(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 113939534 B
(45)授权公告日 2025.02.28

(21)申请号 202080039697.7
(22)申请日 2020.04.02
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 113939534 A
(43)申请公布日 2022.01.14
(30)优先权数据
62/828,601 2019.04.03 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2021.11.26
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/026304 2020.04.02
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2020/206063 EN 2020.10.08

(73)专利权人 建新公司
地址 美国马萨诸塞州
(72)发明人 邱华伟
(74)专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51)Int.Cl.
C07K 16/28(2006.01)
(56)对比文件
CN 104684930 A,2015.06.03
CN 106795220 A,2017.05.31
审查员 王碧燕

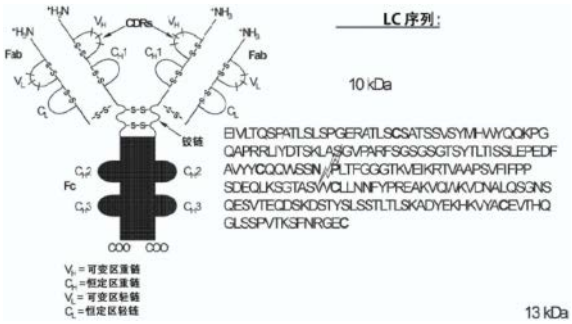
权利要求书2页 说明书28页
序列表18页 附图13页

(54)发明名称

具有降低的断裂的抗α β TCR结合多肽

(57)摘要

本公开文本涉及改进的用于治疗T细胞介导的疾病和障碍(例如,自身免疫障碍、移植物抗宿主病和移植物排斥)的组合物和方法。提供了包括抗体在内的如下抗α β TCR结合多肽,其包含至少一个氨基酸取代或修饰,所述至少一个氨基酸取代或修饰通过降低轻链可变区的断裂来增加所述结合多肽的稳定性。本文提供的方法总体上涉及向有需要的受试者施用有效量的对α β T细胞受体(α β TCR)具有特异性的稳定化人源化结合多肽。



CN 113939534 B

1.一种特异性结合人αβTCR/CD3复合物的结合多肽,其包含重链可变区、轻链可变区和恒定区,其中:

所述轻链可变区包含三个分别由SEQ ID NO: 26、27和28所示的氨基酸序列组成的互补决定区LCDR1、LCDR2和LCDR3;

SEQ ID NO: 28的氨基酸序列为Q-Q-W-S-S-X1-X2-L-T,其中X1是丝氨酸,并且X2是脯氨酸;

其中所述重链可变区包含选自SEQ ID NO: 7、12、13、15和16的任一个氨基酸序列;并且

所述恒定区是人来源的。

2. 根据权利要求1所述的结合多肽,其中所述轻链可变区还包含SEQ ID NO: 14所示的人轻链可变区中的人轻链框架区。

3. 根据权利要求1或2所述的结合多肽,其中所述重链可变区包含如SEQ ID NO: 16所示的氨基酸序列。

4. 根据权利要求1或2所述的结合多肽,其中与VH31相比,所述结合多肽在大于5.0的pH下具有增加的稳定性,其中VH31包含SEQ ID NO: 16的重链可变区和SEQ ID NO: 14的轻链可变区。

5. 根据权利要求1或2所述的结合多肽,其中与VH31相比,所述结合多肽在大于4°C的温度下具有增加的稳定性,其中VH31包含SEQ ID NO: 16的重链可变区和SEQ ID NO: 14的轻链可变区。

6. 根据权利要求1或2所述的结合多肽,其中所述重链可变区包含选自SEQ ID NO: 7、SEQ ID NO: 12和SEQ ID NO: 13的任一个氨基酸序列。

7. 根据权利要求1或2所述的结合多肽,其中所述重链可变区包含选自SEQ ID NO: 15和SEQ ID NO: 16的任一个氨基酸序列。

8. 根据权利要求1或2所述的结合多肽,其中所述重链可变区包含SEQ ID NO: 15所示的氨基酸序列。

9.根据权利要求1或2所述的结合多肽,其中所述恒定区包含具有经修饰的糖基化模式的Fc修饰,所述经修饰的糖基化模式降低Fcγ受体结合,其中所述Fc修饰是选自下组的任一者:N297Q/S298N/Y300S、S298N/T299A/Y300S和S298N/Y300S,其中所述氨基酸位置根据EU编号进行编号。

10.根据权利要求9所述的结合多肽,其中所述Fc修饰是N297Q/S298N/Y300S,其中所述氨基酸位置根据EU编号进行编号。

11.根据权利要求9所述的结合多肽,其中所述Fc修饰是S298N/T299A/Y300S,其中所述氨基酸位置根据EU编号进行编号。

12.根据权利要求9所述的结合多肽,其中所述Fc修饰是S298N/Y300S,其中所述氨基酸位置根据EU编号进行编号。

13.根据权利要求1所述的结合多肽,其中所述结合多肽是人源化的。

14.根据权利要求1或2所述的结合多肽,其中所述结合多肽是单克隆抗体。

15.一种药物组合物,其包含根据权利要求1-14中任一项所述的结合多肽和药学上可接受的载体。

16.一种药物组合物,其包含根据权利要求1-14中任一项所述的结合多肽和药学上可接受的稀释剂。

17.一种包含根据权利要求15或16所述的药物组合物的配制品,其中所述配制品为冻干配制品或液体配制品。

18.一种编码根据权利要求1-14中任一项所述的结合多肽的核酸。

19.一种包含根据权利要求18所述的核酸的载体。

20.一种表达根据权利要求18所述的核酸的细胞。

21.根据权利要求20所述的细胞,其中所述细胞是哺乳动物细胞。

22.根据权利要求21所述的细胞,其中所述哺乳动物细胞为中国仓鼠卵巢细胞或人胚肾细胞。

具有降低的断裂的抗αβTCR结合多肽

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求2019年4月3日提交的美国临时专利号62/828,601的权益,其全部内容通过引用并入本文。

[0003] 序列表

[0004] 本申请含有已以ASCII格式电子提交并通过引用以其整体特此并入的序列表。在2020年3月30日创建的所述ASCII副本名称为704503_SA9-254PC_ST25.txt,并且大小为32,602字节。

背景技术

[0005] 单克隆抗体是一类重要的结合多肽和生物治疗药物。一般来说,多肽骨架在生理条件下是高度稳定的。然而,重链和轻链多肽的断裂是治疗性单克隆抗体的主要问题。

[0006] 一般来说,蛋白质骨架在生理条件下是高度稳定的。然而,断裂可由多种机制引起,例如,由于天然共价键的破坏,导致多肽骨架通过自发或酶促反应裂解。此外,特定区域和基序(例如,Asn-Pro基序)由于以下原因更加易于断裂:氨基酸序列、二维或三维多肽结构的柔性、以及不相容的溶剂和环境条件(例如,温度和pH)。

[0007] 在生物组合物的制造或储存过程中的任何步骤都可能发生断裂。因为断裂可导致效力降低或存在不需要的和潜在的免疫原性物质,所以降低断裂是任何生物治疗剂生产中的关键考虑因素。

[0008] 因此,本领域需要具有改进的稳定性的抗体组合物,其在制造和后续储存过程中展现出降低的抗体多肽链断裂。

发明内容

[0009] 本公开文本提供了改进的可用于治疗T细胞介导的疾病和障碍的组合物和方法。提供了特异性结合αβT细胞受体(αβTCR)的人源化结合多肽。本文提供的抗αβTCR组合物是对已知组合物的改进,所述改进在于改进的组合物包含至少一个氨基酸取代或修饰,所述至少一个氨基酸取代或修饰通过降低轻链可变区的断裂来增加所述结合多肽的稳定性。还提供了用改进的组合物治疗T细胞介导的疾病和障碍(例如,移植物抗宿主病、自身免疫疾病和移植物排斥)的方法。本文提供的方法总体上涉及向有需要的受试者施用有效量的特异性结合αβTCR的人源化结合多肽。

[0010] 出人意料的是,诸位发明人已经发现,去除抗人αβTCR抗体VH31的轻链中的Asn剪切位点降低了该抗体的断裂。这一发现特别出人意料,因为推定的Asn剪切位点出现在互补决定区(CDR)内,并且先前在无关抗体(即sFLT01)中去除Asn剪切位点方面的尝试并没有阻止抗体断裂。

[0011] 在一个方面,提供了一种与人αβTCR/CD3复合物特异性结合的结合多肽,所述结合多肽包含重链可变区、轻链可变区和恒定区,其中:

[0012] 所述轻链可变区包含三个分别含有SEQ ID NO:26、27和28所示的氨基酸序列的互

补决定区(CDR)LCDR1、LCDR2和LCDR3；

[0013] SEQ ID NO:28包含氨基酸序列Q-Q-W-S-S-X_1-X_2-L-T，其中X_1是选自Q、D、H、S、Y和A的氨基酸，并且X_2是选自P和A的氨基酸；并且

[0014] 所述恒定区是人来源的。

[0015] 在某些实施方案中，X_1是S。

[0016] 在某些实施方案中，X_2是P。

[0017] 在某些实施方案中，X_1是S，并且X_2是P。

[0018] 在某些实施方案中，所述轻链可变区还包含SEQ ID NO:14所示的人轻链框架区。

[0019] 在某些实施方案中，与VH31相比，所述结合多肽在大于5.0的pH下具有增加的稳定性。

[0020] 在某些实施方案中，与VH31相比，所述结合多肽在大于4℃的温度下具有增加的稳定性。

[0021] 在某些实施方案中，所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:7、12、13、15和16的氨基酸序列。

[0022] 在某些实施方案中，所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0023] 在某些实施方案中，所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0024] 在某些实施方案中，所述重链可变区包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。

[0025] 在某些实施方案中，所述重链可变区包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0026] 在某些实施方案中，所述恒定区包含具有经修饰的糖基化模式的Fc修饰，所述经修饰的糖基化模式降低Fcγ受体结合。

[0027] 在某些实施方案中，所述Fcγ受体是一种或多种选自FcγRIIIa和FcγRI的受体。

[0028] 在某些实施方案中，所述Fc修饰选自N297Q/S298N/Y300S、S298N/T299A/Y300S、和S298N/Y300S。

[0029] 在某些实施方案中，所述Fc修饰是N297Q/S298N/Y300S。

[0030] 在某些实施方案中，所述Fc修饰是S298N/T299A/Y300S。在一个实施方案中，所述Fc修饰是S298N/Y300S。

[0031] 在某些实施方案中，所述结合多肽是人源化的。

[0032] 在某些实施方案中，所述结合多肽是单克隆抗体。

[0033] 在某些实施方案中，所述结合多肽是多特异性的。

[0034] 在某些实施方案中，所述结合多肽是双特异性的。

[0035] 在另一方面，提供了一种药物组合物，其包含本文所述的结合多肽和药学上可接受的载体或稀释剂。

[0036] 在另一方面，提供了包含本文所述的药物组合物的配制品。在某些实施方案中，所述配制品是液体配制品。在某些实施方案中，所述配制品是冻干配制品。

[0037] 在另一方面，提供了一种治疗受试者的T细胞介导的疾病或障碍的方法，所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的结合多肽或药物组合物，从而实现治疗。在某些实施方案中，所述T细胞介导的疾病或障碍选自系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎

(RA)、炎性肠病(IBD)、溃疡性结肠炎(UC)、克罗恩病(CD)、多发性硬化(MS)、硬皮病、1型糖尿病(T1D)、寻常型天疱疮(PV)、银屑病、特应性皮炎、乳糜泻、慢性阻塞性肺病、桥本甲状腺炎、格雷夫斯病(甲状腺)、舍格伦综合征、格林-巴利综合征、肺出血-肾炎综合征、艾迪生病、韦氏肉芽肿病、原发性胆管硬化、硬化性胆管炎、自身免疫性肝炎、风湿性多肌痛、雷诺现象、颞动脉炎、巨细胞动脉炎、自身免疫性溶血性贫血、恶性贫血、结节性多动脉炎、贝切特病、原发性胆汁性肝硬化、葡萄膜炎、心肌炎、风湿热、强直性脊柱炎、肾小球肾炎、结节病、皮肌炎、重症肌无力、多肌炎、斑秃、白癜风、移植物抗宿主病(GvHD)、和同种异体移植物排斥。

[0038] 在另一方面,提供了编码本文所述的结合多肽的核酸。

[0039] 在另一方面,提供了包含本文所述的核酸的载体。

[0040] 在另一方面,提供了包含本文所述的核酸的细胞。在一个实施方案中,所述细胞是哺乳动物细胞。在一个实施方案中,所述哺乳动物细胞选自中国仓鼠卵巢(CHO)细胞和人胚肾(HEK)细胞。

附图说明

[0041] 从以下说明性实施方案的详细描述结合附图将更充分地理解本发明的前述和其他特征和优点。

[0042] 图1是蛋白质凝胶的照片,其示出在包括升高的温度(45℃)和指定的pH持续五周的加速条件下,参考人源化抗αβTCR抗体VH31配制的抗体的低分子量(LMW)片段的出现。HC,重链;LC,轻链。

[0043] 图2是绘出了不同浓度的参考VH31配制的抗体在持续五周的加速条件下的效力的线图。空心方块对应于在45℃、pH 8.0下储存的参考VH31抗体;空心圆圈对应于在45℃、pH 5.0下储存的参考VH31抗体;以及空心菱形对应于在对照条件即≤0℃、pH 5.0下储存的参考VH31抗体。

[0044] 图3是蛋白质凝胶的照片,其示出在指定加速条件下存在的参考VH31条带的基于分子量和N末端测序的指定身份。HC,重链;LC,轻链。

[0045] 图4描绘了参考VH31轻链(LC)氨基酸序列(SEQ ID NO:25)和N93/P94推定剪切位点。

[0046] 图5A-图5C是示出由在参考VH31轻链的胰蛋白酶消化产物(根据Kabat编号的氨基酸61-102或61-106)的N93/P94处的剪切产生的各种轻链片段的线图。这些片段对应于VH31 LC的氨基酸残基94-102(图5A)、残基61-93(图5B)和残基94-106(图5C)。102和106C末端是由于胰蛋白酶消化不完全所致。

[0047] 图6描绘了提出的方法,通过所述方法可以在溶液中发生在Asn 93(N93)处的裂解。

[0048] 图7描绘了为增强LC稳定性而进行的各种VH31 LC氨基酸突变。

[0049] 图8是一对蛋白质凝胶照片,其示出含有突变(泳道1-8)或非突变LC的VH31抗体的高表达和纯度。1,N93Q;2,N93D;3,N93H;4,N93S;5,N93Y;6,N93A;8,N93A/P94A。

[0050] 图9是一对蛋白质凝胶(左小图)的照片和三个SEC-HPLC图(右小图),其示出包含N93S LC突变的抗体的纯度与野生型(WT)和对照(VH31)抗体的纯度是可比的。

[0051] 图10是绘出包含指示的LC突变的VH31抗体的效力的线图。包含LC变体N93S的抗体(空心菱形符号)仅比参考VH31(空心方形符号)或野生型(WT)抗体(空心八角形符号)的效力略低。

[0052] 图11是蛋白质凝胶的照片,其示出(左小图)在45℃、pH 8下储存6周后,N93S突变体与野生型(WT)或VH31对照抗体相比,降解明显减少。右小图示出,与野生型或VH31对照抗体(均高于20倍损失)相比,N93S突变体在加速条件下的效力损失(损失3倍)明显较少。

[0053] 图12是蛋白质凝胶的照片,其示出参考VH31抗体和N93S突变体在升高的温度(45℃)和pH 5.5下储存六周后的断裂。

具体实施方式

[0054] 本公开文本提供了改进的用于治疗T细胞介导的障碍(例如移植物抗宿主病、自身免疫疾病和同种异体移植物排斥)的组合物和方法。本文提供的方法总体上涉及向有需要的受试者施用有效量的对αβT细胞受体(αβTCR)具有特异性的人源化结合多肽。本文提供的抗αβTCR组合物是对已知组合物的改进,所述改进在于改进的组合物包含一个或多个氨基酸取代或修饰,所述一个或多个氨基酸取代或修饰通过降低轻链可变区的断裂来改进所述结合多肽的稳定性。

[0055] I.定义

[0056] 除非另外陈述,否则在此所使用的所有技术和科学术语具有与本公开文本所属领域的普通技术人员通常所理解的相同的含义。与本文所述的类似或等同的任何方法和材料可以用于本公开文本的技术的方法中。出于描述和公开出版物中报道的可能与本公开文本相关的方法、试剂和工具的目的,本文引用的所有出版物通过引用以其整体并入本文。

[0057] 除非另外指示,否则本申请的方法和技术通常是根据本领域熟知并且如本说明书通篇引用和讨论的各个通用和更具体参考文献中所述的常规方法来进行的。参见,例如,Gennaro,A.R.,编(1990)Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Co.;Hardman,J.G.,Limbird,L.E.,和Gilman,A.G.,编(2001)The Pharmacological Basis of Therapeutics,第10版,McGraw-Hill Co.;Colowick,S.等人,编,Methods In Enzymology,Academic Press,Inc.;Weir,D.M.和Blackwell,C.C.,编(1986)Handbook of Experimental Immunology,第I-IV卷,Blackwell Scientific Publications;Maniatis,T.等人,编(1989)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,第I-III卷,Cold Spring Harbor Laboratory Press;Ausubel,F.M.等人,编(1999)Short Protocols in Molecular Biology,第4版,John Wiley&Sons;Ream等人,编(1998)Molecular Biology Techniques:An Intensive Laboratory Course,Academic Press;Newton,C.R.和Graham,A.,编(1997)PCR(Introduction to Biotechniques Series),第2版,Springer-Verlag。

[0058] 人αβTCR/CD3复合物是一种存在于T细胞表面上的T细胞受体复合物。参见Kuhns等人(2006)Immunity 24:133-139。该复合物由鼠单克隆抗体BMA031(参见欧洲专利申请EP 0403156;SEQ ID NO:1和2,通过引用以其整体并入本文)和本文公开的人源化稳定化抗体靶向。

[0059] 小鼠IgG2b单克隆抗体BMA031(Borst等人(1990)Hum.Immunol.29(3):175-88;

EP0403156)对α-βTCR/CD3复合物的共同决定簇具有特异性,并且不与γ-δTCR结合。BMA031具有高度免疫抑制作用,并且能够通过激活诱导的细胞死亡(AICD)机制诱导激活的T细胞凋亡(Wesselborg等人(1993)J.Immunol.150(10):4338-4345)。在体外,它抑制混合淋巴细胞反应,并在许多实体器官移植场景中预防移植物排斥以及治疗急性移植物抗宿主病方面显示出初步的临床功效(Kurrle等人(1989)Transplant Proc.21(1):1017-1019)。BMA031在大多数人群中不与人Fcγ受体(FcγR)接合。因此,BMA031不会通过T细胞受体的交联引起T细胞激活,因此,它不会诱导T细胞激活或相关的细胞因子释放。在这方面,它的特征比OKT3的特征更优选。然而,BMA031是鼠抗体,因此,鉴于其中引发的人抗小鼠抗体(HAMA)应答,不适合在人受试者中重复给药。

[0060] 已经描述了BMA031的几种人源化形式(参见例如,WO 2013/037484;EP 0403156;还有Shearman等人(1991)J.Immunol.147:4366-4373)。如EP 0403156中所述,仅CDR移植不能成功地保持抗原结合。一种具有显著"教化(civilizing)"框架修饰的克隆,EUCIV3,成功地与T细胞结合;然而,如EP 0403156中所述,与αβTCR的结合不如亲本BMA031抗体有效,如通过流式细胞术竞争测定确定的。此外,EUCIV3最初是在仍然保留FcγR结合的野生型人IgG1或IgG4骨架上生成的。因此,这些人源化抗体允许T细胞激活、增殖和伴随的细胞因子释放,因此与BMA031的原始特性显著不同。

[0061] 除非另有说明,否则术语"结合蛋白"或"结合多肽"用于指代含有负责选择性结合目的靶抗原(例如,人抗原)的至少一个结合位点的多肽(例如,抗体或其抗原结合片段)。示例性结合位点包括抗体可变结构域、受体的配体结合位点或配体的受体结合位点。在某些方面,本文所述的结合多肽包含多个(例如,两个、三个、四个或更多个)结合位点。

[0062] 除非另有说明,否则术语"抗体"用于指代完整抗体以及此类抗体的抗原结合片段。例如,所述术语包括四链IgG分子以及抗体片段。

[0063] 如本文所用,术语"抗体片段"是指完整全长抗体的部分,例如如下文进一步描述的。

[0064] 抗体可为任何类别,如IgG、IgA、IgE、IgD、或IgM;并且为任何亚类,如IgG1或IgG4。免疫球蛋白的不同类别和亚类具有不同的特性,这在不同的应用中可能是有利的。例如,IgG4抗体与Fc受体的结合降低。

[0065] 天然存在的免疫球蛋白具有共同的核心结构,其中两条相同的轻链(约24kDa)和两条相同的重链(约55或70kDa)形成四聚体。每条链的氨基末端部分称为可变(V)区,并且可以与每条链其余部分的更保守的恒定(C)区区分开来。

[0066] 免疫球蛋白中的大多数氨基酸序列变异仅限于每个V区中的三个独立位置,称为高变区或互补决定区(CDR),它们直接参与抗原结合。从氨基末端开始,这些区分别称为CDR1、CDR2和CDR3。CDR由更保守的框架区(FR)固定就位。从氨基末端开始,这些区分别称为FR1、FR2、FR3和FR4。从氨基末端开始,包含在V区中的这些组合区称为FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3和FR4。Kabat等人已经定义了CDR和FR区的位置以及编号系统。(Kabat,E.A.等人,Sequences of Proteins of Immunological Interest,第五版,美国卫生与公共服务部,美国政府印刷局(U.S.Government Printing Office)(1991),及其可在线找到的更新版本)。此外,IMGT命名法进一步定义了CDR区边界。

[0067] 如本文所用,"人源化单克隆抗体"是由人抗体框架构成的抗体,所述人抗体框架

中已移植有来自非人抗体的互补决定区(CDR)。还可以对人受体框架进行更改。人源化抗体的设计和产生程序是本领域熟知的,并且已经描述于例如美国专利号4,816,397;美国专利号4,816,567;和美国专利号5,225,539;欧洲专利申请0 120 694;欧洲专利申请0 125 023;欧洲专利申请0 194 276B1;欧洲专利申请0 239 400;欧洲专利申请0 519 596;和国际专利申请WO 86/01533中。关于抗体、人源化抗体、人工程化抗体、以及它们的制备方法的更多细节可以在Kontermann,R.和Dijbel,S.编(2001,2010)Antibody Engineering,第2版,Springer-Verlag,纽约,纽约州中找到。上面列出的每个专利和专利申请公开案的全部内容通过引用并入本文。

[0068] 可以至少部分地通过以下方式获得根据所述的实施方案的抗体的可变区:人源化BMA031即通过将BMA031的CDR转移到人框架,并进一步修饰一个或多个VL CDR以通过降低轻链可变区的断裂来改进结合多肽的稳定性。PCT公开案WO 2013/037484中描述了两个系列的人源化BMA031抗体,将所述文献通过引用并入本文。这两个系列是:HEBE1系列,其包含本发明的SEQ ID NO:5-7、12和13;以及GL1BM系列,其包含如在本发明的SEQ ID NO:8、15和16中所示的重链可变区。在这两种情况下,所使用的轻链可变区如本发明的SEQ ID NO:14(GL1BM VK43)中所示。使用的人框架在HEBE1的情况下是IGH3-23(本发明的SEQ ID NO:17),而在GL1BM的情况下是IGHV1-3*01和IGKV3-11*01(本发明的SEQ ID NO:18和19)。

[0069] 恒定区可以源自任何人抗体恒定区。可变区基因可与恒定区基因同框克隆到表达载体中,以表达免疫球蛋白重链和轻链。此类表达载体可以转染到抗体产生宿主细胞中以用于抗体合成。

[0070] 人抗体可变区和恒定区可以源自序列数据库。例如,免疫球蛋白序列可在IMGT/LIGM数据库(Giudicelli等人,(2006)Nucleic Acids Res.34(增刊1):D781-D784)或VBase30(vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk)中获得。去糖基化抗体可以具有广泛修饰的功能;参见Boyd等人(1996)Mol.Immunol.32:1311-1318。如本文所用,“Δab”或Δab修饰是在Armour等人,(1999)Eur.J.Immunol.29:2613-2624中描述的Fc修饰。修饰抗体Fc区的糖基化的技术是本领域已知的,并且包括化学、酶促和/或突变手段,例如CH2结构域中N297位置的突变。用于突变抗体基因以产生去糖基化IgG分子的技术描述于Tao和Morrison(1989)J.Immunol.143:2595-2601中。

[0071] 在本文描述的抗体的上下文中,特异性意味着要求保护的抗体能够选择性结合其限定的同源抗原,即αβTCR/CD3复合物。本文所述的抗体结合在细胞上(包括在T细胞上)表达的αβTCR/CD3复合物。

[0072] 术语“稳定”、“稳定性”和“稳定化”,如本文在结合多肽的上下文中所用,是指结合多肽在给定的制造、制备、运输和储存条件下对热和化学降解或断裂的抗性。在给定的制造、制备、运输和储存条件下,“稳定”组合物保持大于或等于80%、85%、90%、95%、98%、99%、99.5%或99.9%的生物活性。结合多肽的稳定性可以例如与对照相比或与起始材料相比,从降解或断裂的程度、或者特定片段的水平或者聚集体的类型或大小方面,使用本领域技术人员已知的方法和测量来评估。此类方法和测量包括但不限于相比于参考,减少的曲线下面积(AUC)、尺寸排阻色谱(SEC)、高效(或高压)尺寸排阻色谱(HPSEC)、液相色谱-质谱(LC-MS)、毛细管凝胶电泳(CGE)和十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)。

[0073] 如本文所用,术语“核酸”包括编码本文所述的抗体的DNA分子。编码本文所述的抗

体的优选DNA分子是适合于在宿主细胞中表达抗体基因的表达载体。用于抗体基因表达的表达载体和宿主细胞是本领域已知的;参见例如,Morrow,K.J.Genetic Engineering& Biotechnology News(2008年6月15日)28(12),和Backliwal,G.等人(2008)Nucleic Acids Res.36(15):e96-e96。

[0074] 如本文所用,术语“治疗”(“treat”)和“治疗”(“treatment”)是指对患有疾病、障碍或病症的患者或受试者的护理。治疗可涉及但不限于以下中的任何一者或任何组合:疾病、障碍或病症的治愈;疾病、障碍或病症的至少一种症状的改善;和/或预防性或预防行为,其目的是预防或减少疾病、障碍或病症的发生。在某些实施方案中,治疗可涉及但不限于疾病、障碍或病症的治愈;或疾病、障碍或病症的至少一种症状的改善。

[0075] 如本文所用,术语“受试者”是指任何哺乳动物,包括小鼠、大鼠、沙鼠、仓鼠、豚鼠、兔、猫、狗、绵羊、山羊、猪、牛、马和灵长类动物。在某些实施方案中,受试者是人以外的哺乳动物。在某些实施方案中,受试者是非人灵长类动物。在某些实施方案中,受试者是人。

[0076] II.抗体

[0077] 本公开文本包括向有需要的受试者施用本文所述的人源化抗αβTCR抗体的一种或多种抗原结合片段的方法。所述抗体的片段能够结合αβTCR/CD3复合物。它们包括Fab、Fab’、F(ab’)2和F(v)片段,或单独的轻链或重链可变区或其任何部分。片段包括例如Fab、Fab’、$F(ab')_2$、Fv、scFv等。在某些方面,与完整抗体相比,片段缺乏完整抗体的Fc部分,从循环中清除得更快,和/或可以具有更少的非特异性组织结合。在某些方面,可以使用熟知的方法从完整抗体产生片段,例如通过用酶如木瓜蛋白酶(以产生Fab片段)或胃蛋白酶(以产生$F(ab')_2$片段)的蛋白水解裂解。

[0078] 在某些方面,抗体和/或抗体片段包括与αβTCR/CD3复合物结合的单链抗体片段(scFv)。在某些方面,scFv包含与抗体轻链可变区(VL)可操作地连接的抗体重链可变区(VH),其中重链可变区和轻链可变区之一或二者一起或单独形成结合αβTCR的结合位点。scFv可以在氨基末端包含VH区并在羧基末端包含VL区。替代性地,scFv可以在氨基末端包含VL区并在羧基末端包含VH区。此外,虽然Fv片段的两个结构域VL和VH由单独的基因编码,但可以使用重组方法将它们通过合成接头连接起来,使得能够将它们制成单条蛋白质链,其中VL和VH区配对形成单价分子(称为单链Fv(scFv))。scFv还可任选地在重链可变区与轻链可变区之间包含多肽接头。

[0079] 抗体和抗体片段还包括由VH结构域组成的结构域抗体(dAb)片段(如Ward,E.S.等人(1989)Nature 341:544-546所述)。抗体和抗体片段还包括重链抗体(HCAb)。据报道,HCAb仅使用重链可变区形成抗原结合区,因为这些功能性抗体是仅重链的二聚体(称为“重链抗体”或“HCAb”)。因此,在某些方面,抗体和抗体片段可以是特异性结合αβTCR/CD3复合物的HCAb。抗体和抗体片段还包括如下抗体,所述抗体作是对αβTCR/CD3复合物具有特异性的小模块化免疫药物(SMIP)或结合结构域免疫球蛋白融合蛋白。这些构建体是如下单链多肽,所述单链多肽包含与执行抗体效应子功能所必需的免疫球蛋白结构域融合的抗原结合结构域(参见WO 2005/017148)。抗体和抗体片段还包括双抗体。双抗体是指双价抗体,其中VH和VL结构域在单条多肽链上表达,但使用的接头太短而不能使得在同一条链上的两个结构域之间进行配对。这迫使这些结构域与另一条链的互补结构域配对,从而产生两个抗原结合位点(参见例如,WO 93/11161)。双抗体可以是双特异性或单特异性的。

[0080] 在某些方面,抗体或抗体片段特异性结合人αβTCR/CD3复合物,即,这种抗体或抗体片段不与人αβTCR/CD3复合物以外的任何靶标发生交叉反应。

[0081] 可以修饰抗体或抗体片段以增加其血清半衰期,例如通过添加分子如PEG或其他水溶性聚合物(包括多糖聚合物等)以增加抗体或抗体片段的半衰期。

[0082] 抗体和抗体片段可以是多特异性或双特异性的。例如,双特异性抗体或抗体片段可以类似于包含两个不同结合位点(可变区)的单一抗体(或抗体片段)。双特异性抗体可以通过各种方法产生,所述方法如化学技术、"polydoma"技术或重组DNA技术。双特异性抗体可对至少两种不同的表位具有结合特异性,其中的至少一种表位是αβTCR/CD3复合物。其他特异性可以选自任何有用的或期望的特异性,包括例如对人血清白蛋白的特异性以延长体内半衰期。

[0083] 随着三功能卡妥玛索单抗(REMOVAB®)被批准用于恶性腹水情况以及双特异性抗体博纳吐单抗(BLINCYTO®)被批准用作费城染色体阴性复发性或难治性急性成淋巴细胞性白血病(ALL)的二线治疗,双特异性抗体在临床上用于肿瘤学应用现在正在变成现实。这些抗体共同具有一个结合T细胞的结合臂和一个结合肿瘤靶细胞的第二臂,导致T细胞介导的肿瘤靶标裂解。另外共同之处在于,这些分子通过位于细胞表面的CD3蛋白募集T细胞。通过CD3募集的另一种替代方案是利用也在细胞表面表达的αβT细胞受体(αβTCR)。

[0084] 在某些示例性实施方案中,根据本公开文本的抗体可用于通过将对肿瘤相关抗原的特异性与对αβT细胞受体(αβTCR)的特异性进行组合来开发抗肿瘤抗体。

[0085] III.抗αβTCR抗体

[0086] 如上所述,PCT公开案WO 2013/037484中描述了两个系列的此类人源化抗αβTCR抗体,将所述文献通过引用并入本文。这两个系列基于鼠抗αβTCR抗体BMA031,并且包括:HEBE1系列,其包含SEQ ID NO:5-7、12和13;以及GL1BM系列,其包含如SEQ ID NO:8、15和16中所示的重链可变区。在这两种情况下,所使用的轻链可变区如SEQ ID NO:14(GL1BM VK43)中所示。使用的人框架在HEBE1的情况下是IGH3-23(SEQ ID NO:17),而在GL1BM的情况下是IGHV1-3*01(SEQ ID NO:18)和IGKV3-11*01(SEQ ID NO:19)。

[0087] 在表1中列出的序列中,选择的CDR以粗体显示并且如SEQ ID NO:26-28所示。

[0088] 表1.示例性抗αβTCR抗体的VH、VL和CDR氨基酸序列。

[0089]

抗体	序列	SEQ ID NO:
BMA031 HC VD	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKASGYKFTSYVMHWV KQKPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATLTSDKS SSTAYMELSSLTSEDSAVHYCARGSYYDYDGFVYWGQ GTLVTVSA	1
BMA031 LC VD	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSATSSVSYMHWYQQK SGTSPKRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSME AEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK	2
EUCIV3 HC VD	QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYKFTSYVMHWV KQAPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATLTADES TNTAYMELSSLRSEDTAVHYCARGSYYDYDGFVYWGQ GTLVTVSS	3
EUCIV3 LC VD	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTMTCSATSSVSYMHWYQQK PGKAPKRWIYDTSKLASGVPARFIGSGSGTEFTLTISSLQ PDDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK	4
HEBE1 HC VD	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYKFTSYVMHWV KQAPGKGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATLSRDNS KNTLYLQMNSLRAEDTAVHYCARGSYYDYDGFVYWG QGTLVTVSS	5
HEBE1 LC VD	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTMTCSATSSVSYMHWYQQK PGKAPKRWIYDTSKLASGVPARFIGSGSGTEFTLTISSLQ PDDFATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK	6
HEBE1 H10 HC VD	EVQLQQSGPELVKPGASVKMSCKAS**GYKFTSYVMH**W VKQAPGKGLEWIG**YINPYNDVTKYNEKFKG**KATLSRD NSKNTLYLQMNSLRAEDTAVHYC**ARGSYYDYDGFVY** WGQGTLVTVSS	7
GL1BM HC VD	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYVMHW VRQAPGQRLEWMGYINPYNDVTKYNEKFKGKATITRD TSANTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGSYYDYDGFVYW GQGTLVTVSS	8
GL1BM LC VD	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWYQQKP GQAPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK	9

[0090]

HuIgG1 Fc Δ ab	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPPV AGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVY TLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCS VMHEALHNHYTQKSLSLSPGK	10
HuIgG4 agly Fc	ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTK TYTCNVDHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEFLGGP SVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQFQSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNHYTQKSLSLSLGK	11
HEBE1 H66 HC VD	EVQLLQSGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GYKFTSYVMH**WV RQAPGKGLEWVG**YINPYNDVTKYNEKFKG**RFTLSRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARGSYYDYDGFVY**W GQGTLVTVSS	12
HEBE1 H71 HC VD	EVQLLESGGGLVQPGGSVRLSCAAS**GYKFTSYVMH**WV RQAPGKGLEWVG**YINPYNDVTKYNEKFKG**RFTLSRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**ARGSYYDYDGFVY**W GQGTLVTVSS	13
GL1BM VK43 LC VD	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**SATSSVSYMH**WYQQKP GQAPRRLIY**DTSKLAS**GVPARFSGSGSGTSYTLTISSLEP EDFAVYYC**QQWSSNPLT**FGGGTKVEIK	14
GL1BM VH28 HC VD	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYKFTSYVMH**W VKQAPGQGLEWIG**YINPYNDVTKYNEKFKG**RVTITRD TSASTAYMELSSLRSEDTAVYYC**ARGSYYDYDGFVY**W GQGTLVTVSS	15
GL1BM VH31 HC VD	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYKFTSYVMH**W VRQAPGQGLEWIG**YINPYNDVTKYNEKFKG**RVTITRD TSASTAYMELSSLRSEDTAVYYC**ARGSYYDYDGFVY**W GQGTLVTVSS	16
IGH3-23 HC	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAAS**GFTFSSYAMS**WVR QAPGKGLEWVS**AISGSGGSTYYADSVKG**RFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYC**AK**	17
IGHV1-3*01 HC	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS**GYTFTSYAMH**W VRQAPGQRLEWMG**WINAGNGNTKYSQKFQG**RVTITR DTSASTAYMELSSLRSEDTAVYYC**AR**	18
IGKV3-11*01 LC VD	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSC**RASQSVSSYLA**WYQQK PGQAPRLLIY**DASNRAT**GIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYC**QQRSNWP**	19
GL1BM VHΔS	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYVMHW VRQAPGQRLEWMGYINPYNDVTKYNEKFKGKATITRD TSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGSYYDYDGFVYW GQGTLVTVSS	20

[0091]

GL1BM VK1	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWYQQKP GQAPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK	21
GL1BM VK27	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWYQQKP GQAPRRWIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTDFTLTISSME PEDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIK	22
GL1BM VHΔS VH11	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYVMHW VKQKPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATITRDT SASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGSYYDYDGFVYWG QGTLVTVSS	23
GL1BM VHΔS VH15	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYKFTSYVMHW VKQAPGQGLEWIGYINPYNDVTKYNEKFKGKATITRDT SASTAYMELSSLRSEDTAVYYCARGSYYDYDGFVYWG QGTLVTVSS	24
VH31 LC	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWYQQKP GQAPRRLIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYTLTISSLEP EDFAVYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFP PSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYAC EVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	25
GL1BM VK43 LCDR1	S-A-T-S-S-V-S-Y-M-H	26
GL1BM VK43 LCDR2	D-T-S-K-L-A-S	27
稳定化GL1BM VK43 LCDR3	Q-Q-W-S-S-X_1-X_2-L-T，其中 X_1是Q、D、H、S、Y或A；并且 X_2是P或A	28

[0092] SEQ ID NO:14中的GL1BM VK43的LCDR3(QQWSSNPLT(SEQ ID NO:29))与稳定化GL1BM VK43的LCDR3(Q-Q-W-S-S-X_1-X_2-L-T,其中X_1是Q、D、H、S、Y或A,并且X_2是P或A(SEQ ID NO:28))的比较揭示了SEQ ID NO:28中的氨基酸X_1和X_2分别对应于SEQ ID NO:29中的N和P。

[0093] 在某些实施方案中,提供了一种特异性结合人αβTCR/CD3复合物的结合多肽,所述结合多肽包含重链可变区、轻链可变区和恒定区,其中:

[0094] 所述轻链可变区包含三个分别含有SEQ ID NO:26、27和28所示的氨基酸序列的互补决定区(CDR)LCDR1、LCDR2和LCDR3;

[0095] SEQ ID NO:28包含氨基酸序列Q-Q-W-S-S-X_1-X_2-L-T,其中X_1是选自Q、D、H、S、Y和A的氨基酸,并且X_2是选自P和A的氨基酸;并且

[0096] 所述恒定区是人来源的。

[0097] 在某些实施方案中,X_1是Q。

[0098] 在某些实施方案中,X_1是D。

[0099] 在某些实施方案中,X_1是H。

[0100] 在某些实施方案中,X_1是S。

[0101] 在某些实施方案中,X_1是Y。

[0102] 在某些实施方案中,X_1是A。

[0103] 在某些实施方案中,X_2是P。

[0104] 在某些实施方案中,X_2是A。

[0105] 在某些实施方案中,X_1是Q,并且X_2是P。

[0106] 在某些实施方案中,X_1是Q,并且X_2是A。

[0107] 在某些实施方案中,X_1是D,并且X_2是P。

[0108] 在某些实施方案中,X_1是D,并且X_2是A。

[0109] 在某些实施方案中,X_1是H,并且X_2是P。

[0110] 在某些实施方案中,X_1是H,并且X_2是A。

[0111] 在某些实施方案中,X_1是S,并且X_2是P。

[0112] 在某些实施方案中,X_1是S,并且X_2是A。

[0113] 在某些实施方案中,X_1是Y,并且X_2是P。

[0114] 在某些实施方案中,X_1是Y,并且X_2是A。

[0115] 在某些实施方案中,X_1是A,并且X_2是P。

[0116] 在某些实施方案中,X_1是A,并且X_2是A。

[0117] 在某些实施方案中,所述轻链可变区还包含根据SEQ ID NO:14的人轻链框架区。

[0118] 在某些实施方案中,与参考抗体VH31相比,所述结合多肽在大于5.0的pH下具有增加的稳定性。

[0119] 在某些实施方案中,与参考抗体VH31相比,所述结合多肽在大于4℃的温度下具有增加的稳定性。

[0120] 在某些实施方案中,所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:7、12、13、15和16的氨基酸序列。

[0121] 在某些实施方案中,所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12和SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

[0122] 在某些实施方案中,所述重链可变区包含选自SEQ ID NO:15和SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0123] 在某些实施方案中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列。

[0124] 在某些实施方案中,所述重链可变区包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

[0125] IV.修饰的抗αβTCR抗体

[0126] 抗αβTCR抗体可包含一种或多种修饰。可以使用本领域已知的任何技术制备根据本发明的修饰的抗αβTCR抗体。

[0127] i)降低断裂

[0128] 如本文在结合多肽组合物的上下文中使用的术语“断裂”是指结合多肽或其第一部分裂解成两个或更多个部分,每个部分的分子量低于原始结合多肽或其第一部分的分子量。此类断裂形式包括但不限于全长未配对重链、全长未配对轻链、与第二全长重链配对的第一全长重链、与部分重链配对的全长重链、与第二部分重链配对的第一部分重链、与全长轻链配对的全长重链、与部分轻链配对的全长重链、与全长轻链配对的部分重链、与部分轻链配对的部分重链、与第二全长重链配对的第一全长重链以及全长轻链、与第二全长重链配对的第一全长重链以及部分轻链、与第一部分轻链配对的第一全长重链以及与第二部分轻链配对的第二全长重链、与部分重链配对的第一全长重链以及全长轻链、与部分重链配对的第一全长重链以及两条全长轻链、与部分重链配对的第一全长重链以及部分轻链、与第二部分重链配对的第一部分重链以及全长轻链、以及与第二部分重链配对的第一部分重链以及部分轻链。

[0129] 如本文所用,“片段”是指至少一个氨基酸。通常,片段将包含连接在一起的两个或更多个氨基酸,更通常至少10、20、30、40或50个这样的氨基酸。特别是对于包含多于一条多肽链的片段,片段可包含例如至少100、至少200、至少300、至少400、至少500、至少600或至少700个氨基酸。

[0130] 断裂可由多种机制引起,例如,由于天然共价键的破坏,导致多肽骨架通过自发(例如非酶促)或酶促反应裂解。一般来说,蛋白质骨架在生理条件下是高度稳定的。然而,特定区域和基序由于以下原因更加易于断裂:其氨基酸序列、二维或三维多肽结构的柔性、以及不相容的溶剂和环境条件(例如,温度和pH)。

[0131] 例如,已经表明氨基酸Asp(D)、Gly(G)、Ser(S)、Thr(T)、Cys(C)和Asn(N)对抗体的多肽骨架中的裂解特别敏感。参见,例如,Liu H.,等人J.Am.Soc.Mass Spectrom.2009;20:2258-2264。此外,已知Asn-Pro(N-P)酰胺键在氨的存在下会发生完全裂解。参见,例如,Tarelli E.和Corran P.H.J.Peptide Res.2003;62:245-251。

[0132] 在生物组合物的制造或储存过程中的任何步骤都可能发生断裂。因为断裂可导致效力降低或存在不需要的和潜在的免疫原性物质,所以降低断裂是任何生物治疗剂生产中的关键考虑因素。

[0133] 在一些实施方案中,少于5%(例如,少于4.9%、4.8%、4.7%、4.6%、4.5%、4.4%、4.3%、4.2%、4.1%、4.0%、3.9%、3.8%、3.7%、3.6%、3.5%、3.4%、3.3%、3.2%、3.1%、3.0%、2.9%、2.8%、2.7%、2.6%、2.5%、2.4%、2.3%、2.2%、2.1%、2.0%、1.9%、1.8%、1.7%、1.6%、1.5%、1.4%、1.3%、1.2%、1.1%、1.0%、0.9%、0.8%、0.7%、0.6%、0.5%、0.4%、0.3%、0.2%、或0.1%)的抗体在2℃至8℃下储存至少一个月(例如,至少两个月、三个月、四个月、五个月、六个月、七个月、八个月、九个月、10个月、11个月、12个月、13个月、14个月、15个月、16个月、17个月、18个月、19个月、20个月、21个月、22个月、23个月、24个月、或更长时间)后发生断裂。

[0134] 确定单体结合多肽的量以及溶液中存在的结合多肽的单体、寡聚体、聚集或断裂形式的量的方法描述于本文中并在工作实施例中举例说明。例如,熟练技术人员可以使用例如尺寸排阻色谱高效液相色谱(SEC-HPLC)、静态光散射(SLS)、傅里叶变换红外光谱(FTIR)、圆二色性(CD)、尿素诱导的蛋白质解折叠技术、内在色氨酸荧光、非还原性十二烷基硫酸钠聚丙烯酰胺凝胶电泳(SDS-PAGE)和差示扫描量热法(DSC)确定给定溶液中存在的完整的、断裂的、未折叠的中间物和/或聚集物质的百分比。在本文所述的工作实施例中,诸位发明人举例说明了使用SEC-HPLC和SDS-PAGE等来确定溶液中结合多肽的物理状态。

[0135] ii)降低免疫原性

[0136] 在某些示例性实施方案中,去免疫可用于降低抗体或其抗原结合部分的免疫原性。如本文所用,术语“去免疫”包括改变抗体或其抗原结合部分,以修饰一个或多个T细胞表位(参见,例如,WO 98/52976 A1、WO 00/34317 A2)。例如,可以分析来自起始抗体的VH和VL序列,并且可以从每个V区生成人T细胞表位“图谱”,所述图谱示出与互补决定区(CDR)相关的表位的位置以及序列内的其他关键残基。可以分析来自T细胞表位图谱的单独T细胞表位以鉴定具有改变最终抗体活性低风险的替代性氨基酸取代。可以设计一系列替代性VH和VL序列,所述序列包括氨基酸取代的多种组合,并且可以随后将这些序列并入一系列抗αβTCR抗体或抗αβTCR抗体片段中以用于本文公开的方法中,然后对所述抗体或片段的功能进

行测试。然后将包含修饰的V和人C区的完整重链和轻链基因克隆到表达载体中,并且可以将随后的质粒引入细胞系中以产生完整抗体。然后可以在适当的生物化学和生物学测定中比较抗体,并可以鉴定最佳变体。

[0137] iii)效应子功能和Fc修饰

[0138] 人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可以包含介导一种或多种效应子功能的抗体恒定区(例如,IgG恒定区,例如人IgG恒定区,例如人IgG1或IgG4恒定区)。例如,补体的C1成分与抗体恒定区的结合可以激活补体系统。补体的激活在细胞病原体的调理作用和裂解中很重要。补体的激活还刺激炎症反应,并且还可参与自身免疫性超敏反应。此外,抗体经由Fc区与多种细胞上的受体结合,其中抗体Fc区上的Fc受体结合位点与细胞上的Fc受体(FcR)结合。存在许多Fc受体,所述Fc受体对如下不同类别的抗体具有特异性,包括IgG(γ受体,即Fcγ受体)、IgE(ε受体)、IgA(α受体)和IgM(μ受体)。抗体与细胞表面上的Fc受体的结合引发了许多重要和多样的生物反应,包括抗体包被颗粒的吞噬和破坏、免疫复合物的清除、杀伤细胞裂解抗体包被的靶细胞(称为抗体依赖性细胞介导的细胞毒性,或ADCC)、炎症介质的释放、胎盘转移和免疫球蛋白产生的控制。

[0139] 在某些实施方案中,人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)与Fcγ受体结合。在替代性实施方案中,人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可包含不能引导一种或多种效应子功能(例如ADCC活性)和/或无法结合Fcγ受体的恒定区。

[0140] 本文所述的某些实施方案提供了人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段),其中一个或多个恒定区结构域中的至少一个氨基酸已缺失或以其他方式改变以提供所需的生化特征,例如当与具有大致相同免疫原性的完整的未改变的抗体相比时,降低或增强的效应子功能、非共价二聚化的能力、提高的定位于肿瘤部位的能力、减少的血清半衰期、和/或增加的血清半衰期。例如,用于本文所述的诊断和治疗方法中的某些抗体或其片段是结构域缺失的抗体,其包含类似于免疫球蛋白重链的多肽链,但其缺乏一个或多个重链结构域的至少一部分。例如,在某些抗体中,经修饰的抗体的恒定区的一个整个结构域将缺失,例如,CH2结构域的全部或部分将缺失。

[0141] 在某些其他实施方案中,人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)包含源自不同抗体同种型的恒定区(例如,来自人IgG1、IgG2、IgG3或IgG4中的两种或更多种的恒定区)。在其他实施方案中,人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)包含嵌合铰链(即,包含源自不同抗体同种型的铰链结构域的铰链部分的铰链,所述铰链结构域例如来自IgG4分子的上部铰链域和IgG1中间铰链结构域)。在一个实施方案中,人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)包含来自人IgG4分子的Fc区或其部分,以及在分子的核心铰链区中的Ser228Pro(S228P)突变(EU编号)。

[0142] 在某些示例性实施方案中,人源化单克隆抗体的Fc部分或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可以使用本领域已知的技术进行突变以提高或降低效应子功能。例如,恒定区结构域的缺失或失活(通过点突变或其他手段)可以减少循环修饰抗体的Fc受体结合,从而增加肿瘤定位。在其他情况下,可能是与本公开文本一致的恒定区修饰减弱了补体结合,从而减少了血清半衰期和缀合的细胞毒素的非特异性缔合。恒定区的其

他修饰可以用于修饰二硫键或寡糖部分,其由于增加的抗原特异性或柔性而允许增强的定位。所得的生理特征、生物利用度和修饰的其他生物化学效应(如肿瘤定位、生物分布和血清半衰期)可以使用熟知的免疫学技术在无需过多的实验的情况下容易地测量和量化。

[0143] 在某些实施方案中,在人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段中使用的Fc结构域(例如,抗αβTCR抗体或其片段)是Fc变体。如本文所用,术语"Fc变体"是指相对于衍生所述Fc结构域的野生型Fc结构域具有至少一个氨基酸取代的Fc结构域。例如,其中所述Fc结构域源自人IgG1抗体,所述人IgG1 Fc结构域的Fc变体包含相对于所述Fc结构域的至少一个氨基酸取代。

[0144] Fc变体的一个或多个氨基酸取代可以位于Fc结构域内的任何位置(即,任何EU惯例氨基酸位置)处。在一个实施方案中,所述Fc变体在位于铰链结构域或其部分中的氨基酸位置处包含取代。在另一个实施方案中,所述Fc变体在位于CH2结构域或其部分中的氨基酸位置处包含取代。在另一个实施方案中,所述Fc变体在位于CH3结构域或其部分中的氨基酸位置处包含取代。在另一个实施方案中,所述Fc变体在位于CH4结构域或其部分中的氨基酸位置处包含取代。

[0145] 所述抗体可以采用已知赋予效应子功能和/或FcR结合改善(例如,减少或增强)的任何本领域公认的Fc变体。所述Fc变体可以包括例如国际PCT公开案WO 88/07089A1、WO 96/14339A1、WO 98/05787A1、WO 98/23289A1、WO 99/51642A1、WO 99/58572A1、WO 00/09560A2、WO 00/32767A1、WO 00/42072A2、WO 02/44215A2、WO 02/060919A2、WO 03/074569A2、WO 04/016750A2、WO 04/029207A2、WO 04/035752A2、WO 04/063351 A2、WO 04/074455A2、WO 04/099249A2、WO 05/040217A2、WO05/070963A1、WO 05/077981A2、WO 05/092925A2、WO 05/123780A2、WO 06/019447A1、WO 06/047350A2和WO 06/085967A2或美国专利号5,648,260;5,739,277;5,834,250;5,869,046;6,096,871;6,121,022;6,194,551;6,242,195;6,277,375;6,528,624;6,538,124;6,737,056;6,821,505;6,998,253;和7,083,784中公开的任何一个氨基酸取代,其各自通过引用并入本文。

[0146] 在一个示例性实施方案中,人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可以包括在EU位置268处包含氨基酸取代(例如,H268D或H268E)的Fc变体。在另一个示例性实施方案中,人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可以在EU位置239(例如,S239D或S239E)和/或EU位置332(例如,I332D或I332Q)处包含氨基酸取代。

[0147] 在某些实施方案中,人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可以包括包含氨基酸取代的Fc变体,所述氨基酸取代改变抗体的抗原非依赖性效应子功能,特别是抗体的循环半衰期。当与缺乏这些取代的抗体相比时,此类抗体展现出与新生儿Fc受体(FcRn)的增加或减少的结合,因此在血清中分别具有增加或减少的半衰期。具有改善的对于FcRn的亲和力的Fc变体预期具有较长的血清半衰期,并且此类分子在治疗哺乳动物的方法中具有有用的应用,在所述哺乳动物中需要所施用的抗体具有长半衰期例如以治疗慢性疾病或障碍。相反,具有降低的FcRn结合亲和力的Fc变体预期具有较短的半衰期,并且此类分子也可用于例如施用至哺乳动物,在所述哺乳动物中缩短的循环时间可能是有利的,例如,对于体内诊断成像或者在当起始抗体长期存在于循环中时具有毒副作用的情况下。具有降低的FcRn结合亲和力的Fc变体也不太可能穿过胎盘,因此也可

用于治疗孕妇的疾病或障碍。另外,可能需要降低的FcRn结合亲和力的其他应用包括需要定位到脑、肾和/或肝脏的那些应用。在一个示例性实施方案中,改变的抗体展现出从脉管系统穿过肾小球上皮的转运减少。在另一个实施方案中,改变的抗体展现出从脑穿过血脑屏障(BBB)进入血管空间的转运减少。

[0148] 在一个实施方案中,具有经改变的FcRn结合的抗体包含在Fc结构域的“FcRn结合环”内具有一个或多个氨基酸取代的Fc结构域。FcRn结合环由氨基酸残基280-299(根据EU编号)构成。在国际PCT公开号WO 05/047327中披露了改变FcRn结合活性的示例性氨基酸取代,将所述文献出于所有目的通过引用以其整体并入本文。在某些示例性实施方案中,人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)包含具有一个或多个以下取代的Fc结构域:V284E、H285E、N286D、K290E和S304D(EU编号)。

[0149] 在其他实施方案中,用于本文描述的诊断和治疗方法中的人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)具有被改变以减少或消除糖基化的恒定区,例如IgG1或IgG4重链恒定区。例如,抗体还可以包括包含改变抗体糖基化的氨基酸取代的Fc变体。例如,所述Fc变体可以具有降低的糖基化(例如,N-或O-连接的糖基化)。在示例性实施方案中,Fc变体包含通常在氨基酸位置297(EU编号)处发现的N-连接聚糖的降低的糖基化。在另一个实施方案中,所述抗体在糖基化基序(例如,含有氨基酸序列NXT或NXS的N-连接的糖基化基序)内或附近具有氨基酸取代。在特定实施方案中,所述抗体包括在氨基酸位置228或299(EU编号)处具有氨基酸取代的Fc变体。在更特定实施方案中,所述抗体包含含有S228P和T299A突变(EU编号)的IgG1或IgG4恒定区。

[0150] 在国际PCT公开号WO 05/018572中披露了赋予降低或改变的糖基化的示例性氨基酸取代,将所述文献出于所有目的通过引用以其整体并入本文。在某些实施方案中,抗体或其片段被修饰以消除糖基化。此类抗体或其片段可称为“agly”抗体或其片段(例如,“agly”抗体片段)。虽然不旨在受科学理论的束缚,但认为agly抗体或其片段在体内可以具有改进的安全性和稳定性特征。示例性agly抗体或agly抗体片段包含缺乏Fc效应子功能的IgG4抗体的去糖基化Fc区,从而消除了Fc介导的对正常重要器官的毒性的可能性。在又其他实施方案中,agly抗体或agly抗体片段包含改变的聚糖。例如,agly抗体或agly抗体片段可以在Fc区的Asn297(N297)处的N-聚糖上具有减少数量的岩藻糖残基,即,去岩藻糖基化。在另一个实施方案中,agly抗体或agly抗体片段可以在Fc区的Asn297处的N-聚糖上具有改变数量的唾液酸残基。

[0151] iv)共价附接

[0152] 可以修饰人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段),例如通过将分子共价附接至抗体,使得共价附接不会阻止抗体特异性结合其同源表位。例如,但无限制,人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可以通过以下方式来修饰:糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、由已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白水解裂解、与细胞配体或其他蛋白质连接等。许多化学修饰中的任何一种可以通过已知技术进行,包括但不限于特异性化学裂解、乙酰化、甲酰化等。此外,衍生物可含有一种或多种非经典氨基酸。

[0153] 人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可进一步在N末端或C末端重组融合至异源多肽或者化学缀合(包括共价和非共价缀合)至多肽

或其他组合物。例如,抗αβTCR抗体可以与在检测测定中可用作标记的分子以及效应分子(如异源多肽、药物、放射性核素或毒素)重组融合或缀合。参见例如PCT公开案WO 92/08495、WO 91/14438和WO 89/12624;美国专利号5,314,995;和EP 396,387。

[0154] 人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可以与一种或多种异源多肽融合以增加体内半衰期或用于使用本领域已知的方法进行的免疫测定中。例如,在一个实施方案中,聚乙二醇(PEG)可以与人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)缀合以增加其体内半衰期。Leong,S.R.,等人,Cytokine 16:106(2001);Chapman A.P,Adv.Drug Deliv.Rev.54:531(2002);或Weir等人,Biochem.Soc.Transactions 30:512(2002)。

[0155] 此外,人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可以与一个或多个标记序列(如肽)融合,以促进人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)的纯化或检测。在某些实施方案中,标记氨基酸序列是六组氨酸肽,尤其如在pQE载体中提供的标签(QIAGEN,Inc.,9259Eton Avenue,Chatsworth,Calif.,91311),许多所述六组氨酸肽是可商购的。如Gentz等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:821-824(1989)中所述,例如,六组氨酸使得可便利地纯化融合蛋白。可用于纯化的其他肽标签包括但不限于对应于源自流感血凝素蛋白的表位(Wilson等人,Cell 37:767-778(1984))的"HA"标签、以及"flag"标签。

[0156] 人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可以以非缀合形式使用或可以缀合至多种分子中的至少一种,例如以改善分子的治疗特性,以促进靶标检测,或用于受试者的成像或治疗。当进行纯化时,可以在纯化之前或之后标记或缀合人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)。特别地,人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可以与治疗剂、前药、肽、蛋白质、酶、病毒、脂质、生物反应调节剂、药剂或PEG缀合。

[0157] 本公开文本还包括与诊断剂或治疗剂缀合的人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)。人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可以在诊断方面使用以例如监测免疫细胞障碍(例如,CLL)的发生或进展,作为临床测试程序的一部分以例如确定给定治疗和/或预防方案的功效。可通过将人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)与可检测物质偶联来促进检测。可检测物质的例子包括各种酶、辅基、荧光材料、发光材料、生物发光材料、放射性材料、使用各种正电子发射断层扫描的正电子发射金属以及非放射性顺磁性金属离子。关于可根据本公开文本缀合至抗体以用作诊断剂的金属离子参见例如美国专利号4,741,900。合适的酶的例子包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、β-半乳糖苷酶和乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的例子包括链霉亲和素/生物素和抗生物素蛋白/生物素;合适的荧光物质的例子包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯和藻红蛋白;发光物质的例子包括鲁米诺;生物发光物质的例子包括萤光素酶、荧光素和水母发光蛋白;并且合适的放射性物质的例子包括^{125}I、^{131}I、^{111}In和^{99}Tc。

[0158] 用于本文公开的诊断和治疗方法中的人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可以与以下缀合:一种或多种细胞毒素(如放射性同位素、细胞毒性药物或毒素)治疗剂、细胞抑制剂、生物毒素、前药、肽、蛋白质、酶、病毒、脂质、生

物反应调节剂、药剂、免疫活性配体(例如淋巴因子或其他抗体,其中所得分子与肿瘤细胞和效应细胞(如T细胞)二者结合)或PEG。

[0159] 在另一个实施方案中,用于本文公开的诊断和治疗方法中的人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可以与减少肿瘤细胞生长的分子缀合。在其他实施方案中,所公开的组合物可包含与药物或前药偶联的人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)。本文所述的再其他实施方案包括使用与特定生物毒素或其细胞毒性片段如蓖麻毒素、多花白树毒蛋白、假单胞菌外毒素或白喉毒素等缀合的抗体或其片段。选择使用哪种缀合抗体或非缀合抗体将取决于癌症的类型和阶段、辅助治疗的使用(例如,化学疗法或外部辐射)和受试者状况。应当理解,本领域技术人员鉴于本文的传授内容可以容易地做出这样的选择。

[0160] 应当理解,在之前的研究中,同位素标记的抗肿瘤抗体已成功用于破坏动物模型中的肿瘤细胞,并且在一些情况下还用于人体。示例性放射性同位素包括但不限于:^{67}Cu、^{67}Ga、^{90}Y、^{105}Rh、^{111}In、^{123}I、^{125}I、^{131}I、^{153}Sm、^{166}Ho、^{177}Lu、^{186}Re、和^{188}Re。放射性核素通过产生电离辐射起作用,导致核DNA中的多条链断裂,从而导致细胞死亡。用于产生治疗性缀合物的同位素通常产生具有短路径长度的高能α或β粒子。此类放射性核素杀死它们紧密接近的细胞,例如缀合物已附接或已进入的肿瘤细胞。它们对非定位细胞影响不大或没有影响。放射性核素基本上是非免疫原性的。

[0161] V.抗体生产

[0162] 抗体生产可以通过本领域已知的任何技术进行,包括在转基因生物中进行,所述转基因生物如山羊(参见Pollock等人(1999)J.lmmunol.Methods 231:147-157)、鸡(参见Morrow,K.J.J.(2000)Genet.Eng.News 20:1-55)、小鼠(参见Pollock等人,同上)或植物(参见Doran,P.M.(2000)Curr.Opinion Biotechnol.11:199-204;Ma.J.K-C.(1998)Nat.Med.4:601-606;Baez,J.等人(2000)BioPharm.13:50-54;Stoger,E.等人(2000)Plant Mol.Biol.42:583-590)。抗体也可以通过化学合成或通过在宿主细胞中表达编码抗体的基因来产生。

[0163] 将编码人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)的多核苷酸分离并插入到可复制的构建体或载体(如质粒)中,以便在宿主细胞中进一步增殖或表达。适合于表达根据所述的实施方案的人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)的构建体或载体(例如,表达载体)在本领域中是可获得的。多种载体是可获得的,包括在宿主细胞中保持为单拷贝或多拷贝的载体,或整合到宿主细胞的一种或多种染色体中的载体。可以将构建体或载体引入合适的宿主细胞中,并且可以在培养物中产生和维持表达人源化免疫球蛋白的细胞。可以使用单个载体或多个载体来表达人源化免疫球蛋白。

[0164] 编码人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)的多核苷酸易于使用常规程序(例如寡核苷酸探针)分离和测序。可以使用的载体包括质粒、病毒、噬菌体、转座子、微型染色体,其中质粒是典型实施方案。通常,此类载体还包括信号序列、复制起点、一个或多个标记基因、增强子元件、启动子和转录终止序列,它们与轻链和/或重链多核苷酸可操作地连接以促进表达。可以将编码轻链和重链的多核苷酸插入到分开的载体中并且并行或依次引入(例如,通过转化、转染、电穿孔或转导)到同一宿主细胞

中,或者如果需要,可以将重链和轻链二者插入到同一载体中然后进行这种引入。

[0165] 可以提供启动子以用于在合适的宿主细胞中表达。启动子可为组成型或诱导型。例如,启动子可以与编码人源化免疫球蛋白或免疫球蛋白链的核酸可操作地连接,以使其引导所编码多肽的表达。用于原核和真核宿主的多种合适启动子是可获得的。原核启动子包括用于大肠杆菌的lac、tac、T3、T7启动子;3-磷酸甘油酸激酶或其他糖酵解酶,例如烯醇化酶、甘油醛-3-磷酸脱氢酶、己糖激酶、丙酮酸脱羧酶、磷酸果糖激酶、6-磷酸葡萄糖异构酶、3-磷酸甘油酸变位酶和葡糖激酶。真核启动子包括诱导型酵母启动子,例如醇脱氢酶2、异细胞色素C、酸性磷酸酶、金属硫蛋白和负责氮代谢或麦芽糖/半乳糖利用的酶;RNA聚合酶II启动子,包括病毒启动子,如多瘤病毒、鸡痘病毒和腺病毒(例如,腺病毒2)、牛乳头瘤病毒、鸟类肉瘤病毒、巨细胞病毒(特别是即时早期基因启动子)、逆转录病毒、乙型肝炎病毒、肌动蛋白、劳斯肉瘤病毒(RSV)启动子和早期或晚期猿猴病毒40以及非病毒启动子,如EF-1α(Mizushima和Nagata(1990)Nucleic Acids Res.18(17):5322)。本领域技术人员将能够选择适当的启动子来表达人源化抗体或其部分。

[0166] 如果适合于例如在高等真核生物细胞中表达,可包括另外的增强子元件来代替被发现位于上述启动子中的增强子,或与所述增强子共存。合适的哺乳动物增强子序列包括来自球蛋白、弹性蛋白酶、白蛋白、胎蛋白、金属硫蛋白和胰岛素的增强子元件。替代性地,可使用来自真核细胞病毒的增强子元件,如SV40增强子、巨细胞病毒早期启动子增强子、多瘤病毒增强子、杆状病毒增强子或鼠IgG2a基因座(参见WO 04/09823)。所述增强子通常位于载体上的启动子上游位点,同时其还可位于其他位置,例如在非翻译区内或在聚腺苷酸化信号下游。增强子的选择和定位可基于与用于表达的宿主细胞的相容性。

[0167] 另外,载体(例如,表达载体)可包含用于选择携带载体的宿主细胞的选择性标记物,以及在复制型载体的情况下的复制起点。编码赋予抗生素或药物抗性的产物的基因是常用选择性标记物,并且可用于原核细胞(例如,f3-内酰胺酶基因(氨苄青霉素抗性)、tet基因(四环素抗性)和真核细胞(例如,新霉素(G418或遗传霉素)、gpt(霉酚酸)、氨苄青霉素或潮霉素5抗性基因)。二氢叶酸还原酶标记基因允许在多种宿主中用甲氨蝶呤进行选择。编码宿主的营养缺陷型标记物的基因产物的基因(例如,LEU2、URA3、HIS3)通常在酵母中用作选择性标记物。还考虑了病毒(例如,杆状病毒)或噬菌体载体以及能整合到宿主细胞基因组中的载体(如逆转录病毒载体)的使用。

[0168] 在真核系统中,聚腺苷酸化和终止信号可操作地连接到编码本文所述抗体的多核苷酸。所述信号通常位于开放阅读框的3'。在哺乳动物系统中,聚腺苷酸化/终止信号的非限制性例子包括源自以下的信号:生长激素、延伸因子-1α和病毒(例如,SV40)基因或逆转录病毒长末端重复序列。在酵母系统中,聚腺苷酸化/终止信号的非限制性例子包括源自磷酸甘油酸激酶(PGK)和醇脱氢酶1(ADH)基因的信号。在原核系统中,通常不需要聚腺苷酸化信号,并且通常代之以采用较短并且更确定的终止子序列。聚腺苷酸化/终止序列的选择可基于与用于表达的宿主细胞的相容性。除了上文以外,可用于提高产率的其他特征包括染色体重塑元件、内含子和宿主细胞特异性密码子修饰。可以修改本文所述抗体的密码子使用以适应宿主细胞的密码子偏倚,从而增加转录物和/或产物产量(例如,Hoekema,A.等人(1987)Mol.Cell Biol.7(8):2914-24)。密码子的选择可以基于与用于表达的宿主细胞的相容性。

[0169] 因此,本公开文本涉及编码人源化免疫球蛋白或其重链或轻链的分离的核酸分子。本公开文本还涉及编码免疫球蛋白及其链的抗原结合部分的分离的核酸分子。

[0170] 人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可以例如通过在合适的宿主细胞中表达一种或多种编码所述抗体的重组核酸来产生。宿主细胞可以使用任何合适的方法产生。例如,可以将本文所述的表达构建体(例如,一种或多种载体,例如哺乳动物细胞表达载体)引入合适的宿主细胞中,并且可以将所得细胞维持(例如,在培养物中、在动物中、在植物中)在适合表达一种或多种构建体或一种或多种载体的条件下。宿主细胞可以是原核细胞,包括细菌细胞,如大肠杆菌(例如菌株DH5α™)(Invitrogen,卡尔斯巴德,加利福尼亚州)、PerC6(Crucell,莱顿,荷兰)、枯草芽孢杆菌和/或其他合适的细菌;真核细胞,如真菌或酵母细胞(例如毕赤酵母、曲霉属、酿酒酵母、粟酒裂殖酵母、粗糙脉孢菌)或其他低等真核细胞,以及高等真核细胞:如来自昆虫的那些(例如施耐德果蝇S2细胞、Sf9昆虫细胞)(WO 94/126087)、BTI-TN-5B1-4(High Five™)昆虫细胞(Invitrogen),哺乳动物细胞(例如COS细胞,如COS-1(ATCC登录号CRL-1650)和COS-7(ATCC登录号CRL-1651)、CHO(例如ATCC登录号CRL-9096)、CHO DG44(Urlaub,G.和Chasin,L.A.(1980)Proc.Natl.Acad.Sci.USA,77(7):4216-4220)、293(ATCC登录号CRL-1573)、HEK、HeLa(ATCC登录号CCL-2)、CVI(ATCC登录号CCL-70)、WOP(Dailey,L.,等人(1985)J.Virol.,54:739-749)、3T3、293T(Pear,W.S.,等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.U.S.A.,90:8392-8396)、NS0细胞、SP2/0细胞、HuT 78细胞等,或者植物(例如烟草、浮萍属(浮萍)、和藻类)。参见例如,Ausubel,F.M.等人,编Current Protocols in Molecular Biology,Greene Publishing Associates and John Wiley&Sons Inc.(1993)。在一些实施方案中,宿主细胞不是多细胞生物体(例如植物或动物)的一部分,例如它是分离的宿主细胞或是细胞培养物的一部分。

[0171] 宿主细胞可在以下装置中培养:旋转烧瓶、振荡烧瓶、滚瓶、波式反应器(例如,来自wavebiotech.com的System 1000)或中空纤维系统,但对于大规模生产,优选的是搅拌罐反应器或袋式反应器(例如,美国新泽西州萨默塞特Wave Biotech)特别用于悬浮培养。搅拌罐反应器可适于使用例如喷洒器、挡板或低剪切叶轮进行通风。对于鼓泡塔和气升式反应器,可使用用空气或氧气泡直接通风。如果在无血清培养基中培养宿主细胞,培养基中可补充有细胞保护剂,如普朗尼克F-68以帮助防止细胞因通风过程而损伤。根据宿主细胞的特征,可使用微载体作为锚定依赖性细胞系的生长基底,或该细胞可适于悬浮培养。宿主细胞、特别是脊椎动物宿主细胞的培养可利用多种操作模式,如分批、补料分批、重复分批加工(参见,Drapeau等人(1994)Cytotechnology 15:103-109)、延长分批工序或灌注培养。虽然重组转化的哺乳动物宿主细胞可在含血清培养基(例如包含胎牛血清(FCS)的培养基)中培养,但是优选的是,此类宿主细胞是在无血清培养基中培养,如Keen等人(1995)Cytotechnology 17:153-163中所披露,或可商购培养基,如ProCHO™或UltraCHO™(美国新泽西州Cambrex),所述培养基在需要时补充有诸如葡萄糖等能源和诸如重组胰岛素等合成生长因子。宿主细胞的无血清培养可能需要那些细胞适于在无血清条件下生长。一种适应方法是在含血清培养基中培养此类宿主细胞并将80%的培养基反复更换为无血清培养基,使得宿主细胞学会适应无血清条件(参见,例如,Scharfenberg,K.等人(1995)Animal Cell Technology:Developments Towards the 21st Century(Beuvery,E.C.等人编),第619-623页,Kluwer Academic publishers)。

[0172] 根据所述的实施方案的人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可以分泌到培养基中并使用多种技术从中回收和纯化以提供一定程度的适用于预期用途的纯化。例如,在与包含治疗性抗体的培养基相比时,使用人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)以治疗人受试者通常要求如通过还原SDS-PAGE测定的至少95%纯度,更通常为98%或99%纯度。在第一种情况下,可通过以下方式从培养基去除细胞碎片:使用离心,之后使用例如微滤、超滤和/或深层过滤对上清液进行澄清步骤。替代性地,人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)可在不用事先离心的情况下通过微滤、超滤或深层过滤来收获。可使用多种其他技术,如透析和凝胶电泳和色谱技术,如羟基磷灰石(HA)、亲和色谱(任选地涉及亲和标签系统,如多组氨酸)和/或疏水相互作用色谱(HIC)(参见US 5,429,746)。在一个实施方案中,在各种澄清步骤后,通过以下方式捕获人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段):使用蛋白A或蛋白G亲和色谱,之后进行进一步的色谱步骤,如离子交换和/或HA色谱、阴离子或阳离子交换、尺寸排阻色谱,以及硫酸铵沉淀。还可采用各种病毒去除步骤(例如,使用例如DV-20过滤器进行纳米过滤)。在这些不同步骤后,提供了包含至少10mg/mL或更多,例如100mg/mL或更多的本文所述抗体的纯化制剂,并且因此形成本文所述的另一个实施方案。超速离心可产生100mg/mL或更高的浓度。此类制剂基本上不含本文所述抗体的聚集形式。

[0173] 细菌系统特别适合于表达抗体片段。此类片段位于细胞内或周质内。不溶性周质蛋白可根据本领域技术人员已知的方法提取并重新折叠以形成活性蛋白,参见Sanchez等人(1999)J.Biotechnol.72:13-20;Cupit,P.M.等人(1999)Lett.Appl.Microbiol.29:273-277。

[0174] 本公开文本还涉及包含本文所述的核酸例如载体(例如,表达载体)的细胞。例如,可通过适用于所选宿主细胞的方法(例如,转化、转染、电穿孔、感染)将编码根据所述的实施方案的人源化免疫球蛋白的重链和轻链的核酸(即,一种或多种核酸)或包含这样的一种或多种核酸的构建体(例如一种或多种构建体,例如一种或多种载体)引入到合适的宿主细胞中,其中所述一种或多种核酸可操作地连接或变为可操作地连接至一个或多个表达控制元件(例如,通过方法在细胞中产生的整合到宿主细胞基因组中的载体中、构建体中)。可以将宿主细胞维持在适合于表达的条件下(例如,在诱导剂、补充有适当盐、生长因子、抗生素、营养补充物等的合适培养基的存在下),由此产生编码的一种或多种多肽。如果需要,可以从例如宿主细胞、培养基或乳汁中分离编码的人源化抗体。该过程包括在转基因动物或植物(例如,烟草)的宿主细胞(例如,乳腺细胞)中表达(参见例如WO 92/03918)。

[0175] VI.治疗或预防T细胞介导的障碍的方法

[0176] 在需要免疫抑制和/或发生自身免疫病症的许多情况下,需要抑制T细胞活性。因此,指示靶向αβTCR/CD3复合物可治疗涉及不适当或不需要的免疫应答的疾病,如炎症、自身免疫性和/或涉及此类机制的其他病症。在一个实施方案中,这种疾病或障碍是自身免疫疾病和/或炎症疾病。此类T细胞介导的自身免疫疾病和/或炎症疾病的例子包括但不限于:系统性红斑狼疮(SLE)、类风湿性关节炎(RA)、炎性肠病(IBD)(包括溃疡性结肠炎(UC)和克罗恩病(CD))、多发性硬化(MS)、硬皮病、1型糖尿病(T1D)、以及其他疾病和障碍,如寻常型天疱疮(PV)、银屑病、特应性皮炎、乳糜泻、慢性阻塞性肺病、桥本甲状腺炎、格雷夫斯病(甲

状腺)、舍格伦综合征、格林-巴利综合征、肺出血-肾炎综合征、艾迪生病、韦氏肉芽肿病、原发性胆管硬化、硬化性胆管炎、自身免疫性肝炎、风湿性多肌痛、雷诺现象、颞动脉炎、巨细胞动脉炎、自身免疫性溶血性贫血、恶性贫血、结节性多动脉炎、贝切特病、原发性胆汁性肝硬化、葡萄膜炎、心肌炎、风湿热、强直性脊柱炎、肾小球肾炎、结节病、皮肌炎、重症肌无力、多肌炎、斑秃、和白癜风。

[0177] 在一个实施方案中,这种疾病或障碍是SLE。在一个实施方案中,这种疾病或障碍是RA。在一个实施方案中,这种疾病或障碍是IBD。在一个实施方案中,这种疾病或障碍是MS。在一个实施方案中,这种疾病或障碍是T1D。

[0178] 在另一个实施方案中,这种疾病或障碍是异种移植、同种异体移植、异种妊娠、先兆子痫或Rh疾病。

[0179] 在具体实施方案中,根据所述的实施方案的抗体用于通过对受试者进行免疫抑制来帮助移植。这种用途减轻了移植物抗宿主病(GvHD),这是异种移植或同种异体移植(包括但不限于:干细胞、骨髓、组织、身体部位和实体器官的移植)后的常见并发症。组织可以包括但不限于:角膜、巩膜、骨、皮肤、血管和心脏瓣膜。身体部位可以包括但不限于:面部或其一部分、一个或多个手臂或其部分、一只或多只手或其部分、一条或多条腿或其部分、以及头皮或其部分。实体器官可以包括但不限于:心脏、肺、肝脏、肾脏、胰腺、胃、小肠、大肠、睾丸和卵巢。关于移植物抗宿主病的现有治疗的描述,参见例如Svennilson,Bone Marrow Transplantation(2005)35:S65-S67和其中引用的参考文献。有利地,本公开文本中提供的抗体可以与其他可用疗法组合使用。

[0180] 关于自身免疫疾病的治疗,组合疗法可包括将本文所述的抗体与药物一起施用,所述药物与所述抗体一起构成预防或治疗此类自身免疫疾病的有效量。当所述自身免疫疾病是1型糖尿病时,组合疗法可包括一种或多种促进胰腺β细胞生长或增强β细胞移植的药剂,如β细胞生长或存活因子或者免疫调节抗体。当所述自身免疫疾病是类风湿性关节炎时,组合疗法可包括以下中的一种或多种:甲氨蝶呤、抗TNF-α抗体、TNF-α受体-Ig融合蛋白、抗IL-15或抗IL-21抗体、非甾体抗炎药(NSAID)、或改善病情的抗风湿药(DMARD)。例如,另外的药剂可以是生物剂,如抗TNF剂(例如,ENBREL®、英利昔单抗(REMICADE®)和阿达木单抗(HUMIRA®)或利妥昔单抗(RITUXAN®)。当所述自身免疫疾病是造血细胞移植排斥时,可以施用一种或多种造血生长因子(如红细胞生成素、G-CSF、GM-CSF、IL-3、IL-11、血小板生成素等)或一种或多种抗微生物剂(如抗细菌、抗病毒、抗真菌药物)。当所述自身免疫疾病是银屑病时,另外的药剂可以是以下中的一种或多种:焦油及其衍生物、光疗法、皮质类固醇、环孢菌素A、维生素D类似物、甲氨蝶呤、p38丝裂原激活蛋白激酶(MAPK)抑制剂以及生物药剂(如抗TNF-α剂和RITUXAN®)。当所述自身免疫疾病是炎性肠病(IBD),如克罗恩病或溃疡性结肠炎时,另外的药剂可以是以下中的一种或多种:氨基水杨酸盐、皮质类固醇、免疫调节剂、抗生素、或生物药剂(如REMICADE®和HUMIRA®)。

[0181] 组合治疗可以以本领域技术人员认为必要或便利的任何方式进行,并且为了本说明书的目的,对使用的化合物的顺序、量、重复或相对量没有考虑限制。因此,可以将根据所述的实施方案的抗体配制成用于治疗的药物组合物。

[0182] VII.抗αβTCR抗体的药物组合物和施用方法

[0183] 在某些实施方案中,提供了药物组合物,所述药物组合物包含本文所述的人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段),或可通过如本公开文本前述方面中定义的测定方法鉴定的一种或多种配体。如本文所讨论的,配体可以是免疫球蛋白、肽、核酸或小分子。在以下讨论中,它们称为"化合物"。

[0184] 本文所述的药物组合物是包含一种或多种能够调节T细胞活性的化合物作为活性成分的物质组合物。所述化合物是任何药学上可接受的盐的形式,或例如,在适当的情况下,是类似物、游离碱形式、互变异构体、对映异构体外消旋体或其组合。预期包含本文所述活性成分的药物组合物的活性成分当以取决于具体情况的量施用时展现出治疗活性,例如在治疗移植物抗宿主病中。

[0185] 在某些实施方案中,药物组合物包含本文所述的人源化单克隆抗体或人源化单克隆抗体片段(例如,抗αβTCR抗体或其片段)、以及药学上可接受的载体或稀释剂。

[0186] 在某些实施方案中,在治疗任何上述病症中,本公开文本中所述的一种或多种化合物可以与任何本领域公认的已知适用于治疗特定适应症的化合物组合使用。因此,本文所述的一种或多种化合物可以与一种或多种本领域公认的已知适用于治疗上述适应症的化合物组合,使得可以向受试者施用便利的单一组合物。可以调整剂量方案以提供最佳治疗反应。

[0187] 例如,可以每天给予几个分开的剂量,或者可以如治疗情况的紧急状态所示按比例减少剂量。

[0188] 可以将活性成分以便利的方式施用,如通过口服、静脉内(水溶性情况下)、肌内、皮下、鼻内、皮内或栓剂途径或植入(例如,使用缓慢释放分子)。在移植的情况下,还可以将活性成分用于在移植前处理移植到患者体内的细胞、组织或器官。这样做可以是为了预防、降低例如移植物抗宿主病的可能性或减轻例如移植物抗宿主病的症状。

[0189] 根据施用途径,活性成分可能需要被包覆在一种材料中以保护所述成分免受酶、酸和其他可能使所述成分失活的自然条件的作用。

[0190] 为了通过肠胃外施用以外的方式施用活性成分,将所述活性成分用材料包覆或与材料一起施用以防止其失活。例如,可以将活性成分在佐剂中施用,与酶抑制剂共同施用或在脂质体中施用。佐剂以其最广泛的意义使用,并且包括任何免疫刺激化合物,如干扰素。本文考虑的佐剂包括间苯二酚、非离子表面活性剂(如聚氧乙烯油基醚和正十六烷基聚乙烯醚)。酶抑制剂包括胰腺胰蛋白酶。

[0191] 脂质体包括水包油包水乳剂以及常规脂质体。

[0192] 也可以将活性成分肠胃外或腹膜内施用。

[0193] 也可以在甘油、液体聚乙二醇及其混合物以及在油中制备分散体。在通常的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。

[0194] 适合于注射使用的药物形式包括无菌水溶液(水溶性的情况下)或分散体,以及用于临时制备无菌可注射溶液或分散体的无菌粉末。在所有情况下该形式必须是无菌的并且必须具有达到容易注射的程度的流动性。其在制造和储存条件下必须稳定并且必须抵抗微生物(如细菌和真菌)的污染作用而保存。载体可以是溶剂或分散介质,所述溶剂或分散介质含有例如水、乙醇、多元醇(例如,甘油、丙二醇和液体聚乙二醇等)、其合适的混合物以及

植物油。例如,通过使用包衣(如卵磷脂)、在分散体的情况下通过维持所需粒度、以及通过使用表面活性剂,可以维持适当的流动性。

[0195] 可以通过各种抗细菌剂和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等)来防止微生物的作用。在某些情况下,可优选的是包括等渗剂,例如糖或氯化钠。通过在所述组合物中使用延迟吸收的药剂(例如单硬脂酸铝和明胶),可以延长可注射组合物的吸收。

[0196] 通过以下制备无菌可注射溶液:将活性成分以所需量掺入视需要具有若干上文所列举的其他成分的适当溶剂中,随后过滤灭菌。总体上,通过将灭菌的活性成分掺入无菌媒介物中来制备分散体,所述无菌媒介物含有基础分散介质以及来自以上枚举的那些的所需其他成分。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选制备方法为真空干燥和冷冻干燥技术,这些方法由先前无菌过滤的溶液产生活性成分加上任何另外的所需成分的粉末。

[0197] 各种其他材料可以作为包衣存在或以其他方式改变剂量单位的物理形式。当然,用于制备任何剂量单位形式的任何材料应是药学上纯的并且在所使用的量下基本上是无毒的。此外,可以将活性成分掺入持续释放制剂和配制品中。

[0198] 如本文所用,“药学上可接受的载体和/或稀释剂”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。在某些实施方案中,药学上可接受的载体或稀释剂是水性流体。此类介质和药剂用于药物活性物质的用途是本领域熟知的。除非任何常规介质或药剂与活性成分不相容,否则考虑其在治疗性组合物中的用途。也可以将补充性活性成分掺入组合物中。

[0199] 以剂量单位形式配制肠胃外组合物是尤其有利的,以便于施用和剂量的均匀。如本文所用的剂量单位形式是指适合作为待治疗哺乳动物受试者的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位含有经计算与所需的药物载体联合产生所需治疗效果的预定量的活性物质。本文所述的新型剂量单位形式的规格取决于且直接依赖于(a)活性物质的独特特征和所要实现的特定治疗效果,和(b)在合成用于治疗患有疾病或病症的活受试者(其身体健康受损)的疾病的这种活性物质的领域中固有的限制。主要活性成分以有效量与合适的药学上可接受的载体以剂量单位形式混合以方便和有效施用。在含有补充性活性成分的组合物的情况下,参考所述成分的常用剂量和施用方式确定剂量。

[0200] 剂量可以包括但不限于0.01mg/kg至20mg/kg,包括:0.01mg/kg、0.02mg/kg、0.03mg/kg、0.04mg/kg、0.05mg/kg、0.06mg/kg、0.07mg/kg、0.08mg/kg、0.09mg/kg、0.10mg/kg、0.2mg/kg、0.3mg/kg、0.4mg/kg、0.5mg/kg、0.6mg/kg、0.7mg/kg、0.8mg/kg、0.9mg/kg、1.0mg/kg、1.1mg/kg、1.2mg/kg、1.3mg/kg、1.4mg/kg、1.5mg/kg、1.6mg/kg、1.7mg/kg、1.8mg/kg、1.9mg/kg、2.0mg/kg、2.1mg/kg、2.2mg/kg、2.3mg/kg、2.4mg/kg、2.5mg/kg、2.6mg/kg、2.7mg/kg、2.8mg/kg、2.9mg/kg、3.0mg/kg、3.1mg/kg、3.2mg/kg、3.3mg/kg、3.4mg/kg、3.5mg/kg、3.6mg/kg、3.7mg/kg、3.8mg/kg、3.9mg/kg、4.0mg/kg、4.1mg/kg、4.2mg/kg、4.3mg/kg、4.4mg/kg、4.5mg/kg、4.6mg/kg、4.7mg/kg、4.8mg/kg、4.9mg/kg、5.0mg/kg、5.1mg/kg、5.2mg/kg、5.3mg/kg、5.4mg/kg、5.5mg/kg、5.6mg/kg、5.7mg/kg、5.8mg/kg、5.9mg/kg、6.0mg/kg、6.1mg/kg、6.2mg/kg、6.3mg/kg、6.4mg/kg、6.5mg/kg、6.6mg/kg、6.7mg/kg、6.8mg/kg、6.9mg/kg、7.0mg/kg、7.1mg/kg、7.2mg/kg、7.3mg/kg、

7.4mg/kg、7.5mg/kg、7.6mg/kg、7.7mg/kg、7.8mg/kg、7.9mg/kg、8.0mg/kg、8.1mg/kg、8.2mg/kg、8.3mg/kg、8.4mg/kg、8.5mg/kg、8.6mg/kg、8.7mg/kg、8.8mg/kg、8.9mg/kg、9.0mg/kg、9.1mg/kg、9.2mg/kg、9.3mg/kg、9.4mg/kg、9.5mg/kg、9.6mg/kg、9.7mg/kg、9.8mg/kg、9.9mg/kg、10.0mg/kg、10.1mg/kg、10.2mg/kg、10.3mg/kg、10.4mg/kg、10.5mg/kg、10.6mg/kg、10.7mg/kg、10.8mg/kg、10.9mg/kg、11.0mg/kg、11.1mg/kg、11.2mg/kg、11.3mg/kg、11.4mg/kg、11.5mg/kg、11.6mg/kg、11.7mg/kg、11.8mg/kg、11.9mg/kg、12.0mg/kg、12.1mg/kg、12.2mg/kg、12.3mg/kg、12.4mg/kg、12.5mg/kg、12.6mg/kg、12.7mg/kg、12.8mg/kg、12.9mg/kg、13.0mg/kg、13.1mg/kg、13.2mg/kg、13.3mg/kg、13.4mg/kg、13.5mg/kg、13.6mg/kg、13.7mg/kg、13.8mg/kg、13.9mg/kg、14.0mg/kg、14.1mg/kg、14.2mg/kg、14.3mg/kg、14.4mg/kg、14.5mg/kg、14.6mg/kg、14.7mg/kg、14.8mg/kg、14.9mg/kg、15.0mg/kg、15.1mg/kg、15.2mg/kg、15.3mg/kg、15.4mg/kg、15.5mg/kg、15.6mg/kg、15.7mg/kg、15.8mg/kg、15.9mg/kg、16.0mg/kg、16.1mg/kg、16.2mg/kg、16.3mg/kg、16.4mg/kg、16.5mg/kg、16.6mg/kg、16.7mg/kg、16.8mg/kg、16.9mg/kg、17.0mg/kg、17.1mg/kg、17.2mg/kg、17.3mg/kg、17.4mg/kg、17.5mg/kg、17.6mg/kg、17.7mg/kg、17.8mg/kg、17.9mg/kg、18.0mg/kg、18.1mg/kg、18.2mg/kg、18.3mg/kg、18.4mg/kg、18.5mg/kg、18.6mg/kg、18.7mg/kg、18.8mg/kg、18.9mg/kg、19.0mg/kg、19.1mg/kg、19.2mg/kg、19.3mg/kg、19.4mg/kg、19.5mg/kg、19.6mg/kg、19.7mg/kg、19.8mg/kg、19.9mg/kg、和20.0mg/kg。

[0201] 剂量还可以包括但不限于:约100ng/kg至约0.01mg/kg,包括:约100ng/kg、约200ng/kg、约300ng/kg、约400ng/kg、约500ng/kg、约600ng/kg、约700ng/kg、约800ng/kg、约900ng/kg、约1微克/kg、约2微克/kg、约3微克/kg、约4微克/kg、约5微克/kg、约6微克/kg、约7微克/kg、约8微克/kg、约9微克/kg、约10微克/kg。

[0202] 为了促进肽化合物(包括抗体)向细胞的递送,可以修饰肽以提高它们跨细胞膜的能力。例如,US 5,149,782披露了使用融合肽、离子通道形成肽、膜肽、长链脂肪酸和其他膜共混剂来增加蛋白质跨细胞膜的转运。这些和其他方法还描述于WO 97/37016和US 5,108,921中,将所述文献通过引用并入本文。

[0203] 在另外的方面,提供了本文所述的活性成分,其单独或与已知适合于治疗特定适应症的本领域公认的化合物组合用于治疗疾病。因此,提供了本文所述的活性成分在制备用于治疗与异常免疫应答相关的疾病的药物中的用途。

[0204] 此外,提供了一种治疗与异常免疫应答相关的病症的方法,所述方法包括向受试者施用治疗有效量的可使用如上文所述测定方法鉴定的配体。

[0205] 下文提供的实施例仅用于说明目的,并且不应被视为对本文所述的组合物和方法的限制。

[0206] 实施例

[0207] 实施例1:VH31抗αβTCR抗体配制品的加速稳定性研究

[0208] 对VH31抗体的各种配制品进行了加速稳定性研究。参考或对照VH31抗体是GL1BM系列中的野生型人源化抗人αβTCR抗体,其包含具有如SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列的重链可变结构域和具有如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列的轻链可变结构域(表1)。在4℃或更低的冷藏温度下四个月后,在液体配制品中没有观察到断裂。然而,在经受包括升高的温度和pH(即45℃;pH 4.0-8.0)在内的加速条件持续五周的VH31液体配制品中检测到片

段。注意到两个低分子量(LMW)条带的存在显现与对应于VH31抗体轻链(LC)的条带的消失相关(图1,箭头),这意味着观察到的LMW物质的来源发生了轻链断裂。

[0209] 实施例2:基于细胞的测定以评价应激配制品的效力

[0210] VH31抗αβTCR抗体选择性地耗尽激活的T细胞。为了确定暴露于加速条件下的VH31配制品是否保留了这种能力,进行了基于细胞的效力测定。效力测定基于T细胞受体的激活和随后抗αβTCR抗体的结合(以刺激细胞凋亡途径)。

[0211] Jurkat T淋巴细胞表达T细胞受体复合物。效力测定利用Jurkat T细胞系,所述细胞系含有与萤光素酶报告基因相连的激活T细胞核因子(NFAT)响应元件。该工程化细胞系用于检查T细胞激活以及随后抗αβTCR抗体对激活信号的抑制。T细胞受体复合物的激活刺激NFAT通路,导致萤光素酶的产生。然后使用萤光素酶底物(例如萤光素)和发光检测器测量萤光素酶的产生。激活水平与萤光素酶的产生成比例。固定化抗CD3激活Jurkat T细胞,如通过在NFAT-萤光素酶Jurkat细胞中诱导NFAT途径和随后的萤光素酶产生来测量。抗αβTCR抗体以剂量依赖性方式抑制激活,这是抗αβTCR效力的定性量度。

[0212] 定性效力测定以96孔板形式运行。96孔板在2-8℃下用1μg/mL的抗CD3包被过夜。洗涤板,并将NFAT-萤光素酶Jurkat T淋巴细胞($5x10^4$个细胞/孔)添加至抗CD3包被的板中。将细胞与抗CD3在37℃和5%CO_2下孵育五小时,以激活T细胞受体复合物。然后将每种细胞条件与多种水平(0.003至200μg/mL)的抗αβTCR(对照和样品)一起再孵育十八小时。每个条件都包括阴性抗CD3(0μg/mL)和抗αβTCR(0μg/mL)对照。在第二个孵育步骤之后,去除抗αβTCR稀释液,并将细胞用细胞培养裂解试剂裂解。使用萤光素酶底物和发光读板器测量裂解物的萤光素酶产生。预期较高剂量的抗αβTCR抗体会导致较低的发光信号,表明激活反应受到抑制。使用Softmax Pro软件绘制剂量反应数据,并将样品剂量反应曲线与对照剂量反应曲线进行目视比较。

[0213] 图2中的图示出了来自基于细胞的效力测定的数据。与暴露于较不严酷条件(即45℃;pH 5.0)五周(空心圆圈符号)或对照条件(即≤0℃;pH 5.0;空心菱形符号)的VH31配制品相比,暴露于加速条件(即45℃;pH 8.0)五周的VH31抗体配制品显示出相当大的效力损失。该研究证明了LMW物质的出现与抗体效力损失之间的关系,二者可能是由于轻链断裂造成。

[0214] 实施例3:抗体片段的分析

[0215] 通过对观察到的条带的分子量估计以及通过N末端测序和肽作图研究,进一步分析抗体片段(图3)。已知多肽的化学和酶促裂解发生在Asn(N)与Pro(P)残基之间。因此,基于测序和作图研究,轻链氨基酸残基N93和P94被鉴定为轻链剪切的可能位置和所鉴定片段的来源(图4)。为了进一步证实这一点,将VH31轻链(P7)在pH 4.0至8.0下进行胰蛋白酶消化。图5中的图示出了如果在N93/P94处发生酶促剪切时预期的各种轻链片段。这些片段对应于氨基酸残基94-102(图5A)、残基61-93(图5B)和残基94-106(图5C)。对应于氨基酸94-102和94-106的两个C末端产物是由于胰蛋白酶消化不完全所致。如预期的那样,pH的增加与预测片段的增加有关。

[0216] 已知Asn(N)可在溶液中转化为Asp(D),例如通过Asn侧链的脱酰胺作用(图6)。为了更好地理解LC断裂的机制,分析了LC片段以确定残基93是N还是D。同位素分布揭示大部分61-93肽片段以Asn为末端。没有观察到对应于D93的单独峰,表明Asn转化为Asp、随后

Asp/Pro裂解并不是VH31 LC断裂的主要原因。由于这些原因,随后的工程化稳定性研究集中在残基N93/P94上。

[0217] 实施例4:通过诱变工程化轻链(LC)变体

[0218] 采用诱变方法来工程化具有提高的稳定性和抗断裂性的VH31轻链变体。先前尝试去除无关抗体(即sFLT01)中的Asn剪切位点并不能防止抗体断裂。更复杂的是,注意到氨基酸残基N93和P94位于轻链互补决定区3(LC CDR3)内。考虑到上述情况,轻链变体被合理设计,目的是增强轻链稳定性的同时还保持抗原结合亲和力和抗体效力。

[0219] 氨基酸Pro(P)在折叠的蛋白质结构中几乎不提供自由度。因此,假设在不破坏LC CDR3构象的情况下替代残基94处的Pro可能是困难的。Ala(A)由于其物理特征而常用于诱变。作为起点,残基N93和P94被单独或相伴随地被A替代。此外,基于视为相容的氨基酸特征,例如电荷、大小、氢键、极性与非极性等,在残基N93处制得了若干其他取代。图7示出了制得和测试的各种氨基酸取代。

[0220] 野生型抗αβTCR VH31表达载体用作用于诱变和表达控制的模板。设计了八对引物,并使用QuikChange Lightning定点诱变试剂盒(Agilent)进行PCR诱变。然后通过DNA测序确认突变DNA。

[0221] 实施例5:LC变体的表达和分析

[0222] 将突变体和野生型(WT)DNA转染到Expi293瞬时表达系统中。转染后四天收获条件培养基,并通过Octet蛋白A测定测量表达水平。结果(示于表2中)表明αβTCR野生型(114μg/mL培养基)和8个突变体中的7个(>45μg/mL培养基)表达良好。一种突变体(N93A)的表达水平相对较低(16μg/mL)。对于所有8个突变体,转染规模扩大到30mL。收集条件培养基用于蛋白A纯化。

[0223] 使条件培养基通过1mL HiTrap蛋白A HP(GE)柱以便纯化。将所述柱用PBS pH 7.2(Gibco)平衡5个柱体积。将培养基以0.5mL/min的流速上样,并且然后用PBS pH 7.2洗涤20个柱体积(CV),之后洗脱。将抗体洗脱到10mM琥珀酸盐(pH 3.75)中,并且在洗脱后立即用0.2M氢氧化钠调节至pH 5.5。将所有样品均用0.2μm低蛋白结合膜和注射器过滤器过滤(回收率50%-80%),并使用Amicon YM30浓缩样品(回收率100%)。结果总结在表2中。

[0224] 表2

[0225]

ID	样品	表达水平(μg/mL培养基)	纯化后(μg/mL)	体积(mL)	总纯化量(μg)
WT	αβTCR WT	114	341	2	682
1	αβTCR N93Q	33.7	355	0.98	348
2	αβTCR N93D	30.2	350	0.98	343
3	αβTCR N93H	38.1	394	0.92	362
4	αβTCR N93S	42.6	250	1.94	485
5	αβTCR N93Y	9.7	316	0.255	81

[0226]

6	αβTCR N93A	33.7	370	1	370
7	αβTCR P94A	29.2	339	0.92	312
8	N93A P94A	30	267	1.94	518

[0227] 将纯化的抗体在Mini-PROTEAN TGX免染凝胶(Bio-Rad)上运行,每孔1.5μg上样量。结果显示所有测试的突变体与WT是可比的,并且具有良好的纯度(图8)。通过稳定性和功能测定对纯化的突变体进行进一步表征。

[0228] 在Expi293瞬时表达系统中进行了六十毫升规模的αβTCR N93S突变体转染。转染后四天收获条件培养基。通过Octet蛋白A测定测量表达水平并测定为37μg/mL。

[0229] HiTrap蛋白A HP(GE)柱(1mL)用于纯化。将所述柱用PBS pH 7.2(Gibco)平衡5个CV。将条件培养基样品以0.5mL/min的流速上样,并且然后用PBS pH 7.2洗涤20个CV,之后洗脱。将抗体洗脱到10mM琥珀酸盐(pH 3.75)中,共5个CV(总共5mL),产率几乎为100%。洗脱后,将洗脱的抗体用0.2M氢氧化钠调节至pH 5.5。溶液在pH 5.5时变得轻微混浊,并用50mL管顶过滤器(0.2μm CA,低蛋白质结合)过滤。过滤回收率为77%(总共1.7mg),这可能是由于相对较大的体积损失。将纯化的抗体和αβTCR VH31对照在Mini-PROTEAN TGX免染凝胶(每孔2μg上样量)上运行。结果显示所有测试的突变体与VH31对照是可比的。将纯化的N93S和先前纯化的WT和VH31对照在SEC-HPLC上运行,并且图谱显示在图9中。WT和N93S突变体二者的SEC图谱显现与VH31对照是可比的。

[0230] 实施例6:用以评价LC变体效力的测定

[0231] 用包含变体轻链的抗体重复实施例2中描述的定性效力测定。野生型和对照抗体包含相同的VH31氨基酸序列,但由不同的制剂产生。野生型VH31抗体是与LC变体抗体一起产生的,而对照抗体是由单独的大规模制备产生的。如图10所示,包含LC变体N93S的抗体的效力仅略低于野生型VH31或对照抗体的效力。相比之下,包含LC变体N93Q、N93A和N93A/P94A的抗体的效力都明显低于上述任何抗体的效力。基于这些结果,N93S变体被选为加速稳定性研究的候选物。

[0232] 实施例7:LC变体的加速稳定性研究

[0233] 将包含LC变体N93S的抗体置于升高的温度(即45℃)和pH(即pH 8.0)下六周,以确定N93S氨基酸取代是否稳定LC并防止断裂。在升高的温度和pH 8.0下六周后,在野生型、参考VH31和N93S抗体中观察到断裂。然而,N93S突变体与野生型或VH31对照抗体相比,降解明显减少(图11)。值得注意的是,与野生型或VH31对照抗体(均高于20倍损失)相比,N93S突变体在加速条件下的效力损失(损失3倍)明显减少。在pH 5.5(比pH 8.0更接近假设抗体药品配制品的pH)下,在六周时断裂显著不太普遍(图12)。

[0234] 上述结果显示,在储存条件(包括在升高的温度和升高的pH)下,与VH31αβTCR抗体相比,N93S突变体展现出改善的LC稳定性和效力。这些结果是出人意料的,因为先前尝试去除无关抗体(即sFLT01)中的Asn剪切位点并不能防止抗体断裂。

[0001] 序列表

[0002] <110> 建新公司

[0003] <120> 具有降低的断裂的抗αβTCR结合多肽

[0004] <130> 704503: SA9-254PC

[0005] <150> US 62/828,601

[0006] <151> 2019-04-03

[0007] <160> 29

[0008] <170> PatentIn 3.5版

[0009] <210> 1

[0010] <211> 120

[0011] <212> PRT

[0012] <213> 人工序列

[0013] <220>

[0014] <223> 合成多肽

[0015] <400> 1

[0016] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

[0017] 1 5 10 15

[0018] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr

[0019] 20 25 30

[0020] Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

[0021] 35 40 45

[0022] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

[0023] 50 55 60

[0024] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

[0025] 65 70 75 80

[0026] Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val His Tyr Cys

[0027] 85 90 95

[0028] Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln

[0029] 100 105 110

[0030] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala

[0031] 115 120

[0032] <210> 2

[0033] <211> 106

[0034] <212> PRT

[0035] <213> 人工序列

[0036] <220>

[0037] <223> 合成多肽

[0038] <400> 2

[0039] Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
[0040] 1 5 10 15
[0041] Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
[0042] 20 25 30
[0043] His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr
[0044] 35 40 45
[0045] Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[0046] 50 55 60
[0047] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
[0048] 65 70 75 80
[0049] Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
[0050] 85 90 95
[0051] Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
[0052] 100 105
[0053] <210> 3
[0054] <211> 120
[0055] <212> PRT
[0056] <213> 人工序列
[0057] <220>
[0058] <223> 合成多肽
[0059] <400> 3
[0060] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser
[0061] 1 5 10 15
[0062] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
[0063] 20 25 30
[0064] Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0065] 35 40 45
[0066] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[0067] 50 55 60
[0068] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr
[0069] 65 70 75 80
[0070] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val His Tyr Cys
[0071] 85 90 95
[0072] Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
[0073] 100 105 110
[0074] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0075] 115 120
[0076] <210> 4
[0077] <211> 106

[0078] <212> PRT

[0079] <213> 人工序列

[0080] <220>

[0081] <223> 合成多肽

[0082] <400> 4

[0083] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0084] 1 5 10 15

[0085] Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met

[0086] 20 25 30

[0087] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

[0088] 35 40 45

[0089] Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ile Gly Ser

[0090] 50 55 60

[0091] Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp

[0092] 65 70 75 80

[0093] Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

[0094] 85 90 95

[0095] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0096] 100 105

[0097] <210> 5

[0098] <211> 120

[0099] <212> PRT

[0100] <213> 人工序列

[0101] <220>

[0102] <223> 合成多肽

[0103] <400> 5

[0104] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0105] 1 5 10 15

[0106] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr

[0107] 20 25 30

[0108] Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

[0109] 35 40 45

[0110] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

[0111] 50 55 60

[0112] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0113] 65 70 75 80

[0114] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val His Tyr Cys

[0115] 85 90 95

[0116] Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln

[0117] 100 105 110

[0118] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0119] 115 120

[0120] <210> 6

[0121] <211> 106

[0122] <212> PRT

[0123] <213> 人工序列

[0124] <220>

[0125] <223> 合成多肽

[0126] <400> 6

[0127] Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly

[0128] 1 5 10 15

[0129] Asp Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met

[0130] 20 25 30

[0131] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

[0132] 35 40 45

[0133] Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ile Gly Ser

[0134] 50 55 60

[0135] Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Asp

[0136] 65 70 75 80

[0137] Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

[0138] 85 90 95

[0139] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0140] 100 105

[0141] <210> 7

[0142] <211> 120

[0143] <212> PRT

[0144] <213> 人工序列

[0145] <220>

[0146] <223> 合成多肽

[0147] <400> 7

[0148] Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala

[0149] 1 5 10 15

[0150] Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr

[0151] 20 25 30

[0152] Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile

[0153] 35 40 45

[0154] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

[0155] 50 55 60

[0156] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
[0157] 65 70 75 80
[0158] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val His Tyr Cys
[0159] 85 90 95
[0160] Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
[0161] 100 105 110
[0162] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0163] 115 120
[0164] <210> 8
[0165] <211> 120
[0166] <212> PRT
[0167] <213> 人工序列
[0168] <220>
[0169] <223> 合成多肽
[0170] <400> 8
[0171] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0172] 1 5 10 15
[0173] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
[0174] 20 25 30
[0175] Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
[0176] 35 40 45
[0177] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[0178] 50 55 60
[0179] Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Asn Thr Ala Tyr
[0180] 65 70 75 80
[0181] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0182] 85 90 95
[0183] Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
[0184] 100 105 110
[0185] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0186] 115 120
[0187] <210> 9
[0188] <211> 106
[0189] <212> PRT
[0190] <213> 人工序列
[0191] <220>
[0192] <223> 合成多肽
[0193] <400> 9
[0194] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0195] 1 5 10 15

[0196] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met

[0197] 20 25 30

[0198] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Trp Ile Tyr

[0199] 35 40 45

[0200] Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

[0201] 50 55 60

[0202] Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

[0203] 65 70 75 80

[0204] Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

[0205] 85 90 95

[0206] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0207] 100 105

[0208] <210> 10

[0209] <211> 329

[0210] <212> PRT

[0211] <213> 人工序列

[0212] <220>

[0213] <223> 合成多肽

[0214] <400> 10

[0215] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

[0216] 1 5 10 15

[0217] Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

[0218] 20 25 30

[0219] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

[0220] 35 40 45

[0221] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

[0222] 50 55 60

[0223] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

[0224] 65 70 75 80

[0225] Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

[0226] 85 90 95

[0227] Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

[0228] 100 105 110

[0229] Pro Ala Pro Pro Val Ala Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys

[0230] 115 120 125

[0231] Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val

[0232] 130 135 140

[0233] Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr

[0234] 145 150 155 160
[0235] Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
[0236] 165 170 175
[0237] Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
[0238] 180 185 190
[0239] Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
[0240] 195 200 205
[0241] Gly Leu Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
[0242] 210 215 220
[0243] Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
[0244] 225 230 235 240
[0245] Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
[0246] 245 250 255
[0247] Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
[0248] 260 265 270
[0249] Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
[0250] 275 280 285
[0251] Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
[0252] 290 295 300
[0253] Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
[0254] 305 310 315 320
[0255] Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
[0256] 325
[0257] <210> 11
[0258] <211> 327
[0259] <212> PRT
[0260] <213> 人工序列
[0261] <220>
[0262] <223> 合成多肽
[0263] <400> 11
[0264] Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
[0265] 1 5 10 15
[0266] Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
[0267] 20 25 30
[0268] Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
[0269] 35 40 45
[0270] Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
[0271] 50 55 60
[0272] Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr

[0273] 65 70 75 80

[0274] Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

[0275] 85 90 95

[0276] Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro

[0277] 100 105 110

[0278] Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys

[0279] 115 120 125

[0280] Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val

[0281] 130 135 140

[0282] Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp

[0283] 145 150 155 160

[0284] Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe

[0285] 165 170 175

[0286] Gln Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp

[0287] 180 185 190

[0288] Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

[0289] 195 200 205

[0290] Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg

[0291] 210 215 220

[0292] Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys

[0293] 225 230 235 240

[0294] Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp

[0295] 245 250 255

[0296] Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys

[0297] 260 265 270

[0298] Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser

[0299] 275 280 285

[0300] Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser

[0301] 290 295 300

[0302] Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser

[0303] 305 310 315 320

[0304] Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys

[0305] 325

[0306] <210> 12

[0307] <211> 120

[0308] <212> PRT

[0309] <213> 人工序列

[0310] <220>

[0311] <223> 合成多肽

[0312] <400> 12

[0313] Glu Val Gln Leu Leu Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0314] 1 5 10 15

[0315] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr

[0316] 20 25 30

[0317] Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0318] 35 40 45

[0319] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

[0320] 50 55 60

[0321] Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0322] 65 70 75 80

[0323] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0324] 85 90 95

[0325] Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln

[0326] 100 105 110

[0327] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0328] 115 120

[0329] <210> 13

[0330] <211> 120

[0331] <212> PRT

[0332] <213> 人工序列

[0333] <220>

[0334] <223> 合成多肽

[0335] <400> 13

[0336] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly

[0337] 1 5 10 15

[0338] Ser Val Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr

[0339] 20 25 30

[0340] Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0341] 35 40 45

[0342] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

[0343] 50 55 60

[0344] Lys Gly Arg Phe Thr Leu Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0345] 65 70 75 80

[0346] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0347] 85 90 95

[0348] Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln

[0349] 100 105 110

[0350] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0351] 115 120

[0352] <210> 14

[0353] <211> 106

[0354] <212> PRT

[0355] <213> 人工序列

[0356] <220>

[0357] <223> 合成多肽

[0358] <400> 14

[0359] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0360] 1 5 10 15

[0361] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met

[0362] 20 25 30

[0363] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Leu Ile Tyr

[0364] 35 40 45

[0365] Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

[0366] 50 55 60

[0367] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

[0368] 65 70 75 80

[0369] Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

[0370] 85 90 95

[0371] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0372] 100 105

[0373] <210> 15

[0374] <211> 120

[0375] <212> PRT

[0376] <213> 人工序列

[0377] <220>

[0378] <223> 合成多肽

[0379] <400> 15

[0380] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

[0381] 1 5 10 15

[0382] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr

[0383] 20 25 30

[0384] Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

[0385] 35 40 45

[0386] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

[0387] 50 55 60

[0388] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

[0389] 65 70 75 80

[0390] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0391] 85 90 95
[0392] Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
[0393] 100 105 110
[0394] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0395] 115 120
[0396] <210> 16
[0397] <211> 120
[0398] <212> PRT
[0399] <213> 人工序列
[0400] <220>
[0401] <223> 合成多肽
[0402] <400> 16
[0403] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0404] 1 5 10 15
[0405] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
[0406] 20 25 30
[0407] Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
[0408] 35 40 45
[0409] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[0410] 50 55 60
[0411] Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
[0412] 65 70 75 80
[0413] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0414] 85 90 95
[0415] Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
[0416] 100 105 110
[0417] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0418] 115 120
[0419] <210> 17
[0420] <211> 98
[0421] <212> PRT
[0422] <213> 人工序列
[0423] <220>
[0424] <223> 合成多肽
[0425] <400> 17
[0426] Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
[0427] 1 5 10 15
[0428] Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr

[0429] 20 25 30

[0430] Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val

[0431] 35 40 45

[0432] Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val

[0433] 50 55 60

[0434] Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr

[0435] 65 70 75 80

[0436] Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0437] 85 90 95

[0438] Ala Lys

[0439] <210> 18

[0440] <211> 98

[0441] <212> PRT

[0442] <213> 人工序列

[0443] <220>

[0444] <223> 合成多肽

[0445] <400> 18

[0446] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

[0447] 1 5 10 15

[0448] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr

[0449] 20 25 30

[0450] Ala Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met

[0451] 35 40 45

[0452] Gly Trp Ile Asn Ala Gly Asn Gly Asn Thr Lys Tyr Ser Gln Lys Phe

[0453] 50 55 60

[0454] Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

[0455] 65 70 75 80

[0456] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0457] 85 90 95

[0458] Ala Arg

[0459] <210> 19

[0460] <211> 95

[0461] <212> PRT

[0462] <213> 人工序列

[0463] <220>

[0464] <223> 合成多肽

[0465] <400> 19

[0466] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0467] 1 5 10 15

[0468] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Ser Tyr
[0469] 20 25 30
[0470] Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile
[0471] 35 40 45
[0472] Tyr Asp Ala Ser Asn Arg Ala Thr Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly
[0473] 50 55 60
[0474] Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro
[0475] 65 70 75 80
[0476] Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Arg Ser Asn Trp Pro
[0477] 85 90 95
[0478] <210> 20
[0479] <211> 120
[0480] <212> PRT
[0481] <213> 人工序列
[0482] <220>
[0483] <223> 合成多肽
[0484] <400> 20
[0485] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
[0486] 1 5 10 15
[0487] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr
[0488] 20 25 30
[0489] Val Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
[0490] 35 40 45
[0491] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe
[0492] 50 55 60
[0493] Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
[0494] 65 70 75 80
[0495] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
[0496] 85 90 95
[0497] Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
[0498] 100 105 110
[0499] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0500] 115 120
[0501] <210> 21
[0502] <211> 106
[0503] <212> PRT
[0504] <213> 人工序列
[0505] <220>
[0506] <223> 合成多肽

[0507] <400> 21

[0508] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0509] 1 5 10 15

[0510] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met

[0511] 20 25 30

[0512] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Trp Ile Tyr

[0513] 35 40 45

[0514] Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

[0515] 50 55 60

[0516] Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu

[0517] 65 70 75 80

[0518] Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

[0519] 85 90 95

[0520] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0521] 100 105

[0522] <210> 22

[0523] <211> 106

[0524] <212> PRT

[0525] <213> 人工序列

[0526] <220>

[0527] <223> 合成多肽

[0528] <400> 22

[0529] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly

[0530] 1 5 10 15

[0531] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met

[0532] 20 25 30

[0533] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Trp Ile Tyr

[0534] 35 40 45

[0535] Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser

[0536] 50 55 60

[0537] Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Pro Glu

[0538] 65 70 75 80

[0539] Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

[0540] 85 90 95

[0541] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

[0542] 100 105

[0543] <210> 23

[0544] <211> 120

[0545] <212> PRT

[0546] <213> 人工序列

[0547] <220>

[0548] <223> 合成多肽

[0549] <400> 23

[0550] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

[0551] 1 5 10 15

[0552] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr

[0553] 20 25 30

[0554] Val Met His Trp Val Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

[0555] 35 40 45

[0556] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

[0557] 50 55 60

[0558] Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

[0559] 65 70 75 80

[0560] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0561] 85 90 95

[0562] Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln

[0563] 100 105 110

[0564] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

[0565] 115 120

[0566] <210> 24

[0567] <211> 120

[0568] <212> PRT

[0569] <213> 人工序列

[0570] <220>

[0571] <223> 合成多肽

[0572] <400> 24

[0573] Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

[0574] 1 5 10 15

[0575] Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe Thr Ser Tyr

[0576] 20 25 30

[0577] Val Met His Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

[0578] 35 40 45

[0579] Gly Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn Glu Lys Phe

[0580] 50 55 60

[0581] Lys Gly Lys Ala Thr Ile Thr Arg Asp Thr Ser Ala Ser Thr Ala Tyr

[0582] 65 70 75 80

[0583] Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

[0584] 85 90 95

[0585] Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln
[0586] 100 105 110
[0587] Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
[0588] 115 120
[0589] <210> 25
[0590] <211> 213
[0591] <212> PRT
[0592] <213> 人工序列
[0593] <220>
[0594] <223> 合成多肽
[0595] <400> 25
[0596] Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
[0597] 1 5 10 15
[0598] Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met
[0599] 20 25 30
[0600] His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Arg Leu Ile Tyr
[0601] 35 40 45
[0602] Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
[0603] 50 55 60
[0604] Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Glu Pro Glu
[0605] 65 70 75 80
[0606] Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr
[0607] 85 90 95
[0608] Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
[0609] 100 105 110
[0610] Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
[0611] 115 120 125
[0612] Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
[0613] 130 135 140
[0614] Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
[0615] 145 150 155 160
[0616] Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
[0617] 165 170 175
[0618] Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
[0619] 180 185 190
[0620] Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
[0621] 195 200 205
[0622] Asn Arg Gly Glu Cys
[0623] 210

[0624] <210> 26

[0625] <211> 10

[0626] <212> PRT

[0627] <213> 人工序列

[0628] <220>

[0629] <223> 合成肽

[0630] <400> 26

[0631] Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met His

[0632] 1 5 10

[0633] <210> 27

[0634] <211> 7

[0635] <212> PRT

[0636] <213> 人工序列

[0637] <220>

[0638] <223> 合成肽

[0639] <400> 27

[0640] Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

[0641] 1 5

[0642] <210> 28

[0643] <211> 9

[0644] <212> PRT

[0645] <213> 人工序列

[0646] <220>

[0647] <223> 合成肽

[0648] <220>

[0649] <221> 尚未归类的特征

[0650] <222> (6)..(6)

[0651] <223> Gln, Asp, His, Ser, Tyr, 或Ala

[0652] <220>

[0653] <221> 尚未归类的特征

[0654] <222> (7)..(7)

[0655] <223> Pro或Ala

[0656] <400> 28

[0657] Gln Gln Trp Ser Ser Xaa Xaa Leu Thr

[0658] 1 5

[0659] <210> 29

[0660] <211> 9

[0661] <212> PRT

[0662] <213> 人工序列

[0663] <220>

[0664] <223> 合成肽

[0665] <400> 29

[0666] Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr

[0667] 1 5

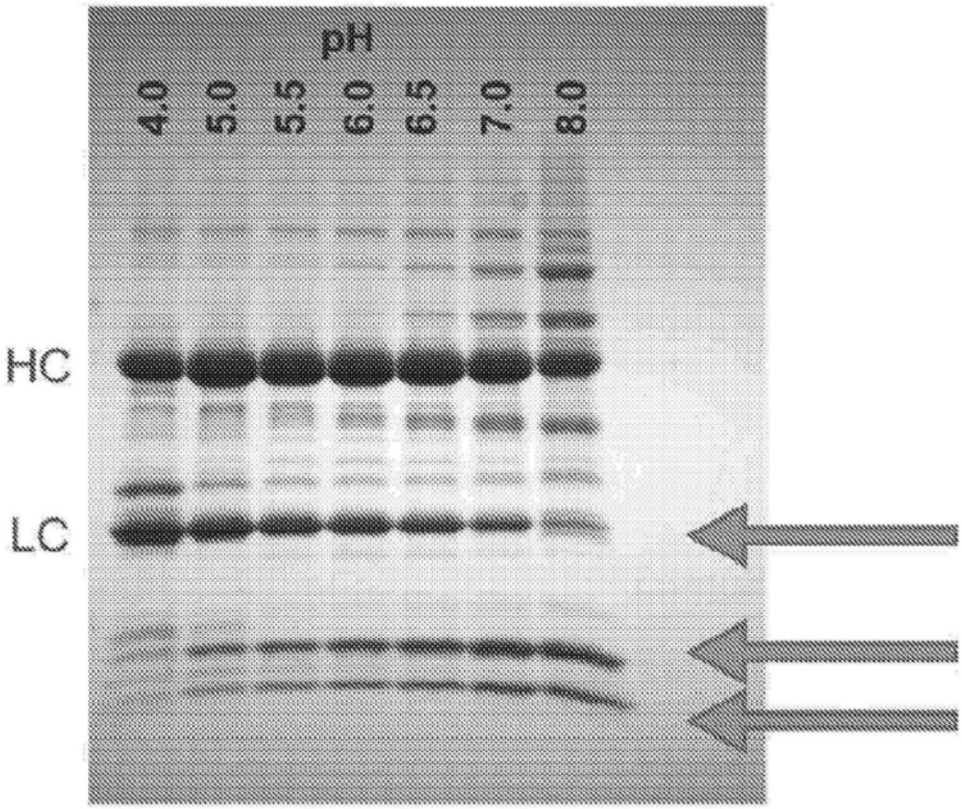


图1

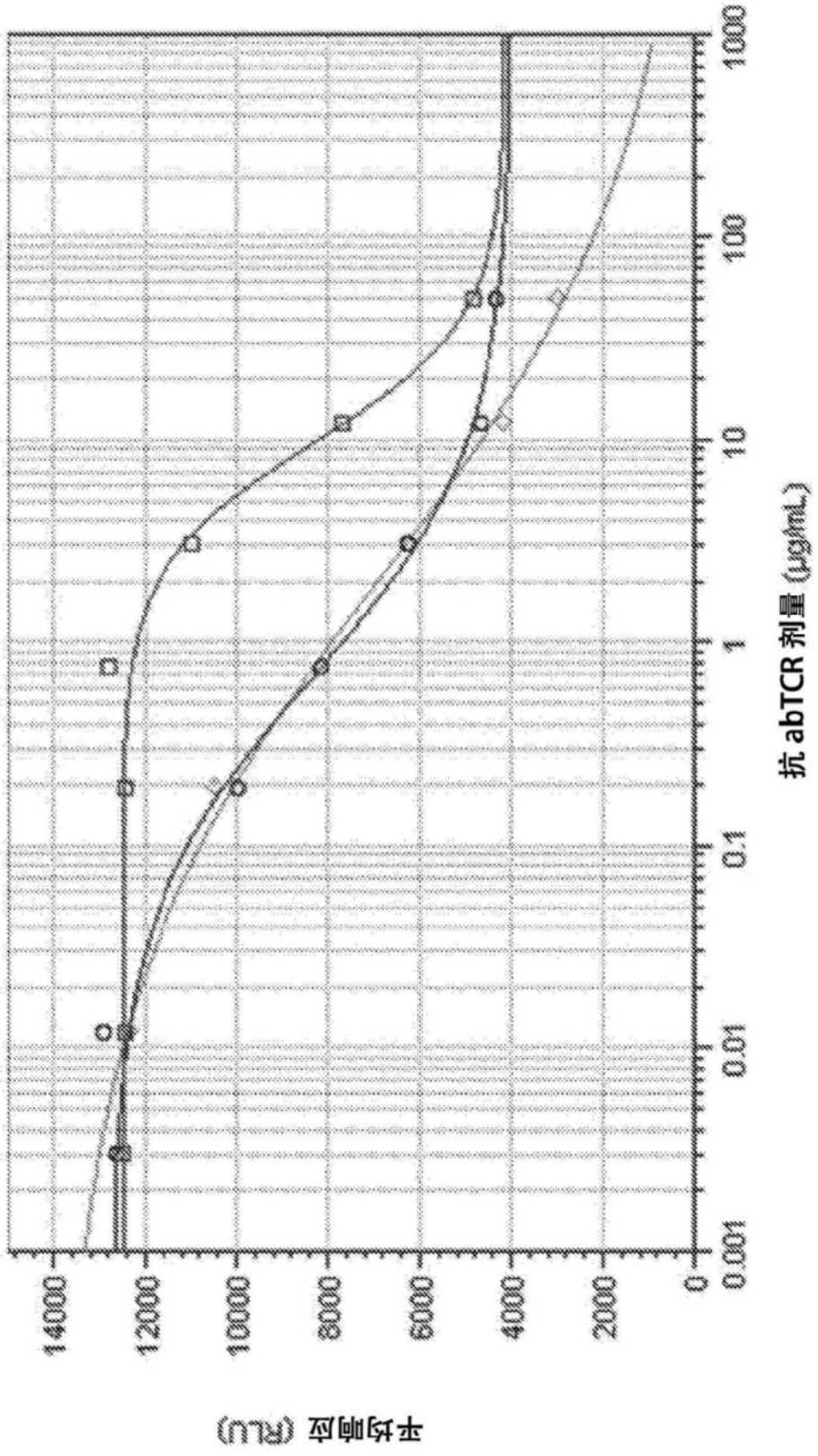

平均响应 (RU)
14000
12000
10000
8000
6000
4000
2000
0
抗 abTCR 剂量 (μg/mL)
1000
100
10
1
0.1
0.01
0.001

图2

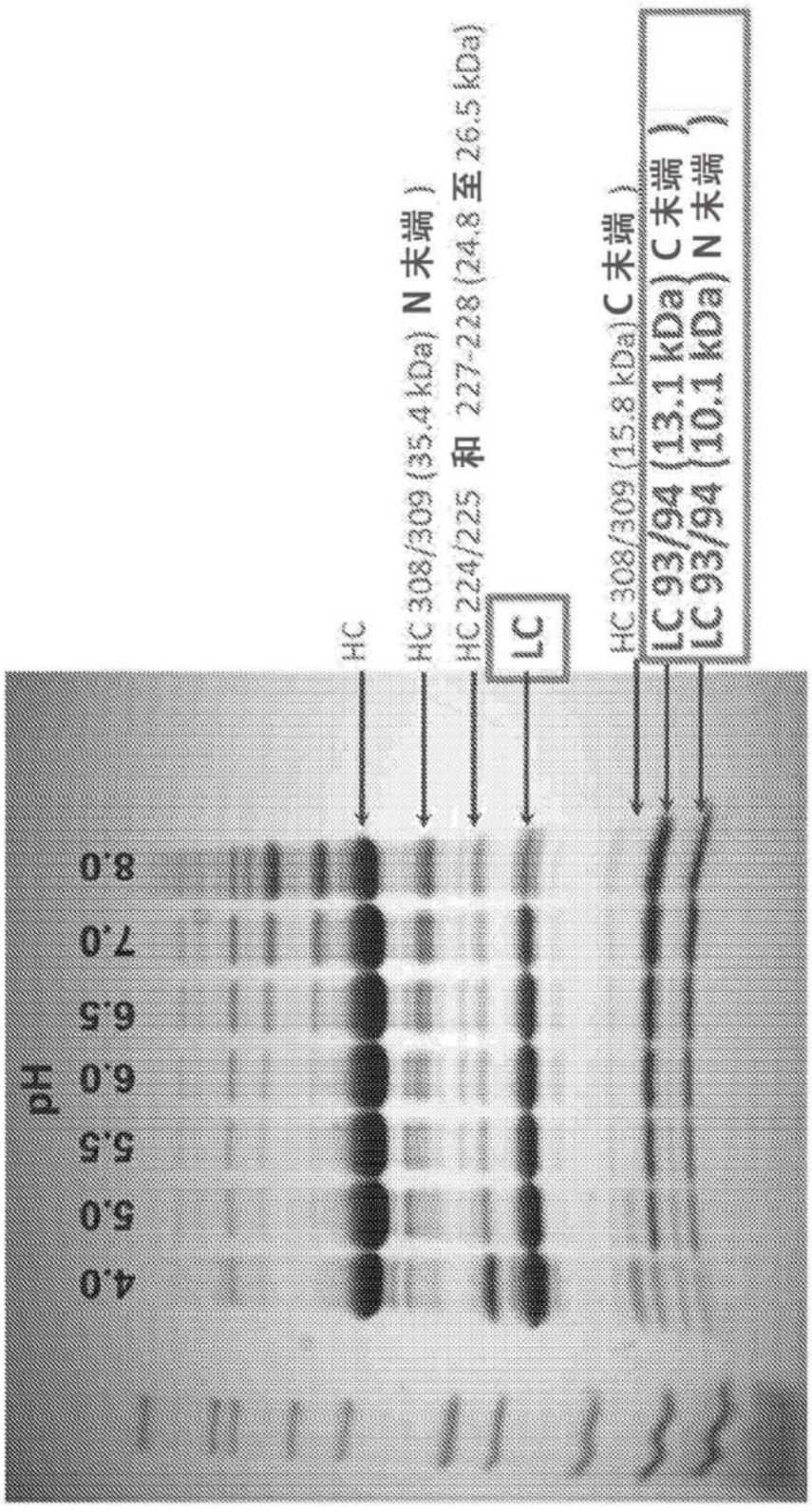

pH
8.0
7.0
6.5
6.0
5.5
5.0
4.0
HC
HC 308/309 (35.4 kDa) N 末端
HC 224/225 和 227-228 (24.8 至 26.5 kDa)
LC
HC 308/309 (15.8 kDa) C 末端
LC 93/94 (13.1 kDa) C 末端
LC 93/94 (10.1 kDa) N 末端

图3

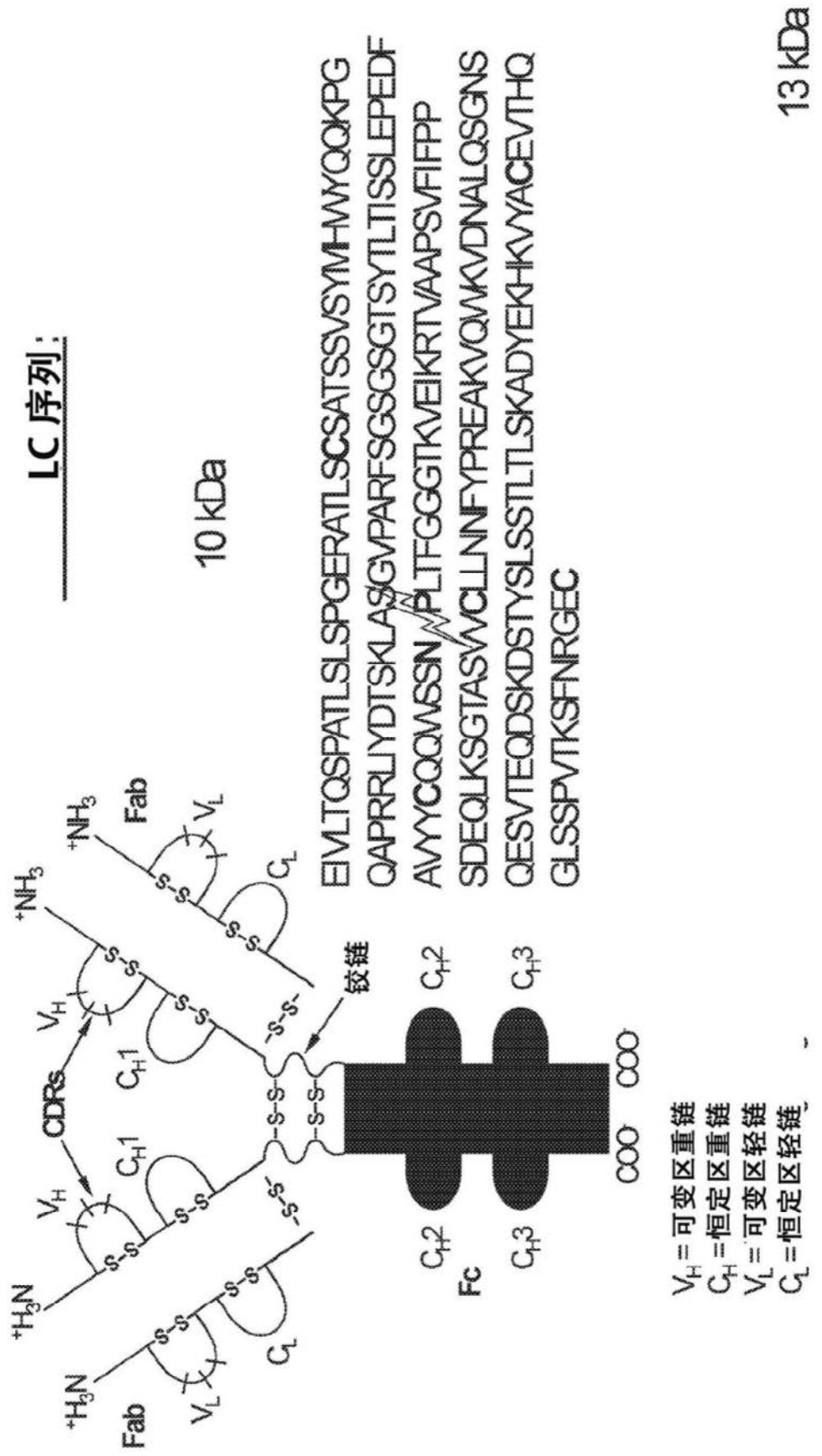

LC 序列：
10 kDa
13 kDa
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCSATSSVSYMHWYQQKPG
QAPRRLIYDTSKLASGVPARFSGSGSGTSYTLTISSLEPEDF
AVYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPP
SDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNS
QESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQ
GLSSPVTKSFNRGEC
铰链
Fab
Fab
CDRs
Fc
V_H = 可变区重链
C_H = 恒定区重链
V_L = 可变区轻链
C_L = 恒定区轻链

图4

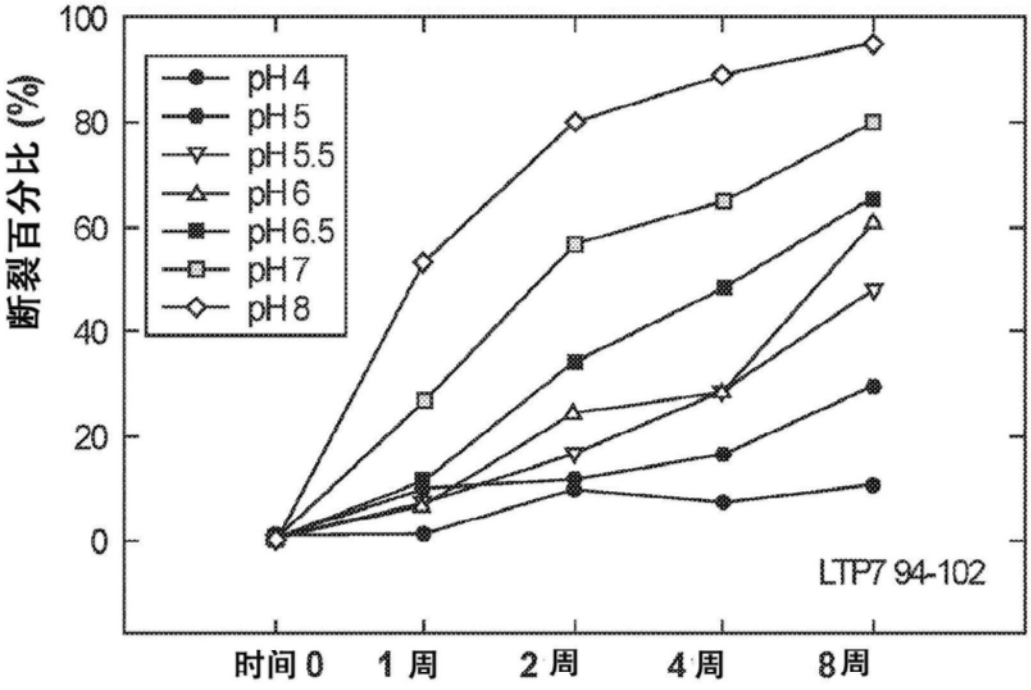

100
80
60
40
20
0
断裂百分比 (%)
pH4
pH5
pH5.5
pH6
pH6.5
pH7
pH8
LTP7 94-102
时间 0
1 周
2 周
4 周
8周

图5A

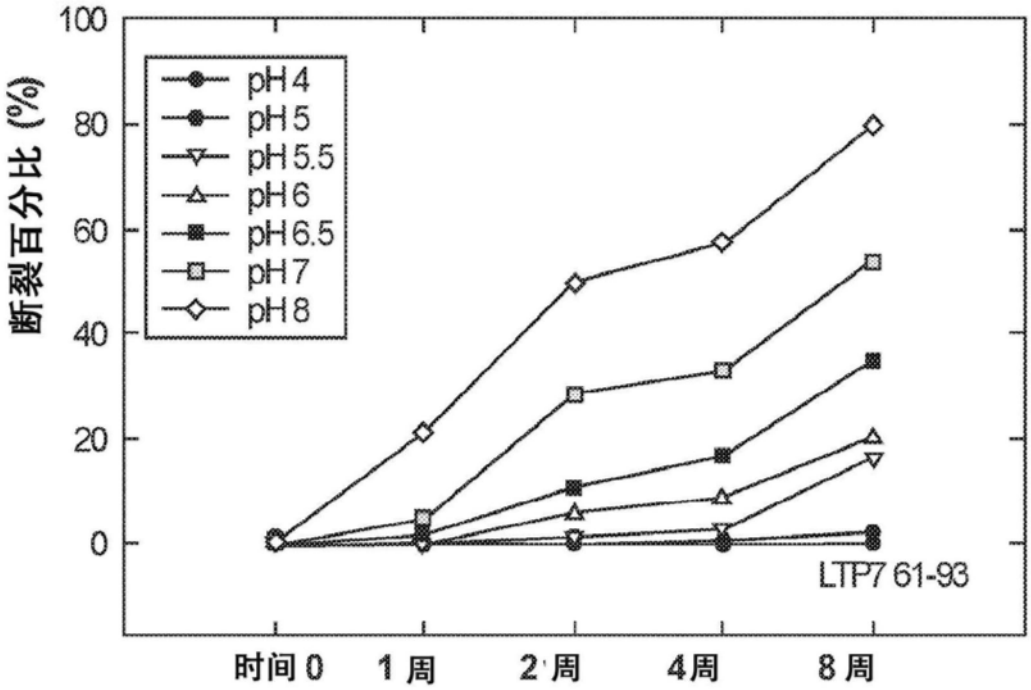

100
80
60
40
20
0
断裂百分比 (%)
pH4
pH5
pH5.5
pH6
pH6.5
pH7
pH8
LTP7 61-93
时间 0
1 周
2 周
4周
8 周

图5B

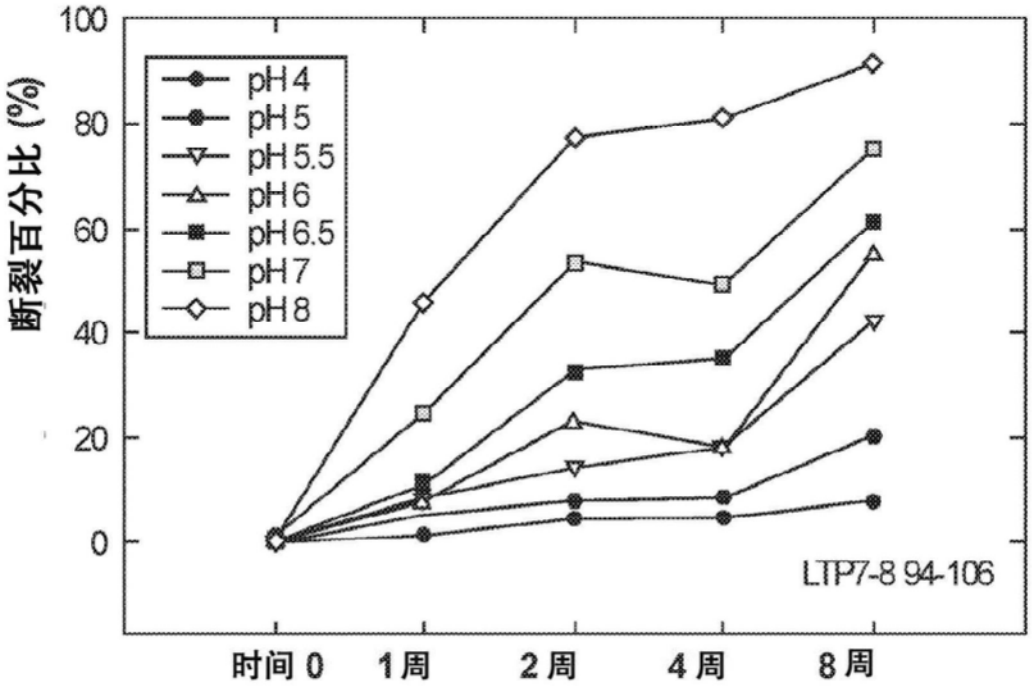

100
80
60
40
20
0
断裂百分比 (%)
pH 4
pH 5
pH 5.5
pH 6
pH 6.5
pH 7
pH 8
LTP7-8 94-106
时间 0
1 周
2 周
4 周
8 周

图5C

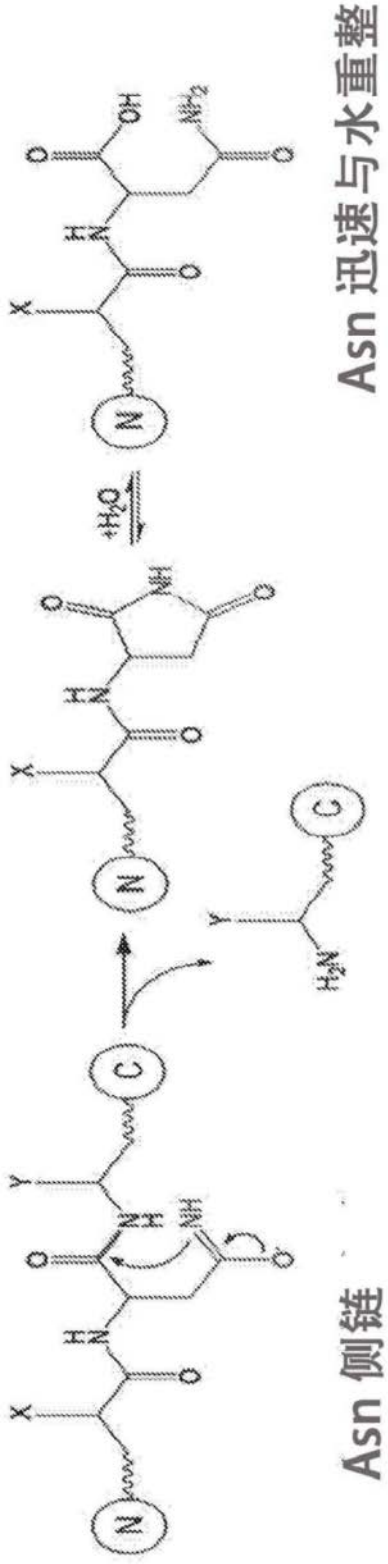
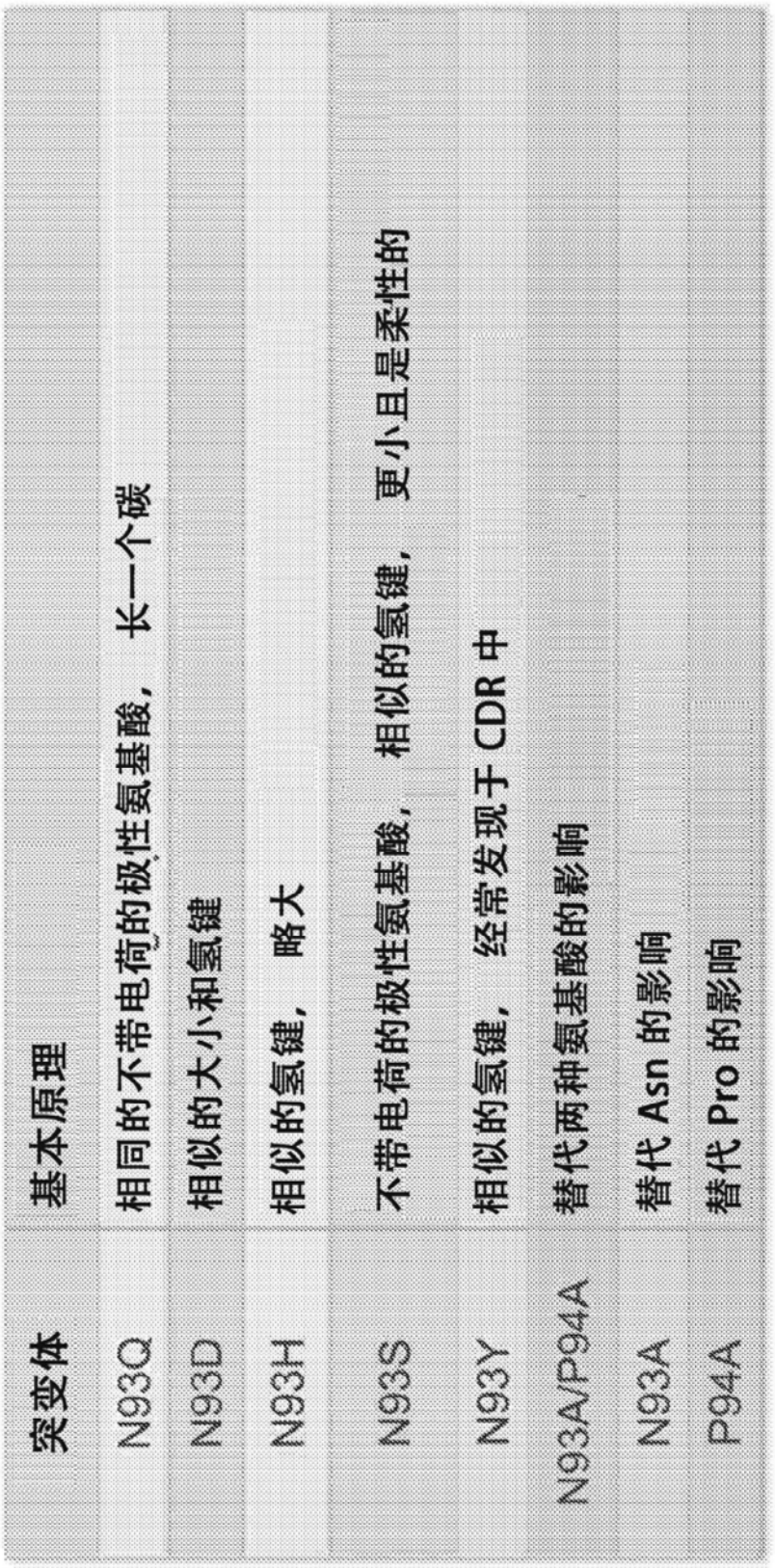


图6



突变体	基本原理
N93Q	相同的不带电荷的极性氨基酸，长一个碳
N93D	相似的大小和氢键
N93H	相似的氢键，略大
N93S	不带电荷的极性氨基酸，相似的氢键，更小且是柔性的
N93Y	相似的氢键，经常发现于 CDR 中
N93A/P94A	替代两种氨基酸的影响
N93A	替代 Asn 的影响
P94A	替代 Pro 的影响

图7

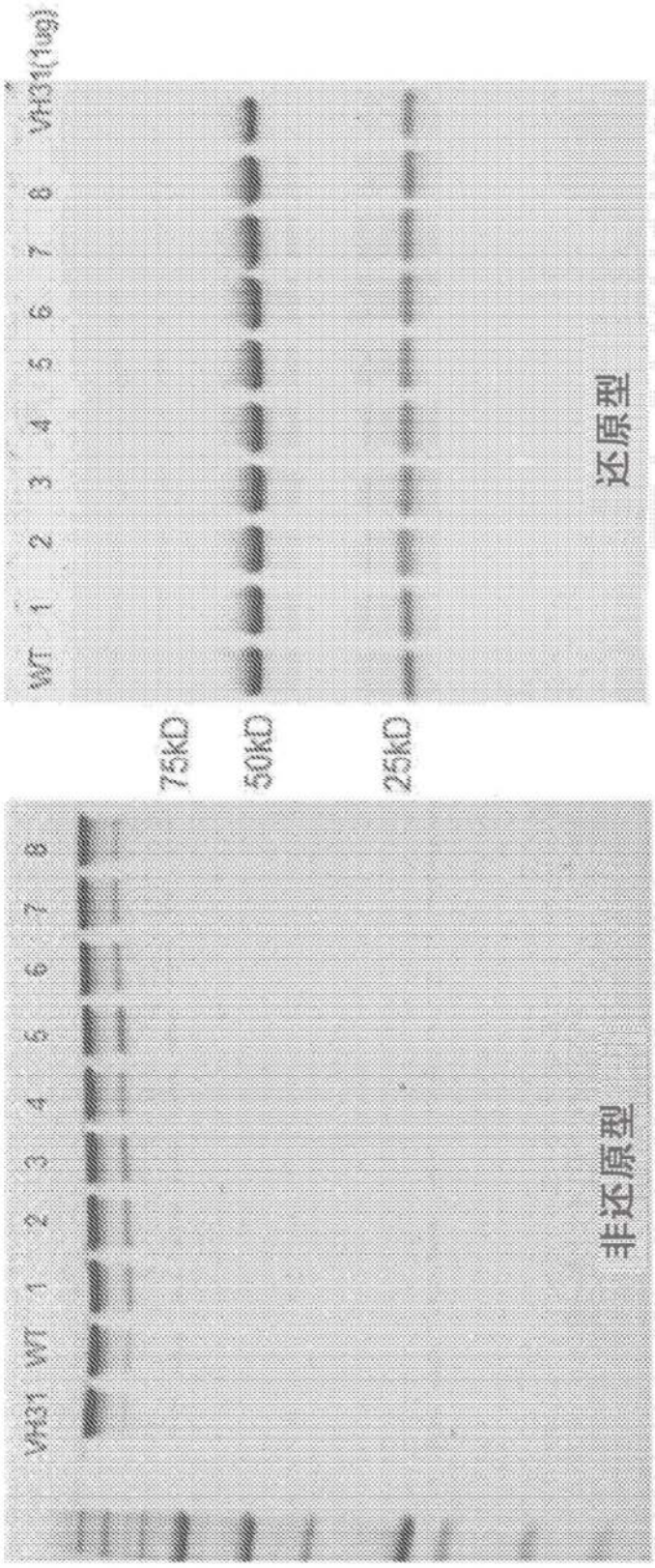

VH31(1ug)
WT 1 2 3 4 5 6 7 8
还原型
75kD
50kD
25kD
VH31 WT 1 2 3 4 5 6 7 8
非还原型

图8

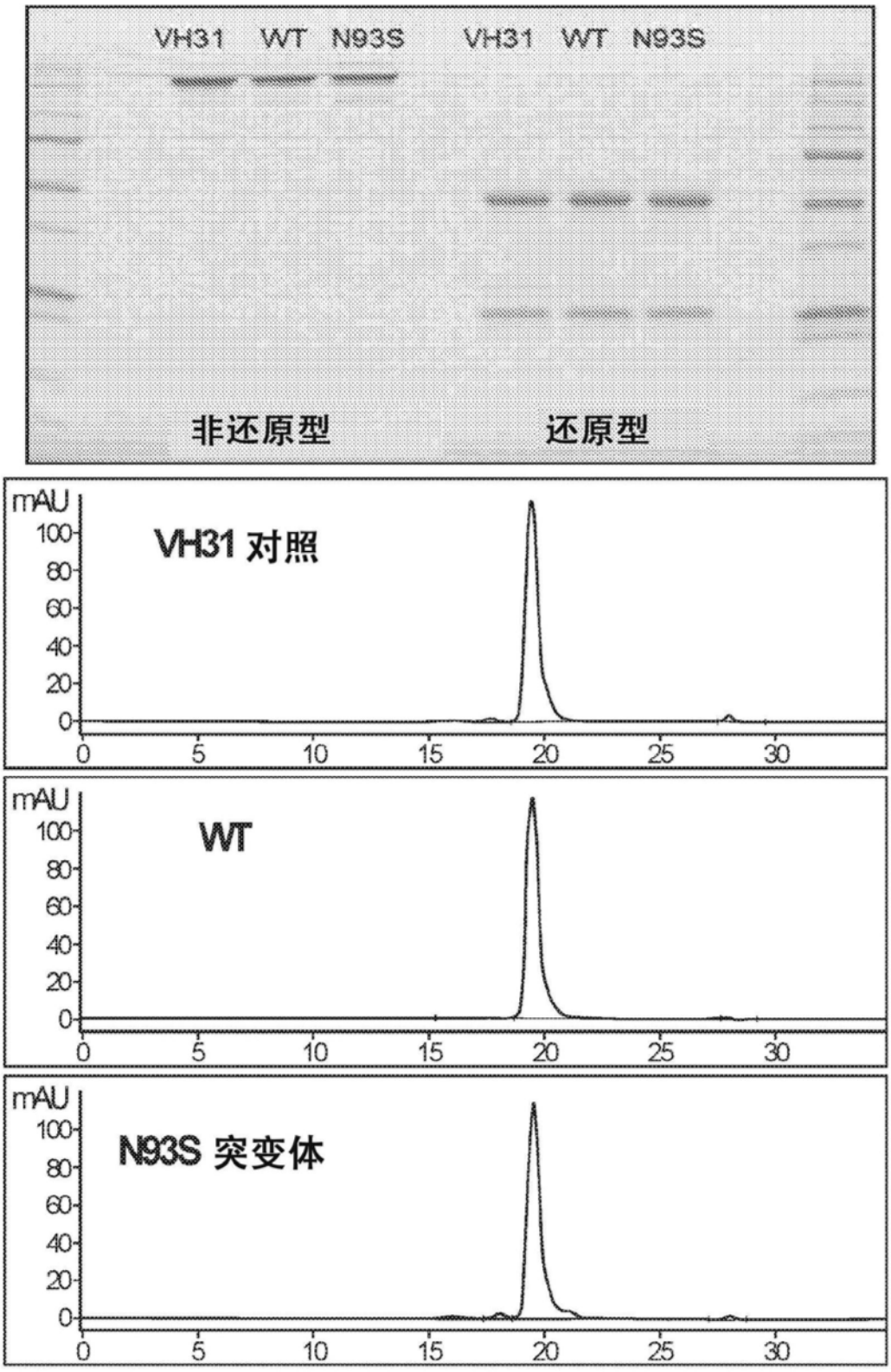

VH31
WT
N93S
VH31
WT
N93S
非还原型
还原型
mAU
VH31 对照
WT
N93S 突变体
0
20
40
60
80
100
0
5
10
15
20
25
30

图9

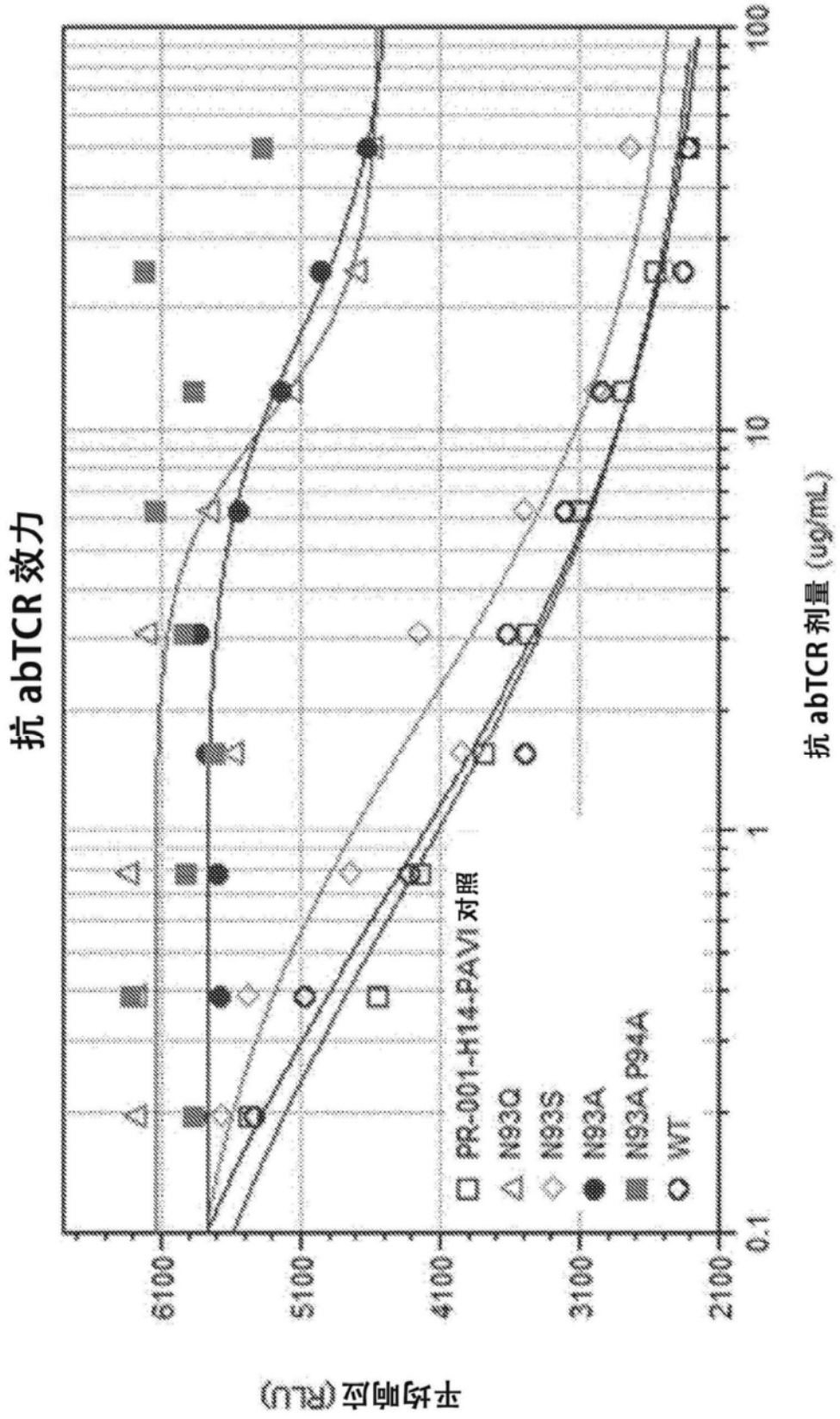

抗 abTCR 效力
抗 abTCR 剂量 (ug/mL)
平均响应 (RLU)
6100
5100
4100
3100
2100
0.1
1
10
100
PR-001-H14-PAVII 对照
N93Q
N93S
N93A
N93A P94A
WT

图10

效力测定数据

样品	周	IC50 (ug/ml)	损失倍数
N93S突变体	T=0	0.567	3
	T=6	1.94	
WT	T=0	0.633	>20
	T=6	>100	
VH31对照	T=0	0.491	>20
	T=6	11	

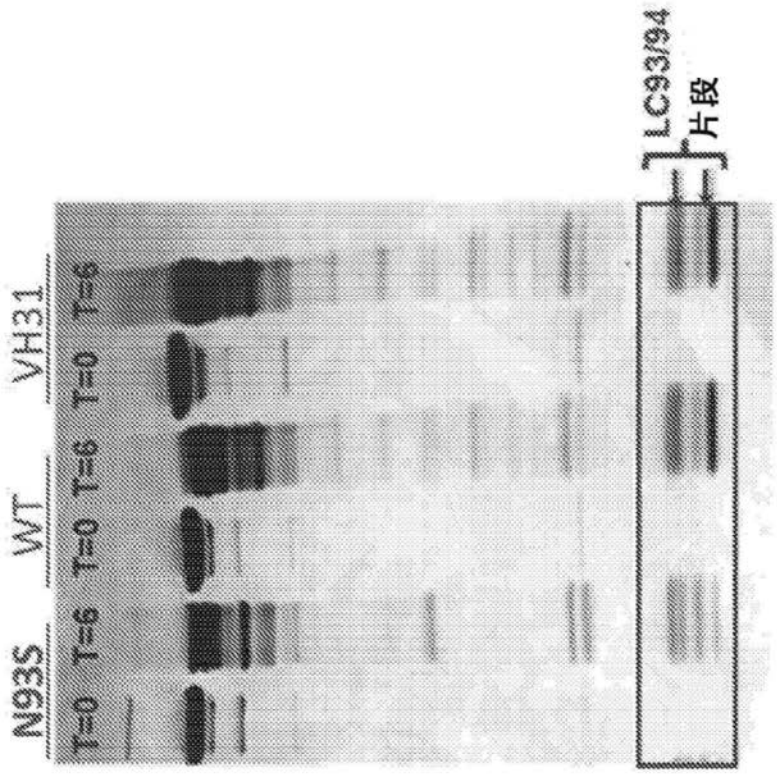


图11

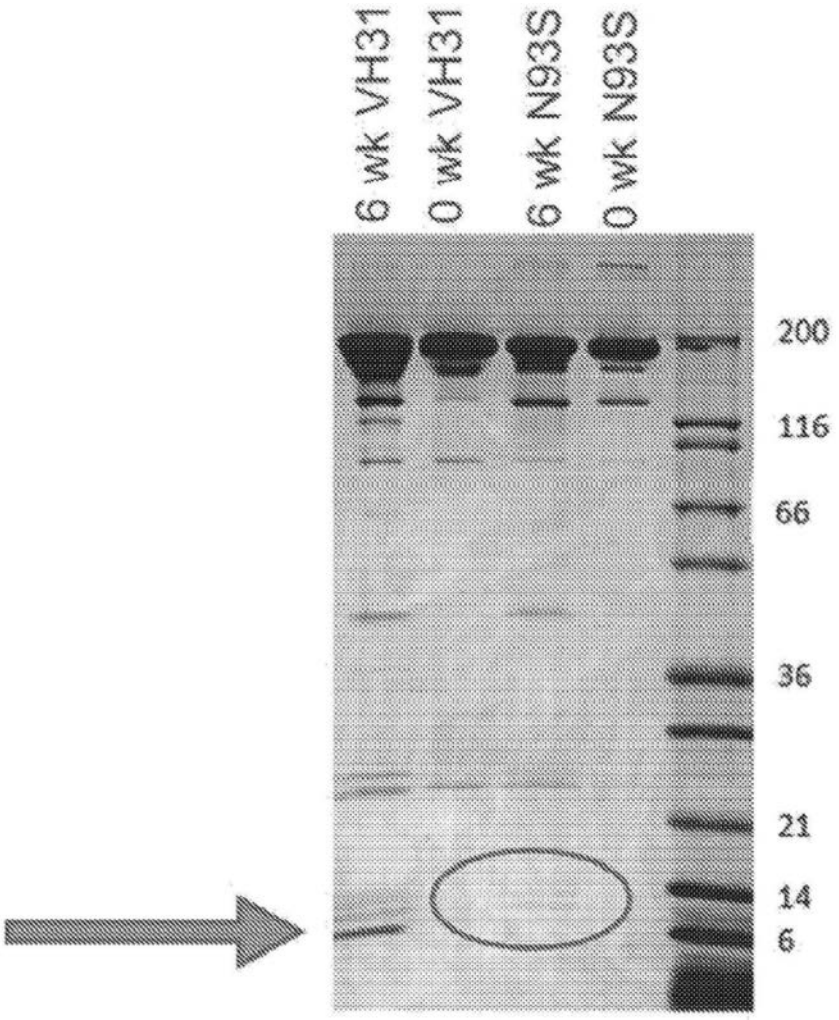


图12