



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105636982 B

(45)授权公告日 2020.06.23

(21)申请号 201480050976.8

G·莫尔登豪尔

(22)申请日 2014.09.16

(74)专利代理机构 永新专利商标代理有限公司

72002

(65)同一申请的已公布的文献号

代理人 左路 林晓红

申请公布号 CN 105636982 A

(43)申请公布日 2016.06.01

(51)Int.Cl.

(30)优先权数据

C07K 16/08(2006.01)

13184635.4 2013.09.16 EP

C07K 16/28(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

C07K 16/46(2006.01)

2016.03.16

A61K 39/395(2006.01)

A61P 31/20(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

(56)对比文件

PCT/EP2014/069675 2014.09.16

CN 101687915 A,2010.03.31,

(87)PCT国际申请的公布数据

CN 101687915 A,2010.03.31,

W02015/036606 EN 2015.03.19

EP 2524699 A1,2012.11.21,

(73)专利权人 健康与环境慕尼黑德国研究中心

FELIX BOHNE等.T Cells Redirected

赫姆霍茨中心(有限责任公司)

Against Hepatitis B Virus Surface
Proteins Eliminate.《Gastroenterology》
.2008,第134卷第239-247页.

地址 德国诺伊赫伯格

专利权人 德国公共权利基金会癌症研究中心

审查员 王雪

(72)发明人 U·普罗策 F·博内 F·蒙堡

权利要求书2页 说明书25页

序列表18页 附图16页

(54)发明名称

用于治疗HBV感染和相关病症的结合免疫效应细胞表面抗原和HBV抗原的双或多特异性多肽

(57)摘要

本发明涉及多肽,其包含(a)配置为结合第一抗原的第一组的6个互补性决定区域(CDR);和(b)(ba)配置为结合第二抗原的第二组的6个CDR;或者(bb)能够结合第二抗原的配体;其中(i)所述第一抗原选自乙型肝炎病毒(HBV)小表面抗原;HBV中表面抗原;和HBV大表面抗原;和(ii)所述第二抗原选自免疫效应细胞如天然杀伤(NK)细胞和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)所呈现的表面抗原。还提供了用于治疗或预防HBV感染和/或所述HBV感染所引起的病症的方法的组合物,所述HBV感染所引起的病症选自肝硬化和肝癌。

1. 多肽,其包含

(a) 配置为结合第一抗原的第一组的6个互补性决定区域,其中,所述第一组的6个互补性决定区域结合乙型肝炎病毒小表面抗原且如SEQ ID NO:1-6的序列所示,或者

所述第一组的6个互补性决定区域结合乙型肝炎病毒小表面抗原且如SEQ ID NO:7-12的序列所示,或者

所述第一组的6个互补性决定区域结合乙型肝炎病毒大表面抗原且如SEQ ID NO:13-18的序列所示;和

(b) 配置为结合第二抗原的第二组的6个互补性决定区域,其中,所述第二组的6个互补性决定区域结合CD3且如SEQ ID NO:19-24的序列所示,或者

所述第二组的6个互补性决定区域结合CD28且如SEQ ID NO:25-30的序列所示,或者

所述第二组的6个互补性决定区域结合CD16且如SEQ ID NO:31-36的序列所示,或者

所述第二组的6个互补性决定区域结合CD56且如SEQ ID NO:37-42的序列所示;

其中,所述的第一组和第二组的6个互补性决定区域中各个互补性决定区域的顺序如下:重链的互补性决定区域1,重链的互补性决定区域2,重链的互补性决定区域3,轻链的互补性决定区域1,轻链的互补性决定区域2,和轻链的互补性决定区域3;且

其中,所述互补性决定区域是免疫球蛋白结构域的部分。

2. 权利要求1的多肽,其中

(a) 所述第一组的6个互补性决定区域被包含在第一个scFv片段中;和/或

(b) 所述第二组的6个互补性决定区域被包含在第二个scFv片段中。

3. 权利要求1的多肽,其中所述第一组的6个互补性决定区域结合所述第一抗原的表位,该表位位于:

(a) 所述乙型肝炎病毒小表面抗原中;

(b) 不被所述乙型肝炎病毒小表面抗原所包含的所述乙型肝炎病毒大表面抗原的部分中;或

(c) 在所述乙型肝炎病毒大表面抗原的部分中,该部分与所述乙型肝炎病毒小表面抗原在结构上不同。

4. 权利要求1-3任一项的多肽,其中所述多肽还包含二聚化区域,其中所述二聚化区域提供共价和/或非共价二聚化。

5. 权利要求2的多肽,其中所述多肽还包含间隔区区域,所述间隔区区域包含CH2结构域和CH3结构域,在所述多肽的氨基酸序列中,所述间隔区区域位于以下两者之间:

(i) 所述第一scFv片段;和

(ii) 所述第二scFv片段,

并且所述CH2结构域和/或所述CH3结构域在一个或多个位置经过突变以减少或者消除对Fc受体的结合。

6. 编码权利要求1-5的任一项的多肽的核酸。

7. 复合物,其包含第一种和第二种多肽或者由第一种和第二种多肽组成,所述第一和第二种多肽是权利要求1-5的任一项所定义的,其中

(a) 在所述第一种和所述第二种多肽之间至少有一个共价连接,所述共价连接是所述第一种多肽的半胱氨酸残基和所述第二种多肽的半胱氨酸残基之间的至少一个二硫桥;或

者

(b) 所述第一种和所述第二种多肽非共价地彼此结合。

8. 组合物, 其包含或者由以下组成: 一或多种权利要求1-5任一项的多肽和/或一或多种权利要求7的复合物, 前提是至少两种多肽被包含在所述组合物中, 该两种多肽在其所结合的第一抗原和/或第二抗原方面彼此不同。

9. 权利要求8的组合物, 其中所述多肽是

(a) (i) 结合乙型肝炎病毒小或大表面抗原和CD3的多肽; 和

(ii) 结合乙型肝炎病毒小或大表面抗原和CD28的多肽; 或者

(b) (i) 结合乙型肝炎病毒小或大表面抗原和CD16的多肽; 和

(ii) 结合乙型肝炎病毒小或大表面抗原和CD56的多肽。

10. 权利要求7的复合物或者权利要求8或9的组合物, 其中所述复合物和所述组合物包含双特异性、三特异性或四特异性的四价抗体或者由双特异性、三特异性或四特异性的四价抗体所组成。

11. 药物组合物, 其包含以下或者由以下组成: 权利要求1-5任一项的一或多种多肽、权利要求7的一或多种复合物和/或权利要求8或9的一或多种组合物。

12. 权利要求1-5任一项的一种或多种多肽、一或多种权利要求7的复合物和/或一或多种权利要求8或9的组合物在制备用于治疗或预防乙型肝炎病毒感染和/或所述乙型肝炎病毒感染所引起的病症的药物组合物中的用途, 所述乙型肝炎病毒感染所引起的病症选自肝硬化、肝细胞癌、和肝癌, 所述肝癌特征在于一或多种乙型肝炎病毒表面抗原的表达。

13. 体外的或离体的免疫效应细胞, 其具有结合至所述免疫效应细胞表面抗原的权利要求1-5任一项的多肽或者权利要求7的复合物。

用于治疗HBV感染和相关病症的结合免疫效应细胞表面抗原 和HBV抗原的双或多特异性多肽

技术领域

[0001] 本发明涉及多肽,其包含(a)配置为结合第一抗原的第一组的6个互补性决定区域(CDR);和(b)(ba)配置为结合第二抗原的第二组的6个CDR;或者(bb)能够结合第二抗原的配体;其中(i)所述第一抗原选自乙型肝炎病毒(HBV)小表面抗原;HBV中表面抗原;和HBV大表面抗原;和(ii)所述第二抗原选自免疫效应细胞如天然杀伤(NK)细胞和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)所呈现的表面抗原。

[0002] 在本说明书中,引用了许多文献包括专利申请和厂商手册。这些文献的公开内容(当不认为与本发明的专利性相关时)以其整体援引加入本文。更具体的地,所有引用的文献都以这样的程度援引加入,也即如同每个单独的文献都是特别并且单独指定援引加入的。

背景技术

[0003] 大约3.5亿人类受到乙型肝炎病毒(HBV)的慢性感染。HBV感染可包含肝硬化和肝细胞癌(HCC),其每年导致大约一百万人死亡(Ganem等人,Hepatitis B virus infection—natural history and clinical consequences.N Engl J Med;350:1118-29(2004))。HBV的感染目前在约5%的成人患者和约90%的新生儿中不能得到控制。在此种情形中,HBV感染变成慢性。可能的原因是细胞免疫应答不足。目前可用的用于治疗HBV感染的抗病毒药物抑制病毒的复制。然而,共价闭合环状DNA(cccDNA)保留在受感染肝细胞的细胞核中并且一旦患者停止摄入药物就可能引发HBV感染的再次激活。因此,如果要完全治愈感染则必不可少地要消除携带有所述cccDNA的HBV感染细胞(Protzer等人,Nat Immunol Rev 12:2013-213(2012))。

[0004] 然而,HBV感染细胞的此类毒性消除(通过细胞毒性T淋巴细胞或天然杀伤(NK)细胞)并未发生或者发生的程度不足。

[0005] 携带有HBV cccDNA的感染细胞在其表面展现出病毒表面蛋白。即便病毒被释放至细胞内囊泡中也同样如此,因为许多HBV表面蛋白保持整合在内质网的细胞内膜内。在囊泡转移的过程中,所述细胞内膜可以与细胞膜融合,结果是HBV表面蛋白展现在感染细胞的表面。

[0006] Bohne等人(T Cell redirected against Hepatitis B virus surface protein eliminate infected hepatocyte.Gastroenterology;134:239-247(2008))和Krebs等人(T cell Expressing a Chimeric Antigen Receptor That Binds Hepatitis B virus Envelope Proteins Control Virus Replication in Mice.Gastroenterology(2013))描述了嵌合抗原受体,当其通过逆转录病毒呈递并在T细胞表面表达时,能够促使原代人类和鼠类T细胞识别展现HBV小表面抗原的肝细胞并且溶解复制HBV的细胞。

[0007] 双特异性抗体通常应用于肿瘤学领域。作为实例,参见Hartmann等人(Treatment of refractory Hodgkin's disease with an anti-CD16/CD30bispecific

antibody.Blood;89:2042-7 (1997))。

[0008] EP 2 524 699A1描述了三功能抗体。这些抗体“具有功能性的Fc部分”并且“必须由不同亚类的重免疫球蛋白链组成”。在另一方面Hornig和Färber-Schwarz在“Antibody Engineering”(ed.Patrick Channes, Humane Press, 2012)的第40章描述了缺乏Fc部分的scFv结构。

[0009] Liao等人(Oncology Reports 3, 637-644 (1996))描述了双特异性单克隆抗体,其重新靶向于效应细胞以用以溶解裸鼠中的人类肝癌异种移植物。所描述的双特异性抗体是通过两种杂交瘤的融合而产生的,所述融合导致产生了杂交瘤细胞系表达两种不同抗体的重/轻链组合。这可以导致两种不同重链的配对,但也可以导致相同重链的配对,造成了单特异性亲代和双特异性抗体的随机混合物。所述双特异性抗体含有重链和轻链并且二聚化以形成Ig分子(其不是单一多肽链)。

[0010] 参考现有技术,可见的技术问题是提供替代的或者改善的措施和方法,用以治疗HBV感染以及由HBV感染所引起的病症如肝硬化或肝细胞癌症。以细胞生物学的术语表达,可见的技术问题是提供用于根除携有HBV cccDNA的细胞的措施和方法。此类技术问题由所附的权利要求解决。

发明内容

[0011] 因此,本发明在第一方面涉及多肽,其包含(a)配置为结合第一抗原的第一组的6个互补性决定区域(CDR);和(b) (ba)配置为结合第二抗原的第二组的6个CDR;或者(bb)能够结合第二抗原的配体;其中(i)所述第一抗原选自HBV小表面抗原;HBV中表面抗原;和HBV大表面抗原;和(ii)所述第二抗原选自免疫效应细胞如天然杀伤(NK)细胞和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)所呈现的表面抗原。

[0012] 术语“多肽”定义了氨基酸的缩聚物分子,其形成具有一个N-末端和一个C-末端的单一的链。其成分氨基酸包括20中天然存在的成蛋白氨基酸。优选地,所述多肽仅由所述天然存在的成蛋白氨基酸所构成。有鉴于此,该术语延伸至这样的分子,其在所述天然存在的成蛋白氨基酸之外,还含有高达20%、10%、5%、2%、或1%的选自以下的氨基酸:非天然存在的 α -氨基酸、 β -氨基酸、D-氨基酸、硒代半胱氨酸、硒代甲硫氨酸、羟基脯氨酸、吡咯赖氨酸和鸟氨酸。还应理解一或多个氨基酸(如2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)可以是磷酸化的。后者特别适用于丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸。还可以存在其它本领域已知的翻译后修饰,包括糖基化。糖基化包括N-连接糖基化(通常在天冬酰胺处)和O-连接糖基化(通常在丝氨酸或苏氨酸残基处)。N-和/或C-末端可以得到保护,保护基团包括用于N-末端的乙酰基和用于C-末端的胺。所述多肽中所包含的氨基酸之间的连接类型局限于酰胺(CONH)键。术语“酰胺键”包括肽键,其将给定氨基酸的 α -羧基连接至随后氨基酸的 α -氨基。所述“酰胺键”还扩展至异肽键,其是不出现在多肽主链上的酰胺键。例如,涉及的可以是赖氨酸的侧链氨基而非 α -氨基。类似地,涉及的可以是谷氨酸或天冬氨酸的侧链羧基而非 α -羧基。涵盖了存在一个或多个异肽键,如2、3、4、5、6、7、8、9或10个异肽键。但是优选其中的成分氨基酸仅仅通过肽键彼此连接的多肽。

[0013] 一般而言,多肽中氨基酸的数目没有上限。如序列表中所包含的示例性多肽序列所示,本发明的多肽通常含有几百个氨基酸,优选250至1000个、400至900个、或者700至800

个氨基酸。通常会区分一方面的肽和另一方面的多肽,其中肽具有30个或更少的氨基酸而多肽具有超过30个氨基酸。

[0014] 术语“互补性决定区域”,缩写为“CDR”具有本领域已知的含义。这些是短的亚序列,通常范围在大约3至大约25个氨基酸,其赋予抗体特异性识别抗原表位的能力。一般而言,抗体轻链的可变结构域提供3个CDR,以及抗体重链的可变结构域提供3个CDR。虽然CDR通常是免疫球蛋白结构域的部分,但本发明在这一方面并无要求。只要是包含所述CDR的氨基酸序列就够了,前提是所述氨基酸序列当在生理条件下折叠时能够以空间接近性呈现所述CDR,并且保持其识别同族抗原的能力。所提到的空间接近性以及结合抗原的能力在用于上文所公开的主要实施方案中时,表述为术语“配置为结合抗原”。术语“免疫球蛋白结构域”是本领域已知的,并且是指通常70至100个氨基酸的序列(呈现出7至9个反平行 β -链的2-层夹心三维结构)。

[0015] 所述第一组的6个CDR以及所述第二组的6个CDR每个均限定了结合位点。

[0016] 应理解在所述第一组和第二组之外,本发明的多肽中不存在另外的CDR。

[0017] 术语“抗原”具有本领域已知的含义。其是指一组6个CDR(通常由免疫球蛋白结构域呈现)特异性地识别并结合的分子。所述CDR识别并结合的抗原特定部分已知为表位。

[0018] 术语“配体”具有本领域已知的含义。配体是受体的对立结构。更具体地,配体能够结合(优选特异性结合)其同族受体。根据本发明,所述配体优选是免疫配体。免疫配体是能够结合免疫效应细胞表面上所呈现的受体的配体。优选的免疫效应细胞有(如上文所述的),NK细胞和CTL。优选的是这样的免疫配体,当结合至免疫效应细胞表面的其同族受体时,其会发挥刺激和/或共刺激效应。术语“激活”和“刺激”在此种背景下等价使用。优选的免疫配体所结合的受体在下文做进一步详述。

[0019] HBV S/M/L表面蛋白是HBV外包膜中的小、中和大表面抗原(Stibbe, W., 和 W.H.Gerlich. Structural relationships between minor and major proteins of hepatitis B surface antigen. J.Virol.1983 46:626-628)。

[0020] 三个HBV表面抗原由一个阅读框转录和翻译,且彼此的差别是N-末端部分的长度。因此,所述大表面抗原包含中和小表面抗原中都不存在的部分,以及所述中表面抗原包含小抗原中不包含的部分(但包含在大抗原中)。所述小抗原由这样的序列组成,其包含在中和大抗原的C-末端部分。

[0021] 所述大HBV表面抗原可以两种方式插入到细胞质膜中。N-末端或者C-末端可以位于胞外侧。两种配制在HBV感染的细胞中都有发现。

[0022] 所提到的第二抗原是由免疫效应细胞呈现的表面抗原,优选是特异性地由NK细胞和/或CTL所呈现的。免疫效应细胞是要重新导向HBV感染细胞的细胞,所述HBV感染的细胞在其表面呈现所提到的HBV表面抗原。

[0023] 特别优选的是,本发明的结合是特异性的,特别是CDR和抗原之间的结合以及配体和抗原之间的结合。术语“特异性地结合”和“特异性结合”(与“特异性相互作用”具有相同含义)如本发明中所用是指,这些结合部分不会(或基本上不会)与类似于靶标抗原的表位或结构交叉反应。可以对所研究的一组分子的交叉反应性进行测试,例如,通过评估该组分子在常规条件下对感兴趣表位的结合,以及其对一些或多或少(结构上和/或功能上)紧密相关的表位的结合。只有在其相关背景中结合感兴趣的表位(例如蛋白结构中的特定基序)

但却不会或基本不会结合任何其它表位的那些分子才会被认为对感兴趣的表位是特异性的。

[0024] 第一方面包含这样的实施方案,其中条目(a)和(ba)一起是所述多肽上呈现的仅有的结合位点,以及包含这样的实施方案,其中条目(a)和(bb)一起是所述多肽上呈现的仅有的结合位点。

[0025] 慢性HBV感染特征在于免疫耐受状态。更具体的地,在患者的CTL和NK细胞的作用下未发生感染细胞的完全根除或者HBV复制的完全控制或者HBV的完全消除。本发明的多肽在这样的意义上而言是双特异性分子,也即其一方面特异性识别HBV表面抗原而另一方面特异性识别免疫效应细胞表面抗原。此类双特异性分子可以视为赋予了针对免疫效应细胞的人工特异性。事实上,本发明的多肽靶向CTL和NK细胞(也称作是“双特异性”)从而其被用于HBV感染的细胞并将其杀伤。

[0026] 一方面本发明的多肽对HBV感染的细胞的结合和另一方面对免疫效应细胞的使用可以任何顺序发生或者也可以同时发生。

[0027] 具体而言,想要通过注射或者作为口服应用形式来全身性地应用本发明的多肽,并使其能结合HBV-感染的或者表达HBV抗原的靶标T细胞并将所述免疫效应细胞用于所述靶标T细胞。

[0028] 有鉴于此,还涵盖了将本发明的多肽与免疫效应细胞(或者包含所述效应细胞的外周血单核细胞群体)接触,从而所述效应细胞加载了所述多肽。此类已经在体外或者离体加载的效应细胞(或包含此类加载的效应细胞的PBMC群体)可以继而施用于患有HBV感染(或者与其相关的和下文定义的病症)的患者。此种施用可以在静脉内发挥作用,例如肝动脉。免疫效应细胞(具有结合至所述免疫效应细胞表明抗原的本发明的多肽)也是本发明的方面。此方面在下文中进一步公开。

[0029] 此种杀伤,特别是与免疫细胞分泌的抗病毒免疫介导体(例如细胞因子)联用时,提供了对HBV感染的根除或者对HBV感染的持续控制或者对表达HBV表面抗原的肿瘤细胞的消除。本发明优选的或者示例性的双特异性多肽提供了对HBV感染的细胞或者复制HBV或表达HBV表面抗原的肿瘤细胞(也称作肝癌细胞)令人惊讶的高杀伤率;参见本文公开的实施例。

[0030] 考虑到本发明的双特异性多肽提供了对免疫效应细胞的订制的特异性,免疫效应细胞天然固有的特异性或者将抗原对其呈递变得无关紧要。由此,大量的候选效应细胞可以修改以重新靶向。另外,本发明的多肽具有至少与单克隆抗体相当的生物可利用性和半衰期。

[0031] 在优选的实施方案中(a)所述第一组的6个CDR被包含在第一个scFv片段中;和/或(b)(ba)所述第二组的6个CDR被包含在第二个scFv片段中;或者(bb)所述配体是免疫配体,优选能够结合NKG2D/CD314(如配体MICA、MICB、ULBP1-6)、NKp30/NCR3/CD337(如配体B7-H6)、4-1BB/CD137(如配体4-1BB-L/CD137L)或者OX40/CD134(如配体OX40-L/CD252)。斜线(“/”)分开本领域的不同命名。括号中提供了给定抗原种类的代表。

[0032] 术语“scFv”是本领域熟知的。该缩写代表抗体的“单链可变片段”并且定义了能够特异性识别和结合抗原的表位的多肽。如上文所述,抗体轻链的可变结构域(V_L)呈现3个CDR,以及抗体重链的可变结构域(V_H)呈现3个CDR。在scFv中两个可变结构域通过肽接头彼

此连接。所获得的融合构建物是单一多肽链。这提供了scFv分子的简易表达。示意图可参见图1。

[0033] 术语“V_H结构域”和“V_L结构域”根据本领域给出的定义使用。因此，它们分别是指免疫球蛋白的重链可变区(V_H)和轻链可变区(V_L)。一般而言，V_H和V_L结构域每个均包含3个互补性决定区域(CDR)，其中CDR是主要负责抗原结合的高度可变的区域。

[0034] 肽接头优选用于连接scFv的可变区或者用于将scFv连接至二聚化和/或间隔区区域，优选连接至Fc。通常肽接头具有3至30个氨基酸的长度，优选5至25个或者10至20个氨基酸长。优选这样的接头，其不影响或者基本上不影响所连接的结构域或多肽的结构和/或功能(连接产生单一的连续多肽链)。接头包括富含Gly的接头如(Gly₄Ser)₃(SEQ ID NO:47)接头，其用于本发明优选的多肽以用来连接CTL或NK特异性scFv的V_H/V_L结构域；以及Yo1接头(SEQ ID NO:48;AKTTPKLEEGEFSEARV,如Sellrie等人,Journal of Biochemistry and Molecular Biology,Vol.40,No.6,November 2007,pp.875-880中所述)，其用于本发明优选的多肽以用来连接特异于HBV表面抗原的scFv的V_H/V_L结构域。还有(Gly₄Ser)₄接头(SEQ ID NO:49)可用于连接特异于HBV表面抗原的scFv的V_H/V_L结构域。

[0035] 如本文所用术语“抗体”具有本领域已知的含义。优选地，其实指单克隆抗体。可以通过例如，最初在Köhler and Milstein,Nature 256(1975),495和Galfré, Meth.Enzymol.73(1981),3中描述的技术来制备单克隆抗体，其中包括将小鼠骨髓瘤细胞融合至源自经免疫哺乳动物的脾细胞(经过现有技术中所开发的修改)。另外，可以通过例如Harlow and Lane“Antibody,A Laboratory Manual”,CSH Press,Cold Spring Harbor,1988中所述的方法来获得针对HBV表面蛋白前述抗体或其片段。嵌合抗体的产生在例如W089/09622中有描述。用于本发明的抗体的另外的来源是所谓的异种抗体。产生异种抗体(如小鼠中的人类抗体)的一般原理在例如W0 91/10741、W0 94/02602、W0 96/34096和W0 96/33735中有描述。本发明所要使用的抗体或者其相应的免疫球蛋白链可以使用本领域已知的常规技术进行进一步的修饰，例如，通过使用氨基酸缺失、插入、取代、添加、和/或重组和/或本领域已知的任何其它修饰(单独或组合使用)。在构成免疫球蛋白链氨基酸序列的DNA或多肽序列中引入此类修饰的方法是本领域技术人员所熟知的；参见例如,Sambrook, Molecular Cloning:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,NY,1989。多肽的修饰还包括翻译后修饰如糖基化。

[0036] 在另外的优选实施方案中，所述第一组的6个CDR结合所述第一抗原的表位，该表位位于：(a)所述HBV小表面抗原中；或者(b)不被所述HBV小表面抗原所包含的所述HBV大表面抗原的部分中；或者(c)在所述HBV大表面抗原的部分中，该部分与所述HBV小表面抗原在结构上有改变。

[0037] 条目(a)是指HBV小表面抗原中存在的表位。基于上文所述的小、中和大HBV表面抗原之间的关系，所述小抗原的整个序列包含在中和大抗原中。一般而言(但并非必然)，小表面抗原所呈现的三维表位也会由所述中和/或大表面抗原所呈现。

[0038] 对于条目(b)，优选所述HBV大表面抗原的所述部分也不被所述HBV中表面抗原所包含。对于条目(c)，应理解“结构改变”包括所述HBV大表面抗原的表位，其包含或由这样的序列组成，所述序列是所述HBV小表面抗原序列的部分，其中所述表位不存在于所述HBV小表面抗原上。对于条目(c)，进一步优选所述表位是所述HBV大表面抗原的部分，该部分在结

构方面还与所述HBV中表面抗原有变化。

[0039] 所述条目(a),也即所述第一抗原(是所述HBV小表面抗原)特别优选与本发明的所有方面和实施方案进行结合。

[0040] 根据条目(b)和(c),所述多肽将会特异性地识别HBV的大表面抗原。

[0041] 在另外的优选实施方案中,由免疫效应细胞呈现的所述表面抗原选自CD3、CD28、4-1BB、OX40、CD16、CD56、NKG2D、和NKp30/NCR3。因此,本发明提供了多肽,其包含(a)配置为结合第一抗原的第一组的6个互补性决定区域(CDR);和(b)(ba)配置为结合第二抗原的第二组的6个CDR;或者(bb)能够结合第二抗原的配体;其中(i)所述第一抗原选自乙型肝炎病毒(HBV)小表面抗原;HBV中表面抗原;和HBV大表面抗原;以及(ii)所述第二抗原选自免疫效应细胞如天然杀伤(NK)细胞和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)所呈现的表面抗原,其中(c)所述第一组的6个CDR被包含在第一个scFv片段中;和(d)(da)所述第二组的6个CDR被包含在第二个scFv片段中;或者(db)所述配体是免疫配体能够结合NKG2D如配体MICA、MICB、ULBP1-6;NKp30如配体B7-H6,4-1BB如配体4-1BB-L;或者OX40如配体OX40-L;且其中由免疫效应细胞呈现的所述表面抗原选自CD3、CD28、4-1BB、OX40、CD16、CD56、NKG2D、和NKp30。

[0042] CD3代表CD3 ϵ -链,其是CD3-T-细胞受体复合物的部分。(Borst,J.等人,The delta-and epsilon-chains of the human T3/T-cell receptor complex are distinct polypeptides.Nature.1984.312:455-458)。

[0043] CD28是主要的T细胞共刺激受体。(Lesslauer,W.等人,T90/44(9.3antigen).A cell surface molecule with a function in human T cell activation.Eur.J.Immunol.1986.16:1289-1296)。

[0044] 4-1BB(CD137)是激活的T细胞和NK细胞的共刺激受体。(Kwon,B.S.等人,cDNA sequences of two inducible T-cell genes.Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.1989.86:1963-1967)。

[0045] OX40(CD134)是二级共刺激受体。(Arch,R.H.等人,Mol.Cell.Biol.1998.18:558-565)。4-1BB和OX40是肿瘤坏死因子(TNF)受体家族的成员,其结合TNF受体关联的配体并激活核因子kappaB。

[0046] CD16(Fc γ RIIIa)是低亲和性Fc受体,其由NK细胞表达(激活的细胞毒T细胞的亚集)以及由来自骨髓单核细胞谱系的细胞所表达,其结合IgG分子的Fc结构域。(Lanier,L.L.等人,Functional properties of a unique subset of cytotoxic CD3+T lymphocytes that express Fc receptors for IgG(CD16/Leu-11antigen).J.Exp.Med.1985.162:2089-2106)。

[0047] CD56(NCAM)是由NK细胞所表达的细胞粘附分子。(Lanier,L.L.et al.,Identity of Leu-19(CD56)leukocyte differentiation antigen and neural cell adhesion molecule.J.Exp.Med.1989.169:2233-2238)。

[0048] NKG2D是由NK细胞所表达的激活受体(Houchins,J.et al.,DNA sequence analysis of NKG2,a family of related cDNA clones encoding type II integral membrane proteins on human natural killer cells.1991.J.Exp.Med.173:1017-1020)。

[0049] NKp30(NCR3)是由NK细胞所表达的受体(Pende,D.et al.,Identification and

molecular characterization of NKp30, a novel triggering receptor involved in natural cytotoxicity mediated by human natural killer cells. 2000. J. Exp. Med. 192:337-346)。

[0050] CD3、CD28、4-1BB和OX40存在于CTL的表面。本发明的多肽结合至任何这些表面抗原都涉及CTL的激活或共激活。

[0051] CD16、CD56、NKp30/NCR3和4-1BB存在于NK细胞的表面上。本发明的多肽结合至任何这些表面抗原都涉及NK细胞的激活或共激活。

[0052] 对于人类CTL, 优选CD3和CD28。对于人类NK细胞, 优选CD16和CD56。

[0053] 所提到的表面抗原根据本领域已知的名称命名(参见Kenneth Murphy, Janeway's Immunobiology, 7th edition, Garland Science; William E. Paul, Fundamental Immunology, 7th edition, Lippincott Williams & Wilkins)。

[0054] 在另外的优选实施方案中, 所述多肽还包含二聚化区域。所述二聚化区域可提供共价和/或非共价二聚化。

[0055] 通过二聚化, 双特异性二价抗体变为双特异性四价(或者如果不同的双特异性抗体在生产细胞中共表达时甚至是四特异性四价)。此处所描述的双特异性四价试剂预期具有与常规单特异性抗体类似的增强的亲合力, 这是由于他们能够分别用其N末端侧及其C末端侧来衔接两个抗原分子。

[0056] 在特别优选的实施方案中, 连接两个本发明多肽的所述二聚化区域由IgG重链的铰链区组成或者包含负责抗体重链的二聚化的半胱氨酸残基。优选地, 所述二聚化区域由长度32个氨基酸的亚序列组成, 也即所谓的重链的铰链区 (EPKSSDKTHTCPPCPAPEFEGAPSVFLFPKP, 参见SEQ ID NO: 43-46), 并且包含两个负责重链二聚化的半胱氨酸残基(在上述序列中加下划线)。优选IgG重链铰链区内的单个半胱氨酸(其在天然抗体中介导IgG重链和轻链恒定结构域之间的分子间二硫键)被突变为丝氨酸, 以便防止异常的二硫桥。

[0057] 适于非共价二聚化的二聚化结构域在本领域已知且包括亮氨酸拉链。

[0058] 在另外的优选实施方案中, 所述多肽还包含间隔区区域, 所述间隔区区域优选包含CH2结构域和CH3结构域, 所述间隔区区域位于以下两者之间: (i) 所述第一scFv片段和(ii) 所述第二scFv片段或所述多肽的氨基酸序列中的所述重组配体。

[0059] 有利的是包含CH2结构域和CH3结构域(特别是来自IgG) 或由其组成的间隔区区域。它们结合蛋白A的能力提供了充分的从生产细胞的分泌和/或随后从试剂中的纯化。

[0060] 一方面所述CH2和CH3结构域以及另一方面所述二聚化区域都可以由IgG的相应区域来提供, 优选IgG1或IgG2分子, 更优选人类IgG1或IgG2 (hIgG1、hIgG2) 分子。用于提供CH2结构域、CH3结构域和二聚化结构域的hIgG1分子的优选亚序列可以参见序列43至46。优选(并且这适用于所提到的序列) hIgG1的部分(特别是所述CH2结构域) 在多个位置进行了诱变, 以便减少或者消除对Fc受体的结合(在下文进一步给出的序列中标示为粗体斜体)。更普遍地, 所述Fc区域, 特别是CH2结构域和/或CH3结构域, 可以在一个或多个位置进行突变, 以减少或消除对Fc受体的结合。此过程是本领域已知的, 并且在例如Armour等人, Recombinant human IgG molecules lacking Fc gamma receptor I binding and monocyte triggering activities. Eur. J. Immunol. 1999. 29:2613-2624以及Lazar等人, Engineered antibody Fc variants with enhanced effector function. Proc. Natl. Ac

ad.Sci.U.S.A.2006.103:4005-4010中有描述。这是有利的,因为在本发明中优选不引发抗体依赖的细胞介导细胞毒性(ADCC)。

[0061] 换句话说,抗体Fc片段可用于实现间隔区区域和二聚化区域。术语“Fc片段”是本领域技术人员已知的,并且定义了通过木瓜蛋白酶切割而获得的且包含CH2和CH3结构域的IgG片段。

[0062] 在所述第一scFv片段与所述间隔区区域之间和/或在所述间隔区区域与所述第二scFv片段之间存在(a)接头序列。优选的接头序列在上文有公开。由序列表中包含的优选序列可见(特别是SEQ ID NO:43至46的序列),此类接头序列可以由甘氨酸或者由甘氨酸和丝氨酸组成。

[0063] 图2示出了优选的本发明多肽的分子构架,其包含二聚化区域(hIgG铰链区)以及CH2和CH3区域将两个scFv片段彼此分开。

[0064] 术语“CH2结构域”和“CH3结构域”具有本领域已知的含义。它们是指抗体重链的第二和第三个恒定结构域。

[0065] 应理解特别优选的实施方案涉及这样的多肽,其包含(a)配置为结合第一抗原的第一组的6个互补性决定区域(CDR);和(b)(ba)配置为结合第二抗原的第二组的6个CDR;或者(bb)能够结合第二抗原的配体;其中(i)所述第一抗原选自乙型肝炎病毒(HBV)小表面抗原;HBV中表面抗原;和HBV大表面抗原;和(ii)所述第二抗原选自免疫效应细胞如天然杀伤(NK)细胞和细胞毒性T淋巴细胞(CTL)所呈现的表面抗原,其中(c)所述第一组的6个CDR被包含在第一个scFv片段中;和(d)(da)所述第二组的6个CDR被包含在第二个scFv片段中;或者(db)所述配体是免疫配体,优选能够结合NKG2D如配体MICA、MICB、ULBP1-6;NKp30如配体B7-H6;4-1BB如配体4-1BB-L;或者OX40如配体OX40-L,其中由免疫效应细胞呈现的所述表面抗原选自CD3、CD28、4-1BB、OX40、CD16、CD56、NKG2D、NKp30和4-1BB,以及其中所述多肽还包含二聚化区域和间隔区区域,所述二聚化区域和所述间隔区区域优选如上文那样进一步限定。

[0066] 在另外的优选实施方案中,(a)所述第一组的6个CDR具有SEQ ID NO:1-6、7-12、或13-18的序列;和/或(b)所述第二组的6个CDR具有SEQ ID NO:19-24、25-30、31-36、或37-42的序列。

[0067] 如本领域中常见的那样,以及由所附序列表中所示的,如上文所述的每组的6个CDR中CDR的顺序如下:重链的CDR1、重链的CDR2、重链的CDR3、轻链的CDR1、轻链的CDR2、和轻链的CDR3。

[0068] 如序列表中所用的C8、5F9、5A19、OKT3、9.3、A9和NCAM29.2分别表示各个CDR来源于哪个抗体,以及分别是指优选的抗-HBs抗体、第二种不同的抗-HBs抗体、针对HBV大表面抗原的抗体、针对人类CD3的抗体、针对人类CD28的抗体、针对人类CD16的抗体、以及针对人类CD56的抗体。“HBs”表示HBV小表面抗原。

[0069] 特别优选的是,所述多肽包含以下氨基酸序列或者由以下氨基酸序列组成:SEQ ID NO:43至46的任意一个氨基酸序列或者与SEQ ID NO:43至46的任意一个氨基酸序列展现出至少80%相同性的氨基酸序列,前提是与SEQ ID NO:43至46的任意一个氨基酸序列展现出至少80%相同性的所述氨基酸序列的CDR分别与SEQ ID NO:43至46的任意一个中所包含的CDR相同。在SEQ ID NO:43中,最后三个残基“GNS”是可有可无的。

[0070] 优选的序列相同性水平包括至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、和至少99%。用于确定序列相同性的措施和方法是本领域熟知的。用于确定成对的序列相同性的优选算法是基本局部比对搜索工具 (BLAST), 如例如McGinnis and Madden(核酸Research 32,W20-W25 (2004)) 中所述的。

[0071] 给定序列中所述CDR的位置(当前情形中也即在SEQ ID NO:43至46的序列中)可以用本领域已知的方法来确定, 本领域已知的方法分别包括Chothia、Kabat和LeFranc/IMGT的系统。如果没有任何相反的表述, 则应理解上文所述特别优选实施方案中的CDR是上文所定义的那些, 也即具有SEQ ID NO:1至6、7至12或13-18的序列的第一组, 和具有SEQ ID NO:19至24、25至30、31至36或者37至42的序列的第二组。如所附序列表中包含的序列所示, 这些具体的CDR序列(在下文给出的序列中加下划线)确实包含在SEQ ID NO:43至46的序列中。

[0072] SEQ ID NO:1至6的序列定义了所述CDR, 而SEQ ID NO:37至40则定义了能够在HBV的小表面抗原内结合特定表位的双特异性多肽。此表位位于a-抗原决定簇, 其分别暴露于感染的细胞和毒粒的表面。术语“a-抗原决定簇”用于表示HBV的小表面抗原内的区域, 用于诱导保护性体液免疫应答的主要表位位于其中。这些CDR以及SEQ ID NO:43至46的多肽具有优势, 它们可用于所有的HBV血清型。

[0073] 在第二方面, 本发明提供了编码上述多肽的核酸。所述多肽的优选实施方案引出所述核酸的相应优选实施方案。

[0074] 术语“核酸”具有本领域已知的含义且并未有特定的限制。优选的是DNA如基因组DNA或者cDNA以及RNA如mRNA。虽然并不优选, 但是也涵盖了使用核苷酸衍生物, 所述核苷酸衍生物包括2' 衍生的核苷酸如2' 甲基核苷酸; 肽核酸中出现的肽核苷酸及类似的。

[0075] 在第三方面, 本发明提供了共价连接的复合物, 其包含第一种和第二种多肽或者由第一种和第二种多肽组成, 其中所述第一和所述第二多肽之间至少有一个共价连接, 优选在所述第一种多肽的Cys残基和所述第二种多肽的Cys残基之间有至少一个二硫桥, 所述第一种和第二种多肽如本发明所定义。

[0076] 优选在所述第一和所述第二种多肽之间有两个共价连接, 优选如图2所示的两个二硫键。

[0077] 还提供了复合物, 其包含第一种和第二种多肽或者由第一种和第二种多肽组成, 其中所述第一种和所述第二种多肽彼此非共价结合。

[0078] 此种共价连接的复合物的示例图如图2所示。优选所述复合物是二聚体。

[0079] 在第四方面, 本发明提供了组合物, 其包含或者由以下组成: 本发明的一或多种多肽和/或本发明的一或多种复合物, 前提是所述组合物中包含至少两种多肽, 该两种多肽在其所结合的第一抗原和/或第二抗原方面彼此不同。

[0080] 在所述第四方面的优选实施方案中, 所述两种多肽是 (a) (i) 结合HBV小或大表面抗原和CD3的多肽; 和 (ii) 结合HBV小或大表面抗原和CD28的多肽; 或者 (b) (i) 结合HBV小或大表面抗原和CD16的多肽; 和 (ii) 结合HBV小或大表面抗原和CD56的多肽。

[0081] 与阴性对照相比, 此优选实施方案的选择 (a) 以及选择 (b) 提供了非常高的达到95%的消除率(特别是达到它们涉及结合HBV小表面抗原的多肽的程度)。这预期会提供对HBV感染的细胞或HBV-抗原阳性肿瘤细胞的完全根除, 特别是在体内情形下重复应用之后。

[0082] 已经发现结合两种不同CTL标志物或NK标志物的双特异性分子的组合使用会提供协同效应。图3和4B显示了施用双特异性构建物后特定靶细胞溶解的比较。

[0083] 在特别优选的实施方案中,所述两个多肽包含或者由以下序列组成:(a) SEQ ID NO:43和44;或者(b) SEQ ID NO:45和46。

[0084] SEQ ID NO:43至46的每个序列在形成同二聚体时会允许形成两个二硫桥。有鉴于此,需要深入考虑也形成异二聚体。异二聚体的实例会是两个本发明多肽共价连接的复合物,其中第一个多肽将会结合HBV表面抗原和免疫效应细胞呈现的第一标志物,而第二个多肽则会结合HBV表面抗原和免疫效应细胞呈现的第二标志物。免疫效应细胞的两个所述标志物可以是,例如,CD3和CD28,或者是CD16和CD56。

[0085] 在另外的方面,本发明提供了药物组合物,其包含以下或者由以下组成:一或多种本发明的多肽、一或多种本发明的复合物和/或一或多种本发明的组合物。

[0086] 所述药物组合物还可以包含药物可接受的载体、赋形剂和/或稀释剂。药物载体、赋形剂和/或稀释剂的适宜实例是本领域熟知的,且包括磷酸盐缓冲盐水溶液、水、乳液如油/水乳液、各种类型的湿润剂、无菌溶液等。含有此类载体的组合物可以通过本领域熟知的常规方法来配制。这些药物组合物可以适宜的剂量施用于对象。适宜组合物的施用可以通过不同的方式来实现,例如,通过静脉、皮下或口服施用,优选这三种选择,另外还可以通过腹膜内、肌内、外用、皮内、鼻内、或支气管内施用。用于口服施用的配制品包括片剂和浆剂。特别优选通过注射进行所述施用。所述组合物还可以直接施用于目标部位,例如通过基因枪递送至内部或外部目标部位。给药方案将由参与的医师和临床因素来决定。在医学领域内熟知的是,向任何一个患者给药都取决于许多因素。包括患者的体型大小、体表面积、年龄、所要施用的特定化合物、性别、施用时间和途径、总体健康、以及同时施用的其它药物。蛋白药物活性物质可以每剂量1ng至10mg/kg体重的量存在;然而,也涵盖了低于或高于此实例范围的剂量,特别是考虑到以上的因素。如果方案是连续灌注,也应当在每分钟1μg至10mg单位每公斤体重的范围内。

[0087] 特别优选的是静脉内施用。

[0088] 在另外的方面,本发明提供了一或多种本发明的多肽、一或多种本发明的复合物和/或一或多种本发明的任一种组合物,在用于治疗或预防HBV感染和/或所述HBV感染所引起的病症的方法中的用途,所述HBV感染所引起的病症选自肝硬化、肝细胞癌、和肝癌,所述肝癌特征在于表达一或多种HBV表面抗原。优选所述肝细胞癌特征在于表达一或多种上文所定义的HBV表面抗原。

[0089] 在另外的方面,本发明提供了用于治疗或预防HBV感染和/或所述HBV感染所引起的病症的方法,所述所述HBV感染所引起的病症选自肝硬化和肝细胞癌,所述方法分别包括向有需要的患者施用治疗有效量的或预防有效量的一或多种本发明的多肽、一或多种本发明的复合物和/或一或多种本发明的组合物。

[0090] 优选所述药物组合物、用于治疗方法的所述多肽/复合物/组合物以及所述治疗方法中,所提到的多肽、复合物和/或组合物是其中所包含的或所使用的仅有的药物活性物质。

[0091] 有鉴于此,还涵盖了在组合疗法中掺入一或多种其它的药物活性物质。此类其它的药物活性物质可以选自干扰素或者其它免疫调节剂(如例如干扰素-α2a或2b,干扰素-

λ)、直接作用的抗病毒剂如核苷酸(核苷)相似物(如例如,拉米夫定(Epivir-HBV、Zeffix或Heptodin)、阿德福韦二匹伏酯(Hepsera,Preveon)、恩替卡韦(Baraclude,Entaliv)、替比夫定(Tyzeka,Sebivo)、替诺福韦(Viread))、进入抑制剂(如例如,Myrcludex-B)、其它抗病毒剂、或细胞因子如白介素-2。

[0092] 在另外的方面,本发明提供了杀伤HBV感染的细胞的体外方法,所述方法包括将HBV感染的所述细胞与以下一起培养:(i)免疫效应细胞和(ii)一或多种本发明的多肽、一或多种本发明的复合物和/或一或多种本发明的组合物。

[0093] 在体外方法的优选实施方案中,所述免疫效应细胞(i)包含在外周血单核细胞中;或者(ii)是NK细胞和/或CTL或者包含NK细胞和/或CTL。

[0094] 在另外的方面,本发明提供了体外的或离体的免疫效应细胞,其具有本发明的多肽或者本发明的复合物结合至所述免疫效应细胞的表面抗原。优选的免疫效应细胞和优选的免疫效应细胞呈现的表面抗原如上文所述。此类免疫效应细胞可用于施用给患有HBV感染、肝硬化或肝细胞癌的患者。因而还提供了药物组合物,其包含以下或者由以下组成:免疫效应细胞,其将本发明的多肽或本发明的复合物结合至其表面抗原。还提供了免疫效应细胞以用于治疗或预防HBV感染、肝硬化或肝细胞癌的方法,所述免疫效应细胞将本发明的多肽或者本发明的复合物结合至其表面抗原。

[0095] 本申请中所公开的序列

SEQ ID NO 1
C8 HC CDR1
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala

SEQ ID NO 2
C8 HC CDR2
Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr

SEQ ID NO 3
C8 HC CDR3
Ala Lys Pro Pro Gly Arg Gln Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Ile Tyr Tyr Phe Pro Leu
Gly Asn

SEQ ID NO 4
C8 LC CDR1
Asn Ile Gly Ser Lys Ser

SEQ ID NO 5
C8 LC CDR2
Asp Asp Ser

SEQ ID NO 6
C8 LC CDR3
Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Leu Val Val

[0096]

SEQ ID NO 7
5F9 HC CDR1
Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala

SEQ ID NO 8
5F9 HC CDR2
Ile Asn Ser Asp Gly Arg Ser Thr

SEQ ID NO 9
5F9 HC CDR3
Ala Arg Thr Phe Tyr Ala Asp Tyr

SEQ ID NO 10
5F9 LC CDR1
Gln Asn Val Asp Thr Thr

SEQ ID NO 11
5F9 LC CDR2
Trp Ala Ser

SEQ ID NO 12
5F9 LC CDR3
Gln Gln Tyr Ser Ile Phe Pro Tyr Thr

SEQ ID NO 13
5A19 HC CDR1
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala

SEQ ID NO 14
5A19 HC CDR2
Val Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala
SEQ ID NO 15
5A19 HC CDR3
Ala Ser Phe Asn Trp Asp Val Ala Tyr

SEQ ID NO 16
5A19 LC CDR1
Gln Ser Leu Leu Asn Thr Arg Thr Arg Lys Ser Tyr

SEQ ID NO 17
5A19 LC CDR2
Trp Ala Ser

SEQ ID NO 18
5A19 LC CDR3
Lys Gln Ser Tyr Ser Leu Tyr Thr

SEQ ID NO 19
OKT3 HC CDR1
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr

[0097] SEQ ID NO 20
OKT3 HC CDR2
Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr

SEQ ID NO 21
OKT3 HC CDR3
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr

SEQ ID NO 22
OKT3 LC CDR1
Ser Ser Val Ser Tyr

SEQ ID NO 23
OKT3 LC CDR2
Asp Thr Ser

SEQ ID NO 24
OKT3 LC CDR3
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr

SEQ ID NO 25
9.3 HC CDR1
Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Gly

SEQ ID NO 26
9.3 HC CDR2
Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr

SEQ ID NO 27
9.3 HC CDR3
Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr

SEQ ID NO 28
9.3 LC CDR1
Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu

SEQ ID NO 29
9.3 LC CDR2
Ala Ala Ser

SEQ ID NO 30
9.3 LC CDR3
Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr

SEQ ID NO 31
A9 HC CDR1
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp

SEQ ID NO 32
A9 HC CDR2
Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr

SEQ ID NO 33
A9 HC CDR3
Ala Arg Ser Ala Ser Trp Tyr Phe Asp Val

SEQ ID NO 34
A9 LC CDR1
Thr Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn Tyr

[0098] SEQ ID NO 35
A9 LC CDR2
His Thr Asn

SEQ ID NO 36
A9 LC CDR3
Ala Leu Trp Tyr Asn Asn His Trp Val

SEQ ID NO 37
NCAM29.2 HC CDR1
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly

SEQ ID NO 38
NCAM29.2 HC CDR2
Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Ala Ile

SEQ ID NO 39
NCAM29.2 HC CDR3
Val Arg Gly Arg Arg Leu Gly Glu Gly Tyr Ala Met Asp Tyr

SEQ ID NO 40
NCAM29.2 LC CDR1
Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr

SEQ ID NO 41
NCAM29.2 LC CDR2
Trp Ala Ser

SEQ ID NO 42
NCAM29.2 LC CDR3
Gln Gln Tyr Ser Ser Trp Thr

SEQ ID NO 43

C8-hIgG1Fc_{mut}-OKT3

MDFEVQIFSFLLISASVIMSRMAEVOLVESGGGGLLOPGGSLRLSCAASGF
TFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNISK
NTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPPGROEYYGSSIYYFPLGNWGQGTTLVT
VSSASTKGPKLEEGERFSEARVQSALTQPASVSVAPGOTARITCGGNNIGSKS
VHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGD
EADYYCOVWDSSSDLVVFGGGTCLTVLGNSSGGGGSGGGGSGGGGSASE
PKSSDKTHTCPPCPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLN
GKEYKCAVSNKGLASSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGIFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKDPGWSHPQFEKSRGGG
GQVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLE
WIGYINPSRGYTNYNOKFKDKATLTDDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYC
ARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSSGNSGGGGSGGGGSGGGGSASQIVLT
QSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLA
SGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLE
INGNS

SEQ ID NO 44

C8- hIgG1Fc_{mut}-9.3

MDFEVQIFSFLLISASVIMSRMAEVOLVESGGGGLLOPGGSLRLSCAASGF
TFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNISK
NTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPPGROEYYGSSIYYFPLGNWGQGTTLVT
VSSASTKGPKLEEGERFSEARVQSALTQPASVSVAPGOTARITCGGNNIGSKS
VHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGD
EADYYCOVWDSSSDLVVFGGGTCLTVLGNSSGGGGSGGGGSGGGGSASE
PKSSDKTHTCPPCPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLN
GKEYKCAVSNKGLASSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGIFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKDPGWSHPQFEKSSGGG
GQVQLQSGPGLVTPSQSLTSITCVSGFSLSDYGVHWSRQSPGQGLEW
GIWAGGSGTNYSALMSRKSISKDNSKSOVFLKMNSLQADDTAVYYCA
RDKGYSYYYSMDYWGQGTTLTVSSRGGGSGGGGSGGGGSDIELTQSPA
SLAVSLGORATISCRASESVEYYVTSLMOWYQQKPGOPPKLLIFAASNVE
SGVPARFSGSGSGTNTFSLNIHPVDEDDVAMYFCQQSRKVPYTFGGGTCL
EIKR

[0099]

SEQ ID NO 45

C8- hIgG1Fc_{mut}-A9

MDFEVQIFSFLLISASVIMSRMAEVOLVESGGGGLLOPGGSLRLSCAASGF
TFSGYAMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNISK
NTLYLQMNSLRAEDTALYYCAKPPGROEYYGSSIYYFPLGNWGQGTTLVT
VSSASTKGPKLEEGERFSEARVQSALTQPASVSVAPGOTARITCGGNNIGSKS
VHWYQQKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGD
EADYYCOVWDSSSDLVVFGGGTCLTVLGNSSGGGGSGGGGSGGGGSASE
PKSSDKTHTCPPCPAPPAAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSH
EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHODWLN
GKEYKCAVSNKGLASSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
TCLVKGIFYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
RWQOGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGKDPGWSHPQFEKSRGGG
GQVQLQQSGAELVRPGTSVKISCKASGYTFTNYWLGWVKQRPGHGLE
WIGDIYPGGGYTNYNEKFKGKATVTADTSSRTAYVQVRSLTSEDSAVYF
CARSAWYFDVWGAGTTVTVSSGNSGGGGSGGGGSGGGGSASQAVVTQ
ESALTTSPGETVTLTCSRNTGTVTTSNYANWVQEKPDHFLTGLIGHTNN
RAPGVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYNNHWVFGGGT
KLTVL

SEQ ID NO 46
 C8- hIgG1Fc_{mut}-NCAM29.2
 MDFEVQIFSFLLISASVIMSRMAEVOLVESGGGGLLPGGSLRLSCAASGF
 TFSGYAMSWVROAPGKGLEWVSSISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNK
 NTLYLQMNLSRAEDTALYYCAKPPGRQEEYYGSSIIYFPLGNWGQGT
 VSSASTKGPKEGEFSEARVQSALTQPASVSVAPGQTARITCGGNNIGSKS
 VHWYQOKPGQAPVLVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGD
 EADYYCOVWDSSSDLVVFVGGGTLTLVLGNSGGGGSGGGGSGGGGSASE
 PKSSDKTHTCPPCPAP~~P~~AAGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH
 EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVHLHODWLN
 GKEYKCAVSNKGLASSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSL
 TCLVKGFIYPSDIAVEWESNGOPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKS
 RWQOGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGKDPGWSHPQFEKSSGGG
 DVOLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSFGMHVWVROAPEKGLEWV
 [0100] AYISSGSYAIYYADTVKGRFTISRDNPNENTLFLQMTSLRSEDSAMYYCVR
 GRRLGEGYAMDYWGQGTSTVTVSSGNSGGGGSGGGGSGGGGSASDIVMS
 QSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLYSSNQKNYLAWYQOKPGQSPKLLI
 YWASTRKSQVDRFTGSGSGTDFTLTISSVKAEDLAVYYCQQYSSWTFG
 GGTKLEIKR

SEQ ID NO 47
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

SEQ ID NO 48
 Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val

SEQ ID NO 49
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 Gly Ser

附图说明

[0101] 附图对本发明进行了说明。

[0102] 图1:通过融合两个可变结构域获得scFv片段。融合涉及使用灵活的肽接头,其不影响或者基本上不影响每个可变结构域的结构。

[0103] 图2:两个本发明多肽通过形成二硫键而二聚化。每个多肽包含双特异性二价抗体。天然抗体在生产细胞的内质网中的二聚化可以导致形成双特异性四价抗体,或者三-或四-特异性、四价抗体(如果两个双特异性二价抗体共表达的话(未显示))。

[0104] 图3:比较使用单个双特异性抗体后产HBV表面抗原的肝癌靶细胞的特异性消除与同时施用两个CTL-特异性或两个NK细胞-特异性双特异性抗体的协同效应。使用了CellTiter-Blue细胞生存力测定。

[0105] 图4:A)细胞因子的分泌表明在存在本发明的双特异性抗体时免疫效应细胞的激活。在存在或者缺乏所示双特异性抗体时,将HBV感染的HepaRG细胞与PBMC共培养。B)与免疫效应细胞和双特异性抗体共培养的HBV感染的靶细胞的特异性消除。

[0106] 图5:存在单个HBs-活性双特异性抗体时,与PBMC共培养的靶细胞的生存力。单个双特异性抗体介导靶细胞的溶解。A,C,E:用αHBs xαCD3刺激的效果(A),用αHBs xαCD28刺激的效果(C)或者总结的(E)。B,D,F:用αHBs xαCD3[Fc Δ ADCC]刺激的效果(B),用αHBs xαCD28[Fc Δ ADCC]刺激的效果(D)或者总结的(F)。箭头表示添加PBMC和双特异性抗体。虚线代表HBs-转染的HuH7-S细胞,有菱形的曲线代表HuH7亲代肝癌细胞。使用了xCELLigence实时细胞毒性测定。细胞指数的归一化时间:0h。

[0107] 图6:存在HBs-活性双特异性抗体时,与PBMC共培养的靶细胞的生存力。双特异性

抗体的组合介导靶细胞的大规模杀伤。A:用 α HBs \times α CD3和 α HBs \times α CD28刺激的效果。B:用 α HBs \times α CD3[Fc Δ ADCC]和 α HBs \times α CD28[Fc Δ ADCC]刺激的效果。C,D:单个双特异性抗体与组合相比的效果。箭头表示添加PBMC和双特异性抗体。虚线代表HuH7-S细胞,有菱形的曲线为HuH7细胞。细胞指数的归一化时间:0h。

[0108] 图7:存在不同浓度的双特异性抗体时,与PBMC共培养的靶细胞的生存力。50 μ l/50 μ l的含抗体的上清的混合物 α HBs \times α CD3/ α HBs \times α CD28 (A)、或 α HBs \times α CD3[Fc Δ ADCC]/ α HBs \times α CD28[Fc Δ ADCC] (B),诱导了靶细胞的溶解比25 μ l/25 μ l混合物更早,表明了依赖剂量的效应。箭头表示添加PBMC和双特异性抗体。虚线代表HuH7-S细胞,有菱形的曲线为HuH7细胞。细胞指数的归一化时间:0h。

[0109] 图8:存在 α HBs \times α CD3和 α HBs \times α CD28的混合物时,与不同量的PBMC共培养的靶细胞的生存力。2 $\times 10^5$ PBMC介导比1 $\times 10^5$ PBMC显著更早的HuH7-S细胞的消除。箭头表示添加PBMC和双特异性抗体。虚线代表HuH7-S细胞,有菱形的曲线为HuH7细胞。细胞指数的归一化时间:0h。

[0110] 图9:存在 α HBs \times α CD3/ α HBs \times α CD28混合物达不同时间段时,与PBMC共培养的靶细胞的生存力。在刺激给定时间段之后,将含有双特异性抗体的上清液移出。4h刺激仅仅导致靶细胞生存力的小降低(78.5%的终末点生存力)。PBMC与双特异性抗体刺激8h或更长诱导了靶细胞的消除。在刺激8h和12h之后,靶细胞的杀伤与24h或48h的刺激相比有延迟,表明了效应细胞的连续激活也重新靶向。然而,HuH7-S在48h的终末点生存力相当:8h stim.:14.7%;12h stim.:11.7%,24h stim.:5.1%,48h stim.:3.2%)。箭头表示添加PBMC和双特异性构建物。显示了HuH7-S细胞的生存力动力学。细胞指数的归一化时间:0h。

[0111] 图10:于不同时间点 α HBs \times α CD3/ α HBs \times α CD28的存在下,在与HuH7-S/HuH7细胞共培养后,PBMC的IL-2、IFN- γ 和TNF- α 分泌。A:IL-2浓度随着时间提高并在大约24h达到浓度约1550pg/ml的平稳期。B:IFN- γ 分泌在8h至12h之间开始并提高至12000pg/ml(48h)。C:TNF- α 的产生在4h后就可以检测到了,持续提高,在24h达到峰值(1700pg/ml)并在48h后衰减至1400pg/ml。在缺乏HBs(HuH7细胞)时可以检测到高的背景TNF- α 分泌,4h后最高浓度(~ 70 pg/ml)在48h的共培养后降低至9pg/ml。

[0112] 图11:在双特异性抗体的存在下,PBMC与HuH7-S/HuH7细胞共培养后的LAMP-1染色。在 α HBs \times α CD3/ α HBs \times α CD28 (A,C)或者 α HBs \times α CD3[Fc Δ ADCC]/ α HBs \times α CD28[Fc Δ ADCC] (B,D)的存在下,与HuH7-S(黑线)和HuH7(灰线)细胞共培养后,在CD4 $^+$ (A,B)和CD8 $^+$ (C,D) T细胞上检测到内含体脱粒标志物LAMP-1的表面表达。

[0113] 图12:在 α HBs \times α CD3/ α HBs \times α CD28的存在下,8h、12h和24h之后,PBMC与HuH7-S或HuH7细胞共培养的FACS分析。A,B:IFN γ^+ /IL-2 $^+$ /TNF α^+ /CD154 $^+$ CD4 $^+$ T细胞 (A) 或者IFN γ^+ /IL-2 $^+$ /TNF α^+ /CD154 $^+$ CD8 $^+$ (B) T细胞的百分比。C,D:IFN γ^+ , IL-2 $^+$ 和/或TNF α^+ CD4 $^+$ (C)、或者IFN γ^+ , IL-2 $^+$ 和/或TNF α^+ CD8 $^+$ (D) T细胞的布尔组合门。

[0114] 图13:在 α HBs \times α CD3[Fc Δ ADCC]/ α HBs \times α CD28[Fc Δ ADCC]的存在下,24h和48h后,PBMC与固定的或可溶的HBsAg共培养的FACS分析。A,B:IFN γ^+ /IL-2 $^+$ /TNF α^+ /CD154 $^+$ CD4 $^+$ T细胞 (A) 或者IFN γ^+ /IL-2 $^+$ /TNF α^+ /CD154 $^+$ CD8 $^+$ (B) T细胞的百分比。C,D:IFN γ^+ , IL-2 $^+$ 和/或TNF α^+ CD4 $^+$ (C)、或者IFN γ^+ , IL-2 $^+$ 和/或TNF α^+ CD8 $^+$ (D) T细胞的布尔组合门。

[0115] 图14:HuH7-S细胞(110.8S/CO)、HepG2.2.15细胞(41.7S/CO)和HBV感染的HepaRG

细胞(16.5S/CO)的上清液中的HBsAg。

[0116] 图15:在双特异性抗体的存在下,与PBMC共培养的HBV感染的/未感染的HepaRG细胞的生存力。 α HBs \times α CD3 (A) 和 α HBs \times α CD3/ α HBs \times α CD28 (B) 介导显著的靶细胞溶解。未治疗细胞的终末点生存力是65.9% (HBV+) 和62.9% (HBV-)。箭头表示添加PBMC和双特异性构建物。虚线代表HBV感染的HepaRG细胞,有菱形的曲线为未感染的HepaRG细胞。xCELLigence测定中细胞指数的归一化时间:0h。

[0117] 图16:用双特异性抗体治疗的动物中肿瘤大小的减小。用人类PBMC以及 α HBs \times α CD3和 α HBs \times α CD28双特异性抗体的混合物在连续四天治疗携有HBV-阳性皮下HepG2.2.15肿瘤的小鼠。将小鼠处死并分析了肿瘤的大小。

[0118] 实施例对本发明进行了说明。

[0119] 实施例1

[0120] 用于实施例2的材料和方法

[0121] 双特异性抗体的克隆和制备

[0122] 通过从各个杂交瘤的逆转录mRNA进行PCR扩增,获得了编码抗-CD3 (OKT3)、抗-CD28 (9.3)、抗-CD16 (A9) 和抗-CD56 (NCAM29.2) 的可变重链和可变轻链的互补DNA,其中使用涵盖所有VH和Vk/Vl亚型的一组引物。将PCR产物连接至pCR2.1-TOPO中 (Invitrogen, Life Technologies) 并测序。在质粒pMP71-C8中以密码子优化的形式提供抗-HBsAg scFv C8。使用5' 和3' 侧含有适宜的限制性位点的引物,以甘氨酸-丝氨酸接头将编码上述抗体的可变重链和可变轻链cDNA组合至scFvs中。将OKT3、9.3、A9和NCAM29.2scFvs (N-末端扩展了(Gly)₃₋₄) 克隆至编码人类IgG1的Fc结构域(铰链,CH2,CH3)的呈现于pBluescript KS II+ (Stratagene) 中的cDNA的3' 端,其在5' 端扩展有甘氨酸-丝氨酸接头GlyAsnSer (Gly₄Ser)₃AlaSer和StrepTag序列(WSHPQFEK),并且在第二系列的构建物中,其在3' 端扩展有额外的甘氨酸-丝氨酸接头(Gly₄Ser)₃。将C8scFv编码序列克隆至所述5' 甘氨酸-丝氨酸接头的5' 端。将完整的scFv-接头-hIgG1Fc-接头-scFv序列亚克隆至哺乳动物表达载体pcDNA3.1 (-) (Invitrogen) 之中。利用peqFECT转染试剂(Peqlab) 以Maxi-prep质粒DNA来转染HEK293细胞。使用0.8-1.0mg/ml的G418来选择稳定的转染体并进行了扩展。收集了来自HEK转染体的上清液并通过ELISA分析了分泌的双特异性抗体的浓度以及通过蛋白印迹分析了所分泌抗体的完整性(使用山羊抗-人类IgG-Fc特异性、过氧化物酶标记的抗体)。

[0123] 细胞培养条件和HBV感染

[0124] 将HuH7肝癌细胞 (Nakabayashi, 等人1982. Growth of human hepatoma cell lines with differentiated functions in chemically defined medium. Cancer Res. 42:3858-3863) 和HEK293细胞保存在Dulbecco改良的Eagle培养基 (DMEM) 中,其中补加有10%的胎牛血清 (FBS)、青霉素 (100U/mL)、链霉素 (100 μ g/mL)、和L-谷氨酰胺 (2mmol/L) (全部来自GIBCO, Life Technologies)。

[0125] 使用LSM 1077淋巴细胞分离培养基 (PAA), 通过密度梯度离心从肝素化的全血中分离了外周血单核细胞 (PBMC)。25ml的血液在13ml的LSM1077之上分层。在室温下以2000rpm离心20min (没有间歇) 之后,收集PBMC并在RPMI 1640培养基中培养,其中补加有10%的胎牛血清 (FBS)、青霉素 (100U/mL)、链霉素 (100 μ g/ml)、和L-谷氨酰胺 (2mmol/l) (全部来自GIBCO)。在过夜静置步骤后,将PBMC或分选的NK细胞用于共培养实验。

[0126] 将HepaRG细胞保持在Williams E培养基中(Invitrogen GmbH, Karlsruhe, Germany),其中补加有L-谷氨酰胺(5mmol/l)、葡萄糖(0.06% [wt/vol])、HEPES (23mmol/l, pH7.4)、庆大霉素(50µg/ml)、青霉素(50I U/ml)、链霉素(50µg/ml)、肌苷(37µmol/l)、氢化可的松(4.8µg/ml)、和胰岛素(1µg/ml)。在感染之前使用分化培养基(Williams E培养基(如上所述)补加有DMSO(1.75%))将HepaRG细胞分化4周。以最终m.o.i.200的HBV母液和PEG(5%)在分化培养基中感染HepaRG细胞。在过夜温育之后将感染接种物移除且用分化培养基替换并培养6天。对于与重新导向的T细胞共培养,我们在开始共培养前两天将分化培养基更换为无氢化可的松的培养基以避免由氢化可的松介导的免疫阻抑。

[0127] 用HBV表面抗原编码质粒进行转染

[0128] 使用FuGene转染试剂(Promega),以编码各种表面抗原的质粒转染HuH-7细胞。对于96孔平板的8个孔,将3µl的FuGENE、1µg的质粒DNA加至100µl的OptiMEM(Gibco)。将转染溶液在室温温育15min以便使得FuGENE结合质粒DNA。在添加另外的OptiMEM并温育至少24小时后,每孔应用100µl的终体积。

[0129] NK细胞的磁激活细胞分选(MACS)

[0130] 使用人类CD56⁺CD16⁺NK细胞分离试剂盒(Miltenyi)从PBMC分离了NK细胞。在第一个阴性筛选步骤中,通过单克隆抗体将所有的非NK细胞去除,所述单克隆抗体是针对未在NK细胞表面上表达的抗原。在第二个阳性筛选步骤中,通过缀合至氧化铁微珠的单克隆CD16抗体分离了NK细胞并保留在磁场内。在分离后,将NK细胞培养在如上文所述的RPMI-1640培养基中。

[0131] HBV-阳性靶细胞和重新导向的效应细胞的共培养

[0132] 以全铺满(full confluency)将靶细胞培养在96孔平板中。将 1×10^5 的效应细胞添加至每孔体积100µl的培养基。将含有双特异性抗体的100µl的HEK上清液应用于每孔。为了确定协同效应,向每孔添加50µl的每种双特异性抗体上清液。与200µl的培养基共培养的或者仅与效应细胞共培养的或者仅与双特异性抗体共培养的未经治疗的靶细胞用作阴性对照。

[0133] 对效应细胞激活的酶联免疫吸附测定(ELISA)

[0134] 通过ELISA检测到由效应细胞激活所引起的细胞因子分泌。使用人类IFN- γ ELISA MAXTM(BioLegend)。使用程序Magellan6和InfiniteF200(Tecan)检测了在450nm的吸收。

[0135] 靶细胞生存力测定

[0136] 使用细胞Titer-Blue细胞生存力测定(Promega)来确定共培养后的靶细胞生存力。此测定是基于活细胞由于代谢活性将氧化还原染料(刃天青)转化为荧光终产物(试卤灵)的能力。非存活细胞快速丧失其代谢能力因而并不会产生荧光信号。在去除上清液后,将每孔100µl的无色DMEM(含有20%的细胞Titer-Blue试剂)添加至共培养物并在37℃温育2小时。使用InfiniteF200(Tecan)在569nm记录荧光信号。

[0137] 实施例2

[0138] 结果

[0139] 在第一线的实验中,我们评估了针对CTL表面抗原CD3和CD28以及针对NK细胞表面抗原CD16和CD56双特异性抗体构建物的活性。我们利用了质粒转染的产HBV表面抗原的肝癌细胞系。在建立了HBV蛋白表达之后,将这些靶细胞与免疫效应细胞(也即PBMC和分离的

NK细胞)以及双特异性抗体构建物一起共培养。PBMC含有大约70%的T细胞但却仅有7%的NK细胞。因此,我们磁分离了CD16⁺CD56⁺NK细胞。作为阴性对照我们分析了具有HBV-阴性靶细胞的共培养物,其已经与含有HBV和亚病毒颗粒的上清液进行了预先温育。我们利用此对照来排除效应细胞由于非特异性结合HBV-阴性靶细胞表面的HBV颗粒而造成的激活。另外,我们将HBV-阳性靶细胞与免疫效应细胞进行了共培养(缺乏双特异性构建物)以便评估非特异性的背景细胞毒性。为了排除双特异性构建物的细胞毒性作用,我们在双特异性构建物的存在下制备了无免疫效应细胞的HBV-阳性靶细胞。

[0140] 这些实验显示了在CD3-或CD28-特异性构建物的存在下的共培养时CTL的特异性激活,这是通过促炎症反应细胞因子干扰素- γ (IFN- γ) 高达7000pg/ml的分泌所确定的。通过共施用CD3-和CD28特异性构建物进一步增强了此效应,证明了协同效应。

[0141] 另外,双特异性构建物介导了产HBsAg的HuH7肝癌细胞系(图3)特异性细胞毒性消除,其中靶细胞生存力与对照相比有高达90%的降低。此细胞毒性反应在PBMC和HBV-阳性靶细胞与针对CD3和CD28的双特异性构建物一起的共培养中观察到,以及在分离的NK-细胞与针对CD16和CD56的构建物中观察到。CTL-和NK-细胞特异性构建物的共施用进一步协同性地将细胞毒性作用提高至超过95%的消除率。我们观察到了CTL和NK细胞分别有15%至40%的非特异性背景细胞毒性。

[0142] 在第二轮的实验中,我们利用了HBV感染的HepaRG肝癌细胞。此细胞系允许在4周的分化后用于HBV感染并反映了HBV感染组织的天然情况。通常,HepaRG细胞的感染率从未达到100%并且感染的和未感染的细胞的此种混合物模拟了HBV感染的个体在抗病毒治疗时的情形,在细胞外病毒颗粒的存在下,携带有感染的和未感染的细胞。

[0143] 在免疫效应细胞于共同施用的双特异性构建物的共培养中,HBV感染的HepaRG细胞介导了CTL和NK细胞二者的有效激活,伴有高达60,000pg/ml的阻抑量的IFN- γ 分泌(图4A)。在此实验中,我们并未在共培之前分离或者富集NK细胞。

[0144] 另外,双特异性抗体构建物导致了激活的免疫效应细胞的细胞毒性反应,引起HBV感染的靶细胞的特异性消除(图4B)。我们观察到了NK-细胞和CTL分别有50%至70%的消除率。在这些实验中缺乏非特异性的细胞毒性。

[0145] 实施例3

[0146] 用于实施例4的方法

[0147] 为了分析双特异性抗体构建物成功将T细胞重新靶向HBV-阳性细胞的治疗潜力,详细地进行并分析了体外共培养实验。我们利用针对人类CD3(α CD3)和人类CD28(α CD28)的含有单链结合结构域的双特异性抗体构建物,以及另外的在其Fc间隔区结构域中含有消除抗体依赖性细胞毒性的定向突变的构建物(Δ ADCC)(通过避免Fc γ 受体结合)。这些是构建用作安全措施以排除天然杀伤细胞的非特异性激活。在另一侧,所有的双特异性抗体构建物都携带有HBV S-蛋白(HBsAg)特异性结合结构域C8。将从健康供血者的新鲜静脉血中分离的外周血单核细胞(PBMC)与不同的人类肝癌细胞系共培养以用于代替HBV-感染。我们利用了HuH7-S(HBV S-抗原转基因)以及作为阴性对照的母细胞系HuH7和HBV感染的或作为对照的未感染的HepaRG细胞。HepG2.2.15(HBV基因组转基因)细胞用作对HBV标志物进行定量的对照。为了提供双特异性抗体构建物,添加了含有双特异性抗体的生产细胞系的上清液。为了使得靶细胞生存力由于双特异性抗体介导的细胞毒性而随着时间的变化可视化,使用

了xCELLigence系统。此技术允许在长时间的培养中对细胞的生存力进行实时监测。因此,将靶标肝癌细胞接种在特别设计的微滴定平板上,其含有交错的金微电极来非侵入性的监测粘附靶细胞的生存力(使用电阻抗作为读数)。细胞毒性消除导致阻抗的改变,其可以被转换成所谓的细胞指数(CI)值,用于监测细胞生存力。

[0148] 与靶细胞共培养

[0149] 在第0天,在96孔平板中每孔接种 3×10^4 HuH7-S/HuH7细胞(E-Plate 96)。在第1天,移除上清液并将100 μ l PBMC培养基中的 1×10^5 原代人类PBMC或者仅仅是作为对照的100 μ l培养基加入到各个孔。另外,添加了100 μ l的含有双特异性抗体的上清液(单独或者组合)。作为阴性对照,将100 μ l的DMEM培养基加入到孔中,得到200 μ l的总体积。在xCELLigence系统中监测共培养48h或72h。

[0150] 将HepaRG细胞培养至铺满(confluence),分化21天并在免疫治疗实验之前用HBV感染。

[0151] 为感染HepaRG细胞,在含有PEG的分化培养基中制备了病毒母液并在每孔添加了50 μ l。PEG的终浓度为5%并且病毒母液的MOI设置为200(7.5×10^6 病毒颗粒/孔)。在添加感染混合液(master mix) 16小时后,用PBS洗涤细胞3次以去除残余病毒。添加分化培养基,每3天更换一次培养基总共12天。在共培养实验之前,将培养基更换为共培养培养基(缺少了免疫抑制剂氢化可的松)。通过测量感染细胞上清液中的HBsAg(AxSYM)和HBeAg(BEP III System)来测试HBV对HepaRG细胞的成功感染。

[0152] PBMC制备

[0153] 用于共培养实验的PBMC分离自全血。用RPMI洗涤培养基1:1稀释了肝素化的新鲜血液。将25ml经稀释的血液层铺至15ml的Percoll上并以960g在摇转式离心机中无间歇离心20min。分离PBMC并用RPMI培养基将其转移到50ml。洗涤之后,将细胞在10ml的PBMC培养基中重悬浮并确定细胞数目。将浓度调整至 2×10^6 细胞/ml以确保最佳状况。将PBMC在37 $^{\circ}$ C静置过夜。

[0154] 荧光激活细胞分选(FACS)

[0155] 为了检验重新导向的PBMC的效应功能,进行了FACS分析。因而,分别分析了促炎症反应细胞因子IFN- γ 、IL-2和TNF- α 的分泌、以及激活标志物CD154(CD40L)和脱粒标志物LAMP-1(CD107a)的表达。使用细胞内细胞因子染色来对细胞因子的产生进行测量。因此将0.2 μ g/ml的Brefeldin A(BFA)应用于细胞并在37 $^{\circ}$ C温育4小时。

[0156] BFA封闭内质网和高尔基体之间的正向转移,结果使细胞因子的胞外分泌被抑制。在要对LAMP-1同时进行染色的情况下,在添加BFA之前1h应用抗体(使得LAMP-1能够移位至细胞表面)。随后,将细胞转移至96孔平板(圆底)并在200 μ l的FACS缓冲液中洗涤两次。为了给存活细胞染色并排除死亡细胞,使用了LIVE/DEAD Fixable Near-IR Dead Cell Stain试剂盒。为了固定以及通透化,将细胞在100 μ l Cytofix/Cytoperm试剂中重悬浮并在冰上于暗处冰浴20min。在洗涤后,将细胞在制备的抗体混合液中重悬浮或者仅用各个单一颜色进行染色以用于系统性补偿。染色于暗处在冰上进行30min。洗涤之后,将细胞在200 μ l的FACS缓冲液中重悬浮并转移至FACS管中用于获取(acquisition)。FACSCanto II或者LSR Fortessa来进行获取。使用了FACS Diva软件来记录数据,使用FlowJo软件来进行分析。

[0157] 动物实验

[0158] 为了进行第一次体内双特异性构建物的测试,用免疫缺陷的Rag2/IL2R γ 裸小鼠(国际命名:B10;B6-Rag2tm1Fwa II2rgtm1Wjl)进行了实验。我们向老年小鼠注射了6周HBV-转基因人类肝癌细胞系HepG2.2.15的 5×10^6 细胞。细胞是通过皮下注射至动物的体测。这导致了在14天的时间段形成了肿瘤。通过确定HBV病毒血症来监测肿瘤内的HBV复制。从新鲜的人类脐带血分离了人类PBMC并在预先包被了针对人类CD3和CD28的抗体的平板上以 0.25×10^6 PBMC/ml的细胞浓度刺激了3天。随后将细胞在含有300U/ml的IL-2的细胞培养培养基中保持7天。

[0159] 在肿瘤诱导后的第14天,向小鼠腹膜内注射了 2×10^7 PBMC/小鼠,并且小鼠在连续4天从尾静脉接受每个小鼠100 μ l的 α CD3/ α CD28双特异性抗体构建物(于HEK生产细胞的上清液中)。在肿瘤诱导后的第18天处死小鼠并分析了肿瘤大小。随后,储存了血清和组织样本用于进一步分析。

[0160] 实施例4

[0161] 双特异性抗体介导表达HBV表面蛋白的靶细胞(HuH7-S)的特异性消除

[0162] 为了检验双特异性抗体构建物是否成功地将T细胞重新靶向为针对表达HBsAg的靶细胞并诱导靶细胞溶解,在双特异性抗体构建物的存在下,将分离的PBMC与HuH7-S细胞共培养。HuH7-S细胞被稳定地转染以表达HBsAg并因而模拟HBV感染的肝细胞。这导致亚病毒颗粒产生和分泌至上清液中,以及HBsAg掺入到细胞膜中。未转染的HuH7细胞用作阴性对照。

[0163] 单个双特异性抗体激起对靶细胞的杀伤

[0164] 为了分析双特异性抗体是否能够刺激T细胞的激活并介导靶细胞溶解,在 α HBs \times α CD3、 α HBs \times α CD28、 α HBs \times α CD3[Fc Δ ADCC]或 α HBs \times α CD28[Fc Δ ADCC]双特异性四价抗体的存在下,将PBMC与HuH7-S/HuH7细胞共培养。由单个双特异性抗体对效应细胞的刺激导致表达HBsAg的靶细胞的特异性杀伤(图5)。针对CD3的双特异性抗体介导的靶细胞消除比针对CD28的构建物更早且更强,因为用 α CD3处理的HuH7-S细胞的终末点生存力仅为6.4%(α CD3 Δ ADCC:15.5%),相较而言 α CD28为44.42%(α CD28 Δ ADCC:48.9%)。另外,与 α CD3和 α CD28相比, α CD3 Δ ADCC和 α CD28 Δ ADCC分别需要更多的时间来诱导靶细胞的溶解。 α CD3 Δ ADCC介导的杀伤在开始共培养后大约35h才开始,而 α CD3在12小时后就已经导致靶细胞生存力的降低了。在 α CD28 Δ ADCC和 α CD28介导的靶细胞溶解之间也观察到大约20h的时间差。用 α CD3刺激也导致了HBsAg-阴性HuH7细胞可检测的溶解,其终末点生存力为78.1%,表明了非特异性激活。用 α CD3 Δ ADCC激活在一些实验里也是这样,即使在本文中未显示。在其它双特异性构建物的存在下,HuH7细胞在共培养期间的生存力保持100%。

[0165] 此数据证明了用每个单个双特异性抗体刺激均激起了对靶细胞的消除(无进一步共刺激)。

[0166] 双特异性抗体以协同的方式介导靶细胞溶解

[0167] 为了进一步分析双特异性构建物的组合是否会导致增强的活性并因此而有增强的效应细胞的细胞毒性,在 α CD3/ α CD28或者 α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC组合的存在下将PBMC与HuH7-S/HuH7细胞共培养。如图6所示,双特异性构建物的组合导致了表达HBsAg的靶细胞的大规模杀伤,其中剩余生存力为1.2%(α CD3/ α CD28)和4.4%(α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC),而几乎没有HuH7细胞被消除(HuH7细胞的终末点生存力: α CD3/ α CD28:92.4%; α CD3

Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC:100.4%)。

[0168] 再次, α CD3/ α CD28介导的靶细胞溶解比具有突变的Fc区域的构建物所诱导的杀伤要快,即便是靶细胞的杀伤在大约相同的时间(约11h后)开始(图6A,B)。与单个双特异性构建物所诱导的溶解相比,双特异性抗体的组合导致了靶细胞更快的消除(图6C,D)。这是可以预期的,因为T细胞不仅仅接受单个构建物存在时的一个信号,而如果存在针对CD3和CD28的抗体时,其是接受到了激活和共刺激信号两者。

[0169] 因而,双特异性构建物的组合以协同的方式介导表达HBV表面蛋白的靶细胞的特异性溶解。

[0170] 双特异性抗体以浓度依赖性的形式激起靶细胞的消除

[0171] 为了检验双特异性抗体的量是否对靶细胞溶解有影响,使用两种不同量的双特异性构建物进行共培养。因此,使用了通常量的抗体(总共100 μ l上清液=高)以及其一半(总共50 μ l上清液=低)。较低量的双特异性抗体也能够诱导靶细胞的溶解(HuH7-S细胞的终末点生存力: α CD3/ α CD28:12.6%; α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC:15.9%),而较高的量引起了靶细胞更快的消除(图7),其中仅有1.5% (α CD3/ α CD28)和2.1% (α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC)的剩余存活细胞。HuH7细胞在两种情形中都未受影响。 α CD3/ α CD28或 α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC的组合以浓度依赖性的方式激起了靶细胞的杀伤。

[0172] 效应细胞浓度的提高增强了靶细胞的溶解

[0173] 另外的兴趣是了解效应细胞的数量是否会对靶细胞的消除有影响。因而,将用于共培养的常规量的PBMC (1×10^5)与双倍的量(2×10^5)进行比较。如图8中所证明的,更高数量的PBMC在 α CD3/ α CD28的存在下诱导HuH7-S细胞的溶解要显著更快,其中终末点生存力为4.5%相较于11.7%,但是如果存在双倍量的PBMC会有更多的HuH7细胞被杀伤(HuH7细胞的终末点生存力: 2×10^5 PBMC:83.8%; 1×10^5 PBMC:102.7%)。

[0174] 此数据表明靶细胞的消除依赖于效应细胞的量。

[0175] 双特异性抗体仅在8小时共培养后就介导靶细胞的杀伤

[0176] 为了研究双特异性抗体需要在共培养中存在多久才能激活T细胞并由此诱导细胞毒性,在不同的时间段将含有双特异性抗体的共培养上清液移出并添加新的DMEM标准培养基。如果含有 α CD3/ α CD28的上清液在4h后被移出,PBMC仅仅诱导了靶细胞生存力的小降低(78.5%),但却未能激起靶细胞的溶解(图9)。如果含有双特异性抗体的上清液存在了8h或更久,则PBMC就能够引起靶细胞的消除。如图10所示,PBMC需要较多的时间来诱导靶细胞溶解,如果用 α CD3/ α CD28刺激持续8h或12h(相较于24h或48h),但是在48h之后的效果就几乎类似了(HuH7-S终末点生存力:8h:14.7%;12h:11.7%,24h:5.1%,48h:3.2%)。

[0177] 双特异性抗体在与HBsAg或者HuH7-S细胞共培养期间介导T细胞的效应功能

[0178] 为了研究共培养实验期间T细胞的激活和功能性,通过ELISA或者FACS分析检验了细胞因子的分泌。

[0179] 双特异性构建物介导IFN- γ 、TNF- α 和IL-2的分泌

[0180] 在时间线实验中,分析了PBMC在与双特异性抗体接触后何时开始分泌细胞因子,以及动力学如何随着时间而发展。因此,在添加PBMC和 α CD3/ α CD28之后4h、8h、12h、24h和48h移出共培养的上清液。通过ELISA测量了细胞因子IL-2、IFN- γ 和TNF- α 的生产。IL-2的分泌随着时间增加,但是在4h后几乎检测不到IL-2,在8h后其浓度已经为316pg/ml,而在随

后的4h,其浓度几乎变为四倍(1119pg/ml)。在24h至48h之间几乎没有进一步的提升,而IL-2的浓度似乎达到了平稳期约1550pg/ml(图10A)。IFN- γ 分泌(图10B)需要更多的时间,在8h后依然只能监测到很低的水平。在8h至12h之间,T细胞开始分泌IFN- γ ,因为其浓度在12h后已经达到1800pg/ml。随后(24h)观察到IFN- γ 生产的提高,其浓度提高至大约10000pg/ml。最高的量在48h之后检测到(12000pg/ml)。对于IL-2和IFN- γ 二者,HBsAg阴性细胞上的浓度随着时间而提高,在48h之后达到最高量(IL-2:45pg/ml;IFN- γ :200pg/ml),这也对应了关于细胞生存力的观察。

[0181] TNF- α 的分泌(图10C)提升至24h,就此达到其峰值浓度(1700pg/ml)。接着其降低并在48h后达到仅有1400pg/ml。相反,TNF- α 分泌比其它开始的更早,在4h后有大约100pg/ml,随后稳定提升至24h。有趣的是,HuH7细胞上TNF- α 的产生以完全相反的方式进行。具有相较于其它细胞因子相对较高的背景浓度,其在4h后显示出最高浓度(\sim 70pg/ml),然后随着时间而降低并在48h后降低至9pg/ml。PBMC在与表达HBsAg的细胞共培养期间通过与 α CD3/ α CD28接触而被诱导分泌IL-2、IFN- γ 和TNF- α ,而不同单个细胞因子之间其分泌动力学不同。

[0182] 双特异性构建物激活CD8⁺T细胞以及CD4⁺T细胞

[0183] 为了分析PBMC是否还显示出细胞毒性囊泡的脱粒,研究了脱粒标志物LAMP-1(CD107a)的移位。在 α CD3/ α CD28或者 α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC的存在下,与HuH7-S/HuH7细胞共培养后,CD8⁺T细胞显示了LAMP-1染色的清晰迁移,而在 α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC刺激的样本中的信号比 α CD3/ α CD28更强(图11C,D)。有趣的是,CD4⁺T细胞也可观察到相同的结果(图11A,B)。对于 α CD3/ α CD28,LAMP-1的移位比在CD8⁺T细胞中更加突出,而对于 α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC则恰好相反。

[0184] 此数据证明了,在与双特异性抗体和HBsAg接触后,不仅是CD8⁺T细胞,CD4⁺也被诱导分泌细胞毒性粒子。

[0185] 为了检验T细胞在共培养实验之后的多功能性,在添加PBMC和 α CD3/ α CD28之后8h、12h和24h,将PBMC针对IFN- γ 、IL-2和TNF- α 以及针对激活标志物CD154(CD40L)(其主要在CD4⁺T细胞上表达)进行染色(图12)。CD4⁺T细胞显示了稳定的提高:IFN- γ ⁺T细胞(24h后9.3%)、IL-2⁺T细胞(24h后11.3%)、TNF- α ⁺T细胞(24h后14.7%)和CD154⁺T细胞(24h后28.0%),而主要的提升发生在12h至24h之间(图12A)。

[0186] CD8⁺T细胞也是如此,而IFN- γ ⁺和IL-2⁺细胞的百分比为18.4%和11.3%超过了CD4⁺T细胞。TNF- α ⁺和CD154⁺CD8⁺T细胞的量相较于CD4⁺T细胞降低为10.1%和6.25%(图12B)。HuH7细胞上的PBMC在任何样品中都未显示激活。使用了布尔组合门(Boolean combination gate)进一步分析分泌细胞因子的T细胞(图12C,D)。在24h后,3.1%的CD4⁺T细胞和2.1%的CD8⁺T细胞为IFN- γ ⁺,IL-2⁺和TNF- α ⁺,表明了T细胞的多功能性。因此,在与HuH7-S/HuH7细胞共培养期间, α CD3/ α CD28介导PBMC的激活,导致多功能性的CD4⁺和CD8⁺T细胞。

[0187] 为了排除FACS分析期间,由于抗体对死亡靶细胞的非特异性结合而检测到假阳性信号的可能性,在固定的HBsAg的存在下培养了PBMC。另外还检验了可溶性HBsAg的作用,因为HBV感染的患者在其血液中展现出高含量的HBsAg。再次将PBMC针对IFN- γ 、IL-2和TNF- α 、以及CD154进行了染色,但是仅仅在添加PBMC和 α CD3 Δ ADCC/ α CD28 Δ ADCC之后24h和48h

(图13)。再次,CD4⁺T细胞显示了IFN- γ ⁺T细胞的提高(24h后3.4%,48h后6.8%),以及CD154⁺T细胞的提高(24小时后17.2%,48小时后19.9%)。48h之后的IL-2⁺T细胞(4.9%)比24h之后(5.5%)少,TNF- α ⁺T细胞也降低了(24小时后14.9%,48小时后8.1%) (图13A)。CD8⁺T细胞仅仅在TNF- α ⁺T细胞显示了降低(24小时后12.6%,48小时后7.4%),而此降低也在ELISA中观测到(图10)。IFN- γ ⁺、IL-2⁺和CD154⁺CD8⁺T细胞的百分比在24h至48h之间提升(IFN- γ ⁺:24小时后4.7%,48小时后8.5%,IL-2⁺:24小时后5.1%,48小时后7.2%,CD154⁺:24小时后8.3%,48小时后10.4%) (图13B)。IFN- γ ⁺和IL-2⁺CD8⁺T细胞的百分比再次超过了CD4⁺T细胞,并且TNF- α ⁺和CD154⁺CD8⁺T细胞的量与CD4⁺T细胞相比降低。在48h后,也有一些T细胞似乎被可溶性HBsAg所激活,因为TNF α ⁺T细胞达到了1.1% (CD4⁺T细胞)和1.0% (CD8⁺T细胞)、CD154⁺T细胞2.7% (CD4⁺T细胞)和3.1% (CD8⁺T细胞)、IFN- γ ⁺CD8⁺T细胞1.2%和IL-2⁺CD8⁺T细胞1.4%。再次使用布尔门来进一步分析分泌细胞因子的T细胞(图13C,D)。0.35% (24h后)和0.63% (48h后)的CD4⁺T细胞,0.3% (24h后)和1.0% (48h后)的CD8⁺T细胞为IFN- γ ⁺,IL-2⁺和TNF- α ⁺,表明了T细胞的多功能性。 α CD3 Δ DCC/ α CD28 Δ ADCC介导PBMC在与固定的HBsAg细胞共培养期间的激活,导致多功能性的CD4⁺和CD8⁺T细胞。由于可溶性HBsAg的激活则依然保持低下。

[0188] 双特异性抗体介导IFN- γ 分泌以及HBV感染的HepaRG细胞的杀伤

[0189] 最后,感兴趣的是双特异性抗体是否能够将T细胞重新靶向至HBV感染的HepaRG细胞。通过测量感染细胞的上清液中的HBsAg来测试感染的成功。与HuH7-S或HepG2.2.15细胞的结果相比,由HBV感染的HepaRG细胞所产生的HBsAg浓度很低。另外相对较高的标准差表明,不同孔中的值差别很大(图14)。

[0190] 尽管如此,感染是成功的并且PBMC与HepaRG细胞在双特异性抗体的存在下进行了共培养。如图15所示,未经治疗的细胞的生存力随着时间而降低,在56h之后剩余的生存力为65.9% (HBV+)和62.9% (HBV-)。相较而言, α CD3和组合 α CD3/ α CD28介导了HBV感染的HepaRG细胞特异性的溶解。 α CD28自己未能诱导靶细胞的特异性消除。如果 α CD3在共培养期间存在,HBV感染的细胞的生存力降低至25.3%,而未感染的HepaRG细胞保持在53.5% (图15A)。 α CD3/ α CD28对效应细胞的刺激也导致对HBV感染的HepaRG细胞的显著杀伤(图15B),其中37.5%的靶细胞保持存活(未感染HepaRG细胞:62.4%)。

[0191] 因此, α CD3或 α CD3/ α CD28诱导HBV感染的HepaRG细胞的特异性溶解。

[0192] 双特异性抗体在体内介导HBV阳性肿瘤的减少

[0193] 向注射了人类HBV-转基因肝癌细胞系HepG2.2.15以发展皮下HBV-阳性肿瘤的免疫缺陷小鼠,注射了人类PBMC和针对CD3和CD28的双特异性构建物(图16)。该治疗导致了肿瘤大小的显著降低(相较于未经治疗或者经过模拟治疗(接受PBMC和PBS的动物)的动物)。在经治疗动物中肿瘤大小减少大约50%。

序列表

<110> 健康与环境慕尼黑德国研究中心赫姆霍茨中心（有限责任公司）
德国公共权利基金会癌症研究中心

<120> 用于治疗 HBV 感染和相关病症的新措施和方法

<130> W2662 PCT

<150> EP 13 18 4635.4
<151> 2013-09-16

<160> 49

<170> BiSSAP 1.2

<210> 1
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 of scFv C8 heavy chain

<400> 1
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala
1 5

[0001] <210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 of scFv C8 heavy chain

<400> 2
Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr
1 5

<210> 3
<211> 21
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 of scFv C8 heavy chain

<400> 3
Ala Lys Pro Pro Gly Arg Gln Glu Tyr Tyr Gly Ser Ser Ile Tyr Tyr
1 5 10 15
Phe Pro Leu Gly Asn
20

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 of scFv C8 light chain

<400> 4
Asn Ile Gly Ser Lys Ser
1 5

<210> 5
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 of scFv C8 light chain

<400> 5
Asp Asp Ser
1

<210> 6
<211> 11
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 of scFv C8 light chain

<400> 6
[0002] Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Leu Val Val
1 5 10

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 of scFv 5F9 heavy chain

<400> 7
Gly Phe Thr Phe Asn Asn Tyr Ala
1 5

<210> 8
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 of scFv 5F9 heavy chain

<400> 8
Ile Asn Ser Asp Gly Arg Ser Thr
1 5

<210> 9
<211> 8

<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 of scFv 5F9 heavy chain

<400> 9
Ala Arg Thr Phe Tyr Ala Asp Tyr
1 5

<210> 10
<211> 6
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 of scFv 5F9 light chain

<400> 10
Gln Asn Val Asp Thr Thr
1 5

<210> 11
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

[0003] <220>
<223> CDR2 of scFv 5F9 light chain

<400> 11
Trp Ala Ser
1

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 of scFv 5F9 light chain

<400> 12
Gln Gln Tyr Ser Ile Phe Pro Tyr Thr
1 5

<210> 13
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 of scFv 5A19 heavy chain

<400> 13
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Ala
1 5

<210> 14
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 of scFv 5A19 heavy chain

<400> 14
Val Ser Ser Asp Gly Ser Tyr Ala
1 5

<210> 15
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 of scFv 5A19 heavy chain

<400> 15
Ala Ser Phe Asn Trp Asp Val Ala Tyr
1 5

<210> 16
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

[0004] <220>
<223> CDR1 of scFv 5A19 light chain

<400> 16
Gln Ser Leu Leu Asn Thr Arg Thr Arg Lys Ser Tyr
1 5 10

<210> 17
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 of scFv 5A19 light chain

<400> 17
Trp Ala Ser
1

<210> 18
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 of scFv 5A19 light chain

<400> 18
Lys Gln Ser Tyr Ser Leu Tyr Thr

1 5

<210> 19
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 of scFv OKT3 heavy chain

<400> 19
Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 20
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 of scFv OKT3 heavy chain

<400> 20
Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr
1 5

[0005] <210> 21
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 of scFv OKT3 heavy chain

<400> 21
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 22
<211> 5
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 of scFv OKT3 light chain

<400> 22
Ser Ser Val Ser Tyr
1 5

<210> 23
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 of scFv OKT3 light chain

[0006]

<400> 23
Asp Thr Ser
1

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 of scFv OKT3 light chain

<400> 24
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr
1 5

<210> 25
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 of scFv 9.3 heavy chain

<400> 25
Gly Phe Ser Leu Ser Asp Tyr Gly
1 5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 of scFv 9.3 heavy chain

<400> 26
Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr
1 5

<210> 27
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 of scFv 9.3 heavy chain

<400> 27
Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 of scFv 9.3 light chain

<400> 28
Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu
1 5 10

<210> 29
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 of scFv 9.3 light chain

<400> 29
Ala Ala Ser
1

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 of scFv 9.3 light chain

<400> 30
Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr
1 5
[0007]

<210> 31
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 of scFv A9 heavy chain

<400> 31
Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Trp
1 5

<210> 32
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 of scFv A9 heavy chain

<400> 32
Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr
1 5

<210> 33
<211> 10
<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 of scFv A9 heavy chain

<400> 33
Ala Arg Ser Ala Ser Trp Tyr Phe Asp Val
1 5 10

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 of scFv A9 light chain

<400> 34
Thr Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn Tyr
1 5

<210> 35
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 of scFv A9 light chain

[0008] <400> 35
His Thr Asn
1

<210> 36
<211> 9
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 of scFv A9 light chain

<400> 36
Ala Leu Trp Tyr Asn Asn His Trp Val
1 5

<210> 37
<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR1 of scFv NCAM29.2 heavy chain

<400> 37
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly
1 5

<210> 38

<211> 8
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 of scFv NCAM29.2 heavy chain

<400> 38
Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Ala Ile
1 5

<210> 39
<211> 14
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 of scFv NCAM29.2 heavy chain

<400> 39
Val Arg Gly Arg Arg Leu Gly Glu Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
1 5 10

<210> 40
<211> 12
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

[0009] <220>
<223> CDR1 of scFv NCAM29.2 light chain

<400> 40
Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser Asn Gln Lys Asn Tyr
1 5 10

<210> 41
<211> 3
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR2 of scFv NCAM29.2 light chain

<400> 41
Trp Ala Ser
1

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> Artificial Sequence

<220>
<223> CDR3 of scFv NCAM29.2 light chain

<400> 42
Gln Gln Tyr Ser Ser Trp Thr
1 5

<210> 43
 <211> 794
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Anti-HBsAg scFv [C8][^]Glycin-Serin-Linker[^]hIgG1-Fc[C245S, L259F, L260E, G262A, A355T][^]StrepTag[^]Glycin-Linker[^]anti-CD3 scFv [OKT3]

 <400> 43
 Met Asp Phe Glu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Met Ser Arg Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 20 25 30
 Gly Leu Leu Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 35 40 45
 Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
 50 55 60
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 85 90 95
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 100 105 110
 Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Pro Gly Arg Gln Glu Tyr
 115 120 125
 Tyr Gly Ser Ser Ile Tyr Tyr Phe Pro Leu Gly Asn Trp Gly Gln Gly
 130 135 140
 [0010] Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Lys Leu Glu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro
 165 170 175
 Ala Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
 180 185 190
 Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 195 200 205
 Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 210 215 220
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
 225 230 235 240
 Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 245 250 255
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr
 260 265 270
 Lys Leu Thr Val Leu Gly Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 275 280 285
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys
 290 295 300
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Ala Pro
 305 310 315 320
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 325 330 335
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 340 345 350
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 355 360 365
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

370 375 380
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Thr Pro Ile Glu Lys
 405 410 415
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 420 425 430
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 435 440 445
 Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 450 455 460
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 465 470 475 480
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 485 490 495
 Ser Arg Trp Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 500 505 510
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 515 520 525
 Lys Asp Pro Gly Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Ser Arg Gly Gly
 530 535 540
 Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro
 545 550 555 560
 Gly Ala Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 565 570 575
 Arg Tyr Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu
 580 585 590
 Trp Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln
 595 600 605
 Lys Phe Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr
 610 615 620
 Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 625 630 635 640
 Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly
 645 650 655
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Gly Asn Ser Gly Gly Gly Gly
 660 665 670
 Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Gln Ile Val
 675 680 685
 Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly Glu Lys Val
 690 695 700
 Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr
 705 710 715 720
 Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser
 725 730 735
 Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser Gly Ser Gly
 740 745 750
 Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala
 755 760 765
 Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe Gly Ser
 770 775 780
 Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Gly Asn Ser
 785 790

 <210> 44
 <211> 793
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-HBsAg scFv [C8][^]Glycin-Serin-Linker[^]hIgG1-Fc[C245S,L259F,L260E,G262A,A355T][^]StrepTag[^]Glycin-Linker[^] anti-CD28 scFv [9.3]

<400> 44

Met	Asp	Phe	Glu	Val	Gln	Ile	Phe	Ser	Phe	Leu	Leu	Ile	Ser	Ala	Ser
1			5						10					15	
Val	Ile	Met	Ser	Arg	Met	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly
		20					25					30			
Gly	Leu	Leu	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
	35					40					45				
Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro
	50				55				60						
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser
65					70				75					80	
Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
			85					90					95		
Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu
		100					105					110			
Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Pro	Pro	Gly	Arg	Gln	Glu	Tyr
	115					120					125				
Tyr	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Phe	Pro	Leu	Gly	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly
	130				135				140						
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Lys	Leu	Glu
145					150				155					160	
Glu	Gly	Glu	Phe	Ser	Glu	Ala	Arg	Val	Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro
			165				170						175		
Ala	Ser	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Gly
		180					185					190			
Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro
	195					200						205			
Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr	Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser
	210				215				220						
Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr
225					230				235					240	
Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys
			245					250					255		
Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr
	260						265					270			
Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Asn	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
	275					280						285			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys
	290				295				300						
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Ala	Pro
305					310				315						
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
			325					330					335		
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
	340						345					350			
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
	355					360					365				
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
	370					375					380				
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
385					390				395					400	
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Thr	Pro	Ile	Glu	Lys
			405					410					415		

[0012]

[0013]

```

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
      420                      425                      430
Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
      435                      440                      445
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
      450                      455                      460
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
      465                      470                      475                      480
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
      485                      490                      495
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
      500                      505                      510
Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
      515                      520                      525
Lys Asp Pro Gly Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Ser Ser Gly Gly
      530                      535                      540
Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Thr Pro
      545                      550                      555                      560
Ser Gln Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Ser
      565                      570                      575
Asp Tyr Gly Val His Trp Val Arg Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Glu
      580                      585                      590
Trp Leu Gly Val Ile Trp Ala Gly Gly Gly Thr Asn Tyr Asn Ser Ala
      595                      600                      605
Leu Met Ser Arg Lys Ser Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Ser Gln Val
      610                      615                      620
Phe Leu Lys Met Asn Ser Leu Gln Ala Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr
      625                      630                      635                      640
Cys Ala Arg Asp Lys Gly Tyr Ser Tyr Tyr Tyr Ser Met Asp Tyr Trp
      645                      650                      655
Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Arg Gly Gly Gly Ser Gly
      660                      665                      670
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Asp Ile Glu Leu Thr Gln Ser
      675                      680                      685
Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys
      690                      695                      700
Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Tyr Tyr Val Thr Ser Leu Met Gln Trp
      705                      710                      715                      720
Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Phe Ala Ala
      725                      730                      735
Ser Asn Val Glu Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser
      740                      745                      750
Gly Thr Asn Phe Ser Leu Asn Ile His Pro Val Asp Glu Asp Asp Val
      755                      760                      765
Ala Met Tyr Phe Cys Gln Gln Ser Arg Lys Val Pro Tyr Thr Phe Gly
      770                      775                      780
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
      785                      790

```

<210> 45

<211> 792

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Anti-HBsAg scFv [C8]^hGlycin-Serin-Linker^hIgG1-Fc[C245S, L259F, L260E, G262A, A355T]^hStrepTag^hGlycin-Linker^hStrepTag^hanti-CD16 scFv [A9]

<400> 45
 Met Asp Phe Glu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15
 Val Ile Met Ser Arg Met Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly
 20 25 30
 Gly Leu Leu Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
 35 40 45
 Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro
 50 55 60
 Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser
 65 70 75 80
 Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
 85 90 95
 Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu
 100 105 110
 Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys Ala Lys Pro Pro Gly Arg Gln Glu Tyr
 115 120 125
 Tyr Gly Ser Ser Ile Tyr Tyr Phe Pro Leu Gly Asn Trp Gly Gln Gly
 130 135 140
 Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Lys Leu Glu
 145 150 155 160
 Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg Val Gln Ser Ala Leu Thr Gln Pro
 165 170 175
 Ala Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly
 180 185 190
 Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro
 195 200 205
 Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser
 210 215 220
 Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr
 225 230 235 240
 Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys
 245 250 255
 Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Leu Val Val Phe Gly Gly Gly Thr
 260 265 270
 Lys Leu Thr Val Leu Gly Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly
 275 280 285
 Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Glu Pro Lys Ser Ser Asp Lys
 290 295 300
 Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe Glu Gly Ala Pro
 305 310 315 320
 Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 325 330 335
 Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 340 345 350
 Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 355 360 365
 Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
 370 375 380
 Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
 385 390 395 400
 Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Thr Pro Ile Glu Lys
 405 410 415
 Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
 420 425 430
 Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr
 435 440 445

[0014]

Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
 450 455 460
 Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
 465 470 475 480
 Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 485 490 495
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 500 505 510
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 515 520 525
 Lys Asp Pro Gly Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Ser Arg Gly Gly
 530 535 540
 Gly Gly Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro
 545 550 555 560
 Gly Thr Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr
 565 570 575
 Asn Tyr Trp Leu Gly Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly His Gly Leu Glu
 580 585 590
 Trp Ile Gly Asp Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Glu
 595 600 605
 Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Val Thr Ala Asp Thr Ser Ser Arg Thr
 610 615 620
 Ala Tyr Val Gln Val Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr
 625 630 635 640
 Phe Cys Ala Arg Ser Ala Ser Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala Gly
 645 650 655
 Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Asn Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
 660 665 670
 Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Gln Ala Val Val Thr
 675 680 685
 Gln Glu Ser Ala Leu Thr Thr Ser Pro Gly Glu Thr Val Thr Leu Thr
 690 695 700
 Cys Arg Ser Asn Thr Gly Thr Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn Trp
 705 710 715 720
 Val Gln Glu Lys Pro Asp His Leu Phe Thr Gly Leu Ile Gly His Thr
 725 730 735
 Asn Asn Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Leu Ile
 740 745 750
 Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala Gln Thr Glu Asp Glu
 755 760 765
 Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Asn Asn His Trp Val Phe Gly
 770 775 780
 Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 785 790

 <210> 46
 <211> 799
 <212> PRT
 <213> Artificial Sequence

 <220>
 <223> Anti-HBsAg scFv [C8]^Glycin-Serin-Linker^hIgG1-Fc[C245S, L259F, L26
 OE, G262A, A355T]^StrepTag^Glycin-Linker^ StrepTag^anti-CD56 scFv
 [NCAM29. 2]

 <400> 46
 Met Asp Phe Glu Val Gln Ile Phe Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
 1 5 10 15

Val	Ile	Met	Ser	Arg	Met	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly
			20					25					30		
Gly	Leu	Leu	Gln	Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser
		35					40					45			
Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Gly	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro
	50					55					60				
Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val	Ser	Ser	Ile	Ser	Gly	Ser	Gly	Gly	Ser
65					70					75					80
Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp
				85					90					95	
Asn	Ser	Lys	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu
			100					105					110		
Asp	Thr	Ala	Leu	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Lys	Pro	Pro	Gly	Arg	Gln	Glu	Tyr
		115					120					125			
Tyr	Gly	Ser	Ser	Ile	Tyr	Tyr	Phe	Pro	Leu	Gly	Asn	Trp	Gly	Gln	Gly
	130					135					140				
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Lys	Leu	Glu
145					150					155					160
Glu	Gly	Glu	Phe	Ser	Glu	Ala	Arg	Val	Gln	Ser	Ala	Leu	Thr	Gln	Pro
				165					170					175	
Ala	Ser	Val	Ser	Val	Ala	Pro	Gly	Gln	Thr	Ala	Arg	Ile	Thr	Cys	Gly
			180					185					190		
Gly	Asn	Asn	Ile	Gly	Ser	Lys	Ser	Val	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro
		195					200					205			
Gly	Gln	Ala	Pro	Val	Leu	Val	Val	Tyr	Asp	Asp	Ser	Asp	Arg	Pro	Ser
	210					215					220				
Gly	Ile	Pro	Glu	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Asn	Ser	Gly	Asn	Thr	Ala	Thr
225				230					235						240
Leu	Thr	Ile	Ser	Arg	Val	Glu	Ala	Gly	Asp	Glu	Ala	Asp	Tyr	Tyr	Cys
				245					250					255	
Gln	Val	Trp	Asp	Ser	Ser	Ser	Asp	Leu	Val	Val	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr
			260					265					270		
Lys	Leu	Thr	Val	Leu	Gly	Asn	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
	275						280					285			
Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ser	Glu	Pro	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys
	290					295					300				
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Phe	Glu	Gly	Ala	Pro
305					310					315					320
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				325					330					335	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			340					345					350		
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
	355						360					365			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	T						

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
 485 490 495
 Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
 500 505 510
 Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 515 520 525
 Lys Asp Pro Gly Trp Ser His Pro Gln Phe Glu Lys Ser Ser Gly Gly
 530 535 540
 Gly Gly Asp Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 545 550 555 560
 Gly Gly Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser
 565 570 575
 Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu
 580 585 590
 Trp Val Ala Tyr Ile Ser Ser Gly Ser Tyr Ala Ile Tyr Tyr Ala Asp
 595 600 605
 Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Glu Asn Thr
 610 615 620
 Leu Phe Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Met Tyr
 625 630 635 640
 Tyr Cys Val Arg Gly Arg Arg Leu Gly Glu Gly Tyr Ala Met Asp Tyr
 645 650 655
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Asn Ser Gly Gly
 660 665 670
 Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Ser Asp
 675 680 685
 Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly Glu
 690 695 700
 [0017] Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser Ser
 705 710 715 720
 Asn Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 725 730 735
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val Pro
 740 745 750
 Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile
 755 760 765
 Ser Ser Val Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr
 770 775 780
 Ser Ser Trp Thr Phe Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 785 790 795

<210> 47

<211> 15

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 47

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5 10 15

<210> 48

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

[0018]

<220>

<223> Linker

<400> 48

Ala Lys Thr Thr Pro Lys Leu Glu Glu Gly Glu Phe Ser Glu Ala Arg

1

5

10

15

Val

<210> 49

<211> 20

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Linker

<400> 49

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly

1

5

10

15

Gly Gly Gly Ser

20

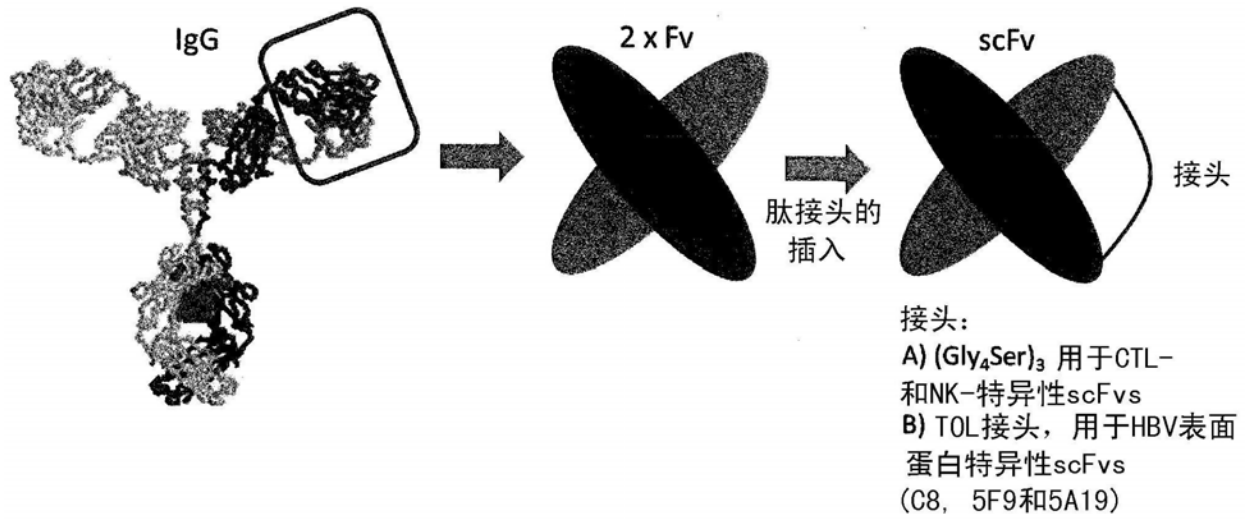


图1

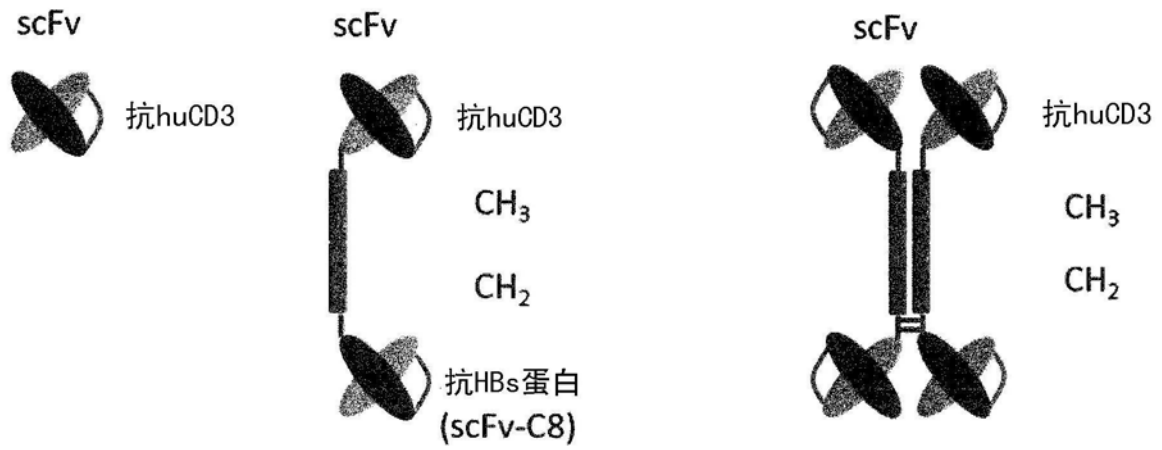


图2

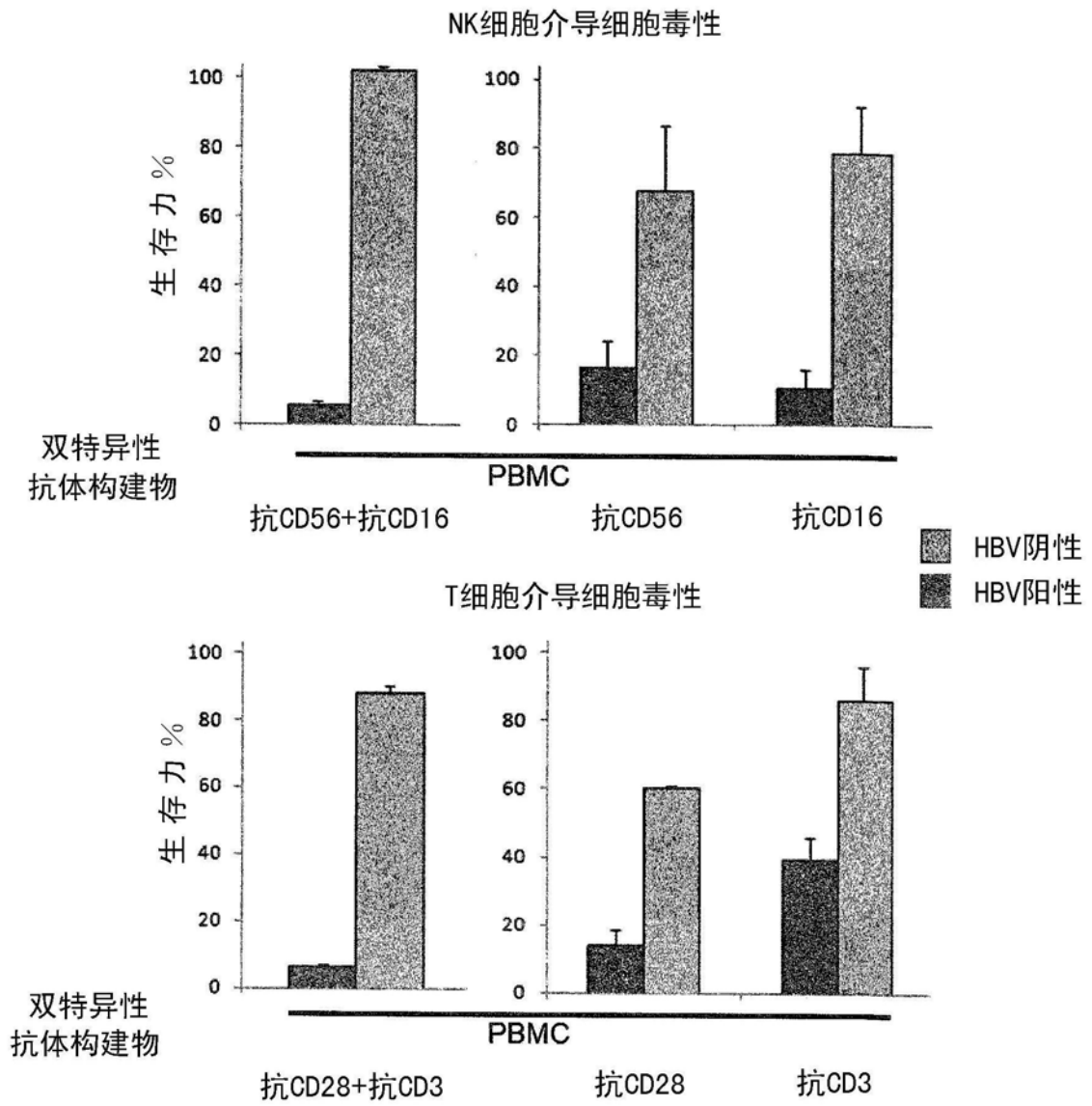


图3

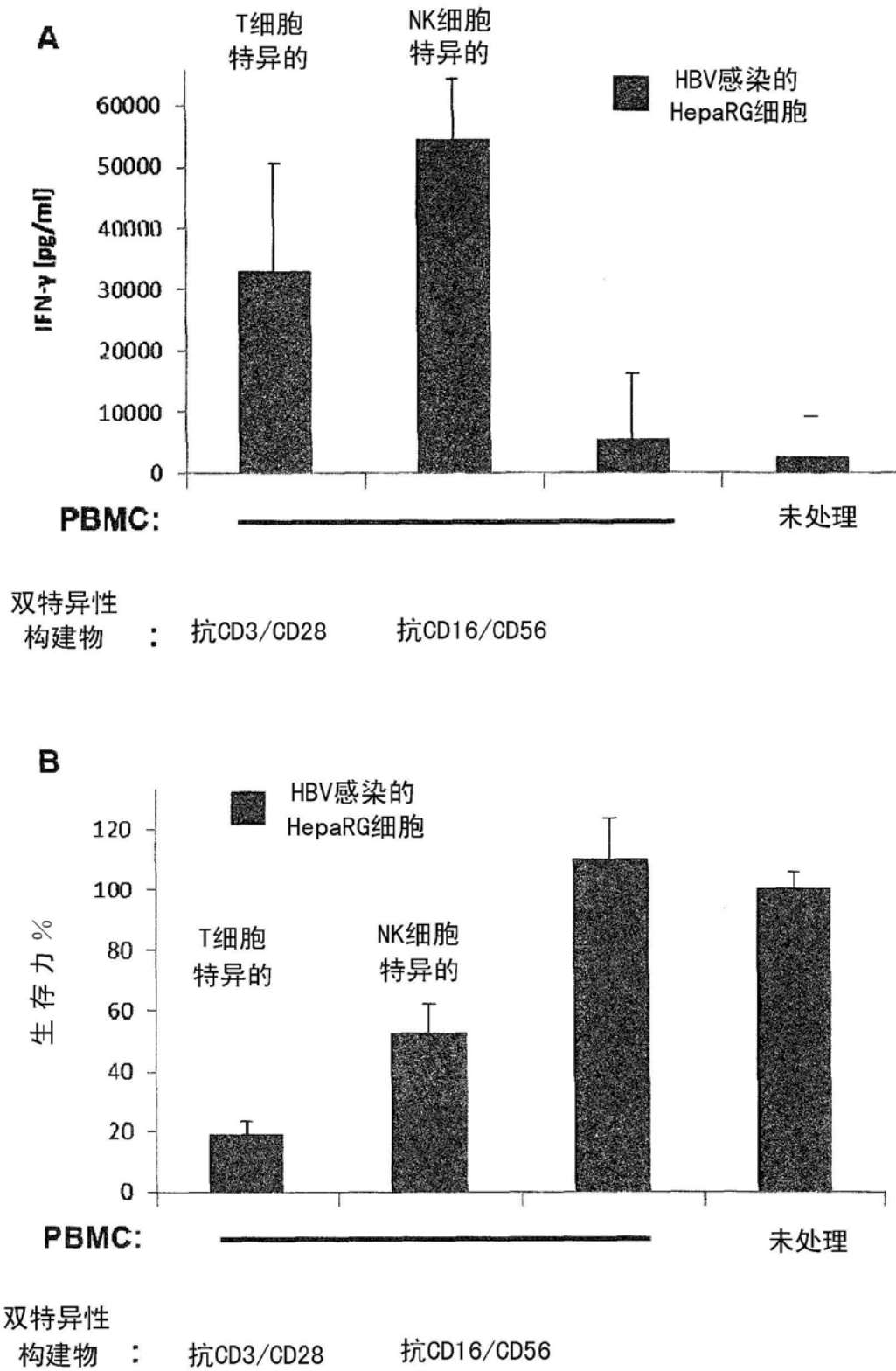


图4

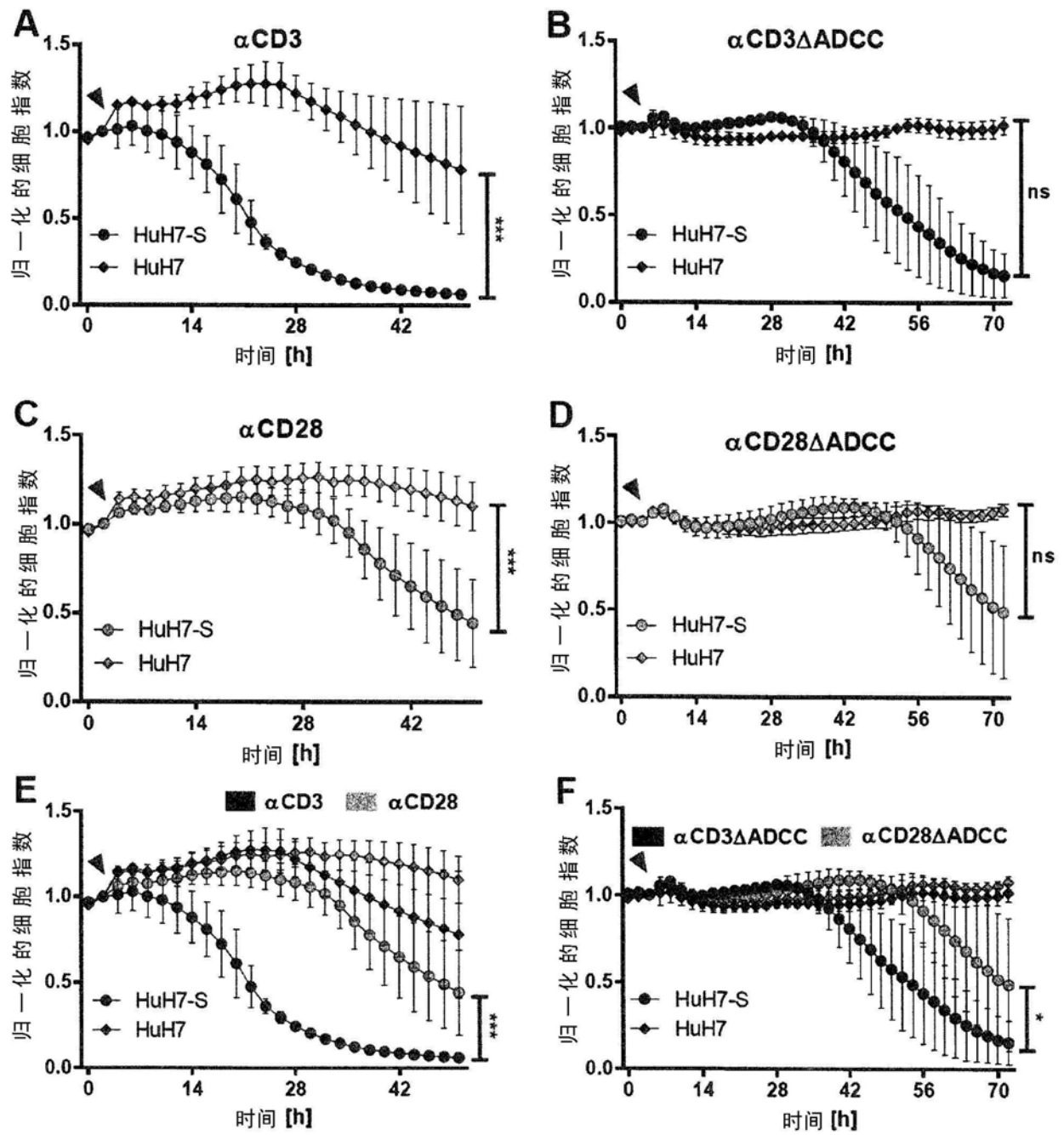


图5

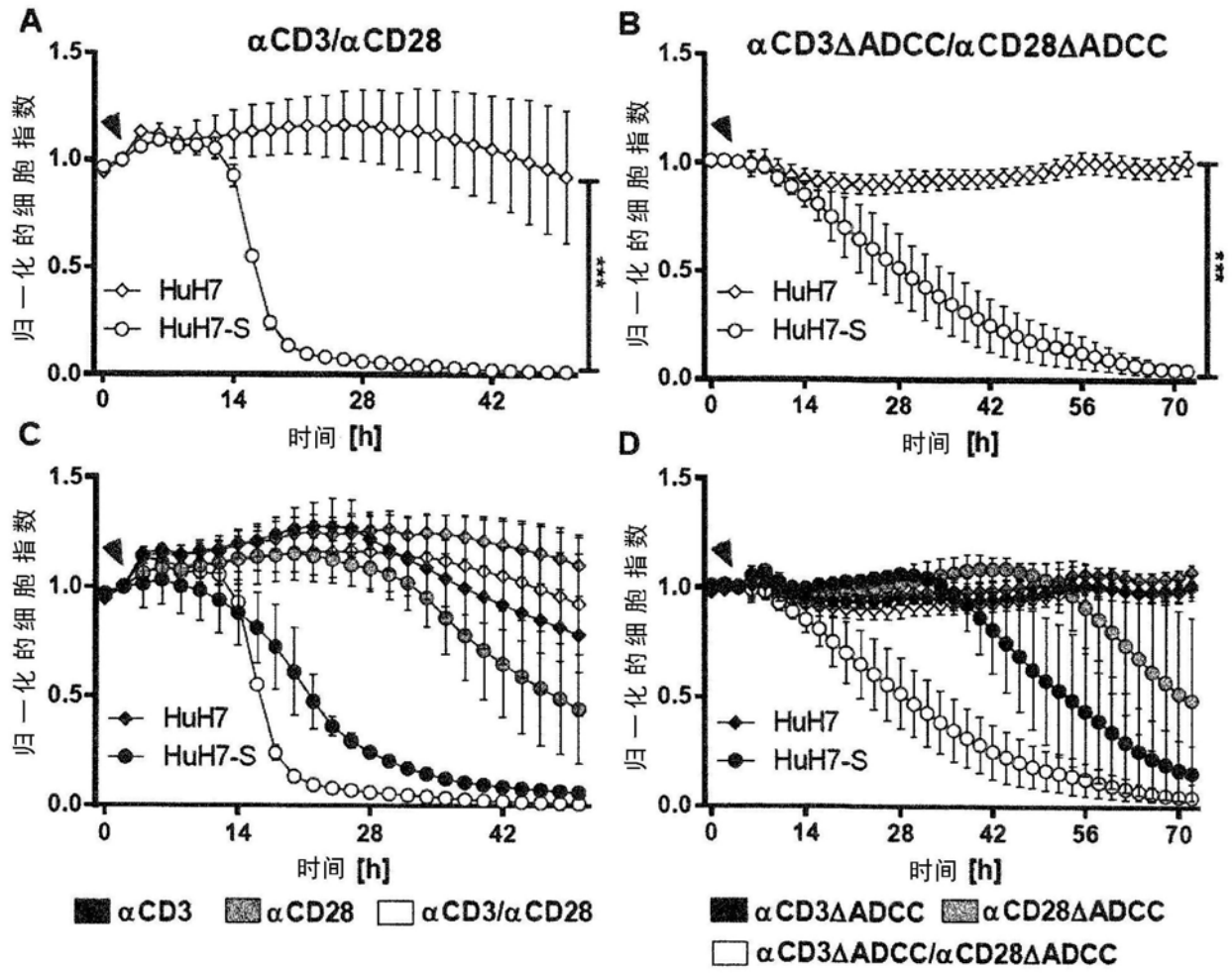


图6

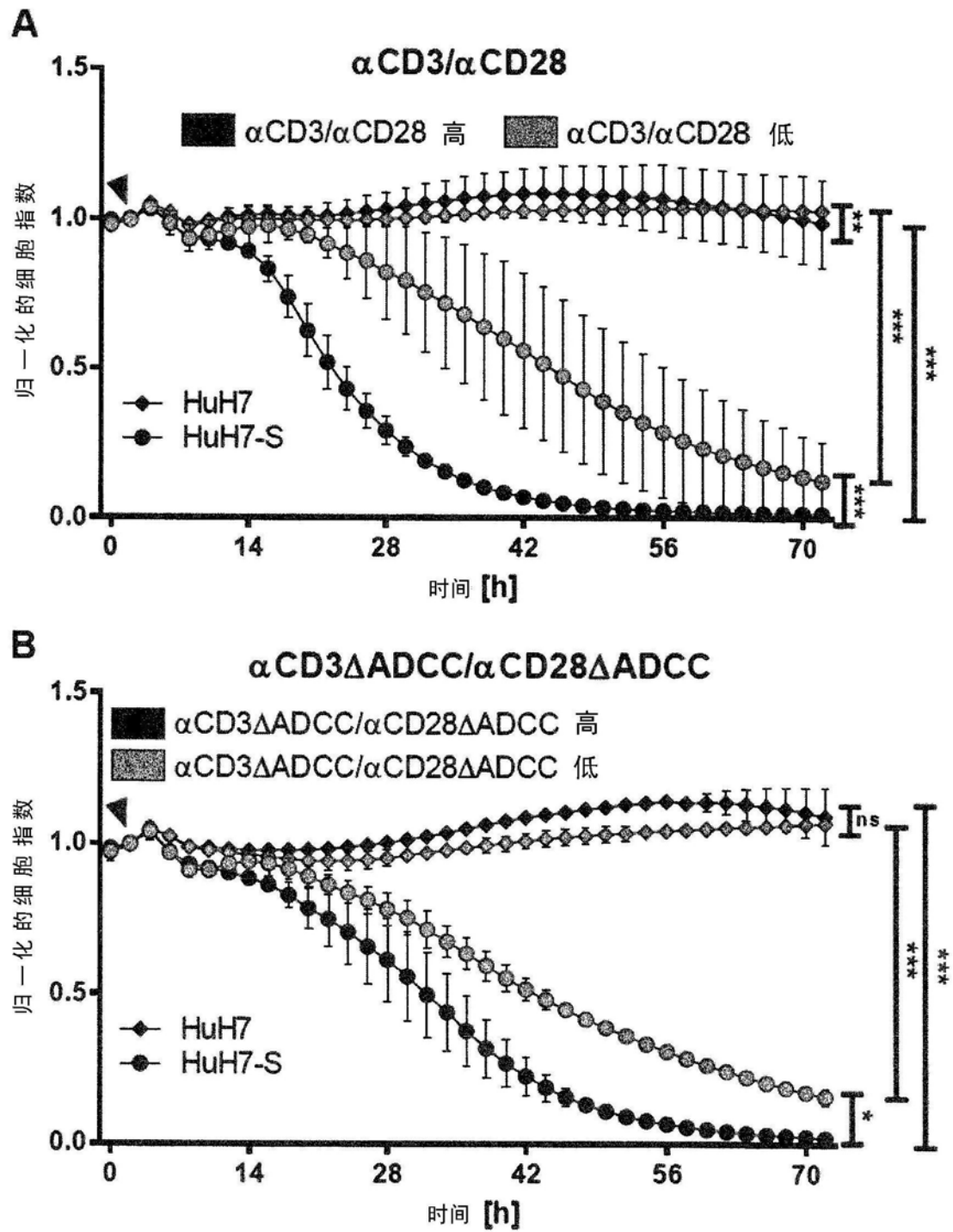


图7

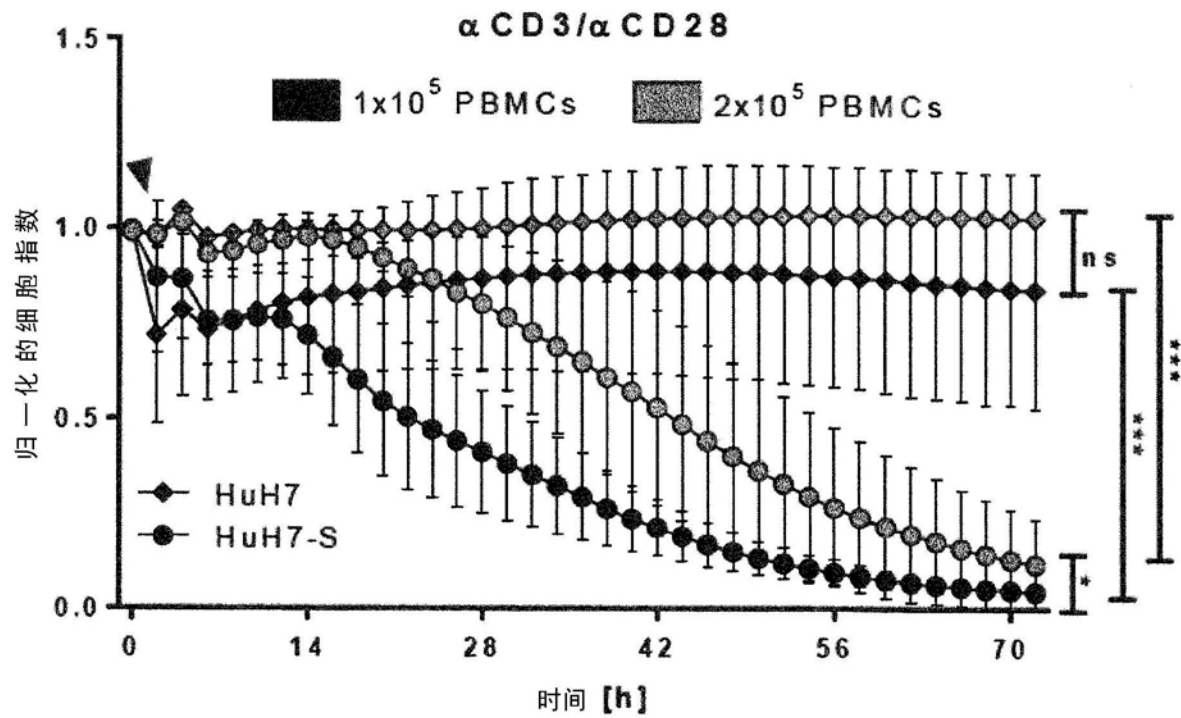


图8

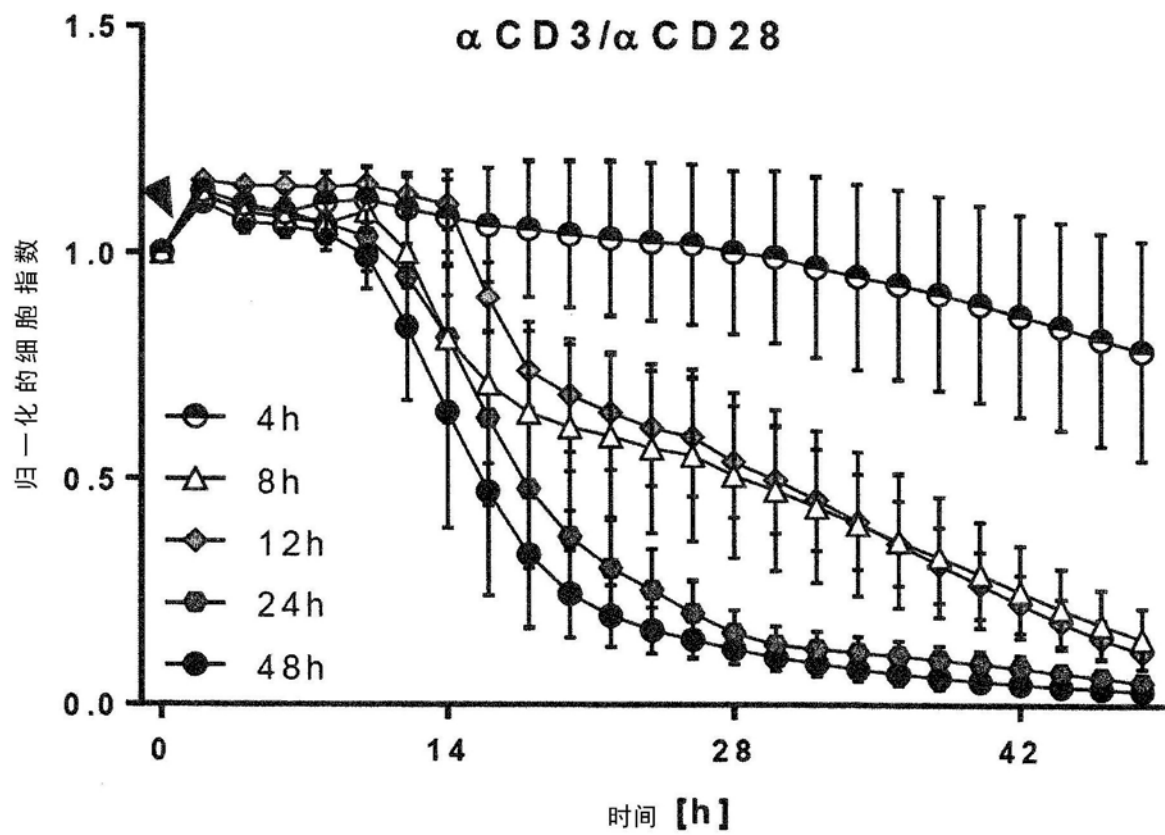


图9

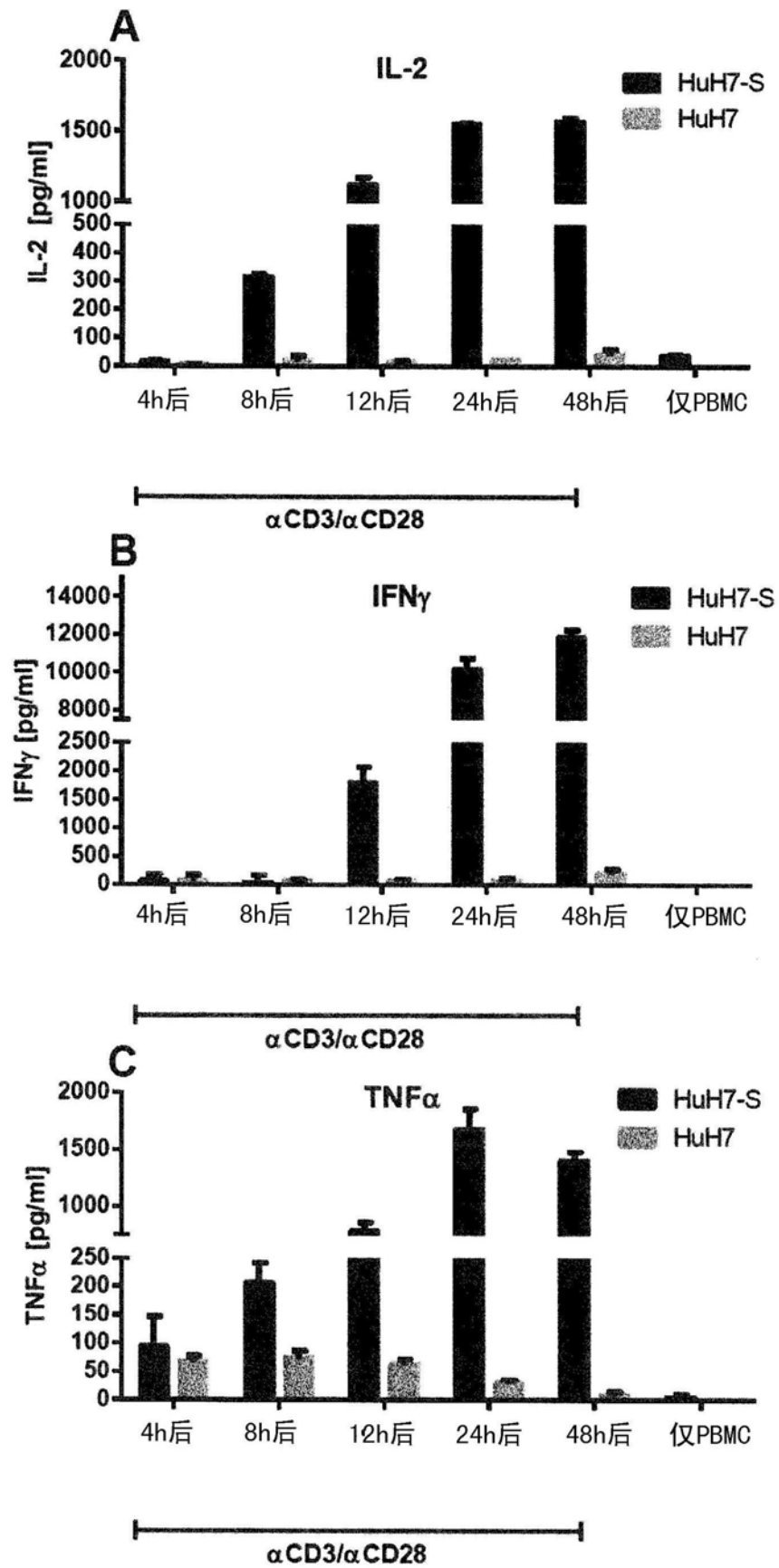


图10

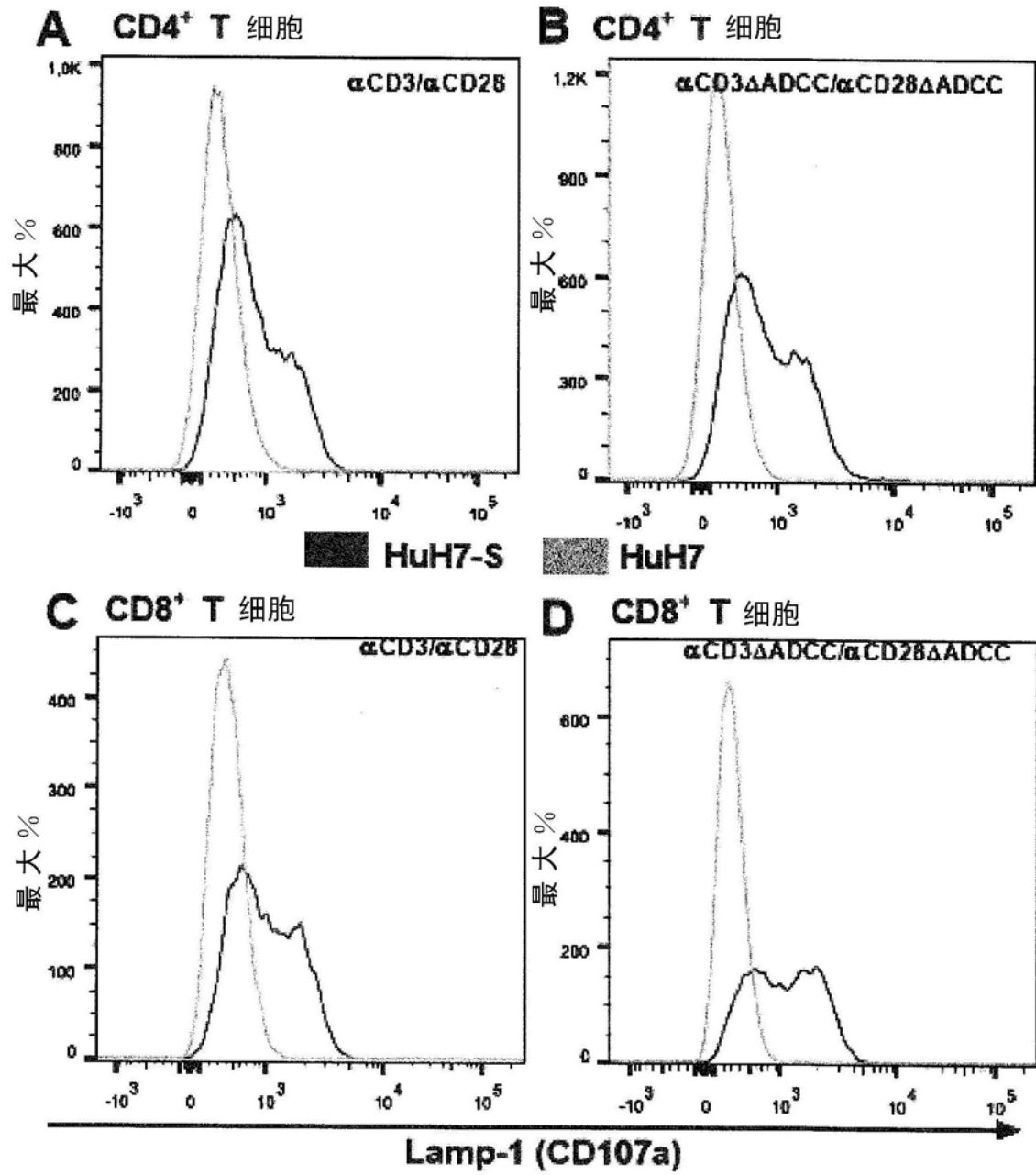


图11

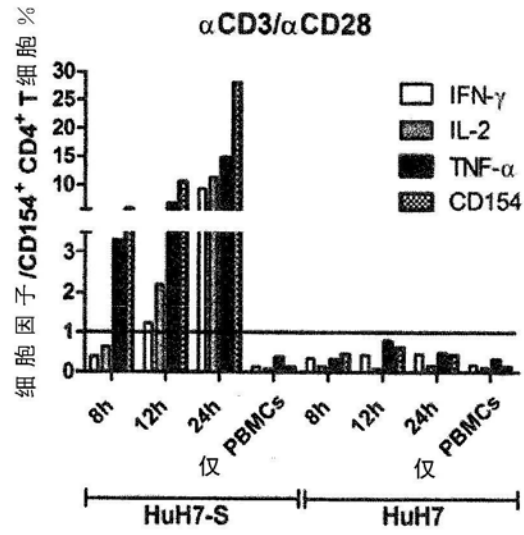


图12A

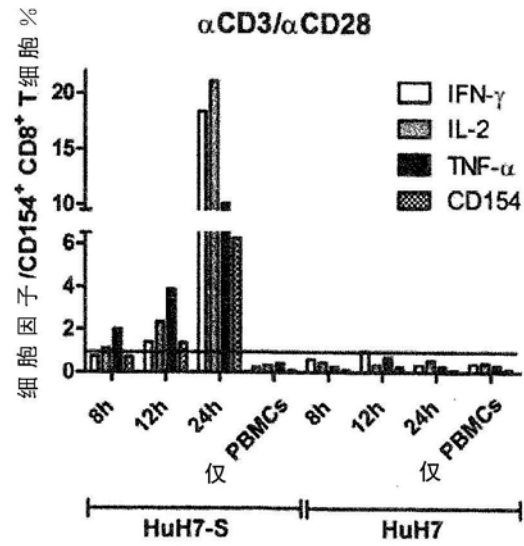


图12B

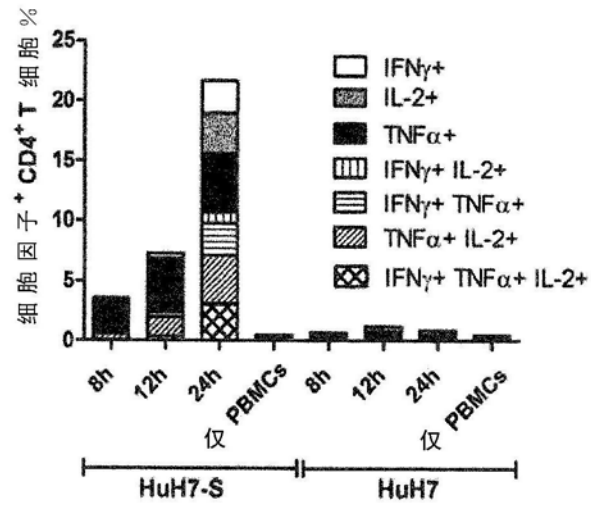


图12C

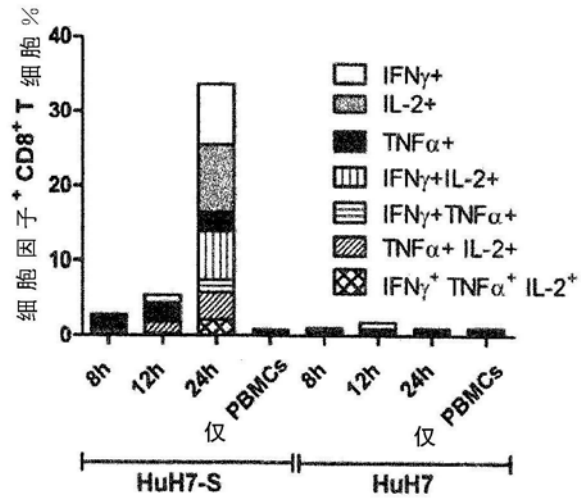


图12D

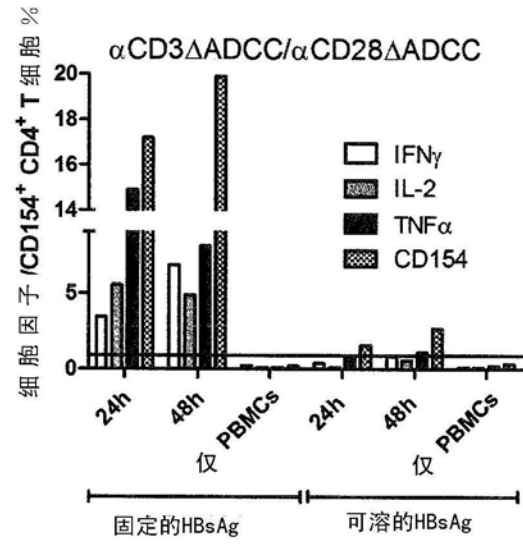


图13A

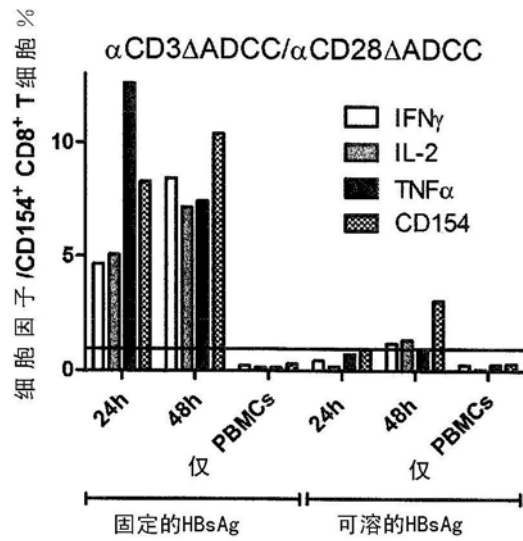


图13B

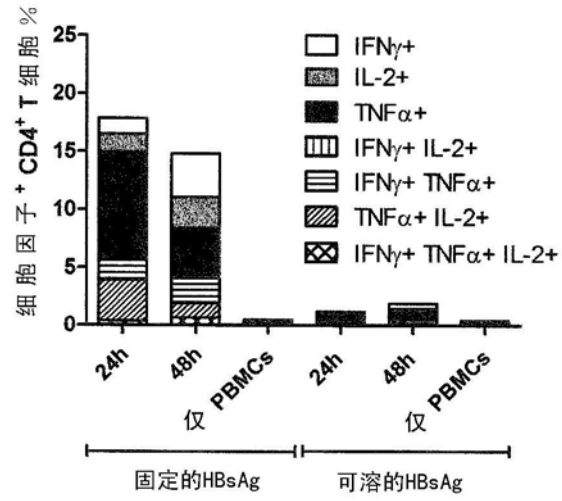


图13C

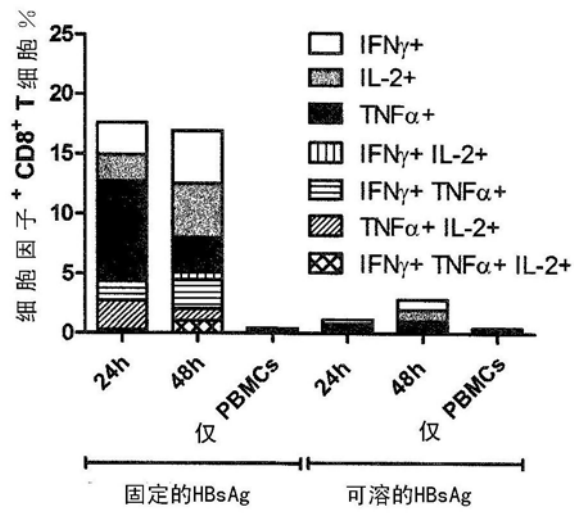


图13D

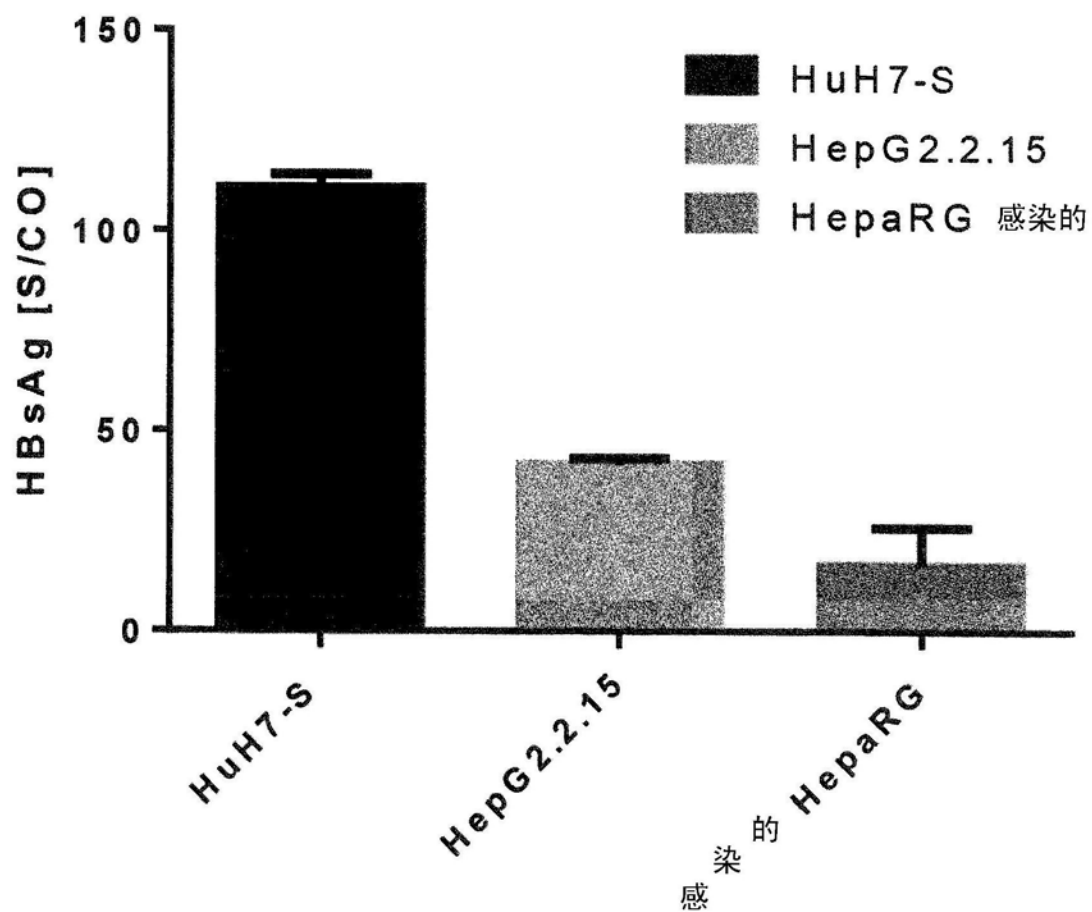


图14

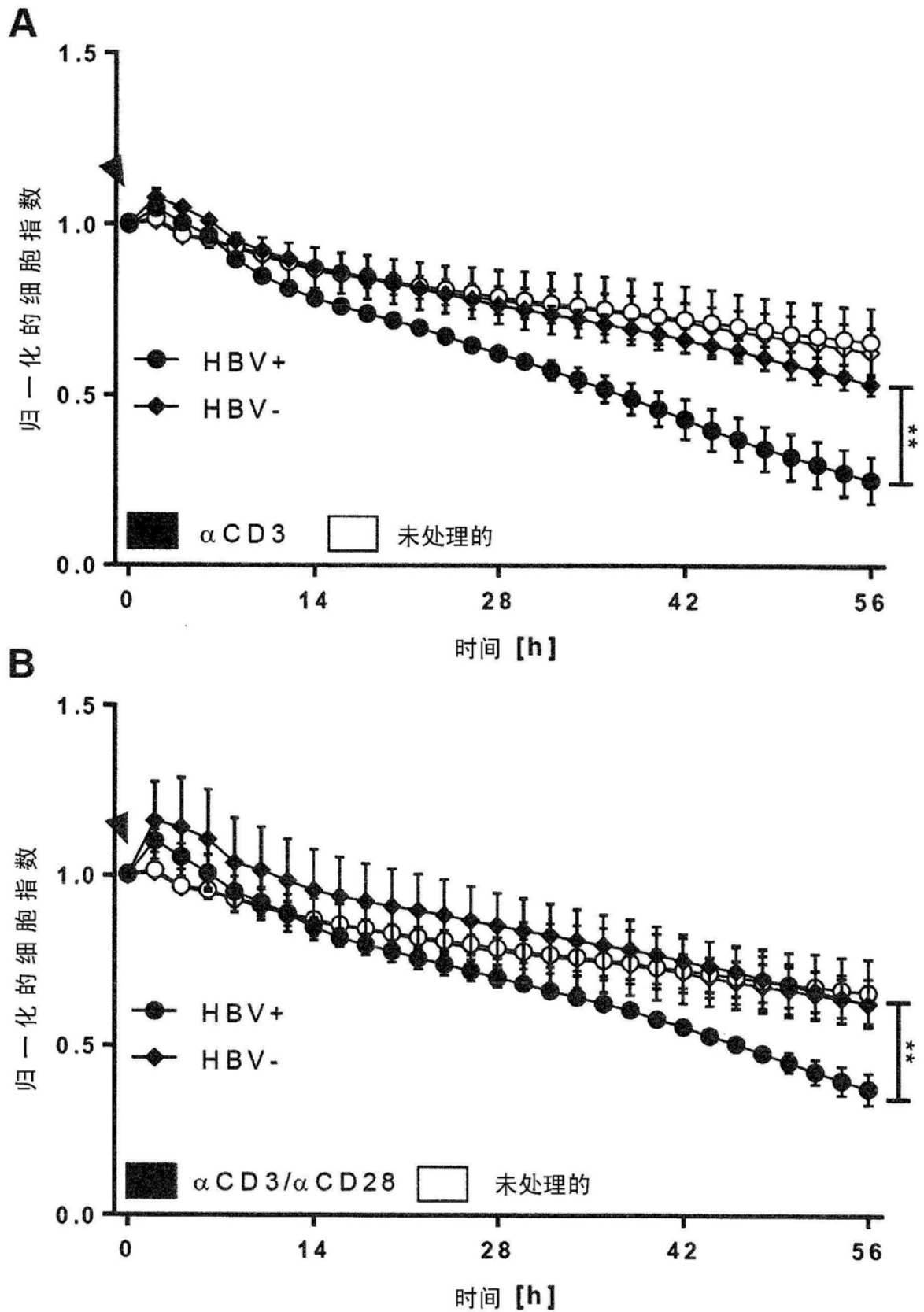


图15

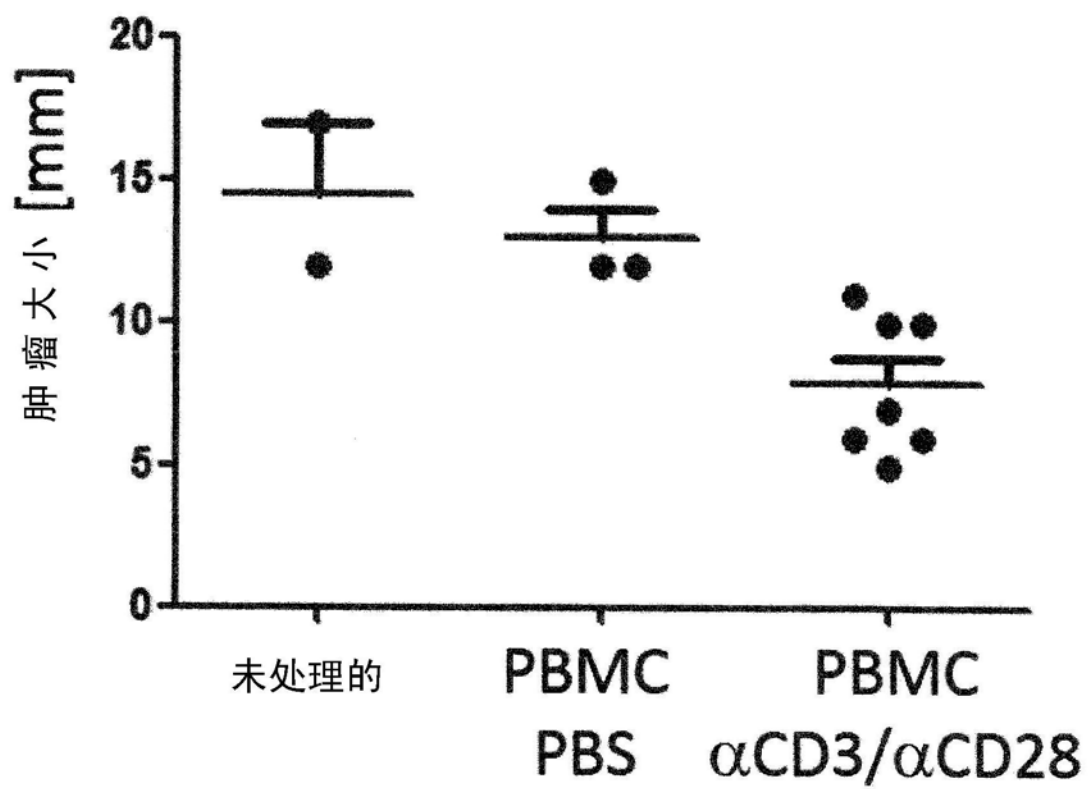


图16