

包含多特异性抗体的治疗剂及其在肿瘤治疗中的应用

技术领域

[0001] 本发明涉及生物医药领域，具体涉及一种包含多特异性抗体的治疗剂及其在肿瘤治疗中的应用。

背景技术

[0002] 根据世界卫生组织（WHO）公布的数据，肿瘤已成为危害人类健康最严重的疾病之一，发病人数持续增加，死亡率高，当前传统的肿瘤治疗手段仍存在许多未被满足的临床需求。溶瘤病毒疗法提供了一种新型肿瘤免疫疗法，溶瘤病毒在肿瘤细胞中选择性的复制，通过直接裂解破坏肿瘤细胞，刺激宿主抗肿瘤免疫反应达到杀伤肿瘤细胞的目的，而不影响正常细胞的生长，为广大恶性肿瘤患者带来希望（Shi T et al., Front Immunol 2020;11:683）。相比较于其他的肿瘤免疫疗法，溶瘤病毒疗法呈现出多种优势包括肿瘤杀伤效率高，靶向性好，耐药低以及成本低等多种优点（Heo et al., 2012）。

[0003] 正如其他抗肿瘤疗法，溶瘤病毒疗法也有一些限制例如病毒递送到靶标，渗透到肿瘤块，以及会引起强烈的抗病毒免疫反应，且会受到物理屏障和宿主免疫力的限制。因此溶瘤病毒疗法常需要配合化疗或者免疫类药物提升治疗效果。全球范围内，已上市或者在研究的溶瘤病毒药物也大多在进行联合用药的实验，例如与免疫检测点或者 CAR-T 细胞治疗联用。

[0004] 双特异性抗体（Bispecific antibody, BsAb）是能同时特异性结合两个抗原或者抗原表位的抗体。自 1960 年 Nisonoff 及其合作者首次提出 BsAb 的概念以来，双特异性抗体随着基因工程抗体技术的逐渐成熟，得到了快速发展。由于 BsAb 可以靶向多个抗原或者抗原表位，相较于单克隆抗体表现出更多的优势，而且也逐渐展现出比单克隆抗体联用疗法更高的疗效。例如，可以将特异性免疫效应细胞重定向到邻近的肿瘤细胞，以增强肿瘤杀伤；而且可以通过两个不同的细胞表面抗原的相互作用增加结合的特异性；同时相较于单一抗体联用来说，可以降低开发成本、临床试验。双特异性抗体现已成为抗体工程领域的研究热点，在肿瘤治疗及自身免疫疾病等领域中具有广泛的应用前景。而且随着技术的发展，靶向更多抗原或更多抗原表位的抗体，例如三特异性抗体或多功能融合抗体等应运而生。

[0005] 尽管多种疗法层出不穷，临床上仍存在未被满足的需求，迫切需要开发新的免疫疗法。

发明内容

[0006] 本发明提供了一种包含多特异性抗体的治疗剂及其在肿瘤治疗中的用途。利用治疗剂中的第一活性成分，使得肿瘤细胞或者癌细胞带有标记性多肽，并利用多特异性抗体识别标记在肿瘤细胞或癌细胞上的标记性多肽，多特异性抗体的另一抗原结合部分能够招募免疫细胞例如 T 细胞、NK 细胞等，实现肿瘤细胞或癌细胞的杀伤。利用本发明所提供的治疗剂能够显著提升肿瘤治疗的效果。进一步地，可以通过施用溶瘤病毒使得肿瘤细胞或者癌细胞带有标记性多肽，在施用多特异性抗体之前即实现肿瘤杀伤作用，在施用多特异性抗体之后显著提升肿瘤治疗的目的。为此，本发明还提供了一种新的免疫疗法，包括分别对受试者施用治疗有效量的溶瘤病毒和多特异性抗体，通过溶瘤病毒疗法和多特异性抗体疗法联合，达到肿瘤治疗的目的。本发明所提供的免疫疗法，将为肿瘤的治疗提供了一种全新的且创造性的疗法。

[0007] 具体而言，本发明提供了如下技术方案：

[0008] 本发明的第一方面提供了一种治疗剂，包含：

[0009] (a) 第一组合物，所述第一组合物包含第一活性成分，第一活性成分包括或含有用于导入肿瘤细胞和/或癌细胞的、具有标记性多肽编码序列的核酸；所述标记性多肽具有可操作地连接的胞外抗原决定区、间隔部分和跨膜部分；所述胞外抗原决定区的氨基酸序列含有一个或多个抗原表位多肽的氨基酸序列；在自然状态下，哺乳动物细胞膜蛋白或分泌蛋白的氨基酸序列不含有所述抗原表位多肽的氨基酸序列；以及

[0010] (b) 第二组合物，所述第二组合物包含第二活性成分，所述第二活性成分包含多特异性抗体，所述多特异性抗体至少包括第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，所述第一抗原结合部分能够特异性识别并结合所述标记性多肽的所述胞外抗原决定区；

[0011] 所述第二抗原结合部分能够特异性识别并结合免疫细胞抗原或第一细胞因子或其受体；

[0012] 所述多特异性抗体还可以选择性地包括第三抗原结合部分，所述第三抗原结合部分特异识别并结合肿瘤抗原或免疫检查点或第二细胞因子或其受体。

[0013] 本发明的第二方面提供了一种多特异性抗体，至少包括第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，所述第一抗原结合部分包含一个或多个能够特异性识别并结合 Strep 标签 I 或者 Strep 标签 II 的氨基酸序列的结构域，所述第二抗原结合部分包含一个或多个能够特异性识别并结合免疫细胞抗原或第一细胞因子或其受体的结构域；所述多特异性抗体还可以选择性的包括第三抗原结合部分，所述第三抗原结合部分包含一个或多个能够特异性识别并结合肿瘤抗原或免疫检查点或第二细胞因子或其受体的结构域。第一抗原结合能够特异性识别并结合 Strep 标签 I 或者 Strep 标签 II，这些标签经过证实在哺乳动物体内不存在或

者几乎不存在，通过使得哺乳动物尤其是人的肿瘤细胞带上相应的标签，第一抗原结合部分能够特异性靶向这些标签，从而使得多特异性抗体可以特异性靶向肿瘤细胞。然后通过第二抗原结合部分招募免疫细胞或者细胞因子或其受体，来特异性杀伤肿瘤细胞，从而得到肿瘤特异性靶向和杀伤的效果。多特异性抗体还可以根据需要进一步包括能够特异性靶向肿瘤抗原或免疫检查点或者细胞因子或其受体的第三抗原结合部分，进一步发挥肿瘤靶向以及杀伤的效果。

[0014] 本发明的第三方面提供了一种多核苷酸，所述多核苷酸编码本发明第二方面所述的多特异性抗体。

[0015] 本发明的第四方面提供了一种构建体，所述构建体包括本发明第三方面所述的多核苷酸。

[0016] 本发明的第五方面提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞包括本发明第四方面所述的构建体。

[0017] 本发明的第六方面提供了一种生产第二方面所述的多特异性抗体的方法，包括：培养第五方面所述的宿主细胞，以及从培养物中收集所述的多特异性抗体。

[0018] 本发明的第七方面提供了一种治疗剂或者多特异性抗体在制备用于治疗肿瘤和/或癌症的药物中的用途，所提到的治疗剂为本发明第一方面所提到的治疗剂，所述多特异性抗体为本发明第二方面所述的多特异性抗体。

[0019] 本发明的第八方面提供了一种用于治疗肿瘤和/或癌症的具有协同作用的联合药物的药盒，包括：第一容器，该第一容器装有根据第一方面所述的治疗剂中的第一组合物；第二容器，该第二容器装有根据第一方面所述的治疗剂中的第二组合物或者装有根据第二方面所述的多特异性抗体，其中所述第一容器和所述第二容器是独立的；以及载明给药时机和给药方式的说明书。

[0020] 本发明的第九方面提供了一种治疗肿瘤和/或癌症的方法，包括：对受试者施用根据第一方面任一项所述的治疗剂中的第一组合物；和对所述受试者施用根据第一方面所述的治疗剂中的第二组合物，或者施用根据第二方面所述的多特异性抗体。

[0021] 本发明的第十方面提供了一种新型免疫疗法，包括：对受试者施用治疗有效量的溶瘤病毒，所述溶瘤病毒的基因组含有标记性多肽的编码序列，所述标记性多肽具有可操作地连接的胞外抗原决定区、间隔部分和跨膜部分，所述胞外抗原决定区的氨基酸序列含有一个或者多个抗原表位多肽的氨基酸序列，在自然状态下，所述受试者细胞膜蛋白或分泌蛋白的氨基酸序列不含有所述抗原表位多肽的氨基酸序列；和

[0022] 对所述受试者施用治疗有效量的多特异性抗体，所述多特异性抗体至少包括第一抗

原结合部分和第二抗原结合部分，所述第一抗原结合部分能够特异性识别并结合所述标记性多肽的所述胞外抗原决定区，所述第二抗原能结合部分能够特异性识别并结合免疫细胞抗原或第一细胞因子或其受体；

[0023] 所述多特异性抗体还可以选择性地包括第三抗原结合部分，所述第三抗原结合部分能够特异性识别并结合肿瘤抗原或免疫检查点或第二细胞因子或其受体。

[0024] 本发明取得了如下有益技术效果：

[0025] 本发明提供了一种治疗剂，其含有第一组合物和第二组合物，第一组合物中包含第一活性成分，其通过外源的标记性多肽来标记肿瘤和/或癌症细胞的表面，并通过第二组合物中的多特异性抗体与该标记性多肽进行识别，通过二者联用的策略，能够有效的杀伤肿瘤细胞。而且当以溶瘤病毒作为载体介导外源的标记性多肽在肿瘤细胞中的表达时，在溶瘤病毒已有的溶瘤杀伤作用上，靶向标记性多肽的多特异性抗体能够有效清除已被溶瘤病毒感染的残余肿瘤细胞。同时由于溶瘤病毒破坏了肿瘤的微环境，多特异性抗体对于肿瘤的杀伤能力会进一步提高，从而显著提升了肿瘤治疗的有效性，尤其是实体瘤的治疗效果。具体地，本发明利用具有胞外抗原决定区、间隔部分和跨膜部分的标记性多肽氨基酸序列，以及编码该标记性多肽的核酸，使得核酸在转染肿瘤细胞和/或癌细胞后、或在将所述核酸插入病毒基因组后使所得到的重组病毒感染肿瘤细胞和/或癌细胞后，肿瘤细胞和/或癌细胞能够表达所述标记性多肽，该标记性多肽会最终修饰在肿瘤细胞和/或癌细胞表面。由于标记性多肽的胞外抗原决定区的氨基酸序列含有一个或多个抗原表位多肽的氨基酸序列，因此能够有效解决实体肿瘤抗原表达的异质性和肿瘤逃避免疫监视的问题。同时与能够识别胞外抗原决定区的多特异性抗体联用，利用多特异性抗体识别并结合免疫细胞，实现免疫细胞与肿瘤细胞桥联，并特异性地杀伤肿瘤细胞。而且相较于通过 CAR 修饰的免疫细胞的杀伤，通过多特异性抗体介导的免疫细胞的杀伤，能够极大的降低药物成本以及毒副作用。尤其是 CAR-T 细胞在机体内具有较长的存活时间，靶向标记性多肽的 CAR-T 细胞在机体内的持续存在会阻碍后续编码标记性多肽的核酸或重组病毒的多次给药；而多特异性抗体具有一定的半衰期，在体内不会持续存在，可以更加灵活的通过调整给药周期和频率来维持多特异性抗体在体内的药物浓度。

[0026] 进一步地，当以溶瘤病毒为载体，利用溶瘤病毒能够特异性的在肿瘤细胞中复制从而将所述标记性多肽编码核酸导入肿瘤细胞和/或癌细胞，使得溶瘤病毒在杀伤肿瘤细胞和/或癌细胞作用的同时，能够显著加强上述抗原表位肽在肿瘤细胞表面的表达，进而与多特异性抗体招募的免疫细胞联合表现出协同治疗效果，更重要的是避免了对正常组织的脱靶（on-target off-tumor）作用。溶瘤病毒破坏了肿瘤的微环境，使得多特异性抗体对于肿瘤细

胞的杀伤能力得到进一步提高，从而提升了肿瘤（特别是实体瘤）治疗的有效性。此外，多特异性抗体还可以有效清除被溶瘤病毒感染后，不能完成复制周期并产生足够数量的子病毒而发生裂解的肿瘤细胞；由此实现了更进一步的协同作用。此外，被溶瘤病毒裂解的肿瘤细胞所释放的抗原可进一步激活机体自身的抗肿瘤免疫，从而可实现比单独使用溶瘤病毒或多特异性抗体表现出更好的肿瘤杀伤效果，实现了协同治疗效果。

[0027] 在进一步的发明中，本发明对靶向标记性多肽的多特异性抗体的氨基酸序列和/或蛋白质结构进行了改进，包括对第一抗原结合部分和第二抗原结合部分和重链/轻链恒定结构域进行了人源化改造，使本发明的治疗剂的免疫原性降低。此外，通过对多特异性抗体抗体的第一抗原结合部分和第二抗原结合部分进行改造，改进了至少这两部分与靶抗原的亲和力，使得多特异性抗体不仅可以有效地起到抗肿瘤的效果，还可以避免对免疫细胞抗原过度亲和所引起的免疫风暴等安全性问题。例如，通过对靶向标记性多肽的第一抗原结合部分的人源化改造，在保证与标记性多肽靶抗原亲和的同时有效降低可能引起的免疫原性，从而可以降低在人体内产生的风险，而且与标记性多肽靶抗原保持在非常高的亲和水平，从而可以保证多特异性抗体的肿瘤杀伤能力；并且，通过对靶向免疫细胞抗原的第二抗原结合部分的人源化改造，使得多特异性抗体在招募免疫细胞时，对于免疫细胞上的靶抗原的亲和活性维持在一个比较适中的水平，从而可以在实现肿瘤杀伤的同时避免产生安全问题。本发明的设计和筛选使得多特异性抗体整体表现出特别适宜的亲和力。经过改造后的多特异性抗体具有优异的抗肿瘤效果以及安全性。

附图说明

[0028] 图 1 是根据本发明的实施例提供的一种利用治疗剂发挥治疗效果的示意图。

[0029] 图 2 是根据本发明的实施例提供的一种双特异性抗体的结构示意图，其中 a 为其中一种双特异性抗体的结构示意图，b 为另一种双特异性抗体的结构示意图。

[0030] 图 3 是根据本发明的实施例提供的一种双特异性抗体的结构示意图，其中第一抗原结合部分中灰色椭圆形代表 VL，黑色椭圆形代表 VH。

[0031] 图 4 是根据本发明的实施例提供的一种双特异性抗体的结构示意图，其中第一抗原结合部分中灰色椭圆形代表 VL，黑色椭圆形代表 VH。

[0032] 图 5 是根据本发明的实施例 1 提供的利用 FACS 检测双特异性抗体与 T 细胞的结合活性结果。图 5 中 A 至 D 均为流式直方图，其中图 5 中 A 为未添加抗体染色的流式检测图谱（空白对照），图 5 中 B 为添加同型对照抗体染色的流式检测图谱（阴性对照），图 5 中 C 为添加抗 CD3 单抗染色的流式检测图谱（阳性对照），图 5 中 D 为添加双抗染色的流式检测图谱（双抗）。图中横坐标为流式细胞仪所显示的荧光强度读数，纵坐标表示相对

细胞数。

[0033] 图 6 是根据本发明的实施例 1 提供的利用 FACS 检测双特异性抗体与野生型 HCT116 细胞株的结合活性结果。图 6 中 A 为空白对照,图 6 中 B 为 0.1nM 双抗染色结果,图 6 中 C 为 1nM 双抗染色结果,图 6 中 D 为 10nM 双抗染色结果,图 6 中 E 为 100nM 双抗染色结果。图中横坐标为流式细胞仪所显示的荧光强度读数,纵坐标表示相对细胞数。

[0034] 图 7 是根据本发明的实施例 1 提供的利用 FACS 检测双特异性抗体与 HCT116-TT3 细胞株的结合活性结果。图 7 中 A 为空白对照,图 7 中 B 为 0.1nM 双抗染色结果,图 7 中 C 为 1nM 双抗染色结果,图 7 中 D 为 10nM 双抗染色结果,图 7 中 E 为 100nM 双抗染色结果。图中横坐标为流式细胞仪所显示的荧光强度读数,纵坐标表示相对细胞数。

[0035] 图 8 是根据本发明的实施例 1 提供的双特异性抗体与 TT3 端以及 CD3 端的亲和结果图,其中 A、B、C 为不同的双特异性抗体与 CD3 端的亲和结果,D、E、F 为不同的双特异性抗体与 TT3 端的亲和结果。

[0036] 图 9 是根据本发明的实施例 1 提供的利用 FACS 检测双特异性抗体与野生型肿瘤细胞株 HCT116 (图 9 中 A 所示)和 MC38 (图 9 中 B 所示)的结合特异性结果。双特异性抗体的浓度为 10nM (白色)和 100nM (黑色斜杠)。图中横坐标为不同的单抗或双特异性抗体,纵坐标表示抗体结合百分比。

[0037] 图 10 是根据本发明的实施例 2 提供的通过 RTCA 实时杀伤仪检测双特异性抗体和预先活化扩增的 T 细胞体外联合杀伤结果图。图中横坐标为时间,以小时计,以肿瘤细胞株铺板作为起始时间;纵坐标为细胞生长指数;效应细胞:靶细胞 (E:T)=2:1;图中展示每个点为双复孔的均值。

[0038] 图 10 中 A 为抗 CD3 单抗与 T 细胞体外联合杀伤野生型 HCT116 细胞株的结果,黑色圆圈代表 HCT116 组 (HCT116),深灰色三角形代表 HCT116+T 细胞组 (HCT116+T),灰色方形代表 HCT116+T 细胞+10nM 抗 CD3 单抗组 (HCT116+T+10nM CD3 Ab),浅灰色倒三角形代表 HCT116+T 细胞+1nM 抗 CD3 单抗组 (HCT116+T+1nM CD3 Ab),灰白色菱形代表 HCT116+T 细胞+0.1nM 抗 CD3 单抗组 (HCT116+T+0.1nM CD3 Ab)。

[0039] 图 10 中 B 为双抗与 T 细胞体外联合杀伤野生型 HCT116 细胞株的结果,黑色圆圈代表 HCT116 组 (HCT116),灰色方形代表 HCT116+T 细胞+10nM 双抗组 (HCT116+T+10nM BK-A-101),浅灰色倒三角形代表 HCT116+T 细胞+1nM 双抗组 (HCT116+T+1nM BK-A-101),灰白色菱形代表 HCT116+T 细胞+0.1nM 双抗组 (HCT116+0.1nM+BK-A-101)。

[0040] 图 10 中 C 为抗 CD3 单抗与 T 细胞体外联合杀伤 HCT116-TT3 细胞株的结果,黑色圆圈代表 HCT11-TT3 组 (HCT116-TT3),深灰色三角形代表 HCT116-TT3+T 细胞组

(HCT116-TT3+T)，灰色方形代表 HCT116-TT3+T 细胞+10nM 抗 CD3 单抗组 (HCT116-TT3+T+10nM CD3 Ab)，浅灰色倒三角形代表 HCT116-TT3+T 细胞+1nM 抗 CD3 单抗组 (HCT116-TT3+T+1nM CD3 Ab)，灰白色菱形代表 HCT116-TT3+T 细胞+0.1nM 抗 CD3 单抗组 (HCT116-TT3+T+0.1nM CD3 Ab)。

[0041] 图 10 中 D 为双抗与 T 细胞体外联合杀伤 HCT116-TT3 细胞株的结果，黑色圆圈代表 HCT116-TT3 组 (HCT116-TT3)，灰色方形代表 HCT116-TT3+T 细胞+10nM 双抗组 (HCT116-TT3+T+10nM BK-A-101)，浅灰色倒三角形代表 HCT116-TT3+T 细胞+1nM 双抗组 (HCT116-TT3+T+1nM BK-A-101)，灰白色菱形代表 HCT116-TT3+T 细胞+0.1nM 双抗组 (HCT116-TT3+T+0.1nM BK-A-101)。

[0042] 图 11 是根据本发明的实施例 2 提供的通过 RTCA 检测双特异性抗体和 T 细胞体外联合杀伤结果图。图中横坐标为时间，以小时计，以肿瘤细胞株铺板作为起始时间；纵坐标为细胞生长指数；效应细胞：靶细胞 (E:T)=5:1。图 A 的双抗浓度为 0.1nM，图 B 的双抗浓度为 1nM。标号 1-9 分别代表 HCT116-TT3+T 细胞+双抗 BK-D-01~BK-D-09 组，标号 10 代表 HCT116-TT3+T 细胞+BK-A-101 组，标号 11 代表仅为 HCT116-TT3 细胞，未加入双抗和 T 细胞处理，标号 12 代表 HCT116-TT3 细胞中仅加入 T 细胞处理，未加入双抗。

[0043] 图 12 是根据本发明的实施例 2 提供的通过 RTCA 检测双特异性抗体和 T 细胞体外联合杀伤结果图。图中横坐标为时间，以小时计，以肿瘤细胞株铺板作为起始时间；纵坐标为细胞生长指数；效应细胞：靶细胞 (E:T)=5:1。图 A 的双抗浓度为 100nM，肿瘤细胞株为 HCT116 细胞株；图 B 的双抗浓度为 10nM，肿瘤细胞株为 SKHEP1 细胞株。其中标号 1-6 分别代表野生型肿瘤细胞株+T 细胞+双抗 BK-D-01、04、05、06、07、08 组，标号 7 代表野生型肿瘤细胞株+T 细胞+TT3 单抗-1 组，标号 8 代表野生型肿瘤细胞株+T 细胞+CD3 单抗 SP34 组，标号 9 代表仅为野生型肿瘤细胞株细胞，未加入抗体和 T 细胞处理，标号 10 代表野生型肿瘤细胞株细胞中仅加入 T 细胞处理，未加入抗体。

[0044] 图 13 是根据本发明的实施例 3 提供的通过 RTCA 检测双特异性抗体和 PMBC 细胞体外联合杀伤结果图。图中横坐标为时间，以小时计，以肿瘤细胞株铺板作为起始时间；纵坐标为细胞生长指数；效应细胞：靶细胞 (E:T)=2:1；图中展示的点为双复孔的均值。黑色圆圈 (标号 1) 代表 HCT116-TT3 组 (HCT116-TT3)，深灰色方形 (标号 2) 代表 HCT116-TT3+PBMC 组 (HCT116-TT3+PBMC)，灰色三角形 (标号 3) 代表 HCT116-TT3+PBMC+10nM 双抗组 (HCT116-TT3+PBMC+10nM BK-A-101)，灰白色倒三角形 (标号 4) 代表 HCT116-TT3+PBMC+1nM 双抗组 (HCT116-TT3+PBMC+1nM BK-A-101)。

[0045] 图 14 是根据本发明的实施例 4 提供的利用 FACS 检测 DDvv-TT3 感染肿瘤细胞株

后与双特异性抗体 BK-A-101 的结合活性结果。图 A 为人胰腺癌细胞株 (PANC-1) 的检测结果, 图 B 为人黑素瘤细胞株 (A375) 的检测结果, 图 C 为人脑胶质瘤细胞株 (U251) 的检测结果, 图 D 为人卵巢癌细胞株 (SKOV3) 的检测结果。图中横坐标为 DDvv-TT3 不同的感染 MOI, 纵坐标为在细胞群体的流式阳性百分比。圆形代表同型对照抗体染色检测的结果 (阴性对照), 方形代表双抗染色检测的结果 (BK-A-101), 三角形代表商业化抗体 (金斯瑞) 染色检测的结果 (阳性对照)。

[0046] 图 15 是根据本发明的实施例 5 提供的利用 FACS 检测双特异性抗体刺激体外培养 T 细胞和 PBMC 活化的结果。双特异性抗体的浓度为 0.01nM (白色)、0.1nM (黑色斜杠)、1nM (黑点)、10nM (黑色横杠)、100nM (黑色交叉线)、250nM (黑色网格)。图 A 为体外培养 T 细胞的结果, 图 B 为 PBMC 的结果。横坐标为不同的双特异性抗体, 纵坐标表示 T 细胞表面早期活化标记物 CD25 的表达比例。

[0047] 图 16 是根据本发明的实施例 5 提供的利用 ELISA 检测双特异性抗体和 PBMC 共培养 3 天后上清中 IFN- γ 的含量。双特异性抗体的浓度为 0.1nM (黑点)、1nM (黑色网格)、10nM (黑色竖杠)、100nM (黑色斜杠)、250nM (黑色交叉线)。图 A 为双特异性抗体和 PBMC 共培养 3 天的上清检测结果, 图 B 为双特异性抗体和 PBMC 及 SKHEP1 细胞株共培养 3 天的上清检测结果, 图 C 为双特异性抗体和 PBMC 及 SKHEP1-TT3 细胞株共培养 3 天的上清检测结果。图中横坐标为 CD3 单抗 SP34 和不同的双特异性抗体 BK-A-101 及 BK-D-01、04、05、06、07、08, 纵坐标表示共培养上清中 IFN- γ 的含量 (pg/mL)。

[0048] 图 17 是根据本发明的实施例 6 提供的通过 RTCA 检测双特异性抗体和 T 细胞及重组溶瘤痘病毒体外联合杀伤结果图。图 A 和 C 为体外实时杀伤结果, 图中横坐标为时间, 以小时计, 以肿瘤细胞株铺板作为起始时间, 纵坐标为细胞生长指数。效应细胞: 靶细胞 (E:T) = 10:1, 双特异性抗体的浓度为 1nM, 重组溶瘤痘病毒 DDvv-TT3 的 MOI 为 1。图 B 和 D 为体外实时杀伤 80 个小时节点处肿瘤抑制率结果图, 图中横坐标为不同实验组, 纵坐标为肿瘤生长抑制率。图 A 和 B 为野生型 HCT116 细胞株, 图 C 和 D 为野生型 HCT116 细胞株+DDvv-TT3。图 A 中标号 1 为 HCT116 组, 标号 2 为 HCT116+T 细胞组, 标号 3-5 为 HCT116+T 细胞+双特异性抗体 BK-D-04、06、07, 标号 6 为 HCT116+T 细胞+BK-A-101; 图 C 中标号 1 为 HCT116 组, 标号 2 为 HCT116+DDvv-TT3 组, 深标号 3 为 HCT116+DDvv-TT3+T 组, 标号 4-6 为 HCT116+ DDvv-TT3+T 细胞+双特异性抗体 BK-D-04、06、07, 标号 7 为 HCT116+ DDvv-TT3+T 细胞+BK-A-101 组。

[0049] 需要说明的是, 图 11、图 12、图 3 以及图 17 等中的相同的数字标号 (例如 1, 2, 3 等) 并非对应完全相同内容, 每个附图中的数字标号所代表的含义已在上文列出。

具体实施方式

[0050] 下面结合具体示例对于本发明的技术方案进行详细说明。同时，为了方便本领域技术人员理解，对于本发明的一些术语进行解释和说明，需要说明的是，这些解释和说明仅用来方便本领域技术人员的理解，而不应看作是本发明保护范围的限制。

[0051] 如本说明书和权利要求书中所使用的，“一个”、“一种”和“该”包括复数指代物，除非上下文明确地指示其他的情况。词语“肿瘤”、“癌症”、“肿瘤细胞”、“癌细胞”涵盖本领域通常认为的含义。

[0052] 本文所用的词语“溶瘤病毒”是指能够选择性地肿瘤细胞中复制并裂解肿瘤细胞的病毒。

[0053] 本文中术语“治疗有效量”是指药物或者制剂或者活性成分能够表现出可检测的治疗效果或抑制效果的量。所提到的可检测的治疗效果或抑制效果，可以通过本领域任何已知的检测方法检测。

[0054] 术语“第一”、“第二”、“第三”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量，也不用来表示先后顺序。例如第一组合物和第二组合物、第一活性成分和第二活性成分，并不表示先后顺序，也不用来表征重要性，仅用来区分。

[0055] 本文中，术语“MOI”或“感染复数”（Multiplicity of infection）即病毒与细胞个数比，是指平均每个细胞感染病毒的病毒颗粒数。 $MOI = \text{pfu}/\text{细胞}$ 。PFU（Plaque forming unit）为噬斑形成单位，用于描述具有感染活性的病毒颗粒数。

[0056] 本发明提供了一种治疗剂，包含：

[0057] （a）第一组合物，所述第一组合物包含第一活性成分，第一活性成分包括或含有用于导入肿瘤细胞和/或癌细胞的、具有标记性多肽编码序列的核酸；所述标记性多肽具有可操作地连接的胞外抗原决定区、间隔部分和跨膜部分；所述胞外抗原决定区的氨基酸序列含有一个或多个抗原表位多肽的氨基酸序列；在自然状态下，哺乳动物细胞膜蛋白或分泌蛋白的氨基酸序列不含有所述抗原表位多肽的氨基酸序列；以及

[0058] （b）第二组合物，所述第二组合物包含第二活性成分，所述第二活性成分包含多特异性抗体，所述多特异性抗体至少包括第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，所述第一抗原结合部分能够特异性识别并结合所述标记性多肽的所述胞外抗原决定区；

[0059] 所述第二抗原结合部分能够特异性识别并结合免疫细胞抗原或第一细胞因子或其受体；

[0060] 所述多特异性抗体还可以选择性地包括第三抗原结合部分，所述第三抗原结合部分

特异识别并结合肿瘤抗原或者免疫检查点或第二细胞因子或其受体。

[0061] 为了更方便理解，图 1 中示出了通过所提供的治疗剂发挥治疗作用的示意图，在图 1 中以 IgG 样双抗（IgG-like bispecific antibody）作为示例，TT3 作为一种标记性多肽的示例进行说明。一种人工合成的哺乳动物细胞膜蛋白或分泌蛋白的氨基酸序列中不含有的抗原表位多肽（抗原表位多肽作为胞外抗原决定区的至少一部分，和间隔部分以及跨膜部分形成 TT3 标记性多肽）被携带至肿瘤细胞，并被标记在肿瘤细胞表面。双特异性抗体一方面能够特异性识别并结合 TT3，另一方面能够特异性识别并结合免疫细胞，例如图中所示出的 T 细胞、NK 细胞。通过双特异性抗体连接免疫细胞和肿瘤细胞，以便重定向溶解肿瘤细胞（Redirected tumour lysis），并活化免疫细胞，产生包括穿孔素（Perforin）和颗粒酶（granzymes）在内的细胞毒性分子，以杀伤肿瘤细胞，从而发挥特异性杀伤作用。需要说明的是，图 1 中所示出的仅以 IgG 样双抗作为示例，并不代表本文中所提到的多特异性抗体为特定的该 IgG 型结构。

[0062] 当以溶瘤病毒作为载体，利用溶瘤病毒特异性在肿瘤中复制从而将标记性多肽在肿瘤细胞或癌细胞中表达时，使得溶瘤病毒在杀伤肿瘤细胞或癌细胞作用的同时，显著加强抗原表位肽在肿瘤细胞表面的表达，进而与抗体桥联的免疫细胞联合表现出协同治疗的效果。

[0063] 标记性多肽

[0064] 本文中所提到的标记性多肽记载在国际申请号为 PCT/CN2019/102480，国际公开号为 WO2020038490A 的 PCT 专利申请中，现根据需要将其全部或者部分引用在本文中。所提到的标记性多肽用于修饰肿瘤细胞和/或癌细胞表面，其具有可操作地连接的胞外抗原决定区、间隔部分和跨膜部分，能够经表达而修饰在肿瘤细胞和/或癌细胞的表面；所述胞外抗原决定区的氨基酸序列含有一个或多个抗原表位多肽的氨基酸序列；其中在自然状态下，哺乳动物细胞膜蛋白或分泌蛋白的氨基酸序列不含有所述抗原表位多肽的氨基酸序列。

[0065] 本文所用的术语“胞外抗原决定区”是指标记性多肽在表达于细胞表面时，位于细胞膜以外的含有抗原表位多肽的部分。

[0066] 根据本发明的实施方式，所述抗原表位多肽的氨基酸序列来源于自然界存在的蛋白的氨基酸序列，或者为人工合成的自然界不存在的氨基酸序列。其中，自然界存在的蛋白包括哺乳动物细胞内蛋白和除哺乳动物外的其它生物的蛋白。除哺乳动物外的其它生物的蛋白包括病毒蛋白、细菌蛋白、真菌蛋白、原动物蛋白、植物蛋白、昆虫蛋白、以及除哺乳动物外的其它动物蛋白。

[0067] 在本发明的一些实施方案中，所述抗原表位多肽的氨基酸序列来源于以下标签的氨

氨基酸序列：Myc 标签、HA 标签、Strep 标签 I、Strep 标签 II、Flag 标签、HAT 标签、S 标签、SI 标签、蛋白 C 标签、tag-100 标签、E2 标签、TAP 标签、HSV 标签、KT3 标签、V5 标签、VSV-G 标签、His 标签或 RFP 标签等。这些标签的氨基酸序列和核苷酸序列均为已知的，可以由本领域常用的公开数据库查询到。

[0068] 在本发明的优选实施方案中，所述抗原表位多肽的氨基酸序列来源于以下标签的氨基酸序列：人 Myc 标签（相应的标记性多肽记为 TT1）、流感病毒 HA 标签（相应的标记性多肽记为 TT2）、Strep 标签 II（相应的标记性多肽记为 TT3）、或者 Strep 标签 I。所提到的 Strep 标签 I 或者 Strep 标签 II，其氨基酸序列的长度至少为 3 个氨基酸，例如 3 个氨基酸、4 个氨基酸、5 个氨基酸、6 个氨基酸、7 个氨基酸、8 个氨基酸、9 个氨基酸、10 个氨基酸、或者 11 个、12 个、13 个、14 个或者 15 个氨基酸，并且其中可包含 NWSHPQFEK（SEQ ID NO:59）或者 AWRHPQFGG（SEQ ID NO:60）所示序列来源的氨基酸，还可以是 SEQ ID NO:59 或者 SEQ ID NO:60 所示序列的部分序列或者部分序列的组合。更具体而言，Strep 标签 II 的氨基酸序列可为（例如）WSHPQFEK（SEQ ID NO:58）、NWSHPQFEK（SEQ ID NO:59）所示。所提到的 Strep 标签 I 的氨基酸序列可为（例如）AWRHPQFGG（SEQ ID NO:60）所示。还优选地，所述抗原表位多肽的氨基酸序列与人 Myc 蛋白的第 410 位-第 419 位氨基酸序列一致；或者所述抗原表位多肽的氨基酸序列与流感病毒 HA 蛋白的第 119 位-第 127 位氨基酸序列一致；或者所述抗原表位多肽的氨基酸序列与 Strep 标签 II（Strep 标签 II 的详细描述见文献“Molecular Interaction Between the Strep-tag Affinity Peptide and its Cognate Target, Streptavidin, Thomas G. M. Schmidt, Jurgen Koepke, Ronald Frank and Arne Skerra”）一致。在本发明另一些实施方案中，TT1 和 TT2 的抗原表位多肽的氨基酸序列可向上游序列的上下游扩展不超过 10 个氨基酸。其中，人 Myc 蛋白的氨基酸序列可为 UniProtKB 中编号为 P01106 isoform1 的氨基酸序列。流感病毒 HA 蛋白的氨基酸序列可为 UniProtKB 中编号为 Q03909 的氨基酸序列。

[0069] 在一个具体实施方案中，所述标记性多肽的胞外抗原决定区的氨基酸序列包括一个或多个所述抗原表位多肽的氨基酸序列，其中当所述标记性多肽的胞外抗原决定区的氨基酸序列包括多个所述抗原表位多肽的氨基酸序列时，每两个相邻的所述抗原表位多肽之间是可操作地连接的，例如可以采用接头连接，也可以不采用接头而直接连接。所述接头的氨基酸序列可以为（例如）：G（如标记性多肽 Cl&2a、Cl&2b 中所采用）、GGG（如 Cl&2a、Cl&2b 中所采用）、GGGGSGGGGS（如 TT1-TT3 中所采用）。

[0070] 为了增强标记性多肽的免疫原性，所述标记性多肽的胞外抗原决定区优选包含 n 个抗原表位多肽，其中 n 为大于等于 1 的整数，例如 n=1、2、3、4...。优选的是，n 为 1-10

之间的整数；还优选的是，n 为 2-5 之间的整数；还优选的是，n=2 或 3。例如，所述标记性多肽的胞外抗原决定区可以包含 3 个重复的来源于 Myc 标签的抗原表位多肽（参见（例如）TT1），或包含 3 个重复的来源于 HA 标签的抗原表位多肽（参见（例如）TT2），或包含 3 个重复的来源于 Strep 标签 II 的抗原表位多肽（参见（例如）TT3）、或包含 3 个重复的来源于 Myc 标签的抗原表位多肽以及 3 个重复的来源于 HA 标签的抗原表位多肽（参见（例如）Cl&2a）、或包含 2 个重复的来源于 Myc 标签的抗原表位多肽以及 2 个重复的来源于 HA 标签的抗原表位多肽（参见（例如）Cl&2b）。

[0071] 在本发明的一个实施方案中，所述胞外抗原决定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 1（对应于 TT1）、SEQ ID NO:2（对应于 TT2）、SEQ ID NO:3（对应于 TT3）、SEQ ID NO:4（对应于 Cl&2a）、SEQ ID NO: 5 所示（对应于 Cl&2b）。

[0072] 优选地，所述跨膜部分来源于 CD8、CD3 ζ 、CD4 或 CD28 的跨膜区，其全长氨基酸序列和核苷酸序列均为已知的，可以由本领域常用的公开数据库查询到。还优选地，所述跨膜部分来源于人 CD8 α 的跨膜区。更优选地，所述跨膜部分的氨基酸序列包含如 SEQ ID NO:7 所示的氨基酸序列。CD8 为跨膜的糖基化膜蛋白，由 α 和 β 两个亚基组成，与 T 细胞表面受体共同作用使 T 细胞与特定抗原结合，CD8 特异性结合 MHC I，介导细胞毒性 T 细胞的杀伤作用。跨膜区通常为跨越细胞膜的疏水性 α 螺旋。

[0073] 在本发明的标记性多肽中，所述跨膜部分与所述胞外抗原决定区可以通过间隔部分相连。这一区域的结构应该是易弯曲的，这样可以使胞外抗原决定区适应不同的方向，以促进相应的多特异性抗体的识别和结合。形式最简单的间隔部分是免疫球蛋白 IgG1 的铰链区，也可以是免疫球蛋白 CH₂CH₃ 区的一部分。通过研究和实验摸索发现，所述间隔部分优选来自 CD8 α 的铰链区，并且所述跨膜区优选来自 CD8 α 的跨膜区。优选地，所述间隔部分的氨基酸序列如 SEQ IDNO: 6 所示。还优选地，所述间隔部分和跨膜部分构成间隔跨膜部分，并且其中所述间隔跨膜部分的氨基酸序列与 CD8 α 的第 Y 位-第 210 位氨基酸序列一致，且 $118 \leq Y \leq 128$ ，Y 为整数。其中，CD8 α 的氨基酸序列的 UniProtKB 编号可为 P01732。也就是说，所述间隔跨膜部分的氨基酸序列优选选自 CD8 α 的第 118-210 位氨基酸、并且包含第 128-210 位氨基酸。例如，所述间隔跨膜部分的氨基酸序列如以下氨基酸序列组中任一氨基酸序列所示：CD8 α 的第 118-210 位氨基酸、第 119-210 位氨基酸、第 120-210 位氨基酸、第 121-210 位氨基酸、第 122-210 位氨基酸、第 123-210 位氨基酸、第 124-210 位氨基酸、第 125-210 位氨基酸、第 126-210 位氨基酸、第 127-210 位氨基酸、或第 128-210 位氨基酸。

[0074] 本文所用的术语“间隔部分”和“跨膜部分”的定义是本领域已知的，具体可参考

“《免疫学导论》，于善谦，高等教育出版社，2008”；以及“《Immunobiology》，第七版，Kenneth Murphy, Paul Travers, Mark Walport 等”。

[0075] 在本发明的具有标记性多肽编码序列的核酸中，在标记性多肽编码序列的 5' 端之前还优选包含信号肽编码序列，信号肽具有引导目的蛋白分泌到细胞表面的功能。本发明发现，将所述胞外抗原决定区与来自 GM-CSF α 链的信号肽进行组合，可使标记性多肽表达于肿瘤细胞表面。GM-CSF α 链信号肽是将本发明的标记性多肽靶向至分泌途径的前导序列，其编码序列首先与标记性多肽的编码序列一起在细胞内被翻译成蛋白质，引导合成的蛋白进入胞内分泌途径。在细胞表面表达标记性多肽前，信号肽被去除。GM-CSF α 链的全长氨基酸序列和核苷酸序列均为已知的，可以由本领域常用的公开数据库查询到。优选地，所述信号肽的氨基酸序列选自人 GM-CSF α 链的第 1 位-第 22 位氨基酸。更优选的，所述信号肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:8 所示。其中，GM-CSF α 链的氨基酸序列来自 UniProtKB-P15509。

[0076] 在本发明的具体实施方案中，所述标记性多肽包括可操作地连接且依次串联的以下氨基酸序列：胞外抗原决定区（其包括一个或多个所述抗原表位多肽的氨基酸序列）、间隔部分和跨膜部分。在本发明更具体的实施方案中，所述胞外抗原决定区的抗原表位多肽的氨基酸序列来自以下多肽中的抗原表位多肽的氨基酸序列：源于人细胞内蛋白 Myc 的 Myc 标签、源于流感病毒 HA 蛋白的 HA 标签、人工合成自然界不存在的序列 Strep 标签 II，所述间隔部分来自人 CD8 α 铰链区，所述跨膜部分来自人 CD8 α 跨膜区。

[0077] 如上所述，信号肽和胞外抗原决定区之间、胞外抗原决定区和间隔部分之间、间隔部分和跨膜部分之间是可操作地连接的，例如可以采用接头连接，也可以不采用接头而直接连接。在本发明的一个实施方案中，信号肽和胞外抗原决定区之间采用接头连接，例如为 GAHADITS（如 TT1-TT3 中所采用）、GAHAAQLTLTKGNK（如 Cl&2a 中所采用）、GAHA（如 Cl&2b 中所采用）。胞外抗原决定区和间隔部分之间采用接头连接，（例如）为 -Ala-Ser-、G，而间隔部分和跨膜部分之间未采用接头而直接连接。

[0078] 本发明还进一步发现标记性多肽可以同时表达两种抗原表位多肽，具体而言，本发明设计了标记性多肽 Cl&2a，其抗原决定区含有 Myc 标签和 HA 标签的各三个重复。本发明还设计了标记性多肽 Cl&2b，其抗原决定区含有 Myc 标签和 HA 标签的各两个重复；为了进一步稳定标记性多肽在细胞膜表面的表达，在 Cl&2b 的间隔部分加入了 TIGIT 的间隔区，其中所述加入的间隔区的氨基酸序列与 TIGIT 的第 24 位-第 140 位氨基酸序列一致。其中，TIGIT 的氨基酸序列来自 UniProtKB-Q495A1。更优选的，所述添加的 TIGIT 间隔的氨基酸序列如 SEQ ID NO:9 所示，所述 Cl&2b 的间隔跨膜部分的氨基酸序列如 SEQ ID NO:

10 所示。

SEQ ID NO:	序列
1	EQKLISEEDLGGGGSGGGGSEQKLISEEDLGGGGSGGGGSEQKLISEEDL
2	YPYDVPDYAGGGGSGGGGSPYDVPDYAGGGGSGGGGSPYDVPDYA
3	NWSHPQFEKGGGGSGGGGSNWSHPQFEKGGGGSGGGGSNWSHPQFEK
4	EQKLISEEDLGEQKLISEEDLGEQKLISEEDLGGSYPYDVPDYAGYPYDVPDYAGYPYDVPDYA
5	EQKLISEEDLGEQKLISEEDLGGSYPYDVPDYAGYPYDVPDYA
6	FVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACD
7	IYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN
8	MLLLVTSLLLCELPHPAFLIP
9	TGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDR VAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQI
10	TGTIETTGNISAEKGGSIILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDR VAPGPGLGLTLQSLTVNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIASFVP VFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGT CGVLLLSLVITLYCNHRN

[0079] 优选地，所述标记性多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO: 11（对应于 TT1）、SEQ ID NO: 12（对应于 TT2）、SEQ ID NO: 13（对应于 TT3）、SEQ ID NO: 14（对应于 Cl&2a）或 SEQ ID NO: 15（对应于 Cl&2b）所示。

[0080] SEQ ID NO:11:

EQKLISEEDLGGGGSGGGGSEQKLISEEDLGGGGSGGGGSEQKLISEEDLGGGGSGGGG
GSASFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN

[0081] 其中黑体示出抗原表位多肽，灰色部分示出来自 CD8 铰链区的间隔部分，下划线示出来自 CD8 跨膜区的跨膜部分。

[0082] SEQ ID NO: 12:

YPYDVPDYAGGGGSGGGGSPYDVPDYAGGGGSGGGGSPYDVPDYAGGGGSGGGG
SASFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWA
PLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN

[0083] 其中黑体示出抗原表位多肽，灰色部分示出来自 CD8 铰链区的间隔部分，下划线

示出来自 CD8 跨膜区的跨膜部分。

[0084] SEQ ID NO: 13:

NWSHPQFEKGGGGSGGGGSNWSHPQFEKGGGGSGGGGSNWSHPQFEKGGGGSGGG
GSASFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYI
WAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN

[0085] 其中黑体示出抗原表位多肽，灰色部分示出来自 CD8 铰链区的间隔部分，下划线示出来自 CD8 跨膜区的跨膜部分。

[0086] SEQ ID NO: 14:

EQKLISEEDLGEQKLISEEDLGEQKLISEEDLGGSPYDVPDYAGYPYDVPDYAGYPY
DVPDYAASFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFAC
DIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN

[0087] 其中黑体示出抗原表位多肽，灰色部分示出来自 CD8 铰链区的间隔部分，下划线示出来自 CD8 跨膜区的跨膜部分。

[0088] SEQ ID NO: 15:

EQKLISEEDLGEQKLISEEDLGGSPYDVPDYAGYPYDVPDYAGTGTIETTGNISAEKG
GSILQCHLSSTTAQVTQVNWEQQDQLLAICNADLGWHISPSFKDRVAPGPGGLGLTLQSLT
VNDTGEYFCIYHTYPDGTYTGRIFLEVLESSVAEHGARFQIASFVPVFLPAKPTTTPAPRP
TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNH
RN

[0089] 其中黑体示出抗原表位多肽，深灰色部分示出间隔部分中来自 TIGIT 间隔区的部分，浅灰色部分示出间隔部分中来自 CD8 铰链区的部分，下划线示出来自 CD8 跨膜区的跨膜部分。

[0090] **具有标记性多肽编码序列的核酸**

[0091] 在获得上述标记性多肽编码序列时，可以采用本领域通用的规则，获得编码这些标记性多肽的编码序列。所述具有标记性多肽编码序列的核酸包括 DNA 或 RNA；所述 RNA 包括由所述 DNA 转录的 mRNA。所述核酸依次包含可操作地连接的启动子和所述标记性多肽编码序列。所述启动子的例子包括本领域已知的用于启动下游 DNA 序列转录的任何启动子，例如 CMV 启动子、T7 启动子等。在国际申请号为 PCT/CN2019/102480，国际公开号为 WO2020038490A 的 PCT 专利申请中也详细记载了上述标记性多肽编码序列，在这里就不再详细进行赘述。

[0092] **重组病毒**

[0093] 在本发明一个实施方案中，所述第一活性成分为重组病毒，所述重组病毒的基因组具有依次的、可操作地连接的启动子、信号肽编码序列、所述标记性多肽编码序列；其中，所述重组病毒包括选择复制型重组溶瘤病毒或复制缺陷型重组病毒。所述标记性多肽编码序列编码所述标记性多肽。

[0094] 优选地，所述重组溶瘤病毒来源于具有溶瘤作用的经基因突变的病毒和具有溶瘤作用的野生型病毒；优选地，所述重组溶瘤病毒来源于具有溶瘤作用的腺病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒、麻疹病毒、塞姆利基森林病毒、水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、逆转录病毒、呼肠孤病毒、塞内卡谷病毒、埃可型肠道病毒、柯萨奇病毒、新城疫病毒和马拉巴病毒。

[0095] 溶瘤病毒疗法具有悠久的历史，有很多种类的病毒已被改造用于溶瘤病毒研发，包括腺病毒、疱疹病毒、痘病毒、小核糖核酸病毒、副粘病毒、呼肠孤病毒、细小病毒、弹状病毒。截止至目前，已有几种溶瘤病毒(H101、T-VEC、Delytact)获批可用于临床肿瘤的治疗。溶瘤病毒是经人工改造的病毒，这些病毒的致病基因被敲除，基本无法在正常组织细胞内复制，但是可以在肿瘤细胞内选择性的复制以发挥溶瘤作用。以痘病毒为例，溶瘤痘病毒通常通过遗传生物工程手段利用同源重组技术敲除痘病毒内源性胸苷激酶(Thymidine Kinase, TK)基因或双敲除 TK 和痘苗生长因子(Vaccinia growth factor, VGF)基因来构建。TK 是 DNA 合成的关键酶之一，痘病毒在复制过程中需要借助 TK 作用形成高浓度核酸池以完成子代顺利复制。痘病毒常通过 VGF 基因产物促进宿主及周边细胞增殖，实现自身的复制增殖，而缺失 VGF 的痘病毒大大减弱了病毒对正常细胞的损伤。由于缺失 TK 和 VGF 基因，病毒在正常细胞内的复制能力受到限制，在溶瘤病毒载体上插入的外源性基因的表达也会受到极大的限制。但大多数肿瘤细胞环境内 TK 基因是高表达的状态，为痘病毒的复制、包装提供了有利的环境，使得痘病毒具有选择性在肿瘤细胞内复制、溶瘤的功能，并且高表达在溶瘤病毒载体上插入的外源性基因。除了直接的溶瘤作用，溶瘤病毒还可以使肿瘤细胞释放全息的肿瘤抗原以激活机体内在的抗肿瘤免疫，同时对肿瘤微环境具有一定的调节作用。

[0096] 本发明将所述标记性多肽编码序列插入溶瘤病毒的基因组，利用溶瘤病毒能够特异性的在肿瘤细胞中复制从而将所述标记性多肽编码核酸导入肿瘤细胞和/或癌细胞，这样在发挥溶瘤病毒杀伤肿瘤细胞和/或癌症细胞作用的同时，外源的抗原表位肽在肿瘤细胞表面表达与多特异性抗体联合达到协同治疗效果。由于溶瘤病毒破坏了肿瘤的微环境，能够进一步提高多特异性抗体的治疗效果，从而进一步提升实体瘤治疗的有效性。此外，多特异性抗体通过招募免疫细胞，还可以有效清除被溶瘤病毒感染后，不能完成复制周期并产生

足够数量的子病毒而发生裂解的肿瘤细胞；由此实现了进一步的协同作用。此外，被溶瘤病毒裂解的肿瘤细胞所释放的抗原可进一步激活机体自身的抗肿瘤免疫，从而可实现比单独使用溶瘤病毒或多特异性抗体更好的肿瘤杀伤效果，实现了协同治疗效果。

[0097] 在本发明的一个实施方案中，所得到的选择复制型重组溶瘤痘病毒的基因组中可以插入上述标记性多肽编码序列的核酸。

[0098] 优选地，所述重组溶瘤病毒是 TK 基因和 VGF 基因功能缺陷型的重组溶瘤痘病毒。所述 TK 基因可以通过插入外源核苷酸序列而使该 TK 基因功能缺陷。所述 VGF 基因可以通过基因敲除或插入外源核苷酸序列而使该 VGF 基因功能缺陷，但优选将所述 VGF 基因敲除。

[0099] 本发明在提及溶瘤病毒的基因时所使用的术语“功能缺陷”是指该溶瘤病毒无法发挥该基因应有的功能，即功能丧失，该目的可通过（例如）在基因中插入外源片段或敲除该基因而实现。还优选地，所述重组溶瘤痘病毒是惠氏株或 WR 株。

[0100] 所述标记性多肽编码序列可以插入 TK 基因中，从而得到本发明所述的重组溶瘤病毒。所述标记性多肽编码序列也可以插入 VGF 基因中，从而得到本发明所述的重组溶瘤病毒。

[0101] 在一个优选的实施方案中，所述重组溶瘤痘病毒是对 VSC20 痘病毒进行基因改造而得到的。VSC20 痘病毒是 VGF 基因缺失的痘病毒，制备方法可参见科技文献：“McCart, JA, et al. Systemic cancer therapy with a tumor-selective vaccinia virus mutant lacking thymidine kinase and vaccinia growth factor genes. *Cancer Res* (2001) 61: 8751–8757.”。所述基因改造包括将外源标记性多肽编码序列插入该 VSC20 痘病毒的 TK 基因中，从而使该 TK 基因功能缺陷。

[0102] 所述重组病毒的基因组中还可以整合有其它外源基因，例如外源筛选基因，所述外源筛选基因包括嘌呤霉素基因、gpt 基因和/或 LacZ 基因。所述外源筛选基因可以在纯化含有外源标记性多肽编码基因的时候通过基因敲除系统（例如，LoxP）敲除。

[0103] 在一些实施方案中，本发明通过分别使用痘病毒早/晚启动子 p7.5 控制外源筛选基因，以及人工合成痘病毒早启动子 pSEL 控制信号肽序列和外源标记性多肽编码序列，使用体外细胞内重组技术将外源筛选基因编码序列以及信号肽编码序列和标记性多肽编码序列插入到痘病毒 VSC20 株的 TK 基因区中，以此构建溶瘤病毒，两个启动子以背靠背的方式分别启动各自调控基因的表达。

[0104] 在本发明的另一个实施方案中，利用 Crisper-Cas9 基因编辑技术构建重组溶瘤痘病毒。优选地，所述 Crisper-Cas9 基因编辑方法可以同时在一个基因的两个位点进行剪切和进

行同源重组，以达到一次性完成对一段序列进行敲除和转基因插入的目的。

[0105] 优选地，所述 Crisper-Cas9 基因编辑方法可以同时靶序列和供体 (donor) 序列进行剪切，以提高同源重组的效率。Crisper-Cas9 基因编辑方法的剪切和同源重组的设计也详细的记载在国际公开号为 WO2020038490A (申请号为 PCT/CN2019/102480) 的 PCT 专利申请中，在此不再详细进行赘述。

[0106] 多特异性抗体

[0107] 本文中，术语“抗体”作最广泛意义使用，指包含抗原结合位点或抗原结合部分或抗原结合片段的蛋白质或者多肽，涵盖各种结构的天然抗体和人工抗体，包括但不限于完整抗体形式或者抗体的抗原结合片段。

[0108] 本文中，“完整抗体”或“完全抗体”等均用来表示相同的含义，指示包含二硫键相互连接的至少两个重链 (H) 和两条轻链 (L) 的蛋白。每条重链由重链可变区 (缩写为 VH) 和重链恒定区 (也称为重链恒定结构域，缩写为 CH) 组成。重链恒定区包括重链恒定结构域 CH1、重链恒定结构域 CH2 和重链恒定结构域 CH3。每条轻链由轻链可变区 (缩写为 VL) 和轻链恒定区 (也称为轻链恒定结构域，缩写为 CL) 组成。VH 和 VL 可以进一步划分为互补决定区 (也称为超变区或者高变区，缩写为 CDR 或者 HVR)，其间插有保守的框架区 (FR)。每个 VH 和 VL 包含三个 CDR 和四个 FR，从氨基端 (N 端) 到羧基端 (C 端) 按照如下序列排列：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3 和 FR4。重链可变区的 CDR 从氨基末端开始分别被称为 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，轻链可变区的 CDR 从氨基末端开始分别称为 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3。

[0109] “抗原结合片段”、“抗原结合部分”、或者“抗原结合位点”是指包含全长抗体的一部分，这部分表现出与抗原结合的特异性。如上文提到的，完整抗体的重链和轻链的超变区或者高变区表现出与抗原的特异性结合。抗原结合片段或者抗原结合部分的实例包括但不限于 Fab、Fab'、F(ab')₂、双特异性 Fab' 和 Fv 片段、线性抗体、单链抗体、单域抗体等。完整抗体经木瓜蛋白酶消化产生两个完全相同的抗原结合片段，称为 Fab 片段，其各自含有重链和轻链可变区以及轻链恒定结构域和重链恒定结构域 CH1。Fab' 片段在重链恒定结构域 CH1 的羧基末端增加了少数残基而与 Fab 片段有所不同，包括来自抗体铰链区的一个或多个半胱氨酸。完整抗体经胃蛋白酶消化获得 F(ab')₂ 片段。F(ab')₂ 片段具有通过二硫键连接在一起的两个抗原结合 F(ab) 部分，F(ab')₂ 片段为双价抗体。单链抗体由抗体重链可变区和轻链可变区通过一个约 10-25 个氨基酸组成的柔性短肽连接而成的融合蛋白。单域抗体是由单个单体的可变区组成的抗体片段。由于单域抗体通常来源于骆驼科动物抗体或鲨鱼科动物抗体重链的可变区，因此也常称为纳米抗体。

[0110] 术语“多特异性抗体” (multispecific antibody, 也称为多抗) 是指包含与至少两种不同生物分子的表位或者相同生物分子的至少两种不同的表位特异性结合的抗原结合部分。例如, “多特异性抗体可以为双特异性抗体 (也称为双抗), 也可以为三特异性抗体等。“多”意指两个及以上。同时为了表述的方便, 分别在抗原结合部分前面加上量词, 用以区分。例如, 可以根据需要, 分别表述为“第一抗原结合部分”、“第二抗原结合部分”、“第三抗原结合部分”等。“第一”、“第二”、“第三”不表示结合的先后顺序, 也不用来表征重要性。下文对于“第一抗原结合部分”、“第二抗原结合部分”和“第三抗原结合部分”也会有解释和说明。除非另外说明, 否则所列出的多特异性抗体中与抗原的结合顺序是任意的。当然, 多特异性抗体在与不同生物分子特异性结合时, 有可能和该特定生物分子的不止一个抗原表位结合。根据本发明的优选实施方式, 所提到的多特异性抗体包含与至少两种不同生物分子的不同表位结合的抗原结合部分。

[0111] 术语“和/或”用于连接两个或者多个可选项时, 应理解为意指可选项中的任一项或者可选项中的任意两项或者多项。

[0112] 术语“包含”或者“包括”意指包括所提到的要素或者步骤, 但是不排除其他要素或者步骤。当然, 除非另有说明, 包含或者包括也涵盖了由所提及的要素或者步骤组成的情形。例如, 当提及包含某个具体序列的抗体可变区时, 也旨在涵盖由该具体序列组成的抗体可变区。

[0113] 本文所提到的“亲和力”或者“结合亲和力”按照本领域的通常含义来理解, 用来反映抗原和抗体或者抗原结合片段上的结合位点之间的强度和/或稳定性。

[0114] “特异性结合”或“特异性结合于”、“结合”、“特异性靶向”特定抗原或表位, 或对特定抗原或表位“具有特异性”或者“能够结合”意味着与非特异性相互作用相区分, 这种特异性结合可以通过本领域常用的一些方法测得。抗体与抗原结合的能力可以通过酶联免疫吸附测定 (ELISA) 或者本领域技术人员熟悉的其他技术来测量。例如可以通过流式细胞仪测定对携带有抗原的细胞进行检测, 通过测定细胞的阳性率指标来检测待测抗体与标记抗体的竞争结合情况。由于细胞表面的抗原空间结构更接近于体内存在的形式, 所以通过该方法更能反映真实情况。根据本发明的具体实施方式, 所提供的双特异性抗体与免疫细胞抗原 (例如, T 细胞抗原 (例如 CD3 抗原)) 具有 0.5~200nM、1~200nM、5~200nM、10~200nM、15~200nM、0.5~150nM、1~150nM、5~150nM、10~150nM、15~150nM、0.5~120nM、1~120nM、5~120nM、10~120nM、15~120nM、10~100nM、15~100nM、10~80nM、15~80nM、10~60nM、15~60nM、10~50nM、或 15~50nM 的 EC₅₀ 值, 与标记性多肽 (例如 TT3 抗原) 具有 0.01~20nM、0.05~20nM、0.01~16nM、0.05~16nM、0.01~15nM、0.05~15nM、

0.01~10nM、0.05~10nM、0.1~10nM、0.3~5nM 的 EC₅₀ 值。除此之外，还可以通过表面等粒子共振技术（SPR）或生物薄膜干涉技术（BLI）测定抗体与抗原的结合活性。

[0115] 本文中所提到的多特异性抗体，或者是多核苷酸，通常是可分离的或者重组的。“可分离的”是指能够从表达多肽或者蛋白的细胞或者细胞培养物中鉴定并且分离和/或回收。通常，分离的多肽将通过至少一个纯化步骤来制备。“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体或其抗原结合片段。“重组”意味着可以使用基因重组技术在外源宿主细胞中产生抗体。

[0116] “人源化”抗体通常是指基于来源于非人物种的抗原结合部分，和基于人的免疫球蛋白分子的部分结构和序列组成的抗体。例如，人源化抗体中，除 CDR 之外的整个抗体由人类来源的多核苷酸编码，其保留了抗原的结合活性，同时降低了免疫原性。

[0117] 本文中所示出的 CDR 序列是结合已有的定义方案分析获得的，例如所示出的抗体的 CDR 序列，以及多特异性抗体的第一抗原结合部分的 CDR 序列，和第二抗原结合部分的 CDR 序列是结合 IMGT 定义方案（Ehrenmann F., Kaas Q. and Lefranc M.-P. *Nucleic Acids Res.*, 38:D301-D307 (2010); Ehrenmann, F., Lefranc, M.-P. *Cold Spring Harbor Protoc.*, 6:737-749 (2011)）获得的。还可以通过 Kabat（例如可以参见 U.S.Dept. of Health and Human Services, “Sequences of Proteins of Immunological Interest”(1983)）、Chothia（例如可以参见 *J.Mol.Biol.*196:901-917(1987)）等定义方案获得。本领域技术人员可知的是，由于定义方法方法而表现出来的 CDR 的差异，也都包含在本发明的保护范围之内。

[0118] 双特异性抗体（Bispecific antibody, BsAb，也称为双抗）是能同时特异性结合两个抗原或者相同抗原不同表位的抗体。BsAb 可以靶向多个抗原或者抗原表位，相较于单克隆抗体表现出更多的优势，而且也逐渐展现出比单克隆抗体联用疗法更高的疗效。例如，可以将特异性免疫效应细胞重定向到邻近的肿瘤细胞，以增强肿瘤杀伤；而且可以通过两个不同的细胞表面抗原的相互作用增加结合的特异性；同时相较于单一抗体联用来说，可以降低开发成本、临床试验。双特异性抗体在肿瘤治疗及自身免疫疾病等领域中具有广泛的应用前景，并且随着基因工程抗体技术的逐渐成熟，得到了快速发展。

[0119] 第二组合物包括第二活性成分，第二活性成分包含多特异性抗体。第二组合物中除了所提到的多特异性抗体，还可以根据需要含有药学上可接受的载体。一些药学上可接受的盐，例如酸加成盐或者碱加成盐（例如记载在 Berge, S.M.etal(1977)*J.Pharma.Sci.*66:1-19）。所述多特异性抗体可以为双特异性抗体，其包括第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，第一抗原结合部分能够特异性识别并结合所述标记性多肽的胞外抗原决定区；第二抗原结合部分能够特异性识别并结合免疫细胞抗原或第一细胞因子或其受体。通过招募或者桥联

免疫细胞或细胞因子或其受体，发挥免疫治疗作用。所提到的第一抗原结合部分和第二抗原结合部分融合，第一抗原结合部分和第二抗原结合部分分别靶向不同抗原不同表位。所提到的第一抗原结合部分和第二抗原结合部分融合，可以直接连接（例如通过二者的末端氨基酸直接连接），可以通过连接子进行间接连接，二者之间还可以连接有其他功能区序列，例如 Fc 区、CH1、CL 序列等。需要说明的是，如文中所示，术语“第一”、“第二”、“第三”仅用于描述目的，而不能理解为指示或暗示相对重要性或者隐含指明所指示的技术特征的数量，也不用来表示先后顺序。术语“第一抗原结合部分”、“第二抗原结合部分”、“第三抗原结合部分”分别意指能够与不同靶抗原的不同表位或者相同靶抗原的不同表位结合的部分，其可以是完整抗体，也可以是完整抗体的一部分，例如重链可变区、Fab、Fab’、F(ab’)₂、单链抗体（ScFv）、或单域抗体（sdAb）等等。根据本发明的优选实施方式，“第一抗原结合部分”、“第二抗原结合部分”、“第三抗原结合部分”分别与不同抗原的不同表位特异性结合。

[0120] 本文中，“连接子”和“连接片段”具有相同的含义。连接子可以为一些寡肽或者多肽，可以是任何能够提供柔性的氨基酸序列。可用的连接子为本领域常用的连接子，包括但不限于以下组成的组：GS、SG、GGS、GSG、SGG、GGG、GGGS、SGGG、GGGS、GGGGSGS、GGGGSGS、GGGGSGGS、GGGGSGGGSGGGGS、GGGGSGGGGS、GGGGSGGGSGGGSGGGGS、GGGGSGGGSGGGSGGGGS、GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGGS 等等。

[0121] 所提供的第一抗原结合部分能够特异性识别并结合所述标记性多肽的所述胞外抗原决定区。根据具体实施方案中，所提供的第一抗原结合部分能够特异性识别并结合上文提到的 SEQ ID NO:1、2、3、4 或 5 所示的氨基酸序列。根据具体实施方案，所提供的第一抗原结合部分包含一个或多个能够特异性识别并结合所述抗原表位多肽的结构域，其中所述抗原表位多肽的氨基酸序列包括 Strep 标签 II 的氨基酸序列。

[0122] 优选的是，靶向 TT1 的抗原结合结构域的轻链的氨基酸序列与抗 Myc 抗体（例如克隆 9e10）的轻链的第 1 位-第 111 位氨基酸序列一致（在本发明另一些实施方案中，靶向 TT1 的抗原结合结构域的轻链的氨基酸序列可向上游序列的下游扩展不超过 10 个氨基酸），重链的氨基酸序列与抗 Myc 抗体（例如克隆 9e10）的重链的第 23 位-第 143 位的氨基酸序列一致（在本发明另一些实施方案中，靶向 TT1 的抗原结合结构域的重链的氨基酸序列可向上游序列的上下游扩展不超过 10 个氨基酸）。

[0123] 优选的是，靶向 TT2 的抗原结合结构域的轻链的氨基酸序列与抗 HA 抗体（例如克隆 12ca5）的轻链的第 2 位-第 121 位氨基酸序列一致（在本发明另一些实施方案中，靶向

TT2 的抗原结合结构域的轻链的氨基酸序列可向上游序列的下游扩展不超过 10 个氨基酸), 重链的氨基酸序列与抗 HA 抗体 (例如克隆 12ca5) 的重链的第 2 位-第 114 位氨基酸序列一致 (在本发明另一些实施方案中, 靶向 TT2 的抗原结合结构域的重链的氨基酸序列可向上游序列的下游扩展不超过 10 个氨基酸)。

[0124] 优选的是, 靶向 TT3 的抗原结合结构域的轻链的氨基酸序列与抗 Strep 标签 II 抗体 (参见 (例如) 专利文献 EP2871189A1) 的轻链一致, 重链的氨基酸序列与抗 Strep 标签 II 抗体 (参见 (例如) 专利文献 EP2871189A1) 的重链一致。

[0125] 其中, 抗 Myc 抗体 (克隆 9e10) 轻链的氨基酸序列可以源自编号为 PDB: 2ORB_L 的氨基酸序列 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/2ORB_L), 抗 Myc 抗体 (克隆 9e10) 重链的氨基酸序列可以源自编号为 GenBank: CAA73271.1 的氨基酸序列 ([https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA73271.1?report=genbank&log\\$=protalign&blast_rank=1&RID=P597FX1S014](https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/CAA73271.1?report=genbank&log$=protalign&blast_rank=1&RID=P597FX1S014)), 连接轻链和重链的连接子的氨基酸序列如 SEQ ID NO:16 所示。根据具体实施方案, 第一抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:17 所示的氨基酸序列。抗 HA 抗体 (克隆 12ca5) 轻链的氨基酸序列可以源自编号为 PDB: 5XCS_B 的氨基酸序列 (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/1258501213>), 抗 HA 抗体 (克隆 12ca5) 重链的氨基酸序列可以源自编号为 PDB: 5XCS_A 的氨基酸序列 (https://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/5XCS_A), 连接轻链和重链的连接子的氨基酸序列可以如 SEQ ID NO:18 所示。根据具体实施方案, 第一抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:19 所示的氨基酸序列。

[0126] 抗 Strep 标签 II 抗体轻链和重链的氨基酸序列可以源自专利文献 EP2871189A1 所公开的氨基酸序列, 连接轻链和重链的连接子的氨基酸序列可以如 SEQ ID NO:16 所示。根据具体实施方案, 所述第一抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:20、21 和 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列, 以及 SEQ ID NO:23、24 和 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列。所示出的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列, 以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列根据 IMGT 定义方案获得。根据具体实施方案, 所述第一抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:26 所示的轻链可变区序列和 SEQ ID NO:27 所示的重链可变区序列。轻链可变区序列和重链可变区序列之间通过连接子进行连接, 根据具体实施方式, 可以通过如 SEQ ID NO:16 所示的连接子进行连接。根据具体实施方案, 所述第一抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:28 所示的序列。根据具体实施方案, 所述第一抗原结合部分通过对 SEQ ID NO:26 所示的轻链可变区和 SEQ ID NO:27 所示的重链可变区人源化, 降低了免疫原性, 同时保留了与 TT3 的结合活性。根据具体实施方案, 所述第一抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:29 所示的重链可变

区和 SEQ ID NO:32 所示的轻链可变区。根据具体实施方案,所述第一抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:29 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:33 所示的轻链可变区。根据具体实施方案,所述第一抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:29 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:34 所示的轻链可变区。根据具体实施方案,所述第一抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:30 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:32 所示的轻链可变区。根据具体实施方案,所述第一抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:30 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:33 所示的轻链可变区。根据具体实施方案,所述第一抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:30 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:34 所示的轻链可变区。根据具体实施方案,所述第一抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:32 所示的轻链可变区。根据具体实施方案,所述第一抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:33 所示的轻链可变区。根据具体实施方案,所述第一抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:34 所示的轻链可变区。

SEQ ID NO:	序列
16	GSTSGSGKPGSGEGSTKG
17	DIVLTQSPAFLAVSLGQRATISCRASESVDNYGFSFMNWFQQKPGQPPKLLIYAINSRGSGVPARFSGSGGTDFSLNIHPVEEDDPAMYFCQQTKVPWTFGGGKLEIKGSTSGSGKPGSGEGSTKGQVQLQESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSHYGMSWVRQTPDKRLEWVATIGSRGTYTHYPDSVKGRFTISRDNNDKNALYLQMNSLKSEDTAMYYCARRSEFYYYGNTYYYSAMDYWGQGASVTVSS
18	GGGGSGGGSGGGGS
19	EVKLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSYGMWVRQTPDKRLEWVATISRGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARRETYDEKGFA YWGQGTITVTVSSGGGGSGGGSGGGSDIELTQSPSSLTVTAGEKVTMSCKSSQS LLNSGNQKNYLTWYQQKPGQPPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGRDFLTIS VQAEDLAVYYCQNDNSHPLTFGAGTKLELK
20 (HCDR1)	GYTFTNYY
21 (HCDR2)	LNPNGDT
22 (HCDR3)	ARTGRYEENAMDY
23 (LCDR1)	ESVDSYGKSF
24 (LCDR2)	RAS
25 (LCDR3)	QQNNEDPWT
26 (VL)	ELVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDNYGFSFMHWWYQLKPGQPPKLLIYRA

	SNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPWTFGGGTKLEIK
27 (VH)	EVQLEQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYYMKWVKQSHGKSLEWIGDLNP NNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSNTAYMQLNSLTSEDSAVYYCARTGRYEENAM DYWGQGTSTVTVSS
28	ELVMTQSPASLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKSFMHWYQLKPGQPPKLLIYRA SNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTIDPVEADDAATYYCQQNNEDPWTFGGGTKLEI KGSTSGSGKPGSGEGSTKGEVQLEQSGPELVKPGASVKMSCKASGYTFTNYYMK WVKQSHGKSLEWIGDLNPNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSSNTAYMQLNSLTSE DSAVYYCARTGRYEENAMDYWGQGTSTVTVSS
29(VH)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMKWVKQAPGQRLEWMGDL NPNNGDTFYNQKFKGRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDVAVYYCARTGRYEENA MDYWGQGTSLTVTVSS
30(VH)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMKWVKQAPGQSLEWIGDLN PNNGDTFYNQKFKGRVTITVDKSASTAYMELNSLRSEDVAVYYCARTGRYEENA MDYWGQGTSLTVTVSS
31(VH)	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTNYYMKWVKQAPGQSLEWIGDLN PNNGDTFYNQKFKGKATLTVDKSASTAYMELNSLRSEDVAVYYCARTGRYEENA MDYWGQGTSLTVTVSS
32(VL)	DIVLTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVDSYGKSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRAS NLESGVPARFSGSGSRTDFTLTINPVEANDTANYYCQQNNEDPWTFGQGTKLEIK
33(VL)	DLVMTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVDSYGKSFMHWYQQKPGQPPKLLIYRA SNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTINPVEANDTANYYCQQNNEDPWTFGQGTKLEI K
34(VL)	DLVMTQSPASLAVSPGQRATITCRASESVDSYGKSFMHWYQLKPGQPPKLLIYRA SNLESGVPARFSGSGSRTDFTLTINPVEANDTANYYCQQNNEDPWTFGQGTKLEI K

[0127] 第一抗原结合部分可以通过连接子与第二抗原结合部分连接形成多特异性抗体。本领域常用的用来连接氨基酸片段的柔性寡肽均可以用作第一抗原结合部分和第二抗原结合部分的连接子。根据具体实施方式，第一抗原结合部分的氨基端（也称 N 端）氨基酸可以和第二抗原结合部分的羧基端（也称 C 端）氨基酸连接。根据具体实施方式，第一抗原结合部分的 C 端氨基酸可以和第二抗原结合部分的 N 端氨基酸连接。在第一抗原结合部分和第二抗原结合部分连接时，可以直接连接，也可以通过连接子连接，还可以在二者之间连接有其他功能氨基酸序列。所提到的其他功能氨基酸序列例如可以为 Fc 序列，从而可以起到介导 ADCC（抗体依赖的细胞介导的细胞毒性作用）、ADCP（抗体依赖细胞介导的细胞吞噬作用）或者 CDC（补体介导的细胞毒性作用）等。可以根据需要在第一抗原结合部分和第二抗原结合部分之间连接有 CH₁、CH₂、CL 序列等。根据具体实施方式，第一抗原结

合部分的 C 端氨基酸和 Fc 序列连接, 并通过连接子与第二抗原结合部分连接。根据具体实施方式, 第二抗原结合部分的 C 端氨基酸和 CH1、CL 序列、Fc 区形成 IgG 样抗体结构, Fc 区的 C 端氨基酸通过连接子与第一抗原结合部分的 N 端氨基酸连接。根据具体实施方式, 第一抗原结合部分的轻链可变区和重链可变区序列可以直接通过连接子连接, 形成单链抗体 (scFv) 形式, 也可以直接连接。

[0128] 在一些具体实施方案中, 第二抗原结合部分能够特异性识别并结合第一细胞因子或其受体。所提到的第一细胞因子或其受体可以是细胞因子的全长, 片段或其变体。在一些实施方式中, 所提到的第一细胞因子包括但不限于: 白细胞介素-1 (IL-1 α)、白细胞介素-1 β (IL-1 β)、白细胞介素-2 (IL-2)、白细胞介素-4 (IL-4)、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-17a、IL-17b、IL-17c、IL-17d、IL-17f、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-34、IL-35、IL-37、EPO、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、XCL1、XCL2、CX3CL1、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、TNF α 、TGF β 、VEGF、GM-CSF、GCSF 或其相关受体中的至少一种。通过结合细胞因子或其受体, 可以起到免疫调节的作用。

[0129] 在一些具体实施方案中, 第二抗原结合部分能够特异性识别并结合免疫细胞抗原, 尤其是能够特异性识别并结合免疫细胞表面抗原, 招募免疫细胞达到肿瘤杀伤的目的。本文中, “免疫细胞”是指在免疫系统中起作用, 例如保护免受感染和异物侵害的各种细胞中的任何一种。在具体实施方式中, 该术语可以包括白细胞, 例如嗜中性粒细胞, 嗜酸性粒细胞, 嗜碱性粒细胞, 淋巴细胞和单核细胞。免疫细胞还包括免疫效应细胞。免疫效应细胞是指参与免疫应答的细胞, 例如促进免疫效应应答。免疫效应细胞的示例包括但不限于 T 细胞, 例如 CD4+T 细胞, CD8+T 细胞, α T 细胞, β T 细胞, γ T 细胞和 δ T 细胞; B 细胞; 自然杀伤 (NK) 细胞; 自然杀伤 T (NKT) 细胞; 树突状细胞; 和肥大细胞等。在一些实施方式中, 免疫细胞为 T 细胞或 NK 细胞。在一些实施方式中, 免疫细胞是细胞毒性 T 细胞 (例如 CD8+T 细胞)。在一些实施方式中, 免疫细胞是辅助 T 细胞, 例如 CD4+T 细胞。所提到的免疫细胞抗原包括但不限于 CD1, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD12w, CD13, CD14, CD15, CD16, CD16a, CD16b, CD17, CD18, CD19,

CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD67, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD85a, CD85b, CD85c, CD85d, CD85e, CD85f, CD85g, CD85h, CD85i, CD85j, CD85k, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD111, CD112, CD115, CD116, CD117, CD119, CD120, CD121, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD133, CD131, CD132, CD134, CD135, CD137, CD138, CD139, CD141, CD142, CD143, CD144, CD147, CD146, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158, CD158a, CD158b1, CD158b2, CD158c, CD158d, CD158e, CD158f1, CD158f2, CD158g, CD158h, CD158i, CD158j, CD158k, CD158z, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD163, CD166, CD165, CD166, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, Cd177, CD178, CD179, CD180, CD181, CD183, CD184, CD185, CD186, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CD198, CD199, CD200, CD203, CD205, CD208, CD209, CD210, CD210b, CD212, CD231a1, CD213a2, CD217, CD218a, CD218b, CD222, CD224, CD225, CD226, CD227, CD229, CD232, CD243, CD244, CD245, CD247, CD252, CD253, CD256, Cd257, CD258, CD261, CD262, CD262, CD263, CD264, CD265, CD268, CD269, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD286, CD288, CD289, CD290, CD292, CDw293, CD294, CD296, CD297, CD300a, CD300b, CD300c, CD300d, CD300e, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD309, CD312, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD328, CD329, CD335, CD336, CD337, CD352, CD353, CD357, CD361, CD362 等。

[0130] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分能够特异性识别并结合 CD3 抗原。CD3（T 细胞表面糖蛋白 CD3，T 细胞受体的信号转导共受体）是表达于所有 T 淋巴细胞表面的一种分化抗原，主要介导 T 细胞活化信号的转导，在机体免疫系统的抗感染免疫中起着重要的作用。本文中所提到的 CD3 包含任何脊椎动物（包括哺乳动物，如灵长类动物（例如人）和啮齿类动物（例如小鼠和大鼠））的任何天然 CD3，除非另有说明。术语“CD3”涵盖“全长”未加工的 CD3 以及由细胞内加工产生的任何形式的 CD3 或其任何片段。该术语还包括天然存在的 CD3 的变体，例如剪接变体或等位变体。在一些具体实施方式中，CD3 是指来自

人和食蟹猴 CD3 全长或其片段。在一些具体实施方式中，CD3 是指来自小鼠或者大鼠全长或其片段。

[0131] 在一些实施方案中，所述第二抗原结合部分能够特异性识别并结合 CD3 抗原。抗 CD3 抗体可以来自于任何已知的靶向 CD3 的抗体，也可以是正在开发的或者未来开发的靶向 CD3 的抗体。例如抗体 SP34（参见例如 Pessano,S.et al., EMBO J4(1985)337-344）、抗体 OKT3（参见例如 Kung, P.et al., Science 206(1979)347-349; Salmeron, A. et al., J Immunol 147(1991)3047-3052）、抗体 UCHT1（参见例如 Callard, R.E. et al., Clin Exp Immunol 43(1981) 497-505）等。通过对鼠源 SP34 进行序列优化以及人源化改造，获得特异性识别并靶向 CD3 抗原的第二抗原结合部分。而且经过人源化后，可以与人和食蟹猴 CD3 抗原表现出高的亲和力。

[0132] 根据具体实施方案，所述第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:35、36 和 37 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列，以及 SEQ ID NO:38、39 和 40 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列。所示出的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列以及 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列根据 IMGT 定义方案获得。

编号 (SEQ ID NO:)	序列	编号 (SEQ ID NO:)	序列
35	GFTFNTYA	38	TGAVTTSNY
36	IRSKYNNYAT	39	GTN
37	VRHGNFGNSYVSWF AY	40	ALWYSNLWV

[0133] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列。

[0134] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分的序列经过人源化改造，人源化后的第二抗原结合部分表现出与人或者食蟹猴的 CD3 抗原高的亲和力，在和第一抗原结合部分形成双特异性抗体时，与 CD3 抗原的亲和力相较于人源化的 CD3 单抗来说有所下降。即便如此，多特异性抗体通过对第一抗原结合部分进行改造，与标记性多肽的亲和力保持在高水平，可以有效实现肿瘤靶向以及肿瘤杀伤作用。本发明的设计和筛选使得多特异性抗体整体表现出特别适宜的亲和力。根据具体实施方式，所述第二抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:43、44 或 45 所示的重链可变区序列。根据具体实施方式，所述第二抗原结合部分具有如 SEQ ID NO:46、47、48、49、50、51、52 或 53 所示的轻链可变区序列。人源化改造后的重链可

变区或者轻链可变区可以和人源化改造前的轻链可变区或者重链可变区形成靶向 CD3 抗原的序列。例如，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:46 所示的轻链可变区序列。再例如，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:47 所示的轻链可变区序列。再例如，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:48 所示的轻链可变区序列。再例如，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:49 所示的轻链可变区序列。再例如，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:50 所示的轻链可变区序列。再例如，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列。再例如，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列。再例如，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列。再例如，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列。再例如，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列。再例如，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列。

[0135] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:46 所示的轻链可变区序列。

[0136] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:47 所示的轻链可变区序列。

[0137] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:48 所示的轻链可变区序列。

[0138] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:49 所示的轻链可变区序列。

[0139] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:50 所示的轻链可变区序列。

[0140] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列。

[0141] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列。

[0142] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列。

[0143] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:46 所示的轻链可变区序列。

[0144] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:47 所示的轻链可变区序列。

[0145] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:48 所示的轻链可变区序列。

[0146] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:49 所示的轻链可变区序列。

[0147] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:50 所示的轻链可变区序列。

[0148] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列。

[0149] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列。

[0150] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列。

[0151] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:46 所示的轻链可变区序列。

[0152] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:47 所示的轻链可变区序列。

[0153] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:48 所示的轻链可变区序列。

[0154] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:49 所示的轻链可变区序列。

[0155] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:50 所示的轻链可变区序列。

[0156] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列。

[0157] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列。

[0158] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列

和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列。

SEQ ID NO:	序列
41(VH)	EVKLLSEGGGLVQPKGSLKLSAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSQSILYLQMNNLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLLVTVSA
42(VL)	QAVVTQESALTTSPGETVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQEKPDHLFTGLIGGTNKRAP GVPARFSGSLIGDKAALTITGAQTEDEAIYFCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
43(VH)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGTLLVTVSA
44(VH)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFA YWGQGTLLVTVSA
45(VH)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIRSKYN NYATYYADSVKDRFTISRDDSKNLYLQMNSLKTEDTAMYYCVRHGNFGNSYVSWF AYWGQGTLLVTVSA
46(VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAP PWTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
47(VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAP PWTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQTEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
48(VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAP PWTPARFSGSLLGGKAALTITGAQTEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
49(VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAP PWVTPARFSGSLLGDKAALTLSGAQTEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
50(VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAP PWVTPARFSGSLLGDKAALTLSGAQTEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
51(VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAP WTPARFSGSLLGGKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
52(VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAP WVTPARFSGSLLGDKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
53(VL)	QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCSRSTGAVTTSNYANWVQKPGQAPRGLIGGTNKRAP WVTPARFSGSLLGDKAALTLSGAQPEDEAEYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
54 (重链恒定结构域)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGLCKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ SSGLYSLSVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCPPCPAPEF EGGSPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKP REEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPASIETISKAKGQPREPQV YTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFL

	YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
55 (轻链恒定结构域)	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
56 (Fc 区)	PCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK
57 (重链恒定结构域)	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTWNSGALTSGLVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLSPGK

[0159] 根据具体实施方式，第二抗原结合部分和第一抗原结合部分通过连接子进行连接。根据具体实施方式，所述连接子为(G₄S)₃。第二抗原结合部分的重链可变区与 CH1 连接，CH1 和 Fc 区连接，轻链可变区与 CL1 连接。第一抗原结合部分的 N 端氨基酸通过连接子与 Fc 区的 C 端氨基酸连接。第一抗原结合部分的轻链可变区序列和重链可变区序列直接连接或者通过连接子连接。所提到的 Fc 区可以是人源的 Fc 区序列。Fc 区序列可以来源包括但不限于 IgA, IgD, IgE, IgG (例如 IgG1、IgG2、IgG3、IgG4), IgM 及其变体。所提到的变体为在 Fc 区发生的突变，包括但不限于 K214R、L234F、L235E、P331S、D356E、L358M 或其任意组合，例如 L234F/235E/P331S、K214R/L234F/L235E/P331S 等。

[0160] 根据具体实施方式，所提供的双特异性抗体，其包括第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，第二抗原结合部分的重链可变区和重链恒定结构域 (CH1 以及 Fc 区) 直接连接，第二抗原结合部分的轻链可变区和 CL 直接连接，形成 IgG 样结构，Fc 区的 C 末端氨基酸和第一抗原结合部分的轻链可变区的 N 末端氨基酸序列通过连接子 (所用到的连接子如 SEQ ID NO:18 所示) 连接，其中第一抗原结合部分的轻链可变区的 C 端氨基酸通过连接子 (所用到的连接子如 SEQ ID NO:16 所示) 和第一抗原结合部分的重链可变区的 N 末端氨基酸连接，如图 2 中 a 所示，所形成的双特异性抗体编号以 “BK-A” 开头。根据一种具体实施方式，所提供的双特异性抗体为 BK-A-101，其第一抗原结合部分的轻链可变区和重链可变区所形成的序列如 SEQ ID NO:28 所示，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列，第二抗原结合部分的重链可变区序列和重链恒定结构域 CH (SEQ ID NO:57 所示的序列) 连接，第二抗原结合部分的轻链可变区序列和轻链恒定结构域 CL (SEQ ID NO:55 所示的序列) 连接组成 IgG 型结

构；第一抗原结合部分的 N 端氨基酸和 Fc 区的 C 端氨基酸连接。

[0161] 根据具体实施方式，所提供的双特异性抗体为 BK-A-101-hu1，其是将 BK-A-101 抗体的第二抗原结合部分序列经过人源化改造后形成的双特异性抗体，BK-A-101-hu1 的第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列。其他序列与 BK-A-101 相同。

[0162] 根据具体实施方式，所提供的双特异性抗体为 BK-A-101-hu2，其是将 BK-A-101 抗体的第二抗原结合部分序列经过人源化改造后形成的双特异性抗体，BK-A-101-hu2 的第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO: 44 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列。其他序列与 BK-A-101 相同。

[0163] 根据具体实施方式，所提供的双特异性抗体为 BK-A-101-hu3，其是将 BK-A-101 抗体的第二抗原结合部分序列经过人源化改造后形成的双特异性抗体，BK-A-101-hu3 的第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO: 44 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列。其他序列与 BK-A-101 相同。

[0164] 根据具体实施方式，所提供的双特异性抗体为 BK-A-101-hu4，其是将 BK-A-101 抗体的第二抗原结合部分序列经过人源化改造后形成的双特异性抗体，BK-A-101-hu4 的第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO: 45 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列。其他序列与 BK-A-101 相同。

[0165] 根据具体实施方式，所提供的双特异性抗体为 BK-A-101-hu5，其是将 BK-A-101 抗体的第二抗原结合部分序列经过人源化改造后形成的双特异性抗体，BK-A-101-hu5 的第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO: 45 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列。其他序列与 BK-A-101 相同。

[0166] 根据具体实施方式，所提供的双特异性抗体为 BK-A-101-hu6，其是将 BK-A-101 抗体的第二抗原结合部分序列经过人源化改造后形成的双特异性抗体，BK-A-101-hu6 的第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO: 45 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列。其他序列与 BK-A-101 相同。

[0167] 根据具体实施方式，所提供的双特异性抗体包括第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，第一抗原结合部分的重链可变区和重链恒定结构域直接连接，第一抗原结合部分的轻链可变区与轻链恒定结构域直接连接，形成 IgG 样结构，IgG 样结构的 Fc 区的羧基端氨基酸通过连接子与第二抗原结合部分的轻链可变区的 N 末端氨基酸连接，第二抗原结合部分的重链可变区的 N 末端氨基酸通过连接子和第二抗原结合部分的轻链可变区的 C 末端氨基酸连接，如图 2 中 b 所示，所形成的双特异性抗体编号为以“BK-D”开头，其中所用到

的连接子均为(G₄S)₃。根据一种具体实施方式，所提供的双特异性抗体为BK-D-01，其包括SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32所示的第一抗原结合部分，以及SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:46所示的第二抗原结合部分。根据一种具体实施方式，所提供的双特异性抗体为BK-D-02，其包括SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:34所示的第一抗原结合部分，以及SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46所示的第二抗原结合部分。根据一种具体实施方式，所提供的双特异性抗体为BK-D-03，其包括SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:34所示的第一抗原结合部分，以及SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:46所示的第二抗原结合部分。根据一种具体实施方式，所提供的双特异性抗体为BK-D-04，其包括SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:32所示的第一抗原结合部分，以及SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:49所示的第二抗原结合部分。根据一种具体实施方式，所提供的双特异性抗体为BK-D-05，其包括SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:32所示的第一抗原结合部分，以及SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:48所示的第二抗原结合部分。根据一种具体实施方式，所提供的双特异性抗体为BK-D-06，其包括SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:32所示的第一抗原结合部分，以及SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:50所示的第二抗原结合部分。根据一种具体实施方式，所提供的双特异性抗体为BK-D-07，其包括SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32所示的第一抗原结合部分，以及SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46所示的第二抗原结合部分。根据一种具体实施方式，所提供的双特异性抗体为BK-D-08，其包括SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:32所示的第一抗原结合部分，以及SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46所示的第二抗原结合部分。根据一种具体实施方式，所提供的双特异性抗体为BK-D-09，其包括SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:32所示的第一抗原结合部分，以及SEQ ID NO:44和SEQ ID NO:47所示的第二抗原结合部分。根据一种具体实施方式，所提供的双特异性抗体为BK-D-10，其包括SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:34所示的第一抗原结合部分，以及SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:46所示的第二抗原结合部分。根据一种具体实施方式，所提供的双特异性抗体为BK-D-11，其包括SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:32所示的第一抗原结合部分，以及SEQ ID NO:43和SEQ ID NO:46所示的第二抗原结合部分。根据一种具体实施方式，所提供的双特异性抗体为BK-D-12，其包括SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:34所示的第一抗原结合部分，以及SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:46所示的第二抗原结合部分。根据一种具体实施方式，所提供的双特异性抗体为BK-D-13，其包括SEQ ID NO:29和SEQ ID NO:32所示的第一抗原结合部分，以及SEQ ID NO:45和SEQ ID NO:50所示的第二抗原结合部分。根据具体实施方式，BK-D结构的双特异性抗体中的重链恒定结构域序列如SEQ ID NO:54所示，轻链恒定结构域序列如SEQ ID NO:55所示。Fc区序列如SEQ ID NO:56所示。BK-D结构的双特异性抗体中的重链恒定结构域的序列（SEQ ID NO:54）

相较于 SEQ ID NO:57 所示的序列来说, Fc 区发生突变。根据具体实施方式, 所提供的双特异性抗体与 CD3 抗原的亲合活性相较于 Fc 未突变的人源化单抗来说, 有所下降, 双特异性抗体与 CD3 抗原的 EC₅₀ 值为 0.5~200nM、1~200nM、5~200nM、10~200nM、15~200nM、0.5~150nM、1~150nM、5~150nM、10~150nM、15~150nM、0.5~120nM、1~120nM、5~120nM、10~120nM、15~120nM、10~100nM、15~100nM、10~80nM、15~80nM、10~60nM、15~60nM、10~50nM、或 15~50nM。

[0168] 根据具体实施方式, 所提供的双特异性抗体, 其包括第一抗原结合部分和第二抗原结合部分, 第一抗原结合部分的 C 末端氨基酸和 Fc 区序列 (CH₂ 和 CH₃) 直接连接, Fc 区 C 末端氨基酸通过连接子和第二抗原结合部分的轻链可变区的 N 端氨基酸连接, 第二抗原结合部分的轻链可变区的 C 末端氨基酸和第二抗原结合部分的重链可变区的 N 末端氨基酸通过连接子 (结合具体实施方式, 连接子如 SEQ ID NO:18 所示) 连接, 如图 3 所示。根据一种具体实施方式, 所提供的双特异性抗体为 BK-B-110, 其中第一抗原结合部分的轻链可变区和重链可变区所形成的序列如 SEQ ID NO:28 所示, 第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列, Fc 区序列如 SEQ ID NO:56 所示。根据具体实施方式, 所提供的双特异性抗体为 BK-B-110-hu1, 其是将 BK-B-110 抗体的第二抗原结合部分经过人源化改造后形成的双特异性抗体, 其第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列。根据具体实施方式, 所提供的双特异性抗体为 BK-B-110-hu2, 其是将 BK-B-110 抗体的第二抗原结合部分经过人源化改造后的双特异性抗体, 其第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列。根据具体实施方式, 所提供的双特异性抗体为 BK-B-110-hu3, 其是将 BK-B-110 抗体的第二抗原结合部分经过人源化改造后的双特异性抗体, 其第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列。根据具体实施方式, 所提供的双特异性抗体为 BK-B-110-hu4, 其是将 BK-B-110 抗体的第二抗原结合部分经过人源化改造后的双特异性抗体, 其第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO: 45 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列。根据具体实施方式, 所提供的双特异性抗体为 BK-B-110-hu5, 其是将 BK-B-110 抗体的第二抗原结合部分经过人源化改造后的双特异性抗体, 其第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO: 45 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列。根据具体实施方式, 所提供的双特异性抗体为 BK-B-110-hu6, 其是将 BK-B-110 抗体的第二抗原结合部分经过人源化的双特异性抗体, 第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO: 45 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列。

[0169] 根据具体实施方式，所提供的双特异性抗体，其包括第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，第一抗原结合部分的 C 末端氨基酸直接和 Fc 区序列连接，Fc 区 C 末端氨基酸通过连接子和第二抗原结合部分的重链可变区的 N 端氨基酸通过连接子（根据具体实施方式，所用到的连接子如 SEQ ID NO:18 所示）连接，第二抗原结合部分的重链可变区的 C 末端氨基酸和第二抗原结合部分的轻链可变区的 N 末端氨基酸通过连接子（根据具体实施方式，所用到的连接子如 SEQ ID NO:18 所示）连接，如图 4 所示。根据一种具体实施方式，所提供的双特异性抗体抗体为 BK-C-120，其第一抗原结合部分具有 SEQ ID NO:28 所示的序列，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列，Fc 区序列如 SEQ ID NO:56 所示。根据具体实施方式，所提供的双特异性抗体为 BK-C-120-hu1，其是将抗体 BK-C-120 的第二抗原结合部分经过人源化改造后的双特异性抗体，其第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列。根据具体实施方式，所提供的双特异性抗体为 BK-C-120-hu2，其是将 BK-C-120 抗体的第二抗原结合部分经过人源化改造后的双特异性抗体，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列。根据具体实施方式，所提供的双特异性抗体为 BK-C-120-hu3，其是将 BK-C-120 抗体的第二抗原结合部分经过人源化改造后的双特异性抗体，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列。根据具体实施方式，所提供的双特异性抗体为 BK-C-120-hu4，其是将抗体 BK-C-120 的第二抗原结合部分经过人源化改造后的双特异性抗体，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO: 45 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列。根据具体实施方式，所提供的双特异性抗体为 BK-C-120-hu5，其是将抗体 BK-C-120 的第二抗原结合部分经过人源化改造后的双特异性抗体，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列。根据具体实施方式，所提供的双特异性抗体为 BK-C-120-hu6，其是将抗体 BK-C-120 的第二抗原结合部分经过人源化的双特异性抗体，第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO: 45 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列。

[0170] 多特异性抗体还可以根据需要选择性地包括第三抗原结合部分，第三抗原结合部分特异性识别并结合肿瘤抗原或者免疫检查点或第二细胞因子或其受体。所提到的肿瘤抗原包括肿瘤相关抗原（TAA）。肿瘤相关抗原是肿瘤细胞产生的抗原物质，能够引发宿主的免疫应答。肿瘤相关抗原可来自于癌症，包括但不限于原发或转移性黑色素瘤，胸腺瘤，淋巴瘤，肉瘤，肺癌，肝癌，非霍奇金淋巴瘤，白血病，子宫癌，宫颈癌，膀胱癌，卵巢癌，乳腺癌等等。TAA 可以是患者特异性的。例如包括但不限于 p53, Ras, β -连环蛋白, CDK4,

α -辅肌动蛋白-4, CD20, PSMA, Her2, EGFR 等等。根据具体实施方式, 肿瘤抗原包括但不限于 AFP、BCMA、 β -catenin、CD5、CD19、CD20、CD22、CD30、CD38、CD70、CD123、CD133、CD171、CD138、CDK-4、CEA、CA-125、Caspase 8、c-Met、EGFR、Ep-CAM、EphA2、ETA、FAP、GPC3、GP100、GD2、Her2、HPV16、Igk chain、Ley、Mesothlin、MUC-1、MUC16、MAGE、MART1、NKG2D 配体、CLL1、NY-ESO-1、P53、RAS、OSA、PAP、PSCA、ROR1、ROR2、PSMA、SSTR2、Trop-2、TYR、VEGFR、WT1 中的至少一种。所提到的免疫检查点包括但不限于 PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、BTLA、TIM-3、TIGIT、VISTA、TIPE2、Galectin-9、NKG2A、KIRs、B7-H3、B7-H7、2B4、DNAM-1、PTA1、TLISA1、Vstm3、VSIG9、Siglecs 家族、GITR、OX40、4-1BB、LAYN、LIRB1-5 或其相关受体。第三抗原结合部分还可以特异性识别并结合第二细胞因子或其受体, 所提到的第二细胞因子或其受体包括但不限于 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-17a、IL-17b、IL-17c、IL-17d、IL-17f、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-34、IL-35、IL-37、EPO、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、XCL1、XCL2、CX3CL1、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、TNF α 、TGF β 、VEGF、GM-CSF、GCSF 或其相关受体。需要说明的是, 第一细胞因子或其受体、第二细胞因子或其受体可以相同, 也可以不同。

[0171] 所提供的多特异性抗体可以通过多核苷酸进行编码。术语“核酸”或“多核苷酸”是指 DNA 或 RNA 及其呈单链或双链形式的聚合物。根据具体实施方式, 多核苷酸编码多特异性抗体, 可以用来在体内或者体外表达多特异性抗体。所提到的多核苷酸是可分离的, 包括但不限于 DNA、RNA 或者 cDNA 等等。可以采用本领域的常规方法获得分离的多核苷酸序列, 用来编码多特异性抗体。

[0172] 为了制备所提到的抗体, 可以将编码抗体的多核苷酸序列插入到可复制的表达载体中, 并在宿主细胞或者无细胞表达系统中表达。为此, 还提供了一种构建体, 包含上述所述的多核苷酸。“构建体”是指任何重组多核苷酸分子(诸如质粒、病毒、自主复制多核苷酸分子、噬菌体或线性或环状单链或双链 DNA 或 RNA 多核苷酸分子), 衍生自任何来源, 能够与宿主基因组整合或自主复制, 并在宿主细胞中完成抗体的表达。本领域常用的多种方法都可以用来获得构建体, 包括体外重组 DNA 技术、DNA 合成技术、体内重组技术等

等，例如可以将多核苷酸插入到表达载体多克隆位点形成构建体。构建体中可以根据需要含有启动子、终止子、标记基因等多种操纵因子，这些操纵因子可操作地与多核苷酸进行连接。启动子通常用来提供开始转录的信号，启动子可以根据需要选择乳糖启动子（Lac）、Trp 启动子、Tac 启动子、噬菌体的 PL 和 PR 启动子；终止子在转录过程中提供转录终止的信号，构建体上的标记基因常用作筛选。当然还可以根据需要还有增强子，增强蛋白的表达。表达载体不做特殊限制，可以是市售的一些表达载体，也可以是根据需要人工改造后的表达载体，例如质粒、噬菌体、病毒等。病毒可以为植物细胞病毒、哺乳动物细胞病毒等。构建体可以在体外表达抗体或者蛋白，也可以被转入到细胞中表达抗体或者蛋白。

[0173] 为了生产或者表达多特异性抗体，用作治疗剂中成分。还提供了一种宿主细胞，含有上述多核苷酸或者上述构建体。任何适用于多核苷酸或者构建体进行抗体或蛋白表达的细胞都可以作为宿主细胞。宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；也可以是真核细胞，例如酵母细胞、哺乳动物细胞等。常用的宿主细胞可以是酵母细胞、中国仓鼠卵巢（CHO）细胞（例如 CHO-K1、CHO DG44、CHO-S、CHO-DXB11、CHO-M 等）、HEK-293 细胞、COS 细胞、果蝇 S2 或 Sf9 的昆虫细胞、NS0 细胞、Hela 细胞、3T3 细胞、BHK 细胞等。采用本领域常用的方法可以获得含有多核苷酸或者构建体的宿主细胞，如显微注射法、电穿孔法、化学转染法、病毒介导的转化法等。

[0174] 本发明还提供了一种用于治疗肿瘤和/或癌症的具有协同作用的联合药物的药盒，包括：

[0175] 第一容器，该第一容器装有根据本发明所述的治疗剂中的第一组合物；

[0176] 第二容器，该第二容器装有根据本发明所述的治疗剂中的第二组合物，或者装有本发明所提到的多特异性抗体，其中所述第一容器和所述第二容器是独立的；以及

[0177] 载明给药时机和给药方式的说明书。

[0178] 本文中所提到的第一组合物和第二组合物以及多特异性抗体可以根据需要制备成不同的剂型，以满足给药的需求。例如针剂、粉剂、液体制剂等等。在制备成不同的剂型时，第一活性成分或者第二活性成分可以和不同的药学上可接受的载体进行复配。

[0179] 本发明还提供了所述的分离的、具有根据本发明所述的标记性多肽的编码序列的核酸在制备用于治疗或预防肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

[0180] 本发明还提供了所述的药盒在制备用于治疗或预防肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

[0181] 所述肿瘤和/或癌症包括：乳腺癌，头颈部肿瘤，滑膜癌，肾癌，结缔组织癌，黑色素瘤，肺癌，食管癌，结肠癌，直肠癌，脑癌，肝癌，骨癌，绒毛膜癌，胃泌素瘤，嗜铬细胞瘤，催乳素瘤，vonHippel-Lindau 病，Zollinger-Ellison 综合征，肛门癌，胆管癌，膀胱癌，

输尿管癌, 神经胶质瘤, 神经母细胞瘤, 脑膜瘤, 脊髓肿瘤, 骨软骨瘤, 软骨肉瘤, 尤文氏肉瘤, 原发部位不明癌, 类癌, 纤维肉瘤, 佩吉特病, 宫颈癌, 胆囊癌, 眼癌, 卡波西氏肉瘤, 前列腺癌, 睾丸癌, 皮肤鳞状细胞癌, 间皮瘤, 多尖端骨髓瘤, 卵巢癌, 胰腺内分泌瘤, 胰高血糖素瘤, 胰腺癌, 阴茎癌, 垂体瘤, 软组织肉瘤, 视网膜母细胞瘤, 小肠癌, 胃癌, 胸腺癌, 滋养细胞癌, 葡萄胎, 子宫内膜癌, 阴道癌, 外阴癌, 蕈样真菌病, 胰岛素瘤, 心脏癌, 脑膜癌, 腹膜癌, 胸膜癌和血液癌。

[0182] 本发明还提供了一种治疗肿瘤和/或癌症的方法, 包括: 对受试者施用根据本发明所述的治疗剂中的第一组合物; 和对所述受试者施用根据本发明所述的治疗剂中的第二组合物或者施用本发明所提到的多特异性抗体。“受试者”包括任何人或非人动物。术语“非人动物”包括所有脊椎动物, 例如哺乳动物和非哺乳动物, 诸如非人灵长类动物、羊、狗、猫、马、牛、鸡、两栖动物、爬行动物等。根据具体实施方式, 所述受试者为肿瘤和/或癌症患者。所提到的“治疗”意指能够导致疾病症状的严重性降低, 疾病无症状期的频率和持续时间增加, 或者防止因疾病引起的痛苦降低。经过治疗后, 相较于未经过治疗的受试者来说, 受试者体内肿瘤细胞或癌细胞的抑制率达到 10% 以上, 15% 以上, 20% 以上, 25% 以上, 30% 以上, 40% 以上, 45% 以上, 50% 以上, 55% 以上, 60% 以上, 65% 以上, 70% 以上, 75% 以上, 80% 以上, 85% 以上, 甚至是 90% 以上或者 95% 以上。

[0183] 所述治疗剂中的第一组合物和第二组合物或多特异性抗体可以同时(例如, 作为混合物)、分开但同时(例如, 分别通过瘤内和静脉注射给药)或依次施用(例如, 首先施用第一组合物, 然后施用第二组合物或者多特异性抗体)。

[0184] 优选地, 所述方法包括以下依次进行的步骤:

[0185] 1) 对所述受试者首先施用所述第一组合物; 和

[0186] 2) 在施用所述第一组合物之后, 对所述受试者施用所述的治疗剂中的第二组合物或者施用多特异性抗体。

[0187] 优选地, 在首先施用所述第一组合物之后的第 1-60 天, 对所述受试者施用所述的治疗剂中的第二组合物或者多特异性抗体。

[0188] 以施用第一组合物和第二组合物为例, “在首先施用所述第一组合物之后的第 1-60 天, 对所述受试者患者施用所述的治疗剂中的第二组合物”是指首次第二组合物的施用与首次第一组合物施用的时间间隔为 1-60 天(例如, 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13... 60 天), 或首次第二组合物的施用与在其之前最相邻一次的所述第一组合物施用的时间间隔为 1-60 天(例如, 1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13... 60 天)。优选地, 首次第二组合物的施用与在其之前最相邻一次的所述第一组合物施用的时间间隔为 1-

30 天（例如，1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13... 30 天）。更优选地，首次第二组合物的施用与在其之前最相邻一次的所述第一组合物施用的时间间隔为 5-20 天（例如，5、6、7、8、9、10... 20 天）。

[0189] 需要说明的是，在对所述受试者施用第一组合物之后，对所述受试者可以施用不止一次所述第二组合物，例如可以施用两次、三次、四次等多次第二组合物。第二组合物的施用次数可以根据受试者的情况进行调整。同样地，在对所述受试者施用第二组合物之前，可以不止施用一次所述第一组合物，例如可以施用两次、三次、四次等多次第一组合物。第一组合物的施用次数可以根据受试者的情况进行调整。类似地，对受试者可以施用多次第一组合物，并施用多次第二组合物。第一组合物和第二组合物的施用次数均可以根据受试者的情况进行调整。

[0190] 在本发明的一个优选实施方案中，所述核酸的施用剂量为 0.01-10mg/天，1 天施用 1-3 次，连续施用 1-7 天。所述核酸能够在受试者体内编码标记性多肽。

[0191] 在本发明的一个优选实施方案中，所述重组溶瘤痘病毒的施用剂量为：每个疗程总剂量范围为约 5×10^7 - 5×10^{12} 个病毒颗粒（可以单次施用或多次施用），或上述范围间的任何值，或者所述重组溶瘤痘病毒的施用剂量为：每个疗程总剂量范围为约 5×10^7 - 5×10^{12} PFU（可以单次施用或多次施用），或上述范围间的任何值。其精确剂量还取决于从业者的判断以及每个人的特有情况。在多次施用的情况下，1 天施用 1-3 次，连续施用 1-7 天。

[0192] 在本发明的一个优选实施方案中，所述多特异性抗体的施用剂量为 0.1-50mg/Kg 体重，例如为 0.5-50mg/kg 体重，1-50mg/Kg 体重，2-49mg/Kg 体重，3-48mg/Kg 体重，4-47mg/Kg 体重，5-46mg/Kg 体重，6-45mg/Kg 体重，7-44mg/Kg 体重，8-43mg/Kg 体重，9-42mg/Kg 体重，10-41mg/Kg 体重，11-40mg/Kg 体重，12-39mg/Kg 体重，13-38mg/Kg 体重，14-37mg/Kg 体重，15-36mg/Kg 体重，16-35mg/Kg 体重，17-34mg/Kg 体重，18-33mg/Kg 体重，19-32mg/Kg 体重，20-31mg/Kg，21-30mg/Kg 体重，22-29mg/Kg 体重，23-28mg/Kg 体重，24-27mg/Kg 体重，25-26mg/Kg 体重，10-20mg/Kg 体重，15-25mg/Kg 体重。

[0193] 在某些实施方案中，所述治疗肿瘤和/或癌症的方法还包括对患者施用其它用于治疗肿瘤和/或癌症的药物，和/或用于调节患者免疫系统的药物，以增强肿瘤治疗的效果。所述其它用于治疗肿瘤和/或癌症的药物包括但不限于：化疗药物，例如环磷酰胺、氟达拉滨（fludarabine）；放疗药物；免疫抑制剂，例如环孢素、硫唑嘌呤、甲氨蝶呤、麦考酚酯（mycophenolate）、FK50；抗体，例如抗 CD3、IL-2、IL-6、IL-17、TNF α 的抗体。

[0194] 所述 DNA 可以配制成通过瘤内注射或静脉给药；所述 mRNA 可以配制成通过瘤内注射或静脉给药。例如，以质粒的形式直接肿瘤内注射，也可用脂质体包装后瘤内注射，

也可连接到纳米颗粒上（如多聚赖氨酸、聚氨基酸、聚亚乙基胺和壳聚糖等聚合物）瘤内注射，也可瘤内注射后用电转方法加强转染率。

[0195] 所述重组病毒可以配制成不同的给药方式，包括但不限于通过瘤内注射给药或静脉给药或者颅内注射给药或者腹腔给药等等。任何可以将重组病毒注射到受试者体内发挥治疗效果的给药方式，均可以予以接受。给药方式可以根据受试者需要进行调整，也可以多种给药方式组合施用。所述多特异性抗体可以通过多种方式给药，例如瘤内注射给药，静脉给药，腹腔注射等。多特异性抗体的给药方式可以根据受试者需要进行调整，也可以多种给药方式组合施用。

[0196] 本发明还提供了一种新型免疫疗法，包括：对受试者施用治疗有效量的溶瘤病毒，所述溶瘤病毒的基因组含有标记性多肽的编码序列，所述标记性多肽具有可操作地连接的胞外抗原决定区、间隔部分和跨膜部分，所述胞外抗原决定区的氨基酸序列含有一个或者多个抗原表位多肽的氨基酸序列，在自然状态下，所述受试者细胞膜蛋白或分泌蛋白的氨基酸序列不含有所述抗原表位多肽的氨基酸序列；和对所述受试者施用治疗有效量的多特异性抗体，所述多特异性抗体至少包括第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，所述第一抗原结合部分能够特异性识别并结合所述标记性多肽的所述胞外抗原决定区，所述第二抗原结合部分能够特异性识别并结合免疫细胞抗原或第一细胞因子或其受体；所述多特异性抗体还可以选择性地包括第三抗原结合部分，所述第三抗原结合部分特异性识别并结合肿瘤抗原或免疫检查点或第二细胞因子或其受体。根据具体实施方式，所述第二抗原结合部分能够特异性识别并结合免疫细胞表面抗原。

[0197] 根据具体实施方式，包括以下依次进行的步骤：

[0198] 1) 对所述受试者施用治疗有效量的溶瘤病毒；和

[0199] 2) 在施用所述溶瘤病毒后，对所述受试者施用治疗有效量的所述多特异性抗体。

[0200] 本发明还提供了一种抗 CD3 抗体，其通过对鼠源 SP34 进行序列优化，以及人源化改造，能够特异性靶向 CD3 抗原，而且与人和食蟹猴 CD3 抗原表现出更高的亲和力。根据具体实施方式，抗 CD3 抗体具有 SEQ ID NO: 43、44 或 45 所示的重链可变区序列。根据具体实施方式，抗 CD3 抗体具有 SEQ ID NO:46、47、48、49、50、51、52 或 53 所示的轻链可变区序列。根据具体实施方式，抗 CD3 抗体具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列。根据具体实施方式，抗 CD3 抗体具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列。根据具体实施方式，抗 CD3 抗体具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列。根据具体实施方式，抗 CD3 抗体具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:51 所示

的轻链可变区序列。根据具体实施方式，抗 CD3 抗体具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列。根据具体实施方式，抗 CD3 抗体具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列。抗体中的重链恒定结构域序列如 SEQ ID NO:57 所示，轻链恒定结构域序列如 SEQ ID NO:55 所示。根据具体实施方式，所提供的抗 CD3 抗体以 10nM 或更小的 EC50 结合人 CD3 或者猴（例如食蟹猴（cynomolgus））CD3，例如与 CD3 的亲和力 EC50 值小于 5nM，小于 4nM，小于 3nM，小于 2nM，小于 1nM，小于 0.8nM，小于 0.5nM，小于 0.3nM，或者是小于 0.1nM，小于 0.05nM。

[0201] 下面参考例子对本发明的技术方案进行详细说明。需要说明的是，这些例子仅用于方便本领域技术人员的理解，不应看作是对本发明保护范围的限制。下面详细描述本发明的例子，所描述的例子是示例性的，旨在用于解释本发明，而不能理解为对本发明的限制。

[0202] 例子

[0203] 例子中所用到的细胞株信息如下：

[0204] 人卵巢癌细胞株 SKOV3、人结直肠癌细胞株 HCT116、人胰腺癌细胞株 PANC-1 均购自 ATCC。

[0205] 人肝癌细胞株 SK-HEP-1、人脑胶质瘤细胞株 U251、人黑素瘤细胞株 A375 购自上海中科院细胞库。

[0206] MC38 细胞株购自南京科伯生物科技有限公司。

[0207] 人胚胎肾细胞 293T 来自上海吉凯基因医学科技股份有限公司。

[0208] 人外周血单个核细胞（PBMC）购自上海迈顺。

[0209] Jurkat 细胞购自睿智化学。

[0210] SKOV3 和 HCT116 用 McCoy 5A（商购自：Gibco）+10%FBS（商购自：PAN）培养，SK-HEP-1 和 U251 用 MEM（商购自：Gibco）+10%FBS 培养，PANC-1、A375 和 293T 用 DMEM（商购自：Gibco）+10%FBS 培养。

[0211] 流式缓冲液为 1×DPBS+2%FBS，1×DPBS 商购自白鲨生物科技有限公司，FBS 商购自 PAN。

[0212] LV-TT3-GFP 慢病毒的包装

[0213] 将 293T 细胞用 0.25%胰蛋白酶（商购自碧云天）消化成单细胞后按 2×10^6 /ml 重悬于 packing medium。Packaging medium 的配方为 Opti-MEM（商购自：Gibco）+5%FBS（商购自：Gibco）+Sodium pyruvate（商购自：Gibco，终浓度为 200mM）。按 1mL/孔接种于 6

孔板。根据 Lipo3000 说明书配制慢病毒质粒混合物：(1) 250 μ L Opti-MEM+7 μ L Lipo3000，(2) 250 μ L Opti-MEM+6 μ L p3000+慢病毒 4 质粒（摩尔质量比=1: 1: 1: 1）。然后将 (1) 和 (2) 混匀后室温孵育 15min，于 6 孔板每孔加入 500 μ L 质粒混合物后混匀置于培养箱中继续培养。转染 48h 后收获培养液，3000 $\times$ rpm 10min 离心后，取上清病毒液分装并冻存于 -80 $^{\circ}$ C 备用。

[0214] 稳定表达 TT3 的 HCT116 细胞株(HCT116-TT3)和 SK-HEP-1(SK-HEP-1-TT3)的构建

[0215] 将野生型 HCT116 用 0.25%胰蛋白酶消化成单细胞后，按 $1\times 10^5/500\mu\text{L}$ /孔接种于 48 孔板，并加入 300 μ L 慢病毒 LV-TT3-GFP 以及聚凝胺 (polybrene) (商购自：上海翊圣生物科技有限公司，终浓度 8 $\mu\text{g/mL}$)，放置于培养箱中培养并传代扩增。一周后将感染的细胞消化并按照 2 个细胞/孔接种于 96 孔板，每孔 100 μ L，置于培养箱继续培养。持续培养约 10 天长出单克隆细胞后，在镜下挑选全部细胞 GFP 阳性且只有一团细胞克隆的孔，并传代扩增。通过流式检测 GFP 和 TT3 的表达，根据 GFP 和 TT3 的表达比例和强度筛选并最终得到最优单克隆，获得表达 TT3 抗原的稳转细胞株 (HCT116-TT3)。

[0216] 通过类似的方法构建表达 TT3 抗原的稳转细胞株 SK-HEP-1-TT3。

[0217] T 细胞的制备

[0218] 将 PBMC 细胞复苏后加入完全培养基在培养箱孵育 2h，孵育结束按 $5\times 10^5/500\mu\text{L}$ /孔接种于 24 孔板，并加入 10 μ L Dynabeads $^{\circledR}$ Human T-Activator CD3/CD28 (商购自：Gibco) 激活。随后根据细胞生长状况隔天补充完全培养基，持续培养至第 10 天去除磁珠并将细胞冻存储备。完全培养基为 AIM-V+5%FBS+hIL-2(终浓度为 100IU/ml)，AIM-V 商购自 Gibco，人重组白介素 2 (hIL-2) 商购自江苏金丝利药业股份有限公司。

[0219] 痘病毒 (DDVV-TT3) 构建：可参考国际公开号为 WO2020038490A (国际申请号为 PCT/CN2019/102480) 的 PCT 专利中的方法获得痘病毒 DDVV-TT3。需要说明的是，在 WO2020038490A 专利中痘病毒被表示为：vvDD-TT3。二者代表同一重组痘病毒。

[0220] 所提到的人源化的抗 CD3 的单抗及其活性表征结果具体如下：

[0221] 基于 SP34 抗体序列在数据库中检索人源化序列模板，并基于 3D 结构对于不同氨基酸的重要性进行分析，必要时对影响结构的关键氨基酸进行回复突变，确定相应的人源化抗体。将人源化抗体与人类来源的恒定区序列进行融合，构建至 pcDNA3.1 哺乳动物表达载体中，构建成嵌合抗体的形式。然后利用哺乳动物细胞体系对所获得的不同抗体进行

表达纯化，获得纯度至少在 90%以上的不同的抗体。所表达的抗体序列分别为 CD3 Ab01~CD3 Ab15，所表达的抗体为 IgG 型抗体，抗体的重链恒定结构域如 SEQ ID NO:57 所示，抗体的轻链恒定结构域如 SEQ ID NO:55 所示。各抗体的重链可变区和轻链可变区的序列在本文中的编号分别为：抗体 CD3 Ab01 的重链可变区如 SEQ ID NO:43 所示，轻链可变区如 SEQ ID NO:46 所示。抗体 CD3 Ab02 的重链可变区如 SEQ ID NO:43 所示，轻链可变区如 SEQ ID NO:47 所示。抗体 CD3 Ab03 的重链可变区如 SEQ ID NO:43 所示，轻链可变区如 SEQ ID NO:48 所示。抗体 CD3 Ab04 的重链可变区如 SEQ ID NO:43 所示，轻链可变区如 SEQ ID NO:49 所示。抗体 CD3 Ab05 的重链可变区如 SEQ ID NO:43 所示，轻链可变区如 SEQ ID NO:50 所示。抗体 CD3 Ab06 的重链可变区如 SEQ ID NO:44 所示，轻链可变区如 SEQ ID NO:46 所示。抗体 CD3 Ab07 的重链可变区如 SEQ ID NO:44 所示，轻链可变区如 SEQ ID NO:47 所示。抗体 CD3 Ab08 的重链可变区如 SEQ ID NO:44 所示，轻链可变区如 SEQ ID NO:48 所示。抗体 CD3 Ab09 的重链可变区如 SEQ ID NO:44 所示，轻链可变区如 SEQ ID NO:49 所示。抗体 CD3 Ab10 的重链可变区如 SEQ ID NO:44 所示，轻链可变区如 SEQ ID NO:50 所示。抗体 CD3 Ab11 的重链可变区如 SEQ ID NO:45 所示，轻链可变区如 SEQ ID NO:46 所示。抗体 CD3 Ab12 的重链可变区如 SEQ ID NO:45 所示，轻链可变区如 SEQ ID NO:47 所示。抗体 CD3 Ab13 的重链可变区如 SEQ ID NO:45 所示，轻链可变区如 SEQ ID NO:48 所示。抗体 CD3 Ab14 的重链可变区如 SEQ ID NO:45 所示，轻链可变区如 SEQ ID NO:49 所示。抗体 CD3 Ab15 的重链可变区如 SEQ ID NO:45 所示，轻链可变区如 SEQ ID NO:50 所示。

[0222] 通过 ELISA 方法对所制备得到的人源化抗体进行活性检测。实验过程如下：使用包被液将 hCD3（人源的 CD3 抗原）稀释至 0.5ug/mL，然后按照 100uL/孔加入到 96 孔板中，4°C 孵育过夜。采用 PBST 清洗，然后每孔加入 200uL 封闭液，于 37°C 温度下封闭 2h。采用 PBST 清洗，然后按 100ul/孔加入稀释抗体（初始浓度为 40nM，按照 1:6 进行梯度稀释），于 37°C 温度下孵育 2h。采用 PBST 清洗，然后按 100uL/孔加入 HRP 标记山羊抗人 IgG，37°C 孵育 1h。采用 PBST 清洗，按 100uL/孔加入 TMB，于 37°C 显色 10-20min，每孔加入 50uL 2M H₂SO₄ 终止反应。在 450nm 条件下读取数值。抗体 CD3 Ab01、CD3 Ab02、CD3 Ab03、CD3 Ab04、CD3 Ab05、CD3 Ab06、CD3 Ab07、CD3 Ab08、CD3 Ab09、CD3 Ab10、CD3 Ab11、CD3 Ab12、CD3 Ab13、CD3 Ab14、CD3 Ab15 的 EC₅₀ 结果分别为：0.0096nM、0.0117nM、0.0042nM、0.0068nM、0.0099nM、0.0126nM、0.0129nM、0.0116nM、0.0080nM、0.0020nM、0.0118nM、0.0095nM、0.0099nM、0.0087nM、0.0099nM。

[0223] 通过 FACs 技术对所制备的人源化抗体的结合活性进行了检测。实验过程如下：用

Jurkat 细胞或者 293T-CD3 细胞铺板, 采用 FACS 缓冲液清洗, 1200rpm, 离心 3-5min; 然后加入稀释的不同浓度的抗体, 于 4°C 孵育 0.5h, 1200rpm, 离心 3-5min, 用 FACS 缓冲液清洗; 然后按 100uL/孔加入山羊抗人 IgG 二抗 (厂家: Abcam, ab98596), 于 4°C 孵育 0.5h; 1200rpm, 离心 3-5min, 用 FACS 缓冲液清洗, 并加入 50uL 的 FACS 缓冲液重悬细胞, 用流式细胞仪检测。其中抗体 CD3 Ab01、CD3 Ab02、CD3 Ab03、CD3 Ab04、CD3 Ab05、CD3 Ab06、CD3 Ab07、CD3 Ab08、CD3 Ab09、CD3 Ab10、CD3 Ab11、CD3 Ab12、CD3 Ab13、CD3 Ab14、CD3 Ab15 与 Jurkat 细胞的 FACS 检测结果 EC50 结果分别为: 3.299 nM、2.642nM、2.284nM、1.182nM、1.024nM、3.309nM、2.415nM、1.823nM、0.862nM、0.784nM、4.451nM、3.518nM、3.194nM、1.142nM、1.108nM; 与 293T-CD3 细胞的 FACS 检测结果 EC50 结果分别为 22.600nM、12.300nM、10.060nM、5.234nM、4.267nM、12.990nM、9.020nM、4.238nM、4.401nM、2.438nM、21.550nM、15.770nM、12.360nM、5.728nM、3.479nM。

[0224] 所提到的人源化的抗 TT3 的单抗及其活性表征结果具体如下:

[0225] 对抗体(编号 Ab-TT3, 其重链可变区为 SEQ ID NO:26, 轻链可变区为 SEQ ID NO:27)进行人源化改造。具体地, 基于 Ab-TT3 抗体序列在数据库中检索人源化序列模板, 为了保持 CDR 区的构象, 重点关注三类残基, 包括位于 VL 和 VH 结合界面上的残基, 靠近 CDR 区并且包埋于蛋白内部的残基, 以及与 CDR 区有直接相互作用的残基, 相互作用包括: 疏水相互作用、氢键和盐桥。并给予 3D 结构对于不同氨基酸的重要性进行分析, 必要时对影响结构的关键氨基酸进行回复突变, 确定相应的人源化抗体。

[0226] 将人源化抗体与人类来源的恒定区序列进行融合, 构建至 pcDNA3.1 哺乳动物表达载体中, 构建成嵌合抗体的形式。然后利用哺乳动物细胞体系对所获得的不同抗体进行表达纯化, 获得纯度至少在 90%以上的不同的抗体, 所表达的抗体分别为 TT3 Ab-1、TT3 Ab-2、TT3 Ab-3, 其中抗体的重链恒定结构域如 SEQ ID NO:57 所示, 抗体的轻链恒定结构域如 SEQ ID NO:55 所示。TT3 Ab-1 具有 SEQ ID NO:29 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:32 所示的轻链可变区。TT3 Ab-2 具有 SEQ ID NO:30 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:33 所示的轻链可变区。TT3 Ab-3 具有 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区和 SEQ ID NO:34 所示的轻链可变区。同时对 TT3 Ab-3 抗体的 Fc 区进行突变, 突变后的抗体编号为 TT3 Ab-3mu, 其重链恒定结构域如 SEQ ID NO:54 所示, 轻链恒定结构域如 SEQ ID NO:55 所示。

[0227] 通过 ELISA 方法对所制备的人源化抗体进行活性检测。实验过程如下: 使用包被液将 TT3 抗原稀释至 0.5ug/mL, 按照 100uL/孔加入到 96 孔板中, 4°C 孵育过夜。使用 PBST 清洗, 然后每孔加入 200uL 抗体封闭液, 37°C 封闭 2h。使用 PBST 清洗, 按 100uL/孔加入

不同的抗体（起始浓度 100nM，按照 1: 6 进行梯度稀释），37°C 孵育 2h。使用 PBST 清洗，按 100uL/孔加入 HRP 结合的山羊抗人/鼠 IgG 抗体，37°C 孵育 1h。使用 PBST 清洗，按 100uL/孔加入 TMB，37°C 显色 10-20min；每孔加入 50ul 2M 硫酸终止反应。在 450nm 波长下读取 OD 值。抗体 TT3 Ab-1、TT3 Ab-2、TT3 Ab-3、Ab-TT3 的 EC50 值分别为：0.0104nM、0.0105nM、0.0140nM、0.0878nM。

[0228] 通过 FACs 方法对所制备的人源化抗体进行活性检测，实验过程如下：利用不同的细胞（HCT116-TT3、SK-HEP-1-TT3、MC38-TT3）铺板，然后用 FACS 缓冲液清洗，1200rpm，离心 3-5min，加入不同浓度的稀释抗体（起始浓度为 100nM，按照 1: 5 进行梯度稀释），4°C 孵育 0.5h，1200rpm，离心 3-5min。用 FACS 缓冲液清洗，然后按 1: 250 稀释山羊抗人 IgG 二抗（Abcam, ab98596）抗体，按 100uL/孔加入板中，4 度孵育 0.5h，1200rpm，离心 3-5min，用 FACs 缓冲液清洗，然后加入 50uL 的 FACs 缓冲液重悬细胞，用流式细胞仪检测。其中抗体 TT3 Ab-1、TT3 Ab-2、TT3 Ab-3 与 HCT116-TT3 细胞的 FACs 亲和活性 EC50 结果分别为：0.568nM、0.958nM、0.692nM；与 SK-HEP-1-TT3 细胞的 FACs 亲和活性 EC50 结果分别为 0.546nM、1.527nM、0.738nM；与 MC38-TT3 细胞的 FACs 亲和活性 EC50 结果分别为 1.201nM、2.327nM、0.588nM。

[0229] 相同的方法对 Fc 突变后的抗体（TT3 Ab-3mu）进行检测，发现 Fc 突变前与 Fc 突变后均能与 TT3 抗原结合，具有生物学活性，且二者的结合活性差别不大。

[0230] 实施例 1

[0231] 通过基因工程的方法制备双抗 BK-A-101。具体为将编码双抗重链部分和轻链部分的核苷酸序列合成后按本领域常规技术克隆到 pcDNA3.1 表达载体（购自金斯瑞）中，然后通过电转的转染方法瞬时转染 CHO-S 细胞表达双抗蛋白，收集上清，并通过蛋白 A 亲和柱进行纯化，通过 HPLC 和 SDS-PAGE 测定纯化后的抗体的纯度，经过检测确定双抗 BK-A-101 的纯度在 90% 以上。然后通过流式检测双抗 BK-A-101 与靶抗原的结合活性。相似的方法获得 BK-A 结构的其他双特异性抗体（包括 BK-A-101-hu1、BK-A-101-hu2、BK-A-101-hu3、BK-A-101-hu4、BK-A-101-hu5、BK-A-101-hu6）。

[0232] 采用相似的方法通过电转瞬时转染 293F 细胞制备获得 BK-B 结构的双特异性抗体（BK-B-110、BK-B-110-hu1、BK-B-110-hu2、BK-B-110-hu3、BK-B-110-hu4、BK-B-110-hu5、BK-B-110-hu6），BK-C 结构的双特异性抗体（BK-C-120、BK-C-120-hu1、BK-C-120-hu2、BK-C-120-hu3、BK-C-120-hu4、BK-C-120-hu5、BK-C-120-hu6）以及 BK-D 结构的双特异性抗体（包括 BK-D-01、BK-D-02、BK-D-03、BK-D-04、BK-D-05、BK-D-06、BK-D-07、

BK-D-08、BK-D-09、BK-D-10、BK-D-11、BK-D-12、BK-D-13)。

[0233] 通过流式细胞技术 (FACS) 检测双特异性抗体与 T 细胞的结合活性, 步骤如下所示: 将 T 细胞用流式缓冲液重悬并分装于 96 孔板。然后准备不同的抗体进行孵育, 组 1 为空白对照组, 不添加任何抗体染色; 组 2 加入同型对照抗体 (阴性对照, human IgG1, 商购自 Biolegend), 使其终浓度为 50nM; 组 3 加入抗 CD3 单抗 (L2K 抗体, 商购自康源博创, 以下用到的抗 CD3 单抗与此相同), 使其终浓度为 50nM; 组 4 加入 BK-A-101 双特异性抗体, 使其终浓度分别为 50nM。各组于 2~8℃ 孵育 30min 后, 用流式缓冲液稀释清洗重悬, 每组加入 PE 标记的抗人 IgG 的二抗 (商购自 ABCAM, 1:200 稀释), 于 2~8℃ 孵育 30min。用流式缓冲液稀释清洗后用 200μL 流式缓冲液重悬, 上机检测 (Novocyte)。其结果如图 5 所示, 空白对照和阴性对照流式检测结果为阴性, 阳性对照通过流式检出 99.45% 的阳性率, 双特异性抗体检出 99.44% 的阳性率, 结果表明双特异性抗体 BK-A-101 具有较高的 T 细胞结合活性。

[0234] 通过流式细胞技术 (FACS) 检测双抗 BK-A-101 与 HCT116 细胞或者 HCT116-TT3 细胞的结合活性, 步骤如下所示: 将 HCT116 和 HCT116-TT3 细胞用 0.25% 胰酶分别消化成单细胞并重悬于流式缓冲液。分别添加 BK-A-101 双抗, 使其终浓度分别为 0.1nM、1nM、10nM 和 100nM, 混匀后于 2~8℃ 孵育 30min。用流式缓冲液稀释清洗后重悬, 每组加入 PE 标记的抗人 IgG 的二抗 (1:200 稀释), 于 2~8℃ 孵育 30min。用流式缓冲液稀释清洗后用 200μL 流式缓冲液重悬, 上机检测 (Novocyte)。其结果如图 6 和图 7 所示。

[0235] 其中图 6 示出了双特异性抗体与 HCT116 细胞株的结合活性检测结果, 结果表明即使随着双特异性抗体浓度的增加, 其也并不表现出与 HCT116 细胞株的结合活性。图 7 中示出了双抗 BK-A-101 与 HCT116-TT3 细胞的结合活性, 结果表明随着双特异性抗体浓度的增加, 流式检测的阳性率呈现递增的趋势。图 6 和图 7 的结果表明双特异性抗体对 TT3 结合的特异性。

[0236] 通过类似的方法检测双特异性抗体与 SK-HEP-1 细胞株以及 SK-HEP-1-TT3 细胞株的结合活性。试验结果表明, 双特异性抗体与 SK-HEP-1 细胞株并不表现出结合活性, 但是与 SK-HEP-1-TT3 表现出结合活性, 而且双特异性抗体浓度的增加, 结合的比例呈现递增的趋势, 也进一步证明了双特异性抗体对 TT3 结合的特异性。

[0237] 通过 FACs 的方法检测了双特异性抗体 (BK-D-01、BK-D-02、BK-D-03、BK-D-04、BK-D-05、BK-D-06、BK-D-07、BK-D-08、BK-D-09、BK-D-10、BK-D-11、BK-D-12) 与 CD3 端以及 TT3 端的亲和活性 (即亲和力)。检测方法以及结果分别为:

[0238] 利用 Jurkat 细胞铺板；用 FACS 缓冲液清洗，1200rpm 离心 3-5min；然后按 100ul/孔 加入不同浓度的稀释抗体，4℃孵育 0.5h；1200rpm 离心 3-5min，用 FACS 缓冲液清洗；然后加入经稀释的山羊抗人 IgG（FITC, Abcam/ab97224）抗体，4℃孵育 0.5h；1200rpm 离心 3-5min，用 FACS 缓冲液清洗，并加入 50uL 的 FACS 缓冲液重悬细胞，用流式细胞仪检测。

[0239] 同样地，检测双特异性抗体与 TT3 端的亲和活性，实验步骤如下：将 HCT116-TT3 细胞铺板；用 FACS 缓冲液清洗，1200rpm 离心 3-5min；然后加入不同浓度的稀释抗体；4℃孵育 0.5h；1200rpm 离心 3-5min，用 FACS 缓冲液清洗；加入经稀释的山羊抗人 IgG Fc（Dylight 650, Abcam/ab98622）抗体，4℃孵育 0.5h；1200rpm 离心 3-5min，用 FACS 缓冲液清洗；加入 50uL 的 FACS 缓冲液重悬细胞，用流式细胞仪检测。

[0240] 所对应的检测结果如下表和图 8 所示：

[0241] 表 1 FACS 检测双特异性抗体和 CD3 端以及 TT3 端的亲和活性

双特异性抗体编号	CD3 端 EC50(nM)	HCT116-TT3 细胞 TT3 端 EC50 (nM)
BK-A-101	0.80	15.80
BK-D-01	62.55	0.070
BK-D-02	80.30	0.099
BK-D-03	111.10	0.464
BK-D-04	18.16	0.470
BK-D-05	71.40	1.038
BK-D-06	32.59	0.908
BK-D-07	49.40	0.127
BK-D-08	135.60	0.368
BK-D-09	97.81	-
BK-D-10	142.90	0.248
BK-D-11	169.00	0.336
BK-D-12	80.59	0.523
hIgG1	NA	NA

[0242] 表 1 中“-”代表未进行该实验。

[0243] 实验结果表明：所制备的双特异性抗体表现出与 TT3 端以及 CD3 端的高的亲和活性，相似的方法利用 SKHEP1-TT3 细胞或者 MC38-TT3 细胞检测了双特异性抗体与 TT3 端

的亲和性，结果表明双特异性抗体表现出与 TT3 端的高亲和活性。

[0244] 其他 BK-B 以及 BK-D 结构的双抗也表现出与 CD3 端以及 TT3 端相似的亲和活性。

[0245] 进一步地，通过 FACS 检测双特异性抗体和野生型肿瘤细胞株的非特异性结合。步骤如下所示：将 HCT116 和 SK-HEP-1 细胞用 0.25%胰酶分别消化成单细胞并重悬于流式缓冲液。分别添加 BK-A-101、BK-D-01~09 双抗，使其终浓度分别为 10nM 和 100nM，混匀后于 2~8℃ 孵育 30min。用流式缓冲液稀释清洗后重悬，每组加入 APC 标记的抗人 IgG 的二抗（1:200 稀释），于 2~8℃ 孵育 30min。用流式缓冲液稀释清洗后用 200μL 流式缓冲液重悬，上机检测（Novocyte）。结果如图 9 所示，双特异性抗体 BK-A-101、BK-D-01~09 组在 10nm 的一般浓度下非特异性结合比例较低。双特异性抗体 BK-D-01、02、03、04、05、06、08 组甚至在 100nm 的极高浓度下非特异性结合比例也较低。这表明在没有特异性靶点的情况下，本发明的双特异性抗体表现出较低的非特异性结合性，具有较好的安全性。

[0246] 实施例 2

[0247] 实施例 2 提供了通过 RTCA 实时杀伤仪检测双特异抗体和预先活化扩增的 T 细胞联合对于 HCT116 和 HCT116-TT3 细胞株的杀伤作用。

[0248] 首先，用 50μLMcCoy 5A+10%FBS 培养液平衡 96 E-Plate（商购自：安捷伦科技有限公司）。然后取野生型 HCT116 和 HCT116-TT3，分别用 0.25%胰蛋白酶消化成单细胞并重悬于 McCoy 5A+10%FBS 培养液中，按照 5×10^3 个细胞/50μl/孔将肿瘤细胞接种到 96 E-Plate 中。铺板 5 小时后将 T 细胞按照 E:T=2:1（E:T 为效靶比，代表效应细胞和靶细胞的比例）的细胞比添加至 96 E-Plate 相应的孔中，50μL/孔；同时将双特异性抗体（BK-A-101）或抗 CD3 单抗（CD3 Ab）梯度稀释后添加到 96 E-Plate 相应的孔中，BK-A-101 的终浓度分别为 10nM、1nM、0.1nM，CD3 Ab 的终浓度分别为 10nM、1nM、0.1nM，每孔终体积为 200μL，设置每 15min 扫描一次采集数据。

[0249] 其结果如图 10 所示，T 细胞单独作用、以及各浓度的 CD3 Ab 或 BK-A-101 与 T 细胞联合，对野生型的 HCT116 未展示出显著的杀伤效果；T 细胞单独作用、以及各浓度的 CD3 Ab 与 T 细胞联合，对 HCT116-TT3 也未展示出显著的杀伤效果；但是各浓度的 BK-A-101 与 T 细胞联合，对 HCT116-TT3 展示出非常显著的杀伤效果，且与 BK-A-101 的浓度呈现剂量相关性，具体为 1nM 和 1nM 的 BK-A-101 与 T 细胞联合可以几乎完全清除 HCT116-TT3 并具有较好的持续性，而 0.1nM 的 BK-A-101 与 T 细胞联合在 40 小时以前可以几乎完全清除 HCT116-TT3。

[0250] 相似的方法获得对于 BK-D 结构的双抗的检测结果，不同之处在于肿瘤细胞株铺板

过夜后,再加效应细胞和双抗,效应细胞和靶细胞的比例为 5:1。其结果如图 11 所示。其中图 11 中 A、B 分别示出了双特异性抗体在不同浓度下(0.1 nM 或者 1nM)和预先活化扩增的 T 细胞联合对于 HCT116-TT3 细胞株的杀伤作用,其中标号 1-9 分别代表 HCT116-TT3+T 细胞+双抗 BK-D-01~BK-D-09 组,标号 10 代表 HCT116-TT3+T 细胞+BK-A-101 组,标号 11 代表仅为 HCT116-TT3 细胞,未加入双抗和 T 细胞处理,标号 12 代表 HCT116-TT3 细胞中仅加入 T 细胞处理,未加入双抗。从结果可以看出,本发明的双特异性抗体和 T 细胞联合在各浓度下均可以几乎完全清除特异性癌细胞,并具有很好的持续性,表现出优异的肿瘤细胞杀伤效果。

[0251] 相似的方法我们测试了双特异性抗体在高浓度情况下,对野生型肿瘤细胞株 HCT116(图 12 中 A)和 SK-HEP-1(图 12 中 B)的杀伤,其中标号 1-6 分别代表野生型肿瘤细胞株+T 细胞+双抗 BK-D-01、04、05、06、07、08 组,标号 7 代表野生型肿瘤细胞株+T 细胞+TT3 单抗-1 组,标号 8 代表野生型肿瘤细胞株+T 细胞+CD3 单抗 SP34 组,标号 9 代表仅为野生型肿瘤细胞株细胞,未加入抗体和 T 细胞处理,标号 10 代表野生型肿瘤细胞株细胞中仅加入 T 细胞处理,未加入抗体。图 12 中 A 中,双特异性抗体浓度为 100nM;图 12 中 B 中,双特异性抗体浓度为 10nM。结果如图 12 所示,即使在极高浓度的情况下,本发明的双特异性抗体 BK-D-04、05、06、07、08 也未对野生型细胞株呈现显著的杀伤作用,表明这些双特异性抗体具有较好的杀伤特异性。

[0252] 实施例 3

[0253] 实施例 3 提供了通过 RTCA 实时杀伤仪检测双特异抗体和 PBMC 细胞联合对于 HCT116 细胞株的杀伤作用。

[0254] PBMC 复苏后用完全培养液重悬,于培养箱中恢复过夜。次日,首先用 50 μ L McCoy 5A+10%FBS 培养液平衡 96 E-Plate (Agilent)。然后取 HCT116-TT3 用 0.25%胰蛋白消化成单细胞并重悬于 McCoy 5A+10%FBS 培养液中,按照 5×10^3 个细胞/50 μ L/孔将肿瘤细胞接种到 96 E-Plate 中。铺板 5 小时后将 PBMC 按照 E:T=2:1 的细胞比添加至 96 E-Plate 相应的孔中,50 μ L/孔;同时将 BK-A-101 梯度稀释后添加到 96 E-Plate 相应的孔中,BK-A-101 的终浓度分别为 10nM 和 1nM。每孔终体积为 200 μ l,设置每 15min 扫描一次采集数据。

[0255] 其结果如图 13 所示,PBMC 细胞单独作用对 HCT116-TT3 未展示出显著的杀伤效果;但是各浓度的 BK-A-101 与 PBMC 细胞联合,对 HCT116-TT3 展示出非常显著的杀伤效果,10nM 和 1nM 的 BK-A-101 与 PBMC 细胞联合可以几乎完全清除 HCT116-TT3 并具有较好的持续性。

[0256] 实施例 4

[0257] 实施例 4 通过流式细胞技术 (FACS) 检测 DDvv-TT3 感染人肿瘤细胞株后 BK-A-101 的结合。步骤如下:

[0258] 分别将 SKOV3、PANC1、A375 和 U251 用 0.25% 胰蛋白酶消化成单细胞后用各自的完全培养基重悬, 按照 1×10^5 /2mL/孔将细胞接种于 6 孔板中。次日, 取出 6 孔板, 弃去培养液, 将 DDvv-TT3 重组溶瘤痘病毒用添加 5%FBS 的相应培养基梯度稀释后按照 500 μ L/孔添加, MOI=2、0.2、0.02。轻轻晃匀放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱中孵育 2h 后, 取出 6 孔板, 各孔补加 1.5mL 含 5%FBS 的培养基至 2mL, 轻轻晃匀后放入培养箱中继续培养。病毒感染 48h 后, 收获细胞并重悬于流式缓冲液, 分别添加如下抗体, 并于 2~8 $^{\circ}$ C 孵育 30min。

[0259] 组 1: 同型对照抗体 (isotype, human IgG1, 阴性对照, 终浓度 100nM),

[0260] 组 2: 双特异性抗体 BK-A-101 (终浓度 100nM),

[0261] 组 3: 抗 Strep tag II 抗体 (阳性对照, 抗 TT3 单抗, 商购自金斯瑞, 终浓度为 10 μ g/mL)。

[0262] 用流式缓冲液清洗重悬后, 其中组 1 和组 2 分别添加 PE 标记的抗人 IgG 的二抗 (商购自 ABCAM, 1:200 稀释), 组 3 添加 PE 标记的抗鼠 IgG 抗体 (商购自 ABCAM, 1:200 稀释), 2~8 $^{\circ}$ C 孵育 30min。缓冲液稀释清洗后用 200 μ L 缓冲液重悬, 上机检测 (Novocyte)。

[0263] 其结果如图 14 所示, 随着 MOI 值的升高, 同型对照组流式检测结果均为阴性, 阳性对照和双抗染色组的流式检测结果呈现递增的趋势。实验结果表明: 利用 DDvv-TT3 感染人肿瘤细胞株后, 加入双特异性抗体可以与溶瘤病毒感染的肿瘤细胞发生特异性结合; 并且随着 MOI 值的升高, 结合的百分比也增加。

[0264] 实施例 5 (刺激 T 细胞增殖和活化的实验)

[0265] 实施例 5 通过流式细胞技术 (FACS) 检测双特异性抗体和体外培养的 T 细胞 (图 15 中 A 所示) 或 PBMC (图 15 中 B 所示) 共孵育 3 天后, T 细胞的活化情况, 步骤如下:

[0266] 将预先活化扩增的 T 细胞或 PBMC 用完全培养基重悬, 按照 1×10^5 /150 μ L/孔将细胞接种于 48 孔板中, 接种完成后向相应的孔中加入 150 μ L 稀释至不同浓度的双特异性抗体, 双特异性抗体的终浓度为 0.01nM、0.1nM、1nM、10nM、100nM、250nM, Blank 组不加入双抗, 只加入相同体积的空白培养基。培养 3 天后, 取出 48 孔板, 收获各组细胞, 用流式缓冲液稀释清洗后重悬, 每组加入 FITC anti-human CD3、PE anti-human CD4、APC-Cy7 anti-human CD25、APC anti-human CD127, 混匀后于 2~8 $^{\circ}$ C 孵育 30min。用流式缓冲液稀释清洗后用 200 μ L 流式缓冲液重悬, 上机检测 (Novocyte)。其结果如图 15 所示, 双特异性抗

体 BK-D-01~09 组在 0.01nm、0.1nm、1nm、10nm 等一般浓度下 T 细胞表面的活化标记物 CD25 表达比例均较低。双特异性抗体 BK-D-04~09 组甚至在 100nm、250nm 等极高浓度下 T 细胞表面的活化标记物 CD25 表达比例也较低。这些结果表明在没有特异性靶点的情况下，本发明的双特异性抗体表现出较低的 T 细胞活化能力，具有较好的安全性。

[0267] 实施例 5 还通过 ELISA 检测双特异性抗体和 PBMC、SK-HEP1 细胞株共孵育 3 天后，培养上清中细胞因子 IFN- γ 的释放（图 16），双特异性抗体的终浓度为 0.1nM、1nM、10nM、100nM、250nM。图 16 中 A 为 PBMC 和双特异性抗体共培养 3 天的结果，图 16 中 B 为 PBMC 和双特异性抗体、野生型 SK-HEP-1 细胞组共培养 3 天的结果，图 16 中 C 为 PBMC 和双特异性抗体、SK-HEP-1-TT3 共培养 3 天的结果。其结果表明：当双特异性抗体与 PBMC 共培养，或双特异性抗体与 PBMC 和 SK-HEP-1 共培养时，双特异性抗体 BK-D-01、04~08 组在 0.1nm、1nm、10nm 等一般浓度下 IFN- γ 分泌量均较低。当双特异性抗体与 PBMC 共培养时，双特异性抗体 BK-D-04、05、06 组甚至在 100nm、250nm 等极高浓度下 IFN- γ 分泌量也较低。这些结果表明在没有特异性靶点时，本发明的双特异性抗体活化 T 细胞的能力较低，具有较好的安全性。当双特异性抗体与 PBMC 和 SK-HEP-1-TT3 共培养时，所有的双特异性抗体组都分泌大量的 IFN- γ ，表明在有特异性靶点时，本发明的双特异性抗体可以较强地活化 T 细胞。

[0268] 实施例 6

[0269] 实施例 6 提供了通过 RTCA 实时杀伤仪检测双特异性抗体和重组溶瘤痘病毒 DDvv-TT3、预先活化扩增的 T 细胞体外联合对于 HCT116 细胞株的杀伤作用（如图 17 所示）。

[0270] 首先，用 50 μ L McCoy 5A+10%FBS 培养液平衡 96 E-Plate（商购自：安捷伦科技有限公司）。然后取野生型 HCT116，分别用 0.25%胰蛋白酶消化成单细胞并重悬于 McCoy 5A+10%FBS 培养液中，按照 5×10^3 个细胞/50 μ l/孔将肿瘤细胞接种到 96 E-Plate 中。铺板过夜后，将 DDvv-TT3 按 50 μ l/孔将肿瘤细胞接种到 96 E-Plate 中（MOI=1）。加入溶瘤痘病毒过夜后，将 T 细胞按照 E:T=10:1 的细胞比添加至 96 E-Plate 相应的孔中，50 μ L/孔；同时将双特异性抗体 BK-A-101、BK-D-04、BK-D-06、BK-D-07 按照 50 μ l/孔添加到 96 E-Plate 相应的孔中，双特异性抗体的终浓度为 1nM，每孔终体积为 250 μ L，设置每 15min 扫描一次采集数据。图 17 中 A 中标号 1 代表 HCT116 组，未加入 T 细胞、痘病毒和双抗；标号 2 代表 HCT116+T 细胞组；标号 3~6 代表 HCT116+T+双特异性抗体 BK-D-04、06、07 或 BK-A-101。图 17 中 C 中标号 1 代表 HCT116 组，未加入 T 细胞、痘病毒和双抗；标号 2 代表 HCT116+DDvv-TT3 组；标号 3 代表 HCT116+DDvv-TT3+T 细胞组；标号 4~7 代表

HCT116+DDvv-TT3+T+双特异性抗体 BK-D-04、06、07 或 BK-A-101。将图 17 中 A 于 80 个小时的细胞指数换算成肿瘤生长抑制率 (IR, %), 得到图 17 中 B; 将图 17 中 C 于 80 个小时的细胞指数换算成肿瘤生长抑制率, 得到图 17 中 D。

[0271] 结果表明, 未加入重组溶瘤痘病毒 DDvv-TT3 的情况下, 肿瘤细胞呈现持续的生长 (图 17 中 A 所示), 加入重组溶瘤痘病毒 DDvv-TT3 后, 双特异性抗体 BK-D-04、06、07 或 BK-A-101 联合 T 细胞都呈现出显著的杀伤作用 (图 17 中 C 所示)。结合图 17 中 B 和 D 所示结果, 双特异性抗体 BK-D-04、06、07+T 细胞组, HCT116 细胞的生长抑制率小于 <10%; DDvv-TT3+T 细胞组, HCT116 细胞的生长抑制率约为 40%; 双特异性抗体 BK-D-04、06、07 联合 DDvv-TT3 以及 T 细胞组, HCT116 细胞的生长抑制率小于 >80%, 表明双特异性抗体 BK-D-04、06、07 联合 DDvv-TT3 及 T 细胞, 呈现出协同杀伤作用。

[0272] 在本发明的描述中, 术语“多个”的含义是至少两个, 例如两个, 三个等, 除非另有明确具体的限定。

[0273] 在本说明书的描述中, 参考术语“一个实施例”、“一些实施例”、“示例”、“具体示例”、或“一些示例”等的描述意指结合该实施例或示例描述的具体特征、结构、材料或者特点包含于本发明的至少一个实施例或示例中。在本说明书中, 对上述术语的示意性表述不必针对的是相同的实施例或示例。而且, 描述的具体特征、结构、材料或者特点可以在任一个或多个实施例或示例中以合适的方式结合。此外, 在不相互矛盾的情况下, 本领域的技术人员可以将本说明书中描述的不同实施例或示例以及不同实施例或示例的特征进行结合和组合。

[0274] 尽管上面已经示出和描述了本发明的实施例, 可以理解的是, 上述实施例是示例性的, 不能理解为对本发明的限制, 本领域的普通技术人员在本发明的范围内可以对上述实施例进行变化、修改、替换和变型。

权利要求

1、一种治疗剂，其特征在于，包含：

(a) 第一组合物，所述第一组合物包含第一活性成分，所述第一活性成分包括或含有用于导入肿瘤细胞和/或癌细胞的、具有标记性多肽编码序列的核酸；所述标记性多肽具有可操作地连接的胞外抗原决定区、间隔部分和跨膜部分；所述胞外抗原决定区的氨基酸序列含有一个或多个抗原表位多肽的氨基酸序列；在自然状态下，哺乳动物细胞膜蛋白或分泌蛋白的氨基酸序列不含有所述抗原表位多肽的氨基酸序列；以及

(b) 第二组合物，所述第二组合物包含第二活性成分，所述第二活性成分包含多特异性抗体，所述多特异性抗体至少包括第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，所述第一抗原结合部分能够特异性识别并结合所述标记性多肽的所述胞外抗原决定区；

所述第二抗原结合部分能够特异性识别并结合免疫细胞抗原或第一细胞因子或其受体；

所述多特异性抗体还可以选择性地包括第三抗原结合部分，所述第三抗原结合部分能够特异性识别并结合肿瘤抗原或免疫检查点或第二细胞因子或其受体。

2、根据权利要求1所述的治疗剂，其特征在于，所述免疫细胞包括T细胞、NK细胞、DC细胞、B细胞、巨噬细胞、自然杀伤T细胞、中性粒细胞中的至少一种。

3、根据权利要求1所述的治疗剂，其特征在于，所述免疫细胞抗原包括CD1, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD12w, CD13, CD14, CD15, CD16, CD16a, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD67, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD85a, CD85b, CD85c, CD85d, CD85e, CD85f, CD85g, CD85h, CD85i, CD85j, CD85k, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD11, CD112, CD115, CD116, CD117, CD119, CD120, CD121, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD133, CD131, CD132, CD134, CD135, CD137, CD138, CD139, CD141, CD142, CD143, CD144, CD147, CD146, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156,

CD157, CD158, CD158a, CD158b1, CD158b2, CD158c, CD158d, CD158e, CD158f1, CD158f2, CD158g, CD158h, CD158i, CD158j, CD158k, CD158z, CD159a, CD159c, CD160, CD161, CD162, CD163, CD166, CD165, CD166, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, Cd177, CD178, CD179, CD180, CD181, CD183, CD184, CD185, CD186, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CD198, CD199, CD200, CD203, CD205, CD208, CD209, CD210, CD210b, CD212, CD231a1, CD213a2, CD217, CD218a, CD218b, CD222, CD224, CD225, CD226, CD227, CD229, CD232, CD243, CD244, CD245, CD247, CD252, CD253, CD256, Cd257, CD258, CD261, CD262, CD262, CD263, CD264, CD265, CD268, CD269, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD286, CD288, CD289, CD290, CD292, CD293, CD294, CD296, CD297, CD300a, CD300b, CD300c, CD300d, CD300e, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD309, CD312, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD328, CD329, CD335, CD336, CD337, CD352, CD353, CD357, CD361, CD362 中的至少一种;

所述第一细胞因子或其受体、所述第二细胞因子或其受体各自独立地包括 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-17a、IL-17b、IL-17c、IL-17d、IL-17f、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-34、IL-35、IL-37、EPO、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、XCL1、XCL2、CX3CL1、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、TNF α 、TGF β 、VEGF、GM-CSF、GCSF 或其相关受体中的至少一种。

4、根据权利要求1所述的治疗剂，其特征在于，所述肿瘤抗原选自 AFP、BCMA、 β -catenin、CD5、CD19、CD20、CD22、CD30、CD38、CD70、CD123、CD133、CD171、CD138、CDK-4、CEA、CA-125、Caspase 8、c-Met、EGFR、Ep-CAM、EphA2、ETA、FAP、GPC3、GP100、GD2、Her2、HPV16、Igk chain、Ley、Mesothlin、MUC-1、MUC16、MAGE、MART1、NKG2D 配体、CLL1、NY-ESO-1、P53、RAS、OSA、PAP、PSCA、ROR1、ROR2、PSMA、SSTR2、Trop-2、TYR、VEGFR、WT1 中的至少一种;

所述免疫检查点选自 PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、BTLA、TIM-3、TIGIT、VISTA、TIGIT2、Galectin-9、NKG2A、KIRs、B7-H3、B7-H7、2B4、DNAM-1、PTA1、TLISA1、Vstm3、

VSIG9、Siglecs 家族、GITR、OX40、4-1BB、LAYN、LIRB1-5 或其相关受体中的至少一种。

5、根据权利要求 1 所述的治疗剂，其特征在于，所述第二抗原结合部分能够特异性识别并结合 CD3，所述第二抗原结合部分包括选自 OKT3、SP34、L2K、UCHT1 及其变体中的至少一种。

6、根据权利要求 1 所述的治疗剂，其特征在于，所述第二抗原结合部分包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列为如 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列为如 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

任选地，所述第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:35、36 和 37 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列；和 SEQ ID NO:38、39 和 40 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列；

或者所述第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:41、43、44 或 45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42、46、47、48、49、50、51、52 或 53 所示的轻链可变区序列；

任选地，所述第二抗原结合部分选自：

(a-1) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列；或

(a-2) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:46 所示的轻链可变区序列；或

(a-3) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:47 所示的轻链可变区序列；或

(a-4) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:48 所示的轻链可变区序列；或

(a-5) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:49 所示的轻链可变区序列；或

(a-6) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:50 所示的轻链可变区序列；或

(a-7) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列；或

(a-8) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列；或

(a-9) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区

序列；或

(b-1) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列；或

(b-2) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列；或

(b-3) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列；或

(c-1) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:46 所示的轻链可变区序列；或

(c-2) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:47 所示的轻链可变区序列；或

(c-3) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:48 所示的轻链可变区序列；或

(c-4) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:49 所示的轻链可变区序列；或

(c-5) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:50 所示的轻链可变区序列；或

(c-6) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列；或

(c-7) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列；或

(c-8) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列；或

(d-1) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:46 所示的轻链可变区序列；或

(d-2) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:47 所示的轻链可变区序列；或

(d-3) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:48 所示的轻链可变区序列；或

(d-4) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:49 所示的轻链可变区序列；或

(d-5) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:50 所示的轻链可变区

序列；或

(d-6) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列；或

(d-7) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列；或

(d-8) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列；或

(e-1) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:46 所示的轻链可变区序列；或

(e-2) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:47 所示的轻链可变区序列；或

(e-3) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:48 所示的轻链可变区序列；或

(e-4) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:49 所示的轻链可变区序列；或

(e-5) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:50 所示的轻链可变区序列；或

(e-6) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列；或

(e-7) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列；或

(e-8) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列。

7、根据权利要求 1 所述的治疗剂，其特征在于，所述多特异性抗体通过宿主细胞生产获得，所述宿主细胞中含有构建体，所述构建体含有编码所述多特异性抗体的核苷酸。

8、根据权利要求 7 所述的治疗剂，其特征在于，所述宿主细胞选自 CHO 系列细胞株、293 系列细胞株、NS0 细胞、Hela 细胞、3T3 细胞、BHK 细胞中的至少一种。

9、根据权利要求 1 所述的治疗剂，其特征在于，所述抗原表位多肽的氨基酸序列来源于自然界存在的蛋白的氨基酸序列，或者为人工合成的自然界不存在的氨基酸序列。

10、根据权利要求 1 所述的治疗剂，其特征在于，所述抗原表位多肽的氨基酸序列包括以下标签的氨基酸序列：Myc 标签、HA 标签、Strep 标签 I、Strep 标签 II、Flag 标签、HAT 标签、S 标签、SI 标签、蛋白 C 标签、tag-100 标签、E2 标签、TAP 标签、HSV 标签、

KT3 标签、V5 标签、VSV-G 标签、His 标签或 RFP 标签。

11、根据权利要求 1 所述的治疗剂，其特征在于，所述胞外抗原决定区的氨基酸序列如 SEQ ID NO:1、2、3、4 或 5 所示。

12、根据权利要求 1 所述的治疗剂，其特征在于，所述间隔部分来自 CD8 α 的铰链区、IgG 的铰链区或 IgD 的铰链区；优选地，所述间隔部分的氨基酸序列如 SEQ ID NO:6 所示；

所述跨膜部分来源于 CD8、CD3 ζ 、CD4 或 CD28 的跨膜区；优选地，所述跨膜部分的氨基酸序列如 SEQ ID NO:7 所示。

13、根据权利要求 1 所述的治疗剂，其特征在于，所述标记性多肽的氨基酸序列如 SEQ ID NO:11、12、13、14 或 15 所示。

14、根据权利要求 1 所述的治疗剂，其特征在于，所述第一抗原结合部分包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中：所述 HCDR、HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列为如 SEQ ID NO:27 所示的重链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列为如 SEQ ID NO:26 所示的轻链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

任选地，所述第一抗原结合部分具有 SEQ ID NO:20、21 和 22 所示的 HCDR1、HCDR 和 HCDR3 序列；和 SEQ ID NO:23、24 和 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列；

或者所述第一抗原结合部分具有 SEQ ID NO:27、29、30 或 31 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:26、32、33 或 34 所示的轻链可变区序列；

任选地，所述第一抗原结合部分选自：

(1-1) 具有 SEQ ID NO:27 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:26 所示的重链可变区序列；或

(1-2) 具有 SEQ ID NO:27 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:32 所示的重链可变区序列；或

(1-3) 具有 SEQ ID NO:27 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:33 所示的重链可变区序列；或

(1-4) 具有 SEQ ID NO:27 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:34 所示的重链可变区序列；或

(1-5) 具有 SEQ ID NO:29 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:26 所示的重链可变区序列；或

(1-6) 具有 SEQ ID NO:30 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:26 所示的重链可变区序列；或

(1-7) 具有 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:26 所示的重链可变

区序列；或

(1-8) 具有 SEQ ID NO:29 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:32 所示的轻链可变区序列；或

(1-9) 具有 SEQ ID NO:29 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:33 所示的轻链可变区序列；或

(1-10) 具有 SEQ ID NO:29 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:34 所示的轻链可变区序列；或

(1-11) 具有 SEQ ID NO:30 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:32 所示的轻链可变区序列；或

(1-12) 具有 SEQ ID NO:30 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:33 所示的轻链可变区序列；或

(1-13) 具有 SEQ ID NO:30 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:34 所示的轻链可变区序列；或

(1-14) 具有 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:32 所示的轻链可变区序列；

(1-15) 具有 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:33 所示的轻链可变区序列；或

(1-16) 具有 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:34 所示的轻链可变区序列。

15、根据权利要求 1 所述的治疗剂，其特征在于，所述核酸包括 DNA 或 RNA；所述 RNA 包括由 DNA 转录的 mRNA。

16、根据权利要求 15 所述的治疗剂，其特征在于，所述第一组合物包括治疗有效量的所述 DNA、或治疗有效量的所述 mRNA。

17、根据权利要求 15 所述的治疗剂，其特征在于，所述 DNA 配制通过瘤内注射、静脉注射、腹腔注射或颅内注射给药；所述 mRNA 配制通过瘤内注射、静脉注射、腹腔注射或颅内注射给药。

18、根据权利要求 1 所述的治疗剂，其特征在于，所述第一活性成分为重组病毒，所述重组病毒的基因组具有标记性多肽编码序列；所述重组病毒包括选择复制型重组溶瘤病毒或复制缺陷型重组病毒。

19、根据权利要求 18 所述的治疗剂，其特征在于，所述第一组合物包括治疗有效量的所述重组病毒。

20、根据权利要求 18 所述的治疗剂，其特征在于，所述重组溶瘤病毒来源于具有溶瘤

作用的经基因突变的病毒和具有溶瘤作用的野生型病毒；优选地，所述重组溶瘤病毒来源于具有溶瘤作用的腺病毒、痘病毒、单纯疱疹病毒、麻疹病毒、塞姆利基森林病毒、水疱性口炎病毒、脊髓灰质炎病毒、逆转录病毒、呼肠孤病毒、塞内卡谷病毒、埃可型肠道病毒、柯萨奇病毒、新城疫病毒和马拉巴病毒。

21、根据权利要求 18 所述的治疗剂，其特征在于，所述重组病毒配置成瘤内注射给药、静脉给药、腹腔注射给药或颅内注射给药。

22、根据权利要求 1 所述的治疗剂，其特征在于，所述第一组合物和所述第二组合物各自独立地存在于所述治疗剂中而互不混合。

23、根据权利要求 1 所述的治疗剂，其特征在于，所述治疗剂由所述第一组合物和所述第二组合物组成。

24、根据权利要求 1 所述的治疗剂，其特征在于，所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分通过如下方式连接：

1) 所述第二抗原结合部分的重链可变区和轻链可变区分别与重链恒定区以及轻链恒定区连接，形成 IgG 样结构，所述 IgG 样结构的 Fc 区的羧基端氨基酸和第一抗原结合部分的轻链可变区的氨基端氨基酸连接，所述第一抗原结合部分的轻链可变区的羧基端氨基酸和所述第一抗原结合部分的重链可变区的氨基端氨基酸连接；或

2) 所述第一抗原结合部分的重链可变区和轻链可变区分别与重链恒定区以及轻链恒定区连接，形成 IgG 样结构，所述 IgG 样结构的 Fc 区的羧基端氨基酸与所述第二抗原结合部分的轻链可变区的氨基端氨基酸连接，所述第二抗原结合部分的轻链可变区的羧基端氨基酸和所述第二抗原结合部分的重链可变区的氨基端氨基酸连接；或

3) 所述第一抗原结合部分的轻链可变区的羧基端氨基酸和所述第一抗原结合部分的重链可变区的氨基端氨基酸连接，所述第一抗原结合部分的羧基端氨基酸直接和 Fc 区连接，所述 Fc 区羧基端氨基酸和所述第二抗原结合部分的氨基端氨基酸连接，所述第二抗原结合部分的轻链可变区的羧基端氨基酸和所述第二抗原结合部分的重链可变区的氨基端氨基酸连接；或

4) 所述第一抗原结合部分的轻链可变区的羧基端氨基酸和所述第一抗原结合部分的重链可变区的氨基端氨基酸连接，所述第一抗原结合部分的羧基端氨基酸直接和 Fc 区连接，所述 Fc 区羧基端氨基酸和所述第二抗原结合部分的氨基端氨基酸连接，所述第二抗原结合部分的重链可变区的羧基端氨基酸和所述第二抗原结合部分的轻链可变区的氨基端氨基酸连接。

25、根据权利要求 24 所述的治疗剂，其特征在于，所述 Fc 区是人源化序列或者经突变的人源化序列。

26、根据权利要求 1 所述的治疗剂，其特征在于，所述第二抗原结合部分包含一个或多个能够特异性识别并结合 CD3 的结构域，所述第一抗原结合部分包含一个或多个能够特异性识别并结合所述抗原表位多肽的结构域，其中所述抗原表位多肽的氨基酸序列包括 Strep 标签 I 或者 Strep 标签 II 的氨基酸序列。

27、一种多特异性抗体，其特征在于，至少包括第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，所述第一抗原结合部分包含一个或多个能够特异性识别并结合 Strep 标签 I 或者 Strep 标签 II 的氨基酸序列的结构域，所述第二抗原结合部分包含一个或多个能够特异性识别并结合免疫细胞抗原或第一细胞因子或其受体的结构域；

所述多特异性抗体还可以选择性地包括第三抗原结合部分，所述第三抗原结合部分包含一个或多个能够特异性识别并结合肿瘤抗原或免疫检查点或第二细胞因子或其受体的结构域。

28、根据权利要求 27 所述的多特异性抗体，其特征在于，所述免疫细胞包括 T 细胞、NK 细胞、DC 细胞、B 细胞、巨噬细胞、自然杀伤 T 细胞、中性粒细胞中的至少一种。

29、根据权利要求 27 所述的多特异性抗体，其特征在于，所述免疫细胞抗原包括 CD1, CD1a, CD1b, CD1c, CD1d, CD1e, CD2, CD3, CD3d, CD3e, CD3g, CD4, CD5, CD6, CD7, CD8, CD8a, CD8b, CD9, CD10, CD11, CD11a, CD11b, CD11c, CD11d, CD12w, CD13, CD14, CD15, CD16, CD16a, CD16b, CD17, CD18, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD25, CD26, CD27, CD28, CD29, CD30, CD31, CD32, CD33, CD34, CD35, CD36, CD37, CD38, CD39, CD40, CD41, CD42, CD42a, CD42b, CD42c, CD42d, CD43, CD44, CD45, CD45RA, CD45RB, CD45RC, CD45RO, CD46, CD47, CD48, CD49a, CD49b, CD49c, CD49d, CD49e, CD49f, CD50, CD52, CD53, CD54, CD55, CD56, CD57, CD58, CD59, CD60a, CD60b, CD60c, CD61, CD62E, CD62L, CD62P, CD63, CD64, CD65, CD66a, CD66b, CD66c, CD66d, CD66e, CD66f, CD67, CD68, CD69, CD70, CD71, CD72, CD73, CD74, CD75, CD75s, CD77, CD79, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CD84, CD85, CD85a, CD85b, CD85c, CD85d, CD85e, CD85f, CD85g, CD85h, CD85i, CD85j, CD85k, CD86, CD87, CD88, CD89, CD90, CD91, CD92, CD93, CD94, CD95, CD96, CD97, CD98, CD99, CD100, CD101, CD102, CD103, CD104, CD105, CD106, CD107, CD107a, CD107b, CD108, CD109, CD110, CD11, CD112, CD115, CD116, CD117, CD119, CD120, CD121, CD122, CD123, CD124, CD125, CD126, CD127, CD129, CD130, CD133, CD131, CD132, CD134, CD135, CD137, CD138, CD139, CD141, CD142, CD143, CD144, CD147, CD146, CD148, CD150, CD151, CD152, CD153, CD154, CD155, CD156, CD157, CD158, CD158a, CD158b1, CD158b2, CD158c, CD158d, CD158e, CD158f1, CD158f2, CD158g, CD158h, CD158i, CD158j, CD158k, CD158z, CD159a, CD159c, CD160,

CD161, CD162, CD163, CD166, CD165, CD166, CD168, CD169, CD170, CD171, CD172a, CD172b, CD172g, CD173, Cd177, CD178, CD179, CD180, CD181, CD183, CD184, CD185, CD186, CD191, CD192, CD193, CD194, CD195, CD196, CD197, CD198, CD199, CD200, CD203, CD205, CD208, CD209, CD210, CD210b, CD212, CD231a1, CD213a2, CD217, CD218a, CD218b, CD222, CD224, CD225, CD226, CD227, CD229, CD232, CD243, CD244, CD245, CD247, CD252, CD253, CD256, Cd257, CD258, CD261, CD262, CD262, CD263, CD264, CD265, CD268, CD269, CD271, CD272, CD273, CD274, CD275, CD276, CD277, CD278, CD279, CD280, CD281, CD282, CD283, CD284, CD286, CD288, CD289, CD290, CD292, CD293, CD294, CD296, CD297, CD300a, CD300b, CD300c, CD300d, CD300e, CD303, CD304, CD305, CD306, CD307a, CD307b, CD307c, CD307d, CD309, CD312, CD314, CD315, CD316, CD317, CD318, CD319, CD320, CD328, CD329, CD335, CD336, CD337, CD352, CD353, CD357, CD361, CD362 中的至少一种;

所述第一细胞因子或其受体、所述第二细胞因子或其受体各自独立地包括 IL-1 α 、IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-7、IL-9、IL-10、IL-11、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-17a、IL-17b、IL-17c、IL-17d、IL-17f、IL-18、IL-19、IL-20、IL-21、IL-22、IL-23、IL-24、IL-25、IL-26、IL-27、IL-28、IL-29、IL-30、IL-31、IL-32、IL-33、IL-34、IL-35、IL-37、EPO、CCL1、CCL2、CCL3、CCL4、CCL5、CCL6、CCL7、CCL8、CCL9、CCL10、CCL11、CCL12、CCL13、CCL14、CCL15、CCL16、CCL17、CCL18、CCL19、CCL20、CCL21、CCL22、CCL23、CCL25、CCL26、CCL27、CCL28、CXCL1、CXCL2、CXCL3、CXCL4、CXCL5、CXCL6、CXCL7、CXCL8、CXCL9、CXCL10、CXCL11、CXCL12、CXCL13、CXCL14、CXCL15、CXCL16、CXCL17、XCL1、XCL2、CX3CL1、IFN α 、IFN β 、IFN γ 、TNF α 、TGF β 、VEGF、GM-CSF、GCSF 或其相关受体中的至少一种。

30、根据权利要求 27 所述的多特异性抗体，其特征在于，所述肿瘤抗原选自 AFP、BCMA、 β -catenin、CD5、CD19、CD20、CD22、CD30、CD38、CD70、CD123、CD133、CD171、CD138、CDK-4、CEA、CA-125、Caspase 8、c-Met、EGFR、Ep-CAM、EphA2、ETA、FAP、GPC3、GP100、GD2、Her2、HPV16、Igk chain、Ley、Mesothlin、MUC-1、MUC16、MAGE、MART1、NKG2D 配体、CLL1、NY-ESO-1、P53、RAS、OSA、PAP、PSCA、ROR1、ROR2、PSMA、SSTR2、Trop-2、TYR、VEGFR、WT1 中的至少一种;

所述免疫检查点选自 PD-1、PD-L1、CTLA-4、LAG-3、BTLA、TIM-3、TIGIT、VISTA、TIPE2、Galectin-9、NKG2A、KIRs、B7-H3、B7-H7、2B4、DNAM-1、PTA1、TLISA1、Vstm3、VSIG9、Siglecs 家族、GITR、OX40、4-1BB、LAYN、LIRB1-5 或其相关受体中的至少一种。

31、根据权利要求 27 所述的多特异性抗体，其特征在于，所述第二抗原结合部分包含一个或多个能够特异性识别并结合 CD3 的结构域，所述第一抗原结合部分包含一个或多个能够特异性识别并结合 Strep 标签 I 或者 Strep 标签 II 的氨基酸序列的结构域。

32、根据权利要求 27 所述的多特异性抗体，其特征在于，所述第二抗原结合部分包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列为如 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列为如 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3；并且/或者

所述第一抗原结合部分包括重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3，所述轻链可变区包含 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3，其中：所述 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 的氨基酸序列为如 SEQ ID NO:27 所示的重链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3，所述 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 的氨基酸序列为如 SEQ ID NO:26 所示的轻链可变区的 CDR1、CDR2 和 CDR3；

任选地，所述第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:35、36 和 37 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列；和 SEQ ID NO:38、39 和 40 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列；所述第一抗原结合部分具有 SEQ ID NO:20、21 和 22 所示的 HCDR1、HCDR2 和 HCDR3 序列；和 SEQ ID NO:23、24 和 25 所示的 LCDR1、LCDR2 和 LCDR3 序列；

任选地，所述第二抗原结合部分具有 SEQ ID NO:41、43、44 或 45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42、46、47、48、49、50、51、52 或 53 所示的轻链可变区序列；所述第一抗原结合部分具有 SEQ ID NO:27、29、30 或 31 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:26、32、33 或 34 所示的轻链可变区序列；

任选地，所述第二抗原结合部分选自：

(a-1) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列；或

(a-2) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:46 所示的轻链可变区序列；或

(a-3) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:47 所示的轻链可变区序列；或

(a-4) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:48 所示的轻链可变区序列；或

(a-5) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:49 所示的轻链可变区

序列；或

(a-6) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:50 所示的轻链可变区序列；或

(a-7) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列；或

(a-8) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列；或

(a-9) 具有 SEQ ID NO:41 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列；或

(b-1) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列；或

(b-2) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列；或

(b-3) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:42 所示的轻链可变区序列；或

(c-1) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:46 所示的轻链可变区序列；或

(c-2) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:47 所示的轻链可变区序列；或

(c-3) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:48 所示的轻链可变区序列；或

(c-4) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:49 所示的轻链可变区序列；或

(c-5) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:50 所示的轻链可变区序列；或

(c-6) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列；或

(c-7) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列；或

(c-8) 具有 SEQ ID NO:43 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列；或

(d-1) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:46 所示的轻链可变区

序列；或

(d-2) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:47 所示的轻链可变区序列；或

(d-3) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:48 所示的轻链可变区序列；或

(d-4) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:49 所示的轻链可变区序列；或

(d-5) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:50 所示的轻链可变区序列；或

(d-6) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列；或

(d-7) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列；或

(d-8) 具有 SEQ ID NO:44 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列；或

(e-1) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:46 所示的轻链可变区序列；或

(e-2) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:47 所示的轻链可变区序列；或

(e-3) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:48 所示的轻链可变区序列；或

(e-4) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:49 所示的轻链可变区序列；或

(e-5) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:50 所示的轻链可变区序列；或

(e-6) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:51 所示的轻链可变区序列；或

(e-7) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:52 所示的轻链可变区序列；或

(e-8) 具有 SEQ ID NO:45 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:53 所示的轻链可变区序列；

任选地，所述第一抗原结合部分选自：

- (1-1) 具有 SEQ ID NO:27 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:26 所示的重链可变区序列；或
- (1-2) 具有 SEQ ID NO:27 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:32 所示的重链可变区序列；或
- (1-3) 具有 SEQ ID NO:27 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:33 所示的重链可变区序列；或
- (1-4) 具有 SEQ ID NO:27 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:34 所示的重链可变区序列；或
- (1-5) 具有 SEQ ID NO:29 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:26 所示的重链可变区序列；或
- (1-6) 具有 SEQ ID NO:30 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:26 所示的重链可变区序列；或
- (1-7) 具有 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:26 所示的重链可变区序列；或
- (1-8) 具有 SEQ ID NO:29 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:32 所示的轻链可变区序列；或
- (1-9) 具有 SEQ ID NO:29 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:33 所示的轻链可变区序列；或
- (1-10) 具有 SEQ ID NO:29 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:34 所示的轻链可变区序列；或
- (1-11) 具有 SEQ ID NO:30 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:32 所示的轻链可变区序列；或
- (1-12) 具有 SEQ ID NO:30 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:33 所示的轻链可变区序列；或
- (1-13) 具有 SEQ ID NO:30 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:34 所示的轻链可变区序列；或
- (1-14) 具有 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:32 所示的轻链可变区序列；
- (1-15) 具有 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:33 所示的轻链可变区序列；或
- (1-16) 具有 SEQ ID NO:31 所示的重链可变区序列和 SEQ ID NO:34 所示的轻链可变区序列。

33、根据权利要求 32 所述的多特异性抗体，其特征在于，所述第一抗原结合部分和所述第二抗原结合部分通过如下方式连接：

1) 所述第二抗原结合部分的重链可变区和轻链可变区分别与重链恒定区以及轻链恒定区连接，形成 IgG 样结构，所述 IgG 样结构的 Fc 区的羧基端氨基酸和第一抗原结合部分的轻链可变区的氨基端氨基酸连接，所述第一抗原结合部分的轻链可变区的羧基端氨基酸和所述第一抗原结合部分的重链可变区的氨基端氨基酸连接；或

2) 所述第一抗原结合部分的重链可变区和轻链可变区分别与重链恒定区以及轻链恒定区连接，形成 IgG 样结构，所述 IgG 样结构的 Fc 区的羧基端氨基酸与所述第二抗原结合部分的轻链可变区的氨基端氨基酸连接，所述第二抗原结合部分的轻链可变区的羧基端氨基酸和所述第二抗原结合部分的重链可变区的氨基端氨基酸连接；或

3) 所述第一抗原结合部分的轻链可变区的羧基端氨基酸和所述第一抗原结合部分的重链可变区的氨基端氨基酸连接，所述第一抗原结合部分的羧基端氨基酸直接和 Fc 区连接，所述 Fc 区羧基端氨基酸和所述第二抗原结合部分的氨基端氨基酸连接，所述第二抗原结合部分的轻链可变区的羧基端氨基酸和所述第二抗原结合部分的重链可变区的氨基端氨基酸连接；或

4) 所述第一抗原结合部分的轻链可变区的羧基端氨基酸和所述第一抗原结合部分的重链可变区的氨基端氨基酸连接，所述第一抗原结合部分的羧基端氨基酸直接和 Fc 区连接，所述 Fc 区羧基端氨基酸和第二抗原结合部分的氨基端氨基酸连接，所述第二抗原结合部分的重链可变区的羧基端氨基酸和所述第二抗原结合部分的轻链可变区的氨基端氨基酸连接。

34、根据权利要求 33 所述的多特异性抗体，其特征在于，所述 Fc 区为人源化序列或者经突变的人源化序列。

35、一种多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸编码权利要求 27-34 中任一项所述的多特异性抗体。

36、一种构建体，其特征在于，所述构建体包括权利要求 35 所述的多核苷酸。

37、一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞包括权利要求 36 所述的构建体；
任选地，所述宿主细胞为原核细胞或真核细胞。

38、一种生产权利要求 27-34 中任一项所述的多特异性抗体的方法，其特征在于，包括：

培养权利要求 37 所述的宿主细胞，以及
从培养物中收集所述的多特异性抗体。

39、根据权利要求 1-26 中任一项所述的治疗剂或者权利要求 27-34 中任一项所述的多特异性抗体在制备用于治疗肿瘤和/或癌症的药物中的用途。

40、根据权利要求 39 所述的用途，其中所述肿瘤和/或癌症包括：乳腺癌，头颈部肿瘤，滑膜癌，肾癌，结缔组织癌，黑色素瘤，肺癌，食管癌，结肠癌，直肠癌，脑癌，肝癌，骨癌，绒毛膜癌，胃泌素瘤，嗜铬细胞瘤，催乳素瘤，von Hippel-Lindau 病，Zollinger-Ellison 综合征，肛门癌，胆管癌，膀胱癌，输尿管癌，神经胶质瘤，神经母细胞瘤，脑膜瘤，脊髓肿瘤，骨软骨瘤，软骨肉瘤，尤文氏肉瘤，原发部位不明癌，类癌，纤维肉瘤，佩吉特病，宫颈癌，胆囊癌，眼癌，卡波西氏肉瘤，前列腺癌，睾丸癌，皮肤鳞状细胞癌，间皮瘤，多尖端骨髓瘤，卵巢癌，胰腺内分泌瘤，胰高血糖素瘤，胰腺癌，阴茎癌，垂体瘤，软组织肉瘤，视网膜母细胞瘤，小肠癌，胃癌，胸腺癌，滋养细胞癌，葡萄胎，子宫内膜癌，阴道癌，外阴癌，蕈样真菌病，胰岛素瘤，心脏癌，脑膜癌，腹膜癌，胸膜癌和血液癌中的至少一种。

41、一种用于治疗肿瘤和/或癌症的具有协同作用的联合药物的药盒，包括：

第一容器，该第一容器装有根据权利要求 1-26 中任一项所述的治疗剂中的第一组合物；

第二容器，该第二容器装有根据权利要求 1-26 中任一项所述的治疗剂中的第二组合物或者装有根据权利要求 27-34 中任一项所述的多特异性抗体，其中所述第一容器和所述第二容器是独立的；以及

载明给药时机和给药方式的说明书。

42、一种治疗肿瘤和/或癌症的方法，包括：

对受试者施用根据权利要求 1-26 中任一项所述的治疗剂中的第一组合物；和

对所述受试者施用根据权利要求 1-26 中任一项所述的治疗剂中的第二组合物，或者施用权利要求 27-34 中任一项所述的多特异性抗体。

43、根据权利要求 42 所述的方法，包括以下依次进行的步骤：

1) 对所述受试者施用所述第一组合物；和

2) 在施用所述第一组合物之后，对所述受试者施用所述第二组合物或者所述多特异性抗体。

44、根据权利要求 43 所述的方法，其中所述肿瘤和/或癌症包括：乳腺癌，头颈部肿瘤，滑膜癌，肾癌，结缔组织癌，黑色素瘤，肺癌，食管癌，结肠癌，直肠癌，脑癌，肝癌，骨癌，绒毛膜癌，胃泌素瘤，嗜铬细胞瘤，催乳素瘤，von Hippel-Lindau 病，Zollinger-Ellison 综合征，肛门癌，胆管癌，膀胱癌，输尿管癌，神经胶质瘤，神经母细胞瘤，脑膜瘤，脊髓肿瘤，骨软骨瘤，软骨肉瘤，尤文氏肉瘤，原发部位不明癌，类癌，纤维肉瘤，佩吉特病，宫颈癌，胆囊癌，眼癌，卡波西氏肉瘤，前列腺癌，睾丸癌，皮肤鳞状细胞癌，间皮瘤，多尖端骨髓瘤，卵巢癌，胰腺内分泌瘤，胰高血糖素瘤，胰腺癌，阴茎癌，垂体瘤，软组织肉瘤，视网膜母细胞瘤，小肠癌，胃癌，胸腺癌，滋养细胞癌，葡萄胎，子宫内膜癌，阴道癌，

外阴癌，蕈样真菌病，胰岛素瘤，心脏癌，脑膜癌，腹膜癌，胸膜癌和血液癌中的至少一种。

45、一种免疫疗法，其特征在于，包括：

对受试者施用治疗有效量的溶瘤病毒，所述溶瘤病毒的基因组含有标记性多肽的编码序列，所述标记性多肽具有可操作地连接的胞外抗原决定区、间隔部分和跨膜部分，所述胞外抗原决定区的氨基酸序列含有一个或者多个抗原表位多肽的氨基酸序列，在自然状态下，所述受试者细胞膜蛋白或分泌蛋白的氨基酸序列不含有所述抗原表位多肽的氨基酸序列；和

对所述受试者施用治疗有效量的多特异性抗体，所述多特异性抗体至少包括第一抗原结合部分和第二抗原结合部分，所述第一抗原结合部分能够特异性识别并结合所述标记性多肽的所述胞外抗原决定区，所述第二抗原能结合部分能够特异性识别并结合免疫细胞抗原或第一细胞因子或其受体；

所述多特异性抗体还可以选择性地包括第三抗原结合部分，所述第三抗原结合部分能够特异性识别并结合肿瘤抗原或免疫检查点或第二细胞因子或其受体。

46、根据权利要求 45 所述的方法，其特征在于，包括以下依次进行的步骤：

- 1) 对所述受试者施用治疗有效量的所述溶瘤病毒；和
- 2) 在施用所述溶瘤病毒后，对所述受试者施用治疗有效量的所述多特异性抗体。