A	04.04.2012
		CO 6420350 A2	16.04.2012
		ECSP 11011335 A	30.12.2011
US 2011/0076232 A1	31.03.2011	KR 20110122848 A	11.11.2011
		MX 2011008767 A	02.11.2011
		PE 05692012 A1	14.06.2012
		SG 173688 A1	29.09.2011
		US 2011/0313230 A1	22.12.2011
		WO 2011/041319 A2	07.04.2011
		WO 2011/041319 A3	07.04.2011
		WO 2011/041319 A8	07.04.2011
		AR 080663 A1	02.05.2012
		TW 201124155 A1	16.07.2011
UY 32915 A	29.04.2011		
US 2011/0293511 A1	01.12.2011		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2013/072098

Continuation of: second sheet: A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER:

C07K 14/705 (2006.01) i

C07K 16/28 (2006.01) i

C07K 16/46 (2006.01) i

C07K 16/30 (2006.01) i

A61K 39/395 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

A. 主题的分类		
见附加页		
按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和 IPC 两种分类		
B. 检索领域		
检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)		
IPC: C07K 14/-; C07K 16/-; A61K 39/-; A61P35/-		
包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献		
在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))		
WPI, EPODOC, CNPAT, CNKI, 万方, google, ISI web of Knowledge, Elsevier Science Direct, Genbank, EBI, 中国专利生物序列数据库		
EGFR、表皮生长因子受体, epidermal growth factor receptor, EGF receptor, T 细胞, T cell, CD3, 7B3, 806, mAb, antibody, 抗体, 双特异性, 多功能, bispecific, antigen, cryptic epitope, SEQ ID NO:1-14		
C. 相关文件		
类 型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	CN 101687915 A (米克罗麦特股份公司) 31.3 月 2010 (31.03.2010) 权利要求 1-3、12-13、16-20 和 26, 说明书第 29 页倒数第 2 段至第 31 页第 1 段, 第 32 页第 1 行至第 46 页第 6 行	1、4-9、12、15-20
Y	WO 2010/096434 A2 (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 26.8 月 2010 (26.08.2010) 说明书第[0253]、[0270]、[0712]-[713]段, 图 65	1、4-9、12、15-20
Y	PFOSSER, A. et al. Role of target antigen in bispecific-antibody-mediated killing of human glioblastoma cells: a pre-clinical study. Int. J. Cancer. 09.2 月 1999 (09.02.1999), 第 80 卷, 第 4 期, 第 612-616 页, 尤其第 612 页右栏第 1 段	1、4-9、12、15-20
<input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在 C 栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。		
* 引用文件的具体类型:		“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
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件		“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
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利		“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
“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)		“&” 同族专利的文件
“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		
国际检索实际完成的日期 13.5 月 2013 (13.05.2013)	国际检索报告邮寄日期 13.6 月 2013 (13.06.2013)	
ISA/CN 的名称和邮寄地址: 中华人民共和国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路 6 号 100088 传真号: (86-10)62019451	受权官员 陈中伟 电话号码: (86-10) 62414097	

C(续). 相关文件		
类 型	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
Y	REUSCH, U. et al. Anti-CD3×Anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Bispecific Antibody Redirects T-Cell Cytolytic Activity to EGFR-Positive Cancers <i>In vitro</i> and in an Animal Model. Clin. Cancer Res. 01.1月2006 (01.01.2006), 第12卷, 第1期, 第183-190页, 尤其第184页左栏最后一段	1、4-9、12、15-20
Y	US 2011/0076232 A1 (LUDWIG INSTITUTE FOR CANCER RESEARCH) 31.3 月 2011 (31.03.2011) 说明书第[0024]段和 SEQ ID NO:14	1、4-9、12、15-20
A	HENION, P.D. et al. Avian Transitin Expression Mirrors Glial Cell Fate Restrictions During Neural Crest Development. Dev.Dyn. 5月2000, 第218卷, 第1期, 第150-159页	1-20

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2013/072098

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
CN 101687915 A	31.03.2010	WO 2008/119567 A2	09.10.2008
		WO 2008/119567 A3	09.10.2008
		WO 2008/119567 A8	09.10.2008
		AU 2008234020 A1	09.10.2008
		AU 2008234020 B2	09.10.2008
		CA 2683370 A1	09.10.2008
		EP 2155783 A2	24.02.2010
		KR 20100016206 A	12.02.2010
		US 2010/0150918 A1	17.06.2010
		JP 2010524851 A	22.07.2010
		JP 2010524851 A5	19.05.2011
		RU 2009136912 A	10.05.2011
		US 8077311 B1	13.12.2011
		NZ 580755 A	25.05.2012
		EP 2520590 A2	07.11.2012
		EP 2520590 A3	07.11.2012
		WO 2008/119566 A2	09.10.2008
		WO 2008/119566 A3	09.10.2008
		WO 2008/119565 A2	09.10.2008
		WO 2008/119565 A3	09.10.2008
		CA 2682626 A1	09.10.2008
		AU 2008234019 A1	09.10.2008
		KR 20100016199 A	12.02.2010
		EP 2155788 B1	24.02.2010
		CN 101675077 A	17.03.2010
		MX 2009010611 A	26.03.2010
		MX 2009010610 A	08.06.2010
		US 2010/0150918 A1	17.06.2010
		JP 2010524435 A	22.07.2010
		JP 2010524435 A5	19.05.2011
		US 2010/0183615 A1	22.07.2010
		RU 2009136913 A	20.06.2011
		NZ 580746 A	25.05.2012
SG 182234 A1	30.07.2012		
PT 2155788 E	24.02.2010		
US 2012/0244162 A1	27.09.2012		
DK 2155788 T3	08.10.2012		

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2013/072098

检索报告中引用的 专利文件	公布日期	同族专利	公布日期
WO 2010/096434 A2	26.08.2010	RS 52492 B	28.02.2013
		ES 2390243 T3	07.11.2012
		SI 2155788 T1	30.11.2012
		HK 1141299 A1	07.12.2012
		HR P20120759 T1	31.10.2012
		EP 2520590 A2	07.11.2012
		US 2010/0056762 A1	04.03.2010
		WO 2010/096434 A3	26.08.2010
		EP 2398828 A2	28.12.2011
		US 2012/0183471 A1	19.07.2012
		JP 2012518039 A	09.08.2012
		JP 2012518039 A5	04.04.2013
		AU 2010216168 A1	29.09.2011
		CA 2752584 A1	26.08.2010
		CN 102405235 A	04.04.2012
		CO 6420350 A2	16.04.2012
		ECSP 11011335 A	30.12.2011
KR 20110122848 A	11.11.2011		
MX 2011008767 A	02.11.2011		
PE 05692012 A1	14.06.2012		
SG 173688 A1	29.09.2011		
US 2011/0313230 A1	22.12.2011		
US 2011/0076232 A1	31.03.2011	WO 2011/041319 A2	07.04.2011
		WO 2011/041319 A3	07.04.2011
		WO 2011/041319 A8	07.04.2011
		AR 080663 A1	02.05.2012
		TW 201124155 A1	16.07.2011
		UY 32915 A	29.04.2011
		US 2011/0293511 A1	01.12.2011

续：第 2 页：A.主题的分类：

C07K 14/705 (2006.01) i

C07K 16/28 (2006.01) i

C07K 16/46 (2006.01) i

C07K 16/30 (2006.01) i

A61K 39/395 (2006.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i