

市朝阳区东三环北路甲2号8号楼0549室,
陆薇薇, Beijing 100027 (CN)。

(81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DJ, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, 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)。

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))。

抗 EGFR 和抗 CD3 双特异性抗体及其应用

技术领域

本发明涉及生物技术领域，具体涉及一种针对 EGFR 和 CD3 的双特异性抗体的构建和制备方法，以及该抗体在疾病中的应用。

背景技术

双特异性抗体 (bispecific antibody, BiAb) 是由两种不同的抗体片段构成的人工抗体，能够特异性识别和结合两个不同的抗原或两个不同的抗原表位。

单克隆抗体广泛应用于癌症、炎症和其它疾病的治疗，由于这些抗体所针对的都是单一的靶标，很多患者不能充分响应单一的治疗，时常出现抗药性。双特异性抗体能够同时识别两个不同的抗原或抗原表位，可以作为一种媒介重新定向免疫效应细胞，如自然杀伤细胞和 T 细胞，加强对肿瘤细胞的杀伤功能。此外，双特异性抗体还可以定位于同一个细胞的两个不同的抗原，导致细胞信号的改变，包括癌症扩散信号或炎症信号。经过长时间的研究和发展，出现了多种形式的双特异性抗体，如双特异性微抗体、双链抗体、单链双价抗体和多价双特异性抗体等。这些双特异性抗体基本上分为两大类：含有 Fc 的和不含有 Fc 的。前者具有较好的溶解性、稳定性和半衰期，而 Fc 介导的抗体依赖的细胞毒性作用 (ADCC) 和补体依赖性细胞溶解效应 (CDC) 可以带来一些治疗所需的附加效应。相比之下，缺乏 Fc 的双特异性抗体完全依赖其抗原结合能力发挥其治疗作用；另外 Fc 蛋白可以延长药物蛋白 (或多肽) 在体内的半衰期，从而延长活性分子在体内的作用时间。

肿瘤细胞表面抗原表皮生长因子受体 (EGFR)：表皮生长因子受体广泛分布于除血管组织外的上皮细胞膜上，是一个跨膜蛋白，分子量约为 180KDa，具有配体诱导酪氨酸蛋白激酶活性，它是 ErbB 这个保守的受体家族中的一员，这个家族的其他成员包括

HER2/Neu/ErbB2, HER3/ErbB3 和 HER4/ErbB4。ErbB 受体的共同特征是：包含一个胞外(EC)配体结合区，由两个重复的富含半胱氨酸的区域组成的单一跨膜区，以及含有酪氨酸蛋白激酶和自身磷酸化位点的胞内序列；配体和受体结合后，引起受体的二聚化作用，形成同型或异型二聚体；二聚化的受体发生交联磷酸化，激活胞内区的 TK 亚区，从而激发下一级信号传导，导致细胞增殖、转化。EGFR 与肿瘤细胞的增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转移及细胞凋亡的抑制有关，其机制包含有：EGFR 的高表达引起下游信号传导的增强，突变型 EGFR 受体或配体表达的增加导致 EGFR 的持续活化，自分泌环的作用增强，受体下调机制的破坏，异常信号传导通路的激活等。研究表明 EGFR 在很多实体瘤中高表达或异常表达，与肿瘤细胞的增殖、血管生成、肿瘤侵袭、转移及细胞凋亡的抑制有关。EGFR 的过表达在肿瘤的演进中发挥着重要作用，如胶质细胞瘤、肺癌、前列腺癌、胰腺癌等组织中都有 EGFR 的过度表达。

免疫细胞表面抗原分化簇 3 (CD3)：CD3 分子是 T 细胞膜上的重要分化抗原，是成熟 T 细胞的特征性标志，由 6 条肽链组成，以非共价键与 T 细胞抗原受体 (TCR) 组成 TCR-CD3 复合体，不仅参与 TCR-CD3 复合体的胞浆内组装，而且通过各多肽链胞浆区的免疫受体酪氨酸活化基序 (immunoreceptor tyrosine-based activation motif, ITAM) 传递抗原刺激信号。CD3 分子的主要功能为：稳定 TCR 结构，传递 T 细胞活化信号，当 TCR 特异性识别并结合抗原后，CD3 参与将信号转导到 T 细胞胞浆内，作为诱导 T 细胞活化的第一信号，在 T 细胞抗原识别和免疫应答产生过程中具有极其重要的作用。

在医学中，特别是肿瘤的免疫治疗中，双特异性抗体具有良好的效果和前景，能够同时结合肿瘤细胞和免疫细胞上的特异性抗原-免疫活性细胞 CD16 或 CD3 的部分，具有激活 NK 细胞或 T 细胞作用，而抗肿瘤的抗原部分可以结合肿瘤细胞，将免疫细胞靶向到肿瘤细胞，提高局部 NK 细胞或 T 细胞浓度，从而使免疫效应细胞对肿瘤细胞起到特异性杀伤作用。现有技术中，还没有成功上市的 EGFR

和 CD3 双特异性抗体药物产品，该项技术有待研究。

相对于中国专利 CN201510030519.9，本发明是采用四价双特异性抗体，完整的保留了抗 EGFR 抗体的生物学活性；四价双特异能够更好的识别肿瘤抗原和效应细胞（T 细胞和 NK 细胞等），从而能够更好地发挥双特异抗体的生物学活性。美国专利 US9249217 B2 则采用 ScFv-ScFv（BITE）形式，而 BITE 是二价的且没有 Fc 片段。与 BITE 相比，本发明除了具有四价抗体的优势外，还含有 Fc 片段；Fc 片段可以延长效应分子在体内的半衰期，从而延长了效应分子在体内的作用时间。

发明内容

本发明中提供了一种双特异性抗体，该双特异性抗体在抗 EGFR 的 C-端增加了抗 CD3 的 ScFv 序列，这种双特异抗体保留了抗 EGFR 抗体完整分子结构，同时增加了结合 CD3 抗原的能力，这样既保持了原有 EGFR 抗体在体内生物学活性，同时通过特异性识别两种不同的抗原，靶向免疫效应细胞到肿瘤细胞，从而增加了免疫效应细胞杀伤肿瘤细胞的效果。

本发明提供了抗 EGFR 和抗 CD3 双特异抗体及其应用，

包含 (a) 完整的单克隆抗体，(b) 单链抗体 ScFv 和 (c) 连接子；所述 (a) 与 EGFR 抗原特异性结合并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成；所述 (b) 与免疫细胞抗原 CD3 特异性结合，所述 (b) 为两条单链抗体 ScFv；所述 (b) 为两条单链抗体 ScFv；所述 (b) 的两条单链抗体 ScFv 分别通过所述 (c) 连接子 linker 与所述 (a) 的两条重链的 C 末端连接。

其中，所述双特异抗体中所述 (c) 连接子 linker 的氨基酸序列为 (GGGGX)_n，X 包含 Ser 或 Ala，X 优选 Ser；n 为 1-4 的自然数，n 优选 3。

其中，所述双特异性抗体 (a) 完整的单克隆抗体是由两条轻链和两条重链组成，每条重链和轻链之间通过二硫键连接，两条重链之间通过铰链区的二硫键连接。所述重链和轻链的可变区特

异性结合肿瘤细胞表面 EGFR 抗原。

其中,所述(a)完整的单克隆抗体的重链恒定区为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 中的一种,优选 IgG2。

其中,所述(a)完整的单克隆抗体的重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2 或 SEQ ID NO 3 中的一种;所述(a)完整的单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO 4、EQ ID NO 5 或 SEQ ID NO 6 中的一种。所述(b)单链抗体 ScFv 的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO 8,所述(b)单链抗体 ScFv 的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO 9。

其中,所述(b)两条单链抗体 ScFv 的氨基酸序列均为 SEQ ID NO 7。

其中,每个(b)单链抗体 ScFv 是由重链可变区、(c)连接子 linker 和轻链可变区组成,所述重链可变区和轻链可变区特异性结合免疫细胞表面 CD3 抗原;所述(c)连接子 linker 的氨基酸序列为 (GGGGS)_n, n 为 1-4 的自然数,优选为 (GGGGS)₃。

其中,构建双特异抗体的表达载体,其中所述双特异抗体可以构建到一个载体中,或者分别构建到两个不同的载体上。

其中,通过基因工程方法将构建好的载体转染到宿主细胞中,所述宿主细胞包含原核细胞、酵母或哺乳动物细胞,如 CHO 细胞、NSO 细胞或其他哺乳细胞,优选为 CHO 细胞。

其中,通过常规的免疫球蛋白方法,包含蛋白质 A 亲和层析和离子交换、疏水层析或分子筛方法获得所述双特异性抗体。

其中,所述双特异性抗体用于 EGFR 高表达或非正常表达的肿瘤组织的治疗及其他 EGFR 过表达引起疾病的治疗。

其中,所述完整的单克隆抗体为全长抗体。

采用上述技术方案,包括以下有益技术效果:

本发明的双特异性抗体是采用四价抗体的形式,这种形式的四价抗体完整的保留了结合肿瘤抗原的抗体序列,具有较高的亲和力。同时四价双特异抗体可以更好的连接肿瘤细胞和效应细胞,从而更有利

于发挥双特异抗体的生物学功能。相对于现在常用的 BITE 双特异抗体形式，本发明中的分子还包括了 Fc 片段；Fc 片段的存​​在可以延长药物分子在体内的半衰期，从而能够使药物分子更好的发挥作用，降低病人用药频率，减轻病人的痛苦。本发明用于高表达或非正常表达 EGFR 肿瘤组织的治疗，以及其他 EGFR 过表达引起疾病的治疗。

附图说明

图 1 示例性示出了双特异抗体的分子示意图；

图 2 示例性示出了双特异分子质粒表达的构建图；

图 3 示例性示出了纯化后的双特异分子的变性 SDS 电泳图；

图 4 示例性示出了 ELISA 法检测双特异分子与抗原的结合能力；

图 5 示例性示出了双特异抗体与 A431 细胞的结合；

图 6 示例性示出了双特异抗体与 Jukart 细胞的结合；

图 7 示例性示出了双特异抗体介导的 PBMC 对 A431 的结合；

图 8 示例性示出了双特异抗体介导的 PBMC 对 H520 的杀伤效果。

具体实施方式

下面通过具体的实施例并结合附图对本发明做进一步的详细描述。

本发明提供了抗 EGFR 和抗 CD3 双特异抗体及其应用，包含(a)完整的单克隆抗体，(b)单链抗体 ScFv 和 (c)连接子；所述 (a)与 EGFR 抗原特异性结合并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成；所述 (b)与免疫细胞抗原 CD3 特异性结合，所述 (b)为两条单链抗体 ScFv；所述 (b)为两条单链抗体 ScFv；所述 (b)的两条单链抗体 ScFv 分别通过所述 (c)连接子 linker 与所述 (a)的两条重链的 C 末端连接。

进一步优选地，所述双特异抗体中所述 (c)连接子 linker 的氨基酸序列为 (GGGGX) n ，X 包含 Ser 或 Ala，X 优选 Ser； n 为 1-4 的自然数， n 优选 3。

进一步优选地，所述双特异性抗体 (a)完整的单克隆抗体是由两条轻链和两条重链组成，每条重链和轻链之间通过二硫键连

接，两条重链之间通过铰链区的二硫键连接。所述重链和轻链的可变区特异性结合肿瘤细胞表面 EGFR 抗原。

进一步优选地，所述 (a) 完整的单克隆抗体的重链恒定区为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 中的一种，优选 IgG2。

进一步优选地，所述 (a) 完整的单克隆抗体的重链可变区氨基酸序列为 SEQ ID NO 1、SEQ ID NO 2 或 SEQ ID NO 3 中的一种；其中，

SEQ ID NO 1 (尼妥珠单克隆抗体的重链可变区氨基酸序列)：
QVQLQQPGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTNYYIYWKQRPGQGLEWIGGINPTSG
GSNFNEKFKTKATLTVDESSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRQGLWFDSDGRGDFD
WGQGTTLTVSS；

SEQ ID NO 2 (西妥昔单克隆抗体的重链可变区氨基酸序列)：
QVQLKQSGPGLVQPSQSLSTCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSSGN
TDYNTPTFTRLSINKDNSKSKVFFKMNLSQNDTAIYYCARALTYDYEFAYWGQG
TLVTVSA；

SEQ ID NO 3 (帕尼单抗单克隆抗体的重链可变区氨基酸序列)：
QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGGSVSSGDYYWTWIRQSPGKGLEWIGHIYYS
GNTNYPNPSLKSRLTISIDTSKTQFSLKLSSVTAADTAIYYCVRDRVTGAFDIWGQG
TMVTVSS。

其中，所述 (a) 完整的单克隆抗体的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO 4、SEQ ID NO 5 或 SEQ ID NO 6 中的一种，

SEQ ID NO 4 (尼妥珠单克隆抗体的轻链可变区氨基酸序列)：
DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISCRSSQNI VHSNGNTYLDWYLQKPGQSPNLLIYKV
SNRFSGVPDRFRGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCFQYSHVPWTFGGGKLEIK
；

SEQ ID NO 5 (西妥昔单克隆抗体的轻链可变区氨基酸序列)：
DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRRTNGSPRLLIKYASESIS
GIPSRFSGSGSGTDFTLINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELK；

SEQ ID NO 6 (帕尼单抗单克隆抗体的轻链可变区氨基酸序列)：

DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCQASQDISNYLNWYQQKPGKAPKLLIYDASNLET
GVPSRFSGSGSGTDFTFTISSLQPEDIATYFCQHFDHLPLAFGGGKVEIK。

进一步优选地，所述 (b) 单链抗体 ScFv 的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO 8，所述 (b) 单链抗体 ScFv 的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO 9；其中，

SEQ ID NO 8 (抗 CD3 单链抗体的重链可变区氨基酸序列)：
DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRG
YTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQG
TTLTVSS；

SEQ ID NO 9 (抗 CD3 单链抗体的轻链可变区氨基酸序列)：
DIQLTQSPA IMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASG
VPYRFSGSGSGTSYSLT ISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK。

进一步优选地，所述 (b) 两条单链抗体 ScFv 的氨基酸序列均为 SEQ ID NO 7；其中，

SEQ ID NO 7 (抗 CD3 单链抗体氨基酸序列)：
DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSRG
YTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQG
TTLTVSSGGGGSGGGGSGGGGSDIQLTQSPA IMSASPGEKVTMTCRASSSVSYMNW
YQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTSYSLT ISSMEAEDAATYYCQQW
SSNPLTFGAGTKLELK。

进一步优选地，每个 (b) 单链抗体 ScFv 是由重链可变区、
(c) 连接子 linker 和轻链可变区组成，所述重链可变区和轻链可变区特异性结合免疫细胞表面 CD3 抗原；所述 (c) 连接子 linker 的氨基酸序列为 (GGGGS)_n，n 为 1-4 的自然数，优选为 (GGGGS)₃。

进一步优选地，将构建好的载体转染到宿主细胞中，所述宿主细胞包含原核细胞、酵母或哺乳动物细胞，如 CHO 细胞、NSO 细胞或其他哺乳细胞，优选为 CHO 细胞。

进一步优选地，所述双特异性抗体用于 EGFR 高表达或非正常表达的肿瘤组织的治疗及其他 EGFR 过表达引起疾病的治疗。

具体实施例 1、双特异抗体分子的表达载体的构建

a) 双特异瞬时表达载体构建

按照图 1 中双特异抗体的形式设计相应的基因序列。选择 PTSE 作为表达载体去克隆和表达抗 EGFR 的轻链基因和抗 EGFR 重链—CD3 的 ScFV 融合基因。轻链基因和融合基因分别在编码区序列两侧加入 Sall、BamHI 酶切位点，两条基因由中美泰和生物技术(北京)有限公司合成并分别克隆到 PUC19 载体中。将两个质粒分别转化到 TOP 感受态(汇天东方, 货号 HT702-03)中, 用康为世纪小提试剂盒(货号 CW0500)进行小提后与载体分别用限制性内切酶 Sall-HF 和 BamHI-HF 酶切, 进行同源重组, 分别得到含有轻链及融合基因的表达载体(示意图见图 2A 和图 2B), 质粒分别命名为: PTSE-JY016L-TetBiAb、PTSE-JY016H-TetBiAb。

b) 双特异稳转表达载体构建

选择 PGN-2CMV 作为表达载体去克隆和表达抗 EGFR 的轻链基因和抗 EGFR 重链—CD3 的 ScFV 融合基因, 该载体包括筛选标记 Neomycin 和 GS, 含有两个 CMV 启动子及相应的结构单元。设计轻链及融合基因的引物并引入 Kozak 序列、信号肽及相应的酶切位点, 由中美泰和生物技术(北京)有限公司进行合成。以质粒 PTSE-JY016L-TetBiAb、PTSE-JY016H-TetBiAb 为模板, PCR 扩增出相应的条带并与载体进行同源重组(质粒图谱见图 2C)。

具体实施例 2、双特异抗体分子的表达与纯化

a) 四价抗体的表达

利用无内毒素大提试剂盒(康为世纪, CW2104)进行质粒大提, 具体操作步骤按照试剂盒提供的说明书进行操作。

人胚肾细胞(HEK293ES 悬浮细胞)在 FreeStyle 293 Expression Medium(Gibco, 12338-026)中培养, 细胞每隔一到两天传代一次, 传代后细胞起始密度维持在 $0.2 \sim 0.6 \times 10^6/\text{ml}$, 细胞培养体积为摇瓶容积的 15~35%, 细胞培养瓶放在摇床(摇床

转速:135rpm, 温度:37°C, CO₂:5%)中培养。转染前一天, 将处于对数生长期, 生长状态良好的 HEK293ES 细胞, 传代到细胞密度为 0.5×10⁶/ml, 放摇床 (135rpm, 37°C, 5%CO₂) 培养过夜, 待第二天进行转染。

转染前将准备好的 1×10⁶/ml 细胞悬液在摇床 (135rpm, 39°C, 5%CO₂) 培养 2h, 转染时, 依次加入 PTSE-antiEGFR-H-TetBiAb (终浓度 0.5 μg/ml)、PTSE-antiEGFR-L (终浓度 0.5 μg/ml)、聚乙烯亚胺 PEI (Sigma) (终浓度 2ug/ml), 混匀, 一起共转染到 HEK293ES 悬浮细胞中, 之后, 置于摇床 (135rpm, 39°C, 5%CO₂) 培养 40min。转染后的细胞继续在 135rpm, 37°C, 5% CO₂ 摇床中培养, 表达抗 EGFR×CD3 的四价抗体。转染 96 小时后离心收获表达上清。

b) 四价双特异抗体的纯化

表达上清用 0.22μm 滤膜过滤, 利用亲和层析柱从表达上清中获得带有 Fc 结构域的抗体。平衡缓冲液和洗脱缓冲液分别为 50mM Tris-HCl 0.15M NaCl PH7.0 和 0.1M 柠檬酸-柠檬酸钠 PH3.0。通过阳离子交换层析获得目标双特异抗体, 阳离子交换柱为 HiTrap SP FF, 通过平衡缓冲 20mM PB PH6.3 平衡 SP 层析柱, 用洗脱缓冲液 20mMPB+1M NaCl (PH6.3) 进行洗脱, 最后用 PBS 缓冲液进行换液浓缩。纯化后的双特异分子还原 SDS-PAGE 如图 3 所示。其中 Bispecific-1 的 EGFR 抗体序列为尼妥珠单抗 (nimotuzumab) 序列; Bispecific-2 的 EGFR 抗体序列为西妥昔单抗 (Cetuximab); Bispecific-3 的 EGFR 抗体序列为帕尼单抗 (Panitumumab)。

具体实施例 3: 双特异抗体分子与 CD3 和 EGFR 分子结合情况

用 pH9.6 的碳酸盐缓冲液包被 EGFR 胞外区或者 CD3E 与 CD3G 亚基胞外区的二聚体, 100ng/孔/100ul, 4°C 包被过夜。用 300ul/孔含 0.1%的 PBS (PBS-T) 缓冲液洗五次, 再加入 1%BSA-PBS

溶液在室温封闭 2h。加入不同稀释度的双特异抗体或者是对应的抗体。各种双特异抗体(或抗体)最高浓度是 1 μ M, 3 倍稀释做 10 个梯度, 最后一个孔只加稀释液 PBS 作为阴性对照, 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。用 300 μ l/孔 PBS-T 溶液洗五次, 再加入用 1%BSA-PBS 溶液 1:40000 稀释的 Anti-Human Fc-HRP 二抗 37 $^{\circ}$ C 孵育 1h。用 100 μ l/孔的 TMB 显色试剂盒显色, 室温显色 8min, 然后用 2M H₂SO₄ 终止显色, 50 μ l/孔, 450nm/630nm 读数。实验结果如图 4 所示, 所有双特异抗体结合 EGFR 的能力均与其对应的单抗能力相似[即由尼妥珠单抗序列构建的双特异抗体结合 EGFR 的能力与尼妥珠单抗的相似(图 4A); 由西妥昔单抗序列构建的双特异抗体结合 EGFR 的能力与西妥昔单抗的相似(图 4B); 由帕尼单抗序列构建的双特异抗体结合 EGFR 的能力与帕尼单抗的相似(图 4C)]; 而各种双特异抗体结合 CD3E 和 CD3G 二聚体的能力相近(图 4D)。结果表明了文中采用的双特异抗体的形式几乎完整的保留了原先抗体结合抗原的能力; 而且 CD3 的 ScFv 结合 CD3 的能力与其连接的不同抗体无关(图 4D)。

具体实施例 4、双特异抗体分子与过表达 EGFR 或 CD3 细胞结合情况

a) 双特异性抗体与 A431 细胞的结合情况

本发明采用过表达 EGFR 的肿瘤细胞系(A431)来检测不同的双特异抗体与细胞表面 EGFR 的结合情况, 采用相对应的抗体做阳性对照, 用人的 IgG(hIgG)作为同型对照。用 0.25%胰酶消化、离心收集 A431 细胞。同时稀释各种抗体, 最高浓度为 1 μ M, 3 倍梯度稀释。将收集的细胞用 PBS+1%BSA 洗三遍, 再加 PBS+1%BSA 重悬细胞, 然后铺细胞于 96 孔板中, 每孔 1×10^5 个细胞, 加入 100 μ l 稀释好的双特异性抗体, 室温孵育 1 小时; 离心去上清, 用 PBS 洗细胞三遍, 再用稀释好的 Alexa488 标记的抗人 IgG-Fc 抗体重悬细胞, 室温避光孵育 1 小时, PBS 洗三遍, 再用 100 μ l

PBS 重悬，用流式细胞仪检测荧光强度。结果用 Graphpad Prism 分析。结果显示（图 5），每种双特异抗体与 A431 的结合能力与其对应的抗体具有可比性，而 hIgG 与 A431 的结合力很弱。证明双特异抗体较好的保持了其母本抗体的特异结合细胞表面 EGFR 特异结合的活性。

b) 双特异抗体与 Jurkat 细胞结合情况

Jurkat 细胞过表达 CD3，可以用来检测双特异抗体与细胞表面 CD3 的结合情况。双特异抗体与 Jurkat 细胞结合情况实验过程与实施例 4a 类似，区别在于 Jurkat 细胞是悬浮细胞，而 A431 是贴壁细胞。离心收集 Jurkat 细胞，加入各种抗体，其余操作与 A431 实验相同。结果显示（图 6），同型对照结合 Jurkat 的能力很弱；不同的双特异抗体均能够很好的结合细胞，而且三种双特异抗体结合 Jurkat 细胞的能力一致，表明了图 1 的双特异抗体中抗 CD3 的 ScFv 结合细胞表面抗原的能力不受与它连接的抗体影响。

具体实施例 5、双特异抗体分子介导的 PBMC 对效应细胞的杀伤作用

a) A431 或 H520 细胞 PKH26 标记

A431 是一种过表达 EGFR 的肿瘤细胞株；而 H520 则不表达 EGFR。本实验采用 A431 作为实验细胞株；而 H520 作为阴性对照。

取 2×10^6 个细胞于 1.5ml 离心管中 1500rpm 离心 5min，弃完全培养基，用无血清的培养基分别清洗细胞两次；用 PKH26 试剂盒中的 Diluent C 溶液重悬细胞，然后加入等体积的 2×P KH26 染料液（配制比例：0.4μl 染料原液溶于 100μl 的 Diluent C），混匀后室温放置 1min。反应结束后，立即加入与管中溶液等体积的 0.5% BSA-PBS 溶液终止反应，再加入 1ml 相应的完全培养基稀释重悬细胞，1500rpm 离心 5min 收集细胞沉淀。用完全培养基重

悬后与细胞培养瓶中培养待用。

b) PBMC 分离

在 50ml 管中加入 20ml 单个核细胞分离液；用全血稀释液将采集到的血液按 1:1 进行稀释处理，混匀后沿康宁管内壁匀速缓慢的铺至分离液上层，每管内加入稀释后全血体积为 20ml；待各管加液完毕后放入提前预冷至 22℃的离心机内，600g 水平离心 15min（加减速设置为 1）；离心完成后取出离心管，用移液器小心吸取置于分离液和血清间呈圆弧状分布的细胞层—单个核细胞（PBMC），置于新的 50ml 管中；按照 1:5 比例在细胞液中加入细胞洗涤液，充分混匀后离心，弃上清，再重复洗涤一次，收集细胞沉淀，用 RPMI-1640 培养基重悬，培养于细胞瓶中待用。

c) CD3+ T 细胞磁珠分选

PBS (Ph7.2, 含 0.5% BSA, 2mM EDTA), 过滤除菌, 同时避免产生气泡。

离心去血小板（20 度，200g，10-15 分钟），然后 30 μ m 滤膜去除细胞团块。收集 PBMC 细胞：200g 离心 10 分钟，弃上清。2 $\times 10^7$ 细胞重悬于 60 μ l buffer + 20 μ l FcR Blocking Reagent 中。加入 20 μ l 磁珠，混匀，2-8℃ 孵育 15 分钟；加入 1-2ml buffer，300g，离心 10 分钟，弃尽上清；500 μ l 重悬。将分选柱置于分选架上，500 μ l 润洗；加入细胞悬液，收集未结合细胞；柱体顶端液体流尽后，500 μ l 洗三次；将分选柱从分选架上取下，置于收集管中，1ml 快速冲洗，收集细胞，计数并观察活细胞比例。

d) 双特异抗体效应功能检测

按照终浓度 1 μ M 起，1:3 倍比稀释，10 梯度，2 复孔；同时设立 2 个无药物对照孔，用培养基补足体积，将标记后的 A431 或 H520 细胞（2 $\times 10^4$ 个/孔/50 μ l）与 CD3+T 细胞（2 $\times 10^5$ 个/孔/50 μ l），按照所需用量混匀后分至 V-bottom 96 孔板各孔，同时设立以下三个流式对照孔：①无标记的 Raji 细胞（2 $\times 10^4$ 个/孔）②PKH26 标记后的细胞（2 $\times 10^4$ 个/孔）；③CD3+T 细胞（2 $\times 10^5$ 个/孔）。

培养 18 小时，孵育结束后按照 1:50000 的比例加入 T0-PR03 染料，37°C 避光孵育 10min；同时设立一个流式对照④T0-PR03 标记后的细胞。3000rpm 离心 5min 后弃部分培养基上清，用 0.5% BSA-PBS 溶液重悬，流式检测。

计算公式：

细胞死亡率% = $(1 - \text{PKH26}^+ \text{T0PR03}^- \text{细胞数目 (药物作用组)} / \text{PKH26}^+ \text{T0PR03}^- \text{细胞数目 (无药物作用组)}) \times 100$

e) 结果分析

由图 7 可知，双特异抗体分子介导的 PBMC 对过表达 EGFR 的 A431 效应细胞有非常好的杀伤作用；而他们对应的抗体和 hIgG 则杀伤效果很弱。同时所有的双特异抗体对不表达 EGFR 的 H520 细胞杀伤效果都非常弱，且与同型对照 hIgG 类似（图 8）。这表明了所有构建的双特异抗体对靶细胞的杀伤作用是特异的；三种不同的双特异抗体杀伤特异性靶细胞的能力相似，而且细胞死亡率在 80% 左右。以上表明了图 1 中双特异抗体具有良好的生物学活性。

以上所述仅为本发明的优选实施例而已，并不用于限制本发明，对于本领域的技术人员来说，本发明可以有各种更改和变化。凡在本发明的精神和原则之内，所作的任何修改、等同替换、改进等，均应包含在本发明的保护范围之内。

权 利 要 求 书

1、一种双特异性抗体，其特征在于，包含 (a) 完整的单克隆抗体、(b) 单链抗体 ScFv 和 (c) 连接子；所述 (a) 与 EGFR 抗原特异性结合并且由两条抗体重链和两条抗体轻链组成；所述 (b) 与免疫细胞抗原 CD3 特异性结合，所述 (b) 为两条单链抗体 ScFv；所述 (b) 的两条单链抗体 ScFv 分别通过所述 (c) 连接子 linker 与所述 (a) 的两条重链的 C 末端连接。

2、根据权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述 (c) 连接子 linker 的氨基酸序列为 (GGGGX) n ，其中 X 为 Gly 或 Ser； n 为 1-4 的自然数。

3、根据权利要求 2 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述 X 为 Ser；所述 n 为 3。

4、根据权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述 (a) 完整的单克隆抗体的重链可变区和轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO 1 和 SEQ ID NO 4、SEQ ID NO 2 和 SEQ ID NO 5 或 SEQ ID NO 3 和 SEQ ID NO 6 三种组合中的一种。

5、根据权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述 (b) 两条单链抗体 ScFv 的氨基酸序列均为 SEQ ID NO 7。

6、根据权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述 (b) 单链抗体 ScFv 的重链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO 8，所述 (b) 单链抗体 ScFv 的轻链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID NO 9。

7、根据权利要求 1 所述的双特异性抗体，其特征在于，所述 (a) 完整的单克隆抗体的重链恒定区为 IgG1、IgG2、IgG3 或 IgG4 中的一种。

8. 一种抗体、多肽或蛋白，其特征在于，所述抗体、多肽或蛋白包含权利要求 1-7 任一所述的双特异性抗体。

9. 一种多核苷酸序列或其组合，其特征在于，所述多核苷酸序列或其组合编码包含权利要求 1-7 任一所述的双特异性抗体。

10. 一种重组 DNA 表达载体，其特征在于，所述重组 DNA 表达载体包含权利要求 9 所述的多核苷酸序列或其组合。

11. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞在转染如权利要求 10 所述的重组 DNA 表达载体时用到；所述宿主细胞包含原

核细胞、酵母或哺乳动物细胞。

12. 一种药物或药物组合物，其特征在于，所述药物或药物组合物包含如权利要求 1-7 任一所述的双特异性抗体。

13. 根据权利要求 1-7 任一所述的双特异性抗体在制备治疗 EGFR 抗原特异性表达引起的肿瘤疾病或其他疾病的药物中的用途。

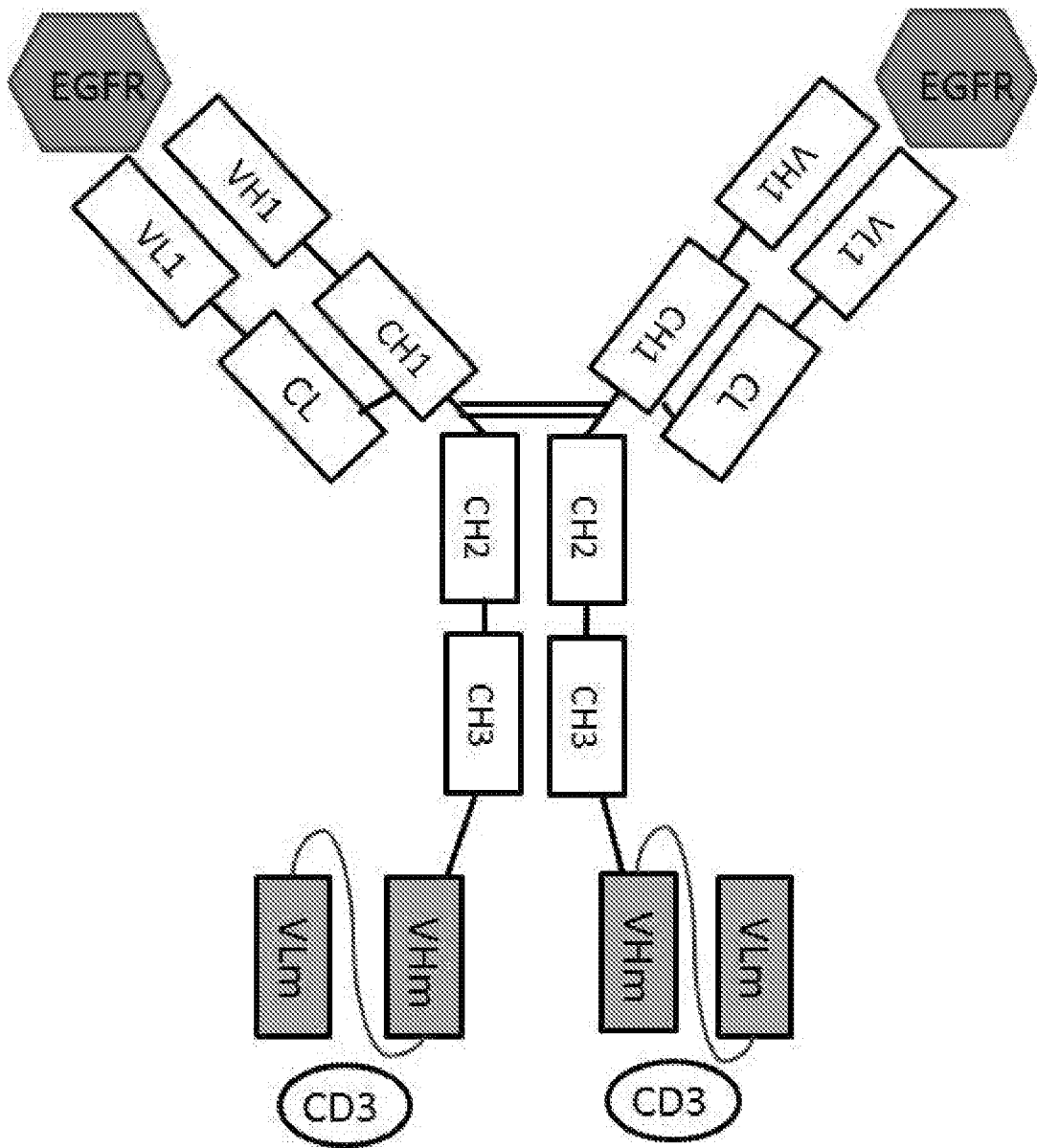


图 1

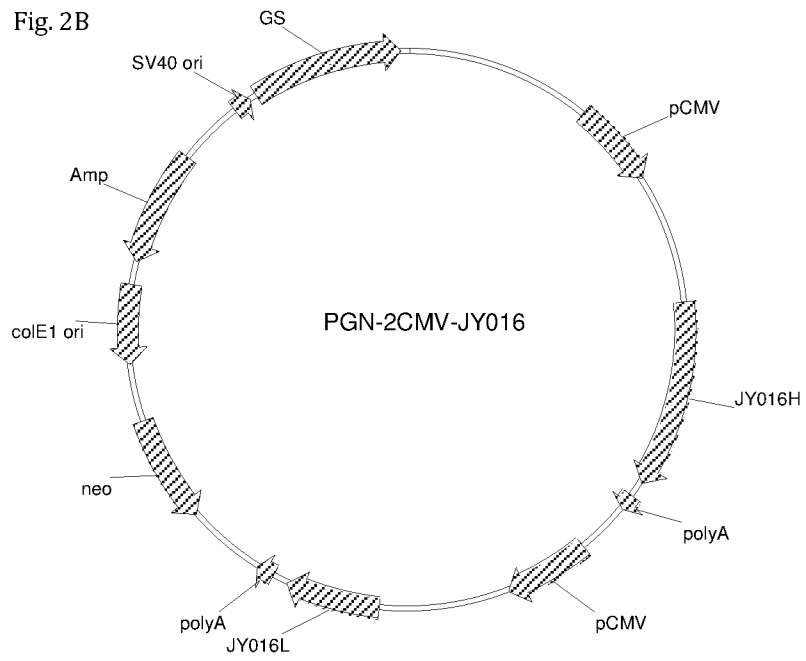
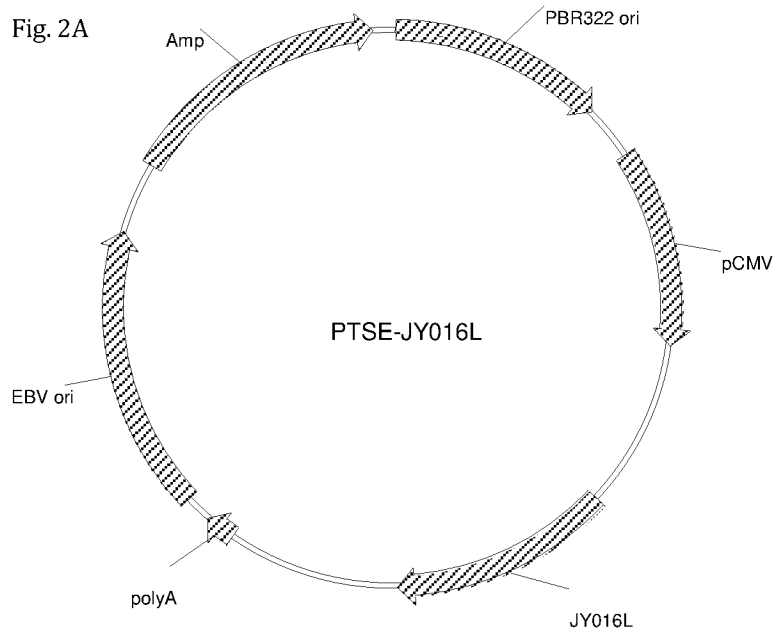


Fig. 2C

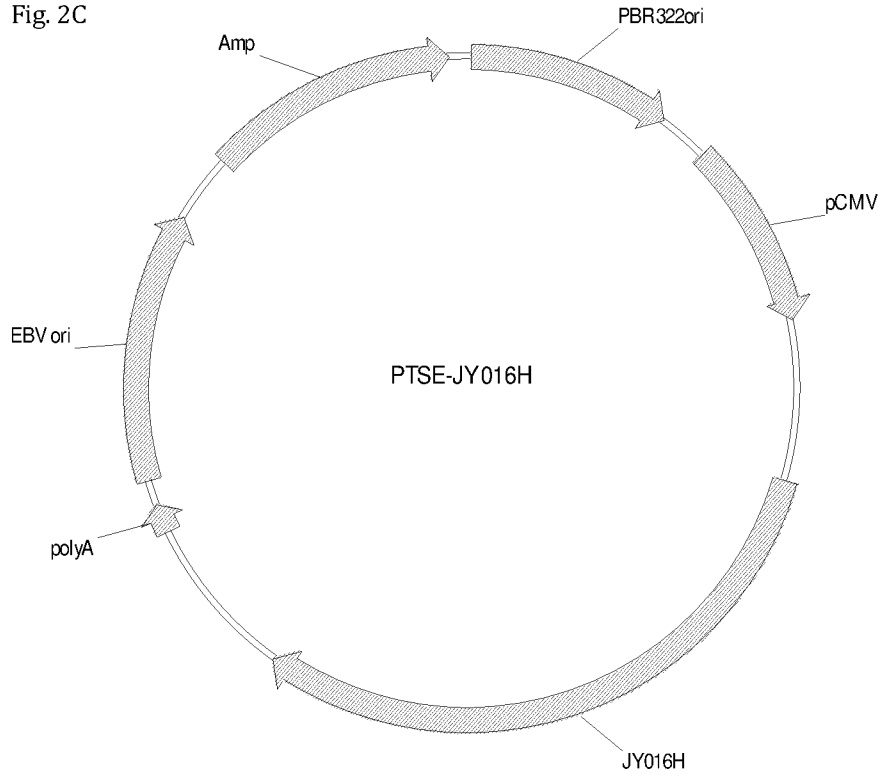


图 2

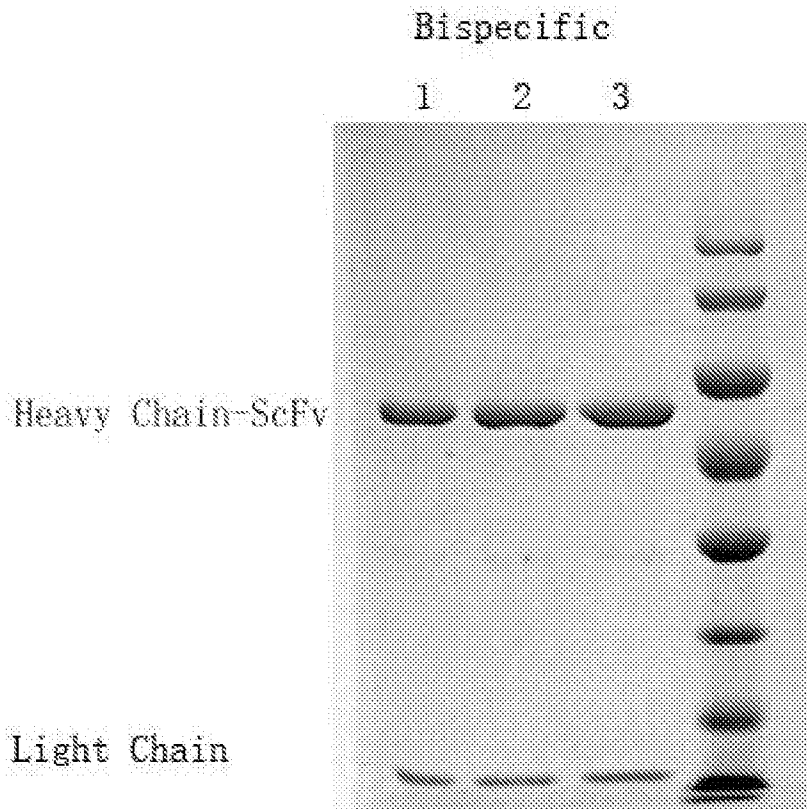


图 3

Fig. 4A

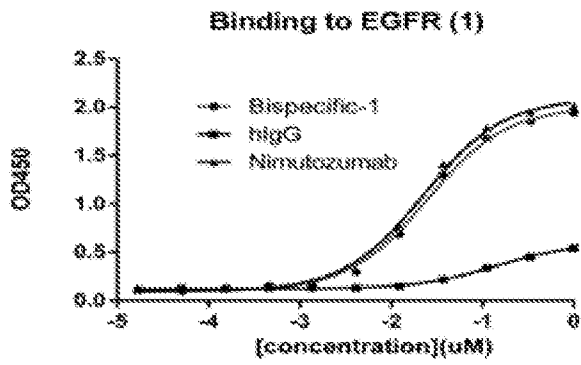


Fig. 4B

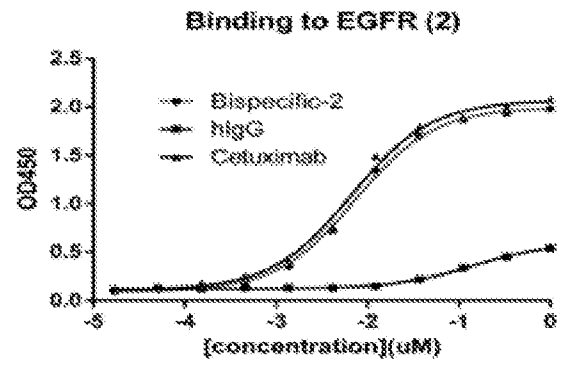


Fig. 4C

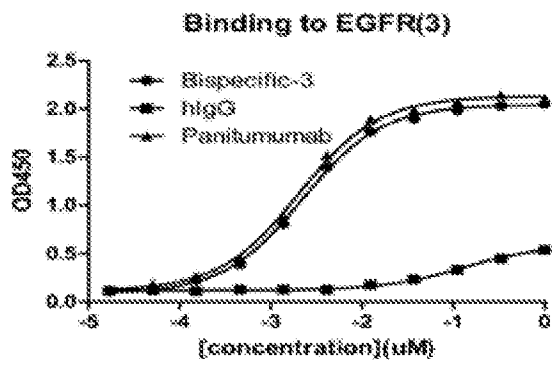


Fig. 4D

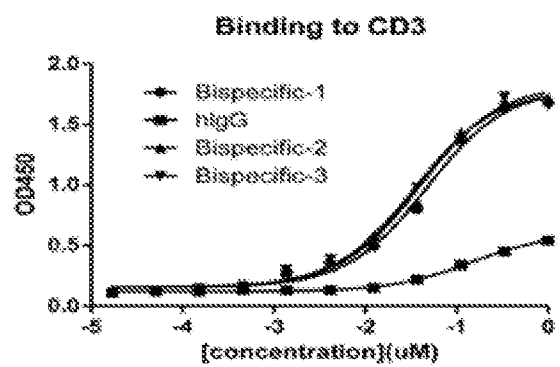


图 4

Fig. 5A

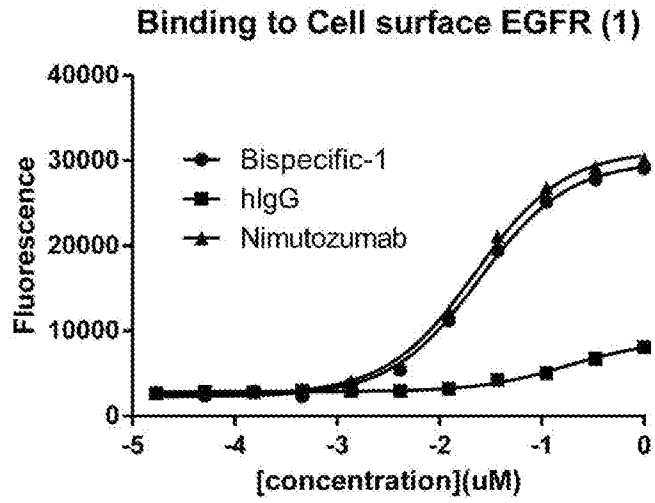


Fig. 5B

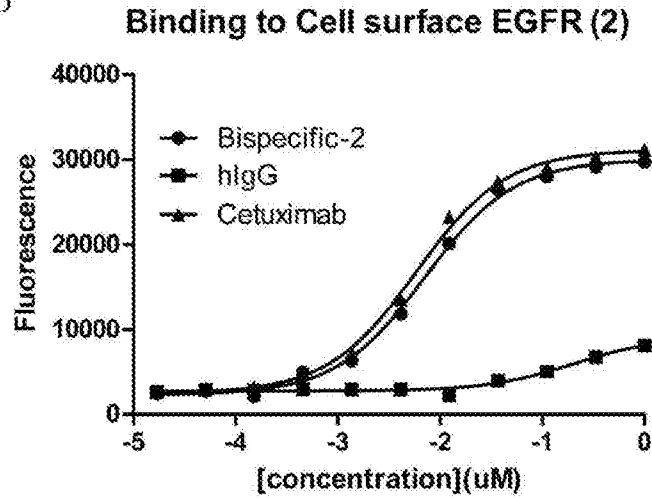


Fig. 5C

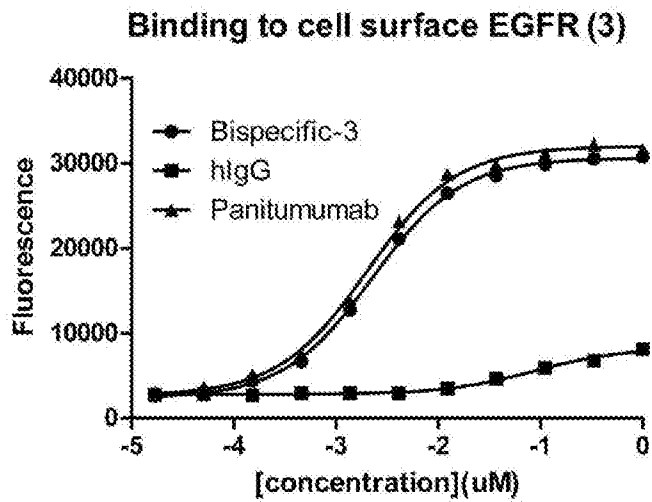


图 5

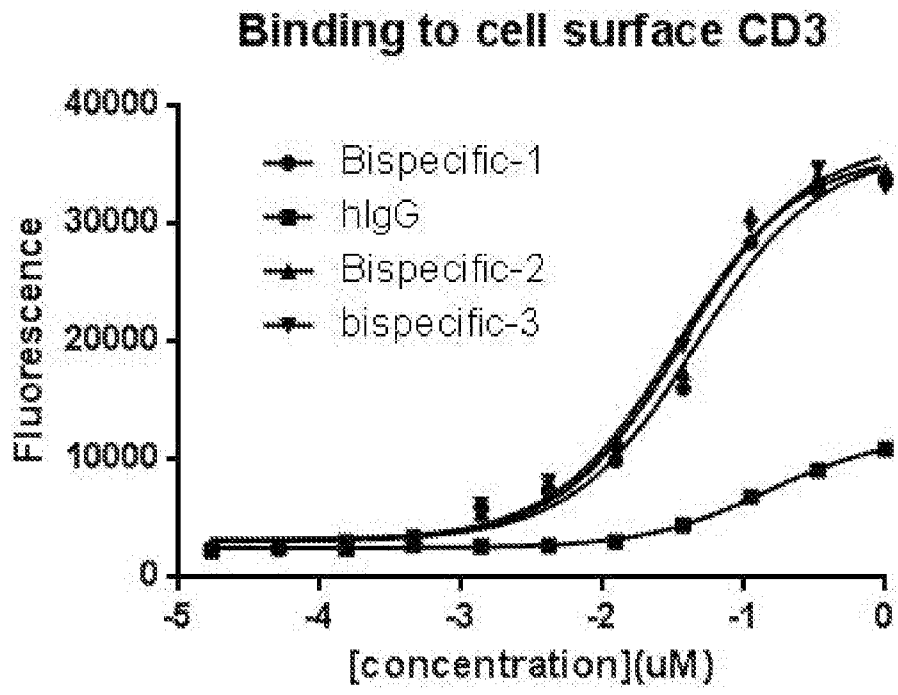


图 6

Fig 7A

PBMC对A431杀伤实验(1)

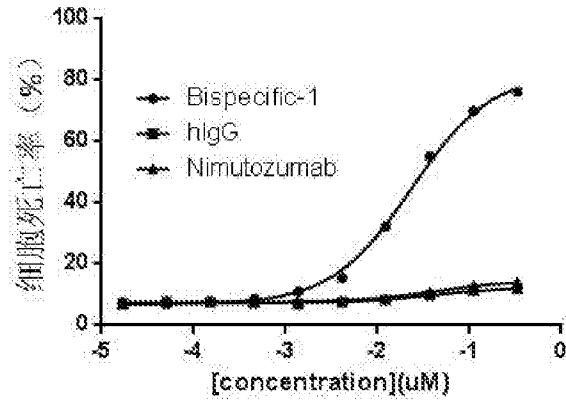


Fig 7B

PBMC对A431杀伤实验(2)

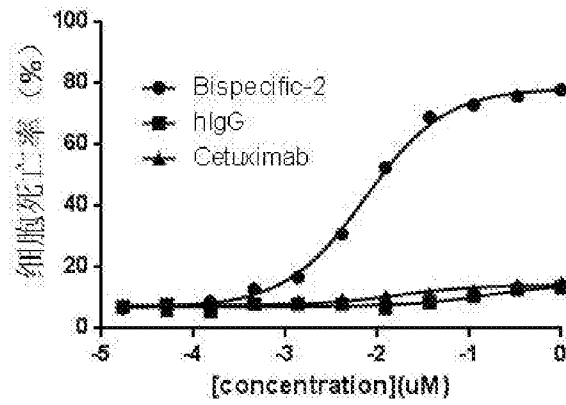


Fig 7C

PBMC对A431杀伤实验(3)

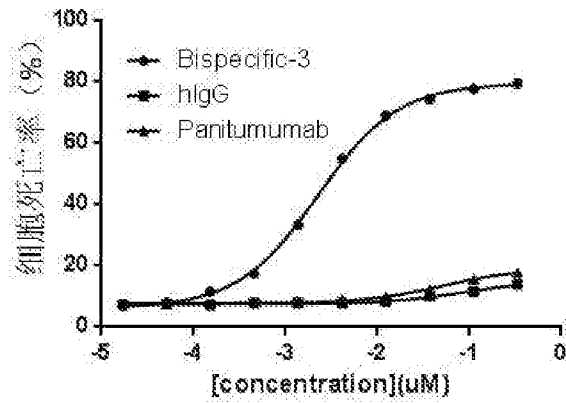


图 7

PBMC对H520杀伤实验

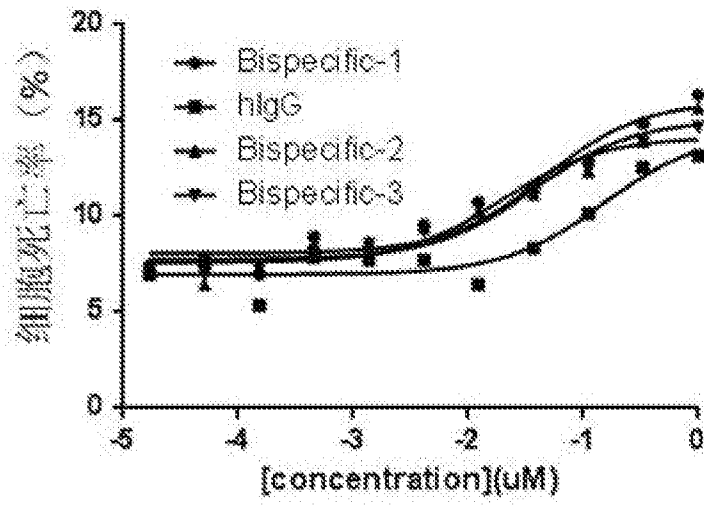


图 8

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2017/103896

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/46 (2006.01) i; C07K 16/30 (2006.01) i; C07K 16/28 (2006.01) i; C12N 15/13 (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)

CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; VEN; CNKI; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; Pubmed; NCBI Genbank; EBIEMBL; Google; sequences 1-9, 双特异性抗体, 四价, 连接子, IgG, scFv, EGFR, CD3, bispecific antibody, tetravalent, IgG-scFv, linker

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
PX	CN 106632681 A (BEIJING DONGFANG BIOTECH CO., LTD. et al.) 10 May 2017 (10.05.2017), claims 1-12	1-13
X	WO 2016115274 A1 (COMPASS THERAPEUTICS LLC.) 21 July 2016 (21.07.2016), description, figure 11A, and paragraphs, [0020], [0023], [0025], [0028], [0256], [0275], [0316], [0317], [0319], [0376] and [0383]	1-3, 7-13
Y	WO 2016115274 A1 (COMPASS THERAPEUTICS LLC.) 21 July 2016 (21.07.2016), description, figure 11A, and paragraphs, [0020], [0023], [0025], [0028], [0256], [0275], [0316], [0317], [0319], [0376] and [0383]	4-6, 8-13
Y	CN 104774268 A (WUHAN YZY BIOPHARMA CO., LTD.) 15 July 2015 (15.07.2015), description, paragraphs [0068], [0070], [0074], [0078], [0082] and [0086]	4-6, 8-13

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

* Special categories of cited documents:	“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
“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance	“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
“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date	“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
“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)	“&” document member of the same patent family
“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	

Date of the actual completion of the international search 01 December 2017	Date of mailing of the international search report 05 January 2018
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer GUO, Tingting Telephone No. (86-10) 62413879

INTERNATIONAL SEARCH REPORTInternational application No.
PCT/CN2017/103896

C (Continuation). DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 1133886 A (CENTRO INMUNOLOGIA MOLECULAR) 23 October 1996 (23.10.1996), description, and figure 1	4, 8-13
A	WO 2005004809 A2 (IMMUNOMEDICS, INC.) 20 January 2005 (20.01.2005), entire document	1-13
A	CN 104341504 A (BIO-THERA SOLUTIONS LTD.) 11 February 2015 (11.02.2015), entire document	1-13
A	CN 104203981 A (SYNIMMUNE GMBH) 10 December 2014 (10.12.2014), entire document	1-13
A	US 2012189630 A1 (DUKE UNIVERSITY) 26 July 2012 (26.07.2012), entire document	1-13
A	REUSCH, U. et al. Anti-CD3XAnti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Bispecific Antibody Redirects T-Cell Cytolytic Activity to EGFR-Positive Cancers In vitro and in an Animal Model. Clin. Cancer Res. 01 January 2006 (01.01.2006), 12(1), pp. 183-190	1-13
A	ASANO, R. et al. Highly Enhanced Cytotoxicity of a Dimeric Bispecific Diabody, the hEx3 Tetrabody. THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY. 02 July 2010 (02.07.2010), 285(27), pp. 20844-20849	1-13

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/103896

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 106632681 A	10 May 2017	None	
WO 2016115274 A1	21 July 2016	AU 2016206707 A1	10 August 2017
		WO 2016115274 A8	17 August 2017
		CA 2973720 A1	21 July 2016
CN 104774268 A	15 July 2015	None	
CN 1133886 A	23 October 1996	CU 22615 A1	10 February 2000
		PT 699755 T	30 September 2004
		DE 69532940 D1	03 June 2004
		EP 0699755 A2	06 March 1996
		US 5712120 A	27 January 1998
		EP 0699755 A3	12 June 1996
		PT 699755 E	30 September 2004
		CA 2153135 A1	31 December 1995
		CA 2153135 C	07 June 2005
		DE 69532940 T2	25 May 2005
		JP H08280387 A	29 October 1996
		EP 0699755 B1	28 April 2004
		DK 0699755 T3	30 August 2004
		CN 1279168 C	11 October 2006
		JP 3238049 B2	10 December 2001
ES 2220918 T3	16 December 2004		
AT 265531 T	15 May 2004		
WO 2005004809 A2	20 January 2005	US 2011223645 A1	15 September 2011
		CA 2531118 A1	20 January 2005
		IL 172843 A	30 July 2015
		EP 1638510 B1	02 September 2015
		IL 172843 D0	11 June 2006
		US 2009252731 A1	08 October 2009

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/103896

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		WO 2005004809 A3	02 February 2006
		EP 1638510 A4	11 June 2008
		US 8188239 B2	29 May 2012
		AU 2004255216 B2	19 August 2010
		JP 2007527391 A	27 September 2007
		US 2005100543 A1	12 May 2005
		EP 1638510 A2	29 March 2006
		US 7951921 B2	31 May 2011
		KR 20060041205 A	11 May 2006
		JP 5026072 B2	12 September 2012
		CA 2531118 C	08 January 2013
		AU 2004255216 A1	20 January 2005
CN 104341504 A	11 February 2015	CN 104341504 B	24 October 2017
		US 9567403 B2	14 February 2017
		WO 2015018306 A1	12 February 2015
		US 2015044216 A1	12 February 2015
CN 104203981 A	10 December 2014	US 2015119555 A1	30 April 2015
		JP 2015502373 A	22 January 2015
		ES 2628075 T3	01 August 2017
		SI 2794658 T1	31 May 2017
		HR P20170658 T1	30 June 2017
CA 2859767 A1	27 June 2013	WO 2013092001 A1	27 June 2013
		EP 2794658 A1	29 October 2014
		US 9718893 B2	01 August 2017
		LT 2794658 T	10 May 2017
		SI EP2794658 T1	31 May 2017
		EA 201400709 A1	31 August 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2017/103896

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
		DK 2794658 T3	19 June 2017
		EP 2794658 B1	15 March 2017
US 2012189630 A1	26 July 2012	US 9249217 B2	02 February 2016

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 16/46(2006.01)i; C07K 16/30(2006.01)i; C07K 16/28(2006.01)i; C12N 15/13(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>CPRSABS; CNABS; DWPI; SIPOABS; VEN; CNKI; CNTXT; WOTXT; EPTXT; USTXT; Pubmed; NCBI Genbank; EBI-EMBL; Google; 序列1-9, 双特异性抗体, 四价, 连接子, IgG, scFv, EGFR, CD3, bispecific antibody, tetravalent, IgG-scFv, linker</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>PX</td> <td>CN 106632681 A (北京东方百泰生物科技有限公司 等) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 权利要求1-12</td> <td>1-13</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>WO 2016115274 A1 (COMPASS THERAPEUTICS LLC) 2016年 7月 21日 (2016 - 07 - 21) 说明书附图11A, 说明书第20、23、25、28、256、275、316-317、319、376、383段</td> <td>1-3, 7-13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>WO 2016115274 A1 (COMPASS THERAPEUTICS LLC) 2016年 7月 21日 (2016 - 07 - 21) 说明书附图11A, 说明书第20、23、25、28、256、275、316-317、319、376、383段</td> <td>4-6, 8-13</td> </tr> <tr> <td>Y</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) 说明书第68、70、74、78、82、86段</td> <td>4-6, 8-13</td> </tr> <tr> <td>Y</td> <td>CN 1133886 A (分子免疫中心) 1996年 10月 23日 (1996 - 10 - 23) 说明书附图1</td> <td>4, 8-13</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>WO 2005004809 A2 (IMMUNOMEDICS, INC.) 2005年 1月 20日 (2005 - 01 - 20) 全文</td> <td>1-13</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	PX	CN 106632681 A (北京东方百泰生物科技有限公司 等) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 权利要求1-12	1-13	X	WO 2016115274 A1 (COMPASS THERAPEUTICS LLC) 2016年 7月 21日 (2016 - 07 - 21) 说明书附图11A, 说明书第20、23、25、28、256、275、316-317、319、376、383段	1-3, 7-13	Y	WO 2016115274 A1 (COMPASS THERAPEUTICS LLC) 2016年 7月 21日 (2016 - 07 - 21) 说明书附图11A, 说明书第20、23、25、28、256、275、316-317、319、376、383段	4-6, 8-13	Y	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) 说明书第68、70、74、78、82、86段	4-6, 8-13	Y	CN 1133886 A (分子免疫中心) 1996年 10月 23日 (1996 - 10 - 23) 说明书附图1	4, 8-13	A	WO 2005004809 A2 (IMMUNOMEDICS, INC.) 2005年 1月 20日 (2005 - 01 - 20) 全文	1-13
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																					
PX	CN 106632681 A (北京东方百泰生物科技有限公司 等) 2017年 5月 10日 (2017 - 05 - 10) 权利要求1-12	1-13																					
X	WO 2016115274 A1 (COMPASS THERAPEUTICS LLC) 2016年 7月 21日 (2016 - 07 - 21) 说明书附图11A, 说明书第20、23、25、28、256、275、316-317、319、376、383段	1-3, 7-13																					
Y	WO 2016115274 A1 (COMPASS THERAPEUTICS LLC) 2016年 7月 21日 (2016 - 07 - 21) 说明书附图11A, 说明书第20、23、25、28、256、275、316-317、319、376、383段	4-6, 8-13																					
Y	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) 说明书第68、70、74、78、82、86段	4-6, 8-13																					
Y	CN 1133886 A (分子免疫中心) 1996年 10月 23日 (1996 - 10 - 23) 说明书附图1	4, 8-13																					
A	WO 2005004809 A2 (IMMUNOMEDICS, INC.) 2005年 1月 20日 (2005 - 01 - 20) 全文	1-13																					
<p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。</p> <p><input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>																							
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <p>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</p> <p>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</p> <p>“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)</p> <p>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</p> <p>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</p> <p>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</p> <p>“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</p> <p>“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</p> <p>“&” 同族专利的文件</p>																							
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2017年 12月 1日</p>		<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2018年 1月 5日</p>																					
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>		<p>受权官员</p> <p>郭婷婷</p> <p>电话号码 (86-10)62413879</p>																					

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	CN 104341504 A (百奥泰生物科技广州有限公司) 2015年 2月 11日 (2015 - 02 - 11) 全文	1-13
A	CN 104203981 A (合成免疫股份有限公司) 2014年 12月 10日 (2014 - 12 - 10) 全文	1-13
A	US 2012189630 A1 (DUKE UNIVERSITY) 2012年 7月 26日 (2012 - 07 - 26) 全文	1-13
A	REUSCH, U. 等. "Anti-CD3×Anti-Epidermal Growth Factor Receptor (EGFR) Bispecific Antibody Redirects T-Cell Cytolytic Activity to EGFR-Positive Cancers In vitro and in an Animal Model." Clin. Cancer Res., 第12卷, 第1期, 2006年 1月 1日 (2006 - 01 - 01), 第183-190页	1-13
A	ASANO, R. 等. "Highly Enhanced Cytotoxicity of a Dimeric Bispecific Diabody, the hEx3 Tetrabody." THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY., 第285卷, 第27期, 2010年 7月 2日 (2010 - 07 - 02), 第20844-20849页	1-13

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/103896

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	106632681	A	2017年 5月 10日	无			
WO	2016115274	A1	2016年 7月 21日	AU	2016206707	A1	2017年 8月 10日
				WO	2016115274	A8	2017年 8月 17日
				CA	2973720	A1	2016年 7月 21日
CN	104774268	A	2015年 7月 15日	无			
CN	1133886	A	1996年 10月 23日	CU	22615	A1	2000年 2月 10日
				PT	699755	T	2004年 9月 30日
				DE	69532940	D1	2004年 6月 3日
				EP	0699755	A2	1996年 3月 6日
				US	5712120	A	1998年 1月 27日
				EP	0699755	A3	1996年 6月 12日
				PT	699755	E	2004年 9月 30日
				CA	2153135	A1	1995年 12月 31日
				CA	2153135	C	2005年 6月 7日
				DE	69532940	T2	2005年 5月 25日
				JP	H08280387	A	1996年 10月 29日
				EP	0699755	B1	2004年 4月 28日
				DK	0699755	T3	2004年 8月 30日
				CN	1279168	C	2006年 10月 11日
				JP	3238049	B2	2001年 12月 10日
				ES	2220918	T3	2004年 12月 16日
				AT	265531	T	2004年 5月 15日
WO	2005004809	A2	2005年 1月 20日	US	2011223645	A1	2011年 9月 15日
				CA	2531118	A1	2005年 1月 20日
				IL	172843	A	2015年 7月 30日
				EP	1638510	B1	2015年 9月 2日
				IL	172843	D0	2006年 6月 11日
				US	2009252731	A1	2009年 10月 8日
				WO	2005004809	A3	2006年 2月 2日
				EP	1638510	A4	2008年 6月 11日
				US	8188239	B2	2012年 5月 29日
				AU	2004255216	B2	2010年 8月 19日
				JP	2007527391	A	2007年 9月 27日
				US	2005100543	A1	2005年 5月 12日
				EP	1638510	A2	2006年 3月 29日
				US	7951921	B2	2011年 5月 31日
				KR	20060041205	A	2006年 5月 11日
				JP	5026072	B2	2012年 9月 12日
				CA	2531118	C	2013年 1月 8日
				AU	2004255216	A1	2005年 1月 20日
CN	104341504	A	2015年 2月 11日	CN	104341504	B	2017年 10月 24日
				US	9567403	B2	2017年 2月 14日
				WO	2015018306	A1	2015年 2月 12日
				US	2015044216	A1	2015年 2月 12日
CN	104203981	A	2014年 12月 10日	US	2015119555	A1	2015年 4月 30日
				JP	2015502373	A	2015年 1月 22日
				ES	2628075	T3	2017年 8月 1日
				SI	2794658	T1	2017年 5月 31日
				HR	P20170658	T1	2017年 6月 30日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2017/103896

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)
		CA 2859767 A1	2013年 6月 27日
		WO 2013092001 A1	2013年 6月 27日
		EP 2794658 A1	2014年 10月 29日
		US 9718893 B2	2017年 8月 1日
		LT 2794658 T	2017年 5月 10日
		SI EP2794658 T1	2017年 5月 31日
		EA 201400709 A1	2016年 8月 31日
		DK 2794658 T3	2017年 6月 19日
		EP 2794658 B1	2017年 3月 15日
US 2012189630 A1	2012年 7月 26日	US 9249217 B2	2016年 2月 2日