

(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
2016 年 12 月 8 日 (08.12.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/192613 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 16/46 (2006.01) *A61K 39/395* (2006.01)
C12N 1/19 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)
C12N 1/21 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/084003
- (22) 国际申请日: 2016 年 5 月 31 日 (31.05.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
62/169,088 2015 年 6 月 1 日 (01.06.2015) US
201610251713.4 2016 年 4 月 20 日 (20.04.2016) CN
- (71) 申请人: 中山大学 (SUN YAT-SEN UNIVERSITY)
[CN/CN]; 中国广东省广州市番禺区外环东路 132 号, Guangdong 510006 (CN)。
- (72) 发明人: 王忠 (WANG, Zhong); 中国广东省广州市番禺区外环东路 132 号, Guangdong 510006 (CN)。
- (74) 代理人: 广州市天河区倪律专利代理事务所 (普通合伙) (WINGUAN PATENT AND TRADE-MARK ATTORNEYS); 中国广东省广州市天河区思成路 23 号 607, Guangdong 510663 (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, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, 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))。

(54) Title: BIVALENT ANTIBODY HAVING SINGLE-DOMAIN ANTIGEN-BINDING FRAGMENT FUSED TO CONVENTIONAL FAB FRAGMENT

(54) 发明名称: 具有融合至常规 Fab 片段的单域抗原结合片段的二价抗体

(57) Abstract: Provided is a bivalent antibody, comprising: (a) an antigen-binding fragment (Fab) comprising a light chain and a portion of a heavy chain of the antibody, and (b) a single-domain antigen-binding fragment (VHH) fused to a C terminal of the light chain or the portion of the heavy chain, wherein the portion of the heavy chain does not comprise a CH2 or CH3 domain.

(57) 摘要: 提供了一种二价抗体, 包含(a)包含了抗体的轻链和部分重链的抗原结合片段(Fab), 以及(b)融合至所述轻链或所述部分重链的 C 端的单域抗原结合片段(VHH), 其中所述部分重链不包含 CH2 或 CH3 域。



WO 2016/192613 A1

具有融合至常规 Fab 片段的单域抗原结合片段的二价抗体

相关申请的交叉引用

本申请要求 2015 年 6 月 1 日提交的美国临时专利申请 US 62/169,088 号和 2016 年 4 月 20 日提交的中国发明专利申请 201610251713.4 号的优先权。

技术领域

本发明涉及一种二价抗体，特别是具有融合至常规 Fab 片段的单域抗原结合片段的二价抗体。

背景技术

双特异抗体 (BsMAb, BsAb) 是由两种不同单克隆抗体的片段组成的人造蛋白，因而可结合到两种不同类型抗原。例如，在癌症免疫治疗中，经过工程化的 BsMAbs 同时结合至细胞毒性细胞及要被杀灭的靶标（如肿瘤细胞）。

至少三种类型的双特异抗体已经被提出或测试，包括三官能抗体、化学连接的 Fab 和双特异 T 细胞衔接体。为了克服制造上的难点，已经开发了被称作三官能抗体的第一代 BsMAb。它由两个重链和两个轻链组成，每个来自不同的抗体。这两个 Fab 区针对两种抗原。Fc 区由两个重链组成并形成第三个结合位点，由此得名。

已设计其他类型的双特异抗体来解决某些问题，例如，半衰期短、免疫原性和细胞因子释放引起的副作用。它们包括：仅由 Fab 区组成的化学连接的 Fab，以及各种类型二价及三价的单链可变区 (scFv)（模拟两种抗体可变结构域的融合蛋白）。最新开发的形式是双特异的 T 细胞衔接体 (BiTE) 及四官能的抗体。

虽然取得了这些进步，但是双特异抗体主要的挑战仍然存在，例如提高制造效率、保留免疫原性和维持半衰期。

发明内容

在一个实施方式中，本发明提供了二价或三价抗体，这种抗体包括常规的抗原结合片段 (Fab) 和一个或两个单域抗原结合 (VHH) 片段。每一个 Fab 和 VHH 具有对某种抗原的特异性，它们可能相同或不同。

在抗体生产和纯化中，这样的一种相对于常规抗体分子量减少的二价或三价抗体，呈现一个显著的优势。尽管它尺寸小，但出乎意料地，这样的抗体仍然能有效地结合到两个不同的抗原，实现它预期的生物学功能。尽管这些公开的双特异抗体是异质二聚体，已知它们不利于表达和生产，但同样出乎意料地，它们能在细菌细胞（例如 *E.coli*）轻易表

达，导致生成可溶性蛋白。相反，其他由 *E. coli* 生产的已知的双特异抗体几乎不溶。除此之外，因为 Fab 的重链和轻链不会与它们自己结合（即，重链结合重链或者轻链结合轻链），所以在生产中避免形成非预期的异质二聚体或至少使其最小化，导致预期的异质二聚体产量高。

因此，本发明的一个实施方式提供了一种二价抗体，所述二价抗体包含(a)包含抗体的轻链和部分重链的抗原结合片段(Fab)和(b)融合至所述轻链的或部分重链的 C-末端的单域抗原结合（VHH）片段，其中所述部分重链不包括 CH2 或 CH3 结构域。

在某些方面，VHH 片段融合至所述部分重链。在某些方面，该抗体进一步地包含融合至所述轻链的第二 VHH 片段。

在某些方面，Fab 片段和 VHH 片段每个都有对肿瘤细胞或者免疫细胞的特异性。在某些方面，所述 Fab 片段具有对肿瘤抗原的特异性，并且所述 VHH 片段具有对免疫细胞的特异性。在某些方面，所述肿瘤抗原选自 CEA、EGFR、Her2、EpCAM、CD20、CD30、CD33、CD47、CD52、CD133、CEA、gpA33、黏蛋白、TAG-72、CIX、PSMA、叶酸结合蛋白、GD2、GD3、GM2、VEGF、VEGFR、整合素、 α V β 3、 α 5 β 1、ERBB2、ERBB3、MET、IGF1R、EPHA3、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP 和腱生蛋白。在某些方面，所述肿瘤抗原是 CEA 或 Her2。

在某些方面，所述 VHH 片段有对哺乳动物 T 细胞或哺乳动物 NK 细胞的特异性。在某些方面，VHH 片段对选自 CD3、CD16、CD19、CD28 和 CD64 的抗原有特异性。在某些方面，所述抗原是 CD16 或 CD3。

在某些方面，所述 VHH 片段分别在 Kabat 位置 37、44、45 和 47 不包含 Val、Gly、Leu 和 Trp 残基。

在一个实施方式中，本发明还提供了包含一个或多个编码本发明的抗体的多核苷酸的宿主细胞。在某些方面，宿主细胞是细菌细胞或酵母细胞。在某些方面，宿主细胞是 *E. coli*。

在另一个实施方式中，本发明提供了一种制备可溶性抗体方法，所述方法包含使本发明的宿主以及收获在细胞中表达的抗体。

更进一步地，在一个实施方式中，本发明提供一种治疗患者中的肿瘤的方法，该方法包括给所述患者施用本发明的抗体。

附图说明

图 1a 为一种二价抗体，所述抗体包括抗原结合片段(Fab)和单域抗原结合片段(VHH)。此 Fab 片段包括具有可变域(VH)和恒定域(CH1)的部分重链，以及具有可变域(VL)和恒定域(CL)的轻链。重链和轻链由二硫键连接。VHH 片段融合至重链的 C 端。

图 1b 为一种三价抗体，这种抗体包括抗原结合片段(Fab)和两个单域抗原结合片段(VHH 和 VHH')。所述 Fab 片段包括具有可变域(VH)和恒定域(CH1)的部分重链，以及具有可变域(VL)和恒定域(CL)的轻链。重链和轻链由二硫键连接。VHH 和 VHH'片段各自融合至重链和轻链的 C 端。

图 2a-f 展示了双特异抗体 S-Fab 设计和制备。(a)单链的细菌表达结构。此结构包含：PelB 信号序列、人源化抗 CD3 (UTCH1 克隆) VH 或 VL、CH1 或 CL、以及抗 CEA VHH。Flag 标签或 his8 标签被加至 C 端，以助于蛋白检测和纯化。(b)通过共表达的对照 Fab (HCBF4/5) 和 S-Fab (HCB5/6) 的方案。(c)和(b)，SDS-PAGE 考马斯蓝染色及免疫印迹检测经固定化 Ni-NTA 亲和层析后的纯化蛋白。上图，Ni-NTA 亲和层析法 (M, 分子量梯; SF, 蔗糖组分; PF, 周质组分; P, 微孔球; FT, 穿透液; W, 洗液; E, 洗脱液; E1,100nM 咪唑, E2,200nM 咪唑, E3, 300nM 咪唑, E4,400nM 咪唑)。箭头表明纯化的 HCBF4/5 (左) 和 HCBF5/6 (右); 中图, 免疫印迹法通过抗 His 抗体检测 HCBF5; 下图, 免疫印迹法通过抗 Flag 抗体检测 HCBF4 (左) 和 HCBF6 (右)。(e) 经第二次固定化 Ni-NTA 亲和层析后的纯化蛋白。(f)凝胶过滤层析展示了电泳至 60kd 的 HCBF4/5 和 HCB5/6。上图, 凝胶过滤的蛋白标记。

图 3a-c 展示了纯化的 S-Fab 能够识别 T 细胞和 CEA 抗原。(a)在 CD3 阳性的 Jurkat 细胞上, HCBF5/6(50ug/ml)(黑色线)和对照 OKT3 抗体 (红色线)的流式细胞分析, 灰色区域是没有染色的细胞, 以及蓝色线是只有抗 Flag-FITC 染色的细胞。(b)和(c), HCBF4/5 和 HCB5/6 结合至 CEA 的 SPR 分析。

图 4a-e 展示了 S-Fab 以 T 细胞依赖的和肿瘤抗原依赖的方式杀伤肿瘤细胞。在存在所示浓度的 S-Fab 和 Fab 的情况下, 人 T 细胞与肿瘤细胞以 10:1(a)和 5:1(b)的比例混合。细胞孵育 48 小时后, 如方法与材料所述测量细胞毒性。(c)在不同细胞系中的 CEA 免疫印迹分析。(d)S-Fab HCBF5/6 在 HT29 (空心正方形)、LS174T (空心三角形)、DLD-1 (空心菱形)细胞中的 EC50。(e). 结合抗 CD3 影响 S-Fab HCB5/6 活性。在存在所示浓度的 HCBF5/6 和对照 Fab 的情况下, 使用 T 细胞和 LS174T (10: 1) 进行细胞毒性试验 (*P<0.05, T test, 100nM HCBF4/5 对不含 HCBF4/5)。所有的误差线代表三次同样实验的标准差。数据代表至少三次独立实验之一。

图 5 展示了 S-Fab 在体内抑制肿瘤生长。NOD/SCID 小鼠 (n=5/每组) 皮下移植 LS174T 及人的 PBMC。随后, 给予小鼠 PBS (实心菱形, PBS 治疗, 无 PBMC 移植); 仅 PBMC(空心三角形, PBS 治疗, PBMC 移植); HCBF4/5(空心圆形, HCBF4/5 治疗, PBMC 移植); 这些数据代表 5 只小鼠的平均的肿瘤体积。误差线代表标准差>(*P<0.05, T test, HCBF5/6 比其他三组)。

图 6. 由 *E.coli* 纯化 Her2-S-Fab. (a) Her2-S-Fab 和对照 Her2-Fab 的细菌表达构建体, 每个构建体含有用于周质表达的信号序列 pelB; 抗 Her2-VL-CL 和抗 Her2-VH-CH1 构建体的共表达产生 Her2-Fab; 抗 Her2-VL-CL 和抗 Her2-VH-CH1-抗 CD16 VHH 构建体的共表达产生 Her2-S-Fab; 为便于蛋白检测和纯化, 在每个构建体的 C 末端连接 Flag 标签或 His8 标签. (b) 两步法纯化后 Her2-S-Fab 的考马斯亮蓝染色结果, M 代表分子量标记, 单位为 kD; (c) 凝胶过滤色谱显示 Her2-S-Fab 的大小为约 65 kD.

图 7. Her2-S-Fab 识别 Her2 阳性细胞. Her2-PE 抗体 (a)、曲妥珠单抗 (b)、对照 Fab (c) 和 Her2-S-Fab (d) 在不同细胞系上的流式细胞分析结果.

图 8. Her2-S-Fab 诱导 NK 细胞介导的细胞毒作用. (a) 以 10 μ g/ml 的 Her2-Fab、Her2-S-Fab 或曲妥珠单抗对 CHO 和 SKOV3 细胞系进行细胞毒性实验. 数据是三次实验的平均值, 误差条表示标准差. 黑色表示无 NK 细胞时的 CHO; 灰色表示加入了 NK 的 CHO; 粗条纹表示无 NK 细胞的 SKOV3; 细条纹表示添加了 NK 的 SKOV3. (b-f) 对不同细胞系进行了剂量依赖性的细胞毒作用的分析: CHO (b); MDAMB435 (c); MCF7 (d); SKBR3 (e) 和 SKOV3 (f). Her2-Fab、Her2-S-Fab 或曲妥珠单抗的浓度为 0.01 ng/ml 至 10 μ g/ml. 数据是三次实验的平均值, 误差条表示标准差.

图 9. Her2-S-Fab 抑制体内肿瘤生长. NOD/SCID 小鼠 (n=5/组, 雄性) 被皮下接种 SKOV3 细胞 (2 $\times$ 10⁶) 和新鲜分离的人 PBMC (2 $\times$ 10⁷) 的混合物. 两小时后, 腹腔注射 PBS、对照 Her2-Fab (1mg/kg) 或 Her2-S-Fab (1 mg/kg) 作为首次给药 (D₀). 在随后 6 天 (D1、D2、D3、D4、D5 和 D6), 给小鼠皮下 (*i.p.*) 注射 PBS (点画线); Her2-Fab (1 mg/kg, 虚线) 或 Her2-S-Fab (1 mg/kg, 实线). 数据代表 5 只小鼠的平均肿瘤体积. 误差条表示标准差 (*P<0.05, t test, Her2-S-Fab 相对于其他两组).

具体实施方式

I. 定义

应当注意的是术语“一种”实体是指一个或多个该实体, 例如, “一种二价抗体”被理解为代表一个或多个二价抗体. 同样地, 这些术语“一种”、“一个或多个”和“至少一个”在此可互换使用.

“同源性”或“同一性”或者“相似性”是指两个多肽序列间的或两个核酸分子间的序列相似性. 通过比较在每个序列的位置而测定同源性, 每一个序列可能为了比较目的而被比对. 当这种比较序列的位置被相同碱基或氨基酸占据时, 那么这些分子在那个位置是同源的. 序列间的同源性程度随着这些序列共有的匹配或同源位置的数量而变. “不相关的”

或“非同源的”序列是指与本发明的序列之一具有低于 40% 的同一性，优选低于 25% 的同一性。

多核苷酸或多核苷酸区（或多肽或多肽区）与另一序列具有某种百分比（例如，60%、60 %、65 %、70 %、75 %、80 %、85 %、90 %、95 %、98 %或 99 %）的“序列同一性”是指当比对时，在比较这两个序列时该百分比的碱基（或氨基酸）是相同的。使用本领域已知的软件程序可确定这种比对和同源性或序列同一性的百分比。

术语“等同的多核苷酸”是指与一种参照核酸序列或其互补序列具有一种一定程度同源性或序列同一性的核酸序列。在一个方面，核酸的同源体能够杂交至此核酸或其互补序列。同样地，“等同的多肽”是指与对照多肽的氨基酸序列具有一种一定程度同源性或序列同一性的多肽。在某些方面，序列的同一性至少约为 70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或 99%。在一些方面，这种等同序列保持对照序列的活性（例如表位结合）或结构（例如盐桥）。

在此公开的每一个多肽或多核苷酸，它的等同物也是预期的。在一个方面，一种多肽的等同物包括氨基酸残基的改变（即，缺失、增加或取代）。在一方面，一种多肽等同物包括不多于两种氨基酸残基的改变。在一方面，一种多肽的等同物包括不多于 3、4 或 5 种氨基酸残基的改变。在一些方面，这种氨基酸改变位于对参照的多肽活性不是关键的残基上。对多肽活性关键的残基能够通过位点特异性突变分析、甚至是序列比对（因为这种序列是高度保守的）而被轻易地测试。

本文所用的“抗体”或“抗原结合多肽”是指特异性地识别和结合到一种或多种抗原的多肽或多肽复合物。抗体是全抗体和其任何抗原结合片段或单链。因此，术语“抗体”包括至少含有免疫球蛋白一部分的分子的任何蛋白或肽，此免疫球蛋白分子的一部分具有结合至抗原的生物活性。这样的例子包括，但不限于，重/轻链或其配体结合部分的互补性决定区（CDR）、重链或轻链可变区、重链或轻链恒定区、构架（FR）区或其任何部分、或结合蛋白的至少一部分。术语抗体也包含一旦激活即具备抗原结合能力的多肽或多肽复合物。

本文所用的术语“抗体片段”或“抗原结合片段”是抗体的一部分，例如 $F(ab')_2$ 、 $F(ab)_2$ 、Fab'、Fab、Fv、scFv 等。无论结构如何，抗体片段都与完整抗体所识别的相同抗原结合。此术语“抗体片段”包括适配体、镜像体（spiegelmers）、双体。术语“抗体片段”也包括任何合成的或基因工程化的蛋白，这些蛋白通过结合至特异抗原以形成一种复合体而像抗体一样起作用。

本发明的抗体、抗原结合多肽、其变体或衍生物包括但不限于多克隆的、单克隆的、多特异性的、人类的、人源的、灵长化的（primatized）或嵌合的抗体、单链抗体、表位结合片段（例如，Fab、Fab' 和 $F(ab')_2$ 、Fd、Fvs、单链 Fvs（scFv）、单链抗体、二硫键连

接的 Fvs (sdFv)、包含 VK 或 VH 域的片段、由 Fab 表达文库生成的片段、以及抗独特型 (anti-Id) 抗体 (包括例如在此公开的 anti-Id 抗体至 LIGHT 抗体)。本发明的免疫球蛋白或抗体分子可以是任何类型 (例如, IgG、IgE、IgM、IgD、IgA 和 IgY)、种类 (例如, IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2) 或亚类的免疫球蛋白分子。

轻链分为 kappa 或 lambda (,)。每一个重链种类可与 kappa 或 lambda 轻链结合。总体来说, 轻链和重链彼此共价结合, 当通过杂交瘤、B 细胞或基因工程的宿主细胞产生免疫球蛋白时, 两个重链的“尾”部通过共价的二硫键或非共价键而彼此结合。在重链中, 氨基酸序列从在 Y 构象叉状端的 N 端运行到在每一个链的底部的 C 端。

轻链和重链都被分为结构和功能的同源性的区。术语“恒定的”和“可变的”被功能性地使用。在这一方面, 应当理解的是, 轻链可变域 (VK) 和重链可变域 (VH) 都决定抗原识别和特异性。相反地, 轻链 (CK) 和重链 (CH1、CH2 或 CH3) 的恒定域赋予重要的生物特性, 例如分泌、经胎盘流动性、Fc 受体结合、补体结合等。按照惯例, 恒定区结构域的编号随着它们变得远离抗原结合位点或抗体氨基端时而增加。N 端部分是可变域, 而 C 端部分是恒定域; CH3 和 CK 结构域实际上分别包含了轻链和重链的羧基端。

如上所述, 可变区允许抗体选择性地识别及特异性地结合抗原上的表位。也就是说, 抗体的 VK 结构域和 VH 结构域, 或互补决定区(CDR)的亚类, 结合以形成确定出三维的抗原结合位点的可变域。这种四元抗体结构形成了呈现在 Y 的每一个臂末端的抗原结合位点。更具体地, 抗原结合位点由在每条 VH 和 VK 链上的三个 CDR 确定 (即, CDR-H1、CDR-H2、CDR-H3、CDR-L1、CDR-L2 和 CDR-L3)。在一些例子中, 例如, 源自骆驼科或基于骆驼科免疫球蛋白的工程化的某些免疫球蛋白分子, 完整免疫球蛋白分子可能仅由重链组成, 而不具有轻链, 参见例如 Hamers-Casterman *et al.*, *Nature* 363:446-448 (1993)。

在天然抗体中, 存在于每一个抗原结合域中的六个“互补决定域”或“CDR”是短的、非连续的氨基酸序列, 它们被特异地定位以当抗体在水性环境中呈现三维构型时形成抗原结合域。抗原结合域中的剩余部分的氨基酸 (称“构架区”) 展现出较低的分子间可变性。构架区主要采用 β -折叠构象, CDR 形成环, 这些环连接 β -折叠结构, 在某些情况下构成 β -折叠结构的一部分)。因此, 构架区用于形成支架, 其通过链间的非共价的相互作用而将 CDR 以正确的方向定位。由排列的 CDR 形成的抗原结合域定义出在免疫反应性抗原上的表位互补的表面。这种互补表面促使抗体非共价地结合至它的同源表位。对于任何给定的重链或轻链的可变域, 本领域普通技术人员能够轻易地分别鉴别包含 CDR 和构架区的这些氨基酸, 因为它们已经被准确定义 (参见 “Sequences of Proteins of Immunological Interest,” Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); 以及 Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.*, 196:901-917 (1987), 通过引用将它们整体并入本文中)。

如果在本领域中对于一个术语使用和/或接受两个或更多个定义，那么在本文中，除非另有说明，否则该术语的定义意在包括所有这样的涵义。一个具体的例子是，术语“互补决定区”(“CDR”)用来描述在重链多肽和轻链多肽的可变区内都找得到的非连续抗原结合位点。这个特定的区域已在以下文献中有描述：Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest” (1983)和 Chothia *et al.*, *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)，通过引用将它们合并至本文中。根据 Kabat 和 Chothia 对于 CDR 的定义，其包括彼此对比时的氨基酸残基的重叠或子群体。但是，使用任何一种关于抗体或其可变区的 CDR 的定义都被认为是在本发明定义和使用的术语的范围内。包含如以上任一引用文献所定义的 CDR 的合适氨基酸残基被作为对比而列于以下表格中。包含特定 CDR 的准确残基数量根据 CDR 的序列和大小而变化。对于抗体的可变区氨基酸序列来说，本领域技术人员可通过常规方法确定出包含特定 CDR 的残基。

Kabat 等也定义了可适用于任何抗体的可变域序列的编号系统。本领域技术人员可明确地将该“Kabat 编号”系统应用至任何可变域序列，而不需要依赖于超出序列本身的任何实验数据。如本文所使用的，“Kabat 编号”是指在以下文献中阐述的编号系统：Kabat *et al.*, U.S. Dept. of Health and Human Services, “Sequence of Proteins of Immunological Interest” (1983)。

“特异性结合”或“对.....有特异性”通常是指抗体通过其抗原结合域结合至表位，并且该结合需要抗原结合域和表位之间的一定的互补性。根据这个定义，当抗体经由其抗原结合域相比于结合至随机的不相关的表位而言能够更快速地结合至特定表位，则称该抗体“特异性结合”至该表位。术语“特异性”被用来定量特定抗体结合特定表位的相对亲和性。例如，对于给定的表位，抗体“A”被视为比抗体“B”具有更高的特异性，或者抗体“A”结合至表位“C”的特异性高于其结合至相关的表位“D”的特异性。

本文使用的术语“治疗”是指治疗性或预防性手段，其中对象被预防或减慢（缓解）不期望的病理学变化或紊乱，例如癌症的进展。有益的或期望的临床结果包括，但不限于，症状的减轻、疾病程度的减小、疾病状态的稳定（即不恶化）、疾病进展的延迟或减慢、疾病状态的改善或缓和以及缓解（无论是局部的或整体的），无论这些结果是否是可检测的或不可检测的。“治疗”还指与不接受治疗预期的存活期相比存活期延长。需要治疗的对象包括已患有疾病或病症的对象以及倾向于患有该疾病或病症的对象或需要预防该疾病或病症的对象。

“对象”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”是指任何期望诊断、预后或治疗的对象，特别是哺乳动物对象。哺乳动物对象包括人、驯养动物、农畜以及动物园动物、竞技动物或宠物，例如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、奶牛等。

术语“有治疗需要的患者”或“有治疗需要的对象”包括可从施用本发明的抗体或组合物中受益的对象，例如哺乳动物对象，以实现例如检测、诊断程序和/或治疗的目的。

II. 二价和三价抗体

在一个实施方式中，本发明提供二价抗体，其具有融合至 Fab 片段的其中一个链的单域抗原结合片段（VHH）。当 Fab 片段的另一个链也融合至单域抗原结合片段（VHH'），那么该抗体是三价的。

本发明的二价或三价抗体可以是单特异性的、双特异性的或三特异性的。当 Fab 和 VHH 具有结合至相同抗原的特异性，那么该抗体是单特异性的。如果他们具有不同的结合特异性，那么该抗体是双特异性的。如果 VHH、VHH' 和 Fab 每个具有不同的结合特异性，那么该抗体是三特异性的。

如试验例中所证实的，双特异性抗体的示意性类型是靶定两个不同抗原的抗体，其中一个抗原存在于肿瘤细胞或微生物上，另一个存在于免疫细胞上。当施用至个体时，这种双特异性抗体特异性地结合至肿瘤细胞或微生物，同时特异性地结合至免疫细胞（如细胞毒细胞）。这种双重结合可导致所结合的肿瘤或微生物被宿主的免疫系统杀死。

A. 本发明的双特异性抗体的预料不到的性质

因为 VHH 片段比常规抗体小且短得多，先前人们怀疑当 VHH 融合至 Fab 片段时，大的蛋白会由于位阻效应而抑制 VHH 的结合能力。而且，人们怀疑这种嵌合蛋白在生理条件下不会稳定。

但是，在预料之外的是，所怀疑的位阻效应对本发明的二价抗体的功能具有有限的影响。而且，该抗体（不需要 Fc 片段）的总体亲和性与常规抗体相当。另一个惊人之处在于 VHH 可有效地结合至其靶标，而不论它以相同的方向（即 VHH 的 N 端连接至 Fab 片段的轻链或重链的 N 端）或是以相反的方向（即 VHH 的 C 端连接至 Fab 片段的轻链或重链的 N 端）融合至 Fab 片段。

本发明的优点还体现于细胞表达效率和蛋白稳定性。虽然一般认为小的抗体比更大的抗体更容易在细胞中产生，但是异源二聚体抗体对于抗体产生提出了特别的挑战。这至少是因为两个（或三个或四个）不同的蛋白链可在细胞内外相互作用，导致干扰，从而降低了宿主细胞表达系统的效率，且增加了蛋白的不稳定性。因此，具有全部重链和轻链的异源二聚体抗体通常表达于两个独立的细胞，或使用共同的轻链来减少轻链与重链的错配，这导致生成无功能的抗体。

即使是小于本发明公开的双特异性抗体的那些双特异性抗体也具有这些问题。例如，双特异性 T 细胞衔接体（BITE）是由两个典型的单链可变片段构成的融合蛋白。虽然小

于（通常为 55 KDa）本文公开的双特异性抗体（约 65 KDa），但 BITE 无法在细菌细胞中以可溶形式表达。目前，BITE 在哺乳动物细胞中表达，其非常昂贵。

预料不到的是，如试验例中所证实的，当表达于 *E. coli* 细胞时，多达约 20% 的本发明的双特异性抗体是可溶的（基于 Western 杂交分析）。如上所述，这些抗体比 BITE 大得多。但是，虽然细菌表达的 BITE 完全不溶，但本发明的抗体可轻易由细菌产生。因此，该结果是令人惊讶的且是预料之外的。

因此，本发明的抗体与常规抗体相比具有相对较小的尺寸，并且能够有效地（特别是以大规模生产的方式）再例如酵母和细菌宿主中生产。这些抗体的这种稳定性、可溶性和半寿期大大优于本领域正在开发的那些双特异性抗体。

从之前的描述可知，本发明的抗体表现出高细菌生产率、稳定性和接合亲和性。这种二价和三价抗体的例子分别图示于图 1a 和图 1b 中。

图 1a 显示具有 Fab 部分和 VHH 部分的二价抗体。Fab 部分包括具有可变域（VL）和恒定域（CL）的轻链。Fab 部分还包括具有可变域（VH）和恒定域（CH1）的重链。不同于普通抗体的重链，该重链不包括 CH2 域和 CH3 域中的任何一个或两个。Fab 片段是功能性单元，可特异性结合至抗原。在结构上，VH 和 VL 包含适于这种特异性的 CDR，CH1 和 CL 具有适当的氨基酸残基使得它们彼此连接以形成所需的 Fab 结构。

图 1a 显示了 VHH 片段融合至 Fab 片段的重链的 CH1 域的 C 端。容易意识到的是，在一些实施方式中，VHH 片段也可融合至轻链。当融合至 Fab 片段时，VHH 和 Fab 可具有相同的 N 端至 C 端方向，使得整个链能够以单个多核苷酸来表达。在另一个实施方式中，VHH 的 C 端可连接至 Fab 片段的重链或轻链的 C 端。

类似地，图 1b 显示了本发明的三价抗体，其包括 Fab 部分和两个 VHH（VHH 和 VHH'），每个 VHH 融合至 Fab 片段的一个链。

抗体的 Fab 部分可容易地识别和制备。例如，轻链和重链的序列可从包括两个相同的 Fab 片段的任何常规抗体中识别。常规抗体可来源于动物或人源化，并且可进一步通过本领域已知的方法来修饰。

“单域抗原结合片段”或“单域抗体片段”或“VHH”是一种能够结合至抗原而不需配备轻链的抗原结合片段。VHH 最初以单个抗原结合片段的形式分离自单域抗体（sdAb）。第一个已知的单域抗体分离自骆驼（Hamers-Casterman et al., *Nature* 363:446-8 (1993)），之后分离自软骨鱼。骆驼产生没有轻链的功能性抗体，它们的单个 N 端结构域（VHH）结合抗原而无需结构域配对（见 Harmsen and Haard, *App Microbiol Biotechnol.*, 77:13-22 (2007) 综述）。单域抗体不包括 CH1 域，在常规抗体中，CH1 域与轻链相互作用。

VHH 包含构成免疫球蛋白结构域的核心结构的四个框架区（FR1-FR4）以及涉及抗原结合的三个互补决定区（CDR1-CDR3）。相比于人 VH 结构域，VHH 框架区显示出与人

VH 结构域的高序列同源性 (> 80%)。参见 Harmsen and Haard, 2007, 其进一步描述称: “VHH 的最特征性的特点在于在四个 FR2 位置 (第 37、44、45 和 47 位; Kabat 编号) 处的氨基酸取代, 它们在常规 VH 结构域中是保守的, 并且涉及与 VL 结构域的疏水相互作用”。VHH 通常具有在这些以及其他在常规 VH 中高度保守的位置处的不同氨基酸 (如 Leu11Ser、Val37Phe 或 Tyr、Gly44Glu、Leu45Arg 或 Cys、Trp47Gly)。

Harmsen and Haard, 2007 还描述了: VHH 的 CDR 具有某些已知的特征性特点。例如, CDR1 的 N 端部分比常规抗体更加可变。而且, 某些 VHH 具有延长的 CDR3, 其通常通过与 CDR1 或 FR2 中的半胱氨酸形成额外的二硫键而稳定, 导致 CDR3 环在之前的 VL 的整个界面上折叠。美洲驼 VHH 的特定亚家族(VHH3)还含有一个延长的 CDR3, 其通过与 FR2 的第 50 位的半胱氨酸形成额外的二硫键而稳定。

本领域已知有许多 sdAb, 并且能够从例如骆驼等动物中容易制备。基于这些 sdAb, 它们的 VHH 可轻易被识别和制备。表 1 列出了许多 VHH 和 sdAb 的非限制性例子。因此, 在一些实施方式中, 本发明提供包含每个这样的公开序列或其等同物的多肽以及编码每个多肽的多核苷酸。在一个方面, 该多肽包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列, 或具有一个、两个或三个氨基酸插入/缺失/取代的氨基酸序列。

表 1. 示例性的单域抗原结合片段 (VHH) 和单域抗体 (sdAb)

1. 抗 CEA VHH (SEQ ID NO:1)
EVQLVESGGG FVQAGESLTL SCTSSTLTFT PYRMAWYRQA PGKQRD LVAD ISSGDGR TTN YADFAKGRFT ISRDNIKNTV FLRMTNLKPE DTAVYYCNTF VSFVGIARSW GQGTQVT VSS
2. 抗 CD16 VHH (SEQ ID NO:2)
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCSFPGSIFS LTMGWYRQAP GKERELVTSA TPGGDTNYAD FVKGRFTISR DNARSIIYLQ MNSLKPEDTA VYYCYARTRN WG
3. 抗 CD16 VHH (SEQ ID NO:3)
EVQLVESGGE LVQAGGSLRL SCAASGLTFS SYNMGWFERRA PGKERE FVAS ITWSGRDTFY ADSVKGRFTI SRDNAKNTVY LQMSSLKPED TAVYYCAANP WP
4. 抗 CD16 VHH (SEQ ID NO:4)
EVQLVESGGG LVQPGESLTL SCVVAGSIFS FAMSWYRQAP GKERELVARI GSDDRVTYAD SVKGRFTISR DNIKRTAGLQ MNSLKPEDTA VYYCNAQTDL RD

5. 抗 CD16 VHH (SEQ ID NO:5)
EVQLVESGGG LVQPGGSLTL SCVAAGSIFT FAMSWYRQAP RKERELVARI GTDDETMYKD SVKGRFTISR DNVKRTAGLQ MNNLKPEDTA VYYCNARTDY RD
6. 抗 Her2 sdAb (SEQ ID NO:6)
QVQLVQSGGG LVQAGGSLRL SCAASGRIFS SYAMAWFRQA PGKEREVAA ISWSGANIYV ADSVKGRFTI SRDNAKDTVY LQMNSLKPED TAVYYCAVKL GFAPVEERQY DYWGQGTQVT VSS
7. 抗 EGFR1 VHH (SEQ ID NO:7)
MAEVQQASGG GLVQAGGSLR LSCAASGRTE TTSIAWFRQ APGKEREVFA QISASGLGIN YSGTVKGRFT ISRDADKTTV YLQMNSLTPE DTAVYYCAAG FHYIAAIRRT TDFHFWGPGT LVTVSSGR
8. 抗 F4+ETEC 细菌 VHH (SEQ ID NO:8)
QVQLQESGGG LVQAGGSLRL SCEASGNVDR IDAMGWFRQA PGKQREFVGY ISEGGILNYG DFVKGRFTIS RDNAKNTVYL QMSNLKSEDV GVFCAASHW GTLLIKGIEH WGKGTQVTVS S
9. 抗 PS2-8 VHH (SEQ ID NO:9)
EVQLVESGGG LVQAGGSLRL SCAASGRSFS RDAMGWFRQA PGKERDVAA INLNGGRITYS ADSVKGRFTI SRDNDKNTVY LQMNSLKPED TAVYYCAARE GDVGLVSYKR SSNYPYWGQG TQVTVSS
10. 抗 Hunta 病毒 VHH (SEQ ID NO:10)
MAEVQLQASG GGLVQAGGSL RLSCAASGRT SSMYSMVWFR QAPGKEREFV AGIIWTSSLT YYADSLKGRF TISRDNKNT VYLQMNSLKP EDTAIYYCAA DTKTGGGGYE YWGQVTVTVS S
11. 抗 Hunta 病毒 VHH (SEQ ID NO:11)
MAEVQLQASG GGLVQPGGSL RLSCAASGSI FSSDVMGWFR QAPGKERELV

AFITDDGGTN YADSVKGRFT ISRDNAENTV SLQMNSLKPE DTAVYYCNAR YYSGGYRNYW GQVTVTVSS
12. 抗 CD16 VHH (SEQ ID NO:12)
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCSFPGSIFS LTMGWYRQAP GKEREIVTSA TPGGDTNYAD FVKGRFTISR DNARSIIYLQ MNSLKPEDTA VYYCYARTRN WGTWVGQGTQVTVSS
13. 抗 CD3 VHH (SEQ ID NO:13)
QVQLQESGGG LVQAGGSLRL SCAASGRFTS NYHMGWFRQA PGKERELVAA ISGSGGSTYY TDSVKGRFTI SRNNAKNTMS LQMSNLKPED TGVYYCTTPT EKGSSIDYWG QGTQVTVSSG RYPYDVPDY

从上表可明显看出，这些序列的某些区域是高度保守的（例如 FR1-3），而 CDR 是更加可变的。

B. 单特异性、双特异性和三特异性抗体

当 Fab 片段和 VHH 具有相同的结合特异性时，二价抗体可以是单特异性的，或者当它们具有不同的结合特异性时，二价抗体可以是双特异性的。类似地，三价抗体可以是单特异性的、双特异性的或三特异性的。

双特异性抗体可被配置以靶定不同的抗原。例如，在 Fab 片段和 VHH 片段之间，一个具有对第一免疫细胞的特异性，另一个可靶定第二免疫细胞；一个具有对第一肿瘤细胞的特异性，而另一个具有对第二肿瘤细胞的特异性；一个具有对免疫细胞的特异性，另一个具有对微生物、感染细胞、肿瘤细胞、炎症细胞、凋亡细胞或外源细胞（无限定）的特异性。

类似地，三价抗体可按需要配置。在一个方面，Fab、VHH 和 VHH' 片段具有对相同抗原或表位的特异性。在另一个方面，Fab 片段具有对一种抗原或表位的特异性，而 VHH 和 VHH' 片段具有对另一种抗原或表位的特异性。在另一个方面，Fab 片段具有与 VHH 相同但与 VHH' 不同的结合特异性。在另一个方面，它们中的每一个都具有不同的结合特异性。

二价和三价抗体的结合结构的非限制性的例子列于下表中。

表 2. 二价抗体的示例性结构

片段	结合特异性	片段	结合特异性
Fab	肿瘤细胞	VHH	相同肿瘤细胞
Fab	免疫细胞	VHH	相同免疫细胞
Fab	肿瘤细胞	VHH	另一种肿瘤细胞

Fab	免疫细胞	VHH	另一种免疫细胞
Fab	肿瘤细胞	VHH	免疫细胞
Fab	免疫细胞	VHH	肿瘤细胞
Fab	免疫细胞	VHH	微生物
Fab	微生物	VHH	免疫细胞

表 3. 三价抗体的示例性结构

片段	结合特异性	片段	结合特异性	片段	结合特异性
Fab	免疫细胞	VHH	第二种 免疫细胞	VHH'	第二种 免疫细胞
Fab	免疫细胞	VHH	第二种 免疫细胞	VHH'	第三种 免疫细胞
Fab	肿瘤细胞	VHH	第二种 肿瘤细胞	VHH'	第二种 肿瘤细胞
Fab	肿瘤细胞	VHH	第二种 肿瘤细胞	VHH'	第三种 肿瘤细胞
Fab	免疫细胞	VHH	肿瘤细胞	VHH'	肿瘤细胞
Fab	免疫细胞	VHH	肿瘤细胞	VHH'	第二种 肿瘤细胞
Fab	肿瘤细胞	VHH	免疫细胞	VHH'	免疫细胞
Fab	肿瘤细胞	VHH	免疫细胞	VHH'	第二种 免疫细胞
Fab	肿瘤细胞	VHH	免疫细胞	VHH'	第二种 肿瘤细胞
Fab	免疫细胞	VHH	肿瘤细胞	VHH'	第二种 免疫细胞

C. 结合靶标

在一些实施方式中，二价抗体的 Fab 或 VHH(或 VHH')片段具有对肿瘤抗原的免疫特异性。

“肿瘤抗原”是在肿瘤细胞中产生的抗原物质，即，它引起宿主的免疫响应。肿瘤抗原可用于识别肿瘤细胞并且是癌症治疗的潜在候选物质。体内的正常蛋白不是抗原性的。但是，某些蛋白在肿瘤生成过程中产生或过度表达，因而对身体来说显得是“外源”的。这可包括很好地躲避了免疫系统的正常蛋白、通常以极小量产生的蛋白、通常仅在特定发育阶段产生的蛋白或结构由于突变而被修饰的蛋白。

本领域已知有许多肿瘤抗原，通过筛选可容易发现许多新的肿瘤抗原。肿瘤抗原的非限制性例子包括 EGFR、Her2、EpCAM、CD20、CD30、CD33、CD47、CD52、CD133、CEA、gpA33、黏蛋白、TAG-72、CIX、PSMA、叶酸结合蛋白、GD2、GD3、GM2、VEGF、VEGFR、整合素、 $\alpha V\beta 3$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、ERBB2、ERBB3、MET、IGF1R、EPHA3、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP 和 Tenascin。

在一些方面，Fab 或 VHH 片段具有对相比于相应非肿瘤细胞在肿瘤细胞上过度表达的蛋白的特异性。“相应非肿瘤细胞”是指与肿瘤细胞来源的细胞具有相同细胞类型的非肿瘤细胞。要注意的是，这样的蛋白不必然不同于肿瘤抗原。非限制性的例子包括癌胚抗原（CEA），其过度表达于大多数结肠癌、直肠癌、乳癌、肺癌、胰腺癌和胃肠道癌；调

蛋白受体(HER-2, *neu* 或 *c-erbB-2*)，其通常在乳癌、卵巢癌、直肠癌、肺癌、前列腺癌和宫颈癌中过度表达的；表皮生长因子受体，其在一系列实体肿瘤（包括乳癌、头颈癌、非小细胞性肺癌和前列腺癌）内过量表达；脱唾液酸糖蛋白受体；转铁蛋白受体；在肝细胞上表达的丝氨酸蛋白酶抑制剂酶复合体受体；在胰岛导管腺癌细胞上过度表达的成纤维细胞生长因子受体（FGFR）；用于抗血管新生基因治疗的血管内皮生长因子受体（VEGFR）；选择性地过表达于 90% 的非黏液型的卵巢癌的叶酸受体；细胞表面的多糖-蛋白复合物（glycocalyx）；碳水化合物受体；以及多聚免疫球蛋白受体，其有益于基因转运至呼吸道上皮细胞，并且对肺病（例如囊胞性纤维症）治疗有吸引力。

在一个方面，VHH 片段对 CEA 或 Her2 具有特异性。这种 VHH 的代表性的序列为 SEQ ID NO:1 或 6(表 1)。在一些方面，VHH 包括 SEQ ID NO:1 或 6 的氨基酸序列并具有一个或两个或三个插入、缺失或取代。在一个方面，VHH 包括 SEQ ID NO:7 氨基酸序列(抗-EGFR1)，并且任选地具有一个或两个或三个插入、缺失或取代。

在一些方面，Fab 或 VHH 片段对微生物（例如病毒或细菌）具有特异性。微生物的非限制性例子包括微生物表面受体和内毒素。内毒素的例子包括，但不限于，脂多糖(LPS)和脂寡糖(LOS)。

在一些方面，VHH 片段包括选自 SEQ ID NO: 8-11 (表 1)的氨基酸序列，或者任选地具有一个或两个或三个插入、缺失或取代。

在一些方面，二价抗体的另一片段对免疫细胞具有特异性。在一个方面，该免疫细胞选自由 T 细胞、B 细胞、单核细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、树突细胞、吞噬细胞、自然杀伤细胞、嗜酸性粒细胞、嗜碱性细胞和肥大细胞组成的群组。

在一个方面，该另一片段特异性地识别抗原，所述抗原选自由 CD3、CD16、CD19、CD28 和 CD64 组成的群组。在一个方面，第二 VHH 特异地识别 CD3 或 CD16。

在一个方面，该另一片段对 CD16 或 CD3 具有特异性。VHH 片段的代表性序列为 SEQ ID NO: 2、3、4、5、12 和 13 (表 1)，或者任选地具有一个或两个或三个插入、缺失或取代。

在一些方面，Fab 部分包括：一个或两个选自 SEQ ID NO: 14-25 (表 4) 的氨基酸序列，或者任选地具有一个或两个或三个插入、缺失或取代。

表 4. Fab 序列示例

1. 抗-CD19Fab 核酸-核酸 (SEQ ID NO:14)
GATATTCAGATGACTCAGAGCCCTTCCTCACTGTCCGCCAGCGTCGGGGATCGGGTCACT ATTACATGCAAAGCAAGCCAGAGCGTCGACTATGATGGGGACTCCTATCTGAACTGGTAC CAGCAGAAGCCAGGCAAAGCTCCCAAGCGGCTGATCTACGACGCATCAAATCTGGTGAGC GGCGTCCCTTCCAGATTCTCTGGGAGTGGATCAGGCACAGATTTTACCCTGACAATTAGC TCCCTGCAGCCTGAGGACTTCGCCACTTACTATTGCCAGCAGAGCACAGAAGATCCATGG

ACTTTTGGCGGGGGAACCAAAGTGGAGATCAAGAGA (VL) ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGT (CL)
2. 抗-CD19Fab 轻链 – 蛋白 (SEQ ID NO:15)
DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCKASQSVSDYDGD SYLNWYQQKPGKAPKRLIYDASNLVS GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSTEDPWTFGGGTKVEIKR (VL) TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (CL)
3. 抗-CD19Fab 重链 – 核酸 (SEQ ID NO:16)
CAGGTGCAGCTGGTCCAGTCCGGGGCAGAAGTGAAGAAACCAGGAGCCTCTGTGAAAGTC AGTTGTAAGGCTTCAGGCTATACCTTCATCTCTTACTGGATGAACTGGGTGAGACAGGCA CCAGGACAGGGACTGGAGTGGATGGGACAGATTTGGCCTGGCGATGGGGACACCAACTAT AATCAGCTGCTGAAGGATAAAGCAACTCTGACCGCCGACAAGAGCGCCTCCACCGCTTAC ATGGAGCTGTCTAGTCTGCGAAGCGAAGACACAGCTGTGTACTATTGCGCACGGAGAGAA ACCACAACTGTGGGCCGCTACTATTACGCAATGGATTACTGGGGACAGGGCACACTGGTG ACTGTCTCAAGC (VH) GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCTG TGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCGGCTGTCTACAGTCTCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT (CH)
4. 抗-CD19Fab 重链 – 蛋白 (SEQ ID NO:17)
QVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFISYWMNWVRQAPGQGLEWMGQIWPGDGDNTY NQLLKDKATLTADKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGLV TVSS (VH) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSS GLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKV (CH)
5. 抗-CD20Fab 轻链 – 核酸 (SEQ ID NO:18)
CAGATCGTGCTGAGCCAGAGCCCCGCCATCCTGAGCGCCAGCCCCGGCGAGAAGGTGACC ATGACCTGCAGGGCCAGCAGCAGCGTGAGCTACATCCACTGGTTCAGCAGAAGCCCCGGC AGCAGCCCCAAGCCCTGGATCTACGCCACCAGCAACCTGGCCAGCGGCGTGCCCGTGAGG TTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCAGCTACAGCCTGACCATCAGCAGGGTGGAGGCCGAG GACGCCGCCACCTACTACTGCCAGCAGTGGACCAGCAACCCCCCACCTTCGGCGGCGGC

ACCAAGCTGGAGATCAAGAGG (VL)
ACGGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATCTGGA ACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGG AAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGC AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAA CACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGC TTCAACAGGGGAGAGTGT (CL)
6. 抗-CD20Fab 轻链 – 蛋白 (SEQ ID NO:19)
QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFQQKPGSSPKPWIYATSNLASGVPVR FSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQWTSNPPTFGGGTKLEIKR (VL)
TVAAPSVFIF PPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDS KDSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (CL)
7. 抗-CD20Fab 重链 – 核酸 (SEQ ID NO:20)
CAGGTGCAGCTGCAGCAGCCCGGCGCCGAGCTGGTGAAGCCCGGCGCCAGCGTGAAGATG AGCTGCAAGGCCAGCGCTACACCTTACCAGCTACAACATGCACTGGGTGAAGCAGACC CCCGGCAGGGGCTGGAGTGGATCGGCGCCATCTACCCCGGCAACGGCGACACCAGCTAC AACCAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACCCTGACCGCCGACAAGAGCAGCAGCACCGCCTAC ATGCAGCTGAGCAGCCTGACCAGCGAGGACAGCGCCGTGTACTACTGCGCCAGGAGCACC TACTACGGCGGCGACTGGTACTTCAACGTGTGGGGCGCCGGCACCACCGTGACCGTGAGC (VH)
GCTAGCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGG GGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTGCG TGAACTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCTTACAGTCCTCA GGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACCGTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACC TACATCTGCAACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTT (CH)
8. 抗-CD20Fab 重链 – 蛋白 (SEQ ID NO:21)
QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAIYPGNGDTSY NQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVS (VH)
ASTKGPSVFP LAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV (CH)
9. 抗-Her2Fab 轻链 – 核酸 (SEQ ID NO:22)
GATATTCAGA TGACCCAGAG CCCGAGCAGC CTGTCCGCAA GCGTCGGCGA CCGCGTCACG ATTACCTGCC GTGCAAGCCA GGATGTCAAC ACCGCAGTGG CTTGGTATCA GCAAAAACCG GGTAAAGCGC CGAACTGCT GATTTATAGT GCCTCCTTTC TGTACTCTGG CGTGCCGAGT CGTTTCTCAG GTTCGCGCAG CGGCACCGAT TTTACCCTGA CGATCAGCTC TCTGCAGCCG GAAGACTTCG CCACGTATTA CTGCCAGCAA CATTATACCA CGCCGCCGAC CTTTGGTCAA GGCACGAAAG TCGAAATTAA A (VL)

ACGGTGGCTG CACCATCTGT CTTCATCTTC CCGCCATCTG ATGAGCAGTT GAAATCTGGA ACTGCCTCTG TTGTGTGCCT GCTGAATAAC TTCTATCCCA GAGAGGCCAA AGTACAGTGG AAGGTGGATA ACGCCCTCCA ATCGGGTAAC TCCCAGGAGA GTGTCACAGA GCAGGACAGC AAGGACAGCA CCTACAGCCT CAGCAGCACC CTGACGCTGA GCAAAGCAGA CTACGAGAAA CACAAAGTCT ACGCCTGCGA AGTCACCCAT CAGGGCCTGA GCTCGCCCGT CACAAAGAGC TTCAACAGGG GAGAGTGT (CL)
10. 抗-Her2Fab 轻链 – 蛋白(SEQ ID NO:23)
DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAPKLLIYSASFLYSGVPS RFGSGRSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQHYTTPPTFGQGTKVEIK (VL) TVAAPSVFIF PPSDEQLKSG TASVVCLLNN FYPREAKVQW KVDNALQSGN SQESVTEQDS KDYSTYLSST LTLSKADYEK HKVYACEVTH QGLSSPVTKS FNRGEC (CL)
11. 抗-Her2Fab 重链 – 核酸 (SEQ ID NO:24)
GAAGTGCAGC TGGTTGAATC TGGCGGTGGC CTGGTTCAAC CGGGTGGCTC CCTGCGTCTG TCATGTGCAG CATCGGGTTT CAACATTAAA GATACCTATA TCCACTGGGT TCGTCAGGCA CCGGGTAAAG GCCTGGAATG GGTCGCTCGC ATTTACCCGA CCAATGGTTA TACGCGTTAC GCGGATAGCG TGAAAGGCCG CTTCACCATC AGCGCAGACA CCTCTAAAAA CACGGCTTAT CTGCAGATGA ACTCGCTGCG TGCAGGAAGAT ACGGCCGTTT ATTACTGTAG CCGCTGGGGT GGCGACGGCT TTTACGCAAT GGATTACTGG GGTCAAGGCA CGCTGGTCAC GGTCTCA (VH) GCTAGCACCA AGGGCCCATC GGTCTTCCCC CTGGCACCTT CCTCCAAGAG CACCTCTGGG GGCACAGCGG CCCTGGGCTG CTTGGTCAAG GACTACTTCC CCGAACCGGT GACGGTGTCTG TGGAATCTAG GCGCCCTGAC CAGCGGCGTG CACACCTTCC CGGCTGTCTT ACAGTCTCTA GGACTCTACT CCCTCAGCAG CGTGGTGACC GTGCCCTCCA GCAGCTTGGG CACCCAGACC TACATCTGCA ACGTGAATCA CAAGCCCAGC AACACCAAGG TGGACAAGAA AGTT (CH)
12. 抗-Her2Fab 重链 – 蛋白 (SEQ ID NO:25)
EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIKDTYIHWVRQAPGKGLEWVARIYPTNGYTRY ADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRWGGDGFYAMDYWGQGLTVTVS (VH) ASTKGPSVFPLAPSSKSTSG GTAALGCLVK DYFPEPVTVS WNSGALTSGV HTFPAVLQSS GLYSLSSVVT VPSSSLGTQT YICNVNHKPS NTKVDKKV (CH)

下表 5 展示了本发明的双特异抗体的一个实施例的氨基酸序列。

表 5. 靶向 CD3 (在 Fab 处) 和 CEA (在 VHH 处) 的双特异抗体

1. 抗-CD3 VL-CL (SEQ ID NO:26)
MKYLLPTAAA GLLLLAAQPA MAMGEIVLTQ SPATLSLSPG ERATLSCSAS SGVNYMHWYQ QKPGQAPRRW IYDTSKLAGS VPARFSGSGS GTSYSLTISS LEPEDFAVYY CHQRGGSYTF GGGTKLEIKR KLTVAAPSVF IFPPSDEQLK SGTASVVCLL NNFYPREAKV QWKVDNALQS GNSQESVTEQ DSKDYSTYLS STLTLSKADY EKHKVYACEV THQGLSSPVT KSFNRGECGS

2. 抗-CD3 VH-CH1 anti-CEA VHH (SEQ ID NO:27)				
MGQVQLVQSG	AEVKKPGASV	KVSCKTSGYT	FTSNWMHWVR	QAPGQGLEWM
GEIDPSDSYT	NYNQKFKGRV	TITVDKSAST	AYMELSSLRS	EDTAVYYCAR
GSNPYYYAMD	YWGQGTLLTV	SSKLASTKGP	SVFPLAPSSK	STSGGTAALG
CLVKDYFPEP	VTVSWNSGAL	TSGVHTFPAV	LQSSGLYSLS	SVVTVPSSSL
GTQTYICNVN	HKPSNTKVDK	KVGSEVQLVE	SGGGFVQAGE	SLTLSCTSST
LTFTPYRMAW	YRQAPGKQRD	LVADISSGDG	RTTNYADFAK	GRFTISRDN
KNTVFLRMTN	LKPEDTAVYY	CNTFVSFVGI	ARSWGQGTQV	TVSSDYKDDD DK

以上描述的任何的抗体或多肽可进一步地包括额外的多肽，例如，指导所编码的多肽的分泌的信号肽、如本文所述的抗体恒定区或其他如本文所述的异源多肽。

本领域普通技术人员将理解，本文所公开的抗体可被修饰，使得它们在氨基酸序列上不同于它们所其衍生的天然结合多肽。例如，源自一种特定蛋白的多肽或氨基酸序列可以是相似的，例如，对起始序列具有一定百分数的一致性，例如它可能和起始序列具有60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%的一致性。

此外，可在“非必需”氨基酸区进行核苷酸或氨基酸的保守性取代、缺失或插入。例如，源自特定蛋白多肽或氨基酸可以同起始序列一样，除了一个或多个单个的氨基酸取代、插入、或缺失（例如，一个、两个、三个、四个、五个、六个、七个、八个、九个、十个、十五个、二十个或更多个单独的氨基酸取代、插入或缺失）。在某些实施方式中，相对于起始序列，源自特定蛋白的多肽或氨基酸序列具有一至五、一至十、或一至二十个单独的氨基酸取代、插入或缺失。

在某些实施方式中，抗原结合多肽包含通常不与抗体相连的氨基酸序列或一个或多个部分。下文详细描述了示例性的修饰。例如，本发明的片段可包含柔性连接序列，或可被修饰以添加了功能部分（例如 PEG、药物、毒素或标记）。

本发明的抗体、其变体或衍生物包括被修饰的衍生物，即任何类型分子共价连接至抗体，只要该共价连接不阻止抗体结合至表位。例如，但并非为了限制，抗体可以被修饰，例如糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护基或阻断基衍生化，蛋白酶切、连接至细胞配体或其他蛋白等。通过已知的技术可实施大量化学修饰中的任何修饰，包括但不限于特异的化学裂解、乙酰化、甲酰化、衣霉素的代谢合成等等。此外，抗体可以包含一个或多个非典型氨基酸。

在其他实施方式中，本发明的抗原结合多肽可以包含保守的氨基酸取代。

在“保守的氨基酸取代”中，一个氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代。具有相似侧链的氨基酸残基家族已经在本领域被定义，包括碱性侧链（例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸）、酸性侧链（例如天冬氨酸、谷氨酸）、不带电荷的极性侧链（例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸）、非极性侧链（例如丙氨酸、

缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸)、 β 分支侧链(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)及芳香族侧链(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸、组氨酸)。因此,在免疫球蛋白多肽的非必须氨基酸残基更适宜由来自同样侧链家族的其他氨基酸残基取代。在另一个实施方式中,氨基酸链可以被结构相似但侧链家族成员的顺序或组成上不同的链取代。

下表提供了保守氨基酸取代的非限制的例子。在表中相似性分数 0 或更高来表明在两种氨基酸的保守取代。

	C	G	P	S	A	T	D	E	N	Q	H	K	R	V	M	I	L	F	Y	W
W	-8	-7	-6	-2	-6	-5	-7	-7	-4	-5	-3	-3	2	-6	-4	-5	-2	0	0	17
Y	0	-5	-5	-3	-3	-3	-4	-4	-2	-4	0	-4	-5	-2	-2	-1	-1	7	10	
F	-4	-5	-5	-3	-4	-3	-6	-5	-4	-5	-2	-5	-4	-1	0	1	2	9		
L	-6	-4	-3	-3	-2	-2	-4	-3	-3	-2	-2	-3	-3	2	4	2	6			
I	-2	-3	-2	-1	-1	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4	2	5				
M	-5	-3	-2	-2	-1	-1	-3	-2	0	-1	-2	0	0	2	6					
V	-2	-1	-1	-1	0	0	-2	-2	-2	-2	-2	-2	-2	4						
R	-4	-3	0	0	-2	-1	-1	-1	0	1	2	3	6							
K	-5	-2	-1	0	-1	0	0	0	1	1	0	5								
H	-3	-2	0	-1	-1	-1	1	1	2	3	6									
Q	-5	-1	0	-1	0	-1	2	2	1	4										
N	-4	0	-1	1	0	0	2	1	2											
E	-5	0	-1	0	0	0	3	4												
D	-5	1	-1	0	0	0	4													
T	-2	0	0	1	1	3														
A	-2	1	1	1	2															
S	0	1	1	1																
P	-3	-1	6																	
G	-3	5																		
C	12																			

在一些实施方式中,抗体可以被结合至治疗性的制剂、前药、肽、蛋白、酶、病毒、脂类、生物效应调节物、药物制剂或 PEG。

这些抗体可以被结合或融合至治疗性的制剂,这种治疗性制剂可包括可检测标记(例如放射性标记)、免疫调节剂、激素、酶、寡核苷酸、光敏治疗剂或诊断剂、细胞毒性制剂(药物或毒素)、超声增强剂、非放射性标记、它们的组合和其他本领域已知的制剂。

通过耦合至化学发光的化合物来标记抗体,则该抗体可以被检测。然后,通过检测荧光(出现在化学反应过程中)的存在,来确定化学发光标记的抗原结合多肽的存在。极其

有用的化学发光标记化合物的例子是鲁米诺、异鲁米诺、theromatic 吡啶酯、咪唑、吡啶盐和草酸酯。

III. 编码抗体的多核苷酸及制备抗体的方法

本发明也提供了分离的编码双特异抗体、其变体或衍生物的多核苷酸或核酸分子。

本发明的多核苷酸可在相同的多核苷酸分子上或在独立的多核苷酸分子上编码全部的 VHH、其变体或衍生物。此外，本发明的多核苷酸可在相同的多核苷酸分子上或在独立的多核苷酸分子上编码抗体的或 VHH、其变体或衍生物的一部分。

在某些实施方式中，制备的抗体将不会在受试动物（例如人体）上引起有害的免疫反应。在一个实施方式中，使用领域认可的技术修饰本发明的抗原结合多肽、其变体或衍生物以降低它们的免疫原性。例如，抗体可以是人源化的、灵长化的、去免疫性的，或者可制备嵌合抗体。

本发明的双特异抗体的结合特异性能通过体外分析（例如，免疫沉淀法、放射免疫测定（RIA）或免疫酶联吸附法（ELISA））来确定。

IV. 生产系统和方法

本发明还提供了用于生产本发明的双特异性抗体的方法和系统。本领域公知的适于生产抗体的细胞包括人类细胞（例如 CHO 细胞）、哺乳动物细胞和细菌细胞。用细菌细胞来生产双特异抗体存在重大挑战。然而，正如在实施例中所展示的，当在细菌细胞中表达抗体时，即使是两个肽链都表达于相同细胞中时，产生的抗体很大程度上也是可溶的。

因此，在一个实施方式中，本发明提供了包含一个或多个编码本发明的双特异抗体的两个链的多核苷酸的宿主细胞。在一个方面，单核苷酸构建体（例如质粒）包括两个编码序列。在另一个方面，本发明提供两种不同多核苷酸构建体，每一个编码其中一个多核苷酸链。在一个实施方式中，本发明还提供了包含本发明的双特异抗体的两个多肽链的宿主细胞。

在一些方面，所述宿主细胞是人类细胞。在一些方面，所述宿主细胞是哺乳动物细胞。在一些方面，所述宿主细胞是酵母细胞。在一些方面，所述宿主细胞是细菌细胞，包括 G⁺和 G⁻细菌细胞。代表性的细菌细胞包括，但不限于，大肠杆菌和鼠伤寒沙门氏菌。

在某些方面，本发明还提供制备本发明的双特异性抗体的方法。在一个方面，该方法需要在宿主细胞中表达该抗体的两个肽链并且从细胞裂解液中提取抗体。此外，本发明还提供由这些方法得到的双特异性抗体。

V. 治疗和诊断方法

如上所述，本发明的双特异性抗体、其变体或衍生物可用于与癌症或感染性疾病相关的某些治疗和诊断方法中。

本发明进一步涉及基于抗体的疗法，其涉及将本发明的双特异性抗体施用至患者，例如动物、哺乳动物和人体，以治疗本文所述的一种或多种疾病或症状。本发明的治疗性组合物包括，但不限于，本发明的抗体（包括本文所述的其变体和衍生物）和编码本发明的抗体（包括本文所述的其变体和衍生物）的核酸或多核苷酸。

本发明的抗体可被用来治疗、抑制或预防以下疾病、失调或病症，包括与例如与增加细胞存活或抑制细胞凋亡相关的疾病或失调（如癌症）相关的恶性疾病、失调或病症，所述癌症包括但不限于滤泡性淋巴瘤、带有 p53 突变的癌症以及激素依赖的肿瘤（包括但不限于结肠癌、心脏肿瘤、胰腺癌、黑色素瘤、成视网膜瘤、恶性胶质瘤、肺癌、大肠癌、睾丸癌、胃癌、成神经母细胞瘤、粘液瘤、肌瘤、淋巴瘤、内皮瘤、成骨细胞瘤、破骨细胞瘤、骨肉瘤、软骨肉瘤、腺癌、乳腺癌、前列腺癌、Kaposi 肉瘤）；自体免疫失调

（例如多发性硬化症、Sjogren 综合征、Grave 病、Hashimoto 甲状腺炎、自体免疫糖尿病、胆汁性肝硬化、Behcet 病、Crohn 病、多肌炎、系统性红斑狼疮、免疫相关的肾小球肾炎、自体免疫的胃炎、自体免疫的血小板减少性紫癜及类风湿性关节炎）；和病毒性感染（例如疱疹病毒、痘病毒及腺病毒）、炎症、移植物抗宿主病（急性和/或慢性）、急性移植物排斥和慢性移植物排斥。本发明的抗原结合多肽、其变体或衍生物被用于抑制癌症的发展、演进和/或转移，特别是在上文或随后的段落中列出的癌症。

可用本发明的抗体或其变体或衍生物治疗、预防、诊断和/或预后与细胞存活增加相关的其他的疾病或病症，包括但不限于，以下疾病的进展和/或转移：恶性肿瘤及相关疾病，例如白血病（急性白血病（如急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病（包括成髓细胞、早幼粒细胞白血病、髓单核细胞、单核细胞和白血病细胞））和慢性白血病（如慢性髓细胞（粒细胞）白血病和慢性淋巴细胞白血病））、真性红细胞增多、淋巴瘤（如 Hodgkin 病和非 Hodgkin 病）、多发性骨髓瘤、Waldenstrom 巨球蛋白血症、重链病和实体肿瘤(包括但不限于：肉瘤和癌（如纤维肉瘤、粘液肉瘤、脂肪肉瘤、软骨肉瘤、骨源性肉瘤、脊索瘤、血管肉瘤、内皮肉瘤、淋巴肉瘤、淋巴内皮肉瘤、滑膜瘤、间皮瘤、Ewing 瘤、平滑肌瘤、横纹肌肉瘤、结肠癌、胰腺癌、胸腺癌、卵巢癌、前列腺癌、鳞状细胞癌、基底细胞癌、腺癌、汗腺瘤、乳头状癌、乳头状腺癌、囊腺癌、髓样癌、支气管癌、肾细胞癌、肝癌、胆管癌、绒毛膜癌、精原细胞癌、胚胎性癌、Wilm 肿瘤、宫颈癌、睾丸瘤、肺癌、小细胞肺癌、膀胱癌、上皮癌、胶质瘤、形状细胞瘤、成神经管细胞瘤、颅咽管瘤、室管膜瘤、松果体瘤、成血管细胞瘤、听神经瘤、间胶质瘤、脑膜瘤、黑色素瘤、成神经细胞瘤和成视网膜细胞膜瘤))。

本发明的抗体也可通过靶定微生物和免疫细胞来影响微生物的消除而用于治疗由微生物引起的感染性疾病或杀灭微生物。在一个方面，该微生物是病毒（包括 RNA 和 DNA 病毒）、革兰氏阳性菌、革兰氏阴性菌、原生动植物或真菌。

对于任何特定病人特异的剂量和治疗方案将取决于多种因素（包括所使用的特异抗原结合多肽、其变体或衍生物，患者的年龄、体重、总体健康、性别、饮食、施用时间、排泄率、药物的联合以及被治疗的特定疾病的严重程度）。医护人员对这样的因素判断属于本领域普通技术人员判断范围内。该剂量还会基于被治疗的个体病人、施用途径、配方的类型、所使用的组合物的特点、疾病的严重程度及所期待的效果。使用的剂量可通过本领域所公知的药理学和药代动力学的原则决定。

双特异抗体、变体的施用方法包括但不限于：皮内的、肌内的、腹腔的、静脉的、皮下的、鼻内的、硬膜外的和口腔途径。抗原结合多肽或组合物可以通过任何方便途径施用，例如，通过输注或弹丸式注射、通过上皮或黏膜保护层的吸收（例如口腔黏膜、直肠和肠黏膜等等）；它可同其他生物活性制剂一起使用。因此，包含本发明的抗原结合多肽的药用组合物可以经口腔、直肠、肠外、阴道内、腹腔、局部（如通过粉剂、软膏、滴剂或皮肤药贴）、含服施用或是通过口腔或鼻的喷雾施用。

本文所用的术语“肠胃外的”是指施用的方式，这种方式包括静脉内的、肌内的、腹腔的、胸骨内的、皮下的和关节内的注射和输注。

施用可以是系统的或局部的。此外，可预期通过任何合适途径将本发明的抗体引入至中枢神经系统，这些途径包括：脑室内和鞘内的注射；通过脑室内导管（例如连接至储存器（例如 Ommaya 储存器））可以促进脑室内的注射。也可采用肺部给药，例如通过使用吸入器或喷雾器及带有气雾剂的配方给药。

将本发明的双特异抗体或组合物局部施用于需要治疗的区域可能是合乎需要的；这可通过例如（但不限于）以下方式实现：手术中局部输注、局部施用（例如在术后联合使用伤口敷料）、注射、通过导管、通过栓剂或通过植入物（植入物为多孔的、非多孔的、非渗透的或凝胶状的材料，包括薄膜（例如硅胶膜）或纤维）。优选地，当给予包括本发明的蛋白（包括抗体）时，需注意使用此蛋白不吸附的材料。

本发明的抗体在炎症、免疫或恶性疾病、失调或病症的治疗、抑制和预防中有效量，可以通过标准的临床技术来确定。此外，可以选择性地采用体外测定来帮助识别最佳剂量范围。在配方中采用的准确的剂量也将取决于给药的途径以及疾病、失调、或病症的严重性，并且应当根据执业医师的判断和每一个患者的情况来决定。有效剂量可以从源自体外的或动物模型测试系统的剂量-反应曲线推论出。

作为一般性的建议，给予患者的本发明的抗原结合多肽的剂量通常为 0.1mg/kg 至 100mg/kg 患者体重、0.1mg/kg 至 20mg/kg 患者体重，或 1mg/kg 至 10mg/kg 患者体重。总

体来说，由于对外源的多肽的免疫反应，在人体内，人的抗体比来自其他种属的抗体具有更长的半衰期。因此，人抗体的较低给药剂量和更低给药频率通常是可能的。而且，本发明的抗体的给药频率和剂量可通过修饰（例如脂化）而增强这些抗体的摄入和组织穿透力（例如进入大脑）来降低。

用于治疗感染或恶性疾病、病症或失调的方法（包含给予本发明的抗体、其变体或衍生物），在用于人体前，通常在体外被测试，然后在可接受动物模型中进行体内测试，以获得期待的治疗或预防活性。合适的动物模型(包括转基因动物)对本领域普通技术人员是熟知的。例如，表明本文所述的抗原结合多肽的治疗效用的体外实验包括抗原结合多肽在细胞系或病人组织样品上的效果。利用本领域技术人员所知的技术（例如在本文其他地方公开的试验）可确定抗原结合多肽在细胞系和/或组织样品上的效果。根据本发明，可被用来确定是否需要使用特异性的抗原结合多肽的体外试验包括体外细胞培养试验（其中病人组织样品在培养基中生长并被暴露于或以其他方式给予抗体）以及观察这种抗体在该组织样品上的效果。

在进一步的实施方式中，本发明的组合物与抗肿瘤剂、抗病毒剂、抗菌剂或抗生素制剂或抗真菌制剂联合施用。任何这些在本领域已知的制剂都可以在本发明的组合物中被给予。

在另一个实施方式中，本发明的组合物与化疗制剂联合给予。可与本发明的组合物一起给予的化疗制剂包括但不限于：抗生素衍生物（例如阿霉素、博来霉素、道诺霉素、放线菌素）、抗雌激素（例如他莫昔芬）、抗代谢物（例如氟尿嘧啶、5-FU、氨甲嘌呤、氟尿苷、干扰素 α -2b、谷氨酸、普卡霉素、巯嘌呤和 6-巯基鸟嘌呤）、细胞毒剂（例如卡莫司汀、BCNU、洛莫司汀、CCNU、阿糖胞苷、环磷酰胺、雌莫司汀、羟基脲、甲苄肼、丝裂霉素、白消安、顺铂及长春新碱硫酸盐）、激素（例如甲羟孕酮、雌莫司汀磷酸钠、乙炔雌二醇、雌二醇、醋酸甲地孕酮、甲羟睾酮、二磷酸己烯雌酚、氯烯雌醚及睾内酯）、氮芥衍生物（苯丙氨酸氮芥、苯丁酸氮芥、二氯甲基二乙胺（氮芥）、噻替哌）、类固醇类及制品(倍他米松磷酸钠)及其他（例如达卡巴嗪、天冬酰胺酶、米托坦、长春新碱硫化物、长春花碱硫化物和依托泊苷）。

在另外的实施方式中，本发明的组合物与细胞因子联合给予。可与本发明的组合物一起被给予的细胞因子包括但不限于：IL-2、IL-3、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、抗-CD40、CD40L 和 TNF- α 。

在另外的实施方式中，本发明的组合物与其他治疗或预防疗法（例如放射治疗）联合给予。

VI. 组合物

本发明还提供了药物组合物。这样的组合物包含有效量的抗体及可接受的载体。在一个具体实施方式中，术语“药学上可接受的”意为由联邦的或州政府的监管机构许可的、或在美国药典或其他通常公认的药典所列的用于动物，更具体来说，用于人的。进一步地，“药学上可接受载体”通常将是无毒的固态的、半固态的或液态的填充剂、稀释剂、封装材料或任何类型的辅料。

术语“载体”是指药物使用所借助的稀释剂、佐剂、赋形剂或载体。这样的药物载体可以是无菌的液体，例如水和油，包括石油、动物、植物或合成来源的油，例如花生油、大豆油、矿物油、芝麻油等。当药物组合物被静脉注射地给药时，水是首选载体。盐溶液及水性的葡萄糖与甘油溶液也可以作为液相的载体被采用，特别是对可注射的溶液来说。合适的药物赋形剂包括：淀粉、葡萄糖、乳糖、蔗糖、明胶、麦芽、米、面粉、白垩、硅胶、硬脂酸钠、单硬脂酸甘油酯、滑石、氯化钠、脱脂奶粉、丙三醇、丙烯、乙二醇、水、乙醇等。如果需要，组合物也可以包含少量的润湿或乳化剂或 pH 缓冲剂，例如醋酸盐、柠檬酸盐或磷酸盐。也可预期加入抗菌制剂(例如苄醇或苯甲酸甲酯)；抗氧化剂(例如抗坏血酸或亚硫酸氢钠)；螯合剂(乙二胺四乙酸)和用于等张性调节的制剂(例如氯化钠或右旋糖)。这些组合物可以采取溶液、悬浮液、药片、药丸、胶囊、粉末、缓释配方等形式。该组合物可使用惯常的粘合剂和载体(例如甘油三酯)而作为栓剂配制。口服配方可包括标准的载体，例如，药物级的甘露醇、乳糖、淀粉、硬脂酸镁、糖精钠、纤维素、碳酸镁等等。在 Remington's Pharmaceutical Sciences 中由 E. W. Martin 描述合适的药物载体的例子(通过引用将其合并至本中)。这样的组合物将包含治疗上有效量的抗原结合多肽(较好为纯化的形式)与合适数量的载体，以便为患者提供合适的给药方式。这种配方应适合给药的方式。这种亲代(parental)制剂可装于安瓿瓶、一次性注射器或是玻璃或塑料制成的多剂量瓶中。

在一种实施方式中，根据例行程序将该组合物配制成为适于静脉给药于人类的药物组合物。通常，用于静脉给药的组合物为在无菌等渗的水性缓冲液中的溶液。在必要时，组合物也可包括增溶剂和局部麻醉药(例如利多卡因，以减轻注射部位疼痛)。组分通常是单独或是混合在一起以单位剂量形式提供，例如，在密闭容器(例如标明活性制剂的数量的安瓿或 sachette)中的冻干粉剂或无水浓缩物。当组合物通过输注给予时，它可分散于含无菌的药物级水或盐水的输液瓶中。当组合物通过注射给予时，可提供一个安瓿的用于注射的无菌水或盐水，以便在给药前此成分可以被混合。

本发明的组合物可以被配制成为中性的或盐的形式。药学上可接受的盐包括由阴离子形成的盐，例如那些源于盐酸、磷酸、乙酸、草酸、酒石酸等的盐，及由阳离子形成的盐，

例如那些源于钠、钾、铵、钙、氢氧化铁、异丙胺、三乙胺、乙基羟乙胺、组氨酸、普鲁卡因等的盐。

实验例

实施例 1. 双特异抗体诱导 T-细胞介导的细胞毒性

该实施例提供了一种新的双特异抗体形式，通过将靶定 CEA 阳性的肿瘤细胞的单域抗-CEA VHH 连接至结合 T 细胞的抗-CD3 Fab 而成。这样的抗体（S-Fab）可募集 T 细胞至 CEA-阳性的肿瘤细胞。通过使 T 细胞参与，这种 S-Fab 抗体在体外有效地杀伤 CEA 阳性的肿瘤细胞。在异种移植的模型中，该 S-Fab 抗体展现了有力的肿瘤抑制效果，表明这样的策略用于许多免疫疗法中。进一步地，该 S-Fab 抗体可以从 *E. coli* 中被有效地且稳定地表达和纯化。

该实施例利用了单域抗体（VHH）和 Fab 片段的组合来生产异质二聚体抗体。在这种形式中，一个抗-CEA VHH 被连接至抗-CD3 抗体（VH-CH1）的部分重链的 C 端，然后所产生的 VH-CH1-VHH 链与抗-CD3 轻链（VL-CL）配对来形成 S-Fab 双特异抗体。CEA 被选为靶标，是因为它通常在癌症（结肠癌、胰腺癌、胃癌、食道癌、肺癌、乳腺癌、子宫癌、卵巢癌、子宫内膜癌）中过度表达。

这种 S-Fab 抗体从 *E. coli* 中被表达和纯化。体外实验证实 S-Fab 的肿瘤细胞杀伤功能对 CEA-阳性的肿瘤细胞是特异性的并且是依赖 T 细胞的。在体内，这种 S-Fab 抗体抑制肿瘤发展。因此，这样的抗体形式呈现了作为免疫治疗剂的双特异抗体的新形式。

方法与材料

Fab 设计和蛋白纯化

构建如图 2a-b 的 S-Fab 蛋白 HCBF5/6 和对照 Fab HCBF4/5。基于公开的序列合成抗-CD3（人源化的 UCHT1）基因（见表 5）。骆驼抗-CEA VHH 序列被克隆到 CH1 域的 C 端。信号序列被添加至每一个链的 N 端用于周质表达。

重组抗体的质粒被共转化进入 BL21（DE3）感应细胞，并且在带有合适的抗生素选择的 LB 培养基中共表达。对于蛋白表达，1L 培养物于 16°C 生长 20h 至 OD600 0.8-1.0（0.1mM IPTG 诱导）。细菌细胞在 4°C，4400rpm 离心 30min 形成细胞团块。在冷冻的蔗糖溶液中（20 mM Tris-HCl pH 8.0; 25 % (w/v) 蔗糖; 1 mM EDTA; 1mM PMSF）以 1:4(m/v)重悬细胞团块而携带周质提取物。这种悬浮液在 8,500g 离心 20min，上清液为蔗糖组分。细胞团块在冷冻的周质溶液(5mM MgCl₂)中被重悬，悬浮液在 8,500g 离心 20min，上清液为周质组分。

通过由 C 端 His8-标记的固定化金属亲和层析的两个步骤，从蔗糖组分和周质组分的混合组分中纯化这种蛋白。

按制造商所述, 使用 GE Superdex 200 Increase 10/300GL 进行了凝胶过滤。凝胶过滤的蛋白标记购自 Sigma(MWGF1000)。

细胞系和动物

所有细胞系(包括 CEA 阳性的人直肠癌细胞系 HT29、DLD-1 和 LS174T, CEA 阴性的人直肠癌细胞系 SKOV3, 和 JurkatT 细胞系)购自中国科学院典型培养物保藏中心(中国, 上海)。在 5% CO₂, 37 °C 潮湿的培养箱中, HT29 和 SKOV3 在含 10%的胎牛血清(Gibco, Life Technologies, China)和 1%青霉素/链霉素(Hyclone)的 DMEM 培养基(Gibco, Life Technologies, China)中培养, LS174T 和 Jurkat 含有 10%胎牛血清(Gibco, Life Technologies, USA)和 1%青霉素/链霉素(Hyclone)的 RPMI-1640 培养基(Gibco, Life Technologies, China)中培养。Nod/SCID 小鼠购自中山大学实验动物中心。人血液采集、动物照料和动物实验由中山大学批准。

从 PBMC 分离 T 细胞

使用 Ficoll 密度离心从健康捐赠者中制备人 PBMC。用 EasySep™人 CD3 阳性选择试剂盒(STEMCELL Technologies, Inc., Vancouver, Canada)纯化 T 细胞。分离的 T 细胞培养于含有 10%FBS 和 1%青霉素/链霉素的完全的 RPMI1640 培养基中, 置于 37°C, 5% CO₂ 潮湿培养箱。

CEA 和 S-Fab 相互作用的表面等离子体共振(SPR)试验

癌胚抗原 CEA 全长蛋白(ab742, Abcam)被用于固定化芯片(GLC 芯片, #33D21101, Bio-Rad)。在固定化后, 在 25°C, 以 5 µl/min 流速的 PBST(10mM Na₃PO₄, 150mM NaCl, 0.01% Tween, pH=7.4)作为电泳缓冲液, 进行了对不同样品的相互作用分析。用 ProteOn™ XPR 36 (Bio-rad)收集数据, 使用 Protein On evaluation 软件(Bio-rad)分析这些数据以适用合适的结合模型。根据结合与解离相的拟合测定动力学常数。KD 源自这些常数的比率。阳性对照(CEA/CD66e (CB30) Mouse mAb(#2383, Cell Signaling)用于优化此过程。

流式细胞分析

为了检查 S-Fab 与 CD3 细胞表面标记的结合, 1×10⁶ Jurkat 细胞/样品被离心收集(1000rpm, 5min), 然后用 1ml 冰冷的 PBS+0.1%BSA 清洗。细胞团块在 100ul 冰冷的 PBS+0.1%BSA 中重悬。抗-CD3 抗体(R&D systems, MAB100)、HCBF4/5 和 HCBF5/6 (S-Fab) 被加至终浓度 50ug/ml。细胞与一抗在冰上孵育一小时。细胞被用冰冷的 PBS+0.1%BSA 清洗两次。然后, 羊-抗-鼠 Alexa 488 或抗-Flag-FITC 被加至终浓度 10ug/ml。细胞在冰上再孵育一小时。清洗在细胞两次后, 进行流式细胞分析。

细胞毒性试验

SKOV3、HT29 和 LS174T 被用作靶细胞。人 PBMC 或分离的未预刺激的 T 细胞被用作效应细胞。100ul 的靶标细胞（5000 个细胞）被转移至 96 孔板的每一个孔（一式四份）。在 6 小时孵育后，等体积的 $CD3^+$ T 细胞以 E:T(10:1 或 5:1)的比率被加至每一个孔。然后加入从 0.01ng/ml 至 10ug/ml 的所示浓度的抗体。在 48 小时孵育后，细胞用 PBS 洗两次。10 ul CCK8 Kit 随后被加入至每一个孔中。通过”Magellan”软件使用 TECAN Infinite F50 进行测量。靶细胞存活率（%）按照此公式计算： $[(\text{存活靶细胞（样品）}-\text{培养基})/(\text{存活靶细胞（对照）}-\text{培养基})] \times 100$ 。

在竞争性试验中，LS174T 被用作靶细胞。效应细胞对靶细胞的比率是 10:1。HCBF4/5 和 HCBF5/6 以 1:1、1:10 和 1:100 的比率加入。然后，如上所述进行细胞毒性试验。

体内试验

非肥胖糖尿病/重症联合免疫缺陷(NOD-SCID)小鼠饲养于中山大学实验动物中心，在无菌和标准化环境条件下（20-26°C 室温，40%-70%相对湿度，及 12 小时昼夜节律）小鼠接受高压灭菌的食物、垫料和无菌饮用水。

从细胞培养液中收获的 LS174T 人结肠癌细胞，用 PBS 洗一次，在 PBS 中重悬，然后与自健康捐赠者刚分离的 PBMC 混合。细胞悬液被皮下注射于右侧，总体积 0.4mL/小鼠，混合有 1×10^6 LS174T 细胞和 5×10^6 人 PBMC。在 LS174T/T 细胞移植后一小时，腹腔注射（i.p.）给予抗体或载体对照（PBS）。然后，在接下来的 7 天每日治疗这些动物。肿瘤大体形成于移植后大约 8 到 10 天。用游标卡尺在两个垂直的方向上测量肿瘤体积，使用此公式（宽度²×长度）/2 计算体积。所有结果以每一组的算术平均值表示。

结果

S-Fab 双特异抗体构建和纯化

通过抗-CEA 单域抗体和常规抗-CD3 Fab 的连接而设计出双特异抗体 S-Fab(图 2a, 2b)。该单价抗-CD3 Fab 被期望识别 T 细胞和募集 T 细胞。在 VH-CH 链的 C 端，抗 CEA VHH 与 Fab 融合。S-Fab 的表达水平与对照抗 CD3 Fab 的表达水平相当。为了促进 S-Fab 的表达和纯化，S-Fab 的两个链被克隆进两个不同的质粒；周质表达被用于纯化此复合体(图 2c, 2d)。

与 Fab 相似，此 S-Fab 以异质二聚体的形式被纯化。免疫印迹（图 2c, 2d）展现了该半抗体的确折叠成一个完整的 Fab。在第二次 Ni-NTA 亲和纯化后，此蛋白的纯度超过 90%(图 2e)。然后，凝胶过滤被用于分析此纯化蛋白。轻链和重链组合成完整 Fab 抗体(图 2e)，分子量（~65KD 和~50KD）如预期分子量一样。

S-Fab 识别抗原 CD3 和 CEA

为了检测此纯化抗体是否能识别这些抗原, 进行流式细胞术分析以表征 CD3 抗原与 S-Fab HCBF5/6 的结合。对于对照抗体 OKT3, 观察到了在 D3 阳性的 Jurkat 细胞上的阳性表达(图 3a)。S-Fab HCBF5/6 也具有在 Jurkat 细胞上的阳性表达(图 3a), 表明 HCBF5/6 可结合至 Jurkat 细胞。这种低强度可能是由于 Fab 的单价造成的。

为了确认 S-Fab 与 CEA 的结合, 该实施例使用 SPR 来测量 S-Fab 与 CEA 的结合。对于对照 FabHCBF4/5, 没有检测到与 CEA 的结合(图 3a)。在 $k_d \sim 12.5 \text{ nM}$ 时可观察到 S-Fab HCBF5/6 与 CEA 的牢固结合(图 3b)。

HCBF5/6 S-Fab 杀伤特异性表达 CEA 的肿瘤细胞

为了评估 S-Fab 是否能靶定肿瘤细胞以实现 T 细胞介导的细胞杀伤, 进行了细胞毒性测定。在 E:T 10:1 (图 4a) 或 5:1(图 4b)的比率, 对于 S-Fab (HCBF5/6) 或对照 CD3 Fab (HCBF4/5) 都没有观察到对 CEA 阴性的细胞系 (SKOV3) 的细胞毒性。对于 CEA 阳性的细胞系(LS174), 对照抗 CD3 Fab (HCBF4/5) 没有细胞杀伤作用; 但 S-Fab (HCB5/6) 可以诱导细胞杀伤(图 4b)。对于 CEA 阳性细胞系(HT29), 对照 CD3 Fab (HCBF4/5) 本身即可杀伤肿瘤细胞, 然而, S-Fab (HCBF5/6) 比 HCBF4/5 可诱导更高细胞杀伤活性(图 4a 和 4b)。

免疫印迹分析表明 LS174T 细胞比 HT29 细胞具有更高 CEA 表达(图 4c)。在剂量反应实验中, 相比于在 HT29 细胞上, S-Fab HCBF5/6 在 LS174T 细胞上具有更低的 IC50(图 4d), 进一步地确认 CEA 的表达对于 S-Fab HCBF5/6 介导的细胞杀伤是重要的。

T 细胞结合介导 S-Fab 的细胞杀伤活性

为了进一步地确认 T 细胞对 S-Fab HCBF5/6 诱导的细胞杀伤必不可少, 进行了竞争性测定。CD3⁺T 细胞和 LS174T 以 E:T=10:1 的比率使用。当 1nM HCBF5/6 被用于肿瘤细胞和 T 细胞时, 引发了有效的细胞杀伤(图 5)。然而, 当应用增大量的 Fab HCBF4/5 时, 细胞杀伤效应缩小。由于单独的 FabHCBF4/5 对细胞杀伤不具影响, 此数据表明 S-Fab HCBF5/6 需要结合至 T 细胞来引导细胞杀伤。当 T 细胞的结合被对照抗体 HCB4/5 竞争隔离时, 则诱导了较低的细胞杀伤作用。

S-Fab 在体内抑制肿瘤生长

该实施例测试了 S-Fab HCBF5/6 是否能在体内抑制肿瘤生长。LS174T 细胞与人 PBMC 混合, 然后在 NOD-SCID 小鼠上皮下移植。然后, 这些小鼠用 20ug 的 S-Fab HCBF5/6, 或作为对照组的 PBS 或对照 Fab HCBF4/5(n=5)来处理。对于仅用 PBMC 治疗的肿瘤或含对照 Fab HCBF4/5 的 PBMC 治疗的肿瘤没有观察到肿瘤生长抑制。对于用 PBMC 和 HCBF5/6 治疗的小鼠观察到了明显的肿瘤生长抑制(图 5)。在用 PBMC 和 HCBF5/6 治疗的小鼠中, 仅五分之二的小鼠形成了肿瘤。在其他三组小鼠中没有观察到肿瘤生长。这些数据确认了 S-Fab HCB5/6 可特异性地抑制在移植瘤小鼠中的肿瘤生长。

该实施例提供了双特异抗体的新的形式(S-Fab)。双特异抗体作为强有力的免疫治疗方法已经引起了极大兴趣。对于它们的抗肿瘤活性的各种各样的形式已经被提出和研究。在它们之中,因为 BITE 通过直接靶向 T 细胞诱导强的抗肿瘤活性,所以 BITE(两个单链 Fv 融合的抗体)展现了广阔的前景。Blinatumomab(靶定 CD19 和 CD3 的 BITE 抗体)已经被允许在临床上用于 B 细胞白血病。然而,单链 Fv 融合蛋白(通过 BITE 和其他相似的技术使用)具有聚集的趋势和在细菌细胞内表达的难题。

一种新的双特异抗体(S-Fab)以常规 Fab 为基础(图 2b),其中单域抗体连接至 VH-CH1 的 C 端。不同于 BITE 或其他单链 Fv,在本研究中 S-Fab 的抗-CD3 部分是 Fab 的天然形式,因此更趋于稳定。测试了一些不同的抗 CD3 抗体,由于源自 UTCH1 克隆的抗 CD3 Fab 展现出在 *E.coli* 更好表达和可溶性,因而将它在本研究中使用。由于这种抗 CD3 Fab 可以在 *E.coli* 中表达和生成,它极大地减少 ScFv 表达的复杂性,ScFv 通常需要昂贵的哺乳细胞表达系统。

S-Fab 提供了双特异抗体的新形式,其具有多种优势。在本发明中使用天然人抗-CD3 Fab, T 细胞可以参与杀伤肿瘤细胞。

实施例 2. 双特异抗体诱导 NK-细胞介导的细胞毒性

该实施例提供了一种新的双特异抗体形式 Her2-S-Fab,通过将单域抗-CD16 VHH 连接至曲妥珠单抗(Trastuzumab, Herceptin®) Fab 的 C 末端构建而成。Her2-S-Fab 可经细菌细胞表达和纯化。在体外细胞实验中,Her2-S-Fab 可通过招募 NK 细胞特异性杀死 Her2 过表达的癌细胞。与曲妥珠单抗相比,观察到了增强的肿瘤细胞杀伤效果。体内研究表明,Her2-S-Fab 可抑制肿瘤进展。

方法与材料

Fab 设计与蛋白纯化

Her2-S-Fab 及对照 Her2-Fab 的构建体显示于图 6a 中,通过标准 DNA 克隆技术,首先化学合成曲妥珠单抗抗 Her2 VL-CL 和 VH-CH1(见表 5),并克隆到 pET21a 载体和 pET26b 载体中。随后,将 VHH-CD16 克隆到曲妥珠单抗抗 Her2 VH-CH1 的 C-末端。在 N-末端添加信号序列 pelB 以实现细胞周质表达。VL-CL/VH-CH1-VHH(CD16)的异源二聚化形成了 Her2-S-Fab,而 VL-CL/VH-CH1 的异源二聚化形成了 Her2-Fab。

在 *E. coli* 中的细胞周质蛋白纯化简述如下。编码不同多肽的两个质粒被共转化至具有合适抗生素标记的 BL21(DE3)细胞中。诱导蛋白质表达并提取细胞周质。通过 Ni-NTA 琼脂糖亲和色谱以及抗 IgG CH1 亲和纯化从蔗糖与细胞周质成分的混合物中纯化出抗 Her2 Fab 或 Her2-S-Fab(图 6b)。使用 GE Hiload 16/600 Superdex 200 pg 按制造商(GE)说明进行凝胶过滤。凝胶过滤的蛋白质标记物购自 Sigma(MWGF1000)。

细胞系和动物

Her2 阳性癌细胞系 SKBR3（人乳腺癌细胞）、BT474（人乳腺癌细胞）、SKOV3（人卵巢癌细胞）、MCF7（人乳腺癌细胞）以及 Her-2 阴性癌细胞系 MDAMB435、MDAMB468、中国仓鼠卵巢细胞（CHO）均购自中科院典型培养物中心（上海）。SKBR3、SKOV3 和 MDAMB435 细胞培养于添加了 10% HI 胎牛血清（Gibco, Life Technologies, USA）和 1%青霉素/链霉素（HyClone）的 DMEM 培养基（Gibco, Life Technologies, China）中；BT474 和 CHO 细胞培养于添加了 10% HI 胎牛血清（Gibco, Life Technologies, USA）和 1%青霉素/链霉素（HyClone）的 RPMI-1640 培养基（Gibco, Life Technologies, China）中；MDAMB468 细胞培养于 L15（Gibco, Life Technologies, China）中，置于温度 37℃、湿度 5% 的 CO₂ 培养箱中。

Nod/SCID 小鼠购自中山大学实验动物中心。人血液采集、动物照料和动物实验由中山大学批准。

血细胞分离

使用 Ficoll 密度离心从健康捐赠者中制备人外周血单核细胞（PBMC）。用 EasySep™ 人 NK 细胞富集试剂盒（STEMCELL Technologies, Inc., Vancouver, Canada）纯化 NK 细胞。分离的 NK 细胞培养于含有 10%FBS 和 1%青霉素/链霉素的完全 RPMI1640 培养基中，置于 37℃, 5% CO₂ 潮湿培养箱。

流式细胞分析

当组织培养细胞融合度达到 80-90%时，加入 0.25%胰蛋白酶消化。在 1500 rpm 离心 5 分钟按 1×10^5 细胞/样品收集细胞，然后用 3ml 冰冷的 PBS+0.1%BSA 清洗两次。细胞团块在 500ul 冰冷的 PBS+0.1%BSA 中重悬。每个试管中分别加入曲妥珠单抗、Her-2 Fab 或 Her2-S-Fab 作为一抗；羊-抗-人 IgG（H+L）Alexa Fluor 488（Invitrogen, cat#A11013）作为二抗。HER2/neu-PE(BD, cat#340552)作为对照。清洗在细胞两次后，进行流式细胞分析。

细胞毒性试验

SKBR3、BT474、MCF7、SKOV3、MDAMB435、MDAMB468 和 CHO 细胞被作为靶（T）细胞。人 PBMC 细胞或分离的 NK 细胞（未经刺激）被用作效应（E）细胞。100μl 的靶细胞（5000 个细胞）被转移至 96 孔板的每一个孔（一式三份）。在 12 小时孵育后，等体积的 NK 细胞以 E:T(10:1)的比例被加至每一个孔。然后加入从 0.01ng/ml 至 10μg/ml 的所示浓度的抗体。在 72 小时孵育后，使用 CCK8 试剂（Dojindo, CK04）对细胞存活率进行定量分析。靶细胞存活率（%）按照此公式计算： $[(\text{存活靶细胞（样品）}-\text{培养基})/(\text{存活靶细胞（对照）}-\text{培养基})] \times 100$ 。

体内肿瘤生长抑制试验

从细胞培养液中收获 SKOV3 细胞，用 PBS 洗一次，在 PBS 中重悬，然后与从健康捐赠者刚分离的 PBMC 混合。细胞悬液被皮下注射于 NOD/SCID 小鼠右侧，总体积 0.2 mL/小鼠，混合有 2×10^6 SKOV3 细胞和 1×10^7 人 PBMC。在 SKOV3/PBMC 细胞移植后 2 小时，腹腔注射 (i.p.) 给予抗体或载体对照 (PBS)。然后，在接下来的 6 天每日治疗这些动物并观测小鼠状态。用游标卡尺在两个垂直的方向上测量肿瘤体积，使用公式（宽度² × 长度）/2 计算体积。所有结果以每一组的算术平均值表示。

结果

Her2-S-Fab 和 Her2-Fab 的纯化

Her2-Fab 和 Her2-S-Fab 的纯化通过两步法实现，首先使用 Ni-NTA-琼脂糖，再使用抗-CH1 亲和纯化（图 6b）。因为 VHH 相对较小且为可溶性的，添加抗 CD16 VHH 不会影响抗 Her2 Fab 的表达水平和溶解度。Her2-S-Fab 的溶解度和表达水平与对照 Her2-Fab 相当（0.6 mg/L）。为了确定 Her2-S-Fab 是否正确地折叠成为异源二聚物，使用凝胶过滤法来分析纯化的蛋白。蛋白的大部分形成了单个的峰。轻链和重链组成完整的 Fab 抗体，分子量为约 65 kD（图 6c）和约 50 kD（数据未示出），分别与 Her2-S-Fab 和 Her2-Fab 的预期分子量相似，表明大部分 Her2-S-Fab 都正确地折叠。

Her2-S-Fab 识别 Her2 阳性细胞

为验证 Her2-S-Fab 是否可以结合至 Her2 阳性表达细胞，利用 HER2 阳性和 HER2 阴性细胞进行流式细胞分析。结果显示，使用对照抗 Her2 抗体，Her2 阴性细胞 CHO、MDAMB435 和 MDAMB 468 具有非常低的、甚至没有染色；MCF7 具有非常低的 Her2 表达；而 BT474、SKBR3 和 SKOV3 细胞具有高 Her2 表达（图 7a）。

曲妥珠单抗可以染色 HER2 表达细胞（图 7b）。Her2-Fab 和 Her2-S-Fab 都可结合至 HER2 阳性细胞（图 7c 和 7d），并且显示出相似的荧光强度变化，表明对照 Fab 和 Her2-S-Fab 具有相似的结合能力。Her2-Fab 和 Her2-S-Fab 也显示出于曲妥珠单抗相同的染色模式，强度较低，这与 Her2-Fab 以及 Her2-S-Fab 的单价性质一致。

Her2-S-Fab 诱导 NK 细胞介导的细胞毒作用

为了评价 Her2-S-Fab 的细胞毒作用，Her2-Fab、Her2-S-Fab 以及曲妥珠单抗被与癌细胞以及新鲜分离的 NK 细胞一起培养。在 10 μ g/ml 的浓度下，即使存在 NK 细胞，HER2-阴性细胞系 CHO 中也没有观察到细胞毒性（图 8a）。对于 HER2 过表达的细胞系 SKOV3，当不存在 NK 细胞时，只有曲妥珠单抗降低细胞增殖，存活率为 72%（图 8a），Her2-S-Fab 或 Her2-Fab 对细胞存活率无影响。但是，当存在 NK 细胞时，Her2-S-Fab 诱导强烈的细胞毒性，并且比曲妥珠单抗的细胞毒性更高（存活率 10.70% vs 33.12%）（图 8a）。Her2-S-Fab 的细胞毒作用依赖于抗 CD16，因为单独的 Her2-Fab 即使在存在 NK 细胞的情况下也没有细胞毒作用（图 8a）。

为进一步评价 Her2-S-Fab 在肿瘤细胞上的作用，我们测定了不同抗体在癌细胞上的剂量反应。Her2-Fab 对细胞存活率没有或仅有很少的影响，而不论 Her2 表达状态如何（图 8b-f）。曲妥珠单抗在无 NK 细胞时仅对 Her2 高表达细胞 SKOV3 具有轻微的肿瘤抑制作用（图 8b-f）。在存在 NK 细胞的情况下，曲妥珠单抗和 Her2-S-Fab 对 SKBR3 和 SKOV3 细胞引起强烈的细胞毒作用，并且呈剂量依赖性，但对于 HER2 阴性细胞系 MDAMB435 以及 CHO 没有作用（图 8b-f）。对于 MCF7（Her2 低表达癌细胞）需要高浓度的抗体才能诱导细胞毒作用，表明 Her2-S-Fab 的活性依赖于 Her2 的表达。在 MCF7、SKBR3 和 SKOV3 细胞中，Her2-S-Fab 都显示出比曲妥珠单抗更强的细胞毒作用，表明 Her2-S-Fab 与曲妥珠单抗更有效。

Her2-S-Fab 抑制体内肿瘤生长

使用过继转移模型来测试 Her2-S-Fab 是否可以在体内抑制肿瘤生长。首先将 SKOV3 细胞与人 PBMC 细胞混合，随后皮下移植到 NOD/SCID 小鼠中。小鼠随后用 PBS、Her2-Fab 或 Her2-S-Fab 处理。对于以 Her2-Fab 处理的小鼠，没有观察到肿瘤生长的抑制。但是，对于 Her2-S-Fab，观察到的强大的肿瘤生长抑制现象（图 9）。

因此，Her2-S-Fab 可被用来使 NK 细胞导向 Her2 过表达细胞。Her2-S-Fab 能够在体内和体外有效地杀伤 Her2 阳性癌细胞。

* * *

说明书中引用的所有专利和其他参考文献都是本发明所属领域普通技术人员的水平的表示，通过引用将它们以整体形式合并至本文中，包括其中的任何表格和附图，就如同每个参考文献都单独通过引用以其整体形式合并至本文中一样。

本领域技术人员会容易意识到，本发明可容易改造而获得本文所述的那些目的和优点以及隐含在本文中的那些目的和优点。在本文中当前优选实施方式的代表的形式描述的方法、变体和组合物是示例性的，并不意在限制本发明的范围。对于本领域技术人员来说，可对它们做出改变或将其用于其他用途，但这都包括在如所附权利要求定义的本发明的范围内。

此外，当以马库什群组或其他替代物群组形式描述本发明的一些特征或方面时，本领域技术人员会意识到，本发明也以该马库什群组或其他群组的任何单个成员或成员的子群组的形式被描述。

而且，除非有相反表示，否则当一些实施方式中提供了各种数量值时，通过取任何两个不同的值作为一个范围值的端点，来描述其他实施方式。这些范围值也在本发明的范围之内。

在适当时候，本文中解释性地描述的内容可在缺少未在本文具体公开的任何一个或多个元件、一个或多个限制条件的情况下实施。因此，例如，在本文的每种情况下，术语

“包括”、“实质上由...组成”以及“由...组成”中的任何一个都可被其他两个术语替代。因此，要理解的是，虽然本发明已通过优选实施方式和任选的特征具体公开，但本领域技术人员可对本文公开的想法做出修改和变化，而这些修改和变化仍属于所附权利要求定义出的本发明的范围之内。

权利要求

1. 一种二价抗体，包含 (a) 包含了抗体的轻链和部分重链的抗原结合片段 (Fab)，以及 (b) 融合至所述轻链或所述部分重链的 C 端的单域抗原结合片段 (VHH)，其中所述部分重链不包含 CH2 或 CH3 域。
2. 根据权利要求 1 所述的二价抗体，其中所述 VHH 片段被融合至所述部分重链。
3. 根据权利要求 2 所述的二价抗体，其中所述二价抗体进一步包含融合至轻链的第二种 VHH 片段。
4. 根据权利要求 1 至 3 中的任一项所述的二价抗体，其中所述 Fab 片段和所述 VHH 片段每一个都具有对肿瘤细胞或免疫细胞的特异性。
5. 根据权利要求 4 所述的二价抗体，其中所述 Fab 片段对肿瘤抗原具有特异性，并且所述 VHH 片段对免疫细胞具有特异性。
6. 根据权利要求 5 所述的二价抗体，其中所述肿瘤抗原选自 CEA、EGFR、Her2、EpCAM、CD20、CD30、CD33、CD47、CD52、CD133、CEA、gpA33、黏蛋白、TAG-72、CIX、PSMA、叶酸结合蛋白、GD2、GD3、GM2、VEGF、VEGFR、整合素、 $\alpha V\beta 3$ 、 $\alpha 5\beta 1$ 、ERBB2、ERBB3、MET、IGF1R、EPHA3、TRAILR1、TRAILR2、RANKL、FAP 和 Tenascin。
7. 根据权利要求 5 所述的二价抗体，其中所述肿瘤抗原为 CEA 或 Her2。
8. 根据权利要求 5 所述的二价抗体，其中所述 VHH 片段对哺乳动物 T 细胞或哺乳动物 NK 细胞具有特异性。
9. 根据权利要求 5 所述的二价抗体，其中所述 VHH 片段对选自 CD3、CD16、CD19、CD28 和 CD64 的抗原具有特异性。
10. 根据权利要求 9 所述的二价抗体，其中所述抗原为 CD16 或 CD3。

11. 根据权利要求 1 到 3 或权利要求 5 到 9 中任一项所述的二价抗体，其中所述 VHH 片段在 Kabat 位点 37、44、45、47 处分别不包含 Val、Gly、Leu 和 Trp 残基。
12. 一种宿主细胞，其包含一个或多个编码上述权利要求任一项所述的二价抗体的多核苷酸。
13. 根据权利要求 12 所述的宿主细胞，其中所述宿主细胞是细菌细胞或酵母细胞。
14. 根据权利要求 12 所述的宿主细胞，其中宿主细胞为 *E. coli*。
15. 一种制备可溶性抗体的方法，所述方法包含培养权利要求 12-14 中任一项所述的宿主细胞，以及收获在所述细胞中表达的抗体。
16. 权利要求 1-11 的任一项所述的二价抗体在制备治疗癌症的药物中的应用。

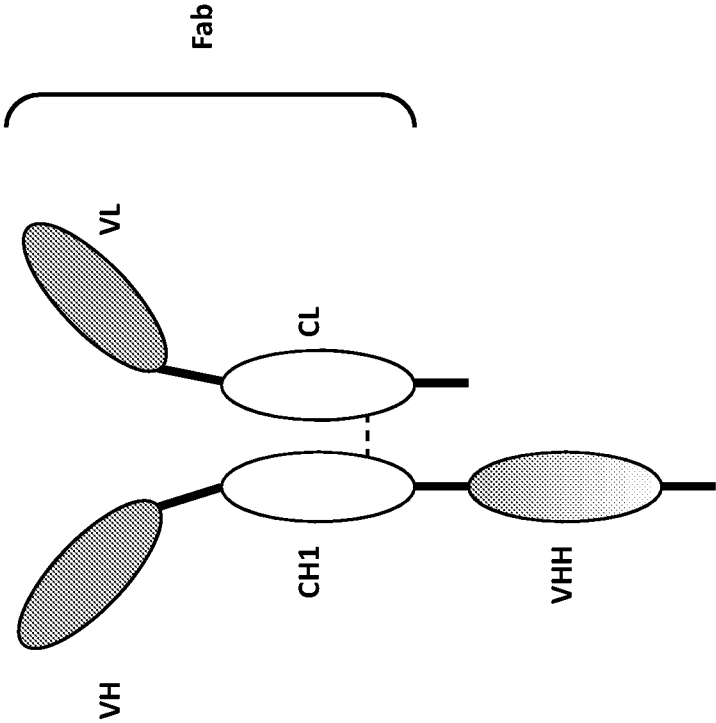


FIG. 1a

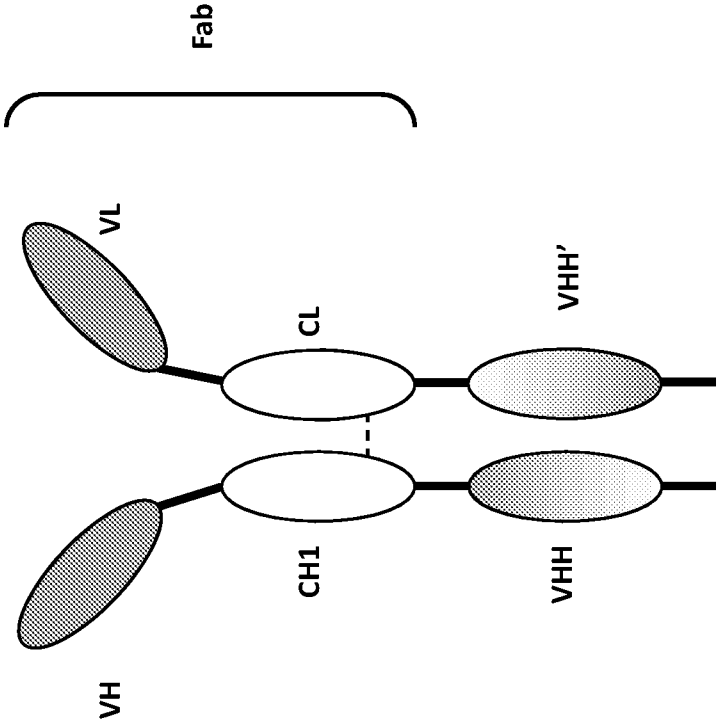


FIG. 1b

FIG. 2a

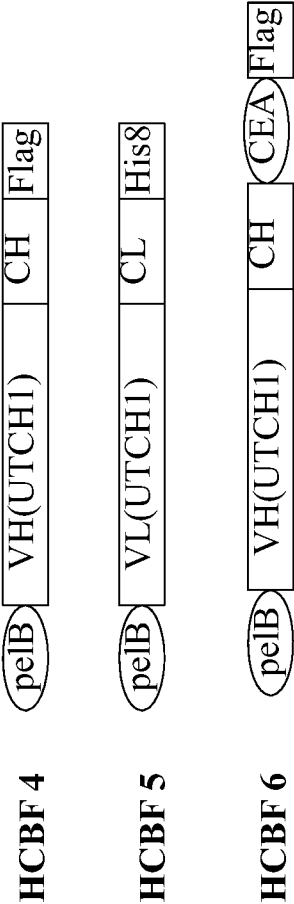


FIG. 2b

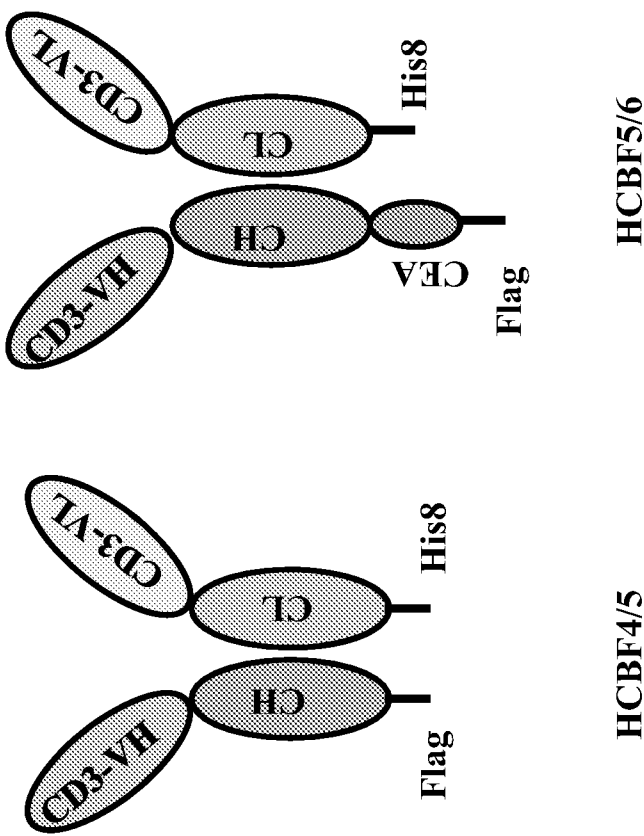


FIG. 2d

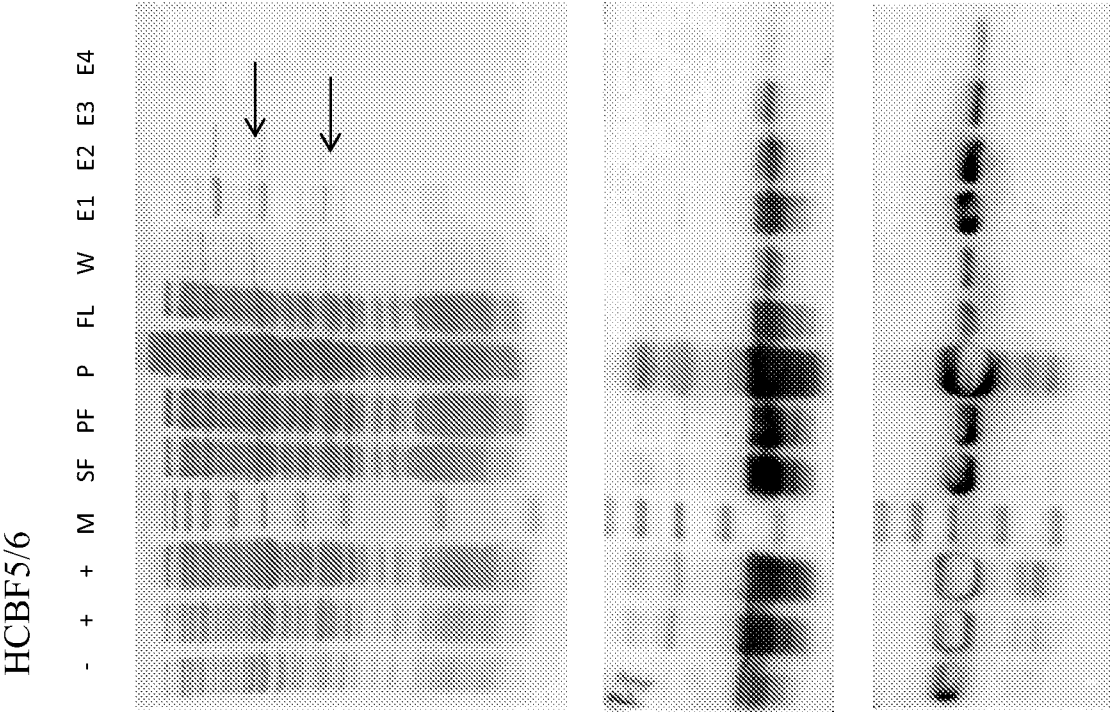


FIG. 2c

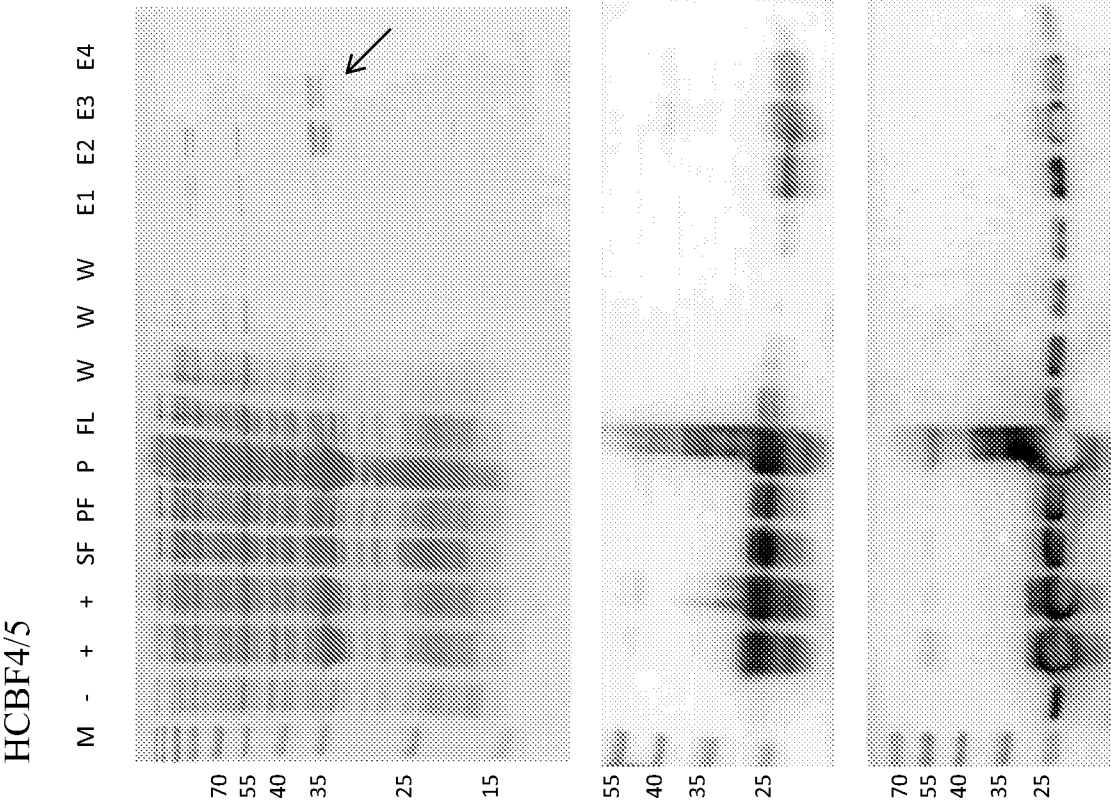


FIG. 2f

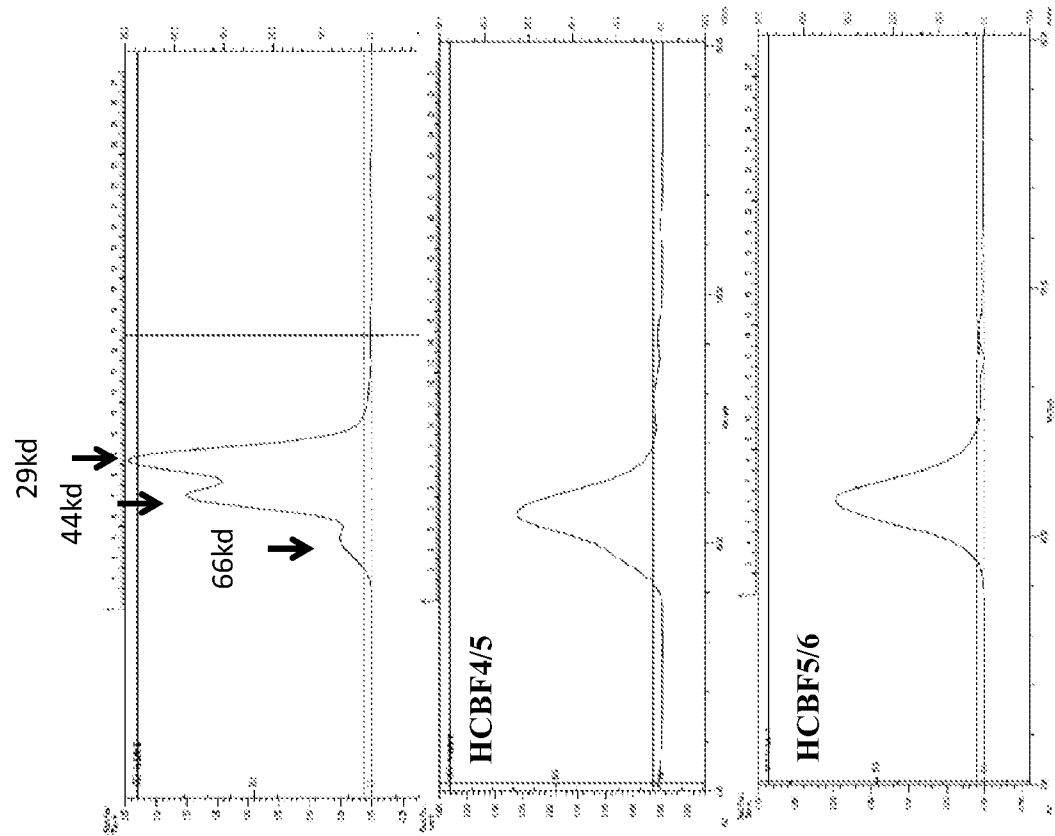


FIG. 2e

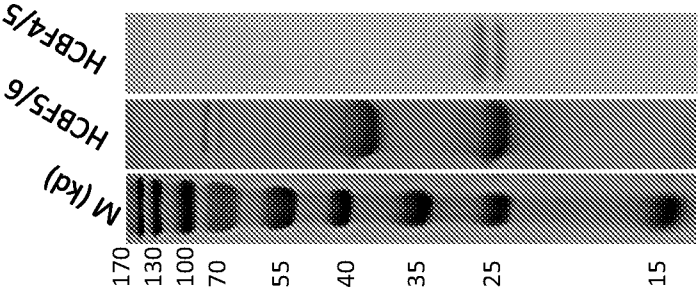
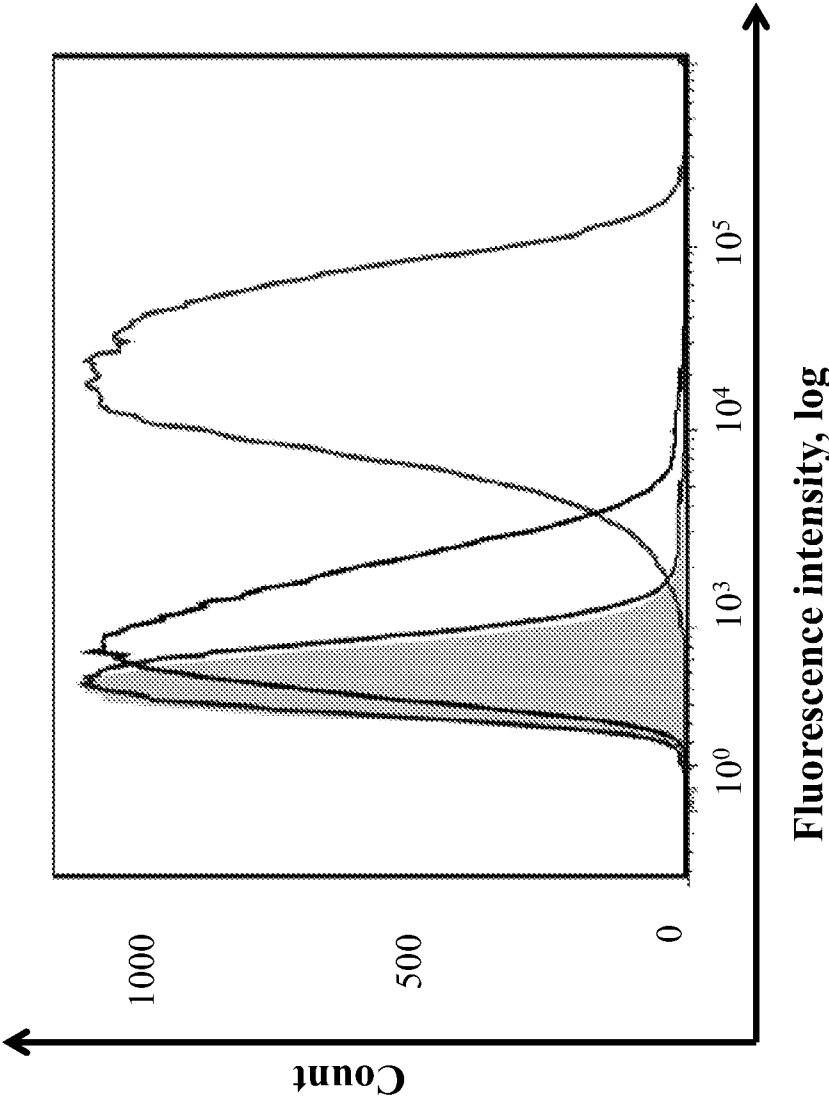
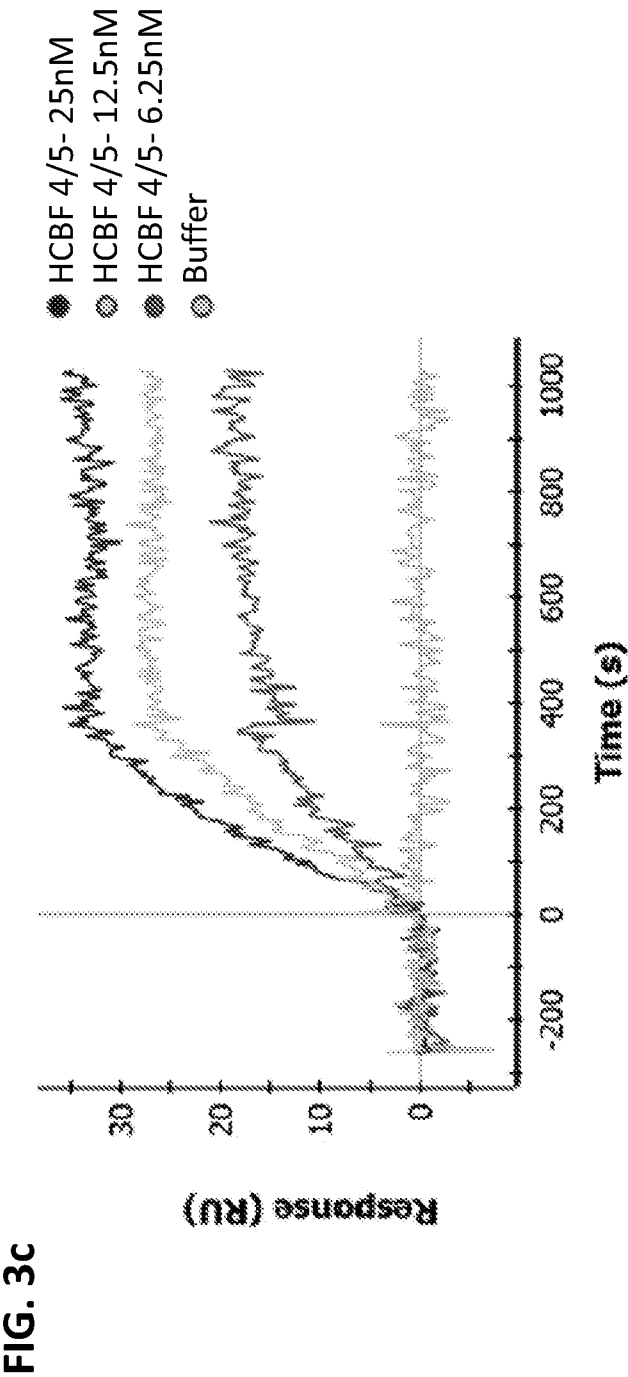
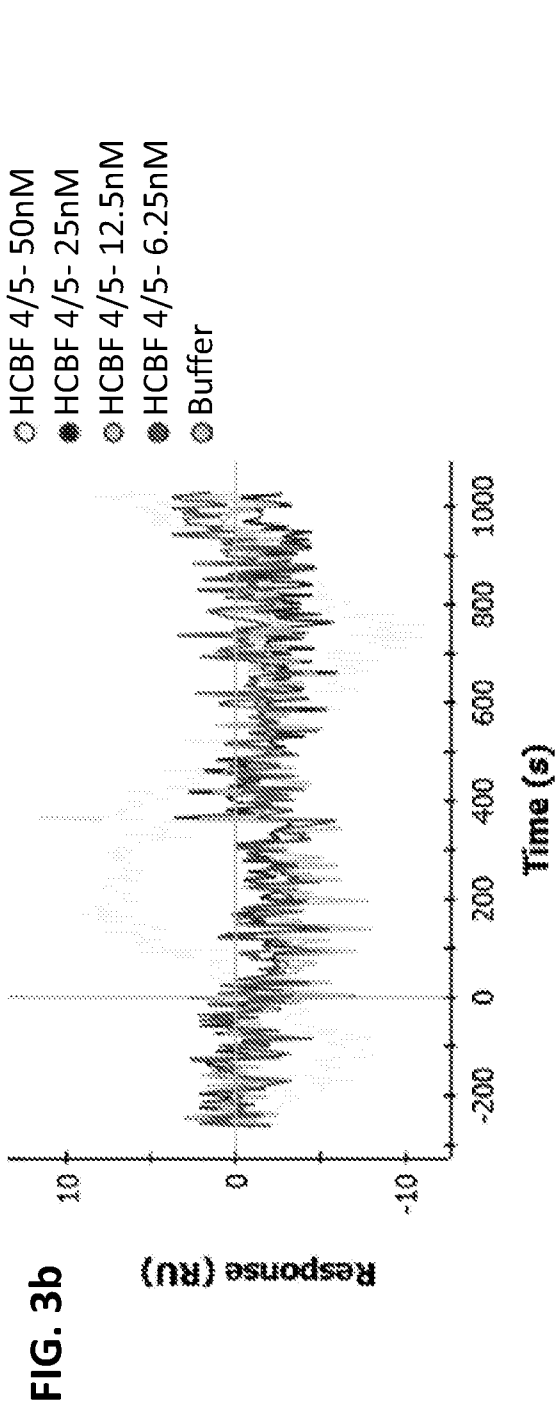
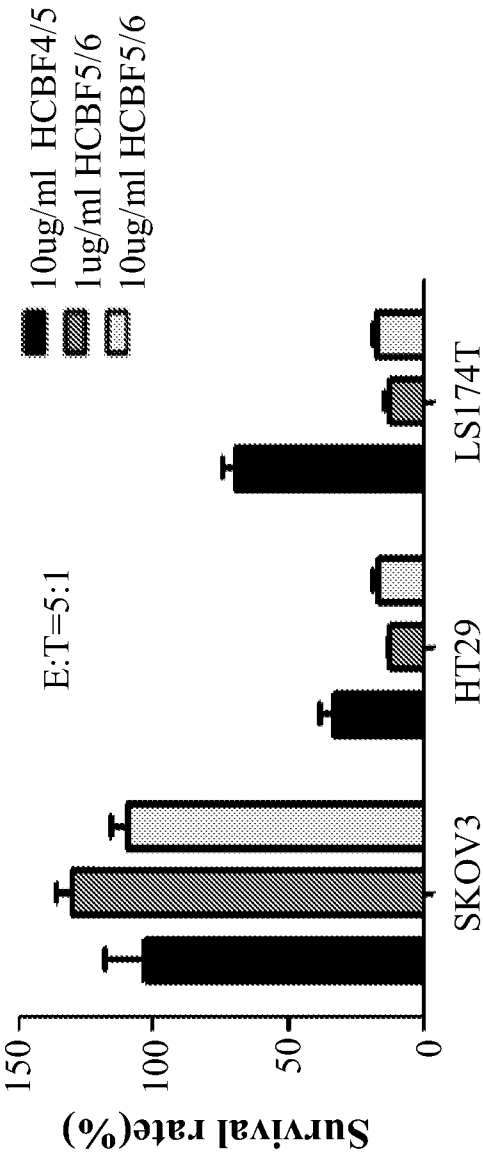
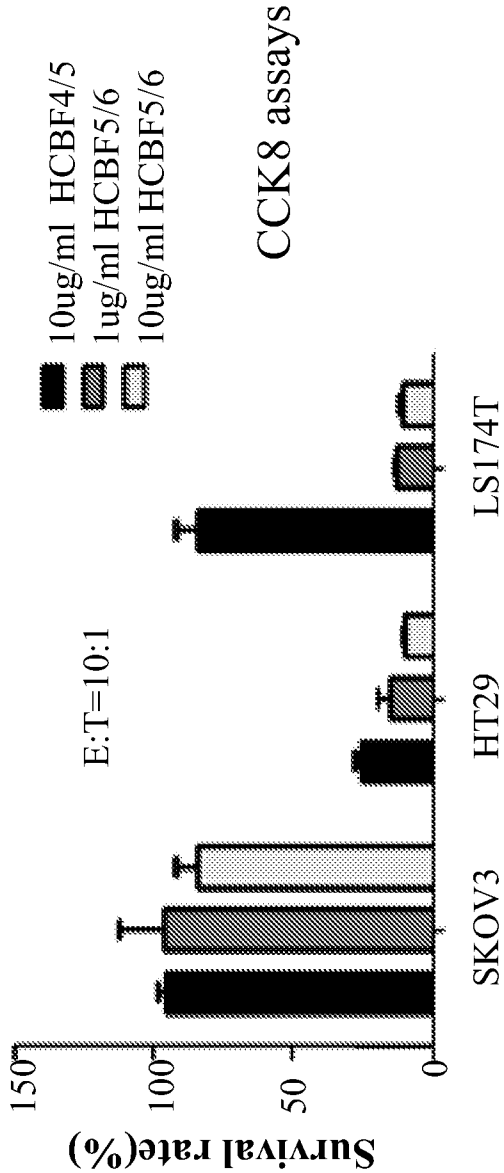


FIG. 3a







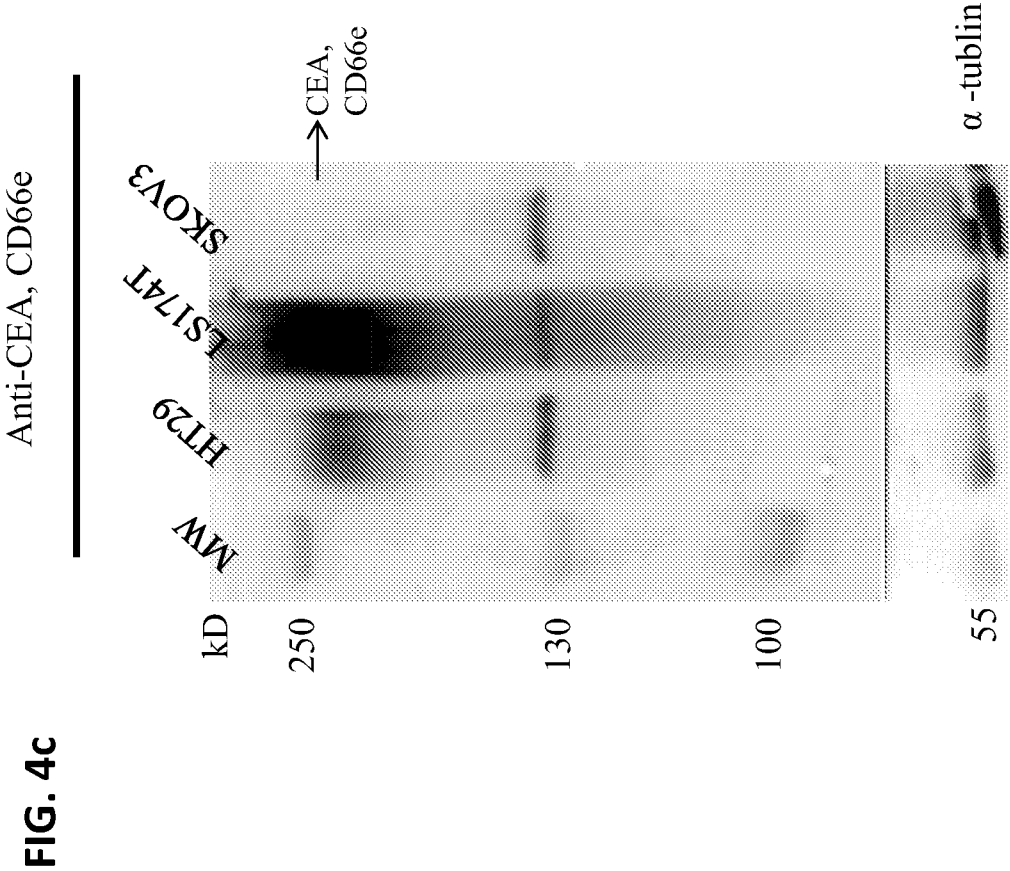
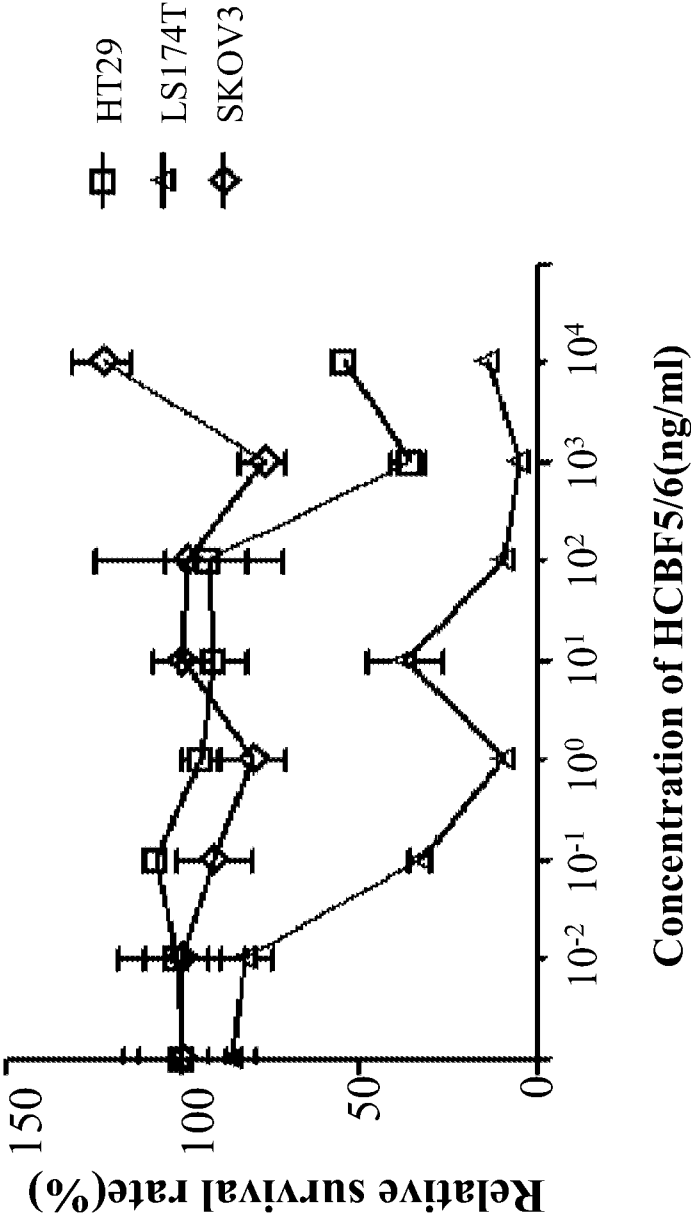
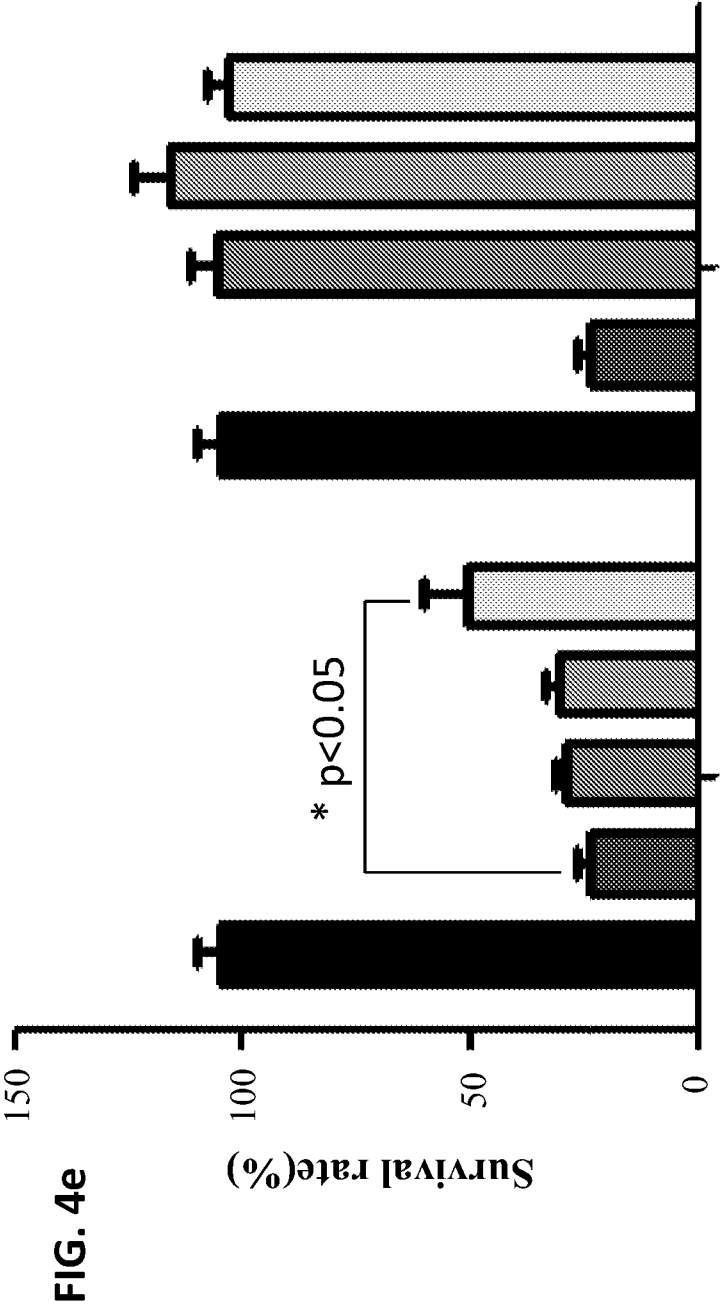


FIG. 4d





LS174T	+	+	+	+	+	+	+
T cells	+	+	+	+	+	+	+
HCBF4/5(1nM)						+	
HCBF4/5(10nM)						+	
HCBF4/5(100nM)						+	
HCBF5/6(1nM)							+

FIG. 5

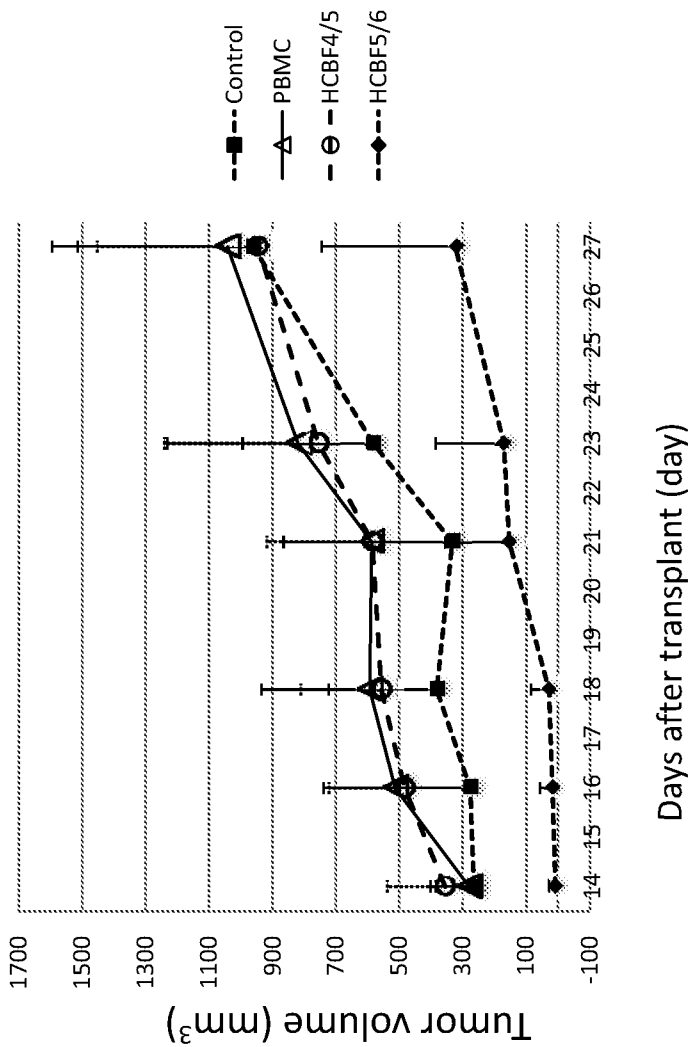


FIG. 6a a

Her2-VH-CHI	pelB	VH(Her2)	CHI	Flag
	pelB	VL(Her2)	CL	His8
	pelB	VH(Her2)	CHI	CD16
Her2-VH-CHI-CD16	pelB	VH(Her2)	CHI	Flag

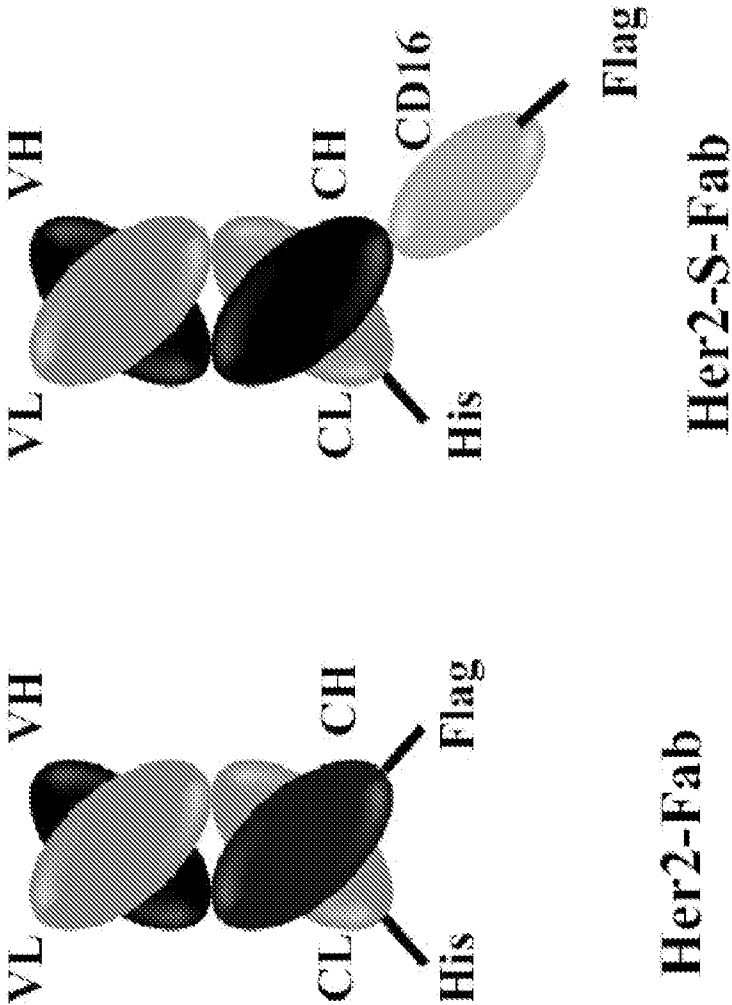


FIG. 6b

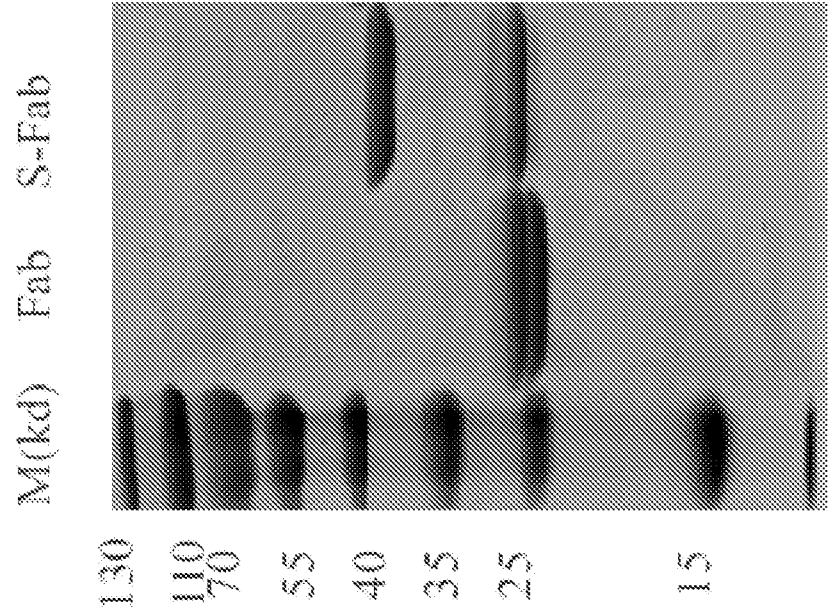


FIG. 6c

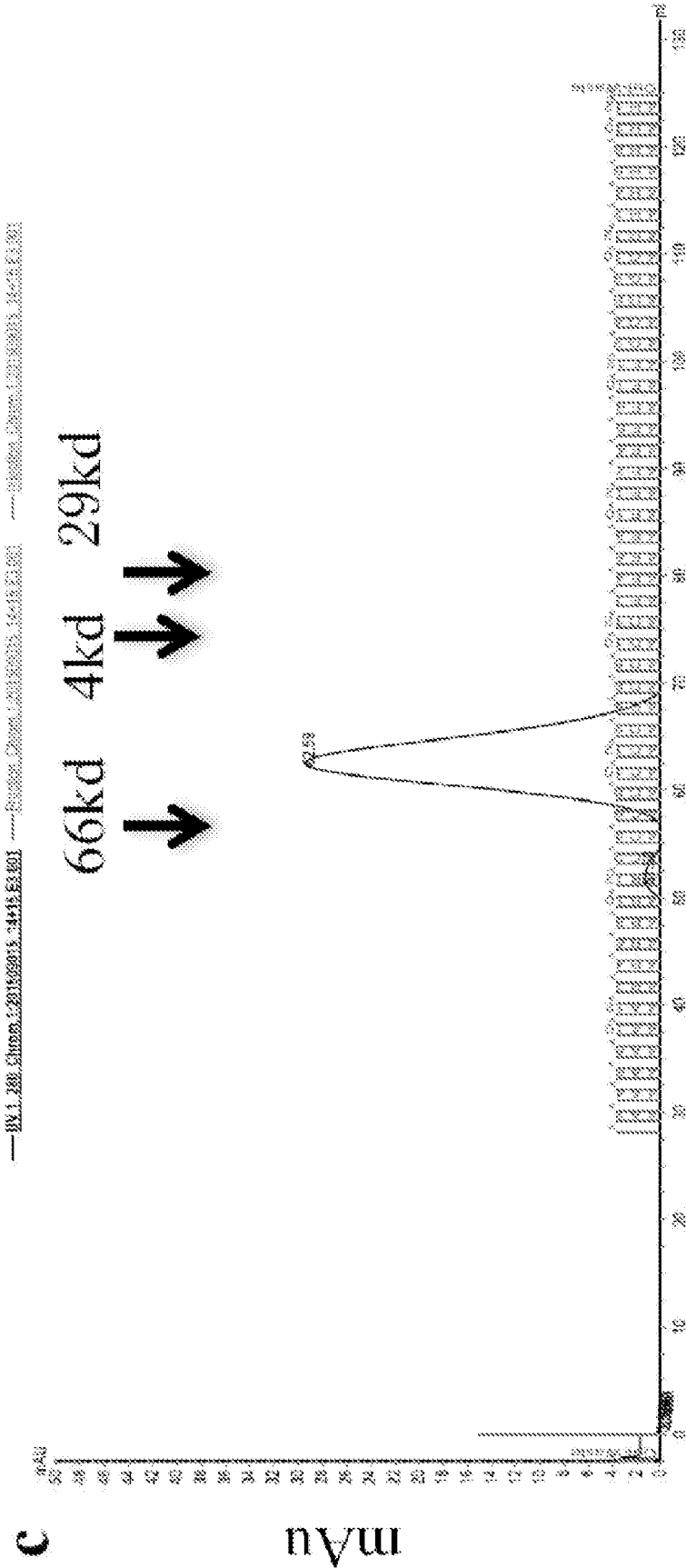


FIG. 7

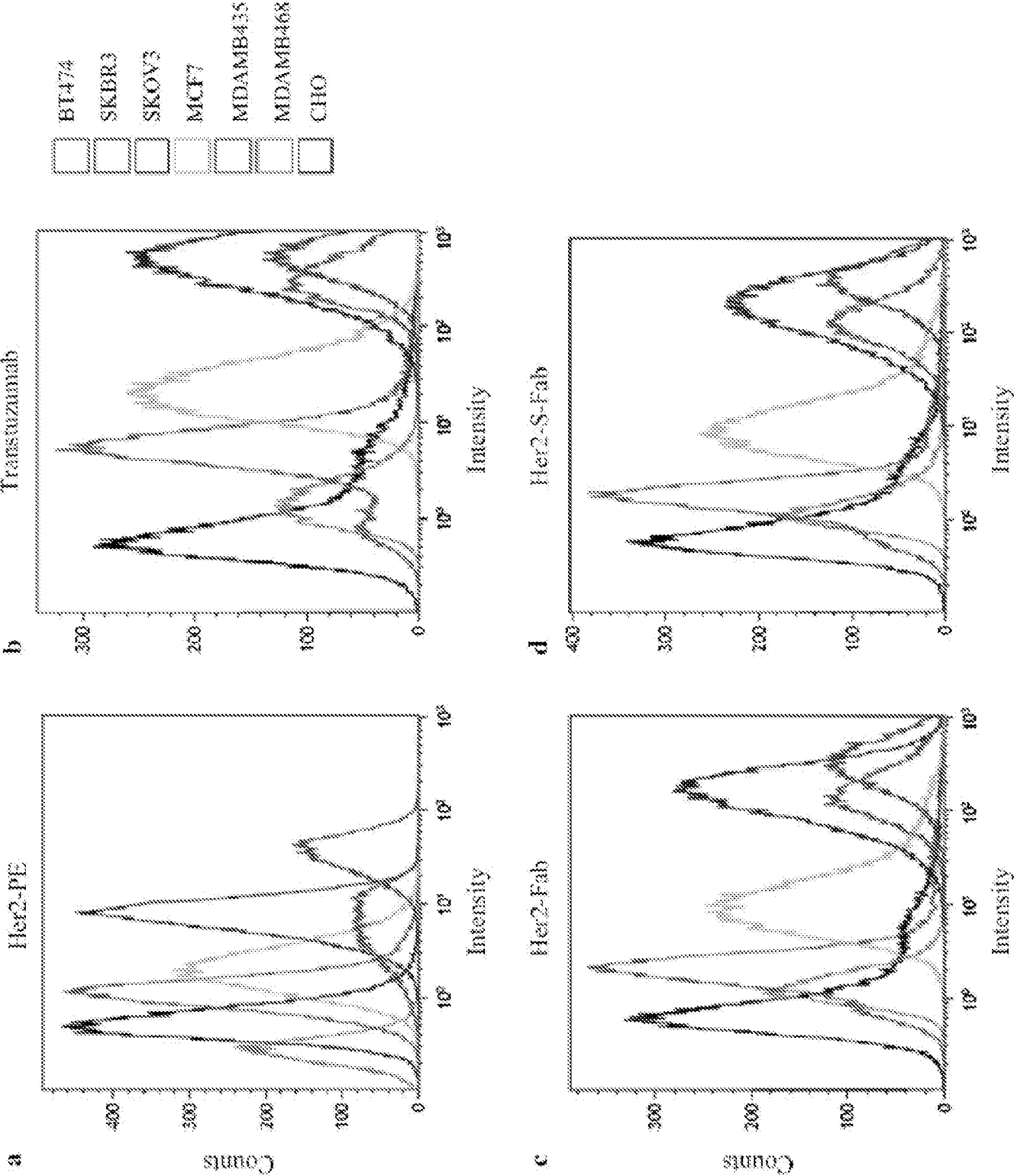


FIG. 8a

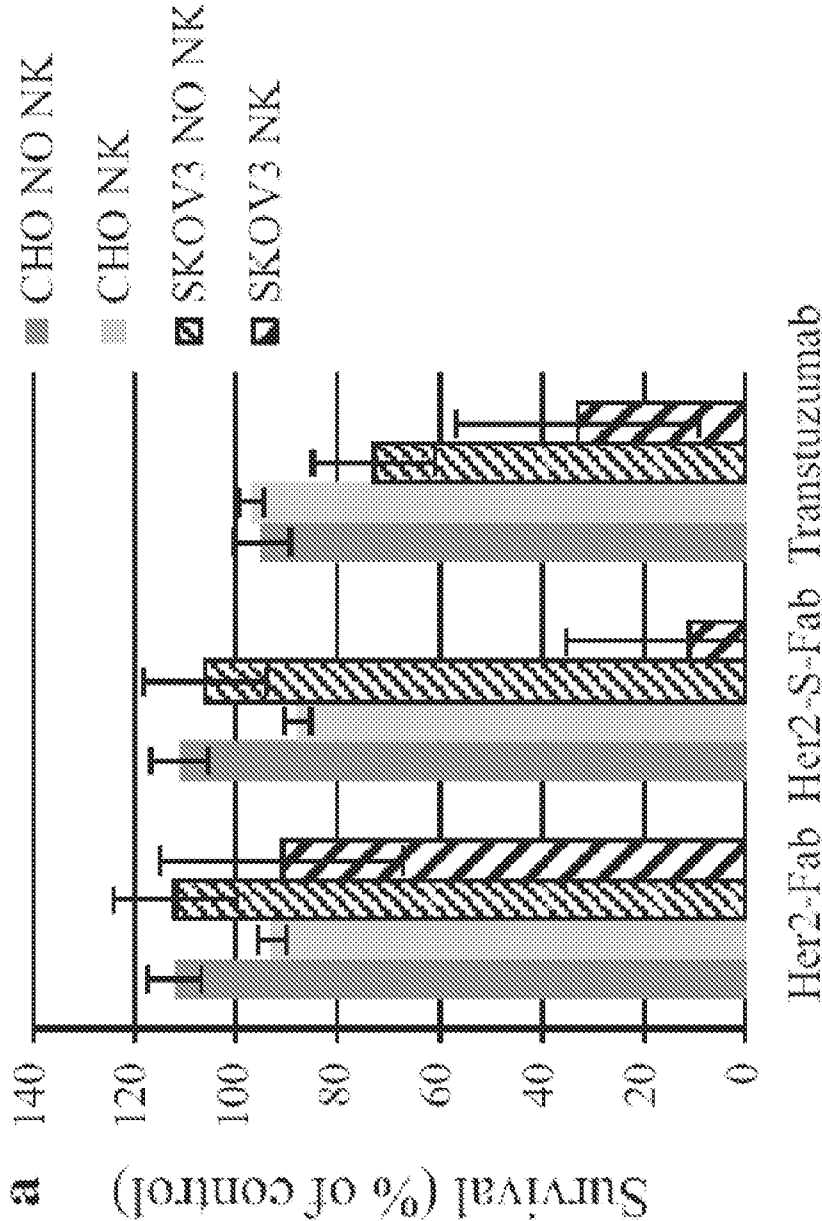


FIG. 8b

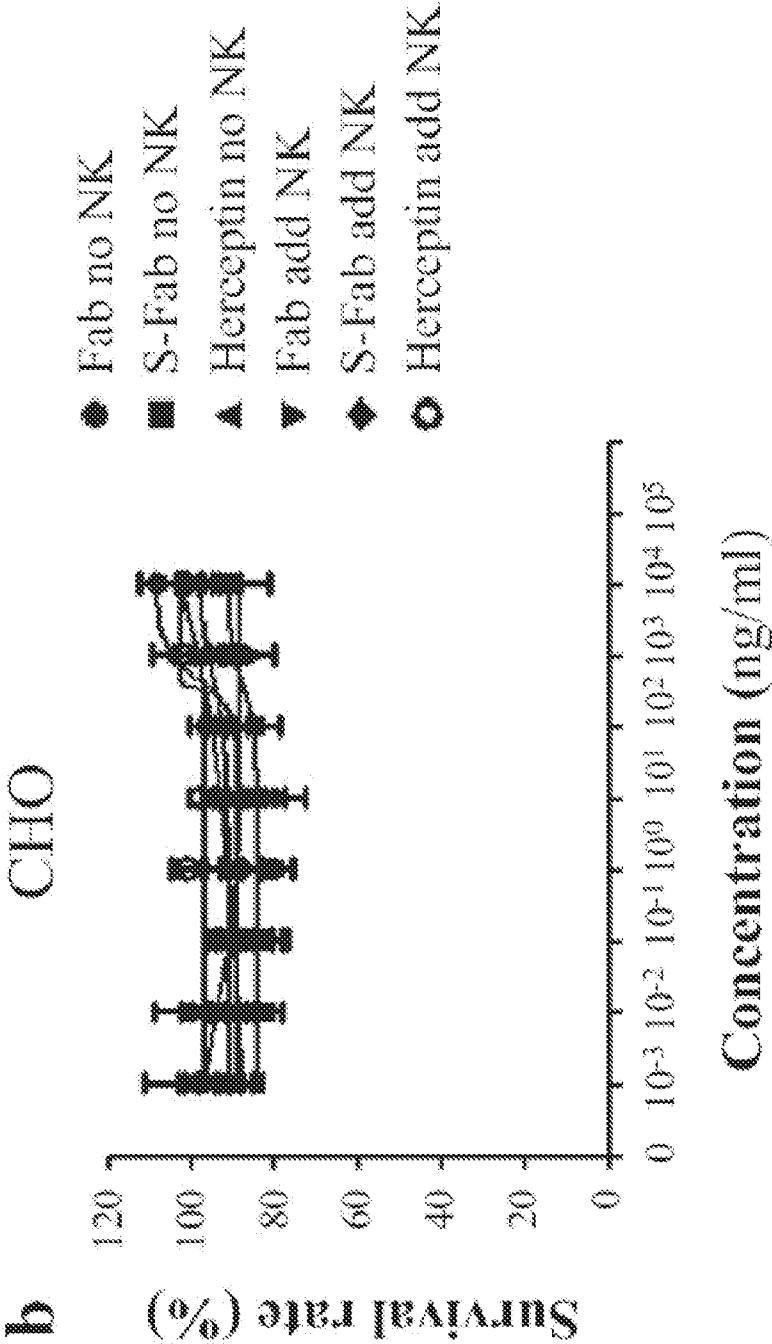


FIG. 8c

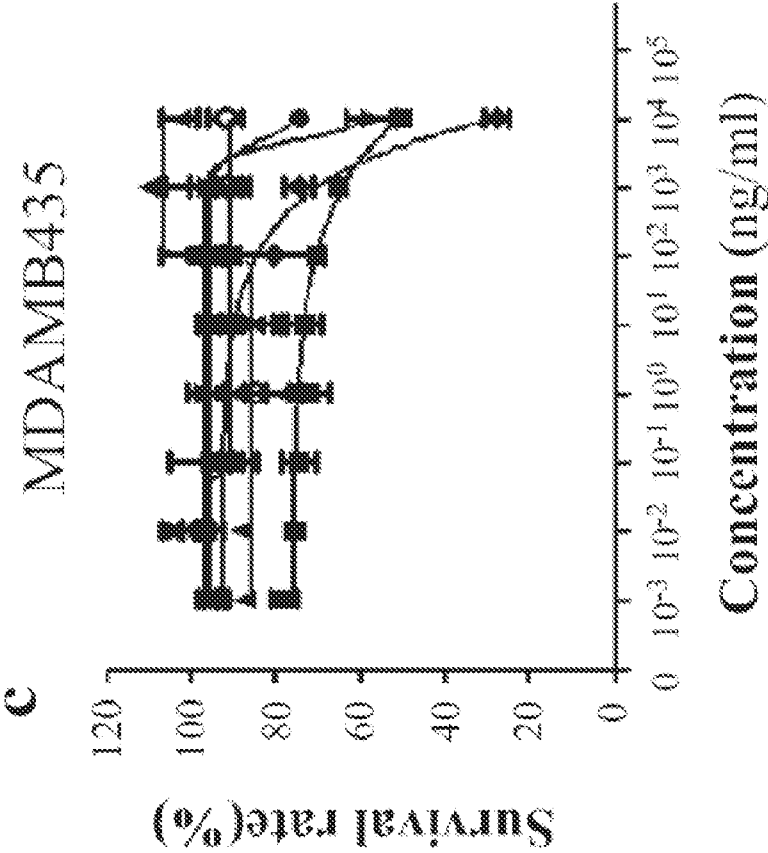


FIG. 8d

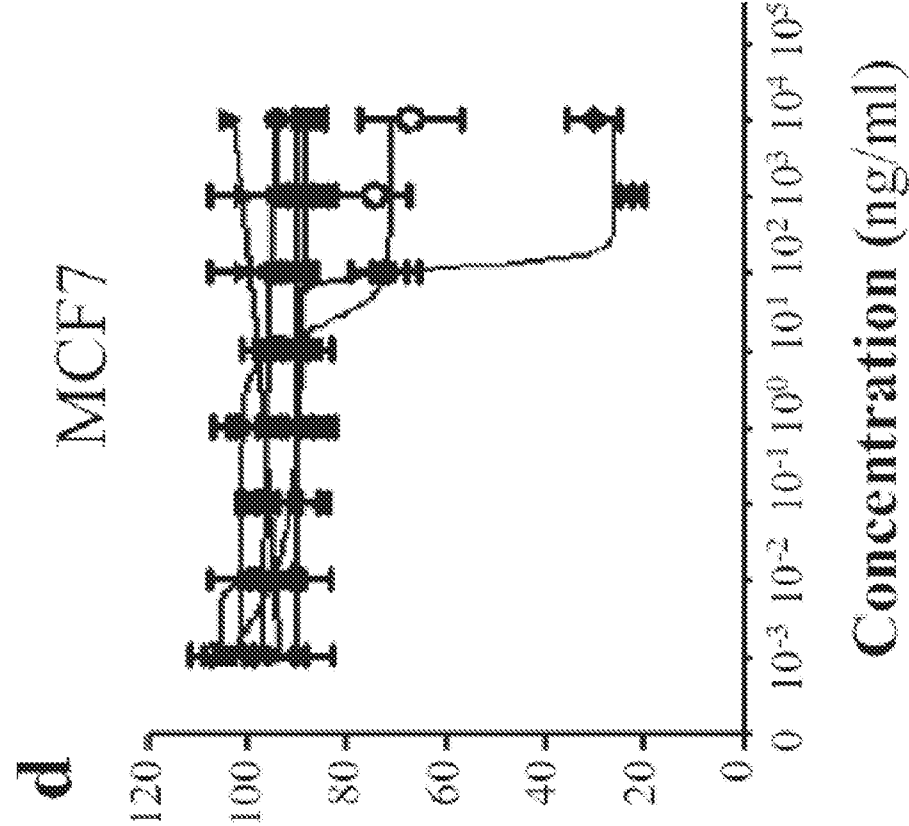


FIG. 8e

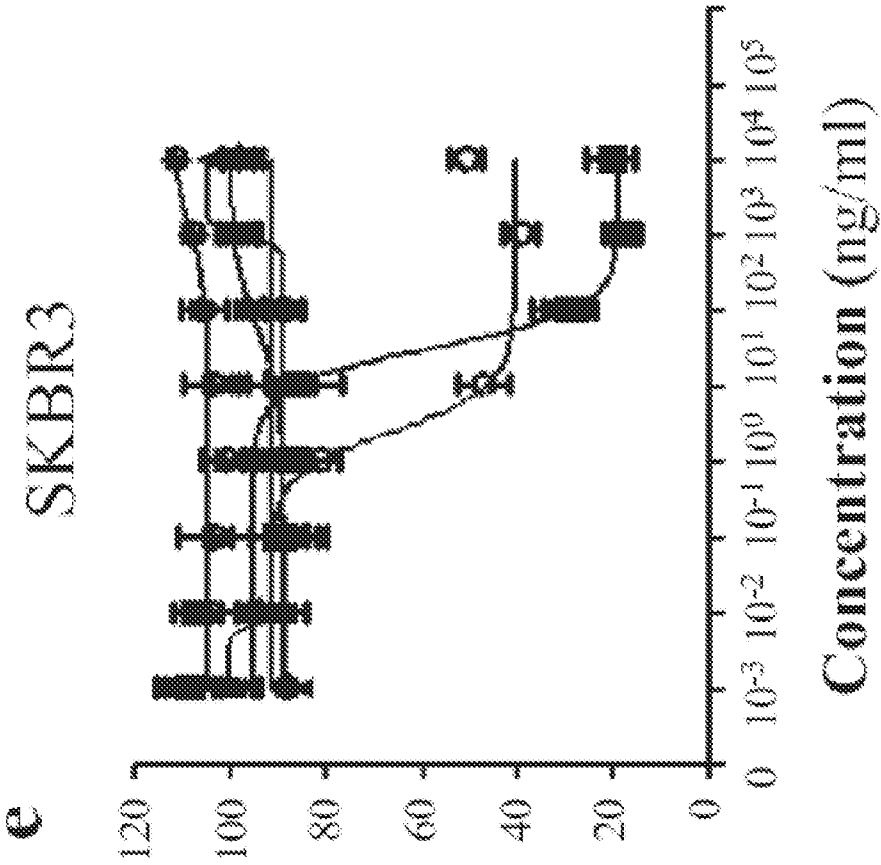
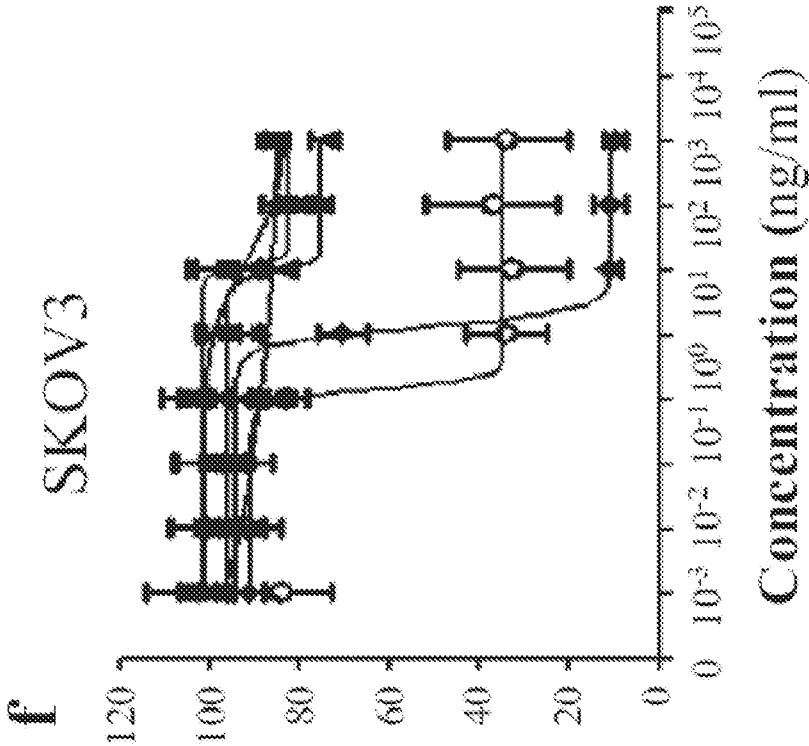


FIG. 8f



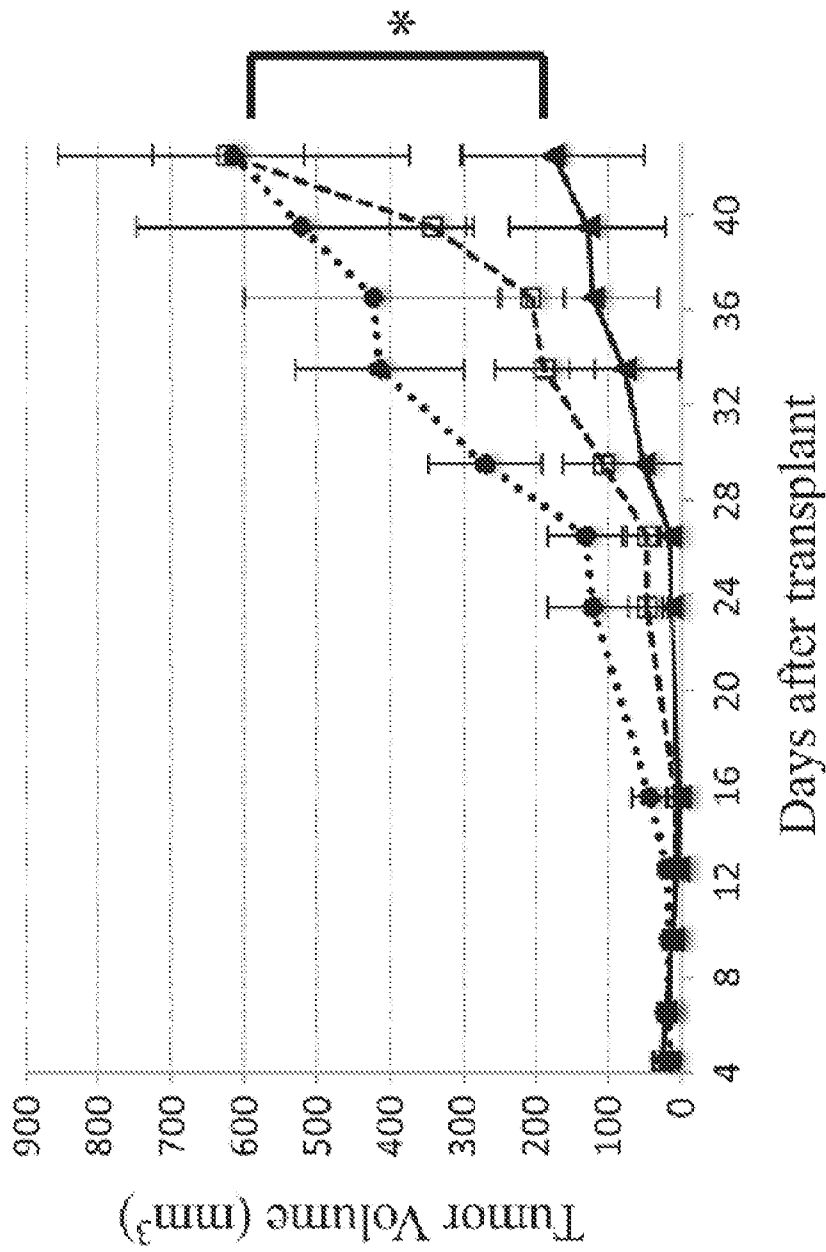


FIG. 9

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/084003

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 16/46 (2006. 01) i; C12N 1/19 (2006. 01) i; C12N 1/21 (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; CNKI; CNTXT; VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT and keywords: wang zhong, antibod+, single domain, bivalent, VHH, etc.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
Y	CN 102164965 A (UCB PHARMA SA) 24 August 2011 (24. 08. 2011) see the abstract, and claims 1-10	1-16
Y	CN 102639566 A (BOEHRINGER INGELHEIM INT GMBH) 15 August 2012 (15. 08. 2012) see the abstract, and claims 1-3	1-16

☐ 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 29 August 2016	Date of mailing of the international search report 05 September 2016
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 WANG, Jinfeng Telephone No. (86-10) 62412282

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/084003

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 102164965 A	24 August 2011	BR PI0918947 A2	01 December 2015
		WO 2010035012 A9	17 March 2011
		JP 2015178536 A	08 October 2015
		JP 2012503638 A	09 February 2012
		CN 105601745 A	25 May 2016
		EA 201100527 A1	31 October 2011
		EP 2334705 A1	22 June 2011
		CN 102164965 B	30 March 2016
		WO 2010035012 A1	01 April 2010
		CA 2737241 A1	01 April 2010
		US 2011184152 A1	28 July 2011
		KR 20120101375 A	13 September 2012
		JP 5833009 B2	16 December 2015
CN 102639566 A	15 August 2012	US 2014120095 A1	01 May 2014
		JP 2016026207 A	12 February 2016
		CN 105037542 A	11 November 2015
		EC SP12011835 A	29 June 2012
		UY 32920 A	29 April 2011
		US 2011172398 A1	14 July 2011
		AU 2010302589 A1	19 April 2012
		IN 2752DEN2012 A	18 September 2015
		WO 2011039370 A1	07 April 2011
		MA 33607 B1	01 September 2012
		MX 2012003897 A	08 May 2012
		TW 201124533 A	16 July 2011
		NZ 626302 A	25 September 2015
		EA 201200548 A1	28 December 2012
		CN 102639566 B	22 July 2015
		CA 2775422 A1	07 April 2011
		AP 201206188 D0	30 April 2012
		IL 218542 D0	31 May 2012
		PE 10242012 A1	10 August 2012
		EP 2483314 A1	08 August 2012
		JP 2013506411 A	28 February 2013
		NZ 598956 A	25 July 2014
		AR 078515 A1	16 November 2011

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2016/084003

A. 主题的分类		
C07K 16/46(2006.01)i; C12N 1/19(2006.01)i; C12N 1/21(2006.01)i; A61K 39/395(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i		
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)		
C07K; C12N; A61K; A61P		
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))		
CPRSABS; CNABS; CNKI; CNTXT; VEN; MEDLINE; EPTXT; USTXT; WOTXT和关键词: 王忠, 抗体, 单域, 二价, Wang zhong, antibod+, single domain, bivalent, VHH, 等		
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 102164965 A (UCB医药有限公司) 2011年 8月 24日 (2011 - 08 - 24) 见摘要、权利要求1-10	1-16
Y	CN 102639566 A (贝林格尔. 英格海姆国际有限公司) 2012年 8月 15日 (2012 - 08 - 15) 见摘要、权利要求1-3	1-16
☐ 其余文件在C栏的续页中列出。 ☒ 见同族专利附件。		
* 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		
国际检索实际完成的日期		国际检索报告邮寄日期
2016年 8月 29日		2016年 9月 5日
ISA/CN的名称和邮寄地址		授权官员
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		王金凤
传真号 (86-10)62019451		电话号码 (86-10)62412282

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/084003

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	102164965	A	2011年 8月 24日	BR	PI0918947	A2	2015年 12月 1日
				WO	2010035012	A9	2011年 3月 17日
				JP	2015178536	A	2015年 10月 8日
				JP	2012503638	A	2012年 2月 9日
				CN	105601745	A	2016年 5月 25日
				EA	201100527	A1	2011年 10月 31日
				EP	2334705	A1	2011年 6月 22日
				CN	102164965	B	2016年 3月 30日
				WO	2010035012	A1	2010年 4月 1日
				CA	2737241	A1	2010年 4月 1日
				US	2011184152	A1	2011年 7月 28日
CN	102639566	A	2012年 8月 15日	KR	20120101375	A	2012年 9月 13日
				JP	5833009	B2	2015年 12月 16日
				US	2014120095	A1	2014年 5月 1日
				JP	2016026207	A	2016年 2月 12日
				CN	105037542	A	2015年 11月 11日
				EC	SP12011835	A	2012年 6月 29日
				UY	32920	A	2011年 4月 29日
				US	2011172398	A1	2011年 7月 14日
				AU	2010302589	A1	2012年 4月 19日
				IN	2752DEN2012	A	2015年 9月 18日
				WO	2011039370	A1	2011年 4月 7日
				MA	33607	B1	2012年 9月 1日
				MX	2012003897	A	2012年 5月 8日
				TW	201124533	A	2011年 7月 16日
				NZ	626302	A	2015年 9月 25日
				EA	201200548	A1	2012年 12月 28日
				CN	102639566	B	2015年 7月 22日
				CA	2775422	A1	2011年 4月 7日
				AP	201206188	D0	2012年 4月 30日
				IL	218542	D0	2012年 5月 31日
				PE	10242012	A1	2012年 8月 10日
				EP	2483314	A1	2012年 8月 8日
				JP	2013506411	A	2013年 2月 28日
				NZ	598956	A	2014年 7月 25日
				AR	078515	A1	2011年 11月 16日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)