



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108430506 A

(43)申请公布日 2018.08.21

(21)申请号 201680066388.2

(22)申请日 2016.09.15

(30)优先权数据

62/218,990 2015.09.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2018.05.14

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2016/051847 2016.09.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02017/048902 EN 2017.03.23

(71)申请人 得克萨斯州大学系统董事会

地址 美国得克萨斯州

(72)发明人 L·J·N·库珀 B·杰纳

(74)专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司 31100

代理人 杨昀 陶家蓉

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 14/725(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

权利要求书9页 说明书46页

序列表12页 附图32页

(54)发明名称

T细胞受体(TCR)结合抗体及其用途

(57)摘要

提供了基本上不依赖于T细胞表位特异性而结合T细胞受体(如,TCR α)的抗体及其抗原结合片段。还提供了用于操作T细胞的方法和使用此类抗体进行治疗的方法。

1. 一种特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位的分离抗体或其抗原结合片段。

2. 一种特异性结合TCR α 多肽的抗体或其抗原结合片段,其包含

(a) HCDR1,其与SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(b) HCDR2,其与SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(c) HCDR3,其与CDYW (SEQ ID NO:21)、CAYW (SEQ ID NO:23)或CAYL (SEQ ID NO:22)具有同一性;

(d) LCDR1,其与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:9具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(e) LCDR2,其与SEQ ID NO:5具有至少80%、85%、90%或95%同一性;以及

(f) LCDR3,其与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:10具有至少80%、85%、90%或95%同一性。

3. 根据权利要求2所述的抗体或其抗原结合片段,其包含

(a) HCDR1,其与SEQ ID NO:2具有同一性;

(b) HCDR2,其与SEQ ID NO:3具有同一性;

(c) HCDR3,其与CDYW (SEQ ID NO:21)、CAYW (SEQ ID NO:23)或CAYL (SEQ ID NO:22)具有同一性;

(d) LCDR1,其与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:9具有同一性;

(e) LCDR2,其与SEQ ID NO:5具有同一性;以及

(f) LCDR3,其与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:10具有同一性。

4. 一种特异性结合TCR α 多肽的抗体或其抗原结合片段,其包含

(a) HCDR1,其与79A-15的V_H CDR1SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(b) HCDR2,其与79A-15的V_H CDR2SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(c) HCDR3,其与79A-15的V_H CDR3 (SEQ ID NO:22)具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(d) LCDR1,其与79A-15的V_L CDR1SEQ ID NO:9具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(e) LCDR2,其与79A-15的V_L CDR2SEQ ID NO:5具有至少80%、85%、90%或95%同一性;以及

(f) LCDR3,其与79A-15的V_L CDR3SEQ ID NO:10具有至少80%、85%、90%或95%同一性。

5. 根据权利要求1所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A-15的V_H结构域 (SEQ ID NO:11)具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_H结构域,和与79A-15的V_L结构域 (SEQ ID NO:12)具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_L结构域。

6. 根据权利要求5所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A-15的V_H结构域 (SEQ ID NO:11)具有在90%和99%之间同一性的V_H结构域,和与79A-15的V_L结构域 (SEQ ID NO:12)具有在90%和99%之间同一性的V_L结构域。

7. 根据权利要求5所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A15的V_H结构域 (SEQ ID NO:11)具有同一性的V_H结构域,和与79A-15的V_L结构域 (SEQ ID NO:12)具有同一性的V_L结构域。

8. 一种特异性结合TCR α 多肽的分离抗体或其抗原结合片段,其包含

(a) HCDR1,其与79A-13的V_H CDR1KASGYTFTDYMNWV (SEQ ID NO:2)具有至少80%、85%、

90%或95%同一性;

(b) HCDR2,其与79A-13的V_H CDR2WIGEINPNN (SEQ ID NO:3) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(c) HCDR3,其与79A-13的V_H CDR3CAYL (SEQ ID NO:22) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(d) LCDR1,其与79A-13的V_L CDR1NTYLEWY (SEQ ID NO:4) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(e) LCDR2,其与79A-13的V_L CDR2KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;以及

(f) LCDR3,其与79A-13的V_L CDR3MQGSHVPW (SEQ ID NO:10) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性。

9. 根据权利要求8所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含

(a) HCDR1,其与KASGYTFTDYIMNWV (SEQ ID NO:2) 具有同一性;

(b) HCDR2,其与WIGEINPNN (SEQ ID NO:3) 具有同一性;

(c) HCDR3,其与CAYL (SEQ ID NO:22) 具有同一性;

(d) LCDR1,其与NTYLEWY (SEQ ID NO:4) 具有同一性;

(e) LCDR2,其与KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5) 具有同一性;以及

(f) LCDR3,其与MQGSHVPW (SEQ ID NO:10) 具有同一性。

10. 根据权利要求1所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A-13的V_H结构域 (SEQ ID NO:11) 具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_H结构域,和与79A-13的V_L结构域 (SEQ ID NO:14) 具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_L结构域。

11. 根据权利要求10所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A-13的V_H结构域 (SEQ ID NO:11) 具有在90%和99%之间同一性的V_H结构域,或与79A-13的V_L结构域 (SEQ ID NO:14) 具有在90%和99%之间同一性的V_L结构域。

12. 根据权利要求10所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A-13的V_H结构域 (SEQ ID NO:11) 具有同一性的V_H结构域,和与79A-13的V_L结构域 (SEQ ID NO:14) 具有同一性的V_L结构域。

13. 一种特异性结合TCR α 多肽的抗体或其抗原结合片段,其包含

(a) HCDR1,其与79A-11的V_H CDR1KASGYTFTDYIMNWV (SEQ ID NO:2) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(b) HCDR2,其与79A-11的V_H CDR2WIGEINPNN (SEQ ID NO:3) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(c) HCDR3,其与79A-11的V_H CDR3CAYW (SEQ ID NO:23) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(d) LCDR1,其与79A-11的V_L CDR1NTYLEWF (SEQ ID NO:9) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(e) LCDR2,其与79A-11的V_L CDR2KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;以及

(f) LCDR3,其与79A-11的V_L CDR3MQGSHVPW (SEQ ID NO:10) 具有至少80%、85%、90%或

95%同一性。

14. 根据权利要求13所述的抗体或其抗原结合片段,其包含

(a) HCDR1,其与KASGYTFTDYMNWV (SEQ ID NO:2) 具有同一性;

(b) HCDR2,其与WIGEINPNN (SEQ ID NO:3) 具有同一性;

(c) HCDR3,其与CAYW (SEQ ID NO:23) 具有同一性;

(d) LCDR1,其与NTYLEWF (SEQ ID NO:9) 具有同一性;

(e) LCDR2,其与KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5) 具有同一性;以及

(f) LCDR3,其与MQGSHVPW (SEQ ID NO:10) 具有同一性。

15. 根据权利要求1所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A-11的V_H结构域 (SEQ ID NO:13) 具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_H结构域,和与79A-11的V_L结构域 (SEQ ID NO:12) 具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_L结构域。

16. 根据权利要求15所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A-11的V_H结构域 (SEQ ID NO:13) 具有在90%和99%之间同一性的V_H结构域,或与79A-11的V_L结构域 (SEQ ID NO:12) 具有在90%和99%之间同一性的V_L结构域。

17. 根据权利要求15所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A11的V_H结构域 (SEQ ID NO:13) 具有同一性的V_H结构域,和与79A11的V_L结构域 (SEQ ID NO:12) 具有同一性的V_L结构域。

18. 一种特异性结合TCR α 多肽的分离抗体或其抗原结合片段,其包含

(a) HCDR1,其与79A的V_H CDR1KASGYTFTDYMNWV (SEQ ID NO:2) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(b) HCDR2,其与79A的V_H CDR2WIGEINPNN (SEQ ID NO:3) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(c) HCDR3,其与79A的V_H CDR3CDYW (SEQ ID NO:21) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(d) LCDR1,其与79A的V_L CDR1NTYLEWY (SEQ ID NO:4) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(e) LCDR2,其与79A的V_L CDR2KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;以及

(f) LCDR3,其与79A的V_L CDR3FQGSHPW (SEQ ID NO:6) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性。

19. 根据权利要求18所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含

(a) HCDR1,其与KASGYTFTDYMNWV (SEQ ID NO:2) 具有同一性;

(b) HCDR2,其与WIGEINPNN (SEQ ID NO:3) 具有同一性;

(c) HCDR3,其与CDYW (SEQ ID NO:21) 具有同一性;

(d) LCDR1,其与NTYLEWY (SEQ ID NO:4) 具有同一性;

(e) LCDR2,其与KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5) 具有同一性;以及

(f) LCDR3,其与FQGSHPW (SEQ ID NO:6) 具有同一性。

20. 根据权利要求1所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A的V_H结构域 (SEQ ID NO:7) 具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_H结构域,和与79A的V_L结构域 (SEQ

ID NO:8) 具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_L结构域。

21. 根据权利要求20所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A的V_H结构域 (SEQ ID NO:7) 具有在90%和99%之间同一性的V_H结构域,或与79A的V_L结构域 (SEQ ID NO:8) 具有在90%和99%之间同一性的V_L结构域。

22. 根据权利要求20所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A的V_H结构域 (SEQ ID NO:7) 具有同一性的V_H结构域,和与79A的V_L结构域 (SEQ ID NO:8) 具有同一性的V_L结构域。

23. 一种特异性结合TCR α 多肽的分离抗体或其抗原结合片段,其包含

(a) HCDR1,其与KASGYTFTGYMNWV (SEQ ID NO:15) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(b) HCDR2,其与WIGGINPNN (SEQ ID NO:16) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(c) HCDR3,其与CRYW (SEQ ID NO:17) 具有同一性;

(d) LCDR1,其与QSIVHGGGNTY (SEQ ID NO:18) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

(e) LCDR2,其与KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性;

以及

(f) LCDR3,其与FQGSHVPW (SEQ ID NO:6) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性。

24. 根据权利要求23所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含

(a) HCDR1,其与KASGYTFTGYMNWV (SEQ ID NO:15) 具有同一性;

(b) HCDR2,其与WIGGINPNN (SEQ ID NO:16) 具有同一性;

(c) HCDR3,其与CRYW (SEQ ID NO:17) 具有同一性;

(d) LCDR1,其与QSIVHGGGNTY (SEQ ID NO:18) 具有同一性;

(e) LCDR2,其与KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5) 具有同一性;以及

(f) LCDR3,其与FQGSHVPW (SEQ ID NO:6) 具有同一性。

25. 根据权利要求1所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A-23的V_H结构域 (SEQ ID NO:19) 具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_H结构域,和与79A-23的V_L结构域 (SEQ ID NO:20) 具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_L结构域。

26. 根据权利要求25所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A-23的V_H结构域 (SEQ ID NO:19) 具有在90%和99%之间同一性的V_H结构域,和与79A-23的V_L结构域 (SEQ ID NO:20) 具有在90%和99%之间同一性的V_L结构域。

27. 根据权利要求25所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A-23的V_H结构域 (SEQ ID NO:19) 具有同一性的V_H结构域,和与79A-23的V_L结构域 (SEQ ID NO:20) 具有同一性的V_L结构域。

28. 根据权利要求1至27中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其为多特异性的。

29. 根据权利要求28所述的抗体或其抗原结合片段,其为双特异性的。

30. 根据权利要求1至29中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其为Fab片段。

31. 根据权利要求1至29中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其为F(ab)₂片段。

32. 根据权利要求1至29中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其为F_v片段。

33. 根据权利要求1至29中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其为单链抗体。

34. 根据权利要求1至33中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其为多价的,并且包

含至少两条重链和至少两条轻链。

35. 根据权利要求1至29、33和34中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含选自人 κ 恒定区和人 λ 恒定区的轻链恒定区。

36. 根据权利要求1至30和33至35中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其包含重链恒定区或其片段。

37. 根据权利要求36所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述重链恒定区或其片段是人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgE或IgD。

38. 根据权利要求1至37中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段是人源化的、灵长类源化的或嵌合的。

39. 根据权利要求1至37中任一项所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述抗体或其片段是人源化的。

40. 根据权利要求1所述的抗体或其抗原结合片段,其包含被接头分隔的VH结构域和VL结构域。

41. 根据权利要求40所述的抗体或其抗原结合片段,其还包含跨膜域。

42. 根据权利要求40或41所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH是与选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:19的多肽具有至少90%同一性的多肽,并且所述VL是与选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:20的多肽具有至少90%同一性的多肽。

43. 根据权利要求40或41所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH是与SEQ ID NO:11具有至少90%同一性的多肽,并且所述VL是与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的多肽。

44. 根据权利要求40或41所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH是与SEQ ID NO:13具有至少90%同一性的多肽,并且所述VL是与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的多肽。

45. 根据权利要求40或41所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH是与SEQ ID NO:11具有至少90%同一性的多肽,并且所述VL是与SEQ ID NO:14具有至少90%同一性的多肽。

46. 根据权利要求40或41所述的抗体或其抗原结合片段,其中所述VH是与SEQ ID NO:19具有至少90%同一性的多肽,并且所述VL是与SEQ ID NO:20具有至少90%同一性的多肽。

47. 一种包含编码特异性结合T细胞受体 α 链(TCR α)的抗体或其抗原结合片段的核酸的分离的多核苷酸,所述抗体结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的TCR α 多肽的表位。

48. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:19具有至少90%同一性的VH多肽。

49. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:20具有至少90%同一性的VL多肽。

50. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:2具有同一性的HCDR1氨基酸序列。

51. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:15具有同一性的HCDR1氨基酸序列。

52. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:3具有同一性的HCDR2氨基酸序列。

53. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:16具有同一性的HCDR2氨基酸序列。

54. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:21具有同一性的HCDR3氨基酸序列。

55. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:22具有同一性的HCDR3氨基酸序列。

56. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:23具有同一性的HCDR3氨基酸序列。

57. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:17具有同一性的HCDR3氨基酸序列。

58. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:4具有同一性的LCDR1氨基酸序列。

59. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:9具有同一性的LCDR1氨基酸序列。

60. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:18具有同一性的LCDR1氨基酸序列。

61. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:5具有同一性的LCDR2氨基酸序列。

62. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:6具有同一性的LCDR3氨基酸序列。

63. 根据权利要求47所述的分离的多核苷酸,其中所述核酸编码与SEQ ID NO:10具有同一性的LCDR3氨基酸序列。

64. 一种包含编码VH多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VH多肽包含分别包含SEQ ID NO:2、3和21的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VH多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位。

65. 一种包含编码VH多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VH多肽包含分别包含SEQ ID NO:2、3和22的HCDR1、HCDR2、HCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VH多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位。

66. 一种包含编码VH多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VH多肽包含分别包含SEQ ID NO:2、3和23的HCDR1、HCDR2、HCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VH多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位。

67. 一种包含编码VH多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VH多肽包含分别包含SEQ ID NO:15、16和17的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VH多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位。

68. 一种包含编码VL多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VL多肽包含分别包含SEQ ID NO:4、5和6的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VL多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位。

69. 一种包含编码VL多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VL多肽包含分别包含SEQ ID NO:9、5和10的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VL多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位。

70. 一种包含编码VL多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VL多肽包含分别包含SEQ ID NO:4、5和10的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VL多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位。

71. 一种包含编码VL多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VL多肽包含分别包含SEQ ID NO:18、5和6的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VL多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位。

72. 一种包含根据权利要求47至71中任一项所述的多核苷酸的载体。

73. 根据权利要求72所述的载体,其中所述多核苷酸与启动子可操作地缔合。

74. 一种制造抗体或其抗原结合片段的方法,其包括:(a)在细胞中表达一种或多种编码抗体的V_L和V_H链的多核苷酸分子;以及(b)从所述细胞纯化所述抗体,其中所述抗体特异性结合T细胞受体 α 链(TCR α)。

75. 根据权利要求74所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段选择性结合包含GSTLRG (SEQ ID NO:1)的TCR α 的表位。

76. 一种用于选择包含T细胞受体 α 链(TCR α)的细胞的方法,其包括:(a)使所述细胞与结合TCR α 链的抗体或其抗原片段接触,其中所述抗体或片段结合具有多种T细胞表位特异性的T细胞;以及(b)根据所述抗体或片段的结合选择包含所述TCR α 链的细胞。

77. 根据权利要求76所述的方法,其中所述TCR α 链包括包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的表位。

78. 根据权利要求76或77所述的方法,其中所述抗体或片段包含报告基因,并且所述方法还包括通过荧光活化细胞分选(FACS)选择所述细胞。

79. 一种用于扩增和/或活化T细胞的方法,其包括在存在结合T细胞受体(TCR)的表位的抗体或其抗原结合片段的情况下,使所述T细胞与人工抗原呈递细胞(aAPC)接触,其中所述表位是包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的多肽。

80. 根据权利要求79所述的方法,其中所述aAPC是K562细胞。

81. 根据权利要求80所述的方法,其中所述K562细胞表达T细胞共刺激配体。

82. 根据权利要求79所述的方法,其中所述aAPC表达结合TCR的所述表位的抗体或其抗原结合片段。

83. 根据权利要求79所述的方法,其中所述aAPC包含用于表达结合TCR的所述表位的抗体或其抗原结合片段的表达构建体。

84. 根据权利要求79所述的方法,其中所述结合TCR的表位的抗体或其抗原结合片段结合包含多种T细胞表位特异性的T细胞。

85. 根据权利要求79所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段根据权利要求1至47中的任一项。

86. 根据权利要求85所述的方法,其中所述抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:2具有至少95%或100%同一性的HCDR1;与SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的HCDR2;与CAYL (SEQ ID NO:22)具有同一性的HCDR3。

87. 根据权利要求85所述的方法, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:9具有至少95%或100%同一性的LCDR1; 与SEQ ID NO:5具有至少95%或100%同一性的LCDR2; 与SEQ ID NO:10具有至少95%同一性的LCDR3。

88. 根据权利要求85所述的方法, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:2具有至少95%或100%同一性的HCDR1; 与SEQ ID NO:3具有至少95%或100%同一性的HCDR2; 与CAYW (SEQ ID NO:23) 具有同一性的HCDR3。

89. 根据权利要求85所述的方法, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:9具有至少95%或100%同一性的LCDR1; 与SEQ ID NO:5具有至少95%或100%同一性的LCDR2; 与SEQ ID NO:10具有至少95%或100%同一性的LCDR3。

90. 根据权利要求85所述的方法, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:4具有至少95%或100%同一性的LCDR1; 与SEQ ID NO:5具有至少95%或100%同一性的LCDR2; 与SEQ ID NO:10具有至少95%或100%同一性的LCDR3。

91. 根据权利要求85所述的方法, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:15具有至少95%或100%同一性的HCDR1; 与SEQ ID NO:16具有至少95%或100%同一性的HCDR2; 与CRYW (SEQ ID NO:17) 具有同一性的HCDR3。

92. 根据权利要求85所述的方法, 其中所述抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:18具有至少95%或100%同一性的LCDR1; 与SEQ ID NO:5具有至少95%或100%同一性的LCDR2; 与SEQ ID NO:6具有至少95%或100%同一性的LCDR3。

93. 根据权利要求85所述的方法, 其中所述抗体或抗原结合片段包含被接头分隔的VH结构域和VL结构域。

94. 根据权利要求93所述的方法, 其中所述抗体或抗原结合片段还包含跨膜域。

95. 根据权利要求93或94所述的方法, 其中所述VH是与选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:19的多肽具有至少90%同一性的多肽, 并且所述VL是与选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:20的多肽具有至少90%同一性的多肽。

96. 根据权利要求91或92所述的方法, 其中所述VH是与SEQ ID NO:11具有至少90%同一性的多肽, 并且所述VL是与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的多肽。

97. 根据权利要求93或94所述的方法, 其中所述VH是与SEQ ID NO:13具有至少90%同一性的多肽, 并且所述VL是与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的多肽。

98. 根据权利要求93或94所述的方法, 其中所述VH是与SEQ ID NO:11具有至少90%同一性的多肽, 并且所述VL是与SEQ ID NO:14具有至少90%同一性的多肽。

99. 根据权利要求93或94所述的方法, 其中所述VH是与SEQ ID NO:19具有至少90%同一性的多肽, 并且所述VL是与SEQ ID NO:20具有至少90%同一性的多肽。

100. 根据权利要求79至99所述的方法, 其中所述T细胞是外周血单核细胞(PBMC)。

101. 一种治疗需要治疗的动物中的自身免疫疾病或T细胞白血病的方法, 其包括将包含靶向包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1) 的TCR α 多肽的嵌合抗原受体的宿主细胞施用于所述动物。

102. 根据权利要求101所述的方法, 其中所述宿主细胞是NK或 γ δ T细胞。

103. 一种包含编码抗体或其抗原结合片段的一种或多种多核苷酸分子的宿主细胞, 所述抗体或其抗原结合片段结合包含GSTLRG (SEQ ID NO:1) 的TCR α 链, 其中所述抗体或其抗

原结合片段选择性结合具有多种T细胞表位特异性的T细胞。

104. 根据权利要求103所述的宿主细胞, 其中所述细胞选自哺乳动物细胞、酵母细胞、细菌细胞、纤毛虫细胞或昆虫细胞。

105. 一种包含编码VH的多核苷酸和编码VL的多核苷酸的重组宿主细胞, 其中所述编码VH的多核苷酸编码VH多肽, 所述VH多肽包含分别由SEQ ID NO:2和3组成的HCDR1和HCDR2氨基酸序列和HCDR3氨基酸序列CAYL (SEQ ID NO:22), 其中所述编码VL的多核苷酸编码VL多肽, 所述VL多肽包含分别包含SEQ ID NO:9、5和10的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列, 并且其中所述编码VH和VL的多核苷酸编码的抗体或其抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的TCR α 链多肽的表位。

106. 一种包含编码VH的多核苷酸和编码VL的多核苷酸的重组宿主细胞, 其中所述编码VH的多核苷酸编码VH多肽, 所述VH多肽包含分别包含SEQ ID NO:2和3的HCDR1和HCDR2氨基酸序列和HCDR3氨基酸序列CAYW (SEQ ID NO:23), 其中所述编码VL的多核苷酸编码VL多肽, 所述VL多肽包含分别包含SEQ ID NO:9、5和10的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列, 并且其中所述编码VH和VL多核苷酸编码的抗体或其抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的TCR α 链多肽的表位。

107. 一种包含编码VH的多核苷酸和编码VL的多核苷酸的重组宿主细胞, 其中所述编码VH的多核苷酸编码VH多肽, 所述VH多肽包含分别由SEQ ID NO:2和3组成的HCDR1和HCDR2氨基酸序列和HCDR3氨基酸序列CAYL (SEQ ID NO:22), 其中所述编码VL的多核苷酸编码VL多肽, 所述VL多肽包含分别包含SEQ ID NO:4、5和10的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列, 并且其中所述编码VH和VL的多核苷酸编码的抗体或其抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的TCR α 链多肽的表位。

108. 一种包含编码VH的多核苷酸和编码VL的多核苷酸的重组宿主细胞, 其中所述编码VH的多核苷酸编码VH多肽, 所述VH多肽包含分别由SEQ ID NO:15和16组成的HCDR1和HCDR2氨基酸序列和HCDR3氨基酸序列CRYW (SEQ ID NO:17), 其中所述编码VL的多核苷酸编码VL多肽, 所述VL多肽包含分别包含SEQ ID NO:18、5和6的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列, 并且其中所述编码VH和VL的多核苷酸编码的抗体或其抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的TCR α 链多肽的表位。

109. 一种包含特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的TCR α 多肽的表位的表面抗体或其含抗原片段的重组宿主细胞, 其还包含靶向肿瘤相关抗原的抗体或其含抗原片段。

110. 根据权利要求107所述的重组宿主细胞, 其中所述靶向肿瘤相关抗原的抗体或其含抗原片段是嵌合抗原受体 (CAR)。

111. 一种包含靶向包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的TCR α 多肽的嵌合抗原受体的宿主细胞, 其中所述宿主细胞是NK或 $\gamma\delta$ T细胞。

T细胞受体 (TCR) 结合抗体及其用途

[0001] 本专利申请要求2015年9月15日提交的美国临时专利申请No.62/218,990的权益,该临时专利申请的全部内容以引用的方式并入本文。

[0002] 序列表的并入

[0003] 本专利申请包含已经以ASCII格式电子提交的序列表,并且全文据此以引用的方式并入。在2016年9月15日创建的所述ASCII副本被命名为0100-0021W01_SL.txt并且大小为15kb。

[0004] 发明背景

技术领域

[0005] 本发明整体涉及分子生物学和免疫学领域。更具体地讲,它涉及结合 $\alpha\beta$ -TCR的单克隆重组抗体(T细胞受体),以及使用此类抗体在体内和体外操作 $\alpha\beta$ -TCR⁺T细胞的用途。

[0006] 相关领域的描述

[0007] 目前正在探索使用基于T细胞的治疗法来治疗多种疾病。然而,一些基于T细胞的治疗法的主要障碍之一是用于该疗法的T细胞的高效选择(分离)和数值扩增。此外,T细胞可以在体内改变以进行活化和免疫抑制。因此,仍需要可用于体内和离体操作T细胞的新方法和组合物。

[0008] 发明概述

[0009] 本发明提供特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位的分离抗体或其抗原结合片段。

[0010] 在实施方案中,抗体或其抗原结合片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位,其亲和力特征在于解离常数(K_D)不大于 $5 \times 10^{-2}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $5 \times 10^{-3}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $8.4 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $5 \times 10^{-13}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $5 \times 10^{-14}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $5 \times 10^{-15}M$ 或 $10^{-15}M$ 。在实施方案中, K_D 为约 $5 \times 10^{-9}M$ 至约 $6 \times 10^{-9}M$ 。在另外的实施方案中, K_D 为约 $1 \times 10^{-9}M$ 至约 $2 \times 10^{-9}M$ 。

[0011] 在另外的实施方案中,本发明涉及特异性结合TCR α 多肽的抗体或其抗原结合片段,其包含(a)HCDR1,其与SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%或95%同一性;(b)HCDR2,其与SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%或95%同一性;(c)HCDR3,其与CDYW (SEQ ID NO:21)、CAYW (SEQ ID NO:23)或CAYL (SEQ ID NO:22)具有同一性;(d)LCDR1,其与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:9具有至少80%、85%、90%或95%同一性;(e)LCDR2,其与SEQ ID NO:5具有至少80%、85%、90%或95%同一性;以及(f)LCDR3,其与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:10具有至少80%、85%、90%或95%同一性。

[0012] 本发明还提供特异性结合TCR α 多肽的抗体或其抗原结合片段,其包含(a)HCDR1,其与79A-15的V_H CDR1SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%或95%同一性;(b)HCDR2,其与79A-15的V_H CDR2SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%或95%同一性;(c)HCDR3,其与79A-15的V_H CDR3 (SEQ ID NO:22)具有至少80%、85%、90%或95%同一性;(d)LCDR1,其与

79A-15的V_L CDR1SEQ ID NO:9具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(e) LCDR2,其与79A-15的V_L CDR2SEQ ID NO:5具有至少80%、85%、90%或95%同一性；以及(f) LCDR3,其与79A-15的V_L CDR3SEQ ID NO:10具有至少80%、85%、90%或95%同一性。

[0013] 在另外的方面,本发明提供特异性结合TCR α 多肽的分离抗体或其抗原结合片段,其包含(a) HCDR1,其与79A-13的V_H CDR1KASGYTFTDYMNWV (SEQ ID NO:2) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(b) HCDR2,其与79A-13的V_H CDR2WIGEINPNN (SEQ ID NO:3) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(c) HCDR3,其与79A-13的V_H CDR3CAYL (SEQ ID NO:22) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(d) LCDR1,其与79A-13的V_L CDR1NTYLEWY (SEQ ID NO:4) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(e) LCDR2,其与79A-13的V_L CDR2KLLIYKVS NRFS (SEQ ID NO:5) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；以及(f) LCDR3,其与79A-13的V_L CDR3MQGSHVPW (SEQ ID NO:10) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性。

[0014] 在实施方案中,本发明还涉及特异性结合TCR α 多肽的抗体或其抗原结合片段,其包含(a) HCDR1,其与79A-11的V_H CDR1KASGYTFTDYMNWV (SEQ ID NO:2) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(b) HCDR2,其与79A-11的V_H CDR2WIGEINPNN (SEQ ID NO:3) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(c) HCDR3,其与79A-11的V_H CDR3CAYW (SEQ ID NO:23) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(d) LCDR1,其与79A-11的V_L CDR1NTYLEWF (SEQ ID NO:9) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(e) LCDR2,其与79A-11的V_L CDR2KLLIYKVS NRFS (SEQ ID NO:5) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；以及(f) LCDR3,其与79A-11的V_L CDR3MQGSHVPW (SEQ ID NO:10) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性。

[0015] 本发明还提供特异性结合TCR α 多肽的分离抗体或其抗原结合片段,其包含(a) HCDR1,其与79A的V_H CDR1KASGYTFTDYMNWV (SEQ ID NO:2) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(b) HCDR2,其与79A的V_H CDR2WIGEINPNN (SEQ ID NO:3) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(c) HCDR3,其与79A的V_H CDR3CDYW (SEQ ID NO:21) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(d) LCDR1,其与79A的V_L CDR1NTYLEWY (SEQ ID NO:4) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(e) LCDR2,其与79A的V_L CDR2KLLIYKVS NRFS (SEQ ID NO:5) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；以及(f) LCDR3,其与79A的V_L CDR3FQGSHVPW (SEQ ID NO:6) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性。

[0016] 在实施方案中,本发明提供特异性结合TCR α 多肽的分离抗体或其抗原结合片段,其包含(a) HCDR1,其与KASGYTFTGYMNWV (SEQ ID NO:15) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(b) HCDR2,其与WIGGINPNN (SEQ ID NO:16) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(c) HCDR3,其与CRYW (SEQ ID NO:17) 具有同一性；(d) LCDR1,其与QSIVHGGNTY (SEQ ID NO:18) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(e) LCDR2,其与KLLIYKVS NRFS (SEQ ID NO:5) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；以及(f) LCDR3,其与FQGSHVPW (SEQ ID NO:6) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性。

[0017] 在另外的方面,本发明还提供包含编码特异性结合T细胞受体 α 链(TCR α)的抗体或其抗原结合片段的核酸的分离的多核苷酸,所述抗体结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1) 的TCR α 多肽的表位。

[0018] 在另外的实施方案中,本发明提供包含编码特异性结合T细胞受体 α 链(TCR α)的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸的载体,所述抗体结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1) 的

TCR α 多肽的表位。

[0019] 在另外的实施方案中,本发明提供制造抗体或其抗原结合片段的方法,其包括:(a)在细胞中表达一种或多种编码抗体的V_L和V_H链的多核苷酸分子;以及(b)从细胞纯化抗体,其中该抗体特异性结合T细胞受体 α 链(TCR α)。

[0020] 本发明还提供选择包含T细胞受体 α 链(TCR α)的细胞的方法,其包括:(a)使细胞与结合TCR α 链的抗体或其抗原片段接触,其中该抗体或片段结合具有多种T细胞表位特异性的T细胞;以及(b)根据抗体或片段的结合选择包含TCR α 链的细胞。

[0021] 在另外的实施方案中,本发明提供用于扩增和/或活化T细胞的方法,其包括在存在结合T细胞受体(TCR)的表位的抗体或其抗原结合片段的情况下,使T细胞与人工抗原呈递细胞(aAPC)接触,其中所述表位是包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的多肽。

[0022] 在某些方面,本发明提供治疗需要治疗的动物中的自身免疫疾病或T细胞白血病的方法,其包括将宿主细胞施用于所述动物,该宿主细胞包含靶向包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的TCR α 多肽的嵌合抗原受体。

[0023] 在另外的实施方案中,本发明提供宿主细胞,其包含一种或多种编码结合包含GSTLRG (SEQ ID NO:1)的TCR α 链的抗体或其抗原结合片段的多核苷酸分子,其中该抗体或其抗原结合片段选择性结合具有多种T细胞表位特异性的T细胞。

[0024] 一个另外的实施方案提供包含本发明实施方案的抗体或包含一种或多种编码结合T细胞受体(TCR)的抗体的多核苷酸分子的宿主细胞的试剂盒,其中该抗体结合具有多种T细胞表位特异性的T细胞和至少用于增加哺乳动物T细胞的增殖的第一试剂。在某些方面,试剂盒另外地包含APC。

附图说明

[0025] 以下附图形成本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步证明本发明的某些方面。通过参考这些附图中的一个或多个,结合本文提出的具体实施方案的详细描述可以更好地理解本发明。

[0026] 图1A-1E (i)、1E (ii) .A) 单克隆抗体(克隆79A)的结合特异性。ELISA在涂覆有线性TCR非变异链特异性合成肽的固相上进行。以1000ng/mL至7.5ng/mL的浓度范围运行抗体剂量曲线。在测定中,对照包括非特异性肽、二抗对照和缓冲液对照。通过Victor™读板器在OD450下读取测定板。样品一式两份运行。B) A1a-扫描文库证实了涂覆于固相ELISA上的冻干肽(Mimotope™ A1a-扫描肽文库)上的mAb 79A的线性表位特异性。图形示出了用丙氨酸置换选择AA时79A mAb的最高结合强度。C) 79A与特定肽的中等结合,如被丙氨酸置换的图中所示。D) GSTLGR (SEQ ID NO:1) 代表TCR Va24和Ja18的接合点,其中79A结合焦点由于这些AA被丙氨酸置换而完全消除结合。E (i) 和E (ii)) 79A缺乏对TCR-CDR3非变异链的构象拟合。流式细胞术测定显示,79A不能结合纯化的iNKT细胞(在图中示出)或常规 $\alpha\beta^+$ -T细胞(稍后示出),其中iNKT特异性mAb 6B11检测iNKT细胞上的构象表位。

[0027] 图2.mAb克隆79A的V基因扩增。琼脂糖凝胶图像示出了杂交瘤克隆A79的VH和VL链的扩增。图中示出了使用小鼠重链恒定区引物(MH-IgG1)以及小鼠重链FR1区引物(含有高和低简并性的混合物)的混合物扩增后的VH链(400~bp),和使用小鼠 κ 链通用简并性引物和 κ -链恒定引物的混合物扩增后的VL链(370~bp)。VL和VH二者的所有5'引物设计为从FR1

的第一个核苷酸开始。

[0028] 图3A-3D.A-B) 抗体(79A) 同源性模型。根据通过Paratome服务器分析的ABR构建79A同源性模型(参考文献Kunik,V.、Peters,B.和Ofra,Y. (2012) Structural consensus among antibodies defines the antigen binding site.PLoS computational biology, 8,e1002388.) (Kunik等人,2012.Nucleic Acid Research.40,W521-524)。WAM服务器(万维网址antibody.bath.ac.uk)用于构建VL链,由于短VH链CDR,SWISS-MODEL(万维网址swissmodel.expasy.org)用于构建VH结构域。参数根据服务器规格设置。C) 具有TCR非变异链特异性肽的79A的Z-对接模型。对接模型显示79A不诱导构象特异性拟合,其中TCR非变异链特异性肽来源于2CDE。D) 对接模型显示出79A抗体与 $\alpha\beta$ -TCR(PDB代码1KGC) 复合,该模型在网络服务器ZDOCK上构建并且通过BuildModel函数获得输出。通过FoldX分析对接模型。进行Ala-扫描以绘制抗体CDR中单个氨基酸的能量贡献。相互作用能量的总变化($\Delta \Delta G$) 通过从突变体的相互作用能量减去野生型的相互作用能量来计算。

[0029] 图4A-4C. 相互作用能量的变化($\Delta \Delta G$) 基于FoldX的复变Ala-扫描函数。 $(\Delta \Delta G = \Delta G_{MU} - \Delta G_{WT} (-9.98))$ 总相互作用能量($\Delta \Delta G$) 在Ala-扫描后从抗体对接模型获得。 $\Delta \Delta G$ *通过从突变体的相互作用能量减去野生型的相互作用能量来计算。红色圆圈表示相互作用能量的最小变化和适合突变的残基。A) L-链的CDR1的位置41处的酪氨酸(Y) 突变为苯丙氨酸(F)。L-链的CDR3的位置94处的苯丙氨酸(F) 改变为甲硫氨酸(M)。B) H-链的CDR3的位置99处的天冬氨酸(D) 突变为丙氨酸(A)。H-链的CDR3的位置101处的色氨酸(W) 突变为亮氨酸(L)。C) 散点线图表示分子相互作用能量($\Delta \Delta G$) (单位为Kcal/摩尔) 沿抗体79A CDR(VH和VL区) 的分布。具有低相互作用能量(<0.5 Kcal/mol) 的氨基酸被视为突变候选者并对其进行标记(红色箭头)。相关突变为在79A轻链CDR1中位置32处丝氨酸突变为甘氨酸(S32G), 位置33处天冬酰胺突变为甘氨酸(N33G), 在重链CDR1中位置31处天冬氨酸突变为甘氨酸(D31G), 在重链CDR2中位置50处天冬氨酸突变为甘氨酸(D50G) 以及在79A重链的CDR3中位置99处天冬氨酸突变为精氨酸(D99R)。将相关突变引入79A抗体可变区,以构建突变重组抗体克隆S23。

[0030] 图5A(i)、5A(ii)、5B.A-(i) 用于突变重组抗体表达载体S15(单链亲和力优化的新型突变体15) 的分子构建体。示意图中示出了融合至截短的IgG1Fc以产生重组抗体的79A突变scFv。抗体基因表达盒由连接至可变重链(VH-突变体15) 和可变轻链(VL-突变体15) 框内的VH5信号肽组成。表达在SV40启动子的控制下并且以polyA信号终止。表达在SV40启动子的控制下并且以polyA信号结束。A(ii) 载体图,其示出了融合至截短的IgG1Fc以产生重组抗体(S15) 的79A突变scFv。抗体表达盒由连接至可变重链(VH-突变体15) 和可变轻链(VL-突变体15) 框内的VH5信号肽组成。表达在SV40启动子的控制下并且以polyA信号结束。B) 分子构建体,其代表突变体23(S23) 的VH和VL。具有修饰(D31G、D50G和D99R) 的VH可变区融合至人IgG1Fc γ 恒定链,并且具有修饰(S32G和N33G) 的VL融合至人 κ -恒定轻链。PCR扩增全长抗体序列,然后克隆至高表达载体(Lake Pharma) 的MCS,然后转染HEK293细胞以进行瞬时表达。培养物上清液用于进行抗体纯化。

[0031] 图6A-6E.A) 重组抗体(S11、S13和S15) 的均质性和纯度。在蛋白A纯化后,考马斯蓝染色的SDS-PAGE凝胶显示出重组抗体制备物的均质性和纯度。图中示出了在哺乳动物293T细胞中表达的3种不同的突变抗体。B) 79A突变体(单链mAb) 检测变性全T细胞裂解物中的

TCR- α 链。从供体PBMC或纯化的T细胞提取的全细胞裂解物在变性PAGE (SDS+2ME与2X溴酚蓝组合) 中运行。在标准化之后向每个泳道加入等量(10ug) 的蛋白质。亲本mAb 79A和突变mAb (突变体13和突变体15) 用作一抗, 然后将HRP缀合的匹配二抗用于检测。通过化学发光使印迹可视化, 并通过Biorad成像仪获取图像。突变m15实现了最大检测灵敏度, 其中最高 $\Delta \Delta G$ 与亲本A79scFv和突变mAb (S13和S15) 之间的“相互作用能量变化”有关。C) 重组mAb S15与T细胞的 $\alpha\beta$ -TCR的构象特异性结合。流式图显示S15可以以其天然构型结合 $\alpha\beta$ -TCR⁺T细胞。s15 (突变体15) 的结合改善与引入79A链的位点特异性突变相关。在左图上, 亲本mAb79A不能结合PBMC衍生的T细胞。然而, S15与 $\alpha\beta$ -TCR+T细胞共染色和结合相当于商业化抗 $\alpha\beta$ -TCR (WT31) 抗体。D) 重组蛋白 (S15和S23) 的SDS-PAGE分析在TGX预染色凝胶 (Miniprotean, Biorad) 上运行。样品用2 β ME还原并加热 (95C) 2min, 然后加入凝胶。通过Biorad成像系统 (ChemiDoc) 获取图像。蛋白A亲和力纯化样品的重链和轻链的位置如图所示。E) 点图显示了突变重组抗体S15与从培养物收集的活化 $\alpha\beta$ +T细胞的改善结合 (n=3)。细胞用一抗79A或S15以及匹配荧光缀合的二抗染色, 并在流式细胞仪上运行, 如方法中所述。在BD FACS caliber上基于预定义的前向角和侧向角散射设置, 将活细胞针对淋巴细胞进行设门, 并获取50万个细胞的数据。

[0032] 图7A-7M. A) 将S15 (突变体VH-接头-突变体VL) 栓系到K562-活化和增殖细胞 (AaPC) 上的分子构建体。用于编码S15 (突变体VH-接头-突变体VL) 的转移质粒的分子构建体。图中示出了5' LTR (长末端重复序列) 融合至异源性增强子RSV劳氏 (Rous) 肉瘤病毒、HIV包装信号 ψ 、RRE逆响应元件、cPPT中央聚嘌呤道、Igk前导链序列、S15-VH突变抗体可变重链、S15-VL可变轻链、4甘氨酸-3丝氨酸接头重复序列、具有HA标签的CD8TM跨膜序列和截短的CD8跨膜序列、HBV PRE Woodchuck肝炎病毒转录后调控元件和自失活HIV LTR、选择性标记Amp^R氨苄青霉素抗性基因。包装载体 (psPAX2) 和包膜 (pVSV-G) 质粒单独加入。将所有质粒转染进293T细胞, 以产生慢病毒颗粒。B) 工程化K562-AaPC (K562-S15和K562-OKT3) 表达T细胞活化和共刺激配体。柱状图显示了转导为表达S15scFv (通过抗HA标签检测)、T细胞共刺激配体CD86、CD137L和细胞因子配体IL15-IL15Ra的K562细胞慢病毒的免疫表型。K562细胞也工程化为表达CD64以加载CD3 ϵ mAb OKT3和类似的共刺激配体。C) 基于CFSE的染料稀释测定显示, 与CD28和OKT3 (CD3 ϵ 特异性mAb) 相比, 在通过平板结合的重组抗体S15和S23活化后发生T细胞分裂。对细胞进行活-死染色并通过流式细胞术针对CD3⁺设门的T细胞进行分析。通过流式细胞术在488nm激发下捕获CFSE强度。每个峰代表第2天抗体刺激后产生的不同CD3阳性T细胞群。D) 基于CFSE的染料稀释测定示出了第6天平板结合的抗体活化后的T细胞增殖。CFSE加载的未刺激的PBMC (深灰色柱状图) 在测定中用作对照。E) 针对K562-AaPC扩增的T细胞的生长动力学。在与照射的K562-AaPC共培养两周后, 扩增来自健康供体PBMC的CD3⁺ $\alpha\beta$ -TCR⁺T细胞。通过台盼蓝染料排除法对活细胞进行计数并且表示为绝对细胞数。图形示出了在存在T细胞共刺激配体的情况下通过S15和OKT3刺激的T细胞。F) 针对加载有抗体 (仅S15) 的K562细胞的类似的T细胞的生长动力学。K562亲本细胞用作阴性对照, 加载有OKT3的K562用作阳性对照。G) 离体培养的活化T细胞的免疫表型。通过流式细胞术分析存活的活化T细胞的 $\alpha\beta$ -TCR (WT31)、CD3、CD4和CD8T细胞标记物 (BD) 的细胞表面表达。图中示出了伪彩色图, 其描述了在使用K562 (亲本)、K562S15 (在共刺激作用下)、K562OKT3 (在共刺激作用下) 共培养的第7天收集的活化T细胞中标记物的免疫表型表达。H) 分析通过重组抗体

活化的离体增殖的T细胞的ab-TCR表达,且ab-TCR表达与CD3一起示出。I) 在通过抗体活化之前和之后CD4表达的T细胞表型。J) 在通过抗体活化之前和之后CD8表达的T细胞表型。K) 和L) T细胞分化标记物根据CD45RA和CD45RO的表达评估活化水平,从而产生记忆或效应记忆表型。通过流式细胞术分析离体增殖的活T细胞(可固定存活鉴定染料阴性)和健康供体PBMC衍生的T细胞。用CD19和CD14对细胞染色,以排除B细胞和单核细胞。将所有活细胞针对CD3+CD56阴性T细胞群进行设门。与PBMC衍生的未操作的T细胞群相比,在OKT3刺激之后CD4+T细胞百分比似乎降低,而S23维持高CD4组成,相比之下,在OKT3刺激组中CD8百分比最高。对于细胞分化,在OKT3组中CD45RA阴性群体最高,而在每个细胞组中CD45RA阴性CD45RO阳性群体保持稳定,与用于刺激的抗体克隆无关。(M) 与S15或S23介导的活化相比,在OKT3刺激组中T细胞消耗标记物PD1上调。

[0033] 图8A-8D. A) 与通过S15或OKT3-CD3 ϵ 刺激针对aAPC扩增的活化T细胞相比,健康供体PBMC衍生的T细胞的TCRV β 谱系显示出产生具有异质性T细胞谱系的T细胞群。注意到在活化的体外扩增的T细胞中未出现意外的谱系偏差。B) 通过S15刺激(CS1S15)或通过OKT3T细胞生长的活化T细胞的TCRV β 谱系。该谱系代表克隆型无任何特定生长的多克隆T细胞群。C) 在离体增殖之后T细胞克隆频率和分布的新一代深度序列调查。与OKT3刺激相比,在S15介导的活化之后,可以看到克隆型的共同性与PBMC更好地一致。D) 表中示出了皮尔逊(Pearson)系数值(r^2),它表示在活化之后产生的T细胞的克隆频率。在通过(亲本K562/ACT)、通过(K562-S15-共刺激)和(K562-OKT3-共刺激)刺激的T细胞之间进行T细胞克隆频率比较。与PBMC相比,样品重叠显示出,对于S15T细胞, r^2 值为0.043和 $\phi=0.472$,对于OKT3-PBMC, $r^2=0.055$,样品重叠 $\phi=0.172$ 。对于S15活化T细胞,克隆重叠具有优势。

[0034] 图9.V-J配对基因频率。堆叠柱状图示出了在共刺激作用下在K562-S15上生长的T细胞(克隆CS1S15)和在共刺激作用下在K562-OKT3上生长的T细胞(克隆K562OKT3)的任何特定基因座中的V-J配对基因频率。

[0035] 图10. 在深度测序之后从NGS数据分析的未操作的T细胞与活化T细胞的克隆层级。基于由用于T细胞活化和增殖的健康供体PBMC样品中的每个克隆表示的生产性测序读数的百分比的最高排序(1-10)克隆(上图)。表中示出了相应的TCR CDR3的氨基酸序列,以及V和J家族等位基因和相应的百分比。K562-S15活化的与K562-OKT3活化的T细胞之间的最高克隆频率的比较如柱状图所示(下图)。Y轴表示每个样品总计数的百分比。

[0036] 图11. S15活化的T细胞和OKT3活化的T细胞二者的CDR3链长的正态曲线分布。活化T细胞的CDR3链长与PBMC衍生的T细胞相比,在CDR3链的整个分布上未观察到扰动。

具体实施方式

[0037] I. 定义

[0038] 如本文所用,就指定组分而言,“基本上不含”在本文中用于指任何指定组分都不有目的地配制为组合物和/或仅作为污染物或以痕量存在。因此,从组合物的任何不期望的污染获得的指定组分的总量优选地小于0.01%。最优选的是其中指定组分的量不能通过标准分析方法检测的组合物。

[0039] 如本文所用,在说明书和权利要求中,“一个”或“一种”可以意指一个(种)或多个(种)。如本文所用,在说明书和权利要求中,当与词语“包含”一起使用时,词语“一个”或“一

种”可以意指一个(种)或多于一个(种)。如本文所用,在说明书和权利要求书中,“另一个”或“另种”可以意指至少第二个(种)或更多个(种)。

[0040] 如本文所用,在说明书和权利要求中,术语“约”用于表示数值包括设备的固有误差变异,该方法用于确定数值,或研究主体之间存在的变异。

[0041] 如本文所用,术语“多肽”旨在涵盖单个“多肽”以及多个“多肽”,是指由单体(氨基酸)通过酰胺键(也称为肽键)线性连接组成的分子。术语“多肽”是指两个或更多个氨基酸的任何一个或多个链,并且不涉及产物的特定长度。因此,肽、二肽、三肽、寡肽、“蛋白质”、“氨基酸链”或用于指两个或更多个氨基酸的一个或多个链的任何其他术语,包括在“多肽”的定义中,并且术语“多肽”可以代替这些术语中的任何一个或可互换使用。术语“多肽”还旨在指多肽的表达后修饰,包括但不限于糖基化、乙酰化、磷酸化、酰胺化、通过已知的保护/封闭基团衍生化、蛋白酶切割或通过非天然存在的氨基酸修饰的产物。多肽可以衍生自天然生物来源或通过重组技术产生,但不一定从指定的核酸序列翻译。它可以以任何方式,包括通过化学合成产生。

[0042] 本发明的多肽可以具有约3个或更多个、5个或更多个、10个或更多个、20个或更多个、25个或更多个、50个或更多个、75个或更多个、100个或更多个、200个或更多个、500个或更多个、1,000个或更多个或2,000个或更多个氨基酸的大小。多肽可以具有确定的三维结构,尽管它们不一定具有此类结构。具有确定的三维结构的多肽被称为折叠的,并且不具有确定的三维结构,而是可以采取许多不同构象的多肽被称为未折叠的。如本文所用,术语糖蛋白是指偶联至至少一个碳水化合物部分的蛋白质,所述碳水化合物部分通过氨基酸残基,如丝氨酸残基或天冬酰胺残基的含氧或含氮侧链连接至蛋白质。

[0043] 所谓“分离的”多肽或其片段、变体或衍生物意指不在其天然环境中的多肽。不需要特定的纯化水平。例如,分离的多肽可以从其天然或自然环境移除。出于本发明的目的,在宿主细胞中表达的合成重组多肽和/或蛋白质被视为分离的,正如已通过任何合适的技术分离、分级或部分或基本上纯化的天然或重组多肽。

[0044] 还包括作为本发明的多肽的是前述多肽的片段、衍生物、类似物或变体以及它们的任何组合。当提及本发明的抗TCR抗体或抗体多肽时,术语“片段”、“变体”、“衍生物”和“类似物”包括保留本发明的相应抗体或抗体多肽的至少一些抗原结合性质的任何多肽。除本文别处讨论的特定抗体片段之外,本发明的多肽的片段包括蛋白酶解片段,以及缺失片段。本发明的抗TCR抗体和抗体多肽的变体包括如上所述的片段,以及由于氨基酸置换、缺失或插入而具有改变的氨基酸序列的多肽。变体可以是天然存在的或非天然存在的。非天然存在的变体可以使用本领域已知的诱变技术产生。变体多肽可以包含保守或非保守氨基酸置换、缺失或添加。变体多肽在本文中也可以称为“多肽类似物”,如本文所用,抗TCR抗体或抗体多肽的“衍生物”是指具有通过官能性侧基的反应化学衍生的一个或多个残基的主题多肽。还包括作为“衍生物”的是含有二十个标准氨基酸的一种或多种天然存在的氨基酸衍生物的那些肽。例如,4-羟脯氨酸可以代替脯氨酸;5-羟赖氨酸可以代替赖氨酸;3-甲基组氨酸可以代替组氨酸;高丝氨酸可以代替丝氨酸;并且鸟氨酸可以代替赖氨酸。本发明的抗TCR抗体和抗体多肽的衍生物,可以包括已经改变为表现出本发明的参考抗体或抗体多肽中不存在的另外特征的多肽。

[0045] 术语“多核苷酸”旨在涵盖单个核酸以及多个核酸,是指分离的核酸分子或构建

体,如信使RNA (mRNA) 或质粒DNA (pDNA)。多核苷酸可以包含常规的磷酸二酯键或非常规键(如,酰胺键,诸如可见于肽核酸(PNA))。术语“核酸”是指存在于多核苷酸中的任何一个或多个核酸区段,如DNA或RNA片段。所谓“分离的”核酸或多核苷酸意指已从其天然环境移除的核酸分子、DNA或RNA。例如,出于本发明的目的,载体中含有的编码抗TCR结合分子,如抗体或其抗原结合片段的重组多核苷酸被视为分离的。分离的多核苷酸的另外实例包括维持在异源性宿主细胞中的重组多核苷酸或溶于溶液中的纯化的(部分或基本上)多核苷酸。分离的RNA分子包括本发明的多核苷酸的体内或体外RNA转录物。根据本发明的分离的多核苷酸或核酸还包括此类合成产生的分子。此外,多核苷酸或核酸可以是或可以包括调控元件诸如启动子、核糖体结合位点或转录终止子。

[0046] 如本文所用,“编码区”是由翻译成氨基酸的密码子组成的核酸的一部分。虽然“终止密码子”(TAG、TGA或TAA)不翻译成氨基酸,但它可以被视为编码区的一部分,但是任何侧翼序列例如启动子、核糖体结合位点、转录终止子、内含子等等都不是编码区的一部分。本发明的两个或更多个编码区可以存在于单个多核苷酸构建体中,如在单个载体上,或存在于单独的多核苷酸构建体中,如在单独的(不同的)载体上。此外,任何载体均可以包含单个编码区,或可以包含两个或更多个编码区,如单个载体可以分别地编码免疫球蛋白重链可变区和免疫球蛋白轻链可变区。此外,本发明的载体、多核苷酸或核酸可以编码异源性编码区,该异源性编码区融合或未融合至编码抗TCR抗体或其片段、变体或衍生物的核酸。异源性编码区包括但不限于专用元件或基序,诸如分泌信号肽或异源性功能域。

[0047] 在某些实施方案中,多核苷酸或核酸是DNA。就DNA而言,包含编码多肽的核酸的多核苷酸通常可以包含与一个或多个编码区可操作地缔合的启动子和/或其他转录或翻译控制元件。可操作的缔合是当基因产物如多肽的编码区与一种或多种调控序列缔合时,从而使得基因产物的表达置于调控序列的影响或控制下。如果启动子功能的诱导导致编码所需基因产物的mRNA转录,并且如果两个DNA片段之间的连接的性质不干扰表达调控序列指导基因产物的表达的能力或干扰DNA模板被转录的能力,则两个DNA片段(诸如多肽编码区及其相关的启动子)“可操作地缔合”。因此,如果启动子能够影响核酸的转录,则启动子区将与编码多肽的核酸可操作地缔合。启动子可以是仅指导预定细胞中DNA的实质转录的细胞特异性启动子。除启动子之外,其他转录控制元件,例如增强子、操纵子、阻遏子和转录终止信号可以与多核苷酸可操作地缔合,以指导细胞特异性转录。本文公开了合适的启动子和其他转录控制区。

[0048] 许多转录控制区是本领域技术人员熟知的。这些转录控制区包括但不限于在脊椎动物细胞中发挥作用的转录控制区,诸如但不限于来自巨细胞病毒(立即早期启动子,与内含子-A一起)、猿猴病毒40(早期启动子)和逆转录病毒(诸如劳氏肉瘤病毒)的启动子和增强子区段。其他转录控制区包括衍生自脊椎动物基因诸如肌动蛋白、热休克蛋白、牛生长激素和兔 β -球蛋白以及能够控制真核细胞中的基因表达的其他序列的那些。另外合适的转录控制区包括组织特异性启动子和增强子以及淋巴因子诱导型启动子(例如,可被干扰素或白介素诱导的启动子)。

[0049] 类似地,许多翻译控制元件是本领域普通技术人员已知的。这些翻译控制元件包括但不限于核糖体结合位点、翻译起始和终止密码子以及衍生自小核糖核酸病毒的元件(特别是内部核糖体进入位点或IRES,也称为CITE序列)。

[0050] 在其他实施方案中,本发明的多核苷酸是RNA,例如以信使RNA (mRNA) 的形式。

[0051] 本发明的多核苷酸和核酸编码区可以与编码分泌或信号肽的另外编码区缔合,该分泌或信号肽指导本发明的多核苷酸编码的多肽的分泌。根据信号假设,哺乳动物细胞分泌的蛋白质具有一旦生长中的蛋白质链开始跨过糙面内质网输出,即从成熟蛋白质切割下来的信号肽或分泌前导序列。本领域普通技术人员意识到,脊椎动物细胞分泌的多肽通常具有融合至多肽的N-末端的信号肽,该信号肽从完整或“全长”多肽切割下来,以产生分泌或“成熟”形式的多肽。在某些实施方案中,使用天然信号肽,如免疫球蛋白重链或轻链信号肽,或该序列的功能衍生物,该功能衍生物保留指导与其可操作地缔合的多肽的分泌的能力。或者,可以使用异源性哺乳动物信号肽或其功能衍生物。例如,野生型前导序列可以被人组织血纤溶酶原激活剂 (TPA) 或小鼠 β -葡糖醛酸酶的前导序列取代。

[0052] 如本文所用,术语“TCR”是指“T细胞受体”。T细胞受体是T淋巴细胞(“T细胞”)表面上的分子。在实施方案中,该受体是 $\alpha\beta$ -TCR受体,意指T细胞受体包含alpha (α) 和beta (β) 链,其通常表达为与CD3链分子形成的复合物的一部分。因此,“ $\alpha\beta$ -TCR⁺T细胞”是其表面上含有T细胞受体的T淋巴细胞,该T细胞受体包含 α 和 β 链。虽然T细胞受体 α 链含有恒定(保守区),即Va24-Ja18接合点(氨基酸序列GSTLGR (SEQ ID NO:1)),但是 α 和 β 链均为高变的。

[0053] 本发明的“结合分子”或“抗原结合分子”在其最广义上是指特异性结合抗原决定簇的分子。在一个实施方案中,结合分子特异性结合TCR,如T细胞受体,如T细胞受体 α 链。在实施方案中,结合分子特异性结合T细胞受体 α -链的Va24-Ja18接合点(氨基酸序列GSTLGR (SEQ ID NO:1))。在另一个实施方案中,本发明的结合分子是包含增加亲和力的点突变的抗体或其抗原结合片段。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含抗体分子的至少一个重链或轻链CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含来自一个或多个抗体分子的至少两个CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含来自一个或多个抗体分子的至少三个CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含来自一个或多个抗体分子的至少四个CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含来自一个或多个抗体分子的至少五个CDR。在另一个实施方案中,本发明的结合分子包含来自一个或多个抗体分子的至少六个CDR。

[0054] 本发明涉及某些抗TCR抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物。除非特别提及全长抗体诸如天然存在的抗体,否则术语“抗TCR抗体”涵盖此类抗体的抗原结合片段、变体、类似物或衍生物,如以类似于抗体分子的方式结合抗原的天然存在的抗体或免疫球蛋白分子或工程化抗体分子或片段。

[0055] 如本文所用,“人”或“完全人”抗体包括具有人免疫球蛋白的氨基酸序列的抗体,并且包括从人免疫球蛋白文库或从一种或多种人免疫球蛋白转基因动物分离且不表达内源性免疫球蛋白的抗体,如下文以及例如授予Kucherlapati等人的美国专利No.5,939,598所描述。“人”或“完全人”抗体还包括包含至少重链的可变域,或至少重链和轻链的可变域的抗体,其中该可变域具有人免疫球蛋白可变域的氨基酸序列。

[0056] “人”或“完全人”抗体还包括这样的“人”或“完全人”抗体:如上文所述,其包括本文所述的抗体分子(如,VH区和/或VL区)的变体(包括衍生物),基本上由其组成或由其组成,所述抗体或其片段免疫特异性结合TCR或其片段或变体。本领域技术人员已知的标准技术可用于将突变引入编码人抗TCR抗体的核苷酸序列,包括但不限于产生氨基酸置换的定

点诱变和PCR介导的诱变。优选地,相对于参考VH区(HCDR1、HCDR2、HCDR3)、VL区(LCDR1、LCDR2或LCDR3),变体(包括衍生物)编码小于50个氨基酸置换、小于40个氨基酸置换、小于30个氨基酸置换、小于25个氨基酸置换、小于20个氨基酸置换、小于15个氨基酸置换、小于10个氨基酸置换、小于5个氨基酸置换、小于4个氨基酸置换、小于3个氨基酸置换或小于2个氨基酸置换。

[0057] 在某些实施方案中,氨基酸置换是保守氨基酸置换,如下文进一步讨论。或者,突变可以沿编码序列的全部或部分随机引入,诸如通过饱和诱变,并且可以筛选所得突变体的生物学活性,以鉴定保留活性(如,结合TCR多肽,如人、鼠或人和鼠二者TCR的能力)的突变体。“人”或“完全人”抗体的此类变体(或其衍生物)也可以称为“优化的”或“针对抗原结合优化的”人或完全人抗体,并且包括具有改善的抗原亲和力的抗体。

[0058] 术语“抗体”和“免疫球蛋白”在本文中可互换使用。抗体或免疫球蛋白包含至少重链的可变域,并且通常包含至少重链和轻链的可变域。脊椎动物系统中的基本免疫球蛋白结构相对较好理解。参见例如,Harlow等人(1988) *Antibodies: A Laboratory Manual* (第2版; Cold Spring Harbor Laboratory Press)。

[0059] 如下文更详细地讨论,术语“免疫球蛋白”包括可以在生物化学上区分的许多广泛种类的多肽。本领域技术人员应理解,重链被分类为 γ 、 μ 、 α 、 δ 或 ϵ ,其中有一些亚类(如, γ 1- γ 4)。该链的性质决定了抗体的“种类”分别为IgG、IgM、IgA、IgG或IgE。免疫球蛋白亚类(同种型)如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1等已被充分表征,并且已知赋予功能专业化。技术人员在考虑本发明的公开内容时,将易于区别这些种类和同种型中的每一个的修改型式,因此在本发明的范围内。所有免疫球蛋白种类都明显地在本发明的范围内。以下讨论通常将涉及免疫球蛋白分子的IgG种类。就IgG而言,标准免疫球蛋白分子包含分子量为大约23,000道尔顿的两条相同的轻链多肽,和分子量为53,000-70,000的两条相同的重链多肽。四条链通常通过二硫键连接成“Y”构型,其中轻链包围重链,从“Y”的口部开始延伸通过可变区。

[0060] 轻链被分类为kappa或lambda (κ 、 λ)。每个重链种类可以结合 κ 或 λ 轻链。一般来讲,轻链和重链彼此共价结合,并且当通过杂交瘤、B细胞或基因工程宿主细胞产生免疫球蛋白时,两条重链的“尾部”部分通过共价二硫键或非共价键彼此结合。在重链中,氨基酸序列从Y构型的叉状末端的N-末端延伸至每条链底部的C-末端。

[0061] 轻链和重链二者均分为结构和功能同源区。术语“恒定”和“可变”在功能上使用。就此而言,可以理解的是,轻链(VL或VK)和重链(VH)两部分的可变域决定了抗原识别和特异性。相反,轻链(CL)和重链(CH1、CH2或CH3)的恒定结构域赋予重要生物学性质,诸如分泌、经胎盘移动、Fc受体结合、补体结合等等。按照惯例,恒定区结构域的编号随着其远离抗体的抗原结合位点或氨基末端而增加。N-末端部分是可变区,C-末端部分是恒定区;CH3和CL结构域实际上分别包含重链和轻链的羧基末端。

[0062] 如上文所述,可变区允许抗体选择性识别和特异性结合抗原上的表位。即,抗体的VL结构域和VH结构域,或这些可变域内互补决定区(CDR)的子集,组合形成限定三维抗原结合位点的可变区。该四级抗体结构形成存在于Y的每个臂末端的抗原结合位点。更具体地讲,抗原结合位点由VH和VL链中的每个上的三个CDR限定。如本文所用,术语HCDR1、HCDR2、HCDR3分别指VH CDR1、VH CDR2、VH CDR3。同样,如本文所用,术语LCDR1、LCDR2、LCDR3分别

指VL CDR1、VL CDR2和VL CDR3。在一些情况下,例如衍生自骆驼科物种或根据骆驼科免疫球蛋白工程化的某些免疫球蛋白分子、完整的免疫球蛋白分子可以仅由重链组成,无轻链。参见例如,Hamers-Casterman等人,Nature 363:446-448 (1993)。

[0063] 在天然存在的抗体中,每个抗原结合域中存在的六个“互补决定区”或“CDR”是特异性定位为形成抗原结合域的短的、非邻接氨基酸序列,因为抗体在水环境中采取其三维构型。抗原结合域中的其余氨基酸称为“框架”区,其显示出较小的分子间可变性。框架区主要采取折叠构象,CDR形成连接 β -折叠结构的环,并且在一些情况下形成 β -折叠结构的一部分。因此,框架区起到形成支架的作用,该支架用于通过链间非共价相互作用将CDR定位于正确方向。通过定位CDR形成的抗原结合域限定了与免疫反应性抗原上的表位互补的表面。该互补表面促进抗体非共价结合至其同源表位。本领域普通技术人员可以容易地鉴定分别包含CDR和框架区的氨基酸的任何给定的重链或轻链可变域,因为它们已被精确定义(参见下文)。

[0064] 在本领域中使用和/或接受的术语有两个或更多个定义的情况下,除非明确指明相反,本文所用的术语的定义旨在包括所有这些含义。具体实例是使用术语“互补决定区”(“CDR”)描述可见于重链和轻链多肽二者的可变区内的非邻接抗原组合位点。该特定区由Kabat等人(1983)U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”Chothia和Lesk,J.Mol.Biol.196:901-917 (1987)进行了描述,并且最近由Kunik等人,Nucl.Acids Res.40:W521-W524 (2012)进行了更新,这些参考文献以引用的方式并入本文,其中当彼此比较时,该定义包括氨基酸残基的重叠和子集。然而,应用任何定义来涉及抗体或其变体的CDR都旨在处于本文定义和使用的术语的范围内。作为比较,涵盖上文引用的参考文献中的每个定义的CDR的适当的氨基酸残基在下表1中示出。涵盖特定CDR的确切残基数量将根据CDR的序列和大小而变化。鉴于抗体的可变区氨基酸序列,本领域技术人员可以例行地确定哪些残基包含特定CDR。

[0065] Kabat等人还定义了适用于任何抗体的可变域序列的编号系统。本领域普通技术人员可以明确地将该“Kabat编号”系统分配给任何可变域序列,而不依赖于除序列本身之外的任何实验数据。如本文所用,“Kabat编号”是指Kabat等人(1983)U.S.Dept.of Health and Human Services,“Sequence of Proteins of Immunological Interest”示出的编号系统。

[0066] Kunik等人,Nucl.Acids Res.40:W521-W524 (2012)公开了根据序列或结构系统鉴定抗体中的抗原结合区的在线工具Paratome。通常,基于Paratome的分析与Kabat编号匹配,但还可以包括邻近常规CDR的残基。除非另外指明,否则根据基于Paratome鉴定的编号系统提及本发明的抗TCR抗体CDR或其抗原结合片段、变体或衍生物中特定氨基酸残基位置的编号。

[0067] 本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物包括但不限于多克隆、单克隆、多特异性、人、人源化、灵长类源化或嵌合抗体、单链抗体、表位结合片段,如Fab、Fab'和F(ab')₂、Fd、Fvs、单链Fvs (scFv)、二硫键连接的Fvs (sdFv)、包含VL或VH结构域的片段、Fab表达文库产生的片段和抗独特型(抗Id)抗体(包括例如,针对本文公开的抗TCR抗体的抗Id抗体)。ScFv分子是本领域已知的,并且例如在美国专利No.5,892,019中有所描述。本发明的免疫球蛋白或抗体分子可以是免疫球蛋白分子的任何类型(IgG、IgE、IgD、IgA和IgY)、种

类(如,IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1和IgA2等)或亚类。

[0068] 如本文所用,术语“重链部分”包括衍生自免疫球蛋白重链的氨基酸序列。包含重链部分的多肽包含以下至少一者:CH1域、铰链域(如,上、中和/或下铰链区)、CH2域、CH3域或其变体或片段。例如,用于本发明的结合多肽可以包括包含CH1域的多肽链;包含CH1域、铰链域的至少一部分和CH2域的多肽链;包含CH1域和CH3域的多肽链;包含CH1域、铰链域的至少一部分和CH3域的多肽链或包含CH1域、铰链域的至少一部分、CH2域和CH3域的多肽链。在另一个实施方案中,本发明的多肽包括包含CH3域的多肽链。另外,用于本发明的结合多肽可以缺少CH2域的至少一部分(如,CH2域的全部或一部分)。如上所述,本领域普通技术人员将理解,可以修饰这些域(如,重链部分),使得它们的氨基酸序列不同于天然存在的免疫球蛋白分子。

[0069] 在本文公开的某些抗TCR抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物中,多聚体的一条多肽链的重链部分与多聚体的第二多肽链的重链部分具有同一性。或者,本发明的含重链部分单体不具有同一性。例如,每个单体可以包含不同的靶结合位点,形成例如双特异性抗体。

[0070] 用于本文公开的诊断和治疗方法的结合分子的重链部分可以衍生自不同的免疫球蛋白分子。例如,多肽的重链部分可以包含衍生自IgG1分子的C.sub.H1域和衍生自IgG3分子的铰链区。在另一个实例中,重链部分可以包含部分衍生自IgG1分子且部分衍生自IgG3分子的铰链区。在另一个实例中,重链部分可以包含部分衍生自IgG1分子且部分衍生自IgG4分子的嵌合铰链。

[0071] 如本文所用,术语“轻链部分”包括衍生自免疫球蛋白轻链,如 κ 或 λ 轻链的氨基酸序列。优选地,轻链部分包含VL结构域或CL结构域中的至少一者。

[0072] 本文公开的抗TCR抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以针对抗原的表位或部分进行描述或指定,例如该抗原的表位或部分识别或特异性结合的本文公开的靶多肽(如,TCR)。与抗体的抗原结合域特异性相互作用的靶多肽的部分是“表位”或“抗原决定簇”。靶多肽可以包含单个表位,但通常包含至少两个表位,并且根据抗原的大小、构象和类型,可以包含任何数量的表位。此外,应当指出,靶多肽上的“表位”可以为或可以包括非多肽元件,例如表位可以包括碳水化合物侧链。

[0073] 抗体的肽或多肽表位的最小大小被认为是约四至五个氨基酸。肽或多肽表位优选地含有至少七个,更优选地至少九个以及最优选地在至少约15个至约30个氨基酸之间。由于CDR可以识别三级形式的抗原肽或多肽,因此包含表位的氨基酸不必是邻接的,在一些情况下,可以甚至不在相同的肽链上。本发明的抗TCR抗体识别的肽或多肽表位可以含有TCR的至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、更优选地至少8个、至少9个、至少10个、至少15个、至少20个、至少25个或在约15个至约30个之间的邻接或非邻接氨基酸的序列。

[0074] 所谓“特异性结合”通常意指抗体通过其抗原结合域结合表位,并且该结合需要抗原结合域和表位之间的一些互补性。根据该定义,当抗体通过其抗原结合域结合表位比其结合随机、不相关的表位更容易时,则该抗体被称为“特异性结合”该表位。术语“特异性”在本文中用于定量某些抗体结合某些表位的相对亲和力。例如,抗体“A”可以被认为具有的给定表位的特异性高于抗体“B”,或抗体“A”可以被认为结合表位“C”的特异性高于其具有的对于相关表位“D”的特异性。

[0075] 所谓“优先地结合”意指抗体特异性结合表位比其结合相关、相似、同源或类似表位更容易。因此，“优先地结合”给定表位的抗体更可能结合该表位，而不结合相关表位，即使此类抗体可以与相关表位交叉反应。

[0076] 作为非限制性实例，如果抗体结合第一表位的解离常数 (K_D) 小于该抗体结合第二表位的 K_D ，则该抗体可以被视为优先地结合所述第一表位。在另一个非限制性实例中，如果抗体结合第一表位的亲和力比该抗体结合第二表位的 K_D 小至少一个数量级，则该抗体可以被视为优先地结合第一抗原。在另一个非限制性实例中，如果抗体结合第一表位的亲和力比该抗体结合第二表位的 K_D 小至少两个数量级，则该抗体可以被视为优先地结合第一表位。

[0077] 在另一个非限制性实例中，如果抗体结合第一表位的解离速率 ($k(\text{off})$) 小于该抗体结合第二表位的 $k(\text{off})$ ，则该抗体可以被视为优先地结合第一表位。在另一个非限制性实例中，如果抗体结合第一表位的亲和力比该抗体结合第二表位的 $k(\text{off})$ 小至少一个数量级，则该抗体可以被视为优先地结合第一表位。在另一个非限制性实例中，如果抗体结合第一表位的亲和力比该抗体结合第二表位的 $k(\text{off})$ 小至少两个数量级，则该抗体可以被视为优先地结合第一表位。本文公开的抗体或抗原结合片段、变体或衍生物可以被认为结合本文公开的靶多肽 (例如，TCR，如人、鼠或人和鼠二者 TCR) 或其片段或变体的解离速率 ($k(\text{off})$) 小于或等于 $5 \times 10^{-2} \text{秒}^{-1}$ 、 10^{-2}秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-3} \text{秒}^{-1}$ 或 10^{-3}秒^{-1} 。更优选地，本发明的抗体可以被认为结合本文公开的靶多肽 (例如，TCR，如人、鼠或人和鼠二者 TCR) 或其片段或变体的解离速率 ($k(\text{off})$) 小于或等于 $5 \times 10^{-4} \text{秒}^{-1}$ 、 10^{-4}秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-5} \text{秒}^{-1}$ 或 10^{-5}秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-6} \text{秒}^{-1}$ 、 10^{-6}秒^{-1} 、 $5 \times 10^{-7} \text{秒}^{-1}$ 或 10^{-7}秒^{-1} 。

[0078] 本发明的抗 TCR 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以具有“多特异性”、双特异性、三特异性或更大的多特异性，意味着它同时识别和结合一个或多个不同抗原 (如，蛋白质) 上存在的两个或更多个不同表位。因此，抗 TCR 抗体是“单特异性”的还是“多特异性”的，如“双特异性”的是指与结合多肽发生反应的不同表位的数量。多特异性抗体可以对本文所述的靶多肽的不同表位具有特异性，或可以对靶多肽以及对异源性表位，诸如异源性多肽或固体支持物材料具有特异性。

[0079] 如本文所用，术语“价”是指结合多肽或 TCR 结合分子，如抗体或其抗原结合片段中存在的潜在结合域，如抗原结合域的数量。每个结合域特异性结合一个表位。当结合多肽或 TCR 结合分子包含超过一个结合域时，对于具有两个结合域的抗体，每个结合域可以特异性结合相同的表位，称为“二价单特异性”，或对于具有两个结合域的抗体，特异性结合不同的表位，称为“二价双特异性”。抗体或其抗原结合片段也可以具有双特异性且每个特异性二价 (称为“双特异性四价抗体”)。在另一个实施方案中，可以制备四价微抗体或结构域缺失抗体。

[0080] 双特异性二价抗体及其制备方法在例如美国专利 No. 5,731,168、5,807,706、5,821,333；和美国专利申请公开 No. 2003/020734 和 2002/0155537 中有所描述，所有这些专利的公开内容以引用的方式并入本文。双特异性四价抗体及其制备方法在例如 WO 02/096948 和 WO 00/14788 中有所描述，这两个专利的公开内容以引用的方式并入本文。一般参见 PCT 公开 WO 93/17715；WO 92/08802；WO 91/00360；WO 92/05793；Tutt 等人，J. Immunol. 147: 60-69 (1991)；美国专利 No. 4,471,893、4,714,681、4,925,618、5,573,920、5,601,819；

Kostelny等人, J. Immunol. 148:1547-1553 (1992)。

[0081] 如上文所述,许多免疫球蛋白种类的恒定区的亚基结构和三维构型是熟知的。如本文所用,术语“VH结构域”包括免疫球蛋白重链的氨基末端可变域,术语“CH1域”包括免疫球蛋白重链的第一(最远氨基末端)恒定区结构域。CH1域邻近VH结构域,并且是免疫球蛋白重链分子的铰链区的氨基末端。

[0082] 如本文所用,术语“CH2域”包括例如使用常规编号方案从抗体的约残基244延伸至残基360(残基244至360, Kabat编号系统;以及残基231-340, EU编号系统;参见Kabat E A等人)的重链分子的部分。CH2域是独特的,因为它不与另一个域紧密配对。相反,两个N-连接支链碳水化合物链插入完整天然IgG分子的两个CH2域之间。还充分证明了,CH3域从CH2域延伸至IgG分子的C-末端,并且包含大约108个残基。

[0083] 如本文所用,术语“铰链区”包括将CH1域连接至CH2域的重链分子的部分。该铰链区包含大约25个残基并且是柔性的,因此允许两个N-末端抗原结合区独立地移动。铰链区可以细分为三个不同的域:上、中和下铰链域(Roux等人, J. Immunol. 161:4083 (1998))。

[0084] 如本文所用,术语“二硫键”包括在两个硫原子之间形成的共价键。氨基酸半胱氨酸包含巯基,其可以与第二巯基形成二硫键或桥。在大部分天然存在的IgG分子中,CH1和CL区通过二硫键连接,并且两个重链在使用kabat编号系统对应于239和242的位置(位置226或229, EU编号系统)通过两个二硫键连接。

[0085] 如本文所用,术语“嵌合抗体”被认为意指其中免疫反应性区或位点得自或衍生自第一物类并且恒定区(根据本发明,其可以是完整的、部分的或修饰的)得自第二物类的任何抗体。在实施方案中,靶结合区或位点将来自非人来源小鼠或灵长类,并且恒定区是人的。

[0086] 如本文所用,术语“工程化抗体”是指其中重链或轻链或它们二者中的可变域通过具有已知特异性的抗体的一个或多个CDR的至少部分替换,以及如果必要通过部分框架区替换和序列改变而改变的抗体。虽然CDR可以衍生自与衍生框架区的抗体相同种类或甚至亚类的抗体,但是可以设想CDR将衍生自不同种类的抗体,优选地来自不同物类的抗体。其中将来自具有已知特异性的非人抗体的一个或多个“供体”CDR移植到人重链或轻链框架区的工程化抗体在本文中称为“人源化抗体”。不一定需要使用来自供体可变域的完整CDR替换所有CDR,以将一个可变域的抗原结合能力转移至另一个。相反,只需要转移维持靶结合位点活性必需的那些残基。

[0087] 还认识到,人源化抗体的重链或轻链或它们二者中的可变域内的框架区可以仅包含人来源的残基,在这种情况下,人源化抗体的这些框架区称为“完全人框架区”。或者,供体可变域的框架区的一个或多个残基可以在人源化抗体的重链或轻链或它们二者中的可变域的人框架区的对应位置内工程化,如果必要维持与TCR抗原的适当结合或增强结合。因此,以这种方式工程化的人框架区将包含人和供体框架残基的混合物,并且在本文中称为“部分人框架区”。

[0088] 例如,抗TCR抗体的人源化可以基本上根据Winter和同事的方法(Jones等人, Nature 321:522-525 (1986); Riechmann等人, Nature 332:323-327 (1988); Verhoeyen等人, Science 239:1534-1536 (1988))通过用啮齿类动物或突变啮齿类动物CDR或CDR序列代替人抗TCR抗体的对应序列来进行。还可参见美国专利No. 5,225,539、5,585,089、5,693,761、

5,693,762、5,859,205;以引用的方式并入本文。所得的人源化抗TCR抗体将包含在人源化抗体的重链和/或轻链的可变域的完全人框架区内的至少一个啮齿类动物或突变啮齿类动物CDR。在一些情况下,人源化抗TCR抗体的一个或多个可变域的框架区内的残基被对应的非人(例如,啮齿类动物)残基置换(参见例如,美国专利No.5,585,089、5,693,761、5,693,762和6,180,370),在这种情况下,所得的人源化抗TCR抗体将包含重链和/或轻链的可变域内的部分人框架区。

[0089] 此外,人源化抗体可以包含受体抗体或供体抗体中不存在的残基。进行这些修饰以进一步改进抗体性能(如,获得所需的亲和力)。一般来讲,人源化抗体将包含基本上全部至少一个、通常两个可变域,其中全部或基本上全部CDR对应于非人免疫球蛋白的CDR,并且全部或基本上全部框架区为人免疫球蛋白序列的框架区。人源化抗体任选地还将包含免疫球蛋白恒定区(Fc),通常人免疫球蛋白恒定区的至少一部分。更多详情,参见Jones等人,Nature 331:522-525(1986);Riechmann等人,Nature 332:323-329(1988);和Presta,Curr.Op.Strict.Biol.2:593-596(1992);以引用的方式并入本文。因此,此类“人源化”抗体可以包括其中基本上少于完整的人可变域被来自非人物类的对应序列置换的抗体。实际上,人源化抗体通常为其中一些CDR残基以及可能地一些框架残基被来自啮齿类动物抗体中的类似位点的残基置换的人抗体。参见例如美国专利No.5,225,539、5,585,089、5,693,761、5,693,762、5,859,205。还可参见美国专利No.6,180,370和国际公开No.WO 01/27160,其中公开了对预定抗原具有改善的亲和力的人源化抗体和产生人源化抗体的技术。

[0090] 如本文所用,术语“连接”、“融合的”或“融合”可互换使用。这些术语是指通过包括化学缀合或重组手段的任何手段将两个或更多个元件或组件连接在一起。“框内融合”是指两个或更多个多核苷酸开放阅读框(ORF)以维持原始ORF的正确翻译阅读框的方式连接,从而形成连续、更长的ORF。因此,重组融合蛋白是含有对应于原始ORF编码的多肽的两个或更多个区段(该区段通常在自然界中不会如此连接)的单个蛋白质。虽然如此产生的阅读框在整个融合区段中是连续的,但是区段可以通过例如框内接头序列在物理上或在空间上分隔。例如,编码免疫球蛋白可变区的CDR的多核苷酸可以框内融合,但是被编码至少一个免疫球蛋白框架区或另外的CDR区的多核苷酸分隔,只要“融合”CDR作为连续多肽的一部分共翻译即可。

[0091] 在多肽的语境中,“线性序列”或“序列”是多肽中从氨基至羧基末端方向的氨基酸顺序,其中序列中彼此相邻的残基在多肽的一级结构中是邻接的。

[0092] 如本文所用,术语“表达”是指其中基因产生生物化学物质,例如多肽的过程。该过程包括基因功能性存在于细胞内的任何表现,包括但不限于基因敲低以及瞬时表达和稳定表达二者。它包括但不限于基因转录为信使RNA(mRNA)以及此类mRNA翻译为多肽。如果最终所需产物是生物化学物质,则表达包括该生物化学物质和任何前体的产生。基因的表达产生“基因产物”。如本文所用,基因产物可以是核酸,如基因转录产生的信使RNA,或从转录物翻译的多肽。本文所述的基因产物还包括具有转录后修饰,如聚腺苷酸化的核酸,或具有翻译后修饰,如甲基化、糖基化、添加脂质、与其他蛋白质亚基缔合、蛋白酶切割等的多肽。

[0093] 如本文所用,术语“治疗”或“防治”是指治疗性处理和预防性或防治性措施,其中目的是预防或减缓(减轻)不期望的生理变化或障碍,诸如多发性硬化、关节炎或癌症的进展。有益的或期望的临床结果包括但不限于可检测的或不可检测的症状的减轻、疾病程度

的减少、疾病的稳定(即,不恶化)状态、疾病进展的推迟或减缓、疾病状态的改善或缓和以及缓解(部分或完全)。“治疗”也可意指与未接受治疗的预期存活期相比更长的存活期。需要治疗的人包括已患有病症或障碍的人以及容易患上病症或障碍的人或其中病症或障碍将得到预防的人。

[0094] 所谓“受试者”或“个体”或“动物”或“患者”或“哺乳动物”意指期望接受诊断、预后或治疗的任何受试者,特别是哺乳动物受试者。哺乳动物受试者包括人、家畜、农场动物和动物园动物、竞技动物或宠物诸如狗、猫、豚鼠、兔、大鼠、小鼠、马、牛、奶牛等等。

[0095] 如本文所用,诸如“将受益于抗TCR抗体的施用的受试者”和“需要治疗的动物”和“有需要的受试者”的短语包括将受益于抗TCR抗体的施用的受试者,诸如哺乳动物受试者,所述抗TCR抗体用于例如体内刺激某些T细胞群,以便进行数值扩增,检测抗TCR多肽(如,用于诊断程序)和/或使用抗TCR抗体进行疾病的治疗,即缓和或预防。如本文更详细地描述,抗TCR抗体可以未缀合形式使用,或可以缀合至例如药物、前药或同位素。

[0096] 从以下详细描述本发明的其他目的、特征和优点将显而易见。然而,应当理解,详细描述和具体实例,虽然指出了本发明的某些实施方案,但仅以说明的方式给出,因为对于本领域技术人员而言从这种详细描述中,本发明的精神和范围内的许多变化和修改将变得显而易见。

[0097] II. 介绍

[0098] 目前正在研究将利用T细胞来靶向特定抗原(如,肿瘤相关抗原)的治疗法用于治疗从癌症到传染病的许多疾病。然而,这些试剂的复杂性需要专用工具来纯化、增殖和/或活化T细胞。本专利申请的实施方案提供特异性结合T细胞,特别是通过以中等亲和力结合TCR的抗体或其抗原结合片段,例如scFv,并且可用于选择性纯化、增殖和/或活化T细胞,而不依赖于T细胞识别的表位。例如,在一个方面,提供特异性结合TCR α 链并且接合识别许多T细胞表位的T细胞的抗体。经修饰的79A-15(“S15”)、79A-11(“S11”)、79A-13(“S13”)、79A-23(“S23”)单克隆抗体,例如在特定构象内特异性结合TCR α ,以便接合 $\alpha\beta$ -TCR。该构象特异性结合用于分析、分离或增殖和/或活化T细胞。包含实施方案的细胞表面抗TCR抗体的aAPC,诸如K562细胞可用于活化,从而增殖原代T细胞群(参见例如图7)。在本发明的一些方面,K562细胞是HLA阳性的,在其他方面,K562细胞是HLA阴性的。此外,通过此类表达aAPC的抗TCR抗体扩增的T细胞群显示出许多广泛的涵盖多克隆T细胞谱系的克隆型(图8-10)。另外,通过TCR指导的scFv的对T细胞的最佳刺激比目前流行的类似的其他T细胞刺激方法更好地保存供体T细胞谱系。因此,本文详述的方法提供了广义T细胞扩增的新方法。

[0099] III. 靶多肽

[0100] 在实施方案中,本发明的结合分子特异性结合含有 α 和 β 链的T细胞受体($\alpha\beta$ -TCR)。在实施方案中,本发明的结合分子特异性结合位于T细胞受体 α -链的Va24-J18接合点区(GSTLGR (SEQ ID NO:1))的TCR α 链的非变异区。在实施方案中,T细胞可以经由 $\alpha\beta$ TCR⁺T细胞中的TCR α 链特异性结合分子通过 $\alpha\beta$ -TCR交联来扩增和/或活化。在实施方案中,本发明的结合分子因此特异性结合含有非变异GSTLGR (SEQ ID NO:1)的TCR,而与T细胞克隆型无关。

[0101] IV. 抗TCR抗体

[0102] 在某些实施方案中,抗体或其片段结合TCR多肽并且离体刺激T细胞生长。在某些方面,本文提供的抗体基本上独立于TCR识别的表位而结合TCR,并且可用于刺激具有许多

克隆型的T细胞的扩增。抗体可选自嵌合抗体、亲和力成熟抗体、多克隆抗体、单克隆抗体、人源化抗体、人抗体或抗原结合抗体片段或天然或合成配体。优选地,抗TCR抗体是单克隆抗体或人源化抗体。

[0103] 适用于本发明实施方案的抗体片段的实例包括但不限于:(i) Fab片段,其由V_L、V_H、C_L和C_{H1}域组成;(ii) “Fd”片段,其由V_H和C_{H1}域组成;(iii) “Fv”片段,其由单个抗体的V_L和V_H结构域组成;(iv) “dAb”片段,其由V_H结构域组成;(v) 分离CDR区;(vi) F(ab')₂片段,含有两个连接的Fab片段的二价片段;(vii) 单链Fv分子(“scFv”),其中V_H结构域和V_L结构域通过肽接头连接,该肽接头允许两个域缔合形成结合域;(viii) 双特异性单链Fv二聚体(参见美国专利No.5,091,513);和(ix) 通过基因融合构建的双体、多价或多特异性片段(美国专利申请公开20050214860)。Fv、scFv或双体分子可以通过掺入连接V_H和V_L结构域的二硫桥来稳定。还可以制备含有连接至CH3域的scFv的微抗体(Hu等人,1996)。

[0104] 在实施方案中还设想了抗体样结合肽模拟物。Liu等人(2003)描述了“抗体样结合肽模拟物”(ABiP),它是充当稀释抗体的肽,并且具有某些优点,如长血清半衰期以及不太繁琐的合成方法。

[0105] 在一个实施方案中,抗体是嵌合抗体,例如包含来自移植到异源性非人、人或人源化序列(例如,框架和/或恒定结构域序列)的非人供体的抗原结合序列的抗体。已经开发了用人来源的类似域替换单克隆抗体的轻链和重链恒定结构域的方法,使得外源性抗体的可变区保持完整。或者,在针对人免疫球蛋白基因转基因的小鼠中产生“完全人”单克隆抗体。还开发了通过重组构建具有啮齿类动物(例如,小鼠)和人氨基酸序列的抗体可变结构域来将单克隆抗体的可变域转化为更多人形式的方法。在“人源化”单克隆抗体中,仅高变的CDR衍生自小鼠单克隆抗体,并且框架和恒定区衍生自人氨基酸序列(参见美国专利No.5,091,513和6,881,557)。据认为,用可见于人抗体的对应位置的氨基酸序列替换具有啮齿类动物特征的抗体中的氨基酸序列将降低治疗用途期间不良免疫反应的可能性。产生抗体的杂交瘤或其他细胞也可以经受遗传突变或其他变化,这可以或不可以改变由杂交瘤产生的抗体的结合特异性。

[0106] 置换变体通常包含在蛋白质内的一个或多个位点处的一个氨基酸与另一个氨基酸的交换,并且可以被设计为调节多肽的一个或多个性质,伴随或不伴随其他功能或性质的丧失。置换可以是保守的,也就是说,用类似形状和电荷中的一者替换一个氨基酸。保守置换在本领域中是熟知的,并且包括例如以下变化:丙氨酸置换为丝氨酸;精氨酸置换为赖氨酸;天冬酰胺置换为谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸置换为谷氨酸;半胱氨酸置换为丝氨酸;谷氨酰胺置换为天冬酰胺;谷氨酸置换为天冬氨酸;甘氨酸置换为脯氨酸;组氨酸置换为天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸置换为亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸置换为缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸置换为精氨酸;甲硫氨酸置换为亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸置换为酪氨酸,亮氨酸或甲硫氨酸;丝氨酸置换为苏氨酸;苏氨酸置换为丝氨酸;色氨酸置换为酪氨酸;酪氨酸置换为色氨酸或苯丙氨酸;以及缬氨酸置换为异亮氨酸或亮氨酸。或者,置换可以是非保守的,使得多肽的功能或活性受到影响。非保守变化通常涉及用化学上不相似的残基置换残基,诸如用极性或带电荷的氨基酸置换非极性或不带电荷的氨基酸,反之亦然。

[0107] 蛋白质可以是体外重组或合成的。或者,可以从细菌中分离非重组或重组蛋白质。还设想了,可以在组合物和方法中实施含有此类变体的细菌。因此,不需要分离蛋白质。

[0108] 抗体或优选地抗体的免疫部分可以与其他蛋白质化学缀合或作为融合蛋白而表达。出于本说明书和所附权利要求书的目的,所有此类融合蛋白都包括在抗体或抗体的免疫部分的定义中。

[0109] 在实施方案中,本发明提供特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位的分离抗体或其抗原结合片段。

[0110] 在实施方案中,特异性结合TCR α 多肽的抗体或其抗原结合片段包含 (a) HCDR1,其与SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%或95%同一性; (b) HCDR2,其与SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%或95%同一性; (c) HCDR3,其与CDYW (SEQ ID NO:21)、CAYW (SEQ ID NO:23)或CAYL (SEQ ID NO:22)具有同一性; (d) LCDR1,其与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:9具有至少80%、85%、90%或95%同一性; (e) LCDR2,其与SEQ ID NO:5具有至少80%、85%、90%或95%同一性;以及 (f) LCDR3,其与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:10具有至少80%、85%、90%或95%同一性。在实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含 (a) HCDR1,其与SEQ ID NO:2具有同一性; (b) HCDR2,其与SEQ ID NO:3具有同一性; (c) HCDR3,其与CDYW (SEQ ID NO:21)、CAYW (SEQ ID NO:23)或CAYL (SEQ ID NO:22)具有同一性; (d) LCDR1,其与SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:9具有同一性; (e) LCDR2,其与SEQ ID NO:5具有同一性;以及 (f) LCDR3,其与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:10具有同一性。

[0111] 本发明还提供特异性结合TCR α 多肽的抗体或其抗原结合片段,其包含 (a) HCDR1,其与79A-15的V_H CDR1SEQ ID NO:2具有至少80%、85%、90%或95%同一性; (b) HCDR2,其与79A-15的V_H CDR2SEQ ID NO:3具有至少80%、85%、90%或95%同一性; (c) HCDR3,其与79A-15的V_H CDR3CAYL (SEQ ID NO:22)具有至少80%、85%、90%或95%同一性; (d) LCDR1,其与79A-15的V_L CDR1SEQ ID NO:9具有至少80%、85%、90%或95%同一性; (e) LCDR2,其与79A-15的V_L CDR2SEQ ID NO:5具有至少80%、85%、90%或95%同一性;以及 (f) LCDR3,其与79A-15的V_L CDR3SEQ ID NO:10具有至少80%、85%、90%或95%同一性。

[0112] 本发明另外提供特异性结合TCR α 多肽的分离抗体或抗原结合片段,其包含与79A-15的V_H结构域 (SEQ ID NO:11)具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_H结构域,和与79A-15的V_L结构域 (SEQ ID NO:12)具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_L结构域。在实施方案中,分离抗体或抗原结合片段包含与79A-15的V_H结构域 (SEQ ID NO:11)具有在90%和99%之间同一性的V_H结构域,和与79A-15的V_L结构域 (SEQ ID NO:12)具有在90%和99%之间同一性的V_L结构域。在另外的实施方案中,分离抗体或其抗原结合片段包含与79A15的V_H结构域 (SEQ ID NO:11)具有同一性的V_H结构域,和与79A-15的V_L结构域 (SEQ ID NO:12)具有同一性的V_L结构域。

[0113] 本发明还提供特异性结合TCR α 多肽的分离抗体或其抗原结合片段,其包含 (a) HCDR1,其与79A-13的V_H CDR1KASGYTFTDYMNWV (SEQ ID NO:2)具有至少80%、85%、90%或95%同一性; (b) HCDR2,其与79A-13的V_H CDR2WIGEINPNN (SEQ ID NO:3)具有至少80%、85%、90%或95%同一性; (c) HCDR3,其与79A-13的V_H CDR3CAYL (SEQ ID NO:22)具有至少80%、85%、90%或95%同一性; (d) LCDR1,其与79A-13的V_L CDR1NTYLEWY (SEQ ID NO:4)具有至少80%、85%、90%或95%同一性; (e) LCDR2,其与79A-13的V_L CDR2KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5)具有至少80%、85%、90%或95%同一性;以及 (f) LCDR3,其与79A-13的V_L CDR3MQGSHVPW (SEQ ID NO:10)具有至少80%、85%、90%或95%同一性。在另外的实施方案

中,本发明提供分离抗体或其抗原结合片段,其包含(a)HCDR1,其与KASGYTFTDYIMNWV (SEQ ID NO:2)具有同一性;(b)HCDR2,其与WIGEINPNN (SEQ ID NO:3)具有同一性;(c)HCDR3,其与CAYL (SEQ ID NO:22)具有同一性;(d)LCDR1,其与NTYLEWY (SEQ ID NO:4)具有同一性;(e)LCDR2,其与KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5)具有同一性;以及(f)LCDR3,其与MQGSHVPW (SEQ ID NO:10)具有同一性。

[0114] 在另外的实施方案中,本发明提供特异性结合TCR α 多肽的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A-13的V_H结构域 (SEQ ID NO:11)具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_H结构域,和与79A-13的V_L结构域 (SEQ ID NO:14)具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_L结构域。在实施方案中,分离抗体或抗原结合片段包含与79A-13的V_H结构域 (SEQ ID NO:11)具有在90%和99%之间同一性的V_H结构域,和与79A-13的V_L结构域 (SEQ ID NO:14)具有在90%和99%之间同一性的V_L结构域。在另外的实施方案中,分离抗体或抗原结合片段包含与79A-13的V_H结构域 (SEQ ID NO:11)具有同一性的V_H结构域,和与79A-13的V_L结构域 (SEQ ID NO:14)具有同一性的V_L结构域。

[0115] 本发明还提供特异性结合TCR α 多肽的抗体或其抗原结合片段,其包含(a)HCDR1,其与79A-11的V_H CDR1KASGYTFTDYIMNWV (SEQ ID NO:2)具有至少80%、85%、90%或95%同一性;(b)HCDR2,其与79A-11的V_H CDR2WIGEINPNN (SEQ ID NO:3)具有至少80%、85%、90%或95%同一性;(c)HCDR3,其与79A-11的V_H CDR3CAYW (SEQ ID NO:23)具有至少80%、85%、90%或95%同一性;(d)LCDR1,其与79A-11的V_L CDR1NTYLEWF (SEQ ID NO:9)具有至少80%、85%、90%或95%同一性;(e)LCDR2,其与79A-11的V_L CDR2KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5)具有至少80%、85%、90%或95%同一性;以及(f)LCDR3,其与79A-11的V_L CDR3MQGSHVPW (SEQ ID NO:10)具有至少80%、85%、90%或95%同一性。在实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含(a)HCDR1,其与KASGYTFTDYIMNWV (SEQ ID NO:2)具有同一性;(b)HCDR2,其与WIGEINPNN (SEQ ID NO:3)具有同一性;(c)HCDR3,其与CAYW (SEQ ID NO:23)具有同一性;(d)LCDR1,其与NTYLEWF (SEQ ID NO:9)具有同一性;(e)LCDR2,其与KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5)具有同一性;以及(f)LCDR3,其与MQGSHVPW (SEQ ID NO:10)具有同一性。

[0116] 在实施方案中,本发明提供特异性结合TCR α 多肽的抗体或其抗原结合片段,其包含与79A-11的V_H结构域 (SEQ ID NO:13)具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_H结构域,和与79A-11的V_L结构域 (SEQ ID NO:12)具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_L结构域。在实施方案中,分离抗体或其抗原结合片段包含与79A-11的V_H结构域 (SEQ ID NO:13)具有在90%和99%之间同一性的V_H结构域,或与79A-11的V_L结构域 (SEQ ID NO:12)具有在90%和99%之间同一性的V_L结构域。在另外的实施方案中,根据权利要求16所述的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A11的V_H结构域 (SEQ ID NO:13)具有同一性的V_H结构域,和与79A11的V_L结构域 (SEQ ID NO:12)具有同一性的V_L结构域。

[0117] 本发明还提供特异性结合TCR α 多肽的分离抗体或其抗原结合片段,其包含(a)HCDR1,其与79A的V_H CDR1KASGYTFTDYIMNWV (SEQ ID NO:2)具有至少80%、85%、90%或95%同一性;(b)HCDR2,其与79A的V_H CDR2WIGEINPNN (SEQ ID NO:3)具有至少80%、85%、90%或95%同一性;(c)HCDR3,其与79A的V_H CDR3CDYW (SEQ ID NO:21)具有至少80%、85%、90%或95%同一性;(d)LCDR1,其与79A的V_L CDR1NTYLEWY (SEQ ID NO:4)具有至少

80%、85%、90%或95%同一性；(e) LCDR2,其与79A的V_L CDR2KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；以及(f) LCDR3,其与79A的V_L CDR3FQGSHVPW (SEQ ID NO:6) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性。在实施方案中,分离抗体或抗原结合片段包含(a) HCDR1,其与KASGYTFTDYIMNWV (SEQ ID NO:2) 具有同一性；(b) HCDR2,其与WIGGINPNN (SEQ ID NO:3) 具有同一性；(c) HCDR3,其与CDYW (SEQ ID NO:21) 具有同一性；(d) LCDR1,其与NTYLEWY (SEQ ID NO:4) 具有同一性；(e) LCDR2,其与KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5) 具有同一性；以及(f) LCDR3,其与FQGSHVPW (SEQ ID NO:6) 具有同一性。

[0118] 本发明还提供特异性结合TCR α 多肽的分离抗体或其抗原结合片段,其包含与79A的V_H结构域 (SEQ ID NO:7) 具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_H结构域,和与79A的V_L结构域 (SEQ ID NO:8) 具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_L结构域。在实施方案中,分离抗体或抗原结合片段包含与79A的V_H结构域 (SEQ ID NO:7) 具有在90%和99%之间同一性的V_H结构域,或与79A的V_L结构域 (SEQ ID NO:8) 具有在90%和99%之间同一性的V_L结构域。在实施方案中,分离抗体或抗原结合片段包含与79A的V_H结构域 (SEQ ID NO:7) 具有同一性的V_H结构域,和与79A的V_L结构域 (SEQ ID NO:8) 具有同一性的V_L结构域。

[0119] 在实施方案中,本发明提供特异性结合TCR α 多肽的分离抗体或其抗原结合片段,其包含(a) HCDR1,其与KASGYTFTGYIMNWV (SEQ ID NO:15) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(b) HCDR2,其与WIGGINPNN (SEQ ID NO:16) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(c) HCDR3,其与CRYW (SEQ ID NO:17) 具有同一性；(d) LCDR1,其与QSIVHGGGNTY (SEQ ID NO:18) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；(e) LCDR2,其与KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性；以及(f) LCDR3,其与FQGSHVPW (SEQ ID NO:6) 具有至少80%、85%、90%或95%同一性。在实施方案中,分离抗体或其抗原结合片段包含(a) HCDR1,其与KASGYTFTGYIMNWV (SEQ ID NO:15) 具有同一性；(b) HCDR2,其与WIGGINPNN (SEQ ID NO:16) 具有同一性；(c) HCDR3,其与CRYW (SEQ ID NO:17) 具有同一性；(d) LCDR1,其与QSIVHGGGNTY (SEQ ID NO:18) 具有同一性；(e) LCDR2,其与KLLIYKVSNRFS (SEQ ID NO:5) 具有同一性；以及(f) LCDR3,其与FQGSHVPW (SEQ ID NO:6) 具有同一性。

[0120] 本发明还提供抗TCR抗体或其抗原结合片段,其包含与79A-23的V_H结构域 (SEQ ID NO:19) 具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_H结构域,和与79A-23的V_L结构域 (SEQ ID NO:20) 具有至少约80%、85%、90%或95%同一性的V_L结构域。在实施方案中,分离抗体或其抗原结合片段包含与79A-23的V_H结构域 (SEQ ID NO:19) 具有在90%和99%之间同一性的V_H结构域,和与79A-23的V_L结构域 (SEQ ID NO:20) 具有在90和99%之间同一性的V_L结构域。在另外的实施方案中,分离抗体或其抗原结合片段包含与79A-23的V_H结构域 (SEQ ID NO:19) 具有同一性的V_H结构域,和与79A-23的V_L结构域 (SEQ ID NO:20) 具有同一性的V_L结构域。

[0121] 在实施方案中,本文提供的抗TCR抗体或其抗原结合片段是多特异性的,如双特异性的。在实施方案中,本文提供的特异性结合TCR α 多肽的抗体和抗原结合片段是Fab片段、Fv片段和/或是单链。在实施方案中,本文提供的抗TCR抗体和抗原结合片段是多价的,并且包含至少两条重链和至少两条轻链。在实施方案中,本文提供的特异性结合TCR α 多肽的抗体和抗原结合片段包含选自人 κ 恒定区和人 λ 恒定区的轻链恒定区。

[0122] 在实施方案中,本文提供的抗TCR抗体和抗原结合片段包含重链恒定区或其片段。

在实施方案中,本文提供的特异性结合TCR α 多肽的抗体和抗原结合片段包含人IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgE或IgD的重链恒定区或其片段。

[0123] 在实施方案中,抗体或其抗原结合片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO: 1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位,其亲和力特征在于解离常数(K_D)不大于 $5 \times 10^{-2}M$ 、 $10^{-2}M$ 、 $5 \times 10^{-3}M$ 、 $10^{-3}M$ 、 $5 \times 10^{-4}M$ 、 $10^{-4}M$ 、 $5 \times 10^{-5}M$ 、 $10^{-5}M$ 、 $5 \times 10^{-6}M$ 、 $10^{-6}M$ 、 $5 \times 10^{-7}M$ 、 $10^{-7}M$ 、 $5 \times 10^{-8}M$ 、 $10^{-8}M$ 、 $5 \times 10^{-9}M$ 、 $10^{-9}M$ 、 $5 \times 10^{-10}M$ 、 $10^{-10}M$ 、 $5 \times 10^{-11}M$ 、 $10^{-11}M$ 、 $5 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $8.4 \times 10^{-12}M$ 、 $10^{-12}M$ 、 $5 \times 10^{-13}M$ 、 $10^{-13}M$ 、 $5 \times 10^{-14}M$ 、 $10^{-14}M$ 、 $5 \times 10^{-15}M$ 或 $10^{-15}M$ 。在实施方案中, K_D 为约 $5 \times 10^{-9}M$ 至约 $6 \times 10^{-9}M$ 。在另外的实施方案中, K_D 为约 $1 \times 10^{-9}M$ 至约 $2 \times 10^{-9}M$ 。

[0124] 在实施方案中,本文提供的特异性结合TCR α 多肽的抗体和抗原结合片段是人源化的、灵长类源化的或嵌合的。在实施方案中,本文提供的特异性结合TCR α 多肽的抗体和抗原结合片段是人源化的。

[0125] 在实施方案中,本发明的抗TCR抗体或其抗原结合片段包含被接头分隔的VH和VL结构域。在实施方案中,本发明的抗体或其抗原结合片段,还包含跨膜域。在实施方案中,包含被接头分隔的VH和VL结构域的抗体或其抗原结合片段包含与选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:19的多肽具有至少90%同一性的VH多肽,和与选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:20的多肽具有至少90%同一性的多肽VL。

[0126] 在实施方案中,本文公开的抗TCR抗体或片段含有与SEQ ID NO:11具有至少90%同一性的VH多肽,和与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的VL多肽,其中VH和VL被接头分隔。

[0127] 在实施方案中,本文公开的抗TCR抗体或片段含有与SEQ ID NO:13具有至少90%同一性的VH多肽,和与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的VL多肽,其中VH和VL被接头分隔。

[0128] 本发明还提供含有与SEQ ID NO:11具有至少90%同一性的VH多肽和与SEQ ID NO:14具有至少90%同一性的VL多肽的抗TCR抗体或片段,其中VH和VL被接头分隔。

[0129] 在实施方案中,本文公开的抗TCR抗体或片段含有与SEQ ID NO:19具有至少90%同一性的VH多肽,和与SEQ ID NO:20具有至少90%同一性的VL多肽,其中VH和VL被接头分隔。

[0130] 因此,在实施方案中,本文公开的抗TCR抗体或抗原结合片段是单链Fv片段(scFv),例如含有VH和VL结构域的异源二聚体,所述VH和VL结构域通过接头连接,形成单条多肽。

[0131] 在实施方案中,接头是长度在10-30个氨基酸之间、长度在15-25个氨基酸之间、长度在15和20个氨基酸之间的多肽。在实施方案中,接头的长度为15、16、17、18、19、20、21、22、23或25个氨基酸。合适的scFv接头是本领域技术人员已知的。例如,GGGGS (G4S或Gly4Ser)多聚体是合适的接头。示例性G4S多聚体包括15聚体(G4S)₃和20聚体(G4S)₄。另一个示例性接头是18聚体GGSSRSSSSGGGSGGGG。还设想了将具有添加官能团的示例性序列作为接头序列,所述官能团诸如表位标签或含有Cre-Lox重组位点的编码序列或改善scFv性质的序列。

[0132] V. 编码抗TCR抗体的多核苷酸

[0133] 本发明还包括本发明别处所述的多核苷酸片段。另外,本发明还设想了如本文所

述编码融合多肽、Fab片段和其他衍生物的多核苷酸。

[0134] 多核苷酸通过本领域已知的方法产生或制造。例如,如果抗体的核苷酸序列是已知的,编码抗体的多核苷酸可以从化学合成的寡核苷酸组装(例如,如Kutmeier等人,Bio Techniques 17:242(1994)所述),简而言之,其涉及含有编码抗体的序列部分的重叠寡核苷酸的合成,这些寡核苷酸的退火和连接,然后通过PCR扩增连接的寡核苷酸。

[0135] 或者,本发明的编码抗TCR抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的多核苷酸,可以从合适来源的核酸产生。如果含有编码特定抗体的核酸的克隆不可用,但抗体分子的序列是已知的,则编码抗体的核酸可以化学合成或通过使用合成引物进行PCR扩增(该引物可杂交至序列的3'和5'末端)或通过使用对特定基因序列具有特异性的寡核苷酸探针克隆(以便从编码抗体或其他抗TCR抗体的cDNA文库鉴定例如cDNA克隆)从合适的来源(例如,抗体cDNA文库,或从或核酸产生的cDNA文库,优选地从表达抗体或其他抗TCR抗体的任何组织或细胞,诸如被选择用于表达抗体的杂交瘤细胞分离的多聚A+RNA)获得。然后可以使用本领域熟知的任何方法将通过PCR产生的扩增核酸克隆至可复制克隆载体。

[0136] 一旦确定抗TCR抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的核苷酸序列和对应的氨基酸序列,即可使用本领域熟知的核苷酸序列操作方法,例如重组DNA技术、定点诱变、PCR等操作其核苷酸序列(参见例如,Sambrook等人(1990)Molecular Cloning,A Laboratory Manual(第2版;Cold Spring Harbor Laboratory,Cold Spring Harbor,N.Y.)和Ausubel等人编(1998)Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Sons,NY)描述的技术,它们全文均以引用的方式并入本文),以产生具有不同氨基酸序列的抗体,例如产生氨基酸置换、缺失和/或插入。

[0137] 编码抗TCR结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的多核苷酸,可以由任何多核糖核苷酸或多脱氧核糖核苷酸组成,其可以是未修饰的RNA或DNA或修饰的RNA或DNA。例如,编码抗TCR抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的多核苷酸可以由单链和双链DNA、单链和双链区混合物的DNA、单链和双链RNA,以及单链和双链区混合物的RNA,包含可为单链或更通常地双链或单链和双链区混合物的DNA和RNA的杂交分子组成。此外,编码抗TCR结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的多核苷酸可以由包含RNA或DNA或RNA和DNA二者的三链区组成。编码抗TCR结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的多核苷酸还可以含有一个或多个修饰碱基或出于稳定性或出于其他原因而修饰的DNA或RNA骨架。“修饰”碱基包括例如三苯甲基化碱基和不常见碱基诸如肌苷。可以对DNA和RNA进行许多修饰;因此,“多核苷酸”包括化学、酶或代谢修饰形式。

[0138] 编码衍生自免疫球蛋白(例如,免疫球蛋白重链部分或轻链部分)的多肽的非天然变体的分离的多核苷酸可以通过将一个或多个核苷酸置换、添加或缺失引入免疫球蛋白的核苷酸序列,从而将一个或多个氨基酸置换、添加或缺失引入编码的蛋白质来产生。突变可以通过标准技术,诸如定点诱变和PCR介导的诱变引入。优选地,保守氨基酸置换在一个或多个非必需氨基酸残基处进行。

[0139] 在实施方案中,本发明提供包含编码特异性结合TCR α 链的抗体或其抗原结合片段的核酸的分离的多核苷酸,所述抗体结合包含序列GSTLRG(SEQ ID NO:1)的TCR α 多肽的表位。

[0140] 在实施方案中,本发明提供编码与SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:19

具有至少90%同一性的VH多肽的核酸。在实施方案中,本发明提供编码与SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14或SEQ ID NO:20具有至少90%同一性的VL多肽的核酸。

[0141] 本发明还提供编码与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:15具有同一性的HCDR1氨基酸序列;与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:16具有同一性的HCDR2氨基酸序列;和/或与SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:17具有同一性的HCDR3氨基酸序列的核酸。

[0142] 本发明还提供编码与SEQ ID NO:4、9或18具有同一性的LCDR1氨基酸序列;与SEQ ID NO:5具有同一性的LCDR2氨基酸序列的核酸,和/或编码与SEQ ID NO:6或10具有同一性的LCDR3氨基酸序列的核酸。

[0143] 本发明还提供包含编码VH多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VH多肽包含分别包含SEQ ID NO:2、3和21的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VH多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位。

[0144] 本发明还提供包含编码VH多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VH多肽包含分别包含SEQ ID NO:2、3和22的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VH多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位。

[0145] 在实施方案中,本发明涉及包含编码VH多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VH多肽包含分别包含SEQ ID NO:2、3和23的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VH多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位。

[0146] 在另外的实施方案中,本发明提供包含编码VH多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VH多肽包含分别包含SEQ ID NO:15、16和17的HCDR1、HCDR2和HCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VH多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位。

[0147] 在实施方案中,本发明还涉及包含编码VL多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VL多肽包含分别包含SEQ ID NO:4、5和6的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VL多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位。

[0148] 在实施方案中,本发明提供包含编码VL多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VL多肽包含分别包含SEQ ID NO:9、5和10的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VL多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位。

[0149] 本发明还提供包含编码VL多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VL多肽包含分别包含SEQ ID NO:4、5和10的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VL多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α (TCR α)多肽的表位。

[0150] 在实施方案中,本发明提供包含编码VL多肽的核酸的分离的多核苷酸,其中所述VL多肽包含分别包含SEQ ID NO:18、5和6的LCDR1、LCDR2和LCDR3氨基酸序列,并且其中包含所述VL多肽的抗体或抗原片段特异性结合包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的T细胞受体 α

(TCR α)多肽的表位。

[0151] VI.融合蛋白和抗体缀合物

[0152] 如本文别处更详细地讨论,抗TCR结合分子,例如本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物还可以重组融合至异源性多肽的N-或C-末端或化学缀合(包括共价和非共价缀合)至多肽或其他组合物。例如,抗TCR抗体可以重组融合或缀合至在检测测定中用作标记的分子和效应分子,诸如异源性多肽、药物、放射性核素或毒素。参见例如,PCT公开WO 92/08495、WO 91/14438、WO89/12624;美国专利No.5,314,995;和EP 396,387。

[0153] 本发明的抗TCR抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以包括经修饰的衍生物,所述修饰即通过将任何类型的分子共价连接至抗体,以使得共价连接不妨碍抗体结合靶TCR。例如但不限于,抗体衍生物包括经修饰,如通过糖基化、乙酰化、聚乙二醇化、磷酸化、酰胺化、通过已知保护/封闭基团衍生化、蛋白酶切割、连接至细胞配体或其他蛋白质等的抗体。许多化学修饰中的任一种都可以通过已知技术,包括但不限于特定化学切割、乙酰化、甲酰化等进行。另外,衍生物可以含有一个或多个非经典氨基酸。

[0154] 抗TCR结合分子,如本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以由通过肽键或修饰肽键(即肽电子等排体)彼此连接的氨基酸组成,并且可以含有除20个基因编码的氨基酸之外的氨基酸。例如,抗TCR抗体可以通过自然过程,诸如翻译后加工,或通过本领域熟知的化学修饰技术来修饰。此类修饰在基础教科书和更详细的专著,以及大量研究文献中很好地进行了描述。修饰可以在抗TCR结合分子中的任何地方,包括肽骨架、氨基酸侧链和氨基或羧基末端,或在部分诸如碳水化合物上进行。应理解,相同类型的修饰可以以相同或不同程度存在于给定抗TCR结合分子中的若干位点。另外,给定抗TCR结合分子可以含有许多类型的修饰。抗TCR结合分子可以是支链的,例如作为泛素化的结果,并且它们可以是环状的,含有或不含有支链。环状的、支链的和支链环状的抗TCR结合分子可以由翻译后自然过程产生,或可以通过合成方法制备。修饰包括乙酰化、酰基化、ADP-核糖基化、酰胺化、黄素的共价连接、血红素部分的共价连接、核苷酸或核苷酸衍生物的共价连接、脂质或脂质衍生物的共价连接、磷脂酰肌醇的共价连接、交联、环化、二硫键形成、去甲基化、共价交联的形成、半胱氨酸的形成、焦谷氨酸的形成、甲酰化, γ -羧基化、糖基化、GPI锚定形成、羟基化、碘化、甲基化、豆蔻酰化、氧化、聚乙二醇化、蛋白酶解加工、磷酸化、异戊二烯化、外消旋化、硒化、硫酸化、转运RNA介导的氨基酸添加至蛋白质诸如精氨酸和泛素化(参见例如Proteins--Structure and Molecular Properties,T.E.Creighton,W.H.Freeman and Company,NY;第2版(1993);Johnson编(1983)Posttranslational Covalent Modification of Proteins(Academic Press,NY),第1-12页;Seifter等人,Meth.Enzymol.182:626-646(1990);Rattan等人,Ann.NY Acad.Sci.663:48-62(1992))。

[0155] 本发明还提供包含抗TCR抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物和异源性多肽的融合蛋白。抗体融合的异源性多肽用于功能发挥或用于靶向表达抗TCR多肽的细胞。例如,TCR的结合和/或交联引发T细胞效应子功能,诸如细胞因子产生、增殖和杀死。在另一个实施方案中,包括突变体的抗体或其衍生物可以融合至人免疫细胞表面受体的跨膜域,以用于所期望的融合构建体在转染细胞表面上的表达和/或用于允许所期望的嵌合体识别靶标,从而引起改善的效应子功能。

[0156] 在一个实施方案中,本发明的融合蛋白包含具有本发明的抗体的VH结构域中的任

何一个或多个的氨基酸序列或本发明的抗体的VL结构域中的任何一个或多个的氨基酸序列的多肽,或其片段或变体,以及异源性多肽序列,基本上由其组成或由其组成。

[0157] 在另一个实施方案中,用于本文公开的诊断和治疗方法的融合蛋白包含具有抗TCR抗体的VH结构域的CDR中的任何一个、两个、三个的氨基酸序列的多肽,或其片段、变体或衍生物,或具有抗TCR抗体的VL结构域的CDR中的任何一个、两个、三个的氨基酸序列的多肽,或其片段、变体或衍生物,以及异源性多肽序列,基本上由其组成或由其组成。在一个实施方案中,融合蛋白包含具有本发明的抗TCR抗体的VH结构域中的至少一个的氨基酸序列和本发明的抗TCR抗体的VL结构域中的至少一个的氨基酸序列的多肽,或其片段、衍生物或变体,以及异源性多肽序列。优选地,融合蛋白的VH和VL结构域对应于特异性结合TCR的至少一个表位的单来源抗体(或scFv或Fab片段)。在又一个实施方案中,用于本文公开的诊断和治疗方法的融合蛋白包含具有抗TCR抗体的VH结构域的CDR中的任何一个、两个、三个或更多个的氨基酸序列和抗TCR抗体的VL结构域的CDR中的任何一个、两个、三个或更多个的氨基酸序列的多肽,或其片段或变体,以及异源性多肽序列。优选地,VH结构域或VL结构域的CDR中的两个、三个、四个、五个、六个或更多个对应于本发明的单来源抗体(或者Fab片段)。本发明还涵盖编码这些融合蛋白的核酸分子。

[0158] 文献中报道的示例性融合蛋白包括T细胞受体(Gaseoigne等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 84:2936-2940(1987));CD4(Capon等人,Nature 337:525-531(1989);Traunecker等人,Nature 339:68-70(1989);Zettmeissl等人,DNA Cell Biol.USA 9:347-353(1990);以及Byrn等人,Nature 344:667-670(1990));L-选择素(归巢受体)(Watson等人,J.Cell.Biol.110:2221-2229(1990);和Watson等人,Nature349:164-167(1991));CD44(Aruffo等人,Cell 61:1303-1313(1990));CD28和137(Linsley等人,J.Exp.Med.173:721-730(1991));CTLA-4(Lisley等人,J.Exp.Med.174:561-569(1991));CD22(Stamenkovie等人,Cell 66:1133-1144(1991));TNF受体(Ashkenazi等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 88:10535-10539(1991);Lesslauer等人,Eur.J.Immunol.27:2883-2886(1991);以及Peppel等人,J.Exp.Med.174:1483-1489(1991));以及IgE受体(Ridgway和Gorman,J.Cell.Biol.第115卷,摘要No.1448(1991))的融合。

[0159] 如本文别处所讨论,抗TCR结合分子,如本发明的抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物,可以是融合的异源性多肽,以增加多肽的体内半衰期,或用于使用本领域已知的方法进行免疫测定。例如,在一个实施方案中,PEG可以缀合至本发明的抗TCR抗体,以增加其体内半衰期。参见Leong等人,Cytokine 16:106(2001);Adv.in Drug Deliv.Rev.54:531(2002);或Weir等人,Biochem.Soc.Transactions 30:512(2002)。

[0160] 此外,抗TCR结合分子,如本发明的抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物,可以融合至标记物序列,诸如促进其纯化或检测的肽。在优选的实施方案中,标记物氨基酸序列是六组氨酸肽,诸如pQE载体(QIAGEN,Inc.,9259Eton Avenue,Chatsworth,Calif.,91311)中提供的标签等等,它们中的很多可商购获得。如Gentz等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 86:821-824(1989)所述,例如六组氨酸提供了融合蛋白的简便纯化。可用于纯化的其他肽标签包括但不限于“HA”标签(其对应于衍生自流感血凝素蛋白质的表位(Wilson等人,Cell 37:767(1984)))和“flag”标签。

[0161] 融合蛋白可以使用本领域熟知的方法制备(参见例如美国专利No.5,116,964和5,

225,538)。进行融合的精确位点可以根据经验选择,以优化融合蛋白的分泌或结合特征。然后将编码融合蛋白的DNA转染至宿主细胞进行表达。

[0162] 抗TCR结合分子,如本发明的抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物,可以用于非缀合形式或可以缀合至许多分子中的至少一种,例如用于改善分子的治疗性质,促进靶标检测,或用于成像或患者的治疗。抗TCR结合分子,如本发明的抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物,可以在纯化之前或之后,或当纯化进行时标记或缀合。

[0163] 具体地讲,本发明的抗TCR抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物,可以缀合至治疗剂、前药、肽、蛋白质、酶、病毒、脂质、生物响应调节剂、药剂或PEG。

[0164] 本领域技术人员应理解,缀合物也可以根据所选的缀合试剂使用许多技术进行组装。例如,生物素的缀合物如通过使结合多肽与生物素的活化酯诸如生物素N-羧基琥珀酰亚胺酯反应来制备。类似地,荧光标记物的缀合物可以在存在偶联剂,如本文列出的那些偶联剂的情况下,或通过与异硫氰酸酯,优选地荧光素-异硫氰酸酯的反应来制备。本发明的抗TCR抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物的缀合物以类似方式制备。

[0165] 本发明还涵盖缀合至诊断或治疗剂的抗TCR结合分子,如本发明的抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物。抗TCR抗体,包括其抗原结合片段、变体和衍生物,可以在诊断上用于,例如作为临床测试程序的一部分监测疾病的发展或进展,以便例如确定给定治疗和/或预防方案的功效。例如,可以通过使抗TCR抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物偶联至可检测物质来促进检测。可检测物质的实例包括各种酶、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计算机断层扫描术的正电子发射金属以及非放射性顺磁性金属离子。参见例如美国专利No.4,741,900的金属离子,其可以缀合至用作根据本发明的诊断剂的抗体。合适的酶的实例包括辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、 β -半乳糖苷酶或乙酰胆碱酯酶;合适的辅基复合物的实例包括链霉亲和素/生物素和亲和素/生物素;合适的荧光材料的实例包括伞形酮、荧光素、异硫氰酸荧光素酯、罗丹明、二氯三嗪基胺荧光素、丹磺酰氯或藻红素;发光材料的实例包括鲁米诺;生物发光材料的实例包括荧光素酶、荧光素和水母素;并且合适的放射性材料的实例包括 ^{125}I 、 ^{131}I 、 ^{111}In 、 ^{90}Y 或 ^{99}Tc 。

[0166] 抗TCR结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,可以缀合至治疗部分,诸如细胞毒素、治疗剂或放射性金属离子。细胞毒素或细胞毒性剂包括对细胞有害的任何试剂。

[0167] 抗TCR结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物也可以通过将其偶联至报告基因,诸如化学发光或荧光化合物来可检测地标记。然后通过检测在化学反应过程中产生的发光的存在来确定标记的抗TCR结合分子的存在。特别有用的化学发光标记化合物的实例是鲁米诺、异鲁米诺、热吡啶鎓酯、咪唑、吡啶鎓盐和草酸酯。

[0168] 其中抗TCR抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以可检测地标记的一种方式是通过将其连接至酶并且将连接产物用于酶免疫测定(EIA) (Volley,A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md.; Diagnostic Horizons 2:1-7 (1978); Voller等人, J.Clin.Pathol.31:507-520 (1978); Butler, Meth.Enzymol.73:482-523 (1981); Maggio编(1980) Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla.; Ishikawa等人编(1981) Enzyme Immunoassay (Kagaku Shoin, Tokyo))。连接至抗TCR抗体的酶将与合适的底物,优选地显色

底物反应,从而产生可以例如通过分光光度计、荧光计或通过目测手段检测的化学部分。可以用于可检测地标记抗体的酶包括但不限于苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、 δ -5-甾体异构酶、酵母醇脱氢酶、 α -甘油磷酸脱氢酶、丙糖磷酸异构酶、辣根过氧化物酶、碱性磷酸酶、天冬酰胺酶、葡萄糖氧化酶、 β -半乳糖苷酶、核糖核酸酶、脲酶、过氧化氢酶、葡萄糖-6-磷酸脱氢酶、葡糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶。另外,检测可以通过利用酶的显色底物的比色法来完成。检测也可以通过底物与类似制备的标准品的酶促反应程度的目测比较来完成。

[0169] 检测也可以使用许多其他免疫测定中的任一种来完成。例如,通过放射性标记抗TCR结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,可以通过使用放射免疫测定(RIA)检测结合分子(参见例如,Weintraub(1986年3月)Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques(The Endocrine Society),该文献以引用的方式并入本文)。放射性同位素可以通过包括但不限于 γ 计数器、闪烁计数器或放射自显影的手段检测。

[0170] 抗TCR结合分子,如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,也可以使用荧光发射金属诸如 ^{152}Eu 或其他镧系元素可检测地标记。这些金属可以使用诸如二亚乙基三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)的金属螯合基团连接至结合分子。

[0171] 用于将各种部分缀合至抗体(如,抗TCR抗体),或其抗原结合片段、变体或衍生物的技术是熟知的,参见例如Amon等人(1985)“Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy”,载于Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy,Reisfeld等人编(Alan R.Liss, Inc.),第243-56页;Hellstrom等人(1987)“Antibodies for Drug Delivery”,载于Controlled Drug Delivery,Robinson等人编(第2版;Marcel Dekker, Inc.),第623-53页;Thorpe(1985)“Antibody Carriers of Cytotoxic Agents in Cancer Therapy:A Review”,载于Monoclonal Antibodies'84: Biological and Clinical Applications,Pinchera等人编,第475-506页;“Analysis, Results, and Future Prospective of the Therapeutic Use of Radiolabeled Antibody in Cancer Therapy”,载于Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy, Baldwin等人编, Academic Press, 第303-16页(1985);以及Thorpe等人(1982)“The Preparation and Cytotoxic Properties of Antibody-Toxin Conjug” Immunol.Rev.62:119-58。

[0172] VII. 表达抗TCR抗体多肽

[0173] 编码抗体的轻链和重链的DNA序列可以根据熟知的方法使用逆转录酶和DNA聚合酶同时或分别制备。PCR可以根据公开的重链和轻链DNA和氨基酸序列通过共有恒定区引物或通过更多特异性引物引发。如上文所讨论,PCR也可以用于分离编码抗体轻链和重链的DNA克隆。在这种情况下,可以通过共有引物或更大的同源探针,诸如小鼠恒定区探针筛选文库。

[0174] DNA,通常是质粒DNA,可以使用本领域已知的技术从细胞分离,根据例如在前述关于重组DNA技术的参考文献中详细示出的标准的熟知技术进行限制性绘图和测序。当然,根据本发明,在分离过程或随后分析期间的任何点,DNA可以是合成的。

[0175] 在操作分离的遗传物质,以提供本发明的抗TCR抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物之后,通常将编码抗TCR抗体的多核苷酸插入表达载体,以引入宿主细胞,该宿主细

胞可用于产生所需量的抗TCR抗体。

[0176] 抗体或其片段、衍生物或类似物,例如结合本文所述的靶分子(如,TCR)的抗体的重链或轻链的重组表达需要构建含有编码抗体的多核苷酸的表达载体。一旦获得编码本发明的抗体分子或抗体或其部分的重链或轻链(优选地,含有重链或轻链可变域)的多核苷酸,用于产生抗体分子的载体即可使用本领域熟知的技术通过重组DNA技术产生。因此,本文描述了通过表达含有编码核苷酸序列的抗体的多核苷酸来制备蛋白质的方法。本领域技术人员熟知的方法可用于构建含有抗体编码序列和适当的转录和翻译控制信号的表达载体。这些方法包括例如体外重组DNA技术、合成技术和体内遗传重组。因此,本发明提供了编码本发明的抗体分子或其重链或轻链,或重链或轻链可变域的核苷酸序列的可复制载体,所述核苷酸序列可操作地连接至启动子。此类载体可以包括编码抗体分子的恒定区的核苷酸序列(参见例如,PCT公开W0 86/05807;PCT公开W089/01036;和美国专利No.5,122,464),并且抗体的可变域可以克隆至此类载体以表达整个重链或轻链。

[0177] 术语“载体”或“表达载体”在本文中用于指根据本发明用作将所需基因引入宿主细胞和表达该基因的媒介物的载体。如本领域技术人员所知,此类载体可以容易地选自质粒、噬菌体、病毒和逆转录病毒。一般来讲,与本发明相容的载体将包含选择标记、适当的限制性位点,以促进所需基因的克隆以及进入真核或原核细胞和/或在其中复制的能力。

[0178] 在具体方面,本发明提供包含编码如本文所公开的抗TCR抗体和抗原结合片段的多核苷酸的载体。在实施方案中,载体是病毒的、非病毒的、附加体的或整合的。在实施方案中,载体是转座子,如睡美人转座子。在实施方案中,载体是包含慢病毒骨架组分的载体。示例性骨架组分包括但不限于pFUGW和pSMPUW。

[0179] 出于本发明的目的,可以利用许多表达载体系统。例如,一类载体利用衍生自动物病毒诸如牛乳头瘤病毒、多瘤病毒、腺病毒、牛痘病毒、杆状病毒、逆转录病毒(RSV、MMTV或MOMLV)或SV40病毒的DNA元件。其他载体涉及使用具有内部核糖体结合位点的多顺反子系统。另外,可以通过引入一个或多个允许选择转染宿主细胞的标记物来选择DNA整合进其染色体的细胞。标记物可以为营养缺陷型宿主提供原养型、杀生物剂抗性(如,抗生素)或对重金属诸如铜的抗性。选择性标记基因可以直接连接至待表达的DNA序列,或通过共转化引入相同的细胞。另外的元件也可以是最佳合成mRNA所必须的。这些元件可以包括信号序列、剪接信号以及转录启动子、增强子和终止信号。

[0180] 在特别优选的实施方案中,将克隆可变区基因以及如上文所讨论合成的重链和轻链恒定区基因(优选地,人)插入表达载体。当然,任何能够在真核细胞中引发表达的表达载体均可用于本发明。合适的载体的实例包括但不限于质粒pcDNA3、pHCMV/Zeo、pCR3.1、pEF1/His、pIND/GS、pRc/HCMV2、pSV40/Zeo2、pTRACER-HCMV、pUB6/V5-His、pVAX1和pZeoSV2(得自Invitrogen, San Diego, Calif.)以及质粒pCI(得自Promega, Madison, Wis.)。一般来讲,如果免疫球蛋白重链和轻链是可以例如通过机器人系统进行的例行实验,则筛选大量合适地表达高水平的转化细胞。

[0181] 更一般地,一旦制备出编码抗TCR抗体的单体亚基的载体或DNA序列,即将表达载体引入适当的宿主细胞。将质粒引入宿主细胞可以通过本领域技术人员熟知的各种技术来完成。这些技术包括但不限于转染(包括电泳和电穿孔)、原生质体融合、磷酸钙沉淀、通过包膜DNA进行的细胞融合、显微注射和通过完整病毒感染。参见Ridgway(1988) ”

Mammalian Expression Vectors”，载于Vectors,Rodriguez和Denhardt编(Butterworths, Boston,Mass.),第24.2章,第470-472页。通常,通过电穿孔将质粒引入宿主。使具有表达构建体的宿主细胞在适合产生轻链和重链的条件下生长,并测定重链和/或轻链蛋白质合成。示例性测定技术包括酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)或荧光活化细胞分选分析(FACS)、免疫组织化学等等。

[0182] 表达载体通过常规技术转移至宿主细胞,然后通过常规技术培养转染细胞以产生用于本文所述的方法的抗体。因此,本发明包括含有编码本发明的抗体,或其重链或轻链的多核苷酸的宿主细胞,所述多核苷酸可操作地连接至异源性启动子。在用于表达双链抗体的优选实施方案中,编码重链和轻链的载体可以在宿主细胞中共表达,以表达整个免疫球蛋白分子,如下文所详述。

[0183] “宿主细胞”是指具有使用重组DNA技术构建并且编码至少一个异源基因的载体的细胞。在从重组宿主分离抗体的过程的描述中,除非另外明确地指明,术语“细胞”和“细胞培养物”可互换使用,以表示抗体的来源。换言之,从“细胞”回收多肽可以意指从离心的全细胞,或从含有培养基和悬浮细胞的细胞培养物。

[0184] 许多宿主表达载体系统可以用于表达用于本文所述的方法的抗体分子。此类宿主表达系统不仅代表可以产生并且随后纯化所关注的编码序列所借助的媒介物,而且代表当使用适当的核苷酸编码序列转化或转染时,可以原位表达本发明的抗体分子的细胞。这些宿主表达系统包括但不限于微生物诸如使用含有抗体编码序列的重组噬菌体DNA、质粒DNA或粘粒DNA表达载体转化的细菌(如,大肠杆菌(E.coli)、枯草芽孢杆菌(B.subtilis));使用含有抗体编码序列的重组酵母表达载体转化的酵母(如,酵母属(Saccharomyces)、毕赤酵母属(Pichia));使用含有抗体编码序列的重组病毒表达载体(如,杆状病毒)感染的昆虫细胞系统;使用重组病毒表达载体(如,花椰菜花叶病毒,CaMV;烟草花叶病毒TMV)感染或使用含有抗体编码序列的重组质粒表达载体(如,Ti质粒)转化的植物细胞系统;或具有含有衍生自哺乳动物细胞基因组的启动子(如,金属硫蛋白启动子)或衍生自哺乳动物病毒的启动子(如,腺病毒晚期启动子;牛痘病毒7.5K启动子)的重组表达构建体的哺乳动物细胞系统(如,COS、CHO、BLK、293、3T3细胞)。优选地,使用细菌细胞诸如大肠杆菌,更优选地,真核细胞来表达重组抗体分子,特别地用于表达全重组抗体分子。例如,哺乳动物细胞诸如中国仓鼠卵巢细胞(CHO),与载体诸如来自人巨细胞病毒的主要立即早期基因启动子元件一起,是有效的抗体表达系统(Foecking等人,Gene 45:101(1986);Cockett等人,Bio/Technology 8:2(1990))。

[0185] 用于蛋白质表达的宿主细胞系通常是哺乳动物来源的;本领域技术人员有能力优先确定最适合于所需基因产物在其中表达的特定宿主细胞系。示例性宿主细胞系包括但不限于CHO(中国仓鼠卵巢)、DG44和DUXB11(中国仓鼠卵巢细胞系,DHFR阴性)、HELA(人宫颈癌)、CVI(猴肾细胞系)、COS(CVI与SV40T抗原的衍生物)、VERY、BHK(幼仓鼠肾)、MDCK、293、WI38、R1610(中国仓鼠成纤维细胞)、BALBC/3T3(小鼠成纤维细胞)、HAK(仓鼠肾细胞系)、SP2/0(小鼠骨髓瘤)、P3.times.63-Ag3.653(小鼠骨髓瘤)、BFA-1c1BPT(牛内皮细胞)、RAJI(人淋巴细胞)和293(人肾)。宿主细胞系通常可从商业服务美国组织培养物保藏中心(American Tissue Culture Collection)或从公开的文献获得。

[0186] 此外,可以选择调节插入序列的表达,或以所需的特定方式修饰和加工基因产物

的宿主细胞株。蛋白质产物的此类修饰(如,糖基化)和加工(如,切割)对于蛋白质的功能可以是重要的。不同的宿主细胞具有蛋白质和基因产物的翻译后加工和修饰的特征和特定机制。可以选择适当的细胞系或宿主系统,以确保所表达的外源蛋白质的正确修饰和加工。为此,可以使用具有用于初级转录物的正确加工、基因产物的糖基化和磷酸化的细胞机器的真核宿主细胞。

[0187] 对于重组蛋白的长期、高产量产生,稳定表达是优选的。例如,稳定表达抗体分子的细胞系可以是工程化的。可以使用适当的表达控制元件(例如,启动子、增强子、序列、转录终止子、聚腺苷酸化位点等)和选择性标记控制的DNA转化宿主细胞,而不使用含有病毒复制起点的表达载体。在引入外源DNA之后,可以允许工程化细胞在富集培养基中生长1-2天,然后切换至选择性培养基。重组质粒中的选择性标记赋予对选择的抗性,并且允许细胞将质粒稳定整合进其染色体,并生长形成灶,继而可克隆所述灶并扩增为细胞系。该方法可以有利地用于工程化稳定表达抗体分子的细胞系。

[0188] 可以使用许多选择系统,包括但不限于单纯疱疹病毒胸苷激酶(Wigler等人,Cell 11:223(1977))、次黄嘌呤-鸟嘌呤磷酸核苷转移酶(Szybalska和Szybalski,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 48:202(1992))和腺嘌呤磷酸核苷转移酶(Lowy等人,Cell 22:817(1980))基因分别可用于tk⁻、hgp^{rt}-或ap^{rt}-细胞。另外,抗代谢物抗性可用作选择以下基因的基础:dhfr,其赋予对甲氨喋呤的抗性(Wigler等人,Natl.Acad.Sci.USA 77:357(1980);O'Hare等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:1527(1981));gpt,其赋予对霉酚酸的抗性(Mulligan和Berg,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 78:2072(1981));neo,其赋予对氨基糖苷G-418的抗性(Clinical Pharmacy 12:488-505;Wu和Wu,Biotherapy 3:87-95(1991);Tolstoshey,Ann.Rev.Pharmacol.Toxicol.32:573-596(1993);Mulligan,Science 260:926-932(1993);以及Morgan和Anderson,Ann.Rev.Biochem.62:191-217(1993);TIB TECH 11(5):155-215(1993年5月));以及hygro,其赋予对潮霉素的抗性(Santerre等人,Gene 30:147(1984))。可以使用的重组DNA技术领域通常已知的方法在Ausubel等人(1993)Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley&Sons,NY);Kriegler(1990)"Gene Transfer and Expression",载于A Laboratory Manual(Stockton Press,NY);Dracopoli等人编(1994)Current Protocols in Human Genetics(John Wiley&Sons,NY),第12和13章;Colberre-Garapin等人(1981)J.Mol.Biol.150:1中有所描述,这些文献全文以引用的方式并入本文。

[0189] 可以通过载体扩增来增加抗体分子的表达水平(综述参见Bebbington和Hentschel(1987)"The Use of Vectors Based on Gene Amplification for the Expression of Cloned Genes in Mammalian Cells in DNA Cloning"(Academic Press,NY),第3卷)。当载体系统表达抗体中的标记物是可扩增的时,宿主细胞培养物中存在的抑制剂水平的增加将增加标记基因的拷贝数。由于扩增区与抗体基因相关,因此抗体的产生也将增加(Crouse等人,Mol.Cell.Biol.3:257(1983))。

[0190] 体外产生允许放大从而得到大量所需多肽。在组织培养条件下用于哺乳动物细胞培养的技术是本领域已知的,包括均匀悬浮培养,如在气升式反应器中或在连续搅拌反应器中,或固定化或包埋细胞培养,如在中空纤维、微胶囊中、在琼脂糖微珠或陶瓷筒上。如果必要和/或需要,可以通过常规色谱法,例如凝胶过滤、离子交换色谱、DEAE-纤维素上色谱

或(免疫)亲和色谱来纯化多肽溶液,如在合成较链区多肽的优先生物合成之后或在本文所述的HIC色谱步骤之前或之后。

[0191] 编码本发明的抗TCR抗体,或其抗原结合片段、变体或衍生物的基因也可以在非哺乳动物细胞诸如昆虫、细菌或酵母或植物细胞中表达。容易吸收核酸的细菌包括肠杆菌科(*enterobacteriaceae*)的成员,诸如大肠杆菌或沙门氏菌属(*Salmonella*)菌株;杆菌属(*Bacillaceae*)的成员,诸如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*);肺炎球菌(*Pneumococcus*);链球菌(*Streptococcus*)和流感嗜血杆菌(*Haemophilus influenzae*)。还将理解,当在细菌中表达时,异源性多肽通常成为包涵体的一部分。异源性多肽必须是分离的、纯化的,然后组装为功能性分子。当需要抗体的四价形式时,亚基将自组装为四价抗体(WO 02/096948A2)。

[0192] 在细菌系统中,可以根据用于表达的抗体分子的用途有利地选择许多表达载体。例如,当需要产生大量此类蛋白质时,对于抗体分子的药物组合物的产生,指导容易纯化的融合蛋白产物的高水平表达的载体可为所期望的。此类载体包括但不限于大肠杆菌表达载体pUR278(Ruther等人,EMBO J.2:1791(1983)),其中抗体编码序列可以单独连接至载体的lacZ编码区框内,以便产生融合蛋白;ON载体(Inouye和Inouye,Nucleic Acids Res.13:3101-3109(1985);Van Heeke和Schuster,J.Biol.Chem.24:5503-5509(1989))等等。pGEX载体也可以用于使外源多肽作为与谷胱甘肽S-转移酶(GST)的融合蛋白表达。一般来讲,此类融合蛋白是可溶性的,并且可以通过以下步骤轻松地从裂解细胞纯化:吸附并与基质谷胱甘肽-琼脂糖珠结合,然后在存在游离谷胱甘肽的情况下洗脱。pGEX载体被设计为包含凝血酶或因子Xa蛋白酶切割位点,从而克隆的靶基因产物可以从GST部分释放。

[0193] 除原核生物之外,也可以使用真核微生物。在真核微生物中,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)或普通面包酵母是最常用的,但许多其他菌株通常也是可用的,如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)。

[0194] 对于在酵母属中的表达,通常使用例如质粒YRp7(Stinchcomb等人,Nature 282:39(1979);Kingsman等人,Gene 7:141(1979);Tschemper等人,Gene 10:157(1980))。该质粒已含有TRP1基因,其为缺乏在色氨酸中生长能力的酵母突变株,例如ATCC No.44076或PEP4-1提供选择标记(Jones,Genetics 85:12(1977))。作为酵母宿主细胞基因组的特征,trp1损伤的存在其后通过在不存在色氨酸的情况下生长为检测转化提供了有效的环境。

[0195] 在昆虫系统中,加州苜蓿夜蛾(*Autographa californica*)核多角体病毒(AcNPV)通常用作表达外源基因的载体。该病毒在草地夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)细胞中生长。抗体编码序列可以单独克隆至病毒的非必需区(例如多角体蛋白基因)并置于AcNPV启动子(例如多角体蛋白启动子)的控制下。

[0196] 一旦本发明的抗体分子被重组表达,即可通过本领域已知的任何免疫球蛋白分子纯化方法,例如通过色谱(如,离子交换色谱、亲和色谱(特别是对蛋白A后特定抗原的亲和)和筛分柱色谱)、离心、差示溶解度,或通过任何其他蛋白质纯化标准技术来纯化。或者,美国专利申请公开No.2002 0123057A1中公开了增加本发明的抗体的亲和力的优选方法。

[0197] 因此,本发明提供制造抗体或其抗原结合片段的方法,其包括:(a)在细胞中表达一种或多种编码抗体的VL和VH链的多核苷酸分子;以及(b)从细胞纯化抗体,其中该抗体特异性结合TCR α 链。在实施方案中,抗体或其抗原结合片段选择性结合包含GSTLRG(SEQ ID

NO:1)的TCR α 链的表位。

[0198] VIII.选择含TCR细胞的方法

[0199] 在另一个实施方案中,提供了选择包含T细胞受体(TCR)的细胞的方法,其包括:
(a)使细胞与结合TCR的抗体接触,其中该抗体结合具有多种T细胞表位特异性的T细胞;以及
(b)根据抗体的结合选择包含TCR的细胞。在某些方面,该抗体:(i)与79A、79A-23、79A-15、79A-11或79A-13单克隆抗体竞争TCR的结合;(ii)基本上不依赖于T细胞表位特异性而结合T细胞;(iii)激动T细胞的TCR活性;或(iv)刺激T细胞增殖。

[0200] 在选择含TCR细胞的方法的一些方面,该抗体结合TCR α 多肽。在其他方面,该抗体结合包含序列GSTLRG(SEQ ID NO:1)的TCR α 多肽的表位。在一些方面,细胞是体内的。在一些方面,该抗体包含报告基因,并且该方法包括选择包含荧光活化细胞分选(FACS)的TCR的细胞。在一些方面,选择细胞包括使用顺磁珠选择。在某些方面,该抗体结合到支持物。例如,该支持物是珠、表面、柱或宿主细胞。在某些方面,该方法被进一步定义为用于纯化或富集T细胞的方法。在另外的方面,使细胞与抗体接触包括在包含TCR的细胞中诱导活化或生长。在一些方面,纯化或富集包含TCR的细胞包括刺激细胞的增殖。

[0201] IX.人工抗原呈递细胞(aAPC)

[0202] 在一些情况下,人工抗原呈递细胞(“aAPC”)也称为活化和增殖细胞(aAPC),它用于扩增、增殖和/或活化T细胞或T细胞祖细胞,以及制备基于T细胞的治疗组合物和细胞治疗产品。T细胞治疗组合物可以包括例如经遗传修饰为包含嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体(TCR)或任何嵌合受体的T细胞。

[0203] 根据实施方案使用的aAPC包括但不限于树突细胞、巨噬细胞、永生化细胞和人工抗原呈递细胞。在一个方面,aAPC可以是转基因K562细胞。在本发明的一些方面,aAPC是HLAC阴性的,在本发明的一些方面,aAPC是HLAC阳性的。在某些方面,aAPC缀合至实施方案的抗TCR结合抗体。在另外的方面,aAPC包含抗TCR结合抗体(如,膜结合抗体)的表面表达的表达构建体。关于抗原呈递系统的制备和使用的一般指导,参见例如美国专利No.6,225,042、6,355,479、6,362,001和6,790,662;美国专利申请公开No.2009/0017000和2009/0004142;以及国际公开No.WO2007/103009,这些专利中的每个均以引用的方式并入本文。

[0204] 在一些情况下,aAPC可以包含另外的活化或共刺激T细胞的分子。在一些情况下,所述另外分子可以包括膜结合的C γ 细胞因子。在更进一步的方面,aAPC是失活的或照射的,或经测试和确认为不含感染性物质。在更进一步的方面,在存在aAPC的情况下培养细胞包括在包含可溶性细胞因子,诸如IL-15、IL-21和/或IL-2的培养基中培养细胞。细胞可以在约10:1至约1:10、约3:1至约1:5、约1:1至约1:3的比率(免疫效应细胞:aAPC)下;或其中可导出的任何范围中培养。例如,T细胞和aAPC可以以约1:1、约1:2或约1:3的比率共培养。在某些方面,离体培养经遗传修饰的T细胞或T细胞不超过14天、不超过7天或不超过3天。在其他方面,离体培养经遗传修饰的T细胞或T细胞小于21天,诸如小于18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8、7、6、5、4、3、2天、1天或更短。

[0205] 例如,离体培养(如,在存在AaPC或aAPC的情况下培养)可以进行小于一次T细胞群体倍增。在更进一步的方面,T细胞不在存在AaPC或aAPC的情况下离体培养。

[0206] 在一个方面,aAPC可以表达CD137L。在其他方面,aAPC还可以表达CD19、CD64、CD86或膜结合的IL-15。在某些方面,膜结合的IL-15(mIL-15)包含IL-15和IL-15Ra之间的融合

蛋白。在另一个方面,mIL-15构建体包含通过丝氨酸-甘氨酸接头融合至全长IL-15Ra (NM 002189.3)的IL-15cDNA序列(NM 000585.4)。IgE信号肽(gb|AAB59424.1)可以用于mIL15融合构建体。mIL-15的实例在WO/2014/186469中有所描述,该专利以引用的方式并入本文。

[0207] 在实施方案中,截短的CD8跨膜蛋白(tCD8-TM)或截短的人Fc-tCD8-TM域(含有和不含HA标签)或类似的胞外支架分子融合至抗TCR抗体或其片段并且在细胞上表达,诸如衍生自K562以及共刺激配体C86、CD137L或IL15(包括作为膜结合制剂)或它们的任何组合。在本发明的方面,SEQ ID NO:24是人截短的CD8域的实例,SEQ ID NO:25是人CD8a跨膜域的实例,SEQ ID NO:26是hCD8a胞外域的实例。

[0208] aAPC可以用于一般地或以TCR表位特异性的方式扩增和/或活化T细胞。在遇到肿瘤抗原期间,通过抗原呈递细胞递送至T细胞的信号可以影响T细胞编程及其后续治疗功效。这对开发人工抗原呈递细胞具有刺激作用,所述人工抗原呈递细胞允许对提供给T细胞的信号进行最佳控制(Turtle等人,2010)。除抗体诸如TCR-结合抗体之外,APC系统也可以包含至少一种外源性辅助分子。可以采用任何合适数量和组合的辅助分子。辅助分子可选自诸如共刺激分子和粘附分子的辅助分子。示例性共刺激分子包括C86、CD137L和mIL15或OX40L(CD134L);以及CD70和B7.1(也称为B7或CD80),其可以结合T细胞表面上的CD28、4-1BB或OX40分子,从而影响例如T细胞扩增、Th1分化、短期T细胞存活和细胞因子分泌诸如白介素(IL)-2。粘附分子可以包括碳水化合物结合糖蛋白诸如选择素、跨膜结合糖蛋白诸如整合素、钙依赖性蛋白诸如钙粘素以及单次跨膜免疫球蛋白(Ig)超家族蛋白诸如促进例如细胞与细胞或细胞与基质接触的细胞间粘附分子(ICAM)。示例性粘附分子包括LFA-3和ICAM,诸如ICAM-1。用于示例性辅助分子(包括共刺激分子和粘附分子)的选择、克隆、制备和表达的技术、方法和试剂在例如美国专利No.6,225,042、6,355,479和6,362,001中示例,这些专利以引用的方式并入本文。

[0209] 在一些情况下,被选择成为aAPC的细胞具有胞内抗原加工、胞内肽运输和/或胞内MHC I类或II类分子肽组装缺陷,或为变温的(即,对温度挑战的敏感性小于哺乳动物细胞系),或具有缺陷和变温性质二者。在一些方面,被选择成为aAPC的细胞也缺乏表达被引入细胞的外源性MHC I类或II类分子和辅助分子组分的至少一种内源性对应物(例如,如上所述的内源性MHC I类或II类分子和/或内源性辅助分子)的能力。此外,aAPC可以保留在被修饰为产生aAPC之前的细胞具有的缺陷和变温性质。示例性aAPC构成或衍生自抗原加工相关转运蛋白(TAP)缺陷细胞系,诸如昆虫细胞系。示例性变温昆虫细胞系是果蝇属(*Drosophila*)细胞系,诸如Schneider 2细胞系(如,Schneider,J.m 1972)。Schneider 2细胞制备、生长和培养的说明性方法在美国专利No.6,225,042、6,355,479和6,362,001中提供,这些专利以引用的方式并入本文。

[0210] aAPC可以经受冻-融循环。例如,可以通过使含有aAPC的合适容器接触适当量的液氮、固态二氧化碳(干冰)或类似的低温物质以便迅速发生冻结来使aAPC冷冻。然后通过从低温物质移除aAPC并暴露于环境室温条件下,或通过促进融化过程来使冻结的aAPC融化,其中利用微温水浴或温手来促进融化时间缩短。另外,aAPC可以在融化之前长时间冷冻和储存。也可以使冻结的aAPC融化,然后在进一步使用前冻干。可以对冻-融程序产生不利影响的防腐剂,诸如二甲基亚砷(DMSO)、聚乙二醇(PEG)和其他防腐剂,可以有利地从经历冻-融循环的含有aAPC的培养基除去或基本上除去,诸如通过将aAPC转移至基本上不含此类防

腐剂的培养基。

[0211] 在其他实施方案中,异种核酸和aAPC内源性核酸可以通过交联失活,使得在失活之后基本上不发生细胞生长、核酸的复制或表达。例如,aAPC可以在外源性MHC和辅助分子的表达,在aAPC的表面上呈递此类分子,以及用一种或多种选择肽加载所呈递的MHC分子之后的时间点失活。因此,加载此类失活和选择肽的aAPC,虽然变得基本上不能增殖或复制,但可以保留选择肽的呈递功能。交联也可以产生基本上不含污染微生物,诸如细菌和病毒的APCS,并且基本上不降低aAPC的抗原呈递细胞功能。因此交联可以用于维持aAPC的重要APC功能,同时有助于减少关于使用aAPC开发的细胞治疗产品的安全性的关注。关于交联和aAPC的方法,参见例如美国专利申请公开No. 20090017000,该专利申请以引用的方式并入本文。

[0212] X. 扩增和/或活化T细胞的方法

[0213] 本发明提供T细胞活化以及离体和体内增殖以产生T细胞的方法。在关于离体活化和增殖的实施方案中,T细胞是临床级的。在实施方案中,该方法使用本发明的抗体或抗原结合片段通过 $\alpha\beta$ -TCR交联活化T细胞。在实施方案中,T细胞是外周血单核细胞(PBMC)。在另外的实施方案中,T细胞可以包括例如经遗传修饰为包含嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体(TCR)或任何嵌合受体的T细胞。在一些方面,T细胞也可以使用刺激T细胞的增殖和/或存活的细胞因子修饰。例如,T细胞可以包含IL-7、IL-15或IL-21的膜结合型式。在一些方面,通过细胞因子编码序列与细胞因子受体的融合来将细胞因子栓系到膜。例如,细胞可以包含用于表达IL-15-IL-15Ra融合蛋白的载体,参见例如WO 2014186469,该专利以引用的方式并入本文。

[0214] 在另外的方面,还使用转座酶修饰T细胞,该转座酶促进CAR或TCR编码序列整合进转染细胞的基因组。在一些方面,转座酶以DNA表达载体提供。然而,在优选的方面,转座酶以可表达的RNA或蛋白质提供,使得转座酶的长期表达不在转基因细胞中发生。例如,在一些方面,转座酶以mRNA(如,包含帽和多聚A尾的mRNA)提供。可以根据实施方案使用任何转座酶系统。然而,在一些方面,转座酶是鲑鱼型Te1样转座酶(SB)。例如,转座酶也可以是所谓的“睡美人”转座酶,参见例如美国专利6,489,458,该专利以引用的方式并入本文。在某些方面,转座酶是酶活性增加的工程化酶。转座酶的一些特定实例包括但不限于SB 10、SB 11、SB 100x转座酶(参见例如Mates等人,2009,该文献以引用的方式并入本文)或SB110X转座酶。例如,方法可以涉及使用编码SB 10、SB 11、SB100x或SB110x转座酶的mRNA电穿孔细胞。

[0215] 活化T细胞或T细胞活化包括T细胞的数值扩增(即,增加T细胞的数量)(也称为T细胞扩增)以及刺激T细胞以产生细胞因子和杀死特定细胞(如,肿瘤抗原呈递细胞)。

[0216] 本发明的扩增和/或活化T细胞的方法可以用于临床环境,以扩增和/或活化患病受试者(即,有需要的受试者)的T细胞群,或扩增和/或活化供体的T细胞群,即衍生自除患病受试者之外的来源的T细胞。

[0217] 本发明另外提供用于扩增和/或活化T细胞的方法,其包括在存在结合T细胞受体(TCR)的表位的抗体或其抗原结合片段的情况下,使T细胞与人工抗原呈递细胞(aAPC)接触,其中所述表位是包含序列GSTLRG(SEQ ID NO:1)的多肽。在实施方案中,aAPC缀合至结合TCR表位的抗体或其抗原结合片段。在实施方案中,aAPC包含用于表达结合TCR的所述表

位的抗体或其抗原结合片段的表达构建体。在实施方案中,抗体或其抗原结合片段以构象特异性方式接合 $\alpha\beta$ -TCR,以通过多种T细胞表位特异性识别引发多克隆T细胞应答。

[0218] 在扩增和/或活化T细胞的方法中,如本文所公开,在实施方案中,抗体或抗原结合片段是本文公开的抗TCR抗体。例如,抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:2具有至少95%或100%同一性的HCDR1;与SEQ ID NO:3具有至少95%同一性的HCDR2;与CAYL (SEQ ID NO:22) 具有同一性的HCDR3。在另外的实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:9具有至少95%或100%同一性的LCDR1;与SEQ ID NO:5具有至少95%或100%同一性的LCDR2;与SEQ ID NO:10具有至少95%同一性的LCDR3。另外,抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:2具有至少95%或100%同一性的HCDR1;与SEQ ID NO:3具有至少95%或100%同一性的HCDR2;与CAYW (SEQ ID NO:23) 具有同一性的HCDR3。

[0219] 在扩增和/或活化T细胞的方法中,如本文所公开,在实施方案中,抗体或抗原结合片段是本文公开的抗TCR抗体。例如,抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:9具有至少95%或100%同一性的LCDR1;与SEQ ID NO:5具有至少95%或100%同一性的LCDR2;与SEQ ID NO:10具有至少95%或100%同一性的LCDR3。在实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:4具有至少95%或100%同一性的LCDR1;与SEQ ID NO:5具有至少95%或100%同一性的LCDR2;与SEQ ID NO:10具有至少95%或100%同一性的LCDR3。在另外的实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:15具有至少95%或100%同一性的HCDR1;与SEQ ID NO:16具有至少95%或100%同一性的HCDR2;与CRYW (SEQ ID NO:17) 具有同一性的HCDR3。在另外的实施方案中,抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:18具有至少95%或100%同一性的LCDR1;与SEQ ID NO:5具有至少95%或100%同一性的LCDR2;与SEQ ID NO:6具有至少95%或100%同一性的LCDR3。

[0220] 在扩增和/或活化T细胞的方法中,如本文所公开,在实施方案中,抗体或抗原结合片段是本文公开的抗TCR抗体。例如,抗体或抗原结合片段包含被接头分隔的VH和VL结构域。在实施方案中,抗体或抗原结合片段还包含跨膜域(如,hCD α (SEQ ID NO:25))。在扩增和/或活化T细胞的方法中,如本文所公开,在实施方案中,抗体或抗原结合片段是本文公开的抗TCR抗体。例如,所述VH是与选自SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13和SEQ ID NO:19的多肽具有至少90%同一性的多肽,所述VL是与选自SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:20的多肽具有至少90%同一性的多肽。在实施方案中,所述VH是与SEQ ID NO:11具有至少90%同一性的多肽,所述VL是与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的多肽。在另外的实施方案中,所述VH是与SEQ ID NO:13具有至少90%同一性的多肽,所述VL是与SEQ ID NO:12具有至少90%同一性的多肽。在另外的实施方案中,所述VH是与SEQ ID NO:11具有至少90%同一性的多肽,所述VL是与SEQ ID NO:14具有至少90%同一性的多肽。在另一个实施方案中,所述VH是与SEQ ID NO:19具有至少90%同一性的多肽,所述VL是与SEQ ID NO:20具有至少90%同一性的多肽。

[0221] 在本发明的某些方面,原代T细胞的刺激通过在培养中使用本发明的抗TCR可溶性抗体或抗原结合片段来实现。在其他方面,维持活化通过在存在T细胞生长促进细胞因子诸如IL-2、IL-7、IL-15或IL-21的情况下,经由本发明的可溶性抗TCR抗体或抗原结合片段接合T细胞的 $\alpha\beta$ -TCR来完成。在其他方面,T细胞通过TCR配体经由支持物(诸如磁珠/聚苯乙烯表面或通过细胞如照射的K562饲养细胞)的恒定接合而数值扩增。培养条件和配体呈递模

式将会不同,从而影响引起T细胞数值扩增的活化和刺激。

[0222] XI. 使用治疗性抗TCR抗体的治疗方法

[0223] 本发明还提供在需要治疗的动物中治疗自身免疫疾病或T细胞白血病或T细胞淋巴瘤,或预防/控制同种异体移植(骨髓或实体器官)的排斥的方法,其包括将本发明的抗TCR抗体和/或抗原结合片段,作为可溶性蛋白质、抗体的一部分,或作为包含靶向包含序列GSTLRG(SEQ ID NO:1)的TCR α 多肽的嵌合抗原受体(CAR)的宿主细胞施用于动物。在实施方案中,宿主细胞是NK或 $\gamma\delta$ T细胞或经工程化为预防内源性 $\alpha\beta$ TCR的表达的T细胞。

[0224] CAR通常由用于抗原识别的胞外抗体衍生的单链可变域(scFv)组成,并且通过柔性接头连接,该柔性接头连接至跨膜域和包含用于T细胞活化的CD3 ζ 的胞内信号转导域。通常当体内活化T细胞时,它们接收初级抗原诱导的TCR信号,并且来自CD28的次级共刺激信号转导诱导细胞因子(即,IL-2和IL-21)的产生,然后该细胞因子以自分泌/旁分泌方式反馈到信号转导环。有鉴于此,CAR可以包含CD28胞质信号转导域或其他共刺激分子信号转导域,诸如4-1BB信号转导域。嵌合CD28共刺激通过上调抗凋亡分子和产生IL-2以及扩增衍生自外周血单核细胞(PBMC)的T细胞来改善T细胞持久性。

[0225] 在一个实施方案中,CAR是衍生自单克隆抗体的单链可变片段(scFv)融合至跨膜域和CD3- ζ 胞内域的融合物。此类分子响应于其靶标的scFv的识别而产生 ζ 信号传递。

[0226] 在一个实施方案中,CAR可以具有胞外域(胞外)、跨膜域和胞内域(胞内)。在CAR胞外域的一个实施方案中,信号肽指导初生蛋白质进入内质网。这是例如受体被糖基化并锚定于细胞膜中的情况。设想任何真核信号肽序列都是有功能的。通常,使用天然连接至最远氨基末端组分的信号肽(例如在具有取向轻链-接头-重链的scFv中,使用轻链的天然信号)。可以使用的示例性信号肽包括来自免疫球蛋白、CD3、CD3 ζ 、CD8 α (CD8a)和CD28的信号肽。

[0227] 抗原识别域可以是scFv。然而,可以有替代选择。设想了来自天然T细胞受体(TCR) α 和 β 单链的抗原识别域,因为它们具有简单胞外域(例如识别HIV感染的细胞的CD4胞外域)以及其他识别组分,诸如连接的例如细胞因子(其引起携带细胞因子受体的细胞的识别)。几乎以高亲和力结合给定靶标的任何物质均可用作抗原识别区。在另外的方面,scFv可以衍生自SEQ ID NO:7、11、13、19、20、8、12、14、19和/或20。在另外的方面,scFv包含SEQ ID NO:7和8;SEQ ID NO:11和12;SEQ ID NO:13和14;或SEQ ID NO:19和20,在每种情况下任选地被接头分隔。在更进一步的方面,scFv包含SEQ ID NO:2、3、21、4、5和/或6;SEQ ID NO:2、3、22、9、5和/或10;SEQ ID NO:2、3、23、9、5和/或10;SEQ ID NO:2、3、22、4、5和/或10;或SEQ ID NO:15、16、17、18、5和/或6。

[0228] 一般来讲,CAR以二聚化形式存在并且以连接胞外scFv(VH连接至VL)区、茎结构域、跨膜域和胞内信号转导基序的融合蛋白表达。第一代CAR的胞内域诱导单独通过CD3- ζ 信号转导进行T细胞活化。第二代CAR通过CD3- ζ 和CD28或其他胞内域诸如4-1BB或OX40提供活化信号转导。第三代CAR经由三种信号转导基序诸如CD28、4-1BB或OX40的含CD3- ζ 组合活化T细胞。

[0229] 在实施方案中,在CAR的胞外域和跨膜域之间掺入了茎结构域。如本文所用,术语“茎结构域”通常意指作用于将跨膜域连接至多肽链中的scFv或胞质域的任何寡核苷酸或多肽。茎结构域可以包含柔性铰链诸如Fc铰链以及任选地Fc的一个或两个恒定结构域。

[0230] 在本发明的方面,抗TCR抗体或其抗原结合片段的序列用于重定向免疫细胞的特异性或结合。例如,本发明的抗TCR抗体或抗原结合片段的抗原结合序列用于产生膜结合蛋白,当该膜结合蛋白在免疫细胞上表达时,可用于重定向所述免疫细胞的特异性或结合。

[0231] 在另外的实施方案中,本发明提供在需要治疗的动物中治疗疾病,诸如癌症或病原体感染的方法,其包括将多特异性T细胞接合物施用于动物,所述多特异性T细胞接合物包含(a)靶向包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的TCR α 多肽的抗体或其抗原结合片段,和(b)靶向肿瘤相关抗原的至少一种抗体或其抗原结合片段。靶向包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的TCR α 多肽的示例性抗体或其抗原结合片段是scFv。靶向肿瘤相关抗原的示例性抗体或其抗原结合片段是scFv。示例性多特异性T细胞接合物是包含靶向TCR α 多肽的scFv和靶向肿瘤相关抗原的scFv的双特异性T细胞接合物。三特异性T细胞接合物例如包含靶向TCR α 多肽的scFv和靶向肿瘤相关抗原的第一和第二scFv。在另外的方面,在该实施方案中靶向TCR α 多肽的scFv包含SEQ ID NO:7、8、11、12、13、14、19和/或20。在另外的方面,scFv包含SEQ ID NO:7和8;SEQ ID NO:11和12;SEQ ID NO:13和14;或SEQ ID NO:19和20,在每种情况下该序列任选地被接头分隔。在更进一步的方面,scFv包含SEQ ID NO:2、3、21、4、5和/或6;SEQ ID NO:2、3、22、9、5和/或10;SEQ ID NO:2、3、23、9、5和/或10;SEQ ID NO:2、3、22、4、5和/或10;或SEQ ID NO:15、16、17、18、5和/或6。

[0232] 在其他实施方案中,靶向包含序列GSTLRG (SEQ ID NO:1)的TCR α 多肽的示例性抗体或其抗原结合片段可以与其他scFv或蛋白质组合,所述其他scFv或蛋白质结合肿瘤抗原以产生可溶性重组“结合剂”。在接合肿瘤时,结合剂可以通过交联TCR以活化T细胞的效应子功能诸如增殖、细胞因子产生和杀死来活化T细胞。

[0233] 在本发明的治疗方法中,在某些方面,需要治疗的动物是人。

[0234] 在某些实施方案中,多特异性T细胞接合物包含靶向肿瘤相关抗原或病原体特异性抗原结合域(包括模式识别受体识别的碳水化合物抗原,诸如Dectin-1)的抗体或其抗原结合片段。肿瘤相关抗原可以是任何种类的,只要它在肿瘤细胞的表面上表达即可。肿瘤相关抗原的示例性实施方案包括CD19、CD20、癌胚抗原、 α 胎儿蛋白质、CA-125、MUC-1、CD56、EGFR、c-Met、AKT、Her2、Her3、上皮肿瘤抗原、黑素瘤相关抗原、突变的p53、突变的ras等等。

[0235] 在某些实施方案中,胞内肿瘤相关抗原可以被靶向,诸如HA-1、存活素、WT1和p53。这可以通过在通用T细胞上表达scFv来实现,所述通用T细胞识别在HLA的语境中从胞内肿瘤相关抗原描述的加工肽。此外,通用T细胞可以经遗传修饰为表达T细胞受体配对,所述T细胞受体配对在HLA的语境中识别胞内加工的肿瘤相关抗原。在某些实施方案中,当存在少量肿瘤相关抗原时,T细胞可以与膜结合的细胞因子共表达,以改善持久性。例如,CAR可以与膜结合的IL-15共表达。

[0236] 在实施方案中,本发明的抗TCR抗体和抗原结合片段在有需要的受试者体内抑制免疫系统,例如通过过活化T细胞,引起T细胞的丧失和免疫抑制。例如,器官、骨髓和干细胞移植可以提高生活质量并延长存活期。然而,移植组织的排斥需要通过各种手段抑制免疫系统。因此,本发明提供抑制免疫系统的方法,其包括将抗TCR抗体或其抗原结合片段施用于有需要的患者。在实施方案中,将本发明的抗TCR抗体或其抗原结合片段以1至20mg/天的剂量每天一次、每天两次或每天三次经由静脉内(IV)注射施用于有需要的患者2至21天。在实施方案中,将本发明的抗TCR抗体或其抗原结合片段以5至10mg/天的剂量每天一次经由

IV注射施用于有需要的患者5至15天。在实施方案中,将本发明的抗TCR抗体或其抗原结合片段以5mg/天的剂量每天一次经由IV注射施用于有需要的患者10至14天。

[0237] 在另外的实施方案中,在治疗方法中将本发明的抗TCR抗体和抗原结合片段施用于有需要的受试者,以在体内活化T细胞,和/或用于体内效应子功能,诸如抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)和补体依赖性细胞毒性(CDC)。在实施方案中,将本发明的抗TCR抗体或其抗原结合片段以1至20mg/天的剂量每天一次、每天两次或每天三次经由静脉内(IV)注射施用于有需要的患者2至21天。在实施方案中,将本发明的抗TCR抗体或其抗原结合片段以5至10mg/天的剂量每天一次经由IV注射施用于有需要的患者5至15天。在实施方案中,将本发明的抗TCR抗体或其抗原结合片段以5mg/天的剂量每天一次经由IV注射施用于有需要的患者10至14天。

[0238] XII. 药物组合物和施用方法

[0239] 制备抗TCR结合分子,例如本发明的抗体、或其抗原结合片段、变体或衍生物以及将其施用于有需要的受试者的方法是本领域技术人员熟知的或本领域技术人员容易确定的。抗TCR结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的施用途径可以是例如口服、肠胃外、通过吸入或局部施用。如本文所用,术语肠胃外包括例如静脉内、动脉内、腹膜内、肌肉内、皮下、直肠或阴道施用。虽然所有这些施用形式被明确地设想为在本发明的范围内,但施用形式的实例将是用于注射,特别是用于静脉内或动脉内注射或滴注的溶液。通常,用于注射的合适的药物组合物可以包含缓冲液(例如乙酸盐、磷酸盐或柠檬酸盐缓冲液)、表面活性剂(例如聚山梨醇酯)、任选地稳定剂(例如人白蛋白)等。然而,在与本文的教导相容的其他方法中,抗TCR结合分子,例如本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以直接递送至不良细胞群体的部位,从而增加患病组织对治疗剂的暴露。

[0240] 如本文所讨论,抗TCR结合分子,例如本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以以药学有效量施用,用于体内治疗表达TCR的细胞介导的疾病,诸如某些类型的癌症、自身免疫疾病、炎性疾病包括中枢神经系统(CNS)和周围神经系统(PNS)炎性疾病以及侵袭性血管新生。就此而言,应理解本发明公开的结合分子将配制为促进施用和促进活性剂的稳定。优选地,根据本发明的药物组合物包含药学上可接受的非毒性无菌载剂,诸如生理盐水、非毒性缓冲液、防腐剂等等。出于本专利申请的目的,药学有效量的抗TCR结合分子,例如缀合的或未缀合的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物,应被认为意指足以实现有效结合靶标和实现有益效果,例如改善疾病或障碍的症状或检测物质或细胞的量。

[0241] 本发明使用的药物组合物包含药学上可接受的载剂,包括例如离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白诸如人血清白蛋白、缓冲物质诸如磷酸、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的部分甘油酯混合物、水、盐或电解质诸如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐、胶体二氧化硅、三硅酸镁、聚乙烯基吡咯烷酮、纤维素基物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0242] 肠胃外施用制剂包括无菌水溶液或非水溶液、悬浮液和乳液。非水溶剂的实例是丙二醇、聚乙二醇、植物油诸如橄榄油以及可注射的有机酯诸如油酸乙酯。水性载剂包括例如水、醇/水溶液、乳液或悬浮液,包括盐水和缓冲介质。在本发明中,药学上可接受的载剂包括但不限于0.01-0.1M优选地0.05M磷酸盐缓冲液或0.8%盐水。其他常见的肠胃外媒介

物包括磷酸钠溶液、林格氏 (Ringer) 右旋糖、葡萄糖和氯化钠、乳酸林格氏液或固定油。静脉内媒介物包括流体和营养补充剂、电解质补充剂, 诸如基于林格氏右旋糖的那些等等。也可以存在防腐剂和添加剂, 诸如例如抗微生物剂、抗氧化剂、螯合剂和惰性气体等等。

[0243] 更具体地讲, 适用于注射用途的药物组合物包括无菌水溶液 (其中水溶性的) 或分散体和用于无菌注射溶液或分散体的临时制备的无菌粉末。在这种情况下, 组合物必须是无菌的, 并且应为流体以便容易注射。它在制造和储存条件下应为稳定的, 并且将优选地能够防止微生物诸如细菌和真菌的污染作用。载剂可以是含有例如水、乙醇、多元醇 (例如, 甘油、丙二醇和液态聚乙二醇等等) 及其合适混合物的溶剂或分散介质。可以例如通过使用包衣诸如卵磷脂, 就分散体而言通过维持所需的粒度以及通过使用表面活性剂来维持适当流动性。用于本文公开的治疗方法的合适制剂在 Remington's Pharmaceutical Sciences (Mack Publishing Co.) 第16版 (1980) 中有所描述。

[0244] 微生物作用的防止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、抗坏血酸、硫柳汞等等来实现。在很多情况下, 组合物中包含等渗剂, 例如糖、多元醇诸如甘露糖醇、山梨糖醇或氯化钠将是优选的。可以通过在组合物中包含延迟吸收的试剂例如单硬脂酸铝和明胶来产生可注射组合物的延长吸收。

[0245] 在任何情况下, 可以通过在适当的溶剂中掺入所需量的活性化合物 (例如, 抗 TCR 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物, 单独或与其他活性剂组合), 根据需要加入本文列出的一种成分或多种成分的组合, 然后过滤灭菌来制备无菌注射溶液。通常, 分散体通过将活性化合物掺入无菌媒介物来制备, 其含有基本分散介质和上文列出的那些所需其他成分。就用于制备无菌注射溶液的无菌粉末而言, 优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥, 其从其先前的无菌过滤溶液产生活性成分以及任何另外的所需成分的粉末。根据本领域已知的方法处理注射制剂, 装入容器诸如安瓿瓶、袋子、瓶子、注射器或小瓶, 并且在无菌条件下密封。另外, 可以包装制剂并以试剂盒, 诸如美国公开 No. 2002/0102208 中描述的那些试剂盒的形式销售。此类制品将优选地具有标签或包装说明书, 表明相关组合物可用于治疗患有或倾向于疾病或障碍的受试者。

[0246] 肠胃外制剂可以是单次推注剂量、输注或负荷推注剂量, 然后是维持剂量。这些组合物可以以特定的固定或可变间隔, 如每天一次或“根据需要”施用。

[0247] 本发明使用的某些药物组合物可以以可接受的剂型, 包括例如胶囊剂、片剂、水性悬浮液或溶液口服施用。某些药物组合物也可以以鼻腔气雾剂或吸入剂施用。此类组合物可以利用苄醇或其他合适的防腐剂、增加生物利用率的吸收促进剂和/或其他常规增溶剂或分散剂, 以溶于盐水的溶液制备。

[0248] 可以与载剂材料组合产生单一剂型的抗 TCR 结合分子, 例如抗体或其片段、变体或衍生物的量将根据所治疗的宿主和特定施用模式而变化。组合物可以以单次剂量、多次剂量或甚至在输注中确定的时间期内施用。也可以调整给药方案以提供最佳所需响应 (治疗性或预防性响应)。

[0249] 与本公开的范围一致, 可以根据前述治疗方法将本发明的抗 TCR 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物以足以产生治疗效果的量施用于人或其他动物。本发明的抗 TCR 抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物可以以通过根据已知技术使本发明的抗体与常规药理学上可接受的载剂或稀释剂组合而制备的常规剂型施用于此类人或其他动物。本领域技术人员

将认识到,药学上可接受的载剂或稀释剂的形式和特性由与其组合的活性成分的量、施用途径和其他熟知变量规定。本领域技术人员还将认识到,包含一种或多种抗TCR结合分子物类,例如本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的混合物可以被证明是特别有效的。

[0250] 所谓“治疗有效剂量或量”或“有效量”意指就患有待治疗疾病的患者的治疗而言,在施用时产生积极治疗响应的抗TCR结合分子,例如抗体或其抗原结合片段的量。

[0251] 用于治疗表达TCR的细胞介导的疾病,诸如某些类型的癌症,如头颈癌、前列腺癌、结肠癌、乳腺癌和肺癌;自身免疫疾病,如关节炎、多发性硬化、炎性疾病包括中枢神经系统(CNS)和周围神经系统(PNS)炎性疾病;以及侵袭性血管新生的本发明的组合物的治疗有效剂量根据许多不同因素而变化,包括施用手段、靶位点、患者的生理状态(无论患者是人还是动物)、所施用的其他药物(无论治疗是预防性的还是治疗性的)。通常,患者是人,但也可以治疗非人哺乳动物(包括转基因哺乳动物)。治疗剂量可以使用本领域技术人员已知的例行方法滴定,以优化安全性和功效。

[0252] 鉴于本发明的公开内容,本领域普通技术人员可以容易地确定待施用的至少一种抗TCR结合分子,例如抗体或其结合片段的量,而无需过度实验。影响施用模式的因素和至少一种抗TCR结合分子,例如抗体、其抗原结合片段、变体或衍生物的相应量包括但不限于疾病的严重性、病史以及正在接受治疗的个体的年龄、身高、体重、健康和身体状况。类似地,待施用的抗TCR结合分子,例如抗体或其片段、变体或衍生物的量将取决于施用模式以及受试者是否将经历单次剂量或多次剂量的该试剂。

[0253] 本发明还提供将抗TCR结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物用于制造用于治疗自身免疫疾病和/或炎性疾病包括例如关节炎、多发性硬化、CNS和PNS炎性疾病或癌症的药物的用途。

[0254] 本发明还提供将抗TCR结合分子,例如本发明的抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物用于制造用于治疗受试者,用于治疗自身免疫疾病和/或炎性疾病或用于治疗癌症的药物的用途,其中该药物用于已使用至少一种其他疗法预治疗的受试者。所谓“预治疗”或“预先治疗”意指受试者在接受包含抗TCR结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的药物之前,已接受一种或多种其他疗法(例如,已使用至少一种其他癌症疗法治疗),“预治疗”或“预先治疗”包括在开始使用包含抗TCR结合分子,例如本文公开的单克隆抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的药物之前2年内、18个月内、1年内、6个月内、2个月内、6周内、1个月内、4周内、3周内、2周内、1周内、6天内、5天内、4天内、3天内、2天内、或甚至1天内已使用至少一种其他疗法治疗的受试者。受试者不必是使用一种或多种现有疗法预治疗的响应者。因此,接受包含抗TCR结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的药物受试者可以对使用现有疗法的预治疗,或对其中预治疗包括多种疗法的一种或多种现有疗法产生响应或不能产生响应(例如,癌症是难治性的)。受试者在接受包含抗TCR结合分子,例如抗体或其抗原结合片段、变体或衍生物的药物之前已接受预治疗的其他癌症疗法的实例包括但不限于手术;放射疗法;化学疗法,任选地与自体骨髓移植组合,其中合适的化疗剂包括但不限于本文上面列出的那些;其他抗癌症单克隆抗体疗法;基于小分子的癌症疗法,包括但不限于本文上面列出的小分子;基于疫苗/免疫疗法的癌症疗法;干细胞疗法;其他癌症疗法;或它们的任何组合。除非另外指明,本发明的实践将采用细胞生物学、

细胞培养物、分子生物学、转基因生物学、微生物学、重组DNA和免疫学的常规技术,它们在本领域的技术范围内。在文献中全面解释了此类技术。参见例如Sambrook等人编,(1989)Molecular Cloning A Laboratory Manual(第2版;Cold Spring Harbor Laboratory Press);Sambrook等人编,(1992)Molecular Cloning:A Laboratory Manual,(Cold Springs Harbor Laboratory,NY);D.N.Glover编,(1985)DNA Cloning,第I和II卷;Gait编,(1984)Oligonucleotide Synthesis;Mullis等人美国专利No.4,683,195;Hames和Higgins编(1984)Nucleic Acid Hybridization;Hames和Higgins编(1984)Transcription And Translation;Freshney(1987)Culture Of Animal Cells(Alan R.Liss,Inc.);Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press)(1986);Perbal(1984)A Practical Guide To Molecular Cloning;the treatise,Methods ID Enzymology(Academic Press,Inc.,N.Y.);Miller和Calos编(1987)Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells,(Cold Spring Harbor Laboratory);Wu等人编,Methods In Enzymology,第154和155卷;Mayer和Walker编(1987)Immunochemical Methods ID Cell And Molecular Biology(Academic Press,London);Weir和Blackwell编,(1986)Handbook Of Experimental Immunology,第I-IV卷;Manipulating the Mouse Embryo,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,(1986);以及Ausubel等人(1989)Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley and Sons,Baltimore,Md.)。

[0255] 抗体工程的一般原理在Borrebaeck编,(1995)Antibody Engineering(第2版;Oxford Univ.Press)中示出。蛋白质工程的一般原理在Rickwood等人编,(1995)Protein Engineering,A Practical Approach(IRL Press at Oxford Univ.Press,Oxford,Eng.)中示出。抗体和抗体-半抗原结合的一般原理在Nisonoff(1984)Molecular immunology(第2版;Sinauer Associates,Sunderland,Mass.);和Steward(1984)Antibodies,Their Structure and Function(Chapman and Hall,New York,N.Y.)中示出。另外,本领域已知和未特别描述的免疫学标准方法通常如Current Protocols in Immunology,John Wiley& Sons,New York;Stites等人编,(1994)Basic and Clinical Immunology(第8版;Appleton&Lange,Norwalk,Conn.)以及Mishell和Shiigi(编)(1980)Selected Methods in Cellular Immunology(WIT.Freeman and Co.,NY)所述。

[0256] 阐述免疫学的一般原理的标准参考文献包括Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons,New York;Klein(1982)J.,Immunology:The Science of Self-Nonself Discrimination(John Wiley&Sons,NY);Kennett等人编,(1980)Monoclonal Antibodies,Hybridoma:A New Dimension in Biological Analyses(Plenum Press,NY);Campbell(1984)“Monoclonal Antibody Technology”,载于Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology,Burden等人编,(Elsevere,Amsterdam);Goldsby等人编,(2000)Kuby Immunology(第4版;H.Freemad&Co.);Roitt等人,(2001)Immunology(第6版;London:Mosby);Abbas等人,(2005)Cellular and Molecular Immunology(第5版;Elsevier Health Sciences Division);Kontermann和Dubel(2001)Antibody Engineering(Springer Verlan);Sambrook和Russell(2001)Molecular Cloning:A Laboratory Manual(Cold Spring Harbor Press);Lewin(2003)Genes VIII(Prentice Hall2003);Harlow和Lane(1988)Antibodies:A Laboratory

Manual (Cold Spring Harbor Press); Dieffenbach 和 Dveksler (2003) PCR Primer (Cold Spring Harbor Press)。

[0257] 上文引用的所有参考文献以及本文引用的所有参考文献全文以引用的方式并入本文。

[0258] III. 实施例

[0259] 包括以下实施例以示出本发明的优选实施方案。本领域技术人员应当理解, 下面的实施例中公开的技术表示发明人发现在本发明的实践中作用良好的技术, 因此可以被认为构成其实践的优选模式。然而, 根据本公开, 本领域技术人员应认识到, 在不脱离本发明的精神和范围的前提下, 可以在公开的具体实施方案中进行许多改变, 并且仍然获得相同或相似的结果。

[0260] 实施例1-T细胞的离体产生和分析

[0261] 杂交瘤-使用表达编码融合至mCD8a的TCR非变异链(ICVVS DRG STL GRL)的融合蛋白的小鼠L-成纤维细胞免疫CD1D敲除小鼠。杂交瘤克隆使用PEG-1500经由标准细胞融合方法产生。在表达免疫原的L-细胞上筛选之后选择非变异链表位特异性抗体克隆。使用代表免疫原的合成肽通过涂覆有100ng游离肽的间接ELISA验证阳性结合剂(图1A)。选择具有最高OD450的最佳结合剂79A进行进一步分析。

[0262] 抗体产生和表征-选择对TCRVa24-Ja18接合点(氨基酸序列:GSTLGR (SEQ ID NO: 1))具有窄线性表位特异性, 但未显示出对TCR α -CDR3 α -链的构象特异性的单克隆抗体(克隆79A)进行抗体建模和亲和力改善。抗体克隆79A的特异性通过针对线性肽的ELISA检查, 在Ala-肽文库上以及流式细胞术分析进行确认(图1B-1D)。

[0263] 结合测定-结合测定在涂覆有线性肽序列跨越Va24-Ja18区的固相ELISA上进行(图1B)。使用79A或突变抗体一抗和匹配荧光缀合的二抗(抗小鼠Fab PE或抗人 γ Fc PE山羊Fab多克隆)对PBMC衍生的活CD3+T细胞进行流式细胞术检测(图1E)。对从全细胞裂解(PBMC或T细胞)分离的变性蛋白质进行蛋白质印迹, 在SDS-PAGE上解析。

[0264] V-基因扩增和scFv产生-选择线性表位GSTLGR (SEQ ID NO: 1) 特异性克隆79A进行scFv产生。利用鼠VH FR1 5' 引物和Ig恒定区3' 引物的简并引物标准混合物通过PCR从79A cDNA扩增抗体V-基因(图2) (Wang, Z., Raifu, M., Howard, M., Smith, L., Hansen, D., Goldsby, R. 和 Ratner, D. (2000) Universal PCR amplification of mouse immunoglobulin gene variable regions: the design of degenerate primers and an assessment of the effect of DNA polymerase 3' to 5' exonuclease activity. Journal of immunological methods, 233, 167-177)。通过琼脂糖凝胶电泳验证VH/VL扩增子的正确大小。从琼脂糖凝胶切下PCR扩增V-基因产物, 通过凝胶纯化试剂盒(Qiagen)纯化, 根据制造商的说明将PCR产物克隆至TOPO载体。使用T3/T7或M13F、M13R引物通过Sanger测序法对抗体基因进行测序(MD Anderson DNA Sequencing Core)。在NCBI BLAST上使用至少4个克隆获得VH和VL的共有序列。使用借助IMGT/V-Quest软件(万维网址 imgt.org/IMGT_vquest/vquest)分析的VH或VL共有序列鉴定抗体CDR。(Giudicelli, V., Chaume, D. 和 Lefranc, M.P. (2004) IMGT/V-QUEST, an integrated software program for immunoglobulin and T cell receptor V-J and V-D-J rearrangement analysis. Nucleic acids research, 32, W435-440) 通过另一个软件V-Base(万维网址

vbase2.org) 进一步确认CDR位置。

[0265] 分子建模和对接-抗体同源性建模和对接用于研究对TCR- α 链非变异区具有线性表位特异性的抗体(79A) CDR中残基的能量贡献。通过Paratome服务器对79A scFv序列进行ABR分析(图3A)并确认VH和VL区中CDR残基的正确定位。通过WAM服务器(Whitelegg, N.R. 和 Rees, A.R. (2000) WAM: an improved algorithm for modelling antibodies on the WEB. *Protein engineering*, 13, 819-824) 和SWISS-Models开发抗体同源性模型(图3B)。SWISS-MODEL (Biasini, M., Bienert, S., Waterhouse, A., Arnold, K., Studer, G., Schmidt, T., Kiefer, F., Cassarino, T.G., Bertoni, M., Bordoli, L. 等人 (2014) SWISS-MODEL: modelling protein tertiary and quaternary structure using evolutionary information. *Nucleic acids research*, 42, W252-258) 适用于构建VH结构域, 因为A79的重链中含有非常短的CDR3。使用PROCHECK检查最终抗体模型结构的质量。在ZDOCK服务器上使用79A和TCR-模型(PDB源)建立对接模型(图3A、3B、3C)。在模型中, 位于拉氏(Ramachandran)图的最佳区或最大区中的氨基酸残基百分比为99.4%。A79和TCR的对接模型[Protein Data Bank (PDB) ID code 1KGC4]在ZDOCK服务器上构建(图3D)。Pierce, B.G., Wiehe, K., Hwang, H., Kim, B.H., Vreven, T. 和 Weng, Z. (2014) ZDOCK server: interactive docking prediction of protein-protein complexes and symmetric multimers. *Bioinformatics* (Oxford, England), 30, 1771-1773。对于对接模型的分析, 应用Fold X经验力场。Fold X的复合“Ala扫描”函数用于鉴定可能突变从而增加结合亲和力的氨基酸残基。使用“Build Model”函数生成突变A79模型。相互作用能量变化($\Delta \Delta G$)根据* ($\Delta G = \Delta GMU - \Delta GWT$) 来计算, 然后用于定义相关AA(在抗体结合区的CDR中)针对对应受体的能量贡献。总能量定义为突变体的结合能量减去野生型的结合能量。

[0266] 使用FoldX软件的复合-ALA-扫描函数来鉴定可能突变的氨基酸(AA)残基, 使得79A CDR中针对TCR- α 链的亲合力增强是可能的(图4A、4C)。

[0267] 分子构建体和抗体表达盒-重组抗体表达载体(编码A79突变scFv融合至截短的IgG1Fc)的示意图, 即载体图谱在图5A和5B中提供。简而言之, 抗体基因表达盒由连接至可变重链(VH-突变体)和可变轻链(VL-突变体)框内的VH5信号肽组成。VH和VL通过修饰的甘氨酸丝氨酸G3S序列连接以产生A79-scFv。制备了四种此类突变体(S11、S13、S15和S23)。在四种突变体中, 将两种具有改善的 $\Delta \Delta G$ 的型式(S15和S23)用作全IgG或以K562细胞表面上的scFv表达, 以进行功能测定。然后A79-scFv融合至截短的人IgG1-Fc序列框内。表示突变体A79scFv的cDNA以基因串产物从头合成(Geneart)), 然后克隆至含有SV40复制起点和启动子元件并且以SV40polyA尾结束的质粒骨架。抗体经由指定表达质粒以可溶性蛋白质在哺乳动物细胞中表达。从组织培养物上清液通过亲和力纯化(蛋白A)纯化分泌的抗体, 然后透析至PBS (pH7.2)。在SDS-PAGE上检查重组抗体纯度, 通过BCA (Thermoscientific) 测定蛋白质浓度。重组抗体的等分试样冷冻储存于-80°C下直到使用。

[0268] 79A CDR中的定点诱变导致突变重组抗体S15的重建(单链亲和力优化的新型突变体15), 其显示出改善的亲合力和泛特异性TCR α 链的构象特异性结合(图6A-6C)。凝胶电泳图像显示出重组突变体23(S23)的均质性和纯度(图6D)。另外的结合数据使用图6E中的S15提供。

[0269] 载体设计和重组抗体S15在K562HLAC细胞表面上的表达-S15序列融合至截短的

CD8跨膜(tCD8-TM)或截短的人Fc-tCD8-TM域(含有和不含有HA标签(图7A)),并且与共刺激配体CD86、CD137L和IL15-15Ra一起在K562C细胞上表达(图7B)。对于S23序列,载体设计和表达类似。

[0270] 细胞增殖测定-为了评估通过CD3复合物OKT3刺激或经由突变scFv的 $\alpha\beta$ -TCR接合之后细胞的增殖,使用CFSE染料稀释法(CellTrace, ThermoFisher Scientific)。向活细胞加入5 μ M CFSE染料(根据制造商的方案),然后以100万个细胞/mL的密度接种于聚苯乙烯平板(Nunc)上的完全RPMI-1640培养基(10%FBS、1X Glutamax和IL-2;50IU/mL IL-2)中,该聚苯乙烯平板涂覆有单独的OKT3、S15、S23或与10 μ g/mL浓度的CD28组合。在第1天、第2天和第6天对活化细胞取样,并且运行于流式细胞术上,用于定量CFSE减少。在BD LSR-Fortessa的适当滤光器上以488nm激发分析活CD3+T细胞的CFSE荧光。数据以柱状图表示,其以T细胞的每个连续世代的不同峰示出了CFSE表达(图7C和7D)。加入CFSE的PBMC用作阳性对照。市售的抗CD28抗体用作T细胞模拟的实验抗体对照。

[0271] K562-工程化人工抗原呈递细胞-S15序列与HA标签一起融合至截短的人CD8跨膜(tCD8TM)域或截短的人Fc-tCD8TM域(图7A)。表示S15-tCD8TM-HA或S15-tCD8TM-tFc融合蛋白的cDNA以基因串产物合成(Geneart)。使用gateway重组法将S15克隆回含有HIV调控元件、gateway克隆位点侧接的Ig κ 前导肽序列的质粒载体pLV300。用瞬时表达质粒转染293-METR细胞,然后从培养物收集病毒颗粒,然后在Amicon超离心过滤器(Millipore)上浓缩。转染K562细胞以表达T细胞共刺激配体,诸如CD86、CD137L、IL15-15Ra。使用市售的CD86、CD137L、IL15-15Ra(BD)和HA(Biolegend)抗体通过流式细胞术评估引入配体的表面表达或使用抗人Fc抗体(Life Tech)来检测S15融合蛋白。为了在不存在共刺激的情况下评估重组抗体刺激T细胞的功效,将K562细胞工程化为表达CD64,然后如上文所述加入全抗体。

[0272] 在K562-S15饲养细胞(AaPC)上进行T细胞的离体增殖-将K562细胞工程化为表达S15或其衍生物以及T细胞共刺激配体,从而离体完成T细胞活化。在照射后,将稳定表达单独的S15或与共刺激配体组合的K562细胞或加入全抗体的K562-CD64细胞用作饲养细胞(图7B)。将PBMC或脐带血T细胞(UCB)衍生的单核细胞与工程化照射的K562以及IL-2(50IU/mL)一起以1:1的比率共培养。在K562-PBMC共培养系统中以7天间隔刺激细胞两次。对活细胞(Nexcelom™台盼蓝染料排除)计数来监测生长动力学(图7C-7D)。完成免疫表型以确定扩增的T细胞的特征(图7E)。通过流式细胞术评估CD3⁺CD56^{neg}T细胞群的出现。监测绝对细胞数以估计不同aAPC上的细胞生长(仅K562细胞、含有单独S15/或具有共刺激配体的S15的K562、含有单独抗CD3 ϵ mAb(OKT3)/或具有共刺激的K562、或加入S15、S23或OKT3的K562-CD64)。进行离体扩增的T细胞的免疫表型分析以评估消耗和记忆表型相关的标记物。(图7E和7F)。

[0273] 流式细胞术-将BD LSR Fortessa X-20用于T细胞的多参数免疫表型分析。简而言之,用含有(PBS和2%FBS)的冷FACS缓冲液洗涤健康供体PBMC或离体培养的活T细胞,用荧光染料缀合的抗体在黑暗中冰育20min。然后,用FACS缓冲液洗涤细胞两次,然后用Fixable活染料在室温下温育5min以进行活死细胞染色。针对活细胞进行设门,在转储通道上排除单核细胞(CD14^{Pos})和B细胞(CD19^{Pos})。T细胞被鉴定为CD3^{Pos} CD56^{neg},然后分析 $\alpha\beta$ -TCR、细胞分化标记物(CD25、CD69、CD45RA和CD45RO)、Th表型标记物(CD294和CD25)和消耗标记物(PD1、LAG3、TIM3、BLIMP)的表达。抗体稀释和使用根据制造商的指导进行。使用校准珠

(eBioscience) 进行多参数分析的补偿。通过Flow Jo软件V10分析补偿数据并以点图表示。每个实验针对三个或更多个供体进行。(图7G)

[0274] 通过高通量深度测序进行TCR谱系测定-通过靶向TCR β 基因编码的人TCR-CDR3区来深入分析活化T细胞的V基因重排(Adaptive Biotechnology的人TCR β 深度测定)。该测定涉及专利多重PCR引物、扩增步骤(包括掺入合成免疫受体类似物以避免扩增偏差的第二PCR)以及TCR β 谱系ImmuSEQTM软件的准确定量(Robins, H.S., Campregher, P.V., Srivastava, S.K., Wachter, A., Turtle, C.J., Kahsai, O., Riddell, S.R., Warren, E.H. 和 Carlson, C.S. (2009) Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. *Blood*, 114, 4099-4107.)。结果在图8A-8B中示出。

[0275] 通过TCR β 基因编码的TCR-CDR3的下一代深度测序评估离体增殖T细胞的免疫谱系(hTCR β 深度测定, Adaptive Biotech)。将从CD3⁺T细胞(PBMC对照)或离体扩增的T细胞分离的基因组DNA用于TCR谱系分析。用于测定的各种APC组为K562C⁻(未修饰的对照)、仅表达S15的K562C⁻、表达S15以及共刺激分子(CD86、CD137L和IL15-15Ra)的K562C⁻、加入OKT3(抗CD3 ϵ mAb)和共刺激分子(CD86、CD137L和IL15-15Ra)的K562C⁻。通过供应商提供的试剂盒中提供的专利引物混合物的多重化产生扩增子。Carlson, C.S., Emerson, R.O., Sherwood, A.M., Desmarais, C., Chung, M.W., Parsons, J.M., Steen, M.S., LaMadrid-Herrmannsfeldt, M.A., Williamson, D.W., Livingston, R.J. 等人(2013) Using synthetic templates to design an unbiased multiplex PCR assay. *Nature communications*, 4, 268。遵循两步扩增过程, 其中引入合成免疫受体类似物以进行TCR β 谱系的无偏差估计。Robins, H.S., Campregher, P.V., Srivastava, S.K., Wachter, A., Turtle, C.J., Kahsai, O., Riddell, S.R., Warren, E.H. 和 Carlson, C.S. (2009) Comprehensive assessment of T-cell receptor beta-chain diversity in alphabeta T cells. *Blood*, 114, 4099-4107。TCR文库在Illumina miSEQ平台上产生, 在标准QC检查后通过ImmunoSeq分析仪分析数据(Adaptive Biotech)。从每个活化T细胞组以及从未操作的健康供体PBMC T细胞获得免疫测序数据。在操作之前和之后比较所有数据(原代与活化T细胞)。报道表示TCRV基因频率、CDR3链长、配对基因频率的数据。还根据测序读数百分比跟踪最高克隆分布, 该测序读数解释了样品组内的每个单独克隆。提供散点图分析以估计每个样品组的克隆出现频率。计算关于香农(Shannon)熵、皮尔森(Pearson)系数值(r^2)的克隆形成能力分数, 以确定通过不同策略活化的每个T细胞组中出现的克隆重叠(S15与OKT3, 与未操作的供体PBMC T细胞相比)。(图8D)。

[0276] 讨论-发明人描述了T细胞活化和离体增殖以产生临床级T细胞的替代方法。与经由CD3 ϵ -特异性mAb OKT3以及超激动剂抗CD28mAb的CD3复合物活化相比, 它们通过 $\alpha\beta$ -TCR交联经由栓系在K562-AaPC(活化和增殖细胞)上的工程化TCR α 链特异性重组抗体片段来活化T细胞。

[0277] 单链亲和力优化的新型突变体15和23(S15和S23)对 $\alpha\beta$ -TCR⁺T细胞具有高亲和力, 它们用于在培养物中通过交联TCR活化和增殖原代T细胞。S15-AaPC介导的T细胞活化的生长动力学和表型与CD3 ϵ 特异性OKT3mAb刺激所实现的平行。

[0278] 活化T细胞的基因组DNA的高通量深度测序揭示了不同的V-基因重排和经由S15的TCR交联进行的克隆群体保存。分析既未显示功能性V基因重排的任何意外变化, 也未显示

免疫谱系的任何偏差。经由TCR交联产生的 $\alpha\beta^+\text{TCR}^+\text{T}$ 细胞可有助于其中在离体活化和增殖之后克隆群体的保存是所期望的情况。(参见图9-11)。

[0279] ***

[0280] 根据本发明的公开内容,本文公开和受权利要求书保护的所有方法可以在无需过度实验的情况下进行和执行。虽然已经根据优选实施方案描述了本发明的组合物和方法,但是对于本领域技术人员显而易见的是,在不脱离本发明的概念、精神和范围的前提下,可以对所述方法和在本文所述方法的步骤或步骤顺序上施加变化。更具体地讲,将显而易见的是,化学和生理相关的某些试剂可以代替本文所述的试剂,同时实现相同或相似的结果。对于本领域技术人员显而易见的所有此类相似替代和修改被视为在由所附权利要求书所限定的本发明的精神、范围以及概念之内。

序列表

<110> 得克萨斯州大学系统董事会
<120> T细胞受体(TCR)结合抗体及其用途
<130> UTFC.P1281W0
<140> 未知
<141> 2016-09-15
<150> 62/218,990
<151> 2015-09-15
<160> 27
<170> PatentIn version 3.5
<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0001] <400> 1
Gly Ser Thr Leu Arg Gly
1 5

<210> 2
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 2
Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Met Asn Trp Val
1 5 10 15

<210> 3
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 3

Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Asn Asn
1 5

<210> 4
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 4

Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr
1 5

<210> 5
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 5

[0002]

Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5 10

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 6

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Trp
1 5

<210> 7
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 7

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Cys Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

[0003]

<210> 8
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 8

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 9
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 9

Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe
1 5

<210> 10
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

[0004]

<220>
<223> 合成肽

<400> 10

Met Gln Gly Ser His Val Pro Trp
1 5

<210> 11
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 11

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Cys Ala Tyr Leu Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 12
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

[0005]

<400> 12

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13
 <211> 111
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 13

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

[0006] Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Cys Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 14
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 14

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
 20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 15
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

[0007] <220>
<223> 合成肽

<400> 15

Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr Tyr Met Asn Trp Val
1 5 10 15

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 16

Trp Ile Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn
1 5

<210> 17
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 17

Cys Arg Tyr Trp
1

<210> 18

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

<400> 18

Gln Ser Ile Val His Gly Gly Gly Asn Thr Tyr
1 5 10

<210> 19

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

[0008]

<220>

<223> 合成肽

<400> 19

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr
20 25 30

Tyr Met Asn Trp Val Lys Gln Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asn Pro Asn Asn Gly Gly Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

Ala Cys Arg Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
 100 105 110

<210> 20
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 20

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Gly
 20 25 30

Gly Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45

[0009] Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95

Ser His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 21
 <211> 4
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 合成肽

<400> 21

Cys Asp Tyr Trp
 1

<210> 22
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 22

Cys Ala Tyr Leu
1

<210> 23
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成肽

<400> 23

Cys Ala Tyr Trp
1

[0010]

<210> 24
<211> 27
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 24

Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu
1 5 10 15

Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr Leu Ile Cys Tyr
20 25

<210> 25
<211> 21
<212> PRT
<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 25

Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu
1 5 10 15

Ser Leu Val Ile Thr
20

<210> 26
 <211> 161
 <212> PRT
 <213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 26

Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu Gly Glu
 1 5 10 15

Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly
 20 25 30

Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Phe
 35 40 45

Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp
 50 55 60

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

[0011]

Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala
 85 90 95

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu
 100 105 110

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
 115 120 125

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
 130 135 140

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
 145 150 155 160

Asp

<210> 27
 <211> 14
 <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成肽

[0012]

<400> 27

Ile Cys Val Val Ser Asp Arg Gly Ser Thr Leu Gly Arg Leu

1 5 10

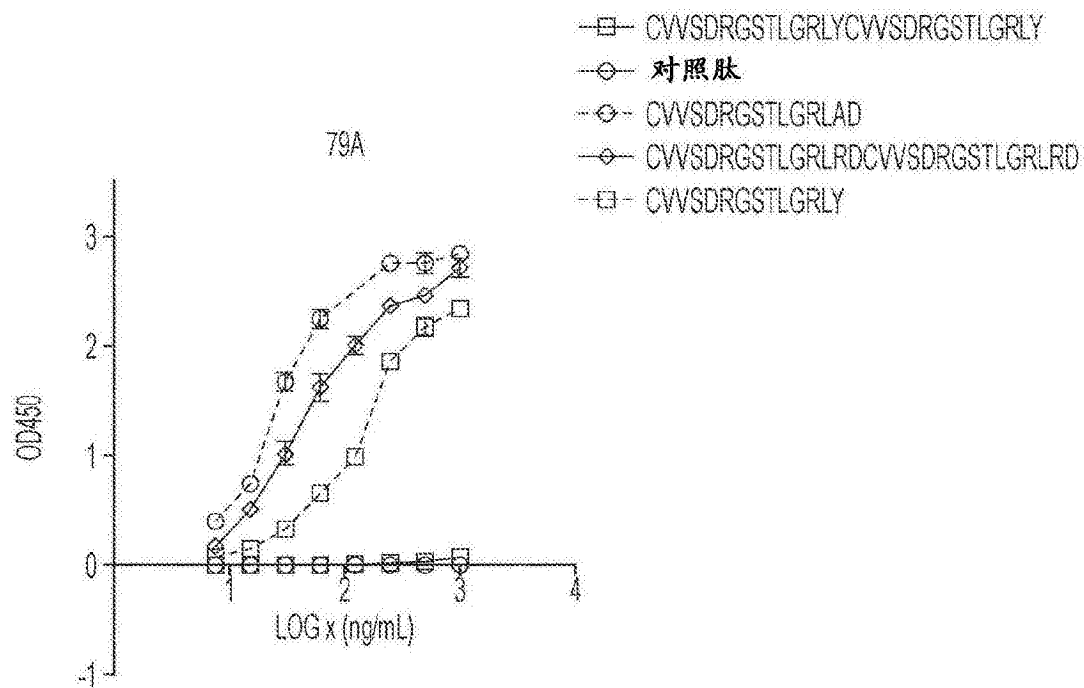


图1A

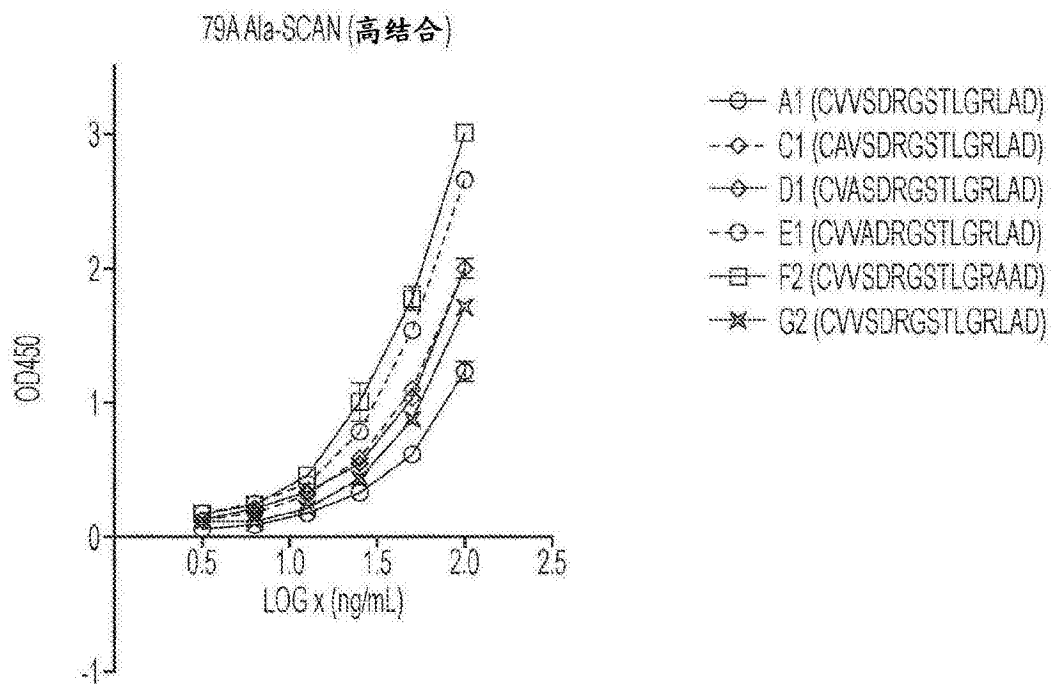


图1B

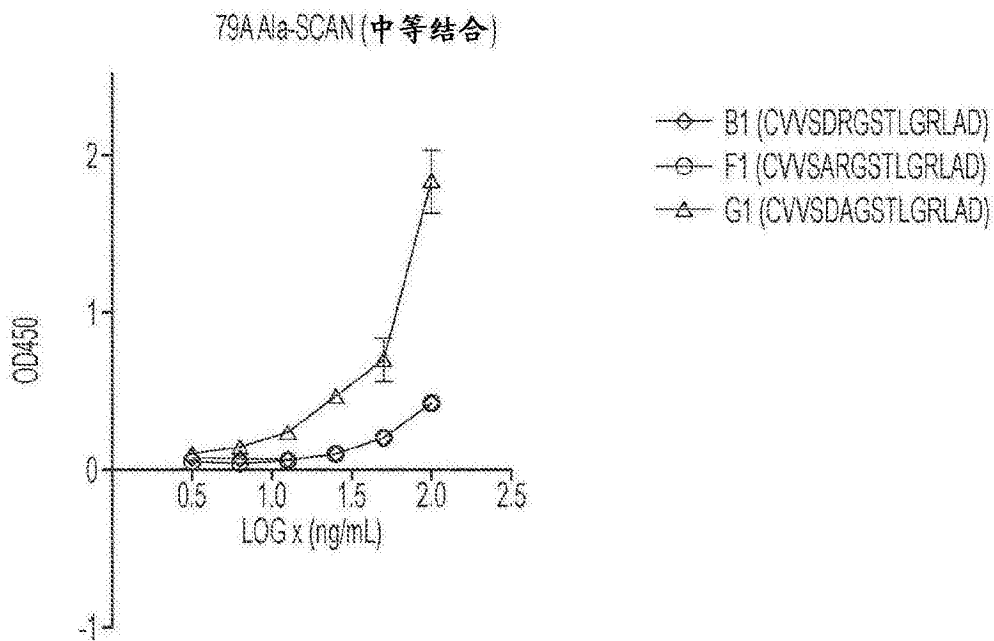


图1C

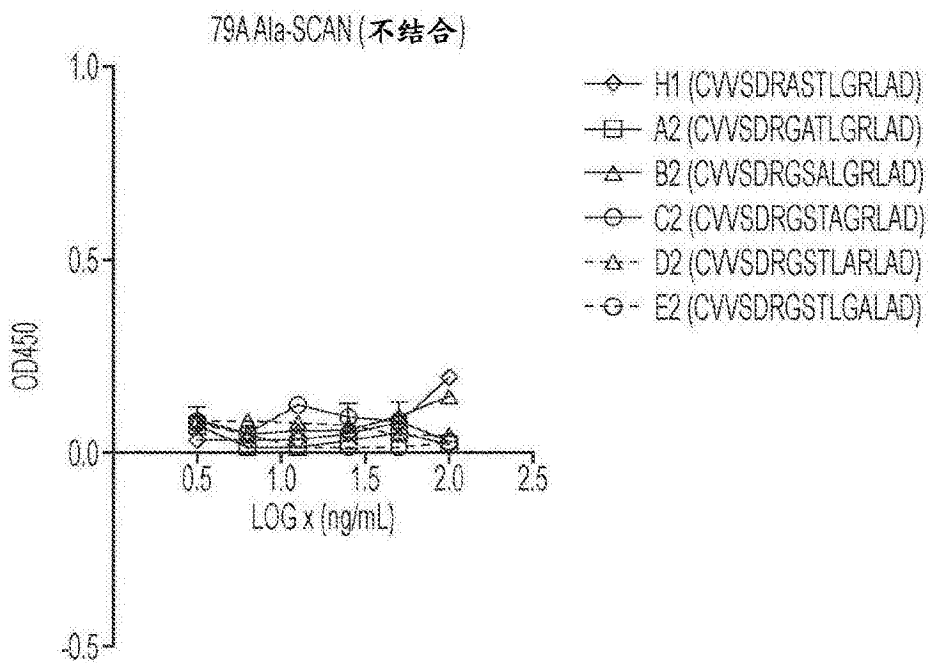


图1D

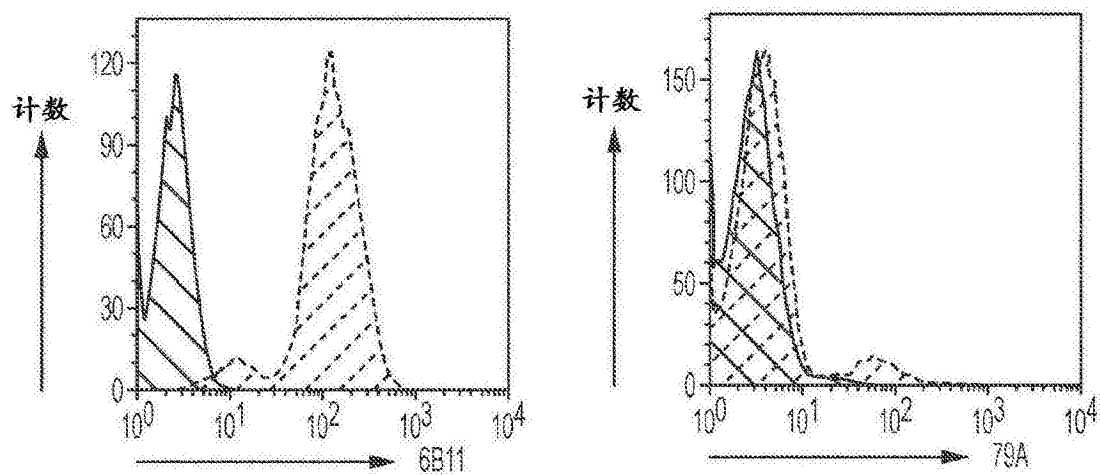


图1E (i)

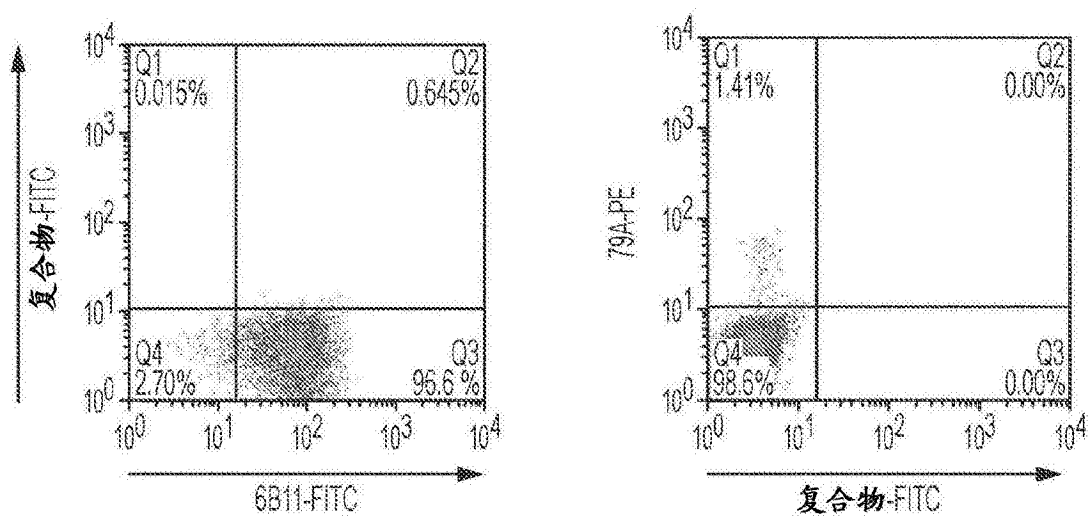


图1E (ii)

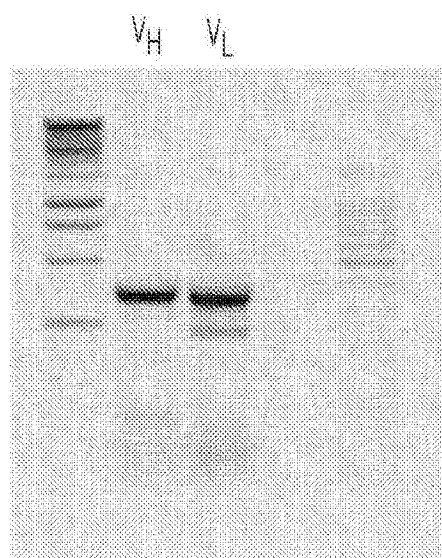


图2

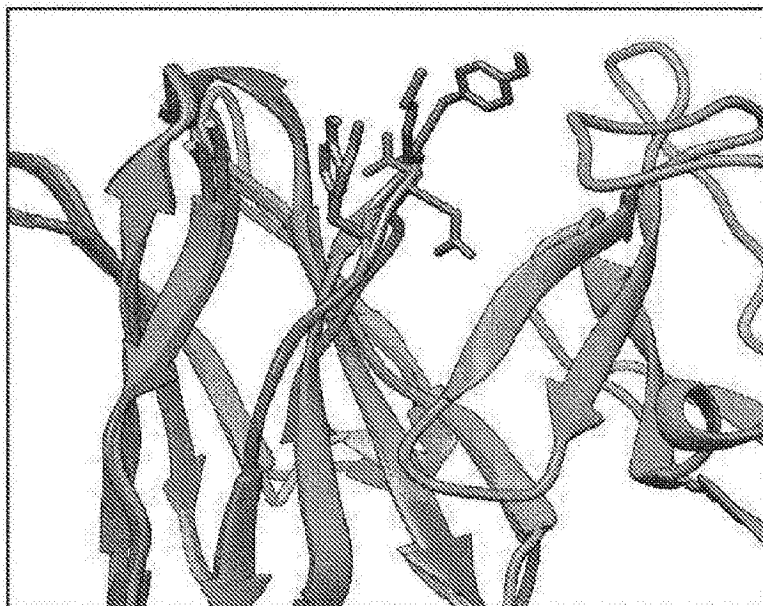


图3A

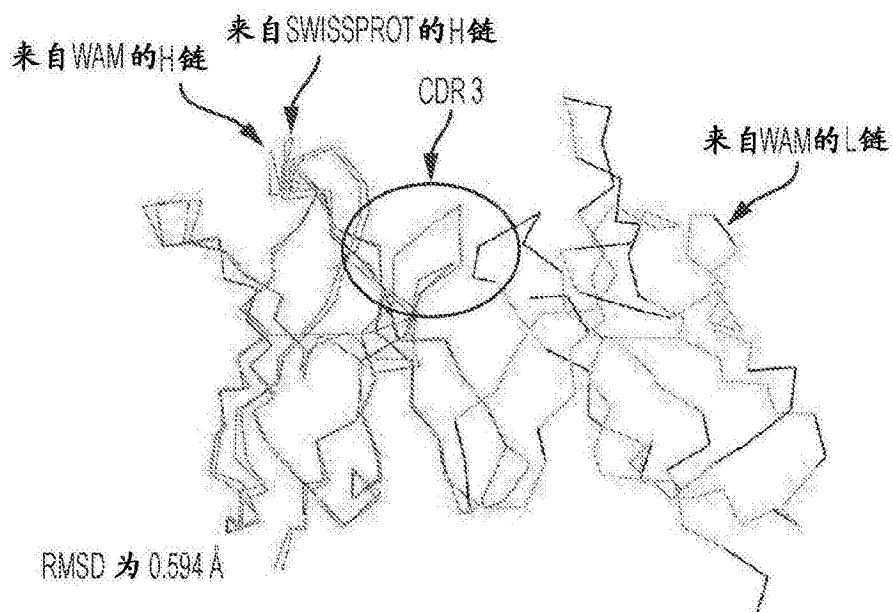


图3B

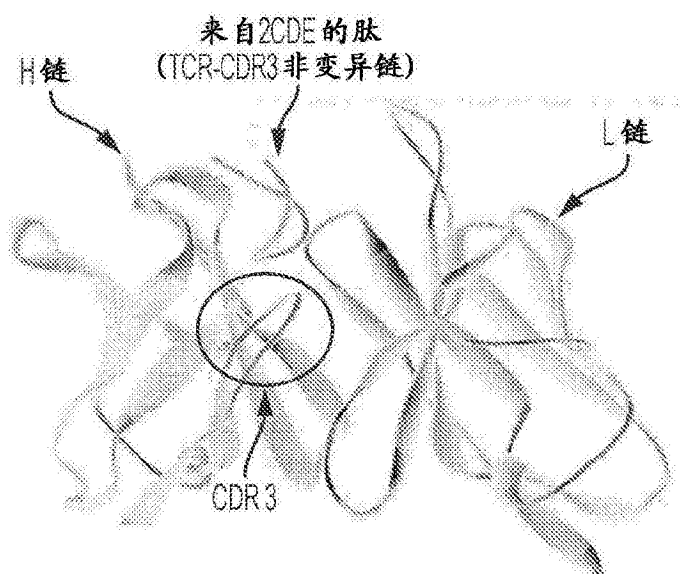


图3C

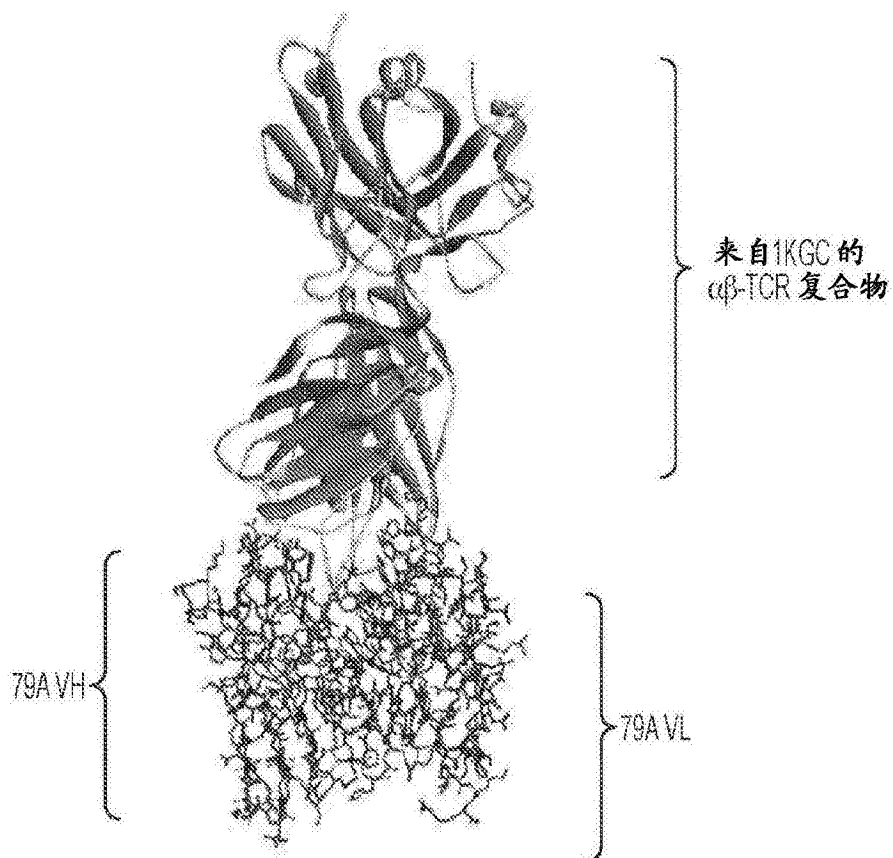


图3D

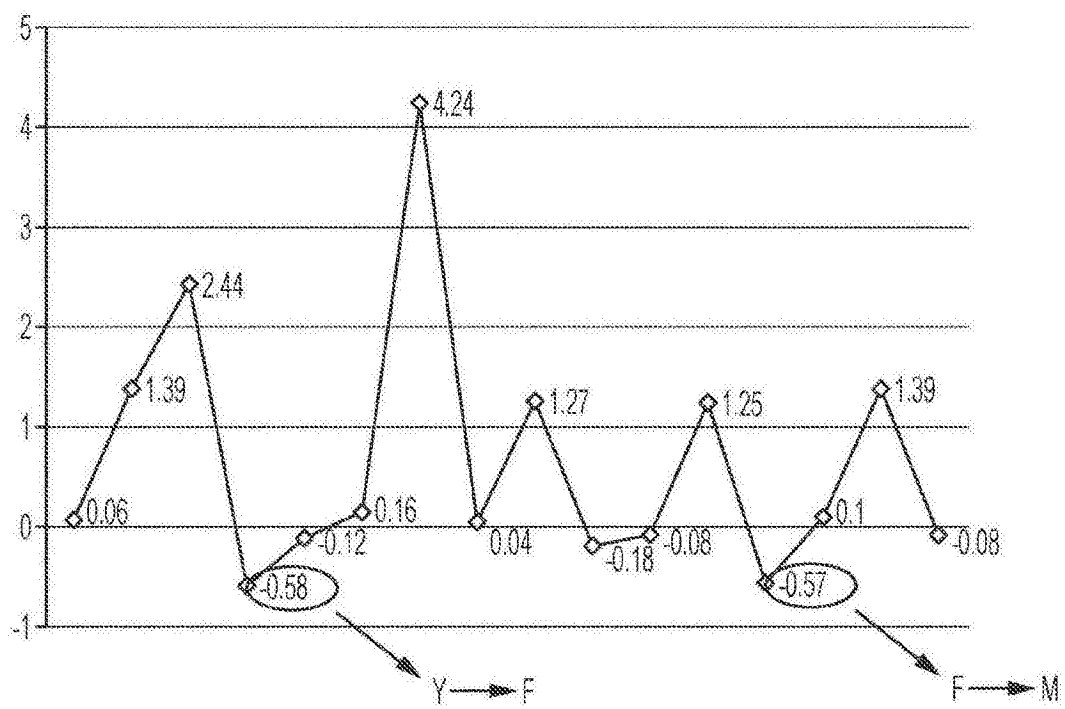


图4A

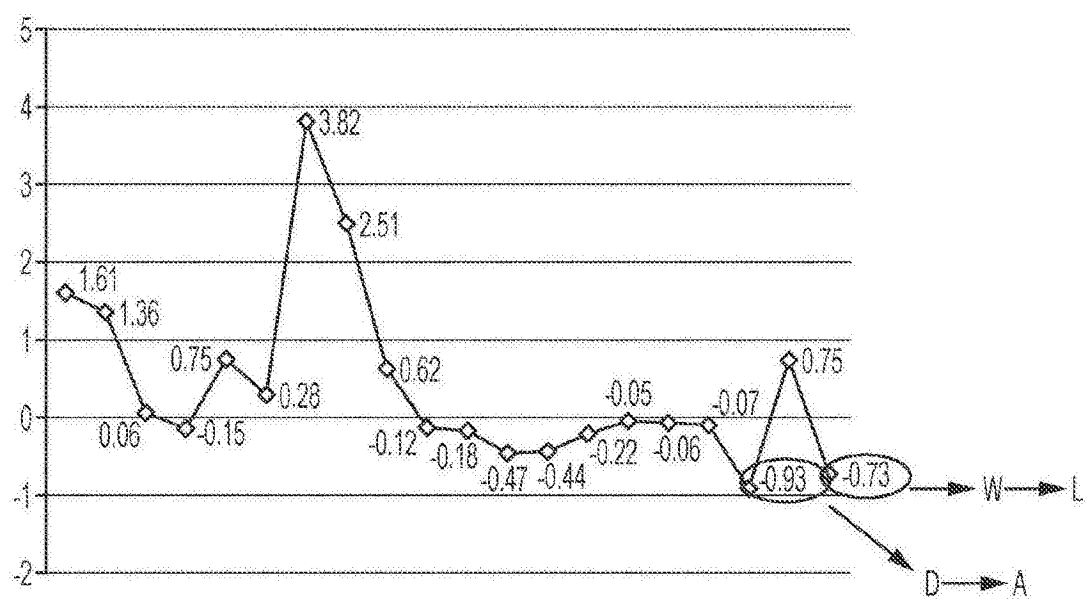


图4B

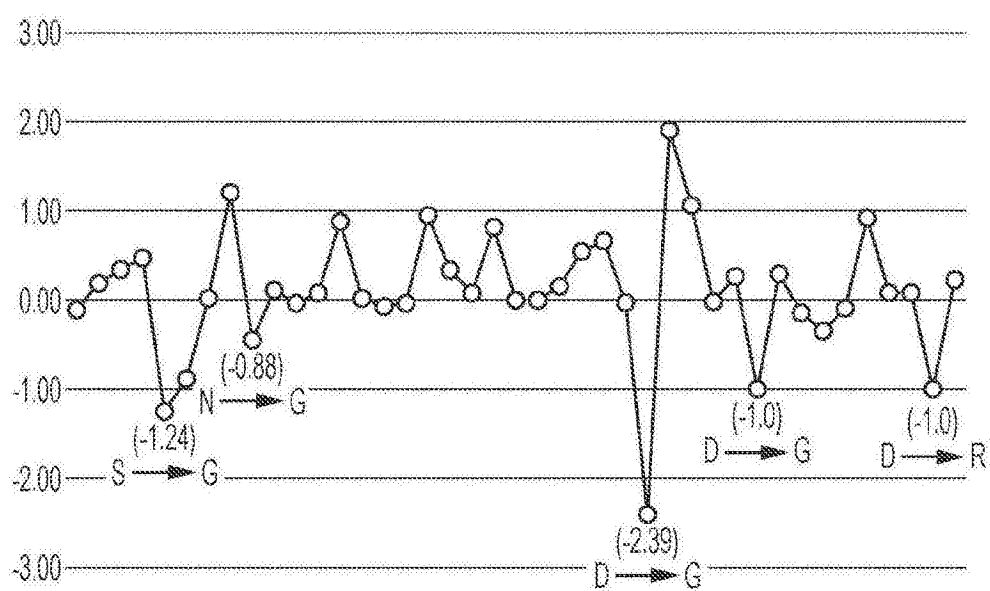


图4C

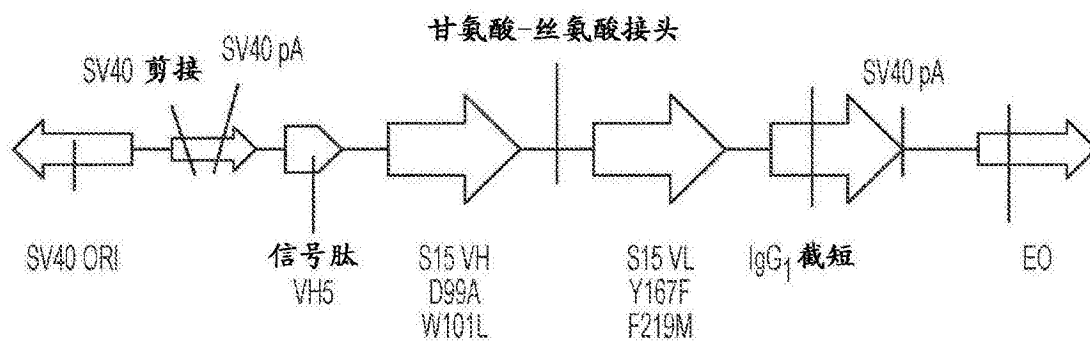


图5A (i)

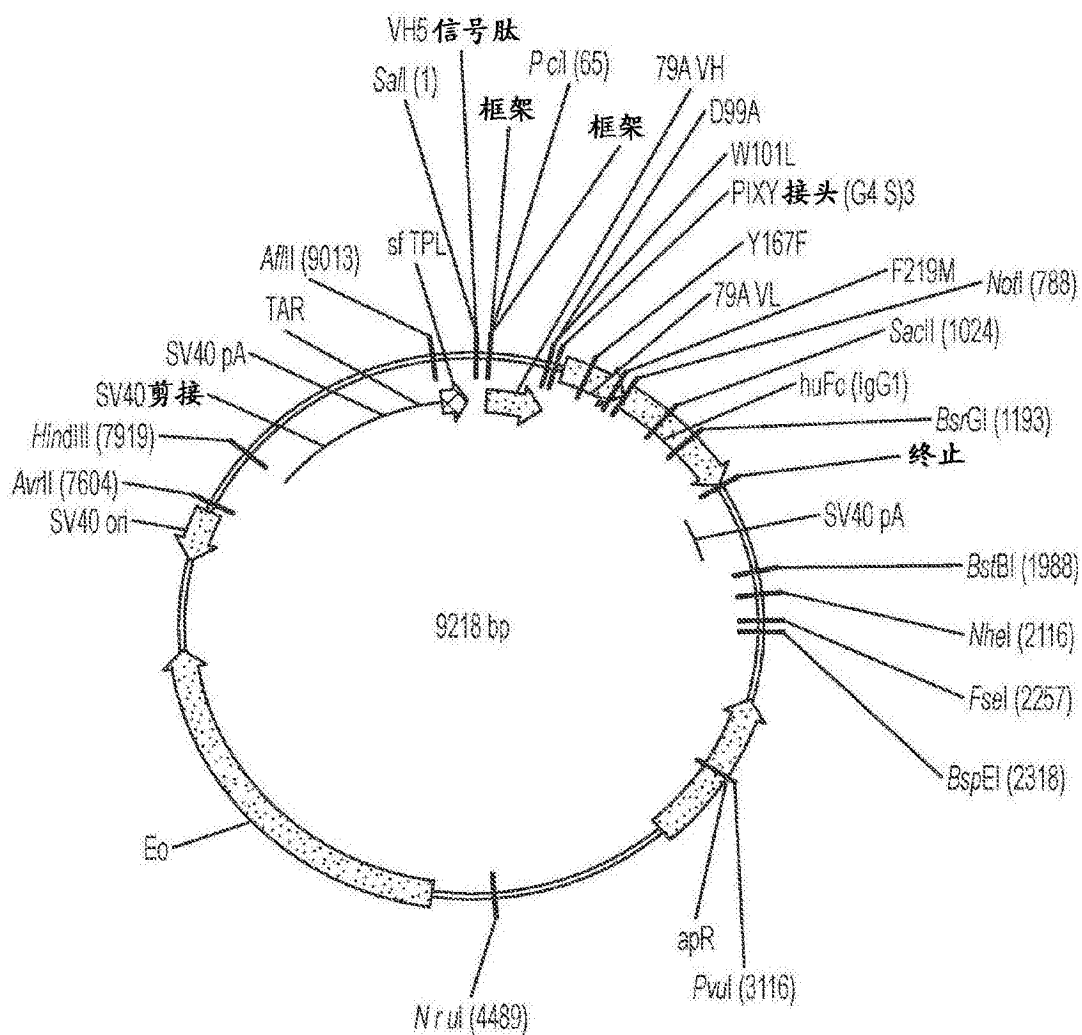


图5A (ii)

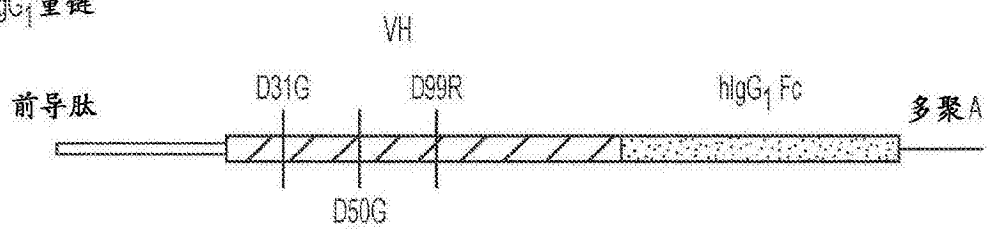
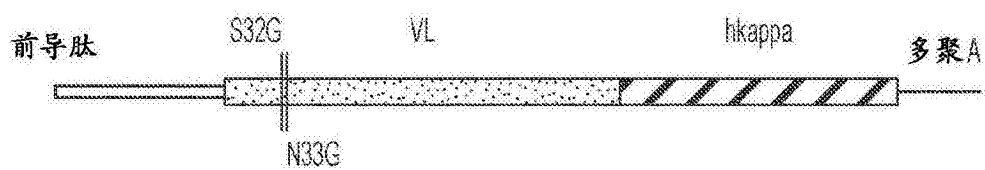
S23-hlgG₁重链S23-h KAPPA₁轻链

图5B

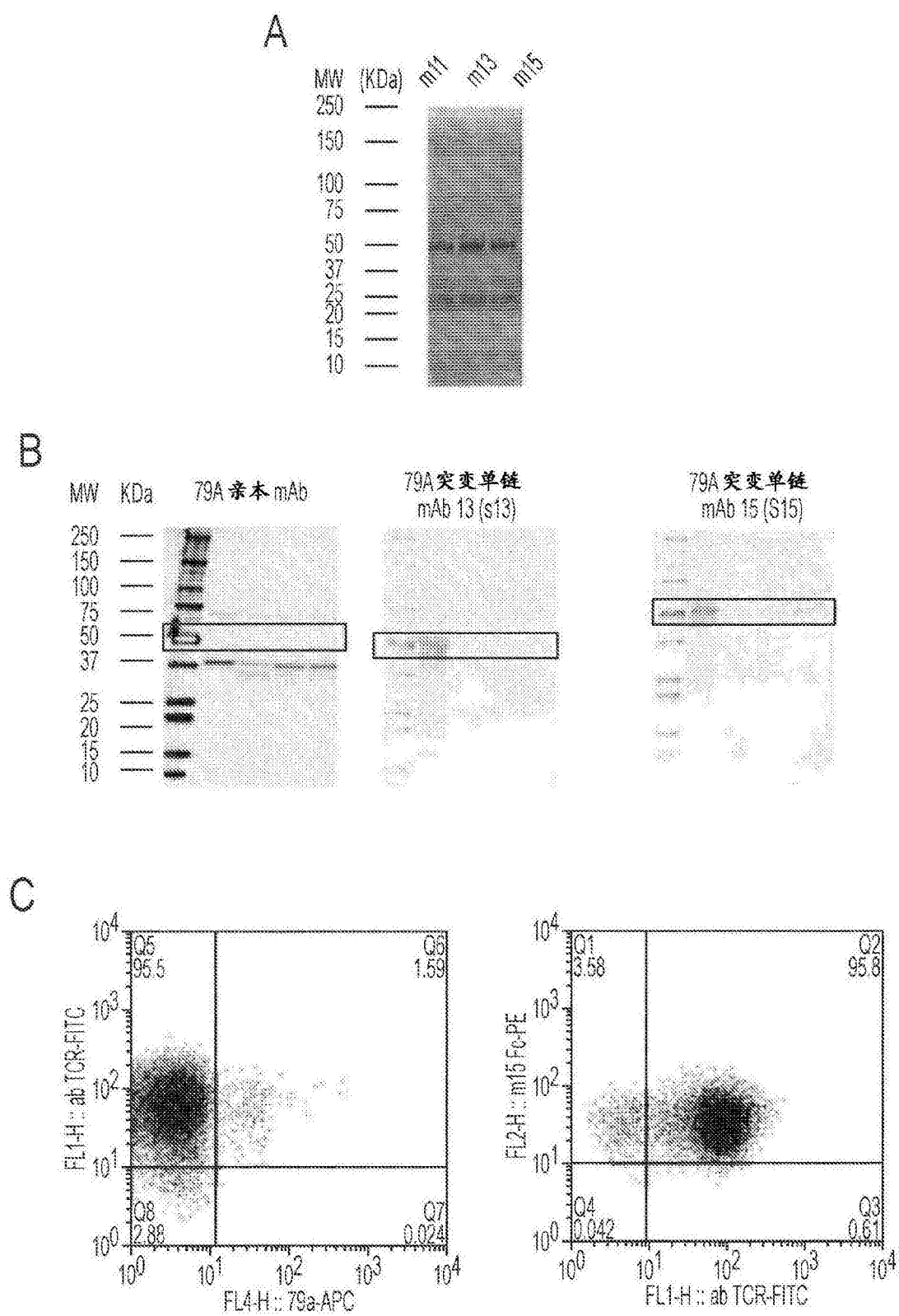


图6A-C

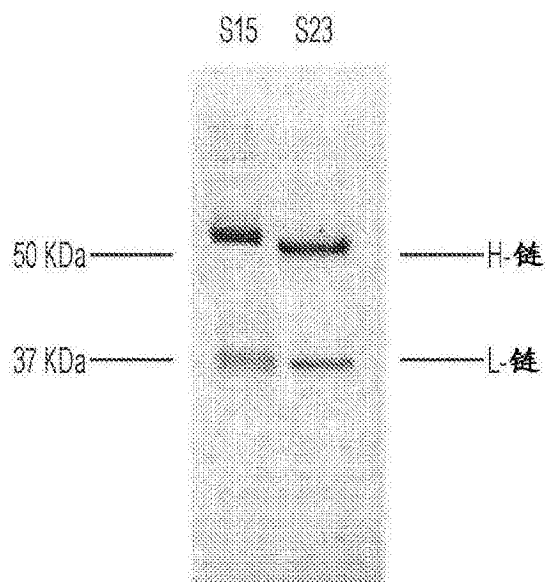


图6D

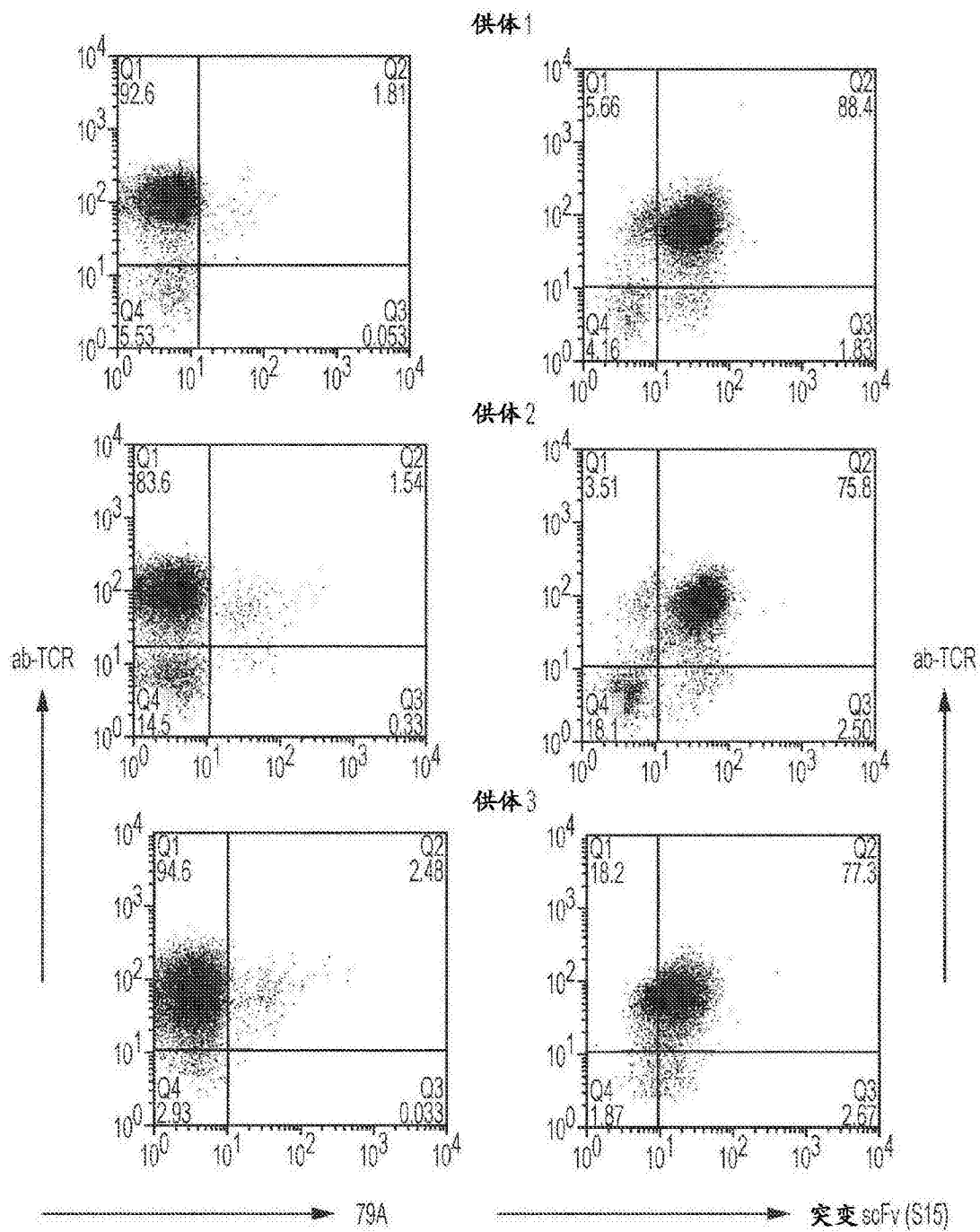


图6E

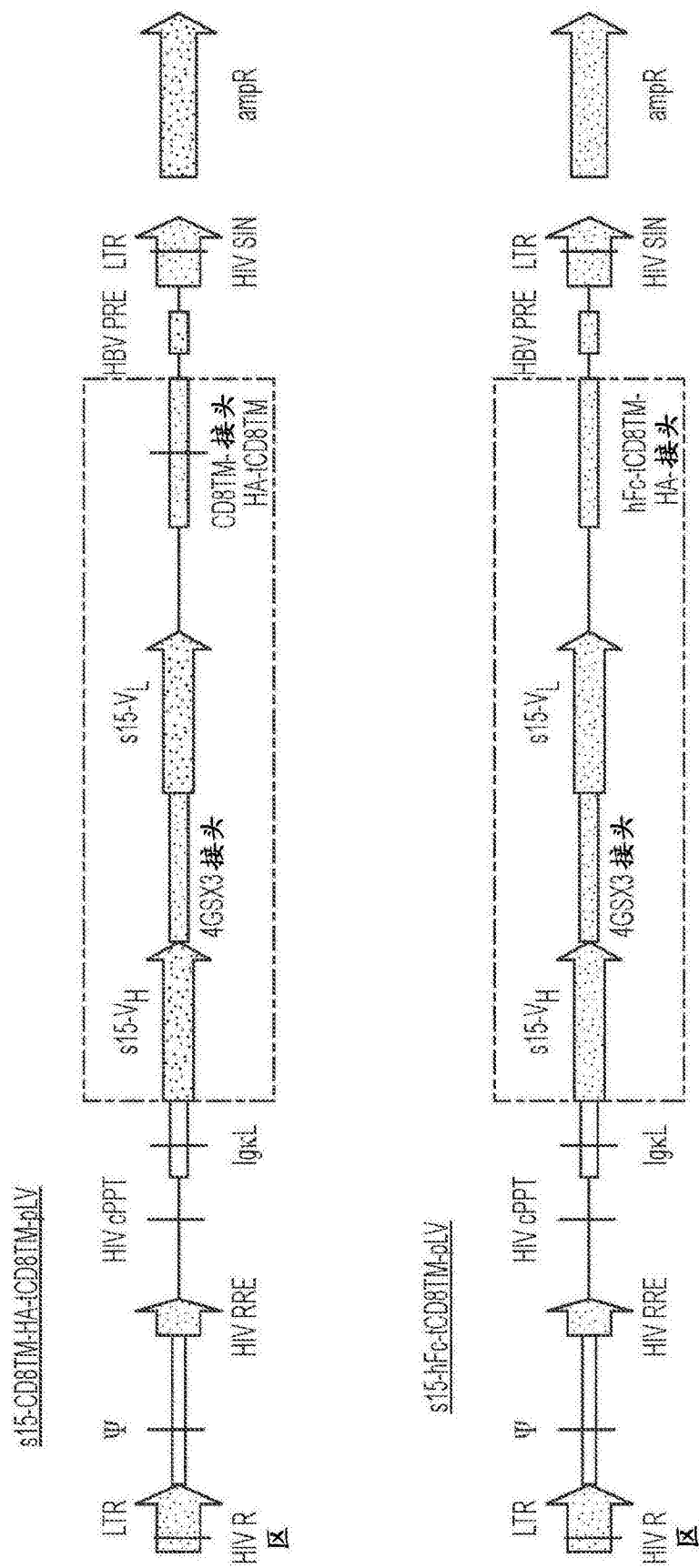


图7A

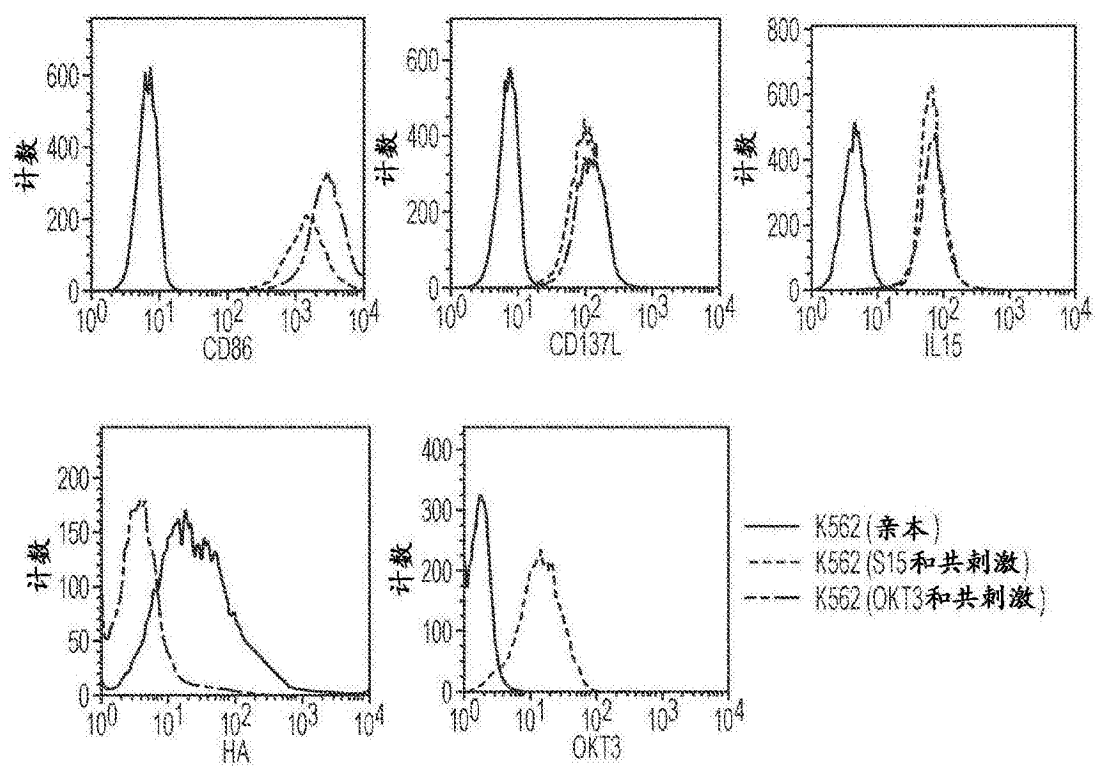


图7B

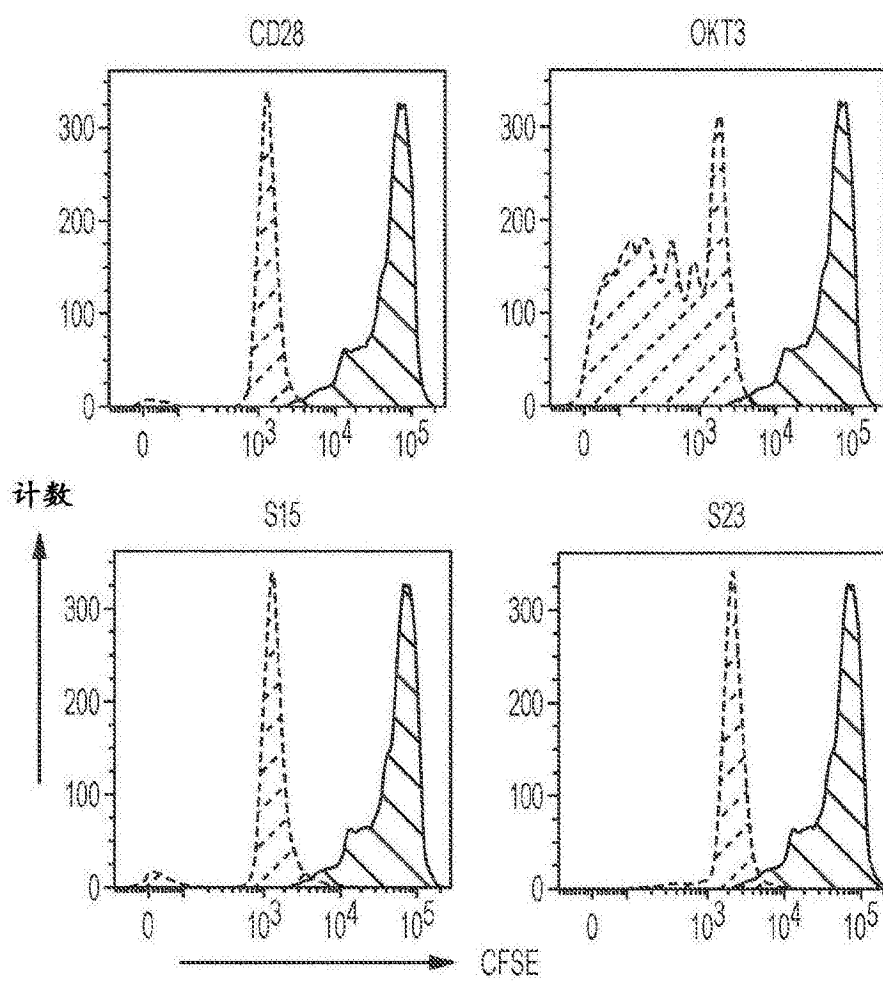


图7C

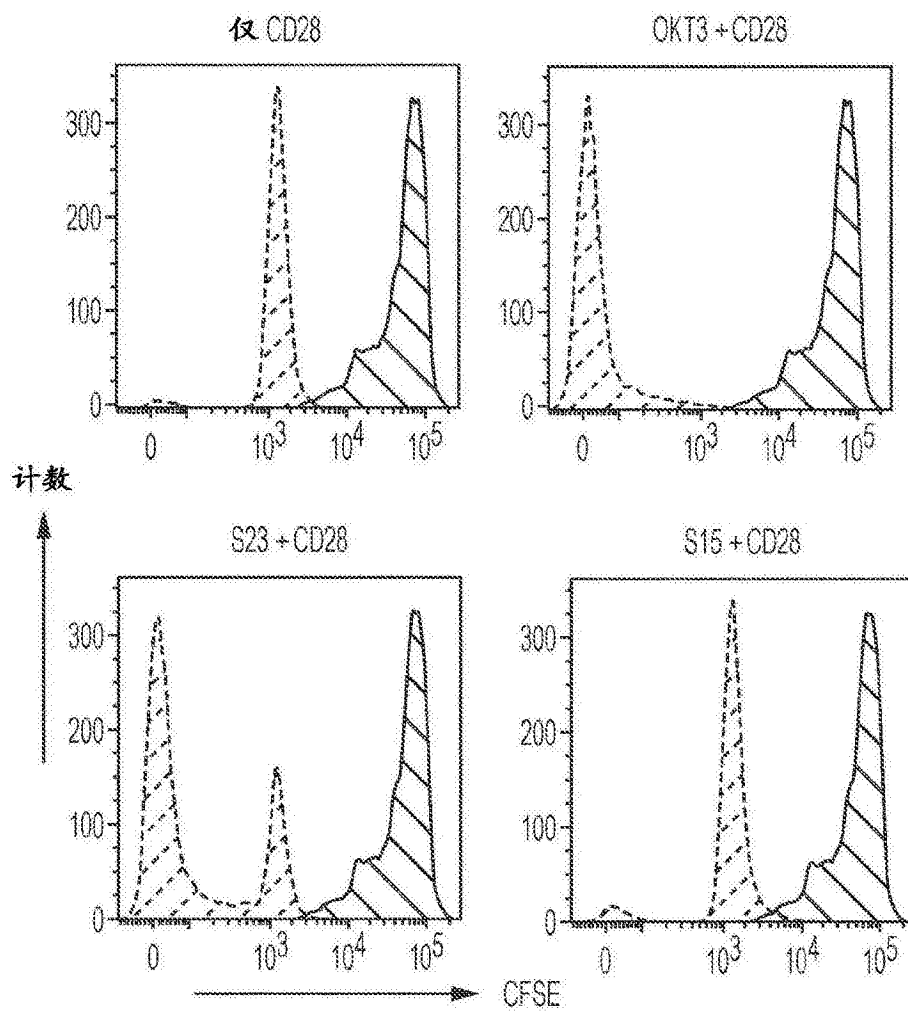


图7D

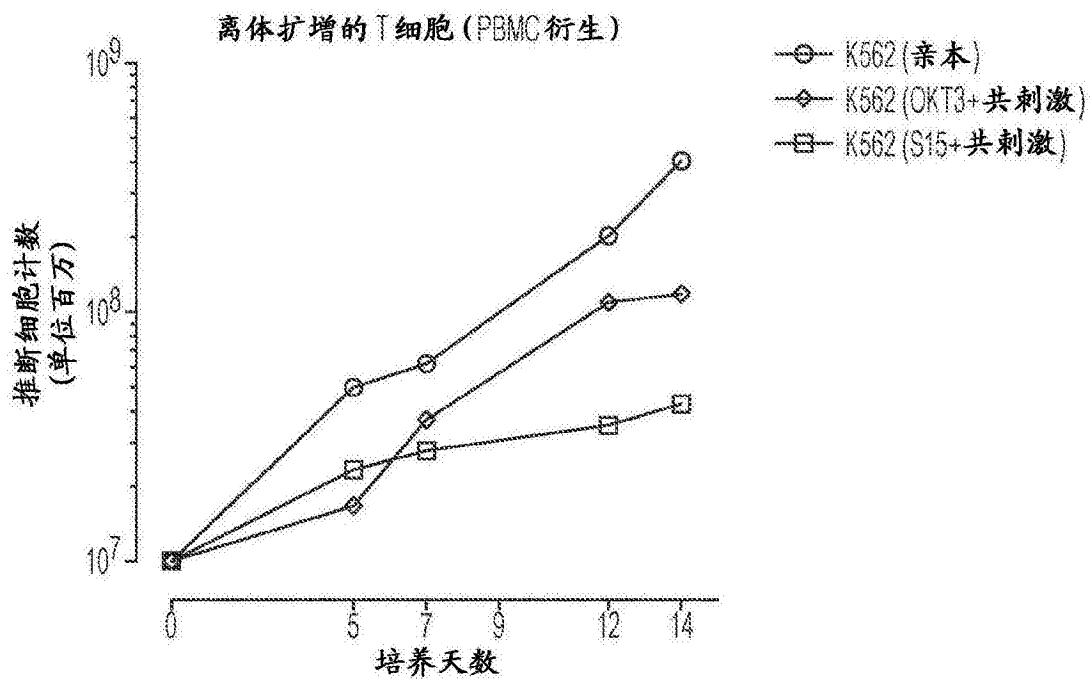


图7E

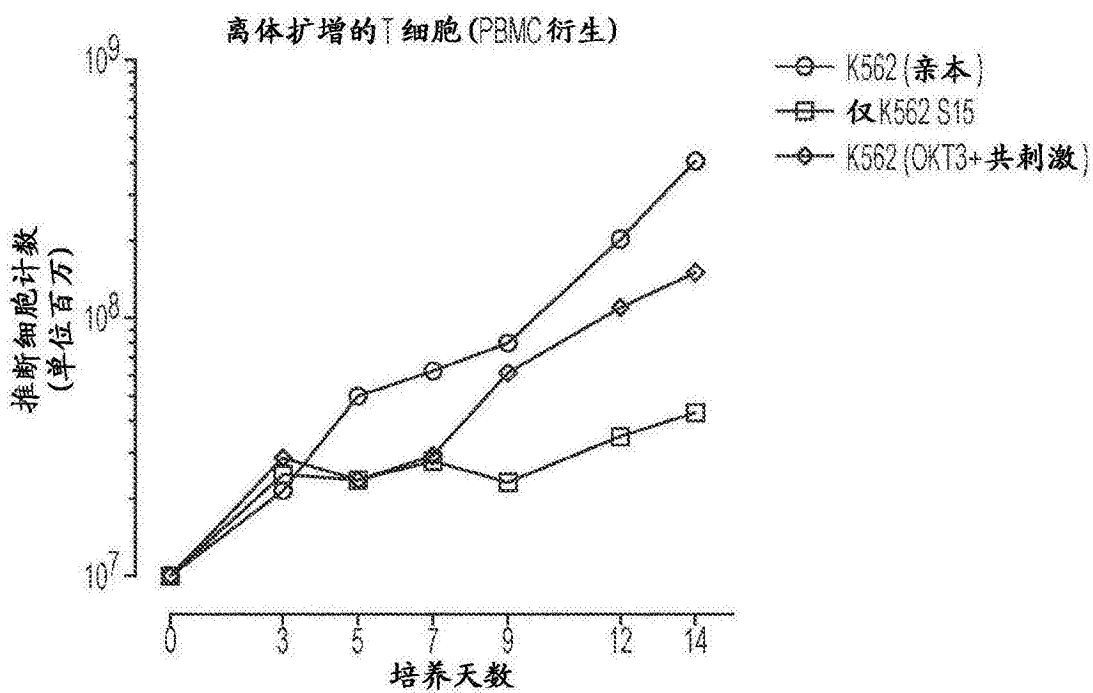


图7F

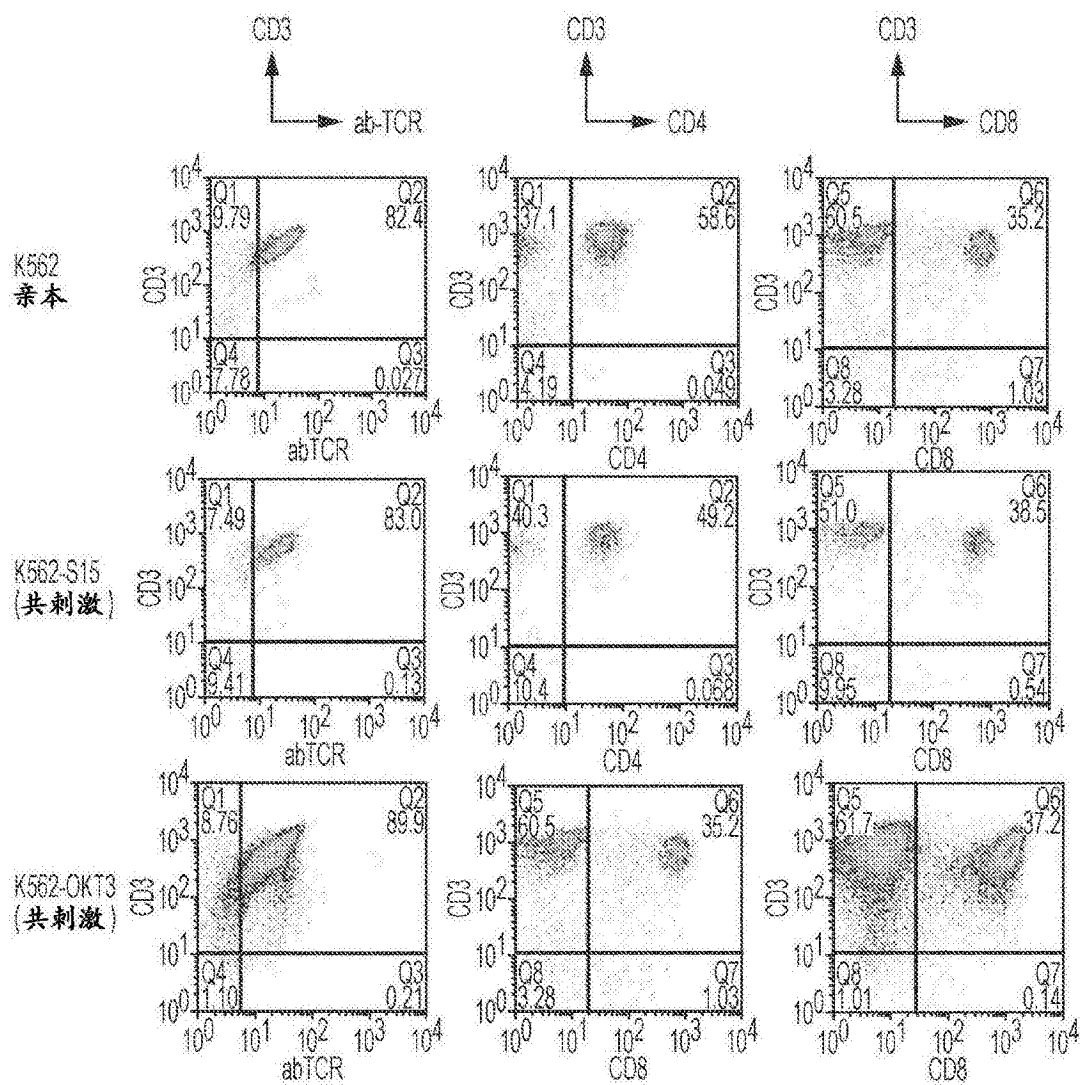


图7G

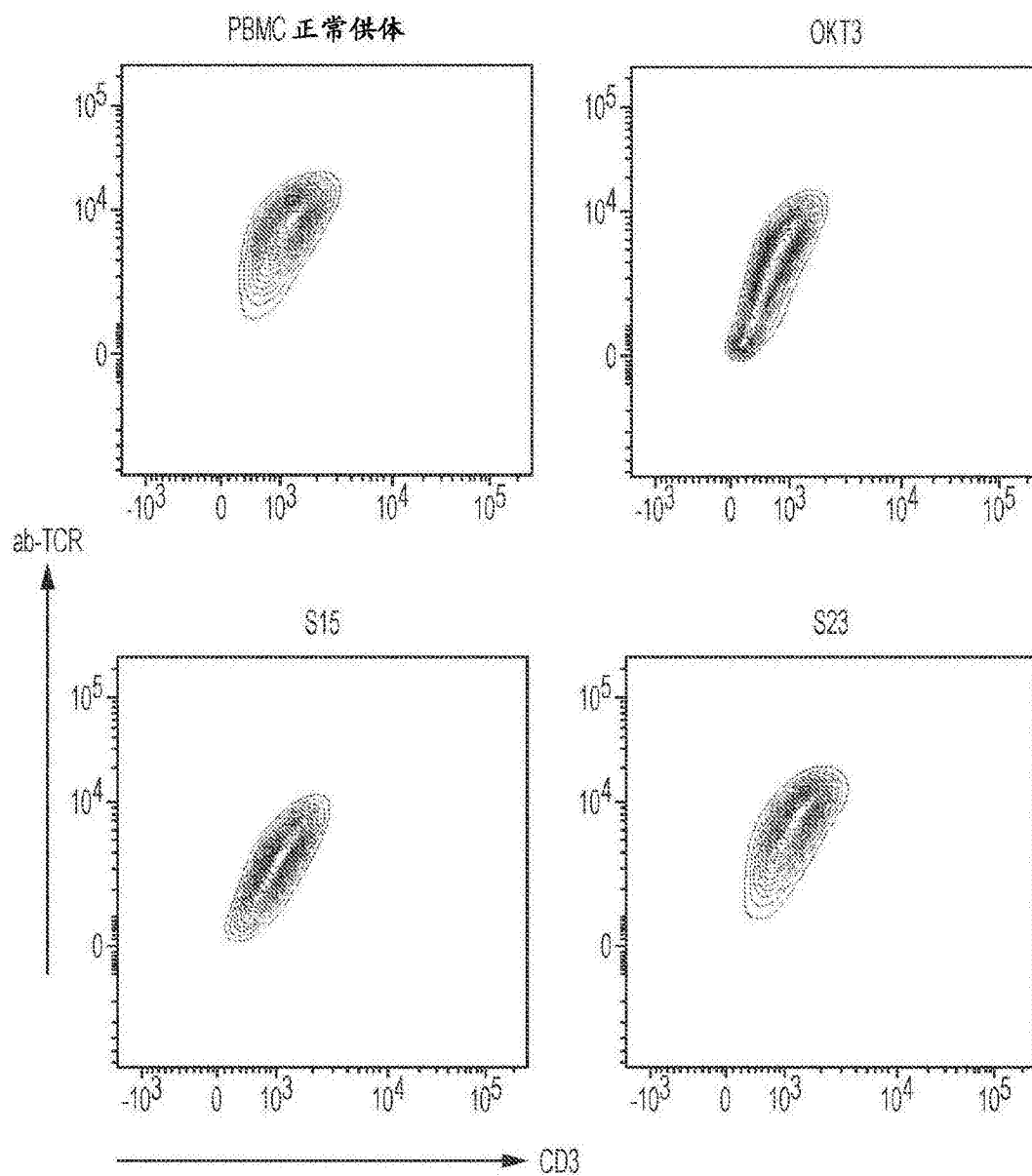


图7H

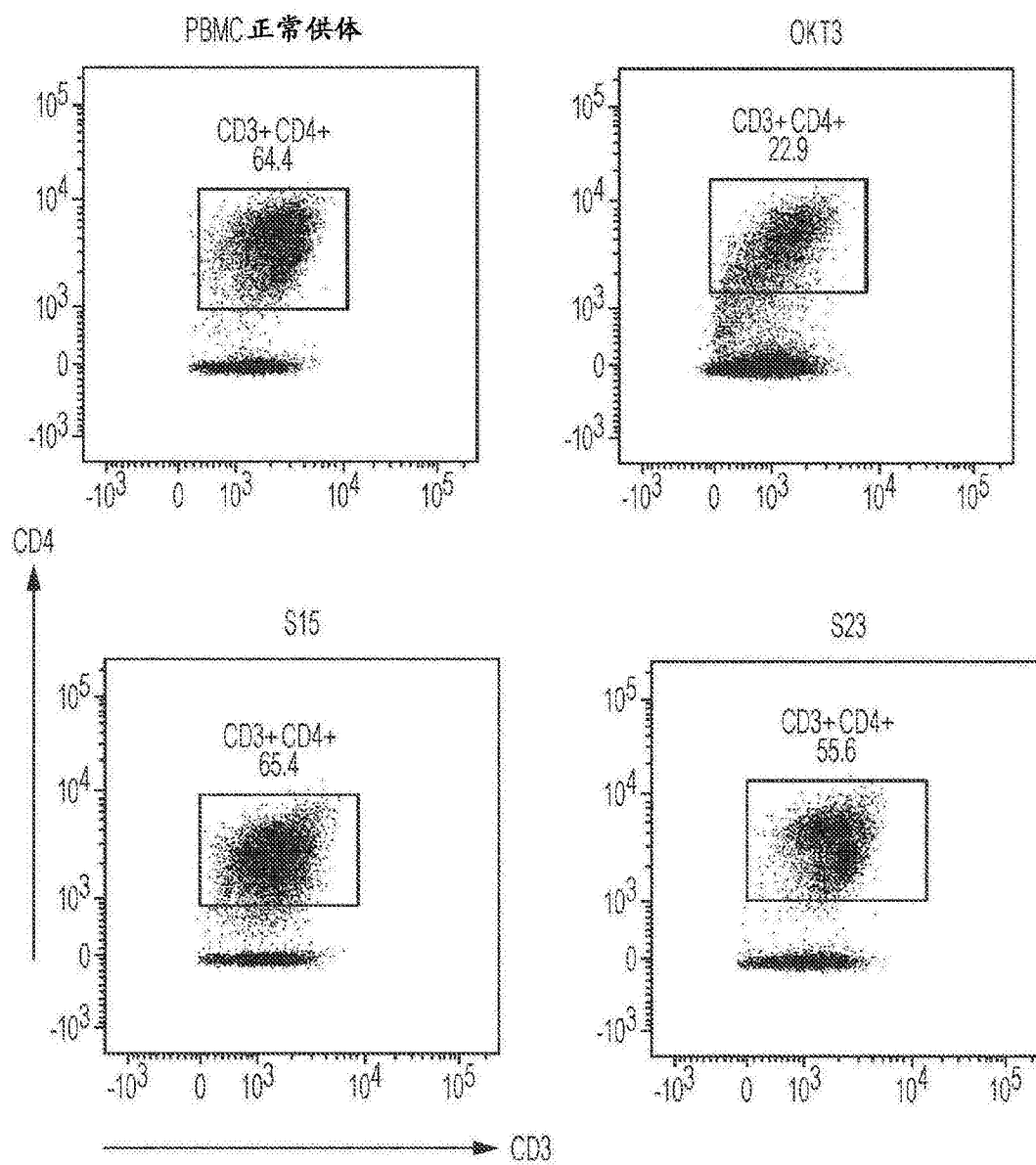


图7I

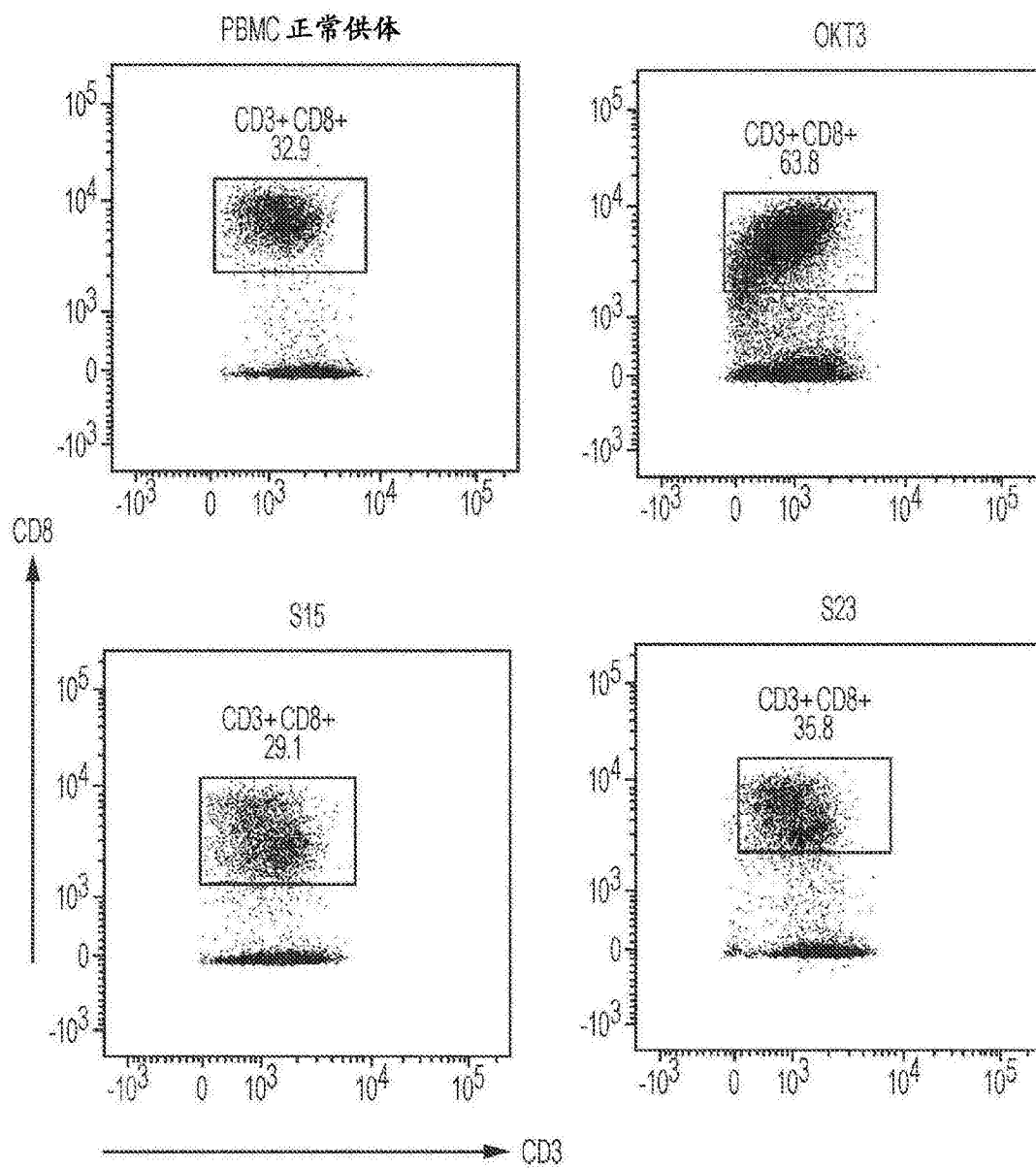


图7J

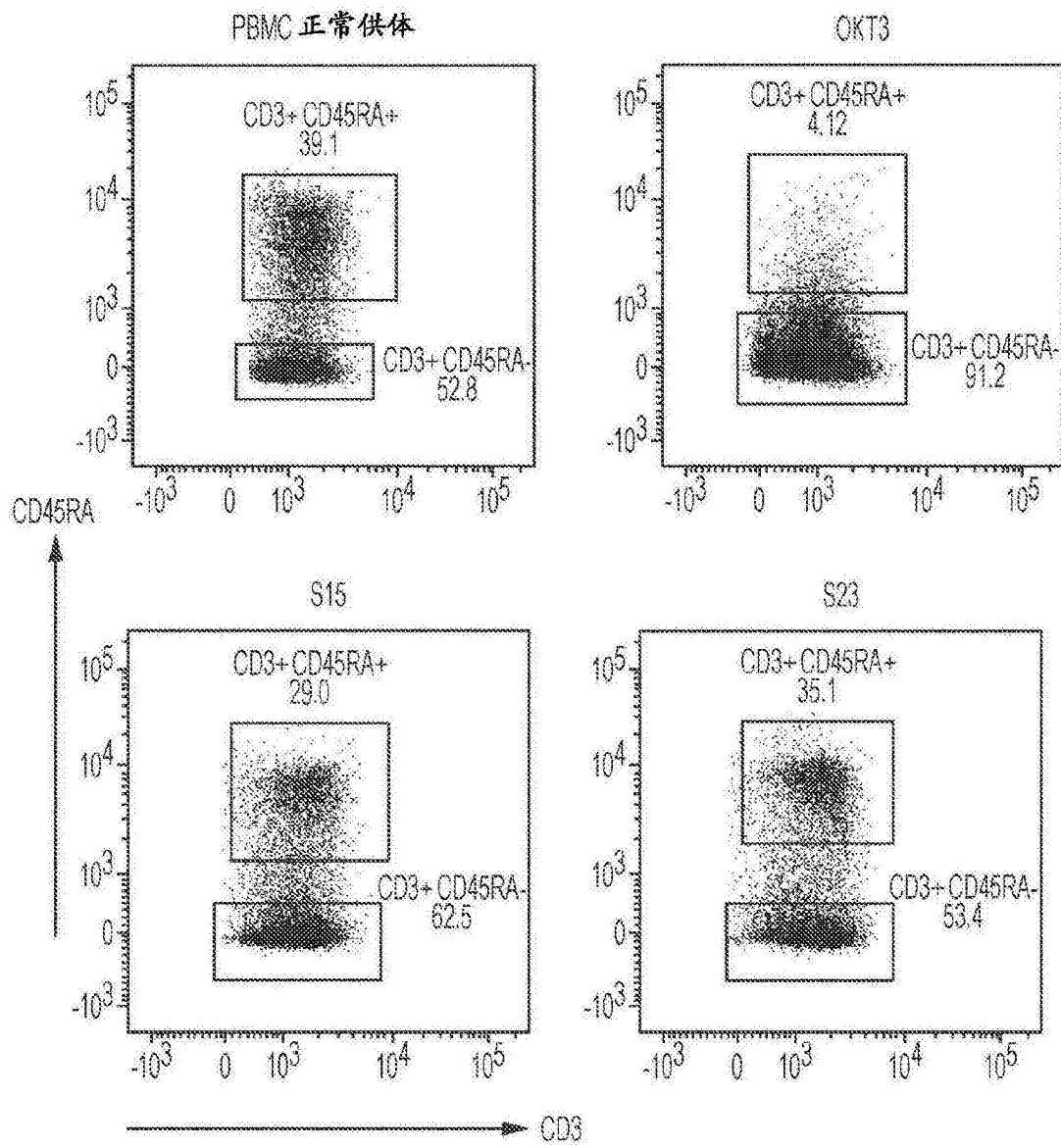


图7K

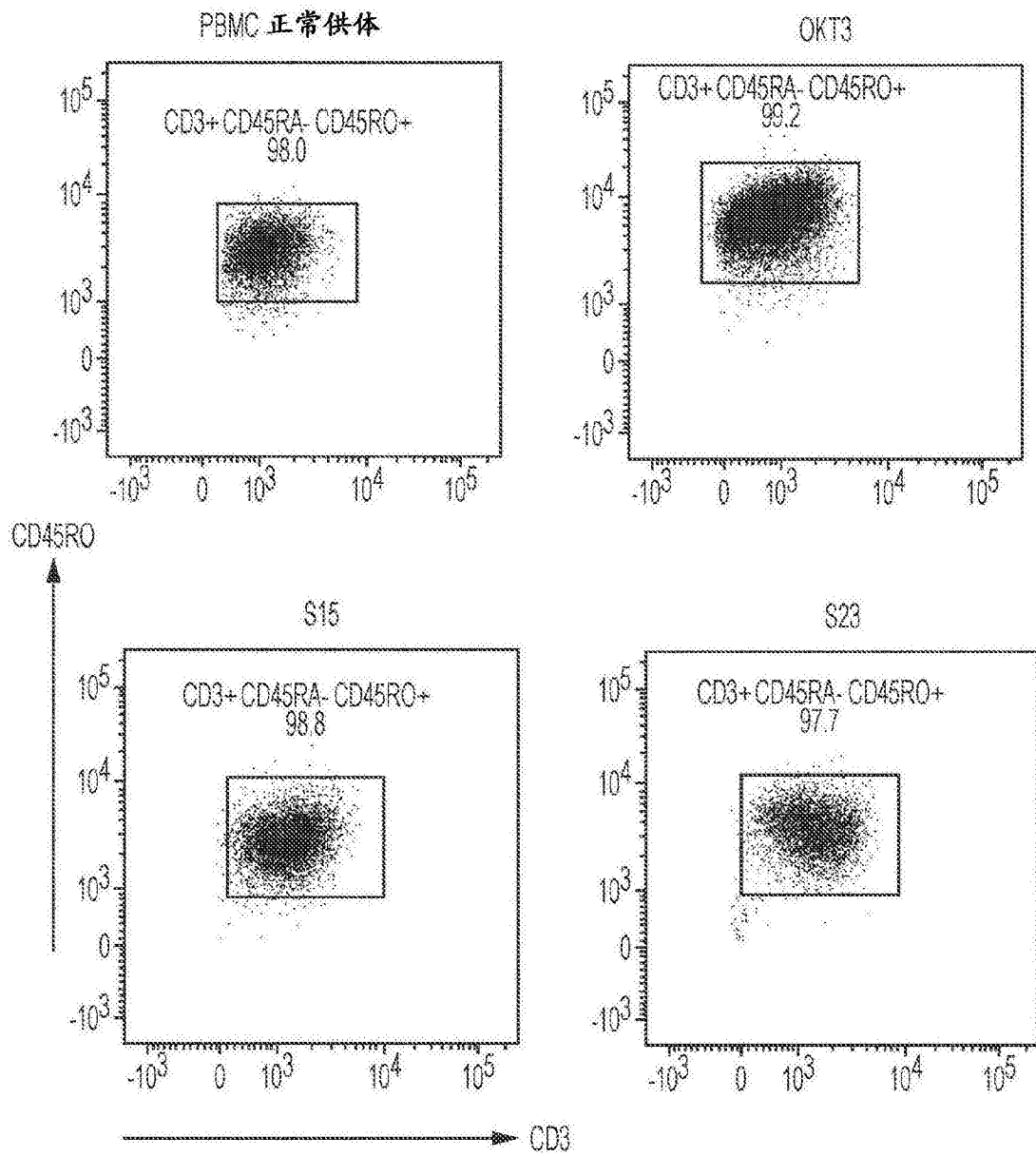


图7L

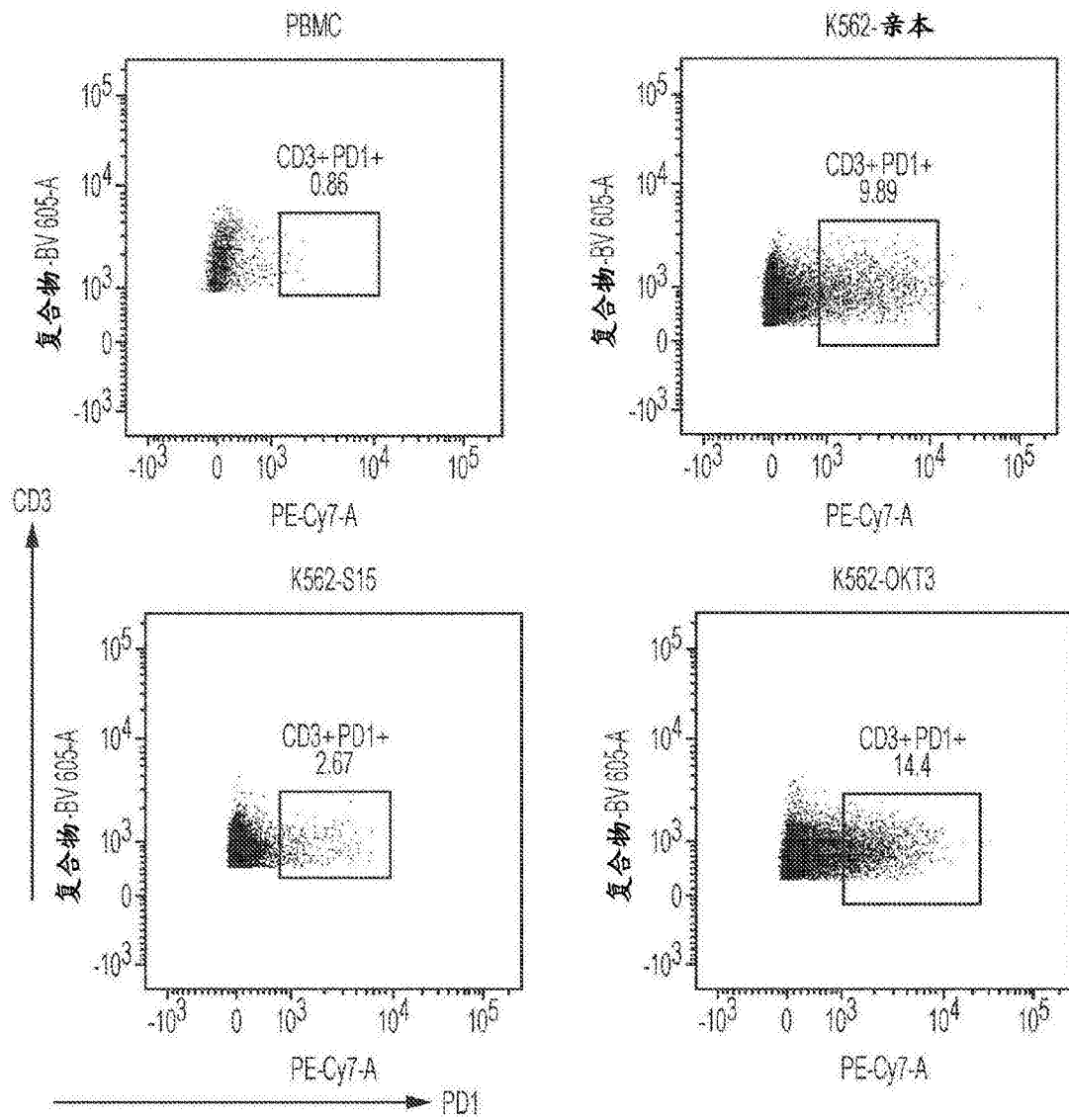


图7M

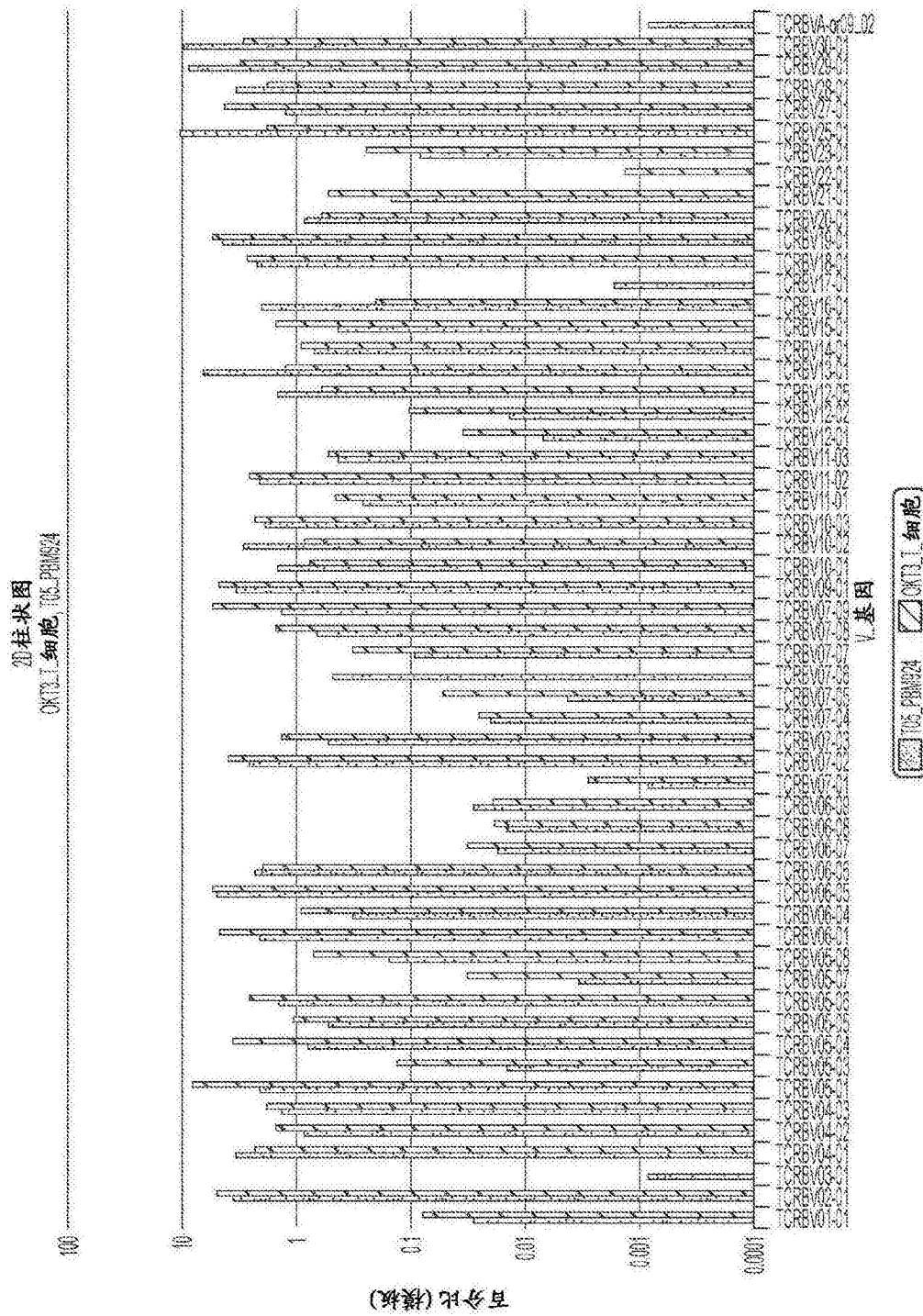


图8A

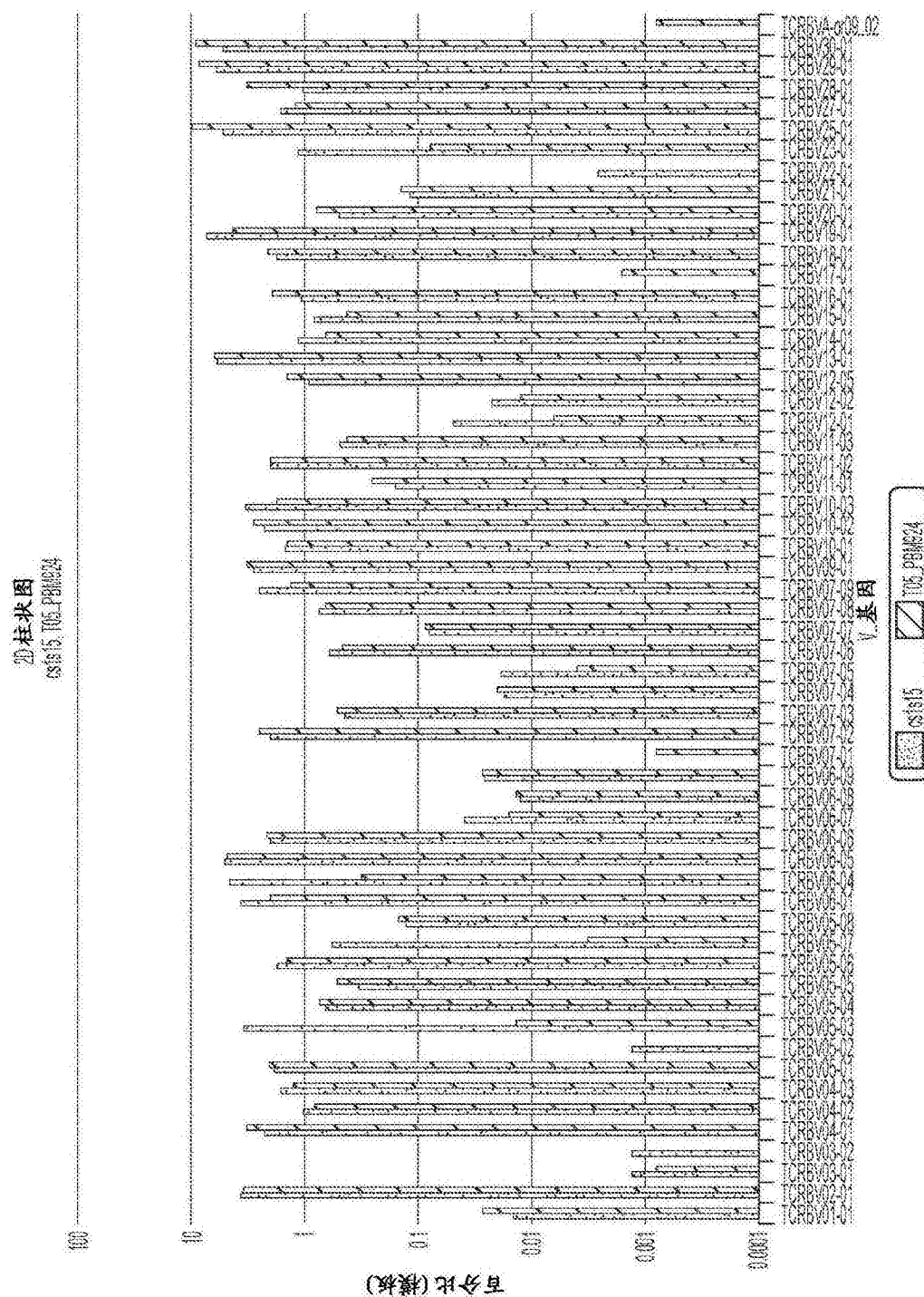


图8A续

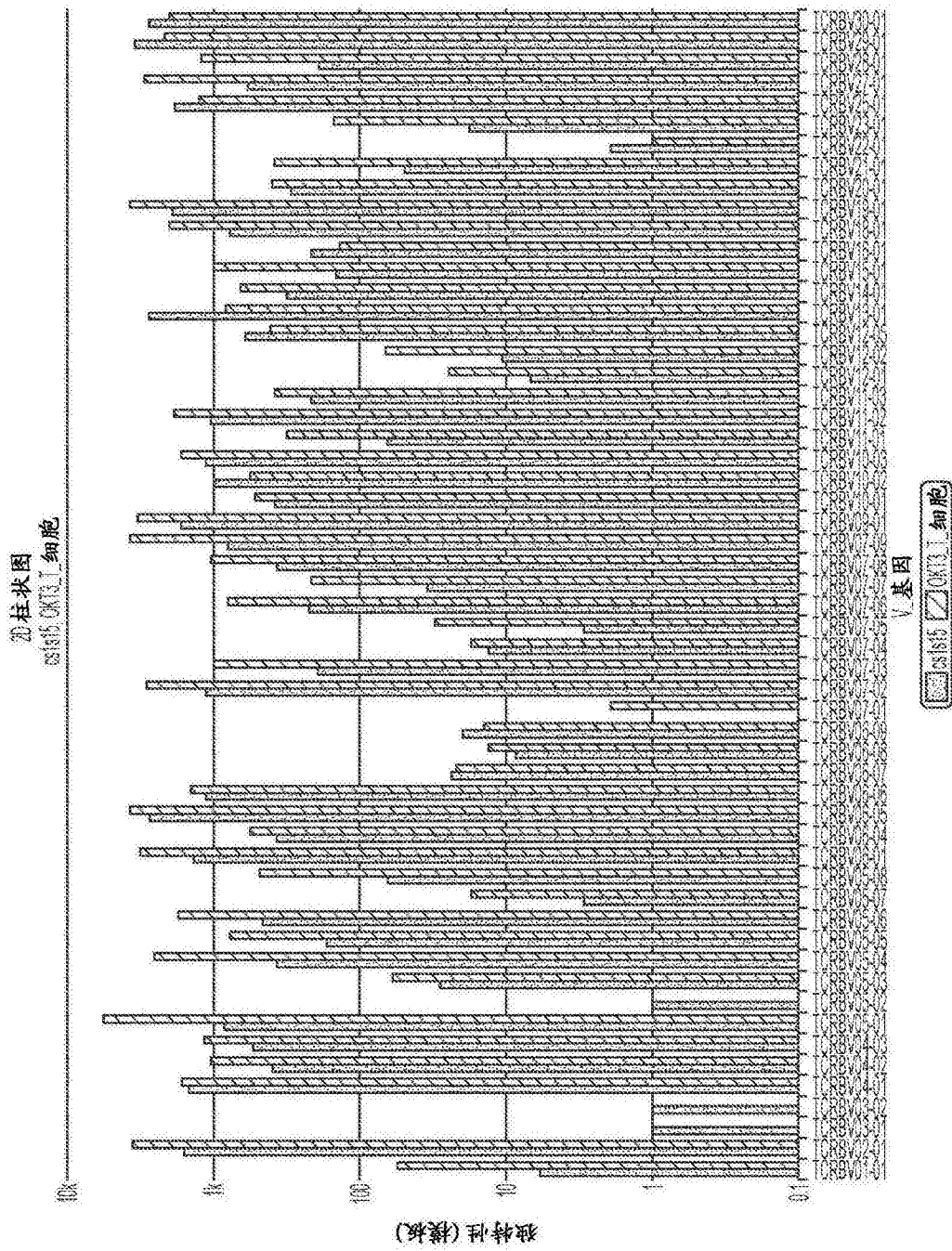


图8B

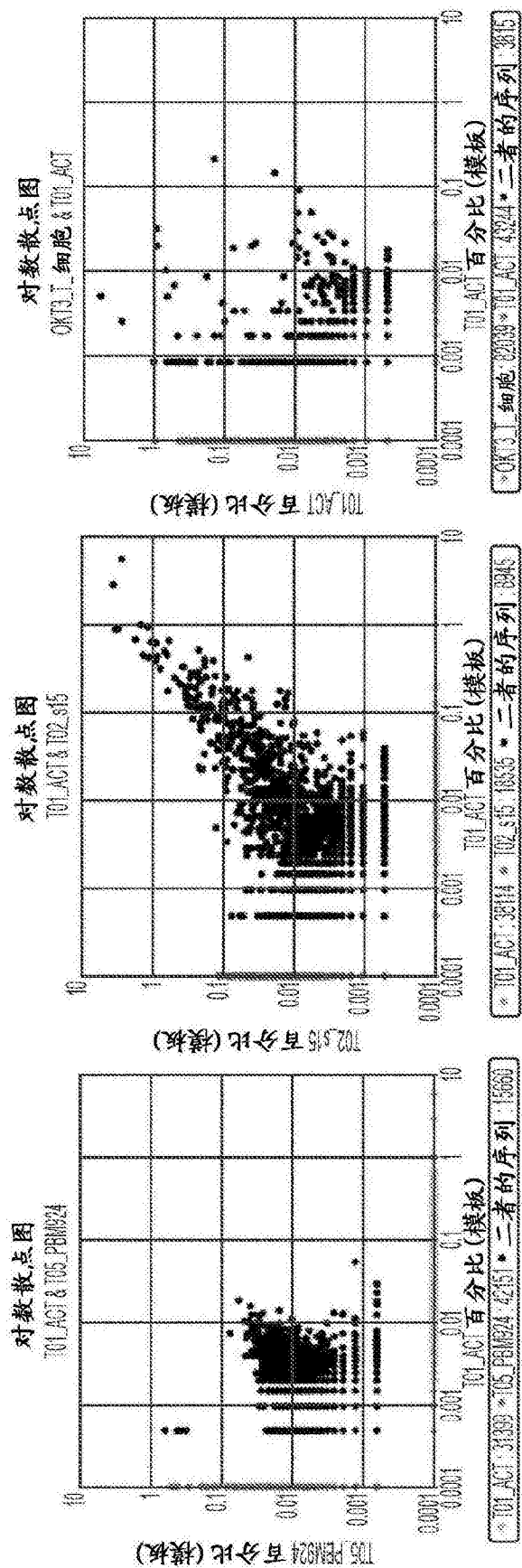


图8C

	OKT3T 细胞	PBMC_T 细胞	CS1S15
OKT3T 细胞		$r^2=0.055$ $O=0.172$	$r^2=0.040$ $O=0.224$
PBMC_T 细胞	$r^2=0.055$ $O=0.172$		$r^2=0.043$ $O=0.472$
CS1S15	$r^2=0.040$ $O=0.224$	$r^2=0.043$ $O=0.472$	

图8D

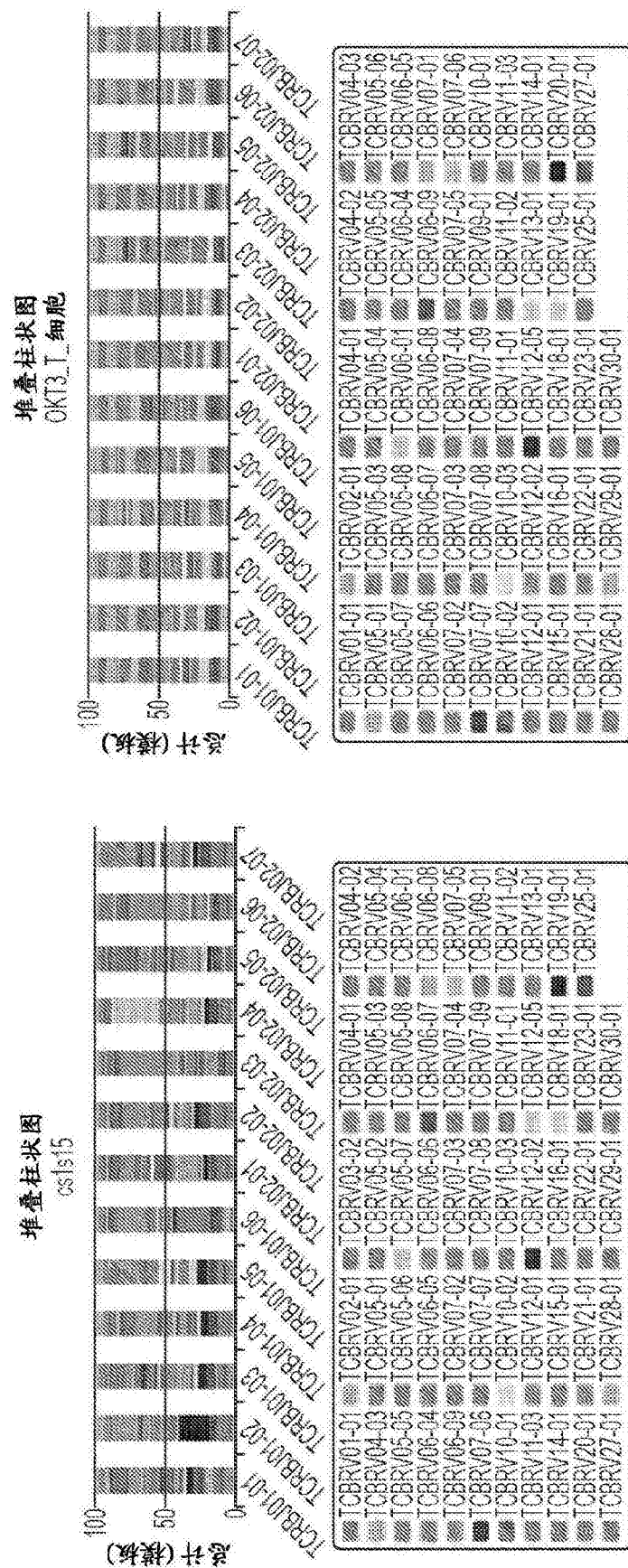


图9

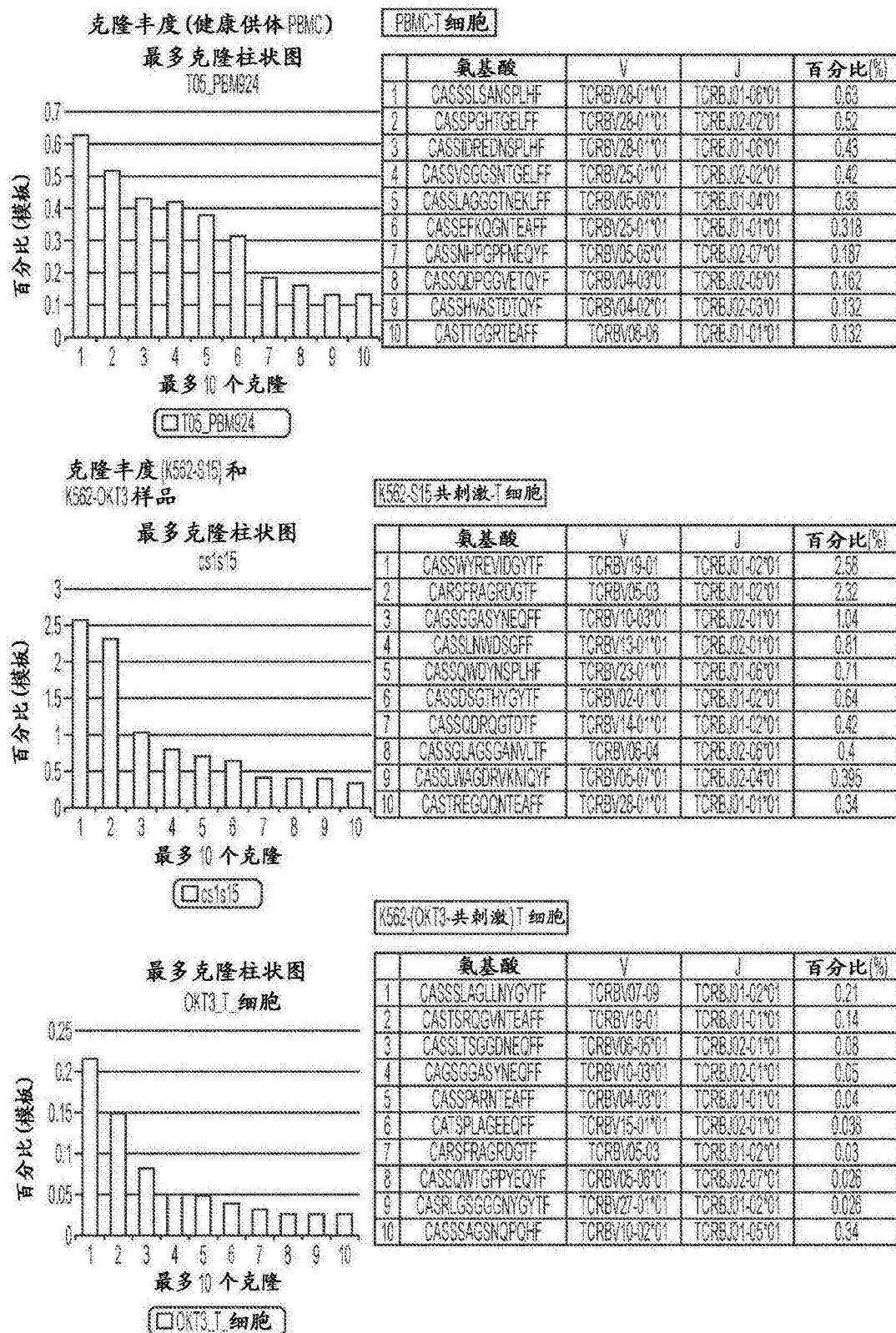


图10

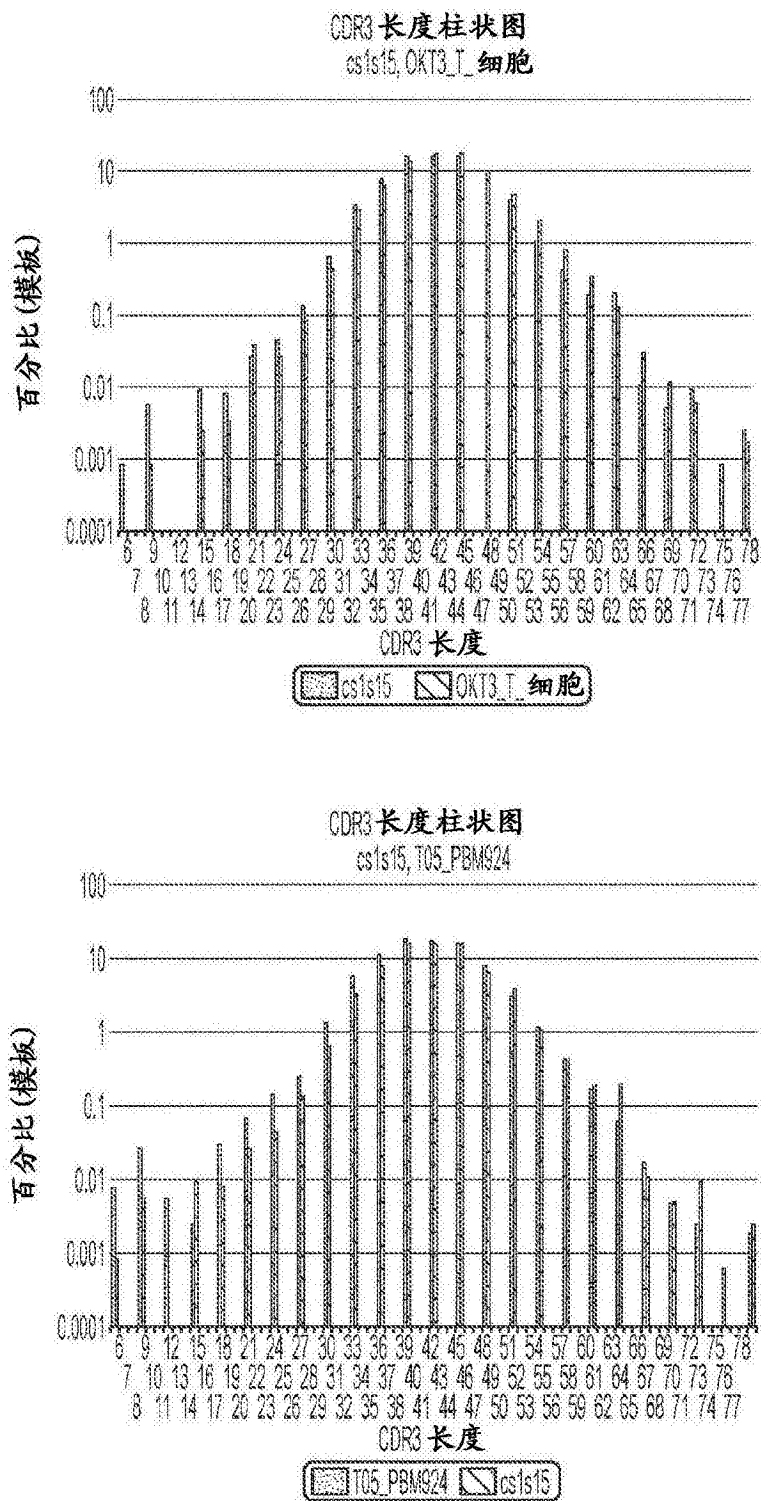


图11