



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 115052885 A

(43) 申请公布日 2022.09.13

(21) 申请号 202080089240.7

(22) 申请日 2020.10.21

(30) 优先权数据

1915282.6 2019.10.22 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.06.21

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2020/079573 2020.10.21

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2021/078774 EN 2021.04.29

(71) 申请人 英美诺科有限公司

地址 英国牛津郡

(72) 发明人 钱德拉牟利·池拉库里

乔治·迪亚兹·多·纳西门托

康纳·海斯 詹姆斯·帕克

彼得·詹姆斯 罗南·奥德怀尔

安德鲁·普乐

(74) 专利代理机构 华进联合专利商标代理有限公司 44224

专利代理师 郑元博

(51) Int.Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/705 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

权利要求书4页 说明书23页 附图5页

(54) 发明名称

特异性结合分子

(57) 摘要

本发明涉及与来源于癌种系抗原MAGEA1的HLA-A*02限制性肽KVLEYVIKV (SEQ ID NO:1) 结合的特异性结合分子,例如T细胞受体(TCR)。相对于天然MAGEA1TCR,所述特异性结合分子可以包含α和/或β可变结构域内的非天然突变。本发明的特异性结合分子特别适用作用于治疗恶性疾病的新型免疫治疗试剂。

SEQ ID NO: 2 支架α链可变区

10	20	30	40	50	60	
AQSVTQLGSH	VSVSEGA	LVL LRCNYSS	SVP PYLFW	VQYP NQGLQL	LLKY TSAATL	VKGI
			CDR1		CDR2	
70	80	90	100	110		
NGFEAEFKKS	ETSFHLTKPS	AHMSDAAEYF	CAARPSSSNT	GKLI	FGQGT LQVKP	
			CDR3			

SEQ ID NO: 3 支架β链可变区

10	20	30	40	50	60	
AAGVIQSPRH	LIKEKRETAT	LKCYPIPRHD	TVYVYQQGPG	QDPQFLISFY	EKMQSDK	GSI
			CDR1		CDR2	
70	80	90	100	110		
PDRFSAQQFS	DYHSELNMSS	LELGDSALYF	CASSFTGFDE	QFFGPGTRLT	VL	
			CDR3			

1. 一种特异性结合分子,所述特异性结合分子具有与KVLEYVIKV (SEQ ID NO:1) HLA-A*02复合物和/或KVLEYVIKV (SEQ ID No:17) HLA-A*02复合物结合的性质并且包含TCR α 链可变结构域和/或TCR β 链可变结构域,所述TCR α 链可变结构域和/或所述TCR β 链可变结构域中的每个包含FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR为骨架区,并且CDR为互补决定区,其中

(a) 所述 α 链CDR具有以下序列:

CDR1-SSVPPY (SEQ ID NO:15)

CDR2-YTSAATLV (SEQ ID NO:16)

CDR3-AARPSSSNTGKLI (SEQ ID NO:17)

其中任选地有一个或多个突变,

和/或

(b) 所述 β 链CDR具有以下序列:

CDR1-PRHDT (SEQ ID NO:18)

CDR2-FYEKMV (SEQ ID NO:19)

CDR3-ASSFTGFDEQF (SEQ ID NO:20)

其中任选地有一个或多个突变。

2. 根据权利要求1所述的特异性结合分子,其特征在于,所述 α 链可变结构域骨架区包含以下序列:

FR1-SEQ ID NO:2的第1-26位氨基酸

FR2-SEQ ID NO:2的第33-49位氨基酸

FR3-SEQ ID NO:2的第58-91位氨基酸

FR4-SEQ ID NO:2的第105-115位氨基酸

或与上述序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的各序列,和/或

所述 β 链可变结构域骨架区可以包含以下序列:

FR1-SEQ ID NO:3的第1-26位氨基酸

FR2-SEQ ID NO:3的第32-48位氨基酸

FR3-SEQ ID NO:3的第55-91位氨基酸

FR4-SEQ ID NO:3的第103-112位氨基酸

或与上述序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的各序列。

3. 根据权利要求1或权利要求2所述的特异性结合分子,其特征在于,所述 α 链CDR中的所述突变中的一个或多个选自(参照SEQ ID NO:2的编号):

- 在第26位后插入4个氨基酸 (ARWG)
- S27D
- S28G
- S52G
- A53G
- A54D

- T55L
- I56V
- S97D
- S98A。

4. 根据权利要求3所述的特异性结合分子,其特征在于,

所述 α 链CDR1包含以下序列:SSVPPY (SEQ ID NO:15)或ARWGDGVPPY (SEQ ID NO:21);

所述 α 链CDR2包含以下序列:Y TSAATLV (SEQ ID NO:16)或YTGGDLVV (SEQ ID NO:22);

和/或

所述 α 链CDR3包含以下序列:AARPSSSNTGKLI (SEQ ID NO:17)、AARPSDSNTGKLI (SEQ ID NO:23)或AARPSSANTGKLI (SEQ ID NO:24)。

5. 根据前述任一权利要求所述的特异性结合分子,其特征在于,所述 β 链CDR中的所述突变中的一个或多个选自(参照SEQ ID NO:3的编号):

- Y50F
- K52T
- M53K
- Q54F
- F95V
- T96W
- G97D
- F98W/Y。

6. 根据权利要求5所述的特异性结合分子,其特征在于,

所述 β 链CDR1包含以下序列:PRHDT (SEQ ID NO:18);

所述 β 链CDR2包含以下序列:FYEKMQ (SEQ ID NO:19)、FFETMF (SEQ ID NO:25)或FFETKF (SEQ ID NO:26);和/或

所述 β 链CDR3包含以下序列:ASSFTGFDEQF (SEQ ID NO:20)、ASSVWDWDEQF (SEQ ID NO:27)或ASSVWDYDEQF (SEQ ID NO:28)。

7. 根据前述任一权利要求所述的特异性结合分子,其特征在于,所述特异性结合分子具有以下 α 链CDR和 β 链CDR的组合之一:

	α			β		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
a	<u>ARWGDGVPPY</u>	<u>YTGGDLVV</u>	<u>AARPSSSNTGKLI</u>	<u>PRHDT</u>	<u>FFETMF</u>	<u>ASSVWDWDEQF</u>
b	<u>ARWGDGVPPY</u>	<u>YTGGDLVV</u>	<u>AARPSSSNTGKLI</u>	<u>PRHDT</u>	<u>FFETKF</u>	<u>ASSVWDYDEQF</u>
c	<u>ARWGDGVPPY</u>	<u>YTGGDLVV</u>	<u>AARPSDSNTGKLI</u>	<u>PRHDT</u>	<u>FFETMF</u>	<u>ASSVWDWDEQF</u>
d	<u>ARWGDGVPPY</u>	<u>YTGGDLVV</u>	<u>AARPSDSNTGKLI</u>	<u>PRHDT</u>	<u>FFETMF</u>	<u>ASSVWDYDEQF</u>
e	<u>ARWGDGVPPY</u>	<u>YTGGDLVV</u>	<u>AARPSSANTGKLI</u>	<u>PRHDT</u>	<u>FFETMF</u>	<u>ASSVWDYDEQF</u>

8. 根据前述任一权利要求所述的特异性结合分子,其特征在于,所述 α 链可变结构域包含SEQ ID NO:4-6的氨基酸序列中的任一个或与其具有至少90%同一性的序列,并且所述 β 链可变结构域包含SEQ ID NO:7-9的氨基酸序列中的任一个或与其具有至少90%同一性的序列。

9. 根据前述任一权利要求所述的特异性结合分子,其特征在於,所述特异性结合分子包含以下 α 链和 β 链可变结构域对之一:

α 链可变结构域	β 链可变结构域
SEQ ID No:4	SEQ ID No:7
SEQ ID No:4	SEQ ID No:8
SEQ ID No:5	SEQ ID No:7
SEQ ID No:5	SEQ ID No:9
SEQ ID No:6	SEQ ID No:9

10. 根据前述任一权利要求所述的特异性结合分子,其特征在於,所述特异性结合分子是具有 α 链TRAC恒定结构域序列和 β 链TRBC1或TRBC2恒定结构域序列的 α - β 异二聚体。

11. 根据权利要求10所述的特异性结合分子,其特征在於,通过截短或替换使TRAC的外显子2的Cys4与TRBC1或TRBC2的外显子2的Cys2之间的天然二硫键缺失来修饰所述 α 链和 β 链恒定结构域序列。

12. 根据权利要求10或11所述的特异性结合分子,其特征在於,通过用半胱氨酸残基替换TRAC的Thr48和TRBC1或TRBC2的Ser57来修饰所述 α 和/或 β 链恒定结构域序列,所述半胱氨酸在所述TCR的所述 α 和 β 恒定结构域之间形成非天然二硫键。

13. 根据前述任一权利要求所述的特异性结合分子,其特征在於,所述特异性结合分子为 $V\alpha$ -L- $V\beta$ 、 $V\beta$ -L- $V\alpha$ 、 $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$ 、 $V\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$ 型的单链形式,其中 $V\alpha$ 和 $V\beta$ 分别为TCR α 和TCR β 可变区, $C\alpha$ 和 $C\beta$ 分别为TCR α 和TCR β 恒定区,并且L为接头序列。

14. 根据权利要求13所述的特异性结合分子,其特征在於,所述接头序列选自由以下组成的组:GGGS (SEQ ID No:29)、GGSG (SEQ ID No:30)、GGSGG (SEQ ID No:31)、GSGGG (SEQ ID No:32)、GSGGGP (SEQ ID No:33)、GGEPS (SEQ ID No:34)、GGEGGGP (SEQ ID No:35)、GGEGGGSEGGGS (SEQ ID No:36)、GGSGGGG (SEQ ID NO:37)、GGGS (SEQ ID No:38)、GGGS (SEQ ID No:39)、TVLRT (SEQ ID No:40)、TVSSAS (SEQ ID No:41)和TVLSSAS (SEQ ID No:42)。

15. 根据前述权利要求所述的特异性结合分子可以与可检测标记物、治疗剂和/或PK修饰部分相关联。

16. 根据权利要求15所述的特异性结合分子,其特征在於,抗CD3抗体可选地通过接头序列与所述特异性结合分子的所述 α 链或 β 链的C端或N端共价连接。

17. 一种特异性结合分子抗CD3融合分子,包含: α 链可变结构域,所述 α 链可变结构域包含选自SEQ ID NO:4-6的氨基酸序列或与其具有至少90%同一性的序列;

β 链可变结构域,所述 β 链可变结构域包含选自SEQ ID NO:7-9的氨基酸序列或与其具有至少90%同一性的序列;和

抗CD3抗体,所述抗CD3抗体可选地包含选自SEQ ID NO:12-14的氨基酸序列并且可选地通过接头序列与所述 β 链的N端或C端共价连接。

18. 根据权利要求17所述的融合分子,包含:

具有SEQ ID NO 4的序列或与其至少90%相同的序列的 α 可变结构域和具有SEQ ID NO 10的序列或与其至少90%相同的序列的 α 链恒定结构域,具有SEQ ID NO 8的序列或与其至少90%相同的序列的 β 可变结构域和具有SEQ ID NO 11的序列或与其至少90%相同的序列

的β链恒定结构域;和具有SEQ ID NO 12的序列或与其至少90%相同的序列的抗CD3 scFv抗体片段,所述抗CD3 scFv抗体片段通过接头与所述β链的N端融合,所述接头具有SEQ ID NO:29的序列或与其至少90%相同的序列,或

具有SEQ ID NO 4的序列或与其至少90%相同的序列的α可变结构域和具有SEQ ID NO 10的序列或与其至少90%相同的序列的α链恒定结构域,具有SEQ ID NO 8的序列或与其至少90%相同的序列的β可变结构域和具有SEQ ID NO 11的序列或与其至少90%相同的序列的β链恒定结构域;和具有SEQ ID NO 14的序列或与其至少90%相同的序列的抗CD3 scFv抗体片段,所述抗CD3 scFv抗体片段通过接头与所述β链的N端融合,所述接头具有SEQ ID NO:29的序列或与其至少90%相同的序列。

19. 一种核酸,所述核酸编码如前述权利要求中任一项所述的α链和/或β链。

20. 一种表达载体,所述表达载体包含权利要求19所述的核酸。

21. 一种细胞,所述细胞携带:

(a) 权利要求20所述的表达载体,所述表达载体在单个开放阅读框中或两个不同的开放阅读框中编码如权利要求1至18中任一项所述的α和β可变链;或

(b) 第一表达载体和第二表达载体,所述第一表达载体包含编码如权利要求1至18中任一项所述的特异性结合分子的α可变链的核酸,所述第二表达载体包含如权利要求1至18中任一项所述的特异性结合分子的β可变链的核酸。

22. 一种非天然存在的和/或纯化的和/或工程化改造的细胞,尤其是T细胞,所述非天然存在的和/或纯化的和/或工程化改造的细胞呈递权利要求1至16中任一项所述的特异性结合分子。

23. 一种药物组合物,所述药物组合物包含权利要求1至16中任一项所述的特异性结合分子、权利要求17或权利要求18所述的特异性结合分子抗CD3融合分子、权利要求19所述的核酸和/或权利要求21或22所述的细胞以及一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。

24. 权利要求1至16中任一项所述的特异性结合分子、权利要求17或权利要求18所述的特异性结合分子抗CD3融合分子、权利要求19所述的核酸、权利要求21或22所述的细胞和/或权利要求23所述的药物组合物在医药中的用途,优选用于人对象。

25. 权利要求1至16中任一项所述的特异性结合分子、权利要求17或权利要求18所述的特异性结合分子抗CD3融合分子、权利要求19所述的核酸、权利要求21或22所述的细胞和/或权利要求23所述的药物组合物在用于治疗癌症或肿瘤的方法中的用途,优选用于人对象。

26. 一种治疗患有癌症或肿瘤的人对象的方法,所述方法包括向有需要的所述对象施用药学有效剂量的根据权利要求23所述的药物组合物。

27. 一种生产根据权利要求1至16中任一项所述的特异性结合分子或根据权利要求17或权利要求18所述的特异性结合分子抗CD3融合分子的方法,所述方法包括:a) 使根据权利要求21或22所述的细胞保持在用于表达所述特异性结合分子链的最优条件下;和b) 分离所述特异性结合分子链。

特异性结合分子

[0001] 本发明涉及与来源于癌种系抗原MAGEA1的HLA-A*02限制性肽KVLEYVIKV (SEQ ID NO:1) 结合的特异性结合分子,例如T细胞受体 (TCR)。相对于天然MAGEA1 TCR,所述特异性结合分子可以包含 α 和/或 β 可变结构域内的非天然突变。本发明的特异性结合分子特别适用作用于治疗恶性疾病的新型免疫治疗试剂。

背景技术

[0002] T细胞受体 (T cell receptor, TCR) 由CD4⁺和CD8⁺T细胞天然表达。TCR被设计为识别在抗原呈递细胞表面上展示的与主要组织相容性复合物 (Major Histocompatibility Complex, MHC) 分子 (在人中, MHC分子也被称为人白细胞抗原或HLA) 复合的短肽抗原 (Davis et al., Annu Rev Immunol. 1998; 16: 523-44)。CD8⁺T细胞也称为细胞毒性T细胞, 其具有特异性识别结合至MHC I类分子的肽的TCR。CD8⁺T细胞通常负责发现和介导包括癌细胞和病毒感染细胞在内的病变细胞的破坏。由于胸腺选择, 天然库中的癌症特异性TCR对相应抗原的亲中性通常较低, 这意味着癌细胞经常逃避检测和破坏。旨在促进T细胞识别癌症的新型免疫治疗方法, 为开发有效的抗癌治疗提供了非常有前景的策略。

[0003] MAGEA1 (黑色素瘤相关抗原1) 是被称为癌睾丸抗原的种系编码抗原家族的成员。癌睾丸抗原是免疫治疗干预的有吸引力的靶标, 因为它们通常在正常成人组织中有限表达或不表达。MAGEA1的Uniprot登录号为P43355, 其也称为MAGE-1抗原、癌/睾丸抗原1.1、CT1.1或抗原MZ2-E。MAGEA1在许多实体瘤以及白血病和淋巴瘤中表达 (参考文献)。本发明的以MAGEA1靶向疗法为目标的免疫疗法可能特别适合于治疗癌症, 包括但不限于: 肺癌 (NSCLC和SCLC)、乳腺癌 (包括三阴性)、卵巢癌、子宫内膜癌、食道癌、膀胱癌以及头颈癌。

[0004] 肽KVLEYVIKV (SEQ ID NO:1) 对应于全长MAGEA1蛋白的第278-286位氨基酸, 并与HLA-A*02复合呈递在细胞表面上。该肽-HLA复合物为基于TCR的免疫治疗干预提供了有用的靶标。

[0005] 以高亲和力和高特异性结合至KVLEYVIKV (SEQ ID NO:1) HLA-A*02复合物的特定TCR序列的鉴定, 对于开发新的免疫疗法是有利的。例如, 治疗性TCR可用作可溶性靶向剂, 用于将细胞毒性剂递送至肿瘤部位或激活针对肿瘤细胞的免疫效应子功能的目的 (Lissin, et al., "High-Affinity Monoclonal T-cell receptor (mTCR) Fusions", Fusion Protein Technologies for Biopharmaceuticals: Applications and Challenges. 2013. S.R. Schmidt, Wiley; Boulter et al., Protein Eng. 2003 Sep; 16 (9) : 707-11; Liddy, et al., Nat Med. 2012 Jun; 18 (6) : 980-7), 或者可选地, 治疗性TCR可用于工程化改造T细胞以进行过继性治疗。

[0006] 先前已经报道了结合至与HLA-A*02复合的KVLEYVIKV (SEQ ID NO:1) 的TCR (W02014118236、CN106749620、W02018104438、W02018170338)。但是, 这些TCR尚未被工程化改造 (突变) 以使它们相对于天然TCR以增加的亲和力/超生理亲和力结合至靶抗原。如下文进一步解释的, 超生理抗原亲和力是治疗性TCR的期望特征, 治疗性TCR的产生并不简单, 特别是当与其他期望特征 (例如特异性) 相平衡时。

[0007] 本文定义的TCR序列参考IMGT命名法进行描述,该命名法对于TCR领域的技术人员而言广为人知且可以获得。例如,请参阅:LeFranc and LeFranc, (2001). “T cell Receptor Factsbook”, Academic Press; Lefranc, (2011), Cold Spring Harb Protoc 2011 (6):595-603; Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol Appendix 1: Appendix 100; 和 Lefranc, (2003), Leukemia 17 (1):260-266。简而言之, $\alpha\beta$ TCR由两条以二硫键连接的链组成。通常认为每条链(α 和 β)具有两个结构域,即可变结构域和恒定结构域。短连接区连接可变结构域和恒定结构域,并且通常被认为是 α 可变区的一部分。另外, β 链通常包含在连接区旁的短的多多样性区,该多样性区通常也被认为是 β 可变区的一部分。

[0008] 每条链的可变结构域位于N端,并包含嵌入骨架序列(Framework sequence, FR)的三个互补决定区(Complementarity Determining Region, CDR)。CDR包含肽-MHC结合的识别位点。存在若干个编码 α 链可变(V α)区的基因和若干个编码 β 链可变(V β)区的基因,其区别在于它们的骨架、CDR1和CDR2序列,以及部分定义的CDR3序列。在IMGT命名法中,V α 和V β 基因分别用前缀“TRAV”和“TRBV”来表示(Folch and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17 (1):42-54; Scaviner and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17 (2):83-96; LeFranc and LeFranc, (2001), “T cell Receptor Factsbook”, Academic Press)。同样地, α 链和 β 链各有若干连接基因或J基因,分别被称为TRAJ或TRBJ,而 β 链有被称为TRBD的多样性基因或D基因(Folch and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17 (2):107-114; Scaviner and Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17 (2):97-106; LeFranc and LeFranc, (2001), “T cell Receptor Factsbook”, Academic Press)。T细胞受体链的巨大多样性源于各种V、J和D基因之间的组合重排,包括等位基因变体和连接多样性(Arstila, et al., (1999), Science 286 (5441):958-961; Robins et al., (2009), Blood 114 (19):4099-4107.)。TCR α 和 β 链的恒定区或C区分别称为TRAC和TRBC (Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol Appendix 1: Appendix 10)。

[0009] 本申请的发明人惊讶地发现了能够以高亲和力和高特异性结合至KVLEYVIKV-HLA-A*02复合物的新型TCR。本发明的某些特异性结合分子是由引入了许多突变的合适的支架序列(scaffold sequence)工程化改造而成的。本发明的特异性结合分子具有特别适合于治疗用途的特性。通常,这种TCR的鉴定并不简单,并且通常具有高损耗率,因此没有预期成功鉴定特定靶标的合适的特异性结合分子(例如TCR)。

[0010] 在第一种情况下,技术人员需要鉴定合适的起始序列或支架序列。通常这种序列从天然来源获得,例如,从提取自供体血液的抗原应答T细胞获得。考虑到天然库中癌症特异性T细胞的稀有性,通常必须筛选许多供体,例如20个或更多个,然后才能找到应答T细胞。筛选过程可能耗费数周或数月,甚至在发现应答T细胞的情况下,它也可能不适合免疫治疗用途。例如,应答可能太弱和/或可能对靶抗原无特异性。或者,可能不能产生克隆T细胞群,也不能扩增或维持给定的T细胞系以产生足以鉴定正确的TCR链序列的物质。适合作为起始序列或支架序列的TCR序列应具有一个或多个以下性质:对靶肽-HLA复合物具有良好的亲和力,例如200 μ M或更强;高水平的靶特异性,例如,与替代肽-HLA复合物的结合相对弱或不结合;可适于在展示文库(例如噬菌体展示)中使用;并且能够重折叠和以高产率纯化。考虑到TCR识别的简并性,即使是熟练的专业人员也很难确定特定的支架TCR序列是否具有使其适于用于治疗用途的工程化改造的特异性特性(Wooldridge, et al., J Biol

Chem.2012Jan 6;287(2):1168-77)。

[0011] 接下来的挑战是工程化改造TCR,以对靶抗原具有更高的亲和力,同时保留所需的特性(例如特异性和产率)。与抗体相比,天然存在的TCR对靶抗原的亲和力弱(低微摩尔范围),并且针对癌抗原的TCR通常具有弱于病毒特异性TCR的抗原识别(Aleksic,et al.Eur J Immunol.2012Dec;42(12):3174-9)。这种弱亲和力与癌细胞上的HLA下调相结合意味着用于癌症免疫疗法的治疗性TCR通常需要工程化改造以增加其对靶抗原的亲和力,从而产生更有效的应答。这种亲和力增加对基于TCR的可溶性试剂是必不可少的。在这种情况下,期望的是抗原结合亲和力在纳摩尔至皮摩尔范围内,并且结合半衰期为若干小时。在Liddy等人(Liddy,et al.(2012),Nat Med,18(6),980-987)的图1e和1f中举例说明了通过低表位数下的高亲和性抗识别引起效力改进。亲和力成熟过程通常涉及技术人员必须对起始TCR序列工程化改造特定突变和/或突变组合以增加抗原识别的强度,所述突变包括但不限于替换、插入和/或缺失。对给定的TCR进行亲和力工程化改造以增强突变的方法是本领域已知的,例如使用展示文库(Li et al.,Nat Biotechnol.2005Mar;23(3):349-54;Holler et al.,Proc Natl Acad Sci U S A.2000May 9;97(10):5387-92)。然而,为了引起给定TCR对给定靶标的亲和力显著增加,技术人员可能不得不从大量可能的替代方案中工程化改造突变组合。引起亲和力显著增加的特定突变和/或突变组合是不可预测的,并且存在高耗损率。在许多情况下,可能无法以给定TCR起始序列实现亲和力的显著增加。

[0012] 亲和力成熟过程还必须考虑保持TCR抗原特异性的必要性。由于TCR抗原识别固有的简并性,增加TCR对其靶抗原的亲和力带来与其他非预期靶标显示交叉反应的显著风险(Wooldridge,et al.,J Biol Chem.2012Jan 6;287(2):1168-77;Wilson,et al.,Mol Immunol.2004Feb;40(14-15):1047-55;Zhao et al.,J Immunol.2007Nov 1;179(9):5845-54)。在天然亲和力水平下,交叉反应抗原的识别可能太低而不能产生应答。如果在正常健康细胞上展示交叉反应抗原,则体内脱靶结合的可能性很大,这可能表现为临床毒性。因此,除了增加抗原结合强度之外,技术人员还必须工程化改造突变和/或突变组合,以允许TCR保留对靶抗原的高特异性并在临床前测试中显示出良好的安全性特性。再者,合适的突变和/或突变组合是不可预测的。在这个阶段的损耗率甚至更高,并且在许多情况下可能根本不能由给定的TCR起始序列实现。

[0013] 尽管存在上述困难,但发明人已经鉴定出具有特别合适的亲和力和特异性的突变的TCR。所述TCR表现出对作为与T细胞重定向部分融合的可溶性试剂制备时的抗原阳性癌细胞的强效和特异性杀伤。

具体实施方式

[0014] 在第一方面,本发明提供一种特异性结合分子,该特异性结合分子具有结合至与HLA-A*02复合的KVLEYVIKV (SEQ ID NO:1)的性质并且包含TCR α 链可变结构域和/或TCR β 链可变结构域,TCR α 链可变结构域和/或TCR β 链可变结构域中的每个包含FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4,其中FR为骨架区,并且CDR为互补决定区,其中,

[0015] (a) α 链CDR具有以下序列:

[0016] CDR1-SSVPPY (SEQ ID NO:15)

[0017] CDR2-YTSAATLV (SEQ ID NO:16)

[0018] CDR3-AARPSSSNTGKLI (SEQ ID NO:17)

[0019] 其中任选地有一个或多个突变,和/或

[0020] (b) β 链CDR具有以下序列:

[0021] CDR1-PRHDT (SEQ ID NO:18)

[0022] CDR2-FYEKMQ (SEQ ID NO:19)

[0023] CDR3-ASSFTGFDEQF (SEQ ID NO:20)

[0024] 其中任选地有一个或多个突变。

[0025] 本发明提供了与KVLEYVIKV-HLA复合物结合的特异性结合分子,包括CDR和可变结构域。特异性结合分子或其结合片段包括TCR可变结构域,TCR可变结构域可以对应于来自天然TCR的那些,或更优选地,TCR可变结构域可以是工程化改造的/非天然的。天然TCR可变结构域也可称为野生型结构域、天然结构域、亲本结构域、未突变结构域或支架结构域。特异性结合分子或结合片段可用于产生具有理想治疗特性的分子,例如对靶标的超生理亲和力、长的结合半衰期、对靶标的高特异性和良好的稳定性。本发明还包括整合了特异性结合分子或其结合片段和T细胞重定向部分的双特异性或双功能或融合分子。此类分子可以通过重定向和激活T细胞来介导针对抗原阳性靶细胞的有效和特异性反应。或者,特异性结合分子或结合片段可以整合到工程化改造的T细胞中用于过继性治疗。

[0026] 在第一方面的特异性结合分子中,所述 α 链可变结构域骨架区可以包含以下骨架序列:

[0027] FR1-SEQ ID NO:2的第1-26位氨基酸

[0028] FR2-SEQ ID NO:2的第33-49位氨基酸

[0029] FR3-SEQ ID NO:2的第58-91位氨基酸

[0030] FR4-SEQ ID NO:2的第105-115位氨基酸

[0031] 或与所述序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的各序列,和/或

[0032] 所述 β 链可变结构域骨架区可以包含以下序列:

[0033] FR1-SEQ ID NO:3的第1-26位氨基酸

[0034] FR2-SEQ ID NO:3的第32-48位氨基酸

[0035] FR3-SEQ ID NO:3的第55-91位氨基酸

[0036] FR4-SEQ ID NO:3的第103-112位氨基酸

[0037] 或与所述序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的各序列。

[0038] α 链骨架区可以包含对应于TRAV8-4*01链的氨基酸序列和/或 β 链骨架区可以包含对应于TRBV13*01链的氨基酸序列的氨基酸序列。骨架区可以与TRAV8-4*01链或TRBV13*01链具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性。

[0039] 如本文所用,术语“特异性结合分子”是指能够与靶抗原结合分子。此类分子可采用如本文所讨论的多种不同形式。一个例子是TCR,另一个例子是包含TCR CDR的双抗体,其可以是TCR可变区的形式。此外,还设想为本发明的特异性结合分子的片段。片段是指特异性结合分子的保留与靶抗原结合的部分。

[0040] 术语“突变”涵盖了替换、插入和缺失。对天然(也称为亲本、天然、未突变的野生型或支架)特异性结合分子的突变可以包括增加特异性结合分子对KVLEYVIKV-HLA-A*02复合物的结合亲和力(k_D 和/或结合半衰期)的突变。

[0041] α 链CDR和/或骨架区可以包含相对于天然CDR和/或骨架的至少一个突变。在 α 链CDR或骨架中可以有一个、两个或更少、三个或更少、四个或更少或五个或更少、六个或更少、七个或更少、八个或更少、九个或更少、十个或更少或更多个突变。 α 链CDR和/或骨架可以包含替换和插入。参照SEQ ID NO:2的编号, α 链可包含以下CDR突变:

- [0042] • 在第26位后插入4个氨基酸(例如ARWG)
- [0043] • S27D
- [0044] • S28G
- [0045] • S52G
- [0046] • A53G
- [0047] • A54D
- [0048] • T55L
- [0049] • I56V
- [0050] • S97D
- [0051] • S98A

[0052] β 链CDR和/或骨架区可以包含相对于天然CDR和/或骨架的至少一个突变。在 β 链CDR或骨架中可以有一个或更少、两个或更少、三个或更少、四个或更少、五个或更少、六个或更少、七个或更少、八个或更少、或更多个突变。 β 链CDR和/或骨架可以包含替换和插入。

[0053] 参照SEQ ID NO:3的编号, β 链可包含以下CDR突变:

- [0054] • Y50F
- [0055] • K52T
- [0056] • M53K
- [0057] • Q54F
- [0058] • F95V
- [0059] • T96W
- [0060] • G97D
- [0061] • F98W/Y

[0062] 因此, α 和 β 链CDR中可存在任何或所有列出的突变,这些突变任选地与其他突变结合。其他突变可在CDR中和/或在骨架区中。

[0063] α 链CDR1可以包括以下序列:

[0064] SSVPPY (SEQ ID NO:15) 或

[0065] ARWGDGVPPY (SEQ ID NO:21)。

[0066] α 链CDR2可以包括以下序列:

[0067] YTSAATLV (SEQ ID NO:16) 或

[0068] YTGDLVV (SEQ ID NO:22)。

[0069] α 链CDR3可以包括以下序列:

[0070] AARPSSNTGKLI (SEQ ID NO:17)

- [0071] AARPSDSNTGKLI (SEQ ID NO:23) 或
 [0072] AARPSSANTGKLI (SEQ ID NO:24)。
 [0073] β 链CDR1可以包括以下序列：
 [0074] PRHDT (SEQ ID NO:18)，
 [0075] β 链CDR2可以包括以下序列：
 [0076] FYEKM (SEQ ID NO:19)。
 [0077] FFETMF (SEQ ID NO:25) 或
 [0078] FFETKF (SEQ ID NO:26)
 [0079] β 链CDR3可以包括以下序列：
 [0080] ASSFTGFDEQF (SEQ ID NO:20)
 [0081] ASSVWDWDEQF (SEQ ID NO:27) 或
 [0082] ASSVWDYDEQF (SEQ ID NO:28)。
 [0083] α 和 β 链CDR的优选组合如下表所示：

	α			β		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
[0084]	<u>ARWGDGVPPY</u>	<u>YTGGDLV</u>	<u>AARPSSSNTGKLI</u>	<u>PRHDT</u>	<u>FFETMF</u>	<u>ASSVWDWDEQF</u>
	<u>ARWGDGVPPY</u>	<u>YTGGDLV</u>	<u>AARPSSSNTGKLI</u>	<u>PRHDT</u>	<u>FFETKF</u>	<u>ASSVWDYDEQF</u>
	<u>ARWGDGVPPY</u>	<u>YTGGDLV</u>	<u>AARPSDSNTGKLI</u>	<u>PRHDT</u>	<u>FFETMF</u>	<u>ASSVWDWDEQF</u>
	<u>ARWGDGVPPY</u>	<u>YTGGDLV</u>	<u>AARPSDSNTGKLI</u>	<u>PRHDT</u>	<u>FFETMF</u>	<u>ASSVWDYDEQF</u>
	<u>ARWGDGVPPY</u>	<u>YTGGDLV</u>	<u>AARPSSANTGKLI</u>	<u>PRHDT</u>	<u>FFETMF</u>	<u>ASSVWDYDEQF</u>

- [0085] 特别优选的组合如下表所示：

	α			β		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
[0086]	<u>ARWGDGVPPY</u>	<u>YTGGDLV</u>	<u>AARPSSSNTGKLI</u>	<u>PRHDT</u>	<u>FFETKF</u>	<u>ASSVWDYDEQF</u>

- [0087] 另一个特别优选的组合如下表所示：

	α			β		
	CDR1	CDR2	CDR3	CDR1	CDR2	CDR3
[0088]	<u>ARWGDGVPPY</u>	<u>YTGGDLV</u>	<u>AARPSSSNTGKLI</u>	<u>PRHDT</u>	<u>FFETMF</u>	<u>ASSVWDWDEQF</u>

[0089] CDR内的突变优选地提高特异性结合分子对KVLEYVIKV-HLA-A*02复合物的结合亲和力,但是可以另外地或替代地赋予其他优点,例如改善分离形式的稳定性和改善特异性。一个或多个位置的突变可以另外地或替代地影响相邻位置与同源pMHC复合物的相互作用,例如通过提供更有利的相互作用角度。突变可以包括能够减少非特异性结合量的突变,即,减少结合至相对于KVLEYVIKV-HLA-A*02的替代性抗原的突变。突变可以包括提高折叠和/或制造效率的突变。一些突变可能有利于这些特征中的每一个;另一些可能有利于例如亲和力而非特异性,或者有利于特异性而非亲和力等。

[0090] 通常,总共需要至少5个、至少10个、至少15个或更多个CDR突变以获得对靶抗原具有pM亲和力的特异性结合分子。对靶抗原具有pM亲和力的特异性结合分子尤其适用于可溶性治疗剂。用于过继性治疗应用的特异性结合分子对靶抗原可具有较低的亲和力,因此可

具有较少的CDR突变,例如,总共至多1个、至多2个、至多5个或更多个CDR突变。在某些情况下,特异性结合分子可对靶抗原具有足够高的亲和力,因此不需要突变。

[0091] 另外地或替代地,可以在骨架区内CDR之外进行突变;这种突变可以提高可溶形式的纯化特异性结合分子的结合和/或特异性、和/或稳定性、和/或产率。例如,可以修饰 α 和/或 β 链的N端以提高在大肠杆菌中生产期间N端甲硫氨酸切割的效率。无效切割可能对治疗不利,因为它可能导致异质蛋白产物和/或起始甲硫氨酸的存在可能在人体中是致免疫的。

[0092] 优选地,本发明的特异性结合分子的 α 链可变结构域可以包含与SEQ ID NO:2的第1-26位、第33-49位、第58-91位、第105-115位骨架氨基酸残基具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的各骨架氨基酸序列。本发明的特异性结合分子的 β 链可变结构域可以包含与SEQ ID NO:2的第1-26位、第32-48位、第55-91位、第103-112位骨架氨基酸残基具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的各骨架氨基酸序列。可替代地,当作为一个整体考虑时,所述百分比同一性可以是关于骨架序列的。

[0093] α 链可变结构域可以包含SEQ ID NO:4、5和6的氨基酸序列中的任一个或与其具有至少90%同一性的序列,并且 β 链可变结构域可以包含SEQ ID NO:7、8和9的氨基酸序列中的任一个或与其具有至少90%同一性的序列。

[0094] 例如,特异性结合分子可以包含以下 α 和 β 链可变结构域对:

α 链可变结构域	β 链可变结构域
SEQ ID No:4	SEQ ID No:7
SEQ ID No:4	SEQ ID No:8
SEQ ID No:5	SEQ ID No:7
SEQ ID No:5	SEQ ID No:9
SEQ ID No:6	SEQ ID No:9

[0096] 优选的配对是SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:8。另一个优选的配对是SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:7。

[0097] 本文公开的本发明的任何特异性结合分子的表型沉默变体属于本发明的范围内。如本文所用,术语“表型沉默变体”应理解为指整合了除了上述那些之外的一个或多个其他氨基酸变化(包括替换、插入和缺失)的TCR可变结构域,该TCR具有与相应的不含所述变化的TCR相似的表型。为了本申请的目的,TCR表型包含结合亲和力(K_D 和/或结合半衰期)和特异性。优选地,除了结合亲和力和特异性之外,与免疫效应子相关联的可溶性特异性结合分子的表型包括免疫激活和纯化产率的效力。当在相同的条件(例如在25°C下和/或在相同的SPR芯片上)下测量时,表型沉默变体对KVLEYVIKV-HLA-A*02复合物的 K_D 和/或结合半衰期可以为不含所述变化的相应TCR的所测得的 K_D 和/或结合半衰期的50%以内,或更优选为30%以内、25%以内或20%以内。实施例2中进一步提供了合适的条件。如本领域技术人员已知的,有可能生产这样的特异性结合分子:与以上详述的那些TCR相比,在该TCR的可变结构域中整合了变化,而不改变与KVLEYVIKV-HLA-A*02复合物的相互作用的亲和力,和/或其他功能特性。特别地,可以将这种沉默突变并入已知不直接参与抗原结合的序列的部分(例如,骨架区和/或CDR的不与抗原接触的部分)中。这种变体包括在本发明的范围内。

[0098] 表型沉默变体可以包含一个或多个保守替换和/或一个或多个耐受替换。耐受替换意指那些不落入如下所提供的保守的定义但仍然是表型沉默的替换。技术人员知道不同的氨基酸具有相似的性质并因此是“保守的”。蛋白质、多肽或肽的一种或多种这样的氨基酸通常可以被一种或多种其他这样的氨基酸替换,而不会消除该蛋白质、多肽或肽的所需活性。

[0099] 因此,氨基酸甘氨酸、丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸(具有脂肪族侧链的氨基酸)通常可以互相替换。在这些可能的替换中,优选使用甘氨酸和丙氨酸来互相替换(因为它们具有相对短的侧链),以及使用缬氨酸、亮氨酸和异亮氨酸来互相替换(因为它们具有较大的疏水脂肪族侧链)。通常可以互相替换的其他氨基酸包括:苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸(具有芳香族侧链的氨基酸);赖氨酸、精氨酸和组氨酸(具有碱性侧链的氨基酸);天冬氨酸和谷氨酸(具有酸性侧链的氨基酸);天冬酰胺和谷氨酰胺(具有酰胺侧链的氨基酸);以及半胱氨酸和甲硫氨酸(具有含硫侧链的氨基酸)。应当理解,本发明范围内的氨基酸替换可以使用天然存在的或非天然存在的氨基酸来进行。例如,本文构思可以用乙基基团取代丙氨酸上的甲基基团,和/或可以对肽骨架进行微小的改变。无论是否使用天然氨基酸或合成氨基酸,优选仅存在L-氨基酸。

[0100] 这种性质的替换通常被称为“保守”或“半保守”氨基酸替换。因此,本发明延伸至这样的特异性结合分子的用途:包含上述任意氨基酸序列但在该序列中具有一个或多个保守替换和/或一个或多个耐受替换,使得可变结构域的氨基酸序列与SEQ ID NO:4、5或6和/或SEQ ID NO:7或8或9中提供的可变结构域具有至少90%的同一性,例如至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性。

[0101] 如本领域已知的“同一性”是通过比较序列所确定的两个或更多个多肽序列或两个或更多个多核苷酸序列之间的关系。在本领域中,同一性也意指多肽或多核苷酸序列(视情况而定)之间的序列相关程度,如通过这种序列的串之间的匹配所确定。虽然存在许多测量两个多肽序列或两个多核苷酸序列之间的同一性的方法,但通常用于确定同一性的方法是在计算机程序中编码的。用于确定两个序列之间的一致性的优选计算机程序包括但不限于GCG程序包(Devereux, et al., *Nucleic Acids Research*, 12, 387 (1984))、BLASTP、BLASTN和FASTA(Atschul et al., *J. Molec. Biol.* 215, 403 (1990))。

[0102] 可以使用程序(例如CLUSTAL程序)来比较氨基酸序列。该程序比较氨基酸序列,并通过视情况而定在任一序列中插入空格来找到最优对齐。可以针对最优对齐来计算氨基酸同一性或相似性(同一性加上氨基酸类型的保守性)。像BLASTx这样的程序会对齐相似序列的最长延伸(longest stretch),并为该拟合赋值。因此,可以在发现若干相似区,每个区具有不同的分数的情况下获得比较。本发明中考虑了两种类型的同一性分析。

[0103] 通过出于最优比较目的对序列进行对齐(例如,可以在第一序列中引入空位以与序列进行最佳对齐)并且比较相应位置处的氨基酸残基或核苷酸,来确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的百分比同一性。“最佳对齐”是获得最高的百分比同一性的两个序列的对齐。百分比同一性由所比较序列中的相同氨基酸残基或核苷酸的数量来确定的(即, %同一性 = 相同位置数/位置总数 × 100)。

[0104] 可以使用本领域技术人员已知的数学算法来完成两个序列之间的百分比同一性

的确定。用于比较两个序列的数学算法的例子是Karlin and Altschul (1990) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 87:2264-2268的算法,该算法在Karlin and Altschul (1993) Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:5873-5877中进行了改进。Altschul, et al. (1990) J.Mol.Biol.215:403-410的BLASTn和BLASTp程序已经整合了这种算法。可以用BLASTn程序来进行两个核苷酸序列之间的同一性百分比的确定。可以用BLASTp程序来进行两个蛋白质序列之间的同一性百分比的确定。为了获得用于比较目的的空位对齐 (gapped alignment), 可以使用Gapped BLAST, 如1997年Altschul等人所述。可替代地, 可以使用PSI-Blast来执行迭代搜索, 检测分子之间的远距离关系 (Id.)。当使用BLAST、Gapped BLAST和PSI-Blast程序时, 可以使用各个程序 (例如, BLASTp和BLASTn) 的默认参数。参见 <http://www.ncbi.nlm.nih.gov>。默认的常规参数可以包括, 例如, 字体大小=3, 期望阈值=10。可以选择参数以自动调整为输入短序列。用于序列比较的数学算法的另一例子是Myers and Miller, CABIOS (1989) 的算法。作为CGC序列比对软件包的一部分的ALIGN程序 (版本2.0) 已经合并了这种算法。本领域已知的用于序列分析的其他算法包括如Torellis and Robotti (1994) Comput. Appl. Biosci., 10:3-5中所述的ADVANCE和ADAM; 以及Pearson and Lipman (1988) Proc. Natl. Acad. Sci. 85:2444-8中所述的FASTA。在FASTA中, ktup是设置搜索的灵敏度和速度的控制选项。出于评估本发明中的百分比同一性的目的, 使用BLASTp以及默认参数作为比较方法。另外, 当所述同一性百分比提供氨基酸的非整数值 (即, 具有90%序列同一性的25个氨基酸的序列提供的值为“22.5”) 时, 则将所得值向下舍入到下一个整数, 即“22”)。因此, 在提供的例子中, 在25个氨基酸中具有22个匹配的序列在90%序列同一性内。

[0105] 对于本领域技术人员来说显而易见的是, 在基本不影响特异性结合分子的功能特性的情况下, 有可能将在其C端和/或N端所提供的序列截短或延伸1、2、3、4、5或更多个残基。所有这些变体都涵盖在本发明中。

[0106] 可以使用任何适当的方法将突变 (包括保守和耐受的替换、插入和缺失) 引入所提供的序列中, 所述方法包括但不限于基于聚合酶链反应 (PCR)、基于限制酶的克隆或不依赖于连接的克隆 (Ligation independent cloning, LIC) 步骤的方法。这些方法在许多标准分子生物学文本中都有详细描述。有关聚合酶链反应 (PCR) 和基于限制酶的克隆的更多细节, 参见Sambrook&Russell, (2001) Molecular Cloning-A Laboratory Manual (3rd Ed.) CSHL Press。有关不依赖于连接的克隆 (LIC) 步骤的更多信息可以在Rashtchian, (1995) Curr Opin Biotechnol 6 (1):30-6中找到。本发明提供的TCR序列可以从固态合成或本领域已知的任何其他合适的方法获得。

[0107] 本发明的特异性结合分子具有结合KVLEYVIKV-HLA-A*02复合物的性质。本发明的特异性结合分子显示出对KVLEYVIKV-HLA-A*02复合物的高度特异性, 并因此特别适合于治疗用途。在本发明的特异性结合分子背景下的特异性涉及该特异性结合分子识别抗原为阳性的HLA-A*02靶细胞的能力, 同时具有最小的识别抗原为阴性的HLA-A*02靶细胞的能力。

[0108] 如本领域技术人员所知, HLA-A*02等位基因组包括许多亚型。所有这些亚型都包括在本发明的范围内。优选亚型的一个例子是HLA-A*0201。

[0109] 特异性可以在体外测量, 例如在细胞试验 (比如实施例3和4中描述的细胞试验) 中测量。为了测试特异性, 结合分子 (例如TCR) 可以是可溶形式并与免疫效应子相关联, 和/或

可以在细胞(例如T细胞)的表面上表达。可以通过测量在抗原阳性和抗原阴性靶细胞存在的情况下的T细胞活化水平来确定特异性。抗原阴性靶细胞的最小识别被定义为在相同条件下和在治疗相关的特异性结合分子浓度下测量时低于存在抗原阳性靶细胞时产生的水平的20%、优选低于10%、优选低于5%、并且更优选低于1%的T细胞活化水平。对于与免疫效应子相关联的可溶性TCR,治疗相关浓度可以定义为 10^{-9} M或更低的TCR浓度,和/或大于相应EC50值的高达100倍、优选高达1000倍的浓度。对于与免疫效应子相关联的可溶性TCR,针对抗原阳性细胞对比针对抗原阴性细胞,T细胞活化所需的浓度上至少存在100倍的差异。抗原阳性细胞可以使用合适的肽浓度通过肽脉冲来获得,以获得与癌细胞相当的抗原呈递水平(例如, 10^{-9} M肽,如Bossi et al., (2013) *Oncoimmunol.* 1;2 (11) :e26840中所描述),或者抗原阳性细胞可以天然地呈递所述肽。优选地,抗原阳性细胞和抗原阴性细胞都是人细胞。优选地,抗原阳性细胞是人癌细胞。抗原阴性细胞优选包括来源于人健康组织的细胞。

[0110] 另外地或替代地,特异性可以涉及特异性结合分子结合至KVLEYVIKV (SEQ ID NO: 1) HLA-A*02复合物而不结合至一组替代肽-HLA复合物的能力。这可以通过例如实施例3的Biacore方法来确定。所述组可含有至少5种,优选至少10种可替代肽-HLA-A*02复合物。替代肽可以与SEQ ID NO:1共享低水平的序列同一性,并且可以是天然存在的。替代肽优选衍生自在人健康组织中表达的蛋白质。特异性结合分子与KVLEYVIKV-HLA-A*02复合物的结合可以是其他天然呈递的肽HLA复合物的至少2倍,更优选至少10倍,或至少50倍或至少100倍,甚至更优选至少400倍。

[0111] 确定特异性结合分子特异性的替代的或另外的方法可以是使用连续诱变(例如丙氨酸扫描)来鉴定肽识别基序。构成结合基序的一部分的残基是不允许替换的残基。不允许替换可以定义为如下肽位置:在不允许替换中,特异性结合分子的结合亲和力相对于非突变肽的结合亲和力降低至少50%,或优选至少80%。在Cameron et al., (2013), *Sci Transl Med.* 2013Aug 7;5 (197) :197ra103 and W02014096803中进一步描述了这种方法。在这种情况下,特异性可以通过鉴定含有替代基序的肽,特别是在人蛋白质组中含有替代基序的肽,并测试这些肽与特异性结合分子的结合来确定。特异性结合分子与一种或多种替代肽的结合可表明缺乏特异性。在这种情况下,可能需要通过细胞试验进一步测试特异性。肽中心部分(丙氨酸)替换的低耐受性表明,特异性结合分子具有高特异性并因此表现出低的与替代肽发生交叉反应的风险。

[0112] 本发明的特异性结合分子可具有用作治疗剂的理想的安全性特性。在这种情况下,特异性结合分子可以是可溶形式,并且可以优选地与免疫效应子融合。合适的免疫效应子包括但不限于细胞因子(比如IL-2和IFN- γ);超级抗原及其突变体;趋化因子(比如IL-8、血小板因子4、黑色素瘤生长刺激蛋白);结合至免疫细胞(如T细胞或NK细胞)上的抗原的抗体(例如抗CD3、抗CD28或抗CD16),包括其片段、衍生物和变体;以及补体活化剂。理想的安全性特性意味着除了显示良好的特异性外,本发明的特异性结合分子还可以通过进一步的临床前安全性测试。这种测试的例子包括:全血测定,以确认在存在全血的情况下细胞因子释放最少,并因此使在体内引起潜在细胞因子释放综合征的风险低;以及同种异体反应性测试,以确认识别替代性HLA类型的可能性低。

[0113] 本发明的特异性结合分子可以适于高产率纯化。产率可以基于纯化过程期间保留的物质量来确定(即,相对于重折叠前获得的水溶性物质的量的、在纯化过程结束时获得的

正确折叠物质的量),和/或产率可以基于相对于原始培养物体积在纯化过程结束时获得的正确折叠物质的量。高产率意指大于1%,或更优选大于5%,或更高的产率。高产率意指大于1mg/ml,或更优选大于3mg/ml,或大于5mg/ml,或更高的产率。

[0114] 优选地,本发明的特异性结合分子对于KVLEYVIKV-HLA-A*02复合物的 K_D 大于(即,强于)非突变或支架TCR,例如在1pM至50 μ M范围内。在一方面,本发明的特异性结合分子对复合物的 K_D 为约(即 $\pm 10\%$)1pM至约400nM、约1pM至约1000pM、约100pM至约800pM。另外地或可替代地,所述特异性结合分子对复合物的结合半衰期($T_{1/2}$)可以在约1分钟至约60小时、约20分钟至约50小时、或约1小时至约6小时的范围内。优选地,本发明的特异性结合分子对KVLEYVIKV-HLA-A*02复合物的 K_D 为约200pM至约800pM的和/或结合半衰期为约1小时至约6小时。这种高亲和力对于与治疗剂和/或可检测标记物相关联的可溶形式的特异性结合分子是优选的。

[0115] 在另一方面,本发明的特异性结合分子对复合物可具有约50nM至约200 μ M、或约100nM至约1 μ M的 K_D ,和/或对复合物具有约3秒至约12分钟的结合半衰期。这种特异性结合分子对于过继性治疗应用可能是优选的。

[0116] 确定结合亲和力(与平衡常数 K_D 成反比)和结合半衰期(表示为 $T_{1/2}$)的方法是本领域技术人员已知的。在一个优选的实施方式中,结合亲和力和结合半衰期分别使用表面等离子体共振(Surface Plasmon Resonance, SPR)或生物层干涉法(Bio-Layer Interferometry, BLI)来确定,例如分别使用BIAcore仪器或Octet仪器来确定。实施例3中提供了一种优选的方法。应当理解,特异性结合分子的亲和力加倍导致 K_D 减半。根据 $\ln 2$ 除以解离率(k_{off})计算 $T_{1/2}$ 。因此, $T_{1/2}$ 加倍导致 k_{off} 减半。TCR的 K_D 和 k_{off} 值通常是对可溶形式(即被截短以去除细胞质和跨膜结构域残基的形式)的TCR进行测量的。为了考虑独立测量之间的变化,尤其是解离时间超过20小时下的相互作用,可以使用相同的测定方案测量给定特异性结合分子的结合亲和力和/或结合半衰期数次(例如3次或更多次),并取结果的平均值。为了比较两个样品(即两个不同的特异性结合分子和/或同一特异性结合分子的两种制剂)之间的结合数据,优选使用相同的测定条件(例如温度)进行测量,例如实施例2中所述的那些条件。

[0117] 本发明的某些优选的特异性结合分子对KVLEYVIKV-HLA-A*02复合物的结合亲和力和/或结合半衰期显著高于天然TCR。增加天然TCR的结合亲和力通常会降低TCR对其肽-MHC配体的特异性,这在Zhao et al., (2007) J. Immunol, 179:9, 5845-5854中得到证实。然而,尽管本发明的这种特异性结合分子具有比天然TCR显著更高的结合亲和力,其仍保持对KVLEYVIKV-HLA-A*02复合物的特异性。

[0118] 某些优选的特异性结合分子能够在体外产生针对抗原阳性细胞的高效T细胞应答,特别是针对那些呈递低水平的癌细胞典型抗原的细胞(即每个细胞大约5-100个抗原,例如50个抗原(Bossi et al., (2013) Oncoimmunol. 1;2(11):e26840;Purbhoo et al., (2006) J Immunol 176(12):7308-7316))。这种特异性结合分子可以与免疫效应子(比如抗CD3抗体)连接。测量的T细胞应答可以是T细胞活化标志物(比如干扰素 γ 或颗粒酶B)的释放、或靶细胞杀伤、或T细胞活化的其他量度,比如T细胞增殖。优选地,高效响应是 EC_{50} 值在pM范围内的响应,例如200pM或更低。

[0119] 本发明的特异性结合分子可以包含可以是 $\alpha\beta$ 异二聚体的TCR可变结构域。在某些

情况下,本发明的特异性结合分子可以包含可以是 $\gamma\delta$ 异二聚体的TCR可变结构域。在其他情况下,本发明的特异性结合分子可以包含可以是 $\alpha\alpha$ 或 $\beta\beta$ 同源二聚体(或 $\gamma\gamma$ 或 $\delta\delta$ 同源二聚体)的TCR可变结构域。本发明的 α - β 异二聚体特异性结合分子可以包含 α 链TRAC恒定结构域序列和/或 β 链TRBC1或TRBC2恒定结构域序列。恒定结构域可以是全长的,这意味着存在胞外跨膜结构域和胞外胞质结构域,或者它们可以是可溶形式(即不具有跨膜结构域或胞质结构域)。恒定结构域中的一个或两个可包含相对于天然TRAC和/或TRBC1/2序列突变、替换或缺失。术语TRAC和TRBC1/2也涵盖天然多态性变体,例如TRAC第4位处的N变为K(Bragado et al International immunology.1994Feb;6(2):223-30)。此外,TRAC的N端氨基酸最常见的是N,但在某些情况下它可能是D或其他氨基酸。优选的残基是D。

[0120] 可通过截短或替换使TRAC的外显子2的Cys4与TRBC1或TRBC2的外显子2的Cys2之间的天然二硫键缺失来修饰 α 和 β 链恒定结构域序列。 α 和/或 β 链恒定结构域序列可以在各恒定结构域的残基之间具有引入的二硫键,例如W0 03/020763中所描述。在一个优选的实施方式中,可以通过用半胱氨酸残基替换TRAC的Thr48位和TRBC1或TRBC2的Ser57位来修饰 α 和 β 恒定结构域,所述半胱氨酸在TCR的 α 和 β 恒定结构域之间形成二硫键。TRBC1或TRBC2可另外包括恒定结构域第75位的半胱氨酸至丙氨酸突变和恒定结构域的第89位的天冬酰胺至天冬氨酸突变。在本发明的 $\alpha\beta$ 异二聚体中存在的胞外恒定结构域中的一个或两个可以在C端或C末端截短,例如截短至多15个、或至多10个、或至多8个或更少的氨基酸。在本发明的 $\alpha\beta$ 异二聚体中存在的胞外恒定结构域中的一个或两个可以在C端或C末端截短例如至多15个、或至多10个或至多8个氨基酸。 α 链胞外恒定结构域的C端可以截短8个氨基酸。SEQ ID NO:10和11提供了 α 和 β 恒定结构域序列的优选示例。

[0121] 可选择地,可能没有TCR恒定结构域,而不是全长或截短的恒定结构域。因此,本发明的特异性结合分子可以由TCR α 和 β 链的可变结构域组成,任选地具有如本文所述的其他结构域。其他结构域包括但不限于免疫效应子结构域(例如抗体结构域)、Fc结构域或白蛋白结合结构域。

[0122] 本发明的特异性结合分子可以是单链形式。单链形式包括但不限于 $V\alpha$ -L- $V\beta$ 、 $V\beta$ -L- $V\alpha$ 、 $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$ 、 $V\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$ 、或 $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$ 型的 $\alpha\beta$ TCR多肽,其中 $V\alpha$ 和 $V\beta$ 分别为TCR α 和TCR β 可变区, $C\alpha$ 和 $C\beta$ 分别为TCR α 和TCR β 恒定区,并且L为接头序列(Weidanz et al., (1998) J Immunol Methods. Dec 1;221(1-2):59-76;Epel et al., (2002), Cancer Immunol Immunother. Nov;51(10):565-73;W02004/033685;W09918129)。接头序列通常是柔性的,因为它们主要由诸如不具有可能限制柔性的庞大侧链的甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸的氨基酸组成。可替代地,具有更大刚性的接头可能是期望的。可以容易地确定可用的接头序列或接头序列的最佳长度。通常,接头序列的长度将小于约12个氨基酸,例如小于10或为2至10个氨基酸。接头的长度可以为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。可用于本发明的多结构域结合分子的合适接头的实例包括但不限于:GGGGS(SEQ ID No:29)、GGGSG(SEQ ID No:30)、GGSGG(SEQ ID No:31)、GSGGG(SEQ ID No:32)、GSGGGP(SEQ ID No:33)、GGEPS(SEQ ID No:34)、GGEGGGP(SEQ ID No:35)、和GGEGGGSEGGGS(SEQ ID No:36)(如W02010/133828中所述)以及GGGSGGGG(SEQ ID NO:37)。额外的接头可以包括具有以下序列基序中的一个或多个的序列:GGGS(SEQ ID No:38)、GGGGS(SEQ ID No:39)、TVLRT(SEQ ID No:40)、TVSSAS(SEQ ID

No:41)和TVLSSAS (SEQ ID No:42)。在存在的情况下,恒定结构域中的一个或两个可以是全长的,或者它们可以如上所述被截短和/或含有突变。优选地,单链TCR是可溶的。本发明的某些单链TCR可以在各恒定结构域的残基之间具有引入的二硫键,如WO 2004/033685中所描述的。WO2004/033685;W098/39482;W001/62908;Weidanz et al. (1998) J Immunol Methods 221 (1-2):59-76;Hoo et al. (1992) Proc Natl Acad Sci US A 89 (10):4759-4763;Schodin (1996) Mol Immunol 33 (9):819-829中进一步描述了单链TCR。TCR可变结构域可以按双体形式排布。

[0123] 本发明还包括展示本发明的特异性结合分子的颗粒以及颗粒文库内的所述颗粒的包涵体。这些颗粒包括但不限于噬菌体、酵母细胞、核糖体或哺乳动物细胞。产生这种颗粒和文库的方法是本领域已知的(例如,参见WO2004/044004;W001/48145,Chervin et al. (2008) J. Immuno. Methods 339.2:175-184)。

[0124] 本发明的特异性结合分子可用于将可检测标记物或治疗剂递送至抗原呈递细胞和含有抗原呈递细胞的组织。因此,它们可以(以共价或其他方式)与可检测标记物(用于诊断目的,其中特异性结合分子用于检测呈递同源抗原的细胞的存在);和/或治疗剂;和/或药代动力学(PK)修饰部分关联。

[0125] PK修饰部分的实例包括但不限于PEG (Dozier et al., (2015) Int J Mol Sci. Oct 28;16 (10):25831-64和Jevsevar et al., (2010) Biotechnol J. Jan;5 (1):113-28)、血浆半衰期延长(PASylation) (Schlapschy et al., (2013) Protein Eng Des Sel. Aug;26 (8):489-501)、白蛋白、和白蛋白结合域、(Dennis et al., (2002) J Biol Chem. Sep 20;277 (38):35035-43)、和/或非结构化多肽 (Schellenberger et al., (2009) Nat Biotechnol. Dec;27 (12):1186-90)。其他PK修饰部分包括抗体Fc片段。PK修饰部分可用于延长体内半衰期。

[0126] 当免疫球蛋白Fc结构域用作PK修饰部分时,它可以是任何抗体Fc区。Fc区是抗体的尾部区域,该区域与细胞表面Fc受体和补体系统的一些蛋白质相互作用。Fc区通常包含两条均具有两个或三个重链恒定结构域(称为CH2、CH3和CH4)的多肽链和以及铰链区。这两条链通过铰链区内的二硫键连接。来自免疫球蛋白亚类IgG1、IgG2和IgG4的Fc结构域结合FcRn并经历FcRn介导的再循环,这赋予了长的循环半衰期(3周至4周)。IgG与FcRn的相互作用已定位于覆盖部分CH2和CH3结构域的Fc区。用于本发明的优选免疫球蛋白Fc包括但不限于来自IgG1或IgG4的Fc结构域。优选地,Fc结构域来源于人序列。Fc区还可以优选地包括促进二聚化的KiH突变,以及防止与活化受体(即功能沉默分子)相互作用的突变。免疫球蛋白Fc结构域可以按任何合适的顺序或构型与其他结构域(即TCR可变结构域或免疫效应子)的C端或N端融合。免疫球蛋白Fc可以通过接头与其他结构域(即TCR可变结构域或免疫效应子)融合。接头序列通常是柔性的,因为它们主要由诸如不具有可能限制柔性的庞大侧链的甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸的氨基酸组成。可替代地,具有更大刚性的接头可能是期望的。可以容易地确定可用的接头序列或接头序列的最佳长度。通常,接头序列的长度将小于约12个氨基酸,例如小于10或为2至10个氨基酸。接头的长度可以为1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。可用于本发明的多结构域结合分子的合适接头的实例包括但不限于:GGGGS (SEQ ID No:29)、GGGSG (SEQ ID No:30)、GGSGG (SEQ ID No:31)、GSGGG (SEQ ID No:32)、GSGGGP (SEQ ID No:33)、

GGEPS (SEQ ID No:34)、GGEGGGP (SEQ ID No:35) 和GGEGGGSEGGGS (SEQ ID No:36) (如W02010/133828中所述) 以及GGGSGGGG (SEQ ID NO:37)。额外的接头可以包括具有以下序列基序中的一个或多个的序列:GGGS (SEQ ID No:38)、GGGS (SEQ ID No:39)、TVLRT (SEQ ID No:40)、TVSSAS (SEQ ID No:41) 和TVLSSAS (SEQ ID No:42)。当免疫球蛋白Fc与TCR融合时,它可以通过接头或不通过接头而与 α 链或 β 链融合。此外,Fc的各个链可以与TCR的各个链融合。

[0127] 优选地,Fc区可以源自IgG1或IgG4亚类。这两条链可以包含CH2和CH3恒定结构域以及全部或部分铰链区。铰链区可以基本上或部分对应于来自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4的铰链区。铰链可以包括全部或部分核心铰链结构域和全部或部分下铰链区。优选地,铰链区包含至少一个连接两条链的二硫键。

[0128] Fc区可以包含相对于WT序列的突变。突变包括替换、插入和缺失。可以为了引入期望的治疗特性而进行此类突变。例如,为了促进异源二聚化,可以将杵臼结构(Knobs into holes,KiH) 突变工程化改造到CH3结构域中。在这种情况下,将一条链工程化改造为包含庞大的突出残基(即杵(Knob)),例如Y,而将另一条链工程化改造为包含一个互补的口袋(即臼(Hole))。KiH突变的合适位置是本领域已知的。另外地或可替代地,可以引入消除或减少与Fc γ 受体的结合和/或增加与FcRn的结合、和/或阻止Fab臂交换或去除蛋白酶位点的突变。

[0129] PK修饰部分也可以是白蛋白结合结构域,其也可以起到延长半衰期的作用。如本领域中已知的,白蛋白具有19天的长循环半衰期,部分原因在于其大小高于肾阈值以及由于其特异性相互作用和经由FcRn的再循环。与白蛋白连接是一种众所周知的改善治疗分子体内循环半衰期的策略。白蛋白可以通过使用特定的白蛋白结合结构域以非共价方式连接,或通过缀合或直接遗传融合以共价方式连接。Sleep et al.,*Biochim Biophys Acta*.2013Dec;1830(12):5526-34中给出了利用与白蛋白的连接来改善半衰期的治疗分子的例子。

[0130] 白蛋白结合结构域可以是能够与白蛋白结合的任何部分,包括任何已知的白蛋白结合部分。白蛋白结合结构域可以选自特异性结合白蛋白的内源性或外源性配体、有机小分子、脂肪酸、肽和蛋白质。优选的白蛋白结合结构域的例子包括:短肽,例如Dennis et al.,*J Biol Chem*.2002Sep 20;277(38):35035-43中描述的(例如肽QRLMEDICLPRWGCLWEDDF);经工程化改造以结合白蛋白的蛋白质,例如抗体、抗体片段和抗体样支架,例如由GSK商品化提供的Albudab®(O'Connor-Semmes et al.,*Clin Pharmacol Ther*.2014Dec;96(6):704-12)和由Ablynx商品化提供的Nanobody®(Van Roy et al.,*Arthritis Res Ther*.2015May20;17:135);以及基于在自然界中发现的白蛋白结合结构域(如链球菌蛋白G蛋白(Stork et al.,*Eng Des Sel*.2007Nov;20(11):569-76))的蛋白质,例如由Affibod商品化提供的Albumod®。

[0131] 优选地,白蛋白是人血清白蛋白(Human serum albumin,HSA)。白蛋白结合结构域对人白蛋白的亲合力可以在皮摩尔至微摩尔的范围内。鉴于人血清中白蛋白的浓度极高(35mg/ml-50mg/ml,大约0.6mM),据计算,基本上所有的白蛋白结合结构域在体内都将与白蛋白结合。

[0132] 白蛋白结合部分可以按任何合适的顺序或构型连接至其他结构域(即TCR可变结

构域或免疫效应子)的C端或N端。白蛋白结合部分可以通过接头连接至其他结构域(即TCR可变结构域或免疫效应子)。接头序列通常是柔性的,因为它们主要由诸如不具有可能限制柔性的庞大侧链的甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸的氨基酸组成。可替代地,具有更大刚性的接头可能是期望的。可以容易地确定可用的接头序列或接头序列的最佳长度。通常接头序列的长度小于约12个氨基酸,例如小于10个或为2-10个氨基酸。接头的长度可以为约1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸。可用于本发明的多结构域结合分子的合适接头的实例包括但不限于:GGGGS (SEQ ID No:29)、GGGSG (SEQ ID No:30)、GGS GG (SEQ ID No:31)、GSGGG (SEQ ID No:32)、GSGGGP (SEQ ID No:33)、GGEPS (SEQ ID No:34)、GGE GGP (SEQ ID No:35)和GGEGGGSEGGGS (SEQ ID No:36)(如W02010/133828中所述)以及GGGSGGGG (SEQ ID NO:37)。额外的接头可以包括具有以下序列基序中的一个或多个的序列:GGGS (SEQ ID No:38)、GGGGS (SEQ ID No:39)、TVLRT (SEQ ID No:40)、TVSSAS (SEQ ID No:41)和TVLSSAS (SEQ ID No:42)。当白蛋白结合部分与TCR融合时,它可以通过接头或不通过接头而与 α 链或 β 链连接。

[0133] 用于诊断目的的可检测标记包括:例如,荧光标记、放射性标记、酶、核酸探针和造影剂。

[0134] 出于某些目的,本发明的特异性结合分子可以聚集成包含若干个特异性结合分子的复合物,以形成多价复合物。有许多人蛋白质含有可用于生产多价复合物的多聚化结构域。例如已用于生产scFv抗体片段四聚体的p53的四聚化结构域,与单体scFv片段相比,其表现出增加的血清持久性和显著降低的解离速率(Willuda et al. (2001) J. Biol. Chem. 276 (17) 14385-14392)。血红蛋白也具有可用于这种应用的四聚化结构域。与非多价复合物相比,本发明的多价复合物可具有增强的对复合物的结合能力。因此,多价复合物也被包括在本发明内。这种多价复合物特别可用于在体外或体内追踪或靶向呈递特定抗原的细胞。

[0135] 可以与本发明的特异性结合分子相关联的治疗剂包括免疫调节剂和效应子、放射性化合物、酶(例如穿孔素)或化疗剂(例如顺铂)。为了确保在所需位置发挥毒性作用,毒素可以在与特异性结合分子连接的脂质体内,以使得化合物缓慢释放。这将防止在体内转运过程中的损伤作用,并确保毒素在特异性结合分子与相关抗原呈递细胞结合后具有最大效应。

[0136] 合适的治疗剂的实例包括但不限于:

[0137] • 小分子细胞毒性剂,即具有杀伤哺乳动物细胞的能力的分子量小于700道尔顿的化合物。这种化合物还可以含有能够具有细胞毒性作用的有毒金属。此外,应当理解,这些小分子细胞毒性剂还包括前药,即在生理条件下衰变或转化以释放细胞毒性剂的化合物。这种药剂的实例包括顺铂、美登素(maytansine)衍生物、雷卡霉素(rachelmycin)、卡奇霉素(calicheamicin)、多西他赛(docetaxel)、依托泊苷(etoposide)、吉西他滨(gemcitabine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、伊立替康(irinotecan)、美法仑(melphalan)、米托蒽醌(mitoxantrone)、吡吩姆钠光敏素II(sorfiner sodiumphotofrin II)、替莫唑胺(temozolomide)、拓扑替康(topotecan)、trimetreate arbourate、奥瑞斯他汀E(auristatin E)、长春新碱(vincristine)和多柔比星(doxorubicin);

[0138] • 肽细胞毒素,即具有杀伤哺乳动物细胞能力的蛋白质或其片段。例如,蓖麻毒

素、白喉毒素、假单胞菌细菌外毒素A、脱氧核糖核酸酶和核糖核酸酶；

[0139] • 放射性核素,即随着 α 或 β 粒子或 γ 射线中的一种或多种的同时发射而衰变的元素的不稳定同位素。例如,碘131、镱186、铟111、钇90、铋210和213、钶225和砷213;可以使用螯合剂来促进这些放射性核素与高亲和力TCR或其多聚体的缔合;

[0140] • 免疫刺激剂,即刺激免疫应答的免疫效应子分子。例如,细胞因子,比如IL-2和IFN- γ ;

[0141] • 超级抗原及其突变体;

[0142] • TCR-HLA融合体,例如与肽-HLA复合物的融合体,其中,所述肽衍生自常见的人病原体,例如埃伯斯坦巴尔病毒(Epstein Barr Virus,EBV);

[0143] • 趋化因子,比如IL-8、血小板因子4、黑色素瘤生长刺激蛋白等;

[0144] • 抗体或其片段,包括抗T细胞或NK细胞决定簇抗体(例如抗CD3、抗CD28或抗CD16);

[0145] • 具有抗体样结合特征的替代蛋白质支架。

[0146] • 补体活化剂;

[0147] • 异种蛋白结构域、同种异体蛋白结构域、病毒/细菌蛋白结构域、病毒/细菌肽。

[0148] 在优选的方面,特异性结合分子包含免疫效应子结构域,通常通过将所述免疫效应子以任何合适的构型与特异性结合分子的 α 或 β 链的N端或C端融合,或两者。特别优选的免疫效应子是抗CD3抗体、或所述抗CD3抗体的功能片段或变体。如本文所用,术语“抗体”涵盖这种片段和变体。抗CD3抗体的实例包括但不限于OKT3、UCHT-1、BMA-031和12F6。适用于本文所述的组合物和方法的抗体片段和变体/类似物包括微型抗体、Fab片段、F(ab')₂片段、dsFv和scFv片段、Nanobodies™(这些构建体由Ablynx(比利时)销售,包含:衍生自骆驼科动物(例如骆驼或美洲驼)抗体和域抗体(Domantis(比利时)的合成的单一免疫球蛋白重链可变结构域,包括亲和力成熟的单一免疫球蛋白重链可变结构域或免疫球蛋白轻链可变结构域)或表现出抗体样结合特性的替代蛋白质支架,例如Affibody(Affibody(瑞典),其包含工程化蛋白A支架)或Anticalins(Pieris(德国)),其包括工程化的anticalins),略举数例。在一个优选的实施方式中,抗CD3是对应于SEQ ID NO:12-14的scFv片段。

[0149] 在另一种优选的形式中,特异性结合分子的可变结构域和免疫效应子结构域可以在不同的多肽链上交替,导致二聚化。例如在W02019012138中描述了这样的形式。简而言之,第一多肽链可以包括从N端到C端)第一抗体可变结构域,随后是TCR可变结构域,任选地随后是Fc结构域。第二链可以包括(从N端到C端)TCR可变结构域,随后是第二抗体可变结构域,任选地随后是Fc结构域。给出适当长度的接头,链将二聚化成多特异性分子,任选地包括Fc结构域。其中结构域以这种方式位于不同链上的分子也可以称为双体,本文中也考虑了这种双体。可以添加额外的链和结构域以形成例如三体。

[0150] 因此,本文还提供了选自包含第一多肽链和第二多肽链的分子的组中的特异性结合分子,其中:

[0151] 第一多肽链包含:与人免疫效应细胞的细胞表面抗原特异性结合的抗体的可变结构域的第一结合区(VD1),和

[0152] 与MHC相关肽表位特异性结合的TCR的可变结构域的第一结合区(VR1),和

[0153] 连接所述结构域的第一接头(LINK1);

[0154] 第二多肽链包含:与MHC相关肽表位特异性结合的TCR的可变结构域的第二结合区(VR2),和

[0155] 与人免疫效应细胞的细胞表面抗原特异性结合的抗体的可变结构域的第二结合区(VD2),和

[0156] 连接所述结构域的第二接头(LINK2);

[0157] 其中所述第一结合区(VD1)和所述第二结合区(VD2)缔合以形成结合人免疫效应细胞的细胞表面抗原的第一结合位点(VD1)(VD2);

[0158] 所述第一结合区(VR1)和所述第二结合区(VR2)缔合以形成结合所述MHC相关肽表位的第二结合位点(VR1)(VR2);

[0159] 其中所述两条多肽链与人IgG铰链结构域和/或人IgG Fc结构域或其二聚化部分融合;以及

[0160] 其中所述两条多肽链通过所述铰链结构域和/Fc结构域之间的共价和/或非共价键连接;以及

[0161] 其中所述双特异性多肽分子能够同时结合细胞表面分子和MHC相关肽表位以及双特异性多肽分子,其中两条多肽链中结合区的顺序选自VD1-VR1和VR2-VD2或VD1-VR2和VR1-VD2,或VD2-VR1和VR2-VD1或VD2-VR2和VR1-VD1,其中结构域通过LINK1或LINK2连接,其中MHC相关肽表位是KVLEYVIKV,并且MHC是HLA-A*02。

[0162] TCR和抗CD3抗体的连接可以通过共价或非共价连接。共价连接可以是直接的,或通过接头序列间接的。接头序列通常是柔性的,因为它们主要由诸如不具有可能限制柔性的庞大侧链的甘氨酸、丙氨酸和丝氨酸的氨基酸组成。可替代地,具有更大刚性的接头可能是期望的。可以容易地确定可用的接头序列或接头序列的最佳长度。通常接头序列的长度小于约12个氨基酸,例如小于10个或为2-10个氨基酸。可用于本发明的TCR的合适接头的实例包括但不限于:GGGGS(SEQ ID No:29)、GGGSG(SEQ ID No:30)、GGSGG(SEQ ID No:31)、GSGGG(SEQ ID No:32)、GSGGGP(SEQ ID No:33)、GGEPS(SEQ ID No:34)、GGEGGGP(SEQ ID No:35)和GGEGGGSEGGGS(SEQ ID No:36)(如WO2010/133828中所述)以及GGGSGGGG(SEQ ID NO:37)

[0163] 本发明优选的特异性结合分子抗CD3融合构建体包括这样的构建体:该构建体中 α 链可变结构域包含SEQ ID NO:4-6中任一个的氨基酸序列或与其具有至少90%同一性的序列,和/或 β 链可变结构域包含SEQ ID NO:7-9中任一个的氨基酸序列或与其具有至少90%同一性的序列。所述 α 和 β 链可以进一步包含含有非天然二硫键的 α 和 β 胞外恒定区。 α 链的恒定结构域可以截短8个氨基酸。 α 和 β 胞外恒定区可以分别由SEQ ID NO 10和11提供。选自SEQ ID NO 12-14的抗CD3 scFv抗体片段可以通过接头与 β 链的N端融合,接头可以选自SEQ ID NO:29-32。

[0164] 本发明的抗CD3-TCR融合构建体的特别优选的序列由以下提供:

[0165] α 可变结构域SEQ ID NO 4和恒定结构域SEQ ID NO 10,

[0166] β 可变结构域SEQ ID NO 8和恒定结构域SEQ ID NO 11,

[0167] SEQ ID NO 12的抗CD3 scFv抗体片段通过SEQ ID NO:29的接头与 β 链的N端融合。

[0168] 或

[0169] α 可变结构域SEQ ID NO 4和恒定结构域SEQ ID NO 10,

[0170] β 可变结构域SEQ ID NO 8和恒定结构域SEQ ID NO 11,

[0171] SEQ ID NO 14的抗CD3 scFv抗体片段通过SEQ ID NO:29的接头与 β 链的N端融合。

[0172] 所述抗CD3-TCR融合构建体的功能变体也包括在本发明的范围内。所述功能变体优选与以上序列具有至少90%的同一性,例如至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%的同一性,但在功能上仍然等效。

[0173] 在另一方面,本发明提供了编码本发明的特异性结合分子的 α 链和/或 β 链或特异性结合分子抗CD3融合体的核酸。在一些实施方式中,该核酸是cDNA。在一些实施方式中,该核酸可以是mRNA。在一些实施方式中,本发明提供了包含编码本发明特异性结合分子的 α 链可变结构域的序列的核酸。在一些实施方式中,本发明提供了包含编码本发明特异性结合分子的 β 链可变结构域的序列的核酸。核酸可以是非天然存在的和/或纯化的和/或工程化的。核酸序列可以根据所用的表达系统进行密码子优化。如本领域技术人员已知的,表达系统可以包括细菌细胞,例如大肠杆菌,或酵母细胞,或哺乳动物细胞,或昆虫细胞,或者该表达系统可以是无细胞表达系统。

[0174] 在另一方面,本发明提供了包含本发明的核酸的载体。优选地,该载体是TCR表达载体。合适的TCR表达载体包括,例如, γ -逆转录病毒载体,或更优选地,慢病毒载体。可以在Zhang 2012及其参考文献(Zhang et al., *Adv Drug Deliv Rev.* 2012 Jun 1; 64(8):756-762)中找到更多详细信息。

[0175] 本发明还提供了携带本发明的载体的细胞,所述载体优选为TCR表达载体。合适的细胞包括哺乳动物细胞,优选为免疫细胞,甚至更优选为T细胞。载体可包含在单个开放阅读框中编码的本发明的核酸,或分别编码 α 链和 β 链的两个不同的开放阅读框的本发明的核酸。另一方面提供携带第一表达载体和第二表达载体的细胞,该第一表达载体包含编码本发明特异性结合分子的 α 链的核酸,该第二表达载体包含编码本发明特异性结合分子的 β 链的核酸。这种细胞在过继性治疗中特别有用。本发明的细胞可以是分离的和/或重组的和/或非天然存在的和/或工程化的。

[0176] 由于本发明的特异性结合分子可用于过继性治疗,因此本发明包括非天然存在的和/或纯化的和/或工程化的细胞,特别是呈递本发明的特异性结合分子的T细胞。本发明还提供了呈递本发明的特异性结合分子(例如TCR)的T细胞扩增群。存在许多适于用编码本发明的特异性结合分子的核酸(例如,DNA、cDNA或RNA)转染T细胞的方法(参见例如Robbins et al., (2008) *J Immunol.* 180:6116-6131)。表达本发明的特异性结合分子的T细胞将适用于基于过继性治疗的癌症治疗。如本领域技术人员将知晓的,有许多合适方法可以通过过继性治疗进行(参见例如Rosenberg et al., (2008) *Nat Rev Cancer* 8(4):299-308)。

[0177] 如本领域所熟知的,可以对TCR进行翻译后修饰。糖基化就是这样一种修饰,其包括寡糖部分与TCR链中限定的氨基酸的共价连接。例如,天冬酰胺残基或丝氨酸/苏氨酸残基是熟知的寡糖连接位置。特定蛋白质的糖基化状态取决于许多因素,包括蛋白质序列、蛋白质构象和某些酶的可用性。此外,糖基化状态(即寡糖类型、共价键和附着总数)会影响蛋白质功能。因此,当生产重组蛋白时,通常需要控制糖基化。受控糖基化已被用于改善基于抗体的治疗剂(Jefferis et al., (2009) *Nat Rev Drug Discov* Mar; 8(3):226-34)。对于本发明的可溶性特异性结合分子,可以通过例如使用特定细胞系(包括但不限于哺乳动物

细胞系,比如中国仓鼠卵巢(Chinese hamster ovary,CHO)细胞或人胚肾(Human embryonic kidney,HEK)细胞)或通过化学修饰来控制糖基化。这种修饰可能是期望的,因为糖基化可以改善药代动力学、降低免疫原性并且更接近地模拟天然人蛋白质(Sinclair and Elliott, (2005) Pharm Sci. Aug;94 (8) :1626-35)。

[0178] 为了向患者施用,本发明的特异性结合分子(优选与可检测标记物或治疗剂相关联或在转染的T细胞上表达)、本发明的特异性结合分子抗CD3融合分子、核酸、表达载体或细胞可以作为无菌药物组合物的一部分与一种或多种药学上可接受的运载体或赋形剂一起提供。该药物组合物可以是任何合适的形式(取决于将其施用于患者的所需方法)。其可以以单位剂型提供,通常在密封容器中提供,并且可以作为试剂盒的一部分提供。这种试剂盒会通常(但并非必然)包括使用说明。它可以包括多个所述单位剂型。

[0179] 药物组合物可以适于通过任何适当途径的施用,例如肠胃外(包括皮下、肌内、囊内或静脉内)、肠内(包括口服或直肠)、吸入或鼻内途径。这种组合物可以通过药学领域已知的任何方法制备,例如通过在无菌条件下将活性成分与运载体或赋形剂混合来制备。

[0180] 本发明的物质的剂量可以在宽限度内变化,这取决于待治疗的疾病或病症、待治疗个体的年龄和状况等,TCR抗CD3融合分子的合适剂量范围可以在25ng/kg至50 μ g/kg或1 μ g至1g的范围内。医师将最终确定所使用的适当剂量。

[0181] 本发明的特异性结合分子、特异性结合分子抗CD3融合分子、药物组合物、载体、核酸和细胞可以以基本纯的形式提供,例如纯度为至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或100%。

[0182] 本发明还提供:

[0183] • 本发明的特异性结合分子、特异性结合分子抗CD3融合分子、核酸、药物组合物或细胞,该特异性结合分子、特异性结合分子抗CD3融合分子、核酸、药物组合物或细胞用于医学,优选用于治疗癌症或肿瘤的方法;

[0184] • 本发明的特异性结合分子、特异性结合分子抗CD3融合分子、核酸、药物组合物或细胞在制造用于治疗癌症或肿瘤的药物中的用途;

[0185] • 治疗患者的癌症或肿瘤的方法,包括将本发明的特异性结合分子、特异性结合分子抗CD3融合分子、核酸、药物组合物或细胞施用至患者;

[0186] • 用于向人对象施用的可注射制剂,该可注射制剂包含本发明的特异性结合分子、特异性结合分子抗CD3融合分子、核酸、药物组合物或细胞。

[0187] 癌症可以是实体瘤或液体肿瘤。优选的,肿瘤表达MAGEA1。表达MAGEA1的肿瘤的例子包括但不限于肝癌(HCC)、肺癌(NSCLC和SCLC)、膀胱癌、头颈癌、胃癌、食道癌、乳腺癌、皮肤黑色素瘤、卵巢癌、宫颈癌、子宫内膜癌和多发性骨髓瘤。本发明的特异性结合分子、特异性结合分子抗CD3融合分子、核酸、药物组合物或细胞可以通过注射施用,例如静脉内或皮下或直接肿瘤内注射。人对象可以具有HLA-A*02亚型。

[0188] 治疗方法可进一步包括分开、联合或依次施用另外的抗肿瘤剂。这种药剂的实例是本领域已知的,并且可以包括免疫激活剂和/或T细胞调节剂。

[0189] 本发明还提供了生产本发明的特异性结合分子或本发明的特异性结合分子抗CD3融合分子的方法,该方法包括:a)使根据本发明的细胞维持在用于表达特异性结合分子链

的最佳条件下;和b)分离该特异性结合分子链。

[0190] 本发明的每个方面的优选特征在细节上作必要修改后用于每个其他方面。本文提到的现有技术文件在法律允许的最大范围内并入本文。

附图说明

[0191] 图1-提供了 α 和 β 链可变区的氨基酸序列。CDR加有下划线。

[0192] 图2-提供了突变TCR α 和 β 链可变区的氨基酸序列。CDR加有下划线且相对于WT的突变为粗体。

[0193] 图3-提供了 α 和 β 链胞外恒定区的氨基酸序列。

[0194] 图4-提供了抗CD3 scFv变体的氨基酸序列。

[0195] 图5-证明由TCR抗CD3融合蛋白介导了针对抗原阳性靶细胞的有效T细胞活化,如实施例3中所述。

[0196] 图6-证明TCR抗CD3融合蛋白对源自正常组织的细胞的最小识别,如实施例3中所述。

[0197] 图7-证明TCR抗CD3融合蛋白杀伤肿瘤细胞,如实施例4中所述。

[0198] 以下非限制性实施例进一步描述了本发明。

[0199] 实施例

[0200] 实施例1-可溶性TCR和TCR抗CD3融合蛋白的表达、重折叠和纯化

[0201] 方法

[0202] 使用标准方法(如Sambrook, et al. Molecular cloning. Vol. 2. (1989) New York: Cold spring harbour laboratory press中所描述)将编码本发明的可溶性TCR和TCR抗CD3融合蛋白的 α 和 β 胞外区的DNA序列分别克隆到基于pGMT7的表达质粒中。将表达质粒分别转化到大肠杆菌菌株Rosetta (BL21pLysS)中。对于表达,使细胞在补充有1%甘油(+氨苄青霉素100 μ g/ml和34 μ g/ml氯霉素)的自动诱导培养基中以230rpm于37 $^{\circ}$ C生长2小时,然后将温度降低到30 $^{\circ}$ C过夜。随后通过离心收获细胞。根据制造商的说明书,用BugBuster蛋白提取试剂(Merck Millipore)裂解细胞团块。通过离心回收包涵体团块。将团块在Triton缓冲液(50mM Tris-HCl pH8.1, 0.5% Triton-X100, 100mM NaCl, 10mM NaEDTA)中洗涤两次,并最终重悬于不含洗涤剂的缓冲液(50mM Tris-HCl pH8.1, 100mM NaCl, 10mM NaEDTA)中。通过用6M盐酸胍溶解并测量OD₂₈₀来对包涵体蛋白质产率定量。然后使用消光系数计算蛋白质浓度。通过用8M尿素溶解并在还原条件下将约2 μ g加样到4%-20% SDS-PAGE上来测量包涵体纯度。然后使用密度测定软件(Chemidoc, Biorad)估算或计算纯度。将包涵体储存于+4 $^{\circ}$ C下以进行短期储存,储存于-20 $^{\circ}$ C或-70 $^{\circ}$ C下以进行长期储存。

[0203] 对于可溶性TCR重折叠,首先将含有 α 链和 β 链的包涵体混合并稀释到增溶/变性缓冲液(6M盐酸胍, 50mM Tris HCl pH 8.1, 100mM NaCl, 10mM EDTA, 20mM DTT)中,然后在37 $^{\circ}$ C下孵育30分钟。然后通过进一步稀释到重折叠缓冲液(100mM Tris pH8.1, 800mM或400mM L-精氨酸HCL, 2mM EDTA, 4M尿素, 6.5mM半胱胺盐酸盐和1.9mM胱胺二盐酸盐)中并将溶液充分混合来引发重折叠。将重折叠的混合物在5 $^{\circ}$ C \pm 3 $^{\circ}$ C下对每L重折叠物以10L H₂O透析18-20小时。此后,将透析缓冲液用10mM Tris pH8.1 (10L)更换两次,并继续再透析15小时。然后将重折叠混合物通过0.45 μ m纤维素过滤器过滤。如所述进行TCR抗CD3融合分子的制备,

除了重折叠步骤中氧化还原试剂的浓度为1mM脘胺二盐酸盐、10mM半脘胺盐酸盐。

[0204] 通过将透析后的重折叠物施加到POROS®50HQ阴离子交换柱上,并且使用Akta® Pure (GE Healthcare)用0-500mM NaCl梯度的20mM Tris pH8.1溶液以6个柱体积洗脱结合的蛋白来启动可溶性TCR的纯化。通过SDS PAGE鉴定峰值TCR级分,然后将其合并并浓缩。接着将浓缩的样品施加到在Dulbecco's PBS缓冲液中预平衡的Superdex®200Increase 10/300GL凝胶过滤柱 (GE Healthcare)上。合并峰值TCR级分并浓缩,并计算纯化物质的最终产率。对于TCR抗CD3融合分子,在阴离子交换步骤之后增加了阳离子交换步骤。在这种情况下,将来自阴离子交换的峰值级分在40mM MES中稀释20倍,并施加到POROS®50HS阳离子交换柱上。用0-500mM NaCl梯度的40mM MES溶液洗脱结合蛋白。合并峰值级分并调节至200mM Tris pH8.1,然后浓缩并如所述直接施加到凝胶过滤基质上。

[0205] 实施例2-结合表征

[0206] 使用BIAcore 8K、BIAcore 3000或BIAcore T200仪器,通过表面等离子体共振对纯化的可溶性TCR和TCR抗CD3融合分子与肽-HLA复合物的结合进行了分析。将生物素化的I类HLA-A*02分子用目标肽重折叠并使用本领域技术人员已知的方法 (O' Callaghan et al. (1999). Anal Biochem 266 (1) :9-15; Garboczi, et al. (1992). Proc Natl Acad Sci USA 89 (8) :3429-3433) 进行纯化。所有测量均在25°C下在补充有0.005%P20的Dulbecco's PBS缓冲液中进行。

[0207] BIAcore方法

[0208] 将生物素化的肽-HLA单体固定在Biotin CAPture传感器芯片的链霉亲和素偶联的CM-5上。使用连续稀释的可溶性TCR或融合分子来测定平衡结合常数,该可溶性TCR或融合分子以10-30 μ l/min的恒定流速注射至包覆有约500个响应单位 (Response unit, RU) 的肽-HLA-A*02复合物的流动池。通过减去对不含肽-HLA的对照流动池的缓冲液响应,来对每个TCR浓度的平衡响应进行归一化。通过使用Prism软件的非线性曲线拟合和Langmuir结合等温线获得 K_D 值, $\text{bound (结合)} = C * \text{Max} / (C + K_D)$, 其中“bound”是在注入的TCR浓度C下RU中的平衡结合,Max是最大结合。

[0209] 对于高亲和力相互作用,通过单循环动力学分析来确定结合参数。使用50 μ l/min⁻¹至60 μ l/min⁻¹的流速,在包覆有~50RU至200RU的肽-HLA复合物的流动池上注射五种不同浓度的可溶性TCR或融合蛋白。通常,以2nM至100nM的最高浓度注射60 μ l至200 μ l可溶性TCR或融合蛋白,连续进行2倍稀释用于其他四次注射。首先注入最低浓度。为了测量解离相,注入缓冲液直至发生 $\geq 10\%$ 解离,通常在1小时至3小时后。使用制造商的软件计算动力学参数。将解离相拟合为单个指数衰减方程,从而能够计算半衰期。平衡常数 K_D 由 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 计算。

[0210] 结果

[0211] 可溶性WT TCR的结合表征

[0212] 显示出包含图1中提供的 α 和 β 可变结构域以及图3中提供的 α 和 β 胞外恒定结构域的可溶性WT TCR与KVLEYVIKV-HLA-A*02复合物结合, K_D 为21.6 μ M \pm 3 μ M (n=2)。

[0213] 评估相同的可溶性TCR与一组24个不相关的肽HLA-A*02复合物的结合。不相关的pHLA被分为三组并加样到三种流动细胞之一。以117 μ M和21.6 μ M的浓度注射可溶性野生型TCR到所有流动细胞。在任一浓度下均未检测到显著结合,表明可溶性WT TCR对-HLA-A*02复合物具有特异性。

[0214] 使用一组肽进行额外的特异性评估,其中KVLEYVIKV肽的各残基依次被丙氨酸取代。测定了与每种丙氨酸替换肽的相对结合。显示出肽中心部分的丙氨酸替换导致完全丧失TCR结合(位置E4、Y5和V6)。这些数据表明TCR特别适用于治疗试剂的开发。

[0215] TCR抗CD3融合蛋白的结合表征

[0216] 制备了包含图2中提供的突变可变结构域、图3中提供的胞外恒定结构域和图4中提供的抗CD3 scFv序列的TCR抗CD3融合蛋白。在本实施例中,在每种情况下,抗CD3与β可变结构域的N端融合。各种融合体与KVLEYVIKV-HLA-A*02复合物的结合参数如下表所示。

[0217]	α链	β链	K _D (nM)	T _{1/2} (h)
	a169	b58	0.628	1
	a169	b77	0.645	2.1
	a212	b58	0.460	1.8
	a212	b78	0.409	1.1
	a213	b78	0.115	2.9

[0218] 实施例3-对抗原阳性靶细胞的有效和特异性T细胞活化

[0219] T细胞活化

[0220] 评估了TCR抗CD3融合蛋白介导CD3+T细胞对呈递KVLEYVIKV-HLA-A*02复合物的细胞的有效和特异性活化的能力。干扰素-γ (IFN-γ) 释放用作T细胞活化的读出。

[0221] 方法

[0222] 根据制造商的说明,使用人IFN-γ ELISPOT试剂盒(BD Biosciences)进行检测。简而言之,在1-7天前用IFN γ 抗体涂覆ELISpot板。在测定当天,用100ul测定培养基(R10)封闭ELISPOT板。解除封闭后,将靶细胞以每孔50ul体积50000个/孔铺板。对融合蛋白进行滴定以得到5nM、1nM、0.5nM、0.3nM、0.2nM、0.1nM、0.05nM、0.03nM、0.02nM和0.01nM的最终浓度(横跨预期的临床相关范围),并以50ul体积添加到孔中。将效应子(PBMC)从液氮中解冻,计数并以每孔50ul体积20至80000个细胞铺板(每个实验所用的确切的细胞数目取决于供体,并且可以进行调整以在适于测定的范围内产生响应)。每个孔的最终体积用R10补足至200ul。将板/细胞培养过夜,第二天使板显影并将板在室温下干燥至少2小时,然后使用CTL分析仪(Cellular Technology Limited)通过免疫印迹软件来对点计数。使用PRISM绘制响应曲线并计算Ec50值。

[0223] 在该实施例中,使用以下人癌细胞系作为靶细胞:

[0224] • NCI-H1703 (抗原阳性) 肺

[0225] • NCI-H2023 (抗原阳性) 肺

[0226] • U-2-OS (抗原阳性) 骨

[0227] • Me1624 (抗原阴性) 黑色素瘤

[0228] 结果

[0229] 图5示出了使用本发明的TCR抗CD3融合蛋白生成的响应曲线。在每种情况下,针对抗原阳性细胞的Ec50值都在低pM范围(<200pM)内。在治疗相关范围(≤1nM)内仅观察到对抗原阴性细胞的最小活化,导致中靶(on-target)刺激和脱靶刺激之间有一个宽范围的安全窗口。

[0230] 正常组织的最小识别

[0231] 为了进一步证明TCR抗CD3融合蛋白的特异性,使用与上述描述的相同的ELISPOT方法,用一组来自人健康组织的正常细胞作为靶标进行了进一步的测试。癌细胞系NCI-H1703和NCI-H2087分别用作抗原阳性对照和抗原阴性对照。将融合蛋白滴定至最终浓度为2nM、1nM、0.5nM和0.2nM。

[0232] 结果

[0233] 图6示出了本发明的TCR抗CD3融合蛋白在治疗相关范围(≤ 1 nM)内对源自两种不同组织的正常细胞仅产生T细胞最小活化。

[0234] 实施例4-有效杀伤肿瘤细胞

[0235] 使用xCELLigence测定法(Acea Biosciences)研究了TCR抗CD3融合分子介导有效的T细胞介导的抗原阳性肿瘤细胞杀伤的能力。简而言之,将50 μ l R10添加到xCELLigenceE板中的所有孔中,使其平衡约1小时,然后读取背景读数。对靶细胞进行计数,并以500pM至5nM的最终浓度铺板在50 μ l中。使板平衡30分钟,然后放入培养箱。设置每30分钟一次扫描。取出效应子(PBMC)并于37 $^{\circ}$ C在烧瓶中放置过夜以去除单核细胞。第二天,从将要添加肽的孔中去除50 μ l R10。添加50 μ l ImmTAC(4x稀释)和50u1效应子以提供5:1的E:T比。必要时添加50 μ l肽(4x稀释),以提供10 μ M肽的最终浓度和1nM ImmTAC。每个孔中的体积用R10补足至200u1,设置每2小时一次扫描,持续198小时(100次扫描)。在24小时和48小时后计算每个浓度的细胞溶解百分比,并在PRISM中绘制响应曲线。

[0236] 结果

[0237] 图7示出了使用本发明的TCR抗CD3融合蛋白生成的响应曲线。在每种情况下,EC50值在每个时间点都在低pM范围(< 50 pM)内,表明对抗原阳性癌细胞的有效杀伤。

SEQ ID NO: 2 支架 α 链可变区

```
      10      20      30      40      50      60
AQSVTQLGSH VSVSEGalVL LRCNYSSSVP PYLFWYVQYP NQGLQLLLKY TSAATLVKGI
                        CDR1                        CDR2
      70      80      90      100     110
NGFEAEFKKS ETSFHLTKPS AHMSDAAEYF CAARPSSSNT GKLIFGQGT LQVKP
                        CDR3
```

SEQ ID NO: 3 支架 β 链可变区

```
      10      20      30      40      50      60
AAGVIQSPRH LIKEKRETAT LKCYPIPRHD TVYWYQQGPG QDPQFLISFY EKMQSDKGS I
                        CDR1                        CDR2
      70      80      90      100     110
PDRFSAQQFS DYHSELNMSS LELGDSALYF CASSFTGFDE QFFGPGTRLT VL
                        CDR3
```

图1

SEQ ID NO 4: 突变 α 链 (a169)

AQSVTQLGSHVSVSE~~GALVLLRCNYS~~ARWGDGVPPYLFWYVQYPNQGLQ~~LLK~~YTGGDLVVKGINGF~~EAE~~FK
KSETSFHLTKPSAHMSDAAEYFCAARPSSNTGKLI FGQGTTLQVKP

SEQ ID NO 5: 突变 α 链 (a212)

AQSVTQLGSHVSVSE~~GALVLLRCNYS~~ARWGDGVPPYLFWYVQYPNQGLQ~~LLK~~YTGGDLVVKGINGF~~EAE~~FK
KSETSFHLTKPSAHMSDAAEYFCAARPSDSNTGKLI FGQGTTLQVKP

SEQ ID NO 6: 突变 α 链 (a213)

AQSVTQLGSHVSVSE~~GALVLLRCNYS~~ARWGDGVPPYLFWYVQYPNQGLQ~~LLK~~YTGGDLVVKGINGF~~EAE~~FK
KSETSFHLTKPSAHMSDAAEYFCAARPSSANTGKLI FGQGTTLQVKP

SEQ ID NO 7: 突变 β 链 (b58)

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFETMFSDKGSIPDRFSAQQFSDY
HSELNMSSELGDSALYFCASSVVDWDEQFFGPGTRRLTVL

SEQ ID NO 8: 突变 β 链 (b77)

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFETKFSDKGSIPDRFSAQQFSDY
HSELNMSSELGDSALYFCASSVVDYDEQFFGPGTRRLTVL

SEQ ID NO 9: 突变 β 链 (b78)

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFETMFSDKGSIPDRFSAQQFSDY
HSELNMSSELGDSALYFCASSVVDYDEQFFGPGTRRLTVL

图2

SEQ ID NO 10: α 胞外恒定结构域

DIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA
CANAFNNSIIPEDT

SEQ ID NO 11: β 胞外恒定结构域

EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDS
RYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRAD

图3

SEQ ID NO 12: 抗 CD3-U0

AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYT
LTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ
PGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNS
LRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO 13: 抗 CD3-U2

AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYT
LTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ
PGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNS
LRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGLTVTVSS

SEQ ID NO 14: 抗 CD3-U28

AIQMTQSPSSLSASVGDRTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGTDYT
LTISLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGLVQ
PGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNS
LRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGLTVTVSS

图4

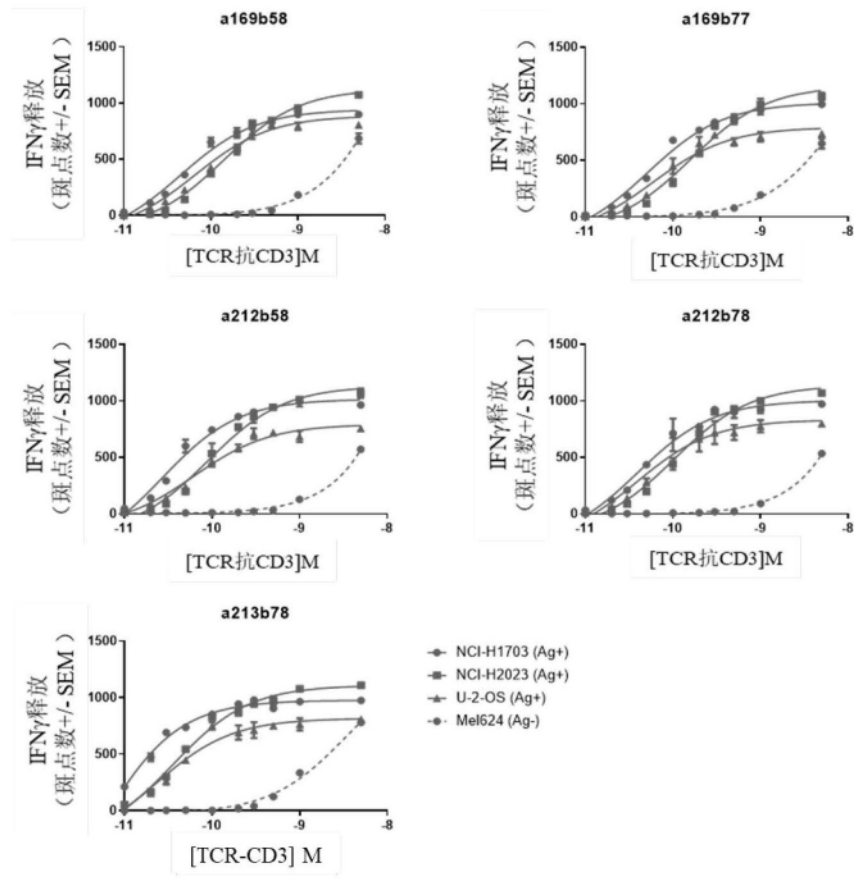


图5

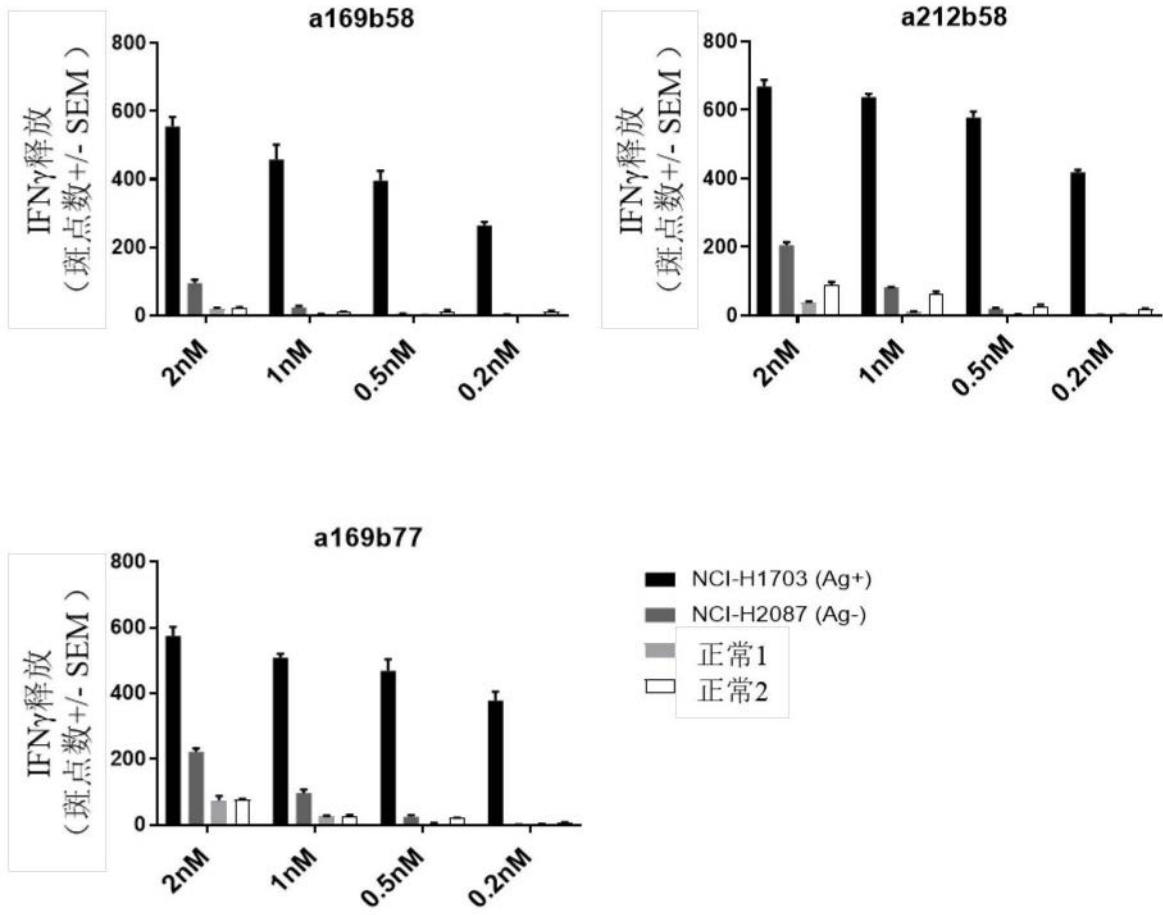


图6

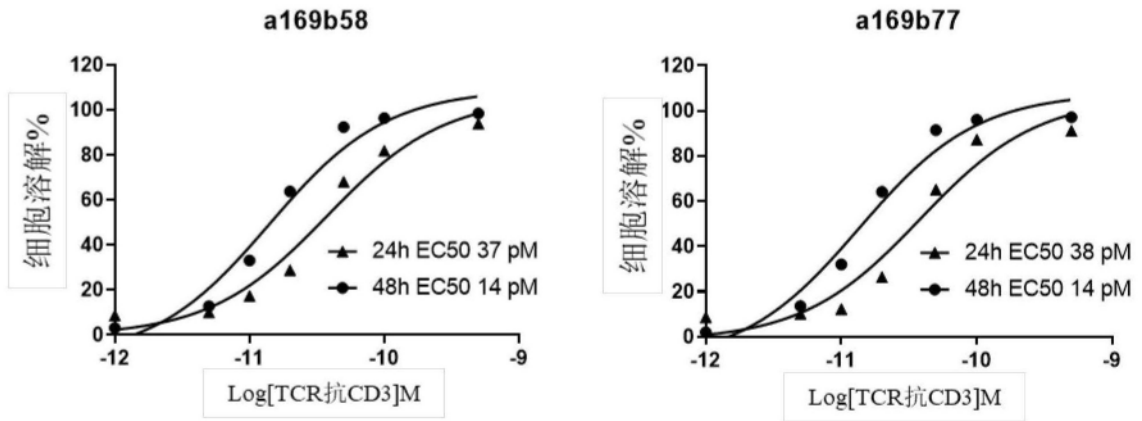


图7