



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116847864 A

(43) 申请公布日 2023. 10. 03

(21) 申请号 202280012134.8

(22) 申请日 2022.01.28

(30) 优先权数据

2101228.1 2021.01.29 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.07.27

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2022/052130 2022.01.28

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/162192 EN 2022.08.04

(71) 申请人 商瑟欧普公司

地址 挪威, 奥斯陆

(72) 发明人 K·维特维克

(74) 专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314

专利代理师 程伟

(51) Int.Cl.

A61K 38/00 (2006.01)

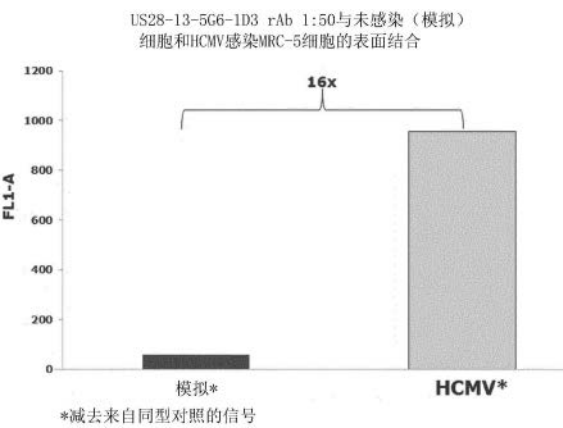
权利要求书19页 说明书176页
序列表90页 附图31页

(54) 发明名称

治疗剂和诊断剂以及其用途

(57) 摘要

本发明提供具有以下中的一种或多种(优选全部)的结合分子:与人巨细胞病毒(HCMV)的US28蛋白的高度特异性结合、与健康(未感染)细胞的极低水平的非特异性结合和/或病毒株不可知的结合能力;以及编码所述结合分子的核酸分子。所述结合分子经设计以结合至人巨细胞病毒(HCMV)的US28蛋白的胞外结构域3(ECD3),即由US28展现的四个胞外结构域中的第三个,对应于如SEQ ID NO:5所定义的US28蛋白序列的位置167至183。已证实本发明的结合分子具有优异的结合特性,包括对侵袭性和/或转移性HCMV感染的癌症(包括乳腺癌)的特定结合特异性。在某些优选的实施方案中,所述结合分子选自抗体(包括例如BiTE抗体)和嵌合抗原受体(CAR)或其功能变体、片段、融合蛋白和/或缀合物。还提供表达所述结合分子的细胞,如CAR表达细胞,包括CAR-T细胞、CAR-NK细胞和CAR-M细胞。



1. 一种结合分子,其包含一条或多条多肽链,所述结合分子对人巨细胞病毒(HCMV)的US28蛋白的胞外结构域3(ECD3)内的表位具有结合特异性,

其中所述US28蛋白的ECD3包含存在于所述US28蛋白中的氨基酸序列,其位置对应于由如SEQ ID NO:5中所阐述的人巨细胞病毒(HCMV)编码的所述US28蛋白的位置167至183。

2. 根据权利要求1所述的结合分子,其中所述结合分子选自抗体和嵌合抗原受体(CAR)。

3. 根据权利要求1或2所述的结合分子,其中所述结合分子对完全存在于HCMV的所述US28蛋白的胞外结构域3(ECD3)内的表位具有结合特异性。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子对所述US28蛋白的ECD3内的线性表位具有结合特异性。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的结合分子,其对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有HCMV病毒株不可知的结合特异性,

例如,其中所述结合分子:(a)对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有结合特异性,所述结合特异性对两种或更多种(如全部)HCMV病毒株为不可知的;(b)对4D变异株和4N变异株具有不可知的结合特异性;和/或(c)对两种或更多种(如全部)选自以下的HCMV病毒株具有不可知的结合特异性:DB、Towne、AF1、VHL/E、AD169、BL、DAVIS、JP、Merlin、PH、TB40/E、Toledo、TR和VR1814(FIX)。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子对HCMV的所述US28蛋白的ECD3内的表位具有结合特异性,无论所述US28蛋白的所述ECD3是否包含4D变体或4N变体的序列:

-其中所述4D变体包含如在US28的ECD3中发现的由如以下的第一组HCMV病毒株编码的序列TKKDNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:7):Towne、VR1814、TB40/E、Merlin、JP、Ad169、AF1、VHL/E、BL和DAVIS;并且

-其中所述4N变体包含如在US28的ECD3中发现的由如以下的第二组HCMV病毒株编码的序列TKKNNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:6):Toledo、TR和DB病毒株。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的结合分子,其包含对应于以下抗体的互补决定区(CDR)序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR:

(a) 分别如SEQ ID NO:8、9、10、14、15和16所定义的1D3,和/或抗体1D3的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体;

(b) 分别如SEQ ID NO:112、113、114、117、83和118所定义的1C10,和/或抗体1C10的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体;

(c) 分别如SEQ ID NO:112、113、114、117、83和118所定义的1A10,和/或抗体1A10的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体;

(d) 分别如SEQ ID NO:76、77、78、82、83和84所定义的1G9,和/或抗体1G9的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体;和/或

(e) 分别如SEQ ID NO:76、95、96、82、99和100所定义的1E8,和/或抗体1E8的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体;

并且

任选其中所述结合分子选自抗体和CAR。

8. 根据权利要求7所述的结合分子,其包含:

(a) 以下抗体的可变重链(V_H)的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个:

(i) 1D3,分别如SEQ ID NO:8、9和10所定义;

(ii) 1C10,分别如SEQ ID NO:112、113和114所定义;

(iii) 1A10,分别如SEQ ID NO:112、113和114所定义;

(iv) 1G9,分别如SEQ ID NO:76、77和78所定义;和/或

(v) 1E8,分别如SEQ ID NO:76、95和96所定义;

和/或

(b) 以下抗体的可变轻链(V_L)的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个:

(i) 1D3,分别如SEQ ID NO:14、15和16所定义;(ii) 1C10,分别如SEQ ID NO:117、83和118所定义;

(iii) 1A10,分别如SEQ ID NO:117、83和118所定义;

(iv) 1G9,分别如SEQ ID NO:82、83和84所定义;和/或

(v) 1E8,分别如SEQ ID NO:82、99和100所定义。

9. 根据权利要求7或8所述的结合分子,其包含:

(a) 至少一个可变重链(V_H)多肽,其包含具有以下序列的CDR 1、2和3序列:

(i) 分别SEQ ID NO:8、9和10,和

任选其中所述至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:12的序列、基本上由其组成或由其组成;

(ii) 分别SEQ ID NO:112、113和114,和

任选其中所述至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:104的序列、基本上由其组成或由其组成;

(iii) 分别SEQ ID NO:112、113和114,和

任选其中所述至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:122的序列、基本上由其组成或由其组成;

(iv) 分别SEQ ID NO:76、77和78,和

任选其中所述至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:68的序列、基本上由其组成或由其组成;和/或

(v) 分别SEQ ID NO:76、95和96,和

任选其中所述至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:88的序列、基本上由其组成或由其组成;

和/或

(b) 至少一个可变轻链(V_L)多肽,其包含具有以下序列的CDR 1、2和3序列:

(i) 分别SEQ ID NO:14、15和16,和

任选其中所述可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:18的序列、基本上由其组成或由其组成;

(ii) 分别SEQ ID NO:117、83和118,和

任选其中所述可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:108的序列、基本上由其组成或由其组

成；

(iii) 分别SEQ ID NO:117、83和118,和

任选其中所述可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:126的序列、基本上由其组成或由其组成；

(iv) 分别SEQ ID NO:82、83和84,和

任选其中所述可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:72的序列、基本上由其组成或由其组成；和/或

(v) 分别SEQ ID NO:82、99和100,和

任选其中所述可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:92的序列、基本上由其组成或由其组成。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子选自：

(a) 二价抗体,如IgG-scFv抗体(例如,其中第一结合结构域为完整IgG,且第二结合结构域为scFv,所述scFv在所述IgG的轻链的N-末端和/或在轻链的C-末端和/或在重链的N-末端和/或在重链的C-末端处附接至所述第一结合结构域,或反之亦然)；

(b) 单价抗体,如DuoBody[®]或“臼包杵(knob-in-hole)”双特异性抗体(例如scFv-KIH、scFv-KIH^r、BiTE-KIH或BiTE-KIH^r)；

(c) scFv₂-Fc抗体；

(d) 双特异性抗体,如双特异性T细胞接合子(BiTE)抗体；

(e) 双重可变结构域(DVD)-Ig抗体；

(f) 基于双亲和力再靶向(DART)的抗体(例如,DART₂-Fc或DART)；

(g) 三特异性抗体,如DNL-Fab₃抗体；

(h) scFv-HSA-scFv抗体；

(i) 单域抗体；

(j) 仅重链IgG(hcIgG),如骆驼IgG(例如VHH抗体)和鲨鱼免疫球蛋白新抗原受体(IgNAR),及其单链抗体；和

(k) 包含根据权利要求1或其任何从属权利要求所述的胞外结构域,例如包含本权利要求的选项(a)至(h)中任一个的胞外结构域或其组合的嵌合抗原受体(CAR)。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的结合分子,其中所述结合分子为：

(i) 双特异性免疫细胞接合子抗体,例如双特异性T细胞接合子(BiTE),且任选其中所述BiTE抗体包含CD3结合结构域；或

(ii) 单克隆抗体,任选重组单克隆抗体,例如由CHO细胞重组产生的单克隆抗体。

12. 一种根据前述权利要求中任一项所述的结合分子的功能片段,其中所述功能片段：

(a) 包含根据前述权利要求中任一项所述的结合分子的抗原结合片段或其变体、融合体或衍生物或由其组成,所述抗原结合片段或其变体、融合体或衍生物选自:Fv片段(如单链Fv片段(scFv)或二硫键结合Fv片段)、Fab样片段(如Fab片段、Fab'片段或F(ab)₂片段)和单域抗体(dAb,包括单一形式和双重形式,如dAb-接头-dAb和纳米抗体)；

(b) 提供根据权利要求1至6中任一项所述的结合特征；

(c) 包含根据权利要求7至9中任一项所述的CDR序列；和/或

(d) 包含根据权利要求9所述的 V_H 和/或 V_L 序列。

13. 根据权利要求1至11中任一项所述的结合分子或根据权利要求12所述的所述结合分子的功能片段, 其中所述结合分子或其功能片段包含融合多肽序列,

所述融合多肽序列包含融合有第二氨基酸序列的第一氨基酸序列, 其中

所述第一氨基酸序列包含以下或由以下组成: 所述结合分子或其功能片段的多肽链中的至少一条, 并且

所述第二氨基酸序列为融合伴侣。

14. 一种嵌合抗原受体 (CAR), 其包含:

(i) 胞外结构域, 其中所述胞外结构域包含以下或由以下组成: 根据权利要求1至11或13中任一项所述的结合分子或根据权利要求12或13所述的所述结合分子的功能片段;

(ii) 跨膜结构域; 和

(iii) 胞内结构域;

其中所述CAR的所述胞外结构域对人巨细胞病毒 (HCMV) 的US28蛋白的胞外结构域3 (ECD3) 内的表位具有结合特异性, 并且

其中所述US28蛋白的ECD3包含存在于所述US28蛋白中的氨基酸序列, 其位置对应于由如SEQ ID NO:5中所阐述的人巨细胞病毒 (HCMV) 编码的所述US28蛋白的位置167至183。

15. 根据权利要求14所述的CAR, 其中:

(a) 所述CAR的所述胞外结构域对完全存在于HCMV的所述US28蛋白的胞外结构域3 (ECD3) 内的表位具有结合特异性;

(b) 所述CAR的所述胞外结构域对所述US28蛋白的ECD3内的线性表位具有结合特异性;

(c) 所述CAR的所述胞外结构域对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有HCMV病毒株不可知的结合特异性, 例如对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有结合特异性, 所述结合特异性对选自以下的HCMV病毒株中的两种或更多种 (如全部) 为不可知的: DB、Towne、AD169、BL、DAVIS、JP、Merlin、PH、TB40/E、Toledo、TR、VHL/E和VR1814 (FIX); 和/或

(d) 所述CAR的所述胞外结构域对HCMV的所述US28蛋白的ECD3内的表位具有特异性, 无论所述US28蛋白的所述ECD3是否包含以下序列:

如在大部分HCMV病毒株编码的US28的ECD3中发现的TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7), 或

如在少数HCMV病毒株编码的US28的ECD3中发现的TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)。

16. 根据权利要求14或15所述的CAR, 其中:

(a) 所述CAR的所述胞外结构域包含对应于以下抗体的互补决定区 (CDR) 序列中的任一个、两个、三个、四个、五个或全部六个的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR:

(i) 分别如SEQ ID NO:8、9、10、14、15和16所定义的1D3, 和/或抗体1D3的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体;

(ii) 分别如SEQ ID NO:112、113、114、117、83和118所定义的1C10, 和/或抗体1C10的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体;

(iii) 分别如SEQ ID NO:112、113、114、117、83和118所定义的1A10, 和/或抗体1A10的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体;

(iv) 分别如SEQ ID NO:76、77、78、82、83和84所定义的1G9, 和/或抗体1G9的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体; 和/或

(v) 分别如SEQ ID NO:76、95、96、82、99和100所定义的1E8,和/或抗体1E8的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体;

(b) 所述CAR的所述胞外结构域包含:

以下抗体的可变重链(V_H)的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个:

(i) 1D3,分别如SEQ ID NO:8、9和10所定义;

(ii) 1C10,分别如SEQ ID NO:112、113和114所定义;

(iii) 1A10,分别如SEQ ID NO:112、113和114所定义;

(iv) 1G9,分别如SEQ ID NO:76、77和78所定义;和/或

(v) 1E8,分别如SEQ ID NO:76、95和96所定义;和/或

以下抗体的可变轻链(V_L)的CDR 1、2和3的序列中的一个、两个或全部三个:

(vii) 1D3,分别如SEQ ID NO:14、15和16所定义;

(viii) 1C10,分别如SEQ ID NO:117、83和118所定义;

(ix) 1A10,分别如SEQ ID NO:117、83和118所定义;

(x) 1G9,分别如SEQ ID NO:82、83和84所定义;和/或

(xi) 1E8,分别如SEQ ID NO:82、99和100所定义;和/或

(c) 所述CAR的所述胞外结构域包含:

至少一个可变重链(V_H)多肽序列,其包含具有以下序列的CDR 1、2和3序列:

(i) 分别SEQ ID NO:8、9和10,且任选其中所述至少一个可变重链(V_H)多肽序列包含SEQ ID NO:12的序列、基本上由其组成或由其组成;

(ii) 分别SEQ ID NO:112、113和114,和

任选其中所述至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:104的序列、基本上由其组成或由其组成;

(iii) 分别SEQ ID NO:112、113和114,和

任选其中所述至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:122的序列、基本上由其组成或由其组成;

(iv) 分别SEQ ID NO:76、77和78,和

任选其中所述至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:68的序列、基本上由其组成或由其组成;和/或

(v) 分别SEQ ID NO:76、95和96,和

任选其中所述至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:88的序列、基本上由其组成或由其组成;和/或

至少一个可变轻链(V_L)多肽序列,其包含具有以下序列的CDR 1、2和3序列:

(vii) 分别SEQ ID NO:14、15和16,且任选其中所述可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:18的序列、基本上由其组成或由其组成;

(viii) 分别SEQ ID NO:117、83和118,和

任选其中所述可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:108的序列、基本上由其组成或由其组成;

(ix) 分别SEQ ID NO:117、83和118,和

任选其中所述可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:126的序列、基本上由其组成或由其组

成;

(x) 分别SEQ ID NO:82、83和84,和

任选其中所述可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:72的序列、基本上由其组成或由其组成;和/或

(xi) 分别SEQ ID NO:82、99和100,和

任选其中所述可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:92的序列、基本上由其组成或由其组成。

17. 根据权利要求14至16中任一项所述的CAR,其中所述胞外结构域为抗体,例如单链可变片段(scFv)。

18. 根据权利要求14至17中任一项所述的CAR,其中所述跨膜结构域包含蛋白质的跨膜结构域,例如跨膜受体蛋白的跨膜结构域,和

任选其中所述跨膜结构域包含选自以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD8、CD45和CD4。

19. 根据权利要求14至18中任一项所述的CAR,其中所述胞外结构域通过铰链区连接至所述跨膜结构域。

20. 根据权利要求14至19中任一项所述的CAR,其中所述胞内结构域包含胞内信号传导结构域,例如其中:

(a) 所述胞内信号传导结构域包含一个或多个基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM);和/或

(b) 所述胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 、Fc受体 γ 、Fc受体 β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的信号传导结构域。

21. 根据权利要求20所述的CAR,其中所述胞内结构域包含一个或多个共刺激结构域,例如:

(a) 其中所述一个或多个共刺激结构域包括一个或多个自选自CD28、41BB、OX40、ICOS、CD27和DAP10的蛋白质获得的功能性信号传导结构域;

(b) 其中所述胞内结构域掺入接近所述胞内信号传导结构域的共刺激结构域,

(c) 其中所述胞内结构域包含两个或更多个共刺激结构域,例如两个串联共刺激结构域,和/或

(d) 其中所述胞内结构域掺入单独的细胞因子信号。

22. 根据权利要求14至21中任一项所述的CAR,其中所述CAR进一步包含前导序列。

23. 一种核酸分子或多个不同核酸分子的组合,

其中所述核酸分子包含、或所述多个不同核酸分子的组合共同包含一个或多个核酸序列,所述一个或多个核酸序列单独地或以组合形式编码根据权利要求1至13中任一项所述的结合分子或根据权利要求14至22中任一项所述的CAR。

24. 一种载体,其包含根据权利要求23所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合。

25. 根据权利要求24所述的载体,其中所述载体选自逆转录病毒载体、质体、慢病毒载体和腺病毒载体。

26. 一种细胞,其包含根据权利要求23所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合或根据权利要求24或25所述的载体,

任选其中所述细胞表达根据权利要求1至13中任一项所述的一个或多个结合分子和/或根据权利要求14至22中任一项所述的一个或多个CAR,所述一个或多个结合分子和/或CAR由根据权利要求23所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合或根据权利要求24或25所述的载体编码。

27. 根据权利要求26所述的细胞,其中所述细胞包含:

(a) 根据权利要求23所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,其中所述经编码结合分子为根据权利要求1至11中任一项所述的抗体、根据权利要求12所述的所述抗体的功能片段,或具有包含根据权利要求13所述的融合多肽序列的所述结合分子的功能片段的抗体;和/或

(b) 根据权利要求25或26所述的载体,其中所述载体包含如由本权利要求的部分(a)所定义的核酸分子或多个不同核酸分子的组合。

28. 根据权利要求26所述的细胞,其中所述细胞包含:

(a) 根据权利要求23所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,其中所述经编码结合分子为根据权利要求14至22中任一项所述的CAR;和/或

(b) 根据权利要求25或26所述的载体,其中所述载体包含如由本权利要求的部分(a)所定义的核酸分子或多个不同核酸分子的组合。

29. 一种细胞,其包含根据权利要求1至13中任一项所述的结合分子和/或编码所述结合分子的核酸,任选其中所述核酸为根据权利要求23至25中任一项所述的核酸或载体。

30. 根据权利要求29所述的细胞,其中

所述结合分子为根据权利要求1至11中任一项所述的抗体、根据权利要求12所述的所述抗体的功能片段,或具有包含根据权利要求13所述的融合多肽序列的所述结合分子的功能片段的抗体,并且

任选其中所述抗体为单克隆抗体,且进一步例如其中所述细胞为重组表达所述单克隆抗体的CHO细胞。

31. 一种细胞,其包含根据权利要求14至22中任一项所述的CAR和/或编码所述CAR的核酸,任选其中所述核酸为根据权利要求23至25中任一项所述的核酸或载体。

32. 一种根据权利要求26、28、29或31所述的细胞或根据权利要求32所述的方法,其中所述细胞为T细胞、自然杀伤(NK)细胞或巨噬细胞。

33. 根据权利要求31或32所述的细胞,其中所述细胞为CAR-T细胞、CAR-NK细胞或CAR巨噬细胞,并且

任选地,当所述细胞为CAR-T细胞时,则所述T细胞选自:CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、效应T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、EBV特异性T细胞受体(TCR)或 $\gamma\delta$ -T细胞亚型。

34. 一种产生细胞的方法,所述方法包括将根据权利要求23所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合和/或根据权利要求24或25所述的载体引入至细胞中。

35. 一种产生根据权利要求1至13中任一项所述的结合分子或根据权利要求14至22中任一项所述的CAR的方法,所述方法包括:

在细胞中表达根据权利要求23所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合和/或根据权利要求24或25所述的载体。

36. 根据权利要求35所述的方法,其包括将如此产生的结合分子与所述细胞分离的步骤;并且

任选地,其中所述结合分子为根据权利要求1至11中任一项所述的抗体、根据权利要求12所述的所述抗体的功能片段,或具有包含根据权利要求13所述的融合多肽序列的所述结合分子的功能片段的抗体。

37. 一种经分离的结合分子,其通过根据权利要求36所述的方法获得或可通过其获得,任选地,其中经分离的结合分子经进一步配制以向受试者施用。

38. 一种缀合物,所述缀合物包含与根据权利要求1至11或13中任一项所述的结合分子或与根据权利要求12或13所述的所述结合分子的功能片段缀合的部分。

39. 根据权利要求38所述的缀合物,其中所述部分为治疗性、预防性、诊断性、预后性或治疗诊断性部分。

40. 根据权利要求38或39所述的缀合物,其中所述部分为药物(例如,其中所述缀合物为抗体-药物缀合物(“ADC”))和/或放射性部分(例如,其中所述缀合物适用于放射免疫疗法(“RIT”))。

41. 一种产生根据权利要求38至40中任一项所述的缀合物的方法,所述方法包括以下步骤:

(a) 提供根据权利要求1至11或13中任一项所述的结合分子或根据权利要求12或13所述的所述结合分子的功能片段;和

(b) 使部分与根据权利要求1至11或13中任一项所述的结合分子缀合,或与根据权利要求12或13所述的所述结合分子的功能片段缀合。

42. 根据权利要求41所述的方法,其包含分离如此产生的缀合物的步骤。

43. 根据权利要求38至40中任一项所述的缀合物或根据权利要求41或42所述的方法,其中所述结合分子为根据权利要求1至11中任一项所述的抗体、根据权利要求12所述的所述抗体的功能片段,或具有包含根据权利要求13所述的融合多肽序列的所述结合分子的功能片段的抗体。

44. 一种经分离的缀合物,其通过根据权利要求42或43所述的方法获得或可通过其获得,

任选地,其中所述经分离的缀合物经进一步配制以向受试者施用。

45. 一种对抗HCMV或与HCMV相关的疾病或病症的方法,所述方法包括向受试者或向离体细胞物质或体外细胞物质施用选自以下的任何一种或多种试剂:

- i. 根据权利要求1至11或13中任一项所述的结合分子,
- ii. 根据权利要求12或13所述的所述结合分子的功能片段,
- iii. 根据权利要求37所述的经分离的结合分子,
- iv. 根据权利要求23所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,
- v. 根据权利要求24或25所述的载体,
- vi. 根据权利要求26至33中任一项所述的细胞,
- vii. 根据权利要求38至40中任一项所述的缀合物,和
- viii. 根据权利要求44所述的经分离的缀合物。

46. 一种或多种供使用的试剂,其用于对抗受试者或离体细胞物质或体外细胞物质的

与HCMV相关的疾病或病症,其中所述一种或多种试剂选自或各自单独地选自:

- i. 根据权利要求1至11或13中任一项所述的结合分子,
- ii. 根据权利要求12或13所述的所述结合分子的功能片段,
- iii. 根据权利要求37所述的经分离的结合分子,
- iv. 根据权利要求23所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,
- v. 根据权利要求24或25所述的载体,
- vi. 根据权利要求26至33中任一项所述的细胞,
- vii. 根据权利要求38至40中任一项所述的缀合物,和
- viii. 根据权利要求44所述的经分离的缀合物。

47. 一种或多种试剂的用途,其用于制造用于对抗受试者或离体细胞物质或体外细胞物质的与HCMV相关的疾病或病症的药物,其中所述一种或多种试剂选自或各自单独地选自:

- i. 根据权利要求1至11或13中任一项所述的结合分子,
- ii. 根据权利要求12或13所述的所述结合分子的功能片段,
- iii. 根据权利要求37所述的经分离的结合分子,
- iv. 根据权利要求23所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,
- v. 根据权利要求24或25所述的载体,
- vi. 根据权利要求26至33中任一项所述的细胞,
- vii. 根据权利要求38至40中任一项所述的缀合物,和
- viii. 根据权利要求44所述的经分离的缀合物。

48. 根据权利要求45所述的方法、根据权利要求46所述的一种或多种供使用的试剂或根据权利要求47所述的用途,其中:

i. 所述疾病或病症为HCMV感染或与HCMV感染相关,且任选所述HCMV感染包含多株HCMV感染,其中所述多株HCMV感染包含感染多于一种不同HCMV病毒株,例如一种或多种编码US28的ECD3的所述4N变体的HCMV病毒株和一种或多种编码US28的ECD3的所述4D变体的HCMV病毒株;

ii. 所述疾病或病症为潜伏HCMV感染(任选为多株潜伏HCMV感染)或与潜伏HCMV感染(任选为多株潜伏HCMV感染)相关;

iii. 所述疾病或病症为裂解HCMV感染(任选为多株裂解HCMV感染)或与裂解HCMV感染(任选为多株裂解HCMV感染)相关;

iv. 所述疾病或病症为先天性单株或多株HCMV感染,如潜伏先天性单株或多株HCMV感染或裂解先天性单株或多株HCMV感染;

v. 所述疾病或病症为癌症;

vi. 所述疾病或病症为HCMV感染癌症(任选为多株HCMV感染癌症),如潜伏HCMV感染癌症(任选为多株潜伏HCMV感染癌症);

vii. 所述疾病或病症为上皮癌;任选其中所述上皮癌为乳腺癌;例如其中所述乳腺癌为三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2阳性乳腺癌(如三阳性乳腺癌“TPBC”);

viii. 所述疾病为转移和/或侵袭形式的癌症,如转移和/或侵袭形式的HCMV感染癌症(例如具有潜伏HCMV感染和/或多株HCMV感染的癌症);

ix. 所述疾病或病症不为胶质母细胞瘤；

x. 所述有需要的受试者已被诊断为具有HCMV感染癌细胞，如潜伏HCMV感染癌细胞或具有生产性HCMV感染的癌细胞（包括但不限于具有生产性HCMV感染的肿瘤相关巨噬细胞）；和/或

xi. 所述有需要的受试者为或旨在为器官捐献受体或器官供体。

49. 根据权利要求45或48所述的方法、根据权利要求46或48所述的一种或多种供使用的试剂或根据权利要求47或48所述的用途，

其中所述试剂选自：

i. 根据权利要求1至11中任一项所述的治疗性抗体，

ii. 根据权利要求12所述的所述治疗性抗体的功能片段，

iii. 包含根据权利要求13所述的融合多肽序列的治疗性抗体；和

iv. 包含根据权利要求13所述的融合多肽序列的所述治疗性抗体的功能片段。

50. 根据权利要求45或48所述的方法、根据权利要求46或48所述的一种或多种供使用的试剂或根据权利要求47或48所述的用途，

其中所述试剂为双特异性抗体，例如双特异性免疫细胞接合子抗体，如双特异性T细胞接合子（BiTE）抗体，任选其中所述BiTE抗体包含CD3结合结构域。

51. 根据权利要求45或48所述的方法、根据权利要求46或48所述的一种或多种供使用的试剂或根据权利要求47或48所述的用途，

其中所述试剂为根据权利要求38至40中任一项所述的缀合物，如作为抗体-药物缀合物（“ADC”）的缀合物，或包含放射性部分的缀合物，如适用于放射免疫疗法（“RIT”）的缀合物。

52. 根据权利要求45或48所述的方法、根据权利要求46或48所述的一种或多种供使用的试剂或根据权利要求47或48所述的用途，

其中所述试剂为根据权利要求31至33中任一项所述的包含CAR的细胞，例如CAR-T细胞、CAR-NK细胞或CAR巨噬细胞。

53. 根据权利要求45或权利要求48至52中任一项所述的方法、根据权利要求46或权利要求48至52中任一项所述的一种或多种供使用的试剂或根据权利要求47至52中任一项所述的用途，

其中所述受试者为被施用另一物质的受试者，如另一治疗性、预防性、诊断性、预后性或治疗诊断性物质，并且

任选其中所述另一物质与所述一种或多种试剂或其中的每一种分别、依次或同时施用。

54. 一种用于医药的试剂，其中所述试剂选自：

i. 根据权利要求1至11或13中任一项所述的结合分子，

ii. 根据权利要求12或13所述的所述结合分子的功能片段，

iii. 根据权利要求37所述的经分离的结合分子，

iv. 根据权利要求23所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合，

v. 根据权利要求24或25所述的载体，

vi. 根据权利要求26至33中任一项所述的细胞，

vii. 根据权利要求38至40中任一项所述的缀合物, 和

viii. 根据权利要求44所述的经分离的缀合物。

55. 一种疫苗组合物, 其适用于针对与人巨细胞病毒 (HCMV) 相关的疾病或病症进行疫苗接种、降低所述疾病或病症的风险、预防所述疾病或病症或对抗所述疾病或病症,

其中所述疫苗为主动或被动疫苗,

其中所述疫苗触发和/或提供针对存在于HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位的免疫反应, 并且

其中所述US28蛋白的ECD3包含存在于所述US28蛋白中的氨基酸序列, 其位置对应于由如SEQ ID NO:5中所阐述的HCMV编码的所述US28蛋白的位置167至183。

56. 根据权利要求55所述的疫苗组合物, 其中所述疫苗触发和/或提供针对以下的免疫反应:

(a) 完全存在于HCMV的所述US28蛋白的胞外结构域3 (ECD3) 内的一个或多个表位;

(b) 所述US28蛋白的ECD3内的一个或多个线性表位;

(c) HCMV的US28蛋白的ECD3内的一个或多个表位, 其为以相同形式存在于HCMV的4D变异株和4N变异株两者中的一个表位或多个表位, 其中HCMV的所述4D变异株编码包含具有TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) 的序列的ECD3的US28蛋白, 且其中HCMV的所述4N变异株编码包含具有TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6) 的序列的ECD3的US28蛋白; 和/或

(d) 其中由所述疫苗触发或提供的所述免疫反应对HCMV的所述4D变异株和所述4N变异株为HCMV病毒株不可知的, 且触发和/或提供针对选自Towne、VR1814、TB40/E、Merlin、JP、Ad169、VHL/E、AF1、BL和DAVIS的所述4D变异HCMV病毒株中的一种或多种且还针对选自Toledo、TR和DB的所述4N变异HCMV病毒株中的一种或多种的免疫反应。

57. 根据权利要求55或56所述的疫苗组合物, 其中:

(i) 所述疫苗为被动疫苗, 和/或任选包含:

(a) 根据权利要求1至11或13中任一项所述的一个或多个结合分子,

(b) 根据权利要求12或13所述的所述一个或多个结合分子的一个或多个功能片段,

(c) 根据权利要求37所述的一个或多个经分离的结合分子,

(d) 根据权利要求23所述的一个或多个核酸分子或多个不同核酸分子的组合,

(e) 根据权利要求24或25所述的一种或多种载体,

(f) 根据权利要求26至33中任一项所述的一个或多个细胞,

(g) 根据权利要求38至40中任一项所述的一种或多种缀合物, 和/或

(h) 根据权利要求44所述的一种或多种经分离的缀合物; 和/或

(ii) 所述疫苗为主动疫苗, 和/或任选包含:

(a) 根据权利要求84至88中任一项所述的一种或多种肽或多肽、根据权利要求89所述的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据权利要求90所述的融合蛋白、根据权利要求91所述的至少两种不同融合蛋白的组合、根据权利要求92至94中任一项所述的缀合物和/或根据权利要求95所述的至少两种不同缀合物的组合; 和/或

(b) 根据权利要求101或102所述的一个或多个核酸分子或多个不同核酸分子的组合或根据权利要求103或104所述的载体; 和/或

(c) 树突状细胞或其均质或异质群体, 其中所述树突状细胞或各树突状细胞负载有以

下中的一种或多种：根据权利要求84至88中任一项所述的肽或多肽、根据权利要求89所述的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据权利要求90所述的融合蛋白，根据权利要求91所述的至少两种不同融合蛋白的组合、根据权利要求92至94中任一项所述的缀合物、根据权利要求95所述的至少两种不同缀合物的组合、根据权利要求101或102所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合和/或根据权利要求103或104所述的一种或多种载体。

58. 一种针对与HCMV相关的疾病或病症进行疫苗接种、降低所述疾病或病症的风险、预防所述疾病或病症和/或对抗所述疾病或病症的方法，所述方法包括向受试者施用根据权利要求55至57中任一项所述的疫苗，

任选其中所述疾病或病症为潜伏HCMV感染，或为与潜伏HCMV感染相关的疾病或病症。

59. 根据权利要求55至57中任一项所述的疫苗，其用于针对受试者的与HCMV相关的疾病或病症进行疫苗接种、降低所述疾病或病症的风险、预防所述疾病或病症和/或对抗所述疾病或病症，

任选其中所述疾病或病症为潜伏HCMV感染，或为与潜伏HCMV感染相关的疾病或病症。

60. 根据权利要求55至57中任一项所述的疫苗在制造药物中的用途，所述药物用于针对受试者的与HCMV相关的疾病或病症进行疫苗接种、降低所述疾病或病症的风险、预防所述疾病或病症和/或对抗所述疾病或病症，

任选其中所述疾病或病症为潜伏HCMV感染，或为与潜伏HCMV感染相关的疾病或病症。

61. 根据权利要求55至57中任一项所述的疫苗组合物、根据权利要求58所述的方法、根据权利要求59所述的供使用的疫苗组合物或根据权利要求60所述的用途，其中：

i. 所述疾病或病症为HCMV感染或与HCMV感染相关，且任选所述HCMV感染包含多株HCMV感染，其中所述多株HCMV感染包含感染有一种以上不同HCMV病毒株，例如一种或多种编码US28的ECD3的所述4N变体的HCMV病毒株和一种或多种编码US28的ECD3的所述4D变体的HCMV病毒株；

ii. 所述疾病或病症为潜伏HCMV感染（任选为多株潜伏HCMV感染）或与潜伏HCMV感染（任选为多株潜伏HCMV感染）相关；

iii. 所述疾病或病症为裂解HCMV感染（任选为多株裂解HCMV感染）或与裂解HCMV感染（任选为多株裂解HCMV感染）相关；

iv. 所述疾病或病症为先天性单株或多株HCMV感染，如潜伏先天性单株或多株HCMV感染或裂解先天性单株或多株HCMV感染；

v. 所述疾病或病症为癌症；

vi. 所述疾病或病症为HCMV感染癌症（任选为多株HCMV感染癌症），如潜伏HCMV感染癌症（任选为多株潜伏HCMV感染癌症）；

vii. 所述疾病或病症为上皮癌；任选其中所述上皮癌为乳腺癌；例如其中所述乳腺癌为三阴性乳腺癌（TNBC）或HER2阳性乳腺癌（如三阳性乳腺癌“TPBC”）；

viii. 所述疾病或病症为转移和/或侵袭形式的癌症，如转移和/或侵袭形式的HCMV感染癌症（例如具有潜伏HCMV感染和/或多株HCMV感染的癌症）；

ix. 所述疾病或病症不为胶质母细胞瘤；

x. 所述有需要的受试者已被诊断为具有HCMV感染癌细胞，如潜伏HCMV感染癌细胞或具有生产性HCMV感染的癌细胞（包括但不限于具有生产性HCMV感染的肿瘤相关巨噬细胞）；

和/或

xi. 所述有需要的受试者为或旨在为器官捐献受体或器官供体。

62. 一种评定受试者和/或离体生物材料的一种或多种生物条件和/或生物特征的方法, 其中所述方法包括:

(a) 使所述受试者和/或所述离体生物材料与根据权利要求1至13中任一项所述的结合分子或根据权利要求38至40、43或44中任一项所述的缀合物接触; 和

(b) 基于对所述结合分子或缀合物与所述受试者和/或所述离体生物材料的结合的直接和/或间接测量来评定所述受试者和/或所述离体生物材料。

63. 根据权利要求62所述的方法, 其中所述方法包括ELISA方法, 且任选对离体生物材料, 如一种或多种体液执行所述方法。

64. 根据权利要求62所述的方法, 其中所述方法包括流式细胞术方法, 且任选所述方法为用于评定来自受试者的离体血液样品和/或离体骨髓样品的方法。

65. 根据权利要求62所述的方法, 其中所述方法包括使用根据权利要求38至40、43或44中任一项所述的缀合物,

其中所述缀合物包含可检测部分, 如放射性部分, 且所述方法包括检测所述受试者和/或所述离体生物材料中的所述放射性部分,

例如, 其中所述方法为免疫正电子发射 (PET) 成像方法。

66. 根据权利要求62所述的方法, 其中所述方法为对离体生物材料的样品执行的免疫组织化学方法。

67. 根据权利要求62至66中任一项所述的方法, 其中出于对受试者的与HCMV相关的疾病或病症进行诊断或预后评定的目的, 对所述受试者或对自所述受试者获得的离体生物材料执行所述方法。

68. 根据权利要求67所述的方法, 其中:

i. 所述疾病或病症为HCMV感染或与HCMV感染相关, 且任选所述HCMV感染包含多株HCMV感染, 其中所述多株HCMV感染包含感染有一种以上不同HCMV病毒株, 例如一种或多种编码US28的ECD3的所述4N变体的HCMV病毒株和一种或多种编码US28的ECD3的所述4D变体的HCMV病毒株;

ii. 所述疾病或病症为潜伏HCMV感染 (任选为多株潜伏HCMV感染) 或与潜伏HCMV感染 (任选为多株潜伏HCMV感染) 相关;

iii. 所述疾病或病症为裂解HCMV感染 (任选为多株裂解HCMV感染) 或与裂解HCMV感染 (任选为多株裂解HCMV感染) 相关;

iv. 所述疾病或病症为先天性单株或多株HCMV感染, 如潜伏先天性单株或多株HCMV感染或裂解先天性单株或多株HCMV感染;

v. 所述疾病或病症为癌症;

vi. 所述疾病或病症为HCMV感染癌症 (任选为多株HCMV感染癌症), 如潜伏HCMV感染癌症 (任选为多株潜伏HCMV感染癌症);

vii. 所述疾病或病症为上皮癌; 任选其中所述上皮癌为乳腺癌; 例如其中所述乳腺癌为三阴性乳腺癌 (TNBC) 或HER2阳性乳腺癌 (如三阳性乳腺癌“TPBC”);

viii. 所述疾病或病症为转移和/或侵袭形式的癌症, 如转移和/或侵袭形式的HCMV感

染癌症(例如具有潜伏HCMV感染和/或多株HCMV感染的癌症);

ix.所述疾病或病症不为胶质母细胞瘤;和/或

x.所述有需要的受试者已被诊断为具有HCMV感染癌细胞,如潜伏HCMV感染癌细胞或具有生产性HCMV感染的癌细胞(包括但不限于具有生产性HCMV感染的肿瘤相关巨噬细胞)和/或多株HCMV感染癌细胞;

xi.所述受试者为或旨在为器官捐献受体或器官供体。

69.一种对抗活的离体生物材料的HCMV感染(如潜伏HCMV感染和/或裂解HCMV感染和/或多株HCMV感染)的方法,所述方法包括使所述活的离体生物材料与选自以下组成的群组的任一种或多种试剂接触:

i.根据权利要求1至11或13中任一项所述的结合分子,

ii.根据权利要求12或13所述的所述结合分子的功能片段,

iii.根据权利要求37所述的经分离的结合分子,

iv.根据权利要求23所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,

v.根据权利要求24或25所述的载体,

vi.根据权利要求26至33中任一项所述的细胞,

vii.根据权利要求38至40中任一项所述的缀合物,和

viii.根据权利要求44所述的经分离的缀合物。

70.一种活的离体生物材料,其通过根据权利要求69所述的方法获得或可通过其获得。

71.根据权利要求69所述的方法或根据权利要求70所述的活的离体生物材料,其中所述离体活生物材料包含选自包括以下的活的离体生物材料、基本上由其组成或由其组成:一种或多种类型的离体细胞;一种或多种类型的离体细胞培养物;一种或多种类型的离体组织;一种或多种类型的离体组织培养物;一种或多种类型的离体类器官;一种或多种类型的离体类器官培养物;一种或多种类型的离体器官;和/或一种或多种类型的离体器官培养物。

72.一种治疗有需要的受试者的方法,其包括向所述受试者施用根据权利要求60或61所述的离体活生物材料。

73.根据权利要求72所述的方法,其中所述方法为移植所述离体活生物材料的方法,如器官移植或组织移植。

74.一种筛选结合分子的方法,所述结合分子对人巨细胞病毒(HCMV)的US28蛋白的胞外结构域3(ECD3)内的表位具有结合特异性,

其中所述US28蛋白的ECD3包含存在于所述US28蛋白中的氨基酸序列,其位置对应于由如SEQ ID NO:5中所阐述的HCMV编码的所述US28蛋白的位置167至183,

所述方法包括:

(a)提供一种或多种与所述US28蛋白的ECD3中存在的氨基酸序列对应的肽,任选其中所述一种或多种肽为以以下的形式提供:根据权利要求84至88中任一项所述的一种或多种肽或多肽、根据权利要求89所述的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据权利要求90所述的一种或多种融合蛋白、根据权利要求91所述的至少两种不同融合蛋白的组合、根据权利要求92至94中任一项所述的缀合物或根据权利要求95所述的至少两种不同缀合物的组合;

(b)提供一种或多种候选结合分子;

(c) 测定一种或多种候选结合分子对所述一种或多种肽的结合特异性和/或结合亲和力。

75. 根据权利要求74所述的方法, 其中所述一种或多种肽或其中的每一者包含以下、基本上由以下组成或由以下组成: 多肽序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) 和/或TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6) 和/或任一者或两者的免疫原性片段;

任选其中所述一种或多种肽为以以下形式提供: 根据权利要求84至88中任一项所述的一种或多种肽或多肽、根据权利要求89所述的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据权利要求90所述的一种或多种融合蛋白、根据权利要求91所述的至少两种不同融合蛋白的组合、根据权利要求92至94中任一项所述的缀合物或根据权利要求95所述的至少两种不同缀合物的组合。

76. 根据权利要求74或75所述的方法, 其中所述一种或多种候选结合分子为抗体和/或CAR, 如以下中的任何一种或多种:

(a) 二价抗体, 如IgG-scFv抗体 (例如, 其中第一结合结构域为完整IgG, 且第二结合结构域为scFv, 所述scFv在IgG的轻链的N-末端和/或在轻链的C-末端和/或在重链的N-末端和/或在重链的C-末端处附接至所述第一结合结构域, 或反之亦然);

(b) 单价抗体, 如*DuoBody*[®]或”白包杵”双特异性抗体 (例如scFv-KIH、scFv-KIH^r、BiTE-KIH或BiTE-KIH^r);

(c) scFv₂-Fc抗体;

(d) 双特异性抗体, 如双特异性T细胞接合子 (BiTE) 抗体;

(e) 双重可变结构域 (DVD) -Ig抗体;

(f) 基于双亲和力再靶向 (DART) 的抗体 (例如, DART₂-Fc或DART);

(g) 三特异性抗体, 如DNL-Fab₃抗体;

(h) scFv-HSA-scFv抗体; 和

(i) 嵌合抗原受体 (CAR)。

77. 根据权利要求74至76中任一项所述的方法, 其进一步包括基于对所述一种或多种肽的结合特异性和/或结合亲和力选择候选结合分子的步骤。

78. 根据权利要求77所述的方法, 其中所选候选结合分子:

(a) 对完全存在于HCMV的所述US28蛋白的胞外结构域3 (ECD3) 内的表位具有结合特异性;

(b) 对所述US28蛋白的ECD3内的线性表位具有结合特异性;

(c) 对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有HCMV病毒株不可知的结合特异性, 例如对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有结合特异性, 所述结合特异性对选自以下的HCMV病毒株中的两者或更多者 (如全部) 为不可知的: DB、Towne、AD169、DAVIS、BL、JP、Merlin、PH、TB40/E、Toledo、VHL/E、TR和VR1814 (FIX); 和/或

(d) 对HCMV的所述US28蛋白的ECD3内的表位具有特异性, 无论所述US28蛋白的所述ECD3是否包含序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) 或TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)。

79. 根据权利要求77或78所述的方法, 其中所选候选结合分子对所述一种或多种肽具有的结合特异性和/或结合亲和力等同于如由抗体所展现的对相同一种或多种肽的结合特

异性和/或结合亲和力,所述抗体包含由SEQ ID NO:12的序列组成的可变重链(V_H)多肽和由SEQ ID NO:18的序列组成的可变轻链(V_L)多肽。

80.一种产生包含结合分子的多个复本的组合物的方法,所述方法包括使所选候选结合分子复制,所述候选结合分子已根据权利要求77、78或79中任一项所述的方法经选择。

81.一种评定所选候选结合分子的方法,所述候选结合分子已根据权利要求77、78或79中任一项所述的方法经选择,所述方法包括和鉴别所选候选结合分子内的一种或多种结构,所述一种或多种结构提供所述候选结合分子结合特征,

例如,鉴别作为抗体或CAR的所选候选结合分子中的所述CDR序列或各CDR序列。

82.一种产生包含结合分子的多个复本的组合物的方法,其中所述结合分子包含已根据权利要求81所述的方法在所选候选结合分子内经鉴别的一种或多种结构或其中的每一者,所述一种或多种结构提供所述候选结合分子结合特征,

所述方法包括使所述结合分子复制。

83.一种结合分子的组合物,其通过根据权利要求80或82所述的方法获得。

84.一种肽或多肽,其包含序列TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)、基本上由其组成或由其组成,或包含SEQ ID NO:6的免疫原性片段的序列,其中所述肽或多肽并非所述US28蛋白,且优选其中所述肽或多肽中仅US28衍生的序列为SEQ ID NO:6的序列或SEQ ID NO:6的免疫原性片段的序列。

85.一种肽或多肽,其包含序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7)、基本上由其组成或由其组成,或包含SEQ ID NO:7的免疫原性片段的序列,其中所述肽或多肽并非所述US28蛋白,且优选其中所述肽或多肽中仅US28衍生的序列为SEQ ID NO:7的序列或SEQ ID NO:7的免疫原性片段的序列。

86.根据权利要求84或85所述的肽或多肽,其中参考序列SEQ ID NO:6或7的免疫原性片段包含少于所述参考序列的全序列,且包含所述参考序列的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个连续氨基酸。

87.根据权利要求84、85或86所述的肽或多肽,其中所述免疫原性片段包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:与SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7共有的且存在于所述序列内的序列。

88.一种肽或多肽,其包含TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)或TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7)的免疫原性片段或变体的序列、由其组成或基本上由其组成,其中所述免疫原性片段或变体包含由抗体1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8所结合的US28的ECD3内的表位的序列。

89.一种至少两种不同肽和/或多肽的组合,其包含第一肽或多肽和第二肽或多肽,其中:

所述第一肽或多肽包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:序列TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)或其免疫原性片段,如根据权利要求86或88所述的免疫原性片段,条件为所述免疫原性片段至少包含SEQ ID NO:6的4N氨基酸;和

所述第二肽或多肽包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7)或其免疫原性片段,如根据权利要求86或88所述的免疫原性片段,条件为所述免疫原性片段至少包含SEQ ID NO:7的4D氨基酸。

90. 一种融合蛋白,其包含直接或经由一个或多个接头氨基酸序列融合至第二氨基酸序列的第一氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,其中

所述第一氨基酸序列为根据权利要求84至88中任一项所述的肽或多肽的序列;和

所述第二氨基酸序列为融合伴侣,任选其中所述融合伴侣为载体蛋白,如经选择以提供适用于针对所述第一氨基酸序列进行免疫接种和产生抗体的融合蛋白的载体蛋白,

任选其中所述载体蛋白选自:钥孔血蓝蛋白(KLH)、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白(OVA)、破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、经遗传修饰的白喉类毒素的交叉反应材料(CRM)、脑膜炎球菌外膜蛋白复合物(OMPC)和流感嗜血杆菌蛋白质D(HiD)。

91. 一种至少两种不同融合蛋白的组合,其包含第一融合蛋白和第二融合蛋白,其中:

根据权利要求90所述的第一融合蛋白包含序列作为所述第一融合蛋白的第一氨基酸序列,所述序列包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:序列TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)或其免疫原性片段,如根据权利要求86或88所述的免疫原性片段,条件为所述免疫原性片段至少包含SEQ ID NO:6的4N氨基酸;和

根据权利要求90所述的第二融合蛋白包含序列作为所述第二融合蛋白的第一氨基酸序列,所述序列包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7)或其免疫原性片段,如根据权利要求86或88所述的免疫原性片段,条件为所述免疫原性片段至少包含SEQ ID NO:7的4D氨基酸。

92. 一种缀合物,其包含与根据权利要求84至88中任一项所述的肽或多肽或与根据权利要求90所述的融合蛋白缀合的部分。

93. 根据权利要求92所述的缀合物,其中:

(i) 所述部分直接与根据权利要求84至88中任一项所述的肽或多肽或与根据权利要求90所述的融合蛋白缀合;或

(ii) 所述部分如经由接头间接地与根据权利要求84至88中任一项所述的肽或多肽或与根据权利要求90所述的融合蛋白缀合。

94. 根据权利要求92或93所述的缀合物,其中所述部分为载体,例如载体蛋白,例如选自以下的载体:钥孔血蓝蛋白(KLH)、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白(OVA)、破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、经遗传修饰的白喉类毒素的交叉反应材料(CRM)、脑膜炎球菌外膜蛋白复合物(OMPC)和流感嗜血杆菌蛋白质D(HiD)。

95. 一种至少两种不同缀合物的组合,其中所述组合包含:

根据权利要求92至94中任一项所述的第一缀合物,其中所述第一缀合物包含与肽或多肽结合的部分、基本上由其组成或由其组成,其中所述肽或多肽包含以下、基本上由其组成或由以下组成:序列TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)或其免疫原性片段,如根据权利要求86或88所述的免疫原性片段,条件为所述免疫原性片段至少包含SEQ ID NO:6的4N氨基酸;和

根据权利要求92至94中任一项所述的第二缀合物,其中所述第二缀合物包含与肽或多肽结合的部分、基本上由其组成或由其组成,其中所述肽或多肽包含序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7)或其免疫原性片段、基本上由其组成或由其组成,如根据权利要求86或88所述的免疫原性片段,条件为所述免疫原性片段至少包含SEQ ID NO:7的4D氨基酸。

96. 一种产生根据权利要求92至94中任一项所述的缀合物的方法, 所述方法包括以下步骤:

(a) 提供根据权利要求84至88中任一项所述的肽或多肽或根据权利要求90所述的融合蛋白; 和

(b) 使部分与根据权利要求84至88中任一项所述的肽或多肽或与根据权利要求90所述的融合蛋白结合。

97. 一种产生根据权利要求95所述的至少两种不同缀合物的组合的方法, 所述方法包括以下步骤:

(a) 通过根据权利要求95所述的方法产生根据权利要求90所述的第一缀合物;

(b) 通过根据权利要求95所述的方法产生根据权利要求90所述的第二缀合物; 和

(c) 组合所述第一缀合物和所述第二缀合物, 由此形成根据权利要求95所述的组合。

98. 一种产生根据权利要求95所述的至少两种不同缀合物的组合的方法, 所述方法包括以下步骤:

(a) 提供根据权利要求89所述的至少两种不同肽和/或多肽的组合或根据权利要求91所述的至少两种不同融合蛋白的组合; 和

(b) 使部分与根据权利要求89所述的至少两种不同肽和/或多肽的组合或与根据权利要求91所述的至少两种不同融合蛋白的组合结合, 由此形成根据权利要求95所述的组合。

99. 根据权利要求96、97或98所述的方法, 其包含分离如此产生的缀合物或缀合物的组合的步骤。

100. 一种经分离的缀合物或缀合物的组合, 其通过根据权利要求97至99中任一项所述的方法获得或可通过其获得,

任选地, 其中所述经分离的缀合物经进一步配制以用于向受试者施用。

101. 一种核酸分子或多个不同核酸分子的组合,

其中所述核酸分子包含、或所述多个不同核酸分子的组合共同包含一个或多个核酸序列, 所述一个或多个核酸序列单独地或以组合形式编码根据权利要求84至88中任一项所述的一种或多种肽和/或多肽、根据权利要求89所述的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据权利要求90所述的融合蛋白和/或根据权利要求91所述的至少两种不同融合蛋白的组合。

102. 根据权利要求101所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合, 其中所述核酸分子或各核酸分子为独立地选自DNA或RNA分子。

103. 一种载体, 其包含根据权利要求101或102所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合。

104. 根据权利要求103所述的载体, 其中所述载体选自: 逆转录病毒载体、质体、慢病毒载体和腺病毒载体。

105. 一种细胞, 其包含根据权利要求101或102所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合或根据权利要求103或104所述的载体,

任选其中所述细胞表达根据权利要求84至88中任一项所述的一种或多种肽或多肽、根据权利要求89所述的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据权利要求90所述的融合蛋白或根据权利要求91所述的至少两种不同融合蛋白的组合。

106. 一种细胞,其暴露于和/或包含根据权利要求84至88中任一项所述的一种或多种肽或多肽、根据权利要求89所述的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据权利要求90所述的融合蛋白、根据权利要求91所述的至少两种不同融合蛋白的组合、根据权利要求92至94中任一项所述的缀合物、根据权利要求95所述的至少两种不同缀合物的组合、根据权利要求101或102所述的核酸分子或多个不同核酸分子的组合或根据权利要求103或104所述的载体。

107. 一种分离和/或富集包含对US28的ECD3中的表位具有特异性的T细胞受体 (TCR) 的细胞 (例如天然存在的T细胞,或表达根据权利要求14至22中任一项所述的CAR的重组细胞,例如CAR T细胞、CAR NK细胞和/或CAR巨噬细胞) 的方法,其中所述方法包括使用试剂的步骤,

其中所述试剂选自:根据权利要求84至88中任一项所述的肽或多肽、根据权利要求89所述的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据权利要求90所述的融合蛋白、根据权利要求91所述的至少两种不同融合蛋白的组合、根据权利要求92至94中任一项所述的缀合物和/或根据权利要求95所述的至少两种不同缀合物的组合,

以分离和/或富集对SEQ ID NO:6和/或7的序列中的一者或两者具有结合特异性的细胞。

108. 根据权利要求107所述的方法,其中所述序列经配制为MHC四聚体,

例如用于抗原特异性CD8⁺T细胞检测的I类MHC四聚体、用于抗原特异性CD4⁺T细胞检测的II类MHC四聚体、用于流式细胞术或荧光显微术的荧光团标记四聚体。

109. 根据权利要求107或108所述的方法,其中所述T细胞选自CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、效应T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、细胞毒性T淋巴细胞 (CTL)、EBV特异性T细胞受体 (TCR) 或 $\gamma\delta$ -T细胞亚型。

110. 一种MHC四聚体,其包含根据权利要求84至88中任一项所述的肽或多肽、根据权利要求89所述的至少两种不同肽和/或多肽的组合,任选其中所述肽包含或对应于SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7或任一者或两者的免疫原性片段,

例如其中所述MHC四聚体为用于抗原特异性CD8⁺T细胞检测的I类MHC四聚体、用于抗原特异性CD4⁺T细胞检测的II类MHC四聚体、用于流式细胞术或荧光显微术的荧光团标记四聚体。

111. 根据权利要求110所述的MHC四聚体,其用于分离和/或富集包含对US28的ECD3中的表位具有特异性的T细胞受体 (TCR) 的细胞,例如选自以下的T细胞:CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞、效应T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、细胞毒性T淋巴细胞 (CTL)、EBV特异性T细胞受体 (TCR) 或 $\gamma\delta$ -T细胞亚型;和/或表达根据权利要求14-22中任一项所述的CAR的重组细胞,例如CAR T细胞、CAR NK细胞和/或CAR巨噬细胞。

治疗剂和诊断剂以及其用途

技术领域

[0001] 本发明涉及病毒学领域。更具体地,本发明涉及靶向如由人巨细胞病毒(HCMV)编码的US28蛋白的特定区的治疗剂和诊断剂,和与其相关的疗法,包括但不限于HCMV感染癌症和与潜伏或裂解HCMV感染相关的其他病症。

[0002] 参考文献

[0003] 在本说明书中对明显先前已出版的文献的列举或论述不必被视为承认该文献为目前先进技术的一部分或为公共常识。所公开的参考文献以引用的方式特此并入本文中,以便其对本文所述内容提供示例性程序化或其他细节补充。

背景技术

[0004] 人巨细胞病毒(HCMV),也称为人疱疹病毒5(HHV-5),为由全球56-94%人口携带的普遍机会性DNA病毒(Geisler等人,《癌症(Cancers)》,2019,11:1842;Zuhair等人,《医学与病毒学评论(Rev Med Virol)》,2019.29(3):第e2034页)。

[0005] 在大部分免疫活性个体中,HCMV感染无症状、未确诊且被视为无害的,因为宿主免疫系统能很好地控制病毒复制(Boeckh和Geballe,《《临床研究杂志》(J Clin Invest)》,2011.121(5):第1673-80页)。

[0006] 与所有疱疹病毒类似,HCMV在初次感染之后建立终生持久性潜伏感染。潜伏感染的特征在于低水平病毒复制或不存在病毒复制,其中病毒基因组主要驻存于CD34⁺造血祖细胞群中,该造血祖细胞群驻存于骨髓中(Collins-McMillen等人,《病毒(Viruses)》,2018.10(8))。

[0007] 假定,潜伏HCMV除非被宿主免疫系统持续控制,否则可以随机方式间歇地再活化。出于此原因,该病毒可在某些情况下引起并发症,例如在免疫功能不全患者中,在所述患者中不仅初级HCMV感染而且再感染或再活化还可引起危及生命的疾病,侵袭许多器官,导致相当大发病率和死亡率(Boeckh和Geballe,同上;Griffiths等人,《病理学杂志(J Pathol)》,2015.235(2):第288-97页)。

[0008] HCMV为最常见先天性病毒感染之一和出生缺陷的最重要原因(Davis等人,《出生缺陷研究(Birth Defects Res)》,2017.109(5):第336-346页)。愈来愈清楚的是,在生命过程中HCMV感染还可能在动脉粥样硬化、自体免疫疾病和数种恶性病(特别是多形性胶质母细胞瘤)的发病机制方面发挥作用(Soderberg-Naucler,《《内科医学杂志》(J Intern Med)》,2006,259(3):第219-46页;Cobbs,《病毒学新观点(Curr Opin Virol)》,2019.39:第49-59页)。另外,HCMV血清状态可能影响烧伤、创伤和败血症的临床病程(Soderberg-Naucler,2006,同上;Limaye等人,JAMA,2008.300(4):第413-22页;Osawa和Singh,《重症监护(Crit Care)》,2009.13(3):第R68页)。

[0009] 潜伏HCMV感染可能在发炎过程期间在祖细胞分化成单核细胞/浸润巨噬细胞或树突状细胞(DC)时经再活化,且这些细胞可将病毒散播至周边器官(Soderberg-Naucler等人,《细胞(Cell)》,1997,91:119-126)。由此类发炎细胞携带的再活化HCMV可到达所有身体

组织,且感染广泛数目的细胞类型并在其中复制(Ljungman等人,《北美传染病诊所(Infect.Dis.Clin.North.Am.)》,2010,24:319-337)。由所有体液,包括唾液和母乳进一步传播该感染(Hamprecht等人,《柳叶刀(Lancet)》,2001,357:513-518)。百分之九十的来自HCMV血清反应呈阳性的女性的母乳样品含有该病毒,且在一岁儿童中导致约30% HCMV患病率。因此,哺乳和亲代接触构成婴儿早期或儿童期获HCMV感染的重要途径(Hamprecht等人,2001,同上)。

[0010] 巨细胞病毒基因组和遗传多样性:

[0011] 如Berg等人,2019,《公共科学图书馆:综合(PLoS ONE)》14(9):e0222053中所论述,CMV基因组由单一线性双链DNA组成且尺寸大约为235kb。其含有超过750个经翻译ORF(Stern-Ginossar等人,《科学(Science)》,2012,338(6110):1088-93),所述ORF可被分成两个区:独特长(UL)区和独特短(US)区,所述区侧接有末端和内部反向重复序列。

[0012] 巨细胞病毒已调适多种策略以避免免疫检测且促进感染散播。这些策略基于在感染期间对宿主免疫反应的操控和调节,其例如通过表达对人免疫系统正常功能重要的受体和配体的经病毒编码同源物而实现。CMV通过编码比其他疱疹病毒多2至3倍数目的基因产物(许多所述基因产物已展示与人免疫系统的相互作用且操控人免疫系统(Mocariski,《微生物学趋势(Trends Microbiol.)》,2002;10(7):332-9)),具有可供用于调节宿主的免疫反应的前所未有的工具数目。

[0013] 流行CMV病毒株之间的遗传变异较大,且近期研究报导75%病毒株在数个基因中含有断裂性突变和多态性(Sijmons等人,《病毒学杂志(J.Virol.)》,2015,89(15):7673-7695)。为了排除由于连续传代所致的断裂性突变,研究作者仅使用传代1至2次的病毒株且直接自临床样品验证大部分所观察到的突变。对于基因UL40和UL111A,分别于9.9%和5.5%的所研究病毒株中发现引起功能性剔除的突变(Sijmons等人,2015,同上)。UL111A为可抑制正常免疫反应的功能性白介素10同源物(Mocariski,2002,同上;Engel和Angulo,《实验医学与生物学进展(Adv Exp Med Biol.)》,2012,738:256-76)。UL40的信号肽促进HLA-E在感染细胞表面上表达,该HLA-E为自然杀伤细胞抑制受体的配体(Wilkinson等人,《临床病毒学期刊(J Clin Virol.)》,2008;41(3):206-12)。

[0014] 其他同样高度可变的CMV基因为其中已鉴别出14种不同基因型的趋化因子同源物UL146(Dolan等人,《普通病毒学期刊(J Gen Virol.)》,2004,85(Pt5):1301-12)和趋化因子清道夫受体(scavenging receptor)(Kledal等人,《欧洲生化学会联合会快报(FEBS Lett.)》,1998;441(2):209-14)以及其中已报导了大量N-末端多态性的G蛋白偶联受体US28(Goffard等人,《病毒基因(Virus Genes)》,2006;33(2):175-81;Arav-Boger等人,《传染病学杂志(J Infect Dis.)》,2002;186(8):1057-64)。

[0015] Berg等人,2019(同上)报导对于其他人疱疹病毒未观测到此遗传多样性程度(Sijmons等人,2015,同上)且引起以下问题:CMV为何在重要的免疫调节基因中施加此类变化及其如何影响病毒-宿主相互作用。

[0016] 据认为,大部分HCMV发病机制与病毒潜伏期相关,该病毒潜伏期与病毒经由多种机制避开体液免疫反应和细胞宿主免疫反应的能力密切相关(Manandhar等人,《国际分子科学杂志(Int J Mol Sci)》,2019.20(15))。此类机制中最重要的一点包括HCMV的这种高度的、不断变化的遗传多样性。HCMV基因组在不同个体之间且甚至在相同宿主内变化

(Gorzer等人,《病毒学杂志》,2010,84(14):7195-7203;Renzette等人,《PLOS病原体(PLoS Pathog)》,2011,7(5):e1001344;Renzette等人,《病毒学新观点》,2014.8:109-15;Renzette等人,《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci USA)》,2015,112(30):E4120-8;Renzette等人,《病毒学杂志》,2017,91(5))。新的宿主感染产生对各经感染个体独特的病毒株,且产生选择事件,在所述选择事件中,由于免疫反应的选择性压力,新基因型变得显性(Renzette等人,2011,同上)。有可能病毒和宿主因素均会有助于在HCMV感染期间促进病毒遗传漂移(Vabret等人,《免疫趋势(Trends Immunol)》,2017,38(1):53-65;Christensen和Paludan,《细胞与分子免疫学(Cell Mol Immunol)》,2017,14(1):4-13)。另外,各患者很可能感染有如文献中先前充分报导的多个CMV病毒株(Renzette等人,2015,同上)。相同个体中存在多个病毒株使得能够自不同HCMV病毒株重组。重组被视为代表HCMV遗传多样性的主要驱动因素(Suarez等人,《传染病学杂志》,2019,220(5):781-791;Sijmons等人,2015,同上;Lassalle等人,《病毒进化(Virus Evol)》,2016,2(1):vew017;Cudini等人,《美国国家科学院院刊》,2019,116(12):5693-5698)。对高度多样性区再分类将产生新组合以确保有效的免疫逃避,这也可影响病毒的病原性。一致地,混合HCMV感染已与数项研究中免疫功能不全个体的较差临床结果相关(Coaquette等人,《临床传染病(Clin Infect Dis)》,2004,39(2):155-161;Lisboa等人,《移植感染性疾病(Transpl Infect Dis)》,2012,14(2):132-140;Houldcroft等人,《微生物学前沿(Front Microbiol)》,2016,7:1317)。

[0017] 此外,HCMV多样性通过遗传多态性驱动,所述遗传多态性在整个基因组中不均匀分布(Sijmons等人,2015,同上)。在暴露于病毒粒子表面上的蛋白质区中和对于在胞外结构域中的宿主细胞膜处表达的病毒蛋白,选择较强(Mozzi等人,《PLOS病原体》,2020,16(5):e1008476)。宿主免疫系统施加的选择性压力很可能在流行HCMV病毒株当中的基因多样性的形成中发挥主要作用。因此,通过正向选择靶向的数个位点位于人抗体识别的表位内或直接与参与免疫反应的宿主分子相互作用的蛋白质区中(Sijmons等人,2015,同上;Mozzi等人,2020,同上)。这些特征与HCMV与人免疫系统之间的持续捉迷藏式相互作用(hide and seek interplay)一致。

[0018] 病毒株变化性和不断突变的病毒使得对病毒诊断学与HCMV疫苗和药物开发两者要求苛刻且为当前抗病毒药治疗设定了限制。多年来,HCMV疫苗开发一直为医学界的高度优先事项,但迄今为止尚未有有效的HCMV疫苗获得批准。

[0019] HCMV的致癌特性

[0020] HCMV编码的蛋白质显示不同致癌功能(Geisler等人,2019,同上)。在进入宿主细胞后,如pUL48的HCMV病毒粒子的间层蛋白经释放,从而使细胞固有免疫反应和先天性免疫反应失能,且促进宿主细胞的增强的代谢活动(Kumari等人,《细胞死亡和分化(Cell Death Dis.)》,2017,8:e3078)。这些HCMV编码的蛋白质可使得细胞能够越过G1期以促进快速细胞分裂(Kumari等人,2017,同上)。经由上调抗凋亡基因和下调促凋亡基因,细胞进入增强的存活状态。

[0021] 在病毒DNA进入细胞核之后,细胞RNA聚合酶I和II(Pol I和II)用于通过结合至主要即刻早期启动子(MIEP)来转录病毒基因(Kostopoulou等人,《肿瘤标靶(Oncotarget)》,2017,8:96536-96552)。表达的最初基因为即刻早期(IE)基因。衍生自所述基因的IE蛋白充

当控制早期和晚期病毒基因表达和直接宿主基因表达的转录因子。所述蛋白质必须建立裂解感染且对于潜伏期的病毒再活化至关重要(Kumari等人,2017,同上;Tamrakar等人,《病毒学杂志》,2005,79:15477-15493)。裂解HCMV感染导致细胞周期失调,且IE基因产物干扰关键细胞因子,包括视网膜母细胞瘤蛋白家族(Rb)、细胞周期蛋白、p53、Wnt、磷脂酰肌醇3-激酶/Akt、人端粒酶逆转录酶(hTERT)和NF- κ B,以增加感染细胞的永生特性(Moussawi等人,《科学报告(Sci.Rep.)》,2018,8:12574)。这些途径通常在癌细胞中活化。由如Fos和Myc的原致癌基因递送的促细胞分裂信号的活化可通过HCMV感染细胞中的IE蛋白诱导(Hagemeier等人,《病毒学杂志》,1992,66:4452-4456)。此外,在HCMV感染细胞中诱导MYB基因,类似于在HPV相关肿瘤中增强MYB基因表达(Moussawi等人,2018,同上)。除促细胞分裂信号以外,HCMV感染经由DNA修复途径的恶化而引起染色体畸变,引起感染细胞中的遗传不稳定性(Straat等人,《国立癌症研究所杂志(J.Natl.Cancer Inst.)》,2009,101:488-497;Siew等人,《生医科学杂志(J.Biomed.Sci.)》,2009,16:107)。此推动了基因突变的发展。

[0022] 据报导,包括US27、US28、UL33和UL78的各种HCMV编码G蛋白偶联受体(GPCR)样蛋白显示重要致癌功能(Heukers等人,《致癌基因(Oncogene)》,2018,37:4110-4121)。G蛋白活化代谢和致癌关键信号传导途径,如cAMP和PI3K信号传导途径,其中后者对于出现上皮细胞的锚定非依赖性生长和致癌性转化至关重要(Moussawi等人,2018,同上;Boroughs等人,《自然细胞生物学(Nat.Cell Biol.)》,2015,17:351-359)。HCMV-2.7早期基因转录物为长的非编码(lnc)RNA,其直接与线粒体中的呼吸链的复合物I相互作用,通过抑制Fas-配体相互作用和通过与凋亡蛋白酶8结合抑制颗粒酶B、改善感染细胞中的氧化能力和维持能量产生来防止线粒体诱导的细胞死亡(Reeves等人,《科学》,2007,316:1345-1348)。

[0023] HCMV还产生了数种方式来操控先天性和适应性免疫反应,以减少对其免疫监视且提高其在其免疫活性宿主中的存活率,这可能很好地解释了HCMV感染癌细胞中的重要的免疫逃避机制。HCMV编码调节感染细胞的NK细胞识别的多种蛋白质(Fielding等人,《PLOS病原体》,2014,10:e1004058),且增加CD8⁺ T细胞对病毒蛋白的耐受性。HCMV编码的蛋白质可刺激DC的未成熟表型的发展,这减少CD4⁺ T细胞反应的活化(Wagner等人,《白细胞生物学杂志(J.Leukoc Biol.)》,2008,83:56-63),且另外减少CD8⁺细胞毒性T细胞对感染细胞的消除。

[0024] HCMV治疗靶点:

[0025] 当前,针对HCMV可用的唯一抗病毒疗法依赖于核苷类似物,如更昔洛韦(ganciclovir,GCV)和缙更昔洛韦(valganciclovir,VAL-GCV)(Rawlinson等人,《柳叶刀感染病学(Lancet Infect Dis)》,2017,17(6):e177-e188;James和Kimberlin,《儿科新观点(Curr Opin Pediatr)》,2016,28(1):81-85),所述核苷类似物具有数个缺点,如较差生物可用性、毒副作用和产生抗药性的风险。当前结果指示,DNA聚合酶(UL54)和病毒磷酸转移酶(UL97)这两种高度多态HCMV基因在针对GCV的抗药性中发挥重要作用(Komatsu等人,《抗病毒研究(Antiviral Res)》,2014,101:12-25)。

[0026] 另外,重要地,现有抗病毒剂仅可用于治疗裂解HCMV感染,但不可清除潜伏病毒。根除或减少潜伏池(latent reservoir)将有利于减少数个患者群组中HCMV相关疾病的负担。

[0027] 先前研发的抗HCMV药,如更昔洛韦(GCV)、膦甲酸(foscarnet,FOS)和西多福韦

(cidofovir, CDV), 均靶向UL54病毒DNA聚合酶。然而, 在移植环境中, 抗病毒毒性和HCMV抗病毒抗药性构成越来越大的治疗挑战, 且因此急需具有新颖病毒靶点的新型抗HCMV药(Burrel等人, 2014, “人巨细胞病毒(HCMV)对当前抗病毒药敏感, 缺乏对HCMV编码的US28趋化因子受体多态性的影响(Lack of influence of human cytomegalovirus (HCMV) susceptibility to current antiviral drugs on HCMV-encoded US28 chemokine receptor polymorphism)”, 巴塞罗那ECCMID 2014的海报展示)。

[0028] Burrel等人, 2014(同上)教导, 由于HCMV编码的US28在病毒散播和持久性以及平滑肌细胞迁移和肿瘤形成方面的潜在作用, 该蛋白质构成新颖抗病毒疗法的潜在靶点。

[0029] HCMV US28为一种七次跨膜蛋白, 属于G蛋白偶联的受体(GPCR)一类。GPCR构成由经批准药物靶向的蛋白质的最大家族(Sriram和Insel, 《分子药理学(Mol Pharmacol)》, 2018.93(4):251-258), 且共有共同架构, 各自由以下组成: 具有胞外N-末端、胞内C-末端和由三个胞外环连接(ECL1-3)的七个疏水性跨膜结构域(TM1-TM7)的单一多肽(Alexander等人, 《英国药理学杂志(Br J Pharmacol)》, 2019, 176期增刊1:S21-S141)。

[0030] 如由HCMV病毒株DB(寄存编号KT959235)编码的US28的全序列在本申请中提供为SEQ ID NO:5, 其中:

[0031] N-末端胞外结构域(在本文中也称为ECD1, 因其为第一胞外结构域)在本文中提供为SEQ ID NO:1且对应于SEQ ID NO:5的位置1-37,

[0032] 第一胞外环(ECL1; 尽管在本文中也称为ECD2, 因其为第二胞外结构域)在本文中提供为SEQ ID NO:2且对应于SEQ ID NO:5的位置91-101,

[0033] 第二胞外环(ECL2; 尽管在本文中也称为ECD3, 因其为第三胞外结构域)在本文中提供为SEQ ID NO:3且对应于SEQ ID NO:5的位置167-183; 并且

[0034] 第三胞外环(ECL3; 尽管在本文中也称为ECD4, 因其为第四胞外结构域)在本文中提供为SEQ ID NO:4且对应于SEQ ID NO:5的位置250-273。

[0035] Burrel等人(同上)评定US28蛋白在HCMV临床病毒株当中的多态性水平, 且得出结论, US28在临床病毒株当中的多态性水平高于先前报导的其他HCMV编码的蛋白质(如UL97磷酸转移酶和UL44持续合成因子(processivity factor))的多态性水平, 尽管此多态性并不根据HCMV易感性或对当前审批通过的抗病毒药(即GCV、FOS和CDV)的抗性而显著变化, 因此支持以下观点: HCMV编码的US28趋化因子受体可构成用于抗HCMV药的有前景的病毒靶点, 尤其在HCMV抗性的情况下。

[0036] WO 2019/151865作者采取US28聚焦方法, 如还在等同期刊文章De Groof等人, 2019, 《分子药理学(Mol. Pharmaceutics)》, 16:3145-3156中报导。作者报导其已生成单一重链可变结构域抗体(VHH), 由特定VHH示例, 称为VUN100(本申请的SEQ ID NO:60), 据称该抗体特异性检测胶质母细胞瘤(GBM)组织中的US28且抑制配体依赖性和组成性US28活性, 且作者报导该抗体因而在原位异种移植模型中体外和体内削弱US28依赖性GBM生长。

[0037] 显示VUN100与不连续表位结合, 该表位包含US28的N-末端胞外区(位置1-37, 在本文中也称为ECD1)中的多个结合位置, 且进一步受US28的第三胞外环(ECL3, 位置250-273, 在本文中也称为ECD4)的存在的影响, 如WO 2019/151865的实施例3(第36页, 第11-32列)和De Groof等人, 2019(同上)的图例2中所论述。

[0038] 关于比较VUN100 Ab与表达US28的HEK293T膜相比于与经模拟转染的HEK293T膜的

结合的分析展示,20%经模拟转染的细胞由VUN100结合,且表达US28的HEK293T膜仅达成4的相对特异性分数(De Groof等人,2019(同上),在其支持信息、其图S1.A和本申请的表2中)。区分表达US28的细胞与US28阴性细胞的明显能力(特异性分数仅约4)可能为次佳的,且引发关于VUN100向HCMV感染细胞提供特异性靶向作用同时避免健康细胞中不可接受的含量的脱靶副作用的能力的担忧。其还引起关于VUN100在分析(包括诊断分析,如用于免疫组织化学(IHC))中可靠地鉴别表达US28的细胞(特别是HCMV感染细胞)的情况下适用的能力的担忧。此外,在另一公开中,已确认US28靶向纳米抗体的效能需要在病毒和潜在体内环境中验证(De Groof等人,2021,《药理学评论(Pharmacol Rev)》73:828-846)。

[0039] 特别需要提供在体内和/或在分析(包括IHC)中使用时特异性结合至表达US28的细胞(特别是HCMV感染细胞)和/或使与不表达US28的细胞(特别是未感染HCMV的细胞)的脱靶结合降至最低的能力实质上大于VUN100的结合分子。

[0040] 此外,如上文所指出,临床病毒株当中US28的多态性水平高于先前报导的其他HCMV编码蛋白质的多态性水平(Burrell等人,同上),且已报导US28的大量N-末端多态性(Goffard等人,2006,同上;Arav-Boger等人,2002,同上)。

[0041] 因此,本发明人考虑了以下可能性:在如由VUN100结合的US28的N-末端区中存在的高水平多态性可能使得VUN100 VHH分子不能与不同HCMV病毒株一致地结合。实际上,当在该情况下考虑时,WO 2019/151865的图8D中与VUN100和不同HCMV病毒株的结合相关的结果展示HCMV的VHL/E、Merlin和TB40/E病毒株之间的结合差异,其中在病毒株TB40/E(B1型)中的结合尤其减少,仅为针对Merlin病毒株所观测到的结合水平的约一半。此外,在可在线获得的De Groof等人,2020(doi:<https://doi.org/10.1101/2020.05.12.071860>)的预印文章中报导了VUN100的进一步表征,其中补充数据的图2提供由VUN100结合的CD14+单核细胞的细胞核中诱导的IE表达%的结果。测试的所有细胞均来自HCMV血清反应呈阳性的受试者,且确认为潜伏感染HCMV,但感染各供体的HCMV病毒株待定。由与来自四名不同患者中的每一名的这些HCMV阳性CD14+细胞结合的VUN100诱导的IE表达量实质上不同,其中对于供体1-4报导的数字分别为57%、33%、22%和4%(差值范围大于14倍)。VUN100与所确认的HCMV阳性细胞结合后的此高水平反应变化似乎最可能归因于不同HCMV病毒株感染供体中的每一个,且因此有力指示VUN100的结合能力在不同HCMV病毒株之间将显著变化。同一图还展示在二价形式的VUN100(De Groof等人,2020(同上)称为VUN100b,由本申请的SEQ ID NO:63表示)与相同组的来自供体1-4的HCMV阳性细胞结合之后的高水平的反应变化(差值水平超过7倍),再次提供指示特异性结合敏感性的结果。

[0042] 为了利用US28作为治疗靶点,重要的是解决上述一个或多个最重要的问题,不仅包括已报导的针对本领域已知的VUN100分子的相对较高水平的非特异性结合活性,且还使脱靶结合活性降至最低,且提供US28结合分子解决病毒株多样性、病毒突变、突变漂移和病毒在病毒潜伏期间自免疫系统隐藏的能力的问题。

[0043] 因此,本发明的目标为提供可与表达US28和/或对于HCMV感染呈阳性的生物材料高度特异性地结合(相较于健康人细胞应低得多)和/或使与健康人细胞的脱靶结合的绝对水平降至最低的结合分子。举例而言,提供结合分子对抗HCMV感染和与其相关的病症受到广泛关注,所述结合分子向结合分子所结合的细胞提供或引导细胞毒性作用,且本发明的一个目标为提供可使健康人细胞中脱靶细胞毒性作用的不可接受(例如治疗不可接受)水

平降至最低或避免所述水平的方式靶向这些作用。特别是,本发明的目标之一为提供在针对与表达US28和/或对于HCMV感染呈阳性的生物材料(例如细胞)相比于不表达US28且对于HCMV感染不呈阳性的生物材料(例如等同细胞)结合的特异性评估时,针对US28和/或HCMV感染细胞具有比WO 2019/151865和De Groof等人,2019(同上)的VUN100Ab和/或比De Groof等人,2020(同上)的VUN100b二价分子高的特异性水平的结合分子。

[0044] 本发明的另一目标为提供针对US28的结合分子,其对表达US28和/或对于经HCMV感染的US28表达细胞呈阳性的生物材料相比于不表达US28的对应生物材料(如健康人细胞)的结合具有特异性,和/或其显示比如上所述的VUN100 Ab分子明显低的与健康人细胞的脱靶结合的绝对水平。

[0045] 本发明的另一目标为提供病毒株不可知的且因此理想情况下能够靶向所有或实质上所有HCMV感染(无论存在HCMV的病毒株或病毒株的组合)和/或能够在HCMV感染的治疗过程期间提供持续的作用的结合分子,而不管在所治疗的受试者内感染病毒株增加一个或多个HCMV突变的可能性。特别是,与VUN100 Ab相比,具有展示出较大程度的病毒株不可知的结合的结合特征的针对US28的结合分子备受关注。

发明内容

[0046] 本发明提供具有一种或多种(优选全部)与人巨细胞病毒(HCMV)的US28蛋白的高度特异性结合、极低水平的与健康(未感染)细胞的非特异性结合和/或病毒株不可知的结合能力的结合分子以及编码所述结合分子的核酸分子。

[0047] 本发明的结合分子经设计以在人巨细胞病毒(HCMV)的US28蛋白的胞外结构域3(ECD3)内结合。

[0048] 已证实本发明的结合分子具有优异的结合特性,包括上文所描述且如本文进一步描述的那些结合特性。举例而言,出人意料地,还已证实本发明的结合分子提供针对侵袭性和/或转移性HCMV感染癌症(包括乳腺癌)尤其有利的结合特异性。

[0049] 在某些优选的实施方案中,结合分子选自抗体(包括例如BiTE抗体)和嵌合抗原受体(CAR)或其功能变体、片段、融合蛋白和/或缀合物,以及编码其的核酸分子。该结合分子可例如包括或结合至细胞毒性组分或其他效应组分,能够对结合分子所结合的任何细胞施加影响(如抑制或杀伤)。该结合分子可例如包括或结合至可募集其他试剂(例如其他蛋白质、药物、细胞或任何其他所选物质)的组分,以此方式使得所募集的试剂具有特异性靶向的能力以对结合分子所结合的细胞施加影响(如抑制或杀伤);因此,非限制性实例为BiTE分子,其具有募集T细胞以作用于该BiTE所结合的细胞上。还提供表达所述结合分子的细胞,包括其中结合分子为CAR的实例,且所述细胞可为CAR表达细胞,包括CAR-T细胞、CAR-NK细胞和CAR-M细胞。

[0050] 本发明的这些和其他公开通过以下描述和随附权利要求和附图更详细地描述。

[0051] 因此,本发明的第一方面提供包含一条或多条多肽链的结合分子,该结合分子对人巨细胞病毒(HCMV)的US28蛋白的胞外结构域3(ECD3)内的表位具有结合特异性。根据本发明,US28蛋白的ECD3包含存在于由HCMV病毒株编码的位于如下位置处的US28蛋白中的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,所述位置对应于由如SEQ ID NO:5中所阐述的人巨细胞病毒(HCMV)的DB病毒株编码的US28蛋白的位置167至183。

[0052] 例如(但不限于),本发明的第一方面的结合分子可选自抗体或嵌合抗原受体(CAR)。

[0053] 本发明的第一方面的结合分子可例如对完全存在于HCMV的US28蛋白的胞外结构域3(ECD3)内的表位具有结合特异性。

[0054] 本发明的第一方面的结合分子可例如对US28蛋白的ECD3内的线性表位具有结合特异性。

[0055] 本发明的第一方面的结合分子可例如对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有病毒株不可知的结合特异性。举例而言,结合分子可对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有结合特异性,其中该结合特异性对两种或更多种(如全部)HCMV病毒株为不可知的,例如对4D变异株和4N变异株(各自如本文中进一步描述),任选两种或更多种(如全部)选自DB、Towne、AF1、VHL/E、AD169、BL、DAVIS、JP、Merlin、PH、TB40/E、Toledo、TR和VR1814(FIX)的HCMV病毒株为不可知的。

[0056] 因此,本发明的第一方面的结合分子可例如对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有结合特异性,无论US28蛋白的ECD3是否包含4D变体或4N变体的序列:

[0057] 其中该4D变体包含如US28的ECD3中发现的由如以下的第一组HCMV病毒株编码的序列TKKDNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:7):Towne、VR1814、TB40/E、Merlin、JP、Ad169、AF1、VHL/E、BL和DAVIS;和

[0058] 其中该4N变体包含如US28的ECD3中发现的由如以下的第二组HCMV病毒株编码的序列TKKNNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:6):Toledo、TR和DB病毒株。

[0059] 通过利用本文所描述的方案,本申请人一致地且反复地生成具有上述一个或多个有益结合特性的大量抗ECD3抗体,包括在本文中通过以下名称所提及的抗体(其序列还提供于下文):US28-13-5G6-1D3;US28-13-1C10-1C10;US28-13-1H3-1A10;US28-14-2C2-1G4;US28-13-1C10-1G9;和US28-14-4E4-1E8。

[0060] 在一个实施方案中,本发明的第一方面的结合分子包含对应于分别如SEQ ID NO:8、9、10、14、13、15和16所定义的抗体13-5G6-1D3(本文中通常缩写为“1D3”)的CDR序列中任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个的一个、两个、三个、四个、五个或六个互补决定区(CDR),和/或抗体1D3的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体,且任选其中结合分子选自抗体和CAR。

[0061] 任选地,根据此实施方案的结合分子可包含(a)分别如SEQ ID NO:8、9和10所定义的抗体1D3的可变重链(V_H)的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或三个;和/或(b)分别如SEQ ID NO:14、15和16所定义的抗体1D3的可变轻链(V_L)的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或三个。

[0062] 另外或替代地,在另一选项中,根据此实施方案的结合分子可包含:(a)至少一个可变重链(V_H)多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:8、9和10的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:12的序列、基本上由其组成或由其组成;和/或(b)至少一个可变轻链(V_L)多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:14、15和16的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:18的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0063] 参考下文所描述的序列鉴别编号(SEQ ID NO),鉴别本文中的US28-13-5G6-1D3抗

体的以下序列：

ID3		DNA 序列	蛋白质序列
完整重链（包括前导序列）		SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 20
完整轻链（包括前导序列）		SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 21
V _H 链	未成熟	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 11
	成熟	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 12
V _L 链	未成熟	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 17
	成熟	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 18
V _H -CDR1		SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 8
V _H -CDR2		SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 9
V _H -CDR3		SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 10
V _L -CDR1		SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 14
V _L -CDR2		SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 15
V _L -CDR3		SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 16

[0065] 在另一实施方案中，本发明的第一方面的结合分子包含对应于分别如SEQ ID NO: 112、113、114、117、83和118所定义的抗体13-1C10-1C10（本文中通常缩写为“1C10”）的CDR序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR，和/或抗体1C10的所述CAR的任何一个或多个的功能变体，且任选其中结合分子选自抗体和CAR。

[0066] 任选地，根据此实施方案的结合分子可包含 (a) 分别如SEQ ID NO: 112、113和114所定义的抗体13-1C10-1C10的V_H的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个；和/或 (b) 分别如SEQ ID NO: 117、83和118所定义的抗体13-1C10-1C10的V_L的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个。

[0067] 另外或替代地，在另一选项中，根据此实施方案的结合分子可包含：(a) 至少一个V_H多肽，其包含分别具有SEQ ID NO: 112、113和114的序列的CDR 1、2和3序列，且任选其中至少一个V_H多肽包含SEQ ID NO: 104的序列、基本上由其组成或由其组成；和/或 (b) 至少一个V_L多肽，其包含分别具有SEQ ID NO: 117、83和118的序列的CDR 1、2和3序列，且任选其中V_L多肽包含SEQ ID NO: 108的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0068] 参考下文所描述的序列鉴别编号 (SEQ ID NO)，鉴别本文中的US28-13-1C10-1C10抗体的以下序列：

[0069]

1C10		DNA 序列	蛋白质序列
完整重链（包括前导序列）		SEQ ID NO: 155	SEQ ID NO: 157
完整轻链（包括前导序列）		SEQ ID NO: 156	SEQ ID NO: 158
V _H 链	未成熟	SEQ ID NO: 101	SEQ ID NO: 103
	成熟	SEQ ID NO: 102	SEQ ID NO: 104
V _L 链	未成熟	SEQ ID NO: 105	SEQ ID NO: 107
	成熟	SEQ ID NO: 106	SEQ ID NO: 108
V _H -CDR1		SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 112
V _H -CDR2		SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 113
V _H -CDR3		SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 114
V _L -CDR1		SEQ ID NO: 115	SEQ ID NO: 117
V _L -CDR2		SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 83
V _L -CDR3		SEQ ID NO: 116	SEQ ID NO: 118

[0070] 在另一实施方案中,本发明的第一方面的结合分子包含对应于分别如SEQ ID NO: 112、113、114、117、83和118所定义的抗体13-1H3-1A10(本文中通常缩写为“1A10”)的CDR序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR,和/或抗体1A10的所述CAR的任何一个或多个的功能变体,且任选其中结合分子选自抗体和CAR。

[0071] 任选地,根据此实施方案的结合分子可包含(a)分别如SEQ ID NO:112、113和114所定义的抗体13-1H3-1A10的V_H的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个;和/或(b)分别如SEQ ID NO:117、83和118所定义的抗体13-1H3-1A10的V_L的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个。

[0072] 另外或替代地,在另一选项中,根据此实施方案的结合分子可包含:(a)至少一个V_H多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:112、113和114的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中至少一个V_H多肽包含SEQ ID NO:122的序列、基本上由其组成或由其组成;和/或(b)至少一个V_L多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:117、83和118的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中V_L多肽包含SEQ ID NO:126的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0073] 参考下文所描述的序列鉴别编号(SEQ ID NO),鉴别本文中的US28-13-1H3-1A10抗体的以下序列:

[0074]

1A10		DNA 序列	蛋白质序列
完整重链（包括前导序列）		SEQ ID NO: 159	SEQ ID NO: 161
完整轻链（包括前导序列）		SEQ ID NO: 160	SEQ ID NO: 162
V _H 链	未成熟	SEQ ID NO: 119	SEQ ID NO: 121
	成熟	SEQ ID NO: 120	SEQ ID NO: 122
V _L 链	未成熟	SEQ ID NO: 123	SEQ ID NO: 125
	成熟	SEQ ID NO: 124	SEQ ID NO: 126
V _H -CDR1		SEQ ID NO: 109	SEQ ID NO: 112
V _H -CDR2		SEQ ID NO: 110	SEQ ID NO: 113
V _H -CDR3		SEQ ID NO: 111	SEQ ID NO: 114
V _L -CDR1		SEQ ID NO: 115	SEQ ID NO: 117
V _L -CDR2		SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 83
V _L -CDR3		SEQ ID NO: 116	SEQ ID NO: 118

[0075] 在另一实施方案中,本发明的第一方面的结合分子包含对应于分别如SEQ ID NO: 76、77、78、82、83和84所定义的抗体13-1C10-1G9(本文中通常缩写为“1G9”)的CDR序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR,和/或抗体1G9的所述CAR的任何一个或多个的功能变体,且任选其中结合分子选自抗体和CAR。

[0076] 任选地,根据此实施方案的结合分子可包含(a)分别如SEQ ID NO: 76、77和78所定义的抗体13-1C10-1G9的V_H的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个;和/或(b)分别如SEQ ID NO: 82、83和84所定义的抗体13-1C10-1G9的V_L的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个。

[0077] 另外或替代地,在另一选项中,根据此实施方案的结合分子可包含:(a)至少一个V_H多肽,其包含分别具有SEQ ID NO: 76、77和78的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中至少一个V_H多肽包含SEQ ID NO: 68的序列、基本上由其组成或由其组成;和/或(b)至少一个V_L多肽,其包含分别具有SEQ ID NO: 82、83和84的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中V_L多肽包含SEQ ID NO: 72的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0078] 参考下文所描述的序列鉴别编号(SEQ ID NO),鉴别本文中的US28-13-1C10-1G9抗体的以下序列:

[0079]

1G9		DNA 序列	蛋白质序列
完整重链（包括前导序列）		SEQ ID NO: 147	SEQ ID NO: 149
完整轻链（包括前导序列）		SEQ ID NO: 148	SEQ ID NO: 150
V _H 链	未成熟	SEQ ID NO: 65	SEQ ID NO: 67
	成熟	SEQ ID NO: 66	SEQ ID NO: 68
V _L 链	未成熟	SEQ ID NO: 69	SEQ ID NO: 71
	成熟	SEQ ID NO: 70	SEQ ID NO: 72
V _H -CDR1		SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 76
V _H -CDR2		SEQ ID NO: 74	SEQ ID NO: 77
V _H -CDR3		SEQ ID NO: 75	SEQ ID NO: 78
V _L -CDR1		SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 82
V _L -CDR2		SEQ ID NO: 80	SEQ ID NO: 83
V _L -CDR3		SEQ ID NO: 81	SEQ ID NO: 84

[0080] 在另一实施方案中,本发明的第一方面的结合分子包含对应于分别如SEQ ID NO: 76、95、96、82、99和100所定义的抗体14-4E4-1E8(本文中通常缩写为“1E8”)的CDR序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR,和/或抗体1E8的所述CAR的任何一个或多个的功能变体,且任选其中结合分子选自抗体和CAR。

[0081] 任选地,根据此实施方案的结合分子可包含(a)分别如SEQ ID NO: 76、95和96所定义的抗体14-4E4-1E8的V_H的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个;和/或(b)分别如SEQ ID NO: 82、99和100所定义的抗体14-4E4-1E8的V_L的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个。

[0082] 另外或替代地,在另一选项中,根据此实施方案的结合分子可包含:(a)至少一个V_H多肽,其包含分别具有SEQ ID NO: 76、95和96的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中至少一个V_H多肽包含SEQ ID NO: 88的序列、基本上由其组成或由其组成;和/或(b)至少一个V_L多肽,其包含分别具有SEQ ID NO: 82、99和100的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中V_L多肽包含SEQ ID NO: 92的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0083] 参考下文所描述的序列鉴别编号(SEQ ID NO),鉴别本文中的US28-14-4E4-1E8抗体的以下序列:

[0084]

1E8		DNA 序列	蛋白质序列
完整重链（包括前导序列）		SEQ ID NO: 151	SEQ ID NO: 153
完整轻链（包括前导序列）		SEQ ID NO: 152	SEQ ID NO: 154
V _H 链	未成熟	SEQ ID NO: 85	SEQ ID NO: 87
	成熟	SEQ ID NO: 86	SEQ ID NO: 88
V _L 链	未成熟	SEQ ID NO: 89	SEQ ID NO: 91
	成熟	SEQ ID NO: 90	SEQ ID NO: 92
V _H -CDR1		SEQ ID NO: 73	SEQ ID NO: 76

[0085]	V _H -CDR2	SEQ ID NO: 93	SEQ ID NO: 95
	V _H -CDR3	SEQ ID NO: 94	SEQ ID NO: 96
	V _L -CDR1	SEQ ID NO: 79	SEQ ID NO: 82
	V _L -CDR2	SEQ ID NO: 97	SEQ ID NO: 99
	V _L -CDR3	SEQ ID NO: 98	SEQ ID NO: 100

[0086] 在另一实施方案中,本发明的第一方面的结合分子包含对应于以下共同CDR序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR(其中特定位置的置换氨基酸在括号中指示,且*指示该位置处不存在氨基酸):

[0087] (a) V_H-CDR1对应于S(Y/H)A(M/L)S(SEQ ID NO:167);

[0088] (b) V_H-CDR2对应于SISS(G/R)G(S/R)TYYPDSVKG(SEQ ID NO:168);

[0089] (c) V_H-CDR3对应于GG(S/T)(T/R/H)(M/H/Y)(I/S)(T/Y)(T/G)(G/N)(L/*)GF(A/D)(Y/F)(SEQ ID NO:169);

[0090] (d) V_L-CDR1对应于S(A/V)SSSVSYMH(SEQ ID NO:170);

[0091] (e) V_L-CDR2对应于D(T/S)SKLAS(SEQ ID NO:171);和/或

[0092] (f) V_L-CDR3对应于QQW(S/T/*)SN(*/*)PP(I/L)T(SEQ ID NO:172)。

[0093] 在另一实施方案中,本发明的第一方面的结合分子包含对应于以下共同CDR序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR(其中特定位置的置换氨基酸在括号中指示,且*指示该位置处不存在氨基酸):

[0094] (a) V_H-CDR1对应于S(Y/H)A(M/L)S(SEQ ID NO:167);

[0095] (b) V_H-CDR2对应于SISS(G/R)GRYYYPDSVKG(SEQ ID NO:174);

[0096] (c) V_H-CDR3对应于GG(S/T)(T/R/H)(M/H/Y)(I/S)(T/Y)(T/G)(G/N)GF(A/D)(Y/F)(SEQ ID NO:175);

[0097] (d) V_L-CDR1对应于S(A/V)SSSVSYMH(SEQ ID NO:170);

[0098] (e) V_L-CDR2对应于D(T/S)SKLAS(SEQ ID NO:171);和/或

[0099] (f) V_L-CDR3对应于QQW(T/*)SN(*/*)PPIT(SEQ ID NO:176)。

[0100] 如上文针对抗体US28-13-5G6-1D3、13-1C10-1C10、13-1H3-1A10、13-1C10-1G9、14-4E4-1E8中的任何一个所定义的V_H-CDR1、V_H-CDR2、V_H-CDR3、V_L-CDR1、V_L-CDR2和/或V_L-CDR3序列中的任何一个或多个的功能变体可任选分别包含如上文针对V_H-CDR1、V_H-CDR2、V_H-CDR3、V_L-CDR1、V_L-CDR2和/或V_L-CDR3所述的共有序列中的一个。

[0101] 对应于上述SEQ ID NO的序列在本申请的部分“序列”中给出,其在本申请中的实施例之后。

[0102] 在某些实施方案中,根据本发明的第一方面的结合分子可选自:

[0103] (a) 二价抗体,如IgG-scFv抗体(例如,其中第一结合结构域为完整IgG,且第二结合结构域为scFv,该scFv在IgG的轻链的N-末端和/或在轻链的C-末端和/或在重链的N-末端和/或在重链的C-末端处附接至该第一结合结构域,或反之亦然);

[0104] (b) 单价抗体,如 *DuoBody*[®] 或“臼包杵(knob-in-hole)”双特异性抗体(例如scFv-KIH、scFv-KIH^T、BiTE-KIH或BiTE-KIH^T);

[0105] (c) scFv₂-Fc抗体;

[0106] (d) 双特异性抗体,如双特异性T细胞接合子(BiTE)抗体;

- [0107] (e) 双重可变结构域 (DVD) - Ig 抗体;
- [0108] (f) 基于双亲和力再靶向 (DART) 的抗体 (例如, DART₂-Fc 或 DART);
- [0109] (g) 三特异性抗体, 如 DNL-Fab₃ 抗体;
- [0110] (h) scFv-HSA-scFv 抗体;
- [0111] (i) 单域抗体;
- [0112] (j) 仅重链 IgG (hcIgG), 如骆驼 IgG (例如 VHH 抗体) 和鲨鱼免疫球蛋白新抗原受体 (IgNAR), 及其单链抗体; 和
- [0113] (k) 嵌合抗原受体 (CAR), 其包含构成根据本发明的第一方面的结合分子、基本上由其组成或由其组成的胞外结构域, 例如包含此列表的选项 (a) 至 (h) 中的任何一个或其组合的胞外结构域。
- [0114] 另外或替代地, 根据本发明的第一方面的结合分子可选自:
- [0115] (i) 双特异性免疫细胞接合子抗体, 例如双特异性 T 细胞接合子 (BiTE), 且任选其中该 BiTE 抗体包含 CD3 结合结构域; 或
- [0116] (ii) 单克隆抗体, 任选重组单克隆抗体, 例如由 CHO 细胞重组产生的单克隆抗体。
- [0117] 本发明的第一方面还提供如上文所定义的结合分子的功能片段, 其中该功能片段:
- [0118] (a) 包含如前述技术方案中任一项的结合分子的抗原结合片段或其变体、融合体或衍生物或由其组成, 该抗原结合片段或其变体、融合体或衍生物选自: Fv 片段 (如单链 Fv 片段 (scFv) 或二硫键结合 Fv 片段)、Fab 样片段 (如 Fab 片段、Fab' 片段或 F(ab)₂ 片段) 和单域抗体 (dAb、包括单一形式和双重形式, 如 dAb-接头-dAb 和纳米抗体);
- [0119] (b) 提供如本文所定义的本发明的第一方面的结合分子的结合特征中的一种或多种;
- [0120] (c) 包含如本文所定义的本发明的第一方面的结合分子的 CDR 序列; 和/或
- [0121] (d) 包含如本文所定义的本发明的第一方面的结合分子的 V_H 和/或 V_L 序列。
- [0122] 本发明的第一方面的结合分子的融合还提供于本文中。举例而言, 提供如上文所定义的结合分子或如上文所定义的该结合分子的功能片段, 其中该结合分子或其功能片段包含融合多肽序列, 该融合多肽序列包含融合至第二氨基酸序列的第一氨基酸序列, 其中该第一氨基酸序列包含该结合分子或其功能片段的多肽链中的至少一个或由其组成, 且该第二氨基酸序列为融合伴侣。
- [0123] 在某些实施方案中, 本发明的第一方面的结合分子为嵌合抗原受体 (CAR) 或包含于该嵌合抗原受体内。因此, 本发明的第一方面还提供 CAR, 其包含:
- [0124] (i) 胞外结构域, 其中该胞外结构域包含以下或由以下组成: 如本文所定义的本发明的第一方面的结合分子或如本文所定义的该结合分子的功能片段;
- [0125] (ii) 跨膜结构域; 和
- [0126] (iii) 胞内结构域;
- [0127] 其中该 CAR 的胞外结构域具有对人巨细胞病毒 (HCMV) 的 US28 蛋白的胞外结构域 3 (ECD3) 内的表位的结合特异性, 和
- [0128] 其中该 US28 蛋白的 ECD3 包含存在于该 US28 蛋白中的氨基酸序列, 其位置对应于由如 SEQ ID NO: 5 中所阐述的人巨细胞病毒 (HCMV) 编码的 US28 蛋白的位置 167 至 183

[0129] 任选地,在所述CAR中:

[0130] (a) 该CAR的该胞外结构域对完全存在于HCMV的该US28蛋白的胞外结构域3(ECD3)内的表位具有结合特异性;

[0131] (b) 该CAR的该胞外结构域对该US28蛋白的ECD3内的线性表位具有结合特异性;

[0132] (c) 该CAR的该胞外结构域对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有HCMV病毒株不可知的结合特异性,例如对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有结合特异性,该结合特异性对选自以下的HCMV病毒株中的两种或更多种(如全部)为不可知的:DB、Towne、AD169、DAVIS、BL、JP、Merlin、PH、TB40/E、Toledo、VHL/E、TR和VR1814(FIX);和/或

[0133] (d) 该CAR的该胞外结构域对HCMV的该US28蛋白的ECD3内的表位具有特异性,无论该US28蛋白的该ECD3是否包含以下序列:

[0134] 如在由大部分HCMV病毒株编码的US28的ECD3中发现的TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7),或

[0135] 如在由少数HCMV病毒株编码的US28的ECD3中发现的TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)。

[0136] 在某些实施方案中,在根据本发明的第一方面的CAR中:

[0137] (a) CAR的胞外结构域包含对应于分别如SEQ ID NO:8、9、10、14、15和16所定义的抗体1D3的互补决定区(CDR)序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR,和/或抗体1D3的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体;

[0138] (b) 该CAR的该胞外结构域包含:

[0139] (i) 分别如SEQ ID NO:8、9和10所定义的抗体1D3的可变重链(V_H)的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个;和/或

[0140] (ii) 分别如SEQ ID NO:14、15和16所定义的抗体1D3的可变轻链(V_L)的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个;和/或

[0141] (c) CAR的胞外结构域包含:(i) 至少一个可变重链(V_H)多肽序列,其包含分别具有SEQ ID NO:8、9和10的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽序列包含SEQ ID NO:12的序列、基本上由其组成或由其组成;和/或(ii) 至少一个可变轻链(V_L)多肽序列,其包含分别具有SEQ ID NO:14、15和16的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:18的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0142] 在另一实施方案中,在根据本发明的第一方面的CAR中:

[0143] (a) CAR的胞外结构域包含对应于分别如SEQ ID NO:112、113、114、117、83和118所定义的抗体1C10的互补决定区(CDR)序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR,和/或抗体1C10的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体;

[0144] (b) 该CAR的该胞外结构域包含:

[0145] (i) 分别如SEQ ID NO:112、113和114所定义的抗体1C10的可变重链(V_H)的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个;和/或

[0146] (ii) 分别如SEQ ID NO:117、83和118所定义的抗体1C10的可变轻链(V_L)的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个;和/或

[0147] (c) CAR的胞外结构域包含：(i) 至少一个可变重链(V_H) 多肽序列，其包含分别具有SEQ ID NO:112、113和114的序列的CDR 1、2和3序列，且任选其中至少一个可变重链(V_H) 多肽序列包含SEQ ID NO:104的序列、基本上由其组成或由其组成；和/或(ii) 至少一个可变轻链(V_L) 多肽序列，其包含分别具有SEQ ID NO:117、83和118的序列的CDR 1、2和3序列，且任选其中可变轻链(V_L) 多肽包含SEQ ID NO:108的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0148] 在另一实施方案中，在根据本发明的第一方面的CAR中：

[0149] (a) CAR的胞外结构域包含对应于分别如SEQ ID NO:112、113、114、117、83和118所定义的抗体1A10的互补决定区(CDR) 序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR，和/或抗体1A10的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体；

[0150] (b) 该CAR的该胞外结构域包含：

[0151] (i) 分别如SEQ ID NO:112、113和114所定义的抗体1A10的可变重链(V_H) 的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个；和/或

[0152] (ii) 分别如SEQ ID NO:117、83和118所定义的抗体1A10的可变轻链(V_L) 的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个；和/或

[0153] (c) CAR的胞外结构域包含：(i) 至少一个可变重链(V_H) 多肽序列，其包含分别具有SEQ ID NO:112、113和114的序列的CDR 1、2和3序列，且任选其中至少一个可变重链(V_H) 多肽序列包含SEQ ID NO:122的序列、基本上由其组成或由其组成；和/或(ii) 至少一个可变轻链(V_L) 多肽序列，其包含分别具有SEQ ID NO:117、83和118的序列的CDR 1、2和3序列，且任选其中可变轻链(V_L) 多肽包含SEQ ID NO:126的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0154] 在另一实施方案中，在根据本发明的第一方面的CAR中：

[0155] (a) CAR的胞外结构域包含对应于分别如SEQ ID NO:76、77、78、82、83和84所定义的抗体1G9的互补决定区(CDR) 序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR，和/或抗体1G9的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体；

[0156] (b) 该CAR的该胞外结构域包含：

[0157] (i) 分别如SEQ ID NO:76、77和78所定义的抗体1G9的可变重链(V_H) 的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个；和/或

[0158] (ii) 分别如SEQ ID NO:82、83和84所定义的抗体1G9的可变轻链(V_L) 的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个；和/或

[0159] (c) CAR的胞外结构域包含：(i) 至少一个可变重链(V_H) 多肽序列，其包含分别具有SEQ ID NO:76、77和78的序列的CDR 1、2和3序列，且任选其中至少一个可变重链(V_H) 多肽序列包含SEQ ID NO:68的序列、基本上由其组成或由其组成；和/或(ii) 至少一个可变轻链(V_L) 多肽序列，其包含分别具有SEQ ID NO:82、83和84的序列的CDR 1、2和3序列，且任选其中可变轻链(V_L) 多肽包含SEQ ID NO:72的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0160] 在另一实施方案中，在根据本发明的第一方面的CAR中：

[0161] (a) CAR的胞外结构域包含对应于分别如SEQ ID NO:76、95、96、82、99和100所定义的抗体1E8的互补决定区(CDR) 序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR，和/或抗体1E8的所述CDR序列中的任何一个或多个的

功能变体；

[0162] (b) 该CAR的胞外结构域包含：

[0163] (i) 分别如SEQ ID NO:76、95和96所定义的抗体1E8的可变重链(V_H)的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个；和/或

[0164] (ii) 分别如SEQ ID NO:82、99和100所定义的抗体1E8的可变轻链(V_L)的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个；和/或

[0165] (c) CAR的胞外结构域包含：(i) 至少一个可变重链(V_H)多肽序列，其包含分别具有SEQ ID NO:76、95和96的序列的CDR 1、2和3序列，且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽序列包含SEQ ID NO:88的序列、基本上由其组成或由其组成；和/或(ii) 至少一个可变轻链(V_L)多肽序列，其包含分别具有SEQ ID NO:82、99和100的序列的CDR 1、2和3序列，且任选其中可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:92的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0166] 任选地，在该CAR中，胞外结构域为抗体，例如单链可变片段(scFv)。

[0167] 根据本发明的第一方面的CAR的跨膜结构域可例如包含蛋白质跨膜结构域，例如跨膜受体蛋白的跨膜结构域，且任选其中跨膜结构域包含选自以下的蛋白质的跨膜结构域：T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD8、CD45和CD4。

[0168] 根据本发明的第一方面的CAR的胞外结构域可例如通过铰链区连接至跨膜结构域。

[0169] 根据本发明的第一方面的CAR的胞内结构域可例如包含胞内信号传导结构域，例如其中：(a) 胞内信号传导结构域包含一种或多种基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM)；和/或(b) 胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 、Fc受体 γ 、Fc受体 β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的信号传导结构域。

[0170] 根据本发明的第一方面的CAR的胞内结构域可例如包含一个或多个共刺激结构域，例如：(a) 其中一个或多个共刺激结构域包括一个或多个自选自CD28、41BB、OX40、ICOS、CD27和DAP10的蛋白质获得的功能性信号传导结构域；(b) 其中胞内结构域掺入接近胞内信号传导结构域的共刺激结构域，(c) 其中胞内结构域包含两个或更多个共刺激结构域，例如两个串联共刺激结构域，和/或(d) 其中胞内结构域掺入单独细胞因子信号。

[0171] 根据本发明的第一方面的CAR可例如另外包含前导序列。

[0172] 本发明的第二方面提供核酸分子或多个不同核酸分子的组合，其中核酸分子包含，或多个不同核酸分子的组合共同包含一个或多个核酸序列，该一个或多个核酸序列单独地或以组合形式编码本发明的第一方面的结合分子，例如根据本发明的第一方面的抗体或CAR。

[0173] 本发明的第三方面提供一种载体，该载体包含(或多个不同载体的组合共同包含)根据本发明的第二方面的核酸分子或根据本发明的第二方面的多个不同核酸分子的组合。本发明的第三方面的载体或各载体可例如选自：逆转录病毒载体、质粒、慢病毒载体和腺病毒载体。

[0174] 任选地，根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合和/或根据本发明的第三方面的载体包含一个或多个额外序列，其中该额外序列或各额外序列编码一个或多个可选标记。

[0175] 本发明的第四方面提供一种细胞或细胞群(任选均质或异质细胞群)，其包含根据

本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合和/或根据本发明的第三方面的载体,任选其中细胞表达根据本发明的第一方面的一个或多个结合分子(如一个或多个抗体和/或一个或多个CAR),该一个或多个结合分子和/或CAR由根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合或根据本发明的第三方面的载体编码。所述细胞可任选选自经分离的细胞、离体细胞和体外细胞。

[0176] 根据本发明的第四方面的细胞可例如包含:(a)根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,其中所编码的结合分子为根据本发明的第一方面的抗体、该抗体的功能片段或具有包含融合多肽序列的该结合分子的功能片段的抗体;和/或(b)根据本发明的第三方面的载体,其中该载体包含如由此段落的选项(a)所定义的核酸分子或多个不同核酸分子的组合。

[0177] 根据本发明的第四方面的细胞可例如包含:(a)根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,其中所编码的结合分子为根据本发明的第一方面的CAR;和/或(b)根据本发明的第三方面的载体,其中该载体包含如由此段落的部分(a)所定义的核酸分子或多个不同核酸分子的组合。非限制性地,该细胞可例如选自:T细胞、自然杀伤(NK)细胞和巨噬细胞。因此,细胞可任选为CAR-T细胞、CAR-NK细胞或CAR巨噬细胞,且任选地,当细胞为CAR-T细胞时,则例如T细胞可选自:CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、效应T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、EBV特异性T细胞受体(TCR)或 $\gamma\delta$ -T细胞亚型。

[0178] 本发明的第四方面还提供一种细胞,其包含根据本发明的第一方面的结合分子和/或编码该结合分子的核酸,任选其中该核酸为分别如由本发明的第二或第三方面所定义的核酸或载体。举例而言,结合分子可为根据本发明的第一方面的抗体、根据本发明的第一方面的该抗体的功能片段或具有包含根据本发明的第一方面的融合多肽序列的该结合分子的功能片段的抗体,且任选其中该抗体为单克隆抗体,且进一步例如其中该细胞为重组表达单克隆抗体的哺乳动物细胞,如CHO细胞。

[0179] 本发明的第四方面还提供一种细胞,其包含根据本发明的第一方面的CAR和/或编码该CAR的核酸,任选其中该核酸为分别如由本发明的第二或第三方面所定义的核酸或载体。非限制性地,该细胞可例如选自:T细胞、自然杀伤(NK)细胞和巨噬细胞。因此,细胞可任选为CAR-T细胞、CAR-NK细胞或CAR巨噬细胞,且任选地,当细胞为CAR-T细胞时,则例如T细胞可选自:CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、效应T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、EBV特异性T细胞受体(TCR)或 $\gamma\delta$ -T细胞亚型。

[0180] 本发明的第五方面提供一种产生细胞,更特别是重组细胞或此类细胞的群体(任选均质或异质细胞群)的方法,该方法包含将根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合和/或根据本发明的第三方面的载体引入至细胞中。

[0181] 该方法任选进一步包含选择根据本发明的第五方面的细胞的步骤;例如自异质细胞群中选择所述细胞,由此产生富集和/或均质细胞群。该选择步骤可包括选择根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合中存在的一个或多个可选标记和/或根据本发明的第三方面的载体的存在。

[0182] 本发明的第六方面提供一种产生根据本发明的第一方面的结合分子,例如根据本发明的第一方面的抗体或CAR的方法,该方法包含:在细胞,更特别是,重组细胞或此类细胞的群体(任选地,均质或异质细胞群)中表达根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同

核酸分子的组合,和/或根据本发明的第三方面的载体。任选地,本发明的第六方面的方法还可包含以下步骤:自细胞分离如此产生的结合分子;举例而言,其中结合分子为根据本发明的第一方面的抗体、该抗体的功能片段或具有包含根据本发明的第一方面的融合多肽序列的该结合分子的功能片段的抗体。所述细胞可任选自经分离的细胞、离体细胞和体外细胞。

[0183] 本发明的第七方面提供通过本发明的第六方面的方法获得或可通过其获得的经分离的结合分子,任选其中该经分离的结合分子经进一步配制以用于向受试者施用。

[0184] 本发明的第八方面提供一种缀合物,该缀合物包含与如本发明的第一方面所定义的结合分子结合的部分,或与该结合分子的功能片段结合的部分。非限制性地,该部分可例如为治疗性、预防性、诊断性、预后性或治疗诊断性部分。在一些实施方案中,部分为药物(例如其中缀合物为抗体-药物缀合物(“ADC”))和/或放射性部分(例如其中缀合物适用于放射免疫疗法(“RIT”))。

[0185] 本发明的第九方面提供一种产生根据本发明第八方面的缀合物的方法,该方法包含以下步骤:

[0186] (a)提供如本发明的第一方面所定义的结合分子或该结合分子的功能片段;和

[0187] (b)使部分与该结合分子或与该结合分子的功能片段结合。

[0188] 本发明的第九方面的方法可另外包含分离如此产生的缀合物的步骤。经分离的缀合物可因此以分离形式,例如以如下组合物形式展现,其中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%或实质上100%(以摩尔比)的结合分子或该结合分子的功能片段以缀合物形式存在。另外或替代地,缀合物的经分离的形式可为如下组合物,其中至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%、99.9%或实质上100%(以摩尔比)的部分以缀合物形式存在。本发明的第九方面进一步提供经分离的缀合物或包含该经分离的缀合物的组合物。

[0189] 在本发明的第八方面的缀合物或本发明的第九方面的方法的某些优选实施方案中,结合分子为根据本发明的第一方面的抗体、该抗体的功能片段或具有包含根据本发明的第一方面的融合多肽序列的该结合分子的功能片段的抗体。

[0190] 本发明的第十方面提供一种通过本发明的第九方面的方法获得或可通过其获得的经分离的缀合物,任选其中该经分离的缀合物经进一步配制以用于向受试者施用。

[0191] 本发明的第十一方面提供一种对抗HCMV或与HCMV相关的疾病或病症的方法,该方法包括向受试者或离体细胞物质或体外细胞物质施用选自以下的任何一种或多种试剂:

[0192] i. 根据本发明的第一方面的结合分子,

[0193] ii. 根据本发明的第一方面的该结合分子的功能片段,

[0194] iii. 根据本发明的第七方面的经分离的结合分子,

[0195] iv. 根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,

[0196] v. 根据本发明的第三方面的载体,

[0197] vi. 根据本发明的第四方面的细胞,

[0198] vii. 根据本发明的第八方面的缀合物,和

[0199] viii. 根据本发明的第十方面的经分离的缀合物。

[0200] 换言之,本发明的第十一方面提供所述试剂中的一种或多种用于对抗受试者或离

体或体外细胞物质中与HCMV相关的疾病或病症。

[0201] 此外,本发明的第十一方面提供所述试剂中的一种或多种在制造药物中的用途,所述药物用于对抗受试者或离体或体外细胞物质中与HCMV相关的疾病或病症。

[0202] 根据本发明的第十一方面的待对抗的与HCMV相关的疾病或病症可为HCMV感染或与HCMV感染相关。在一个实施方案中,HCMV感染可为单株感染。任选地,在一个替代实施方案中,HCMV感染包含多株HCMV感染,其中多株HCMV感染包含用一种以上不同HCMV病毒株,例如编码不同US28蛋白序列的两个或更多个HCMV病毒株进行感染。该两个或更多个病毒株可编码US28蛋白,所述蛋白质在一种或多种胞外区上不同,如N-末端(ECD1)区、第一胞外环(ECD2)区、第二胞外环(ECD3)区和/或第三胞外环(ECD4)区。在一个感兴趣的实施方案中,多株HCMV感染中的两个或更多个HCMV病毒株各自编码至少在N-末端(ECD1)区的一个或多个位置上彼此不同的US28蛋白;例如其在N-末端(ECD1)区中的1、2、3、4、5、6、8、9、10或更多个氨基酸位置处可不同。另外或替代地,在另一个感兴趣的实施方案中,多株HCMV感染中的两个或更多个HCMV病毒株各自编码在第二胞外(ECD3)区的一个或多个位置处彼此不同的US28蛋白,例如,HCMV病毒株中的一种或多种在多株HCMV感染中可编码如下US28蛋白,该蛋白质编码ECD3的4N变体,且其他HCMV病毒株中的一种或多种在多株HCMV感染中可编码如下US28蛋白,该蛋白质编码ECD3的4D变体。

[0203] 根据本发明的第十一方面的待对抗的与HCMV相关的疾病或病症可为潜伏HCMV感染(例如,单株或多株潜伏HCMV感染)或与潜伏HCMV感染(任选地,多株潜伏HCMV感染)相关。

[0204] 根据本发明的第十一方面的待对抗的与HCMV相关的疾病或病症可为裂解HCMV感染(任选为多株裂解HCMV感染)或与裂解HCMV感染(任选为多株裂解HCMV感染)相关。

[0205] 根据本发明第十一方面的待对抗的与HCMV相关联的疾病或病症可为先天性HCMV感染(例如,单株或多株感染),如潜伏先天性单株或多株HCMV感染或裂解先天性单株或多株HCMV感染;

[0206] 根据本发明的第十一方面的待对抗的与HCMV相关的疾病或病症可为癌症,例如HCMV感染癌症(任选单株或多株HCMV感染癌症),如潜伏HCMV感染癌症(任选单株或多株潜伏HCMV感染癌症)。

[0207] 根据本发明的第十一方面的待对抗的与HCMV相关联的疾病或病症可为上皮癌;任选其中该上皮癌为乳腺癌;例如,其中该乳腺癌为三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2-阳性乳腺癌。HER2阳性乳腺癌可例如为HER2+HR-(其中HR-是指激素受体-阴性,且是指雌激素受体阴性(ER-)和孕酮受体阴性(PR-)状态);或HER2+ER+PR-;或HER2+ER-PR+;或作为HER2+ER+PR+的三阳性形式的乳腺癌“TPBC”。应注意HER2+HR-为特定侵袭形式的乳腺癌且对于根据本发明的诊断治疗而言受到高度关注。该形式的上皮癌可任选为单株或多株形式的HCMV感染上皮癌,例如潜伏HCMV感染形式的上皮癌(任选单株或多株潜伏HCMV感染癌症)。

[0208] 根据本发明第十一方面的待对抗的与HCMV相关的疾病或病症可为转移和/或侵袭形式的癌症。所述形式的转移和/或侵袭癌症可任选为单株或多株形式的HCMV感染的转移和/或侵袭癌症,例如潜伏HCMV感染形式的转移和/或侵袭癌症(任选单株或多株潜伏HCMV感染癌症)。

[0209] 在一些实施方案中,根据本发明第十一方面的待对抗的与HCMV相关的疾病或病症可为胶质母细胞瘤。在本文所述的其他实施方案中,该疾病或病症不为胶质母细胞瘤和/或

该待处理的受试者不具有和/或尚未被诊断为患有胶质母细胞瘤。

[0210] 在一些实施方案中,根据本发明第十一方面的待处理的受试者(或离体或体外细胞物质)可能具有和/或已被诊断有或具有HCMV感染癌细胞,如潜伏HCMV感染癌细胞。

[0211] 在一些实施方案中,根据本发明第十一方面的待处理的受试者可为或旨在为细胞物质(如细胞产物捐献)的受体。所述细胞产物可例如包含离体活细胞物质、基本上由其组成或由其组成,该离体活细胞物质选自:一种或多种类型的离体细胞;一种或多种类型的离体细胞培养物;一种或多种类型的离体组织;一种或多种类型的离体组织培养物;一种或多种类型的离体器官;和/或一种或多种类型的离体器官培养物。任选地,细胞产物可直接或间接来源于活的供体。

[0212] 在一些实施方案中,根据本发明第十一方面的待处理的受试者可为或旨在为细胞物质的供体,如细胞产物的供体。该细胞产物可包含来自该供体的细胞、组织或器官中的任何一种或多种、基本上由其组成或由其组成。

[0213] 在一些实施方案中,根据本发明第十一方面的待处理的离体或体外细胞物质可为离体细胞产物。所述离体细胞产物可例如包含离体活细胞物质、基本上由其组成或由其组成,该离体活细胞物质选自:一种或多种类型的离体细胞;一种或多种类型的离体细胞培养物;一种或多种类型的离体组织;一种或多种类型的离体组织培养物;一种或多种类型的离体器官;和/或一种或多种类型的离体器官培养物。任选地,细胞产物可直接或间接来源于活的供体。

[0214] 在一个实施方案中,根据本发明第十一方面的待使用的一种或多种试剂可例如选自(或包括选自以下的一种或多种试剂):

[0215] i. 如由本发明的第一方面所定义的治疗性抗体,

[0216] ii. 如由本发明的第一方面所定义的该治疗性抗体的功能片段,

[0217] iii. 包含如由本发明的第一方面所定义的融合多肽序列的治疗性抗体;和

[0218] iv. 包含如由本发明的第一方面所定义的融合多肽序列的该治疗性抗体的功能片段。

[0219] 举例而言,根据本发明第十一方面使用的一种或多种试剂可为(或包括选自以下的一种或多种试剂)如由本发明的第一方面所定义的双特异性抗体。非限制性地,此可以为双特异性免疫细胞接合子抗体。其示例性实施方案为双特异性T细胞接合子(BiTE)抗体,任选其中除了包含对US28蛋白的ECD3区具有结合特异性的本发明的第一方面的结合分子的区以外,BiTE抗体进一步包含T细胞衔接结构域,如CD3结合结构域。

[0220] 在另一实施方案中,根据本发明第十一方面的待使用的一种或多种试剂可例如为(或包括)根据本发明第八方面和/或本发明第十方面的缀合物,如作为抗体-药物缀合物(“ADC”)的缀合物,或包含放射性部分的缀合物,如适用于放射免疫疗法(“RIT”)的缀合物。

[0221] 在另一实施方案中,根据本发明第十一方面的待使用的一种或多种试剂可例如为(或包括)细胞(或细胞群,例如均质细胞群),其中该细胞或各细胞包含根据本发明第四方面的CAR。该细胞或细胞群通常经分离和/或配制以用于向受试者施用。该细胞或各细胞可例如包含根据本发明的第一方面的CAR和/或编码该CAR的核酸,任选其中该核酸为分别如由本发明的第二或第三方面所定义的核酸或载体。该细胞或各细胞可例如为根据本发明的第四方面的细胞。非限制性地,该一种或多种细胞可例如选自:T细胞、自然杀伤(NK)细胞和

巨噬细胞。因此,细胞可任选为CAR-T细胞、CAR-NK细胞或CAR巨噬细胞,且任选地,当细胞为CAR-T细胞时,则例如T细胞可选自:CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、效应T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、EBV特异性T细胞受体(TCR)或 $\gamma\delta$ -T细胞亚型。

[0222] 任选地,根据本发明的第十一方面,可向受试者施用另一物质,如另一治疗性、预防性、诊断性、预后性或治疗诊断性物质,且任选其中该另一物质可分别、依次或与一种或多种试剂中的每一者同时施用。

[0223] 因此,本发明的第十一方面还提供一种治疗有需要的受试者的方法,其为通过向受试者施用治疗性、预防性、诊断性、预后性或治疗诊断性物质执行,其中还分别、依次(例如之前或之后)或同时用一种或多种试剂中的任一种治疗受试者。

[0224] 在同时治疗的实施方案中,接着根据本发明第十一方面使用的一种或多种试剂可与治疗性、预防性、诊断性、预后性或治疗诊断性物质组合配制和/或施用;或可分开配制但作为两种单独配制物同时施用。

[0225] 举例而言,在一个实施方案中,待治疗的疾病或病症可为一种形式的癌症(如一种或多种形式如上文所公开的癌症),且可使其他治疗性、预防性、诊断性、预后或治疗诊断物质靶向癌症。

[0226] 本发明的第十二方面提供一种用于药物的试剂,其中该试剂选自:

[0227] i. 根据本发明的第一方面的结合分子,

[0228] ii. 如本发明的第一方面所定义的该结合分子的功能片段,

[0229] iii. 根据本发明的第七方面的经分离的结合分子,

[0230] iv. 根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,

[0231] v. 根据本发明的第三方面的载体,

[0232] vi. 根据本发明的第四方面的细胞,

[0233] vii. 根据本发明的第八方面的缀合物,和

[0234] viii. 根据本发明的第十方面的经分离的缀合物。

[0235] 就本发明的第十一方面而言,该试剂可例如为如上文所定义的试剂。

[0236] 本发明的第十三方面提供一种肽或多肽,其包含序列TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)、基本上由其组成或由其组成,或包含SEQ ID NO:6的免疫原性片段的序列。该肽或多肽并非US28蛋白。优选地,该肽或多肽中仅有US28衍生的序列为SEQ ID NO:6的序列或SEQ ID NO:6的免疫原性片段的序列。

[0237] 本发明的第十四方面提供一种肽或多肽,其包含序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7)、基本上由其组成或由其组成,或包含SEQ ID NO:7的免疫原性片段的序列。该肽或多肽并非US28蛋白。优选地,该肽或多肽中仅有US28衍生的序列为SEQ ID NO:7的序列或SEQ ID NO:7的免疫原性片段的序列。

[0238] 分别根据本发明的第十三或第十四方面,参考序列SEQ ID NO:6或7的免疫原性片段包含少于参考序列的全序列,且优选包含参考序列的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个连续氨基酸。

[0239] 在一个实施方案中,本发明的第十三和/或第十四方面的肽或多肽的免疫原性片段包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:与SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7共有的且存在于所述序列内的序列。

[0240] 本发明的第十三和第十四方面还提供肽或多肽,其包含以下、由以下组成或基本上由以下组成:分别选自TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)或TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7)的参考序列的免疫原性片段或变体,其中该免疫原性片段或变体包含与如本文所描述的抗体1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8中的任一种所结合的US28的ECD3内的表位的序列(其中还包括scFv,其包含具有分别如SEQ ID NO:12、104、122、68和88所定义的1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的V_H序列的V_H多肽序列,以及如包含具有分别如SEQ ID NO:18、108、126、72和92所定义的1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的V_L序列的V_L多肽序列)。优选地,所述肽或多肽由1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8特异性结合。

[0241] 本发明的第十五方面提供至少两种不同肽和/或多肽的组合,其包含第一肽或多肽和第二肽或多肽,其中:

[0242] 第一肽或多肽包含序列TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)或其免疫原性片段、基本上由其组成或由其组成,如由本发明的第十三方面所定义的免疫原性片段,条件为该免疫原性片段至少包含SEQ ID NO:6的4N氨基酸;和

[0243] 第二肽或多肽包含序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7)或其免疫原性片段、基本上由其组成或由其组成,如由本发明的第十四方面所定义的免疫原性片段,条件为该免疫原性片段至少包含SEQ ID NO:7的4D氨基酸、基本上由其组成或由其组成。

[0244] 本发明的第十六方面提供一种融合蛋白,其包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:直接或经由一个或多个接头氨基酸序列融合至第二氨基酸序列的第一氨基酸序列,其中第一氨基酸序列为如由本发明的第十三或第十四方面所定义的肽或多肽的序列;且第二氨基酸序列为融合伴侣。

[0245] 任选地,融合伴侣为载体蛋白质,如经选择以提供适合于针对第一氨基酸序列进行免疫接种和产生抗体的融合蛋白的载体蛋白质。举例而言,载体蛋白质可选自:钥孔血蓝蛋白(KLH)、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白(OVA)、破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、经遗传修饰的白喉类毒素的交叉反应材料(CRM)、脑膜炎球菌外膜蛋白复合物(OMPC)和流感嗜血杆菌蛋白质D(HiD)。

[0246] 本发明的第十七方面提供至少两种不同融合蛋白的组合,所述融合蛋白包含第一融合蛋白和第二融合蛋白,其中:

[0247] 根据本发明的第十六方面的第一融合蛋白包含作为第一融合蛋白的第一氨基酸序列的序列,该序列包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:序列TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)或其免疫原性片段或变体,条件为该免疫原性片段或变体包括SEQ ID NO:6的4N氨基酸;和

[0248] 根据本发明的第十六方面的第二融合蛋白包含作为第二融合蛋白的第一氨基酸序列的序列,该序列包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7)或其免疫原性片段或变体,条件为该免疫原性片段或变体包括SEQ ID NO:7的4D氨基酸。

[0249] 本发明的第十八方面提供一种缀合物,其包含与如由本发明的第十三和第十四方面中的任一者或两者所定义的肽或多肽结合的部分,或与如由本发明的第十六方面所定义的融合蛋白结合的部分。

[0250] 该缀合物的部分可直接结合至如本发明的第十三和第十四方面中的任一者或两

者所定义的肽或多肽,或结合至如本发明的第十六方面所定义的融合蛋白。替代地,该缀合物的部分可如经由接头而与如由本发明的第十三和第十四方面中的任一者或两者所定义的肽或多肽或与如由本发明的第十六方面所定义的融合蛋白间接结合。

[0251] 任选地,该部分可为载体,例如载体蛋白,如选自以下的载体:钥孔血蓝蛋白(KLH)、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白(OVA)、破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、经遗传修饰的白喉类毒素的交叉反应材料(CRM)、脑膜炎球菌外膜蛋白复合物(OMPC)和流感嗜血杆菌蛋白质D(HiD)。

[0252] 本发明的第十九方面提供至少两种不同缀合物的组合,其中该组合包含:

[0253] 根据本发明的第十八方面的第一缀合物,其中该第一缀合物包含与肽或多肽结合的部分、基本上由其组成或由其组成,其中该肽或多肽包含序列TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)或其免疫原性片段或变体、基本上由其组成或由其组成,条件为该免疫原性片段或变体包括SEQ ID NO:6的4N氨基酸;和

[0254] 根据本发明的第十八方面的第二缀合物,其中第二缀合物包含与肽或多肽结合的部分、基本上由其组成或由其组成,其中该肽或多肽包含序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7)或其免疫原性片段或变体、基本上由其组成或由其组成,条件为该免疫原性片段或变体包括SEQ ID NO:7的4D氨基酸。

[0255] 本发明的第二十方面提供一种产生根据本发明的第十九方面的缀合物的方法,该方法包含以下步骤:

[0256] (a) 提供如本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者所定义的肽或多肽、如本发明的第十五方面所定义的其组合或如本发明的第十六方面所定义的融合蛋白;和

[0257] (b) 将部分与其结合。

[0258] 本发明的第二十一方面提供一种产生如由本发明的第十九方面所定义的至少两种不同缀合物的组合的方法。

[0259] 在一个实施方案中,该方法包含以下步骤:(a) 通过根据本发明的第二十方面的方法提供或产生如由本发明的第十八方面所定义的第一缀合物;(b) 通过根据本发明的第二十方面的方法提供或产生如由本发明的第十八方面所定义的第二缀合物(其中第一缀合物与第二缀合物不同);和(c) 组合第一和第二缀合物,由此形成根据本发明的第十九方面的组合。

[0260] 在另一实施方案中,该方法包含以下步骤:(a) 提供根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合,或根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合;和(b) 使部分与根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合结合,或与根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合结合,由此形成根据本发明的第十九方面的组合。

[0261] 本发明的第二十或第二十一方面的方法任选包含分离如此产生的缀合物或缀合物的组合的步骤。

[0262] 本发明的第二十二方面提供通过本发明的第二十或第二十一方面中的任一者的方法获得或可通过其获得的经分离的缀合物或缀合物的组合,任选其中该经分离的缀合物经进一步配制以用于向受试者施用。

[0263] 本发明的第二十三方面提供核酸分子或多个不同核酸分子的组合,其中核酸分子包含,或多个不同核酸分子的组合共同地包含一个或多个核酸序列,该一个或多个核酸序列单独地或以组合形式编码根据本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者的一种或多种肽和/或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六方面的融合蛋白和/或根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合。

[0264] 根据本发明的第二十三方面的核酸分子或各核酸分子可例如各自独立地选自DNA或RNA分子。根据本发明的第二十三方面的核酸分子或各核酸分子可例如各自独立地选自单链或双链核酸分子。

[0265] 本发明的第二十四方面提供一种载体,其包含根据本发明的第二十三方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合。可使用任何载体,尽管(但不限于)该载体可任选自:逆转录病毒载体、质体、慢病毒载体和腺病毒载体。

[0266] 本发明的第二十五方面提供一种细胞,其包含根据本发明的第二十三方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合或根据本发明的第二十四方面的载体。任选地,该细胞表达选自本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者的一种或多种肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六方面的融合蛋白和/或根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合。

[0267] 本发明的第二十六方面提供一种细胞,其暴露于和/或包含一个或多个选自本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者的肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六方面的融合蛋白和/或根据本发明第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合、根据本发明的第十八方面的缀合物、根据本发明的第十九方面的至少两种不同缀合物的组合、根据本发明的第二十三方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合和/或根据本发明的第二十四方面的载体。

[0268] 本发明的第二十七方面提供一种分离和/或富集包含T细胞受体(TCR)的细胞的方法,该T细胞受体对US28的ECD3中的表位具有特异性(例如天然存在的T细胞,或表达根据本发明的第一方面的CAR的重组细胞,例如CAR T细胞、CAR NK细胞和/或CAR巨噬细胞),其中该方法包含使用一种或多种试剂分离和/或富集对SEQ ID NO:6和/或7的序列中的一个或两个具有结合特异性的细胞的步骤,

[0269] 其中一种或多种试剂为或选自:根据本发明的第十三和/或第十四方面中任一者或两者的肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六方面的融合蛋白和/或根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合、根据本发明的第十八方面的缀合物和/或根据本发明的第十九方面的至少两种不同缀合物的组合。

[0270] 在本发明的第二十七方面的方法的一个实施方案中,可将序列配制为MHC四聚体,例如用于抗原特异性CD8⁺ T细胞检测的I类MHC四聚体、用于抗原特异性CD4⁺ T细胞检测的II类MHC四聚体或用于流式细胞术或荧光显微术的荧光团标记四聚体。任选地,T细胞可选自:CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、效应T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、EBV特异性T细胞受体(TCR)或 $\gamma\delta$ -T细胞亚型。

[0271] 本发明的第二十八方面提供一种MHC四聚体,其包含根据本发明的第十三和/或第

十四方面中的任一者或两者的肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合,任选其中该肽或各肽包含或对应于SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7,或任一者或两者的免疫原性片段,例如其中该MHC四聚体为用于抗原特异性CD8⁺ T细胞检测的I类MHC四聚体、用于抗原特异性CD4⁺ T细胞检测的II类MHC四聚体、用于流式细胞术或荧光显微术的荧光团标记四聚体。MHC四聚体可进一步用于分离和/或富集包含对US28的ECD3中的表位具有特异性的T细胞受体(TCR)的细胞,例如选自以下的T细胞:CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、效应T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、EBV特异性T细胞受体(TCR)或 $\gamma\delta$ -T细胞亚型和/或表达根据本发明的第一方面的CAR的重组细胞,例如CAR T细胞、CAR NK细胞和/或CAR巨噬细胞。

[0272] 本发明的第二十九方面提供适用于针对与人巨细胞病毒(HCMV)相关的疾病或病症进行接种疫苗、降低该疾病或病症的风险、预防该疾病或病症或对抗该疾病或病症的疫苗组合物。疫苗可为主动或被动疫苗。根据本发明的第二十九方面的主动疫苗可触发针对存在于HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位的免疫反应。根据本发明的第二十九方面的被动疫苗可为提供针对表位的免疫反应的组合物,该表位存在于HCMV的US28蛋白的ECD3内。如上文所述,在本发明的其他方面的情况下,US28蛋白的ECD3包含存在于由HCMV的病毒株编码的位于如下位置处的US28蛋白中的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,所述位置对应于由如SEQ ID NO:5中所阐述的人巨细胞病毒(HCMV)的DB病毒株编码的US28蛋白的位置167至183。

[0273] 在一些实施方案中,本发明的第二十九方面的疫苗组合物针对以下触发和/或提供免疫反应:

[0274] (a)完全存在于HCMV的该US28蛋白的胞外结构域3(ECD3)内的一个或多个表位;

[0275] (b)该US28蛋白的ECD3内的一个或多个线性表位;

[0276] (c) HCMV的US28蛋白的ECD3内的一个或多个表位,其为以相同形式存在于HCMV的所述4D变异株和所述4N变异株两者中的一个表位或多个表位,其中HCMV的该4D变异株编码包含具有TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7)的序列的ECD3的US28蛋白,且其中HCMV的该4N变异株编码包含具有TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)的序列的ECD3的US28蛋白;和/或

[0277] (d)其中由该疫苗触发或提供的该免疫反应对HCMV的所述4D变异株和所述4N变异株为HCMV病毒株不可知的,且触发和/或提供针对选自Towne、VR1814、TB40/E、Merlin、JP、Ad169、VHL/E、BL、AF1和DAVIS的所述4D变异HCMV病毒株中的一种或多种且还针对选自Toledo、TR和DB的所述4N变异HCMV病毒株中的一种或多种的免疫反应。

[0278] 该疫苗组合物可为被动疫苗,和/或任选包含:(a)根据本发明的第一方面的一个或多个结合分子,(b)如由本发明的第一方面所定义的该一个或多个结合分子的功能片段,(c)根据本发明的第七方面的一个或多个经分离的结合分子,(d)根据本发明的第二方面的一个或多个核酸分子或多个不同核酸分子的组合,(e)根据本发明的第三方面的一种或多种载体,(f)根据本发明的第四方面的一种或多种细胞,(g)根据本发明的第八方面的一种或多种缀合物,和/或(h)根据本发明的第十方面的一种或多种经分离的缀合物。

[0279] 替代地,该疫苗组合物可为主动疫苗,和/或任选包含:

[0280] (a)根据本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者的一种或多种肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六

方面的融合蛋白、根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合、根据本发明的第十八方面的缀合物和/或根据本发明的第十九方面的至少两种不同缀合物的组合；

[0281] (b) 根据本发明的第二十三方面的一个或多个核酸分子或多个不同核酸分子的组合和/或根据本发明的第二十四方面的载体；和/或

[0282] (c) 细胞，如抗原呈递细胞（例如树突状细胞），或所述细胞的均质或异质群体，其中所述细胞或所述细胞中的每一种负载有以下中的一种或多种：根据本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者的肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六方面的融合蛋白、根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合、根据本发明的第十八方面的缀合物、根据本发明的第十九方面的至少两种不同缀合物的组合、根据本发明的第二十三方面的一个或多个核酸分子或多个不同核酸分子的组合和/或根据本发明的第二十四方面的载体。

[0283] 本发明的第三十方面提供一种针对与HCMV有关的疾病或病症进行疫苗接种、降低该疾病或病症的风险、预防该疾病或病症和/或对抗该疾病或病症的方法，该方法包含向受试者施用根据本发明的第二十九方面的疫苗。

[0284] 本发明的第三十方面提供根据本发明的第二十九方面的疫苗，其用于针对受试者的与HCMV有关的疾病或病症进行疫苗接种、降低该疾病或病症的风险、预防该疾病或病症和/或对抗该疾病或病症。

[0285] 本发明的第三十方面提供根据本发明的第二十九方面的疫苗的用途，其用于制造供针对与HCMV有关的疾病或病症进行疫苗接种、降低该疾病或病症的风险、预防该疾病或病症和/或对抗该疾病或病症用的药物。

[0286] 与HCMV相关的该疾病或病症可例如为如上文在本发明第十一方面的情况下所公开的和HCMV相关的疾病或病症。任选地，疾病或病症为潜伏HCMV感染，或为与潜伏HCMV感染相关的疾病或病症。

[0287] 在一些实施方案中，针对与HCMV有关的疾病或病症进行疫苗接种、降低该疾病或病症的风险、预防该疾病或病症和/或对抗该疾病或病症的方法可包含仅向受试者施用疫苗一次。

[0288] 在其他实施方案中，针对与HCMV有关的疾病或病症进行疫苗接种、降低该疾病或病症的风险、预防该疾病或病症和/或对抗该疾病或病症的方法可包含向受试者施用疫苗两次或多次。举例而言，在其中疫苗为主动疫苗的实施方案中，可适于向受试者分别施用初始剂量和后续加强剂量。

[0289] 本发明的第三十一方面提供一种评定受试者和/或离体生物材料的一种或多种生物条件和/或生物特征的方法，其中该方法包含：(a) 使受试者和/或离体生物材料与例如如由本发明的第一方面所定义的结合分子或例如如由本发明的第八方面或第十方面所定义的缀合物接触；和(b) 基于结合分子或缀合物与受试者和/或离体生物材料的结合的直接和/或间接测量来评定受试者和/或离体生物材料。

[0290] 在一些实施方案中，评定（其可包括诊断）受试者和/或离体生物材料的一个或多个生物条件和/或生物特征的方法为通过原位杂交（ISH）特异性检测由HCMV编码的一个或多个核酸序列来进行，最优选其中该ISH不检测由健康（即不经HCMV感染）受试者和/或健康离体生物材料编码的核酸序列。借助于非限制性实例，ISH可使用如本申请的实施例中所论

述的核酸序列。在一些实施方案中,该生物病症为癌症和/或所述生物特征为关于癌症。在一些实施方案中,该癌症选自本文所指定的癌症中的一种或多种,任选其中该癌症不为胶质母细胞瘤。在一些实施方案中,癌症选自:乳腺癌(例如HER2+乳腺癌或三阴性乳腺癌)、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、肾上腺皮质癌、肾癌、心脏肉瘤、肝癌和血管平滑肌癌;任选其中该癌症不为胶质母细胞瘤。

[0291] 在一些实施方案中,评定(其可包括诊断)受试者和/或离体生物材料的一种或多种生物病症和/或生物特征的方法为通过免疫组织化学(IHC)特异性检测由HCMV编码的一个或多个蛋白质序列来进行,最优选其中该IHC不检测由健康(即不感染HCMV)受试者和/或健康离体生物材料编码的蛋白质序列。在一些实施方案中,IHC使用结合分子,其允许特异性检测仅由潜伏HCMV感染表达或仅由其表面表达的一种或多种蛋白质序列。在一些实施方案中,IHC使用结合分子,其允许特异性检测一个或多个仅由裂解HCMV感染表达或仅由其表面表达的蛋白质序列。在一些实施方案中,IHC使用结合分子,其允许特异性检测由裂解和潜伏HCMV感染两者表达,例如由其表面表达的一个或多个蛋白质序列。在一些实施方案中,可以执行IHC(例如使用尚未透性化细胞的生物组织)以仅允许检测细胞表面表达的蛋白质。在其他实施方案中,可以执行IHC(例如使用已透性化细胞的生物组织)以允许检测细胞内蛋白质。作为非限制性实例,IHC可以使用基于抗体的分子特异性检测如本申请的实施例中所论述的由HCMV编码的一个或多个蛋白质序列,和/或使用本发明的结合分子中的一种或多种。在一些实施方案中,该生物病症为癌症和/或所述生物特征与癌症相关。在一些实施方案中,该癌症选自本文所指定的癌症中的一种或多种,任选其中该癌症不为胶质母细胞瘤。在一些实施方案中,癌症选自:乳腺癌(例如HER2+乳腺癌或三阴性乳腺癌)、星形细胞瘤、胶质母细胞瘤、肾上腺皮质癌、肾癌、心脏肉瘤、肝癌和血管平滑肌癌;任选其中该癌症不为胶质母细胞瘤。

[0292] 其中已由本发明的第三十二方面确诊HCMV感染为阳性的受试者和/或活的离体生物材料可为可根据如本文所描述的本发明的其他方面处理的示例性受试者和/或材料。

[0293] 本发明的第三十二方面提供一种对抗活的离体生物材料的HCMV感染(如潜伏HCMV感染和/或裂解HCMV感染和/或多株HCMV感染)的方法,该方法包括使活的离体生物材料与选自以下的任一种或多种试剂接触:

[0294] i. 根据本发明的第一方面的结合分子,

[0295] ii. 如本发明的第一方面所定义的该结合分子的功能片段,

[0296] iii. 根据本发明的第七方面的经分离的结合分子,

[0297] iv. 根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,

[0298] v. 根据本发明的第三方面的载体,

[0299] vi. 根据本发明的第五方面的细胞,

[0300] vii. 根据本发明的第八方面的缀合物,和

[0301] viii. 根据本发明的第十方面的经分离的缀合物。

[0302] 本发明的第三十二方面还提供通过此方面的方法获得或可通过其获得的活的离体生物材料。

[0303] 在本发明的第三十二方面的方法和/或由此获得或可由此获得的活的离体生物材料的一个实施方案中,该离体活生物材料包含选自以下的活的离体生物材料、基本上由其

组成或由其组成：一种或多种类型的离体细胞；一种或多种类型的离体细胞培养物；一种或多种类型的离体组织；一种或多种类型的离体组织培养物；一种或多种类型的离体类器官；一种或多种类型的离体类器官培养物；一种或多种类型的离体器官；和/或一种或多种类型的离体器官培养物。

[0304] 本发明的第三十三方面提供一种治疗有需要的受试者的方法，其包含向受试者施用如本发明的第三十二方面所定义的离体活生物材料。

[0305] 举例而言，该方法可为移植离体活生物材料，如器官移植或组织移植的方法。该方法可用于预防移植受体的HCMV传播和感染或与HCMV感染相关的疾病或病症，或降低其风险。

[0306] 本发明的第三十四方面提供一种筛选对人巨细胞病毒 (HCMV) 的US28蛋白的胞外结构域3 (ECD3) 内的表位具有结合特异性和/或结合亲和力的结合分子的方法，该方法包括：

[0307] (a) 提供一种或多种肽，其对应于US28蛋白的ECD3中存在的氨基酸序列，

[0308] (b) 提供一种或多种候选结合分子；

[0309] (c) 测定一种或多种候选结合分子对该一种或多种肽的结合特异性和/或结合亲和力。

[0310] 本发明的第三十五方面提供一种产生包含结合分子的多个复本的组合物的方法，该方法包含使得所选候选结合分子复制，该候选结合分子已根据本发明的第三十四方面的方法经选择。

[0311] 本发明的第三十六方面提供一种评定所选候选结合分子的方法，该结合分子已根据本发明的第三十四方面的方法经选择和/或根据本发明的第三十五方面的方法产生，该方法包括并鉴别所选候选结合分子内的结构，该结构提供该候选结合分子结合特征（特别是，与人巨细胞病毒 (HCMV) 的US28蛋白的胞外结构域3 (ECD3) 内的表位的结合特异性和/或结合亲和力），例如通过鉴别作为抗体或CAR的所选候选结合分子中的该CDR序列或各CDR序列。

[0312] 本发明的第三十七方面提供一种产生组合物的方法，该组合物包含对人巨细胞病毒 (HCMV) 的US28蛋白的胞外结构域3 (ECD3) 内的表位具有结合特异性和/或结合亲和力的结合分子的多个复本，其中根据本发明的第三十六方面的方法，该结合分子包含已在所选候选结合分子内经鉴别为提供其结合特征的结构（例如CDR序列）或此（类）结构中的每一种，该方法包括使结合分子复制。

[0313] 本发明的第三十七方面进一步提供通过相同方面获得的结合分子的组合物。

附图说明

[0314] 图1. 使用蛋白质印迹分析通过使用抗HIS Ab验证经转化CHO-US28-A1细胞中的US28蛋白表达。自左侧起，第一列：梯带，第二列：来自CHO对照细胞的蛋白质提取物，第三列：来自CHO-US28-A1细胞的蛋白质提取物，和第四列：6HIS阳性对照。经转染至CHO-US28-A1细胞中的US28-A1构建体的C-末端部分含有6HIS标签。当与梯带相比时，用结合于6HIS标签上的抗HIS抗体的染色以~41kDa标记出特定条带，其与HCMV US28蛋白的先前报导的尺寸等同。在图片中圈出的此条带未出现于对照CHO细胞中，因此验证了US28在经转染的CHO-

US28-A1细胞中但不在对照CHO细胞中表达。6HIS阳性对照为阳性,指示6HIS Ab如所预期结合至其目标。

[0315] 图2.流式细胞术分析展示US28-13-5G6-1D3抗体克隆在CHO-US28-A1细胞上的表面结合。自左侧起为空白对照、第二抗体对照和结合于CHO-US28-A1细胞的表面上的克隆US28-13-5G6-1D3 Ab。US28-13-5G6-1D3 Ab结合至53.4%的CHO-US28-A1细胞,而空白对照和第二抗体对照展示弱结合:分别为0.11%和1.63%。

[0316] 图3.通过FACS分析中的梯度稀释进一步验证克隆US28-13-5G6-1D3在CHO-US28-A1细胞上的阳性表面结合。自左侧起,以1:20、1:50、1:200(w/v)稀释的克隆US28-13-5G6-1D3 Ab表面结合至CHO-US28-A1细胞。

[0317] 图4.将克隆US28-13-5G6-1D3在CHO-US28-A1细胞上的阳性表面结合与US28阴性CHO对照细胞进行比较。以1:50(w/v)的克隆US28-13-5G6-1D3 Ab结合至US28阳性CHO-US28-A1细胞的表面,比结合至US28阴性CHO细胞多15倍。

[0318] 图5.原始ELISA分析展示在生物肽(Bio-Peptide)-1(US28 ECD3基因型4N)和生物肽-2(US28 ECD3基因型4D)上US28-13-5G6-1D3抗体克隆的相等定性结合。由于ECD3中未观测到其他突变,因此这些结果表明US28-13-5G6-1D3Ab与其目标的结合为HCMV病毒株不可知的。

[0319] 图6.定性ELISA分析展示重组抗体产物US28-13-5G6-1D3 rAb与生物肽1和2的结合。这些结果展示所产生的抗体与US28 ECD3的两种基因变体的强且相等的结合,确认重组抗体与其目标良好地结合且维持HCMV病毒株不可知的结合特性。

[0320] 图7.通过使用FACS分析验证13-5G6-1D3 rAb在CHO-US28-A1细胞上和在各自身对照CHO细胞上的表面结合。展示CHO细胞结果的条柱用深灰色着色,而展示CHO-US28-A1细胞结果的条柱用浅灰色着色。自左侧起,第一个条柱展示不具有分别针对CHO-US28-A1和CHO细胞的抗体的空白对照的测量;自左侧的第二个条柱展示抗小鼠IgG-Alexa 488第二Ab单独在两种细胞类型上的表面结合;自左侧的第三个条柱展示以1:10稀释(w/v)的13-5G6-1D3 rAb在两种细胞类型上的表面结合;自左侧的第四个条柱展示以1:50稀释(w/v)的13-5G6-1D3 rAb仅在CHO-US28-A1细胞上的表面结合;且自左侧的第五个条柱展示以1:100稀释(w/v)的13-5G6-1D3 rAb仅在CHO-US28-A1细胞上的表面结合。y轴展示与细胞百分比的结合。基于这些结果,13-5G6-1D3 rAb的最优染色稀释度为1:50w/v(自左侧的第三条柱)。仅测量以1:10稀释(w/v)的13-5G6-1D3 rAb与CHO细胞的表面结合且在去除与空白和抗小鼠IgG-Alexa 488第二Ab对照的结合之后为0.77%。这些结果与先前通过使用来自13-5G6-1D3克隆的抗体获得的结果一致,且展示13-5G6-1D3 rAb在CHO-US28-A1细胞上的高度比表面结合,其超过正常CHO细胞>21倍。

[0321] 图8.通过FACS分析展示US28-13-5G6-1D3 rAb在经HCMV Ad169感染的MRC-5细胞群的表面上结合,但不在模拟细胞上结合。A.上排展示US28-13-5G6-1D3 rAb在模拟细胞相对于经HCMV Ad169感染的MRC-5细胞上的表面结合,展示了在HCMV感染细胞上的高度特异性结合。B.为了验证13-5G6-1D3 rAb结合于HCMV感染细胞群的表面,另一组经HCMV Ad169感染的细胞和模拟细胞经透性化并用市售抗体MAB810X针对HCMV主要即刻早期(IE)抗原染色,该抗原为已知在裂解HCMV感染期间较早表达的胞内蛋白。MAB810X抗体与US28-13-5G6-1D3 rAb染色相同的经HCMV感染的MRC-5细胞群,未观测到任一抗体染色未感染细胞,确认

了US28-13-5G6-1D3 rAb所展现的表面结合对HCMV Ad169感染细胞具有特异性。

[0322] 图9.通过使用小鼠IgG同型对照代替第一抗体测试US28-13-5G6-1D3 rAb的非特异性结合,随后与山羊抗小鼠IgG-Alexa 488一起孵育。结果展示通过US28-13-5G6-1D3 rAb,与同型对照相比,经HCMV感染的MRC-5细胞的染色发生偏移,而未感染细胞(模拟)的染色类似于IgG同型对照。综合而言,这些结果展示,与未感染细胞相比,US28-13-5G6-1D3 rAb特异性结合(约多16倍的结合)至裂解HCMV感染细胞的表面。

[0323] 图10.通过使用与先前研究中相同的流式细胞术方案研究US28-13-5G6-1D3rAb与来自三个HCMV血清反应呈阳性的受试者的原代PBMC的结合。图中的条柱展示US28-13-5G6-1D3 rAb在来自各自供体的PBMC上的相对表面结合。结果展示US28-13-5G6-1D3 rAb分别在18.37%、3.57%和5.25%的来自三个受试者的总PBMC上的表面结合。来自相同受试者的表达某些不同细胞表面标记的PBMC的相对比例列于条柱下方;总计超过100%,因为一些相同细胞表达这些细胞表面标记(然而,其在与US28-13-5G6-1D3 rAb结合相同的实验期间未经测量)中的多于一种。在所研究的PBMC中,仅CD11+、CD14+和CD16+阳性细胞可为HCMV携带者,且这些表面标记可在不同单个核细胞中部分重叠。潜伏感染HCMV的单个核细胞群通常总计达总PBMC的约15%(尽管受试者之间可存在一些相当大的变化)。因此,在供体1、2和3中观测到的US28-13-5G6-1D3 rAb分别在18.37%、3.57%和5.25%的总PBMC上的表面结合证实了与可观比例的可为HCMV携带者的PBMC结合。这些结果与PBMC亚型无关,但指示US28-13-5G6-1D3 rAb可在潜伏HCMV感染细胞的表面上结合。

[0324] 图11.测试市售US28多克隆Ab与CHO-US28-A1细胞的结合并与US28-13-5G6-1D3 rAb与相同细胞的结合进行比较。A.US28-13-5G6-1D3抗体结合至超过50%的CHO-US28-A1细胞的表面(自左侧的第一条柱),而市售US28 Ab仅结合在10%的细胞上(自左侧的第二条柱)。B.我们随后在经HCMV Ad169感染的MRC-5细胞上测试市售US28 Ab,其中其展示对HCMV感染群体的特异性结合。然而,与IgG同型对照相比,市售US28多克隆Ab还使未感染的模拟细胞染色约两倍,指示未感染的MRC-5细胞的表面上的非特异性结合。当减去来自IgG同型的信号时,若与US28阴性模拟MRC-5细胞比较,市售US28 Ab与HCMV Ad169阳性MRC-5细胞的结合特异性仅为1.7。

[0325] 图12.通过使用免疫组织化学分析(IHC)研究以1:400稀释(w/v)的US28-13-5G5-1D3与HCMV感染人组织的结合。A.用US28-13-5G6-1D3 rAb染色HCMV感染肺组织证实对经HCMV感染的肺泡和内皮细胞的特异性。箭头(在此图的非彩色版本中)标记在HCMV阳性对照载片中在具有特征性巨细胞效应的典型HCMV感染肺泡细胞上的US28-13-5G6-1D3 rAb细胞质染色。B.13-5G6-1D3展示巨噬细胞的阳性US28染色,但正常肺组织中肺泡细胞为阴性染色。C.相同巨噬细胞在相同肺活体组织切片中展示阳性HCMV DNA,而正常肺泡细胞中不存在HCMV DNA信号,其与相同样品中的US28染色一致。D.用MAB810R抗体染色HCMV感染肺组织证实对经HCMV感染的肺泡和内皮细胞的特异性。箭头(在此图的非彩色版本中)标记在HCMV阳性对照载片中在具有特征性巨细胞效应的典型HCMV感染细胞上的MAB810R抗体核染色。E.正常肺组织中的肺泡HCMV阳性巨噬细胞的IE染色呈阴性。正常肺泡细胞同样展示阴性染色。F.使用IgG作为阴性对照抗体且展示相同肺组织的阴性染色。在非彩色版本旁边还提供图12的彩色版本。

[0326] 图13.在乳腺癌队列中通过免疫组织化学(IHC)和原位杂交(ISH)研究HCMV US28

表达。A. 在三阴性乳腺癌 (TNBC) 样品中, US28-13-5G6-1D3 rAb 展示癌细胞的强细胞质染色 (3+) (在此图的非彩色版本中以箭头标记)。此样品中大部分肿瘤细胞对于 US28-13-5G6-1D3 rAb (棕色) 呈阳性染色。B. 相同样品展示在整个样品内的少数细胞中对于抗 IE MAB810R 抗体的一些点样阳性细胞质染色。C. ISH 分析展示相同肿瘤细胞的许多核中的多个 HCMV DNA 信号, 其对于我们的材料中的许多三阴性和 HER2 阳性肿瘤为典型的。箭头指出图中的一些阳性 HCMV DNA 信号。在细胞的细胞质中未见 HCMV DNA。D. 阴性对照 IgG Ab 展示阴性染色。图 13 的彩色版本提供于非彩色版本之后的页面上。

[0327] 图 14. A. 来自 HER2 阳性乳腺癌的腺癌转移展示所有肿瘤细胞中对于 US28-13-5G6-1D3 rAb (棕色) 的阳性中间细胞质染色 (2+)。B. 相同样品中的大多数癌细胞对于 MAB810R 染色呈阴性。对于 MAB810R Ab, 整个样品中仅有一个或两个细胞具有点样阳性细胞质染色 (图中未展示)。C. ISH 分析展示相同肿瘤细胞中许多阳性核 HCMV DNA 信号。箭头指出此类阳性 HCMV DNA 信号。在肿瘤细胞的细胞质中未见 HCMV DNA。D. 相同样品的阴性对照抗 IgG Ab 染色呈阴性。还提供图 14 的彩色版本。

[0328] 图 15. US28 染色和 HCMV ISH 在许多正常相邻肿瘤 (NAT) 乳房组织中呈阴性, 如样品 BR1008b_J6 的图中所示例。A. US28-13-5G6-1D3 rAb 展示正常乳房组织的阴性 IHC 染色。B. MAB810R 抗体还展示相同样品的阴性染色。C. 通过 ISH 未见相同样品的核或细胞质 HCMV DNA 信号。D. IgG 染色也呈阴性。这些结果指示, 抗体针对没有 HCMV 感染的征象的正常腺乳房组织始终展示阴性染色。值得注意的是, HCMV 阴性样品 BR1008b_J6 放置于与样品 BR1008b_D5 和 BR1008b_H6 相同的 TMA 载片上, 后两者展示对于 US28-13-5G6-1D3 抗体的强阳性染色和对于 HCMV DNA ISH 的阳性核信号。因此, 样品暴露于完全相同的染色条件和抗体/DNA 探针浓度。用 US28-13-5G6-1D3 rAb 所见的阳性染色经评估对乳腺癌和正常组织两者中的 HCMV 感染细胞具有特异性。还提供图 15 的彩色版本。

[0329] 图 16. A. 用 US28-13-5G6-1D3 rAb 的原发性乳腺癌样品的 IHC 染色在 41 个所研究的原发性乳房肿瘤样品的约 73% 中具有特异性并呈阳性。对于 US28 染色呈阳性的 100% 的肿瘤对于 HCMV DNA 信号也呈阳性, 且在 12 个/41 个肿瘤的核中有多个信号。所有 10 个正常相邻组织对照 (n=10) 对于乳房上皮细胞中的细胞质 US28 染色呈阴性 (0), 且 7 个/10 个对于 ISH 信号也呈阴性。B. 用 US28-13-5G6-1D3rAb 的阳性染色见于约 94% 的所研究的 30 个乳腺癌转移瘤中且对转移性细胞具有特异性。所有 TNBC (n=7) 和 HER2 阳性 (n=11) 转移瘤均具有阳性 US28-13-5G6-1D3 染色, 且仅有的阴性样品 (n=2) 为激素受体阳性癌症。ISH 分析展示 100% 的转移瘤中的阳性核 HCMV DNA。43% 的转移性组织在肿瘤细胞中展示多个核 DNA 信号。这些样品排他地为 TNBC 或 HER2+ 亚型, 且两个例外具有低 HR+ 状态。ISH 结果未展示于图中。

[0330] 图 17. 通过使用 IHC 和用对于 HCMV DNA 的 ISH 分析, 用 US28-13-5G6-1D3rAb 和 MAB810R 抗体研究人胶质母细胞瘤组织。A. 胶质母细胞瘤 IV 级脑瘤展示 US28 在肿瘤细胞中的中度染色 (棕色)。B. MAB810R 抗体染色在相同癌细胞中未展示 IE 表达。然而, MAB810R 的阳性细胞质染色见于约 90% 的胶质母细胞瘤样品中。在不同于乳腺癌样品的每个阳性样品中的数个细胞中存在染色。然而, 胶质细胞的染色弱于 US28-13-5G6-1D3 rAb。C. 脑组织 NAT 对于 13-5G6-1D3 染色呈阴性。D. ISH 分析展示相同肿瘤细胞中的阳性核 HCMV DNA 信号。箭头指示这些信号。E. 相同胶质母细胞瘤 IV 级样品对于 IgG 抗体的染色呈阴性。F. ISH 分析对于相

同脑组织NAT样品呈阴性。这些图的非彩色版本中用箭头指示阳性胶质细胞。图17的彩色版本提供于非彩色版本之后的页面上。

[0331] 图18. 含有人星形细胞瘤1-3级和胶质母细胞瘤4级和NAT组织的人脑癌队列的US28-13-5G6-1D3染色。所有星形细胞瘤1级(n=4)染色均呈阴性(0)。在星形细胞瘤2-3级中,6个染色呈阴性(0),37个具有阳性细胞质染色(1+),且2个具有中度阳性细胞质染色(2+)。所有胶质母细胞瘤4级(n=19)肿瘤对于US28-13-5G6-1D3 rAb展示阳性细胞质染色(1+),其中3个为中度阳性(2+)。ISH分析确认核HCMV DNA存在于所有肿瘤样品的肿瘤细胞中。10个NAT样品中仅3个为HCMV DNA阳性。

[0332] 图19.A.对各种人原代细胞的28-13-5G6-1D3-PE抗体进行流式细胞术分析以排除与这些细胞类型的表面的一般脱靶结合。研究以下细胞系:人原代肾上腺皮质细胞、人原代肾脏上皮细胞、人原代心脏微血管内皮细胞、人原代肝脏上皮细胞和人原代静脉平滑肌细胞。US28靶向抗体13-5G6-1D3展示极弱表面结合,与所有这些细胞类型的结合远低于<1%,指示13-5G6-1D3针对这些细胞类型没有脱靶表面结合。这些结果支持我们对实验室细胞的观测结果,展示与正常US28阴性细胞表面的低度结合。B. 原始的人原代心脏细胞不可获得,因此通过免疫组织化学研究人心脏组织样品对于13-5G6-1D3的染色。图中的实施例展示心肌组织的阴性13-5G6-1D3染色,类似于用阴性IgG抗体对照的染色。ISH分析未展示人心肌中存在潜伏HCMV感染的任何迹象。如果人心脏中存在HCMV感染,则其始终为生产性感染类型。阳性对照位于心脏样品的相同TMA盘上且为阳性:13-5G6-1D3展示恶性嗜铬细胞瘤的阳性染色。ISH对照还展示在相同活体组织切片中肿瘤细胞的核中的典型HCMV DNA染色,指示此肿瘤类型中存在潜伏HCMV感染。阳性13-5G6-1D3和HCMV ISH结果在图中用箭头标记。还提供图19的彩色版本。

[0333] 图20. 研究一些胰腺组织以排除28-13-5G6-1D3与此组织类型的一般脱靶结合。上排展示正常胰腺组织用13-5G6-1D3、MAB810R和IgG对照抗体进行阴性染色。HCMV ISH为阴性指示正常胰腺组织样品中不存在病毒HCMV DNA。下排展示具有阳性13-5G6-1D3和MAB810R染色以及阴性IgG对照抗体染色(阴性对照)的另一患者的胰腺组织样品。HCMV ISH分析也展示阳性结果,指示相同样品中存在细胞质HCMV DNA聚集物。因此,相同样品对于HCMV蛋白US28和IE两者和HCMV DNA呈阳性,但对于阴性对照IgG呈阴性,指示特异性抗体结合。正如预期,US28蛋白染色为细胞质的,正如预期,因为IE蛋白为核蛋白,其主要位于细胞核中。因为病毒在细胞质中包装,HCMV ISH展示大型细胞质病毒DNA聚集物,指示生产性HCMV感染。这些结果指示,抗体US28-13-5G6-1D3不与胰腺组织脱靶结合,且形态学上正常的胰腺组织中存在的HCMV感染具有生产性质,与似乎具有潜伏特征的肿瘤形成对比。还提供图20的彩色版本。

[0334] 图21.A. 一组抗体的绝对结合水平,对现有技术所公开的VUN100(单价或二价)与US28-13-5G6-1D3的结合特性相对于对照CHO细胞和表达由不同HCMV病毒株(DB和TB40/E)编码的US28的CHO细胞以及表达含有所有已知US28突变的经修饰US28(“突变病毒株”)的CHO细胞的结合特性进行比较。B. 与对照CHO细胞相比,同一组抗体对表达不同形式的US28的CHO细胞的结合特异性,结果表达为与对照CHO细胞相比,与US28表达细胞结合的增加倍数。C. 病毒株差异对同一组抗体的绝对结合水平的影响,展示为与表达由HCMV病毒株DB和TB40/E编码的US28的CHO细胞的结合之间的绝对结合水平的变化百分比,其中较小变化百

分比指示较大程度的病毒株不可知的结合。D. 同一组抗体在表达由HCMV病毒株DB和TB40/E编码的US28形式的CHO细胞之间的结合特异性保持率,其中接近100%的结合特异性保持率指示病毒株不可知的结合特异性,而更可观的差异(如由两个VUN100抗体样品所展现)指示依赖于编码US28的病毒株的结合特异性变化(即缺乏病毒株不可知的结合特异性)。E. 当归一化至对于每种US28形式对于1D3所观测到的结合水平时,抗体与表达不同形式的US28(如由DB、TB40/E和突变形式所编码)的CHO细胞的结合百分比,其中给定抗体对于不同CHO形式的结合%变化指示与1D3-mFc抗体相比,病毒株不可知的结合活性降低,且展示结合更依赖于编码US28的病毒株(即与1D3-mFc抗体相比,缺乏病毒株不可知的结合)。

[0335] 图22. 与VUN100相比,本发明的各种ECD3结合分子的脱靶结合百分比,如通过结合至对照CHO细胞所评定的。

[0336] 图23. 相对于同一分析中VUN100的特异性水平,示例性ECD3结合分子结合于US28表达CHO相比于对照CHO细胞的结合特异性的倍数变化。A. 与VUN100 (n=3) 相比,1D3的结合特异性有所提高。B. 与VUN100 (n=3) 相比,1C10的结合特异性有所提高。C. 与VUN100 (n=3) 相比,1A10的结合特异性有所提高。D. 与VUN100 (n=3) 相比,1G4的结合特异性有所提高。E. 与VUN100 (n=1) 相比,1E8的结合特异性有所提高。

具体实施方式

[0337] 本发明涉及靶向如由人巨细胞病毒 (HCMV) 编码的US28蛋白的特定区的试剂和与其相关的治疗性、预防性和诊断性方法,包括但不限于HCMV感染癌症和其他与潜伏或裂解HCMV感染相关的病症。

[0338] HCMV US28蛋白表现出靶向HCMV感染(包括潜伏库)的优异潜力,因为:

[0339] (1) 在裂解和潜伏HCMV感染期间US28蛋白的某些部分在细胞表面上表达 (Elder等人, *iScience*, 2019, 12:13-26);

[0340] (2) US28为GPCR,其向质膜的迁移既允许用结合分子直接靶向它,还允许由于其胞吞作用而用作有效负载的转运蛋白,该胞吞作用为组成性的或由于配体结合而发生。GPCR总体上构成由经批准药物靶向的最大蛋白质家族 ((Sriram和Insel,《分子药理学》,2018, 93(4):251-258);并且

[0341] (3) 与许多靶向由人DNA编码的GPCR的经批准药物相比, HCMV US28完全由病毒DNA编码,因此采用排他地位于感染HCMV中但不位于健康人细胞中的高度特异性药物靶点。

[0342] A. US28的结合分子

[0343] 当考虑针对US28的结合分子的设计时,本发明人注意到, N-末端结构域为US28蛋白的配体结合部分,以物理方式自质膜延伸,且因此最可能暴露于宿主抗体产生、免疫反应和遗传选择压力 (Mozzi等人, 2020, 同上)。一致地,它还是已知含有高病毒株间变化性和突变的区域 (Arav-Boger等人, 2002, 同上)。较不保守的位点还更易产生可改变对随时间推移靶向这些区域的治疗的反应的新突变 (Komatsu等人,《抗病毒研究》, 2014, 101:12-25)。因此, HCMV基因中的新突变很可能产生于较不保守的位点中,其由不同病毒株之间的变化精准确定。大多数结构抗体最可能针对US28蛋白的N-末端部分产生 (De Groof等人,《分子制药学 (Mol Pharm)》, 2019, 16(7):3145-3156), 因此可同样为人体中天然抗体的情况 (Elder等人, 2019, 同上)。

[0344] 根据我们了解,迄今为止已鉴别出三种类型的HCMV高风险致癌病毒株。最近已鉴别出DB(KT95923)和BL(MW980585)临床HCMV分离株,以促进致癌分子途径,体外建立锚定非依赖性生长且在小鼠模型中产生致癌性,且因此被命名为高风险致癌病毒株(Kumar等人,2018和Ahmad等人,2021)。另外,Soroanu等人在10个HCMV阳性胶质母细胞瘤肿瘤中对US28基因的C-末端部分进行测序。结果(呈现于原始公布的NIHMS323374-supplement-1.pdf中)的比对展示所有这些病毒株将类似于HCMV VHL/E临床分离株(L20501.1)。高风险致癌病毒株DB、BL和VHL/E在US28基因中,尤其在N-末端部分(表3)中均展示不同突变。N-末端部分在位置E18D;A19E;F25L(VHL/E)和A19D、T21A、F25L(BL)与DB病毒株不同。因此,氨基酸位置18、19、21和25在这些高风险致癌病毒株中均突变;且还已知其他病毒株在位置8和/或15处具有突变(表3)。

[0345] 由于其高度可变序列,本发明人认为US28蛋白的N-末端部分区(ECD1)为针对US28的高度特异性且病毒株不可知的抗体的不适当靶点。

[0346] 相比之下,本发明人确定US28的ECD2和ECD3在不同HCMV病毒株之间高度保守;ECD2不具有任何已知突变,而本发明人对来自许多不同HCMV病毒株的ECD3的已知序列的分析揭露仅存在一个已知突变。在已知的高风险致癌病毒株中,DB病毒株为ECD3 N170N(在本文中也称为“4N”变体形式,因为US28蛋白的位置170对应于ECD3的位置4),而BL和VHL/E病毒株表示N170D(在本文中也称为“4D”)变体(表3)。本发明人鉴别出编码US28 ECD4 DNA的DNA序列含有多个多态位点,其中仅一个产生较常见的氨基酸变化(R267K)。值得注意的是,高风险致癌BL病毒株含有ECD4变体V250L和R267K两者(表3)。

[0347] 出人意料地,本研究证实ECD2和ECD4蛋白的保守部分不为小鼠的适当免疫原,而本申请人能够开发一种针对HCMV US28的ECD3区鉴别高度特异性、病毒株不可知的结合分子的新方法。如本申请的实施例中所报导,单克隆抗体展示良好结合且尤其在以下上的结合:US28 ECD3肽的两种基因变体,US28过度表达US28-CHO-A1细胞、经HCMV Ad169感染的MRC-5细胞、来自HCMV血清反应呈阳性的受试者的原代PBMC、HCMV感染人肺组织和数种类型的侵袭性人肿瘤,如食道癌、胃癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、恶性嗜铬细胞瘤和局部晚期结肠癌、乳腺癌及其转移瘤和胶质母细胞瘤4级。

[0348] 因此,本申请人已提供高度特异性且HCMV病毒株不可知的针对由HCMV编码的US28蛋白的结合分子,包括但不限于特别是抗体和嵌合抗原受体(“CAR”),以及其用途,例如用于与HCMV相关的诊断性、预防性和治疗性用途和方法中。还提供HCMV疫苗和适合用于产生所述结合分子的其他试剂。

[0349] 本发明的第一方面提供一种结合分子,其包含一条或多条多肽链,该结合分子对人巨细胞病毒(HCMV)的US28蛋白的细胞外结构域3(ECD3)内的表位具有结合特异性,其中US28蛋白的ECD3包含存在于该US28蛋白中的氨基酸序列,其位置对应于由如SEQ ID NO:5中所阐述的人巨细胞病毒(HCMV)编码的US28蛋白的位置167至183。如下文进一步论述,根据本发明的第一方面的该结合分子的非限制性但特别优选的实施例包括抗体和嵌合抗原受体(CAR)。

[0350] 表位:

[0351] 如上文所指出,根据本发明的第一方面的结合分子对人巨细胞病毒(HCMV)的US28蛋白的细胞外结构域3(ECD3)内的表位具有结合特异性,其中US28蛋白的ECD3包含存在于

该US28蛋白中的氨基酸序列,其位置对应于由如SEQ ID NO:5中所阐述的人巨细胞病毒(HCMV)编码的US28蛋白的位置167至183。

[0352] 本发明的第一方面的结合分子对其具有结合特异性的表位可例如优选完全存在于HCMV的US28蛋白的细胞外结构域3(ECD3)内。

[0353] 表位可例如为US28蛋白的ECD3内(优选完全在其内)的线性表位。替代地,表位可为US28蛋白的ECD3内(优选完全在其内)的不连续和/或构象表位。

[0354] 表位可例如包含17个或更少的HCMV的US28蛋白的ECD3的氨基酸或由其组成,例如其可包含以下或由以下组成:16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3个或更少的HCMV的US28蛋白的ECD3的氨基酸,其可任选为US28的ECD3中的连续氨基酸。

[0355] 存在于对应于由如SEQ ID NO:5中所阐述的人巨细胞病毒(HCMV)编码的US28蛋白的位置167至183的位置处的US28蛋白中的氨基酸序列可能未必与SEQ ID NO:5的该区中发现的序列一致,因为在不同HCMV病毒株中,US28的ECD3的序列可存在病毒株间变化。因此,在此情况下,术语“对应于”是指在具有由任何HCMV相关病毒株编码的US28蛋白的对应位置(即在第二胞外环中,也称为ECD3区)的区中发现的氨基酸。

[0356] 然而,在分析来自许多不同临床和实验室HCMV病毒株的US28蛋白的序列之后,本申请人已鉴别出在经HCMV编码的US28的ECD3内仅存在单一多态性,因此存在两个替代ECD3序列,其在本文中称为4D变体和4N变体。

[0357] 4D变体是指存在于如由第一组HCMV病毒株编码的US28的ECD3中的序列变异,且表现为较常见的形式;如通过BLAST搜索所鉴别,约90%的由不同HCMV病毒株编码的US28序列展示4D变异序列。4D变体的特征在于在US28的ECD3中包含序列TKKDNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:7;其中位置4带下划线,为D)。具有US28的4D变体的第一群组的示例性HCMV病毒株包括Towne、VR1814、TB40/E、VHL/E、Merlin、JP、Ad169、AF1、BL和DAVIS病毒株。

[0358] 4N变体是指存在于如由第二组HCMV病毒株编码的US28的ECD3中的替代序列变异,且表现为较不常见的形式。4D变体的特征在于在US28的ECD3中包含序列TKKNNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:6;其中位置4带下划线,为N)。具有US28的4N变体的第二群组的示例性HCMV病毒株包括Toledo、TR和DB病毒株。展示US28的ECD3中的4N变异序列的这些和其他HCMV病毒株展示于表1中。

[0359] 本发明的第一方面的结合分子(如本发明的第一方面的HCMV病毒株不可知的结合分子)对其具有结合特异性的表位优选为与序列TKKNNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:6,对应于US28的ECD3的4N变体)和序列TKKDNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:7,对应于ECD3的4D变体)共有的且存在于所述序列内的表位。换言之,本发明的第一方面的结合分子对其具有结合特异性的US28的ECD3内的表位优选不包括SEQ ID No:6和7中的每一者的第4个氨基酸残基,其对应于4N变体中的N和4D变体中的D。

[0360] 在线性表位的情况下,则任选地,与4N变体和4D变体共有的且存在于此两者内且排除第4变异氨基酸残基的表位可包括序列NQCMTDYDYLEVS的所有13个氨基酸,或其任何12、11、10、9、8、7、6、5、4、3个或更少的氨基酸,其可任选为该序列的连续氨基酸。

[0361] 在其中表位为US28蛋白的ECD3内(优选完全在其之内)的不连续和/或构象表位的另一选项中,则不连续表位可包括TKKNNQCMTDYDYLEVS的4N变体ECD3序列和/或TKKDNQCMTDYDYLEVS的4D变体ECD3序列的17个氨基酸中的任何3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、

13、14、15或16个。

[0362] ECD3内的线性不连续或构象表位可排除US28的ECD3的一个或多个氨基酸,其包含在对应于4N变体中的TKKNNQCMTDYDYLEVSV和4D变体中的TKKDNQCMTDYDYLEVSV的序列内第1至第17位置。

[0363] 在一个优选的实施方案中,ECD3内的线性不连续或构象表位优选不包括已知在不同HCMV病毒株之间变化的第4位置(N/D)。

[0364] 另外或替代地,US28的ECD3的一个或多个氨基酸可排除于由本发明的结合分子,如本发明的第一方面的HCMV病毒株不可知的结合分子结合的线性不连续或构象表位中。

[0365] 举例而言,ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第1位置。ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第2位。ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第3位。ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第5位。ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第6位。ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第7位。ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第8位。ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第9位。ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第10位。ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第11位。ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第12位。ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第13位。ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第14位。ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第15位。ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第16位。ECD3内的线性、不连续或构象表位可另外或替代地排除第17位。

[0366] 本发明的第一方面的结合分子(如本发明的第一方面的HCMV病毒株不可知的结合分子)对其具有结合特异性的表位优选为大于90%的已知临床和/或实验室HCMV病毒株(包括至少本申请中所公开的所有HCMV病毒株),例如至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或实质上100%(例如,90%与100%之间、91%与100%之间、92%与100%之间、93%与100%之间、95%与100%之间、96%与100%之间、97%与100%之间、98%与100%之间、99%与100%之间)的临床和/或实验室HCMV病毒株(包括至少本申请中所公开的所有HCMV病毒株)所共有的且存在于其内的表位。

[0367] 在一个优选的实施方案中,本发明的第一方面的结合分子对其具有结合特异性的表位中的氨基酸可包括由以下结合的ECD3内的表位中的氨基酸或与所述氨基酸一致:如本文所描述的US28-13-5G6-1D3、13-1C10-1C10、13-1H3-1A10、13-1C10-1G9、14-4E4-1E8抗体中的任何一个或多个(在本文中通常分别缩写为“1D3”、“1C10”、“1A10”、“1G9”和“1E8”)(其中还包括scFv,其包含具有分别如SEQ ID NO:12、104、122、68和88所定义的1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的V_H序列的V_H多肽序列和具有分别如SEQ ID NO:18、108、126、72和92所定义的1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的V_L序列的V_L多肽序列),或与该表位相差不超过5、4、3、2或1个氨基酸。

[0368] 结合特性:

[0369] 如本申请的实施例中所报导,针对US28的ECD3的多种单克隆抗体通过使用本文所描述的方法产生,且展示其良好且特异性地结合US28 ECD3肽的遗传变体和US28过度表达US28-CHO-A1细胞两者,且自其的某些示例性抗体经进一步测试且展示提供与以下的优异

结合特性：经HCMV Ad169感染的MRC-5细胞、来自HCMV血清反应呈阳性的受试者的原代PBMC、HCMV感染人肺组织和数种类型的侵袭性人肿瘤，如食道癌、胃癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、恶性嗜铬细胞瘤和局部晚期结肠癌、乳腺癌及其转移瘤和胶质母细胞瘤4级。这些单克隆抗体为根据本发明的结合分子的示例性实施方案。

[0370] 更特别地，分别如本文所描述的1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8抗体（其中还包括scFv，其包含具有分别如SEQ ID NO:12、104、122、68和88所定义的1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的V_H序列的V_H多肽序列和具有分别如SEQ ID NO:18、108、126、72和92所定义的1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的V_L序列的V_L多肽序列）为根据本发明的优选示例性结合分子，尽管已产生其他结合分子且本发明的第一方面的范围不仅限于1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8，而且还限于自其衍生的结合分子（如共有1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的CDR的其他结合分子），尽管这些可表示各种优选的实施方案。然而，1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8抗体（其中其还包括scFv，其包含具有分别如SEQ ID NO:12、104、122、68和88所定义的1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的V_H序列的V_H多肽序列和具有分别如SEQ ID NO:18、108、126、72和92所定义的1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的V_L序列的V_L多肽序列）可提供用于表征根据本发明的第一方面的其他结合分子的结合特性的有用基准。

[0371] 举例而言，当在与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8相同的条件下测试时，对US28蛋白的胞外结构域3 (ECD3) 内的表位具有结合特异性的根据本发明的第一方面的结合分子可展现与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8中的任何一个或多个的结合特性类似或实质上等同的结合特性。

[0372] 在该情况下，若在分别与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8相同的条件下测试时，根据本发明的第一方面的结合分子显示与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8类似或实质上等同的结合特异性、类似或实质上等同的病毒株不可知的结合特性和/或类似或实质上等同的结合亲和力，则该结合分子可被视为与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8具有“类似或实质上等同的结合特性”。此类测试可例如对应于本申请中所报导用于评定1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8的结合特性的测试中的任何一个或多个，例如为测定与以下的结合所进行的测试中的任何一个或多个：US28 ECD3肽、US28过度表达US28-CHO-A1细胞、经HCMV Ad169感染的MRC-5细胞、来自HCMV血清反应呈阳性的受试者的原代PBMC、HCMV感染人肺组织和数种类型的侵袭性人肿瘤，如食道癌、胃癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、恶性嗜铬细胞瘤和局部晚期结肠癌、乳腺癌及其转移瘤和胶质母细胞瘤4级。

[0373] 根据本发明的第一方面的结合分子可被视为与本发明的参考结合分子（例如1D3、1C10、1A10、1G4和/或1E8中的任何一个或多个）具有类似或实质上等同的结合特异性，若在用于确定特异性结合至以下的能力的任何一个或多个测试下：US28 ECD3肽（相比于阴性对照，如BSA）、US28表达细胞（相比于不表达US28的等同细胞）、HCMV感染细胞（相比于不具有HCMV感染的等同细胞）、来自HCMV血清反应呈阳性的个体的原代PBMC（相比于来自HCMV血清反应呈阴性的个体的原代PBMC）、HCMV感染人肺组织（相比于未经HCMV感染的人肺组织）和/或HCMV感染人肿瘤的类型，特别是侵袭性肿瘤，如食道癌、胃癌、直肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、恶性嗜铬细胞瘤和局部晚期结肠癌、乳腺癌及其转移瘤和胶质母细胞瘤4级（相比于未感染HCMV的等同非癌细胞），结合分子显示参考结合分子（例如1D3、1C10、1A10、1G4和/或1E8中的任一者）的至少1、5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、95或实质上100%

的结合特异性。在前述测试中的任何一个或多个下,根据本发明的第一方面的某些结合分子可具有与参考结合分子(例如1D3、1C10、1A10、1G4和/或1E8中的任何一个或多个)的结合特异性类似或实质上等同的结合特异性,尽管如此,其仍然低于参考结合分子(例如1D3、1C10、1A10、1G4和/或1E8中的任何一个或多个)的结合特异性;然而在前述测试中的任何一个或多个下,根据本发明的第一方面的某些其他结合分子可具有比参考结合分子(例如1D3、1C10、1A10、1G4和/或1E8中的任何一个或多个)高的结合特异性。

[0374] 根据本发明的第一方面的结合分子可被视为与参考结合分子(例如1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8中的任何一个或多个)具有类似或实质上等同的病毒株不可知的结合特性,若在用于确定特异性结合至以下的能力的任何一个或多个测试下:4D和4N变体US28 ECD3肽中的每一者(各自相比于阴性对照,如BSA)、4D和4N变体US28表达细胞中的每一者(各自相比于不表达US28的等同细胞;且任选其中US28的4D和4N变体分别为由TB40/E和HCMV的病毒株编码的US28序列,和/或进一步任选其中细胞为CHO细胞)、4D和4N变体US28编码HCMV病毒株感染细胞中的每一者(各自相比于不具有HCMV感染的等同细胞)、来自4D和4N变体US28编码HCMV病毒株血清反应呈阳性的个体的原代PBMC(相比于来自HCMV血清反应呈阴性的个体的原代PBMC)、经4D和4N变体US28编码HCMV病毒株感染的人肺组织中的每一者(相比于未感染HCMV的人肺组织)和/或HCMV感染人肿瘤的4D和4N变体US28编码HCMV病毒株类型中的每一者,特别是侵袭性肿瘤,如食道癌、胃癌、直肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、恶性嗜铬细胞瘤和局部晚期结肠癌、乳腺癌及其转移瘤和胶质母细胞瘤4级(相比于未感染HCMV的等同非癌细胞),结合分子显示与4D和4N变体的等同结合,其类似或实质上等同(例如 ± 30 、25、20、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1%或更小)于由参考结合分子(例如1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8中的任何一个或多个)所示的等同结合。

[0375] 根据本发明的第一方面的结合分子可被视为与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8具有类似或实质上等同的背景结合,若在用于测定与以下的背景结合的任一个或多个测试下:不表达US28的细胞(相比于经工程改造以表达US28的等同细胞)、HCMV未感染的细胞(相比于经HCMV感染的等同细胞)、来自HCMV血清反应呈阴性的个体的原代PBMC(相比于来自HCMV血清反应呈阳性的个体的原代PBMC)、未感染HCMV的人肺组织(相比于感染HCMV的人肺组织)和/或HCMV未感染的人肿瘤的类型(相比于感染HCMV的等同癌细胞,特别是侵袭性肿瘤,如食道癌、胃癌、直肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、恶性嗜铬细胞瘤和局部晚期结肠癌、乳腺癌及其转移瘤和胶质母细胞瘤4级),背景结合分子显示至少1、5、10、15、20、25、30、40、50、60、70、80、90、95或实质上100%的1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8的背景结合。在前述测试中的任何一个或多个下,根据本发明的第一方面的某些结合分子可具有与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8的背景结合类似或实质上等同的背景结合,尽管如此,其高于1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8的背景结合;然而在任一个或多个前述测试下,根据本发明的第一方面的某些其他结合分子可具有比1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8低的结合特异性。替代地或另外,在以上测试中的任何一个或多个下,与VUN100(单价VUN100和/或二价VUN100)的背景结合相比,根据本发明的第一方面的某些结合分子可具有较低背景结合(例如小于95%、90%、80%、70%、60%、50%、40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%、1%或小于1%)。

[0376] 根据本发明的第一方面的结合分子可视为与参考结合分子(例如1D3、1C10、1A10、

1G4、1G9和/或1E8中的任何一个或多个)具有(例如 ± 20 、15、10、9、8、7、6、5、4、3、2、1%或更小)实质上等同的结合亲和力,若在用于测定与以下的结合亲和力的任一个或多个测试下:US28 ECD3肽、US28表达细胞、HCMV感染细胞、来自HCMV血清反应呈阳性的个体的原代PBMC、HCMV感染人肺组织、和/或HCMV感染人肿瘤的类型,特别是侵袭性肿瘤,如食道癌、胃癌、直肠癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、恶性嗜铬细胞瘤和局部晚期结肠癌、乳腺癌及其转移瘤和胶质母细胞瘤4级,结合分子显示的结合亲和力以Kd形式表达,其在参考结合分子(例如1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8中的任何一个或多个)的结合亲和力的例如6、5、4、3、2或1个数量级内。在前述测试中的任何一个或多个下,根据本发明的第一方面的某些结合分子可具有比参考结合分子(例如1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8中的任何一个或多个)低的结合亲和力;然而在前述测试中的任何一个或多个下,根据本发明的第一方面的某些其他结合分子可具有比参考结合分子(例如1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8中的任何一个或多个)高的结合亲和力。应注意,例如特别在高结合亲和力可较不优选的CAR的情况下,较高结合亲和力并非必须始终合乎需要,且具有较高结合特异性的CAR一般产生比高结合亲和力的CAR更大的治疗效益。

[0377] 根据本发明的第一方面的结合分子可视为具有前述特性中的任何一个或多个。举例而言,结合分子可视为具有以下特性中的一种或多种(其中的每一者在上面更详细地描述):

[0378] 1. 与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8类似或实质上等同的结合特异性;

[0379] 2. 与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8类似或实质上等同的病毒株不可知的结合特性;

[0380] 3. 与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8的类似或实质上等同的背景结合;

[0381] 4. 与VUN100(单价VUN100和/或二价VUN100)的背景结合相比较低的背景结合;和/或

[0382] 5. 与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8实质上等同的结合亲和力。

[0383] 举例而言,结合分子可具有(i)与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8类似或实质上等同的病毒株不可知结合的特性;和(ii)与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8类似或实质上等同的背景结合。在其他实施方案中,结合分子可具有(i)与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8类似或实质上等同的病毒株不可知的结合特性;和(ii)比VUN100(单价VUN100和/或二价VUN100)的背景结合低的背景结合。在其他实施方案中,结合分子可具有(i)与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8类似或实质上等同的病毒株不可知的结合特性;(ii)与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8类似或实质上等同的背景结合;和(iii)比VUN100(单价VUN100和/或二价VUN100)的背景结合低的背景结合。在其他实施方案中,结合分子可具有(i)与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8类似或实质上等同的病毒株不可知的结合特性;(ii)与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8类似或实质上等同的背景结合;和(iii)比VUN100(单价VUN100和/或二价VUN100)的背景结合低的背景结合;和(iv)与1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8类似或实质上等同的结合特异性。

[0384] 在下文论述用于表征根据本发明的第一方面的结合分子的结合特性的另外任选的分析。

[0385] (a) 分析1:

[0386] 如本申请的图5中所示,根据本发明的示例性结合分子,即针对来源于US28的ECD3的肽序列产生的单克隆抗体1D3,与阴性对照BSA相比具有特异性结合至来源于US28的ECD3的肽序列的能力。

[0387] 该分析中所用的肽序列命名为:肽1,其具有序列TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 6,对应于ECD3的4N变体),和肽2,其具有序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO: 7,对应于ECD3的4D变体)。

[0388] 如图5中所指示,相比于BSA对照,1D3抗体展示与肽1和2中的每一者多大致27至28倍的特异性结合;且观测到的1D3与肽1和2的结合水平(均作为绝对水平且在针对相应BSA对照归一化时)基本上相同(例如,差异小于5%,且很可能在实验误差区内)。这些结果清楚地展示1D3对US28的ECD3具有特异性,且还为病毒株不可知的。

[0389] 相比之下,W0 2019/151865的VUN100(具有本申请的SEQ ID NO:60的序列)的结合特性极其不同。据报导,其结合于US28的N-末端区(在不同HCMV病毒株之间具有较高序列变化水平的US28的区)中的表位。VUN100展示具有相对较低的结合特异性水平;De Groof等人,2019(同上)在其支持信息、其图S1.A和本申请表2中报导特异性分数为4。另外,VUN100展示在与HCMV的VHL/E、Merlin与TB40/E病毒株的结合之间有相当大的差异,其中在TB40/E(B1类型)中的结合尤其减少,为针对Merlin病毒株所观测到的结合水平的约仅一半(W0 2019/151865的图8D)。VUN100的进一步表征报导于可在线获得的De Groof等人2020(doi: <https://doi.org/10.1101/2020.05.12.071860>)的预印文章中,其中补充数据的图2给出来自四个不同HCMV血清反应呈阳性的供体的由VUN100结合的经诱导HCMV IE阳性CD14+单核细胞%的结果,其中未测定各供体内的HCMV的病毒株。由与这些细胞结合的VUN100诱导的IE阳性水平在不同供体之间变化至多14倍。此可视为VUN100的结合能力在感染有不同HCMV病毒株的细胞之间显著变化的另一指示。与本发明的结合分子相比,VUN100的这些不利特性在本申请的实施例中进一步得到证实,具体参考图21A-E、图22和图23。

[0390] 因此,在一个实施方案中,在结合分析中,在其中参考抗体(其中该参考抗体为1D3)相比于相同阴性对照显示与肽1和/或肽2(优选两者)更大程度的结合的条件下,本发明的第一方面的结合分子的特征可在于,若其相比于阴性对照(如BSA),显示与肽1和/或肽2(优选两者)更大程度的结合,则其具有与HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位的结合特异性。在另一实施方案中,参考结合分子可选自1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8。

[0391] 在另一或替代实施方案中,若在前述分析中所观测到的针对肽1和2中的每一者的结合分子的各自结合水平(作为绝对水平和/或当以各自阴性对照(如BSA)对照归一化所观测到的结合水平时)基本上相同,如在彼此的30%、25%、20%、15%、10%、5%、4%、3%、2%、1%或更小内,则本发明的第一方面的结合分子可表征为具有与ECD3的病毒株不可知的结合。

[0392] 结合分子对US28蛋白的ECD3内的表位的结合特异性可通过以下评定,例如在ELISA,如如本申请的实施例中所述的方法,或通过该方法的变体,如通过在微量滴定板的第一组孔中包被来源于ECD3(如生物肽1和/或生物肽2)的肽和在微量滴定板的第二组孔中包被阴性对照(如BSA)。第一组孔可任选进一步再分为第一组孔的第一子组,其包含US28的ECD3的4N变体的序列,和第一组孔的第二子组,其包含US28的ECD3的4D变体的序列,以准许测定针对各变体的相对结合特异性。在包被第一组和第二组孔之后,可在第一组和第二组

孔中的每一者中孵育感兴趣的结合分子,任选其中在对应的第一组孔和第二组孔中额外测试阳性对照(例如1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8中的任何一个或多个)。在孵育之后,可洗涤孔且随后与酶缀合的第二抗体一起孵育。在进一步洗涤之后,可添加所缀合酶的底物,其经历可测量的反应(例如颜色变化、吸光度),其与结合分子和对照的结合量相关,其提供结合特异性和/或病毒株不可知的结合特征的指示。因此,在一些实施方案中,相较于与阴性对照(如BSA)的结合,感兴趣的结合分子在ELISA之后具有吸光度值,该值指示与第一组孔中来源于ECD3的肽1和/或2中的一种或多种(优选两种)的阳性结合。

[0393] 通过“阳性结合”,我们包括相比于与对照(例如BSA)的结合水平,感兴趣的结合分子可具有较高的与肽1和/或2中的一种或多种(优选两种)的结合水平,其指示较高的结合特异性。

[0394] 其例如在抗体1D3显示与肽1和/或肽2的结合比阴性对照(如BSA)大约多27倍至28倍的条件下,显示与肽1和/或肽2的结合比阴性对照(如BSA)多至少约2倍、至少约5倍、至少约10倍、至少15倍、至少20倍、至少25倍、约26倍、约27倍或约28倍。如在此情况下所用的术语“约”可包括所陈述值的 $\pm 50\%$ 、 40% 、 30% 、 20% 、 15% 、 10% 、 9% 、 8% 、 7% 、 6% 、 5% 、 4% 、 3% 、 2% 或 1% 的值(例如至少约10倍的 $\pm 10\%$ 是指9倍至11倍的范围)。举例而言,用于此类分析的条件可经选择与用于产生图5中所示的结果的分析中所用的条件相同或等同。

[0395] 替代地或另外,“阳性结合”可包括相关结合分子具有与阳性对照(例如1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8)相比类似(例如至少 $\pm 50\%$ 、 40% 、 30% 、 20% 、 10% 、 5% 或更小)或更高/增加/提高/改进的吸光度水平。

[0396] (b)分析2:

[0397] 在另一实施方案中,优选地,例如以1:50(w/v)稀释,例如如通过流式细胞术分析所测定,相比于与US28阴性细胞(如野生型CHO细胞)结合,本发明的结合分子优选与US28表达细胞(如经工程改造以表达US28的CHO细胞)结合。US28表达细胞优选为以展现US28蛋白细胞表面表达为特征的细胞。US28的表面表达通常特征在于显示细胞表面上的US28的胞外结构域(ECD 1、2、3和4分别对应于由如SEQ ID NO:5的序列所定义的HCMV病毒株DB或其他HCMV病毒株的等同序列编码的US28蛋白的位置1-37、位置91-101、位置167-183和位置250-273)。

[0398] 本申请的图4、7和表2证实与US28阴性对照CHO细胞相比,根据本发明的示例性结合分子,即针对US28的ECD3产生的单克隆抗体1D3,具有特异性结合至US28表达中国仓鼠卵巢(CHO-US28-A1)细胞的能力,其中特异性分数在所用结合条件下为约15至21.5。此可使用任何适合技术,例如使用FACS分析来分析,以测定结合的总细胞计数百分比。如本申请的实施例1中进一步报导,特别参考表2,尽管克隆US28-13-5G6-1D3(编码抗体1D3)经最充分表征,但与其与US28阴性对照CHO细胞的结合相比时,针对US28的ECD3产生的其他经克隆的单克隆抗体展示对CHO-US28-A1细胞的优异的结合特异性。如实施例2中进一步报导,在与其与US28阴性对照CHO细胞的结合相比时,针对US28的ECD3产生的其他经克隆的单克隆抗体仍然展示对CHO-US28-A1细胞的优异结合特异性,尤其在与其与US28阴性对照CHO细胞的结合相比时,具有极低的脱靶结合(例如与由VUN100展现的更高的脱靶结合水平相比)且在许多情况下还会展示对CHO-US28-A1细胞的较高结合特异性。

[0399] 这些数据清楚地证实,通过遵循本申请的教导内容,提供一致的产生针对US28的

ECD3产生的抗体的途径,相比于与US28阴性细胞(如US28阴性CHO细胞)的结合,该途径可提供与US28表达细胞(如CHO细胞)的高度特异性结合,优选具有较低的脱靶结合水平,其为一组不由VUN100共有的特征。

[0400] 相比之下,WO 2019/151865的VUN100(具有本申请的SEQ ID NO:60的序列)的结合特性极其不同。据报导,其结合于US28的N-末端区(在不同HCMV病毒株之间具有较高序列变化水平的US28的区)中的表位。当测试VUN100与表达US28的HEK293T膜(HEK+US28)或经模拟转染的HEK293T膜的结合时,其展示具有相对低水平的结合特异性:De Groof等人,2019(同上)在其支持信息、其图S1.A(且概述于本申请的表2中)中报导特异性分数为4。VUN100显然不能够提供与US28的高度特异性结合。与本发明的结合分子相比,VUN100的此类不利特性在本申请的实施例中进一步得到证实,具体参考图21A-E、图22和图23。

[0401] 因此,在一个优选的实施方案中,本发明的第一方面的结合分子将显示特异性结合,其特征在于:与US28阴性细胞(如CHO细胞)相比,其对US28表达细胞(如CHO-US28-A1细胞,任选其中US28序列对应于由HCMV的病毒株DB或TB40/E编码的序列)的结合特异性大于由VUN100达成的特异性水平。举例而言,本发明的第一方面的结合分子的特异性水平可大于VUN100在相同分析中相同摩尔浓度下达成的特异性水平的至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约80%、约90%、约100%(即约2倍)、约150倍、约200%(即约3倍)、约300%(即约4倍)、约400%(即约5倍)或约500%(即约6倍)。在此情况下,VUN100比较物可指代一种多肽,该多肽包含SEQ ID NO:60-64的序列中的任何一个或多个的序列、基本上由其组成或由其组成。在SEQ ID NO:61和63的情况下,此可包括具有或不具有指定信号肽序列的蛋白质。

[0402] 在另一优选的实施方案中,本发明的第一方面的结合分子将显示特异性结合,其特征在于在相同分析中相同摩尔浓度下,相比于US28阴性细胞(如CHO细胞),其对于US28表达细胞(如CHO-US28-A1细胞,任选其中US28序列对应于由HCMV的病毒株DB或TB40/E编码的序列)的结合特异性与1D3、1C10、1A10、1G4和/或1E8中的任何一个或多个至少约为相同特异性水平。如在此情况下所用的术语“约”可包括在相同分析中相同摩尔浓度下,1D3、1C10、1A10、1G4和/或1E8中的任何一个或多个的特异性水平的 $\pm 80\%$ 、70%、60%、50%、40%、30%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的值。

[0403] 在此情况下,1D3、1C10、1A10和/或1E8比较物可指包含以下、基本上由以下组成或由以下组成的抗体分子:

[0404] 如SEQ ID NO:20所定义的1D3的重链多肽序列(在去除指定N-末端前导序列之后)和如SEQ ID NO:21所定义的1D3的轻链多肽序列(在去除指定N-末端前导序列之后);

[0405] 如SEQ ID NO:157所定义的1C10的重链多肽序列(在去除指定N-末端前导序列之后)和如SEQ ID NO:158所定义的1C10的轻链多肽序列(在去除指定N-末端前导序列之后);

[0406] 如SEQ ID NO:161所定义的1A10的重链多肽序列(在去除指定N-末端前导序列之后)和如SEQ ID NO:162所定义的1A10的轻链多肽序列(在去除指定N-末端前导序列之后);
或

[0407] 如SEQ ID NO:153所定义的1E8的重链多肽序列(在去除指定N-末端前导序列之后)和如SEQ ID NO:154所定义的1E8的轻链多肽序列(在去除指定N-末端前导序列之后)。

[0408] 可例如进行此类分析以测定与US28表达细胞(如CHO-US28-A1细胞,任选其中US28

序列对应于由HCMV的病毒株DB或TB40/E编码的序列) 和与US28阴性细胞(如CHO细胞)的相对结合,例如以等同于1D3、1C10、1A10和/或1E8的1:50(w/v) 稀释的摩尔比,例如通过流式细胞术分析测定。

[0409] (c) 分析3:

[0410] 在另一实施方案中,优选地,相比于与不具有HCMV感染的等同细胞的结合相比,本发明的第一方面的结合分子可优选结合于HCMV感染细胞(如MRC-5细胞;cat#CCL-171, RRID:CVCL_0440,美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), Manassas, VA 20110USA)。如本申请的图8中所示,当使用流式细胞术分析进行分析时,根据本发明的示例性结合分子,即针对US28的ECD3产生的单克隆抗体1D3,具有与经HCMV感染的MRC-5细胞结合但不与未感染(模拟)细胞结合的能力。在所使用的分析条件下,相比于与未感染(模拟)细胞的0%结合,1D3展示与HCMV感染细胞的约5.4%结合。如图9中所示,进一步测试展示,相比于未感染细胞,1D3与经HCMV感染的MRC-5细胞的表面特异性结合(具有多大致16倍的特异性)。

[0411] 因此,在另一优选的实施方案中,相比于与不具有HCMV感染的等同细胞的结合,本发明的第一方面的结合分子将显示与HCMV感染细胞(如MRC-5细胞)的优选结合,该优选结合多或至少多5倍、约6倍、约7倍、约8倍、约9倍、约10倍、约11倍、约12倍、约13倍、约14倍、约15倍或约16倍。此类分析可例如根据用于产生本申请的图8或图9中所示的结果的方案或使用等同方案进行。如在此情况下所用的术语“约”可包括为所陈述值的±50%、40%、30%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的值。

[0412] 在另一优选的实施方案中,相比于与不具有HCMV感染的等同细胞的结合,本发明的第一方面的结合分子将显示与HCMV感染细胞(如MRC-5细胞)的优选结合,该优选结合大于由VUN100达成的优选结合水平。举例而言,本发明的第一方面的结合分子的优选结合水平可大于由VUN100在相同分析中相同摩尔浓度下达成的优选结合水平的至少约10%、约20%、约30%、约40%、约50%、约60%、约80%、约90%、约100%(即约2倍)、约150倍、约200%(即约3倍)、约300%(即约4倍)、约400%(即约5倍)或约500%(即约6倍)。在此情况下,VUN100比较物可指代一种多肽,该多肽包含SEQ ID NO:60-64的序列中的任何一个或多个的序列、基本上由其组成或由其组成。在SEQ ID NO:61和63的情况下,此可包括具有或不具有指定信号肽序列的蛋白质。

[0413] 相比于与不具有HCMV感染的等同细胞的结合,本发明的第一方面的结合分子可例如显示与HCMV感染细胞的优选结合,其为或至少为约20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或实质上100%的本发明的参考抗体(例如1D3、1C10、1A10、1G4、1G9和/或1E8中的任何一个或多个)在相同条件下的优选结合活性。如在此情况下所用的术语“约”可包括为所陈述值的±50%、40%、30%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%的值(例如10%的±50%为指5%至15%的范围)。举例而言,此类分析的条件可经选择以与用于产生图8或图9中所示的结果的分析中的条件相同或等同。

[0414] 多肽

[0415] 根据本发明的第一方面的结合分子包含一条或多条多肽链、基本上由其组成或由其组成。

[0416] “多肽”在本文中以其最广泛意义使用,是指两种或更多种子单元氨基酸、氨基酸类似物或其他肽模拟物的化合物。因此,术语“多肽”包括短肽序列且还包括较长多肽和蛋白质。如本文所用的术语“氨基酸”包括标准的二十种基因编码氨基酸及其呈“D”形式(与天然“L”形式相比)的对应立体异构体、 Ω 氨基酸、其他天然存在的氨基酸、非常规氨基酸(例如 α,α -二取代氨基酸、N-烷基氨基酸等)和化学衍生氨基酸(参见下文)。

[0417] 本文中的氨基酸可通过全称、三字母编码或单字母编码指代。当具体列举氨基酸,如“丙氨酸”或“Ala”或“A”时,除非另外明确说明,否则该术语是指L-丙氨酸和D-丙氨酸两者。其他非常规氨基酸也可为本发明的多肽的适合组分,只要多肽保留所需功能特性即可。对于所示肽,各编码氨基酸残基适当由单一字母名称表示,该名称对应于常规氨基酸的常用名。

[0418] 在一个实施方案中,如本文所定义的多肽包含L-氨基酸或由其组成。

[0419] 本领域技术人员将了解,本发明和/或如本文结合本发明所描述使用的多肽可包含已经修饰或衍生的一个或多个氨基酸或由其组成。

[0420] 一个或多个氨基酸的化学衍生物可通过与功能侧基反应来达成。此类衍生分子包括例如其中游离氨基已衍生形成胺盐酸盐、对甲苯磺酰基、羧基苯氧基、叔丁氧羰基、氯乙酰基或甲酰基的那些分子。游离羧基可经衍生以形成盐、甲酯和乙酯或其他类型的酯和酰胺。游离羟基可经衍生以形成O-酰基或O-烷基衍生物。还包括含有二十种标准氨基酸的天然存在的氨基酸衍生物的那些肽作为化学衍生物。举例而言:4-羟脯氨酸可替换脯氨酸;5-羟赖氨酸可替换赖氨酸;3-甲基组氨酸可替换组氨酸;高丝氨酸可替换丝氨酸,以及鸟氨酸替换赖氨酸。衍生物还包括含有一个或多个添加或缺失的肽,只要维持必需的活性即可。其他所包括的修饰为酰胺化、氨基端酰化(例如乙酰化或硫代乙醇酸酰胺化)、末端羧基酰胺化(例如用氨或甲胺)及其类似末端修饰。

[0421] 本领域技术人员应进一步了解,肽模拟化合物也可有用的。术语“肽模拟物”是指模拟特定肽的构象和所需特征作为治疗剂的化合物。

[0422] 举例而言,所述多肽不仅包括氨基酸残基通过肽(-CO-NH-)键接合的分子,而且包括其中肽键发生逆转的分子。此类逆-反肽模拟物可使用本领域已知的方法,例如Meziere等人(1997,《免疫学杂志(J. Immunol.)》,159(7):3230-3237)中所述的方法制成。此方法涉及制成含有涉及主链而非侧链的方向的变化的假肽。含有NH-CO键而非CO-NH肽键的逆转肽对蛋白水解的抗性大得多。替代地,该多肽可为其中氨基酸残基中的一种或多种经- γ (CH₂NH)-键而非常规酰胺键连接的肽模拟化合物。

[0423] 在另一替代方案中,可完全省去肽键,条件为使用保留氨基酸残基的碳原子之间的间距的适当接头部分;其可有利于接头部分具有与肽键实质上相同的电荷分布和实质上相同的平面度。

[0424] 还将了解,该多肽可宜在其N-末端或C-末端处阻断,以便帮助降低对胞外蛋白水解消化的易感性。

[0425] 多种非编码或经修饰的氨基酸(如D-氨基酸和N-甲基氨基酸)还已经用于修饰哺乳动物肽。此外,假定生物活性构象可通过共价修饰(如环化)或通过并入内酰胺或其他类型的桥键而稳定化,例如参见Veber等人(1978,《美国国家科学院院刊(Proc.Natl.Acad.Sci.USA)》,75:2636)和Thursell等人(1983,《生物化学与生物物理研究

通讯(Biochem.Biophys.Res.Comm.)》111:166),其通过引用并入本文中。

[0426] 结合分子结构:

[0427] 根据本发明的第一方面的“结合分子”通常包含一个或多个多肽、基本上由其组成或由其组成。

[0428] 在一些实施方案中,结合分子(或其一部分)可经由多个多肽的组合形成。举例而言, V_H 多肽可与 V_L 多肽组合,在其中形成Fab片段。多肽的组合可为来自一个示例性ECD3结合分子的 V_H 多肽,其与同一示例性ECD3结合分子的 V_L 多肽组合,或与不同示例性ECD3结合分子的 V_L 多肽组合。

[0429] 在一些优选的实施方案中,结合分子选自:抗体和嵌合抗原受体(CAR)。

[0430] 如上文所论述且进一步阐明于实施例1的表2中以及实施例2中,本申请描述根据本文所描述的方法针对US28的ECD3产生的大量抗体,其具有高度有益的对US28的结合特性,包括抗体13-5G6-1D3(本文中一般缩写为“1D3”)、13-5C6-1B5、14-1H3-1A6、13-1C10-1C10(本文中一般缩写为“1C10”)、14-1H3-1A10(本文中一般缩写为“1A10”)、14-2C2-1G4(本文中一般缩写为“1G4”)、13-1C10-1G9(本文中一般缩写为“1G9”)和14-4E4-1E8(本文中一般缩写为“1E8”)。

[0431] 如在本申请的部分N中所进一步论述,本申请还提供一种根据本发明的第三十四方面获得对HCMV的US28蛋白的胞外结构域3(ECD3)内的表位具有结合特异性的其他抗体的方法。举例而言,该方法可包括:

[0432] (a) 提供一种或多种对应于US28蛋白的ECD3中所存在的氨基酸序列的肽,如一或两个包含以下、基本上由以下组成或由以下组成的肽:多肽序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) 和/或TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6) 和/或任一者或两者的免疫原性片段;

[0433] (b) 提供一种或多种候选抗体(其任选已响应于所述肽中的一种或两种而培养);和

[0434] (c) 测定一种或多种候选抗体对所述肽中的一种或两种的结合特异性和/或结合亲和力。

[0435] 在一些优选的实施方案中,本发明的第一方面的结合分子包含一个、两个、三个、四个、五个或六个互补决定区(CDR),其对应于分别如SEQ ID NO:8、9、10、14、15和16所定义的抗体1D3的CDR序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个,和/或抗体1D3的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体,且任选其中结合分子选自抗体和CAR。

[0436] 如下为如SEQ ID NO:8、9、10、14、15和16所定义的抗体1D3的CDR序列的序列和一致性:

[0437]	SEQ ID NO: 8	GFTFTDYY	1D3 的 V_H -CDR1 序列
	SEQ ID NO: 9	IRSKANGYTT	1D3 的 V_H -CDR2 序列
	SEQ ID NO: 10	ARDERRTAWLAY	1D3 的 V_H -CDR3 序列
	SEQ ID NO: 14	QSIVHSNGNTY	1D3 的 V_L -CDR1 序列
[0438]	SEQ ID NO: 15	KVS	1D3 的 V_L -CDR2 序列
	SEQ ID NO: 16	FQGSHVPTWT	1D3 的 V_L -CDR3 序列

[0439] 在另一实施方案中,本发明的第一方面的结合分子包含一个、两个、三个、四个、五

个或六个互补决定区 (CDR), 其对应于分别如SEQ ID NO:112、113、114、117、83、118所定义的抗体1C10的CDR序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个, 和/或抗体1C10的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体, 且任选其中结合分子选自抗体和CAR。

[0440] 如下为如SEQ ID NO:112、113、114、117、83、118所定义的抗体1C10的CDR序列的序列和一致性:

[0441]	SEQ ID NO:112	SHALS	1C10的V _H -CDR1序列
	SEQ ID NO:113	SISSRGRTYYPDSVKG	1C10的V _H -CDR2序列
	SEQ ID NO:114	GGTHYSYGNFDF	1C10的V _H -CDR3序列
	SEQ ID NO:117	SVSSSVSYMH	1C10的V _L -CDR1序列
	SEQ ID NO:83	DTSKLAS	1C10的V _L -CDR2序列
	SEQ ID NO:118	QQWSNNPPIT	1C10的V _L -CDR3序列

[0442] 在另一实施方案中, 本发明的第一方面的结合分子包含一个、两个、三个、四个、五个或六个互补决定区 (CDR), 其对应于分别如SEQ ID NO:112、113、114、117、83、118所定义的抗体1C10的CDR序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个, 和/或抗体1A10的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体, 且任选其中结合分子选自抗体和CAR。

[0443] 如下为如SEQ ID NO:112、113、114、117、83、118所定义的抗体1A10的CDR序列的序列和一致性:

[0444]	SEQ ID NO:112	SHALS	1A10的V _H -CDR1序列
	SEQ ID NO:113	SISSRGRTYYPDSVKG	1A10的V _H -CDR2序列
	SEQ ID NO:114	GGTHYSYGNFDF	1A10的V _H -CDR3序列
	SEQ ID NO:117	SVSSSVSYMH	1A10的V _L -CDR1序列
	SEQ ID NO:83	DTSKLAS	1A10的V _L -CDR2序列
	SEQ ID NO:118	QQWSNNPPIT	1A10的V _L -CDR3序列

[0445] 在另一实施方案中, 本发明的第一方面的结合分子包含一个、两个、三个、四个、五个或六个互补决定区 (CDR), 其对应于分别如SEQ ID NO:76、77、78、82、83和84所定义的抗体1G9的CDR序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个, 和/或抗体1G9的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体, 且任选其中结合分子选自抗体和CAR。

[0446] 如下为如SEQ ID NO:76、77、78、82、83和84所定义的抗体1G9的CDR序列的序列和一致性:

[0447]	SEQ ID NO: 76	SYAMS	1G9 的 V _H -CDR1 序列
	SEQ ID NO: 77	SISSGGSTYYPDSVKG	1G9 的 V _H -CDR2 序列
	SEQ ID NO: 78	GGSTMITTGLGFAY	1G9 的 V _H -CDR3 序列
[0448]	SEQ ID NO: 82	SASSSVSYMH	1G9 的 V _L -CDR1 序列
	SEQ ID NO: 83	DTSKLAS	1G9 的 V _L -CDR2 序列
	SEQ ID NO: 84	QQWSSNPPLT	1G9 的 V _L -CDR3 序列

[0449] 在另一实施方案中, 本发明的第一方面的结合分子包含一个、两个、三个、四个、五个或六个互补决定区 (CDR), 其对应于分别如SEQ ID NO:76、95、96、82、99和100所定义的抗体1E8的CDR序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个, 和/或抗体1E8的所述

CDR序列中的任何一个或多个的功能变体,且任选其中结合分子选自抗体和CAR。

[0450] 如下为如SEQ ID NO:76、95、96、82、99和100所定义的抗体1E8的CDR序列的序列和一致性:

[0451]	SEQ ID NO:76	SYAMS	1E8的V _H -CDR1序列
	SEQ ID NO:95	SISSGGRTYYPD SVKG	1E8的V _H -CDR2序列
	SEQ ID NO:96	GGTRHSYGN GFDY	1E8的V _H -CDR3序列
	SEQ ID NO:82	SASSSVSYM H	1E8的V _L -CDR1序列
	SEQ ID NO:99	DSSKLAS	1E8的V _L -CDR2序列
	SEQ ID NO:100	QQWTSNP PIT	1E8的V _L -CDR3序列

[0452] 在其他实施方案中,本发明的第一方面的结合分子包含一个、两个、三个、四个、五个或六个互补决定区(CDR),其对应于任何其他对US28的ECD3具有结合特异性(且优选为病毒株不可知的结合特异性)的抗体的CDR序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个(和/或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体),如如本文所述的抗体13-5C6-1B5和14-1H3-1A6中的任一者,和/或通过获得其他对HCMV的US28蛋白的胞外结构域3(ECD3)内的表位具有结合特异性的抗体的方法获得的任何抗体,如上文所描述。

[0453] 将了解,含有三个或更少CDR区(在一些情况下,仅单个CDR或其一部分)的分子能够保持CDR所衍生自的抗体的抗原结合活性。举例而言,Gao等人(1994,《生物化学杂志(J Biol Chem)》269:32389-93)描述了对其底物具有高亲和力的完整V_L链(包括全部三个CDR)。

[0454] 含有两个CDR区的分子例如由Vaughan和Sollazzo(2001,《组合化学和高通量筛选(Combinatorial Chemistry&High Throughput Screening)》,4:417-430)描述。在第418页(右栏-3我们的设计策略)上,描述了仅包括穿插于框架区内的H1和H2 CDR高变区的微型抗体。微型抗体描述为能够与目标结合。Vaughan和Sollazzo参考了Pessi等人(1993,《自然(Nature)》,362:367-9)和Bianchi等人(1994,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》,236:649-59)且更详细地描述了H1和H2微型抗体及其特性。Qiu等人(2007,《自然生物技术(Nature Biotechnology)》,25:921-9)证实由两个连接的CDR组成的分子能够结合抗原(摘要和第926页,右栏)。Quiocho(1993,《自然》,362:293-4)提供Pessi等人“微型抗体”技术的概述。Ladner(2007,《自然生物技术》,25:875-7)检阅Qiu等人的论文且评述含有两个CDR的分子能够保持抗原结合活性(第875页,右栏)。

[0455] Laune等人(1997,JBC,272:30937-44)描述了含有单个CDR区的分子,证实一系列来源于CDR的己肽显示抗原结合活性(摘要),且应注意,完全单个CDR的合成肽显示强结合活性(第30942页,右栏)。Monnet等人(1999,JBC,274:3789-96)展示一系列12-聚体肽和相关框架区具有抗原结合活性(摘要),且评述单独CDR3样肽能够结合抗原(第3785页,左栏)。Heap等人(2005,《普通病毒学杂志(J.Gen.Virol.)》,86:1791-1800)报导“微抗体”(含有单个CDR的分子)能够结合抗原(摘要和第1791页,左栏),且展示来自抗HIV抗体的环肽具有抗原结合活性和功能。Nicaise等人(2004,《蛋白质科学(Protein Science)》,13:1882-91)展示单个CDR可赋予其溶菌酶抗原的抗原结合活性和亲和力。

[0456] 当提及抗体的特定CDR序列的功能变体时,将了解,如所定义的抗体中的一个或多个CDR可变化。因此,在抗体定义为包含各自具有特定序列的轻链或重链CDR(例如CDR 1-3)

的情况下,那些特定序列中的至多一个、两个或三个可变化。类似地,当抗体定义为包含各自具有特定序列的轻链和重链CDR(例如六个CDR)时,那些特定序列中的至多一个、两个、三个、四个、五个或全部六个可变化。功能变体通常为如下文进一步描述的保守性氨基酸替换和/或可包括氨基酸缺失和/或插入。

[0457] 举例而言,1D3的 V_H -CDR1序列为8-氨基酸序列GFTFTDYY(SEQ ID NO:8)。其功能变体可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7或8个)如下文进一步描述的保守性氨基酸替换,和/或可包括一个或多个(例如1、2、3、4或5个)氨基酸缺失和/或一个或多个氨基酸插入。1C10、1A10、1G9和1E8的 V_H -CDR1序列为5-氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:112、112、138、76和76)。其功能变体可包括一个或多个(例如1、2、3、4或5个)如下文进一步描述的保守性氨基酸替换,和/或可包括一个或多个(例如1或2个)氨基酸缺失和/或一个或多个氨基酸插入。

[0458] 1D3的 V_H -CDR2序列为10-氨基酸序列IRSKANGYTT(SEQ ID NO:9)。其功能变体可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)如下文进一步描述的保守性氨基酸替换,和/或可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6或7个)氨基酸缺失和/或一个或多个氨基酸插入。1C10、1A10、1G9和1E8的 V_H -CDR2序列为16-氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:113、113、77和95)。其功能变体可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个)如下文进一步描述的保守性氨基酸替换,和/或可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13)氨基酸缺失和/或一个或多个氨基酸插入。

[0459] 1D3的 V_H -CDR3序列为12-氨基酸序列ARDERRTAWLAY(SEQ ID NO:10)。其功能变体可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个)如下文进一步描述的保守性氨基酸替换,和/或可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8或9个)氨基酸缺失和/或一个或多个氨基酸插入。1G9的 V_H -CDR3序列为14-氨基酸序列(SEQ ID NO:78)。其功能变体可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13或14个)如下文进一步描述的保守性氨基酸替换,和/或可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10或11个)氨基酸缺失和/或一个或多个氨基酸插入。1C10、1A10和1E8的 V_H -CDR3序列为13-氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:114、114和96)。其功能变体可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13个)如下文进一步描述的保守性氨基酸替换,和/或可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)氨基酸缺失和/或一个或多个氨基酸插入。

[0460] 1D3的 V_L -CDR1序列为11-氨基酸序列QSIVHSNGNTY(SEQ ID NO:14)。其功能变体可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)如下文进一步描述的保守性氨基酸替换,和/或可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7或8个)氨基酸缺失和/或一个或多个氨基酸插入。1C10、1A10、1G9和1E8的 V_L -CDR1序列为10-氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:117、117、82和82)。其功能变体可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)如下文进一步描述的保守性氨基酸替换,和/或可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6或7个)氨基酸缺失和/或一个或多个氨基酸插入。

[0461] 1D3的 V_L -CDR2序列为3-氨基酸序列KVS(SEQ ID NO:15)。其功能变体可包括一个或多个(例如1、2、3个)如下文进一步描述的保守性氨基酸替换,和/或可包括一个或多个氨基酸缺失和/或一个或多个氨基酸插入。1C10、1A10、1G9和1E8的 V_L -CDR2序列为7-氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:83、83、145、83和99)。其功能变体可包括一个或多个(例如1、2、3、4、

5、6或7个)如下文进一步描述的保守性氨基酸替换,和/或可包括一个或多个(例如1、2、3或4个)氨基酸缺失和/或一个或多个氨基酸插入。

[0462] 1D3的V_L-CDR3序列为10-氨基酸序列FQGSHVPTWT (SEQ ID NO:16)。其功能变体可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)如下文进一步描述的保守性氨基酸替换,和/或可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6或7个)氨基酸缺失和/或一个或多个氨基酸插入。1C10、1A10、1G9和1E8的V_L-CDR3序列为10-氨基酸序列(分别为SEQ ID NO:118、118、84和100)。其功能变体可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个)如下文进一步描述的保守性氨基酸替换,和/或可包括一个或多个(例如1、2、3、4、5、6或7个)氨基酸缺失和/或一个或多个氨基酸插入。

[0463] 所述CDR中的一种或多种的功能变体可通过本领域熟知的各种方法中的任一种产生。举例而言,包含1、2、3、4、5或6个CDR的结合分子的结合特性可通过成熟方法产生。举例而言,提供结合分子的CDR的结合亲和力可通过成熟步骤修饰(增加或减少);和/或提供结合分子的CDR的结合特异性可通过成熟步骤修饰(一般而言,增加)。应理解,对US28的高或增加的结合亲和力水平可能并非始终合乎需要,尤其是在以对如健康人细胞的脱靶不可接受的高水平的结合亲和力为代价时不合乎需要。结合分子,包括但不限于CAR和CAR表达细胞,例如可得益于结合亲和力的较低水平,但一般将始终得益于结合特异性的优化水平。

[0464] 在成熟方法的一个实例中,可在抗原结合筛选期间使用单价展示噬菌粒系统修改亲和力效应。两种替代或组合方法、非靶向诱变和寡核苷酸定向诱变可用于构建随机或限定子库以引入大量原始结合分子的突变体。接着通过修改筛选条件,如在严格度分析中,选择结合至US28表达细胞和/或HCMV感染细胞的具有所需经修饰特性(如增加的特异性和/或增加或减少的亲和力)的结合分子。

[0465] 本发明的第一方面的结合分子包含以下抗体的一个、两个、三个、四个、五个或全部六个CDR序列中的任一者的功能变体:

[0466] (a) 1D3,分别如SEQ ID NO:8、9、10、14、15和16所定义;

[0467] (b) 1C10,分别如SEQ ID NO:112、113、114、117、83和118所定义;

[0468] (c) 1A10,分别如SEQ ID NO:112、113、114、117、83和118所定义;

[0469] (d) 1G9,分别如SEQ ID NO:76、77、78、82、83和84所定义;和/或

[0470] (e) 1E8,分别如SEQ ID NO:76、95、96、82、99和100所定义;

[0471] 且如上文进一步描述,当分别在与1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8相同的条件下测试时,优选具有一个或多个与1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的结合特性类似或实质上等同的结合特性。

[0472] 在一个实施方案中,本发明的第一方面的结合分子可包含:

[0473] (a) 以下抗体的可变重链(V_H)的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个:

[0474] i. 1D3,分别如SEQ ID NO:8、9和10所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体);

[0475] ii. 1C10,分别如SEQ ID NO:112、113和114所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体);

[0476] iii. 1A10,分别如SEQ ID NO:112、113和114所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体);

[0477] iv.1G9,分别如SEQ ID NO:76、77和78所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体);和/或

[0478] v.1E8,分别如SEQ ID NO:76、95和96所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体);

[0479] 和/或

[0480] (b)以下抗体的可变轻链(V_L)的CDR 1、2和3的序列中的一个、两个或全部三个:

[0481] i.1D3,分别如SEQ ID NO:14、15和16所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体);

[0482] ii.1C10,分别如SEQ ID NO:117、83和118所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体);

[0483] iii.1A10,分别如SEQ ID NO:117、83和118所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体);

[0484] iv.1G9,分别如SEQ ID NO:82、83和84所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体);和/或

[0485] v.1E8,分别如SEQ ID NO:82、99和100所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体)。

[0486] 另外或替代地,本发明的第一方面的结合分子可包含:

[0487] (a)至少一个可变重链(V_H)多肽,其包含具有以下序列的CDR 1、2和3序列:

[0488] i.分别SEQ ID NO:8、9和10(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体),且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:12的序列(或其功能变体)、基本上由其组成或由其组成;

[0489] ii.分别SEQ ID NO:112、113和114(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体),且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:104的序列(或其功能变体)、基本上由其组成或由其组成;

[0490] iii.分别SEQ ID NO:112、113和114(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体),且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:122的序列(或其功能变体)、基本上由其组成或由其组成;

[0491] iv.分别SEQ ID NO:76、77和78(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体),且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:68的序列(或其功能变体)、基本上由其组成或由其组成;和/或

[0492] v.分别SEQ ID NO:76、95和96(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体),且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:88的序列(或其功能变体)、基本上由其组成或由其组成;

[0493] 和/或

[0494] (b)至少一个可变轻链(V_L)多肽,其包含具有以下序列的CDR 1、2和3序列:

[0495] i.分别SEQ ID NO:14、15和16(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体),且任选其中可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:18的序列、基本上由其组成或由其组成;

[0496] ii.分别SEQ ID NO:117、83和118(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的

功能变体),且任选其中可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:108的序列、基本上由其组成或由其组成;

[0497] iii.分别SEQ ID NO:117、83和118(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体),且任选其中可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:126的序列、基本上由其组成或由其组成;

[0498] iv.分别SEQ ID NO:82、83和84(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体),且任选其中可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:72的序列、基本上由其组成或由其组成;和/或

[0499] v.分别SEQ ID NO:82、99和100(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体),且任选其中可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:92的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0500] 如下为分别如SEQ ID NO:12和18所定义的抗体1D3的可变重链(V_H)可变轻链(V_L)多肽序列的序列和一致性:

[0501]	SEQ ID NO: 12	EVKLVESGGG LVQPGGSLRL ACATSGFTFT DYYMSWVRQP PGKALEWLG F IRSKANGYTT EYSASVKGRF TISRDNQSQI LYLQMNLTLS EDSATYYCAR DERRTAWLAY WGQGTTLTVS A	1D3 的 V_H 序列的成熟形式, 无前导序列
	SEQ ID NO: 18	DVLTQTPLS LPVSLGDQAS ISCRSSQSIV HSGNTYLDW YLQKPGQSPK LLIYKVS NRF SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YYCFQGSHVP TWTFGGGTKL EIK	1D3 的 V_L 序列的成熟形式, 无前导序列

[0502] 如下为分别如SEQ ID NO:104和108所定义的抗体1C10的可变重链(V_H)可变轻链(V_L)多肽序列的序列和一致性:

[0503]	SEQ ID NO: 104	EVKLVESGGV LVKPGGSLKF SCAASGFTFS SHALSWVRQT PEKRLEWVAS ISSRGRITYYP DSVKGRFTVS RDNARNILYL QVSSLRSED T AMYYCTRGGT HYSYGN GDF WGQGTTLTVS S	1C10 的 V_H 序列的成熟形式, 无前导序列
	SEQ ID NO: 108	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCVSSSVS YMHWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGV PAR FSGSGSGTSY SLTISTMEAE DAATYYCQ QW SNNPPITFGA GTKLELK	1C10 的 V_L 序列的成熟形式, 无前导序列

[0504] 如下为分别如SEQ ID NO:122和126所定义的抗体1A10的可变重链(V_H)可变轻链(V_L)多肽序列的序列和一致性:

[0505]	SEQ ID NO: 122	EVKLVESGGV LVKPGGSLKF SCAASGFTLS SHALSWVRQT PEKRLEWVAS ISSRGRITYYP DSVKGRFTVS RDNARNILYL QVSSLRSED T AMYYCTRGGT HYSYGN GDF WGQGTTLTVS S	1A10 的 V_H 序列的成熟形式, 无前导序列
	SEQ ID NO: 126	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCVSSSVS YMHWYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGV PAR FSGSGSGTSY SLTISTMEAE DAATYYCQ QW SNNPPITFGA GTKLELK	1A10 的 V_L 序列的成熟形式, 无前导序列

[0506] 如下为分别如SEQ ID NO:68和72所定义的抗体1G9的可变重链(V_H)可变轻链(V_L)

多肽序列的序列和一致性:

[0507]	SEQ ID NO: 68	EVKLVESGGG LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYAMSWVRQT PEKRLEWVAS ISSGGSTYYF DSVKGRFTIS RDNARNILYL QMSSLRSED AMYCARGGS TMITTGLGFA YWGQTLVTV SA	1G9 的 V _H 序列的成熟形式, 无前导序列
	SEQ ID NO: 72	QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSSSSVS YMHYQQKSG TSPKRWIYDT SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW SSNPPLTFGA GTKLELK	1G9 的 V _L 序列的成熟形式, 无前导序列

[0508] 如下为分别如SEQ ID NO:88和92所定义的抗体1E8的可变重链(V_H)可变轻链(V_L)多肽序列的序列和一致性:

[0509]	SEQ ID NO: 88	EVKLVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYAMSWVRQT PEKRLEWVAS ISSGGRTYYF DSVKGRFTIS RDNARNILYL QMSSLRSED AIYYCARGGT RHYGNGFDY WQGTTTLTVS S	1E8 的 V _H 序列的成熟形式, 无前导序列
	SEQ ID NO: 92	QIVLSQSPTI MSASPGEKVT MTCSSSSVS YMHYQQKSG TSPKRWIYDS SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW TSNPPIITFGA GTKLELK	1E8 的 V _L 序列的成熟形式, 无前导序列

[0510] 在其他实施方案中,本发明的第一方面的结合分子包含(a)包含对US28的ECD3具有结合特异性(且优选为病毒株不可知的结合特异性)的另一抗体的V_H链的CDR 1、2和3序列(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体)的至少一个可变重链(V_H)多肽,和/或(b)包含对US28的ECD3具有结合特异性(且优选为病毒株不可知的结合特异性)的相同其他抗体的V_L链的CDR 1、2和3序列(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体)的至少一个可变轻链(V_L)多肽。该其他抗体可例如为如本文所述的抗体13-5C6-1B5和14-1H3-1A6中的任何一种,和/或通过获得对如上文所述的HCMV的US28蛋白的胞外结构域3(ECD3)内的表位具有结合特异性的其他抗体的方法获得的另一抗体。

[0511] 当抗体定义为具有包含特定氨基酸序列的轻链可变区和具有特定氨基酸序列的重链可变区时,应了解那些序列中的至多一个或两个可根据定义而变化。变异可仅在序列的非CDR区内、仅在序列的CDR区内,或在序列的非CDR区和CDR区内。通常,变异在CDR区之外,且因此轻链可变区和重链可变区的变体可包含本文所定义的特定CDR序列中的任何一个。

[0512] 在抗体包含如本文所定义的重链可变区和/或轻链可变区的变体(例如,选自SEQ ID NO:12、104、122、130、68和88的V_H和/或选自SEQ ID NO:18、108、126、134、72和92的V_L)的情况下,变体可具有至少1、2、3、4或5个氨基酸替换。通常,变体不具有超过30、20或10个氨基酸替换。因此,变体可具有至少1、2、3、4或5个氨基酸替换,但不超过30、20或10个氨基酸替换。

[0513] 在抗体包含如本文所定义的重链可变区和/或轻链可变区的变体(例如,选自SEQ ID NO:12、104、122、130、68和88的V_H和/或选自SEQ ID NO:18、108、126、134、72和92的V_L)的情况下,变体一般与所定义的氨基酸序列具有至少70%序列一致性,例如至少75%、80%、85%、90%、或95%序列一致性,且更一般而言与所定义的氨基酸序列具有95-99%序列一

致性(例如96%、97%、98%或99%序列一致性)。变化水平可仅适用于非CDR区。举例而言,如本文所定义的重链可变区和/或轻链可变区的变体(例如选自SEQ ID NO:12、104、122、130、68和88的V_H和/或选自SEQ ID NO:18、108、126、134、72和92的V_L)可与所定义的氨基酸序列具有至少70%一致性(例如75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%序列一致性),但包含一个或多个(如全部)如本文所定义的同CDR。

[0514] 两种多肽之间的序列一致性百分比可使用适合计算机程序,例如威斯康辛大学遗传计算组(the University of Wisconsin Genetic Computing Group)的GAP程序来确定,且将了解,一致性百分比为相对于已最佳比对序列的多肽来计算。可使用Clustal W程序(Thompson等人,(1994)《核酸研究(Nucleic Acids Res)》22,4673-80)替代地进行比对。所用参数可如下:快速成对比对参数:K-元组(字)大小;1,窗大小;5,空隙罚分;3,顶部对角线的数目;5。计分方法:x%。多序列比对参数:空隙开放罚分;10,空隙扩展罚分;0.05。计分矩阵:BLOSUM。

[0515] 本发明的第一方面的结合分子,其包含如以下所定义的抗体1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的可变重链(对于V_H)和/或可变轻链(V_L)多肽序列的功能变体:对于V_H,分别为SEQ ID NO:12、104、122、68和88且对于V_L为SEQ ID NO:18、108、126、72和92,如上文进一步描述,当在分别与1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8相同的条件下测试时,其优选具有一个或多个类似或实质上等同于1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的结合特性的结合特性。

[0516] 通常,优选地,本文所公开的变体的氨基酸替换为保守性氨基酸替换,例如其中氨基酸残基经具有类似侧链的氨基酸残基置换。保守性氨基酸替换为本领域所熟知的,并且包括(原始残基→替换)Ala(A)→Val、Gly或Pro;Arg(R)→Lys或His;Asn(N)→Gln;Asp(D)→Glu;Cys(C)→Ser;Gln(Q)→Asn;Glu(G)→Asp;Gly(G)→Ala;His(H)→Arg;Ile(I)→Leu;Leu(L)→Ile、Val或Met;Lys(K)→Arg;Met(M)→Leu;Phe(F)→Tyr;Pro(P)→Ala;Ser(S)→Thr或Cys;Thr(T)→Ser;Trp(W)→Tyr;Tyr(Y)→Phe或Trp;和Val(V)→Leu或Ala。

[0517] 抗体:

[0518] 在一个非限制性但优选的实施方案中,根据本发明的第一方面的结合分子可包含抗体。

[0519] 如本文所用的术语“抗体”任选包括该抗体的抗原结合片段。如本文所用的术语“嵌合抗原受体(CAR)”任选包括该CAR的抗原结合片段。

[0520] 通过“抗体或其抗原结合片段”,我们包括实质上完整的抗体分子,以及嵌合抗体、人源化抗体、经分离的人抗体、单链抗体、单特异性抗体、双特异性抗体、抗体重链、抗体轻链、抗体重链和/或轻链的均二聚体和杂二聚体,及其抗原结合片段和衍生物。适合的抗原结合片段和衍生物包括Fv片段(例如单链Fv和二硫键结合Fv)、Fab样片段(例如Fab片段、Fab'片段和F(ab)2片段)、单一可变结构域(例如VH和VL域)和单域抗体(dAb,包括单一形式和双重形式[dAb-接头-dAb],以及纳米抗体)。使用抗体片段而非全抗体的潜在优势为多重的。片段的较小尺寸可导致改善的药理特性,如更好地穿透实体组织。此外,抗原结合片段(如Fab、Fv、ScFv和dAb抗体片段)可在重组源(例如CHO细胞、大肠杆菌等)中表达且自重组源分泌,由此允许轻松生产大量所述片段。

[0521] 通过“抗体”或“其抗原结合片段”,我们包括实质上完整的抗体分子,以及嵌合抗体、人源化抗体和经分离的人抗体。

[0522] 包括“其抗原结合片段”、CAR或其抗原结合片段和/或根据本发明的第一方面的其他结合分子的“抗体”可例如：

[0523] i. 具有“n”的价数，其中n为一或多的整数，且因此例如，可为单价、二价、三价或多价的；和/或

[0524] ii. 对一种抗原或两种或更多种不同抗原具有结合特异性，例如其可具有特异性结合至“x”个不同抗原的能力，其中x为一或二或更多的整数，需满足至少一种抗原为US28蛋白的ECD3的要求；例如其可具有单特异性、双特异性、三特异性或多特异性结合特异性。

[0525] 抗体或其抗原结合片段的示例性形式可包括单链抗体、双特异性抗体、抗体重链、抗体轻链、抗体重链和/或抗体轻链的均二聚体和杂二聚体以及其抗原结合片段和衍生物中的任何一种或多种。适合的抗原结合片段和衍生物包括Fv片段（例如单链Fv和二硫键结合Fv）、Fab样片段（例如Fab片段、Fab'片段和F(ab)2片段）、单一可变结构域（例如VH和VL域）和单域抗体（dAb，包括单一形式和双重形式[dAb-接头-dAb]，以及纳米抗体）。使用抗体片段而非全抗体的潜在优势为多重的。片段的较小尺寸可导致改善的药理特性，如更好地穿透实体组织。此外，如Fab、Fv、单链Fv（ScFv）和dAb抗体片段的抗原结合片段可在重组宿主细胞（如大肠杆菌）中表达，且自重组宿主细胞分泌，由此允许轻松生产大量所述片段。

[0526] 如本文所用的术语“双特异性”是指多肽能够特异性结合至少两个靶标实体。这些目标实体中的每一种可为衍生自同一蛋白质的表位（例如结合至同一蛋白质的第一表位和第二表位，例如US28）。替代地，靶标实体可为衍生自不同蛋白质的表位（例如结合至第一蛋白质的第一表位和第二不同靶点（如不同蛋白质）的第二表位）。

[0527] 通过“ScFv分子”，我们是指其中V_H和V_L伴侣结构域经由柔性寡肽连接的分子。经工程改造的抗体（如ScFv抗体）可使用本领域已知的技术和方法制成。使用抗体片段而非全抗体的优势为多重的。片段的较小尺寸可导致改善的药理特性，如更好地穿透至靶标位点。去除全抗体的效应功能，如补体结合。Fab、Fv、ScFv和dAb抗体片段均可在大肠杆菌中表达且自大肠杆菌分泌，由此允许轻松生产大量片段。全抗体和F(ab')₂片段为“二价”。通过“二价”，我们是指抗体和F(ab')₂片段具有两个抗原结合位点。相比之下，Fab、Fv、ScFv和dAb片段为单价，仅具有一个抗原组合位点。

[0528] 词组“抗体”或“其抗原结合片段”还旨在涵盖抗体模拟物（例如具有高度稳定性但允许在某些位置引入变化性的非抗体骨架结构）。生物化学领域的技术人员将熟悉许多此类分子，如Gebauer和Skerra, 2009中所论述。示例性抗体模拟物包括：亲和体（也称为Trinectin；Nygren, 2008,《FEBS期刊（FEBS J）》, 275, 2668-2676）；CTLD（也称为四连接素（Tetranectin）；《医药技术创新（Innovations Pharmac. Technol.）》（2006）, 27-30）；adnectin（也称为monobody；《分子生物学方法（Meth. Mol. Biol.）》, 352（2007）, 95-109）；抗运载蛋白（anticalin）（《最新药物（Drug Discovery Today）》（2005）, 10, 23-33）；DARPin（锚蛋白；《自然生物科技（Nat. Biotechnol.）》（2004）, 22, 575-582）；高亲合性多聚体（avimer）（《自然生物科技》（2005）, 23, 1556-1561）；微体（《FEBS期刊》, （2007）, 274, 86-95）；肽适体（《生物治疗专家意见（Expert. Opin. Biol. Ther.）》（2005）, 5, 783-797）；Kunitz结构域（《药理学与实验疗法杂志（J. Pharmacol. Exp. Ther.）》（2006）318, 803-809）；affilin（《生物技术趋势（Trends. Biotechnol.）》, （2005）, 23, 514-522）；affimer（Avacta Life Sciences, Wetherby, UK）。

[0529] 本领域技术人员将进一步了解,无论目前存在或在未来存在,本发明还涵盖抗体及其抗原结合片段的修改版本,例如通过聚乙二醇或另一适合聚合物的共价连接(参见下文)和/或共价或非共价连接(例如通过呈现为融合蛋白)至其他多肽序列来修饰。

[0530] 产生抗体和抗体片段的方法为本领域所熟知。举例而言,抗体可经由数种方法中的任一种产生,所述方法采用诱导体内产生抗体分子、筛选免疫球蛋白库(Orlandi等人,1989;Winter等人,1991)或通过培养中的细胞系产生单克隆抗体分子。这些包括但不限于杂交瘤技术、人B细胞杂交瘤技术和艾伯斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus)杂交瘤技术(Kohler等人,1975.《自然》256:4950497;Kozbor等人,1985.《免疫学方法杂志(J.Immune Methods)》81:31-42;Cote等人,1983.《美国国家科学院院刊》80:2026-2030;Cole等人,1984.《分子与细胞生物学(Mol.Cell Biol.)》62:109-120)

[0531] 用于产生单克隆抗体的适合方法还公开于《单克隆抗体:技术手册(Monoclonal Antibodies:A manual of techniques)》,H Zola(CRC出版社,1988)和《单株杂交瘤抗体:技术与应用(Monoclonal Hybridoma Antibodies:Techniques and Applications)》,J G R Hurrell(CRC出版社,1982)中。

[0532] 如本文所用的术语“单克隆抗体”包括自实质上均质的抗体群体获得的抗体,即除了可少量存在可能天然存在的突变之外,构成该群体的单个抗体是相同的。单克隆抗体针对单一抗原位点具有高度特异性。此外,相比于通常包括针对不同决定簇(表位)的不同抗体的常规(多克隆)抗体制剂,每个单克隆抗体针对抗原上的单一决定簇。除了其特异性之外,单克隆抗体为有利的,因为其通过杂交瘤培养合成,未经其他免疫球蛋白污染。修饰语“单克隆”指示抗体为自实质上同质的抗体群体获得的特征,且不应理解为需要通过任何特定方法来产生该抗体。举例而言,将根据本发明使用的单克隆抗体可由Kohler等人,Nature,256:495(1975)首先描述的杂交瘤方法制成或可通过重组DNA方法(参见例如美国专利第4,816,567号)制成。还可使用例如Clackson等人,《自然》,352:624-628(1991)和Marks等人,《分子生物学杂志》,222:581-597(1991)中描述的技术自噬菌体抗体库分离“单克隆抗体”。

[0533] 同样地,可使用本领域熟知的方法获得抗体片段(参见例如Harlow和Lane,1988,《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,Cold Spring Harbor Laboratory,New York)。举例而言,本发明的抗体片段可通过抗体的蛋白水解或通过在大肠杆菌或哺乳动物细胞(例如中国仓鼠卵巢[CHO]细胞培养物或其他蛋白质表达系统)中表达编码片段的DNA来制备。替代地,抗体片段可通过常规方法进行全抗体的胃蛋白酶或番木瓜蛋白酶消化来获得。

[0534] 本领域技术人员将了解,对于人疗法和/或诊断,优选使用人抗体或人源化抗体。非人(例如鼠)抗体的人源化形式为具有优选地衍生自非人抗体的最小部分的经基因工程改造的嵌合抗体或抗体片段(例如抗原结合片段)。人源化抗体包括其中人抗体(受体抗体)的互补决定区(CDR)经来自具有所需功能的非人物种(供体抗体)(如小鼠、大鼠或兔)的互补决定区的残基置换的抗体。在一些情况下,人抗体的Fv框架残基经相应非人残基置换。人源化抗体还可包含既不存在于受体抗体中也不存在于导入互补决定区或框架序列中的残基。一般而言,人源化抗体将包含实质上全部的至少一个且通常两个可变结构域,其中全部或实质上全部的互补决定区对应于感兴趣的供体抗体(如非人抗体)的互补决定区,且全部

或实质上全部的框架区对应于相关人共有序列的框架区。人源化抗体最佳还包括通常衍生自人抗体的抗体恒定区(如Fc区)的至少一部分(参见例如Jones等人,1986,《自然》321:522-525;Riechmann等人,1988,《自然》332:323-329;Presta,1992,《结构生物学新观点(Curr.Op.Struct.Biol.)》2:593-596,其以引用的方式并入本文中)。

[0535] 人源化非人抗体的方法为本领域所熟知。一般而言,人源化抗体具有一个或多个自非人来源引入至其中的氨基酸残基。这些非人氨基酸残基通常称为导入残基,通常获自导入可变结构域。人源化可基本上如所描述进行(参见例如Jones等人,1986;Reichmann等人,1988;Verhoeyen等人,1988,《科学》239:1534-1536I;US4,816,567,其以引用的方式并入本文中),通过用对应啮齿动物互补决定区替换人互补决定区。因此,此类人源化抗体为嵌合抗体,其中实质上少于完整人可变结构域已被替换为来自非人物种的对应序列。实际上,人源化抗体通常可为其中一些互补决定区残基和可能一些框架残基被来自啮齿动物抗体中的类似位点的残基替换的人抗体。

[0536] 人抗体还可使用本领域已知的各种技术鉴别,包括噬菌体展示文库(参见例如Hoogenboom和Winter,1991,《分子生物学杂志》227:381;Marks等人,1991,《分子生物学杂志》222:581;Cole等人,1985,见:《单克隆抗体与癌症治疗(Monoclonal antibodies and Cancer Therapy)》,Alan R.Liss,第77页;Boerner等人,1991,《免疫学方法杂志》147:86-95,Soderlind等人,2000,《自然-生物技术(Nat Biotechnol)》18:852-6和WO 98/32845,其以引用的方式并入本文中)。

[0537] 本领域技术人员将了解,本发明的多肽(例如抗体)可具有任何适合的结构形式。

[0538] 抗体还可包含Fc区,对于该Fc区,存在Fc特异性受体。工程改造治疗性单克隆抗体或Fc融合蛋白的Fc区可产生更适合于其所需的药理学活性的分子(Strohl,2009,《生物技术新观点(Curr Opin Biotechnol)》20(6):685-91,其公开内容以引用的方式并入本文中)。

[0539] (a) 半衰期增加的经工程改造的Fc区

[0540] 一种提高治疗性抗体的功效的方法为增加其血清持久性,由此允许较高循环水平、较低施用频率和减少的剂量。

[0541] IgG的半衰期取决于与新生受体FcRn的pH依赖性结合。FcRn在内皮细胞的表面上表达,以pH依赖性方式结合IgG并保护其免于降解。

[0542] 一些在pH 6.0而非pH 7.4下选择性结合FcRn的抗体在多种动物模型中呈现出较高半衰期。

[0543] 位于CH2与CH3结构域之间的界面处的突变,如T250Q/M428L(Hinton等人,2004,《生物化学杂志》279(8):6213-6,其公开内容以引用的方式并入本文中)和M252Y/S254T/T256E+H433K/N434F(Vaccaro等人,2005,《自然-生物技术》23(10):1283-8,其公开内容以引用的方式并入本文中)已展示增加与FcRn的结合亲和力和IgG1的体内半衰期。

[0544] (b) 效应子功能改变的经工程改造的Fc区

[0545] 抗体Fc部分对FcγRI、FcγRII和FcγRIII的亲和力可通过流式细胞术与野生型IgG1比较,以测定FcγR表达细胞达成何种半最大结合浓度(Hezareh等人,2001,《病毒学杂志》,75(24):12161-12168,以引用的方式并入本文中)。此可替代地通过FcγR酶联免疫吸附分析(ELISA)测定(Shields等人,2001,《细胞发展与生物学分子基础(Mol.Basis Cell

Dev. Biol.)》, 276(9):6591-6604, 以引用的方式并入本文中)。

[0546] 四种人IgG同型以不同亲和力结合活化Fc γ 受体(Fc γ RI、Fc γ RIIa、Fc γ RIIIa)、抑制Fc γ RIIb受体和补体第一组分(C1q), 产生极为不同的效应功能(Bruhns等人, 2009,《血液(Blood.)》113(16):3716-25, 其公开内容以引用的方式并入本文中)。IgG1分子具有最高亲和力和诱导效应功能的能力, 而IgG2、IgG3和IgG4不太有效(Bruhns, 2012,《血液》119(24):5640-9; Hogarth和Pietersz, 2012,《自然综述: 药物发现(Nature Reviews Drug Discovery)》11, 311-331; Stewart等人2014《癌症免疫治疗杂志(Journal for ImmunoTherapy of Cancer)》2:29; Wang等人2015《免疫学前沿(Front Immunol)》6:368; Vidarsson等人2014,《免疫学前沿(Front Immunol)》5:520, 以引用的方式并入本文中)。另外, IgG1的Fc区中的某些突变显著降低Fc γ R亲和力和效应功能, 同时保留新生FcR(FcRn)相互作用(Ju和Jung, 2014,《生物技术新观点》30:128-39; Leabman等人2013, mAbs, 5:6, 896-903; Oganessian等人2008《晶体学报D生物晶体学(Acta Crystallogr D Biol Crystallogr.)》64(Pt 6):700-704; Oganessian等人2008《分子免疫学(Mol Immunol.)》45(7):1872-82; Sazinsky等人, 2008《美国国家科学院院刊》105(51)20167-20172, 其公开内容以引用的方式并入本文中)。

[0547] 最广泛使用的IgG1突变体为单独或与D265A组合的N297A, 以及位置L234和L235处的突变, 包括所谓的“LALA”双重突变L234A/L235A。通过突变进一步使IgG1沉默的另一位置为P329(参见US2012/0251531)。Fc区中的额外突变描述于WO 2021/234402中。因此, 本发明的结合分子可掺入如WO 2021/234402(其内容以引用的方式并入本文中)中所描述的Fc区中的任一个。

[0548] 在示例性实施方案中, 多肽选自以下(其中任一种可为单特异性或双特异性):

[0549] (a) 二价抗体, 如IgG-scFv抗体(例如, 其中第一结合结构域为完整IgG, 且第二结合结构域为scFv, 该scFv在IgG的轻链的N-末端和/或在轻链的C-末端和/或在重链的N-末端和/或在重链的C-末端附接至第一结合结构域, 或反之亦然);

[0550] (b) 单价抗体, 如 *DuoBody*[®] (丹麦哥本哈根Genmab AS) 或“白包杵”双特异性抗体((例如scFv-KIH、scFv-KIH^r、BiTE-KIH或BiTE-KIH^r(参见Xu等人, 2015, mAbs 7(1):231-242);

[0551] (c) scFv₂-Fc抗体(如来自新兴生物科技公司(Emergent Biosolutions Inc)的ADAPTIR[™]双特异性抗体);

[0552] (d) BiTE/scFv₂抗体;

[0553] (e) DVD-Ig抗体;

[0554] (f) 基于DART的抗体(例如DART₂-Fc or DART);

[0555] (g) DNL-Fab₃抗体; 和

[0556] (h) scFv-HSA-scFv抗体。

[0557] 举例而言, 抗体可为IgG-scFv抗体。IgG-scFv抗体可呈VH-VL或VL-VH取向。在一个实施方案中, scFv可通过VH与VL之间的S-S桥键稳定化。

[0558] 第一结合结构域和第二结合结构域可彼此直接融合。替代地, 第一结合结构域和第二结合结构域可经由接头(如多肽接头)接合。举例而言, 多肽接头可为约10至约25个氨基之间的短连接肽。接头通常富含甘氨酸以具有柔性, 以及丝氨酸或苏氨酸以具有可溶性,

且可使 V_H 的N-末端与 V_L 的C-末端连接,或反之亦然。

[0559] 术语“结合活性”和“结合亲和力”旨在指多肽分子结合或不结合至靶点的倾向。结合亲和力可通过测定多肽与其靶点的解离常数(K_d)来定量。较低 K_d 指示对目标的较高亲和力。类似地,多肽与其靶点的结合特异性可根据多肽对其靶点与多肽和另一非靶点分子的解离常数相比的比较解离常数(K_d)来定义。

[0560] 此解离常数值可直接通过熟知方法测定,且甚至复杂混合物的解离常数值可通过如Caceci等人,1984中所阐述的那些方法的方法计算。举例而言, K_d 可使用如Wong和Lohman,1993所公开的双过滤器硝化纤维过滤器结合分析而确定。评估配体(如针对靶点的抗体)的结合能力的其他标准分析为本领域已知的,包括例如ELISA、蛋白质印迹法、RIA和流式细胞术分析。多肽的结合动力学(例如结合亲和力)还可通过本领域已知的标准分析(如通过Biacore®系统分析)来评定。

[0561] 可进行竞争结合分析,其中将多肽与靶点的结合与该靶点的另一配体(如另一多肽)与靶点的结合比较。出现50%抑制的浓度称为 K_i 。在理想条件下, K_i 等于 K_D 。因为 K_i 值应永不小于 K_d ,所以可宜由提供 K_d 的上限替代测量 K_i 。

[0562] 结合亲和力的替代测量包括EC50或IC50。在此情况下,EC50指示多肽达成其与固定量的靶点的最大结合的50%的浓度。IC50指示多肽抑制50%的固定量竞争者与固定量的靶点的最大结合的浓度。在两种情况下,EC50或IC50的较低水平指示对靶点的较高亲和力。配体对其靶点的EC50和IC50值可通过熟知方法(例如ELISA)测定。评定多肽的EC50和IC50的适合分析阐述于实施例中。

[0563] 如所提及,抗体可通过标准技术产生,例如通过用适当(糖基)多肽或其部分进行免疫接种,或通过使用噬菌体展示文库产生。

[0564] 若需要多克隆抗体,则用带有任选半抗原化至另一多肽的所需表位的免疫原性多肽对所选哺乳动物(例如小鼠、兔、山羊、马等)进行免疫接种。取决于宿主物种,可使用多种佐剂来增加免疫反应。此类佐剂包括但不限于弗氏佐剂(Freund's);矿物凝胶,如氢氧化铝;以及表面活性物质,如溶血卵磷脂、复合多元醇、多价阴离子、肽、油乳剂、钥孔血蓝蛋白和二硝基苯酚。根据已知程序收集来自经免疫接种的动物的血清并进行处理。若含有多克隆抗体的所需表位的血清含有针对其他抗原的抗体,则多克隆抗体可通过免疫亲和层析纯化。用于产生和加工多克隆抗血清的技术为本领域所熟知。

[0565] 针对整个多肽或其特定表位(例如在本申请的情况下,针对US28的ECD3)的单克隆抗体还可容易地由本领域技术人员产生。通过杂交瘤制备单克隆抗体的一般方法为熟知的。产生肿瘤抗体的细胞系可通过细胞融合,也可通过其他技术产生,如直接转化具有致癌DNA的B淋巴细胞或通过艾伯斯坦-巴尔病毒转染。针对上文所列的多肽产生的单克隆抗体组可针对多种特性进行筛选;即针对同型和表位特异性和/或亲和力,以及病毒株不可知的结合特性。单克隆抗体可使用熟知技术中的任一种制备,所述技术通过在培养中的连续细胞系提供抗体分子的产生。

[0566] 在一些实施方案中,优选抗体为单克隆抗体。在一些情况下,尤其在向人患者重复施用抗体的情况下,单克隆抗体优选为人单克隆抗体或人源化单克隆抗体,其适于施用人而不引起人针对所施用的免疫球蛋白的免疫反应。适当制备的非人抗体可以已知方式“人源化”,例如通过将小鼠抗体的CDR区插入人抗体的框架中。人源化抗体可使用Verhoeyen等

人, (1988)《科学》, 239, 1534-1536和Kettleborough等人, (1991)《蛋白质工程改造 (Protein Engineering)》, 14 (7), 773-783中所述的技术和方法制成。在一些情况下, 人免疫球蛋白的Fv框架残基经相应的非人残基置换。一般而言, 人源化抗体将含有可变结构域, 其中所有或大部分CDR区对应于非人免疫球蛋白的CDR区和实质上或完全为人免疫球蛋白共有序列的CDR区。

[0567] 可使用重组技术产生完全人抗体。通常, 使用包含数十亿种不同抗体的大型文库。与使用例如嵌合或人源化鼠抗体的先前技术相比, 此技术不依赖于动物免疫接种产生特异性抗体, 而是重组文库包含大量预制抗体变体, 其中很可能文库将具有至少一种对任何抗原具有特异性的抗体。因此, 使用此类文库, 可鉴别具有所需结合特征的现有抗体。为了以有效方式找到文库中的良好结合子, 已设计出其中表型 (即抗体或其片段) 连接至其基因型 (即编码基因) 的各种系统。最常用的此类系统为所谓噬菌体展示系统, 其中抗体片段表达、展示为与丝状噬菌体粒子表面上的噬菌体外壳蛋白融合, 同时携带编码所展示分子的遗传信息 (McCafferty等人, 1990, 《自然》348: 552-554)。展示对特定抗原具有特异性的抗体片段的噬菌体可经由结合于相关抗原来选择。接着可扩增经分离的噬菌体, 且编码所选抗体可变结构域的基因可任选转变为其他抗体形式, 如全长免疫球蛋白, 并使用本领域熟知的适当载体和宿主细胞以高量表达。替代地, “人” 抗体可通过对本质上含有人免疫球蛋白基因的转基因小鼠进行免疫接种来制成 (Vaughan等人, (1998)《自然-生物技术》16, 535-539)。

[0568] 将了解, 当抗体用于向非人个体施用, 抗体可针对预期的接受物种进行特定地设计/生产。

[0569] 噬菌体粒子上展示的抗体特异性的形式可不同。最常用形式为Fab (Griffiths等人, 1994, 《欧洲分子生物学学会会刊 (EMBO J.)》13: 3245-3260) 和scFv (Hoogenboom等人, 1992, 《分子生物学杂志 (J Mol Biol.)》227: 381-388), 均包含抗体的可变抗原结合结构域。单链形式由经由柔性接头连接至可变轻链结构域 (V_L) 的可变重链结构域 (V_H) 构成 (US 4, 946, 778)。在用作治疗剂之前, 抗体可转变成可溶性形式 (例如Fab或scFv) 且按原样分析。在后续步骤中, 经鉴别具有所需特征的抗体片段可转变成其他形式, 如全长抗体。

[0570] WO 98/32845和Soderlind等人, (2000)《自然-生物技术》18: 852-856描述在抗体文库中产生变化性的技术。源自此文库的抗体片段均具有相同框架区且仅在其CDR方面不同。因为框架区具有种系序列, 所以来源于该文库或使用相同技术产生的类似文库的抗体的免疫原性预期会尤其低 (Soderlind等人, 2000, 同上)。此特性对于治疗性抗体具有很大价值, 降低患者形成所施用抗体的抗体的风险, 由此降低过敏反应、出现阻断抗体的风险和允许抗体具有较长血浆半衰期。因此, 当研发用于人的治疗性抗体时, 现使用现代重组文库技术 (Soderlind等人, 2001, 《组合化学和高通量筛选 (Chem. & High Throughput Screen.)》4: 409-416) 优先于早期杂交瘤技术。

[0571] 通过抗体, 我们还包括在结构上衍生自骆驼科抗体的重链抗体, 如Nanobodies[®] (Ablynx)。这些为含有天然存在的重链抗体的结构和功能特性的抗体衍生的治疗蛋白。在发现骆驼科动物 (骆驼和骆马) 具有缺乏轻链的全功能性抗体之后, 研发出Nanobody[®] 技术。这些重链抗体含有单一可变结构域 (VHH) 和两个恒定结构域 (C_H2 和 C_H3)。克隆并分离的

VHH结构域为具有原始重链抗体的完整抗原结合能力的完全稳定多肽。具有独特结构和功能性特性的这些VHH域形成 Nanobodies[®] 的基础。其将常规抗体的优点(高目标特异性、高目标亲和力和低固有毒性)与小分子药物的重要特征(抑制酶和接近钳形受体(receptor cleft)的能力)组合。此外,其为稳定的,具有通过除注射以外的手段施用的潜力,更易于制造且可人源化。(参见例如US 5,840,526;US 5,874,541;US 6,005,079;US 6,765,087;EP 1 589 107;WO 97/34103;WO97/49805;US 5,800,988;US 5,874,541和US 6,015,695)。

[0572] 优选地,选择性地结合至US28的ECD3的抗体或其他结合分子不结合相关多肽(如CCR5),或抗体以比针对相关多肽(如CCR5)更大的亲和力结合US28。优选地,抗体以比相关多肽大至少5倍、或至少10倍或至少50倍的亲和力结合US28。更佳地,抗体分子以比相关多肽大至少100倍、或至少1,000倍、或至少10,000倍的亲和力结合US28。此类结合可通过本领域熟知的方法测定,如Biacore[®] 系统之一。

[0573] 双特异性抗体和其他双特异性结合分子

[0574] 在特别感兴趣的一个实施方案中,本发明的第一方面的结合分子为或包含双特异性结合分子。

[0575] 举例而言,根据本发明的第一方面的双特异性结合分子可包含能够通过特异性结合至效应细胞上的效应抗原来募集效应细胞的活性的第一结构域;和能够特异性结合至经HCMV编码的US28蛋白的ECD3作为靶标抗原的第二结构域,其中该靶标抗原可位于除效应细胞以外的靶标细胞上。第二结构域为或包含根据本发明的第一方面的结合分子。

[0576] 第一和第二结构域的全部或部分可任选通过一个或多个接头序列连接。第一结构域可包含多个功能结构域且那些功能结构域中的每一个可直接或经由接头序列连接至相邻结构域和/或可由超过一个单独多肽序列形成。第二结构域可包含多个功能结构域且那些功能结构域中的每一者可直接或经由接头序列连接至相邻结构域和/或可由超过一个单独多肽序列形成。

[0577] 在一个或多个接头序列存在于本发明的双特异性结合分子中的情况下,则各接头序列可独立地选自任何适合的接头序列。举例而言,各接头序列长度可为至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50或更多个氨基酸残基。各接头序列可包含任何天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,各接头序列可包含氨基酸甘氨酸和丝氨酸或由其组成。在另一实施方案中,该或各接头序列可包含甘氨酸和丝氨酸重复序列的集合或由其组成,如 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_n$,其中n为等于或大于1的正整数,如2、3、4、5、6或更多。在一个实施方案中,接头为 $(\text{Gly}_4\text{Ser})_3$ 。接头长度的变化可保持或提高活性,在活性研究中产生优良功效。

[0578] 在一个实施方案中,双特异性结合分子为双特异性抗体(bsAb)形式,如Suurs等人,2019,《药理学和治疗(Pharmacology&Therapeutics)》,201:103-119中所述的那些形式,且特别是Suurs等人,2019(同上)的图1C中说明的形式中的一种或多种,如TriMab、IgG-like BsAb、CrossMab、2:1CrossMab、2:2CrossMab、DuoBody、DVD-Ig BsAb、scFv-IgG和IgG-IgG、Fab-scFv-Fc、TF、ADAPTIR、BiTE、BiTE-Fc、DART、DART-Fc、四价DART、TandAb、ImmTAC、TriKE和scFv-scFv-scFv或三特异性纳米抗体形式。

[0579] 在一个实施方案中,第一和/或第二结构域可包含至少一个可变轻链和/或至少一个可变重链。在一个实施方案中,第一和/或第二结构域可包含至少一个可变轻链和至少一

个可变重链以形成scFv。在一个实施方案中,第一结构域和/或第二结构域包含通过接头(例如小肽接头)连接的scFv的非共价二聚体以形成双功能抗体。在一个实施方案中,第一结构域和/或第二结构域可包含多个双功能抗体以形成串联双功能抗体(TandAb)。

[0580] 在一个实施方案中,第一和/或第二结构域可进一步包含至少一个恒定轻链和/或至少一个恒定重链。举例而言,第一和/或第二结构域可包含scFv,其进一步包含恒定轻链和恒定重链以形成Fab。在一个实施方案中,第一和/或第二结构域包含多个Fab(例如两个Fab)。

[0581] 在一个实施方案中,第一和/或第二结构域可进一步包含至少一个Fc。举例而言,第一和/或第二结构域可包含scFv,其进一步包含Fc以形成scFv-IgG。另外或替代地,第一和/或第二结构域可包含两个Fab结构域,其进一步包含Fc以形成IgG。

[0582] 在一个实施方案中,第一结构域可为连接至第二结构域的scFv,该第二结构域任选经由接头连接以形成BiTE,任选其中BiTE进一步包含Fc以形成BiTE-Fc。

[0583] 在一个实施方案中,第一结构域的VH或VL可分别与第二结构域的VH或VL交换,以形成包含第一结构域和第二结构域的DART,任选其中DART进一步包含Fc以形成DART-Fc。另外或替代地,多种DART可连接至单一Fc以形成四价DART。

[0584] 在一个实施方案中,第一结构域和/或第二结构域呈T细胞受体形式,其可与呈scFv形式的第一结构域和/或第二结构域组合以形成ImmTAC。举例而言,第一结构域可为scFv且第二结构域可为T细胞受体,优选地其中该scFv对CD3的表位(即CD3结合结构域)具有特异性,由此产生ImmTAC。

[0585] 在一个实施方案中,第一结构域的效应细胞为免疫效应细胞,例如选自以下的免疫效应细胞:T细胞(例如CD4⁺ T细胞和/或CD8⁺ T细胞)、NK T细胞、NK细胞、巨噬细胞或其任何重组细胞(例如CAR表达细胞,如CAR-T细胞、CAR-NK细胞或CAR-M细胞)。在此类实施方案中,双特异性结合分子可以称为“双特异性免疫细胞接合子抗体”,其中“免疫细胞”可以取代效应细胞类型。举例而言,若第一结构域的效应细胞为T细胞,则此类实施方案可称为“双特异性T细胞接合子抗体”(BiTE,其可具有但不一定具有Suurs等人,2019,同上的图1C中所示的BiTE或BiTE-Fc分子形式),且若第一结构域的效应细胞为NK细胞,则此类实施方案可以称为“双特异性NK细胞接合子抗体”等。

[0586] 在一个实施方案中,双特异性结合分子的第一结构域对CD3的表位具有特异性,所述表位可称为CD3结合结构域。

[0587] 在一个实施方案中,CD3结合结构域可包含例如如本申请的SEQ ID NO:48序列所定义的OKT3重链可变区序列,或其实质上保留SEQ ID NO:48序列的CD3结合特异性和/或亲和力的功能变体或片段。功能变体或其片段可任选包含对应于如SEQ ID NO:48所定义的OKT3重链可变区的CDR序列中的任何一个、两个或全部三个的一个、两个或三个CDR。OKT3重链可变区的CDR序列分别如SEQ ID NO:49、50和51所定义,和/或抗体OKT3的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体。

[0588] 在另一实施方案中,CD3结合结构域可包含例如如本申请的SEQ ID NO:52序列所定义的OKT3轻链可变区序列,或其实质上保留SEQ ID NO:52序列的CD3结合特异性和/或亲和力的功能变体或片段。功能变体或其片段可任选包含对应于如SEQ ID NO:52所定义的OKT3轻链可变区的CDR序列中的任何一个、两个或全部三个的一个、两个或三个CDR。OKT3重

链可变区的CDR序列分别如SEQ ID NO:53、54和55所定义,和/或抗体OKT3的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体。

[0589] 在另一实施方案中,CD3结合结构域可包含例如分别如通过本申请的SEQ ID NO:48和52的序列所定义的OKT3重链可变区和OKT3轻链可变区的序列两者,或任一者或两者的功能变体或片段,如如上文所描述的功能变体或片段。

[0590] 在一个优选的实施方案中,CD3结合结构域可包含例如如通过本申请的SEQ ID NO:48和52的序列所定义的OKT3重链可变区和OKT3轻链可变区的序列两者,其任选通过接头,如具有序列GGGSGGGSGGGGS(SEQ ID NO:56)的接头接合。任选通过接头接合的OKT3重链可变区和OKT3轻链可变区的此组合可形成OKT3的scFv。

[0591] 因此,CD3结合结构域可为包含SEQ ID NO:48、56和52的序列的OKT3的scFv,所述序列按如下次序接合在一起,其中SEQ ID NO:48的OKT3重链可变区在其C-末端处接合至SEQ ID NO:56的接头序列的N-末端,该接头序列又在其C-末端处接合至SEQ ID NO:52的轻链可变区OKT3的N-末端。替代地,可调换轻链区和重链区的次序,使得CD3结合结构域包含以该次序接合在一起的SEQ ID NO:52、56和48的序列。将了解,可使用其他接头序列代替SEQ ID NO:56的示例性序列;其他接头序列可任选包含序列GGGGS(SEQ ID NO:57)的多个重复序列,且因此可具有序列[GGGGS]_n,其中n为2、3、4、5、6、7、8、9、10或更大的整数;或可含有任何其他适合的接头序列。

[0592] 任选地,CD3结合结构域包含至少一个(优选两个)OKT3的scFv。举例而言,双特异性结合分子可包含含有两个OKT3 scFv的第一结构域,任选其中两个scFv彼此直接连接或经由第二结构域间接连接。

[0593] 在一个实施方案中,包含根据本发明的第一方面的结合分子且与HCMV的US28蛋白的ECD3具有结合特异性的双特异性结合分子的第二结构域对作为US28表达细胞和/或感染HCMV的细胞(其可例如经潜伏感染或裂解感染)的靶标细胞具有结合特异性。

[0594] 在一个实施方案中,双特异性结合分子的第二结构域包含一个、两个、三个、四个、五个或六个互补决定区(CDR),其对应于以下抗体的CDR序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个:

[0595] (a) 1D3,分别如SEQ ID NO:8、9、10、14、15和16所定义;

[0596] (b) 1C10,分别如SEQ ID NO:112、113、114、117、83和118所定义;

[0597] (c) 1A10,分别如SEQ ID NO:112、113、114、117、83和118所定义;

[0598] (d) 1G9,分别如SEQ ID NO:76、77、78、82、83和84所定义;和/或

[0599] (e) 1E8,分别如SEQ ID NO:76、95、96、82、99和100所定义;

[0600] 和/或抗体1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体。

[0601] 任选地,根据此实施方案的US28结合结构域可包含:

[0602] (a) 以下抗体的可变重链(V_H)的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个:

[0603] i. 1D3,分别如SEQ ID NO:8、9和10所定义;

[0604] ii. 1C10,分别如SEQ ID NO:112、113和114所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体);

[0605] iii. 1A10,分别如SEQ ID NO:112、113和114所定义(和/或所述CDR序列中的任一

个、两个或三个的功能变体)；

[0606] iv.1G9,分别如SEQ ID NO:76、77和78所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体)；和/或

[0607] v.1E8,分别如SEQ ID NO:76、95和96所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体)；

[0608] 和/或

[0609] (b) 以下抗体的可变轻链(V_L)的CDR 1、2和3的序列中的一个、两个或全部三个：

[0610] i.1D3,分别如SEQ ID NO:14、15和16所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体)；

[0611] ii.1C10,分别如SEQ ID NO:117、83和118所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体)；

[0612] iii.1A10,分别如SEQ ID NO:117、83和118所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体)；

[0613] iv.1G9,分别如SEQ ID NO:82、83和84所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体)；和/或

[0614] v.1E8,分别如SEQ ID NO:82、99和100所定义(和/或所述CDR序列中的任一个、两个或三个的功能变体)。

[0615] 优选地,根据此实施方案的US28结合结构域包含至少4种不同CDR序列,例如至少5或6种不同CDR序列。

[0616] 另外或替代地,在另一选项中,根据此实施方案的双特异性结合分子的第二结构域可包含:(a)至少一个可变重链(V_H)多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:8、9和10的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中该至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:12的序列、基本上由其组成或由其组成;和/或(b)至少一个可变轻链(V_L)多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:14、15和16的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中该可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:18的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0617] 另外或替代地,在另一选项中,根据此实施方案的双特异性结合分子的第二结构域可包含:(a)至少一个可变重链(V_H)多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:76、77和78的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中该至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:68的序列、基本上由其组成或由其组成;和/或(b)至少一个可变轻链(V_L)多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:82、83和84的序列的CDR1、2和3序列,且任选其中该可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:72的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0618] 另外或替代地,在另一选项中,根据此实施方案的双特异性结合分子的第二结构域可包含:(a)至少一个可变重链(V_H)多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:76、95和96的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中该至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:88的序列,基本上由其组成或由其组成;和/或(b)至少一个可变轻链(V_L)多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:82、99和100的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中该可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:92的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0619] 另外或替代地,在另一选项中,根据此实施方案的双特异性结合分子的第二结构域可包含:(a)至少一个可变重链(V_H)多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:112、113和114的序

列的CDR 1、2和3序列,且任选其中该至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:104的序列,基本上由其组成或由其组成;和/或(b)至少一个可变轻链(V_L)多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:117、83和118的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中该可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:108的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0620] 另外或替代地,在另一选项中,根据此实施方案的双特异性结合分子的第二结构域可包含:(a)至少一个可变重链(V_H)多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:112、113和114的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中该至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:122的序列,基本上由其组成或由其组成;和/或(b)至少一个可变轻链(V_L)多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:117、83和118的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中该可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:126的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0621] 另外或替代地,在另一选项中,根据此实施方案的双特异性结合分子的第二结构域可包含:(a)至少一个可变重链(V_H)多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:138、139和140的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中该至少一个可变重链(V_H)多肽包含SEQ ID NO:130的序列,基本上由其组成或由其组成;和/或(b)至少一个可变轻链(V_L)多肽,其包含分别具有SEQ ID NO:144、145和146的序列的CDR 1、2和3序列,且任选其中该可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:134的序列、基本上由其组成或由其组成。

[0622] 在一个实施方案中,双特异性结合分子的第一结构域为包含OKT3的全部六个CDR序列的scFv(优选其中第一结构域为OKT3的scFv),且双特异性结合分子的第二结构域为包含1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的全部六个CDR序列的scFv(优选其中第二结构域为1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的scFv),任选其中第一和第二结构域经由接头连接。

[0623] 在一个实施方案中,双特异性结合分子的第一结构域包含两个各自包含OKT3的全部六个CDR序列的scFv(优选其中第一结构域包含OKT3的两个scFv);且双特异性结合分子的第二结构域包含两个Fab,其各自包含对应于如下抗体的CDR序列的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个的一个、两个、三个、四个、五个或六个CDR:

[0624] (a) 1D3,如SEQ ID NO:8、9、10、14、15和16所定义(优选其中第一结构域包含两个1D3的Fab);

[0625] (b) 1C10,如SEQ ID NO:112、113、114、117、83和118所定义(优选其中第一结构域包含1C10的两个Fab);

[0626] (c) 1A10,如SEQ ID NO:112、113、114、117、83和118所定义(优选其中第一结构域包含1A10的两个Fab);

[0627] (d) 1G9,如SEQ ID NO:76、77、78、82、83和84所定义(优选其中第一结构域包含1G9的两个Fab);和/或

[0628] (e) 1E8,如SEQ ID NO:76、95、96、82、99和100所定义(优选其中第一结构域包含1E8的两个Fab);

[0629] 且进一步包含Fc,任选其中该Fc对应于人IgG的Fc。

[0630] 在一些实施方案中,两个Fab相同。在一些实施方案中,两个Fab对应于选自1D3、1C10、1A10、1G9和1E8的不同抗体。

[0631] 在一个具体的实施方案中,双特异性结合分子为具有CD3结合OKT3 scFv结构域结合区的BiTE,且包含具有1D3抗体序列的US28 ECD3结合区,且更特别是,优选包含以下、基

本上由以下组成或由以下组成：

[0632] (i) 第一多肽序列，其包含以下、基本上由以下组成或由以下组成：包括1D3的V_H区的重链序列；任选地，一个或多个C_H序列（如C_H1、C_H2和/或C_H3序列）；任选存在的接头序列；和OKT3 scFv序列，例如具有SEQ ID NO:58的序列的重链序列；和

[0633] (ii) 第二多肽序列，其包含以下、基本上由以下组成或由以下组成：包括1D3的V_L区的轻链序列，和任选存在的C_L序列，例如具有SEQ ID NO:59的序列的轻链序列。

[0634] 在另一实施方案中，1D3抗体的序列可在BiTE中经选自1C10、1A10、1G9和1E8的抗体的对应序列置换。

[0635] CAR/CAR T细胞和其他重组CAR表达细胞

[0636] 基于免疫疗法的治疗可基于嵌合抗原受体 (CAR)。CAR为抗原的重组受体，其在单一分子中使T淋巴细胞和其他免疫细胞的特异性和功能重新定向 (Sadelain等人2013《癌症发现 (Cancer Discov)》3(4):388)。

[0637] 其用于癌症免疫疗法中的一般前提为快速产生肿瘤靶向T细胞，绕过主动免疫的障碍和递增动力学。一旦表达于T细胞中，经CAR修饰的T细胞获得上述生理学特性且充当可发挥即刻和长期作用的“活药物”。将CAR工程改造至T细胞中需要培养T细胞以允许转导和扩增。转导可利用多种方法，但需要稳定的基因转移以在克隆扩展和持久T细胞中实现持续CAR表达。

[0638] 原则上，任何细胞表面分子可经由CAR靶向，因此在限制T细胞反应性范围的生理学T细胞谱系中超越对自体抗原和抗原识别差异的耐受性。

[0639] 各种T细胞亚群以及T细胞祖细胞和其他免疫细胞（如自然杀伤细胞）可用CAR靶向。

[0640] 使用如T细胞的经CAR工程改造的细胞的过继性免疫疗法为有前景的癌症治疗方法 (Han等人2013《儿科血液学和肿瘤学杂志 (J Hematol Oncol)》6:47)。在过去几十年中取得的显著进展已促成研发更有效抗肿瘤免疫疗法。举例而言，并入肿瘤抗原特异性抗体的单链可变片段 (scFv) 和T细胞受体的信号传导结构域呈现具有抗体特异性和细胞毒性T淋巴细胞的细胞毒性的CAR。CAR以MHC非依赖性方式赋予T细胞抗原特异性识别、活化和增殖。此外，CAR绕过许多癌细胞由此逃逸免疫识别的机制。这些机制包括下调MHC、降低共刺激分子表达、诱导抑制细胞因子和募集调节性T细胞。除了这些有益作用以外，CAR的技术可行性使其在过继性免疫疗法的研发中甚至更具吸引力。临床前和临床研究的观测结果已揭露经CAR介导的免疫疗法在多种癌症（包括淋巴瘤、慢性淋巴细胞性白血病、黑色素瘤和神经母细胞瘤）中的极令人鼓舞的治疗功效。

[0641] 在一个实施方案中，本发明的第一方面的结合分子可为CAR，例如包含以下的CAR：

[0642] (i) 胞外结构域，其中该胞外结构域包含如上文所定义的结合分子（如抗体）或该结合分子的功能片段或由其组成；

[0643] (ii) 跨膜结构域；和

[0644] (iii) 胞内结构域；

[0645] 其中该CAR的该胞外结构域对人巨细胞病毒 (HCMV) 的US28蛋白的胞外结构域3 (ECD3) 内的表位具有结合特异性，并且

[0646] 其中该US28蛋白的ECD3包含存在于该US28蛋白中的氨基酸序列，其位置对应于由

如SEQ ID NO:5中所阐述的人巨细胞病毒(HCMV)编码的US28蛋白的位置167至183。

[0647] 任选地:

[0648] (a) CAR的胞外结构域对完全存在于HCMV的US28蛋白的胞外结构域3(ECD3)内的表位具有结合特异性;

[0649] (b) CAR的胞外结构域对US28蛋白的ECD3内的线性表位具有结合特异性;

[0650] (c) 该CAR的胞外结构域对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有HCMV病毒株不可知的结合特异性,例如对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有结合特异性,该结合特异性对选自以下的HCMV病毒株中的两种或更多种(如全部)为不可知的:DB、Towne、AD169、DAVIS、BL、JP、Merlin、PH、TB40/E、Toledo、VHL/E、TR和VR1814(FIX);和/或

[0651] (d) CAR的胞外结构域对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有特异性,无论US28蛋白的ECD3是否包含以下序列:

[0652] 如在由大部分HCMV病毒株编码的US28的ECD3中发现的TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7),或

[0653] 如在由少数HCMV病毒株编码的US28的ECD3中发现的TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)。

[0654] 在一个优选的实施方案中,CAR的胞外结构域可包含一个、两个、三个、四个、五个或六个互补决定区(CDR),其对应于以下抗体的CDR序列中的任何一个、两个、三个、四个、五个或全部六个:

[0655] (a) 1D3,分别如SEQ ID NO:8、9、10、14、15和16所定义,和/或抗体1D3的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体;

[0656] (b) 1C10,分别如SEQ ID NO:112、113、114、117、83和118所定义,和/或抗体1C10的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体;

[0657] (c) 1A10,分别如SEQ ID NO:112、113、114、117、83和118所定义,和/或抗体1A10的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体;

[0658] (d) 1G9,分别如SEQ ID NO:76、77、78、82、83和84所定义,和/或抗体1G9的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体;和/或

[0659] (e) 1E8,分别如SEQ ID NO:76、95、96、82、99和100所定义,和/或抗体1E8的所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体。

[0660] 另外或替代地,CAR的胞外结构域可包含:

[0661] (a) 以下抗体的可变重链(V_H)的CDR 1、2和3序列中的一个、两个或全部三个:

[0662] i. 1D3,分别如SEQ ID NO:8、9和10所定义(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体);

[0663] ii. 1C10,分别如SEQ ID NO:112、113和114所定义(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体);

[0664] iii. 1A10,分别如SEQ ID NO:112、113和114所定义(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体);

[0665] iv. 1G9,分别如SEQ ID NO:76、77和78所定义(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体);和/或

[0666] v. 1E8,分别如SEQ ID NO:76、95和96所定义(或所述CDR序列中的任何一个或多个

的功能变体)；

[0667] 和/或

[0668] (b) 以下抗体的可变轻链(V_L)的CDR 1、2和3的序列中的一个、两个或全部三个：

[0669] i. 1D3, 分别如SEQ ID NO:14、15和16所定义(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体)；

[0670] ii. 1C10, 分别如SEQ ID NO:117、83和118所定义(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体)；

[0671] iii. 1A10, 分别如SEQ ID NO:117、83和118所定义(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体)；

[0672] iv. 1G9, 分别如SEQ ID NO:82、83和84所定义(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体)；

[0673] v. 1E8, 分别如SEQ ID NO:82、99和100所定义(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体)。

[0674] 另外或替代地, CAR的胞外结构域可包含：

[0675] (a) 至少一个可变重链(V_H)多肽序列, 其包含具有以下序列的CDR 1、2和3序列：

[0676] i. 分别SEQ ID NO:8、9和10(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体), 且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽序列包含SEQ ID NO:12的序列(或其功能变体)、基本上由其组成或由其组成；

[0677] ii. 分别SEQ ID NO:112、113和114(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体), 且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽序列包含SEQ ID NO:104的序列(或其功能变体)、基本上由其组成或由其组成；

[0678] iii. 分别SEQ ID NO:112、113和114(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体), 且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽序列包含SEQ ID NO:122的序列(或其功能变体)、基本上由其组成或由其组成；

[0679] iv. 分别SEQ ID NO:76、77和78(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体), 且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽序列包含SEQ ID NO:68的序列(或其功能变体)、基本上由其组成或由其组成；和/或

[0680] v. 分别SEQ ID NO:76、95和96(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体), 且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽序列包含SEQ ID NO:88的序列(或其功能变体)、基本上由其组成或由其组成；

[0681] 和/或

[0682] (b) 至少一个可变轻链(V_L)多肽序列, 其包含具有以下序列的CDR 1、2和3序列：

[0683] i. 分别SEQ ID NO:14、15和16(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体), 且任选其中可变轻链(V_L)多肽包含SEQ ID NO:18的序列(或其功能变体)、基本上由其组成或由其组成；

[0684] ii. 分别SEQ ID NO:117、83和118(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体), 且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽序列包含SEQ ID NO:108的序列(或其功能变体)、基本上由其组成或由其组成；

[0685] iii. 分别SEQ ID NO:117、83和118(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变

体),且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽序列包含SEQ ID NO:126的序列(或其功能变体)、基本上由其组成或由其组成;

[0686] iv. 分别SEQ ID NO:82、83和84(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体),且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽序列包含SEQ ID NO:72的序列(或其功能变体)、基本上由其组成或由其组成;和/或

[0687] v. 分别SEQ ID NO:82、99和100(或所述CDR序列中的任何一个或多个的功能变体),且任选其中至少一个可变重链(V_H)多肽序列包含SEQ ID NO:92的序列(或其功能变体)、基本上由其组成或由其组成。

[0688] 选自SEQ ID NO:12、18、68、72、88、92、104、108、122或126的参考序列的功能变体可任选与所定义参考物具有至少70%序列一致性,例如至少75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%。与所定义的氨基酸序列具有98%或99%序列一致性,且更一般而言95-99%序列一致性(例如96%、97%、98%或99%序列一致性)。变异可仅在可变重链或轻链的功能变体的序列的非CDR区内,仅在序列的CDR区内,或在序列的非CDR区和CDR区内。将了解,若变异包括于功能变体的CDR区中,则变异可分别在重链可变区或轻链可变区的一个CDR、两个CDR或三个CDR内。通常,变化为在CDR区之外。

[0689] 在某些实施方案中,CAR的胞外结构域为以下或包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:抗体(任选人源化抗体,例如单链可变片段(scFv))或其功能变体的序列,其中所述抗体及其功能变体为根据本发明的第一方面的结合分子。

[0690] scFv可在其VL区与VH区之间包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、25、30、35、40、45、50个或更多个氨基酸残基的接头。接头可包含任何天然存在的氨基酸。在一些实施方案中,接头序列包含氨基酸甘氨酸和丝氨酸。在另一实施方案中,接头序列包含甘氨酸和丝氨酸重复序列组,如 $(Gly_4Ser)_n$,其中n为等于或大于1的正整数,如2、3、4、5、6或更大。在一个实施方案中,接头为 $(Gly_4Ser)_3$ 。接头长度的变化可保持或提高活性,在活性研究中产生优良功效。

[0691] scFv的轻链可变区和重链可变区可例如呈以下取向中的任一者:轻链可变区-接头-重链可变区或重链可变区-接头-轻链可变区。

[0692] 如本文所描述的CAR包含跨膜结构域。通过跨膜结构域,我们包括任何部分能够嵌入于脂膜中的意义。通过嵌入于脂膜中,我们包括跨膜结构域有利地与构成脂膜的脂质的疏水性部分相互作用的意义。插入脂膜中可使用本领域已知的任何适合方法分析,包括用荧光显微法进行荧光标记。因此,将了解,跨膜结构域为一种使CAR分子定位于脂膜内的跨膜结构域。

[0693] 任选地,跨膜结构域包含蛋白质(例如跨膜蛋白)的跨膜结构域,例如跨膜受体蛋白的跨膜结构域。在一个实施方案中,跨膜结构域为与CAR的其他结构域中的一者相关联的跨膜结构域。在一个实施方案中,跨膜结构域包含构成胞内信号传导结构域的至少部分的胞内信号传导蛋白质的跨膜部分。在一些情况下,跨膜结构域可通过氨基酸替换选择或修饰以避免此类结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,例如将与受体复合物的其他成员的相互作用减至最少。在一些情况下,跨膜结构域能够与细胞表面上的另一CAR均二聚。

[0694] 跨膜结构域可来源于天然或重组来源。结构域可来源于任何膜结合蛋白或跨膜蛋

白。在一个实施方案中,每当CAR已结合至目标时,跨膜结构域能够向胞内结构域传导信号。适用于本发明的跨膜结构域可以包括T细胞受体的 α 链、 β 链或 ζ 链的跨膜区CD28、CD3 ϵ 、CD8、CD45和CD4。

[0695] 跨膜结构域可包括一个或多个与跨膜区相邻的额外氨基酸,如一个或多个与跨膜结构域所源自的蛋白质的胞外区有关的氨基酸(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10直至15个胞外区氨基酸)和/或一个或多个与跨膜蛋白所源自的蛋白质的胞内区有关的额外氨基酸(例如1、2、3、4、5、6、7、8、9、10直至15个胞内区氨基酸)。

[0696] 在某些实施方案中,CAR的胞外结构域通过铰链区连接至跨膜结构域。铰链区可包含一个或多个免疫球蛋白结构域。特定实例包括IgG1的Fc区和CD4和CD8的免疫球蛋白样胞外区。将了解,当选择性结合US28的抗体为scFv分子时,铰链区可用于延伸scFv的范围以允许其连接至跨膜结构域而不影响其结合至US28。铰链可来自人蛋白质,如人免疫球蛋白。铰链区可例如为CD8 α 铰链区(例如,如An等人,2016,《肿瘤标靶(Oncotarget)》,7:10638-10649中所描述,其内容以引用的方式并入本文中)。

[0697] 通常,跨膜结构域主要包含疏水性氨基酸残基,如亮氨酸和缬氨酸。

[0698] 在实施方案中,短寡肽或多肽接头(如长度在2与10个氨基酸之间)可在CAR的跨膜结构域与胞内信号传导结构域之间形成连接。接头可例如包含甘氨酸和/或丝氨酸残基。适合接头的一个实例为甘氨酸-丝氨酸二联体。

[0699] 通过胞内信号传导结构域,我们包括以下意义:结构域能够活化其中引入CAR的细胞的正常功能中的至少一种,如免疫细胞(例如T细胞)的正常效应功能中的至少一种。效应功能是指细胞的专门功能。T细胞的效应功能例如可为细胞溶解功能或辅助活性,包括细胞因子的分泌。因此,胞内信号传导结构域可为转导效应功能信号和引导细胞(例如T细胞)执行专门功能的蛋白质的一部分。

[0700] 一般而言,可使用整个胞内信号传导结构域;然而,将了解,不必使用整个域,条件为所使用的信号传导结构域的任何部分仍能够转导效应功能信号。还将了解,也可使用具有实质上相同或更大功能能力的此类胞内信号传导结构域的变体。由此,我们包括如下意义:变体应具有效应功能信号的实质上相同或更大的转导。通常,实质上相同或更大的信号转导包括未经修饰的胞内信号传导结构域的至少80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%或120%或更大的信号转导,其中未经修饰的胞内信号传导结构域的信号转导对应于100%。

[0701] 用于评定效应功能信号的转导的方法为本领域技术人员所熟知且包括例如评定指示转导信号的分子(例如蛋白质,如细胞因子)的量和/或活性。因此,当信号为T细胞的溶胞功能时,方法可涉及测量由T细胞分泌的一种或多种细胞因子,已知所述细胞因子具有溶胞活性(例如IFN γ)且在测量靶标细胞溶解之后。

[0702] 用于本发明的CAR的胞内信号传导结构域的实例包括共同作用以在抗原受体接合后起始信号转导的T细胞受体(TCR)和辅助受体的细胞质序列,以及此类序列和具有相同功能能力的任何重组序列的任何衍生物或变体。

[0703] 已知单独TCR产生的信号不足以完全活化T细胞且还可需要第二和/或共刺激信号。因此,T细胞活化可称为由两种不同类别的胞内信号传导序列介导:经由TCR起始抗原依赖性主要活化的那些(主要胞内信号传导结构域)和以抗原非依赖性方式起作用以提供次

要或共刺激信号的那些(次要胞内信号传导结构域,如共刺激结构域)。共刺激结构域促进效应功能的活化且还可促进细胞的效应功能和/或存活的持久性。

[0704] 主要胞内信号传导结构域以刺激方式或抑制方式调节TCR复合物的主要活化。以刺激方式起作用的主要胞内信号传导结构域可含有信号传导基序,称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM(例如2、3、4、5或更多个ITAM)。因此,胞内信号传导结构域可包含一个或多个ITAM。特定用于本发明的含有主要胞内信号传导结构域的ITAM的实例包括CD3 ζ 、Fc受体 γ 、Fc受体 β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d的那些ITAM。

[0705] 在一个实施方案中,本发明的CAR包含CD3- ζ 的胞内信号传导结构域。

[0706] 将了解,胞内信号传导结构域的一个或多个ITAM可例如通过突变修饰。与原生ITAM结构域相比,修饰可用于提高或降低ITAM的信号传导功能。

[0707] 如上文所提及,胞内信号传导结构域本身可包含主要胞内信号传导结构域,或其可包含主要胞内信号传导结构域以及一个或多个次级胞内信号传导结构域,如一个或多个共刺激信号传导结构域。因此,CAR的胞内信号传导结构域本身可包含CD3 ζ 信号传导结构域或与一个或多个其他胞内信号传导结构域(如一个或多个共刺激信号传导结构域)组合。

[0708] 共刺激信号传导结构域是指CAR中包含共刺激分子的胞内结构域的一部分。共刺激分子可为除了免疫细胞(例如淋巴细胞)对抗原的有效反应所需的抗原受体或其配体以外的细胞表面分子。此类分子的实例包括CD28、4-1BB(CD137)、OX40、ICOS、DAP10、CD27、CD30、CD40、PD1、ICOS、淋巴细胞功能相关的抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3和特异性结合CD83的配体及其类似物。举例而言,CD27协同刺激已证明可增强体外人CAR T细胞的扩增、效应功能和存活且增强体内人T细胞的持久性和抗肿瘤活性(Song等人,《血液》2012,119(3):696-706)。

[0709] 本发明的CAR的胞内部分中的胞内信号传导序列可以随机或指定次序彼此连接。任选地,例如长度在2个与10个氨基酸之间(例如2、3、4、5、6、7、8、9或10个氨基酸)的短寡肽或多肽接头可在胞内信号传导序列之间形成键。在一个实施方案中,甘氨酸-丝氨酸二联体可用作适合接头。在另一实施方案中,单一氨基酸,如丙氨酸或甘氨酸可用作适合的接头。

[0710] 在一个实施方案中,胞内信号传导结构域经设计以包含两个或两个以上,例如3、4、5个或更多个共刺激信号传导结构域。在一实施方案中,两个或两个以上(例如2、3、4、5个或更多个)共刺激信号传导结构域通过接头分子(如本文中所描述的接头分子)分离。在一个实施方案中,胞内信号传导结构域包含两个共刺激信号传导结构域。在一些实施方案中,接头分子为甘氨酸残基。在一些实施方案中,接头为丙氨酸残基。

[0711] 在一个优选的实施方案中,CAR的胞内部分包含CD3 ζ 的信号传导结构域和CD28的信号传导结构域。

[0712] 在另一实施方案中,CAR的胞内部分包含CD3- ζ 的信号传导结构域和4-1BB的信号传导结构域。

[0713] 在另一实施方案中,CAR的胞内部分包含CD3- ζ 的信号传导结构域和OX40的信号传导结构域。

[0714] 在另一实施方案中,CAR的胞内部分包含CD3- ζ 的信号传导结构域和ICOS的信号传导结构域。

[0715] 在另一实施方案中,CAR的胞内部分包含CD3- ζ 的信号传导结构域和DAP10的信号

传导结构域。

[0716] 在另一实施方案中,CAR的胞内部分包含CD3- ζ 的信号传导结构域、4-1BB的信号传导结构域和OX40的信号传导结构域。

[0717] CAR的其他任选组分

[0718] 在实施方案中,CAR可进一步包含前导序列。通过“前导序列”,我们包括肽序列可将CAR引导至细胞膜的意义。因此,当CAR为嵌合融合蛋白时,其可在氨基端(N-末端)含有前导序列。任选地,前导序列在CAR细胞加工和定位至细胞膜期间自CAR裂解。

[0719] 在另一实施方案中,CAR可包含诱导性自杀部分。通过诱导性自杀部分,我们包括以下意义:分子具有引起细胞死亡的诱导性能力,在该细胞的细胞膜中CAR驻存(例如T细胞)。以此方式,可经由选择性缺失包含CAR的细胞来严格控制CAR对受试者的影响。方便地,自杀部分包含具有直接或间接细胞毒性的抗体的表位。具有直接细胞毒性的抗体包括结合于CD20的裂解抗体,如利妥昔单抗(Rituximab)。因此,在一个实施方案中,CAR可包含CD20表位。抗体还可通过结合至一个或多个细胞毒性部分而间接地具有细胞毒性。

[0720] 在一个优选的实施方案中,CAR包含:(i)胞外结构域,其中胞外结构域包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:根据本发明的第一方面的选择性结合至US28多肽的ECD3的抗体(例如scFv片段);(ii)跨膜结构域;和(iii)胞内信号传导结构域(例如包含主要信号传导结构域(如CD3 ζ)的胞内信号传导结构域,和任选一个或多个共刺激结构域,如CD28、4-1BB、OX40、ICOS和DAP10)。

[0721] 融合多肽:

[0722] 在另一选项中,如本发明的第一方面所定义的结合分子可包含融合多肽序列,其中融合多肽序列包含融合第二氨基酸序列的第一氨基酸序列,且其中第一氨基酸序列包含结合分子的多肽链或其功能片段的多肽链中的至少一种或由其组成,且第二氨基酸序列为融合伴侣。

[0723] 可选择任何感兴趣的融合伴侣。本领域技术人员熟知本领域已知的融合伴侣序列,且可选择任何序列。融合伴侣可例如提供额外或替代的结合特性;其可提供效应子部分,该效应子部分在结合分子的结合位点处产生作用(实例包括能够扩增免疫反应或诱导对由结合分子结合的任何细胞的直接破坏的序列,例如细胞毒性序列);其可提供结合分子的循环半衰期的调节(如增加或减少);其可提供促进该结合分子的捕获、回收或纯化的序列;和/或其可提供促进该结合分子的检测的序列。

[0724] 缀合物:

[0725] 根据本发明的第一方面的结合分子可包括和/或连接至至少一种试剂以形成缀合物,如抗体缀合物。该试剂可任选为非蛋白质,如小分子药物或其他试剂,其可为例如低分子量(<900道尔顿)有机化合物。

[0726] 为了增加抗体分子和其他结合剂作为诊断剂或治疗剂的功效,常规地连接或共价结合或复合至少一个所需分子或部分。此类分子或部分可为(但不限于)至少一个效应子或报告子分子。效应子分子可包含具有所需活性的分子,例如药物、细胞毒素剂、免疫抑制剂、消炎剂等。此类分子可任选经由可裂解接头连接至抗体分子或其他结合剂,该可裂解接头经设计以允许分子在靶标位点处或附近释放。

[0727] 该所需分子或部分可任选在细胞外环境中选择性地具有活性或在细胞内环境中

选择性地具有活性。如上文所论述,US28为GCPR,其向质膜迁移允许其经结合分子直接靶向且其由于其胞吞作用而用作有效负载的转运蛋白,该胞吞作用为组成性的或由于配体结合而发生。GCPR一般构成由经批准药物靶向的最大蛋白质家族((Sriram和Insel,《分子药理学(Mol Pharmacol)》,2018,93(4):251-258)。因此,与US28的ECD3具有结合特异性的本发明的结合分子可用于通过US28表达细胞(特别是HCMV感染细胞)实现一种或多种所需分子或部分(如在细胞内环境中选择性活性的所需分子或部分)的内化,该内化为通过使该一种或多种所需分子或部分与本发明的结合分子缀合来达成。

[0728] 相比之下,报告子分子定义为可使用分析法检测的任何部分。已与抗体和其他结合剂结合的报告子分子的非限制性实例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、发色团、光亲和分子、着色粒子或配体(如生物素)。

[0729] 此类缀合物通常用作诊断剂。这些诊断剂一般属于两类:用于体外诊断,如多种免疫分析和/或免疫组织化学(IHC)中的诊断剂;和用于体内诊断方案的诊断剂,一般称为“抗体导向成像”。本领域已知许多适当成像剂,以及用于其附着至抗体和其他此类结合分子的方法(参见例如,美国专利5,021,236、4,938,948和4,472,509)。所用成像部分可为顺磁性离子、放射性同位素、荧光染料、NMR可检测的物质和X射线成像剂。

[0730] 在顺磁性离子的情况下,可例如提及如铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钆(III)、钙(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、铽(III)、镨(III)、钆(III)和/或铪(III)的离子,其中特别优选钆。可用于其他情况(如X射线成像)的离子包括但不限于镧(III)、金(III)、铅(II)且尤其是铋(III)。

[0731] 在用于治疗和/或诊断应用的放射性同位素的情况下,可提及 ^{211}Po 、 ^{14}C 、 ^{51}Cr 、 ^{36}Cl 、 ^{57}Co 、 ^{58}Co 、 ^{67}Cu 、 ^{152}Eu 、 ^{67}Ga 、 ^3H 、 ^{123}I 、 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{59}Fe 、 ^{32}P 、 ^{186}Re 、 ^{188}Re 、 ^{75}Se 、 ^{35}S 、 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和/或 ^{90}Y 。 ^{125}I 通常优选用于某些实施方案中,且 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 和/或 ^{111}In 还由于其能量低和适用于远程检测而通常优选。放射性标记的单克隆抗体可根据本领域熟知的方法产生。举例而言,单克隆抗体和其他结合剂可通过与碘化钠和/或碘化钾和化学氧化剂(如次氯酸钠)或酶氧化剂(如乳过氧化物酶)接触而碘化。单克隆抗体和其他结合剂可通过配体交换法,例如通过用亚锡溶液还原pertechnetate,将经还原的 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 螯合至葡聚糖凝胶柱上且将该抗体施加至此柱来用 $^{99\text{m}}\text{Tc}$ 标记。替代地,可以使用直接标记技术,例如通过温育pertechnetate、还原剂(如 SnCl_2)、缓冲溶液(如邻苯二甲酸钠-钾溶液)和该抗体。中间官能团通常用于将放射性同位素结合至抗体或其他结合剂,且以金属离子形式存在,为二乙撑三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[0732] 在涵盖用作缀合物的荧光标记中包括Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6-FAM、异硫氰酸荧光素、HEX、6-JOE、俄勒冈绿(Oregon Green) 488、俄勒冈绿500、俄勒冈绿514、太平洋蓝(Pacific Blue)、REG、罗丹明绿(Rhodamine Green)、罗丹明红、肾造影剂(Renographin)、ROX、TAMRA、TET、四甲基罗丹明和/或得克萨斯红(Texas Red)。

[0733] 所涵盖的另一类缀合物为主要旨在用于体外的缀合物,其中抗体或其他结合分子连接至将在与发色底物接触时产生有色产物的第二结合配体和/或酶(酶标签)。适合的酶的实例包括尿素酶、碱性磷酸酶、(辣根)氢过氧化物酶或葡萄糖氧化酶。优选的第二结合配体为生物素和亲和素和链霉亲和素化合物。此类标记的使用为本领域技术人员熟知的且描述

于例如美国专利3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149和4,366,241中。

[0734] 本领域已知用于抗体或其他结合分子与其结合部分的连接或结合的数种方法。一些连接方法涉及使用金属螯合剂复合物,采用例如有机螯合剂,如二乙撑三胺五乙酸的酸酐(DTPA);乙三胺四乙酸;N-氯-对甲苯磺酰胺;和/或四氯-3 α -6 α -二苯基甘脲-3连接至抗体(美国专利4,472,509和4,938,948)。单克隆抗体或其他结合分子还可在如戊二醛或高碘酸盐的偶联剂存在下与酶反应。带有荧光素标记的缀合物在所述偶联剂存在下或通过与异硫氰酸盐反应来制备。在美国专利4,938,948中,乳房肿瘤的成像使用单克隆抗体实现且可检测成像部分使用如甲基-对羟基苯甲亚胺酸酯或N-琥珀酰亚胺基-3-(4-羟苯基)丙酸酯的接头结合至抗体。

[0735] 在其他实施方案中,涵盖通过使用不改变抗体组合位点的反应条件,在免疫球蛋白的Fc区中选择性引入硫氢基进行免疫球蛋白或其他结合分子的衍生作用。公开的根据此方法产生的抗体缀合物展现改善的耐久性、特异性和敏感性(美国专利5,196,066,以引用的方式并入本文中)。文献中还已公开效应子分子或报导子分子的位点特异性连接,其中报导子分子或效应子分子为缀合至Fc区中的碳水化合物残基。

[0736] 前药:

[0737] 将了解,本发明的第一方面的结合分子可以“前药”形式施用。举例而言,在前药形式中,选择性地结合至US28的ECD3的结合分子的ECD3结合部分可以仅在靶标细胞(例如表达US28和/或潜伏和/或裂解感染HCMV的那些细胞)的地点中选择性地揭露的方式经遮蔽。

[0738] 如本申请中所用的术语“前药”是指生物或药学活性物质的前体或衍生物形式,其活性低于亲本生物或药学活性物质且能够以酶方式活化或转化为活性较大的亲本形式(参见例如D.E.V.Wilman《癌症化疗中的前药(Prodrugs in Cancer Chemotherapy)》《生物化学学会学报(Biochemical Society Transactions)》14,375-382(第615次会议,Belfast 1986)和V.J.Stella等人,《前药:靶向药递送的化学方法(Prodrugs:A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery)》Directed Drug Delivery R.Borchardt等人,(编)第247-267页(胡马纳出版社(Humana Press)1985))。

[0739] B. 核酸分子

[0740] 本发明的第二方面提供一种核酸分子或多个不同核酸分子的组合,其中核酸分子包含或多个不同核酸分子的组合共同地包含一个或多个核酸序列,该一个或多个核酸序列单独地或以组合方式编码通过本发明的第一方面的结合分子提供的一条或多条多肽链。

[0741] 根据本发明的第二方面的核酸分子或各核酸分子可例如为DNA(例如基因组DNA或互补DNA)或RNA(例如mRNA分子、体外转录RNA或合成RNA)。在一个实施方案中,核酸分子或各核酸分子为cDNA分子。其可包含脱氧核糖核苷酸、核糖核苷酸、经修饰的核苷酸或碱基和/或其类似物,或可通过DNA或RNA聚合酶或通过合成反应并入聚合物中的任何底物。多核苷酸可包含经修饰的核苷酸,如甲基化核苷酸及其类似物。若存在修饰,则可在聚合物组装之前或之后对核苷酸结构进行修饰。核苷酸的序列可间杂有非核苷酸组分。编码本发明抗体的核酸分子的一些特定实例描述于本文中。其他适合序列可基于抗体结构和遗传密码的知识容易地确定。

[0742] 通过术语“体外转录RNA”,我们包括以下意义:已在体外合成的RNA,包括mRNA。一

一般而言,体外转录RNA为由体外转录载体或PCR产生的多核苷酸模板产生。体外转录载体包含用于产生体外转录的RNA的模板。用于产生供转染用的mRNA的方法可以涉及用专门设计的引物体外转录模板,随后添加聚腺苷酸,以产生构建体,该构建体含有3'和5'非翻译序列(“UTR”)、5'帽和/或内部核糖体进入位点(IRES)、待表达的核酸和聚腺苷酸尾(长度通常为50-2000个碱基)。此类RNA可用于有效转染不同种类的细胞,如下文进一步描述。

[0743] 根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合可经分离。通过“分离”,我们包括以下任选存在的意义:核酸分子不位于细胞内或以其他方式提供于细胞内。

[0744] 根据本发明的第二方面的核酸分子或各核酸分子可为单链的。替代地,根据本发明的第二方面的核酸分子或各核酸分子可为双链的。

[0745] 在本发明的第一方面的结合分子由单一连续氨基酸序列形成的情况下,则其可由根据本发明的单一核酸分子编码序列编码。

[0746] 在本发明的第一方面的结合分子由两个或更多个单独多肽序列形成的情况下,则各单独多肽序列可由单独核酸分子编码,使得结合分子的全部由多个不同核酸分子的组合编码;替代地,结合分子的两个或两个以上单独多肽序列可由包含多个不同编码序列的单一核酸分子编码,其中那些多个不同编码序列分别编码结合分子的不同两个或两个以上单独多肽序列中的每一个。

[0747] 在一个实施方案中,根据本发明的第二方面的核酸分子编码本发明的第一方面的结合分子或其部分,其包含抗体重链或其可变区。

[0748] 在一个实施方案中,根据本发明的第二方面的核酸分子编码本发明的第一方面的结合分子或其部分,其包含抗体轻链或其可变区。

[0749] 在一个实施方案中,根据本发明的第二方面的核酸分子或根据本发明的第二方面的多个不同核酸分子的组合共同地编码本发明的第一方面的结合分子或其部分,包含抗体重链或其可变区和抗体轻链或其可变区两者。

[0750] 因此,将了解,核酸分子或多个不同核酸分子的组合可编码本发明的第一方面的结合分子中的任一种(如抗体、其片段、融合蛋白、CAR等),包括如上文所定义的特定氨基酸序列的变体,或其部分。

[0751] 在一个实施方案中,根据本发明的第二方面的核酸分子包含(或根据本发明的第二方面的多个不同核酸分子的组合共同地包含):

[0752] a) 编码可变重链序列的核苷酸序列,该可变重链序列包含以下序列:

[0753] i. 分别编码1D3的V_H-CDR1、V_H-CDR2和V_H-CDR3序列的SEQ ID NO:22、23和24;

[0754] ii. 分别编码1C10的V_H-CDR1、V_H-CDR2和V_H-CDR3序列的SEQ ID NO:109、110和111;

[0755] iii. 分别编码1A10的V_H-CDR1、V_H-CDR2和V_H-CDR3序列的SEQ ID NO:109、110和111;

[0756] iv. 分别编码1G9的V_H-CDR1、V_H-CDR2和V_H-CDR3序列的SEQ ID NO:73、74和75;和/或

[0757] v. 分别编码1E8的V_H-CDR1、V_H-CDR2和V_H-CDR3序列的SEQ ID NO:73、93和94;

[0758] 和

[0759] b) 编码可变轻链序列的核苷酸序列,该可变轻链序列包含以下序列:

- [0760] i. 分别编码1D3的 V_L -CDR1、 V_L -CDR2和 V_L -CDR3序列的SEQ ID NO:28、29和30;
- [0761] ii. 分别编码1C10的 V_H -CDR1、 V_H -CDR2和 V_H -CDR3序列的SEQ ID NO:115、80和116;
- [0762] iii. 分别编码1A10的 V_H -CDR1、 V_H -CDR2和 V_H -CDR3序列的SEQ ID NO:115、80和116;
- [0763] iv. 分别编码1G9的 V_H -CDR1、 V_H -CDR2和 V_H -CDR3序列的SEQ ID NO:79、80和81;和/或
- [0764] v. 分别编码1E8的 V_H -CDR1、 V_H -CDR2和 V_H -CDR3序列的SEQ ID NO:79、97和98;
- [0765] 或这些序列中的任何一个的功能变体,例如在所述SEQ ID NO中的任何一个或多个内包含1、2、3、4或5个核苷酸取代的变体和/或与所述SEQ ID No具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列一致性的变体。举例而言,该变异核酸或各变异核酸变化可为沉默突变,且因此不改变其编码的氨基酸序列。
- [0766] 在另一实施方案中,根据本发明的第二方面的核酸分子包含(或根据本发明的第二方面的多个不同核酸分子的组合共同地包含):
- [0767] a) 包含选自自由SEQ ID NO:26、102、120、66和86组成的群组的序列的核苷酸序列,其分别编码1D3、1C10、1A10、1G9和1E8的可变重链序列,和
- [0768] b) 包含选自自由SEQ ID NO:32、106、124、70和90组成的群组的序列的核苷酸序列,其分别编码1D3、1C10、1A10、1G9和1E8的可变轻链序列,
- [0769] 或这些序列中的任何一个的功能变体,例如与该SEQ ID No具有至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%序列一致性的变体。
- [0770] 在另一实施方案中,根据本发明的第二方面的核酸分子包含(或根据本发明的第二方面的多个不同核酸分子的组合共同地包含):
- [0771] a) 包含以下序列的核苷酸序列:
- [0772] i. SEQ ID NO:34(具有或不具有如所指示的前导序列编码区,且若不具有,则任选包含编码替代前导序列的序列),其编码如SEQ ID NO:20所定义的1D3的重链的完全成熟序列;
- [0773] ii. SEQ ID NO:155(具有或不具有如所指示的前导序列编码区,且若不具有,则任选包含编码替代前导序列的序列),其编码如SEQ ID NO:157所定义的1C10的重链的完全成熟序列;
- [0774] iii. SEQ ID NO:159(具有或不具有如所指示的前导序列编码区,且若不具有,则任选包含编码替代前导序列的序列),其编码如SEQ ID NO:161所定义的1A10的重链的完全成熟序列;
- [0775] iv. SEQ ID NO:147(具有或不具有如所指示的前导序列编码区,且若不具有,则任选包含编码替代前导序列的序列),其编码如SEQ ID NO:149所定义的1G9的重链的完全成熟序列;和/或
- [0776] v. SEQ ID NO:151(具有或不具有如所指示的前导序列编码区,且若不具有,则任选包含编码替代前导序列的序列),其编码如SEQ ID NO:153所定义的1E8的重链的完全成熟序列;
- [0777] 和
- [0778] b) 包含以下序列的核苷酸序列:
- [0779] i. SEQ ID NO:35(具有或不具有如所指示的前导序列编码区,且若不具有,则任选

包含编码替代前导序列的序列),如SEQ ID NO:21所定义的1D3的轻链的完全成熟序列;

[0780] ii.SEQ ID NO:156(具有或不具有如所指示的前导序列编码区,且若不具有,则任选包含编码替代前导序列的序列),其编码如SEQ ID NO:158所定义的1C10的轻链的完全成熟序列;

[0781] iii.SEQ ID NO:160(具有或不具有如所指示的前导序列编码区,且若不具有,则任选包含编码替代前导序列的序列),其编码如SEQ ID NO:162所定义的1A10的轻链的完全成熟序列;

[0782] iv.SEQ ID NO:148(具有或不具有如所指示的前导序列编码区,且若不具有,则任选包含编码替代前导序列的序列),其编码如SEQ ID NO:150所定义的1G9的轻链的完全成熟序列;和/或

[0783] v.SEQ ID NO:152(具有或不具有如所指示的前导序列编码区,且若不具有,则任选包含编码替代前导序列的序列),其编码如SEQ ID NO:154所定义的1E8的轻链的完全成熟序列;

[0784] 或这些序列中的任何一个的功能变体,例如与所述SEQ ID No具有至少20%、30%、40%、50%、60%、70%、75%、80%、85%、90%或95%序列一致性的变体(任选地,其中序列一致性为相对于不具有如所指示的前导序列编码区的所述序列测定)。

[0785] 根据前述实施方案,所述所定义核酸序列的功能变体可例如为以上核酸序列中的任何一个的替换、缺失和/或添加变体。变体多核苷酸可包含序列中所给定的序列的1、2、3、4、5、至多10、至多20、至多30、至多40、至多50、至多75或更多种核酸替换和/或缺失。

[0786] 在一些实施方案中,变体可与本文中所公开的核酸序列中的任何一个的多核苷酸至少70%同源、优选与其至少80%或90%且更佳至少95%、97%或99%同源。优选地,这些水平下的同源性和一致性至少相对于多核苷酸的编码区存在。测量同源性的方法为本领域熟知,且本领域技术人员将理解,在本发明的情况下,基于核酸一致性计算同源性。此类同源性可存在于至少15个、优选至少30个、例如至少40、60、100、200个或更多个连续核苷酸的区内。此类同源性可遍及未经修饰的多核苷酸序列的全部长度存在。

[0787] 任选地,在本文所述的一些变异核酸序列中,编码可变重链和可变轻链内存在的六个CDR序列中的任何一个或多个的区的序列可为保守性的,且在别处存在任何序列变异;或在另一选项中,编码可变重链和可变轻链内存在的六个CDR序列中的任何一个或多个的区中的变异的水平和/或性质与其余的核酸分子或各核酸分子相比可降至最低。举例而言,可变重链和可变轻链内存在的六个CDR序列中的任何一个或多个的区内或各区内的变化程度可限于1、2、3、4或5个核苷酸替换和/或展现与对应非变异CDR编码区具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列一致性的CDR编码区。该变异核酸或各变异核酸的变化形式可例如为沉默突变,且因此不改变其编码的氨基酸序列的序列;这在编码V_H-CDR1、V_H-CDR2和V_H-CDR3序列和/或V_L-CDR1、V_L-CDR2和V_L-CDR3序列中的任何一个或多个的区中可为(尽管不必需)尤其优选的。

[0788] 测量多核苷酸同源性或一致性的方法在本领域已知。举例而言,UWGCG程序包提供BESTFIT程序,其可用于计算同源性(例如在其默认设定下使用)(Devereux等人,1984,《核酸研究(Nucleic Acids Research)》12:387-395,其公开内容以引用的方式并入本文中)。

[0789] PILEUP和BLAST算法还可用于计算同源性或对齐序列(通常在其预设设定下),例

如,如Altschul,1993,《分子进化杂志(J Mol Evol)》36:290-300;Altschul等人,1990,《分子生物学杂志(J Mol Biol)》215:403-10中所描述,其公开内容以引用的方式并入本文中。

[0790] 进行BLAST分析的软件可经由国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)公开获得(<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/>)。此算法涉及通过鉴别查询序列中的长度W的短字来首先鉴别高分序列对(high scoring sequence pair, HSP),所述短字在与数据库序列中相同长度的字比对时匹配或满足某些正值临限值分数T。T称作邻域字分数阈值(Altschul等人,同上)。这些初始邻域字命中充当用于启动搜寻的种子以发现含有其的HSP。字命中沿各序列以两个方向延伸,只要累积比对分数可增加即可。在以下情况下字命中在各个方向上的延伸中止:由于一个或多个负分残基比对的积累,累积比对得分达到零或低于零;或达到任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X决定比对的灵敏度和速度。BLAST程序使用字长(W) 11, BLOSUM62分数矩阵(参见Henikoff和Henikoff, 1992) 比对(B) 50, (E) 10, M=5, N=4和两条链的比较作为预设。

[0791] BLAST算法对两个序列之间的相似性执行统计分析;参见例如Karlin和Altschul, 1993。通过BLAST算法提供的一种相似性度量为最小总和机率(P(N)),其提供两个核苷酸或氨基酸序列之间偶然出现匹配的机率的指示。举例而言,若第一序列与第二序列的比较中的最小总概率小于约1,优选小于约0.1,更优选小于约0.01且最优选小于约0.001,则认为序列与另一序列相似。

[0792] 同源物可与相关多核苷酸中的序列在小于3、5、10、15、20或更多种突变上存在不同(其中各者可为取代、缺失或插入)。这些突变可遍及同源物的至少30,例如至少40、60或100或更多个连续核苷酸的区测量。

[0793] 在一个实施方案中,变体序列可借助基因密码中的冗余由序列表中所给定的特定序列而变化。DNA编码具有4种主要核酸残基(A、T、C和G)且使用这些来“拼写”表示编码在生物体的基因中的蛋白的氨基酸的三字母密码子。沿DNA分子的密码子的线性序列经翻译成由那些基因编码的蛋白中的氨基酸的线性序列。密码高度简并,61个密码子编码20种天然氨基酸且3个密码子表示“终止”信号。因此,大多数氨基酸由多于一个密码子编码,事实上有数种由四个或更多个不同密码子编码。本发明的变体多核苷酸可因此编码与本发明的另一多核苷酸相同的多肽序列,但由于使用不同密码子编码相同氨基酸而可能具有不同核酸序列。

[0794] 存在于本发明的第一方面的结合分子内的一种或多种多肽因此可由一种或多种多核苷酸产生或以其形式递送,该一种或多种多核苷酸对其编码且能够表达该或所述多肽。

[0795] 本发明的多核苷酸可根据本领域熟知的方法来合成,如例如在Green和Sambrook (2012,《分子克隆-实验室手册(Molecular Cloning-a laboratory manual)》,第4版;Cold Spring Harbor Press)中所描述的。

[0796] 本领域技术人员将了解,核酸分子可经密码子优化以表达特定宿主细胞中的抗体多肽,例如表达于人细胞中(例如参见Angov, 2011)。

[0797] 为避免疑问,当提及编码特定CDR序列的核酸的变体时,将了解,编码如所定义的CDR的一种或多种核苷酸序列可变化。因此,当核酸定义为编码各自由特定核酸序列编码的重链或轻链CDR(例如CDR 1-3)时,那些特定序列中的至多一个、两个或三个可变化,等等。

类似地,当核酸定义为编码各自由特定核苷酸序列编码的轻链和重链CDR(例如六个CDR)时,那些特定序列中的至多一个、两个、三个、四个、五个或全部六个可变化。变体通常为引起如上文所描述的保守性氨基酸替换的变体。

[0798] 当核酸定义为编码轻链可变区和重链可变区时,将了解,那些序列中的至多一个或两个可如所定义而变化。变异可仅在编码非CDR区的序列的一部分内,仅在编码CDR区的序列的一部分内,或在编码CDR区和编码非CDR区的部分的部分内。通常,变异为在CDR区外部,且因此核酸可包含编码本文所定义的特定CDR的核酸中的任何一个(例如1D3的SEQ ID NO:8、9、10、14、15和/或16,或1C10、1A10、1G9和/或1E8中的对应SEQ ID NO中的任何一个)。

[0799] 将了解,本文所述的特定核酸序列的任何变体不应显著影响所需结合特性中的一种或多种,例如US28的ECD3的选择性结合特异性、特异性结合但以对US28的ECD3的病毒株不可知的方式和/或对US28的ECD3的结合亲和力。上文关于本发明的第一方面描述测试此类所需活性的方法。

[0800] 在一个特别优选的实施方案中,核酸编码(或多个不同核酸分子的组合共同编码)选择性结合至US28的ECD3的scFv的本发明的第一方面的结合分子。因此,核酸(或多个不同核酸分子的组合)可包含如下序列区,其分别编码通常呈单一连续核酸编码区形式的可变重(V_H)链序列和可变轻(V_L)链序列,例如其中编码 V_H 和 V_L 序列的序列区的单一连续核酸编码区由编码接头序列的序列连接,使得scFv可表达为由单一核酸编码的单一多肽。

[0801] 在另一特别优选的实施方案中,该核酸编码(或多个不同核酸分子的组合共同编码)本发明的第一方面的结合分子,该结合分子为双特异性免疫细胞接合子抗体,例如双特异性T细胞接合子(BiTE)。举例而言,核酸(或多个不同核酸分子的组合中的一种或多种)可编码作为细胞接合区的区,如T细胞接合区,例如CD3结合结构域。

[0802] 在另一特别优选的实施方案中,该核酸编码(或多个不同核酸分子的组合共同编码)作为嵌合抗原受体(CAR)的本发明的第一方面的结合分子。因此,根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合可包括一个或多个编码CAR的核酸序列,该CAR包含:

[0803] (i)胞外结构域(例如抗体,如scFv),其中该胞外结构域包含如本文所定义的本发明的第一方面的结合分子或如本文所定义的该结合分子的功能片段或由其组成;

[0804] (ii)跨膜结构域(例如跨膜受体蛋白的跨膜结构域,且任选其中跨膜结构域包含选自以下的蛋白质的跨膜结构域:T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链、CD28、CD3 ϵ 、CD8、CD45和CD4);和

[0805] (iii)胞内结构域(例如胞内信号传导结构域,例如其中:(a)胞内信号传导结构域包含一个或多个基于免疫受体酪氨酸的活化基序(ITAM);和/或(b)胞内信号传导结构域包含CD3 ζ 、Fc受体 γ 、Fc受体 β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b和CD66d)的信号传导结构域;

[0806] 其中该CAR的该胞外结构域对人巨细胞病毒(HCMV)的US28蛋白的胞外结构域3(ECD3)内的表位具有结合特异性,和

[0807] 其中该US28蛋白的ECD3包含存在于该US28蛋白中的氨基酸序列,其位置对应于由如SEQ ID NO:5中所阐述的人巨细胞病毒(HCMV)编码的US28蛋白的位置167至183。

[0808] 任选地,由本发明的第二方面的核酸分子编码的CAR的胞外结构域可例如通过较

链区连接至跨膜结构域。因此,本发明的第二方面的核酸分子可包括编码该铰链区的核酸序列的区。

[0809] 由本发明的第二方面的核酸分子编码的CAR的胞内结构域可例如通过铰链区连接至跨膜结构域,该铰链区例如包含一个或多个共刺激结构域,例如:(a) 其中一个或多个共刺激结构域包括一个或多个选自CD28、41BB、OX40、ICOS、CD27和DAP10的蛋白质的功能性信号传导结构域;(b) 其中胞内结构域掺入接近胞内信号传导结构域的共刺激结构域,(c) 其中胞内结构域包含两个或更多个共刺激结构域,例如两个串联共刺激结构域,和/或(d) 其中胞内结构域掺入单独细胞因子信号。因此,本发明的第二方面的核酸分子可包括编码该一个或多个共刺激结构域的核酸序列的一个或多个区。

[0810] 根据本发明的第二方面的核酸分子或各核酸分子还可编码前导序列、跨膜结构域、胞内信号传导结构域和铰链区,如如上文所描述的任一个或多个此类序列。因此,根据本发明的第二方面的核酸分子或各核酸分子可包含前导序列(例如SEQ ID NO:13或19的前导序列)。

[0811] 任选地,根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合可以表达盒形式(共同地或单独地呈独立形式)提供,该表达盒包括可操作地连接至插入序列的控制序列,由此允许体内表达本发明的多肽。该表达盒可向宿主受试者直接施用。这些表达盒又通常提供于载体(例如质体或重组病毒载体)内,例如如下文进一步论述。

[0812] C. 载体

[0813] 本发明的第三方面进一步提供一种载体,其包含根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合。

[0814] 术语“载体”是指掺入一个或多个经分离核酸序列的序列且可用于将该经分离核酸或各经分离核酸递送至细胞内部的核酸。本领域已知多种载体,包括线性多核苷酸、与离子化合物或两亲性化合物相关的多核苷酸、质粒和病毒。因此,术语载体包括自主复制质粒或病毒。该术语还应解释为进一步包括促进核酸转移至细胞中的非质粒且非病毒的化合物,如聚赖氨酸化合物、脂质体及其类似物。

[0815] 在本文所用的情况下,术语“载体”包括单个和/或多个载体。举例而言,在本发明的第一方面的结合分子由根据本发明的第二方面的多个不同核酸分子的组合编码的情况下,其可包括多个载体,其中存在于多个不同核酸分子的该组合中的一个或多个核酸可呈现于第一载体上,且存在于该多个不同核酸分子的组合中的其他核酸中的一种或多种可呈现于第二不同载体上,和/或该多个不同核酸分子的组合中的其他核酸可呈现于第三、第四、第五等不同其他载体上。

[0816] 因此,举例而言,若本发明的第一方面的结合分子为包含超过一条不同多肽链的抗体或CAR,则任选根据本发明的第三方面的单一形式的载体可包含所有必需核酸序列以编码超过一条形成结合分子的不同多肽链。替代地,本发明的第三方面还提供多个不同载体(例如两个载体或更多个)的组合,其中多个不同载体的组合共同地包含根据本发明的第二方面的多个不同核酸分子的组合。因此,举例而言,若本发明的第一方面的结合分子为包含超过一条不同多肽链的抗体或CAR,则多个不同载体可各自包含各自编码共同形成结合分子的不同和不同多肽链的一个或多个核酸序列,使得结合分子包含一条或多条由第一载体编码的不同多肽链和一条或多条由一个或多个后续不同载体编码的其他不同多肽链。

[0817] 出于简洁起见,一般而言,本申请是指呈单数形式的“载体(vector)”,但将理解,此还可任选涵盖呈复数形式的“载体(vectors)”,包括如上文所描述的多种不同形式的载体。

[0818] 任选地,该(或各)载体可选自:逆转录病毒载体、质粒、慢病毒载体和腺病毒载体。

[0819] 根据本发明的第三方面的包含根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合的该(或各)载体可向宿主受试者施用。优选地,多核苷酸使用遗传载体来制备和/或施用。适合载体可为能够携带足量遗传信息且允许表达一个或多个由载体或各载体编码的多肽序列,如允许表达根据本发明的第一方面的结合分子的任何载体。

[0820] 编码本发明的第一方面的结合分子(如抗体或其片段,包括scFv、BiTE及其类似物,以及CAR)的天然或合成核酸的表达通常通过将一种或多种各自独立地编码一种或多种多肽(或其部分)的核酸可操作地连接至启动子且将该或各构建体并入至一种或多种表达载体中来达成。因此,该(或各)载体可为表达载体。

[0821] 因此,本发明的第三方面包括包含此类多核苷酸序列的表达载体。通过“表达载体”,我们包括包含重组型多核苷酸的载体的意义,该重组型多核苷酸包含可操作地连接于待表达的核苷酸序列的表达控制序列。此类表达载体通常在分子生物学技术中构建且可例如涉及使用质粒DNA和适当起始子、启动子、增强子和其他组件,如聚腺苷酸化信号,所述组件可为必需的,且以适当取向定位,以便允许表达一个或多个由载体或各载体编码的多肽序列,如允许表达根据本发明的第一方面的结合分子。其他适合的载体将对本领域技术人员显而易见(参见Green和Sambrook,同上)。

[0822] 表达载体可包含足够的顺式作用元素用于表达;用于表达的其他组件可由宿主细胞供应或在体外表达系统中。表达载体包括本领域已知的全部那些,包括掺入重组多核苷酸的黏粒、质粒(例如裸露或含于脂质体中)和病毒(例如慢病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒)。典型克隆载体含有转录和翻译终止子、起始序列和可用于调节所需核酸序列的表达的启动子。

[0823] 此外,表达载体可以病毒载体形式提供。病毒载体技术为本领域所熟知且描述于例如Sambrook等人,2012,《分子克隆:实验室手册(MOLECULAR CLONING:A LABORATORY MANUAL)》,第1-4卷,Cold Spring Harbor Press,NY)中。可用作载体的病毒包括但不限于逆转录病毒、腺病毒、腺相关病毒、疱疹病毒和慢病毒。

[0824] 已开发出用于将基因转移至哺乳动物细胞中的多种基于病毒的系统。举例而言,逆转录病毒为基因递送系统提供方便的平台。编码一个或多个感兴趣的多肽序列的一个或多个所选核酸序列可插入载体中并使用本领域已知的技术包装于逆转录病毒粒子中。接着可分离重组型病毒并体内或离体递送至细胞中。本领域已知许多逆转录病毒系统。

[0825] 术语“慢病毒”是指逆转录病毒科家族的属。慢病毒在逆转录病毒中为独特的,因其能够感染未分化细胞;其可将大量遗传信息递送至宿主细胞的DNA中,因此其为基因递送载体的最有效方法中的一种。HIV、SIV和FIV均为慢病毒的实例。慢病毒载体为达成长期基因转移的特别适合的工具,因为其允许转基因的长期稳定整合及其在子细胞中的复制。

[0826] 术语“慢病毒载体”是指来源于慢病毒基因组的至少一部分的载体,尤其包括如Milone等人,《分子治疗(Mol.Ther.)》17(8):1453-1464(2009)中所提供的自身失活慢病毒载体。临床中可使用的慢病毒载体的其他实例包括但不限于例如来自Oxford BioMedica的

LENTIVECTOR®基因递送技术、来自Lentigen的LENTIMAX™载体系统及其类似物。非临床型慢病毒载体还为可获得的且将为本领域技术人员所已知。

[0827] 还可使用腺病毒载体,且多种腺病毒载体为本领域已知的。

[0828] 还可使用混合载体,且多种混合载体为本领域已知的。混合载体通常包括经基因工程改造以具有超过一个载体的特性的载体病毒。改变病毒以避免典型病毒载体的缺点,所述典型病毒载体可具有有限负载容量、免疫原性、遗传毒性且无法支持长期充足转基因表达。

[0829] 编码根据本发明的第一方面的结合分子的核酸的表达还可使用转座子(如睡美人、CRISPR、CAS9和锌指核酸酶)实现。

[0830] 载体可适合于在真核生物中复制和整合,和/或其可适合在原核生物中(如细菌物种中)表达。优选地,该或各载体能够在生产细胞(例如CHO细胞、大肠杆菌细胞等)或受试者细胞(例如哺乳动物细胞(例如人细胞),如哺乳动物(例如人)免疫细胞(例如T细胞、NK细胞、巨噬细胞等))中表达根据本发明的第一方面的结合分子。

[0831] 根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合还可克隆至许多类型的载体中,包括质粒、噬菌粒、噬菌体衍生物、动物病毒和黏粒。尤其受关注的载体包括表达载体、复制载体、探针产生载体和测序载体。

[0832] 一般而言,适合的载体将任选含有在至少一种生物体中起作用的复制起点、可操作地连接至该或各编码核酸序列的启动子序列、方便的限制性核酸内切酶位点和/或一个或多个可选标记(例如WO 01/96584;WO 01/29058;和美国专利第6,326,193号)。

[0833] 将了解,根据本发明的第三方面的载体可包含调节转录起始频率的额外启动子组件,例如增强子。通常,这些定位于起始位点上游30-110bp区中,尽管许多启动子已显示还含有在起始位点下游的功能性元件。启动子元件之间的间距通常是灵活的,使得当元件反向或相对于彼此移动时保留启动子功能。在胸苷激酶(tk)启动子中,启动子元件之间的间距在活性开始减退之前可增加至相隔50bp。取决于启动子,个体组件可协作地或独立地发挥活化转录功能。

[0834] 能够表达哺乳动物T细胞中相关转基因的启动子的实例为EF1a启动子。原生EF1a启动子驱使伸长因子-1复合物的 α 亚基的表达,所述复合物负责将氨基酰基tRNA酶促递送至核糖体。EF1a启动子已广泛用于哺乳动物表达质粒且已显示有效驱动表达转基因克隆至慢病毒载体。参见例如Milone等人,《分子治疗》17(8):1453-1464(2009)。

[0835] 启动子的另一实例为即刻早期巨细胞病毒(CMV)启动子序列。此启动子序列为强组成性启动子序列,其能够驱动与其可操作地连接的任何多核苷酸序列的高表达量。

[0836] 替代地或另外,可使用其他组成性启动子序列,包括但不限于猴病毒40(SV40)早期启动子、小鼠乳腺瘤病毒(MMTV)、人免疫缺陷病毒(HIV)长末端重复序列(LTR)启动子、MoMuLV启动子、禽白血病病毒启动子、艾伯斯坦-巴尔病毒即刻早期启动子、劳氏肉瘤病毒启动子(Rous sarcoma virus promoter),以及人基因启动子,如(但不限于)肌动蛋白启动子、肌凝蛋白启动子、伸长因子-1a启动子、血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。

[0837] 此外,本发明不限于组成性启动子的使用。还涵盖诱导性启动子作为本发明的一部分。诱导性启动子的使用提供分子开关,该分子开关能够在需要其可操作地连接的多核苷酸序列的表达时打开此类表达或在不需要表达时关闭表达。诱导性启动子的实例包括但

不限于金属硫蛋白启动子、糖皮质激素启动子、孕酮启动子和四环素启动子。因此,将了解,在本文所述的本发明的方法或用途中的任一种中,通过本发明的第二方面的核酸或根据本发明的第三方面的载体编码的根据本发明的第一方面的结合分子的表达可为条件性或诱导性的,例如经由环境刺激物或经由第二分子的作用。以此方式,有可能限制不良脱靶影响或使其降至最低(例如,在并不表达或表达低含量US28的组织中)。

[0838] 为了评定相关多肽在细胞(例如根据本发明的第一方面的结合分子)中的表达,载体宜含有可选标记基因或报告子基因或两者,以便于鉴别和选择表达细胞。在其他实施方案中,可选标记可携带于单独一份DNA上且用于共转染程序。可选标记基因和报告子基因均可侧接适当调节序列以使得能够在宿主细胞中表达。适用可选标记包括例如耐抗生素基因,如neo及其类似物。

[0839] 报告子基因用于鉴别潜在经转染细胞和评估调节序列功能。一般而言,报告子基因为不存在于受体生物体或组织中或由受体生物体或组织表达的基因,且该基因编码表达通过一些容易检测的特性(例如酶促活性)显现的多肽。在DNA已引入受体细胞中之后的适合时间分析报告子基因的表达。适合的报告子基因可包括编码荧光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯霉素乙酰基转移酶、分泌的碱磷酸酯酶的基因或绿色荧光蛋白基因(例如Ui-Tei等人,2000《欧洲生化学会联合会快报(FEBS Letters)》479:79-82)。适合的表达系统已熟知且可使用已知技术制备或市售购买。一般而言,展示最高报告子基因表达量的具有最小5'侧翼区的构建体鉴别为启动子。此类启动子区可连接至报告子基因并用于评估试剂调节启动子驱动的转录的能力。

[0840] 本发明的表达构建体还可用于使用标准基因递送方案的核酸免疫和基因疗法(参见例如US 5,399,346)。因此,载体可为基因疗法载体。在此情况下,可能需要使核酸和/或载体连接至适合的靶向部分以使得其可引导至适当细胞、组织或器官以用于表达。因此,将了解,在某些实施方案中,本发明的核酸分子和/或载体可经由基因疗法方法,使用下文描述且本领域已知的配制物和方法用于本发明的治疗方面中。

[0841] D. 经转化细胞

[0842] 本发明的第四方面提供一种细胞或细胞群(任选地,均质或异质细胞群),其包含根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,和/或根据本发明的第三方面的载体,任选其中细胞表达根据本发明的第一方面的一个或多个结合分子(如一个或多个抗体,例如单克隆抗体和/或一个或多个CAR),该一个或多个结合分子和/或CAR由根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合编码,或根据本发明的第三方面的载体。所述细胞可任选自经分离的细胞、离体细胞和体外细胞。

[0843] 所述细胞包括瞬时或优选地稳定高等真核细胞株(如哺乳动物细胞或昆虫细胞)、低等真核细胞(如酵母)或原核细胞(如细菌细胞)。可通过插入编码根据本发明的第一方面的结合分子的载体或表达盒修饰的细胞的特定实例包括哺乳动物HEK293T、CHO、HeLa、NS0和COS细胞。优选地,所选细胞系将为不仅稳定而且还允许多肽的成熟糖基化和/或细胞表面表达的细胞系。

[0844] 本发明的此类细胞系可使用常规方法培养以产生根据本发明的第一方面的结合分子,或可治疗性或预防性地用于向受试者递送根据本发明的第一方面的结合分子。

[0845] 替代地,本发明的多核苷酸、表达盒或载体可向来自受试者的细胞离体施用且该

细胞随后返回受试者身体中。

[0846] 如下文进一步描述,在所述细胞治疗性或预防性地用于受试者的实施方案中,细胞则可任选相对于受试者为“自体的”或“同种异体的”。

[0847] 根据本发明的第四方面的细胞可例如包含:(a)根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,其中所编码的结合分子为根据本发明的第一方面的抗体、该抗体的功能片段或具有包含融合多肽序列的该结合分子的功能片段的抗体;和/或(b)根据本发明的第三方面的载体,其中该载体包含如根据此段落的选项(a)所定义的核酸分子或多个不同核酸分子的组合。

[0848] 根据本发明的第四方面的细胞可例如包含:(a)根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,其中所编码的结合分子为根据本发明的第一方面的CAR;和/或(b)根据本发明的第三方面的载体,其中该载体包含如由此段落的部分(a)所定义的核酸分子或多个不同核酸分子的组合。非限制性地,该细胞可例如选自:T细胞、自然杀伤(NK)细胞和巨噬细胞。因此,细胞可任选为CAR-T细胞、CAR-NK细胞或CAR巨噬细胞,且任选地,当细胞为CAR-T细胞时,则例如T细胞可选自:CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、效应T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、EBV特异性T细胞受体(TCR)或 $\gamma\delta$ -T细胞亚型。

[0849] 本发明的第四方面还提供一种细胞,其包含根据本发明的第一方面的结合分子和/或编码该结合分子的核酸,任选其中该核酸为分别如本发明的第二或第三方面所定义的核酸或载体。举例而言,结合分子可为根据本发明的第一方面的抗体、根据本发明的第一方面的该抗体的功能片段或包含根据本发明的第一方面的融合多肽序列的该结合分子的功能片段的抗体,且任选其中该抗体为单克隆抗体,且进一步例如其中该细胞为重组表达单克隆抗体的哺乳动物细胞,如CHO细胞。

[0850] 本发明的第四方面还提供一种细胞,其包含根据本发明的第一方面的CAR和/或编码该CAR的核酸,任选其中该核酸为分别如由本发明的第二或第三方面所定义的核酸或载体。非限制性地,该细胞可例如选自:T细胞、自然杀伤(NK)细胞和巨噬细胞(M)。因此,细胞可任选为CAR-T细胞、CAR-NK细胞或CAR-M巨噬细胞,且任选地,当细胞为CAR-T细胞时,则例如T细胞可选自:CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、效应T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、EBV特异性T细胞受体(TCR)或 $\gamma\delta$ -T细胞亚型。

[0851] 本发明的第五方面提供一种产生细胞、更特别地为重组细胞或此类细胞的群体(任选均质或异质细胞群)的方法,该方法包含将根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合和/或根据本发明的第三方面的载体引入至细胞中。

[0852] 向细胞中引入和表达基因的方法在本领域已知。在表达载体的情况下,载体易于通过本领域的任何方法引入宿主细胞(例如哺乳动物、细菌、酵母或昆虫细胞)中。举例而言,表达载体可通过物理、化学或生物方式转移至宿主细胞中。

[0853] 用于将多核苷酸引入宿主细胞中的物理方法包括磷酸钙沉淀、脂质体转染、粒子轰击、显微注射、电穿孔和类似方法。用于产生包含载体和/或外源性核酸的细胞的方法为本领域熟知的。参见例如Sambrook等人,2012,《分子克隆:实验室手册》,第1-4卷,Cold Spring Harbor Press,NY)。将多核苷酸引入宿主细胞中的优选方法为磷酸钙转染。

[0854] 用于将感兴趣的多核苷酸引入至宿主细胞的生物方法包括使用DNA和RNA载体。病毒载体和尤其逆转录病毒载体已成为最广泛用于将基因插入至哺乳动物细胞(例如人细

胞)中的方法。其他病毒载体可来源于慢病毒、痘病毒、I型单纯疱疹病毒、腺病毒和腺相关病毒及其类似病毒。参见例如美国专利第5,350,674号和第5,585,362号。相关多核苷酸可经由病毒转导递送至细胞。

[0855] 用于将多核苷酸引入至宿主细胞中的化学方式包括胶态分散系统,如大分子复合物、纳米囊、微球、珠粒,和基于脂质的系统,包括水包油乳液、微胞、混合微胞和脂质体。通常,脂质体(例如人工膜囊泡)可用作体外和体内递送载体。可用现有技术中靶向递送核酸的其他方法,如用靶向纳米颗粒或其他适合的亚微米尺寸递送系统递送多核苷酸。

[0856] 在利用非病毒递送系统的情况下,递送载体可为脂质体。涵盖使用脂质配制物将核酸引入宿主细胞中(体外、离体或体内)。与脂质相关联的核酸可包封于脂质体的水性内部中,穿插于脂质体的脂质双层内,经由与脂质体和寡核苷酸相关联的接头分子附接至脂质体、包覆于脂质体中,与脂质体复合,分散于含有脂质的溶液中,与脂质混合,与脂质组合,以悬浮液形式含于脂质中,含有微胞或与微胞复合,或以其他方式与脂质相关联。与脂质、脂质/DNA或脂质/表达载体相关联的组合物不限于溶液中的任何特定结构。举例而言,其可存在于双层结构中,呈微胞形式或具有“塌陷”结构。其还可简单地散布于溶液中,可能形成尺寸或形状上不均匀的聚集物。脂质为可天然存在的脂肪物质或合成脂质。举例而言,脂质包括细胞质中天然存在的脂肪滴以及含有长链脂族烃及其衍生物的化合物类别,如脂肪酸、醇、胺、氨基醇和醛。

[0857] 适用的脂质可获自市售来源。举例而言,二肉豆蔻基磷脂酰胆碱(“DMPC”)可获自Sigma, St. Louis, MO; 二鲸蜡醇磷酸酯(“DCP”)可获自K&K Laboratories (Plainview, NY); 胆固醇(“Choi”)可获自Calbiochem-Behring; 二肉豆蔻基磷脂酰甘油(“DMPG”)和其他脂质可获自Avanti Polar Lipids公司(Birmingham, AL.)。

[0858] “脂质体”为通称,其涵盖通过产生经围封的脂质双层或聚集物而形成的多种单层和多层脂质载体。脂质体的特征可为具有囊泡结构,其具有磷脂双层膜和内部水性介质。多层脂质体具有由水性介质分隔开的多个脂质层。其在磷脂悬浮于过量水性溶液中时自发地形成。脂质组分在形成封闭结构之前进行自身重排且在脂质双层之间捕获水和溶解的溶解物(Ghosh等人, 1991《糖生物学 (Glycobiology)》5:505-10)。然而,还涵盖在溶液中具有与正常囊泡结构不同的结构的组合物。举例而言,脂质可采用胶束结构或仅以脂质分子的非均匀聚集物形式存在。还涵盖lipofectamine-核酸复合物。

[0859] 可使用瞬时转染形式将编码本发明的第一方面的结合分子的一个或多个RNA分子引入细胞。将编码RNA (a) 引入细胞的其他方法包括但不限于例如电穿孔 (Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.)或Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany)、使用脂质体转染的阳离子脂质体介导的转染、聚合物包封、肽介导的转染、或生物弹道粒子递送系统(如“基因枪(gene gun)” (参见例如Nishikawa等人,《人基因疗法 (Hum Gene Ther.)》, 12(8):861-70(2001))。

[0860] 不管用于将外源性核酸引入宿主细胞中或以其他方式使细胞暴露于本发明的核酸或载体的方法,为了确认核酸在宿主细胞中的存在,可进行多种分析。此类分析包括例如本领域技术人员熟知的“分子生物学”分析,如Southern印迹和Northern印迹、RT-PCR和PCR; “生物化学”分析,如检测特定肽的存在或不存在,例如通过免疫学方式(ELISA和蛋白

质印迹)或通过本文所描述的用于鉴别在本发明范围内的试剂的分析进行检测。

[0861] 该方法任选进一步包含选择根据本发明的第五方面的细胞的步骤;例如自异质细胞群中选择所述细胞,由此产生富集和/或均质细胞群。该选择步骤可包括选择根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合中存在的一个或多个可选标记和/或根据本发明的第三方面的载体的存在。

[0862] 该方法任选包含培养所述细胞。所述经培养细胞可因此产生根据本发明的第一方面的一个或多个结合分子,且该方法可包括自所述经培养细胞分离和/或纯化该一种或多种结合分子。任选地,经分离和/或纯化的一种或多种结合分子可例如以药学上可接受的配制物形式配制和/或向有需要的受试者施用。

[0863] E. CAR表达细胞:

[0864] 如上文所述,在一个优选的实施方案中,根据本发明的第四方面的细胞可包含:

[0865] (a) 根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,其中所编码的结合分子为根据本发明的第一方面的CAR;和/或

[0866] (b) 根据本发明的第三方面的载体,其中该载体包含如由此段落的部分(a)所定义的核酸分子或多个不同核酸分子的组合。

[0867] 非限制性地,该细胞可例如选自:T细胞、自然杀伤(NK)细胞和巨噬细胞(M)。因此,细胞可任选为CAR-T细胞、CAR-NK细胞或CAR-M细胞。

[0868] 当细胞为CAR-T细胞时,则T细胞可为 α - β T细胞、 γ - δ T细胞、记忆T细胞(例如具有干细胞样特性的记忆T细胞)中的任一种。举例而言,T细胞可选自:CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、效应T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、EBV特异性T细胞受体(TCR)或 $\gamma\delta$ -T细胞亚型。在一个特别优选的实施方案中,免疫细胞可为具有干细胞样特性的记忆T细胞。

[0869] 当细胞为CAR-NK细胞时,则NK细胞可任选为恒定NK细胞。

[0870] 当细胞为CAR巨噬细胞(CAR-M)细胞时,则巨噬细胞可任选为M1型巨噬细胞。如Mukhopadhyay(《自然-方法(Nature Methods)》,2020,17:559-565)中所论述,尽管T细胞上的CAR表达已在恶性肿瘤治疗中展示巨大前景,但CAR-T细胞疗法可能受阻于T细胞无法穿透实体肿瘤以及抑制肿瘤微环境(TME),而已展示CAR引入巨噬细胞(CAR-M)可有效地促成抑制肿瘤微环境。

[0871] 然而,更一般而言,将了解,CAR表达细胞可为任何类型的来源于受试者(例如人受试者)的细胞(例如免疫细胞,如T细胞)或任何细胞系。此类细胞可经修饰以包含根据本发明的核酸或载体且由此表达本发明的CAR。因此,本发明包括一种产生表达本发明CAR的细胞的方法,该方法包含获得衍生自受试者的细胞或提供衍生自受试者的细胞或提供细胞系,和将根据本发明的第二方面的一个或多个多核苷酸分子或根据本发明的第三方面的载体引入至该细胞或细胞系中。

[0872] 受试者的实例包括哺乳动物、人、狗、猫、小鼠、大鼠及其转基因物种。

[0873] 细胞可为“自体的”或“同种异体的”,如下文进一步描述。

[0874] 通过“自体的”,我们包括以下意义:CAR表达细胞来源于源自个体的细胞,CAR表达细胞将根据本申请的各种方面用于所述个体。

[0875] 通过“同种异体的”,我们包括以下意义:CAR表达细胞来源于不源自个体的细胞,

CAR表达细胞将根据本申请的各种方面用于所述个体。通常,细胞来源于与将对其进行所述方法或用途的受试者相同的物种的细胞。

[0876] 免疫细胞如T细胞可获自许多来源:外周血单个核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、来自感染部位的组织、腹水、胸膜积液、脾组织和肿瘤。还可使用本领域可获得的任何数目的细胞系(例如免疫细胞系,如T细胞系)。

[0877] 在一个实施方案中,免疫细胞(例如T细胞)为使用本领域已知的任何适合技术(如Ficoll™分离)获自受试者的血液单位。在另一实施方案中,通过血细胞分离术获得来自受试者的循环血液的细胞。血细胞分离术产物通常含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和血小板。将了解,通过血细胞分离术收集的细胞可经洗涤以去除血浆部分并将细胞置于适当缓冲液或培养基中以用于后续处理步骤。举例而言,细胞可用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤。替代地,洗涤溶液缺乏钙且可能缺乏镁或可能缺乏许多(若并非全部)二价阳离子。缺乏钙的初始活化步骤能引起活化扩增。洗涤步骤可通过本领域技术人员已知的方法实现,如通过使用半自动“流过式”离心机(例如Cobe 2991细胞处理器、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5),根据制造商说明书实现。洗涤后,可将细胞重悬于多种生物兼容性缓冲液中,如不含Ca不含Mg的PBS、PlasmaLyte A或其他具有或不具有缓冲剂的生理盐水溶液。替代地,可去除血细胞分离术样品的非所需组分,并将细胞直接重悬于培养基中。

[0878] 在一个实施方案中,通过溶解红细胞和例如通过经由PERCOLL™梯度离心或通过逆流离心淘析耗尽单核细胞,而自外周血淋巴细胞分离T细胞。T细胞的特定亚群,如CD3+、CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+和CD45RO+T细胞,可进一步通过本领域已知的阳性或阴性选择技术分离。举例而言,T细胞可通过与如DYNABEADS®M-450CD3/CD28T的抗CD3/抗CD28(例如3×28)结合珠粒一起孵育达足以正选择所需T细胞的时间段来分离。另外地或替代地,T细胞群可通过阴性选择富集,例如通过针对阴性选择的细胞所特有的表面标记的抗体的组合来富集。可使用经由负磁性免疫黏附或流式细胞术的细胞分选和/或选择。

[0879] 将理解,将经修饰以表达本发明的CAR(和/或其他结合分子)的来源于受试者的细胞可在其使用之前储存一段时间(参见例如下文治疗方法)。举例而言,细胞可任选在其已洗涤之后冷冻,或其可在适合条件下孵育以便其保持存活直至需要(例如在2-10℃或在室温、在旋转器上)。以此方式,可储存细胞直至可能需要其的时候。其可以未修饰的状态(即其中其不表达本发明的CAR)或以修饰的状态(即其中其已经修饰以表达本发明的CAR)储存。

[0880] 在用于下文进一步描述的治疗应用中之前,细胞一般可使用本领域已知的方法活化和扩增。举例而言,T细胞可通过与表面接触而扩增,该表面连接有刺激CD3/TCR复合物相关信号的试剂和刺激T细胞表面上的共刺激分子的配体。特别是,T细胞群可如本文所描述刺激,如通过与抗CD3抗体或其抗原结合片段、或固定于表面上的抗CD28抗体接触,或通过与蛋白激酶C活化因子(例如,苔藓虫素)以及钙离子载体接触。为了共刺激T细胞表面上的辅助分子,使用结合辅助分子的配体。举例而言,可使T细胞群与抗CD3抗体和抗CD28抗体在适于刺激T细胞增殖的条件下接触。抗CD28抗体的实例包括9.3、B-T3、XR-CD28(Diaclone, Besançon, France),可按本领域通常已知的其他方法使用(Berg等人,《移植程序(Transplant Proc.)》30(8):3975-3977,1998;Haanen等人,《实验医学杂志(J.Exp.Med.)》

190(9):13191328,1999;Garland等人,《免疫方法杂志(J.Immunol Meth.)》227(1-2):53-63,1999)。

[0881] 在一个实施方案中,表达本发明的CAR(和/或其他结合剂)的细胞进一步经修饰以包含或表达增强细胞(例如T细胞)活性的一种或多种其他试剂。

[0882] 举例而言,另一试剂可为抑制已知减少CAR表达细胞建立有效免疫反应的能力的抑制性分子的试剂。抑制性分子的实例包括PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4和TGF- β 受体。抑制抑制性分子的试剂可包含第一多肽,例如与向细胞(例如本文所描述的胞内信号传导结构域)提供阳性信号的第二多肽相关的抑制性分子。

[0883] 另外或替代地,其他试剂可为促炎性或促增殖性细胞因子。此类细胞因子的目的可为提供自分泌支持以增强CAR表达细胞的功能、增殖和/或持久性,和/或有利地改变肿瘤微环境并募集内源性先天和同源免疫效应。

[0884] 将了解,本发明提供一种细胞群,其包含根据本发明的第二方面的一种或多种多核苷酸和/或根据本发明的第四方面的一种或多种载体。因此,本发明提供表达本发明的CAR(和/或其他结合分子)的细胞(例如免疫细胞,如T细胞)群。在一些实施方案中,CAR表达细胞群包含表达不同CAR的细胞的混合物。举例而言,细胞群可包含:第一细胞,其表达具有对如本文所述的US28的ECD3具有特异性的结合结构域的CAR;和第二细胞,其表达具有不同结合结构域(如抗US28结合结构域)的CAR,例如对如本文所述的US28的ECD3具有特异性的不同CAR。作为另一实例,CAR表达细胞群可包括:第一细胞,其表达包括对如本文所述的US28的ECD3具有特异性的结合结构域的CAR;和第二细胞,其表达包括针对不同于US28的靶点的抗原结合结构域的CAR。作为另一实例,CAR表达细胞群可包括:第一细胞,其表达包括对如本文所述的US28的ECD3具有特异性的结合结构域的CAR;和第二细胞,其表达增强CAR表达细胞(例如T细胞)的活性的一种或多种试剂。

[0885] 分析CAR活性

[0886] 本发明还包括制成本发明的CAR的方法。举例而言,本发明包括在适合的宿主细胞中表达编码CAR的重组载体,并回收CAR。用于表达和纯化多肽(例如抗体)的方法为本领域所熟知。

[0887] 一旦已构建本发明的CAR,则可使用各种分析来评定其活性,包括分析抗原刺激之后扩增T细胞、在无再刺激存在下维持T细胞扩增的能力和在适当体外和体内(例如动物)模型中的抗癌活性。

[0888] 可通过流式细胞术在抗原刺激之后测量CAR表达细胞(例如T细胞)的体外扩增。举例而言,细胞可表达CAR以及荧光报告子,且在US28存在和不存在下和/或在根据本发明的第十三和/或第十四方面的一种或多种肽存在或不存在下测量荧光。适合的方法描述于Milone等人,《分子疗法(Molecular Therapy)》17(8):1453-1464(2009)中。

[0889] 动物模型还可用于测量CAR表达细胞(例如免疫细胞,如T细胞)的活性。举例而言,使用US28特异性表达CAR的T细胞的异种移植模型可用于处理免疫缺乏小鼠的原发性人US28表达癌症,如已在处理免疫缺乏小鼠的前B ALL中针对CD19特异性CAR表达T细胞进行(参见例如Milone等人,《分子疗法》17(8):1453-1464(2009))。

[0890] 此外,CAR的活性可通过评定细胞增殖和细胞因子产生来测定(参见例如Milone等

人,《分子疗法》17(8):1453-1464(2009))。

[0891] 成像技术还可用于评估具有肿瘤的动物模型中CAR的特定运输和增殖。此类分析法已描述于例如Barrett等人,《人基因疗法(Human Gene Therapy)》22:1575-1586(2011)中。

[0892] 其他分析,包括本领域已知的分析,也可用于评估本发明的CAR构建体。

[0893] 可用于与CAR表达细胞疗法组合的试剂:

[0894] 本发明还涵盖CAR表达细胞与增加该CAR表达细胞的功效和/或增殖和/或持久性的试剂的组合的用途。优选地,增加CAR表达细胞的功效和/或增殖和/或持久性的试剂为细胞因子。

[0895] 另一治疗剂可为增强CAR表达细胞(例如T细胞)的功效/持久性/扩增的细胞因子。

[0896] 另一治疗剂可为改善与施用CAR表达细胞相关的一种或多种副作用的试剂。举例而言,另一治疗剂可用于治疗“细胞因子风暴”(例如抗IL6抗体)。通过“细胞因子风暴”(也称为细胞因子级联反应和高细胞因子血症),我们是指响应于病原体和免疫损伤对T细胞和巨噬细胞的刺激的炎性介质(细胞因子)的潜在致命的超释放。

[0897] 另一治疗剂可为阻断CTLA-4(例如伊匹单抗(ipilimumab)和曲美木单抗(tremelimumab))、PD-1(例如纳武单抗(nivolumab)、帕博利珠单抗(pembrolizumab)和匹地利珠单抗(pidilizumab))和/或PD-L1(例如MDX-1105和MPDL3280A)的抗体或抗体组合。

[0898] 已确认可经由趋化因子受体(CXCR2或CCR4)的共表达或经由与趋化因子组合而将CAR-T细胞疗法引导至肿瘤组织(Di Stasi等人,2009,《血液》,113:6392-6402;Kershaw等人,2002,《人基因疗法》,13:1971-1980)。因为US28还结合于多种CC趋化因子以及CX3CR1,所以此可为一项选择。

[0899] Xia等人,2016,《癌症研究》76:6747-6759表明组合溶瘤病毒与CAR-T细胞疗法可在干扰素基因刺激蛋白失活和I型IFN破坏肿瘤方面尤其有效。相比之下,Ajina和Maher(《免疫疗法与癌症杂志(J Immunother Cancer.)》,2017;5:90),Kim(《自然-通讯》2017;8:344)和Scott等人(《大分子生物学(Macromol Biosci.)》,2018年1月;18)指示溶瘤病毒感染可能增加CAR-T细胞的进入和移动,且减轻或逆转局部免疫抑制且增强CAR-T细胞效应子的功能和持久性。

[0900] F.结合分子的产生和纯化

[0901] 本发明的第六方面提供一种产生根据本发明的第一方面的结合分子(例如根据本发明的第一方面的抗体或CAR)的方法,该方法包含:在细胞(更特别地为重组细胞)或此类细胞的群体(任选均质或异质细胞群)中表达根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,和/或根据本发明的第三方面的载体。该一个或多个细胞可为根据本发明的第五方面,例如如上文所描述的细胞。

[0902] 任选地,本发明的第六方面的方法还可包含自细胞分离或纯化如此产生的结合分子的步骤;举例而言,其中结合分子为根据本发明的第一方面的根据本发明的第一方面的抗体、该抗体的功能片段或具有包含融合多肽序列的该结合分子的功能片段的抗体。

[0903] 因此,在某些实施方案中,本公开的结合分子可经纯化。如本文所用的术语“纯化”旨在指可与其他组分分离的组合物,其中结合分子相对于其可在初始生产之后获得的状态,例如其在细胞或细胞培养物中产生的状态,经纯化至任何程度。当使用术语“实质上经

纯化”时,此名称将指以下组合物,其中结合分子形成组合物的主要组分,如构成组合物中的蛋白质含量的约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%或更高(以重量计)。

[0904] 蛋白质纯化技术为本领域技术人员熟知的。所述技术一方面涉及将细胞环境粗品部分分离成多肽和非多肽部分。在已将相关多肽(例如,本发明的结合分子)与其他蛋白质分离之后,可使用层析和电泳技术进一步纯化相关多肽以达成部分或完全纯化(或纯化至均质)。特别适合于制备纯肽的分析方法为离子交换层析法、排阻层析法、聚丙烯酰胺凝胶电泳、等电聚焦。用于蛋白质纯化的其他方法包括用硫酸铵、PEG、抗体及其类似物沉淀,或通过热变性,随后离心;凝胶过滤、逆相层析、羟磷灰石层析和亲和层析;和此类和其他技术的组合。

[0905] 在纯化本发明的抗体或其他结合分子中,可能需要在原核或真核表达系统中表达多肽并使用变性条件提取蛋白质。可使用结合至多肽的标记部分的亲和柱自其他细胞组分纯化多肽。如本领域一般所知,据信执行多个纯化步骤的次序可改变,或可省略某些步骤,且仍为适用于制备实质上纯化的蛋白质或肽的方法。

[0906] 通常,利用结合抗体Fc部分的试剂(即蛋白A)分级分离完整抗体。替代地,可以使用抗原同时纯化和选择适当抗体。举例而言,在对US28的ECD3具有结合特异性的根据本发明的结合分子的情况下,随后适合的抗原可包括选自本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者的肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合中的一种或多种、根据本发明的第十六方面的融合蛋白,和/或根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合、根据本发明的第十八方面的缀合物和/或根据本发明的第十九方面的至少两种不同缀合物的组合。

[0907] 此类方法通常利用结合至支撑物,如柱、过滤器或珠粒的选择剂。可通过施加条件(盐、热等)使抗体或其他结合分子结合至支撑物、去除(例如洗掉)污染物并释放抗体(或其他结合分子)。

[0908] 本领域技术人员根据本公开将获知用于对蛋白质或肽的纯化程度进行定量的多种方法。这些包括例如测定活性部分的比活性,或通过SDS/PAGE分析评估一个部分内的多肽的量。用于评估一个部分的纯度的另一方法为计算该部分的比活性,将其与初始提取物的比活性相比较,且由此计算纯度。用于表示活性的量的实际单位当然取决于选择用于跟踪纯化的特定分析技术和表达的蛋白质或肽是否展现可检测的活性。

[0909] 本发明的第七方面提供通过本发明的第六方面的方法获得或可通过其获得的经分离和/或纯化的结合分子,任选其中该经分离的结合分子进一步配制用于向受试者施用。

[0910] 在一个实施方案中,本发明的结合分子可配制为药物组合物;该组合物包含药学上有效量的一种或多种如本文所定义的本发明的结合分子。在一个优选的实施方案中,药物组合物进一步包含药学上或兽医学上可接受的佐剂、稀释剂或载体,其通常将根据预期施用途径和标准药学实践选择。组合物可为立即释放、延迟释放或控制释放应用的形式。优选地,配制物为单位剂量,其含有活性成分的每日剂量或单位、每日次剂量或其适当部分。

[0911] 词组“药学或兽医学上可接受的”包括提和当如适当地向动物或人施用时不会产生有害反应、过敏反应或其他不良反应的组合物。根据本公开,此类药学或兽医学组合物的制备为本领域技术人员已知的,如由《雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences)》,第18版Mack Printing公司,1990所示例,其以引用方式并入本文中。此外,对

于动物或人施用,应理解,制剂应满足如FDA生物标准办公室(FDA Office of Biological Standards)所要求的无菌性、发热性、一般安全性和纯度标准。

[0912] 如本文所用,“药学上或兽医学上可接受的载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、界面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如抗细菌剂、抗真菌剂)、等张剂、盐、防腐剂、药物、药物稳定剂、赋形剂、崩解剂、类似的材料及其组合,如医药领域普通技术人员已知。除非任何常规载体与活性成分不兼容,否则考虑将其用于治疗或药物组合物中。

[0913] 在一个实施方案中,药物组合物进一步包含另一药物和/或其他治疗剂、预防剂或诊断剂。

[0914] 在一个实施方案中,如本文所述的本发明的结合分子、本文所述的组合物或本文所述的医药组合物经配制用于口服肠胃外、静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、眼内、颅内、脑内、骨内、脑室内、鞘内或皮下施用。

[0915] 无菌可注射溶液可通过将所需量的本发明的结合分子与上文列举的各种其他成分一起掺入适当溶剂中,视需要随后灭菌来制备。药物组合物可最佳以无菌水溶液形式使用,该无菌水溶液可含有其他物质,例如足够的盐或葡萄糖以使溶液与血液等渗。必要时,可适当地缓冲水溶液(优选达pH 3至9)。在无菌条件下制备适合的药物配制物是易于通过医药领域技术人员熟知的标准药学技术实现。

[0916] 根据本发明的药物或兽医学组合物可替代地以粉末形式配制,如无菌粉末,其可为冻干粉末。

[0917] G. 对抗HCMV和/或与HCMV相关的疾病或病症

[0918] 本发明的第十一方面提供一种对抗HCMV或与HCMV相关的疾病或病症的方法。

[0919] 在此情况下,术语“对抗”可任选包括以下中的任何一种或多种:预防HCMV感染或与HCMV感染相关的疾病或病症、针对其接种疫苗、降低其风险、预防、治疗、改善、减缓该感染或相关疾病或病症或阻止其发展、逆转和/或治愈该感染或相关疾病或病症。

[0920] 在一个选项中,术语“对抗”可指治疗性治疗。此类治疗性治疗可引起疾病症状的严重程度降低,和/或无症状期的频率或持续时间增加。足以实现此目标的量定义为“治疗有效量”。

[0921] 在预防性应用中,该方法的受试者可能尚未呈现出HCMV感染的症状或与HCMV感染相关的疾病或病症,且该方法可用于预防或延迟症状的发展。足以实现此的量定义为“预防有效量”。受试者可通过任何适合手段鉴别为处于患上疾病或病症的风险下。

[0922] 本发明的第十一方面的方法包含向受试者或向离体或体外细胞物质施用选自以下的任何一种或多种试剂:

[0923] i. 根据本发明的第一方面的结合分子,

[0924] ii. 根据本发明的第一方面的该结合分子的功能片段,

[0925] iii. 根据本发明的第七方面的经分离的结合分子,

[0926] iv. 根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,

[0927] v. 根据本发明的第三方面的载体,

[0928] vi. 根据本发明的第四方面的细胞,

[0929] vii. 根据本发明的第八方面的缀合物,和

[0930] viii. 根据本发明的第十方面的经分离的缀合物。

[0931] 换言之,本发明的第十一方面提供所述试剂中的一种或多种用于对抗受试者或离体或体外细胞物质中与HCMV相关的疾病或病症的用途。

[0932] 此外,本发明的第十一方面提供所述试剂中的一种或多种的用途,其用于制造供对抗受试者或离体或体外细胞物质中与HCMV相关的疾病或病症用的药物。

[0933] 受试者优选为人。然而,还将理解,受试者可为非人哺乳动物,如任何非人哺乳动物,例如马、犬、猪、牛、绵羊、大鼠、小鼠、豚鼠或灵长类动物,例如其中非人动物为人源化动物模型,具有可为HCMV载体的经移植人细胞。

[0934] 受试者可任选为雄性,如人男性。

[0935] 受试者可任选为雌性,如人女性。

[0936] 受试者可例如为成年体、青年体、少年体、幼年体、婴儿体、新出生体、胎儿体或胚胎;如人成人、人少年、人青少年、人儿童、人婴儿、人新生儿、人胎儿或人胚胎。

[0937] 受试者可例如为年龄小于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月的人婴儿。

[0938] 受试者可例如年龄为至少或超过1岁,例如至少或超过2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20岁;并任选小于100、90、85、80、75、65、60、55、50、45或40岁的人(例如人男性和/或人女性)。

[0939] 受试者可例如为年龄至少或超过20岁、例如至少或超过25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75或80岁;并任选小于100、90或85岁的人(例如人男性和/或人女性)。

[0940] 该受试者可为患有实际(包括阳性诊断)、疑似或潜在HCMV感染的受试者。因此,受试者可通过直接检测获自所述受试者的生物样品(例如血液、唾液和/或尿液)中的HCMV病毒确定为具有实际HCMV感染。

[0941] 该受试者可任选为已接受、继续接受或将随后接受任何一种或多种针对HCMV感染和/或与其相关的任何病症或症状的其他治疗的受试者。可用于抑制HCMV感染的进展的本领域已知的两种药物为更昔洛韦(ganciclovir)和膦甲酸。通常,这些经静脉内递送,且通常,治疗持续长时间段。经批准用于眼部CMV感染的片剂形式的更昔洛韦已变得可用。此外,以玻璃体内植入形式递送的更昔洛韦(例如Vitrasert Implant)可用作提供药物至眼部的长期递送的手段。此递送系统通常需要对眼部进行微小手术以植入递送系统。此递送形式通常在其必须重复之前持续3至6个月。对于在出生时具有先天性CMV感染征象的婴儿,抗病毒试剂(主要为缙更昔洛韦(valganciclovir))可改善听觉和发育结果。缙更昔洛韦可具有严重副作用且仅已在患有先天性CMV感染征象的婴儿中研究。还已使用静脉内HCMV免疫球蛋白(人)(CMV IGIV)。CMV IGIV为富集于针对巨细胞病毒(CMV)的抗体中的静脉内免疫球蛋白;其经美国FDA批准作为针对与移植肾脏、肺、肝、胰腺和心脏相关的CMV疾病的预防性措施(预防性)。

[0942] 具有疑似HCMV感染的受试者可能未必已直接针对携带HCMV病毒进行测试,但可展示HCMV感染的一种或多种症状。举例而言,在其他健康成年人中与HCMV感染(特别是裂解HCMV感染)相关的症状可包括与感染性单核细胞增多症类似的症状,包括例如以下中的任何一种、两种、三种或所有四种:疲乏;发热;喉咙痛;和/或肌肉疼痛。特别是在免疫力减弱的个体和/或免疫功能不全的个体中的额外症状可在以下中的任何一种、两种、三种、四种、五种、六种或全部七种上存在问题:眼、肺、肝、食道、胃、肠和/或脑。在患有先天性HCMV感染(特别是裂解HCMV感染)的婴儿中与HCMV相关的症状可为例如以下特征中的任何一种、两

种、三种、四种、五种、六种、七种、八种或全部九种：早产；低出生重；黄皮肤和眼睛（黄疸）；增大且功能不良的肝脏；紫色肤斑或皮疹或两者；异常小头（脑过小）；脾增大；肺炎；和/或癫痫。

[0943] HCMV可经由许多途径自感染个体扩散至未感染个体，包括经由体液，如血液、唾液、尿液、精液和母乳。举例而言，传播可通过以下发生：通过受试者在与感染的人的体液接触之后触摸其眼或其鼻内或口内；通过与感染的人性接触；通过与来自感染母体的母乳接触（包括摄取）；通过与来自感染的人的生物材料（器官、组织、骨髓或干细胞移植）接触（例如植入或移植）或输血；或在怀孕和/或出生期间，其中感染母体可在婴儿出生之前或出生期间将病毒传给该婴儿。具有潜在HCMV感染的受试者可能尚未直接针对携带HCMV病毒进行测试和/或可能不展示HCMV感染的一种或多种症状，但尽管如此可如通过上文所定义的途径中的任何一个或多个，具有使其处于自一个或多个感染个体感染HCMV的风险下的历史（例如，在之前70、60、50、40、30、20、10、5、4、3、2或1年内，之前12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2或1个月内、或新近历史，如在之前4、3、2或1周内，或在之前7、6、5、4、3、2或1天内），且可因此表征为具有根据本发明的潜在HCMV感染的受试者。

[0944] 根据本发明的第十一方面的待对抗的与HCMV相关的疾病或病症可为HCMV感染或与HCMV感染相关。如以下进一步论述，HCMV感染癌症为本发明的特殊关注点，但在任何情况下的HCMV感染，和与HCMV感染相关的任何疾病或病症为根据本发明进行对抗的关注点。

[0945] 任选地，根据本发明第十一方面的待对抗的疾病、疾患或病症可与US28的表达相关，包括特别是US28的表面表达和US28的ECD3在细胞表面处的暴露。这可包括例如与表达US28的细胞相关的任何疾病或病症。举例而言，细胞可为非所要细胞。非所要细胞可为其在宿主中的存在为非所需的任何细胞。因此，与US28表达相关的疾病或病症可为特征在于存在表达US28且为非所要的细胞的任何病症，例如其中至少一部分病理为通过存在此类表达US28的非所要细胞来介导的任何生物学或医学病症或病症。病症可由非所要细胞的存在引起，否则非所要细胞的存在可影响病症。

[0946] 通过US28的表达，我们包括以下意义：US28蛋白能够在细胞上或细胞中或在由细胞制备的提取物中检测到，或多肽表达可通过检测编码US28的mRNA来推断。为了确认US28在细胞上或在细胞中的表达，可进行多种分析。此类分析包括例如本领域技术人员熟知的生物化学分析，如通过免疫手段（ELISA和蛋白质印迹）检测特定蛋白质（即US28）的存在，或本领域技术人员熟知的分子生物分析，如Northern印迹、RT-PCR和PCR，用于检测US28 mRNA的存在。然而，如本文中进一步描述，US28的检测可通过不同HCMV病毒株之间的氨基酸水平变化和/或通过基因水平下的多态性复杂化，且某些方法可对来自有限数目的HCMV病毒株的US28蛋白表达敏感和/或允许检测来自有限数目的HCMV病毒株的US28蛋白表达。这会引起未能检测来自其他病毒株的HCMV感染。可优选的是，使用病毒株不可知的方法来确定US28表达。本发明的结合分子可提供对US28的ECD3的病毒株不可知的结合，且可为评定受试者的一个或多个细胞上或一个或多个细胞中或由细胞制备的提取物中US28表达的特别优选的方法。

[0947] 任选地，HCMV感染可为无症状的，和/或其可为未确诊的。任选地，HCMV感染可为潜伏感染，例如其特征可为低水平或不存在的病毒复制，其中病毒基因组主要驻存于CD34⁺造血祖细胞群中，该造血祖细胞群驻存于骨髓中。

[0948] 其中待对抗与HCMV相关的疾病或病症的受试者可为免疫功能不全患者,例如原发性HCMV感染、再感染或再活化可引起影响一个或多个器官的疾病,如危及生命的疾病的患者。免疫功能不全的人的特征可例如在于具有影响其以下中的任何一种、两种、三种、四种、五种、六种或全部七种的一个或多个严重问题:眼、肺、肝脏、食道、胃、肠和/或脑。免疫功能不全受试者可例如为具有、已具有生物材料(如器官、干细胞或骨髓移植)移植或旨在成为生物材料移植的受体的人;另外或替代地,在一个选项中,待移植的生物材料可为根据本发明的第十一方面的待处理的离体或体外细胞物质。

[0949] HCMV为最常见的先天性病毒感染之一且为出生缺陷的最重要原因。婴儿还可在出生期间或不久之后被感染(围产期HCMV);此群组包括经由母乳感染的婴儿。因此,与HCMV相关联的病症可为先天性HCMV感染或先天性HCMV相关的出生缺陷或可为围产期HCMV感染或围产期HCMV相关的疾病或病症。婴儿中的先天性HCMV感染可例如通过病症表征,所述病症显示以下特征中的任何一种、两种、三种、四种、五种、六种、七种、八种或全部九种:早产;低出生重;黄皮肤和眼睛(黄疸);增大且功能不良的肝脏;紫色肤斑或皮疹或两者;异常小头(脑过小);脾增大;肺炎;和/或癫痫;在任何情况下,直接检测所述婴儿中的HCMV感染可用以确认先天性感染。

[0950] 受试者可例如为婴儿。所述婴儿可为由具有实际(包括阳性诊断)、疑似或潜在HCMV感染的母体出生的新生儿。该婴儿可为亲本(特别是母体)具有实际(包括阳性诊断)、疑似或潜在HCMV感染的婴儿。该婴儿可为由母体哺乳的婴儿,其具有实际(包括阳性诊断)、疑似或潜在HCMV感染。受试者可为由具有实际(包括阳性诊断)、疑似或潜在HCMV感染的母亲携带的胎儿或胚胎。受试者可为母体、怀孕雌性或具有实际(包括阳性诊断)、疑似或潜在HCMV感染的预期母体。受试者可为具有实际(包括阳性诊断)、疑似或潜在HCMV感染的哺乳母亲。受试者可为怀孕之前具有实际(包括阳性诊断)、疑似或潜在HCMV感染的雌性。

[0951] 与HCMV相关的病症可为例如心血管疾病,如动脉粥样硬化或自体免疫疾病。

[0952] HCMV感染状态可另外影响烧伤、创伤、败血症和感染病原体(如细菌和/或除HCMV以外的病毒)的临床病程;并且其中与HCMV相关的疾病或病症待对抗的受试者可为患有烧伤、创伤、败血症和/或病原性感染(例如细菌感染或除HCMV以外的病毒感染)和/或所述HCMV相关的疾病或病症可包括烧伤、创伤、败血症和/或病原性感染(例如细菌感染或除HCMV以外的感染)中的任何一种或多种。特别是在免疫力减弱的个体和/或免疫功能不全个体中的与HCMV相关的病症可为例如以下中的任何一种或多种:由于眼的感光层发炎(视网膜炎)的视觉丧失;消化系统问题,包括结肠发炎(结肠炎)、食道发炎(食道炎)和/或肝脏发炎(肝炎);神经系统问题,包括脑发炎(脑炎);和/或肺炎。

[0953] 与具有先天性HCMV感染的婴儿中的HCMV相关的病症可为例如以下中的任何一种或多种:听觉丧失、智力障碍、视觉问题、癫痫、缺乏协调、虚弱和/或使用肌肉问题。

[0954] 在一个实施方案中,HCMV感染可为单株感染。

[0955] 在一个替代的实施方案中,HCMV感染包含多株HCMV感染,其中多株HCMV感染包含用多于一个不同HCMV病毒株(例如两个或更多个不同HCMV病毒株)的感染。此类多株感染为常见的,且将了解,能够在多株感染中仅靶向一些而非所有HCMV病毒株的试剂可处于产生选择性压力的风险下,该选择性压力可通过抑制或去除一个或多个由该试剂靶向的竞争性HCMV病毒株来促进多株HCMV感染中的非靶向病毒株。因此,在选择对抗实际、疑似或潜在多

株HCMV感染的方法的情况下,尤其优选使用提供病毒株不可知的作用的治疗模式。根据本发明,病毒株不可知的试剂的使用可由此用于预防在经治疗的受试者中产生病症,其选择性地促进由存在于多株HCMV感染中的一个或多个HCMV病毒株产生感染,因为多株HCMV感染中的所有HCMV病毒株均由病毒株不可知的试剂靶向。

[0956] 任选地,多株感染的两个或更多个不同HCMV病毒株编码不同US28蛋白编码序列。所述两个或更多个病毒株可编码US28蛋白,所述蛋白质在胞外区,如N-末端(ECD1)区、第一胞外环(ECD2)区、第二胞外环(ECD3)区和/或第三胞外环(ECD4)区中的一个或多个上不同。在一个感兴趣的实施方案中,多株HCMV感染中的两个或更多个HCMV病毒株各自编码至少在N-末端(ECD1)区的一个或多个位置上彼此不同的US28蛋白;例如其在N-末端(ECD1)区中的1、2、3、4、5、6、8、9、10或更多个氨基酸位置处可不同。另外或替代地,在另一个感兴趣的实施方案中,多株HCMV感染中的两个或更多个HCMV病毒株各自编码在第二胞外(ECD3)区的一个或多个位置处彼此不同的US28蛋白,例如,HCMV病毒株中的一种或多种在多株HCMV感染中可编码如下US28蛋白,该蛋白质编码ECD3的4N变体,且其他HCMV病毒株中的一种或多种在多株HCMV感染中可编码如下US28蛋白,该蛋白质编码ECD3的4D变体。举例而言,编码不同US28蛋白编码序列的HCMV病毒株可选自以下的任何两个或更多个: HCMV病毒株DB(寄存编号KT959235)、HCMV病毒株Toledo(寄存编号GU937742)、HCMV病毒株Towne(寄存编号FJ616285)、HCMV病毒株VR1814(寄存编号GU179289)、HCMV病毒株TB40/E(寄存编号KF297339)、HCMV病毒株Merlin(寄存编号AY446894)、HCMV病毒株JP(寄存编号GQ221975)、HCMV病毒株Ad169(寄存编号X17403.1)、HCMV病毒株AF1(寄存编号GU179291.1)、HCMV病毒株VHL/E(寄存编号L20501.1)、HCMV病毒株BL(寄存编号MW980585)、HCMV病毒株DAVIS(寄存编号JX512198.1)、HCMV病毒株TR(寄存编号KF021605.1)。

[0957] 根据本发明的第十一方面的待对抗的与HCMV相关的疾病或病症可为潜伏HCMV感染(例如,单株或多株潜伏HCMV感染)或与潜伏HCMV感染(任选多株潜伏MV感染)相关。

[0958] 根据本发明的第十一方面的待对抗的与HCMV相关的疾病或病症可为裂解HCMV感染(任选多株裂解HCMV感染)或与裂解HCMV感染(任选多株裂解HCMV感染)相关。

[0959] 根据本发明第十一方面的待对抗的与HCMV相关联的疾病或病症可为先天性HCMV感染(例如,单株或多株感染),如潜伏先天性单株或多株HCMV感染或裂解先天性单株或多株HCMV感染;

[0960] 根据本发明的第十一方面的待对抗的与HCMV相关的疾病或病症可为癌症,例如HCMV感染癌症(任选单株或多株HCMV感染癌症),如潜伏HCMV感染癌症(任选单株或多株潜伏HCMV感染癌症)。

[0961] 癌症可任选位于受试者体内的原发性、继发性或任何其他肿瘤的部位。

[0962] 肿瘤通常分配级别和阶段。实体肿瘤的阶段是指其尺寸或程度和是否其已扩散至其他器官和组织。肿瘤级别(癌症级别)为其有可能生长和扩散的快速程度的指示。

[0963] 举例而言,癌症可为0期、I期、II期、III期或IV期,或其任何一个或多个的细分。这些不同阶段及其细分的特征为本领域所熟知。然而,一般而言,术语0期指示癌症在何处开始(原位)且尚未扩散。I期指示癌症较小且尚未在任何地方扩散。II期指示癌症已生长,但尚未扩散。III期指示癌症较大且可已扩散至周围组织和/或淋巴结(淋巴系统的一部分)。IV期指示癌症自开始处扩散至至少一个其他身体器官;也称为“继发性”癌症或“转移性”癌

症。

[0964] 在一个实施方案中,癌症可为由TNM分期系统分类的癌症阶段。此为由AJCC和国际抗癌联盟(Union for International Cancer Control,UICC)开发和维持的系统。其为世界各地医疗专业人士最常用的分期系统。TNM分类系统作为医生的工具开发,以基于某些标准化准则对不同类型的癌症进行分期。TNM分期系统基于肿瘤(T)的程度、扩散至淋巴结(N)的程度和癌转移(M)的存在。

[0965] -T类别描述原始(原发性)肿瘤。TX是指不可评估的原发性肿瘤。T0是指无原发性肿瘤的迹象。Tis是指原位癌(尚未扩散至相邻组织的早期癌症)。T1、T2、T3和T4涉及原发性肿瘤的尺寸和/或程度。

[0966] -N类别描述癌症是否已到达附近淋巴结。NX指示无法评估局部淋巴结。N0指示不涉及局部淋巴结(淋巴结中未发现癌症)。N1、N2和N3指示涉及局部淋巴结(扩散的数目和/或程度)。

[0967] -M类别告知是否存在远处转移(癌症扩散至身体其他部分)。M0指示无远处转移(癌症尚未扩散至身体的其他部分)。M1指示远处转移(癌症已扩散至身体的远处部分)。

[0968] 因为各癌症类型具有其自身分类系统,所以字母和数字对于每种癌症不始终是指相同事物。一旦测定T、N和M,则将其组合,且可指定0、I、II、III、IV的总体阶段。有时,这些阶段还使用字母(如IIIA和IIIB)细分。进一步指导可见于<https://cancerstaging.org>。

[0969] 在一些癌症类型中,可考虑非解剖学因素来指定解剖阶段/预后群组。这些明确定义于AJCC癌症分期手册的每个章节中(例如前列腺中的格里森评分(Gleason Score))。与T、N和M分开收集此类因素,其保持纯粹解剖的且用以指定分期群组。在非解剖学因素用于分组的情况下,存在针对非解剖学因素不可用的情况(X)或需要指定忽略非解剖学因素的群组的情况提供的分组定义。

[0970] I期癌症最不晚期且通常具有较好的预后。较高分期的癌症通常为较晚期的,但在许多情况下,仍可成功地治疗。

[0971] 在另外和/或替代选项中,癌症可具有指定级别。分级通常基于细胞的分化(与正常细胞类似的程度)。癌症的指定级别可例如为I级、II级、III级或IV级癌症或两个或三个类别的组合。这些不同级别的特征为本领域所熟知。然而,一般而言:I级癌症为其中细胞类似于正常细胞且不快速生长的类型的癌症;II级癌症为其中癌细胞看起来不像正常细胞且生长得比正常细胞快的类型的癌症;且III级和IV级为其中癌细胞看起来异常且可更积极生长或扩散的类型的癌症。生长特征可例如在一些癌症中基于分裂细胞的频率来评定。

[0972] 癌症可例如为选自以下的癌症类型:癌瘤、肉瘤、骨髓瘤、白血病、淋巴瘤和混合型癌症。

[0973] 癌瘤是指上皮源恶性肿瘤或身体内部或外部内壁的癌症。癌瘤为上皮组织恶性病,占有癌症病例的80%至90%。上皮组织发现于整个身体中。如上文进一步论述,其存在于皮肤中,以及器官和内部通道(如胃肠道)的覆盖物和内壁中。

[0974] 癌瘤可分为两种主要亚型:腺癌,其在腺器官中产生;和鳞状细胞癌,其起源于鳞状上皮细胞中。

[0975] 腺癌一般出现在黏膜中且首先被发现为增厚斑样白色黏膜。其通常在其出现的软组织中易于扩散。鳞状细胞癌出现在身体的许多区域中。

[0976] 大部分癌瘤影响能够分泌的器官或腺体,如产生乳汁的乳房,或分泌黏液的肺部,或结肠或前列腺或膀胱。

[0977] 在一个实施方案中,癌瘤可为由上皮细胞引起的癌症,所述上皮细胞选自乳腺癌、基底细胞癌、腺癌、胃肠癌、唇癌、口腔癌、食道癌、小肠癌和胃癌、结肠癌、肝癌、膀胱癌、胰腺癌、卵巢癌、宫颈癌、肺癌和皮肤癌(如鳞状细胞癌和基底细胞癌)、前列腺癌、肾细胞癌和影响全身上皮细胞的其他已知癌症。

[0978] 肉瘤是指起源于支持和结缔组织(如骨骼、肌腱、软骨、肌肉和脂肪)中的癌症。一般出现在年轻人中,最常见肉瘤常常作为骨骼上的疼痛块状物发生。肉瘤通常与其生长的组织类似。

[0979] 肉瘤的实例为:骨肉瘤或骨原性肉瘤(骨)、软骨肉瘤(软骨)、平滑肌肉瘤(平滑肌)、横纹肌肉瘤(骨骼肌)、间皮肉瘤或间皮瘤(体腔的膜性内壁)、纤维肉瘤(纤维组织)、血管肉瘤或血管内皮瘤(血管)、脂肪肉瘤(脂肪组织)、胶质细胞瘤或星形细胞瘤(脑中发现的神经结缔组织)、黏液肉瘤(原始胚胎结缔组织)、间质瘤或混合型中胚层肿瘤(混合结缔组织型)。

[0980] 骨髓瘤为起源于骨髓浆细胞中的癌症。浆细胞产生一些在血液中发现的蛋白质。

[0981] 癌症可为实体癌症或液体癌症。

[0982] 举例而言,白血病(“液体癌症”或“血液癌症”)为骨髓(血细胞产生部位)癌症。该疾病通常与未成熟白细胞的过度生产相关。这些未成熟白细胞的表现不如其应当具有的表现,因此患者常常易于感染。白血病还影响红细胞且可引起因贫血所致的不良血液凝固和疲劳。白血病的实例包括:

[0983] -骨髓性或粒细胞性白血病(骨髓性和粒细胞性白细胞系列的恶性病)

[0984] -淋巴性、淋巴细胞性或淋巴母细胞性白血病(淋巴和淋巴细胞性血细胞系列的恶性病)

[0985] -真性红细胞增多症或红细胞增多症(各种血细胞产物的恶性病,但红细胞占主导)。

[0986] 淋巴瘤在淋巴系统的腺体或结节中产生,淋巴系统是血管、结节和器官(尤其脾脏、扁桃体和胸腺)的网络,其纯化体液并产生感染对抗性白细胞或淋巴细胞。不同于有时称为“液体癌症”的白血病,“淋巴瘤”为“实体癌症”。淋巴瘤还可发生在特定器官(如胃、乳房或脑)中。这些淋巴瘤称为外结节淋巴瘤。淋巴瘤细分为两个类别:霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)和非霍奇金氏淋巴瘤。霍奇金氏淋巴瘤中里德-斯德伯格氏细胞(Reed-Sternberg cell)的存在在诊断上将霍奇金氏淋巴瘤与非霍奇金氏淋巴瘤区分开。

[0987] 混合型癌症可包括类型组分位于一个癌症类别或不同癌症类别内的癌症。一些实例为:腺鳞癌;混合型中胚层肿瘤;癌肉瘤;和畸胎瘤。

[0988] 任选地,癌症可为原发性癌症或转移性癌症。原发性癌症是指原发性肿瘤中的癌细胞,其为出现在受试者内的第一部位处的肿瘤且可区别于在远离原发性肿瘤的远处部位处出现在受试者体内的转移性肿瘤。转移性癌症由转移产生,转移是指癌症自起源器官扩散至患者中的其他远处部位的病症。

[0989] 举例而言,癌症类型可任选选择以下清单中的任何一种或多种:

[0990] • 急性淋巴母细胞性白血病(ALL),

- [0991] • 急性骨髓性白血病(AML),
- [0992] • 青少年癌症(例如在12至18岁的年龄之间的青年),
- [0993] • 肾上腺皮质癌,还包括例如:
 - [0994] ◦ 儿童肾上腺皮质癌
- [0995] • AIDS相关癌症,还包括例如:
 - [0996] ◦ 卡波西肉瘤(Kaposi Sarcoma) (软组织肉瘤)
 - [0997] ◦ AIDS相关淋巴瘤(淋巴瘤)
 - [0998] ◦ 原发性CNS淋巴瘤(淋巴瘤)
- [0999] • 肛门癌
- [1000] • 阑尾癌
- [1001] • 儿童星形细胞瘤(脑癌)
- [1002] • 儿童中枢神经系统非典型畸胎样/横纹样肿瘤(脑癌)
- [1003] • 皮肤基底细胞癌
- [1004] • 胆道癌
- [1005] • 膀胱癌,还包括例如:
 - [1006] ◦ 儿童膀胱癌
- [1007] • 骨癌(例如尤文氏肉瘤(Ewing Sarcoma)、骨肉瘤或恶性纤维组织细胞瘤)
- [1008] • 脑肿瘤(包括例如胶质细胞瘤或胶质母细胞瘤)
- [1009] • 乳腺癌,还包括例如:
 - [1010] ◦ 儿童乳腺癌
- [1011] • 儿童支气管肿瘤
- [1012] • 伯基特淋巴瘤(Burkitt Lymphoma)
- [1013] • 类癌(肠胃道),还包括例如:
 - [1014] ◦ 儿童类癌肿瘤
- [1015] • 原发灶不明癌,还包括例如:
 - [1016] ◦ 儿童原发灶不明癌
- [1017] • 儿童心脏(Cardiac/Heart) 肿瘤
- [1018] • 中枢神经系统,还包括例如:
 - [1019] ◦ 儿童非典型畸胎样/杆状肿瘤(脑癌)
 - [1020] ◦ 儿童胚胎瘤(脑癌)
 - [1021] ◦ 儿童生殖细胞瘤(脑癌)
- [1022] ◦ 原发性CNS淋巴瘤
- [1023] • 宫颈癌,还包括例如:
 - [1024] ◦ 儿童宫颈癌
- [1025] • 儿童癌症(例如年龄在18岁以下、优选年龄在16岁、14岁或12岁以下,如在1岁至12岁的范围内的儿童),
- [1026] • 不常见儿童癌症,
- [1027] • 胆管癌
- [1028] • 儿童脊索瘤,

- [1029] • 慢性淋巴细胞性白血病 (CLL)
- [1030] • 慢性骨髓性白血病 (CML)
- [1031] • 慢性骨髓增生性肿瘤
- [1032] • 结肠直肠癌,还包括例如:
 - [1033] ○ 儿童结肠直肠癌
- [1034] • 儿童颅咽管瘤 (脑癌)
- [1035] • 皮肤T细胞淋巴瘤
- [1036] • 导管原位癌 (DCIS)
- [1037] • 儿童中枢神经系统胚胎瘤 (脑癌)
- [1038] • 子宫内膜癌 (子宫癌)
- [1039] • 儿童室管膜瘤 (脑癌)
- [1040] • 食道癌,还包括例如:
 - [1041] ○ 儿童食道癌
- [1042] • 嗅神经母细胞瘤 (头颈癌)
- [1043] • 尤文氏肉瘤 (骨癌)
- [1044] • 儿童颅外生殖细胞瘤,
- [1045] • 性腺外生殖细胞瘤
- [1046] • 眼癌,还包括例如:
 - [1047] ○ 儿童眼内黑色素瘤
 - [1048] ○ 眼内黑色素瘤
 - [1049] ○ 视网膜母细胞瘤
- [1050] • 输卵管癌
- [1051] • 恶性骨纤维性组织细胞瘤和骨肉瘤
- [1052] • 膀胱癌
- [1053] • 胃 (Gastric/Stomach) 癌,还包括例如:
 - [1054] ○ 儿童胃 (Gastric/Stomach) 癌
 - [1055] • 胃肠道类癌
 - [1056] • 胃肠道基质肿瘤 (GIST) (软组织肉瘤),还包括例如:
 - [1057] ○ 儿童胃肠道基质肿瘤
- [1058] • 生殖细胞瘤,还包括例如:
 - [1059] ○ 儿童中枢神经系统生殖细胞瘤 (脑癌)
 - [1060] ○ 儿童颅外生殖细胞瘤
 - [1061] ○ 性腺外生殖细胞瘤
 - [1062] ○ 卵巢生殖细胞肿瘤
 - [1063] ○ 睾丸癌
- [1064] • 妊娠滋养细胞疾病
- [1065] • 毛细胞白血病
- [1066] • 头颈癌
- [1067] • 儿童心脏肿瘤

- [1068] • 肝细胞(肝)癌
- [1069] • 朗格汉斯细胞(Langerhans Cell)组织细胞增生症
- [1070] • 霍奇金氏淋巴瘤
- [1071] • 下咽癌(头颈癌)
- [1072] • 眼内黑色素瘤,还包括例如:
- [1073] o 儿童眼内黑色素瘤
- [1074] • 胰岛细胞肿瘤、胰腺神经内分泌肿瘤
- [1075] • 卡波西肉瘤(软组织肉瘤)
- [1076] • 肾(肾细胞)癌
- [1077] • 朗格汉斯细胞组织细胞增生症
- [1078] • 喉癌(头颈癌)
- [1079] • 白血病
- [1080] • 唇和口腔癌(头颈癌)
- [1081] • 肝癌
- [1082] • 肺癌(非小细胞和小细胞),还包括例如:
- [1083] o 儿童肺癌
- [1084] • 淋巴瘤
- [1085] • 男性乳腺癌
- [1086] • 骨恶性纤维组织细胞瘤和骨肉瘤
- [1087] • 黑色素瘤,还包括例如:
- [1088] o 儿童黑色素瘤
- [1089] • 眼内(眼)黑色素瘤,还包括例如:
- [1090] o 儿童眼内黑色素瘤
- [1091] • 梅克尔细胞癌(皮肤癌)
- [1092] • 恶性间皮瘤,还包括例如:
- [1093] o 儿童间皮瘤
- [1094] • 转移性癌症
- [1095] • 隐匿性原发性转移性鳞状颈癌(头颈癌)
- [1096] • 具有NUT基因变化的中线道(Midline Tract)癌
- [1097] • 口腔癌(头颈癌)
- [1098] • 多发性内分泌瘤综合征
- [1099] • 多发性骨髓瘤/浆细胞肿瘤
- [1100] • 蕈样霉菌病(淋巴瘤)
- [1101] • 骨髓发育不良综合征、骨髓发育不良/骨髓增生性肿瘤
- [1102] • 慢性骨髓性白血病(CML)
- [1103] • 急性骨髓性白血病(AML)
- [1104] • 慢性骨髓增生性肿瘤
- [1105] • 鼻腔和鼻窦癌(头颈癌)
- [1106] • 鼻咽癌(头颈癌)

- [1107] • 神经母细胞瘤
- [1108] • 非霍奇金氏淋巴瘤
- [1109] • 非小细胞肺癌
- [1110] • 口腔癌、唇和口腔癌和口咽癌(头颈癌)
- [1111] • 骨肉瘤和骨恶性纤维组织细胞瘤
- [1112] • 卵巢癌,还包括例如:
 - [1113] ○儿童卵巢癌
- [1114] • 胰腺癌,还包括例如:
 - [1115] ○儿童胰腺癌
- [1116] • 胰腺神经内分泌肿瘤(胰岛细胞肿瘤)
- [1117] • 乳头状瘤症(儿童喉部)
- [1118] • 副神经节瘤,还包括例如:
 - [1119] ○儿童副神经节瘤
- [1120] • 副鼻窦癌和鼻腔癌(头颈癌)
- [1121] • 副甲状腺癌
- [1122] • 阴茎癌
- [1123] • 咽癌(头颈癌)
- [1124] • 嗜铬细胞瘤,还包括例如:
 - [1125] ○儿童嗜铬细胞瘤
- [1126] • 垂体瘤
- [1127] • 浆细胞肿瘤/多发性骨髓瘤
- [1128] • 胸膜肺母细胞瘤
- [1129] • 妊娠和乳腺癌(即怀孕女性的乳腺癌)
- [1130] • 原发性中枢神经系统(CNS)淋巴瘤
- [1131] • 原发性腹膜癌
- [1132] • 前列腺癌
- [1133] • 直肠癌
- [1134] • 复发性癌症
- [1135] • 肾细胞(肾)癌
- [1136] • 视网膜母细胞瘤
- [1137] • 儿童横纹肌肉瘤(软组织肉瘤)
- [1138] • 唾液腺癌(头颈癌)
- [1139] • 肉瘤,还包括例如:
 - [1140] ○儿童横纹肌肉瘤(软组织肉瘤)
 - [1141] ○儿童血管瘤(软质组织肉瘤)
 - [1142] ○尤文氏肉瘤(骨癌)
 - [1143] ○卡波西肉瘤(软组织肉瘤)
 - [1144] ○骨肉瘤(骨癌)
 - [1145] ○软组织肉瘤

- [1146] ○子宫肉瘤
- [1147] • 塞扎里综合征(Sézary Syndrome) (淋巴瘤)
- [1148] • 皮肤癌,还包括例如:
- [1149] ○儿童皮肤癌
- [1150] • 小细胞肺癌
- [1151] • 小肠癌
- [1152] • 软组织肉瘤
- [1153] • 皮肤鳞状细胞癌
- [1154] • 隐匿性原发性转移性鳞状颈癌(头颈癌)
- [1155] • 胃(Gastric/Stomach)癌,还包括例如:
- [1156] ○儿童胃(Gastric/Stomach)癌
- [1157] • 皮肤T细胞淋巴瘤
- [1158] • 睾丸癌,还包括例如:
- [1159] ○儿童睾丸癌
- [1160] • 咽喉癌(头颈癌),还包括例如:
- [1161] ○鼻咽癌
- [1162] ○口咽癌
- [1163] ○下咽癌
- [1164] • 胸腺瘤和胸腺癌
- [1165] • 甲状腺癌
- [1166] • 肾盂和尿管移行细胞癌(肾脏(肾细胞)癌)
- [1167] • 原发灶不明癌,还包括例如:
- [1168] ○儿童原发灶不明癌
- [1169] • 儿童不常见癌症
- [1170] • 尿管和肾盂移行细胞癌(肾脏(肾细胞)癌)
- [1171] • 尿道癌
- [1172] • 子宫内膜癌
- [1173] • 子宫肉瘤
- [1174] • 阴道癌,还包括例如:
- [1175] ○儿童阴道癌
- [1176] • 血管肿瘤(软组织肉瘤)
- [1177] • 外阴癌
- [1178] • 维尔姆斯瘤(Wilms Tumour)和其他儿童肾脏肿瘤
- [1179] • 年轻成人(例如在年龄为16-30岁,如18-30岁;任选小于28、26、24、22或20岁的年轻成人)癌症
- [1180] 更特别地,癌症类型可任选选择以下清单中的任何一种或多种:
- [1181] 皮肤癌:有三种原发性皮肤癌类型:基底细胞、鳞状细胞和黑色素瘤。这些癌症衍生自具有相同名称的表皮层。黑色素瘤来源于表皮的最深水平的黑色素细胞或色素细胞。基底细胞癌和鳞状细胞癌通常发生在暴露于日光的身体部分,如面部、耳朵和四肢。

[1182] 肺癌:肺癌极难在早期检测到,因为通常直至疾病晚期才出现症状。症状包括持续性咳嗽、痰有血丝、胸痛和肺炎或支气管炎反复发作。

[1183] 女性或男性乳腺癌:据估算,在美国约8名女性中的1名在其一生中最终会患上乳腺癌。大部分乳腺癌为导管癌。最可能患上该疾病的女性为50岁以上的女性;在一只乳房中已有癌症的女性;其母亲或姊妹患有乳腺癌的女性;从未有孩子的女性;和在30岁之后有其第一个孩子的女性。其他风险因素包括肥胖、高脂饮食、初潮(月经开始的年龄)早和停经(月经停止的年龄)迟。

[1184] 前列腺癌:前列腺癌主要见于老年男性中。随着男性年龄增长,前列腺可能增大且阻塞尿道或膀胱。这可造成排尿困难或干扰性功能。此病症称为良性前列腺肥大(BPH)。尽管BPH不为癌性,但可能需要手术来对其纠正。BPH的症状或前列腺中的其他问题可类似于前列腺癌的症状。

[1185] 结肠和/或直肠癌:结肠直肠癌(CRC)为通常源自为胃肠道的结肠或直肠内壁的上皮细胞的疾病。在影响结肠的癌症中,约70%发生在结肠中,约30%发生在直肠中。这些癌症总体上为第三大最常见癌症。症状包括便血,其可通过简单粪便潜血测试或排便习惯变化(如严重便秘或腹泻)来测试。

[1186] 宫颈癌(子宫体)癌症:子宫为女性骨盆中的囊,其允许婴儿自受精的卵子发育并保护其直至出生。子宫癌为最常见的妇科恶性病。此癌症不常在40岁以下的女性中发生。其最频繁地出现在60岁之后。呈现症状通常为异常子宫出血。通常进行子宫内膜活体组织切片或D&C来确认诊断。

[1187] 除了上文所论述的以原发部位命名的癌症类型之外,还有许多其他实例,如脑癌、睾丸癌、膀胱癌等。

[1188] 特别是,根据本发明第十一方面的待对抗的与HCMV相关的疾病或病症可为上皮癌;任选其中该上皮癌为乳腺癌;例如,其中该乳腺癌为三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2阳性乳腺癌(如本文所描述)。所述形式的上皮癌可任选为单株或多株形式的HCMV感染上皮癌,例如潜伏HCMV感染形式的上皮癌(任选单株或多株潜伏HCMV感染癌症)。

[1189] 根据本发明第十一方面的待对抗的与HCMV相关的疾病或病症可为转移和/或侵袭形式的癌症。所述形式的转移和/或侵袭癌症可任选为单株或多株形式的HCMV感染的转移和/或侵袭癌症,例如潜伏HCMV感染形式的转移和/或侵袭癌症(任选单株或多株潜伏HCMV感染癌症)。

[1190] 在一些实施方案中,根据本发明第十一方面的待对抗的与HCMV相关的疾病或病症可为胶质母细胞瘤。在本文所述的其他实施方案中,该疾病或病症不为胶质母细胞瘤和/或该待处理的受试者不患有和/或尚未被诊断患有胶质母细胞瘤。

[1191] 在一些实施方案中,根据本发明第十一方面的待处理的受试者(或离体或体外细胞物质)可能具有和/或已经诊断有或具有HCMV感染癌细胞,如潜伏HCMV感染癌细胞。

[1192] 在一些实施方案中,根据本发明第十一方面的待处理的受试者可为或旨在为细胞物质(如细胞产物捐献)的受体。该细胞产物可例如包含离体活细胞物质、基本上由其组成或由其组成,该离体活细胞物质选自:一种或多种类型的离体细胞;一种或多种类型的离体细胞培养物;一种或多种类型的离体组织;一种或多种类型的离体组织培养物;一种或多种类型的离体器官;和/或一种或多种类型的离体器官培养物。任选地,细胞产物可直接或间

接来源于活的供体。

[1193] 在一些实施方案中,根据本发明第十一方面的待处理的受试者可为或旨在为细胞物质的供体,如细胞产物的供体。该细胞产物可包含来自该供体的细胞、组织或器官中的任何一种或多种、基本上由其组成或由其组成。

[1194] 在一些实施方案中,根据本发明第十一方面的待处理的离体或体外细胞物质可为离体细胞产物。该离体细胞产物可例如包含离体活细胞物质、基本上由其组成或由其组成,该离体活细胞物质选自:一种或多种类型的离体细胞;一种或多种类型的离体细胞培养物;一种或多种类型的离体组织;一种或多种类型的离体组织培养物;一种或多种类型的离体器官;和/或一种或多种类型的离体器官培养物。任选地,细胞产物可直接或间接来源于活的供体。

[1195] 在一个实施方案中,根据本发明第十一方面的待使用的一种或多种试剂可例如选自以下(或包括选自以下的一种或多种试剂):

[1196] i. 如本发明的第一方面所定义的治疗性抗体,

[1197] ii. 如本发明的第一方面所定义的该治疗性抗体的功能片段,

[1198] iii. 包含作为如通过本发明的第一方面所定义的融合多肽序列的治疗性抗体;和

[1199] iv. 包含如本发明的第一方面所定义的融合多肽序列的该治疗性抗体的功能片段。

[1200] 举例而言,根据本发明第十一方面使用的一种或多种试剂可为(或包括选自以下的一种或多种试剂)如由本发明的第一方面所定义的双特异性抗体。非限制性地,这可以为双特异性免疫细胞接合子抗体。其示例性实施方案为双特异性T细胞接合子(BiTE)抗体,任选其中除包含对US28蛋白的ECD3区具有结合特异性的本发明的第一方面的结合分子的区以外,BiTE抗体进一步包含T细胞衔接结构域,如CD3结合结构域。

[1201] 在另一实施方案中,根据本发明第十一方面的待使用的一种或多种试剂可例如为(或包括)根据本发明第八方面和/或本发明第十方面的缀合物,如作为抗体-药物缀合物(“ADC”)的缀合物,或包含放射性部分的缀合物,如适用于放射免疫疗法(“RIT”)的缀合物。

[1202] 在另一实施方案中,根据本发明第十一方面的待使用的一种或多种试剂可例如为(或包括)细胞(或细胞群,例如均质细胞群),其中该细胞或各细胞包含根据本发明第四方面的CAR。该细胞或细胞群通常经分离和/或配制以用于向受试者施用。

[1203] H. 组合治疗:

[1204] 任选地,根据本发明的第十一方面,可向受试者施用另一物质,如另一治疗性、预防性、诊断性、预后性或治疗诊断性物质,且任选其中该另一物质可分别、依次施用或与一种或多种试剂中的每一种同时施用。

[1205] 因此,本发明的第十一方面还提供一种治疗有需要的受试者的方法,其通过向受试者施用治疗性、预防性、诊断性、预后性或治疗诊断性物质进行,其中还分别、依次(例如之前或之后)或同时用一种或多种试剂中的任一种治疗受试者。

[1206] 在同时治疗的实施方案中,接着根据本发明第十一方面使用的一种或多种试剂可与治疗性、预防性、诊断性、预后性或治疗诊断性物质组合配制和/或施用;或可分开配制但作为两种单独配制物同时施用。

[1207] 举例而言,在一个实施方案中,待治疗的疾病或病症可为一种形式的癌症(如一种

或多种形式如上文所公开的癌症), 且其他治疗性、预防性、诊断性、预后或治疗诊断物质可靶向癌症。

[1208] 因此, 在本公开的情况下, 还预期, 本发明的结合分子和如本发明第十一方面所定义的其他治疗剂可类似地用于治疗癌症以及化学或放射治疗性干预或其他治疗。

[1209] 所述不同形式的治疗可以数分钟至数周范围内的间隔先于其他治疗或在其他治疗之后。举例而言, 在彼此的约12至24小时内, 且更佳在彼此的约6至12小时内, 其中仅约12小时的延迟时间为一个优选选项。在一些情况下, 可能需要延长时段以进行显著治疗, 无论如何, 在各自施用之间会流逝数天(2、3、4、5、6或7)至数周(1、2、3、4、5、6、7或8)。

[1210] 考虑到治疗的毒性(若存在), 向患者施用本发明的治疗剂将遵循用于施用该特定第二疗法的一般方案。预期治疗周期将视需要重复进行。还预期, 各种标准疗法以及手术干预可与所描述的癌症疗法组合应用。

[1211] 本领域技术人员被导向《雷明顿药物科学》第15版, 第33章, 特别是第624-652页。取决于所治疗受试者的病症, 将必然出现一些剂量变化。在任何事件中, 负责施用的人员将判定个体受试者的适当剂量。对于人施用而言, 制剂应符合FDA生物制剂标准办公室所要求的无菌、无热原、一般安全和纯度标准。

[1212] 1. 化学疗法

[1213] 化学治疗抗癌剂可例如选自烷基化剂, 包括氮芥, 如甲基二(氯乙基)胺(HN_2)、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑(L-溶肉瘤素)和氯芥苯丁酸; 氮丙啶和甲基三聚氰胺, 如六甲蜜胺、塞替派(thiotepa); 烷基磺酸盐, 如白消安(busulphan); 亚硝基脲, 如卡莫司汀(carmustine)(BCNU)、洛莫司汀(lomustine)(CCNU)、司莫司汀(semustine)(甲基-CCNU)和链脲佐菌素(streptozocin)(链佐霉素); 和三氮烯, 如达卡巴嗪(decarbazine)(DTIC; 二甲基三氮烯基咪唑-甲酰胺); 抗代谢物, 包括叶酸类似物, 如甲氨喋呤(methotrexate/amethopterin); 嘧啶类似物, 如氟尿嘧啶(5-氟尿嘧啶; 5-FU)、氟尿苷(氟脱氧尿苷; FUDR)和阿糖胞苷(胞嘧啶阿拉伯糖苷); 和嘌呤类似物和相关抑制剂, 如巯基嘌呤(6-巯基嘌呤; 6-MP)、硫鸟嘌呤(6-硫鸟嘌呤; TG)和喷司他汀(2'-脱氧助间型霉素); 包括长春花生物碱的天然产物, 如长春碱(VLB)和长春新碱; 表鬼臼毒素, 如依托泊苷(etoposide)和替尼泊苷(teniposide); 抗生素, 如放线菌素(放线菌素D)、道诺霉素(daunorubicin)(柔红霉素(daunomycin); 红比霉素(rubidomycin))、阿霉素、博来霉素(bleomycin)、普卡霉素(plicamycin)(光神霉素(mithramycin))和丝裂霉素(丝裂霉素C); 酶类, 如L-天冬酰胺酶; 和生物反应调节剂, 如干扰素 α phenome; 各种试剂, 包括铂配位复合物, 如顺铂(顺-DDP)和卡铂; 蒽醌, 如米托蒽醌(mitoxantrone)和蒽环霉素; 经取代尿素, 如羟基脲; 甲基胍衍生物, 如丙卡巴肼(N-甲基胍, MIH); 和肾上腺皮质抑制剂, 如米托坦(mitotane)(o,p'-DDD)和氨鲁米特(aminoglutethimide); 紫杉醇及类似物/衍生物; 细胞周期抑制剂; 蛋白酶抑制剂, 如硼替佐米(Bortezomib)(Velcade[®]); 信号转导酶(transductase)(例如酪氨酸激酶)抑制剂, 如伊马替尼(Imatinib)(Glivec[®])、COX-2抑制剂和激素激动剂/拮抗剂, 如氟他胺(flutamide)和他莫昔芬(tamoxifen)。

[1214] 临床上使用的抗癌剂通常通过以下作用机制分组: 烷基化剂、拓扑异构酶I抑制剂、拓扑异构酶II抑制剂、RNA/DNA抗代谢物、DNA抗代谢物和抗有丝分裂剂。美国NIH/国家癌症研究所网站清单122化合物(<http://dtp.nci.nih.gov/docs/cancer/searches/>

standard_mechanism.html),其均可结合如通过本发明的各方面所描述的US28靶点方法来使用。其包括烷基化剂,包括Asaley、AZQ、BCNU、白消安(Busulfan)、羧基邻苯二甲酸铂、CBDCA、CCNU、CHIP、氯芥苯丁酸、氯脲菌素、顺铂、氯乙砒、氰基-N-吗啉基-阿霉素、cyclodisone、卫康醇(dianhydrogalactitol)、氟多潘(fluorodopan)、hepsulfam、羟胺硫蒽酮(hycanthone)、美法仑、甲基CCNU、丝裂霉素C、mitozolamide、氮芥、PCNU、哌嗪、哌嗪二酮、哌泊溴烷(pipobroman)、泊非罗霉素(porfiromycin)、螺乙内酰脲氮芥(spirohydantoin mustard)、替罗昔隆(teroxirone)、四铂(tetraplatin)、吡铂(picoplatin)(SP-4-3)(顺-胺二氯(2-甲基吡啶)Pt(II))、塞替派、三乙撑蜜胺、尿嘧啶氮芥、Yoshi-864;抗有丝分裂剂,包括别秋水仙碱(allocolchicine)、软海绵素B、秋水仙碱、秋水仙碱衍生物、海兔毒素10、美登素、根瘤菌素、紫杉醇、紫杉醇衍生物、硫代秋水仙碱、三苯甲基半胱氨酸、长春碱硫酸盐、长春新碱硫酸盐;拓扑异构酶I抑制剂,包括喜树碱、喜树碱Na盐、氨基喜树碱、喜树碱衍生物、吗啉基阿霉素;拓扑异构酶II抑制剂,包括阿霉素、氨茶非特(amonafide)、m-AMSA、蒽吡唑(anthrapyrazole)衍生物、派拉瑞丁(pyrazoloacridine)、比生群(bisantrene)HCl、道诺霉素、脱氧阿霉素、米托蒽醌、美诺立尔(menogaril)、N,N'-二苯甲基柔红霉素、氧杂蒽唑(oxanthrazole)、柔红霉素苯胺(rubidazone)、VM-26、VP-16;RNA/DNA抗代谢物,包括L-丙氨酸、5-氮胞苷、5-氟尿嘧啶、阿西维辛(acivicin)、3-氨基嘌呤衍生物、抗叶酸剂、贝克氏可溶性抗叶酸剂(Baker's soluble antifol)、二氯烯丙基指甲花醌(dichlorallyl lawsone)、布喹那(brequinar)、替加氟(ftorafur)(前药)、5,6-二氢-5-氮胞苷、甲氨嘌呤、甲氨嘌呤衍生物、N-(磷酸乙酰基)-L-天冬氨酸(PALA)、吡唑呋喃菌素(pyrazofurin)、曲美沙特(trimetrexate);DNA抗代谢物,包括3-HP、2'-脱氧-5-氟尿苷、5-HP、 α -TGDR、甘氨酸阿非迪霉素(aphidicolin glycinate)、阿糖胞苷(ara-C)、5-氮杂-2'-脱氧胞苷; β -TGDR、环胞苷、胍唑、羟基脲、肌苷乙醇醛(inosine glycodialdehyde)、麦克菌素(macbecin)II、吡唑并咪唑、硫鸟嘌呤和硫嘌呤。

[1215] 然而,至少一种其他抗癌剂优选选自顺铂;卡铂;吡铂;5-氟尿嘧啶;太平洋紫杉醇;丝裂霉素C;阿霉素;吉西他滨(gemcitabine);雷替曲塞(tomodex);培美曲塞(pemetrexed);甲氨嘌呤;伊立替康(irinotecan)、氟尿嘧啶和甲酰四氢叶酸;奥沙利铂(oxaliplatin)、5-氟尿嘧啶、epirubin、卡培他滨(cabecitabine)、多西他赛(doxotaxel)、太平洋紫杉醇和卡铂。

[1216] 优选的抗血管生成化合物包括贝伐单抗(bevacizumab)(Avastin®);伊曲康唑(itraconazole);羧酰胺基三唑;TNP-470(烟霉素类似物);CM101;IFN- α ;IL-12;血小板因子-4;苏拉明(suramin);SU5416;血小板反应蛋白;VEGFR拮抗剂;血管抑制性类固醇+肝素;软骨源血管生成抑制因子;基质金属蛋白酶抑制剂;血管抑素;内皮抑素(endostatin);2-甲氧基雌二醇;替康兰(tecogalan);四硫钼酸盐;沙立度胺(thalidomide);促乳素; $\alpha_v\beta_3$ 抑制剂;利诺胺(linomide);他喹莫德(tasquinimod);雷珠单抗(ranibizumab);索拉非尼(sorafenib);(Nexavar®);舒尼替尼(sunitinib)(Sutent®);帕唑帕尼(pazopanib)(Votrient®);和依维莫司(everolimus)(Afinitor®)。

[1217] 另一治疗剂可为缺氧活化细胞毒性剂(例如替拉扎明(Tirapazamine))。

[1218] 癌症疗法还包括具有基于化学和放射两者的治疗的多种组合疗法。组合化学疗法

包括例如顺铂(CDDP)、卡铂、丙卡巴肼、氮芥、环磷酰胺、喜树碱、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥、白消安、亚硝基脲、更生霉素、道诺霉素、阿霉素、博莱霉素、光辉霉素(plicomycin)、丝裂霉素、依托泊苷(VP16)、他莫昔芬、雷诺昔芬(raloxifene)、雌激素受体结合剂、紫杉醇、吉西他滨、温诺平(navelbine)、法呢基蛋白转移酶抑制剂、反铂、5-氟尿嘧啶、长春新碱、长春碱和甲氨喋呤、替莫唑胺(Temazolomide) (一种水性形式DTIC)或前述的任何类似物或衍生变体。

[1219] 化学疗法与生物疗法的组合已知为生化疗法。本发明涵盖可采用或本领域已知用于治疗或预防癌症的任何化学治疗剂。

[1220] 2. 放射疗法

[1221] 造成DNA损伤且已广泛使用的其他因素包括通常称为 γ -射线、X射线和/或放射性同位素直接递送至肿瘤细胞的因素。还涵盖其他形式的DNA损伤因素,如微波和UV辐照。最可能的情况为,所有这些因素对DNA、DNA的前体、DNA的复制和修复、和染色体的组装和维持造成大范围损害。X射线的剂量范围在延长的时段(3至4周)期间50至200伦琴日剂量至2000至6000伦琴的单次剂量范围内。放射性同位素的剂量范围变化极大,且取决于同位素的半衰期、所发射辐射的强度和类型和赘生性细胞的摄取。

[1222] 当应用于细胞时,术语“接触”和“暴露”在本文中用于描述治疗剂和化学治疗剂或放射性治疗剂借以递送至目标或与目标直接并列放置的过程。为实现细胞杀伤或停滞,两种试剂以有效杀伤靶点处的一个或多个细胞或阻止所述细胞分裂的组合量递送至细胞。

[1223] 3. 免疫疗法

[1224] 免疫治疗剂通常依赖于使用免疫效应细胞和分子以靶向并摧毁癌细胞。免疫效应子可为例如对肿瘤细胞表面上的一些标记具有特异性的抗体。出于本发明的目的且非限制性地,标记可为如表达于HCMV感染肿瘤细胞的表面上的US28;在此情况下抗体可为或包含本发明的结合分子中的任一种。单独的抗体可充当疗法的效应子或其可募集其他细胞以实际上实现细胞杀伤。抗体还可与药物或毒素(化学治疗剂、放射性核素、蓖麻毒素A链、霍乱毒素、百日咳毒素等)结合且仅充当靶向剂。替代地,效应子可为携带直接或间接与肿瘤细胞目标相互作用的表面分子的淋巴细胞。各种效应细胞包括细胞毒性T细胞和NK细胞。治疗模式的组合,即直接细胞毒活性和Fortilin蛋白的抑制或减少将在癌症治疗中提供治疗益处。

[1225] 免疫疗法还可用作组合疗法的一部分。下文论述用于组合疗法的通用方法。在免疫疗法的一个方面中,肿瘤细胞必须带有一些适合于靶向(即不存在于大部分其他细胞上)的标记。存在许多肿瘤标记,且任何这些标记可适用于在本发明的情况下靶向。常见肿瘤标记包括癌胚抗原、前列腺特异性抗原、尿液肿瘤相关抗原、胚胎抗原、酪氨酸酶(p97)、gp68、TAG-72、HMFG、唾液酸化刘易斯抗原(Sialyl Lewis Antigen)、MucA、MucB、PLAP、雌激素受体、层黏连蛋白受体、erb B和p155。免疫疗法的替代方面为组合抗癌作用与免疫刺激作用。还存在免疫刺激分子,包括:细胞因子,如IL-2、IL-4、IL-12、GM-CSF、 γ -IFN、趋化因子,如MIP-1、MCP-1、IL-8和生长因子,如FLT3配体。组合免疫刺激分子作为蛋白质或使用基因递送与肿瘤抑制因子(如MDA-7)的组合已展示增强抗肿瘤作用(Ju等人,2000)。

[1226] 当前在研究中或在使用中的免疫疗法的实例为免疫佐剂(例如牛分枝杆菌(Mycobacterium bovis)、镰状疟原虫(Plasmodium falciparum)、二硝基氯苯和芳族化合

物) (美国专利5,801,005;美国专利5,739,169;Hui和Hashimoto,1998,《感染与免疫(Infect.Immun.)》,66(11):5329-36;Christodoulides等人,1998,《微生物学(Microbiology)》,144(Pt 11):3027-37)、细胞因子治疗(例如干扰素;和IL-1、GM-CSF和TNF)(Bukowski等人,1998,《临床癌症研究》4(10):2337-47;Davidson等人,1998,《免疫与疗法杂志(J.Immunother.)》,21(5):389-98;Hellstrand等人,1998,《肿瘤学(Oncol)》,37(4):347-353)、基因疗法(例如TNF、IL-1、IL-2、p53)(Qin等人,1998,《美国国家科学院院刊》,95(24):1441 1-14416;Austin-Ward和Villasaca,1998,Rev.Med.Chil,126(7):838-45;美国专利5,830,880和美国专利5,846,945)和单克隆抗体(例如抗神经节苷脂GM2、抗HER-2、抗p185)(Pietras等人,1998,《致癌基因(Oncogene)》,17(17):2235-49;Hanibuchi等人,1998,《国际癌症期刊》,78(4):480-5;美国专利5,824,311)。赫赛汀(Herceptin)(曲妥珠单抗(trastuzumab))为阻断HER2-neu受体的嵌合(小鼠-人)单克隆抗体。其具有抗肿瘤活性且已批准用于治疗恶性肿瘤(Dillman,1999,Cancer Biother.Radiopharm.,14:5-10)。赫赛汀与化学疗法的癌症组合疗法已展示比单独疗法更有效。因此,预期一种或多种抗癌疗法可与针对如本文所描述的HCMV编码US28的ECD3的本发明的疗法一起采用。

[1227] 在过继性免疫疗法中,将患者的循环淋巴细胞或肿瘤浸润淋巴细胞体外分离,通过如IL-2的淋巴因子活化或用针对肿瘤坏死的基因转导,并再施用(Rosenberg等人,1988,《新英格兰医学杂志(N.Engl J.Med)》,319:1676;Rosenberg等人,1989,《外科学年鉴(Ann.Surg.)》,210:474)。为达成此目的,将向动物或人患者施用免疫学上有效量的活化淋巴细胞与如本文所述的掺入佐剂的抗原肽组合物的组合。活化淋巴细胞将最优选为患者自身细胞,其先前自血液或肿瘤样品分离且体外经活化(或“扩增”)。此形式的免疫疗法已产生数种黑色素瘤和肾癌消退情况,但反应者百分比相比于无反应者较少。

[1228] 存在用于癌症的被动免疫疗法的多种不同方法。其可广泛地分成以下:单独注射抗体;注射与毒素偶联的抗体或化学治疗剂;注射与放射性同位素偶联的抗体;注射抗个体基因型抗体;和最后,清除骨髓中的肿瘤细胞。

[1229] 人单克隆抗体用于被动免疫疗法中,因为其在患者中产生很少的副作用或没有副作用。然而,其应用略微受限于其稀缺性且迄今为止仅在病灶内施用过。针对神经节苷脂抗原的人单克隆抗体已向患有皮肤复发性黑色素瘤的患者病灶内施用(Irie和Morton,1986,《美国国家科学院院刊》83:8694-8698)。在十个患者中的六个患者中观测到消退,随后每日或每周进行病灶内注射。在另一研究中,由病灶内注射两种人单克隆抗体而实现适度成功(Irie等人,“黑色素瘤神经节苷脂和人单克隆抗体(Melanoma gangliosides and human monoclonal antibody)”见:《人肿瘤抗原和特异性肿瘤疗法(Human Tumor Antigens and Specific Tumor Therapy)》,Metzgar和Mitchell(编),Alan R.Liss公司,New York,第115-126页,1989)。可能的治疗性抗体包括抗TNF、抗CD25、抗CD3、抗CD20、CTLA-4-IG和抗CD28。

[1230] 施用多于一种针对两种不同抗原的单克隆抗体或甚至具有多种抗原特异性的抗体可能为有利的。治疗方案还可包括施用淋巴因子或其他免疫增强剂,如Bajorin等人,1988,Proc.Anu.Meet.Am.Soc.Clin.Oncol,7:A967所描述。人单克隆抗体的研发进一步详细描述于本说明书中其他处。

[1231] 4.基因疗法

[1232] 在又一实施方案中,第二治疗为一种基因疗法,其中治疗性多核苷酸在本发明第十一方面的疗法之前、之后或同时施用。可与本发明组合的被某种形式的基因疗法靶向的各种基因为本领域普通技术人员所熟知且可包含涉及癌症的任何基因。

[1233] 细胞增殖的诱导剂。诱导细胞增殖的蛋白质进一步属于各种类别,取决于功能。所有这些蛋白质的共同性为其调节细胞增殖的能力。举例而言,PDGF(sis致癌基因)的一种形式为分泌生长因子。致癌基因很少由编码生长因子的基因产生,且在本发明中,sis为唯一已知的天然存在的致癌生长因子。在本发明的一个实施方案中,预期针对细胞增殖的特定诱导子的反义mRNA用于防止细胞增殖的诱导子的表达。

[1234] 蛋白质FMS、ErbA、ErbB和neu为生长因子受体。这些受体的突变导致可调节功能丧失。举例而言,影响Neu受体蛋白质的跨膜结构域的点突变产生neu致癌基因。erbA致癌基因来源于甲状腺激素的细胞内受体。被修饰的致癌ErbA受体被认为与内源性甲状腺激素受体竞争,引起不受控生长。

[1235] 最大类别的致癌基因包括信号转导蛋白质(例如,Src、Abl和Ras)。蛋白质Src为细胞质蛋白质酪氨酸激酶,且其自原致癌基因至致癌基因的转化在一些情况下经由酪氨酸残基527处的突变产生。相比之下,在一个实例中,GTP酶蛋白质ras自原致癌基因至致癌基因的转化由序列中氨基酸12处的缬氨酸至甘氨酸突变产生,从而降低ras GTP酶活性。蛋白质Jun、Fos和Myc为直接发挥其对核功能充当转录因子的作用的蛋白质。

[1236] 细胞增殖抑制剂。肿瘤抑制致癌基因用于抑制过度细胞增殖。这些基因的失活破坏其抑制活性,导致不受调控的增殖。最常见的肿瘤抑制剂为Rb、p53、p21和p16。可根据本发明采用的其他基因包括APC、DCC、NF-1、NF-2、WT-1、MEN-I、MEN-II、zac1、p73、VHL、C-CAM、MMAC1/PTEN、DBCCR-1、FCC、rsk-3、p27、p27/p16融合物和p21/p27融合物。

[1237] 程序化细胞死亡的调节子。细胞凋亡或程序化细胞死亡为正常胚胎发育、维持成人组织内稳态和抑制癌发生的基本过程(Kerr等人,1972)。在其他系统中,Bcl-2家族蛋白质和ICE样蛋白酶已经证实为细胞凋亡的重要调节因子和效应子。发现与滤泡性淋巴瘤结合的Bcl-2蛋白质响应于不同细胞凋亡刺激在控制细胞凋亡和增强细胞存活方面起重要作用(Bakhshi等人,1985,《细胞》,41(3):899-906;Cleary和Sklar,1985,《美国国家科学院院刊》,82(21):7439-43;Cleary等人,1986,《实验医学杂志》,164(1):315-20;Tsujimoto等人,1985,《科学》,228(4706):1440-3;Tsujimoto和Croce,1986,《美国国家科学院院刊》,83(14):5214-8)。现将进化保守的Bcl-2蛋白质视为相关蛋白质家族的成员,其可归类为死亡激动剂或死亡拮抗剂。

[1238] 在发现其之后,Bcl-2展示用以抑制由多种刺激触发的细胞死亡。此外,显而易见地,存在共有共同结构和序列同源性的Bcl-2细胞死亡调节蛋白家族。这些不同家族成员已展示具有与Bcl-2(例如Bcl_{XL}、Bcl_W、Bcl_S、Mcl-1、A1、Bfl-1)类似的功能,或抵消Bcl-2功能且促进细胞死亡(例如Bax、Bak、Bik、Bim、Bid、Bad、Harakiri)。

[1239] 5. 手术

[1240] 大致60%患有癌症的人将经历一些类型的手术,其包括预防性、诊断性或分期性、治愈性和姑息性手术。治愈性手术为可与其他疗法结合使用的癌症治疗,如本发明的治疗、化学疗法、放射线疗法、激素疗法、基因疗法、免疫疗法和/或替代疗法。

[1241] 治愈性手术包括切除,其中物理上去除、切除和/或破坏癌组织的全部或一部分。

肿瘤切除是指物理去除肿瘤的至少一部分。除了肿瘤切除以外,手术治疗还包括激光手术、冷冻手术、电手术和显微镜控制手术(莫氏手术(Mohs'surgery))。进一步预期,本发明可与去除浅表癌、初癌或附带量的正常组织结合使用。

[1242] 在切除一部分或所有癌细胞、组织或肿瘤后,可在体内形成空腔。治疗可通过用额外抗癌疗法对该区域灌注、直接注射或局部施用而实现。可例如每1天、2天、3天、4天、5天、6天或7天,或每1周、2周、3周、4周和5周,或每1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或12个月重复此类治疗。

[1243] I. ECD3衍生肽序列及其用途

[1244] 如上文所论述,当考虑到针对US28的结合分子设计时,本发明人指出,鉴于US28蛋白的N-末端部分(ECD1)在不同HCMV病毒株当中含有高水平突变且似乎为高度特异性和病毒株不可知的抗体的不适当目标,且鉴于本发明人意外发现保守ECD2和ECD4蛋白质的保守部分为小鼠的不适当免疫原,本申请人能够开发出鉴别针对HCMV US28的ECD3区的高度特异性、病毒株不可知的结合分子的新颖方法。

[1245] 此方法基于使用来源于ECD3的两个以下变异形式的肽序列,具有如SEQ ID NO:6所定义的序列TKKNNQCMTDYDYLEVVS的4N变体;和具有如SEQ ID NO:7所定义的序列TKKDNQCMTDYDYLEVVS的4D变体。

[1246] 在本申请的实施例中分别称为肽1和2的这些肽序列用于对小鼠进行免疫,且用于筛选和鉴别对US28 ECD3肽的两种基因变体具有高度特异性和病毒株不可知的结合特性的抗体,以及展示与以下的高度特异性结合:US28过度表达US28-CHO-A1细胞、经HCMV Ad169感染的MRC-5细胞、来自HCMV血清反应呈阳性的受试者的原代PBMC、HCMV感染人肺组织和数种类型的侵袭性人肿瘤,如食道癌、胃癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、恶性嗜铬细胞瘤和局部晚期结肠癌、乳腺癌及其转移瘤和胶质母细胞瘤4级。

[1247] 进一步提供所述肽序列及其功能衍生物和变体以及其根据本发明的用途。

[1248] 因此,本发明的第十三方面提供一种肽或多肽,其包含US28的ECD3的4N变体的序列TKKNNQCMTDYDYLEVVS(SEQ ID NO:6)、基本上由其组成或由其组成,或包含SEQ ID NO:6的免疫原性片段或变体的序列。

[1249] 该肽或多肽并非US28蛋白。举例而言,当在整个其长度中考虑时,在由SEQ ID NO:6或其免疫原性片段或变体定义的序列之外,本发明的第十三方面的肽或多肽的剩余序列可与US28的序列具有小于50%、40%、30%、20%、10%或5%序列一致性。优选地,该肽或多肽中仅有的US28衍生的序列为SEQ ID NO:6的序列或SEQ ID NO:6的免疫原性片段或变体的序列。

[1250] 本发明的第十四方面提供一种肽或多肽,其包含序列TKKDNQCMTDYDYLEVVS(SEQ ID NO:7)、基本上由其组成或由其组成,或包含SEQ ID NO:7的免疫原性片段或变体的序列。

[1251] 该肽或多肽并非US28蛋白。举例而言,当在其整个长度考虑时,在由SEQ ID NO:7或其免疫原性片段或变体定义的序列之外,本发明第十四方面的肽或多肽的剩余序列可与US28的序列具有小于50%、40%、30%、20%、10%或5%序列一致性。优选地,该肽或多肽中仅有的US28衍生的序列为SEQ ID NO:7的序列或SEQ ID NO:7的免疫原性片段或变体的序列。

[1252] 分别根据本发明的第十三或第十四方面的参考序列SEQ ID NO:6或7的免疫原性

片段或变体包含少于参考序列的全序列,且优选包含参考序列的至少3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15或16个连续氨基酸。

[1253] SEQ ID NO:6的所述免疫原性片段可例如选自以下中的任何一个或多个:

[1254] -16-聚体,其选自:KKNNQCMTDYDYLEVS或TKKNNQCMTDYDYLEV;

[1255] -15-聚体,其选自:KNNQCMTDYDYLEVS;KNNQCMTDYDYLEV;或TKKNNQCMTDYDYLE;

[1256] -14-聚体,其选自:NNQCMTDYDYLEVS;KNNQCMTDYDYLEV;KKNNQCMTDYDYLE;或TKKNNQCMTDYDYL;

[1257] -13-聚体,其选自:NQCMTDYDYLEVS;NNQCMTDYDYLEV;KNNQCMTDYDYLE;KKNNQCMTDYDYL;或TKKNNQCMTDYDY;

[1258] -12-聚体,其选自:QCMTDYDYLEVS;NQCMTDYDYLEV;NNQCMTDYDYLE;KNNQCMTDYDYL;KKNNQCMTDYDY;TKKNNQCMTDYD;

[1259] -11-聚体,其选自:CMTDYDYLEVS;QCMTDYDYLEV;NQCMTDYDYLE;NNQCMTDYDYL;KNNQCMTDYDY;KKNNQCMTDYD;或TKKNNQCMTDY;

[1260] -10-聚体,其选自:MTDYDYLEVS;CMTDYDYLEV;QCMTDYDYLE;NQCMTDYDYL;NNQCMTDYDY;KNNQCMTDYD;KKNNQCMTDY;或TKKNNQCMTD;

[1261] -9-聚体,其选自:TDYDYLEVS;MTDYDYLEV;CMTDYDYLE;QCMTDYDYL;NQCMTDYDY;NNQCMTDYD;KNNQCMTDY;KKNNQCMTD;或TKKNNQCMT;

[1262] -8-聚体,其选自:DYDYLEVS;TDYDYLEV;MTDYDYLE;CMTDYDYL;QCMTDYDY;NQCMTDYD;NNQCMTDY;KNNQCMTD;KKNNQCMT;或TKKNNQCM;

[1263] -7-聚体,其选自:YDYLEVS;DYDYLEV;TDYDYLE;MTDYDYL;CMTDYDY;QCMTDYD;NQCMTDY;NNQCMTD;KNNQCMT;KKNNQCM;或TKKNNQC;

[1264] -6-聚体,其选自:DYLEVS;DYDYLEV;DYDYLE;TDYDYL;MTDYDY;CMTDYD;QCMTDY;NQCMTD;NNQCMT;KNNQCM;KKNNQC;或TKKNNQ;

[1265] -5-聚体,其选自:YLEVS;DYLEV;DYDYLE;DYDYL;TDYDY;MTDYD;CMTDY;QCMTD;NQCMT;NNQCM;KNNQC;KKNNQ;或TKKNN;

[1266] -4-聚体,其选自:LEVS;YLEV;DYLE;DYDL;DYDY;TDYD;MTDY;CMTD;QCMT;NQCMT;NNQC;KNNQ;KKNN;或TKKN;或

[1267] -3-聚体,其选自:EVS;LEV;YLE;DYL;YDY;DYD;TDY;MTD;CMT;QCM;NQC;NNQ;KNN;KKN;或TKK。

[1268] SEQ ID NO:7的所述免疫原性片段可例如选自以下中的任何一个或多个:

[1269] -16-聚体,其选自:KKDNQCMTDYDYLEVS或TKKDNQCMTDYDYLEV;

[1270] -15-聚体,其选自:KDNQCMTDYDYLEVS;KKDNQCMTDYDYLEV;或TKKDNQCMTDYDYLE;

[1271] -14-聚体,其选自:DNQCMTDYDYLEVS;KDNQCMTDYDYLEV;KKDNQCMTDYDYLE;或TKKDNQCMTDYDYL;

[1272] -13-聚体,其选自:NQCMTDYDYLEVS;DNQCMTDYDYLEV;KDNQCMTDYDYLE;KKDNQCMTDYDYL;或TKKDNQCMTDYDY;

[1273] -12-聚体,其选自:QCMTDYDYLEVS;NQCMTDYDYLEV;DNQCMTDYDYLE;KDNQCMTDYDYL;KKDNQCMTDYDY;TKKDNQCMTDYD;

[1274] -11-聚体,其选自:CMTDYDYLEVS;QCMTDYDYLEV;NQCMTDYDYLE;DNQCMTDYDYL;

KDNQCMTDYDY;KKDNQCMTDYD;或TKKDNQCMTDY;

[1275] -10-聚体,其选自:MTDYDYLEVS;CMTDYDYLEV;QCMTDYDYLE;NQCMTDYDYL;DNQCMTDYDY;KDNQCMTDYD;KKDNQCMTDY;或TKKDNQCMTD;

[1276] -9-聚体,其选自:TDYDYLEVS;MTDYDYLEV;CMTDYDYLE;QCMTDYDYL;NQCMTDYDY;DNQCMTDYD;KDNQCMTDY;KKDNQCMTD;或TKKDNQCMT;

[1277] -8-聚体,其选自:DYDYLEVS;TDYDYLEV;MTDYDYLE;CMTDYDYL;QCMTDYDY;NQCMTDYD;DNQCMTDY;KDNQCMTD;KKDNQCMT;或TKKDNQCMT;

[1278] -7-聚体,其选自:YDYLEVS;DYDYLEV;TDYDYLE;MTDYDYL;CMTDYDY;QCMTDYD;NQCMTDY;DNQCMTD;KDNQCMT;KKDNQCMT;或TKKDNQC;

[1279] -6-聚体,其选自:DYLEVS;YDYLEV;DYDYLE;TDYDYL;MTDYDY;CMTDYD;QCMTDY;NQCMTD;DNQCMT;KDNQCMT;KKDNQC;或TKKDNQ;

[1280] -5-聚体,其选自:YLEVS;DYLEV;YDYLE;DYDYL;TDYDY;MTDYD;CMTDY;QCMTD;NQCMT;DNQCMT;KDNQC;KKDNQ;或TKKDN;

[1281] -4-聚体,其选自:LEVS;YLEV;DYLE;YDYL;DYDY;TDYD;MTDY;CMTD;QCMT;NQCMT;DNQC;KDNQ;KKDN;或TKKD;或

[1282] -3-聚体,其选自:EVS;LEV;YLE;DYL;YDY;DYD;TDY;MTD;CMT;QCM;NQC;DNQ;KDN;KKD;或TKK。

[1283] 优选地,所选免疫原性片段或其中的每一种不包括存在于任何其他蛋白质,特别是任何蛋白质(如其他GPCR)的胞外区中的那些序列;这可帮助获得US28的ECD3所需特异性且使任何脱靶效应降至最低或优选避免任何脱靶效应。因此,较长免疫原性片段可为优选的,例如至少5-聚体、至少6-聚体、至少7-聚体、至少8-聚体、至少9-聚体、至少10-聚体、至少11-聚体、至少12-聚体、至少13-聚体、至少14-聚体、至少15-聚体或至少16-聚体。

[1284] 分别根据本发明的第十三或第十四方面的参考序列SEQ ID NO:6或7的免疫原性片段或变体通常能够引起免疫反应(例如人或其他动物体内的免疫反应),如引起体液和/或细胞介导的免疫反应。该免疫反应为分别对如存在于根据本发明的第十三或第十四方面的肽或多肽内的参考序列(即SEQ ID NO:6和/或7)具有特异性的免疫反应。

[1285] 在一个实施方案中,本发明的第十三和/或第十四方面的肽或多肽的免疫原性片段或变体包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:与SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7共有的且存在于所述序列内的序列。该共有序列可包含连续氨基酸序列或非连续氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[1286] 在一个实施方案中,可由本发明的第十三和/或第十四方面的肽或多肽的免疫原性片段或变体引起的免疫反应可为对与SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7共有的且存在于所述序列内的序列具有特异性的免疫反应。举例而言,共有序列可以包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:与SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:7共有的且存在于所述序列内的连续氨基酸序列或非连续氨基酸序列。

[1287] 本发明的第十三和第十四方面还提供肽或多肽,其包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:分别选自TKKNNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:6)或TKKDNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:7)的参考序列的免疫原性片段或变体,其中该免疫原性片段或变体包含US28的ECD3内由抗体1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8结合的表位的序列、基本上由其组成或由其组成(其中

还包括scFv,其包含具有分别如SEQ ID NO:12、104、122、68和88所定义的1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的V_H序列的V_H多肽序列,以及如包含具有分别如SEQ ID NO:18、108、126、72和92所定义的1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8的V_L序列的V_L多肽序列)。优选地,所述肽或多肽由1D3、1C10、1A10、1G9和/或1E8特异性结合。

[1288] 在一个实施方案中,本发明的第十三和/或第十四方面的肽或多肽(或各肽或多肽)(和/或其免疫原性片段或变体)以经纯化和/或分离形式提供。

[1289] 如本发明的第十三和/或第十四方面所定义的肽或多肽(或其免疫原性片段或变体)适用于广泛多种作用和效用。非限制性地,其可分别或组合使用以引起针对HCMV的US28蛋白的ECD3的特异性免疫反应(例如作为受试者中的疫苗和/或产生具有针对US28的ECD3的结合特异性的其他抗体);且还为了捕获、鉴别和/或表征已指定为US28的ECD3的结合分子(包括例如通过提供用以捕获、鉴别和/或表征此类结合分子的手段,所述结合分子对指定为US28的ECD3具有病毒株不可知的结合,使得所述病毒株不可知的结合分子可经确认为基本上同等地结合于如由本发明的第十三和/或第十四方面所定义的肽或多肽(或其免疫原性片段或变体)中的每一种,而不管是否存在4N变异序列或4D变异序列)。因此,在一些实施方案中,分别使用(例如单独分析中各类型中的一种,所述单独分析待用于组合中)或彼此混合使用呈组合形式的如本发明的第十三和/或第十四方面所定义的所述肽或多肽(或其免疫原性片段或变体)可为适用的。

[1290] 因此,本发明的第十五方面提供至少两种不同肽和/或多肽的组合,其包含第一肽或多肽和第二肽或多肽,其中:

[1291] 第一肽或多肽包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:序列TKKNNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:6)或其免疫原性片段或变体,如如本发明的第十三方面所定义的肽或多肽(或其免疫原性片段或变体),条件为该免疫原性片段包含至少SEQ ID NO:6的4N氨基酸;和

[1292] 该第二肽或多肽包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:序列TKKDNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:7)或其免疫原性片段或变体,如如本发明的第十四方面所定义的肽或多肽(或其免疫原性片段或变体),条件为该免疫原性片段包含至少SEQ ID NO:7的4D氨基酸。

[1293] 如本发明的第十三和/或第十四方面所定义的肽或多肽(或其免疫原性片段或变体)和如本发明的第十五方面所定义的至少两种不同肽和/或多肽的组合可以其效用的最适当方式展现。举例而言,其可适合于产生融合蛋白或缀合物(其(但不限于)可适用作用于将所述肽或多肽(或其免疫原性片段或变体)呈递至免疫系统的载体)和/或产生所述肽或多肽(或其免疫原性片段或变体)的固定形式,或其融合蛋白或缀合物,例如用于在用于捕获、鉴别和/或表征指定为US28的ECD3的结合分子的分析中使用所述固定分子。

[1294] 因此,本发明的第十六方面提供一种融合蛋白,其包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:直接或经由一个或多个接头氨基酸序列融合至第二氨基酸序列的第一氨基酸序列,其中第一氨基酸序列为如本发明的第十三或第十四方面所定义的肽或多肽(或其免疫原性片段或变体)的序列;且第二氨基酸序列为融合伴侣。

[1295] 可选择任何相关融合伴侣。本领域技术人员熟知本领域已知的融合伴侣序列,且可选择任何序列。融合伴侣可例如为载体蛋白质。另外或替代地,融合伴侣可向与其融合的

第一氨基酸序列提供额外或替代的结合特性和/或抗原特性;其可提供在第一氨基酸序列的结合位点处产生效应的效应部分;其可提供结合分子循环半衰期的调节(如增加或减少);其可提供有助于检测结合分子的序列。

[1296] 在一个优选的选项中,融合伴侣为载体蛋白,如经选择以提供适合于针对第一氨基酸序列进行抗体的免疫和产生的融合蛋白的载体蛋白。举例而言,载体蛋白可选自:钥孔血蓝蛋白(KLH)、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白(OVA)、破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、经遗传修饰的白喉类毒素的交叉反应材料(CRM)、脑膜炎球菌外膜蛋白复合物(OMPC)和流感嗜血杆菌蛋白质D(HiD)。

[1297] 迄今为止,就申请人所知,已用于经授权缀合物疫苗中的五种载体蛋白为:TT、DT、白喉毒素的经基因修饰的CRM、脑膜炎球菌OUNK和HiD。临床试验已证实这些缀合物疫苗在预防传染病中的功效。所有五种载体蛋白均有效增加疫苗的免疫原性,但引起不同量的具有不同亲和力的抗体。已经评估(尽管在临床试验中不太充分)的额外载体蛋白包括绿脓杆菌外毒素A(rEPA)、钥孔血蓝蛋白(KLH)和鞭毛蛋白。

[1298] 本发明的第十七方面提供至少两种不同融合蛋白的组合,所述融合蛋白包含第一融合蛋白和第二融合蛋白,其中:

[1299] 根据本发明的第十六方面的第一融合蛋白包含作为第一融合蛋白的第一氨基酸序列的序列,该序列包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:序列TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)或其免疫原性片段或变体,条件为该免疫原性片段或变体包括SEQ ID NO:6的4N氨基酸;和

[1300] 根据本发明的第十六方面的第二融合蛋白序列包含作为第二融合蛋白的第一氨基酸序列的序列,该序列包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7)或其免疫原性片段或变体,条件为该免疫原性片段或变体包括SEQ ID NO:7的4D氨基酸。

[1301] 该组合可例如特别是适用作疫苗组合物的免疫原性组分,该疫苗组合物可用于在受试者中引起免疫反应,该免疫反应对HCMV病毒的4N变体和4D变异株具有反应性。该反应可例如包括产生多克隆抗体反应,其包含包括以下的抗体群体:与US28的ECD3的4N变体具有结合特异性的抗体、与US28的ECD3的4D变体具有结合特异性的抗体和优选与US28的ECD3的4N和4D变体两者具有病毒株不可知的结合特异性的抗体。本发明还提供一种可由该多克隆抗体反应获得的经分离多克隆抗体产物,其中该多克隆抗体产物可经选择以包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:对US28的ECD3的4N和4D变体中的任一者或优选两者具有结合特异性的抗体。

[1302] 如上文所论述,作为产生融合蛋白的替代(或额外修饰),本发明还提供缀合物的产生。因此,本发明的第十八方面提供一种缀合物,其包含与如由本发明的第十三和第十四方面中的任一者或两者所定义的肽或多肽结合的部分,或与如由本发明的第十六方面所定义的融合蛋白结合的部分。

[1303] 该缀合物的部分可直接结合于如本发明的第十三和第十四方面中的任一者或两者所定义的肽或多肽(或其免疫原性片段或变体),或结合于如本发明的第十六方面所定义的融合蛋白。替代地,该缀合物的部分可如经由接头而与如本发明的第十三和第十四方面中的任一者或两者所定义的肽或多肽或与如本发明的第十六方面所定义的融合蛋白间接

结合。

[1304] 任选地,该部分可为载体,例如载体蛋白,如选自以下的载体:钥孔血蓝蛋白(KLH)、人血清白蛋白(HSA)、牛血清白蛋白(BSA)、卵白蛋白(OVA)、破伤风类毒素(TT)、白喉类毒素(DT)、经遗传修饰的白喉类毒素的交叉反应材料(CRM)、脑膜炎球菌外膜蛋白复合物(OMPC)和流感嗜血杆菌蛋白质D(HiD)。

[1305] 本发明的第十九方面提供至少两种不同缀合物的组合,其中该组合包含:

[1306] 根据本发明的第十八方面的第一缀合物,其中该第一缀合物包含与肽或多肽结合的部分、基本上由其组成或由其组成,其中该肽或多肽包含序列TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)或其免疫原性片段或变体、基本上由其组成或由其组成,条件为该免疫原性片段或变体包括SEQ ID NO:6的4N氨基酸;

[1307] 根据本发明的第十八方面的第二缀合物,其中第二缀合物包含与肽或多肽结合的部分、基本上由其组成或由其组成,其中该肽或多肽包含序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7)或其免疫原性片段或变体、基本上由其组成或由其组成,条件为该免疫原性片段或变体包括SEQ ID NO:7的4D氨基酸。

[1308] 该组合可例如尤其适用作疫苗组合物的免疫原性组分,该疫苗组合物可用于在受试者中引起免疫反应,该免疫反应对HCMV病毒的4N变体和4D变异株具有反应性。该反应可以例如包括产生多克隆抗体反应,其包含包括以下的抗体群体:与US28的ECD3的4N变体具有结合特异性的抗体、与US28的ECD3的4D变体具有结合特异性的抗体和优选与US28的ECD3的4N和4D变体两者具有病毒株不可知的结合特异性的抗体。本发明还提供一种可由该多克隆抗体反应获得的经分离多克隆抗体产物,其中该多克隆抗体产物可经选择以包含以下、基本上由以下组成或由其组成:对US28的ECD3的4N和4D变体中的任一者或优选两者具有结合特异性的抗体。

[1309] 本发明的第二十方面提供一种产生根据本发明的第十九方面的缀合物的方法,该方法包含以下步骤:(a)提供如本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者所定义的肽或多肽(或其免疫原性片段或变体)、如本发明的第十五方面所定义的其组合或如本发明的第十六方面所定义的融合蛋白;和(b)将部分与其缀合。

[1310] 可使用使部分与肽或多肽(或其免疫原性片段或变体)缀合的任何方式;本领域技术人员熟知在所选肽/多肽与所选其他部分之间产生缀合物的常规方式,且自由选择最适当方法。

[1311] 举例而言但不限于,交联多肽的一些常规方法包括通常描述于O'Sullivan等人,《分析生物化学(Anal.Biochem.)》,1979,100,100-108中的方法。举例而言,肽或多肽可经工程改造以富集一个或多个硫醇基和所选适用于与能够与那些硫醇基反应的双官能试剂反应的部分,所述双官能试剂例如碘乙酸(NHIA)或N-琥珀酰亚胺基-3-(2-吡啶基二硫代)丙酸酯(SPDP)(异双官能交联剂,其在缀合物种之间掺入二硫桥键)的N-羟基丁二酰亚胺酯。例如用间马来酰亚胺基-N-羟基琥珀酰亚胺酯达成的酰胺和硫醚键在体内一般比二硫键更稳定。

[1312] 其他适用的交联剂包括但不限于:作为一级胺的硫醇化试剂的S-乙酰硫代乙醇酸N-羟基琥珀酰亚胺酯(SATA),其允许在温和条件下使硫氢基去保护(Julian等人,《分析生物化学》1983,132:68),辛二亚氨酸二甲酯二盐酸盐和N,N'-邻苯基二马来酰亚胺。

[1313] 本发明的第二十一方面提供一种产生如本发明的第十九方面所定义的至少两种不同缀合物的组合的方法。两种不同缀合物可分别产生,且接着组合,或替代地,两种不同肽或多肽(或任一种的免疫原性片段或变体)可组合,且接着在同一反应中产生每一种的缀合物,以便产生至少两种不同缀合物的组合。

[1314] 本发明的第二十或第二十一方面的方法任选包含以下步骤:分离由此产生的缀合物或缀合物的组合;并且本发明的第二十二方面提供通过本发明的第二十或第二十一方面的任一者的方法获得或可获得的经分离缀合物或缀合物的组合,任选其中经分离缀合物经进一步配制用于向受试者施用。举例而言,其可配制用于下游用途,例如以药学或兽医学组合物形式向受体施用。

[1315] 本发明的第二十三方面提供核酸分子或多个不同核酸分子的组合,其中核酸分子包含,或多个不同核酸分子的组合共同地包含一个或多个核酸序列,该一个或多个核酸序列单独地或以组合形式编码根据本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者的一种或多种肽和/或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六方面的融合蛋白和/或根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合。

[1316] 根据本发明的第二十三方面的核酸分子或各核酸分子可例如各自独立地选自DNA或RNA分子。根据本发明的第二十三方面的核酸分子或各核酸分子可例如各自独立地选自单链或双链核酸分子。上文在本申请的部分B中所论述的选项中的每一种,在编码根据本发明的第一方面的结合分子的核酸的情况下公开于本文中,且可在细节上作必要修改后应用于根据本发明的第二十三方面的核酸分子或各核酸分子。

[1317] 本发明的第二十四方面提供一种载体,其包含根据本发明的第二十三方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合。可使用任何载体,尽管但不限于,该载体可任选自:逆转录病毒载体、质粒、慢病毒载体和腺病毒载体。上文在本申请的部分C中所论述的选项中的每一种,在并入一种或多种编码根据本发明的第一方面的结合分子的核酸的情况下公开于本文中,且可在细节上作必要修改后应用于根据本发明的第二十四方面的载体或各载体。

[1318] 本发明的第二十五方面提供一种细胞,其包含根据本发明的第二十三方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合或根据本发明的第二十四方面的载体。任选地,该细胞表达选自本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者的一种或多种肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六方面的融合蛋白和/或根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合。上文在本申请的部分D中所论述的选项中的每一者,在并入一种或多种编码根据本发明的第一方面的结合分子的核酸(或并入该一种或多种核酸的载体)的细胞的情况下公开于本文中,且可在细节上作必要修改后应用于根据本发明的第二十五方面的细胞或各细胞。

[1319] 本发明进一步提供经分离的分子群体,其用于分离和/或扩增对HCMV的US28蛋白的ECD3具有特异性的细胞(优选具有病毒株不可知的特异性),且任选其中细胞为T细胞和/或B细胞,其中经分离的分子群体包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:选自本发明的第十三和/或第十四多肽中的任一者或两者的一种或多种肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六方面的一种或多种融合

蛋白和/或根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合、根据本发明的第十八方面的一种或多种缀合物和/或根据本发明的第十九方面的至少两种不同缀合物的组合。

[1320] 本发明进一步提供一种分离和/或扩增能够特异性靶向HCMV的US28蛋白的ECD3的细胞(优选具有病毒株不可知的特异性)的方法,其中该方法包含提供细胞源,和在选择对HCMV的US28蛋白的ECD3具有特异性的细胞(且优选针对病毒株不可知的特异性进行选择)的方法中使用如前述段落中所定义的分选分子群体,和扩增所选细胞,且任选其中细胞源选自:

[1321] i. 根据本发明的各种方面中的任一者的待治疗和/或待对抗HCMV感染或与其相关的疾病或病症的受试者的细胞;

[1322] ii. 与根据本发明的各种方面中的任一者的待治疗和/或待对抗HCMV感染或与其相关的疾病或病症的受试者HLA匹配的细胞;

[1323] iii. 外周血白细胞或PBMC;和

[1324] iv. T细胞或B细胞。

[1325] 所述所选细胞可任选为:

[1326] (a) 具有T细胞受体(TcR)的T细胞,该T细胞受体对HCMV的US28蛋白的ECD3具有特异性(优选具有病毒株不可知的特异性);

[1327] (b) 具有表面结合抗体的B细胞,该表面结合抗体对HCMV的US28蛋白的ECD3具有特异性(优选具有病毒株不可知的特异性);和/或

[1328] (c) 分泌对HCMV的US28蛋白的ECD3具有特异性(优选具有病毒株不可知的特异性)的抗体的B细胞。

[1329] 本发明的第二十六方面提供一种细胞,其暴露于和/或包含选自本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者的一种或多种肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六方面的融合蛋白和/或根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合、根据本发明的第十八方面的缀合物、根据本发明的第十九方面的至少两种不同缀合物的组合、根据本发明的第二十三方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合和/或根据本发明的第二十四方面的载体。

[1330] 举例而言,细胞(或细胞群)可为抗原呈递细胞(APC)。任选地,APC选自:树突状细胞(DC)、巨噬细胞、朗格汉斯细胞(Langerhans cell)和B细胞。

[1331] 任选地,细胞(或细胞群)可经或已经以下脉冲:选自本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者的一种或多种肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六方面的融合蛋白和/或根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合、根据本发明的第十八方面的缀合物和/或根据本发明的第十九方面的至少两种不同缀合物的组合。另外或替代地,细胞(或细胞群)可表达或已表达根据本发明的第二十三方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合,和/或根据本发明的第二十四方面的载体,且由此包含由该一个或多个核酸编码的肽或多肽序列。

[1332] 任选地,细胞(如APC(例如DC))可来自根据本发明的各种方面中的任一者的待治疗和/或待对抗HCMV感染或与其相关的疾病或病症的受试者。

[1333] 任选地,DC可为单核细胞衍生DC(MoDC),且例如衍生DC的单核细胞可为来自根据

本发明的各种方面中的任一者的待治疗和/或待对抗HCMV感染或与其相关的疾病或病症的受试者的单核细胞。

[1334] 任选地,DC来自与根据本发明的各种方面中的任一者的待治疗和/或待对抗HCMV感染或与其相关的疾病或病症的受试者HLA匹配的供体。

[1335] 任选地,DC为MoDC和衍生DC的单核细胞,所述单核细胞来自与根据本发明的各种方面中的任一者的待治疗和/或待对抗HCMV感染或与其相关的疾病或病症的受试者HLA匹配的供体。

[1336] 本发明的第二十七方面提供一种分离和/或富集包含T细胞受体(TCR)的细胞的方法,该T细胞受体对US28的ECD3中的表位具有特异性(例如天然存在的T细胞,或表达根据本发明的第一方面的CAR的重组细胞,例如CAR T细胞、CAR NK细胞和/或CAR巨噬细胞),其中该方法包含使用一种或多种试剂分离和/或富集对SEQ ID NO:6和/或7的序列中的一者或两者具有结合特异性的细胞的步骤,

[1337] 其中一种或多种试剂为或选自:根据本发明的第十三和/或第十四方面中任一者或两者的肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六方面的融合蛋白和/或根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合、根据本发明的第十八方面的缀合物和/或根据本发明的第十九方面的至少两种不同缀合物的组合。

[1338] 在本发明的第二十七方面的方法的一个实施方案中,序列可以配制为MHC四聚体。

[1339] MHC四聚体已成为用于表征T细胞免疫反应的特异性和表型且因此还用于细胞重组表达T细胞受体(TCR)的重要工具,适用于多种疾病和疫苗研究。肽-MHC多聚体通常在MHC结合沟中展示抗原肽,充当作为T细胞受体与抗原呈递细胞相互作用的一部分出现的识别事件的替代物。现今,最普遍使用的多聚体形式由展示于卵白素分子上的生物素标记pMHC组成,形成四价复合体;因此此检测方法通常使用术语“四聚体”。从首次描述起,MHC四聚体已广泛用于定量抗原特异性T细胞反应。当与预测肽同MHC分子结合的方法一起使用时,四聚体分析可极其适用于鉴别T细胞受体表位。特别是,应用I类四聚体来研究自身抗原还在肿瘤抗原的研究中广泛发展。

[1340] 在某些实施方案中,根据本发明的第二十七方面,该MHC四聚体可例如为用于抗原特异性CD8⁺ T细胞检测的I类MHC四聚体、用于抗原特异性CD4⁺ T细胞检测的II类MHC四聚体或用于流式细胞术或荧光显微术的荧光团标记四聚体。

[1341] 任选地,T细胞可选自:CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、效应T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、EBV特异性T细胞受体(TCR)或 $\gamma\delta$ -T细胞亚型。

[1342] 本发明的第二十八方面提供一种MHC四聚体,其包含根据本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者的肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合,任选其中该或各肽包含或对应于SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:7或任一者或两者的免疫原性片段,例如其中该MHC四聚体为用于抗原特异性CD8⁺ T细胞检测的I类MHC四聚体、用于抗原特异性CD4⁺ T细胞检测的II类MHC四聚体、用于流式细胞术或荧光显微术的荧光团标记四聚体。MHC四聚体可进一步用于分离和/或富集包含对US28的ECD3中的表位具有特异性的T细胞受体(TCR)的细胞,例如选自以下的T细胞:CD8⁺ T细胞、CD4⁺ T细胞、效应T细胞、辅助T细胞、记忆T细胞、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、EBV特异性T细胞受体(TCR)或 $\gamma\delta$ -

T细胞亚型和/或表达根据本发明的第一方面的CAR的重组细胞,例如CAR T细胞、CAR NK细胞和/或CAR巨噬细胞。

[1343] J. 配制物

[1344] 可配制根据本发明的各种方面的产物以供进一步使用。举例而言,其可配制为药学上或兽医学上可接受的配制物。

[1345] 药学上或兽医学上可接受的配制物可以本领域已知的充分储存稳定且适用于向人和动物施用的方式制备。在一个选项中,其可以溶液(如无菌溶液)形式呈现。在另一选项中,特别是就非细胞产物的配制物而言,药学上或兽医学上可接受的配制物可例如经由冷冻干燥、喷雾干燥、喷洒冷却或经由使用由超临界颗粒形成的颗粒成型来冻干。

[1346] 此类非细胞产物可包括但不限于以下中的一种或多种:本发明的第一或第七方面的结合分子;根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合;根据本发明的第三方面的载体或多个不同载体的组合;根据本发明的第八方面的缀合物;根据本发明第十方面的经分离的缀合物;根据本发明的第十二方面提供的试剂的各种非细胞选项的非细胞试剂;选自本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者的一种或多种肽或多肽;根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六方面的融合蛋白和/或至少两种根据本发明的第十七方面的不同融合蛋白的组合、根据本发明的第十八方面的缀合物、根据本发明的第十九方面的至少两种不同缀合物的组合、根据本发明的第二十三方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合和/或根据本发明的第二十四方面的载体;根据本发明的第二十八方面的MHC四聚体;根据本发明的第二十九方面提供的各种非细胞选项的非细胞疫苗组合物。

[1347] 通过“药学上可接受的”,我们是指不降低一种或多种根据本发明的各种方面的经配制产物(包括一种或多种药学上可接受的缓冲液、载体和/或赋形剂)的有效性的无毒材料。此类药学上可接受的缓冲液、载剂或赋形剂为本领域熟知的(参见《雷明顿药物科学》,第18版,A.R Gennaro编,马克出版公司(Mack Publishing Company)(1990)和《药物赋形剂(Pharmaceutical Excipients)》手册,第3版,A.Kibbe编,英国医药出版社(Pharmaceutical Press)(2000))。

[1348] 术语“缓冲液”旨在指含有酸碱混合物的水溶液,其目的为稳定pH。缓冲液的实例为Trizma、二甘氨酸、麦黄酮、MOPS、MOPSO、MOBS、Tris、Hepes、HEPBS、MES、磷酸盐、碳酸盐、乙酸盐、柠檬酸盐、羟乙酸盐、乳酸盐、硼酸盐、ACES、ADA、酒石酸盐、AMP、AMPD、AMPSO、BES、CABS、二甲胍酸盐、CHES、DIPSO、EPPS、乙醇胺、甘氨酸、HEPPSO、咪唑、咪唑乳酸、PIPES、SSC、SSPE、POPSO、TAPS、TABS、TAPSO和TES。

[1349] 术语“稀释剂”旨在指水性或非水性溶液,其目的为稀释药物制剂中的多肽。稀释剂可例如为生理食盐水、水、聚乙二醇、丙二醇、乙醇或油(如红花油、玉米油、花生油、棉籽油或芝麻油)中的一种或多种。

[1350] 任选地,药学上或兽医学上可接受的配制物可包含辅助剂。术语“辅助剂”旨在指添加至配制物中以增加配制物内的一种或多种本发明的产物的生物学作用的任何化合物。辅助剂可为具有不同阴离子的锌、铜或银盐中的一种或多种,所述阴离子例如但不限于不同酰基组合物的氟离子、氯离子、溴离子、碘离子、氰酸根、亚硫酸根、氢氧根、磷酸根、碳酸根、乳酸根、乙醇酸根、柠檬酸根、硼酸根、酒石酸根和乙酸根。辅助剂还可为阳离子聚合物,

如阳离子纤维素醚；阳离子纤维素酯；去乙酰化玻尿酸；壳聚糖；阳离子树枝状聚合物；阳离子合成聚合物，如聚（乙烯基咪唑）；和阳离子多肽，如聚组氨酸、聚赖氨酸、聚精氨酸和含有这些氨基酸的肽。

[1351] 赋形剂可为碳水化合物、聚合物、脂质和矿物质中的一种或多种。碳水化合物的实例包括乳糖、葡萄糖、蔗糖、甘露醇和环糊精，其添加至组合物中例如用于促进冻干。聚合物的实例为淀粉、纤维素醚、羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、乙基羟乙基纤维素、海藻酸盐、卡拉胶、玻尿酸及其衍生物、聚丙烯酸、聚磺酸盐、聚乙二醇/聚氧化乙烯、聚氧化乙烯/聚氧化丙烯共聚物、不同水解程度的聚乙烯醇/聚乙酸乙烯酯和聚乙烯吡咯烷酮，其均为不同分子量，均添加至配制物中，例如用于黏度控制，用于达成生物黏附或用于保护脂质免受化学和蛋白质降解。脂质的实例为脂肪酸、磷脂、单酸甘油酯、双酸甘油酯以及三酸甘油酯、神经酰胺、鞘脂和糖脂，其均具有不同酰基链长和饱和度；蛋黄卵磷脂、大豆卵磷脂、氢化蛋黄卵磷脂和大豆卵磷脂，出于与那些聚合物类似的原因添加至该组合物中。矿物质的实例为滑石、氧化镁、氧化锌和氧化钛，其添加至组合物中以获得如减少液体积聚或有利色素特性的益处。

[1352] 在本发明的医疗用途的一个实施方案中，配制物还可包含至少一种其他治疗剂（例如抗癌剂和/或抗血管生成化合物，其实例在本申请的部分H中论述）。

[1353] 在一个实施方案中，本发明的药物组合物可呈脂质体形式，其中除了其他药学上可接受的载体之外，根据本发明的各种方面的一种或多种产物（下文中称为“活性剂”）可与两亲性试剂（如脂质）组合配制，所述两亲性试剂作为微泡、不可溶单层和液晶以聚集形式存在。脂质体制制物的适合脂质包括但不限于单酸甘油酯、二酸甘油酯、硫酸脑苷脂、溶血卵磷脂、磷脂、皂苷、胆酸及其类似物。适合的脂质还包括极性头基中通过聚（乙二醇）修饰以用于延长血流循环时间的上述脂质。此类脂质体制制物的制备可见于例如US 4,235,871中。

[1354] 本发明的药物组合物还可呈可生物降解微球体形式。脂族聚酯，如聚（乳酸）（PLA）、聚（乙醇酸）（PGA）、PLA和PGA的共聚物（PLGA）或聚（己内酯）（PCL）和聚酸酐，已广泛用作微球体生产中的可生物降解聚合物。此类微球体的制备可见于US 5,851,451和EP 0 213 303中。

[1355] 在另一实施方案中，本发明的药物组合物以聚合物凝胶形式提供，其中聚合物用于增稠含有该试剂的溶液，所述聚合物如淀粉、纤维素醚、羧甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羟乙基纤维素、乙基羟乙基纤维素、海藻酸盐、卡拉胶、玻尿酸及其衍生物、聚丙烯酸、聚乙烯咪唑、聚磺酸盐、聚乙二醇/聚氧化乙烯、聚氧化乙烯/聚氧化丙烯共聚物、不同水解程度的聚乙烯醇/聚乙酸乙烯酯和聚乙烯吡咯烷酮。聚合物还可包含明胶或胶原蛋白。

[1356] 替代地，活性剂可简单地溶解于生理盐水、水、聚乙二醇、丙二醇、乙醇或油（如红花油、玉米油、花生油、棉籽油或芝麻油）、黄耆胶和/或各种缓冲液中。

[1357] 将了解，本发明的药物组合物可包括用于强化活性多肽的作用的离子和界定pH。另外，组合物可经受常规医药操作，如灭菌和/或可含有常规辅助剂，如防腐剂、稳定剂、湿润剂、乳化剂、缓冲液、填充剂等。

[1358] 适于肠胃外施用的配制物包括可含有抗氧化剂、缓冲液、抑菌剂和使配制物与预期受体血液等张的溶质的水性和非水性无菌注射溶液；和可包括悬浮剂和增稠剂的水性和

非水性无菌悬浮液。

[1359] 在一替代的优选实施方案中,医药组合物适用于向患者局部施用。

[1360] 优选地,配制物为单位剂量,其含有每日剂量或单位剂量、每日次剂量或其适当部分的活性成分。

[1361] 将了解,在以下所描述的施用途径中,本领域技术人员应知晓哪些活性剂适用于任何给定施用途径。

[1362] 活性剂可以药学上可接受的剂型,以包含任选呈无毒有机或无机、酸或碱加成盐形式的活性成分的药物配制物形式口服或通过任何肠胃外途径施用。取决于待治疗的病症和患者以及施用途径,组合物可以不同剂量施用。

[1363] 在人疗法中,活性剂将一般与就预期施用途径和标准药学实践选择的适合的药物赋形剂、稀释剂或载剂混合施用。

[1364] 举例而言,活性剂可以片剂、胶囊、卵形栓剂、酏剂、溶液或悬浮液形式口服、颊内或舌下施用,其可含有调味剂或着色剂,用于立即、延迟或控制释放应用。活性剂还可经由肝内注射施用。

[1365] 适合的片剂可含有赋形剂,如微晶纤维素、乳糖、柠檬酸钠、碳酸钙、磷酸氢二钙和甘氨酸;崩解剂,如淀粉(优选玉米、马铃薯或木薯淀粉)、羟基乙酸淀粉钠、交联羧甲基纤维素钠和某些复合硅酸盐;和粒化黏合剂,如聚乙烯吡咯烷酮、羟丙基甲基纤维素(HPMC)、羟丙基纤维素(HPC)、蔗糖、明胶和阿拉伯胶。另外,可包括润滑剂,如硬脂酸镁、硬脂酸、甘油二十二烷酸酯和滑石。

[1366] 类似类型的固体组合物还可作为填料以明胶胶囊形式使用。在此方面优选的赋形剂包括乳糖、淀粉、纤维素、奶糖或高分子量聚乙二醇。对于水性悬浮液和/或酏剂而言,本发明的化合物可与各种甜味剂或调味剂、着色物质或染料、与乳化剂和/或悬浮剂和与稀释剂(如水、乙醇、丙二醇和甘油及其组合)组合。

[1367] 活性剂还可肠胃外施用,例如静脉内、动脉内、腹膜内、鞘内、脑室内、胸骨内、颅内、肌内或皮下施用,或其可通过输注技术施用。其最佳以无菌水溶液形式使用,该无菌水溶液可含有其他物质,例如含有足够盐或葡萄糖以使溶液与血液具有等张性。必要时,应适当地缓冲水溶液(优选达pH 3至9)。在无菌条件下制备适合的肠胃外配制物易于通过本领域技术人员所熟知的标准医药技术来实现。

[1368] 配制物可存于单位剂量或多剂量容器(例如密封安瓿和小瓶)中,且可储存于冷冻干燥(冻干)的条件下,仅需要在即将使用之前添加用于注射的无菌液体载体,例如水。即用型注射溶液和悬浮液可由前述种类的无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[1369] 对于向人患者口服和肠胃外施用,活性剂的日剂量通常将为以单次或分次剂量施用,每个成人1至1000mg(即约0.015至15mg/kg)。

[1370] 因此,举例而言,具有活性剂的片剂或胶囊可含有1mg至1000mg活性剂,以按需要每次施用一份或两份或更多份。在任何情况下,医师会确定将最适于任何个别患者的实际剂量,且其将随特定患者的年龄、体重和反应而变化。上述剂量为一般情况的示例。当然,可存在值得较高或较低剂量范围的个别情况,且此类情况在本发明的范畴内。

[1371] 活性剂还可鼻内或通过吸入施用,且宜以干粉吸入器或使用适合的推进剂(例如二氯二氟甲烷、三氯氟甲烷、二氯四氟乙烷、氢氟烷烃,如1,1,1,2-四氟乙烷(HFA 134A3)或

1,1,1,2,3,3,3-七氟丙烷(HFA 227EA3)、二氧化碳或其他适合的气体)自加压容器、泵、喷雾或喷雾器的气溶胶喷雾呈递形式递送。在加压气雾剂的情况下,剂量单位可通过提供递送计量的量的阀来确定。经加压的容器、泵、喷雾或喷雾器可含有活性化合物的溶液或悬浮液,例如使用乙醇与推进剂的混合物作为溶剂,该溶剂可额外含有润滑剂,例如脱水山梨糖醇三油酸酯。可配制含有活性剂与如乳糖或淀粉的适合粉末基质的粉末混合物的胶囊和药筒(例如由明胶制成)用于吸入器或吹入器中。此类配制物可尤其适用于治疗肺实体肿瘤,如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、胸膜肺母细胞瘤或类癌瘤。

[1372] 优选配置气溶胶或干粉配制物,使得各定量剂量或“一喷”含有有效量(例如至少1mg)的活性剂以递送至受试者。将了解,气溶胶的总体日剂量将因患者而不同,且可在一日中以单次剂量或更通常以分次剂量施用。

[1373] 替代地,活性剂可以栓剂或阴道栓剂形式施用,尤其用于治疗或靶向结肠、直肠或前列腺肿瘤。

[1374] 活性剂还可通过眼部途径施用。对于眼科用途,活性剂可配制为例如等张微粉化悬浮液,pH经调节;无菌生理盐水或优选呈等张溶液形式,pH经调节;无菌生理盐水,任选与如苯扎氯铵的防腐剂组合。替代地,活性剂可配制在如石蜡脂的软膏中。此类配制物可尤其适用于治疗眼睛的实体肿瘤,如视网膜母细胞瘤、髓上皮瘤、葡萄膜黑色素瘤、横纹肌肉瘤、眼内淋巴瘤或眼眶淋巴瘤。

[1375] 活性剂可以洗剂、溶液、乳膏、软膏或粉剂形式局部应用,或可例如通过使用皮肤贴片来经皮施用。对于局部应用于皮肤,活性剂可配制为含有悬浮或溶解于例如与以下中的一种或多种的混合物中的活性化合物的适合软膏:矿物油、液体石蜡脂、白石蜡脂、丙二醇、聚氧乙烯聚氧丙烯化合物、乳化蜡和水。替代地,其可配制成适合的洗剂或乳膏,其悬浮或溶解于例如以下中的一种或多种的混合物中:矿物油、脱水山梨糖醇单硬脂酸酯、聚乙二醇、液体石蜡、聚山梨醇酯60、十六酯蜡、十六醇十八醇、2-辛基十二醇、苧醇和水。此类配制物可尤其适用于治疗皮肤的实体肿瘤,如基底细胞癌、鳞状细胞癌或黑色素瘤。

[1376] 对于皮肤癌,活性剂还可通过电掺入(electroincorporation,EI)递送。EI在皮肤表面上直径至多30微米的小粒子经受与电穿孔中使用的那些相同或类似的电脉冲时发生。在EI中,这些粒子经由角质层驱动且进入皮肤的更深层。颗粒可负载或包被有抑制剂,或可简单地充当在皮肤中产生孔隙使试剂、抗体或化合物可经由其进入的“子弹”。

[1377] 适合于在口中局部施用的配制物包括在调味基剂(通常为蔗糖和阿拉伯胶或黄蓍胶)中包含活性成分的锭剂;在惰性基剂(如明胶和甘油、或蔗糖和阿拉伯胶)中包含活性成分的含片;以及在适合液体载剂中包含活性成分的漱口水。此类配制物可特别适用于治疗口腔和咽喉的实体肿瘤。

[1378] 在一个实施方案中,当活性剂包含多肽、基本上由其组成或由其组成时,则活性剂可使用可注射的持续释放药物递送系统递送。这些经特定设计以降低注射频率。此类系统的实例为Nutropin Depot,其将重组人生长激素(rhGH)包封于可生物降解微球体中,在注射后,在一段持续时间内缓慢释放rhGH。

[1379] 活性剂可通过以手术方式植入的装置施用,该装置直接将活性剂释放至所需部位,例如释放至眼中以治疗眼部肿瘤。此类向疾病部位的直接施加实现有效疗法而无显著全身性副作用。

[1380] 用于递送活性剂(其包含如抗体和CAR的多肽、基本上由其组成或由其组成)的替代方法为热敏性ReGel可注射系统。ReGel为低于体温的可注射液体,而在体温下其立即形成凝胶库,缓慢腐蚀并溶解于已知的安全可生物降解的聚合物中。随着生物聚合物溶解,随时间推移递送活性药物。

[1381] 多肽活性剂还可口服递送。该方法采用口服摄取维生素B₁₂入体内以共递送蛋白质和肽的自然过程。通过利用维生素B₁₂吸收系统,蛋白质或肽活性剂可移动穿过肠壁。复合物由维生素B₁₂类似物与药物合成,其保持复合物的维生素B₁₂部分的内因子(IF)的显著亲和力和复合物的药物部分的显著生物活性。

[1382] 核酸活性剂可作为如本文所述的适合基因构建体施用并递送至受试者用于表达。通常,基因构建体中的核酸可操作地连接于启动子,该启动子可在细胞中表达化合物。本发明的基因构建体可使用本领域熟知的方法制备,例如Sambrook等人(2012)《分子克隆:实验室手册》,第1-4卷,Cold Spring Harbor Press, NY。

[1383] 优选地,将基因构建体调整为用于递送至人细胞。将基因构建体引入细胞中的手段和方法为本领域已知,且包括使用免疫脂质体、脂质体、病毒载体(包括牛痘、经修饰牛痘、慢病毒、细小病毒、逆转录病毒、腺病毒和腺相关病毒(AAV)载体),和通过DNA的直接递送,例如使用基因枪和电穿孔。此外,将多核苷酸递送至患者的靶点组织进行治疗的方法也为本领域熟知的。在替代方法中,采用使用受体介导的内吞作用将DNA大分子携带至细胞中的高效率核酸递送系统。这通过使铁转运蛋白(运铁蛋白)与结合核酸的聚阳离子结合来实现。还可使用本发明的DNA构建体或其他基因构建体的高效受体介导的递送,使用通过Cotten等人(1992)《美国国家科学院院刊》89,6094-6098的方法产生的缺陷性或化学不活化的腺病毒粒子的胞内体破坏活性。将了解,“裸DNA”和与阳离子和中性脂质复合的DNA还可适用于将本发明的DNA引入待处理的受试者的细胞中。基因疗法的非病毒方法描述于Ledley(1995,《人基因疗法(Human Gene Therapy)》6,1129-1144)中。

[1384] 尽管对于特定组织的癌症/肿瘤,在编码本发明的核酸分子的载体中使用组织特异性启动子可能有用,但这并非必需的,因为相较于对于患有癌症/肿瘤的治疗益处,期望在体内除了癌症/肿瘤以外的位置表达核酸序列的风险为可耐受的。

[1385] 在一个实施方案中,本发明的药物组合物或配制物用于肠胃外施用,更特别是用于静脉内施用。在一个优选的实施方案中,药物组合物适用于例如通过注射向患者静脉内施用。在其他实施方案中,可使用盲肠内施用例如以靶向大脑和/或神经系统。

[1386] K. 疫苗

[1387] 本发明的第二十九方面提供适用于针对HCMV感染经和/或与人巨细胞病毒(HCMV)相关的疾病或病症进行接种疫苗、降低该疾病或病症的风险、预防该疾病或病症或对抗该疾病或病症的疫苗组合物。该HCMV感染和/或与人巨细胞病毒(HCMV)相关的疾病或病症可如本申请的部分G中所定义。

[1388] 疫苗可包含主动疫苗和/或被动疫苗的组分。主动疫苗组分经设计以引起自动免疫;而被动疫苗组分经设计以提供被动免疫。

[1389] 当施用于受试者时,根据本发明的第二十九方面的主动疫苗可诱导受试者的免疫系统产生针对存在于HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位的免疫反应,优选为病毒株不可知的免疫反应。

[1390] 根据本发明的第二十九方面的被动疫苗可为如下组合物,其在施用于受试者时提供针对存在于HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位的免疫系统能力,优选为病毒株不可知的免疫系统能力。

[1391] 在一些实施方案中,本发明的第二十九方面的疫苗组合物针对以下触发和/或提供免疫反应:

[1392] (a)全部存在于HCMV的US28蛋白的细胞外结构域3(ECD3)内的一个或多个表位(例如存在于SEQ ID No:6或7的免疫原性片段中的一种或多种中的表位,如根据本发明的第十三和/或第十四方面所描述);

[1393] (b)US28蛋白的ECD3内的一个或多个线性表位;

[1394] (c)HCMV的US28蛋白的ECD3内的一个或多个表位,其为以相同形式存在于HCMV的所述4D变异株和所述4N变异株两者中的一个表位或多个表位,其中HCMV的该4D变异株编码包含具有TKKDNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:7)的序列的ECD3的US28蛋白,且其中HCMV的该4N变异株编码包含具有TKKNNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:6)的序列的ECD3的US28蛋白;和/或

[1395] (d)其中由该疫苗触发或提供的该免疫反应对HCMV的所述4D变异株和所述4N变异株为HCMV病毒株不可知的,且触发和/或提供针对选自Towne、VR1814、TB40/E、Merlin、JP、Ad169、VHL/E、AF1、BL和DAVIS的所述4D变异HCMV病毒株中的一种或多种以及针对选自Toledo、TR和DB的所述4N变异HCMV病毒株中的一种或多种的免疫反应。

[1396] 该疫苗组合物可为被动疫苗,和/或任选包含:(a)根据本发明的第一方面的一个或多个结合分子,(b)如本发明的第一方面所定义的该一个或多个结合分子的功能片段,(c)根据本发明的第七方面的一个或多个经分离的结合分子,(d)根据本发明的第二方面的一个或多个核酸分子或多个不同核酸分子的组合;(e)根据本发明的第三方面的一种或多种载体;(f)根据本发明的第四方面的一种或多种细胞;(g)根据本发明的第八方面的一种或多种缀合物;和/或(h)根据本发明的第十方面的一种或多种经分离的缀合物。

[1397] 替代地,该疫苗组合物可为主动疫苗,和/或任选包含:

[1398] (a)根据本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者的一种或多种肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六方面的融合蛋白、根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合、根据本发明的第十八方面的缀合物和/或根据本发明的第十九方面的至少两种不同缀合物的组合;

[1399] (b)根据本发明的第二十三方面的一个或多个核酸分子或多个不同核酸分子的组合和/或根据本发明的第二十四方面的载体;和/或

[1400] (c)细胞,如抗原呈递细胞(例如树突状细胞),或所述细胞的均质或异质群体,其中所述细胞或所述细胞中的每一个负载有以下中的一种或多种:根据本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者的肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六方面的融合蛋白、根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合、根据本发明的第十八方面的缀合物、根据本发明的第十九方面的至少两种不同缀合物的组合、根据本发明的第二十三方面的一个或多个核酸分子或多个不同核酸分子的组合和/或根据本发明的第二十四方面的载体。

[1401] 本发明的第三十方面提供一种针对与HCMV有关的疾病或病症进行疫苗接种、降低该疾病或病症的风险、预防该疾病或病症和/或对抗该疾病或病症的方法,该方法包括向受

试者施用根据本发明的第二十九方面的疫苗。

[1402] 本发明的第三十方面提供根据本发明的第二十九方面的疫苗,其用于针对受试者的与HCMV有关的疾病或病症进行疫苗接种、降低该疾病或病症的风险、预防该疾病或病症和/或对抗该疾病或病症。

[1403] 本发明的第三十方面提供根据本发明的第二十九方面的疫苗的用途,其用于制造供针对与HCMV有关的疾病或病症进行疫苗接种、降低该疾病或病症的风险、预防该疾病或病症和/或对抗该疾病或病症用的药物。

[1404] 与HCMV相关的该疾病或病症可例如为如上文在本发明第十一方面的情况下所公开的与HCMV相关的疾病或病症。任选地,疾病或病症为潜伏HCMV感染,或与潜伏HCMV感染相关的疾病或病症。

[1405] 在一些实施方案中,针对与HCMV有关的疾病或病症进行疫苗接种、降低该疾病或病症的风险、预防该疾病或病症和/或对抗该疾病或病症的方法可包括仅向受试者施用疫苗一次。

[1406] 在其他实施方案中,针对与HCMV有关的疾病或病症进行疫苗接种、降低该疾病或病症的风险、预防该疾病或病症和/或对抗该疾病或病症的方法可包括向受试者施用疫苗两次或多次。举例而言,在其中疫苗为主动疫苗的实施方案中,可适于向受试者分开施用初始剂量和后续加强剂量。

[1407] L. 诊断和其他检测和评定模式

[1408] 如本申请的发明内容部分中所论述,本发明的第三十一方面提供一种评定受试者和/或离体生物材料的一种或多种生物条件和/或生物特征的方法。

[1409] 所述方法利用根据本发明的结合分子或其缀合物的结合特征,以高度特异性结合至US28蛋白的ECD3,且优选以高度特异性结合但不区分HCMV的不同病毒株。

[1410] 该方法包含:(a)使受试者和/或离体生物材料与如本发明的第一方面所定义的结合分子或如本发明的第八或第十方面所定义的缀合物接触;和(b)基于结合分子或缀合物与受试者和/或离体生物材料的结合的直接和/或间接测量来评定受试者和/或离体生物材料。

[1411] 任何适合的方法均可用于评定。举例而言且非限制性地,方法可包含ELISA法,且任选地,该方法对离体生物材料(如一种或多种体液(例如,血液、唾液、尿液))进行。

[1412] 在一替代实施方案中,该方法包括流式细胞术方法,且任选该方法为用于评定来自受试者的离体血液样品和/或离体骨髓样品的方法。

[1413] 在另一替代实施方案中,该方法包括使用如由本发明的第八或第十方面定义的缀合物,其中缀合物包含可检测部分,如放射性部分,且该方法包括检测受试者和/或离体生物材料中的可检测部分,例如其中该方法为免疫正电子发射(PET)的方法。

[1414] 在另一替代实施方案中,该方法为免疫组织化学(IHC)方法,例如对离体生物材料样品进行的IHC。该样品可例如为来自获自受试者或其他相关生物学来源的生物材料的组织学样品。本领域技术人员十分了解用于自生物材料制备组织学样品的本领域熟知的许多技术。在本发明的情况下,可使用用于制备组织学样品的任何适合方式。

[1415] 在一个实施方案中,出于产生适合于对受试者中的HCMV感染和/或与HCMV相关的疾病或病症进行诊断或预后评定的数据(如影像或其他可测量数据)的目的,对受试者或对

获自受试者的离体生物材料执行本发明的第三十一方面的方法。

[1416] 通过本发明的第三十一方面的方法可进行诊断或预后评定(或可由此产生相关数据)的该HCMV感染和/或与HCMV相关的疾病或病症可例如由本申请的部分G中所定义。

[1417] 通过本发明的第三十一方面的方法可进行诊断或预后评定(或可由此产生相关数据)的受试者可例如为由本申请的部分G中所述的任何受试者。

[1418] 通过本发明的第三十一方面的方法可进行诊断或预后评定(或可由此产生相关数据)的与HCMV相关的疾病或病症可为HCMV感染或与HCMV感染相关。

[1419] 在一个实施方案中,HCMV感染可为单株感染。

[1420] 任选地,在一个替代实施方案中,HCMV感染包含多株HCMV感染,其中多株HCMV感染包含用多于一个不同HCMV病毒株(例如编码不同US28蛋白编码序列的两个或更多个HCMV病毒株)感染。该两个或更多个病毒株可编码US28蛋白,所述蛋白在胞外区,如N-末端(ECD1)区、第一胞外环(ECD2)区、第二胞外环(ECD3)区和/或第三胞外环(ECD4)区中的一个或多个上不同。在一个感兴趣的实施方案中,多株HCMV感染中的两个或更多个HCMV病毒株各自编码至少在N-末端(ECD1)区的一个或多个位置上彼此不同的US28蛋白;例如其在N-末端(ECD1)区中的1、2、3、4、5、6、8、9、10或更多个氨基酸位置处可不同。另外或替代地,在另一感兴趣的实施方案中,多株HCMV感染中的两个或更多个HCMV病毒株各自编码在第二胞外(ECD3)区的一个或多个位置处彼此不同的US28蛋白,例如,HCMV病毒株中的一种或多种在多株HCMV感染中可编码如下US28蛋白,该蛋白质编码ECD3的4N变体,且其他HCMV病毒株中的一种或多种在多株HCMV感染中可编码如下US28蛋白,该蛋白质编码ECD3的4D变体。

[1421] 通过本发明的第三十一方面的方法可进行诊断或预后评定(或可由此产生相关数据)的与HCMV相关的疾病或病症可为潜伏HCMV感染(例如单株或多株潜伏HCMV感染)或与潜伏HCMV感染(任选多株潜伏HCMV感染)相关。

[1422] 通过本发明的第三十一方面的方法可进行诊断或预后评定(或可由此产生相关数据)的与HCMV相关的疾病或病症可为裂解HCMV感染(任选多株裂解HCMV感染)或与裂解HCMV感染(任选多株裂解HCMV感染)相关。

[1423] 通过本发明的第三十一方面的方法可进行诊断或预后评定(或可由此产生相关数据)的与HCMV相关的疾病或病症可为先天性HCMV感染(例如单株或多株感染),如潜伏先天性单株或多株HCMV感染或裂解先天性单株或多株HCMV感染。因此,具有此类评定的受试者可为疾病或病症尚待评定的受试者,如婴儿(如新生儿)、胎儿或胚胎,或母亲(或受试者的预期母亲),如受试者的哺乳母亲、怀有受试者的女性或在怀有个体之前待评定的女性。

[1424] 通过本发明的第三十一方面的方法可进行诊断或预后评定(或可由此产生相关数据)的与HCMV相关的疾病或病症可为癌症,例如感染HCMV的癌症(任选单株或多株HCMV感染癌症),如潜伏HCMV感染癌症(任选单株或多株潜伏HCMV感染癌症)。

[1425] 通过本发明的第三十一方面的方法可进行诊断或预后评定(或可由此产生相关数据)的与HCMV相关的疾病或病症可为上皮癌;任选其中该上皮癌为乳腺癌;例如其中该乳腺癌为三阴性乳腺癌(TNBC)或HER2阳性乳腺癌(如本文所描述)。该形式的上皮癌可任选为单株或多株形式的HCMV感染上皮癌,例如潜伏HCMV感染形式的上皮癌(任选单株或多株潜伏HCMV感染癌症)。

[1426] 通过本发明的第三十一方面的方法可进行诊断或预后评定(或可由此产生相关数

据)的与HCMV相关的疾病或病症可为转移性和/或侵袭性形式的癌症。所述形式的转移和/或侵袭癌症可任选为单株或多株形式的HCMV感染的转移和/或侵袭癌症,例如潜伏HCMV感染形式的转移和/或侵袭癌症(任选单株或多株潜伏HCMV感染癌症)。

[1427] 通过本发明的第三十一方面的方法可进行诊断或预后评定(或可由此产生相关数据)的与HCMV相关的疾病或病症可为胶质母细胞瘤。

[1428] 通过本发明的第三十一方面的方法可进行诊断或预后评定(或可由此产生相关数据)的与HCMV相关的疾病或病症可发生在受试者或自受试者获得的离体生物材料中,其已经诊断患有或具有或疑似患有HCMV感染癌细胞,如潜伏HCMV感染癌细胞。

[1429] 通过本发明的第三十一方面的方法可进行诊断或预后评定(或可由此产生相关数据)的与HCMV相关的疾病或病症可为或旨在为细胞物质(如细胞产物捐献)的受体。该细胞产物可例如包含离体活细胞物质、基本上由其组成或由其组成,该离体活细胞物质选自:一种或多种类型的离体细胞;一种或多种类型的离体细胞培养物;一种或多种类型的离体组织;一种或多种类型的离体组织培养物;一种或多种类型的离体器官;和/或一种或多种类型的离体器官培养物。任选地,细胞产物可直接或间接来源于活的供体。

[1430] 通过本发明的第三十一方面的方法可进行诊断或预后评定(或可由此产生相关数据)的与HCMV相关的疾病或病症可对受试者评定,该受试者为或旨在为细胞物质的供体,如细胞产物的供体;或来自所述供体的离体生物材料。所述细胞产物可包含来自该供体的细胞、组织或器官中的任何一个或多个、基本上由其组成或由其组成。

[1431] 通过本发明的第三十一方面的方法可进行诊断或预后评定(或可由此产生相关数据)的与HCMV相关的疾病或病症可对生物材料进行,如离体或体外细胞物质,如适合于和/或待用于向受体受试者施用的生物材料。该离体细胞产物可例如包含离体活细胞物质、基本上由其组成或由其组成,该离体活细胞物质选自:一种或多种类型的离体细胞;一种或多种类型的离体细胞培养物;一种或多种类型的离体组织;一种或多种类型的离体组织培养物;一种或多种类型的离体器官;和/或一种或多种类型的离体器官培养物。任选地,细胞产物可直接或间接来源于活的供体。

[1432] 本文还提供一种试剂盒,如诊断试剂盒,其包含一种或多种上文在此部分中所论述的组分,该一种或多种组分例如呈适用于使用(或能够转化为适用于使用的形式,例如通过对所储存形式进行复原或其他简单处理)的形式存在于该试剂盒内,具有根据本发明的第三十一方面评定受试者和/或离体生物材料的一种或多种生物条件和/或生物特征的效能。

[1433] M. 离体材料的处理

[1434] 如上所述,HCMV传输至受试者的一些途径可为经由与来自感染个人或来自任何其他感染源的离体生物材料接触。实例包括向该受试者中植入或移植离体生物材料(如器官、组织、骨髓或干细胞移植)或输血。

[1435] 因此,本发明的第三十二方面提供一种对抗离体活生物材料中的HCMV感染(如潜伏HCMV感染和/或裂解HCMV感染和/或多株HCMV感染)的方法,该方法包括使离体活生物材料与选自以下的任何一种或多种试剂接触:

[1436] i. 根据本发明的第一方面的结合分子,

[1437] ii. 如本发明的第一方面所定义的该结合分子的功能片段,

[1438] iii.根据本发明的第七方面的经分离的结合分子，
[1439] iv.根据本发明的第二方面的核酸分子或多个不同核酸分子的组合，
[1440] v.根据本发明的第三方面的载体，
[1441] vi.根据本发明的第五方面的细胞，
[1442] vii.根据本发明的第八方面的缀合物，和
[1443] viii.根据本发明的第十方面的经分离的缀合物。
[1444] 本发明的第三十二方面还提供通过此方面的方法获得或可通过其获得的活的离体生物材料。

[1445] 在本发明的第三十二方面的方法和/或由此获得或可由此获得的活的离体生物材料的一个实施方案中，该离体活生物材料包含选自以下的活的离体生物材料、基本上由其组成或由其组成：一种或多种类型的离体细胞；一种或多种类型的离体细胞培养物；一种或多种类型的离体组织；一种或多种类型的离体组织培养物；一种或多种类型的离体类器官；一种或多种类型的离体类器官培养物；一种或多种类型的离体器官；和/或一种或多种类型的离体器官培养物。示例性实施方案包括器官移植、组织移植、骨髓移植、干细胞移植和/或输血。

[1446] 本发明的第三十三方面提供一种治疗有需要的受试者(即需要移植或植入该离体活生物材料的受试者)的方法，其包括向受试者施用如本发明的第三十二方面所定义的离体活生物材料。

[1447] 举例而言，该方法可为移植离体活生物材料的方法，如器官移植或组织移植。该方法可用于预防移植受体的HCMV传播和感染，或与HCMV感染相关的疾病或病症，或降低其风险。

[1448] 根据本发明的第三十三方面的待处理的受试者可例如为如本申请的G部分中所述的任何受试者。

[1449] 根据本发明的第三十三方面的与HCMV相关的疾病或病症可例如为如在本申请的部分G中所描述的HCMV感染或与HCMV感染相关的疾病或病症的任何形式。

[1450] N. 筛选结合分子的方法

[1451] 如本申请的实施例中所述，本申请人已通过聚焦于培养与HCMV US28的ECD3区内的表位结合的结合分子，研发了一种鉴别针对HCMV US28蛋白的高度特异性、病毒株不可知的结合分子的新颖方法。如本申请的实施例中所述，由此方法产生的单克隆抗体展示结合良好且特别是在US28 ECD3肽的两种基因变体上的结合良好，由此证实特异性和病毒株不可知的结合特性，且进一步证实在以下上的特异性结合：US28过度表达US28-CHO-A1细胞、经HCMV Ad169感染的MRC-5细胞、来自HCMV血清反应呈阳性的受试者的原代PBMC、HCMV感染人肺组织和数种类型的侵袭性人肿瘤，如食道癌、胃癌、肝癌、肺癌、胰腺癌、宫颈癌、恶性嗜铬细胞瘤和局部晚期结肠癌、乳腺癌及其转移瘤和胶质母细胞瘤4级。

[1452] 本申请人的方法使用US28的ECD3中的氨基酸变化的经鉴别单一位点，利用经选择以引起免疫反应的肽的组合，且产生并分离对US28的ECD3具有病毒株不可知的结合特异性的抗体。此方法可用于产生并鉴别其他具有本发明的有利结合特性的此类结合分子。

[1453] 因此，本发明的第三十四方面提供一种筛选对人巨细胞病毒(HCMV)的US28蛋白的胞外结构域3(ECD3)内的表位具有结合特异性和/或结合亲和力的结合分子的方法，该方法

包括：

[1454] (a) 提供一种或多种肽，其对应于US28蛋白的ECD3中存在的氨基酸序列，

[1455] (b) 提供一种或多种候选结合分子；

[1456] (c) 测定一种或多种候选结合分子对该一种或多种肽的结合特异性和/或结合亲和力和。

[1457] 任选地，步骤(a)中所提供的一种或多种肽或每一种以以下形式提供：根据本发明的第十三和/或第十四方面中的任一者或两者的一种或多种肽或多肽、根据本发明的第十五方面的至少两种不同肽和/或多肽的组合、根据本发明的第十六方面的融合蛋白、根据本发明的第十七方面的至少两种不同融合蛋白的组合、根据本发明的第十八方面的缀合物、根据本发明的第十九方面的至少两种不同缀合物的组合。

[1458] 任选地，该一种或多种肽或其各自包含以下、基本上由以下组成或由以下组成：多肽序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) 和/或TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6) 和/或任一者或两者的免疫原性片段。

[1459] 任选地，一种或多种候选结合分子可为抗体和/或CAR，如以下中的任何一个或多个：

[1460] (a) 二价抗体，如IgG-scFv抗体（例如，其中第一结合结构域为完整IgG，且第二结合结构域为scFv，该scFv在IgG的轻链的N-末端和/或在轻链的C-末端和/或在重链的N-末端和/或在重链的C-末端处附接至该第一结合结构域，或反之亦然）；

[1461] (b) 单价抗体，如 *DuoBody*[®] 或”白包杵”双特异性抗体（例如scFv-KIH、scFv-KIH^r、BiTE-KIH或BiTE-KIH^r；

[1462] (c) scFv₂-Fc抗体；

[1463] (d) 双特异性抗体，如双特异性T细胞接合子 (BiTE) 抗体；

[1464] (e) 双重可变结构域 (DVD) - Ig抗体；

[1465] (f) 基于双亲和力再靶向 (DART) 的抗体（例如，DART₂-Fc或DART）；

[1466] (g) 三特异性抗体，如DNL-Fab₃抗体；

[1467] (h) scFv-HSA-scFv抗体；和

[1468] (i) 嵌合抗原受体 (CAR)。

[1469] 本发明的第三十四方面的方法可包括基于对一种或多种肽的结合特异性和/或结合亲和力选择候选结合分子的步骤。举例而言，所选候选结合分子：

[1470] (a) 可对完全存在于HCMV的该US28蛋白的胞外结构域3 (ECD3) 内的表位具有结合特异性；

[1471] (b) 可对该US28蛋白的ECD3内的线性表位具有结合特异性；

[1472] (c) 可对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有HCMV病毒株不可知的结合特异性，例如对HCMV的US28蛋白的ECD3内的表位具有结合特异性，该结合特异性对选自以下的HCMV病毒株中的两种或更多种（如全部）为不可知的：DB、Towne、AD169、DAVIS、BL、JP、Merlin、PH、TB40/E、Toledo、VHL/E、TR和VR1814 (FIX)；和/或

[1473] (d) 可对HCMV的该US28蛋白的ECD3内的表位具有特异性，无论该US28蛋白的该ECD3是否包含序列TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7) 或TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6)。

[1474] 所选候选结合分子可具有与一种或多种肽的结合特异性和/或结合亲和力,其等同于如通过抗体所展现的与相同一种或多种肽的结合特异性和/或结合亲和力:该抗体包含由SEQ ID NO:12、104、122、68或88的序列组成的可变重链(V_H)多肽和由SEQ ID NO:18、108、126、72或92的序列组成的可变轻链(V_L)多肽。该抗体可例如为如本文进一步描述的1D3、1C10、1A10、1G9或1E8抗体。

[1475] 该所选候选结合分子中的一种或多种的功能变体可通过本领域熟知的各种方法中的任一种产生。举例而言,所选候选结合分子(例如包含1、2、3、4、5或6个CDR的所选候选结合分子)的结合特性可通过成熟方法开发。举例而言,结合亲和力可通过成熟步骤修饰(增加或减少);和/或结合特异性可通过成熟步骤修饰(一般而言,增加)。应理解,对US28的较高或增加的结合亲和力水平可能并非始终合乎需要,尤其是在以对如健康人细胞的脱靶不可接受的高水平的结合亲和力为代价时不合乎需要。结合分子,包括但不限于CAR和CAR表达细胞,例如可受益于较低结合亲和力水平,但一般将始终受益于最佳结合特异性水平。成熟方法的实例论述于上本申请的部分A中。

[1476] 本发明的第三十五方面提供一种产生包含结合分子的多个复本的组合物的方法,该方法包括使已根据本发明的第三十四方面的方法选择的所选候选结合分子复制。

[1477] 该方法可例如包括提供核酸分子或多个不同核酸分子的组合,其中核酸分子包含一个或多个单独或组合编码所选候选结合分子的核酸序列或多个不同核酸分子的组合共同包含一个或多个核酸序列。该方法可进一步包括例如在重组细胞或经该核酸分子转化的细胞群或多个不同核酸分子的组合中表达该核酸分子或多个不同核酸分子的组合。此类表达可用于产生所选候选分子的其他复本。

[1478] 任选地,该所选候选分子随后经分离和/或纯化和/或配制,例如呈药学上可接受的组合物形式。

[1479] 任选地,该所选候选分子例如根据本申请的A部分中所论述的缀合物的论述缀合。

[1480] 本发明的第三十六方面提供一种评定所选候选结合分子的方法,该结合分子已根据本发明的第三十四方面的方法经选择和/或根据本发明的第三十五方面的方法产生,该方法包括并鉴别所选候选结合分子内的结构,该结构提供该候选结合分子结合特征(特别是,与人巨细胞病毒(HCMV)的US28蛋白的胞外结构域3(ECD3)内的表位的结合特异性和/或结合亲和力)。

[1481] 举例而言,鉴别所选候选结合分子内提供其结合特征的结构步骤可包括鉴别所选候选结合分子中的作为抗体或CAR的可变轻链和/或可变重链区和/或对其进行测序。

[1482] 另外或替代地,鉴别所选候选结合分子内提供其结合特征的结构步骤可包括鉴别作为抗体或CAR的所选候选结合分子中的各CDR区和/或对其进行测序。

[1483] 鉴别可变轻链和/或可变重链区和鉴别CDR序列的方法为本领域所熟知,且可由本领域技术人员使用常规技术采用。

[1484] 举例而言,抗体的重链和轻链可变结构域序列(V_H 和 V_L)可由重链和轻链cDNA确定,其通过本领域通常已知的技术由各自mRNA合成。CDR区接着可通过本领域已知的技术确定。举例而言,CDR区可使用Kabat方法确定(Wu和Kabat, J(1970)《实验医学杂志(J. Exp. Med.)》132, 211)。CDR可通过使用X射线结晶或分子建模技术的结构分析确定。复合CDR可定义为含有一个CDR中的所有残基和对应高变区中的所有残基。这些复合CDR以及来自框架区的某些

选择残基优选鉴别为可转移“抗原结合位点”。鉴别CDR序列的其他熟知方法包括Chothia编码制(例如,如Al-Lazikani等人,JMB,1997,273:927-948中所描述)或Martin(增强Chothia)编码制。

[1485] 本发明的结合分子和多肽的CDR使用Kabat方法测定。因此,在一些实施方案中,本发明的多肽或结合分子的CDR中的1、2、3、4、5或6个已使用Kabat方法测定。此外,在CDR序列尚未表征的情况下,对于本领域技术人员,一旦提供有全长轻链和/或重可变链,则使用常规方法(如计算算法或突变/结合分析)常规确定CDR中的一个或多个。

[1486] 本发明的第三十七方面提供一种产生组合物的方法,该组合物包含具有与人巨细胞病毒(HCMV)的US28蛋白的细胞外结构域3(ECD3)内的表位的结合特异性和/或结合亲和力的结合分子的多个复本,其中该结合分子包含在所选候选结合分子内已根据本发明的第三十六方面的方法鉴别为提供其结合特征的结构(例如CDR序列或其)或其每一个,所述方法包括引起该结合分子的复制。

[1487] 本发明的第三十七方面进一步提供通过相同方面获得的结合分子的组合物,例如药学上可接受的组合物。所述结合分子或其组合物可随后在本发明的第一方面的结合分子的情况下以本文中所论述的任何方式使用。

[1488] *****

[1489] 本文所公开并要求保护的所有方法可在根据本公开不进行过度实验的情况下进行并执行。虽然已在优选实施方案的方面描述了本发明的组合物和方法,但本领域技术人员将显而易见的是,在不脱离本发明的概念、精神和范围的情况下可对该方法并在本文所描述的方法的步骤或步骤顺序中应用变化。更特别是,将显而易见的是,在化学上和生理上相关的某些试剂可取代本文所描述的试剂,同时将实现相同或类似结果。对本领域技术人员显而易见的所有此类类似取代和修饰均视为在由随附申请专利范围所定义的本发明的精神、范围和概念内。

[1490] 现将借助于以下非限制性实施例描述本发明。

[1491] 实施例

[1492] 实施例1

[1493] 方法:

[1494] 人材料和伦理标准:

[1495] 所有组织材料均在最高伦理标准下收集,包括当地伦理委员会的方案批准,且供体被告知并签署知情同意书。活体组织切片已在标准医学护理期间收集且结果无法追溯至个体供体。所有人组织均在HIPPA批准的方案下收集。所有人样品已测试为对HIV和B型肝炎呈阴性并经批准用于市售产品研发。

[1496] 动物:

[1497] 在Creative Biolabs公司Shirley,NY 11967,USA的准则下,将BABL/c小鼠维持于动物设施中。所有动物实验均根据美国农业部(U.S.Department of Agriculture,USDA)的动物的照料和科学使用准则进行。

[1498] 免疫接种:

[1499] 对于HCMV US28 ECD3,两种肽经由化学合成制备:肽1:TKKNNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:6);肽2:TKKDNQCMTDYDYLEVS (SEQ ID NO:7)。为增强免疫原性,钥孔血蓝蛋白(KHL)

连接于亲本肽的N-末端处。KLH缀合肽分别命名为KLH肽-1和KLH肽-2,并用于免疫接种。质谱法(MS)和高效液相色谱法(HPLC)分析证实两种KLH连接肽非常适合免疫接种。另外,制备生物素标记肽,其随后用于抗体筛选。简言之,将生物素添加至亲本肽的N-末端,其分别重命名为生物肽-1和生物肽-2。

[1500] 用肽1和肽2对五只小鼠(#10-15)进行免疫接种。每14天重复免疫接种。各小鼠接受30 μ g KLH肽-1和30 μ g KLH肽-2与弗氏完全佐剂(complete Freund's adjuvant)的组合的共免疫接种作为初始免疫接种。自第2次加打,各小鼠接受30 μ g KLH肽-1和30 μ g KLH肽-2与弗氏不完全佐剂的组合的共免疫接种。在第3次加打剂量之后,收集抗血清,且通过展示分别针对肽-1和肽-2的正信号的酶联免疫吸附分析(ELISA)检验免疫反应。在第4次加打剂量之后,收集抗血清,且抗血清分别展示针对肽-1和肽-2的增加的阳性信号。效价在小鼠11#、13#、14#和15#中达到超过40000且在小鼠12#中超过10000。

[1501] 相比之下,用KHL连接的HCMV US28 ECD2和ECD4肽:QYLLDHNSLAS和DTLKLKWISSSCE免疫接种四只小鼠(16#、17#、18#和19#)产生比如上文所描述的类似加打方案低的效价(若存在任何抗体)。MS和HPLC分析另外确认这些肽的免疫接种的低免疫原性。这些数据表明,即使在胞外结构域的序列内,鉴别HCMV US28蛋白的适合免疫原性部分仍可为具有挑战性的。相比于ECD2衍生肽和ECD4衍生肽的失败,ECD3衍生肽的成功并非先验可预测的。

[1502] 杂交瘤培养物:

[1503] 考虑到抗血清ELISA结果,选择小鼠13#和14#用于细胞融合。在通过分别静脉内注射100 μ g KLH肽-1和100 μ g KLH肽-2的第5次加打之后5天收集小鼠13#和14#的脾脏。使用聚(乙二醇)(PEG)1500(Sigma-Aldrich,Merck KGaA,64293Darmstadt,Germany)使脾脏细胞与骨髓瘤细胞融合。接着将融合细胞接种至96孔培养板中且在氢原子转移(HAT)试剂(目录号21060017,Thermofisher,Waltham,MA 02451,USA)存在下在半固体培养基中培养。针对生物肽-1和生物肽-2进行QC-ELISA验证。在针对肽-1(包衣生物肽-1)的第1筛选中测试960个单个克隆,且鉴别26个阳性克隆。在第2筛选中进一步研究32个克隆(包括以上26个阳性克隆)以鉴别特异性识别肽-1与肽-2的克隆。在第2筛选中鉴别18个阳性克隆。

[1504] 通过限制稀释法对10个克隆进行次克隆。在细胞融合筛选步骤中,基于ELISA效价选择5个各自来自小鼠13#和14#的克隆:小鼠13#:1C10、3H9、4C10、4F1和5G6;小鼠14#:1F12、2C2、3D11、4F11和5H11。针对生物肽-1进行QC-ELISA验证。鉴别8个结合至肽1的阳性克隆,其中6个克隆为单克隆。为鉴别更特异性的克隆,对来自小鼠14#的其余8个克隆进行次克隆:1D2、1B9、1H3、2E3、2G8、2G12、3A1和4E4。针对生物肽-1进行QC-ELISA验证。鉴别7个结合至肽1的阳性克隆,其中4个克隆为单颗粒。在这些10个单克隆中,额外验证展示US28-13-5G6-1D3克隆的优良结合特性,选择所述克隆用于进一步研究。然而,还进一步研究克隆13-1C10-1C10、13-1C10-1G9、14-1H3-1A10、14-2C2-1G4和14-4E4-1E8。

[1505] US28-13-5G6-1D3克隆的测序:

[1506] Creative Biolabs(Shirley,NY 11967,USA)的杂交瘤测序服务用于获得US28-13-5G6-1D3、13-1C10-1C10、13-1C10-1G9、14-1H3-1A10和14-4E4-1E8抗体的序列信息。杂交瘤测序是指获得关于编码特异性抗体的可变重链(V_H)和可变轻链(V_L)结构域的cDNA的序列信息的方法。在测序之前,通过RNA分离试剂提取所选杂交瘤细胞的总mRNA(Cat.R401-

01, Vazyme Biotech, Cellagen Technology LLC, San Diego, CA 92121, USA)。5'RACE方法, 如Georgious等人[1]所述, 用于扩增、克隆完整特异性抗体可变区(VH和VL)以及非可变侧翼恒定区序列并对其进行测序, 其随后克隆至两个克隆载体中以用于下游序列操纵和表达载体构建。接着使用桑格测序方法(Sanger sequencing method)对载体构建体进行测序并将其用于在HEK293-F细胞中表达重组抗体(rAb)。通过蛋白G色谱法纯化抗体并在琼脂糖凝胶上用SDS-PAGE检查结果。

[1507] 其他抗体:

[1508] 抗HIS HRP抗体自GenScrip, Piscataway, NJ 08854(目录号A00612)订购。抗HIS FITC抗体自ThermoFisher, Waltham, MA 02451, USA (Cat. MA1-81891)订购。在兔中制成的市售多克隆抗US28抗体制剂自Mybiosource, San Diego, CA 92195(目录号MBS9606669)订购。CMV即刻早期抗原Alexa488 Ab自Merck Life Sciences, Oslo, Norway(目录号MAB810X)和MilliporeSigma, Burlington, MA 01803, USA(目录号MAB810R)订购。所使用的第二和IgG同型对照抗体自ThermoFisher, Oslo, Norway订购; 山羊抗小鼠IgG-Alexa 488(目录号A11001); 山羊抗兔IgG Alexa 488(目录号A11008); 山羊抗小鼠IgG的同型对照(目录号14-4714-82); 和山羊抗兔IgG(目录号MA516384)。由Creative Biolabs自HEK293-F细胞用重组技术制造单价和二价VUN100 scFv。

[1509] 实验室细胞:

[1510] 除了重组抗体合成之外, 使用中国仓鼠卵巢(CHO-K1)细胞(Creative Biolabs, Shirley, NY 11967, USA)过度表达US28蛋白以研究US28抗体的表面结合。人胚胎肾脏293-F(HEK293-F)细胞系用于表达US28-13-5G6-1D3重组抗体(rAb)(Creative Biolabs, Shirley, NY 11967, USA)。医学研究委员会细胞系-5(MRC-5), 其来源于人胚胎肺纤维母细胞(目录号CCL-171, RRID:CVCL_0440, 美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection, ATCC), Manassas, VA 20110USA), 用于研究与HCMV感染细胞的表面结合的抗体。市售外周血单个核细胞(PBMC)获自三个血清反应呈阳性的健康供体(供体#509, #526, #230, Cellero, Bothell, WA 98021 USA)。

[1511] 原代细胞:

[1512] 来自不同组织来源的原代细胞在包被有3 mL基于明胶的包被溶液(Cellbiologics, 6950)的T25培养瓶中培养, 并在37°C放置1小时。在细胞接种之前抽吸过量溶液。用6 mL经预加热的完全培养基制备15 mL离心管。将储存于液氮中的原代细胞在37°C水浴中快速解冻<1分钟, 并转移至15 mL离心管中。细胞在1000 rpm下离心5分钟, 随后抽吸上清液且将细胞沉淀重悬于6 mL完全培养基中。将重悬细胞添加至预包被T25培养瓶中, 且在37°C具有5% CO₂的加湿孵育箱中孵育。第二天更换培养基以去除非黏附细胞并每日重复补充营养物。当细胞汇合>85%时, 自烧瓶去除并丢弃细胞培养基。用无菌PBS(1×)洗涤黏附层2次。将细胞与2 mL温热(37°C) 0.25%胰蛋白酶-EDTA溶液一起孵育3分钟。细胞一经分离, 即添加8 mL完全培养基以中和胰蛋白酶, 随后将其铺于在37°C加湿5% CO₂孵育箱中的用基于明胶的包被溶液预包被的新鲜培养瓶中。第二天更换培养基以去除非黏附细胞, 并每天在显微镜下检查细胞以验证适当细胞形态。如本文所述进行FACS分析。

[1513] US28表达构建体:

[1514] 进行质粒构造以产生US28过度表达细胞系。US28序列等同于HCMV DB病毒株(寄存

编号:KT959235;本申请的SEQ ID No.5),在其C-末端部分融合至6His标签,插入至pCDH-EF1a-MCS载体(Creative Biolabs,Shirley,NY 11967,USA)中。质粒构建体经转染至CHO-K1细胞系。转染48小时后收集细胞。细胞系称为CHO-US28-A1-6His且其蛋白质序列(SEQ ID NO:47)如下:

[1515] MTPTTTTAEALTTEFDYDEAATPCVFTDVLNQSKPVTFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSG
DVYFINLAAADLLFVCTPLPWMQYLLDHNSLASVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVMYRYPVKQA
CLFSIFWWIFAVIIAIPHFMVVTKKNNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIPLSVISYCYRISRIVAVSQS
RHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLLKWISSSCEFERSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFGT
KFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSSPSRRETSSDLSDEVCRVSQIIPAAALEGSHHHHHH。

[1516] 还以类似方式制造携带TB40/E和突变US28病毒株的DNA(分别为SEQ ID NO:254和255)的质粒。

[1517] SEQ ID NO:177:

[1518] MTPTTTTTTELTEFEYDLGATPCTFTDVLNQSKPVTFLYGVVFLFGSVGNFLVIFTITWRRRIQCSG
DVYFINLAAADLLFVCTPLPWMQYLLDHNSLASVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVMYRYPVKQA
CLFSIFWWIFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIPLSVISYCYRISRIVAVSQS
RHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLLKWISSSCEFERSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFGT
KFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSSPSRRETSSDLSDEVCRVSQIIPAAALEGSHHHHHH。

[1519] SEQ ID NO:178:

[1520] MTQTTTTTELTEFDYDLGAALCTLTDVLNQSKPITFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGD
VYFINLAAADLLFVCTPLPWMQYLLDHNSLASVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVMYRYPVKQAC
LFSIFWWIFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIPLSVISYCYRISRIVAVSQSR
HKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFLDTLKLLKWISSSCESEKSLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFGTK
FRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSSPSRRETSSDLSDEVCRVSQIIPAAALEGSHHHHHH。

[1521] MRC-5细胞的HCMV感染:

[1522] 用胰蛋白酶消化MRC-5人胚胎肺纤维母细胞第21至30代,并将每个T75培养瓶 1×10^6 个细胞铺于达尔伯克氏改良伊格尔培养基(Dulbecco's modified Eagle medium, DMEM)中,该培养基补充有10%胎牛血清(FBS)、2mM L-谷氨酰胺、0.1mM非必需氨基酸、10mM HEPES和各100U/ml的青霉素和链霉素。使细胞保持未感染(模拟)或用HCMV病毒株Ad169感染(ATCC® VR538™, ATCC, VA 20110USA),感染倍率(multiplicity of infection, m.o.i.)为5。在添加病毒至各自细胞之后,在37℃和5% CO₂孵育细胞,直至在感染后(p.i.)第4天(96小时pi)收集细胞。通过显微法确认感染。

[1523] 酶联免疫吸附分析(ELISA):

[1524] 微量滴定板孔用100μl溶液包被,该溶液含有在涂布缓冲液中呈在1-10μg/ml之间的浓度的生物肽-1和生物肽-2,该缓冲液由1.5g Na₂CO₃和2.93g NaHCO₃于1L pH 9.6蒸馏水中组成,并随后在室温孵育微量滴定板孔1-2小时。在由含有0.05%v/v Tween-20的PBS组成的洗涤缓冲液中洗涤板3次,并随后用纸巾吸取。将150μl含有包含1%w/v BSA的磷酸盐缓冲盐水(PBS)的阻断溶液添加至各孔中且在37℃下孵育该盘2小时。在洗涤缓冲液中洗涤孔4次,并在最后一次洗涤之后在纸巾上吸干。将100μl的抗体稀释液添加至各孔中,并在37℃孵育板1小时,并随后在洗涤缓冲液中洗涤3次。将100μl酶缀合的第二抗体(经洗涤缓

冲液适当稀释)添加至各孔中并在37℃孵育板1小时。随后再次在洗涤缓冲液中洗涤孔3次,并在最后一次洗涤之后用纸巾吸干。将100μl适当的底物溶液添加至各孔并在室温孵育30分钟,或直至达到所需颜色变化。在适当波长下立即读取吸光度值并通过CMax Plus, Molecular Devices, San Jose, CA 95134, USA分析数据。

[1525] 蛋白质印迹:

[1526] 蛋白质印迹用于验证US28蛋白在CHO-US28-A1-6His细胞中的表达。收集的细胞和US28阴性对照CHO细胞用PBS洗涤两次并添加具有1% PMSF的冰冷RIPA溶解缓冲液。使用塑料细胞刮刀将黏附细胞平缓地自培养皿刮下,且将细胞悬浮液转移至预冷却的微量离心管中,在4℃搅拌30分钟。随后将试管离心,并将上清液抽吸至新试管中。通过BCA方法测定试管的蛋白质浓度。以相同体积添加由4% SDS、10% 2-巯基乙醇、20%甘油、0.004%溴酚蓝和0.125M Tris HCl组成的2X Laemmli缓冲液。通过使样品缓冲液中的裂解物煮沸来使样品还原并变性。制备聚丙烯酰胺凝胶(12%)并将30-120μg各样品的蛋白质装载至SDS-PAGE孔中。将蛋白质标记装载于第一泳道中。用由25mM Tris碱、250mM甘氨酸、0.1% SDS组成、调节至pH 8.3的1×操作缓冲液进行电泳,在80V电压下进行30分钟并在100电压下进行1.5小时。通过在甲醇中浸湿30秒并接着将其短暂浸泡于蒸馏水中、随后于1×转移缓冲液中来制备聚偏二氟乙烯(PVDF)膜,该缓冲液含有25mM Tris碱,192mM甘氨酸,20%甲醇,调节至pH 8.3。蛋白质随后通过夹心湿法在转移盒中转移至PVDF膜。将膜用1×TRIS缓冲生理盐水和Tween 20(TBST)溶液洗涤并在含有1×TBST和10%脱脂奶粉的封闭溶液中孵育。接着用5%脱脂奶粉将第一抗体在1×TBST中稀释至工作浓度并在室温孵育1.5小时。用1×TBST洗涤膜三次,并在与如上所述相同的孵育和洗涤程序下添加第二抗体。将预混合化学发光底物溶液(ThermoFisher, Waltham, MA 02451, USA, 目录号34075)添加至膜上,其后用化学发光成像系统(BIO-RAD ChemiDoc XRS+, Bio-Rad, Hercules, CA 94547, USA)对该膜进行成像1-90秒。

[1527] 流式细胞术(FACS)分析:

[1528] 使用流式细胞术分析US28抗体的细胞表面结合。在收集细胞后,用细胞染色缓冲液(磷酸盐缓冲盐水(PBS (Amresco, Cleveland, OH 44139, USA), 添加0.5% BSA和0.05%叠氮化钠(NaN_3))洗涤黏附的未感染和US28过度表达或HCMV感染细胞三次。用胰蛋白酶消化细胞并随后重悬于具有10% FBS的DMEM中以抑制胰蛋白酶作用。接着以400×g沉淀细胞10分钟,并在细胞染色缓冲液中洗涤三次。细胞存活率和细胞浓度通过台盼蓝(trypan blue)存活率分析和细胞计数器(Countess, Invitrogen, Carlsbad, CA 92008, USA)测量。用冰冷细胞染色缓冲液将细胞悬浮液调节至 1×10^6 个细胞/mL。细胞在每 1×10^6 个细胞1ml含10% FBS或1% BSA的PBS中封闭,短暂涡旋并孵育10至30分钟以消除非特异性染色。细胞接着用各自抗体和适当阴性对照染色。

[1529] 所用第一抗体为I) 13-5G6-1D3 1:50至50μg/ml;和II)市售US28多克隆抗体(50μg/ml), III)单价和二价VUN100 ScFv(50μg/ml),且对于某些实验,包括适当同型对照。

[1530] 将抗体添加至细胞,涡旋并在冰上孵育15至30分钟直至过夜,并用细胞染色缓冲液洗涤两次以去除任何未结合的抗体。另外,在实验之一中包括CMV即刻早期抗原(IE) Alexa488 Ab, MAB810X, 1:50来验证HCMV感染细胞。由于其结合至胞内HCMV编码的蛋白质,因此其在用70%乙醇透性化细胞30分钟之后在冰上添加。

[1531] 添加1:500-1:5000的适当荧光结合的以下第二抗体与细胞染色缓冲液：(I) 山羊抗小鼠IgG-Alexa 488；和(II) 山羊抗兔IgG-Alexa 488，并在冰上避光孵育15-20分钟。洗涤细胞三次以去除任何未结合抗体。随后将细胞用0.5%多聚甲醛(PFA)在冰上固定30分钟，并重悬于200-500μL细胞染色缓冲液中，用于使用Accuri C6流式细胞术系统(BD Biosciences, San Jose, CA 95131, USA)进行最终流式细胞分析。使用FlowJo软件v8.8 (Treestar公司Ashland, OR 97520, USA)进行数据分析。

[1532] 人石蜡包埋组织阵列：

[1533] 含有CMV阳性肺组织和CMV阴性子宫肌层的巨细胞病毒(CMV)对照载片(产品编号#3240A)获自Newcomer Supply公司, Middleton, WI 53562-2579, USA。组织微阵列(TMA)获自USBiomax公司, Derwood, MD 20855, USA, 且包括肿瘤组织#BR1008b、#BS17016c、#BCN721b和正常组织#FDA662a和心脏组织#HEN241a。

[1534] 免疫组织化学(IHC)分析：

[1535] 将石蜡切片依次浸入至a. 100%二甲苯三次(各5分钟)；b. 100%乙醇两次(各2分钟)；c. 95%乙醇两次(各2分钟)。载片于水中冲洗两次5分钟以去除乙醇。对于抗原修复，将载片浸没在3% H₂O₂中5分钟且其后用蒸馏水洗涤两次(2×)。随后将载片浸没于工作柠檬酸盐缓冲液(pH 6.0)中并用盖子盖上。在微波中加热缓冲液直至其已沸腾，并随后保持于蒸箱中15分钟。

[1536] 将切片在室温冷却30分钟并用PBS洗涤。随后将5% BSA封闭溶液添加至经HIER处理的样品中并在37℃孵育30分钟。根据由稀释梯度测试得到的最佳结果稀释第一抗体并将其添加至样品中用于在4℃过夜孵育或在37℃孵育1小时。接着在PBS中在震荡器上洗涤载片三次。第二抗体以1:200稀释度使用，添加至样品并在37℃孵育30分钟。在PBS中在震荡器上洗涤载片三次(每次5分钟)。添加链霉亲和素-亲和素生物素复合物(SABC)HRP或AP缀合试剂，并在室温避光孵育样品。随后将样品在蒸馏水中洗涤，通过苏木精对比染色，并随后经由70%至100%的梯度乙醇脱水，并在二甲苯中清洁3次，各5分钟。载片由ACRYMOUNT (StatLab, MicKinney, TX 75069, USA)封片并加上盖玻片。数字化图片由Olympus VS120扫描仪取得并由资深病理学家使用OlyVia 3.2软件(Olympus Corporation, 20101Tokyo, Japan)分析。

[1537] 原位杂交(ISH)

[1538] CMV ISH探针(目录号：ISHP-031, Creative Bioarray)经设计用于通过显色原位杂交(CISH)检测福尔马林固定、石蜡包埋的组织或细胞中的巨细胞病毒(CMV) DNA。使用NICK方法，用CMV IE1基因载体，用地高辛(Digoxin)标记CMV探针。

[1539] 载片首先通过在85℃烘烤载片15分钟来预处理，其后在室温将载片浸没于新鲜二甲苯中两次5分钟。载片接着在室温在100%、85%、75%乙醇中脱水3分钟并浸没于PBS中2分钟。

[1540] 随后通过使载片浸没于0.2M HCl中12分钟来用蛋白酶预处理载片。在PBS中添加0.5% Triton X100并孵育载片12分钟。载片用1×PBS洗涤2分钟，接着浸没于20μg/ml蛋白酶K中15分钟，随后再次用1×PBS洗涤两次2分钟。此后，将载片浸没于3% H₂O₂中15分钟，用1×PBS洗涤两次2分钟并风干。

[1541] 为了制备含有探针的杂交缓冲液，将1μl探针储备溶液添加至50μl的杂交缓冲液

中,并接着涡旋并离心。ISH探针在85℃变性10分钟且保持在37℃30分钟。在载片已干燥90+分钟之后,将200μl含有探针的杂交缓冲液分配至载片的组织切片上。将干净的24×60mm矩形玻璃盖玻片小心地放置于杂交溶液上以完全覆盖组织切片并使杂交溶液分布均匀。将载片置于加湿小室中,用组织培养盖覆盖,并用封口膜密封小室。载片在37℃避光孵育20-36小时。

[1542] 通过在2×SSC中浸没载片5分钟自切片去除盖玻片,之后进行原位洗涤。在37℃将载片与3% BSA溶液一起孵育30分钟,并其后在37℃与抗DIG-HRP溶液(于1% BSA中1:100稀释)一起孵育30分钟。接着载片首先用2×SSC洗涤两次2分钟,并接着用1×PBS洗涤两次5分钟。其后,将载片与DAB溶液一起孵育2-10分钟并在流动自来水中洗涤。将载片浸没在苏木精中以对比染色3-5分钟并再次在流动自来水中洗涤。载片最后在室温在100%乙醇中脱水1分钟并风干,并接着在室温浸没于二甲苯中10分钟。使用水性固定溶液来固定切片。

[1543] 使用配备有40×物镜的Nikon 80I显微镜获取明场图像。

[1544] 结果

[1545] 抗体设计:

[1546] HCMV编码的US28蛋白具有4个胞外结构域(ECD),其中第2和第3ECD和第4ECD的部分在不同HCMV病毒株之间高度保守。相比之下,HCMV US28的N-末端部分(ECD1)含有频繁突变(例如,各种经鉴别的N-末端区突变展示于本申请的表3中),且因此我们确定ECD1一般不为用于开发针对HCMV编码的US28蛋白、对US28具有高度特异性且还为病毒株不可知的抗体的适当免疫原。

[1547] 用5次加打KHL连接的HCMV US28 ECD2和ECD4肽重复免疫接种小鼠出乎意料地产生较低(若存在)抗体效价。这些肽的免疫接种的低质量通过MS和HPLC分析确认。

[1548] 对于用于免疫接种的ECD3衍生肽的设计,我们考虑不同HCMV病毒株之间的基因变化。使用BLAST搜索,且我们鉴别出US28 ECD3的第4氨基酸存在单一D至N变化。90%的随机选择的100个HCMV临床病毒株含有US28 ECD3 4D变体,而10%具有US28 ECD3 4N变体。在展示US28 ECD3 4N变体的病毒株中,HCMV DB(寄存编号:KT959235),TR(寄存编号:KF021605.1)临床病毒株和Toledo(寄存编号:GU93774)实验室病毒株(表1),其均基于其US28序列,携带HCMV A1病毒株基因型[2]。

[1549] 含有两种基因变体的HCMV US28 ECD3肽-1和肽-2(分别为SEQ ID NO:6和7)选择为用于进一步开发可识别免疫小鼠中的4N和4D基因型的病毒株不可知的抗体的免疫原。在自五只免疫小鼠鉴别的总共>1000个杂交瘤克隆中,获得32个阳性克隆,其中鉴别出18个阳性克隆特异性识别肽-1和肽-2。这些的次克隆产生15个阳性克隆,其经鉴别结合至生物肽1,其中10个克隆为单克隆。

[1550] 抗US28克隆的结合特性:

[1551] 为测试所得十个单克隆HCMV US28抗体克隆,通过将编码来自HCMV病毒株DB的US28的DNA序列与C-末端6His标签(氨基酸序列SEQ ID NO:47)一起插入至pCDH-EF1a-MCS载体中并接着将载体构建体转染至CHO-K1细胞中来产生US28蛋白过度表达细胞系。之后,US28过度表达细胞称为CHO-US28-A1细胞。

[1552] 经由蛋白质印迹分析,通过使用在添加至US28-A1蛋白质构建体的C-末端部分的6HIS标签上的抗HIS抗体结合来验证US28蛋白在经转化的CHO-US28-A1细胞中的成功表达。

抗HIS抗体以约41kDa标记出特定条带,其与HCMV US28的先前报导的蛋白质尺寸等同,且其不存在于对照CHO细胞上,由此指示US28蛋白在经转染的CHO-US28-A1细胞中表达,但在对照CHO细胞中表达(图1)。

[1553] 对所获得的十个单克隆抗体克隆(以1:50w/v Ab稀释度)进行FACS分析以测量这些克隆与CHO-US28-A1细胞表面上的HCMV US28跨膜蛋白的表面结合。克隆US28-13-5G6-1D3展示最佳结合结果,其比任何其他9个克隆(数据未示出)优异(比CHO-US28-A1细胞结合多约8-10倍)。不具有任何抗体和仅具有小鼠第二抗体的阴性对照视为阴性(图2)。

[1554] CHO-US28-A1细胞上的克隆US28-13-5G6-1D3的阳性表面结合进一步通过梯度稀释(1:20、1:50、1:200,以w/v表示)来验证,展示抗体结合的直接相关性(图3)。在数个实验中确认与CHO对照细胞的表面结合较低(比结合小>15倍),指示克隆US28-13-5G6-1D3 Ab与表达CHO细胞的US28的表面的结合具有高度特异性(图4)。

[1555] 原始ELISA分析展示针对肽1(US28 ECD3基因型4N)和肽2(US28 ECD3基因型4D)的US28-13-5G6抗体克隆的相等定性结合亲和力(图5)。这些结果指示所产生US28-13-5G6-1D3抗体克隆可良好且特异性地结合于过度表达CHO细胞的HCMV US28蛋白的表面上,且US28-13-5G6-1D3抗体与其靶点的结合为HCMV病毒株不可知的。

[1556] US28-13-5G6-1D3 rAb的产生和验证

[1557] 为了能够重组产生US28-13-5G6-1D3抗体,对编码US28-13-5G6-1D3的杂交瘤克隆进行测序。参考下文所描述的序列鉴别编号(“SEQ ID NO”),鉴别US28-13-5G6-1D3抗体的以下序列:

[1558]

		DNA 序列	蛋白质序列
完整重链(包括前导序列)		SEQ ID NO: 34	SEQ ID NO: 20
完整轻链(包括前导序列)		SEQ ID NO: 35	SEQ ID NO: 21
V _H 链	未成熟	SEQ ID NO: 25	SEQ ID NO: 11
	成熟	SEQ ID NO: 26	SEQ ID NO: 12
V _L 链	未成熟	SEQ ID NO: 31	SEQ ID NO: 17
	成熟	SEQ ID NO: 32	SEQ ID NO: 18
V _H -CDR1		SEQ ID NO: 22	SEQ ID NO: 8
V _H -CDR2		SEQ ID NO: 23	SEQ ID NO: 9
V _H -CDR3		SEQ ID NO: 24	SEQ ID NO: 10
V _L -CDR1		SEQ ID NO: 28	SEQ ID NO: 14
V _L -CDR2		SEQ ID NO: 29	SEQ ID NO: 15
V _L -CDR3		SEQ ID NO: 30	SEQ ID NO: 16

[1559] 对应于上述SEQ ID NO的序列在本申请的部分“序列”中给出,其在这些实施例之后。

[1560] 测序分析证实,US28-13-5G6-1D3的亚型最可能为IgG1κ。US28-13-5G6-1D3DNA序列插入两个克隆载体中并转染至HEK293-F细胞系中用于重组生产。通过定性ELISA针对生物肽-1和生物肽-2测试所得重组抗体产物US28-13-5G6-1D3rAb的结合,再次展示与US28 ECD3基因变体相等、强且高的结合亲和力,确认重组型抗体也展示HCMV病毒株不可知的特性(图6)。

[1561] 此后验证13-5G6-1D3 rAb与CHO-US28-A1细胞的表面结合并针对来自其他候选杂

交瘤克隆(13-5C6-1B5、13-5G6-1D3培养物、13-4C10-1D8、14-1H3-1A6、14-2C2-1A7、14-2E3-1A12、14-4E4-1B3)(数据未示出)的抗体比较。与来自13-5G6-1D3克隆的抗体的早期测试结果类似,结果展示13-5G6-1D3 rAb与CHO-US28-A1细胞的最高结合。

[1562] 对13-5G6-1D3 rAb与CHO-US28-A1细胞和各自对照CHO细胞以1:10、1:50和1:100稀释(w/v)的表面结合的进一步FACS验证展示13-5G6-1D rAb结合于US28表达细胞的16.55%的表面上,并且我们针对13-5G6-1D3 rAb进行测试的最佳染色稀释为:1:50(w/v)。在1:10稀释(w/v)下测量13-5G6-1D rAb与对照CHO细胞的表面结合,此为应增强对任何非特异性结合的检测的高浓度,且在去除与空白和抗小鼠IgG-Alexa 488第二Ab对照物的结合之后,还展示仅结合至0.77%对照CHO细胞(图7)。当与对照CHO细胞相比时,这些结果展示的高>21倍的表面结合与其他我们在US28表达CHO细胞上通过13-5G6-1D3 Ab克隆获得的特异性结果完全一致(图4)。我们还针对US28的ECD3产生的数种其他抗体克隆展示对US28表达细胞的极大特异性(与针对US28阴性对照CHO细胞观测到的结合水平相比,US28表达CHO细胞的结合特异性因子大大约11倍至26倍),因此确认ECD3肽为US28结合抗体的特异性靶点(表2)。

[1563] US28-13-5G6-1D3 rAb与HCMV感染MRC-5细胞的结合

[1564] 我们随后研究US28-13-5G6-1D3 rAb是否能够特异性结合至HCMV感染细胞的表面。已知HCMV进入人纤维母细胞中,在其中复制并引起裂解感染[3]。我们因此用HCMV Ad169实验室病毒株以5m.o.i.感染人MRC-5细胞,并在第4天p.i.(96hpi)收集细胞。如通过显微镜所观察,在大部分细胞中,细胞展示裂解HCMV感染的典型征象(以平坦、肿胀细胞为特征的巨细胞)。

[1565] 通过使用流式细胞术分析,将US28-13-5G6-1D rAb与HCMV Ad169感染细胞的表面结合与用适当IgG同型对照染色的经感染细胞以及未感染的经培养MRC-5细胞(模拟)相比较。结果展示US28-13-5G6-1D rAb在HCMV Ad169感染的MRC-5细胞的表面上的特异性结合,但不在模拟细胞上(图8-图9)。

[1566] 为了验证13-5G6-1D rAb结合于HCMV感染细胞群的表面,另一组HCMV Ad169感染的细胞和模拟细胞经透性化并用市售抗体MAB810X针对HCMV主要即刻早期(IE)抗原染色,该抗原为已知在裂解HCMV感染期间较早表达的胞内蛋白[3]。在FACS分析中,MAB810X抗体与US28-13-5G6-1D3 rAb染色相同的经HCMV感染的MRC-5细胞群,未观测到任一抗体染色未感染细胞,确认了US28-13-5G6-1D3 rAb所展现的表面结合对HCMV感染细胞具有特异性(图8A和图8B)。

[1567] 在与山羊抗小鼠IgG-Alexa 488一起孵育之前,通过使用在小鼠中制备的非免疫血清(IgG同型对照)代替第一抗体来测试US28-13-5G6-1D3 rAb的非特异性结合。结果展示与同型对照相比,HCMV感染MRC-5细胞通过US28-13-5G6-1D3 rAb的染色发生偏移,而未感染细胞的染色(模拟)类似于IgG同型对照。综合而言,这些结果展示,与未感染细胞相比,US28-13-5G6-1D3 rAb特异性结合(约大16倍的特异性)至HCMV感染细胞的表面(图9)。

[1568] 应注意,HCMV Ad169实验室病毒株编码US28的4D变体(SEQ ID NO:42),因为其在ECD3序列的第4氨基酸处展现D;与由DB病毒株编码的4N变体相反,DB病毒株为先前实验中所论述的用于产生CHO-US28-A1细胞的序列。US28-13-5G6-1D3与US28的4D和4N变体的结合,如本实施例中所证实,为所提供的病毒株不可知的结合特性的明确指示。

[1569] 人PBMC上的US28-13-5G6-1D3结合

[1570] CD34+祖细胞及其衍生物(包括粒细胞-巨噬细胞祖细胞和CD14单核细胞)中的终生潜伏HCMV携带物提供可在血清反应呈阳性的个体中再活化的HCMV库[4]。我们随后通过使用与我们先前研究相同的流式细胞术方案研究US28-13-5G6-1D3 rAb是否可结合至来自三个HCMV血清反应呈阳性的个体(供体1-3)的原代PBMC。结果展示来自三个供体的PBMC细胞的US28-13-5G6-1D3rAb的表面结合分别为18.37%、3.57%和5.25%(图10)。在所研究PBMC中,仅CD11+、CD14+和CD16+阳性细胞可为HCMV的携带者,且这些细胞标记可在不同单个核细胞中部分重叠。取决于个人和情况,潜伏感染的细胞群总计约15%但可变化。因此,分别在供体1、2和3中观测到的US28-13-5G6-1D3 rAb在18.37%、3.57%和5.25%的总PBMC上的表面结合证实与实质性比例的可为HCMV携带者的PBMC结合。这些结果与PBMC亚型无关,但指示US28-13-5G6-1D3 rAb可与潜伏HCMV感染细胞的表面结合。

[1571] 市售US28抗体

[1572] 购买市售多克隆US28 Ab以将其结合特性与US28-13-5G6-1D3 Ab相比较。

[1573] 测试市售US28多克隆Ab与CHO-US28-A1细胞的结合,并与US28-13-5G6-1D3 rAb与相同细胞的结合进行比较。US28-13-5G6-1D3抗体结合至超过50%的CHO-US28-A1细胞,而在同一实验中市售US28 Ab仅染色10%细胞(图11A)。我们随后在HCMV Ad169感染MRC-5细胞上测试市售US28 Ab,其中其展示对HCMV感染群体的特异性结合。然而,与IgG同型对照物相比,此抗体还染色未感染模拟细胞约两倍,指示未感染MRC-5细胞的表面上的非特异性结合(图11B)。另外,市售US28抗体在人原代PBMC上的结合在所有三种测试样品中>80%(数据未展示),由于潜伏感染细胞总计约15%,指示与此细胞群的非特异性结合。因此,在HCMV Ad169感染MRC-5细胞上观测到的市售US28抗体的特异性结合作用的一部分可由此非特异性表面结合组分产生。

[1574] 单价与二价VUN100的比较

[1575] WO 2019/151865,如还在等同期刊文章De Groof等人,2019[5]中所报导,描述了对US28的单重链可变结构域抗体(VHH),由称为VUN100的特定VHH示例。VUN100(其序列提供为本申请的SEQ ID NO:60)展示结合于不连续表位,该不连续表位在US28的N-末端胞外区(位置1-37,在本文中也称为ECD1)中包含多个结合位置,且进一步受US28的第三胞外环(ECL3,位置250-273,在本文中也称为ECD4)的存在影响,如WO 2019/151865的实施例3(第36页,第11-32行)和De Groof等人,2019[5]的图2的图例中所论述。VUN100 Ab与HEK293-F模拟细胞的表面结合(约20%),特异性分数为4,由De Groof等人,2019[5]在其支持信息,其图S1.A(且概述在本申请的表2中)中报导。相比于使用针对US28的ECD3产生的抗体(包含抗体13-5G6-1D3、13-5C6-1B5和14-1H3-1A6)获得的持续较高水平的特异性分数,显著区分US28表达细胞和US28阴性细胞的能力(仅约4的特异性分数)为次佳的,前者始终展现在11-26的范围内的特异性分数(表2),即使在选择高抗体浓度以使任何非特异性结合最大化时也是如此,且使用更市售相关(较低)抗体浓度甚至展现更高特异性分数(图7)。

[1576] 对VUN100报导的低特异性分数引发关于其为HCMV感染细胞提供特异性靶向作用、同时避免健康细胞中的脱靶副作用的能力的担忧。在将具有高度特异性的细胞毒性活性引导至HCMV感染细胞的情况下,如通过使用包含本文所提供的结合分子的US28结合活性的BiTE和/或CAR-T细胞,提供针对US28的ECD3的高度特异性结合分子,所述结合分子实质上

避免健康细胞中不可接受的脱靶结合水平,为本发明的一个特别关注点。对VUN100报导的特性指示其缺乏将具有高度特异性的细胞毒性活性引导至HCMV感染细胞的适合性。与本发明的高度特异性结合分子对比,其还引发关于VUN100在分析(包括诊断分析,如用于免疫组织化学(IHC))中可靠地鉴别表达US28的细胞(特别是HCMV感染细胞)的情况下适用的能力的问题。

[1577] 在W0 2019/151865和等同期刊文章De Groof等人,2019,《分子药理学》,16:3145-3156中,作者参考VUN100且指示特异性检测GBM组织中的US28并抑制配体依赖性和组成性US28活性的能力,并因此削弱原位异种移植模型中体外和体内US28依赖性GBM生长。

[1578] 然而,为了利用US28作为治疗靶点,特别是出于将细胞毒性活性引导至展示US28的表面表达的细胞的目的,重要的是克服如先前所描述的最重要障碍,不仅包括已针对本领域已知的VUN100分子报导的相对较高水平的非特异性结合活性,而且提供US28结合分子解决病毒株多样性、病毒突变、突变漂移和病毒在病毒潜伏期间自免疫系统隐藏的能力的问题。

[1579] 因此,已在已报导结合于US28的ECD3的本发明的结合分子(如13-5G6-1D3)与W0 2019/151865和De Groof等人,2019(同上)的VUN100 Ab和/或De Groof等人,2020(同上)的VUN100b二价分子之间进行比较,已报道后者与存在于US28的N-末端和ECD4内的不连续表位结合。

[1580] 在重组表达来自HCMV病毒株DB(作为代表性4N变体)或HCMV病毒株TB40/E(作为代表性4D变体)的US28序列的CHO细胞中进行比较,并使用非重组CHO细胞作为对照。如上文所指出,本申请人已鉴别,HCMV病毒株可参考其ECD3序列进行分类,且一般落入作为4N或4D变体的范围(这大约分为分别10%/90%),且因此所示例的DB和TB40/E病毒株代表在这两个分组内的许多其他病毒株。因此,展示对4N变体和4D变体的交叉反应性指示对于广泛范围的HCMV病毒株的病毒株不可知的结合。

[1581] 用以下第一抗体对感染细胞系中的每一种进行FACS分析(如上所述): (i) 13-5G6-1D3; (ii) 单价(缩写为“Mv”) VUN100; 和 (iii) 二价VUN100(缩写为“BvVUN100”)且也称为VUN100b)。细胞结合表示为群体中与抗体结合的细胞的百分比。

[1582] 对于CHO阴性对照观测到低结合百分比,单价VUN100展示2.25%背景结合,二价VUN100展示1.06%背景结合,且13-5G6-1D3(图中缩写为“1D3”)展示0.88%的最低背景结合(图21A)。这些数据表明与VUN100抗体相比,示例性ECD3结合抗体13-5G6-1D3对未感染CHO细胞具有较低背景结合。

[1583] 在表达由HCMV的DB病毒株编码的US28的CHO细胞(示例性4N变体)中,观测到所有测试抗体的结合增加,其中单价VUN100与6.91%的群体结合,二价VUN100与9.24%的群体结合,且13-5G6-1D3与16.65%的群体结合(图21A)。这展示,除了具有比单价或二价VUN100低的背景结合以外,13-5G6-1D3还实质上具有较高的与表达US28的DB形式的CHO细胞的结合。当表示为US28的DB形式的CHO对照细胞与CHO细胞之间的结合增加%时,相比于用单价或二价VUN100观测到的较低特异性水平,此结果为由13-5G6-1D3提供的显著改良的结合特异性的指示(图21B)。这些数据表明示例性ECD3结合抗体13-5G6-1D3与感染有HCMV的4N变异株的CHO细胞的特异性结合改善。

[1584] 类似地,当将表达US28的TB40/E形式(示例性4D变体)的CHO细胞的结合与结合至

CHO对照细胞相比较时,数据明确展示示例性ECD3结合抗体13-5G6-1D3与表达US28的TB40/E形式(图21A)的CHO细胞的较高结合和单价和二价VUN100两者极大改良的特异性(图21B)。

[1585] 这些数据还提供病毒株不可知的结合活性的相对含量的指示。

[1586] 可比较组中不同抗体在表达US28的DB形式(ECD3中的示例性4N变体)和US28的TB40/E形式(ECD3中的示例性4D变体)的CHO细胞中的结合水平。如图21A中所示,对于单价VUN100,与4N变体相比观测到与4D变体的结合减少,自6.91%降至4.33%的群体。同样地,二价VUN100展示减少的结合,自9.24%降至5.2%的群体。这些结果与WO 2019/151865中的发现一致。然而,有趣地,示例性ECD3结合抗体13-5G6-1D3相比于4N变异株具有进一步改良的特异性结合,自16.65%稍微增加至18.25%的群体。

[1587] 图21C展示对于测试组中的不同抗体,在表达US28的DB和TB40/E形式的CHO细胞的结合之间,与细胞群的结合的绝对水平变化%。自这些数据显而易见,取决于衍生出US28序列的HCMV的病毒株,单价和二价VUN100两者的结合能力存在相当大的差异(分别大于35%和大于40%)。相比之下,获得US28蛋白的HCMV病毒株一致性在小得多的程度上影响示例性ECD3结合抗体13-5G6-1D3的结合,差异小于10%。

[1588] 当比较来源于这些不同HCMV病毒株的US28时,还可分析这些数据以确定对于US28的结合活性的保留率。图21D展示示例性ECD3结合抗体13-5G6-1D3在这些病毒株之间保持基本上100%的结合活性,而取决于获得US28蛋白的HCMV病毒株一致性,VUN100单价和二价形式仅保持约或低于60%(即损失约或超过40%)。

[1589] 图21E中还明确说明取决于获得US28的HCMV病毒株而定的结合能力的这些差异,其中基于针对13-5G6-1D3分别与US28的相同形式的结合进行归一化的值,计算单价和二价VUN100中的每一种分别与来自每一所测试HCMV病毒株的US28结合的能力。当以此方式归一化时,与针对13-5G6-1D3所观察到的相比,单价和二价VUN100各自结合的病毒株依赖性变化清楚可见。

[1590] 这些数据表明,尽管单价和二价VUN100抗US28抗体对于US28具有很大程度上受编码US28的HCMV病毒株影响的结合活性,相比之下,本发明的示例性ECD3结合抗体13-5G6-1D3为有效地病毒株不可知的,对于HCMV的4N-和4D变体两者具有高结合水平。

[1591] 这些数据进一步展示,病毒株不可知的表位序列(“SAES”)存在于US28内,本发明的ECD3结合分子可利用其保持对多种不同HCMV病毒株的高结合特异性。因此,本发明的结合分子靶向先前尚未靶向的有利表位,即US28的ECD3内的SAES。相比之下,现有技术的VUN100分子与N-末端区和ECD4内的不连续表位结合,具有相对较高的背景(脱靶)结合、实质上较低的特异性,且显示HCMV病毒株依赖的结合特性。

[1592] 这些比较结果证实,本发明的抗体结合至US28的ECD3内的SAES,如US28-13-5G6-1D3 rAb所示例,在所测试的所有细胞系和细胞上显示高度US28特异性表面结合特性,而两种参考抗体:市售多克隆US28 Ab和VUN100 Ab单克隆抗体,在US28阴性对照细胞的表面上显示高度非特异性结合。因此,已根据本文所描述的方案针对US28的ECD3产生的抗体,特别是如通过US28-13-5G6-1D3 rAb和通过本申请中所描述的方法获得的其他抗ECD3抗体所示例,据我们所知为能够以高度特异性但又病毒株不可知的方式结合于US28表达HCMV感染细胞的表面上的唯一现存抗体。

[1593] 与人工产生的US28突变病毒株结合

[1594] US28在其序列内具有可突变的许多已知点(参见表3)。此外,已知病毒(如HCMV)突变以适应疗法。举例而言,缙更昔洛韦易受病毒经由突变产生抗性的影响(Boivin等人,2012; Göhring等人,2015;和Jung等人,2019)。因此,制备US28的突变形式,其包括其序列内所有已知点处的突变(在本文中称为“突变”形式),以模拟HCMV病毒株内可能未来基因漂移的极端形式。序列在本文中提供为SEQ ID NO:173,且相比于由HCMV病毒株DB编码的US28序列(SEQ ID NO:5)具有以下突变:P3Q、T7del(即缺失)、A8T、E18L、A19G、T21A、P22L、V24T、F25L、V35I、N170D、V250L、F265S、R267K。

[1595] 比较经工程改造以表达突变形式的CHO细胞(“CHO-突变病毒株”)在示例性ECD3结合分子1D3与不结合至ECD3的VUN100分子之间的结合(参见图21A)。

[1596] 有趣地,对于单价VUN100观测到,未检测到与突变病毒株的结合高于与CHO阴性对照的结合(与这些实验中对照CHO细胞的2.25%结合相比,与突变病毒株1.41%结合),表明与表达US28的细胞相比,单价VUN100实际上更强地结合于脱靶细胞。这进一步说明于图21B中,其展示单价VUN100对CHO突变病毒株的特异性小于1(即其与突变US28表达细胞的结合小于对照细胞)。

[1597] 二价VUN100呈现与表达US28的突变形式的细胞的2.58%的极低结合,其相比于对照CHO细胞仅提高1.52%(图21A),这对应于相比于对照CHO细胞,与表达US28的突变病毒株形式的细胞的结合仅增加2.43倍(图21B)。

[1598] 相比之下,本发明的示例性ECD3结合分子13-5G6-1D3(“1D3”)保持与表达突变US28形式的细胞12.93%高度结合(图21A),与0.88%的对照细胞相比,这几乎为与表达US28突变形式的细胞的结合水平大15倍(图21B)。

[1599] 这些数据证实,鉴于现有技术的VUN100分子(其与US28的N-末端区和ECD4结合于不连续表位)可高度易受结合特性和特异性的变化的影响,取决于病毒突变(例如在进化以发展抗性时),本发明的ECD3结合分子(如1D3)具有针对所鉴别的病毒株不可知的表位序列(“SAES”)的结合,且这允许本发明的抗ECD3结合分子维持与US28的其他突变病毒株的高水平特异性结合。因此,基于这些数据,与例如如W0 2019/151865、De Groof等人,2019,同上和De Groof等人,2020,同上中所描述的VUN100抗体相比,HCMV较不可能经由突变对ECD3结合分子产生抗性。这是本发明的ECD3结合分子优于其他HCMV疗法(如缙更昔洛韦)的优势。

[1600] 实施例2:

[1601] 其他ECD3抗体与HCMV的4N和4D变体结合

[1602] 鉴于实施例1中的发现,我们假设使用4N和4D生物肽,以以上方式产生并选择针对US28的ECD3的抗体和其他结合分子的过程提供有益结合特性,包括由于在ECD3内使用经鉴别的病毒株不可知的表位序列(“SAES”)而引起的病毒株不可知的结合。

[1603] 为了确认此假设,使用与先前所述相同的方法产生其他次克隆,且随后通过ELISA测试与两种肽变体的结合(如上文所描述,参见分析1)。如前所述,此ELISA分析中所用的肽序列为生物肽1,其具有序列TKKNNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:6,对应于ECD3的4N变体),和肽2,其具有序列TKKDNQCMTDYDYLEVS(SEQ ID NO:7,对应于ECD3的4D变体)。

[1604] 总共测试28个次克隆,其针对US28的ECD3产生特异性。次克隆来源自的克隆的细节可见于表4中。如先前所描述,“13”和“14”指示小鼠13和小鼠14。次克隆可因此通过将次克隆标识标记在相应克隆标识的末端并排除“US28”而充分表征为例如13-1C10-1A2,US28

仅表示克隆为针对US28具有特异性而产生。

[1605] 表4:ECD3结合分子的克隆和次克隆。

[1606]	克隆标识	次克隆标识
	US28-13-1C10	1A2, 1A8, 1B9, 1B11, 1C10, 1D3, 1G8, 1G9
	US28-14-1H3	1A10, 1C10, 1C11, 1C12, 1D2, 1E1
	US28-14-2C2	1A2, 1A3, 1G4, 1G9, 1G11
[1607]	US28-14-4E4	1A1, 1A4, 1E6, 1E8
	US28-14-4F11	1A1, 1A2, 1A3, 1A4
	US28-14-5H11	1H6

[1608] 全部次克隆标识列于表5A中,各次克隆的吸光度值在数值上表示于对应的表5B中。这些表格两者均代表实验的96孔板布局,且因此表5A的指示抗体次克隆的细胞(代表96孔板中的孔)可与表5B的对应细胞匹配。空白孔包被有对应肽并在无第一抗体存在下用第二抗体处理。

[1609] 观测到所有28个抗体次克隆对生物肽-1与生物肽-2的高吸光度值,其证实可针对ECD3产生不同序列的许多抗体,其将共有与HCMV的4N和4D变体的病毒株不可知的结合的有益特性。

[1610]

表 5A: 针对与 HCMV 的 4N 和 4D 变体结合进行测试的额外 28 个克隆的 ECD3 抗体克隆关键点.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
肽-1	13-1C10-1	14-2C2-1G	14-2C2-1G	13-1C10-1	14-5H11-1	13-1C10-1	14-4E4-1E	14-4F11-1	14-4E4-1A	14-1H3-1C	14-1H3-1E	14-4E4-1A4
肽 2	A8	4	9	B9	H6	G8	6	A1	1	10	1	
肽-1	14-4F11-1	14-1H3-1C	13-1C10-1	14-2C2-1A	14-1H3-1D	14-4E4-1E	13-1C10-1	14-2C2-1G	14-2C2-1A	14-1H3-1A	14-1H3-1C	14-4F11-1A
肽 2	A2	12	A2	2	2	8	D3	11	3	10	11	3
肽-1	13-1C10-1	14-4F11-1	13-1C10-1	13-1C10-1	空白							
肽 2	C10	A4	G9	B11								

表 5B: 针对与 HCMV 的 4N 和 4D 变体结合进行测试的额外 28 个克隆的吸光度值.

	1	2	3	4	5	6	7	8	9	10	11	12
肽-1	2.921	2.951	2.830	3.097	2.921	2.880	2.880	2.717	2.921	2.983	2.907	2.454
肽 2	2.951	2.811	2.747	2.823	2.944	2.993	3.090	2.944	2.976	3.187	2.914	2.374
肽-1	2.971	2.752	2.841	2.794	3.005	2.988	3.005	2.742	3.005	3.005	3.005	2.645
肽 2	2.902	2.871	2.789	2.488	2.765	2.871	2.661	2.534	2.765	2.842	2.765	2.482
肽-1	3.106	2.987	3.106	3.154	0.033							
肽 2	3.029	2.922	3.065	2.330	0.032							

[1611] 额外克隆与US28表达细胞的结合

[1612] 据认为,大部分HCMV发病机制与病毒潜伏相关,其与病毒经由多种机制避开体液

和细胞宿主免疫反应的能力密切有关(Manandhar等人,《国际分子科学杂志》,2019.20(15))。此类机制中最重要的一种包括HCMV的这种高度且不断变化的遗传多样性。许多CMV基因已鉴别为高度可变的,包括已报导许多N-末端多态性的G蛋白偶联受体US28(Goffard等人,Virus Genes,2006;33(2):175-81;Arav-Boger等人,J Infect Dis.,2002;186(8):1057-64)。

[1613] 我们的研究已鉴别出HCMV病毒株可参考其ECD3序列进行分类,且分别落入4N或4D变体的范围(这大约分为分别10%/90%)。以上表5B中提供的结合数据展示,与结合至US28分子的其他区(如VUN100(据报导结合至US28的N-末端和ECD4区中的不连续表位)的抗US28抗体的特征相比,针对ECD3内的病毒株不可知的表位序列(“SAES”)产生的结合分子始终显示病毒株不可知的结合,如通过本申请的图21中的数据所证明(如上文实施例1中所论述)。

[1614] 因此,本发明的结合分子的特征可在于对表达US28的细胞具有病毒株不可知的结合,其中结合程度和/或结合特异性实质上不受表达US28的HCMV的病毒株的影响。不仅鉴于不同个体可感染不同HCMV病毒株的事实,且还由于个体可同时感染有多种不同HCMV病毒株,因此这可为重要的(Gorzer等人,J Virol,2010,84(14):7195-7203;Renzette等人,PLoS Pathog,2011,7(5):e1001344;Renzette等人,Curr Opin Virol,2014.8:109-15;Renzette等人,Proc Natl Acad Sci USA,2015,112(30):E4120-8;Renzette等人,J Virol,2017,91(5))。在用HCMV的不同病毒株感染的情况下,提供这样的结合剂是非常有益的,该结合剂能够发挥其结合特性而与HCMV病毒株存在无关,且因此避免在开始治疗之前对HCMV感染的病毒株进行分类的需要。在个体同时感染多种不同HCMV病毒株的情况下,能够在个体中同时处理所有病毒株是非常有益的;特别是,这可帮助避免产生施加选择性压力以促进任何非结合病毒株的感染发展的环境。

[1615] 还已知,新的宿主感染产生各经感染个体的独特病毒株,且产生选择事件,其中由于免疫反应的选择性压力,新的基因型可变得占主导地位(Renzette等人,2011,同上),且病毒因子和宿主因子有可能在HCMV感染期间促进培养病毒基因漂移(Vabret等人,Trends Immunol,2017,38(1):53-65;Christensen和Paludan,Cell Mol Immunol,2017,14(1):4-13)。这是其中提供具有病毒株不可知的结合的抗US28结合分子很重要的另一情况。

[1616] 至少出于这些原因,病毒株不可知的结合(或至少使本发明的抗US28结合分子的结合特性的变化程度降至最低,如在HCMV的不同病毒株之间)是高度优选的。

[1617] 另外或替代地,本发明的结合分子可由以下进一步表征:与US28阴性细胞的结合相比,优选与US28表达细胞结合。因此,特异性为另一重要特征,以及以病毒株不可知的方式保留该特异性的能力。

[1618] 至少在一些情况下(例如在其中本发明的结合分子用于递送针对所结合细胞的细胞毒性活性的治疗情况下),在绝对意义上脱靶结合程度低也是重要的。在此类情况下,结合仅对US28表达细胞具有强特异性可能是不够的。换言之,尽管在某些情况下极高水平的与US28表达细胞的结合可以是有帮助的,但若高水平的与US28表达细胞的结合还伴随相对高水平的脱靶结合,则这在治疗背景下可能是不可接受的,尽管结合特异性的相对水平(比较与靶细胞相对于脱靶细胞的结合的绝对水平)可能产生有利比率。实际上,在此类情况下,避免结合至脱靶细胞(即不感染HCMV的细胞)是具有高度重要性的额外特征,从而允许提供避免脱靶活性的治疗适用分子。换言之,以低绝对水平结合至US28阴性细胞的本

发明的结合分子在一些情况下可提供更加治疗相关的活性,因为高背景结合将对结合分子的脱靶作用有风险。举例而言,在CAR T细胞或BiTE选择性杀伤所结合的任何细胞的情况下,CAR T细胞或BiTE具有低水平的与靶点阴性细胞的背景结合是关键的。否则,CAR T细胞或BiTE可能杀伤除了预期目标以外的细胞。

[1619] 如上文所指出,在本申请的实施例1中(如图21中进一步所示),与抗US28VUN100现有技术抗体(据报导其与US28的N-末端和ECD4区中的不连续表位结合)相比,本发明的示例性ECD3结合分子(13-5G6-1D3)提供实质上较低的脱靶结合活性,提供显著改善的病毒株不可知的结合,且还提供更高特异性以及改善的对不同HCMV病毒株的特异性的保持。

[1620] 因此,进一步分析所选其他抗ECD3结合分子与VUN100和1D3相比的结合特性。

[1621] 为了测定脱靶结合程度和对US28表达细胞的结合特异性程度,对选自28种病毒株不可知的ECD3结合分子的多个候选次克隆(所选候选物可见于表6中)使用与上述分析2相同的流式细胞术分析,并与1D3-mFc相比,1D3-mFc是一种含有鼠Fc受体的示例性13-5G6-1D3形式,作为阳性对照,且与比率1:1的50 μ g/ml的Mv和Bv VUN100分子的混合物相比,所述分子为现有技术已知的针对US28的结合分子,作为另一比较对照。

[1622] 表6:所选用于针对US28表达细胞的结合分析的次克隆。

克隆标识	次克隆标识
US28-13-1C10	1B9, 1C10, 1G9
US28-14-1H3	1A10, 1C10
US28-14-2C2	1G4
US28-14-4E4	1A1, 1E8

[1624] 通过流式细胞术测试所选次克隆与经工程改造以过度表达DB-US28的CHO细胞(“CHO-US28”细胞)的结合,与不过度表达US28的CHO细胞(“CHO”细胞)相比,作为测量各种结合分子的非特异性结合的方式。用CHO细胞和CHO-US28细胞使用各自的第二抗体(对次克隆使用抗mFc-FITC,或对VUN100分子使用抗myc-PE)测定背景水平。鉴于US28表达于细胞表面上,对于这些实验,细胞为未经透性化的。

[1625] 表7和图22概述了对照CHO细胞(即不表达US28)中流式细胞术的结合百分比,其表明脱靶结合的风险,其中去除第二抗体的背景水平。因此,通过各条件指示的结合百分比为经测试结合分子的脱靶结合。

[1626] 表7:与对US28呈阴性的CHO细胞的结合百分比。

条件	与CHO细胞的结合百分比
1D3-mFc (1:4) 250 μ g/ml	0.66%
VUN100Mv+Bv Ab 1:1混合物50 μ g/ml	2.47%
13-1C10-1B9(1:5) (200 μ g/ml)	0.71%
13-1C10-1C10(1:5) (200 μ g/ml)	0.62%
13-1C10-1G9(1:5) (200 μ g/ml)	0.44%
14-1H3-1A10(1:5) (200 μ g/ml)	0.58%
14-1H3-1C10(1:5) (200 μ g/ml)	0.31%
14-2C2-1G4(1:20) (50 μ g/ml)	0.35%
14-4E4-1A1(1:5) (200 μ g/ml)	1.63%

14-4E4-1E8 (1:5) (200µg/ml)	0.03%

[1628] 表7和图22中的数据展示,与针对ECD3内的病毒株不可知的表位序列(“SAES”)产生的抗体相比,VUN100分子具有始终较高水平的与US28阴性CHO细胞的背景结合。应注意,VUN100在比大多数其他抗体高的稀释/较低浓度下进行测试,这应帮助降低检测到的VUN100样品的脱靶结合(因为较高抗体浓度往往会导致较高背景结合)。尽管如此,数据展示与VUN100样品相比,本发明的抗体始终展示降低的背景结合。

[1629] 通常,VUN100分子以至少3倍或4倍或更高的增加的水平结合脱靶细胞。

[1630] 相比较地,其他ECD3结合分子(如先前所描述的1D3结合分子)表明与US28-阴性CHO细胞的背景结合低得多。

[1631] 因此,与VUN100分子相比,针对ECD3内的病毒株不可知的表位序列(“SAES”)产生的本发明的ECD3结合分子始终表明具有更加治疗相关的活性,具有较低的脱靶结合风险。

[1632] 尽管与基于VUN100的分子相比,改善的病毒株不可知的结合和/或低背景水平两者是ECD3结合分子的足够有利特性,但本申请人进一步研究是否可容易地获得ECD3结合分子,其具有在VUN100分子的结合特异性之上改善的结合特异性。因此,将五种示例性ECD3结合分子与已示例的有前景的1D3候选物相比,VUN100作为对照。五种示例性ECD3结合分子如表8中所列出。

[1633] 为了计算相比于对照细胞,对表达US28的CHO细胞的结合特异性,如下计算示例性ECD3结合分子的特异性水平:如上文所描述减去背景水平,各测试抗体样品的CHO-US28结合水平除以其各自对照CHO结合水平(即阳性结合与阴性结合的比率),并计算差异(相对于对VUN100样品确定的结合特异性),其中值>1表示相比于VUN100改善的特异性。

[1634] 这些实验的结果表示于表8和图23中。

[1635] 表8:5个示例性ECD3结合次克隆的结合特异性。

[1636]	条件	与 VUN100 显示的特异性相比的结合特异性
	VUN100 Mv+Bv Ab 混合物 (1:20) 50 µg/ml	1.00
	14-2C2-1G4 (1:20)	5.37
	14-4E4-1E8 (1:5)	4.60
	14-1H3-1A10 (1:5)	2.29
	13-1C10-1C10 (1:5)	1.74
	1D3-mFc (1:4) 250 µg/ml	1.65

[1637] 结合特异性数据证实,许多其他次克隆提供并甚至增加了针对ECD3产生的1D3-Fc结合分子的改善的特异性,且还证实比VUN100分子改善的结合特异性。

[1638] 这证实针对ECD3内的病毒株不可知的表位序列(“SAES”)产生的多个ECD3结合分子可根据本文所述的方案容易地鉴别,所述结合分子与1D3相比具有改善的结合特异性,和/或与VUN100分子相比至少具有改善的结合特异性。

[1639] 总体而言,这些数据证实,如根据本文所描述的方案产生的针对ECD3内的病毒株不可知的表位序列(“SAES”)的具有ECD3结合特异性的结合分子可提供为呈现以下特征中的一个、两个或全部三个:

[1640] 1.与VUN100分子相比,始终改善的与由不同HCMV病毒株编码的US28的病毒株不可

知的结合；

[1641] 2. 与VUN100分子相比，始终实质上较低的与US28阴性细胞的背景结合；和任选地

[1642] 3. 与VUN100和/或1D3分子相比，维持或优选改善的结合特异性。

[1643] 实施例3：

[1644] 在HCMV感染人组织上的结合

[1645] HCMV感染人肺组织用于通过使用免疫组织化学分析(IHC)验证本发明的示例性ECD3结合分子US28-13-5G6-1D3 rAb在HCMV感染人组织上的结合。

[1646] US28-13-5G6-1D3 rAb展示在1:400-1:1600稀释(w/v)之间的染色，且选择1:400稀释(w/v)用于进一步筛选研究(图12A)。如制造商手册中所建议，HCMV抗IE市售抗体MAB810R用作阳性对照，且以1:200(w/v)稀释展示HCMV感染肺组织的最佳染色(图12D)。IgG用作阴性对照抗体(图12F)。用US28-13-5G6-1D3rAb染色HCMV感染肺组织证明对HCMV感染肺泡细胞的特异性，因为正常肺组织(图12B)或HCMV阴性子宫肌层(数据未示出)中无肺泡细胞和纤维母细胞染色。US28-13-5G6-1D3 rAb染色典型HCMV感染细胞，其在HCMV阳性对照载片中具有特征性细胞肿大作用(图12A)。13-5G6-1D3 rAb在这些细胞中展示强细胞质染色，因为已知US28蛋白位于细胞质和细胞膜中，而抗IE对照抗体MAB810R展示核染色，这是如所预期的，因为已知IE蛋白在生产性HCMV感染期间位于细胞核中(图12D)。通过使用原位杂交(ISH)方法，其中探针靶向相同样品中的HCMV DNA，检验了阳性染色为HCMV特异性的。有趣地，在正常肺组织中，13-5G6-1D3 rAb对于已知为潜伏或再活化HCMV的携带者的一些组织巨噬细胞呈阳性染色(图12B)。如通过阳性ISH信号所表明的，相同巨噬细胞展示HCMV DNA的存在(图12C)。相同巨噬细胞未展示对IE蛋白呈阳性染色(图12E)。对于肺组织，用阴性抗体对照抗IgG Ab染色保持阴性(图12F)。这些结果与本文中展现的来自细胞研究的我们其他结果一致，所述细胞研究展示US28-13-5G6-1D3 rAb与HCMV感染人组织的特异性结合。图20展示在形态上正常的相邻肿瘤(NAT)胰腺组织中的生产性HCMV感染的额外实例的特异性染色结果。

[1647] 在HCMV感染人癌症上的结合

[1648] 我们其后通过使用IHC和验证性ISH分析研究US28-13-5G6-1D3 rAb与人癌症组织的结合。结果由资深病理学家评估。我们发现US28-13-5G6-1D3 rAb在数种癌症类型上特异性染色。其中有胶质母细胞瘤(例如胶质母细胞瘤4级)、结肠癌、直肠癌、乳腺癌(例如局部晚期乳腺癌及其转移瘤)、食道癌、胃(gastric/stomach)癌、胰腺癌、肝癌(如肝细胞癌)、肺癌、恶性嗜铬细胞瘤和宫颈癌，首次显示US28在癌症病理学中的潜在通用作用。不同癌细胞的染色强度分类为阴性=0，弱阳性=1，中等阳性=2或强阳性=3。US28染色仅在肿瘤细胞具有不同于相邻正常组织的阳性染色的情况下分类为阳性。在阳性US28-13-5G6-1D3rAb染色的大多数肿瘤中，染色一般在大部分肿瘤细胞中为阳性。通过使用ISH阳性发现肿瘤细胞核中的HCMV DNA来确认肿瘤阳性。在许多情况下，肿瘤样品展示血管内皮和平滑肌细胞的阳性染色，其也见于相邻正常组织中且不视为肿瘤阳性的迹象。IgG对照Ab染色用作阴性对照且在所有经研究癌性组织和正常组织中为阴性。

[1649] 存在阳性US28-13-5G6-1D3 rAb染色强度，与三个经研究食道和胃腺癌样品之一的细胞核HCMV DNA的发现组合。HCMV阳性胃肿瘤展示弥漫性类型胃癌的形态征象，其通常在小细胞组中生长并影响大区域，而非仅影响胃的一个区域。阳性肿瘤样品来自56岁男

性,其肿瘤为3级且TNM分类为T3N1M0。此外,US28阳性食道癌展示IIIa期、T3N1M0的侵袭性类型。对于上皮细胞染色,相邻食道组织的全部(3/3)均为阴性,且对于HCMV DNA,2/3胃肿瘤相邻样品也为阴性。

[1650] 除了1/3经测试结肠腺癌中的阳性HCMV DNA分析以外,US28-13-5G6-1D3rAb的染色强度为阳性(1+),而3/3对照对于相邻上皮细胞中的US28-13-5G6-1D3染色皆为阴性。HCMV DNA仍可在2/3相邻样品中追踪。阳性肿瘤为3级,其中TNM分类为T4N1M0。值得注意地,T4分级是指癌症已穿透结肠壁,且可能已附着或生长至其他邻近组织或器官中,且因此根据定义分类为局部晚期结肠癌。

[1651] 所有3个经研究直肠腺癌样品具有阳性US28-13-5G6-1D3染色和阳性HCMV ISH。其为T3N0M0,2级;T4N0M0,2级;和T3N1M0,3级。在相邻样品中,2/3对于HCMV为阴性,且1/3具有阳性US28-13-5G6-1D3染色和阳性ISH两者。

[1652] 2/3的经研究肝细胞癌对于US28-13-5G6-1D3染色和HCMV ISH为阳性。引人注目地,相邻肝组织展示生产性HCMV感染的征象,具有中度US28-13-5G6-1D3染色和库普弗细胞(Kupffer cell)中的大且频繁的细胞质HCMV DNA聚集物。这也见于肿瘤相邻肝组织和各自相邻样品两者中。

[1653] 我们还在2/3肺癌样品、2/3宫颈癌样品和1/3胰腺癌样品中发现US28-13-5G6-1D3染色和阳性ISH两者。

[1654] 我们接着通过使用IHC和ISH更详细地研究乳腺癌队列中的HCMV US28表达。41个经研究原发性乳房肿瘤样品中的约74%展示US28-13-5G6-1D3 rAb的阳性和特异性细胞质染色和癌细胞中的阳性核HCMV DNA(图13和图15)。出人意料地,肿瘤形式越具有侵袭性(如具有低激素受体表达、为HER2阳性或三阴性乳腺癌(TNBC)的那些肿瘤形式),则在肿瘤细胞中对US28-13-5G6-1D3 rAb的染色趋势越强(图13和图16A)。US28-13-5G6-1D3 rAb染色限于肿瘤细胞,尽管许多肿瘤血管也展示强阳性染色。有趣地,约94%的经研究的30个转移性淋巴结展示转移性细胞的特异性US28-13-5G6-1D3 rAb染色。最密集的染色见于TNBC和HER2阳性转移瘤中(图14和图16B)。所有TNBC(n=8)和HER2阳性(n=11)转移瘤均具有阳性US28-13-5G6-1D3染色(图16B)。HCMV ISH对于98%的经研究乳腺癌样品(n=41)和100%的经研究腺性乳腺癌转移(n=30)为阳性。有趣地,唯一的HCMV DNA阴性乳腺癌样品为神经内分泌肿瘤,其还展示阴性US28-13-5G6-1D3染色。ISH发现也与以上列出的IHC结果一致,展示仅12%原发性肿瘤中每个肿瘤细胞有许多核HCMV DNA信号,而在39%转移瘤中每个肿瘤细胞有许多核ISH信号。在原发性肿瘤和转移瘤中每个肿瘤细胞有许多ISH信号的情况排他性地见于三阴性肿瘤和HER2阳性肿瘤中,仅有一个或两个例外情况。正常乳房上皮细胞和10/10相邻对照乳房组织中没有US28-13-5G6-1D3的细胞质染色(图15)。正常淋巴组织未展示任何阳性US28染色(2/2样品均为阴性)。然而,许多相邻组织对于血管内皮细胞和平滑肌细胞(在70%相邻乳房组织中)展示阳性染色,其类似于肿瘤样品。一致地,还在3/10正常相邻乳房组织中发现少量HCMV DNA。13-5G6-1D3染色评估为对乳腺癌和相邻正常组织两者中的HCMV感染细胞具有特异性。

[1655] 数项早期研究记录HCMV感染和US28在胶质母细胞瘤组织中的表达[5,6]。我们用US28-13-5G6-1D3 rAb和MAB810R抗体对人星形细胞瘤1-3级和胶质母细胞瘤4级组织进行染色。对于US28-13-5G6-1D3 rAb染色,所有星形细胞瘤1级(n=4)均为阴性。在星形胶质细

胞瘤2-3级中,6个为阴性,37个为阳性(1+),且2个对于US28-13-5G6-1D3 rAb染色为中度阳性(2+)。所有胶质母细胞瘤4级(n=19)均为阳性,其中3个对于US28-13-5G6-1D3 rAb染色为中度阳性(2+)(图17和图18)。抗IE抗体MAB810R展示17/19胶质母细胞瘤4级样品的阳性染色,而2个样品视为阴性。HCMV ISH在所有肿瘤样品中为阳性,指示100%样品中存在HCMV DNA。相邻正常脑组织对照未展示US28-13-5G6-1D3 rAb的任何一般染色(图17C)。对于HCMV DNA,五个NAT为完全阴性。HCMV DNA发现于其余五个NAT样品中的星形胶质细胞和胶质细胞核中。肿瘤组织中的阴性IgG对照染色为阴性(图17C),指示脑组织中通过13-5G6-1D3 rAb的HCMV US28特异性染色。

[1656] 仅6/41个经研究乳腺癌样品、但大部分胶质母细胞瘤4级样品(17/19)展示抗IE MAB810R抗体的阳性细胞质染色。阳性乳腺癌样品通常仅含有具有阳性细胞质染色的稀少阳性细胞,但阳性样品中的5/6为HER2阳性(n=4)或TNBC(n=1)。另外,一个HER2阳性样品在肿瘤巨噬细胞中对MAB810R Ab阳性染色。仅1/37转移瘤对MAB810R Ab阳性染色,但此样品也为HER2阳性。在乳腺癌样品中,MAB810R Ab的染色始终与US28-13-5G6-1D3 rAb的阳性染色组合。极有趣地,具有阴性MAB810R染色的数个肿瘤样品展示阳性血管内皮和平滑肌细胞染色,其对于US28-13-5G6-1D3 rAb和MAB810R抗体均为阳性。

[1657] HCMV IE蛋白的细胞质染色先前已描述于数种癌症类型中[7,8]。MAB810R单克隆抗体在我们的实验中用作HCMV阳性对照以靶向细胞内、HCMV编码的IE1和IE2蛋白。这些蛋白共有外显子1-3且另外包括外显子4(IE1)或5(IE2)。全长IE蛋白为HCMV复制和自潜伏再活化以引起生产性HCMV感染所需[4]。其不在HCMV实验潜伏期期间表达[9]。然而,IE1蛋白的外显子4(IE1x4)(约60kDa尺寸)的RNA和蛋白表达先前已展示于潜伏HCMV感染的CD34+造血祖细胞中,但不展示于天然和实验潜伏系统中的CD14单核细胞中[10]。因此,除了US28蛋白之外,潜伏期期间的HCMV基因表达可包括IE1x4的表达,但不包括全长IE1和IE2蛋白[10]。根据来自制造商的信息(MerckMillipore.com),MAB810R抗体结合于约68-72kDa全长IE1和IE2蛋白上,指示MAB810R Ab靶向具有裂解或复制CMV感染的细胞。因此,其不应与潜伏HCMV感染细胞结合。我们的结果展示,阳性乳房肿瘤样品中的大部分癌细胞表达US28蛋白,但不表达IE蛋白。

[1658] 在我们的研究中,当用ISH研究时,100%乳腺癌转移瘤和100%脑瘤均为HCMV DNA阳性。我们观测到,在恶性肿瘤中,HCMV DNA排他性地位于肿瘤细胞核中。核HCMV DNA信号的数目在不同肿瘤样品之间变化。我们还观测到,侵袭性癌症类型(如TNBC和HER2阳性乳腺癌)中每个肿瘤细胞核ISH信号的数目增加。在其中病毒DNA主要在多个大聚集体中位于细胞质中的正常组织中,未观测到ISH信号的核定位(图20)。在生产性HCMV感染期间,病毒粒子在自细胞排出之前填充于内质网中。这解释了在生产性HCMV感染期间大部分病毒DNA的细胞质位置。我们仅在正常组织(和NAT),如胰腺(图20)、乳房、肝脏和肺组织(图12)中观测到此类生产性HCMV感染。

[1659] 当综合而言时,这些数据表明癌细胞(且尤其乳腺癌细胞)携带潜伏HCMV感染。我们的研究中支持此发现,不仅由IE蛋白表达的缺乏和细胞质病毒聚集物的缺乏支持,而且由肿瘤细胞中存在核HCMV信号支持。我们的结果和结论由更早的数据支持,指示肿瘤细胞中缺乏细胞病变效应且缺乏复制病毒的迹象[11,12]。

[1660] 潜伏HCMV感染单核细胞经程序化以用于长期细胞存活[13],且合理地,肿瘤细胞

中的潜伏HCMV感染可促进增加的肿瘤细胞存活。潜伏HCMV感染单核细胞展示在其微环境中发挥较宽免疫抑制功能以保护自身免受免疫系统消除[13]。这也类似于癌细胞,且逃避免疫破坏已确认为癌症的十大标志之一[14]。

[1661] 有趣地,还如更早时由其他人所描述[7,8],我们发现在少数侵袭性乳腺癌样品和大部分胶质母细胞瘤4样品中的细胞质全长IE蛋白表达。癌症特异性表观遗传机制(如组蛋白修饰、DNA低甲基化或某些病毒或宿主突变)可抑制病毒复制,但仍允许某些侵袭性癌症中的一些IE表达[15]。我们发现一些阳性乳房肿瘤样品中的仅少数细胞的细胞质中存在IE蛋白表达,指示非均质癌细胞群可含有更容许复制病毒的少数细胞/细胞类型。已提出癌症干细胞尤其允许HCMV感染且胶质母细胞瘤细胞中的IE蛋白表达致突变并诱导细胞存活、肿瘤生长和上皮间质(EMT)表型[16]。潜伏HCMV感染的US28阳性癌细胞可进一步产生强免疫抑制微环境,其可允许IE蛋白的表达,已知IE蛋白在少数肿瘤细胞中为高度免疫原性CD4+ T细胞抗原和CD8+ T细胞抗原[17]。我们的结果另外展示肿瘤含有其他HCMV感染细胞,其对IE蛋白阳性染色,如内皮细胞和平滑肌细胞和有时巨噬细胞。已知这些细胞类型比肿瘤细胞更允许复制性病毒感染[16],且可另外促进肿瘤内的病毒维持和脱落。然而,胶质母细胞瘤肿瘤中参与HCMV相关感染的机制可能由于这些癌症的不同细胞来源而不同于乳腺癌。

[1662] 综合以上列出的结果,我们在此展示特异性结合于US28的ECD3的结合剂,如本文中通过US28-13-5G6-1D3 rAb所示例,特异性结合于HCMV感染细胞的表面上,如US28-13-5G6-1D3在US28过度表达细胞模型、HCMV感染细胞和组织、来自HCMV血清反应呈阳性个体的PBMC和肿瘤组织中HCMV阳性癌细胞上的结合所展示。相比之下,如本文中通过US28-13-5G6-1D3 rAb所示例,特异性结合至US28的ECD3的结合剂通常不结合于HCMV阴性对照细胞或组织上(如图12、图15、图17、图19和图20中所示)。这些发现与US28蛋白的作用相干,其展示为在裂解HCMV感染和潜伏HCMV感染两者期间存在[18]。我们在此首次展示人乳腺癌、直肠癌、食道癌、胃癌、胰腺癌、肝癌、肺癌和宫颈癌的阳性US28染色并确认在胶质母细胞瘤4级[5,6]和结肠癌[19]中的HCMV US28表达的一些更早结果。最重要地,我们展示US28-13-5G6-1D3 rAb特异性结合于局部晚期结肠癌、转移性乳腺癌组织(约94%)和胶质母细胞瘤IV级肿瘤(约100%),证实我们在侵袭性、局部晚期和转移人癌症中高HCMVUS28表达的假设,且为特异性结合于US28的ECD3的结合剂提供另一作用。

[1663] 这些发现支持HCMVUS28作为针对HCMV感染(在潜伏HCMV感染中特别有意义)和针对HCMV阳性癌症(在侵袭性、局部晚期和转移性、HCMV阳性癌症中特别有意义)的重要治疗靶点的作用,且指向针对US28的ECD3的抗体和其他结合剂,特别是对US28具有高度特异性和/或病毒株不可知的结合的那些结合剂,如抗体US28-13-5G6-1D3,作为高效的治疗性、预防性和诊断性结合分子。这包括提供针对HCMV感染(在潜伏HCMV感染中特别有意义)和针对HCMV阳性癌症的细胞毒性活性的高度特异性靶向的能力。

[1664] 在未感染HCMV的原代组织上的结合

[1665] 当考虑治疗分子时,评定结合分子的脱靶结合的风险是重要的。这对于US28特别重要,US28与可存在于受试者中的CCR5具有序列同源性水平。因此,高结合特异性和低脱靶结合为具有低脱靶效应风险的有前景的治疗结合分子的指标。

[1666] 因此,我们研究本发明的示例性结合分子与多种人原代组织的结合以评定脱靶结合的水平。这些数据使用以与先前所述相同的方式制备的US28-13-5G6-1D3抗体,在流式细

胞术(FACS)中产生。

[1667] 对各种人原代细胞进行使用13-5G6-1D3抗体的流式细胞术分析以排除一般脱靶结合。研究以下细胞系:人原代肾上腺皮质细胞、人原代肾脏上皮细胞、人原代心脏微血管内皮细胞、人原代肝脏上皮细胞和人原代静脉平滑肌细胞。US28靶向抗体13-5G6-1D3在所有这些细胞类型上展示极低表面结合,远低于<1%,指示13-5G6-1D3在1:40浓度针对这些细胞类型没有脱靶结合(图19A)。这些结果支持我们对实验室细胞(即非原代细胞系)的观测结果,展示在正常US28阴性细胞上的低结合。人胰腺组织用US28-13-5G6-1D3 Ab的IHC染色展示HCMV感染胰腺组织的特异性染色和HCMV未感染胰腺组织的阴性染色(图20)。

[1668] 人心脏组织的IHC

[1669] 通过免疫组织化学研究人心脏组织样品以1:400浓度的13-5G6-1D3染色。免疫组织化学未展示13-5G6-1D3对人心肌组织的任何一般脱靶结合(图19B)。相同肌肉组织还对HCMV DNA为阴性(数据未示出)。用13-5G6-1D3染色类似于用阴性IgG抗体对照染色。人恶性嗜铬细胞瘤肿瘤在分析中用作HCMV感染的阳性对照。其与心脏样品位于相同TMA板上并展示对13-5G6-1D3抗体的阳性染色(图19B)。ISH对照还展示在相同活体组织切片中肿瘤细胞的细胞核中的典型HCMV DNA染色,确认此阳性对照中存在潜伏HCMV感染(图19B)。

[1670] 这些数据表明,抗体US28-13-5G6-1D3特异性结合于生产性和潜伏HCMV感染细胞和人组织两者上且其不结合于健康人细胞和组织的表面上。阳性和阴性结果已由HCMV感染的其他独立替代标记确认,如通过ISH分析用MAB810抗体和HCMV DNA对照染色,和用人IgG抗体阴性对照染色。

[1671] 实施例的参考文献:

[1672] 1.Georgiou,G.,等人,The promise and challenge of high-throughput sequencing of the antibody repertoire.Nat Biotechnol,2014.32(2):p.158-68.

[1673] 2.Arav-Boger,R.,等人,Polymorphisms of the cytomegalovirus (CMV)-encoded tumor necrosis factor-alpha and beta-chemokine receptors in congenital CMV disease.J Infect Dis,2002.186(8):p.1057-64.

[1674] 3.Groves,I.J.,M.B.Reeves,和J.H.Sinclair,Lytic infection of permissive cells with human cytomegalovirus is regulated by an intrinsic 'pre-immediate-early' repression of viral gene expression mediated by histone post-translational modification.J Gen Virol,2009.90(Pt 10):p.2364-2374.

[1675] 4.Elder,E.和J.Sinclair,HCMV latency:what regulates the regulators?Med Microbiol Immunol,2019.208(3-4):p.431-438.

[1676] 5.De Groof,T.W.M.,等人,Nanobody-Targeted Photodynamic Therapy Selectively Kills Viral GPCR-Expressing Glioblastoma Cells.Mol Pharm,2019.16(7):p.3145-3156.

[1677] 6.Soroceanu,L.,等人,Human cytomegalovirus US28 found in glioblastoma promotes an invasive and angiogenic phenotype.Cancer Res,2011.71(21):p.6643-53.

[1678] 7.Harkins,L.E.,等人,Detection of human cytomegalovirus in normal and neoplastic breast epithelium.Herpesviridae,2010.1(1):p.8.

- [1679] 8.Taher,C.,等人,High prevalence of human cytomegalovirus in brain metastases of patients with primary breast and colorectal cancers.Transl Oncol,2014.7(6):p.732-40.
- [1680] 9.Collins-McMillen,D.,等人,Alternative promoters drive human cytomegalovirus reactivation from latency.Proc Natl Acad Sci U S A,2019.116(35):p.17492-17497.
- [1681] 10.Tarrant-Elorza,M.,C.C.Rossetto,和G.S.Pari,Maintenance and replication of the human cytomegalovirus genome during latency.Cell Host Microbe,2014.16(1):p.43-54.
- [1682] 11.Naucler,C.S.,J.Geisler,和K.Vetvik,The emerging role of human cytomegalovirus infection in human carcinogenesis:a review of current evidence and potential therapeutic implications.Oncotarget,2019.10(42):p.4333-4347.
- [1683] 12.Geisler,J.,等人,A Review of the Potential Role of Human Cytomegalovirus (HCMV) Infections in Breast Cancer Carcinogenesis and Abnormal Immunity.Cancers(Basel),2019.11(12).
- [1684] 13.Elder,E.,等人,Monocytes Latently Infected with Human Cytomegalovirus Evade Neutrophil Killing.iScience,2019.12:p.13-26.
- [1685] 14.Hanahan,D.和R.A.Weinberg,Hallmarks of cancer:the next generation.Cell,2011.144(5):p.646-74.
- [1686] 15.Kumar,A.,等人,The Human Cytomegalovirus Strain DB Activates Oncogenic Pathways in Mammary Epithelial Cells.EBioMedicine,2018.30:p.167-183.
- [1687] 16.Cobbs,C.,Cytomegalovirus is a tumor-associated virus:armed and dangerous.Curr Opin Virol,2019.39:p.49-59.
- [1688] 17.Adamson,C.S.和M.M.Nevels,Bright and Early:Inhibiting Human Cytomegalovirus by Targeting Major Immediate-Early Gene Expression or Protein Function.Viruses,2020.12(1).
- [1689] 18.Krishna,B.A.,等人,The Requirement for US28 During Cytomegalovirus Latency Is Independent of US27 and US29 Gene Expression.Front Cell Infect Microbiol,2020.10:p.186.
- [1690] 19.Cai,Z.Z.,等人,Human cytomegalovirus-encoded US28 may act as a tumor promoter in colorectal cancer.World J Gastroenterol,2016.22(9):p.2789-98.
- [1691] 20.Kumar A,Tripathy MK,Pasquereau S,Al Moussawi F,Abbas W,Coquard L, 等人,The Human Cytomegalovirus Strain DB Activates Oncogenic Pathways in Mammary Epithelial Cells.EBioMedicine(2018) 30:167-83.doi:10.1016/j.ebiom.2018.03.015.
- [1692] 21.Sandy Haidar Ahmad,Sebastien Pasquereau,Ranim El Baba,Zeina Nehme,

Clara Lewandowski和Georges Herbein.Distinct Oncogenic Transcriptomes in Human Mammary Epithelial Cells Infected With Cytomegalovirus.Frontiers in Immunology(2021)12:Article 772160.

[1693] 22.Liliana Soroceanu等人,Cancer Res.2011Nov 1;71(21):6643-53.

[1694] 23.Boivin等人,J Clin Virol.2012Mar;53(3):208-13.

[1695] 24.Göhring等人,Computational and Structural Biotechnology Journal, 2015;13:153-158.

[1696] 25.Jung等人,BMC Infectious Diseases(2019)19:388.

[1697]

序列		描述
SEQ ID NO:1	序列 MTPTTTTAAELTTEFDYDEAAATPCVFTDVLNQSKPVTL	US28 的 N-末端细胞外结构域 1 (ECD1)， 如由 HCMV 病毒株 DB (寄存编号 KT959235) 编码，对应于 SEQ ID NO: 5 的 位置 1-37
SEQ ID NO:2	QYLLDHNSLAS	US28 的胞外结构域 2(ECD2)，如由 HCMV 病毒株 DB (寄存编号 KT959235) 编码， 对应于 SEQ ID NO: 5 的位置 91-101
SEQ ID NO:3	TKKNNQCMTDYDYLEVS	US28 的细胞外结构域 3 (ECD3)，如由 HCMV 病毒株 DB (寄存编号 KT959235) 编码，对应于 SEQ ID NO: 5 的位置 167-183
SEQ ID NO:4	VDTLKLLKWISSCEFEERSLKRAL	US28 的细胞外结构域 4 (ECD4) 如由 HCMV 病毒株 DB (寄存编号 KT959235) 编码，对应于 SEQ ID NO: 5 的位置 250-273
SEQ ID NO:5	MTPTTTTAAELTTEFDYDEAAATPCVFTDVLNQSKPVTLFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV YFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLASVPCITLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYVAIVMYRYP VKQACLFSEFWIFAVIIAIPHEMVVTKKNNQCMTDYDYLEVSYPILNLVELMIGAFVPLSVISYCYR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIADVIVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLKWISSCEFEERSLKRALILTESLA FCHCCLNPLLYVFGTKFRQELHCLLAEFRQRIFSRDVSWYHMSFSRRSSPSRRETSSDILSDEVCRVS QIIP	由 HCMV 病毒株 DB 编码的 US28 的全序 列 (寄存编号 KT959235)
SEQ ID NO:6	TKKNNQCMTDYDYLEVS	US28 蛋白的 ECD3，如由 HCMV 病毒株的 ECD3 4N 变体组 (例如病毒株 DB，寄存编 号 KT959235) 编码
SEQ ID NO:7	TKKDNQCMTDYDYLEVS	US28 蛋白的 ECD3，如由 HCMV 病毒株的 ECD3 4D 变体组 (例如病毒株 AF1，寄存 编号 GU179291.1) 编码
SEQ ID NO:8	GFTFTDYY	ID3 的 V _H -CDR1 序列

[1698]

SEQ ID NO: 9	IRSKANGYTT	ID3 的 V _H -CDR2 序列
SEQ ID NO: 10	ARDERRTAWLAY	ID3 的 V _H -CDR3 序列
SEQ ID NO: 11	MKLWNWIFLVTLNGIQCEVKLVESGGGLVQPGGSLRLACATSGTFTDYMSWVRQPPGKALEWLGFI RSKANGYTTTEYSASVKGRFTISRDNSSQILYLQMNLTIRSEDSATYYCARDERRTAWLAYWGQGLTVTVSA	ID3 的重组表达 V _H 序列的未成熟形式, 其中位置 1-19 对应于前导序列
SEQ ID NO: 12	EVKLVESSGGGLVQPGGSLRLACATSGTFTDYMSWVRQPPGKALEWLGFIIRSKANGYTTTEYSASVKGRF TISRDNSSQILYLQMNLTIRSEDSATYYCARDERRTAWLAYWGQGLTVTVSA	ID3 的 V _H 序列的成熟形式, 无前导序列
SEQ ID NO: 13	MKLWNWIFLVTLNGIQ	ID3 的重组表达 V _H 序列的前导序列
SEQ ID NO: 14	QSIHNSNGNTY	ID3 的 V _L -CDR1 序列
SEQ ID NO: 15	KVS	ID3 的 V _L -CDR2 序列
SEQ ID NO: 16	FQGSHPVTWT	ID3 的 V _L -CDR3 序列
SEQ ID NO: 17	MKLPRVRLVLMVWIPASSSDVLMTQTPLSLPVSLGDAQSISCRSSQSIHNSNGNTYLDWYLQKPGQSPKLL LIYKVSNNRFSGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFQGSHPVTWTFGGGKLEIK	ID3 的重组表达 V _L 序列的未成熟形式, 其中位置 1-19 对应于前导序列
SEQ ID NO: 18	DVLMTQTPLSLPVSLGDAQSISCRSSQSIHNSNGNTYLDWYLQKPGQSPKLLIYKVSNNRFSGVDPDRFSGS GSGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFQGSHPVTWTFGGGKLEIK	ID3 的 V _L 序列的成熟形式, 无前导序列
SEQ ID NO: 19	MKLPRVRLVLMVWIPASS	ID3 的重组表达 V _L 序列的前导序列
SEQ ID NO: 20	MKLWNWIFLVTLNGIQCEVKLVESGGGLVQPGGSLRLACATSGTFTDYMSWVRQPPGKALEWLGFI RSKANGYTTTEYSASVKGRFTISRDNSSQILYLQMNLTIRSEDSATYYCARDERRTAWLAYWGQGLTVTVSA AKTTPPSVYPLAPGSAAGTNSMVTLCGLVKGYFPEPVTVTNSSGSLSSGVHTFPFPAVLQSDLYTLSSSVTV PSSTWFEVTCNVAPHASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLITITLTPKVTGVV VDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKRCRVNSAAFPAPFIE KTIISKTKGRPKAPQVYTI PPPKEQMAKDKVSLTCMTDFFEDI TVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGS YFIYSKLNVOKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK	ID3 的重链的完整序列。前导序列带下划线; 其在成熟序列中经去除。成熟 V _H 序列以粗体显示。
SEQ ID NO: 21	MKLPRVRLVLMVWIPASSSDVLMTQTPLSLPVSLGDAQSISCRSSQSIHNSNGNTYLDWYLQKPGQSPKLL LIYKVSNNRFSGVDPDRFSGSGGTDFTLKISRVEAEDLGYYCFQGSHPVTWTFGGGKLEIK RADAAPTIV SIFPESSEQLTSGGASVWCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNWTQDQSKDSTYSMSSITLITKDE YERHNSYTCATHKTKTSTSPIVKSFNNEC	ID3 轻链的完整序列。前导序列带下划线; 其在成熟序列中经去除。成熟 V _L 序列以粗体显示。
SEQ ID NO: 22	GGGTTCACCTCACATGATTACTAT	编码如 SEQ ID NO: 8 所定义的 ID3 的 V _H -CDR1 序列的核酸序列
SEQ ID NO: 23	ATTAGAAAGCAAGCTAATGGTTACACAACA	编码如 SEQ ID NO: 9 所定义的 ID3 的 V _H -CDR2 序列的核酸序列

[1699]

SEQ ID NO: 24	GCAAGAGATGAGCGCGTACTGCTGGCTTGCTTAC	编码如 SEQ ID NO: 10 所定义的 ID3 的 V _H -CDR3 序列的核酸序列
SEQ ID NO: 25	ATCAAGTTGTGGCTGAACCTGGATTTTCTTGTAAACACTTTTAAATGGTATCCAGTGGAGGTCGAAGCTGG TGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCGGGGGTCTCTGAGACTCGCCTGTGCAACTTCTGGGTTCAC CTTCACCTGATTAATGAGCTGGTCCGCCAGCCTCCAGGAAGGCACCTGAGTGGCTGGGTTTATT AGAAGCAAGCTAATGGTTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTTAAGGTCGGTTCACCATCTCCAGAG ATAATTCCCAAGCATCTCTATCTTCAATGAACACCCCTGAGATCTGAGGACAGTCCCACTTATTACTG TGCAAGAGATGAGCGCGTACTGCTGGCTTGCTTACTGGGGCCAGGGACTCTGGTCACTCTCTCTGCA GC	编码如 SEQ ID NO: 11 所定义的 ID3 的重组表达 V _H 序列的未成熟形式的核酸序列。编码前导序列的核酸序列带下划线
SEQ ID NO: 26	GAGGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGTACAGCGGGGGTCTCTGAGACTCGCCTGTGCAA CTTCTGGGTTCACCTTCACTGATTACTATATGAGCTGGTCCGCCAGCCTCCAGGAAGGCACCTTGGAGTG GCTGGGTTTTATTAGAAGCAAGCTAATGGTTACACAACAGAGTACAGTGCATCTGTTAAGGTCGGTTC ACCATCTCCAGAGATAATCCCAAGCATCTCTATCTTCAATGAACACCCCTGAGATCTGAGGACAGTG CCACTTATTACTGTGCAAGAGATGAGCGCGTACTGCTGGCTTGCTTACTGGGGCCAGGGACTCTGGT CACTGCTCTGTCAGC	编码无前导序列的如 SEQ ID NO: 12 所定义的 ID3 的 V _H 序列的成熟形式的核酸序列
SEQ ID NO: 27	ATGAAGTTGTGGCTGAACCTGGAATTTTCTGTGAACACTTTTAAATGGTATCCAGTGT	编码如 SEQ ID NO: 13 所定义的 ID3 的重组表达 V _H 序列的前导序列的核酸序列
SEQ ID NO: 28	CAGAGCATGTACATAGTAATGGAACACCTAT	编码如 SEQ ID NO: 14 所定义的 ID3 的 V _L -CDR1 序列的核酸序列
SEQ ID NO: 29	AAAGTTTCC	编码如 SEQ ID NO: 15 所定义的 ID3 的 V _L -CDR2 序列的核酸序列
SEQ ID NO: 30	TTTCAAGTTACATGTTCCCACTGGAGC	编码如 SEQ ID NO: 16 所定义的 ID3 的 V _L -CDR3 序列的核酸序列
SEQ ID NO: 31	ATGAAGTTGCCCTGTAGGCTGTTGGTGTGATGGTCTGGATTCTCTGCTTCCAGCAGTGAATGTTTGTATGA CCCAACTCCACTCTCCCTGCCCTGTCAGTCTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCCAGAG CAATTGTACATAGTAATGGAACACCTAATTTAGACTGGTACCTTCCAGAAACCCAGGCCAGTCTCCAAAGCTC CTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGAATTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAAGTGGCAGTGCAGGGGACAG ATTTCACTCAAAATCAGCAGAGTGGAGCTGAGATCTGGGAGTTTATTACTGCTTTTCAAGGTTTCACA TGTTCCACGTCGACGTTCCGGTGGAGGCACCAAGCTGGAATCAAA	编码如 SEQ ID NO: 17 所定义的 ID3 的重组表达 V _L 序列的未成熟形式的核酸序列。带下划线的核酸序列编码对应于前导序列的 SEQ ID NO: 17 的氨基酸序列的位置 1-19。
SEQ ID NO: 32	GATGTTTTGATGACCCCAACTCCACTCTCCCTGCTGTGAGTCTTTGGAGATCAAGCCTCCATCTCTGCA GATCTAGTCAGAGCATTTGATAGTAATGGAACACCTAATTTAGACTGGTACCTTTCAGAAACCCAGGCCA GTCTCCAAAGCTCCTGATCTACAAAGTTTCCAAACCGAATTTCTGGGGTCCAGACAGGTTTCAGTGGCAGT	编码无前导序列的如 SEQ ID NO: 18 所定义的 ID3 的 V _L 序列的成熟形式的核酸序列

[1701]

SEQ ID NO: 36	MTPTTTTAAELTTEFDYDEAATPCVFTDVLNQSKPVTFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV YFINLAAADLLFVCTPLWMQYLLDHNLSASVPC~~TL~~LTACFYVAMFASLCFTEIALDRYYAIVVMRYRP VKQACLF~~S~~IFWWIFAVIIAI~~P~~HEMVVTKKNNQCM~~T~~DYDYLEVSYPIILNVELMLGAFV~~I~~PLSVISYCYR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLKWISSCEFE~~S~~RSIKRALILTESLA FCHCCLNPLLYVFGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSPSRRETSSDTLSDEVCRVS QIIP	由 HCMV 病毒株 Toledo 编码的 US28 的全序列（寄存编号 GU937742）。ECD3 的序列带下划线。
SEQ ID NO: 37	MTPTTTTAAELTTEFDYDEAATPCVFTDVLNQSKPVTFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV YFINLAAADLLFVCTPLWMQYLLDHNLSASVPC~~TL~~LTACFYVAMFASLCFTEIALDRYYAIVVMRYRP VKQACLF~~S~~IFWWIFAVIIAI~~P~~HEMVVTKKNNQCM~~T~~DYDYLEVSYPIILNVELMLGAFV~~I~~PLSVISYCYR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLKWISSCEFE~~S~~RSIKRALILTESLA FCHCCLNPLLYVFGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSPSRRETSSDTLSDEVCRVS QIIP	由 HCMV 病毒株 Towne 编码的 US28 的全序列（寄存编号 FJ616285）。ECD3 的序列带下划线。
SEQ ID NO: 38	MTPTTTTAAELTTEFDYDEAATPCVFTDVLNQSKPVTFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV YFINLAAADLLFVCTPLWMQYLLDHNLSASVPC~~TL~~LTACFYVAMFASLCFTEIALDRYYAIVVMRYRP VKQACLF~~S~~IFWWIFAVIIAI~~P~~HEMVVTKKNNQCM~~T~~DYDYLEVSYPIILNVELMLGAFV~~I~~PLSVISYCYR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLKWISSCEFE~~S~~RSIKRALILTESLA FCHCCLNPLLYVFGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSPSRRETSSDTLSDEVCRVS QIIP	由 HCMV 病毒株 VR1814 编码的 US28 的全序列（寄存编号 GU179289）。ECD3 的序列带下划线。
SEQ ID NO: 39	MTPTTTTAAELTTEFDYDEAATPCVFTDVLNQSKPVTFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV YFINLAAADLLFVCTPLWMQYLLDHNLSASVPC~~TL~~LTACFYVAMFASLCFTEIALDRYYAIVVMRYRP VKQACLF~~S~~IFWWIFAVIIAI~~P~~HEMVVTKKNNQCM~~T~~DYDYLEVSYPIILNVELMLGAFV~~I~~PLSVISYCYR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLKWISSCEFE~~S~~RSIKRALILTESLA FCHCCLNPLLYVFGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSPSRRETSSDTLSDEVCRVS QIIP	由 HCMV 病毒株 TB40/E 编码的 US28 的全序列（寄存编号 KF297339）ECD3 的序列带下划线。
SEQ ID NO: 40	MTPTTTTAAELTTEFDYDEAATPCVFTDVLNQSKPVTFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV YFINLAAADLLFVCTPLWMQYLLDHNLSASVPC~~TL~~LTACFYVAMFASLCFTEIALDRYYAIVVMRYRP VKQACLF~~S~~IFWWIFAVIIAI~~P~~HEMVVTKKNNQCM~~T~~DYDYLEVSYPIILNVELMLGAFV~~I~~PLSVISYCYR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLKWISSCEFE~~S~~RSIKRALILTESLA FCHCCLNPLLYVFGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSPSRRETSSDTLSDEVCRVS QIIP	由 HCMV 病毒株 Merlin 编码的 US28 的全序列（寄存编号 AY446894）。ECD3 的序列带下划线。
SEQ ID NO: 41	MTPTTTTAAELTTEFDYDEAATPCVFTDVLNQSKPVTFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV YFINLAAADLLFVCTPLWMQYLLDHNLSASVPC~~TL~~LTACFYVAMFASLCFTEIALDRYYAIVVMRYRP VKQACLF~~S~~IFWWIFAVIIAI~~P~~HEMVVTKKNNQCM~~T~~DYDYLEVSYPIILNVELMLGAFV~~I~~PLSVISYCYR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLKWISSCEFE~~S~~RSIKRALILTESLA FCHCCLNPLLYVFGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSPSRRETSSDTLSDEVCRVS QIIP	由 HCMV 病毒株 JP 编码的 US28 的全序列（寄存编号 GQ221975）。ECD3 的序列带下划线。

[1702]

SEQ ID NO: 42	QIIP MTPTTTTAAELTTEFDYDEDAATPCVFTDVLNQSKPVTFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV YFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLASVPC¹LLTACFVAMFASLCFITEIALDRYYAIVVMRYRP VKQACLF²SIFWWIFAVIIAIPHEMVVTKKNNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVPLSVISYCYIR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLKWISSCEFEKSLKRALILTESLA FCHCCLNPLLYYVFGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSSPSRRETSSDTLSDEACRV QIIP 由 HCMV 病毒株 AdI69 编码的 US28 的全序列（寄存编号 X17403.1）。ECD3 的序列带下划线。
SEQ ID NO: 43	QIIP MTPTTTTAAELTTEFDYDEDAATPCVFTDVLNQSKPVTFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV YFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLASVPC¹LLTACFVAMFASLCFITEIALDRYYAIVVMRYRP VKQACLF²SIFWWIFAVIIAIPHEMVVTKKNNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVPLSVISYCYIR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLKWISSCEFEKSLKRALILTESLA FCHCCLNPLLYYVFGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSSPSRRETSSDTLSDEACRV QIIP 由 HCMV 病毒株 AF1 编码的 US28 的全序列（寄存编号 GU179291.1）。ECD3 的序列带下划线。
SEQ ID NO: 44	QIIP MTPTTTTAAELTTEFDYDEDAATPCVFTDVLNQSKPVTFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV YFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLASVPC¹LLTACFVAMFASLCFITEIALDRYYAIVVMRYRP VKQACLF²SIFWWIFAVIIAIPHEMVVTKKNNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVPLSVISYCYIR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLKWISSCEFEKSLKRALILTESLA FCHCCLNPLLYYVFGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSSPSRRETSSDTLSDEACRV QIIP 由 HCMV 病毒株 VHL/E 编码的 US28 的全序列（寄存编号 L20501.1）。ECD3 的序列带下划线。
SEQ ID NO: 45	QIIP MTPTTTTAAELTTEFDYDEDAATPCVFTDVLNQSKPVTFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV YFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLASVPC¹LLTACFVAMFASLCFITEIALDRYYAIVVMRYRP VKQACLF²SIFWWIFAVIIAIPHEMVVTKKNNQCMTDYDYLEVSYPIILNIELMLGAFVPLSVISYCYIR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLKWISSCEFEKSLKRALILTESLA FCHCCLNPLLYYVFGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSSPSRRETSSDTLSDEACRV QIIP 由 HCMV 病毒株 DAVIS 编码的 US28 的全序列（寄存编号 JX512198.1）。ECD3 的序列带下划线。
SEQ ID NO: 46	QIIP MTPTTTTAAELTTEFDYDEDAATPCVFTDVLNQSKPVTFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV YFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLASVPC¹LLTACFVAMFASLCFITEIALDRYYAIVVMRYRP VKQACLF²SIFWWIFAVIIAIPHEMVVTKKNNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVPLSVISYCYIR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLKWISSCEFEKSLKRALILTESLA FCHCCLNPLLYYVFGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSSPSRRETSSDTLSDEACRV QIIP 由 HCMV 病毒株 TR 编码的 US28 的全序列（寄存编号 KF021605.1）。ECD3 的序列带下划线。
SEQ ID NO: 47	QIIP MTPTTTTAAELTTEFDYDEDAATPCVFTDVLNQSKPVTFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV YFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLASVPC¹LLTACFVAMFASLCFITEIALDRYYAIVVMRYRP VKQACLF²SIFWWIFAVIIAIPHEMVVTKKNNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVPLSVISYCYIR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIAVVLVFIIFWLPYHLTLFVDTLKLKWISSCEFEKSLKRALILTESLA QIIP US28 融合蛋白，包含来自 HCMVDB 病毒株的 US28 序列（寄存编号：KT959235），在其 C-末端部分融合至 6His 标签

[1703]

	FCHCCLNPLLYVFGTKFRQELHCLLAEFRQLFRDVSWMYHSMFSRRSSPSRRRETSSDTLSDEVCRVS QIIPAAALEGSHHHHH	
SEQ ID NO: 48	QVQLQDSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATL TTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYICARYDDHYCLDYWCQGTTLTVSS	小鼠 OKT3 (mOKT3) 重链可变区
SEQ ID NO: 49	RYTMH	OKT3 V _H -CDR1 序列
SEQ ID NO: 50	YINPSRGYTNYNQKFK	OKT3 V _H -CDR2 序列
SEQ ID NO: 51	YCARYYDD	OKT3 V _H -CDR3 序列
SEQ ID NO: 52	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSY SLTISGMEAEADAATYICQWSSNPFTFGSGTKLEIN	mOKT3 轻链可变区
SEQ ID NO: 53	SASSSVSYMNW	OKT3 V _L -CDR1 序列
SEQ ID NO: 54	TSKLAGS	OKT3 V _L -CDR2 序列
SEQ ID NO: 55	QWSSNPFTF	OKT3 V _L -CDR3 序列
SEQ ID NO: 56	GGGGSGGGSGGGGS	接头序列
SEQ ID NO: 57	GGGS	部分接头序列
SEQ ID NO: 58	[EVKLIVESGGGLVQPGSLRLACATSGTFTTDYVMSWVRQPPGKALEWLGFIIRSKANGYTTTEYSASVKGR FTISRDNQSILLYLQMNLTIRSEDSATYYCARDERRTAWLAYWGQGLTVTVSA] [ASTKGPSVFPLAPSSK STSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVTPSSSLGTQTYICNVN HKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHCTCPCPAPPELLGGP] [SVFLFPPPKDITLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLTQHDLNKGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKG QPREPQVYTLPPSRDELDT] [KNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSK LTVDKSRWQOGNVPFSCVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK] [GGGGSGGGGS] [QVQLQDSGAELARPGASV KMSCKASGYTFTRYTMHWKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKATLTTDKSSSTAYMQLSSLTS EDSAVYICARYDDHYCLDYWCQGTTLTVSS] [GGGGSGGGSGGGGS] [QIVLTQSPAIMSASPGEKVT MTCSSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLAGVPAHFRGSGSGTSYSLTISGMEAEADAATYICQW SSNPFTFGSGTKLEIN]	优选 BiTE 分子的第一多肽序列, 该分子包 含包括 ID3 的 VH 区的重链序列、接头序 列和 mOKT3 scFv 的序列 对于额外信息, 序列的独立功能区块的起始 和结束分别由 “[” 和 “]” 指示, 尽管应 理解, 第一多肽以所展现的次序在单一连续 多肽链中含有所有此类序列。
SEQ ID NO: 59	[DVLMTQTPLSLPVSLGDAQSISCRSSQSIVHSNGNTYLDWYLQKPGQSPKLLIYKYSNRFSGVDPDRFSG SGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYCFQGSHPVPTWTFGGGTKLEIK] [RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSITYSLSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHOGL SSPVTKSFNRGEC]	优选 BiTE 分子的第二多肽序列, 该分子包 含包括 ID3 的 VL 区的轻链序列或具有 SQE ID NO: 59 的序列的实例 对于额外信息, 序列的独立功能区块的起始 和结束分别由 “[” 和 “]” 指示, 尽管应

[1704]

		理解, 第一多肽在单一连续多肽链中含有所有此类序列。
SEQ ID NO: 60	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAVSGPGLIFKFTGVAWYRRQVPGAKRGLVALITGDGATRYGDSVKGRFTVSRDIAAKRVYLEMNDLRSEDTAVYYCKTGEYWGQGTQVTVSS	VUN100 的核心序列, 如 WO 2019/151865 的第 24 页所展示
SEQ ID NO: 61	MHSSALLCCLVLLTGVRAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAVSGPGLIFKFTGVAWYRRQVPGAKRGLVALITGDGATRYGDSVKGRFTVSRDIAAKRVYLEMNDLRSEDTAVYYCKTGEYWGQGTQVTVSS <u>DLHHHHH</u>	SEQ ID NO: 60 的 VUN100 序列, 具有额外 N-末端信号肽 (带下划线) 和 C-末端 Myc-6His 标签序列 (带双下划线)
SEQ ID NO: 62	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAVSGPGLIFKFTGVAWYRRQVPGAKRGLVALITGDGATRYGDSVKGRFTVSRDIAAKRVYLEMNDLRSEDTAVYYCKTGEYWGQGTQVTVSS	VUN100b 为二价 VUN100 分子, 由 VUN100 的两个通过接头序列接合的复本组成 (接头序列带下划线)
SEQ ID NO: 63	MHSSALLCCLVLLTGVRAEVQLVESGGGLVQPGGSLRLACAVSGPGLIFKFTGVAWYRRQVPGAKRGLVALITGDGATRYGDSVKGRFTVSRDIAAKRVYLEMNDLRSEDTAVYYCKTGEYWGQGTQVTVSS <u>ISEEDLHHHHH</u>	SEQ ID NO: 62 的 VUN100b 序列, 具有额外 N-末端信号肽 (带下划线) 和 C-末端 Myc-6His 标签序列 (带双下划线)
SEQ ID NO: 65	ATGAAGTTGGCTGAAGTGGATTTCCCTGTAAACACTTTTAAATGGTATCCAGTGTGAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGAGGCTTAGTGAAGCCITGGAGGTCCTGAACTCTCTGTCAGCCCTTGGAITCACTTTCAGTAGCTATGCCATGCTTGGGTTCCGCCAGACTCCAGAGAAGGCTGGAGTGGGTCCGATCCATTAGTAGTGGTGTAGCACCCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGCCGATTCACCACTCCAGAGATAATGCCAAGAACATCCTGTACCTGCAAAATCAGCAGTCTGAGGCTGAGGACACGGCCATGTATTTACTGTGCAAGAGCGGTCTACTATGATTACGACGGGGCTGGGGTTTGGCTTACTGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGCTCTGCA	编码如 SEQ ID NO: 67 所定义的 IG9 的重组表达 VH 序列的未成熟形式的核酸
SEQ ID NO: 66	GAAGTGAAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCTTAGTGAAGCCITGGAGGTCCTGAACTCTCTGTGTGCAGCCTCTGGATTACCTTCAGTAGCTATGCCATGCTTGGGTTCCGCCAGACTCCAGAGAAGGCTGGAGTGGGTCCGATCCATTTAGTAGTGGTGTAGCACCCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGCCGATTCACCACTCCAGAGATAATGCCAAGAACATCCTGTACCTGCAAAATCAGCAGTCTGAGGCTGAGGACACGGCCATGTATTTACTGTGCAAGAGACTGTGCAAGAGCGGTCTACTATGATTACGACGGGGCTGGGGTTTGGCTTACTGGGGCCAAAGGACTCTGGTCACTGCTCTGCA	编码如 SEQ ID NO: 68 所定义的 IG9 的 VH 序列的成熟形式的核酸
SEQ ID NO: 67	MKLWLNWIFLVTLNGLQCEVKLVESGGGLVKPGGSLRLACAVSGPGLIFKFTGVAWYRRQVPGAKRGLVALITGDGATRYGDSVKGRFTVSRDIAAKRVYLEMNDLRSEDTAVYYCKTGEYWGQGTQVTVSS A	IG9 的重组表达 V _H 序列的未成熟形式, 其中位置 1-19 对应于前导序列

[1705]

SEQ ID NO: 68	EVKLVESSGGGLVKGPSGLKLSAASGFTFFSSAMSWVRQTPEKRLWVASISSGGSTYYPDVSKGRFTIS RDNARNILYLQMSSLRSEDTAMYYCARGGSTMITTLGLGFAYWGGTLVTVSA	IG9 的 VH 序列的成熟形式, 无前导序列
SEQ ID NO: 69	ATGAAGTTGGCTGTTAGGCTGTTGGCTGATGCTCGATTCTCGCTTCCAGCAGTCAAAATTGTTCTCA CCCAGTCTCCAGCAATCATGCTGCACTCCAGGGGAGAAAGGTCACCAATGACCTCCAGTCCAGCTCAAG TGTAAGTTACATGCACTGGTACAGCAGAAAGTCAGGACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCC AAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTGCTGCTCAGTGGCAGTGGGCTGGGACCTCTTACTCTCTCAACAATCA GCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCCACCCCTCACGTT CGGTGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	编码如 SEQ ID NO: 71 所定义的 IG9 的重组 表达 VL 序列的未成熟形式的核酸
SEQ ID NO: 70	CAAAATGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCAATGCTGCACTCTCCAGGGGAGAGGTCAACATGACCTGCA GTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGCACTGGTACCAAGTACAGCAAGTCAAGCACCTCCCCAAAAGATGGAT TTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGCTCTGGGACCTCTTAC TCTCTCACAAATCAGCAGCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAGTAACCC CACCCCTCACGTTCCGCTGGGACCAAGCTGGAGCTGAAA	编码如 SEQ ID NO: 72 所定义的 IG9 的 VL 序列的成熟形式的核酸
SEQ ID NO: 71	MKLPVRLVLVMWIPASSSQIVLTQSPAIMASPGKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTS KLASGVPARFSGSGSTSYSLTISMEAEADAATYCYQQWSSNPPLTFGAGTKLELK	IG9 的重组表达 VL 序列的未成熟形式, 其 中位置 1-19 对应于前导序列
SEQ ID NO: 72	QIVLTQSPAIMASPGKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSTSY SLTISMEAEADAATYCYQQWSSNPPLTFGAGTKLELK	IG9 的 VL 序列的成熟形式, 无前导序列
SEQ ID NO: 73	AGCTATGCCATGTCT	编码如 SEQ ID NO: 76 所定义的 IG9、IE8 的 VH-CDR1 序列的核酸
SEQ ID NO: 74	TCCATTAGTAGTGGTGGTAGCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGGC	编码如 SEQ ID NO: 77 所定义的 IG9 的 VH-CDR2 序列的核酸
SEQ ID NO: 75	GGCGGGTCTACTATGATACGACGGGCTGGGTTTGCTTAC	编码如 SEQ ID NO: 78 所定义的 IG9 的 VH-CDR3 序列的核酸
SEQ ID NO: 76	SYAMS	IG9、IE8 的 VH-CDR1 序列
SEQ ID NO: 77	SISGGSTYYPDVSKG	IG9 的 VH-CDR2 序列
SEQ ID NO: 78	GGSTMITTLGLGFAY	IG9 的 VH-CDR3 序列
SEQ ID NO: 79	AGTGCCAGCTCAAGTGTAAAGTTACATGCAC	编码如 SEQ ID NO: 82 所定义的 IG9、IE8 的 VL-CDR1 序列的核酸
SEQ ID NO: 80	GACACATCCAAACTGGCTTCT	编码如 SEQ ID NO: 83 所定义的 IG9、 IC10、IA10 的 VL-CDR2 序列的核酸

[1707]

SEQ ID NO: 91	MKLPVRLILVMVWIPASSQIVLSQSPTIMSASPEKVTMTCSASSSVSYMHVYQQKSGTSPKRWIYDSS KLASGVPARFSGSGTSYSLTISMEAEADAATYCCQWTSNPPITFGAGTKLELK	IE8 的重组表达 VL 序列的未成熟形式, 其中位置 1-19 对应于前导序列
SEQ ID NO: 92	QIVLSQSPTIMSASPEKVTMTCSASSSVSYMHVYQQKSGTSPKRWIYDSSKLASGVPARFSGSGTSY SLTISMEAEADAATYCCQWTSNPPITFGAGTKLELK	IE8 的 VL 序列的成熟形式, 无前导序列
SEQ ID NO: 93	TCCATTAGTAGTGGTGGTAGAACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGCG	编码如 SEQ ID NO: 95 所定义的 IE8 的 VH-CDR2 序列的核酸
SEQ ID NO: 94	GGCGGGACTCGTCAATCCTACGGCAACGGGTTTGACTAC	编码如 SEQ ID NO: 96 所定义的 IE8 的 VH-CDR3 序列的核酸
SEQ ID NO: 95	SISGGRTYYPDSVKG	IE8 的 VH-CDR2 序列
SEQ ID NO: 96	GGTRHSYGNFDY	IE8 的 VH-CDR3 序列
SEQ ID NO: 97	GATCATCCAAACTGGCTTCT	编码如 SEQ ID NO: 99 所定义的 IE8 的 VL-CDR2 序列的核酸
SEQ ID NO: 98	CAGCAGTGCACTAGTAACCCACCCATCACG	编码如 SEQ ID NO: 100 所定义的 IE8 的 VL-CDR3 序列的核酸
SEQ ID NO: 99	DSSKLAS	IE8 的 VL-CDR2 序列
SEQ ID NO: 100	QQWTSNPPIT	IE8 的 VL-CDR3 序列
SEQ ID NO: 101	ATGAAGTTGTGGCTGAACCTGGATTTTCTTTGTAACACTTTTAAATGGTATCCAGTGTGAAGTGAACCTGG TTGAGTCTGGGGAGTCTTAGTGAAGCCTGGAGGTCCTCGAAATTTCTCTGTCAGCCTCTGGATTAC TTTCAGTAGCCATGCCTTGTCTTGGTTCCGCCAGACTCCAGAGAAGAGACTGGAGTGGTCCGATCCATT AGTAGTCGTGGTCCGAACCTACTATCCAGACAGTGTAAAGGCCGATTACCGCTCTCCAGAGATAATGCCA GGAACATCCTGTATCTGCAAGTGAAGTGAAGTGTGAGGTCGTGAGGACACGGCCCATGTATTATTGTACAAAGG CGGCACTCATTAATCTACGGCAACGGTTTGTACTTCTGGGGCCAAAGCCACCACTCTCACAGTCTCCTCA GAAGTGAAACTGGTTGAGTCTGGGGAGTCTTAGTGAAGCCTGGAGGTCCTGAAATTTCTCTGTGCAG CCTCTGGATTCACTTTCAGTAGCCATGCCCTGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCAGAGAAGAGACTGGAGTG GGTCGCATCCATTAGTAGTGTGGTCCGAACCTACTATCCAGACAGTGTAAAGGCCGATTCACCGTCTCC AGAGATAATGCCAGGAACATCCTGTATCTGCAAGTGAAGTGTGAGGTCGTGAGGACACGGCCATGTATT ATTGTACAAGAGCGGGGACTCATTAATCTACGGCAACGGTTTGTACTTCTGGGGCCAAAGCCACCACTCT CACAGTCTCCTCA	编码如 SEQ ID NO: 103 所定义的 1C10 的重组表达 VH 序列的未成熟形式的核酸
SEQ ID NO: 102		编码如 SEQ ID NO: 104 所定义的 1C10 的 VH 序列的成熟形式的核酸
SEQ ID NO: 103	MKLWLNWIFLVTLLNGIQCEVKLVESGGVLVKGPSGLKFSCAASGTFSSHALSWVRQTPPKRLEWVASI SSRGRTYYPDSVKGRFTVSRDNARNILYLQVSSLRSEDATMYCYCTRGGTHYSYNGNDFWGGTTLITVSS	1C10 的重组表达 V _H 序列的未成熟形式, 其中位置 1-19 对应于前导序列

[1708]

SEQ ID NO: 104	EVKLVESSGVIVKPGSLKFSCAASGRTFFSSHALSWVRQTPEKLEWVASISSRGRYYYPDSVKGRFTVS RDARNILYLQVSSLRSEDTAMYCTRGGTHSYGNGDFWGGCTLLTVSS	IC10 的 VH 序列的成熟形式，无前导序列
SEQ ID NO: 105	ATGAAGTTGGCTGTTAGGCTGTTGGCTGATGGTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTCAAAATTGTTCTCA CCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCACTCCAGGGGAGAGGTCACCATGACCTCCAGTGTGAGCTCAAG TGTTAGTTACATGCACTGGTACAGCAGAAAGTCAGGACCTCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCC AAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTGCTGCTTCCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAAAATCA GCACCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAATAACCCACCCATCAGTT CGGTGCTGGGACCAAGCTGGAAGTAAAA	编码如 SEQ ID NO: 107 所定义的 IC10 的重 组表达 VL 序列的未成熟形式的核酸
SEQ ID NO: 106	CAAAATGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCACTCCAGGGGAGAGGTCAACATGACCTGCA GTGTGAGCTCAAGTGTAGTTACATGCACTGGTACCAAGTACAGCAAGTCAAGCAGCTCCCCAAAAGATGGAT TTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTGCTTCCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTAC TCTCTCACAAATCAGCAGCAGTGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAATAACCC CACCCATCAGCTTCGGTCTGGGACCAAGCTGGAAGTAAAA	编码如 SEQ ID NO: 108 所定义的 IC10 的 VL 序列的成熟形式的核酸
SEQ ID NO: 107	MKLPVRLVLMVWIPASSSQIVLTQSPALMSASPGKVTMTCSVSSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTS KLASGVPARFSGSGSTSYSLTISTMEAEADAATYYCQQWSNNPPIITFGAGTKLELK	IC10 的重组表达 VL 序列的未成熟形式， 其中位置 1-19 对应于前导序列
SEQ ID NO: 108	QIVLTQSPALMSASPGKVTMTCSVSSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSTSY SLTISTMEAEADAATYYCQQWSNNPPIITFGAGTKLELK	IC10 的 VL 序列的成熟形式，无前导序列
SEQ ID NO: 109	AGCCATGCTGTGCT	编码如 SEQ ID NO: 112 所定义的 IC10、 IA10 的 VH-CDR1 序列的核酸
SEQ ID NO: 110	TCCATTAGTAGTCTGTTGGTGGAACTACTATCCAGACAGTGTAAAGGGC	编码如 SEQ ID NO: 113 所定义的 IC10、 IA10 的 VH-CDR2 序列的核酸
SEQ ID NO: 111	GGCGGACTCATTATTCCTACGGCAACGGTTTGTACTTC	编码如 SEQ ID NO: 114 所定义的 IC10、 IA10 的 VH-CDR3 序列的核酸
SEQ ID NO: 112	SHALS	IC10、IA10 的 VH-CDR1 序列
SEQ ID NO: 113	SISRRGRYYPDVSKG	IC10、IA10 的 VH-CDR2 序列
SEQ ID NO: 114	GGTHSYGNGFDF	IC10、IA10 的 VH-CDR3 序列
SEQ ID NO: 115	AGTGTCAGCTCAAGTGTAGTTACATGCAC	编码如 SEQ ID NO: 117 所定义的 IC10、 IA10 的 VL-CDR1 序列的核酸
SEQ ID NO: 116	CAGCAGTGGAGTAATAACCCACCCATCAGC	编码如 SEQ ID NO: 118 所定义的 IC10、 IA10 的 VL-CDR3 序列的核酸

[1709]

SEQ ID NO: 117	SVSSSVSYMH	IC10、1A10 的 VL-CDR1 序列
SEQ ID NO: 118	QQWSNNPPIIT	IC10、1A10 的 VL-CDR3 序列
SEQ ID NO: 119	ATGAAGTTGTGGCTGAACGTGATTTTCCTTGTAAACATTTTAAATGGTATCCACTGTGAAGTGAACCTGG TTGAGTCTGGGGAGCTTTAGTGAACCTGGAGGTCCTGAAATTTTCCTGTGACGCTCTGGATTCAC TCTCAGTAGCCATGCGCTTGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAAAGACTGGAGTGGTTCGCAATCCAT AGTAGTCGTGGTTCGAAACCTACTATCCAGACAGTGTAAAGGCCGATTCACCGTCTCCAGAGATAATGCCA GGAAACATCTGTATCTGAAAGTGAAGCTGAGGCTGAGGACACGGCCATGTATTTATGTACAGAGG CGGACATCATTTATCTTACGCCAACGGTTTGTACTTCTGGGCCAAGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA	编码如 SEQ ID NO: 121 所定义的 1A10 的重 组表达 VH 序列的未成熟形式的核酸
SEQ ID NO: 120	GAAGTGAACCTGGTTGAGTCTGGGGAGTCTTAGTGAAGCCCTGGAGGGTCCCTGAAATTTTCTGTGCAG CCTCTGGATTACATCTCAGTAGCCATGCTTGTCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAAGACTGGAGTG GGTCGCATCCATTTAGTAGTCTGTGTCGAACCTACTATCCAGACAGTGTAAAGGCCGATTCACCGTCTCC AGAGATAATGCCAGGAACATCTGTATCTGCAAGTGAAGCTGAGGCTGAGGACACGGCCATGTATTT ATTGTACAAGAGCGGGACATATTATCTTACGGCAACGGTTTGTACTTCTGGGGCCAGGCCACCACTCT CACAGTCTCCTCA	编码如 SEQ ID NO: 122 所定义的 1A10 的 VH 序列的成熟形式的核酸
SEQ ID NO: 121	MKLWLNWLFVLVTLNGIQCEVKLVESGGVLKPGGSLKFSKASGFTLSSHLSWVRQTPKRLRWVASI SSRGRTYYPDVSVKGRFTVSRDNARNILYLQVSSLSRSEDYAMYCTRGGTHSYGNGFDWFGQGTTLTVSS	1A10 的重组表达 V _H 序列的未成熟形式, 其 中位置 1-19 对应于前导序列
SEQ ID NO: 122	EVKLVESGGVLVLPFGSLKFSKASGFTLSSHLSWVRQTPKRLRWVASISSRGRTYYPDVSVKGRFTVS RDNARNILYLQVSSLSRSEDYAMYCTRGGTHSYGNGFDWFGQGTTLTVSS	1A10 的成熟形式的 VH 序列, 无前导序列
SEQ ID NO: 123	ATGAAGTTGCCTGTAGGCTGTGGTGTGATGGTCTGGATTCCTTCCAGCAGTCAAATTTGTTCTCA CCAGTCTCCAGCAATCATGCTTGCATCTCCAGGGGAGAGGTCAACCATGACCTGCAGTGTCAAGTCAAG TGTTAGTTACATGCATGGTACCAAGAGTCAAGCACCTCCCCCAAAAGATGGATTTATGACACATCC AACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTGCTTCAAGTGGCAGTGGGCTGGGACCTCTTACTCTCTCAAAATCA GCACCATGGAGGCTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAACCCACCCCATCACGTT CGGTGCTGGGACCAAGCTGGAACTGAAA	编码如 SEQ ID NO: 125 所定义的 1A10 的 重组表达 VL 序列的未成熟形式的核酸
SEQ ID NO: 124	CAAAATGTTCTCACCCAGTCTCCAGCAATCATGCTGCATCTCCAGGGGAGAGGTCAACATGACCTGCA GTGTACAGTCAAGTGTAGTTACATGCATCTGCATCCAGCAGAGAGTCAAGCACCTCCCCCAAAAGATGGAT TTATGACACATCCAAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTGCTTCAAGTGGCAGTGGGCTCTGGGACCTCTTAC TCTCTCACAAATCAGCACCATGGAGGTGAAGATGCTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTAAATACC CACCCATCAGTTCGGTCTGGGACCAAGCTGGAACITGAAA	编码如 SEQ ID NO: 126 所定义的 1A10 的 VL 序列的成熟形式的核酸
SEQ ID NO: 125	MKLPLVRLVLMVWLPASSQIVLTQSPAIMSAPGKVTMTCSVSSSVSYMHYQQKSGTSPKRWLYDTS KLASGVPARFSGSGSTSYSLTISITMEAEADAATYYCQQWSNNPPIITFGAGTKLELK	1A10 的重组表达 VL 序列的未成熟形式, 其中位置 1-19 对应于前导序列
SEQ ID NO: 126	QIVLTQSPAIMSAPGKVTMTCSVSSSVSYMHYQQKSGTSPKRWLYDTSKLASGVPARFSGSGSTSY SLTISITMEAEADAATYYCQQWSNNPPIITFGAGTKLELK	1A10 的 VL 序列的成熟形式, 无前导序列

[1710]

SEQ ID NO: 127	MTPTTTTAAELTTEFDYDEDAAPCVLTDLVINOQKPVTLFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTLTWRRLQCSGDV YFINLAAADLLFVCTLPLWQYLLDHNLSASVPCITLLTACFYVAMFASLCFTIEIALDRYYAIVMYRYP VKQACLFSEIFWVIFAVIIAIPHFMVVTKKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVIFPLSVISYCYVR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLIADVLFVIFLWLPYHLTLFDLTKLLKWISSCEFEKSLKRALLITLESIA FCHCLNPLLYVFGTKFRQELHCLLAEFRQLFRDVSWYHSMSPSRSSRRETSDDLDEACRVSS QIIP	由 HCMV 病毒株 BL 编码的 US28 的全序列 (寄存编号 MW980585.1)。ECD3 的序列 带下划线。
SEQ ID NO: 147	ATGAAGTTGGCTGAACCTGATTTCTTGTATACACTTTTAAATGGTATCCAGTGTGAAGTGAAGCTGG TGGAGCTCTGGGGAGGCTTAGTGAAGCCTGGAGGTCCTCTGAACCTCTCTCTGTCAGGCTCTGGATTCAC TTTCAGTAGCTATGCCATGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCAGAGAGAGGCTGGAGTGGGTGCGATCCCAT AGTAGTGGTGTAGCACCTACTATCCAGACAGTGTGAAGGCCGATTCACCATCTCCAGAGATAATGCCA GGAACATCCTGTACCTGCAATGAGCAGTCTGAGGCTGTGAGGACACGGCCATGTATTACTGTGCAAGAGG CGGGTCTACTATGATTACGACGGGGCTGGGTTTGTCTTACTGGGGCAAGGGACTCTGGTCACTGTCTCT GCACAAAACGACACCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGTCTGCCAACTAACTCCATGGTG ACCCCTGGGATGCCCTGGTCAAGGCTATTTCCTGAGCCAGTGTACAGTGTGACCTGTGGAACCTCTGGATCCCTGT CCAGCGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGAGCTGTGACCTGTACACTCTGAGCAGCTCAGTGAAGTGT CCCCCTCCAGCACCTGGCCAGCAGACCGTCACTGCAAGCTTGGCCACCCGCGCCAGCAGCACCAAGGTG GACAAAGAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCATATGTACAGTCCCAAGAGTATCATCTG TCTTCATCTTCCCCCAAGCCCAAGGATGTGTCAACCACTTACTCTGACTCTTAAGGTCAAGTGTGTTGT GGTAGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACA GCTCAGACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTCACAGCACCTTCCGCTCAGTCAAGTGAAGTTCACATCATGC ACCAAGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAATGCAGGGTCAACAGTGCAGCTTTCCCTGCCCCCATCGA GAAAACCATCTCCAAAACCAAGGCAGACCGAGGCTCCACAGGTTACACCATTCACACCTCCCAAGGAG CAGATGGCCCAAGGATAAAGTCAAGTCTGACCTGCATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTAAGTGTG AGTGCAGTGGAAATGGCAGCCAGCGGAGAACTACAAGAACACTCAGCCCATCAAGGACACAGATGGCTC TTACTTCACTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAGAGCAACTGGGAGGCGAGAAATACCTTCACTGTCTCT GTGTACATGAGGGCTGCACAAACCACTACTGAGAAGAGCCTCTCCCACTCTCTCGTAAATGA	编码如 SEQ ID NO: 149 所定义的 1G9 的重 链的完整序列的核酸序列。带下划线的核酸 序列编码前导序列,该前导序列在成熟表达 的蛋白质中经去除。
SEQ ID NO: 148	ATGAAGTTGGCTGTAGGCTGTGGTGTGATGTCTGGATTTCTTCCAGCAGTCAAAATGTTCTCA CCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGATCTCCAGGGGAGAGGTCAACATGACTGCAGTGCAGCTCAAG TGTAAGTTACATGCACTGGTACAGCAGAGAGTCAAGCAGCTCCCAAGAGATGGAATTAAGACACATCC AAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGTCTGCTTCAGTGGCAGTGGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAAAATCA GCAGCATGGAGGCTGAAGATGTGCCACTTATTACTGCCAGCAGTGGAGTGTAAACCCCTCAAGT CGGTCTGGGACCAAGCTGGAGTGAACGGGCTGATGTGTCACCAACTGTATCCATCTTCCCAACCATCC AGTGACAGATTAAACATCTGGAGTGCCTCAGTGTGCTTCTTGAACAACTCTACCCCAAGACATCA ATGTCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCCCTGAACAGTTGGAGTGAATCAGGACAG CAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTTACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAACAGC	编码如 SEQ ID NO: 150 所定义的 1G9 轻链 的完整序列的核酸序列。带下划线的核酸序 列编码前导序列,该前导序列在成熟表达的 蛋白质中经去除。

[1711]

	TATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCAACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTCTT AG	
SEQ ID NO: 149	<u>MKLWLNWIFLVTLNLNGIQCEVKLVESGGGLVKPGGSLKLSAASGFTFSSVAMSWVRQTPEKRLEWVASI</u> <u>SSGGSTYYPDSVKGRFTISRDNARNLILYLQMSLSRSED</u>TAMYCARGGSTMTTGLGFAYWQGTLLTVS AAKTPPSVYPLAPGSAAGQNSMWTLGCLVKGYFPEPVTVIWNSSGLSSGVHTFPAYLQSDLYTLSSSVT VPSSTWPSSETVTCNVNVAHPASSTKVDKIVPRDCGCKPCICIVPEVSSVFIFFPKPKDVLTTITLTPKVTCTV VVDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDLNGLNGKEFKRCRVNSAAFPAPI EKTIKTKGRPKAPQVYTTIPPPKEQMAKDKVSLTCTMITDFPEDITVWQWNGQPAENYKNTQPIIMDTDG SYFTYKLVQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK	IG9 重链的完整序列。前导序列带下划线；其在成熟序列中经去除。成熟 V _H 序列以粗体显示。
SEQ ID NO: 150	MKLPVRLVLVLMVWIPASSSQIVLTQSPAIMSAAPGSKVTMTCSASSSVSYMHYQQKSGTSPKRWIYDTS KLASGVPARFSGSGGTSYSLTISSEAEADAATYYCQWSSNPPLTFGAGTKLELKRADAAPTVSIFPPS SEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKDSITYSMSSTLTLLTKDEYERHNS YTCEATHKTSITSPIVKSFNRNEC	IG9 轻链的完整序列。前导序列带下划线；其在成熟序列中经去除。成熟 V _L 序列以粗体显示。
SEQ ID NO: 151	ATGAAGTTGTGGCTGAACCTGGATTTCCTTGTATAACACTTTTAAATGGTATCCAGTGTGAAGTGAAGCTGG TGGAGTCTGGGGGAGACTTAGTGAAGCCTGGAGGGTCCCTGAAACTCTCTCTGTGCAAGCTCTGTGATTAC TTTCAGTAGCTATGCCATGCTTGGGTTCGCCAGACTCCAGAGAAGAGGTGGAGTGGTCCGATCCCAT AGTAGTGGTGGTAGAACCTACTATCCAGACAGTGAAGGGCCGATTACCACTCTCCAGAGATAATGGCA GGAACATCTCTGACTGCAAAATGACGAGTCTGAGGCTGAAGACACGGCCATCTATTACTGTGCCACGAGG CGGACTCGTCAATCTCTACGGCAACGGGTTGACTACTGGGGCCCAAGGCCACTCTCACAGTCTCCCTCA CAAAACGACACCCCATCTCTCTATCCACTGGCCCTGGATCTGTCTGCCAACTACTCCATGGTGACC CTGGGATGCTGTCAAGGCTATTTCCTGAGCCAGTGACAGTGACCTGGAACTCTGGATCCCTGTCCA GGGTGTGCACACCTTCCAGCTGTCTGAGCTTGACCTTACACTCTGACGAGCTCAGTACTGCTGCC CTCCAGCACTGGCCAGCGAGACCGTCACTGCAACGTTGCCACCGCCAGCAGCACCAAGGTGGAC AAGAAAATTGTGCCAGGGATTGTGGTTGTAAGCCTTGCAATGTACAGTCCAGTCCAGAAAGTATCATCTGTCT TCATCTTCCCCCAAGCCCAAGGATGTGCTACCATTAATCTGACTCTTAAGGTACAGTGTGTGTGGT AGACATCAGCAAGGATGATCCCGAGGTCCAGTTCAGCTGGTTGTAGATGATGTGGAGGTGCACACAGCT CAGACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTCAACAGCACTTCCGCTCAGTCAAGAACTTCCCATCATGTCACC AGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAAAATGCAAGGTCAACAGTGCAGCTTTCCTGCCCCCATCGAGAA AACCATCTCCAAAACCAAGGCAGACCCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCAATCCACCTCCCAAGGAGCAG ATGGCCAAGGATAAAGTACTGTACCTGCAATGATAACAGACTTCTTCCCTGAAGACATTAATGTGGAGT GGCAGTGGAAATGGCAGCCAGCGGAGAACTACAGAACTATGAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTA CTTCATCTACAGCAAGCTCAATGTGCAGAGACAGCAACTGGGAGGAGGAAATACTTTCAACCTGCTCTGTG TTACATGAGGGCTTCACAACCACTACTGAGAGAGCCCTCCCACTCTCCTGGTAAATGA	编码如 SEQ ID NO: 153 所定义的 IE8 的重链的完整序列的核酸序列。带下划线的核酸序列编码前导序列，该前导序列在成熟表达的蛋白质中经去除。
SEQ ID NO: 152	ATGAAGTTGGCTGTAGGCTGTGGTGTCTGATGGTCTGGATTCTCTGTTCAGCAGTCAAAATGTCTCTCT CCCAGTCTCCAAACAATCATGTCTGTGATCTCCAGGGGAGAGGTACCATGACCTGCAGTGCACGCTCAAG	编码如 SEQ ID NO: 154 所定义的 IE8 轻链的完整序列的核酸序列。带下划线的核酸序

[1713]

	AACCACTCCAAACCAAGGACACCGAAGGCTCCACAGGTGTACACCAATCCACCTCCCAAGGAGCAG ATGCCCAAGGATAAGTACAGTCTCAGCTTCACCTGCATGATAACAGACTTCTCCCTGAAGACATTAATCTGGAGT GGCAGTGGAAATGGGCAGCGCAGAGAACTACAGAACACTCAGCCCATCATGGACACAGATGGCTCTTTA CTTCACTACAGCAAGCTCAATGTGAGAGAGCAACTGGGAGGCGAAATACTTTACCTGCTCTGTG TTACATGAGGGCTGCACAACCACTACTGAGAGAGCCTCTCCACTCTCCTGGTAAATGA	
SEQ ID NO: 156	ATGAAGTTGCCGTGTAGGCTGTGGTGTGATGGTCTGGATTCTGCTTCCAGCAGTCAAAATGCTTCTCA CCCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGAGAAAGTCAACCATGACCTGCAGTGTCAAGTCAAG TGTTAGTTACATGCACCTGGTACCGACAGAAAGTCAAGCACTCCCAAGGATGGATTTATGACACATCC AAACTGGCTTCTGGAGTCCCTGCTGCTTCAAGTGGCAGTGGTCTGGGACCTCTTACTCTCTCAAAATCA GCACCATGGAGCTGAAGATCTGCCACTTATTACTGCCACAGTGGAGTAAATACCCACCCATCAAGTT CGGTGCTGGGACCAAGCTGGAACAGAAACGGGCTGATGCTGCACCAACTGTATCCATCTTCCCAACCATCC AGTGACAGTTAAACATCTGGAGTGCCTCAGTGTGCTTCTTTGAACAACTCTACCCCAAGACATCA ATGTCAAGTGGAAATTTGATGGCAGTGAACGACAAAATGGCGTCTGAAACAGTTGGACTGATCAGGACAG CAAAGACAGCACTTACAGCATGACGAGCACCTTACGTTGACCAAGGACGAGTATGAACGACATAAACAGC TATACCTGTGAGGCCACTCACAAGACATCAACTTCACCCATTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT AG	编码如 SEQ ID NO: 158 所定义的 IC10 轻链 的完整序列的核酸序列。带下划线的核酸序 列编码前导序列, 该前导序列在成熟表达的 蛋白质中经去除。
SEQ ID NO: 157	MKLWLNWIFLVTLNLGIGQEVKLIVESGVLVKGPGSLKFSKAASGFTFFSHALSWVRQTPKEKLEWVASI SSRGRTPYPSVKGRFTVSRDNARNILYLQVSSLRSEDTAMYCTRGGTHYSGNGDFWQGQTTLTIVSS AKTTPPSVYPLAPGSAQTNSMVTGLCLVKGYFPEPVTVIWNSSLSGGVHFPFVAVLQSDLYTLSSSVTV PSSTWPSSETVTCNVVAHPASSTKVDKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFFPKPKDVLITITLTPKVTGV VDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTQPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAPPAPIE KTIISKTKGRPRAPQVYTIPTPPKEQMAKDKVSLTCMI TDFFPEDITVFEWQWNGQPAENYKNTQPIIMDTDGS YFIYSKLNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLHNHHTKSLSHSPGK	IC10 重链的完整序列。前导序列带下划线; 其在成熟序列中经去除。成熟 V_H 序列以粗 体显示。
SEQ ID NO: 158	MKLPRLLVLMVWIPASSSQIVLTQSPALMSASPEGKVTMTCSVSSSVSYMHWYQKSGTSPKRWIYDTS KLASGVPARFSGSGGTSYSLTISTMEAEADAATYCCQWSNNPPIITFGAGTKLELKRADAAPTIVSIFPPS SEQLTSGGASVVCFLNNFYPKIDINVKWKIDGSEKQNGVLNWSWTDQDSKDSITYSMSSTLTLLTKDEYERHNS YTCEATHKSTSTSPIVKSFNRNEC	IC10 轻链的完整序列。前导序列带下划线; 其在成熟序列中经去除。成熟 V_L 序列以粗 体显示。
SEQ ID NO: 159	ATGAAGTTGGCTGAACGTGAATTTCCCTTGTAACACTTTTAAATGGTATCCAGTGTGAAGTGAAACTGG TTGAGTCTGGGGAGTCTTAGTGAAGCCCTGGAGGTCCCTCAAAATTTCTCTGTCAGCTCTCTGGATTCAC TCTCAGTAGCCATGCCCTTGTCTTGGGTTCCGCCAGACTCCAGAGAAGAGACTGGAGTGGGTGCGCATCCATT AGTAGTCGTGGTGCAGAACCTACTATCCAGACAGTGTAAAGGCCCGATTACCCGCTCTCCAGAGATAATGCCA GGAACATCCCTGTPATCTGCAAGTGAAGCAGTCTGAGGTCTGAGGACACCGGCCATGTATTAATGTACAAGAGG CGGGACTCAATTAATCCTACGGCAACGGTTTGTACTTCTGGGGCCCAAGGACCACTCTCACAGTCTCCTCA CAAAACGACACCCCCATCTGTCTATCCACTGGCCCCCTGGATCTGTGCTGCCCAAACTAACTCCATGGTGACC CTGGGATGCCCTGGTCAAGGGCTATTTCCCTGAGCCAGTGACAGTGCAGTGGAACTCTGGATCCCTGTGCCA	编码如 SEQ ID NO: 161 所定义的重 链的完整序列的核酸序列。带下划线的核酸 序列编码前导序列, 该前导序列在成熟表达 的蛋白质中经去除。

[1714]

	GGGTTGTGCACACCTTCCAGTGTCTCTGAGTCTGAGTCTACCTCTACAGCTCAGTCTGACCTGCC CTCCAGCACCTGGCCCGCAGCAGACCGTCACTCAAGTTGCCACCGCCAGCAGCAGCAAGGTGGAC AAGAAATTTGCCAGGATTTGTGTTGTAAAGCTTGCAATATACAGTCCCAAGATCATCTGTCT TCATCTCCCCCAAGCCCAAGGATGTGCTCACCATTACTCTGACTCCTTAAGTCAAGTGTGTGTGGT AGACATCAGCAAGGATGATCCGAGGTCCAGTTCAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGTCTGAGT CAGACGCAACCCCGGAGGAGCAGTTCACACGACATTTCCCGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAG AGGACTGGCTCAATGGCAAGGAGTTCAATGCAAGGTCCAGGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAG AACCATCTCCAAAACCAAGGAGCAGCCGAGGTCCAGGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAG ATGGCCAAAGGATAAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAGTCAAG GGCAGTGGAAATGGCAGCCAGCGAGAACTACAAGAACACTACGCCCATCATGGACACAGATGGCTTTA CTTCATCTACAGCAAGTCAATGTGCAAGAGCAACTGGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAGGAG TTACATGAGGGCTGCACCAACCACTACTGAGAAAGGCTCTCCCACTCTCTGGTAAATGA	
SEQ ID NO: 160	ATGAAGTTGGCTGTAGGCTGTGGTGTGATGGTCTGGATTCCTGCTTCCAGCAGTCAAAATGTTCTCA CCAGTCTCCAGCAATCATGTCTGCATCTCCAGGGGAGAAAGTCAACCATGACCTGACGTGAGTCAAG TGTTAGTTACATGACTGGTACAGCAGAAAGTCAAGGACCTCCGCCAAAGATGATTAACACATCC AACTGGCTTCTGGACTCCCTGCTCGCTTCAGTGGCAGTGGGCTGGGACCTCTTACTCTCTCACAATCA GCACATGGAGGCTGAAGTGTGCCACTTATTAAGTGGCAGTGGGAGTAAATACCCACCCATCAAGT CGGTCTGGACCAAGCTGGAACCTGAAACGGGTGATGCTGCACCACTGATCATCTTCCCAACCATCC AGTGAGCAGTTAATCTGGAGTGGCTCAGTCTGCTGCTCTTTGAACAACTTACCCCAAGACATCA ATGCAAGTGAAGATTGATGGCAGTGAACGACAAATGGCGCTTGAACAGTGGACTGATCAGGACAG CAAGACAGCACCTACAGCATGAGCAGCACCTCAGCTGACCAAGGAGGAGTGAACGACATACAGC TATACCTGTGAGGCCACTCAAGACATCAACTTACCCCATTTGTCAAGAGCTTCAACAGGAATGAGTGT AG	编码如 SEQ ID NO: 162 所定义的 IA10 轻链 的完整序列的核酸序列。带下划线的核酸序 列编码前导序列, 该前导序列在成熟表达的 蛋白质中经去除。
SEQ ID NO: 161	MKLNLNWI FLVTLNLNGIQEVLVSEGGVLVKEPGLKLFSCAAGFTLSSHLSWVRQTEPKRLEWVASI SSRGTYYPDSVKGRFTVSRDNARNILYLQVSSLRSEDTAMYCTRGTHSYGNGDFWQGGTTLTVSS AKTTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTGLGLVKGYFPEPVITWNSSLSGVTFFPAVLQSDLYTLSSSVTV PSSTWPESETVNCNVAHPASSTKVDKIVPRDCCKPCICTVPEVSSVFTFPKPKDVLTLTLTPKVTCTV VDISKDDPEVQFSWFVDDVEVHTAQTPREEQFNSTFRSVSELPIMHQDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIE KTI SKTKGRPKAPQVYTI PPKEQMAKDKVSLTCMITDFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGS YFIYSKLNVOKSNWEAGNTFTCSVLHEGLNHNHTEKLSLHSPGK	IA10 重链的完整序列。前导序列带下划线; 其在成熟序列中经去除。成熟 V _H 序列以粗 体显示。
SEQ ID NO: 162	MKLPLVRLVLMVWIPASSSQIVLTQSPALMSAPGKVTMTCTCSSSVSYMHWYQKSGTSPKRWIYDTS KLASGVPAFSGSGGTSTSLTISTMEAEADATFYCQQWSNNPITTFGAGTKLELKRADAAPTIVSIFPPS SEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDI NVKWKIDGSRQNGVLSWTDQDSKDSYSSWSTLTTLTKDEVERHNS YTCEATHKTSITSPIVKSFNRNEC	IA10 轻链的完整序列。前导序列带下划线; 其在成熟序列中经去除。成熟 V _L 序列以粗 体显示。
SEQ ID NO: 167	S (Y/H) A (M/L) S	V _H -CDRI 共有序列

[1715]

SEQ ID NO: 168	SISS (G/R) G (S/R) TYYPD ^{SV} KG	V _H -CDR2 共有序列, 变体 1
SEQ ID NO: 169	GG (S/T) (T/R/H) (M/H/Y) (I/S) (T/Y) (T/G) (G/N) (L/*) GF (A/D) (Y/F)	V _H -CDR3 共有序列, 变体 1
SEQ ID NO: 170	S (A/V) SSSVSYMH	V _L -CDR1 共有序列
SEQ ID NO: 171	D (T/S) SKLAS	V _L -CDR2 共有序列
SEQ ID NO: 172	QQW (S/T/*) SN (* /N) PP (I/L) T	V _L -CDR3 共有序列, 变体 1
SEQ ID NO: 173	MTQTTT TELTTEFDYDGLGALCTLTDLVNQSKPITFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV YFINLAAADLLFVCTPLPMMQYLLDHNSLASVPCITLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVVMRYRP VKQACLSIFWVIFAVIIAIPHFMMVTKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVPLSVISYCYR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLI ^{AV} LVFIIFWLPYHLTLFLDITLKLKWISSCESEKSLKRALILTESLA FCHCCINPLLYVFGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSPSRRETSSDTLSDEVCRVS QIIP	US28 突变病毒株 (人工产生)。应注意, 该空间指示关于突变序列 (其不存在于序列表中的此序列的形式中) 的缺失。带下划线的部分依序分别对应于 N-末端 (即 ECD1)、ECD2、ECD3 和 ECD4。带有粗体下划线和加粗文本的氨基酸指示已发生突变的位置。
SEQ ID NO: 174	SISS (G/R) GRTYYPD ^{SV} KG	V _H -CDR2 共有序列, 变体 2
SEQ ID NO: 175	GG (S/T) (T/R/H) (M/H/Y) (I/S) (T/Y) (T/G) (G/N) GF (A/D) (Y/F)	V _H -CDR3 共有序列, 变体 2
SEQ ID NO: 176	QQW (T/*) SN (* /N) PPIT	V _L -CDR3 共有序列, 变体 2
SEQ ID NO: 177	MTPTTTTELTTTEFDYDGLGAPCTFTDVLNQSKPVTFLYGVVFLFGSVGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV YFINLAAADLLFVCTPLPMMQYLLDHNSLASVPCITLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVVMRYRP VKQACLSIFWVIFAVIIAIPHFMMVTKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVPLSVISYCYR ISRIVAVSQSRHKGRIVRVLI ^{AV} LVFIIFWLPYHLTLFLDITLKLKWISSCESEKSLKRALILTESLA FCHCCINPLLYVFGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSPSRRETSSDTLSDEVCRVS QIIPAAALEGSHHHHH	US28 融合蛋白, 包含来自 HCMV 突变病毒株的 US28 序列
SEQ ID NO: 178	MTQTTTTELTTTEFDYDGLGALCTLTDLVNQSKPITFLYGVVFLFGSIGNFLVIFTITWRRRIQCSGDV FINLAAADLLFVCTPLPMMQYLLDHNSLASVPCITLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVVMRYRP VKQACLSIFWVIFAVIIAIPHFMMVTKDNQCMTDYDYLEVSYPIILNVELMLGAFVPLSVISYCYR SRIVAVSQSRHKGRIVRVLI ^{AV} LVFIIFWLPYHLTLFLDITLKLKWISSCESEKSLKRALILTESLA FCHCCINPLLYVFGTKFRQELHCLLAEFRQRLFSRDVSWYHSMFSRRSPSRRETSSDTLSDEVCRVS QIIPAAALEGSHHHHH	US28 融合蛋白, 包含来自 HCMV 突变病毒株的 US28 序列

[1716] 表1:根据Blast搜索,90%的HCMV病毒株展示ECD 4D变体。展示4N变体的病毒株列于下文:

[1717]	寄存编号	病毒株名称	来源	变异US28ECD3	年份
	MT044485.1	SYD-SCT1	血浆	4N	2020
	KF021605.1	TR	HIV患者的眼	4N	2013
	AF073835	N8	?	4N	2015
	KP745645.1	BE/13/2010	尿液	4N	2015
	KP745727.1	BE/17/2010	尿液	4N	2015
	AF073834.1	L10	?	4N	2000
	KY490076.1	HANRTR8	肾三联症患者(kidn.trpl.pat.)血液	4N	2017
	AF073833.1	FS4	?	4N	2000
	MH836520.1	P020	?	4N	2018
	MH836506.1	P003	?	4N	2018
	GU93774	Toledo	先天性感染婴儿的尿液	4N	2003
	KT959235	DB	怀孕女性	4N	2009

[1718] 表2:潜在US28结合抗体的表面结合特异性的比较

[1719]	抗体	结合特异性
	13-5G6-1D3克隆	15.2*
	13-5G6-1D3 rAb	21.5*
	13-5C6-1B5克隆	11*
	14-1H3-1A6克隆	26*
	VUN100	4**
	US28市售Ab	1.70***

[1720] 比率基于抗体与以下的表面结合:*CHO-US28-A1细胞相比于US28阴性对照CHO细胞;**US28表达HEK-293相对于模拟HEK-293膜,如由De Groof等人2019(同上)所报导;***HCMVAd169感染MRC-5细胞相对于模拟MRC-5细胞。值>1是指在US28表达细胞上的结合高于阴性对照细胞。

[1721] 表3:由HCMV病毒株DB编码的US28蛋白结构(SEQ ID No:5/寄存编号KT959235;突变以粗体文字指示),和由不同HCMV病毒株编码的US28蛋白中的突变:

[1722] MTP **T**TTT **A**ELTTEF **D**YD **E**A **T**PC **V**F TDVLNQSKPVTFLYGVVF **L**FGS **I**GNFLVIFTITWRRRIQCSGDVYFINLAAADLLFVCTLPLWMQYLLDHNSLASVPCTLLTACFYVAMFASLCFITEIALDRYYAIVYMRYPVKQACLF SIFWWIFAVIIAIPHFMVVTKK **N**NQCMTDYDYLEVSYPIILN **V**ELMLGAFVIPLSVISYCYRISRIVAVSQSRHKGRIVRVLI AVVLVFIIFWLPYHLTLF **V**DTLKLKWISSSCEFE **R**SLKRALILTESLAFCHCCLNPLLYVFGTKFRQELHCLLAEFRQLFSRDVSWYHSMFSRR **S**SPSRRETSSDTLSDE **V**CRVSIIP (SEQ ID No:5)

[1723]

HCMVDB (KT959235) 相对于	US28 突变
Toledo (GU937742)	相同 (A1 基因型)
Towne (FJ616285)	A19D; N170D (A2 基因型)
VR1814 (GU179289)	A19D; N170D; S330G (A2 基因型)
TR (KF021605.1)	L45I; R267K (A1 基因型)
TB40/E (KF297339)	A8T; D15E; E18L; A19G; V24T; N170D (B1 基因型)
Merlin (AY446894)	A19D; N170D; S330G (A2 基因型)
JP (GQ221975)	N170D (A1 基因型)
AD169 (X17403.1)	A19D; N170D (A2 基因型)
AF1 (GU179291.1)	N170D (A1 基因型)
VHL/E (L20501.1)	E18D; A19E; F25L; N170D; R267K; V346A (D 基因型)
Davis (JX512198.1)	A19D、N170D、V190I、R267K、V346A (A1 基因型)
BL (MW980585)	A19D、T21A、F25L、N170D、V250L、R267K、V346A (C 基因型)

序列表

<110> 商瑟欧普公司

<120> 治疗剂和诊断剂以及其用途

<130> THEBE/P78812PC

<150> GB2101228.1

<151> 2021-01-29

<160> 178

<170> BiSSAP 1.3.6

<210> 1

<211> 37

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> US28的ECD1,HCMV病毒株DB

<400> 1

Met Thr Pro Thr Thr Thr Thr Ala Glu Leu Thr Thr Glu Phe Asp Tyr

1 5 10 15

Asp Glu Ala Ala Thr Pro Cys Val Phe Thr Asp Val Leu Asn Gln Ser

20 25 30

Lys Pro Val Thr Leu

35

<210> 2

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> US28的ECD2,HCMV病毒株DB

<400> 2

Gln Tyr Leu Leu Asp His Asn Ser Leu Ala Ser

1 5 10

<210> 3

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> US28的ECD3,HCMV病毒株DB

<400> 3

Thr Lys Lys Asn Asn Gln Cys Met Thr Asp Tyr Asp Tyr Leu Glu Val

1	5	10	15
Ser			
<210> 4			
<211> 24			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> US28的ECD4,HCMV病毒株DB			
<400> 4			
Val	Asp	Thr	Leu
Lys	Leu	Leu	Lys
Trp	Ile	Ser	Ser
Ser	Cys	Glu	Phe
1	5	10	15
Glu	Arg	Ser	Leu
Lys	Arg	Ala	Leu
20			
<210> 5			
<211> 354			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> US28,HCMV病毒株DB			
<400> 5			
Met	Thr	Pro	Thr
Thr	Thr	Thr	Ala
Glu	Leu	Thr	Thr
Glu	Phe	Asp	Tyr
1	5	10	15
Asp	Glu	Ala	Ala
Thr	Pro	Cys	Val
Phe	Thr	Asp	Val
Leu	Asn	Gln	Ser
20			
25			
30			
Lys	Pro	Val	Thr
Leu	Phe	Leu	Tyr
Gly	Val	Val	Phe
Leu	Phe	Gly	Ser
35			
40			
45			
Ile	Gly	Asn	Phe
Leu	Val	Ile	Phe
Thr	Ile	Thr	Trp
Arg	Arg	Arg	Ile
50			
55			
60			
Gln	Cys	Ser	Gly
Asp	Val	Tyr	Phe
Ile	Asn	Leu	Ala
Ala	Ala	Ala	Asp
Leu	65		
70			
75			
80			
Leu	Phe	Val	Cys
Thr	Leu	Pro	Leu
Trp	Met	Gln	Tyr
Leu	Leu	Asp	His
85			
90			
95			
Asn	Ser	Leu	Ala
Ser	Val	Pro	Cys
Thr	Leu	Leu	Thr
Ala	Cys	Phe	Tyr
100			
105			
110			
Val	Ala	Met	Phe
Ala	Ser	Leu	Cys
Phe	Ile	Thr	Glu
Ile	Ala	Leu	Asp
115			
120			
125			
Arg	Tyr	Tyr	Ala
Ile	Val	Tyr	Met
Arg	Tyr	Arg	Pro
Val	Lys	Gln	Ala
130			
135			
140			
Cys	Leu	Phe	Ser
Ile	Phe	Trp	Trp
Ile	Phe	Ala	Val
Ile	Ile	Ala	Ile

145	150	155	160
Pro His Phe Met Val Val Thr Lys Lys Asn Asn Gln Cys Met Thr Asp			
	165	170	175
Tyr Asp Tyr Leu Glu Val Ser Tyr Pro Ile Ile Leu Asn Val Glu Leu			
	180	185	190
Met Leu Gly Ala Phe Val Ile Pro Leu Ser Val Ile Ser Tyr Cys Tyr			
	195	200	205
Tyr Arg Ile Ser Arg Ile Val Ala Val Ser Gln Ser Arg His Lys Gly			
	210	215	220
Arg Ile Val Arg Val Leu Ile Ala Val Val Leu Val Phe Ile Ile Phe			
225	230	235	240
Trp Leu Pro Tyr His Leu Thr Leu Phe Val Asp Thr Leu Lys Leu Leu			
	245	250	255
Lys Trp Ile Ser Ser Ser Cys Glu Phe Glu Arg Ser Leu Lys Arg Ala			
	260	265	270
Leu Ile Leu Thr Glu Ser Leu Ala Phe Cys His Cys Cys Leu Asn Pro			
	275	280	285
Leu Leu Tyr Val Phe Val Gly Thr Lys Phe Arg Gln Glu Leu His Cys			
	290	295	300
Leu Leu Ala Glu Phe Arg Gln Arg Leu Phe Ser Arg Asp Val Ser Trp			
305	310	315	320
Tyr His Ser Met Ser Phe Ser Arg Arg Ser Ser Pro Ser Arg Arg Glu			
	325	330	335
Thr Ser Ser Asp Thr Leu Ser Asp Glu Val Cys Arg Val Ser Gln Ile			
	340	345	350

Ile Pro

<210> 6

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCMV病毒株的ECD3 4N变体组

<400> 6

Thr Lys Lys Asn Asn Gln Cys Met Thr Asp Tyr Asp Tyr Leu Glu Val

1

5

10

15

Ser

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> HCMV病毒株的ECD3 4D变体组

<400> 7

Thr Lys Lys Asp Asn Gln Cys Met Thr Asp Tyr Asp Tyr Leu Glu Val

1

5

10

15

Ser

<210> 8

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1D3的VH-CDR1序列

<400> 8

Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr

1

5

<210> 9

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1D3的VH-CDR2序列

<400> 9

Ile Arg Ser Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr

1

5

10

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1D3的VH-CDR3序列

<400> 10

Ala Arg Asp Glu Arg Arg Thr Ala Trp Leu Ala Tyr

1

5

10

<210> 11

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1D3的重组表达VH序列的未成熟形式,其中位置1-19对应于前导序列

<400> 11

```

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
1           5           10           15
Ile Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
20           25           30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe
35           40           45
Thr Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu
50           55           60
Glu Trp Leu Gly Phe Ile Arg Ser Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu
65           70           75           80
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
85           90           95
Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ser Glu Asp Ser
100          105          110
Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Glu Arg Arg Thr Ala Trp Leu Ala
115          120          125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
130          135          140

```

<210> 12

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1D3的VH序列的成熟形式,无前导序列

<400> 12

```

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr
20           25           30
Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu
35           40           45
Gly Phe Ile Arg Ser Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala
50           55           60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile
65           70           75           80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Thr Tyr
85           90           95

```

Tyr Cys Ala Arg Asp Glu Arg Arg Thr Ala Trp Leu Ala Tyr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 13

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1D3的重组表达VH序列的前导序列

<400> 13

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
1 5 10 15

Ile Gln Cys

<210> 14

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1D3的VL-CDR1序列

<400> 14

Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 15

<400> 15

000

<210> 16

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1D3的VL-CDR3序列

<400> 16

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Thr Trp Thr
1 5 10

<210> 17

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1D3的重组表达VL序列的未成熟形式,其中位置1-19对应于前导序列

<400> 17

```

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Val Trp Ile Pro Ala
1           5           10           15
Ser Ser Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
           20           25           30
Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
           35           40           45
Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
           50           55           60
Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
65           70           75           80
Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
           85           90           95
Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys
           100          105          110
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Thr Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
           115          120          125
Leu Glu Ile Lys
           130

```

<210> 18

<211> 113

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1D3的VL序列的成熟形式,无前导序列

<400> 18

```

Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1           5           10           15
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
           20           25           30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
           35           40           45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
           50           55           60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65           70           75           80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly

```

	85		90		95
Ser His Val Pro Thr Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile					
	100		105		110
Lys					
<210> 19					
<211> 19					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 1D3的重组表达VL序列的前导序列					
<400> 19					
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Val Trp Ile Pro Ala					
1	5		10		15
Ser Ser Ser					
<210> 20					
<211> 464					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 1D3的重链的完整序列					
<400> 20					
Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly					
1	5		10		15
Ile Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln					
	20		25		30
Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe					
	35		40		45
Thr Asp Tyr Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu					
	50		55		60
Glu Trp Leu Gly Phe Ile Arg Ser Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu					
65		70		75	80
Tyr Ser Ala Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser					
	85		90		95
Gln Ser Ile Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ser Glu Asp Ser					
	100		105		110
Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Arg Asp Glu Arg Arg Thr Ala Trp Leu Ala					
	115		120		125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Lys Thr Thr					
	130		135		140

Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn
145					150				155						160
Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
				165					170					175	
Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr
				180				185					190		
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val
		195					200					205			
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val
	210					215					220				
Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg
225					230				235						240
Asp	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser
				245					250					255	
Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu
				260				265					270		
Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro
		275					280					285			
Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala
	290					295					300				
Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val
305					310				315						320
Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe
				325					330				335		
Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
			340				345						350		
Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile
		355					360					365			
Pro	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys
		370				375					380				
Met	Ile	Thr	Asp	Phe	Phe	Pro	Glu	Asp	Ile	Thr	Val	Glu	Trp	Gln	Trp
385					390				395						400
Asn	Gly	Gln	Pro	Ala	Glu	Asn	Tyr	Lys	Asn	Thr	Gln	Pro	Ile	Met	Asp
				405					410				415		
Thr	Asp	Gly	Ser	Tyr	Phe	Ile	Tyr	Ser	Lys	Leu	Asn	Val	Gln	Lys	Ser
			420					425				430			
Asn	Trp	Glu	Ala	Gly	Asn	Thr	Phe	Thr	Cys	Ser	Val	Leu	His	Glu	Gly
		435					440					445			
Leu	His	Asn	His	His	Thr	Glu	Lys	Ser	Leu	Ser	His	Ser	Pro	Gly	Lys

206

<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1D3的VH-CDR1序列	
<400> 22	
gggttcacct tcactgatta ctat	24
<210> 23	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1D3的VH-CDR2序列	
<400> 23	
attagaagca aagctaattgg ttacacaaca	30
<210> 24	
<211> 36	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1D3的VH-CDR3序列	
<400> 24	
gcaagagatg agcgccgtac tgcctggctt gcttac	36
<210> 25	
<211> 422	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1D3的重组表达VH序列的未成熟形式	
<400> 25	
atgaagttgt ggctgaactg gattttcett gtaacacttt taaatggtat ccagtgtgag	60
gtgaagctgg tggagtctgg aggaggcttg gtacagccgg ggggttctct gagactcgcc	120
tgtgcaactt ctgggttcac cttcactgat tactatatga gctgggtccg ccagcctcca	180
ggaaaggcac ttgagtggct gggttttatt agaagcaaag ctaatggtta cacaacagag	240
tacagtgcac ctgttaaggg tcggttcacc atctccagag ataattccca aagcctctc	300
tatcttcaaa tgaacaccct gagatctgag gacagtgcc cttattactg tgcaagagat	360
gagcgccgta ctgcctggct tgcttactgg ggccaaggga ctctggtcac tgtctctgca	420
gc	422
<210> 26	

<211> 365	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1D3的VH序列的成熟形式	
<400> 26	
gaggtgaagc tggaggagtc tggaggagc ttggtacagc cgggggggttc tctgagactc	60
gcctgtgcaa cttctgggtt caccttcact gattactata tgagctgggt ccgccagcct	120
ccaggaaagg cacttgagtg gctgggtttt attagaagca aagctaattg ttacacaaca	180
gagtacagtg catctgttaa gggtcgggtt accatctcca gagataattc ccaaagcatc	240
ctctatcttc aaatgaacac cctgagatct gaggacagtg ccacttatta ctgtgcaaga	300
gatgagcgcc gtactgcctg gcttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct	360
gcagc	365
<210> 27	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1D3的重组表达VH序列的前导序列	
<400> 27	
atgaagttgt ggctgaactg gattttcctt gtaacacttt taaatggtat ccagtgt	57
<210> 28	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1D3的VL-CDR1序列	
<400> 28	
cagagcattg tacatagtaa tggaaacacc tat	33
<210> 29	
<400> 29	
000	
<210> 30	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1D3的VL-CDR3序列	
<400> 30	

tttcaagggtt cacatgttcc cacgtggacg	30
<210> 31	
<211> 396	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1D3的重组表达VL序列的未成熟形式	
<400> 31	
atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atggtctgga ttcttgcttc cagcagtgat	60
gttttgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc	120
tcttgcagat ctagtcagag cattgtacat agtaatggaa acacctatct agactggtac	180
cttcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct	240
ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcaggacag atttcacact caaaatcagc	300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat tactgctttc aaggttcaca tgttcccacg	360
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaa	396
<210> 32	
<211> 339	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1D3的VL序列的成熟形式	
<400> 32	
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc	60
atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtaatg gaaacaccta tttagactgg	120
taccttcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtctt caaccgattt	180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaaaatc	240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggttc acatgttccc	300
acgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaa	339
<210> 33	
<211> 57	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1D3的重组表达VL序列的前导序列	
<400> 33	
atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atggtctgga ttcttgcttc cagcagt	57
<210> 34	
<211> 1395	
<212> DNA	

<213> 人工序列

<220>

<223> 1D3的重链的完整序列

<400> 34

atgaagttgt ggctgaactg gattttcctt gtaacacttt taaatggat ccagtgtgag	60
gtgaagctgg tggagtctgg aggaggcttg gtacagccgg ggggttctct gagactcgcc	120
tgtgcaactt ctgggttcac cttcactgat tactatatga gctgggtccg ccagcctcca	180
ggaaaggcac ttgagtggct gggttttatt agaagcaaag ctaatggta cacaacagag	240
tacagtgcac ctgttaaggg tcgggttcacc atctccagag ataattccca aagcatcctc	300
tatcttcaaa tgaacaccct gagatctgag gacagtgcc cttattactg tgcaagagat	360
gagcgccgta ctgcctggct tgcttactgg ggccaaggga ctctgggtcac tgtctctgca	420
gcaaaaacga ccccccatc tgtctatcca ctggccctg gatctgctgc ccaactaac	480
tccatggtga ccctgggatg cctgggtcaag ggctatttcc ctgagccagt gacagtgacc	540
tggaaactctg gatccctgtc cagcgggtgtg cacaccttcc cagctgtcct gcagtctgac	600
ctctacactc tgagcagctc agtgactgtc ccctccagca cctggcccag cgagaccgtc	660
acctgcaacg ttgcccaccc ggccagcagc accaaggtgg acaagaaaat tgtgcccagg	720
gattgtgggt gtaagccttg catatgtaca gtcccagaag tatcatctgt cttcatcttc	780
cccccaaagc ccaaggatgt gctcaccatt actctgactc ctaaggtcac gtgtgtttgtg	840
gtagacatca gcaaggatga tcccaggtc cagttcagct ggtttgtaga tgatgtggag	900
gtgcacacag ctacagcga accccgggag gagcagttca acagcacttt ccgctcagtc	960
agtgaacttc ccatcatgca ccaggactgg ctcaatggca aggagttaa atgcagggtc	1020
aacagtgcag ctttccctgc ccccatcgag aaaaccatct ccaaaaccaa aggcagaccg	1080
aaggctccac aggtgtacac cattccacct cccaaggagc agatggccaa ggataaagtc	1140
agtctgacct gcatgataac agacttcttc cctgaagaca ttactgtgga gtggcagtg	1200
aatgggcagc cagcggagaa ctacaagaac actcagccca tcatggacac agatggctct	1260
tacttcatct acagcaagct caatgtgcag aagagcaact gggaggcagg aaatactttc	1320
acctgctctg tgttacatga gggcctgcac aaccaccata ctgagaagag cctctccac	1380
tctcctggta aatga	1395

<210> 35

<211> 720

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1D3的轻链的完整序列

<400> 35

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atggtctgga ttcttgcttc cagcagtgat	60
gttttgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc	120
tcttgagat ctagtcagag cattgtacat agtaatggaa acacctattt agactggtac	180
cttcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct	240

```

ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcaggacag atttcacact caaaatcagc 300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat tactgctttc aaggttcaca tgttcccacg 360
tggacgttcg gtggaggcac caagctggaa atcaaacggg ctgatgctgc accaactgta 420
tccatcttcc caccatccag tgagcagtta acatctggag gtgcctcagt cgtgtgcttc 480
ttgaacaact tctaccccaa agacatcaat gtcaagtgga agattgatgg cagtgaacga 540
caaaatggcg tcctgaacag ttggactgat caggacagca aagacagcac ctacagcatg 600
agcagcaccc tcacgttgac caaggacgag tatgaacgac ataacagcta tacctgtgag 660
gccactcaca agacatcaac ttcaccatt gtcaagagct tcaacaggaa tgagtgttag 720

```

<210> 36

<211> 354

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> US28 Toledo病毒株

<400> 36

Met Thr Pro Thr Thr Thr Thr Ala Glu Leu Thr Thr Glu Phe Asp Tyr

1 5 10 15

Asp Glu Ala Ala Thr Pro Cys Val Phe Thr Asp Val Leu Asn Gln Ser

20 25 30

Lys Pro Val Thr Leu Phe Leu Tyr Gly Val Val Phe Leu Phe Gly Ser

35 40 45

Ile Gly Asn Phe Leu Val Ile Phe Thr Ile Thr Trp Arg Arg Arg Ile

50 55 60

Gln Cys Ser Gly Asp Val Tyr Phe Ile Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu

65 70 75 80

Leu Phe Val Cys Thr Leu Pro Leu Trp Met Gln Tyr Leu Leu Asp His

85 90 95

Asn Ser Leu Ala Ser Val Pro Cys Thr Leu Leu Thr Ala Cys Phe Tyr

100 105 110

Val Ala Met Phe Ala Ser Leu Cys Phe Ile Thr Glu Ile Ala Leu Asp

115 120 125

Arg Tyr Tyr Ala Ile Val Tyr Met Arg Tyr Arg Pro Val Lys Gln Ala

130 135 140

Cys Leu Phe Ser Ile Phe Trp Trp Ile Phe Ala Val Ile Ile Ala Ile

145 150 155 160

Pro His Phe Met Val Val Thr Lys Lys Asn Asn Gln Cys Met Thr Asp

165 170 175

Tyr Asp Tyr Leu Glu Val Ser Tyr Pro Ile Ile Leu Asn Val Glu Leu

180 185 190

Met Leu Gly Ala Phe Val Ile Pro Leu Ser Val Ile Ser Tyr Cys Tyr
 195 200 205
 Tyr Arg Ile Ser Arg Ile Val Ala Val Ser Gln Ser Arg His Lys Gly
 210 215 220
 Arg Ile Val Arg Val Leu Ile Ala Val Val Leu Val Phe Ile Ile Phe
 225 230 235 240
 Trp Leu Pro Tyr His Leu Thr Leu Phe Val Asp Thr Leu Lys Leu Leu
 245 250 255
 Lys Trp Ile Ser Ser Ser Cys Glu Phe Glu Arg Ser Leu Lys Arg Ala
 260 265 270
 Leu Ile Leu Thr Glu Ser Leu Ala Phe Cys His Cys Cys Leu Asn Pro
 275 280 285
 Leu Leu Tyr Val Phe Val Gly Thr Lys Phe Arg Gln Glu Leu His Cys
 290 295 300
 Leu Leu Ala Glu Phe Arg Gln Arg Leu Phe Ser Arg Asp Val Ser Trp
 305 310 315 320
 Tyr His Ser Met Ser Phe Ser Arg Arg Ser Ser Pro Ser Arg Arg Glu
 325 330 335
 Thr Ser Ser Asp Thr Leu Ser Asp Glu Val Cys Arg Val Ser Gln Ile
 340 345 350

Ile Pro

<210> 37

<211> 354

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> US28 Towne病毒株

<400> 37

Met Thr Pro Thr Thr Thr Thr Ala Glu Leu Thr Thr Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 Asp Glu Asp Ala Thr Pro Cys Val Phe Thr Asp Val Leu Asn Gln Ser
 20 25 30
 Lys Pro Val Thr Leu Phe Leu Tyr Gly Val Val Phe Leu Phe Gly Ser
 35 40 45
 Ile Gly Asn Phe Leu Val Ile Phe Thr Ile Thr Trp Arg Arg Arg Ile
 50 55 60
 Gln Cys Ser Gly Asp Val Tyr Phe Ile Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu
 65 70 75 80
 Leu Phe Val Cys Thr Leu Pro Leu Trp Met Gln Tyr Leu Leu Asp His

	85		90		95
Asn Ser Leu Ala Ser Val Pro Cys Thr Leu Leu Thr Ala Cys Phe Tyr					
100		105		110	
Val Ala Met Phe Ala Ser Leu Cys Phe Ile Thr Glu Ile Ala Leu Asp					
115		120		125	
Arg Tyr Tyr Ala Ile Val Tyr Met Arg Tyr Arg Pro Val Lys Gln Ala					
130		135		140	
Cys Leu Phe Ser Ile Phe Trp Trp Ile Phe Ala Val Ile Ile Ala Ile					
145		150		155	
Pro His Phe Met Val Val Thr Lys Lys Asp Asn Gln Cys Met Thr Asp					
165		170		175	
Tyr Asp Tyr Leu Glu Val Ser Tyr Pro Ile Ile Leu Asn Val Glu Leu					
180		185		190	
Met Leu Gly Ala Phe Val Ile Pro Leu Ser Val Ile Ser Tyr Cys Tyr					
195		200		205	
Tyr Arg Ile Ser Arg Ile Val Ala Val Ser Gln Ser Arg His Lys Gly					
210		215		220	
Arg Ile Val Arg Val Leu Ile Ala Val Val Leu Val Phe Ile Ile Phe					
225		230		235	
Trp Leu Pro Tyr His Leu Thr Leu Phe Val Asp Thr Leu Lys Leu Leu					
245		250		255	
Lys Trp Ile Ser Ser Ser Cys Glu Phe Glu Arg Ser Leu Lys Arg Ala					
260		265		270	
Leu Ile Leu Thr Glu Ser Leu Ala Phe Cys His Cys Cys Leu Asn Pro					
275		280		285	
Leu Leu Tyr Val Phe Val Gly Thr Lys Phe Arg Gln Glu Leu His Cys					
290		295		300	
Leu Leu Ala Glu Phe Arg Gln Arg Leu Phe Ser Arg Asp Val Ser Trp					
305		310		315	
Tyr His Ser Met Ser Phe Ser Arg Arg Ser Ser Pro Ser Arg Arg Glu					
325		330		335	
Thr Ser Ser Asp Thr Leu Ser Asp Glu Val Cys Arg Val Ser Gln Ile					
340		345		350	

Ile Pro

<210> 38

<211> 354

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> US28 VR 1814病毒株

<400> 38

Met	Thr	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Glu	Leu	Thr	Thr	Glu	Phe	Asp	Tyr
1				5					10					15	
Asp	Glu	Asp	Ala	Thr	Pro	Cys	Val	Phe	Thr	Asp	Val	Leu	Asn	Gln	Ser
			20					25					30		
Lys	Pro	Val	Thr	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gly	Val	Val	Phe	Leu	Phe	Gly	Ser
			35					40					45		
Ile	Gly	Asn	Phe	Leu	Val	Ile	Phe	Thr	Ile	Thr	Trp	Arg	Arg	Arg	Ile
			50				55				60				
Gln	Cys	Ser	Gly	Asp	Val	Tyr	Phe	Ile	Asn	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu
65					70					75					80
Leu	Phe	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Leu	Trp	Met	Gln	Tyr	Leu	Leu	Asp	His
				85					90					95	
Asn	Ser	Leu	Ala	Ser	Val	Pro	Cys	Thr	Leu	Leu	Thr	Ala	Cys	Phe	Tyr
			100					105					110		
Val	Ala	Met	Phe	Ala	Ser	Leu	Cys	Phe	Ile	Thr	Glu	Ile	Ala	Leu	Asp
			115					120					125		
Arg	Tyr	Tyr	Ala	Ile	Val	Tyr	Met	Arg	Tyr	Arg	Pro	Val	Lys	Gln	Ala
			130					135					140		
Cys	Leu	Phe	Ser	Ile	Phe	Trp	Trp	Ile	Phe	Ala	Val	Ile	Ile	Ala	Ile
145					150					155					160
Pro	His	Phe	Met	Val	Val	Thr	Lys	Lys	Asp	Asn	Gln	Cys	Met	Thr	Asp
				165					170					175	
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Pro	Ile	Ile	Leu	Asn	Val	Glu	Leu
			180					185					190		
Met	Leu	Gly	Ala	Phe	Val	Ile	Pro	Leu	Ser	Val	Ile	Ser	Tyr	Cys	Tyr
			195					200					205		
Tyr	Arg	Ile	Ser	Arg	Ile	Val	Ala	Val	Ser	Gln	Ser	Arg	His	Lys	Gly
			210				215					220			
Arg	Ile	Val	Arg	Val	Leu	Ile	Ala	Val	Val	Leu	Val	Phe	Ile	Ile	Phe
225					230					235					240
Trp	Leu	Pro	Tyr	His	Leu	Thr	Leu	Phe	Val	Asp	Thr	Leu	Lys	Leu	Leu
				245					250					255	
Lys	Trp	Ile	Ser	Ser	Ser	Cys	Glu	Phe	Glu	Arg	Ser	Leu	Lys	Arg	Ala
			260					265					270		
Leu	Ile	Leu	Thr	Glu	Ser	Leu	Ala	Phe	Cys	His	Cys	Cys	Leu	Asn	Pro
			275					280					285		
Leu	Leu	Tyr	Val	Phe	Val	Gly	Thr	Lys	Phe	Arg	Gln	Glu	Leu	His	Cys

290	295	300
Leu Leu Ala Glu Phe Arg Gln Arg Leu Phe Ser Arg Asp Val Ser Trp		
305	310	315
Tyr His Ser Met Ser Phe Ser Arg Arg Gly Ser Pro Ser Arg Arg Glu		320
	325	330
Thr Ser Ser Asp Thr Leu Ser Asp Glu Val Cys Arg Val Ser Gln Ile		335
	340	345
		350
Ile Pro		
<210> 39		
<211> 354		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> US28 TB40/E病毒株		
<400> 39		
Met Thr Pro Thr Thr Thr Thr Thr Glu Leu Thr Thr Glu Phe Glu Tyr		
1	5	10
Asp Leu Gly Ala Thr Pro Cys Thr Phe Thr Asp Val Leu Asn Gln Ser		
	20	25
		30
Lys Pro Val Thr Leu Phe Leu Tyr Gly Val Val Phe Leu Phe Gly Ser		
	35	40
		45
Val Gly Asn Phe Leu Val Ile Phe Thr Ile Thr Trp Arg Arg Arg Ile		
	50	55
		60
Gln Cys Ser Gly Asp Val Tyr Phe Ile Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu		
65	70	75
		80
Leu Phe Val Cys Thr Leu Pro Leu Trp Met Gln Tyr Leu Leu Asp His		
	85	90
		95
Asn Ser Leu Ala Ser Val Pro Cys Thr Leu Leu Thr Ala Cys Phe Tyr		
	100	105
		110
Val Ala Met Phe Ala Ser Leu Cys Phe Ile Thr Glu Ile Ala Leu Asp		
	115	120
		125
Arg Tyr Tyr Ala Ile Val Tyr Met Arg Tyr Arg Pro Val Lys Gln Ala		
	130	135
		140
Cys Leu Phe Ser Ile Phe Trp Trp Ile Phe Ala Val Ile Ile Ala Ile		
145	150	155
		160
Pro His Phe Met Val Val Thr Lys Lys Asp Asn Gln Cys Met Thr Asp		
	165	170
		175
Tyr Asp Tyr Leu Glu Val Ser Tyr Pro Ile Ile Leu Asn Val Glu Leu		
	180	185
		190

Met Leu Gly Ala Phe Val Ile Pro Leu Ser Val Ile Ser Tyr Cys Tyr
 195 200 205
 Tyr Arg Ile Ser Arg Ile Val Ala Val Ser Gln Ser Arg His Lys Gly
 210 215 220
 Arg Ile Val Arg Val Leu Ile Ala Val Val Leu Val Phe Ile Ile Phe
 225 230 235 240
 Trp Leu Pro Tyr His Leu Thr Leu Phe Val Asp Thr Leu Lys Leu Leu
 245 250 255
 Lys Trp Ile Ser Ser Ser Cys Glu Phe Glu Arg Ser Leu Lys Arg Ala
 260 265 270
 Leu Ile Leu Thr Glu Ser Leu Ala Phe Cys His Cys Cys Leu Asn Pro
 275 280 285
 Leu Leu Tyr Val Phe Val Gly Thr Lys Phe Arg Gln Glu Leu His Cys
 290 295 300
 Leu Leu Ala Glu Phe Arg Gln Arg Leu Phe Ser Arg Asp Val Ser Trp
 305 310 315 320
 Tyr His Ser Met Ser Phe Ser Arg Arg Ser Ser Pro Ser Arg Arg Glu
 325 330 335
 Thr Ser Ser Asp Thr Leu Ser Asp Glu Val Cys Arg Val Ser Gln Ile
 340 345 350

Ile Pro

<210> 40

<211> 354

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> US28 Merlin病毒株

<400> 40

Met Thr Pro Thr Thr Thr Thr Ala Glu Leu Thr Thr Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 Asp Glu Asp Ala Thr Pro Cys Val Phe Thr Asp Val Leu Asn Gln Ser
 20 25 30
 Lys Pro Val Thr Leu Phe Leu Tyr Gly Val Val Phe Leu Phe Gly Ser
 35 40 45
 Ile Gly Asn Phe Leu Val Ile Phe Thr Ile Thr Trp Arg Arg Arg Ile
 50 55 60
 Gln Cys Ser Gly Asp Val Tyr Phe Ile Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu
 65 70 75 80
 Leu Phe Val Cys Thr Leu Pro Leu Trp Met Gln Tyr Leu Leu Asp His

	85		90		95
Asn Ser Leu Ala Ser Val Pro Cys Thr Leu Leu Thr Ala Cys Phe Tyr					
100		105		110	
Val Ala Met Phe Ala Ser Leu Cys Phe Ile Thr Glu Ile Ala Leu Asp					
115		120		125	
Arg Tyr Tyr Ala Ile Val Tyr Met Arg Tyr Arg Pro Val Lys Gln Ala					
130		135		140	
Cys Leu Phe Ser Ile Phe Trp Trp Ile Phe Ala Val Ile Ile Ala Ile					
145		150		155	
Pro His Phe Met Val Val Thr Lys Lys Asp Asn Gln Cys Met Thr Asp					
165		170		175	
Tyr Asp Tyr Leu Glu Val Ser Tyr Pro Ile Ile Leu Asn Val Glu Leu					
180		185		190	
Met Leu Gly Ala Phe Val Ile Pro Leu Ser Val Ile Ser Tyr Cys Tyr					
195		200		205	
Tyr Arg Ile Ser Arg Ile Val Ala Val Ser Gln Ser Arg His Lys Gly					
210		215		220	
Arg Ile Val Arg Val Leu Ile Ala Val Val Leu Val Phe Ile Ile Phe					
225		230		235	
Trp Leu Pro Tyr His Leu Thr Leu Phe Val Asp Thr Leu Lys Leu Leu					
245		250		255	
Lys Trp Ile Ser Ser Ser Cys Glu Phe Glu Arg Ser Leu Lys Arg Ala					
260		265		270	
Leu Ile Leu Thr Glu Ser Leu Ala Phe Cys His Cys Cys Leu Asn Pro					
275		280		285	
Leu Leu Tyr Val Phe Val Gly Thr Lys Phe Arg Gln Glu Leu His Cys					
290		295		300	
Leu Leu Ala Glu Phe Arg Gln Arg Leu Phe Ser Arg Asp Val Ser Trp					
305		310		315	
Tyr His Ser Met Ser Phe Ser Arg Arg Gly Ser Pro Ser Arg Arg Glu					
325		330		335	
Thr Ser Ser Asp Thr Leu Ser Asp Glu Val Cys Arg Val Ser Gln Ile					
340		345		350	

Ile Pro

<210> 41

<211> 354

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> US28 JP病毒株

<400> 41

Met	Thr	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Glu	Leu	Thr	Thr	Glu	Phe	Asp	Tyr
1				5					10					15	
Asp	Glu	Ala	Ala	Thr	Pro	Cys	Val	Phe	Thr	Asp	Val	Leu	Asn	Gln	Ser
			20					25						30	
Lys	Pro	Val	Thr	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gly	Val	Val	Phe	Leu	Phe	Gly	Ser
			35					40						45	
Ile	Gly	Asn	Phe	Leu	Val	Ile	Phe	Thr	Ile	Thr	Trp	Arg	Arg	Arg	Ile
			50					55						60	
Gln	Cys	Ser	Gly	Asp	Val	Tyr	Phe	Ile	Asn	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu
65					70					75					80
Leu	Phe	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Leu	Trp	Met	Gln	Tyr	Leu	Leu	Asp	His
				85					90						95
Asn	Ser	Leu	Ala	Ser	Val	Pro	Cys	Thr	Leu	Leu	Thr	Ala	Cys	Phe	Tyr
			100						105					110	
Val	Ala	Met	Phe	Ala	Ser	Leu	Cys	Phe	Ile	Thr	Glu	Ile	Ala	Leu	Asp
			115						120					125	
Arg	Tyr	Tyr	Ala	Ile	Val	Tyr	Met	Arg	Tyr	Arg	Pro	Val	Lys	Gln	Ala
			130						135					140	
Cys	Leu	Phe	Ser	Ile	Phe	Trp	Trp	Ile	Phe	Ala	Val	Ile	Ile	Ala	Ile
145					150					155					160
Pro	His	Phe	Met	Val	Val	Thr	Lys	Lys	Asp	Asn	Gln	Cys	Met	Thr	Asp
				165						170					175
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Pro	Ile	Ile	Leu	Asn	Val	Glu	Leu
			180						185					190	
Met	Leu	Gly	Ala	Phe	Val	Ile	Pro	Leu	Ser	Val	Ile	Ser	Tyr	Cys	Tyr
			195						200					205	
Tyr	Arg	Ile	Ser	Arg	Ile	Val	Ala	Val	Ser	Gln	Ser	Arg	His	Lys	Gly
			210							215				220	
Arg	Ile	Val	Arg	Val	Leu	Ile	Ala	Val	Val	Leu	Val	Phe	Ile	Ile	Phe
225					230					235					240
Trp	Leu	Pro	Tyr	His	Leu	Thr	Leu	Phe	Val	Asp	Thr	Leu	Lys	Leu	Leu
				245						250					255
Lys	Trp	Ile	Ser	Ser	Ser	Cys	Glu	Phe	Glu	Arg	Ser	Leu	Lys	Arg	Ala
				260						265				270	
Leu	Ile	Leu	Thr	Glu	Ser	Leu	Ala	Phe	Cys	His	Cys	Cys	Leu	Asn	Pro
			275							280					285
Leu	Leu	Tyr	Val	Phe	Val	Gly	Thr	Lys	Phe	Arg	Gln	Glu	Leu	His	Cys

290	295	300
Leu Leu Ala Glu Phe Arg Gln Arg Leu Phe Ser Arg Asp Val Ser Trp		
305	310	315
Tyr His Ser Met Ser Phe Ser Arg Arg Ser Ser Pro Ser Arg Arg Glu		320
	325	330
Thr Ser Ser Asp Thr Leu Ser Asp Glu Val Cys Arg Val Ser Gln Ile		335
	340	345
		350
Ile Pro		
<210> 42		
<211> 354		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> US28 Ad169病毒株		
<400> 42		
Met Thr Pro Thr Thr Thr Thr Ala Glu Leu Thr Thr Glu Phe Asp Tyr		
1	5	10
Asp Glu Asp Ala Thr Pro Cys Val Phe Thr Asp Val Leu Asn Gln Ser		15
	20	25
Lys Pro Val Thr Leu Phe Leu Tyr Gly Val Val Phe Leu Phe Gly Ser		30
	35	40
Ile Gly Asn Phe Leu Val Ile Phe Thr Ile Thr Trp Arg Arg Arg Ile		45
	50	55
Gln Cys Ser Gly Asp Val Tyr Phe Ile Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu		60
65	70	75
Leu Phe Val Cys Thr Leu Pro Leu Trp Met Gln Tyr Leu Leu Asp His		80
	85	90
Asn Ser Leu Ala Ser Val Pro Cys Thr Leu Leu Thr Ala Cys Phe Tyr		95
	100	105
Val Ala Met Phe Ala Ser Leu Cys Phe Ile Thr Glu Ile Ala Leu Asp		110
	115	120
Arg Tyr Tyr Ala Ile Val Tyr Met Arg Tyr Arg Pro Val Lys Gln Ala		125
	130	135
Cys Leu Phe Ser Ile Phe Trp Trp Ile Phe Ala Val Ile Ile Ala Ile		140
145	150	155
Pro His Phe Met Val Val Thr Lys Lys Asp Asn Gln Cys Met Thr Asp		160
	165	170
Tyr Asp Tyr Leu Glu Val Ser Tyr Pro Ile Ile Leu Asn Val Glu Leu		175
	180	185
		190

Met Leu Gly Ala Phe Val Ile Pro Leu Ser Val Ile Ser Tyr Cys Tyr
 195 200 205
 Tyr Arg Ile Ser Arg Ile Val Ala Val Ser Gln Ser Arg His Lys Gly
 210 215 220
 Arg Ile Val Arg Val Leu Ile Ala Val Val Leu Val Phe Ile Ile Phe
 225 230 235 240
 Trp Leu Pro Tyr His Leu Thr Leu Phe Val Asp Thr Leu Lys Leu Leu
 245 250 255
 Lys Trp Ile Ser Ser Ser Cys Glu Phe Glu Arg Ser Leu Lys Arg Ala
 260 265 270
 Leu Ile Leu Thr Glu Ser Leu Ala Phe Cys His Cys Cys Leu Asn Pro
 275 280 285
 Leu Leu Tyr Val Phe Val Gly Thr Lys Phe Arg Gln Glu Leu His Cys
 290 295 300
 Leu Leu Ala Glu Phe Arg Gln Arg Leu Phe Ser Arg Asp Val Ser Trp
 305 310 315 320
 Tyr His Ser Met Ser Phe Ser Arg Arg Ser Ser Pro Ser Arg Arg Glu
 325 330 335
 Thr Ser Ser Asp Thr Leu Ser Asp Glu Val Cys Arg Val Ser Gln Ile
 340 345 350

Ile Pro

<210> 43

<211> 354

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> US28 AF1病毒株

<400> 43

Met Thr Pro Pro Thr Thr Thr Ala Glu Leu Thr Thr Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 Asp Glu Ala Ala Thr Pro Cys Val Phe Thr Asp Val Leu Asn Gln Ser
 20 25 30
 Lys Pro Val Thr Leu Phe Leu Tyr Gly Val Val Phe Leu Phe Gly Ser
 35 40 45
 Ile Gly Asn Phe Leu Val Ile Phe Thr Ile Thr Trp Arg Arg Arg Ile
 50 55 60
 Gln Cys Ser Gly Asp Val Tyr Phe Ile Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu
 65 70 75 80
 Leu Phe Val Cys Thr Leu Pro Leu Trp Met Gln Tyr Leu Leu Asp His

	85		90		95
Asn Ser Leu Ala Ser Val Pro Cys Thr Leu Leu Thr Ala Cys Phe Tyr					
100		105		110	
Val Ala Met Phe Ala Ser Leu Cys Phe Ile Thr Glu Ile Ala Leu Asp					
115		120		125	
Arg Tyr Tyr Ala Ile Val Tyr Met Arg Tyr Arg Pro Val Lys Gln Ala					
130		135		140	
Cys Leu Phe Ser Ile Phe Trp Trp Ile Phe Ala Val Ile Ile Ala Ile					
145		150		155	
Pro His Phe Met Val Val Thr Lys Lys Asp Asn Gln Cys Met Thr Asp					
165		170		175	
Tyr Asp Tyr Leu Glu Val Ser Tyr Pro Ile Ile Leu Asn Val Glu Leu					
180		185		190	
Met Leu Gly Ala Phe Val Ile Pro Leu Ser Val Ile Ser Tyr Cys Tyr					
195		200		205	
Tyr Arg Ile Ser Arg Ile Val Ala Val Ser Gln Ser Arg His Lys Gly					
210		215		220	
Arg Ile Val Arg Val Leu Ile Ala Val Val Leu Val Phe Ile Ile Phe					
225		230		235	
Trp Leu Pro Tyr His Leu Thr Leu Phe Val Asp Thr Leu Lys Leu Leu					
245		250		255	
Lys Trp Ile Ser Ser Ser Cys Glu Phe Glu Arg Ser Leu Lys Arg Ala					
260		265		270	
Leu Ile Leu Thr Glu Ser Leu Ala Phe Cys His Cys Cys Leu Asn Pro					
275		280		285	
Leu Leu Tyr Val Phe Val Gly Thr Lys Phe Arg Gln Glu Leu His Cys					
290		295		300	
Leu Leu Ala Glu Phe Arg Gln Arg Leu Phe Ser Arg Asp Val Ser Trp					
305		310		315	
Tyr His Ser Met Ser Phe Ser Arg Arg Ser Ser Pro Ser Arg Arg Glu					
325		330		335	
Thr Ser Ser Asp Thr Leu Ser Asp Glu Val Cys Arg Val Ser Gln Ile					
340		345		350	

Ile Pro

<210> 44

<211> 354

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> US28 VHL/E病毒株

<400> 44

Met	Thr	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Glu	Leu	Thr	Thr	Glu	Phe	Asp	Tyr
1				5					10					15	
Asp	Asp	Glu	Ala	Thr	Pro	Cys	Val	Leu	Thr	Asp	Val	Leu	Asn	Gln	Ser
			20					25					30		
Lys	Pro	Val	Thr	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gly	Val	Val	Phe	Leu	Phe	Gly	Ser
			35					40					45		
Ile	Gly	Asn	Phe	Leu	Val	Ile	Phe	Thr	Ile	Thr	Trp	Arg	Arg	Arg	Ile
			50				55				60				
Gln	Cys	Ser	Gly	Asp	Val	Tyr	Phe	Ile	Asn	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu
65					70					75					80
Leu	Phe	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Leu	Trp	Met	Gln	Tyr	Leu	Leu	Asp	His
				85					90					95	
Asn	Ser	Leu	Ala	Ser	Val	Pro	Cys	Thr	Leu	Leu	Thr	Ala	Cys	Phe	Tyr
			100					105					110		
Val	Ala	Met	Phe	Ala	Ser	Leu	Cys	Phe	Ile	Thr	Glu	Ile	Ala	Leu	Asp
			115					120					125		
Arg	Tyr	Tyr	Ala	Ile	Val	Tyr	Met	Arg	Tyr	Arg	Pro	Val	Lys	Gln	Ala
			130				135					140			
Cys	Leu	Phe	Ser	Ile	Phe	Trp	Trp	Ile	Phe	Ala	Val	Ile	Ile	Ala	Ile
145					150					155					160
Pro	His	Phe	Met	Val	Val	Thr	Lys	Lys	Asp	Asn	Gln	Cys	Met	Thr	Asp
				165					170					175	
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Pro	Ile	Ile	Leu	Asn	Val	Glu	Leu
			180					185					190		
Met	Leu	Gly	Ala	Phe	Val	Ile	Pro	Leu	Ser	Val	Ile	Ser	Tyr	Cys	Tyr
			195					200					205		
Tyr	Arg	Ile	Ser	Arg	Ile	Val	Ala	Val	Ser	Gln	Ser	Arg	His	Lys	Gly
			210				215					220			
Arg	Ile	Val	Arg	Val	Leu	Ile	Ala	Val	Val	Leu	Val	Phe	Ile	Ile	Phe
225					230					235					240
Trp	Leu	Pro	Tyr	His	Leu	Thr	Leu	Phe	Val	Asp	Thr	Leu	Lys	Leu	Leu
				245					250					255	
Lys	Trp	Ile	Ser	Ser	Ser	Cys	Glu	Phe	Glu	Lys	Ser	Leu	Lys	Arg	Ala
			260					265					270		
Leu	Ile	Leu	Thr	Glu	Ser	Leu	Ala	Phe	Cys	His	Cys	Cys	Leu	Asn	Pro
			275					280					285		
Leu	Leu	Tyr	Val	Phe	Val	Gly	Thr	Lys	Phe	Arg	Gln	Glu	Leu	His	Cys

290	295	300
Leu Leu Ala Glu Phe Arg Gln Arg Leu Phe Ser Arg Asp Val Ser Trp		
305	310	315
Tyr His Ser Met Ser Phe Ser Arg Arg Ser Ser Pro Ser Arg Arg Glu		320
	325	330
Thr Ser Ser Asp Thr Leu Ser Asp Glu Ala Cys Arg Val Ser Gln Ile		335
	340	345
		350
Ile Pro		
<210> 45		
<211> 354		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> US28 DAVIS病毒株		
<400> 45		
Met Thr Pro Thr Thr Thr Thr Ala Glu Leu Thr Thr Glu Phe Asp Tyr		
1	5	10
Asp Glu Asp Ala Thr Pro Cys Val Phe Thr Asp Val Leu Asn Gln Ser		15
	20	25
Lys Pro Val Thr Leu Phe Leu Tyr Gly Val Val Phe Leu Phe Gly Ser		30
	35	40
Ile Gly Asn Phe Leu Val Ile Phe Thr Ile Thr Trp Arg Arg Arg Ile		45
	50	55
Gln Cys Ser Gly Asp Val Tyr Phe Ile Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu		60
65	70	75
Leu Phe Val Cys Thr Leu Pro Leu Trp Met Gln Tyr Leu Leu Asp His		80
	85	90
Asn Ser Leu Ala Ser Val Pro Cys Thr Leu Leu Thr Ala Cys Phe Tyr		95
	100	105
Val Ala Met Phe Ala Ser Leu Cys Phe Ile Thr Glu Ile Ala Leu Asp		110
	115	120
Arg Tyr Tyr Ala Ile Val Tyr Met Arg Tyr Arg Pro Val Lys Gln Ala		125
	130	135
Cys Leu Phe Ser Ile Phe Trp Trp Ile Phe Ala Val Ile Ile Ala Ile		140
145	150	155
Pro His Phe Met Val Val Thr Lys Lys Asp Asn Gln Cys Met Thr Asp		160
	165	170
Tyr Asp Tyr Leu Glu Val Ser Tyr Pro Ile Ile Leu Asn Ile Glu Leu		175
	180	185
		190

Met	Leu	Gly	Ala	Phe	Val	Ile	Pro	Leu	Ser	Val	Ile	Ser	Tyr	Cys	Tyr
195				200				205							
Tyr	Arg	Ile	Ser	Arg	Ile	Val	Ala	Val	Ser	Gln	Ser	Arg	His	Lys	Gly
210				215				220							
Arg	Ile	Val	Arg	Val	Leu	Ile	Ala	Val	Val	Leu	Val	Phe	Ile	Ile	Phe
225				230				235				240			
Trp	Leu	Pro	Tyr	His	Leu	Thr	Leu	Phe	Val	Asp	Thr	Leu	Lys	Leu	Leu
				245				250				255			
Lys	Trp	Ile	Ser	Ser	Ser	Cys	Glu	Phe	Glu	Lys	Ser	Leu	Lys	Arg	Ala
260				265				270							
Leu	Ile	Leu	Thr	Glu	Ser	Leu	Ala	Phe	Cys	His	Cys	Cys	Leu	Asn	Pro
275				280				285							
Leu	Leu	Tyr	Val	Phe	Val	Gly	Thr	Lys	Phe	Arg	Gln	Glu	Leu	His	Cys
290				295				300							
Leu	Leu	Ala	Glu	Phe	Arg	Gln	Arg	Leu	Phe	Ser	Arg	Asp	Val	Ser	Trp
305				310				315				320			
Tyr	His	Ser	Met	Ser	Phe	Ser	Arg	Arg	Ser	Ser	Pro	Ser	Arg	Arg	Glu
				325				330				335			
Thr	Ser	Ser	Asp	Thr	Leu	Ser	Asp	Glu	Ala	Cys	Arg	Val	Ser	Gln	Ile
340				345				350							

Ile Pro
 <210> 46
 <211> 354
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> US28 TR病毒株
 <400> 46

Met	Thr	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Glu	Leu	Thr	Thr	Glu	Phe	Asp	Tyr
1	5				10				15						
Asp	Glu	Ala	Ala	Thr	Pro	Cys	Val	Phe	Thr	Asp	Val	Leu	Asn	Gln	Ser
20				25				30							
Lys	Pro	Val	Thr	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gly	Val	Val	Phe	Ile	Phe	Gly	Ser
35				40				45							
Ile	Gly	Asn	Phe	Leu	Val	Ile	Phe	Thr	Ile	Thr	Trp	Arg	Arg	Arg	Ile
50				55				60							
Gln	Cys	Ser	Gly	Asp	Val	Tyr	Phe	Ile	Asn	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu
65				70				75				80			
Leu	Phe	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Leu	Trp	Met	Gln	Tyr	Leu	Leu	Asp	His

	85		90		95
Asn Ser Leu Ala Ser Val Pro Cys Thr Leu Leu Thr Ala Cys Phe Tyr					
100		105		110	
Val Ala Met Phe Ala Ser Leu Cys Phe Ile Thr Glu Ile Ala Leu Asp					
115		120		125	
Arg Tyr Tyr Ala Ile Val Tyr Met Arg Tyr Arg Pro Val Lys Gln Ala					
130		135		140	
Cys Leu Phe Ser Ile Phe Trp Trp Ile Phe Ala Val Ile Ile Ala Ile					
145		150		155	
Pro His Phe Met Val Val Thr Lys Lys Asn Asn Gln Cys Met Thr Asp					
165		170		175	
Tyr Asp Tyr Leu Glu Val Ser Tyr Pro Ile Ile Leu Asn Val Glu Leu					
180		185		190	
Met Leu Gly Ala Phe Val Ile Pro Leu Ser Val Ile Ser Tyr Cys Tyr					
195		200		205	
Tyr Arg Ile Ser Arg Ile Val Ala Val Ser Gln Ser Arg His Lys Gly					
210		215		220	
Arg Ile Val Arg Val Leu Ile Ala Val Val Leu Val Phe Ile Ile Phe					
225		230		235	
Trp Leu Pro Tyr His Leu Thr Leu Phe Val Asp Thr Leu Lys Leu Leu					
245		250		255	
Lys Trp Ile Ser Ser Ser Cys Glu Phe Glu Lys Ser Leu Lys Arg Ala					
260		265		270	
Leu Ile Leu Thr Glu Ser Leu Ala Phe Cys His Cys Cys Leu Asn Pro					
275		280		285	
Leu Leu Tyr Val Phe Val Gly Thr Lys Phe Arg Gln Glu Leu His Cys					
290		295		300	
Leu Leu Ala Glu Phe Arg Gln Arg Leu Phe Ser Arg Asp Val Ser Trp					
305		310		315	
Tyr His Ser Met Ser Phe Ser Arg Arg Ser Ser Pro Ser Arg Arg Glu					
325		330		335	
Thr Ser Ser Asp Thr Leu Ser Asp Glu Val Cys Arg Val Ser Gln Ile					
340		345		350	

Ile Pro

<210> 47

<211> 367

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> US28融合蛋白,包含来自HCMV DB病毒株的US28序列

<400> 47

Met	Thr	Pro	Thr	Thr	Thr	Thr	Ala	Glu	Leu	Thr	Thr	Glu	Phe	Asp	Tyr
1				5					10					15	
Asp	Glu	Ala	Ala	Thr	Pro	Cys	Val	Phe	Thr	Asp	Val	Leu	Asn	Gln	Ser
			20					25					30		
Lys	Pro	Val	Thr	Leu	Phe	Leu	Tyr	Gly	Val	Val	Phe	Leu	Phe	Gly	Ser
			35					40					45		
Ile	Gly	Asn	Phe	Leu	Val	Ile	Phe	Thr	Ile	Thr	Trp	Arg	Arg	Arg	Ile
			50				55				60				
Gln	Cys	Ser	Gly	Asp	Val	Tyr	Phe	Ile	Asn	Leu	Ala	Ala	Ala	Asp	Leu
65				70					75					80	
Leu	Phe	Val	Cys	Thr	Leu	Pro	Leu	Trp	Met	Gln	Tyr	Leu	Leu	Asp	His
				85					90					95	
Asn	Ser	Leu	Ala	Ser	Val	Pro	Cys	Thr	Leu	Leu	Thr	Ala	Cys	Phe	Tyr
			100					105					110		
Val	Ala	Met	Phe	Ala	Ser	Leu	Cys	Phe	Ile	Thr	Glu	Ile	Ala	Leu	Asp
			115					120					125		
Arg	Tyr	Tyr	Ala	Ile	Val	Tyr	Met	Arg	Tyr	Arg	Pro	Val	Lys	Gln	Ala
			130					135					140		
Cys	Leu	Phe	Ser	Ile	Phe	Trp	Trp	Ile	Phe	Ala	Val	Ile	Ile	Ala	Ile
145				150					155					160	
Pro	His	Phe	Met	Val	Val	Thr	Lys	Lys	Asn	Asn	Gln	Cys	Met	Thr	Asp
				165					170					175	
Tyr	Asp	Tyr	Leu	Glu	Val	Ser	Tyr	Pro	Ile	Ile	Leu	Asn	Val	Glu	Leu
			180					185					190		
Met	Leu	Gly	Ala	Phe	Val	Ile	Pro	Leu	Ser	Val	Ile	Ser	Tyr	Cys	Tyr
			195					200					205		
Tyr	Arg	Ile	Ser	Arg	Ile	Val	Ala	Val	Ser	Gln	Ser	Arg	His	Lys	Gly
			210					215				220			
Arg	Ile	Val	Arg	Val	Leu	Ile	Ala	Val	Val	Leu	Val	Phe	Ile	Ile	Phe
225				230						235				240	
Trp	Leu	Pro	Tyr	His	Leu	Thr	Leu	Phe	Val	Asp	Thr	Leu	Lys	Leu	Leu
				245					250					255	
Lys	Trp	Ile	Ser	Ser	Ser	Cys	Glu	Phe	Glu	Arg	Ser	Leu	Lys	Arg	Ala
			260					265					270		
Leu	Ile	Leu	Thr	Glu	Ser	Leu	Ala	Phe	Cys	His	Cys	Cys	Leu	Asn	Pro
			275					280					285		
Leu	Leu	Tyr	Val	Phe	Val	Gly	Thr	Lys	Phe	Arg	Gln	Glu	Leu	His	Cys

290					295					300					
Leu	Leu	Ala	Glu	Phe	Arg	Gln	Arg	Leu	Phe	Ser	Arg	Asp	Val	Ser	Trp
305					310					315					320
Tyr	His	Ser	Met	Ser	Phe	Ser	Arg	Arg	Ser	Ser	Ser	Pro	Ser	Arg	Arg
325					330					335					
Thr	Ser	Ser	Asp	Thr	Leu	Ser	Asp	Glu	Val	Cys	Arg	Val	Ser	Gln	Ile
340					345					350					
Ile	Pro	Ala	Ala	Ala	Leu	Glu	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	His
355					360					365					

$\langle 210 \rangle$ 48

<211> 119

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 OKT3重铈可变区

<400> 48

[illegible]

⟨210⟩ 49

<211> 5

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 OKT3 VH-CDR1序列

<400> 49

Arg Tyr Thr Met His

1 5

<210> 50

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OKT3 VH-CDR2序列

<400> 50

Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

<210> 51

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OKT3 VH-CDR3序列

<400> 51

Tyr Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp

1 5

<210> 52

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OKT3轻链可变区

<400> 52

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn
100 105

<210> 53

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OKT3 VL-CDR1序列

<400> 53

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp
1 5 10

<210> 54

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OKT3 VL-CDR2序列

<400> 54

Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly
1 5

<210> 55

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> OKT3 VL-CDR3序列

<400> 55

Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr Phe
1 5

<210> 56

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 接头序列

<400> 56

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

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 部分接头序列

<400> 57

Gly Gly Gly Gly Ser

1 5

<210> 58

<211> 701

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> BiTE分子,包含包括1D3的VH区的重链序列、接头序列和OKT3 scFv的序列

<400> 58

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Thr Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Tyr

20 25 30

Tyr Met Ser Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu Trp Leu

35 40 45

Gly Phe Ile Arg Ser Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Thr Glu Tyr Ser Ala

50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Gln Ser Ile

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ser Glu Asp Ser Ala Thr Tyr

85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Asp Glu Arg Arg Thr Ala Trp Leu Ala Tyr Trp Gly

100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser

115 120 125

Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala

130 135 140

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val

145 150 155 160

Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala

165 170 175

Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val

180 185 190

Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His		
195	200	205
Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys		
210	215	220
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly		
225	230	235 240
Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met		
	245	250 255
Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His		
	260	265 270
Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val		
	275	280 285
His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr		
	290	295 300
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly		
305	310	315 320
Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile		
	325	330 335
Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val		
	340	345 350
Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser		
	355	360 365
Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu		
	370	375 380
Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro		
385	390	395 400
Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val		
	405	410 415
Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met		
	420	425 430
His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser		
	435	440 445
Pro Gly Lys Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gln Val Gln		
	450	455 460
Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala Ser Val Lys		
465	470	475 480
Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr Thr Met His		
	485	490 495
Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Tyr Ile		

500	505	510
Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr	Asn Tyr Asn Gln Lys Phe	Lys Asp Lys
515	520	525
Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys	Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met	Gln Leu
530	535	540
Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp	Ser Ala Val Tyr Tyr Cys	Ala Arg Tyr
545	550	555
Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu	Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	Thr Thr Leu
565	570	575
Thr Val Ser Ser Gly Gly Gly	Gly Ser Gly Gly Gly Gly	Ser Gly Gly
580	585	590
Gly Gly Ser Gln Ile Val Leu	Thr Gln Ser Pro Ala Ile	Met Ser Ala
595	600	605
Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr	Met Thr Cys Ser Ala Ser	Ser Ser Val
610	615	620
Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln	Gln Lys Ser Gly Thr Ser	Pro Lys Arg
625	630	635
Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys	Leu Ala Ser Gly Val Pro	Ala His Phe
645	650	655
Arg Gly Ser Gly Ser Gly Thr	Ser Tyr Ser Leu Thr Ile	Ser Gly Met
660	665	670
Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr	Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp	Ser Ser Asn
675	680	685
Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly	Thr Lys Leu Glu Ile Asn	
690	695	700
<210> 59		
<211> 220		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> BiTE分子,包含包括1D3的VL区的轻链序列		
<400> 59		
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr	Pro Leu Ser Leu Pro Val	Ser Leu Gly
1	5	10
Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys	Arg Ser Ser Gln Ser Ile	Val His Ser
20	25	30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asp	Trp Tyr Leu Gln Lys Pro	Gly Gln Ser
35	40	45
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys	Val Ser Asn Arg Phe Ser	Gly Val Pro

50	55	60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile		
65	70	75
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly		80
85	90	95
Ser His Val Pro Thr Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile		
100	105	110
Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp		
115	120	125
Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn		
130	135	140
Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu		
145	150	155
Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp		
165	170	175
Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr		
180	185	190
Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser		
195	200	205
Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys		
210	215	220
<210> 60		
<211> 114		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> VUN100的核心序列		
<400> 60		
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly		
1	5	10
Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Val Ser Gly Pro Gly Leu Ile Phe Lys		15
20	25	30
Phe Thr Gly Val Ala Trp Tyr Arg Arg Gln Val Pro Gly Ala Lys Arg		
35	40	45
Gly Leu Val Ala Leu Ile Thr Gly Asp Gly Ala Thr Arg Tyr Gly Asp		
50	55	60
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ile Ala Ala Lys Arg		
65	70	75
Val Tyr Leu Glu Met Asn Asp Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr		80

	85	90	95
Tyr Cys Lys Thr Gly Glu Tyr Trp	Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val		
100	105	110	
Ser Ser			
<210> 61			
<211> 148			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> VUN100序列,具有额外的N-末端信号肽和C-末端Myc-6His标签			
<400> 61			
Met His Ser Ser Ala Leu Leu Cys Cys Leu Val Leu Leu Thr Gly Val			
1	5	10	15
Arg Ala Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro			
20	25	30	
Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Val Ser Gly Pro Gly Leu Ile			
35	40	45	
Phe Lys Phe Thr Gly Val Ala Trp Tyr Arg Arg Gln Val Pro Gly Ala			
50	55	60	
Lys Arg Gly Leu Val Ala Leu Ile Thr Gly Asp Gly Ala Thr Arg Tyr			
65	70	75	80
Gly Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ile Ala Ala			
85	90	95	
Lys Arg Val Tyr Leu Glu Met Asn Asp Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala			
100	105	110	
Val Tyr Tyr Cys Lys Thr Gly Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val			
115	120	125	
Thr Val Ser Ser Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu His His			
130	135	140	
His His His His			
145			
<210> 62			
<211> 258			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> VUN100b			
<400> 62			
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			

1	5	10	15
Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Val Ser Gly Pro Gly Leu Ile Phe Lys			
20	25	30	
Phe Thr Gly Val Ala Trp Tyr Arg Arg Gln Val Pro Gly Ala Lys Arg			
35	40	45	
Gly Leu Val Ala Leu Ile Thr Gly Asp Gly Ala Thr Arg Tyr Gly Asp			
50	55	60	
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ile Ala Ala Lys Arg			
65	70	75	80
Val Tyr Leu Glu Met Asn Asp Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
85	90	95	
Tyr Cys Lys Thr Gly Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val			
100	105	110	
Ser Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly			
115	120	125	
Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser			
130	135	140	
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly			
145	150	155	160
Ser Leu Arg Leu Ala Cys Ala Val Ser Gly Pro Gly Leu Ile Phe Lys			
165	170	175	
Phe Thr Gly Val Ala Trp Tyr Arg Arg Gln Val Pro Gly Ala Lys Arg			
180	185	190	
Gly Leu Val Ala Leu Ile Thr Gly Asp Gly Ala Thr Arg Tyr Gly Asp			
195	200	205	
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Ile Ala Ala Lys Arg			
210	215	220	
Val Tyr Leu Glu Met Asn Asp Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
225	230	235	240
Tyr Cys Lys Thr Gly Glu Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val			
245	250	255	

Ser Ser

<210> 63

<211> 292

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> VUN100b,具有额外的N-末端信号肽和C-末端Myc-6His标签

<400> 63

Met	His	Ser	Ser	Ala	Leu	Leu	Cys	Cys	Leu	Val	Leu	Leu	Thr	Gly	Val
1				5					10					15	
Arg	Ala	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro
				20					25					30	
Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ala	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Ile
				35					40					45	
Phe	Lys	Phe	Thr	Gly	Val	Ala	Trp	Tyr	Arg	Arg	Gln	Val	Pro	Gly	Ala
				50					55					60	
Lys	Arg	Gly	Leu	Val	Ala	Leu	Ile	Thr	Gly	Asp	Gly	Ala	Thr	Arg	Tyr
65									70					75	
Gly	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Ile	Ala	Ala
									85					90	
Lys	Arg	Val	Tyr	Leu	Glu	Met	Asn	Asp	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala
									100					105	
Val	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Thr	Gly	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val
									115					120	
Thr	Val	Ser	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
									130					135	
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
145									150					155	
Gly	Ser	Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro
									165					170	
Gly	Gly	Ser	Leu	Arg	Leu	Ala	Cys	Ala	Val	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Ile
									180					185	
Phe	Lys	Phe	Thr	Gly	Val	Ala	Trp	Tyr	Arg	Arg	Gln	Val	Pro	Gly	Ala
									195					200	
Lys	Arg	Gly	Leu	Val	Ala	Leu	Ile	Thr	Gly	Asp	Gly	Ala	Thr	Arg	Tyr
									210					215	
Gly	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Ile	Ala	Ala
225									230					235	
Lys	Arg	Val	Tyr	Leu	Glu	Met	Asn	Asp	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala
									245					250	
Val	Tyr	Tyr	Cys	Lys	Thr	Gly	Glu	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Gln	Val
									260					265	
Thr	Val	Ser	Ser	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	His	His
									275					280	
His	His	His	His												
									290						

<210> 64

<400> 64

000

<210> 65

<211> 423

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1G9的重组表达VH序列的未成熟形式

<400> 65

atgaagtgtg	ggctgaactg	gattttcctt	gtaacacttt	taaatggtat	ccagtgtgaa	60
gtgaagctgg	tggagtctgg	gggaggetta	gtgaagcctg	gagggtccct	gaaactctcc	120
tgtgcagcct	ctggattcac	tttcagtagc	tatgccatgt	cttgggttcg	ccagactcca	180
gagaagaggc	tggagtgggt	cgcattccatt	agtagtggtg	gtagcaccta	ctatccagac	240
agtgtgaagg	gccgattcac	catctccaga	gataatgcca	ggaacatcct	gtacctgcaa	300
atgagcagtc	tgaggtctga	ggacacggcc	atgtattact	gtgcaagagg	cgggtctact	360
atgattacga	cggggctggg	gtttgcttac	tggggccaag	ggactctggt	cactgtctct	420
gca						423

<210> 66

<211> 366

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1G9的VH序列的成熟形式

<400> 66

gaagtgaagc	tggtggagtc	tgggggaggc	ttagtgaagc	ctggagggtc	cctgaaactc	60
tcctgtgcag	cctctggatt	cactttcagt	agctatgcca	tgtcttgggt	tcgccagact	120
ccagagaaga	ggctggagtg	ggtcgcatcc	attagtagtg	gtggtagcac	ctactatcca	180
gacagtgtga	agggccgatt	caccatctcc	agagataatg	ccaggaacat	cctgtacctg	240
caaatgagca	gtctgaggtc	tgaggacacg	gccatgtatt	actgtgcaag	aggcgggtct	300
actatgatta	cgacggggct	ggggtttgct	tactggggcc	aagggactct	ggtcactgtc	360
tctgca						366

<210> 67

<211> 141

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1G9的重组表达VH序列的未成熟形式,其中位置1-19对应于前导序列

<400> 67

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly

1	5	10	15
Ile Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys			
20	25	30	
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe			
35	40	45	
Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu			
50	55	60	
Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp			
65	70	75	80
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile			
85	90	95	
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr			
100	105	110	
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Ser Thr Met Ile Thr Thr Gly Leu Gly Phe			
115	120	125	
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			
130	135	140	

<210> 68

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1G9的VH序列的成熟形式,无前导序列

<400> 68

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly			
1	5	10	15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr			
20	25	30	
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val			
35	40	45	
Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys			
50	55	60	
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu			
65	70	75	80
Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Ala			
85	90	95	
Arg Gly Gly Ser Thr Met Ile Thr Thr Gly Leu Gly Phe Ala Tyr Trp			
100	105	110	
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala			

115	120	
<210> 69		
<211> 378		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 1G9的重组表达VL序列的未成熟形式		
<400> 69		
atgaagttgc ctgttaggct gttgggtgctg atgggtctgga ttcctgcttc cagcagtcaa	60	
attgtttctca cccagtctcc agcaatcatg tctgcatctc caggggagaa ggtcaccatg	120	
acctgcagtg ccagctcaag tgtaagttac atgcactggt accagcagaa gtcaggcacc	180	
tcccccaaaa gatggattta tgacacatcc aaactggett ctggagtccc tgctcgcttc	240	
agtggcagtg ggtctgggac ctcttactct ctcacaatca gcagcatgga ggctgaagat	300	
gctgccactt attactgcca gcagtggagt agtaaccac ccctcacgtt cggtgctggg	360	
accaagctgg agctgaaa	378	
<210> 70		
<211> 321		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 1G9的VL序列的成熟形式		
<400> 70		
caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccaggga gaaggtcacc	60	
atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc	120	
acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc	180	
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa	240	
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc caccctcac gttcggtgct	300	
gggaccaagc tggagctgaa a	321	
<210> 71		
<211> 126		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 1G9的重组表达VL序列的未成熟形式,其中位置1-19对应于前导序列		
<400> 71		
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Val Trp Ile Pro Ala		
1 5 10 15		
Ser Ser Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala		
20 25 30		

Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
 35 40 45
 Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg
 50 55 60
 Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
 65 70 75 80
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met
 85 90 95
 Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn
 100 105 110
 Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120 125

<210> 72

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1G9的VL序列的成熟形式,无前导序列

<400> 72

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Leu
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 73

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1G9、1E8的VH-CDR1序列

<400> 73	
agctatgccca tgtct	15
<210> 74	
<211> 48	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1G9的VH-CDR2序列	
<400> 74	
tccattagta gtggtggtag cacctactat ccagacagtg tgaagggc	48
<210> 75	
<211> 42	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1G9的VH-CDR3序列	
<400> 75	
ggcgggtcta ctatgattac gacggggctg gggtttgctt ac	42
<210> 76	
<211> 5	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1G9、1E8的VH-CDR1序列	
<400> 76	
Ser Tyr Ala Met Ser	
1 5	
<210> 77	
<211> 16	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1G9的VH-CDR2序列	
<400> 77	
Ser Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly	
1 5 10 15	
<210> 78	
<211> 14	
<212> PRT	

<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1G9的VH-CDR3序列	
<400> 78	
Gly Gly Ser Thr Met Ile Thr Thr Gly Leu Gly Phe Ala Tyr	
1 5 10	
<210> 79	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1G9、1E8的VL-CDR1序列	
<400> 79	
agtgccagct caagtgtaag ttacatgcac	30
<210> 80	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1G9、1C10、1A10的VL-CDR2序列	
<400> 80	
gacacatcca aactggcttc t	21
<210> 81	
<211> 30	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1G9的VL-CDR3序列	
<400> 81	
cagcagtgga gtagtaaccc acccctcacg	30
<210> 82	
<211> 10	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1G9、1E8的VL-CDR1序列	
<400> 82	
Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His	
1 5 10	

<210> 83

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1G9、1C10、1A10的VL-CDR2序列

<400> 83

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 84

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1G9的VL-CDR3序列

<400> 84

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Leu Thr

1 5 10

<210> 85

<211> 420

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的重组表达VH序列的未成熟形式

<400> 85

atgaagttgt ggctgaactg gattttcctt gtaacacttt taaatggtat ccagtgtgaa	60
gtgaagctgg tggagtctgg gggagactta gtgaagcctg gagggtcctt gaaactctcc	120
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatgccatgt cttgggttcg ccagactcca	180
gagaagaggc tggagtgggt cgcattccatt agtagtggtg gtagaaccta ctatccagac	240
agtgtgaagg gccgattcac catctccaga gataatgcca ggaacatcct gtacctgcaa	300
atgagcagtc tgaggctctga agacacggcc atctattact gtgcacgagg cgggactcgt	360
cattcctacg gcaacgggtt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca	420

<210> 86

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的VH序列的成熟形式

<400> 86

```

gaagtgaagc tgggtggagtc tggggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatgcc a tgtcttgggt tcgccagact      120
ccagagaaga ggctggagtg ggtcgcaccc attagtagtg gtggtagaac ctactatcca      180
gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagataatg ccaggaacat cctgtacctg      240
caaatgagca gtctgaggtc tgaagacacg gccatctatt actgtgcacg aggcgggact      300
cgtcattcct acggcaacgg gtttgactac tggggccaag gcaccactct cacagtctcc      360
tca                                     363

```

<210> 87

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的重组表达VH序列的未成熟形式,其中位置1-19对应于前导序列

<400> 87

```

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
1           5           10           15
Ile Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
          20           25           30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
          35           40           45
Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
          50           55           60
Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp
65           70           75           80
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile
          85           90           95
Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
          100          105          110
Tyr Cys Ala Arg Gly Gly Thr Arg His Ser Tyr Gly Asn Gly Phe Asp
          115          120          125
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
          130          135          140

```

<210> 88

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的VH序列的成熟形式,无前导序列

<400> 88

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Ser Ile Ser Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
 50 55 60
 Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
 65 70 75 80
 Gln Met Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Ile Tyr Tyr Cys Ala
 85 90 95
 Arg Gly Gly Thr Arg His Ser Tyr Gly Asn Gly Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110
 Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 89

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的重组表达VL序列的未成熟形式

<400> 89

atgaagttgc ctgtaggct gttggtgctg atggctctgga ttcttgcttc cagcagtc aa 60
 attgttctct cccagtctcc aacaatcatg tctgcatctc caggggagaa ggccaccatg 120
 acctgcagtg ccagctcaag tgtaagttac atgcactggg accagcagaa gtcaggcacc 180
 tcccccaaaa gatggattta tgactcatcc aaactgggctt ctggagtccc tgctcgcttc 240
 agtggcagtg ggtctgggac ctcttactct ctcaaatca gcagcatgga ggctgaagat 300
 gctgccactt attactgcca gcagtggact agtaaccac ccatcacgtt cggctgctggg 360
 accaagctgg agctgaaa 378

<210> 90

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的VL序列的成熟形式

<400> 90

caaattgttc tctcccagtc tccaacaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60
 atgacctgca gtgccagctc aagtgtgaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc 120

acctccccc aaagatggat ttatgactca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc 180
 ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcagcat ggaggctgaa 240
 gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg actagtaacc caccatcac gttcgggtgct 300
 gggaccaagc tggagctgaa a 321

<210> 91

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的重组表达VL序列的未成熟形式,其中位置1-19对应于前导序列

<400> 91

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Val Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15

Ser Ser Ser Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Ile Met Ser Ala
 20 25 30

Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
 35 40 45

Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg
 50 55 60

Trp Ile Tyr Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
 65 70 75 80

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met
 85 90 95

Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn
 100 105 110

Pro Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120 125

<210> 92

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的VL序列的成熟形式,无前导序列

<400> 92

Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35	40	45
Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser		
50	55	60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu		
65	70	75
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Ile		
85	90	95
Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys		
100	105	

<210> 93

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的VH-CDR2序列

<400> 93

tccattagta gtggtgtag aacctactat ccagacagtg tgaagggc

48

<210> 94

<211> 39

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的VH-CDR3序列

<400> 94

ggcgggactc gtcattccta cggcaacggg ttgactac

39

<210> 95

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的VH-CDR2序列

<400> 95

Ser Ile Ser Ser Gly Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly

1

5

10

15

<210> 96

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的VH-CDR3序列

<400> 96

Gly Gly Thr Arg His Ser Tyr Gly Asn Gly Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 97

<211> 21

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的VL-CDR2序列

<400> 97

gactcatcca aactggettc t 21

<210> 98

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的VL-CDR3序列

<400> 98

cagcagtgga ctagtaaccc acccatcacg 30

<210> 99

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的VL-CDR2序列

<400> 99

Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 100

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的VL-CDR3序列

<400> 100

Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Ile Thr

1 5 10

<210> 101

<211>	420														
<212>	DNA														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	1C10的重组表达VH序列的未成熟形式														
<400>	101														
atgaagttgt	ggctgaactg gattttcctt gtaacacttt taaatggtat ccagtgtgaa	60													
gtgaaactgg	ttgagtctgg gggagtctta gtgaagcctg gagggtccct gaaattttcc	120													
tgtgcagcct	ctggattcac tttcagtagc catgccttgt cttgggttcg ccagactcca	180													
gagaagagac	tggagtgggt cgcattccatt agtagtcgtg gtcgaaccta ctatccagac	240													
agtgtaaagg	gccgattcac cgtctccaga gataatgcc ggaacatcct gtatctgcaa	300													
gtgagcagtc	tgaggtctga ggacacggcc atgtattatt gtacaagagg cgggactcat	360													
tattcctacg	gcaacggttt tgacttctgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca	420													
<210>	102														
<211>	363														
<212>	DNA														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	1C10的VH序列的成熟形式														
<400>	102														
gaagtgaac	tggttgagtc tgggggagtc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaattt	60													
tcctgtgcag	cctctggatt cactttcagt agccatgcct tgtcttgggt tcgccagact	120													
ccagagaaga	gactggagtg ggtcgcattc attagtagtc gtggtcgaac ctactatcca	180													
gacagtgtaa	agggccgatt caccgtctcc agagataatg ccaggaacat cctgtatctg	240													
caagtgagca	gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt attgtacaag aggcgggact	300													
cattattcct	acggcaacgg ttttgacttc tggggccaag gcaccactct cacagtctcc	360													
tca		363													
<210>	103														
<211>	140														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	1C10的重组表达VH序列的未成熟形式,其中位置1-19对应于前导序列														
<400>	103														
Met	Lys	Leu	Trp	Leu	Asn	Trp	Ile	Phe	Leu	Val	Thr	Leu	Leu	Asn	Gly
1				5					10						15
Ile	Gln	Cys	Glu	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Lys
				20					25						30
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Phe	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe

35	40	45
Ser Ser His Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu		
50	55	60
Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Ser Arg Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp		
65	70	75
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile		
85	90	95
Leu Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr		
100	105	110
Tyr Cys Thr Arg Gly Gly Thr His Tyr Ser Tyr Gly Asn Gly Phe Asp		
115	120	125
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser		
130	135	140

<210> 104

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1C10的VH序列的成熟形式,无前导序列

<400> 104

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Phe Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
20 25 30
Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Ser Arg Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Val Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95
Arg Gly Gly Thr His Tyr Ser Tyr Gly Asn Gly Phe Asp Phe Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 105

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1C10的重组表达VL序列的未成熟形式

<400> 105

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atggctctgga ttcctgcttc cagcagtcaa	60
attgtttctca cccagtctcc agcaatcatg tctgcatctc caggggagaa ggtcaccatg	120
acctgcagtg tcagctcaag tgttagttag atgcactggg accagcagaa gtcaggcacc	180
tcccccaaaa gatggattta tgacacatcc aaactgggctt ctggagtccc tgctcgcttc	240
agtggcagtg ggtctgggac ctcttactct ctcacaatca gcaccatgga ggctgaagat	300
gctgccactt attactgcca gcagtggagt aataaccac ccatcacgtt cgggtgctggg	360
accaagctgg aactgaaa	378

<210> 106

<211> 321

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1C10的VL序列的成熟形式

<400> 106

caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccaggga gaaggtcacc	60
atgacctgca gtgtcagctc aagtgttagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaggc	120
acctccccca aaagatggat ttatgacaca tccaaactgg cttctggagt ccctgctcgc	180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcacia tcagcaccat ggaggctgaa	240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtaataacc caccatcac gttcggtgct	300
gggaccaagc tggaactgaa a	321

<210> 107

<211> 126

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1C10的重组表达VL序列的未成熟形式,其中位置1-19对应于前导序列

<400> 107

Met	Lys	Leu	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Val	Leu	Met	Val	Trp	Ile	Pro	Ala
1				5					10					15	
Ser	Ser	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala
			20					25				30			
Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Val
		35				40					45				
Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg
50						55					60				

Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
 65 70 75 80
 Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met
 85 90 95
 Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn
 100 105 110
 Pro Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120 125

<210> 108

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1C10的VL序列的成熟形式,无前导序列

<400> 108

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 109

<211> 15

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1C10、1A10的VH-CDR1序列

<400> 109

agccatgcct tgtct

<210> 110

<211> 48

<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1C10、1A10的VH-CDR2序列	
<400> 110	
tccattagta gtcgtggtcg aacctactat ccagacagtg taaagggc	48
<210> 111	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1C10、1A10的VH-CDR3序列	
<400> 111	
ggcgggactc attattccta cggcaacggt ttgacttc	39
<210> 112	
<211> 5	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1C10、1A10的VH-CDR1序列	
<400> 112	
Ser His Ala Leu Ser	
1 5	
<210> 113	
<211> 16	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1C10、1A10的VH-CDR2序列	
<400> 113	
Ser Ile Ser Ser Arg Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly	
1 5 10 15	
<210> 114	
<211> 13	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1C10、1A10的VH-CDR3序列	
<400> 114	

Gly Gly Thr His Tyr Ser Tyr Gly Asn Gly Phe Asp Phe

1 5 10

<210> 115

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1C10、1A10的VL-CDR1序列

<400> 115

agtgtcagct caagtgttag ttacatgcac

30

<210> 116

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1C10、1A10的VL-CDR3序列

<400> 116

cagcagtgga gtaataaccc acccatcacg

30

<210> 117

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1C10、1A10的VL-CDR1序列

<400> 117

Ser Val Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His

1 5 10

<210> 118

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1C10、1A10的VL-CDR3序列

<400> 118

Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Pro Ile Thr

1 5 10

<210> 119

<211> 420

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1A10的重组表达VH序列的未成熟形式

<400> 119

atgaagttgt ggctgaactg gattttcctt gtaacacttt taaatgggtat ccagtgtgaa	60
gtgaaactgg ttgagtctgg gggagtctta gtgaagcctg gagggtcctt gaaattttcc	120
tgtgcagcct ctggattcac tctcagtagc catgccttgt cttgggttcg ccagactcca	180
gagaagagac tggagtgggt cgcattccatt agtagtcgtg gtcgaaccta ctatccagac	240
agtgtaaagg gccgattcac cgtctccaga gataatgcc a ggaacatcct gtatctgcaa	300
gtgagcagtc tgaggtctga ggacacggcc atgtattatt gtacaagagg cgggactcat	360
tattcctacg gcaacggttt tgacttctgg ggccaaggca ccactctcac agtctctca	420

<210> 120

<211> 363

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1A10的VH序列的成熟形式

<400> 120

gaagtgaac tggttgagtc tgggggagtc ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaattt	60
tcctgtgcag cctctggatt cactctcagt agccatgcct tgtcttgggt tcgccagact	120
ccagagaaga gactggagtg ggtcgcattc attagtagtc gtggtcgaac ctactatcca	180
gacagtgtaa agggccgatt caccgtctcc agagataatg ccaggaacat cctgtatctg	240
caagtgagca gtctgaggtc tgaggacacg gccatgtatt attgtacaag aggcgggact	300
cattattcct acggcaacgg ttttgacttc tggggccaag gcaccactct cacagtctcc	360
tca	363

<210> 121

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1A10的重组表达VH序列的未成熟形式,其中位置1-19对应于前导序列

<400> 121

Met	Lys	Leu	Trp	Leu	Asn	Trp	Ile	Phe	Leu	Val	Thr	Leu	Leu	Asn	Gly
1				5							10				15
Ile	Gln	Cys	Glu	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Val	Leu	Val	Lys
				20							25				30
Pro	Gly	Gly	Ser	Leu	Lys	Phe	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Leu
				35							40				45
Ser	Ser	His	Ala	Leu	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Thr	Pro	Glu	Lys	Arg	Leu

50	55	60
Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Ser Arg Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp		
65	70	75
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile		80
85	90	95
Leu Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr		
100	105	110
Tyr Cys Thr Arg Gly Gly Thr His Tyr Ser Tyr Gly Asn Gly Phe Asp		
115	120	125
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser		
130	135	140

<210> 122

<211> 121

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1A10的VH序列的成熟形式,无前导序列

<400> 122

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Phe Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu Ser Ser His
20 25 30
Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Ser Ile Ser Ser Arg Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys
50 55 60
Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile Leu Tyr Leu
65 70 75 80
Gln Val Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Thr
85 90 95
Arg Gly Gly Thr His Tyr Ser Tyr Gly Asn Gly Phe Asp Phe Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 123

<211> 378

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

〈223〉 1A10的重组表达VL序列的未成熟形式

<400> 123

atgaagttgc	ctgttaggct	gttggtgctg	atggctctgga	ttcctgcttc	cagcagtcaa	60
attgttctca	cccagtctcc	agcaatcatg	tctgcatctc	caggggagaa	ggtcaccatg	120
acctgcagtg	tcagctcaag	tgttagt tac	atgcactggg	accagcagaa	gtcaggcacc	180
cccccaaaa	gatggattta	tgacacatcc	aaactggctt	ctggagtccc	tgctcgcttc	240
agtggcagtg	ggctctgggac	ctcttactct	ctcacaatca	gcaccatgga	ggctgaagat	300
gctgccactt	attactgcca	gcagtggagt	aataaccac	ccatcacgtt	cgggtgctggg	360
accaagctgg	aactgaaa					378

124

 $\langle 211 \rangle$ 321

<212> DNA

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 1A10的VL序列的成熟形式

<400> 124

caaatgttc	tcaccagtc	tccagcaatc	atgtctgcat	ctccagggga	gaaggtcacc	60
atgacctgca	gtgtcagctc	aagtgttagt	tacatgcact	ggtaccagca	gaagtcaggc	120
acctcccca	aaagatggat	ttatgacaca	tccaaactgg	cttctggagt	ccctgctcgc	180
ttcagtggca	gtgggtctgg	gacctcttac	tctctcacia	tcagcaccat	ggaggtgaa	240
gatgctgcc	cttattactg	ccagcagtgg	agtaataacc	cacctatcac	gttcggtgct	300
gggaccaagc	tggaactgaa	a				321

⟨210⟩ 125

<211> 126

<212> PRT

〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$

〈223〉 1A10的重组表达VL序列的未成熟形式,其中位置1-19对应于前导序列

125

Met	Lys	Leu	Pro	Val	Arg	Leu	Leu	Val	Leu	Met	Val	Trp	Ile	Pro	Ala
1				5					10					15	
Ser	Ser	Ser	Gln	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ile	Met	Ser	Ala
			20					25					30		
Ser	Pro	Gly	Glu	Lys	Val	Thr	Met	Thr	Cys	Ser	Val	Ser	Ser	Ser	Val
		35					40					45			
Ser	Tyr	Met	His	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser	Pro	Lys	Arg
	50					55				60					
Trp	Ile	Tyr	Asp	Thr	Ser	Lys	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ala	Arg	Phe
65					70					75				80	

Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met
 85 90 95
 Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn
 100 105 110
 Pro Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 115 120 125

<210> 126

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1A10的VL序列的成熟形式,无前导序列

<400> 126

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
 20 25 30
 His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
 35 40 45
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met Glu Ala Glu
 65 70 75 80
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn Pro Pro Ile
 85 90 95
 Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105

<210> 127

<211> 354

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 如HCMV病毒株BL编码的US28的全序列(寄存编号MW980585.1)

<400> 127

Met Thr Pro Thr Thr Thr Thr Ala Glu Leu Thr Thr Glu Phe Asp Tyr
 1 5 10 15
 Asp Glu Asp Ala Ala Pro Cys Val Leu Thr Asp Val Leu Asn Gln Ser
 20 25 30
 Lys Pro Val Thr Leu Phe Leu Tyr Gly Val Val Phe Leu Phe Gly Ser

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

Ile Pro
<210> 128
<400> 128
000
<210> 129
<400> 129
000
<210> 130
<400> 130
000
<210> 131
<400> 131
000
<210> 132
<400> 132
000
<210> 133
<400> 133
000
<210> 134
<400> 134
000
<210> 135
<400> 135
000
<210> 136
<400> 136
000
<210> 137
<400> 137
000
<210> 138
<400> 138
000
<210> 139
<400> 139
000
<210> 140
<400> 140

000	
<210> 141	
<400> 141	
000	
<210> 142	
<400> 142	
000	
<210> 143	
<400> 143	
000	
<210> 144	
<400> 144	
000	
<210> 145	
<400> 145	
000	
<210> 146	
<400> 146	
000	
<210> 147	
<211> 1396	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1G9的重链的完整序列	
<400> 147	
atgaagttgt ggctgaactg gattttcctt gtaacacttt taaatggtat ccagtgtgaa	60
gtgaagctgg tggagtctgg gggaggctta gtgaagcctg gagggtcctt gaaactctcc	120
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatgccatgt cttgggttcg ccagactcca	180
gagaagaggc tggagtgggt cgcattccatt agtagtggtg gtagcaccta ctatccagac	240
agtgtgaagg gccgattcac catctccaga gataatgcca ggaacatcct gtacctgcaa	300
atgagcagtc tgaggtctga ggacacggcc atgtattact gtgcaagagg cgggtctact	360
atgattacga cggggctggg gtttgcttac tggggccaag ggactctggt cactgtctct	420
gcacaaaacg acacccccat ctgtctatcc actggccctt ggatctgctg cccaaactaa	480
ctccatgggtg accctgggat gcctggtcaa gggctatttc cctgagccag tgacagtga	540
ctggaactct ggatccctgt ccagcgggtg gcacaccttc ccagctgtcc tgcagtctga	600
cctctacact ctgagcagct cagtgactgt cccctccagc acctggccca gcgagaccgt	660
cacctgcaac gttgcccacc cggccagcag caccaaggtg gacaagaaaa ttgtgcccag	720
ggattgtggt tgtaagcctt gcatatgtac agtcccagaa gtatcatctg tcttcatctt	780

```

ccccccaaag cccaaggatg tgctcacat tactctgact cctaaggatc cgtgtgttgt      840
ggtagacatc agcaaggatg atcccgaggt ccagttcagc tggttttag atgatgtgga      900
ggtgcacaca gctcagacgc aacccccgga ggagcagttc aacagcactt tccgctcagt      960
cagtgaactt cccatcatgc accaggactg gctcaatggc aaggagtcca aatgcagggt     1020
caacagtgca gctttccctg ccccatcga gaaaaccatc tccaaaacca aaggcagacc     1080
gaaggctcca caggtgtaca ccattccacc tccaaggag cagatggcca aggataaagt     1140
cagtctgacc tgcatgataa cagacttctt ccctgaagac attactgtgg agtggcagtg     1200
gaatgggcag ccagcggaga actacaagaa cactcagccc atcatggaca cagatggctc     1260
ttacttcatc tacagcaagc tcaatgtgca gaagagcaac tgggaggcag gaaatacttt     1320
cacctgctct gtgttacatg agggcctgca caaccacat actgagaaga gcctctccca     1380
ctctcctggg aaatga

```

<210> 148

<211> 702

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1G9的轻链的完整序列

<400> 148

```

atgaagttgc ctgttaggct gttgggtgctg atggctctgga ttcttgcttc cagcagtcaa      60
attgtttctca cccagtctcc agcaatcatg tctgcatctc caggggagaa ggtcacatg      120
acctgcagtg ccagctcaag tgtaagttac atgcactggg accagcagaa gtcaggcacc      180
tcccccaaaa gatggattta tgacacatcc aaactggctt ctggagtccc tgctcgcttc      240
agtggcagtg ggtctgggac ctcttactct ctcaaatca gcagcatgga ggctgaagat      300
gctgccactt attactgcca gcagtggagt agtaaccac ccctcacgtt cggtgctggg      360
accaagctgg agctgaaacg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc      420
agtgagcagt taacatctgg aggtgcctca gtcgtgtgct tcttgaacaa cttctacccc      480
aaagacatca atgtcaagtg gaagattgat ggcagtgaac gacaaaatgg cgtcctgaac      540
agttggactg atcaggacag caaagacagc acctacagca tgagcagcac cctcacgttg      600
accaaggacg agtatgaacg acataacagc tatacctgtg aggccactca caagacatca      660
acttcaccca ttgtcaagag cttcaacagg aatgagtgtt ag

```

<210> 149

<211> 465

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1G9的重链的完整序列

<400> 149

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly

1

5

10

15

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

325	330	335
Phe Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala	Ala Phe Pro Ala Pro	Ile Glu Lys
340	345	350
Thr Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg	Pro Lys Ala Pro Gln	Val Tyr Thr
355	360	365
Ile Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met	Ala Lys Asp Lys Val	Ser Leu Thr
370	375	380
Cys Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro	Glu Asp Ile Thr Val	Glu Trp Gln
385	390	395
Trp Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn	Tyr Lys Asn Thr Gln	Pro Ile Met
405	410	415
Asp Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Ile	Tyr Ser Lys Leu Asn	Val Gln Lys
420	425	430
Ser Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr	Phe Thr Cys Ser Val	Leu His Glu
435	440	445
Gly Leu His Asn His His Thr Glu	Lys Ser Leu Ser His	Ser Pro Gly
450	455	460

Lys

465

<210> 150

<211> 233

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1G9的轻链的完整序列

<400> 150

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu	Val Leu Met Val Trp Ile Pro Ala
1	5 10 15
Ser Ser Ser Gln Ile Val Leu Thr	Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala
20	25 30
Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met	Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val
35	40 45
Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln	Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg
50	55 60
Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu	Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe
65	70 75 80
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser	Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met
85	90 95
Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr	Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn

100	105	110
Pro Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala		
115	120	125
Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu		
130	135	140
Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro		
145	150	155
Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn		
165	170	175
Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr		
180	185	190
Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His		
195	200	205
Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile		
210	215	220
Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
225	230	
<210> 151		
<211> 1393		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 1E8的重链的完整序列		
<400> 151		
atgaagttgt ggctgaactg gattttcctt gtaacacttt taaatggtat ccagtgtgaa	60	
gtgaagctgg tggagtctgg gggagactta gtgaagcctg gaggtccct gaaactctcc	120	
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tatgccatgt cttgggttcg ccagactcca	180	
gagaagaggc tggagtgggt cgcattccatt agtagtggtg gtagaaccta ctatccagac	240	
agtgtgaagg gccgattcac catctccaga gataatgcc ggaacatcct gtacctgcaa	300	
atgagcagtc tgaggctctga agacacggcc atctattact gtgcacgagg cgggactcgt	360	
cattcctacg gcaacggggt tgactactgg ggccaaggca ccaactctcac agtctcctca	420	
caaaacgaca ccccatctg tctatccact ggccctgga tctgctgccc aaactaactc	480	
catggtgacc ctgggatgcc tgggtcaaggg ctatttcctt gagccagtga cagtgcacctg	540	
gaactctgga tccctgtcca gcggtgtgca caccttccca gctgtcctgc agtctgacct	600	
ctacactctg agcagctcag tgactgtccc ctccagcacc tggcccagcg agaccgtcac	660	
ctgcaacgtt gcccacccgg ccagcagcac caaggtggac aagaaaattg tgcccaggga	720	
ttgtggttgt aagccttgca tatgtacagt cccagaagta tcatctgtct tcatcttccc	780	
cccaaagccc aaggatgtgc tcaccattac tctgactcct aaggtcacgt gtgttggtgt	840	
agacatcagc aaggatgatc ccgaggtcca gttcagctgg tttgtagatg atgtggaggt	900	

```

gcacacagct cagacgcaac cccgggagga gcagttcaac agcactttcc gctcagtcag      960
tgaacttccc atcatgcacc aggactggct caatggcaag gagttcaaat gcagggtcaa      1020
cagtgcagct ttccctgccc ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag gcagaccgaa      1080
ggctccacag gtgtacacca ttccacctcc caaggagcag atggccaagg ataaagtcag      1140
tctgacctgc atgataacag acttcttccc tgaagacatt actgtggagt ggcagtggaa      1200
tgggcagcca gcggagaact acaagaacac tcagcccatc atggacacag atggctctta      1260
cttcatctac agcaagctca atgtgcagaa gagcaactgg gaggcaggaa atacctttcac      1320
ctgctctgtg ttacatgagg gctgcacaa ccaccatact gagaagagcc tctcccactc      1380
tcctggtaaa tga

```

<210> 152

<211> 702

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的轻链的完整序列

<400> 152

```

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atggtctgga ttcttgcttc cagcagtcaa      60
attgttctct cccagtctcc aacaatcatg tctgcatctc caggggagaa ggtcaccatg      120
acctgcagtg ccagctcaag tgtaagttac atgcactggt accagcagaa gtcaggcacc      180
tcccccaaaa gatggattta tgactcatcc aaactggctt ctggagtccc tgctcgcttc      240
agtggcagtg ggtctgggac ctcttactct ctcaaatca gcagcatgga ggctgaagat      300
gctgccactt attactgcca gcagtggact agtaaccac ccatcacgtt cggtgctggg      360
accaagctgg agctgaaacg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc      420
agtgagcagt taacatctgg aggtgcctca gtcgtgtgct tcttgaacaa cttctacccc      480
aaagacatca atgtcaagtg gaagattgat ggcagtgaac gacaaaatgg cgtcctgaac      540
agttggactg atcaggacag caaagacagc acctacagca tgagcagcac cctcacgttg      600
accaaggacg agtatgaacg acataacagc tatacctgtg aggccactca caagacatca      660
acttcaccca ttgtcaagag cttcaacagg aatgagtgtt ag

```

<210> 153

<211> 464

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1E8的重链的完整序列

<400> 153

```

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
1           5           10           15
Ile Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys
                20                25                30

```

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

340	345	350
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile		
355	360	365
Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys		
370	375	380
Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp		
385	390	395
Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp		400
405	410	415
Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser		
420	425	430
Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly		
435	440	445
Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys		
450	455	460
<210> 154		
<211> 233		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 1E8的轻链的完整序列		
<400> 154		
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Val Trp Ile Pro Ala		
1	5	10
Ser Ser Ser Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Thr Ile Met Ser Ala		15
20	25	30
Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val		
35	40	45
Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg		
50	55	60
Trp Ile Tyr Asp Ser Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe		
65	70	75
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met		
85	90	95
Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn		
100	105	110
Pro Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala		
115	120	125
Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu		

130	135	140	
Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro			
145	150	155	160
Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn			
165	170	175	
Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr			
180	185	190	
Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His			
195	200	205	
Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile			
210	215	220	
Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys			
225	230		
<210> 155			
<211> 1393			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 1C10的重链的完整序列			
<400> 155			
atgaagtgtg ggctgaactg gattttcctt gtaacacttt taaatggtat ccagtgtgaa	60		
gtgaaactgg ttgagtctgg gggagtctta gtgaagcctg gagggtcctt gaaattttcc	120		
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc catgccttgt cttgggttcg ccagactcca	180		
gagaagagac tggagtgggt cgcattccatt agtagtcgtg gtcgaacctt ctatccagac	240		
agtgtaaagg gccgattcac cgtctccaga gataatgcc ggaacatcct gtatctgcaa	300		
gtgagcagtc tgaggtctga ggacacggcc atgtattatt gtacaagagg cgggactcat	360		
tattcctacg gcaacggttt tgacttctgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca	420		
caaaacgaca ccccatctg tctatccact ggcccctgga tctgctgccc aaactaactc	480		
catggtgacc ctgggatgcc tggtaagggt ctatttcctt gagccagtga cagtgcactg	540		
gaactctgga tccctgtcca gcggtgtgca cacttccca gctgtcctgc agtctgacct	600		
ctacactctg agcagctcag tgactgtccc ctccagcacc tggcccagcg agaccgtcac	660		
ctgcaacgtt gcccacccgg ccagcagcac caaggtggac aagaaaattg tgcccaggga	720		
ttgtggttgt aagccttgca tatgtacagt ccagaagta tcactgtgtc tcactttccc	780		
cccaaagccc aaggatgtgc tcaccattac tctgactcct aaggtcacgt gtgttgtggt	840		
agacatcagc aaggatgatc ccgaggtcca gttcagctgg tttgtagatg atgtggaggt	900		
gcacacagct cagacgcaac cccgggagga gcagttcaac agcactttcc gtcagtcag	960		
tgaacttccc atcatgcacc aggactggct caatggcaag gagttcaaag gcagggtcaa	1020		
cagtgcagct ttccctgccc ccatcgagaa aaccatctcc aaaaccaaag gcagaccgaa	1080		
ggctccacag gtgtacacca ttccacctcc caaggagcag atggccaagg ataaagtcag	1140		

tctgacctgc atgataacag acttcttccc tgaagacatt actgtggagt ggcagtggaa 1200
 tgggcagcca gcggagaact acaagaacac tcagcccatc atggacacag atggctctta 1260
 cttcatctac agcaagctca atgtgcagaa gagcaactgg gaggcaggaa atactttcac 1320
 ctgctctgtg ttacatgagg gcctgcacaa ccaccatact gagaagagcc tctcccactc 1380
 tcctggtaaa tga 1393

<210> 156

<211> 702

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1C10的轻链的完整序列

<400> 156

atgaagttgc ctgttaggct gttgggtgtg atggtctgga ttcttgcttc cagcagtcaa 60
 attgtttctca cccagtctcc agcaatcatg tctgcatctc caggggagaa ggtcaccatg 120
 acctgcagtg tcagctcaag tgttagttac atgcactggt accagcagaa gtcaggcacc 180
 tcccccaaaa gatggattta tgacacatcc aaactggctt ctggagtccc tgctcgcttc 240
 agtggcagtg ggtctgggac ctcttactct ctcaaatca gcaccatgga ggctgaagat 300
 gctgccactt attactgcca gcagtggagt aataaccac ccatcacgtt cggtgctggg 360
 accaagctgg aactgaaacg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc 420
 agtgagcagt taacatctgg aggtgcctca gtcgtgtgct tcttgaacaa cttctacccc 480
 aaagacatca atgtcaagtg gaagattgat ggcagtgaac gacaaaatgg cgtcctgaac 540
 agttggactg atcaggacag caaagacagc acctacagca tgagcagcac cctcacgttg 600
 accaaggacg agtatgaacg acataacagc tatacctgtg aggccactca caagacatca 660
 acttcaccca ttgtcaagag cttcaacagg aatgagtgtt ag 702

<210> 157

<211> 464

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 1C10的重链的完整序列

<400> 157

Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly
 1 5 10 15
 Ile Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Lys
 20 25 30
 Pro Gly Gly Ser Leu Lys Phe Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
 35 40 45
 Ser Ser His Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
 50 55 60

Glu	Trp	Val	Ala	Ser	Ile	Ser	Ser	Arg	Gly	Arg	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp
65					70					75					80
Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Val	Ser	Arg	Asp	Asn	Ala	Arg	Asn	Ile
				85					90					95	
Leu	Tyr	Leu	Gln	Val	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr
				100					105					110	
Tyr	Cys	Thr	Arg	Gly	Gly	Thr	His	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Asn	Gly	Phe	Asp
				115					120					125	
Phe	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Lys	Thr	Thr
Pro	Pro	Ser	Val	Tyr	Pro	Leu	Ala	Pro	Gly	Ser	Ala	Ala	Gln	Thr	Asn
145					150					155					160
Ser	Met	Val	Thr	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro
					165					170					175
Val	Thr	Val	Thr	Trp	Asn	Ser	Gly	Ser	Leu	Ser	Ser	Gly	Val	His	Thr
					180					185				190	
Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Asp	Leu	Tyr	Thr	Leu	Ser	Ser	Ser	Val
					195					200				205	
Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Thr	Trp	Pro	Ser	Glu	Thr	Val	Thr	Cys	Asn	Val
Ala	His	Pro	Ala	Ser	Ser	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Ile	Val	Pro	Arg
225					230					235					240
Asp	Cys	Gly	Cys	Lys	Pro	Cys	Ile	Cys	Thr	Val	Pro	Glu	Val	Ser	Ser
					245					250				255	
Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Val	Leu	Thr	Ile	Thr	Leu
					260					265				270	
Thr	Pro	Lys	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Ile	Ser	Lys	Asp	Asp	Pro
					275					280				285	
Glu	Val	Gln	Phe	Ser	Trp	Phe	Val	Asp	Asp	Val	Glu	Val	His	Thr	Ala
Gln	Thr	Gln	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Phe	Asn	Ser	Thr	Phe	Arg	Ser	Val
305					310					315					320
Ser	Glu	Leu	Pro	Ile	Met	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Phe
					325					330				335	
Lys	Cys	Arg	Val	Asn	Ser	Ala	Ala	Phe	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr
					340					345				350	
Ile	Ser	Lys	Thr	Lys	Gly	Arg	Pro	Lys	Ala	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Ile
					355					360				365	
Pro	Pro	Pro	Lys	Glu	Gln	Met	Ala	Lys	Asp	Lys	Val	Ser	Leu	Thr	Cys

370	375	380
Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp		
385	390	395
Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp		400
	405	410
Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser		415
	420	425
Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly		430
	435	440
Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys		445
450	455	460
<210> 158		
<211> 233		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 1C10的轻链的完整序列		
<400> 158		
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Val Trp Ile Pro Ala		
1	5	10
Ser Ser Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala		15
	20	25
Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val		30
	35	40
Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg		45
50	55	60
Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe		
65	70	75
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met		80
	85	90
Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn		95
	100	105
Pro Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala		110
	115	120
Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu		125
	130	135
Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro		140
145	150	155
Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn		160

	165		170		175
Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr					
	180		185		190
Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His					
	195		200		205
Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile					
	210		215		220
Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys					
225			230		

<210> 159

<211> 1393

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 1A10的重链的完整序列

<400> 159

atgaagtgtg	ggctgaactg	gattttcctt	gtaacacttt	taaatggtat	ccagtgtgaa	60
gtgaaactgg	ttgagtctgg	gggagtctta	gtgaagcctg	gagggtccct	gaaattttcc	120
tgtgcagcct	ctggattcac	tctcagtagc	catgccttgt	cttggttcg	ccagactcca	180
gagaagagac	tggagtgggt	cgcattccatt	agtagtcgtg	gtcgaaccta	ctatccagac	240
agtgtaaagg	gccgattcac	cgtctccaga	gataatgcc	ggaacatcct	gtatctgcaa	300
gtgagcagtc	tgaggctctga	ggacacggcc	atgtattatt	gtacaagagg	cgggactcat	360
tattcctacg	gcaacggttt	tgacttctgg	ggccaaggca	ccactctcac	agtctcctca	420
caaaacgaca	cccccatctg	tctatccact	ggcccctgga	tctgctgccc	aaactaactc	480
catggtgacc	ctgggatgcc	tggcaagggt	ctatttcctt	gagccagtga	cagtgcacctg	540
gaactctgga	tccctgtcca	gcggtgtgca	caccttccca	gctgtcctgc	agtctgacct	600
ctacactctg	agcagctcag	tgactgtccc	ctccagcacc	tggcccagcg	agaccgtcac	660
ctgcaacgtt	gcccacccgg	ccagcagcac	caagggtggac	aagaaaattg	tgcccaggga	720
ttgtggttgt	aagccttgca	tatgtacagt	cccagaagta	tcactgtgtc	tcactttccc	780
cccaaagccc	aaggatgtgc	tcaccattac	tctgactcct	aaggtcacgt	gtgttgtggt	840
agacatcagc	aaggatgac	ccgaggtcca	gttcagctgg	ttttagatg	atgtggaggt	900
gcacacagct	cagacgcaac	cccgggagga	gcagttcaac	agcactttcc	gctcagtcag	960
tgaacttccc	atcatgcacc	aggactggct	caatggcaag	gagttcaa	gcagggtcaa	1020
cagtgcagct	ttccctgccc	ccatcgagaa	aaccatctcc	aaaaccaaag	gcagaccgaa	1080
ggctccacag	gtgtacacca	ttccacctcc	caaggagcag	atggccaagg	ataaagtcag	1140
tctgacctgc	atgataacag	actttctccc	tgaagacatt	actgtggagt	ggcagtggaa	1200
tgggcagcca	gcggagaact	acaagaacac	tcagcccatc	atggacacag	atggctctta	1260
cttcatctac	agcaagctca	atgtgcagaa	gagcaactgg	gaggcaggaa	atactttcac	1320
ctgctctgtg	ttacatgagg	gcctgcacaa	ccaccatact	gagaagagcc	tctcccactc	1380

tcctggtaaa tga	1393
<210> 160	
<211> 702	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1A10的轻链的完整序列	
<400> 160	
atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atggtctgga ttcttgcttc cagcagtcaa	60
attgtttctca ccagttctcc agcaatcatg tctgcatctc caggggagaa ggtcaccatg	120
acctgcagtg tcagctcaag tgtttagttac atgcactggt accagcagaa gtcaggcacc	180
tcccccaaaa gatggattta tgacacatcc aaactggctt ctggagtccc tgctcgcttc	240
agtggcagtg ggtctgggac ctcttactct ctcacaatca gcaccatgga ggctgaagat	300
gctgccactt attactgcca gcagtggagt aataaccac ccatacgtt cggtgctggg	360
accaagctgg aactgaaacg ggctgatgct gcaccaactg tatccatctt cccaccatcc	420
agtgagcagt taacatctgg aggtgcctca gtcgtgtgct tcttgaacaa cttctacccc	480
aaagacatca atgtcaagt gaagattgat ggcagtgaac gacaaaatgg cgtcctgaac	540
agttggactg atcaggacag caaagacagc acctacagca tgagcagcac cctcacgttg	600
accaaggacg agtatgaacg acataacagc tatacctgtg aggccactca caagacatca	660
acttcaccca ttgtcaagag cttcaacagg aatgagtgtt ag	702
<210> 161	
<211> 464	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 1A10的重链的完整序列	
<400> 161	
Met Lys Leu Trp Leu Asn Trp Ile Phe Leu Val Thr Leu Leu Asn Gly	
1 5 10 15	
Ile Gln Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Val Leu Val Lys	
20 25 30	
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Phe Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Leu	
35 40 45	
Ser Ser His Ala Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu	
50 55 60	
Glu Trp Val Ala Ser Ile Ser Ser Arg Gly Arg Thr Tyr Tyr Pro Asp	
65 70 75 80	
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Arg Asn Ile	
85 90 95	

Leu Tyr Leu Gln Val Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr		
100	105	110
Tyr Cys Thr Arg Gly Gly Thr His Tyr Ser Tyr Gly Asn Gly Phe Asp		
115	120	125
Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Lys Thr Thr		
130	135	140
Pro Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Gly Ser Ala Ala Gln Thr Asn		
145	150	155
Ser Met Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr Phe Pro Glu Pro		
165	170	175
Val Thr Val Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser Gly Val His Thr		
180	185	190
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu Ser Ser Ser Val		
195	200	205
Thr Val Pro Ser Ser Thr Trp Pro Ser Glu Thr Val Thr Cys Asn Val		
210	215	220
Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys Ile Val Pro Arg		
225	230	235
Asp Cys Gly Cys Lys Pro Cys Ile Cys Thr Val Pro Glu Val Ser Ser		
245	250	255
Val Phe Ile Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Val Leu Thr Ile Thr Leu		
260	265	270
Thr Pro Lys Val Thr Cys Val Val Val Asp Ile Ser Lys Asp Asp Pro		
275	280	285
Glu Val Gln Phe Ser Trp Phe Val Asp Asp Val Glu Val His Thr Ala		
290	295	300
Gln Thr Gln Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser Thr Phe Arg Ser Val		
305	310	315
Ser Glu Leu Pro Ile Met His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Phe		
325	330	335
Lys Cys Arg Val Asn Ser Ala Ala Phe Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr		
340	345	350
Ile Ser Lys Thr Lys Gly Arg Pro Lys Ala Pro Gln Val Tyr Thr Ile		
355	360	365
Pro Pro Pro Lys Glu Gln Met Ala Lys Asp Lys Val Ser Leu Thr Cys		
370	375	380
Met Ile Thr Asp Phe Phe Pro Glu Asp Ile Thr Val Glu Trp Gln Trp		
385	390	395
Asn Gly Gln Pro Ala Glu Asn Tyr Lys Asn Thr Gln Pro Ile Met Asp		

	405		410		415
Thr Asp Gly Ser Tyr Phe Ile Tyr Ser Lys Leu Asn Val Gln Lys Ser					
	420		425		430
Asn Trp Glu Ala Gly Asn Thr Phe Thr Cys Ser Val Leu His Glu Gly					
	435		440		445
Leu His Asn His His Thr Glu Lys Ser Leu Ser His Ser Pro Gly Lys					
	450		455		460
<210> 162					
<211> 233					
<212> PRT					
<213> 人工序列					
<220>					
<223> 1A10的轻链的完整序列					
<400> 162					
Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Val Trp Ile Pro Ala					
1	5		10		15
Ser Ser Ser Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala					
	20		25		30
Ser Pro Gly Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Val Ser Ser Ser Val					
	35		40		45
Ser Tyr Met His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg					
	50		55		60
Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe					
65	70		75		80
Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Thr Met					
	85		90		95
Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Asn Asn					
	100		105		110
Pro Pro Ile Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys Arg Ala					
	115		120		125
Asp Ala Ala Pro Thr Val Ser Ile Phe Pro Pro Ser Ser Glu Gln Leu					
	130		135		140
Thr Ser Gly Gly Ala Ser Val Val Cys Phe Leu Asn Asn Phe Tyr Pro					
145	150		155		160
Lys Asp Ile Asn Val Lys Trp Lys Ile Asp Gly Ser Glu Arg Gln Asn					
	165		170		175
Gly Val Leu Asn Ser Trp Thr Asp Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr					
	180		185		190
Ser Met Ser Ser Thr Leu Thr Leu Thr Lys Asp Glu Tyr Glu Arg His					

195	200	205
Asn Ser Tyr Thr Cys Glu Ala Thr His Lys Thr Ser Thr Ser Pro Ile		
210	215	220
Val Lys Ser Phe Asn Arg Asn Glu Cys		
225	230	
<210> 163		
<400> 163		
000		
<210> 164		
<400> 164		
000		
<210> 165		
<400> 165		
000		
<210> 166		
<400> 166		
000		
<210> 167		
<211> 5		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> X2 = Y或H;X4 = M或L		
<220>		
<221> 变体		
<222> 2		
<223> Y或H		
<220>		
<221> 变体		
<222> 4		
<223> M或L		
<400> 167		
Ser Xaa Ala Xaa Ser		
1	5	
<210> 168		
<211> 16		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		

<223> X5 = G或R;X7 = S或R

<220>

<221> 变体

<222> 5

<223> G或R

<220>

<221> 变体

<222> 7

<223> S或R

<400> 168

Ser Ile Ser Ser Xaa Gly Xaa Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly

1

5

10

15

<210> 169

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> X3 = S或T;X4 = T、R或H;X5 = M、H或Y;X6 = I或S;X7 = T或Y;
X8 = T或G;X9 = G或N;X10 = L或空白;X13 = A或D;X14 = Y或F

<220>

<221> 变体

<222> 3

<223> S或T

<220>

<221> 变体

<222> 4

<223> T、R或H

<220>

<221> 变体

<222> 5

<223> M、H或Y

<220>

<221> 变体

<222> 6

<223> I或S

<220>

<221> 变体

<222> 7

<223> T或Y

<220>
<221> 变体
<222> 8
<223> T或G
<220>
<221> 变体
<222> 9
<223> G或N
<220>
<221> 变体
<222> 10
<223> L或空白 (也表示为*)
<220>
<221> 变体
<222> 13
<223> A或D
<220>
<221> 变体
<222> 14
<223> Y或F
<400> 169
Gly Gly Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Xaa Gly Phe Xaa Xaa
1 5 10
<210> 170
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> X2 = A或V
<220>
<221> 变体
<222> 2
<223> A或V
<400> 170
Ser Xaa Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met His
1 5 10
<210> 171
<211> 7
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> X2 = T或S

<220>

<221> 变体

<222> 2

<223> T或S

<400> 171

Asp Xaa Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 172

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> X4 = S、T或空白;X7 = 空白或N;X10 = I或L

<220>

<221> 变体

<222> 4

<223> S、T或空白(也表示为*)

<220>

<221> 变体

<222> 7

<223> N或空白(也表示为*)

<220>

<221> 变体

<222> 10

<223> I或L

<400> 172

Gln Gln Trp Xaa Ser Asn Xaa Pro Pro Xaa Thr

1 5 10

<210> 173

<211> 353

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> US28的人工突变病毒株

<400> 173

Met Thr Gln Thr Thr Thr Thr Glu Leu Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Asp

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

〈223〉 N或空白

<220>

<221> 变体

<222> 10

<223> I或L

<400> 176

Gln Gln Trp Xaa Ser Asn Xaa Pro Pro Xaa Thr

1 5 10

<210> 177

<211> 367

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> US28融合蛋白,包含来自HCMV TB40/E病毒株的US28序列

<400> 177

Met Thr Pro Thr Thr Thr Thr Thr Glu Leu Thr Thr Glu Phe Glu Tyr

1 5 10 15

Asp Leu Gly Ala Thr Pro Cys Thr Phe Thr Asp Val Leu Asn Gln Ser

20 25 30

Lys Pro Val Thr Leu Phe Leu Tyr Gly Val Val Phe Leu Phe Gly Ser

35 40 45

Val Gly Asn Phe Leu Val Ile Phe Thr Ile Thr Trp Arg Arg Arg Ile

50 55 60

Gln Cys Ser Gly Asp Val Tyr Phe Ile Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu

65 70 75 80

Leu Phe Val Cys Thr Leu Pro Leu Trp Met Gln Tyr Leu Leu Asp His

85 90 95

Asn Ser Leu Ala Ser Val Pro Cys Thr Leu Leu Thr Ala Cys Phe Tyr

100 105 110

Val Ala Met Phe Ala Ser Leu Cys Phe Ile Thr Glu Ile Ala Leu Asp

115 120 125

Arg Tyr Tyr Ala Ile Val Tyr Met Arg Tyr Arg Pro Val Lys Gln Ala

130 135 140

Cys Leu Phe Ser Ile Phe Trp Trp Ile Phe Ala Val Ile Ile Ala Ile

145 150 155 160

Pro His Phe Met Val Val Thr Lys Lys Asp Asn Gln Cys Met Thr Asp

165 170 175

Tyr Asp Tyr Leu Glu Val Ser Tyr Pro Ile Ile Leu Asn Val Glu Leu

180 185 190

Met Leu Gly Ala Phe Val Ile Pro Leu Ser Val Ile Ser Tyr Cys Tyr

195	200	205
Tyr Arg Ile Ser Arg Ile Val Ala Val Ser Gln Ser Arg His Lys Gly		
210	215	220
Arg Ile Val Arg Val Leu Ile Ala Val Val Leu Val Phe Ile Ile Phe		
225	230	235
Trp Leu Pro Tyr His Leu Thr Leu Phe Val Asp Thr Leu Lys Leu Leu		
245	250	255
Lys Trp Ile Ser Ser Ser Cys Glu Phe Glu Arg Ser Leu Lys Arg Ala		
260	265	270
Leu Ile Leu Thr Glu Ser Leu Ala Phe Cys His Cys Cys Leu Asn Pro		
275	280	285
Leu Leu Tyr Val Phe Val Gly Thr Lys Phe Arg Gln Glu Leu His Cys		
290	295	300
Leu Leu Ala Glu Phe Arg Gln Arg Leu Phe Ser Arg Asp Val Ser Trp		
305	310	315
Tyr His Ser Met Ser Phe Ser Arg Arg Ser Ser Pro Ser Arg Arg Glu		
325	330	335
Thr Ser Ser Asp Thr Leu Ser Asp Glu Val Cys Arg Val Ser Gln Ile		
340	345	350
Ile Pro Ala Ala Ala Leu Glu Gly Ser His His His His His His		
355	360	365

<210> 178

<211> 366

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> US28融合蛋白,包含来自HCMV突变病毒株的US28序列

<400> 178

Met Thr Gln Thr Thr Thr Thr Glu Leu Thr Thr Glu Phe Asp Tyr Asp		
1	5	10
Leu Gly Ala Ala Leu Cys Thr Leu Thr Asp Val Leu Asn Gln Ser Lys		
20	25	30
Pro Ile Thr Leu Phe Leu Tyr Gly Val Val Phe Leu Phe Gly Ser Ile		
35	40	45
Gly Asn Phe Leu Val Ile Phe Thr Ile Thr Trp Arg Arg Arg Ile Gln		
50	55	60
Cys Ser Gly Asp Val Tyr Phe Ile Asn Leu Ala Ala Ala Asp Leu Leu		
65	70	75
Phe Val Cys Thr Leu Pro Leu Trp Met Gln Tyr Leu Leu Asp His Asn		

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

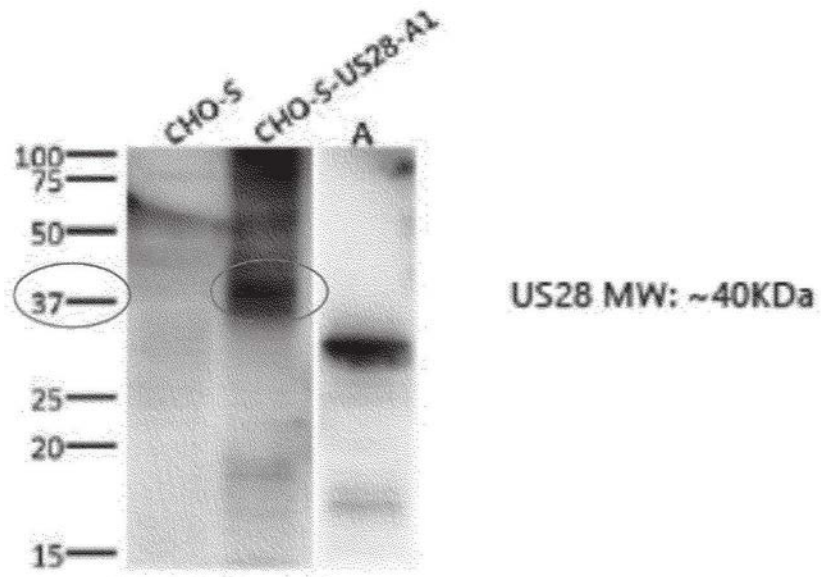


图1

US28-13-5G6-1D3克隆抗体在%的CHO-US28-A1细胞上的表面结合

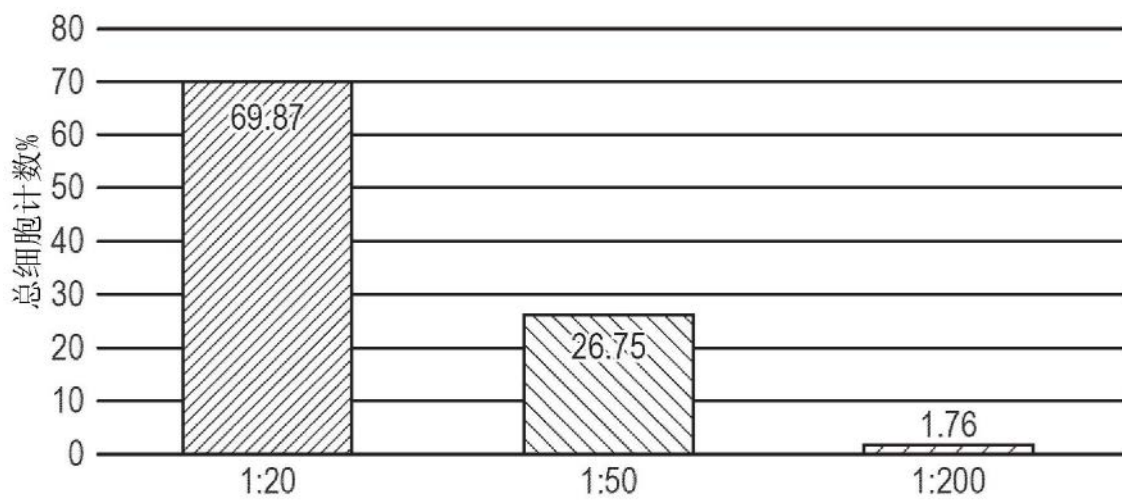


图3

来自US28-13-5G6-1D3克隆的抗体在%的CHO-US28-A1细胞上的表面结合

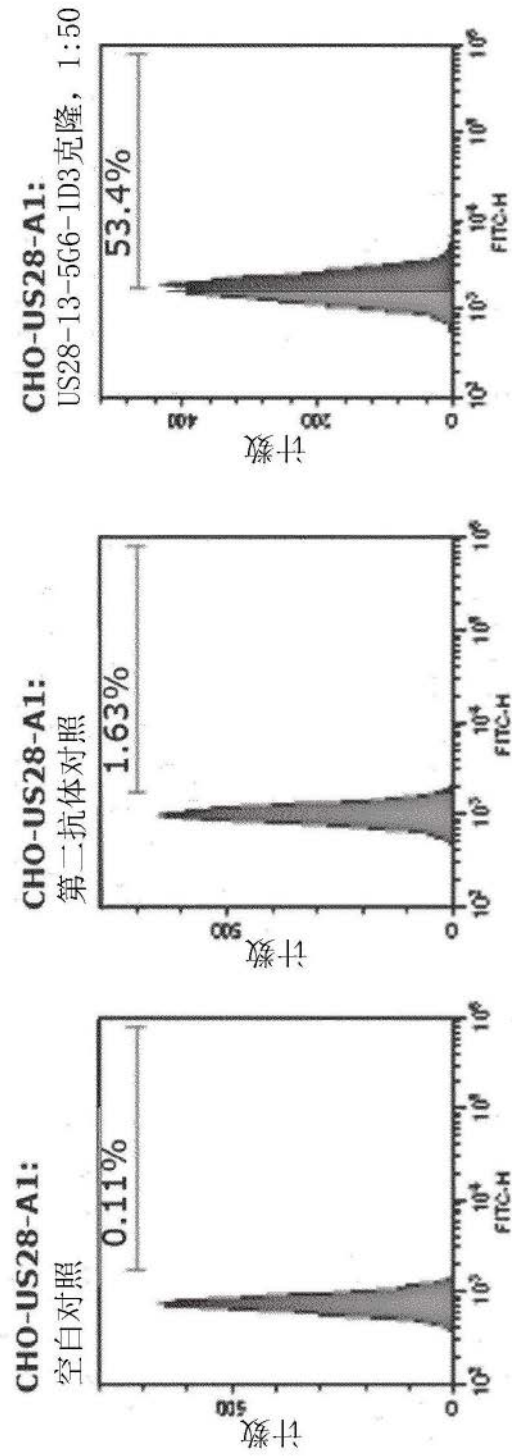


图2

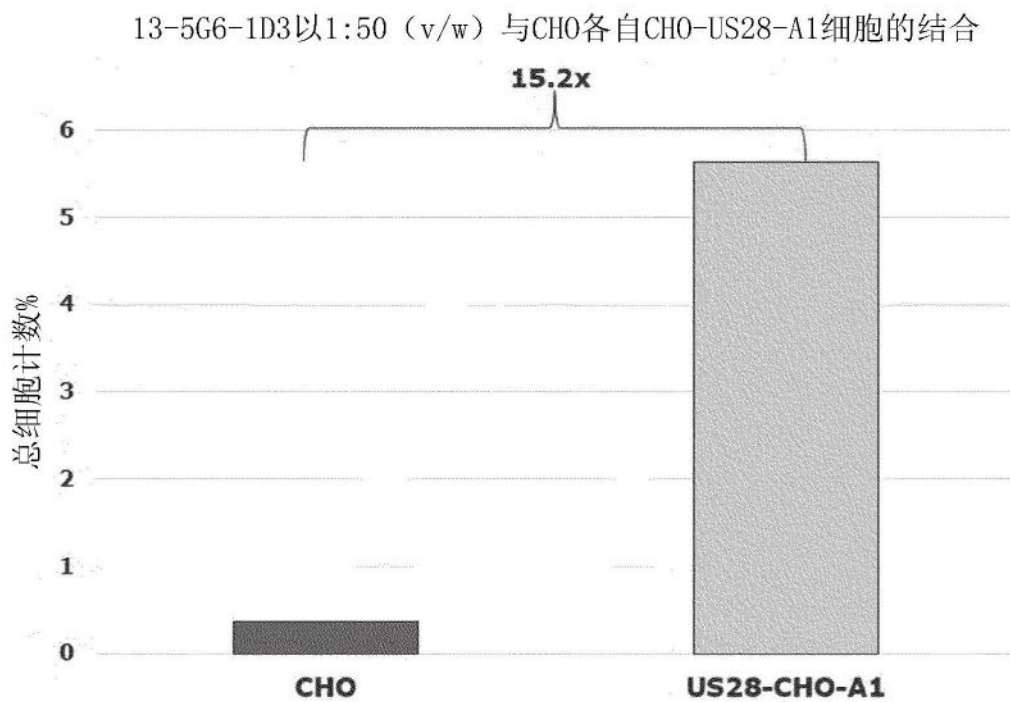


图4

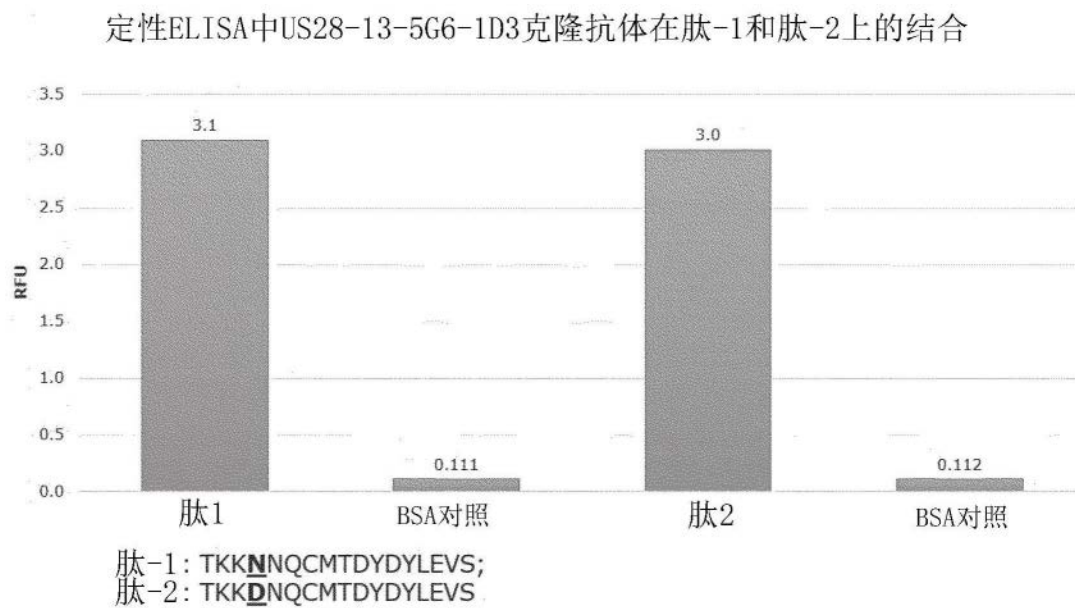
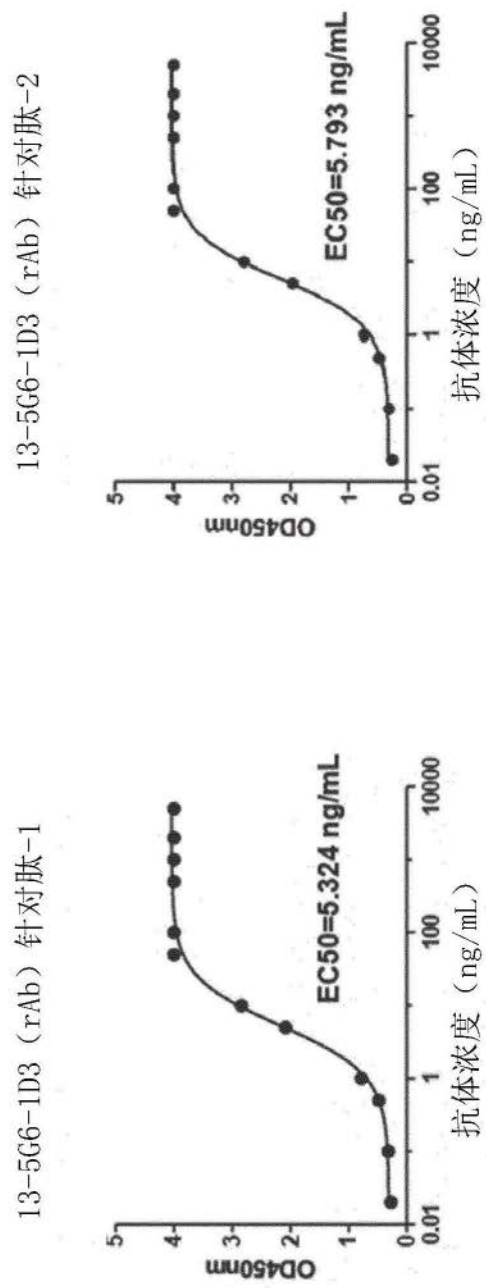


图5

US28-13-5G6-1D3 (rAb) Elisa结合曲线



截止点: 4

图6

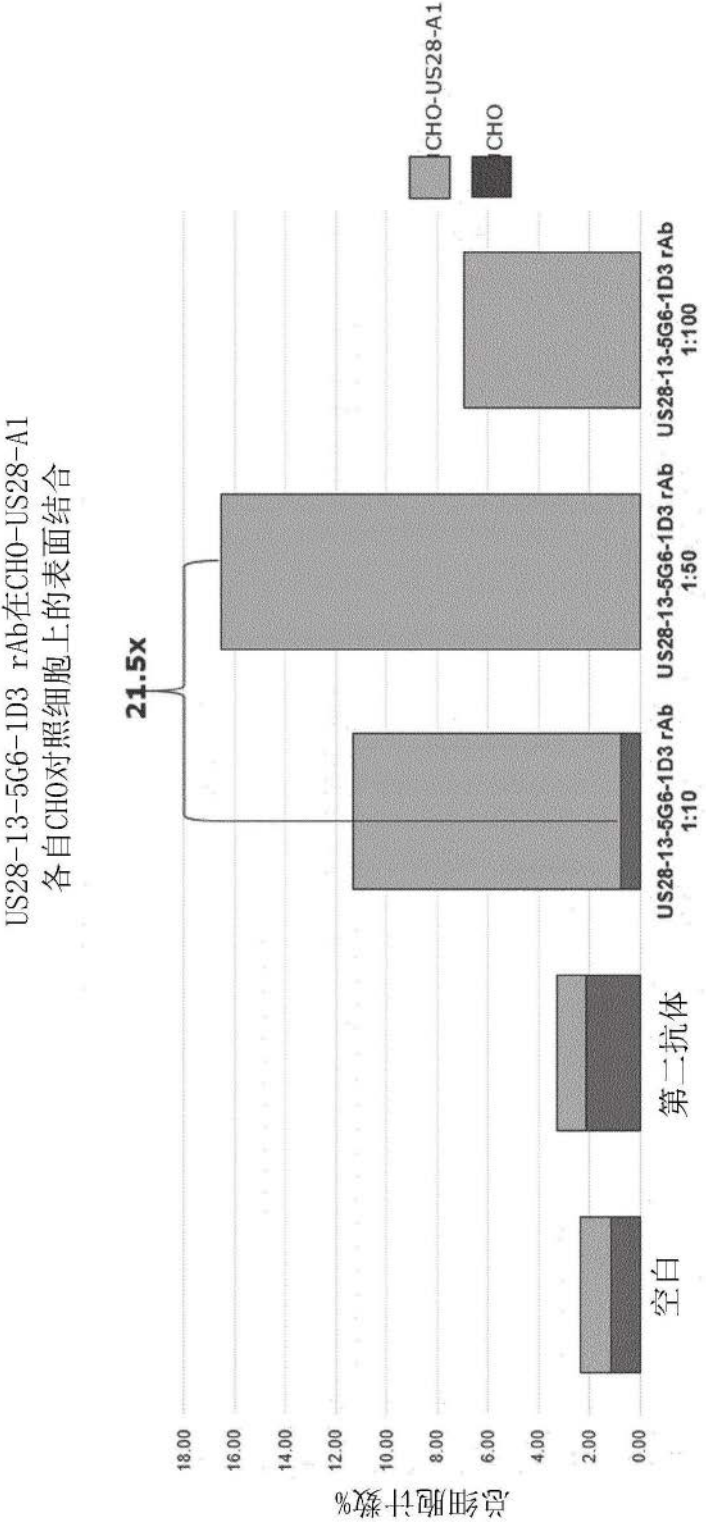


图7

HCMV Ad169感染MRC-5细胞

模拟MRC-5

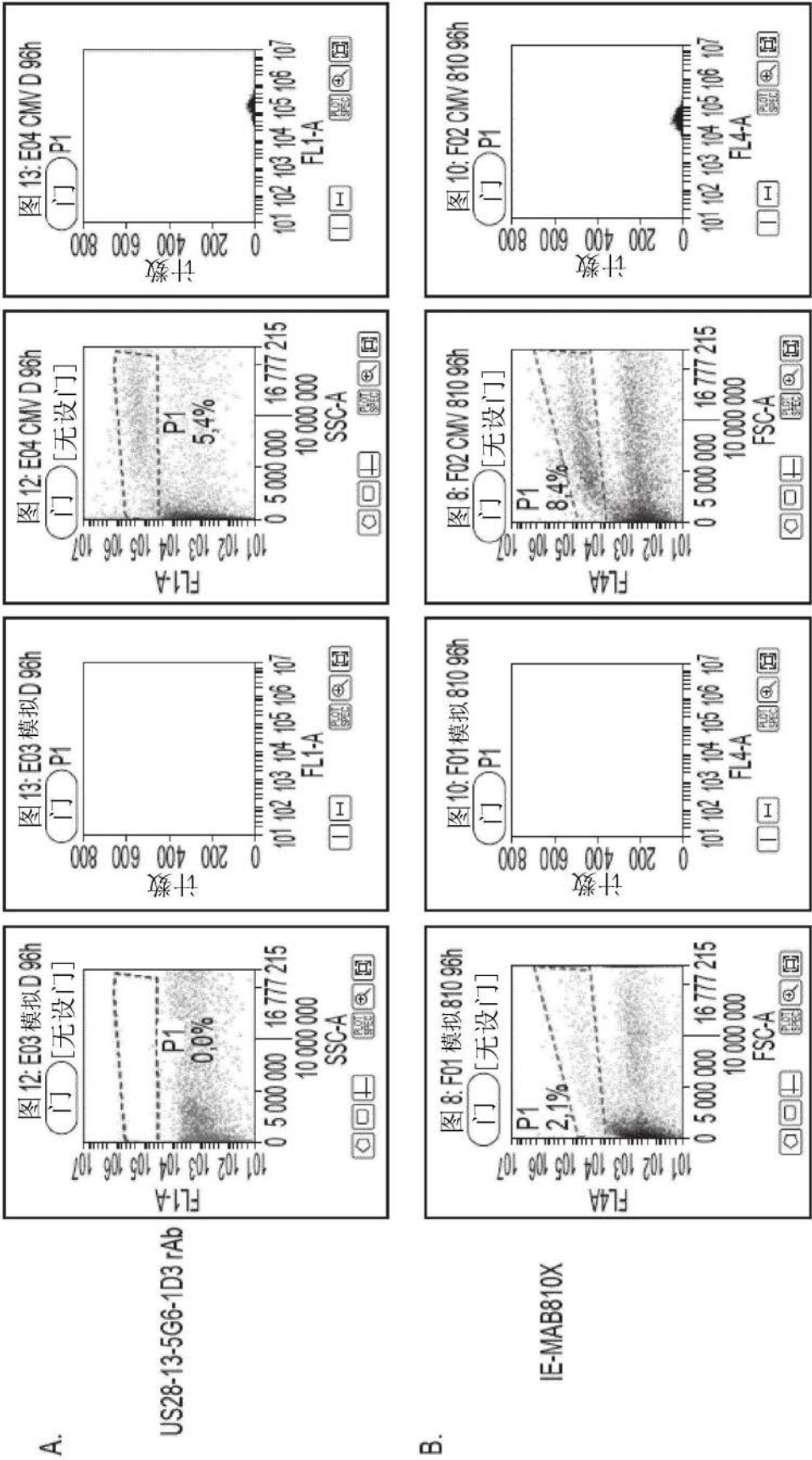


图8

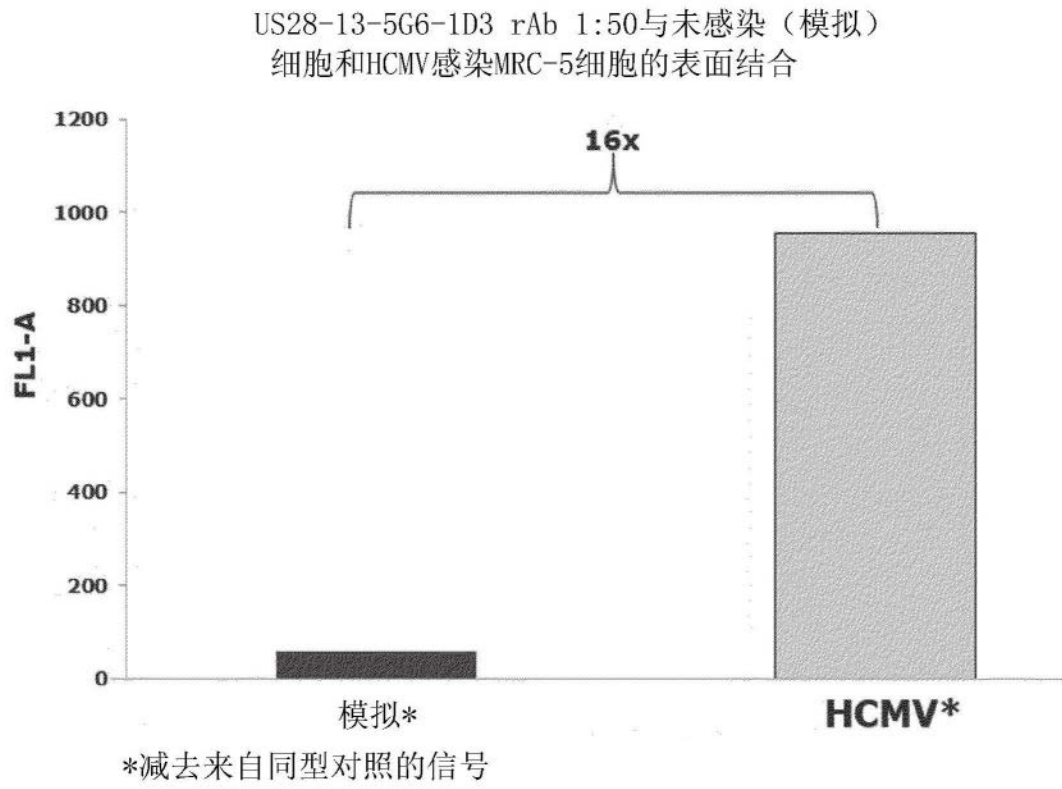


图9

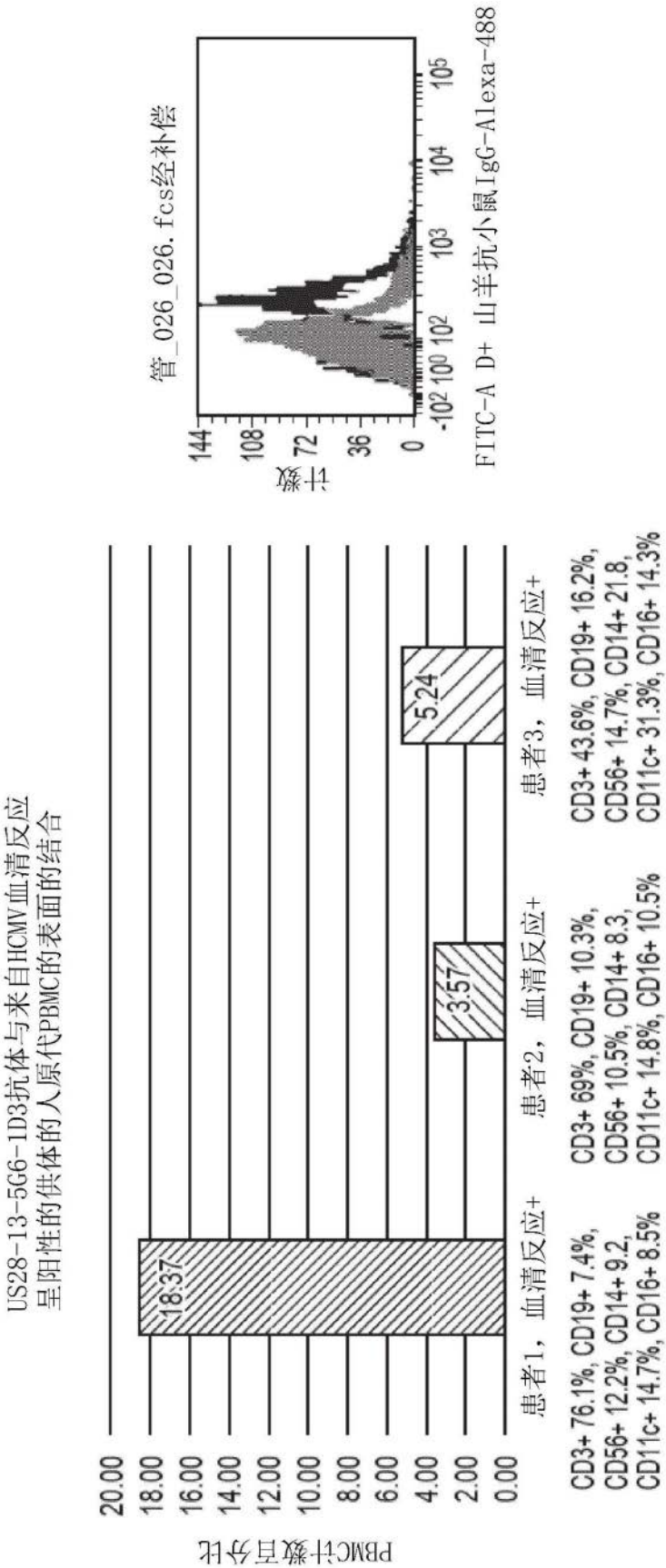
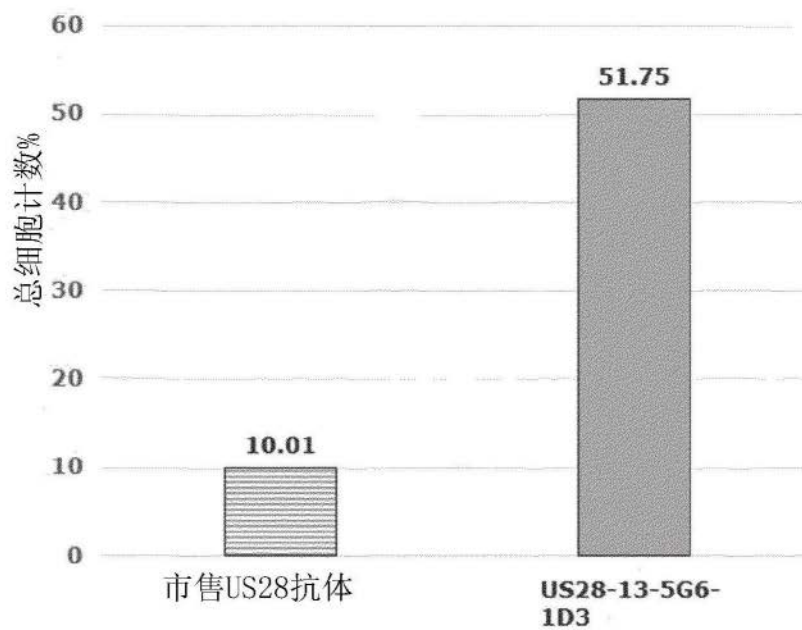


图10

A. 与CHO-US28-A1细胞的表面结合



B. 市售US28抗体在模拟细胞相对于HCMV Ad169感染MRC-5细胞上的表面结合

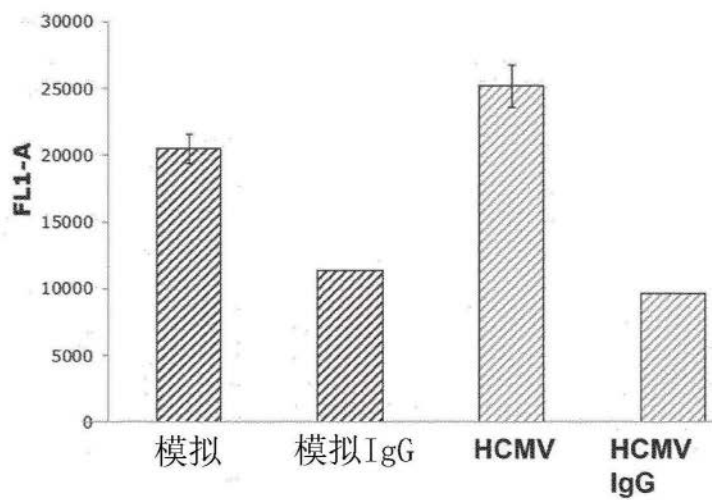


图11

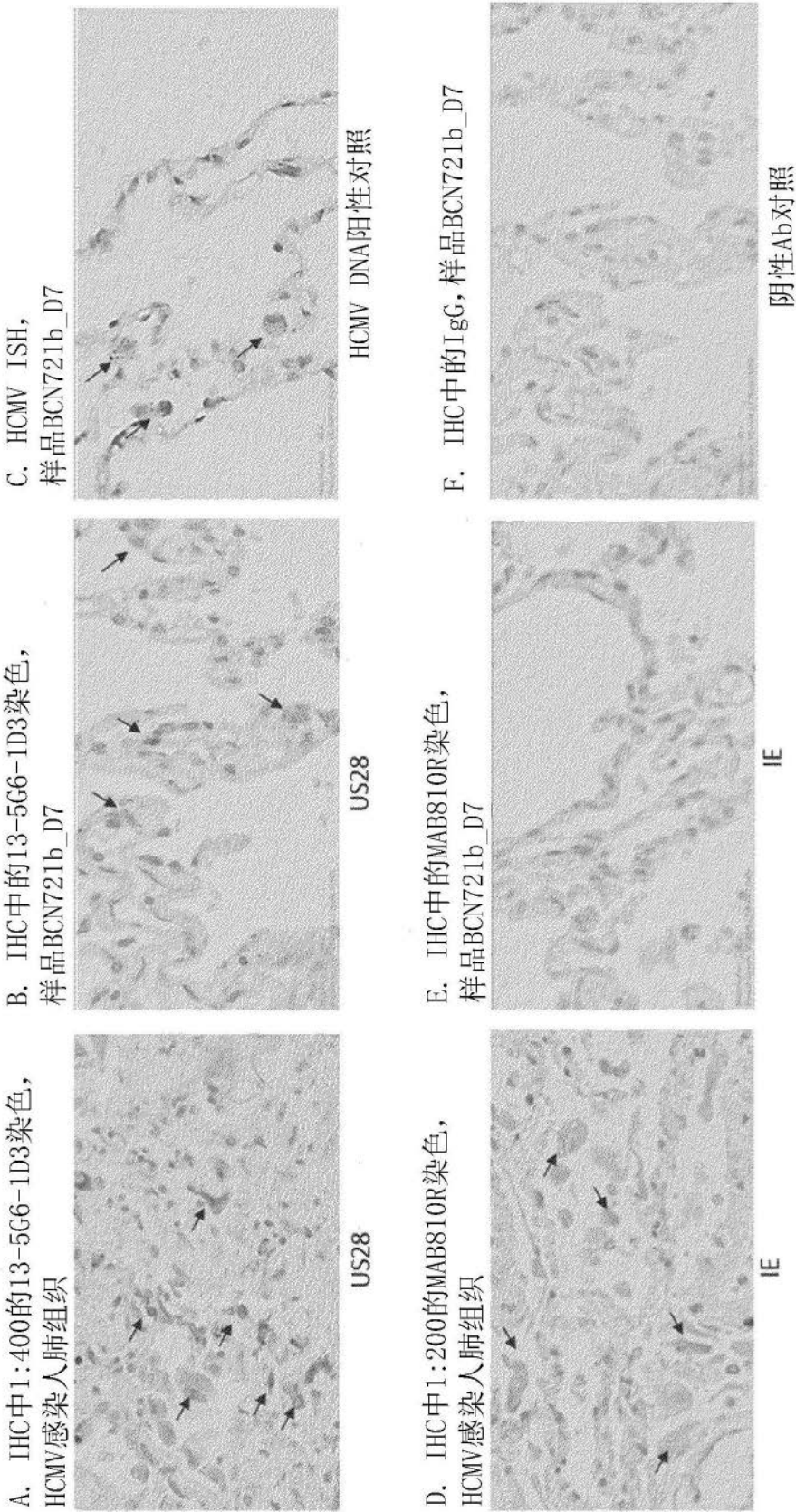


图12

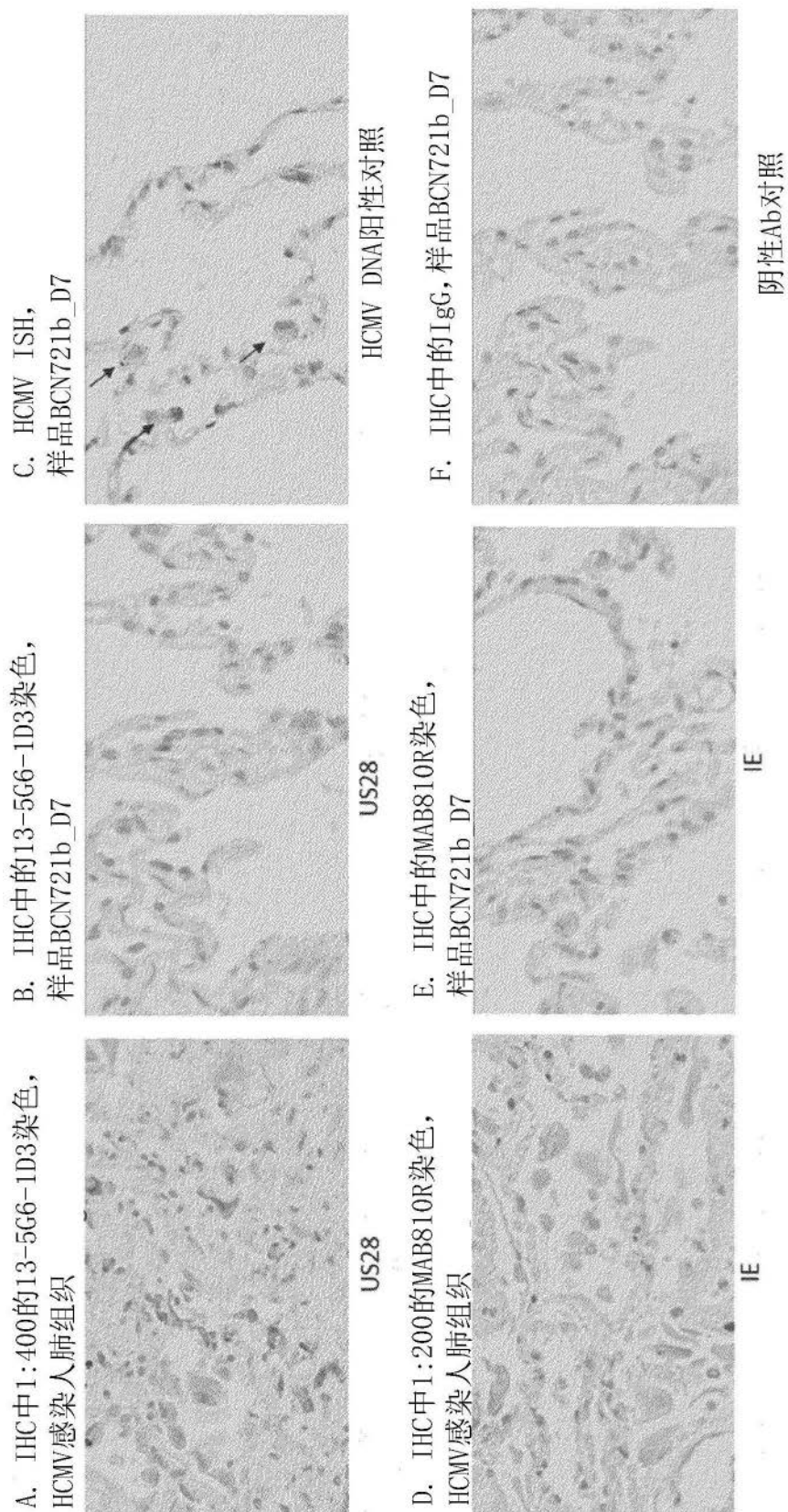
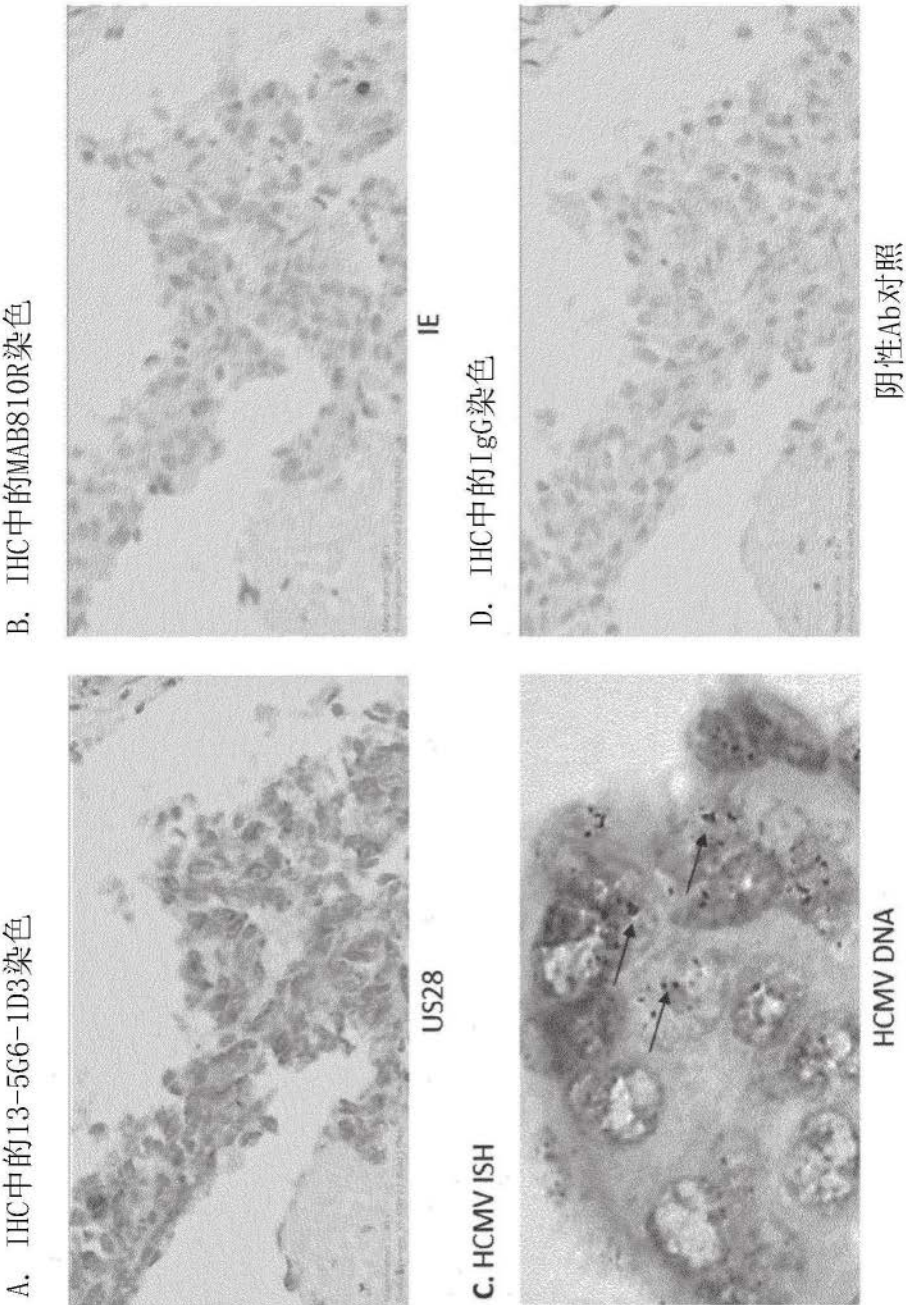


图12(续);彩色



二阴性乳腺癌：
样品BR1008b_D5

图13

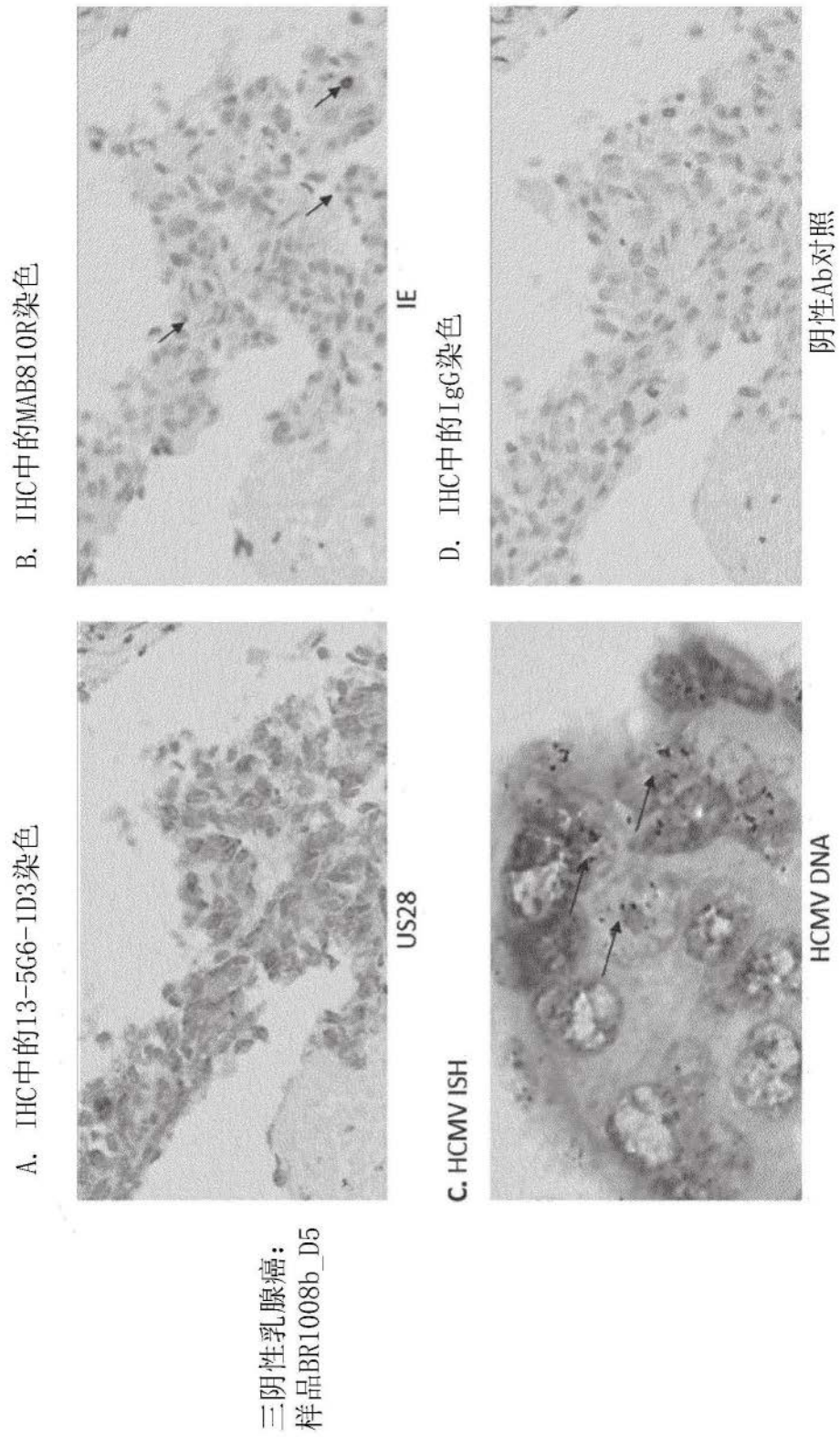


图13(续):彩色

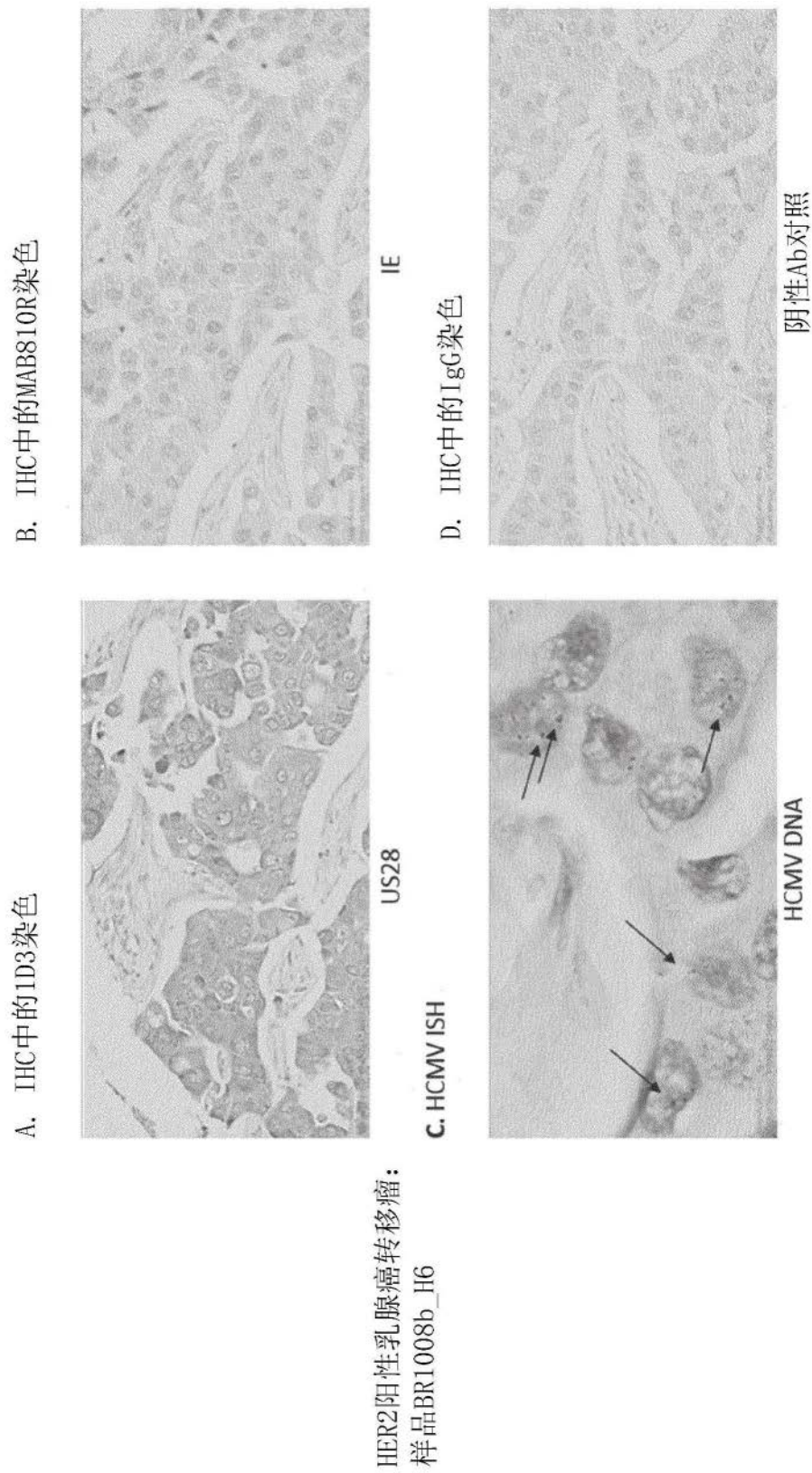


图14

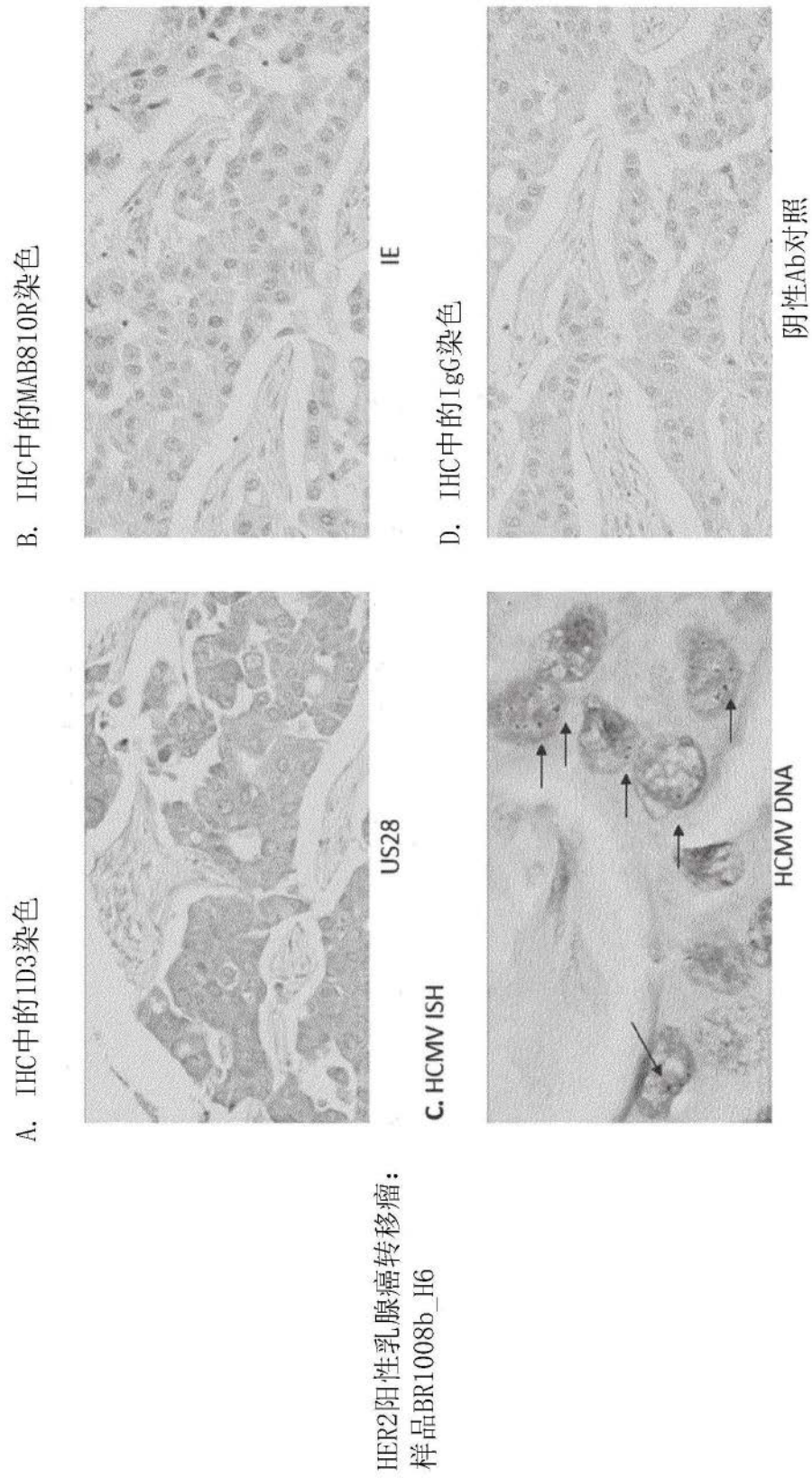


图14(续);彩色

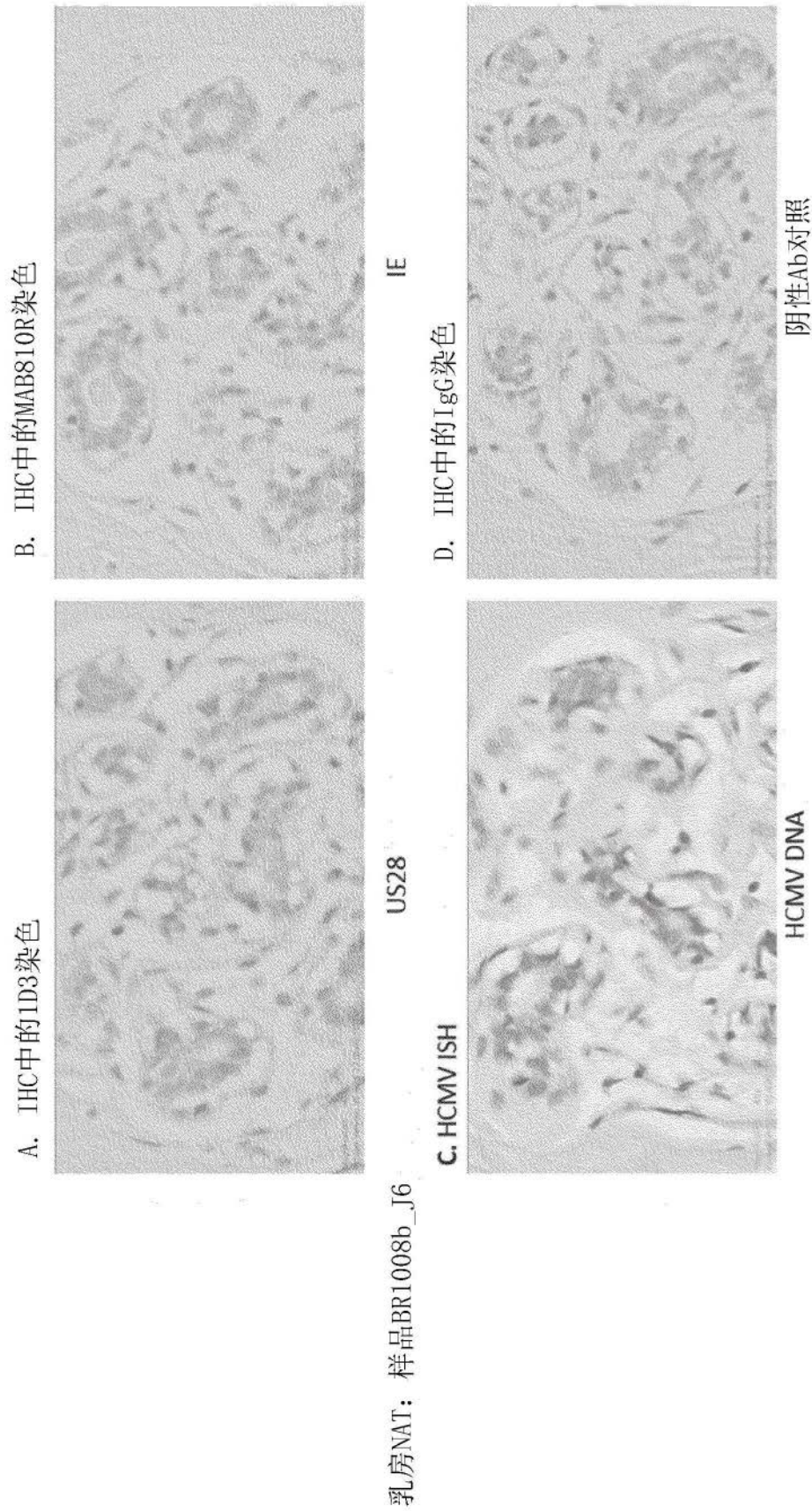


图15

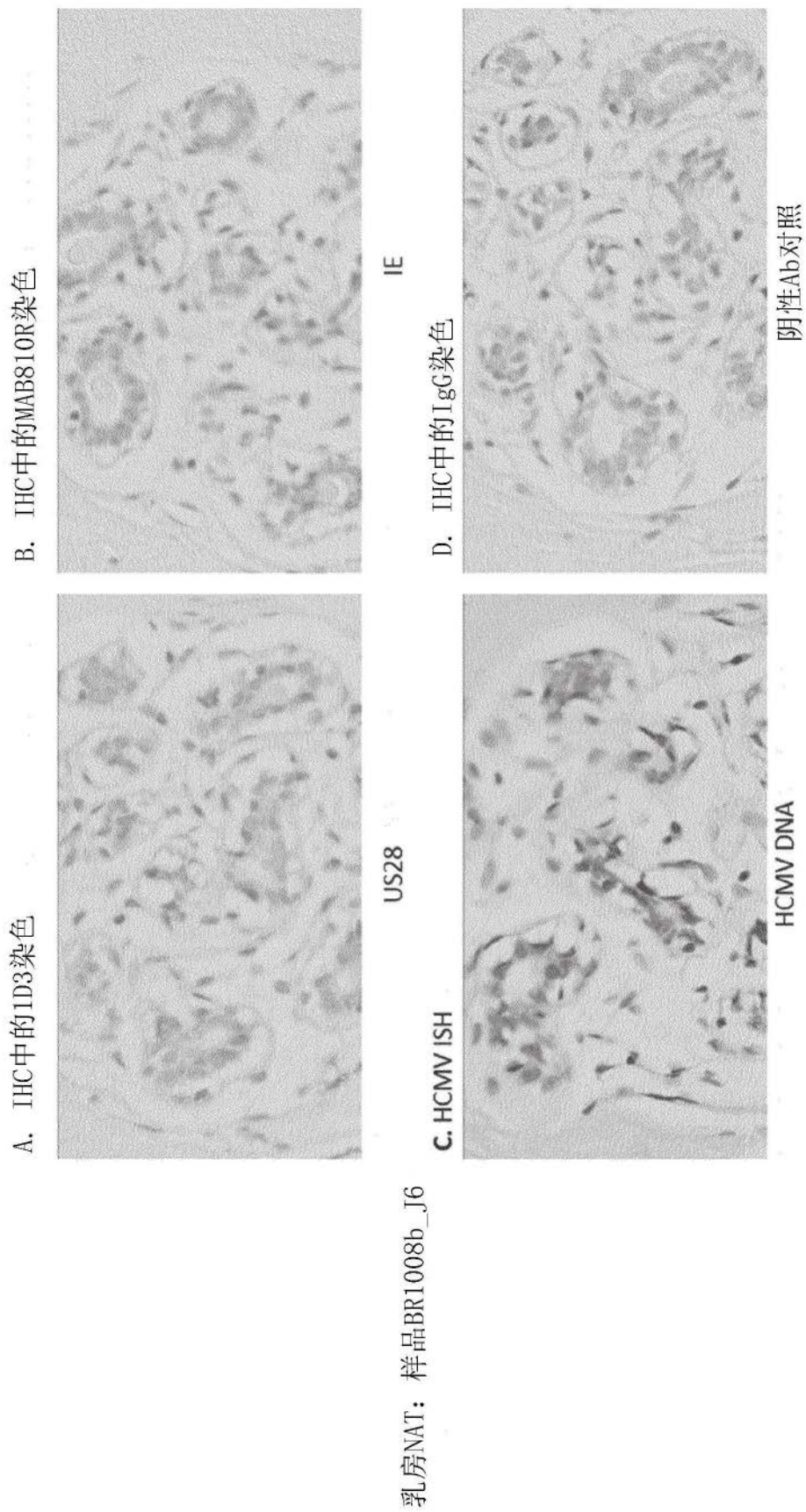
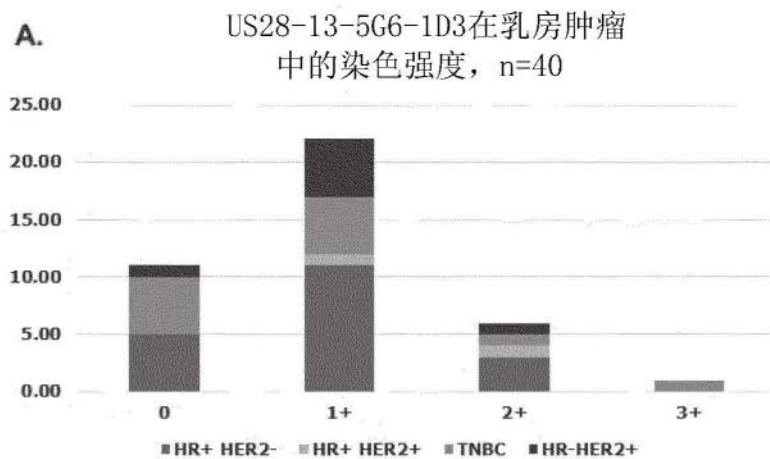
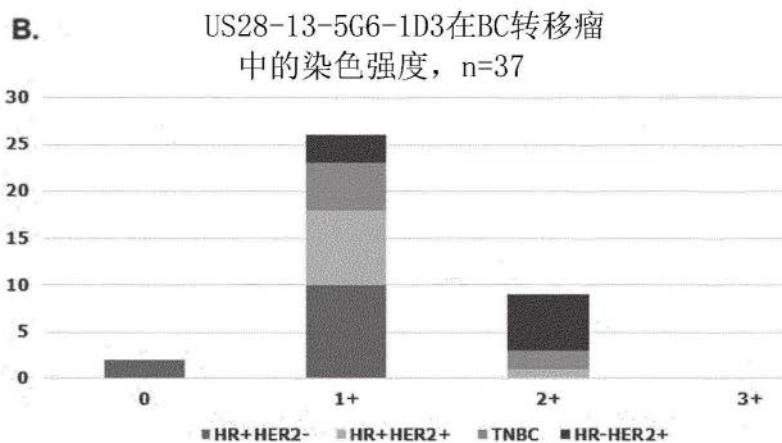


图15(续);彩色



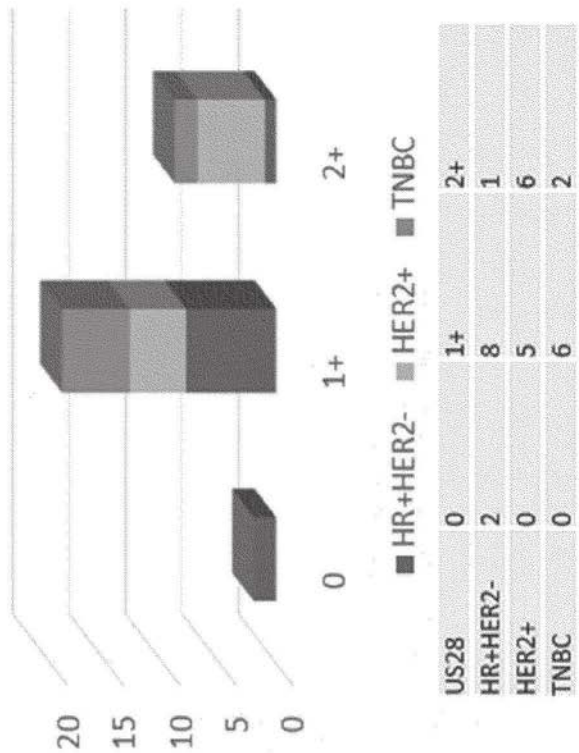
US28	0	1+	2+	3+
HR+HER2-	5,00	11,00	3,00	0,00
HR+HER2+	0,00	1,00	1,00	0,00
TNBC	5,00	5,00	1,00	1,00
HR-HER2+	1,00	5,00	1,00	0,00



US28	0	1+	2+	3+
HR+HER2-	2	10	0	0
HR+HER2+	0	8	1	0
TNBC	0	5	2	0
HR-HER2+	0	3	6	0

图16

B. 腺乳房转移瘤中的US28染色



A. 乳腺癌亚型中的US28染色

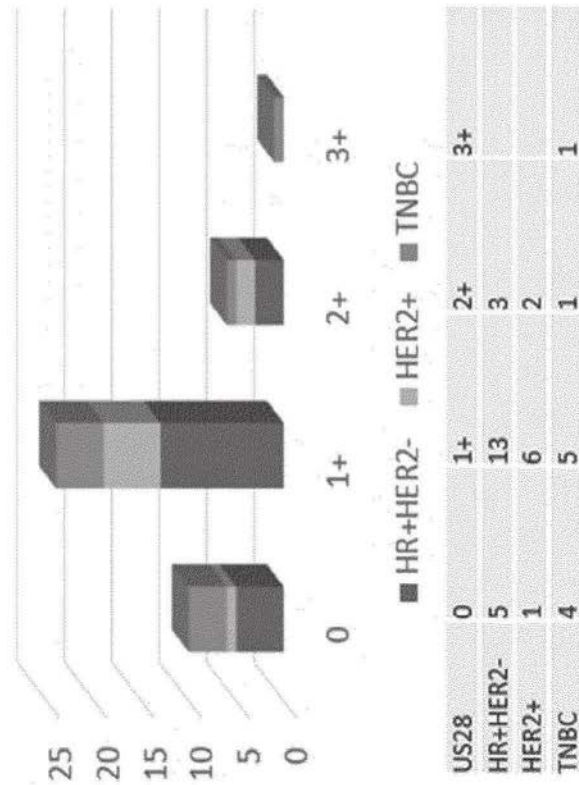


图16(续)

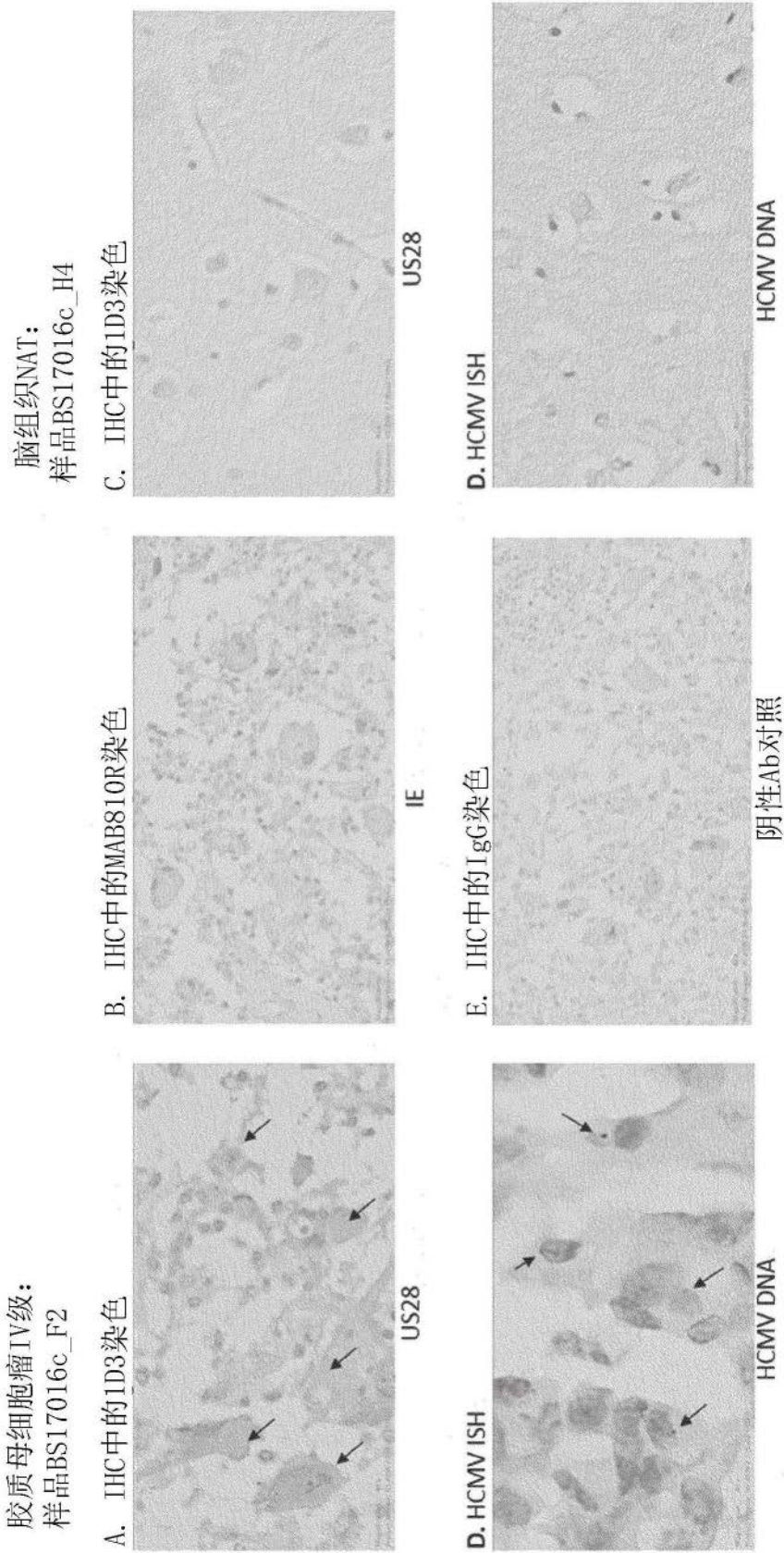


图17

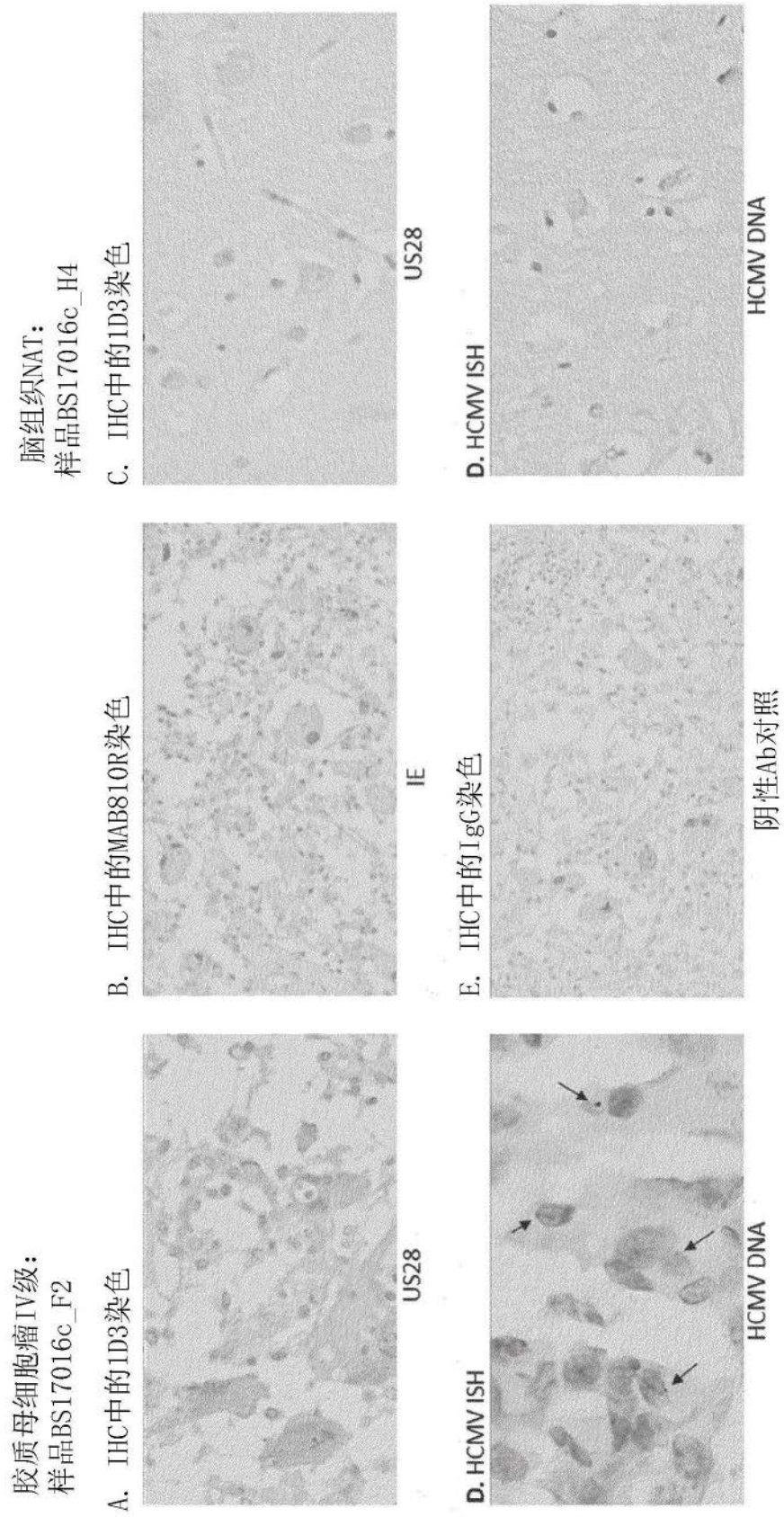


图17(续)：彩色

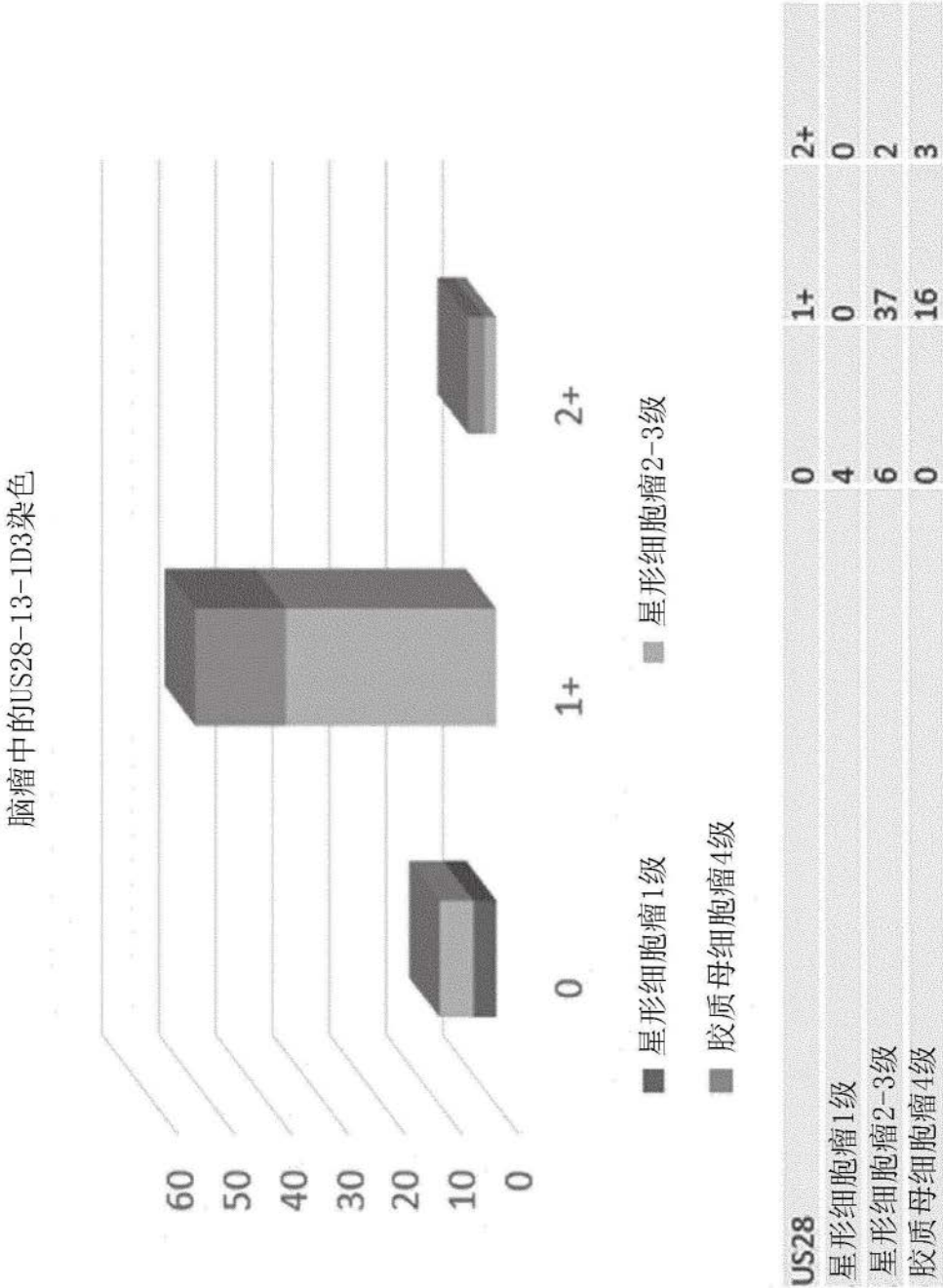
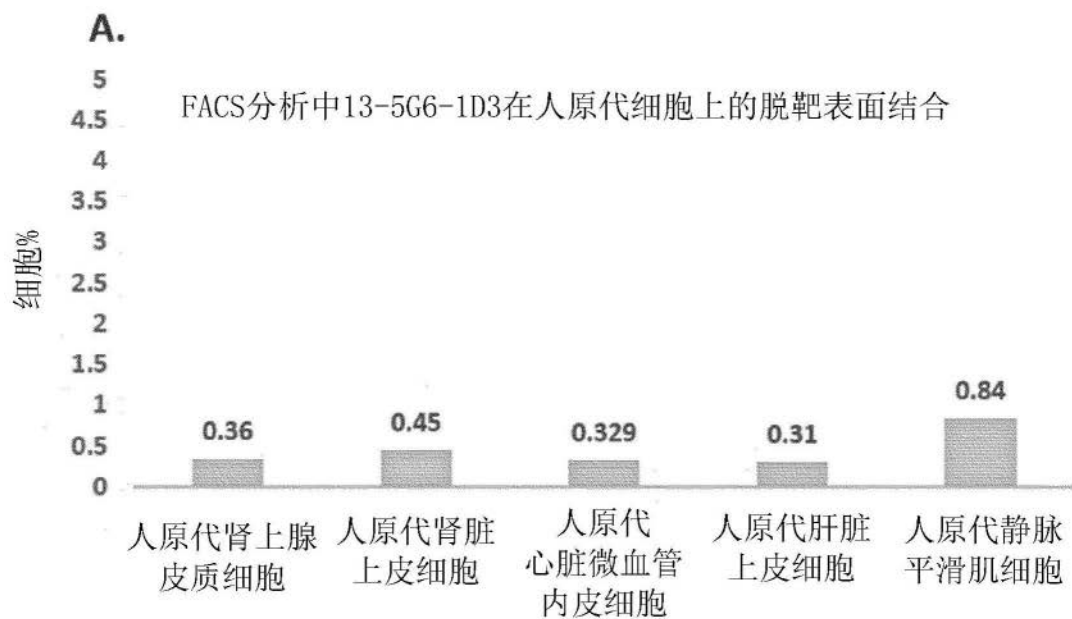


图18



B.

IHC分析中13-5G6-1D3在人心脏组织活体组织切片上的脱靶结合

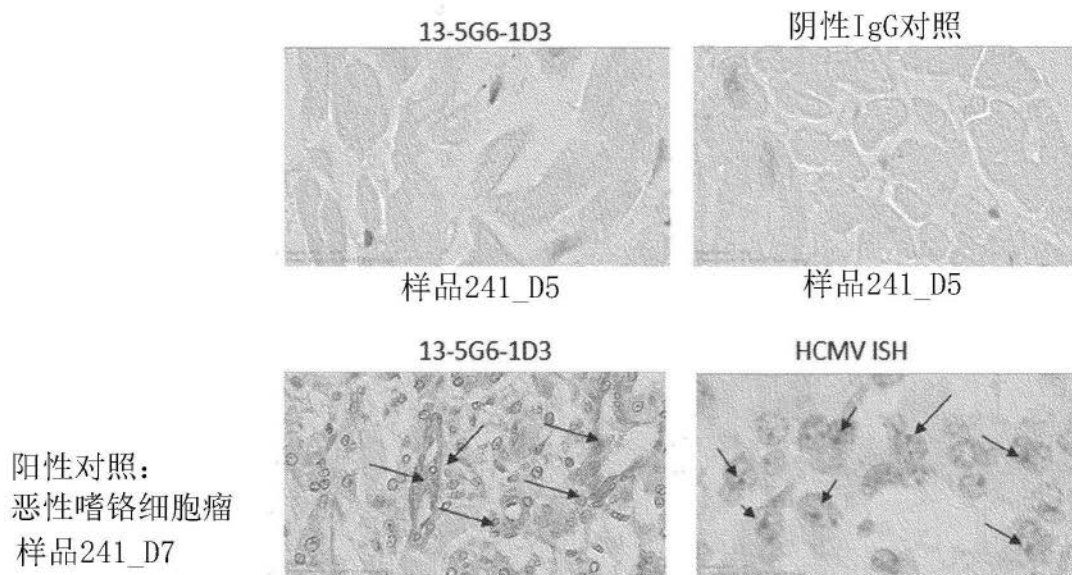


图19

B.

IHC分析中13-5G6-1D3在人心脏
组织活体组织切片上的脱靶结合

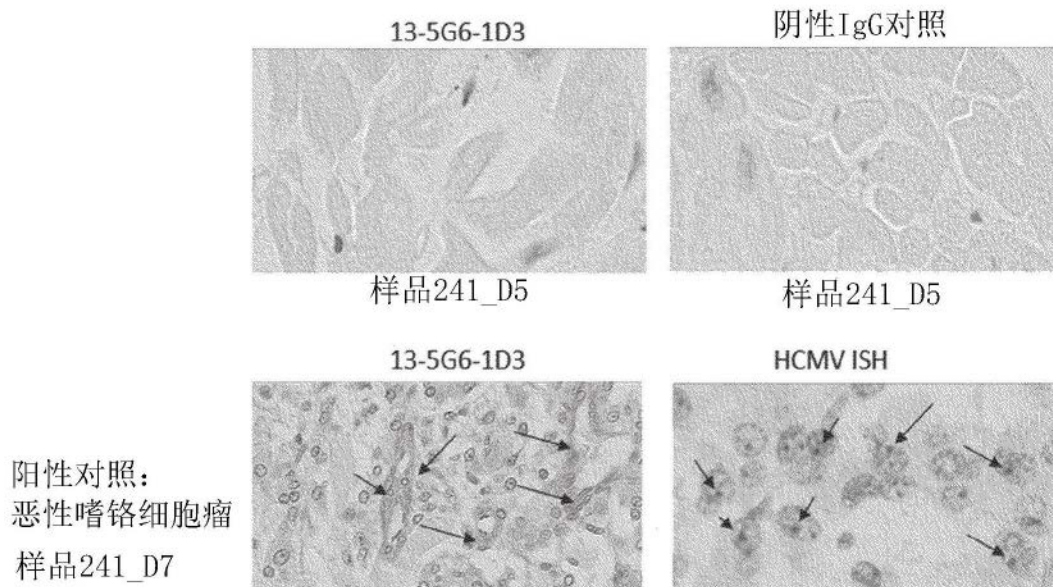
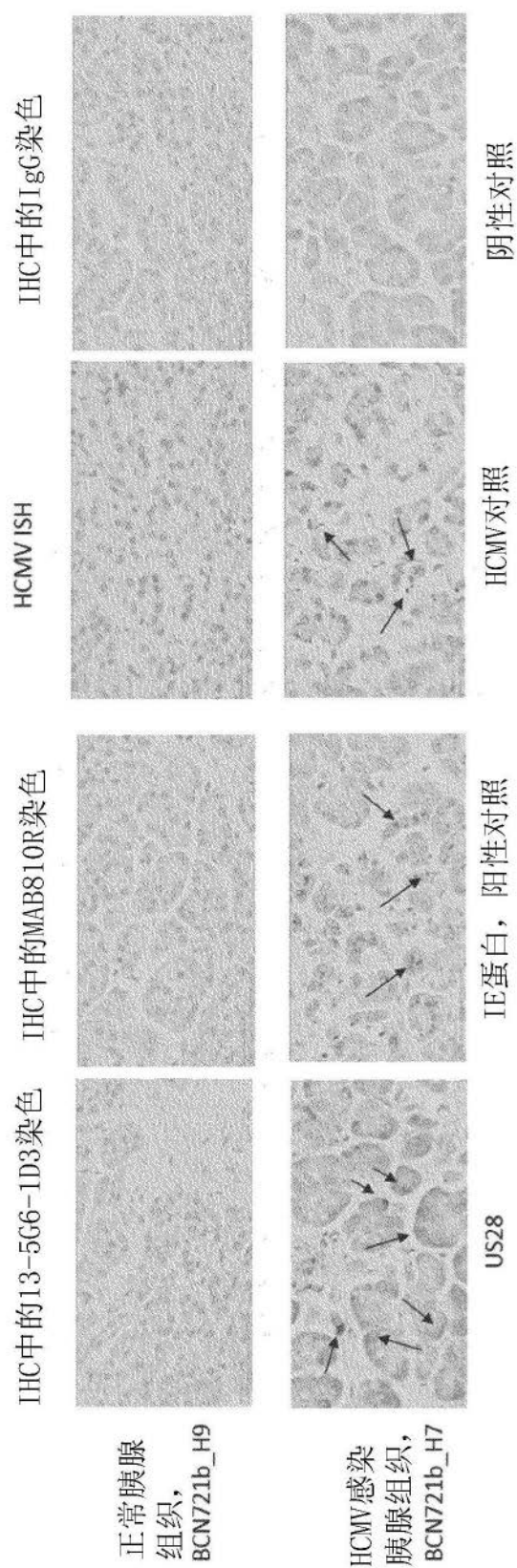


图19(续)：彩色



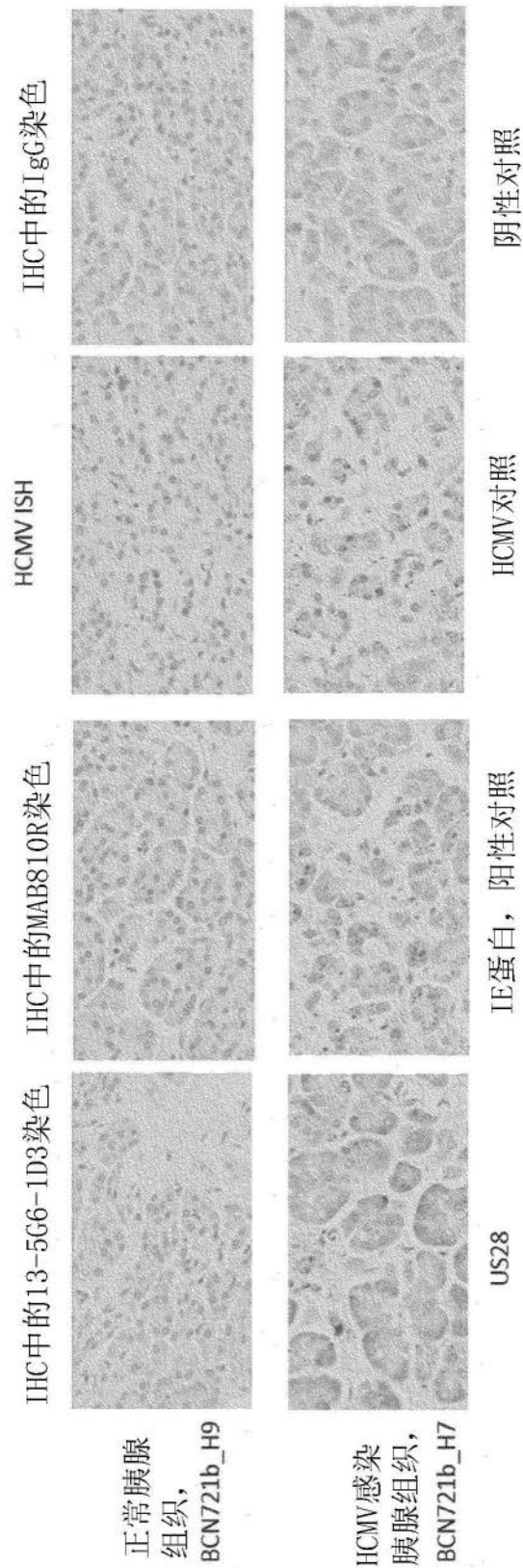


图20(续);彩色

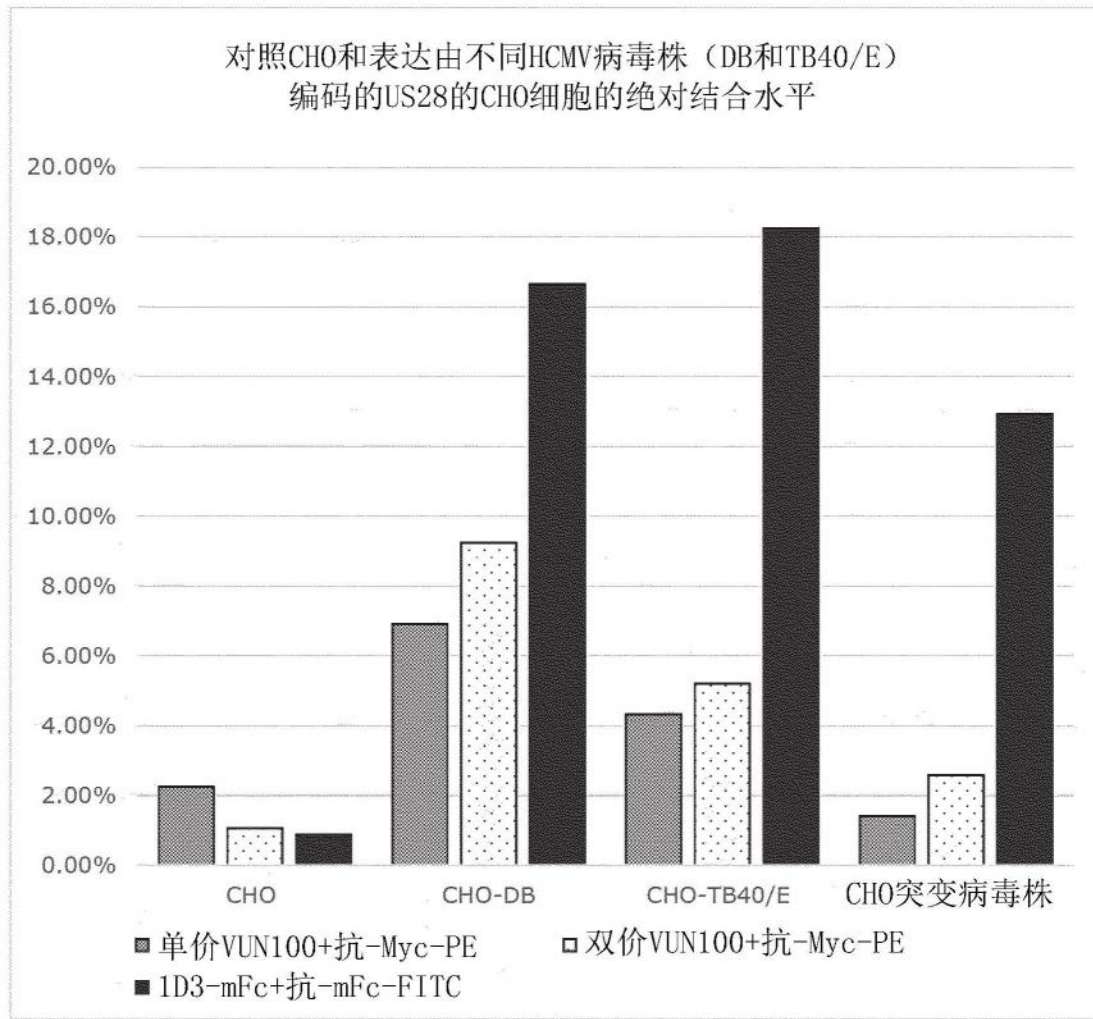
A.

图21

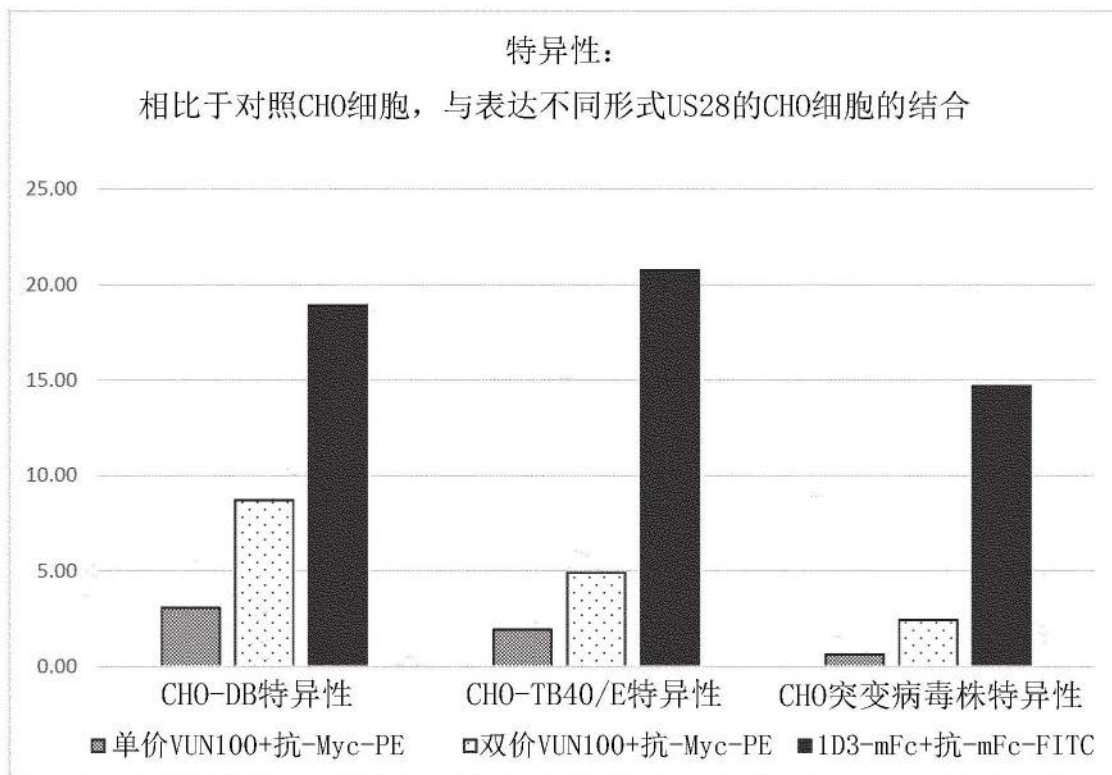
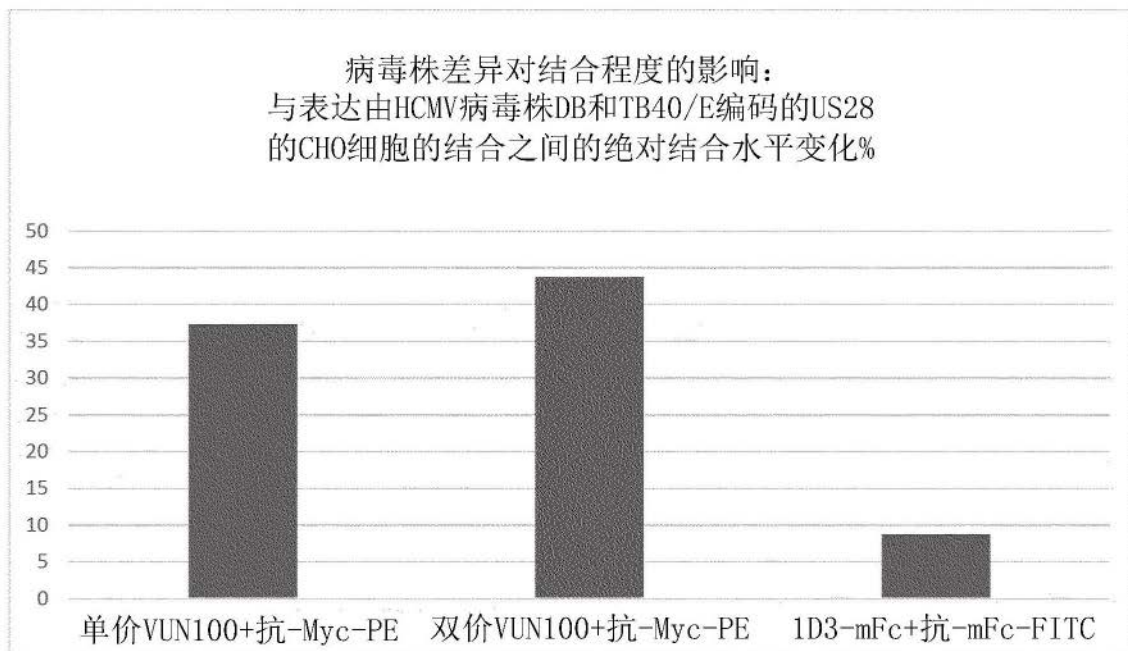
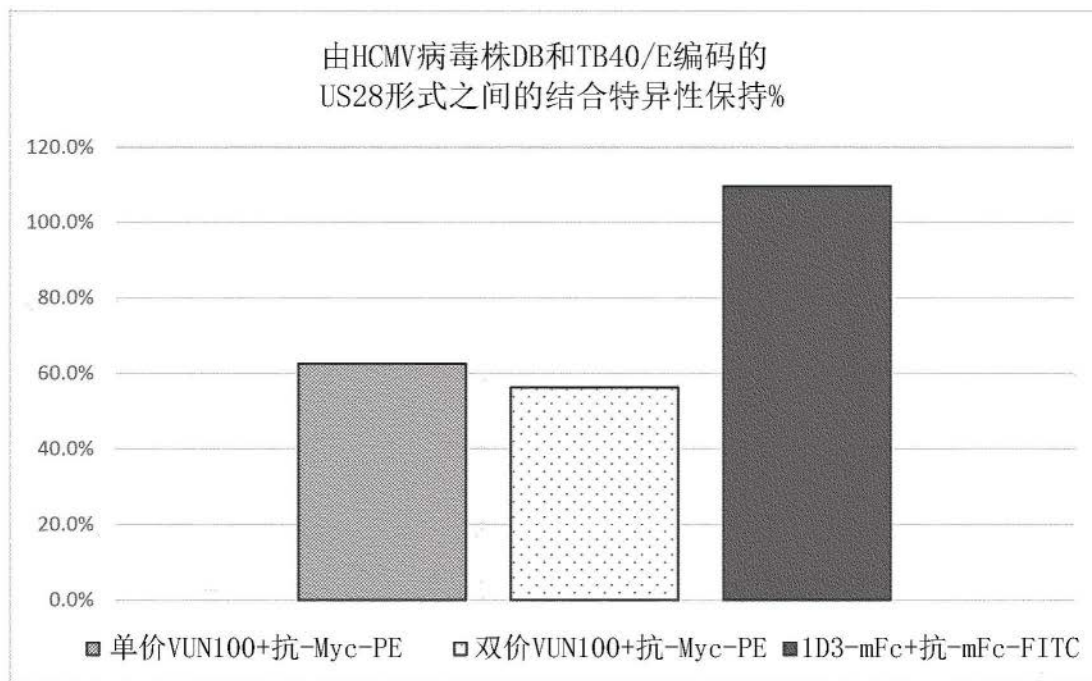
B.**C.**

图21(续)

D.



E.

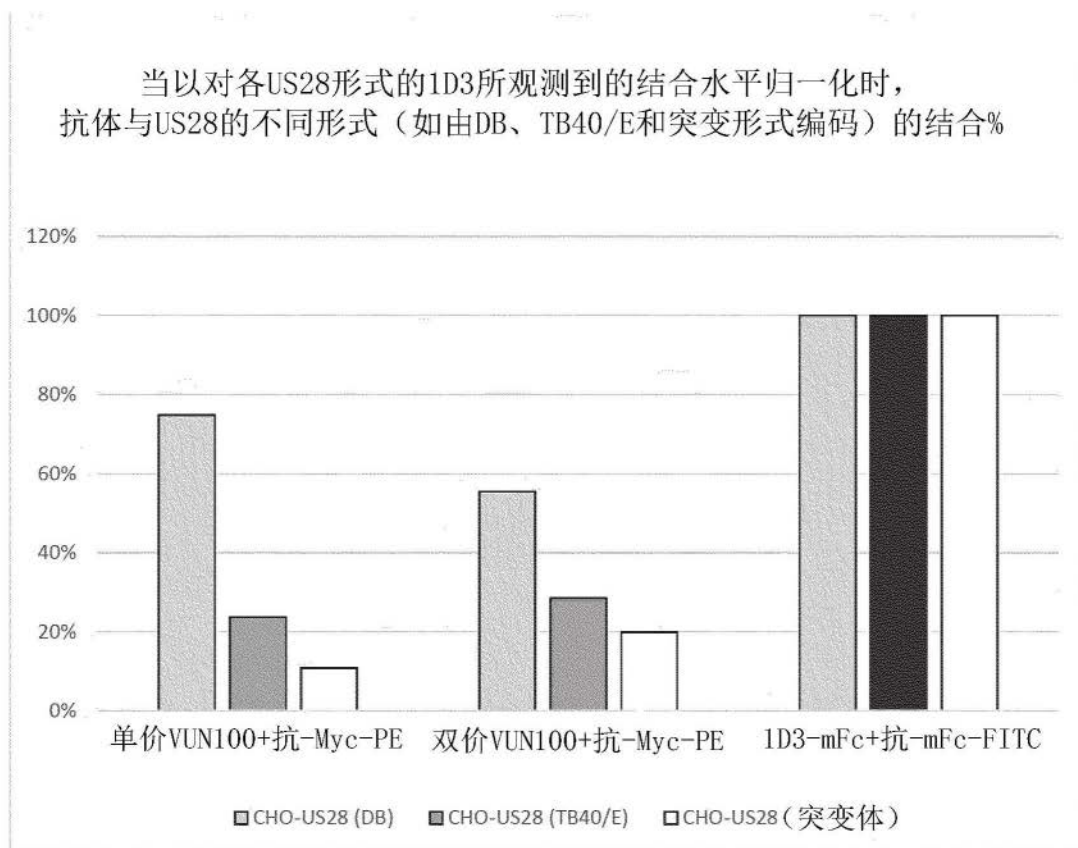


图21(续)

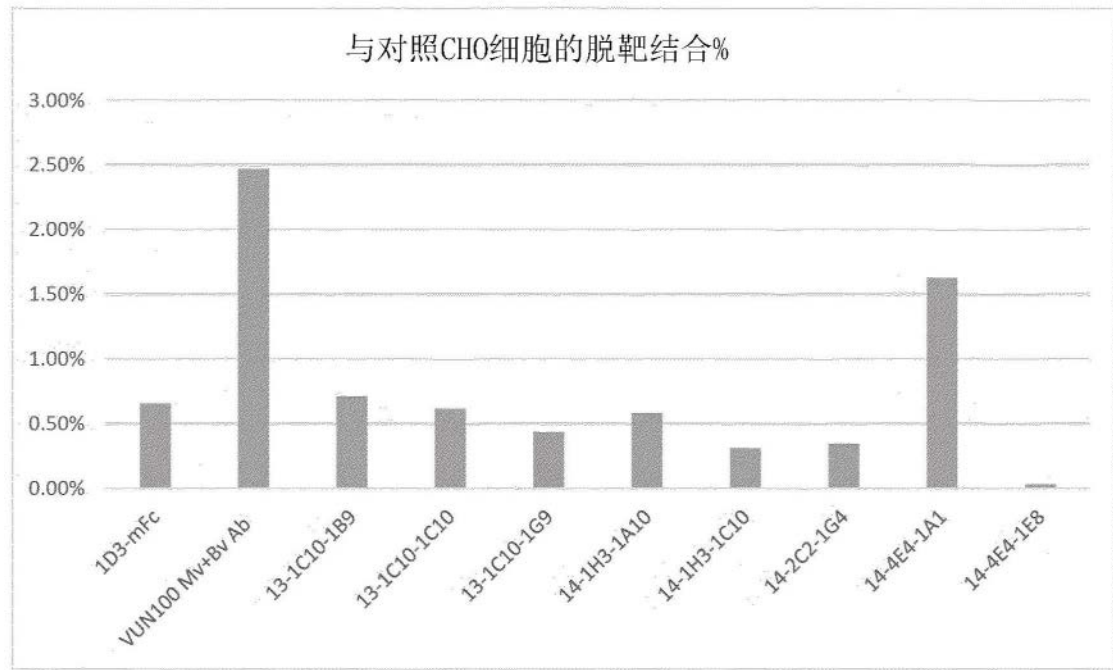


图22

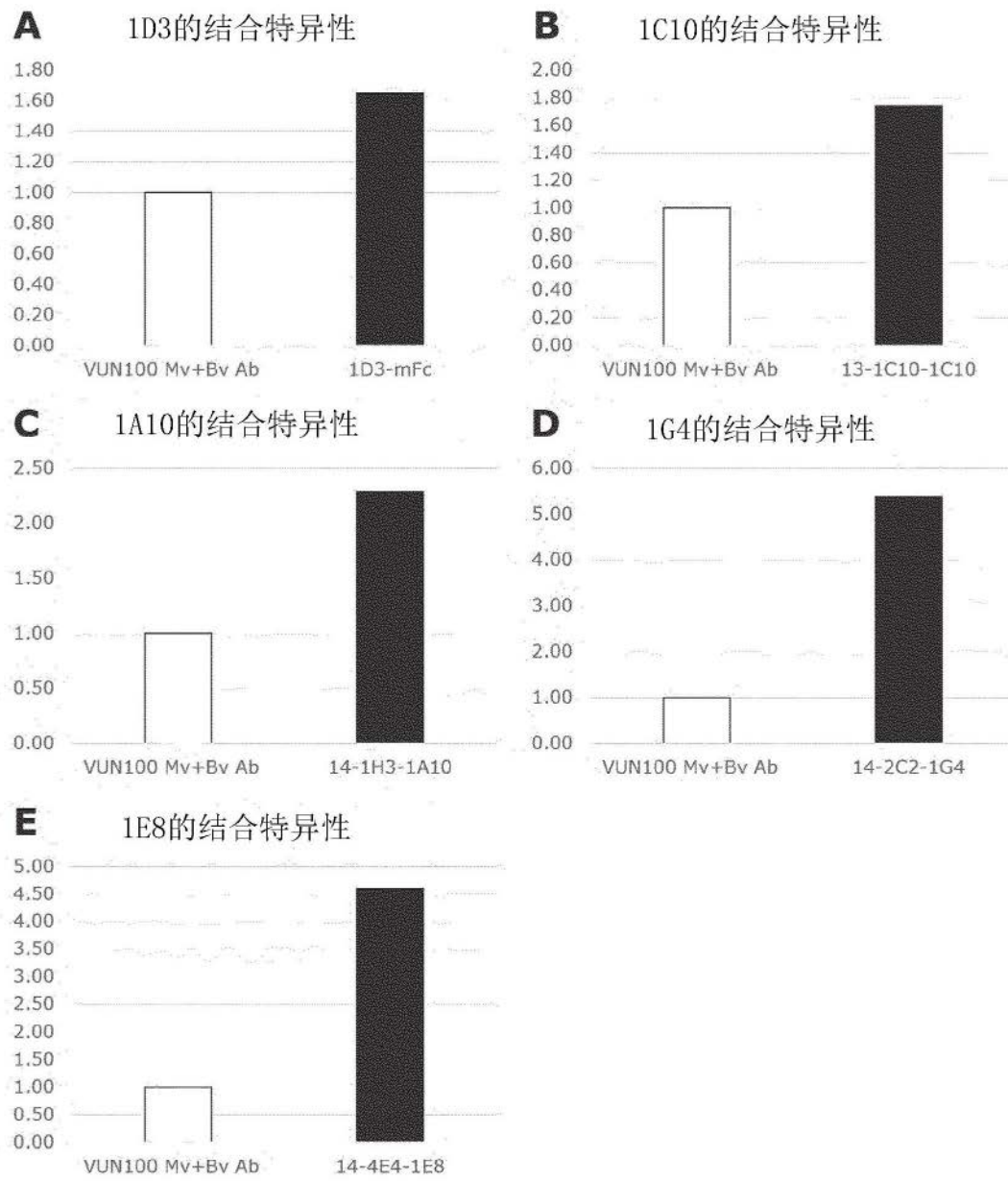


图23