



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116323667 A

(43) 申请公布日 2023.06.23

(21) 申请号 202180053811.6

(22) 申请日 2021.07.08

(30) 优先权数据

20184800.9 2020.07.08 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.02.28

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2021/068960 2021.07.08

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/008646 EN 2022.01.13

(71) 申请人 拉法医疗股份有限公司

地址 荷兰乌得勒支

(72) 发明人 罗伯塔斯·科内利斯·罗弗斯

约翰内斯·耶勒·万德弗利特

莉萨·安娜·金

保罗·威廉·亨利·伊达·帕伦

维多利亚·吉马雷伊格莱西亚斯

大卫·卢蒂耶胡尔希克

彼得·亚历山大·赫拉尔杜斯·马

里亚·马希尔森

(74) 专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司

11227

专利代理师 张珊珊 韩晓帆

(51) Int.Cl.

G07K 16/28 (2006.01)

权利要求书3页 说明书36页

序列表31页 附图17页

(54) 发明名称

结合PSMA和  $\gamma$ - $\delta$  T细胞受体的抗体

(57) 摘要

本发明涉及能够结合人PSMA并且能够结合人V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞受体的抗体。本发明还涉及包含本发明抗体的药物组合物,以及本发明抗体用于医学治疗的用途。

1. 多特异性抗体,其包含能够结合人PSMA的第一抗原结合区和能够结合人V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞受体的第二抗原结合区。

2. 根据权利要求1所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体是双特异性抗体。

3. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一抗原结合区是单结构域抗体。

4. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述第二抗原结合区是单结构域抗体。

5. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体与具有SEQ ID NO:2中所示序列的抗体竞争与人PSMA结合,优选地,其中所述多特异性抗体与具有SEQ ID NO:2中所示序列的抗体结合人PSMA上相同的表位。

6. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一抗原结合区包含SEQ ID NO:14中所示VH CDR1序列、SEQ ID NO:15中所示VH CDR2序列和SEQ ID NO:16中所示VH CDR3序列。

7. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一抗原结合区是人源化的,其中优选地,所述第一抗原结合区包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:2中所示序列,或者与SEQ ID NO:2中所示序列具有至少90%,例如至少92%,例如至少94%,例如至少96%,例如至少98%序列同一性的序列。

8. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体能够使人V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞活化。

9. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体能够与人V $\delta$ 2结合。

10. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体与具有SEQ ID NO:5中所示序列的抗体竞争与人V $\delta$ 2结合,或者与具有SEQ ID NO:20中所示序列的抗体竞争与人V $\delta$ 2结合。

11. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体与具有SEQ ID NO:5中所示序列的抗体结合人V $\delta$ 2上相同的表位,或者与具有SEQ ID NO:20中所示序列的抗体结合人V $\delta$ 上相同的表位。

12. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述第二抗原结合区包含SEQ ID NO:17中所示VH CDR1序列、SEQ ID NO:18中所示VH CDR2序列和SEQ ID NO:19中所示VH CDR3序列,或者包含SEQ ID NO:21中所示VH CDR1序列、SEQ ID NO:22中所示VH CDR2序列和SEQ ID NO:23中所示VH CDR3序列。

13. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述第二抗原结合区是人源化的,其中优选地,所述第二抗原结合区包含以下或由以下组成:SEQ ID NO:5中所示序列,或者与SEQ ID NO:5中所示序列具有至少90%,例如至少92%,例如至少94%,例如至少96%,例如至少98%序列同一性的序列。

14. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一抗原结合区包含SEQ ID NO:14中所示VH CDR1序列、SEQ ID NO:15中所示VH CDR2序列和SEQ ID NO:16中所示VH CDR3序列,并且其中所述第二抗原结合区包含SEQ ID NO:15中所示VH CDR1序列、SEQ ID NO:18中所示VH CDR2序列和SEQ ID NO:19中所示VH CDR3序列。

15. 根据权利要求1至8中任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体能够与人V $\gamma$ 9结合。

16. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体能够介导V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞对PSMA表达细胞例如LNCaP细胞的杀伤。

17. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体能够介导对来自前列腺癌患者的人PSMA表达细胞的杀伤。

18. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一抗原结合区和所述第二抗原结合区通过肽接头共价连接。

19. 根据权利要求18所述的多特异性抗体,其中所述肽接头包含SEQ ID NO:6中所示序列或由其组成。

20. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述能够结合人PSMA的第一抗原结合区位于所述能够结合人V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞受体的第二抗原结合区的N端。

21. 根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体还包含半衰期延长结构域。

22. 根据权利要求20所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体在施用于人对象时具有长于约168小时的终末半衰期。

23. 根据权利要求1至17、21或22中任一项所述的多特异性抗体,其中所述多特异性抗体包含Fc区。

24. 根据权利要求23所述的多特异性抗体,其中所述Fc区是包含两个Fc多肽的异二聚体,其中所述第一抗原结合区与第一Fc多肽融合并且所述第二抗原结合区与第二Fc多肽融合,并且其中第一Fc多肽和第二Fc多肽包含与形成同二聚体相比有利于形成异二聚体的非对称氨基酸突变。

25. 根据权利要求24所述的多特异性抗体,其中所述Fc多肽的CH3区包含所述非对称氨基酸突变,优选地其中第一Fc多肽包含T366W替换并且第二Fc多肽包含T366S、L368A和Y407V替换,或反之亦然,其中氨基酸位置对应于根据EU编号系统的人IgG1。

26. 根据权利要求23至25中任一项所述的多特异性抗体,其中第一Fc多肽和第二Fc多肽中第220位的半胱氨酸残基已被缺失或替换,其中氨基酸位置对应于根据EU编号系统的人IgG1。

27. 根据权利要求23至26中任一项所述的多特异性抗体,其中第一Fc多肽和第二Fc多肽还包含第234位和/或第235位处的突变,优选地其中第一Fc多肽和第二Fc多肽包含L234F和L235E替换,其中氨基酸位置对应于根据EU编号系统的人IgG1。

28. 根据权利要求23至27中任一项所述的多特异性抗体,其中所述第一抗原结合区包含SEQ ID NO:2中所示序列,所述第二抗原结合区包含SEQ ID NO:5中所示序列,并且其中:

- 第一Fc多肽包含SEQ ID NO:12中所示序列并且第二Fc多肽包含SEQ ID NO:13中所示序列,或者

- 第一Fc多肽包含SEQ ID NO:12中所示序列并且第二Fc多肽包含SEQ ID NO:13中所示序列。

29. 药物组合物,其包含根据前述权利要求中任一项所述的多特异性抗体以及可药用赋形剂。

30. 根据权利要求29所述的药物组合物,其中所述多特异性抗体是根据权利要求23至28中任一项所述的抗体,并且其中所述药物组合物包含缓冲剂、蔗糖、聚山梨醇酯80和甲硫氨酸,其中所述组合物的pH为5.4至7.4,例如为5.4至6.1。

31. 根据权利要求1至28中任一项所述的多特异性抗体,其用作药物。

32. 根据权利要求1至28中任一项所述的多特异性抗体,其用于治疗癌症。

33. 根据权利要求1至28中任一项所述的多特异性抗体,其用于治疗前列腺癌。

34. 根据权利要求1至28中任一项所述的多特异性抗体,其用于治疗其中PSMA在原发性或转移性肿瘤的肿瘤新血管系统或肿瘤相关内皮细胞上表达的癌症,所述原发性或转移性肿瘤包括来自结直肠癌、肺癌、乳腺癌、子宫内膜和卵巢癌、胃癌、肾细胞癌、尿路上皮癌、肝细胞癌、口腔鳞癌、甲状腺肿瘤和胶质母细胞瘤。

35. 根据权利要求1至28中任一项所述的多特异性抗体,其用于治疗头颈部腺样囊性癌。

36. 治疗疾病的方法,其包括将根据权利要求1至28中任一项所述的多特异性抗体施用于有此需要的人对象。

37. 根据权利要求36所述的方法,其中所述疾病是癌症。

38. 核酸构建体,其编码根据权利要求1至28中任一项所述的多特异性抗体。

39. 表达载体,其包含根据权利要求38所述的核酸构建体。

40. 宿主细胞,例如哺乳动物宿主细胞,优选CHO细胞,其包含根据权利要求38所述的核酸构建体或根据权利要求39所述的表达载体。

41. 用于产生根据权利要求1至28中任一项所限定的多特异性抗体,优选根据权利要求23至28中任一项所限定的多特异性抗体的方法,其通过以下实现:在合适的宿主细胞,例如哺乳动物细胞,优选CHO细胞中(共)表达一种或更多种编码所述多特异性抗体的核酸构建体,随后纯化所产生的重组抗体。

## 结合PSMA和 $\gamma$ - $\delta$ T细胞受体的抗体

### 技术领域

[0001] 本发明涉及能够结合人PSMA并且能够结合人 $V\gamma 9V\delta 2$  T细胞受体的新多特异性抗体。本发明还涉及包含本发明抗体的药物组合物,以及本发明抗体用于医学治疗的用途。

### 背景技术

[0002] 在欧洲和美国,前列腺癌是男性中最常见的癌症。局限性疾病的早期检测导致高的存活率。然而,转移的肿瘤导致存活显著降低。前列腺特异性膜抗原(prostate-specific membrane antigen,PSMA),也称为叶酸水解酶I或谷氨酸羧肽酶II,是药物开发的潜在靶标。PSMA是一种II型跨膜蛋白,其显示出在前列腺癌细胞上过表达,但在正常组织中低表达。

[0003] 已经开发了数种PSMA靶向分子(参见例如Haberkorn et al. (2016) Clin Cancer Res 22:9),包括抗体(Chatalic et al. (2015) J Nucl Med 56:1094;W02018098354)。还描述了双特异性PSMA+CD3 T细胞接合抗体方法(Hernandez-Hoyos et al. (2016) Mol Cancer Ther 15:2155;W02016187594)。双特异性T细胞接合抗体具有肿瘤靶标结合特异性和T细胞结合特异性,并因此通过将T细胞细胞毒性重定向至恶性细胞来提高效力,参见例如Huehls et al. (2015) Immunol Cell Biol 93:290;Ellerman (2019) Methods,154:102;de Bruin et al. (2017) Oncoimmunology 7(1):e1375641和W02015156673。然而,结果差异显著。例如,在其中CD3结合部分与针对8种不同B细胞靶标(CD20、CD22、CD24、CD37、CD70、CD79b、CD138和HLA-DR)的结合部分组合的一项研究中,发现靶向不同肿瘤靶标的双特异性抗体在其诱导靶细胞细胞毒性能力方面显示出强变化,并且细胞毒性与抗原表达水平不相关。例如,尽管具有中间至高的HLA-DR和CD138表达水平,但靶向HLA-DR或CD138的基于CD3的双特异性抗体不能诱导细胞毒性(Engelberts et al. (2020) Ebiomedicine 52:102625)。很少有T细胞重定向治疗达到后期临床开发,这可能是由于显著的毒性、生产问题、免疫原性和实体瘤的低响应率。特别地,当T细胞接合剂包含CD3结合臂时,由于不受控的免疫活化和细胞因子释放而可能发生毒性。

[0004] 因此,虽然已经取得了重大进展,但仍然需要治疗高效且具有可接受毒性的新PSMA抗体。这样的新PSMA抗体还应具有适当的药代动力学和药效学特性,并且最适宜能够以高产率和纯度进行生产。此外,需要其中发生最少的降解和聚集的这样的抗体的稳定形成。

[0005] 通过本发明解决了这些需求。

### [0006] 发明概述

[0007] 本发明提供了用于基于PSMA的治疗的新抗体。构建了这样的双特异性抗体,其中PSMA结合区与能够结合 $V\gamma 9V\delta 2$  T细胞受体并因此接合 $\gamma\delta$ T细胞的结合区组合。出乎意料地,所述双特异性抗体能够介导自体 $V\gamma 9V\delta 2$  T细胞(包括肿瘤浸润性 $V\gamma 9V\delta 2$  T细胞)的活化,并且能够在存在自体PBMC来源 $V\gamma 9V\delta 2$  T细胞的情况下以非常高的效力诱导对患者来源肿瘤细胞的杀伤。使用肿瘤细胞系在低的效应细胞( $\gamma\delta$ T细胞)与靶细胞(肿瘤细胞)比下

也观察到这些活性,这是重要的,因为 $\gamma\delta$ T细胞仅是人T细胞的亚群,其数目可以变化。在另一方面,正常的健康组织没有受到影响,表明这些抗体用于有效且安全的癌症治疗的潜能。另外,用全人血进行的研究表明,尽管该抗体对靶细胞具有高效力,但其仅诱导低水平的细胞因子释放,表明细胞因子释放综合征的低风险。

[0008] 此外,开发了包含VHH-人-Fc的新双特异性抗体形式,当其在哺乳动物宿主细胞中产生时,产生了高度均质和纯的产物。此外,该形式具有用于医学治疗的合适的药代动力学特性,并且开发了针对该产物的合适稳定制剂。不受任何特定理论的束缚,该形式的分子尺寸和降低的流体动力学半径可能高度适合于肿瘤穿透,还避免了肾过滤并通过与FcRn结合确保进行保护以免于降解。

[0009] 因此,在第一方面中,本发明提供了多特异性抗体,其包含能够结合人PSMA的第一抗原结合区和能够结合人 $V\gamma 9V\delta 2$  T细胞受体的第二抗原结合区。

[0010] 在另一些方面中,本发明涉及包含本发明抗体的药物组合物,本发明抗体在医学治疗中的用途,以及用于产生本发明抗体的核酸构建体、表达载体,以及包含这样的核酸构建体或表达载体的宿主细胞。

[0011] 下文描述了本发明的另一些方面和实施方案。

[0012] 附图简述

[0013] 图1:抗PSMA VHH JVZ-007的人源化变体的序列比对。LV1044是原始的美洲驼(Llama)来源序列;其他序列是人源化变体。

[0014] 图2:双特异性VHH的半衰期延长形式的示意图。Fc沉默突变由星号表示。经修饰铰链的序列在图旁边显示,以及赋予KiH介导的异二聚化的CH3突变。HC:重链。

[0015] 图3:测试人源化变体诱导T细胞脱颗粒(degranulation)的效力的T细胞活化测定(脱颗粒)。上图:使用PSMA阳性LNCaP细胞作为靶细胞的双特异性构建体的滴定。下图:在使用PC-3细胞作为靶细胞的脱颗粒测定中使用的单一高(10nM)浓度的双特异性构建体。5C8表示抗 $V\gamma 9V\delta 2$  TCR特异性VHH且5C8var1是其人源化变体。

[0016] 图4:抗体诱导、 $V\gamma 9V\delta 2$  T细胞介导的对LNCaP细胞的细胞毒性。

[0017] 图5:在FACS中LV1050-Fc x 5C8var1-Fc与不同细胞/细胞系的结合。上图:与PSMA阳性细胞系LNCaP和与PSMA阴性系PC-3的结合。下图:与 $V\gamma 9V\delta 2$  T细胞的结合。

[0018] 图6:靶标依赖性、LV1050-Fc x 5C8var1-Fc诱导的 $V\gamma 9V\delta 2$  T细胞的活化(上图)和细胞毒性(下图)。

[0019] 图7:肿瘤组织和正常前列腺组织上PSMA和CD277的表达水平以及组织中 $V\gamma 9V\delta 2$ -T细胞的频率(作为总CD3+群的一部分)。

[0020] 图8:由 $V\gamma 9V\delta 2$  T细胞和LV1044-5C8(“LAVA化合物”)诱导的对前列腺肿瘤细胞的细胞毒性(24小时测定)。\*\*\* $p < 0.05$ 。未处理的肿瘤细胞(上图)或正常细胞(下图)的数目设置为100%。

[0021] 图9:用PSMA与LV1050-5C8var1-无-C-标签之间的交联作图的相互作用。数字指示具有SEQ ID NO:30的PSMA构建体中的氨基酸位置,其基于UniProt ID Q04609,但具有不同的信号肽。PSMA构建体中的位置编号与UniProt ID Q04609中的编号对应如下:构建体中的位置=UniProt ID Q04609中的位置+41。所示的PSMA片段在SEQ ID NO:33至36中示出。

[0022] 图10:使用扩增的 $V\gamma 9V\delta 2$ -T细胞和PSMA阳性肿瘤来源细胞系进行的脱颗粒测定。

使用原代、扩增的V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞与不同的PSMA表达细胞系(LNCaP、22Rv1和VCaP细胞)共培养来测量脱颗粒。CD3-V $\gamma$ 9设门中CD107a阳性(脱颗粒)细胞的百分比绘制为LV1050-Fc x 5C8var1-Fc浓度的函数。

[0023] 图11:使用扩增的V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞和PSMA阳性或PSMA阴性细胞进行的细胞毒性测定。使用原代、扩增的V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞与(A) LNCaP细胞(PSMA阳性细胞),相对于LNCaP.koPSMA细胞(PSMA阴性细胞)或(B)不同的PSMA表达细胞系(LNCaP、22Rv1和VCaP细胞)共培养来测量细胞毒性。使用CytoTox-Glo<sup>TM</sup>测定,通过确定的胞内蛋白酶在培养基中的活性来确定靶细胞的细胞死亡。

[0024] 图12:前列腺肿瘤组织或正常(非恶性)组织中内源性存在的V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞的脱颗粒。在具有或不具有50nM LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的情况下将前列腺肿瘤(A)和正常(非恶性)前列腺组织(B)细胞悬液与荧光标记的CD107a mAb一起孵育4小时,并通过流式细胞术来确定CD45+/CD3+/V $\gamma$ 9+/V $\delta$ 2+/CD107a+细胞的百分比(表示为CD107a表达(EpCAM-/CD45+/CD3+/V $\gamma$ 9+/V $\delta$ 2+的%)。相对于背景(仅培养基)表达来表示LV1050-Fc x 5C8var1-Fc对CD107a表达的诱导。\*\*P<0.01,配对T检验;ns=不显著。

[0025] 图13:自体PBMC中存在的V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞在与患者来源前列腺肿瘤组织或正常(非恶性)前列腺组织共培养时的脱颗粒。在存在自体PBMC的情况下,在具有或不具有50nM LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的情况下将前列腺肿瘤(A)和正常(非恶性)前列腺组织(B)细胞悬液与荧光标记的CD107a mAb一起孵育4小时,并通过流式细胞术来确定CD45+/CD3+/V $\gamma$ 9+/V $\delta$ 2+/CD107a+细胞的百分比(表示为CD107a表达(EpCAM-/CD45+/CD3+/V $\gamma$ 9+/V $\delta$ 2+的%)。相对于背景(仅培养基)表达来表示LV1050-Fc x 5C8var1-Fc对CD107a表达的诱导。\*P<0.05,配对T检验;ns=不显著。

[0026] 图14:在存在自体PBMC的情况下由LV1050-Fc x 5C8var1-Fc介导的肿瘤细胞裂解。在具有或不具有50nM LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的情况下将来自前列腺肿瘤组织(A)或正常(非恶性)前列腺组织(B)的单细胞悬液与自体PBMC以10:1的E:T比一起培养,并孵育24小时。使用7-AAD排斥(7-AAD-exclusion)通过流式细胞术确定细胞毒性,并将其表示为相对于“靶细胞加PBMC”的裂解百分比。示出的是平均值和S.E.M(n=3),\*P<0.05。

[0027] 图15:在接种了22Rv1前列腺癌细胞的小鼠中,LV1050-Fc x 5C8var1-Fc与PBMC的组合抑制了肿瘤生长。向NCG小鼠(n=4至6只/组)皮下注射单独或与来自两个健康供体的PBMC组合的22Rv1前列腺癌细胞。在第0、7、14和21天,IV注射LV1050-Fc x 5C8var1-Fc(0.2或2mg/kg)或PBS。每周两次,使用卡尺测量肿瘤尺寸。当组中的平均肿瘤体积超过2,000mm<sup>3</sup>时处死小鼠。将肿瘤体积(mm<sup>3</sup>;平均值+SEM)绘制为22Rv1前列腺癌细胞接种之后天数的函数。统计学分析(ANOVA(方差分析)与Dunnett事后检验)表明,使用来自供体#1的PBMC,以0.2或2mg/kg施用LV1050-Fc x 5C8var1-Fc导致肿瘤生长率的统计学上显著的降低(\*\*P<0.001),其中第34天的TGI值分别为91%和78%。使用来自供体#2的PBMC,以2mg/kg施用LV1050-Fc x 5C8var1-Fc导致显著的抗肿瘤作用(\*P<0.01),其中第41天的TGI值为52%。

[0028] 图16:在单IV剂之后人FcRn转基因小鼠中LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的药代动力学。在人FcRn转基因小鼠(n=4只/组)中,将LV1050-Fc x 5C8var1-Fc和人源化IgG对照抗体以每组2mg/kg、5mg/kg或10mg/kg静脉内共施用。上图示出了以不同浓度的抗体给药的三组小鼠的LV1050-Fc x 5C8var1-Fc随时间推移的浓度。下图示出了在三个剂量组中获得的

LV1050-Fc x 5C8var1-Fc终末半衰期计算值(使用PK Solutions软件分析ELISA数据)。针对与IgG对照抗体共施用的每组计算的LV1050-Fc x 5C8var1-Fc半衰期是相当的,并且对应于 $139.9 \pm 10.2$ 小时(2mg/kg)、 $160.2 \pm 13.4$ 小时(5mg/kg)和 $171.7 \pm 10.6$ 小时(10mg/kg)。

[0029] 图17:在单IV剂之后NHP中不同剂量的LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的药代动力学。在给药前测量LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的血浆浓度并随后在施用之后0.5、1、2、4、8、24、72、120、168、336、504和528小时测量。LV1050-Fc x 5C8var1的血浆浓度(Y轴)作为时间的函数给出。

[0030] 发明详述

[0031] 定义

[0032] 术语“人PSMA”在本文中使用时是指人前列腺特异性膜抗原蛋白,也称为谷氨酸羧肽酶2(EC:3.4.17.21)、细胞生长抑制基因27蛋白、叶酸水解酶1、叶酰聚- $\gamma$ -谷氨酸羧肽酶(Folylpolym-gamma-glutamate carboxypeptidase,FGCP)、谷氨酸羧肽酶II(glutamate carboxypeptidase II,GCPII)、膜谷氨酸羧肽酶(membrane glutamate carboxypeptidase,mGCP)、N-乙酰化- $\alpha$ -连接的酸性二肽酶I(NAALAD酶I)或蝶酰聚- $\gamma$ -谷氨酸羧肽酶(UniProtKB-Q04609(FOLH1\_HUMAN))、同种型I,在SEQ ID NO:24中示出。

[0033] 术语“人V $\delta$ 2”在本文中使用时是指TRDV2蛋白、T细胞受体 $\delta$ 变体2(UniProtKB-A0JD36(A0JD36\_HUMAN)给出了V $\delta$ 2序列的一个实例)。

[0034] 术语“人V $\gamma$ 9”在本文中使用时是指TRGV9蛋白、T细胞受体 $\gamma$ 变体9(UniProtKB-Q99603\_HUMAN给出了V $\gamma$ 9序列的一个实例)。

[0035] 术语“抗体”旨在是指免疫球蛋白分子、免疫球蛋白分子的片段或其任一种的衍生物,其具有在通常的生理条件下以显著时段的半衰期与抗原特异性结合的能力,所述时段例如至少约30分钟、至少约45分钟、至少约1小时、至少约2小时、至少约4小时、至少约8小时、至少约12小时、约24小时或更多、约48小时或更多,约3、4、5、6、7或更多天等,或任意其他相关的在功能上限定的时期(例如足以诱导、促进、增强、和/或调节与和抗原结合的抗体相关的生理应答的时间和/或足以使抗体募集效应物活性的时间)。与抗原相互作用的抗原结合区(或抗原结合结构域)可包含免疫球蛋白分子的重链和轻链二者的可变区,或者可以是单结构域抗原结合区,例如,仅重链可变区。抗体的恒定区(如果存在的话)可介导免疫球蛋白与宿主组织或因子的结合,所述因子包括免疫系统的多种细胞(例如效应细胞和T细胞)和补体系统的组分,例如C1q,即补体激活经典途径中的第一组分。然而,在一些实施方案中,抗体的Fc区已被修饰为具有惰性,“惰性”意指这样的Fc区,其至少不能结合任何Fc $\gamma$ 受体,诱导Fc介导的FcR交联,或诱导FcR介导的通过单独抗体的两个Fc区进行的靶抗原的交联。在另一个实施方案中,惰性Fc区另外不能结合C1q。在一个实施方案中,该抗体包含第234位和第235位的突变(Canfield和Morrison(1991)J Exp Med 173:1483),例如,第234位的Leu至Phe突变和第235位的Leu至Glu突变。在另一个实施方案中,该抗体包含第234位的Leu至Ala突变、第235位的Leu至Ala突变和第329位的Pro至Gly突变。在另一个实施方案中,该抗体包含第234位的Leu至Phe突变、第235位的Leu至Glu突变、和第265位的Asp至Ala突变。

[0036] 免疫球蛋白的Fc区定义为通常在将抗体用木瓜蛋白酶消化之后产生的抗体片段,

其包含免疫球蛋白的两个CH2-CH3区和一个连接区例如铰链区。抗体重链的恒定结构域限定了抗体同种型,例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1、IgA2、IgM、IgD或IgE。Fc区借助于称为Fc受体的细胞表面受体和补体系统的蛋白质来介导抗体的效应物功能。

[0037] 本文中使用的术语“铰链区”旨在是指免疫球蛋白重链的铰链区。因此,例如人IgG1抗体的铰链区对应于根据EU编号的氨基酸216至230。

[0038] 本文中使用的术语“CH2区”或“CH2结构域”旨在是指免疫球蛋白重链的CH2区。因此,例如人IgG1抗体的CH2区对应于根据EU编号的氨基酸231至340。然而,CH2区也可以是本文中所述的任何其他亚型。

[0039] 本文中使用的术语“CH3区”或“CH3结构域”旨在是指免疫球蛋白重链的CH3区。因此,例如人IgG1抗体的CH3区对应于根据EU编号的氨基酸341至447。然而,CH3区也可以是本文中所述的任何其他亚型。

[0040] 本发明中对Fc区/Fc结构域中氨基酸位置的提及是根据EU编号(Edelman et al., Proc Natl Acad Sci U S A.1969 May;63(1):78-85;Kabat et al., Sequences of proteins of immunological interest.第5版-1991 NIH公布No.91-3242)。

[0041] 如上所述,除非另有说明或与上下文明显矛盾,否则本文中使用的术语抗体包括保留与抗原特异性结合的能力的抗体片段。已经表明抗体的抗原结合功能可通过全长抗体的片段来进行。涵盖在术语“抗体”之内的结合片段的一些实例包括:(i) Fab' 或Fab片段,即由VL、VH、CL和CH1结构域组成的单价片段或如W02007059782中所述的单价抗体;(ii) F(ab')<sub>2</sub>片段,即包含在铰链区通过二硫桥连接的两个Fab片段的二价片段;(iii)基本上由VH和CH1结构域组成的Fd片段;和(iv)基本上由抗体的单臂的VL和VH结构域组成的Fv片段。此外,尽管Fv片段的两个结构域VL和VH由分开的基因编码,但它们可使用重组方法通过合成接头连接起来,使得它们能够成为单蛋白质链,其中VL和VH区配对形成单价分子(称为单链抗体或单链Fv(single chain Fv, scFv),参见例如Bird et al., Science 242,423-426(1988)和Huston et al., PNAS USA 85,5879-5883(1988))。除非上下文另有说明,否则这样的单链抗体涵盖在术语抗体内。尽管这样的片段通常被包括在抗体的含义之内,但是它们共同且各自独立地是本发明的独特特征,表现出不同的生物学特性和效用。除非另有指明,否则术语抗体还包括多克隆抗体、单克隆抗体(monoclonal antibody, mAb)、嵌合抗体和人源化抗体,以及通过任何已知技术(例如酶切割、肽合成和重组技术)提供的抗体片段。

[0042] 在本发明抗体的一些实施方案中,第一抗原结合区或抗原结合区或二者均是单结构域抗体。单结构域抗体(single domain antibody, sdAb,也称为**Nanobody®**或VHH)对于技术人员是公知的,参见例如Hamers-Casterman et al. (1993) Nature 363:446, Roovers et al. (2007) Curr Opin Mol Ther 9:327和Krah et al. (2016) Immunopharmacol Immunotoxicol 38:21。单结构域抗体包含单CDR1、单CDR2和单CDR3。单结构域抗体的一些实例是仅重链抗体(即天然不包含轻链的抗体)的可变片段、来源于常规抗体的单结构域抗体和经改造抗体。单结构域抗体可来源于任意物种,包括小鼠、人、骆驼、美洲驼、鲨鱼、山羊、兔和牛。例如,天然存在的VHH分子可来源于骆驼科(Camelidae)物种中(例如骆驼、单峰骆驼、美洲驼、羊驼(alpaca)和原驼(guanaco)中)产生的抗体。像完整抗体一样,单结构域抗体也能够与特定抗原选择性地结合。单结构域抗体可仅包含免疫球蛋白链的可变结构域,即CDR1、CDR2和CDR3和框架区。

[0043] 本文中使用的术语“免疫球蛋白”旨在是指结构上相关的糖蛋白类别,其由两对多肽链、一对轻(L)链和一对重(H)链组成,所有四对链均可能通过二硫键相互连接。本文中使用的术语“免疫球蛋白重链”、“免疫球蛋白的重链”或“重链”旨在是指免疫球蛋白的链之一。重链通常由重链可变区(本文中缩写为VH)和限定免疫球蛋白同种型的重链恒定区(本文中缩写为CH)构成。重链恒定区通常由三个结构域CH1、CH2和CH3构成。重链恒定区还包含铰链区。在免疫球蛋白(例如IgG)的结构内,两条重链通过铰链区中的二硫键相互连接。与重链一样,每条轻链通常由数个区构成;轻链可变区(variable region,VL)和轻链恒定区(constant region,CL)。此外,VH和VL区可细分为高变的区(或高变区,其可以是序列高变的和/或形成结构上限定的环),也称为互补决定区(complementarity determining region,CDR),散布有更保守的区,称为框架区/framework region,FR)。每个VH和VL通常由从氨基端至羧基端按以下顺序排列的三个CDR和四个FR构成:FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。CDR序列可通过使用多种方法来确定,所述方法例如由Choitia和Lesk(1987) J.Mol.Biol.196:901或Kabat et al.(1991) Sequence of protein of immunological interest,第五版.NIH出版物中提供的方法。用于CDR确定和氨基酸编号的多种方法可在www.abysis.org(UCL)上进行比较。

[0044] 本文中使用的术语“同种型”是指由重链恒定区基因编码的免疫球蛋白(亚)类(例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgD、IgA、IgE或IgM)或其任意同种异型,例如IgG1m(za)和IgG1m(f)。每个重链同种型均可与kappa( $\kappa$ )或lambda( $\lambda$ )轻链组合。本发明的抗体可具有任何同种型。

[0045] 术语“亲本抗体”应理解为与根据本发明的抗体相同的抗体,但其中亲本抗体不具有一个或更多个特定突变。本发明的“变体”或“抗体变体”或“亲本抗体的变体”是与“亲本抗体”相比包含一个或更多个突变的抗体分子。氨基酸替换可将天然氨基酸更换为另一天然存在的氨基酸,或更换为非天然存在的氨基酸衍生物。氨基酸替换可以是保守的或非保守的。在本发明的上下文中,保守替换可由以下三个表中的一个或更多个中反映的氨基酸类别内的替换来限定:

[0046] 用于保守替换的氨基酸残基类别

酸性残基	Asp (D) 和 Glu (E)
碱性残基	Lys (K)、Arg (R) 和 His (H)
亲水性不带电荷的残基	Ser (S)、Thr (T)、Asn (N) 和 Gln (Q)
脂肪族不带电荷的残基	Gly (G)、Ala (A)、Val (V)、Leu (L) 和 Ile (I)
非极性不带电荷的残基	Cys (C)、Met (M) 和 Pro (P)
芳香族残基	Phe (F)、Tyr (Y) 和 Trp (W)

[0047] 替代的保守氨基酸残基替换类别

[0049]	1	A	S	T
--------	---	---	---	---

2	D	E	
3	N	Q	
4	R	K	
5	I	L	M
6	F	Y	W

[0050] 氨基酸残基的替代物理和功能分类

[0051]	含醇基残基	S 和 T
	脂肪族残基	I、L、V 和 M
	环烯基相关残基	F、H、W 和 Y
	疏水性残基	A、C、F、G、H、I、L、M、R、T、V、W 和 Y
	带负电荷的残基	D 和 E
	极性残基	C、D、E、H、K、N、Q、R、S 和 T
	带正电荷的残基	H、K 和 R
	小残基	A、C、D、G、N、P、S、T 和 V
	非常小的残基	A、G 和 S
	参与转角形成 (turn formation) 的残基	A、C、D、E、G、H、K、N、Q、R、S、P 和 T
柔性残基	Q、T、K、S、G、N、D、E 和 R	

[0052] 在本发明的上下文中,变体中的替换表示为:

[0053] 原始氨基酸-位置-替换氨基酸;

[0054] 使用三字母代码或单字母代码,包括代码Xaa和X来表示氨基酸残基。因此,符号“T366W”意指变体在与亲本抗体中第366位氨基酸相对应的变体氨基酸位置处包含色氨酸对苏氨酸的替换。

[0055] 此外,术语“替换”涵盖替换成其他十九种天然氨基酸中的任一种,或替换成其他氨基酸,例如非天然氨基酸。例如,第366位中氨基酸T的替换包括以下替换中的每一者: 366A,366C,366D,366G,366H,366F,366I,366K,366L,366M,366N,366P,366Q,366R,366S,366E,366V,366W和366Y。

[0056] 术语“全长抗体”在本文中使用时是指包含对应于通常存在于该同种型的野生型抗体中的那些的所有重链和轻链恒定结构域和可变结构域的抗体。

[0057] 术语“嵌合抗体”是指其中可变区来源于非人物种(例如,来源于啮齿动物)并且恒定区来源于不同物种(例如人)的抗体。嵌合抗体可通过遗传改造来产生。开发用于治疗应用的嵌合单克隆抗体以降低抗体的免疫原性。

[0058] 术语“人源化抗体”是指经遗传改造的非人抗体,其包含人抗体恒定结构域和被修饰以包含与人可变结构域的高水平序列同源性的非人可变结构域。这可通过将一起形成抗原结合位点的六个非人抗体互补决定区(CDR)移植到同源人接纳体框架区(FR)上来实现。

为了完全重建亲本抗体的结合亲和力和特异性,可需要将来自亲本抗体(即非人抗体)的框架残基替换为人框架区(回复突变)。结构同源性建模可帮助鉴定框架区中对于抗体的结合特性重要的氨基酸残基。因此,人源化抗体可包含非人CDR序列、任选地包含针对非人氨基酸序列的一个或更多个氨基酸回复突变的主要人框架区,以及任选地完全人恒定区。任选地,可引入不一定是回复突变的另外的氨基酸修饰以获得具有优选特征例如亲和力和生物化学特性的人源化抗体。进行非人治疗性抗体的人源化以使其在人中的免疫原性最小化,而同时这样的人源化抗体维持非人来源抗体的特异性和结合亲和力。

[0059] 术语“多特异性抗体”是指对至少两种不同的(例如至少三种)通常不重叠的表位具有特异性的抗体。这样的表位可以在同一或不同的靶抗原上。如果表位在不同的靶标上,则这样的靶标可以在同一细胞或者不同的细胞或细胞类型上。

[0060] 术语“双特异性抗体”是指对两种不同的通常不重叠的表位具有特异性的抗体。这样的表位可以在同一或不同的靶标上。如果表位在不同的靶标上,则这样的靶标可以在同一细胞或者不同的细胞或细胞类型上。

[0061] 不同类别的双特异性抗体的一些实例包括但不限于(i)具有互补CH3结构域以迫使异二聚化的IgG样分子;(ii)重组IgG样双靶向分子,其中所述分子的两侧各自包含至少两种不同抗体的Fab片段或Fab片段的一部分;(iii)IgG融合分子,其中全长IgG抗体与额外的Fab片段或Fab片段的一部分融合;(iv)Fc融合分子,其中单链Fv分子或稳定的双抗体与重链恒定结构域、Fc区或其部分融合;(v)Fab融合分子,其中不同的Fab片段融合在一起,与重链恒定结构域、Fc区或其部分融合;以及(vi)基于ScFv和双抗体的抗体和重链抗体(例如,结构域抗体,**Nanobodies®**),其中不同的单链Fv分子或不同的双抗体或不同的重链抗体(例如,结构域抗体,**Nanobodies®**)彼此融合或者与和重链恒定结构域、Fc区或其部分融合的另一蛋白质或载体分子融合。

[0062] 具有互补CH3结构域分子的IgG样分子的一些实例包括但不限于**Triomab®**(Trion Pharma/Fresenius Biotech)、结进孔(Knobs-into-Holes)(Genentech)、CrossMAbs(Roche)和静电匹配(electrostatically-matched)(Amgen,Chugai,Oncomed)、LUZ-Y(Genentech,Wranik et al.J.Biol.Chem.2012,287(52):43331-9,doi:10.1074/jbc.M112.397869.Epub 2012Nov 1)、DIG体和PIG体(Pharmabcine,W02010134666,W02014081202)、链交换工程化结构域体(Strand Exchange Engineered Domain body,SEEDbody)(EMD Serono)、Biclonics(Merus,W02013157953)、Fc Δ Adp(Regeneron)、双特异性IgG1和IgG2(Pfizer/Rinat)、Azymetric支架(Zymeworks/Merck,)、mAb-Fv(Xencor)、二价双特异性抗体(Roche,W02009080254)和**DuoBody®**分子(Genmab)。

[0063] 重组IgG样双靶向分子的一些实例包括但不限于双靶向(DT)-Ig(GSK/Domantis,W02009058383)、二合一型抗体(Two-in-one Antibody)(Genentech,Bostrom,et al 2009.Science 323,1610-1614)、交联Mab(Cross-linked Mabs)(Karmanos Cancer Center)、mAb2(F-Star)、Zybodies™(Zyngenia,LaFleur et al.MAbs.2013 Mar-Apr;5(2):208-18)、使用共同轻链的方法,κλBodies(NovImmune,W02012023053)和CovX-**body®**(CovX/Pfizer,Doppalapudi,V.R.,et al 2007.Bioorg.Med.Chem.Lett.17,501-506)。

[0064] IgG融合分子的一些实例包括但不限于双可变结构域(DVD)-Ig(Abbott)、双结构

域双头抗体(Dual domain double head antibodies)(Unilever;Sanofi Aventis)、IgG样双特异性(IgG-like Bispecific)(ImClone/Eli Lilly,Lewis et al.Nat Biotechnol.2014 Feb;32(2):191-8)、Ts2Ab(MedImmune/AZ,Dimasi et al.J Mol Biol.2009 Oct 30;393(3):672-92)和BsAb(Zymogenetics,W02010111625)、HERCULES(Biogen Idec)、scFv融合体(Novartis)、scFv融合体(Changzhou Adam Biotech Inc)和TvAb(Roche)。

[0065] Fc融合分子的一些实例包括但不限于ScFv/Fc融合体(Academic Institution,Pearce et al Biochem Mol Biol Int.1997 Sep;42(6):1179)、SCORPION(Emergent BioSolutions/Trubion,Blankenship JW,et al.AACR 100th Annual meeting 2009(摘要#5465);Zymogenetics/BMS,W02010111625)、双亲和再靶向技术(Dual Affinity Retargeting Technology)(Fc-DARTTM)(MacroGenics)和双(ScFv)2-Fab(国家抗体医学研究中心——中国(National Research Center for Antibody Medicine-China))。

[0066] Fab融合双特异性抗体的一些实例包括但不限于F(ab)2(Medarex/AMGEN)、Dual-Action或Bis-Fab(Genentech)、Dock-and-**Lock**<sup>®</sup>(DNL)(ImmunoMedics)、二价双特异性(Bivalent Bispecific)(Biotecnol)和Fab-Fv(UCB-Celltech)。

[0067] 基于ScFv、双抗体的抗体和结构域抗体的一些实例包括但不限于双特异性T细胞接合剂(Bispecific T Cell Engager)(**BiTE**<sup>®</sup>)(Micromet,Tandem Diabody(Tandab)(Affimed)、双亲和再靶向技术(DARTTM)(MacroGenics)、单链双抗体(Single-chain Diabody)(Academic,Lawrence FEBS Lett.1998 Apr 3;425(3):479-84)、TCR样抗体(TCR-like Antibodies)(AIT,ReceptorLogics)、人血清白蛋白ScFv融合体(Human Serum Albumin ScFv Fusion)(Merrimack,W02010059315)和COMBODY分子(Epigen Biotech,Zhu et al.Immunol Cell Biol.2010 Aug;88(6):667-75)、dual targeting **nanobodies**<sup>®</sup>(Ablynx,Hmila et al.,FASEB J.2010)、双靶向仅重链结构域抗体。

[0068] 在抗体与抗原结合的背景下,术语“结合”或“特异性结合”是指抗体与预定抗原或靶标(例如人PSMA或V82)的结合,例如当使用流式细胞术如本文中实施例所述确定时,该结合通常具有对应于以下 $K_D$ 的亲合力:约 $10^{-6}$ M或更小,例如 $10^{-7}$ M或更小,例如约 $10^{-8}$ M或更小,例如约 $10^{-9}$ M或更小,约 $10^{-10}$ M或更小,或约 $10^{-11}$ M或甚至更小。或者,可使用例如表面等离子体共振(surface plasmon resonance,SPR)技术在BIAcore T200仪器中使用抗原作为配体以及结合部分或结合分子作为分析物来确定表观 $K_D$ 值。特异性结合意指抗体以对应于以下 $K_D$ 的亲合力与预定抗原结合:比其与除预定抗原或紧密相关抗原之外的非特异性抗原(例如BSA、酪蛋白)结合的亲合力低至少十倍,例如低至少100倍,例如低至少1,000倍,例如低至少10,000倍,例如低至少100,000倍。亲合力较低的程度取决于结合部分或结合分子的 $K_D$ ,使得当结合部分或结合分子的 $K_D$ 非常低(即,结合部分或结合分子是高度特异性的)时,则针对抗原的亲合力比针对非特异性抗原的亲合力低的程度可以是至少10,000倍。本文中使用的术语“ $K_D$ ”(M)是指抗原与结合部分或结合分子之间的特定相互作用的解离平衡常数。

[0069] 在本发明上下文中,“竞争”或“能够竞争”或其变化形式是指在存在结合结合配偶体的另一分子(例如,不同的PSMA抗体)的情况下,特定结合分子(例如PSMA抗体)结合特定结合配偶体(例如PSMA)的倾向性的任何可检测的显著降低。通常来说,竞争意味着由另一

分子(例如抗体)的存在导致的结合的至少约25%降低,例如至少约50%、例如至少约75%、例如至少90%降低,如通过例如ELISA分析或流式细胞术使用足量的两种或更多种竞争分子(例如抗体)来确定的。用于通过竞争性抑制来确定结合特异性的另外的方法可见于例如Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., (1988), Colligan et al., eds., *Current Protocols in Immunology*, Greene Publishing Assoc, and Wiley InterScience N.Y., (1992, 1993), 和Muller, *Meth. Enzymol.* 92, 589-601 (1983))。在一个实施方案中,本发明的抗体与抗体LV1050结合PSMA上相同的表位和/或与抗体5C8或6H4结合V $\delta$ 2上相同的表位。用于确定结合分子(例如抗体)的表位的方法是本领域已知的。

[0070] 术语“第一”和“第二”抗原结合区在本文中使用时不是指其在抗体中的方向/位置,即其相对于N或C端没有意义。术语“第一”和“第二”仅用于正确和一致地指代权利要求书和说明书中的两个不同的抗原结合区。

[0071] “能够结合V $\gamma$  9V $\delta$ 2-TCR”意指结合分子可结合V $\gamma$  9V $\delta$ 2-TCR,但不排除在不存在另一亚基的情况下结合分子与一个分开的亚基结合,即与单独的V $\gamma$  9链结合或与单独的V $\delta$ 2链结合。例如,抗体5C8是结合V $\gamma$  9V $\delta$ 2-TCR的抗体,但当V $\delta$ 2链单独表达时也结合V $\delta$ 2链。该术语也不排除抗体对两条链的组合具有特异性。

[0072] “序列同一性(%)”在本文中使用时是指不同序列共有的相同核苷酸或氨基酸位置的数目(即,%同一性=相同位置的#/总的位置的# $\times$ 100),将为了获得最佳比对而需要引入的空位数目以及每个空位的长度考虑在内。两个核苷酸或氨基酸序列之间的百分比同一性可例如使用已并入到ALIGN程序(版本2.0)中的E. Meyers和W. Miller, *Comput. Appl. Biosci.* 4, 11-17 (1988)的算法,使用PAM120加权残基表(weight residue table)、为12的空位长度罚分以及为4的空位罚分来确定。

[0073] 本发明的另一些方面和实施方案

[0074] 如上所述,在第一主要方面中,本发明涉及包含能够结合人PSMA的第一抗原结合区和能够结合人V $\gamma$  9V $\delta$ 2 T细胞受体的第二抗原结合区的多特异性抗体。

[0075] 在一个实施方案中,所述多特异性抗体是双特异性抗体。在另一个实施方案中,第一抗原结合区是单结构域抗体。在另一个实施方案中,第二抗原结合区是单结构域抗体。在另一个实施方案中,第一抗原-抗原结合区和第二抗原结合区二者均是单结构域抗体。在另一个实施方案中,多特异性抗体是双特异性抗体,其中第一抗原结合区是单结构域抗体并且第二抗原结合区是单结构域抗体。

[0076] 在一个实施方案中,多特异性抗体与具有SEQ ID NO:2中所示序列的抗体竞争(即能够竞争)与人PSMA结合,优选地,多特异性抗体与具有SEQ ID NO:2中所示序列的抗体结合人PSMA上相同的表位。在一个实施方案中,多特异性抗体与人PSMA上包含以下氨基酸残基中的一个或更多个或全部的表位结合:R190、S197、R204、S317、R320、S322、K324、H618、S631、K729、R730和Y733,其中编号是根据UniProt序列Q04609-1。在另一个实施方案中,第一抗原结合区包含SEQ ID NO:14中所示VH CDR1序列、SEQ ID NO:15中所示VH CDR2序列和SEQ ID NO:16中所示VH CDR3序列。

[0077] 在另一个实施方案中,第一抗原结合区是人源化的,其中优选地第一抗原结合区包含以下或由以下组成:

[0078] • SEQ ID NO:2中所示序列,或

[0079] • 与SEQ ID NO:2中所示序列具有至少90%,例如至少92%,例如至少94%,例如至少96%,例如至少98%序列同一性的序列。

[0080] 如上所述,本发明的多特异性抗体包含能够结合人V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞受体的第二抗原结合区。在一个实施方案中,多特异性抗体能够使人V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞活化。V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞的活化可通过基因表达和/或(表面)标志物表达(例如活化标志物,例如CD25、CD69或CD107a)和/或分泌蛋白(例如,细胞因子或趋化因子)谱来测量。在一个优选实施方案中,多特异性抗体能够诱导V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞的活化(例如CD69和/或CD25表达的上调)导致以CD107a表达提高为标志的脱颗粒(参见实施例5)和/或细胞因子产生(例如TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ )。优选地,当如本文实施例5中所述进行测试时,本发明的多特异性抗体能够将对CD107a呈阳性的细胞的数目提高至少2倍,例如至少5倍。在另一个优选实施方案中,当使用V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞和LNCaP靶细胞如本文实施例5中所述进行测试时,本发明的多特异性抗体具有用于提高CD107a阳性细胞的百分比的EC50值,其为50pM或更小,例如25pM或更小,例如20pM或更小,例如15pM或更小,例如10pM或更小,或甚至5pM或更小,例如2pM或更小或者1pM或更小。

[0081] 在本发明的多特异性抗体的一个实施方案中,多特异性抗体能够与人V $\delta$ 2结合。V $\delta$ 2是V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCR的 $\delta$ 链的一部分。能够与人V $\delta$ 2结合的抗体可结合完全位于V $\delta$ 2区内的表位,或者可结合作为 $\delta$ 链中的恒定区和V $\delta$ 2区中的残基之组合的表位。在另一个实施方案中,多特异性抗体能够与人V $\gamma$ 9结合。V $\gamma$ 9是V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCR的 $\gamma$ 链的一部分。能够与人V $\gamma$ 9结合的抗体可结合完全位于V $\gamma$ 9区内的表位或者可结合作为 $\gamma$ 链的恒定区和V $\gamma$ 9区中的残基之组合的表位。与V $\delta$ 2或V $\gamma$ 9结合的数个这样的抗体描述于W02015156673中,并且它们的抗原结合区至少其CDR序列可并入在本发明的多特异性抗体中。可从中获得V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-TCR结合区的抗体的另一些实例是TCRV $\gamma$ 9抗体7A5(ThermoFisher)(Oberget al.(2014)Cancer Res 74:1349)和抗体B1.1(ThermoFisher)和5A6.E9(ATCC HB 9772),二者均描述于Neuman et al.(2016)J Med Prim 45:139中。

[0082] 在一个实施方案中,多特异性抗体与具有SEQ ID NO:5中所示序列的抗体竞争与人V $\delta$ 2结合或与具有SEQ ID NO:20中所示序列的抗体竞争与人V $\delta$ 2结合。在另一个实施方案中,多特异性抗体与具有SEQ ID NO:5中所示序列的抗体结合人V $\delta$ 2上相同的表位或与具有SEQ ID NO:20中所示序列的抗体结合人V $\delta$ 2上相同的表位。

[0083] 在本发明的多特异性抗体的一个实施方案中,第二抗原结合区包含SEQ ID NO:17中所示VH CDR1序列、SEQ ID NO:18中所示VH CDR2序列和SEQ ID NO:19中所示VH CDR3序列,或者包含SEQ ID NO:21中所示VH CDR1序列、SEQ ID NO:22中所示VH CDR2序列和SEQ ID NO:23中所示VH CDR3序列。

[0084] 在本发明多特异性抗体的一个实施方案中,第二抗原结合区是人源化的。

[0085] 在另一个实施方案中,第二抗原结合区包含以下或由以下组成:

[0086] • SEQ ID NO:5中所示序列,或者

[0087] • 与SEQ ID NO:5中所示序列具有至少90%,例如至少92%,例如至少94%,例如至少96%,例如至少98%序列同一性的序列。

[0088] 在本发明多特异性抗体的一个实施方案中,第一抗原结合区包含SEQ ID NO:14中所示VH CDR1序列、SEQ ID NO:15中所示VH CDR2序列和SEQ ID NO:16中所示VH CDR3序列,

并且其中第二抗原结合区包含SEQ ID NO:17中所示VHCDR1序列、SEQ ID NO:18中所示VH CDR2序列和SEQ ID NO:19中所示VH CDR3序列。

[0089] 在本发明多特异性抗体的另一个实施方案中,第一抗原结合区包含SEQ ID NO:14中所示VH CDR1序列、SEQ ID NO:15中所示VH CDR2序列和SEQ ID NO:16中所示VH CDR3序列,并且其中第二抗原结合区包含SEQ ID NO:21中所示VH CDR1序列、SEQ ID NO:22中所示VH CDR2序列和SEQ ID NO:23中所示VH CDR3序列。

[0090] 在一个实施方案中,本发明的多特异性抗体能够通过使V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞活化来介导对PSMA表达细胞例如LNCaP细胞、22Rv1细胞或VCaP细胞的杀伤。优选地,当如本文实施例6中所述进行测试时,该抗体能够通过使V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞活化以EC50值为50pM或更小,例如25pM或更小,例如20pM或更小,例如15pM或更小,例如10pM或更小,或甚至5pM或更小,例如2pM或更小或者1pM或更小来诱导对LNCaP细胞的杀伤。

[0091] 在另一个实施方案中,当如本文实施例13中所述在24小时之后进行测试时,该抗体能够通过使V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞活化以EC50值为50pM或更小,例如25pM或更小,例如20pM或更小,例如15pM或更小来诱导对LNCaP、22Rv1或VCaP细胞的杀伤,优选在效应物与靶细胞的比率为1:1和1:10这两种情况下。

[0092] 在另一个实施方案中,当如本文实施例7中所述进行测试时,本发明的多特异性抗体能够以EC50为50nM或更小,例如20nM或更小,例如10nM或更小与PSMA阳性前列腺癌细胞系LNCaP结合。在另一个实施方案中,当如本文实施例7中所述进行测试时,本发明的多特异性抗体能够以EC50为10nM或更小,例如5nM或更小,例如2nM或更小与V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞结合。在另一个实施方案中,当如本文实施例11中所述进行测试时,本发明的多特异性抗体能够以KD值为100nM或更小,例如50nM或更小与重组人PSMA蛋白结合。在另一个实施方案中,当如本文实施例11中所述进行测试时,本发明的多特异性抗体能够以KD值为10nM或更小,例如5nM或更小,例如2nM或更小,例如1nM或更小与人V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fc结合。

[0093] 在另一个实施方案中,多特异性抗体能够介导对来自前列腺癌患者的人PSMA表达细胞的杀伤。对来自前列腺癌患者的人PSMA表达细胞的杀伤可例如如本文实施例10中所述来确定。在一个实施方案中,如在本文实施例10或实施例14中所述的测定中所确定的,本发明的多特异性抗体能够在50nM的浓度下介导超过25%,例如超过50%的特定细胞死亡。

[0094] 在另一个实施方案中,多特异性抗体不能介导对PSMA阴性细胞例如PSMA阴性人细胞的杀伤。在另一个实施方案中,当如本文实施例16中所述进行测试时,多特异性抗体在至280nM的浓度下在来自健康供体的全血中不诱导IL-2、IL-4、IL-6、IL-10或TNF $\alpha$ 。在另一个实施方案中,当如本文实施例16中所述进行测试时,多特异性抗体在来自健康供体的全血中诱导是**Campath®**的超过10倍少的IL-8和/或超过50倍少的IFN $\gamma$ 。

[0095] 在一个实施方案中,第一抗原结合区和第二抗原结合区通过肽接头例如长度为1至20个氨基酸,例如1至10个氨基酸,例如2、3、4、5、6、7、8或10个氨基酸的接头彼此共价连接。在一个实施方案中,肽接头包含序列GGGGG或由其组成,如SEQ ID NO:6中所示。

[0096] 在一些实施方案中,能够结合人PSMA的第一抗原结合区位于能够结合人V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞受体的第二抗原结合区的N端。

[0097] 在本发明的一个实施方案中,多特异性抗体还包含半衰期延长结构域。在一个实施方案中,多特异性抗体在施用于人对象时具有长于约168小时的终末半衰期。最优选地,

终末半衰期为336小时或更长。抗体的“终末半衰期”在本文中使用时是指在消除的最后阶段体内多肽的血清浓度降低50%所花费的时间。

[0098] 在一个实施方案中,多特异性抗体包含Fc区。本领域中已经描述了用于制备双特异性抗体的多种方法,例如Brinkmann and Kontermann(2017)MAbs 9:182的综述。在本发明的一个实施方案中,Fc区是包含两个Fc多肽的异二聚体,其中第一抗原结合区与第一Fc多肽融合并且第二抗原结合区与第二Fc多肽融合,并且其中第一Fc多肽和第二Fc多肽包含与形成同二聚体相比有利于形成异二聚体的非对称氨基酸突变(参见例如Ridgway et al. (1996) 'Knobs-into-holes' engineering of antibody CH3 domains for heavy chain heterodimerization. Protein Eng 9:617)。在其另一个实施方案中,Fc多肽的CH3区包含所述非对称氨基酸突变,优选地,第一Fc多肽包含T366W替换并且第二Fc多肽包含T366S、L368A和Y407V替换,或反之亦然,其中氨基酸位置对应于根据EU编号系统的人IgG1。在另一个实施方案中,第一Fc多肽和第二Fc多肽中第220位的半胱氨酸残基已被缺失或替换,其中氨基酸位置对应于根据EU编号系统的人IgG1。在另一个实施方案中,该区包含SEQ ID NO: 10中所示序列。

[0099] 在一些实施方案中,第一Fc多肽和/或第二Fc多肽包含使抗体具有惰性即不能介导效应物功能的突变。在一个实施方案中,第一Fc多肽和第二Fc多肽包含第234位和/或第235位的突变,优选地第一Fc多肽和第二Fc多肽包含L234F和L235E替换,其中氨基酸位置对应于根据EU编号系统的人IgG1。

[0100] 在一个优选实施方案中,第一抗原结合区包含SEQ ID NO:2中所示序列,第二抗原结合区包含SEQ ID NO:5中所示序列,并且

[0101] -第一Fc多肽包含SEQ ID NO:12中所示序列并且第二Fc多肽包含SEQ ID NO:13中所示序列,或者

[0102] -第一Fc多肽包含SEQ ID NO:12中所示序列并且第二Fc多肽包含SEQ ID NO:13中所示序列。

[0103] 在另一个实施方案中,该抗体包含SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26中所示序列或由其组成。

[0104] 在另一个主要方面中,本发明涉及包含如本文中所述根据本发明的多特异性抗体以及可药用赋形剂的药物组合物。

[0105] 抗体可根据常规技术,例如(Rowe et al., Handbook of Pharmaceutical Excipients, 2012 June, ISBN 9780857110275)中公开的那些用可药用赋形剂来配制。可药用赋形剂以及任何其他载体、稀释剂或辅料应适合于抗体和所选择的施用方式。对药物组合物的赋形剂和其他组分的适合性基于对本发明的所选择的抗体或药物组合物的所期望生物学特性没有显著的负面影响(例如,小于对抗原结合的显著性影响(10%或更低的相对抑制,5%或更低的相对抑制等))来确定。

[0106] 药物组合物可包含稀释剂、填充剂、盐、缓冲剂、洗涤剂(例如非离子洗涤剂,例如吐温20或吐温80)、稳定剂(例如糖或不含蛋白质的氨基酸)、防腐剂、组织固定剂、增溶剂和/或适合于包含在药物组合物中的其他材料。另一些可药用赋形剂包括与本发明的抗体在生理上相容的任意和所有合适的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌和抗真菌剂、等张剂、抗氧化剂和吸收延迟剂等。

[0107] 在一个实施方案中,药物组合物包含本发明的多特异性抗体(优选包含Fc区的抗体)、缓冲剂和抗氧化剂,其中组合物的pH为5.4至7.4,例如5.4至6.1。

[0108] 在另一个实施方案中,药物组合物包含本发明的多特异性抗体、缓冲剂和甲硫氨酸,其中组合物的pH为5.4至7.4,例如5.4至6.1。

[0109] 在另一个实施方案中,药物组合物包含本发明的多特异性抗体、缓冲剂、蔗糖、聚山梨醇酯80和甲硫氨酸,其中组合物的pH为5.4至7.4,例如5.4至6.1。

[0110] 在另一个实施方案中,药物组合物包含本发明的多特异性抗体、组氨酸或乙酸钠缓冲液、蔗糖、聚山梨醇酯80和甲硫氨酸,其中组合物的pH为5.4至7.4,例如5.4至6.1。

[0111] 优选地,缓冲液浓度为5至25mM,例如10mM。优选地,蔗糖浓度为100至500mM,例如250mM至300mM,例如280mM。优选地,聚山梨醇酯80浓度为0.005%至0.1%,例如0.01%至0.05%,例如0.02%。优选地,甲硫氨酸浓度为0.2mM至5mM,例如0.5mM至2mM,例如1mM。优选地,组合物中的多特异性抗体包含Fc区。

[0112] 因此,在一个优选实施方案中,药物组合物包含含有Fc区的本发明的多特异性抗体、组氨酸或乙酸钠缓冲液、蔗糖、聚山梨醇酯80和甲硫氨酸,其中组合物的pH为5.4至7.4,例如5.4至6.1。

[0113] 因此,在另一个优选实施方案中,药物组合物包含含有Fc区的本发明的多特异性抗体、10M组氨酸或乙酸钠缓冲液、280mM蔗糖、0.02%聚山梨醇酯80和1mM甲硫氨酸,其中组合物的pH为5.5或6.0。

[0114] 优选地,例如Fc区是包含两个Fc多肽的异二聚体,其中第一抗原结合区与第一Fc多肽融合并且第二抗原结合区与第二Fc多肽融合,并且其中第一Fc多肽和第二Fc多肽包含与形成同二聚体相比有利于形成异二聚体的非对称氨基酸突变。优选地,Fc多肽的CH3区包含所述非对称氨基酸突变,其中优选地第一Fc多肽包含T366W替换并且第二Fc多肽包含T366S、L368A和Y407V替换,或反之亦然。此外,优选地,第一Fc多肽和第二Fc多肽中第220位的半胱氨酸残基已被缺失或替换和/或者第一Fc多肽和第二Fc多肽还包含第234位和/或第235位的突变,其中优选地第一Fc多肽和第二Fc多肽包含L234F和L235E替换。

[0115] 此外,优选地,组合物中的多特异性抗体包含含有SEQ ID NO:2中所示序列的第一抗原结合区,含有SEQ ID NO:5中所示序列的第二抗原结合区,并且

[0116] • 第一Fc多肽包含SEQ ID NO:12中所示序列并且第二Fc多肽包含SEQ ID NO:13中所示序列,或者

[0117] • 第一Fc多肽包含SEQ ID NO:12中所示序列并且第二Fc多肽包含SEQ ID NO:13中所示序列,并且药物组合物包含10M组氨酸或乙酸钠缓冲液、280mM蔗糖、0.02%聚山梨醇酯80和1mM甲硫氨酸,其中组合物的pH为5.5或6.0。优选地,抗体浓度为0.1mg/ml至20mg/ml,例如为0.1至10mg/ml,例如0.5mg/ml至2mg/ml,例如1mg/ml。

[0118] 在另一个主要方面中,本发明涉及如本文中所述根据本发明的多特异性抗体,其用作药物。

[0119] 根据本发明的多特异性抗体能够产生有益于通过V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞杀伤肿瘤细胞,特别是PSMA阳性肿瘤细胞的微环境。

[0120] 因此,在一个优选实施方案中,多特异性抗体用于治疗癌症。在另一个优选实施方案中,多特异性抗体用于治疗前列腺癌,例如转移性或非转移性前列腺癌。在另一个实施方

案中,多特异性抗体用于治疗其中PSMA在原发性或转移性肿瘤的肿瘤新血管系统或肿瘤相关内皮细胞上表达的癌症,所述原发性或转移性肿瘤包括结直肠癌、肺癌、乳腺癌、子宫内膜和卵巢癌、胃癌、肾细胞癌、尿路上皮癌、肝细胞癌、口腔鳞癌、甲状腺肿瘤和胶质母细胞瘤。在另一个实施方案中,多特异性抗体用于治疗头颈部腺样囊性癌(adenoid cystic carcinoma of the head and neck)。

[0121] 类似地,本发明涉及治疗疾病的方法,其包括将如本文中所述根据本发明的多特异性抗体施用于由此需要的人对象。在一个实施方案中,所述疾病是癌症,例如前列腺癌,例如转移性或非转移性前列腺癌。

[0122] 在一些实施方案中,抗体作为单一治疗施用。然而,本发明的抗体也可以以组合治疗,即与和待治疗的疾病或病症相关的其他治疗剂组合施用。

[0123] “治疗”及其变化形式是指以减轻、改善、阻止、根除(治愈)或预防症状或疾病状态为目的施用有效量的根据本发明的抗体。“有效量”是指在必要的剂量下和时间段内有效实现期望的治疗结果的量。多肽(例如抗体)的有效量可根据因素,例如个体的疾病阶段、年龄、性别和体重以及抗体在个体中引发期望应答的能力而变化。有效量也是其中治疗有益作用超过了抗体的任何毒性或有害作用的量。本发明抗体的有效量的示例性非限制性范围为约0.1 $\mu$ g/kg至100mg/kg,例如约1 $\mu$ g/kg至50mg/kg,例如约0.01至20mg/kg,例如约0.1至10mg/kg,例如约0.5、约0.3、约1、约3、约5或约8mg/kg。施用可通过任意合适的途径进行,但是通常是肠胃外的,例如静脉内、肌内或皮下。

[0124] 本发明的多特异性抗体通常重组产生,即通过在合适的宿主细胞中表达编码该抗体的核酸构建体,随后从细胞培养物中纯化所产生的重组抗体。核酸构建体可通过本领域公知的标准分子生物学技术产生。通常使用表达载体将构建体引入到宿主细胞中。合适的核酸构建体和表达载体是本领域已知的。适合于抗体重组表达的宿主细胞是本领域公知的,并且包括CHO、HEK-293、Expi293F、PER-C6、NS/0和Sp2/0细胞。

[0125] 因此,在另一个方面中,本发明涉及编码根据本发明的多特异性抗体的核酸构建体。在一个实施方案中,构建体是DNA构建体。在另一个实施方案中,构建体是RNA构建体。

[0126] 在另一个方面中,本发明涉及包含编码根据本发明的多特异性抗体的核酸构建体的表达载体。

[0127] 在另一个方面中,本发明涉及宿主细胞,即重组宿主细胞,例如哺乳动物宿主细胞,优选CHO细胞,其包含一种或更多种编码根据本发明的多特异性抗体的核酸构建体,或者含有编码根据本发明的多特异性抗体的核酸构建体的表达载体。

[0128] 因此,在另一个方面中,本发明涉及产生本发明的多特异性抗体,优选包含Fc区的本发明的多特异性抗体,其通过在合适的宿主细胞(例如哺乳动物宿主细胞,例如CHO细胞)中(共)表达一种或更多种编码多特异性抗体的核酸构建体,随后从细胞培养物或除去细胞之后的上清液纯化所产生的重组抗体。

[0129] 表1:序列表。

[0130]

SEQ ID.	代码	描述	序列
1	LV1044- JVZ007	VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASRFMISEYSMH WVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYAESVKGRFTIS RDNAKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDGYGYRGQG TQVSS

[0131]

2	LV1050	VHH	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMH WVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYADSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGQ GTQVTVSS
3	LV1051	VHH	EVQLVESGGGSVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSM HWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYADSVKGRFT ISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGL GTQVTVSS
4	5C8	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLSCAASGRPFNSYAM GWFRQAPGKREFVAAISWGGSTSYADSVKGRF TISRDNAKNTVYLQMNSPKPEDTAIYYCAAQFSGA DYFGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTVSS
5	5C8var1	VHH	EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFNSYAM SWFRQAPGKREFVSAISWGGSTSYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGA DYFGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTVSS
6	接头		GGGGS
7	LV1044- 5C8	双特异性 Ab	EVQLVESGGGLVQPGGSLTSCAASRFMISEYSMH WVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYAESVKGRFTIS RDNKNTLYLQMNSLKPEDTAVYYCDGYGYRGQG TQVTVSSGGGGSEVQLVESGGGLVQAGGSLRLSC AASGRPFNSYAMGWFRQAPGKREFVAAISWGG STSYADSVKGRFTISRDNAKNTVYLQMNSPKPEDT AIYYCAAQFSGADYFGRLGIRGYEYDYWGQGTQ VTVSS

[0132]

8	LV1050-5C8var1	双特异性 Ab	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMH WVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYADSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGQ GTQVTVSSGGGGSEVQLLESGGGGSVQPGGSLRLS CAASGRPFNSYAMSWFRQAPGKEREFVSAISWSG GSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAQFSGADYGFGRLLGIRGYEYDYWGQGT QVTVSSAAAEPEA
9	LV1051-5C8var1	双特异性 Ab	EVQLVESGGGGSVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSM HWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYADSVKGRFT ISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGL GTQVTVSSGGGGSEVQLLESGGGGSVQPGGSLRLS CAASGRPFNSYAMSWFRQAPGKEREFVSAISWSG GSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAAQFSGADYGFGRLLGIRGYEYDYWGQGT QVTVSSAAAEPEA
10		经修饰的较链区序列	AAASDKTHTCPPCP
11	wtIgG1 (G1m17, G1m(z) 同种异型)	CH2 和 CH3	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDV SHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLTCLVK GFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGGSFF LYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPG

12	IgG1 L234F L235E T366W	重链恒定区 变体	AAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFS SVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
13	IgG1 L234F L235E T366S L368A Y407V	重链恒定区 变体	AAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLM ISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHN AKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYK CKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD  ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN YKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFS CSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
14	LV1050	CDR1	RFMISEYSMH
15	LV1050	CDR2	TINPAGTTDYADSVKG
16	LV1050	CDR3	DGYGY
17	5C8var1	CDR1	NYAMS
18	5C8var1	CDR2	AISWGGSTSYADSVKG
19	5C8var1	CDR3	QFSGADYGFGR LGIRGYEYDY
20	6H4	VHH	EVQLVESGGGLVQAGGSLRLS CAASGRPF SNYGM GWFRQAPGKKREFVAGISWGGSTDYADSVKGR FTISRDN AKNTVYLQMN SLKPEDTAVYYCAAVFSG AETAYYPSDDYDYWGQGTQVTVSS

[0133]

21	6H4	CDR1	GRPFSNYGMG
22	6H4	CDR2	GISWSSGGSTDYADSVKG
23	6H4	CDR3	VFSGAETAYYPSDDYDY
24	PSMA		<p>MWNLLHETDSAVATARRPRWLCAGALVLAGGFLL                      GFLFGWFIKSSNEATNITPKHNMKAFLDELKAENIK                      KFLYNFTQIPHLAGTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLD                      SVELAHYDVLLSYPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSL                      FEPPPPGYENVSDIVPPPSAFSPQGMPEGDLVYVNY                      ARTEDFFKLERDMKINCSGKIVIARYGKVFRGNKV                      KNAQLAGAKGVILYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLP                      GGGVQRGNILNLNGAGDPLTPGYPANEYAYRRGIA                      EAVGLPSIPVHPIGYYDAQKLEKMGGSAPPDSSW                      RGSLKVPYNVGPGFTGNFSTQKVKMHIHSTNEVT                      RIYNVIGTLRGAVEPDRYVILGGHRDSWVFGGIDP                      QSGAAVVHEIVRSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDA                      EEFLLGSTEWAEENSRLQERGVAYINADSSIEG                      NYTLRVDCTPLMYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLY                      ESWTKKSPSPEFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLG                      IASGRARYTKNWETNKFSGYPLYHSVYETYELVEKF                      YDPMFKYHLTVAQVRGGMVFELANSIVLPFDCRDY                      AVVLRKYADKIYSISMKHPQEMKTYSVSFDSLFA                      VKNFTEIASKFSERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMF                      LERAFIDPLGLPDRPFYRHVIYAPSSHNKYAGESFP                      GIYDALFDIESKVDPSKAWGEVKRQIYVAFTVQA                      AAETLSEVA</p>

[0134]

[0135]

<p>25</p>	<p>5C8var1  Fc  L234F  L235E  T366W</p>		<p>EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSNYAM SWFRQAPGKEREVSAISWGGSTSYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGA DYGFGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTVSSAAASDKT HTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLWCLVKGFPYSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPG</p>
<p>26</p>	<p>LV1050  Fc  L234F  L235E  T366S  L368A  Y407V</p>		<p>EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMH WVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYADSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGQ GTQVTVSSAAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLDSGDSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</p>

[0136]

27	5C8var1  Fc  L234F  L235E  T366W		EVQLLESGGGSVQPGGSLRLSCAASGRPFSNYAM SWFRQAPGKEREVSAISWSGGSTSYADSVKGRF TISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAAQFSGA DYGFGRLGIRGYEYDYWGQGTQVTVSSAAASDKT HTCPPCPAPEFEGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE EQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK
28	LV1050  Fc  L234F  L235E  T366S  L368A  Y407V		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMH WVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYADSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGQ GTQVTVSSAAASDKTHTCPPCPAPEFEGGPSVFLF PPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQ VYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTTPVLSDGSFFLVSKLTVDKSRW QQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK
29	LV1050-  5C8var1-  无-c-标  签		EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMH WVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYADSVKGRFTI SRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCDGYGYRGQ GTQVTVSSGGGGSEVQLLES GGGSVQPGGSLRLS CAASGRPFSNYAMSWFRQAPGKEREVSAISWSG GSTSYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAED

[0137]

			TAVYYCAAQFSGADYGFGRLLGIRGYEYDYWGQGT QVTVSS
30	PSMA  var		MARPLCTLLLLMATLAGALAGSHHHHHHGSKSSN EATNITPKHNMKAFLDELKAENIKKFLYNFTQIPHLA GTEQNFQLAKQIQSQWKEFGLDSVELAHYDVLLS YPNKTHPNYISIINEDGNEIFNTSLFEP PPPGYENV S DIVPPFAFSPQGMPEGDLVYVNYARTEDFFKLERD MKINCSGKVIARYGKVFRGNKVKNAQLAGAKGVI LYSDPADYFAPGVKSYPDGWNLPGGGVQ RGNILN LNGAGDPLTPGYANEYAYRRGIAEAVGLPSIPVHP IGYYDAQKLEKMGG SAPPDSSWRGSLKVPYNVG PGFTGNFSTQVKMHIHSTNEVTRIYNVIGTLRGA VEPDYVILGGHRDSWVFGGIDPQSGAAVVHEIV RSFGTLKKEGWRPRRTILFASWDAEEFLLGSTE W AEENSRLQERGVAYINADSSIEGNYTLRVDCTPL MYSLVHNLTKELKSPDEGFEGKSLYESWTKKSPSP EFSGMPRISKLGSGNDFEVFFQRLGIASGRARYTK NWETNKFSGYPLYHSVYETVELVEKFYDPMFKYHLT VAQVRGGMV FELANSIVLPFDCRDYAVVLRKYADK IYSISMKHPQEMKTYSVSFDSLFSVAVKNFTEIASKF SERLQDFDKSNPIVLRMMNDQLMFLERAFIDPLGL PDRPFYRHVIYAPSSH NKYAGESFPGIYDALFDIES KVDPSKAWGEVKRQIYVAFTVQAAAETLSEVA
31	huV δ 2  ECD-Fc  (孔)-His		MQRISLIHLSLFWAGVMSAIELVPEHQTVPV SIGV PATLRCSMKGEAIGNYYINWYRKTQGNTMTFIYRE KDIYGPFGKDNFQGDIDIAKNLAVLKILAPSERDEG SYCACDTLGMGGEYTDKLIFGKGTRVTVEPRSQP HTKPSVFMKNGTNVACL VKEFYPKDIRINLVSSKK ITEFDPAIVISPSGKYNAVKLGKYEDSNSVTCSVQH

			<p>DNKTVHSTDFEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKS                  CHKPKAIVHTEKVNMMSLTAAASDKTHTCPPCPAP                  ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSH                  EDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRV                  VSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTIS                  KAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGF                  YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLV                  SKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKS                  LSLSPGHHHHH</p>
<p>[0138]</p>	<p>32 huV γ 9                  ECD-Fc                  (结)-C-                  标签</p>		<p>MLSLLHASTLAVLGALCVYGAGHLEQPQISSTKLS                  KTARLECVVSGITISATSVYWRERPGEVIQFLVSI                  SYDGTVRKESGIPSGKFEVDRIPESTSTLTIHNVE                  KQDIATYYCALWEAQQLGKKIKVFGPGTKLIITDK                  QLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFP                  DVIKIHWEEKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYMKFS                  WLTVPEKSLDKEHRCIVRHENKNGVDQEIIFFPIK                  TDVITMDPKDNCSKDANDTLLLQLTNTSAAAASDK                  THTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEV                  TCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPRE                  EQYNSTYRVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKA                  LPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQV                  SLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVL                  DSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL                  HNHYTQKSLSLSPGAAAEPEA</p>

实施例

[0139] 实施例1:PBMC分离和人供体来源V γ 9Vδ2-T细胞培养物的产生

[0140] 从健康的供体志愿者收集全血。或者,从血液供应服务机构Sanquin (blood supply service Sanquin) 获得血沉棕黄层并将其用于分离外周血单个核细胞 (peripheral blood mononuclear cell, PBMC)。使用Lymphoprep™密度梯度离心分离PBMC。然后使用与山羊抗小鼠IgG微珠组合的FITC标记的抗TCR Vδ2小鼠单克隆抗体 (Mab), 通过磁激活细胞分选 (magnetic-activated cell sorting, MACS) 从健康供体PBMC中分离V γ 9V

$\delta 2$ -T细胞。每7天用由以下组成的饲养细胞混合物(feeder cell mix)刺激纯化的V $\gamma$  9V $\delta 2$ -T细胞:重悬于补充有10IU/mL IL-7、10ng/mL IL-15和50ng/ml PHA的Roswell Park Memorial Institute (RPMI)培养基中的来自两个健康供体的经辐照PBMC和EB病毒(Epstein Barr Virus)转化的B细胞系(JY)。在用于实验之前总是对扩增的V $\gamma$  9V $\delta 2$ -T细胞培养物进行纯度测试,并且总是发现>95%的V $\gamma$  9和V $\delta 2$ 双阳性。

[0141] 实施例2:抗PSMA VHH JVZ-007和抗V $\gamma$  9V $\delta 2$  VHH 5C8的人源化

[0142] 将骆驼科来源的抗PSMA VHH JVZ-007的氨基酸序列(LV1044;SEQ ID NO:1)(J Nucl Med.2015 Jul;56(7):1094-9,补充数据)与人V基因数据库进行比对,并且发现最接近的人种系匹配是IGHV3-74\*01。基于人与美洲驼来源序列之间框架区的序列差异,设计了两种人源化变体(SEQ ID NO:2至3),参见图1中的比对。

[0143] 然后将JVZ-007和这两种突变体与抗V $\gamma$  9V $\delta 2$  VHH 5C8(W02015156673中所述的V $\delta 2$ 结合抗体)(SEQ ID NO:4)或5C8var1(5C8的人源化变体)(SEQ ID NO:5)以以下双特异性VHH形式组合:抗PSMA VHH-接头-抗V $\gamma$  9V $\delta 2$  VHH。接头序列为GGGGS(SEQ ID NO:6)。为了纯化和检测目的,在一些构建体中添加了C端C标签(EPEA序列),其前面是三个丙氨酸残基。所得构建体的序列在SEQ ID NO:7至9中示出。

[0144] 实施例3:双特异性VHH形式的半衰期延长形式的设计

[0145] 基于含Fc的形式,设计了双特异性VHH形式的半衰期延长形式。将VHH序列与以下经略微修饰的人IgG1铰链区偶联:氨基酸残基216至230(EU编号),其改变为AAASDKTHTCPPCP(SEQ ID NO:10)。这省略了通常与另一条重链桥接的半胱氨酸,并用三个丙氨酸替代了铰链序列上的“EPK”。将该经修饰铰链与IgG1(G1m17,G1m(z)同种异型序列)-CH2和-CH3序列(SEQ ID NO:11)偶联。对CH2序列进行修饰以包含Fc沉默突变(L234F,L235E),并对CH3序列进行修饰以包含一个“结”突变(T366W)(SEQ ID NO:12)或产生“孔”的三个突变(T366S、L368A和Y407V)(SEQ ID NO:13)。这种“结进孔”(Knob-into-Hole,KiH)技术诱导两条链的优先异二聚化。图2中示意性地示出了所得构建体。

[0146] 实施例4:双特异性VHH分子和含Fc的构建体的克隆、表达和纯化

[0147] 将双特异性VHH分子的氨基酸序列反向翻译成cDNA,并随后进行密码子优化以用于在人细胞中表达。添加调节元件:N端Kozak序列和C端终止密码子(包括用于克隆的BamH1和Not1限制性位点),并将cDNA制备成合成基因。将cDNA克隆到合适的载体中并验证其序列。通过在HEK293\_E细胞中瞬时转染所得质粒来进行蛋白质的表达。通过蛋白A亲和色谱和制备型尺寸排阻色谱从培养物上清液纯化蛋白质。

[0148] 将含Fc的构建体的两条蛋白质链的氨基酸序列反向翻译成编码cDNA,添加必要的调节元件(Kozak序列、终止密码子和克隆位点BamH1和Not1)并对cDNA进行密码子优化以用于表达。通过合成基因合成制备cDNA,并且通过将cDNA分别克隆到合适的载体中来制备编码两条蛋白质链中的任一条的表达质粒。对所得质粒进行序列验证并随后将其用于使用不同比率的两种质粒(1:2、1:1和2:1)转染悬浮生长的CHO细胞。使用蛋白A亲和色谱从培养物上清液纯化分泌的蛋白质,并将其经缓冲液交换至PBS。通过制备型尺寸排阻色谱进一步纯化蛋白质。

[0149] 实施例5:抗PSMA VHH JVZ-007的人源化变体的测试

[0150] 在4小时脱颗粒测定中测试了经纯化含双特异性VHH的人源化变体的诱导靶标依

赖性T细胞活化的能力。如实施例1中所述通过磁激活细胞分选 (MACS) 从PBMC分离V $\gamma$  9V $\delta$ 2 T细胞并进行扩增。总是对用于实验的扩增的V $\gamma$  9V $\delta$ 2 T细胞进行纯度检查, 并且发现在FACS中V $\gamma$  9和V $\delta$ 2染色的双阳性>95%。将经纯化、扩增的V $\gamma$  9V $\delta$ 2 T细胞与相同数目的PSMA阳性LNCaP (ATCC, 目录号CRL-1740) 靶细胞(效应物: 靶标(E:T) 细胞之比为1:1) 和一定浓度范围的双特异性构建体一起孵育。在孵育4小时之后, 通过在FACS中染色来确定表达CD107a的T细胞的百分比。

[0151] 图3示出了PSMA VHH JVZ-007的人源化变体在诱导依赖于抗原阳性细胞系LNCaP的V $\gamma$  9V $\delta$ 2 T细胞脱颗粒方面显示出强效力。然而, 当使用抗原阴性细胞系PC-3时, 单一高浓度的双特异性构建体没有引起T细胞的显著活化。

[0152] 实施例6: 由双特异性VHH和含Fc的对应物介导的细胞毒性

[0153] 将双特异性VHH LV1050-5C8var1的两个VHH序列重格式化成包含如上所述的人IgG1 Fc的半衰期延长分子, 产生SEQ ID NO:25和SEQ ID NO:26中所示构建体(5C8var1-Fc和LV1050-Fc)。

[0154] 测试双特异性VHH构建体LV1050-5C8var1和含Fc的对应物5C8var1-Fc x LV1050-Fc (在本文中也称为LV1050-Fc x 5C8var1) 二者其通过使V $\gamma$  9V $\delta$ 2 T细胞活化来诱导对LNCaP细胞的细胞毒性的能力。

[0155] 图4示出了双特异性VHH以及含有相同VHH序列的含Fc的对应物二者能够以E:T比为1:1在24小时之后诱导100%肿瘤细胞裂解。包含原始抗PSMA VHH JVZ-007的双特异性VHH LV1044-5C8与人源化形式LV1050-5C8var1一样有效, 并且这二者均比含Fc的对应物5C8var1-Fc x LV1050-Fc略微更强效。发现LV1050-5C8var1和LV1044-5C8的EC50值分别为2.2pM和1.6pM, 并且5C8var1-Fc x LV1050-Fc的为10.5pM。对于后续实验, 出于表达目的, 向编码含Fc的链的两种构建体添加C端赖氨酸, 产生了SEQ ID NO:27和SEQ ID NO:28中所示编码序列。对所产生多肽进行的分析表明C端赖氨酸被剪掉(clip off) (数据未示出), 从而产生了与由不编码C端赖氨酸的构建体产生的那些多肽相同的多肽。

[0156] 实施例7: 在FACS中LV1050-Fc x 5C8var1-Fc与靶标阳性细胞的结合

[0157] 如上所述克隆、表达和纯化双特异性含Fc的构建体5C8var1-Fc x LV1050-Fc。为了测试该分子与PSMA的结合, 测试一定浓度范围的抗体与PSMA阳性前列腺癌细胞系LNCaP和抗原阴性细胞系PC-3的结合。用多克隆抗人IgG抗体进行检测。

[0158] 为了测试LV1050-Fc x 5C8var1-Fc与V $\gamma$  9V $\delta$ 2 T细胞的结合, 使用针对VHH的两种不同单克隆抗体(45H8和96A3F5; Genscript, 目录号分别为CP001/18L001614和A01994) 进行的检测, 在FACS染色中测试了一定浓度范围的化合物(100nM及其半对数稀释) 的结合。

[0159] 图5示出了该分子与PSMA特异性地结合(左图), 因为其对PSMA阴性细胞系PC-3没有可测量的染色, 但显示出与LNCaP细胞的强结合。测量的结合EC50为7.3nM。通过FACS测量的V $\gamma$  9V $\delta$ 2 TCR的亲和力为1.7nM(右图)。

[0160] 实施例8: 先导双特异性抗体LV1050-Fc x 5C8var1-Fc诱导强效靶标依赖性T细胞活化和靶细胞裂解

[0161] 为了测量双特异性T细胞接合剂的效力, 将靶标阳性LNCaP细胞与一定浓度范围的该分子和固定数目的V $\gamma$  9V $\delta$ 2 T细胞(效应物: 靶标之比为1:1) 一起孵育。然后通过孵育四小时之后在FACS中对T细胞上的CD107a表达进行染色来测量T细胞活化。在24小时之后通

过测量FACS (7AAD染色) 中活细胞数目来测量细胞毒性。图6示出了LV1050-Fc x 5C8var1-Fc诱导强效T细胞活化, 如由CD107a表达所证明的。另外, 这对LNCaP靶细胞产生了强细胞毒性作用。发现细胞毒性EC50值对于所测试的两种双特异性VHH分子实质上相同 (对于LV1044-5C8 (在本实验中产生, 没有AAAPEEA标签) 和LV1050-5C8var1均为1.9pM), 而对于LV1050-Fc x 5C8var1-Fc略高(9.4pM)。

[0162] 实施例9: 患者来源肿瘤和正常组织中的V $\gamma$  9V $\delta$ 2-T细胞频率和配体表达

[0163] 在对患有非转移性前列腺癌的患者进行根治性前列腺切除术之后获得前列腺肿瘤组织。分析了肉眼检查的正常组织 (macroscopically normal tissue) 以及肿瘤组织二者。用手术刀片将组织切成小块, 并将其重悬于由补充有以下的Iscove改良Dulbecco培养基 (Iscove Modified Dulbecco Medium, IMDM) 构成的解离培养基中: 0.1% DNA酶I (Roche)、0.14% 胶原酶A、100IU/mL青霉素钠/100 $\mu$ g/mL硫酸链霉素/2.0mM L谷氨酰胺和5% FcS。将组织块转移至无菌烧瓶并在磁搅拌器上在37度下孵育45分钟。在该孵育之后, 使细胞悬液运行通过100 $\mu$ M细胞过滤器。肿瘤组织总共解离三次且正常组织解离两次, 在此之后洗涤细胞并准备使用台盼蓝排除法进行活细胞计数。使用AF700标记的抗CD45 mAb、PerCP-Cy5.5标记的抗CD3 mAb、APC标记的抗TCR V $\gamma$  9 mAb和BV711标记的抗TCR V $\delta$ 2 mAb在FACS中进行染色, 来分析解离的肿瘤组织和正常组织中V $\gamma$  9V $\delta$ 2-T细胞的存在情况。使用BV421标记的抗EpCAMmAb、FITC标记的抗PSMA mAb和PE标记的抗CD277 mAb来确定肿瘤细胞和正常细胞上靶标EpCAM、PSMA和CD277的表达。

[0164] 图7示出了肿瘤组织与正常组织之间的PSMA表达以及CD277表达二者中存在显著差异。对切除的组织进行宏观检查并随后将其确定为肿瘤组织或正常组织。这随后在FACS中通过对肿瘤的EpCAM阳性染色 (其与PSMA表达相关) 得到进一步证实。PSMA在正常组织中几乎不存在但在解离的肿瘤细胞上显著表达。CD277 (BTN3A) 表达在肿瘤上也更高度地表达, 但是该差异缺乏统计学显著性。相比之下, V $\gamma$  9V $\delta$ 2-T细胞在肿瘤组织和正常组织二者中的频率在很大程度上相当, 其中正常组织具有略高的百分比。

[0165] 实施例10: 使用患者来源靶细胞进行的对LV1044-5C8的功能性分析

[0166] 为了确定双特异性构建体介导V $\gamma$  9V $\delta$ 2-T细胞针对患者来源靶细胞的细胞毒性的潜能, 将解离的肿瘤细胞和正常细胞的悬液在具有或不具有50nM化合物和V $\gamma$  9V $\delta$ 2-T细胞培养物的情况下以1:1的效应物: 靶标 (E:T) 比在37 $^{\circ}$ C下孵育24小时。使用生死标志物 (life-death marker) 7AAD和123计数eBeads来确定活靶细胞的数目。

[0167] 图8示出了V $\gamma$  9V $\delta$ 2 T细胞能够以靶细胞和V $\gamma$  9V $\delta$ 2 T细胞依赖性方式诱导对患者来源肿瘤细胞的肿瘤细胞杀伤。大部分缺乏PSMA表达的正常组织不受V $\gamma$  9V $\delta$ 2 T细胞的影响, 即使在存在50nM双特异性抗体的情况下。然而, PSMA阳性肿瘤细胞在24小时之后被显著杀伤, 但仅是在存在效应细胞和双特异性抗体二者的情况下。

[0168] 实施例11: 使用生物层干涉术进行的LV1050-Fc x 5C8var1-Fc对人PSMA和V $\gamma$  9V $\delta$ 2 TCR的亲和力测定

[0169] 使用生物层干涉术 (biolayer interferometry, BLI) 来确定LV1050-Fc x 5C8var1-Fc对重组人PSMA和人V $\gamma$  9V $\delta$ 2 TCR的亲和力。作为配体, 将12.5 $\mu$ g/mL生物素化的hPSMA或5 $\mu$ g/mL hV $\gamma$  9V $\delta$ 2-Fc (由SEQ ID NO: 31和32组成) 加载到链霉亲和素生物传感器上。作为分析物, 使用LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的两倍系列稀释物: 范围为3.125至200nM,

与配体PSMA组合;范围为0.03125至20nM,与配体hV $\gamma$ 9V $\delta$ 2-Fc组合。如表2中所示,LV1050-Fc x 5C8var1-Fc与人PSMA结合的 $K_D$ 值为 $32 \pm 1.2$ nM,并且与人V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR结合的 $K_D$ 为 $0.64 \pm 0.16$ nM。

[0170] 表2:使用生物层干涉术进行的LV1050-Fc x 5C8var1-Fc对人PSMA和V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR的亲和力测定

配体	$K_D$ (M)		$k_{on}$ (1/MS)		$k_{dis}$ (1/s)	
	平均值	SD	$k_{on}$ (1/MS)	SD	$k_{dis}$ (1/s)	SD
[0171] PSMA (n=3)	3.16E-08	1.24E-09	3.07E+05	7.41E+03	9.69E-03	4.73E-04
V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 TCR (n=4)	6.35E-10	1.60E-10	2.40E+05	8.64E+03	1.51E-04	3.40E-05

[0172] 实施例12:表位作图

[0173] 为了确定PSMA上被LV1050-Fc x 5C8var1-Fc中并入的VHH所结合的表位,将LV1050-5C8var1-无-c-标签(SEQ ID N0:29)(包含与LV1050-Fc x 5C8var1-Fc相同的PSMA结合VHH结构域)用于由CovalX AG开发的表位作图技术(Pimenova et al. (2008) J Mass Spectrom 43:185)。简言之,使重组PSMA蛋白(SEQ ID N0:30)与LV1050-5C8var1-无-c-标签结合,交联,暴露于不同的蛋白酶,并通过高分辨率质谱来分析所得肽(交联或不交联)。

[0174] 结果表明VHH与图9中所示的构象表位结合。发现以下残基与该抗体具有直接相互作用:R149、S156、R163、S276、R279、S281、K283、H577、S590、K688、R689和Y692。这些残基对应于UniProt序列Q04609-1中的残基R190、S197、R204、S317、R320、S322、K324、H618、S631、K729、R730和Y733。已经在FOLH1基因中鉴定出的罕见单核苷酸多态性(single nucleotide polymorphism, SNP)均未出现在该表位中,表明LV1050-5C8var1-无-c-标签并因此LV1050-Fc x 5C8var1-Fc能够结合靶标的所有相关的已鉴定SNP变体。

[0175] 实施例13:使用肿瘤来源细胞系进行的对LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的进一步功能性分析

[0176] 在4小时内体外测定中使用脱颗粒标志物CD107a (LAMP-1)的表达作为读出来确定LV1050-Fc x 5C8var1-Fc诱导PSMA依赖性V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞活化的能力。在不存在或存在不同浓度的LV1050-Fc x 5C8var1-Fc(范围为10fM至3.16nM)的情况下,将从来自健康供体的PBMC分离的扩增的V $\gamma$ 9V $\delta$ 2 T细胞与PSMA表达前列腺来源癌细胞系LNCaP、VCaP或22Rv1以1:1的效应物:靶细胞比一起培养。收获细胞并通过流式细胞术来确定CD107a的细胞表面表达。在存在所有PSMA表达肿瘤细胞系的情况下,LV1050-Fc x 5C8var1-Fc诱导非常强效的V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞活化(图10),其中 $EC_{50}$ 值在pM范围内(表3)。

[0177] 表3:在使用V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞和PSMA阳性肿瘤细胞系的体外测定中,在LV1050-Fc x 5C8var1-Fc下,V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞脱颗粒和V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞介导的肿瘤细胞毒性的 $EC_{50}$ 值

效应细胞	靶细胞系	测试范围 (nM)	E:T 比	平均值 $EC_{50}$ (nM) ( $\pm$ SD)	实验和供体(n)的数目
[0178] 4小时之后的脱颗粒					

V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T 细胞	LNCaP	3.2-0.000010	1:1	0.016 (0.0049)	n=10 (5 个实验中 10 个供体)
V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T 细胞	22Rv1	3.2-0.000032	1:1	0.029 (0.0049)	n=4 (2 个实验中 4 个供体)
V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T 细胞	VCaP	3.2-0.000032	1:1	0.028 (0.0064)	n=4 (2 个实验中 4 个供体)
[0179]	<b>24 小时之后的细胞毒性</b>				
V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T 细胞	LNCaP	3.2-0.000010	1:1	0.017 (0.013)	n=10 (7 个实验中 10 个供体, 4 个供 体测试两次)
V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T 细胞	22Rv1	3.2-0.000032	1:1	0.013 (0.0069)	n=4 (2 个实验中 4 个供体)
V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T 细胞	VCaP	3.2-0.000032	1:1	0.015 (0.011)	n=3 (2 个实验中 3 个供体)

[0180] 接下来,在同一共培养物中在24小时时使用发光测定对来自垂死/死亡肿瘤细胞的胞内蛋白酶的释放进行定量(CytoTox-Glo<sup>TM</sup>细胞毒性测定,Promega),来确定LV1050-Fc x 5C8var1-Fc诱导靶标依赖性、V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞介导的肿瘤细胞杀伤的能力。LV1050-Fc x 5C8var1-Fc与针对脱颗粒相同范围的EC<sub>50</sub>值(表3)诱导对LNCaP、VCaP和22Rv1细胞的强靶标依赖性和V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞介导的细胞毒性(图11B)。

[0181] 另外,V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞未被单独的LV1050-Fc x 5C8var1-Fc(在不存在肿瘤细胞的情况下)活化,也未观察到其中PSMA表达被消除的肿瘤细胞(LNCaP.koPSMA)的裂解(图11A)。

[0182] 为了研究不同E:T比对LV1050-Fc x 5C8var1-Fc(测试浓度范围:10fM至3.2nM)效力的影响,在24小时细胞毒性测定中使靶标LNCaP细胞的数目保持恒定(即50,000),同时改变效应V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞的数目以获得不同的E:T比(1:1、1:10和1:100)。如表4中所示,由LV1050-Fc x 5C8var1-Fc诱导的V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞介导的细胞毒性的平均EC<sub>50</sub>值在E:T比为1:1至1:10之间相当(分别为17±13pM和9.9±6.5pM),而在E:T比为1:100时,观察到的细胞毒性水平太低而不能准确计算EC<sub>50</sub>值。尽管测定中LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的效力(EC<sub>50</sub>)未受影响,但与E:T比为1:1相比,在E:T比为1:10中观察到的最大裂解百分比显著降低(数据未示出)。因此,LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的效力(即在测定中测量的EC<sub>50</sub>)不受不同E:T比的强影响。

[0183] 表4:使用不同E:T比的由LV1050-Fc x 5C8var1-Fc介导的V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞细胞毒性的EC<sub>20</sub>、EC<sub>50</sub>和EC<sub>90</sub>值。

	<b>E:T 比</b>	<b>平均值 EC20 ± SD (pM)</b>	<b>平均值 EC50 ± SD (pM)</b>	<b>平均值 EC90 ± SD (pM)</b>	<b>实验和供体(n)的数目</b>
[0184]	1:1	4.3 ± 3.0	17 ± 13	79 ± 48	n = 10 (7 个实验中 10 个供体, 4 个供体测试两次)
	1:10	3.6 ± 1.3	9.9 ± 6.5	60 ± 59	n = 4 (2 个实验中 4 个供体)

[0185] 实施例14:使用患者来源靶细胞进行的对LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的功能性分析  
 [0186] 获得患者来源非转移性前列腺癌组织,并如实施例9中所述处理正常(非恶性)组织和肿瘤组织。

[0187] 作为V $\gamma$  9V $\delta$ 2-T细胞活化的量度,在存在或不存在50nMLV1050-Fc x 5C8var1-Fc的情况下确定解离的前列腺样品(来自正常(非恶性)组织或原发性肿瘤组织的 $0.5 \times 10^5$ 至 $1 \times 10^5$ 个解离的细胞)中存在的V $\gamma$  9V $\delta$ 2-T细胞上的脱颗粒标志物CD107a(LAMP-1;使用PE标记的抗人CD107a(Thermofisher)检测)的上调。在4小时之后,通过CD107a表达来测量V $\gamma$  9V $\delta$ 2-T细胞的脱颗粒,并通过基于流式细胞术的测定(确定EpCAM-/CD45+/CD3+/V $\gamma$  9+/V $\delta$ 2+/CD107a+细胞的百分比)进行分析。

[0188] 此外,确定了在存在前列腺肿瘤组织或正常(非恶性)组织的情况下在所培养的自体患者PMBC中LV1050-Fc x 5C8var1-Fc引发V $\gamma$  9V $\delta$ 2-T细胞脱颗粒的能力。出于该目的,使用与上述相同的方法,不同之处在于在此以效应物与靶标(E:T;PMBC:前列腺细胞)之比为10:1添加自体PMBC并孵育24小时。

[0189] 在解离的前列腺癌组织而不是在非恶性前列腺组织中,LV1050-Fc x 5C8var1-Fc诱导了组织浸润V $\gamma$  9V $\delta$ 2-T细胞脱颗粒的统计学上显著的提高。与在没有双特异性抗体的情况下进行组织细胞孵育相比,观察到显著更高百分比的CD107a表达V $\gamma$  9V $\delta$ 2-T细胞(图12A)。在正常组织中,LV1050-Fc x 5C8var1-Fc不诱导组织浸润V $\gamma$  9V $\delta$ 2-T细胞的脱颗粒(图12B)。

[0190] 另外,确定了LV1050-Fc x 5C8var1-Fc在与患者前列腺肿瘤组织或正常(非恶性)组织共培养时使自体PMBC中的V $\gamma$  9V $\delta$ 2-T细胞活化的能力。与单独孵育肿瘤组织细胞和自体PMBC相比,在存在LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的情况下共培养产生显著更高百分比的CD107a表达V $\gamma$  9V $\delta$ 2-T细胞(图13A)。当将LV1050-Fc x 5C8var1-Fc添加至自体PMBC和正常(非恶性)前列腺组织的培养物时,未观察到自体PMBC中V $\gamma$  9V $\delta$ 2-T细胞的活化(图13B)。

[0191] 除使用E:T比为10:1之外,如实施例10中所述在前列腺肿瘤细胞或正常(非恶性)前列腺细胞和自体PMBC的共培养物中测试了由LV1050-Fc x 5C8var1-Fc诱导的特异性细胞毒性。LV1050-Fc x 5C8var1-Fc在存在自体PMBC的情况下诱导统计学上显著的肿瘤细胞裂解,而正常(非恶性)前列腺细胞未被裂解(图14)。

[0192] 实施例15:LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的体内治疗效力

[0193] 对免疫缺陷NCG小鼠皮下接种以2:1之比与人PMBC混合的 $5 \times 10^6$ 个22Rv1细胞

(22Rv1:PBMC)。本研究中使用来自在CD3+T细胞中显示出不同的V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞频率的2个供体(供体#1(21.9%V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞)和供体#2(8.8%V $\gamma$ 9V $\delta$ 2-T细胞))的PBMC。从肿瘤细胞和PBMC接种之日开始,每周(第0、7、14和21天)IV施用LV1050-Fc x 5C8var1-Fc(0.2mg/kg或2mg/kg)或磷酸缓冲盐水(phosphate buffered saline,PBS)。使用卡尺在两个维度(dimension)上测量肿瘤尺寸,每周两次。当组中平均肿瘤体积超过2,000mm<sup>3</sup>时将小鼠处死。

[0194] 对于注射来自供体#1的PBMC的小鼠,以0.2或2mg/kg施用LV1050-Fc x 5C8var1-Fc在第34天(当处死对照(经PBS处理)组中的小鼠时;图15A)分别产生了91%和78%的统计学上显著的肿瘤生长抑制(tumor growth inhibition,TGI)值。对于注射来自供体#2的PBMC的小鼠,在第41天(当处死相应经PBS处理组中的小鼠时)观察到的TGI值对于用0.2和2mg/kg的LV1050-Fc x 5C8var1-Fc处理的小鼠分别为23%和52%(图15B)。对于供体#2,针对所施用化合物的最高剂量发现TGI的统计学显著性。

[0195] 实施例16:全血细胞因子释放评价

[0196] 使用来自30名健康供体的新鲜全血,使用溶液相测定进行体外细胞因子释放测定。将不同浓度的LV1050-Fc x 5C8var1-Fc(范围为280至8.75nM)与全血一起孵育24小时,并使用免疫测定来测量血浆中七种细胞因子(IL-2、IL-4、IL-6、IL-8、IL-10、IFN- $\gamma$ 和肿瘤坏死因子(TNF) $\alpha$ )的水平。**Erbix®**(西妥昔单抗(cetuximab)) and **Campath®**(阿仑单抗(alemtuzumab))作为对照化合物包括在测定中,其在在临床中分别诱导低和高的细胞因子释放。葡萄球菌肠毒素B(staphylococcal enterotoxin B,SEB)用作所有测试细胞因子释放的阳性测定对照。

[0197] 结果总结在表5中示出。LV1050-Fc x 5C8var1-Fc仅诱导IL-8和IFN- $\gamma$ 的释放。LV1050-Fc x 5C8var1-Fc诱导的IL-8释放与**Erbix®**诱导的IL-8释放相当,所述**Erbix®**是已知在患者中不诱导细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome, CRS)(或已知诱导低水平的细胞因子)的抗体。LV1050-Fc x 5C8var1-Fc诱导的IFN- $\gamma$ 释放与**Erbix®**相比略高,但观察到的最高IFN- $\gamma$ 释放远低于由**Campath®**诱导的释放,所述**Campath®**是临床上与CRS相关的抗体。重要的是,LV1050-Fc x 5C8var1-Fc没有诱导任何IL-6释放,所述IL-6是CRS中的重要细胞因子(Tanaka et al(2016)Immunotherapy 8: 959)。

[0198] 在其中将LV1050-Fc x 5C8var1-Fc包被至高结合96孔板,然后与来自10名健康供体的新鲜全血一起孵育的体外细胞因子释放测定中,获得了类似的结果。在此,LV1050-Fc x 5C8var1-Fc诱导了非常低(中值)水平的IL-6和LV-8,这与低响应比较物**Erbix®**相当,并且没有观察到TNF $\alpha$ 释放。与**Erbix®**相比,LV1050-Fc x 5C8var1-Fc在每个测试化合物浓度下均诱导更高(中值)水平的IFN $\gamma$ ,但中值水平显著低于由**Campath®**诱导的中值水平。

[0199] 表5:健康供体的新鲜血液样品中由LV1050-Fc x 5C8var1-Fc诱导的细胞因子释放谱(pg/mL)。

测试制品		IL-2	IL-4	IL-6	IL-8	IL-10	IFN- $\gamma$	TNF $\alpha$
PBS ( 阴性对照 )		0	0	0	0	0	0	0
SEB ( 阳性对照 )		24,4 70.9	53.3	5,613.2	8,936.3	1,010.3	61,792.2	4,302.2
Erbitux <sup>®</sup>	280 nM	0	0	0	15.1	0	0	0
	140 nM	0	0	0	24.8	0	1.1	0
	70 nM	0	0	4.7	15.6	0	0.5	0
	35 nM	0	0	17.4	20.0	0	0	0
	17.5 nM	0	0	46.0	16.6	0	0	0
	8.75 nM	0	0	6.2	15.4	0	3.6	0
Campath <sup>®</sup>	280 nM	0	0	1,732.1	578.2	0.2	3,409.9	18.1
	140 nM	0	0	1,360.3	392.7	0	4,029.0	12.9
	70 nM	0	0	896.5	326.5	0	4,732.9	8.3
	35 nM	0	0	714.9	255.5	0	5,313.4	14.5
	17.5 nM	0	0	422.4	195.1	0	4,353.3	16.9
	8.75 nM	0	0	400.9	180.5	0	4,932.2	20.6
LV1050- Fc x 5C8var1- Fc	280 nM	0	0	0	35.4	0	9.4	0
	140 nM	0	0	0	25.4	0	24.4	0
	70 nM	0	0	0	24.2	0	37.9	0
	35 nM	0	0	0	20.3	0	49.6	0
	17.5 nM	0	0	0	28.2	0	50.0	0
	8.75 nM*	0	0	0	19.2	0	81.4	0

[0201] 通过体外细胞因子释放测定在30名健康供体的新鲜血液样品中测量的针对每种药物/剂量组合的中值细胞因子水平(pg/mL)。

[0202] 实施例17:药代动力学

[0203] LV1050-Fc x 5C8var1-Fc包含人Fc结构域,所述人Fc结构域预期通过与FcRn受体结合来延长该化合物的体内半衰期。为了验证这一点,将LV1050-Fc x 5C8var1-Fc与人IgG对照以2mg/kg、5mg/kg和10mg/kg的三个单IV剂共施用于人FcRn Tg32 SCID小鼠(Jackson实验室:JAX)。在施用之后的不同时间点(5分钟、8小时、1、3、7、10、14、17、21和28天)收集血液样品,并使用抗原捕获ELISA评估LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的浓度。在该模型系统中获得的结果表明,LV1050-Fc x 5C8var1-Fc在这些转基因小鼠中的半衰期范围为140至172小时(5.8至7.2天,图16),与该系统基于IgG的抗体的半衰期相当。

[0204] 还在非人灵长类(non-human primate,NHP)中评价了LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的药代动力学。使用30分钟IV输注,向三只雌性食蟹猴(cynomolgus monkey)给予单IV剂的LV1050-Fc x 5C8var1-Fc(0.14、0.77和2.27mg/kg(每剂1只动物))。LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的半衰期为150至166小时(6.3至6.9天)(图17),这与不与食蟹猴直向同源靶标结合的基于IgG的人源化抗体的半衰期(Walker et al. (2019) PLOS ONE 14:e0217061)一致。观察到暴露的剂量成比例提高。表6中提供了药代动力学参数。

[0205] 表6:在单IV剂之后食蟹猴中LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的药代动力学参数。

动物 ID	施用剂量 (mg/kg)	$T_{max}$ (小时)	$C_{max}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ )	$nC_{max}$ ( $\mu\text{g}/\text{mL}$ ) / (mg/kg)	$T_{1/2}$ (小时)	$AUC_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{小时}/\text{mL}$ )	$nAUC_{0-\infty}$ ( $\mu\text{g}\cdot\text{小时}/\text{mL}$ ) / (mg/kg)	CI (mL/小时/kg)	$V_z$ (mL/kg)
[0206] 61	0.14	1	3.17	22.6	162.1	297.9	2127.9	0.47	109.9
62	0.77	1	17.1	22.2	150.0	1513.2	1965.2	0.51	110.1
63	2.27	1	53.6	23.6	165.9	5548.7	2444.4	0.41	97.9

[0207] CL=清除率;  $(n)C_{max}$ =(归一化的)给药之后的最大浓度;  $(n)AUC_{\infty}$ =(归一化的)从时间点 $t=0$ 小时到无穷大的浓度与时间曲线下的面积;  $T_{max}$ =给药之后达到最大浓度的时间;  $t_{1/2}$ =消除半衰期;  $V_z$ =表观分布体积。

[0208] 实施例18:与转染率无关的均质产物

[0209] 将编码LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的相关两条抗体重链的cDNA各自克隆到适于生产的表达载体中。使用不同比(1:1、1:1.25、1:1.5、1.25:1和1.5:1)的含有LV1050-Fc或5C8var1-Fc的表达载体用于转染适于生产的细胞。然后选择对两种不同抗生素具有抗性的细胞,并通过补料分批生产从所选的细胞库(cell pool)中产生抗体。对所产生抗体进行尺寸排阻高效液相色谱(Size Exclusion High Performance Liquid Chromatography, SE-HPLC)分析显示出高的产物纯度(二聚体含量):93.2%至96.4%的分泌的蛋白质处于预期的分子尺寸,与转染率无关(表7中的主峰面积)。建立反相HPLC(RP-HPLC)分析以进一步区分单体(LV1050-Fc和5C8var1-Fc)和同二聚体(LV1050-Fc x LV1050-Fc和5C8var1-Fc x 5C8var1-Fc)与预期的LAVA异二聚体(LV1050-Fc x 5C8var1-Fc)。所有克隆库(clone pool)样品均显示出高含量的预期异二聚体LAVA LV1050-Fc x 5C8var1-Fc,为86.1%至94.9%。克隆库DGC8-T1P、-T3P和-T5P显示出百分比升高的5C8var1-Fcx5C8var1-Fc二聚体。

[0210] 表7:通过转染不同比率的含有LV1050-Fc或5C8var1-Fc的表达载体获得的克隆库的SE-HPLC的结果。

库-ID.	比 LV1050-Fc : 5c8var1-Fc	相对峰面积[%]		
		HMW 物质	主要	LMW 物质
[0211] DGC8-T1P	1 : 1	4.1	95.8	0.0
DGC8-T3P	1 : 1.25	4.5	94.1	1.4
DGC8-T5P	1 : 1.5	4.3	93.2	2.5
DGC8-T7P	1.25 : 1	3.6	96.4	0.1
DGC8-T9P	1.5 : 1	3.6	96.3	0.0

[0212] HMW-高分子量;LMW-低分子量

[0213] 实施例19:LV1050-Fc x 5C8var1-Fc的配制

[0214] 从所选细胞克隆中,通过以下获得LV1050-Fc x 5C8var1-Fc产物:在生物反应器系统中产生,并且在收获和纯化之后使用四种类型的配方缓冲液以0.5mg/mL和10mg/mL的

蛋白质浓度配制：

缓冲液	配方
缓冲液 1	10 mM 组氨酸 + 280 mM 蔗糖 + 0.02% 聚山梨醇酯 80, pH 6.0
[0215] 缓冲液 2	10 mM 组氨酸 + 280 mM 蔗糖 + 0.02% 聚山梨醇酯 80, pH 6.0 + 1 mM 甲硫氨酸
缓冲液 3	10 mM 乙酸钠 + 280 mM 蔗糖 + 0.02% 聚山梨醇酯 80, pH 5.5
缓冲液 4	10 mM 乙酸钠 + 280 mM 蔗糖 + 0.02% 聚山梨醇酯 80, pH 5.5 + 1 mM 甲硫氨酸

[0216] 使配制样品经受数种储存条件(限定如下)持续多至12周。另外,进行了数项应力测试(stress test):

[0217] • 储存在 $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 下

[0218] • 储存在 $-80^{\circ}\text{C} \pm 10^{\circ}\text{C}$ 下

[0219] • 加速储存条件为 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\%$ 相对湿度(relative humidity, RH)  $\pm 5\%$

[0220] • 在 $40^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/75\%$  RH  $\pm 5\%$ 下热应激

[0221] • 冷冻/解冻循环:将样品完全冷冻至 $-80 \pm 10^{\circ}\text{C}$ 。随后,在使样品在室温(15至 $25^{\circ}\text{C}$ )下完全解冻之后,进行五次冷冻/解冻循环。

[0222] • 搅拌应力:将样品在室温( $15^{\circ}\text{C}$ 至 $25^{\circ}\text{C}$ )下以240rpm搅拌7天。

[0223] • 氧化:样品中掺入 $0.01\%$  (v/v) 过氧化氢( $\text{H}_2\text{O}_2$ )并将其在 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\%$  RH  $\pm 5\%$ 下孵育7天。

[0224] • 光稳定性:在 $25^{\circ}\text{C} \pm 2^{\circ}\text{C}/60\%$  RH  $\pm 5\%$ 下施加 $>1200,000$ 勒克斯小时和 $>200$ 瓦特小时/平方米的近紫外线能量。

[0225] 初始(= $t_0$ )  $5^{\circ}\text{C} \pm 3^{\circ}\text{C}$ 样品用作参考。使用以下分析方法分析样品:

方法	评估
清晰度	外观
颜色	外观
pH	pH
A <sub>280</sub> (UV/VIS)	含量
杂散光	完整性
SE-HPLC	完整性
[0226] 阳离子交换 (CIEX) -HPLC	完整性
毛细管电泳十二烷基硫酸钠 (CE-SDS_ (非还原性)	完整性
CE-SDS (还原性)	完整性
活性测定 - PSMA 结合 ELISA	效力
肽作图	同一性
差示扫描	完整性
液相色谱-质谱 (Liquid chromatography-mass spectrometry, LC-MS) (氧化)	完整性

[0227] 对于-80℃±10℃、5℃±3℃和25℃±2℃的储存温度/60%RH±5%，针对清晰度、颜色、pH、A<sub>280</sub> (UV-VIS)、杂散光、SE-HPLC、CIEX-HPLC、CE-SDS和PSMA结合、差示扫描和肽指纹方面的稳定性随着时间推移的研究的结果高度相当。测量结果表明，该产物在所选缓冲液条件下高度稳定，并且随着时间推移仅观察到轻微影响。

[0228] 在40℃±2℃/75%RH±5%的应力条件下检测到明显的影响，特别是在五周时，能够区分测试的缓冲液和浓度。对在40℃±2℃/75%RH±5%下且5周保存的样品进行的CIEX-HPLC分析表明，在该时间点，对于所有测试的缓冲液和产物浓度，主要变体的含量降至低于60%。与基于乙酸盐的制剂相比，在基于组氨酸的制剂中观察到主要变体百分比的略微较低的降低。

[0229] CE-SDS结果显示，随着时间推移在40℃下储存导致产物的LMW物质略微提高多至5%。对于缓冲液1和3中的10mg/mL样品，这种影响略微更明显。然而，发现抗体非常稳定，即使在40℃±2℃/75%RH±5%的强应力条件下持续5周也是如此。

[0230] 在40℃±2℃/75%RH±5%下，5周时间点的PSMA结合数据显示出缓冲液1和3中10mg/mL样品的EC<sub>50</sub>强提高。在PSMA结合测定中测量的EC<sub>50</sub>的提高与在SE-HPLC分析中观察到的相对HMW物质质量的略微提高(分别从0.3%和0.2%提高至0.6%和0.7%)相关。

[0231] 来自应力测试(冷冻/解冻(五次F/T循环)、光应力、搅拌应力和氧化应力)的结果显示出与温度稳定性研究不同的排序。在温度稳定性研究中，缓冲液3中10mg/mL样品显示出超出其预定分析阈值的最高量的结果，而应力稳定性研究显示，与其他条件相比，缓冲液1中0.5mg/mL样品有超出其预定分析阈值的提高的结果。

[0232] LC-MS分析显示，添加甲硫氨酸(存在于缓冲液2和缓冲液4中)来防止产物氧化是有效的。

[0233] 总之, LV1050-Fc x 5C8var1-Fc在缓冲液2和缓冲液4中配制时最稳定。表8中示出了温度稳定性、应力稳定性和整体稳定性(温度加应力)超出其预定分析阈值的结果的总和的概述。

[0234] 对于最终配方, 选择10mM组氨酸+280mM蔗糖+0.02%聚山梨醇酯80, pH 6.0+1mM甲硫氨酸, 蛋白质浓度为0.5至10mg/mL。

[0235] 表8: 温度稳定性、应力稳定性和整体稳定性(温度加应力)超出其预定分析阈值的结果的总和。

缓冲液	缓冲液 1		缓冲液 2		缓冲液 3		缓冲液 4	
蛋白质浓度 (mg/mL)	0.5	10	0.5	10	0.5	10	0.5	10
温度稳定性	0	2	0	0	1	6	0	0
应力稳定性	11	5	5	4	5	5	5	4
整体稳定性	11	7	5	4	6	11	5	4

## 序列表

<110> LAVA Therapeutics  
 <120> 结合PSMA和 $\gamma$ - $\delta$ T细胞受体的抗体  
 <130> P007  
 <160> 36  
 <170> PatentIn version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 109  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 抗体序列  
 <400> 1

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

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr  
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

[0001]

Ser Thr Ile Asn Pro Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asp  
 85 90 95

Gly Tyr Gly Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Ser Ser  
 100 105

<210> 2  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 抗体序列

<400> 2

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr  
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Thr Ile Asn Pro Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asp  
85 90 95

Gly Tyr Gly Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

<210> 3

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 3

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

[0002]

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr  
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Thr Ile Asn Pro Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asp  
85 90 95

Gly Tyr Gly Tyr Arg Gly Leu Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

<210> 4

<211> 130

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 4

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

[0003] Ser Ser  
130

<210> 5  
 <211> 130  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 抗体序列  
 <400> 5

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

Ala Ala Gln Phe Ser Gly Ala Asp Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Gly Ile  
 100 105 110

Arg Gly Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val  
 115 120 125

Ser Ser  
 130

<210> 6  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 接头序列

<400> 6

Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5

<210> 7  
 <211> 246  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

[0004] <220>  
 <223> 抗体序列

<400> 7

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

Ser Leu Thr Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr  
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Thr Ile Asn Pro Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Glu Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asp  
 85 90 95

Gly Tyr Gly Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly  
 100 105 110

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

Gln Ala Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro  
 130 135 140

Phe Ser Asn Tyr Ala Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu  
 145 150 155 160

Arg Glu Phe Val Ala Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr  
 165 170 175

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

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

Ile Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Phe Ser Gly Ala Asp Tyr Gly Phe Gly  
 210 215 220

Arg Leu Gly Ile Arg Gly Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 225 230 235 240

Gln Val Thr Val Ser Ser  
 245

[0005]

<210> 8  
 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 抗体序列

<400> 8

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr  
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Thr Ile Asn Pro Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asp  
 85 90 95

Gly Tyr Gly Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly  
 100 105 110

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

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro  
 130 135 140

Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu  
 145 150 155 160

Arg Glu Phe Val Ser Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr  
 165 170 175

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

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

Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Phe Ser Gly Ala Asp Tyr Gly Phe Gly  
 210 215 220

Arg Leu Gly Ile Arg Gly Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
 225 230 235 240

[0006]

Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Pro Glu Ala  
 245 250

<210> 9  
 <211> 253  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 抗体序列

<400> 9

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr  
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Thr Ile Asn Pro Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asp  
85 90 95

Gly Tyr Gly Tyr Arg Gly Leu Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly  
100 105 110

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

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro  
130 135 140

Phe Ser Asn Tyr Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu  
145 150 155 160

Arg Glu Phe Val Ser Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr  
165 170 175

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

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

[0007] Val Tyr Tyr Cys Ala Ala Gln Phe Ser Gly Ala Asp Tyr Gly Phe Gly  
210 215 220

Arg Leu Gly Ile Arg Gly Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr  
225 230 235 240

Gln Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Glu Pro Glu Ala  
245 250

<210> 10  
<211> 14  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 抗体序列

<400> 10

Ala Ala Ala Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro  
1 5 10

<210> 11  
<211> 216  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 抗体序列

<400> 11

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys  
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val  
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr  
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu  
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His  
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys  
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln  
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu  
115 120 125

[0008]

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro  
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn  
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu  
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val  
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln  
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
210 215

<210> 12

<211> 230

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 12

Ala Ala Ala Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
1 5 10 15

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
115 120 125

[0009] Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
165 170 175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser  
180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
225 230

<210> 13  
<211> 230  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 抗体序列

<400> 13

Ala Ala Ala Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro  
1 5 10 15

Glu Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys  
20 25 30

Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val  
35 40 45

Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp  
50 55 60

Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr  
65 70 75 80

Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp  
85 90 95

Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu  
100 105 110

Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg  
115 120 125

[0010]

Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys  
130 135 140

Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp  
145 150 155 160

Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys  
165 170 175

Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser  
180 185 190

Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser  
195 200 205

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser  
210 215 220

Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
225 230

<210> 14

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 14

Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr Ser Met His  
1 5 10

<210> 15

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 15

Thr Ile Asn Pro Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys Gly  
1 5 10 15

<210> 16

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 16

[0011] Asp Gly Tyr Gly Tyr  
1 5

<210> 17

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 17

Asn Tyr Ala Met Ser  
1 5

<210> 18

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 18

Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 19  
 <211> 21  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 抗体序列

<400> 19

Gln Phe Ser Gly Ala Asp Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Gly Ile Arg Gly  
 1 5 10 15

Tyr Glu Tyr Asp Tyr  
 20

<210> 20  
 <211> 126  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 抗体序列

<400> 20

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

[0012] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Gly Met Gly Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Lys Arg Glu Phe Val  
 35 40 45

Ala Gly Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Val Tyr  
 65 70 75 80

Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Pro Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95

Ala Ala Val Phe Ser Gly Ala Glu Thr Ala Tyr Tyr Pro Ser Asp Asp  
 100 105 110

Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser  
 115 120 125

<210> 21  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 抗体序列

<400> 21

Gly Arg Pro Phe Ser Asn Tyr Gly Met Gly  
1 5 10

<210> 22

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 22

Gly Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
1 5 10 15

Gly

<210> 23

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 抗体序列

<400> 23

[0013]

Val Phe Ser Gly Ala Glu Thr Ala Tyr Tyr Pro Ser Asp Asp Tyr Asp  
1 5 10 15

Tyr

<210> 24

<211> 750

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 24

Met Trp Asn Leu Leu His Glu Thr Asp Ser Ala Val Ala Thr Ala Arg  
1 5 10 15

Arg Pro Arg Trp Leu Cys Ala Gly Ala Leu Val Leu Ala Gly Gly Phe  
20 25 30

Phe Leu Leu Gly Phe Leu Phe Gly Trp Phe Ile Lys Ser Ser Asn Glu  
35 40 45

Ala Thr Asn Ile Thr Pro Lys His Asn Met Lys Ala Phe Leu Asp Glu  
50 55 60

Leu Lys Ala Glu Asn Ile Lys Lys Phe Leu Tyr Asn Phe Thr Gln Ile  
65 70 75 80

Pro His Leu Ala Gly Thr Glu Gln Asn Phe Gln Leu Ala Lys Gln Ile  
 85 90 95

Gln Ser Gln Trp Lys Glu Phe Gly Leu Asp Ser Val Glu Leu Ala His  
 100 105 110

Tyr Asp Val Leu Leu Ser Tyr Pro Asn Lys Thr His Pro Asn Tyr Ile  
 115 120 125

Ser Ile Ile Asn Glu Asp Gly Asn Glu Ile Phe Asn Thr Ser Leu Phe  
 130 135 140

Glu Pro Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile Val Pro Pro  
 145 150 155 160

Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp Leu Val Tyr  
 165 170 175

Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met  
 180 185 190

Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val  
 195 200 205

[0014] Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly Ala Lys Gly  
 210 215 220

Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro Gly Val Lys  
 225 230 235 240

Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val Gln Arg Gly  
 245 250 255

Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr Pro Gly Tyr  
 260 265 270

Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu Ala Val Gly  
 275 280 285

Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp Ala Gln Lys  
 290 295 300

Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg  
 305 310 315 320

Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe Thr Gly Asn  
 325 330 335

Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr Asn Glu Val  
 340 345 350

Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala Val Glu Pro  
 355 360 365

Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp Val Phe Gly  
 370 375 380

Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu Ile Val Arg  
 385 390 395 400

Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg Arg Thr Ile  
 405 410 415

Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu Gly Ser Thr  
 420 425 430

Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg Gly Val Ala  
 435 440 445

Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr Leu Arg Val  
 450 455 460

Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu Thr Lys Glu  
 465 470 475 480

[0015] Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu Tyr Glu Ser  
 485 490 495

Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met Pro Arg Ile  
 500 505 510

Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe Gln Arg Leu  
 515 520 525

Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp Glu Thr Asn  
 530 535 540

Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu Thr Tyr Glu  
 545 550 555 560

Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His Leu Thr Val  
 565 570 575

Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn Ser Ile Val  
 580 585 590

Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg Lys Tyr Ala  
 595 600 605

Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr  
 610 615 620

Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys Asn Phe Thr  
 625 630 635 640  
 Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe Asp Lys Ser  
 645 650 655  
 Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met Phe Leu Glu  
 660 665 670  
 Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro Phe Tyr Arg  
 675 680 685  
 His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala Gly Glu Ser  
 690 695 700  
 Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser Lys Val Asp  
 705 710 715 720  
 Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala  
 725 730 735  
 Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val Ala  
 740 745 750

[0016]

<210> 25  
 <211> 360  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 抗体序列  
 <400> 25  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala Gln Phe Ser Gly Ala Asp Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Gly Ile

100	105	110
Arg Gly Tyr 115	Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr 120	Gln Val Thr Val 125
Ser Ser Ala Ala Ala 130	Ser Asp Lys Thr His Thr Cys 135	Pro Pro Cys Pro 140
Ala Pro Glu Phe Glu 145	Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys 150	155 160
Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr 165	Pro Glu Val Thr Cys Val 170	175
Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr 180	185	190
Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu 195	200	205
Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His 210	215	220
Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys 225	230	235 240
[0017]		
Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln 245	250	255
Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu 260	265	270
Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro 275	280	285
Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn 290	295	300
Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu 305	310	315 320
Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val 325	330	335
Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln 340	345	350
Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly 355	360	

&lt;210&gt; 26

<211> 341  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 抗体序列

<400> 26

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr  
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Thr Ile Asn Pro Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asp  
 85 90 95

[0018] Gly Tyr Gly Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala  
 100 105 110

Ala Ala Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
 115 120 125

Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
 130 135 140

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
 145 150 155 160

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
 165 170 175

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
 180 185 190

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
 195 200 205

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
 210 215 220

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
 225 230 235 240

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
 245 250 255  
 Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 260 265 270  
 Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 275 280 285  
 Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys  
 290 295 300  
 Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 305 310 315 320  
 Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 325 330 335  
 Ser Leu Ser Pro Gly  
 340  
 <210> 27  
 <211> 361  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列  
 [0019] <220>  
 <223> 抗体序列  
 <400> 27  
 Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Ser Val Gln Pro Gly Gly  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro Phe Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Ala Met Ser Trp Phe Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Phe Val  
 35 40 45  
 Ser Ala Ile Ser Trp Ser Gly Gly Ser Thr Ser Tyr Ala Asp Ser Val  
 50 55 60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
 65 70 75 80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
 85 90 95  
 Ala Ala Gln Phe Ser Gly Ala Asp Tyr Gly Phe Gly Arg Leu Gly Ile  
 100 105 110  
 Arg Gly Tyr Glu Tyr Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 抗体序列

&lt;400&gt; 28

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr  
20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45

Ser Thr Ile Asn Pro Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asp  
85 90 95

Gly Tyr Gly Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Ala  
100 105 110

[0021] Ala Ala Ser Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu  
115 120 125

Phe Glu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp  
130 135 140

Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp  
145 150 155 160

Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly  
165 170 175

Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn  
180 185 190

Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp  
195 200 205

Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro  
210 215 220

Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu  
225 230 235 240

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn  
245 250 255

Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile  
 260 265 270

Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr  
 275 280 285

Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys  
 290 295 300

Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys  
 305 310 315 320

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu  
 325 330 335

Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
 340

<210> 29  
 <211> 246  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 抗体序列

<400> 29

[0022]

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Arg Phe Met Ile Ser Glu Tyr  
 20 25 30

Ser Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
 35 40 45

Ser Thr Ile Asn Pro Ala Gly Thr Thr Asp Tyr Ala Asp Ser Val Lys  
 50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr Leu  
 65 70 75 80

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asp  
 85 90 95

Gly Tyr Gly Tyr Arg Gly Gln Gly Thr Gln Val Thr Val Ser Ser Gly  
 100 105 110

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

Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Arg Pro

	130		135			140														
	Phe	Ser	Asn	Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Phe	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Glu				
	145					150					155					160				
	Arg	Glu	Phe	Val	Ser	Ala	Ile	Ser	Trp	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Ser	Tyr				
					165					170					175					
	Ala	Asp	Ser	Val	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Ser	Lys				
				180					185					190						
	Asn	Thr	Leu	Tyr	Leu	Gln	Met	Asn	Ser	Leu	Arg	Ala	Glu	Asp	Thr	Ala				
			195					200					205							
	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Ala	Gln	Phe	Ser	Gly	Ala	Asp	Tyr	Gly	Phe	Gly				
		210					215					220								
	Arg	Leu	Gly	Ile	Arg	Gly	Tyr	Glu	Tyr	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr				
	225					230					235					240				
	Gln	Val	Thr	Val	Ser	Ser														
					245															
	<210>	30																		
	<211>	737																		
[0023]	<212>	PRT																		
	<213>	智人																		
	<400>	30																		
	Met	Ala	Arg	Pro	Leu	Cys	Thr	Leu	Leu	Leu	Leu	Met	Ala	Thr	Leu	Ala				
	1				5					10					15					
	Gly	Ala	Leu	Ala	Gly	Ser	His	His	His	His	His	His	Gly	Ser	Lys	Ser				
				20					25					30						
	Ser	Asn	Glu	Ala	Thr	Asn	Ile	Thr	Pro	Lys	His	Asn	Met	Lys	Ala	Phe				
			35					40					45							
	Leu	Asp	Glu	Leu	Lys	Ala	Glu	Asn	Ile	Lys	Lys	Phe	Leu	Tyr	Asn	Phe				
		50					55					60								
	Thr	Gln	Ile	Pro	His	Leu	Ala	Gly	Thr	Glu	Gln	Asn	Phe	Gln	Leu	Ala				
	65					70					75					80				
	Lys	Gln	Ile	Gln	Ser	Gln	Trp	Lys	Glu	Phe	Gly	Leu	Asp	Ser	Val	Glu				
					85					90					95					
	Leu	Ala	His	Tyr	Asp	Val	Leu	Leu	Ser	Tyr	Pro	Asn	Lys	Thr	His	Pro				
				100					105					110						
	Asn	Tyr	Ile	Ser	Ile	Ile	Asn	Glu	Asp	Gly	Asn	Glu	Ile	Phe	Asn	Thr				
			115					120					125							

Ser Leu Phe Glu Pro Pro Pro Gly Tyr Glu Asn Val Ser Asp Ile  
 130 135 140

Val Pro Pro Phe Ser Ala Phe Ser Pro Gln Gly Met Pro Glu Gly Asp  
 145 150 155 160

Leu Val Tyr Val Asn Tyr Ala Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu  
 165 170 175

Arg Asp Met Lys Ile Asn Cys Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr  
 180 185 190

Gly Lys Val Phe Arg Gly Asn Lys Val Lys Asn Ala Gln Leu Ala Gly  
 195 200 205

Ala Lys Gly Val Ile Leu Tyr Ser Asp Pro Ala Asp Tyr Phe Ala Pro  
 210 215 220

Gly Val Lys Ser Tyr Pro Asp Gly Trp Asn Leu Pro Gly Gly Gly Val  
 225 230 235 240

Gln Arg Gly Asn Ile Leu Asn Leu Asn Gly Ala Gly Asp Pro Leu Thr  
 245 250 255

[0024] Pro Gly Tyr Pro Ala Asn Glu Tyr Ala Tyr Arg Arg Gly Ile Ala Glu  
 260 265 270

Ala Val Gly Leu Pro Ser Ile Pro Val His Pro Ile Gly Tyr Tyr Asp  
 275 280 285

Ala Gln Lys Leu Leu Glu Lys Met Gly Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser  
 290 295 300

Ser Trp Arg Gly Ser Leu Lys Val Pro Tyr Asn Val Gly Pro Gly Phe  
 305 310 315 320

Thr Gly Asn Phe Ser Thr Gln Lys Val Lys Met His Ile His Ser Thr  
 325 330 335

Asn Glu Val Thr Arg Ile Tyr Asn Val Ile Gly Thr Leu Arg Gly Ala  
 340 345 350

Val Glu Pro Asp Arg Tyr Val Ile Leu Gly Gly His Arg Asp Ser Trp  
 355 360 365

Val Phe Gly Gly Ile Asp Pro Gln Ser Gly Ala Ala Val Val His Glu  
 370 375 380

Ile Val Arg Ser Phe Gly Thr Leu Lys Lys Glu Gly Trp Arg Pro Arg  
 385 390 395 400

Arg Thr Ile Leu Phe Ala Ser Trp Asp Ala Glu Glu Phe Gly Leu Leu  
 405 410 415

Gly Ser Thr Glu Trp Ala Glu Glu Asn Ser Arg Leu Leu Gln Glu Arg  
 420 425 430

Gly Val Ala Tyr Ile Asn Ala Asp Ser Ser Ile Glu Gly Asn Tyr Thr  
 435 440 445

Leu Arg Val Asp Cys Thr Pro Leu Met Tyr Ser Leu Val His Asn Leu  
 450 455 460

Thr Lys Glu Leu Lys Ser Pro Asp Glu Gly Phe Glu Gly Lys Ser Leu  
 465 470 475 480

Tyr Glu Ser Trp Thr Lys Lys Ser Pro Ser Pro Glu Phe Ser Gly Met  
 485 490 495

Pro Arg Ile Ser Lys Leu Gly Ser Gly Asn Asp Phe Glu Val Phe Phe  
 500 505 510

Gln Arg Leu Gly Ile Ala Ser Gly Arg Ala Arg Tyr Thr Lys Asn Trp  
 515 520 525

[0025] Glu Thr Asn Lys Phe Ser Gly Tyr Pro Leu Tyr His Ser Val Tyr Glu  
 530 535 540

Thr Tyr Glu Leu Val Glu Lys Phe Tyr Asp Pro Met Phe Lys Tyr His  
 545 550 555 560

Leu Thr Val Ala Gln Val Arg Gly Gly Met Val Phe Glu Leu Ala Asn  
 565 570 575

Ser Ile Val Leu Pro Phe Asp Cys Arg Asp Tyr Ala Val Val Leu Arg  
 580 585 590

Lys Tyr Ala Asp Lys Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu  
 595 600 605

Met Lys Thr Tyr Ser Val Ser Phe Asp Ser Leu Phe Ser Ala Val Lys  
 610 615 620

Asn Phe Thr Glu Ile Ala Ser Lys Phe Ser Glu Arg Leu Gln Asp Phe  
 625 630 635 640

Asp Lys Ser Asn Pro Ile Val Leu Arg Met Met Asn Asp Gln Leu Met  
 645 650 655

Phe Leu Glu Arg Ala Phe Ile Asp Pro Leu Gly Leu Pro Asp Arg Pro  
 660 665 670

Phe Tyr Arg His Val Ile Tyr Ala Pro Ser Ser His Asn Lys Tyr Ala  
675 680 685

Gly Glu Ser Phe Pro Gly Ile Tyr Asp Ala Leu Phe Asp Ile Glu Ser  
690 695 700

Lys Val Asp Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr  
705 710 715 720

Val Ala Ala Phe Thr Val Gln Ala Ala Ala Glu Thr Leu Ser Glu Val  
725 730 735

Ala

<210> 31  
<211> 503  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223>  $\gamma$   $\delta$  TCR 构建体

<400> 31

[0026] Met Gln Arg Ile Ser Ser Leu Ile His Leu Ser Leu Phe Trp Ala Gly  
1 5 10 15

Val Met Ser Ala Ile Glu Leu Val Pro Glu His Gln Thr Val Pro Val  
20 25 30

Ser Ile Gly Val Pro Ala Thr Leu Arg Cys Ser Met Lys Gly Glu Ala  
35 40 45

Ile Gly Asn Tyr Tyr Ile Asn Trp Tyr Arg Lys Thr Gln Gly Asn Thr  
50 55 60

Met Thr Phe Ile Tyr Arg Glu Lys Asp Ile Tyr Gly Pro Gly Phe Lys  
65 70 75 80

Asp Asn Phe Gln Gly Asp Ile Asp Ile Ala Lys Asn Leu Ala Val Leu  
85 90 95

Lys Ile Leu Ala Pro Ser Glu Arg Asp Glu Gly Ser Tyr Tyr Cys Ala  
100 105 110

Cys Asp Thr Leu Gly Met Gly Gly Glu Tyr Thr Asp Lys Leu Ile Phe  
115 120 125

Gly Lys Gly Thr Arg Val Thr Val Glu Pro Arg Ser Gln Pro His Thr  
130 135 140

Lys Pro Ser Val Phe Val Met Lys Asn Gly Thr Asn Val Ala Cys Leu  
 145 150 155 160

Val Lys Glu Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Arg Ile Asn Leu Val Ser Ser  
 165 170 175

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

Lys Tyr Asn Ala Val Lys Leu Gly Lys Tyr Glu Asp Ser Asn Ser Val  
 195 200 205

Thr Cys Ser Val Gln His Asp Asn Lys Thr Val His Ser Thr Asp Phe  
 210 215 220

Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu  
 225 230 235 240

Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val  
 245 250 255

His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr Ala Ala Ala Ser Asp  
 260 265 270

[0027] Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly  
 275 280 285

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile  
 290 295 300

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu  
 305 310 315 320

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His  
 325 330 335

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg  
 340 345 350

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys  
 355 360 365

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu  
 370 375 380

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr  
 385 390 395 400

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu  
 405 410 415

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp  
 420 425 430

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val  
 435 440 445

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp  
 450 455 460

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His  
 465 470 475 480

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro  
 485 490 495

Gly His His His His His His  
 500

<210> 32  
 <211> 517  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223>  $\gamma$   $\delta$  TCR 构建体

<400> 32

[0028] Met Leu Ser Leu Leu His Ala Ser Thr Leu Ala Val Leu Gly Ala Leu  
 1 5 10 15

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

Lys Thr Leu Ser Lys Thr Ala Arg Leu Glu Cys Val Val Ser Gly Ile  
 35 40 45

Thr Ile Ser Ala Thr Ser Val Tyr Trp Tyr Arg Glu Arg Pro Gly Glu  
 50 55 60

Val Ile Gln Phe Leu Val Ser Ile Ser Tyr Asp Gly Thr Val Arg Lys  
 65 70 75 80

Glu Ser Gly Ile Pro Ser Gly Lys Phe Glu Val Asp Arg Ile Pro Glu  
 85 90 95

Thr Ser Thr Ser Thr Leu Thr Ile His Asn Val Glu Lys Gln Asp Ile  
 100 105 110

Ala Thr Tyr Tyr Cys Ala Leu Trp Glu Ala Gln Gln Glu Leu Gly Lys  
 115 120 125

Lys Ile Lys Val Phe Gly Pro Gly Thr Lys Leu Ile Ile Thr Asp Lys  
 130 135 140

Gln Leu Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu Pro Ser  
 145 150 155 160

Ile Ala Glu Thr Lys Leu Gln Lys Ala Gly Thr Tyr Leu Cys Leu Leu  
 165 170 175

Glu Lys Phe Phe Pro Asp Val Ile Lys Ile His Trp Glu Glu Lys Lys  
 180 185 190

Ser Asn Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys Thr Asn  
 195 200 205

Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Lys Ser Leu  
 210 215 220

Asp Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys Asn Gly  
 225 230 235 240

Val Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile Thr  
 245 250 255

Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu  
 260 265 270

[0029] Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Ala Ala Ala Ser Asp Lys Thr His  
 275 280 285

Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val  
 290 295 300

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr  
 305 310 315 320

Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu  
 325 330 335

Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys  
 340 345 350

Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser  
 355 360 365

Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys  
 370 375 380

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile  
 385 390 395 400

Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro  
 405 410 415

Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu  
420 425 430

Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn  
435 440 445

Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser  
450 455 460

Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg  
465 470 475 480

Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu  
485 490 495

His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Ala Ala  
500 505 510

Ala Glu Pro Glu Ala  
515

<210> 33  
<211> 31  
<212> PRT  
<213> 智人

[0030]

<400> 33

Arg Thr Glu Asp Phe Phe Lys Leu Glu Arg Asp Met Lys Ile Asn Cys  
1 5 10 15

Ser Gly Lys Ile Val Ile Ala Arg Tyr Gly Lys Val Phe Arg Gly  
20 25 30

<210> 34  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 34

Gly Ser Ala Pro Pro Asp Ser Ser Trp Arg Gly Ser Leu Lys Val Pro  
1 5 10 15

Tyr Asn Val Gly Pro  
20

<210> 35  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 35

Ile Tyr Ser Ile Ser Met Lys His Pro Gln Glu Met Lys Thr Tyr Ser

1 5 10 15

Val Ser Phe Asp Ser  
20

[0031] <210> 36  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 36

Pro Ser Lys Ala Trp Gly Glu Val Lys Arg Gln Ile Tyr Val Ala Ala  
1 5 10 15

Phe Thr Val Gln Ala  
20

LV1044	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYAESVKGRFTISRDNAKNTLLIQMNSLKPEDTAVYYCDG:GYRGGGTQVTYSS
LV1050	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLLIQMNSLRAREDVAVYYCDG:GYRGGGTQVTYSS
LV1051	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASRFMISEYSMHWVRQAPGKGLEWVSTINPAGTTDYADSVKGRFTISRDNAKNTLLIQMNSLRAREDVAVYYCDG:GYRGGGTQVTYSS

图1

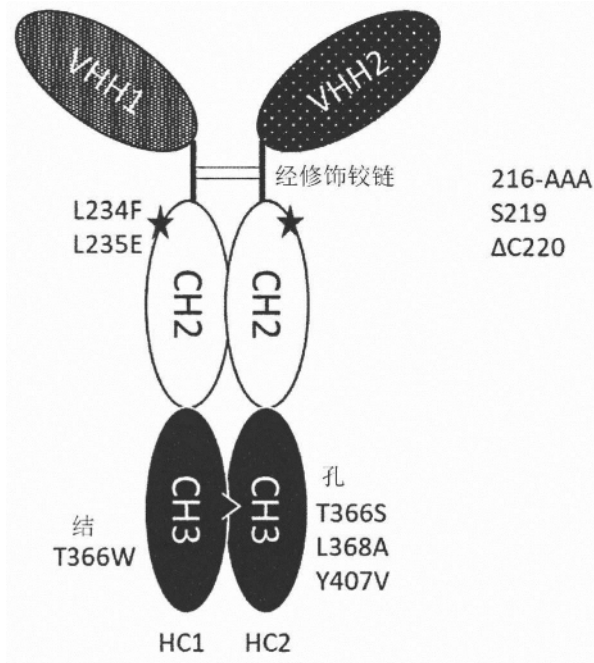


图2

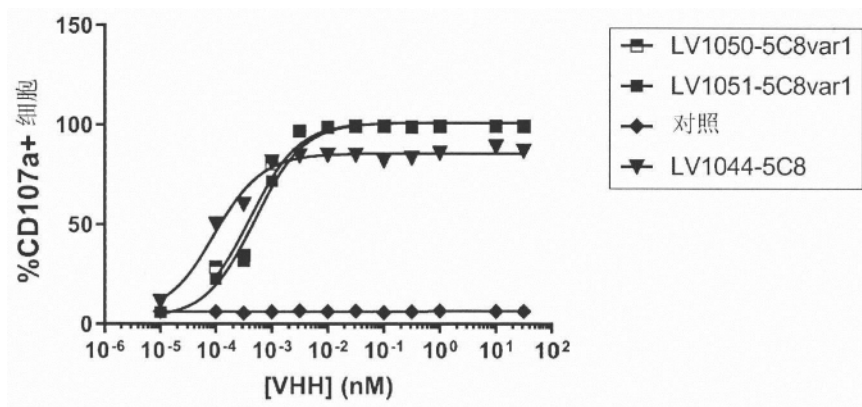


图3A

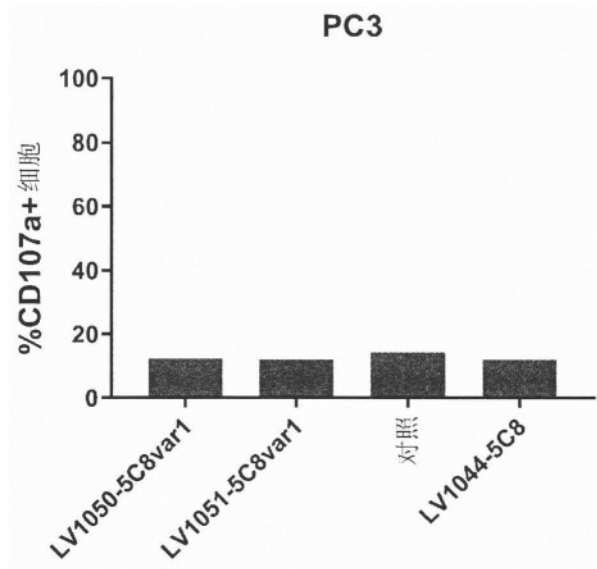


图3B

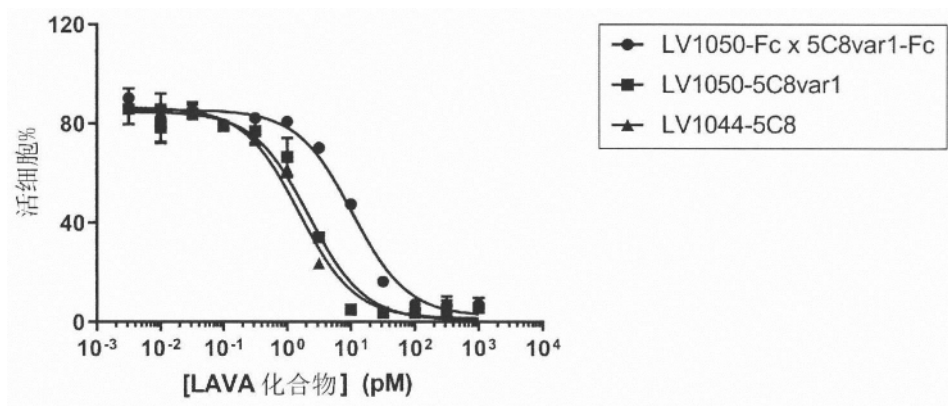


图4

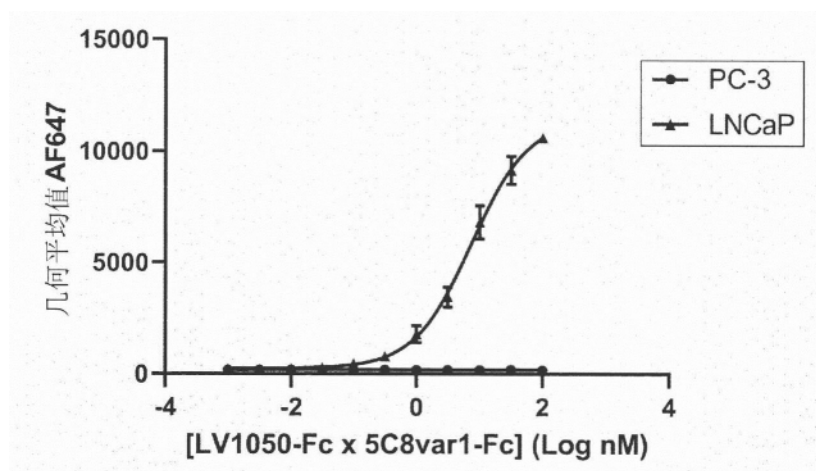


图5A

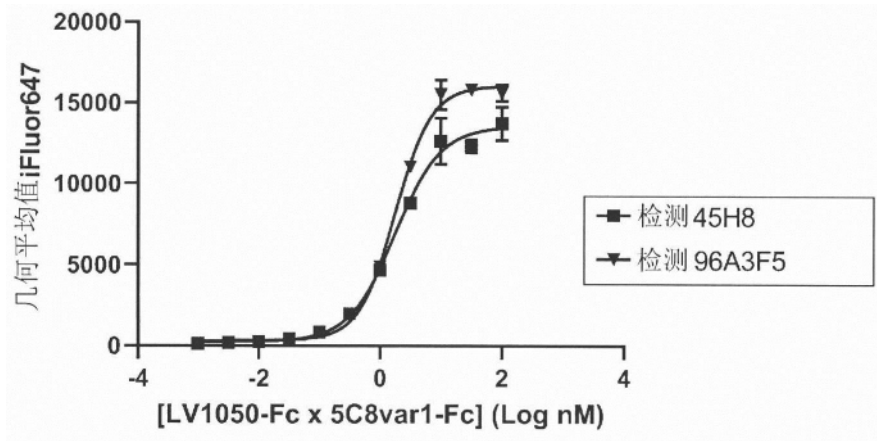


图5B

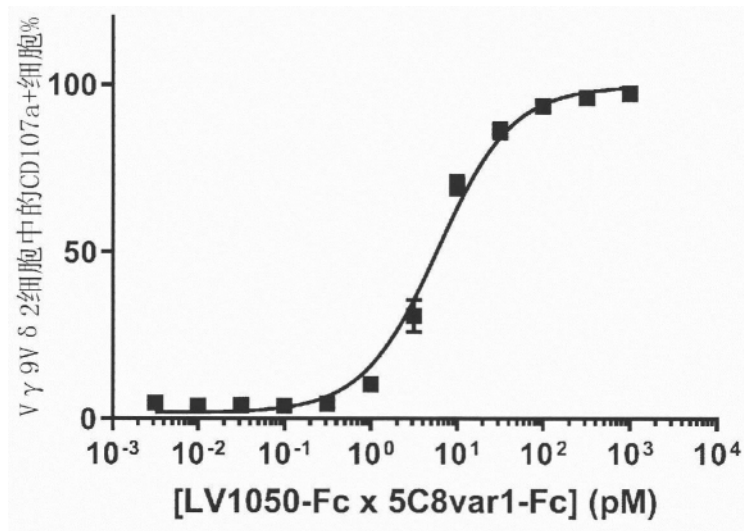


图6A

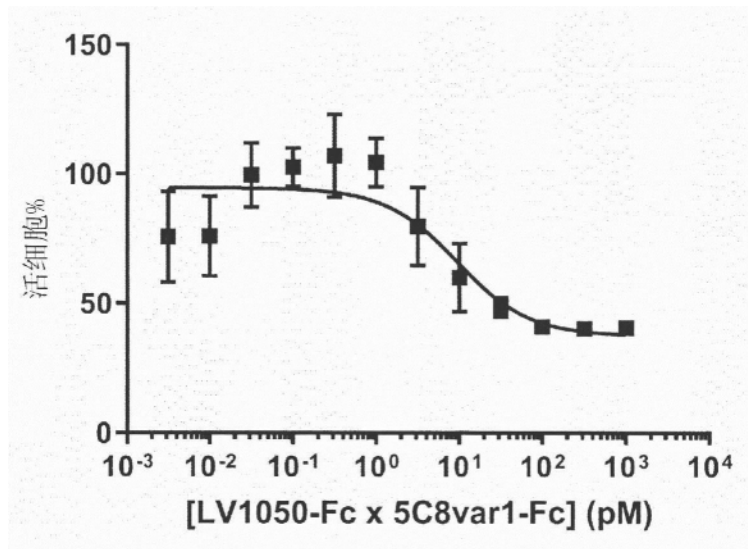


图6B

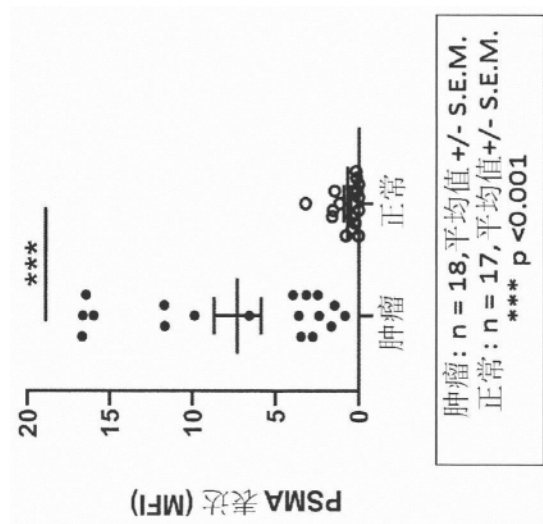


图7A

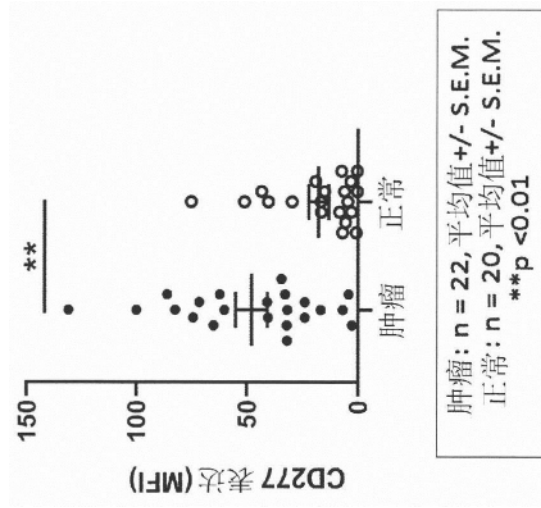


图7B

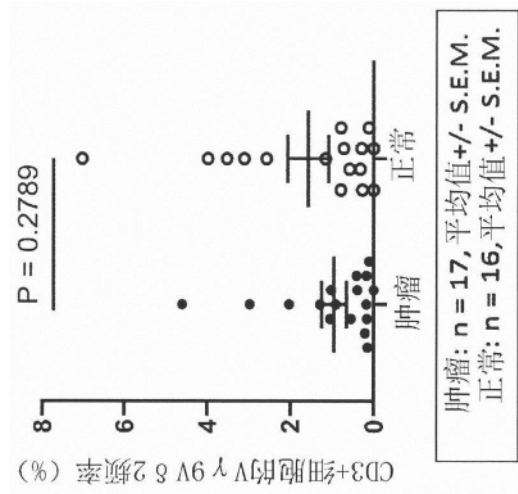


图7C

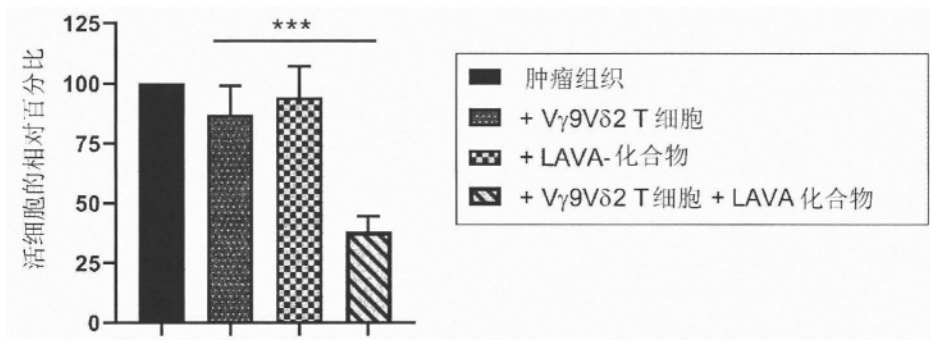


图8A

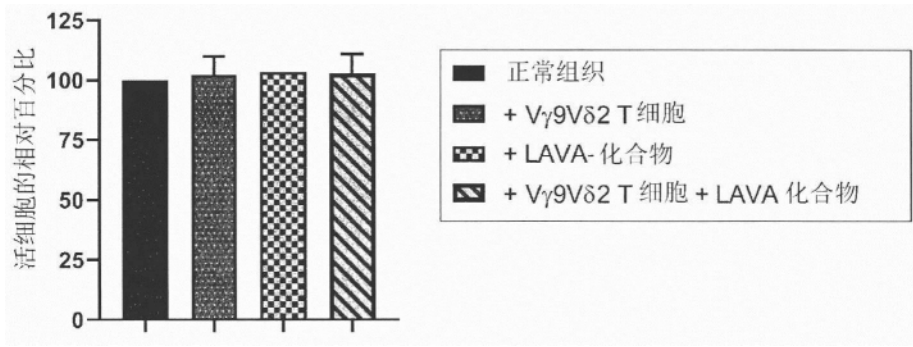


图8B

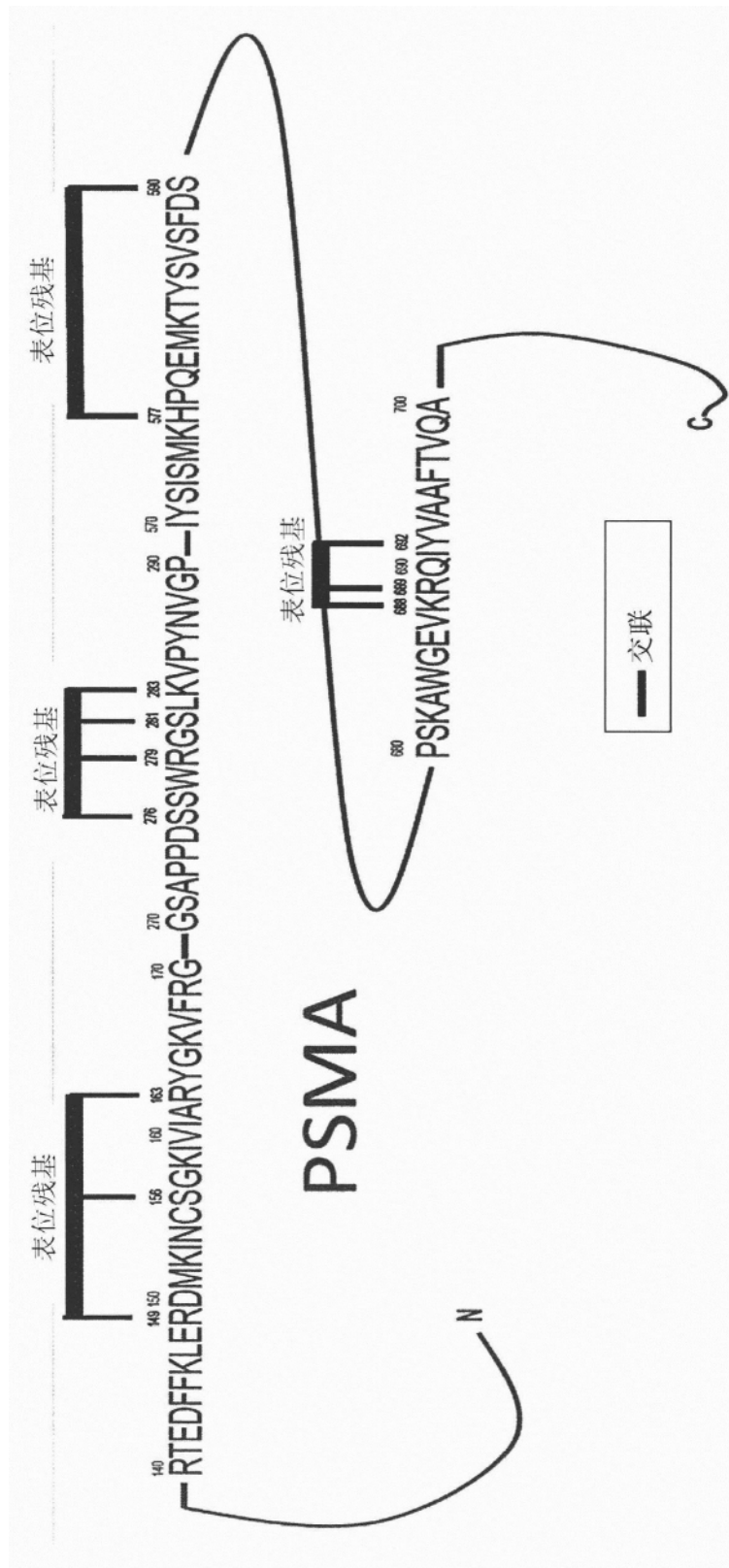


图9

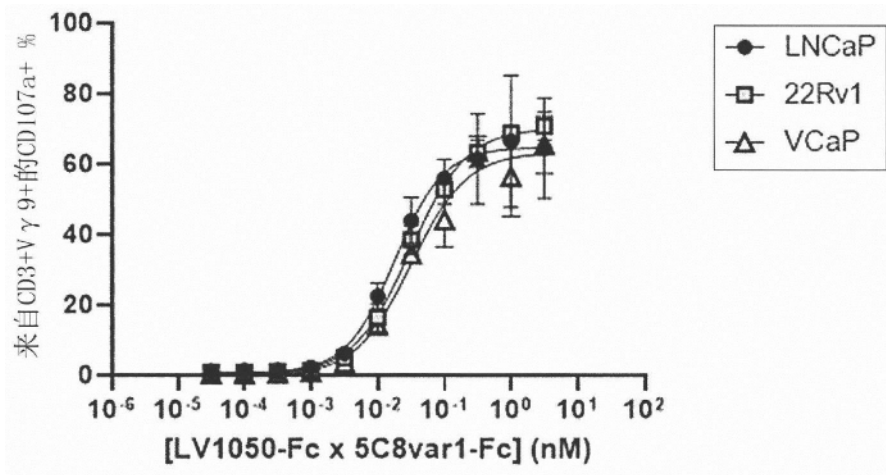


图10

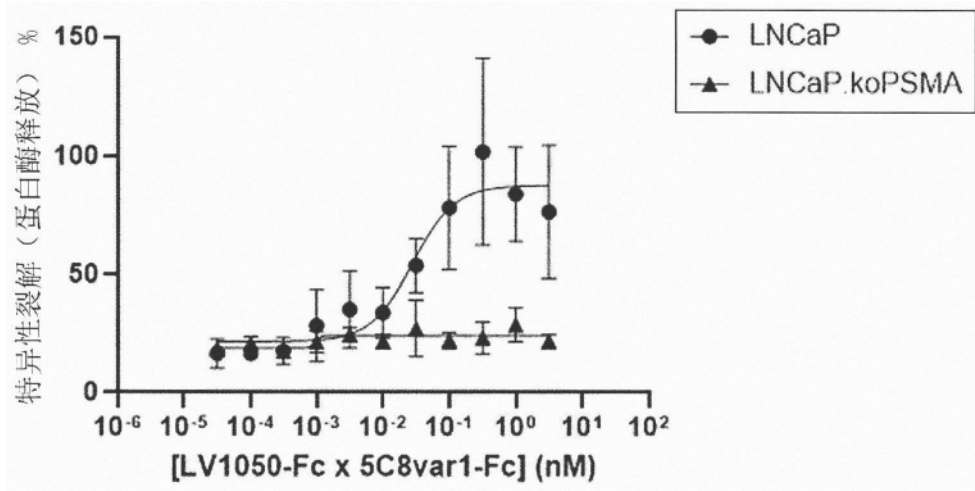


图11A

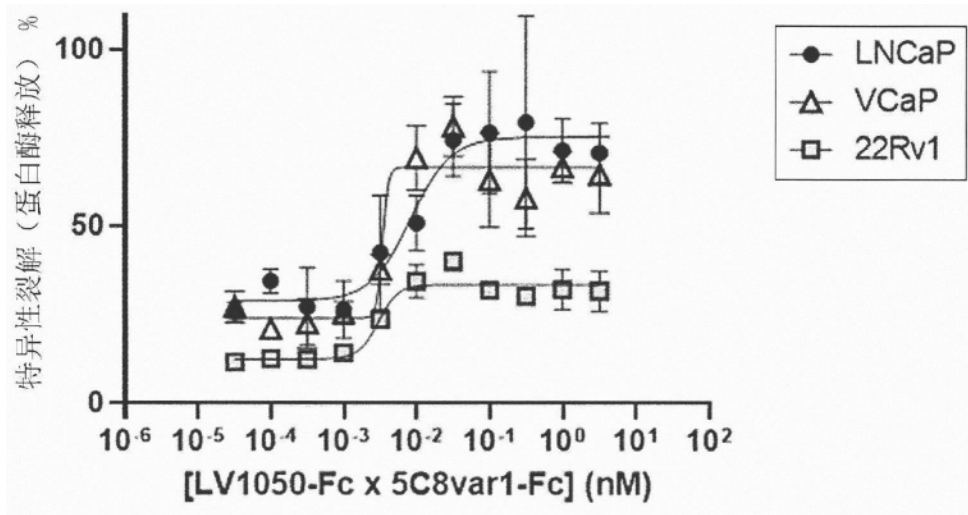


图11B

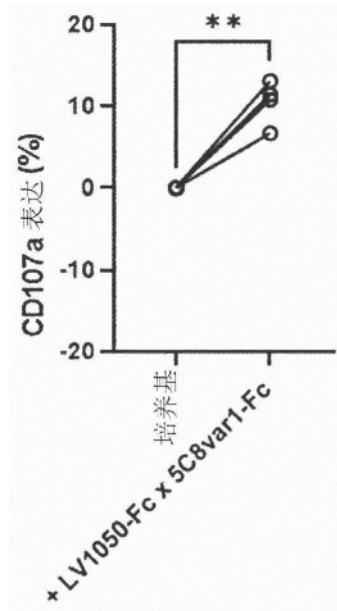


图12A

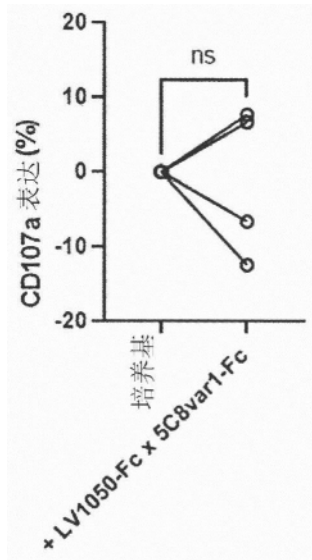


图12B

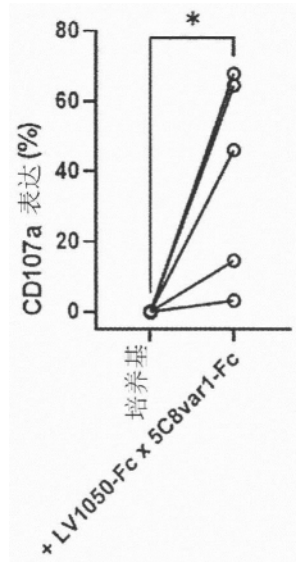


图13A

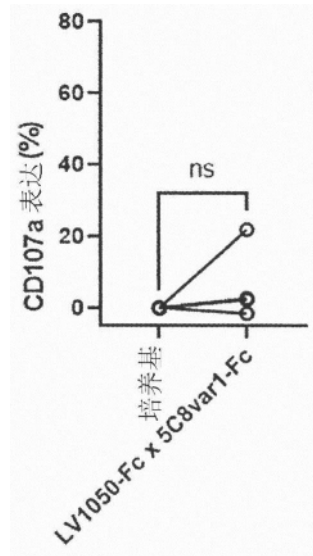


图13B

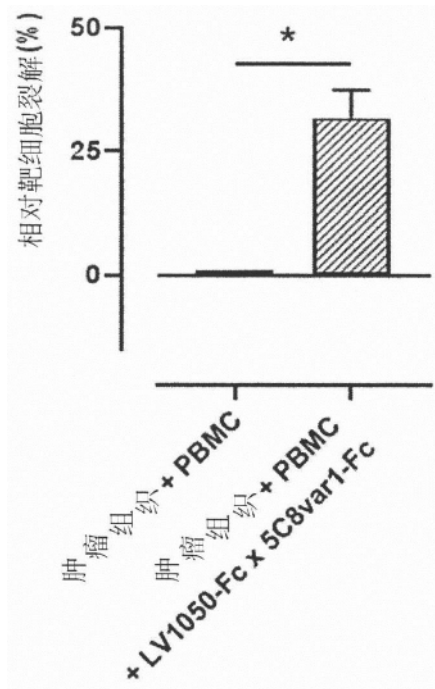


图14A

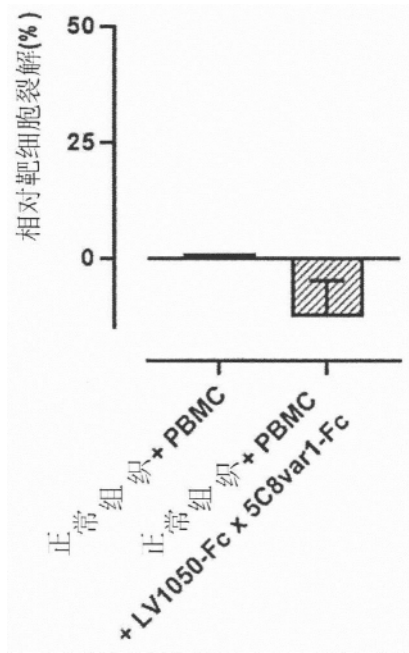


图14B

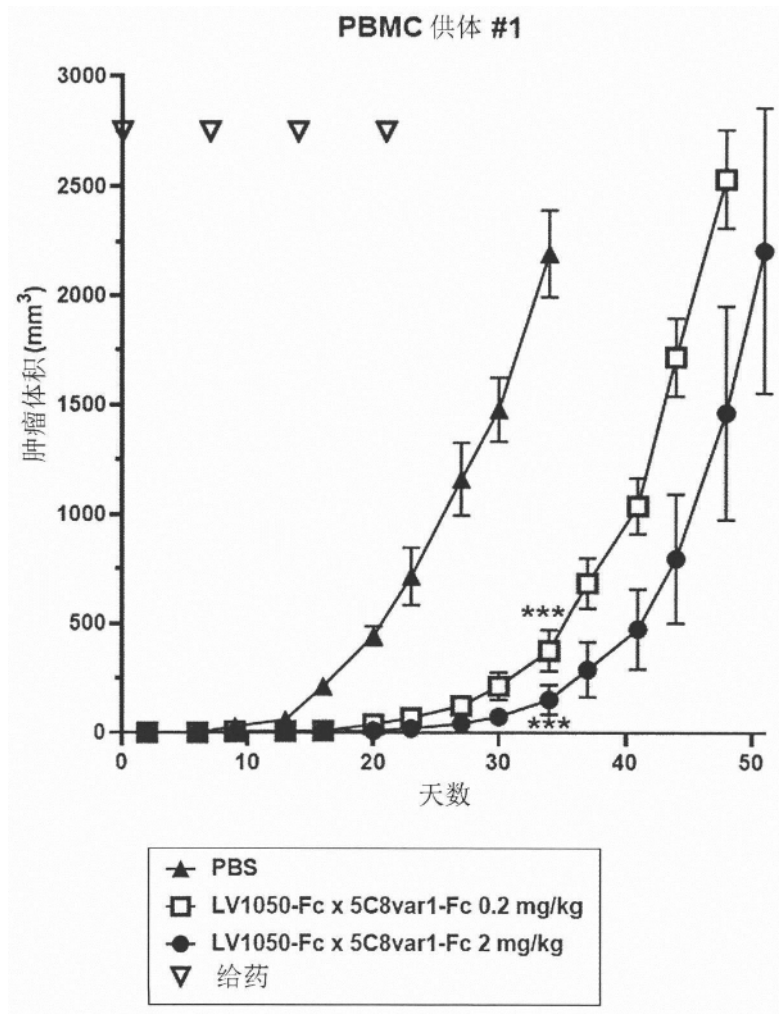


图15A

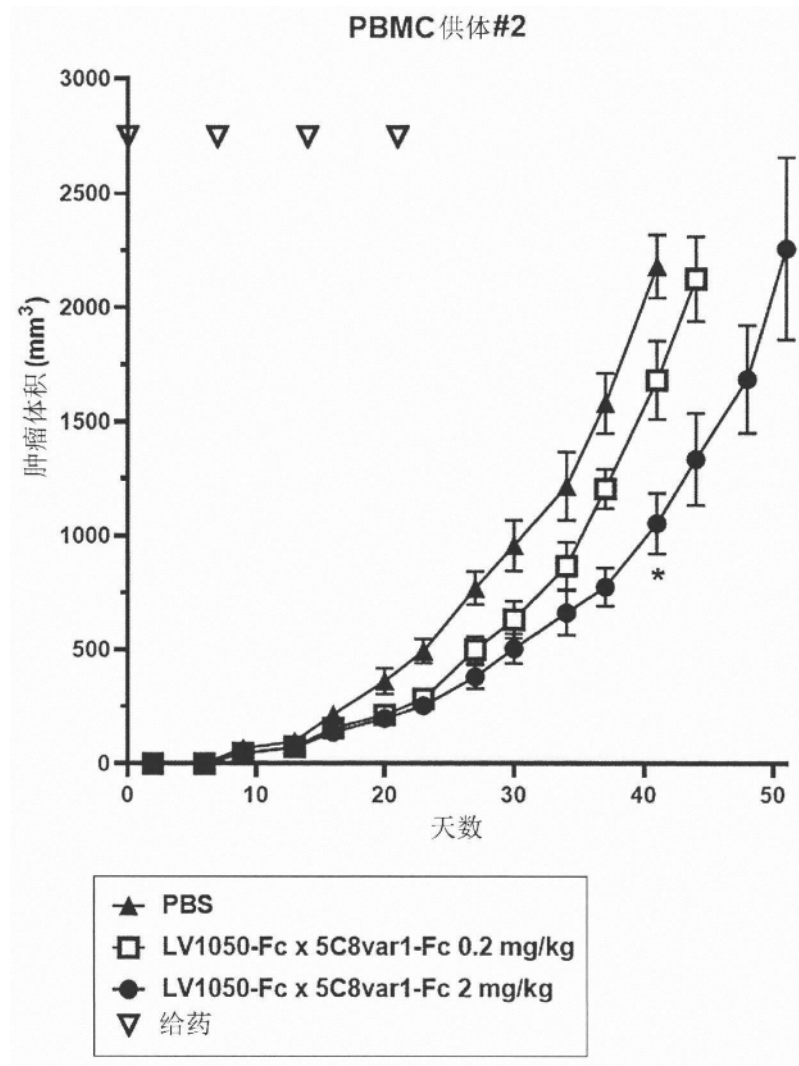


图15B

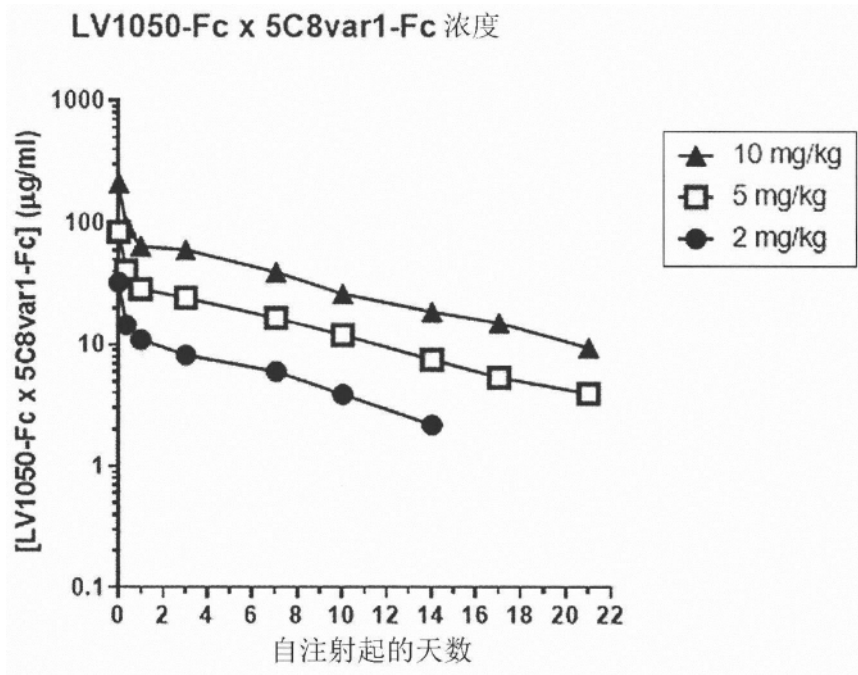


图16A

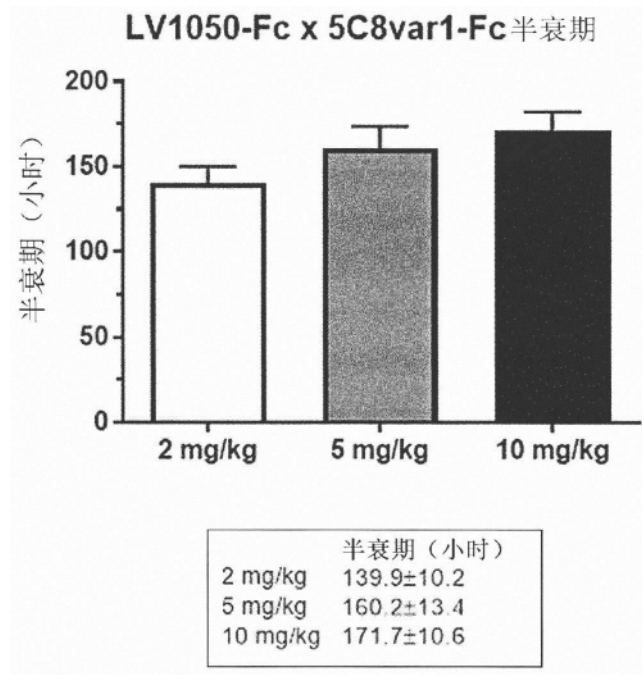


图16B

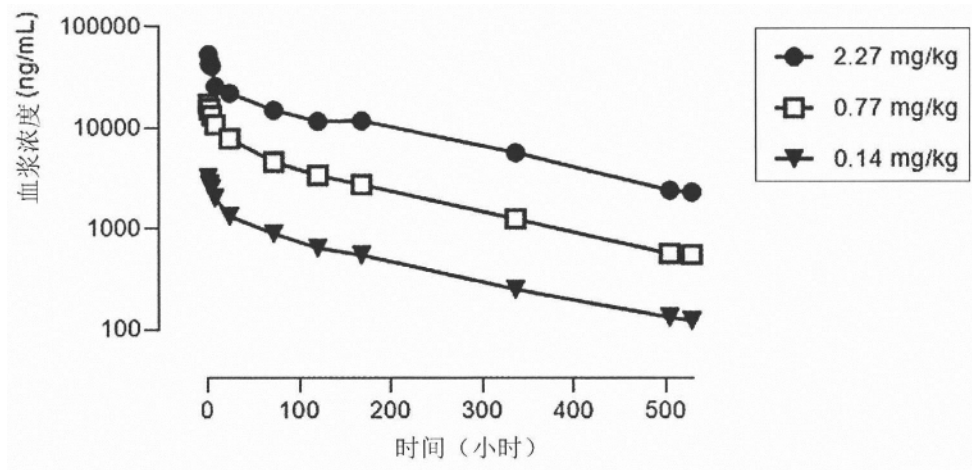


图17