



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 107108721 B

(45) 授权公告日 2021.09.07

(21) 申请号 201580063039.0

(22) 申请日 2015.09.29

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 107108721 A

(43) 申请公布日 2017.08.29

(30) 优先权数据
62/056,834 2014.09.29 US
62/206,586 2015.08.18 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2017.05.19

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2015/053027 2015.09.29

(87) PCT国际申请的公布数据
W02016/054101 EN 2016.04.07

(73) 专利权人 杜克大学
地址 美国北卡罗来纳州
专利权人 宏观基因股份有限公司
北卡罗来纳州大学教堂山分校

(72) 发明人 B·F·海恩斯 G·法拉利
S·凯尼格 L·S·约翰逊
郭家颖 J·A·宋
D·M·马戈利斯 刘丽勤
J·L·诺德斯特姆

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所
11313

代理人 王建秀 郝名悦

(51) Int.Cl.
C07K 16/10 (2006.01)

(56) 对比文件
CN 103703024 A, 2014.04.02
WO 2014052620 A1, 2014.04.03
Shuping Yin等. Elimination of Latently HIV-1-Infected Cells by Lymphoblasts Armed with Bifunctional Antibody. 《Microbiol. Immunol.》. 2013, 第45卷(第1期), 101-108.

审查员 李翠莹

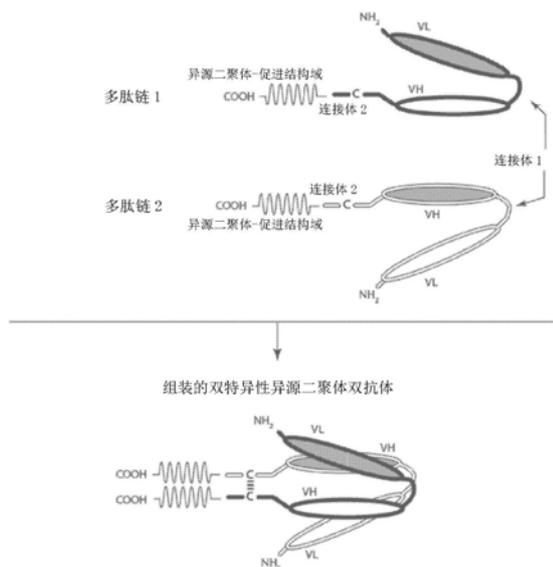
权利要求书7页 说明书51页 附图37页

(54) 发明名称

包含HIV-1包膜靶向臂的双特异性分子

(57) 摘要

本发明涉及包括HIV-1包膜靶向臂和靶向效应细胞的臂的双特异性分子、包括这些双特异性分子的组合物以及使用方法。在某些方面,本发明的双特异性分子可以结合至两个不同细胞上的两个不同的靶或表位,其中第一表位在不同于第二表位的细胞类型上表达,以便所述双特异性分子可以使两个细胞联合在一起。在某些方面,本发明的双特异性分子可以结合两个不同的细胞,其中所述双特异性分子包括具有A32、7B2、CH27、CH28或CH44的结合特异性的臂。



1. 一种双特异性分子,其包含彼此共价结合的第一多肽链和第二多肽链,其中:

(I) 所述第一多肽链在N-末端至C-末端方向包含:

(i) 结构域(A),其包含含有SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:68或SEQ ID NO:74的轻链可变结构域(VL)的第一免疫球蛋白的轻链可变结构域(VL1);

(ii) 结构域(B),其包含含有SEQ ID NO:51或SEQ ID NO:53的重链可变结构域(VH)的第二免疫球蛋白的重链可变结构域(VH2),其中结构域(A)和结构域(B)通过肽连接体1彼此分开;和

(iii) 结构域(C),其包含包括K螺旋或E螺旋的异源二聚体促进结构域;其中所述结构域(C)和结构域(B)被肽连接体2分开;

(II) 所述第二多肽链在N-末端至C-末端方向包含:

(i) 结构域(D),其包含含有SEQ ID NO:52或SEQ ID NO:54的VL的第二免疫球蛋白的轻链可变结构域(VL2);

(ii) 结构域(E),其包含含有SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:11的残基119-241、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:67或SEQ ID NO:73的VH的第一免疫球蛋白的重链可变结构域(VH1),其中结构域(D)和结构域(E)通过肽连接体1彼此分开;和

(iii) 结构域(F),其包含包括K螺旋或E螺旋的异源二聚体促进结构域;其中所述结构域(F)和结构域(E)被肽连接体2分开并且其中:

所述结构域(A)和结构域(B)彼此不缔合形成表位结合位点;

所述结构域(D)和结构域(E)彼此不缔合形成表位结合位点;

所述结构域(A)和结构域(E)缔合以形成结合位点,所述结合位点与如下抗体一样结合HIV-1包膜:所述抗体包含SEQ ID NO:78的VL和SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:11的残基119-241的VH、SEQ ID NO:55的VL和SEQ ID NO:56的VH,SEQ ID NO:68的VL和SEQ ID NO:67的VH或SEQ ID NO:74的VL和SEQ ID NO:73的VH;

所述结构域(B)和结构域(D)缔合以形成结合位点,其结合CD3或CD16的表位;

所述K螺旋包含SEQ ID NO:19的残基240-267和所述E螺旋包含SEQ ID NO:17的残基249-276;

肽连接体2包含SEQ ID NO:17的残基244-248;并且

肽连接体1的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。

2. 权利要求1所述的双特异性分子,其中:

(I) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:78的VL;

(ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:11的残基119-241的VH;

(iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:52的VL;和

(iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:51的VH;或其中

(II) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:78的VL;

(ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:11的残基119-241的VH;

(iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:54的VL;和

(iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:53的VH;或其中

(III) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:55的VL;

(ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:56的VH;

- (iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:52的VL;和
- (iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:51的VH;或其中
- (IV) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:55的VL;
- (ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:56的VH;
- (iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:54的VL;和
- (iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:53的VH;或其中
- (V) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:68的VL;
- (ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:67的VH;
- (iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:52的VL;和
- (iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:51的VH;或其中
- (VI) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:68的VL;
- (ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:67的VH;
- (iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:52的VL;和
- (iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:51的VH;或其中
- (VII) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:74的VL;
- (ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:73的VH;
- (iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:54的VL;和
- (iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:53的VH;或其中
- (VIII) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:74的VL;
- (ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:73的VH
- (iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:54的VL;和
- (iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:53的VH。

3. 权利要求1所述的双特异性分子,其中所述双特异性分子进一步包括Fc结构域。

4. 权利要求3所述的双特异性分子,其中

(i) 所述第一多肽链进一步包括CH2-CH3结构域,其中所述CH2-CH3结构域和结构域(C)被肽连接体3或间隔体-连接体3分开;

(ii) 所述双特异性分子进一步包括第三多肽链,其中所述第三多肽链在N-末端至C-末端方向包含肽连接体3和CH2-CH3结构域;和

(iii) 所述第一多肽链的CH2-CH3结构域和所述第三多肽链的CH2-CH3结构域形成Fc链。

5. 权利要求4所述的双特异性分子,其中

(i) 所述第一多肽链的CH2-CH3结构域包含SEQ ID NO:42和所述第三多肽链的CH2-CH3结构域包含SEQ ID NO:43;或

(ii) 所述第一多肽链的CH2-CH3结构域包含SEQ ID NO:43和所述第三多肽链的CH2-CH3结构域包含SEQ ID NO:42。

6. 权利要求5所述的双特异性分子,其中

- (i) 结构域(A)包含SEQ ID NO:78的VL;
- (ii) 结构域(B)包含SEQ ID NO:51的VH;
- (iii) 结构域(D)包含SEQ ID NO:52的VL;并且

(iv) 结构域 (E) 包含 SEQ ID NO:77 或 SEQ ID NO:11 的残基 119-241 的 VH; 其中所述第一多肽链进一步包含 CH2-CH3 结构域, 其中所述 CH2-CH3 结构域和结构域 (C) 被 SEQ ID NO:50 的间隔体-连接体 3 分开; 并且

其中所述第一多肽链的所述 CH2-CH3 结构域包含 SEQ ID NO:42 并且所述第三多肽链的所述 CH2-CH3 结构域包含 SEQ ID NO:43。

7. 一种组合物, 其包含权利要求 1-6 中任一项所述的双特异性分子中的任一种或其任意组合。

8. 权利要求 7 所述的组合物, 其进一步包含第二双特异性分子, 所述第二双特异性分子包含具有如下抗体的结合特异性的第一臂和靶向 CD3 或 CD16 的第二臂: 包含 SEQ ID NO:78 的 VL 和 SEQ ID NO:77 或 SEQ ID NO:11 的残基 119-241 的 VH 的 HIV-1 抗体、包含 SEQ ID NO:55 的 VL 和 SEQ ID NO:56 的 VH 的 HIV-1 抗体、包含 SEQ ID NO:68 的 VL 和 SEQ ID NO:67 的 VH 的 HIV-1 抗体或包含 SEQ ID NO:74 的 VL 和 SEQ ID NO:73 的 VH 的 HIV-1 抗体, 其中权利要求 1-6 所述的双特异性分子中的任一种和所述第二双特异性分子是不同的。

9. 包含权利要求 1-6 所述的双特异性分子中的任一种或所述双特异性分子中的任一种的组合物在制备用于治疗或预防有需要的受试者的 HIV-1 感染的药物中的用途, 其中所述组合物以治疗有效量被施用于所述受试者。

10. 权利要求 9 所述的用途, 其中潜伏期激活剂被进一步施用于所述受试者。

11. 权利要求 10 所述的用途, 其中所述潜伏期激活剂是伏立诺他、罗咪酯肽、帕比司他、戒酒硫、JQ1、苔藓抑制素、PMA、离子霉素或其任意组合。

12. 一种载体, 其包含核酸, 所述核酸包含编码权利要求 1-6 中任一项所述的双特异性分子的核苷酸。

13. 一种组合物, 其包含含有编码权利要求 1-6 中任一项所述的双特异性分子的核酸的载体。

14. 潜伏期激活剂和包含双特异性分子的组合物在制备用于治疗或预防有需要的受试者的 HIV-1 感染的药物中的用途, 其中所述双特异性分子包含彼此共价结合的第一多肽链和第二多肽链, 其中:

(I) 所述第一多肽链在 N-末端至 C-末端方向包含:

(i) 结构域 (A), 其包含含有 SEQ ID NO:78、SEQ ID NO:55、SEQ ID NO:68 或 SEQ ID NO:74 的轻链可变结构域 (VL) 的第一免疫球蛋白的轻链可变结构域 (VL1);

(ii) 结构域 (B), 其包含含有 SEQ ID NO:51 或 SEQ ID NO:53 的重链可变结构域 (VH) 的第二免疫球蛋白的重链可变结构域 (VH2), 其中结构域 (A) 和结构域 (B) 通过肽连接体 1 彼此分开; 和

(iii) 结构域 (C), 其包含包括 K 螺旋或 E 螺旋的异源二聚体促进结构域; 其中所述结构域 (C) 和结构域 (B) 被肽连接体 2 分开;

(II) 所述第二多肽链在 N-末端至 C-末端方向包含:

(i) 结构域 (D), 其包含含有 SEQ ID NO:52 或 SEQ ID NO:54 的 VL 的第二免疫球蛋白的轻链可变结构域 (VL2);

(ii) 结构域 (E), 其包含含有 SEQ ID NO:77 或 SEQ ID NO:11 的残基 119-241、SEQ ID NO:56、SEQ ID NO:67 或 SEQ ID NO:73 的 VH 的第一免疫球蛋白的重链可变结构域 (VH1) 的结

合区域,其中结构域(D)和结构域(E)通过肽连接体1彼此分开;和

(iii) 结构域(F),其包含包括K螺旋或E螺旋的异源二聚体促进结构域;其中所述结构域(F)和结构域(E)被肽连接体2分开,并且其中:

所述结构域(A)和结构域(B)彼此不缔合形成表位结合位点;

所述结构域(D)和结构域(E)彼此不缔合形成表位结合位点;

所述结构域(A)和结构域(E)缔合以形成结合位点,所述结合位点与如下抗体一样结合HIV-1包膜:所述抗体包含SEQ ID NO:78的VL和SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:11的残基119-241的VH、SEQ ID NO:55的VL和SEQ ID NO:56的VH,SEQ ID NO:68的VL和SEQ ID NO:67的VH或SEQ ID NO:74的VL和SEQ ID NO:73的VH;

所述结构域(B)和结构域(D)缔合以形成结合位点,其结合CD3或CD16的表位;

所述K螺旋包含SEQ ID NO:19的残基240-267和所述E螺旋包含SEQ ID NO:17的残基249-276;

肽连接体2包含SEQ ID NO:17的残基244-248;并且

肽连接体1的长度为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸。

15. 权利要求14所述的用途,其中:

(I) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:78的VL;

(ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:11的残基119-241的VH;

(iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:52的VL;和

(iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:51的VH;

(II) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:78的VL;

(ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:11的残基119-241的VH;

(iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:54的VL;和

(iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:53的VH;

(III) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:55的VL;

(ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:56的VH;

(iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:52的VL;和

(iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:51的VH;

(IV) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:55的VL;

(ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:56的VH;

(iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:54的VL;和

(iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:53的VH;

(V) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:68的VL;

(ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:67的VH;

(iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:52的VL;和

(iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:51的VH;

(VI) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:68的VL;

(ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:67的VH;

(iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:54的VL;和

(iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:53的VH;或

- (VII) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:74的VL;
(ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:73的VH;
(iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:52的VL;和
(iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:51的VH;
(VIII) (i) 所述VL1包含SEQ ID NO:74的VL;
(ii) 所述VH1包含SEQ ID NO:73的VH;
(iii) 所述VL2包含SEQ ID NO:54的VL;和
(iv) 所述VH2包含SEQ ID NO:53的VH。

16. 权利要求14-15中任一项所述的用途,其中所述双特异性分子进一步包括Fc结构域。

17. 权利要求16所述的用途,其中

(i) 所述第一多肽链进一步包括CH2-CH3结构域,其中所述CH2-CH3结构域和结构域(C)被肽连接体3或间隔体-连接体3分开;

(ii) 所述双特异性分子进一步包括第三多肽链,其中所述第三多肽链在N-末端至C-末端方向包含肽连接体3和CH2-CH3结构域;和

(iii) 所述第一多肽链的CH2-CH3结构域和所述第三多肽链的CH2-CH3结构域形成Fc链。

18. 权利要求17所述的用途,其中

(i) 所述第一多肽链的CH2-CH3结构域包含SEQ ID NO:42和所述第三多肽链的CH2-CH3结构域包含SEQ ID NO:43;或

(ii) 所述第一多肽链的CH2-CH3结构域包含SEQ ID NO:43和所述第三多肽链的CH2-CH3结构域包含SEQ ID NO:42。

19. 权利要求18所述的用途,其中:

(i) 结构域(A)包含SEQ ID NO:78的VL;

(ii) 结构域(B)包含SEQ ID NO:51的VH;

(iii) 结构域(D)包含SEQ ID NO:52的VL;并且

(iv) 结构域(E)包含SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:11的残基119-241的VH;其中

所述第一多肽链进一步包含CH2-CH3结构域,其中所述CH2-CH3结构域和结构域(C)被SEQ ID NO:50的间隔体-连接体3分开;并且

其中所述第一多肽链的所述CH2-CH3结构域包含SEQ ID NO:42并且所述第三多肽链的所述CH2-CH3结构域包含SEQ ID NO:43。

20. 权利要求14所述的用途,其中所述组合物进一步包含第二双特异性结合分子,所述第二双特异性结合分子包含具有如下抗体的结合特异性的第一臂和靶向CD3或CD16的第二臂:包含SEQ ID NO:78的VL和SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:11的残基119-241的VH的HIV-1抗体、包含SEQ ID NO:55的VL和SEQ ID NO:56的VH的HIV-1抗体、包含SEQ ID NO:68的VL和SEQ ID NO:67的VH的HIV-1抗体或包含SEQ ID NO:74的VL和SEQ ID NO:73的VH的HIV-1抗体,和其中所述双特异性分子和所述第二双特异性分子是不同的。

21. 权利要求14所述的用途,其中所述潜伏期激活剂是伏立诺他、罗咪酯肽、帕比司他、戒酒硫、JQ1、苔藓抑制素、PMA、离子霉素或其任意组合。

22. 权利要求1所述的双特异性分子,其中:
所述结构域(A)包含SEQ ID NO:78的VL;
所述结构域(E)包含SEQ ID NO:77的VH;和
所述结构域(B)和结构域(D)缔合以形成结合位点,其结合CD3的表位。
23. 权利要求1所述的双特异性分子,其中:
所述结构域(A)包含SEQ ID NO:78的VL;
所述结构域(E)包含SEQ ID NO:77的VH;
所述结构域(B)包含SEQ ID NO:51的VH;和
所述结构域(D)包含SEQ ID NO:52的VL。
24. 权利要求1所述的双特异性分子,其中:
所述结构域(A)包含SEQ ID NO:78的VL;
所述结构域(E)包含SEQ ID NO:11的残基119-241的VH;和
所述结构域(B)和结构域(D)缔合以形成结合位点,其结合CD3的表位。
25. 权利要求1所述的双特异性分子,其中:
所述结构域(A)包含SEQ ID NO:78的VL;
所述结构域(E)包含SEQ ID NO:11的残基119-241的VH;
所述结构域(B)包含SEQ ID NO:51的VH;和
所述结构域(D)包含SEQ ID NO:52的VL。
26. 权利要求1所述的双特异性分子,其中:
所述结构域(A)包含SEQ ID NO:78的VL;
所述结构域(E)包含SEQ ID NO:77的VH;和
所述结构域(B)和结构域(D)缔合以形成结合位点,其结合CD16的表位。
27. 权利要求1所述的双特异性分子,其中:
所述结构域(A)包含SEQ ID NO:78的VL;
所述结构域(E)包含SEQ ID NO:77的VH;
所述结构域(B)包含SEQ ID NO:53的VH;和
所述结构域(D)包含SEQ ID NO:54的VL。
28. 权利要求1所述的双特异性分子,其中:
所述结构域(A)包含SEQ ID NO:78的VL;
所述结构域(E)包含SEQ ID NO:11的残基119-241的VH;和
所述结构域(B)和结构域(D)缔合以形成结合位点,其结合CD16的表位。
29. 权利要求1所述的双特异性分子,其中:
所述结构域(A)包含SEQ ID NO:78的VL;
所述结构域(E)包含SEQ ID NO:11的残基119-241的VH;
所述结构域(B)包含SEQ ID NO:53的VH;和
所述结构域(D)包含SEQ ID NO:54的VL。
30. 权利要求1所述的双特异性分子,其中:
所述结构域(A)包含SEQ ID NO:55的VL;
所述结构域(E)包含SEQ ID NO:56的VH;和

所述结构域 (B) 和结构域 (D) 缔合以形成结合位点,其结合CD3的表位。

31. 权利要求1所述的双特异性分子,其中:

所述结构域 (A) 包含SEQ ID NO:55的VL;

所述结构域 (E) 包含SEQ ID NO:56的VH;和

所述结构域 (B) 包含SEQ ID NO:51的VH;和

所述结构域 (D) 包含SEQ ID NO:52的VL。

32. 权利要求1所述的双特异性分子,其中:

所述结构域 (A) 包含SEQ ID NO:55的VL;

所述结构域 (E) 包含SEQ ID NO:56的VH;和

所述结构域 (B) 和结构域 (D) 缔合以形成结合位点,其结合CD16的表位。

33. 权利要求1所述的双特异性分子,其中:

所述结构域 (A) 包含SEQ ID NO:55的VL;

所述结构域 (E) 包含SEQ ID NO:56的VH;

所述结构域 (B) 包含SEQ ID NO:53的VH;和

所述结构域 (D) 包含SEQ ID NO:54的VL。

34. 权利要求22-33中任一项所述的双特异性分子,其中所述双特异性分子进一步包括Fc结构域。

35. 权利要求34所述的双特异性分子,其中:

(i) 所述第一多肽链进一步包括CH2-CH3结构域,其中所述CH2-CH3结构域和结构域 (C) 被肽连接体3或间隔体-连接体3分开;

(ii) 所述双特异性分子进一步包括第三多肽链,其中所述第三多肽链在N-末端至C-末端方向包含肽连接体3和CH2-CH3结构域;和

(iii) 所述第一多肽链的CH2-CH3结构域和所述第三多肽链的CH2-CH3结构域形成所述Fc结构域。

36. 一种组合物,其包含权利要求22-33中任一项所述的双特异性分子。

37. 权利要求36所述的组合物,其进一步包含第二双特异性分子,所述第二双特异性分子包含具有包含SEQ ID NO:78的VL和SEQ ID NO:77或SEQ ID NO:11的残基119-241的VH、SEQ ID NO:55的VL和SEQ ID NO:56的VH,SEQ ID NO:68的VL和SEQ ID NO:67的VH或SEQ ID NO:74的VL和SEQ ID NO:73的VH的抗体的结合特异性的第一臂和靶向CD3或CD16的第二臂,其中权利要求22-23所述的双特异性分子中的任一种和所述第二双特异性分子是不同的。

38. 包含权利要求22-33所述的双特异性分子中的任一种或所述双特异性分子的任一种的组合物在制备用于治疗或预防有需要的受试者的HIV-1感染的药物中的用途,其中所述组合物以治疗有效量被施用于所述受试者。

39. 权利要求38所述的用途,其中潜伏期激活剂被进一步施用于所述受试者。

包含HIV-1包膜靶向臂的双特异性分子

[0001] 本发明要求美国系列号62/056,834 (2014年9月29日提交) 和美国系列号62/206,586 (2015年8月18日提交) 的利益和优先权,其内容通过引用以其整体并入本文。

[0002] 该专利公开包含受版权保护的材料。版权所有人反对任何人在美国专利商标局专利文档或记录中出现的专利文件或专利公开内容进行复制,但在其他方面保留任何和所有版权。

[0003] 本文引用的所有专利,专利申请和出版物通过引用以其整体并入本文。这些出版物的公开以其整体通过引用并入本申请中,以便更全面地描述截止本文所述的发明之日,本领域技术人员已知的现有技术状态。

[0004] 政府支持

[0005] 本发明是在国立卫生研究院批准的批准号为U19AI067854和UM1AI100645的政府支持下进行的。政府在本发明中具有某些权利。

技术领域

[0006] 本发明涉及HIV-1抗体和包含HIV-1结合结构域和效应细胞结合结构域的双特异性分子,以及它们的用途。

背景技术

[0007] 高效抗逆转录病毒疗法 (HAART) 已经有效地降低病毒负荷并减轻感染个体中HIV-1感染的影响。然而,尽管有这种疗法,由于逃避这种治疗的HIV感染的细胞的潜伏库 (latent reservoir),病毒仍存留于个体中。因此,需要用于治疗HIV-1感染的个体的治疗剂以及靶向病毒感染的细胞并且具有减小HIV-1感染的细胞的潜伏库的潜力的剂。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明涉及双特异性分子,例如形成抗体的共价连接的多肽链、共价双抗体和/或共价双抗体分子及其在治疗HIV-1中的用途。在某些方面,本发明的双特异性分子可以结合至两个不同细胞上的两个不同的靶标或表位,其中第一表位相比第二表位在不同的细胞类型上表达,以便所述双特异性分子可以使两个细胞联合在一起。在某些方面,本发明的双特异性分子可以结合至两个不同的细胞,其中所述双特异性分子包括具有A32、7B2、CH27、CH28或CH44的结合特异性的臂,该臂结合至在第一细胞(例如HIV感染的细胞)上表达的HIV-1包膜,以及包括第二臂,所述第二臂对在不同于第一细胞的细胞类型上表达的表位具有结合特异性,以便所述双特异性分子可以使两个细胞联合在一起。在某些实施方案中,第二细胞在表达CD3或CD16的效应细胞中。

[0010] 在某些实施方案中,即使在可能不知道特异性表位的情况下,抗体特异性结合至特定靶标,肽或多糖(如存在于病原体表面上的抗原,例如gp120、gp41或CD3),并且不会大量结合至存在于样品或者受试者中的其他蛋白质或多糖。可以通过本领域已知的方法确定特异性结合。各种竞争性结合试验是本领域已知的。关于抗体抗原复合物,在某些实施方案中,抗原和抗体的特异性结合具有小于约 10^6 摩尔的KD,诸如小于约 10^6 摩尔、 10^7 摩尔、 10^8 摩

尔、 10^9 摩尔或甚至小于约 10^{10} 摩尔的KD。

[0011] 在某些方面,本发明提供了双特异性分子,其包括彼此共价结合的第一多肽链和第二多肽链,其中:

[0012] (I) 所述第一多肽链在N-末端至C-末端方向包括:

[0013] (i) 结构域(A),其包括具有A32、7B2、CH28或CH44HIV-1包膜抗体的结合特异性的第一免疫球蛋白的轻链可变结构域(VL1)的结合区域;

[0014] (ii) 结构域(B),其包括对表位(2)特异性的第二免疫球蛋白的重链可变结构域(VH2)的结合区域,其中结构域(A)和(B)通过肽连接体1彼此分开;和

[0015] (iii) 结构域(C),其包括包含K螺旋或E螺旋的异源二聚体促进结构域;其中异源二聚体促进结构域(C)和结构域(B)被肽连接体2分开;

[0016] (II) 所述第二多肽链在N-末端至C-末端方向包括:

[0017] (i) 结构域(D),其包括对表位(2)特异性的第二免疫球蛋白的轻链可变结构域(VL2)的结合区域;

[0018] (ii) 结构域(E),其包括具有A32、7B2、CH28或CH44HIV-1抗体的结合特异性的第一免疫球蛋白的重链可变结构域(VH1)的结合区域,其中结构域(D)和(E)通过肽连接体1彼此分开;和

[0019] (iii) 结构域(F),其包括包含K螺旋或E螺旋的异源二聚体促进结构域;其中异源二聚体促进结构域(F)和结构域(E)被肽连接体2分开;并且其中:

[0020] 所述结构域(A)和(B)彼此不缔合形成表位结合位点;

[0021] 所述结构域(D)和(E)彼此不缔合形成表位结合位点;

[0022] 和

[0023] 所述结构域(A)和(E)缔合以形成结合位点,其像A32、7B2、CH28或CH44抗体一样结合HIV-1包膜(1);并且所述结构域(B)和(D)缔合以形成结合表位(2)的结合位点。

[0024] 在某些方面,本发明提供了双特异性分子,其包括第一多肽链、第二多肽链和第三多肽链,其中一些多肽共价结合(见图8),并且其中:

[0025] (I) 所述第一多肽链在N-末端至C-末端方向包括:

[0026] (i) 结构域(A),其包括具有A32、7B2、CH28或CH44HIV-1抗体的结合特异性的第一免疫球蛋白的轻链可变结构域(VL1)的结合区域;

[0027] (ii) 结构域(B),其包括对表位(2)特异性的第二免疫球蛋白的重链可变结构域(VH2)的结合区域,其中结构域(A)和(B)通过肽连接体1彼此分开;

[0028] (iii) 结构域(C),其包括包含K螺旋或E螺旋的异源二聚体促进结构域;其中异源二聚体促进结构域(C)和结构域(B)被肽连接体2分开;

[0029] (iv) CH2-CH3结构域,其中所述CH2-CH3结构域和结构域(C)被肽连接体3或间隔体-连接体3分开;

[0030] (II) 所述第二多肽链在N-末端至C-末端方向包括:

[0031] (i) 结构域(D),其包括对表位(2)特异性的第二免疫球蛋白的轻链可变结构域(VL2)的结合区域;

[0032] (ii) 结构域(E),其包括具有A32、7B2、CH28或CH44HIV-1抗体的结合特异性的第一免疫球蛋白的重链可变结构域(VH1)的结合区域,其中结构域(D)和(E)通过肽连接体1彼此

分开；

[0033] (iii) 结构域 (F), 其包括包含K螺旋或E螺旋的异源二聚体促进结构域; 其中异源二聚体促进结构域 (F) 和结构域 (E) 被肽连接体2分开;

[0034] (III) 所述第三多肽链在N-末端至C-末端方向包括:

[0035] (i) 肽连接体3,

[0036] (ii) CH2-CH3结构域, 并且其中:

[0037] 所述结构域 (A) 和 (B) 彼此不缔合形成表位结合位点;

[0038] 所述结构域 (D) 和 (E) 彼此不缔合形成表位结合位点;

[0039] 所述结构域 (A) 和 (E) 缔合以形成结合位点, 其像A32、7B2、CH28或CH44抗体一样结合HIV-1包膜 (1);

[0040] 所述结构域 (B) 和 (D) 缔合以形成结合表位 (2) 的结合位点; 和

[0041] 第一和第三多肽的所述CH2-CH3结构域形成Fc链。

[0042] 一种双特异性分子, 其包括第一多肽链、第二多肽链和第三多肽链, 其中一些多肽共价结合 (见图8), 并且其中:

[0043] (I) 所述第一多肽链在N-末端至C-末端方向包括:

[0044] (i) 肽连接体3, 之后是CH2-CH3结构域;

[0045] (ii) 结构域 (A), 其包括具有A32、7B2、CH28或CH44HIV-1抗体的结合特异性的第一免疫球蛋白的轻链可变结构域 (VL1) 的结合区域, 其中所述CH2-CH3结构域和结构域 (A) 被肽连接体4分开;

[0046] (iii) 结构域 (B), 其包括对表位 (2) 特异性的第二免疫球蛋白的重链可变结构域 (VH2) 的结合区域, 其中结构域 (A) 和 (B) 通过肽连接体1彼此分开;

[0047] (iv) 结构域 (C), 其包括包含K螺旋或E螺旋的异源二聚体促进结构域; 其中异源二聚体促进结构域 (C) 和结构域 (B) 被肽连接体2分开;

[0048] (II) 所述第二多肽链在N-末端至C-末端方向包括:

[0049] (i) 结构域 (D), 其包括对表位 (2) 特异性的第二免疫球蛋白的轻链可变结构域 (VL2) 的结合区域;

[0050] (ii) 结构域 (E), 其包括具有A32、7B2、CH28或CH44HIV-1抗体的结合特异性的第一免疫球蛋白的重链可变结构域 (VH1) 的结合区域, 其中结构域 (D) 和 (E) 通过肽连接体1彼此分开;

[0051] (iii) 结构域 (F), 其包括包含K螺旋或E螺旋的异源二聚体促进结构域; 其中异源二聚体促进结构域 (F) 和结构域 (E) 被肽连接体2分开;

[0052] (III) 所述第三多肽链在N-末端至C-末端方向包括:

[0053] (i) 肽连接体3,

[0054] (ii) CH2-CH3结构域, 并且其中:

[0055] 所述结构域 (A) 和 (B) 彼此不缔合形成表位结合位点;

[0056] 所述结构域 (D) 和 (E) 彼此不缔合形成表位结合位点;

[0057] 所述结构域 (A) 和 (E) 缔合以形成结合位点, 其像A32、7B2、CH28或CH44抗体一样结合HIV-1包膜 (1);

[0058] 所述结构域 (B) 和 (D) 缔合以形成结合表位 (2) 的结合位点; 和

[0059] 第一和第三多肽的所述CH2-CH3结构域形成Fc链。

[0060] 在某些实施方案中,多肽链1的CH2-CH3结构域为“杵(knob)”设计,以及第三多肽链的CH2-CH3结构域为“臼(hole)”设计,或反之亦然。

[0061] 在某些实施方案中,表位(2)为CD3表位或CD16表位。在某些实施方案中,双特异性分子以A32抗体的特异性结合HIV包膜,并且也结合CD3。在某些实施方案中,双特异性分子以7B2抗体的特异性结合HIV包膜,并且也结合CD3。在某些实施方案中,双特异性分子以CH28抗体的特异性结合HIV包膜,并且也结合CD3。在某些实施方案中,双特异性分子以CH44抗体的特异性结合HIV包膜,并且也结合CD3。在某些实施方案中,双特异性分子以A32抗体的特异性结合HIV包膜,并且也结合CD16。在某些实施方案中,双特异性分子以7B2抗体的特异性结合HIV包膜,并且也结合CD16。在某些实施方案中,双特异性分子以CH28抗体的特异性结合HIV包膜,并且也结合CD16。在某些实施方案中,双特异性分子以CH44抗体的特异性结合HIV包膜,并且也结合CD16。

[0062] 在某些实施方案中,结构域(A)和(E)缔合以形成结合位点,其以A32、7B2、CH28或CH44抗体的结合特异性结合HIV-1包膜。在某些实施方案中,结构域(A)和(E)缔合以形成结合位点,其结合A32、7B2、CH27、CH28或CH44HIV-1抗体表位。

[0063] 在某些实施方案中,A32免疫球蛋白(VL1)的结构域(A)结合区域包括VL-A32CDR3、CDR2和CDR1。在某些实施方案中,其中A32免疫球蛋白(VH1)的结构域(E)结合区域包括VH-A32CDR3、CDR2和CDR1。在某些实施方案中,7B2免疫球蛋白(VL1)的结构域(A)结合区域包括VL-7B2CDR3、CDR2和CDR1。在某些实施方案中,7B2免疫球蛋白(VH1)的结构域(E)结合区域包括VH-7B2CDR3、CDR2和CDR1。在某些实施方案中,CH28免疫球蛋白(VL1)的结构域(A)结合区域包括VL-CH28CDR3、CDR2和CDR1。在某些实施方案中,CH28免疫球蛋白(VH1)的结构域(E)结合区域包括VH-CH28CDR3、CDR2和CDR1。在某些实施方案中,CH44免疫球蛋白(VL1)的结构域(A)结合区域包括VL-CH44CDR3、CDR2和CDR1。在某些实施方案中,CH44免疫球蛋白(VH1)的结构域(E)结合区域包括VH-CH44CDR3、CDR2和CDR1。

[0064] 在某些实施方案中,结构域(A)包括VL-A32、VL-7B2、VL-CH28或VL-CH44。在某些实施方案中,结构域(E)包括VH-A32、VH-7B2、VH-CH28、VH-CH44。

[0065] 在某些实施方案中,第一多肽包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:44。在某些实施方案中,第二多肽包括SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:45。在某些实施方案中,双特异性分子包括互补的第二多肽,并且其中所述第二多肽包括SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:45。

[0066] 在某些实施方案中,双特异性分子包括SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:44的第一多肽和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:45的第二多肽。

[0067] 在某些实施方案中,双特异性分子包括SEQ ID NO:9的第一多肽和SEQ ID NO:11的互补的第二多肽。在某些实施方案中,双特异性分子包括SEQ ID NO:13的第一多肽和SEQ ID NO:15的互补的第二多肽。在某些实施方案中,双特异性分子包括SEQ ID NO:17的第一多肽和SEQ ID NO:19的互补的第二多肽。在某些实施方案中,双特异性分子包括SEQ ID NO:21的第一多肽和SEQ ID NO:23的互补的第二多肽。在某些实施方案中,双特异性分子包

括SEQ ID NO:25的第一多肽和SEQ ID NO:27的互补的第二多肽。

[0068] 在某些实施方案中,双特异性分子包括(基本上由以下组成)SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:44的第一多肽和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:45的第二多肽。

[0069] 在某些实施方案中,双特异性分子包括(由以下组成):SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:44的第一多肽和SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:27或SEQ ID NO:45的第二多肽。

[0070] 在某些实施方案中,双特异性分子包括SEQ ID NO:46、47和48。在某些实施方案中,双特异性分子基本上由SEQ ID NO:46、47和48组成。在某些实施方案中,双特异性分子由SEQ ID NO:46、47和48组成。在某些实施方案中,双特异性分子的第一多肽包括SEQ ID NO:46,双特异性分子的第二多肽包括SEQ ID NO:47,和双特异性分子的第三多肽包括SEQ ID NO:48。

[0071] 在某些方面,本发明提供了一种组合物,其包括任何一种双特异性分子或其任何组合。在某些实施方案中,组合物包括包含双特异性分子的组合物,所述双特异性分子包括具有HIV-1抗体A32、HIV-1抗体7B2、HIV-1抗体CH28、HIV-1抗体CH44的结合特异性的第一臂和靶向CD3或CD16的第二臂。在某些实施方案中,双特异性分子包括Fc部分或延长其血清半衰期的任何其他修饰。在某些实施方案中,组合物进一步包括第二双特异性分子,所述第二双特异性分子包括具有HIV-1抗体A32、HIV-1抗体7B2、HIV-1抗体CH28、HIV-1抗体CH44的结合特异性的第一臂和靶向CD3或CD16的第二臂,其中第一和第二双特异性分子是不同的。

[0072] 在某些方面,本发明提供了一种在需要其的受试者中治疗或预防HIV-1感染的方法,其包括以治疗上有效的量向受试者施用组合物,所述组合物包括本发明的任何一种双特异性分子或任何一种双特异性分子的组合。在某些实施方案中,要求保护的方法进一步包括施用潜伏期激活剂。在一些实施方案中,所述潜伏期激活剂为伏立诺他(vorinostat)、罗咪酯肽(romidepsin)、帕比司他(panobinostat)、戒酒硫(disulfiram)、JQ1、苔藓抑制素、PMA、离子霉素(inonomycin)或其任何组合。

[0073] 在某些方面,本发明提供了核酸,其包括编码本发明的双特异性分子的核苷酸。在某些方面,本发明提供了一种载体,其包括核酸,所述核酸包括编码本发明的双特异性分子的核苷酸。也提供了组合物,其包括载体,所述载体包括编码双特异性分子的核酸。在某些方面,本发明提供了一种细胞系,其包括编码本发明的双特异性分子的载体或核酸,其中所述载体编码用于本发明的双特异性分子的表达的多肽链,例如多肽链1和多肽链2或多肽链1、多肽链2和多肽链3。在某些实施方案中,载体适合于基因递送和表达。在某些实施方案中,载体为腺病毒载体、基于腺伴随病毒的载体或其组合。

[0074] 在某些方面,本发明提供了一种双特异性分子,其包括具有双亲和力重靶向试剂(DART)的多肽,其中所述DART包括双抗体分子,所述双抗体分子包括彼此共价结合的第一多肽链和第二多肽链,其中:

[0075] (A) 所述第一多肽链包括:

[0076] (i) 结构域(A),其包括对第一表位(1)特异性的第一免疫球蛋白的轻链可变结构

域(VL1)的结合区域;其中第一VL1包括来自A32、7B2、CH27、CH28或CH44HIV-1抗体的VL或VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3、基本上由来自A32、7B2、CH27、CH28或CH44HIV-1抗体的VL或VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3组成、由来自A32、7B2、CH27、CH28或CH44HIV-1抗体的VL或VLCDR1、VLCDR2和VLCDR3组成。

[0077] (ii) 结构域(B),其包括对第二靶标例如表位(2)特异性的第二免疫球蛋白的重链可变结构域(VH2)的结合区域,其中结构域(A)和结构域(B)通过肽连接体彼此分开;和

[0078] (iii) 结构域(C),其包括异源二聚体促进结构域;

[0079] (B) 所述第二多肽链包括:

[0080] (i) 结构域(D),其包括对表位(2)特异性的第二免疫球蛋白的轻链可变结构域(VL2)的结合区域;

[0081] (ii) 结构域(E),其包括对第一表位(1)特异性的第一免疫球蛋白的重链可变结构域(VH1)的结合区域;其中第一VH1包括来自A32、7B2、CH27、CH28或CH44HIV-1抗体的VH或VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3、基本上由来自A32、7B2、CH27、CH28或CH44HIV-1抗体的VH或VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3组成、由来自A32、7B2、CH27、CH28或CH44HIV-1抗体的VH或VHCDR1、VHCDR2和VHCDR3组成,其中结构域(D)和(E)通过肽连接体彼此分开,和

[0082] (iii) 结构域(F),其包括异源二聚体促进结构域,并且其中:

[0083] 所述结构域(A)和(B)彼此不缔合形成表位结合位点;

[0084] 所述结构域(D)和(E)彼此不缔合形成表位结合位点;

[0085] 所述结构域(A)和(E)缔合以形成结合位点,其结合A32、7B2、CH27、CH28或CH44HIV-1抗体表位(1);所述结构域(B)和(D)缔合以形成结合第二靶标例如表位(2)的结合位点。

[0086] 在某些实施方案中,本发明提供了双特异性分子,其中HIV抗体VH和VL结构域以及CD3和CD16VH和VL结构域处于不同的取向。例如,在非限制性实施方案中,多肽链1中的VL1结构域来自CD3,且VH2结构域来自HIV包膜结合抗体。在该实施方案中,多肽2的VH1结构域来自CD3,且VL2结构域来自HIV包膜结合抗体。

[0087] 在某些方面,本发明提供了能够特异性结合至HIV-1包膜和结合至CD3的表位的双特异性分子,其中所述双特异性分子包括彼此共价结合的第一多肽链和第二多肽链,其中:

[0088] A. 所述第一多肽链在N-末端至C-末端方向包括:

[0089] i. 结构域1,其包括:

[0090] (1) 亚结构域(1A),其包括能够结合至CD3的单克隆抗体的VL结构域(VLCD3);和

[0091] (2) 亚结构域(1B),其包括能够结合至HIV-1的单克隆抗体的VH结构域(VHHIV-1),

[0092] 其中所述亚结构域1A和1B通过肽连接体(例如SEQ ID NO:1)彼此分开;

[0093] ii. 结构域2,其中所述结构域2为E-螺旋结构域(例如SEQ ID NO:7)或K-螺旋结构域(例如SEQ ID NO:8),其中所述结构域2通过肽连接体(SEQ ID NO:2)与所述结构域1分开;和

[0094] B. 所述第二多肽链在N-末端至C-末端方向包括:

[0095] i. 结构域1,其包括:

[0096] (1) 亚结构域(1A),其包括能够结合至HIV-1的单克隆抗体的VL结构域(VLHIV-1);

和

- [0097] (2) 亚结构域 (1B), 其包括能够结合至CD3的单克隆抗体的VH结构域 (VHCD3),
- [0098] 其中所述亚结构域1A和1B通过肽连接体 (例如SEQ ID NO:1) 彼此分开; 和
- [0099] ii. 结构域2, 其中所述结构域2为K-螺旋结构域 (例如SEQ ID NO:8) 或E-螺旋结构域 (例如SEQ ID NO:7), 其中所述结构域2通过肽连接体 (SEQ ID NO:2) 与所述结构域1分开; 并且其中所述第一和第二多肽链的所述结构域2不都是E-螺旋结构域或不都是K-螺旋结构域, 并且其中:
- [0100] (a) 所述第一多肽链的VL结构域和所述第二多肽链的VH结构域形成能够特异性地结合至CD3的表位的抗原结合结构域; 和
- [0101] (b) 所述第二多肽链的VL结构域和所述第一多肽链的VH结构域形成能够特异性地结合至HIV-1包膜的抗原结合结构域。
- [0102] 一种双特异性分子, 其能够特异性结合至HIV-1包膜和结合至CD16的表位, 其中所述双特异性分子包括彼此共价结合的第一多肽链和第二多肽链, 其中:
- [0103] A. 所述第一多肽链在N-末端至C-末端方向包括:
- [0104] i. 结构域1, 其包括:
- [0105] (1) 亚结构域 (1A), 其包括能够结合至CD16的单克隆抗体的VL结构域 (VLCD16); 和
- [0106] (2) 亚结构域 (1B), 其包括能够结合至HIV-1的单克隆抗体的VH结构域 (VHHIV-1),
- [0107] 其中所述亚结构域1A和1B通过肽连接体 (例如SEQ ID NO:1) 彼此分开;
- [0108] ii. 结构域2, 其中所述结构域2为E-螺旋结构域 (SEQ ID NO:7) 或K-螺旋结构域 (例如SEQ ID NO:8), 其中所述结构域2通过肽连接体 (SEQ ID NO:2) 与所述结构域1分开; 和
- [0109] B. 所述第二多肽链在N-末端至C-末端方向包括:
- [0110] i. 结构域1, 其包括:
- [0111] (1) 亚结构域 (1A), 其包括能够结合至HIV-1的单克隆抗体的VL结构域 (VLHIV-1); 和
- [0112] (2) 亚结构域 (1B), 其包括能够结合至CD16的单克隆抗体的VH结构域 (VHCD16),
- [0113] 其中所述亚结构域1A和1B通过肽连接体 (例如SEQ ID NO:1) 彼此分开; 和
- [0114] ii. 结构域2, 其中所述结构域2为K-螺旋结构域 (例如SEQ ID NO:8) 或E-螺旋结构域 (例如SEQ ID NO:7), 其中所述结构域2通过肽连接体 (SEQ ID NO:2) 与所述结构域1分开; 并且其中所述第一和第二多肽链的所述结构域2不都是E-螺旋结构域或不都是K-螺旋结构域, 并且其中:
- [0115] (a) 所述第一多肽链的VL结构域和所述第二多肽链的VH结构域形成能够特异性地结合至CD16的表位的抗原结合结构域; 和
- [0116] (b) 所述第二多肽链的VL结构域和所述第一多肽链的VH结构域形成能够特异性地结合至HIV-1包膜的抗原结合结构域。
- [0117] 在某些实施方案中, 双特异性分子结合至HIV-1包膜, 像衍生其的HIV抗体一样。在某些实施方案中, 双特异性分子结合至A32-HIV-1包膜表位 (即双特异性分子像A32抗体一样结合至HIV-1包膜) 和CD3或CD16。在某些实施方案中, 双特异性分子结合至7B2-HIV1包膜表位和CD3或CD16。在某些实施方案中, 双特异性分子结合至CH27-HIV-1包膜表位和CD3或CD16。在某些实施方案中, 双特异性分子结合至CH28-HIV-1包膜表位和CD3或CD16。在某些

实施方案中,双特异性分子结合至CH44-HIV-1包膜表位和CD3或CD16。

[0118] 在某些实施方案中,双特异性分子具有A32HIV-1-包膜抗体的结合特异性。在某些实施方案中,双特异性分子具有7B2HIV-1-包膜抗体的结合特异性。双特异性分子具有CH27HIV-1-包膜抗体的结合特异性。双特异性分子具有CH28HIV-1-包膜抗体的结合特异性。在某些实施方案中,双特异性分子具有CH44HIV-1-包膜抗体的结合特异性。

[0119] 在某些实施方案中,本发明的双特异性分子包括本文所述的序列、基本上由本文所述的序列组成、或由本文所述的序列组成(例如表2和表3)。

[0120] 在某些实施方案中,本发明的双特异性分子包括下述序列、基本上由下述序列组成或由下述序列组成:SEQ ID NO:9和11;SEQ ID NO:13和15;SEQ ID NO:17和19;SEQ ID NO:21和23;SEQ ID NO:25和27;SEQ ID NO:44和45(见表2和表3)。

[0121] 在某些方面,本发明提供了组合物,其包括本文描述的任何双特异性分子或其组合。在某些实施方案中,这些组合物被配制成药用于治疗用途的药物组合物。

[0122] 在某些方面,本发明涉及核酸,所述核酸编码本发明的双特异性分子。在某些实施方案中,这些核酸被包括在载体中,并且与启动子可操作地连接。在某些方面,本发明提供了细胞系或分离的细胞,其包括用于本发明的双特异性分子的表达的核酸。

[0123] 在某些方面,本发明提供了组合物,其包括本发明的双特异性分子或编码该双特异性分子的核酸,用于治疗或预防HIV感染的方法。在一些实施方案中,这些方法进一步包括施用潜伏期激活剂。这些潜伏期激活剂的非限制性实施例包括HDAC抑制剂,例如伏立诺他、罗咪酯肽、帕比司他、戒酒硫、JQ1、苔藓抑制素、PMA、离子霉素或其任何组合。在一些实施方案中,该联合疗法靶向被潜伏感染的HIV细胞池。

[0124] 在某些方面,本发明提供了治疗或预防受试者中的HIV感染的方法,所述方法包括以治疗上有效的量向受试者施用组合物,所述组合物包括本发明的任何一种双特异性分子或其组合。在某些实施方案中,方法进一步包括施用潜伏期激活剂。

[0125] 附图简述

[0126] 图1显示介导ADCC的mAb的效力。5种CHAVI mAbs针对22种HIV-1 IMC的ADCC活性被报告为特异性杀伤的最大百分比。每个点代表每组mAb针对单独的IMCs的所有阳性结果的平均活性。线代表平均值±标准偏差。黑线代表阳性应答的截止值(cut off)。

[0127] 图2显示抗-HIV-1-DART-介导的细胞毒性活性。来自HIV-1血清反应阴性供体的激活的CD4+T细胞被HIV-1亚型B BaL、AE CM235和C 1086.c IMC(从上至下)感染。在存在6种浓度的抗-HIV-1(A32xCD3◆和7B2xCD3■)和对照(4420xCD3•)DART的情况下,以效应细胞和靶细胞比为33:1,将这些细胞与自体静息CD8T细胞一起孵育6、24和48小时。结果被报告为在每个时间点观察到的特异性杀伤的最大百分比。

[0128] 图3显示抗-HIV-1BaL DART-介导的细胞毒性活性的剂量依赖。来自HIV-1血清反应阴性供体的激活的CD4+T细胞被HIV-1亚型BBaL感染。在存在6种浓度的抗-HIV-1(A32xCD3◆和7B2xCD3■)和对照(4420xCD3•)DART的情况下,以效应细胞和靶细胞比为33、11和3:1(从上至下),将这些细胞与自体静息CD8T细胞一起孵育48小时。结果被报告为特异性杀伤的百分比。

[0129] 图4显示达到50%特异性杀伤的DART浓度。来自HIV-1血清反应阴性供体的激活的CD4+T细胞被HIV-1亚型B BaL、AE CM235和C 1086.c IMC感染。在存在6种浓度的抗-HIV

(A32xCD3, 红色; 7B2xCD3, 蓝色) 和对照 (4420xCD3, 黑色) DART的情况下, 以效应细胞和靶细胞比为33:1, 将这些细胞与自体静息CD8T细胞一起孵育48小时。每个柱代表针对每个被感染的靶标群体检测到50%特异性杀伤需要的浓度。

[0130] 图5显示CH27、CH28和CH44HIV-1抗体的序列。CDR在序列 (SEQ ID Nos:57-74) 中指示。

[0131] 图6显示编码A32抗体的VH和VL链的核苷酸序列和A32的VH和VL链的氨基酸序列 (按出现顺序为SEQ ID Nos:75-78)。

[0132] 图7显示编码7B2抗体的VH和VK链的核苷酸序列和7B2的VH和VK链的氨基酸序列 (按出现顺序为SEQ ID NO:79-82)。

[0133] 图8A-C显示本发明的双特异性分子的结构和结构域。图8A示出了由两条多肽链组成的双特异性分子的结构。图8B和8C示出了具有Fc结构域的二链双特异性分子的第一、第二和第三多肽链的两种形式的结构 (形式1, 图8B; 形式2, 图8C)。

[0134] 图9显示各种序列: 连接体1 (SEQ ID NO:1); 连接体2 (SEQ ID NO:2); 异源二聚体促进结构域和K-螺旋和E-螺旋序列 (SEQ ID Nos:3-6、7和8); 连接体3 (DKTHTCPPCP (SEQ ID NO:49); 连接体4--SEQ ID NOS:39、40; CH2-CH3片段--SEQ ID Nos:41-43; CH3VH链—SEQ ID NO:51; CD3VL链--SEQ ID NO:52; CD16VH链—SEQ ID NO:53; CH16VL链—SEQ ID NO:54; 7B2VL—SEQ IDNO:55; 7b2 VH-SEQ IDNO:56。SEQ ID Nos:9-38、44-48显示各种双特异性抗体 (见表2)。

[0135] 图10A-10C显示HIVxCD3 DART结构。(图10A-10B) 这些DART分子包含与抗-CD3结合臂 (hXR32) 组合的抗-HIV-1结合臂 (A32或7B2)。它们由两条多肽链组成: 一条具有与抗-HIV的VH连接的抗-CD3的VL; 第二条具有与抗-CD3的VH连接的抗-HIV的VL。链的羧基末端具有链间二硫键和配对的、带相反电荷的E-螺旋/K-螺旋二聚化结构域。对照DART的一条臂被来源于抗-FITC抗体 (4420) 或来源于抗-RSV抗体、帕利珠单抗 (palivizumab) (RSV) 序列的不相关的臂取代。(图10C) 图示了HIVxCD3 DART同时结合至两个不同的抗原并重定向细胞毒性T细胞 (效应子), 以裂解表达Env的HIV-1感染的细胞 (靶标)。

[0136] 图11A-11F显示HIVxCD3 DART的结合性质。图11A-11C显示通过ELISA的抗原结合。DART结合人CD3蛋白 (图11A)、结合JR-FLgp140蛋白 (图11B) 或同时结合JR-FL gp140和人CD3蛋白两者 (图11C)。图11D-11F显示通过FACS的细胞表面结合。DART结合表达CD3的原代人T细胞 (图11D)、结合表达HIV-1Env、CM244、亚型AE的HEK293-D371细胞 (图11E) 或结合表达CD3和HIV-1Env、HXBC2、亚型B的Jurkat 522-F/Y细胞 (图11F)。数据被报告为平均荧光强度 (MFI)。细胞的CD3和Env表达特征被报告在括号内。A32和7B2为分别识别HIV-1gp120和gp41的靶向臂; CD3为识别CD3 ϵ 的效应臂; 4420为不相关的、阴性对照臂。

[0137] 图12A-12H显示HIVxCD3 DART对Env⁺靶细胞的重定向T-细胞杀伤。图12A显示, 在存在人T-细胞的情况下, 以E:T比为10:1达48小时, DART对Env⁺Jurkat 522-F/Y细胞的浓度依赖性杀伤, 其中细胞裂解通过LDH释放试验测量; A32xCD3和7B2xCD3的EC₅₀分别为230和160pg/mL。对照DART (A32x4420、7B2x4420、4420xCD3) 是无活性的。图12B显示, 在不存在效应T-细胞的情况下, 缺乏DART介导的对Env⁺Jurkat 522-F/Y细胞的杀伤, 其中细胞裂解通过LDH释放试验测量。图12C显示, 以E:T比为10:1, 48小时, 缺乏DART对Env⁻Jurkat Δ KS细胞的重定向T-细胞杀伤, 其中通过LDH释放试验测量细胞裂解。图12D显示, 在人T-细胞存在

时,以E:T比为10:1达48小时,DART对Env⁺Jurkat 522-F/Y GF细胞的浓度依赖性杀伤,其中通过LUM试验测量细胞裂解;A32xCD3和7B2xCD3的EC₅₀值分别为172和147pg/mL。图12E-12G显示,在不同的E:T比(10:1、5:1、1:1)和孵育时间(24、48、72小时),7B2xCD3 DART对Env⁺Jurkat522-F/Y GF细胞的浓度依赖性重定向T细胞杀伤,其中通过LUM试验测量细胞裂解。图12H显示,7B2xCD3在不同的E:T比的最大细胞溶解活性的时间过程(数据来自图12E-12G)。

[0138] 图13A-13F显示HIVxCD3 DART针对被不同亚型的HIV-1 IMC感染的CD4⁺细胞的重定向T-细胞细胞毒性。图13A-13C显示DART浓度依赖。来自HIV-1血清反应阴性供体的激活的CD4⁺T细胞被HIV-1亚型B BaL(图13A)、亚型AE CM235(图13B)或亚型C 1086.C(图13C) IMC感染,并且,在自体静息CD8⁺T细胞存在的情况下以E:T比为33:1(实心符号)或在不存在效应细胞(E:T比为0:1)的情况下(空心符号),与A32xCD3(红色圆)、7B2xCD3(蓝色方形)或4420xCD3(黑色菱形)一起孵育48小时。数据被报告为特异性裂解的百分比(%SL)。DART浓度范围从0.001ng/mL至1000ng/mL。图13D-13F显示时间过程。数据代表在6、24和48小时观察到的每种DART针对被HIV-1亚型B BaL(图13D)、亚型AE CM235(图13E)或亚型C1086.C(图13F) IMC感染并与自体静息CD8⁺T细胞以E:T比为33:1一起孵育的CD4⁺T细胞的最大%SL。

[0139] 图14A-14H显示HIVxCD3 DART诱导对CD8⁺T-细胞的特异性脱粒。图14A-14D显示在DART存在的情况下与HIV-1BaL感染的靶细胞一起孵育6小时后鉴定活的/CD3⁺CD8⁺CD107⁺T细胞的设门策略的示意图。(图14E-14G)点状图代表在1ng/mL的4420xCD3(图14E)、7B2xCD3(图14F)或A32xCD3(图14G)存在的情况下观察到的活的/CD3⁺CD8⁺CD107⁺细胞的百分比。图14H显示,与自体感染的CD4⁺T细胞以E:T比为33:1一起孵育6小时后,在5个HIV-1血清反应阴性健康供体的每一个中观察到的CD3⁺CD4⁻CD8⁺CD107⁺T细胞的频率。每个符号代表对每一个供体进行的重复刺激的平均值。线代表平均值±标准偏差。*表示多重比较的Dunnett's检验后p<0.05。

[0140] 图15A-15C显示用来评价HIVxCD3 DART对来自健康的HIV血清反应阴性供体的自体JR-CSF-感染的CD4⁺T细胞的重定向CD8⁺T细胞杀伤的病毒清除试验。来自HIV血清反应阴性供体的激活的CD4⁺T细胞被HIV-1克隆JR-CSF感染,然后在不存在(无DART)或存在浓度为100ng/mL的HIVxCD3或对照DART的情况下与自体静息CD8⁺T效应细胞以E:T比为1:1一起孵育7天。显示了两个健康供体(图15A-15B),以及对于健康供体2在共培养期间存在整合酶和非核苷逆转录酶抑制剂以抑制病毒复制(图15C)的结果。每个柱代表在培养上清液中检测到的绝对p24浓度。误差线代表n=3的标准误差均值(SEM)。*表示通过多重比较的Dunnett's检验,p<0.05。

[0141] 图16A-16H显示病毒清除试验利用来自HIV-感染的ART抑制的患者的淋巴细胞检测HIVxCD3 DART对JR-CSF或自体储库(AR)病毒-感染的CD4⁺细胞的重定向CD8⁺T细胞清除。来自HIV-感染的ART抑制的患者的CD4⁺消耗的T细胞的被PHA激活,并且被HIV-1亚型B克隆JR-CSF(图16A-16C)自体储库(AR)病毒分离株(isolate)(图16D-16F)感染,然后在不存在(无DART)或存在浓度为100ng/mL的HIVxCD3(A32xCD3、7B2xCD3)或对照(7B2x4420、4420xCD3)DART的情况下不与CD8⁺T效应细胞(图16A、16D)或与自体CD8⁺T效应细胞以E:T比为1:10(图16B、16E)或1:1(图16C、16F)一起孵育7天。‘Combo’表示总浓度为100ng/mL的7B2xCD3和A32xCD3的1:1混合物。每个柱代表在培养上清液中检测到的p24的对数倍降低

(log fold reduction), 计算为对数(感染的靶细胞的p24只有对照除以测试条件的p24)。图16G显示在DART存在的情况下与HIV-1JR-CSF感染的靶细胞一起孵育6小时后鉴定活的/CD3+CD4+CD107+效应子(TFL4-) T细胞的设门策略的示意图。图16H显示, 在n=4的患者中, 与指示的DART和JR-CSF感染的靶标一起孵育6小时后, 活的/效应细胞(TFL4阴性的)/CD3+/CD4+/107a+细胞的%。误差线代表n=8(图16A-16C, 除了combo n=5和7B2x4420n=6)、n=5(图16D-16F)和n=4(图16G-16H)的SEM。*表示通过多重比较的Dunnett's检验, $p < 0.05$ 。

[0142] 图17A-17B显示用来评价HIVxCD3 DART重定向的CD8⁺T-细胞活性的潜伏清除试验。将来自HIV-感染的、ART抑制的患者的静息CD4⁺T细胞与PHA(图17A)或伏立诺他(图17B)一起孵育, 根据患者潜伏库的大小将其涂覆在12-36个重复的孔内, 并不存在或存在100ng/mL的HIVxCD3或对照DART的情况下与自体CD8⁺T细胞以E:T比为1:10共培养24小时(或在指示的情况下长达96小时), 随后将DART洗掉, 并添加来自血清反应阴性供体的CD8-消耗的PBMC以扩增残留的病毒。在第15天, 通过ELISA对孔中p24存在与否进行评价。‘Combo’表示总浓度为100ng/mL的7B2xCD3和A32xCD3的1:1混合物。结果显示为病毒恢复%(阳性孔的数目/涂覆的总数), 归一化至没有添加CD8⁺T细胞的对照。虚线表示检测不到的病毒恢复。NT表示由于(根据图21中显示的表)低的细胞可用性而没有进行测试的条件。

[0143] 图18通过HIV-1亚型和中和层(Neutralization Tier)显示IMC的列表。

[0144] 图19显示A32xCD3和7B2xCD3结合至重组Env和CD3蛋白质的平衡解离常数(K_D)。

[0145] 图20显示临床特征。

[0146] 图21显示DART针对JR-CSF感染的自体靶细胞重定向患者T细胞和绝对p24浓度。

[0147] 图22显示通过DART的潜伏清除试验中阳性孔的绝对#。

[0148] 图23显示介导ADCC的mAb的效力和幅度。A32(抗-gp120C1/C2)mAb(◆)和7B2(抗-gp41簇I)mAb(■)的ADCC活性被报告为针对22种HIV-1 IMC的每一种的最大特异性裂解百分比(%SL)。每个点代表一种HIV-1 IMC。也报告了从一个HIV-1血清反应阳性(阳性对照; pos ctrl)和一个血清反应阴性(阴性对照; neg ctrl)供体的血浆获得的结果。线代表平均值±标准偏差。黑线代表阳性应答的截止值。

[0149] 图24显示已知影响7B2和A32mAb的结合的HIV-1Env残基的保守性。在gp41中的线性7-残基序列(gp160位置598-604; 免疫显性簇I)被报告含有7B2mAb的结合位点(28, 29)。在gp120C1-C4中已知影响A32mAb结合的不连续的残基(基于点诱变研究)发生在位置52、53、66、69、83、86、96、100、103、107、112、215、217、252、256、262、427和479处(37, 39, 68)。在洛斯阿拉莫斯国家实验室[Los Alamos National Laboratory (LANL)]HIV1Env氨基酸过滤网络比对, 由代表所有亚型的4556条HIV-1Env序列组成的数据库中, 通过QuickAlign分析(http://www.hiv.lanl.gov/content/sequence/QUICK_ALIGNv2/QuickAlign.html)评价这些残基的保守性。在Env每个位置处的残基的高度与其在HIV-1分离株间分布的频率成正比。根据疏水性, 残基被着色为: 黑色, 亲水性; 绿色, 中性; 蓝色, 疏水性。根据与N5-i5(一种A32-样mAb)的Fab片段复合的CD4-稳定化的gp120核心的晶体结构, 52、53、69、103、107和217处(位于C1-C2)的残基可能是直接的表位触者(27)。

[0150] 图25显示A32x4420和7B2x4420对照DART的细胞表面Env结合。结合表达HIV-1Env、CM244、亚型AE的HEK293-D371细胞的DART被测量, 并且数据被报告为平均荧光强度(MFI)。A32和7B2为分别识别HIV-1gp120和gp41的靶向臂; 4420为不相关的、阴性对照臂。

[0151] 图26A-26D显示HIVxCD3 DART-介导的T-细胞活化取决于与靶细胞的共-接合 (co-engagement)。来自健康的血清反应阴性供体的未刺激的CD4⁺或CD8⁺T-细胞在不存在或存在40、0.32和0ng/mL的对照 (RSVxCD3) 或HIVxCD3 (A32xCD3、7B2xCD3) DART的情况下与表达Env的Jurkat-522F/Y细胞系 (图26A、26C) 和与 (26B、26D) 表达Env的Jurkat-522F/Y细胞系一起孵育48小时。CD8⁺ (图26A-26B) 和CD4⁺ (图26C-26D) T细胞活化通过用CD25Ab细胞染色进行评价。数据被报告为激活的 (CD25⁺) T细胞的频率 (%)。每个柱代表从2个不同的供体获得的结果的平均值。

[0152] 图27显示HIV DART特异性地结合HIV-1 IMC感染的CD4⁺T细胞。如在方法部分报告的,从健康的HIV-1血清反应阴性供体获得的激活的CD4⁺T细胞用代表HIV-1亚型B BaL、AE CM235和C1086.C的HIV-1 IMC感染48小时。非感染的CD4⁺T细胞 (模拟的) 被用作阴性对照。利用7B2x4420和A32x4420 DART对这些细胞染色,其中CD3臂被不相关的4420蛋白取代以避免结合至CD3受体。与DART一起孵育后,细胞被二级抗-EK-IgG2a-生物素化的复合体染色,以揭示DART的结合。通过二级鼠抗-人-IgG mAb,利用间接染色技术,进行用7B2和A32mAb的染色,作为对照。二级荧光素化抗-人IgG Ab和帕利珠单抗mAb被用作为阴性对照。如方法部分报告的,利用抗-p24mAb,通过细胞内染色测定被感染细胞的频率。如图上方所指示的,每个柱代表被IMC和对照感染的CD4⁺T细胞。结果被报告为存活的被感染的 (p24⁺) CD4⁺T细胞的频率 (%),这些细胞被如x-轴上所列出的DART、mAb和对照的每一种染色。

[0153] 图28A-28D显示在不存在添加的靶细胞时,利用来自HIV-1感染的供体的PBMC, HIVxCD3 DART对T细胞生存力或活化状态的影响的缺乏。来自HIV-1感染的、ART抑制的未刺激的CD4⁺或CD8⁺T-细胞在不存在或存在100ng/mL的对照 (4420xCD3、7B2x4420、A32x4420) 或活性的 (A32xCD3、7B2xCD3) DART的情况下被孵育7天。(图28A-28B) 通过针对膜联蛋白V/7-AAD对细胞染色来评价T细胞生存力。存活的细胞被鉴定为膜联蛋白V和7-AAD阴性的那些细胞。(图28C-28D) 通过针对HLA-DR和CD25表达对细胞染色来评价T细胞活化。2个分析的数据点均来自n=3患者,其在3个独立场合进行。误差线代表标准误差均值。

[0154] 发明详述

[0155] 高效抗逆转录病毒疗法 (HAART) (单独或联合潜伏期逆转剂) 不能减少潜伏性感染的细胞池。这是因为CD8⁺T细胞消除HIV-1潜伏性感染的细胞的有限能力。双亲和力重靶向蛋白质 (DARTs) 是双特异性的,基于抗体的分子,其能够同时结合两种不同的抗原。HIV-1 DARTs包含与效应细胞结合臂组合的HIV-1结合臂,并且被设计成重定向细胞毒性CD3⁺T细胞,以接合并杀伤HIV-1感染的细胞。研究了一组单克隆抗体 (mAbs),以确定它们针对22种不同的分离株介导ADCC的量级和幅度。目标是:1) 鉴定可被用作DARTs的HIV-1结合臂的mAbs; 2) 测试所产生的DARTs介导HIV-1感染的细胞杀伤的能力。本文提供了与不同组的介导ADCC的mAbs的效力相关的数据以及针对HIV-1传染性分子克隆 (IMC) -感染的靶细胞所产生的DARTs。

[0156] 抗体和其他结合分子

[0157] 抗体

[0158] 本发明提供了多克隆或单克隆抗体、变体、包括具有所需特异性的抗原识别位点的抗体部分的融合蛋白、人源化抗体和嵌合抗体、以及包括具有所需特异性的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰的构型。遍及本申请,抗体的轻链和重链的氨基酸残

基的编号是根据Kabat等人的EU索引(Kabat等(1992) SEQUENCES OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, National Institutes of Health Publication No.91-3242)。在一些实施方案中,抗体的抗原-结合片段是具有至少一个抗原识别位点的抗体的一部分。片段包含例如但不限于Fab、Fab'、F(ab')₂Fv和单链(scFv)。

[0159] 单克隆抗体在本领域是已知的。在某些实施方案中,单克隆抗体不仅包含完整的单克隆抗体和全长的单克隆抗体,还包含其片段(如Fab、Fab'、F(ab')₂Fv)、单链(scFv)、其突变体、包括抗体部分的融合蛋白、人源化单克隆抗体、嵌合单克隆抗体和包括具有所需特异性和结合至抗原的能力的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰的构型。关于抗体的来源或其制造方式(例如通过杂种瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等),单克隆抗体并不受限制。

[0160] 制造单克隆抗体的方法在本领域是已知的。在某些实施方案中,抗体通过本领域任何已知的方法重组产生。在一个实施方案中,这样的抗体被测序,然后,多核苷酸序列被克隆到载体中用于表达和增殖。编码目的抗体的序列可在宿主细胞中保持在载体中,然后宿主细胞可以被扩增和冷冻以备将来使用。这样的抗体的多核苷酸序列可用于基因操作,以产生本发明的双特异性分子以及嵌合抗体、人源化抗体或犬源化(caninized)抗体,以改善抗体的亲和力或其他特征。人源化抗体的一般原则涉及保留抗体的抗原-结合部分的基本序列,同时用人抗体序列交换抗体的非-人剩余部分。人源化单克隆抗体有4个一般步骤。它们是:(1) 确定起始抗体轻链和重链可变结构域的核苷酸和预测的氨基酸序列,(2) 设计人源化抗体或犬源化抗体,即决定在人源化或犬源化过程中使用哪种抗体框架区域,(3) 实际的人源化或犬源化方法/技术和(4) 人源化抗体的转染和表达。见例如美国专利号4,816,567;5,807,715;5,866,692;和6,331,415。

[0161] 双特异性抗体、多特异性双抗体和DARTTM双抗体

[0162] 非单特异性“双抗体”的供应提供相比抗体的明显优势:共连接和共定位表达不同表位的细胞的能力。因此,二价双抗体具有广泛的应用,包括治疗和免疫诊断。在各种应用中,二价在双抗体的设计和工程化中允许极大的灵活性,提供对多聚抗原的增强的亲合力、不同抗原的交联和对特定细胞类型的导向靶向,这取决于两个靶抗原的存在。由于它们增加的价、低解离速率和从循环中快速清除(对于小尺寸的双抗体,为~50kDa或以下),本领域已知的双抗体分子在肿瘤成像领域中也显示出特定的用途(Fitzgerald等(1997) “Improved Tumour Targeting By Disulphide Stabilized Diabodies Expressed In *Pichia pastoris*,” *Protein Eng.* 10:1221)。尤其重要的是不同细胞的共连接,例如细胞毒性T细胞与肿瘤细胞的交联(Staerz等(1985) “Hybrid Antibodies Can Target Sites For Attack By T Cells,” *Nature* 314:628-631;和Holliger等(1996) “Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody,” *Protein Eng.* 9:299-305)。

[0163] 双抗体表位结合结构域也可以被引导至B细胞的表面决定簇,如CD19、CD20、CD22、CD30、CD37、CD40和CD74(Moore, P.A.等(2011) “Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma,” *Blood* 117(17):4542-4551;Cheson, B.D.等(2008) “Monoclonal Antibody Therapy For B-Cell Non-Hodgkin's Lymphoma,” *N.Engl.J.Med.* 359(6):613-626;

Castillo, J. 等 (2008) "Newer monoclonal antibodies for hematological malignancies," *Exp. Hematol.* 36 (7) : 755-768)。在许多研究中, 还发现结合至效应细胞决定簇, 例如 Fc γ 受体 (Fc γ R), 的双抗体, 激活效应细胞 (Holliger 等 (1996) "Specific Killing Of Lymphoma Cells By Cytotoxic T-Cells Mediated By A Bispecific Diabody," *Protein Eng.* 9:299-305; Holliger 等 (1999) "Carcinoembryonic Antigen (CEA)-Specific T-Cell Activation In Colon Carcinoma Induced By Anti-CD3x Anti-CEA Bispecific Diabodies And B7x Anti-CEA Bispecific Fusion Proteins," *Cancer Res.* 59:2909-2916; WO 2006/113665; WO 2008/157379; WO 2010/080538; WO 2012/018687; WO 2012/162068)。通常, 效应细胞活化由结合抗原的抗体通过 Fc-Fc γ R 相互作用结合至效应细胞而触发; 因此, 就这一点而言, 双抗体分子可展示出 Ig-样功能性, 而不依赖于它们是否包括 Fc 结构域 (如在本领域已知的任何效应子功能试验或本文所示例的效应子功能试验 (例如 ADCC 试验) 中所测定的)。通过交联肿瘤和效应细胞, 双抗体不仅使效应细胞接近肿瘤细胞, 而且还导致有效的肿瘤杀伤 (见如 Cao 等 (2003) "Bispecific Antibody Conjugates In Therapeutics," *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 55:171-197)。

[0164] 这类非单特异性双抗体的形成需要成功组装两种或更多种独特和不同的多肽 (即, 这样的形成需要通过不同多肽链种类的异源二聚化而形成双抗体)。该事实与单特异性双抗体不同, 单特异性双抗体通过一致的多肽链的同源二聚化而形成。由于至少两个不同的多肽 (即, 两个多肽种类) 必须被提供以形成非单特异性双抗体并且由于这样的多肽的同源二聚化导致失活分子 (Takemura, S. 等 (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," *Protein Eng.* 13 (8) : 583-588), 这类多肽的产生必须以这样的方式完成, 以防止相同种类的多肽之间的共价结合 (即, 以便防止同源二聚化) (Takemura, S. 等 (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," *Protein Eng.* 13 (8) : 583-588)。因此, 本领域教导了这类多肽的非共价缔合 (见例如 Olafsen 等 (2004) "Covalent Disulfide-Linked Anti-CEA Diabody Allows Site-Specific Conjugation And Radiolabeling For Tumor Targeting Applications," *Prot. Engr. Des. Sel.* 17:21-27; Asano 等 (2004) "A Diabody For Cancer Immunotherapy And Its Functional Enhancement By Fusion Of Human Fc Domain," Abstract 3P-683, *J. Biochem.* 76 (8) : 992; Takemura, S. 等 (2000) "Construction Of A Diabody (Small Recombinant Bispecific Antibody) Using A Refolding System," *Protein Eng.* 13 (8) : 583-588; Lu, D. 等 (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," *J. Biol. Chem.* 280 (20) : 19665-19672)。

[0165] 本领域已经认识到由非共价缔合的多肽构成的双特异性双抗体是不稳定的并且容易解离成非功能性的单体 (见例如 Lu, D. 等 (2005) "A Fully Human Recombinant IgG-Like Bispecific Antibody To Both The Epidermal Growth Factor Receptor And The Insulin-Like Growth Factor Receptor For Enhanced Antitumor Activity," *J. Biol. Chem.* 280 (20) : 19665-19672)。

[0166] 面对这一挑战, 本发明提供了稳定的、共价结合的异源二聚非单特异性双抗体, 称

为DARTsTM (见,例如,美国专利公开号2014-0099318;2013-0295121;2010-0174053和2009-0060910;欧洲专利公开号EP 2714079;EP 2601216;EP 2376109;EP 2158221;和PCT公开号WO 2015/026894;WO2015/026892;WO 2015/021089;WO 2014/159940;WO 2012/162068;WO 2012/018687;WO 2010/080538;Moore,P.A.等(2011)“Application Of Dual Affinity Retargeting Molecules To Achieve Optimal Redirected T-Cell Killing Of B-Cell Lymphoma,”Blood 117(17):4542-4551;Veri,M.C.等(2010)“Therapeutic Control Of B Cell Activation Via Recruitment Of Fcγ Receptor IIb(CD32B) Inhibitory Function With A Novel Bispecific Antibody Scaffold,”Arthritis Rheum.62(7):1933-1943;Johnson,S.等(2010)“Effector Cell Recruitment With Novel Fv-Based Dual-Affinity Re-Targeting Protein Leads To Potent Tumor Cytolysis And in vivo B-Cell Depletion,”J.Mol.Biol.399(3):436-449),这些出版物的内容通过引用以其整体并入本文。这样的双抗体包括两条或多条共价复合的多肽并涉及将一个或多个半胱氨酸残基工程化到每个应用的多肽种类中。例如,已经显示向这类构建体的C-末端添加半胱氨酸残基允许多肽链之间的二硫键结合,稳定化所得的异源二聚体而不干扰二价分子的结合特征。

[0167] 在一些实施方案中,DARTTM的两条多肽中的每一条包括3个结构域(图8A)。第一多肽包括:(i)包括第一免疫球蛋白的轻链可变结构域(VL1)的结合区域的结构域,(ii)包括第二免疫球蛋白的重链可变结构域(VH2)的结合区域的第二结构域,和(iii)用于促进与第二多肽的异源二聚化和促进双抗体的第一多肽和第二多肽共价结合的第三结构域。第二多肽包含互补的第一结构域(VL2结构域),互补的第二结构域(VH1结构域)和第三结构域,所述第三结构域与第一多肽链的第三结构域复合,以促进异源二聚化以及与第一多肽链的共价结合。这样的分子是稳定的、有效的,并且具有同时结合两个或更多抗原的能力。它们能够促进重定向T细胞(CD3)或NK(CD16)细胞介导的对表达靶抗原的细胞的杀伤。

[0168] 在某些方面,本发明涉及能够同时结合至HIV-1和CD3或HIV-1和CD16的HIV-1x CD3和HIV-1x CD16双特异性单价双抗体,以及涉及这类分子在治疗HIV-1感染中的用途。

[0169] 在某些实施方案中,本发明的HIV-1x CD3和HIV-1x CD16双特异性单价双抗体由两条多肽链构成,所述两条多肽链彼此缔合以形成对HIV-1的表位特异性的一个结合位点和对CD3或CD16的表位特异性的一个结合位点(见图8),以便能够同时结合至HIV-1和结合至CD3或CD16。因此,这类双抗体结合至“第一抗原”(其可能是CD3或HIV-1)和“第二抗原”(当第一表位为CD3时,其为HIV-1,当第一表位为HIV-1时,其为CD3)。可选地,这类双抗体结合至“第一抗原”(其可能为CD16或HIV-1)和“第二抗原”(当第一表位为CD16时,其为HIV-1,当第一表位为HIV-1时,其为CD16)。

[0170] 在图8显示的某些实施方案中,这样的两条多肽链中的第一条在N-末端至C-末端方向包含N-末端、“第一”抗原(CD3或HIV-1包膜)的轻链可变结构域(VL)的抗原-结合结构域、第二抗原(若第一抗原为CD3,其为HIV-1;若第一抗原为HIV-1,其为CD3)的重链可变结构域(VH)的抗原-结合结构域、异源二聚化-促进结构域和C-末端。间插连接体肽(连接体1)将轻链可变结构域的抗原-结合结构域与重链可变结构域的抗原-结合结构域分开。在某些实施方案中,重链可变结构域的抗原-结合结构域通过间插连接体肽(连接体2)连接至异源二聚化-促进结构域。在某些实施方案中,两条多肽链的第一条在N-末端至C-末端方向因此

包含VL_{第 一 抗 原}-连接体1-VH_{第 一 抗 原}-连接体2-异源二聚化-促进结构域。

[0171] 在某些实施方案中,这样的两条多肽链的第二条在N-末端至C-末端方向包含N-末端、第二抗原的轻链可变结构域(VL)的抗原-结合结构域、第一抗原的重链可变结构域(VH)的抗原-结合结构域、异源二聚化-促进结构域和C-末端。间插连接体肽(连接体1)将轻链可变结构域的抗原-结合结构域与重链可变结构域的抗原-结合结构域分开。在某些实施方案中,重链可变结构域的抗原-结合结构域通过间插连接体肽(连接体2)被连接至异源二聚化-促进结构域。在某些实施方案中,两条多肽链的第二条在N-末端至C-末端方向因此包含VL_{第 一 抗 原}-连接体1-VH_{第 一 抗 原}-连接体2-异源二聚化-促进结构域。

[0172] 第一多肽链的轻链可变结构域的抗原-结合结构域与第二多肽链的重链可变结构域的抗原-结合结构域相互作用以形成对第一抗原(即HIV-1包膜或CD3/CD16)特异性的功能性抗原-结合位点。同样地,第二多肽链的轻链可变结构域的抗原-结合结构域与第一多肽链的重链可变结构域的抗原-结合结构域相互作用以形成对第二抗原(即,根据第一抗原的身份为CD3/CD16或HIV-1包膜)特异性的第二功能性抗原-结合位点。因此,第一和第二多肽链的轻链可变结构域的抗原-结合结构域和重链可变结构域的抗原-结合结构域的选择被协调,以便所述的两条多肽链总共包括能够结合至预定靶标(在某些实施方案中,例如HIV-1包膜和CD3或CD16)的轻链和重链可变结构域的抗原-结合结构域。

[0173] 在某些实施方案中,分开多肽链的这样的VL和VH结构域的连接体1的长度被选择,以基本上或完全阻止这样的VL和VH结构域彼此结合。因此,第一多肽链的VL和VH结构域基本上或完全不能彼此结合。同样地,第二多肽链的VL和VH结构域基本上或完全不能彼此结合。在某些实施方案中,这是由于分开VH和VL结构域的连接体。在某些实施方案中,连接体为5、6、7、8、9、10、11、12、13、14个氨基酸,但不会超过15个氨基酸。在某些实施方案中,间插间隔体肽(连接体1)具有序列(SEQ ID NO:1):GGGSGGGG。

[0174] 连接体2将多肽链的VH结构域与该多肽链的异源二聚体-促进结构域分开。任何种类的连接体均可以用于连接体2的目的。在某些实施方案中,这类连接体2的序列具有氨基酸序列:GGCGGG(SEQ ID NO:2),其具有半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基通过二硫键可以用于彼此共价结合第一和第二多肽链。

[0175] 第一和第二多肽链的异源二聚体的形成可以通过包含异源二聚化-促进结构域而驱动。这类结构域包含在一条多肽链上的GVEPKSC(SEQ ID NO:3)或VEPKSC(SEQ ID NO:4)和另一条多肽链上的GFNRGEC(SEQ ID NO:5)或FNRGEC(SEQ ID NO:6)(见US2007/0004909,其通过引用以其整体并入本文)。

[0176] 在一些实施方案中,本发明的异源二聚化-促进结构域是由1、2、3或4个具有相反电荷的串联重复的螺旋结构域形成的,所述串联重复的螺旋结构域包括至少6个、至少7个或至少8个带电荷的氨基酸残基的序列(Apostolovic,B.等(2008)“pH-Sensitivity of the E3/K3 Heterodimeric Coiled Coil,”*Biomacromolecules* 9:3173-3180;Arndt,K.M.等(2001)“Helix-stabilized Fv(hsFv) Antibody Fragments:Substituting the Constant Domains of a Fab Fragment for a Heterodimeric Coiled-coil Domain,”*J.Molec.Biol.*312:221-228;Arndt,K.M.等(2002)“Comparison of In Vivo Selection and Rational Design of Heterodimeric Coiled Coils,”*Structure* 10:1235-1248;Boucher,C.等(2010)“Protein Detection By Western Blot Via Coiled-Coil

Interactions,” *Analytical Biochemistry* 399:138-140; Cachia, P.J. 等 (2004) “Synthetic Peptide Vaccine Development: Measurement Of Polyclonal Antibody Affinity And Cross-Reactivity Using A New Peptide Capture And Release System For Surface Plasmon Resonance Spectroscopy,” *J. Mol. Recognit.* 17:540-557; De Crescenzo, G.D. 等 (2003) “Real-Time Monitoring of the Interactions of Two-Stranded de novo Designed Coiled-Coils: Effect of Chain Length on the Kinetic and Thermodynamic Constants of Binding,” *Biochemistry* 42:1754-1763; Fernandez-Rodriguez, J. 等 (2012) “Induced Heterodimerization And Purification Of Two Target Proteins By A Synthetic Coiled-Coil Tag,” *Protein Science* 21:511-519; Ghosh, T.S. 等 (2009) “End-To-End And End-To-Middle Interhelical Interactions: New Classes Of Interacting Helix Pairs In Protein Structures,” *Acta Crystallographica D* 65:1032-1041; Grigoryan, G. 等 (2008) “Structural Specificity In Coiled-Coil Interactions,” *Curr. Opin. Struc. Biol.* 18:477-483; Litowski, J.R. 等 (2002) “Designing Heterodimeric Two-Stranded α -Helical Coiled-Coils: The Effects Of Hydrophobicity And α -Helical Propensity On Protein Folding, Stability, And Specificity,” *J. Biol. Chem.* 277:37272-37279; Steinkruger, J.D. 等 (2012) “The d’--d--d’ Vertical Triad is Less Discriminating Than the a’--a--a’ Vertical Triad in the Antiparallel Coiled-coil Dimer Motif,” *J. Amer. Chem. Soc.* 134 (5) :2626-2633; Straussman, R. 等 (2007) “Kinking the Coiled Coil-Negatively Charged Residues at the Coiled-coil Interface,” *J. Molec. Biol.* 366:1232-1242; Tripet, B. 等 (2002) “Kinetic Analysis of the Interactions between Troponin C and the C-terminal Troponin I Regulatory Region and Validation of a New Peptide Delivery/Capture System used for Surface Plasmon Resonance,” *J. Molec. Biol.* 323:345-362; Woolfson, D.N. (2005) “The Design Of Coiled-Coil Structures And Assemblies,” *Adv. Prot. Chem.* 70:79-112; Zeng, Y. 等 (2008) “A Ligand-Pseudoreceptor System Based On de novo Designed Peptides For The Generation Of Adenoviral Vectors With Altered Tropism,” *J. Gene Med.* 10:355-367)。

[0177] 这类重复的螺旋结构域可以是精确的重复或可具有取代。例如，第一多肽链的异源二聚化-促进结构域可以包括8个带负电荷的氨基酸残基的序列和第二多肽链的异源二聚化-促进结构域可以包括8个带负电荷的氨基酸残基的序列。哪一个螺旋被提供至第一或第二多肽链并不重要，条件是提供相反电荷的螺旋用于另一条多肽链。

[0178] 在某些实施方案中，本发明的HIV-1x CD3双特异性单价双抗体的第一多肽链具有带负电荷的螺旋。带正电荷的氨基酸可以是赖氨酸、精氨酸、组氨酸等和/或带负电荷的氨基酸可以是谷氨酸、天冬氨酸等。在某些实施方案中，带正电荷的氨基酸是赖氨酸和/或带负电荷的氨基酸是谷氨酸。有可能只使用单一的异源二聚化-促进结构域(因为这类结构域将抑制同源二聚化从而促进异源二聚化)。在某些实施方案中，本发明的双抗体的第一和第二多肽链两者都包含异源二聚化-促进结构域。

[0179] 在某些实施方案中，异源二聚化-促进结构域之一包括4个串联“E-螺旋”螺旋结构域 (SEQ ID NO:7:EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK-EVAALEK)，其谷氨酸残基在PH7形成负电荷，

而另外一个异源二聚化-促进结构域包括4个串联“K-螺旋”结构域(SEQ ID NO:8:KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE-KVAALKE),其赖氨酸残基在PH7形成正电荷。这类带电荷的结构域的存在促进第一和第二多肽之间的缔合,并且因此促进异源二聚化。在一些实施方案中,K螺旋和E螺旋结构域的数量可以变化,并且本领域的技术人员可以很容易地确定不同数量的K-螺旋或E-螺旋是否导致异源二聚化。

[0180] 在某些实施方案中,本发明的HIV-1x CD3或HIV-1x CD16双特异性单价双抗体被工程化,以便它们的第一和第二多肽链通过沿着它们的长度布置的一个或多个半胱氨酸残基彼此共价结合。这类半胱氨酸残基可被引入到分开多肽的VL和VH结构域的间插连接体中。可选地,连接体2可以包含半胱氨酸残基。

[0181] 本发明还包括本文公开的抗体的变体(和片段),包括这样的变体:所述变体保持具体公开的抗体的结合至重组Env蛋白的能力、结合至病毒感染的细胞表面的能力和/或介导ADCC的性质的变体,本发明还包括使用它们的方法,例如来降低HIV-1感染的风险。本文公开的抗体或其片段的组合也可以用于本发明的方法中。

[0182] 在某些实施方案中,本发明提供了双特异性抗体。双特异性的或双功能性的抗体为具有两个不同的重/轻链对和两个不同的结合位点的人工杂种(hybrid)抗体(见例如Romain Rouet&Daniel Christ“Bispecific antibodies with native chain structure”*Nature Biotechnology* 32,136-137(2014);Byrne等“A tale of two specificities: bispecific antibodies for therapeutic and diagnostic applications”*Trends in Biotechnology*,Volume 31,Issue 11,November 2013,Pages 621-632 Songsivilai and Lachmann,*Clin.Exp.Immunol.*,79:315-321(1990);Kostelny等,*J.Immunol.*148:1547-53(1992)(以及本文的参考文献))。在某些实施方案中,双特异性抗体为任何同种型的全抗体。在其他实施方案中,双特异性片段例如但不限于F(ab)₂片段。在一些实施方案中,双特异性抗体不包含Fc部分,这使得这些双抗体的尺寸相对小,易于穿透组织。

[0183] 在某些实施方案中,双特异性抗体可以包含Fc区域。含Fc的双抗体例如但不限于含Fc的DARTs较重,并且可以结合新生儿Fc受体,增加它们的循环半衰期。见Garber“Bispecific antibodies rise again”*Nature Reviews Drug Discovery* 13,799-801(2014),Figure 1a;见美国专利公开号20130295121、美国专利公开号20140099318,其通过引用以其整体并入本文。在某些实施方案中,本发明包括包含Fc结构域或其部分(如CH2结构域或CH3结构域)的双抗体分子。Fc结构域或其部分可来源于任何免疫球蛋白同种型或同种异型(allotype),包括但不限于IgA、IgD、IgG、IgE和IgM。在一些实施方案中,Fc结构域(或其部分)来源于IgG。在一些实施方案中,IgG同种型为IgG1、IgG2、IgG3或IgG4或其同种异型。在一些实施方案中,双抗体分子包括Fc结构域,所述Fc结构域包括独立地选自任何免疫球蛋白同种型的CH2结构域和CH3结构域(即Fc结构域包括来源于IgG的CH2结构域和来源于IgE的CH3结构域或来源于IgG1的CH2结构域和来源于IgG2的CH3结构域等)。在一些实施方案中,在相对于多肽链的其他结构域或部分的任意位置处,可以将Fc结构域工程化到构成本发明的双抗体分子的多肽链中(例如Fc结构域或其部分可以在多肽链的VL和VH结构域两者的C-末端;可以在VL和VH结构域两者的N-末端;或可以在一个结构域的N-末端和在另一个结构域的C-末端(即多肽链的两个结构域之间))。

[0184] 考虑双特异性分子的其他修饰以增加双特异性分子的半衰期。在一些实施方案

中,这些修饰包括添加血清结合蛋白的多肽部分。见US20100174053A1,其通过引用并入本文。

[0185] 在一些实施方案中,期望本发明的双特异性分子的Fc变体相对于非-Fc变体具有增加的血清半衰期。本领域的技术人员可以容易地执行各种试验(包括药物动力学研究)来确定这些分子的半衰期。

[0186] 在一些实施方案中,本发明包含多肽链,每一条多肽链包括包含本文所述的CDRs的VH和VL结构域。在某些实施方案中,构成每条多肽链的VL和VH结构域具有相同的特异性,并且多聚体分子是二价的和单特异性的。在其他实施方案中,构成每条多肽链的VL和VH结构域具有不同的特异性,并且多聚体为二价的和双特异性的。

[0187] 在一些实施方案中,多聚体中的多肽链进一步包括Fc结构域。Fc结构域的二聚化导致展现免疫球蛋白-样功能,即Fc介导的功能(如Fc-Fc. γ . R相互作用,补体结合等),的双抗体分子的形成。

[0188] 在前所述的双特异性分子的形成需要不同多肽链的相互作用。由于许多潜在的链错配变体,这种相互作用很难在单细胞重组生产系统中有效地实现。一种增加错配的可能性的方案是将“杵-入-臼”(“knobs-into-holes”)型突变工程化到所需的多肽链对中。这样的突变相对于同源二聚化利于异源二聚化。例如,关于Fc-Fc-相互作用,氨基酸取代(优选以包括形成“杵(knob)”的大侧基的氨基酸例如色氨酸进行取代)可被引入至CH2或CH3结构域中,以便空间干扰将防止与类似的突变结构域的相互作用并将迫使突变的结构域与其中互补或适应性突变已经被工程化的结构域——即‘臼(hole)’(例如,用甘氨酸取代)——配对。这样的突变组可被工程化到构成双抗体分子的任意多肽对中,并且,进一步地被工程化到多肽链对的任何部分中。蛋白质工程化以相对于同源二聚化利于异源二聚化的方法在本领域中是悉知的,尤其就工程化免疫球蛋白样分子而言,这些都包括在本文中(见例如Ridgway等(1996)“`Knobs-Into-Holes`Engineering Of Antibody CH3Domains For Heavy Chain Heterodimerization,”*Protein Engr.*9:617-621,Atwell等(1997)“Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,”*J.Mol.Biol.*270:26-35,和Xie等(2005)“A New Format Of Bispecific Antibody:Highly Efficient Heterodimerization,Expression And Tumor Cell Lysis,”*J.Immunol.Methods* 296:95-101;其每一篇通过引用以其整体并入本文)。

[0189] 本发明还包括包含变异的Fc(或其部分)的双抗体分子,所述变异的Fc结构域相对于可比较的野生型Fc结构域或铰链-Fc结构域(或其部分)包括至少一个氨基酸修饰(如取代、插入删除)。包括变异的Fc结构域或铰链-Fc结构域(或其部分)的分子(如抗体)相对于包括野生型Fc结构域或铰链-Fc结构域或其部分的分子通常具有改变的表型。变异的表型可以表示为改变的血清半衰期、改变的稳定性、改变的对细胞酶的敏感性或改变的效应子功能,如在NK依赖性或巨噬细胞依赖性试验中所测定的。被鉴定为改变效应子功能的Fc结构域变体在本领域是已知的。例如国际申请W004/063351,美国专利申请公开2005/0037000和2005/0064514。

[0190] 本发明的双特异性双抗体能同时结合两个分开的和不同的表位。在某些实施方案中,表位来自相同的抗原。在其他实施方案中,表位来自不同的抗原。在非限制性实施方案中,至少一个表位结合位点对在免疫效应细胞上表达的决定簇(如CD3、CD16、CD32、CD64等)

是特异性的,所述决定簇在T淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞或其他单核细胞上表达。在一个实施方案中,双抗体分子结合至效应细胞决定簇,并且也激活效应细胞。就这一点而言,本发明的双抗体分子可以展现Ig-样功能性而不依赖于它们是否进一步包括Fc结构域(例如在本领域已知的任何效应子功能试验或本文例示的效应子功能试验中所测定的)。

[0191] 在某些实施方案中,双特异性抗体包括HIV包膜结合片段,例如但不限于来自本文所述的任何抗体的HIV包膜结合片段。在其他实施方案中,双特异性抗体进一步包括第二抗原-相互作用-位点/片段。在其他实施方案中,双特异性抗体进一步包括至少一个效应子结构域。

[0192] 在某些实施方案中,双特异性抗体接合细胞,用于抗体-依赖性细胞-介导的细胞毒性(ADCC)。在某些实施方案中,双特异性抗体接合自然杀伤细胞、嗜中性粒细胞多形核白细胞、单核细胞和巨噬细胞。在某些实施方案中,双特异性抗体为T-细胞接合器(engager)。在某些实施方案中,双特异性抗体包括HIV包膜结合片段和CD3结合片段。各种CD3抗体在本领域是已知的。见例如美国专利8,784,821和美国专利公开号2014-0099318,其提供关于各种CD3抗体的各种公开内容,所述公开内容通过引用以其整体并入。在某些实施方案中,双特异性抗体包括HIV包膜结合片段和CD16结合片段。

[0193] 在某些实施方案中,本发明提供了具有双靶向特异性的抗体。在某些方面,本发明提供了能够将免疫效应细胞定位至表达HIV-1包膜的细胞的双特异性分子,以促进表达HIV-1包膜的细胞的杀伤。就这一点而言,双特异性抗体用一条“臂”结合至靶细胞上的表面抗原,和用第二“臂”结合至T细胞受体(TCR)复合体的激活的、不变的组分。这类抗体与其两个靶标的同时结合促使靶细胞和T细胞之间暂时的相互作用,导致任何细胞毒性T细胞的活化并导致靶细胞的随后裂解。因此,免疫应答被重定向至靶细胞,并且不依赖于通过靶细胞的肽抗原呈递或与CTLs的正常的MHC-受限的活化相关的T细胞的特异性。由于这个原因,当靶细胞向CTLs呈递双特异性抗体时,只有CTLs是激活的,即免疫突触被模拟,这很关键。尤其期望的是这样的双特异性抗体:其不要求淋巴细胞预处理或共刺激以引发靶细胞的有效裂解。

[0194] 在某些实施方案中,本发明提供了这样的抗体或片段,例如但不限于DARTS或毒素标记的HIV-1结合分子,其包括本发明抗体的VH和/或VL链的CDR(s),或VH和/或VL链,作为双特异性分子的HIV-1结合臂。

[0195] 在某些实施方案中,这类双特异性分子包括靶向HIV-1包膜的一个部分和结合第二靶标的第二部分。在某些实施方案中,第一部分包括来自本文所述的抗体的VH和VL序列,或CDRs。在某些实施方案中,第二靶标可以是,例如但不限于效应细胞。在某些实施方案中,第二部分是T-细胞接合器。在某些实施方案中,第二部分包括靶向CD3的序列/互补位。在某些实施方案中,第二部分是来源于CD3抗体(任选地已知CD3抗体)的抗原-结合区域。在某些实施方案中,抗-CD抗体诱导T细胞-介导的杀伤。在某些实施方案中,双特异性抗体是全抗体。在其他实施方案中,双靶向抗体基本上由Fab片段组成。在其他实施方案中,双靶向抗体包括重链恒定区域(CH1)。在某些实施方案中,双特异性抗体不包括Fc区域。在某些实施方案中,双特异性抗体具有改善的效应子功能。在某些实施方案中,双特异性抗体具有改善的细胞杀伤活性。设计双特异性分子的各种方法和平台在本领域是已知的。见例如美国公开20140206846、美国公开20140170149、20100174053、美国公开20090060910、美国公开

20130295121、美国公开20140099318、美国公开20140088295,其内容通过引用以其整体并入本文。

[0196] 在某些实施方案中,本发明提供了人、人源化和/或嵌合抗体。构建这类抗体的方法在本领域是已知的。

[0197] 在某些方面,本发明提供了本发明的抗体(包括双特异性抗体)在治疗和预防个体中HIV-1感染的方法中的用途,其包括向个体施用治疗上有效量的组合物,所述组合物包括处于药学上可接受的形式本发明的抗体。在某些实施方案中,该方法包含组合物,所述组合物包含多于一种HIV-1靶向抗体。在某些实施方案中,在这类组合中的HIV-1靶向抗体结合HIV-1包膜上的不同表位。在某些实施方案中,靶向多于一个HIV-1表位的双特异性抗体的这类组合提供对HIV-1感染细胞的增加的杀伤。在其他实施方案中,靶向多于一个HIV-1表位的双特异性抗体的这类组合提供识别不同HIV-1亚型的增加的幅度。

[0198] 本发明还包括本文公开的抗体的变体(和片段),包括保持具体公开的抗体的结合至重组Env蛋白的能力、结合至病毒感染的细胞表面的能力和/或介导ADCC的性质的变体,本发明还包括还使用它们的方法,以例如减少HIV-1感染的风险。本文公开的抗体或其片段的组合也可以用于本发明的方法中。

[0199] 特异性结合多肽的抗体的VL或VH的同系物和变体特征通常在于具有至少大约75%,例如至少大约80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的序列同一性,所述序列同一性在与目标氨基酸序列的全长比对上计数。当用这种方法进行评价时,与参考序列具有甚至更大相似性的蛋白质将显示增加的同源性百分比,如至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%、或至少99%的序列同一性。当小于整体序列针对序列同一性被比较时,同系物和变体在10-20个氨基酸的短的窗口上通常具有至少80%的序列同一性,并且基于它们与参考序列的相似性可具有至少85%或至少90%或95%的序列同一性。在这么短的窗口上测定序列同一性的方法可在网络上在NCBI网站上获得。本领域技术人员将理解,提供这些序列同一性范围仅用于指导;完全有可能获得超出所提供的范围的极重要的同系物。

[0200] 在某些实施方案中,本发明提供了抗体,其与本文所述的抗体的VH和VL氨基酸序列具有99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%的同一性,并且仍维持它们的表位结合幅度和/或效力。在某些实施方案中,本发明提供了抗体,其与本文所述的抗体的VH氨基酸序列的CDR1、2和/或3,和VL氨基酸序列的CDR1、2和/或3具有99%、98%、97%、96%、95%、94%、93%、92%、91%、90%、89%、88%、87%、86%、85%、84%、83%、82%、81%、80%的同一性,并且仍维持它们的表位结合幅度和/或效力。

[0201] 在另一个方面,本发明提供了含Fc的双特异性分子。在一些实施方案中,多肽之一或两者的第三结构域可另外包括CH2-CH3结构域的序列,以便双抗体多肽的复合形成能够结合至细胞(如B淋巴细胞、树突细胞、自然杀伤细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、嗜伊红细胞、嗜碱性粒细胞和肥大细胞)的Fc受体的Fc结构域(图8B-8C)。这类分子的许多变型已经被描述(见例如美国专利公开号2014-0099318;2013-0295121;2010-0174053和2009-0060910;欧洲专利公开号EP 2714079;EP 2601216;EP 2376109;EP 2158221和PCT公开号WO 2015/026894;WO 2015/026892;WO 2015/021089;WO 2014/159940;WO 2012/162068;WO

2012/018687;WO 2010/080538),这些出版物的每一个的内容通过引用以其整体并入本文。

[0202] 在一些实施方案中,这些含Fc的DARTs可包括三条多肽链。这类双抗体的第一多肽包含三个结构域:(i)包含VL1的结构域,(ii)包含VH2的结构域,(iii)促进异源二聚化和与该双抗体的第一多肽链共价结合的结构域和(iv)包含CH2-CH3序列的结构域。这类DARTTM的第二多肽包含:(i)包含VL2的结构域,(ii)包含VH1的结构域和(iii)促进异源二聚化和与该双抗体的第一多肽链共价结合的结构域。这类DARTTM的第三多肽包括CH2-CH3序列。因此,这类DARTTM的第一和第二多肽链缔合在一起,以形成能够结合至表位的VL1/VH1结合位点,以及能够结合至第二表位的VL2/VH2结合位点。第一和第二多肽通过涉及在它们各自的第三结构域中的半胱氨酸残基的二硫键彼此结合。尤其地,第一和第三多肽链彼此复合以形成通过二硫键稳定化的Fc结构域。这类双抗体具有增强的效力。这类含Fc的DARTsTM可具有两种取向之一(表1):

[0203]	第一取向	第三链	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
		第一链	NH ₂ -VL1-VH2-异源二聚体促进结构域-CH ₂ -CH ₃ -COOH
		第二链	NH ₂ -VL2-VH1-异源二聚体促进结构域-COOH
[0204]	第二取向	第三链	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -COOH
		第一链	NH ₂ -CH ₂ -CH ₃ -VL1-VH2-异源二聚体促进结构域-COOH
		第二链	NH ₂ -VL2-VH1-异源二聚体促进结构域-COOH

[0204] HIV x CD3双特异性单价Fc双抗体由三条多肽链构成,所述三条多肽链彼此缔合以形成对HIV的表位特异性的一个结合位点和对CD3的表位特异性的一个结合位点(见图8B-8C),以便能够同时结合至HIV和结合至CD3。因此,这类双抗体结合至“第一抗原”(可以为CD3或HIV)和“第二抗原”(当第一表位为CD3时,其为HIV,并且当第一表位为HIV时,其为CD3)。

[0205] 如图8B所显示,这样的三条多肽链中的第一条在N-末端至C-末端方向包含N-末端、“第一”抗原(CD3或HIV)的轻链可变结构域(VL)的抗原-结合结构域、第二抗原(若第一抗原为CD3,其为HIV;若第一抗原为HIV,其为CD3)的重链可变结构域(VH)的抗原-结合结构域、异源二聚化-促进结构域和C-末端。间插连接体肽(连接体1)将轻链可变结构域的抗原-结合结构域与重链可变结构域的抗原-结合结构域分开。在非限制性实施方案中,重链可变结构域的抗原-结合结构域通过间插连接体肽(连接体2)被连接至异源二聚化-促进结构域。在HIV x CD3双抗体单价Fc双抗体的情况下,异源二聚化-促进结构域的C-末端通过间插连接体肽(连接体3)或通过间插间隔体-连接体肽(间隔体-连接体3)被连接至Fc区域的CH₂-CH₃结构域(“Fc结构域”)。在非限制性实施方案中,该三条多肽链中的第一条在N-末端至C-末端方向因此包含:VL_{第一抗原}-连接体1-VH_{第二抗原}-连接体2-异源二聚化-促进结构域-间隔体-连接体3-Fc结构域。

[0206] 可选地,如图8C所显示,这样的三条多肽链中的第一条在N-末端至C-末端方向包含N-末端、连接体3、Fc区域的CH₂-CH₃结构域(“Fc结构域”)、具有例如氨基酸序列:APSSS

(SEQ ID NO:39)或氨基酸序列APSSSPME (SEQ ID NO:40)的间插间隔体肽(连接体4)、第一抗原(CD3或HIV)的轻链可变结构域(VL)的抗原-结合结构域、第二抗原(若第一抗原为CD3,其为HIV;若第一抗原为HIV,其为CD3)的重链可变结构域(VH)的抗原-结合结构域、异源二聚化-促进结构域和C-末端。间插连接体肽(连接体1)将轻链可变结构域的抗原-结合结构域与重链可变结构域的抗原-结合结构域分开。在非限制性实施方案中,重链可变结构域的抗原-结合结构域通过间插连接体肽(连接体2)被连接至异源二聚化-促进结构域。在非限制性实施方案中,该三条多肽链中的第一条在N-末端至C-末端方向因此包含:连接体3-Fc结构域-连接体4-VL_{第一抗原}-连接体1-VH_{第二抗原}-连接体2-异源二聚化-促进结构域。

[0207] 在非限制性实施方案中,这样的三条多肽链中的第二条在N-末端至C-末端方向包含N-末端、第二抗原的轻链可变结构域(VL)的抗原-结合结构域、第一抗原的重链可变结构域(VH)的抗原-结合结构域、异源二聚化-促进结构域和C-末端。间插连接体肽(连接体1)将轻链可变结构域的抗原-结合结构域与重链可变结构域的抗原-结合结构域分开。在非限制性实施方案中,重链可变结构域的抗原-结合结构域通过间插连接体肽(连接体2)被连接至异源二聚化-促进结构域。在非限制性实施方案中,该三条多肽链中的第二条在N-末端至C-末端方向因此包含:VL_{第二抗原}-连接体1-VH_{第一抗原}-连接体2-异源二聚化-促进结构域。

[0208] 在非限制性实施方案中,这样的三条多肽链中的第三条包含连接体肽(连接体3)和Fc区域的CH2-CH3结构域(“Fc结构域”)。

[0209] 本发明的双特异性分子考虑具有各种连接体的设计,以分开包括在多肽链中的不同的结构域。连接体的具体的非限制性实施方案公开在本文中。其他的连接体可被很容易地确定。连接体的另外的一些实施例公开在美国公开20100174053中,其通过引用以其整体并入。

[0210] 第一多肽链的轻链可变结构域的抗原-结合结构域与第二多肽链的重链可变结构域的抗原-结合结构域相互作用以形成对第一抗原(即HIV或CD3)特异性的功能性抗原-结合位点。同样地,第二多肽链的轻链可变结构域的抗原-结合结构域与第一多肽链的重链可变结构域的抗原-结合结构域相互作用以形成对第二抗原(即取决于第一抗原的身份,其为CD3或HIV)特异性的第二功能性抗原-结合位点。因此,第一和第二多肽链的轻链可变结构域的抗原-结合结构域和重链可变结构域的抗原-结合结构域的选择被协调,以便该两条多肽链总共包括能够结合至HIV和CD3的轻链和重链可变结构域的抗原-结合结构域。

[0211] 本发明的HIV x CD3双特异性单价Fc双抗体的Fc结构域可以是完整的Fc区域(如完整的IgG Fc区域)或仅是完整的Fc区域的片段。虽然本发明的双特异性单价Fc双抗体的Fc结构域可具有结合至一种或多种Fc受体(如Fc γ R(一种或多种))的能力,但是在非限制性实施方案中,这类Fc结构域将引起与Fc γ RIA(CD64)、Fc γ RIIA(CD32A)、Fc γ RIIB(CD32B)、Fc γ RIIIA(CD16a)或Fc γ RIIIB(CD16b)减少的结合(相对于野生型Fc区域表现的结合)或将基本上消除这类Fc结构域结合至这类受体(一种或多种)的能力。本发明的双特异性单价Fc双抗体的Fc结构域可包含完整的Fc区域的一些或所有的CH2结构域和/或一些或所有的CH3结构域,或可包括变异的CH2和/或变异的CH3序列(其可包含例如相对于完整的Fc区域的CH2或CH3结构域的一个或多个插入和/或一个或多个删除)。本发明的双特异性单价Fc双抗体的Fc结构域可包括非Fc多肽部分,或可包括非天然的完整的Fc区域的部分,或可包括非天然产生的取向的CH2和/或CH3结构域(如,例如两个CH2结构域或两个CH3结构

域,或在N-末端至C-末端方向,CH3结构域连接至CH2结构域等)。

[0212] 在非限制性实施方案中,本发明的HIV x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一和第三多肽链各自包括复合在一起以形成免疫球蛋白(IgG)Fc结构域的CH2-CH3结构域。人IgG1的CH2-CH3结构域的氨基酸序列是(SEQ ID NO:41):

APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

[0213] PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHNHYTQKS LSLSPGK

[0214] 因此第一和第三多肽链的CH2和/或CH3结构域可以都由SEQ ID NO:41或其变体构成。

[0215] 在非限制性实施方案中,本发明的HIV x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一和第三多肽链的CH2-CH3结构域展现出对Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a)或Fc γ RIIIB (CD16b)减少的(或基本上没有)结合(相对于野生型Fc区域(SEQ ID NO:41)表现的结合)。能够介导这种改变的结合的Fc变体和突变形式在本领域是已知的,其包含在位置234和235处的氨基酸取代、位置265处的取代或位置297处的取代(见例如美国专利号5,624,821,通过引用并入本文)。在非限制性实施方案中,本发明的HIV x CD3双特异性单价Fc双抗体的第一和/或第三多肽链的CH2-CH3结构域包含在位置234处通过丙氨酸的取代和235处通过丙氨酸的取代。

[0216] 第一和第三多肽链的CH2和/或CH3结构域不需要在序列上完全相同,且有利地被修饰以促进两条多肽链之间的复合。例如,氨基酸取代(例如以包括形成“杵”的大侧基的氨基酸例如色氨酸进行取代)可被引入至CH2或CH3结构域中,以便空间干扰阻止与类似的突变结构域的相互作用,并且迫使该突变结构域与其中互补或适应性的突变已被工程化的结构域(即“臼”(例如用甘氨酸取代))配对。这样的突变组可被工程化到构成双特异性单价Fc双抗体分子的任何多肽对中,并且进一步被工程化到所述多肽链对的任何部分中。蛋白质工程化以相对于同源二聚化利于异源二聚化的方法在本领域中是悉知的,尤其就工程化免疫球蛋白样分子而言,这些都包括在本文中(见例如Ridgway等(1996)“Knobs-Into-Holes Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization,” Protein Engr.9:617-621;Atwell等(1997)“Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library,” J.Mol.Biol.270:26-35;和Xie等(2005)“A New Format Of Bispecific Antibody:Highly Efficient Heterodimerization,Expression And Tumor Cell Lysis,” J.Immunol.Methods 296:95-101;其每一篇通过引用以其整体并入本文)。在非限制性实施方案中,“杵”被工程化到第一多肽链的CH2-CH3结构域中和“臼”被工程化到第三多肽链的CH2-CH3结构域中。因此,“杵”将帮助防止第一多肽链通过其CH2和/或CH3结构域而进行同源二聚(homodimerizing)。在非限制性实施方案中,由于第三多肽链包含“臼”取代,其将与第一多肽链异源二聚,并且与其自身同源二聚。在非限制性实施方案中,杵通过修饰天然的IgG Fc结构域而产生,以包含修饰T366W。在非限制性实施方案中,臼通过修饰天然的IgG Fc结构域而产生,以包含修饰T366S、L368A和Y407V。为了帮助从包括第一、第二和第三多肽

链的最终的双特异性单价Fc双抗体中纯化第三多肽链同源二聚体,第三多肽链的CH2和CH3结构域的蛋白A结合位点通过位置435处的氨基酸取代被突变(H435R)。因此,第三多肽链同源二聚体将不会结合至蛋白A,然而双特异性单价Fc双抗体将保持其通过第一多肽链上的蛋白A结合位点结合蛋白A的能力。

[0217] 在非限制性实施方案中,本发明的HIV x效应子(例如CD3)双特异性单价Fc双抗体的第一多肽链的CH2和CH3结构域的序列具有“含有杵的”序列(SEQ ID NO:42):

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

[0218] PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSL**WCL**VK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHN**H**YTQKS LSLSPGK

[0219] 在非限制性实施方案中,本发明的HIV x效应子(例如CD3)双特异性单价Fc双抗体的第三多肽链的CH2和CH3结构域的序列具有“含有白的”序列(SEQ ID NO:43):

APE**AA**GGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD
GVEVHNAKTK PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA

[0220] PIEKTISKAK GQPREPQVYT LPPSREEMTK NQVSL**SCA**VK GFYPSDIAVE
WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFL**V**SKL TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE
ALHN**R**YTQKS LSLSPGK

[0221] 要注意的是,SEQ ID NO:42和SEQ ID NO:43的CH2-CH3结构域包含位置234处通过丙氨酸的取代和位置235处通过丙氨酸的取代,因此形成对Fc γ RIA (CD64)、Fc γ RIIA (CD32A)、Fc γ RIIB (CD32B)、Fc γ RIIIA (CD16a)或Fc γ RIIIB (CD16b)展现减少的(或基本上没有)结合(相对于野生型Fc区域(SEQ ID NO:41)表现的结合)的Fc结构域。

[0222] 在非限制性实施方案中,第一多肽链具有“含有杵”的CH2-CH3序列,诸如SEQ ID NO:42的序列。但是,应该意识到,“含有白”的CH2-CH3结构域(例如SEQ ID NO:43)可被用于第一多肽链中,在这种情况下,“含有杵”的CH2-CH3结构域(例如SEQ ID NO:42)可被用于第三多肽链中。

[0223] 在非限制性实施方案中,Fc结构域可通过氨基酸取代而被修饰,以增加与新生儿Fc受体的结合,因此在向受试者施用增加抗体的半衰期。Fc结构域可以是IgA、IgM、IgD、IgE或IgG Fc结构域。Fc结构域可以是优化的Fc结构域,如美国专利申请号2010093979中所描述的,其通过引用并入本文。在某些实施方案中,抗体包括氨基酸改变或其组合,例如在表位结合之外的Fc区域中,所述改变可以改善它们的性质。各种Fc修饰在本领域是已知的。氨基酸编码根据Kabat的EU索引。在一些实施方案中,发明考虑包括影响新生儿Fc受体(FcRn)结合、抗体半衰期、和抗体在粘膜位点的定位以及持续的突变。关于各种Fc区域突变,见例如Ko SY等,Nature 514:642-45,2014,图1a和其引文;Kuo,T.和Averson,V.,mAbs 3(5):422-430,2011,表1;美国专利公开号20110081347(在Kabat残基288处的天冬氨酸和/或在Kabat残基435处的赖氨酸);美国专利公开号20150152183,其通过引用以其整体并入。

[0224] 在某些实施方案中,抗体包括在已经被报告通过NK细胞来提高ADCC的抗体的Fc区域中以及周围的AAAA取代(AAA突变),其包含S298A以及E333A和K334A的Fc区域氨基酸(Shields RI等JBC,276:6591-6604,2001)以及第四个A(N434A)是为了提高新生儿FcR介导

的IgG向粘膜位点的转运 (Shields RI等,同上)。其他抗体突变已经被报告改善抗体半衰期或功能或两者,其可被并入至抗体的序列中。这些包含DLE组的突变 (Romain G,等.Blood 124:3241,2014);LS突变M428L/N434S、单独地或与其他Fc区域突变组合 (Ko SY等.Nature 514:642-45,2014,图1a和其引文;Zlevsky等,Nature Biotechnology,28(2):157-159,2010;美国专利公开号20150152183);YTE Fc突变 (Robbie G等Antimicrobial Agents and Chemotherapy 12:6147-53,2013)以及其他对抗体的工程化突变诸如QL突变、IHH突变 (Ko SY等.Nature 514:642-45,2014,图1a和相关引文;还见Rudicell R等.J.Virol 88:12669-82,201)。在一些实施方案中,抗体可以包括修饰,例如但不限于糖基化,其减少或消除抗体的多应答性。见例如Chuang,等.Protein Science 24:1019-1030,2015。在一些实施方案中,抗体可以包括在Fc结构域的修饰以便Fc结构域相对于未修饰的Fc结构域展现增强的抗体依赖性细胞介导的细胞毒性 (ADCC);提高的对Fc. γ .RIIA或Fc. γ .RIIIA的结合;减少的对Fc. γ .RIIB的结合;或提高的对Fc. γ .RIIB的结合。见例如美国专利公开号20140328836。

[0225] 上述抗体及其片段可被配制为组合物(例如药物组合物)。合适的组合物可包括溶解在或分散在药学上可接受的载体(例如含水介质)中的介导ADCC的抗体(或抗体片段)。组合物可以是无菌的并且可以是注射形式(例如但不限于适于静脉内注射或肌肉注射的形式)。抗体(及其片段)也可被配制为适于向皮肤或粘膜局部施用的组合物。这类组合物可以采用液体、软膏、霜剂、凝胶和糊剂的形式。抗体(及其片段)也可被配制成适于鼻内施用的组合物。抗体(及其片段)可被配制以便作为交配后冲洗剂或与避孕套一起施用。标准的配制技术可用来制备合适的组合物。

[0226] 抗体(及其片段),例如本文所述的介导ADCC的抗体具有例如在包括但不限于以下情形(setting)中的效用:

[0227] i) 在预先的已知的暴露于HIV-1感染的情形中,本文所述的抗体(或其片段)可以作为杀微生物剂被预防性地(例如IV、局部地或鼻内)施用。

[0228] ii) 在已知或怀疑暴露的情形中,诸如发生在强奸受害者、或商业性工作者、或在没有避孕套保护的任何同性或异性传播中的情形中,本文所述的抗体(或其片段)可作为暴露后预防法(例如IV或局部地)被施用,和

[0229] iii) 在急性的HIV-1感染(AHI)的情形中,本文所述的抗体(或其片段)可作为用于AHI的治疗被施用,以控制初始病毒载量或用于消除病毒感染的CD4T细胞。

[0230] 根据本发明,本文所述的介导ADCC的抗体(或抗体片段)可在受试者或受试者的免疫系统/细胞与HIV-1接触之前或在这样的接触约48小时内被施用。在这个时间范围内施用可以最大化对受试者易受攻击的细胞受HIV-1感染的抑制。

[0231] 另外,本文所述的抗体的各种形式可被施用于长期或急性感染的HIV-1患者并且凭借这些抗体结合至病毒感染的细胞的表面并且能够向这些储库细胞递送毒素而用于杀死剩余的病毒感染的细胞。在某些实施方案中,本发明的抗体可与潜伏期激活剂组合施用,以便激活HIV感染的细胞的潜伏库。预期的是,通过激活静息细胞中潜伏的前病毒HIV DNA,一旦失活细胞开始产生新的病毒,它们将被免疫系统识别和消除。潜伏期激活剂的非限制性实施例为HDAC抑制剂,例如伏立诺他、罗咪酯肽、帕比司他、戒酒硫、JQ1、苔藓抑制素、PMA、离子霉素或其任何组合。见Bullen等.Nature Medicine 20,425-429(2014)。

[0232] 合适的剂量范围可取决于抗体(或片段)和取决于制剂的性质和给药的途径。最佳剂量可以通过本领域的技术人员来确定,无需过多的实验。例如,可以使用未标记的或(以毒素或放射性部分)标记的抗体的1-50mg/kg范围内的抗体剂量。如果具有或不具有毒素的片段被使用或可以靶向特定CD4感染的T细胞的抗体被使用,则可以使用较少的抗体(例如从5mg/kg至0.01mg/kg)。

[0233] 本发明的抗体及其片段可以使用包括编码选自在表中和实施例显示的那些VH和VL序列的核苷酸序列的核酸而被重组产生。

[0234] 在某些实施方案中,本发明提供了完整的/全抗体。在某些实施方案中,本发明提供了其抗原结合片段。通常地,片段与衍生其的完整抗体竞争与靶标的特异性结合,所述片段包括单独的重链、轻链Fab、Fab'、F(ab')₂、F(ab)₂、双抗体、Dabs、纳米抗体和Fv。片段可由重组DNA技术或由完整的免疫球蛋白的酶或化学分离产生。

[0235] 编码用于产生如本文所述的具有特异性的双特异性抗体的多肽的核酸序列可用于产生质粒,用于重组抗体的稳定表达。用于重组表达和纯化的方法在本领域是已知的。在Fc的某些实施方案中,质粒也包括本文所述的Fc部分的任何变化。在一些实施方案中,这些是在已经被报告通过NK细胞来提高ADCC的抗体的Fc区域中以及周围的AAAA取代(AAA突变),其包含S298A以及E333A和K334A的Fc区域氨基酸(Shields RI等JBC,276:6591-6604,2001)以及第四个A(N434A)是为了提高新生儿FcR介导的IgG向粘膜位点的转运(Shields RI等,同上)。

[0236] 在某些实施方案中,核酸被优化,用于在合适的宿主细胞中重组表达。在某些实施方案中,载体适于基因递送和表达。有许多表达系统可用于蛋白的表达,包括大肠埃希氏菌(E.coli)、其他细菌宿主、酵母菌和各种高等真核细胞诸如COS、CHO、HeLa和骨髓瘤细胞系。

[0237] 任何合适的细胞系可用于本发明的多肽的表达,包括但不限于CHO细胞、293T细胞。在一些方面,本发明提供了编码这些抗体的核酸、包含这些核酸的表达盒和载体,并且也提供了表达编码本发明的抗体的核酸的分离细胞。本发明的多肽可由用于多肽和/或抗体纯化的任何适合的方法纯化。

[0238] 在整个说明书中引用的各种出版物的内容通过引用以其整体并入。

实施例

[0239] 实施例1A:HIV-1x CD3或HIV-1x CD16双特异性分子和对照双特异性分子的构建

[0240] 表2包含被设计、表达和纯化的双特异性双抗体的列表。双特异性双抗体是异源二聚体或所述的氨基酸序列的异源三聚体。WO 2006/113665、WO 2008/157379、WO 2010/080538、WO 2012/018687、WO 2012/162068、WO 2012/162067、WO 2014/159940、WO 2015/021089、WO 2015/026892和WO 2015/026894提供了形成双特异性双抗体的方法。

[0241]

表 2					
双特异性分子		多肽链氨基酸序列		核酸编码序列	
HIV-1 x CD3 双特异性双抗体 (A32 x CD3)		SEQ NO:9	ID	SEQ NO:10	ID

表 2

双特异性分子	多肽链氨基酸序列		核酸编码序列	
(来自 A32 的可变结构域, 结合至 HIV-1 gp120)	SEQ NO:11	ID	SEQ NO:12	ID
HIV-1 x CD3 双特异性双抗体 (7B2 x CD3) (来自 7B2 的可变结构域, 结合至 HIV-1 gp41)	SEQ NO:13	ID	SEQ NO:14	ID
	SEQ NO:15	ID	SEQ NO:16	ID
HIV-1 x CD3 双特异性双抗体 (CH28 x CD3) (来自 CH28 的可变结构域, 结合至 HIV-1 gp)	SEQ NO:17	ID	SEQ NO:18	ID
	SEQ NO:19	ID	SEQ NO:20	ID
HIV-1 x CD3 双特异性双抗体 (CH44 x CD3) (来自 CH44 的可变结构域, 结合至 HIV-1 gp)	SEQ NO:21	ID	SEQ NO:22	ID
	SEQ NO:23	ID	SEQ NO:24	ID
HIV-1 x CD16 双特异性双抗体 (7B2 x CD16) (来自 7B2 的可变结构域, 结合至 HIV-1 gp41)	SEQ NO:25	ID	SEQ NO:26	ID
	SEQ NO:27	ID	SEQ NO:28	ID
荧光素 x CD3 双特异性双抗体 (4420 x CD3)	SEQ NO:29	ID		
	SEQ NO:30	ID		
荧光素 x CD16 双特异性双抗体 (4420 x CD16)	SEQ NO:31	ID		
	SEQ NO:32	ID		
HIV-1 x 荧光素 双特异性双抗体	SEQ NO:33	ID		

[0242]

表 2		
双特异性分子	多肽链氨基酸序列	核酸编码序列
(7B2 x 4420) (来自 7B2 的可变结构域, 结合至 HIV-1 gp41)	SEQ ID NO:34	
HIV-1 x 荧光素 双特异性双抗体 (A32 x 4420) (来自 A32 的可变结构域, 结合至 HIV-1 gp120)	SEQ ID NO:35 SEQ ID NO:36	
帕利珠单抗 x CD3 双特异性双抗体 (帕利珠单抗 x CD3)	SEQ ID NO:37 SEQ ID NO:38	
HIV-1 x CD16 双特异性双抗体 (A32 x CD16) (来自 A32 的可变结构域, 结合至 HIV-1 gp120)	SEQ ID NO: 44 SEQ ID NO: 45	
具有 Fc 结构域 V1 的 HIV-1 x CD3 双特异性双抗体 (7B2 x CD3) (来自 7B2 的可变结构域, 结合至 HIV-1 gp41)	SEQ ID NO: 46 SEQ ID NO: 47 SEQ ID NO: 48	

[0244] HIV-1x CD3双特异性双抗体能够同时结合至HIV-1和CD3。HIV-1x CD16双特异性双抗体能够同时结合至HIV-1和CD16。对照双特异性双抗体(4420x CD3)能够同时结合至FITC和CD3。对照双特异性双抗体(4420x CD16)能够同时结合至FITC和CD16。对照双特异性双抗体(7B2x 4420)能够同时结合至HIV-1和FITC。对照双特异性双抗体(A32x 4420)能够同时结合至HIV-1和FITC。对照双特异性双抗体(帕利珠单抗x CD3)能够同时结合至RSV和CD3。

[0245] 表3显示了双特异性分子的一些实施方案的概述。说明书中的信息可容易地用于所列出的双特异性分子的替代设计,并且用于利用来自这些抗体的CDRs或VH和VL链设计其他双特异性分子,例如7B2、CH27、Ch28、CH44。

[0246]

HIVXCD3		HIVXCD3 Fc V1		HIVXCD3 FcV2	
一个实施方案	A32xCD3 一个实施方案 SEQ ID Nos: 9 和 11 一起	一个实施方案	A32xCD3 Fc V1	一个实施方案	A32xCD3 Fc V2
多肽链 1	SEQ ID NO:9 是一个实施方案	多肽链 1		多肽链 1	
NH2-VL (HIV)	SEQ ID NO:78(图 6) -	NH2-VL (HIV)	SEQ ID NO:78	NH2- 连接 体 3	SEQ ID NO:49
连接体 1	SEQ ID NO: 1	连接体 1	SEQ ID NO: 1	CH2-CH3	SEQ ID NO: 42 (含杆的) 或 SEQ ID NO: 43 (含白的)
VH(CD3)	SEQ ID NO: 51	VH(CD3)	SEQ ID NO: 51	连接体 4	SEQ ID NO:39、40
连接体 2	SEQ ID NO: 2	连接体 2	SEQ ID NO: 2	VL(HIV)	SEQ ID NO:78
异源二聚 体促进结 构域 K 螺旋或 E 螺旋	SEQ ID Nos: 3-6 SEQ ID Nos: 7 或 8	异源二聚 体促进结 构域 K 螺旋或 E 螺旋	SEQ ID Nos: 3-6 SEQ ID Nos: 7 或 8	连接体 1	SEQ ID NO: 1
		连接体 3 或 间隔体连 接体 3	SEQ ID NO:49 SEQ ID NO:50	VH (CD3)	SEQ ID NO:51
		CH2-CH3	SEQ ID NO: 42	连接体 2	SEQ ID NO: 2

[0247]

HIVXCD3		HIVXCD3 Fc V1		HIVXCD3 FcV2	
			(含杆的) 或 SEQ ID NO: 43 (含白的)		
				异源二聚体促进结构域 K 螺旋或 E 螺旋	SEQ ID Nos: 3-6 SEQ ID Nos: 7 或 8
多肽链 2	SEQ ID NO: 11 是一个实施方案	多肽链 2		多肽链 2	
NH2-VL (CD3)	SEQ ID NO: 52	NH2-VL (CD3)	SEQ ID NO: 52	NH2-VL (CD3)	SEQ ID NO: 52
连接体 1	SEQ ID NO: 1	连接体 1	SEQ ID NO: 1	连接体 1	SEQ ID NO: 1
VH(HIV1)	SEQ ID NO: 77 (图 6)	VH(HIV1)	SEQ ID NO:77	VH(HIV)	SEQ ID NO:77
连接体 2	SEQ ID NO: 2	连接体 2	SEQ ID NO: 2	连接体 2	SEQ ID NO: 2
异源二聚体促进结构域 K 螺旋或 E 螺旋	SEQ ID Nos: 3-6 SEQ ID Nos: 7 或 8	异源二聚体促进结构域 K 螺旋或 E 螺旋	SEQ ID Nos: 3-6 SEQ ID Nos: 7 或 8	异源二聚体促进结构域 K 螺旋或 E 螺旋	SEQ ID Nos: 3-6 SEQ ID Nos: 7 或 8
多肽链 3	无	多肽链 3		多肽链 3	
		NH2- 连接体 3	SEQ ID NO:49	NH2- 连接体 3	SEQ ID NO: 49
		CH2-CH3	SEQ ID NO: 42 (含杆的) 或 SEQ ID NO: 43 (含白的)	CH2-CH3	SEQ ID NO: 42 (含杆的) 或 SEQ ID NO: 43 (含白的)

[0248] 实施例1C:具有ADCC活性的HIV-1抗体

[0249] 单克隆抗体。5种mAbs代表针对HIV-1env gp120恒定区域1 (C1;n=1)、CD4结合位点(CD4bs;n=3)、和gp41簇1的那些[Pollara J.Curr.HIV Res.2013;11(8):378-3870]。所有的mAbs在表1中列出。除了mAbs之外,所有的都是用Fc区域的序列生成的,所述Fc区域的

序列包括根据Shields等人的氨基酸取代,以优化与Fc γ -受体(Fc γ -R) IIIa的结合 [Shields RL J Biol Chem 2001;276(9):6591-6604]。

[0250] A32mAb识别在HIV-1Env gp120的C1区域中的构象表位(Wyatt等,J.Virol.69:5723-5733(1995)),可以介导有效的ADCC活性,并且可以阻断在HIV-1感染的个体中可检测到的显著比例的介导ADCC的Ab活性(Ferrari等,J.Virol.85:7029-7036(2011))。

[0251] CH28或CH44为HIV-1CD4bs中和抗体。

[0252] 表4. 针对ADCC测试的mAbs列表

		gp120		gp41
		C1	CD4bs	簇 I
[0253]	A32		CH27 CH28 CH44	7B2
所有的 mAbs 以 3A 形式产生, 以优化与 Fc γ -受体 IIIa 的结合, 除了由符号(*)标识的那些。				

[0254] 感染性分子克隆(IMC)。根据通过A3R5细胞系的测试,HIV-1 IMCs代表22种分离株,代表对中和具有不同程度的敏感性的那些。表5报告了IMCs的列表。

[0255] 表5. 用于产生感染的靶细胞的HIV-1亚型的IMC列表。

		A	AE	B	C
[0256]	Q23.17		C1080.C03 427299	SF162 BaL	MW96.5 CAP45
[0257]			92TH023 CM235 CM244 816763	CH058 CH040 SUMA WITO YU2	245-F3-C10 TV-1 CH0505 DU151 DU422 1086.c

[0258] 如前所述,所有IMCs都是在来源于NHL4-3分离株的骨架上生成的 [Edmonds TG.Virology.2010;408(1):1-13;Adachi A.J Virol.1986;59(2):284-291],但是对于亚型AE 92TH023,其是使用来自40021AE HIV-1分离株的骨架生成的。所有IMCs都表达海肾属(Renilla) 萤光素酶报告基因,并保留所有9个病毒开放阅读框。海肾属萤光素酶报告基因在HIV-1Tat基因的控制下表达。在HIV-1感染CD4+T细胞时,在HIV-1复制过程中Tat的表达将诱导萤光素酶的表达,并且可以通过测量相对发光单位容易地量化感染的细胞。

[0259] 抗体依赖性细胞的细胞毒性(ADCC) 试验。根据我们以前发表的方法,使用基于萤光素酶的平台作为由mAbs介导的细胞毒性的读出,进行测定 [Pollara J.J Virol.2014;88

(14):7715-7726]。效应细胞群体全部来源于在Fc γ -R IIIa的位置158处具有氨基酸的表征的杂合表型F/V的单个供体。在每个试验中效应子与靶标比例为30:1。在每个试验中,来自HIV-1感染的个体(A300)的血浆和帕利珠单抗(抗-RSV)mAb用作阳性和阴性对照。针对每个IMC一起测试所有mAbs。特异性杀伤百分比(%SK)如先前报告的那样计算。如果%SK>20%,则结果被认为是阳性的。

[0260] 介导ADCC的mAbs的效力和幅度。针对表2中列出的22种IMCs中的每一种,对表1中列出的每种mAbs单独地测试。结果已被评估,以不依赖于活性被观察时的浓度鉴定作为%SK的最大ADCC活性。基于识别的env gp120和gp41区域对mAbs进行分组。每种mAb的阳性应答的平均值报告在图1中。mAbs的量级和幅度总结在表3中。针对gp120C1和gp41簇1的非中和Abs通过分别识别21种(95%)和20种(91%)HIV-1分离株提供了最宽的ADCC谱。特异性杀伤的平均%(%SK)对于C1mAbs为37%,对于gp41簇I mAb为34%。A32和7B2的最大%SK的平均值分别为45和42。累积地,CH44mAb识别<60%的分离株,所述分离株经测试具有21至60%SK之间的活性范围。

[0261] 表6. 介导ADCC的mAbs的量级和幅度

	A32	7B2	CH27	CH28	CH44
平均值	45	42	31	36	13
最大%SK					
[0262] 范围	23-86	21-74	21-53	23-48	21-60
# IMCs	21	20	8	7	14
识别的(%)	(95%)	(91%)	(36%)	(31%)	(59%)

[0263] 实施例2:通过双亲和力和重靶向(DART)分子A32/CD3和7B2/CD3的细胞杀伤

[0264] 设计和表达双亲和力和重靶向分子A32/CD3(SEQ ID NOs:9和11)和7B2/CD3(SEQ ID NO:13和15)。这些分子包含基于抗-HIV-1单克隆抗体(mAbs)的Fab生成的HIV-1结合臂(具有结合至层(tier)2传播/奠基者(T/F)病毒感染的CD4T细胞的表面的性质的mAbs(即A32或7B2)) [Ferrari G, J Virol. 2011;85(14):7029-7036; Pollara J. Curr. HIV Res. 2013;11(8):378-3870], 和效应细胞结合臂,其可以结合CD3(α CD3 ϵ 臂)受体或CD16(α CD16h3G8臂)受体。用不相关的结合臂[α 荧光素(4420)或 α RSV]代替HIV-1或效应臂的适当的阴性对照已经被开发出。本实施例中示出的结果来自使用CD3-DARTs的实验。

[0265] 基于荧光素酶的细胞毒性试验。我们优化了一种量化通过DARTs招募的细胞毒性CD8T细胞对HIV-1感染的细胞的消除的方法,该方法基于作为最终读出的荧光素酶活性的检测,如以前报告的 [Pollara J. J Virol. 2014;88(14):7715-7726]。使用抗人CD3(克隆OKT3;eBioscience)/抗人CD28(克隆CD28.2;BD Pharmingen)将来自正常健康HIV-1血清反应阴性供体的冷冻保存的静息PBMC激活72小时。随后,使用磁珠获得CD4+富集的细胞群,在存在代表HIV-1亚型AE(CM235)、B(BaL)和C(1086.c)的IMC的情况下离心接种(spinoculated),并培养72小时。然后将CD4+感染的靶细胞与静息CD8+效应细胞一起以33:1、11:1、3:1和0:1效应子与靶标比例涂覆。将DARTs(4420xCD3、7B2xCD3或A32xCD3)以0.001至1000ng/ml范围的浓度加入到组合的细胞中,并孵育6、24和48小时时间点。没有DARTs的组合的效应子和靶细胞、未感染的细胞和靶细胞单独地被包含在每个板上,用于对照条件。

在每次孵育时间结束时,将Viviren底物加入每个孔中,并在光度计上分析孔以通过荧光素酶读出来测量RLU值。在目的细胞毒性细胞存在的情况下,使用适当的已公开的公式评估对感染的靶细胞的消除[Pollara J.J Virol.2014;88(14):7715-7726]。结果报告为%SK,如针对ADCC试验所述。

[0266] 抗HIV-1 DART介导的细胞毒性活性。基于上述结果,产生了两种DARTs,其抗-HIV-1臂是A32和7B2Fab区域,效应细胞结合臂是 α CD3 ϵ 臂。我们研究了这两种DART分子识别和介导感染的CD4+T细胞的杀伤的能力。从HIV-1血清反应阴性供体获得的白细胞去除法样品在体外被感染,以生成如材料和方法部分所述的靶细胞,使用我们先前描述的基于ADCC荧光素酶的试验来检测DART的细胞毒性的影响。我们测试了两种CD3-DART分子(7B2xCD3和A32xCD3)针对亚型B BaL、AE CM235和C 1086.c HIV-1 IMC感染的自体CD4+T细胞重定向静息CD8+T细胞的细胞毒性的能力。以效应子-与-靶标比例为33:1、11:1和3:1孵育效应子和靶细胞后6、24和48小时,我们评估了DART介导的细胞毒性。尽管6小时孵育后已经观察到细胞毒性活性,但使用针对每种HIV-1 IMC的33:1E:T比例,在48小时时检测到峰值细胞毒性活性(>70%SK)(图2)。两种HIV-1 DARTs的活性总是大于使用4420xCD3对照DART观察到的背景最大杀伤。还观察到两种DARTs针对每种HIV-1 IMC感染的靶细胞群体的剂量依赖效力,其也以每种E:T比例的水平体现,如对于BaL IMC所示(图3)。

[0267] 还分析了两种DARTs的效力差异,作为以E:T为33:1在48小时时检测到50%的特异性杀伤(杀伤浓度₅₀或KC₅₀)的DART浓度。针对每种HIV-1 IMC,A32xCD3 DART KC₅₀总是比7B2xCD3 DART KC₅₀低约一个对数(图4)。

[0268] 这些结果表明,DARTs可以有效地招募CD8+T细胞并引导其针对HIV-1感染的细胞的细胞毒性活性。

[0269] 实施例3:A32/CD16和7B2/CD16 DARTs

[0270] 如实施例6所述使用基于荧光素酶细胞毒性试验和CD4+感染的靶细胞以及静息效应细胞分析双亲和力重靶向分子A32/CD16(SEQ ID NO:44和45)和7B2/CD16(SEQ ID NO:25和27,见表2)。对于CD16-DART试验,效应细胞是CD16+细胞,其可以通过从全PBMC中除去CD3+CD20+细胞来纯化。

[0271] 实施例2中描述的基于荧光素酶的杀伤试验将用于检查和比较CD16-DART增强的对生产性感染的清除的效力和动力学,如先前针对CD3-DARTs提议的。该过程是相同的,但效应细胞的阴性选择将提供富集的CD16+细胞群。

[0272] 实施例4:CH28和CH44 DARTs

[0273] 制备了具有HIV-1臂(其CH28或CH44的结合特异性)和靶向CD3或CD16的效应细胞臂的DART分子,并在基于荧光素酶的杀伤试验中测试,基本上如在实施例2和3中所述。CH28或CH44是HIV-1 CD4 bs中和抗体。见美国临时申请号:2013年9月27日提交的61/883,220和相应的PCT申请。CH28/CD3包含SEQ ID NO:19和19。CH44/CD3包含SEQ ID NO:21和23。

[0274] 实施例5:CD13-和CD16-DARTs的组合

[0275] 基于荧光素酶的杀伤试验将用于测试组合制剂中的CD13-和CD16-DART是否提供增强的益处。对于每种DART组合,我们将使用表达3种不同的Fc γ -R IIIa(CD16)表型的细胞和已建立的IMCs的组(panel)来测试DARTs同时招募CD3+和CD16+效应细胞的能力。使用从HIV-1血清反应阴性供体获得的白细胞去除法样品进行这些评价。

[0276] 本文引用的所有文档及其他信息源通过引用以其整体并入本文。

[0277] 实施例6:双亲和力重靶向(DART)蛋白引导对潜伏性HIV感染的细胞的T细胞介导的细胞裂解

[0278] 可能需要HIV特异性免疫的增强,以消除潜伏性HIV感染。为此目的,已经开发了一种新颖的免疫治疗方式,双亲和力重靶向(DART)蛋白,其是基于双特异性抗体的分子,可以同时结合两个不同的细胞表面分子。本文所述的是HIV_xCD3 DARTs,其被设计有单价HIV-1包膜(Env)结合臂,所述单价HIV-1包膜(Env)结合臂来源于已知结合至HIV-感染的靶细胞的结合广泛、介导ADCC的抗体,与被设计来接合溶细胞的效应T细胞的单价CD3结合臂连接。因此,DART重定向多克隆T细胞,以特异性接合并杀伤表达Env的细胞,包括受不同HIV-1亚型感染的CD4⁺T细胞,从而避免对HIV特异性免疫的要求。使用来自进行抑制性抗逆转录病毒治疗(ART)的患者的淋巴细胞,DARTs介导被HIV-1菌株JR-CSF超感染或被分离自HIV-感染的患者静息CD4⁺T细胞的自体储库病毒感染的CD4⁺T细胞的体外CD8⁺T细胞清除。重要的是,在诱导潜伏性病毒表达后,DART还介导来自静息CD4⁺T细胞培养物的HIV的CD8⁺T细胞清除。联合HIV潜伏期逆转剂,HIV_xCD3 DARTs有可能成为有效的免疫治疗剂来清除HIV感染的个体中的潜伏性HIV-1储库。

[0279] 通过以下过程表明抗逆转录病毒治疗(ART)无法根除HIV:首先通过证明静息CD4⁺T细胞的潜伏性感染(1),然后通过从接收有效ART的患者的静息CD4⁺记忆T细胞中恢复稀有的、整合的、能复制的HIV(2-4)。目前的ART无法根除HIV感染,因为这些长寿的CD4⁺T细胞仍然持续性地被感染并且不被免疫系统识别,其中HIV基因或蛋白质的表达最少(1,5,6)。休眠的HIV感染的持续性(主要在中央记忆T细胞内)是根除HIV感染的主要障碍(2-4,7-9)。

[0280] 通过非常低水平的可检测病毒RNA(10,11),病毒持续性也出现在相当大比例的治疗患者中,所述可检测病毒RNA代表病毒颗粒的表达,而没有有效轮次的新复制,并且似乎不会导致耐药性或治疗失败(12,13)。然而,持续的病毒血症说明免疫应答无法识别和清除HIV-1感染的细胞。

[0281] 长期感染的个体通常在撤销ART时具有快速的病毒反弹(14-16)。这一观察结果表明,除非受进一步干预的支持,否则患者中的免疫系统不能控制病毒血症。在CD4⁺和CD8⁺细胞免疫应答保持相对保护(preserved)的情况下,治疗性免疫(即使在启动ART的个体中)迄今为止还没有成功地诱导在没有ART的情况下可以限制病毒血症的增强的抗HIV免疫力(17)。因此,消除HIV感染细胞的潜伏库(尽管存在ART)以及在大部分患者发现的作为低水平的病毒血症的源的未知细胞(尽管存在ART),需要新的创新策略。一个初步的步骤(在潜伏感染的细胞中潜伏期的中断和病毒抗原表达的诱导)被集中研究(18,19)。然而,随着在开发潜伏期逆转剂(LRAs)中取得早期进展,也必须寻求清除持续感染能力的改善。

[0282] 潜伏感染的细胞是非常稀有的,并且即使相比每10⁶个静息中央记忆CD4⁺细胞约1个感染细胞的通常估计值潜伏库多达60倍(20),但当前的LRAs可能仅在该群体的一小部分中诱导前病毒转录,并且所呈递的病毒抗原的数量可能较低(21,22)。因此,可能需要一种新颖而有力的免疫应答来检测和清除产生低水平病毒血症的细胞,以及被诱导离开潜伏状态的休眠的感染细胞两者。

[0283] 在潜伏性HIV的再活化之后,病毒抗原呈现在细胞的表面上,因此可以被抗体或衍生抗体的分子靶向。由免疫毒素(由与毒素效应结构域连接的靶向结构域(诸如抗体或配

体)组成的双功能嵌合蛋白)提供这种方法的概念的证据(23)。尽管在HIV感染的个体中使用免疫毒素的初步临床试验未能对免疫学或临床标记物持续产生影响(24),但据报告,免疫毒素3B3-PE38(25)在BLT人源化小鼠模型中减少持续存在的HIV感染的细胞的水平,尽管存在ART(26)。

[0284] 已经报告了几种单克隆抗体(mAbs)能够识别HIV-1感染的细胞并且接合携带Fc- γ 受体的细胞,以介导抗体依赖性细胞细胞毒性(ADCC)(27),诸如A32和7B2、分别结合gp120(28)和gp41(29,30)中保守残基的非-中和mAb。基于这些性质,生成了两种双亲合力重靶向(DART)蛋白(31,32),其中来源于A32和7B2mAbs的HIV包膜靶向臂与来源于hXR32(一种人源化的抗-CD3 ϵ mAb)的CD3效应臂组合,以产生两种HIVxCD3 DARTs(A32xCD3和7B2xCD3)(图10)。

[0285] 已经表征并开发了主要用于肿瘤学的(31-34)、将T细胞与表达抗原的靶细胞共接合的双特异性分子,如DARTs和双特异性T细胞接合蛋白(BiTEs)。它们依赖于两种结合臂的接合,以主要组织相容性复合体(MHC)独立的方式,激活并重定向多克隆T细胞针对表达抗原的靶细胞的溶细胞活性(31-34)。在相比通常用于mAbs的剂量(33,34)低许多倍的剂量,这类双特异性分子在体内是有效的,并且已证明其是临床有效和有用的,具有可接受的安全性,如通过批准利妥木单抗(blinatumumab)(一种CD19xCD3BiTE)用于治疗复发性或难治性前体B急性成淋巴细胞白血病(ALL)所证明的(35,36)。DARTs在其C-末端具有链间二硫键并且结构紧凑,使得它们非常适合于在靶和效应细胞之间形成稳定的细胞-与-细胞联系,在并排比较中展现出比BiTEs更大的效力(32,37)。

[0286] 本文公开的是HIVxCD3 DART使CD8⁺T细胞针对HIV-1感染的CD4⁺细胞重定向的能力,所述HIV-1感染的CD4⁺细胞包括被真正的潜伏性病毒分离株感染的那些细胞,所述真正的潜伏性病毒分离株在被设计来模拟潜在的临床HIV根除策略的模型系统中从HIV感染的患者的细胞中出现。HIVxCD3 DARTs识别感染细胞上的保守的HIV-1抗原并同时接合多克隆效应T细胞膜上的受体的能力,将战胜激活预先存在的HIV特异性细胞毒性效应细胞的需要(38),从而克服妨碍有效消除感染的CD4⁺T细胞储库的重大障碍。

[0287] DARTs的HIV臂选择。A32mAb与gp120C1/C2中的CD4可诱导的构象表位结合(在表位簇A内)(28,39-41),并且,7B2mAb与gp41簇I中的线性表位结合(29,30,42)。测试这两种mAbs针对亚型A、AE、B和C的22种代表性HIV-1感染性分子克隆(IMCs)的组介导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的能力(图18)。A32mAb识别了21种(95%)HIV-1分离株,平均特异性裂解百分比(%SL)为43.69%(范围12-86%;图23)。7B2mAb识别了20种(91%)HIV-1分离株,平均%SL为39.58%(范围为15-74%;图23)。除了拥有介导ADCC的幅度和效率——指示HIV感染的细胞表面的表位可及性——之外,HIVxCD3 DARTs——A32和7B2mAbs——的必要性质是用于DART的Env结合结构域的有吸引力的源,因为影响这些mAbs的结合的Env中的残基在所有HIV-1亚型中是高度保守的(图24)。基于这些性质,生成了两种HIVxCD3 DARTs,其中来源于A32和7B2mAbs的HIV靶向臂与来源于人源化抗-CD3 ϵ mAb的hXR32的CD3效应臂组合(图10A-10C)。这些HIVxCD3 DARTs被命名为A32xCD3和7B2xCD3。也生成了对照DARTs,其来源于抗-FITC抗体(4420)或来源于帕利珠单抗(一种呼吸道合胞病毒(RSV)融合蛋白抗体的抗体)的不相关的臂代替HIV臂(4420xCD3、RSVxCD3)或CD3臂(A32x4420、7B2x4420)。也生成了对照DARTs,其来源于抗-FITC抗体(4420)或来源于帕利珠单抗(一种呼吸道合胞

病毒 (RSV) 融合蛋白抗体的抗体) 的不相关的臂代替 HIV 臂 (4420xCD3 和 RSVxCD3) 或 CD3 臂 (A32x4420 和 7B2x4420)。

[0288] HIV DART 结合性质。A32xCD3 和 7B2xCD3 各自 (单独地和同时地) 表现出与重组人 CD3 和 HIV-1Env 蛋白的结合, 如 ELISA 所示 (图 11A-11C)。虽然两种 DARTs 与 CD3 蛋白的结合相似, 但是对于 7B2xCD3, 与 JR-FL gp140CF 的结合的量级比 A32xCD3 与 JR-FLgp140CF 的结合的量级更大, 这可能是由于构象 A32 表位是 CD4 高度依赖性的 (41-44)。基于表面等离子体共振 (SPR), A32xCD3 和 7B2xCD3 的 CD3 臂结合的平衡解离常数 (K_D) 分别为 3.6 和 6.1 nM, 并且对于使用 M.ConS gp140CFI 的 A32xCD3 以及使用 JR-FL gp140CF 的 7B2xCD3, HIV 臂结合的 K_D 分别为 47.7 nM 和 15.1 nM (图 19)。由于与 JR-FL gp140CF 结合的 A32xCD3 效率低下, 并且与 M.ConSgp140CFI 结合的 7B2xCD3 由于缺乏 gp41 簇 I 序列而被排除, 因此不同的 Env 蛋白在 SPR 研究中用于这两种 DARTs。

[0289] HIVxCD3 DARTs 以特异性结合其细胞表面抗原。具有 CD3 效应臂的 DARTs (A32xCD3、7B2xCD3、4420xCD3) 以相似的效率结合人 CD3⁺T 细胞, 而 CD3 臂被不相关的臂取代 (A32x4420、7B2x4420) 或具有两个不相关的臂 (4420x4420) 的 DARTs 不结合 (图 11D)。HIVxCD3 DARTs (A32xCD3、7B2xCD3) 有效结合表达亚型 AE CM244Env 的 HEK293-D371 细胞 (图 11E), 并通过 A32x4420 和 7B2x4420 对照 DARTs 观察到相似的结合活性 (图 25)。如预期的, 4420xCD3 对照 DART 不与这些细胞结合 (图 11E)。A32xCD3 和 7B2xCD3 结合 Jurkat-522F/Y 细胞, 所述 Jurkat-522F/Y 细胞表达 CD3 和亚型 BHXbc2Env (45), 并且如通过 4420xCD3、A32xCD3 和 7B2xCD3 结合的等同物 (equivalence) 所显示的, 经 CD3 臂的结合占主导地位。当 CD3 臂被不相关的 4420 臂取代以消除 CD3 结合时, 用 A32x4420 而不是用 7B2x4420 检测到与细胞表面 Env 的低水平结合 (图 11F)。

[0290] HIVxCD3 DART 对表达 Env 的细胞系的重定向 T-细胞杀伤以及伴随的 T-细胞活化。Jurkat 522-F/Y 是表达 Env 并作为 HIV 感染的 CD4⁺T 细胞的模型的人 CD4⁺ 细胞系, 并且, Jurkat-ΔKS 是相同的对照细胞系, 除了在 Env 基因中妨碍其表达的删除/移码突变 (45)。这些细胞系用于评估 HIVxCD3 DARTs 介导对 Env⁺ 靶细胞的重定向 T 细胞杀伤的能力。通过用标准试验测量乳酸脱氢酶 (LDH) 释放来测定靶细胞裂解, 并通过发光 (LUM) 试验确认结果。如通过 LDH 释放试验测量的, A32xCD3 和 7B2xCD3 重定向来源于健康供体的人 T 细胞, 从而以浓度依赖性方式, 以 10:1 的 E:T 比, 杀伤 Jurkat-522F/Y 细胞, 并且这两种 HIVxDARTs 在以 50% 有效浓度 (EC_{50}) 为 160-230 pg/mL 孵育 48 小时后, 表现相似的效力 (图 12A)。通过对照 DARTs (4420xCD3、A32x4420、7B2x4420), 其中 HIV 臂或 CD3 臂被不相关的臂取代, 没有发生 DART 介导的对 Jurkat-522F/Y 细胞的重定向 T 细胞杀伤 (图 12A)。当没有效应 T 细胞时 (图 12B) 或当靶细胞缺乏 Env 表达时 (图 12C), A32xCD3 和 7B2xCD3 DARTs 不介导靶细胞杀伤。这些数据表明为了 HIVxCD3 DART 介导的细胞溶解活性而对于表达 Env 的靶细胞及其与表达 CD3 的效应细胞的共接合的严格要求。

[0291] 如通过 LUM 试验测量的, A32xCD3 和 7B2xCD3 对于 Jurkat522-F/Y GF 细胞的重定向 T 细胞杀伤以 EC_{50} 值为 140-170 pg/mL 显示相似的效力 (图 12D), 这与通过 LDH 释放试验测量的那些接近, 表明两种不同试验方式的一致性。此外, 以 LUM 试验的灵敏度和特异性, Env⁺ 靶细胞的 DART 依赖性消除几乎是完全的 (>98%), 而 4420xCD3 对照 DART 不介导细胞毒性 (图 12D)。HIVxCD3 DART 重定向的 T 细胞杀伤活性是时间依赖性和 E:T 比依赖性的。用 7B2xCD3,

在10:1和5:1的E:T比,48小时时达到几乎完全的细胞裂解,而在E:T比为1:1时,高水平细胞裂解(>80%)延迟到72小时(12E-12H),表明时间是在较低E:T细胞比时有效消除靶细胞的限制因素。

[0292] 伴随着重定向的T细胞杀伤活性,HIVxCD3 DARTs在Env⁺靶细胞的存在下诱导T细胞活化(通过活化标记物CD25的上调测量),其中在CD8⁺T细胞中CD25上调的程度高于在CD4⁺T细胞中的上调程度(图26A-26D)。总体数据表明,A32xCD3和7B2xCD3有效地激活并重定向T细胞(尤其是CD8⁺T细胞)以特异性杀伤表达Env的靶细胞。此外,杀伤数据证实,即使通过FACS分析对Env结合的检测是微不足道的,但两种DARTs都能识别和结合CD4⁺细胞系表面上的Env抗原(图13F)。

[0293] HIVxCD3 DARTs结合HIV感染的CD4⁺T细胞的表面,并使用来自HIV-1血清反应阴性供体的淋巴细胞重定向CD8⁺T细胞以杀伤HIV-1感染的CD4⁺细胞。评估A32x4420和7B2x4420 DARTs结合和重定向对HIV-1感染性分子克隆(代表亚型AE CM235,亚型B BaL和亚型C 1086.C HIV-1分离株)感染的CD4⁺T细胞的杀伤的能力。用荧光素酶报告基因工程化每个IMC,以定量测量感染的靶细胞的细胞裂解。为了评价与受感染的细胞表面Env的结合,将A32x4420和7B2x4420 DARTs(其缺少CD3效应臂)与亲本A32和7B2mAbs进行比较。观察到两种HIVxCD3 DARTs对p24⁺(感染的)CD4⁺T细胞相似的染色(不依赖于用于感染的HIV-1 IMC)(图27)。有趣的是,通过A32x4420 DART的染色接近地重现通过A32mAbs的染色;相比之下,7B2x4420 DART识别>66%的HIV-1感染的细胞(范围66-78%),而7B2mAb识别>24%(范围24-38),表明DART与mAb相比具有对簇I gb41表位更好的可及性(图27)。用作对照的二次缀合的Abs和帕利珠单抗mAb识别小于<5%的HIV-1感染的CD4⁺T细胞。

[0294] 随后研究了A32xCD3和7B2xCD3针对用三种HIV-1 IMCs感染的自体CD4⁺T细胞重定向来自HIV-1血清反应阴性供体的CD8⁺T细胞的能力。两种HIVxCD3 DARTs以浓度依赖性方式重定向自体CD8⁺T效应细胞以杀伤亚型B BaL(图13A)、亚型AE CM235(图13B)和亚型C 1086.C(图13C) IMC感染的CD4⁺靶细胞,而对照DART(4420xCD3)是无活性的。在用IMC感染的CD4⁺细胞的这些研究中,与7B2xCD3(EC₅₀ ~ 10ng/mL)相比,A32xCD3(EC₅₀ ≤ 1ng/mL)表现更强的效力,这与在用Env⁺细胞系的研究中观察到的相似效力形成对比(图12A-12C)。DART介导的对IMC感染的CD4⁺T细胞的杀伤依赖于CD8⁺效应细胞的存在,并且在它们不存在时没有观察到细胞溶解活性(图13A-13C)。在时间过程研究中,在6小时时,DART依赖性细胞溶解活性是明显的,48小时时具有最大活性(>70%细胞裂解)(图13D-13F)。

[0295] 为了获得对由DARTs招募的效应T细胞杀伤HIV-1感染的靶细胞的频率的理解,评价了在用于检测细胞溶解活性的相同条件下与自体HIV-1BaL IMC感染的CD4⁺细胞共孵育时,DARTs诱导从5个HIV-1血清反应阴性供体获得的CD8⁺T细胞脱粒的能力。对于数据分析采用的设门策略的实施例在图14A-14G中显示。在对照条件下(不存在HIVxCD3 DART或存在对照DART),活的/CD3⁺/CD8⁺/CD107⁺细胞(图14H)的平均频率为0.38%(标准偏差为0.10%;范围为0.24-0.51),其在1ng/mL 7B2xCD3或A32xCD3存在时,分别增加至平均为3.53%(范围1.5-6.9%)或18.23%(范围12.30-23.35%)。数据表明,在表达Env的靶细胞(自体HIV-1感染的CD4⁺T细胞)存在时,HIVxCD3 DARTs可以特异性地诱导静息CD8⁺T细胞的脱粒。

[0296] HIVxCD3 DART针对来自血清反应阴性供体的JR-CSF感染的细胞的重定向CD8⁺T细胞杀伤活性。使用测量HIV gag p24抗原生产的病毒清除试验作为评价DART重定向的T细胞

杀伤活性的替代方法。来自健康供体的CD4⁺细胞用HIV-1分化枝B克隆JR-CSF进行超感染,并在不存在或存在100ng/mL DARTs时,以1:1的E:T比与自体CD8⁺T细胞一起孵育7天。在使用两种不同供体的实验中,与不存在DARTs的情况下进行的孵育相比,添加对照DART(4420xCD3)没有显著减少p24生产,而添加A32xCD3或7B2xCD3以相似程度显著减少p24生产(分别减少72-96%或87-99%; $p<0.01$,学生T检验;图15A-15B)。一旦感染建立,则在加入效应细胞和DARTs时,在存在整合酶和非核苷逆转录酶抑制剂的情况下还进行病毒清除试验,以阻断更多轮的感染。当抗逆转录病毒药物(antiretroviral)(ARVs)被包括在该试验中时,A32xCD3和7B2xCD3仍然介导了p24生产降低的趋势,尽管可能由于抗逆转录病毒药物的基线p24生产的低水平而没有达到统计学显著性(图15C),这表明DARTs不是通过抑制病毒传播而是通过感染细胞的清除来起作用。

[0297] 使用来自处于抑制性ART的患者的淋巴细胞,HIVxCD3 DARTs重定向CD8⁺T-细胞以清除JR-CSF超感染的CD4⁺细胞。慢性ART的特征在于功能障碍和消耗的T细胞应答(46,47),因此在体外对患者样品中有力的DART介导的T细胞重定向清除活性的确认至关重要。评估HIVxCD3 DARTs在病毒清除试验中的活性,其中淋巴细胞来自8名处于抑制性ART的HIV感染个体。所有参与者在研究时处于ART达至少6个月,病毒载量 <50 拷贝/mL,否则表现出不同的临床背景(图20)。

[0298] 因为来自HIV-1血清反应阳性受试者的T细胞比来自血清反应阴性受试者的细胞更易于凋亡(48),评价了在不存在靶细胞的情况下,HIVxCD3 DARTs是否可能影响T-细胞存活力(这可能会使DART活性的分析与患者细胞混淆)进行了评估。在存在100ng/mL DART的情况下(其模拟病毒清除试验条件),来自HIV感染的、ART-抑制的患者的CD4⁺或CD8⁺T细胞培养7天后,基于膜联蛋白V/7AAD染色,没有观察到T细胞存活力的下降(图28A-28B)。此外,在用HIVxCD3或对照DARTs培养后,未观察到未刺激的CD4⁺或CD8⁺T细胞上的活化标记物(HLA-DR、CD25)的变化(图28C-28D),表明仅CD3臂的接合不能在体外激活患者的CD8⁺或CD4⁺T细胞。

[0299] 使用来自处于抑制性ART的8名HIV患者的淋巴细胞进行病毒清除试验,其中CD4⁺细胞用HIV-1JR-CSF(靶细胞)进行超感染,并以0:1、1:10或1:1的E:T比在不存在或存在100ng/mL DARTs的情况下与自体CD8⁺细胞(效应子)一起孵育7天。HIVxCD3 DART活性甚至在没有添加的CD8⁺T细胞的情况下发生,表明在这些实验条件下,CD4⁺T细胞可以被招募为效应细胞;与对照相比,p24的生产通过7B2xCD3减少了0.89log($p<0.05$),通过A32xCD3降低了0.321log($p=NS$),通过两种DARTs的1:1混合物降低了0.81($p<0.05$) (图16A)。事实上,当存在感染的靶细胞时,添加完全激活的DARTs导致CD4⁺T细胞显著增加的脱粒(图16G、16H)。作为效应子的CD8⁺T细胞的添加导致p24水平进一步降低;与以1:10的E:T仅用CD8⁺T细胞观察的0.131log相比,用7B2xCD3,p24生产减少1.21log($p<0.05$),用A32xCD3减少0.61log($p=NS$),用两种DARTs的混合物减少1.81log($p<0.05$) (图16B)。以1:1的更高E:T比,观察到甚至更明显的降低,其中仅CD8s导致0.71log降低,但是p24生产通过7B2xCD3降低2.81log($p<0.05$),通过A32xCD3降低1.61log($p=NS$),和通过两种DARTs的混合物降低2.81log($p<0.05$) (图16C)。即使在没有任何可检测到的基线CD8T细胞抗病毒活性的情况下,也可见显著的降低,并且在三种情况下,用DARTs孵育后(患者749用两种完全激活的DARTs,和患者720和725用7B2xCD3),没有病毒能够被恢复。绝对的HIV gagp24抗原值在图21中提供。

[0300] 使用来自处于抑制性ART的患者的淋巴细胞, HIVxCD3 DARTs重定向CD8⁺T细胞以清除自体储库病毒 (AR) -超感染的CD4⁺细胞。通过采用来自5名患者的自体储库病毒 (AR) -感染的CD4⁺靶细胞的病毒清除试验 (图16D-16F), 评估DARTs针对源自潜伏库的表达Env序列的靶细胞而重定向T细胞能力。由有丝分裂原刺激的静息CD4⁺T细胞的有限稀释培养物的汇集的上清液产生患者AR病毒分离株, 以体现潜伏性病毒再活化后体内可能遇到的病毒的多样性。尽管AR病毒分离株的多样性, DART活性反映了用JR-CSF-感染的靶细胞所见的活性。在不存在CD8⁺效应子的情况下, 用AR-感染的靶细胞观察到适度的活性 (因此归因于CD4⁺T细胞; 图16D), 其中通过7B2xCD3, p24生产减少0.32log, 通过A32xCD3减少0.20log (p=NS. 由于对7B2xCD3的应答的更高的方差) 和通过两种DARTs的1:1混合物减少0.51log (p<0.05), 而通过对照DARTs没有观察到活性 (图16D)。将HIVxCD3DARTs添加至AR病毒-感染的CD4⁺靶细胞和自体CD8⁺效应细胞的混合中导致p24生产的显著增强的降低。在1:10的E:T比, 与单独用CD8⁺细胞仅减少0.02log相比, p24生产通过7B2xCD3减少0.51log (p<0.05), 通过A32xCD3减少0.37log, 和通过两者的1:1混合物减少0.79log (p<0.05) (图16E)。在1:1的较高E:T比, 也可以看到在HIVxCD3DARTs存在时p24生产降低的趋势, 但这种效果的量级通过在不存在DARTs时看到的可变的基线CD8⁺活性而被减少 (图16F)。值得注意的是, 用来自所有5名患者的淋巴细胞观察到离体DART活性, 所述DART活性用两种HIVxCD3DARTs中的至少一种进行评估, 并且在所有的情况下用1:1的DART混合物。

[0301] HIVxCD3 DARTs重定向来自处于抑制性ART的HIV-感染的个体的T细胞, 以在诱导潜伏性病毒表达后从静息CD4⁺T细胞中清除病毒。

[0302] 最终, 用于“休克和杀伤”HIV根除策略的剂必须识别和清除稀有感染细胞, 所述稀有感染细胞在从潜伏期出现时可能表达低水平的抗原。如前所述 (49), 采用潜伏清除试验。该试验涉及测量DARTs重定向自体CD8⁺T细胞以在诱导处于抑制性ART的HIV-感染的个体的静息CD4⁺T细胞后降低病毒恢复的能力。以1:10的E:T比将完全激活的DARTs或A32xCD3和7B2xCD3的1:1混合物添加至CD8⁺T细胞与PHA刺激的静息CD4⁺T细胞的共培养物, 在6名患者的所有6例中都降低病毒恢复, 尽管患者的降低的量级不尽相同 (图17A, 22)。

[0303] 使用体内最大有丝分裂原刺激的HIV潜伏期的逆转在临床上是不实用的 (50)。然而, 使用不导致整体T细胞活化的剂 (诸如伏立诺他 (VOR)) 逆转潜伏期后, 病毒抗原的呈递比最大有丝分裂原刺激后的呈递更不稳健。为了在临床相关环境下评估HIVxCD3DARTs, 使用对VOR的生理相关暴露以诱导潜伏病毒包膜表达, 所述生理相关暴露模拟单一400mg体内剂量 (18) 后获得的暴露。在这种情形下, 以1:10的E:T比添加CD8⁺细胞以及完全激活的DARTs, 在24小时共培养期后, 当与5名测试患者中的4名中不具有或具有对照DARTs的CD8⁺细胞相比时, 其导致病毒恢复的降低。在24小时共培养期后没有对DARTs应答的单个患者 (患者795) 中, 将共培养期从24小时延伸至96小时, 导致病毒恢复的彻底消除 (图17B, 22)。

[0304] 讨论

[0305] 在消除潜伏性HIV-1储库中的重大障碍包括: 1) 在用潜伏逆转剂 (LRA) 诱导之前或之后, 免疫系统识别呈递适度水平的HIV抗原的稀有HIV-1感染的细胞的有限能力 (38, 51); 2) HIV-1潜伏库中存在CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞逃逸突变体 (52); 和3) 在处于ART的患者中循环性HIV-特异性CD8⁺T细胞的低频率, 并且由于感染细胞提供的不足刺激而需要激活它们 (38)。本文所述的是HIVxCD3 DARTs可以克服这些主要阻碍的数据。

[0306] 具有来源于非中和mAbs A32和7B2的HIV臂的HIVxCD3 DARTs能够识别表达HIV-1Env的细胞系并引起重定向T-细胞杀伤活性,即使在细胞表面Env表达看起来低的时候。此外,HIVxCD3 DARTs在重定向CD8⁺T细胞以清除对VOR暴露后从ART-治疗的病毒血症(aviremic)患者获得的静息CD4⁺T细胞是离体有效的。

[0307] 据报告潜伏库中代表的HIV-1分离株包括由CD8⁺T细胞应答产生的逃逸突变体(52),这可限制由自然感染诱导的MHC类I-限制的CD8⁺CTL应答清除HIV-1感染的细胞的能力。HIVxCD3 DARTs的A32和7B2臂基于广泛反应的非中和抗-HIV mAbs,其分别与gp120和gp41中的高度保守的残基相互作用,并且有效地介导针对受各种亚型的HIV-1分离株感染的细胞的ADCC活性。值得注意的是,A32mAb表位是已知在合胞体形成过程中(53)或在层2病毒感染后(54)在受感染细胞表面上表达的最早的表位,并且7B2mAb表位在gp41枝干(stumps)上易接近,其在芽殖期间在受感染细胞的表面上表达,并且当gp120亚基解离时保留在膜表面(29,55)。这些性质表示A32和7B2表位在受感染细胞表面上的可及性。重要的是,CTL逃逸突变体的存在并不是限制,因为CTL表位与DART-介导的重定向杀伤活性是不相关的。此外,双特异性分子(如DARTs)招募的效应T细胞是多克隆的,而不是MHC-限制的(33)。与这些主张一致,A32xCD3和7B2xCD3在重定向来自患者的CD8⁺T细胞以清除由其自身的自体储库(AR)病毒感染的CD4⁺细胞方面是有效的,不管是否存在开始治疗前可能已经累积的任何逃逸突变体(52)。有趣的是,在体外活化用作靶细胞的CD4⁺T细胞后,在不存在CD8⁺T细胞的情况下观察到病毒恢复的具体降低,这表明DARTs也可以在这些具体实验条件下招募细胞毒性CD4⁺T细胞。根据这些,发现DARTs在存在表达Env的Jurkat-522F/Y细胞的情况下诱导CD4⁺T细胞的活化,并且当与来自HIV阳性个体的受感染的自体靶细胞共培养时能够增加CD4⁺T细胞的脱粒。在对HIV-1(56)和巨细胞病毒(57)应答的背景下已经被报告了细胞毒性CD4⁺T细胞。需要进一步的研究来确定在体内环境中是否发生有效的DART招募和细胞毒性CD4⁺T细胞的重定向。

[0308] A32xCD3和7B2xCD3 DARTs的相对效力在我们的研究中应用的不同测试系统之间是不同的,很可能是由于表达Env的靶细胞和/或效应T细胞的特征的变化。然而,每当DARTs的其中一个表现出比另一个更大的活性时,在用受感染的患者细胞的研究中使用两种DARTs的组合时,一贯地观察到与更有效的DART的活性相似的活性(图16A-16H和17A-17B)。因此,靶向不同HIV表位的DARTs的组合可能是最大化活性的水平和幅度两者的有利策略,这与针对介导ADCC的(58)或广泛地中和抗-HIV-1mAbs的组合所描述的相似(59,60)。

[0309] 通过HIV-1特异性CD8⁺T细胞应答消除潜伏感染的细胞池受到被感染个体中这些细胞的低频率的限制以及从静息状态激活它们的需要的限制(38)。用来自先前没有对HIV-1抗原的任何暴露的HIV-1血清反应阴性个体的静息CD8⁺T细胞,当与预定要被杀伤的自体HIV-1感染的靶细胞一起孵育时,HIVxCD3 DARTs诱导这些静息CD8⁺T细胞的高达23%的脱粒。DART还能够重定向来自在病毒清除试验中接受抗逆转录病毒治疗的HIV-1血清反应阳性个体的CD8⁺T细胞。因此,HIVxCD3 DART蛋白可以有效地招募并重定向CD8⁺T细胞毒性细胞,而不依赖于对HIV抗原的先前暴露,且不论在慢性HIV-1感染中可能保留的任何功能伤害(46,47,61)。

[0310] 针对表达HIV-1Env的靶标的DART重定向的T细胞活性依赖于HIVxCD3 DART浓度,效应子:靶(E:T)细胞比和孵育时间。HIVxCD3 DART分子的每个结合臂的单价性质确保靶细

胞杀伤仅仅取决于效应/靶细胞共接合,如用CD19xCD3和其他DARTs所观察到的(31,32,34)。在靶细胞上不存在Env表达时,没有观察到HIVxCD3 DART介导的T细胞活化或重定向杀伤活性。类似地,用来自处于抑制性ART的HIV感染的患者的T细胞,在不存在病毒感染的靶细胞的情况下,没有观察到T细胞活化。因为它们应该仅在HIV-1感染的表达Env的靶细胞附近从循环T细胞引起细胞毒性活性,不预期HIVxCD3 DARTs在处于ART的HIV感染的患者中引起普遍的系统性影响,诸如炎性细胞因子的释放,这是由于表达Env的靶细胞的不足。考虑到HIV感染在HIV-1特异性T-细胞亚群中以及在一般的CD8⁺T细胞群体中在疾病的急性期和慢性期都诱导免疫系统的非特异性活化,由HIVxCD3 DARTs引起的T-细胞重定向应答的特异性在临床上将是至关重要的(62-64)。

[0311] 表达细胞表面Env的HIV-感染的CD4⁺T细胞是HIVxCD3 DART-重定向T细胞杀伤活性的主要体内靶标。因为这些靶细胞也表达CD3,所以DART分子可以介导感染的和未感染的CD4⁺T细胞之间的突触,这(不是重定向对受感染细胞的杀伤或除了重定向对受感染细胞的杀伤以外还)令人信服地可促进病毒向未感染细胞的扩散。然而,没有证据表明观察到DARTs增强了病毒的扩散,因为即使在不存在CD8⁺T细胞的情况下,DARTs也降低p24生产(图16A和16D)。

[0312] 总之,本文所述的实验证明,具有来源于非中和A32和7B2mAbs的HIV臂的HIVxCD3 DARTs是针对由以下组成的靶细胞重定向溶细胞T-细胞的特异性的和有效的剂:1)表达HIV-1Env的CD4⁺细胞系,2)来自受不同亚型的HIV-1 IMCs感染的血清反应阴性个体的激活的CD4⁺细胞,3)来自受JR-CSF或自体储库病毒感染的、处于抑制性ART的血清反应阳性患者的激活的CD4⁺细胞,或4)来自离体暴露于T细胞有丝分裂原(植物凝集素,PHA)或潜伏期逆转剂(伏立诺他,VOR)的HIV-感染的患者的静息CD4⁺细胞。重要的是,研究证明,来自处于抑制性ART的HIV感染的患者的自体CD8⁺T细胞在DARTs存在的情况下作为效应细胞是有用的。在伏立诺他存在的情况下,HIVxCD3 DART-介导的T细胞杀伤活性的证明是尤其值得注意的,因为它提供的证据表明,针对从被设计来模拟潜在的临床HIV根除策略的模型系统中的HIV-感染的患者细胞中表达的真正的潜伏性病毒分离株的活性与使用离体扩增的CTLs的早期发现相似(49)。因此,所公开的数据表明,HIVxCD3 DARTs在“休克和杀伤”HIV根除策略中是用于与LRAs组合进行体内测试的合适的剂。

[0313] 方法

[0314] 由于我们研究中的样本数量相对有限,我们使用多重比较的Dunnett's检验再分析了这些数据,这被认为是适当的。计算的p值在正文(第14页)和图5-7的图例中指示。统计分析方法部分也已修订。

[0315] 患者群体。白细胞除去法样品从HIV血清反应阴性供体或处于至少6个月的稳定的ART的、具有不可检测的血浆病毒血症(<50拷贝/mL)的HIV-感染的供体获得,如所指出的。从每名患者获得书面知情同意书,并且该研究由杜克和UNC生物医学机构审查委员会(Biomedical Institutional Review Boards)批准。

[0316] 感染性分子克隆(IMCs)。如前所述,用来源于NHL4-3分离株的骨架产生用于亚型B BaL、亚型AE CM235和亚型C 1086.C的HIV-1 IMC(65,66)。所有IMCs都表达海肾属荧光素酶报告基因,并保留了所有9个病毒开放阅读框。海肾属荧光素酶报告基因在HIV-1Tat基因的控制下表达。在HIV-1感染CD4⁺T细胞时,HIV-1复制过程中Tat的表达将诱导荧光素酶表达,

这允许通过测量相对发光单位 (RLU) 量化受感染的细胞。

[0317] HIVxCD3 DARTs的构建、表达和纯化。DARTs由共表达两条多肽链的质粒产生,所述两条多肽链的一条具有与抗-HIV的VH连接的抗-CD3的VL;第二条具有与抗-CD3的VH连接的抗-HIV的VL。两条多肽链的羧基末端由成对的带相反电荷的E-螺旋/K-螺旋二聚化结构域组成,其包含链间二硫键(图10A-10C)。HIV臂序列来源于非中和mAbs,A32[Genbank登录号3TNM_H和3TNM_L]和7B2[Genbank登录号AFQ31502和AFQ31503],并且,CD3臂序列来源于hXR32(一种人源化小鼠抗人CD3 ϵ mAb(L.Huang,L.S.Johnson,CD3-binding molecules capable of binding to human and nonhuman CD3,美国专利20140099318(2014))。通过用来自抗-荧光素mAb(4420)(67)或抗-RSV mAb(帕利珠单抗)(68)的不相关的特异性取代HIV或CD3特异性类似地构建对照DARTs。编码DART的序列被克隆到CET1019AD UCOE载体(EMD Millipore)中、转染到CHO细胞中,并如前所述纯化蛋白质(31)。通过SDS-PAGE(NuPAGE Bis-Tris凝胶系统,Invitrogen)和分析SEC(TSK GS3000SWxL SE-HPLC,Tosoh Bioscience)来分析纯化的蛋白质。

[0318] ELISA。对于单特异性结合试验,用3%BSA和0.1%Tween-20阻断用碳酸氢盐缓冲液中的重组蛋白(人CD3 ϵ / δ 异二聚体,JR-FL gp140 Δ CF;(69))涂覆的MaxiSorp微量滴定板(Nunc)。应用DART蛋白,随后依次加入生物素化的抗-EK螺旋抗体和链霉亲和素-HRP(BD Biosciences)。对于双特异性结合试验,用JRFL gp140 Δ CF涂覆平板,并且应用DART,随后依次加入生物素化的CD3 ϵ / δ 和链霉亲和素-HRP。使用SuperSignal ELISA Pico化学发光底物(Thermo Scientific)检测HRP活性。

[0319] SRP分析。结合至抗原的HIVxCD3 DART通过BIAcore 3000生物传感器(GE, Healthcare)分析,如前所述(31,32)。根据制造商的程序,将人CD3 ϵ / δ 固定在CM5传感器芯片上。分析结合至固定化的CD3的DART,以评估CD3臂的性质,并分析结合至在固定化的CD3上捕获的HIV DART的HIV-1Env蛋白,以评价HIV臂的性质。JRFLgp140 Δ CF被用来评价7B2xCD3结合和M.ConS gp140 Δ CFI(69)被用来评价A32xCD3结合。使用不同的Env蛋白,因为A32xCD3不能有效地结合至JR-FL gp140 Δ CF,并且M.ConS gp140 Δ CFI缺乏对7B2xCD3的gp41结合位点。在10mM HEPES,pH 7.4、150mM NaCl、3mM EDTA和0.005%P20表面活性剂中进行结合实验。固定化受体表面的再生通过脉冲注射10mM甘氨酸,pH 1.5进行。通过对Langmuir 1:1结合模型(BIA评估软件v4.1)的结合曲线的全局拟合来确定K_D值。

[0320] 细胞系。通过转导和克隆选择,在MacroGenics从Jurkat-522F/Y细胞产生Jurkat-522F/Y GF细胞,其组成型的表达桃足类绿色荧光蛋白(copGFP)和萤火虫荧光素酶的融合蛋白(System Biosciences)。具有HIV-1CM244(亚型AE)gp140的多西环素诱导型表达的HEK293-D371细胞从John Kappes博士获得(伯明翰阿拉巴马大学)。

[0321] 结合至细胞的DART或mAb的流式细胞检测分析。将4 μ g/mL的DARTs在含有10%人AB血清的200 μ L FACS缓冲液中与10⁵个细胞在室温一起孵育30分钟。洗涤后,将细胞重悬于100 μ L的1 μ g/mL的生物素-缀合的小鼠抗-EK抗体(识别DART蛋白的E/K异源二聚化区域)中,与1:500稀释的链霉亲和素-PE混合,并在黑暗中在2-8 $^{\circ}$ C孵育45分钟。洗涤细胞,用FACS缓冲液重悬,并用BD Calibur流式细胞分析仪和FlowJo软件(TreeStar,Ashland OR)分析。如前所述(54),对于A32和7B2mAbs,进行与来自正常人供体的IMC-感染的CD4⁺T细胞的结合,并且对于HIVx4420 DARTs,用生物素-缀合的小鼠抗-EK抗体和1:500稀释的链霉亲和素-

PE,进行与来自正常人供体的IMC-感染的CD4⁺T细胞的结合。

[0322] 针对表达HIV-1 Env的细胞系的重定向T-细胞细胞毒性试验以及T-细胞活化的评价。使用Dynabeads® Untouched™ 人T细胞试剂盒 (Invitrogen) 从健康的人PBMCs中分离全 (pan) T细胞。用DARTs的连续稀释物与人T细胞以效应子:靶标 (E:T) 比=10:1 (或不然以所指示的变化的E:T比) 一起处理表达HIV-1Env的细胞系 ($1-4 \times 10^5$ 个细胞/mL), 并在37°C, 5%CO₂ 孵育过夜。如前所述,通过乳酸脱氢酶 (LDH) 释放 (CytoTox 96® 非放射性细胞毒性试验, Promega) 测量细胞毒性 (32)。用Jurkat-522F/Y GF细胞系,还通过使用荧光素酶-Glo底物 (Promega) 的发光测量细胞毒性。从发光计数 (RLU) 计算特异性裂解:细胞毒性 (%) = $100 \times (1 - (\text{样品的RLU} \div \text{对照的RLU}))$, 其中对照 = 在不存在DART时用效应细胞孵育的靶细胞的平均RLU。数据被拟合至S型剂量应答函数,以获得50%有效浓度 (EC₅₀) 和最大特异性裂解值百分比。用CD8-FITC、CD4-APC和CD25-PE抗体 (BD Biosciences) 标记试验板中的细胞后,通过FACS分析测量T-细胞活化,随后通过配备有采集软件CellQuest Pro Version 5.2.1的FACS Calibur流式细胞分析仪收集细胞 (BD Biosciences)。使用FlowJo软件进行数据分析 (Treestar, Inc)。

[0323] 针对HIV-1 IMC-感染的CD4⁺细胞的重定向T-细胞细胞毒性试验。用抗人CD3 (克隆OKT3; eBioscience) 和抗人CD28 (克隆CD28.2; BD Pharmingen) 将来自正常健康HIV-1血清反应阴性供体的冷冻保存的静息PBMC激活72小时。随后,通过使用磁珠 (Miltenyi Biosciences) 消耗CD8⁺T细胞获得CD4⁺富集的细胞群 (纯度>92.3%; 平均值±标准偏差 $95.73 \pm 2.6\%$), 在代表HIV-1亚型AE (CM235)、B (BaL) 或C (1086.C) 的、表达荧光素酶的IMC存在的情况下离心接种,并培养72小时。将CD4⁺感染的靶细胞与静息CD8⁺效应细胞 (通过阴性选择从自体PBMC分离, CD8⁺T细胞分离试剂盒, Miltenyi Biosciences) 以33:1、11:1、3:1和0:1的E:T比,在不存在或存在DARTs的情况下,以浓度范围为1,000至0.0001ng/mL一起孵育6-48小时。未感染的和感染的靶细胞单独地被包括,作为另外的对照。每个条件重复进行测试。孵育后,加入ViviRen™ 活细胞底物 (Promega), 并在光度计上测量RLU; 如前所述测定靶细胞的特异性裂解百分比 (%SL) (58)。

[0324] T-细胞脱粒 (CD107) 试验。如针对以HIV-1 IMC-感染的细胞作为靶标的细胞毒性试验所描述的,在不存在或存在1ng/mL DARTs的情况下,受HIV-1BaL IMC感染的激活的CD4⁺细胞与静息CD8⁺效应细胞以33:1的E:T比一起被涂覆,并孵育6小时。对于CD4T细胞脱粒,激活的CD4⁺T细胞或者受JR-CSF感染并用我们的ADCC试验 (70) 中常规使用的存活力 (NFL1) 和靶特异性 (TFL4) 标记物进行标记,或者在添加DARTs之前以10:1的比作为效应子被添加至靶标。每个条件重复进行测试。CD107PE-Cy5 (克隆H4A3; eBioscience) 在孵育的最后6小时内连同莫能菌素 (Monensin) 溶液 (BD GolgiStop) 一起被滴定和添加 (71)。由LIVE/DEAD Aqua着色剂 (stain)、抗-CD3 APC-H7 (克隆SK7; BD Pharmingen)、抗-CD4BV605 (克隆OKT4; Biolegend)、抗-CD8BV650 (克隆RPA-T8; Biolegend) 组成的抗体组用于检测CD107⁺CD8⁺T细胞。洗涤和固定后,样品在接下来的24小时内定制定制的LSRII (BD Bioscience, San Jose, CA) 上取得。每个测试获得总数至少300,000可行事件。使用Flow-Jo软件 (Treestar, Ashland, OR) 进行数据分析。

[0325] T-细胞存活力和活化试验。CD8⁺T细胞和从HIV感染的ART抑制患者中获得的CD8消耗的PBMCs以每孔 5×10^4 个细胞被涂覆到具有100ng/mL指示的DART的96孔板中。细胞在

0.2mL补充有10%FBS、1%青霉素/链霉素和5U/mL IL-2的cIMDM培养基中培养7天,然后用以下抗体染色:HLA-DR-PerCP(克隆L243)、CD25-PE(克隆M-A251)、CD8-FITC(克隆HIT8a)、CD8-PE(克隆HIT8a)、CD4-FITC(克隆RPA-T4)和膜联蛋白V-PE和7-AAD(所有BD biosciences, San Jose, CA)。

[0326] 重定向T-细胞病毒性清除试验。通过阳性选择(EasySep人CD8⁺选择试剂盒, Stem Cell)从PBMCs中分离CD8⁺T细胞。首先用2 μ g/mL的PHA(Remel, Lenexa, KS)和60U/mL的IL-2激活CD8消耗的PBMCs,然后,通过在1200xg离心接种90分钟,以MOI为0.01,用JR-CSF或自体储库病毒(AR)感染,如前所述的(47)。对于如前所述进行的每个患者,从静息CD4⁺T细胞的派生(outgrowth)试验的重复的孔的汇集的上清液获得AR病毒(72)。在0.2m补充有10%FBS、1%青霉素/链霉素和5U/mL IL-2的cIMDM培养基中,在不存在或存在100ng/mL DART的情况下,以指定的E:T比将五万(5×10^4)个靶标/孔与CD8⁺T细胞共培养,重复三次。对于在抗逆转录病毒药物(ARVs)存在下进行的实验,在离心接种后24小时,洗涤细胞,添加1 μ M的雷特格韦(raltegravir)和4 μ M的阿巴卡韦(abacavir),然后将DARTs和CD8⁺T细胞添加到培养物中。通过p24ELISA(ABL, Rockville, MD)在第7天测试上清液。结果计算为对数(感染的靶细胞的p24只有对照除以测试条件的p24)。

[0327] 潜伏清除试验(LCA)。在添加抗病毒效应细胞和/或分子后,使用ART-治疗的病毒血症患者的静息CD4⁺T细胞,通过标准定量病毒派生试验来评价来自CD4⁺感染的细胞的病毒恢复的降低,如前所述(49)。在这种情况下,LCA用于模拟DARTs在临床和药理学相关条件下清除从潜伏库中出现的病毒的能力。如前所述(72),从白细胞去除法产物中分离静息CD4⁺T细胞,并暴露于PHA(4 μ g/mL)和IL-2(60U/mL)24小时或暴露于伏立诺他(VOR)(335nM, 6小时)(Merck Research Laboratories),并根据储库的大小在12至36个重复的孔中以0.5至 1×10^6 个细胞/孔涂覆。然后将VOR洗去,并以1:10的E:T比添加CD8,以及100ng/mL的指示的DART。将细胞共培养24小时(除非另有说明),随后将DART蛋白质洗去,并添加来自HIV阴性供体的同种异体CD8消耗的PBMCs以扩增残留的病毒。在第15天,对每只孔测试上清液中p24抗原的存在。结果计算为病毒性恢复%[(阳性孔的数目/总的涂覆数) \times 100],归一化至没有添加CD8⁺T细胞的对照。

[0328] 统计学分析。使用多重比较的Dunnett's检验,利用GraphPad Prism Software(La Jolla, CA)分析组之间的统计学比较;用多重比较的Dunnett校正计算,p值<0.05被认为是显著的。多重比较的Dunnett检验被认为是适当的,因为研究中样本数量相对有限。

[0329] 实施例6的参考文献

[0330] 1.Chun T-W et al. In vivo fate of HIV-1-infected T cells: Quantitative analysis of the transition to stable latency. Nat Med. 1995;1(12):1284-1290.

[0331] 2.Chun T-W et al. Quantification of latent tissue reservoirs and total body viral load in HIV-1 infection. Nature. 1997;387(6629):183-188.

[0332] 3.Finzi D et al. Identification of a reservoir for HIV-1 in patients on highly active antiretroviral therapy. Science. 1997;278(5341):1295-1300.

[0333] 4.Wong JK. Recovery of Replication-Competent HIV Despite Prolonged Suppression of Plasma Viremia. Science. 1997;278(5341):1291-1295.

[0334] 5.Pierson TC et al. Molecular Characterization of Preintegration

Latency in Human Immunodeficiency Virus Type 1 Infection. *J Virol.* 2002;76(17):8518-8531.

[0335] 6. Pomerantz RJ. Reservoirs of Human Immunodeficiency Virus Type 1: The Main Obstacles to Viral Eradication. *Clin Infect Dis.* 2002;34(1):91-97.

[0336] 7. Chomont N et al. HIV reservoir size and persistence are driven by T cell survival and homeostatic proliferation. *Nat Med.* 2009;15(8):893-900.

[0337] 8. Bosque A, Famiglietti M, Weyrich AS, Goulston C, Planelles V. Homeostatic Proliferation Fails to Efficiently Reactivate HIV-1 Latently Infected Central Memory CD4+T Cells. *PLoS Pathog.* 2011;7(10):e1002288.

[0338] 9. Soriano-Sarabia N et al. Quantitation of Replication-Competent HIV-1 in Populations of Resting CD4+T Cells. *J Virol.* 2014;88(24):14070-14077.

[0339] 10. Palmer S et al. New Real-Time Reverse Transcriptase-Initiated PCR Assay with Single-Copy Sensitivity for Human Immunodeficiency Virus Type 1 RNA in Plasma. *J Clin Microbiol.* 2003;41(10):4531-4536.

[0340] 11. Palmer S et al. Low-level viremia persists for at least 7 years in patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2008;105(10):3879-3884.

[0341] 12. Dinoso JB et al. Treatment intensification does not reduce residual HIV-1 viremia in patients on highly active antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2009;106(23):9403-9408.

[0342] 13. Gandhi RT et al. No Evidence for Decay of the Latent Reservoir in HIV-1—Infected Patients Receiving Intensive Enfuvirtide-Containing Antiretroviral Therapy. *J Infect Dis.* 2010;201:293-296.

[0343] 14. Davey RT et al. HIV-1 and T cell dynamics after interruption of highly active antiretroviral therapy (HAART) in patients with a history of sustained viral suppression. *Proc Natl Acad Sci USA.* 1999;96(26):15109-15114.

[0344] 15. Carcelain G et al. Transient Mobilization of Human Immunodeficiency Virus (HIV)-Specific CD4 T-Helper Cells Fails To Control Virus Rebounds during Intermittent Antiretroviral Therapy in Chronic HIV Type 1 Infection. *J Virol.* 2001;75(1):234-241.

[0345] 16. Rothenberger MK et al. Large number of rebounding/founder HIV variants emerge from multifocal infection in lymphatic tissues after treatment interruption. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2015;pii:201414926[Epub ahead of print].

[0346] 17. Robb ML, Kim JH. Shot in the HAART: vaccine therapy for HIV. *The Lancet infectious diseases.* 2014;14(4):259-260.

[0347] 18. Archin NM et al. Administration of vorinostat disrupts HIV-1 latency in patients on antiretroviral therapy. *Nature.* 2012;487(7408):482-485.

[0348] 19. Denton PW et al. Targeted cytotoxic therapy kills persisting HIV

infected cells during ART. *PLoS Pathog.* 2014;10(1):e1003872.

[0349] 20. Ho Y-C et al. Replication-Competent Noninduced Proviruses in the Latent Reservoir Increase Barrier to HIV-1 Cure. *Cell.* 2013;155(3):540-551.

[0350] 21. Bullen CK, Laird GM, Durand CM, Siliciano JD, Siliciano RF. New ex vivo approaches distinguish effective and ineffective single agents for reversing HIV-1 latency in vivo. *Nat Med.* 2014;20(4):425-429.

[0351] 22. Cillo AR et al. Quantification of HIV-1 latency reversal in resting CD4+T cells from patients on suppressive antiretroviral therapy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2014;111(19):7078-7083.

[0352] 23. Pincus SH. Therapeutic potential of anti-HIV immunotoxins. *Antiviral research.* 1996;33(1):1-9.

[0353] 24. Davey RT et al. Use Of Recombinant Soluble Cd4 Pseudomonas Exotoxin, A Novel Immunotoxin, For Treatment Of Persons Infected With Human Immunodeficiency Virus. *J Infect Dis.* 1994;170(November):1180-1188.

[0354] 25. Bera TK, Kennedy PE, Berger EA, Barbas CFI, Pastan I. Specific killing of HIV-infected lymphocytes by a recombinant immunotoxin directed against the HIV-1 envelope glycoprotein. *Molecular Medicine.* 1998;4(6):384.

[0355] 26. Denton PW et al. Generation of HIV latency in humanized BLT mice. *J Virol.* 2012;86(1):630-634.

[0356] 27. Pollara J et al. Epitope Specificity of Human Immunodeficiency Virus-1 Antibody Dependent Cellular Cytotoxicity [ADCC] Responses. *Curr HIV Res.* 2013;11(8):378-387.

[0357] 28. Acharya P et al. Structural Definition of an Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity Response Implicated in Reduced Risk for HIV-1 Infection. *J Virol.* 2014;88(21):12895-12906.

[0358] 29. Pincus SH et al. In Vivo Efficacy of Anti-Glycoprotein 41, But Not Anti-Glycoprotein 120, Immunotoxins in a Mouse Model of HIV Infection. *J Immunol.* 2003;170:2236-2241.

[0359] 30. Craig RB, Summa CM, Corti M, Pincus SH. Anti-HIV Double Variable Domain Immunoglobulins Binding Both gp41 and gp120 for Targeted Delivery of Immunoconjugates. *PLoS ONE.* 2012;7(10):e46778.

[0360] 31. Johnson S et al. Effector Cell Recruitment with Novel Fv-based Dual-affinity Re-targeting Protein Leads to Potent Tumor Cytolysis and in Vivo B-cell Depletion. *J Mol Biol.* 2010;399(3):436-449.

[0361] 32. Moore PA et al. Application of dual affinity retargeting molecules to achieve optimal redirected T-cell killing of B-cell lymphoma. *Blood.* 2011;117(17):4542-4551.

[0362] 33. Nagorsen D, Baeuerle PA. Immunomodulatory therapy of cancer with T cell-engaging BiTE antibody blinatumomab. *Experimental Cell Research.* 2011;317

(9):1255-1260.

[0363] 34.Chichili GR et al.A CD3xCD123 bispecific DART for redirecting host T cells to myelogenous leukemia:Preclinical activity and safety in nonhuman primates.Sci Transl Med.2015;7(289):289ra82.

[0364] 35.Topp MS et al.Phase II Trial of the Anti-CD19 Bispecific T Cell-Engager Blinatumomab Shows Hematologic and Molecular Remissions in Patients With Relapsed or Refractory B-Precursor Acute Lymphoblastic Leukemia.J Clin Oncol.2014;32(36):4134-4140.

[0365] 36.Topp MS et al.Safety and activity of blinatumomab for adult patients with relapsed or refractory B-precursor acute lymphoblastic leukaemia:a multicentre,single-arm,phase 2 study.Lancet Oncol.2014;16:57-66.

[0366] 37.Rader C.DARTs take aim at BiTEs.Blood.2011;117(17):4403-4404.

[0367] 38.Shan L et al.Stimulation of HIV-1-Specific Cytolytic T Lymphocytes Facilitates Elimination of Latent Viral Reservoir after Virus Reactivation.Immunity.2012;36(3):491-501.

[0368] 39.Moore JP et al.Exploration of antigenic variation in gp120 from clades A through F of human immunodeficiency virus type 1 by using monoclonal antibodies.J Virol.1994;68(12):8350-8364.

[0369] 40.Guan Y et al.Diverse specificity and effector function among human antibodies to HIV-1 envelope glycoprotein epitopes exposed by CD4 binding.Proc Natl Acad Sci USA.2013;110(1):E69-78.

[0370] 41.Veillette M et al.Interaction with Cellular CD4 Exposes HIV-1 Envelope Epitopes Targeted by Antibody-Dependent Cell-Mediated Cytotoxicity.J Virol.2014;88(5):2633-2644.

[0371] 42.Zhang M-Y et al.Identification and characterization of a broadly cross-reactive HIV-1 human monoclonal antibody that binds to both gp120 and gp41.PLoS ONE.2012;7(9):e44241.

[0372] 43.Wyatt R et al.Involvement of the V1/V2 variable loop structure in the exposure of human immunodeficiency virus type 1 gp120 epitopes induced by receptor binding.J Virol.1995;69(9):5723-5733.

[0373] 44.Sanders RW et al.A next-generation cleaved,soluble HIV-1 Env Trimer,BG505 SOSIP.664 gp140,expresses multiple epitopes for broadly neutralizing but not non-neutralizing antibodies.PLoS Pathog.2013;9(9):e1003618.

[0374] 45.Cao J,Park IW,Cooper A,Sodroski J.Molecular determinants of acute single-cell lysis by human immunodeficiency virus type 1.J Virol.1996;70(3):1340-1354.

[0375] 46.Trautmann L,Janbazian L,Chomont N,The E.Upregulation of PD-1 expression on HIV-specific CD8 T cells leads to reversible immune

dysfunction. *Nat Med.* 2006;12(10):1198-1202.

[0376] 47. Blackburn SD et al. Coregulation of CD8+T cell exhaustion by multiple inhibitory receptors during chronic viral infection. *Nat Immunol.* 2008;10(1):29-37.

[0377] 48. Groux H. Activation-induced death by apoptosis in CD4+T cells from human immunodeficiency virus-infected asymptomatic individuals. *J Exp Med.* 1992;175(2):331-340.

[0378] 49. Sung JA et al. Expanded Cytotoxic T-Cell Lymphocytes Target the Latent HIV Reservoir. *J Infect Dis.* 2015;:1-15.

[0379] 50. Van Praag RME et al. OKT3 and IL-2 Treatment for Purging of the Latent HIV-1 Reservoir in Vivo Results in Selective Long-Lasting CD4+T Cell Depletion-Springer. *J Clin Immunol.* 2001;21(3):218-226.

[0380] 51. Durand CM, Blankson JN, Siliciano RF. Developing strategies for HIV-1 eradication. *Trends Immunol.* 2012;33(11):554-562.

[0381] 52. Deng K et al. Broad CTL response is required to clear latent HIV-1 due to dominance of escape mutations. *Nature.* 2015;517(7534):381-385.

[0382] 53. Finnegan CM, Berg W, Lewis GK, DeVico AL. Antigenic properties of the human immunodeficiency virus envelope during cell-cell fusion. *J Virol.* 2001;75(22):11096-11105.

[0383] 54. Ferrari G et al. An HIV-1 gp120 envelope human monoclonal antibody that recognizes a C1 conformational epitope mediates potent antibody-dependent cellular cytotoxicity (ADCC) activity and defines a common ADCC epitope in human HIV-1 serum. *J Virol.* 2011;85(14):7029-7036.

[0384] 55. Moore PL et al. Nature of nonfunctional envelope proteins on the surface of human immunodeficiency virus type 1. *J Virol.* 2006;80(5):2515-2528.

[0385] 56. Johnson S et al. Cooperativity of HIV-Specific Cytolytic CD4 T Cells and CD8 T Cells in Control of HIV Viremia. *J Virol.* 2015;89(15):7494-7505.

[0386] 57. Casazza JP et al. Acquisition of direct antiviral effector functions by CMV-specific CD4+T lymphocytes with cellular maturation. *J Exp Med.* 2006;203(13):2865-2877. 58. Pollara J et al. HIV-1 Vaccine-Induced C1 and V2 Env-Specific Antibodies Synergize for Increased Antiviral Activities. *J Virol.* 2014;88(14):7715-7726.

[0387] 59. Shingai M et al. Antibody-mediated immunotherapy of macaques chronically infected with SHIV suppresses viraemia. *Nature.* 2013;503(7475):277-280.

[0388] 60. Barouch DH et al. Therapeutic efficacy of potent neutralizing HIV-1-specific monoclonal antibodies in SHIV-infected rhesus monkeys. *Nature.* 2013;503(7475):224-228.

- [0389] 61.Yamamoto T et al.Surface expression patterns of negative regulatory molecules identify determinants of virus-specific CD8+T-cell exhaustion in HIV infection.Blood.2011;117(18):4805-4815.
- [0390] 62.Giorgi JV et al.Elevated levels of CD38+CD8+T cells in HIV infection add to the prognostic value of low CD4+T cell levels:results of 6 years of follow-up.The Los Angeles Center,Multicenter AIDS Cohort Study.J Acquir Immune Defic Syndr.1993;6(8):904-912.
- [0391] 63.Perfetto SP et al.CD38 expression on cryopreserved CD8+T cells predicts HIV disease progression.Cytometry.1998;33(2):133-137.
- [0392] 64.Vinikoor MJ et al.Antiretroviral Therapy Initiated During Acute HIV Infection Fails to Prevent Persistent T-Cell Activation.J Acquir Immune Defic Syndr.2013;62(5):505-508.
- [0393] 65.Edmonds TG et al.Replication competent molecular clones of HIV-1 expressing Renilla luciferase facilitate the analysis of antibody inhibition in PBMC.Virology.2010;408(1):1-13.
- [0394] 66.Adachi A et al.Production of acquired immunodeficiency syndrome-associated retrovirus in human and nonhuman cells transfected with an infectious molecular clone.J Virol.1986;59(2):284-291.
- [0395] 67.Kranz DM,Voss EW.Partial elucidation of an anti-hapten repertoire in BALB/c mice:comparative characterization of several monoclonal anti-fluorescyl antibodies.Mol Immunol.1981;18(10):889-898.
- [0396] 68.Johnson S et al.Development of a Humanized Monoclonal Antibody (MEDI-493)with Potent In Vitro and In Vivo Activity against Respiratory Syncytial Virus.J Infect Dis.1997;176(November):1215-1224.
- [0397] 69.Liao H-X et al.A group M consensus envelope glycoprotein induces antibodies that neutralize subsets of subtype B and C HIV-1 primary viruses.Virology.2006;353:268-282.
- [0398] 70.Pollara J et al.High-throughput quantitative analysis of HIV-1 and SIV-specific ADCC-mediating antibody responses.Cytometry A.2011;79A(8):603-612.
- [0399] 71.Betts MR et al.Sensitive and viable identification of antigen-specific CD8+T cells by a flow cytometric assay for degranulation.J Immunol Methods.2003;281(1-2):65-78.
- [0400] 72.Archin NM et al.Valproic acid without intensified antiviral therapy has limited impact on persistent HIV infection of resting CD4+T cells.AIDS.2008;22(10):1131-1135.

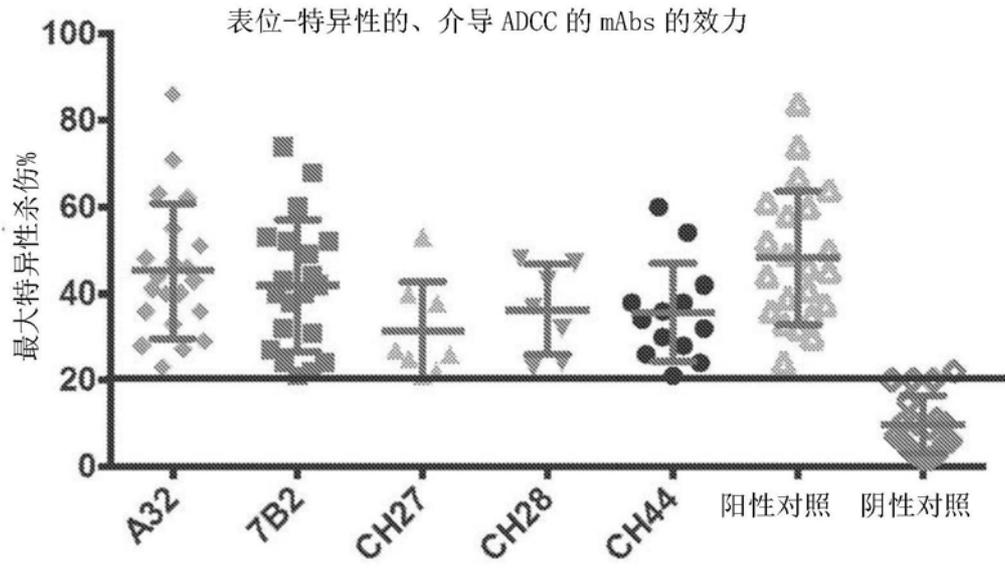


图1

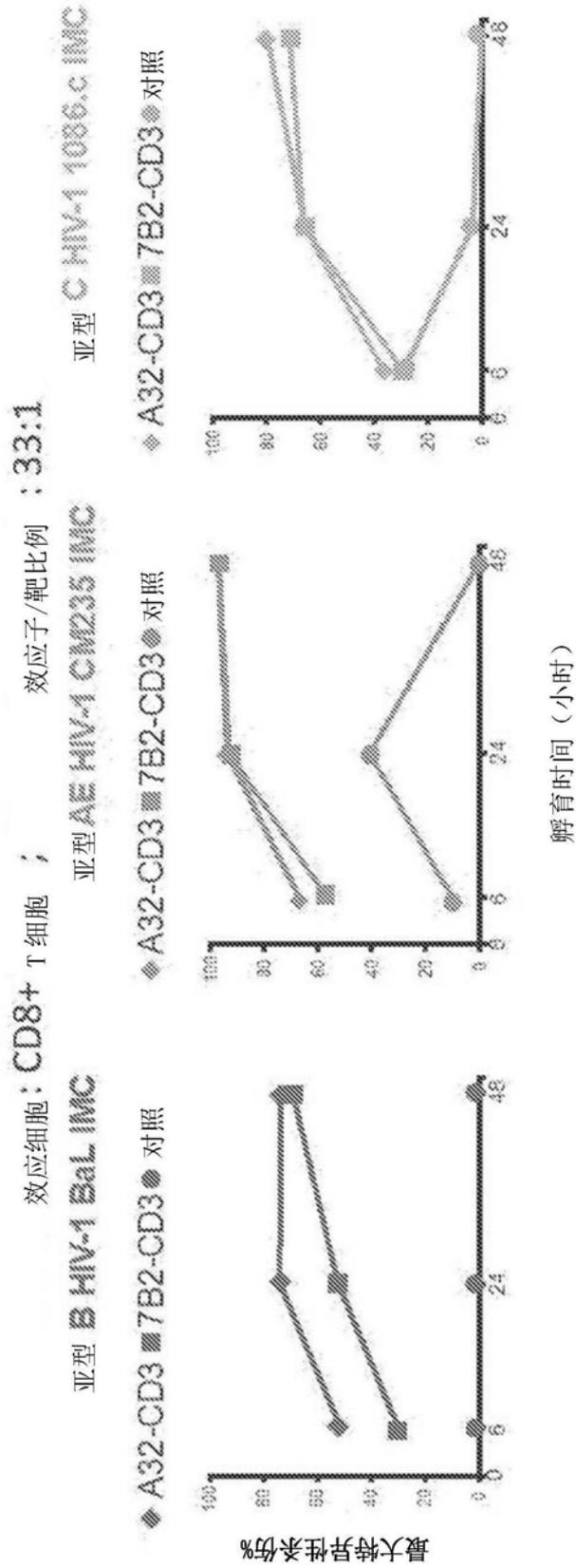


图2

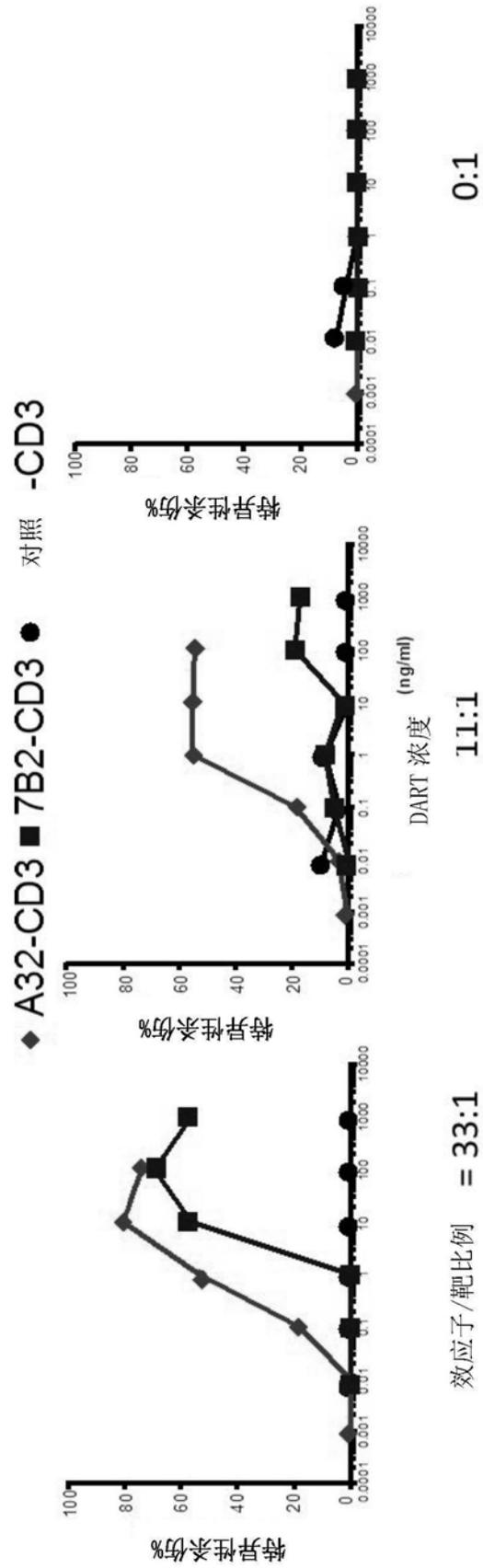


图3

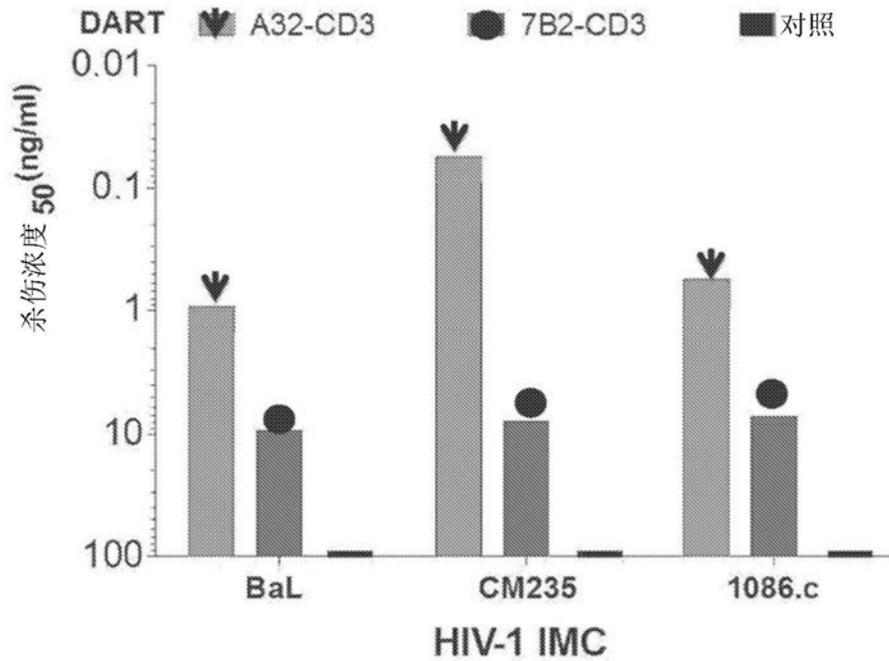


图4

CDR1 是粗体。CDR2 是绿色粗体/加下划线的。CDR3 是红色粗体/斜体

mAb CH27: 原始 cDNA 序列

>H004021_CH27_HC SEQ ID NO: 57

```

GAGGTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGTGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTTGTGC
AGCCTCTGGATTGAGCGTCAGCTACGACTATATGGCCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGG
AGTGGGTCTCTATTATTTATGGTGGTGGTAGTCCATATTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTGCC
ATCTCCAGAGACACCTCCAGGAATACACTGGATCTTCAAATGAGCAGCCTGAGACGTGACGACAGCGG
TGTTTACTTCTGTGCGAGGGGACTCGCCTCGCTCTTCGATCTCTGGGGCCGAGGCACCCCTGGTCACTG
TCTCGTCAGCATCCCCGACCAGCCCCAAGGTCTTCCCCTGAGCCTCGACAGCACCAGC

```

>K003061_CH27_KC SEQ ID NO: 58

```

GAAATTGTGTTGACRCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGAGAAAACAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCGGCGTGTAAACGTCAACTACCTAGCCTGGTATCAACACAGACCTGGCCAGAGTCCCA
GGCTCCTCATGTACGGTCCCTACAACAGGCCCACTGGCATCCCGGGCAGGTTCTGGGGCGAGTGGTCT
GGGCCACTCTTCACTCTCAACATCGACAGACTGGAGCCTGTTGATCGAGCAGTCTATTACTGTCTACA
CTTTGACTCTGATACTTCTTCGTGGGCGTTCGGCCGAGGGACCAAGGTGGAGGTCAAACGAACGTGG
CTGCACCATCTTCTTCACTCTTCCAAAAACATCTGAAGCAGTTTTAATCTCAACTTCTCTCATCAAAC
CCGGGGGGGAGATCAAGACCGATGGGCCAGCCACGGTGGTGGACCGGCACGGGGCCGCCCCACA
GCGAAAAAAGGGGAGACCCAGAGTGTGAGGGCACTAGAGGGGTGGGGACAGACCCCTTCTGGGGACT
TGAAGGGGGAGAGTCGCCCCACATGCCAAACGGGGGGCCACCACCGGGCGGTTTCACGGACGTTAT
TAACGGGGCCGGAATTTTCCCGCTGTTTCATACAAGCCCCCCCCCTGGAGGGGGAAACAAACCCCGC
CAAAAAGGGGCTTTATTCTCAAACCAACAACGCGCGCCCCCAACCCCTCCAAAATTTTCCCCCAA
ACCAAACACAAACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC

```

图5

mAb CH27: 干净的 DNA 序列

>H004021_CH27_HC_ 干净的 SEQ ID NO: 59

GAGGTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGTGGCTTGGTCCAGCCGGGGGGTCCCTGAGACTCTCTTGTGC
 AGCCTCTGGATTTCAGCGTCA**AGCTACGACTATATGGCC**TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGGGACTGG
 AGTGGGTCTCTATATTTATGGTGGTGGTACTCCATATACCGCAGACTCTGTGAAGGGCCGATTCCGC
 ATCTCCAGAGACACCTCCAGGAATACACTGGATCTTCAAATGAGCAGCCTGAGACGTGACGACAGCGG
 TGTACTTCTGTGGAGGGGACTGGCCCTCGCTCTTCGATCTCTGGGGCCGAGGCACCCCTGGTCACTG
 TCTCGTCAGCA

>K003061_CH27_KC_干净的 SEQ ID NO: 60

GAAATTGTGTTGACRCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTTGTCTCCAGGAGAAACAGCCACCCTCTCCTG
 CAGGGCCAGTCGGCGTGT**AACGTCAACTACCTAGCC**TGGTATCAACACAGACCTGGCCAGAGTCCCA
 GGCTCCTCATGTACGGTCTCTACAAACAGGCCCACTGGCCTCCCGGGCAGGTTCTGGGGCAGTGGTCT
 GGGCCACTCTTCACTCTCAACATCGACAGACTGGAGCCTGTTGATCGAGCAGTCTATTACTGTCTACA
 CTTTACTCTGATACTCTCTCGTGGGCGTTCGGCCGAGGGACCAAGGTGGAGGTCAAACGA

mAb CH27: 氨基酸序列

>H004021_CH27_HC_AA SEQ ID NO: 61

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSV**SYDYMA**WVRQAPGKGLEWVS**LIYGGSPFYADSVKGRFA**
 ISRDTSRNTLDLQMSLRRDSDGVYFCAR**GLASLFDLWGRGTLVTVSSA**

>K003061_CH27_KC_AA SEQ ID NO: 62

EIVLTQSPGTLSLSPGETATLSCRASRRV**VN**NYLAWYQHRPGQSPRLLMYGFY**NRP**TGI**PGR**FWGEWS
 GPLFTLNIDRLEPVDRVY**YCLAFDS**DTSS**NA**FGRGTKVEV**KR**

图5续

mAb CH28: 原始 cDNA 序列

>H004367_CH28_HC SEQ ID NO: 63

```

CAGGTGCAGCTGGTRCAGTCTGGGACTTAATCCTCTACACACACCCATATCTCCTACGCTCCATAACG
GACCTACTTTGCACTAATCCTTAGGACACGCGGACTCCTCCTCGGGGTAAACTCTATAAAGATGACAA
AAGATAGTAACCTAGGAATAGAACAATGCAATATACTAAAGAACTGATCCTTGACACTGCTACCGCCT
AGGTATTCGCAATATAACAAATATCATCATCCGACCCAAGTATATGCTGGATTTGTTAAAAATAGTCAG
AGAACTATATCTATCTGCAATGGCTTACAGCTAAGCCAGAATCTACAATAAAAAACAACAAGCGGGAAC
GCTTCCAAAGAAAAAACCATATACTCAGGCTGTGTTCCACCATCTCAATCACCACATTTCACACATTTT
TTCCCAGGCTTACAAAGATATTCAGGGTTTTTTTTTTCCTTTTCCATTCCAGAGGAACACAGTGCAGC
GTGTCAGTAGGGGGTAAGGAAAAAAGCCTGGTTCCCTCAGTGTGTCTCTCTGGCAAGTCTGGGGCG
CCTCCTTTAGAAATAATCTCACCCAGCCCCCGCCACCTCCAGGGAATGGACGAGTAGTCGAGACAA
ATCTTCCCCCTTATGTTAGAAGAAACAACCAACCCAGATAAAATGCCGCGGAAGCGTCACATTTCTCC
CAAACCAACCTATATCGCATCTAACAGGGGATAAAGCAGCTCAAAAAAGACACGGCGGCTGTATG
TGGGAGAGATCGGTTTCTCTCCTTACAGAACGGAGACCCCCGGAATTAATAATGGGGCCAAGAGAAA
AGAGTTAATTTTTCTTCTGGGTATGTGATGGGGGGGAGAATAATCTGCGCACCAGACCACAGGGTAG
CTGCGTACGTCTCGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTTCAGCGTCAGGAACGACC
AGATGGCTGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGCGACTGGAGTGGGTCT

```

>K003331_CH28_KC SEQ ID NO: 64

```

GAAATGTGTTGACRCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTGTCTCCAGGGGAGAGAGCCACCCCTCTCCTG
CAGGGCCAATCGGCGGATTGACATGAACGCCTTGGCCTGGTACCAGCACCAGTCTGGCCAGGCTCCCA
GGCTCCTCACCATGGTGTCTATAACAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTCAAGTGGCTATTTGGTCT
GGGCCAGAGTTACCCCTCGTCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTCTATTACTGTGTACA
CTTTCTCTACGAAAAATCCAGCGTGGGCGTTCGGCCGAGGGACCAAGATAGAGGTCAAGCGAACTGTGG
CTGCACCATCTGCTCACATCTTCCAACCATATGATGAGCACTTGAAATCTGAAACTGCCTCATCACC
CTGGCGGGGAAAAACAAGAACGGTGGGGGCGCCACAGGTGCCAAAAACTTTATGTGCTCCGGGCAAA
AGCCCCCGTGGAATTTTCATGAAAAAGGGGTACCCATTAGTAGACCGCAAAATGCCGGGCCAAATCTCC
TAAATAACAGAGGTAGAATTAACCAAACAGATGTCCAAAGAACTTTGCTGGAACACCGTAAGCGGTAT
CAAAGAGGAGGGGGAGAGAACCGGGGGCCCTGCCGATATATATCTGTAAACAGCCGGGCCAATG
GATTTCTCCCCCTGTGGGCCCTAAAAAAGGGGTGTTCTTAAACCCACAAAAAAGGGAAAAACGG
TGTCCCGGAAACACACCTTTCTCCAATATTATTTCCGCGGGGAAAAAAGAAAAACAAAAA
AACCC

```

图5续

mAb CH28: 干净的 DNA 序列

>H004367_CH28_HC_干净的 SEQ ID NO: 65

```
GAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGTAGCTGCGTACGTCTCGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC
AGCCTCTGGATTACGCGTCAGGAACGACCAGATGGCC TGGGTCCGCCAGGCTCCAGGGAAGCGACTGG
AGTGGGTCTCTATTATTAAACGATGGGCTAGTCCARACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGCTTCGCC
ATGTCCAGAGACACCTCCAAGAATACAGTGTTCCTTCAGATGAACAGCCTGAGACGTGACGACACAGC
TGTTTATTCTGTGCGAGGGGATCGCCTCATTCCTTCGATGTCTGGGGCCGTGGCAGCCTGGTCGCTG
TCTCGTCAGCA
```

>K003331_CH28_KC_干净的 SEQ ID NO: 66

```
GAAATTGTGTTGACRCAGTCTCCAGGCACCCTGTCTTGTCTCCAGGGGAGAGAGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAATCGGCGGATTGACATGAACGCC TGGCC TGGTACCAGCACCGATCTGGCCAGGCTCCCA
GGCTCCTCACCCTATGGTGTCTATAACAGGGCCACTGGCATCCCAGACAGGTTTCACTGGCTATTGGTCT
GGCCAGAGTTTACCCTCGTCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGCAGTCTATTACTGTGTACA
CTTCTCTACGAAAAATCCAGCGTGGCGCTTCGGCCGAGGGACCAAGATAGAGGTCAAGCGA
```

mAb CH28: 氨基酸序列

>H004367_CH28_HC_AA SEQ ID NO: 67

```
EVQLVESGGSCVRLGGSRLRLSCAASGFSVRNDQMAWVFPQAPGKRLWVSIINDGASPHYADSVKGRFA
MSRDTSKNTVFLQMNSLRDDTAVYFCARGIASFFDVGWGRGTLVAVSSA
```

>K003331_CH28_KC_AA SEQ ID NO: 68

```
EIVLTQSPGTLISLSPGERATLSCRANRRIDMNALAWYQHRSGQAPRLLTHGVYNPATGIPDRFSGYWS
GPEFTLVISRLEPEDFAVYYCVHFLYENPAAWAFGRGTKIEVKR
```

图5续

mAb CH44: 原始 cDNA 序列

>H004016_CH44_HC SEQ ID NO: 69

```

GAGGTKCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGTGGCGTGGTCCACCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC
AGCCTCTGGATTTCAGCGTCAGTCACGACTTCATGGCCTGGATCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGACTGG
AGTGGATCTCTATCATATATAACACTGGTTCTCGATACTACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGCTTC
GCCCTCTCCAGAGATACGTCCAACAACACACTGATTCTTCACATGAGCGGCCTGAGACGTGACGACAC
GGCTATTTATTTCTGTGCCAGGGGAGTCGCCTCGTTCTTCGAATTGTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCA
CTGTCTCGTCAGCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGC

```

>K003056_CH44_KC SEQ ID NO: 70

```

GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAACCGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCGCCGTGTTGACATGAACGGCCTCGCCTGGTACCAACACAGGCCTGGCCAGGCTCCCA
GGCTCCTCATGCATGGTGTATAAATAGGGCCGCCGATCTCAGGCAGGTTCACTGGCAGTTGGTCT
GGGCCAGTCTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGGAGTCTATTACTGTCAACA
CTTTTACTATGAGACTTCAGCGTGGCGTTCGGCCGAGGGACCAGGGTGGAGGGCAAACGAACGTGG
CTGCACCATCTTCTCCTATCTTCCAAAAAACAACCTCCCAATGACAGCTGTAAATGTAACATAACTG
TGGCACAATCCATCAGCATCCGCCGCGGAAGGGCGAGCAAAGGGCCCCCGCCCGCCCGCCGGGGGG
GGGGGGGGGGGTGGGGGGGGCCCCCTGGGCGGGGGGCCCCACCCCCCGGCCCCCCCGGGGCC
GGCCCCCCCCCCCCCGGCCCCCCCCCCCGGGCGGGGCCCCACAGGGCCCCGGGGGGCCCCCTCC
CCCCCCCCCAAACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGCCGCCCCCCCCCCCCCCCC
CCCCCCCCCAAACCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCGCCGCCCCCCCCCCCCCCCC
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCCC
CCCCCCCCCCCCCCCCCCCC

```

图5续

mAb CH44:干净的 DNA 序列

>H004016__CH44__HC__干净的 SEQ ID NO: 71

```
GAGGTKCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGTGGCGTGGTCCACCCTGGGGGGTCCCTGAGACTCTCCTGTGC
AGCCTCTGGATTTCAGCGTCAGTCACGACTTCATGGCCGGATCCGCCAGGCTCCAGGAAAGGGACTGG
AGTGGATCTCTATCATATATAACACTGGTCTCGATACTACTACGCAGACTCTGTGAAGGGCCGCTTC
GCCCTCTCCAGAGATACGTCCAACAACACACTGATTCTTCACATGAGCGGCCCTGAGACGTGACGACAC
GGCTATTTATTTCTGTGCCAGGGGAGTCGCCCTCGTTCTTCGAAFTGTGGGGCCGTGGCACCCCTGGTCA
CTGTCTCGTCAGCC
```

>K003056__CH44__KC__干净的 SEQ ID NO: 72

```
GAAACGACACTCACGCAGTCTCCAGCCATCCTGTCTGTGTCTCCAGGGGAAACCGCCACCCTCTCCTG
CAGGGCCAGTCGCCGTGTTGACATGAACGGCCTCGCCGGTACCAACACAGGCCCTGGCCAGGCTCCCA
GGCTCCTCATGCATGGTGTFTTATAATAGGGCCGCCGCATCTCAGGCAGGTTCACTGGCAGTTGGTCT
GGGCCAGTCTTCACTCTCACCATCAGCAGACTGGAGCCTGAAGATTTTGGAGTCTATTACTGTCAACA
CTTTTACTATGAGACTTCAGCGTGGGCGTTCGGCCGAGGGACCAGGGTGGAGGGCAAACGA
```

mAb CH44:氨基酸序列

>H004016__CH44__HC__AA SEQ ID NO: 73

```
EVQLVESGGGVVHPPGSLRRLSCAASGFSVSHDFMAWIRQAPGKLEWISIIYNTFGSRYYYADSVKGRF
ALSRDTSNNTLILHMSGRLRRDDTAIFYCARGVASFFELWGRGTLVTVSSA
```

>K003056__CH44__KC__AA SEQ ID NO: 74

```
ETTLTQSPAILSVPGETATLSCRASRRVDMNGLAWYQHRPGQAPRLMHGVYNPAAGISGRFTGSWS
GPVFTLTISRLEPEDFGVYYCQHFYYETSAWAFGRGTRVEGKR
```

图5续

```

>A32VH
CAGGTGCAGCTGTGCGGAGTCGGGCCAGGACTGTTGAAGCCTTCACAGACCTTGTCCCTCAGTTGCACTGTG
TCTGGTGGCTCCDAGCAGTAGTGGTCTCACTACTGGAGTTGGATCCGCCAGTACCCAGGGAAGGGCCCTGGAG
TGGATTGGTTACATCCATTACACTGGGAACACTTACTACAAACCCGTCCTCAGAGTGGAAATACCATATPCA
CAACACACCGTCTGAGAACCAGTTCTCCCTGAAGCTCAACTCTGTGACTGTTGCGAGACACGGCCCTCTATTAC
TGTGGGAGAGGGACCCGCTCTCCGGACACTACGGATGCTTTTGTATATTTGGGGCCAGGGGACAAAGGGTCACC
GTCTCTTCA (SEQ ID NO:75)
>A32VL
CAGTCTGCCCCGACTCAGCCCTCCCTCCGGGTCGGGCTCTCCTGGACACTCAGTCCACCATCTCCTGCACTGGA
ACCAGCAGTGCAGCTTGGTGTATATACTATATGTTTCTTGGTACCAACACCCACCCAGGCCAAAGCCCCAAACTC
ATAATTTCTGAGGTCAATAACCCGGCCCTCAGGGTCCCTGATCGTTTCTCTGGCTCCAACTCTGGCAACAGG
GCCTCCCTGACCGTCTCTGGGCTCCAGGCTGAGGATGAGGCTGAAATATTACTGCAGCTCATACACAGACTC
CACAATTCGTCTTCCGGGAGGGACCAAGCTGACCGTCCCTA (SEQ ID NO:76)
---
>A32VH
QVQLCGVGFGLVKPSQTLSELSCTVSGGSSSGAHYWSWLRQYPGKGLEWIGYIHYSGNTYYNPSLRSRITIS
QHTSENQPSLRLNLSVTVADIAVYYCARGTRLETLRNFAPDLWGQGRVTVSS (SEQ ID NO:77)
>A32VL
QSALTQPPSASGSPQGSVTISCTGTSSEVGGYNYVSWYQHHPGKAPKLIISEVNNPSPGVDRFRSGSKSGNT
ASLTVSGLQAEDEAEYCCSYTDLHNFVFGGTELTVL (SEQ ID NO:78)

```

图6

```

>7E2VH
CAGTTCAGCTGGTGGAGTCTGGGGGAGGCGTTTTCAAGCCTGGAGGGTCCCTGAGACTCTCCTG
TGAAGCCTCTGGATTACATTTACTGAATATTTACATGACTTGGGTCCGCCAGGCTCCTGGGAAGG
GGCTGGAGTGGCTTGGGTATATTAGTAAGAAATGGTGAATATTCAAAATATTCACCGTCCCTCAAAC
GGCCGGTTCAACATCTCCAGAGACAACGCCAAGAAGTCACTGTTTTCTGCAATTGGACAGACTGAG
CGCCGACGACACGGCCGTCTATTACTGTGGAGAGCGGACCGATTAAACATACTTCTCTGATATAC
TCCARTACATTTTTGACCTCTGGGGCCAGGGAGCCCGGTCACCGTCTCCTCG (SEQ ID NO:79)
>7E2VH
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDQVQLVQSGGVSFKPGSLRLSCEASGFTFTEHYMTWVRQAPGKG
LEWLAYISKNGEYSKYSPPSNGRFTLSRDNAKNSVFLQLDRLSADDEAVYYCARADGLTYFSELL
QYIFDLWGQGARVTVSS (SEQ ID NO:80)
>7E2VK
METDTLLLWVLLLWVPGSTGDETTLTQSPDSLAVSPGERATTHCKSSQTLVYSSNNRHSIAWYQQ
RPGQPPKLLLYWAMRLSGVDFRFGSGSGTDEFTLTINNLAEDVAIYYCHQYSSHPPTFGHGTR
VELR (SEQ ID NO:81)
>7E2VK
GAAACGACACTCAGCAGTCTCCAGACTCCCTGGCTGTGTCTCCGGGCGAGAGGGCCACCATCCA
CTGCCAGTCCAGCCAGACTCTTTTGTACAGCTCCAACAATAGACACTCCATTGCTTGGTACCAAC
AGAGACCAGGACAGCCCTCCTAAATTACTCCTTTATTGGGCATCTATCCGGCTTTCCGGGGTCCCT
GACCGATTCAATGGCAGCGGCTCTGGACAGATTTCACTCTCACCATCAACAACCTGCAGGCTGA
GGATGTGGCCATCTATTACTGTACCAATATTCAGTCACTCCCCGACGTTCCGGCCACGGGACCA
GGGTGGAGCTCASA (SEQ ID NO:82)

```

图7

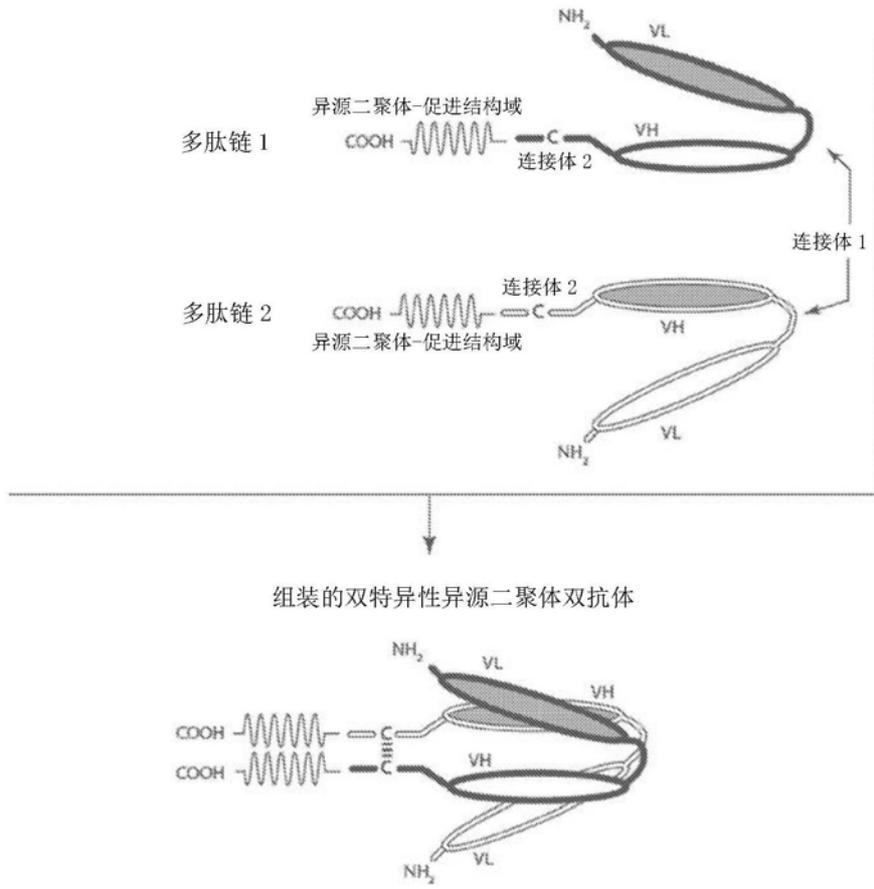


图8A

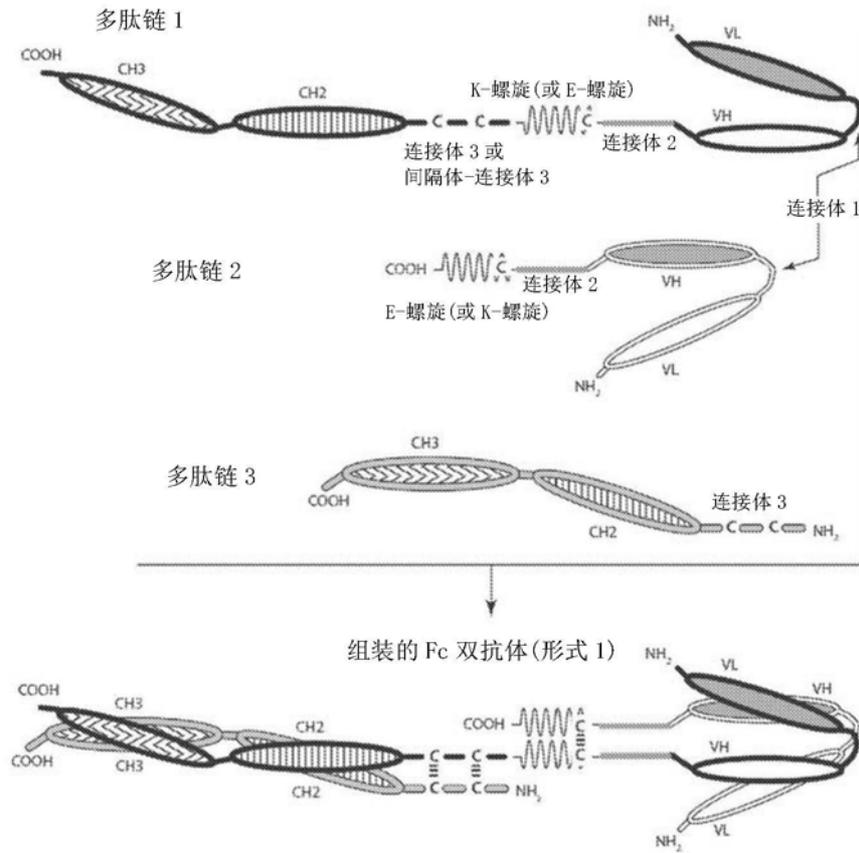


图8B

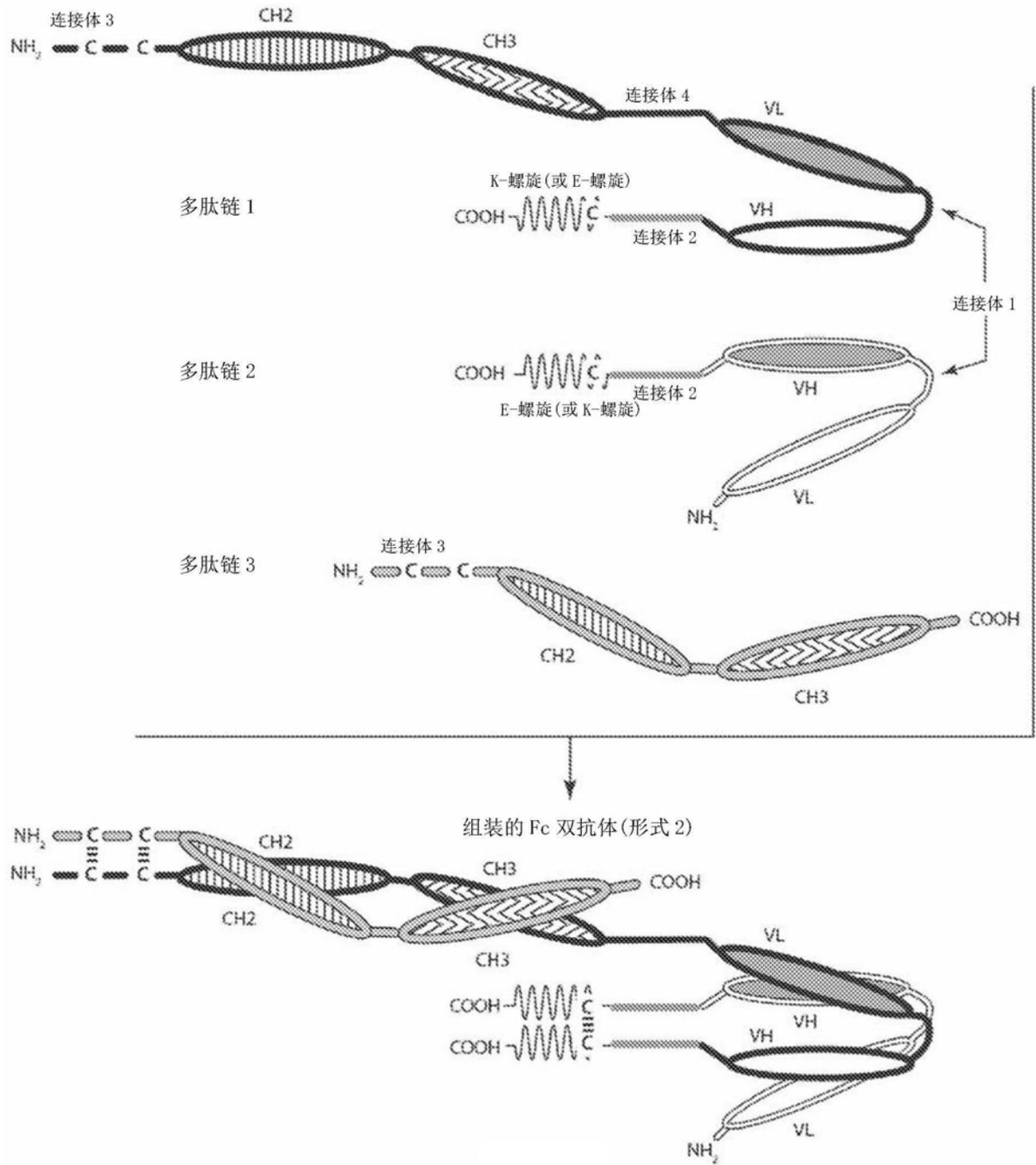


图8C

序列

SEQ ID NO: 1
GGGSGGGG

SEQ ID NO: 2
GGCGGG

SEQ ID NO: 3
GVEPKSC

SEQ ID NO: 4
VEPKSC

SEQ ID NO: 5
GFNRGEC

SEQ ID NO: 6
FNRGEC

SEQ ID NO: 7
EVAALEKEVA ALEKEVAALE KEVAALEK

SEQ ID NO: 8
KVAALKEKVA ALKEKVAALK EKVAALKE

图9

SEQ ID NO: 9

QSALTQPPSA SGSPGQSVTI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQH HPGKAPKLI
 SEVNNRPSGV PDRFSGSKSG NTASLTVSGL QAEDEAEYYC SSYTDIHN
 FV FGGGTKLTVL GGGSGGGGEV QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSTY
 AMNWVRQAPG KGLEWVGRIR SKYNNYATYY ADSVKGRFTI SRDDSKNSLY
 LQMNSLKTED TAVYYCVRHG NFGNSYVSWF AYWGQGTTLVT VSSGGCGGGE
 VAALEKEVAA LEKEVAALEK EVAALEK

SEQ ID NO: 10

cagagcgcac tgactcagcc cccttcgccc tccgggtctc ctggacagag cgtgacaatc
 tcatgcactg ggacttcaag cgatgtgggc ggggtacaact atgtgagttg gtaccagcac
 catcccggga aggcacctaa actgatcatt agcgaagtga acaatcgacc aagcggcgtc
 cccgaccggt tcagcggcag caagtctggc aataccgcca gtctgacagt ctcaggcctg
 caggccgagg atgaagctga gtactattgc tcatcataca ctgacatcca taacttcgtc
 ttcggcggcg gaactaaact gaccgtgctg ggtggcggat cggcggcgg aggcggagg
 cagctggtgg agtctggggg aggcttggtc cagcctggag ggtccctgag actctcctgt
 gcagcctctg gattcacctt cagcacatac gctatgaatt gggtcgcca ggctccaggg
 aaggggctgg agtggggttg aaggatcagg tccaagtaca acaattatgc aacctactat
 gccgactctg tgaagggtag attcaccatc tcaagagatg attcaaagaa ctcactgtat
 ctgcaaatac acagcctgaa aaccgaggac acggccgtgt attactgtgt gagacacggt
 aacttcggca attcttacgt gtcttggttt gcttattggg gacaggggac actggtgact
 gtgtcttccg gaggatgtgg cgggtggagaa gtggccgcac tggagaaaga ggttgctgct
 ttggagaagg aggtcgtctc acttgaaaag gaggtcgcag ccctggagaa a

SEQ ID NO: 11

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT
 PARFSGSLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV
 QLQESGPGLV KPSQTLRLSC TVSGGSSSSG AHYWSWIRQY PGKGLEWIGY IHYSGNTYYN
 PSLKSRITIS QHTSENQFSL KLNSVTVADT AVYYCARGTR LRTLRFNAFDI WGQGTTLTVS
 SGGCGGKVA ALKEKVAALK EKVAALKEK AALKE

图9续

SEQ ID NO: 12

caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaaac tgtgaccctg
 acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag
 aagccaggac aggcaccaag gggcctgac ggggggtacaa acaaaagggc tccctggacc
 cctgcaacgg tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat tacctgggca
 caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
 gggggtggca caaaactgac tgtgctggga ggggggtggat ccggcggcgg aggccagggtg
 cagctgcagg agtccggccc cggactggtc aaaccctctc agactctgtc tctgtcatgt
 accgtgtcag gcggctcttc cagctccggg gcacactact ggagctggat caggcagtat
 cccggcaagg ggctggagtg gatcggatac attcattata gcggcaaac atactataat
 cttctctga agagtccgat cactatttca cagcacacca gcgaaaacca gttcagcctg
 aagctgaaca gcgtgaccgt cgcgcacaca gccgtgtact attgcgcccg gggcaccaga
 ctgagaactc tgagaaacgc atttgacatc tggggacagg ggacactggt gacagtgagc
 tccggaggat gtggcgggtg aaaagtggc gcactgaagg agaaagtgc tgctttgaaa
 gagaaggctc ccgacttaa ggaaaaggtc gcagccctga aagag

SEQ ID NO: 13

DIVMTQSPDS LAVSPGERAT IHCKSSQTLL YSSNNRHSIA WYQQRPGQPP KLLLYWASMR
 LSGVPDRFSG SSGTDFTLT INNLQAEDVA IYCHQYSSH PPTFGHGTRV EIKGGGSGGG
 GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF STYAMNWVRQ APGKGLEWVG RIRSKYNRYA
 TYYADSVKGR FTISRDDS KN SLYLQMNSLK TEDTAVYYCV RHGNEFGNSYV SWFAYWGQGT
 LVTVSSGGCG GGEVAALEKE VAALEKEVAA LEKEVAALEK

SEQ ID NO: 14

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctccgggcca gagggccacc
 atccactgca agtccagcca gactcttttg tacagctcca acaatagaca ctccattgct
 tggtagcaac agagaccagg acagcctcct aaattactcc tttattgggc atctatgagg
 ctttccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc
 atcaacaacc tgaggctga ggatgtggc atctattact gtcaccaata ttccagtcac
 cccccagct tcggccacgg gaccaggtg gagatcaaag gtggaggatc cggcggcggg
 ggcgaggtgc agctggtgga gtctggggga ggcttggtcc agcctggagg gtcctgaga
 ctctcctgtg cagcctctgg attcaccttc agcacatag ctatgaattg ggtccgccc

图9续

```

gctccagggga aggggctgga gtgggttggga aggatcaggt ccaagtacaa caattatgca
acctactatg ccgactctgt gaagggtaga ttcaccatct caagagatga ttcaaagaac
tcaactgtatc tgcaaatgaa cagcctgaaa accgaggaca cggccgtgta ttactgtgtg
agacacggta acttcggcaa ttcttacgtg tcttggtttg cttattgggg acaggggaca
ctgggtgactg tgtcttccgg aggatgtggc ggtggagaag tggccgcaact ggagaaagag
gttgctgctt tggagaagga ggtcgcctgca cttgaaaagg aggtcgcagc cctggagaaa

```

SEQ ID NO: 15

```

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAFWT
PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV
QLVQSGGGVF KPGGSLRLSC EASGFTFTEY YMTWVRQAPG KGLEWLAYIS KNGEYSKYSP
SSNGRFTISR DNAKNSVFLQ LDRLSADDTA VYYCARADGL TYFSELLQYI FDLWGQGARV
TVSSGGCGGG KVAALKEKVA ALKEKVAALK EKVAALKE

```

SEQ ID NO: 16

```

caggctgtgg tgactcagga gcotcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag
aagccaggac aggcaccaag gggcctgatc gggggtacaa acaaaagggc tccttgacc
cctgcacgggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga ggggtggat ccggcggagg tggacaggtg
cagctggtgc agtctggggg aggcgttttc aagcctggag ggtccctgag actctctgt
gaagcctctg gattcacatt tactgaatat tacatgactt gggtcgcca ggctectggg
aaggggctgg agtggttgc gtatattagt aagaatggtg aatattcaaa atattcacg
tcctcaaacy gccggttcac catctccaga gacaacgcca agaactcagt gtttctgcaa
ttggacagac tgagcgccga cgacacggcc gtctattact gtgcgagagc ggacggatta
acatacttct ctgaattact ccaatacatt tttgacctct ggggccaggg agcccgggtc
accgtctctc cggaggatg tggcgggtgga aaagtggccg cactgaagga gaaagttgct
gctttgaaag agaaggtcgc cgcacttaag gaaaaggtcg cagccctgaa agag

```

图9续

SEQ ID NO: 17

EIVLTQSPGT LSLSPGERAT LSCRANRRID MNALAWYQHR SGQAPRLLTH GVYNRATGIP
 DRFSGYWSGP EFTLVISRLE PEDFAVYYCV HFLYENPAWA FGQGTKLEIK GGGSGGGGEV
 QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSTY AMNWVRQAPG KGLEWVGRIR SKYNNYATYY
 ADSVKGRFTI SRDDSKNSLY LQMNSLKTED TAVYYCVRHG NFGNSYVSWF AYWGQGTLLV
 VSSASTKGEV AACEKEVAAL EKEVAALEKE VAALEK

SEQ ID NO: 18

gaaattgtgt tgacgcagtc tccaggcacc ctgtccttgt ctccagggga gagagccacc
 ctctcctgca gggccaatcg ggggattgac atgaacgcct tggcctggta ccagcaccga
 tctggccagg ctcccaggct cctcaccat ggtgtctata acagggccac tggcatcca
 gacaggttca gtggctattg gtctgggcca gagttcacc tcgtcatcag cagactggag
 cctgaagatt ttgcagtcta ttactgtgta cactttctct acgaaaatcc agcgtggcg
 ttcggccagg ggaccaagct ggagatcaag ggtggaggat ccggcggcgg aggcgaggtg
 cagctggtgg agtctggggg aggcttggtc cagcctggag ggtccctgag actctcctgt
 gcagcctctg gattcacctt cagcacatac gctatgaatt gggtcgcgca ggctccaggg
 aaggggctgg agtggggttg aaggatcagg tccaagtaca acaattatgc aacctactat
 gccgactctg tgaagggtag attcaccatc tcaagagatg attcaaagaa ctactgtat
 ctgcaaatga acagcctgaa aaccgaggac acggcogtgt attactgtgt gagacacggt
 aacttcggca attcttacgt gtcttggttt gcttattggg gacaggggac actggtgact
 gtgtcttccg cctccaccaa gggcgaagtg gccgcatgtg agaaagaggt tgctgctttg
 gagaaggagg tcgctgcact tgaaaaggag gtgcagccc tggagaaa

SEQ ID NO: 19

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT
 PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV
 QLVESGGGVV HPGGSLRLSC AASGFVSRND QMAWVRQAPG KRLEWVSIIN DGASPYADS
 VKGRFAMSRD TSKNTVFLQM NSLRDDTAV YFCARGIASF FDVWGRGTLV TVSSASTK GK
 VAACKEKVAAL LKEKVAALKE KVAALKE

图9续

SEQ ID NO: 20

```
caggctgtgg tgactcagga gccttcaactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac gggggtacaa acaaaagggc tccctggacc
cctgcacggg tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggagg tggagagggtg
cagctggtgg agtctggagg tggcgtggtc caccctggag gaagcctgag actctcctgt
gcagcctctg gattcagcgt caggaacgac cagatggcct gggtcgccca ggctccaggg
aagcgactgg agtgggtctc tattattaac gatggtgcta gtccatacta cgcagactct
gtgaagggcc gcttcgcat gtccagagac acctccaaga atacagtgtt tcttcagatg
aacgcctga gacgtgacga cacagctggt tatttctgtg cgagggggat cgcctcatc
ttgatgtct gggccgtgg cacgctggtc actgtctctg cagcctccac caaggcaaa
gtggccgcat gtaaggagaa agttgctgct ttgaaagaga aggtcggcgc acttaaggaa
aaggtcgcag ccctgaaaga
g
```

SEQ ID NO: 21

```
EIVLTQSPAI LSVSPGETAT LSCRASRRVD MNGLAWYQHR PGQAPRLMH GVYNRAAGIS
GRFTGSWSGP VFTLTISRLE PEDFGVYYCQ HFYYETSAWA FGQGTRLEIK GGGSGGGGEV
QLVESGGGLV QPGGSLRLSC AASGFTFSTY AMNWVRQAPG KGLEWVGRIR SKYNNYATYY
ADSVKGRFTI SRDDSKNSLY LQMNSLKTED TAVYYCVRHG NFGNSYVSWF AYWGQGLVLT
VSSASTKGEV AACEKEVAAL EKEVAALEKE VAALEK
```

SEQ ID NO: 22

```
gaaattgtgt tgaecgagtc tccagccatc ctgtctgtgt ctccagggga aaccgccacc
ctctcctgca gggccagtcg ccgtggtgac atgaacggcc tcgcctggta ccaacacagg
cctggccagg ctcccaggct cotcatgcat ggtgtttata atagggccgc cggcatctca
ggcaggttca ctggcagttg gtctgggcca gtcttcaactc tcaccatcag cagactggag
cctgaagatt ttggagtcta ttactgtcaa cacttttact atgagacttc agcgtgggcg
ttcggccagg ggaccaggct ggagatcaaa ggtggaggat ccggcggcgg aggcgagggtg
cagctggtgg agtctggggg aggcttggtc cagcctggag ggtccctgag actctcctgt
```

图9续

```

gcagcctctg gattcacctt cagcacatac gctatgaatt gggtcgcgca ggctccaggg
aaggggctgg agtgggttgg aaggatcagg tccaagtaca acaattatgc aacctactat
gccgactctg tgaagggtag attcaccatc tcaagagatg attcaaagaa ctactgtat
ctgcaaatga acagcctgaa aaccgaggac acggcctgtg attactgtgt gagacacggt
aacttcggca attcttacgt gtcttggttt gcttattggg gacaggggac actggtgact
gtgtcttccg cctccaccaa gggcgaagtg gccgcatgtg agaaagaggt tgctgctttg
gagaaggagg tcgctgcact tgaaaaggag gtcgcagccc tggagaaa

```

SEQ ID NO: 23

```

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT
PARFSGSLLG GKAALITIGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV
QLVESGGGVV HPGGSLRLSC AASGFSVSHD FMAWIRQAPG KGLEWISIIY NTGSRYYYAD
SVKGRFALSR DTSNNTLILH MSGLRRDDTA IYFCARGVAS FFELWGRGTL VTVSSASTKG
KVAACKEKVA ALKEKVAALK EKVAALKE

```

SEQ ID NO: 24

```

caggctgtgg tgactcagga gccttcactg accgtgtccc caggcggaac tgtgaccctg
acatgcagat ccagcacagg cgcagtgacc acatctaact acgccaattg ggtgcagcag
aagccaggac aggcaccaag gggcctgac gggggtacaa acaaaagggc tccttgacc
cctgcacggt tttctggaag tctgctgggc ggaaaggccg ctctgactat taccggggca
caggccgagg acgaagccga ttactattgt gctctgtggt atagcaatct gtgggtgttc
gggggtggca caaaactgac tgtgctggga gggggtggat ccggcggagg tggagaggtg
cagctggtgg agtctggagg tggcgtggtc caccctggag gaagcctgag actctcctgt
gcagcctctg gattcagcgt cagtcacgac ttcattggct ggatcaggca ggctccagga
aagggactgg agtggatctc tatcatatat aacctgggtt ctcgatacta ctacgcagac
tctgtgaagg gccgcttcgc cctctccaga gataogtcca acaacacact gattcttcac
atgagcggcc tgagacgtga cgacacggct atttatttct gtgccagggg agtcgcctcg
ttctttgaat tgtggggccg tggcaccctg gtcactgtct cgtcagcctc caccaagggc
aaagtggccg catgtaagga gaaagttgct gctttgaaag agaaggtcgc cgcacttaag
gaaaaggtcg cagccctgaa
agag

```

图9续

SEQ ID NO: 25

DIVMTQSPDS LAVSPGERAT IHCKSSQTLL YSSNNRHSIA WYQQRPGQPP KLLLYWASMR
 LSGVPDRFSG SGSGETDFTLT INNLQAEDVA IYYCHQYSSH PPTFGHGTRV EIKGGGSGGG
 GQVTLRESGP ALVKPTQTLT LTCTFSGFSL STSGMGVGIWI RQPPGKALEW LAHIWDDDK
 RYNFALKSRL TISKDTSKNQ VVLTMTNMDP VDTATYYCAQ INPAWFAYWG QGTILVTVSSG
 GCGGGEVAAL EKEVAALEKE VAALEKEVAA LEK

SEQ ID NO: 26

gacatcgtga tgaccagtc tccagactcc ctggctgtgt ctccgggcca gagggccacc
 atccactgca agtccagcca gactcttttg tacagctcca acaatagaca ctccattgct
 tggtagcaac agagaccagg acagcctcct aaattactcc tttattgggc atctatgagg
 ctttccgggg tccctgaccg attcagtggc agcgggtctg ggacagattt cactctcacc
 atcaacaacc tgcaggctga ggatgtggc atctattact gtcaccaata ttccagtcac
 cccccagct tggccacgg gaccaggtg gagatcaaag gtggaggatc cggcggcggg
 ggccaggta ccctgagaga gtctggccct gcgctgggta agcccacaca gaccctcaca
 ctgacttgta ccttctctgg gttttcactg agcacttctg gtatgggtgt aggctggatt
 cgtagcctc cgggaaggc tctagagtgg ctggcacaca tttgggggga tgatgacaag
 cgctataatc cagccctgaa gagccgactg acaatctcca aggatacctc caaaaaccag
 gtatgcctca caatgaccaa catggaccct gtggatactg ccacatacta ctgtgctcaa
 ataaaccccg cctggtttgc ttactggggc caagggactc tggcactgt gagctccgga
 ggatgtggcg gtggagaagt ggccgactg gagaaagagg ttgctgcttt ggagaaggag
 gtcgctgcac ttgaaaagga ggtcgcagcc ctggagaaa

SEQ ID NO: 27

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSDV FDGDSFMNWX QQKPGQPPKL LIYTTSNLES
 GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQSNEDPY TFGQGTKLEI KGGGSGGGGQ
 VQLVQSGGGV FKPGGSLRLS CEASGFTFTE YYMTWVRQAP GKLEWLAYI SKNGEYSKYS
 PSSNGRFTIS RDNKNSVFL QLDRLSADDT AVYYCARADG LTYFSELLQY IFDLWGQGAR
 VTVSSGGCGG GKVAALKEK AALKEKVAAL KEKVAALKE

图9续

SEQ ID NO: 28

gacatcgtga tgaccaatc tccagactct ttggctgtgt ctctagggga gagggccacc
 atcaactgca aggccagcca aagtgttgat tttgatggtg atagttttat gaactggtac
 caacagaaac caggacagcc acccaaactc ctcatctata ctacatccaa tctagaatct
 ggggtcccag acaggtttag tggcagtggg tctgggacag acttcaccct caccatcagc
 agcctgcagg ctgaggatgt ggcagtttat tactgtcagc aaagtaatga agatccgtac
 acgttcggac aggggaccaa gcttgagatc aaaggaggcg gatccggcgg aggtggacag
 gtgcagctgg tgcagtctgg gggaggcgtt ttcaagcctg gagggtcctt gagactctcc
 tgtgaagcct ctggattcac atttactgaa tattacatga cttgggtccg ccaggctcct
 gggaaagggc tggagtggct tgcgtatatt agtaagaatg gtgaatattc aaaatattca
 ccgtcctcaa acggccgggt caccatctcc agagacaacg ccaagaactc agtgtttctg
 caattggaca gactgagcgc cgacgacacg gccgtctatt actgtgcgag agcggacgga
 ttaacatact tctctgaatt actccaatac atttttgacc tctggggcca gggagccggg
 gtcaccgtct cctccggagg atgtggcggg ggaaaagtgg ccgcactgaa ggagaaagtt
 gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt aaggaaaagg tcgcagccct gaaagag

SEQ ID NO: 29

QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT
 PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGEV
 KLDETGGGLV QPGRPMKLSV VASGFTFSY WMNWVRSPE KGLEWVAQIR NKPYNYETYY
 SDSVKGRFTI SRDDSKSSVY LQMNLRVED MGIYYCTGSY YGMDYWGQGT SVTVSSGGCG
 GGEVAALEKE VAALKEKVAALKEVAALKE

SEQ ID NO: 30

DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNNGTYLRW YLQKPGQSPK VLIYKVSNRF
 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP WTFGGGTKLE IKGGSGGGG
 QVQLQESGPG LVKPSQTLISL SCTVSGGSSS SGAHYWSWIR QYPGKGLEWI GYIHYSNGTY
 YNPSLKSRII ISQHTSENQF SLKLNSTVA DTAVYYCARG TRLRTLRFNAF DIWGQGTLLV
 VSSGGCGGGK VAALKEKVAALKEVAALKE KVAALKE

图9续

SEQ ID NO: 31
 DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNNGNTYLRW YLQKPGQSPK VLIYKVSNRF
 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP WTFGGGKLEI IKGGGSGGGG
 QVTLRESGPA LVKPTQTLTL TCTFSGFSL S TSGMGVGVWIR QPPGKALEWL AHIWDDDKR
 YNPALKSRIT ISKDTSKNQV VLTMTNMDPV DTATYYCAQI NPAWFAYWQ GTLVTVSSGG
 CGGGEVAAL KEVAALKEV AALEKEVAAL EK

SEQ ID NO: 32
 DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVDFDGDSFMNWX QQKPGQPPKL LIYTTSNLES
 GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQSNEDPY TFGGKLEI KGGGSGGGG
 VKLDETGGL VQVGRPMKLS CVASGFTFSD YWMNWVRQSP EGGLEWVAQI RNKPYNYETY
 YSDSVKGRFT ISRDDSKSSV YLQMNLRVE DMGIYYCTGS YGMDYWGQG TSVTVSSGGG
 GGGKVAALKE KVAALKEVA ALKEKVAALK E

SEQ ID NO: 33
 DIVMTQSPDS LAVSPGERAT IHCKSSQTLL YSSNNRHSIA WYQQRPGQPP KLLLYWASMR
 LSGVPDRFSG SSGTDFTLT INNLAEDVA IYYCHQYSSH PPTFGHGTRV EIKGGGSGGG
 GEVKLDETGGLV QVGRPMKLS LSCVASGFTF SDYWMNWVRQ SPEGGLEWVA QIRNKPYNYE
 TYSDSVKGR FTISRDDSKS SVYLMNLR VEDMGIYYCT GSYYGMDYWG QGTSVTVSSG
 GCGGGEVAAL EKEVAALKE VAALKEVAA LEK

SEQ ID NO: 34
 DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNNGNTYLRW YLQKPGQSPK VLIYKVSNRF
 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP WTFGGGKLEI IKGGGSGGGG
 QVQLVQSGGG VFKPGGSLRL SCEASGFTFT EYMTWVRQA PGKLEWLA ISKNGEYSKY
 SPSSNGRFTI SRDNAKNSVF LQLDRLSADD TAVYYCARAD GLTYFSELLQ YIFDLWGQGA
 RVTVSSGGCG GGVKVAALKE VAALKEVAA LKEKVAALKE

SEQ ID NO: 35
 QSALTQPPSA SGSPGQSVTI SCTGTSSDVG GYNYVSWYQH HPGKAPKLI SEVNNRPSGV
 PDRFSGSKSG NTASLTVSGL QAEDAEEYIC SSYTDIHNFV FGGGKLTVL GGGSGGGGEV
 KLEDETGGLV QVGRPMKLS VASGFTFSDY WMNWVRQSPE KGLEWVAQIR NKPYNYETTY
 SDSVKGRFTI SRDDSKSSVY LQMNLRVED MGIYYCTGSY YGMDYWGQGT SVTVSSGGCG
 GGEVAALKE VAALKEVAA LEKEVAALKE

SEQ ID NO: 36
 DVVMTQTPFS LPVSLGDQAS ISCRSSQSLV HSNNGNTYLRW YLQKPGQSPK VLIYKVSNRF
 SGVPDRFSGS GSGTDFTLKI SRVEAEDLGV YFCSQSTHVP WTFGGGKLEI IKGGGSGGGG
 QVQLQESGPG LVKPSQTL SLCTVSGGSS SGAHYWSWIR QYPGKLEWI GYIHYSGNTY
 YNPALKSRIT ISQHTSENQF SLKLNSVTVA DTAVYYCARG TRLRTRLNRF DIWQGTTLVT
 VSSGGCGGGK VAALKEVAA LKEKVAALKE KVAALKE

图9续

SEQ ID NO: 37
 QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT
 PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV
 TLRESGPALV KPTQTLTLTC TFSGFSLSST GMSVGVIRQP PGKALEWLAD IWWDDKKDYN
 PSLKSRLTIS KDTSKNQVVL KVTNMDPADT ATYYCARSMI TNWYFDVWGA GTTVTVSSGG
 CGGGEVAALE KEVAALEKEV AALEKEVAAL EK

SEQ ID NO 38
 DIQMTQSPST LSASVGDVRT ITCRASQSVG YMHYQQKPG KAPKLLIYDT SKLASGVPSR
 FSGSGSGTEF TLTISLQPD DFATYYCFQG SGYPFTFGGG TKLEIKGGGS GGGGEVQLVE
 SGGGLVQPGG SLRLSCAASG FTFSTYAMNW VFQAPGKGLE WVGRIIRSKYN NYATYYADSV
 KGRFTISRDD SKNSLYLQMN SLKTEDTAVY YCVRHGNGFN SYVSWFAYWG QGTLVTVSSG
 CGGGKVAAL KEKVAALKEK VAALKEKVAAL LKE

SEQ ID NO: 39
 APSSS

SEQ ID NO: 40
 APSSSPME

SEQ ID NO: 41
 APELLGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPSREEMTK NQVSLTCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

SEQ ID NO:42
 APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPSREEMTK NQVSLWCLVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNHYTQKS LSLSPGK

SEQ ID NO: 43
 APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTTTPVLDS DGSFFLYSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVME ALHNRYTQKS LSLSPGK

图9续

SEQ ID NO: 44
 SQSALTQPPS ASGSPGQSVT ISCTGTSSDV GGYNYVSWYQ HHPGKAPKLI ISEVNNRPSG
 VPDRFSGSKS GNTASLTVSG LQAEDAEY YCSSYTDIHN FVFGGKTLTV LGGGSGGGGQ
 VTLRESGPAL VKPTQTLTLT CTFSGFSLST SGMGVGWIRQ PPGKALEWLA HIWWDKRY
 NPALKSRLTI SKDTSKNQVV LTMTNMDPVD TATYYCAQIN PAWFAYWGQG TLVTVSSGGC
 GGGEVAALEK EVAALEKEVA ALEKEVAALE K

SEQ ID NO: 45
 DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSV DFDGDSFMN WYQOKPGQPPKL LIYTTSNLES
 GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQSNEDPY TFGQGTKLEI KGGGSGGGGQ
 VQLQESGPGL VKPSQTLTSL CTVSGGSSSS GAHYWSWIRQ YPGKLEWIG YIHYSNTYY
 NPSLKSRTI SQHTSENQFS LKLNSVTVAD TAVYICARGT RLRTLRFNAFD IWGQGLVTV
 SSGGCGGGKV AALKEKVAAL KEKVAALKE VAALKE

SEQ ID NO: 46
 DIVMTQSPDS LAVSPGERAT IHCKSSQTL YSSNNRHSIA WYQQRPGQPP KLLLYWASMR
 LSGVPDRFSG SSGTDFTLT INNLQAEDVA IYYCHQYSSH PPTFGHGTRV EIKGGGSGGG
 GEVQLVESGG GLVQPGGSLR LSCAASGFTF STYAMNWRQ APGKLEWVG RIRSKYNNYA
 TTYADSVKGR FTISRDDSKN SLYLQMNSLK TEDTAVYICV RHGNFGNSYV SWFAYWGQGT
 LVTVSSGGCG GGEVAALEKE VAALKEVAA LEKEVAALEK GGGDKHTTCP PCPAPEAAGG
 PSVFLFPPKP KDTLMISRTP EVTCVVVDVS HEDPEVKFNW YVDGVEVHNA KTKPREEQYN
 STYRVVSVLT VLHQDWLNGK EYKCKVSNKA LPAPIEKTIS KAKQPREPQ VYTLPPSREE
 MTKNQVSLWC LVKGFYPSDI AVEWESNGQP ENNYKTPPV LDSDGSFFLY SKLTVDKSRW
 QQGNVFSCSV MHEALHNHYT QKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 47
 QAVVTQEPSL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT
 PARFSGLLG GKAALTITGA QAEDADYIC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG GGGSGGGGQV
 QLVQSGGGVF KPGGSLRLSC EASGFTFTEY YMTWVRQAPG KGLEWLAYIS KNGEYSKYS
 SSNGRFTISR DAKNSVFLQ LDRLSADDTA VYYCARADGL TYFSELLQYI FDLWGQGARV
 TVSSGGCGGG KVAALKEVA ALKEKVAALK EKVAALKE

SEQ ID NO: 48
 APEAAGGPSV FLFPPKPKDT LMISRTPEVT CVVVDVSHED PEVKFNWYVD GVEVHNAKTK
 PREEQYNSTY RVVSVLTVLH QDWLNGKEYK CKVSNKALPA PIEKTISKAK GQPREPQVYT
 LPPSREEMTK NQVSLSCAVK GFYPSDIAVE WESNGQPENN YKTPPVLDSDGSFFLVSKL
 TVDKSRWQQG NVFSCSVMHE ALHNRYTQKS LSLSPGK

图9续

SEQ ID NO: 49 (连接体 3)
DKTHTCPPCF

SEQ ID NO: 50 (间隔体 连接体 3)
GGGDKTHTCPPCF

SEQ ID NO: 51 (VH CD3)
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS TYAMNWVRQA PGKGLEWVGR IRSKYNNYAT
YYADSVKGRF TISRDDSKNS LYLQMNSLKT EDTAVYYCVR HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL
VTVSS

SEQ ID NO: 52 (VL CD3)
QAVVTQEPFL TVSPGGTVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQQ KPGQAPRGLI GGTNKRAPWT
PARFSGSLLG GKAALTITGA QAEDEADYYC ALWYSNLWVF GGGTKLTVLG

SEQ ID NO: 53 (VH CD16)
QVTLRESGP ALVKPTQTLT LTCTFSGFSL STSGMGVGIWI RQPPGKALEW LAHIWDDDK
RYNPALKSRL TISKDTSKNQ VVLTMTNMDP VDTATYYCAQ INPAWFAYWG QGTLVTVSS

SEQ ID NO: 54 (VL CD16)
DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVD FDGDSFMNWI QKPGQPPKL LIYTTSNLES
GVPDRFSGS SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQQSNEDPY TFGQGTKLEI K

SEQ ID NO: 55 (VL 7B2 GenBank: AFQ31503.1) DIVMTQSPDS LAVSPGERAT
IHCKSSQTLI YSSNNRHSIA WYQQRPGQPP KLLLYWASMR
LSGVPDRFSG SSGTDFTLT INNLAQEDVA IYYCHQYSSH PPTFGHGTRV

SEQ ID NO: 56 (VH 7B2 GenBank: AFQ31502.1)
QVQLVQSGGG VFKPGGSLRL SCEASGFTFT EYMTWVRQA PGKGLEWVLA ISKNGEYSKY
SPSSNGRFTI SRDPAKNSVF LQLDRLSADD TAVYYCARAD GLTYFSELLQ YIFDLWGQGA
RVTVSS

图9续

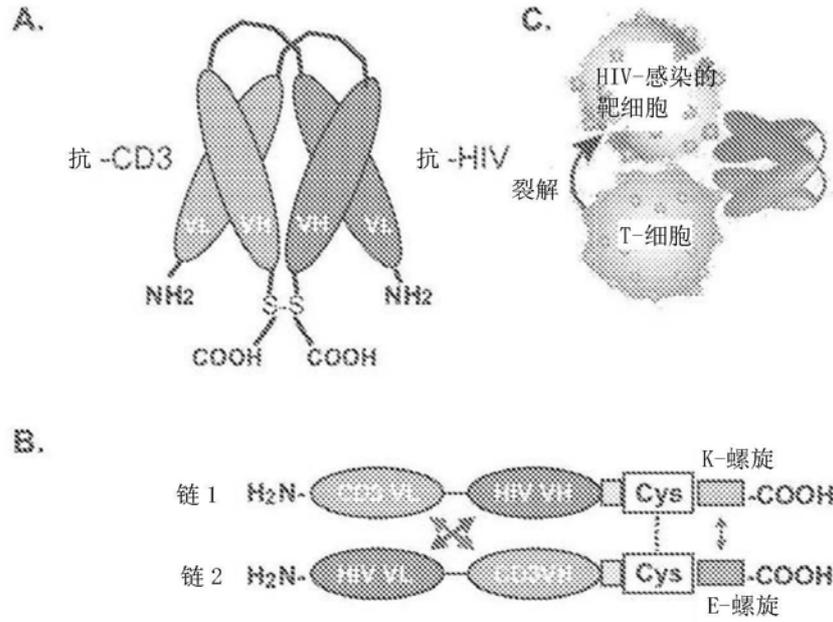


图10A-10C

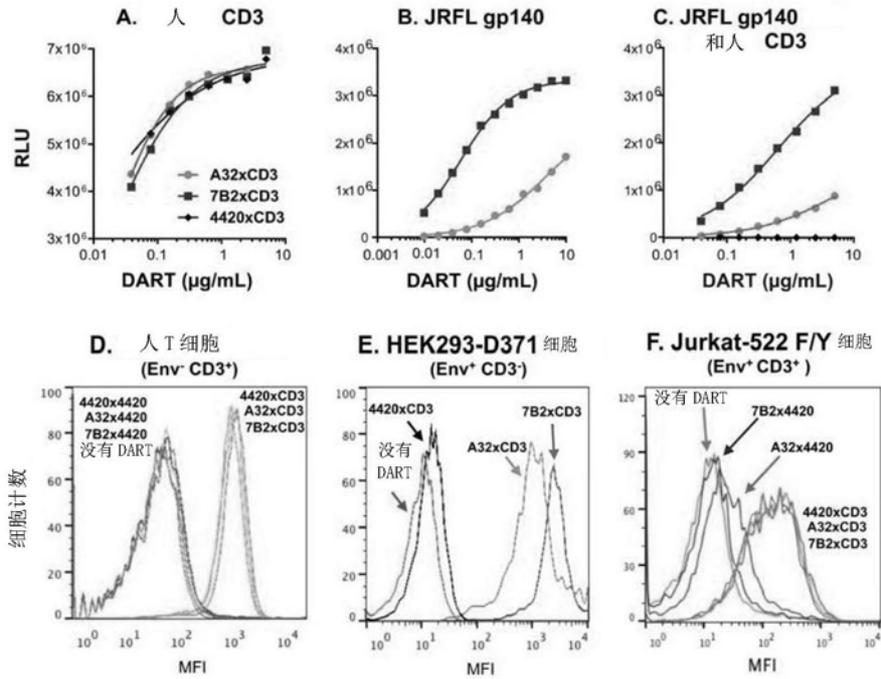


图11A-11F

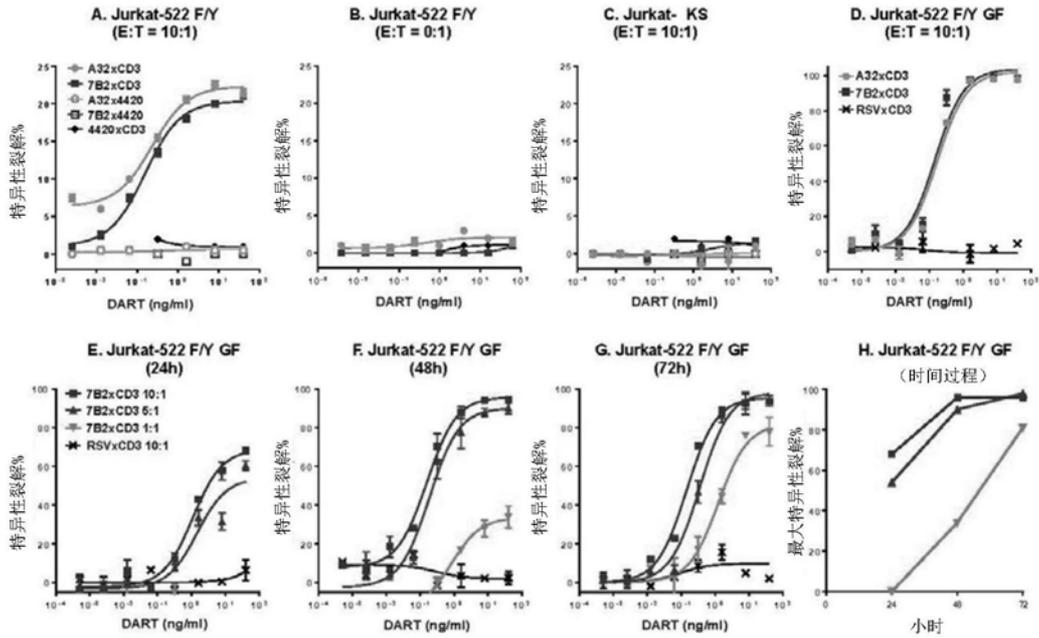


图12A-12H

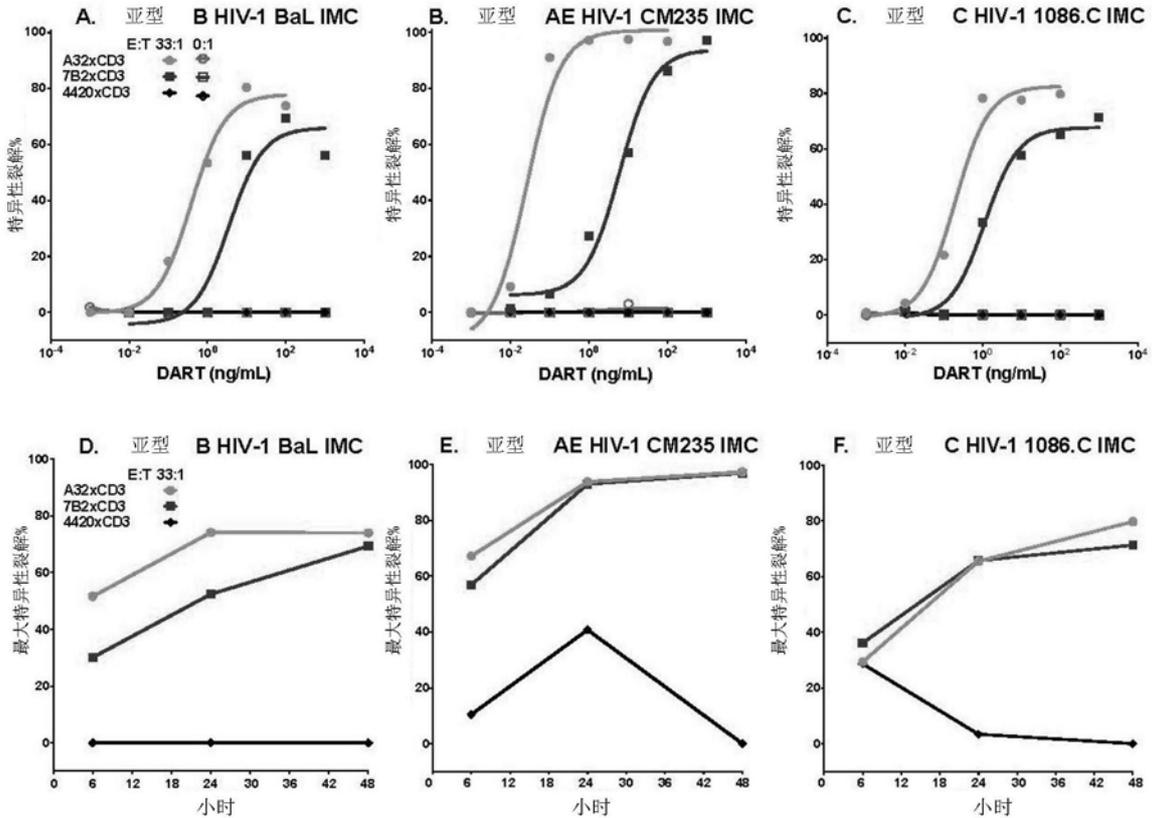


图13A-13F

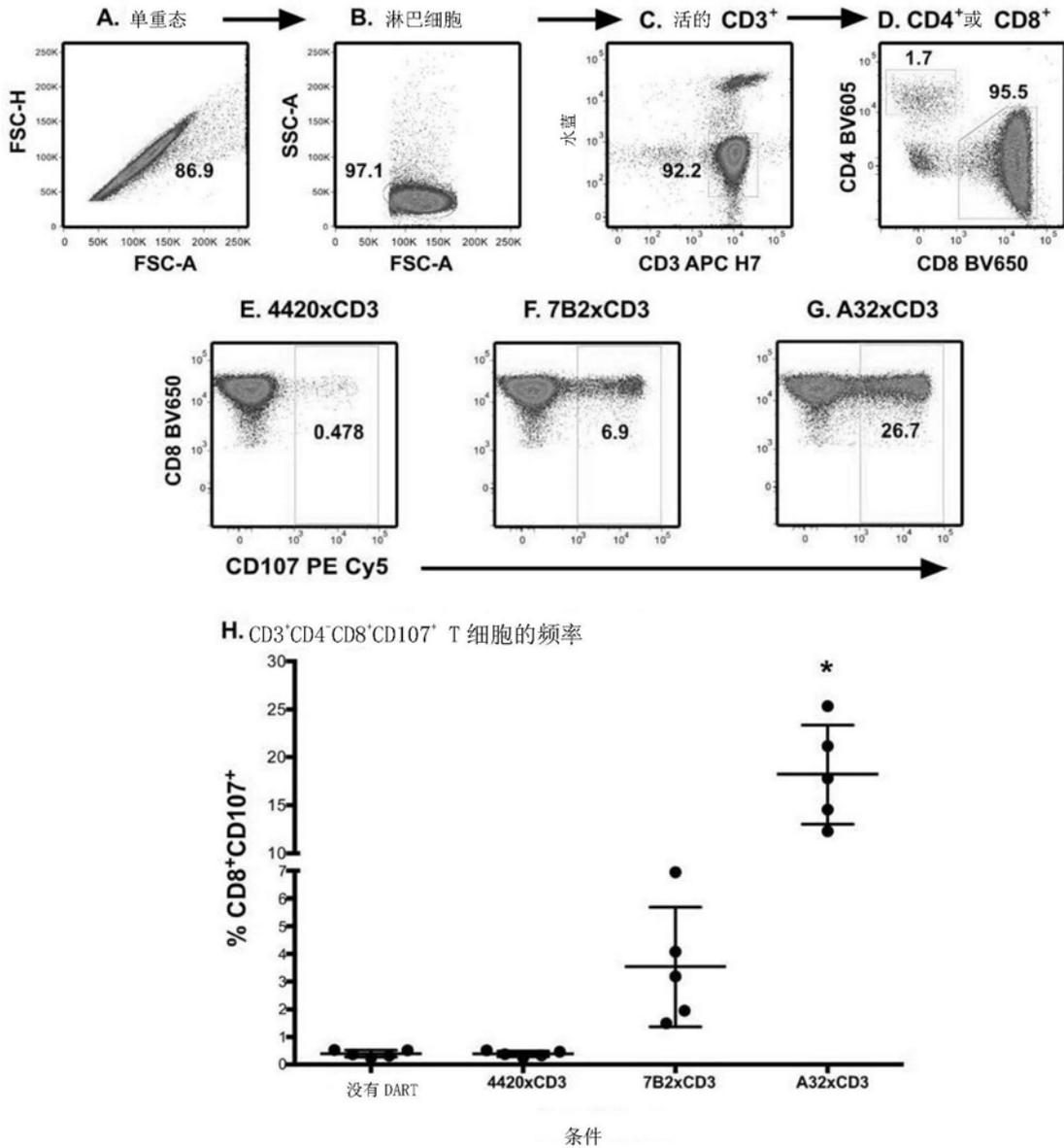


图14A-14H

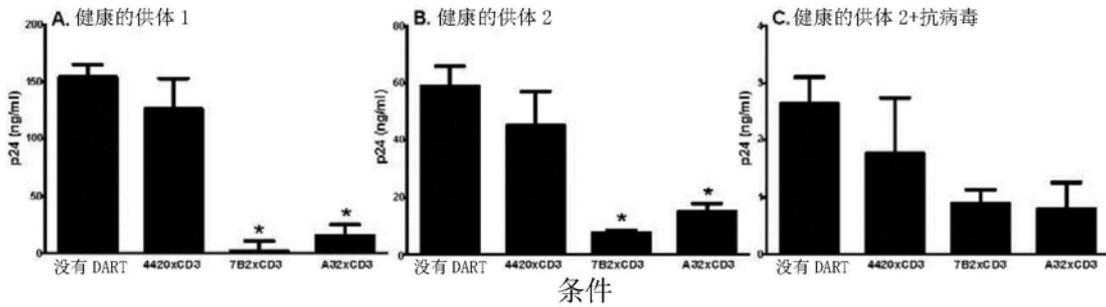


图15A-15C

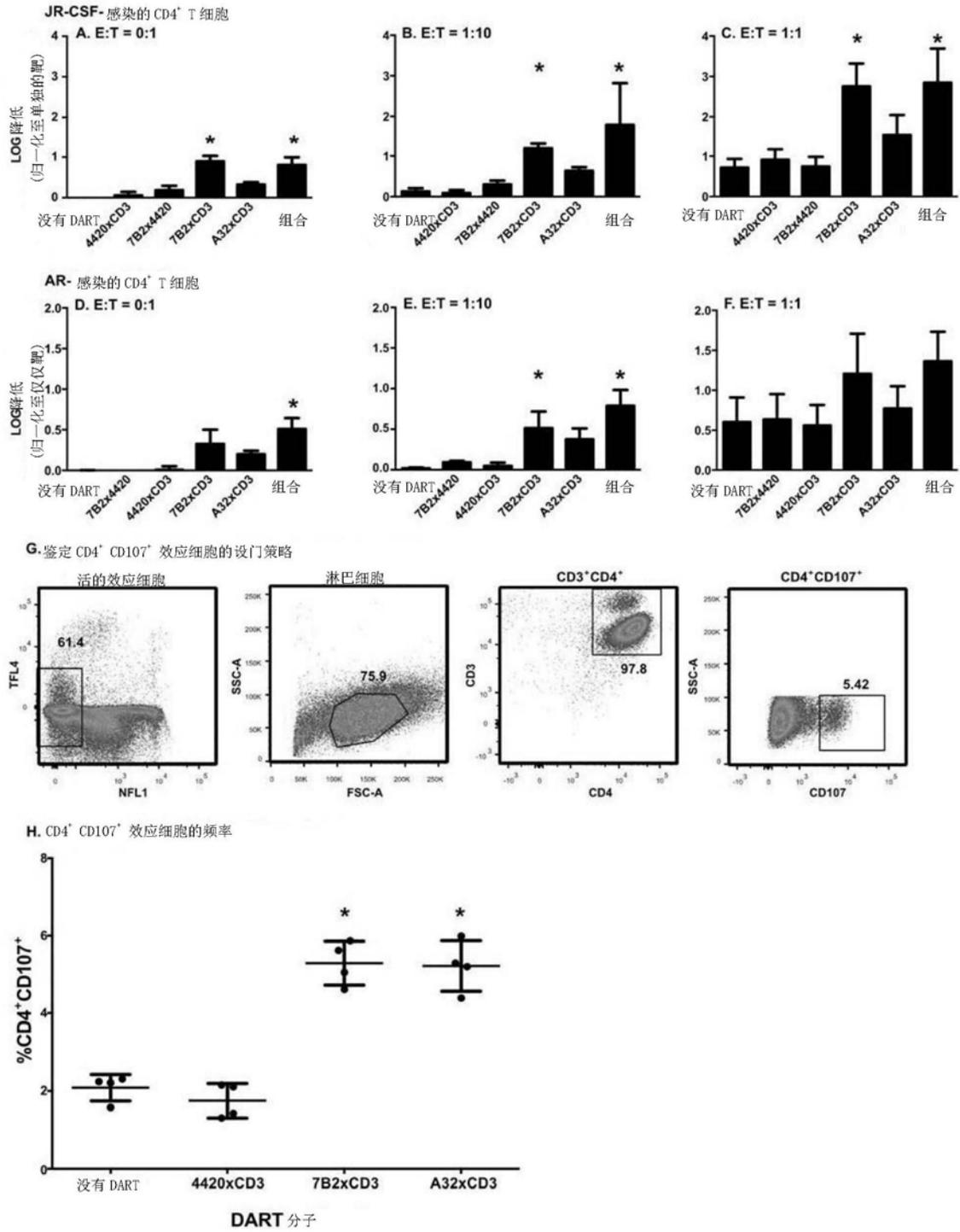


图16A-16H

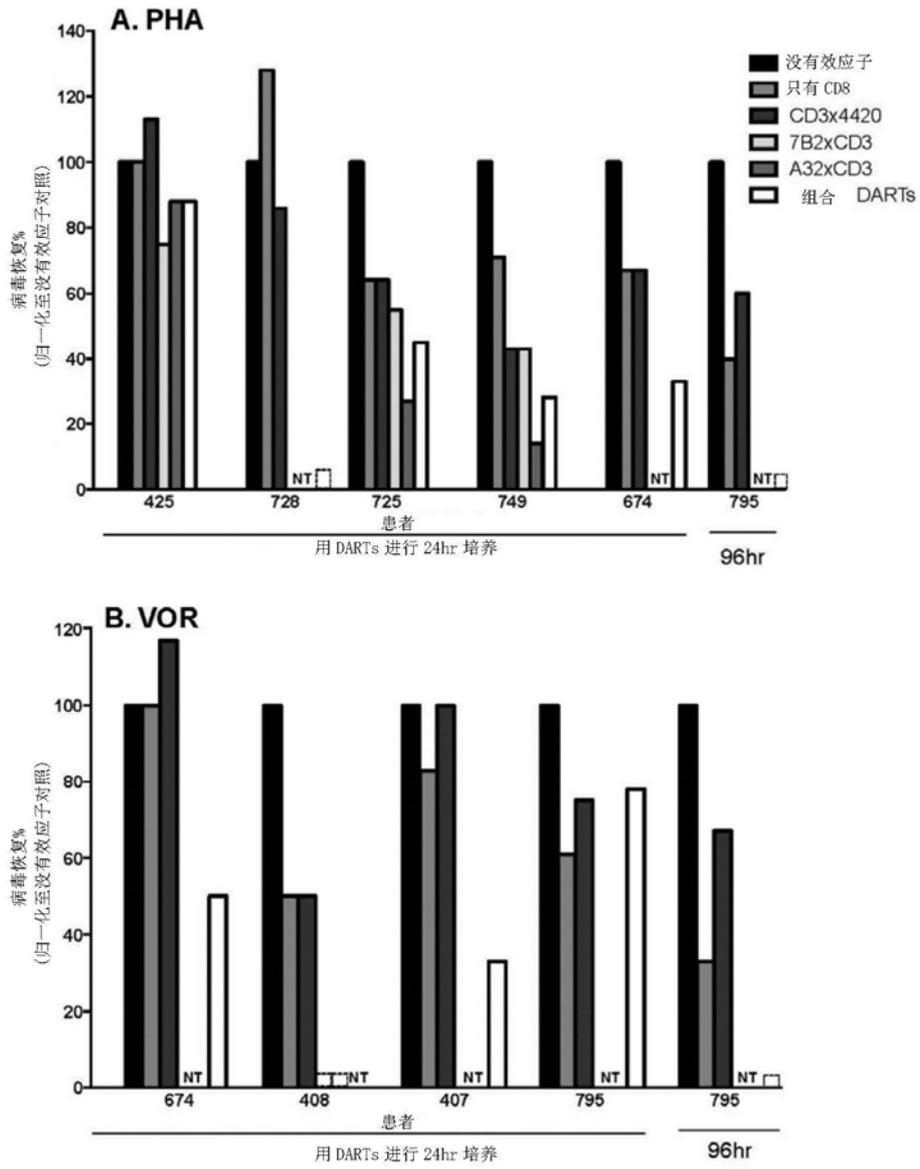


图17A-17B

	亚型 A	亚型 AE	亚型 B	亚型 C
层 1	Q32.17	92TH023	BaL SF162	MW96.5
层 2		CM235 CM244 C1080.C03 427299 816763	CH040 CH058 SUMA WITO YU2	CAP45 CH505 DU151 DU422 TV1 1086.C 246-F3.C10

图18

抗原	DART	$k_a (\pm SD), M^{-1} s^{-1}$	$k_d (\pm SD), s^{-1}$	$K_D (\pm SD), nM$
人 CD3 ϵ/δ	A32xCD3	$6.8 (\pm 0.1) \times 10^5$	$2.4 (\pm 0.0) \times 10^{-3}$	$3.6 (\pm 0.1)$
	7B2xCD3	$4.1 (\pm 0.0) \times 10^4$	$2.5 (\pm 0.0) \times 10^{-4}$	$6.1 (\pm 0.0)$
M.ConS gp140	A32xCD3	$1.7 (\pm 0.0) \times 10^4$	$8.1 (\pm 1.8) \times 10^{-4}$	$47.7 (\pm 10.8)$
JR-FL gp140	7B2xCD3	$2.0 (\pm 0.1) \times 10^4$	$3.1 (\pm 0.9) \times 10^{-4}$	$15.1 (\pm 3.5)$

图19

患者	用于在 VCA*中进行感染的病毒	预-ART 病毒载量 (拷贝 /ml)	最低点 CD4	当前的 CD4 计数	抑制的持续时间(年)
493	JR-CSF	78,115	257	637	2.5
532	JR-CSF	未知	130	623	14
673	JR-CSF	未知	未知	707	7
527	JR-CSF, AR	184,781	600	718	4.5
728	JR-CSF, AR	45,000	354	456	4
749	JR-CSF, AR	未知	404	402	1.5
725	JR-CSF, AR	234,048	475	789	3
720	JR-CSF, AR	586,930	166	446	3
425	自体的	750,001	604	783	8
407	自体的	1,042,734 (AHI)	499	706	2
408	自体的	6095 (AHI)	830	1168	2
795	自体的	175,718	526	850	2.5
674	自体的	185,042	338	1045	4.5

* 病毒清除试验
 AR = 自体储库病毒
 自体的指示在潜伏清除试验中使用的患者细胞，没有使用超感染。
 AHI = 急性 HIV 感染

图20

患者	E:T 比例	HIV-1 gag p24 浓度 (ng/ml) (SEM)					组合
		没有 DART	CD3x4420	7B2x4420	7B2xCD3	A32xCD3	
493	没有 CD8s	10.6(2)	12.6(4)	NT	1.44(1.0)	10.8(2.2)	NT
	1:10	4.7(1.0)	7.35(2.1)	NT	1.05(0.6)	3.5(1.3)	NT
	1:1	.92(0.2)	1.29(.03)	NT	.04(.02)	.343(.01)	NT
532	没有 CD8s	12.9(2.7)	12.6(3.9)	NT	1.44(1.0)	10.8(4.1)	NT
	1:10	8.9(1.7)	7.35(2.1)	NT	1.05(.629)	3.5(1.3)	NT
	1:1	0.92(0.2)	1.5(0.16)	NT	0.04(0.02)	0.16(0.03)	NT
673	没有 CD8s	345(6.4)	194(25)	253(17)	213(28)	139(4.6)	NT
	1:10	329(1.2)	137(5.2)	184(12)	73(4.6)	57(5.2)	NT
	1:1	94(6.9)	8.8(0.2)	13.5(0.5)	4.4(0.5)	11.4(1.0)	NT
527	没有 CD8s	154(5.2)	185(22)	106(9.4)	27.3(12.3)	54.2(29.3)	62.9(3.4)
	1:10	164(16)	210(11)	78(6.6)	12.1(2.1)	21(2.8)	68(5.9)
	1:1	116(53)	139(10.8)	80(21)	13(6)	8.4(0.9)	34.9(5.6)
728	没有 CD8s	103(25)	111(10)	92(24)	19(10)	122(51)	30(11)
	1:10	114(18)	117(13)	90(2.2)	3.7(2.6)	54(11)	15.9(5.4)
	1:1	178(14)	121(32)	60(23)	1.9(1.1)	44(9.5)	0.9(0.4)
749	没有 CD8s	27.9(11)	7.3(6.8)	13.8(2.9)	0.9(0.5)	19.3(7.7)	15.5(12.2)
	1:1	11.4(0.5)	6.8(3.3)	5.5(3)	ND	ND	ND
725	没有 CD8s	191(3.7)	177(37)	189(24)	29(21)	134(16)	45(13)
	1:10	234(53)	187(14)	163(22)	6.5(5.5)	122(17)	ND
	1:1	60(22)	71(5)	53(17)	ND	4.5(3.3)	ND
720	没有 CD8s	15(4.8)	26.3(4.8)	22(2.3)	0.7(0.2)	5.9(2.6)	0.6(0.2)
	1:10	5.7(2.5)	17(2.3)	16(4.6)	0.4(0.1)	2.5(0.5)	1.0(0.6)
	1:1	1.1(0.1)	0.4(0.3)	1.1(0.3)	ND	1.3(0.4)	0.2(0.02)

SEM= 3 次重复的平均值的标准误差

ND = 没有检测到

NT = 由于细胞可用性而没有测试

图21

LRA	患者	# 涂覆的孔	# 添加 DART 分子后的阳性孔					
			没有效应子	没有 DART	4420 xCD3	7B2 xCD3	A32 xCD3	组合
PHA	425	12	8	8	9	6	7	7
	728	12	7	9	6	NT	NT	0
	725	12	11	7	7	6	3	5
	749	12	7	5	3	3	1	2
	674	12	6	4	4	NT	NT	2
	795*	12	10	4	6	NT	NT	0
VOR	674	12	6	6	7	NT	NT	3
	408	12	2	1	1	0	0	NT
	407	24	6	5	6	NT	NT	2
	795	36	28	17	21	NT	NT	22
	795*	12	3	1	2	NT	NT	0

LRA= 潜伏期逆转剂

NT=由于细胞可用性而没有测试

组合=添加 50ng/ml 的 7B2xCD3 DART 和 50ng/ml 的 A32xCD3 DART

* 使用 96 小时共培养评价的

VOR= 伏立诺他

图22

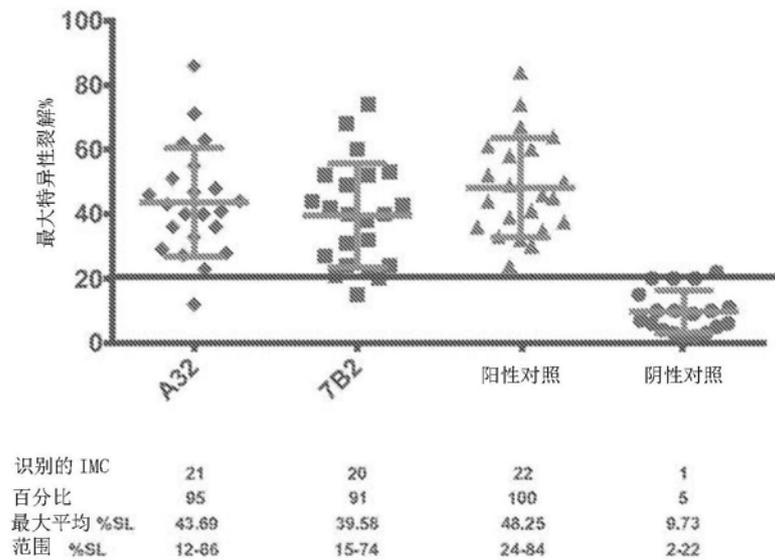


图23



图24

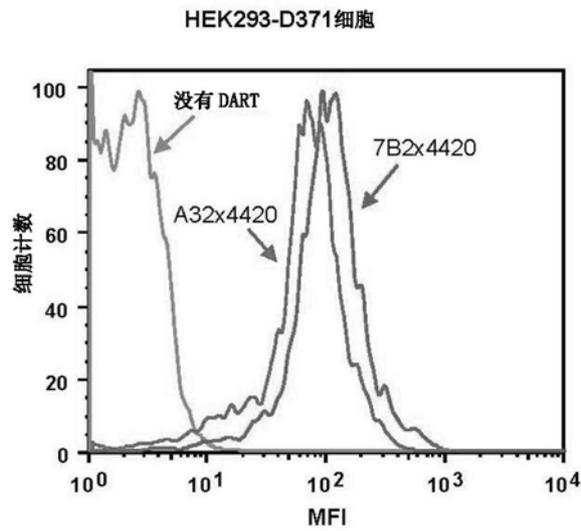


图25

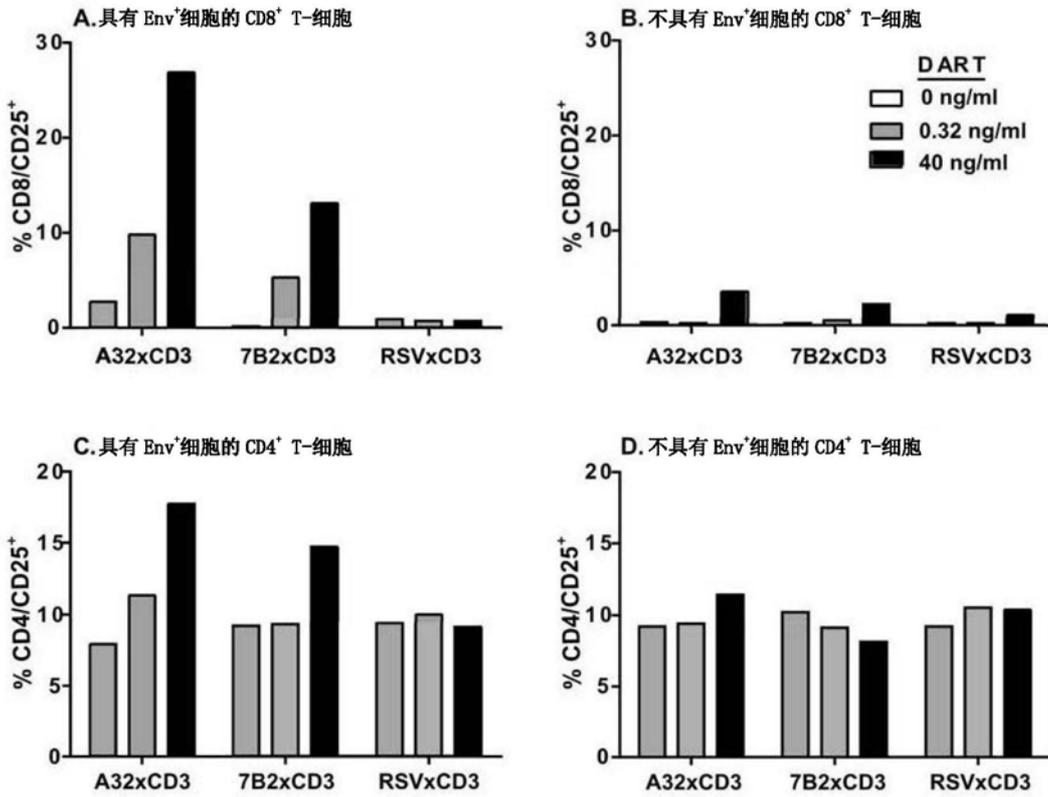


图26A-26D

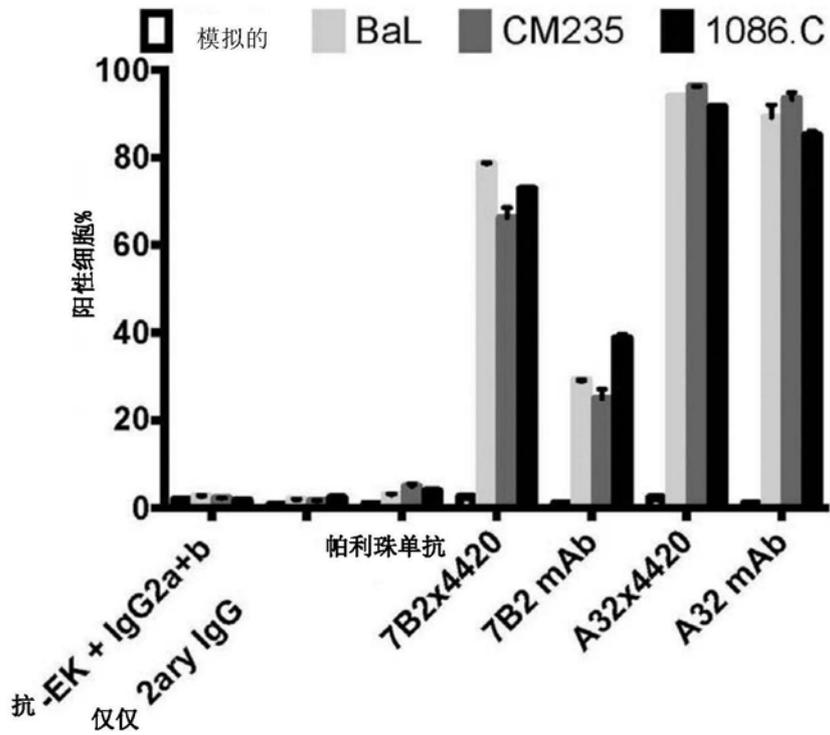


图27

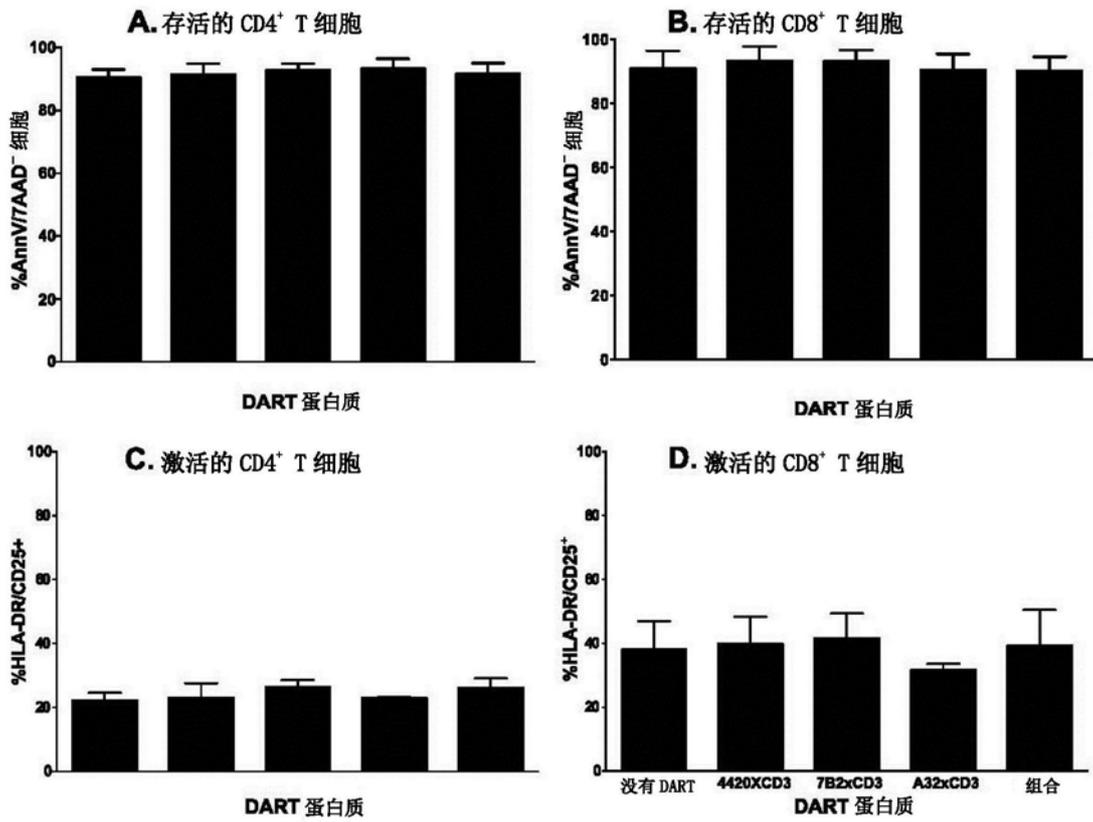


图28A-28D