(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 116472060 A
(43)申请公布日 2023.07.21

(21)申请号 202180071121.3
(22)申请日 2021.09.02
(30)优先权数据
20194018.6 2020.09.02 EP
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.04.18
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2021/074314 2021.09.02
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/049220 EN 2022.03.10
(71)申请人 健玛保
地址 丹麦哥本哈根
(72)发明人 H·贝诺尼松 J·米德尔伯格
T·范霍尔 I·阿尔廷塔斯
K·肯珀 J·舒尔曼
K·A·洛伊德
V·奥夫辛尼科夫斯 G·左恩
(74)专利代理机构 北京市柳沈律师事务所 11105
专利代理师 张文辉
(51)Int.Cl.
A61K 39/395(2006.01)
A61K 39/12(2006.01)
A61K 39/02(2006.01)
A61K 39/215(2006.01)
A61K 39/155(2006.01)
A61K 39/39(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61K 35/17(2015.01)
A61K 38/20(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 31/12(2006.01)
A61P 31/04(2006.01)
A61P 31/14(2006.01)
A61P 31/16(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)

权利要求书15页 说明书64页
序列表25页 附图26页

(54)发明名称

抗体疗法

(57)摘要

本发明涉及肿瘤学领域内的联合疗法;特别是疫苗与结合CD3和肿瘤细胞上的靶抗原的结合剂的联合疗法。



CN 116472060 A

1.一种用于在有此需要的受试者中预防或减少肿瘤生长或者治疗癌症的方法,其包括向所述受试者提供:

i)结合剂,所述结合剂包含结合CD3如人CD3的抗原结合区,以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶抗原的抗原结合区;以及

ii)免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包含至少一种疫苗抗原。

2.根据权利要求1所述的方法,其中所述疫苗抗原为非肿瘤特异性疫苗抗原。

3.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述免疫原性组合物为疫苗,如预防性疫苗或治疗性疫苗。

4.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述免疫原性组合物是针对感染性疾病;例如病毒或细菌感染的疫苗。

5.根据权利要求4所述的方法,其中所述感染性疾病或感染选自下组:霍乱(霍乱弧菌;例如WC/rBS)、白喉(白喉棒状杆菌)、b型流感嗜血杆菌(Hib)、甲型肝炎、乙型肝炎、人乳头瘤病毒、流感、冠状病毒、脑炎、麻疹、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎(LCM)(淋巴细胞性脉络丛脑膜炎哺乳动物沙粒病毒(LCMV))、脑膜炎球菌疾病(脑膜炎奈瑟氏球菌)、腮腺炎、百日咳/白日咳(百日咳博德特氏菌)、肺炎球菌疾病/感染(肺炎链球菌)、脊髓灰质炎(小儿麻痹症)、狂犬病、轮状病毒感染、风疹/德国麻疹、破伤风(破伤风梭菌)、天花、伤寒(伤寒沙门氏菌)、水痘/禽痘、黄热病、结核病、斑块(鼠疫耶尔森氏菌)、蝙蝠丽沙病毒、日本脑炎、Q热病(贝氏柯克斯体)、水痘带状疱疹(禽痘)、炭疽(炭疽芽孢杆菌)。

6.根据权利要求4所述的方法,其中所述感染是冠状病毒感染,如严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)感染。

7.根据权利要求4或5所述的方法,其中所述感染性疾病是冠状病毒疾病2019(COVID-19)。

8.根据权利要求4所述的方法,其中所述感染是流感感染。

9.根据权利要求4或8所述的方法,其中所述感染性疾病是流感。

10.根据权利要求4所述的方法,其中所述感染是淋巴细胞性脉络丛脑膜炎哺乳动物沙粒病毒(LCMV)感染。

11.根据权利要求4或10所述的方法,其中所述感染性疾病是淋巴细胞性脉络丛脑膜炎(LCM)。

12.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述免疫原性组合物选自下组:

活疫苗,如减毒活疫苗,

灭活疫苗,

裂解疫苗,如裂解病毒疫苗,

基于病毒样颗粒的疫苗,

级分疫苗,如亚单位疫苗、基于蛋白质的疫苗、基于肽的疫苗、基于多糖的疫苗、或缀合疫苗,

重组疫苗;以及

基于核酸的疫苗,如基于病毒载体的疫苗。

13.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述免疫原性组合物是活疫苗,例如减毒活疫苗;如

病毒减毒活疫苗;例如麻疹减毒活疫苗、腮腺炎减毒活疫苗、风疹减毒活疫苗、流感减毒活疫苗、禽痘/水痘带状疱疹减毒活疫苗、减毒活牛痘(天花)疫苗、口服小儿麻痹减毒活疫苗(OPV)(Sabin)、轮状病毒减毒活疫苗或黄热病减毒活疫苗;

或如

细菌减毒活疫苗;例如BCG疫苗、针对伤寒沙门氏菌的减毒活疫苗(Ty21)(口服伤寒疫苗或流行性斑疹伤寒疫苗)、霍乱减毒活疫苗。

14.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述免疫原性组合物是灭活疫苗;如

灭活病毒疫苗;例如脊髓灰质炎病毒灭活疫苗(IPV)(Salk疫苗)、流感灭活疫苗、狂犬病灭活疫苗、日本脑炎灭活疫苗或甲型肝炎灭活疫苗;

或如

灭活细菌疫苗,例如灭活伤寒疫苗、灭活霍乱疫苗、灭活鼠疫疫苗、灭活Q热疫苗、灭活炭疽疫苗或灭活百日咳疫苗。

15.根据权利要求12所述的方法,其中所述级分疫苗是选自下组的基于蛋白质的疫苗:

类毒素疫苗,例如包含破伤风类毒素或白喉类毒素的疫苗;

亚单位疫苗;以及

亚病毒粒子疫苗。

16.根据权利要求12或15所述的方法,其中所述级分疫苗是基于多糖的疫苗;例如基于多糖的脑膜炎球菌疾病(脑膜炎奈瑟氏球菌(A,C,Y.W135))疫苗、基于多糖的伤寒沙门氏菌疫苗或基于多糖的肺炎球菌疾病(肺炎链球菌)疫苗。

17.根据权利要求12、15和16中任一项所述的方法,其中所述级分疫苗是包含与多肽连接的多糖的缀合疫苗;例如缀合的b型流感嗜血杆菌(Hib)疫苗、缀合的肺炎链球菌疫苗、缀合的脑膜炎奈瑟氏球菌疫苗。

18.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述免疫原性组合物是重组疫苗。

19.根据权利要求1-12中任一项所述的方法,其中所述免疫原性组合物是选自下组的疫苗:BCG;霍乱:灭活口服;登革热四价(活,减毒);白喉-破伤风;白喉-破伤风(减少的抗原含量);白喉-破伤风-百日咳(无细胞)(DTaP/Tdap);白喉、破伤风、无细胞百日咳和b型流感嗜血杆菌(DTaP-Hib);白喉-破伤风-百日咳(无细胞)-乙型肝炎-b型流感嗜血杆菌-小儿麻痹(灭活);白喉-破伤风-百日咳(全细胞)(DTP);白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-b型流感嗜血杆菌(DTP-Hib);白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙型肝炎;白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙型肝炎-b型流感嗜血杆菌;埃博拉-扎伊尔(rVSVΔG-ZEBOV-GP,活减毒);b型流感嗜血杆菌(Hib);甲型肝炎(人二倍体细胞),灭活(成人用);甲型肝炎(人二倍体细胞),灭活(儿科用);乙型肝炎、乙型肝炎(儿科用);人乳头瘤病毒(二价);人乳头瘤病毒(九价);人乳头瘤病毒(四价);流感,大流行H1N1;流感,季节性(四价);流感,季节性(三价);日本脑炎疫苗(灭活);日本脑炎疫苗(活,减毒);麻疹;麻疹和风疹;麻疹、腮腺炎和风疹(MMR);麻疹、腮腺炎、风疹和水痘(MMRV),麻疹、腮腺炎和风疹(MMR);脑膜炎球菌A缀合物10μg;脑膜炎球菌A缀合物5μg;脑膜炎球菌ACYW-135(缀合物疫苗);肺炎球菌(缀合物);小儿麻痹疫苗-灭活(IPV);小儿麻痹疫苗-口服(OPV)二价1和3型;小儿麻痹疫苗-口服(OPV)单价1型;小儿麻痹疫苗-口服(OPV)三价;狂犬病;轮状病毒;轮状病毒(活,减毒);风疹;破伤风类毒素;伤寒(缀合物);伤寒(多糖);水痘;黄热病,卡介苗(BCG)。

20.根据权利要求19所述的方法,其中所述免疫原性组合物是COVID-19疫苗。

21.根据权利要求19或20所述的方法,其中所述COVID-19疫苗选自下组:BNT162b2/COMIRNATY(Tozinameran)(Pfizer BioNTech)、CVnCoV/CV07050101(Zorecimeran)(CureVac)、AZD1222 Vaxzevria(AstraZeneca)、mRNA-1273(Moderna)、SARS-CoV-2疫苗(Vero细胞)、灭活(lnCoV)(Sinopharm/Beijing Institute of Biological Products Co.,Ltd.(BIBP))、CoV2 preS dTM-AS03疫苗(Sanofi)和Covishield(ChAdOx1_nCoV-19)(Serum Institute of India Pvt.Ltd)、Sputnik V(rAd26和rAd5)(Acellena)、Sputnik Light(rAd26)(Acellena)、Ad26.COV2.S(JNJ78436735)(Janssen)、CoronaVav(Sinovac)、BBIBP-CorV(Beijing Institute of Biological Products;China National Pharmaceutical Group(Sinopharm))、EpiVacCorona(Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology)、Convidicea(CanSino Biologics)和MVC-COV1901(Medigen Vaccine Biologics Corp.;Dynavax)。

22.根据权利要求19所述的方法,其中所述免疫原性组合物是流感疫苗。

23.根据权利要求19或22所述的方法,其中所述免疫原性组合物是选自下组的类型的流感疫苗:流感大流行(H1N1)、季节性流感(三价)和季节性流感(四价)。

24.根据权利要求19所述的方法,其中所述感染性疾病为淋巴细胞性脉络丛脑膜炎(LCM)疫苗。

25.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述免疫原性组合物是儿科疫苗或儿童疫苗。

26.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述免疫原性组合物是儿童加强疫苗。

27.根据权利要求1或3所述的方法,其中所述免疫原性组合物是癌症疫苗,如预防性或治疗性癌症疫苗。

28.根据权利要求1、3和27中任一项所述的方法,其中所述疫苗抗原是肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原。

29.根据权利要求1、3、27和28中任一项所述的方法,其中所述免疫原性组合物包含由所述肿瘤或癌症表达的疫苗抗原。

30.根据权利要求1、3和27-29中任一项所述的方法,其中所述靶抗原和所述疫苗抗原均由所述肿瘤或癌症表达。

31.根据权利要求1、3和27-30中任一项所述的方法,其中所述结合剂和所述免疫原性组合物针对或者靶向相同的肿瘤或癌症。

32.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述疫苗抗原和所述靶抗原是相同的,或者所述疫苗抗原是所述靶抗原的一部分、子序列或变体。

33.根据权利要求1、3和27-32中任一项所述的方法,其中所述免疫原性组合物包含选自下组的疫苗抗原:由所述肿瘤过表达的抗原,如Her2/neu、生存素或Muc-1;癌症新抗原,如p53新抗原;癌睾丸抗原,如MAGE-A3、MAGE-A2、MAGE-A4、PRAME、CT83、SSX2或NY-ESO-1;分化抗原,如Mart1、PSA或PAP,以及病毒相关抗原,如HPV抗原。

34.根据权利要求1、3和27-32中任一项所述的方法,其中所述免疫原性组合物是个性化癌症疫苗,并且所述疫苗抗原是对所述受试者的肿瘤特异性的新抗原。

35.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述疫苗抗原包含T细胞表位。

36.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述免疫原性组合物能够在体内和/或体外引发细胞毒性T细胞反应。

37.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述疫苗能够引发T细胞反应,所述T细胞反应包含T细胞活化和/或所述肿瘤或癌症的T细胞浸润。

38.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述免疫原性组合物能够i)引发T细胞反应,所述T细胞反应包含所述肿瘤或癌症的T细胞浸润以及肿瘤浸润性T细胞的活化;并且/或者ii)引发肿瘤中的免疫细胞的浸润和/或扩增,如自然杀伤(NK)细胞和/或树突状细胞(DC)的浸润和/或扩增。

39.根据权利要求37或38所述的方法,其中在携带表达与所述结合剂的第2结合区结合的抗原的肿瘤的小鼠中,使用程序对T细胞浸润和/或活化进行测定,在所述程序中使所述小鼠经受肿瘤特异性T细胞转移并然后皮下注射所述免疫原性组合物并随后注射所述结合剂。

40.根据权利要求37-39中任一项所述的方法,其中浸润和/或活化在包括以下步骤的程序中进行测定:

i)提供T细胞,所述T细胞表达能够与所述结合剂结合的抗原,并且组成性表达能够产生第1生物发光的第1氧化酶以及能够产生第2生物发光的第2氧化酶,其中所述第2氧化酶的表达由T细胞活化诱导,如通过活化T细胞核因子(NFAT)诱导,

ii)向携带表达能够与所述结合剂的所述肿瘤靶向结合区结合的抗原的肿瘤的小鼠如白化C57BL/6小鼠,经静脉内注射在尾静脉中注射i)中定义的所述T细胞,

iii)在ii)中的所述T细胞注射后1和8天,在尾基部经皮下注射向所述小鼠给药两剂的所述免疫原性组合物,

iv)在ii)中的所述T细胞注射后10天和14天,经静脉内注射或输注向所述小鼠给药两剂的所述结合剂,

v)向所述小鼠注射所述氧化酶中每者的底物,并且测量所述第1和第2生物发光。

41.根据权利要求37-39中任一项所述的方法,其中T细胞浸润和/或活化是使用基本上如本文的实施例5中所示的程序,或者使用实施例5中所示的程序来测定的。

42.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法包括确定所述受试者中的现有T细胞免疫;如来自先前的疫苗接种或感染的现有T细胞免疫。

43.根据权利要求42所述的方法,其中现有T细胞免疫是通过测量外周T细胞活化来确定的。

44.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法包括确定所述受试者先前是否参与疫苗接种规划,如儿童疫苗接种规划。

45.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述免疫原性组合物是针对感染或感染性疾病的疫苗,针对所述感染或感染性疾病,所述受试者先前已经并且/或者已经发展出T细胞免疫反应;如前述权利要求中任一项所定义的感染或感染性疾病或感染。

46.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述方法还包括给药佐剂。

47.根据权利要求46所述的方法,其中所述佐剂是Th1/Th2佐剂、Th1佐剂或Th2佐剂;优选地Th1佐剂。

48.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述免疫原性组合物在与所述佐剂一起给药时能够引发Th1/Th2型免疫反应、Th1型免疫反应或Th2型免疫反应；优选地Th1型免疫反应。

49.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述免疫原性组合物包含佐剂。

50.根据权利要求49所述的方法，其中包含所述佐剂的所述免疫原性组合物能够引发NK细胞反应和/或Th1/Th2型免疫反应、Th1型免疫反应、或Th2型免疫反应；优选地Th1型免疫反应。

51.根据权利要求46-50中任一项所述的方法，其中所述佐剂包含铝盐；例如明矾(XAl$(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$；其中X为单价阳离子，如K^+或NH_4^+)。

52.根据权利要求46-50中任一项所述的方法，其中所述佐剂是基于乳液的佐剂，如水包油型乳液。

53.根据权利要求46-50和52中任一项所述的方法，其中所述佐剂选自下组：

a)包含角鲨烯、聚山梨醇酯80和脱水山梨醇三油酸酯的佐剂；例如MF59，

b)包含角鲨烯、聚山梨醇酯80和α-生育酚的佐剂；例如AS03，

c)包含角鲨烯、聚氧乙烯、十六十八烷基醚、甘露糖醇和脱水山梨醇油酸酯的佐剂；例如AF03，

d)包含3-O-去酰基-4'-单磷酰脂质A(MPL)、皂树级分21(QS-21)和脂质体的佐剂；例如AS01；以及

e)包含3-O-去酰基-4'-单磷酰脂质A(MPL)和氢氧化铝的佐剂；例如AS04。

54.根据权利要求46或49所述的方法，其中所述佐剂包含Toll样受体7(TLR7)激动剂，如选自咪喹莫特(Aldara)、瑞喹莫德和嘎德莫特的TLR7激动剂。

55.根据权利要求46或49所述的方法，其中所述佐剂包含：

i)Toll样受体9(TLR9)激动剂，如选自脑膜炎奈瑟氏球菌孔蛋白B(porB)、CpG寡脱氧核苷酸(ODN)和tilsotolimod的TLR9激动剂，

ii)Toll样受体4(TLR4)激动剂，如选自单磷酰脂质A(MPL)、吡喃葡萄糖基脂质A(GLA)和新赛普酊-3(neoseptin-3)的TLR4激动剂，

iii)Toll样受体5(TLR5)激动剂，如选自莫比朗(mobilan)、恩托莫德(entolimod)或重组鞭毛蛋白FlicC的TLR5激动剂；和/或

iv)Toll样受体3(TLR3)激动剂，如选自Poly-IC及其衍生物的TLR3激动剂。

56.根据权利要求1-49中任一项所述的方法，其中所述佐剂包含纳米粒子，如脂质纳米粒子(LPN)；例如引入有佐剂的脂质纳米粒子。

57.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述免疫原性组合物或所述佐剂包含细胞因子。

58.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述方法包括将所述免疫原性组合物与细胞因子联合给药。

59.根据权利要求57或58所述的方法，其中所述细胞因子是白介素-2(IL2)受体激动剂如IL2/阿地白介素或白介素-15。

60.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中通过肠胃外或全身给药，如通过注射或输注；例如通过静脉内注射或输注，将所述结合剂给药于所述受试者。

61.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述结合剂以一个或多个治疗周期提供给所述受试者。

62.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述结合剂每周一次(1Q1W)、每两周一次(1Q2W)、每三周一次(1Q3W)或每四周一次(1Q4W)给予。

63.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中将所述免疫原性组合物给药于所述受试者以实现局部效应/通过局部给药，如通过将霜剂施用到皮肤上。

64.根据权利要求1-62中任一项所述的方法，其中将所述免疫原性组合物给药以实现全身效应/通过全身给药，如通过口服给药、皮下注射、肌内注射、皮内注射或通过经粘膜途径。

65.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中将所述佐剂给药于所述受试者以实现局部效应/通过局部给药，如通过将霜剂施用到皮肤上。

66.根据权利要求46-64中任一项所述的方法，其中将所述佐剂给药以实现全身效应/通过全身给药，如通过口服给药、皮下注射、肌内注射、皮内注射或通过经粘膜途径。

67.根据权利要求58-66中任一项所述的方法，其中通过肠胃外或全身给药，如通过注射或输注；例如通过静脉内注射或输注，将所述细胞因子如白介素2受体激动剂给药于所述受试者。

68.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述免疫原性组合物以及任选地所述佐剂和/或所述细胞因子如白介素2受体激动剂作为所提供的治疗方案的一部分给药，以减少所述肿瘤的生长并且/或者治疗所述癌症。

69.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中将所述免疫原性组合物和所述结合剂的给药与过继性T细胞疗法联合。

70.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其包括向所述受试者给药多个T细胞。

71.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中与所述结合剂的给药同时或在同一天，与所述结合剂的第一剂的给药同时或在同一天，并且/或者作为用所述结合剂的第一治疗周期的一部分，将所述免疫原性组合物给药于所述受试者。

72.根据权利要求1-71中任一项所述的方法，其中所述免疫原性组合物的给药与所述结合剂的给药，如所述免疫原性组合物的给药与所述结合剂的第一剂的给药和/或用所述结合剂的第一治疗周期的起始相隔至多2个月、如至多1个月、至多4周、至多3周、至多2周、至多1周、至多6天、至多5天、至多4天、至多3天或至多2天的时间段。

73.根据权利要求1-71中任一项所述的方法，其中所述免疫原性组合物的给药与所述结合剂的给药，如所述免疫原性组合物的给药与所述结合剂的第一剂的给药和/或用所述结合剂的第一治疗周期的起始相隔2天至2个月、如2天至1个月、2天至4周、2天至3周、2天至2周、2天至1周、3天至2个月、3天至1个月、3天至4周、3天至3周、3天至2周、3天至1周、4天至2个月、4天至1个月、4天至4周、4天至3周、4天至2周、4天至1周、5天至2个月、5天至1个月、5天至4周、5天至3周、5天至2周、5天至1周、6天至2个月、如6天至1个月、6天至4周、6天至3周、6天至2周、1周至2个月、1周至1个月、1至4周、1至3周、1至2周、3周至2个月、3周至1个月或3至4周的时间段。

74.根据权利要求1-71中任一项所述的方法，其中在所述结合剂的给药之前、在所述结合剂的第一剂的给药之前，并且/或者在所述结合剂的第一治疗周期之前，将所述免疫原性

组合物给药于所述受试者。

75.根据权利要求1-71和74中任一项所述的方法，其中在所述结合剂的给药之前、在所述结合剂的第一剂的给药之前，并且/或者在所述结合剂的第一治疗周期之前2天至2个月；如在所述结合剂的给药之前、在所述结合剂的第一剂的给药之前，并且/或者在所述结合剂的第一治疗周期之前2天至1个月、2天至4周、2天至3周、2天至2周、2天至1周、3天至2个月、3天至1个月、3天至4周、3天至3周、3天至2周、3天至1周、4天至2个月、4天至1个月、4天至4周、4天至3周、4天至2周、4天至1周、5天至2个月、5天至1个月、5天至4周、5天至3周、5天至2周、5天至1周、6天至2个月、6天至1个月、6天至4周、6天至3周、6天至2周、1周至2个月、1周至1个月、1至4周、1至3周、1至2周、3周至2个月、3周至1个月，或如3至4周，将所述免疫原性组合物给药于所述受试者。

76.根据权利要求65-75中任一项所述的方法，其中与所述结合剂的给药同时或在同一天，与所述结合剂的第一剂的给药同时或在同一天，并且/或者作为用所述结合剂的第一治疗周期的一部分，将所述多个T细胞给药于所述受试者，或者将所述过继性T细胞疗法提供给所述受试者。

77.根据权利要求65-75中任一项所述的方法，其中在所述结合剂的给药之前、在所述结合剂的第一剂的给药之前，并且/或者在所述结合剂的第一治疗周期之前，将所述多个T细胞给药于所述受试者，或者将所述过继性T细胞疗法提供给所述受试者。

78.根据权利要求65-75中任一项所述的方法，其中

i)所述免疫原性组合物的给药以及所述多个T细胞的给药、或所述过继性T细胞疗法，与

ii)所述结合剂的给药，如所述结合剂的第一剂的给药，和/或用所述结合剂的第一治疗周期的起始，

相隔2天至2个月、如2天至1个月、2天至4周、2天至3周、2天至2周、2天至1周、3天至2个月、3天至1个月、3天至4周、3天至3周、3天至2周、3天至1周、4天至2个月、4天至1个月、4天至4周、4天至3周、4天至2周、4天至1周、5天至2个月、5天至1个月、5天至4周、5天至3周、5天至2周、5天至1周、6天至2个月、如6天至1个月、6天至4周、6天至3周、6天至2周、1周至2个月、1周至1个月、1至4周、1至3周、1至2周、3周至2个月、3周至1个月或3至4周的时间段。

79.根据权利要求65-75中任一项所述的方法，其中在所述结合剂的给药之前、在所述结合剂的第一剂的给药之前，并且/或者在用所述结合剂的第一治疗周期之前2天至2个月；如在所述结合剂的给药之前、在所述结合剂的第一剂的给药之前，并且/或者在所述结合剂的第一治疗周期之前2天至1个月、2天至4周、2天至3周、2天至2周、2天至1周、3天至2个月、3天至1个月、3天至4周、3天至3周、3天至2周、3天至1周、4天至2个月、4天至1个月、4天至4周、4天至3周、4天至2周、4天至1周、5天至2个月、5天至1个月、5天至4周、5天至3周、5天至2周、5天至1周、6天至2个月、6天至1个月、6天至4周、6天至3周、6天至2周、1周至2个月、1周至1个月、1至4周、1至3周、1至2周、3周至2个月、3周至1个月，或如3至4周，将所述免疫原性组合物以及所述多个T细胞的给药、或所述过继性T细胞疗法给药于所述受试者。

80.根据权利要求65-79中任一项所述的方法，其中所述结合剂、所述免疫原性组合物，以及任选地所述佐剂、所述多个T细胞以及白介素2各自以有效量提供给所述受试者。

81.根据权利要求1-66中任一项所述的方法，其中在给药所述免疫原性组合物之前将

所述结合剂的第一剂给药于所述受试者，并且/或者其中将所述免疫原性组合物作为所述结合剂的第二或后续治疗计划表的一部分给药。

82.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述方法包括确定所述受试者中是否存在对所述免疫原性组合物的T细胞特异性反应，并且/或者监测对所述免疫原性组合物的任何T细胞特异性反应，任选地包括监测所述受试者中对所述免疫原性组合物特异性的T细胞的扩增。

83.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述靶抗原是对所述肿瘤特异性的抗原。

84.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述靶抗原是由所述肿瘤或癌症的细胞过表达；如在与健康组织的细胞相比时过表达的抗原。

85.根据权利要求1-83中任一项所述的方法，其中所述靶抗原是仅由所述肿瘤或癌症的细胞表达的抗原，或者是在肿瘤微环境内的免疫抑制细胞(例如TAM、MDSC、Treg)上过表达的抗原。

86.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述靶抗原选自Her2、CD19、EpCAM、EGFR、CD66e(CEA，CEACAM5)、CD33、EphA2和MCSP(HMW-MAA)。

87.根据权利要求86所述的方法，其中结合所述靶抗原的所述抗原结合区选自下组：结合Her2/neu的赫塞汀的抗原结合区、结合CD19的博纳吐单抗的抗原结合区、结合EpCAM的卡妥索单抗的抗原结合区、结合EGFR的西妥昔单抗或帕尼单抗的抗原结合区，以及结合CD33的林妥珠单抗的抗原结合区。

88.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述肿瘤是实体瘤。

89.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述肿瘤或癌症选自下组：乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、卵巢癌、胃癌、结肠直肠癌、食管癌以及头颈部鳞状细胞癌、宫颈癌、胰腺癌、睾丸癌、恶性黑素瘤、软组织癌；例如滑膜肉瘤。

90.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述肿瘤选自下组：黑素瘤，以及腺癌(例如导管腺癌)。

91.根据权利要求1-87中任一项所述的方法，其中所述肿瘤是血液肿瘤。

92.根据权利要求91所述的方法，其中所述血液肿瘤选自下组：B细胞淋巴瘤，以及慢性淋巴性白血病或急性淋巴性白血病。

93.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述肿瘤没有任何免疫浸润物，如没有任何功能性免疫浸润物。

94.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述肿瘤的特征在于存在抑制性免疫细胞，如选自调节性T细胞(Treg)、髓源性抑制细胞(MDSC)和M2型巨噬细胞的免疫细胞。

95.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述结合CD3的抗原结合区结合人CD3ε(epsilon)，如SEQ ID NO:1中所指定的人CD3ε(epsilon)。

96.根据前述权利要求中任一项所述的方法，其中所述结合CD3的抗原结合区包含：

包含分别为SEQ ID NO.:2、3和4的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区(VH)；[野生型抗-CD3(SP34/人源化SP34，WO2015001085(Genmab))-VH CDR序列]；

以及任选地

包含分别为SEQ ID NO:6、GTN和7的CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区(VL)[野生型

抗-CD3,VL CDR序列]。

97.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合CD3的抗原结合区包含:

包含SEQ ID NO:57的序列、或与SEQ ID NO:5的序列[野生型抗-CD3-VH全长序列]具有至少90%、至少95%、至少97%、或至少99%氨基酸序列同一性的序列的重链可变区(VH);

以及任选地

包含SEQ ID NO:60的序列、或与SEQ ID NO:8的序列[野生型抗-CD3-VL全长序列]具有至少90%、至少95%、至少97%、或至少99%氨基酸序列同一性的序列的轻链可变区(VL)。

98.根据权利要求1-95中任一项所述的方法,其中所述结合剂比具有包含如SEQ ID NO:5中所示的VH序列以及如SEQ ID NO:8中所示的VL序列[野生型抗-CD3(人源化SP34,WO2015001085(Genmab))VH和VL序列]的抗原结合区的结合剂具有更低的人CD3ε结合亲和力,优选地其中所述亲和力低至少5倍,如低至少10倍,例如低至少20倍、低至少30倍、低至少40倍、低至少45倍或如低至少50倍。

99.根据前述权利要求1-96中任一项所述的方法,其中所述抗原结合区以200-1000nM范围内,如300-1000nM范围内、400-1000nM范围内、500-1000nM范围内、300-900nM范围内、400-900nM范围内、400-700nM范围内、500-900nM范围内、500-800nM范围内、500-700nM范围内、600-1000nM范围内、600-900nM范围内、600-800nM范围内、或如600-700nM范围内的平衡解离常数K_D结合CD3。

100.根据权利要求1-97中任一项所述的方法,其中所述抗原结合区以1-100nM范围内,如5-100nM范围内、10-100nM范围内、1-80nM范围内、1-60nM范围内、1-40nM范围内、1-20nM范围内、5-80nM范围内、5-60nM范围内、5-40nM范围内、5-20nM范围内、10-80nM范围内、10-60nM范围内、10-40nM范围内、或如10-20nM范围内的平衡解离常数K_D结合CD3。

101.根据权利要求1-95中任一项所述的方法,其中

所述结合CD3的抗原结合区包含含有CDR1序列、CDR2序列和CDR3序列的重链可变(VH)区,

所述重链可变(VH)区当与包含SEQ ID NO:5中所示的序列的重链可变(VH)区相比时在CDR序列之一中具有氨基酸置换,所述置换处于选自下组的位置:T31、N57、H101、G105、S110和Y114,所述位置根据SEQ ID NO:5的序列[VH_huCD3-H1L1]进行编号;并且

所述野生型轻链可变(VL)区包含分别在SEQ ID NO:6、GTN和SEQ ID NO:7中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列。

102.根据权利要求101所述的方法,其中所述结合CD3的抗原结合区的所述重链可变(VH)区的CDR1、CDR2和CDR3当与SEQ ID NO:5中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3相比时总共包含至多1、2、3、4或5个氨基酸置换。

103.根据权利要求101或102所述的方法,其中所述结合CD3的抗原结合区的所述重链可变(VH)区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列与所述野生型重链可变(VH)区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列具有至少95%序列同一性,如至少96%序列同一性、至少97%序列同一性、至少98%序列同一性或至少99%序列同一性,序列同一性基于对由所述结合CD的抗原结合区的所述重链可变(VH)区的CDR1、CDR2和CDR3的序列组成的氨基酸序列与包含所述野生型重链可变(VH)区的CDR1、CDR2和CDR3的序列的氨基酸序列进行比对来计算。

104.根据权利要求1-95和98-103中任一项所述的方法,其中所述结合CD3的抗原结合

区包含选自下组的突变:T31M、T31P、N57E、H101G、H101N、G105P、S110A、S110G、Y114M、Y114R、Y114V。

105.根据权利要求1-95和98-104中任一项所述的方法,其中所述能够结合CD3的抗原结合区包含:

a)包含分别具有如SEQ ID NO:9、3和4中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[VH CDR1-T31P+野生型VH CDR 2、3]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL),或者

b)包含分别具有如SEQ ID NO:11、3和4中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[VH CDR1-T31M+野生型VH CDR 2、3]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL),或者

c)包含分别具有如SEQ ID NO:2、13和4中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[VH CDR-N57E+野生型VH CDR1、3]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL),或者

d)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和15中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-H101G]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL),

e)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和17中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-H101N]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL);

f)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和19中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-G105P]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL);

g)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和21中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-S110A]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL),或者

h)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和23中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-S110G]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:658中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL),

i)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和25中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-Y114V]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、

3]的轻链可变区(VL),或者

j)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和27中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-Y114M]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL),或者

k)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和29中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR1、2+VH CDR3-Y114R]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL)。

106.根据权利要求1-83和86-93中任一项所述的方法,其中所述能够结合CD3的抗原结合区包含含有分别具有如SEQ ID NO:2、3和15中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-H101G]的重链可变区(VH),以及含有具有分别如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL)。

107.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述能够结合人CD3的抗原结合区包含选自下组的VH序列和VL序列:

a)如SEQ ID NO:10中所示的VH序列[VH T31P全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列[野生型全长序列],

b)如SEQ ID NO:12中所示的VH序列[VH T31M全长序列]和如SEQ IDNO:8中所示的VL序列,

c)如SEQ ID NO:14中所示的VH序列[VH N57E全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列,

d)如SEQ ID NO:16中所示的VH序列[VH H101G全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列,

e)如SEQ ID NO:18中所示的VH序列[VH H101N全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列,

f)如SEQ ID NO:20中所示的VH序列[VH G105P全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列,

g)如SEQ ID NO:22中所示的VH序列[VH S110A全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列,

h)如SEQ ID NO:24中所示的VH序列[VH S110G全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列,

i)如SEQ ID NO:26中所示的VH序列[VH Y114V全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列,

j)如SEQ ID NO:28中所示的VH序列[VH Y114M全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列;以及

k)如SEQ ID NO:30中所示的VH序列[VH Y114R全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列。

108.根据权利要求1-95和98-107中任一项所述的方法,其中所述能够结合人CD3的抗

原结合区包含如SEQ ID NO:10中所示的VH序列[VH H101G全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列。

109.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗体为选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型。

110.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂为全长抗体,如全长IgG1抗体。

111.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂为IgG1m(f)同种异型的抗体。

112.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂为多特异性抗体,如双特异性抗体。

113.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中每个抗原结合区包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),并且其中所述可变区各自包含三个CDR序列,分别为CDR1、CDR2和CDR3,以及四个框架序列,分别为FR1、FR2、FR3和FR4。

114.根据权利要求113所述的方法,其中所述结合剂包含两个重链恒定区(CH)和两个轻链恒定区(CL)。

115.根据权利要求113或114所述的方法,其中所述结合剂包含第一和第二重链,所述第一和第二重链各自至少包含铰链区、CH2和CH3区,其中在所述第一重链中,对应于人IgG1重链中的选自T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置的位置中的氨基酸的至少一个被置换,并且在所述第二重链中,对应于人IgG1重链中的选自T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置的位置中的至少一个氨基酸被置换,其中所述第一和所述第二重链的所述置换不处于相同的位置,并且其中所述氨基酸位置根据EU编号进行编号。

116.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含第一和第二重链,并且其中在所述第一重链中,对应于人IgG1重链中K409的位置的氨基酸是R,并且在所述第二重链中,对应于人IgG1重链中F405的位置的氨基酸是L,或反之亦然。

117.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含第一和第二重链,并且其中在所述第一和所述第二重链两者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置L234和L235的位置处的氨基酸残基分别为F和E。

118.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含第一和第二重链,并且其中在所述第一和所述第二重链两者中,对应于根据EU编号的人IgG1重链中的位置D265的位置处的氨基酸残基为A。

119.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含第一以及任选地第二重链,并且其中所述第一重链以及如果存在的话所述第二重链被修饰成使得相对于相同的未修饰抗体而言,所述抗体诱导Fc介导的效应子功能的程度更低。

120.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含kappa(κ)轻链。

121.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含lambda(λ)轻链。

122.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含含有所述结合CD3的结合区的重链和lambda(λ)轻链。

123.根据权利要求1-121中任一项所述的方法,其中所述结合剂包含含有所述结合CD3的结合区的重链和kappa(κ)轻链。

124.根据权利要求123所述的方法,其中所述kappa(κ)轻链包含选自下组的氨基酸序列:

a)SEQ ID NO:31中所示的序列,

b)a)中的所述序列的子序列,如其中从a)中定义的所述序列的N末端或C末端起始缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的子序列;以及

c)与a)或b)中定义的所述氨基酸序列相比具有至多5个置换,如至多个4置换、至多3个、至多2个或至多1个置换的序列。

125.根据权利要求122所述的方法,其中所述lambda(λ)轻链包含选自下组的氨基酸序列:

a)SEQ ID NO:32中所示的序列,

b)a)中的所述序列的子序列,如其中从a)中定义的所述序列的N末端或C末端起始缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的子序列;以及

c)与a)或b)中定义的所述氨基酸序列相比具有至多5个置换,如至多个4置换、至多3个、至多2个或至多1个置换的序列。

126.根据前述权利要求中任一项所述的方法,其中所述抗体包含第一和/或第二重链,并且所述第一和/或第二重链的所述恒定区包含选自下组的氨基酸序列或基本上由或由选自下组的氨基酸序列组成:

a)SEQ ID NO:33中所示的序列,

b)a)中的所述序列的子序列,如其中从a)中定义的所述序列的N末端或C末端起始缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的子序列;以及

c)与a)或b)中定义的所述氨基酸序列相比具有至多5个置换,如至多个4置换、至多3个、至多2个或至多1个置换的序列。

127.根据权利要求124-126中任一项所述的方法,其中所述至多5个置换包含选自L234F、L235E、D265A、F405L和K409R的一个或多个置换,如1、2、3或4个置换。

128.一种用于在有此需要的受试者中预防或减少肿瘤生长的方法,其包括:

向所述受试者提供包含至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物,由此增加所述肿瘤中的活细胞群内免疫细胞的相对量,以及任选地增加所述免疫细胞的活化;以及

向所述受试者提供结合剂,所述结合剂包含结合CD3如人CD3的抗原结合区,以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶抗原的抗原结合区。

129.根据权利要求128所述的方法,其中所述免疫细胞选自T细胞,如$CD8^+$T细胞、自然杀伤(NK)细胞以及自然杀伤T(NKT)细胞。

130.一种用于在有此需要的受试者中预防或减少肿瘤生长或者治疗癌症的方法,其包括向所述受试者提供:

i)编码结合剂的核酸构建体,所述结合剂包含结合CD3如人CD3的抗原结合区,以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶抗原的抗原结合区;以及

ii)免疫原性组合物,所述免疫原性组合物包含至少一种疫苗抗原。

131.根据权利要求130所述的方法,其中所述结合剂如权利要求1、83-115中任一项所定义。

132.根据权利要求130或131所述的方法,其中所述免疫原性组合物如权利要求1-45中

任一项所定义。

133.根据权利要求132-132中任一项所述的方法，其中所述结合剂进一步与细胞因子如白介素2受体激动剂，例如人白介素-2、人白介素-15或它们的类似物联合给药。

134.根据权利要求131-133中任一项所述的方法，其中所述结合剂进一步与佐剂如权利要求35-44中任一项所定义的佐剂联合给药。

135.一种结合剂，用于在受试者中预防或减少肿瘤长出或者治疗癌症的用途，所述结合剂包含结合CD3的结合区以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶标的结合区，其中所述用途包括将所述抗体与包含至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物联合提供给所述受试者。

136.根据权利要求135所述的用途的结合剂，其中所述结合剂如权利要求1、95-127中任一项所定义。

137.根据权利要求135或136所述的用途的结合剂，其中所述免疫原性组合物如权利要求1-45中任一项所定义。

138.根据权利要求135-136中任一项所述的用途的结合剂，其中所述结合剂进一步与细胞因子如白介素-2受体激动剂，例如人白介素-2、人白介素-15或它们的类似物联合给药。

139.根据权利要求135-136中任一项所述的用途的结合剂，其中所述结合剂进一步与佐剂如权利要求46-5544中任一项所定义的佐剂联合给药。

140.包含至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物，用于在受试者中预防或减少肿瘤长出或者治疗癌症的用途，其中所述免疫原性组合物与结合剂联合提供给所述受试者，所述结合剂包含结合CD3的结合区以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶标的结合区。

141.根据权利要求140所述的用途的免疫原性组合物，其中所述结合剂如权利要求1、95-127中任一项所定义。

142.根据权利要求140或141所述的用途的免疫原性组合物，其中所述免疫原性组合物如权利要求1-45中任一项所定义。

143.根据权利要求140-142中任一项所述的用途的免疫原性组合物，其中所述免疫原性组合物试剂进一步与细胞因子如白介素-2受体激动剂，例如人白介素-2、人白介素-15或它们的类似物联合给药。

144.根据权利要求140-143中任一项所述的用途的免疫原性组合物，其中所述免疫原性组合物进一步与佐剂如权利要求45-55中任一项所定义的佐剂、或用于基于基因的疗法；例如包含免疫原性核酸序列或脂质纳米粒子(LNP)的免疫原性组合物联合给药。

145.结合剂在制造用于治疗受试者的癌症的药物中的用途，所述结合剂包含结合CD3的结合区以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶标的结合区，其中所述治疗包括将所述结合剂与包含至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物联合提供给所述受试者。

146.根据权利要求145所述的结合剂的用途，其中所述结合剂如权利要求1、95-127中任一项所定义。

147.根据权利要求145或146所述的结合剂的用途，其中所述免疫原性组合物如权利要求1-45中任一项所定义。

148.根据权利要求145-146中任一项所述的结合剂的用途，其中所述结合剂进一步与细胞因子如白介素-2受体激动剂，例如人白介素-2、人白介素-15或它们的类似物联合给

药。

149.根据权利要求145-148中任一项所述的结合剂的用途，其中所述结合剂进一步与佐剂如权利要求45-55中任一项所定义的佐剂联合给药。

150.包含至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物在制造用于治疗受试者的癌症的药物中的用途，其中所述免疫原性组合物与包含结合CD3的结合区以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶标的结合区的结合剂联合提供给所述受试者。

151.根据权利要求150所述的用途的免疫原性组合物，其中所述结合剂如权利要求1、95-127中任一项所定义。

152.根据权利要求150或151所述的用途的免疫原性组合物，其中所述免疫原性组合物如权利要求1-45中任一项所定义。

153.一种试剂盒，其包含结合剂以及含有至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物，所述结合剂包含结合CD3的结合区以及结合肿瘤或癌症的细胞上的靶标的结合区。

154.根据权利要求153所述的试剂盒，其中所述结合剂如权利要求1、95-127中任一项所定义。

155.根据权利要求153或154所述的试剂盒，其中所述免疫原性组合物如权利要求1-45中任一项所定义。

156.根据权利要求153-155中任一项所述的试剂盒，其还包含佐剂，如权利要求45-55中任一项所定义的佐剂。

157.根据权利要求153-156中任一项所述的试剂盒，其还包含一定量的白介素-2受体激动剂，如人白介素-2、人白介素-15或它们的类似物。

158.根据权利要求153-157中任一项所述的试剂盒，其还包含使用说明书，如用于所述结合剂与所述免疫原性组合物的联合给药。

抗体疗法

技术领域

[0001] 本发明涉及癌症疗法，该癌症疗法将包含至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物与包含结合CD3的抗原结合区以及结合肿瘤细胞上的靶抗原的抗原结合区的结合剂的治疗联合。

背景技术

[0002] 免疫疗法的进步已改变了癌症疗法领域。除了经典的化疗和照射之外，各种各样的癌症类型的患者还获得了如单克隆抗体(mAb)治疗和过继细胞转移(ACT)的治疗选项。单特异性单克隆抗体可特异性和双价地结合到细胞上表达的抗原，例如肿瘤相关抗原或T细胞特异性靶标。然而，双特异性抗体(bsAb)可单价地结合到两个不同的靶标上，从而允许靶向一个细胞上的两个表位或者不同细胞上的两个抗原。在后一情况下，bsAb本质上使两个细胞紧密靠近，例如T细胞与肿瘤细胞。含有T细胞特异性臂和肿瘤相关抗原特异性臂的BsAb(也称为T细胞接合BsAb或CD3 bsAb)可以使T细胞与肿瘤细胞交联，由此诱导T细胞介导的肿瘤细胞杀伤，而不管T细胞的TCR特异性如何。ACT包括免疫细胞(最常见地T细胞)向癌症患者中的过继转移。特别地，使用嵌合抗原受体(CAR)T细胞的两种疗法已被FDA批准用于治疗血液学癌症，它们经遗传工程化成表达人工高亲和力T细胞受体(Schuster等人，N Engl J Med 2019;380:45-56，Neelapu等人，N Engl J Med2017;377:2531-2544)。预防性疫苗通常旨在诱导针对传染原的抗体反应(antibody response)以预防疾病。另一方面，治疗性癌症疫苗可被用于加强现有肿瘤特异性T细胞，例如通过注射具有肿瘤特异性序列的肽(Zwaveling等人，J Immunol.2002;169(1):350-8)。

[0003] 这些疗法的实施在许多癌症类型中导致了更好的总生存率，尽管并非所有的癌症患者均能从免疫疗法中获益。值得注意的是，虽然T细胞接合性bsAb在血液瘤中显示出有前景性的临床结果，但CD3 bsAb尚未被批准用于治疗实体瘤，因为临床功效迄今尚未得到证实(Yu等人，J Hematol Oncol.2017;10:155)。免疫疗法在所谓的“冷性”肿瘤(即没有任何(功能性)免疫浸润物的肿瘤)中明显不那么有效。而且，以抑制性免疫细胞如调节性T细胞(Treg)、髓源性抑制细胞(myeloid-derived suppressor cells，MDSC)和/或M2型巨噬细胞的存在为特征的免疫抑制肿瘤微环境(Xiong等人，Adv Biol2021;5(3):e1900311)可能会阻止T细胞浸润或者局部抑制T细胞功能。为了转化这种抑制环境，对于瘤内注射(无佐剂)季节性流感疫苗(Newman等人，PNAS 2020)、遗传工程化鼠巨细胞病毒(Erkes等人，Molecular Therapy2016)、或灭活改良型痘苗病毒安卡拉株(Ankara)(Dai等人，Science Immunol2017)进行了研究，这些均导致鼠肿瘤模型的抗肿瘤疗效增强。从机制上讲，假定此类疗法经由触发肿瘤驻留型抗原呈递细胞所表达的模式识别受体起作用，导致免疫抑制肿瘤微环境转化为支持免疫浸润和T细胞活化的环境。卡介苗(Bacillus Calmette-Guérin，BCG)免疫疗法用于治疗非肌层侵入性膀胱癌的I临床用途也归因于肿瘤中局部炎症和免疫细胞浸润的触发(Redelman-Sidi等人，Nat Rev Urol 2014;11(3):153-62)。

[0004] 增加肿瘤浸润性T细胞的数量一直是许多治疗性疫苗接种研究的目标。然而，虽然

治疗性疫苗接种在恶性前病变中显示出有前景性的结果,但此类疫苗接种并未在癌症患者中显示出有效的临床功效。因此,联合疗法可能更有效(Melief等人,J Clin Invest.2015;125(9):3401-3412)。Benonisson等人也得出了这一结论,他们展示,用小鼠T细胞接合性bsAb治疗具有鼠黑素瘤(B16F10)的小鼠导致肿瘤T细胞浸润和活化增强,尽管未建立T细胞免疫(Benonisson等人,Mol Cancer Ther.2019Feb;18(2):312-322)。US2015095811和US20190382490均描述了由癌症特异性疫苗和通过单克隆抗体的免疫检查点抑制组成的联合疗法。此外,Ly等人探索了一种由ACT、肿瘤特异性肽疫苗接种、佐剂Toll样受体配体(TLR-L)7和IL-2组成的联合疗法,并且发现了可介导肿瘤清除的T细胞数量明显增加(Ly等人,Cancer Res.2010;70(21):8339-46)。

[0005] 仍然需要使实体瘤中肿瘤浸润性T细胞数量增加的方法,该方法可后续用于与T细胞接合性bsAb抗体治疗的联合疗法。特别地,仍然需要包含T细胞接合性bsAb和肿瘤非特异性疫苗的疗法,这将允许向患者给药通用疫苗,而不管他们的特定癌症类型。

发明内容

[0006] 本发明的一个目的是提供一种用于在有此需要的受试者中预防或减少肿瘤生长或者治疗癌症的方法,该方法包括向受试者提供:

[0007] i)结合剂,该结合剂包含结合CD3(如人CD3)的抗原结合区,以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶抗原的抗原结合区;以及

[0008] ii)免疫原性组合物,该免疫原性组合物包含至少一种疫苗抗原。

[0009] 在第2方面,本发明涉及一种用于在有此需要的受试者中预防或减少肿瘤生长或者治疗癌症的方法,该方法包括向受试者提供:

[0010] i)编码结合剂的核酸构建体,该结合剂包含结合CD3的第1结合区,以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶抗原的第2结合区;以及

[0011] ii)免疫原性组合物,该免疫原性组合物包含至少一种疫苗抗原。

[0012] 在第3方面,本发明涉及一种在受试者中预防或减少肿瘤生长或者治疗癌症的用途的结合剂,该结合剂包含结合CD3的结合区以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶标的结合区,其中该用途包括将抗体与包含至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物组合提供给受试者。

[0013] 在第4方面,本发明涉及一种包含至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物,用于在受试者中预防或减少肿瘤长出(outgrowth)或者治疗癌症的用途,其中免疫原性组合物与结合剂组合提供给受试者,所述结合剂包含结合CD3的结合区以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶标的结合区。

[0014] 在第5方面,本发明涉及结合剂在制造用于治疗受试者的癌症的药物中的用途,该结合剂包含结合CD3的结合区以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶标的结合区,其中该治疗包括将所述结合剂与包含至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物组合提供给受试者。

[0015] 在第6方面,本发明提供了包含至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物在制造用于治疗受试者的癌症的药物中的用途,其中免疫原性组合物与结合区的结合剂组合提供给受试者,所述结合剂包含结合CD3的结合区以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶标。

[0016] 最终,本发明还提供了一种试剂盒,该试剂盒包含结合剂,以及含有至少一种疫苗

抗原的免疫原性组合物,所述结合剂含有结合CD3的结合区以及结合肿瘤或癌症的细胞上的靶标的结合区。

[0017] 这些以及其它方面和实施方案将在以下部分中更详细地描述。

附图说明

[0018] 图1.该图显示了CXCR3介导的免疫细胞浸润对CD3xTA99双特异性抗体治疗的效应。(A)治疗时间线。在第0天,向WT或CXCR3敲除(KO)C57BL/6小鼠s.c.注射50,000个同基因B16F10黑素瘤细胞。在第6天和第9天,向小鼠i.p.注射12.5μg CD3xTA99 bsAb。通过每周测量肿瘤两次并在肿瘤体积超过1000mm^{3}时处死来监测肿瘤长出。(B)个别小鼠的肿瘤生长曲线(n=6-10)。(C)显示治疗组内小鼠生存期的Kaplan-Meier图。通过Mantel-Cox分析来计算生存率的统计意义上的显著差异。(D)在一项单独的实验中,按照与(A)呈现的相同治疗时间线,在第20天对小鼠(n=4-5)处死,处理肿瘤和脾以进行免疫浸润物分析。显示了通过流式细胞术所测量的T细胞和NK细胞的总CD45阳性细胞浸润和比例。(E-G)CXCR3介导的内源性细胞浸润对OT1 ACT+OVA疫苗接种联合CD3xTA99双特异性治疗的效应。(E)治疗时间线。在第0天,向CXCR3敲除C57BL/6小鼠s.c.注射50,000个B16F10肿瘤细胞。小鼠在第3天接受1×10^{6}个OT1富集脾细胞。在第3天和第10天,用OVA肽免疫小鼠。在第3天和第10天,在注射部位局部施用Aldara作为进行免疫的佐剂,并在第10天和第11天经腹膜内注射重组人IL-2。第12天和第15天,向小鼠经腹膜内注射12.5μg CD3xTA99bsAb。每周监测肿瘤生长三次,并且当肿瘤体积超过1000mm^{3}时处死小鼠。(F)个别小鼠的肿瘤生长曲线。(G)治疗组内存活小鼠的百分比。在(F)和(G)中,显示来自(A)的未治疗对照小鼠以供参考。通过Mantel-Cox分析来计算生存率的统计意义上的显著差异。ns=不显著,*P<0.05

[0019] 图2:在第0天,向C57BL/6小鼠s.c.注射100,000个同基因B16F10黑素瘤细胞。在第5天,将3×10^{6}个Pmel-1 T细胞经静脉内给药。在第6天和第9天,向小鼠经腹膜内注射12.5μg CD3xTA99 bsAb。在第6天和第13天,用KVP肽s.c.免疫小鼠。在注射部位局部施用Aldara作为进行免疫的佐剂。此外,在第13和14天,经腹膜内注射重组人IL-2。每周监测肿瘤生长两次,并且当肿瘤体积超过1000mm^{3}时处死小鼠。(A)实验的示意性概述。(B)个别小鼠的肿瘤生长曲线。(C)绘制治疗组内存活小鼠的百分比,并与未治疗小鼠的生存期进行比较(**P<0.01,***P<0.001)。通过Mantel-Cox分析来计算生存率的统计意义上的显著差异。

[0020] 图3.第-1天,向C57BL/6小鼠经静脉给药1×10^{6}个富集的OT1 T细胞。在第0天,向它们s.c.注射100,000个同基因B16F10黑素瘤细胞。在第3天和第10天,用KVP或OVA肽免疫小鼠。在第3天和第10天在注射部位局部施用Aldara作为佐剂,并在第10天和第11天经腹膜内注射重组人IL-2。在第12天和第15天,向小鼠经腹膜内注射12.5μg CD3xTA99 bsAb。每周监测肿瘤生长两次,并且当肿瘤体积超过1000mm^{3}时处死小鼠。(A)实验的示意性概述。(B)个别小鼠的肿瘤生长曲线。(C)绘制治疗组内存活小鼠的百分比,并与未治疗小鼠的生存期进行比较(*P<0.05)。通过Mantel-Cox分析来计算生存率的统计意义上的显著差异。

[0021] 图4.该图显示,CD3xTA99 bsAb与肿瘤特异性疫苗接种的组合或者CD3xTA99 bsAb与肿瘤非特异性疫苗接种联合匹配的肿瘤非特异性T细胞的ACT的组合类似地增强了抗肿瘤功效。(A)第-1天,将1×10^{6}个富集的OT-I T细胞经静脉给药于C57BL/6小鼠。在第0天,向它们s.c.注射100,000个鼠B16F10黑素瘤细胞。在第3天和第10天,用KVP或OVA肽免疫小鼠。

除了在第10天和第11天经腹膜内注射重组人IL-2之外，还在第3天和第10天在注射部位局部施用Aldara作为佐剂。在第12天和第15天，向小鼠经腹膜内注射12.5μg CD3xTA99 bsAb。每周监测肿瘤生长两次。(B)所有治疗组的肿瘤生长曲线。(C)显示不同治疗组中小鼠生存期的Kaplan-Meier图。当肿瘤体积超过1000mm^{3}时处死小鼠，并且绘制治疗组内存活小鼠的百分比，并与未治疗小鼠的生存期进行比较(**P<0.01)。通过Mantel-Cox分析来计算生存率的统计意义上的显著差异。

[0022] 图5.该图显示了OT1 T细胞ACT、OVA肽疫苗接种和CD3xTA99 bsAb联合治疗的白化C57BL/6小鼠中KPC3-TRP1阳性和KPC3-TRP1阴性肿瘤中的OT1 T细胞浸润和活化。(A)治疗时间线。在第0天，向C57BL/6小鼠在背部左侧(TRP1阴性KPC3细胞)和右侧(TRP1阳性KPC3细胞)s.c.注射80,000个KPC3肿瘤细胞。在第5天，将1×10^{6}个富集的TbiLuc x OT1脾细胞经静脉给药于所有小鼠，而接受OVA疫苗接种的小鼠在第6天和第13天s.c.注射与CpG ODN1826混合的卵清蛋白衍生的合成长肽。在第15天和第19天，经腹膜内注射CD3xTA99 bsAb(用箭头表示)。OT1 T细胞的T细胞活化(以Cycluc1生物发光通量/秒测量)显示在接受(B)OT1 T细胞ACT和CD3xTA99 bsAb治疗，(C)OT1 T细胞ACT和OVA疫苗接种，(D)OT1 T细胞ACT、CD3xTA99 bsAb治疗和OVA疫苗接种的小鼠的组中。OT1T细胞的T细胞浸润(以D-萤光素生物发光通量/秒测量)显示在接受(E)OT1 T细胞ACT和CD3xTA99 bsAb治疗，(F)OT1 T细胞ACT和OVA疫苗接种，(G)OT1 T细胞ACT、CD3xTA99 bsAb治疗和OVA疫苗接种的小鼠的组中。同样的数据集呈现于(H-K)中，显示了KPC3肿瘤(H,J)和KPC3-TRP1肿瘤(I,K)中的T细胞活化(H,I)和T细胞浸润(J,K)。在第15天和第19天的CD3xTA99 bsAb注射用箭头表示。(L)治疗时间线。从第0天到第13天的计划表(schedule)与对(A)所描述的相同。在第16天，对小鼠处以安乐死，制备血液、脾和肿瘤的单细胞悬浮液，以通过流式细胞术分析免疫亚组浸润。血液(M)和脾(N)以及TRP1阴性和TRP1阳性KPC3肿瘤(O)中CD45$^+$群体和OT1幼稚(CD44$^-$CD62L$^+$)相对于效应物(CD44$^+$CD62L$^-$)表型内OT1 T细胞的百分比。(P)治疗时间线。从第0天到第13天的计划表与对(L)所描述的相同。在第16天和第19天，经腹膜内注射CD3xTA99 bsAb，并在第20天对小鼠处以安乐死。血液(Q)和脾(R)中CD45$^+$群体和OT1幼稚(CD44$^-$CD62L$^+$)相对于效应物(CD44$^+$CD62L$^-$)表型内OT1 T细胞的百分比。(S)左边：在接受所指定治疗的小鼠中，TRP1阴性和TRP1阳性KPC3肿瘤中CD45$^+$群体内OT1 T细胞的百分比。中间：在向OT1 T细胞ACT和OVA疫苗接种的组合加入bsAb后，OT1 T细胞上CD69的表面水平表达。右边：CD45$^+$群体内具有效应表型(CD44$^+$CD62L$^-$)的OT1 T细胞百分比。使用Welch t检验测定统计学显著性；*P<0.05，**p<0.01，***P<0.001。

[0023] 图6.该图显示了用IL-2、Aldara霜剂、或IL-2与Aldara的组合所治疗的小鼠中的B16F10肿瘤内不同免疫细胞亚组的百分比，如通过流式细胞术测定。(A)治疗时间线。(B)源于未经治疗、用IL-2、Aldara、或IL-2与Aldara的组合所治疗的小鼠的肿瘤的活细胞门内CD45$^+$细胞(免疫细胞)的百分比。(C)如根据(B)所指示，治疗的小鼠的肿瘤中CD45$^+$群体内常规DC(cDC1)的百分比。(D)如根据(B)所指示，治疗的小鼠的肿瘤中CD45$^+$群体内单核细胞来源的DC(MoDC)的百分比。(E)如根据(B)所指示，治疗的小鼠的肿瘤中CD45$^+$群体内NK1.1$^+$/CD3$^-$(NK)细胞的百分比。(F)如根据(B)所指示，治疗的小鼠的肿瘤中CD45$^+$群体内M1型巨噬细胞的百分比。(G)如根据(B)所指示，治疗的小鼠的肿瘤中CD45$^+$群体内静息巨噬细胞(M0巨噬细胞)的百分比。(H)如根据(B)所指示，治疗的小鼠的肿瘤中CD45$^+$群体内未成熟巨噬

细胞的百分比。(I)如根据(B)所指示，治疗的小鼠的肿瘤中$CD45^+$群体内T细胞的百分比。统计分析通过Mann Whitney检验进行；*P<0.05。

[0024] 图7：该图显示，将CD3xTA99 bsAb与肿瘤特异性疫苗接种或肿瘤非特异性疫苗联合类似地增强抗肿瘤功效。(A)实验的示意性概述。在第0天，向C57BL/6小鼠s.c.注射80,000个鼠B16F10黑素瘤细胞。在第3天和第10天，用KVP或Rpl18肽免疫小鼠。除了在第10天和第11天经腹膜内注射重组人IL-2之外，还在第3天和第10天在注射部位局部施用Aldara作为佐剂。在第12天和第15天，向小鼠经腹膜内注射12.5μg CD3xTA99 bsAb。每周监测肿瘤生长两次。(B)个别小鼠的肿瘤生长曲线。(C)显示不同治疗组中小鼠生存期的Kaplan-Meier图。当肿瘤体积超过1000mm^3时处死小鼠，并且绘制治疗组内存活小鼠的百分比，并与仅用CD3xTA99双特异性物治疗的小鼠的生存期进行比较(*P<0.05,**P<0.01)。通过Mantel-Cox分析来计算生存率的统计意义上的显著差异。

[0025] 图8：该图显示了疫苗接种肿瘤非特异性肽(Rpl18)的小鼠的B16F10肿瘤内不同免疫细胞亚组的百分比，如由流式细胞术所测定。(A)治疗时间线。(B)源于未经治疗的小鼠或者用Rpl18肽、Aldara和IL-2疫苗接种的小鼠的肿瘤的活细胞门内$CD45^+$细胞(免疫细胞)、$CD8^+$T细胞、NK细胞、NKT细胞、CD8/CD4 T细胞比、CD8/Treg比、$CD8^+$T细胞和$CD4^+$T细胞的记忆表型(幼稚T细胞[$CD44^-CD62L^+$]、效应T细胞[Teff;$CD44^+CD62L^-$]和中枢记忆T细胞[Tcm;$CD44^+CD62L^+$])、单核细胞来源的DC(MoDC)、未成熟巨噬细胞、嗜酸性粒细胞、嗜中性粒细胞和常规DC(cDC1)的百分比。(C)如根据(B)所指示，在治疗的小鼠的肿瘤群体内，针对CD103、粒酶B(GzmB)阳性的$CD8^+$T细胞、$CD4^+$T细胞、NK细胞、NKT细胞和$CD19^+$B细胞的百分比；针对PD-1以及NKG2A阳性的$CD8^+$T细胞、$CD4^+$T细胞、NK细胞和NKT细胞的百分比。采用Welch t检验进行统计分析；*P<0.05,**P<0.01,***P<0.001。

[0026] 图9.该图显示了用CD3xTA99 bsAb单独地或联合肿瘤非特异性疫苗接种治疗的具有KPC3-TRP1的小鼠的肿瘤和脾中免疫细胞的表型分型。(A)治疗时间线。在第0天，向C57BL/6小鼠s.c.注射80,000个TRP1阳性KPC3肿瘤细胞。在第8天和第15天，将疫苗接种组中的小鼠用150μg OVA肽免疫。除了在第15天和第16天经腹膜内注射600.000UI hIL-2之外，还在第8天和第15天在注射部位局部施用Aldara作为佐剂。在第17天，向小鼠经腹膜内注射12.5μg CD3xTA99 bsAb。在第19天，处死小鼠，并且处理肿瘤和脾以进行分析。肿瘤(B)和脾(C)中$CD45^+$、T细胞、T细胞亚组组成(CD8、$CD4^+FoxP3^-$、$CD4^+FoxP3^+$、幼稚T细胞[$CD44^-CD62L^+$]、效应T细胞[Teff;$CD44^+CD62L^-$]和中枢记忆T细胞[Tcm;$CD44^+CD62L^+$])、B细胞以及NK细胞的分析。(D,E)肿瘤(D)和脾(E)内$CD8^+$T细胞中的活化和抑制性表面标志物、效应分子和转录因子(4-1BB、CD27、OX40、GzmB、CD49a、CD40L、CD69、PD-1、TIGIT、Tim3、CD39、NKG2A、KLRG1、Ki67、TCF-1、Eomes、Tbet、GATA-3和Ror γ T)的表达。(F)肿瘤内NK细胞上活化和抑制性表面标志物和效应分子(GzmB、CD69、CD49a、CD39、KLRG1、NKG2A)的表达。(G)顶部：肿瘤中$CD45^+$细胞内的巨噬细胞的频率。底部：iNOS-Egr2-(M0)、iNOS+Egr2-(M1)和iNOS-Egr2+(M2)巨噬细胞表型的分布。使用Brown-Forsythe和Welch ANOVA进行统计分析，并且用Dunnett的T3多重比较检验确定p值；ns＝不显著，*P<0.05,**P<0.01,***p<0.001,****p<0.0001。

[0027] 图10：(A)实验时间线的示意性概述。在第-30天，向C57BL/6小鼠给药100x TCID50的HKx31流感病毒。在第0天，向它们s.c.注射80,000个同基因B16F10黑素瘤细胞。在第10

天,用2×10^{6}TCID50热灭活流感病毒免疫小鼠。在第10天在注射部位局部施用Aldara作为佐剂,并在第10天和第11天经腹膜内注射重组人IL-2。第12天和第15天,向小鼠经腹膜内注射12.5μg CD3xTA99 bsAb。当肿瘤体积超过1000mm^{3}时处死小鼠。(B)不同治疗组中个别小鼠的肿瘤生长曲线。肿瘤体积以mm^{3}描绘。(C)显示出与未治疗小鼠的生存期相比治疗组内小鼠生存期的Kaplan-Meier图(**P<0.01)。通过Mantel-Cox分析来计算生存率的统计意义上的显著差异。

具体实施方式

[0028] 定义

[0029] 在本发明的上下文中,术语“结合剂”是指能够与期望的抗原结合的任何试剂。在本发明的某些实施方案中,结合剂是抗体、抗体片段、或其构建体。结合剂还可包含合成、修饰或非天然存在的部分,特别是非肽部分。这些部分可例如连接所期望的抗原结合功能或区域,如抗体或抗体片段。在一个实施方案中,结合剂是包含抗原结合互补决定区(CDR)或可变区的合成构建体。

[0030] 术语“免疫球蛋白”是指这样一类结构相关的糖蛋白:由两对多肽链即一对轻(L)低分子量链和一对重(H)链组成,所有四条链均由二硫键相互连接。免疫球蛋白的结构已得到充分表征。参见例如Fundamental Immunology第7章(Paul,W.编辑,第2版,Raven Press,N.Y.(1989))。简而言之,每条重链典型地由重链可变区(本文缩写为VH)和重链恒定区(本文缩写为CH)组成。重链恒定区典型地由三个结构域组成:CH1、CH2和CH3。铰链区是介于重链的CH1和CH2结构域之间的区域并且呈高度柔性。铰链区中的二硫键是IgG分子中两条重链之间相互作用的一部分。每条轻链典型地由轻链可变区(本文缩写为VL)和轻链恒定区(本文缩写为CL)组成。VH和VL区可进一步细分为超突变区(或者超变区,其可在序列中是超变的并且/或者呈结构限定的环形式),也称为互补决定区(CDR),散布有称为框架区(FR)的更保守区域。每个VH和VL典型地由从氨基末端到羧基末端按如下次序布置的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4(另参见Chothia和Lesk J.Mol.Biol.196,901-917(1987))。除非另行指出或上下文相矛盾,本文的CDR序列根据IMGT规则使用DomainGapAlign进行鉴定(Lefranc MP.,Nucleic Acids Research 1999;27:209-212以及Ehrenmann F.,Kaas Q.和Lefranc M.-P.Nucleic Acids Res.,38,D301-307(2010);另参见互联网http地址www.imgt.org/)。除非另行指出或上下文相矛盾,本发明中对恒定区中的氨基酸位置的引用是根据Eu编号的(Edelman等人,Proc Natl Acad Sci U S A.1969May;63(1):78-85;Kabat等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,1991NIH Publication No.91-3242)。例如,本文的SEQ ID NO:33根据Eu编号示出了IgG1m(f)重链恒定区的氨基酸位置118-446。

[0031] 术语“氨基酸”和“氨基酸残基”可在本文中互换使用且不应理解为限制性的。氨基酸是含有胺(-NH_2)和羧基(-COOH)官能团以及对每种氨基酸特异的侧链(R基团)的有机化合物。在本发明的上下文中,氨基酸可以基于结构和化学特征分类。因此,氨基酸的类别可以反映在下表中的一者或两者中:

[0032] 表1:基于R基团的结构和一般化学表征的主要分类

[0033]

类别	氨基酸

酸性残基	D和E
碱性残基	K、R和H
亲水性不带电荷残基	S、T、N和Q
脂族不带电荷残基	G、A、V、L和I
非极性不带电荷残基	C、M和P
芳族残基	F、Y和W

[0034] 表2:氨基酸残基的另选物理和功能分类

[0035]

类别	氨基酸
含羟基残基	S和T
脂族残基	I、L、V和M
环烯基相关残基	F、H、W和Y
疏水性残基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W和Y
带负电荷残基	D和E
极性残基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S和T
带正电荷残基	H、K和R
小残基	A、C、D、G、N、P、S、T和V
极小残基	A、G和S
参与转折形成的残基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P和T
柔性残基	Q、T、K、S、G、P、D、E和R

[0036] 一个氨基酸被另一个氨基酸置换可分类为保守或非保守置换。在本发明的上下文中,“保守置换”是一个氨基酸用具有相似结构和/或化学特征的另一个氨基酸置换,如一个氨基酸残基用如以上两个表中任一者所定义的相同类别的另一个氨基酸残基的置换:例如,亮氨酸可用异亮氨酸置换,因为它们都是脂族支化疏水物。类似地,天冬氨酸可用谷氨酸置换,因为它们都是较小带负电荷残基。

[0037] 如本文所用,术语“对应于……的位置的氨基酸”是指人IgG1重链中的氨基酸位置编号。其它免疫球蛋白中相应的氨基酸位置可通过与人IgG1比对来发现。因此,“对应于”另一个序列中的氨基酸或链段的一个序列中的氨基酸或链段是使用标准序列比对程序(如ALIGN、ClustalW或类似物)典型地在默认设置下与其它氨基酸或链段比对的,前提条件是其它序列与人IgG1重链具有至少50%、至少80%、至少90%、或至少95%同一性。认为本领域中公知的是如何比对序列中的序列或链段,并由此确定序列中与根据本发明的氨基酸位置相对应的位置。

[0038] 在本发明的上下文中,术语“抗体”(Ab)是指免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的片段、或其任一者的衍生物,其能够在典型的生理条件下以显著时间段的半衰期与抗原特异性结合,如至少约30分钟、至少约45分钟、至少约一小时、至少约两小时、至少约四小时、至少约8小时、至少约12小时、约24小时或更多、约48小时或更多、约3、4、5、6、7天或更多天等、或任何其它相关的功能定义的时段(如足以诱导、促进、增强、和/或调节与抗体结合抗原相关联的生理反应的时间,并且/或者足以使抗体募集效应子活性的时间)。免疫球蛋白分子的重链和轻链的可变区含有与抗原相互作用的结合结构域。术语抗体在本文中使用时不仅包含单特异性抗体,而且包含多特异性抗体,该多特异性抗体包含多个,如两个或更多

个(例如三个或更多个)不同的抗原结合区。抗体(Ab)的恒定区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(如效应细胞)以及补体系统的组分如补体的经典激活途径中的第一组分C1q)的结合。如上所指示,除非另行指出或与上下文明显矛盾,本文的术语抗体包括作为抗原结合片段的抗体片段,即,保留特异性结合抗原的能力。已经显示,抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段来进行。涵盖在术语"抗体"内的抗原结合片段的实例包括(i)Fab'或Fab片段,由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段,或单价抗体,如WO2007059782(Genmab)中所述;(ii)$F(ab')_2$片段,包含在铰链区处经二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)基本上由VH和CH1结构域组成的Fd片段;(iv)基本上由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段,(v)dAb片段(Ward等人,Nature 341,544-546(1989)),其基本上由VH结构域组成并且也称为结构域抗体(Holt等人;Trends Biotechnol.2003年11月;21(11):484-90);(vi)骆驼(camelid)或纳米抗体(Nanobody)分子(Revets等人;Expert Opin Biol Ther.2005年1月;5(1):111-24)和(vii)分离的CDR。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码,它们可使用重组方法通过合成接头结合,使得它们成为单一蛋白质链,其中VL和VH区对形成单价分子(称为单链抗体或单链Fv(scFv),参见例如Bird等人,Science 242,423-426(1988)和Huston等人,PNAS USA85,5879-5883(1988))。除非另有说明或上下文明确指出,这样的单链抗体涵盖在术语抗体内。尽管这样的片段通常包括在抗体的含义内,但它们共同且各自独立地为本发明的独特特性,表现出不同的生物学特性和效用。还应当理解,除非另外指明,术语抗体还包括多克隆抗体、单克隆抗体(mAb)、抗体样多肽,如嵌合抗体和人源化抗体,以及由任何已知技术如酶促切割、肽合成以及重组技术所提供的保留特异性结合抗原的能力的抗体片段(抗原结合片段)。如所生成的抗体可为任何同种型。如本文所用,术语"同种型"是指由重链恒定区基因编码的免疫球蛋白(亚)类别(例如IgG(包括亚类IgG1、IgG2、IgG3、IgG4)、IgD、IgA、IgE、或IgM)或其任何同种异型,如IgG1m(za)和IgG1m(f)[SEQ ID NO:33)。因此,在一个实施方案中,抗体包含IgG1类或其任何同种异型的免疫球蛋白的重链。另外,各重链同种型可与kappa(κ)或lambda(λ)轻链组合。

[0039] 因此,当本文提及到特定同种型(例如IgG1)时,该术语并不受限于特异性同种型序列(例如特定IgG1序列),而是用于指示抗体在序列上与其它同种型相比更接近该同种型(例如IgG1)。因此,例如本发明的IgG1抗体可为天然存在的IgG1抗体的序列变体,包括恒定区的变异。

[0040] 在本发明的上下文中,术语"多特异性抗体"是指具有由不同的抗体序列定义的两个或更多个不同的抗原结合区的抗体。当抗体具有由不同抗体序列定义的两个不同的抗原结合区时,它被称为"双特异性抗体"。多特异性抗体可为任何形式,包括任何双特异性抗体形式。

[0041] 如本文所用,术语"人抗体"旨在包括具有衍生自人种系免疫球蛋白序列的可变区和框架区以及人免疫球蛋白恒定结构域的抗体。本发明的人抗体可以包括不由人种系免疫球蛋白序列编码的氨基酸残基(例如,通过体外随机或定点诱变或者通过体内体细胞突变引入的突变、插入或缺失)。然而,如本文所用,术语"人抗体"不旨在包括其中衍生自另一种非人物种(如小鼠)种系的CDR序列移植到人框架序列上的抗体。

[0042] 如本文所用,术语"人源化抗体"是指遗传工程化非人抗体,其含有人抗体恒定结

构域以及经修饰成含有与人可变结构域的高水平的序列同源性的非人可变结构域。这可通过将一起形成抗原结合位点的六个非人抗体CDR移植到同源人受体FR上来实现(参见WO92/22653和EP0629240)。为了完全重构亲本抗体的结合亲和力和特异性,可能需要将来自亲本抗体(即非人抗体)的框架残基置换为人框架区(回复突变)。结构同源性建模可有助于鉴定对抗体的结合特性重要的框架区中的氨基酸残基。因此,人源化抗体可包含非人CDR序列,主要是任选包含非人氨基酸序列的一个或多个氨基酸回复突变的人框架区,以及完全人恒定区。任选地,可以应用不一定是回复突变的额外氨基酸修饰,以获得具有优选的特征(如亲和力和生化特性)的人源化抗体。

[0043] 当在本文中使用时,除非上下文矛盾,术语"Fc区"是指由免疫球蛋白的重链的两个Fc序列组成的抗体区,其中所述Fc序列在从抗体的N末端到C末端的方向上至少包含铰链区、CH2结构域和CH3结构域。抗体的Fc区可以介导免疫球蛋白与宿主组织或因子(包括免疫系统的各种细胞(如效应细胞)以及补体系统的组分)的结合。

[0044] 如本文所用,术语"铰链区"是指免疫球蛋白重链的铰链区。因此,例如,人IgG1抗体的铰链区对应于根据如Kabat(Kabat,E.A.等人,Sequences of proteins of immunological interest.第5版-US Department of Health and Human Services,NIH公开No.91-3242,第662,680,689页(1991))中所示的Eu编号的氨基酸216-230。然而,铰链区也可为如本文所述的任何其它亚型。

[0045] 如本文所用,术语"CH1区"或"CH1结构域"是指免疫球蛋白重链的CH1区。因此,例如,人IgG1抗体的CH1区对应于根据如Kabat(出处同前)中所示的Eu编号的氨基酸118-215。然而,CH1区也可为如本文所述的任何其它亚型。

[0046] 如本文所用,术语"CH2区"或"CH2结构域"是指免疫球蛋白重链的CH2区。因此,例如,人IgG1抗体的CH2区对应于根据如Kabat(出处同前)中所示的Eu编号的氨基酸231-340。然而,CH2区也可为如本文所述的任何其它亚型。

[0047] 如本文所用,术语"CH3区"或"CH3结构域"是指免疫球蛋白重链的CH3区。因此,例如,人IgG1抗体的CH3区对应于根据如Kabat(出处同前)中所示的Eu编号的氨基酸341-447。然而,CH3区也可为如本文所述的任何其它亚型。

[0048] 当在抗体的上下文中使用时,术语"全长"指示该抗体并不是片段,而是含有该同种型在自然界中通常存在的特定同种型的所有结构域,例如,IgG1抗体的VH、CH1区、CH2区、CH3区、铰链、VL和CL结构域。

[0049] 如本文所用,在抗体与预定抗原或表位结合的语境中,术语"结合"或"能够结合"典型地为使用抗原作为配体以及抗体作为分析物,当使用生物层干涉测量法(Bio-Layer Interferometry,BLI)测定时,或者例如当使用表面等离振子共振(SPR)技术测定时,以对应于约10^{-7}M或更小、如如10^{-7}M或更小、如约10^{-8}M或更小、如10^{-8}M或更小、如约10^{-9}M或更小、如10^{-9}M或更小、如约10^{-10}M或更小、如10^{-10}M或更小、如约10^{-11}或如10^{-11}M或甚至更小的K_D的亲和力结合。抗体以对应于比其结合预定抗原或密切相关抗原以外的非特异性抗原(例如,牛血清白蛋白、酪蛋白)的K_D低至少十倍,如低至少100倍,例如低至少1,000倍,如低至少10,000倍,例如低至少100,000倍的K_D的亲和力结合预定抗原。亲和力较高的数量取决于抗体的K_D,使得当抗体的K_D极低(即,抗体是高度特异性的)时,则对抗原的亲和力比对非特异性抗原的亲和力低的程度可为至少10,000倍。

[0050] 如本文所用，术语“k_d”(秒$^{-1}$)是指特定抗体-抗原相互作用的解离速率常数。所述值也称为k_{off}值。

[0051] 如本文所用，术语“K_D”(M)是指特定抗体-抗原相互作用的解离平衡常数。

[0052] 如本文所用，术语“结合区”是指能够结合例如存在于细胞、细菌、或病毒体上的分子(如多肽)的结合剂(如抗体)的区域。当在本文中使用时，“结合区”可特别地指与抗原相互作用并包含重链可变(VH)区和轻链可变(VL)区两者的结合剂(如抗体)的区域。

[0053] 如本文所用，术语“抗原”广泛地指任何能够引发免疫反应的物质。在一些实施方案中，“抗原”可为蛋白质性的，或者可为多糖。

[0054] 如本文所用，术语“靶抗原”是能够被(治疗性)抗体结合的分子。

[0055] 如本文所用，术语“免疫原性组合物”是指在具有或不具有免疫刺激剂(如佐剂或用于增加对抗原的免疫反应的分子)的情况下，含有抗原和/或至少一种编码抗原的核酸分子的组合物。本领域技术人员将免疫原性组合物理解为在向人类或动物受试者给药时会在所述动物或人类受试者体内引发体液反应(例如，抗体反应)、细胞反应(例如，T细胞反应)、或先天反应(例如，粒细胞、抗原呈递细胞、NK细胞的活化)和/或局部炎症的组合物。

[0056] 如本文所用，“疫苗”应理解为包含以下的制剂：至少一种疫苗抗原和/或至少一种编码疫苗抗原的核酸分子，以及药物上可接受的稀释剂或载剂，任选地与赋形剂、佐剂和/或添加剂或保护剂组合。疫苗抗原可衍生自任何适于疫苗接种的材料，例如，抗原或免疫原可衍生自病原体如细菌或病毒颗粒等，或者肿瘤或癌组织。在存在或不存在佐剂的情况下，抗原或免疫原刺激机体的适应性免疫系统，以提供适应性免疫反应，如体液反应(例如抗体反应)和/或细胞反应(例如T细胞反应)。在本发明的上下文中，疫苗可为治疗性疫苗，它在感染后或在受试者诊断患有肿瘤或癌症后给予该受试者，并旨在减少或阻止疾病进展。疫苗也可为预防或防范性疫苗，它在暴露于传染原之前或在受试者诊断患有肿瘤或癌症之前提供给该受试者，并旨在预防初发感染或肿瘤发生或者降低感染或肿瘤生长的速率或负荷。

[0057] 如本文所用，术语“疫苗抗原”是能够诱导体液免疫反应和/或细胞免疫反应的分子，导致产生对所述抗原特异性的B和/或T淋巴细胞。

[0058] 如本文所用，“表位”是指被抗体和/或受试者的免疫系统，特别是被抗体、B细胞、或T细胞所识别的抗原的一部分。表位包括B细胞表位和T细胞表位。B细胞表位是被产生特异性抗体的B细胞识别所需的肽序列或碳水化合物。B细胞表位是指被抗体识别的抗原的特异性区域。抗体结合表位的部分称为互补位。基于结构以及与互补位的相互作用，表位可为构象表位或线性表位。线性的、或连续的表位由蛋白质的特定区域的一级氨基酸序列所定义，或者可由单糖组成所定义。与抗体相互作用的序列顺序彼此相邻位于蛋白质或碳水化合物上，并且表位可通常由单个肽模拟。构象表位是由天然蛋白、碳水化合物或糖蛋白的构象结构所定义的表位。这些表位可为连续或不连续的，即，表位的组分可位于蛋白质的不同部分上，它们在折叠的天然蛋白结构中彼此紧密靠近。T细胞表位由肽序列、脂质、碳水化合物或代谢物构成，它们与细胞表面上的蛋白质缔合是特异性T细胞识别所需的。T细胞表位衍生自多肽、脂质、碳水化合物或代谢物，由APC在细胞内加工并呈现在所有的有核细胞的表面，包括抗原呈递细胞(APC)，在那里它们与经典的主要组织相容性复合体(MHC)分子(包括MHC I类和MHC II类)，或非经典的MHC样分子，如MR1、CD1或butrophilin(BTN3A1)结合。

在MHC I类或MHC II类分子的情形中所呈现的T细胞表位可以被特异性T细胞的T细胞受体识别。

[0059] 如本文所用，“活疫苗”是指包含活微生物或病毒的疫苗。大多数活疫苗是由活微生物或病毒制备的“减毒活疫苗”，其被选择成在相关受试者中无毒性或毒性降低，或者已经受处理以降低或消除毒性，而保留诱导免疫反应的能力，如保护性免疫。例如，处理可包含在不利条件下培养，导致其毒性丧失。

[0060] 如本文所用，术语“灭活疫苗”是指包含在受控条件下生长并然后典型地通过化学处理；例如用甲醛处理、或热处理杀伤或灭活的微生物或病毒颗粒的疫苗。

[0061] 如本文所用，术语“病毒样颗粒”和“VLP”是指类似于不含有任何病毒遗传物质的病毒的非感染性颗粒。VLP是病毒结构蛋白(如衣壳蛋白)表达及其自组装的结果。

[0062] 在本发明上下文中，术语“级分疫苗(fractional vaccine)”是指仅包含细菌、病毒或其它微生物的一部分的疫苗。“级分疫苗”可以是基于蛋白质的或基于多糖的，并且可包含亚单位、类毒素(灭活细菌毒素)、未缀合/纯多糖和/或缀合多糖，如未缀合/纯或缀合细菌细胞壁多糖。

[0063] 如本文所用，“亚单位疫苗”是指能够引发免疫反应的疫苗，其包含细菌或病毒或其它微生物的分离或纯化的疫苗抗原、或几种分离和/或纯化的抗原的组合，如病毒或细菌多肽或编码此类多肽的核酸。

[0064] 在本发明上下文中，术语“基于蛋白质的疫苗”是指包含分离、纯化或重组的蛋白性疫苗抗原(如来自细菌、病毒或其它微生物的蛋白性抗原)的疫苗。

[0065] 在本发明的上下文中，术语“基于多糖的疫苗”是指包含分离或纯化的多糖疫苗抗原(如衍生自细菌荚膜的多糖/细菌荚膜多糖)的疫苗。

[0066] 术语“缀合物疫苗”广泛地指包含两种彼此缀合的抗原的疫苗；典型地，“弱”疫苗抗原与较强抗原缀合。缀合物疫苗的实例包括包含与蛋白质缀合以增强免疫原性的多糖(如细菌荚膜多糖)的疫苗。

[0067] 术语“重组疫苗”是指包含通过重组DNA技术产生的疫苗抗原的疫苗。一般来讲，这涉及将编码疫苗抗原的核苷酸序列插入到细菌、真菌或哺乳动物细胞中，从而在这些细胞中表达抗原，然后从细菌、真菌或哺乳动物细胞的培养物中对抗原进行纯化。

[0068] 在本发明上下文中，术语“基于核酸的疫苗”广泛地指包含编码疫苗抗原的核酸分子的组合物。核酸分子可为脱氧核糖核酸(DNA)；例如质粒或核糖核酸(RNA)的形式；例如mRNA的形式。也可为基于纳米粒子的核苷酸疫苗，例如基于脂类的、基于肽的、基于多糖的和/或无机纳米粒子制剂。

[0069] 术语“基于病毒载体的疫苗”是指包含活复制型病毒的组合物，该病毒经受遗传工程化成携带编码疫苗抗原的核酸序列。该病毒可为例如逆转录病毒、慢病毒、痘苗病毒、腺病毒、腺相关病毒、巨细胞病毒、或仙台病毒。

[0070] 在本发明的上下文下，术语“小儿疫苗”和“儿童疫苗”可互换地用于指旨在用于、建议用于和/或给予儿童以预防或减少感染和/或感染性疾病发展的风险的疫苗。

[0071] 世界卫生组织(world Health Organization,WHO)提供了关于常规疫苗接种/免疫的建议：虽然建议对所有儿童进行一些常规的疫苗接种/免疫，但也例如对居住在某些地理区域的儿童并特别是高危人群的儿童有单独的建议。关于常规疫苗接种的建议可见于

WHO发表的关于下列感染性疾病/试剂和疫苗的意见书中：

[0072] 肺结核/BCG疫苗接种:Weekly Epid.Record(2018,93:73-96)

[0073] 乙型肝炎:Weekly Epid.Record(2017,92:369-392)

[0074] 小儿麻痹症/OPV和IPV:Weekly Epid.Record(2016,9:145-168)

[0075] 白喉:Weekly Epid.Record(2017,92:417-436)

[0076] 破伤风:Weekly Epid.Record(2017,92:53-76)

[0077] 百日咳:Weekly Epid.Record(2015,90:433-460)

[0078] 轮状病毒:Weekly Epid.Record(2013,88:49-64)

[0079] 麻疹:Weekly Epid.Record(2017,92:205-228)

[0080] 肺炎球菌:Weekly Epid.Record(2019,94:85-104)

[0081] 风疹:Weekly Epid.Record(2011,86:301-316)

[0082] 日本脑炎:Weekly Epid.Record(2015,90:69-88)

[0083] 人乳头瘤病毒(HPV):Weekly Epid.Record(2017,92:241-268)

[0084] 黄热病:Weekly Epid.Record(2013,88:269-284)

[0085] 蜱传脑炎病毒(TBE):Weekly Epid.Record(2011,86:241-256)

[0086] 伤寒:Weekly Epid.Record(2018,93:153-172)

[0087] 霍乱:Weekly Epid.Record(2017,92:477-500)

[0088] 甲型肝炎:Weekly Epid.Record(2012,87:261-276)

[0089] 脑膜炎球菌参考:Weekly Epid.Record(2011,86:521-540);MenA缀合物的新版:Weekly Epid Record(2015,90:57-68)

[0090] 狂犬病:Weekly Epid.Record(2018,93:201-220)

[0091] 腮腺炎:Weekly Epid.Record(2007,82:49-60)

[0092] 季节性流感(灭活疫苗):Weekly Epid.Record(2012,87:461-476)

[0093] 登革热:Weekly Epid.Record(2018,93,457-76)

[0094] 水痘:Weekly Epid.Record(2014,89:265-288)

[0095] 如本文所用,“疫苗接种规划”是指一系列的疫苗接种,包括所有剂量的时间,可以是建议或强制的,这取决于居住国。

[0096] 如本文所用,“加强疫苗”是指作为第二次或更晚的疫苗剂量给药的疫苗,它在一个或多个初级疫苗剂量后给予,以增加对初级疫苗剂量中一种或多种疫苗抗原的免疫反应。作为加强疫苗给予的疫苗可以或不可与初级疫苗相同。

[0097] 如本文所用,“癌症疫苗”是指诱导针对肿瘤、肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原的特异性免疫反应的组合物。术语“肿瘤相关抗原”是指这样的抗原:它在受试者的肿瘤细胞之中或之上的存在量与所述受试者的非肿瘤细胞或健康组织细胞之中或之上的存在量相比更高。就结构而言,肿瘤相关抗原通常与在正常细胞之中或之上所见的抗原没有质的区别,但它们存在的量显著更高。

[0098] 术语“肿瘤特异性抗原”是指与同一来源的非癌细胞相比,在肿瘤内的细胞中特异性表达或产生并在相应肿瘤的细胞中特异性表达或上调的抗原。肿瘤抗原或由此衍生的表位可被免疫系统识别以诱导免疫反应。肿瘤特异性抗原可来自所有的蛋白质类别,如酶、受体、转录因子等。

[0099] “新抗原”是指包含新表位的抗原;即,经由肿瘤细胞中发生的随机体细胞突变所生成的抗原表位。新表位通常衍生自特异性肿瘤抗原或独特抗原,它们对单独的细胞或细胞谱系具有特异性,并因此新表位对衍生它的细胞或肿瘤细胞谱系是特异性的。

[0100] 如本文所用,所关注的肽或多肽的“变体”是指一个或多个氨基酸改变的氨基酸序列,从而偏离参考氨基酸序列。该变体可具有“保守”变化,其中置换的氨基酸具有相似的结构或化学性质(例如,用异亮氨酸替换亮氨酸)。更罕见地,变体可具有“非保守”变化(例如,用色氨酸替换甘氨酸)。类似的微小变异也可包括氨基酸缺失或插入、或这两者。变体肽或多肽可具有与参考肽或多肽相同的活性或功能,或者可具有比参考肽或多肽更大或更小的活性或功能,但必须至少保留参考肽或多肽的部分活性或功能。

[0101] 如本文所用,术语“佐剂”是指引起免疫系统的抗原非依赖性刺激或者能够强化抗原的免疫原性的物质或物质的混合物。在本发明的上下文中,佐剂可用于增强对疫苗抗原的免疫反应。

[0102] 在本发明的上下文中,术语“Th1型免疫反应”是指辅助性T细胞亚组的活化,其特征在于它能够在活化时主要分泌炎症性细胞因子,典型地干扰素γ(IFNγ)、肿瘤坏死因子α(TNFα)和白介素-2(IL-2)。Th1型免疫反应主要导致了针对病原体或癌细胞的细胞免疫反应的放大。

[0103] 如本文所用,“Th2型免疫反应”是指辅助性T细胞亚组的活化,其特征在于它能够主要分泌细胞因子如IL-4、IL-5、IL-13(它们与嗜酸性粒细胞的活化和变应性疾病的促进相关联),以及抗炎性细胞因子IL-10。Th2型免疫反应主要有利于体液免疫反应的发展,如抗体反应。

[0104] 如本文所使用的,“过继性T细胞治疗”涉及分离肿瘤特异性或肿瘤非特异性T细胞,以及离体扩增多个此类肿瘤特异性或肿瘤非特异性T细胞,以在受试者中实现更多数量的此类T细胞。

[0105] T细胞可根据已知技术从肿瘤如根据本发明接受治疗的受试者的肿瘤(肿瘤浸润性淋巴细胞,TIL),或者从外周血(外周血淋巴细胞)如从根据本发明接受治疗的受试者抽取的外周血中收集。

[0106] T细胞可为任何适当类型的T细胞,包括但不限于细胞毒性T细胞(CTL;在表面表达CD8的T淋巴细胞(即CD8+T细胞)、CD4+T细胞、嵌合抗原受体T细胞(CAR T细胞)以及T细胞受体基因转导(TCRtg)淋巴细胞。

[0107] T细胞可从人类受试者分离出来,但原则上可从任何哺乳动物物种(优选地灵长类物种)中分离出来。T细胞可与受体受试者是同种异体的(即,分离自同一物种但不同的供体);或者,T细胞可为自体同源的(即,供体和受体是同一者)。

[0108] 多个T细胞可包含一种单一类型的T细胞,或者可为各细胞类型的混合物。所需的细胞数量将取决于T细胞群旨在的最终用途,以及其中所包括的细胞类型。例如,如果期望对特定抗原特异性的细胞,则该群体可含有70%以上,如80%以上、85%以上、90%以上或如95%以上的此类细胞。

[0109] 可通过已知技术(如与抗体的亲和结合)针对所期望类型的T细胞富集多个T细胞。在富集步骤之后,可根据已知的技术(包括但不限于美国专利No.6,040,177中所描述的技术)或者对本领域技术人员而言显而易见的其变型形式对所期望的T细胞进行体外扩增。例

如,可如下扩增所期望的T细胞群或亚群:通过在体外向培养基中添加初始T淋巴细胞群,然后向培养基中添加饲养细胞,如非分裂外周血单个核细胞(PBMC)(例如,使得对于要扩增的初始群体中的每个T淋巴细胞而言,所得的细胞群含有至少约5、10、20、或40个或更多个PBMC饲养细胞);以及孵育培养物(例如,在足以扩增T细胞的数量的时间内)。向培养基中添加T细胞和饲养细胞的次序可根据需要颠倒。培养物可典型地在适于T淋巴细胞生长的温度等条件下孵育。对于人T淋巴细胞的生长,例如,温度通常为至少约25摄氏度,优选地至少约30度,更优选地约37度。

[0110] CAR T细胞可通过本领域已知的技术产生:简而言之,从受试者中采集T细胞。接下来,使用病毒或非病毒载体,将T细胞转导成用于表达嵌合抗原受体(CAR),该受体包含与T细胞信号传导结构域融合的抗体结合结构域。在扩增后,将遗传工程化T细胞给药于经输注治疗的受试者。

[0111] “治疗周期”在本文中定义为按有规律的计划表重复的一段治疗期以及之后的一段休息期(无治疗)。例如,治疗周期包含给予一周治疗,然后休息三周。而且,治疗周期可包含给药单剂的药物,继之以休息期,如休息一周、两周或三周的时段,之后给药另一剂。小时间窗内多次小剂量;例如,在2-24小时内,如2-12小时内或在同一天,可被视为等于较大的单剂量,尤其是如果在剂量之间不存在产品的清除或实质清除。

[0112] 术语“治疗”是指给药有效量的一种或多种治疗活性产品;例如,免疫原性组合物和结合剂(如本申请中所定义),目的是缓解、改善、阻止或根除症状或疾病状态。

[0113] 如在本文可互换使用的术语“治疗有效量”或“有效量”可指当单独地或与其它化合物(如其它活性成分)联合给药时,可足以预防所治疗的障碍、疾病、或病症的一个或多个症状的发展或者在一定程度上缓和这些症状的化合物(如药物组合物中的活性成分)的量。术语“治疗有效量”也可指足以引发研究人员、兽医、医生或临床医师所寻求的细胞、组织、系统、动物、或人类的生物或医学反应的化合物的量。

[0114] 如本文所用,术语“人CD3”是指人分化簇3蛋白,它是T细胞协同受体蛋白复合物的一部分,并且由四条不同的链构成。CD3也存在于其它物种中,因此,除非上下文矛盾,否则术语“CD3”可在本文中使用并且不限于人CD3。在哺乳动物中,复合物含有CD3γ(gamma)链(例如人CD3γ链Swissprot P09693、或食蟹猴CD3γSwissprot Q95LI7)、CD3δ(delta)链(例如人CD3δSwissprot P04234、或食蟹猴CD3δSwissprot Q95LI8)、两个CD3ε(epsilon)链(例如人CD3εSwissprot P07766;食蟹猴CD3εSwissprot Q95LI5或恒河猴CD3ε(Swissprot G7NCB9)),以及CD3ζ(zeta)链(例如人CD3ζSwissprot P20963、食蟹猴CD3ζSwissprot Q09TK0)。这些链与称为T细胞受体(TCR)的分子缔合并在T细胞中生成激活信号。TCR和CD3分子一起构成TCR复合物。

[0115] SEQ ID NO:1显示了成熟人CD3ε(epsilon)的氨基酸序列,如本文所用,术语“成熟”是指不包含任何信号或前导序列的蛋白质。

[0116] 众所周知的是信号肽序列的同源性、长度和切割位点的位置在不同的蛋白质之间差异显著。信号肽可通过不同的方法来测定,例如根据SignalP应用程序(可获得于http://www.cbs.dtu.dk/services/SignalP/)。

[0117] 在一个具体实施方案中,本发明的结合剂结合CD3的ε链,如人CD3(SEQ ID NO:1)的ε链。在又一个具体实施方案中,人源化或嵌合抗体结合人CD3ε(epsilon)(SEQ ID NO:1)

的N末端部分的氨基酸1-27内的表位。在这样的具体实施方案中,抗体可甚至进一步与其它非人灵长类物种,如食蟹猴(食蟹猴CD3ε)和/或恒河猴(恒河猴CD3 epsilon)发生交叉反应。

[0118] 本发明基于实验数据,证实了采用结合CD3和肿瘤靶标的结合剂来治疗肿瘤或癌症不需要存在肿瘤特异性T细胞。因此,仅仅在肿瘤部位存在T细胞似乎就足以使结合剂提供对肿瘤生长的效应,并且疫苗活化的T细胞似乎进入肿瘤中。

[0119] 这些数据进一步显示,能够加强受试者的现有T细胞反应的疫苗(如例如儿童加强疫苗)可以与结合CD3和肿瘤细胞上的靶抗原的结合剂联合使用,由此增加结合剂的抗肿瘤活性。

[0120] 因此,在第一方面,本发明提供了一种用于在有此需要的受试者中预防或减少肿瘤生长或者治疗癌症的方法,该方法包括向受试者提供:

[0121] i)结合剂,该结合剂包含结合CD3(如人CD3)的抗原结合区,以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶抗原的抗原结合区;以及试剂,

[0122] ii)免疫原性组合物,该免疫原性组合物包含至少一种疫苗抗原。

[0123] 疫苗抗原可特别地为非肿瘤特异性疫苗抗原。

[0124] 免疫原性组合物可为疫苗,如预防性疫苗或治疗性疫苗。

[0125] 目前优选的是免疫原性组合物是针对感染性疾病;例如病毒或细菌感染的疫苗,因为这样的疫苗通常易于获得且成本较低。

[0126] 疫苗可针对选自下组的感染性疾病或感染:霍乱(霍乱弧菌(V.cholerae);例如WC/rBS)、白喉(白喉棒状杆菌(Corynebacterium diphtheriae))、b型流感嗜血杆菌(Haemophilus influenzae type b)(Hib)、甲型肝炎、乙型肝炎、人乳头瘤病毒、流感、冠状病毒、脑炎、麻疹、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎(LCM)(淋巴细胞性脉络丛脑膜炎哺乳动物沙粒病毒(mammarenavirus)(LCMV))、冠状病毒、脑炎、麻疹、淋巴细胞性脉络丛脑膜炎(LCM)(淋巴细胞性脉络丛脑膜炎哺乳动物沙粒病毒(LCMV))、脑膜炎球菌疾病(脑膜炎奈瑟氏球菌(Neisseria meningitidis))、腮腺炎、百日咳/白日咳(百日咳博德特菌(Bordetella pertussis))、肺炎球菌疾病/感染(肺炎链球菌(streptococcus pneumoniae))、脊髓灰质炎(小儿麻痹症)、狂犬病、轮状病毒感染、风疹/德国麻疹、破伤风(破伤风梭菌(Clostridium tetani))、天花、伤寒(伤寒沙门氏菌(Salmonella typhi))、水痘/禽痘、黄热病、结核病、斑块(plague)(鼠疫耶尔森氏菌(Yersinia pestis))、蝙蝠丽沙病毒(lyssavirus)、日本脑炎、Q热病(贝氏柯克斯体(Coxiella burnetiid))、水痘带状疱疹(禽痘)、炭疽(炭疽芽孢杆菌(Bacillus anthracis))。

[0127] 感染可特别地为冠状病毒感染,如严重急性呼吸综合征冠状病毒2(SARS-CoV-2)感染。

[0128] 感染性疾病可为冠状病毒病2019(COVID-19)。

[0129] 感染可为流感感染。

[0130] 感染性疾病为流感。

[0131] 感染可为淋巴细胞性脉络丛脑膜炎哺乳动物沙粒病毒(LCMV)感染。

[0132] 感染性疾病可为淋巴细胞性脉络丛脑膜炎(LCM)。

[0133] 免疫原性组合物可选自:

[0134] 活疫苗,如减毒活疫苗,

[0135] 灭活疫苗,

[0136] 裂解疫苗(split vaccine),如裂解病毒疫苗,

[0137] 基于病毒样颗粒的疫苗,

[0138] 级分疫苗,如亚单位疫苗、基于蛋白质的疫苗、基于肽的疫苗、基于多糖的疫苗、或缀合疫苗,

[0139] 重组疫苗;以及

[0140] 基于核酸的疫苗,如基于病毒载体或基于mRNA的疫苗。

[0141] 特别地,免疫原性组合物可为活疫苗,例如减毒活疫苗;如

[0142] 病毒减毒活疫苗;例如麻疹减毒活疫苗、腮腺炎减毒活疫苗、风疹减毒活疫苗、流感减毒活疫苗、禽痘/水痘带状疱疹减毒活疫苗、减毒活牛痘(天花)疫苗、口服小儿麻痹减毒活疫苗(OPV)(Sabin)、轮状病毒减毒活疫苗或黄热病减毒活疫苗;

[0143] 或如

[0144] 细菌减毒活疫苗;例如BCG疫苗、针对伤寒沙门氏菌的减毒活疫苗(Ty21)(口服伤寒疫苗或流行性斑疹伤寒疫苗)、霍乱减毒活疫苗。

[0145] 或者,免疫原性组合物可为灭活疫苗;如

[0146] 灭活病毒疫苗;例如脊髓灰质炎病毒灭活疫苗(IPV)(Salk疫苗)、流感灭活疫苗、狂犬病灭活疫苗、日本脑炎灭活疫苗或甲型肝炎灭活疫苗;

[0147] 或如

[0148] 灭活细菌疫苗,例如灭活伤寒疫苗、灭活霍乱疫苗、灭活鼠疫疫苗、灭活Q热疫苗、灭活炭疽疫苗或灭活百日咳疫苗。

[0149] 级分疫苗可为选自以下的基于蛋白质的疫苗:

[0150] 类毒素疫苗,例如包含破伤风类毒素或白喉类毒素的疫苗;

[0151] 亚单位疫苗;以及

[0152] 亚病毒粒子疫苗。

[0153] 级分疫苗可为基于多糖的疫苗;例如基于多糖的脑膜炎球菌疾病(脑膜炎奈瑟氏球菌(A,C,Y.W135))疫苗、基于多糖的伤寒杆菌疫苗或基于多糖的肺炎球菌疾病(肺炎链球菌)疫苗。

[0154] 级分疫苗可为包含与多肽连接的多糖的缀合疫苗;例如缀合的b型流感嗜血杆菌(Haemophilia influenza type b,Hib)疫苗、缀合的肺炎链球菌疫苗、缀合的脑膜炎奈瑟氏球菌疫苗。

[0155] 免疫原性组合物可为重组疫苗。

[0156] 世界卫生组织(WHO)提供了资格预审疫苗列表,可获得于:https://extranet.who.int/gavi/PQ_Web/。WHO疫苗资格预审是通过标准化程序进行的综合评估,旨在确定产品是否符合免疫规划的安全性和功效的要求。因此,WHO资格预审的疫苗是安全、有效的,并且可根据本发明与如本文所定义的结合剂联合使用。

[0157] 表3:WHO资格预审疫苗列表

[0158]

疫苗类型	名称	制造商
BCG	BCG Freeze Dried Glutamate 疫苗	Japan BCG Laboratory
	BCG Freezed Dried Glutamate 疫苗	Japan BCG Laboratory
	BCG 疫苗	BB- NCIPD Ltd.
	BCG 疫苗	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	BCG 疫苗 SSI	AJ Vaccines A/S
霍乱：灭活口服	Shanchol	Sanofi Healthcare India Private Limited
	Dukoral	Valneva Sweden AB
	Euvichol	EuBiologics Co., Ltd.
	Euvichol-Plus	EuBiologics Co., Ltd.
登革热四价（活，减毒）	Dengvaxia	Sanofi Pasteur SA
白喉-破伤风	Diphtheria and Tetanus Vaccine Adsorbed(吸附白喉破伤风联合疫苗)（儿科用）	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	Adsorbed DT Vaccine(吸附 DT 疫苗)	PT Bio Farma（Persero）
	Diftet	BB- NCIPD Ltd.（Bul Bio-National Center of Infectious and Parasitic Diseases Ltd.）
白喉-破伤风（抗原含量降	Tetadif	BB- NCIPD Ltd.

[0159]

低）	Diphtheria and Tetanus Vaccine Adsorbed for Adults and Adolescents(成人及青少年用吸附白喉破伤风联合疫苗)	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	成人用 IMOVAX dT	Sanofi Pasteur SA
白喉-破伤风-百日咳（无细胞）	Adacel	Diphtheria-Tetanus-Pertussis (acellular)
	Boostrix	GlaxoSmithKline Biologicals SA
白喉-破伤风-百日咳（无细胞）-乙型肝炎-B 型流感嗜血杆菌-小儿麻痹症（灭活）	Hexaxim	Sanofi Pasteur SA
白喉-破伤风-百日咳（全细胞）	Diphtheria-Tetanus-Pertussis Vaccine Adsorbed(吸附白喉-破伤风-百日咳疫苗)	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	DTP 疫苗	PT Bio Farma（Persero）
	TRIPVAC	Biological E. Limited
白喉-破伤风-百日咳（全细胞）-b 型流感嗜血杆菌	Diphtheria, Tetanus, Pertussis and Haemophilus influenzae type b Conjugate Vaccine(白喉、破伤风、百日咳和 B 型流感嗜血杆菌缀合物疫苗)	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
白喉-破伤风-百日咳（全细胞）-乙型肝炎	Diphtheria ,Tetanus, Pertussis and Hepatitis B Vaccine Adsorbed(吸附白喉、破伤风、百日咳和乙型肝炎疫苗)	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
白喉-破伤风-百日咳（全细胞）-乙型肝炎-b 型流感嗜	Diphtheria, Tetanus, Pertussis, Hepatitis B and	Serum Institute of India Pvt. Ltd.

[0160]

血杆菌	Haemophilus influenzae type b Conjugate Vaccine(白喉、破伤风、百日咳、乙型肝炎和B型流感嗜血杆菌缀合物疫苗)	
	Diphtheria, Tetanus, Pertussis, Hepatitis B and Haemophilus influenzae type b Conjugate Vaccine Adsorbed(吸附白喉、破伤风、百日咳、乙型肝炎和b型流感嗜血杆菌结合疫苗)	Serum Institute of India Pvt. Ltd.（India）
	Pentabio	PT Bio Farma（Persero）
	ComBE Five（液体）	Biological E. Limited
	ComBE Five（重构）.	Biological E. Limited
	Eupenta	LG Chem Ltd
	Shan-5	Sanofi Healthcare India Private Limited
	Easyfive-TT	Panacea Biotec Ltd.
埃博拉-扎伊尔（Ebola Zaire）（rVSVΔG-ZEBOV-GP，活减毒）	ERVEBO	Merck Vaccines
b型流感嗜血杆菌	Act-HIB	Sanofi Pasteur SA
	Haemophilus influenzae type b Conjugate Vaccine(B型流感嗜血杆菌缀合物疫苗)	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	Quimi-Hib	Centro de Ingenieria Genetica y Biotecnologia
甲型肝炎(人二倍体细胞)，灭活（成人用）	HEALIVE	Sinovac Biotech Co. Ltd
	Havrix 1440 Adult	GlaxoSmithKline Biologicals

[0161]

		SA
甲型肝炎(人二倍体细胞)，灭活（儿科用）	HEALIVE	Sinovac Biotech Co. Ltd
	Havrix 720 Junior	GlaxoSmithKline Biologicals SA
乙型肝炎	Heberbiovac HB	Centro de Ingenieria Genetica y Biotecnologia
	Engerix	GlaxoSmithKline Biologicals SA
	Hepatitis B Vaccine(乙型肝炎疫苗)（rDNA）（成人用）	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	Hepatitis B Vaccine(乙型肝炎疫苗)（rDNA）（儿科用）	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	Euvax B	LG Chem Ltd
乙型肝炎（儿科用）	Euvax B	LG Chem Ltd
人类乳突病毒（二价）	Cervarix	GlaxoSmithKline Biologicals SA
人乳头瘤病毒（九价）	Gardasil 9	Merck Vaccines
人乳头瘤病毒（四价）	Gardasil	Merck Vaccines
流感，大流行（pandemic）H1N1	Influenza A(甲型流感)（H1N1）2009 单价疫苗	MedImmune
	ASOVAC Influenza Vaccine, Live Attenuated (Human) Freeze-Dried(冻干 NASOVAC 流感疫苗，活减毒（人类）)	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	Panenza	Influenza, pandemic H1N1
	Green Flu-S	Green Cross Corporation
	Panvax	Seqirus Limited
	Celtura	Seqirus GmbH
	Fluvirin-H1N1	Seqirus Vaccines Limited
	Focetria	Seqirus Vaccines Limited

[0162]

	Influenza A(甲型流感)（H1N1）2009 单价疫苗	Sanofi Pasteur-USA
季节性流感病毒（四价）	Fluzone Quadrivalent	Sanofi Pasteur-USA
	注射用 SKYCellflu Quadrivalent	SK Bioscience Co., Ltd.
	注射用 SKYCellflu Quadrivalent Multi	SK Bioscience Co., Ltd.
	Afluria® Quadrivalent	Seqirus Limited
	注射用 GCFLU Quadrivalent	Green Cross Corporation
	注射用 GCFLU Quadrivalent Multi	Green Cross Corporation
季节性流感病毒（三价）	注射用 GC FLU	Green Cross Corporation
	注射用 GC FLU Multi	Green Cross Corporation
	注射用 SKYCellflu®	SK Bioscience Co., Ltd.
	注射用 SKYCellflu® Multi	SK Bioscience Co., Ltd.
	Afluria®	Seqirus Limited
	Influenza Vaccine(流感疫苗)（病毒裂解，灭活）	Hualan Biological Bacterin Co., Ltd
	Fluzone	Sanofi Pasteur-USA
	Serinflu	Abbott Biologicals BV
	注射用 IL-YANG FLU Vaccine	IL-YANG PHARMACEUTICAL CO., LTD.
	Fluvirin	Seqirus Vaccines Limited
	AGRIFLU	Seqirus Vaccines Limited
	Vaxigrip	Sanofi Pasteur SA
	Nasovac-S Influenza Vaccine, Live, Attenuated (Human)(Nasovac-S 流感疫苗，活减毒（人类）)	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
日本脑炎疫苗（灭活）（3μg	JEEV®（3μg）	Biological E. Limited

[0163]

儿科用）		
日本脑炎疫苗（灭活） 6μg	JEEV®（6μg）	Biological E. Limited
日本脑炎疫苗（活，减毒）	Japanese Encephalitis Vaccine Live(日本脑炎活疫苗)（SA14-14-2）	Chengdu Institute of Biological Products Co.,Ltd
	IMOJEV MD	GPO-MBP Co., Ltd.
麻疹	Measles 疫苗	PT Bio Farma（Persero）
	Measles Vaccine, Live, Attenuated(麻疹疫苗，活减毒)	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
麻疹和风疹	Measles and Rubella Vaccine, Live, Attenuated(麻疹和风疹疫苗，活，减毒)	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	Measles And Rubella Vaccine (Live) (Attenuated, Freeze Dried)(麻疹和风疹疫苗（活）（减毒，冻干）)	Biological E. Limited
麻疹、腮腺炎和风疹	rHA M-M-R II	Merck Vaccines
	Measles, Mumps and Rubella Vaccine, Live, Attenuated(麻疹、腮腺炎和风疹疫苗，活减毒)	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	Priorix	GlaxoSmithKline Biologicals SA
A 群脑膜炎球菌缀合物疫苗 10 μg	Meningococcal A Conjugate MenAfriVac	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
A 群脑膜炎球菌缀合物疫苗 5 μg	Meningococcal A Conjugate 5 micrograms MenAfriVac 5μg	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
ACYW-135 群脑膜炎球菌（缀合物疫苗）	Nimenrix	Pfizer
	Menactra	Sanofi Pasteur-USA

[0164]

	Menveo	GlaxoSmithKline Vaccines S.r.l.
肺炎球菌（缀合物）	Synflorix	GlaxoSmithKline Biologicals SA
Polio Vaccine - Inactivated(小儿麻痹疫苗 - 灭活)（IPV）	IPV Vaccine SSI	AJ Vaccines A/S
	Picovax	AJ Vaccines A/S
	Poliomyelitis Vaccine(脊髓灰质炎疫苗)（灭活）	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	IMOVAX POLIO	Sanofi Pasteur SA
	Poliomyelitis vaccine(脊髓灰质炎疫苗)	Bilthoven Biologicals B.V.
	Poliomyelitis vaccine(脊髓灰质炎疫苗)（多剂，注射用混悬剂 2.5 mL）	Bilthoven Biologicals B.V.
	ShanIPV	Sanofi Healthcare India Private Limited
	Poliorix	GlaxoSmithKline Biologicals SA
小儿麻痹疫苗-口服（OPV）二价 1 和 3 型	Polio Sabin One and Three	GlaxoSmithKline Biologicals SA
	Bharat Biotech International Limited	BIOPOLIO B1/3
	Bivalent OPV Type 1 and 3 Poliomyelitis Vaccine, Live(二价 OPV 1 和 3 型脊髓灰质炎疫苗，活)（口服）	Panacea Biotec Ltd.
	Poliomyelitis Vaccine (live, oral attenuated, human Diploid Cell), type 1 and 3(脊髓灰质炎疫苗（活，口服减毒，人二倍体细胞），1 和	Beijing Institute of Biological Products Co., Ltd.

[0165]

	3 型)	
	Poliomyelitis Vaccine (Oral), Bivalent types 1 and 3(脊髓灰质炎疫苗（口服），二价 1 和 3 型)	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	Bivalent type 1&3 Oral Poliomyelitis vaccine(二价 1&3 型口服脊髓灰质炎疫苗), IP（bOPV1&3）	Haffkine Bio Pharmaceutical Corporation Ltd
	Bivalent Oral Poliomyelitis Vaccine Type 1&3(二价口服脊髓灰质炎疫苗 1&3 型)（bOPV 1&3）	PT Bio Farma（Persero）
小儿麻痹疫苗 -口服(OPV)单价 1 型	Monovalent Oral Poliomyelitis Vaccine Type 1(单价口服脊髓灰质炎疫苗 1 型)（mOPV1）	PT Bio Farma（Persero）
	Monovalent type 1 Oral Poliomyelitis vaccine(单价 1 型口服脊髓灰质炎疫苗), IP（mOPV1）	Haffkine Bio Pharmaceutical Corporation Ltd
	ORAL MONOVALENT TYPE 1 POLIOMYELITIS VACCINE	Sanofi Pasteur SA
	Polio Sabin Mono T1	GlaxoSmithKline Biologicals SA
	Polio Sabin Mono Two（口服）	GlaxoSmithKline Biologicals SA
	ORAL MONOVALENT TYPE 2 POLIOMYELITIS VACCINE（mOPV2）	Sanofi Pasteur SA（France）
	Monovalent Oral	PT Bio Farma（Persero）

[0166]

	Poliomyelitis Vaccine Type 2(单价口服脊髓灰质炎疫苗 2 型)	
	ORAL MONOVALENT TYPE 3 POLIOMYELITIS VACCINE	Sanofi Pasteur SA
	Polio Sabin Mono Three（口服）	GlaxoSmithKline Biologicals SA
小儿麻痹疫苗-口服（OPV）三价	BIOPOLIO	Bharat Biotech International Limited
	OPVERO	Sanofi Pasteur SA
	Oral polio	PT Bio Farma（Persero）
	Polioviral 疫苗	Haffkine Bio Pharmaceutical Corporation Ltd
狂犬病	VERORAB	Sanofi Pasteur SA
	Rabies Vaccine Inactivated (Freeze Dried)(狂犬病灭活疫苗（冻干）)（RABIVAX-S）	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	VaxiRab N	Cadila Health Care Ltd
轮状病毒	Rotarix	GlaxoSmithKline Biologicals SA
	Rotateq	Merck Vaccines
轮状病毒（活，减毒）	ROTASIIL	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	ROTASIIL®Thermo	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	Rotavac	Bharat Biotech International Limited
风疹	Rubella Vaccine, Live, Attenuated(风疹疫苗，活减毒)	Serum Institute of India Pvt. Ltd.

[0167]

破伤风类毒素	Tetanus Toxoid Vaccine Adsorbed(吸附破伤风类毒素疫苗)	Serum Institute of India Pvt. Ltd.
	TETAVAX	Sanofi Pasteur SA
	Bett	Biological E. Limited
	ShanTT	Sanofi Healthcare India Private Limited
	Tetatox	BB- NCIPD Ltd.（Bul Bio-National Center of Infectious and Parasitic Diseases Ltd.）
	TT 疫苗	PT Bio Farma（Persero）
伤寒（缀合物）	Typbar-TCV	Bharat Biotech International Limited
伤寒（多糖）	Typhim-Vi	Sanofi Pasteur SA
水痘	Varivax	Merck Vaccines
	注射用 SKYVaricella	SK Bioscience Co., Ltd.
黄热病	Stabilized Yellow Fever Vaccine(稳定黄热病疫苗)	Institut Pasteur de Dakar
	STAMARIL	Sanofi Pasteur SA
	Yellow Fever(黄热病)	Bio-Manguinhos/Fiocruz

[0168] 因此，根据本发明使用的免疫原性组合物可选自：BCG；霍乱：灭活口服；登革热四价(活，减毒)；白喉-破伤风；白喉-破伤风(减少的抗原含量)；白喉-破伤风-百日咳(无细胞)(DTaP/Tdap)；白喉、破伤风、无细胞百日咳和b型流感嗜血杆菌(DTaP-Hib)；白喉-破伤风-百日咳(无细胞)-乙型肝炎-b型流感嗜血杆菌-小儿麻痹(灭活)；白喉-破伤风-百日咳(全细胞)(DTP)；白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-b型流感嗜血杆菌(DTP-Hib)；白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙型肝炎；白喉-破伤风-百日咳(全细胞)-乙型肝炎-b型流感嗜血杆菌；埃博拉-扎伊尔(rVSVΔG-ZEBOV-GP，活减毒)；b型流感嗜血杆菌(Hib)；甲型肝炎(人二倍体细胞)，灭活(成人用)；甲型肝炎(人二倍体细胞)，灭活(儿科用)；乙型肝炎、乙型肝炎(儿科用)；人乳头瘤病毒(二价)；人乳头瘤病毒(九价)；人乳头瘤病毒(四价)；流感，大流行H1N1；流感，季节性(四价)；流感，季节性(三价)；日本脑炎疫苗(灭活)；日本脑炎疫苗(活，减毒)；麻疹；麻疹和风疹；麻疹、腮腺炎和风疹(MMR)；麻疹、腮腺炎、风疹和水痘(MMRV)，麻疹、腮腺炎和风疹(MMR)；脑膜炎球菌A缀合物10μg；脑膜炎球菌A缀合物5μg；脑膜炎球菌ACYW-135(缀合物疫苗)；肺炎球菌(缀合物)；小儿麻痹疫苗-灭活(IPV)；小儿麻痹疫苗-口

服(OPV)二价1和3型;小儿麻痹疫苗-口服(OPV)单价1型;小儿麻痹疫苗-口服(OPV)三价;狂犬病;轮状病毒;轮状病毒(活,减毒);风疹;破伤风类毒素;伤寒(缀合物);伤寒(多糖);水痘;黄热病,卡介苗(BCG)。

[0169] 免疫原性组合物可为COVID-19疫苗。

[0170] COVID-19疫苗可选自BNT162b2/COMIRNATY(Tozinameran)(Pfizer BioNTech)、CVnCoV/CV07050101(Zorecimeran)(CureVac)、AZD1222Vaxzevria(AstraZeneca)、mRNA-1273(Moderna)、SARS-CoV-2疫苗(Vero细胞)、灭活(lnCoV)(Sinopharm/Beijing Institute of Biological Products Co.,Ltd.(BIBP))、CoV2 preS dTM-AS03疫苗(Sanofi)和Covishield(ChAdOx1_nCoV-19)(Serum Institute of India Pvt.Ltd)、Sputnik V(rAd26和rAd5)(Acellena)、Sputnik Light(rAd26)(Acellena)、Ad26.COV2.S(JNJ78436735)(Janssen)、CoronaVav(Sinovac)、BBIBP-CorV(Beijing Institute of Biological Products;China National Pharmaceutical Group(Sinopharm))、EpiVacCorona(Federal Budgetary Research Institution State Research Center of Virology and Biotechnology)、Convidicea(CanSino Biologics)和MVC-COV1901(Medigen Vaccine Biologics Corp.;Dynavax)。

[0171] 免疫原性组合物可为流感疫苗。

[0172] 免疫原性组合物可为选自以下类型的流感疫苗:流感大流行(H1N1)、季节性流感(三价)和季节性流感(四价)。

[0173] 感染性疾病可为淋巴细胞性脉络丛脑膜炎(LCM)疫苗。

[0174] 免疫原性组合物可为小儿疫苗或儿童疫苗。

[0175] 免疫原性组合物可特别地为儿童加强疫苗。

[0176] 或者,免疫原性组合物可为癌症疫苗,如预防性或治疗性癌症疫苗。

[0177] 疫苗抗原可为肿瘤相关抗原或肿瘤特异性抗原。

[0178] 免疫原性组合物可包含由所述肿瘤或癌症表达的疫苗抗原。

[0179] 靶抗原和疫苗抗原可均由所述肿瘤或癌症表达。根据这样的实施方案,结合剂和免疫原性组合物针对或者靶向相同的肿瘤或癌症。

[0180] 在根据本发明的方法中,疫苗抗原和靶抗原可为相同的,或者疫苗抗原可为靶抗原的一部分、子序列或变体。

[0181] 免疫原性组合物可包含选自以下的疫苗抗原:由所述肿瘤过表达的抗原,如Her2/neu、生存素或Muc-1;癌症新抗原,如p53新抗原;癌-睾丸抗原,如MAGE-A3、MAGE-A2、MAGE-A4、PRAME、CT83、SSX2或NY-ESO-1;分化抗原,如Mart1、PSA或PAP,以及病毒相关抗原,如HPV抗原。

[0182] 免疫原性组合物可为个性化癌症疫苗,并且疫苗抗原可为对受试者的肿瘤特异性的新抗原。

[0183] 优选地,疫苗抗原包含一个或多个T细胞表位。

[0184] 而且,免疫原性组合物优选地能够在体内和/或体外引发细胞毒性T细胞反应。

[0185] 进一步优选的是疫苗能够引发T细胞反应,该T细胞反应包含所述肿瘤或癌症的T细胞活化和/或T细胞浸润。

[0186] 而且,根据本发明的方法中使用的免疫原性组合物可能够引发T细胞反应,该T细

胞反应包含对所述肿瘤或癌症的T细胞浸润以及肿瘤浸润性T细胞的活化。

[0187] 在根据本发明的方法中使用的免疫原性组合物可能够引发肿瘤中的免疫细胞的浸润和/或扩增,如自然杀伤(NK)细胞和/或树突状细胞(DC)的浸润和/或扩增。

[0188] 技术人员将容易地能够确定免疫原性组合物引发T细胞浸润或T细胞活化的能力。作为一个实例,可在携带肿瘤的小鼠中使用程序对T细胞浸润和/或T细胞活化进行测定,所述肿瘤表达与所述结合剂的第2结合区结合的抗原,在所述程序中使小鼠经受肿瘤特异性T细胞转移并然后皮下注射免疫原性组合物并随后注射结合剂。

[0189] 以举例的方式,T细胞浸润和/或活化可在包括以下步骤的程序中进行测定:

[0190] i)提供T细胞,该T细胞表达能够与结合剂结合的抗原,并且组成性表达能够产生第1生物发光的第1氧化酶以及能够产生第2生物发光的第2氧化酶,其中第2氧化酶的表达由T细胞活化诱导,如通过活化T细胞核因子(NFAT),

[0191] ii)向携带表达与所述结合剂的肿瘤靶向结合区结合的抗原的肿瘤的小鼠如白化C57BL/6小鼠,经静脉内注射在尾静脉中注射i)中所定义的T细胞,

[0192] iii)在ii)中的T细胞注射后1和8天,在尾基部皮下注射向小鼠给药两剂的免疫原性组合物,

[0193] iv)在ii)中的T细胞注射后10天和14天,经静脉内注射或输注向小鼠给药两剂的所述结合剂,

[0194] v)向小鼠注射所述氧化酶中每者的底物,并且测量所述第1和第2生物发光。

[0195] 另外,以举例的方式,T细胞浸润和/或活化是使用基本上如本文的实施例4中所示的程序,或者使用实施例4中所示的程序来测定的。

[0196] 在另一些实施方案中,根据本发明的方法包括确定所述受试者中的现有T细胞免疫。现有T细胞免疫可来自于先前的疫苗接种,例如用如上所定义的疫苗。或者,现有T细胞免疫可为先前感染(包括以上所定义的任一种病原体的感染)的结果,或者作为对所述肿瘤的免疫反应的结果。

[0197] 现有T细胞免疫是通过测量外周T细胞活化来确定的。

[0198] 根据本发明的方法可以包括确定受试者先前是否参与疫苗接种规划,如儿童疫苗接种规划。这可为确定现有T细胞免疫的一种方便方式,该现有T细胞免疫可作为根据本发明的方法的一部分被加强,特别是在儿童疫苗接种规划良好建立且充分记录多年的国家或地区。

[0199] 根据本发明的方法可使用免疫原性组合物,它是针对感染或感染性疾病的疫苗,针对该感染或感染性疾病,受试者先前已经并且/或者已经发展出T细胞免疫反应;如以上所定义的任何感染或感染性疾病。

[0200] 免疫原性组合物可根据常规技术与药学上可接受的载剂或稀释剂以及任何其它已知的佐剂和赋形剂一起配制。药学上可接受的载剂或稀释剂以及任何其它已知的赋形剂应当适合与疫苗抗原一起使用以及所选的给药模式。根据本发明使用的免疫原性组合物还可包括稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、去污剂(例如非离子去污剂,如Tween-20或Tween-80)、稳定剂(例如,糖或无蛋白氨基酸)、防腐剂、组织固定剂、增溶剂和/或适于包含在药物组合物中的其它材料。

[0201] 根据本发明的方法还可包括给药佐剂。

[0202] 能够引发Th1和Th2反应两者的佐剂,以及具有驱动免疫反应向Th1反应或向Th2反应的能力的佐剂是可用的。因此,根据本发明的方法中使用的佐剂可为Th1/Th2佐剂、Th1佐剂或Th2佐剂;优选地Th1佐剂。

[0203] 同样,免疫原性组合物在与佐剂一起给药时可能够引发NK细胞反应和/或Th1/Th2型免疫反应、Th1型免疫反应、或Th2型免疫反应;优选地Th1型免疫反应。

[0204] 根据本发明的方法中使用的免疫原性组合物可包含佐剂。在这样的实施方案中,特别地,预期佐剂的单独给药不能提供任何额外的有益效果。

[0205] 根据这些实施方案,包含佐剂的免疫原性组合物可能够引发Th1/Th2型免疫反应、Th1型免疫反应、或Th2型免疫反应;优选地Th1型免疫反应。在本发明的上下文中,Th1型免疫反应可为优选的,因为该反应继而生成具有靶向和裂解表达抗原的肿瘤细胞的能力的细胞毒性T细胞。

[0206] 就本发明的目的而言,可使用包含铝盐;例如明矾($XAl(SO_4)_2 \cdot 12H_2O$;其中X为单价阳离子,如K^+或NH_4^+)的佐剂。传统上,包含铝盐的佐剂常用于针对传染性细菌和病毒的疫苗中。

[0207] 或者,佐剂可为基于乳液的佐剂,如水包油型乳液。

[0208] 在具体实施方案中,佐剂选自许可疫苗中常用的佐剂(Del Giudice等人,Seminars in Immunology 39,14-21,2018)。因此,佐剂可选自:

[0209] a)包含角鲨烯、聚山梨醇酯80和脱水山梨醇三油酸酯的佐剂;例如MF59,

[0210] b)包含角鲨烯、聚山梨醇酯80和α-生育酚的佐剂;例如AS03,

[0211] c)包含角鲨烯、聚氧乙烯、十六十八烷基醚(cetostearyl ether)、甘露糖醇和脱水山梨醇油酸酯的佐剂;例如AF03,

[0212] d)包含3-O-去酰基-4'-单磷酰脂质A(MPL)、皂树(Quillaja Saponaria Molina)级分21(QS-21)和脂质体的佐剂;例如AS01;以及

[0213] e)包含3-O-去酰基-4'-单磷酰脂质A(MPL)和氢氧化铝的佐剂;例如AS04。

[0214] 或者,佐剂可为Toll样受体(TLR)激动剂,如选自咪喹莫特(Imiquimod)(Aldara)、瑞喹莫德(resiquimod)和嘎德莫特(gardiquimod)的TLR7激动剂。

[0215] 佐剂可包含:

[0216] i)Toll样受体9(TLR9)激动剂,如选自脑膜炎奈瑟氏球菌孔蛋白B(porB)、CpG寡脱氧核苷酸(ODN)和tilsotolimod的TLR9激动剂,

[0217] ii)Toll样受体4(TLR4)激动剂,如选自单磷酰脂质A(MPL)、吡喃葡萄糖基脂质A(GLA)和新赛普酊-3(neoseptin-3)的TLR4激动剂,

[0218] iii)Toll样受体5(TLR5)激动剂,如选自莫比朗(mobilan)、恩托莫德(entolimod)或重组鞭毛蛋白FlicC的TLR5激动剂;和/或

[0219] iv)Toll样受体3(TLR3)激动剂,如选自Poly-IC及其衍生物的TLR3激动剂。

[0220] 佐剂可包含纳米粒子,如脂质纳米粒子(LPN);例如引入有佐剂的脂质纳米粒子。

[0221] 根据本发明的方法中使用的免疫原性组合物可包含细胞因子。或者,细胞因子可与免疫原性组合物联合给药,或者细胞因子可包括在佐剂中或者与佐剂联合,该佐剂任选地与免疫原性组合物联合给药于受试者,如以上所公开的任何佐剂。

[0222] 因此,根据本发明的方法可包括免疫原性组合物与细胞因子联合给药的步骤。细

胞因子优选地为白介素-2(IL2)受体激动剂如人IL2/阿地白介素(aldesleukin)、或人白介素-15、或两者中任一种的类似物。人白介素-2的氨基酸序列(成熟序列,不包括预测信号肽)如SEQ ID NO:55中所示。人白介素-15的氨基酸序列(成熟序列,不包括预测信号肽和前肽序列)如SEQ ID NO:56中所示。

[0223] 另外,根据本发明,可以使用经修饰或遗传工程化的细胞因子;例如,半衰期延长的免疫细胞因子,条件性呈活性的CD25结合缺陷细胞因子。具体实例包括NKTR-214(Bempegaldesleukin;PEG化IL2)Nektar Therapeutics、Neo-2/15(从头设计IL-2/IL-15模拟物)Neoleukin、IL-2v(CD25结合缺陷)Roche。

[0224] 在根据本发明的方法中,可通过肠胃外或全身给药,如通过注射或输注;例如通过静脉内注射或输注,将结合剂给药于受试者。

[0225] 优选地,结合剂以一个或多个治疗周期提供给受试者。

[0226] 结合剂可每周一次(1Q1W)、每两周一次(1Q2W)、每三周一次(1Q3W)或每四周一次(1Q4W)给予。

[0227] 免疫原性组合物可被给药于受试者以实现局部效应,并且/或者可通过局部给药(如通过注射到待治疗的肿瘤中)进行给药。

[0228] 或者,可将免疫原性组合物给药以实现全身效应,并且/或者其可通过全身给药,如通过口服给药、皮下注射、肌内注射、皮内注射或通过经粘膜途径进行给药。

[0229] 可将佐剂给药于受试者以实现局部效应/通过局部给药。例如,佐剂可通过注射到所述肿瘤中进行给药。

[0230] 可将佐剂给药以实现全身效应/通过全身给药,如通过口服给药、皮下注射、肌内注射、皮内注射或通过经粘膜途径。

[0231] 可通过肠胃外或全身给药,如通过注射或输注;例如通过静脉内注射或输注,将细胞因子给药于受试者。也可将其以核酸制剂(例如mRNA)的形式给药于受试者,用于原位产生所述细胞因子。

[0232] 在接受根据本发明的治疗之前,受试者可以已经接受过免疫原性组合物(例如疫苗)的治疗,并且也可接受过用于不同目的(例如用于治疗感染或感染性疾病)的佐剂。而且,在根据本发明的治疗之前,受试者可以已经接受过细胞因子(例如IL-2)的治疗。IL-2已被批准用于转移性肾细胞癌和转移性黑素瘤的治疗,并因此可作为癌症免疫疗法提供给受试者。然而,应当理解,在根据本发明的方法中,免疫原性组合物以及任选地佐剂和/或细胞因子(如白介素2受体激动剂)优选地作为所提供的治疗方案/相同治疗方案的一部分给药,以减少所述肿瘤的生长并且/或者治疗所述癌症。

[0233] 在本发明的另一些实施方案中,将免疫原性组合物的给药和结合剂的给药与过继性T细胞疗法联合。因此,根据本发明的方法可包括向受试者给药多个T细胞。

[0234] 可以与结合剂的给药同时或在同一天,与结合剂的第一剂的给药同时或在同一天,并且/或者作为结合剂的第一治疗周期的一部分,将免疫原性组合物给药于所述受试者。

[0235] 免疫原性组合物的给药与结合剂的给药,如免疫原性组合物的给药与结合剂的第一剂的给药和/或结合剂的第一治疗周期的起始可相隔至多2个月、如至多1个月、至多4周、至多3周、至多2周、至多1周、至多6天、至多5天、至多4天、至多3天或至多2天的时间段。

[0236] 免疫原性组合物的给药与结合剂的给药，如免疫原性组合物的给药与结合剂的第一剂的给药和/或结合剂的第一治疗周期的起始可相隔2天至2个月、如2天至1个月、2天至4周、2天至3周、2天至2周、2天至1周、3天至2个月、3天至1个月、3天至4周、3天至3周、3天至2周、3天至1周、4天至2个月、4天至1个月、4天至4周、4天至3周、4天至2周、4天至1周、5天至2个月、5天至1个月、5天至4周、5天至3周、5天至2周、5天至1周、6天至2个月、如6天至1个月、6天至4周、6天至3周、6天至2周、1周至2个月、1周至1个月、1至4周、1至3周、1至2周、3周至2个月、3周至1个月或3至4周的时间段。

[0237] 可以在结合剂的给药之前、在结合剂的第一剂量的给药之前，并且/或者在结合剂的第一治疗周期之前，将免疫原性组合物给药于所述受试者。

[0238] 可以在结合剂的给药之前、在结合剂的第一剂量的给药之前，并且/或者在结合剂的第一治疗周期之前2天至2个月；如在结合剂的给药之前、在结合剂的第一剂量的给药之前，并且/或者在结合剂的第一治疗周期之前2天至1个月、2天至4周、2天至3周、2天至2周、2天至1周、3天至2个月、3天至1个月、3天至4周、3天至3周、3天至2周、3天至1周、4天至2个月、4天至1个月、4天至4周、4天至3周、4天至2周、4天至1周、5天至2个月、5天至1个月、5天至4周、5天至3周、5天至2周、5天至1周、6天至2个月、6天至1个月、6天至4周、6天至3周、6天至2周、1周至2个月、1周至1个月、1至4周、1至3周、1至2周、3周至2个月、3周至1个月，或如3至4周，将免疫原性组合物给药于受试者。

[0239] 可以与结合剂的给药同时或在同一天，与结合剂的第一剂的给药同时或在同一天，并且/或者作为结合剂的第一治疗周期的一部分，将多个T细胞给药于所述受试者，或者将过继性T细胞疗法提供给所述受试者。

[0240] 可以在结合剂的给药之前、在结合剂的第一剂量的给药之前，并且/或者在结合剂的第一治疗周期之前，将多个T细胞给药于所述受试者，或者将过继性T细胞疗法提供给所述受试者。

[0241] 在根据本发明的方法中，

[0242] i)免疫原性组合物的给药以及多个T细胞的给药、或过继性T细胞疗法，与

[0243] ii)结合剂的给药，如结合剂的第一剂的给药，和/或结合剂的第一治疗周期的起始，

[0244] 可相隔2天至2个月、如2天至1个月、2天至4周、2天至3周、2天至2周、2天至1周、3天至2个月、3天至1个月、3天至4周、3天至3周、3天至2周、3天至1周、4天至2个月、4天至1个月、4天至4周、4天至3周、4天至2周、4天至1周、5天至2个月、5天至1个月、5天至4周、5天至3周、5天至2周、5天至1周、6天至2个月、如6天至1个月、6天至4周、6天至3周、6天至2周、1周至2个月、1周至1个月、1至4周、1至3周、1至2周、3周至2个月、3周至1个月或3至4周的时间段。

[0245] 可以在结合剂的给药之前、在结合剂的第一剂量的给药之前，并且/或者在结合剂的第一治疗周期之前2天至2个月；如在结合剂的给药之前、在结合剂的第一剂量的给药之前，并且/或者在结合剂的第一治疗周期之前2天至1个月、2天至4周、2天至3周、2天至2周、2天至1周、3天至2个月、3天至1个月、3天至4周、3天至3周、3天至2周、3天至1周、4天至2个月、4天至1个月、4天至4周、4天至3周、4天至2周、4天至1周、5天至2个月、5天至1个月、5天至4周、5天至3周、5天至2周、5天至1周、6天至2个月、6天至1个月、6天至4周、6天至3周、6天至2周、1周至2个月、1周至1个月、1至4周、1至3周、1至2周、3周至2个月、3周至1个月，或如3至4

周，将免疫原性组合物以及多个T细胞、或过继性T细胞疗法给药于受试者。

[0246] 应当理解，结合剂、免疫原性组合物，以及任选地佐剂、多个T细胞以及细胞因子(如白介素-2受体激动剂)各自以有效量提供给受试者。正如技术人员将认识到，当与根据本发明的免疫原性组合物联合使用时，结合剂的有效剂量和剂量方案可取决于例如特定的结合剂和所选的给药途径，以及待治疗的特定肿瘤或癌症。它可进一步取决于若干额外因素，包括受试者的症状的严重程度、受试者的体型和总体健康状况，以及受试者或癌症或肿瘤对治疗的反应。

[0247] 有效剂量和剂量方案可由本领域的技术人员决定。例如，用于治疗性用途的结合剂的“有效量”可以通过其抑制或阻止肿瘤生长、减缓疾病进展或稳定化疾病的能力来测量。

[0248] 特别地，可以根据实体瘤反应评价标准1.1版(Response Evaluation Criteria In Solid Tumors;version 1.1,RECIST Criteria v1.1)来评价根据本发明的治疗的效果。RECIST标准如下表4所示。

[0249] 表4:反应的定义(RECIST标准v1.1)

[0250]

	类别	标准
基于靶病变	完全反应（CR）	所有靶病变消失。任何病理性淋巴结的短轴必须减小到<10 mm。
	部分反应（PR）	靶病变 LD 总和减少≥30%，基线总和 LD 视作参考。
	稳定疾病（SD）	既没有足够的收缩符合 PR，也没有足够的增加符合 PD，自治疗开始起最小的 LD 总和视作参考。
	进行性疾病（PD）	靶病变的 LD 总和增加≥20%，自治疗开始起记录的最小 LD 总和或者一个或多个新病变的出现视作参考。
基于非靶病变	CR	所有非靶病变消失，且肿瘤标志物水平归一化。所有淋巴结的尺寸必须是非病理性的（< 10 mm 短轴）。
	SD	持续存在一个或多个非靶病变，并且/或者肿瘤标志物水平维持高于正常范围。
	PD	出现一个或多个新病变和/或现有非靶病变的明确进展。

[0251] 在本发明的某些实施方案中，在给药免疫原性组合物之前将结合剂的第一剂量给药于所述受试者，并且/或者将免疫原性组合物作为所述结合剂的第二或后续治疗计划表的一部分给药。

[0252] 根据本发明的方法可进一步包括确定受试者中是否存在对免疫原性组合物的T细胞特异性反应，并且/或者监测对免疫原性组合物的任何T细胞特异性反应，任选地包括监测所述受试者中对免疫原性组合物特异性的T细胞的扩增。

[0253] 靶抗原可为对所述肿瘤特异性的抗原。

[0254] 靶抗原可为由所述肿瘤或癌症的细胞过表达;如在与健康组织的细胞相比时过表达的抗原。

[0255] 特别地，靶抗原可为仅由所述肿瘤或癌症的细胞表达的抗原，或者可为在肿瘤微环境内的免疫抑制细胞(例如TAM、MDSC、Treg)上过表达的抗原。

[0256] 靶抗原可例如选自受体酪氨酸蛋白激酶erbB-2(Her2)，如人Her2(UniProtKB-P04626)；B淋巴细胞抗原CD19，如人B淋巴细胞抗原CD19(UniProtKB-P15391)；上皮细胞粘附分子(EpCAM)，如人EpCAM(UniProtKB-P16422)；表皮生长因子受体(EGFR)，如人EGFR(UniProtKB-P00533)；癌胚抗原相关细胞粘附分子5(CEA、CEACAM5、CD66e)，如人CEA(UniProtKB-P06731)；髓性细胞表面抗原CD33(CD33)，如人CD33(UniProtKB-P20138)；A型肝配蛋白受体2(EphA2)，如人EphA2(UniProtKB-P29317)；硫酸软骨素蛋白聚糖4(MCSP或HMW-MAA)，如人MSCP。

[0257] 结合所述靶抗原的抗原结合区可选自：结合Her2的赫塞汀(Herceptin)的抗原结合区、结合CD19的博纳吐单抗(Blinatumomab)的抗原结合区、结合EpCAM的卡妥索单抗(catumaxomab)的抗原结合区、结合EGFR的西妥昔单抗(cetuximab)或帕尼单抗(panitumumab)的抗原结合区，以及结合CD33的林妥珠单抗(Lintuzumab)的抗原结合区。

[0258] 根据本发明的方法中所治疗的肿瘤可特别地为实体瘤。

[0259] 肿瘤或癌症可选自乳腺癌、前列腺癌、非小细胞肺癌、膀胱癌、卵巢癌、胃癌、结肠直肠癌、食管癌以及头颈部鳞状细胞癌、宫颈癌、胰腺癌、睾丸癌、恶性黑素瘤、软组织癌；例如滑膜肉瘤。

[0260] 待根据本发明治疗的肿瘤还可选自黑素瘤，以及腺癌(例如导管腺癌)。

[0261] 或者，待根据本发明治疗的肿瘤可为血液肿瘤。

[0262] 血液肿瘤可选自B细胞淋巴瘤，以及慢性淋巴性白血病或急性淋巴性白血病。

[0263] 待根据本发明治疗的肿瘤可特别地为所谓的“冷性”肿瘤，即，没有任何(功能性)免疫浸润物的肿瘤。冷性肿瘤的特征可特别地在于缺乏或贫乏肿瘤T细胞浸润。造成T细胞浸润的不存在或贫乏的原因的机制可包括缺乏肿瘤抗原、抗原呈递缺陷、以及不存在T细胞活化及向肿瘤床归巢的缺陷。

[0264] 而且，根据本发明的方法可特别有效地用于治疗以免疫抑制性肿瘤微环境为特征的肿瘤，该免疫抑制性肿瘤微环境同样以抑制性免疫细胞如调节性T细胞(Treg)、髓源性抑制细胞(MDSC)和/或M2型巨噬细胞的存在为特征。抑制性免疫细胞可阻止或减少对肿瘤的T细胞浸润，并且/或者可局部抑制T细胞功能。

[0265] 在根据本发明的方法中使用的结合剂中，结合CD3的抗原结合区可特别地结合人CD3ε(epsilon)，如SEQ ID NO:1中所指定的人CD3ε(epsilon)。

[0266] 在本发明的具体实施方案中，结合CD3的抗原结合区包含：

[0267] 包含分别为SEQ ID NO.:2、3和4的CDR1、CDR2和CDR3序列的重链可变区(VH)；[野生型抗-CD3(SP34/人源化SP34，WO2015001085(Genmab))-VH CDR序列]；

[0268] 以及任选地

[0269] 包含分别为SEQ ID NO:6、GTN和7的CDR1、CDR2和CDR3序列的轻链可变区(VL)[野生型抗-CD3，VL CDR序列]。

[0270] 结合CD3的抗原结合区可包含：

[0271] 包含SEQ ID NO:57的序列、或与SEQ ID NO:5的序列[野生型抗-CD3-VH全长序列]具有至少90％、至少95％、至少97％、或至少99％氨基酸序列同一性的序列的重链可变区

(VH)；

[0272] 以及任选地

[0273] 包含SEQ ID NO:60的序列、或与SEQ ID NO:8的序列[野生型抗-CD3-VL全长序列]具有至少90％、至少95％、至少97％、或至少99％氨基酸序列同一性的序列的轻链可变区(VL)。

[0274] 根据本发明的方法中使用的结合剂可比具有包含如SEQ ID NO:5中所示的VH序列以及如SEQ ID NO:8中所示的VL序列[野生型抗-CD3(人源化SP34,WO2015001085(Genmab))VH和VL序列]的抗原结合区的结合剂具有更低的人CD3ε结合亲和力,优选地其中所述亲和力低至少5倍,如低至少10倍,例如低至少20倍、低至少30倍、低至少40倍、低至少45倍或如低至少50倍。

[0275] 所述结合CD3的抗原结合区能够以200-1000nM范围内,如300-1000nM范围内、400-1000nM范围内、500-1000nM范围内、300-900nM范围内、400-900nM范围内、400-700nM范围内、500-900nM范围内、500-800nM范围内、500-700nM范围内、600-1000nM范围内、600-900nM范围内、600-800nM范围内、或如600-700nM范围内的平衡解离常数K_D结合。

[0276] 结合CD3的抗原结合区能够以1-100nM范围内,如5-100nM范围内、10-100nM范围内、1-80nM范围内、1-60nM范围内、1-40nM范围内、1-20nM范围内、5-80nM范围内、5-60nM范围内、5-40nM范围内、5-20nM范围内、10-80nM范围内、10-60nM范围内、10-40nM范围内、或如10-20nM范围内的平衡解离常数K_D结合。

[0277] 在本发明的一些实施方案中,结合CD3的抗原结合区包含含有CDR1序列、CDR2序列和CDR3序列的重链可变(VH)区,其中

[0278] 重链可变(VH)区当与包含SEQ ID NO:5中所示的序列的重链可变(VH)区相比时在CDR序列之一中具有氨基酸置换,该置换处于选自以下的位置:T31、N57、H101、G105、S110和Y114,该位置根据SEQ ID NO:5的序列[VH_huCD3-H1L1]进行编号;并且

[0279] 野生型轻链可变(VL)区包含分别在SEQ ID NO:6、GTN和SEQ ID NO:7中所示的CDR1、CDR2和CDR3序列。

[0280] 结合CD3的抗原结合区的重链可变(VH)区的CDR1、CDR2和CDR3当与SEQ ID NO:5中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3相比时可总共包含至多1、2、3、4或5个氨基酸置换。

[0281] 结合CD3的抗原结合区的重链可变(VH)区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列与野生型重链可变(VH)区的CDR1、CDR2和CDR3的氨基酸序列可具有至少95％序列同一性,如至少96％序列同一性、至少97％序列同一性、至少98％序列同一性或至少99％序列同一性,序列同一性基于对由结合CD的抗原结合区的重链可变(VH)区的CDR1、CDR2和CDR3的序列组成的氨基酸序列与包含野生型重链可变(VH)区的CDR1、CDR2和CDR3的序列的氨基酸序列进行比对来计算。

[0282] 结合CD3的抗原结合区可特别地包含选自以下的突变:T31M、T31P、N57E、H101G、H101N、G105P、S110A、S110G、Y114M、Y114R、Y114V。

[0283] 能够结合CD3的抗原结合区可包含:

[0284] a)包含分别具有如SEQ ID NO:9、3和4中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[VH CDR1-T31P+野生型VH CDR 2、3]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR

1、2、3]的轻链可变区(VL),或者

[0285] b)包含分别具有如SEQ ID NO:11、3和4中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[VH CDR1-T31M+野生型VH CDR 2、3]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL),或者

[0286] c)包含分别具有如SEQ ID NO:2、13和4中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[VH CDR-N57E+野生型VH CDR 1、3]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL),或者

[0287] d)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和15中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-H101G]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL),

[0288] e)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和17中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-H101N]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL);

[0289] f)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和19中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-G105P]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL);

[0290] g)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和21中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-S110A]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL),或者

[0291] h)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和23中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-S110G]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:658中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL),

[0292] i)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和25中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-Y114V]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL),或者

[0293] j)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和27中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-Y114M]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL),或者

[0294] k)包含分别具有如SEQ ID NO:2、3和29中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-Y114R]的重链可变区(VH),以及包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示

的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]的轻链可变区(VL)。

[0295] 能够结合CD3的抗原结合区可包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),所述重链可变区(VH)含有分别具有如SEQ ID NO:2、3和15中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VH CDR 1、2+VH CDR3-H101G],所述轻链可变区(VL)包含分别具有如SEQ ID NO:6中所示的序列、序列GTN以及如SEQ ID NO:7中所示的序列的CDR1、CDR2和CDR3[野生型VL CDR 1、2、3]。

[0296] 能够结合人CD3的抗原结合区可包含选自以下的VH序列和VL序列:

[0297] a)如SEQ ID NO:10中所示的VH序列[VH T31P全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列[野生型全长序列],

[0298] b)如SEQ ID NO:12中所示的VH序列[VH T31M全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列,

[0299] c)如SEQ ID NO:14中所示的VH序列[VH N57E全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列,

[0300] d)如SEQ ID NO:16中所示的VH序列[VH H101G全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列,

[0301] e)如SEQ ID NO:18中所示的VH序列[VH H101N全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列,

[0302] f)如SEQ ID NO:20中所示的VH序列[VH G105P全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列,

[0303] g)如SEQ ID NO:22中所示的VH序列[VH S110A全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列,

[0304] h)如SEQ ID NO:24中所示的VH序列[VH S110G全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列,

[0305] i)如SEQ ID NO:26中所示的VH序列[VH Y114V全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列,

[0306] j)如SEQ ID NO:28中所示的VH序列[VH Y114M全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列;以及

[0307] k)如SEQ ID NO:30中所示的VH序列[VH Y114R全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列。

[0308] 目前优选的是能够结合人CD3的抗原结合区包含如SEQ ID NO:10中所示的VH序列[VH H101G全长序列]和如SEQ ID NO:8中所示的VL序列。

[0309] 还优选的是结合剂为抗体,如选自IgG1、IgG2、IgG3和IgG4的同种型亚类的抗体。

[0310] 结合剂可为全长抗体,如全长IgG1抗体。

[0311] 在一个实施方案中,抗体为人抗体,或者为其中所有可变区和恒定区为人抗体的那些的抗体。或者,抗体可为人源化抗体,或者其中所有可变区来自人源化抗体的抗体。

[0312] 该抗体还可具有包含结合CD3的结合区的第1臂以及包含结合靶抗原的结合区的第2臂,其中第1结合臂为人抗体,而第2结合臂为人源化抗体,或反之亦然。

[0313] 结合剂可为IgG1m(f)同种异型的抗体。

[0314] 结合剂可特别地为多特异性抗体,如双特异性抗体。

[0315] 可用于本发明的双特异性抗体分子的实例包含i)具有包含不同抗原结合区的两个臂的单抗体,(ii)对两个不同表位具有特异性的单链抗体,例如,经由通过额外肽接头串联连接的两个scFv;(iii)双重可变结构域抗体(DVD-Ig™),其中每条轻链和重链含有通过短肽键串联的两个可变结构域(Wu等人,Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin(DVD-Ig™)Molecule,载于:Antibody Engineering,Springer Berlin Heidelberg(2010));(iv)化学连接的双特异性(Fab')2片段;(v)Tandab®,其为两个单链双抗体的融合体,产生具有针对每个靶抗原的两个结合位点的四价双特异性抗体;(vi)柔性抗体(flexibody),其为scFv与双抗体的组合,产生多价分子;(vii)基于蛋白激酶A中的“二聚化和对接结构域”的所谓“对接与锁定”分子(Dock-and-Lock®),其在应用于Fab时可产生三价双特异性结合蛋白,该三价双特异性结合蛋白由连接至不同Fab片段的两个相同Fab片段组成;(viii)所谓的Scorpion分子,其包含例如与人Fab臂的两个末端融合的两个scFv;以及(ix)双抗体。

[0316] 在一个实施方案中,根据本发明使用的双特异性抗体为双抗体、交叉抗体(cross-body),如CrossMab,或经由受控的Fab臂交换获得的双特异性抗体,如描述于(WO 2011/131746;Genmab A/S)。

[0317] 不同类别的双特异性抗体的实例包括但不限于(i)IgG样分子,其具有互补CH3结构域以促成异源二聚化;(ii)重组IgG样双重靶向分子,其中分子的两侧各自含有至少两种不同抗体的Fab片段或Fab片段的部分;(iii)IgG融合分子,其中全长IgG抗体融合至额外的Fab片段或Fab片段的部分;(iv)Fc融合分子,其中单链Fv分子或稳定化双抗体与重链恒定结构域、Fc区或其部分融合;(v)Fab融合分子,其中不同的Fab片段融合在一起、融合至重链恒定区、Fc区或其部分;以及(vi)基于ScFv和双抗体的抗体和重链抗体(例如,域抗体、Nanobodies®),其中不同的单链Fv分子或不同双抗体或不同的重链抗体(例如,域抗体、Nanobodies®)彼此融合,或与融合至重链恒定结构域、Fc区或其部分的另一蛋白质或载体分子融合。

[0318] 具有互补CH3结构域分子的IgG样分子的实例包括但不限于Triomab®(Trion Pharma/Fresenius Biotech,WO/2002/020039;Trion Pharma/Fresenius Biotech)、纽扣(knobs-into-Holes)结构(Genentech,WO2011117329;Roche)、CrossMAb(Roche,[33])和静电匹配的(Amgen,EP1870459;Amgen以及WO2009089004;Amgen;Chugai,[US201000155133;Chugai;Oncomed,WO2010129304;Oncomed)、LUZ-Y(Genentech)、DIG体和PIG体(Pharmabcine)、链交换工程化结构域体(SEEDbody)(EMD Serono,WO2007110205;EMD Serono)、Biclonics(Merus)、Fc Δ Adp(Regeneron,WO 2010/015792;Regeneron)、双特异性IgG1和IgG2(Pfizer/Rinat,WO11143545;Pfizer/Rinat)、Azymetric支架(Zymeworks/Merck,WO2012058768:Zymeworks/Merck)、mAb-Fv(Xencor,WO2011028952;Xencor)、二价双特异性抗体(Roche WO 2009/080254;Roche)和DuoBody®分子(Genmab A/S,WO 2011/131746;Genmab A/S)。

[0319] 重组IgG样双重靶向分子的实例包括但不限于双重靶向(DT)-Ig(GSK/Domantis)、二合一抗体(Genentech)、交联Mab(Karmanos Cancer Center)、mAb2(F-Star,[44])、

Zybodies™(Zyngenia)、采用共同轻链的方法(Crucell/Merus,[45])、κλBodies(NovImmune)以及CovX体(CovX/Pfizer)。

[0320] IgG融合分子的实例包括但不限于双重可变结构域(DVD)-Ig™(Abbott,US 7,612,181;Abbott)、双结构域双头抗体(Unilever;Sanofi Aventis,WO20100226923;Unilever,Sanofi Aventis)、IgG样双特异性(ImClone/Eli Lilly)、Ts2Ab(MedImmune/AZ)和BsAb(Zymogenetics)、HERCULES(Biogen Idec,US007951918;Biogen Idec)、scFv融合物(Novartis)、scFv融合物(Changzhou Adam Biotech Inc,CN 102250246;Changzhou Adam Biotech Inc)和TvAb(Roche,WO2012025525;Roche,WO2012025530;Roche)。

[0321] Fc融合分子的实例包括但不限于ScFv/Fc融合物(Academic Institution)、SCORPION(Emergent BioSolutions/Trubion,Zymogenetics/BMS)、双重亲和力再靶向技术(Fc-DART™)(MacroGenics,WO2008157379;Macrogenics,WO2010/080538;Macrogenics)和双(ScFv)2-Fab(National Research Center for Antibody Medicine-China)。

[0322] Fab融合双特异性抗体的实例包括但不限于F(ab)2(Medarex/AMGEN)、双重作用或双Fab(Genentech)、Dock-and-Lock® (DNL)(ImmunoMedics)、二价双特异性(Biotecnol)和Fab-Fv(UCB-Celltech)。

[0323] 基于ScFv的抗体、基于双抗体的抗体以及域抗体的实例包括但不限于双特异性T细胞接合物(BiTE®)(Micromet)、串联双抗体(Tandab™)(Affimed)、双重亲和力再靶向技术(DART)(MacroGenics)、单链双抗体(Academic)、TCR样抗体(AIT,ReceptorLogics)、人血清白蛋白ScFv融合物(Merrimack)和COMBODY(Epigen Biotech)、dual targeting nanobodies® (Ablynx)、双重靶向仅重链结构域抗体。

[0324] 在根据本发明使用的结合剂中,每个抗原结合区可包含重链可变区(VH)和轻链可变区(VL),并且其中所述可变区各自包含三个CDR序列,分别为CDR1、CDR2和CDR3,以及四个框架序列,分别为FR1、FR2、FR3和FR4。

[0325] 结合剂可包含两个重链恒定区(CH)和两个轻链恒定区(CL)。

[0326] 根据本发明的方法中使用的结合剂可包含第一和第二重链,所述第一和第二重链各自至少包含铰链区、CH2和CH3区,其中在所述第一重链中,对应于人IgG1重链中的选自T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置的位置中的至少一个氨基酸被置换,并且在所述第二重链中,对应于人IgG1重链中的选自T366、L368、K370、D399、F405、Y407和K409的位置的位置中的至少一个氨基酸被置换,其中所述第一和所述第二重链的所述置换不处于相同的位置,并且其中氨基酸位置根据EU编号进行编号。

[0327] 在所述第一重链中,对应于人IgG1重链中K409的位置的氨基酸可特别地为R,并且在所述第二重链中,对应于人IgG1重链中F405的位置的氨基酸可特别地为L,或反之亦然。

[0328] 根据本发明使用的结合剂可为这样的结合剂:其包含第一和第二重链,并且其中在第一和第二重链两者中,对应于人IgG1重链中的位置L234和L235的位置处的氨基酸残基根据EU编号分别为F和E。

[0329] 根据本发明使用的结合剂可为这样的结合剂:其包含第一和第二重链,并且其中在第一和第二重链两者中,对应于根据Eu编号的人IgG1重链中的位置D265的位置处的氨基酸残基为A。

[0330] 根据本发明使用的结合剂也可为这样的结合剂:其包含第一和第二重链,并且其

中在第一和第二重链两者中，对应于根据Eu编号的人IgG1重链中的位置G236的位置处的氨基酸残基为R。

[0331] 根据本发明使用的结合剂可为这样的结合剂：其包含第一以及任选地第二重链，并且其中第一重链以及第二重链(如果存在)被修饰成使得相对于相同的未修饰抗体而言，抗体诱导Fc介导的效应子功能的程度更低。

[0332] 结合剂可包含kappa(κ)轻链。

[0333] 或者，结合剂可包含lambda(λ)轻链。

[0334] 特别地，结合剂可包含重链和lambda(λ)轻链，其包含结合CD3的结合区。

[0335] 或者，结合剂可包含重链和kappa(κ)轻链，其包含结合CD3的结合区。

[0336] 当包括在根据本发明使用的结合剂中时，kappa(κ)轻链包含选自以下的氨基酸序列：

[0337] a)SEQ ID NO:31中所示的序列，

[0338] b)a)中的序列的子序列，如其中从a)中所定义的序列的N末端或C末端起始缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的子序列；以及

[0339] c)与a)或b)中所定义的氨基酸序列相比具有至多5个置换，如至多个4置换、至多3个、至多2个或至多1个置换的序列。

[0340] 当包括在根据本发明使用的结合剂中时，lambda(λ)轻链可包含选自以下的氨基酸序列：

[0341] a)SEQ ID NO:32中所示的序列，

[0342] b)a)中的序列的子序列，如其中从a)中所定义的序列的N末端或C末端起始缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的子序列；以及

[0343] c)与a)或b)中所定义的氨基酸序列相比具有至多5个置换，如至多个4置换、至多3个、至多2个或至多1个置换的序列。

[0344] 所述第一和/或第二重链的恒定区可包含或基本上由或由选自以下的氨基酸序列组成：

[0345] a)SEQ ID NO:33中所示的序列，

[0346] b)a)中的序列的子序列，如其中从a)中所定义的序列的N末端或C末端起始缺失1、2、3、4、5、6、7、8、9或10个连续氨基酸的子序列；以及

[0347] c)与a)或b)中所定义的氨基酸序列相比具有至多5个置换，如至多个4置换、至多3个、至多2个或至多1个置换的序列。

[0348] 至多5个置换可包含选自L234F、L235E、D265A、F405L和K409R的一个或多个置换，如1、2、3或4个置换。

[0349] 或者，至多5个置换可包含选自L234F、L235E、G236R、F405L和K409R的一个或多个置换，如1、2、3或4个置换。

[0350] 本发明提供了一种用于在有此需要的受试者中预防或减少肿瘤生长的方法，该方法包括：

[0351] 向受试者提供包含至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物，由此增加肿瘤中的活细胞群内免疫细胞的相对量，以及任选地增加所述免疫细胞的活化；以及

[0352] 向受试者提供结合剂，该结合剂包含结合CD3(如人CD3)的抗原结合区，以及结合

所述肿瘤或癌症的细胞上的靶抗原的抗原结合区。

[0353] 免疫细胞选自T细胞，如$CD8^+$T细胞、自然杀伤(NK)细胞以及自然杀伤T(NKT)细胞。

[0354] 在替代方法中，根据本发明的方法中使用的结合剂可通过基因递送给药于受试者。因此，在第2方面，本发明提供了一种用于在有此需要的受试者中预防或减少肿瘤生长或者治疗癌症的方法，该方法包括向受试者提供：

[0355] i)编码结合剂的核酸构建体，该结合剂包含结合CD3(如人CD3)的抗原结合区，以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶抗原的抗原结合区；以及

[0356] ii)免疫原性组合物，该免疫原性组合物包含至少一种疫苗抗原。

[0357] 可以利用不同的策略来有效地基因递送结合剂，包括使用载体如腺相关病毒(AAV)载体来递送编码结合剂的多核苷酸。在替代的方法中，可以经由纳米粒子制剂递送编码结合剂的mRNA，例如基于脂质的、基于肽的、基于多糖的纳米粒子、或无机纳米粒子。mRNA可直接递送到期望表达结合剂的一种或多种器官中，或者经由注射或输注全身递送，其将随着时间推移生成表达(从数小时内开始，持续到数天)。在后一方法中，可以通过一种或多种手段对mRNA进行优化，以防止免疫活化，增加稳定性，减少任何随时间推移聚集的倾向，并且/或者避免杂质。这种优化可包括在mRNA中使用经修饰核苷(例如，使用1-甲基假尿苷)，并且/或者可包括特定的5'TR、3'UTR和/或聚(A)尾，以改善细胞内稳定性和翻译效率(参见例如Stadler Nat Med.2017;23(7):815-817)。

[0358] 应当理解，基因疗法所递送的结合剂可具有以上基于蛋白质的递送方法的情形下所示的任何特征。另外，免疫原性组合物可为如上所公开的组合物。

[0359] 另外，应当理解，关于根据本发明第一方面的方法公开的特性同样适用于本发明的第2方面的方法。特别地，编码结合剂的核酸构建体可以与佐剂如TLR激动剂联合给药，如上所公开的。它也可与细胞因子如白介素-2受体激动剂，例如人白介素-2或人白介素-15或它们的类似物(均如上所提供)进一步联合给药。

[0360] 在第3方面，本发明提供了一种在受试者中预防或减少肿瘤长出或者治疗癌症的用途的结合剂，该结合剂包含结合CD3的结合区以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶标的结合区，其中该用途包括将抗体与包含至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物组合提供给受试者。

[0361] 根据本发明的用途的结合剂可以如上关于根据本发明的方法来定义。

[0362] 而且，关于本发明的这一方面，免疫原性组合物可以如上关于根据本发明的方法来定义。

[0363] 同样，应当理解，关于根据本发明第一方面的方法公开的特性同样适用于本发明的第3方面的用途。特别地，结合剂可与如上所公开的佐剂联合给药。它也可与细胞因子如白介素-2受体激动剂，例如人白介素-2、人白介素-15或它们的类似物(均如上所提供)进一步联合给药。

[0364] 特别地，结合剂进一步与细胞因子如白介素-2受体激动剂，例如人白介素2、人白介素-15或它们的类似物联合给药。

[0365] 而且，如前文所公开，结合剂可进一步与佐剂(如上所定义的佐剂)联合给药。

[0366] 或者，结合剂可与用于基于基因的疗法；例如包含免疫原性核酸序列或脂质纳米粒子(LNP)的免疫原性组合物联合给药。

[0367] 本发明的第4方面涉及一种包含至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物，用于在受试者中预防或减少肿瘤长出或者治疗癌症的用途，其中免疫原性组合物与结合剂组合提供给受试者，所述结合剂包含结合CD3的结合区以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶标或者肿瘤微环境内的免疫抑制细胞上表达的靶标的结合区。

[0368] 免疫原性组合物可具有以上所定义的任一种或多种特性和特征。

[0369] 关于根据本发明的用途的免疫原性组合物，结合剂可为如关于本发明的第1方面所定义的结合剂。

[0370] 此外，关于根据本发明的第一方面的方法所公开的任一种或多种特性同样适用于根据本发明的第4方面的用途。特别地，免疫原性组合物和结合剂可进一步与如上所公开的佐剂联合给药。它也可与细胞因子如白介素-2受体激动剂，例如人白介素-2、人白介素-15或它们的类似物(均如上所提供)进一步联合给药。

[0371] 本发明的第5方面涉及结合剂在制造用于治疗受试者的癌症的药物中的用途，该结合剂包含结合CD3的结合区以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶标的结合区，其中该治疗包括将所述结合剂与包含至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物组合提供给受试者。

[0372] 结合剂和免疫原性组合物可以如关于本发明的第1方面所定义。

[0373] 同样，关于根据本发明的第一方面的方法所公开的任一种或多种特性同样适用于根据本发明的第5方面的用途。特别地，免疫原性组合物和结合剂可进一步与如上所公开的佐剂联合给药。它也可与细胞因子如白介素2受体激动剂，例如人白介素2或其类似物(均如上所提供)进一步联合给药。

[0374] 在第6方面，本发明还提供了包含至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物在制造用于治疗受试者的癌症的药物中的用途，其中免疫原性组合物与结合剂组合提供给受试者，所述结合剂包含结合CD3的结合区以及结合所述肿瘤或癌症的细胞上的靶标的结合区。

[0375] 免疫原性组合物和结合剂可以具有关于本发明的第1方面所定义的任何特性和特征。

[0376] 此外，关于根据本发明的第1方面的方法所公开的任一种或多种特性同样适用于根据本发明的第4方面的用途。特别地，免疫原性组合物和结合剂可进一步与如上所公开的佐剂联合给药。它也可与细胞因子如白介素-2受体激动剂，例如人白介素-2、人白介素-15或它们的类似物(均如上所提供)进一步联合给药。

[0377] 在本发明的最终方面，提供了一种试剂盒，该试剂盒包含结合剂，以及含有至少一种疫苗抗原的免疫原性组合物，所述结合剂含有结合CD3的结合区以及结合肿瘤或癌症的细胞上的靶标的结合区。

[0378] 试剂盒还可包含佐剂，比如如上所定义的佐剂。

[0379] 试剂盒还可包含一定量的如关于本发明的第1个方面所公开的细胞因子，如白介素-2或白介素-2受体激动剂。

[0380] 此外，关于根据本发明的第1方面的方法所公开的任一种或多种特性同样适用于根据本发明所提供的试剂盒的成分以及它们用于治疗性目的的方式。特别地，免疫原性组合物和结合剂可进一步与如上所公开的佐剂联合给药。它也可与细胞因子如白介素-2受体激动剂，例如人白介素-2或其类似物(均如上所提供)进一步联合给药。

[0381] 试剂盒还可包含使用说明书，如用于结合剂与免疫原性组合物的联合给药。说明

书还可提供进一步将结合剂和免疫原性组合物与如上所定义的佐剂和/或与如上所定义的细胞因子联合，或者将结合剂和免疫原性组合物与如上所定义的佐剂和/或与如上所定义的细胞因子联合给药。

[0382] 表5：序列

SEQ ID No.	名称	序列	物种
1	成熟人 CD3ε（epsilon）蛋白	QDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVILTCPQYPGSEILW QHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYV CYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATI VIVDICITGGLLLLVYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGR QRGQNKERPPPVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI	人类
2	VH_huCD3-H1L1_CDR1	GFTFNTYA	人源化
3	VH_huCD3-H1L1_CDR2	IRSKYNNYAT	人源化
4	VH_huCD3-H1L1_CDR3	VRHGNFGNSYVSWFAY	人源化
5	VH_huCD3-H1L1	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGTLVTVSS	人源化
6	VL_huCD3-H1L1_CDR1	TGAVTTSNY	人源化
	VL_huCD3-H1L1_CDR2	GTN	人源化
7	VL_huCD3-H1L1_CDR3	ALWYSNLWV	人源化
8	VL_huCD3-H1L1	QAVVTQEPSFSVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANW VQQTPGQAFRGLIGGTNKRAPGVPARFSGSLIGDKAA LTITGAQADDESIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL	人源化
9	VH CDR1-T31P HC_T31P CDR1	GFTFNPYA	人源化
10	VH T31P 全长序列 HC_T31P	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNPYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGTLVTVSS	人源化
11	VH CDR1-T31M HC_T31M CDR1	GFTFNMYA	人源化

[0383]

[0384]

12	VH T31M 全长序列 HC_T31M	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNMYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGTLVTVSS	人源化
13	VH CDR2-N57E HC_N57E CDR2	IRSKYNEYAT	人源化
14	VH N57E 全长序列 HC_N57E	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNEYATYYADSVKDRFTISR DDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAYWGQGTLVTVSS	人源化
15	VH_huCD3-H1L1-H101G_CDR3 HC_H101G CDR3	VRGGNFGNSYVSWFAY	人源化
16	VH_huCD3-H1L1-H101G HC_H101G	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRGGNFGNSYVS WFAYWGQGTLVTVSS	人源化
17	VH CDR3-H101N	VRNGNFGNSYVSWFAY	人源化
18	VH H101N 全长序列	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRNGNFGNSYVS WFAYWGQGTLVTVSS	人源化
19	VH CDR3-G105P	VRHGNFPNSYVSWFAY	人源化
20	VH G105P 全长序列	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFPNSYVS WFAYWGQGTLVTVSS	人源化
21	VH CDR3-S110A	VRHGNFGNSYVAWFAY	人源化
22	VH S110A 全长序列	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVA WFAYWGQGTLVTVSS	人源化
23	VH CDR3-S110G	VRHGNFGNSYVGWFAY	人源化
24	VH S110G 全长序列	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVG WFAYWGQGTLVTVSS	人源化
25	VH CDR3-Y114V	VRHGNFGNSYVSWFAV	人源化

[0385]

26	VH Y114V 全长序列	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAVWGQGTLVTVSS	人源化
27	VH CDR3-Y114M	VRHGNFGNSYVSWFAM	人源化
28	VH Y114M 全长序列	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFAMWGQGTLVTVSS	人源化
29	VH CDR3-Y114R	VRHGNFGNSYVSWFAR	人源化
30	VH Y114R 全长序列	EVKLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNW VRQAPGKGLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDRFTISR DDSKSSLYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVS WFARWGQGTLVTVSS	人源化
31	IgG1 恒定区 LCκ	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKV QWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSK ADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	人类
32	IgG1 恒定区 LCλ	GQPKAAPSVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVT VAWKADSSPVKAGVETTTPSKQSNNKYAASSYLSLTPE QWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECS	人类
33	IgG1-Fc	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESN GQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG	人类
34	$gp100_{20-39}$ 肽	AVGALKVPRNQDWLGVPRQL	小鼠
35	H-2D^b-限制的 CD8$^+$ T 细胞表位	KVPRNQDWL	小鼠
36	$OVA_{241-270}$ 肽	SMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTS	鸡
37	鸡卵清白蛋白 $OVA_{257-264}$/H-2 K^b	SIINFEKL	鸡
38	成熟鼠 CD3ε（epsilon）	QDDAENIEYKVSISGTSVELTCPLDSDENLKWEKNGQE LPQKHDKHLVLQDFSEVEDSGYYVCYTPASNKNTYLYL KARVCEYCVEVDLTAVAIIIIVDICITLGLLMVIYYWSKN RKAKAKPVTRGTGAGSRPRGQNKERPPPVPNPDYEPI RKGQRDLYSGLNQRAV	小鼠（成熟序列）
39	VH_IgG2amm 抗-CD3 145-2C11_CDR 1	GFTFSGYG	小鼠

[0386]

40	VH_IgG2amm 抗-CD3 145-2C11_CDR 2	ITSSSINI	小鼠
41	VH_IgG2amm 抗-CD3 145-2C11_CDR 3	ARFDWDKNY	小鼠
42	VH_IgG2amm 抗-CD3 145-2C11	EVQLVESGGGLVQPGKSLKLSCEASGFTFSGYGMHW VRQAPGRGLESVAYITSSSINIKYADAVKGRFTVSRDNA KNLLFLQMNILKSEDTAMYYCARFDWDKNYWGQGT MVTVSS	小鼠
43	VL_IgG2amm 抗-CD3 145-2C11_CDR 1	QDISNY	小鼠
	VL_IgG2amm 抗-CD3 145-2C11_CDR 2	YTN	小鼠
44	VL_IgG2amm 抗-CD3 145-2C11_CDR 3	QQYYNYPWT	小鼠
45	VL_IgG2amm 抗 -CD3-145-2C11	DIQMTQSPSSLPASLGDRVTINCQASQDISNYLNWYQ QKPGKAPKLLIYYTNKLADGVPSRFSGSGSGRDSSFTIS SLESEDIGSYYCQQYYNYPWTFGPGTKLEIK	小鼠
46	VH_IgG2amm 抗-gp75 TA99_CDR1	GFNIKDYF	小鼠
47	VH_IgG2amm 抗-gp75 TA99_CDR2	INPDNGNT	小鼠
48	VH_IgG2amm 抗-gp75 TA99_CDR3	TRRDYTYEKAALDY	小鼠
49	VH_IgG2amm 抗-gp75 TA99	EVQLQQSGAELVRPGALVKLSCKTSGFNIKDYFLHWV RQRPDQGLEWIGWINPDNGNTVYDPKFQGTASLTAD TSSNTVYLQLSGLTSEDTAVYFCTRRDYTYEKAALDYW GQGASVIVSS	小鼠
50	VL_IgG2amm 抗-gp75 TA99_CDR1	GNIYNY	小鼠
	VL_IgG2amm 抗-gp75 TA99_CDR2	DAK	小鼠
51	VL_IgG2amm	QHFWSLPFT	小鼠

[0387]

	抗-gp75 TA99_CDR3		
52	VL_IgG2amm 抗-gp75 TA99	AIQMSQSPASLSASVGETVTITCRASGNIYNYLAWYQ QKQGKSPHLLVYDAKTLADGVPSRFSGSGSGTQYSLKI SSLQTEDSGNYYCQHFWSLPFTFGSGTKLEIK	小鼠
53	IgG2amm Fc 抗-gp75 CTA99-AAKR	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN AAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVVDVSEDDP DVQISWFVNNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPI QHQDWMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRA PQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVKDFMPEDIYVEW TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYFMYSRLRVEKKNWV ERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	小鼠
54	IgG2amm Fc 抗 -CD3-145-2C11 -AALT	AKTTAPSVYPLAPVCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPEPVTL TWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLYTLSSSVTVTSSTWPS QSITCNVAHPASSTKVDKKIEPRGPTIKPCPPCKCPAPN AAGGPSVFIFPPKIKDVLMISLSPMVTCVVVDVSEDDP DVQISWFVNNVEVLTAQTQTHREDYNSTLRVVSALPI QHQDWMSGKEFKCKVNNKALPAPIERTISKPKGSVRA PQVYVLPPPEEEMTKKQVTLTCMVTDFMPEDIYVEW TNNGKTELNYKNTEPVLDSDGSYLMYSKLTVEKKNWV ERNSYSCSVVHEGLHNHHTTKSFSRTPGK	小鼠
55	人白介素-2（UniProtKB - P60568）蛋白	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTR MLTFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSK NFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVE FLNRWITFCQSIISTLT	人类
56	人白介素-15（UniProtKB - P40933）蛋白	NWVNVISDLKKIEDLIQSMHIDATLYTESDVHPSCKVT AMKCFLLELQVISLESGDASIHDTVENLIILANNSLSSNG NVTESGCKECEELEEKNIKEFLQSFVHIVQMFINTS	人类
57	$Rpl18_{115-132}$肽	KAGGKILTFDQLALESPK	小鼠
58	LCMV SSP_{27-48} 肽	VITGIKAVYNFATCGIFALIS	LCMV

[0388] 本发明通过以下实施例进一步说明，而不应解释为对权利要求书的范围进一步限制。

[0389] 实施例

[0390] 实施例1:CD3xTA99双特异性抗体治疗的抗肿瘤功效依赖于CXCR3介导的免疫细胞对肿瘤中的浸润

[0391] 以一个臂靶向CD3的双特异性抗体(bsAb)可通过将T细胞上的CD3与肿瘤相关抗原(TAA)交联来重定向T细胞以杀伤肿瘤细胞。通过从肿瘤微环境中分泌趋化因子如CXCL9、CXCL10和CXCL11，表达趋化因子受体CXCR3的T细胞和NK细胞可吸引到肿瘤上。在实施例中，探索了bsAb治疗如何受到免疫浸润物水平以及包括T细胞在内的免疫细胞到达肿瘤的能力的影响。为了解决该问题，使用CXCR3敲除(CXCR3-KO)小鼠，这些小鼠表现出CXCL9、CXCL10和CXCL11介导的细胞运输的破坏，这些细胞运输对肿瘤中T细胞浸润中发挥着非冗余的作用(Mikucki等人,Non-redundant requirement for CXCR3 signaling during tumoricidal T-cell trafficking across tumor vascular checkpoints.Nat

Commun.2015年6月25日;6:7458)。

[0392] 所有小鼠品系均在莱顿大学医学中心(Leiden University Medical Centre,LUMC)动物房饲养,并且所有小鼠实验均在LUMC(Leiden,The Netherlands)动物房进行。随着时间的推移,对动物的健康状况进行监测,并且所有动物在FELASA(Federation of European Laboratory Animal Science Associations,欧洲实验动物科学协会联合会)关于无特定病原体的小鼠集落的指南中所列的试剂(agents)检测均呈阴性。所有小鼠研究均获得荷兰动物伦理委员会(Dutch animal ethics committee,CCD)和LUMC的当地动物福利机构(Animal Welfare Body)的批准,许可编号为AVD116002020010004(实施例1、10和11)、AVD1160020188604(实施例12)和AVD116002015271(所有其它实施例)。实验根据荷兰动物实验法案和欧盟指令(Dutch Act on Animal Experimentation and EU Directive)2010/63/EU(“关于保护用于科学目的的动物(On the protection of animals used for scientific purposes)”)进行。使B16F10鼠黑素瘤细胞系(美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection)[ATCC],目录号CRL-6475)在补充有8%胎牛血清(FCS,Bodinco,目录号5010(Gibco,目录号10378-016))的Iscove的改良Dulbecco的培养基(IMDM;Invitrogen,目录号12440-053)中在含有5% CO_2的潮湿气氛中于37℃生长。

[0393] 具有惰性Fc尾的CD3xTA99 bsAb(bsIGg2amm-2C11xTA99-LALA)基于亲本抗-CD3 145-2C11和抗糖蛋白(gp)75TA99抗体,它们分别识别小鼠CD3ε和TAAgp75。CD3结合臂的重链(VH)和轻链(VL)可变区的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:SEQ ID NO:42和45中所示。gp75结合臂的重链和轻链可变区的氨基酸序列分别如SEQ ID NO:49和52中所示。对于CD3结合臂,VH CDR1、-2和-3序列分别在SEQ ID NO:39、40、41中提供。VL CDR1、-2和-3序列分别为SEQ ID NO:43、YTN和SEQ ID NO:44。对于gp75结合臂,VH CDR1、-2和-3序列分别在SEQ ID NO:46、47、48中提供。VL CDR1、-2和-3序列分别为SEQ ID NO:50、DAK和SEQ ID NO:51。通过Leu234Ala和Leu235Ala(LALA)突变使Fc尾变得惰性(Schlothauer等人,Protein Eng.Design and Selection 2016;29(10):457-66)。该bsAb是通过在亲本抗体的CH3结构域中引入允许受控的Fab臂交换的匹配点突变(2C11-145中的Val370Lys和Lys409Arg,以及TA99中的Phe405Leu和Asn411Thr)生成的。如先前所述,内部产生和纯化bsAb(Labrijn等人,Efficient Generation of Bispecific Murine Antibodies for Pre-Clinical Investigations in Syngeneic Rodent Models,Sci Reports,2017)。

[0394] 在第0天,向野生型(WT)雄性C57BL/6小鼠(C57BL/6NCrl,Charles River,the Netherlands)和C57BL/6CXCR3-KO小鼠(The Jackson Laboratory;库存编号005796)在右胁腹中皮下(s.c.)注射50,000个同基因B16F10黑素瘤细胞(于200μL磷酸盐缓冲盐水[PBS;Fresenius Kabi,目录号M090001]中,含有0.1%牛血清白蛋白[BSA;Sigma,目录号A3912])。第6天和第9天,向小鼠经腹膜内(i.p.)注射12.5μg(大约0.5mg/kg)CD3xTA99 bsAb。治疗计划时间线如图1A所呈现。每周用卡尺测量肿瘤尺寸三次,用长度×宽度×高度乘法计算。当肿瘤达到1000mm^3体积时,对小鼠处以安乐死。使用Mantel-Cox检验确定治疗小鼠的生存期是否比与未经治疗的对照组相比显著改善。

[0395] 在未经治疗的WT和CXCR3-KO小鼠两者中,B16F10肿瘤展现出快速长出,中位生存期分别为24天和20天,并且WT组中有1只小鼠保持无肿瘤(图1B,C)。在CD3xTA99 bsAb治疗的组中,CXCR3-KO小鼠的生存期显著与WT组相比更短,60天后仍无肿瘤的小鼠较少(CXCR3-

KO组为2/10相对于WT组为6/10)。CXCR3-KO小鼠(虽然不显著)显示出总体CD45阳性浸润物较低,以及T和NK细胞频率较低的一致趋势(图1D)。这一趋势在CD3xTA99 bsAb治疗的小鼠中维持,其中浸润物内的T细胞存在显著更低。

[0396] 总之,这些数据证实了CXCR3介导的免疫细胞运输在CD3接合性bsAb疗法的功效中的作用。这进一步表明,调节免疫细胞浸润可能有助于改善T细胞接合性bsAb治疗的结果。

[0397] 实施例2:肿瘤特异性疫苗接种联合肿瘤特异性T细胞转移增强了T细胞接合性双特异性抗体CD3xTA99的功效

[0398] 在实施例1中,显示出T细胞向肿瘤微环境的募集影响了T细胞接合性bsAb治疗的抗肿瘤功效。此处,测试了T细胞接合性bsAb的抗肿瘤功效是否可通过肿瘤特异性疫苗接种与肿瘤特异性T细胞联合给药来增强。

[0399] 肿瘤接种和bsAb治疗基本上如实施例1所述进行,除了此处注射了100,000个B16F10细胞之外。治疗计划时间线如图2A所呈现。对于过继细胞转移(ACT),从培育成表达同类系标志物CD45.1或CD90.1的Pmel-1 TCR转基因小鼠中,富集了具有$gp100_{25-33}$/H-$2D^b$特异性T细胞受体(TCR)的脾细胞(Overwijk WW等人,Tumor regression and autoimmunity after reversal of a functionally tolerant state of self-reactive $CD8^+$T cells.J Exp Med 2003;198:569-80;Dr.N.P.Restifo惠赠,Center for Cancer Research,National Cancer Institute,NIH,Bethesda,MD)。从Pmel-1 TCR转基因小鼠的脾和淋巴结中分离淋巴细胞,并在尼龙棉柱上富集Pmel-1 T淋巴细胞(Kisker Biotech GMBH,目录号MKN-50)。这些T淋巴细胞进一步称为Pmel-1 T细胞。

[0400] 在第6天和第13天,每只小鼠通过经腹膜内注射20μL的20mg/mL塞拉嗪(xylazine)(Dechra,目录号615319)、20μL 10%氯胺酮(ketamine)(Alfasan,目录号1907184-06)和60μL PBS的混合物麻醉,之后用gp100衍生的合成肽进行免疫。简而言之,向小鼠在剃毛左胁腹s.c.注射溶于100μlPBS中的100μg的$gp100_{20-39}$肽("KVP")(AVGALKVPRNQDWLGVPRQL;SEQ ID NO:34同源人序列;在Leiden University Medical Center,Leiden,The Netherlands合成,通过基于Fmoc的固相肽合成),该肽具有H-$2D^b$-限制的$CD8^+$T细胞表位(KVPRNQDWL;SEQ ID NO:35)。作为佐剂,将60mg的5%含有咪喹莫特的Aldara霜剂(3M Pharmaceuticals,目录号GTI102C)同时局部施用于注射部位。重组人白介素(IL)-2(600,000IU于100μL PBS中,Proleukin®,Novartis,目录号601381Z)分别在第二免疫当天(第13天)和一天后(第14天)经腹膜内注射。本实施例中使用的术语疫苗接种(如KVP疫苗接种)是指使用肽疫苗如KVP肽进行疫苗接种,包括Aldara佐剂和IL-2治疗,或者包括指定的佐剂CpG。

[0401] 在未经治疗的对照小鼠中,同基因B16F10肿瘤细胞显示出侵袭性肿瘤生长,中位生存期为18天(图2B)。bsAb CD3xTA99治疗显著延长了生存期(图2C;Mantel-Cox检验;P=0.0013),阻止4/7小鼠的肿瘤长出。CD3xTA99治疗与KVP疫苗接种和Pmel-1 T细胞的ACT的组合进一步增加了抗肿瘤功效,阻止了6/8小鼠的肿瘤长出。相比之下,Pmel-1细胞的ACT联合单独的KVP疫苗接种不足以阻止肿瘤长出,并且虽然小鼠的中位生存期(29天)比未经治疗的对照略有增加,但治疗并没有显著改善生存期(Mantel-Cox检验;P=0.0755)。

[0402] 综上所述,这些数据显示,肿瘤特异性疫苗接种联合肿瘤特异性T细胞的ACT增强了CD3xTA99的抗肿瘤功效。

[0403] 实施例3:CD3xTA99的抗肿瘤功效可通过肿瘤特异性疫苗接种联合非匹配的肿瘤

非特异性T细胞的ACT,以及肿瘤非特异性疫苗接种联合匹配的肿瘤非特异性T细胞的ACT来增强。

[0404] 如实施例2所显示,在具有同基因B16F10黑素瘤肿瘤的C57BL/6小鼠中,肿瘤特异性KVP疫苗接种与匹配的肿瘤特异性Pmel-1 T细胞的ACT联合给药增强了CD3xTA99治疗的抗肿瘤功效。

[0405] 此处,测试了CD3xTA99的抗肿瘤功效是否也可通过肿瘤特异性疫苗接种联合非匹配的肿瘤非特异性T细胞的ACT,或者通过肿瘤非特异性疫苗接种联合匹配的肿瘤非特异性T细胞的ACT来增强。

[0406] 实验如实施例1和2中所述进行,并做出如下所述的一些小调整。从培育成表达同类系标志物CD45.1或CD90.1的OT1 TCR转基因小鼠(TheJackson Laboratory,库存编号003831)中富集具有鸡卵清蛋白$OVA_{257-264}$/H-$2K^b$特异性的TCR的脾细胞。如实施例2所述,针对Pmel-1 T细胞进行脾细胞富集。这些OVA特异性脾细胞将进一步称为OT1 T细胞。

[0407] 在第-1天,向雄性C57BL/6小鼠经静脉内尾静脉注射1×10^6个富集OT1T细胞(于200μL PBS中)。第0天,向小鼠在右胁腹中s.c.注射100,000个同基因B16F10黑素瘤细胞(于200μL PBS中,含0.1% BSA)。在第3天和第10天,在如实施例2所述麻醉后,每只小鼠用150μg的如实施例2所述的$gp100_{20-39}$肽(“KVP肽”),或者用溶于100μL PBS中的150μg的鸡卵清蛋白$OVA_{241-270}$肽(“OVA肽”)(SMLVLLPDEVSGLEQLESIINFEKLTEWTS;在Leiden University Medical Center,Leiden,The Netherlands中合成,通过基于Fmoc的固相肽合成)免疫,该鸡卵清蛋白$OVA_{241-270}$肽具有H-$2K^b$-限制的$CD8^+$T细胞表位(SIINFEKL)。在第3天和第10天在注射部位局部施用Aldara作为佐剂,并在第10天和第11天经腹膜内注射IL-2。在第12天和第15天,向小鼠经腹膜内注射12.5μg CD3xTA99 bsAb。如实施例1所述监测肿瘤生长。治疗计划时间线如图3A所呈现。

[0408] 在未经治疗的对照小鼠中,同基因B16F10肿瘤细胞显示出侵袭性肿瘤生长,中位生存期为21天(图3B)。8只小鼠中有1只未观察到肿瘤长出。bsAb CD3xTA99治疗没有显著延长生存期(图3C;Mantel-Cox检验;P=0.0972),但确实将中位生存期延长至31天。这种功效的缺乏可能是由于与实施例2相比bsAb的延迟给药(在实施例3为第12天和第15天,相对于实施例2为第6天和第9天)。CD3xTA99治疗联合肿瘤非特异性OVA疫苗接种和匹配的肿瘤非特异性OT1 T细胞的ACT显著增加了抗肿瘤功效(*P=0.0147),中位生存期为68天。此外,它阻止了8只小鼠中4只的肿瘤长出。同样,CD3xTA99治疗联合肿瘤特异性KVP疫苗接种和非匹配的肿瘤非特异性OT1 T细胞的ACT显著延迟了肿瘤长出(*P=0.0147;中位生存期75天),并阻止了8只小鼠中2只的肿瘤长出。相比之下,仅使用肿瘤非特异性OVA疫苗接种联合匹配的肿瘤非特异性OT1 T细胞的治疗并不能显著延长生存期(P=0.4;中位生存期28天)或阻止肿瘤长出。

[0409] 综上所述,这些数据显示,肿瘤特异性疫苗接种联合非匹配的肿瘤非特异性T细胞的ACT、或肿瘤非特异性疫苗接种联合匹配的肿瘤非特异性T细胞的ACT均可增强CD3xTA99的抗肿瘤功效,其程度与肿瘤特异性疫苗接种联合匹配的肿瘤特异性T细胞的ACT相似。

[0410] 实施例4:CD3xTA99 bsAb与肿瘤特异性疫苗接种的组合或者CD3xTA99 bsAb与肿瘤非特异性疫苗接种联合匹配的肿瘤非特异性T细胞的ACT的组合类似地增强了抗肿瘤功效

[0411] 如实施例2和3所显示，通过将CD3xTA99治疗与肿瘤特异性ACT和肿瘤特异性疫苗接种联合，通过将CD3xTA99与肿瘤非特异性ACT和匹配的肿瘤非特异性疫苗接种联合，或者通过将CD3xTA99治疗与肿瘤非特异性ACT和肿瘤特异性疫苗接种联合，可以增强bsAb CD3xTA99的抗肿瘤疗效。此处，我们研究了在具有鼠B16F10黑素瘤肿瘤的C57BL/6小鼠中，通过将CD3xTA99治疗与肿瘤特异性疫苗接种联合是否也可增强CD3xTA99的抗肿瘤功效。

[0412] 实验基本上如实施例3中所述进行。如实施例1所述，对肿瘤生长进行监测。图4A显示治疗时间线。

[0413] 在未经治疗的对照小鼠中，同基因B16F10肿瘤细胞显示出侵袭性肿瘤生长，中位生存期为22天(图4B)。仅用bsAb CD3xTA99治疗或仅用Aldara和IL-2治疗均未获得显著延长的生存期(图4C)，然而，中位生存期分别延长到29.5天和26天。在CD3xTA99、Aldara和IL-2治疗后，观察到肿瘤生长显著延迟，导致显著延长的生存期(P＝0.0077)，尽管所有小鼠均到第59天因肿瘤负荷而需要被处死。与仅用CD3xTA99 bsAb或仅用Aldara和IL-2治疗的小鼠的组相比，用CD3xTA99、Aldara和IL-2治疗的小鼠的组的生存期没有显著延长。当CD3xTA99治疗联合肿瘤非特异性(OVA)疫苗接种、肿瘤非特异性ACT(OT1)时，8只小鼠中有2只存活，并且与未治疗组相比，生存期显著延长(P＝0.0084)。相似地，当用CD3xTA99联合肿瘤特异性(KVP)疫苗接种、Aldara和IL-2治疗时，8只小鼠中有3只在肿瘤攻击中存活。与未治疗组相比，这种联合治疗显著延长了生存期(P＝0.0092)。

[0414] 总之，这些数据显示，在不存在ACT的情况下，可通过将CD3xTA99治疗与肿瘤特异性疫苗接种联合来增强CD3xTA99的抗肿瘤功效，其程度与CD3xTA99治疗联合肿瘤非特异性ACT和匹配的肿瘤非特异性疫苗接种相同。相比之下，向CD3xTA99治疗中加入Aldara和IL-2并没有显著提高生存期。

[0415] 实施例5:在用CD3xTA99 bsAb联合肿瘤非特异性ACT和肿瘤非特异性疫苗接种治疗的表达TRP1的肿瘤中T细胞浸润和活化增强

[0416] 如实施例2、3和4所显示，可通过将CD3xTA99治疗与肿瘤特异性或肿瘤非特异性ACT和疫苗接种联合，以及通过将CD3xTA99治疗与肿瘤特异性疫苗接种联合来增强bsAb CD3xTA99在B16F10鼠肿瘤模型中的抗肿瘤功效。此处，我们研究了在用CD3xTA99与肿瘤非特异性ACT和疫苗接种联合治疗后，在表达被TA99抗体识别的TRP1抗原(也称为gp75)的肿瘤中，T细胞浸润和活化是否特异性增强。

[0417] 为了研究体内的T细胞浸润和活化，使用衍生自TbiLuc x OT1小鼠的OT1 $CD8^+$T细胞(Kleinovink等人,Front.Immunol.2018;9:3097)。来自双萤光素酶TbiLuc小鼠的T细胞组成性表达发出绿色的叩头虫(click beetle)萤光素酶(CBG99)，以及在T细胞活化后表达发出红色的萤火虫萤光素酶(PpyRE9)。后者是由活化T细胞核因子(NFAT)的活化诱导的，所述NFAT在T细胞活化时被活化。这允许T细胞定位和活化的多色生物发光成像。从具有K-$ras^{G12D/+}$、$p53^{R172H/+}$以及胰腺和十二指肠同源盒1(Pdx-1)-Cre转基因的遗传性胰腺导管腺癌“KPC”小鼠模型中分离出KPC3肿瘤细胞系(Hingorani等人,Cancer Cell 2005;7(5):469-83)。通过使用lipofectamine(Invitrogen)转染TRP1/gp75编码质粒生成KPC3-TRP1细胞，如前所述(Benonisson等人,Molec Canc Ther 2019;18(2):312-22)。该质粒由Gestur Vidarsson(Academic Medical Center,Amsterdam,The Netherlands)友好提供，并通过将zeocin选择基因与新霉素选择基因交换，并通过将巨细胞病毒(CMV)启动子替换为CMV增强

子、鸡β肌动蛋白启动子和兔β珠蛋白剪接受体位点(CAG)启动子来优化。用400μg新霉素对转染的细胞选择7天，然后将它们用TA99抗体和第二Alexa Fluor标记抗小鼠IgG(Biolegend)通过对TRP1/gp75表达进行荧光激活细胞分选(FACS)来富集。

[0418] 治疗计划时间线如图5A所呈现。将白化C57BL/6小鼠(Jackson Laboratories，库存编号000058)在背部的两个位置剃毛，并在第0天s.c.注射80,000个KPC3肿瘤细胞(背部左侧)和80,000个肿瘤KPC3-TRP1细胞(背部右侧)。第5天，经静脉内注射到尾静脉中使小鼠接受1×10^6个TbiLuc x OT1富集脾细胞(于200μL PBS中)。接下来，将随机化小鼠(每组n＝4只)用OT1 T细胞ACT、OVA肽疫苗接种和CD3xTA99抗体治疗的不同组合进行治疗，如下所述。在第6天和第13天，在尾基部s.c.注射给予50μL PBS中与20μg TLR9-配体CpG(ODN-1826，目录号tlrl-1826,InvivoGen)混合的100μg $OVA_{241-270}$合成长肽的免疫。在第15天和第19天，小鼠经腹膜内接受200μL PBS中的12.5μg CD3xTA99(大约0.5mg/kg)。为了生物发光可视化，小鼠经由异氟烷吸入麻醉(4％诱导，1.5％维持，Fendigo，目录号1221894)，随后在颈背s.c.注射100μL PBS中的4.88mg/kg Cycluc1(Aobious，目录号AOB1117)。在第13天(临第二次免疫之前)、第14天、第16天、第19天(临CD3xTA99 bsAb注射之前)、第23天和第26天，使用IVIS光谱成像仪(Perkin Elmer，目录号124262)对小鼠成像。在Cycluc1注射后15分钟，使用具有自动曝光时间的开式滤光器测量生物发光。接下来，向小鼠在颈背s.c.注射100μL PBS中的150mg/kg D-萤光素(Synchem，目录号bc219)，同时保持在异氟烷诱导的麻醉之下。15分钟后，使用540nm滤光器和自动曝光时间设置来测量生物发光。在整个实验中，使用LivingImage 4.2软件(PerkinElmer)，通过使用固定尺寸ROI对特定所关注区域(ROI)进行信号量化。

[0419] 在TRP1阳性和TRP1阴性的KPC3肿瘤两者中，CD3xTA99和OT1 T细胞的联合治疗均未诱导T细胞活化或浸润(图5B、E)。联合的OT1 T细胞的ACT与肿瘤非特异性OVA疫苗接种导致了具有TRP1阳性KPC3肿瘤的小鼠的一部分的T细胞活化和浸润，而在具有无TRP1表达的KPC3肿瘤的小鼠中观察到T细胞浸润和活化略有增加(图5C、F)。在向OT1 T细胞ACT和肿瘤非特异性OVA疫苗接种加入CD3xTA99 bsAb治疗后，在TRP1阳性肿瘤中观察到OT1 T细胞的强T细胞浸润和活化(图5D、G)。在TRP1阴性肿瘤中，也观察到一定程度上的T细胞浸润和活化(图5H、J)。此外，与接受OT1 T细胞和CD3xTA99 bsAb的小鼠相比，以及与接受OT1 T细胞ACT和OVA疫苗接种的小鼠相比，在接受OT1 T细胞ACT、OVA疫苗接种和CD3xTA99 bsAb的小鼠中，KPC3-TRP1肿瘤的T细胞活化增强(图5I)。同样，与接受OT1 T细胞ACT和CD3xTA99 bsAb的小鼠相比，以及与接受OT1 T细胞ACT和OVA疫苗接种的小鼠相比，在接受OT1 T细胞ACT、OVA疫苗接种和CD3xTA99 bsAb的小鼠中，T细胞浸润增强(图5K)。

[0420] 除生物发光成像外，使用流式细胞术证实了疫苗接种对OT1 T细胞活化和肿瘤浸润的效应。治疗计划时间线呈现于图5L和5P中，与上述的治疗计划表一致。将随机化小鼠(每组n＝4只)用OT1 T细胞ACT、OVA肽疫苗接种和CD3xTA99抗体治疗的不同组合进行治疗，如上所述。在第16天或第20天(分别为基线和bsAb给药后的时间点)，分别对小鼠处以安乐死。肿瘤的单细胞悬液通过物理破碎制备，然后与300μL的385μg/mL Liberase™(Roche，目录号05401020001)在37℃下和含有5％ CO_2的潮湿气氛中一起孵育10分钟。最后，通过70μm细胞过滤网(Falcon)捣碎细胞。通过70μm细胞过滤网(Falcon)捣碎进行物理破碎，并随后用裂解缓冲液(LUMC Pharmacy，NH_4Cl 8.4g/L和$KHCO_3$ 1g/L，pH＝7.4+/-0.2)处理以裂解红

细胞,制备脾的单细胞悬浮液。将在第16天和第20天采取的血样用裂解缓冲液处理。使单细胞悬液铺板于96孔板(Greiner,目录号650101)中以进行流式细胞术染色。

[0421] 使细胞重悬于40μL Fc Block的PBS(1:400,BD,目录号553141)中,并在冰上孵育15分钟。将细胞用PBS洗涤1X,并重悬于40μL ZombieAqua viability染料的PBS(1:800,Biolegend,目录号423102)中,并在室温下孵育10分钟。接着,将细胞用PBS洗涤1X,并将表面标志物(CD45.1、CD45、CD8、CD44、CD62L,详述于表6中)在40μL Brilliant染色缓冲液(BD,目录号566349)中于冰上染色20分钟。样品在Fortessa细胞仪(BD Biosciences)上进行测量,并用FlowJo软件(Treestar)进行分析。

[0422] 表6:用于流式细胞术的荧光标记抗体

[0423]

抗体	克隆	公司	目录号	使用的稀释度
抗-CD45-AlexaFluor700	30-F11	Biolegend	103128	1:400
抗-CD45.1-APC	A20	Biolegend	110714	1:400
抗-CD8-PE	53-6.7	Biolegend	100708	1:800
抗-CD69-FITC	H1.2F3	Invitrogen	11-0691-82	1:100
抗-CD44-BV785	IM7	Biolegend	103059	1:100
抗-CD62L-BV421	MEL-14	Biolegend	104436	1:100

[0424] 在实验的第16天,在bsAb给药之前,单独的OT1 T细胞的ACT并没有诱导血液(图5M)、脾(图5N)、或TRP1阳性和TRP1阴性的KPC3肿瘤两者(图5O)中的T细胞活化或扩增。OT1 T细胞ACT和肿瘤非特异性OVA疫苗接种的组合诱导血液和脾中OT1 T细胞扩增(图5M,5N),并且与单独的ACT相比,具有TRP1阳性KPC3肿瘤的小鼠中的OT1 T细胞显著增加(图5O;*P<0.05)。虽然不太明显且不显著,在具有无TRP1表达的KPC3肿瘤的小鼠中,在联合治疗后也观察到增加。在疫苗接种后,OT1 T细胞从幼稚T细胞转变为效应T(T_{eff})细胞,表面CD44水平显著升高,且CD62L水平降低(图5M-5O)。

[0425] 在随后的时间点(第20天;图5P),与单独的OT1 T细胞ACT相比,在添加或不添加CD3xTA99 bsAb的情况下,OT1 T细胞ACT和肿瘤非特异性OVA疫苗接种的组合导致了血液(图5Q;**,p<0.01)和脾(图5R;**,p<0.01)中的外周OT1 T细胞数量显著增加。疫苗接种后,血液(图5Q)和脾(图5R)中的大多数OT1 T细胞转变为效应T(T_{eff})细胞。与仅用OT1T细胞ACT和OVA疫苗接种治疗的组相比,向OT1 T细胞ACT和OVA疫苗接种的组合加入CD3xTA99 bsAb治疗显著降低了脾中检测到的OT1 T细胞的百分比,而在血液中具有类似趋势(图5Q,5R)。

[0426] OT1 T细胞ACT和肿瘤非特异性OVA疫苗接种的组合导致了TRP1阳性和TRP1阴性肿瘤中的OT1 T细胞的显著增加(图4S)。当向OT1 T细胞ACT和肿瘤非特异性OVA疫苗接种组合中加入CD3xTA99 bsAb治疗时,TRP1阳性肿瘤中OT1 T细胞的T细胞浸润和活化显著增强(图5S)。这些数据得到了对CD3xTA99 bsAb和疫苗接种组合所观察到的外周$CD8^+$OT1 T细胞的减少的支持(图5Q,5R)。此外,在包含OT1 T细胞ACT、OVA疫苗接种和bsAb的联合治疗后,TRP1阳性肿瘤中的OT1 T细胞被更多地活化,如由显著提高的CD69表达所反映。肿瘤内的OT1 T细胞表现出效应T细胞表型。

[0427] 总之,这些数据显示,在OT1 T细胞ACT、肿瘤非特异性OVA肽疫苗接种和CD3xTA99 bsAb治疗的联合治疗后,OT1 T细胞特异性浸润表达由CD3xTA99 bsAb所靶向的TRP1抗原的KPC3肿瘤。此外,大多数这些浸润性T细胞在CD3xTA99治疗后被活化。这些数据还显示,在联

合治疗中使用替代佐剂(CpG)也导致T细胞的肿瘤浸润和活化。

[0428] 实施例6:在具有B16F10黑素瘤肿瘤的C57BL/6经Aldara和IL-2治疗后NK细胞、巨噬细胞和树突状细胞的肿瘤浸润增强

[0429] 在实施例2-5中,呈现了包含CD3xTA99抗体治疗、ACT和肽疫苗接种联合Aldara(咪喹莫特)和IL-2、或CpG的联合治疗的抗肿瘤功效。后一治疗的组合导致了B16F10黑素瘤肿瘤模型中的抗肿瘤功效增强,并且在表达由CD3xTA99抗体所靶向的TRP1抗原的KPC3肿瘤中T细胞浸润和活化增加。此处,我们研究了佐剂Aldara和IL-2对C57BL/6小鼠中不同免疫细胞群浸润到B16F10肿瘤微环境中的效应。

[0430] 向C57BL/6小鼠在右胁腹中s.c.注射200μL补充有0.1% BSA的PBS中的100,000个B16F10细胞。小鼠被随机化并分配在不同的治疗组(每组n=4-6只小鼠)。在第7天和第14天,局部施用60mg的含5%咪喹莫特的Aldara霜剂,而在第14天和第15天经腹膜内注射100μL PBS中的重组人IL-2。在第16天,对所有小鼠处以安乐死。肿瘤的单细胞悬液通过物理破碎制备,然后与300μL的385μg/mL Liberase™(Roche,目录号05401020001)在37℃下和含有5% CO_2的潮湿气氛中一起孵育10分钟。最后,细胞通过70μm细胞过滤网(Falcon)捣碎,并铺板于96孔板(Greiner,目录#650101)中以进行流式细胞术染色。

[0431] 细胞重悬于40μL Fc Block的PBS(1:400,BD,目录号553141)中,并在冰上孵育10min。然后,将细胞用PBS洗涤1X,并重悬于40μLZombieAqua viability染料的PBS(1:800,Biolegend,目录号423102)中,并在室温下孵育10分钟。接着,将细胞用PBS洗涤1X,并将表面标志物(MHC-II、Ly6C、CCR2、Siglec-H、Siglec-F、Ly6G、CD103、F4/80、CD11b、CD45、CD11c、CD3、CD19、NK1.1,均在表6中)在40μL Brilliant染色缓冲液(BD,目录号566349)中于冰上染色20分钟。细胞内Egr2和iNOS染色(表7)使用FoxP3染色试剂盒(eBioscience,目录号00-5523-00)提供的缓冲液根据制造商的说明进行。样品在Fortessa细胞仪(BD Biosciences)上进行测量,并用FlowJo软件(Treestar)进行分析。实验的时间线如图6A所呈现。

[0432] 表7:用于流式细胞术的荧光标记抗体

[0433]

抗体	公司	目录号	使用的稀释度
抗-MHC-II-BV-421	BD	562564	1:400
抗-Ly6C-BV605	Biolegend	128036	1:500
抗-CCR2-FITC	Biolegend	150608	1:200
抗-Siglec-H-BV650	BD	747672	1:300
抗-Siglec-F-BV711	BD	740764	1:200
抗-Ly6G-BV785	Biolegend	127645	1:400
抗-CD103-PerCP-Cy5.5	Biolegend	121416	1:100
抗-Egr2-PE	Invitrogen	12-6691-82	1:100
抗-F4/80-PE-Cy5	Biolegend	123112	1:200
抗-CD11b-PE-Cy7	Biolegend	101216	1:1200
抗-iNOS-APC	eBioscience	17-5920-80	1:100
抗-CD45-AlexaFluor700	Biolegend	103128	1:400
抗-CD11c-APC-Cy7	Biolegend	117324	1:100
抗-CD3-BV510	Biolegend	100353	1:800
抗-CD19-BV510	BD	562956	1:800

[0434]

抗-NK1.1-BV510	Biolegend	108737	1:400

[0435] 对小鼠不治疗(n＝4)、用IL-2(n＝5)、Aldara(n＝5),或者用IL-2与Aldara(n＝6)的组合进行治疗。在肿瘤中活细胞群内免疫细胞(CD45$^+$细胞)的平均百分比在治疗组之间没有观察到显著差异(图6B)。接下来,分析CD45$^+$群体内肿瘤浸润性树突状细胞(DC)亚组、T细胞、NK细胞和巨噬细胞亚组的百分比(表8)。

[0436] 表8.使用流式细胞术分析的免疫细胞群的表型

[0437]

群体	表型
cDC1	CD11b$^-$,CD11c$^+$,MHCII$^+$
MoDC	CD11b$^+$,CD11c$^+$,MHCII$^+$和Ly6C$^+$
T细胞	CD3$^+$
NK细胞	NK1.1$^+$,CD3$^-$
M1巨噬细胞	CD11b$^+$,F4/80$^+$,iNOS$^+$
M0巨噬细胞	CD11b$^+$,F4/80$^+$,iNOS$^-$,Egr2$^-$
未成熟巨噬细胞	CD11b$^+$,Ly6C$^+$,MHCII$^+$,CD11c$^-$,CCR2$^-$
M2巨噬细胞	CD11b$^+$,F4/80$^+$,iNOS-Egr2+

[0438] 经IL-2或Aldara治疗后,观察到常规树突状细胞(cDC1)和单核细胞来源的DC(moDC)的肿瘤浸润均显著增加(*p<0.05;图6C,D)。与未经治疗的小鼠相比,用IL-2、

Aldara、或组合进行治疗导致NK细胞的肿瘤浸润显著增加(图6E)。在用Aldara治疗后,观察到M1巨噬细胞的肿瘤浸润显著增加(图6F),但用IL-2或者IL-2与Aldara的组合却非如此。在用Aldara或者Aldara与IL-2的组合进行治疗后,M0巨噬细胞(也称为静息巨噬细胞)的肿瘤浸润减少(图6G)。尽管各组内的扩增相当大,但在IL-2或Aldara治疗后肿瘤浸润性未成熟巨噬细胞的百分比没有显著增加,而IL-2和Aldara的组合确实显著增加了浸润性未成熟巨噬细胞的百分比(图6H;*p<0.05)。检测到Aldara、IL-2或者Aldara与IL-2的组合对T细胞的浸润均无显著效应(图6I)。

[0439] 总之,这些数据显示,无论是用佐剂Aldara和IL-2单独还是联合治疗均诱导了DC亚组、NK细胞和巨噬细胞的B16F10肿瘤浸润增强。然而,巨噬细胞的肿瘤浸润在每个亚组是不同的。在用Aldara和IL-2治疗后,唯一显示小鼠肿瘤内百分比下降的亚组是静息巨噬细胞亚组。

[0440] 实施例7:内源性细胞的完整运输有助于由抗原特异性ACT、关联抗原疫苗接种和双特异性抗体治疗组成的联合治疗的抗肿瘤功效

[0441] 在实施例3和4中,显示了由肿瘤非特异性ACT、匹配抗原疫苗接种和肿瘤靶向性bsAb治疗组成的联合治疗在体内肿瘤模型中展示出抗肿瘤功效。此处,探索了在实施例3和例4中观察到的过继转移OT1细胞控制肿瘤是否需要内源性区室的贡献。为了解决这个问题,向内源性T细胞运输受破坏的CXCR3-KO小鼠植入了如实施例1中所概述的B16F10肿瘤。小鼠在第3天接受CXCR3足够的OT1 T细胞联合OVA疫苗接种(与Aldara和IL-2),然后在第10天仅接受OVA疫苗接种(与Aldara和IL-2)。第12和15天,小鼠经腹膜内注射接受CD3xTA99治疗,基本上如实施例1所述。治疗计划时间线如图1E所呈现。

[0442] 在未经治疗的WT和CXCR3-KO小鼠之间,没有观察到肿瘤长出的差异,如实施例1所强调(图1F,G)。用OT1 T细胞的ACT结合OVA疫苗接种和CD3xTA99 bsAb治疗所治疗的荷瘤CXCR3-KO小鼠的中位生存期延长到33天(图1F,G)。接受相同治疗的WT小鼠的生存期显著延长(p=0.0171),8只小鼠中有5只在60天后仍无肿瘤。

[0443] 这些结果指示,当由外源性转移的疫苗特异性OT1 T细胞驱动时,内源性免疫浸润物有助于由肿瘤非特异性OVA疫苗接种和CD3xTA99 bsAb治疗组成的联合治疗的抗肿瘤效应。

[0444] 实施例8:将CD3xTA99 bsAb治疗和肿瘤特异性疫苗接种或肿瘤非特异性疫苗接种联合类似地增强抗肿瘤功效而不需要ACT

[0445] 如实施例4中所显示,在不存在ACT的情况下,可通过将CD3xTA99治疗与肿瘤特异性疫苗接种联合来增强CD3xTA99的抗肿瘤功效,其程度与CD3xTA99治疗联合肿瘤非特异性ACT和匹配的肿瘤非特异性疫苗接种相同。此处,我们研究了在具有鼠B16F10黑素瘤肿瘤的C57BL/6小鼠中,在不存在ACT的情况下将CD3xTA99 bsAb治疗与肿瘤非特异性疫苗接种联合是否也可增强CD3xTA99的抗肿瘤功效。

[0446] 实验基本上如实施例2所述进行,除以下例外:向接受疫苗接种的小鼠在尾基部s.c.注射100μL PBS中的150μg的肿瘤特异性KVP合成长肽或衍生自核糖体蛋白L18(Rpl18;SEQ ID NO:57)的肿瘤非特异性合成长肽,且不给予ACT。如实施例1所述监测肿瘤生长。图7A显示治疗时间线。

[0447] 在未经治疗的对照小鼠中,同基因B16F10肿瘤细胞显示出侵袭性肿瘤生长,中位

生存期为21天(图7B)。仅用CD3xTA99 bsAb或者用Rpl18或KVP疫苗接种治疗没有获得显著延长的生存期,然而,中位生存期分别延长至25.5、24和29天。当与单独的CD3xTA99 bsAb治疗相比时,当将CD3xTA99bsAb与Rpl18或KVP疫苗接种联合时观察到肿瘤长出的显著延迟,导致了生存期显著延长(分别P＝0.0173和P＝0.0027;图7C)。对于用CD3xTA99 bsAb和肿瘤非特异性Rpl18疫苗接种治疗的小鼠组,中位生存期延长至31天,由此6只小鼠中有1只在肿瘤攻击中存活。当CD3xTA99 bsAb治疗与肿瘤特异性KVP疫苗接种联合时,中位生存期延长至65天,8只小鼠中有4只存活。

[0448] 总之,这些数据显示,在不存在ACT的情况下,可通过将CD3xTA99bsAb治疗与肿瘤特异性或肿瘤非特异性疫苗接种联合来增强CD3xTA99 bs Ab的抗肿瘤功效。此外,尽管Rpl18肽有非外源性质,但当与适当的佐剂联合给予时可实现抗肿瘤效应,这得到了已公开报道数据的支持,其显示向非外源疫苗抗原加入佐剂可以克服自身耐受性(Baumgaertner等人,Int J Ca ncer,2011;130(11):2607-2617,Lienard等人,J Immunother.2009;32(8):875-83)。值得注意的是,与CD3xTA99治疗相比,CD3xTA99治疗和佐剂的组合或者仅佐剂并没有增强生存率(如实施例4中所显示),这支持了当前实施例中观察到的抗肿瘤效应依赖于疫苗抗原加入的假设。

[0449] 实施例9:在bsAb给药时间点,肿瘤非特异性疫苗接种增加了肿瘤内的免疫细胞比例和活化,导致了在与CD3xTA99 bsAb联合时增强的生存率

[0450] 在实施例8中,呈现了不需要ACT的情况下CD3xTA99 bsAb和肿瘤非特异性疫苗接种联合治疗的抗肿瘤功效。在实施例6中,显示了佐剂Aldara和/或IL-2可以诱导肿瘤内cDC1、MoDC、NK细胞、M1巨噬细胞和未成熟巨噬细胞群体的频率增加,以及静息巨噬细胞的频率减少,而没有观察到T细胞频率的显著变化。此处,我们研究了肿瘤非特异性疫苗接种在C57BL/6小鼠中对不同免疫细胞群对B16F10肿瘤微环境中的浸润的效应。

[0451] 向C57BL/6小鼠在右胁腹中s.c.注射补充有0.1% BSA的200μL PBS中的80,000个B16F10细胞。小鼠被随机化并分配在不同的治疗组(每组n＝6只小鼠)。在第7天和第14天,局部施用60mg的含5%咪喹莫特的Aldara霜剂,并将100μL PBS中的150μg Rpl18长肽s.c.注射到右胁腹中。在第14天和第15天,经腹膜内注射100μL PBS中的重组人IL-2。在第16天,对所有小鼠处以安乐死。如实施例5所述制备肿瘤的单细胞悬浮液。

[0452] 使用不同的流式细胞术染色组(详见表9和10),用针对多种表面和细胞内标志物的荧光标记的抗体对细胞进行染色,如实施例6所述。实验的时间线如图8A所呈现。

[0453] 表9:用于淋巴样组(Lymphoid Panel)流式细胞术的荧光标记抗体

[0454]

抗体	公司	目录号	稀释度
抗-CD62L-BV421	Biolegend	104436	1:100
抗-CD4-BV605	Biolegend	100547	1:1000
抗-NK1.1-BV650	BD	564143	1:100
抗-CD103-BV711	BD	121435	1:200
抗-CD44-BV785	Biolegend	103059	1:100
抗-CD19-FITC	Invitrogen	11-0193-85	1:800
抗-CD8-PerCP-Cy5.5	Biolegend	100734	1:100
抗-FoxP3-PE	Invitrogen	12-5773-82	1:100

抗-CD3-PE-CF594	BD	562286	1:400
抗-Granzyme B-PE-Cy7	Invitrogen	25-8898-82	1:200
抗-NKG2A-APC	Biolegend	142808	1:100
抗-CD45-AlexaFluor700	Biolegend	103128	1:400
抗-PD1-APC-Cy7	Biolegend	135224	1:100

[0455] 表10:用于淋巴样组流式细胞术的荧光标记抗体

[0456]

抗体	公司	目录号	稀释度
抗-MHC-II-BV-421	BD	562564	1:400
抗-Ly6C-BV605	Biolegend	128036	1:500
抗-CCR2-FITC	Biolegend	150608	1:200
抗-Siglec-H-BV650	BD	747672	1:300
抗-Siglec-F-BV711	BD	740764	1:200
抗-Ly6G-BV785	Biolegend	127645	1:400

[0457]

抗-Egr2-PE	Invitrogen	12-6691-82	1:100
抗-F4/80-PE-Cy5	Biolegend	123112	1:200
抗-CD11b-PE-Cy7	Invitrogen	25-0112-82	1:1200
抗-iNOS-APC	eBioscience	17-5920-80	1:100
抗-CD45-AlexaFluor700	Biolegend	103128	1:400
抗-CD11c-APC-Cy7	Biolegend	117324	1:100
抗-CD8-PerCP-Cy5.5	Biolegend	100734	1:100
抗-CD3-BV510 (Dump)	BD	563024	1:800
抗-CD19-BV510 (Dump)	BD	562956	1:800
抗-NK1.1-BV510 (Dump)	Biolegend	108737	1:400

[0458] 小鼠不接受治疗(n＝6),或者用Rpl18疫苗接种与佐剂Aldara和IL-2联合治疗(n＝6)。

[0459] 免疫细胞亚组的特征是表11中呈现的标志物的表达。在肿瘤非特异性疫苗接种后,肿瘤中活细胞群内免疫细胞(CD45$^+$细胞)的百分比显著增加(图8B)。在总免疫细胞群中,在肿瘤非特异性疫苗接种后,CD8$^+$T细胞、NK细胞和NKT细胞群的比例也显著增加(图8B;*,$p<0.05$)。相似地,接种疫苗导致CD8$^+$/CD4$^+$T细胞和CD8$^+$/Treg细胞的比率增加。在接种疫苗后,CD8$^+$T效应细胞和CD4$^+$T中枢记忆细胞也显著增加(图8B;**,$p<0.01$)。

[0460] 除了比例增加外,淋巴样群也被更多地活化(图8C)。在疫苗接种后,粒酶B在CD8$^+$T细胞(**,$p<0.01$)、CD4$^+$T细胞(****,$p<0.0001$)、NK细胞(****,$p<0.0001$)、NKT细胞(*,$p<0.01$)和CD19$^+$B细胞(*,$p<0.05$)中显著上调。在肿瘤非特异性疫苗接种的小鼠中也存在显著更多的表达CD103的CD4$^+$T细胞和NK细胞,这指示这些细胞在肿瘤微环境中的组织驻留

(分别p<0.001和p<0.01)。此外,PD-1和NKG2A在$CD8^+$T细胞(p<0.05)和NKT细胞(p<0.05和p<0.01)上的表达显著提高。

[0461] 表11.使用流式细胞术分析的免疫细胞群的表型

[0462]

群体	表型
$CD8^+$ T 细胞	$CD3^+$, $CD8^+$
$CD4^+$ T 细胞	$CD3^+$, $CD4^+$

[0463]

Treg	$CD3^+$, $CD4^+$, $FoxP3^+$
NKT 细胞	$NK1.1^+$, $CD3^+$
MoDC	$CD11b^+$, $CD11c^+$, $MHCII^+$和 $Ly6C^+$
NK 细胞	$NK1.1^+$, $CD3^-$
M1 巨噬细胞	$CD11b^+$, $F4/80^+$, $iNOS^+$
M0 巨噬细胞	$CD11b^+$, $F4/80^+$, $iNOS^-$, $Egr2^-$
未成熟巨噬细胞	$CD11b^+$, $Ly6C^+$, $MHCII^+$, $CD11c^-$, $CCR2^-$
cDC1	$CD11b^-$, $CD11c^+$, $MHCII^+$
嗜酸性粒细胞	$CD11b^+$, $Ly6G^-$, $SiglecF^+$
嗜中性粒细胞	$CD11b^+$, $Ly6G^+$

[0464] 接下来,用流式细胞术分析肿瘤中$CD45^+$群体内髓样细胞亚组的百分比。在用肿瘤非特异性疫苗接种治疗后,肿瘤中观察到单核细胞来源的DC(moDC;*,p<0.05)的扩增增加,观察到未成熟巨噬细胞、嗜酸性粒细胞和常规树突状细胞(cDC1;图8B)的扩增增加趋势。

[0465] 总之,这些数据显示,在双特异性给药前,用肿瘤非特异性疫苗接种治疗诱导了B16F10肿瘤内T细胞、NK细胞和DC亚组的比例增加。此外,在肿瘤非特异性疫苗接种后,肿瘤内的免疫细胞亚组被更多地活化,粒酶B和活化标志物水平升高。比较实施例6和实施例9中呈现的结果,与仅用Aldara和IL-2治疗的小鼠相比(实施例6),当用包含Rpl18肽疫苗接种以及佐剂Aldara和IL-2的联合疗法治疗小鼠时,仅在实施例9中观察到T细胞浸润的增加。这表明,虽然佐剂能够以非抗原特异性方式通过诱导髓样亚组和NK细胞的增加或减少的肿瘤浸润来调节肿瘤微环境(如实施例6所显示),但是触发T细胞活化的疫苗抗原可能是T细胞浸润到肿瘤中所需要的。实施例10:在T细胞接合性bsAb治疗后用肿瘤非特异性外源抗原疫苗接种导致$CD8^+$T细胞的浸润、活化和效应分子表达增加

[0466] 先前的实施例已经证明了,在用CD3xTA99 bsAb连同肿瘤特异性疫苗接种(KVP)、肿瘤非特异性疫苗接种(Rpl18)、或OT1 T细胞ACT与肿瘤非特异性外源抗原疫苗接种(OVA)的组合进行治疗后,肿瘤控制得到改善。此外,在实施例9中,在用Rpl18肽疫苗接种治疗的肿瘤内观察到增强的免疫细胞存在和活化。此处,对用肿瘤非特异性外源抗原(OVA)疫苗接种研究了在肿瘤内免疫细胞存在和活化状态上对CD3xTA99 bsAb治疗的贡献。

[0467] 为了解决这点,在第0天,向C57BL/6小鼠在右胁腹中植入补充有0.1%BSA的100μL PBS中的80,000个表达TRP1的KPC3细胞(图9A)。小鼠被随机化并分配在不同的治疗组(每组

n＝7只小鼠)。在第8天和第15天,在如实施例2所述麻醉后,将疫苗组中的小鼠用溶于100μL PBS中的150μgOVA$_{241-270}$肽免疫。在第8天和第15天在注射部位局部施用Aldara作为佐剂,并在第15天和第16天经腹膜内注射IL-2。在第17天,向小鼠经腹膜内注射12.5μg CD3xTA99 bsAb。在bsAb治疗后两天,处死所有小鼠。如实施例5所述制备肿瘤和脾的单细胞悬浮液。使用表12、13和14所显示的抗体组,按照实施例6中所概述的程序进行染色。

[0468] 表12:用于表面标志物染色的荧光标记抗体

[0469]

抗体	公司	目录号	稀释度
抗-CD8-BUV395	BD	563786	1:400
抗-Viability-ZombieUV	BioLegend	423107	1:400
抗-CD4-BUV496	BD	741051	1:600
抗-CD40L-BUV661	BD	741499	1:300
抗-CD49a-BUV737	BD	741776	1:200
抗-CD62L-BUV805	BD	741924	1:800
抗-CTLA-4-BV421	Biolegend	106312	1:200
抗-FoxP3-PacificBlue	Biolegend	126410	1:200
抗-CD44-BV510	Biolegend	103043	1:600
抗-PD-1-BV605	Biolegend	135220	1:200
抗-NK1.1-BV650	BD	564143	1:200
抗-OX40-BV711	Biolegend	119421	1:200
抗-Tim-3-BV785	Biolegend	119725	1:300
抗-CD3-FITC	Invitrogen	11-0031-85	1:800
抗-CD19-SparkBlue	Biolegend	115566	1:800
抗-KLRG1-PerCP-Cy5.5	Biolegend	138418	1:200
抗-CD39-PE	Biolegend	143804	1:200
抗-TIGIT-PE/dazzle	Biolegend	142110	1:400

[0470]

抗-CD122-PE-Cy5	Biolegend	123219	1:300
抗-NKG2A-PE-Cy7	Biolegend	142810	1:200
抗-4-1BB-APC	Biolegend	106110	1:200
抗-CD45-AF700	Biolegend	103128	1:400
抗	Biolegend	127652	1:600
-Ly6G/CD11b/CD11c-APC/Fire750	Biolegend	101262	1:600
(Dump)	Biolegend	117352	1:400

[0471] 表13:用于细胞内和转录因子组的荧光标记抗体

[0472]

抗体	公司	目录号	稀释度
抗-CD8-BUV395	BD	563786	1:400
抗-Viability-ZombieUV	Biolegend	423107	1:400
抗-CD4-BUV496	BD	741051	1:800
抗-CD69-BUV737	BD	612793	1:200
抗-CD62L-BUV805	BD	741924	1:800
抗-CD25-BV421	Biolegend	102033	1:200
抗-FoxP3-PacificBlue	Biolegend	126410	1:200
抗-CD44-BV510	Biolegend	103043	1:600
抗-Ki-67-BV605	Biolegend	652413	1:200
抗-NK1.1-BV650	BD	564143	1:200
抗-T-bet-BV711	Biolegend	644819	1:100
抗-CD27-BV785	Biolegend	124241	1:200
抗-GATA-3-AF488	Biolegend	653808	1:100
抗-CD19-SparkBlue	Biolegend	115566	1:800
抗-Grz-B-PerCP-Cy5.5	Biolegend	372212	1:100
抗-ROR?T-PE	Invitrogen	12-6988-82	1:100
抗-Eomes-PE/dazzle	Invitrogen	61-4875-82	1:200
抗-CD3-PE-Cy5	Biolegend	100310	1:500
抗-CD28-PE-Cy7	Biolegend	102126	1:200
抗-TCF-1-APC	Cell Signaling Technology	37636S	1:100

[0473]

抗-CD45-AF700	Biolegend	103128	1:400
抗	Biolegend	127652	1:600
-Ly6G/CD11b/CD11c-APC/Fire750	Biolegend	101262	1:600
（Dump）	Biolegend	117352	1:400

[0474] 表14:用于淋巴样组流式细胞术的荧光标记抗体

[0475]

抗体	公司	目录号	稀释度
抗-CD40-BUV395	BD	745697	1:200
抗-Viability-Zombie UV	Biolegend	423107	1:400
抗-CD86-BUV496	BD	750437	1:200
抗-CD11b-BUV563	BD	741242	1:1200
抗-CD70-BUV661	BD	741564	1:200
抗-PD-L1-BUV737	BD	741877	1:300
抗-CD62L-BUV805	BD	741924	1:500
抗-CD163-BV421	Biolegend	155309	1:200
抗-MHC-II-Pacific Blue	Biolegend	107620	1:800
抗-CD3/CD19/NK1.1-BV510（Dump）	BD BD Biolegend	563024 562956 108737	1:800 1:800 1:800
抗-CD11c-BV605	BD	563057	1:200
抗-Siglec-H-BV650	BD	747672	1:200
抗-Siglec-F-BV711	BD	740764	1:400
抗-CCR2-BV785	Biolegend	150621	1:100
抗-iNOS-AF488	Invitrogen	53-5920-82	1:100
抗-Ly6G-Spark Blue	Biolegend	127663	1:300
抗-Ly6C-PerCP-Cy5.5	Biolegend	128012	1:500
抗-XCR1-PE	Biolegend	148204	1:100
抗-CD115-PE/dazzle	Biolegend	135528	1:100
抗-F4/80-PE-Cy5	Biolegend	123112	1:300
抗-Arg1-PE-Cy7	Invitrogen	25-3697-82	1:200
抗-Egr2-APC	Invitrogen	17-6691-82	1:100

[0476]

抗-CD45-AF700	Biolegend	103128	1:400
抗-CD47-APC-Cy7	Biolegend	127526	1:200

[0477] 由不同免疫细胞群表达的标志物提供在实施例6的表8中。

[0478] 用CD3xTA99 bsAb治疗小鼠导致了疫苗接种组和未疫苗接种组的肿瘤内$CD45^+$细胞的比例增加(图9B)。然而,在疫苗接种组中,与仅用CD3xTA99治疗或未经治疗的小鼠相比,这与T细胞频率的显著增加平行。此外,联合治疗导致了T细胞全集主要偏向$CD8^+$T细胞,这由常规($FoxP3^-$)和调节性($Foxp3^+$)$CD4^+$T细胞的减少反映。此外,当与未经治疗的组或单独的CD3xTA99 bsAb相比时,肿瘤内的$CD8^+$T细胞几乎排他性转变为效应T(T_{eff})细胞,与实

施例5和9中描述的结果一致。与仅CD3xTA99 bsAb治疗组相比，联合治疗导致肿瘤中B细胞的相对频率显著降低，而NK细胞的比例显著增加。在脾中，变化不太明显(图9C)。尽管如此，观察到T细胞组成微小偏向$CD8^+$T细胞，幼稚$CD8^+$T细胞减少，并且$CD8^+T_{eff}$细胞相应增加，表明该组内的系统性活化。此外，与仅CD3xTA99 bsAb治疗组相比，联合治疗组中脾的B细胞频率显著降低，而未观察到对NK细胞频率的效应。

[0479] 为了解疫苗接种如何影响T细胞浸润物，对肿瘤和脾内的$CD8^+$T细胞进行了详细的表型分型(图9D,E)。在肿瘤中，用单独的CD3xTA99 bsAb治疗导致了4-1BB表达的中度增加，以及阴性检查点TIGIT(图9D)。另一方面，疫苗接种的加入导致4-1BB、CD27、CD49a和OX40阳性的细胞的进一步增加。联合组中三分之一的细胞对效应分子粒酶B呈阳性。同时，阴性检查点表达提高，尤其是PD-1、Tim3和NKG2A以及免疫抑制性外切酶(ectonuclease)CD39。此外，如由Ki-67的表达所测量，免疫接种小鼠的$CD8^+$T细胞更具增殖性。转录因子分析揭示，两个治疗组均下调了通常与幼稚状态相关联的TCF-1，然而，联合组显示出更大偏向于T_{bet}阳性CTL表型的趋势。将这些结果与脾中存在的$CD8^+$T细胞的表型分型进行比较，揭示出单独的bsAb引起的变化局限于肿瘤(图9E)。相反，联合治疗的效应更具系统性。

[0480] 除了T细胞区室的变化之外，在联合疗法后观察到肿瘤中NK细胞频率的增加(图9B)。经进一步检测，联合治疗组中更高比例的NK细胞活化，并且表达更多的颗粒酶B(图9F)。此外，观察到肿瘤巨噬细胞表型分型的改变，M2巨噬细胞几乎完全损失，M0巨噬细胞减少，并且M1巨噬细胞相应增加(图9G)。总之，这些观察表明，联合治疗效应不仅局限于T细胞，而且还导致肿瘤微环境的更有利的髓系组成。

[0481] 总体而言，这些数据指示，与单独的bsAb治疗相比，bsAb治疗和用外源肿瘤非特异性抗原疫苗接种的组合导致了更大$CD8^+$T细胞和更活化的NK细胞浸润物。

[0482] 实施例11:肿瘤非特异性外源抗原(OVA)疫苗接种对CD3xTA99双特异性抗体治疗的抗肿瘤功效的效应

[0483] 在实施例10中，显示了向CD3xTA99 bsAb治疗加入肿瘤非特异性外源抗原疫苗接种导致了内源性T细胞和NK细胞的浸润和活化显著增加。因此，此处研究这种治疗方案是否也产生增强的肿瘤生长控制，类似于用肿瘤特异性抗原(KVP)或肿瘤非特异性抗原(Rpl18)免疫，如实施例8所显示。此外，在实施例10中观察到在疫苗接种和CD3 bsAb治疗后NK细胞浸润增加且粒酶B表达提高。因此，通过在疫苗接种前耗尽NK细胞来研究NK细胞对联合治疗方案的贡献。

[0484] 为了解决这点，在第0天，向C57BL/6小鼠在右胁腹中植入补充有0.1％BSA的100μL PBS中的50,000个B16F10细胞。小鼠被随机化并分配在不同的治疗组(每组n＝8-12只小鼠)。为了探索NK细胞的作用，在肿瘤注射前2天，然后在第2、9和16天，经腹膜内注射100μg耗尽性抗-NK1.1抗体(Invivoplus抗-NK1.1,BioXcell BP0036)。在第3天和第10天，在如实施例2所述麻醉后，将疫苗组中的小鼠用溶于100μL PBS中的150μg$OVA_{241-270}$肽免疫。在第3天和第10天在注射部位局部施用Aldara作为佐剂，并在第10天和第11天经腹膜内注射重组人IL-2。在第12天和第15天，向小鼠经腹膜内注射12.5μg CD3xTA99 bsAb。通过每周测量肿瘤两次来监测肿瘤长出，并将小鼠在肿瘤体积超过1000mm^3时处死。

[0485] 实施例12:在鼠肿瘤模型中由CD3xTA99 bsAb和初免-加强流感疫苗接种方案组成的联合治疗增强的抗肿瘤功效.

[0486] 在实施例8中，显示了在不需要ACT的情况下，可由包含肿瘤特异性bsAb和肿瘤非特异性疫苗接种的联合治疗来增强鼠肿瘤模型中的抗肿瘤功效。此处，研究了在鼠肿瘤模型中通过将bsAb治疗和疫苗方案联合以加强预先存在的病毒特异性T细胞是否也可增强抗肿瘤功效。

[0487] 在研究的第-30天，向C57BL/6小鼠经鼻内给药低剂量流感病毒100xTCID50(HKx31;Sanquin,The Netherlands)。在活动性感染完全消退后，在第0天，向小鼠在右胁腹s.c.注射200μL补充有0.1％ BSA的PBS中的80,000个B16F10细胞。小鼠被随机化并分配在不同的治疗组(每组n＝10只小鼠)。在第10天，局部施用60mg的含5％咪喹莫特的Aldara霜剂，并将2×10^6TCID50热灭活流感病毒(70℃下1小时)s.c.注射到对侧胁腹。在第10天和第11天，经腹膜内注射100μL PBS中的重组人IL-2。在第12天和第15天，小鼠经腹膜内接受200μL PBS中的12.5μg CD3xTA99(大约0.5mg/kg)。如实施例1所述监测肿瘤生长。治疗计划时间线如图10A所呈现。

[0488] 在未经治疗的对照小鼠中，同基因B16F10肿瘤细胞显示出侵袭性肿瘤生长，中位生存期为20天(图10B)。仅用bsAb CD3xTA99治疗没有获得显著延长的生存期，然而，中位生存期延长至24天(图10B)。当与未治疗小鼠相比时，在活动性流感感染后或者在活动性感染和疫苗接种的组合后，当给药CD3xTA99 bsAb时观察到肿瘤长出的显著延迟，导致了显著延长的生存期(分别P＝0.0096和P＝0.0011;图10C)。在活动性流感感染后，用CD3xTA99 bsAb治疗的小鼠组的中位生存期延长至25.5天，10只小鼠中有1只在肿瘤攻击中存活。当CD3xTA99 bsAb治疗与活动性感染和疫苗接种联合时，中位生存期延长至37.5天，10只小鼠中有3只存活。

[0489] 总之，这些数据显示，CD3xTA99 bsAb治疗的抗肿瘤功效可通过在鼠肿瘤模型中将CD3xTA99 bsAb治疗与加强的预先存在的病毒特异性T细胞联合来增强。

[0490] 实施例13:在鼠肿瘤模型中通过将加强的预先存在的肿瘤非特异性LCMV特异性T细胞和CD3xTA99 bsAb治疗联合来增强抗肿瘤功效

[0491] 在此前实施例中，已经证明了CD3接合性bsAb的抗肿瘤功效可以通过将其与肿瘤非特异性疫苗联合来增强。在实施例12中，在活动性流感感染之前，包含CD3接合性bsAb和流感疫苗的联合治疗显示可以增强的抗肿瘤功效。此处，研究了Cd3接合性bsAb的抗肿瘤功效是否也可在先前感染有LCMV的小鼠中通过将Cd3接合性bsAb治疗与淋巴细胞性脉络丛脑膜炎病毒(LCMV)特异性疫苗接种组合来增强。

[0492] 为了研究这一点，在研究的第-30天，向C57BL/6小鼠经腹膜内给药100μl PBS中的2×10^5PFU的LCMV-Armstrong(LUMC,the Netherlands)。LCMV表达非自身抗原gp33和gp34。在活动性感染完全消退后，在第0天，向小鼠在右胁腹s.c.注射100μL补充有0.1％ BSA的PBS中的50,000B16F10细胞。小鼠被随机化并分配在不同的治疗组(对照组中n＝8只小鼠；治疗组中n＝12)。在第8天，将100μg的含有gp33和gp34表位的SSP_{27-48}合成长肽(内部合成，LUMC,The Netherlands;SEQ ID NO:58)与溶于PBS中的20μg CpG-ODN1826一起s.c.注射到小鼠尾基部。在第12天和第15天，小鼠经腹膜内接受200μL PBS中的12.5μg CD3xTA99(大约0.5mg/kg)。如实施例1所述监测肿瘤生长。

[0493] 对实施例的结论性评述

[0494] 以上实施例中呈现的数据展示了各种所提议方案来增强T细胞接合性bsAb的抗肿

瘤功效。首先，显示了当与关联疫苗联合给予时，过继转移肿瘤特异性或肿瘤非特异性T细胞可能构成额外的T细胞来源，以使得T细胞接合性bsAb能够发挥其抗肿瘤效应。其次，显示了在不存在过继转移T细胞的情况下，也可通过将肿瘤特异性或肿瘤非特异性疫苗和bsAb治疗联合来增强T细胞接合性bsAb的抗肿瘤功效。此外，显示了通过驱动非抑制性白细胞群体(如抗原呈提细胞和NK细胞)增加的频率，在这种疫苗组合物中共同配制的佐剂的效应可有助于调节抑制性肿瘤微环境。包含疫苗抗原和佐剂的联合治疗显示在bsAb治疗的所提议时间之前在肿瘤中诱导T细胞和NK细胞的频率增加，这些细胞表现出更活化表型。最后，包含靶向肿瘤特异性抗原的T细胞接合性bsAb以及能够加强预先存在的T细胞的肿瘤非特异性免疫原性组合物的联合治疗显示出诱导了具有主要活化Teff表型的肿瘤浸润性T细胞的频率显著增加。

[0495] 显示了通过将这种bsAb与设计成加强预先存在的肿瘤非特异性或肿瘤特异性T细胞的疫苗接种方案联合来增强T细胞接合性bsAb的抗肿瘤功效的概括构思。这些T细胞可随后浸润肿瘤微环境，其可被疫苗组分预先调节。这种浸润被认为是(部分)经由CXCR3依赖性机制发生的。通过加强这种预先存在的T细胞，更大且更活化T细胞库可以对于也可单价结合肿瘤靶标的T细胞接合性bsAb的接合变得可用。虽然此类T细胞在与T细胞接合性bsAb结合时可诱导肿瘤细胞的杀伤，但活化T细胞的流入和肿瘤微环境中抑制性细胞群频率的减少与肿瘤浸润的NK细胞的活化是平行的。这些因素共同有助于改善T细胞接合性bsAb治疗的抗肿瘤功效。

[0496] OT1

序列表

<110> 健玛保

Benonisson, Hreinn

Middelburg, Jim

van Hall, Thorbald

Altintas, Isil

Kemper, Kristel

Schuurman, Janine

Zom, Gijs

Ovcinnikovs, Vitalijs

Lloyd, Katy Ann

<120> 抗体疗法

<130> P/0157-WO-PCT

<150> EP20194018.6

<151> 2020/9/2

<160> 58

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 186

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr Gln Thr Pro Tyr Lys
1 5 10 15

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys Pro Gln Tyr Pro
20 25 30

Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys Asn Ile Gly Gly Asp
35 40 45

Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp His Leu Ser Leu Lys
50 55 60

Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg
65 70 75 80

Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg
85 90 95

Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met Ser Val Ala Thr Ile
100 105 110

Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr
115 120 125

Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly
130 135 140
Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro
145 150 155 160
Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp
165 170 175
Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
180 185

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CDR序列
<400> 2
Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr Ala
1 5

<210> 3
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CDR序列
<400> 3
Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr
1 5 10

<210> 4
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CDR序列
<400> 4
Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 5
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 抗体可变区
<400> 5

Glu	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1				5				10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Asn	Thr	Tyr
			20					25					30		
Ala	Met	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp	Val
		35					40					45			
Ala	Arg	Ile	Arg	Ser	Lys	Tyr	Asn	Asn	Tyr	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Ala	Asp
	50					55					60				
Ser	Val	Lys	Asp	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser
65					70					75					80
Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Asn	Leu	Lys	Thr	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr
				85					90					95	
Tyr	Cys	Val	Arg	His	Gly	Asn	Phe	Gly	Asn	Ser	Tyr	Val	Ser	Trp	Phe
			100					105					110		
Ala	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser			
		115					120					125			

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CDR序列
<400> 6

Thr	Gly	Ala	Val	Thr	Thr	Ser	Asn	Tyr
1				5				

<210> 7
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CDR序列
<400> 7

Ala	Leu	Trp	Tyr	Ser	Asn	Leu	Trp	Val
1				5				

<210> 8
<211> 109

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗体可变区
<400> 8

```
Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Phe Ser Val Ser Pro Gly Gly
1               5                  10                  15
Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser
            20                  25                  30
Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Thr Pro Gly Gln Ala Phe Arg Gly
        35                  40                  45
Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Gly Val Pro Ala Arg Phe
    50                  55                  60
Ser Gly Ser Leu Ile Gly Asp Lys Ala Ala Leu Thr Ile Thr Gly Ala
65                  70                  75                  80
Gln Ala Asp Asp Glu Ser Ile Tyr Phe Cys Ala Leu Trp Tyr Ser Asn
                85                  90                  95
Leu Trp Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
            100                 105
```

<210> 9
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CDR序列
<400> 9

```
Gly Phe Thr Phe Asn Pro Tyr Ala
1               5
```

<210> 10
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗体可变区
<400> 10

```
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Pro Tyr
            20                  25                  30
```

Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 11
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CDR序列
<400> 11
Gly Phe Thr Phe Asn Met Tyr Ala
1 5

<210> 12
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗体可变结构域
<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 Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Met Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr

85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 13
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CDR序列
<400> 13
Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Glu Tyr Ala Thr
1 5 10
<210> 14
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗体可变区
<400> 14
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Glu Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 15
<211> 16

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CDR序列
<400> 15

Val Arg Gly Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 16
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗体可变区序列
<400> 16

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg Gly Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 17
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CDR序列
<400> 17

Val Arg Asn Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 18
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗体可变区
<400> 18

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg Asn Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 19
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CDR序列
<400> 19

Val Arg His Gly Asn Phe Pro Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 20
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗体可变区
<400> 20

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Pro Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 21
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CDR序列
<400> 21
Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ala Trp Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 22
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗体可变区
<400> 22
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp

50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Gly Trp Phe
100 105 110
Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CDR序列
<400> 23
Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Gly Trp Phe Ala Tyr
1 5 10 15

<210> 24
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗体可变区
<400> 24
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Gly Trp Phe
100 105 110

Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 25
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CDR序列
<400> 25
Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Val
1 5 10 15

<210> 26
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗体可变区
<400> 26
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 27
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 人源化CDR序列
<400> 27
Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Met
1 5 10 15
<210> 28
<211> 125
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 抗体可变结构域
<400> 28
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Met Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125
<210> 29
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 人源化CDR序列
<400> 29
Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Arg
1 5 10 15
<210> 30
<211> 125
<212> PRT

<213> 人工序列
<220>
<223> 抗体可变结构域
<400> 30

Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Asn Thr Tyr
20 25 30
Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser
65 70 75 80
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Asn Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Met Tyr
85 90 95
Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe
100 105 110
Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120 125

<210> 31
<211> 107
<212> PRT
<213> 智人
<400> 31

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 32
<211> 106
<212> PRT
<213> 智人
<400> 32

Gly Gln Pro Lys Ala Ala Pro Ser Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser
1 5 10 15
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp
20 25 30
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Ser Ser Pro
35 40 45
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Thr Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn
50 55 60
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys
65 70 75 80
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val
85 90 95
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser
100 105

<210> 33
<211> 329
<212> PRT
<213> 智人
<400> 33

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
325

<210> 34
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 含表位肽
<400> 34
Ala Val Gly Ala Leu Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu Gly Val
1 5 10 15
Pro Arg Gln Leu
20
<210> 35

<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 表位肽
<400> 35
Lys Val Pro Arg Asn Gln Asp Trp Leu
1 5
<210> 36
<211> 30
<212> PRT
<213> 原鸡
<400> 36
Ser Met Leu Val Leu Leu Pro Asp Glu Val Ser Gly Leu Glu Gln Leu
1 5 10 15
Glu Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys Leu Thr Glu Trp Thr Ser
20 25 30
<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> 原鸡
<400> 37
Ser Ile Ile Asn Phe Glu Lys
1 5
<210> 38
<211> 169
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 38
Gln Asp Asp Ala Glu Asn Ile Glu Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr
1 5 10 15
Ser Val Glu Leu Thr Cys Pro Leu Asp Ser Asp Glu Asn Leu Lys Trp
20 25 30
Glu Lys Asn Gly Gln Glu Leu Pro Gln Lys His Asp Lys His Leu Val
35 40 45
Leu Gln Asp Phe Ser Glu Val Glu Asp Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr
50 55 60
Thr Pro Ala Ser Asn Lys Asn Thr Tyr Leu Tyr Leu Lys Ala Arg Val
65 70 75 80

Cys Glu Tyr Cys Val Glu Val Asp Leu Thr Ala Val Ala Ile Ile Ile
85 90 95
Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Leu Gly Leu Leu Met Val Ile Tyr Tyr
100 105 110
Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Thr
115 120 125
Gly Ala Gly Ser Arg Pro Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro
130 135 140
Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu
145 150 155 160
Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Ala Val
165

<210> 39
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 39
Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr Gly
1 5

<210> 40
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 40
Ile Thr Ser Ser Ser Ile Asn Ile
1 5

<210> 41
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 41
Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn Tyr
1 5

<210> 42
<211> 116
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 42
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Lys

1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Gly Tyr
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Leu Glu Ser Val
35 40 45
Ala Tyr Ile Thr Ser Ser Ser Ile Asn Ile Lys Tyr Ala Asp Ala Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Val Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Leu Leu Phe
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ile Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Phe Asp Trp Asp Lys Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Met Val
100 105 110
Thr Val Ser Ser
115

<210> 43
<211> 6
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 43
Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
1 5

<210> 44
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 44
Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp Thr
1 5

<210> 45
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 45
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Pro Ala Ser Leu Gly
1 5 10 15
Asp Arg Val Thr Ile Asn Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Asn Lys Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Arg Asp Ser Ser Phe Thr Ile Ser Ser Leu Glu Ser
65 70 75 80

Glu Asp Ile Gly Ser Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Tyr Asn Tyr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 46
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 46

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Phe
1 5

<210> 47
<211> 8
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 47

Ile Asn Pro Asp Asn Gly Asn Thr
1 5

<210> 48
<211> 14
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 48

Thr Arg Arg Asp Tyr Thr Tyr Glu Lys Ala Ala Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 49
<211> 121
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 49

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Thr Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30

Phe Leu His Trp Val Arg Gln Arg Pro Asp Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Asn Pro Asp Asn Gly Asn Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Thr Ala Ser Leu Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Val Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Ser Gly Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Thr Arg Arg Asp Tyr Thr Tyr Glu Lys Ala Ala Leu Asp Tyr Trp Gly
100 105 110
Gln Gly Ala Ser Val Ile Val Ser Ser
115 120

<210> 50
<211> 6
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 50
Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr
1 5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 51
Gln His Phe Trp Ser Leu Pro Phe Thr
1 5

<210> 52
<211> 107
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 52
Ala Ile Gln Met Ser Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15
Glu Thr Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gly Asn Ile Tyr Asn Tyr
20 25 30
Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Gln Gly Lys Ser Pro His Leu Leu Val
35 40 45
Tyr Asp Ala Lys Thr Leu Ala Asp Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gln Tyr Ser Leu Lys Ile Ser Ser Leu Gln Thr
65 70 75 80
Glu Asp Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Gln His Phe Trp Ser Leu Pro Phe
85 90 95
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 53
<211> 330
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 53

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
1 5 10 15
Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60
Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80
Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95
Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Asn Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
145 150 155 160
Phe Val Asn Asn Val Glu Val Leu Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
165 170 175
Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
180 185 190
His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
210 215 220

Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Lys Asp Phe Met
245 250 255
Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
260 265 270
Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Phe
275 280 285
Met Tyr Ser Arg Leu Arg Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
290 295 300
Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
305 310 315 320
Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
325 330

<210> 54
<211> 330
<212> PRT
<213> 小家鼠
<400> 54

Ala Lys Thr Thr Ala Pro Ser Val Tyr Pro Leu Ala Pro Val Cys Gly
1 5 10 15
Asp Thr Thr Gly Ser Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Val Lys Gly Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Leu Thr Trp Asn Ser Gly Ser Leu Ser Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Asp Leu Tyr Thr Leu
50 55 60
Ser Ser Ser Val Thr Val Thr Ser Ser Thr Trp Pro Ser Gln Ser Ile
65 70 75 80
Thr Cys Asn Val Ala His Pro Ala Ser Ser Thr Lys Val Asp Lys Lys
85 90 95
Ile Glu Pro Arg Gly Pro Thr Ile Lys Pro Cys Pro Pro Cys Lys Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Asn Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Ile Lys Asp Val Leu Met Ile Ser Leu Ser Pro Met Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser Glu Asp Asp Pro Asp Val Gln Ile Ser Trp
145 150 155 160

Phe Val Asn Asn Val Glu Val Leu Thr Ala Gln Thr Gln Thr His Arg
165 170 175
Glu Asp Tyr Asn Ser Thr Leu Arg Val Val Ser Ala Leu Pro Ile Gln
180 185 190
His Gln Asp Trp Met Ser Gly Lys Glu Phe Lys Cys Lys Val Asn Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Arg Thr Ile Ser Lys Pro Lys Gly
210 215 220
Ser Val Arg Ala Pro Gln Val Tyr Val Leu Pro Pro Pro Glu Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Lys Gln Val Thr Leu Thr Cys Met Val Thr Asp Phe Met
245 250 255
Pro Glu Asp Ile Tyr Val Glu Trp Thr Asn Asn Gly Lys Thr Glu Leu
260 265 270
Asn Tyr Lys Asn Thr Glu Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Tyr Leu
275 280 285
Met Tyr Ser Lys Leu Thr Val Glu Lys Lys Asn Trp Val Glu Arg Asn
290 295 300
Ser Tyr Ser Cys Ser Val Val His Glu Gly Leu His Asn His His Thr
305 310 315 320
Thr Lys Ser Phe Ser Arg Thr Pro Gly Lys
325 330

<210> 55
<211> 133
<212> PRT
<213> 智人
<400> 55

Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 56
<211> 114
<212> PRT
<213> 智人
<400> 56

Asn Trp Val Asn Val Ile Ser Asp Leu Lys Lys Ile Glu Asp Leu Ile
1 5 10 15
Gln Ser Met His Ile Asp Ala Thr Leu Tyr Thr Glu Ser Asp Val His
20 25 30
Pro Ser Cys Lys Val Thr Ala Met Lys Cys Phe Leu Leu Glu Leu Gln
35 40 45
Val Ile Ser Leu Glu Ser Gly Asp Ala Ser Ile His Asp Thr Val Glu
50 55 60
Asn Leu Ile Ile Leu Ala Asn Asn Ser Leu Ser Ser Asn Gly Asn Val
65 70 75 80
Thr Glu Ser Gly Cys Lys Glu Cys Glu Glu Leu Glu Glu Lys Asn Ile
85 90 95
Lys Glu Phe Leu Gln Ser Phe Val His Ile Val Gln Met Phe Ile Asn
100 105 110
Thr Ser

<210> 57
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成肽
<400> 57

Lys Ala Gly Gly Lys Ile Leu Thr Phe Asp Gln Leu Ala Leu Glu Ser
1 5 10 15
Pro Lys

<210> 58
<211> 21
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 58

Val Ile Thr Gly Ile Lys Ala Val Tyr Asn Phe Ala Thr Cys Gly Ile
1 5 10 15

Phe Ala Leu Ile Ser
20

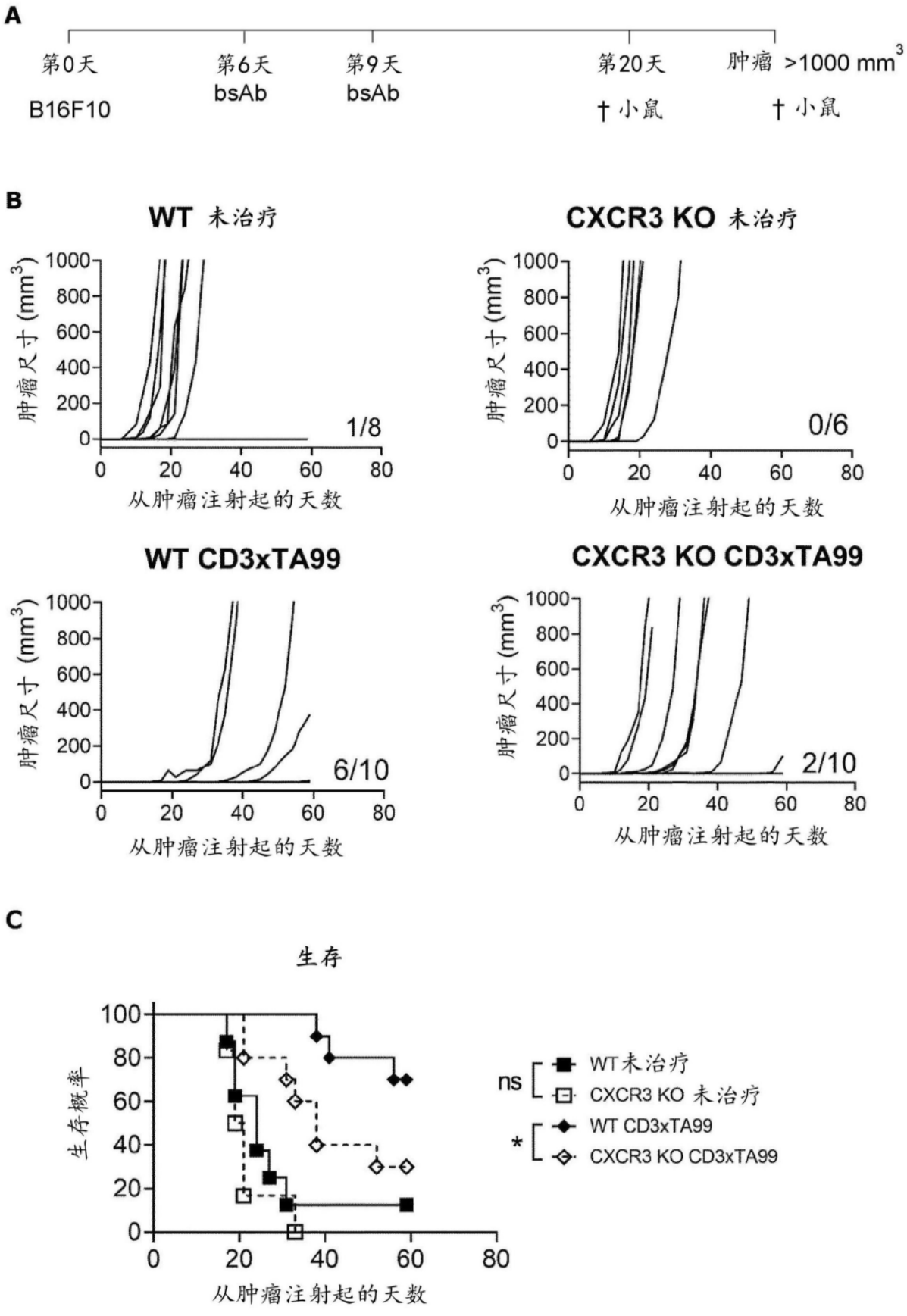

A
第0天
B16F10
第6天
bsAb
第9天
bsAb
第20天
† 小鼠
肿瘤 >1000 mm3
† 小鼠
B
WT 未治疗
CXCR3 KO 未治疗
WT CD3xTA99
CXCR3 KO CD3xTA99
肿瘤尺寸 (mm3)
从肿瘤注射起的天数
1/8
0/6
6/10
2/10
C
生存
生存概率
从肿瘤注射起的天数
ns
*
WT未治疗
CXCR3 KO 未治疗
WT CD3xTA99
CXCR3 KO CD3xTA99

图1

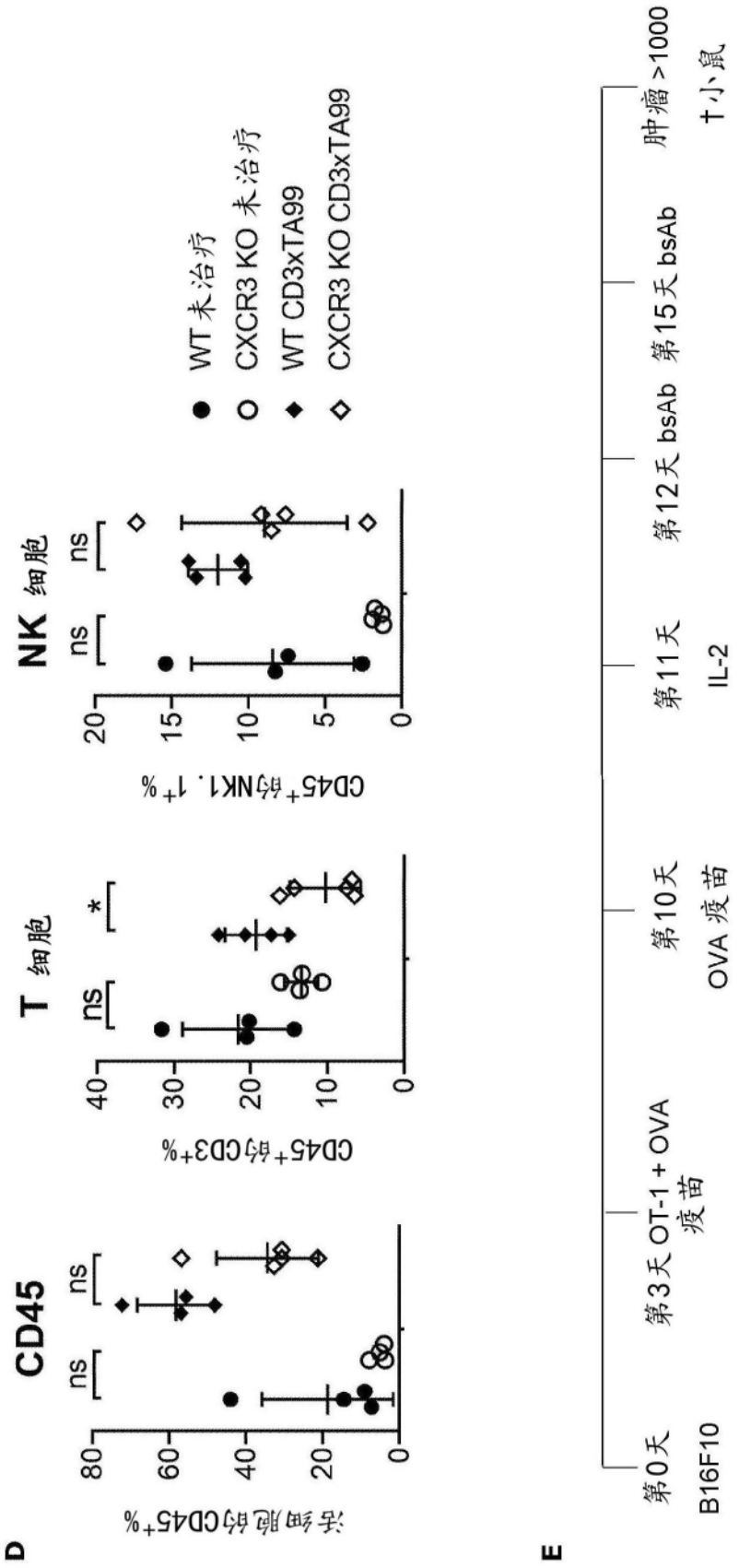

D
CD45
活细胞的CD45+%
ns
ns
80
60
40
20
0
T 细胞
CD45+的CD3+%
ns
*
40
30
20
10
0
NK 细胞
CD45+的NK1.1+%
ns
ns
20
15
10
5
0
WT 未治疗
CXCR3 KO 未治疗
WT CD3xTA99
CXCR3 KO CD3xTA99
E
第0天
B16F10
第3天 OT-1 + OVA
疫苗
第10天
OVA 疫苗
第11天
IL-2
第12天 bsAb
第15天 bsAb
肿瘤 >1000
十小鼠

图1续

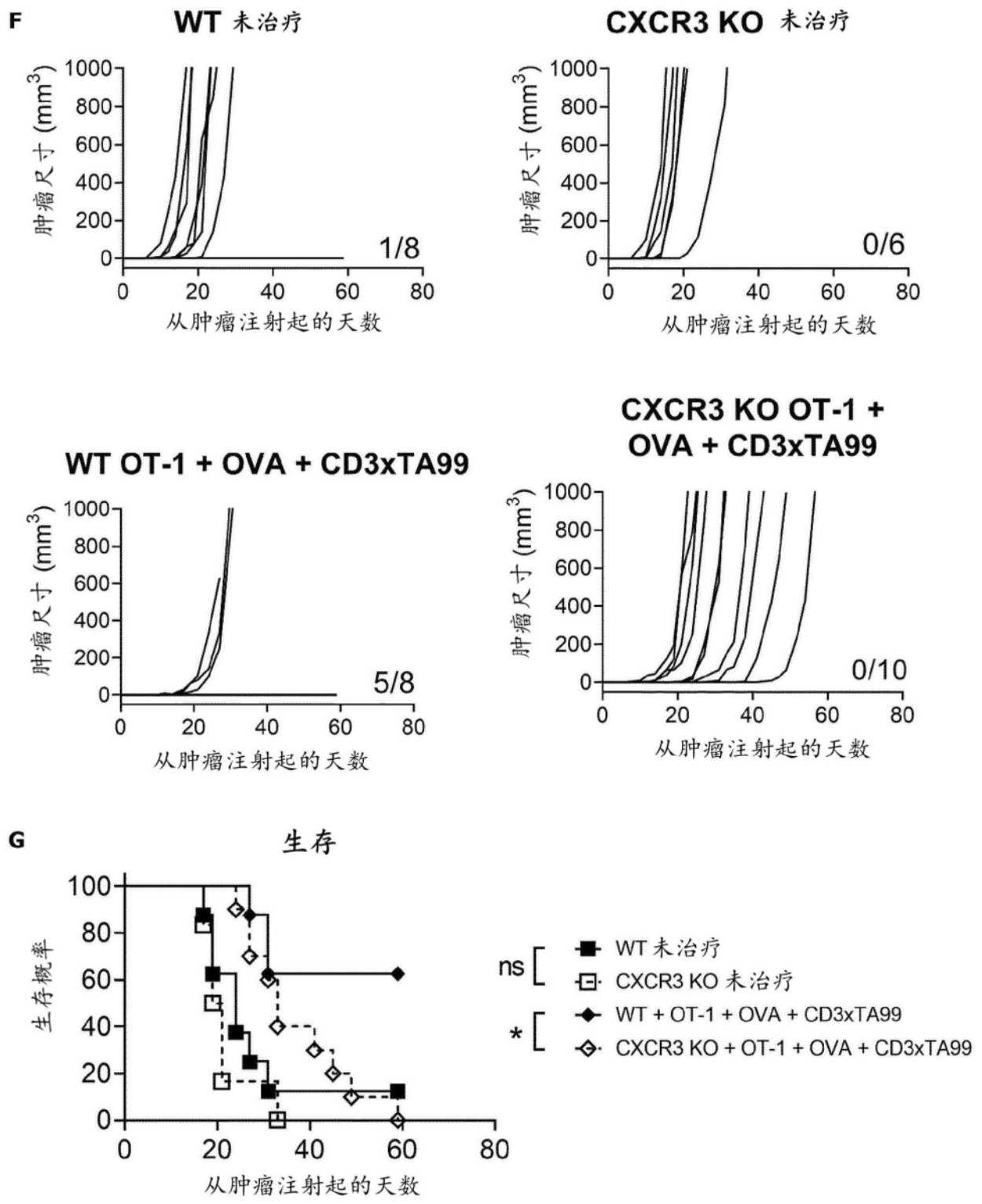

F
WT 未治疗
CXCR3 KO 未治疗
WT OT-1 + OVA + CD3xTA99
CXCR3 KO OT-1 + OVA + CD3xTA99
肿瘤尺寸 (mm3)
从肿瘤注射起的天数
1/8
0/6
5/8
0/10
G
生存
生存概率
ns
*
WT 未治疗
CXCR3 KO 未治疗
WT + OT-1 + OVA + CD3xTA99
CXCR3 KO + OT-1 + OVA + CD3xTA99

图1续

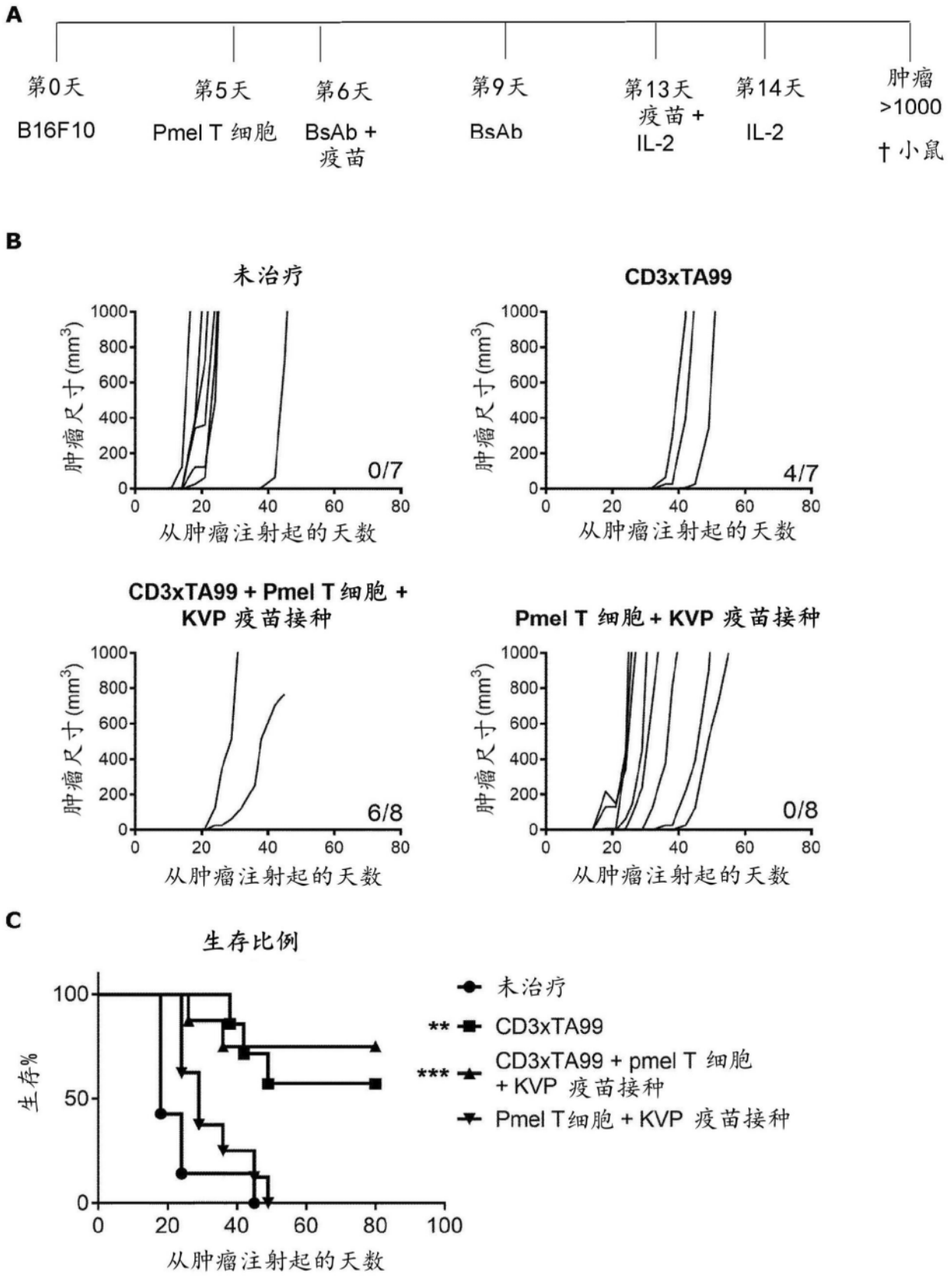

A
第0天
B16F10
第5天
Pmel T 细胞
第6天
BsAb +
疫苗
第9天
BsAb
第13天
疫苗 +
IL-2
第14天
IL-2
肿瘤
>1000
† 小鼠
B
未治疗
0/7
CD3xTA99
4/7
CD3xTA99 + Pmel T 细胞 +
KVP 疫苗接种
6/8
Pmel T 细胞 + KVP 疫苗接种
0/8
肿瘤尺寸(mm3)
从肿瘤注射起的天数
C
生存比例
生存%
从肿瘤注射起的天数
未治疗
** CD3xTA99
*** CD3xTA99 + pmel T 细胞
+ KVP 疫苗接种
Pmel T细胞 + KVP 疫苗接种

图2

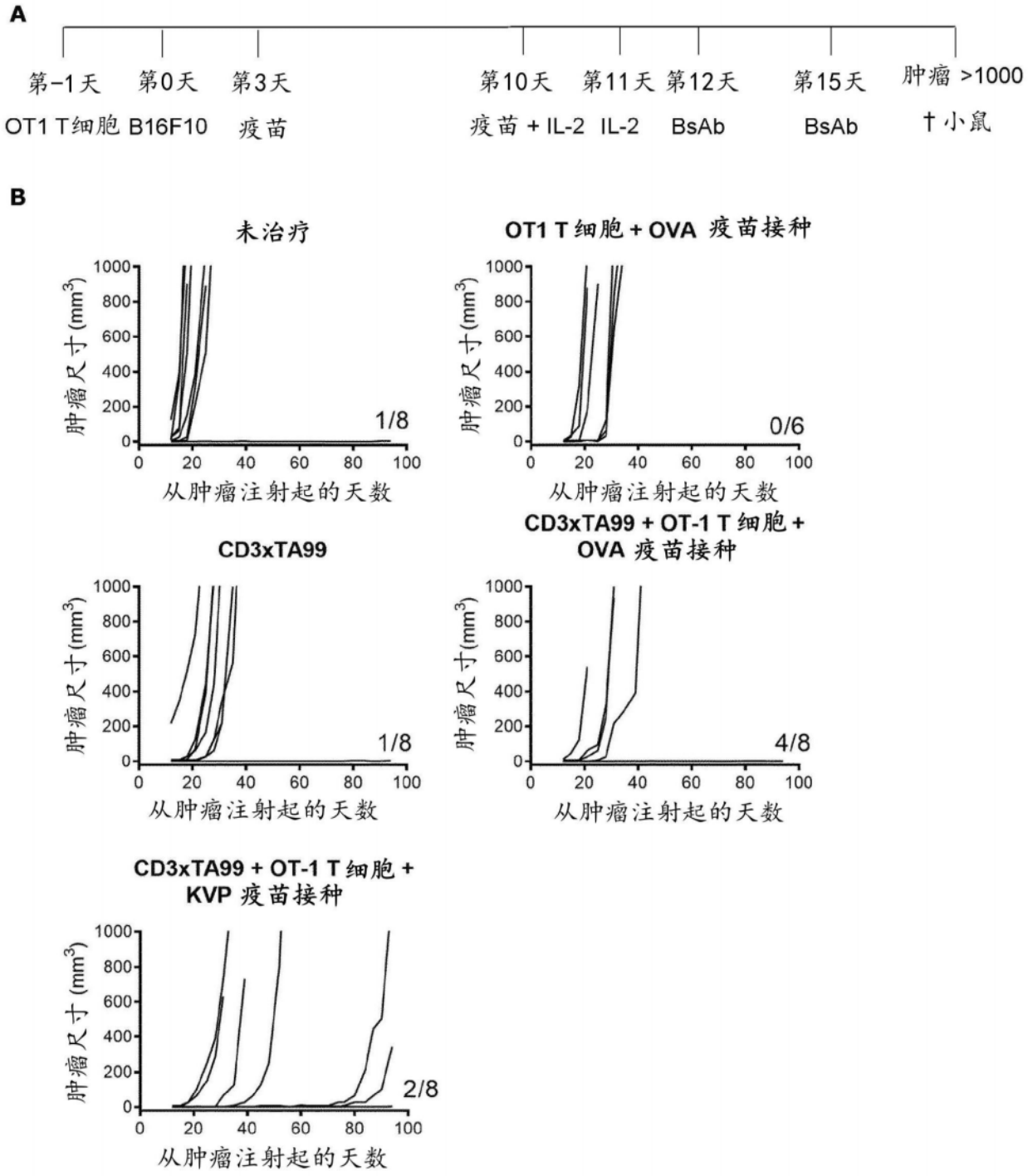

A
第-1天
第0天
第3天
第10天
第11天
第12天
第15天
肿瘤 >1000
OT1 T细胞
B16F10
疫苗
疫苗 + IL-2
IL-2
BsAb
BsAb
† 小鼠
B
未治疗
1/8
OT1 T 细胞 + OVA 疫苗接种
0/6
CD3xTA99
1/8
CD3xTA99 + OT-1 T 细胞 + OVA 疫苗接种
4/8
CD3xTA99 + OT-1 T 细胞 + KVP 疫苗接种
2/8
肿瘤尺寸 (mm3)
从肿瘤注射起的天数

图3

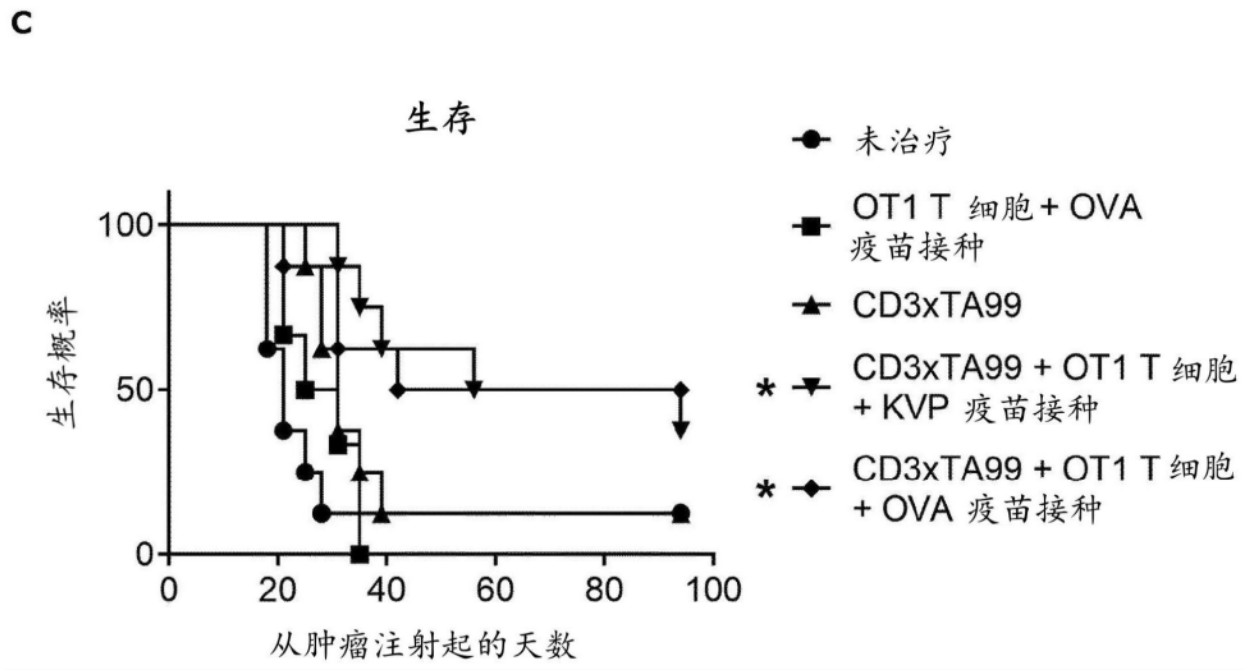

C
生存
生存概率
100
50
0
0
20
40
60
80
100
从肿瘤注射起的天数
未治疗
OT1 T 细胞 + OVA 疫苗接种
CD3xTA99
* CD3xTA99 + OT1 T 细胞 + KVP 疫苗接种
* CD3xTA99 + OT1 T 细胞 + OVA 疫苗接种

图3续

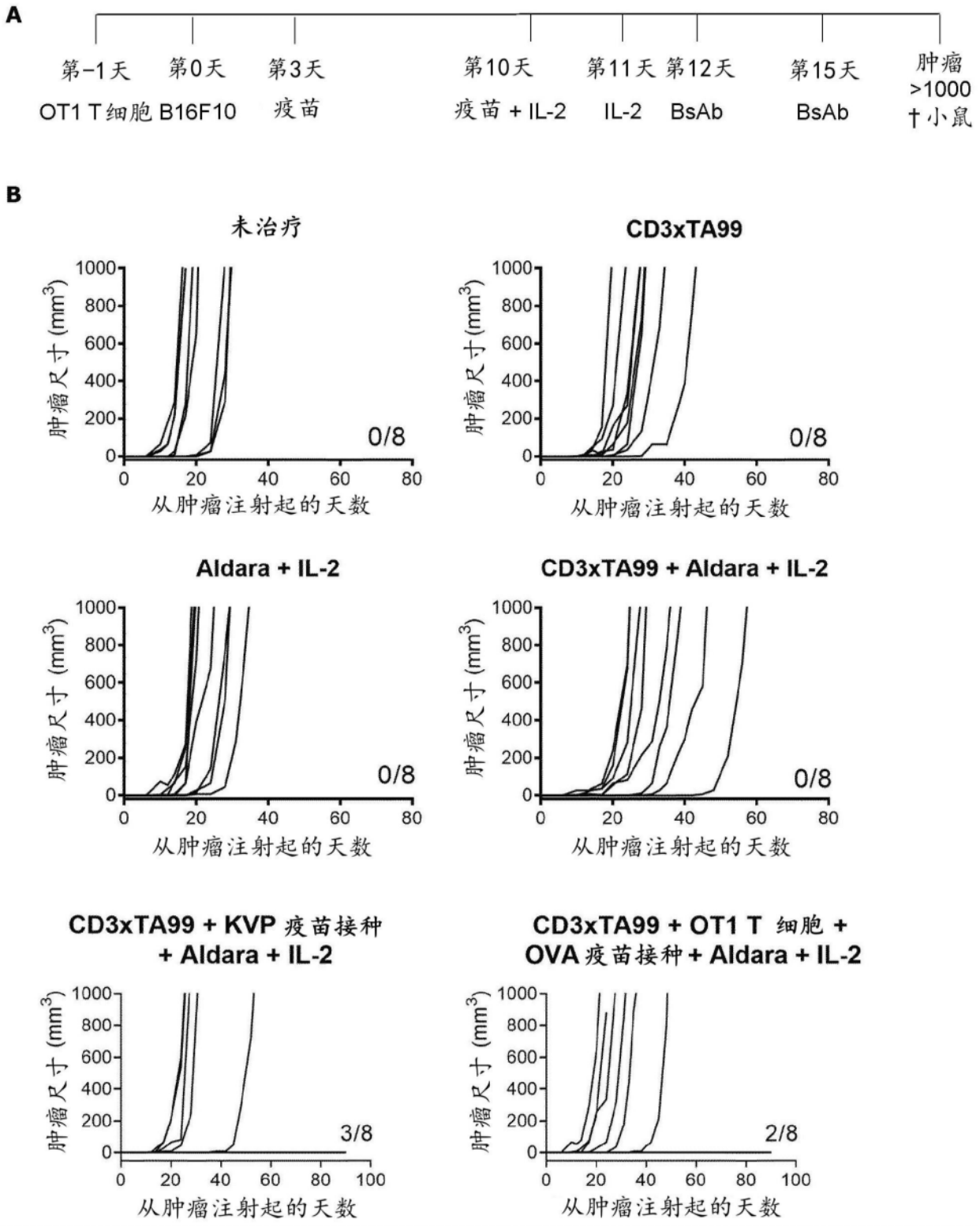

A
第-1天
第0天
第3天
第10天
第11天
第12天
第15天
肿瘤 >1000 † 小鼠
OT1 T细胞 B16F10
疫苗
疫苗 + IL-2
IL-2
BsAb
BsAb
B
未治疗
CD3xTA99
Aldara + IL-2
CD3xTA99 + Aldara + IL-2
CD3xTA99 + KVP 疫苗接种 + Aldara + IL-2
CD3xTA99 + OT1 T 细胞 + OVA 疫苗接种 + Aldara + IL-2
肿瘤尺寸 (mm3)
从肿瘤注射起的天数
0/8
0/8
0/8
0/8
3/8
2/8

图4

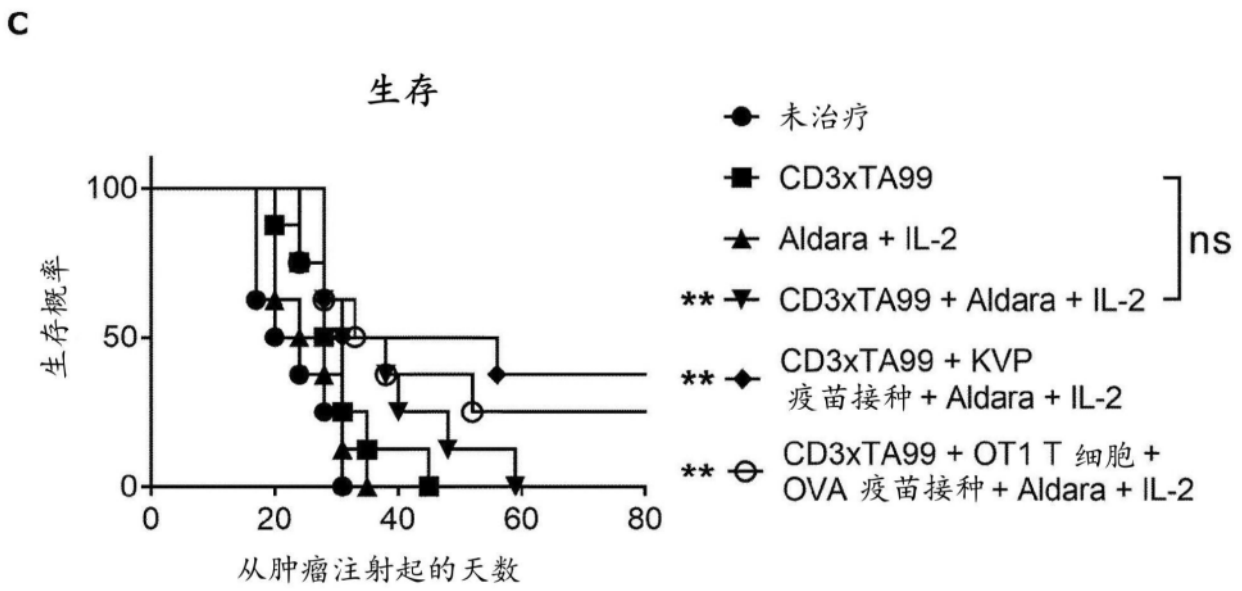

C
生存
生存概率
100
50
0
0
20
40
60
80
从肿瘤注射起的天数
未治疗
CD3xTA99
Aldara + IL-2
ns
** CD3xTA99 + Aldara + IL-2
** CD3xTA99 + KVP 疫苗接种 + Aldara + IL-2
** CD3xTA99 + OT1 T 细胞 + OVA 疫苗接种 + Aldara + IL-2

图4续

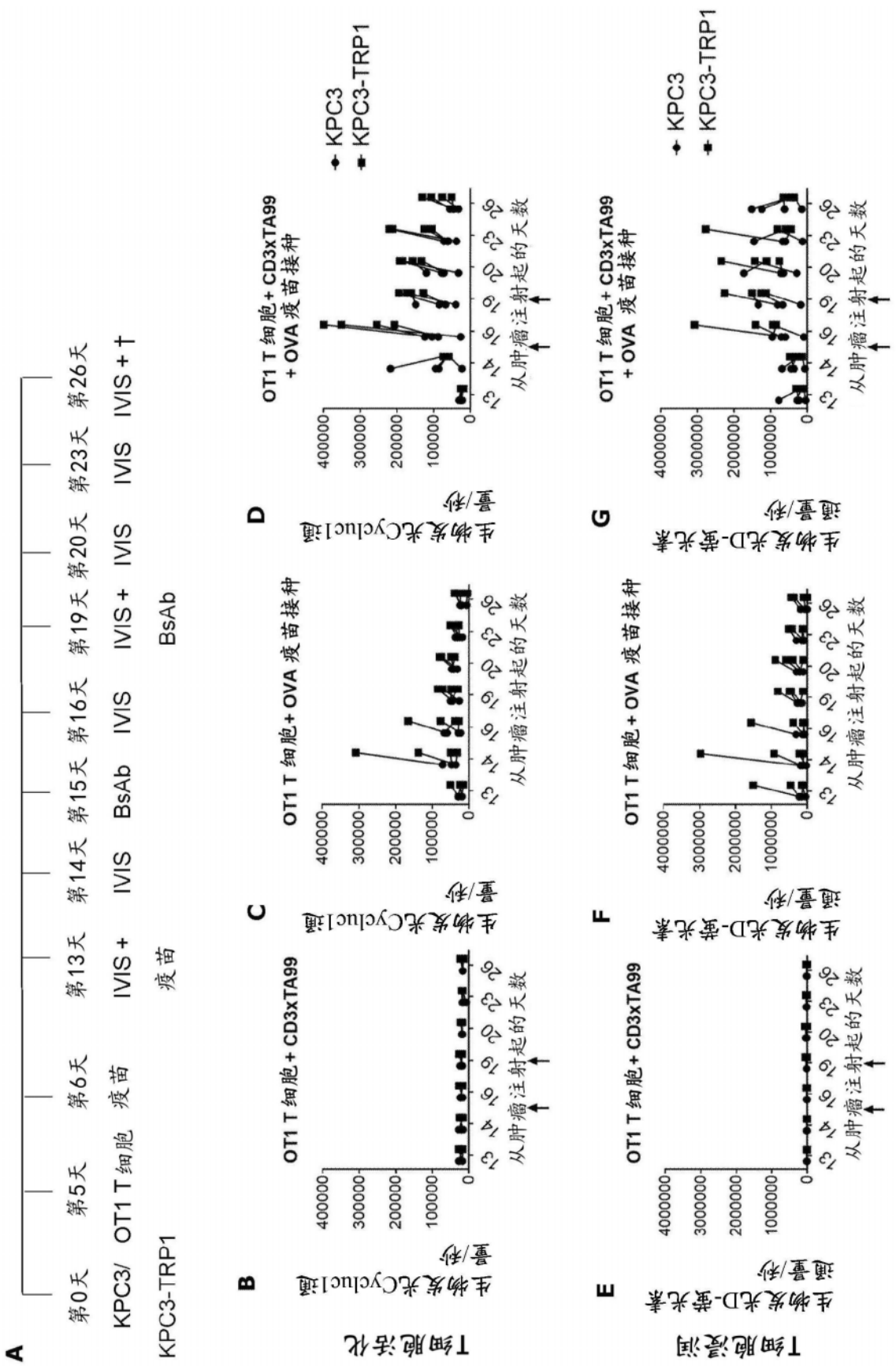

A
第0天 第5天 第6天 第13天 第14天 第15天 第16天 第19天 第20天 第23天 第26天
KPC3/ OT1 T细胞 疫苗 IVIS + IVIS BsAb IVIS IVIS + IVIS IVIS IVIS + †
KPC3-TRP1 疫苗 BsAb
B
OT1 T细胞 + CD3xTA99
生物发光Cyclucl强量/秒
从肿瘤注射起的天数
C
OT1 T细胞 + OVA 疫苗接种
生物发光Cyclucl强量/秒
从肿瘤注射起的天数
D
OT1 T细胞 + CD3xTA99 + OVA 疫苗接种
KPC3
KPC3-TRP1
生物发光Cyclucl强量/秒
从肿瘤注射起的天数
T细胞活化
E
OT1 T细胞 + CD3xTA99
生物发光D-萤光素强量/秒
从肿瘤注射起的天数
F
OT1 T细胞 + OVA 疫苗接种
生物发光D-萤光素强量/秒
从肿瘤注射起的天数
G
OT1 T细胞 + CD3xTA99 + OVA 疫苗接种
KPC3
KPC3-TRP1
生物发光D-萤光素强量/秒
从肿瘤注射起的天数
T细胞浸润

图5

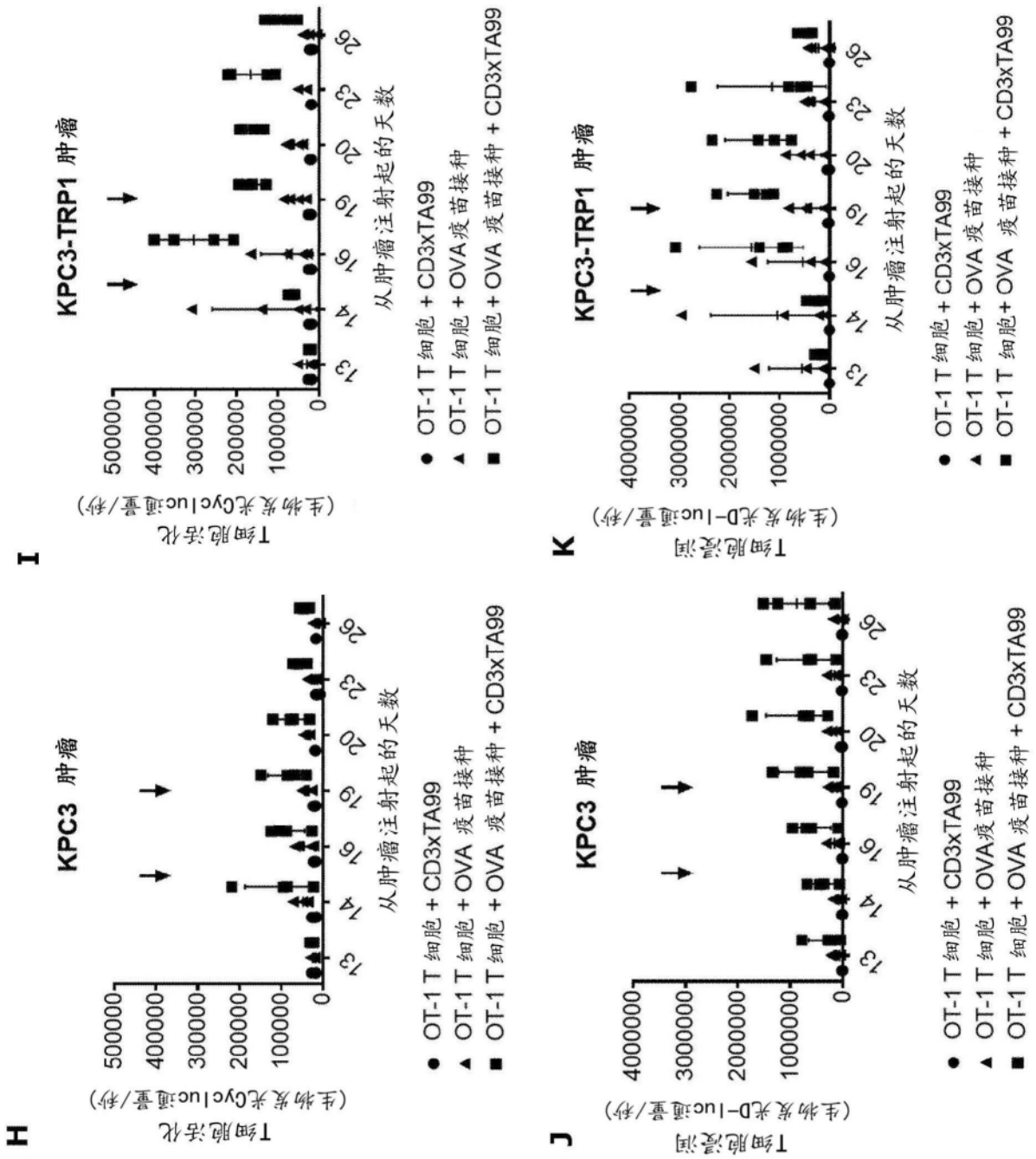

H
KPC3 肿瘤
T细胞活化
(生物发光Cyc|uc通量/秒)
500000
400000
300000
200000
100000
0
13
14
16
19
20
23
26
从肿瘤注射起的天数
OT-1 T 细胞 + CD3xTA99
OT-1 T 细胞 + OVA 疫苗接种
OT-1 T 细胞 + OVA 疫苗接种 + CD3xTA99
I
KPC3-TRP1 肿瘤
T细胞活化
(生物发光Cyc|uc通量/秒)
500000
400000
300000
200000
100000
0
13
14
16
19
20
23
26
从肿瘤注射起的天数
OT-1 T 细胞 + CD3xTA99
OT-1 T 细胞 + OVA 疫苗接种
OT-1 T 细胞 + OVA 疫苗接种 + CD3xTA99
J
KPC3 肿瘤
T细胞浸润
(生物发光D-|uc通量/秒)
4000000
3000000
2000000
1000000
0
13
14
16
19
20
23
26
从肿瘤注射起的天数
OT-1 T 细胞 + CD3xTA99
OT-1 T 细胞 + OVA疫苗接种
OT-1 T 细胞 + OVA 疫苗接种 + CD3xTA99
K
KPC3-TRP1 肿瘤
T细胞浸润
(生物发光D-|uc通量/秒)
4000000
3000000
2000000
1000000
0
13
14
16
19
20
23
26
从肿瘤注射起的天数
OT-1 T 细胞 + CD3xTA99
OT-1 T 细胞 + OVA 疫苗接种
OT-1 T 细胞 + OVA 疫苗接种 + CD3xTA99

图5续

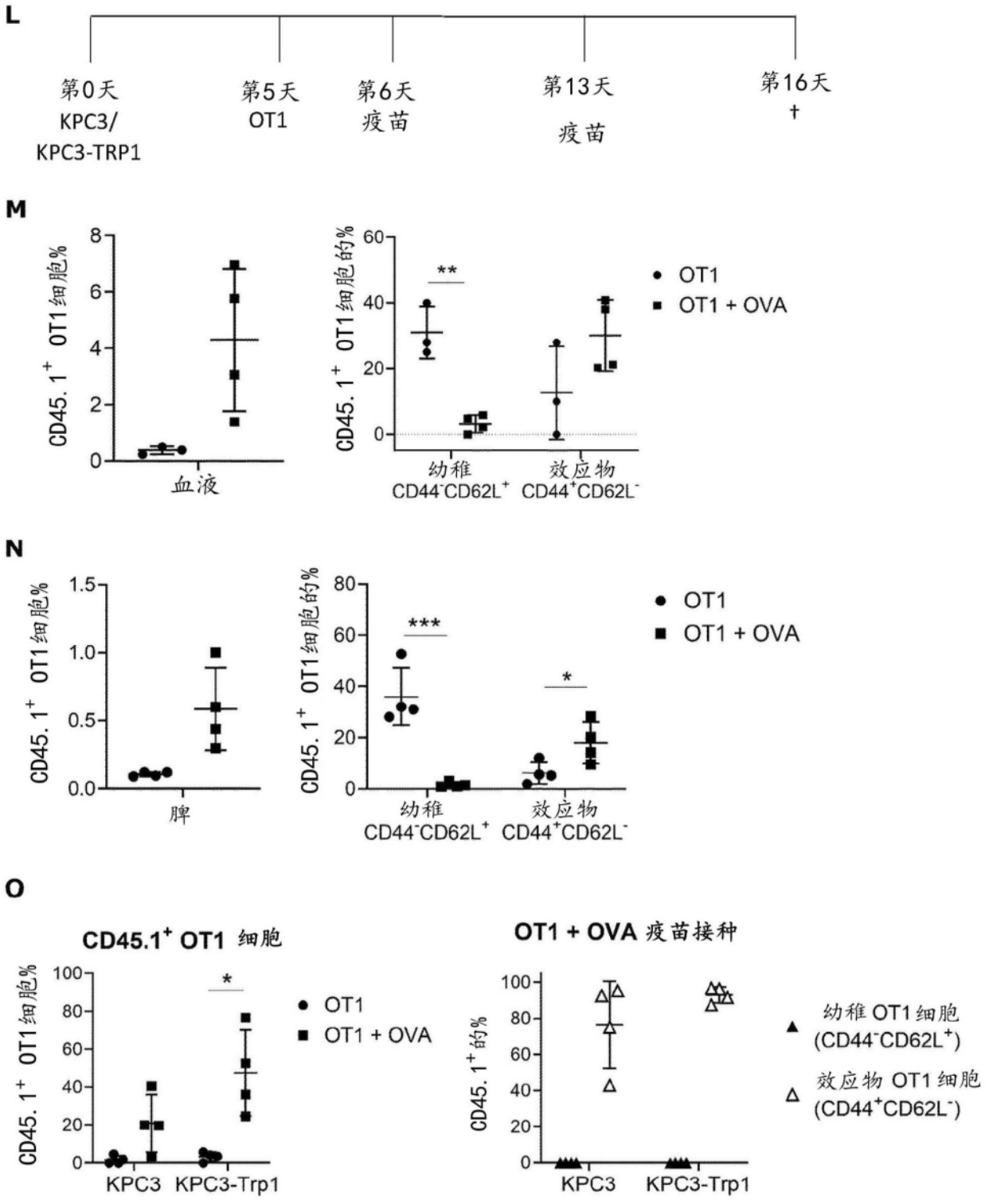

L
第0天
KPC3/
KPC3-TRP1
第5天
OT1
第6天
疫苗
第13天
疫苗
第16天
†
M
CD45.1+ OT1细胞%
血液
CD45.1+ OT1细胞的%
**
OT1
OT1 + OVA
幼稚
CD44-CD62L+
效应物
CD44+CD62L-
N
CD45.1+ OT1细胞%
脾
CD45.1+ OT1细胞的%
***
*
OT1
OT1 + OVA
幼稚
CD44-CD62L+
效应物
CD44+CD62L-
O
CD45.1+ OT1 细胞
CD45.1+ OT1细胞%
*
OT1
OT1 + OVA
KPC3
KPC3-Trp1
OT1 + OVA 疫苗接种
CD45.1+的%
幼稚 OT1细胞
(CD44-CD62L+)
效应物 OT1细胞
(CD44+CD62L-)
KPC3
KPC3-Trp1

图5续

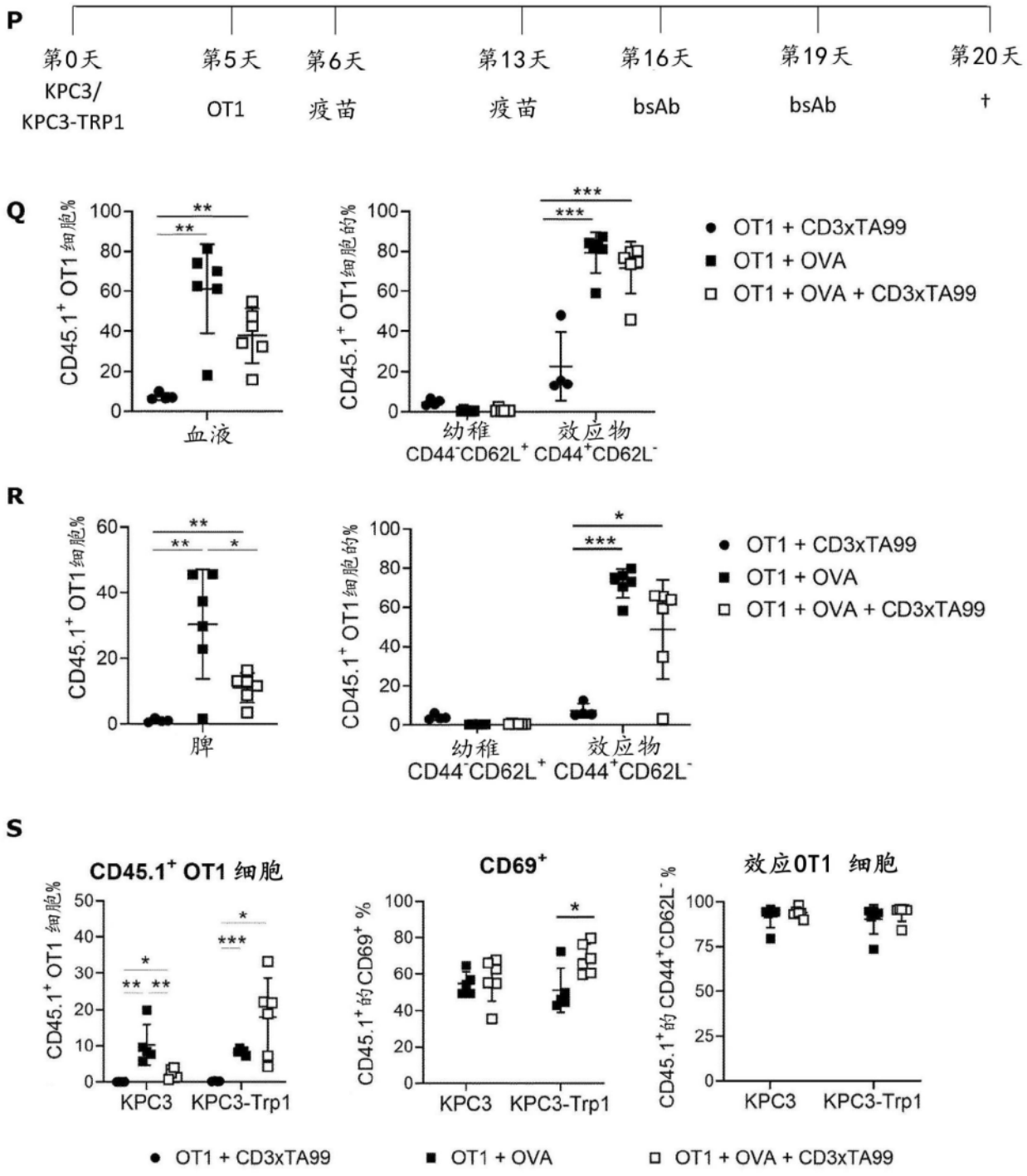

P
第0天
KPC3/
KPC3-TRP1
第5天
OT1
第6天
疫苗
第13天
疫苗
第16天
bsAb
第19天
bsAb
第20天
†
Q
CD45.1+ OT1 细胞%
血液
CD45.1+ OT1细胞的%
幼稚
CD44-CD62L+
效应物
CD44+CD62L-
OT1 + CD3xTA99
OT1 + OVA
OT1 + OVA + CD3xTA99
R
CD45.1+ OT1细胞%
脾
CD45.1+ OT1细胞的%
幼稚
CD44-CD62L+
效应物
CD44+CD62L-
OT1 + CD3xTA99
OT1 + OVA
OT1 + OVA + CD3xTA99
S
CD45.1+ OT1 细胞
CD45.1+ OT1 细胞%
KPC3
KPC3-Trp1
CD69+
CD45.1+的CD69+ %
KPC3
KPC3-Trp1
效应0T1 细胞
CD45.1+的CD44+CD62L- %
KPC3
KPC3-Trp1
OT1 + CD3xTA99
OT1 + OVA
OT1 + OVA + CD3xTA99

图5续

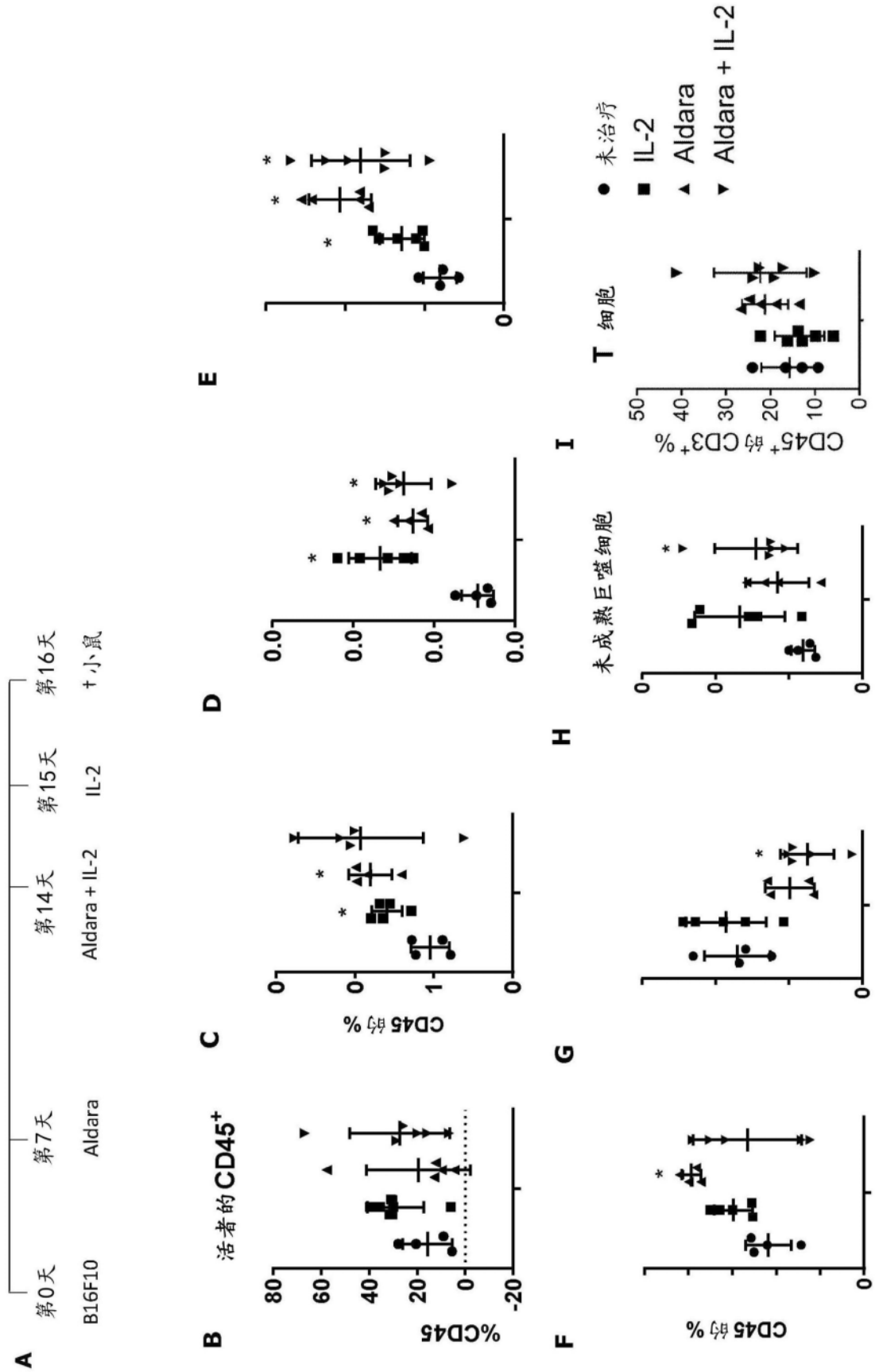

A
第0天
第7天
第14天
第15天
第16天
B16F10
Aldara
Aldara + IL-2
IL-2
+小鼠
B
活者的CD45+
%CD45
C
CD45的%
D
E
F
CD45的%
G
H
未成熟巨噬细胞
I
T 细胞
CD45+的CD3+%
未治疗
IL-2
Aldara
Aldara + IL-2

图6

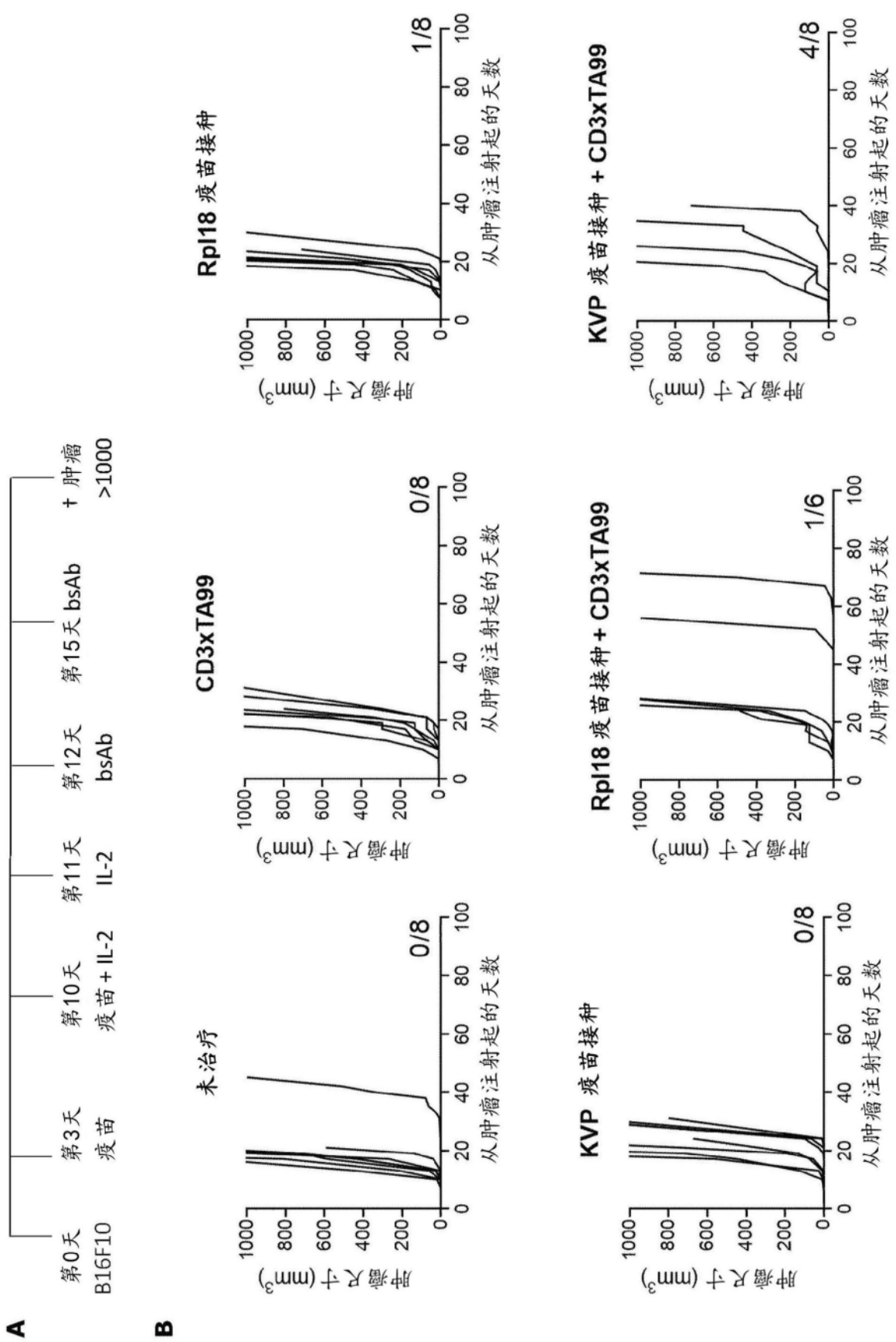

A
第0天
第3天
第10天
第11天
第12天
第15天 bsAb
† 肿瘤
B16F10
疫苗
疫苗 + IL-2
IL-2
bsAb
>1000
B
未治疗
CD3xTA99
Rpl18 疫苗接种
KVP 疫苗接种
Rpl18 疫苗接种 + CD3xTA99
KVP 疫苗接种 + CD3xTA99
0/8
0/8
1/8
0/8
1/6
4/8
肿瘤尺寸 (mm³)
从肿瘤注射起的天数

图7

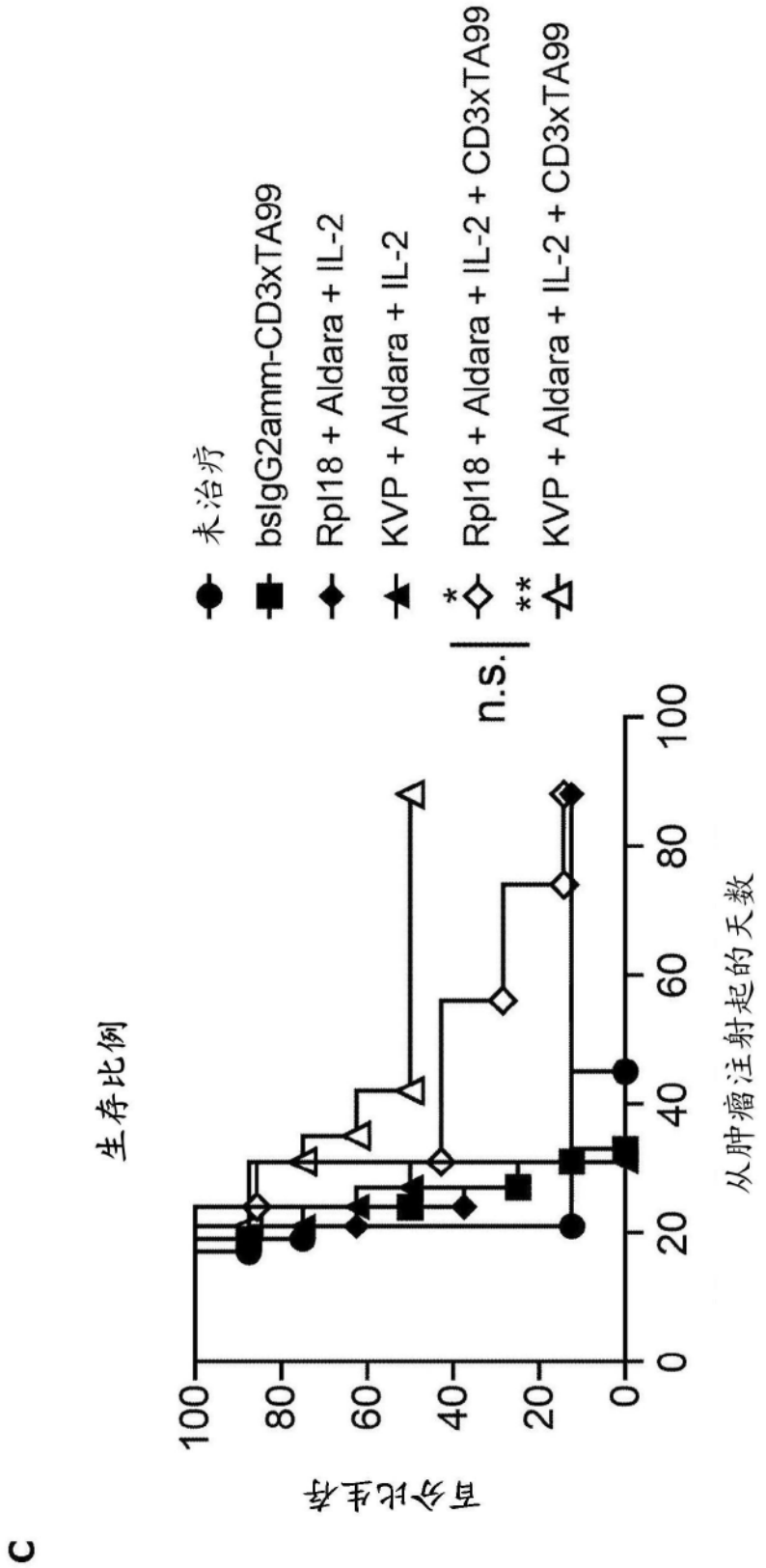

c
生存比例
百分比生存
100
80
60
40
20
0
0
20
40
60
80
100
从肿瘤注射起的天数
未治疗
bsIgG2amm-CD3xTA99
Rpl18 + Aldara + IL-2
KVP + Aldara + IL-2
*
Rpl18 + Aldara + IL-2 + CD3xTA99
n.s.
**
KVP + Aldara + IL-2 + CD3xTA99

图7续

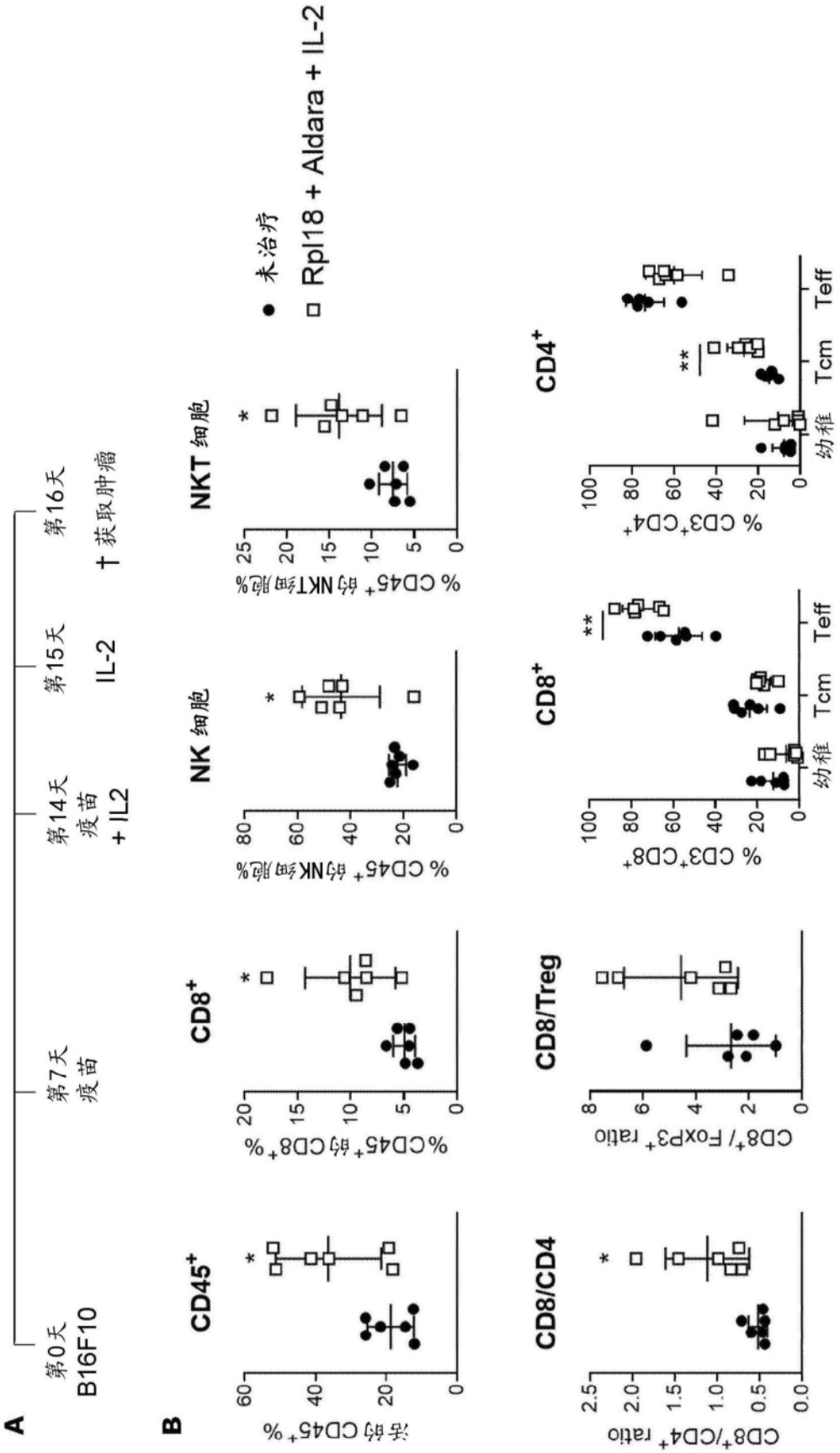

A
第0天
B16F10
第7天
疫苗
第14天
疫苗
+ IL2
第15天
IL-2
第16天
† 获取肿瘤
B
CD45+
活的 CD45+ %
CD8+
%CD45+ 的CD8+%
NK 细胞
% CD45+ 的NK细胞%
NKT 细胞
% CD45+ 的NKT细胞%
CD8/CD4
CD8+/CD4+ ratio
CD8/Treg
CD8+/ FoxP3+ ratio
CD8+
% CD3+CD8+
CD4+
% CD3+CD4+
幼稚
Tcm
Teff
未治疗
Rpl18 + Aldara + IL-2

图8

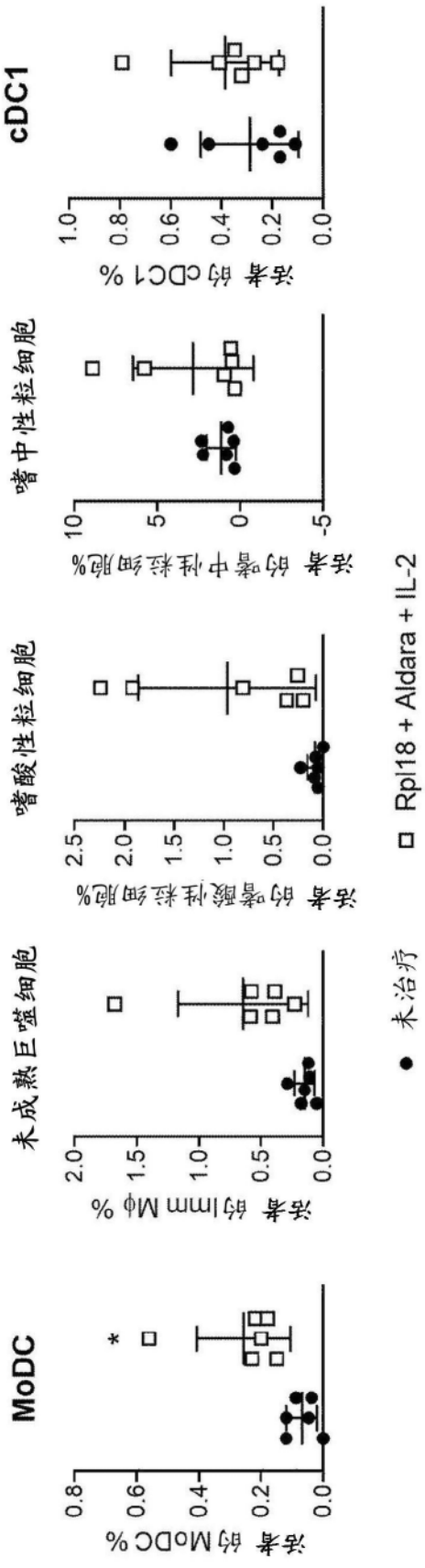

MoDC
cDC1
未成熟巨噬细胞
嗜酸性粒细胞
嗜中性粒细胞
活者 的MoDC %
活者 的cDC1 %
活者 的Imm Mϕ %
活者 的嗜酸性粒细胞%
活者 的嗜中性粒细胞%
● 未治疗
□ Rpl18 + Aldara + IL-2

图8B续

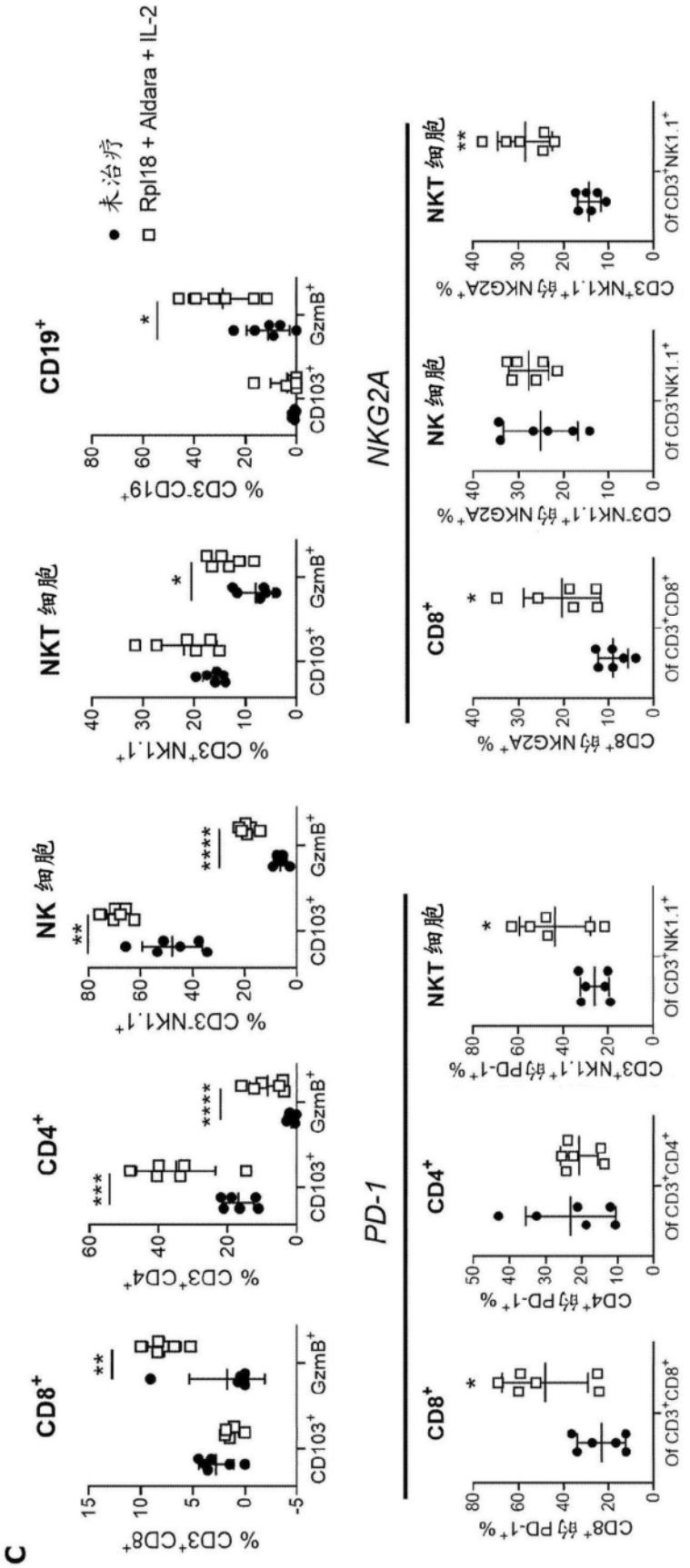

C
CD8+
CD4+
NK 细胞
NKT 细胞
CD19+
未治疗
Rpl18 + Aldara + IL-2
PD-1
NKG2A
% CD3+CD8+
% CD3+CD4+
% CD3-NK1.1+
% CD3+NK1.1+
% CD3-CD19+
CD103+ GzmB+
CD8+ 的 PD-1+ %
CD4+ 的 PD-1+ %
CD3+NK1.1+ 的 PD-1+ %
CD8+ 的 NKG2A+ %
CD3-NK1.1+ 的 NKG2A+ %
CD3+NK1.1+ 的 NKG2A+ %
Of CD3+CD8+
Of CD3+CD4+
Of CD3+NK1.1+

图8续

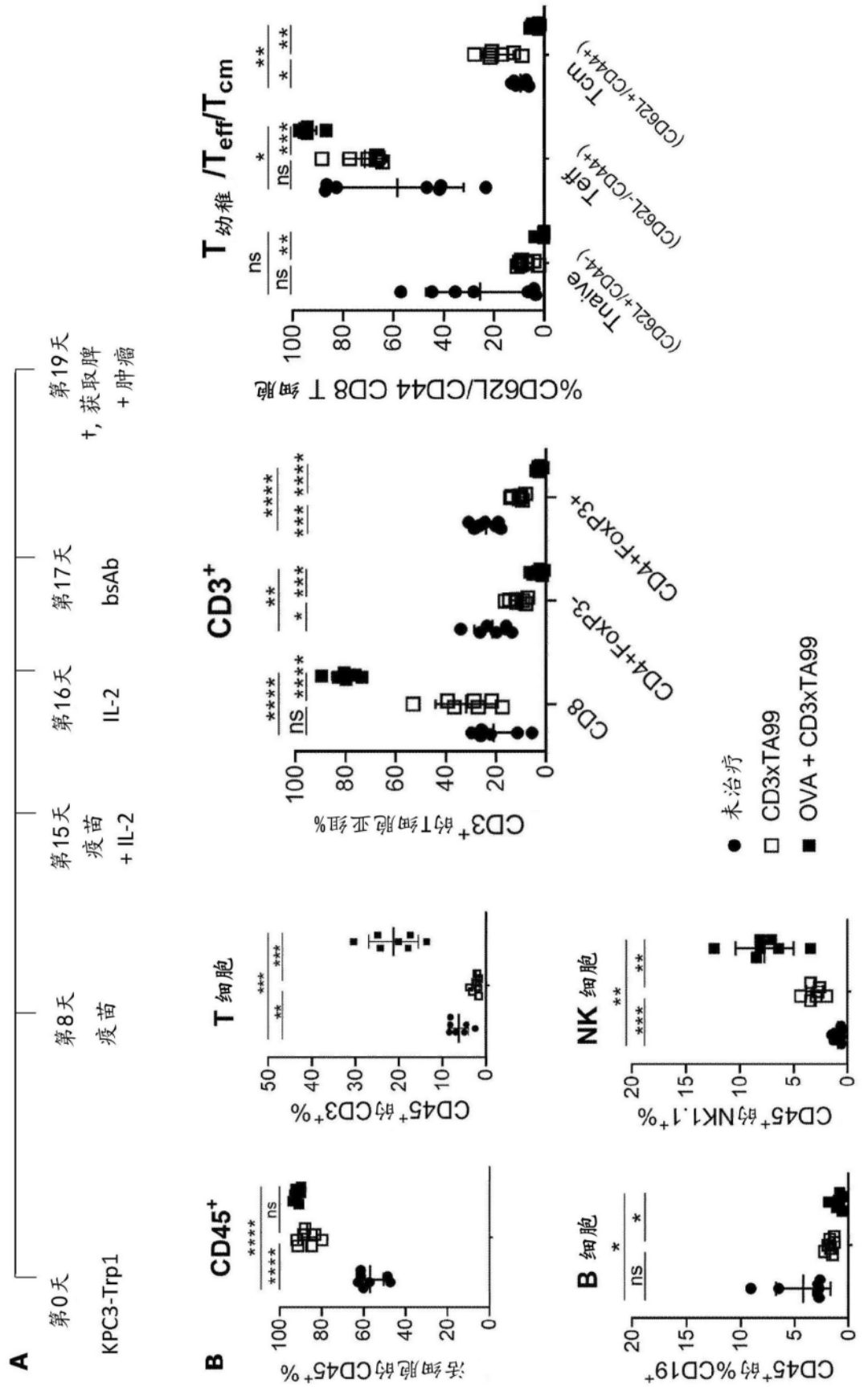

A
第0天
KPC3-Trp1
第8天
疫苗
第15天
疫苗
+ IL-2
第16天
IL-2
第17天
bsAb
第19天
†, 获取脾
+ 肿瘤
B
CD45+
活细胞的CD45+%
T 细胞
CD45+的CD3+%
B 细胞
CD45+的%CD19+
NK 细胞
CD45+的NK1.1+%
CD3+
CD3+的T细胞百分%
CD8
CD4+FoxP3-
CD4+FoxP3+
未治疗
CD3xTA99
OVA + CD3xTA99
%CD62L/CD44 CD8 T 细胞
T幼稚 /Teff/Tcm
Tnaive
(CD62L+/CD44-)
Teff
(CD62L-/CD44+)
Tcm
(CD62L+/CD44+)

图9

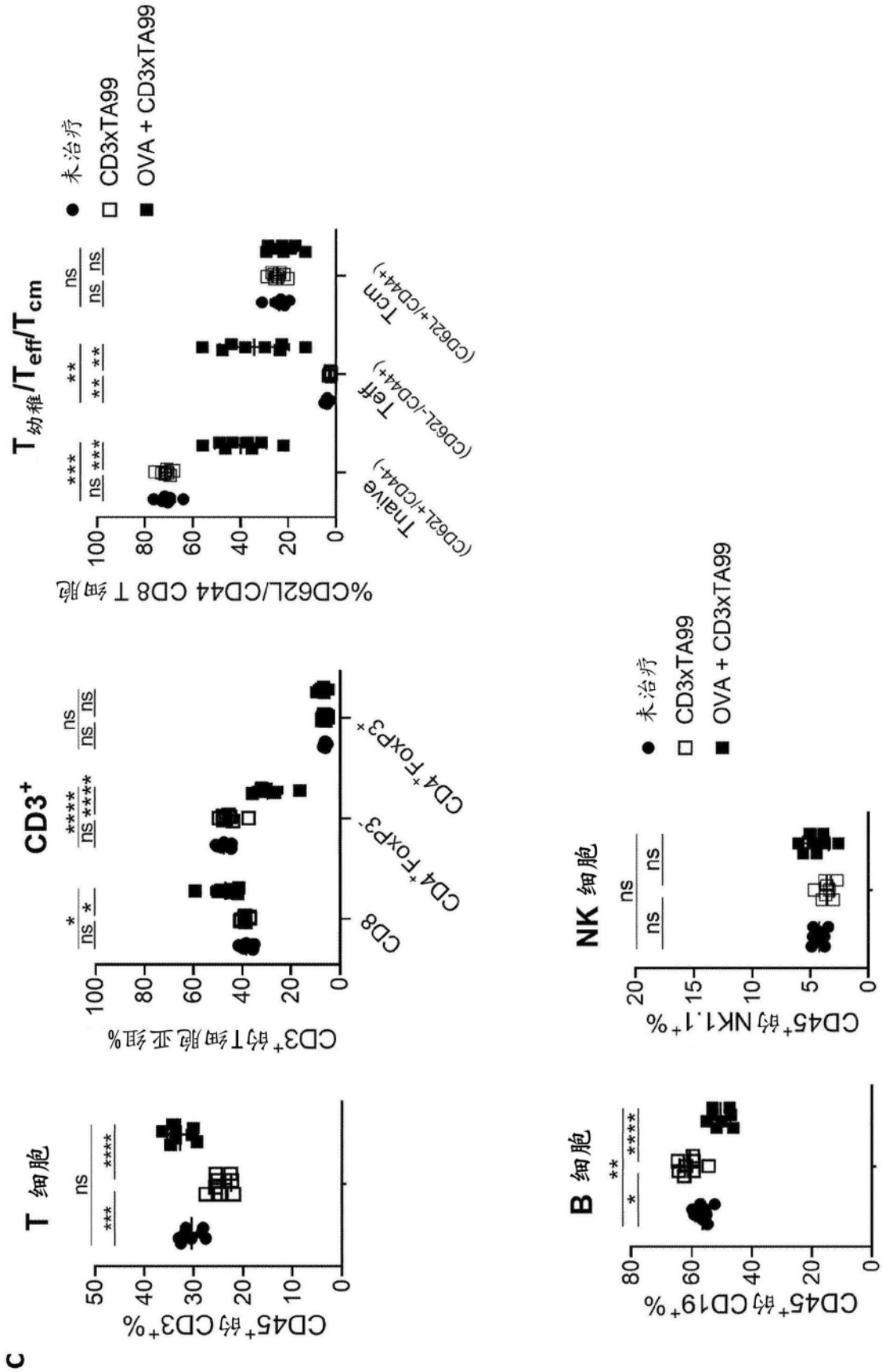

C
T 细胞
CD45+的CD3+%
B 细胞
CD45+的CD19+%
NK 细胞
CD45+的NK1.1+%
CD3+
CD3+的T细胞亚组%
CD8
CD4+FoxP3-
CD4+FoxP3+
T幼稚/Teff/Tcm
%CD62L/CD44 CD8 T 细胞
未治疗
CD3xTA99
OVA + CD3xTA99
Tnaive (CD62L+/CD44-)
Teff (CD62L-/CD44+)
Tcm (CD62L+/CD44+)

图9续

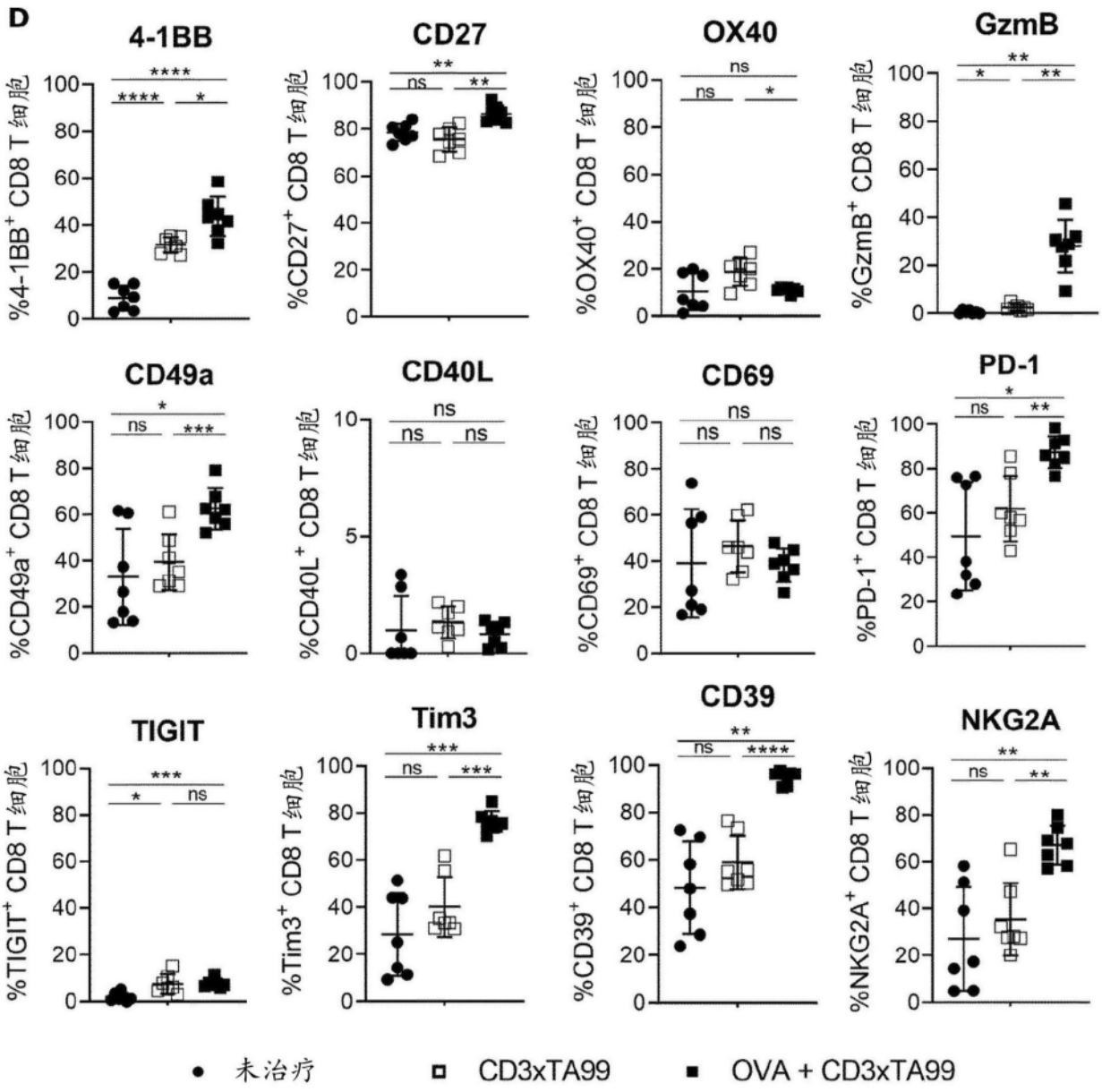

D
4-1BB
CD27
OX40
GzmB
CD49a
CD40L
CD69
PD-1
TIGIT
Tim3
CD39
NKG2A
%4-1BB+ CD8 T细胞
%CD27+ CD8 T细胞
%OX40+ CD8 T细胞
%GzmB+ CD8 T细胞
%CD49a+ CD8 T细胞
%CD40L+ CD8 T细胞
%CD69+ CD8 T细胞
%PD-1+ CD8 T细胞
%TIGIT+ CD8 T细胞
%Tim3+ CD8 T细胞
%CD39+ CD8 T细胞
%NKG2A+ CD8 T细胞
未治疗
CD3xTA99
OVA + CD3xTA99

图9续

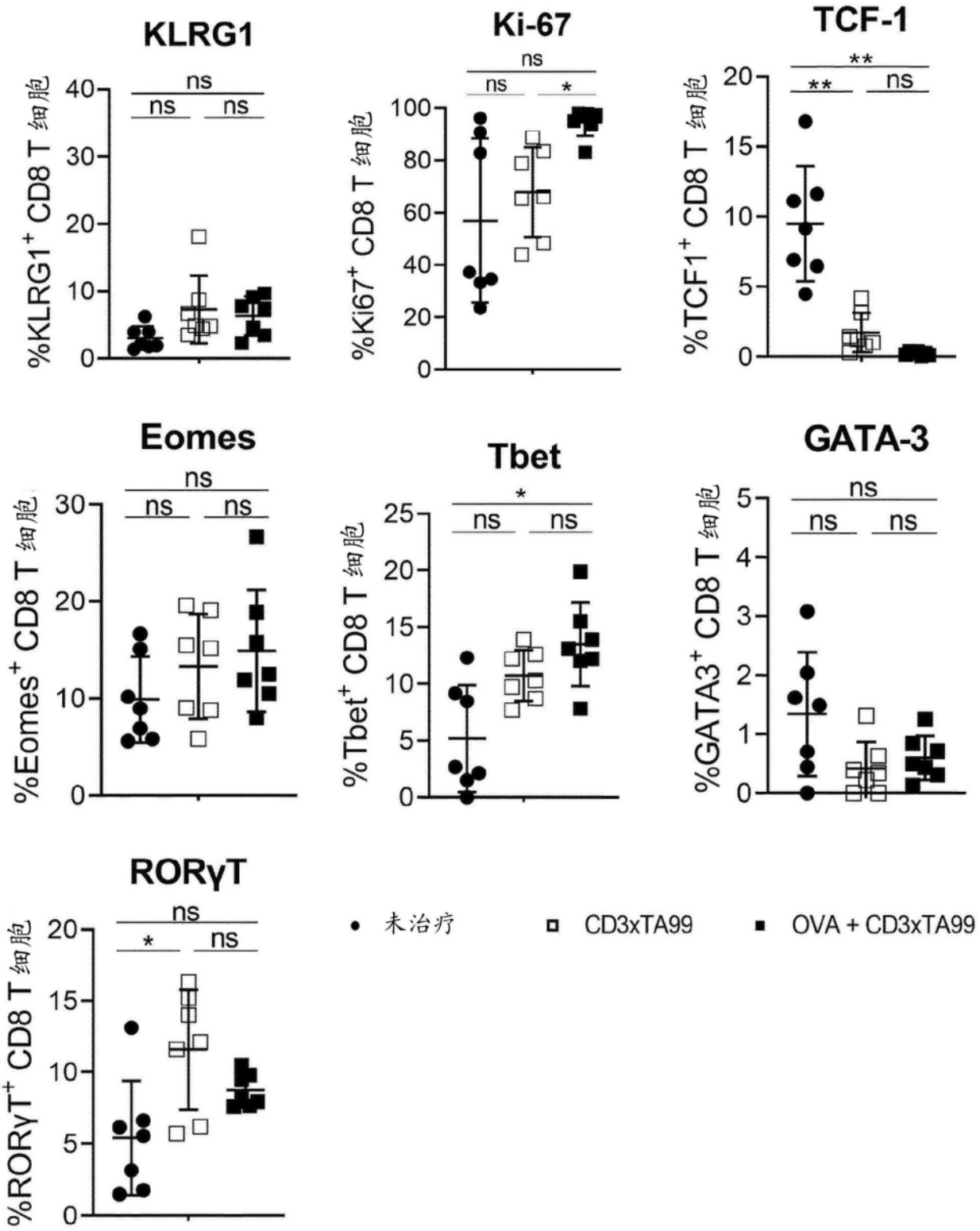

KLRG1
%KLRG1+ CD8 T 细胞
Ki-67
%Ki67+ CD8 T 细胞
TCF-1
%TCF1+ CD8 T 细胞
Eomes
%Eomes+ CD8 T 细胞
Tbet
%Tbet+ CD8 T 细胞
GATA-3
%GATA3+ CD8 T 细胞
RORγT
%RORγT+ CD8 T 细胞
ns
*
**
未治疗
CD3xTA99
OVA + CD3xTA99

图9D续

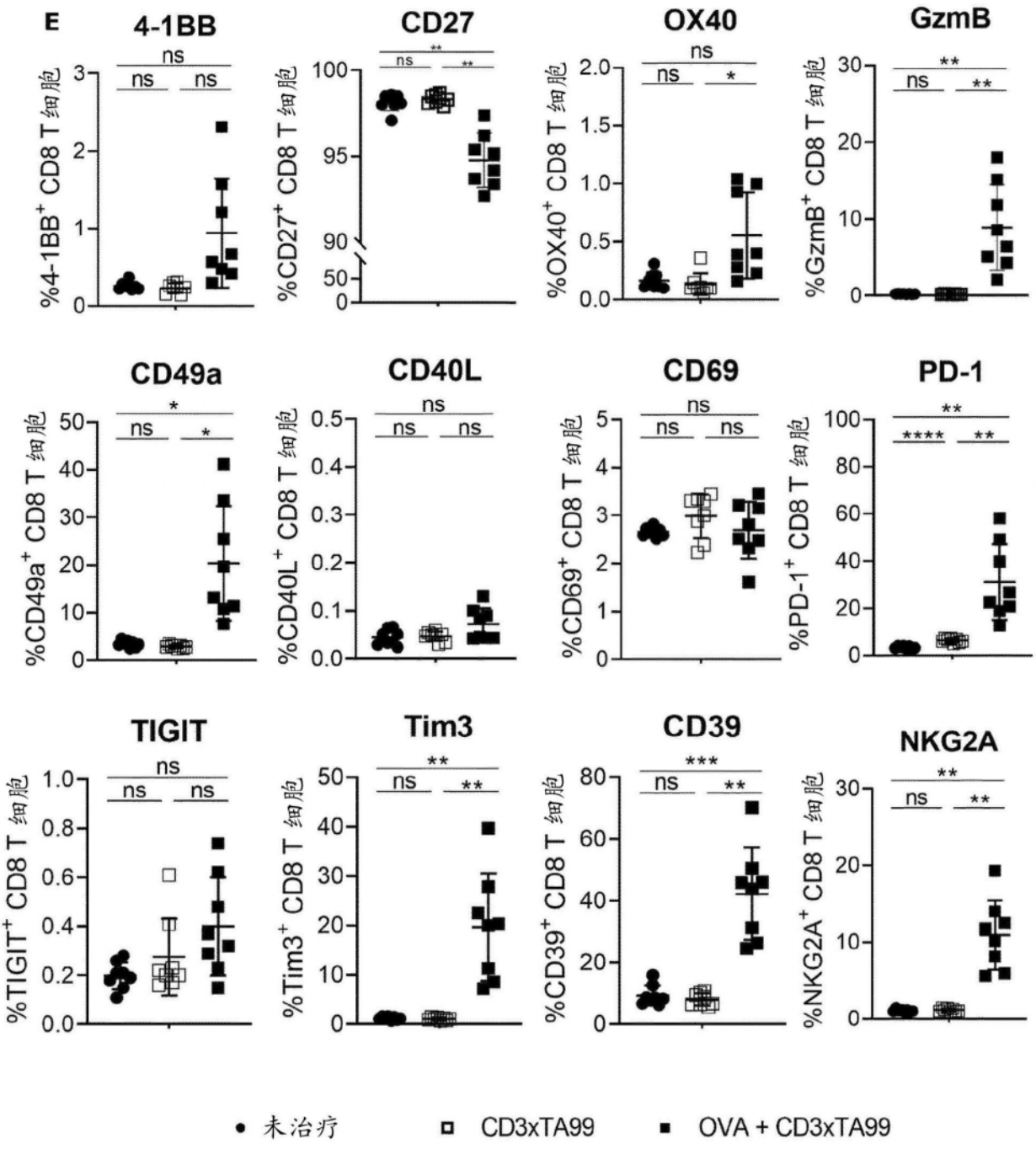

E
4-1BB
CD27
OX40
GzmB
CD49a
CD40L
CD69
PD-1
TIGIT
Tim3
CD39
NKG2A
%4-1BB+ CD8 T 细胞
%CD27+ CD8 T 细胞
%OX40+ CD8 T 细胞
%GzmB+ CD8 T 细胞
%CD49a+ CD8 T 细胞
%CD40L+ CD8 T 细胞
%CD69+ CD8 T 细胞
%PD-1+ CD8 T 细胞
%TIGIT+ CD8 T 细胞
%Tim3+ CD8 T 细胞
%CD39+ CD8 T 细胞
%NKG2A+ CD8 T 细胞
未治疗
CD3xTA99
OVA + CD3xTA99

图9续

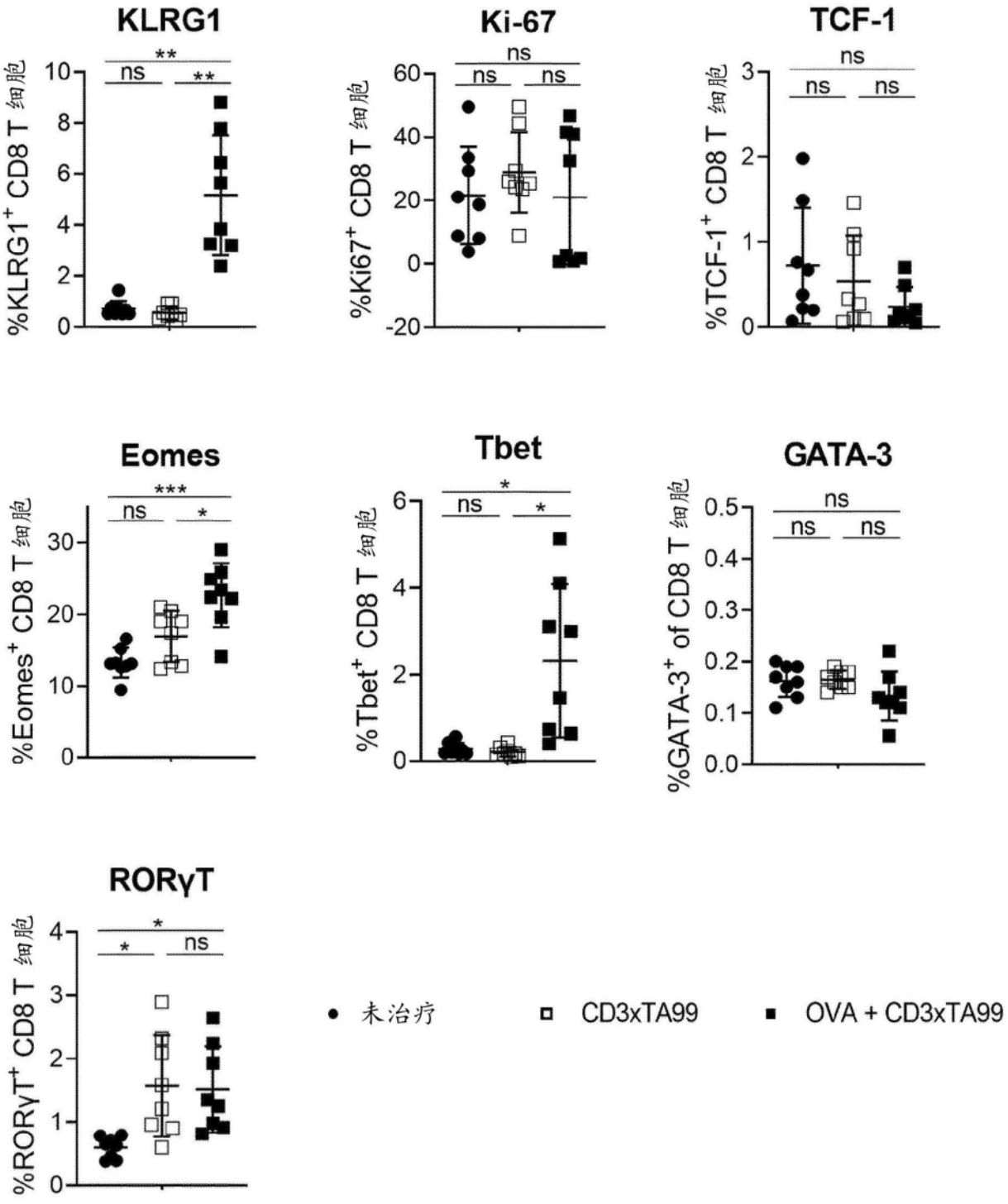
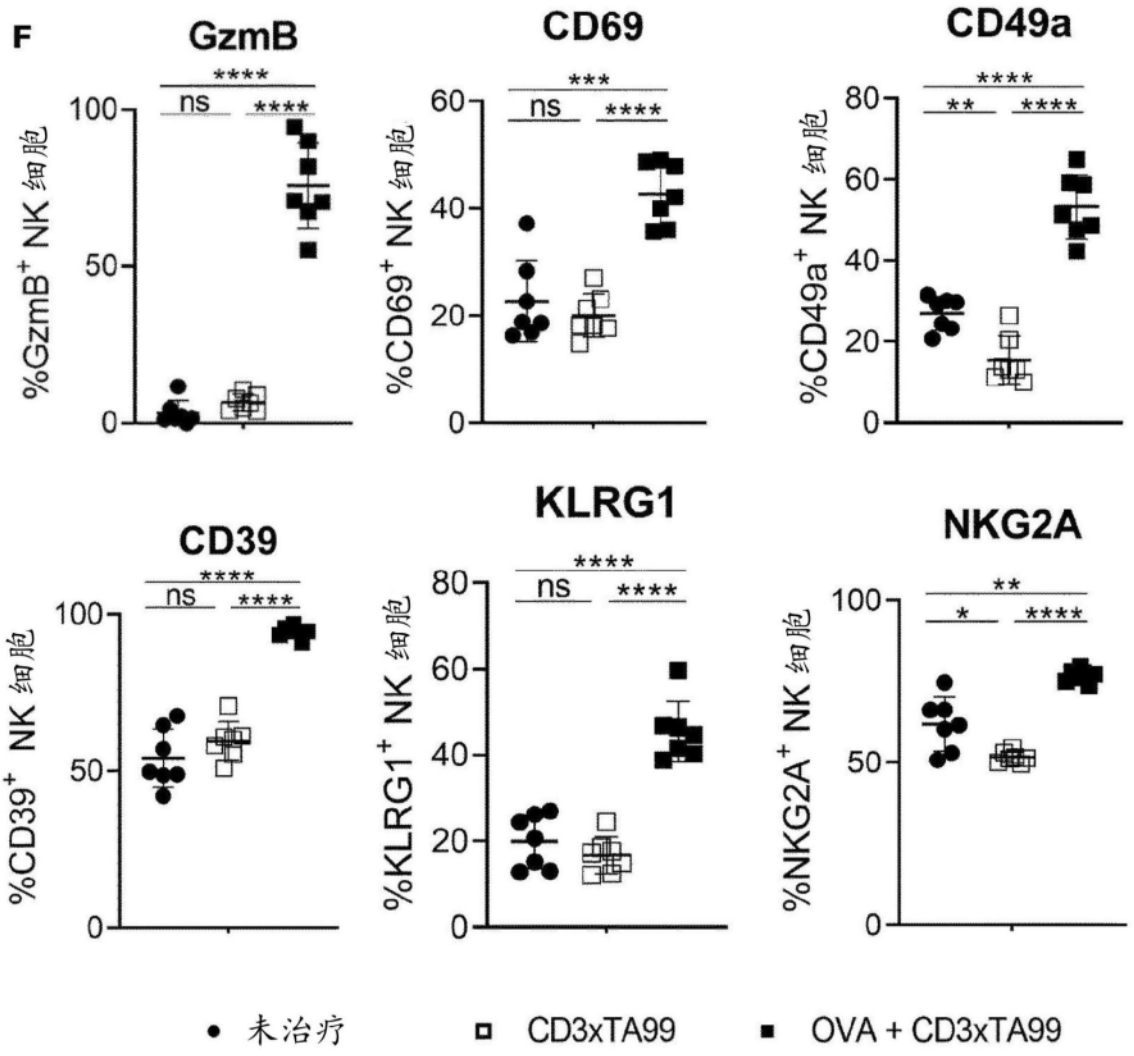

KLRG1
%KLRG1+ CD8 T 细胞
Ki-67
%Ki67+ CD8 T 细胞
TCF-1
%TCF-1+ CD8 T 细胞
Eomes
%Eomes+ CD8 T 细胞
Tbet
%Tbet+ CD8 T 细胞
GATA-3
%GATA-3+ of CD8 T 细胞
RORγT
%RORγT+ CD8 T 细胞
ns
未治疗
CD3xTA99
OVA + CD3xTA99

图9E续


F
GzmB
CD69
CD49a
CD39
KLRG1
NKG2A
%GzmB+ NK 细胞
%CD69+ NK 细胞
%CD49a+ NK 细胞
%CD39+ NK 细胞
%KLRG1+ NK 细胞
%NKG2A+ NK 细胞
ns
****
***
**
*
未治疗
CD3xTA99
OVA + CD3xTA99

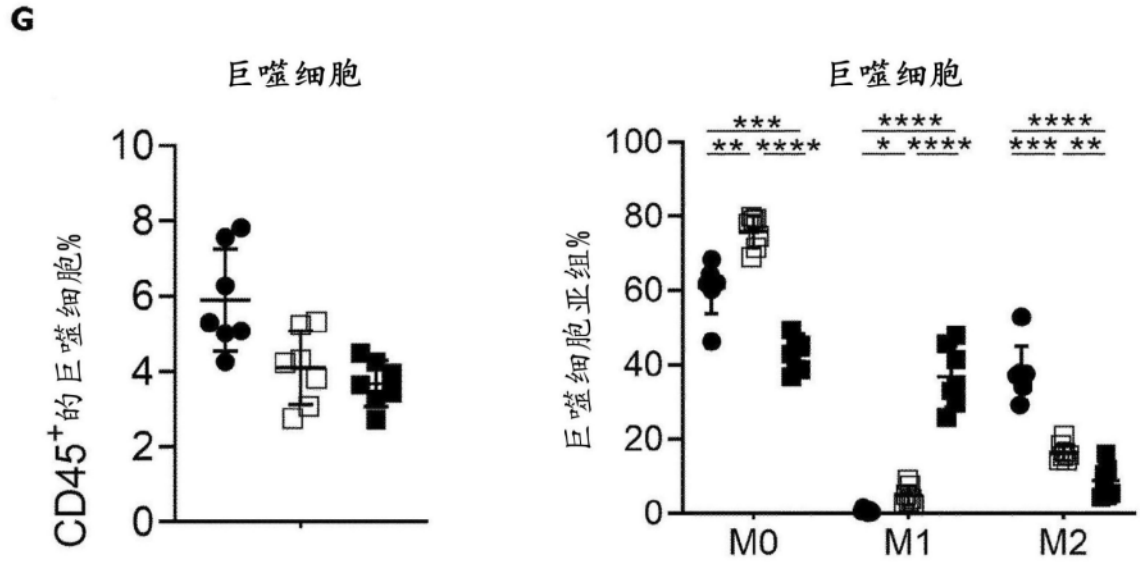

G
巨噬细胞
巨噬细胞
CD45+的巨噬细胞%
巨噬细胞亚组%
M0
M1
M2

图9续

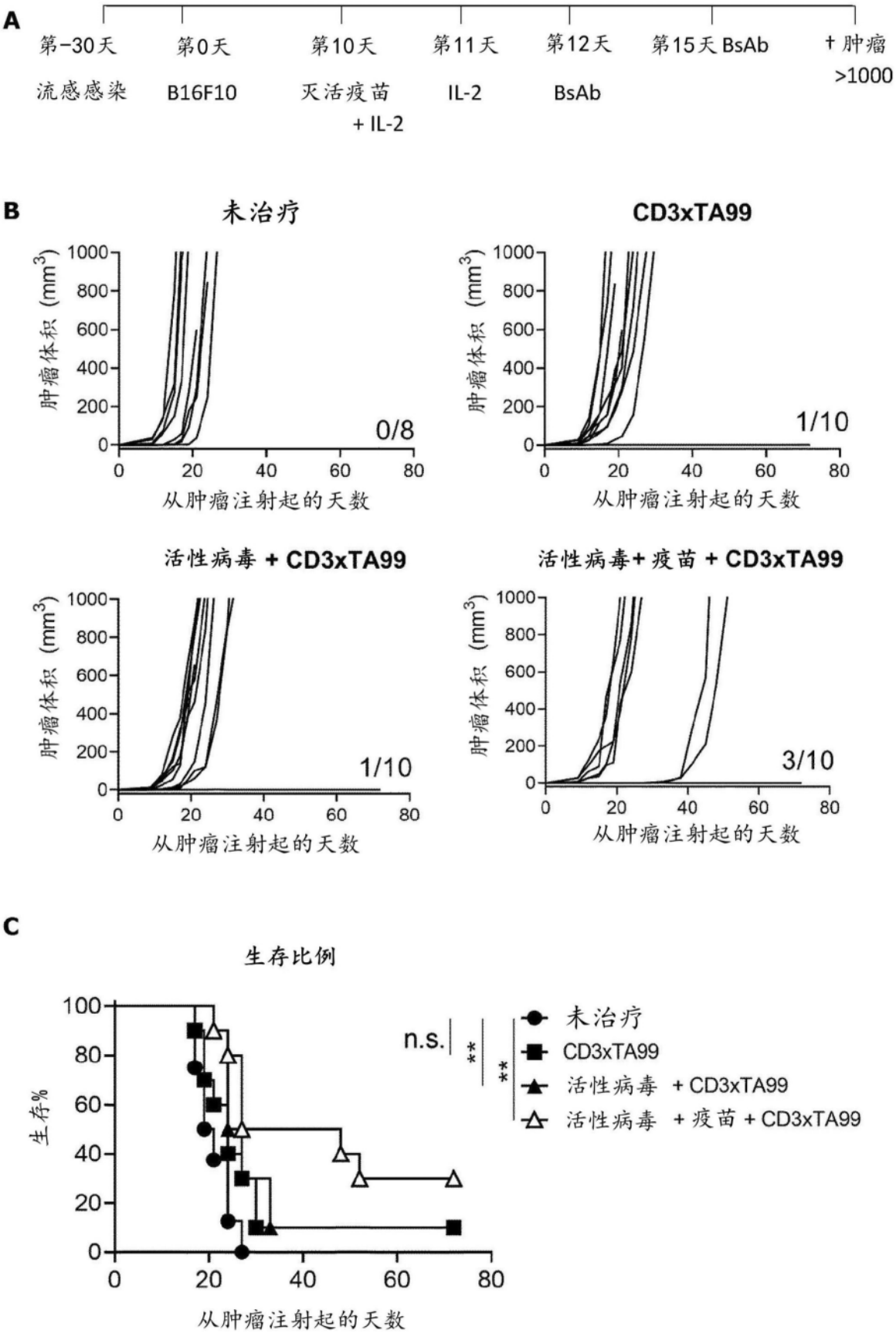

A
第-30天
流感感染
第0天
B16F10
第10天
灭活疫苗
+ IL-2
第11天
IL-2
第12天
BsAb
第15天 BsAb
† 肿瘤
>1000
B
未治疗
CD3xTA99
活性病毒 + CD3xTA99
活性病毒+ 疫苗 + CD3xTA99
肿瘤体积 (mm3)
从肿瘤注射起的天数
0/8
1/10
1/10
3/10
C
生存比例
生存%
从肿瘤注射起的天数
n.s.
**
**
未治疗
CD3xTA99
活性病毒 + CD3xTA99
活性病毒 + 疫苗 + CD3xTA99

图10