



## (12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 111925437 A

(43) 申请公布日 2020.11.13

(21) 申请号 202010439230.3

(22) 申请日 2014.03.13

(30) 优先权数据

61/783,195 2013.03.14 US

(62) 分案原申请数据

201480025460.8 2014.03.13

(71) 申请人 宏观基因有限公司

地址 美国马里兰州

申请人 杜克大学

(72) 发明人 S·凯尼格 L·S·约翰逊

郭家颖 刘丽勤

J·L·诺德斯特姆 B·F·海恩斯

G·法拉利

(74) 专利代理机构 北京市铸成律师事务所  
11313

代理人 刘文娜 郝名悦

(51) Int.Cl.

C07K 16/08 (2006.01)

C07K 16/10 (2006.01)

C07K 16/28 (2006.01)

A61K 39/395 (2006.01)

A61P 31/12 (2006.01)

权利要求书3页 说明书44页

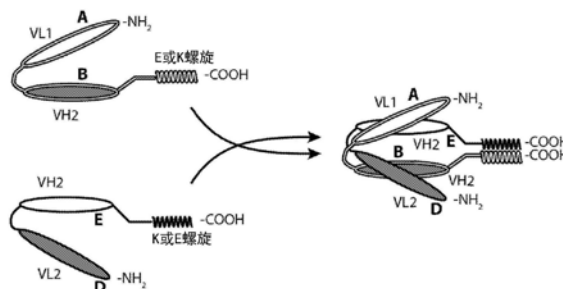
序列表34页 附图7页

### (54) 发明名称

与表达激活受体的免疫效应细胞具有免疫反应性的双特异性分子

### (57) 摘要

本发明涉及与表达激活受体的免疫效应细胞具有免疫反应性的双特异性分子。本发明涉及双特异性分子，其能够将表达激活受体的免疫效应细胞定位至病毒感染的细胞，从而利于杀伤病毒感染的细胞。在优选的实施方式中，使用对免疫效应细胞的激活受体和对感染病毒的细胞表达的抗原具有免疫反应性的双特异性分子实现这样的定位，其中抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上，所述抗原存在的水平大于通过双特异性分子在病毒上检测的抗原水平，和涉及这样的双特异性分子在治疗潜伏性病毒感染中的用途。



1. 一种双特异性双抗体分子,其包括包含至少第一多肽链和第二多肽链的共价连接的复合物,其中:

I. 所述第一多肽链包括第一免疫球蛋白的轻链可变结构域(VL1)的结合区域和第二免疫球蛋白的重链可变结构域(VH2)的结合区域,其中所述VL1和所述VH2不彼此缔合形成表位-结合结构域;

II. 所述第二多肽链包括所述第二免疫球蛋白的轻链可变结构域(VL2)的结合区域和所述第一免疫球蛋白的重链可变结构域(VH1)的结合区域,其中所述VL2和所述VH1不彼此缔合形成表位-结合结构域;和

其中:

(A) 所述VL1和所述VH1缔合形成第一表位结合结构域,所述第一表位结合结构域能够免疫特异性结合免疫效应细胞的激活受体的表位,其中所述免疫效应细胞是T-细胞、CD4+T-细胞、CD8+T-细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、粒细胞或树突细胞细胞;和

(B) 所述VH2和所述VL2缔合形成第二表位结合结构域,所述第二表位结合结构域能够免疫特异性结合由感染病毒的细胞表达的抗原的表位,其中所述病毒是EBV、HSV、CMV、HIV、HBV、HCV、HPV或流感病毒,并且其中所述抗原可检测地存在于由所述病毒感染的所述细胞上,所述抗原存在的水平大于通过所述双特异性双抗体分子在所述病毒上检测的所述抗原的水平。

2. 权利要求1所述的双特异性双抗体分子,其中所述细胞被所述病毒潜伏感染。

3. 权利要求1所述的双特异性双抗体分子,其中由感染所述病毒的所述细胞表达的所述抗原选自LMP-1、LMP-2、流感病毒M<sub>2</sub>蛋白、HIV env蛋白、HPV E6和HPV E7。

4. 权利要求1所述的双特异性双抗体分子,其中由感染所述病毒的所述细胞表达的所述抗原通过所述双特异性双抗体分子可检测地存在于所述感染细胞上,并且未通过所述双特异性双抗体分子在所述病毒上被检测到。

5. 权利要求1所述的双特异性双抗体分子,其中在所述效应细胞上的所述表位是CD3表位、CD4表位、CD8表位、CD2表位、CD16表位、TCR表位或NKG2D表位。

6. 权利要求1所述的双特异性双抗体分子,其中所述第一表位结合结构域是来自CD3抗体、CD4抗体、CD8抗体、CD2抗体、CD16抗体、TCR抗体或NKG2D抗体的表位结合结构域。

7. 权利要求1所述的双特异性双抗体分子,其中:

(1) 由感染所述病毒的所述细胞表达的所述抗原可检测地存在于所述细胞上,所述抗原在所述细胞上存在的水平是通过所述双特异性双抗体分子在所述病毒上检测的所述抗原的水平的至少2倍;或

(2) 由感染所述病毒的所述细胞表达的所述抗原可检测地存在于所述细胞上,所述抗原在所述细胞上存在的水平是通过所述双特异性双抗体分子在所述病毒上检测的所述抗原的水平的至少5倍;或

(3) 由感染所述病毒的所述细胞表达的所述抗原可检测地存在于所述细胞上,所述抗原在所述细胞上存在的水平是通过所述双特异性双抗体分子在所述病毒上检测的所述抗原的水平的至少10倍;或

(4) 由感染所述病毒的所述细胞表达的所述抗原可检测地存在于所述细胞上,所述抗原在所述细胞上存在的水平是通过所述双特异性双抗体分子在所述病毒上检测的所述抗

原的水平至少100倍。

8. 权利要求1所述的双特异性双抗体分子,其中由感染所述病毒的所述细胞表达的所述抗原通过所述双特异性双抗体分子可检测地存在于感染细胞上,并且在未被所述病毒感染细胞上通过所述双特异性双抗体分子未检测到所述抗原。

9. 权利要求1-8中任一项所述的双特异性双抗体分子,其中所述分子包括Fc结构域或其部分。

10. 权利要求1-8中任一项所述的双特异性双抗体分子,其中所述第一多肽链进一步包括半胱氨酸残基和E螺旋或K螺旋,并且其中所述第二多肽链进一步包括:

半胱氨酸残基和K螺旋,如果所述第一多肽链包括E螺旋;或

半胱氨酸残基和E螺旋,如果所述第一多肽链包括K螺旋。

11. 权利要求10所述的双特异性双抗体分子,进一步包括第三多肽链,并且其中所述第一多肽链或所述第二多肽链进一步包括Fc区域的CH2-CH3区域;和所述第三多肽链包括Fc区域的CH2-CH3区域。

12. 权利要求1-8中任一项所述的双特异性双抗体分子,其中:

(A) 所述激活受体是CD3,和由感染病毒的细胞表达的所述抗原是EBVLMP-1;或

(B) 所述激活受体是TCR,和由感染病毒的细胞表达的所述抗原是EBVLMP-2;或

(C) 所述激活受体是CD3,和在MCH I型背景下,由感染病毒的细胞表达的所述抗原是HPV E6;或

(D) 所述激活受体是CD16,和由感染病毒的细胞表达的所述抗原是HIV env;或

(E) 所述激活受体是CD3,和由感染病毒的细胞表达的所述抗原是HIV gp120;或

(F) 所述激活受体是CD3,和由感染病毒的细胞表达的所述抗原是HIV env。

13. 权利要求10所述的双特异性双抗体分子,其中:

(A) 所述激活受体是CD3,和由感染病毒的细胞表达的所述抗原是EBVLMP-1;或

(B) 所述激活受体是TCR,和由感染病毒的细胞表达的所述抗原是EBVLMP-2;或

(C) 所述激活受体是CD3,和在MHC I型背景下,由感染病毒的细胞表达的所述抗原是HPV E6;或

(D) 所述激活受体是CD16,和由感染病毒的细胞表达的所述抗原是HIVenv;或

(E) 所述激活受体是CD3,和由感染病毒的细胞表达的所述抗原是HIVgp120;或

(F) 所述激活受体是CD3,和由感染病毒的细胞表达的所述抗原是HIVenv。

14. 权利要求11所述的双特异性双抗体分子,其中:

(A) 所述激活受体是CD3,和由感染病毒的细胞表达的所述抗原是EBVLMP-1;或

(B) 所述激活受体是TCR,和由感染病毒的细胞表达的所述抗原是EBVLMP-2;或

(C) 所述激活受体是CD3,和在MHC I型背景下,由感染病毒的细胞表达的所述抗原是HPV E6;或

(D) 所述激活受体是CD16,和由感染病毒的细胞表达的所述抗原是HIVenv;或

(E) 所述激活受体是CD3,和由感染病毒的细胞表达的所述抗原是HIVgp120;或

(F) 所述激活受体是CD3,和由感染病毒的细胞表达的所述抗原是HIVenv。

15. 一种药物组合物,其包括权利要求1-14中任一项所述的双特异性双抗体分子和药学上可接受的载体。

16. 权利要求1-14中任一项所述的双特异性双抗体分子在制备治疗潜伏性病毒感染、持续性病毒感染或失活病毒感染的药物中的用途。

17. 权利要求1-14中任一项所述的双特异性双抗体分子在制备用于杀伤包含病毒基因组的细胞或表达病毒蛋白的细胞的药物中的用途。

18. 权利要求15所述的药物组合物在制备用于治疗潜伏性病毒感染、持续性病毒感染或失活病毒感染的药物中的用途。

19. 权利要求15所述的药物组合物在制备用于杀伤包含病毒基因组的细胞或表达病毒蛋白的细胞的药物中的用途。

## 与表达激活受体的免疫效应细胞具有免疫反应性的双特异性分子

本申请是申请日为2014年3月13日、申请号为2014800254608 (PCT/US2014/025491)、发明名称为“与表达激活受体的免疫效应细胞具有免疫反应性的双特异性分子”的中国发明专利的分案申请。

相关申请的交叉引用

本申请要求美国专利专利申请号61/783,195 (2013年3月14日提交, 未决) 的优先权, 该申请通过引用以其整体并入本文。

参考序列表

根据37 C.F.R.1.821以及下面的条款, 本申请包括一个或多个序列表, 所述序列表以纸质和计算机可读的介质公开, 并且所述纸质和计算机可读的公开内容通过引用以它们的整体并入本文。

发明背景

### 技术领域

本发明涉及双特异性分子, 其能够将表达激活受体的免疫效应细胞定位至病毒感染的细胞, 以便从而利于杀伤病毒感染的细胞。在优选的实施方式中, 使用对免疫效应细胞的激活受体和对感染病毒的细胞表达的抗原的表位具有免疫反应性的双特异性分子, 实现这样的定位。本发明另外涉及这样的双特异性分子在治疗潜伏性病毒感染、持续性病毒感染和失活病毒感染中的用途, 以及这样的双特异性分子在杀伤包含病毒基因组的细胞或表达病毒蛋白的细胞的方法中的用途。本发明尤其涉及这样的双特异性分子, 其结合 (1) 免疫效应细胞的激活受体的表位和 (2) 由被病毒感染的细胞表达的抗原的表位, 其中抗原可检测地存在于病毒感染的细胞上, 所述抗原存在的水平大于通过双特异性分子在病毒上检测的抗原的水平; 以及涉及这样的双特异性分子, 其能够介导, 更优选地能够增强, 免疫效应细胞激活和靶向病毒感染的细胞, 使得激活的免疫效应细胞杀伤病毒感染的细胞。

相关技术描述

#### I. 病毒性传染病

最近数十年已经见证了对抗体治疗潜能的兴趣的复兴, 并且抗体已经成为一种主要类型的生物技术衍生的药物 (Chan, C.E. 等 (2009) “The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases,” Singapore Med.J.50 (7):663-666)。接近200种基于抗体的药物已经批准使用或正在开发。

这样的药物尤其有希望用于治疗传染病, 最重要地是用于治疗病毒性传染病。许多病原体已经表现出获得对常规抗微生物药物的抗性的显著能力 (例如, 二甲氧基苯青霉素抗性金黄色葡萄球菌 (*Staphylococcus aureus*), 极抗药性结核分枝杆菌 (*Mycobacterium tuberculosis*) 和抗微生物抗性恶性疟原虫 (*Plasmodium falciparum*))。其他病原体, 比如 HIV、流感病毒等目前使用传统药物的治疗不满意 (见, Beigel, J. 等 (2008) “Current And Future Antiviral Therapy Of Severe Seasonal And Avian Influenza,” Antiviral

Res.78(1):91-102)。而且,这样的药物展示明显的副作用。与传统的药物相反,抗体具有使得它们作为治疗剂而极吸引人的两个特性。第一,因为抗体是身体的天然内源蛋白质,所以展示低毒性。第二,它们展示高特异性,其使得能够定向靶向受感染的细胞。

但是,目前的免疫疗法具有某些缺点(Chan,C.E.等(2009)“The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases,”Singapore Med.J. 50(7):663-666)。病毒感染的清除通常与T细胞介导的获得性免疫相关。 $CD8^+$  T细胞通过杀伤病毒感染的细胞起作用,因此防止病毒复制和减少病毒载荷。另外,除了他们的病毒中和特性之外,抗体还可通过激活介导ADCC的天然杀伤细胞(NK),促进杀伤在其表面上表达病毒蛋白的受感染的细胞。尽管已经显示抗体能够在体外中和许多病毒病原体,但抗体介导的免疫可实现体内病毒清除的程度不清楚。因此,通常施用中和治疗性抗体不是为了介导清除,而是为了抑制病毒复制和病毒血症和给予宿主免疫系统时间以发展对病毒清除的有效应答。就此而言,研究已经显示抗体减少病毒载荷的能力与施用的抗体在血清中的持久性相关,并且当血清中的抗体水平在中止治疗之后下降时,病毒抗原水平最终恢复(Galun,E.等(2002)“Clinical Evaluation(Phase I)Of A Combination Of Two Human Monoclonal Antibodies To HBV:Safety And Antiviral Properties,”Hepatology 35:673-679; Heijtkink, R.A.等(2001)“Administration Of A Human Monoclonal Antibody (TUVIRUMAB)To Chronic Hepatitis B Patients Pre-Treated With Lamivudine: Monitoring Of Serum TUVIRUMAB In Immune Complexes,”J.Med.Virol.64:427-434)。另外,通过HIV的研究已经显示常规施用治疗性抗体可导致逃逸突变体(escape mutant)的发展(Chan, C.E.等(2009)“The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases,” Singapore Med.J.50(7):663-666)。在一个研究中,在12周的时间内施用三种广谱中和HIV抗体的组合,相对于对照在中止抗病毒治疗之后成功延迟了病毒反弹。但是,尽管继续施用所有三种抗体,病毒水平仍最终恢复,同时对三个施用的抗体之一的抗性增加(Trkola,A.等(2005)“Delay Of HIV-1Rebound After Cessation Of Antiretroviral Therapy Through Passive Transfer Of Human Neutralizing Antibodies,” Nat.Med.11:615-622)。

## II.免疫系统激活

$CD4^+$  T-淋巴细胞是大部分哺乳动物免疫和自体免疫应答的基本组织者(Dong, C.等(2003)“Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,”Immunolog.Res. 28(1):39-48)。已经发现抗原呈递细胞和幼稚 $CD4^+$  T淋巴细胞之间的共刺激相互作用介导 $CD4^+$ 辅助性T细胞的激活。需要两种相互作用(Viglietta,V.等(2007)“Modulating Co-Stimulation,”Neurotherapeutics 4:666-675;Korman,A.J.等(2007)“Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy,”Adv.Immunol.90:297-339)。在第一相互作用中,抗原呈递细胞必须展示与细胞的主要组织相容性复合物结合的相关靶抗原,从而其可结合幼稚 $CD4^+$  T-淋巴细胞的T-细胞受体(“TCR”)。在第二相互作用中,抗原呈递细胞的配体必须结合 $CD4^+$  T-淋巴细胞的CD28受体(Dong,C.等(2003)“Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,”Immunolog.Res. 28(1):39-48;Lindley,P.S.等(2009)“The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation,”Immunol.Rev.229:307-321)。经历两个刺激信号的 $CD4^+$ 辅助性T-细胞然后能够对细胞因子(比如白介素-2和

白介素-12) 应答,以发育成Th1细胞。这样的细胞产生干扰素- $\gamma$  (IFN- $\gamma$ ) 和肿瘤坏死因子- $\alpha$  (TNF- $\alpha$ ),其介导对表达靶抗原的靶细胞的炎症反应。也发生B细胞激活和增殖,导致对靶抗原特异性的抗体产生 (Bernard,A.等 (2005) “T and B Cell Cooperation:A Dance of Life and Death,” Transplantation 79:S8-S11)。TCR接合 (engagement) 期间,在没有两个共刺激信号时, T细胞进入功能上无应答状态,称为克隆无反应 (Khawli,L.A.等 (2008) “Cytokine, Chemokine,and Co-Stimulatory Fusion Proteins for the Immunotherapy of Solid Tumors,” Exper.Pharmacol.181:291-328)。在病理状态下,Th1细胞是各种器官特异性自身免疫性疾病,比如I型糖尿病、类风湿性关节炎和多发性硬化的关键参与者 (Dong,C.等 (2003) “Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules,” Immunolog.Res.28 (1) :39-48)。

### III. 治疗性抗体

除了它们在诊断中的已知用途之外,已经证明抗体可用作治疗剂。例如,免疫疗法,或抗体用于治疗性目的的用途,在最近这些年已经用于治疗传染病。被动免疫疗法涉及使用单克隆抗体来治疗感染 (见例如,Ian Gust,A.O. (Epub 2012Feb 21) “Role Of Passive Immunotherapies In Managing Infectious Outbreaks,” Biologicals 40 (3) :196-199; Wang,D.等 (2011) “Palivizumab For Immunoprophylaxis Of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Bronchiolitis In High-Risk Infants And Young Children:A Systematic Review And Additional Economic Modelling Of Subgroup Analyses,” Health Technol.Assess.15 (5) :iii-iv,1-124;Rosenberg,H.F.等 (2012) “Inflammatory Responses To Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection And The Development Of Immunomodulatory Pharmacotherapeutics,” Curr.Med.Chem. 19 (10) :1424-1431)。通过直接结合传染试剂 (例如,病毒、细菌、真菌等) 和通过它们结合已经被这样的试剂感染并且在其细胞表面上表达试剂特异性抗原的宿主细胞的能力,这些抗体可具有固有的治疗性生物活性。这些试剂可被单独施用或结合其他抗感染试剂 (例如,抗生素、抗炎剂、退热剂等) 施用。批准用于治疗呼吸道合胞病毒 (RSV) 细支气管炎的帕利珠单抗 (palivizumab), 和替非珠单抗 (tefibazumab) (在临床试验中用于治疗金黄色葡萄球菌感染) 是这样治疗剂的例子。可选地,抗体可用于制备抗体缀合物,其中抗体连接毒性剂并且通过特异结合肿瘤,将该剂引导至肿瘤。吉妥珠单抗奥佐米星 (Gemtuzumab ozogamicin) 是批准的抗体缀合物的例子,其用于治疗人患者中的白血病。

已经公开了结合病毒感染的细胞的单克隆抗体,其对于诊断和治疗具有潜在用途 (见,例如,US 8,313,746、US 7,507,797、US 2012/0283438、US 2012/0128669、US 2012/0093834、US 2011/0319871、US 2011/0212076、US 2011/0076268、US 2011/0033389、US 2010/0040635、US 2010/0040601、US 2009/0162353、EP 1670826、WO 2011/085289、Oleksiewicz,M.B.等 (Epub 2012年6月13日) “Anti-Bacterial Monoclonal Antibodies: Back To The Future?” Arch.Biochem.Biophys. 526 (2) :124-131;Huang,J.X.等 (Epub 2012Jun 4) “Development Of Anti-Infectives Using Phage Display:Biological Agents Against Bacteria, Viruses, And Parasites,” Antimicrob.Agents Chemother.56 (9) :4569-4582; Ian Gust,A.O. (Epub 2012Feb 21) “Role Of Passive Immunotherapies In Managing Infectious Outbreaks,” Biologicals 40 (3) :196-199;

Geevarghese,B.等(Epub 2012Feb 3)“Antibodies For Prevention And Treatment Of Respiratory Syncytial Virus Infections In Children,”*Antivir.Ther.*17(1Pt B):201-211;Rosenberg,H.F.等(2012)“Inflammatory Responses To Respiratory Syncytial Virus (RSV) Infection And The Development Of Immunomodulatory Pharmacotherapeutics,”*Curr.Med.Chem.*19(10):1424-1431;Nossal,G.J.(2011)“Vaccines Of The Future,”*Vaccine* 29Suppl 4:D111-115;Froude,J.W.等(2011)“Antibodies For Biodefense,”*MAbs* 3(6):517-527;Ter Meulen,J.(2011)“Monoclonal Antibodies In Infectious Diseases:Clinical Pipeline In 2011,”*Infect.Dis.Clin.North Am.*25(4):789-802;Yamada,T.(2011)“Therapeutic Monoclonal Antibodies,”*Keio J. Med.*60(2):37-46;Berry,J.D.等(2011)“Antibodies In Infectious Diseases: Polyclonals, Monoclonals And Niche Biotechnology,”*Nature Biotechnol.* 28(5):489-501;Whaley,K.J.等(2011)“Emerging Antibody Products And Nicotiana Manufacturing,”*Hum.Vaccin.*7(3):349-356;Beasley,D.W.(2011)“Vaccines And Immunotherapeutics For The Prevention And Treatment Of Infections With West Nile Virus,”*Immunotherapy* 3(2):269-285;Wang,D.等(2011)“Palivizumab For Immunoprophylaxis Of Respiratory Syncytial Virus (RSV) Bronchiolitis In High-Risk Infants And Young Children:A Systematic Review And Additional Economic Modelling Of Subgroup Analyses,”*Health Technol.Assess.*15(5):iii-iv,1-124;Li,L.等(2010)“Immunotherapy For Prion Diseases:Opportunities And Obstacles,”*Immunotherapy* 2(2):269-282;Niebecker,R.等(2010)“Safety Of Therapeutic Monoclonal Antibodies,”*Curr.Drug.Saf.*5(4):275-286;Hansel,T.T.等(2010)“The Safety And Side Effects Of Monoclonal Antibodies,”*Nat.Rev.Drug Discov.*9(4):325-338;Chan,C.E.等(2009)“The Use Of Antibodies In The Treatment Of Infectious Diseases,”*Singapore Med.J.* 50(7):663-673;Beigel,J.等(2008)“Current And Future Antiviral Therapy Of Severe Seasonal And Avian Influenza,”*Antiviral Res.*78(1):91-102;Huber,M.等(2008)“Antibodies For HIV Treatment And Prevention:Window Of Opportunity?”*Curr.Top. Microbiol.Immunol.*317:39-66;ter Meulen,J.(2007)“Monoclonal Antibodies For Prophylaxis And Therapy Of Infectious Diseases,”*Expert Opin.Emerg.Drugs.* 12(4):525-540)。

理想的治疗和/或诊断抗体对在感染细胞上存在、但在任何正常组织上不存在或仅以低水平存在的抗原是特异性的。发现、表征和分离能够结合感染细胞上存在的与传染病,尤其是病毒疾病特异性相关的抗原的新抗体在许多方面是有用的。首先,抗体具有针对这样的细胞的生物活性并且能够募集免疫系统的应答,从而治疗疾病。抗体可作为治疗剂被单独施用或结合当前的治疗被施用或用于制备连接毒性剂的免疫缀合物。在单独施用时具有相同特异性但是具有低生物活性或没有生物活性的抗体也可是有用的,因为该抗体可用于制备具有放射性同位素、毒素或化疗剂或包含化疗剂的脂质体的免疫缀合物,其中由于抗体将毒素引导至包含抗原的细胞,缀合形式是生物活性的。

对于理想的治疗和/或诊断抗体的期望的一个方面是发现和表征新的抗体,其能够介导,尤其能够增强针对与任何各种病毒疾病相关的受感染的细胞(尤其是针对病毒感染的

细胞)的免疫系统的激活。

尽管所有之前的进步,但是仍需要改善的组合物,其能够结合被病毒感染的细胞和能够促进或介导针对病毒感染的细胞的免疫应答。另外,仍需要改善的组合物,其能够检测这样病毒感染的细胞。本发明的目的是鉴定这样的组合物。另一目的是提供新的化合物,用于检测在病毒感染的细胞表面上表达的抗原。

如下面详细描述,本发明涉及双特异性分子,其结合1)免疫效应细胞的激活受体的表位和2)由被病毒感染的细胞表达的抗原的表位,并且,这样的双特异性分子能够介导,更优选地能够增强免疫效应细胞的激活和将免疫效应细胞靶向至表达表位的病毒感染的细胞,以便激活的免疫效应细胞杀伤病毒感染的细胞。

## 附图说明

图1A-1C阐释本发明的双特异性分子的结构和结构域。图1A描绘了两多肽链双特异性双抗体,其具有表位结合结构域A-D和另外的结构域E和F。图1B描绘了两多肽链双特异性双抗体,其具有E螺旋和K螺旋结构域。图1C描绘了三多肽链双特异性双抗体,其具有通过两个CH2-CH3结构域的缔合形成的Fc结构域。

图2显示由双特异性双抗体介导的对表达gp140的HEK 293D375细胞(92Th023,亚型AE, R5-热带(tropic))在存在天然杀伤细胞(NK)的情况下以5:1的效应子:靶比例孵育24小时之后的细胞毒性淋巴细胞活性,所述双特异性双抗体包括抗体h3G8的抗CD16表位结合结构域和抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域。通过阳性选择(D56678(LDH))纯化天然杀伤细胞(NK)。包括抗体4-4-20的抗荧光素表位结合结构域和抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域的双特异性双抗体用作对照。

图3显示由双特异性双抗体介导的对表达gp140的HEK 293D375细胞(92Th023,亚型AE, R5-热带)在存在天然杀伤细胞(NK)的情况下以5:1的效应子:靶比例孵育24小时之后的细胞毒性淋巴细胞活性,所述双特异性双抗体包括抗体h3G8的抗CD16表位结合结构域和抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域。通过阴性选择(D55386(LDH))纯化天然杀伤细胞(NK)。如预期的(因为NK细胞缺少CD3),包括抗体h抗体2(hAntibody 2)的抗CD3表位结合结构域和抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域的双特异性双抗体不能显示细胞毒性淋巴细胞活性。包括抗体4-4-20的抗荧光素表位结合结构域和抗体h3G8的抗CD16表位结合结构域的双特异性双抗体用作对照。

图4显示由双特异性双抗体介导的对表达HIV gp140的HEK 293D371细胞(CM244,亚型AE, R5-热带)在存在天然杀伤细胞(NK)的情况下以5:1的效应子:靶比例孵育24小时之后的细胞毒性淋巴细胞活性,所述双特异性双抗体包括抗体h3G8的抗CD16表位结合结构域和抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域。通过阴性选择(D55386(LDH))纯化天然杀伤细胞(NK)。如预期的(因为NK细胞缺少CD3),包括抗体h抗体2的抗CD3表位结合结构域和抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域的双特异性双抗体不能显示细胞毒性淋巴细胞活性。包括抗体4-4-20的抗荧光素表位结合结构域和抗体h3G8的抗CD16表位结合结构域的双特异性双抗体用作对照。

图5显示包括抗体h抗体2的抗CD3表位结合结构域和抗体A32的抗HIV gp120表位结合结构域或抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域的双特异性双抗体在存在全(pan) T细胞

(D54670)的情况下,促进对表达HIV env的Jurkat 522FY细胞的重定向CD8介导的杀伤的能力。细胞被孵育24小时。效应子:靶比例是5:1。包括帕利珠单抗的抗RSV F蛋白表位结合结构域和抗体h抗体2的抗CD3表位结合结构域的双特异性双抗体用作对照。

图6显示包括抗体h抗体2的抗CD3表位结合结构域和抗体A32的抗HIV gp120表位结合结构域或抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域的双特异性双抗体在存在全T细胞(D47239)的情况下,以10:1的效应子:靶比例孵育24小时之后,促进对表达HIV gp140的HEK 293D375细胞(92Th023 gp140)的重定向CD8介导的杀伤的能力。包括抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域和抗体4-4-20的抗荧光素表位结合结构域的双特异性双抗体用作对照。

图7显示包括抗体h抗体2的抗CD3表位结合结构域和抗体A32的抗HIV gp120表位结合结构域或抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域的双特异性双抗体在存在全T细胞(D47239)的情况下,促进对表达HIV gp140的HEK 293D371细胞(CM244,亚型AE,R5-热带)的重定向CD8介导的杀伤的能力。效应子:靶比例是10:1。包括抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域和抗体4-4-20的抗荧光素表位结合结构域的双特异性双抗体用作对照。

## 发明内容

本发明涉及双特异性分子,其能够将表达激活受体的免疫效应细胞定位至病毒感染的细胞,以便从而利于杀伤病毒感染的细胞。在优选的实施方式中,使用对免疫效应细胞的激活受体和对由被病毒感染的细胞表达的抗原的表位二者都具有免疫反应性的双特异性分子实现这样的定位。本发明另外涉及这样的双特异性分子在治疗潜伏性病毒感染、持续性病毒感染和失活病毒感染中的用途,以及这样的双特异性分子在杀伤包含病毒基因组的细胞或表达病毒蛋白的细胞的方法中的用途。本发明尤其涉及这样的双特异性分子,其结合(1)免疫效应细胞的激活受体的表位和(2)由被病毒感染的细胞表达的抗原的表位,其中抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上,所述抗原存在的水平大于通过双特异性分子在病毒上检测的抗原的水平,和涉及这样的双特异性分子:其能够介导,更优选地能够增强免疫效应细胞的激活和靶向被病毒感染的细胞,以便激活的免疫效应细胞杀伤被病毒感染的细胞。

详细地,本发明涉及双特异性分子,其包括:

(A) 第一表位结合结构域,所述第一表位结合结构域能够免疫特异性结合在免疫效应细胞的表面上表达的蛋白质的表位,其中所述免疫效应细胞表达激活受体,和

(B) 第二表位结合结构域,所述第二表位结合结构域能够免疫特异性结合由被病毒感染的细胞表达的抗原的表位;其中所述抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上,所述抗原存在的水平大于通过双特异性分子在病毒上检测的抗原的水平。

本发明进一步涉及这样的双特异性分子的实施方式,其中第一表位结合结构域结合免疫效应细胞的激活受体。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中效应细胞是T细胞、CD4<sup>+</sup> T 细胞、CD8<sup>+</sup> T细胞、天然杀伤细胞、巨噬细胞、粒细胞或树突细胞。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中病毒是爱泼斯坦-巴尔病毒、单纯疱疹病毒1型、单纯疱疹病毒2型、巨细胞病毒、人免疫缺陷病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、人乳头瘤病毒或流感病毒。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中细胞被病毒潜伏感染。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中由被病毒感染的细胞表达的抗原选自 LMP-1、LMP-2、流感M<sub>2</sub>蛋白、HIV env蛋白、HPV E6和HPV E7。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中由被病毒感染的细胞表达的抗原可检测地存在于细胞上,并且在病毒上不能通过双特异性分子被检测到。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中效应细胞上的表位是CD3表位、CD4表位、CD8表位、CD2表位、CD16表位或NKG2D表位。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中第一抗原结合结构域是来自 CD3抗体、CD4抗体、CD8抗体、CD2抗体、CD16抗体或NKG2D抗体的抗原结合结构域。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中由被病毒感染的细胞表达的抗原可检测地存在于细胞上,所述抗原存在的水平是通过双特异性分子在病毒上检测的抗原的水平,如果存在的话,的至少2倍。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中由被病毒感染的细胞表达的抗原可检测地存在于细胞上,所述抗原存在的水平是通过双特异性分子在病毒上检测的抗原的水平,如果存在的话,的至少5倍。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中由被病毒感染的细胞表达的抗原可检测地存在于细胞上,所述抗原存在的水平是通过双特异性分子在病毒上检测的抗原的水平,如果存在的话,的至少10倍。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中由被病毒感染的细胞表达的抗原可检测地存在于细胞上,所述抗原存在的水平是通过双特异性分子在病毒上检测的抗原的水平,如果存在的话,的至少100倍。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上,所述抗原存在的水平大于通过双特异性分子在未被病毒感染的细胞上检测的抗原的水平。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上,所述抗原存在的水平是通过双特异性分子在未被病毒感染的细胞上检测的抗原的水平的至少2倍。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上,所述抗原存在的水平是通过双特异性分子在未被病毒感染的细胞上检测的抗原的水平的至少5倍。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上,所述抗原存在的水平是通过双特异性分子在未被病毒感染的细胞上检测的抗原的水平的至少10倍。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上,所述抗原存在的水平是通过双特异性分子在未被病毒感染的细胞上检测的抗原的水平的至少100倍。

本发明进一步涉及任何上述双特异性分子,其中由被病毒感染的细胞表达的抗原可检测地存在于细胞上,并且在未被感染的细胞上不能通过双特异性分子被检测到。

本发明进一步涉及药学组合物,其包括双特异性分子和药学上可接受的载体;所述双

特异性分子包括：

(A) 第一表位结合结构域，所述第一表位结合结构域能够免疫特异性结合在免疫效应细胞的表面上表达的蛋白质的表位，其中免疫效应细胞表达效应细胞的激活受体，和

(B) 第二表位结合结构域，所述第二表位结合结构域能够免疫特异性结合由被病毒感染的细胞表达的抗原的表位；其中抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上，所述抗原存在的水平大于通过双特异性分子在病毒上检测的抗原的水平。

本发明进一步涉及这样的药学组合物的实施方式，其中第一表位结合结构域结合效应细胞的激活受体。

本发明进一步涉及在需要这样的治疗的个体中治疗潜伏性病毒感染的方法，所述方法包括向个体施用治疗有效量的双特异性分子的步骤，所述双特异性分子包括：

(A) 第一表位结合结构域，该第一表位结合结构域能够免疫特异性结合在免疫效应细胞的表面上表达的蛋白质，其中所述免疫效应细胞表达效应细胞的激活受体的表位，和

(B) 第二表位结合结构域，该第二表位结合结构域能够免疫特异性结合由被病毒感染的细胞表达的抗原的表位；其中抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上，所述抗原存在的水平大于通过双特异性分子在病毒上检测的抗原的水平。

本发明进一步涉及这样的方法的实施方式，其中双特异性分子的第一表位结合结构域结合效应细胞的激活受体。

本发明进一步涉及在需要这样的治疗的个体中治疗持续性病毒感染的方法，所述方法包括向个体施用治疗有效量的双特异性分子的步骤，所述双特异性分子包括：

(A) 第一表位结合结构域，所述第一表位结合结构域能够免疫特异性结合在免疫效应细胞的表面上表达的蛋白质，其中免疫效应细胞表达效应细胞的激活受体的表位，和

(B) 第二表位结合结构域，所述第二表位结合结构域能够免疫特异性结合由被病毒感染的细胞表达的抗原的表位；其中抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上，所述抗原存在的水平大于通过双特异性分子在病毒上检测的抗原的水平。

本发明进一步涉及这样的方法的实施方式，其中双特异性分子的第一表位结合结构域结合效应细胞的激活受体。

本发明进一步涉及在需要这样的治疗的个体中治疗失活病毒感染的方法，所述方法包括向个体施用治疗有效量的双特异性分子的步骤，所述双特异性分子包括：

(A) 第一表位结合结构域，所述第一表位结合结构域能够免疫特异性结合在免疫效应细胞的表面上表达的蛋白质，其中免疫效应细胞表达效应细胞的激活受体的表位，和

(B) 第二表位结合结构域，所述第二表位结合结构域能够免疫特异性结合由被病毒感染的细胞表达的抗原的表位；其中抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上，所述抗原存在的水平大于通过双特异性分子在病毒上检测的抗原的水平。

本发明进一步涉及这样的方法的实施方式，其中双特异性分子的第一表位结合结构域结合效应细胞的激活受体。

本发明进一步涉及杀伤包含病毒基因组的细胞的方法，所述方法包括使细胞接触双特异性分子的步骤，所述双特异性分子包括：

(A) 第一表位结合结构域，所述第一表位结合结构域能够免疫特异性结合在免疫效应细胞的表面上表达的蛋白质，其中免疫效应细胞表达效应细胞的激活受体的表位，和

(B) 第二表位结合结构域,所述第二表位结合结构域能够免疫特异性结合由被病毒感染的细胞表达的抗原的表位;其中抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上,所述抗原存在的水平大于通过双特异性分子在病毒上检测的抗原的水平。

本发明进一步涉及这样的方法的实施方式,其中双特异性分子的第一表位结合结构域结合效应细胞的激活受体。

本发明进一步涉及杀伤表达病毒蛋白的细胞的方法,所述方法包括使细胞接触双特异性分子的步骤,所述双特异性分子包括:

(A) 第一表位结合结构域,所述第一表位结合结构域能够免疫特异性结合在免疫效应细胞的表面上表达的蛋白质,其中免疫效应细胞表达效应细胞的激活受体的表位,和

(B) 第二表位结合结构域,所述第二表位结合结构域能够免疫特异性结合由被病毒感染的细胞表达的抗原的表位;其中抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上,所述抗原存在的水平大于通过双特异性分子在病毒上检测的抗原的水平。

本发明进一步涉及这样的方法的实施方式,其中双特异性分子的第一表位结合结构域结合效应细胞的激活受体。

#### 发明详述

本发明涉及双特异性分子,其能够将表达激活受体的免疫效应细胞定位至病毒感染的细胞,以便从而利于杀伤病毒感染的细胞。在优选的实施方式中,使用对免疫效应细胞的激活受体和对由被病毒感染的细胞表达的抗原的表位二者都具有免疫反应性的双特异性分子实现这样的定位。本发明另外涉及这样的双特异性分子在治疗潜伏性病毒感染、持续性病毒感染和失活病毒感染中的用途,以及这样的双特异性分子在杀伤包含病毒基因组的细胞或表达病毒蛋白的细胞的方法中的用途。本发明尤其涉及这样的双特异性分子,其结合(1)免疫效应细胞的激活受体的表位和(2)由被病毒感染的细胞表达的抗原的表位,其中抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上,所述抗原存在的水平大于通过双特异性分子在病毒上检测的抗原的水平,和涉及这样的双特异性分子:其能够介导,更优选地能够增强免疫效应细胞的激活和靶向被病毒感染的细胞,以便激活的免疫效应细胞杀伤被病毒感染的细胞。

这样的双特异性分子结合免疫效应细胞的激活受体和由被病毒感染的细胞表达的抗原的表位二者的能力允许这样的双特异性分子被用于治疗活性病毒感染、潜伏性病毒感染、持续性病毒感染,和失活病毒感染。

#### I. 一般技术

除非另外指出,本发明的实施将采用分子生物学(包括重组技术)、微生物学、细胞生物学、生物化学和免疫学的常规的技术,其在本领域技术人员的技术范围内。这样的技术充分阐释在下述文献中,比如,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Third Edition (Sambrook等Eds.,2001) Cold Spring Harbor Press,Cold Spring Harbor,NY; Oligonucleotide Synthesis:Methods and Applications(Methods in Molecular Biology),Herdewijn,P.,Ed.,Humana Press,Totowa,NJ;Oligonucleotide Synthesis (Gait,M.J.,Ed.,1984);Methods in Molecular Biology,Humana Press, Totowa,NJ; Cell Biology:A Laboratory Notebook(Cellis,J.E.,Ed.,1998) Academic Press,New York,NY;Animal Cell Culture (Freshney,R.I.,Ed.,1987);Introduction to Cell and

Tissue Culture (Mather, J.P. and Roberts, P.E., Eds., 1998) Plenum Press, New York, NY; Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures (Doyle, A. 等, Eds., 1993-8) John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Methods in Enzymology (Academic Press, Inc.) New York, NY; Weir's Handbook of Experimental Immunology (Herzenberg, L.A. 等 Eds. 1997) Wiley-Blackwell Publishers, New York, NY; Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (Miller, J.M. 等 Eds., 1987) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; Current Protocols in Molecular Biology (Ausubel, F.M. 等, Eds., 1987) Greene Pub. Associates, New York, NY; PCR: The Polymerase Chain Reaction, (Mullis, K. 等, Eds., 1994) Birkhäuser, Boston MA; Current Protocols in Immunology (Coligan, J.E. 等, eds., 1991) John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; Short Protocols in Molecular Biology (John Wiley and Sons, 1999) Hoboken, NJ; Immunobiology 7 (Janeway, C.A. 等 2007) Garland Science, London, UK; Antibodies (P. Finch, 1997) Stride Publications, Devoran, UK; Antibodies: A Practical Approach (D. Catty., ed., 1989) Oxford University Press, USA, New York NY; Monoclonal Antibodies: A Practical Approach (Shepherd, P. 等 Eds., 2000) Oxford University Press, USA, New York NY; Using Antibodies: A Laboratory Manual (Harlow, E. 等 Eds., 1998) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; The Antibodies (Zanetti, M. 等 Eds. 1995) Harwood Academic Publishers, London, UK; 和 DeVita, Hellman, and Rosenberg's Cancer: Principles & Practice of Oncology, 第八版, DeVita, V. 等 Eds. 2008, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

## II. 定义

如本文所使用,“抗体”是能够通过位于免疫球蛋白分子的可变区中的至少一个抗原识别位点特异性结合靶,比如碳水化合物、多核苷酸、脂质、多肽等的免疫球蛋白分子。如本文所使用,该术语不仅仅包括完整的多克隆或单克隆抗体,而且也包括其突变体、天然存在的突变体、包括具有必要特异性的抗原识别位点的抗体部分的融合蛋白、人源化的抗体,和嵌合抗体,以及包括具有必要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结构。遍及本申请,抗体轻链和重链的氨基酸残基的编号是根据如在以下文献中的EU索引: Kabat等(1992) Sequences of Proteins of Immunological Interest, National Institutes of Health (国立卫生研究院) Publication No. 91-3242中。如本文所使用,“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。如本文所使用,该术语包括片段(比如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>Fv)和单链(scFv)。

术语“单克隆抗体”指同质性(homogenous)抗体群体,其中单克隆抗体由参与抗原的选择性结合的氨基酸(天然存在的和非天然存在的)组成。单克隆抗体是高度特异性的,针对单个抗原位点。术语“单克隆抗体”不仅仅包括完整的单克隆抗体和全长单克隆抗体,而且也包括其片段(比如 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>Fv)、单链(scFv)、其突变体、包括抗体部分的融合蛋白、人源化的单克隆抗体、嵌合单克隆抗体,和包括具有必要特异性和结合抗原能力的抗原识别位点的免疫球蛋白分子的任何其他修饰结构。就抗体来源或制备其的方式(例如,通过杂交瘤、噬菌体选择、重组表达、转基因动物等)而言不期望受到限制。该术语包括完整的免疫球蛋白以及上面根据定义“抗体”描述的片段。

术语“嵌合抗体”指一般使用重组技术制备的嵌合分子,具有源自非人物种的免疫球蛋白的可变区和基于人免疫球蛋白的结构和/或序列的分子的剩余的免疫球蛋白结构。

术语“人源化的抗体”指一般使用重组技术制备的分子,其具有源自非人物种的免疫球蛋白的抗原结合位点和基于人免疫球蛋白的结构和/或序列的分子的剩余免疫球蛋白结构。抗原结合位点可包括融合到恒定结构域上的完整的可变结构域或仅仅移植到可变结构域中的适当框架区上的互补决定区(CDR)。抗原结合位点可以是野生型的或通过一个或多个氨基酸置换而被修饰。这消除了人个体中作为免疫原的恒定区,但是仍存在对外源可变区的免疫应答的可能性(LoBuglio,A.F.等(1989)“Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man:Kinetics And Immune Response,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 86: 4220-4224)。另一方法不仅仅关注提供源自人的恒定区,而且也修饰可变区,以便尽可能接近人形式重塑它们。已知重链和轻链二者的可变区均包含三个互补决定区(CDR),其响应讨论的抗原而不同,并且决定结合能力,其由四个框架区(FR)侧接,所述框架区在给定物种中相对保守并且推定为CDR提供支架材料(scaffolding)。当针对具体的抗原制备非人抗体时,可通过将源自非人抗体的CDR移植在待修饰的人抗体中的FR上而将可变区“重塑”或“人源化”。下述文献已经报道了该方法应用于各种抗体:Sato,K.等(1993) *Cancer Res* 53: 851-856.Riechmann,L.等(1988)“Reshaping Human Antibodies for Therapy,”*Nature* 332:323-327;Verhoeven,M.等(1988)“Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity,”*Science* 239:1534-1536;Kettleborough,C.A.等(1991)“Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting:The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation,”*Protein Engineering* 4:773-3783;Maeda,H.等(1991)“Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity,”*Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134;Gorman,S.D. 等(1991)“Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 88: 4181-4185;Tempest,P.R.等(1991)“Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo,”*Bio/Technology* 9:266-271;Co,M.S.等(1991)“Humanized Antibodies For Antiviral Therapy,”*Proc. Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 88:2869-2873;Carter,P.等(1992)“Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy,”*Proc.Natl.Acad.Sci. (U.S.A.)* 89: 4285-4289;和Co,M.S.等(1992)“Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen,”*J.Immunol.*148:1149-1154。在一些实施方式中,人源化的抗体保留全部的CDR序列(例如,人源化的小鼠抗体,其包含来自小鼠抗体的所有六个CDR)。在其他实施方式中,人源化的抗体具有相对于初始抗体已经改变的一个或多个CDR(一个、两个、三个、四个、五个或六个),其也称为“源自”初始抗体的一个或多个CDR的一个或多个CDR。

术语“BiTE”(双特异性T细胞连接子(engager))指具有两个抗原结合结构域的单多肽链分子,其中一个抗原结合结构域结合T细胞抗原和其中第二个抗原结合结构域结合靶细胞表面上存在的抗原(WO 05/061547;Baeuerle,P等(2008)“BiTE:A New Class Of Antibodies That Recruit T Cells,”*Drugs of the Future* 33:137-147;Bargou,et al.2008)“Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-

Engaging Antibody,”Science 321:974-977)。

术语“双抗体”指包括优选地通过共价相互作用缔合以形成至少两个表位结合位点的至少两条多肽链的分子,所述表位结合位点可识别相同或不同的表位。双抗体的每条多肽链均包括免疫球蛋白轻链可变区和免疫球蛋白重链可变区,但是这些区域不相互作用以形成表位结合位点。相反,双抗体多肽链中的一个(例如,第一)的免疫球蛋白重链可变区与不同的(例如,第二)双抗体多肽链的免疫球蛋白轻链可变区相互作用,以形成表位结合位点。类似地,双抗体多肽链中的一个(例如,第一)的免疫球蛋白轻链可变区与不同的(例如,第二)双抗体多肽链的免疫球蛋白重链可变区相互作用,以形成表位结合位点。双抗体可以是单特异性的、双特异性的、三特异性的等,因此能够同时结合一个、两个、三个或更多个不同的表位(其可以是相同的或不同的抗原的表位)。双抗体可另外是单价的、二价的、三价的、四价的、五价的、六价的等,因此能够同时结合一个、两个、三个、四个、五个、六个或更多个分子。双抗体的这两种特性(即,特异性的程度和价)可被组合,例如以产生四价(即,能够结合四组表位)的双特异性抗体(即,能够结合两个表位)等。双抗体分子公开在PCT公开物W0 2006/113665、W0 2008/157379和W0 2010/080538中。

如本文所使用,如果其相对于可选的表位,与另一分子的区域(即,表位)更频繁、更快速地以更大的持续时间和/或以更大的亲和力反应或缔合,则认为抗体或多肽“特异性”结合该表位。例如,特异性结合病毒表位的抗体是这样的抗体:与其结合其他病毒表位或非病毒表位相比,所述抗体以更大的亲和力、抗体亲抗原性、更容易和/或以更持久的时间结合该病毒表位。通过阅读该定义,应理解,例如,特异性结合第一靶的抗体(或部分或表位)可能或可能不特异性或优先结合第二靶。因此,“特异性结合”不一定要(尽管其可包括)排他性结合。一般而言,但是不一定,提及结合则意味着“特异性”结合。

如本文所使用,关于是否“保持免疫学活性”的表位,术语“免疫学活性”指抗体(例如,抗病毒抗体或结合免疫细胞的激活受体或表达这样的激活受体的免疫效应细胞的表面上存在的蛋白质的抗体)在不同条件下,例如,在表位已经经历还原和变性条件之后,结合表位的能力。

不同的生物功能与抗病毒抗体、结合免疫细胞的激活受体的抗体,或结合在表达这样的激活受体的免疫效应细胞的表面上存在的蛋白质的抗体有关,包括但不限于下述一个或多个:特异性结合这样的病毒表位或这样的激活受体(尤其在人细胞,或非人哺乳动物细胞的表面上表达的这样的分子)的能力;竞争性抑制与已知抗病毒抗体或能够结合免疫细胞的激活受体的已知抗体的优先结合的能力,包括优选结合初始抗体优先结合的不同表位的能力;结合包含这样的表位的病毒蛋白的一部分的能力,或结合体外或体内暴露于活细胞表面的免疫细胞的这样的激活受体的一部分的能力;结合包含这样的表位的病毒蛋白的一部分的能力,或结合暴露于活细胞表面上的免疫细胞的这样的激活受体的一部分或它们表面上这样的激活受体的能力,所述细胞比如但不限于表达包含这样的表位的病毒蛋白的细胞;和/或将治疗剂或可检测的标记物递送至在它们的表面上表达这样的分子的细胞中的能力。如本文所讨论,本发明的多肽(包括抗体)可具有这些特征中的任何一个或多个,前提是它们相对于表达激活受体的免疫效应细胞或病毒感染的细胞展示活性。

如本文所使用,术语“剂”指生物、药学或化学化合物。非限制性例子包括简单的或复杂的有机或无机分子、肽、蛋白质、寡核苷酸、抗体、抗体衍生物、抗体片段、维生素衍生物、碳

水化合物、毒素或化疗化合物。各种化合物可以是合成的,例如,小分子和低聚物(例如,寡肽和寡核苷酸),和基于各种核心结构的合成的有机化合物。另外,各种天然来源可提供化合物,用于筛选,比如植物或动物提取物等。

本发明的方法中采用的剂可以是随机选择的或合理选择或设计的。如本文所使用,当在没有关于涉及分子与其天然结合伴侣(一个或多个)或已知抗体结合的具体氨基酸或其他化学部分的之前的考虑或知识的情况下选择剂时,认为剂是随机选择的。随机选择的剂的例子是通过使用和筛选化学文库或肽组合文库鉴定的剂。

如本文所使用,当在考虑与剂的作用有关的靶位点的序列和/或其构象的基础上选择剂时,认为剂是合理选择或设计的。本发明也包括在这样的激活受体和其天然结合伴侣之间的相互作用的位点起作用的剂,但是其他配体和它们的相互作用位点也包括在本发明的范围内,无论是否是目前已知的或稍后鉴定的。通过利用组成受体/配体和/或受体-抗体复合物接触位点的肽序列可合理选择或合理设计剂。例如,合理选择的肽剂可以是这样的肽:所述肽的氨基酸序列与当在其天然环境下暴露于活细胞的表面时病毒蛋白或免疫细胞的激活受体上出现的表位一致。如期望地,通过结合抗体或天然配体,这样的剂将减少或阻断病毒蛋白或激活受体与抗体的缔合,或这样的病毒蛋白质或激活受体与其天然配体的缔合。

如本文所使用,就抗体而言,术语“标记(labeled)”旨在包括通过将可检测物质,比如放射性剂或荧光团(例如藻红蛋白(PE)或荧光素异硫氰酸酯(也称为异硫氰酸荧光素(fluoroisothiocyanate)或FITC))连接(即,物理连接)至抗体而直接标记抗体,以及通过与可检测物质的反应而间接标记探针或抗体。

如本文所使用,就抗体而言,术语“缔合(association)”包括使剂(例如,化疗剂)共价和非共价附着(attachment)或结合至抗体。通过经附着直接结合或间接结合至共同的平台,抗体可与剂(例如,化疗剂)缔合,以便抗体引导剂定位至抗体结合的受感染的细胞,并且其中抗体和剂在生理学条件下基本上不解离,以便剂不靶向抗体结合的相同的受感染细胞或以便剂的效价不下降。

术语“生物样品”包括获得自伴侣(companion)动物的、可用于诊断或监测试验的各种样品类型。定义包括唾液、血液和生物起源的其他液体样品、固体组织样品,比如活组织检查样本或组织培养物或从其衍生的细胞及其子代,例如,获得自怀疑具有病毒感染的个体的组织样品的细胞。定义也包括在它们获取之后以任何方式被操作的样品,比如通过用试剂处理、增溶或富集某些组分,比如蛋白质或多核苷酸,或埋入半固体或固体基质用于切片的目的。术语“生物样品”包括临床样品,并且也包括培养物中的细胞、细胞上清液、细胞裂解物、血清、血浆、生物流体和组织样品。

术语“宿主细胞”包括可以是或已经成为并入多核苷酸插入序列的载体(一种或多种)接受者的单个细胞或细胞培养物。宿主细胞包括单个宿主细胞的子代,并且由于天然的、偶然的或有意的突变,子代可能没必要与初始母细胞完全一致(在形态上或基因组DNA补体上)。宿主细胞包括用本发明的多核苷酸(一个或多个)在体内转染的细胞。

如本文所使用,术语“延迟感染的发展”意思是推迟、阻碍、减缓、延迟、稳定和/或延缓这样感染的发展。该延迟可为不同的时间长度,取决于感染的历史和/或被治疗的个体。如对于本领域技术人员显而易见的是,实际上足够的或明显的延迟可包括预防,因为个体不

不发展感染。

如本文所使用,在一个实施方式中,“有效量”的药学组合物是足以实现有益的或期望的结果的量,所述结果包括但不限于临床结果,比如减少由于疾病造成的症状,缓解感染的症状(例如,病毒载荷、发热、疼痛、脓毒等),提高遭受疾病的那些的生活质量、减少治疗该疾病需要的其他药物治疗的剂量、增强另一药物治疗的作用——比如经靶向和/或内化、延迟疾病的进展,和/或延长个体的生存。可在一个或多个施用中施用有效量。为了本发明的目的,有效量的药物、化合物或药学组合物是足以减少病毒存在的增殖(或作用)和足以直接或间接减少和/或延迟病毒疾病发展的量。在一些实施方式中,有效量的药物、化合物或药学组合物可能结合或不结合另外的药物、化合物或药学组合物实现。因此,可在施用一种或多种化疗剂的背景下考虑“有效量”,并且,如果结合一种或多种其他剂可实现或实现了期望结果,则单一剂可视为以有效量施用。尽管个体需要不同,但测定每种组分的有效量的最佳范围在现有技术内。施用抗体的典型的剂量包括0.1至100 mg/kg/体重之间的一个或多个单位剂量。优选的剂量包括1至100mg/kg/体重。最优选的剂量包括10mg/kg体重至100mg/kg体重。双特异性分子(例如,双抗体和 BiTEs)施用的典型剂量包括0.0001mg/kg体重至100mg/kg体重的一个或多个单位剂量。优选地,施用的剂量在0.0001mg/kg体重和20mg/kg体重、0.0001mg/kg 体重和10mg/kg体重、0.0001mg/kg体重和5mg/kg体重、0.0001mg/kg体重和2 mg/kg体重、0.0001mg/kg体重和1mg/kg体重、或0.0001mg/kg体重和0.75mg/kg/ 体重之间。

如本文所使用,当该核酸分子、剂、抗体、组合物或细胞等基本上从其初始来源中天然存在的污染核酸分子、抗体、剂、组合物或细胞等分离时,认为核酸分子或剂、抗体、组合物或细胞等是“分离的”。

术语“个体”指脊椎动物,优选哺乳动物。哺乳动物包括但不限于人、家畜、体育动物、宠物、灵长类、小鼠和大鼠。在最优选的实施方式中,术语个体表示人。

术语“多肽”、“寡肽”、“肽”和“蛋白质”在本文中可交换使用,指任何长度氨基酸的聚合物,但是尤其是长度大于5、10、15、20或25个氨基酸残基。聚合物可以是线性的或分枝的,其可包括修饰的氨基酸,并且其可被非氨基酸中断。该术语也包括已经被天然或通过干扰修饰的氨基酸聚合物;例如,二硫键形成、糖基化、脂质化、乙酰化、磷酸化,或任何其他操作或修饰,比如缀合标记组分。也包括在定义中的是,例如,包含一个或多个氨基酸的类似物(包括,例如,非天然氨基酸等)以及本领域已知的其他修饰的多肽。应理解,因为本发明的多肽是基于抗体,所以多肽可作为单链或作为缔合的链存在。

本发明也包括本文所述的双特异性分子的拟肽(peptidomimetic)。这样的拟肽包括其中至少一个氨基酸残基被通常在自然中未发现的氨基酸残基,比如氨基酸的D异构体或氨基酸的N-烷基化种类取代的肽。在其他实施方式中,通过用酰胺等构物替换肽激动剂、拮抗剂或调节剂中的至少一个酰胺键( $-C(=O)-NH-$ ),构建拟肽。适当的酰胺等构物包括: $-CH_2-NH-$ 、 $-CH_2-S-$ 、 $-CH_2-S(O)-$ 、 $-CH_2-S(O)_2-$ 、 $-CH_2-CH_2-$ 、 $-CH=CH-$ (E或Z形式)、 $-C(=O)-CH_2-$ 、 $-CH(CN)-NH-$ 、 $-C(OH)-CH_2-$  和  $-O-C(=O)-NH-$ 。肽激动剂、拮抗剂或调节剂中作为用酰胺等构物替换的合适的候选物的酰胺键包括可通过肽激动剂、拮抗剂或调节剂治疗的期望受试者的内源酯酶或蛋白酶水解的键。

如本文所使用,术语“基本上纯的”指至少50%纯的(即,没有污染物),更优选地至少

90%纯的,更优选地至少95%纯的,更优选地至少98%纯的,更优选地至少99%纯的,和最优选地大于99%纯的材料。

如本文所使用,术语“毒素”指在细胞内实现不利应答的任何物质。例如,针对受感染的细胞的毒素可对受感染的细胞具有不利的、有时有害的作用。毒素的例子包括但不限于放射性同位素、加利车霉素和美登木素生物碱。

如本文所使用,术语“治疗(treatment)”或“治疗(treating)”表示获得有益的或期望的结果——包括并且优选有益的或期望的临床结果——的方法。这样有益的或期望的临床结果包括但不限于下述一个或多个:减少(或破坏)受感染的细胞或其他患病的细胞的增殖、减少源自疾病的症状、提高遭受疾病的那些的生活质量、减少治疗疾病需要的其他药物治疗的剂量、延迟疾病的进展,和/或延长伴随动物接受者的生存。

如本文所使用,术语“病毒感染的(virally-infected)”指已经被病毒,尤其是下述病毒感染了的细胞:腺病毒、腺伴随病毒、B病毒(恒河猴疱疹病毒I型(macacine herpesvirus I))、BK病毒、布尼亚病毒、切昆贡亚病毒、coxsackie病毒、冠状病毒、巨细胞病毒、东方马脑炎病毒、埃博拉病毒、肠道病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒、汉坦病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、丁肝病毒、戊肝病毒、单纯疱疹病毒1型、单纯疱疹病毒2型、人泡沫病毒、人疱疹病毒3型、人疱疹病毒5型、人疱疹病毒6型、人疱疹病毒7型、人免疫缺陷病毒、人乳头瘤病毒、人 $\beta$ -嗜淋巴细胞病毒、人T细胞白血病病毒I型、人T细胞白血病病毒II型、流感病毒、JC病毒、JEV、卡波西氏肉瘤相关的疱疹病毒、拉沙病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎(lymphocytic choriomeningitis)病毒、马尔堡病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、尼帕(Nipah)病毒、诺如病毒(norovirus)、诺瓦克病毒、正呼肠孤病毒、副流感病毒、细小病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼肠病毒、呼吸道合胞病毒、鼻病毒、裂谷热病毒、轮状病毒、风疹病毒、圣路易斯脑炎病毒、重型天花病毒、轻型天花病毒(variola minor virus)、水痘带状疱疹病毒(vericella-zoster virus)、西尼罗病毒、西方马脑炎病毒或黄热病病毒。

### III. 制备抗体和多肽的方法

制备单克隆抗体的方法是本领域已知的。可采用的一种方法是Kohler, G.等(1975)“Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Predefined Specificity,”Nature 256:495-497的方法或其改良。典型地,在小鼠、大鼠或兔子中开发单克隆抗体。通过用免疫原量的细胞、细胞提取物或蛋白质制剂免疫小鼠、大鼠或兔子产生抗体,所述细胞、细胞提取物或蛋白质制剂包含期望的病毒表位或免疫效应细胞期望的激活受体(例如,  $\text{Fc } \gamma \text{ RIIA}$ 、 $\text{Fc } \gamma \text{ RIIA}$ 、 $\text{Fc } \gamma \text{ RIIC}$ 、CD3、TCR、CD4、CD2、CD16和NKG2D等)或表达这样的感兴趣的免疫细胞的激活受体的免疫效应细胞表面上存在的蛋白质。免疫原可以是不限于初级细胞、培养的细胞系、癌细胞、核酸或组织。用于免疫的细胞可被培养一段时间(例如,至少24小时),然后它们用作免疫原。细胞它们本身或结合非变性佐剂,比如Ribi可用作免疫原。一般而言,当用作免疫原时,细胞应保持完整并且优选有活力。完整的细胞比通过免疫的动物破坏的细胞可使得抗原更好地被检测。变性或烈性佐剂,例如,弗氏佐剂的使用可破坏细胞,因而是建议的。可以定期的间隔,比如双周或每周,施用免疫原多次,或可以维持动物(例如,组织重组体)中的活力这样的方式施用免疫原。

在一个实施方式中,结合期望的病毒表位或期望的免疫效应细胞的激活受体或表达这样的激活受体的免疫效应细胞的表面上存在的蛋白质的单克隆抗体使用过表达这样的分

子的宿主细胞获得。

为了监测抗体应答,小的生物学样品(例如,血液)可获得自人患者,或更优选地,获得自非人哺乳动物,并且针对免疫原测试抗体的效价。可移除这样的非人哺乳动物的脾和/或若干大淋巴结并且分离成单个细胞。如果期望,可通过将细胞悬液施加至包被抗原的板或孔筛选脾细胞(在移除非特异性粘附的细胞之后)。表达对抗原特异性的膜结合免疫球蛋白的B细胞将结合板,并且不被剩余的悬液冲洗掉。所得B细胞,或所有分离的脾细胞可然后与骨髓瘤细胞(例如,X63-Ag8.653 和来自SaIk Institute,Cell Distribution Center,San Diego,CA的那些)融合。聚乙二醇(PEG)可用于使脾或淋巴细胞与骨髓瘤细胞融合,以形成杂交瘤。然后在选择性培养基(例如,次黄嘌呤、氨基蝶呤、胸苷培养基,另外称为“HAT培养基”)中培养杂交瘤。然后通过有限稀释将所得杂交瘤铺板,并且使用例如FACS(荧光激活细胞分选)或免疫组织化学(IHC)筛选,测定特异性结合免疫原的抗体的产生。然后体外(例如,在组织培养瓶或中空纤维反应器中),或体内(例如,作为小鼠中的腹水)培养选择的分泌单克隆抗体的杂交瘤。

作为细胞融合技术的另一备选方案,爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)-无限增殖化的B细胞可用于产生本发明的单克隆抗体。如果期望,则扩展和亚克隆杂交瘤,并且通过常规的试验程序(例如,FACS、IHC、放射免疫分析、酶免疫试验、荧光免疫试验等)测定上清液的抗免疫原活性。

在另一可选方式中,对期望的病毒表位或期望的免疫效应细胞的激活受体或表达这样的激活受体的免疫效应细胞的表面上存在的蛋白质免疫特异性的现有单克隆抗体和任何其他等同的抗体可被测序并且通过本领域已知的任何方式重组产生。在一个实施方式中,对这样的抗体测序,然后将多核苷酸序列克隆至载体中,用于表达或增殖。编码感兴趣抗体的序列可保持在宿主细胞的载体中,并且可然后扩展宿主细胞并且冷冻,用于将来使用。

这样的抗体的多核苷酸序列可用于遗传操作,以产生本发明的双特异性分子以及嵌合抗体、人源化的抗体,或犬源化(canonized)的抗体,以改善抗体的亲和力或其他特征。人源化或犬源化抗体的一般原则涉及保持抗体的抗原结合部分的基本序列,同时用人抗体序列或犬科动物抗体序列交换抗体的非人或非犬科剩余部分。人源化或犬源化单克隆抗体有四个一般的步骤。这些是:(1)测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)设计人源化的抗体或犬源化的抗体,即,确定在人源化或犬源化过程期间使用哪个抗体框架区(3)实际人源化或犬源化方法/技术和(4)转染和表达人源化的抗体。见,例如,美国专利号 4,816,567、5,807,715、5,866,692和6,331,415。

通过使用短连接肽连接轻链和/或重链可变区制备单链可变区片段(“scFv”)。Bird等(1988) (“Single-Chain Antigen-Binding Proteins,”Science 242:423-426)描述了连接肽的例子,其在一个可变区的羧基末端和另一可变区的氨基末端之间桥接约 3.5nm。已经设计和使用了具有其他序列的连接体(Bird等(1988) “Single-Chain Antigen-Binding Proteins,”Science 242:423-426)。连接体进而可被修饰用于另外的功能,比如药物的附着或附着至固体支持物。可经重组或合成产生单链突变体。对于合成产生scFv,可使用自动合成仪。对于重组产生scFv,包含编码scFv的多核苷酸的适当质粒可被引入到适当的宿主细胞——真核细胞,比如酵母细胞、植物细胞、昆虫细胞或哺乳动物细胞,或原核细胞,比如大肠埃希氏菌(E.coli)中。可通过常规操作,比如多核苷酸的连接制备编码感兴趣scFv的

多核苷酸。可使用本领域已知的标准蛋白质纯化技术分离所得scFv。

本发明包括对本发明的双特异性分子的不明显影响它们性质的修饰和具有增强或降低活性的变体。多肽的修饰是本领域的常规实践,因而不需要在本文详细描述。修饰的多肽的例子包括具有保守氨基酸残基取代的多肽,不明显不利改变功能活性的氨基酸的一个或多个缺失或添加,或化学类似物的使用。可彼此保守取代的氨基酸残基包括但不限于:甘氨酸/丙氨酸;缬氨酸/异亮氨酸/亮氨酸;天冬酰胺/谷氨酰胺;天冬氨酸/谷氨酸;丝氨酸/苏氨酸;赖氨酸/精氨酸和苯丙氨酸/酪氨酸。这些多肽也包括糖基化和非糖基化的多肽,以及具有其他翻译后修饰,比如,例如,用不同的糖糖基化、乙酰化和磷酸化的多肽。优选地,氨基酸取代是保守的,即,取代的氨基酸具有与初始氨基酸的类似的化学特性。这样的保守取代是本领域已知的,并且上面已经提供了例子。氨基酸修饰的范围可以是从改变或修饰一个或多个氨基酸到区域比如可变区的完全重新设计(redesign)。可变区的改变可改变结合亲和力和/或特异性。修饰的其他方法包括使用本领域已知的偶联技术,包括但不限于,酶促方式、氧化取代和螯合作用。修饰可用于,例如,附着用于免疫试验的标签,比如附着用于放射免疫分析的放射性部分。使用现有技术确立的程序制备修饰的多肽,并且可使用本领域已知的标准试验筛选。

本发明也包括融合蛋白,其包括来自本发明多肽和抗体的一个或多个片段或区域。在一个实施方式中,提供的融合多肽包括轻链可变区的至少10个连续氨基酸和重链可变区的至少10个氨基酸。在另一实施方式中,融合多肽包含异源免疫球蛋白恒定区。在另一实施方式中,融合多肽包含由公共保藏的杂交瘤产生的抗体的轻链可变区和重链可变区。为了本发明的目的,抗体融合蛋白包含一个或多个多肽结构域和在天然分子中其未连接的另一氨基酸序列,例如异源序列或来自另一区域的同源序列,所述多肽结构域特异性结合期望的病毒表位或期望的免疫效应细胞的激活受体或表达这样的激活受体的免疫效应细胞的表面上存在的蛋白质。

可使用本领域已知的方法,例如合成或重组,产生抗病毒、抗激活受体,或抗表达这样的激活受体多肽的免疫效应细胞的表面上存在的抗-蛋白质以及其他激动剂、拮抗剂和调节剂。产生这样的肽激动剂、拮抗剂和调节剂的一种方法涉及化学合成多肽,随后在适于获得天然构象——即,正确的二硫键连接——的氧化条件下处理。这可使用本领域技术人员熟知的方法实现(见,例如,Kelley,R.F.等(1990),在以下中:Genetic Engineering Principles and Methods,Setlow,J.K.Ed., Plenum Press,N.Y.,vol.12,pp 1-19;Stewart,J.M等(1984)Solid Phase Peptide Synthesis,Pierce Chemical Co., Rockford,IL;也见美国专利号4,105,603、3,972,859、3,842,067和3,862,925)。

可使用固相肽合成常规地制备本发明的多肽(Merrifield,B.(1986)“Solid Phase Synthesis,”Science 232(4748):341-347;Houghten,R.A.(1985)“General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides:Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids,”Proc.Natl. Acad.Sci.(U.S.A.) 82(15):5131-5135;Ganesan,A.(2006)“Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century,”Mini Rev.Med.Chem.6(1):3-10)。

在一个可选方案中,可重组制备抗体并且使用本领域已知的任何方法进行表达。可如下重组制备抗体:首先分离从宿主动物制备的抗体、获得基因序列和使用基因序列在宿主

细胞(例如,CHO细胞)中重组表达抗体。可采用的另一方法是在植物(例如,烟草)或转基因奶中表达抗体序列。已经公开了在植物或奶中重组表达抗体的适当的方法(见,例如,Peeters等(2001)“Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants,”Vaccine 19:2756;Lonberg,N.等(1995)“Human Antibodies From Transgenic Mice,”Int.Rev.Immunol 13:65-93;和Pollock等(1999)“Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies,”J. Immunol Methods 231:147-157)。制备抗体衍生物例如,人源化的、单链等的适当方法是本领域已知的。在另一可选方案中,可通过噬菌体展示技术重组制备抗体(见,例如,美国专利号5,565,332、5,580,717、5,733,743、6,265,150和Winter,G.等(1994)“Making Antibodies By Phage Display Technology,”Annu.Rev.Immunol. 12:433-455)。

感兴趣的抗体或蛋白质可通过Edman降解法进行测序,其是本领域技术人员熟知的。由质谱或Edman降解法产生的肽信息可用于设计用于克隆感兴趣的蛋白质的探针或引物。

克隆感兴趣的蛋白质的可选方法是通过使用纯化的蛋白质或其部分“淘洗”表达感兴趣的抗体或蛋白质的细胞。可通过如下进行“淘洗”程序:从在第二细胞类型中表达或过表达期望的cDNA的组织或细胞中获得cDNA文库,和筛选特异性结合期望的蛋白质的第二细胞类型的转染细胞。用于通过“淘洗”克隆编码细胞表面蛋白质的哺乳动物基因的方法可见于现有技术(见,例如,Aruffo,A.等(1987)“Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System,”Proc.Natl.Acad.Sci.(U.S.A.) 84:8573-8577;和Stephan,J.等(1999)“Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development:Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation,”Endocrinol. 140:5841-5854)。

可根据现有技术的方法,通过从具体的细胞类型逆转录mRNA获得编码抗体和其他肽激动剂、拮抗剂和调节剂的cDNA。具体而言,可使用各种裂解酶或化学溶液根据上文Sambrook等阐释的程序分离mRNA,或通过商业上可得的核酸-结合树脂根据制造商提供的伴随说明书提取mRNA(例如,Qiagen,Invitrogen, Promega)。然后将合成的cDNA引入表达载体中,以在第二类型细胞中产生感兴趣的抗体或蛋白质。暗示表达载体在宿主细胞中必须是可复制的——作为游离体(episome)或作为染色体DNA的不可缺少的部分。适当的表达载体包括但不限于质粒、病毒载体,包括腺病毒、腺伴随病毒、逆转录病毒和黏粒。

包含感兴趣的多核苷酸的载体可通过许多适当的方式中的任意方式被引入宿主细胞中,所述适当方式包括电穿孔,采用氯化钙、氯化铷、磷酸钙、DEAE-葡聚糖或其他物质进行转染;微弹轰击(microprojectile bombardment);脂转染;和感染(例如,在载体是感染剂比如牛痘病毒的情况下)。引入载体或多核苷酸的选择通常取决于宿主细胞的特征。

任何能够过表达异源DNA的宿主细胞均可用于分离编码感兴趣的抗体、多肽或蛋白质的基因的目的。合适的哺乳动物宿主细胞的非限制性例子包括但不限于 COS、HeLa和CHO细胞。优选地,相比于宿主细胞中相应的感兴趣的内源抗体或蛋白质(如果存在),宿主细胞以约5倍,更优选地10倍,更优选地20倍、更优选地50倍、更优选地100倍的水平表达cDNA。优选地通过免疫试验或FACS实现对特异性结合期望的蛋白质的宿主细胞的筛选。以此方式可鉴定过表达感兴趣的抗体或蛋白质的细胞。

各种技术也是可用的,其现在可用于产生突变体肽激动剂、拮抗剂和调节剂,其编码所

得蛋白质的氨基酸序列相对于亲肽激动剂、拮抗剂或调节剂分子的添加、缺失或改变。

本发明包括包含本发明抗体的氨基酸序列的多肽。可通过本领域已知的程序制备本发明的多肽。可如下产生多肽：通过抗体的蛋白酶解或其他降解、通过如上所述的重组方法（即，单或融合多肽）或通过化学合成。抗体的多肽，尤其是多达约50个氨基酸的较短多肽，通过化学合成被常规制备。化学合成的方法是本领域已知的并且是商业上可得的。例如，这样的多肽可通过采用固相方法的自动多肽合成仪产生。

#### IV. 筛选多肽和单克隆抗体的方法

若干方法可用于筛选多肽和单克隆抗体，其结合期望的病毒表位或期望的免疫效应细胞的激活受体或表达这样的激活受体的免疫效应细胞的表面上存在的蛋白质。应理解，“结合(binding)”指生物学或免疫学相关的特异性结合，而不指可能发生的非特异性结合，例如，当以非常高的浓度针对非特异性靶使用免疫球蛋白时。在一个实施方式中，使用标准筛选技术筛选结合期望的蛋白质或表位的单克隆抗体。如此，可获得单克隆抗体。产生针对免疫效应细胞的激活受体的抗体的本发明优选的杂交瘤是产生针对激活受体：CD3、TCR、CD4、CD2、CD16和NKG2D 的抗体的那些杂交瘤。

可鉴定结合期望的免疫效应细胞的激活受体或表达这样的激活受体的免疫效应细胞的表面上存在的蛋白质的另外的单克隆抗体。为了该目的，筛选单克隆抗体结合这样的表位或蛋白质但是不结合其他表位或蛋白质的差别(differential)能力。可用于筛选的一种方法是免疫组织化学(IHC)。标准免疫组织化学技术是本领域普通技术人员已知的。见，例如，Animal Cell Culture Methods(J.P.Mather和D. Barnes编辑,Academic Press,NY, Vol.57,Ch.18和19,pp.314-350,1998)。生物学样品(例如，组织)可获得自活组织检查、尸体解剖或尸体剖检。为了确定表位是否仅仅存在于免疫效应细胞的表面上，结合潜在表位的抗体可用于检测免疫效应细胞。组织可在冷冻期间被埋入到预防损伤的固体或半固体物质(例如，琼脂糖凝胶或OCT)中，然后被切片用于染色。来自不同器官和处在不同级别的组织可用于筛选单克隆抗体。可用于筛选目的的组织例子包括但不限于卵巢、乳腺(breast)、肺、前列腺、结肠、肾、皮肤、甲状腺、脑、心脏、肝、胃、神经、血管、骨、上消化道和胰腺。

若干不同检测系统中的任意检测系统均可用于检测抗体与组织切片的结合。典型地，免疫组织化学涉及一级抗体与组织的结合，然后产生针对来自一级抗体的种类有活性的二级抗体并且将其缀合至可检测的标记物(例如，辣根过氧化物酶 HRP，或二氨基联苯胺(diaminobenzidine)DAB)。可使用的一种可选的方法是多克隆镜像互补抗体或polyMICA™(多克隆镜像互补的抗体；The Binding Site Limited, Birmingham,UK;Mangham,D.C.等(1999)“A Novel Immunohistochemical Detection System Using Mirror Image Complementary Antibodies(MICA),”Histopathology 35(2):129-33)。PoIyMICA™技术可用于测试一级抗体与正常和受感染组织的结合。若干类型的polyMICA™检测试剂盒是商业上可得的：产品号HK004.D是使用DAB 发色团的polyMICA™检测试剂盒；产品号HK004.A是使用AEC发色团的 polyMICA™检测试剂盒。可选地，一级抗体可直接用可检测的标记物标记。

IHC筛选中选择适当抗体的第一步骤是小鼠中产生的一级抗体(例如，抗激活受体抗体)与一个或多个免疫原(例如，细胞或组织样品)的结合。在一个实施方式中，组织样品是来自不同器官的冷冻组织的切片。细胞或组织样品可包括受感染的细胞或非感染细胞。

可制备冷冻组织、在固定或不固定的情况下将其切片,并且通过熟悉本领域的技术人员已知的许多方法中的任何方法进行IHC(见,例如,Stephan等(1999)“Distribution And Function Of The Adhesion Molecule BEN During Rat Development,”Dev.Biol.212:264-277和Stephan等(1999)“Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development:Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation,”Endocrinology 140:5841-5854)。

#### V. 表征本发明抗体的方法

若干方法中的任何方法均可用于表征本发明的抗体。一种方法是鉴定其结合的表位。表位图谱可商业上获得自各种资源,例如,肽扫描(Pepscan)系统(Lelystad, The Netherlands)。表位图谱可用于确定抗体结合的序列。表位可以是线性表位,即,包含在单段氨基酸中,或由可能不一定包含在单段中的氨基酸的三维相互作用形成的构象表位。

可分离或合成(例如,经重组)不同长度的肽(例如,优选地至少4-6个氨基酸长)并且与抗体一起用于结合试验。可在系统筛选中通过使用源自细胞外序列的重叠肽和通过抗体确定结合,确定抗体结合的表位。

可用于表征本发明抗体的另一方法是使用与已知结合相同抗原的其他抗体的竞争试验,即,确定抗体是否结合与其他抗体相同的表位。对于期望的病毒表位或期望的免疫效应细胞的激活受体或表达这样的激活受体的免疫效应细胞的表面上存在的蛋白质,商业上可得的抗体的例子是可用的并且可使用本文教导的结合试验进行鉴定。竞争试验是本领域技术人员熟知的,并且这样的程序和示意性数据进一步详述在实施例。抗体可进一步通过它们结合的组织、病毒的类型或免疫细胞的类型表征。

如上所讨论,本发明抗体的中心方面涉及它们结合期望的病毒表位或期望的免疫效应细胞的激活受体或表达这样的激活受体的免疫效应细胞的表面上存在的蛋白质的能力。这样的抗体可通过在人效应细胞-反应性抗体或结合期望的病毒颗粒的抗体之间筛选被容易地鉴定。结合期望的免疫效应细胞的激活受体的这样的抗体的非限制性例子包括抗CD3抗体OKT3、M291、YTH12.5、抗CD3抗体1和抗CD3抗体2;抗TCR抗体BMA031;抗CD8抗体TRX2;抗CD4抗体TRX1;抗CD2抗体Lo-CD2a(ATCC登陆号:11423);抗CD16抗体3G8和A9;抗NKG2D 抗体KYK 2.0。

#### VI. 本发明优选的组合物

本发明包括组合物,包括药学组合物,其包含本发明的双特异性分子,源自这样的双特异性分子的多肽,包括编码这样的双特异性分子或多肽的序列的多核苷酸和如本文所描述的其他剂。

就结合期望的病毒表位的抗体而言,优选的抗体包括结合下述病毒表位的那些抗体:腺病毒、腺伴随病毒、B病毒(恒河猴疱疹病毒I型)、BK病毒、布尼亚病毒、切昆贡亚病毒、coxsackie病毒、冠状病毒(例如,M蛋白质等)、巨细胞病毒、东方马脑炎病毒、埃博拉病毒、肠道病毒、爱泼斯坦-巴尔病毒(例如,LMP-1, LMP-2等)、汉坦病毒、甲肝病毒、乙肝病毒、丙肝病毒、丁肝病毒、戊肝病毒、单纯疱疹病毒1型、单纯疱疹病毒2型、人泡沫病毒、人疱疹病毒3型、人疱疹病毒5型、人疱疹病毒6型、人疱疹病毒7型、人免疫缺陷病毒(例如,env等)、人乳头瘤病毒(例如,E6,E7等)、人 $\beta$ -嗜淋巴细胞病毒、人T细胞白血病病毒I型、人T细胞白血病病毒II型、流感病毒(例如,M<sub>2</sub>蛋白等),JC病毒、JEV、卡波西氏肉瘤相关的疱疹病毒、拉沙

病毒、淋巴细胞脉络丛脑膜炎病毒、马尔堡病毒、麻疹病毒、腮腺炎病毒、尼帕病毒、诺如病毒、诺瓦克病毒、正呼肠孤病毒、副流感病毒、细小病毒、脊髓灰质炎病毒、狂犬病病毒、呼肠病毒、呼吸道合胞病毒(例如,M蛋白质等)、鼻病毒、裂谷热病毒、轮状病毒、风疹病毒、圣路易士脑炎病毒、重型天花病毒、轻型天花病毒、水痘带状疱疹病毒、西尼罗病毒、西方马脑炎病毒或黄热病病毒。这样的抗体可商业上获得自许多来源,或可通过用这样的病毒免疫小鼠或其他动物获得(包括产生单克隆抗体)。

就结合期望的免疫效应细胞的激活受体的抗体而言,优选的抗体包括抗CD3 抗体 OKT3、M291、YTH12.5、抗CD3抗体1和抗CD3抗体2;抗TCR抗体 BMA031;抗CD8抗体TRX2;抗CD4 抗体TRX1;抗CD2抗体Lo-CD2a(ATCC 登陆号:11423);抗CD16抗体3G8和A9;抗NKG2D抗体KYG 2.0。下面显示了这些抗体的可变轻链和可变重链的氨基酸序列。所以,本领域技术人员能够构建具有这样的CDR的双特异性分子以及抗体和其能够结合被这些抗体识别的表位的衍生物,包括其入源化的衍生物。

#### 抗CD3抗体

##### OKT3

OKT3轻链可变区(SEQ ID NO:1)(CDR加下划线显示):

QIVLTQSPAI MSASPGGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDT  
SKLASGVPAAH FRGSGSGTSY SLTISGMEAE DAATYYCQQW SSNPFTFGSG  
 TKLEINR

OKT3重链可变区(SEQ ID NO:2)(CDR加下划线显示):

QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RYTMHWVKQR PGQGLEWIGY  
INPSRGYTNY NQKFKDKATL TTDKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCARYYY  
DDHYCLDYWG QGTTLTVSSA KTTAPSVYPL APVCGDITGS SVTLGCLVKG  
 YFPEPVTITW NSGSLSSGVH TFPVAVLQSDL YTLSSSVTVT SS

##### M291

M291轻链可变区(SEQ ID NO:3)(CDR加下划线显示):

DIVLTQSPAI MSASPGGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWTYDT  
SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DADTYYCQQW SSNPPTFGSG TKLEIK

M291重链可变区(SEQ ID NO:4)(CDR加下划线显示):

QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFI SYTMHWVKQR PGQGLEWIGY  
INPSRGYTHY NQKLKDKATL TADKSSSSAY MQLSSLTSED SAVYYCARSA  
YYDYDGFAYW GQGTLVTVSA

##### YTH12.5

YTH12.5轻链可变区(SEQ ID NO:5)(CDR加下划线显示):

MGWSCIIIFL VATATGVHSD IQLTQPNVS TS LGSTVKLS CTLSSGNIEN  
NYVHWYQLYE GRSPTTMIYD DDKRPDGVPD RFSGSIDRSS NSAFLTIHNV  
 AIEDEAIYFC HSYVSSFNVF GGGTKLTVLR

YTH12.5重链可变区(SEQ ID NO:6)(CDR加下划线显示):

MGWSCIILFL VATATGVHSE VQLLESGGGL VQPGGSLRLS CAASGFTFSS  
FPMAWVRQAP GKGLEWVSTI STSGGRTYYR DSVKGRFTIS RDNSKNTLYL  
 QMNSLRAEDT AVYYCAKFRQ YSGGFDYWGQ GTLTVTVSS

抗CD3抗体1

抗CD3抗体1轻链可变区 (SEQ ID NO:7) (CDR加下划线显示) :

QVVLTTQSPAI MSAFPGEKVT MTCSASSSVS YMNWYQQKSG TSPKRWIYDS  
SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMETE DAATYYCQQW SRNPPTFGGG TKLQITR

抗CD3抗体1重链可变区 (SEQ ID NO:8) (CDR加下划线显示) ::

QVQLQQSGAE LARPGASVKM SCKASGYTFT RSTMHWVKQR PGQGLEWIGY  
INPSSAYTNY NQKFKDKATL TADKSSSTAY MQLSSLTSED SAVYYCASPQ  
VHYDYNGFY WGQGTTLVTVS S

抗CD3抗体2

抗CD3抗体2轻链可变区 (SEQ ID NO:9) (CDR加下划线显示) :

QAVVTQESAL TTSPGETVTL TCRSSTGAVT TSNYANWVQE KPDHLFTGLI  
 GGTNKRAPGV PARFSGSLIG DKAALTITGA QTEDEAIYFC ALWYSNLWVF  
 GGGTKLTVLG

抗CD3抗体2重链可变区 (SEQ ID NO:10) (CDR加下划线显示) :

EVQLVESGGG LVQPKGSLKL SCAASGFTFN TYAMNWVRQA PGKGLEWVAR  
IRSKYNNYAT YYADSVKDRF TISRDDSQSI LYLQMNNLKT EDTAMYVCVR  
HGNFGNSYVS WFAYWGQGTL VTVSA

抗TCR抗体

BMA031

BMA031轻链可变区 (SEQ ID NO:11) (CDR加下划线显示) :

QIVLTQSPAI MSASPGEKVT MTCSATSSVS YMHWYQQKSG TSPKRWIYDT  
SKLASGVPAR FSGSGSGTSY SLTISSMEAE DAATYYCQQW SSNPLTFGAG TKLELK

BMA031重链可变区 (SEQ ID NO:12) (CDR加下划线显示) :

EVQLQQSGPE LVKPGASVKM SCKASGYKFT SYVMHWVKQK PGQGLEWIGY  
INPYNDVTKY NEKFKGKATL TSDKSSSTAY MELSSLTSED SAVHYCARGS  
YYDYDGFVYW GQGTTLVTVSA

抗CD8抗体

TRX2

TRX2轻链可变区 (SEQ ID NO:13) (CDR加下划线显示) :

DIQMTQSPSS LSASVGDRVT ITCKGSQDIN NYLAWYQQKP GKAPKLLIYN  
TDILHTGVPS RFSGSGSGTD FTFTISSLPQ EDIATYYCYQ YNNGYTFGQG TKVEIK

TRX2重链可变区 (SEQ ID NO:14) (CDR加下划线显示) :

QVQLVESGGG VVQPGRLRL SCAASGFTFS DFGMNWVRQA PGKGLEWVAL  
IYYDGSNKFY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKPH  
YDGYHFFDS WGQGTTLVTVSS

## 抗CD4抗体

TRX1

TRX1轻链可变区 (SEQ ID NO:15) (CDR加下划线显示) :

DIVMTQSPDS LAVSLGERAT INCKASQSVD YDGDSYMNWY QQKPGQPPKL  
 LIYVASNLES GVPDRFSGSG SGTDFTLTIS SLQAEDVAVY YCQSSLQDPP  
TFGGGGTKVEI KR

TRX1重链可变区 (SEQ ID NO:16) (CDR加下划线显示) :

QVQLVQSGAE VKKPGASVKV SCKASGYTFT AYVISWVRQA PGQGLEWMGE  
IYPGSGSSY NEKFKGRVTM TRDTSTSTVY MELSSLRSED TAVYYCARSG  
DGSRFVYWGQ GTLTVTVSS

## 抗CD2抗体

Lo-CD2a (ATCC登陆号:11423)

Lo-CD2a轻链可变区 (SEQ ID NO:17) (CDR加下划线显示) :

DVVLTTQTPPT LLATIGQSVS ISCRSSQSLL HSSGNTYLNW LLQRTGQSPQ  
 PLIYLVSKLE SGVPNRFGSG GSGTDFTLKI SGVEAEDLGV YYCMQFTHYP  
YTFGAGTKLE LK

Lo-CD2a重链可变区 (SEQ ID NO:18) (CDR加下划线显示) :

EVQLQQSGPE LQRPGASVKL SCKASGYIFT EYYMYWVKQR PKQGLELVGR  
IDPEDGSIDY VEKFKKKATL TADTSSNTAY MQLSSLTSED TATYFCARGK  
FNYRFAYWGQ GTLTVTVSS

## 抗CD16抗体

3G8

3G8轻链可变区 (SEQ ID NO:19) (CDR加下划线显示) :

DTVLTQSPAS LAVSLGQRAT ISCKASQSVD FDGDSFMNWY QQKPGQPPKL  
 LIYTTSNLES GIPARFSASG SGTDFTLNIH PVEEEDTATY YCQQSNEDPY  
TFGGGGTKLEI K

3G8重链可变区 (SEQ ID NO:20) (CDR加下划线显示) :

QVTLKESGPG ILQPSQTLST TCSFSGFSLR TSGMGVGWIR QPSGKGLEWL  
AHIWDDDKR YNPALKSRLT ISKDTSSNQV FLKIASVDTA DTATYYCAQI  
NPAWFAYWGQ GTLTVTVSA

A9

A9轻链可变区 (SEQ ID NO:21) (CDR加下划线显示) :

DIQAVVTQES ALTTSPGETV TLTCRSNTGT VTTSNYANWV QEKPDHLFTG  
 LIGHTNNRAP GVPARFSGSL IGDKAALTIT GAQTEDEAIY FCALWYNNHW  
VFGGGTKLTVL

A9重链可变区 (SEQ ID NO:22) (CDR加下划线显示) :

QVQLQQSGAE LVRPGTSVKI SCKASGYTFT NYWLGWVKQR PGHGLEWIGD  
IYPGGGYTNY NEKFKGKATV TADTSSRTAY VQVRSLTSED SAVYFCARSA  
SWYFDVWGAR TTVTVSS

抗NKG2D抗体

KYK 1.0

KYK 1.0轻链可变区 (SEQ ID NO:23) (CDR加下划线显示):

QPVLTQPSSV SVAPGETARI PCGGDDIETK SVHWYQQKPG QAPVLVIYDD  
DDRPSGIPER FFGSNSGNTA TLSISRVEAG DEADYYCQVW DDNNDEWVFG  
 GGTQLTVL

KYK 1.0重链可变区 (SEQ ID NO:24) (CDR加下划线显示):

EVQLVESGGG VVQPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAF  
IRYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTKY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR  
FGYYLDYWGQ GTLTVTVSS

KYK 2.0

KYK 2.0轻链可变区 (SEQ ID NO:25) (CDR加下划线显示):

QSALTQPASV SGSPGQSITI SCSGSSSNIG NNAVNWYQQQL PGKAPKLLIY  
YDDLLPSGVS DRFSGSKSGT SAFLAISGLQ SEDEADYYCA AWDDSLNGPV  
 FGGGTKLTVL

KYK 2.0重链可变区 (SEQ ID NO:26) (CDR加下划线显示):

QVQLVESGGG LVKPGGSLRL SCAASGFTFS SYGMHWVRQA PGKGLEWVAF  
IRYDGSNKYY ADSVKGRFTI SRDNSKNTLY LQMNSLRAED TAVYYCAKDR  
GLGDGTYFDY WQGTTTVTVS S

本发明进一步提供了结合期望的病毒表位或期望的免疫效应细胞的激活受体或表达这样的激活受体的免疫效应细胞的表面上存在的蛋白质的任何抗体、激动剂或拮抗剂的缀合物。

这些缀合物包括激动剂、拮抗剂或调节剂,其共价结合大分子,比如在本文所讨论的用于诊断、筛选或纯化程序的任何不溶解的、固体载体基质。适当的基质材料包括任何这样的物质:其是化学上惰性的,具有高孔隙度和具有能够与与肽配体形成共价键的大量官能团。基质材料的例子和制备基质-配体缀合物的程序描述在下述文献中:Dean等 (Eds) Affinity Chromatography: A Practical Approach, IRL Press (1985); Lowe, "An Introduction to Affinity Chromatography", 其在以下中: Work等 (Eds) Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology, Vol. 7, 第II部分, North-Holland (1979); Porath等, "Biospecific Affinity Chromatography", 其在 Neurath, H. 等 (Eds), The Proteins, 第三版, Vol. 1, pp. 95-178 (1975) 中; 和 Schott, H. Affinity Chromatography, Marcel Dekker, Inc. NY (1984)。

进一步鉴定结合期望的病毒表位或期望的免疫效应细胞的激活受体或表达这样的激活受体的免疫效应细胞的表面上存在的蛋白质的抗体、激动剂或拮抗剂,并且通过特异性结合在人和/或非人伴随动物细胞的表面上表达的分子的能力和任选地任何(一个或多个)下述标准进行表征:

(a) 竞争抑制已知抗体与这样的表位或蛋白质优先结合的能力,包括优选结合初始抗体优先结合的相同表位的能力;

(b) 体外或体内结合暴露于活人和/或非人哺乳动物细胞的表面上的这样的表位或蛋

白质的一部分的能力；

(c) 递送化疗剂至在其表面表达这样的表位或蛋白质的人和/或非人哺乳动物细胞的能力；和/或

(f) 递送治疗剂或可检测的标记物至在其表面表达这样的表位或蛋白质的人和/或非人哺乳动物细胞中的能力。

本发明也提供了包括本发明抗体的氨基酸序列的多肽。在一些实施方式中，多肽包括抗体的一个或多个轻链和/或重链可变区。在一些实施方式中，多肽包括抗体的一个或多个轻链和/或重链CDR。在一些实施方式中，多肽包括抗体轻链和 /或重链的三个CDR。在一些实施方式中，多肽包括抗体的氨基酸序列，其具有下述的任何一种：初始抗体序列的至少5个连续氨基酸、至少8个连续氨基酸、至少约10个连续氨基酸、至少约15个连续氨基酸、至少约20个连续氨基酸、至少约25个连续氨基酸、至少约30个连续氨基酸，其中至少3个氨基酸来自抗体的可变区。在一个实施方式中，可变区来自初始抗体的轻链。在另一实施方式中，可变区来自抗体的重链。在另一实施方式中，5个(或更多个)连续氨基酸来自抗体的互补决定区(CDR)。

#### VII. 双特异性双抗体(双亲和性重定向试剂)

如上所讨论，本发明另外包括“双特异性双抗体分子(双亲和性重定向试剂)，其包括形成至少两个表位结合位点的至少两条多肽链，其中至少一个表位结合位点特异性结合在免疫效应细胞的表面上表达的蛋白质的表位，其中免疫效应细胞表达效应细胞的激活受体，和其中至少一个表位结合位点特异性结合由被病毒感染的细胞表达的抗原的表位；其中抗原可检测地存在于被病毒感染的细胞上，所述抗原存在的水平大于通过双特异性分子在病毒上检测的抗原的水平。

在优选的实施方式中(图1A)，双抗体的第一多肽链包括：

(i) 结构域(A)，其包括对表位(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；

(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；和

(iii) 结构域(C)。

这样的双抗体的第二多肽链包括：

(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；

(ii) 结构域(E)，其包括对表位(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；和

(iii) 结构域(F)。

上面表位(1)可指病毒蛋白的表位，和表位(2)指激活受体的表位或在表达激活受体的免疫效应细胞的表面上表达的蛋白质的表位。可选地，上面表位(1)可指激活受体的表位或在表达激活受体的免疫效应细胞的表面上表达的蛋白质的表位，和表位(2)指病毒蛋白的表位。

双抗体结构域(A)和(B)不彼此缔合形成表位结合位点。类似地，双抗体结构域(D)和(E)不彼此缔合，以形成表位结合位点。相反，双抗体结构域(A)和(E)缔合，以形成结合表位

(1)的结合位点;所述双抗体结构域(B)和(D)缔合,以形成结合所述表位(2)的结合位点。结构域(C)和(F)共价缔合在一起。形成双抗体分子的方法和双抗体结构域的具体定向公开在美国专利公开号2010/0174053、US 2009/0060910和 US 2007/0004909中。

双抗体分子的每条多肽链均包括VL结构域和VH结构域,其共价连接以便限制结构域自我组装。两条多肽链的相互作用产生两个VL-VH配对,形成两个表位结合位点,即,二价分子。VH或VL结构域都不限于多肽链中的任何位置,即,限于氨基(N)或羧基(C)末端,结构域也不限于其彼此的相对位置,即,VL结构域对于VH结构域可以是N-末端的,反之亦然;但是,优选VL结构域对于VH结构域可以是N-末端的。唯一限制是互补多肽链是可用的,以便形成功能性双抗体。在VL和VH结构域源自相同抗体的情况下,两条互补多肽链可以是一致的。例如,在结合结构域源自对表位A特异性的抗体(即,结合结构域由VL<sub>A</sub>-VH<sub>A</sub>相互作用形成)时,每个多肽包括VH<sub>A</sub>和VL<sub>A</sub>。抗体两条多肽链的同源二聚化导致形成两个 VL<sub>A</sub>-VH<sub>A</sub>结合位点,产生二价单特异性抗体(图1A)。在VL和VH结构域源自对不同抗原特异性的抗体时,功能性双特异性双抗体的形成需要两条不同多肽链的相互作用,即,形成异源二聚体。例如,对于双特异性双抗体,一条多肽链包括 VL<sub>A</sub>和VL<sub>B</sub>;所述链的同源二聚化导致形成两个VL<sub>A</sub>-VH<sub>B</sub>结合位点,其任何一个没有结合或具有不可预期的结合。相比之下,在两条不同的多肽链自由相互作用的情况下,例如,在重组表达系统中,一条包括VL<sub>A</sub>和VH<sub>B</sub>和另一条包括VL<sub>B</sub>和 VH<sub>A</sub>,将形成两个不同的结合位点:VL<sub>A</sub>-VH<sub>A</sub>和VL<sub>B</sub>-VH<sub>B</sub>。对于所有双抗体多肽链对,两条链的可能的错排或错结合,即,VL-VL或VH-VH结构域的相互作用,是可能的;但是,基于适当二聚化的结合位点的免疫特异性,使用本领域已知的或本文列举的任何基于亲和力的方法,例如,亲和层析,容易操纵功能性双抗体的纯化。

双抗体的一条或多条多肽链可任选地包括Fc结构域或其部分(例如CH2结构域,或CH3结构域)。Fc结构域或其部分可源自任何免疫球蛋白同种型或同种异型,包括但不限于IgA、IgD、IgG、IgE和IgM。在优选的实施方式中,Fc结构域(或其部分)源自IgG。在具体的实施方式中,IgG同种型是IgG1、IgG2、IgG3或 IgG4或其同种异型。在一个实施方式中,双抗体分子包括Fc结构域,该Fc结构域包括CH2结构域和CH3结构域,其独立地选自任何免疫球蛋白同种型(即Fc结构域,其包括源自IgG的CH2结构域和源自IgE的CH3结构域,或源自IgG1的CH2结构域和源自IgG2的CH3结构域等)。Fc结构域可被工程化到包括本发明双抗体分子的多肽链中相对于所述多肽链的其他结构域或部分的任何位置中(例如, Fc结构域,或其部分,对于多肽链的VL和VH结构域二者可以是c-末端的;对于VL和VH结构域可以是n-末端的;或对于一个结构域可以是n-末端的和对于另一结构域可以是c-末端的(即,在多肽链的两个结构域之间))。

双抗体分子的多肽链中的Fc结构域优先二聚化,导致形成双抗体分子,其展示免疫球蛋白样特性,例如,Fc-Fc γ R相互作用。包括Fc的双抗体可以是二聚体,例如,由两条多肽链组成,每条多肽链包括VH结构域、VL结构域和Fc结构域。所述多肽链的二聚化产生包括Fc结构域的二价双抗体,尽管结构与未修饰的二价抗体的不同。这样的双抗体分子相对于野生型免疫球蛋白展示改变的表型,例如,改变的血清半衰期、结合特性等。在其他实施方式中,包括Fc结构域的双抗体分子可以是四聚物。这样的四聚物包括两条‘较重的’多肽链,即,包括VL、VH和 Fc结构域的多肽链,和两条‘较轻的’多肽链,即,包括VL和VH的多肽链。较轻的链和较重的链相互作用形成单体,并且所述单体经它们未配对的Fc结构域相互作用,以形

成Ig样分子。这样的Ig样双抗体是四价的并且可以是单特异性、双特异性或四特异性的。

如上文描述的四特异性双抗体分子的形成需要四条不同多肽链的相互作用。由于潜在链错配的许多变体,这样的相互作用难以在单细胞重组生产系统中有效实现。增加错配概率的一个方案是将“杵臼结构(knobs-into-holes)”型突变工程化到期望的多肽链对中。这样的突变相对于同源二聚化有利于异源二聚化。例如,就Fc-Fc相互作用而言,氨基酸取代(优选以包括形成“杵”的大侧基的氨基酸例如色氨酸取代)可被引入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”(例如,用甘氨酸取代)——配对。这样的突变组可被工程化到任意的包括双抗体分子的多肽对中,并进一步被工程化到所述多肽链对的任意部分中。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,尤其是关于工程化免疫球蛋白样分子,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。

本发明也包括双抗体分子,其包括变异的Fc或变异的铰链-Fc结构域(或其部分),该变异的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(例如取代、插入、缺失)。包括变异的Fc结构域或铰链-Fc结构域(或其部分)的分子(例如,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。变异的表型可表现为改变的血清半衰期、改变的稳定性、改变的对细胞酶的易感性或改变的效应子功能,如在NK 依赖性巨噬细胞依赖性试验中测定的。鉴定为改变效应子功能的Fc结构域修饰在上文公开。增加对激活受体(例如,Fc $\gamma$ RIIA(CD16A)的结合和减少对抑制受体(例如,Fc $\gamma$ RIIB(CD32B)的结合的人IgG1的Fc结构域中的许多取代是本领域已知的并且描述在下述文献中:Stavenhagen,J.B.等(2007)“Fc Optimization Of Therapeutic Antibodies Enhances Their Ability To Kill Tumor Cells In Vitro And Controls Tumor Expansion In Vivo Via Low-Affinity Activating Fc $\gamma$  Receptors,”*Cancer Res.* 57(18):8882-8890中。具有与CD32B降低的结合和/或与CD16A增加的结合的人IgG1 Fc结构域的示例性变体包含F243L、R929P、Y300L、V305I或P296L取代。这些氨基酸取代可以任何组合存在于人IgG1 Fc结构域中。在一个实施方式中,人IgG1 Fc结构域变体包含F243L、R929P和Y300L取代。在另一实施方式中,人IgG1 Fc结构域变体包含F243L、R929P、Y300L、V305I和P296L取代。在另一实施方式中,人IgG1 Fc结构域变体包含N297Q取代,因为该突变消除了FcR结合。

本发明也包括包含铰链结构域的分子。铰链结构域可源自任何免疫球蛋白同种型或同种异型,包括IgA、IgD、IgG、IgE和IgM。在优选的实施方式中,铰链结构域源自IgG,其中IgG同种型是IgG1、IgG2、IgG3或IgG4,或其同种异型。所述铰链结构域可与Fc结构域一起被工程化到包括多肽链的双抗体分子中,以便双抗体分子包括铰链-Fc结构域。在某些实施方式中,铰链和Fc结构域独立地选自本领域已知的或本文列举的任何免疫球蛋白同种型。在其

他实施方式中, 铰链和Fc结构域通过多肽链的至少一个其他结构域, 例如, VL结构域, 被分开。铰链结构域, 或任选地铰链-Fc结构域, 可被工程化到本发明多肽中相对于所述多肽链的其他结构域或部分的任何位置中。在某些实施方式中, 本发明的多肽链包括铰链结构域, 该铰链结构域在多肽链的C-末端, 其中所述多肽链不包括Fc结构域。在仍其他实施方式中, 本发明的多肽链包括铰链-Fc结构域, 该铰链-Fc结构域在多肽链的C-末端。在进一步实施方式中, 本发明的多肽链包括铰链-Fc结构域, 该铰链-Fc结构域在多肽链的N-末端。

双抗体多肽链的每个结构域, 即, VL、VH和Fc结构域可由肽连接体分开。肽连接体可以是0、1、2、3、4、5、6、7、8或9个氨基酸。在某些实施方式中, 氨基酸连接体序列是GGGSGGGG (SEQ ID NO:27), 其由核酸序列ggaggcggat ccggaggcgg aggc (SEQ ID NO:28) 编码。双抗体分子的多肽链可被工程化成包括至少一个半胱氨酸残基, 其与双抗体的第二多肽链上的对应半胱氨酸残基相互作用, 以形成链间二硫键。这样的链间二硫键用于稳定双抗体分子, 从而在重组系统中提高表达和回收, 产生稳定和一致的制剂并提高体内分离的和/或纯化的产物的稳定性。半胱氨酸残基可作为单个氨基酸或作为更大氨基酸序列例如铰链结构域的一部分在多肽链的任何部分被引入。在具体的实施方式中, 半胱氨酸残基可被工程化, 以出现在多肽链的C-末端。在一些实施方式中, 半胱氨酸残基被引入到多肽链的氨基酸序列LGGC (SEQ ID NO:29) 中。在具体的实施方式中, 包括本发明双抗体分子的多肽链的C-末端包括氨基酸序列LGGC (SEQ ID NO:29)。在另一实施方式中, 半胱氨酸残基被引入到多肽的包括铰链结构域的氨基酸序列中, 例如 EPKSCDKTHTCPP (SEQ ID NO:30) 或ESKYGPPCPS (SEQ ID NO:31)。在具体的实施方式中, 本发明的双抗体分子的多肽链的C-末端包括IgG铰链结构域的氨基酸序列, 例如SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:31。在另一实施方式中, 本发明的双抗体分子的多肽链的C-末端包括氨基酸序列VEPKSC (SEQ ID NO:32), 其可由核苷酸序列gttgagccca aatcttgt (SEQ ID NO:33) 编码。在其他实施方式中, 半胱氨酸残基被引入到多肽链的氨基酸序列LGGCFNRGEC (SEQ ID NO:34) 中, 其可由核苷酸序列ctgggaggct gcttcaacag gggagagtgt (SEQ ID NO:35) 编码。在具体的实施方式中, 包括本发明双抗体的多肽链的C-末端包括氨基酸序列 LGGCFNRGEC (SEQ ID NO:34)。在仍其他实施方式中, 半胱氨酸残基被引入到多肽链的氨基酸序列FNRGEC (SEQ ID NO:36) 中, 其可由核苷酸序列ttcaacaggg gagagtgt (SEQ ID NO:37) 编码。在具体的实施方式中, 包括本发明双抗体的多肽链的C-末端包括氨基酸序列FNRGEC (SEQ ID NO:36)。

在某些实施方式中, 双抗体分子包括至少两条多肽链, 每条多肽链包括氨基酸序列LGGC (SEQ ID NO:29) 并且由LGGC (SEQ ID NO:29) 序列中的半胱氨酸残基之间的二硫键共价连接。在某些实施方式中, 双抗体分子包括至少两条多肽链, 每条多肽链包括氨基酸序列GGCGGG (SEQ ID NO:38) 并且由GGCGGG (SEQ ID NO:38) 序列中的半胱氨酸残基之间的二硫键共价连接。在另一具体的实施方式中, 双抗体分子包括至少两条多肽链, 其中一条多肽链包括序列FNRGEC (SEQ ID NO:36), 而另一条多肽链包括铰链结构域 (包含至少一个半胱氨酸残基), 其中所述至少两条多肽链由FNRGEC (SEQ ID NO:36) 中的半胱氨酸残基和铰链结构域中的半胱氨酸残基之间的二硫键共价连接。在具体的方面中, 导致二硫键的、位于铰链结构域中的半胱氨酸残基是Cys-128 (如根据Kabat EU编号; 位于未修饰的、完整IgG重链的铰链结构域中) 和对应半胱氨酸残基是Cys-214 (如根据 Kabat EU编号; 位于未修饰的、完整IgG轻链的C-末端) (Elkabetz等(2005) "Cysteines In CH1 Underlie Retention Of

Unassembled Ig Heavy Chains,”J.Biol. Chem.280:14402-14412)。在仍其他实施方式中,至少一个半胱氨酸残基被工程化,以出现在氨基酸链的N-末端。在仍其他实施方式中,至少一个半胱氨酸残基被工程化,以出现在双抗体分子的多肽链的连接体部分。在进一步实施方式中,VH或 VL结构域被工程化,以相对于亲本VH或VL结构域包括至少一个氨基酸修饰,以便所述氨基酸修饰包括用半胱氨酸取代亲本氨基酸。

在该实施方式的仍另一方面中,第一多肽链的结构域(C)包括氨基酸序列 VEPKSC(SEQ ID NO:32),其源自人IgG的铰链结构域,并且其可由核苷酸序列 gttgagccca aatcttgt (SEQ ID NO:33)编码。在该实施方式的另一方面中,第二多肽链的结构域(F)包括氨基酸序列VEPKSC(SEQ ID NO:32)。在该实施方式的某些方面中,第一多肽链的结构域(C)包括人κ轻链的C-末端6个氨基酸, FNRGEC(SEQ ID NO:36);和第二多肽链的结构域(F)包括氨基酸序列 VEPKSC(SEQ ID NO:32)或铰链结构域。在该实施方式的其他方面中,第二多肽链的结构域(F)包括人κ轻链的C-末端6个氨基酸,FNRGEC(SEQ ID NO:36);和第一多肽链的结构域(C)包括氨基酸序列VEPKSC(SEQ ID NO:32)或铰链结构域。

通过上述内容将认识到,双特异性双抗体的单个多肽可形成两种同源二聚体和一种异源二聚体。在本发明的一个实施方式中,带电的多肽可被添加至两个双抗体多肽中的一个的C-末端,或更优选地,被添加至两个双抗体多肽的C-末端。通过针对双特异性双抗体的单个多肽选择具有相反电荷的带电的多肽,包括这样的带电的多肽利于形成异源二聚体和减少同源二聚体的形成。优选地,带正电的多肽包含大量的精氨酸、谷氨酰胺、组氨酸和/或赖氨酸(或这样的氨基酸的混合物)和带负电的多肽包含大量的天冬氨酸或谷氨酸(或这样的氨基酸的混合物)。包含大量赖氨酸的带正电的多肽和包含大量谷氨酸的带负电的多肽是尤其优选的。为了使这些带相反电荷的多肽之间的静电吸引最大化,优选采用能够自发呈现螺旋构象的多肽。

因此,在优选的实施方式中,带负电的“E-螺旋”被添加至用于形成双特异性双抗体的一条多肽和带正电的“K-螺旋”被添加至第二条双抗体的多肽(图1B)。尤其优选的E-螺旋具有序列:(EVAALEK)<sub>4</sub>[即(SEQ ID NO: 39) EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK]。尤其优选的K-螺旋具有序列:(KVAALKE)<sub>4</sub>[即(SEQ ID NO:40) KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE]。

具有这样的E-螺旋的优选的双抗体多肽具有一般的序列:[VL结构域]—[GGGSGGGG]—[VH结构域]—[(EVAALEK)<sub>4</sub>]—GGGNS,其中VL是双抗体的轻链可变Ig结构域,GGGSGGGG是SEQ ID NO:27,VH是双抗体的重链可变Ig结构域,(EVAALEK)<sub>4</sub>是SEQ ID NO:39,和GGGNS是SEQ ID NO:41。具有这样的K-螺旋的优选的双抗体多肽具有一般的序列:[VL结构域]—[GGGSGGGG]—[VH结构域]—[(KVAALKE)<sub>4</sub>]—GGGNS,其中VL是双抗体的轻链可变Ig结构域,GGGSGGGG是SEQ ID NO:25,VH是双抗体的重链可变Ig结构域,(KVAALKE)<sub>4</sub>是SEQ ID NO:40,和GGGNS是SEQ ID NO:41。

在进一步的实施方式中,Fc区可连接至E-螺旋或K-螺旋双抗体的E和/或K螺旋。在其中这样的结构域的较少分隔的布置导致这样的结构域和它们的结合配体之间的相互作用减少或以另外方式干扰双抗体组装的情况下,增进包含Fc的双抗体的Fc区和双抗体VH结构域之间的分离是期望的。尽管可采用具有任何氨基酸序列的分隔子(separator),但是优选采用形成α螺旋结构螺旋的分隔子,以便使 Fc结构域最大延伸和凸出远离可变结构域。因为上述具有相反电荷的螺旋状的多肽另外用于促进异源二聚体形成,所以这样的分子是尤

其优选的分隔子。这样的包含螺旋的Fc-双抗体分子提供与Fc-双抗体的那些益处类似的益处,包括改善的血清半衰期和效应子功能募集。上述E-螺旋和K-螺旋多肽尤其优选用于该目的。因此,在优选的实施方式中,包含E-螺旋Fc的双抗体具有一般的序列:[VL结构域]—[GGGSGGGG]—[VH结构域]—[(EVAALEK)<sub>4</sub>]—GGG—开始于D234 (Kabat 编号)的Fc结构域,其中VL是双抗体的轻链可变Ig结构域,GGGSGGGG是SEQ ID NO:27,VH是双抗体的重链可变Ig结构域和(EVAALEK)<sub>4</sub>是SEQ ID NO:39。类似地,在优选的实施方式中,包含K-螺旋Fc的双抗体具有一般的序列:[VL结构域]—[GGGSGGGG]—[VH结构域]—[(KVAALKE)<sub>4</sub>]—GGG—开始于D234 (Kabat编号)的Fc结构域,其中VL是双抗体的轻链可变Ig结构域,GGGSGGGG 是SEQ ID NO:27,VH是双抗体的重链可变Ig结构域和(KVAALKE)<sub>4</sub>是SEQ ID NO:40。

如上指示,包含螺旋的双抗体分子或包含螺旋的包含Fc的双抗体分子可仅仅包含单个这样的螺旋分隔子,或其可包含大于一个这样的分隔子(例如,两个分隔子,优选地具有相反的电荷,其中一个连接至双抗体多肽的每个VH结构域)。通过将Fc区连接至这样的分隔子分子(一个或多个),增强了通过链交换制备二价、四价等形式Fc-双抗体分子的能力。可因此产生Fc-双抗体分子,其形成单体或二聚体,这取决于Fc结构域是否连接至双抗体VH结构域中的一个或两个。

因此,本发明包括由三条多肽链组成的双抗体,图示在图1C中。第一多肽链包括(从N-末端至C-末端):

(i) 结构域(A),其包括对表位(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;

(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;和

(iii) E螺旋或K螺旋。

第二多肽链包括(从N-末端至C-末端):

(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;

(ii) 结构域(E),其包括对表位(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;和

(iii) K螺旋(如果第一多肽具有E螺旋)或E螺旋(如果第一多肽具有K螺旋)。

第二多肽链另外包含Fc区的CH2-CH3区域,其对于结构域D可以是N-末端的,或对于结构域E可以是C-末端的。

第三多肽链包括Fc区的CH2-CH3区域。

上面表位(1)指病毒蛋白的表位,和表位(2)指激活受体的表位或在表达激活受体的免疫效应细胞的表面上表达的蛋白质的表位。可选地,上面表位(1)指激活受体的表位或在表达激活受体的免疫效应细胞的表面上表达的蛋白质的表位,和表位(2)指病毒蛋白的表位。

在优选的实施方式中,第二多肽链包含杵突变(T366W)和在234和235位的丙氨酸取代。在这样优选的实施方式中,第三多肽链包含白突变(T366S、L368A和 Y407V)和H435R取代,以去除蛋白质A结合能力。这样的杵和白突变的存在促进第二和第三多肽链的各自CH2-CH3区域之间的异源二聚化。

本发明的双特异性分子可同时结合两个分开且不同的表位。在优选的实施方式中,至

少一个表位结合位点对于免疫效应细胞(例如CD3、CD16、CD32、CD64、T细胞受体、NKG2D等)上表达的决定子是特异性的,其在T淋巴细胞、天然杀伤细胞(NK)或其他单核细胞上表达。在一个实施方式中,双抗体分子结合效应细胞决定子并且也激活所述效应细胞。就此而言,本发明的双特异性分子可展示Ig 样功能,不依赖于它们是否进一步包括Fc结构域(例如,如在本领域已知的或本文列举的任何效应子功能试验(例如,ADCC试验)中测定的)。在某些实施方式中,本发明的双特异性双抗体结合病毒表位和效应细胞决定子二者,同时激活所述细胞。

本发明进一步包括并入非天然氨基酸,以产生本发明的双抗体。这样的方法是本领域技术人员已知的,比如使用天然生物合成机构以允许将非天然氨基酸并入蛋白质的那些方法,见,例如,Wang等(2002)“Expanding The Genetic Code,” Chem.Comm.1:1-11;Wang等(2001)“Expanding The Genetic Code Of Escherichia coli,”Science,292:498-500;van Hest等(2001)“Protein-Based Materials,Toward A New Level Of Structural Control,”Chem.Comm.19:1897-1904,其每一篇通过引用以其整体并入本文。可选的策略关注负责氨基酰基-tRNA生物合成的酶,见,例如,Tang等(2001)“Biosynthesis Of A Highly Stable Coiled-Coil Protein Containing Hexafluoroleucine In An Engineered Bacterial Host,”J.Am.Chem.Soc.123(44): 11089-11090;Kiick等(2001)“Identification Of An Expanded Set Of Translationally Active Methionine Analogues In Escherichia coli,”FEBS Lett.502(1-2):25-30;其每一篇通过引用以其整体并入本文。在一些实施方式中,本发明包括通过添加或删除糖基化位点修饰本发明分子的VL、VH或Fc结构域的方法。修饰蛋白质的碳水化合物的方法是本领域熟知的并且包括在本发明中,见,例如,美国专利号6,218,149、EP 0 359 096 B1、美国公开号US 2002/0028486、WO 03/035835、美国公开号 2003/0115614、美国专利号6,218,149、美国专利号6,472,511,其全部通过引用以其整体并入本文。

#### VIII. 使用本发明的双特异性分子用于治疗目的的方法

本发明的双特异性分子可在遭受病毒疾病或处于病毒疾病风险的人和/或非人哺乳动物中用于治疗目的。用这样的双特异性分子的疗法可涉及,如上所述,在体外和体内形成复合物。在一个实施方式中,这样的双特异性分子可结合与这样的疾病相关的病毒并且减少其增殖。应理解,以促进在生理学(例如,体内)条件下结合的浓度施用双特异性分子。在另一实施方式中,这样的双特异性分子可用于针对不同组织比如结肠、肺、乳腺、前列腺、卵巢、胰腺、肾等的病毒感染的细胞(或处在这样感染风险的细胞)的免疫疗法。在另一实施方式中,这样的双特异性分子可单独结合病毒感染的细胞和减少其细胞分裂。在另一实施方式中,这样的双特异性分子可结合病毒感染的细胞和延迟它们的生长。在仍另一实施方式中,患癌症或传染病的个体用这样的双特异性分子给予姑息治疗。这样的个体的姑息治疗涉及治疗或减轻癌症或传染病的不利的症状或由于给予疾病而不直接影响疾病进展的其他治疗而引起的医源性(iatrogenic)症状。这包括缓解疼痛、营养支持、性问题、心理上痛苦(psychological distress)、抑郁症、疲劳、精神病、恶心、呕吐等的治疗。在一个实施方式中,本发明的分子被治疗性或预防性地施用至患者(例如,HIV+患者或癌症患者),以解决在这样的个体中发生的或可能发生的继发性病毒感染(相对于HIV或癌症)。

本发明的双特异性分子的各种制剂可用于施用。在一些实施方式中,可不掺水(neat)

地施用双特异性分子或其片段。除了药理学活性剂以外,本发明的组合物可包含合适的药学上可接受的载体,包括赋形剂和助剂,其是本领域熟知的并且是相对惰性的物质,有利于施用药理学有效的物质或有利于将活性化合物加工成可药学上用于递送至作用位点的制剂。例如,赋形剂可给予形状或稠度 (consistency),或用作稀释剂。合适的赋形剂包括但不限于稳定剂、湿润和乳化剂、改变渗透性的盐、封装剂、缓冲液和皮肤渗透增强剂。

用于肠胃外施用的合适的制剂包括以水溶性形式,例如水溶性盐,的活性化合物的水溶液。另外,可施用适于油性注射悬液的活性化合物的悬液。合适的亲脂溶剂或媒介包括脂肪油,例如,芝麻油,或合成脂肪酸酯,例如,油酸乙酯或甘油三酯。水性注射悬液可包含增加悬液粘度的物质并且包括,例如,羧甲基纤维素钠、山梨醇和/或葡聚糖。任选地,悬液也可包含稳定剂。脂质体也可用于封装剂,用于递送至细胞。

可配制根据本发明的用于全身性施用的药物制剂,用于肠、肠胃外或局部施用。实际上,所有三种类型的制剂可同时使用,以实现活性成分的全身性施用。赋形剂以及用于肠胃外和非肠胃外药物递送的制剂阐释在下述文献中:Remington: The Science And Practice Of Pharmacy,第21版,Lippincott Williams&Wilkins Publishing (2005)。用于口服施用的合适的制剂包括硬胶囊或软胶囊、丸剂、片剂,包括包衣片剂、酏剂、悬剂、糖浆剂或吸入剂和其控释形式。一般而言,这些剂被配制为用于通过注射(例如,腹腔内、静脉内、皮下、肌内等)施用,但是也可使用其他形式的施用(例如,口服、粘膜等)。因此,双特异性分子优选地组合药学上可接受的媒介比如盐水、林格氏溶液、右旋糖溶液等。

经验上的考虑,比如生物半衰期,一般有助于确定剂量。在治疗期间可确定和调整施用的频率,其是基于减少病毒感染的细胞的量、保持受感染细胞的减少、减少受感染细胞的增殖或延迟感染的发展。可选地,双特异性分子的持续释放制剂可能是合适的。用于实现持续释放的各种制剂和设备是本领域已知的。

在一个实施方式中,在已经被给予一个或多个施用的个体中可凭经验确定双特异性分子的剂量。个体被给予增加剂量的双特异性分子。为了评估双特异性分子的效力,可跟踪特定病毒疾病状态的标记物。这些包括直接测量病毒载荷,通过免疫试验、其他成像技术间接测量病毒载荷;如通过这样的测量评估的健康的改善、测量间接病毒标记物,例如,疼痛或麻痹的减轻;改善的与感染相关的语言、视力、呼吸或其他失能;增加的食欲;或生活质量的提高,如通过接受的测试或生存的延长测量的。对于本领域技术人员显而易见的是,剂量将根据个体、病毒类型、疾病的阶段以及已经用过的治疗和使用的同时治疗而改变。

其他制剂包括本领域已知的合适的递送形式,包括但不限于,载体比如脂质体。见,例如,Mahato等(1997) "Cationic Lipid-Based Gene Delivery Systems: Pharmaceutical Perspectives," Pharm. Res. 14:853-859。脂质体制备物包括但不限于细胞转染剂、多层小泡和单层小泡。

现在已经一般性描述了本发明,通过参考下述实施例将更容易理解本发明,所述实施例涉及结合爱泼斯坦-巴尔病毒或人乳头瘤病毒的表位的双特异性分子。通过示例的方式提供这样的实施例而非意图限制本发明,除非明确说明。

#### 实施例1

用于潜伏EBV的双特异性分子的构建

可制备对于人T细胞和爱泼斯坦-巴尔病毒(CD3 x LMP-1和TCR x LMP-2)特异性的双

特异性分子,作为双亲和性重定向(双抗体)分子。这样的双特异性分子能够将T细胞定位(通过使这样的T细胞结合CD3-结合双特异性分子的CD3部分或结合TCR-结合双特异性分子的TCR部分)至潜伏感染EBV并且(分别)表达LMP-1或LMP-2的细胞的位置(通过使这样的细胞结合双特异性分子的LMP-1或LMP-2结合部分)。定位的T细胞可然后在称为“重定向”杀伤的过程中介导潜伏感染EBV的细胞的杀伤。结合LMP-1或LMP-2的抗体是本领域已知的(Fang, C.Y.等(2004) “Construction And Characterization Of Monoclonal Antibodies Specific To Epstein-Barr Virus Latent Membrane Protein 1,” J. Immunol. Methods 287 (1-2):21-30; Fruehling, S.等(1996) “Identification Of Latent Membrane Protein 2A (LMP2A) Domains Essential For The LMP2A Dominant-Negative Effect On B-Lymphocyte Surface Immunoglobulin Signal Transduction,” J Virol. 70:6216-6226; Fruehling, S.等(1998) “Tyrosine 1120 of Latent Membrane Protein 2A Is Essential For Protein Tyrosine Kinase Loading And Regulation Of Epstein-Barr Virus Latency,” J. Virol. 72:7796-7806)并且可获得自Acris Antibodies (San Diego, CA)、GenWay (San Diego, CA)和其他来源。

可构建CD3 x LMP-1双特异性分子,其具有抗CD3抗体2的抗CD3可变结构域和抗体HHV-4 (Acris Antibodies)的抗LMP-1可变结构域。可构建TCR x LMP-2双特异性分子,其具有BMA031的抗TCR可变结构域和抗体14B7的抗LMP-2可变结构域(mybiosource(dot)com)。

可通过ELISA测量双特异性分子与LMP-1-表达细胞和与CD3阳性T细胞的结合。为了证明双特异性分子介导重定向杀伤EBV感染的细胞的能力,可以各种浓度孵育上述CD3 x LMP-1双特异性分子或CD2 x LMP-2双特异性分子与靶细胞和效应细胞(人PBMCs),例如以20:1的效应子与靶比例。可使用,例如LDH试验测定细胞毒性。结果证明CD3 x LMP-1双特异性分子和CD3 x LMP-2双特异性分子通过人PBMCs介导重定向杀伤EBV感染的细胞的能力。

## 实施例2

### 治疗EBV潜伏性感染

静息记忆(resting memory) B细胞代表身体内EBV的持久性的位点。(Babcock, G.J.等“Epstein-Barr Virus-Infected Resting Memory B Cells, Not Proliferating Lymphoblasts, Accumulate In The Peripheral Blood Of Immunosuppressed Patients,” J. Exp. Med. 190 (4):567-576)。在正常感染EBV的成年人中,循环中每百万B细胞中有1至50个感染EBV,并且人中潜伏感染的细胞的量在数年内仍是稳定的。

在复制期间表达的接近100个病毒基因中,仅10个在潜伏感染的B细胞中体外表达,包括LMP-1和LMP-2。

通过在潜伏期明显限制病毒基因表达,EBV降低了表达的病毒蛋白的量,从而限制感染的细胞“暴露”于宿主的细胞毒性T细胞。

具有潜伏EBV感染的患者被施用CD3 x LMP-1双特异性分子。双特异性分子结合受感染的细胞表面上发现的LMP-1,将T细胞募集至受感染的细胞并且激活T细胞。激活的T细胞杀伤感染EBV的细胞,从而消除患者中的EBV感染。

## 实施例3

### 用于HPV的双特异性分子的构建

可制备对人T细胞和人乳头瘤病毒E6特异性的双特异性分子(CD3 x HPV E6/MHC),作

为双亲和性重定向(双抗体)分子。结合人乳头瘤病毒E6的抗体是本领域已知的(Phaeton, R.等(2010)“Radioimmunotherapy With An Antibody To The HPV16 E6 Oncoprotein Is Effective In An Experimental Cervical Tumor Expressing Low Levels Of E6,” Cancer Biol.Ther.10(10):1041-1047;Lagrange,M.等(2005)“Binding Of Human Papillomavirus 16E6 To P53 And E6AP Is Impaired By Monoclonal Antibodies Directed Against The Second Zinc-Binding Domain Of E6,”J. Gen.Virol.86(Pt 4):1001-1007;Wlazlo,A.P.等(2001)“Generation And Characterization Of Monoclonal Antibodies Against The E6 And E7 Oncoproteins Of HPV,”Hybridoma 20(4):257-263)并且可获得自AcrisAntibodies(San Diego,CA)、GenWay(San Diego,CA)、mybiosource(dot)com和其他来源。

这样的双特异性分子能够将T细胞定位(通过使这样的T细胞结合CD3-结合双特异性分子的CD3部分)至感染HPV的细胞的这样的区域:其在细胞的MHC I 型系统的背景下表达E6和展示E6蛋白的片段(通过使这样的细胞结合双特异性分子的HPV E6/MHC结合部分)。定位的T细胞可然后在称为“重定向”杀伤的过程中介导杀伤潜伏感染EBV的细胞。

可构建CD3 x HPV E6/MHC双特异性分子,其具有,例如OKT3的抗CD3 可变结构域和抗体29-10267的抗HPV E6/MHC可变结构域(mybiosource(dot)com)。

可通过ELISA测量双特异性分子与HPV E6/MHC和与CD3阳性T细胞的结合。为了证明双特异性分子介导重定向杀伤HPV感染的细胞的能力,可以各种浓度孵育上述CD3 x HPV E6/MHC双特异性分子与靶细胞和效应细胞(人PBMCs),例如以20:1的效应子与靶比例。可通过LDH试验测定细胞毒性。结果证明CD3 x HPV E6/MHC双特异性分子通过人PBMCs介导重定向杀伤HPV感染的细胞的能力。

#### 实施例4

包括Fc区的双特异性分子介导有效的重定向T细胞杀伤

可构建双特异性分子,其具有抗CD3可变结构域和这样的结构域:其结合病毒抗原并且进一步包括Fc区。可通过在相同的细胞中表达三条多肽链构建这样的分子。第一多肽链包括,例如,抗CD3抗体的轻链可变结构域、短连接体、结合病毒抗原(例如,HPV E6/MHC)的抗体的重链可变结构域和E螺旋结构域。第二多肽链包括,例如,抗HPV E6/MHC抗体的轻链可变结构域、短连接体、抗CD3抗体的重链可变结构域、K螺旋结构域和最后IgG Fc的CH2和CH3结构域。第三多肽链包括,例如,IgG Fc的CH2和CH3结构域。

E和K螺旋确保链1与链2异源二聚化。为了确保链2不在CH2和CH3结构域同源二聚化,修饰序列以包括在366位的杵(T366W修饰)(见美国专利号 5,731,168、5,807,706、5,821,333、7,429,652、7,642,228、7,695,936和8,216,80)。为了使Fc区失去功能,在234和235位并入丙氨酸残基(见美国专利号5,624,821)。为了接收在链2的Fc区产生的杵,在链3中进行三个取代,以产生臼(T366S、L368A 和Y407V)。在435位的修饰(H435R)用于防止链3的同源二聚体结合蛋白质A,因此有助于纯化双特异性分子。可通过尺寸排阻色谱法从产物纯化任何链3同源二聚体。

将编码三条链的载体转染至CHO细胞中。在适当的选择之后,将细胞在培养基中培养7天。收获培养基和细胞。使用本领域熟知的色谱方法纯化双特异性分子,并且显示双特异性分子能够同时结合在免疫效应细胞的表面上表达的CD3和在感染HPV的细胞表面上表达的

HPV E6/MHC,并且从而促进这样的感染HPV 的细胞的死亡。

#### 实施例5

抗CD16 x抗HIV env双特异性分子的构建

抗荧光素x抗HIV env双特异性分子的构建

作为本发明的双特异性分子的进一步实施例,产生双特异性双抗体分子,其由彼此共价结合的两条多肽链组成,以便形成对CD16特异性的第一表位结合位点和对HIV env蛋白特异性的第二表位结合位点。

双特异性双抗体的第一多肽链优选地具有:

(I) 抗HIV env抗体7B2 (GenBank登陆号AFQ31503;Buchacher,A.等(1994) “Generation Of Human Monoclonal Antibodies Against HIV-1Proteins; Electrofusion And Epstein-Barr Virus Transformation For Peripheral Blood Lymphocyte Immortalization,”AIDS Res.Hum.Retroviruses 10(4):359-369;Shen,R.(2010) “GP41-Specific Antibody Blocks Cell-Free HIV Type 1Transcytosis Through Human Rectal Mucosa And Model Colonic Epithelium,”J.Immunol.184(7):3648-3655) 或与抗体7B2竞争结合的抗体或结合HIV的env蛋白的抗体的轻链可变结构域;

(II) 抗体h3G8 (WO 2012/162068、美国专利号7,351,803) 或与抗体3G8竞争结合的抗体或结合CD16 (Fc  $\gamma$  RIIIA) 的抗体的重链可变结构域;和

(III) E螺旋结构域(即, (EVAALEK)<sub>4</sub>; EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK;SEQ ID NO:39) 或K螺旋结构域(即, (KVAALKE)<sub>4</sub>; KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE;SEQ ID NO:40)。

[0167] 这样的双特异性双抗体的第二多肽链优选地具有:

(I) 抗体h3G8 (WO 2012/162068、美国专利号7,351,803) 或与抗体3G8竞争结合的这样的抗体或结合CD16 (Fc  $\gamma$  RIIIA) 的这样的抗体的轻链可变结构域;

(II) 这样的抗体7B2或与抗体7B2竞争结合的这样的抗体或结合HIV的env蛋白的这样的抗体的重链可变结构域;和

(III) K螺旋结构域(即, (KVAALKE)<sub>4</sub>; KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE;SEQ ID NO:40) 或E螺旋结构域(即, (EVAALEK)<sub>4</sub>; EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK;SEQ ID NO:39)。

在优选的实施方式中,带负电的“E-螺旋”被添加至用于形成双特异性双抗体的一个多肽和带正电的“K-螺旋”被添加至第二个双抗体的多肽。

优选地,这样的双抗体的第一多肽链具有氨基酸序列(SEQ ID NO:42) (CDR 是加下划线的):

|                                |                     |                         |                                |                    |
|--------------------------------|---------------------|-------------------------|--------------------------------|--------------------|
| DIVMTQSPDS                     | LAVSPGERAT          | IHCKSSQTLL              | <u>YSSNNRHSIA</u>              | WYQQRPGQPP         |
| KL <del>LLY</del> <u>WASMR</u> | <u>LS</u> GVDPDRFSG | SGSGTDFTLT              | INN <del>L</del> QAEDVA        | IYYC <u>HQYSSH</u> |
| <u>PPT</u> FGHGTRV             | EIKGGGSGGG          | GQVT <del>L</del> RESGP | ALVKPTQT <del>L</del> T        | LTCTFSGFSL         |
| S <u>TSGMGV</u> GWI            | RQPPGKALEW          | LAHIWDDDK               | <u>RYNPALKS</u> R <del>L</del> | TISKDTSKNQ         |
| VVL <del>T</del> MTNMDP        | VDTATYYCAQ          | <u>INPAWFAY</u> WG      | QGTLVTVSSG                     | GCGGGEVAAL         |
| EKEVAALEKE                     | VAALEKEVAAL         | EK                      |                                |                    |

其中残基1-113是抗体7B2的轻链可变结构域(GenBank登陆号AFQ31503) (CDR 残基加下划线显示),残基114-121是连接体GGGSGGGG(SEQ ID NO:27),残基 122-239是抗体h3G8的重链可变结构域(CDR残基加下划线显示),残基240-245 是连接体GGCGGG(SEQ ID NO:

38) 和残基 246-277 是 E 螺旋 (EVAALEK)<sub>4</sub> [即 (SEQ ID NO:39) EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK]。

优选地,这样的双抗体的第二多肽链具有氨基酸序列 (SEQ ID NO:43) (CDR 是加下划线的):

```

DIVMTQSPDS   LAVSLGERAT   INCKASQSVD   FDGDSFMNWY   QQKPGQPPKL
LIYTTSNLES   GVPDRFSGSG   SGTDFTLTIS   SLQAEDVAVY   YCQQSNEDPY
TFGQGTKLEI   KGGGSGGGGQ   VQLVQSGGGV   FKPGGSLRLS   CEASGFTFTE
YYMTWVRQAP   GKGLEWLAYI   SKNGEYSKYS   PSSNGRFTIS   RDNAKNSVFL
QLDRLSADDT   AVYYCARADG   LTYFSELLQY   IFDLWGQGAR   VTVSSGGCGG
GKVAALKEKV   AALKEKVAAL   KEKVAALKE

```

其中残基1-111是抗体h3G8的轻链可变结构域 (CDR残基加下划线显示),残基 112-119 是连接体GGGSGGGG (SEQ ID NO:27),残基120-245是抗体7B2的重链可变结构域 (GenBank 登陆号AFQ31502) (CDR残基加下划线显示),残基246-251 是连接体GGCGGG (SEQ ID NO:38) 和残基252-279是K螺旋 (KVAALKE)<sub>4</sub> [即,SEQ ID NO:40) KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE]。

也产生了双特异性双抗体,其包含上述抗CD16 (Fc  $\gamma$  RIIIA) 抗体h3G8的轻链和重链可变结构域和抗荧光素抗体4-4-20的轻链和重链结构域 (Gruber, M. 等 (1994) "Efficient Tumor Cell Lysis Mediated By A Bispecific Single Chain Antibody Expressed In Escherichia coli," J. Immunol. 152 (11):5368-5374; Bedzyk, W.D. 等 (1989) "Comparison Of Variable Region Primary Structures Within An Anti-Fluorescein Idiotypic Family," J. Biol. Chem. 264 (3):1565-1569)。对照抗体的两条多肽链的氨基酸序列是:

SEQ ID NO:44 (对照双抗体的第一多肽链;VL h3G8 VH 4-4-20) (CDR是加下划线的):

```

DIVMTQSPDS   LAVSLGERAT   INCKASQSVD   FDGDSFMNWY   QQKPGQPPKL
LIYTTSNLES   GVPDRFSGSG   SGTDFTLTIS   SLQAEDVAVY   YCQQSNEDPY
TFGQGTKLEI   KGGGSGGGGE   VKLDETGGGL   VQPGRPMLKS   CVASGFTFSD
YWMNWVRQSP   EKGLEWVAQI   RNKPYNYETY   YSDSVKGRFT   ISRDDSKSSV
YLQMNNLRVE   DMGIYYCTGS   YYGMDYWGQG   TSVTVSSGGC   GGGEVAALEK
EVAALEKEVA   ALEKEVAAL   KGGGNS

```

其中残基1-111是抗体h3G8的轻链可变结构域,残基112-119是连接体GGGSGGGG (SEQ ID NO:27),残基120-237是抗体4-4-20的重链可变结构域,残基238-243 是连接体GGCGGG (SEQ ID NO:38),残基244-271是E螺旋 (EVAALEK)<sub>4</sub> [即 (SEQ ID NO:39) EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK],和残基272-276是连接体 GGGNS (SEQ ID NO:41);和

SEQ ID NO:45 (对照双抗体的第二多肽链;VL 4-4-20VH h3G8) (CDR是加下划线的):

```

DVVMTQTPFS   LPVSLGDQAS   ISCRSSQSLV   HSNGNTYLRW   YLQKPGQSPK
VLIYKVSNRF   SGVPDRFSGS   GSGTDFTLKI   SRVEAEDLGV   YFCSQSTHVP
WTFGGGTKLE   IKGGGSGGGG   QVTLRSGPA   LVKPTQTLTL   TCTFSGFSL
TSGMGVGWIR   QPPGKALEWL   AHIWDDDKR   YNPALKSRLT   ISKDTSKNQV
VLTMTNMDPV   DTATYYCAQI   NPAWFAYWGQ   GTLVTVSSGG   CGGGKVAALK
EKVAALKEKV   AALKEKVAAL   KEGGGNSGGG   DYKDDDDKGG   GSNS

```

其中残基1-112是抗体4-4-20的轻链可变结构域,残基113-120是连接体GGGSGGGG

(SEQ ID NO:27), 残基121-238是抗体h3G8的重链可变结构域, 残基239-244是连接体GGCGGG (SEQ ID NO:38), 残基245-272是K螺旋(KVAALKE)<sub>4</sub>[即, SEQ ID NO:40) KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE], 残基273-277是连接体GGGNS (SEQ ID NO:41) 和残基278-294是FLAG标签 (Munro, S.等(1984) "Use Of Peptide Tagging To Detect Proteins Expressed From Cloned Genes: Deletion Mapping Functional Domains Of Drosophila hsp 70," EMBO J. 3 (13): 3087-3093)。

#### 实施例6

##### CD16 x HIV env双特异性分子的细胞毒性淋巴细胞活性评估

HIV-1感染的初始步骤伴随着细胞表面CD4结合三聚体HIV-1包膜糖蛋白 (Env)、跨膜糖蛋白(gp41)和表面糖蛋白(gp120)的异源二聚体而发生。当CD4结合时, 在三聚体Env中触发的构象改变最终导致病毒和细胞膜的融合以及病毒核心向受感染的细胞的递送 (Harris, A.等(2011) "Trimeric HIV-1 Glycoprotein Gp140 Immunogens And Native HIV-1 Envelope Glycoproteins Display The Same Closed And Open Quaternary Molecular Architectures," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 108 (28): 11440-11445)。gp120和gp41糖蛋白初始作为单一gp160多肽被合成, 其随后被切割产生非共价缔合的gp120/gp41复合物。Env的胞外域是质量约140kDa的异源二聚体, 其由整个gp120组分和约20kDa的gp41组成 (Harris, A.等(2011) "Trimeric HIV-1 Glycoprotein Gp140 Immunogens And Native HIV-1 Envelope Glycoproteins Display The Same Closed And Open Quaternary Molecular Architectures," Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 108 (28): 11440-11445)。

人胚胎肾HEK293 D375细胞(92Th023, 亚型AE, R5-热带)表达HIV gp140蛋白质。作为本发明的双特异性分子用途的进一步例子, 评估上述抗CD16 x抗 HIV env双特异性双抗体在存在天然杀伤细胞的情况下介导HEK 293D375细胞的细胞毒性淋巴细胞活性的能力。上述抗荧光素x抗HIV env双特异性双抗体用作对照。

该研究的结果显示在图2中。图2显示在存在天然杀伤细胞(NK)的情况下以5:1的效应子:靶比例孵育24小时之后, 由双特异性双抗体介导的对表达gp140的HEK 293D375细胞(92Th023, 亚型AE, R5-热带)的细胞毒性淋巴细胞活性, 所述双特异性双抗体包括抗体h3G8的抗CD16表位结合结构域和抗体7B2的抗 HIV env表位结合结构域。通过阳性选择(D56678 (LDH))纯化天然杀伤细胞(NK)。包括抗体4-4-20的抗荧光素表位结合结构域和抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域的双特异性双抗体用作对照。结果显示, 抗CD16 x抗HIV env双特异性双抗体介导细胞毒性淋巴细胞活性, 而对照双抗体则没有。

图3显示在存在天然杀伤细胞(NK)的情况下以5:1的效应子:靶比例孵育24小时之后, 由双特异性双抗体介导的对表达gp140的HEK 293D375细胞(92Th023, 亚型AE, R5-热带)的细胞毒性淋巴细胞活性, 所述双特异性双抗体包括抗体h3G8的抗CD16表位结合结构域和抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域。通过阴性选择(D55386 (LDH))纯化天然杀伤细胞(NK)。如预期的(因为NK细胞缺少CD3), 包括抗体h3G8的抗CD3表位结合结构域和抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域的双特异性双抗体不能显示细胞毒性淋巴细胞活性。包括抗体4-4-20的抗荧光素表位结合结构域和抗体h3G8的抗CD16表位结合结构域的双特异性双抗体用作对照。结果再次显示, 抗CD16 x抗HIV env双特异性双抗体介导细胞毒性淋巴细胞

活性,而上述对照双抗体和CD16 x CD3双特异性双抗体则没有。

图4显示使用表达HIV gp140的HEK293 D371 (CM244,亚型AE,R5-热带) 细胞进行的类似实验的结果。图4显示在存在天然杀伤细胞(NK)的情况下以5:1 的效应子:靶比例孵育24小时之后,由双特异性双抗体介导的对表达HIV gp140 的HEK 293D371细胞(CM244,亚型AE,R5-热带)的细胞毒性淋巴细胞活性,所述双特异性双抗体包括抗体h3G8的抗CD16表位结合结构域和抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域。通过阴性选择(D55386 (LDH))纯化天然杀伤细胞(NK)。如预期的(因为NK细胞缺少CD3),包括抗体h抗体2的抗CD3表位结合结构域和抗体7B2的抗HIV env表位结合结构域的双特异性双抗体不能显示细胞毒性淋巴细胞活性。包括抗体4-4-20的抗荧光素表位结合结构域和抗体h3G8的抗CD16表位结合结构域的双特异性双抗体用作对照。结果再次显示,抗CD16 x抗HIV env双特异性双抗体介导细胞毒性淋巴细胞活性,而上述对照双抗体则没有。

#### 实施例7

抗CD3x抗HIV gp120双特异性分子的构建

抗CD3 x抗HIV env双特异性分子的构建

抗CD3x抗RSV F蛋白质双特异性分子的构建

抗荧光素x抗HIV env双特异性分子的构建

作为本发明的双特异性分子的进一步例子,产生双特异性双抗体分子,其由彼此共价结合的两条多肽链组成,以便形成对CD3特异性的第一表位结合位点对HIV gp120蛋白、HIV env蛋白或RSV F蛋白的A抗原位点特异性的第二表位结合位点。

抗CD3 x抗HIV gp120双特异性分子

双特异性双抗体的第一多肽链优选地具有:

(I) 抗HIV gp120抗体A32 (Ferrari,G.等(2011) “An HIV-1gp120 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-1Serum,” J.Virol.85 (14):7029-7036) 或与抗体A32竞争结合的抗体或结合HIV的gp120蛋白的抗体的轻链可变结构域;

(II) 人源化的抗CD3抗体2 (“h抗体2”) 或与抗CD3抗体2竞争结合的抗体或结合 CD3的抗体的重链可变结构域;和

(III) E螺旋结构域(即, (EVAALEK)<sub>4</sub>; EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK; SEQ ID NO:39) 或K螺旋结构域(即, (KVAALKE)<sub>4</sub>; KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE; SEQ ID NO:40)。

这样的双特异性双抗体的第二多肽链优选地具有:

(I) 人源化的抗CD3抗体2 (“h抗体2”) 或与抗CD3抗体2竞争结合的这样的抗体或结合CD3的这样的抗体的轻链可变结构域;

(II) 这样的抗体A32或与抗体A32竞争结合的这样的抗体或结合HIV的gp120蛋白的这样的抗体的重链可变结构域;和

(III) K螺旋结构域(即, (KVAALKE)<sub>4</sub>; KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE; SEQ ID NO:40) 或E螺旋结构域(即, (EVAALEK)<sub>4</sub>; EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK; SEQ ID NO:39)。

在优选的实施方式中,带负电的“E-螺旋”被添加至用于形成双特异性双抗体的一个多肽和带正电的“K-螺旋”被添加至第二个双抗体的多肽。

优选地,这样的双抗体的第一多肽链具有氨基酸序列(SEQ ID NO:46) (CDR 是加下划线的):

|                               |                            |                                  |                           |                           |
|-------------------------------|----------------------------|----------------------------------|---------------------------|---------------------------|
| QSALTQPPSA                    | SGSPGQSVTI                 | <u>SC</u> <b><u>TGTSSDVG</u></b> | <b><u>GYNYVS</u></b> WYQH | HPGKAPKLI                 |
| S <b><u>EVNNRPS</u></b> GV    | PDRFSGSKSG                 | NTASLTVSGL                       | QAEDEAEYYC                | <b><u>SSYTDIHN</u></b> FV |
| FGGGTKLTVL                    | GGGSGGGGEV                 | QLVESGGGLV                       | QPGGSLRLSC                | AASGFTFS <b><u>TY</u></b> |
| <b><u>AMN</u></b> WVRQAPG     | KGLEWVGR <b><u>RIR</u></b> | <b><u>SKYNNYATYY</u></b>         | <b><u>ADSVKGR</u></b> FTI | SRDDSKNSLY                |
| LQMNSLKTED                    | TAVYYCVR <b><u>HG</u></b>  | <b><u>NFGNSYVSWF</u></b>         | <b><u>AY</u></b> WGQGLT   | VSSGCGGGGE                |
| VAALEKEVAA LEKEVAALEK EVAALEK |                            |                                  |                           |                           |

其中残基1-110是抗体A32的轻链可变结构域(CDR残基加下划线显示),残基 111-118是连接体GGGSGGGG(SEQ ID NO:27),残基119-243是人源化的抗CD3 抗体2的重链可变结构域(“h抗体2;CDR加下划线显示),残基247-252是连接体 GCGGG(SEQ ID NO:38)和残基253-280是E螺旋(EVAALEK)<sub>4</sub>[即(SEQ ID NO: 39)EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK]。

优选地,这样的双抗体的第二多肽链具有氨基酸序列(SEQ ID NO:47) (CDR 是加下划线的):

|                             |                            |                           |                           |                           |
|-----------------------------|----------------------------|---------------------------|---------------------------|---------------------------|
| QAVVTQEPSL                  | TVSPGGTVTL                 | TC <b><u>RSSTGAVT</u></b> | <b><u>TSNYAN</u></b> WVQQ | KPGQAPRGLI                |
| G <b><u>GTNKRAP</u></b> WT  | PARFSGSLLG                 | GKAALTITGA                | QAEDEADYYC                | <b><u>ALWYSNLWV</u></b> F |
| GGGTKLTVLG                  | GGGSGGGGQV                 | QLQESGPGLV                | KPSQTLRLSC                | TVSGGSSS <b><u>SG</u></b> |
| <b><u>AHYWS</u></b> WIRQY   | PGKGLEWIG <b><u>Y</u></b>  | <b><u>IHYSGNTYYN</u></b>  | <b><u>PSLKS</u></b> RITIS | QHTSENQFSL                |
| KLNSVTVADT                  | AVYYCARG <b><u>GTR</u></b> | <b><u>LRTL</u></b> RNAFDI | WGQGLT                    | VS                        |
| ALKEKVAALK EKVAALKEKV AALKE |                            |                           |                           |                           |

其中残基1-110是抗CD3抗体2的轻链可变结构域(CDR残基加下划线显示),残基111-118是连接体GGGSGGGG(SEQ ID NO:27),残基119-241是抗体A32的重链可变结构域(CDR残基加下划线显示),残基242-247是连接体GCGGG(SEQ ID NO:38)和残基248-275是K螺旋(KVAALKE)<sub>4</sub>[即,SEQ ID NO:40) KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE]。

抗CD3 x抗HIV env双特异性分子

双特异性双抗体的第一多肽链优选地具有:

(I) 抗体7B2 (GenBank登陆号AFQ31503;Buchacher,A.等(1994) “Generation Of Human Monoclonal Antibodies Against HIV-1Proteins;Electrofusion And Epstein-Barr Virus Transformation For Peripheral Blood Lymphocyte Immortalization,”AIDS Res. Hum.Retroviruses 10(4):359-369;Shen,R.(2010) “GP41-Specific Antibody Blocks Cell-Free HIV Type 1Transcytosis Through Human Rectal Mucosa And Model Colonic Epithelium,”J.Immunol.184(7):3648-3655) 或与抗体7B2竞争结合的抗体或结合 HIV的env蛋白的抗体的轻链可变结构域;和

(II) 人源化的抗CD3抗体2(“h抗体2”) 或与抗CD3抗体2竞争结合的抗体或结合 CD3的抗体的重链可变结构域;和

(III) E螺旋结构域(即,(EVAALEK)<sub>4</sub>;EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK;SEQ ID NO:39) 或K螺旋结构域(即,(KVAALKE)<sub>4</sub>;KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE;SEQ ID NO:40)。

这样的双特异性双抗体的第二多肽链优选地具有:

(I) 人源化的抗CD3抗体2(“h抗体2”) 或与抗CD3抗体2竞争结合的这样的抗体或结合 CD3的这样的抗体的轻链可变结构域;

(II) 这样的抗体7B2或与抗体7B2竞争结合的这样的抗体或结合HIV的env蛋白的这样的抗体的重链可变结构域;和

(III) K螺旋结构域(即, (KVAALKE)<sub>4</sub>; KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE; SEQ ID NO:40) 或E螺旋结构域(即, (EVAALEK)<sub>4</sub>; EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK; SEQ ID NO:39)。

在优选的实施方式中,带负电的“E-螺旋”被添加至用于形成双特异性双抗体的一个多肽和带正电的“K-螺旋”被添加至第二个双抗体的多肽。

优选地,这样的双抗体的第一多肽链具有氨基酸序列(SEQ ID NO:48) (CDR 是加下划线的):

|                                  |                     |                    |                    |                    |
|----------------------------------|---------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| DIVMTQSPDS                       | LAVSPGERAT          | IHC <u>KSSQTLL</u> | <u>YSSNNRHSIA</u>  | WYQQRPGQPP         |
| KLLLY <u>WASMR</u>               | <u>LS</u> GVDPDRFSG | SGSGTDFTLT         | INNLAEDVA          | IYYC <u>HQYSSH</u> |
| <u>PPT</u> FGHGTRV               | EIKGGGSGGG          | GEVQLVESGG         | GLVQPGGSLR         | LSCAASGFTF         |
| S <u>TYAMN</u> WVRQ              | APGKGLEWVG          | <u>RIRSKYNNYA</u>  | <u>TYYADSVKGR</u>  | FTISRDDSKN         |
| SLYLQMNSLK                       | TEDTAVYYCV          | <u>RHGNFGNSYV</u>  | <u>SWFAY</u> WGQGT | LVTVSSGGCG         |
| GGEVAALEKE VAALEKEVAA LEKEVAALEK |                     |                    |                    |                    |

其中残基1-113是抗体7B2的轻链可变结构域(GenBank登陆号AFQ31503) (CDR 残基加下划线显示),残基114-121是连接体GGGSGGG(SEQ ID NO:27),残基 122-246是人源化的抗CD3抗体2的重链可变结构域(“h抗体2;”CDR加下划线显示),残基247-252是连接体GGCGGG(SEQ ID NO:38)和残基253-280是E螺旋 (EVAALEK)<sub>4</sub>[即(SEQ ID NO:39) EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK]。

优选地,这样的双抗体的第二多肽链具有氨基酸序列(SEQ ID NO:49) (CDR 是加下划线的):

|                                |                    |                    |                    |                    |
|--------------------------------|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|
| QAVVTQEPSL                     | TVSPGGTVTL         | TC <u>RSSTGAVT</u> | <u>TSNYAN</u> WVQQ | KPGQAPRGLI         |
| <u>GGTNKRAPWT</u>              | PARFSGSLLG         | GKAALTITGA         | QAEDADYYC          | <u>ALWYSNLWVF</u>  |
| GGGTKLTVLG                     | GGGSGGGQV          | QLVQSGGGVF         | KPGGSLRLSC         | EASGFTFTE <u>Y</u> |
| <u>YMT</u> WVRQAPG             | KGLEWLAYIS         | <u>KNGEYSKYSP</u>  | <u>SSNGRFTISR</u>  | DNAKNSVFLQ         |
| LDRLSADDTA                     | VYYCAR <u>ADGL</u> | <u>TYFSELLQYI</u>  | <u>FDL</u> WGQGARV | TVSSGGCGGG         |
| KVAALKEKVA ALKEKVAALK EKVAALKE |                    |                    |                    |                    |

其中残基1-110是抗体抗CD3抗体2的轻链可变结构域(CDR残基加下划线显示),残基111-118是连接体GGGSGGG(SEQ ID NO:27),残基119-244是抗体7B2的重链可变结构域(GenBank登陆号AFQ31502) (CDR残基加下划线显示),残基 245-250是连接体GGCGGG(SEQ ID NO:38)和残基251-278是K螺旋 (KVAALKE)<sub>4</sub>[即,SEQ ID NO:40) KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE]。

抗CD3 x抗RSV F蛋白双特异性分子

双特异性双抗体的第一多肽链优选地具有:

(I) 人源化的抗CD3抗体2(“h抗体2”)或与抗CD3抗体2竞争结合的抗体或结合 CD3的抗体的轻链可变结构域;和

(II) 抗RSV F蛋白抗体,帕利珠单抗(Beeler,J.A.等(1989)“Neutralization Epitopes Of The F Glycoprotein Of Respiratory Syncytial Virus:Effect Of Mutation Upon Fusion Function,”J.Virol.63(7):2941-2950;Arbiza,J.等(1992)“Characterization Of Two Antigenic Sites Recognized By Neutralizing

Monoclonal Antibodies Directed Against The Fusion Glycoprotein Of Human Respiratory Syncytial Virus,”J.Gen.Virol. 73(9):2225-2234;Shadman,K.A.等(2011)“A Review Of Palivizumab And Emerging Therapies For Respiratory Syncytial Virus,”Expert Opin.Biol.Ther.11(11):1455-1467; Wang,D.等(2011)“Palivizumab For Immunoprophylaxis Of Respiratory Syncytial Virus(RSV) Bronchiolitis In High-Risk Infants And Young Children:A Systematic Review And Additional Economic Modelling Of Subgroup Analyses,”Health Technol. Assess.15(5):iii-iv,1-124.Doi:10.3310/hta15050)或与帕利珠单抗竞争结合的抗体或结合RSV F蛋白的A抗原位点的抗体的重链可变结构域;

(III)E螺旋结构域(即,(EVAALEK)<sub>4</sub>;EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK;SEQ ID NO:39)或K螺旋结构域(即,(KVAALKE)<sub>4</sub>;KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE;SEQ ID NO:40)。

这样的双特异性双抗体的第二多肽链优选地具有:

(I)抗RSV F蛋白抗体帕利珠单抗或与帕利珠单抗竞争结合的这样的抗体或结合 RSV F蛋白的A抗原位点的这样的抗体的轻链可变结构域;和

(II)人源化的抗CD3抗体2(“h抗体2”)或与抗CD3抗体2竞争结合的这样的抗体或结合CD3的这样的抗体的重链可变结构域;

(III)K螺旋结构域(即,(KVAALKE)<sub>4</sub>;KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE;SEQ ID NO:40)或E螺旋结构域(即,(EVAALEK)<sub>4</sub>;EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK;SEQ ID NO:39)。

在优选的实施方式中,带负电的“E-螺旋”被添加至用于形成双特异性双抗体的一个多肽和带正电的“K-螺旋”被添加至第二个双抗体的多肽。

优选地,这样的双抗体的第一多肽链具有氨基酸序列(SEQ ID NO:50)(CDR 是加下划线的):

|                    |                    |                     |                    |                   |
|--------------------|--------------------|---------------------|--------------------|-------------------|
| QAVVTQEPSL         | TVSPGGTVTL         | <u>TCRSSTGAVT</u>   | <u>TSNYAN</u> WVQQ | KPGQAPRGLI        |
| GG <u>TNKRAPWT</u> | PARFSGSLLG         | GKAALTITGA          | QAEDEADYYC         | <u>ALWYSNLWVF</u> |
| GGGTKLTVLG         | GGGSGGGGQV         | TLRESGPALV          | KPTQTLTLTC         | TFSGFSLSTS        |
| <u>GMSVGWIRQP</u>  | PGKALEWLAD         | <u>IWWDDKKDYN</u>   | <u>PSLKS</u> RLTIS | KDTSKNQVVL        |
| KVTNMDPADT         | ATYYCAR <u>SMI</u> | <u>TNWFYFDV</u> WGA | GTTVTVSSGG         | CGGGEVAALE        |
| KEVAALEKEV         | AALEKEVAAL         | EK                  |                    |                   |

其中残基1-110是抗CD3抗体2的轻链可变结构域(CDR残基加下划线显示),残基111-118是连接体GGGSGGGG(SEQ ID NO:27),残基119-238是抗RSV F蛋白抗体帕利珠单抗的重链可变结构域(CDR残基加下划线显示),残基239-244是连接体GGCGGG(SEQ ID NO:38)和残基245-272是E螺旋(EVAALEK)<sub>4</sub>[即(SEQ ID NO:39)EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK]。

优选地,这样的双抗体的第二多肽链具有氨基酸序列(SEQ ID NO:51)(CDR 是加下划线的):

|                    |                    |                    |                    |                     |
|--------------------|--------------------|--------------------|--------------------|---------------------|
| DIQMTQSPST         | LSASVGDRVLT        | ITC <u>RASQSVG</u> | <u>YMH</u> WYQQKPG | KAPKLLIY <u>DT</u>  |
| <u>SKLAS</u> GVPSR | FSGSGSGTEF         | TLTISSLQPD         | DFATYYCF <u>QG</u> | <u>SGYPFT</u> FGGG  |
| TKLEIKGGGS         | GGGGEVQLVE         | SGGGLVQPGG         | SLRLSCAASG         | FTFS <u>TYAMN</u> W |
| VRQAPGKGLE         | WVG <u>RIRSKYN</u> | <u>NYATYYADSV</u>  | <u>KGRFT</u> ISRDD | SKNSLYLQMN          |
| SLKTEDTAVY         | YCVR <u>HGNFGN</u> | <u>SYVSWFAY</u> WG | QGTLVTVSSG         | GCGGGKVAAL          |
| KEKVAALKEK         | VAALKEKVAA         | LKE                |                    |                     |

其中残基1-106是抗RSV F蛋白抗体帕利珠单抗的轻链可变结构域(CDR加下划线显示),残基107-114是连接体GGGSGGGG (SEQ ID NO:27),残基115-239是人源化的抗CD3抗体2的重链可变结构域(“h抗体2;”CDR加下划线显示),残基 240-245是连接体GGCGGG (SEQ ID NO:38)和残基246-273是K螺旋 (KVAALKE)<sub>4</sub>[即,SEQ ID NO:40) KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE]。

抗荧光素x抗HIV env双特异性分子

双特异性双抗体的第一多肽链优选地具有:

(I) 抗体7B2或与抗体7B2竞争结合的抗体或结合HIV的env蛋白的抗体的轻链可变结构域;

(II) 抗荧光素抗体4-4-20或与抗荧光素抗体4-4-20竞争结合的抗体或结合荧光素的抗体的重链可变结构域;和

(III) E螺旋结构域(即,(EVAALEK)<sub>4</sub>;EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK;SEQ ID NO:39)或K螺旋结构域(即,(KVAALKE)<sub>4</sub>;KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE;SEQ ID NO:40)。

[0196] 这样的双特异性双抗体的第二多肽链优选地具有:

(I) 抗荧光素抗体4-4-20或与抗体4-4-20竞争结合的这样的抗体或结合荧光素的这样的抗体的轻链可变结构域;

(II) 这样的抗体7B2或与抗体7B2竞争结合的这样的抗体或结合HIV的env蛋白的这样的抗体的重链可变结构域;和

(III) K螺旋结构域(即,(KVAALKE)<sub>4</sub>;KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE;SEQ ID NO:40)或E螺旋结构域(即,(EVAALEK)<sub>4</sub>;EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK;SEQ ID NO:39)。

在优选的实施方式中,带负电的“E-螺旋”被添加至用于形成双特异性双抗体的一个多肽和带正电的“K-螺旋”被添加至第二个双抗体的多肽。

优选地,这样的双抗体的第一多肽链具有氨基酸序列(SEQ ID NO:52)(CDR 是加下划线的):

|                     |                     |                           |                    |                    |
|---------------------|---------------------|---------------------------|--------------------|--------------------|
| DIVMTQSPDS          | LAVSPGERAT          | IHC <u>KSSQTLL</u>        | <u>YSSNNRHSIA</u>  | WYQQRPGQPP         |
| KLLLY <u>WASMR</u>  | <u>LS</u> GVDPDRFSG | SGSGTDFTLT                | INNLAEDVA          | IYYC <u>HQYSSH</u> |
| <u>PPT</u> FGHGTRV  | EIKGGGSGGG          | GEVKLDETGG                | GLVQPGRPMK         | LSCVASGFTF         |
| S <u>DYWM</u> NWVRQ | SPEKGLEWVA          | <u>QIRNKPYNYE</u>         | <u>TYYS</u> DSVKGR | FTISRDDSKS         |
| SVYLQMNNLR          | VEDMGIYYCT          | <u>G</u> <u>SYGMDY</u> WG | QGTSVTVSSG         | GCGGGEVAAL         |
| EKEVAALEKE          | VAALEKEVAA          | LEK                       |                    |                    |

其中残基1-113是抗体7B2的轻链可变结构域(GenBank登陆号AFQ31503)(CDR 残基加下划线显示),残基114-121是连接体GGGSGGGG (SEQ ID NO:27),残基 122-239是抗体4-4-20的重链可变结构域,残基240-245是连接体GGCGGG (SEQ ID NO:38)和残基246-277是E螺旋(EVAALEK)<sub>4</sub>[即(SEQ ID NO:39)EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK]。

优选地,这样的双抗体的第二多肽链具有氨基酸序列(SEQ ID NO:53)(CDR 是加下划线的):

|                    |                    |                   |                   |                    |
|--------------------|--------------------|-------------------|-------------------|--------------------|
| DVVMTQTPFS         | LPVSLGDQAS         | <u>ISCRSSQSLV</u> | <u>HSNGNTYLRW</u> | YLQKPGQSPK         |
| VLIY <u>KVSNRF</u> | <u>SGVPDRFSGS</u>  | GSGTDFTLKI        | SRVEAEDLGV        | YFC <u>SQSTHVP</u> |
| <u>WTF</u> GGGTKLE | IKGGGSGGGG         | QVQLVQSGGG        | VFKPGGSLRL        | SCEASGFTFT         |
| <u>EYYMTWVRQA</u>  | PGKGLEWLA <u>Y</u> | <u>ISKNGEYSKY</u> | <u>SPSSNGRFTI</u> | SRDNAKNSVF         |
| LQLDRLSADD         | TAVYYCAR <u>AD</u> | <u>GLTYFSELLQ</u> | <u>YIFDLWGQGA</u> | RVTVSSGGCG         |
| GGKVAALKEK         | VAALKEKVAA         | LKEKVAALKE        |                   |                    |

其中残基1-112是抗体4-4-20的轻链可变结构域,残基113-120是连接体GGGSGGGG (SEQ ID NO:27),残基121-246是抗体7B2的重链可变结构域(CDR残基加下划线显示),残基247-252是连接体GGCGGG (SEQ ID NO:38)和残基253-280是K螺旋(KVAALKE)<sub>4</sub>[即,SEQ ID NO:40)KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE]。

#### 实施例8

表达HIV env的细胞的重定向CD8介导的杀伤

作为本发明的双特异性分子用途的进一步例子,评估上述抗CD3 x抗HIV gp120和抗CD3 x抗HIV env双特异性分子在存在T细胞的情况下促进对表达HIV env的细胞的重定向CD8介导的杀伤的能力。

上述抗荧光素x抗HIV env和抗CD3 x抗RSV F蛋白双特异性分子用作对照。

在一个这样的研究中,在存在四环素的情况下孵育Jurkat 522FY (HxB2 gp160) 细胞,以便诱导它们表达HIV gp160。在存在全T细胞(D54670) (以效应子:靶比例10:1)和上述双特异性分子中的一种的情况下孵育细胞24小时。评估双特异性分子的细胞毒性。结果显示抗CD3 x抗HIV gp120和抗CD3 x抗HIV env双特异性分子均能够造成CD8介导的细胞毒性,而抗CD3 x抗RSV F蛋白对照双抗体不能(图5)。

在第二研究中,在存在多西环素的情况下孵育HEK 293D375细胞(92Th023,亚型AE,R5-热带),以便诱导它们的表达HIV gp140。在存在全T细胞(D47239) (以效应子:靶比例10:1)和一种上述双特异性分子的情况下孵育细胞24小时。评估双特异性分子的细胞毒性。结果显示抗CD3 x抗HIV gp120和抗CD3 x抗HIV env 双特异性分子都能够造成CD8介导的细胞毒性,而抗HIV env x抗荧光素对照双抗体不能,除非在抗体饱和的条件下(图6)。

在第三研究中,在存在多西环素的情况下孵育HEK 293D371细胞(CM244,亚型AE,R5-热带),以便诱导它们表达HIV gp140。在存在全T细胞(D47239) (效应子:靶比例为10:1)和一种上述双特异性分子的情况下孵育细胞24小时。评估双特异性分子的细胞毒性。结果再次显示抗CD3 x抗HIV gp120和抗CD3 x抗HIV env双特异性分子都能够造成CD8介导的细胞毒性,而抗HIV env x抗荧光素对照双抗体不能,除非在抗体饱和的情况下(图7)。

表1总结了观察的使用抗CD3 x抗HIV gp120双特异性分子或抗CD3 x抗 HIV env双特异性分子获得的CD8介导的细胞毒性。

| 表 1          |                          |          |
|--------------|--------------------------|----------|
|              | EC <sub>50</sub> (ng/mL) |          |
| 细胞系          | 7B2 x CD3                | A32x CD3 |
| Jurkat 522Fy | 0.49                     | 0.75     |
| HEK 293 D371 | 0.006                    | 0.024    |
| HEK 293 D375 | 0.18                     | 0.11     |

本说明书提到的所有出版物和专利通过参考并入本文,达到如同好像具体和单独指出每个单个出版物或专利申请通过参考以其整体并入的相同程度。尽管已经结合其具体实施方式描述了本发明,但是应当理解,其能够被进一步更改,并且本申请旨在覆盖大体上遵循本发明原理的本发明的任何变型、用途或改变,所述变型、用途或改变包括与本公开的这种偏离,只要其在本发明所属领域的已知或常规实施范围内和只要其可应用于上文阐释的本质特征。

## 序列表

&lt;110&gt; 宏观基因有限公司

&lt;120&gt; 与表达激活受体的免疫效应细胞具有免疫反应性的双特异性分子

&lt;130&gt; 1301.0079I

&lt;150&gt; US 61/783,195

&lt;151&gt; 2013-03-14

&lt;160&gt; 53

&lt;170&gt; PatentIn版本3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 107

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠 (Mus musculus)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1) .. (107)

&lt;223&gt; OKT3 (鼠科抗-CD3抗体) 轻链可变区

&lt;400&gt; 1

Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met

20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser

50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu

65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr

85 90 95

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn Arg

100 105

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 192

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;223&gt; OKT3 (鼠科抗-CD3抗体) 重链可变区

&lt;400&gt; 2

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

&lt;210&gt; 3

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; M291 (人源化的抗-CD3抗体) 轻链可变区

&lt;400&gt; 3

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly  
 1                      5                      10                      15  
 Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
                     20                      25                      30  
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Thr Tyr  
                     35                      40                      45  
 Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

|                                                                 |     |    |
|-----------------------------------------------------------------|-----|----|
| 50                                                              | 55  | 60 |
| Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu |     |    |
| 65                                                              | 70  | 75 |
| Asp Ala Asp Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr |     |    |
| 85                                                              | 90  | 95 |
| Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys                         |     |    |
| 100                                                             | 105 |    |

&lt;210&gt; 4

&lt;211&gt; 120

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; M291 (人源化的抗-CD3抗体) 重链可变区

&lt;400&gt; 4

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

&lt;210&gt; 5

&lt;211&gt; 130

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 大白鼠 (Rattus norvegicus)

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1) .. (130)

&lt;223&gt; YTH12.5 (大鼠抗-CD3抗体) 轻链可变区

&lt;400&gt; 5

```

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

```

Leu Arg

130

<210> 6

<211> 138

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (138)

<223> XR31 (鼠科抗-CD3抗体) 重链可变区

<400> 6

```

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

```

Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
 100 105 110  
 Tyr Tyr Cys Ala Lys Phe Arg Gln Tyr Ser Gly Gly Phe Asp Tyr Trp  
 115 120 125  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
 130 135

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (107)

<223> 鼠科抗-CD3抗体1轻链可变区

<400> 7

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

<210> 8

<211> 121

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (121)

<223> 鼠科抗-CD3抗体1重链可变区

<400> 8

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala

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

&lt;210&gt; 9

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1) .. (110)

&lt;223&gt; 鼠科抗-CD3抗体2轻链可变区

&lt;400&gt; 9

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

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 125

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1) .. (125)

&lt;223&gt; 鼠科抗-CD3抗体2重链可变区

&lt;400&gt; 10

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

&lt;210&gt; 11

&lt;211&gt; 106

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1) .. (106)

&lt;223&gt; BMA031 抗-TCR抗体轻链可变区

&lt;400&gt; 11

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ile | Val | Leu | Thr | Gln | Ser | Pro | Ala | Ile | Met | Ser | Ala | Ser | Pro | Gly |
| 1   |     |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu | Lys | Val | Thr | Met | Thr | Cys | Ser | Ala | Thr | Ser | Ser | Val | Ser | Tyr | Met |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| His | Trp | Tyr | Gln | Gln | Lys | Ser | Gly | Thr | Ser | Pro | Lys | Arg | Trp | Ile | Tyr |
|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |

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

<210> 12

<211> 120

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> misc\_feature

<222> (1) .. (120)

<223> BMA031 抗-TCR抗体重链可变区

<400> 12

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

<210> 13

<211> 106

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1) .. (106)

&lt;223&gt; TRX2 抗-CD8抗体轻链可变区

&lt;400&gt; 13

```

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

```

&lt;210&gt; 14

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1) .. (121)

&lt;223&gt; TRX2 抗-CD8抗体重链可变区

&lt;400&gt; 14

```

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

```

|                                                                 |     |  |     |  |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|--|-----|--|-----|
|                                                                 | 100 |  | 105 |  | 110 |
| Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser                             |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 115 |  | 120 |  |     |
| <210> 15                                                        |     |  |     |  |     |
| <211> 112                                                       |     |  |     |  |     |
| <212> PRT                                                       |     |  |     |  |     |
| <213> 小家鼠                                                       |     |  |     |  |     |
| <220>                                                           |     |  |     |  |     |
| <221> misc_feature                                              |     |  |     |  |     |
| <222> (1) .. (112)                                              |     |  |     |  |     |
| <223> TRX1 抗-CD4抗体轻链可变结构域                                       |     |  |     |  |     |
| <400> 15                                                        |     |  |     |  |     |
| Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly |     |  |     |  |     |
| 1                                                               | 5   |  | 10  |  | 15  |
| Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 20  |  | 25  |  | 30  |
| Gly Asp Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 35  |  | 40  |  | 45  |
| Lys Leu Leu Ile Tyr Val Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 50  |  | 55  |  | 60  |
| Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser |     |  |     |  |     |
| 65                                                              | 70  |  | 75  |  | 80  |
| Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Leu |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 85  |  | 90  |  | 95  |
| Gln Asp Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 100 |  | 105 |  | 110 |
| <210> 16                                                        |     |  |     |  |     |
| <211> 118                                                       |     |  |     |  |     |
| <212> PRT                                                       |     |  |     |  |     |
| <213> 小家鼠                                                       |     |  |     |  |     |
| <220>                                                           |     |  |     |  |     |
| <221> MISC_FEATURE                                              |     |  |     |  |     |
| <222> (1) .. (118)                                              |     |  |     |  |     |
| <223> TRX1 抗-CD4抗体重链可变结构域                                       |     |  |     |  |     |
| <400> 16                                                        |     |  |     |  |     |
| Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala |     |  |     |  |     |
| 1                                                               | 5   |  | 10  |  | 15  |
| Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ala Tyr |     |  |     |  |     |
|                                                                 | 20  |  | 25  |  | 30  |

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

<210> 17

<211> 112

<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>

<221> MISC\_FEATURE

<222> (1) .. (112)

<223> Lo-CD2a 抗-CD2a抗体轻链可变区

<400> 17

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

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> 小家鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1) .. (118)

&lt;223&gt; Lo-CD2a 抗-CD2a抗体重链可变区

&lt;400&gt; 18

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

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; misc\_feature

&lt;222&gt; (1) .. (111)

&lt;223&gt; 3G8 抗-CD16抗体轻链可变区

&lt;400&gt; 19

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

|                                                                 |     |     |    |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|----|
| 65                                                              | 70  | 75  | 80 |
| Pro Val Glu Glu Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn |     |     |    |
|                                                                 | 85  | 90  | 95 |
| Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys     |     |     |    |
| 100                                                             | 105 | 110 |    |

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1) .. (118)

&lt;223&gt; 3G8 抗-CD16抗体重链可变区

&lt;400&gt; 20

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

&lt;210&gt; 21

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1) .. (111)

&lt;223&gt; A9 抗-CD16抗体轻链可变区

&lt;400&gt; 21

```

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

```

&lt;210&gt; 22

&lt;211&gt; 117

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1) .. (117)

&lt;223&gt; A9 抗-CD16抗体重链可变区

&lt;400&gt; 22

```

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

```

&lt;210&gt; 23

&lt;211&gt; 108

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1) .. (108)

&lt;223&gt; KYK 1.0 抗-NKG2D抗体轻链可变区

&lt;400&gt; 23

```

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

```

&lt;210&gt; 24

&lt;211&gt; 118

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1) .. (118)

&lt;223&gt; KYK 1.0 抗-NKG2D抗体重链可变区

&lt;400&gt; 24

```

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Gly
1           5           10           15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
          20           25           30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
          35           40           45
Ala Phe Ile Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

```

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

&lt;210&gt; 25

&lt;211&gt; 110

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1) .. (110)

&lt;223&gt; KYK 2.0 抗-NKG2D抗体轻链可变区

&lt;400&gt; 25

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

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 121

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 小家鼠

&lt;220&gt;

&lt;221&gt; MISC\_FEATURE

&lt;222&gt; (1) .. (121)

<223> KYK 2.0 抗-NKG2D抗体重链可变区

<400> 26

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

<210> 27

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接体

<400> 27

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
1                   5

<210> 28

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码肽连接体 GGS SGGGG的多核苷酸

<400> 28

ggaggcggat ccggaggcgg aggc 24

<210> 29

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含半胱氨酸的肽

<400> 29

Leu Gly Gly Cys

1

<210> 30

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含半胱氨酸的铰链结构域

<400> 30

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro

1

5

10

<210> 31

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含半胱氨酸的铰链结构域

<400> 31

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser

1

5

10

<210> 32

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含半胱氨酸的肽

<400> 32

Val Glu Pro Lys Ser Cys

1

5

<210> 33

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码包含半胱氨酸的肽VEPKSC的多核苷酸

<400> 33

gttgagccca aatcttgt 18

<210> 34

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含半胱氨酸的肽

<400> 34

Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg Gly Glu Cys

1 5 10

<210> 35

<211> 30

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码包含半胱氨酸的肽LGGCFNRGEC的多核苷酸

<400> 35

ctgggaggct gcttcaacag gggagagtgt 30

<210> 36

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含半胱氨酸的肽

<400> 36

Phe Asn Arg Gly Glu Cys

1 5

<210> 37

<211> 18

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码包含半胱氨酸的肽FNRGEC的多核苷酸

<400> 37

ttcaacaggg gagagtgt 18

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 包含半胱氨酸的肽

<400> 38

Gly Gly Cys Gly Gly Gly

1 5

<210> 39

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> E螺旋

<400> 39

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys

20 25

<210> 40

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> K螺旋

<400> 40

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val

1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu

20 25

<210> 41

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 肽连接体

<400> 41

Gly Gly Gly Asn Ser

1 5

<210> 42

<211> 273

<212> PRT

### 〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$ 

〈223〉 抗-HIV env抗体 7B2 x 抗-CD16

### 抗体h3G8双特异性双抗体的第一多肽链

<400> 42

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Asp | Ile | Val | Met | Thr | Gln | Ser | Pro | Asp | Ser | Leu | Ala | Val | Ser | Pro | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Glu | Arg | Ala | Thr | Ile | His | Cys | Lys | Ser | Ser | Gln | Thr | Leu | Leu | Tyr | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Ser | Asn | Asn | Arg | His | Ser | Ile | Ala | Trp | Tyr | Gln | Gln | Arg | Pro | Gly | Gln |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Pro | Pro | Lys | Leu | Leu | Leu | Tyr | Trp | Ala | Ser | Met | Arg | Leu | Ser | Gly | Val |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |
| Pro | Asp | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser | Gly | Thr | Asp | Phe | Thr | Leu | Thr |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     |     | 80  |
| Ile | Asn | Asn | Leu | Gln | Ala | Glu | Asp | Val | Ala | Ile | Tyr | Tyr | Cys | His | Gln |
|     |     |     |     | 85  |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Tyr | Ser | Ser | His | Pro | Pro | Thr | Phe | Gly | His | Gly | Thr | Arg | Val | Glu | Ile |
|     |     |     | 100 |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Lys | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Gln | Val | Thr | Leu | Arg | Glu | Ser |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Gly | Pro | Ala | Leu | Val | Lys | Pro | Thr | Gln | Thr | Leu | Thr | Leu | Thr | Cys | Thr |
|     | 130 |     |     |     |     | 135 |     |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Phe | Ser | Gly | Phe | Ser | Leu | Ser | Thr | Ser | Gly | Met | Gly | Val | Gly | Trp | Ile |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     |     | 160 |
| Arg | Gln | Pro | Pro | Gly | Lys | Ala | Leu | Glu | Trp | Leu | Ala | His | Ile | Trp | Trp |
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Asp | Asp | Asp | Lys | Arg | Tyr | Asn | Pro | Ala | Leu | Lys | Ser | Arg | Leu | Thr | Ile |
|     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Ser | Lys | Asp | Thr | Ser | Lys | Asn | Gln | Val | Val | Leu | Thr | Met | Thr | Asn | Met |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Asp | Pro | Val | Asp | Thr | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Gln | Ile | Asn | Pro | Ala |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Trp | Phe | Ala | Tyr | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Gly | Cys | Gly | Gly | Gly | Glu | Val | Ala | Ala | Leu | Glu | Lys | Glu | Val | Ala | Ala |
|     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Leu | Glu | Lys | Glu | Val | Ala | Ala | Leu | Glu | Lys | Glu | Val | Ala | Ala | Leu | Glu |
|     |     |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |

Lys

&lt;210&gt; 43

&lt;211&gt; 279

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗-HIV env抗体 7B2 x 抗-CD16

抗体 h3G8双特异性双抗体的第二多肽链

&lt;400&gt; 43

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Phe Asp

20 25 30

Gly Asp Ser Phe Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro

35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Thr Thr Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp

50 55 60

Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser

65 70 75 80

Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Ser Asn

85 90 95

Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly

100 105 110

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly

115 120 125

Gly Val Phe Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser

130 135 140

Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala Pro

145 150 155 160

Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala Tyr Ile Ser Lys Asn Gly Glu Tyr

165 170 175

Ser Lys Tyr Ser Pro Ser Ser Asn Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp

180 185 190

Asn Ala Lys Asn Ser Val Phe Leu Gln Leu Asp Arg Leu Ser Ala Asp

195 200 205

Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ala Asp Gly Leu Thr Tyr Phe

210 215 220

Ser Glu Leu Leu Gln Tyr Ile Phe Asp Leu Trp Gly Gln Gly Ala Arg

225 230 235 240

Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu  
 245 250 255  
 Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
 260 265 270  
 Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
 275

<210> 44

<211> 276

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-荧光素抗体 4-4-20 x

抗-CD16抗体 h3G8双特异性双抗体的第一多肽链

<400> 44

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Val Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr Gly Met |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu |     | 240 |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Gly |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Gly Gly Asn Ser                                                 |     |     |
| 275                                                             |     |     |
| <210> 45                                                        |     |     |
| <211> 294                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <223> 抗-荧光素抗体 4-4-20 x                                          |     |     |
| 抗-CD16抗体 h3G8双特异性双抗体的第二多肽链                                      |     |     |
| <400> 45                                                        |     |     |
| Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Phe Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser Gly Met Gly Val Gly Trp Ile Arg |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
|                                                                 |     | 160 |

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

<210> 46

<211> 277

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-HIV gp120抗体 A32 x 抗-CD3

抗体2双特异性双抗体的第一多肽链

<400> 46

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Phe Thr Phe Ser Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Lys Gly Leu Glu Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Asp Asp Ser Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Ala Ala Leu Glu Lys                                             |     |     |
| 275                                                             |     |     |

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 275

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗-HIV gp120抗体 A32 x

抗-CD3抗体 2双特异性双抗体的第二多肽链

&lt;400&gt; 47

|                                                                 |    |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|
| Gln Ala Val Val Thr Gln Glu Pro Ser Leu Thr Val Ser Pro Gly Gly |    |    |
| 1                                                               | 5  | 10 |
| Thr Val Thr Leu Thr Cys Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser |    |    |
| 20                                                              | 25 | 30 |
| Asn Tyr Ala Asn Trp Val Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Gly |    |    |
| 35                                                              | 40 | 45 |
| Leu Ile Gly Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro Trp Thr Pro Ala Arg Phe |    |    |
| 50                                                              | 55 | 60 |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ser | Gly | Ser | Leu | Leu | Gly | Gly | Lys | Ala | Ala | Leu | Thr | Ile | Thr | Gly | Ala |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |
| Gln | Ala | Glu | Asp | Glu | Ala | Asp | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Leu | Trp | Tyr | Ser | Asn |
| 85  |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Trp | Val | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Thr | Val | Leu | Gly | Gly | Gly |
| 100 |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Gln | Val | Gln | Leu | Gln | Glu | Ser | Gly | Pro | Gly |
| 115 |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |
| Leu | Val | Lys | Pro | Ser | Gln | Thr | Leu | Ser | Leu | Ser | Cys | Thr | Val | Ser | Gly |
| 130 |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |
| Gly | Ser | Ser | Ser | Ser | Gly | Ala | His | Tyr | Trp | Ser | Trp | Ile | Arg | Gln | Tyr |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |     |     |
| Pro | Gly | Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Ile | Gly | Tyr | Ile | His | Tyr | Ser | Gly | Asn |
| 165 |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Tyr | Tyr | Asn | Pro | Ser | Leu | Lys | Ser | Arg | Ile | Thr | Ile | Ser | Gln | His |
| 180 |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |
| Thr | Ser | Glu | Asn | Gln | Phe | Ser | Leu | Lys | Leu | Asn | Ser | Val | Thr | Val | Ala |
| 195 |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |     |     |
| Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Gly | Thr | Arg | Leu | Arg | Thr | Leu |
| 210 |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |     |     |
| Arg | Asn | Ala | Phe | Asp | Ile | Trp | Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |     |     |
| Ser | Gly | Gly | Cys | Gly | Gly | Gly | Lys | Val | Ala | Ala | Leu | Lys | Glu | Lys | Val |
| 245 |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |     |     |     |     |
| Ala | Ala | Leu | Lys | Glu | Lys | Val | Ala | Ala | Leu | Lys | Glu | Lys | Val | Ala | Ala |
| 260 |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |     |     |     |     |     |

Leu Lys Glu  
275

⟨210⟩ 48

280

&lt;212&gt; PRT

### 〈213〉 人工序列

 $\langle 220 \rangle$ 

〈223〉 抗-HIV env抗体 7B2 x 抗-CD3

抗体 2双特异性双抗体的第一多肽链

&lt;400&gt; 48

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly  
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile His Cys Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu Tyr Ser

〈223〉 抗-HIV env抗体 7B2 x 抗-CD3

抗体 2双特异性双抗体的第二多肽链

<400> 49

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ala | Val | Val | Thr | Gln | Glu | Pro | Ser | Leu | Thr | Val | Ser | Pro | Gly | Gly |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |
| Thr | Val | Thr | Leu | Thr | Cys | Arg | Ser | Ser | Thr | Gly | Ala | Val | Thr | Thr | Ser |
|     |     |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Asn | Tyr | Ala | Asn | Trp | Val | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ala | Pro | Arg | Gly |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |
| Leu | Ile | Gly | Gly | Thr | Asn | Lys | Arg | Ala | Pro | Trp | Thr | Pro | Ala | Arg | Phe |
|     | 50  |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |
| Ser | Gly | Ser | Leu | Leu | Gly | Gly | Lys | Ala | Ala | Leu | Thr | Ile | Thr | Gly | Ala |
| 65  |     |     |     |     | 70  |     |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |
| Gln | Ala | Glu | Asp | Glu | Ala | Asp | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Leu | Trp | Tyr | Ser | Asn |
|     |     |     | 85  |     |     |     |     |     | 90  |     |     |     |     | 95  |     |
| Leu | Trp | Val | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Thr | Val | Leu | Gly | Gly | Gly |
|     |     | 100 |     |     |     |     |     | 105 |     |     |     |     | 110 |     |     |
| Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Gln | Ser | Gly | Gly | Gly |
|     |     | 115 |     |     |     |     | 120 |     |     |     |     | 125 |     |     |     |
| Val | Phe | Lys | Pro | Gly | Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Glu | Ala | Ser | Gly |
|     | 130 |     |     |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |
| Phe | Thr | Phe | Thr | Glu | Tyr | Tyr | Met | Thr | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly |
| 145 |     |     |     |     | 150 |     |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |
| Lys | Gly | Leu | Glu | Trp | Leu | Ala | Tyr | Ile | Ser | Lys | Asn | Gly | Glu | Tyr | Ser |
|     |     |     | 165 |     |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |
| Lys | Tyr | Ser | Pro | Ser | Ser | Asn | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn |
|     |     | 180 |     |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Ala | Lys | Asn | Ser | Val | Phe | Leu | Gln | Leu | Asp | Arg | Leu | Ser | Ala | Asp | Asp |
|     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |     |
| Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Ala | Asp | Gly | Leu | Thr | Tyr | Phe | Ser |
|     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |     |     |
| Glu | Leu | Leu | Gln | Tyr | Ile | Phe | Asp | Leu | Trp | Gly | Gln | Gly | Ala | Arg | Val |
| 225 |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |
| Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Cys | Gly | Gly | Gly | Lys | Val | Ala | Ala | Leu | Lys |
|     |     |     | 245 |     |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Glu | Lys | Val | Ala | Ala | Leu | Lys | Glu | Lys | Val | Ala | Ala | Leu | Lys | Glu | Lys |
|     |     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |
| Val | Ala | Ala | Leu | Lys | Glu |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     | 275 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |

<210> 50

&lt;211&gt; 272

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗-RSV F蛋白抗体帕利珠单抗

x 抗-CD3抗体 2双特异性双抗体的第一多肽链

&lt;400&gt; 50

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ala | Val | Val | Thr | Gln | Glu | Pro | Ser | Leu | Thr | Val | Ser | Pro | Gly | Gly | 1   | 5   | 10  | 15  |
| Thr | Val | Thr | Leu | Thr | Cys | Arg | Ser | Ser | Thr | Gly | Ala | Val | Thr | Thr | Ser | 20  | 25  | 30  |     |
| Asn | Tyr | Ala | Asn | Trp | Val | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Gln | Ala | Pro | Arg | Gly | 35  | 40  | 45  |     |
| Leu | Ile | Gly | Gly | Thr | Asn | Lys | Arg | Ala | Pro | Trp | Thr | Pro | Ala | Arg | Phe | 50  | 55  | 60  |     |
| Ser | Gly | Ser | Leu | Leu | Gly | Gly | Lys | Ala | Ala | Leu | Thr | Ile | Thr | Gly | Ala | 65  | 70  | 75  | 80  |
| Gln | Ala | Glu | Asp | Glu | Ala | Asp | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Leu | Trp | Tyr | Ser | Asn | 85  | 90  | 95  |     |
| Leu | Trp | Val | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Thr | Val | Leu | Gly | Gly | Gly | 100 | 105 | 110 |     |
| Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Gln | Val | Thr | Leu | Arg | Glu | Ser | Gly | Pro | Ala | 115 | 120 | 125 |     |
| Leu | Val | Lys | Pro | Thr | Gln | Thr | Leu | Thr | Leu | Thr | Cys | Thr | Phe | Ser | Gly | 130 | 135 | 140 |     |
| Phe | Ser | Leu | Ser | Thr | Ser | Gly | Met | Ser | Val | Gly | Trp | Ile | Arg | Gln | Pro | 145 | 150 | 155 | 160 |
| Pro | Gly | Lys | Ala | Leu | Glu | Trp | Leu | Ala | Asp | Ile | Trp | Trp | Asp | Asp | Lys | 165 | 170 | 175 |     |
| Lys | Asp | Tyr | Asn | Pro | Ser | Leu | Lys | Ser | Arg | Leu | Thr | Ile | Ser | Lys | Asp | 180 | 185 | 190 |     |
| Thr | Ser | Lys | Asn | Gln | Val | Val | Leu | Lys | Val | Thr | Asn | Met | Asp | Pro | Ala | 195 | 200 | 205 |     |
| Asp | Thr | Ala | Thr | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Ser | Met | Ile | Thr | Asn | Trp | Tyr | 210 | 215 | 220 |     |
| Phe | Asp | Val | Trp | Gly | Ala | Gly | Thr | Thr | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | 225 | 230 | 235 | 240 |
| Cys | Gly | Gly | Gly | Glu | Val | Ala | Ala | Leu | Glu | Lys | Glu | Val | Ala | Ala | Leu | 245 | 250 | 255 |     |

Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
 260 265 270

<210> 51

<211> 273

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗-RSV F蛋白抗体

帕利珠单抗 x 抗-CD3抗体2双特异性双抗体的第二多肽链

<400> 51

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Gly Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr  
 35 40 45

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

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 100 105 110

Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro  
 115 120 125

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 130 135 140

Thr Tyr Ala Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 145 150 155 160

Trp Val Gly Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr  
 165 170 175

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys  
 180 185 190

Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala  
 195 200 205

Val Tyr Tyr Cys Val Arg His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser  
 210 215 220

Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly

|                                                                 |     |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|
| 225                                                             | 230 | 235 | 240 |
| Gly Cys Gly Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala |     |     |     |
|                                                                 | 245 | 250 | 255 |
| Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys |     |     |     |
|                                                                 | 260 | 265 | 270 |
| Glu                                                             |     |     |     |
| <210> 52                                                        |     |     |     |
| <211> 273                                                       |     |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |     |
| <220>                                                           |     |     |     |
| <223> 抗-荧光素抗体 4-4-20 x                                          |     |     |     |
| 抗-HIV env抗体 7B2双特异性双抗体的第一多肽链                                    |     |     |     |
| <400> 52                                                        |     |     |     |
| Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Pro Gly |     |     |     |
| 1 5 10 15                                                       |     |     |     |
| Glu Arg Ala Thr Ile His Cys Lys Ser Ser Gln Thr Leu Leu Tyr Ser |     |     |     |
| 20 25 30                                                        |     |     |     |
| Ser Asn Asn Arg His Ser Ile Ala Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln |     |     |     |
| 35 40 45                                                        |     |     |     |
| Pro Pro Lys Leu Leu Leu Tyr Trp Ala Ser Met Arg Leu Ser Gly Val |     |     |     |
| 50 55 60                                                        |     |     |     |
| Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr |     |     |     |
| 65 70 75 80                                                     |     |     |     |
| Ile Asn Asn Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Ile Tyr Tyr Cys His Gln |     |     |     |
| 85 90 95                                                        |     |     |     |
| Tyr Ser Ser His Pro Pro Thr Phe Gly His Gly Thr Arg Val Glu Ile |     |     |     |
| 100 105 110                                                     |     |     |     |
| Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Lys Leu Asp Glu Thr |     |     |     |
| 115 120 125                                                     |     |     |     |
| Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Arg Pro Met Lys Leu Ser Cys Val |     |     |     |
| 130 135 140                                                     |     |     |     |
| Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Tyr Trp Met Asn Trp Val Arg Gln |     |     |     |
| 145 150 155 160                                                 |     |     |     |
| Ser Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Gln Ile Arg Asn Lys Pro |     |     |     |
| 165 170 175                                                     |     |     |     |
| Tyr Asn Tyr Glu Thr Tyr Tyr Ser Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr |     |     |     |
| 180 185 190                                                     |     |     |     |
| Ile Ser Arg Asp Asp Ser Lys Ser Ser Val Tyr Leu Gln Met Asn Asn |     |     |     |

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Leu Arg Val Glu Asp Met Gly Ile Tyr Tyr Cys Thr Gly Ser Tyr Tyr |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Gly Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Gly |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Lys                                                             |     |     |
| <210> 53                                                        |     |     |
| <211> 280                                                       |     |     |
| <212> PRT                                                       |     |     |
| <213> 人工序列                                                      |     |     |
| <220>                                                           |     |     |
| <223> 抗-荧光素抗体 4-4-20 x                                          |     |     |
| 抗-HIV env抗体 7B2双特异性双抗体的第二多肽链                                    |     |     |
| <400> 53                                                        |     |     |
| Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Phe Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly |     |     |
| 1                                                               | 5   | 10  |
| Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser |     |     |
| 20                                                              | 25  | 30  |
| Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Arg Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser |     |     |
| 35                                                              | 40  | 45  |
| Pro Lys Val Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro |     |     |
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Ser |     |     |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Gly Gly Val Phe Lys Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Ser Gly Phe Thr Phe Thr Glu Tyr Tyr Met Thr Trp Val Arg Gln Ala |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Ala Tyr Ile Ser Lys Asn Gly Glu |     |     |

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
|     |     |     |     | 165 |     |     |     |     | 170 |     |     |     |     | 175 |     |     |
| Tyr | Ser | Lys | Tyr | Ser | Pro | Ser | Ser | Asn | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg |     |
|     |     |     |     | 180 |     |     |     |     | 185 |     |     |     |     | 190 |     |     |
| Asp | Asn | Ala | Lys | Asn | Ser | Val | Phe | Leu | Gln | Leu | Asp | Arg | Leu | Ser | Ala |     |
|     |     |     |     | 195 |     |     |     |     | 200 |     |     |     |     | 205 |     |     |
| Asp | Asp | Thr | Ala | Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Ala | Asp | Gly | Leu | Thr | Tyr |     |
|     |     |     |     | 210 |     |     |     |     | 215 |     |     |     |     | 220 |     |     |
| Phe | Ser | Glu | Leu | Leu | Gln | Tyr | Ile | Phe | Asp | Leu | Trp | Gly | Gln | Gly | Ala |     |
| 225 |     |     |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |     |
| Arg | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Gly | Gly | Cys | Gly | Gly | Gly | Lys | Val | Ala | Ala |     |
|     |     |     |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |
| Leu | Lys | Glu | Lys | Val | Ala | Ala | Leu | Lys | Glu | Lys | Val | Ala | Ala | Leu | Lys |     |
|     |     |     |     | 260 |     |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |
| Glu | Lys | Val | Ala | Ala | Leu | Lys | Glu |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|     |     |     |     | 275 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     | 280 |

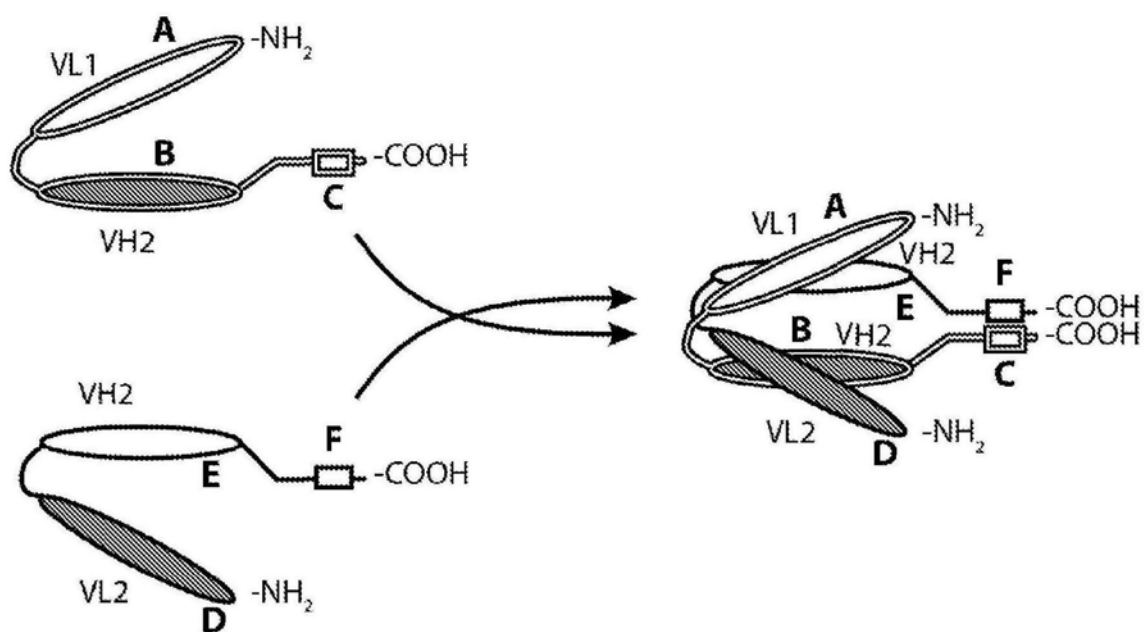


图1A

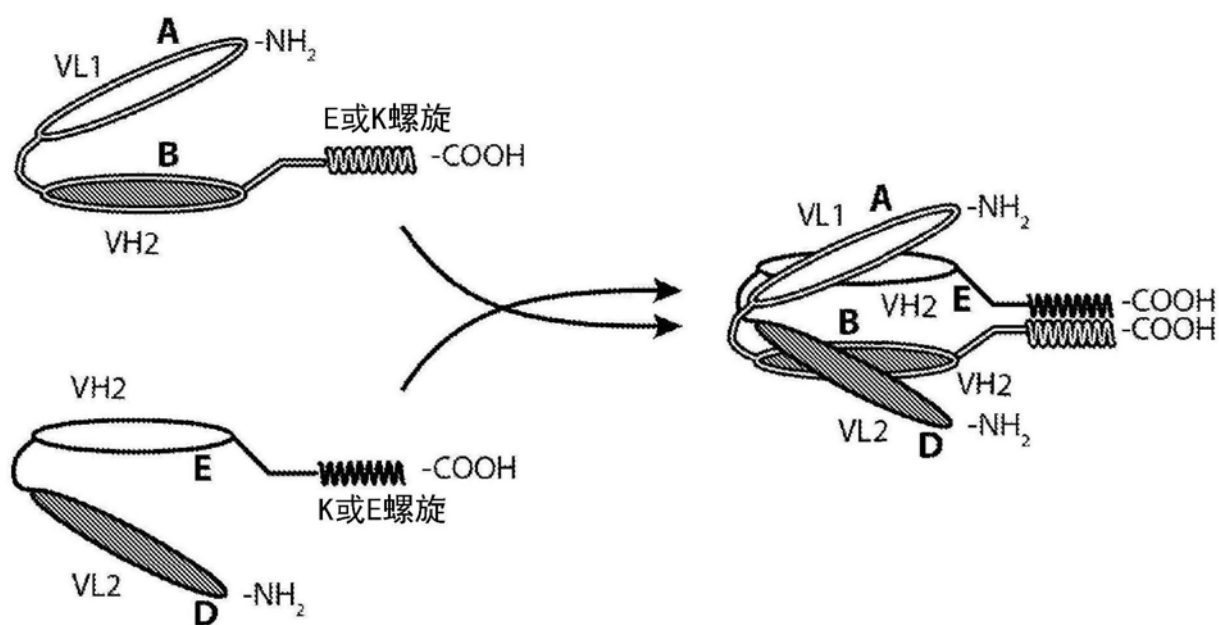


图1B

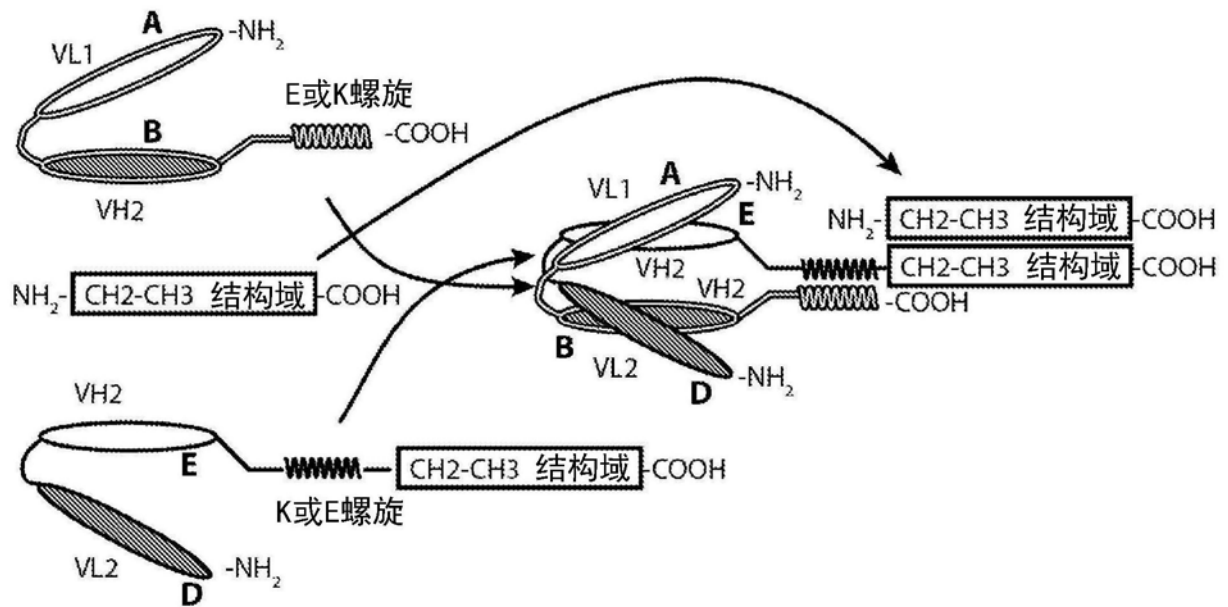
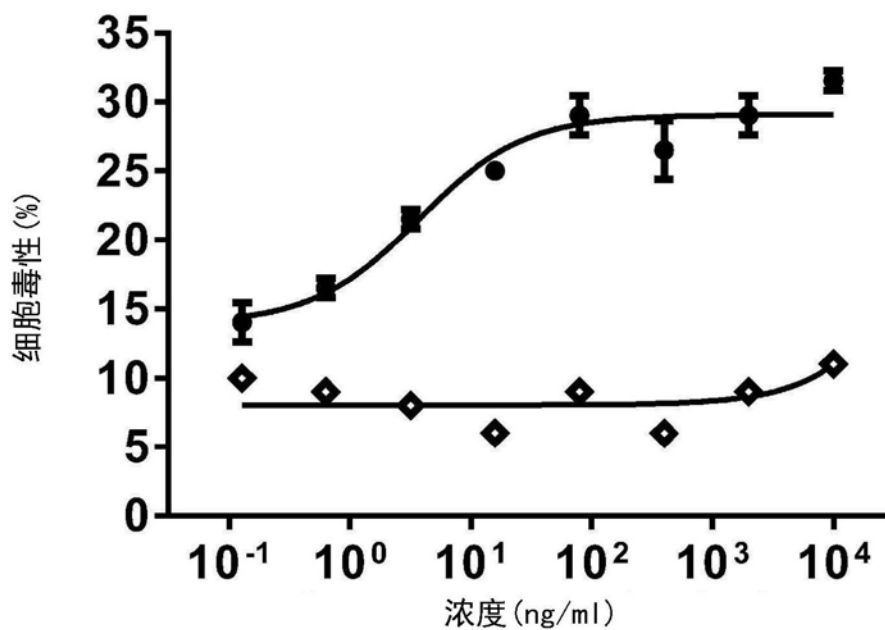


图1C

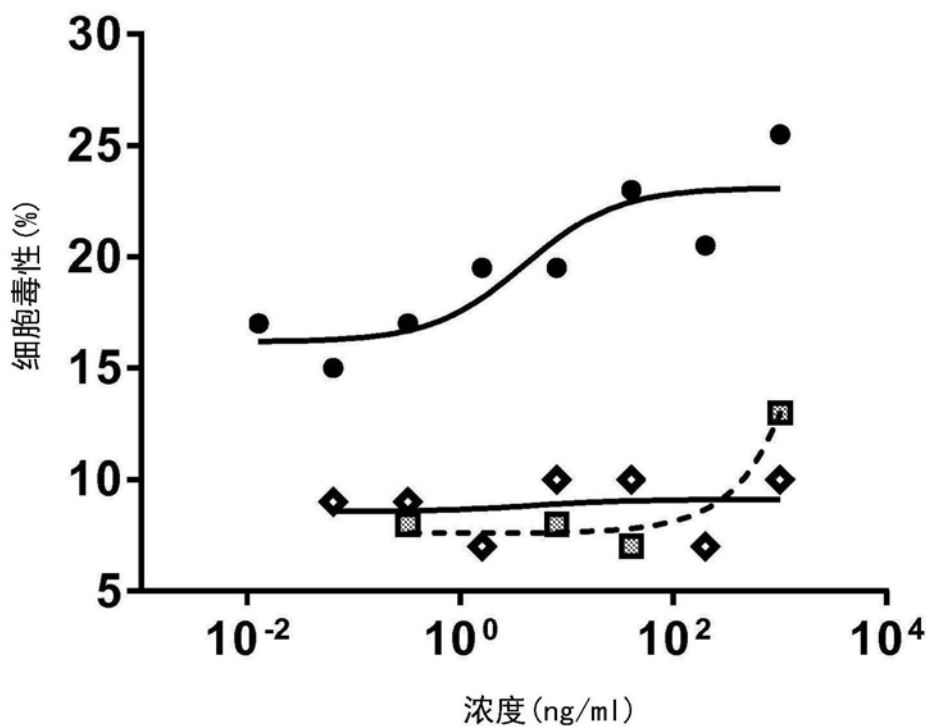
HEK 293 D375 + NK细胞(通过阳性选择纯化)D56678 (LDH) E:T=5:1 24hr



- 抗HIV env (7B2) X抗CD16 (h3G8) 双抗体
- ◆ 抗荧光素(4-4-20) X抗CD16 (h3G8) 双抗体

图2

HEK 293 D375 (5K/孔) + NK细胞(通过阴性选择纯化) D55386 (LDH) E:T=5:1 24hr



- 抗HIV env (7B2) X抗CD16 (h3G8) 双抗体
- 抗HIV env (7B2) X抗CD3 (h抗体2) 双抗体
- ◆ 抗荧光素 (4-4-20) X抗CD16 (h3G8) 双抗体

图3

HEK 293 D371 (5K/孔) + NK细胞(通过阴性选择纯化) D55386 (LDH) E:T=5:1 24h

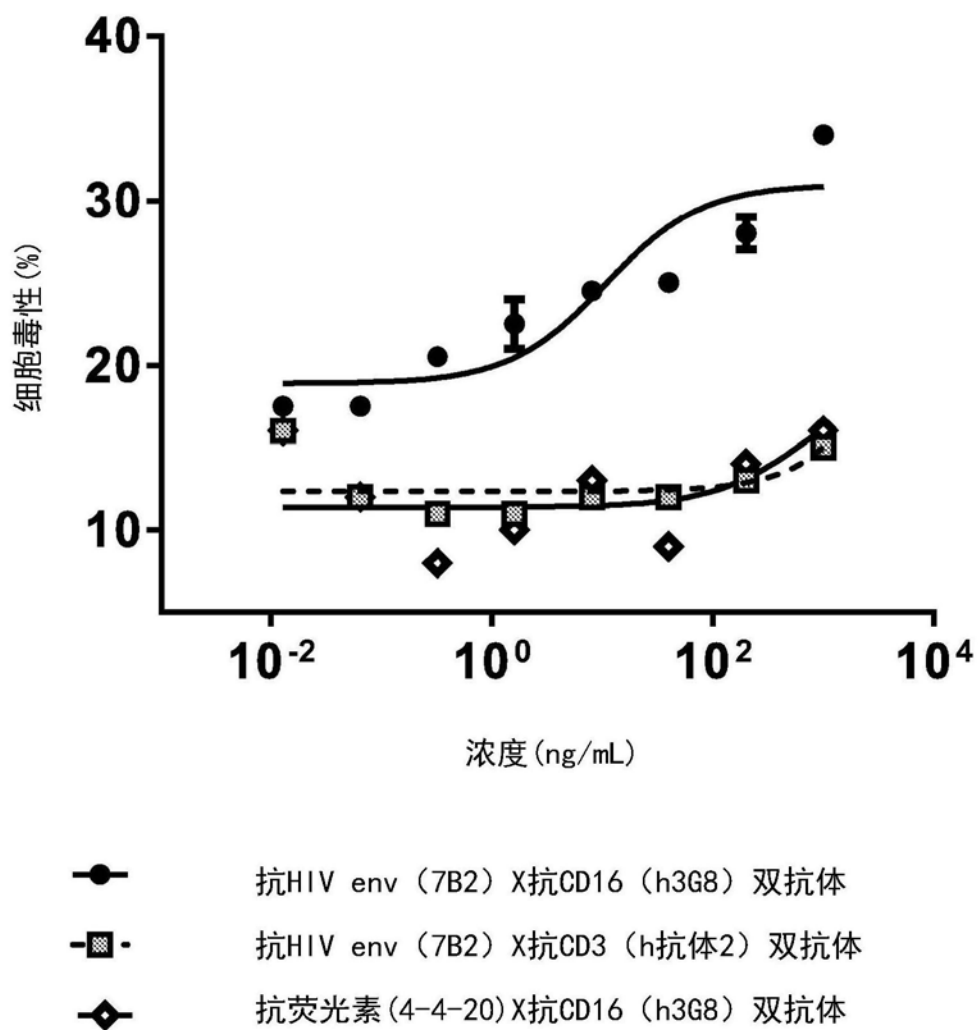


图4

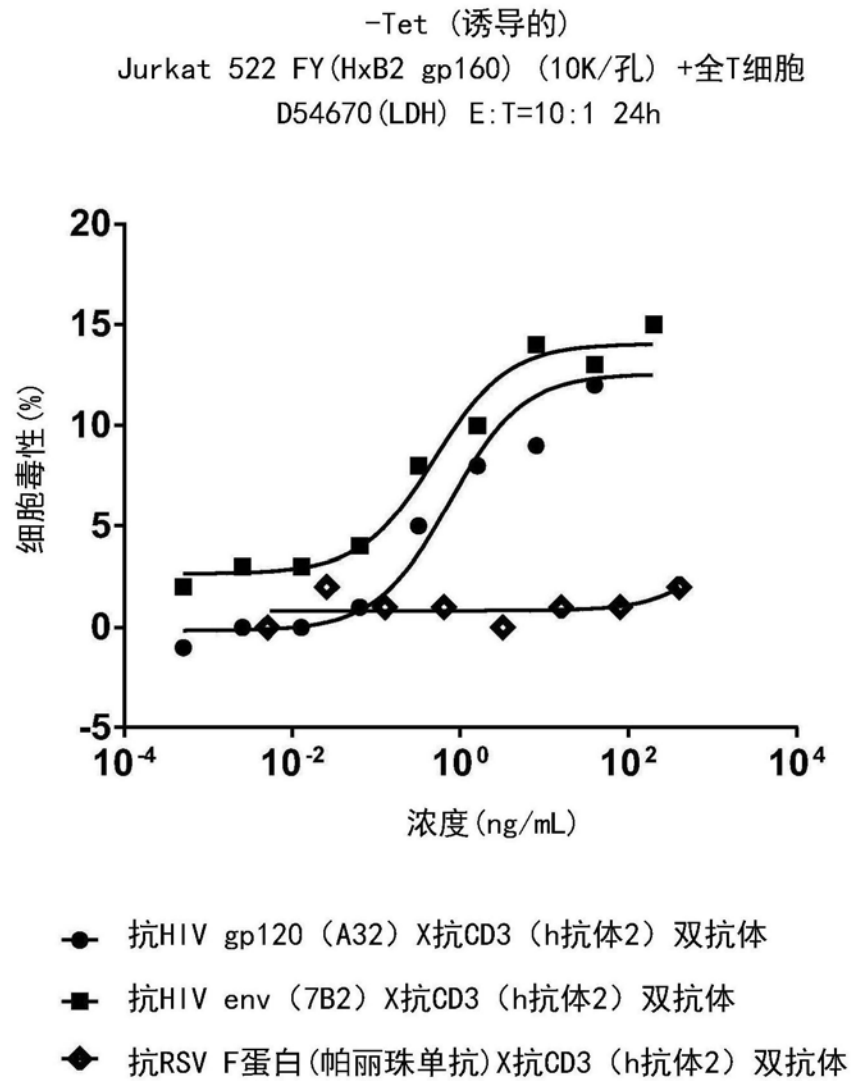


图5

1  $\mu\text{g/mL}$  Dox (诱导的) (CM244)  
 HEK 293 D375 (92Th023 gp140) + 全T细胞  
 D47239 (LDH) E:T=10:1 24h

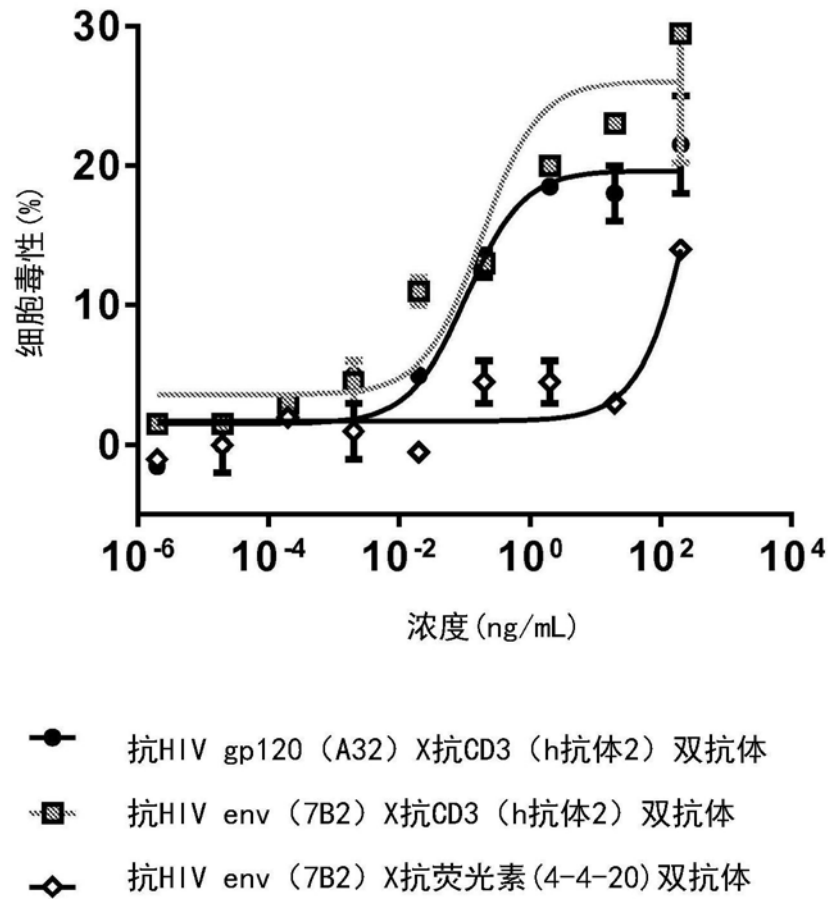


图6

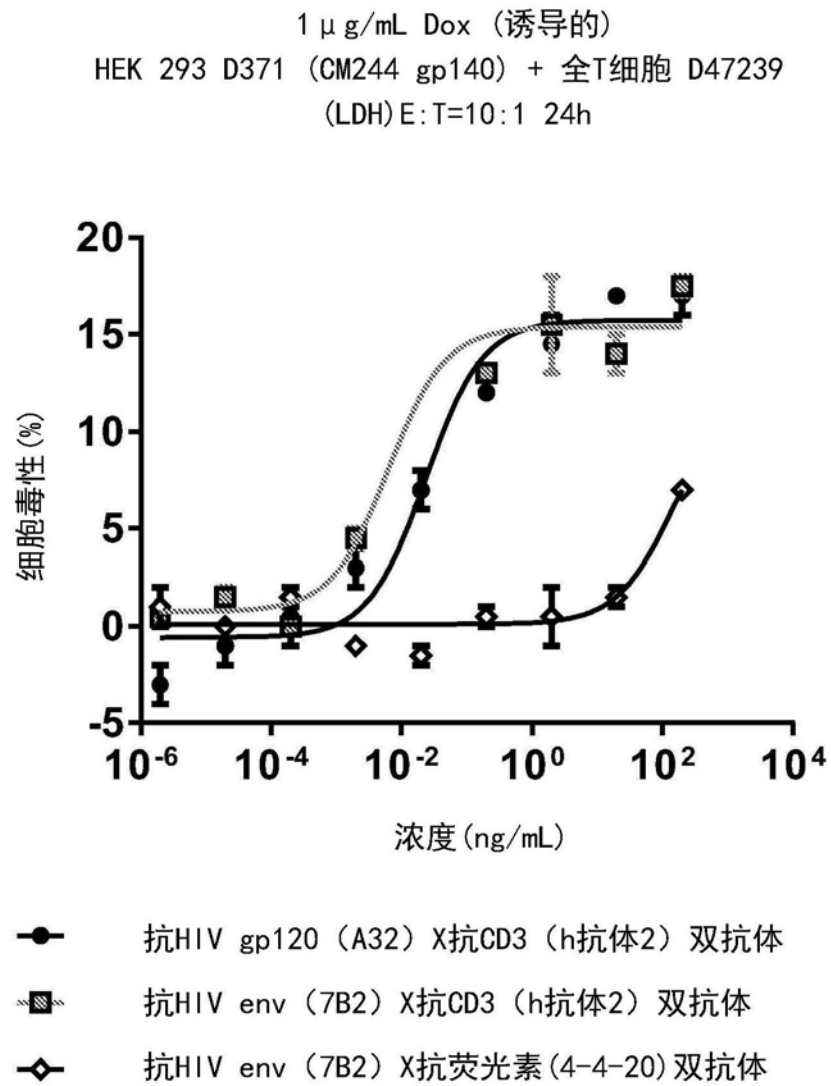


图7