



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 117700549 A

(43) 申请公布日 2024.03.15

(21) 申请号 202311594927.8

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

(22) 申请日 2017.11.16

公司 11021

(30) 优先权数据

专利代理人 吴小明

62/422,770 2016.11.16 US

(51) Int.Cl.

62/557,208 2017.09.12 US

C07K 16/28 (2006.01)

(62) 分案原申请数据

C12N 15/13 (2006.01)

201780083681.4 2017.11.16

A61K 39/395 (2006.01)

(71) 申请人 埃博灵克斯股份有限公司

A61P 35/02 (2006.01)

地址 比利时茨维纳德

(72) 发明人 迪亚娜·范霍里克

权利要求书4页 说明书163页

安内利斯·罗布鲁克

序列表(电子公布) 附图58页

卡特林恩·斯托特勒斯

若昂·维埃拉·爱德华·麦高恩

(54) 发明名称

能够结合CD123和TCR α / β 的T细胞募集多

肽

(57) 摘要

提供了多肽,其结合靶细胞上的CD123和T细胞上的TCR的恒定结构域。所述多肽可用于治疗CD123相关癌症或炎性病症的方法中。

1. 多肽, 优选免疫球蛋白单可变结构域 (ISV), 其特异性结合CD123, 包含分别为FR1至FR4的4个框架区和分别为CDR1至CDR3的3个互补决定区或基本上由分别为FR1至FR4的4个框架区和分别为CDR1至CDR3的3个互补决定区组成, 其中

i) CDR1选自由以下组成的组:

a) SEQ ID NO:11-16; 或

b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列; 条件是与包含不具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比, 包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合, 所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

和/或

ii) CDR2选自由以下组成的组:

c) SEQ ID NO:17-20; 或

d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列; 条件是与包含不具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比, 包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合, 所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

和/或

iii) CDR3选自由以下组成的组:

e) SEQ ID NO:21-25; 或

f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列; 条件是与包含不具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比, 包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合, 所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

2. 根据权利要求1所述的多肽, 其中:

i) CDR1选自由以下组成的组:

a) SEQ ID NO:11-16; 或

b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列, 其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置3、6、7和/或8处(根据Kabat编号的位置28、31、32和/或33); 条件是与包含不具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比, 包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合, 所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

和/或

ii) CDR2选自由以下组成的组:

c) SEQ ID NO:17-20; 或

d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列, 其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置3、6和/或10处(根据Kabat编号的位置52、54和/或58); 条件是与包含不具有所述3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比, 包含具有所述3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合, 所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

和/或

iii) CDR3选自由以下组成的组：

e) SEQ ID NO:21-25; 或

f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的位置3、4和/或5处(根据Kabat编号的位置97、98和/或99);条件是与包含不具有所述3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

3. 根据权利要求1-2中任一项所述的多肽,其中CDR1选自由以下组成的组：

a) SEQ ID NO:11; 或

b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

-在位置3处T已经变为S或P;

-在位置6处I已经变为S;

-在位置7处N已经变为D; 和/或

-在位置8处D已经变为V或A;

条件是与包含不具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的多肽,其中CDR2为SEQ ID NO:17。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的多肽,其中CDR3选自由以下组成的组：

a) SEQ ID NO:21; 或

b) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

-在位置3处P已经变为A;

条件是与包含不具有所述1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有所述1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的多肽,其中

i) CDR1选自由以下组成的组：

a) SEQ ID NO:11; 或

b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

-在位置3处T已经变为S或P;

-在位置6处I已经变为S;

-在位置7处N已经变为D; 和/或

-在位置8处D已经变为V或A;

条件是与包含不具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有所述4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

和

ii) CDR2是SEQ ID NO:17;

和

iii) CDR3选自由以下组成的组：

c) SEQ ID NO:21; 或

d) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列, 其中
-在位置3处P已经变为A;

条件是与包含不具有所述1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比, 包含具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合, 所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的多肽, 其中CDR1选自由SEQ ID NO:11-15组成的组, CDR2是SEQ ID NO:17, 和CDR3选自由SEQ ID NO:21-22组成的组。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的多肽, 其中CDR1是SEQ ID NO:11, CDR2是SEQ ID NO:17, 和CDR3是SEQ ID NO:21。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的多肽, 其中所述多肽是选自SEQ ID NO:1-6的ISV, 或者与SEQ ID NO:1-6之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。

10. 根据权利要求1-2中任一项所述的多肽, 其中CDR1是SEQ ID NO:16。

11. 根据权利要求1、2或10中任一项所述的多肽, 其中CDR2选自由以下组成的组：

a) SEQ ID NO:18; 或

b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列, 其中
-在位置3处Y已经变为W;
-在位置6处N已经变为S; 和/或
-在位置10处Q已经变为E;

条件是与包含不具有所述3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比, 包含具有所述3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合, 所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

12. 根据权利要求1、2、10或11中任一项所述的多肽, 其中CDR3选自由以下组成的组：

a) SEQ ID NO:23; 或

b) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列, 其中
-在位置4处E已经变为R; 和/或
-在位置5处T已经变为D或Y;

条件是与包含不具有所述2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比, 包含具有所述2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合, 所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

13. 根据权利要求1、2或11至12中任一项所述的多肽, 其中CDR1为SEQ ID NO:16, CDR2选自由SEQ ID NO:18-20组成的组, 和CDR3选自由SEQ ID NO:23-25组成的组, 优选其中CDR1是SEQ ID NO:16, CDR2是SEQ ID NO:18, 并且CDR3是SEQ ID NO:23。

14. 根据权利要求1、2或11至13中任一项所述的多肽, 其中所述多肽是选自SEQ ID NO:7-10的ISV, 或者是与SEQ ID NO:7-10之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的多肽,其中所述多肽是ISV,该ISV:

i) 是SEQ ID NO:1-10的免疫球蛋白单可变结构域之一的序列优化的变体;和/或

ii) 与SEQ ID NO:1-10的至少一个免疫球蛋白单可变结构域具有至少80%的氨基酸同一性,其中为了确定氨基酸同一性程度的目的,不考虑形成CDR序列的氨基酸残基;

并且其中

iii) 优选地,根据Kabat编号的位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108处的一个或更多个氨基酸残基选自WO 08/020079的表A-3至表A-8中提到的特征残基。

16. 多肽,其包含两个或更多个特异性结合CD123的ISV或者基本上由两个或更多个特异性结合CD123的ISV组成,其中所述ISV选自根据权利要求9或14中任一项中定义的ISV。

17. 根据权利要求15所述的多肽,其中所述多肽包含第一ISV和第二ISV,其中第一ISV如权利要求9中限定并且第二ISV如权利要求14中限定,优选地,其中所述第二ISV位于所述第一ISV的N端或者其中所述第二ISV位于所述第一ISV的C端。

18. 一种构建体,其包含权利要求1-17中任一项中限定的多肽,并且进一步包含一个或多个的其他基团、残基或结合单元,任选地通过一个或多个肽接头连接,其中与权利要求1-17中任一项中限定的相应多肽相比,所述一个或多个的其他基团、残基或结合单元为所述构建体提供增加的半衰期。

19. 根据权利要求15所述的构建体,其中为所述构建体提供增加的半衰期的所述一个或多个其他结合单元选自可与血清白蛋白或血清免疫球蛋白结合的结合单元。

20. 根据权利要求19所述的构建体,其中所述血清白蛋白是人血清白蛋白。

21. 根据权利要求19所述的构建体,其中所述血清免疫球蛋白是IgG。

22. 一种核酸,其编码权利要求1-17中任一项中限定的多肽或权利要求18至21中任一项中限定的构建体,所述多肽或构建体是这样的:它可以通过表达编码其的核酸而获得,任选地其是遗传构建体的形式。

23. 一种宿主或宿主细胞,其包含:权利要求22中限定的核酸或遗传构建体,或者包含权利要求19中限定的核酸和/或遗传构建体的表达载体。

24. 用于产生权利要求1-17中任一项中限定的多肽或权利要求18-21中任一项中限定的构建体的方法,所述多肽或构建体是这样的:它可以通过表达编码其的核酸而获得,所述方法至少包括以下步骤:

a) 在合适的宿主细胞或宿主生物体或另一个合适的表达系统中,表达权利要求22中限定的核酸;任选地随后

b) 分离和/或纯化权利要求1-17中任一项中限定的多肽或权利要求18-21中任一项中限定的构建体。

25. 一种组合物,其包含至少一种权利要求1-17中任一项中限定的多肽、或权利要求18-21中任一项中限定的构建体、或权利要求22中限定的核酸。

26. 权利要求1-17中任一项中限定的多肽、权利要求18-21中任一项中限定的构建体、或权利要求25中限定的组合物在制备药物中的用途,所述药物用于预防、治疗和/或改善CD123相关的疾病或病症,其中所述CD123相关疾病或病症是白血病,包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病。

能够结合CD123和TCR α / β 的T细胞募集多肽

[0001] 本申请是申请日为2017年11月16日、发明名称为“能够结合CD123和TCR α / β 的T细胞募集多肽”的中国专利申请No. 201780083681.4的分案申请。

发明领域

[0002] 本发明提供多特异性T细胞募集多肽,其包含一个特异性结合T细胞受体 (TCR) 的恒定结构域的免疫球蛋白单可变结构域,和一个或多个结合靶细胞上表达的CD123的免疫球蛋白单可变结构域。本发明还涉及用于这些多特异性多肽的单价CD123结合多肽。本发明还提供了编码所述多肽的核酸以及用于产生本发明多肽的载体、宿主和方法。本发明还涉及利用本发明多肽的治疗方法和提供本发明多肽的试剂盒。

背景技术

[0003] CD123 (白介素3受体的 α 亚基, IL-3Ra) 是75kDa糖蛋白,其在用N-糖苷酶消化后变为43kDa (Sato等, 1993, Blood 82: 752-761)。CD123由三个细胞外结构域、跨膜结构域和短细胞内区域组成。N-端细胞外结构域对于CD123与IL-3的相互作用有显著贡献,而细胞内区域是信号传导所必需的 (Barry等, 1997, Blood 89:842-852)。CD123以低亲和力特异性结合IL-3。CD123与本身不与IL-3结合的共同 β (β c) 亚基的异二聚化导致IL-3R的形成,IL-3R是IL-3的高亲和力受体。 β c亚基在信号转导中起重要作用,并因此触发一系列生物学功能 (Hara等, 1996 Stem cells 14:605-618)。

[0004] 虽然 β c亚基在各种细胞的表面上表达,但CD123表达更受限于IL-3应答细胞,例如造血干/祖细胞、单核细胞、巨核细胞、B淋巴细胞和浆细胞性树突细胞。IL-3的结合刺激造血细胞的增殖和分化。在这些细胞成熟期间,CD123表达逐渐降低,并且在成熟淋巴细胞和粒细胞中不能被检测到。

[0005] 据报道,CD123在白血病干细胞 (LSC) 上高表达,并且与许多疾病的发生和发展有关,例如急性髓性白血病 (AML)、急性淋巴细胞白血病 (ALL) 和毛细胞白血病 (HCL)。参考Liu等人的综述 (2015 Life Sciences 122:59-64) 了解有关CD123和在白血病中相关的临床应用的更多细节。鉴于正常造血干细胞和LSC上CD123表达的差异,CD123是血液癌症中令人关注的治疗靶点。

[0006] AML是一种克隆性恶性疾病,来自具有CD123过表达的LSC细胞的小群体。AML的特征在于骨髓和外周血中骨髓祖细胞的增殖,并导致正常造血作用的破坏。尽管多年来对AML患者的治疗方案和支持性护理有所改善,但在过去三十年中,标准治疗选择并没有发生重大变化。参考Medinger等人 (2016 Leukemia Research Reports 6:39-49) 对AML的新方法和治疗选择的概述。目前,只有35-40%的年龄小于60岁的患者可以治愈所述疾病。对于老年患者 (>60岁),总体预后仍然不利。目前,同种异体造血干细胞移植提供最佳的治愈机会。因此,仍然需要治疗AML的新疗法。

[0007] 预防AML和治疗复发的可能策略是使用免疫疗法,其是癌症研究的快速发展领域。免疫疗法将身体的免疫监视系统并且特别是T细胞引导至癌细胞。

[0008] 细胞毒性T细胞(CTL)是杀死癌细胞、被感染(特别是被病毒感染)的细胞或以其他方式受损的细胞的T淋巴细胞。T淋巴细胞(或T细胞)在细胞表面上表达T细胞受体或TCR分子和CD3受体。 $\alpha\beta$ TCR-CD3复合物(或“TCR复合物”)由六种不同的I型单跨域(single-spanning)跨膜蛋白组成:形成负责配体识别的TCR异二聚体的TCR α 和TCR β 链,以及非共价缔合的CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 和 ζ 链(它们带有在受体活化时被磷酸化的细胞质序列基序并募集大量信号传导组分)(Ca11等,2004,Molecular Immunology 40:1295-1305)。

[0009] T细胞受体的 α 链和 β 链均由恒定结构域和可变结构域组成。在生理学上,T细胞受体的 $\alpha\beta$ 链识别载有肽的MHC复合物,并在与CD3链接合时偶联。这些CD3链随后将接合信号转导至细胞内环境。

[0010] 考虑到天然存在的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)介导细胞溶解的潜力,已经探索了各种策略来募集免疫细胞以介导肿瘤细胞杀伤。然而,特异性T细胞应答的引发依赖于癌细胞对MHC分子的表达以及特异性肽抗原的存在、产生、转运和展示。较新的发展已经尝试了备选的方法,其通过经由基于重组抗体的“双特异性抗体”技术以多克隆方式接合患者的所有T细胞来组合免疫疗法与抗体疗法的优点。

[0011] 已经设计了双特异性抗体,其在一个臂(靶标结合臂)上具有肿瘤识别部分,而该分子的另一个臂对T细胞抗原(效应子结合臂)(主要是CD3)具有特异性。通过将两个臂同时结合到它们各自的抗原上,T淋巴细胞被导向肿瘤细胞并在肿瘤细胞处活化,在那里它们可以发挥其细胞溶解功能。

[0012] 使用双特异性抗体来活化针对肿瘤细胞的T细胞的概念在20多年前就有描述了,但是制造问题和临床失败使该领域陷入停滞。当开发出由抗体减少为其可变片段而产生的较小形式的双特异性抗体时,取得了进一步的进展。

[0013] 尽管第一种T细胞接合形式,博纳吐单抗(Blinatumomab)(识别CD19和CD3的BiTE分子)于2014年12月被FDA批准用于二线治疗,但仍有许多障碍需要克服。博纳吐单抗的首次临床试验由于以下而被过早地停止:在一方面是神经系统不良事件、细胞因子释放综合征和感染,并且在另一方面是缺少生物活性的客观临床反应或强烈迹象。

[0014] 作为AML的治疗选择,MacroGenics最近开发了MGD006,一种CD3x CD123双特异性DART(双亲和力重靶向分子)。如Hussaini等人(2016Blood 127:122-131)所述,MGD006能够识别CD123阳性白血病细胞并诱导T细胞活化,从而在体外和体内杀死过表达CD123的肿瘤细胞。然而,DART还在与CD123阴性细胞系K562^{GFP}温育时上调T细胞上的T细胞活化标记物CD25(图1D,Hussaini等人2016)。此外,用两种CD123阴性细胞系观察到靶标独立杀伤(图2B,Hussaini等人2016)。因此,使用此DART,可能会出现由这一靶标独立的T细胞活化引起的安全问题。

[0015] 为了使不良事件和全身副作用(如细胞因子风暴)的风险最小化,在选择肿瘤和T细胞抗原臂时务必最大谨慎。T细胞抗原臂必须以单价方式与TCR复合物的恒定结构域结合,并且在不存在靶向癌细胞的情况下可能不会触发T细胞信号传导。只有两臂与其靶标(肿瘤和T细胞抗原)的特异性结合可以触发细胞溶解性突触的形成并随后杀死肿瘤细胞。肿瘤识别臂对其抗原的特异性是避免脱靶结合的必要条件,这将不可避免地导致靶标独立的T细胞活化。

[0016] 除了效力之外,MGD006以及博纳吐单抗的体积非常小并且缺乏Fc结构域。因此,

MGD006将需要连续静脉输注,这不会有助于患者的依从性。MacroGenics目前试图通过将Fc结构域融合到其下一代DART上来解决这个问题(WO2015026892),这使得该分子不仅变得更大,而且还可能导致制造问题和其他Fc功能的输入。预计Fc的较大形式具有更好的PK,但重新引入了脱靶活性的风险。

[0017] 因此,仍然需要具有最小靶标独立的T细胞活化的备选双特异性CD123xT细胞抗原结合多肽,其中可以定制半衰期。

[0018] 发明概述

[0019] 本发明通过提供多特异性多肽解决了这个问题,所述多特异性多肽包含一个特异性结合T细胞受体(TCR)的恒定结构域的免疫球蛋白单可变结构域(ISV)和一个或多个特异性结合CD123的ISV。在特定的方面,所述多肽将T细胞重定向至CD123表达细胞并诱导T细胞介导的杀伤。

[0020] 已经特别选择结合T细胞受体结合ISV和CD123结合ISV的组合,以便在CD123表达细胞的(位点)处产生有效的T细胞活化,而靶标独立的T细胞活化看起来最小。

[0021] 因此,在第一方面,本发明提供了重定向T细胞用于杀伤CD123表达细胞的多肽,其包含一个特异性结合T细胞受体(TCR)的免疫球蛋白单可变结构域(ISV)和一个或更多个特异性结合CD123的ISV,其中所述特异性结合TCR的ISV(基本上)由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0022] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0023] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0024] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0025] 和/或

[0026] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0027] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0028] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0029] 和/或

[0030] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0031] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0032] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0033] 和其中所述一个或更多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0034] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0035] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0036] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0037] 和/或

[0038] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0039] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0040] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0041] 和/或

[0042] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0043] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0044] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0045] 在另外的方面,本发明提供了如本文所述的多肽,其中所述特异性结合TCR的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0046] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0047] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0048] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0049] 和

[0050] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0051] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0052] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0053] 和

[0054] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0055] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0056] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0057] 和其中所述一个或更多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0058] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0059] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0060] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0061] 和

[0062] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0063] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0064] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0065] 和

[0066] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0067] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0068] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0069] 在另外的方面,本发明提供了如本文所述的多肽,其中所述特异性结合TCR的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0070] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0071] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0072] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置2、4、5、6、8和/或10处(根据Kabat编号,位置27、29、30、31、33和/或35);条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0073] 和

[0074] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0075] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0076] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置1、3、5、7、8和/或9处(根据Kabat编号,位置50、52、54、56、57和/或58);条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0077] 和

[0078] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0079] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0080] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的位置1、4、5和/或8处(根据Kabat编号,位置95、98、99和/或101);条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0081] 和其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所述。

[0082] 在一个方面,包含在特异性结合TCR的ISV中的CDR1可以选自由以下组成的组:

[0083] a) SEQ ID NO:181;或

[0084] b) 与SEQ ID NO:181的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0085] -在位置2处D已经变为A、S、E或G;

[0086] -在位置4处H已经变为Y;

[0087] -在位置5处K已经变为L;

[0088] -在位置6处I已经变为L;

[0089] -在位置8处F已经变为I或V;和/或

[0090] -在位置10处G已经变为S;

[0091] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0092] 除此之外或另外,包含在所述特异性结合TCR的ISV中的CDR2可以选自由以下组成的组:

[0093] a) SEQ ID NO:192;或

[0094] b) 与SEQ ID NO:192的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0095] -在位置1处H已经变为T或R;

[0096] -在位置3处S已经变为T或A;

[0097] -在位置5处G已经变为S或A;

[0098] -在位置7处Q已经变为D、E、T、A或V;

[0099] -在位置8处T已经变为A或V;和/或

[0100] -在位置9处D已经变为A、Q、N、V或S;

[0101] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有

4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0102] 除此之外或另外,包含在特异性结合TCR的ISV中的CDR3可以选自由以下组成的组:

[0103] a) SEQ ID NO:218;或

[0104] b) 与SEQ ID NO:218的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0105] -在位置1处F已经变为Y、L或G;

[0106] -在位置4处I已经变为L;

[0107] -在位置5处Y已经变为W;和/或

[0108] -在位置8处D已变为N或S;

[0109] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0110] 因此,本发明提供了如本文所述的多肽,其中所述特异性结合TCR的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0111] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0112] a) SEQ ID NO:181;或

[0113] b) 与SEQ ID NO:181的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0114] -在位置2处D已经变为A、S、E或G;

[0115] -在位置4处H已经变为Y;

[0116] -在位置5处K已经变为L;

[0117] -在位置6处I已经变为L;

[0118] -在位置8处F已经变为I或V;和/或

[0119] -在位置10处G已经变为S;

[0120] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0121] 和

[0122] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0123] c) SEQ ID NOs:192;或

[0124] d) 与SEQ ID NO:192的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0125] -在位置1处H已经变为T或R;

[0126] -在位置3处S已经改为T或A;

[0127] -在位置5处G已经变为S或A;

[0128] -在位置7处Q已经变为D、E、T、A或V;

[0129] -在位置8处T已经变为A或V;和/或

[0130] -在位置9处D已经变为A、Q、N、V或S;

[0131] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0132] 和

[0133] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0134] e) SEQ ID NO:218; 或

[0135] f) 与SEQ ID NO:218的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0136] -在位置1处F已经变为Y、L或G;

[0137] -在位置4处I已经变为L;

[0138] -在位置5处Y已经变为W; 和/或

[0139] -在位置8处D已经变为N或S;

[0140] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0141] 和其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所述。

[0142] 在优选的方面,特异性结合TCR的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自由SEQ ID NO:181-191组成的组,CDR2选自由SEQ ID NO:192-217组成的组,CDR3选自由SEQ ID NO:218-225组成的组。

[0143] 因此,本发明提供了多肽,其包含特异性结合TCR的ISV,所述ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自由SEQ ID NO:181-191组成的组,CDR2选自由SEQ ID NO:192-217组成的组,CDR3选自由SEQ ID NO:218-225组成的组,并且包含如本文进一步所述的特异性结合CD123的ISV。

[0144] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1是SEQ ID NO:181,CDR2是SEQ ID NO:192,CDR3是SEQ ID NO:218,并且其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所述。

[0145] 用于本发明多肽的优选ISV可以选自由SEQ ID NO:42和78-180组成的组,或者选自由SEQ ID NO:42和78-180之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV。因此,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV选自由SEQ ID NO:42和78-180组成的组,或者选自由SEQ ID NO:42和78-180之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV,和其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所述。

[0146] 特异性结合TCR的ISV可以存在于本发明多肽中的任何位置。优选地,特异性结合TCR的ISV存在于本发明多肽的N端。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV位于多肽的N端。

[0147] 本发明的多肽还包括一个或多个ISV。已经特别选择用于本发明多肽的ISV,因为它们对存在于CD123表达靶细胞上的CD123具有高特异性。

[0148] 因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0149] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0150] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0151] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置3、6、7和/或8处(根据Kabat编号的位置28、31、32和/或33);条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0152] 和

[0153] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0154] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0155] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置3、6和/或10处(根据Kabat编号的位置52、54和/或58);条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0156] 和

[0157] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0158] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0159] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的位置3、4和/或5处(根据Kabat编号的位置97、98和/或99);条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0160] 本发明已经鉴定了以选择的抗原结合位点或互补位特异性结合CD123的ISV。在一个方面,特异性结合CD123的ISV结合至ISV 56A10结合的表位(即与56A10属于相同家族的ISV或与56A10相关的ISV)。

[0161] 在一个方面,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR1可以选自由以下组成的组:

[0162] a) SEQ ID NO:11;或

[0163] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0164] -在位置3处T已经变为S或P;

[0165] -在位置6处I已经变为S;

[0166] -在位置7处N已经变为D;和/或

[0167] -在位置8处D已经变为V或A;

[0168] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

- [0169] 除此之外或另外,包含在特异性结合TCR的ISV中的CDR2可以是SEQ ID NO:17。
- [0170] 除此之外或另外,包含在特异性结合TCR的ISV中的CDR3可以选自由以下组成的组:
- [0171] a) SEQ ID NO:21;或
- [0172] b) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [0173] -在位置3处P已经变为A;
- [0174] 条件是与包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。
- [0175] 因此,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:
- [0176] i) CDR1选自由以下组成的组:
- [0177] a) SEQ ID NO:11;或
- [0178] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [0179] -在位置3处T已经变为S或P;
- [0180] -在位置6处I已经变为S;
- [0181] -在位置7处N已经变为D;和/或
- [0182] -在位置8处D已经变为V或A;
- [0183] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;
- [0184] 和
- [0185] ii) CDR2是SEQ ID NO:17;
- [0186] 和
- [0187] iii) CDR3选自由以下组成的组:
- [0188] c) SEQ ID NOs:21;或
- [0189] d) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [0190] -在位置3处P已经变为A;
- [0191] 条件是与包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。
- [0192] 在优选的方面,特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自由SEQ ID NO:11-15组成的组,CDR2是SEQ ID NO:17,CDR3选自由SEQ ID NO:21-22组成的组。
- [0193] 因此,本发明提供了多肽,其包含如本文所述的特异性结合TCR的ISV,并且包含一个或更多个特异性结合CD123的ISV,其中所述特异性结合CD123的一个或更多个ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自由SEQ ID NO:11-15组成的组,CDR2是SEQ ID NO:17,和CDR3选自由SEQ ID NO:21-22

组成的组。

[0194] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中特异性结合CD123的一个或更多个ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1是SEQ ID NO:11,CDR2是SEQ ID NO:17,和CDR3是SEQ ID NO:21。

[0195] 用于本发明多肽的优选ISV可以选自由SEQ ID NO:1-6组成的组,或者选自与SEQ ID NO:1-6之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV。因此,本发明还提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中特异性结合CD123的一个或更多个ISV选自由SEQ ID NO:1-6组成的组,或者选自与SEQ ID NO:1-6之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV。

[0196] 在另一方面,特异性结合CD123的ISV结合至纳米抗体55F03结合的表位(即与55F03属于相同家族的ISV或与55F03相关的ISV)。

[0197] 在一个方面,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR1是SEQ ID NO:16。

[0198] 除此之外或另外,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR2可以选自由以下组成的组:

[0199] a) SEQ ID NO:18;或

[0200] b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0201] -在位置3处Y已经变为W;

[0202] -在位置6处N已经变为S;和/或

[0203] -在位置10处Q已经变为E;

[0204] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0205] 除此之外或另外,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR3可以选自由以下组成的组:

[0206] a) SEQ ID NO:23;或

[0207] b) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0208] -在位置4处E已经变为R;和/或

[0209] -在位置5处T已经变为D或Y;

[0210] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0211] 因此,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0212] i) CDR1是SEQ ID NO:16;

[0213] 和

[0214] ii) CDR2选自由以下组成的组:

- [0215] a) SEQ ID NO:18;或
- [0216] b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [0217] -在位置3处Y已经变为W;
- [0218] -在位置6处N已经变为S;和/或
- [0219] -在位置10处Q已经变为E;
- [0220] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;
- [0221] 和
- [0222] iii) CDR3选自由以下组成的组:
- [0223] c) SEQ ID NOs:23;或
- [0224] d) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [0225] -在位置4处E已经变为R;和/或
- [0226] -在位置5处T已经变为D或Y;
- [0227] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。
- [0228] 在优选的方面,特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1是SEQ ID NO:16,CDR2选自由SEQ ID NO:18-20组成的组,和CDR3选自由SEQ ID NO:23-25组成的组。
- [0229] 因此,本发明提供了多肽,其包含如本文所述的特异性结合TCR的ISV,并且包含一个或更多个特异性结合CD123的ISV,其中所述一个或更多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1是SEQ ID NO:16,CDR2选自由SEQ ID NO:18-20组成的组,CDR3选自由SEQ ID NO:23-25组成的组。
- [0230] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1是SEQ ID NO:16,CDR2是SEQ ID NO:18,和CDR3是SEQ ID NO:23。
- [0231] 用于本发明多肽的优选ISV可选自由SEQ ID NO:7-10组成的组,或者选自与SEQ ID NO:7-10之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV选自由SEQ ID NO:7-10组成的组,或者选自与SEQ ID NO:7-10之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV。
- [0232] 本发明的多肽可包括一个特异性结合CD123的ISV或多于一个特异性结合CD123的ISV,如例如两个、三个或甚至更多个。在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其包含如本文所述的特异性结合TCR的ISV,并且包含特异性结合CD123的两个或更多个,优选两个ISV。

[0233] 包含在本发明多肽中的两个或更多个,优选两个ISV可以是如本文所述的特异性结合CD123的任何ISV。包含在本发明多肽中的两个或更多个,优选两个ISV可以是相同的ISV(即具有相同的氨基酸序列),或者它们可以是不同的ISV(即具有不同的氨基酸序列)。在一个方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中两个或更多个特异性结合CD123的ISV是包含第一ISV和第二ISV的双互补位(biparatopic),其中第一ISV结合至CD123上的表位,该表位与第二ISV结合的CD123上的表位不同。

[0234] 优选地,两个或更多个,优选两个特异性结合CD123的ISV是与56A10相关的ISV和与55F03相关的ISV。因此,在一个方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中第一ISV选自与56A10相关的ISV,第二ISV选自与55F03相关的ISV。

[0235] 两个或更多个,优选两个特异性结合CD123的ISV可以存在于本发明多肽中的任何位置。在一个方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中第二ISV位于第一ISV的N端。在另一方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中第二ISV位于第一ISV的C端。

[0236] 存在于本发明多肽中的ISV可以是本领域已知的和如本文进一步描述的任何ISV。在一个方面,存在于本发明多肽中的ISV选自单结构域抗体、dAb、纳米抗体、VHH、人源化VHH、骆驼源化VH或通过亲和力成熟获得的VHH。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中特异性结合TCR的ISV和一个或更多个特异性结合CD123的ISV(基本上)由单结构域抗体、dAb、纳米抗体、VHH、人源化VHH、骆驼源化VH或通过亲和力成熟获得的VHH组成。

[0237] 本发明优选的多肽选自由SEQ ID NO:47、49、52、53、55、56和58-61组成的组,或者选自与SEQ ID NO:47、49、52、53、55、56和58-61之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。

[0238] 更优选地,所述多肽选自由SEQ ID NO:47、49、52、53、55、56和58-61组成的组。

[0239] 如上所述,本发明的多肽重定向T细胞用于杀伤CD123表达细胞。在一个方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述多肽诱导T细胞活化。

[0240] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述T细胞活化独立于MHC识别。

[0241] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述T细胞活化依赖于将与靶细胞上的CD123结合的所述多肽呈递至T细胞。

[0242] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述T细胞活化引起所述T细胞的一种或更多种细胞应答,其中所述细胞应答选自由以下组成的组:增殖、分化、细胞因子分泌、细胞毒性效应分子释放、细胞毒性活性、活化标记物的表达和重定向的靶细胞溶解。

[0243] 在具体的方面,由本发明多肽诱导的T细胞活化引起CD123表达细胞的杀伤,其平均EC50值在1nM和1pM之间,例如平均EC50值为500pM以下,例如小于400、300、200或100pM或甚至更小,例如小于90、80、70、60、50、40或30pM或甚至更小,所述EC50值优选在具有TOPR03读出的基于流式细胞术的测定中确定,该测定使用MOLM-13细胞作为靶细胞,并使用人T细胞作为效应细胞,效应细胞与靶细胞的比率为10比1。

[0244] 在另一个具体的方面,由本发明多肽诱导的T细胞活化引起CD123表达细胞的溶解,其平均溶解百分比为大于约10%,例如15%、16%、17%、18%、19%或20%或甚至更多,

例如大于25%，或甚至大于30%，所述溶解百分比优选在具有TOPRO3读出的基于流式细胞术的测定中确定，该测定使用MOLM-13细胞作为靶细胞，并使用人T细胞作为效应细胞，效应细胞与靶细胞的比率为10比1。

[0245] 在另一具体的方面，本发明提供如本文所述的多肽，其中由本发明的多肽诱导的所述T细胞活化引起IFN- γ 分泌，其平均EC50值在100nM和10pM之间，例如平均EC50值为50nM或以下，例如小于40、30、20、10或9nM或甚至更小，例如小于8、7、6、5、4、3、2或1nM或甚至更小，例如小于500pM或甚至更小，例如小于400、300、200或100pM或甚至更小，所述EC50值优选在基于ELISA的测定中确定。

[0246] 在另外的方面，本发明提供如本文所述的多肽，其中所述T细胞活化引起所述T细胞的增殖。

[0247] 如上所述，选择本发明的多肽使得靶标独立的T细胞活化应该是最小的。因此，在另外的方面，本发明提供如本文所述的多肽，其中在不存在CD123阳性细胞的情况下，所述T细胞活化是最小的。

[0248] 更具体地，本发明多肽的T细胞活化诱导的CD123阴性细胞的溶解不超过约10%，例如9%或更低，例如8、7或6%或甚至更低，所述溶解优选在具有TOPRO3读出的基于流式细胞术的测定中确定为平均溶解百分比，该测定使用U-937细胞作为靶细胞，并使用人T细胞作为效应细胞，效应细胞与靶细胞的比率为10比1。

[0249] 本发明还涉及结构单元(building block)，即构成本发明多肽的ISV。因此，本发明还提供了一种多肽，其是特异性结合CD123的ISV，并且其包含或(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成，其中：

[0250] i) CDR1选自由以下组成的组：

[0251] a) SEQ ID NO:11-16；或

[0252] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合，所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的；

[0253] 和/或

[0254] ii) CDR2选自由以下组成的组：

[0255] c) SEQ ID NO:17-20；或

[0256] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合，所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的；

[0257] 和/或

[0258] iii) CDR3选自由以下组成的组：

[0259] e) SEQ ID NO:21-25；或

[0260] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合，所述

亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0261] 更优选地,作为特异性结合CD123的ISV的多肽包含或(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0262] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0263] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0264] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0265] 和/或

[0266] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0267] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0268] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0269] 和/或

[0270] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0271] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0272] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0273] 在另外的方面,本发明还提供如上所述的多肽,其包含或(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0274] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0275] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0276] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置3、6、7和/或8处(根据Kabat编号的位置28、31、32和/或33);条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0277] 和/或

[0278] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0279] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0280] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置3、6和/或10处(根据Kabat编号的位置52、54和/或58);条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结

合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0281] 和/或

[0282] i ii) CDR3选自由以下组成的组:

[0283] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0284] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的位置3、4和/或5处(根据Kabat编号的位置97、98和/或99);条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0285] 本发明已经鉴定了以选择的抗原结合位点或互补位特异性结合CD123的ISV。在一个方面,特异性结合CD123的ISV结合至ISV 56A10结合的表位(即与56A10属于相同的家族的ISV或与56A10相关的ISV)。

[0286] 因此,在一个方面,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR1可以选自由以下组成的组:

[0287] a) SEQ ID NO:11;或

[0288] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0289] -在位置3处T已经变为S或P;

[0290] -在位置6处I已经变为S;

[0291] -在位置7处N已经变为D;和/或

[0292] -在位置8处D已经变为V或A;

[0293] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0294] 除此之外或另外,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR2是SEQ ID NO:17。

[0295] 除此之外或另外,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR3可以选自由以下组成的组:

[0296] a) SEQ ID NO:21;或

[0297] b) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0298] -在位置3处P已经变为A;

[0299] 条件是与包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0300] 因此,本发明还提供如上所述的多肽,其包含或(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0301] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0302] a) SEQ ID NO:11;或

[0303] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0304] -在位置3处T已经变为S或P;

[0305] -在位置6处I已经变为S;

[0306] -在位置7处N已经变为D;和/或

[0307] -在位置8处D已经变为V或A;

[0308] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0309] 和

[0310] ii) CDR2是SEQ ID NO:17;

[0311] 和

[0312] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0313] c) SEQ ID NOs:21;或

[0314] d) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0315] -在位置3处P已经变为A;

[0316] 条件是与包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0317] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中CDR1选自由SEQ ID NO:11-15组成的组,CDR2是SEQ ID NO:17,CDR3选自由SEQ ID NO:21-22组成的组。优选地,CDR1是SEQ ID NO:11,CDR2是SEQ ID NO:17,并且CDR3是SEQ ID NO:21。

[0318] 与56A10相关的本发明优选的ISV可以选自由SEQ ID NO:1-6组成的组,或者选自与SEQ ID NO:1-6之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述多肽选自由SEQ ID NO:1-6组成的组,或者选自与SEQ ID NO:1-6之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。优选地,多肽选自由SEQ ID NO:1-6组成的组。

[0319] 在一个方面,本发明的多肽以在10nM和100pM之间的平均EC50值,例如5nM以下,诸如小于4、3、2或1nM或甚至更小的平均EC50值,与在MOLM-13细胞上表达的人CD123结合,优选如通过流式细胞术所测量的。

[0320] 在另一方面,本发明的多肽以在10nM和100pM之间的平均KD值,例如5nM以下,诸如小于4、3或2nM或甚至更小的平均KD值与人CD123结合,所述KD值优选地通过表面等离振子共振确定。

[0321] 在另一方面,特异性结合CD123的ISV结合至被ISV 55F03结合的表位(即与55F03属于相同家族的ISV或与55F03相关的ISV)。

[0322] 因此,在一个方面,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR1是SEQ ID NO:16。

[0323] 除此之外或另外,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR2可以选自由以下组成的组:

[0324] a) SEQ ID NO:18;或

[0325] b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0326] -在位置3处Y已经变为W;

[0327] -在位置6处N已经变为S;和/或

[0328] -在位置10处Q已经变为E;

[0329] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0330] 除此之外或另外,包含在特异性结合CD123的ISV中的CDR3可以选自由以下组成的组:

[0331] a) SEQ ID NO:23;或

[0332] b) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0333] -在位置4处E已经变为R;和/或

[0334] -在位置5处T已经变为D或Y;

[0335] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0336] 因此,本发明还提供如上所述的多肽,其包含或(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中:

[0337] i) CDR1是SEQ ID NO:16;

[0338] 和

[0339] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0340] a) SEQ ID NO:18;或

[0341] b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0342] -在位置3处Y已经变为W;

[0343] -在位置6处N已经变为S;和/或

[0344] -在位置10处Q已经变为E;

[0345] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0346] 和

[0347] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0348] c) SEQ ID NO:23;或

[0349] d) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0350] -在位置4处E已变为R;和/或

[0351] -在位置5处T已经变为D或Y;

[0352] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0353] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中CDR1是SEQ ID NO:16,CDR2选自由SEQ ID NO:18-20组成的组,和CDR3选自由SEQ ID NO:23-25组成的组。优选地,CDR1是SEQ ID NO:16,CDR2是SEQ ID NO:18,和CDR3是SEQ ID NO:23。

[0354] 与56A10相关的本发明优选的ISV可选自由SEQ ID NO:7-10组成的组,或者选自与

SEQ ID N0:7-10之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中所述多肽选自由SEQ ID N0:7-10组成的组,或者选自与SEQ ID N0:7-10之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。优选地,多肽选自由SEQ ID N0:7-10组成的组。

[0355] 在一个方面,本发明的多肽以在10 μ M和100nM之间的平均EC50值,例如5 μ M以下,诸如小于4、3或2或1 μ M或甚至更小的平均EC50值与在MOLM-13细胞上表达的人CD123结合,优选地如通过流式细胞术所测量的。

[0356] 在另一方面,本发明的多肽以1 μ M和10nM之间的平均KD值,例如500nM以下,诸如小于400、300或200nM或甚至更小的平均KD值与人CD123结合,所述KD值优选地通过表面等离振子共振确定。

[0357] 在另外的方面,本发明提供了一种多肽,其交叉阻断如本文所述的至少一种多肽与CD123的结合,或交叉阻断具有SEQ ID N0:1-10的至少一种多肽与CD123的结合。

[0358] 在另外的方面,本发明提供了一种多肽,其被如本文所述的至少一种多肽交叉阻断与CD123的结合,或被具有SEQ ID N0:1-10的至少一种多肽交叉阻断与CD123的结合。

[0359] 如本文所述的特异性结合CD123的多肽优选地(基本上)由单结构域抗体、dAb、纳米抗体、VHH、人源化VHH、骆驼源化的VH或通过亲和力成熟获得的VHH组成。

[0360] 特异性结合CD123的本发明多肽可含有一个或多个特异性结合CD123的ISV。因此,在另外的方面,本发明提供了包含两个或更多个,优选两个特异性结合CD123的ISV的多肽。在优选的方面,所述两个或更多个ISV,优选两个特异性结合CD123的ISV选自与56A10相关的ISV组或选自与55F03相关的ISV组。

[0361] 在另外的方面,本发明提供了特异性结合CD123的多肽,其包含两个特异性结合CD123的ISV,其中所述ISV选自与56A10相关的ISV组或与55F03相关的ISV组。

[0362] 包含特异性结合CD123的两个或更多个ISV,优选两个ISV的本发明多肽优选是包含第一ISV和第二ISV的双互补位,其中第一ISV与CD123上的表位结合,该表位不同于第二ISV结合的CD123上的表位。在优选的方面,第一ISV选自与56A10相关的ISV组,第二ISV选自与55F03相关的ISV组。

[0363] ISV可以存在于与CD123结合的本发明双互补位多肽中的任何位置。在一个方面,第二ISV位于第一ISV的N端。在另一方面,第二ISV位于第一ISV的C-端。

[0364] 存在于本发明多肽中的ISV可以直接地彼此连接,或者它们可以通过一个或更多个接头连接,优选为肽接头。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中ISV直接地彼此连接或通过接头彼此连接。用于本发明多肽的优选接头如表B-3所示(SEQ ID N0:325至336)。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中接头选自由SEQ ID N0:325至336组成的组。

[0365] 本发明进一步包括构建体(在本文中也称为“本发明的构建体”),其包含如本文所述的多肽,并且进一步包含一个或更多个其他基团、残基、结构部分或结合单元,任选地通过一个或更多个肽接头连接。

[0366] 在另外的方面,与不含一个或更多个其他基团、残基、结构部分或结合单元的相应多肽相比,所述一个或更多个其他基团、残基、结构部分或结合单元可以为构建体提供增加

的半衰期。为多肽提供增加的半衰期的所述一个或更多个其他基团、残基、结构部分或结合单元可以是任何提供多肽在血清中保留的分子。在一个方面,为多肽提供增加的半衰期的一个或更多个其他基团、残基、结构部分或结合单元选自由以下组成的组:聚乙二醇分子、血清蛋白或其片段、可与血清蛋白结合的结合单元、Fc部分和可与血清蛋白结合的小蛋白或肽。

[0367] 因此,在一个方面,本发明提供如本文所述的构建体,其中为构建体提供增加的半衰期的所述一个或更多个其他基团、残基,结构部分或结合单元选自由血清白蛋白(例如人血清白蛋白)或血清免疫球蛋白(例如IgG)组成的组。

[0368] 在另一方面,本发明提供如本文所述的构建体,其中为构建体提供增加的半衰期的所述一个或更多个的其他结合单元选自由以下组成的组:可与血清白蛋白(例如人血清白蛋白)或血清免疫球蛋白(如IgG)结合的结合单元。优选地,为多肽提供增加的半衰期的所述一个或更多个的其他结合单元是结合血清白蛋白的ISV。在另外的方面,所述结合血清白蛋白的ISV可(基本上)由单结构域抗体、dAb、纳米抗体、VHH、人源化的VHH或骆驼源化的VH组成。

[0369] 用于本文所述的构建体的优选ISV是这样的ISV,其结合血清白蛋白,并且(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1是GFTFSSFGMS(SEQ ID NO:363)或GFTFRSFGMS(SEQ ID NO:364),CDR2是SISGSGSDTL(SEQ ID NO:365),CDR3是GGSLSR(SEQ ID NO:366)。结合血清白蛋白的优选ISV选自由SEQ ID NO:43和351至362组成的组。

[0370] 至于本发明的多肽,所述其他基团、残基、结构部分或结合单元如ISV可以直接地彼此连接或通过接头彼此连接。在另外的方面,本发明提供如本文所述的构建体,其中接头选自由SEQ ID NO:325至336组成的组。

[0371] 本发明的优选构建体可以选自由SEQ ID NO:63-67组成的组,或者与SEQ ID NO:63-67之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的构建体,优选地为SEQ ID NO:63-67。

[0372] 本发明的构建体可以是序列优化的,例如,使构建体更人类似化,改善构建体的表达,增加构建体在储存时的稳定性和/或使构建体不易于与血清中预先存在的抗体结合。在一个方面,本发明提供如本文所述的构建体,其进一步包含C端延伸(X)_n,其中n为1至5,例如1、2、3、4或5,并且其中X是天然存在的氨基酸,优选不是半胱氨酸。优选的构建体选自由SEQ ID NO:338-342组成的组。

[0373] 本发明还提供编码如本文所定义的多肽和构建体的核酸(它们是这样的:它们可通过编码其的核酸的表达而被获得)。在一个方面,如本文所述的核酸是遗传构建体的形式。

[0374] 本发明还提供包含如本文所定义的核酸的表达载体。

[0375] 本发明还提供宿主或宿主细胞,其包含如本文所定义的核酸,或如本文所定义的表达载体。

[0376] 在另外的方面,本发明提供了用于产生如本文所定义的多肽或构建体(其是这样的:其可通过表达编码其的核酸而获得)的方法,所述方法至少包含以下步骤:

[0377] a)在合适的宿主细胞或宿主生物体或另一个合适的表达系统中,表达如本文所定

义的核酸；任选地随后：

[0378] b) 分离和/或纯化如本文所定义的多肽或构建体。

[0379] 在另外的方面，本发明提供了一种组合物，其包含至少一种如本文所定义的多肽或构建体或如本文所定义的核酸。在一个方面，所述组合物是药物组合物。在一个方面，所述组合物进一步包含至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂和/或佐剂，并且任选地包含一种以上另外的药学活性多肽和/或化合物。

[0380] 本发明还提供了如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物，其用作药物。在另外的方面，本发明提供如本文所述的多肽或如本文所述的组合物在制备药物中的用途。在另外的方面，本发明提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物，其用于预防、治疗和/或改善CD123相关的疾病或病症。本发明还提供用于预防、治疗或/或改善CD123相关疾病或病症的方法，包括如下步骤：向有此需要的受试者施用药学活性量的如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物。本发明还提供了如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善CD123相关疾病或病症的药物中的用途。不受限制，CD123相关疾病或病症可以是增殖性疾病或炎性病症。因此，在另外的方面，本发明提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物，其用于预防、治疗和/或改善增殖性疾病或炎性病症。本发明还提供用于预防、治疗和/或改善增殖性疾病或炎性病症的方法，包括如下步骤：向有此需要的受试者施用药学活性量的如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物。本发明还提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善增殖性疾病或炎性病症的药物中的用途。

[0381] 不受限制，增殖性疾病可能是癌症。因此，在另外的方面，本发明提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物，其用于预防、治疗和/或改善癌症。本发明还提供了用于预防、治疗和/或改善癌症的方法，包括如下步骤：向有此需要的受试者施用药学活性量的如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物。本发明还提供了如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善癌症的药物中的用途。

[0382] 通过本发明的方法治疗的癌症可以是已知通过CD123靶向细胞杀伤治疗的任何癌症。已知涉及在异常增殖细胞上CD123表达的癌症包括（不限于）淋巴瘤（包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤）、白血病（包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病）、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞样树突细胞瘤（blastic plasmacytoid dendritic cell neoplasm）、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤。因此，在另外的方面，本发明提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体、如本文所述的组合物，其用于预防、治疗和/或改善选自以下的癌症：淋巴瘤（包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤）、白血病（包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病）、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞样树突细胞瘤、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤。本发明还提供了用于预防、治疗和/或改善癌症的方法，所述癌症选自淋巴瘤（包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤）、白血病（包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病）、骨髓增生异常综合征、原代浆细

胞样树突细胞瘤、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤,该方法包括如下步骤:向有此需要的受试者施用药学活性量的如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物。本发明还提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善癌症的药物中的用途,其中所述癌症选自淋巴瘤(包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞样树突细胞瘤、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤。

[0383] 通过本发明的方法治疗的炎性病症可以是已知通过CD123靶向细胞杀伤治疗的任何炎性病症。已知涉及在细胞上CD123表达的炎性病症包括(不限于)自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎。因此,在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体、如本文所述的组合物,其用于预防、治疗和/或改善选自由以下组成的组的炎性病症:自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎。本发明还提供预防、治疗和/或改善炎性病症的方法,所述炎性病症选自由自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎组成的组,该方法包括如下步骤:向有此需要的受试者施用药学活性量的如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物。本发明还提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善炎性病症的药物中的用途,其中所述炎性病症选自由以下组成的组:自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎。

[0384] 本发明的多肽、构建体和组合物还可以与另一种治疗药物组合使用。因此,在另外的方面,本发明提供用于组合治疗的如本文所述的多肽、如本文所述的构建体、如本文所述的组合物。

[0385] 本发明还提供如本文所述的方法,其中所述治疗是组合治疗。

[0386] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽、如本文所述的构建体或如本文所述的组合物在制备用于如本文所述的预防、治疗和/或改善的药物中的用途,其中治疗是组合治疗。

[0387] 在另外的方面,本发明提供试剂盒,其包含如本文所述的多肽、如本文所述的构建体、如本文所述的核酸、如本文所述的表达载体或如本文所述的宿主或宿主细胞。

附图说明

[0388] 图1:使用100nM抗人TCR α / β 抗体(克隆BW242/412)(黑色)和100nM抗人CD3抗体(克隆OKT-3)(灰色),评价人TCR/CD3和人CD3在转染的CHO、HEK293和L1ana细胞系上的表达。绘制每个细胞系的MCF值(平均通道荧光)。X轴描绘了细胞类型和转染的基因;CD3表示用CD3复合物(ϵ 、 δ 、 γ 和 ζ 链)转染,huTCR表示用TCR α / β 链转染,其中所用的可变结构域在括号之间。

[0389] 图2:使用抗非人灵长类动物/大鼠TCR α / β 抗体克隆R73,抗人TCR α / β 抗体(实心圆圈)和不相关的抗卵溶菌酶纳米抗体(cAb1ys)(空心圆圈),可溶性重组食蟹猴TCR α / β 蛋白的质量评价。针对纳米抗体的浓度绘制OD值。

[0390] 图3:单价抗TCR纳米抗体T0170055A02与在CHO-K1细胞上表达的人TCR/CD3(图3A)和与原代人T细胞(图3B)的剂量依赖性结合。单价抗TCR纳米抗体T0170056G05与CHO-K1细

胞上表达的人TCR/CD3 (图3C) 和与原代人T细胞 (图3D) 的剂量依赖性结合。针对纳米抗体的浓度绘制MCF值 (平均通道荧光)。

[0391] 图4: 单价抗TCR纳米抗体T0170055A02 (图4A) 和T0170056G05 (图4B) 与HEK293H人TCR (2IAN) /CD3 (实心圆圈) 、HEK293H人CD3 (十字) 和与HEK293H参考细胞系 (空心圆圈) 的剂量依赖性结合。针对纳米抗体的浓度绘制MCF值 (平均通道荧光)。

[0392] 图5: 单价抗TCR纳米抗体T0170055A02 (图4A, 实心圆圈) 和T0170056G05 (图4B, 实心圆圈) 和无关的纳米抗体 (图4A和图4B, 空心圆圈) 与可溶性重组人TCR α / β (2XN9) 拉链蛋白的剂量依赖性结合。针对纳米抗体的浓度绘制450nm处的OD。

[0393] 图6: 在Octet RED384仪器上通过BioLayer干涉测量法, 对可溶性重组人TCR α / β (2XN9) 拉链蛋白相互作用的T01700055A02 (图6A) 和T01700056G05 (图6B) 的动力学分析。应用的分析物浓度为: 1000、333、111、37、12.3、4.1和1.4nM。Langmuir拟合动力学数据用黑线表示, 而传感图用灰线表示。

[0394] 图7: 单价抗TCR纳米抗体T0170055A02 (图7A, 实心圆圈) 和T0170056G05 (图7B, 实心圆圈) 和无关的纳米抗体 (图7A和图7B, 空心圆) 与可溶性重组食蟹猴TCR α / β 拉链蛋白的剂量依赖性结合。针对纳米抗体的浓度绘制450nm处的OD。

[0395] 图8: 在Octet RED384仪器上通过BioLayer干涉测量法, 对可溶性重组食蟹猴TCR α / β 拉链蛋白相互作用的T0170055A02 (图8A) 和T0170056G05 (图8B) 的动力学分析。应用的分析物浓度为: 1000、333、111、37、12.3、4.1和1.4nM。Langmuir拟合动力学数据用黑线表示, 而传感图用灰线表示。

[0396] 图9: 珠偶联的单价抗TCR纳米抗体的T细胞活化数据 (图9A)。以溶液形式呈现的单价抗TCR纳米抗体的T细胞活化数据 (图9B)。通过监测CD69在原代人T细胞上的上调对活化进行测量。绘制每种纳米抗体的MCF值 (平均通道荧光)。

[0397] 图10: 在流式细胞术中, 使用抗CD123抗体 (BD Biosciences, 商品目录号554527) (黑色) 和同种型对照 (eBioscience, 商品目录号16-4724-85) (灰色) 随后通过PE标记的山羊抗小鼠 (Jackson Immunoresearch lab. Inc., 商品目录号115-116-071) , 对HEK293 F1p-In上的人CD123表达、HEK293 F1p-In cyno CD123、CHO F1p-In和CHO F1p-In人CD123的表达的评价。绘制每个细胞系的MFI值 (中值通道荧光强度)。

[0398] 图11: 在流式细胞术中, 使用APC标记的抗CD123抗体 (BD Biosciences, 商品目录号560087) (黑色) 和APC标记的同种型对照 (Biolegend, 商品目录号400220) (灰色) , 人CD123在U-937、MOLM-13、KG1a和NCI-H929细胞上表达的评价。绘制每个细胞系的MFI值 (中值通道荧光强度)。

[0399] 图12: 单价抗CD123纳米抗体A0110056A10与MOLM-13细胞 (图12A) 和KG1a细胞 (图12C) 的剂量依赖性结合。单价抗CD123纳米抗体A0110055F03与MOLM-13细胞 (图12B) 和KG1a细胞 (图12D) 的剂量依赖性结合。针对浓度绘制MFI值 (中值通道荧光强度)。

[0400] 图13: Alexa647标记的A0110056A10与F1p-In亲本CHO细胞 (空心符号) 和与人CD123转染的CHO细胞 (实心符号) 的剂量依赖性结合 (图13A)。Alexa647标记的A0110056A10与F1p-In亲本HEK细胞 (空心符号) 和与食蟹猴CD123转染的HEK细胞 (实心符号) 的剂量依赖性结合 (图13B)。针对浓度绘制MFI值 (中值通道荧光强度)。

[0401] 图14: A0110055F03与F1p-In亲本CHO细胞 (空心符号) 和与人CD123转染的CHO细胞

(实心符号)的剂量依赖性结合(图14A)。A0110055F03与F1p-In亲本HEK细胞(空心符号)和与食蟹猴CD123转染的HEK细胞(实心符号)的剂量依赖性结合(图14B)。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0402] 图15:单价抗CD123纳米抗体A0110056A10-Alexa 647与MOLM-13细胞(图15A)和与人CD123转染的CHO F1p-In细胞(图15B)的剂量依赖性结合。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0403] 图16:单价纳米抗体A0110056A10(正方形)和A0110055F03(圆形)与Alexa 647标记的A0110056A10对于在MOLM-13细胞(图16A)上和在人CD123转染的CHO F1p-In细胞上(图16B)结合人CD123的剂量依赖性竞争。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0404] 图17:APC标记的小鼠抗人CD123(克隆7G3)抗体与人CD123在MOLM-13细胞上(图17A)和在人CD123转染的CHO F1p-In细胞上(图17B)的剂量依赖性结合。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0405] 图18:单价纳米抗体A0110056A10(正方形)和A0110055F03(圆形)与APC标记的小鼠抗人CD123(克隆7G3)抗体对于在MOLM-13细胞上(图18A)和在用huCD123转染的CHO F1p-In细胞(图18B)上表达的CD123的结合的剂量依赖性竞争。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0406] 图19:小鼠抗人CD123(克隆7G3)抗体与内部生物素化的CD123重组蛋白(R&D Systems,商品目录号301-R3/CF)的剂量依赖性结合。针对浓度绘制450nm处的OD。

[0407] 图20:在ELISA中,单价抗CD123纳米抗体A0110056A10(正方形)和A0110055F03(实心圆圈)与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)(BD Biosciences,商品目录号554527)对于与CD123蛋白结合的剂量依赖性竞争(图20A)。将不相关的抗卵溶菌酶纳米抗体cAbLys(空心圆圈)和溶液中的小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)(星形)分别作为阴性和阳性对照(图20B)。针对浓度绘制450nm处的OD。

[0408] 图21:单价抗CD123纳米抗体A0110056A10-Alexa 647与MOLM-13细胞(图21A)、人CD123转染的CHO F1p-In细胞(图21B)和cyno CD123转染的HEK F1p-In细胞(图21C)的剂量依赖性结合。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0409] 图22:多价CD123/TCR结合多肽与Alexa647-A0110056A10在对于在MOLM-13细胞上(图22A)和在huCD123转染的CHO F1p-In细胞上(图22C)或在cyCD123转染HEK F1p-In细胞上(图22B)表达的CD123结合的剂量依赖性竞争。将不相关的多价多肽T017000129作为阴性对照。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0410] 图23:多价CD123/TCR结合多肽与生物素化T0170056G05对于与在CHO-K1细胞上表达的人TCR/CD3结合的剂量依赖性竞争。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0411] 图24:多价CD123/TCR结合多肽与T017000099对于在HSC-F上表达的CD3/TCR结合的剂量依赖性竞争。单价His标记的T017000125作为阳性对照。针对浓度绘制MFI值(中值通道荧光强度)。

[0412] 图25:使用效应子与靶标比率为10:1,通过多价CD123/TCR结合多肽,在基于流式细胞术的测定中人CD123表达MOLM-13细胞的剂量依赖性重定向的人效应T细胞杀伤。A0110056A10、T017000132和T017000129作为阴性对照。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0413] 图26:使用效应子与靶标比率为10:1,通过多价CD123/TCR结合多肽,在基于流式细胞术的测定中人CD123表达KG1a细胞的剂量依赖性重定向的人效应T细胞杀伤。A0110056A10、T017000129和T017000132作为阴性对照。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0414] 图27:使用效应子与靶标比率为10:1,通过多价CD123/TCR结合多肽,在基于流式细胞术的测定中人CD123阳性MOLM-13细胞的剂量依赖性重定向的食蟹猴效应T细胞杀伤。A0110056A10作为阴性对照。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0415] 图28:使用效应子与靶标比率为8,通过多价CD123/TCR结合多肽,在基于流式细胞术的测定中人CD123阳性KG1a细胞的剂量依赖性重定向的食蟹猴效应T细胞杀伤。将几种不相关的构建体作为阴性对照。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0416] 图29:在培养72小时后,在人CD123阳性MOLM-13细胞的重定向的食蟹猴效应T细胞杀伤期间,在CD4/CD8+门控(gated)T细胞上通过多价CD123/TCR结合多肽的剂量依赖性T细胞活化(CD25上调)。针对构建体的浓度绘制CD4/CD8+门控T细胞内的MFI(平均荧光强度)。

[0417] 图30:使用效应子与靶标比率为15:1,通过T017000139(实心菱形),在基于xCELLigence的测定中人CD123转染的CHO F1p-In细胞的剂量依赖性重定向的人效应T细胞杀伤。将单价纳米抗体A0110056A10、T0170056G05和无关构建体T017000129作为阴性对照。针对多特异性多肽的浓度绘制50小时温育时间之后的细胞指数(CI)。

[0418] 图31:使用效应子与靶标比率为15:1,在基于xCELLigence的测定中,在使用CD123阴性CHO F1p-In参考细胞系的重定向的人效应T细胞杀伤测定中的单价结构单元和多特异性多肽。针对多特异性多肽的浓度绘制50小时温育时间之后的CI。

[0419] 图32:在不存在T细胞的情况下,在CD123转染的细胞系(图32A)和参考细胞系(图32B)生长上的单价结构单元和多特异性CD123/TCR结合多肽。针对多特异性多肽的浓度绘制50小时温育时间后的CI。

[0420] 图33:使用效应子与靶标比率为15:1,通过T017000139(实心菱形),在基于xCELLigence的测定中食蟹猴CD123转染的HEK F1p-In细胞的剂量依赖性重定向的食蟹猴效应物T细胞杀伤。将单价纳米抗体T0170056G05和无关构建体T017000129一起作为阴性对照。针对多特异性多肽的浓度绘制80小时温育时间后的CI。

[0421] 图34:使用CD123阴性HEK F1p-In参考细胞系,在重定向的食蟹猴T细胞杀伤测定中的单价结构单元和多特异性多肽。针对多特异性多肽的浓度绘制80小时温育时间之后的CI。

[0422] 图35:在不存在T细胞的情况下,在CD123转染的细胞系(图35A)和参考细胞系(图35B)生长上的单价结构单元和多特异性CD123/TCR结合多肽。针对多特异性多肽的浓度绘制80小时温育时间之后的CI。

[0423] 图36:使用效应子与靶标比率为10:1,在人CD123表达CHO F1p-In靶细胞的多特异性CD123/TCR结合多肽依赖性重定向T细胞杀伤的期间,人效应T细胞(图36A)或食蟹猴效应T细胞(图36B)的剂量依赖性细胞因子产生。72小时后测量INF- γ 的产生。针对浓度绘制OD值。

[0424] 图37:使用效应子与靶标比率为10:1,在人CD123表达CHO F1p-In靶细胞的多特异性CD123/TCR结合多肽依赖性重定向T细胞杀伤的期间,效应T细胞的剂量依赖性细胞因子

产生。72小时后测量IL-6的产生。针对浓度绘制pg/ml值。

[0425] 图38:在5小时的温育时间后,在健康人(图38A)和食蟹猴(图38B)PBMC样品中,通过多价CD123/TCR结合多肽对CD123+pDC和嗜碱性粒细胞的重定向自体T细胞介导的消耗。针对构建体的浓度绘制Lin-/CD123+细胞(pDC和嗜碱性粒细胞)的百分比。

[0426] 图39:在5小时(图39A)和24小时(图39B)的温育时间后,在健康人PBMC样品中通过多价CD123/TCR结合多肽的重定向自体T细胞单核细胞消耗。针对构建体的浓度绘制单核细胞(CD14+细胞)的百分比。

[0427] 图40:在24小时的温育时间后,在自体CD123阳性细胞的重定向T细胞杀伤期间,通过在CD3+门控T细胞上的多价CD123/TCR结合多肽的剂量依赖性CD69上调、人T细胞活化。针对构建体的浓度绘制CD3+门控T细胞内的MFI(平均荧光强度)。

[0428] 图41:使用效应子与靶标比率为10:1,在基于流式细胞术的测定中,用于重定向人(图41A)或食蟹猴(图41B)效应T细胞杀伤人CD123 KG1a细胞的单价纳米抗体和不相关的多价多肽T017000129的剂量依赖性表征。将T017000139(实心菱形)作为阳性对照。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0429] 图42:使用效应子与靶标比率为10:1,在基于流式细胞术的测定中,用于重定向人(图42A)或食蟹猴(图42B和图42C)效应T细胞杀伤人CD123 MOLM-13细胞的单价纳米抗体和不相关的多价多肽T017000129的剂量依赖性表征。将T017000139(实心菱形)作为阳性对照。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0430] 图43:使用效应子与靶标比率为10:1,在MOLM-13(图43A和图43C)和KG1a(图43B)靶细胞的多特异性CD123/TCR结合多肽依赖性重定向T细胞杀伤期间,人效应T细胞的剂量依赖性细胞因子产生。72小时后测量人IL-6(图43C)和IFN- γ (图43A和图43B)的产生。针对浓度绘制细胞因子的浓度。

[0431] 图44A和44B:使用CD123阴性NCI-H929细胞系,在基于流式细胞术的测定中,通过多特异性CD123/TCR结合多肽的靶标独立的重定向人效应细胞T细胞杀伤的剂量依赖性表征。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0432] 图45:使用CD123阴性U937细胞系,在基于流式细胞术的测定中,通过多特异性CD123/TCR结合多肽的靶标独立的重定向人(图45A)或食蟹猴(图45B)效应T细胞杀伤的剂量依赖性表征。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0433] 图46:在72小时的温育时间后,在食蟹猴效应T细胞杀伤CD123阴性U-937细胞期间(图46A)和在人效应细胞T细胞杀伤CD123阴性NCI-H929细胞(图46B)期间,在CD4/CD8+门控T细胞上经由多价CD123/TCR结合多肽的剂量依赖性T细胞活化读数。针对构建体的浓度绘制CD4/CD8+门控T细胞内的MFI(平均荧光强度)。

[0434] 图47:使用效应子与靶标的比率10:1,使用人效应T细胞和NCI-H929靶细胞,多特异性CD123/TCR结合多肽对细胞因子产量的影响。测量人IL-6(图47B)和IFN- γ (图47A)的产量。针对浓度绘制细胞因子量的OD值。

[0435] 图48A和48B:使用效应子与靶标比率为10:1,在重定向MOLM-13靶细胞杀伤设置中,经由多特异性多肽的人效应T细胞的剂量依赖性T细胞增殖。针对浓度绘制CPM(每分钟计数)。

[0436] 图49:在不存在靶细胞的情况下,经由多特异性多肽的人效应T细胞的剂量依赖性

T细胞增殖。针对浓度绘制CPM(每分钟计数)。

[0437] 图50:在T017000114和MOLM-13细胞以不同E:T比率存在的情况下,未活化的和预活化的T细胞的溶解潜力。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡。

[0438] 图51:在T017000139和KG1a细胞以不同E:T比率存在的情况下,未活化和预活化的T细胞的溶解潜力。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡。

[0439] 图52:使用效应子与靶标的比率为10:1,通过多价CD123/TCR结合多肽,在基于流式细胞术的测定中,在不存在或存在血清白蛋白的情况下,MOLM-13细胞的剂量依赖性重定向人(图52A和52B)和食蟹猴(图52C和52D)T细胞杀伤。将不相关的多价多肽T017000129和单价结构单元A0110056A10和T0170056G05作为阴性对照。针对多肽的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0440] 图53:使用效应子与靶标的比率为10:1,通过多价CD123/TCR结合多肽,在基于流式细胞术的测定中,在不存在或存在血清白蛋白的情况下,KG1a细胞的剂量依赖性重定向人(图53A、53B和53C)和食蟹猴(图53D、53E和53F)T细胞杀伤。将不相关的多价多肽A022600009(存在或不存在SA)和T017000129,以及单价结构单元A0110056A10和T0170056G05作为阴性对照。针对构建体的浓度绘制%细胞死亡(TOPRO阳性细胞的%)。

[0441] 图54:使用效应子与靶标比率为10:1,在通过HLE多特异性CD123/TCR结合多肽的重定向T细胞杀伤MOLM-13期间,通过人T细胞的剂量依赖性细胞因子产生。测量人IL-6(图54B)和IFN- γ (图54A)的产生。针对浓度绘制细胞因子的量。

[0442] 图55:使用效应子与靶标比率为10:1,在重定向MOLM-13靶细胞杀伤设置中,通过HLE多特异性多肽的人效应T细胞的剂量依赖性T细胞增殖。针对浓度绘制CPM(每分钟计数)。

[0443] 图56:在5小时的温育时间后,在健康人PBMC样品中,通过多价HLE CD123/TCR结合多肽的重定向自体T细胞重定向的CD123+pDC和嗜碱性粒细胞的消耗。针对构建体的浓度绘制Lin-/CD123+细胞(pDC和嗜碱性粒细胞)的百分比。

[0444] 图57:在5h的温育时间后的体外环境中,在健康食蟹猴PBMC样品中,通过多价HLE CD123/TCR结合多肽的重定向自体T细胞重定向的CD123+pDC和嗜碱性粒细胞的消耗。针对构建体的浓度绘制Lin-/CD123+细胞(pDC和嗜碱性粒细胞)的百分比。

[0445] 图58:在24小时的温育时间后,在健康人PBMC样品中,通过多价CD123/TCR结合多肽的重定向自体T细胞重定向的单核细胞的消耗。针对构建体的浓度绘制单核细胞(CD14+细胞)的百分比。

[0446] 图59:经处理的食蟹猴外周血中T细胞随时间的计数。每 μ L血液中CD4 $^+$ CD3 $^+$ T细胞(图59A)和CD8 $^+$ CD3 $^+$ T细胞(图59B)的绝对数量表示为随时间的变化不同治疗组的平均值 \pm SEM:阳性对照(空心圆,n=2),无关/TCR多肽(十字,n=4),CD123/TCR多肽(黑色三角形,n=4)。灰色条反映了连续输注治疗期。

[0447] 图60:经处理的食蟹猴外周血中CD123 $^+$ CD14 $^-$ 细胞随时间的计数。每 μ L血液中CD123 $^+$ CD14 $^-$ 细胞的绝对数量表示为对于不同治疗组的平均值 \pm SEM:阳性对照(空心圆圈,n=2),无关/TCR多肽(十字,n=4),CD123/TCR多肽(黑色三角形,n=4)。灰色条反映了连续输注治疗期。

[0448] 图61:CD4 $^+$ CD3 $^+$ 和CD8 $^+$ CD3 $^+$ T细胞上的PD-1随时间的表达。血液中CD4 $^+$ CD3 $^+$ T细胞(图

61A) 和 CD8⁺CD3⁺T 细胞 (图 61B) 的频率表示为对于不同治疗组的平均值 \pm SEM: 阳性对照 (空心圆圈, n=2)、无关/TCR 多肽 (十字, n=4)、CD123/TCR 多肽 (黑色三角形, n=4)。灰色条反映了连续输注治疗期。

[0449] 图 62: 经处理的食蟹猴中的血清白细胞介素-6 随时间的变化。血清中 IL-6 的浓度表示为对于不同治疗组的平均值 \pm SEM (pg/mL): 阳性对照 (空心圆圈, n=2)、无关/TCR 多肽 (十字, n=4)、CD123/TCR 多肽 (黑色三角形, n=4)。灰色条反映了连续输注治疗期。

[0450] 发明详述

[0451] 定义

[0452] 除非另有说明或定义, 使用的所有术语具有其在本领域中通常的含义, 这对本领域技术人员而言是清楚的。例如参考标准手册, 诸如 Sambrook 等人 (1989, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (第2版) Vols. 1-3, Cold Spring Harbor Laboratory Press)、F. Ausubel 等人 (1987, Current protocols in molecular biology, Green Publishing and Wiley Interscience, New York)、Lewin (1985, Genes II, John Wiley & Sons, New York, N.Y.)、Old 等人 (1981, Principles of Gene Manipulation: An Introduction to Genetic Engineering (第2版) University of California Press, Berkeley, CA)、Roitt 等人 (2001, Immunology (6th Ed.) Mosby/Elsevier, Edinburgh)、Roitt 等人 (2001, Roitt's Essential Immunology (10th Ed.) Blackwell Publishing, UK) 和 Janeway 等人 (2005, Immunobiology (第6版) Garland Science Publishing/Churchill Livingstone, New York), 以及本文引用的一般背景技术。

[0453] 除非另有说明, 所有没有特别详细描述的方法、步骤, 技术和操作可以以本身已知的方式进行并且已经这样进行, 这对本领域技术人员而言是清楚的。例如再次参考本文提及的标准手册和一般背景技术以及其中所引用的另外的参考文献; 以及例如以下综述; Presta (2006, Adv. Drug Deliv. Rev. 58 (5-6) : 640-56)、Levin 和 Weiss (2006, Mol. Biosyst. 2 (1) : 49-57)、Irving 等人 (2001, J. Immunol. Methods 248 (1-2) : 31-45)、Schmitz 等人 (2000, Placenta 21 Suppl. A: S106-12)、Gonzales 等人 (2005, Tumour Biol. 26 (1) : 31-43), 其描述了蛋白质工程技术, 例如亲和力成熟和其他用于改善蛋白质如免疫球蛋白的特异性和其他所需特性的技术。

[0454] 本文使用的术语“序列”(例如, 如“免疫球蛋白序列”、“抗体序列”、“可变结构域序列”、“V_{HH} 序列”或“蛋白质序列”)通常应理解为包括相关的氨基酸序列以及编码其的核酸或核苷酸序列, 除非上下文需要更有限的解释。

[0455] 根据上下文, 氨基酸序列被解释为指单个氨基酸或两个或更多个氨基酸的无支链序列。核苷酸序列被解释为指 3 个或更多个核苷酸的无支链序列。

[0456] 氨基酸是天然存在的蛋白质中常见的那些 L- 氨基酸, 并列于以下表 B-1 中。含有 D- 氨基酸的那些氨基酸序列不旨在包含于该定义中。含有翻译后修饰的氨基酸的任何氨基酸序列可以描述为使用下表中所示的符号最初翻译的氨基酸序列, 具有修饰的位置; 例如, 羟基化或糖基化, 但这些修饰不应在氨基酸序列中明确显示。可以表达为序列修饰的连接、交联和末端帽、非肽键等的任何肽或蛋白质都包含在该定义中。

[0457] 术语“蛋白质”、“肽”、“蛋白质/肽”和“多肽”在整个公开内容中可互换使用, 并且用于本公开的目的, 每个均具有相同的含义。每个术语是指由两个或更多个氨基酸的线性

链构成的有机化合物。该化合物可具有十个或更多个氨基酸；二十五个或更多氨基酸；五十个或更多氨基酸；一百个或更多个氨基酸，两百个或更多个氨基酸，和甚至三百个或更多个氨基酸。本领域技术人员将理解，多肽通常包含比蛋白质更少的氨基酸，尽管没有本领域公认的区分多肽和蛋白质的氨基酸数量的截止点。多肽可以通过化学合成或重组方法制备；并且蛋白质通常通过本领域已知的重组方法在体外或体内制备。

[0458] 氨基酸残基将根据标准的三字母或单字母氨基酸代码表示。参考W0 08/020079的第48页上的表A-2。

[0459] 表B-1:常见氨基酸

单字母代码	三字母代码	名称
[0460]	A	丙氨酸
	B	天冬氨酸或天冬酰胺
	C	半胱氨酸
	D	天冬氨酸
	E	谷氨酸
	F	苯丙氨酸
	G	甘氨酸
	H	组氨酸
	I	异亮氨酸
	J	异亮氨酸或亮氨酸
	K	赖氨酸
	L	亮氨酸
	M	甲硫氨酸
	N	天冬酰胺
	O	吡咯赖氨酸
	P	脯氨酸
	Q	谷氨酰胺
	R	精氨酸
	S	丝氨酸
[0461]	T	苏氨酸
	U	硒代半胱氨酸
	V	缬氨酸
	W	色氨酸
	X	罕见或未指定
	Y	酪氨酸
	Z	谷氨酸或谷氨酰胺

[0462] 核酸或氨基酸被认为是“(以) (基本上) 分离的(形式)”——例如,与已经从其中获得该核酸或氨基酸的反应介质或培养基相比——当它与在所述来源或培养基中通常与其缔合的至少一种其他组分分离时,所述至少一种其他组分诸如另一种核酸、另一种蛋白质/多肽、另一种生物组分或大分子或至少一种污染物、杂质或次要组分。特别地,当核酸或氨基酸被纯化至少2倍,特别是至少10倍,更特别是至少100倍,并且直至1000倍时,则认为核酸或氨基酸是“(基本上) 分离的”。“以(基本上) 分离的形式”的核酸或氨基酸优选基本上是均质的,如使用合适的技术所测定的,例如合适的色谱技术,如聚丙烯酰胺凝胶电泳。

[0463] 除非上下文另有明确要求,否则在整个说明书和权利要求书中,词语“包含(comprise)”、“包含(comprising)”等将以包含性的意义解释,而不是排他性或穷举性的意义;也就是说,以“包括但不限于”的意义。

[0464] 例如,当称核苷酸序列、氨基酸序列或多肽分别“包含”另一个核苷酸序列、氨基酸序列或多肽,或“基本上由”另一个核苷酸序列、氨基酸序列或多肽组成时,这可以是表示后一核苷酸序列、氨基酸序列或多肽分别掺入到首先提及的核苷酸序列、氨基酸序列或多肽中,但更通常这通常意指首先提及的核苷酸序列、氨基酸序列或多肽分别在其序列内包含核苷酸段或氨基酸残基段,所述核苷酸段或氨基酸残基段分别具有与后者序列相同的核苷酸序列或氨基酸序列,而不管实际上如何产生或获得所述首先提及的序列(例如其可以是通过本文描述的任何合适的方法)。通过非限制性实例,当称本发明的多肽包含免疫球蛋白单可变结构域时,这可能意指所述免疫球蛋白单可变结构域序列已掺入本发明多肽的序列中,但更通常,这通常意指本发明的多肽在其序列内含有免疫球蛋白单可变结构域的序列,而不管如何产生或获得所述本发明的多肽。此外,当称核酸或核苷酸序列包含另一个核苷酸序列时,首先提及的核酸或核苷酸序列优选是这样的:当其表达为表达产物(例如多肽)时,由后者核苷酸序列编码的氨基酸序列形成所述表达产物的一部分(换言之,后者核苷酸序列与首先提及的更大的核酸或核苷酸序列在相同的阅读框中)。

[0465] “基本上由……组成”是指本发明方法中所用的免疫球蛋白单可变结构域与本发明的多肽精确相同或对应于具有添加在免疫球蛋白单可变结构域的氨基端末端、羧基端末端或在氨基端末端和羧基端末端二者处的有限数量氨基酸残基的本发明多肽,所述有限数量氨基酸残基为例如1-20个氨基酸残基,如1-10个氨基酸残基和优选地1-6个氨基酸残基,如1、2、3、4、5或6个氨基酸残基。

[0466] “由……组成”是指本发明方法中所用的免疫球蛋白单可变结构域与本发明的多肽完全相同。

[0467] 为了比较两个或更多个核苷酸序列的目的,第一核苷酸序列和第二核苷酸序列之间的“序列同一性”的百分比可以通过将[第一核苷酸序列中与第二核苷酸序列中相应位置的核苷酸相同的核苷酸的数目]除以[第一核苷酸序列中核苷酸的总数目]并乘以[100%]来计算,其中与第一核苷酸序列相比,第二核苷酸序列中每个核苷酸的缺失、插入、取代或添加被认为是单核苷酸(位置)的差异。备选地,可以使用标准设置,使用用于序列比对的已知计算机算法(例如NCBI Blast v2.0)来计算两个或更多个核苷酸序列之间的序列同一程度。用于确定序列同一程度的一些其他技术、计算机算法和设置例如在WO 04/037999、EP 0967284、EP 1085089、WO 00/55318、WO 00/78972、WO 98/49185和GB 2357768中所述。通常,为了根据上文概述的计算方法确定两个核苷酸序列之间“序列同一性”百分比的目

的,具有最大核苷酸数目的核苷酸序列将被视为“第一”核苷酸序列,并且另一个核苷酸序列将被视为“第二”核苷酸序列。

[0468] 为了比较两个或更多个氨基酸序列的目的,第一氨基酸序列和第二氨基酸序列之间的“序列同一性”的百分比(本文中也称为“氨基酸同一性”)可以通过将[第一氨基酸序列中与第二氨基酸序列中相应位置的氨基酸残基相同的氨基酸残基的数目]除以[第一氨基酸序列中氨基酸残基的总数目]并乘以[100%]来计算,其中与第一氨基酸序列相比,第二氨基酸序列中每个氨基酸残基的缺失、插入、取代或添加被认为是单个氨基酸残基(位置)的差异,即本文所定义的“氨基酸差异”。备选地,可以使用已知的计算机算法(例如用于确定核苷酸序列的序列同一性程度的上述提及的那些)来计算两个氨基酸序列之间的序列同一性程度,再次使用标准设置。通常,为了根据上文概述的计算方法确定两个氨基酸序列之间“序列同一性”百分比的目的,具有最大氨基酸残基数目的氨基酸序列将被视为“第一”氨基酸序列,并且另一个氨基酸序列将被视为“第二”氨基酸序列。

[0469] 而且,在确定两个氨基酸序列之间的序列同一性程度时,本领域技术人员可以考虑所谓的“保守”氨基酸取代,其通常可以描述为氨基酸取代,其中氨基酸残基被替换为另一个具有相似化学结构的氨基酸残基,并且其对多肽的功能、活性或其它生物学特性几乎没有影响。这种保守氨基酸取代是本领域熟知的,例如来自W0 04/037999、GB 335768、W0 98/49185、W0 00/46383和W0 01/09300;并且,这种取代的(优选的)类型和/或组合可以基于W0 04/037999以及W0 98/49185和其中引用的另外的参考文献的相关教导进行选择。

[0470] 这种保守取代优选是这样的取代,其中下列组(a) - (e)中的一个氨基酸被相同组内的另一个氨基酸残基取代:(a)小的脂肪族、非极性或轻微极性残基:Ala、Ser、Thr、Pro和Gly;(b)极性、带负电荷的残基及其(不带电荷的)酰胺:Asp、Asn、Glu和Gln;(c)极性带正电荷的残基:His、Arg和Lys;(d)大的脂肪族非极性残基:Met、Leu、Ile、Val和Cys;和(e)芳香族残基:Phe、Tyr和Trp。特别优选的保守取代如下:Ala替换为Gly或Ser;Arg替换为Lys;Asn替换为Gln或His;Asp替换为Glu;Cys替换为Ser;Gln替换为Asn;Glu替换为Asp;Gly替换为Ala或Pro;His替换为Asn或Gln;Ile替换为Leu或Val;Leu替换为Ile或Val;Lys替换为Arg、Gln或Glu;Met替换为Leu、Tyr或Ile;Phe替换为Met、Leu或Tyr;Ser替换为Thr;Thr替换为Ser;Trp替换为Tyr;Tyr替换为Trp;和/或Phe替换为Val、Ile或Leu。

[0471] 应用于本文所述多肽的任何氨基酸取代也可以基于Schulz等人(1978,蛋白质结构原理,Springer-Verlag)开发的不同物种的同源蛋白质之间氨基酸变异频率的分析,由Chou和Fasman(1974,Biochemistry 13:211;1978,Adv. Enzymol.,47:45-149)开发的结构形成潜力的分析,以及Eisenberg等人(1984,Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81:140-144),Kyte和Doolittle(1981,J. Molec. Biol. 157:105-132),和Goldman等(1986,Ann. Rev. Biophys. Chem. 15:321-353)开发的蛋白质中的疏水性模式分析,这些文献均通过引用整体并入本文。关于纳米抗体的一级,二级和三级结构的信息在本文的描述和上文引用的一般背景技术中给出。此外,为此目的,来自美洲驼的V_{HH}结构域的晶体结构例如由Desmyter等人(1996,Nature Structural Biology,3:803),Spinelli等(1996,Natural Structural Biology,3:752-757)和Decanniere等(1999,Structure,7(4):361)给出。关于在常规V_H结构域中形成V_H/V_L界面的一些氨基酸残基和在这些位置上潜在的骆驼化取代的进一步信息可以在上面引用的现有技术中找到。

[0472] 如果氨基酸序列和核酸序列在其整个长度上具有100%的序列同一性(如本文所定义),则称它们是“完全相同的”

[0473] 当比较两个氨基酸序列时,术语“氨基酸差异”是指与第二序列相比,第一序列的位置上的单个氨基酸残基的插入、缺失或取代;应当理解,两个氨基酸序列可含有一个、两个或更多个这种氨基酸差异。更具体地,在本发明的氨基酸序列和/或多肽中,术语“氨基酸差异”是指与分别a)、c)或e)的CDR序列相比,b)、d)或f)中指定的CDR序列的位置上单个氨基酸残基的插入、缺失或取代;应当理解,与分别a)、c)或e)的CDR序列相比,b)、d)和f)的CDR序列可含有一个、两个或最多三个这样的氨基酸差异。

[0474] “氨基酸差异”可以是任何一个、两个、三个或最多四个取代、缺失或插入,或其任何组合,其可以改善本发明多肽的性质,或者至少不会自本发明多肽所期望的性质或自所期望的性质的平衡或组合减损太多。在这方面,与包含不具有一个、两个、三个或最多四个取代、缺失或插入的一个或更多个CDR序列的多肽相比,所得的本发明多肽应至少以相同的、大约相同的或更高的亲和力与CD123或T细胞受体结合,所述亲和力如通过表面等离子共振所测量的。

[0475] 在这方面,根据b)、d)和/或f)的氨基酸序列可以是通过亲和力成熟,使用本身已知的一种或多种亲和力成熟技术分别自根据a)、c)和/或e)的氨基酸序列衍生的氨基酸序列。

[0476] 例如且取决于用于表达本发明多肽的宿主生物体,可以以这样的方式设计这种缺失和/或取代:用于翻译后修饰的一个或更多个位点(例如一个或更多个糖基化位点)被移除,如本领域技术人员的能力范围内。

[0477] “亲和力”表示分子相互作用的强度或稳定性。亲和力通常由 K_D 或解离常数给出,其具有摩尔/升(或M)的单位。亲和力还可以表达为结合常数, K_A ,其等于 $1/K_D$ 并且具有(摩尔/升) $^{-1}$ (或M $^{-1}$)的单位。在本说明书中,两个分子之间的相互作用的稳定性将主要根据它们的相互作用的 K_D 值表达;技术人员将明确,鉴于关系 $K_A = 1/K_D$,通过其 K_D 值指定分子相互作用的强度还可以用于计算相应 K_A 值。 K_D 值也在热力学意义上表征分子相互作用的强度,因为通过公知关系 $DG = RT \cdot \ln(K_D)$ (等价地 $DG = -RT \cdot \ln(K_A)$)它与结合的自由能(DG)的变化相关,其中R等于气体常数,T等于绝对温度并且ln表示自然对数。

[0478] 被认为有意义的(例如特异的)的对于生物学相互作用的 K_D 通常在 $10^{-12} M$ (0.001nM)至 $10^{-5} M$ (10000nM)的范围内。相互作用越强,其 K_D 越低。

[0479] K_D 还可以表示为复合物的解离速率常数(表示为 k_{off})与其缔合速率常数(表示为 k_{on})的比率(因此 $K_D = k_{off}/k_{on}$ 且 $K_A = k_{on}/k_{off}$)。解离速率 k_{off} 具有单位s $^{-1}$ (其中s是秒的SI单位记号)。缔合速率 k_{on} 具有单位M $^{-1} s^{-1}$ 。缔合速率可在 $10^2 M^{-1} s^{-1}$ 至约 $10^7 M^{-1} s^{-1}$ 之间变化,接近用于双分子相互作用的扩散限制的缔合速率常数。通过关系 $t_{1/2} = \ln(2) / k_{off}$,解离速率与给定分子相互作用的半衰期有关。解离速率可以在 $10^{-6} s^{-1}$ (接近具有多日的 $t_{1/2}$ 的不可逆复合物)至 $1 s^{-1}$ ($t_{1/2} = 0.69 s$)之间变化。

[0480] 抗原结合蛋白(例如ISV)与抗原或抗原决定簇的特异性结合可以以本身已知的任何合适的方式确定,包括例如Scatchard分析和/或竞争性结合测定,如放射免疫测定(RIA),酶免疫测定(EIA)和夹心竞争测定,和本领域本身已知的其不同变体;以及本文提及的其他技术。

[0481] 两个分子之间的分子相互作用的亲和力可以通过本身已知的不同技术测量,例如众所周知的表面等离振子共振(SPR)生物传感器技术(参见例如Ober等人,2001,Intern. Immunology 13:1551-1559)。如本文所用,术语“表面等离振子共振”是指光学现象,所述光学现象允许通过检测生物传感器矩阵内的蛋白浓度的改变来分析实时生物特异相互作用,在生物传感器矩阵中,一个分子被固定在生物传感器芯片上,并且另一个分子在流动条件下经过固定的分子,产生 k_{on} 、 k_{off} 测量值,并因此产生 K_D (或 K_A)值。这可以例如使用众所周知的BIAcore®系统(BIAcore International AB, a GE Healthcare company, Uppsala, Sweden and Piscataway, NJ)进行。对于进一步说明,请参阅Jonsson等人(1993, Ann. Biol. Clin. 51:19-26)、Jonsson等人(1991 Biotechniques 11:620-627)、Johnsson等人(1995, J. Mol. Recognit. 8:125-131)和Johnnson等人(1991, Anal. Biochem. 198:268-277)。

[0482] 用于确定生物分子相互作用的亲和力的另一种众所周知的生物传感器技术是生物层干涉测量法(BLI)(参见例如Abdiche等人,2008,Anal. Biochem. 377:209-217)。如本文所用,术语“生物层干涉测量法”或“BLI”是指无标记光学技术,其分析从两个表面反射的光的干涉图案:内部参考层(参考光束)和生物传感器尖端上的固定蛋白质层(信号光束)。结合到生物传感器尖端的分子数量的变化引起干涉图案的变化,报告为波长偏移(nm),所述波长偏移的大小是与生物传感器尖端表面结合的分子数量的直接测量。由于可以实时测量相互作用,因此可以确定结合和解离速率和亲和力。BLI可以例如使用众所周知的Octet®系统(ForteBio, a division of Pall Life Sciences, Menlo Park, USA)进行。

[0483] 备选地,亲和力可以使用KinExA®平台(Sapidyne Instruments Inc, Boise, USA)在动力学排除测定(KinExA)中测量(参见例如Drake等,2004,Anal. Biochem., 328:35-43)。如本文中所用,术语“KinExA”是指测量未修饰分子的真实平衡结合亲和力和动力学的基于溶液的方法。将抗体/抗原复合物的平衡溶液经过具有珠子的柱,其中所述珠子预先涂有抗原(或抗体),这允许游离抗体(或抗原)与涂覆的分子结合。由此捕获的抗体(或抗原)的检测是通过荧光标记的蛋白质结合所述抗体(或抗原)完成的。

[0484] GYROLAB®免疫测定系统为自动化生物分析和快速样品周转提供了平台(Fraley等,2013,Bioanalysis 5:1765-74)。

[0485] 本领域技术人员还将清楚,如果测量过程以某种方式影响隐含分子的固有结合亲和力,例如通过与一个分子的生物传感器上的涂层相关的伪影,则测量的 K_D 可以对应于表观 K_D 。此外,如果一个分子含有多个用于其他分子的识别位点,则可以测量表观 K_D 。在这种情况下,测量的亲和力可能受到两个分子相互作用的亲合力的影响。如本领域技术人员所清楚的,并且如WO 08/020079的53-56页上所述,解离常数可以是实际或表观解离常数。确定解离常数的方法对于技术人员是清楚的,并且例如包括WO 08/020079的53-56页上提及的技术。

[0486] 可以互换使用的术语“表位”和“抗原决定簇”是指大分子的一部分,例如被诸如免疫球蛋白、常规抗体、免疫球蛋白单可变结构域和/或本发明多肽的抗原结合分子,更特别地,被所述抗原结合分子的抗原结合位点识别的多肽或蛋白质。表位定义了免疫球蛋白的最小结合位点,并因此代表免疫球蛋白特异性的靶标。

[0487] 识别表位的抗原结合分子(例如免疫球蛋白、常规抗体、免疫球蛋白单可变结构域

和/或本发明多肽)的部分称为“互补位”。

[0488] 如果多肽(例如免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、本发明的多肽、或通常地抗原结合分子或其片段)可以“结合(至)”或“特异性结合(至)”和/或“具有亲和力”和/或“特异于”某个表位、抗原或蛋白质(或至少其一部分、片段或表位)，那么这样的多肽被称为“针对(against)”或“针对(directed against)”所述表位、抗原或蛋白质，或者是关于这种表位、抗原或蛋白质的“结合”分子，或称为“抗”-表位、“抗”-抗原或“抗”-蛋白质(例如，“抗”-CD123或“抗”-TCR)。

[0489] 术语“特异性”具有W0 08/020079的53-56页上的段落n)中给出的含义；并且如其中所提及的，是指特定的抗原结合分子或抗原结合蛋白(例如本发明的免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽)可结合的不同类型的抗原或抗原决定簇的数目。抗原结合蛋白的特异性可以基于亲和力和/或亲合力来确定，如W0 08/020079(通过引用并入本文)的第53-56页上所述，其还描述了用于测量抗原结合分子(例如本发明的免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽)和相关抗原之间结合的一些优选技术。典型地，抗原结合蛋白(例如本发明的免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽)将与其抗原结合，解离常数(K_D)为 10^{-5} 至 10^{-12} 摩尔/升或更低，优选地 10^{-7} 至 10^{-12} 摩尔/升或更低，更优选 10^{-8} 至 10^{-12} 摩尔/升(即，缔合常数(K_A)为 10^5 至 10^{12} 升/摩尔或更高，优选 10^7 至 10^{12} 升/摩尔或更多，更优选 10^8 至 10^{12} 升/摩尔)。任何大于 10^4 摩尔/升的 K_D 值(或任何低于 $10^4 M^{-1}$ 的 K_A 值)通常被认为表示非特异性结合。优选地，本发明的单特异性多肽将与所需抗原结合，亲和力为小于500nM，优选小于200nM，更优选小于10nM，例如诸如在10和5nM之间，例如小于10nM，小于5nM，小于3nM，小于2nM，例如10nM-1nM，5nM-1nM或甚至更小。抗原结合蛋白与抗原或抗原决定簇的特异性结合可以以本身已知的任何合适的方式确定，包括例如Scatchard分析和/或竞争性结合测定，例如放射免疫测定(RIA)、酶免疫测定(EIA)和夹心竞争试验，和本领域中本身已知的其不同变体；以及本文提到的其他技术。如本领域技术人员所清楚的，并且如W0 08/020079的第53-56页所述，解离常数可以是实际或表观解离常数。确定解离常数的方法对于技术人员是清楚的，并且例如包括W0 08/020079的第53-56页上提及的技术。

[0490] 可用于评价亲和力的一种方法是Friguet等人(1985, J. Immunol. Methods 77: 305-19)的2步ELISA(酶联免疫吸附测定)程序。该方法建立溶液相结合平衡测量，并避免与支持物(例如塑料)上的一种分子的吸附有关的可能的伪影。

[0491] 然而， K_D 的准确测量可能是非常劳动密集的，因此，通常确定表观 K_D 值以评价两个分子的结合强度。应该注意的是，只要所有测量都以一致的方式进行(例如保持测定条件不变)，则表观 K_D 测量值可以用作真实 K_D 的近似值，并且因此在本文件中， K_D 和表观 K_D 应该被以相等的重要性或相关性对待。

[0492] 最后，应该注意的是，在许多情况下，有经验的科学家可以判断它方便用于确定相对于一些参考分子的结合亲和力。例如，为了评价分子A和B之间的结合强度，可以例如使用参考分子C，其已知结合B并且适当地用荧光团或发色团基团或其他化学结构部分如生物素标记，以便在ELISA或FACS(荧光激活的细胞分选)或其他形式中容易检测(用于荧光检测的荧光团、用于光吸收检测的发色团、用于链霉亲和素介导的ELISA检测的生物素)。典型地，参考分子C保持在固定浓度，并且对于给定浓度或量的B，A的浓度是变化的。作为结果，获得对应于A的浓度的 IC_{50} 值，在浓度下，在不存在A的情况下对于C测量的信号减半。假如 K_D ref

(参考分子的 K_D)以及参考分子的总浓度 c_{ref} 是已知的,则相互作用A-B的表观 K_D 可以从下式获得: $K_D = IC_{50} / (1 + c_{ref} / K_{Dref})$ 。注意,如果 $c_{ref} \ll K_{Dref}$,则 $K_D \approx IC_{50}$ 。假如对于比较的结合物的 IC_{50} 的测量以一致的方式进行(例如保持 c_{ref} 固定),则可以通过 IC_{50} 评价分子相互作用的强度或稳定性,并且在本文中将该测量判断为等于 K_D 或表观 K_D 。

[0493] 半数最大抑制浓度(IC_{50})是化合物在抑制生物或生物化学功能例如药理学效果中的有效性的测量。该定量测量指出半数抑制给定生物学过程(或过程的组分,即酶、细胞、细胞受体、趋化作用、间变、转移、侵入等)需要多少ISV(例如纳米抗体)(抑制剂)。换句话说,其是物质的半数最大(50%)抑制浓度(IC)(50% IC,或 IC_{50})。药物的 IC_{50} 可以通过构建剂量响应曲线和检查不同浓度的拮抗剂如本发明的ISVD(例如纳米抗体)对逆转激动剂活性的影响来确定。可以通过确定抑制激动剂的最大生物学响应的一半所需的浓度对给定拮抗剂如本发明的ISVD(例如纳米抗体)计算 IC_{50} 值。

[0494] 术语半数最大有效浓度(EC_{50})是指在指定的暴露时间之后,诱导基线和最大值之间的半数响应的化合物浓度。在本文中其用作多肽的、ISV(例如纳米抗体)的效力的测量值。分级的剂量响应曲线的 EC_{50} 表示观察到其最大效应的50%的情况下化合物的浓度。浓度优选以摩尔单位表达。

[0495] 在生物系统中,配体浓度的小的改变通常导致响应符合S形函数的快速改变。随配体浓度增加而响应增加开始变缓处的拐点是 EC_{50} 。这可以通过对最佳拟合线求导在数学上确定。在多数情况下,依赖于图表来估计是方便的。在实施例部分提供 EC_{50} 的情况下,设计实验以尽可能精确地反映 K_D 。换句话说, EC_{50} 值因此可以被认为是 K_D 值。

[0496] 还涉及 IC_{a0} ,其是化合物的抑制(50%抑制)的测量值。对于竞争结合测定和功能性拮抗剂测定, IC_{50} 是剂量响应曲线的最常见概要测量。对于激动剂/刺激剂测定,最常见的概要测量是 EC_{50} 。

[0497] 抑制剂常数 K_i 表示抑制剂的效力;它是产生半数最大抑制所需的浓度。绝对抑制常数 K_i 可以使用Cheng-Prusoff方程计算:

$$[0498] K_i = \frac{IC_{50}}{\frac{[L]}{K_D} + 1}$$

[0499] 其中 $[L]$ 是配体的固定浓度。

[0500] 当免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽与第一抗原结合的亲和力(如上所述的,适合地表达为 K_D 值、 K_A 值、 K_{off} 速率和/或 K_{on} 速率)是所述免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽与第二靶标或抗原结合的亲和力的至少10倍,如至少100倍,和优选至少1000倍和直至10000倍或更优的亲和力时,将所述免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽称为相比于第二靶标或抗原而言对第一靶标或抗原是“特异的”。例如,免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽可以与第一靶标或抗原以这样的 K_D 值结合:所述 K_D 值是所述免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽与第二靶标或抗原结合的 K_D 的至少10倍小,例如至少100倍小,且优选至少1000倍小,例如10000倍小或甚至更小。优选地,当与第二靶标或抗原相比,免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽对第一靶标或抗原是“特异的”时,它针对(如本文所定义的)所述的第一靶标或抗原,而不针对所述第二靶标或抗原。

[0501] 氨基酸序列例如根据本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽,被称为对两种不

同的抗原或抗原决定簇(例如来自哺乳动物两种不同物种的血清白蛋白,如人血清白蛋白和食蟹猴血清白蛋白,如来自哺乳动物不同物种的CD123,如人CD123和食蟹猴CD123,如来自哺乳动物不同物种的TCR,例如,人TCR和食蟹猴TCR)是“交叉反应的”,假如其对这些不同的抗原或抗原决定簇具有特异性(如本文所定义)的话。

[0502] 术语“交叉阻断(cross-block)”、“被交叉阻断(cross-blocked)”和“交叉阻断的(cross-blocking)”、“交叉竞争((cross)-compete)”、“交叉竞争的((cross)-competing)”和“交叉竞争((cross)-competition)”在本文中可互换使用,指免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂干扰其他免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或结合剂与给定靶标的结合的能力。可使用竞争结合测定来确定免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂能够干扰另一种(结合剂)与靶标结合的程度,以及因此根据本发明是否可被称为交叉阻断。在实施例中描述了一种特别合适的定量交叉阻断测定,包括例如使用在细胞上表达的CD123的荧光激活细胞分选(FACS)结合测定。(交叉)阻断的程度可以通过(减少的)通道荧光来测量。另一种合适的定量交叉阻断测定法使用Biacore仪器,其可以使用表面等离振子共振技术测量相互作用的程度。另一种合适的定量交叉阻断测定使用基于ELISA的方法,以测量免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂在它们与靶标结合方面的竞争。

[0503] 以下一般描述了用于确定免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂是否交叉阻断或是否能够根据本发明进行交叉阻断的合适的FACS分析。应当理解,该测定可与本文所述的任何免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂一起使用。FACS仪器(例如FACSArray;Becton Dickinson)按照制造商的建议操作。

[0504] 为了评价两种结合剂(例如,如两种免疫球蛋白单可变结构域和/或纳米抗体)之间用于结合CD123的“(交叉)阻断”或“(交叉)竞争”,可以使用细胞(例如,内源性表达CD123的细胞系MOLM-13或过表达人CD123的F1p-InTM-CHO细胞)进行FACS竞争实验。可以使用不同的检测试剂,包括例如单克隆ANTI-FLAG[®]M2抗体(Sigma-Aldrich,目录号F1804)、单克隆抗C-myc抗体(Sigma-Aldrich,目录号WH0004609M2)、单克隆ANTI-HIS TAG抗体(Sigma-Aldrich,目录号SAB1305538),每个标记不同。多种荧光团可用作流式细胞术中的标记物(例如诸如PE(R-藻红蛋白)、7-氨基放线菌素D(7-AAD)、吖啶橙、各种形式的Alexa Fluor(例如诸如Alexa647)、别藻蓝蛋白(APC)、AmCyan、氨基香豆素、APC Cy5、APC Cy7、APC-H7、APC/Alexa Fluor 750、AsRed2、Azami-Green、石青、BODIPY FL C5-神经酰胺、BCECF-AM、Bis-oxonol DiBAC2(3)、BODIPY-FL、钙黄绿素、钙黄绿素AM、Caroxy-H2DCFDA、Cascade Blue、Cascade Yellow、Cell Tracker Green、Cerulean、CFSE、色霉素A3、CM-H2DCFDA、Cy2、Cy3、Cy3.5、Cy3B、Cy5、Cy5.5、Cy7、CyPet、DAF-FM DAF-FM二乙酸酯、DAPI、DCFH(2'7'二氯二氢荧光素)、DHR、二氢钙黄绿素AM、二氢罗丹明、Dihydrothidium、DiLC1(5)、DiOC6(3)、DiOC7(3)、dKeima-Red、DRAQ5、Dronpa-绿、各种形式的DsRed dTomato、各种形式的DyLight、大肠杆菌BioParticles AF488、E2-Crimson、E2-Orange、EBFP2、ECFP、各种形式的eFluor、EGFP、EGFP*、祖母绿、eqFP650、eqFP670、ER-Tracker Blue-White DPX、溴化乙锭、Express2、EYFP、Fc OxyBurst绿、Fc OxyBurst绿123、FITC、Fluo-3、Fluo-4、荧光素、Fura-2、Fura-红、GFPuv、H2DCFDA、HcRed1、Hoechst蓝(33258)、Hoechst红(33342)、羟基香豆素、HyPer、Indo-1、Indo-1蓝(低Ca2+)、Indo-1 Violet(高Ca2+)、iRFP、J-Red、JC-1、JC-9、

Katushka (TurboFP635)、Katushka2 Kusabira-橙、LDS 751、丽丝胺罗丹明B、各种形式的Live/Dead、路西法黄、路西法黄CH、Lyso Tracker蓝、Lyso Tracker绿、Lyso Tracker红、mAmenrine、Marina Blue、mBanana、mCFP、mCherry、mCitrine、甲氧基香豆素、mHoneyDew、Midoriishi-Cyan、光神霉素、Mito Tracker Deep Red、Mito Tracker Green、Mito Tracker橙、Mito Tracker红、MitoFluor绿、mKate (TagFP635)、mKate2、mKeima、mKeima-Red、mKO、mKOk、mNeptune、Monochlorobimane、mOrange、mOrange2、mRaspberry、mPlum、mRFP1、mStrawberry、mTangerine、mTarquoise、mTFP1、mTFP1 (Teal)、NBD、OxyBurst Green H2DCFDA、OxyBurst Green H2HFF BSA、Pacific蓝、PE (R-藻红蛋白)、PE Cy5、PE Cy5.5、PE Cy7、PE Texas红、PE-Cy5缀合物、PE-Cy7缀合物、PerCP (Peridinin chlorophyll protein)、PerCP Cy5.5、PhiYFP、PhiYFP-m、碘化丙啶 (PI)、各种形式的Qdot、红613、RFP Tomato、Rhod-2、S65A、S65C、S65L、S65T、单线态氧传感器绿、Sirius、SNARF、Superfolder GFP、SYTOX蓝、SYTOX绿、SYTOX橙、T-宝石蓝、TagBFP、TagCFP、TagGFP、TagRFP、TagRFP657、TagYFP、tdTomato、Texas红、噻唑橙、TMRE、TMRM、Topaz、TOTO-1、TO-PRO-1、TRITC、TRITC TfRed、TurboFP602、TurboFP635、TurboGFP、TurboRFP、TurboYFP、Venus、Vybrant CycleDye Violet、Wild Type GFP、X-罗丹明、Y66F、Y66H、Y66W、YOYO-1、YPet、ZsGreen1、ZsYellow1、Zymosan A BioParticles AF488 (参见更多: <http://www.thefcn.org/flow-fluorochromes>)。荧光团或简称“fluors”通常附着于识别CD123的抗体 (例如免疫球蛋白单可变结构域, 例如纳米抗体) 或附着于用作检测试剂的抗体。可获得各种缀合的抗体, 诸如 (不限于) 例如与Alexa Fluor®、DyLight®、Rhodamine、PE、FITC和Cy3缀合的抗体。每个荧光团具有特征峰值激发和发射波长。可以使用的标记组合将取决于用于激发荧光团的灯或激光的波长以及可用的检测器。

[0505] 为了评价两种测试结合剂 (称为A和B*) 之间对于CD123结合的竞争, 将冷 (无任何标记) 结合剂A的稀释系列与标记的结合剂B*一起加入 (例如100 000) 细胞中。测试混合物中B*的浓度应足够高, 以便易于使细胞上表达的CD123上的结合位点饱和。可以用在CD123表达细胞上的B*的滴定系列和用于结合的EC₅₀值的确定, 来确定使细胞上表达的CD123上的结合剂的结合位点饱和的结合剂B*的浓度。为了在饱和浓度下工作, 结合剂B*可以以100倍EC₅₀浓度使用。

[0506] 在将细胞与A和B*的混合物温育并洗涤细胞后, 可以在FACS上进行读出。首先, 根据散射特征 (profile) 确定完整细胞上的门 (gate), 并记录通道荧光的总量。

[0507] 还制备了结合剂B*的单独溶液。该溶液中的结合剂应与试验混合物 (具有结合剂A和B*) 中的结合剂处于相同的缓冲液中并处于相同的浓度。这种单独的溶液也被添加到细胞中。温育和细胞洗涤后, 可以在FACS上进行读出。首先, 根据散射特征确定完整细胞上设置的门, 并记录通道荧光的总量。

[0508] 与用B*的单独溶液温育的细胞的荧光相比, 用A和B*的混合物温育的细胞的荧光减少表明了结合剂A (交叉) 阻断结合剂B*与在细胞上表达的CD123的结合。

[0509] 根据本发明的交叉阻断免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂是在上述FACS交叉阻断测定中与CD123结合的结合剂, 使得在测定期间和存在第二免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂时, 所记录的荧光是 (对于单独标记的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂所测量的) 最

大荧光的80%和0.1%之间(例如80%至4%)，具体地是最大荧光的75%和0.1%之间(例如75%至4%)，更具体地是(如上刚刚所定义)最大荧光的70%和0.1%之间(例如70%至4%)。

[0510] 两种测试结合剂(称为A*和B*)之间对于结合CD123的竞争也可以通过向CD123表达细胞中添加两种结合剂来评价，每种结合剂用不同的荧光团标记。温育和细胞洗涤后，可以在FACS上进行读出。为每个荧光团设置一个门，记录通道荧光的总量。荧光团之一的荧光的减少和/或缺失表明所述结合剂对于与细胞上表达的CD123结合的(交叉)阻断。

[0511] 以下一般描述了用于确定免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂是否根据本发明进行交叉阻断或能够交叉阻断的合适的Biacore测定法。应当理解，该测定可与本文所述的任何免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂一起使用。Biacore仪器(例如Biacore 3000)的操作符合制造商的建议。因此，在一个交叉阻断测定中，使用标准胺偶联化学将靶蛋白(例如CD123)偶联至CM5 Biacore芯片，以产生用靶标包被的表面。典型地，靶标的200-800个共振单位将与芯片偶联(该量提供易于测量的结合水平，但是通过所使用的测试试剂的浓度容易饱和)。将待评价彼此交叉阻断能力的两种测试结合剂(称为A*和B*)在合适的缓冲液中以结合位点的一比一摩尔比混合，以产生测试混合物。当基于结合位点计算浓度时，假定结合剂的分子量是结合剂的总分子量除以该结合剂上的靶结合位点数量。测试混合物中每种结合剂的浓度应足够高，以便易于Biacore芯片上捕获的靶分子上的结合剂的结合位点饱和。混合物中的结合剂具有相同的摩尔浓度(基于结合)，并且该浓度通常在1.00和1.5微摩尔之间(基于结合位点)。还制备单独含有A*和单独含B*的单独溶液。这些溶液中的A*和B*应该在与测试混合物相同的缓冲液中并且浓度相同。使测试混合物经过靶标包被的Biacore芯片，并记录结合总量。然后以这样的方式处理芯片以便除去结合的结合剂而不损坏与芯片结合的靶标。典型地，这通过用30mM HC1处理芯片60秒来完成。然后将A*单独的溶液通过靶标包被的表面，并记录结合量。再次处理芯片以除去所有结合的结合剂而不损坏与芯片结合的靶标。然后将B*单独的溶液经过靶标包被的表面，并记录结合量。接下来计算A*和B*的混合物的最大理论结合，并且其是当单独通过靶标表面时每种结合剂的结合的总和。如果混合物的实际记录的结合小于该理论最大值，则称两种结合剂彼此交叉阻断。因此，通常，根据本发明的交叉阻断免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂是在上述Biacore交叉阻断测定中将与靶标结合的结合剂，使得在测定期间和在存在第二免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂的情况下，所述记录的结合是在最大理论结合的80%和0.1%之间(例如80%至4%)，具体地是在最大理论结合的75%和0.1%之间(例如75%至4%)，和更具体地，是在组合两种免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或结合剂的最大理论结合(如上所定义)的70%至0.1%之间(例如70%至4%)。上述Biacore测定是用于确定免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂是否根据本发明彼此交叉阻断的主要测定法。在极少数情况下，特定免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂可能不会与通过胺化学偶联至CM5 Biacore芯片的靶标结合(这通常发生在靶标上的相关结合位点通过耦合到芯片而被掩蔽或破坏时)。在这种情况下，可以使用靶标的标记形式(version)来确定交叉阻断，例如N端His标记的形式。在该特定形式中，抗His抗体将与Biacore芯片偶联，然后His标记的靶标将经过芯片表面并被抗

His抗体捕获。交叉阻断分析基本上如上所述进行,除了在每个芯片再生循环后,新的His-标记的靶标将被加载回抗His抗体涂覆的表面上。除了使用N-端His-标记的靶标给出的实例之外,可以备选地使用C-端His-标记的靶标。此外,本领域已知的各种其他标记和标记结合蛋白组合可用于这种交叉阻断分析(例如具有抗HA抗体的HA标记;具有抗FLAG抗体的FLAG标记;具有链霉亲和素的生物素标记)。

[0512] 以下一般描述了用于确定针对靶标(例如CD123)的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂是否如本文所定义进行交叉阻断或能够交叉阻断的ELISA测定。应当理解,该测定可与本文所述的任何免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂一起使用。该测定的一般原理是具有免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或结合剂,其针对包被在ELISA板孔上的靶标。将过量的第二(可能交叉阻断的)抗靶标免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂加入到溶液中(即不与ELISA板结合)。然后将有限量的靶标添加到孔中。包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂以及溶液中的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或结合剂竞争与有限数目的靶分子的结合。洗涤平板以除去未被包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂结合的过量靶标,并除去第二溶液相免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂,以及在第二溶液相免疫球蛋白,抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂和靶标之间形成的任何复合物。然后使用适于检测靶标的试剂测量结合的靶标的量。相对于在不存在第二溶液相免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂时包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂可以结合的靶分子数量,溶液中能够交叉阻断包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂,将能够导致包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂可以结合的靶分子的数量减少。在第一免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂(例如Ab-X)被选择为固定化免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域,多肽或其他结合剂的情况下,将其包被到ELISA板的孔上,然后用合适的封闭溶液封闭平板,以使随后添加的试剂的非特异性结合最小化。然后将过量的第二免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂即Ab-Y加入到ELISA板,使得在ELISA板的包被期间,每孔中Ab-Y靶标结合位点的摩尔数是每孔使用的Ab-X靶标结合位点的摩尔数的至少10倍高。然后加入靶标,使得每孔加入的靶标摩尔数是用于包被每孔的Ab-X靶标结合位点摩尔数的至少25倍更低。在合适的温育期后,洗涤ELISA板,并加入用于检测靶标的试剂,以测量被包被的抗靶标免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂(在这种情况下为Ab-X)特异性结合的靶标的量。测定的背景信号定义为在这样的孔中获得的信号:所述孔具有包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂(在这种情况下为Ab-X),第二溶液相免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂(在这种情况下为Ab-Y),仅靶标缓冲液(即无靶标)和靶标检测试剂。用于测定的阳性对照信号定义为在这样的孔中获得的信号:所述孔具有包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂(在这种情况下为Ab-X),仅第二溶液相免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂缓冲液(即,没有第二溶液相免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其

他结合剂),靶标和靶标检测试剂。可以以这样的方式进行ELISA测定,以使阳性对照信号为背景信号的至少6倍。为了避免由选择哪种免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂用作包被免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂,和选择哪种用作第二(竞争者)免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂所导致的任何伪影(例如Ab-X和Ab-Y之间对靶标的显著不同的亲和力),交叉阻断测定可以以两种形式运行:1)形式1是,Ab-X是包被在ELISA板上的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂,和Ab-Y是溶液中的竞争者免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂;和2)形式2是,Ab-Y是包被在ELISA板上的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂,和Ab-X是溶液中的竞争者免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂。在形式1或形式2中,与在不存在溶液相抗靶标免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂(即阳性对照孔)时获得的靶检测信号相比,如果溶液相抗靶标免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂能够导致靶标检测信号(即,被包被的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂结合的靶标的量)减少60%和100%之间,具体地70%和100%之间,更具体地80%和100%之间,则Ab-X和Ab-Y被定义为交叉阻断。

[0513] 用于确定针对靶标的免疫球蛋白、抗体、免疫球蛋白单可变结构域、多肽或其他结合剂是否如本文所定义地(交叉)阻断、能够(交叉)阻断、竞争性结合或(交叉)竞争的其他方法在例如Xiao-Chi Jia等人(2004,Journal of Immunological Methods288:91-98)、Miller等人(2011,Journal of Immunological Methods365:118-125)和/或本文描述的方法中(参见例如实施例16)进行了描述。

[0514] 本文所用的术语“CD123”是指白细胞介素3受体(IL-3Ra)的 α 亚基。

[0515] 本文所用的术语“TCR”是指由TCR α 和TCR β 链组成的T细胞受体。TCR的 α 链和 β 链均由恒定结构域和可变结构域组成。本发明的多肽和免疫球蛋白单可变结构域与TCR的恒定结构域结合。

[0516] 本发明多肽的“半衰期”通常可如WO 08/020079第57页段落o)所述并且如其中所提及的那样定义,指例如由于多肽的降解和/或通过天然机制对多肽的清除或隔离,多肽在体内的血清浓度减少50%所花费的时间。本发明多肽的体内半衰期可以以本身已知的任何方式确定,例如通过药代动力学分析。合适的技术对于本领域技术人员来说是清楚的,并且通常可以例如WO 08/020079第57页段落o)中所述。如WO 08/020079的第57页段落o)中还提及的,半衰期可使用诸如 $t_{1/2-\alpha}$ 、 $t_{1/2-\beta}$ 和曲线下面积(AUC)的参数表示。例如参考标准手册,例如Kenneth等(1986,Chemical Stability of Pharmaceuticals:A Handbook for Pharmacists,John Wiley&Sons Inc),和M Gibaldi和D Perron(1982,Pharmacokinetics,Marcel Dekker,第二修订版,1982)。术语“半衰期的增加”或“增加的半衰期”也如WO 08/020079第57页段落o)中所定义,特别是指 $t_{1/2-\beta}$ 的增加,伴随或不伴随有 $t_{1/2-\alpha}$ 和/或AUC或二者的增加。

[0517] 除非另有说明,术语“免疫球蛋白”和“免疫球蛋白序列”-无论是否在本文中用于指重链抗体或常规的4-链抗体-用作通用术语,以包括全长抗体、其各个链,以及其所有的部分、结构域或片段(包括但不限于抗原结合结构域或片段,例如 V_{HH} 结构域或 V_H/V_L 结构域)。

[0518] 如本文所用的术语(多肽或蛋白质的)“结构域”是指折叠的蛋白质结构,其具有独立于蛋白质其余部分保留其三级结构的能力。通常,结构域负责蛋白质的离散功能特性,并且在许多情况下可以被添加、去除或转移至其他蛋白质而不丧失蛋白质和/或结构域的其余部分的功能。

[0519] 如本文所用的术语“免疫球蛋白结构域”是指抗体链的球状区域(例如,如常规4-链抗体的或重链抗体的链),或基本上由这种球状区域组成的多肽。免疫球蛋白结构域的特征在于它们保留抗体分子的免疫球蛋白折叠特性,其由排列在两个 β -折叠中的约7个反平行 β -链的两层夹层组成,任选地通过保守的二硫键稳定化。

[0520] 本文所用的术语“免疫球蛋白可变结构域”是指基本上由四个“框架区”组成的免疫球蛋白结构域,所述四个“框架区”在本领域和下文中被分别称为“框架区1”或“FR1”;“框架区2”或“FR2”;“框架区3”或“FR3”;“框架区4”或“FR4”;所述四个框架区被三个“互补决定区”或“CDR”间隔开,所述三个“互补决定区”或“CDR”在本领域和下文中分别称为“互补决定区1”或“CDR1”;“互补决定区2”或“CDR2”;和“互补决定区3”或“CDR3”。因此,免疫球蛋白可变结构域的一般结构或序列可表示如下:FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。免疫球蛋白可变结构域通过携带抗原结合位点赋予抗体对抗原的特异性。

[0521] 术语“免疫球蛋白单可变结构域”或“ISV”可与“单可变结构域”互换使用,表示其中抗原结合位点存在于单个免疫球蛋白结构域上并由单个免疫球蛋白结构域形成的分子。这将免疫球蛋白单可变结构域与“常规”免疫球蛋白或其片段区分开,其中两个免疫球蛋白结构域、特别是两个可变结构域相互作用以形成抗原结合位点。典型地,在常规免疫球蛋白中,重链可变结构域(VH)和轻链可变结构域(VL)相互作用以形成抗原结合位点。在这种情况下,VH和VL二者的互补决定区(CDR)将有助于抗原结合位点,即总共6个CDR将参与抗原结合位点的形成。

[0522] 鉴于上述定义,常规四链抗体(例如本领域已知的IgG、IgM、IgA、IgD或IgE分子)或Fab片段,F(ab')2片段,Fv片段如二硫键连接的Fv或scFv片段,或衍生自这种常规四链抗体的双抗体(均为本领域已知)的抗原结合结构域,通常不被视为免疫球蛋白单可变结构域,因为在这些情况下,通常不会通过一个(单个)免疫球蛋白结构域而是通过一对(缔合的)免疫球蛋白结构域如轻链和重链可变结构域(即通过免疫球蛋白结构域的VH-VL对,它们共同结合相应抗原的表位)发生与抗原的相应表位的结合。

[0523] 相反,免疫球蛋白单可变结构域能够特异性结合抗原的表位而不与另外的免疫球蛋白可变结构域配对。免疫球蛋白单可变结构域的结合位点由单个VH/VHH或VL结构域形成。因此,免疫球蛋白单可变结构域的抗原结合位点由不超过三个CDR形成。

[0524] 因此,单可变结构域可以是轻链可变结构域序列(例如,VL序列)或其合适的片段;或重链可变结构域序列(例如,VH序列或VHH序列)或其合适片段;只要它能够形成单抗原结合单元即可(即,基本上由单可变结构域组成的功能性抗原结合单元,使得单抗原结合结构域不需要与另一个可变结构域相互作用以形成功能性抗原结合单元)。

[0525] 在本发明的一个方面,免疫球蛋白单可变结构域是重链可变结构域序列(例如,VH序列);更具体地,免疫球蛋白单可变结构域可以是衍生自常规四链抗体的重链可变结构域序列,或衍生自重链抗体的重链可变结构域序列。

[0526] 例如,免疫球蛋白单可变结构域可以是(单)结构域抗体(或适合于用作(单)结构

域抗体的氨基酸)、“dAb”或dAb(或适合于用作dAb的氨基酸)、纳米抗体(如本文所定义,包括但不限于VHH)、其他的单可变结构域、或其任何一种的任何合适片段。

[0527] 特别地,免疫球蛋白单可变结构域可以是纳米抗体(如本文所定义)或其合适的片段。[注意:纳米抗体(Nanobody)、纳米抗体(Nanobodies)和纳米克隆(Nanoclone)是Ablynx N.V.的注册商标]。对于纳米抗体的一般描述,参考如下进一步描述,以及本文引用的现有技术,例如如在WO 08/020079(16页)中所描述。

[0528] “VHH结构域”,也称为VHH、 V_H H结构域、VHH抗体片段和VHH抗体,最初被描述为“重链抗体”(即“缺乏轻链的抗体”;Hamers-Casterman等人,Nature 363:446-448,1993)的抗原结合免疫球蛋白(可变)结构域。选择术语“VHH结构域”是为了将这些可变结构域与存在于常规四链抗体中的重链可变结构域(本文称为“ V_H 结构域”或“VH结构域”)和与存在于常规四链抗体中的轻链可变结构域(本文中称为“ V_L 结构域”或“VL结构域”)区分开。关于VHH和纳米抗体的进一步描述,参考Muyldermands的综述文章(2001,Reviews in Molecular Biotechnology 74:277-302),以及参考作为一般背景技术提及的以下专利申请:布鲁塞尔自由大学的WO 94/04678、WO 95/04079和WO 96/34103;联合利华的WO 94/25591、WO 99/37681、WO 00/40968、WO 00/43507、WO 00/65057、WO 01/40310、WO 01/44301、EP 1134231和WO 02/48193;Vlaams Instituut voor Biotechnologie(VIB)的WO 97/49805、WO 01/21817、WO 03/035694、WO 03/054016和WO 03/055527;Algonomics N.V.和Ablynx N.V.的WO 03/050531;加拿大国家研究理事会的WO 01/90190;Institute of Antibodies的WO 03/025020(=EP 1433793);以及Ablynx N.V.的WO 04/041867、WO 04/041862、WO 04/041865、WO 04/041863、WO 04/062551、WO 05/044858、WO 06/40153、WO 06/079372、WO 06/122786、WO 06/122787和WO 06/122825,和Ablynx N.V.的进一步公开的专利申请。还参考了这些申请中提及的另外的现有技术,特别是国际申请WO 06/040153第41-43页上提及的参考文献列表,所述列表和参考文献通过引用并入本文。如这些参考文献中所述,纳米抗体(特别是VHH序列和部分人源化的纳米抗体)尤其可以通过在一个或更多个框架序列中存在一个或更多个“特征残基”来表征。可在例如WO 08/101985和WO 08/142164中发现纳米抗体的进一步描述,包括纳米抗体的人源化和/或骆驼源化,以及其他修饰,部分或片段,衍生物或“纳米抗体融合”,多价构建体(包括接头序列的一些非限制性实例)和增加纳米抗体及其制剂的半衰期的不同修饰。对于纳米抗体的进一步的一般描述,参考本文引用的现有技术,例如WO 08/020079(第16页)中所述。

[0529] “结构域抗体”,也称为“Dab”、“结构域抗体”和“dAbs”(术语“结构域抗体”和“dAbs”被GlaxoSmithKline集团公司用作商标)已在例如EP 0368684、Ward等人(1989,Nature 341:544-546)、Holt等人(2003,Trends in Biotechnology 21:484-490)、WO 03/002609以及例如Domantis Ltd.的WO 04/068820、WO 06/030220、WO 06/003388和其他公开的专利申请中描述。结构域抗体基本上对应于非骆驼科哺乳动物的VH或VL结构域,特别是人四链抗体。为了作为单抗原结合结构域与表位进行结合,即分别不与VL或VH结构域配对,需要对这种抗原结合特性进行特异性选择,例如,通过使用人单VH或VL结构域序列的文库。与VHH一样,结构域抗体具有约13至约16kDa的分子量,并且如果衍生自完全人序列,则不需要人源化例如用于在人体中治疗用途。

[0530] 还应注意,虽然在本发明的上下文中不太优选,因为它们不是哺乳动物来源,但是

单可变结构域可以衍生自某些种类的鲨鱼(例如,所谓的“IgNAR结构域”,参见例如WO 05/18629)。

[0531] 因此,在本发明的含义中,术语“免疫球蛋白单可变结构域”或“单可变结构域”包括衍生自非人源的多肽,优选骆驼科动物,优选骆驼科动物重链抗体。如前所述,它们可以是人源化的。此外,该术语包括衍生自非骆驼科动物来源的多肽,例如已经“骆驼源化”的小鼠或人,如例如Davies和Riechmann(1994,FEBS 339:285-290;1995,Biotechnol.13:475-479;1996,Prot.Eng.9:531-537)和Riechmann和Muyldermaans(1999,J. Immunol. Methods 231:25-38)所描述。

[0532] VHH结构域的氨基酸残基根据Kabat等人("Sequence of proteins of immunological interest",US Public Health Services,NIH Bethesda,MD,Publication No.91)给出的用于V_H结构域的一般编号进行编号,如来自骆驼科动物的VHH结构域所应用,如Riechmann和Muyldermaans的图2所示(1999,J. Immunol. Methods 231:25-38)。用于编码V_H结构域的氨基酸残基的备选方法是本领域已知的,该方法也可以以类似的方式应用于VHH结构域。然而,在本说明书、权利要求和附图中,除非另有说明,否则将遵循如上所述的应用于VHH结构域的根据Kabat的编号。

[0533] 应该注意,如本领域所熟知的,对于V_H结构域和VHH结构域,每个CDR中的氨基酸残基总数可以变化,并且可以不对应于由Kabat编号表示的氨基酸残基的总数(即,根据Kabat编号的一个或更多个位置可以不由实际序列占用,或者实际序列可能包含多于Kabat编号所允许数目的氨基酸残基)。这一般意为,根据Kabat的编号可以对应于或可以不对应于实际序列中氨基酸残基的实际编号。VH结构域和VHH结构域中氨基酸残基的总数通常在110至120的范围内,通常在112至115之间。但应注意,较小和较长的序列也可适用于本文所述的目的。

[0534] CDR区的确定也可以根据不同的方法进行。在根据Kabat的CDR确定中,VHH的FR1包含在位置1-30的氨基酸残基,VHH的CDR1包含在位置31-35的氨基酸残基,VHH的FR2包含在位置36-49的氨基酸,VHH的CDR2包含在位置50-65的氨基酸残基,VHH的FR3包含在位置66-94的氨基酸残基,VHH的CDR3包含在位置95-102的氨基酸残基,和VHH的FR4包含在位置103-113的氨基酸残基。

[0535] 然而,在本申请中,CDR序列是根据Kontermann和Dübel(2010,Eds.,Antibody Engineering,vol 2,Springer Verlag Heidelberg Berlin,Martin,Chapter 3,pp.33-51)确定的。根据该方法,FR1包含在位置1-25的氨基酸残基,CDR1包含在位置26-35的氨基酸残基,FR2包含在位置36-49的氨基酸,CDR2包含在位置50-58的氨基酸残基,FR3包含在位置59-94的氨基酸残基,CDR3包含在位置95-102的氨基酸残基,FR4包含在位置103-113的氨基酸残基(根据Kabat编号)。

[0536] 免疫球蛋白单可变结构域如结构域抗体和纳米抗体(包括VHH结构域)可以进行人源化。特别地,人源化免疫球蛋白单可变结构域如纳米抗体(包括VHH结构域)可以是如之前段落中通常所定义的免疫球蛋白单可变结构域,但其中存在(并且特别地,在至少一个框架残基中存在)是和/或对应于人源化取代(如本文所定义)的至少一个氨基酸残基。通过比较天然存在的V_{HH}序列的框架区的序列与一个或更多个密切相关的人V_H序列的相应框架序列,可以确定可能有用的人源化取代,之后由此确定的一个或更多个可能有用的人源化取代

(或其组合)可以(以本身已知的任何方式,如本文进一步描述的)被引入所述V_{HH}序列中,并且可以测试所得的人源化V_{HH}序列对靶标的亲和力、稳定性、表达的容易性和水平,和/或其他所需的特性。以这种方式,通过有限程度的试验和错误,技术人员可以基于本文的公开内容确定其他合适的人源化取代(或其合适的组合)。而且,基于前述内容,免疫球蛋白单可变结构域(的框架区),例如纳米抗体(包括VHH结构域)可以是部分人源化的或完全人源化的。

[0537] 免疫球蛋白单可变结构域如结构域抗体和纳米抗体(包括VHH结构域和人源化VHH结构域)也可以通过在一个或更多个CDR的氨基酸序列中引入一个或更多个改变而进行亲和力成熟,这些改变导致相比于各自的母体分子,所得的免疫球蛋白单可变结构域对其各自抗原的改善的亲和力。本发明的亲和力成熟的免疫球蛋白单可变结构域分子可以通过本领域已知的方法制备,例如,如Marks等人(1992, Biotechnology 10:779-783)、Barbas等人(1994, Proc. Nat. Acad. Sci. USA 91:3809-3813)、Shier等人(1995, Gene 169:147-155)、Yelton等人(Immunol. 155:1994-2004,)、Jackson等人(J. Immunol. 154:3310-9, 1995)、Hawkins等人(1995, J. MoI. Biol. 226:889-896)、Johnson和Hawkins(1996, Affinity maturation of antibodies using phage display, Oxford University Press)所述。

[0538] 由免疫球蛋白单可变结构域如结构域抗体或纳米抗体开始,设计/选择和/或制备多肽的过程在本文中也被称为“格式化”所述免疫球蛋白单可变结构域;并且,作为多肽的一部分的免疫球蛋白单可变结构域被称为“格式化的”或“格式的”所述多肽。免疫球蛋白单可变结构域可被格式化方式的实例以及这种格式的实例在本文公开的基础上对本领域技术人员来说是清楚的;这种格式化的免疫球蛋白单可变结构域构成了本发明的另一个方面

[0539] 例如但不限于,一个或更多个免疫球蛋白单可变结构域可用作“结合单元”、“结合结构域”或“结构单元”(这些术语可互换使用)用于制备多肽,所述多肽可任选地含有可用作结合单元的一个或更多个另外的免疫球蛋白单可变结构域(即,针对CD123上的相同或另一表位,和/或针对除CD123之外的一个或更多个其他抗原、蛋白质或靶标,例如TCR)。

[0540] 单价多肽包含仅一个结合单元(例如,诸如一个免疫球蛋白单可变结构域),或基本上由其组成。包含两个或更多个结合单元(例如,诸如两个或更多个免疫球蛋白单可变结构域)的多肽在本文中也将被称为“多价”多肽,并且存在于这种多肽中的结合单元/免疫球蛋白单可变结构域在本文中也将被称为“多价格式”。例如,“二价”多肽可包含两个免疫球蛋白单可变结构域,任选地通过接头序列连接,而“三价”多肽可包含三个免疫球蛋白单可变结构域,任选地通过两个接头序列连接,而“四价”多肽可以包含四个免疫球蛋白单可变结构域,任选通过三个接头序列连接,等等。

[0541] 在多价多肽中,两个或更多个免疫球蛋白单可变结构域可以是相同的或不同的,并且可以针对相同的抗原或抗原决定簇(例如针对相同的部分或表位,或针对不同的部分或表位),或备选地可针对不同的抗原或抗原决定簇;或其任何合适的组合。含有至少两个结合单元(例如,如至少两个免疫球蛋白单可变结构域)的多肽,其中至少一个结合单元针对第一抗原(即CD123)和至少一个结合单元针对第二抗原(即,不同于CD123),也将被称为“多特异性”多肽,并且存在于这种多肽中的结合单元(例如,如免疫球蛋白单可变结构域)在本文中也将被称为“多特异性格式”。因此,例如,本发明的“双特异性”多肽是包含至少一个针对第一抗原(即CD123)的免疫球蛋白单可变结构域和另一个针对第二抗原(即,与CD123不同,例如TCR)的免疫球蛋白单可变结构域的多肽,而本发明的“三特异性”多肽是包

含以下的多肽:至少一个针对第一抗原(即CD123)的免疫球蛋白单可变结构域,另一个针对第二抗原(即,不同于CD123,例如TCR)的免疫球蛋白单可变结构域,和至少一个针对第三抗原(即,不同于CD123和第二抗原)的另外的免疫球蛋白单可变结构域;等等。

[0542] 针对一种抗原的多肽也被称为“单特异性”多肽。这种“单特异性”多肽可以是单价多肽,所述单价多肽仅含有一种针对一种抗原(例如TCR或CD123)的结合单元(例如,一种免疫球蛋白单可变结构域)。这种“单特异性”多肽也可以是多价多肽,所述多价多肽含有两个或多个针对相同抗原的免疫球蛋白单可变结构域。这种“单特异性”多价多肽可以针对相同抗原的相同部分或表位,或针对相同抗原的不同部分或表位(例如CD123)。

[0543] 包含针对相同抗原上的不同部分或表位的两个或更多个结合单元的多肽也被称为“双互补位”多肽。因此,“多互补位”多肽如“双互补位”多肽或“三互补位”多肽,包含或基本上组成为两个或更多个结合单元,每个结合单元具有不同的互补位(如本文将进一步描述;参见关于本发明单特异性多肽的章节)。

[0544] 本发明的多肽

[0545] 本发明提供了重定向T细胞以杀死CD123表达细胞的多肽。这些多肽发挥这种功能的能力来自于它们的多特异性格式。本发明提供的多特异性多肽(称为“本发明的多特异性多肽”)包含一个特异性结合T细胞受体(TCR)的免疫球蛋白单可变结构域(ISV)和一个或更多个特异性结合CD123的ISV。

[0546] 本发明还涉及可在本发明的这种多特异性多肽中用作结合单元或结构单元的单价多肽。因此,在一个方面,本发明提供了特异性结合TCR的ISV。另一方面,本发明提供了特异性结合CD123的ISV。这些单价多肽仅与一种抗原结合,因此称为“本发明的单特异性多肽”。

[0547] 特异性结合CD123的ISV可以进一步被格式化以形成多价多肽,其也包括在本发明中。这种多价多肽包含两个或更多个特异性结合CD123的ISV。这些多价多肽仅结合一种抗原(即CD123),因此也称为“本发明的单特异性多肽”。

[0548] 本发明的单特异性多肽和本发明的多特异性多肽在本文中进一步描述,并且通常被称为“本发明的多肽”。

[0549] 1.本发明的单特异性多肽

[0550] 1.1结合TCR的单特异性多肽

[0551] 本发明涉及特异性结合TCR的单特异性多肽。优选地,本发明的这种单特异性多肽是单价的。在优选的方面,单特异性多肽是免疫球蛋白单可变结构域,其在本文中称为“本发明的免疫球蛋白单可变结构域”或“本发明的ISV”。

[0552] T细胞受体(在本文中也称为TCR)是由TCR α 和TCR β 链组成的异二聚体。TCR的 α 链和 β 链均由恒定结构域和可变结构域组成。本发明的多肽特异性结合TCR的恒定结构域。

[0553] T细胞受体形成TCR复合物的一部分。如本文所用,术语“TCR复合物”或“TCR α -CD3复合物”是指在T细胞表面上呈递的T细胞受体复合物(参见Kuhns等人2006, *Immunity* 24: 133-139)。TCR复合物由六种不同的I型单跨膜蛋白组成:形成负责配体识别的TCR异二聚体的TCR α 和TCR β 链,以及非共价缔合的CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 和 ζ 链,其中所述CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 和 ζ 链具有在受体激活时被磷酸化的细胞质序列基序并募集大量信号传导组分。人CD3和人TCR α / β 恒定结构域的序列在表A-8中提供(SEQ ID No: 70-75;参见UniProt标识符:

CD3 δ :P04234,CD3 γ :P09693,CD3s:P07766,CD3 ζ :P20963,TCR α :P01848和TCR β :与P01850相关)。

[0554] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的多肽,其结合T细胞受体 α (TCR α)的恒定结构域(SEQ ID NO:74)和/或T细胞受体 β (TCR β)的恒定结构域(SEQ ID NO:75),或其多态性变体或同种型。

[0555] 同种型是可以通过单个生物事件或通过生物事件的组合从相同基因产生的备选蛋白质序列,所述生物事件为例如选择性启动子使用、选择性剪切、选择性起始和核糖体移码,全部如本领域中已知的。

[0556] 只有在严格的免疫、筛选和选择方法之后,本发明人才能够鉴定出与TCR恒定结构域结合的ISV。鉴定了包含104个在CDR1、CDR2和CDR3中具有相似性和差异的克隆的序列簇(参见表A-5)。(表A-1)提供了相应的序列比对。

[0557] 因此,本发明涉及多肽,所述多肽是选自由SEQ ID NO:42和78-180(参见表A-5)组成的组的ISV。在另外的方面,所述多肽选自由SEQ ID NO:42和78-180组成的组,或选自与SEQ ID NO:42和78-180之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。

[0558] 因此,本发明涉及结合TCR的多肽,其包含或(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR1具有氨基酸序列GX₁VX₂X₃X₄NX₅LX₆,其中X₁是D、A、S、E或G,X₂是H或Y,X₃是K或L,X₄是I或L,X₅是F、I或V,和X₆是G或S。

[0559] 在另外的方面,本发明涉及结合TCR的多肽,其包含或(基本上)由4个框架区(分别是FR1至FR4)和3个互补决定区(分别是CDR1至CDR3)组成,其中CDR2具有氨基酸序列X₁IX₂IX₃DX₄X₅X₆,其中X₁是H、T或R,X₂是S、T或A,X₃是G、S或A,X₄是Q、D、E、T、A或V,X₅是T、A或V和X₆是D、A、Q、N、V或S。

[0560] 在另外的方面,本发明涉及结合TCR的多肽,其包含或(基本上)由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR3具有氨基酸序列X₁SRX₂X₃PYX₄Y,其中X₁是F、Y、G、L或K,X₂是I或L,X₃是Y或W,和X₄是D、N或S。

[0561] 用于本发明多肽的优选CDR序列以及CDR序列的优选组合描述于表A-5中。

[0562] 因此,本发明涉及特异性结合TCR并且包含或基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成的多肽,优选为ISV,其中:

[0563] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0564] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0565] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0566] 和/或

[0567] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0568] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0569] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸

序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0570] 和/或

[0571] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0572] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0573] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0574] 在另外的方面,本发明涉及多肽,优选ISV,其中:

[0575] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0576] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0577] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0578] 和

[0579] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0580] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0581] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0582] 和

[0583] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0584] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0585] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0586] 特别地,本发明涉及多肽,优选ISV,其中:

[0587] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0588] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0589] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置2、4、5、6、8和/或10处(根据Kabat编号的位置27、29、30、31、33和/或35);条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0590] 和

[0591] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0592] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0593] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置1、3、5、7、8和/或9处(根据Kabat编号,位置50、52、54、56、57和/或58);条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0594] 和

[0595] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0596] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0597] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的第1、4、5和/或8处(根据Kabat编号的位置95、98、99和/或101);条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0598] 在另外的方面,本发明涉及多肽,优选ISV,其中CDR1选自由以下组成的组:

[0599] a) SEQ ID NO:181;或

[0600] b) 与SEQ ID NO:181的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0601] -在位置2处D已经变为A、S、E或G;

[0602] -在位置4处H已经变为Y;

[0603] -在位置5处K已经变为L;

[0604] -在位置6处I已经变为L;

[0605] -在位置8处F已经变为I或V;和/或

[0606] -在位置10处G已经变为S;

[0607] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0608] 在另一方面,本发明涉及多肽,优选地ISV,其中CDR2选自由以下组成的组:

[0609] a) SEQ ID NO:192;或

[0610] b) 与SEQ ID NO:192的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0611] -在位置1处H已经变为T或R;

[0612] -在位置3处S已经变为T或A;

[0613] -在位置5处G已经变为S或A;

[0614] -在位置7处Q已经变为D、E、T、A或V;

[0615] -在位置8处T已经变为A或V;和/或

[0616] -在位置9处D已经变为A、Q、N、V或S;

[0617] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0618] 在另一方面,本发明涉及多肽,优选地ISV,其中CDR3选自由以下组成的组:

[0619] a) SEQ ID NO:218;或

[0620] b) 与SEQ ID NO:218的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0621] -在位置1处F已经变为Y、L或G;

[0622] -在位置4处I已经变为L;

[0623] -在位置5处Y已经变为W;和/或

[0624] -在位置8处D已经变为N或S;

[0625] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0626] 因此,本发明涉及多肽,优选地ISV,其中:

[0627] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0628] a) SEQ ID NO:181;或

[0629] b) 与SEQ ID NO:181的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0630] -在位置2处D已经变为A、S、E或G;

[0631] -在位置4处H已经变为Y;

[0632] -在位置5处K已经变为L;

[0633] -在位置6处I已经变为L;

[0634] -在位置8处F已经变为I或V;和/或

[0635] -在位置10处G已经变为S;

[0636] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0637] 和

[0638] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0639] c) SEQ ID NOs:192;或

[0640] d) 与SEQ ID NO:192的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0641] -在位置1处H已经变为T或R;

[0642] -在位置3处S已经变为T或A;

[0643] -在位置5处G已经变为S或A;

[0644] -在位置7处Q已经变为D、E、T、A或V;

[0645] -在位置8处T已经变为A或V;和/或

[0646] -在位置9处D已经变为A、Q、N、V或S;

[0647] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0648] 和

[0649] i ii) CDR3选自由以下组成的组:

[0650] e) SEQ ID N0s:218;或

[0651] f) 与SEQ ID N0:218的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0652] -在位置1处F已经变为Y、L或G;

[0653] -在位置4处I已经变为L;

[0654] -在位置5处Y已经变为W;和/或

[0655] -在位置8处D已经变为N或S;

[0656] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0657] 在另一方面,本发明涉及多肽,优选地ISV,其中CDR1选自由SEQ ID N0:181-191组成的组,CDR2选自由SEQ ID N0:192-217组成的组,和CDR3选自由SEQ ID N0:218-225组成的组。

[0658] 因此,在优选的方面,本发明涉及多肽,优选地ISV,其中CDR1是SEQ ID N0:181,CDR2是SEQ ID N0:192,CDR3是SEQ ID N0:218。

[0659] 通常,表A-5中列出的CDR的组合(即表A-5中在相同的行上提及的那些)是优选的。因此,通常优选的是,当ISV中的CDR是表A-5中提及的CDR序列,或者适当地选自由与表A-5中列出的CDR序列具有4、3、2或仅1个氨基酸差异的CDR序列组成的组时,至少一个优选两个其他的CDR适当地选自属于表A-5中相同组合的(即,在表A-5中相同的行上所提及的)CDR序列,或适当地选自由与属于相同组合的CDR序列具有4、3、2或仅1个氨基酸差异的CDR序列组成的组。

[0660] 本发明还涉及多肽,优选地ISV,其交叉阻断本文所述的至少一种多肽与TCR的结合和/或被如本文所述的至少一种多肽交叉阻断与TCR的结合。

[0661] 本发明的多肽特异性结合效应细胞(例如T细胞)表面上的TCR。在“单价”格式中,结合TCR的本发明的单价多肽引起最小的至无T细胞活化。

[0662] 如本文所用,术语“效应细胞”是包含TCR复合物的细胞,优选免疫细胞例如T细胞,优选CD4⁺T辅助细胞(也称为CD4细胞、T辅助细胞或T4细胞),更优选细胞毒性T细胞(也称为T_c细胞、CTL或CD8⁺T细胞)或天然杀伤T细胞(NKT细胞)。在一些方面,细胞是在体内存在的。在一些方面,细胞是在体外存在的。本发明的效应细胞尤其涉及哺乳动物细胞,优选涉及灵长类细胞,并且甚至更优选涉及人细胞。

[0663] 如本文所用,“T细胞活化”是指T细胞(例如细胞毒性T细胞)的一种或更多种细胞应答,例如选自:增殖、分化、细胞因子分泌、细胞毒性效应分子释放、细胞毒活性、活化标记物的表达和重定向的靶细胞溶解。

[0664] 本发明的单特异性多肽以100nM和10pM之间的平均K_D值与T细胞受体(TCR)的恒定

结构域结合,例如90nM或更小的平均 K_D 值,甚至更优选80nM或更小的平均 K_D 值,例如小于70、60、50、40、30、20、10、5nM或甚至更小,例如小于4、3、2或1nM,例如小于500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20pM或甚至更小,例如小于10pM。优选地, K_D 由Kinexa、BLI或SPR确定,例如如通过Proteon所确定。例如,所述 K_D 如实施例部分中所示的确定。

[0665] 本发明的单特异性多肽以100nM和1pM之间的EC50值与TCR结合,例如100nM或更小的平均EC50值,甚至更优选90nM或更小的平均EC50值,例如小于80、70、60、50、40、30、20、10、5nM或甚至更小,例如小于4、3、2或1nM或甚至更小,例如小于500、400、300、200、100、90、80、70、60、50、40、30、20、10、5pM或甚至更低,例如小于4pM。所述平均EC50优选通过FACS、Biacore或ELISA确定,例如,所述EC50如实施例部分中所示的确定。

[0666] 在实施例中已经显示 K_D 与EC50良好相关。

[0667] 在另外的方面,如本文所述的单特异性多肽对于(或用于结合)TCR具有选自由以下组成的组的结合速率常数(kon):至少约 $10^2 M^{-1}s^{-1}$ 、至少约 $10^3 M^{-1}s^{-1}$ 、至少约 $10^4 M^{-1}s^{-1}$ 、至少约 $10^5 M^{-1}s^{-1}$ 、至少约 $10^6 M^{-1}s^{-1}$ 、 $10^7 M^{-1}s^{-1}$ 、至少约 $10^8 M^{-1}s^{-1}$ 、至少约 $10^9 M^{-1}s^{-1}$ 和至少约 $10^{10} M^{-1}s^{-1}$,优选地如通过表面等离振子共振所测量或如在实施例部分中所进行。

[0668] 在另外的方面,如本文所述的单特异性多肽对于(或用于结合)TCR具有选自由以下组成的组的解离速率常数(k_{off}):至多约 $10^{-3} s^{-1}$ 、至多约 $10^{-4} s^{-1}$ 、至多约 $10^{-5} s^{-1}$ 、至多约 $10^{-6} s^{-1}$ 、至多约 $10^{-7} s^{-1}$ 、至多约 $10^{-8} s^{-1}$ 、至多约 $10^{-9} s^{-1}$ 和至多约 $10^{-10} s^{-1}$,优选地如通过表面等离振子共振所测量或如在实施例部分中所进行。

[0669] 结合TCR的本发明的单特异性多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域可具有框架序列,所述框架序列优选地是免疫球蛋白框架序列或衍生自免疫球蛋白框架序列的框架序列(例如,通过序列优化如人源化或骆驼源化)(的适当组合)。例如,框架序列可以是衍生自免疫球蛋白单可变结构域的框架序列,例如衍生自轻链可变结构域(例如 V_L 序列)和/或衍生自重链可变结构域(例如 V_H 序列)。在一个特别优选的方面,框架序列是衍生自 V_{HH} 序列的框架序列(其中所述框架序列可任选地已经被部分或完全人源化)或者是已经骆驼源化的常规 V_H 序列。

[0670] 框架序列可以优选使得单特异性多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域是结构域抗体(或适合用作结构域抗体的氨基酸序列);单结构域抗体(或适合用作单结构域抗体的氨基酸);“dAb”(或适合用作dAb的氨基酸);纳米抗体; V_{HH} ;人源化 V_{HH} ;骆驼源化 V_H ;或通过亲和力成熟获得的 V_{HH} 。再次,合适的框架序列对于本领域技术人员而言是清楚的,例如基于标准手册和本文提及的进一步公开内容和现有技术。

[0671] 特别地,存在于本发明的单特异性多肽中的框架序列可含有一个或更多个特征残基(如WO 08/020079(表A-3至A-8)中所定义),使得本发明的单特异性多肽是纳米抗体。根据本文的进一步公开内容(参见例如表A-5),这种框架序列(的合适组合)的一些优选但非限制性的实例将变得清楚。通常,纳米抗体(特别是 V_{HH} 、部分或完全人源化的 V_{HH} 和骆驼源化的 V_H)可以特别地以在一个或更多个框架序列中存在一个或更多个“特征残基”为特征(如例如在WO 08/020079,第61页第24行至第98页第3行中进一步所描述)。

[0672] 更特别地,本发明提供了包含或(基本上)由至少一个免疫球蛋白单可变结构域组成的多肽,该免疫球蛋白单可变结构域是具有(通用)结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的氨基酸序列,其中FR1至FR4分别指框架区1至4,其中CDR1至CDR3分别指互补决定区1

至3,并且所述多肽:

[0673] i) 与SEQ ID NO:42和78-180(参见表A-5)的至少一个氨基酸序列具有至少80%、更优选90%、甚至更优选95%的氨基酸同一性,其中为了确定氨基酸同一性程度的目的,不考虑形成CDR序列的氨基酸残基。在这方面,还参考表A-5,其列出了SEQ ID NO:42和78-180的免疫球蛋白单可变结构域的框架1序列(SEQ ID NO:226-250)、框架2序列(SEQ ID NO:251-276)、框架3序列(SEQ ID NO:277-319)和框架4序列(SEQ ID NO:320-324)(参见表A-5);或

[0674] 和其中:

[0675] ii) 优选地,根据Kabat编号在位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108处的一个或多个氨基酸残基选自WO 08/020079的表A-3至表A-8中提到的特征残基。

[0676] 本发明还提供了许多序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域。

[0677] 特别地,本发明的序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域可以是如前面段落中为免疫球蛋白单可变结构域通常所定义的氨基酸序列,但其中存在(和特别地,在至少一个框架残基中存在)是和/或对应于人源化取代(如本文所定义)的至少一个氨基酸残基。基于本文的公开内容,一些优选但非限制性的人源化取代(及其合适的组合)对于本领域技术人员而言将变得清楚。另外,或备选地,通过比较天然存在的VHH序列的框架区的序列与一个或更多个密切相关的人VH序列的相应框架序列,可以确定其他可能有用的人源化取代,之后由此确定的一个或更多个可能有用的人源化取代(或其组合)可以(以本身已知的任何方式,如本文进一步描述的)被引入所述VHH序列中,并且可以测试所得的人源化VHH序列对靶标的亲和力、稳定性、表达的容易性和水平和/或其他所需的特性。以这种方式,通过有限程度的试验和错误,技术人员可以基于本文的公开内容确定其他合适的人源化取代(或其合适的组合)。而且,基于前述内容,免疫球蛋白单可变结构域(的框架区)可以是部分人源化的或完全人源化的。

[0678] 本发明还涉及序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域,其在稳定性研究期间在储存时可显示出改善的表达和/或增加的稳定性。本发明的序列优化的多肽和/或ISV可显示降低的N-端的焦谷氨酸翻译后修饰,因此具有增加的产物稳定性。此外,本发明的序列优化的多肽和/或ISV可以显示出其他改进的性质,例如,免疫原性较低,对于TCR的结合特性的改善(适当地测量和/或表示为 K_D 值(实际或表观)、 K_A 值(实际或表观)、 k_{on} 速率和/或 k_{off} 速率,或者备选地作为 EC_{50} 值,如本文进一步所描述的),对于TCR的改善的亲和力和/或改善的亲合力。

[0679] 本发明的一些特别优选的序列优化的免疫球蛋白单可变结构域是SEQ ID NO:42和78-180的免疫球蛋白单可变结构域的序列优化变体。

[0680] 因此,本发明的一些其它优选的免疫球蛋白单可变结构域是可以与TCR结合(如本文所定义)的纳米抗体,并且所述纳米抗体:

[0681] i) 是SEQ ID NO:42和78-180的免疫球蛋白单可变结构域之一的序列优化变体;和/或

[0682] ii) 与SEQ ID NO:42和78-180(参见表A-5)的至少一个免疫球蛋白单可变结构域具有至少80%的氨基酸同一性,其中为了确定氨基酸同一性程度的目的,不考虑形成CDR序列的氨基酸残基;在这一方面,还参考表A-5,其列出了SEQ ID NO:42和78-180的免疫球蛋白单可变结构域。

白单可变结构域的框架1序列 (SEQ ID NO:226-250)、框架2序列 (SEQ ID NO:251-276)、框架3序列 (SEQ ID NOS:277-319) 和框架4序列 (SEQ ID NO:320-324) (参见表A-5)；

[0683] 和其中：

[0684] iii) 优选地,根据Kabat编号在位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108处的一个或更多个氨基酸残基选自WO 08/020079的表A-3至表A-8中提到的特征残基。

[0685] 本发明的序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域还可含有以下共同未决的美国临时申请中描述的特定突变/氨基酸残基,所有临时申请均标题为“Improved immunoglobulin variable domains”:2014年5月16日提交的US 61/994552、2014年6月18日提交的US 61/014,015、2014年8约21日提交的US 62/040,167和2014年9月8日提交的US 62/047,560(均转让给Ablynx N.V.) ,以及基于这些临时申请并于2015年11月19日公布的国际申请WO 2015/173325。

[0686] 特别地,本发明的序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域可适当地含有 (i) 位置112处的K或Q;或 (ii) 位置110处的K或Q与位置11处的V组合;或 (iii) 位置89处的T;或 (iv) 位置89上的L,伴随有位置110处的K或Q;或 (v) 位置11处的V及第89位的L;或 (i) 至 (v) 的任何合适组合。

[0687] 还如所述共同未决的美国临时申请中所述,当本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域含有根据上述 (i) 至 (v) 之一(或其合适的组合)的突变时:

[0688] -位置11的氨基酸残基优选选自L、V或K(最优先V);和

[0689] -位置14的氨基酸残基优选适当地选自A或P;和

[0690] -位置41的氨基酸残基优选适当地选自A或P;和

[0691] -位置89的氨基酸残基优选适当地选自T、V或L;和

[0692] -位置108的氨基酸残基优选适当地选自Q或L;和

[0693] -位置110的氨基酸残基优选适当地选自T、K或Q;和

[0694] -位置112的氨基酸残基优选适当地选自S、K或Q。

[0695] 如所述共同未决的美国临时申请中所述,所述突变可有效预防或减少所谓的“预先存在的抗体”与本发明的多肽、免疫球蛋白单可变结构域和/或构建体的结合。为此目的,本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域还可含有(任选地与所述突变组合)C端延伸(X)n(其中n为1至10,优选1至5,例如1、2、3、4或5(并且优选1或2,例如1);并且每个X是(优选天然存在的)氨基酸残基,该氨基酸残基独立地选自且优选独立地选自由丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)组成的组),其再次参考所述美国临时申请以及WO 12/175741。特别地,本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域在形成包含其的蛋白质、多肽或其他构建体的C端末端时可以含有这种C端延伸(再次,如所述美国临时申请以及WO 12/175741进一步所描述的)。

[0696] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其进一步包含C端延伸(X)n,其中n为1至5,例如1、2、3、4或5,并且其中X为天然存在的氨基酸,优选不是半胱氨酸。

[0697] 本发明的这些多肽,特别是包含本发明CDR序列的免疫球蛋白单可变结构域,特别适合用作用于制备多特异性多肽,如本发明的多特异性多肽的结构单元或结合单元。

[0698] 因此,结合TCR的本发明的单特异性多肽可以是基本上分离的形式(如本文所定义),或它们可以形成蛋白质或多肽的部分,该蛋白质或多肽可包含或基本上由结合TCR的

一个多肽或ISV组成,并且该蛋白质或多肽可任选地进一步包含一个或更多个另外的氨基酸序列(所有氨基酸序列均任选地通过一个或更多个合适的接头连接)。

[0699] 因此,本发明还涉及蛋白质或多肽,其包含或基本上由一个本发明的单特异性多肽(或其合适的片段)组成。在另外的方面,结合TCR的本发明的单特异性多肽可以形成多特异性多肽的一部分,该多特异性多肽可以包含或基本上由一个结合TCR的ISV组成,并且该多特异性多肽可以任选地进一步包含一个或更多个特异性结合另一种靶标的ISV,例如CD123,并且该多特异性多肽可任选地进一步包含一个或更多个另外的氨基酸序列(全部任选地通过一个或更多个合适的接头连接)。

[0700] 因此,本发明的单特异性多肽用作这种蛋白质或多肽中的结合单元或结构单元,以便提供如本文所述的本发明的多特异性多肽(对于含有一个或更多个VHH结构域的多特异性多肽及其制备,还参考Conrath等人(2001, J.Biol.Chem. 276:7346-7350),以及参考例如WO 96/34103、WO 99/23221和WO 2010/115998)。因此,本发明还涉及多肽,其是包含或基本上由一个结合TCR的单价多肽组成的单价构建体。

[0701] 1.2CD123结合多肽

[0702] 本发明涉及特异性结合CD123,优选人和/或食蟹猴CD123的单特异性多肽。在优选的方面,单特异性多肽是免疫球蛋白单可变结构域,在本文中也称为“本发明的免疫球蛋白单可变结构域”或“本发明的ISV”。

[0703] CD123也称为白细胞介素3受体的 α 亚基(IL-3R α)。人CD123和食蟹猴CD123的序列在表A-8中提供(SEQ ID NO:68-69;参见人CD123:NCBI RefSeq NP_002174和食蟹猴CD123:NCBI genbank no.EHH61867.1)。

[0704] 在一个方面,本发明涉及与人CD123(SEQ ID NO:68)结合的如本文所述的单特异性多肽。

[0705] 已经仔细选择结合CD123的单特异性多肽对CD123的特异性。本发明的多肽在格式化成本发明的多特异性格式时,表现出与CD123的高度特异性结合(即包含一个结合TCR的ISV和一个或更多个结合CD123的ISV的格式)。因此,避免了脱靶结合,并且靶标独立的T细胞活化是最小的,如本文进一步所举例说明的。

[0706] 发明人鉴定了2个纳米抗体簇(实施例12),其表现出与CD123的高度特异性结合。在将簇的代表物格式化为本发明的多特异性多肽(如进一步所描述)后,仅观察到最小的靶标独立的T细胞活化,表明簇代表物的高特异性。提供相应的比对(对于与纳米抗体56A10(的家族成员)相关的纳米抗体(即与纳米抗体56A10属于相同家族的纳米抗体参见表A-2),和对于与纳米抗体55F03(的家族成员)相关的纳米抗体(即与纳米抗体55F03属于相同家族的纳米抗体)参见表A-3)。

[0707] 本说明书中使用的“纳米抗体家族”、“V_{HH}家族”或“家族”是指纳米抗体和/或V_{HH}序列的组,该纳米抗体和/或V_{HH}序列具有相同的长度(即它们在其序列中具有相同数目的氨基酸)并且其中第8位和第106位之间的氨基酸序列(根据Kabat编号)具有89%以上的氨基酸序列同一性。

[0708] 因此,本发明涉及选自由SEQ ID NO:1-10(参见表A-4)组成的组的多肽,优选ISV。在另外的方面,所述多肽选自由SEQ ID NO:1-10组成的组,或选自与SEQ ID NO:1-10之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。

[0709] 因此,本发明涉及特异性结合CD123并且包含或基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成的多肽,优选ISV,其中:

[0710] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0711] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0712] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0713] 和/或

[0714] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0715] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0716] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0717] 和/或

[0718] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0719] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0720] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0721] 在另外的方面,本发明涉及特异性结合CD123的多肽,优选ISV,其包含或基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0722] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0723] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0724] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0725] 和

[0726] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0727] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0728] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0729] 和

[0730] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0731] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0732] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0733] 在另外的方面,本发明的多肽,优选ISV,包含或基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0734] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0735] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0736] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置3、6、7和/或8处(根据Kabat编号的位置28、31、32和/或33);条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0737] 和/或

[0738] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0739] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0740] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置3、6和/或10处(根据Kabat编号的位置52、54和/或58);条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0741] 和/或

[0742] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0743] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0744] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的位置3、4和/或5处(根据Kabat编号的位置97、98和/或99);条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0745] 在另外的方面,本发明的多肽,优选ISV,包含或基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0746] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0747] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0748] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置3、6、7和/或8处(根据Kabat编号的位置28、31、32和/或33);条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0749] 和

[0750] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0751] c) SEQ ID NO:17-20; 或

[0752] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列, 其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置3、6和/或10处(根据Kabat编号的位置52、54和/或58); 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比, 包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合, 所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0753] 和

[0754] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0755] e) SEQ ID NO:21-25; 或

[0756] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列, 其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的位置3、4和/或5处(根据Kabat编号的位置97、98和/或99); 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比, 包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合, 所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0757] 在一个方面, 本发明的多肽, 优选ISV, 与SEQ ID NO:1-6(参见表A-4)之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性。这些多肽在本文中称为“与56A10相关的多肽”或“与56A10相关的ISV”。

[0758] 因此, 本发明涉及多肽, 优选ISV, 其中CDR1选自由以下组成的组:

[0759] a) SEQ ID NO:11; 或

[0760] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列, 其中

[0761] -在位置3处T已经变为S或P;

[0762] -在位置6处I已经变为S;

[0763] -在位置7处N已经变为D; 和/或

[0764] -在位置8处D已经变为V或A;

[0765] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比, 包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合, 所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0766] 在另外的方面, 本发明涉及多肽, 优选ISV, 其中CDR2是SEQ ID NO:17。

[0767] 在另外的方面, 本发明涉及多肽, 优选ISV, 其中CDR3选自由以下组成的组:

[0768] a) SEQ ID NO:21; 或

[0769] b) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列, 其中

[0770] -在位置3处P已经变为A;

[0771] 条件是与包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比, 包含具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合, 所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0772] 因此, 本发明涉及多肽, 优选ISV, 其中:

[0773] i) CDR1选自由以下组成的组:

- [0774] a) SEQ ID NO:11;或
- [0775] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [0776] -在位置3处T已经变为S或P;
- [0777] -在位置6处I已经变为S;
- [0778] -在位置7处N已经变为D;和/或
- [0779] -在位置8处D已经变为V或A;
- [0780] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;
- [0781] 和
- [0782] ii) CDR2是SEQ ID NO:17;
- [0783] 和
- [0784] iii) CDR3选自由以下组成的组:
- [0785] c) SEQ ID NOs:21;或
- [0786] d) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [0787] -在位置3处P已经变为A;
- [0788] 条件是与包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。
- [0789] 在另一方面,本发明涉及如本文所述的多肽,优选ISV,其中CDR1选自由SEQ ID NO:11-15组成的组,CDR2为SEQ ID NO:17,并且CDR3选自由SEQ ID NOs:21-22组成的组。
- [0790] 因此,在优选的方面,本发明涉及如本文所述的多肽,优选ISV,其中CDR1是SEQ ID NO:11,CDR2是SEQ ID NO:17,CDR3是SEQ ID NO:21。
- [0791] 因此,本发明涉及多肽,该多肽是选自由SEQ ID NO:1-6组成的组的ISV。
- [0792] 为了其对CD123的精确特异性,选择与56A10相关的多肽或ISV。可以在合适的结合测定中测量本发明多肽的结合,包括但不限于流式细胞术测定。在这种流式细胞术测定中,可以使用内源性表达CD123的细胞(例如MOLM-13或KG1a细胞)。备选地,可以使用被转染以过表达CD123的细胞(例如CHO-K1 huCD123或HEK293 cyno CD123)。合适的细胞系将从本文的实施例中变得清楚。
- [0793] 本发明的多肽,优选ISV,可以以10nM和100pM之间的平均EC50值与细胞上表达的CD123或表达CD123的细胞结合。
- [0794] 更具体地,本发明的多肽,优选ISV,以10nM和100pM之间的平均EC50值与在MOLM-13细胞上表达的人CD123结合,例如5nM以下的平均EC50值,例如小于4、3、2或1nM或甚至更小,优选如通过流式细胞术所测量的。
- [0795] 本发明的多肽,优选ISV,以10nM和100pM之间的平均EC50值与在CHO-K1细胞上表达的人CD123结合,例如5nM或以下的平均EC50值,例如小于4、3、2或1nM或甚至更小,优选如通过流式细胞术所测量的。
- [0796] 本发明的多肽,优选ISV,以10nM和100pM之间的平均EC50值与在HEK293细胞上表达的食蟹猴CD123结合,例如5nM或以下的平均EC50值,例如小于4或3nM或甚至更小,优选如

通过流式细胞术所测量的。

[0797] 本发明的多肽,优选ISV的结合也可以通过SPR测量。

[0798] 因此,本发明的多肽,优选ISV,可以以10nM和100pM之间的平均 K_D 值与人CD123结合,例如5nM或以下的平均 K_D 值,例如小于4、3或2nM或甚至更低,所述 K_D 值优选如通过表面等离振子共振所确定。

[0799] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽或ISV,其中所述平均 K_D 或EC50通过流式细胞术或SPR确定,例如所述 K_D 或EC50如实施例部分中所示的确定。

[0800] 在实施例中已经显示,在SPR中所测量的 K_D 与在流式细胞术中所测量的EC50良好相关。

[0801] 在另一方面,本发明的多肽与SEQ ID NO:7-10(参见表A-4)之一可具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性。这些多肽在本文中称为“与55F03相关的多肽”或“与55F03相关的ISV”。

[0802] 因此,本发明涉及多肽,优选ISV,其中CDR1是SEQ ID NO:16。

[0803] 在另外的方面,本发明涉及多肽,优选ISV,其中CDR2选自由以下组成的组:

[0804] a) SEQ ID NO:18;或

[0805] b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0806] -在位置3处Y已经变为W;

[0807] -在位置6处N已经变为S;和/或

[0808] -在位置10处Q已经变为E;

[0809] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0810] 在另外的方面,本发明涉及多肽,优选ISV,其中CDR3选自由以下组成的组:

[0811] a) SEQ ID NO:23;或

[0812] b) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0813] -在位置4处E已变为R;和/或

[0814] -在位置5处T已变为D或Y;

[0815] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0816] 因此,本发明涉及多肽,优选ISV,其中:

[0817] i) CDR1是SEQ ID NO:16;

[0818] 和

[0819] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0820] a) SEQ ID NO:18;或

[0821] b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0822] -在位置3处Y已经变为W;

[0823] -在位置6处N已经变为S;和/或

[0824] -在位置10处Q已经变为E;

[0825] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0826] 和

[0827] i ii) CDR3选自由以下组成的组:

[0828] c) SEQ ID NO:23; 或

[0829] d) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[0830] -在位置4处E已变为R; 和/或

[0831] -在位置5处T已变为D或Y;

[0832] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0833] 在另一方面,本发明涉及如本文所述的多肽,优选ISV,其中CDR1是SEQ ID NO:16,CDR2选自由SEQ ID NO:18-20组成的组,并且CDR3选自由SEQ ID NO:23-25组成的组。

[0834] 因此,在优选的方面,本发明涉及如本文所述的多肽,优选ISV,其中CDR1是SEQ ID NO:16,CDR2是SEQ ID NO:18,和CDR3是SEQ ID NO:23。

[0835] 优选的多肽和/或ISV选自由SEQ ID NO:7-10组成的组。

[0836] 为了其对CD123的精确特异性,选择与55F03相关的多肽或ISV。本发明多肽的结合可以在合适的结合测定中进行测量,包括但不限于如本文所述的流式细胞术测定和SPR。

[0837] 本发明的多肽,优选ISV,可以以10 μ M和100nM之间的平均EC50值与细胞上表达的CD123或表达CD123的细胞结合。

[0838] 更具体地,本发明的多肽,优选ISV,以10 μ M和100nM之间的平均EC50值与在MOLM-13细胞上表达的人CD123结合,例如5 μ M或以下,例如小于4、3、2或1 μ M或甚至更小的平均EC50值,优选如通过流式细胞术所测量的。

[0839] 本发明的多肽,优选ISV,以100nM和1nM之间的平均EC50值与在CHO-K1细胞上表达的人CD123结合,例如50nM或以下,例如小于40、30、20或10nM或甚至更小,例如小于9、8或7nM或甚至更小的平均EC50值,优选如通过流式细胞术所测量的。

[0840] 本发明的多肽,优选ISV,以10nM和100pM之间的平均EC50值与HEK293细胞上表达的食蟹猴CD123结合,例如5nM或以下,例如小于4或3nM或甚至更小的平均EC50值,优选如通过流式细胞术所测量的。

[0841] 在另外的方面,本发明涉及多肽或ISV,该多肽或ISV以1 μ M和10nM之间的平均 K_D 值与人CD123结合,例如500nM或以下,例如小于400、300或200nM或甚至更小的平均 K_D 值,所述 K_D 值优选如通过表面等离振子共振所确定的。

[0842] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽或ISV,其中所述平均 K_D 或EC50通过流式细胞术或SPR测定,例如所述 K_D 或EC50如实施例部分中所示的确定。

[0843] 在实施例中已经显示,在SPR中所测量的 K_D 与使用MOLM-13细胞的基于流式细胞术的测定中所确定的EC50良好相关。

[0844] 通常,表A-4中列出的CDR的组合(即表A-4中在相同的行上提及的那些)是优选的。因此,通常优选的是,当ISV中的CDR是表A-4中提及的CDR序列,或者适当地选自由与表A-4

中列出的CDR序列具有4、3、2或仅1个氨基酸差异的CDR序列组成的组时,至少一个并且优选两个其他的CDR适当地选自属于表A-4中相同组合的(即,在表A-4中相同的行上所提及的)CDR序列,或适当地选自由与属于相同组合的CDR序列具有4、3、2或仅1个氨基酸差异的CDR序列组成的组。具有上述CDR的本发明的代表性多肽显示在表A-4中。

[0845] 本发明还涉及特异性结合CD123的多肽,优选ISV,其交叉阻断如本文所述的和/或选自SEQ ID NO:1-10的至少一种多肽与CD123的结合,和/或被如本文所述的和/或选自SEQ ID NO:1-10的至少一种多肽交叉阻断与CD123的结合。

[0846] 本发明进一步涉及单特异性多肽,其包含或(基本上)由结合CD123的两个或更多个ISV组成。在这样的多价(单特异性)多肽中(其在本文中也称为“本发明的多价多肽”),结合CD123的两个或更多个ISV可任选地通过一个或更多个肽接头连接,如本文进一步所描述的。

[0847] 因此,本发明涉及包含两个或更多个特异性结合CD123的ISV的多肽,其中ISV选自与56A10相关的ISV的组或选自与55F03相关的ISV的组。

[0848] 在更具体的方面,本发明涉及包含特异性结合CD123的两个ISV的多肽,其中ISV选自与56A10相关的ISV组或与55F03相关的ISV组。

[0849] 在本发明的这种多价单特异性多肽中,两个或更多个免疫球蛋白单可变结构域可以是相同的或不同的,并且可以针对CD123的相同抗原决定簇(例如针对CD123的相同的部分或表位),或可备选地针对CD123的不同抗原决定簇,或针对CD123的不同部分或表位;或其任何合适的组合。例如,本发明的二价多肽可包含(a)两个相同的免疫球蛋白单可变结构域;(b)针对CD123的第一抗原决定簇的第一免疫球蛋白单可变结构域,和针对CD123的相同抗原决定簇的第二免疫球蛋白单可变结构域,该第二免疫球蛋白单可变结构域与第一免疫球蛋白单可变结构域不同;或(c)针对CD123的第一抗原决定簇的第一免疫球蛋白单可变结构域,和针对CD123的另一抗原决定簇的第二免疫球蛋白单可变结构域。

[0850] 本发明的三价多肽可以是上述任何一种,还包含(a)相同的免疫球蛋白单可变结构域;(b)针对CD123的相同抗原决定簇的不同免疫球蛋白单可变结构域;或(c)针对CD123的另一抗原决定簇的不同免疫球蛋白单可变结构域。

[0851] 因此,在一个方面,本发明的单特异性多肽可以是多互补位多肽,例如诸如双互补位多肽。本文所用的术语“双互补位”(抗原-)结合分子或“双互补位”多肽应意指包含至少两个(即两个或更多个)免疫球蛋白单可变结构域的多肽,其中“第一”免疫球蛋白单可变结构域针对CD123,和“第二”免疫球蛋白单可变结构域针对CD123,并且其中这些“第一”和“第二”免疫球蛋白单可变结构域具有不同的互补位。因此,双互补位多肽包含或由两个或更多个针对CD123的免疫球蛋白单可变结构域组成,其中至少一个“第一”免疫球蛋白单可变结构域针对CD123上的第一表位,和至少一个“第二”免疫球蛋白单可变结构域针对CD123上不同于CD123上第一表位的第二表位。

[0852] 因此,本发明涉及多肽,其中两个或更多个特异性结合CD123的ISV是包含第一ISV和第二ISV的双互补位,其中第一ISV结合CD123上的表位,该表位不同于第二ISV所结合的CD123上的表位。这种多肽在本文中也称为“本发明的双互补位多肽”。

[0853] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的(双互补位)多肽,其中第一ISV选自与56A10相关的ISV组,第二ISV选自与55F03相关的ISV组。

[0854] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中第二ISV位于第一ISV的N端。这种多肽包含与56A10相关的ISV的N端的与55F03相关的ISV。

[0855] 在另外的方面,本发明提供如本文所述的多肽,其中第二ISV位于第一ISV的C端。这种多肽包含与56A10相关的ISV的C端的与55F03相关的ISV。

[0856] 由于亲合结合,也称为“亲合力”,相比于相应的单价多肽,本发明的双互补位多肽可以具有改善的与CD123结合的亲和力。

[0857] 亲合力是多肽的亲和力,即配体能够经由两个(或以上)药效团(ISV)结合,其中多个相互作用协同增强“表现”亲和力。亲合力是本发明的多肽和相关抗原或抗原决定簇之间的结合强度的测量值。本发明的多肽能够经由其两个(以上)结构单元如ISV与至少两个靶标或抗原决定簇结合,其中多个相互作用,例如第一结构单元或ISV结合第一靶标或第一抗原决定簇,并且第二结构单元或ISV结合第二靶标或第二抗原决定簇,协同增强“表现”亲和力。亲合力与抗原决定簇和抗原结合分子上的其抗原结合位点之间的亲和力以及抗原结合分子上存在的相关结合位点的数量相关。例如,并且不受限制,含有两个或以上结构单元(如针对细胞上不同靶标或不同抗原决定簇的ISV)的多肽可以(并且通常将)以比包含在本发明中的多肽中的单个单体或单个结构单元,如,例如,单价ISV更高的亲合力结合。

[0858] 本发明的单特异性多肽包含或(基本上)由一个或更多个免疫球蛋白单可变结构域组成。这些ISV的框架序列优选是免疫球蛋白框架序列或衍生自免疫球蛋白框架序列的框架序列(例如,通过序列优化,例如人源化或骆驼源化)(的合适组合)。例如,框架序列可以是衍生自免疫球蛋白单可变结构域的框架序列,例如衍生自轻链可变结构域(例如,V_L-序列)和/或衍生自重链可变结构域(例如,V_H-序列)。在一个特别优选的方面,框架序列是衍生自V_{HH}序列的框架序列(其中所述框架序列可任选地已经部分或完全人源化)或者是已经骆驼源化的常规V_H序列。

[0859] 框架序列可以优选使得包含在本发明单特异性多肽中的ISV是结构域抗体(或适合用作结构域抗体的氨基酸序列);单结构域抗体(或适合用作单结构域抗体的氨基酸);“dAb”(或适合用作dAb的氨基酸);纳米抗体;V_{HH};人源化V_{HH};骆驼源化V_H;或通过亲和力成熟获得的V_{HH}。再次,合适的框架序列对于本领域技术人员而言是清楚的,例如基于标准手册和本文提及的进一步公开内容和现有技术。

[0860] 特别地,存在于本发明的单特异性多肽中的框架序列可含有一个或更多个特征残基(如WO 08/020079(表A-3至A-8)中所定义),使得本发明的单特异性多肽是纳米抗体。根据本文的进一步公开内容(参见例如表A-4),这种框架序列(的合适组合)的一些优选但非限制性的实例将变得清楚。通常,纳米抗体(特别是V_{HH}、部分或完全人源化的V_{HH}和骆驼源化的V_H)可以特别地以在一个或更多个的框架序列中存在一个或更多个的“特征残基”为特征(如例如在WO 08/020079,第61页第24行至第98页第3行中进一步所描述)。

[0861] 更特别地,本发明提供了包含至少一个免疫球蛋白单可变结构域的多肽,该免疫球蛋白单可变结构域是具有(通用)结构FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4的氨基酸序列,其中FR1至FR4分别指框架区1至4,其中CDR1至CDR3分别指互补决定区1至3,并且所述多肽:

[0862] i) 与SEQ ID NO:1-10(参见表A-4)的至少一个氨基酸序列具有至少80%、更优选90%、甚至更优选95%的氨基酸同一性,其中为了确定氨基酸同一性程度的目的,不考虑形成CDR序列的氨基酸残基。在这方面,还参考表A-4,其列出了SEQ ID NO:1-10的免疫球蛋白

单可变结构域的框架1序列 (SEQ ID NO:26-29)、框架2序列 (SEQ ID NO:30-33)、框架3序列 (SEQ ID NOs:34-39) 和框架4序列 (SEQ ID NO:40-41) (参见表A-4)；或

[0863] 和其中：

[0864] ii) 优选地,根据Kabat编号的位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108处的一个或更多个氨基酸残基选自WO 08/020079的表A-3至表A-8中提到的特征残基。

[0865] 本发明还提供了许多序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域。

[0866] 特别地,本发明的序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域可以是如前面段落中为免疫球蛋白单可变结构域通常所定义的氨基酸序列,但其中存在(和特别地,在至少一个框架残基中存在)是和/或对应于人源化取代(如本文所定义)的至少一个氨基酸残基。基于本文的公开内容,一些优选但非限制性的人源化取代(及其合适的组合)对于本领域技术人员而言将变得清楚。另外,或备选地,通过比较天然存在的VHH序列的框架区的序列与一个或更多个密切相关的人VH序列的相应框架序列,可以确定其他可能有用的人源化取代,之后由此确定的一个或更多个可能有用的人源化取代(或其组合)可以(以本身已知的任何方式,如本文进一步描述的)被引入所述VHH序列中,并且可以测试所得的人源化VHH序列对靶标的亲和力、稳定性、表达的容易性和水平和/或其他所需的特性。以这种方式,通过有限程度的试验和错误,技术人员可以基于本文的公开内容确定其他合适的人源化取代(或其合适的组合)。而且,基于前述内容,免疫球蛋白单可变结构域(的框架区)可以是部分人源化的或完全人源化的。

[0867] 本发明还涉及序列优化的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域,其在稳定性研究期间在储存时可显示出改善的表达和/或增加的稳定性。本发明的序列优化的多肽和/或ISV可显示降低的N-端的焦谷氨酸翻译后修饰,因此具有增加的产物稳定性。此外,本发明的序列优化的多肽和/或ISV可以显示出其他改进的性质,例如,免疫原性较低,对于CD123的结合特性的改善(适当地测量和/或表示为 K_D 值(实际或表观)、 K_A 值(实际或表观)、 k_{on} 速率和/或 k_{off} 速率,或者备选地作为 EC_{50} 值,如本文进一步所描述的),对于CD123的改善的亲和力和/或改善的亲合力。

[0868] 本发明的一些特别优选的序列优化的免疫球蛋白单可变结构域是SEQ ID NO:1-10的免疫球蛋白单可变结构域的序列优化的变体。

[0869] 因此,本发明的一些其它优选的免疫球蛋白单可变结构域是可以与CD123结合(如本文所定义)的纳米抗体,并且所述纳米抗体:

[0870] i) 是SEQ ID NO:1-10的免疫球蛋白单可变结构域之一的序列优化变体;和/或

[0871] ii) 与SEQ ID NO:1-10(见表A-4)的至少一个免疫球蛋白单可变结构域具有至少80%的氨基酸同一性,其中为了确定氨基酸同一性程度的目的,不考虑形成CDR序列的氨基酸残基;在这一方面,还参考表A-4,其列出了SEQ ID NO:1-10的免疫球蛋白单可变结构域的框架1序列 (SEQ ID NO:26-29)、框架2序列 (SEQ ID NO:30-33)、框架3序列 (SEQ ID NOs:34-39)、框架4序列 (SEQ ID NO:40-41) (参见表A-4)；

[0872] 和其中:

[0873] iii) 优选地,根据Kabat编号的位置11、37、44、45、47、83、84、103、104和108处的一个或更多个氨基酸残基选自WO 08/020079的表A-3至表A-8中提到的特征残基。

[0874] 本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域还可含有以下共同未决的美国临时

申请中描述的特定突变/氨基酸残基,所有临时申请均标题为“Improved immunoglobulin variable domains”:2014年5月16日提交的US 61/994552、2014年6月18日提交的US 61/014,015、2014年8月21日提交的US 62/040,167和2014年9月8日提交的US 62/047,560(均转让给Ablynx N.V.),以及基于这些临时申请并于2015年11月19日公布的国际申请WO 2015/173325。

[0875] 特别地,本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域可适当地含有(i)位置112处的K或Q;或(ii)位置110处的K或Q与位置11处的V组合;或(iii)位置89处的T;或(iv)位置89上的L与位置110处的K或Q;或(v)位置11处的V及位置89处的L;或(i)至(v)的任何合适组合。

[0876] 还如所述共同未决的美国临时申请中所述,当本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域含有根据上述(i)至(v)之一(或其合适的组合)的突变时:

[0877] -位置11的氨基酸残基优选选自L、V或K(最优选V);和

[0878] -位置14的氨基酸残基优选适当地选自A或P;和

[0879] -位置41的氨基酸残基优选适当地选自A或P;和

[0880] -位置89的氨基酸残基优选适当地选自T、V或L;和

[0881] -位置108的氨基酸残基优选适当地选自Q或L;和

[0882] -位置110的氨基酸残基优选适当地选自T、K或Q;和

[0883] -位置112的氨基酸残基优选适当地选自S、K或Q。

[0884] 如所述共同未决的美国临时申请中所述,所述突变可有效预防或减少所谓的“预先存在的抗体”与本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域和/或构建体的结合。为此目的,本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域还可含有(任选地与所述突变组合)C端延伸(X)n(其中n为1至10,优选1至5,例如1、2、3、4或5(并且优选1或2,例如1);并且每个X是(优选天然存在的)氨基酸残基,该氨基酸残基独立地选自且优选独立地选自由丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)组成的组),其再次参考所述美国临时申请以及WO 12/175741。特别地,本发明的多肽和/或免疫球蛋白单可变结构域在形成包含其的蛋白质、多肽或其他构建体的C末端时可以含有这种C端延伸(再次,如所述美国临时申请以及WO 12/175741进一步所描述的)。

[0885] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其进一步包含C端延伸(X)n,其中n为1至5,例如1、2、3、4或5,并且其中X为天然存在的氨基酸,优选不是半胱氨酸。

[0886] 本发明的这些多肽,特别是包含本发明CDR序列的免疫球蛋白单可变结构域,特别适合用作用于制备多价或多特异性多肽的结构单元或结合单元。

[0887] 因此,结合CD123的本发明的单特异性多肽可以是基本上分离的形式(如本文所定义),或它们可以形成蛋白质或多肽的部分,该蛋白质或多肽可包含或基本上由结合CD123的一个或多个ISV组成,并且该蛋白质或多肽可任选地进一步包含一个或更多个另外的氨基酸序列(所有氨基酸序列均任选地通过一个或更多个合适的接头连接)。

[0888] 因此,本发明还涉及蛋白质或多肽,其包含或基本上由一个或多个本发明的单特异性多肽(或其合适的片段)组成。在另外的方面,结合CD123的本发明的单特异性多肽可以形成多特异性多肽的一部分,该多特异性多肽可以包含或基本上由一个或多个结合CD123的ISV组成,并且该多特异性多肽可以任选地进一步包含一个特异性结合另一种靶标的

ISV, 例如诸如TCR, 并且该多特异性多肽可任选地进一步包含一个或更多个另外的氨基酸序列(全部任选地通过一个或更多个合适的接头连接)。

[0889] 因此, 本发明的单特异性多肽用作这种蛋白质或多肽中的结合单元或结构单元, 以便提供如本文所述的本发明的多特异性多肽(对于含有一个或更多个VHH结构域的多特异性多肽及其制备, 还参考Conrath等人(2001, J.Biol.Chem. 276:7346-7350), 以及参考例如WO 96/34103、WO 99/23221和WO 2010/115998)。

[0890] 2. 多特异性多肽

[0891] 本发明进一步涉及多特异性多肽, 其包含或(基本上)由两个或更多个结构单元(例如至少两个本发明的单特异性多肽或ISV)组成, 其中至少一个结构单元针对第一抗原(即CD123), 和至少一个结构单元针对第二抗原(即TCR)。这些多特异性多肽在本文中也称为“本发明的多特异性多肽”。用于本发明的这些多特异性多肽中的优选免疫球蛋白单可变结构域是本发明的单特异性多肽(如前所述)。

[0892] 如本文进一步所述, 具有不同抗原特异性(即不同于CD123和TCR)的附加结合单元, 例如免疫球蛋白单可变结构域, 可以与本发明的多特异性多肽连接。通过组合三种或更多种特异性的免疫球蛋白单可变结构域, 可以形成三特异性, 四特异性等构建体。这些多特异性多肽在本文中也称为“本发明的(多特异性)多肽”或“本发明的构建体”。

[0893] 因此, 例如, “本发明的双特异性多肽”是包含或(基本上)由至少一个针对第一抗原(即CD123)的免疫球蛋白单可变结构域和至少一个针对第二抗原(即TCR)的另外的免疫球蛋白单可变结构域组成的多肽组成, 而“本发明的三特异性多肽”是包含或(基本上)由以下组成的多肽: 至少一个针对第一抗原(即CD123)的免疫球蛋白单可变结构域、至少一个针对第二抗原(即TCR)的另外的免疫球蛋白单可变结构域, 和至少一个针对第三抗原(即不同于CD123和TCR)的另外的免疫球蛋白单可变结构域等。免疫球蛋白单可变结构域可任选地经由一个或更多个肽接头连接, 如本文进一步所描述的。

[0894] 因此, 本发明涉及包含或(基本上)由一个特异性结合TCR的免疫球蛋白单可变结构域和一个或更多个特异性结合CD123的ISV组成的多肽。在另外的方面, 本发明还提供了包含或(基本上)由一个特异性结合TCR的免疫球蛋白单可变结构域和两个或多个特异性结合CD123的ISV组成的多肽。根据本文的进一步描述, 这些多特异性多肽或其构建体的一些非限制性实例将变得清楚。

[0895] 应当理解(还如在实施例部分中所证明的), 特异性结合TCR的ISV和特异性结合CD123的一个或更多个ISV可以以任何顺序位于本发明的多肽中。更特别地, 在一个方面, 结合TCR的ISV位于N端, 并且结合CD123的一个或更多个ISV位于C端。在另一个方面, 结合CD123的一个或更多个ISV位于N端, 和结合TCR的ISV位于C端。在另一个方面, 结合CD123的一个或更多个ISV位于N端, 结合TCR的ISV位于中央, 并且结合CD123的一个或更多个另外的ISV位于C端。在优选的方面, 本发明涉及多肽, 其中特异性结合TCR的ISV位于多肽的N端。

[0896] 在一些方面, 本发明的多特异性多肽包含两个或更多个特异性结合CD123的ISV。在一个方面, 特异性结合CD123的两个或更多个ISV结合CD123上的相同表位。在一个方面, 本发明的这种多特异性多肽可包含两个或更多个与56A10相关的ISV。在另一方面, 本发明的这种多肽包含两个或更多个与55F03相关的ISV。

[0897] 在更优选的方面, 特异性结合CD123的两个或更多个ISV与不同的表位结合。因此,

本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合CD123的两个或更多个ISV是包含第一ISV和第二ISV的双互补位,其中第一ISV与CD123上的表位结合,该表位与第二ISV所结合的CD123上的表位不同。

[0898] 更具体地,本发明涉及本发明的多特异性多肽,其中结合CD123的第一ISV选自与56A10相关的ISV,结合CD123的第二ISV选自与55F03相关的ISV。如前所述,与本发明的单特异性多肽相比,本发明的这些双互补位多肽由于亲合结合(也称为亲合力)而具有改善的与CD123结合的亲和力。

[0899] 应当理解(还如在实施例部分中所证明的),结合CD123的ISV可以以任何顺序位于本发明的多特异性多肽中。更特别地,在一个方面,第二ISV(即与55F03相关的ISV)位于第一ISV(即与56A10相关的ISV)的N端。在另一方面,第二ISV(即与55F03相关的ISV)位于第一ISV(即与56A10相关的ISV)的C端。根据本文的进一步描述,这种多特异性构建体的一些非限制性实例将变得清楚。

[0900] 典型地,本发明的多特异性多肽将对靶细胞的高亲和力和高特异性抗原识别与T细胞活化相组合,导致独立于T细胞的天然特异性的活化。

[0901] 如本文所提及的“靶细胞”是在其表面上呈递特定抗原(即CD123)的细胞。在一个方面,“靶细胞”是以CD123过表达为特征的细胞。在优选的方面,这种靶细胞与CD123相关的疾病相关。在甚至更优选的方面,靶细胞是(过)表达CD123的癌细胞。术语“癌症”是指哺乳动物中典型地以异常调控的细胞增殖或存活为特征的病理状况。

[0902] 如本文所用,“T细胞活化”是指T细胞(例如细胞毒性T细胞)的一种或更多种细胞应答,例如选自:增殖、分化、细胞因子分泌、细胞毒性效应分子释放、细胞毒活性、活化标记物的表达和重定向的靶细胞溶解。如本文所用的术语“细胞应答”是指在组装TCR复合物时细胞内信号传导引起的细胞的应答。

[0903] 与靶细胞上的细胞表面分子(例如CD123)和与T细胞TCR二者结合的多肽的作用模式是公知的。使T细胞紧邻于靶细胞(例如CD123表达细胞),即,使所述T细胞接合并聚集TCR复合物,导致T细胞活化并随后通过T细胞杀死所述靶细胞。在本发明中,该方法用于对抗CD123相关疾病,如增殖性疾病或炎性病症。通常,T细胞配备有颗粒,该颗粒包含孔道形成蛋白(称为穿孔蛋白)和细胞死亡诱导蛋白酶(称为粒酶)的致死组合。优选地,这些蛋白质经由细胞溶解突触被递送到靶细胞(如CD123表达细胞),如果T细胞紧邻于打算杀死的靶细胞,那么形成所述细胞溶解突触。正常地,T细胞和靶细胞之间的紧邻通过T细胞使用其匹配的T细胞受体与MHC/肽复合物结合而实现。本发明的多肽在缺少T细胞受体/MHC相互作用的情况下使T细胞如此紧邻于靶细胞。

[0904] 因此,本发明涉及如本文所述的多特异性多肽,其中所述多肽将T细胞导向靶细胞。因此,本发明的多肽“重定向T细胞以杀死CD123表达细胞”,这意味着本发明的多肽使T细胞如此紧邻于被杀死的CD123表达细胞。

[0905] 通过一个臂(结合TCR的ISV),本发明的多特异性多肽与TCR亚基的恒定结构域(T细胞上的T细胞受体的信号转导复合物的蛋白质组分)结合。通过另一个臂(一个或更多个结合CD123的ISV),多特异性多肽与靶细胞上的CD123结合。优选地,仅当多特异性多肽被呈递至T细胞上时,在CD123表达细胞(的位点)处才能看到T细胞活化。对于活化的靶细胞上的抗原依赖性导致有利的安全属性。本发明的多特异性多肽表现出与CD123的高度特异性结

合。因此,避免了脱靶结合,并且靶标独立的T细胞活化是最小的,如本文所例示的。在一个方面,多特异性多肽瞬时连接T细胞和靶细胞。优选地,多特异性多肽可以将静息的多克隆T细胞(例如CD4⁺和/或CD8⁺T细胞)诱导至活化,用于靶细胞(即表达CD123的细胞)的高效重定向溶解。优选地,在第一靶细胞溶解后,T细胞被导向下一个靶细胞。

[0906] 在一个方面,本发明涉及如本文所述的多特异性多肽,其中所述多特异性多肽诱导T细胞活化。

[0907] 在另外的方面,本发明涉及多特异性多肽,其中所述T细胞活化独立于MHC识别。

[0908] 如本文所用,“独立于MHC识别的T细胞活化”是指独立于靶细胞上的MHC/肽复合物与T细胞上的其匹配的T细胞受体的结合的T细胞活化。通过使T细胞紧邻于靶细胞,靶细胞将被杀死。正常地,T细胞和靶细胞之间的紧邻通过T细胞使用其匹配的T细胞受体与MHC/肽复合物结合而实现。本发明的多特异性多肽在缺少T细胞受体/MHC相互作用的情况下使T细胞如此紧邻于靶细胞。多特异性多肽与靶细胞上的CD123结合,并且因此呈递并与T细胞结合,导致T细胞活化并杀死靶细胞。

[0909] 因此,在另外的方面,本发明涉及多特异性多肽,其中所述T细胞活化依赖于将与靶细胞上的CD123结合的所述多肽呈递给T细胞。

[0910] 在另外的方面,本发明涉及多特异性多肽,其中所述T细胞活化引起所述T细胞的一种或多种细胞应答,其中所述细胞应答选自由以下组成的组:增殖、分化、细胞因子分泌、细胞毒性效应分子释放、细胞毒活性、活化标记物的表达和重定向的靶细胞溶解。

[0911] 用于测量T细胞活化的合适测定法是本领域已知的,例如如WO 99/54440或Schlereth等人(2005,Cancer Immunol. Immunother. 20:1-12)所述,或如实施例或下文所例示。

[0912] 不受限制,通过本发明多肽的T细胞活化可通过以下进行监测:CD69、D25和多种细胞粘附分子的上调,细胞因子(例如IFN- γ 、TNF- α 、IL-6、IL-2、IL-4和IL-10)的从头表达和/或释放,粒酶和穿孔蛋白表达的上调,和/或细胞增殖,膜起泡,胱天蛋白酶原(procaspases)3和/或7的活化,核DNA的片段化和/或胱天蛋白酶底物聚(ADP核糖)聚合酶的裂解。优选地,通过多特异性多肽对靶细胞的重定向溶解独立于T细胞受体特异性、I类MHC和/或 β 2微球蛋白的存在、和/或任何共刺激性刺激物。

[0913] 本发明的多肽显示了在体外通过先前未刺激的(即未活化的)外周多克隆CD8⁺和CD4⁺阳性T细胞的重定向溶解,如本文所进一步举例说明的。通过本发明的多肽经由T细胞募集的靶细胞重定向溶解涉及细胞溶解突触形成以及穿孔蛋白和粒酶的递送。通过T细胞的细胞溶解已经在例如Atkinson和Bleackley(1995,Crit. Rev. Immunol. 15 (3-4) :359-384)中描述。优选地,本发明的多肽通过在孔形成中(in pore formation)刺激T细胞并递送细胞毒性T细胞颗粒的促细胞凋亡组分来介导靶细胞如癌细胞的杀伤。优选地,接合的T细胞能够进行连续靶细胞溶解。在体外,使用本发明的多肽,重定向溶解在低皮摩尔浓度下可见,这表明极低数量的本发明多肽需要与靶细胞结合来触发T细胞。如实施例中证明的,低效应细胞与靶细胞比率可以表明连续靶细胞溶解,并证明本发明多肽的高效力。

[0914] 如本文所用,术语“效力”是活性剂(例如单特异性或多特异性多肽、ISV或纳米抗体)的生物活性的测量。效力是其特定效果发生所需的本发明多肽量的函数。它简单地测量为该多肽的IC₅₀的倒数。对于本发明的多特异性肽,它指的是本发明的所述多肽诱导T细胞

活化的能力。活性剂的效力可以通过本领域已知的任何合适的方法确定,例如如实验部分中所述。基于细胞培养的效力测定通常用于确定生物学活性的优选形式,因为它们测量由活性剂引发的生理学应答,并且可以在相对短的时期内产生结果。基于产物的作用机制,可以使用基于各种类型的细胞的测定,包括但不限于增殖测定、细胞毒性测定、细胞杀伤测定、报告基因测定、细胞表面受体结合测定和测量对功能上关键的蛋白或其他信号分子(如磷酸化蛋白、酶、细胞因子、cAMP等)的诱导/抑制的测定、T细胞介导的肿瘤细胞杀伤测定(例如如实施例部分所示),全部是本领域中已知的。来自基于细胞的效力测定的结果可以表达为“相对效力”,如通过将本发明的多特异性多肽与对于相应参考单价ISV(例如仅包含一个ISV或一个纳米抗体,任选地进一步包含不相关纳米抗体的多肽(参见实验部分))获得的应答相比较来确定的。

[0915] 在饱和多肽浓度下,(本发明多肽的)“功效”测量效果本身的最大强度。功效表明本发明的多肽可实现的最大应答。它指多肽产生所需(治疗)效果的能力。

[0916] 在一个方面,本发明的多特异性多肽激活T细胞,导致CD123表达细胞(例如MOLM-13或KG1a细胞)的杀伤,其平均EC50值在10nM和1pM之间,如在基于流式细胞术的测定中所确定的。(参见例25)

[0917] 更具体地,本发明的多肽诱导T细胞活化,其中所述T细胞活化以1nM和1pM之间的平均EC50值引起CD123表达细胞(例如MOLM-13细胞)的杀伤,例如500pM或以下的平均EC50值,例如小于400、300、200或100pM或甚至更小,例如小于90、80、70、60、50、40或30pM或甚至更小,所述EC50值例如在具有TOPRO3读出的基于流式细胞术的测定中被确定,使用MOLM-13细胞作为靶细胞,并使用人T细胞作为效应细胞,效应细胞与靶细胞的比例为10比1。

[0918] 更具体地,本发明的多肽诱导T细胞活化,其中所述T细胞活化以大于约10%的平均溶解百分比引起CD123表达细胞(例如MOLM-13细胞)的溶解,例如15%、16%、17%、18%、19%或20%或甚至更大,例如大于25%,或甚至大于30%,所述溶解百分比例如在具有TOPRO3读出的基于流式细胞术的测定中被确定,该测定使用MOLM-13细胞作为靶细胞,并使用人T细胞作为效应细胞,效应细胞与靶细胞的比例为10比1。

[0919] 更具体地,本发明的多肽诱导T细胞活化,其中所述T细胞活化以10nM和10pM之间的平均EC50值引起CD123表达细胞(例如KG1a细胞)的杀伤,例如5nM或以下的平均EC50值,例如小于4、3、2或1nM或甚至更小,例如小于90、80、70或60pM或甚至更小,所述EC50值例如在具有TOPRO3读出的基于流式细胞术的测定中确定,该测定使用KG1a细胞作为靶细胞,并使用人T细胞作为效应细胞,效应细胞与靶细胞的比例为10比1。

[0920] 更具体地,本发明的多肽诱导T细胞活化,其中所述T细胞活化以大于约10%的平均溶解百分比引起CD123表达细胞(例如KG1a细胞)的溶解,例如15%、16%、17%或18%或甚至更大,例如大于24%,所述溶解百分比例如在具有TOPRO3读出的基于流式细胞术的测定中确定,该测定使用KG1a细胞作为靶细胞,并使用人T细胞作为效应细胞,效应细胞与靶细胞的比例为10比1。

[0921] 在另一方面,本发明的多特异性多肽激活T细胞,并因此可诱导细胞因子分泌。因此,多肽以100nM和10pM之间的平均EC50值引起IFN- γ 或IL-6的分泌。(参见例30)

[0922] 更具体地,本发明的多肽诱导T细胞活化,其中所述T细胞活化在以100nM和10pM之间的平均EC50值引起IFN- γ 分泌,例如50nM或以下的平均EC50值,例如小于40、30、20、10或

9nM或甚至更小,例如小于8、7、6、5、4、3、2或1nM或甚至更小,例如小于500pM或甚至更小,例如小于400、300、200或100pM或甚至更小,所述EC50值例如在基于ELISA的测定中确定,例如在实施例30中进一步所解释。

[0923] 更具体地,本发明的多肽诱导T细胞活化,其中所述T细胞活化以100nM和10pM之间的平均EC50值引起IL-6分泌,例如50nM或以下的平均EC50值,例如小于40、30、20或10nM或甚至更小,例如小于9、8、7、6、5、4、3、2或1nM或甚至更小,例如小于500pM或甚至更小,例如小于400、300、200或100pM或甚至更小,所述EC50值例如在基于ELISA的测定中确定,例如在实施例30中进一步所解释。

[0924] 在另一方面,本发明的多特异性多肽引起浆细胞样细胞(pDC)和嗜碱性粒细胞的消耗。(参见实施例31)

[0925] 因此,本发明涉及一种多肽,其中所述T细胞活化引起浆细胞样细胞(pDC)和嗜碱性粒细胞的消耗。

[0926] 在另一方面,本发明的多特异性多肽可进一步引起T细胞增殖。(参见例39)

[0927] 因此,本发明涉及一种多肽,其中所述T细胞活化引起所述T细胞的增殖。

[0928] 本发明的多特异性多肽包含一个或更多个特异性结合CD123的ISV,为了它们的特异性,所述ISV已被仔细选择。因此,本发明的多特异性多肽表现出与CD123的高度特异性结合,这使得它们能够杀死表达CD123的靶细胞。相反,在缺失CD123表达细胞的情况下仅观察到最小的杀伤,这强调了本发明多肽的安全性。

[0929] 因此,在另一方面,本发明涉及多肽,其中在缺失CD123阳性细胞的情况下T细胞活化是最小的。(参见实施例36至38)

[0930] 更具体地,本发明涉及一种多肽,其中CD123阴性细胞的T细胞活化诱导的溶解不超过约10%,例如9%以下,例如8、7或6%或甚至更小,所述溶解例如被确定为在具有TOPRO3读出的基于流式细胞术的测定中的平均溶解百分比,该测定使用CD123阴性细胞(例如U-937或NCI-H929细胞)作为靶细胞,并使用人T细胞作为效应细胞,效应细胞与靶细胞的比例为10比1。

[0931] 更具体地,本发明涉及一种多肽,其在存在CD123阴性细胞的情况下,不诱导IFN- γ 和IL-6的分泌,所述分泌例如在基于ELISA的测定中确定。

[0932] 发明人观察到本发明的某些多特异性多肽,其包含本发明的TCR结合ISV和一个或更多个本发明的CD123结合ISV,该多特异性多肽特别适于重定向T细胞以杀死CD123表达细胞。通过本发明的这些多特异性多肽,在缺失CD123表达细胞的情况下,T细胞的活化最小。

[0933] 因此,本发明涉及重定向T细胞以杀死CD123表达细胞的多特异性多肽,其包含一个特异性结合T细胞受体(TCR)的免疫球蛋白单可变结构域(ISV)和一个或更多个特异性结合CD123的ISV,其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0934] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0935] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0936] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通

过表面等离振子共振所测量的；

[0937] 和/或

[0938] ii) CDR2选自由以下组成的组：

[0939] c) SEQ ID NO:192-217；或

[0940] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合，所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的；

[0941] 和/或

[0942] iii) CDR3选自由以下组成的组：

[0943] e) SEQ ID NO:218-225；或

[0944] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合，所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的；

[0945] 其中，特异性结合CD123的一个或更多个ISV基本上由4个框架区（分别为FR1至FR4）和3个互补决定区（分别为CDR1至CDR3）组成，其中：

[0946] i) CDR1选自由以下组成的组：

[0947] a) SEQ ID NO:11-16；或

[0948] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合，所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的；

[0949] 和/或

[0950] ii) CDR2选自由以下组成的组：

[0951] c) SEQ ID NO:17-20；或

[0952] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合，所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的；

[0953] 和/或

[0954] iii) CDR3选自由以下组成的组：

[0955] e) SEQ ID NO:21-25；或

[0956] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列；条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合，所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0957] 在另外的方面，本发明涉及多特异性多肽，其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区（分别为FR1至FR4）和3个互补决定区（分别为CDR1至CDR3）组成，其中：

[0958] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0959] a) SEQ ID NO:181-191;或

[0960] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0961] 和

[0962] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0963] c) SEQ ID NO:192-217;或

[0964] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0965] 和

[0966] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0967] e) SEQ ID NO:218-225;或

[0968] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0969] 并且其中,一个或多更多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[0970] i) CDR1选自由以下组成的组:

[0971] a) SEQ ID NO:11-16;或

[0972] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0973] 和

[0974] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[0975] c) SEQ ID NO:17-20;或

[0976] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列;条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[0977] 和

[0978] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[0979] e) SEQ ID NO:21-25;或

[0980] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序

列；条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合，所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[0981] 在特别的方面，本发明涉及多特异性多肽，其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区（分别为FR1至FR4）和3个互补决定区（分别为CDR1至CDR3）组成，其中：

[0982] i) CDR1选自由以下组成的组：

[0983] a) SEQ ID NO:181-191；或

[0984] b) 与SEQ ID NO:181-191之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列，其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置2、4、5、6、8和/或10处（根据Kabat编号的位置27、29、30、31、33和/或35）；条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合，所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的；

[0985] 和

[0986] ii) CDR2选自由以下组成的组：

[0987] c) SEQ ID NO:192-217；或

[0988] d) 与SEQ ID NO:192-217之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列，其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置1、3、5、7、8和/或9处（根据Kabat编号位置50、52、54、56、57和/或58）；条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合，所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的；

[0989] 和

[0990] iii) CDR3选自由以下组成的组：

[0991] e) SEQ ID NO:218-225；或

[0992] f) 与SEQ ID NO:218-225之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列，其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的位置1、4、5和/或8处（根据Kabat编号的位置95、98、99和/或101）；条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比，包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合，所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的；

[0993] 和其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步描述。

[0994] 在另一方面，本发明涉及如上所述的多特异性多肽，其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区（分别为FR1至FR4）和3个互补决定区（分别为CDR1至CDR3）组成，其中CDR1选自由以下组成的组：

[0995] a) SEQ ID NO:181；或

[0996] b) 与SEQ ID NO:181的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列，其中

[0997] -在位置2处D已经变为A、S、E或G；

[0998] -在位置4处H已经变为Y；

[0999] -在位置5处K已经变为L；

[1000] -在位置6处I已经变为L；

[1001] -在位置8处F已经变为I或V;和/或

[1002] -在位置10处G已经变为S;

[1003] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[1004] 在另一方面,本发明涉及如上所述的多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR2选自由以下组成的组:

[1005] a) SEQ ID NO:192;或

[1006] b) 与SEQ ID NO:192的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1007] -在位置1处H已经变为T或R;

[1008] -在位置3处S已经变为T或A;

[1009] -在位置5处G已经变为S或A;

[1010] -在位置7处Q已经变为D、E、T、A或V;

[1011] -在位置8处T已经变为A或V;和/或

[1012] -在位置9处D已经变为A、Q、N、V或S;

[1013] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[1014] 在另一方面,本发明涉及如上所述的多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR3选自由以下组成的组:

[1015] a) SEQ ID NO:218;或

[1016] b) 与SEQ ID NO:218的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1017] -在位置1处F已经变为Y、L或G;

[1018] -在位置4处I已经变为L;

[1019] -在位置5处Y已经变为W;和/或

[1020] -在位置8处D已变为N或S;

[1021] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[1022] 因此,本发明涉及如上所述的多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[1023] i) CDR1选自由以下组成的组:

[1024] a) SEQ ID NO:181;或

[1025] b) 与SEQ ID NO:181的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

- [1026] -在位置2处D已经变为A、S、E或G;
- [1027] -在位置4处H已经变为Y;
- [1028] -在位置5处K已经变为L;
- [1029] -在位置6处I已经变为L;
- [1030] -在位置8处F已经变为I或V;和/或
- [1031] -在位置10处G已经变为S;
- [1032] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;
- [1033] 和
- [1034] ii) CDR2选自由以下组成的组:
- [1035] c) SEQ ID NOs:192;或
- [1036] d) 与SEQ ID NO:192的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [1037] -在位置1处H已经变为T或R;
- [1038] -在位置3处S已经改为T或A;
- [1039] -在位置5处G已经变为S或A;
- [1040] -在位置7处Q已经变为D、E、T、A或V;
- [1041] -在位置8处T已经变为A或V;和/或
- [1042] -在位置9处D已经变为A、Q、N、V或S;
- [1043] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;
- [1044] 和
- [1045] iii) CDR3选自由以下组成的组:
- [1046] e) SEQ ID NO:218;或
- [1047] f) 与SEQ ID NO:218的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中
- [1048] -在位置1处F已经变为Y、L或G;
- [1049] -在位置4处I已经变为L;
- [1050] -在位置5处Y已经变为W;和/或
- [1051] -在位置8处D已经变为N或S;
- [1052] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与TCR结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;
- [1053] 其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所描述。
- [1054] 在另一方面,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自由SEQ ID NO:181-191组成的组,CDR2选自由SEQ ID NO:192-217组成的组,CDR3选自由SEQ ID

NO:218-225组成的组,并且其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所描述的。

[1055] 因此,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1是SEQ ID NO:181,CDR2是SEQ ID NO:192,和CDR3是SEQ ID NO:218,并且其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所描述的。

[1056] 在优选的方面,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV选自由SEQ ID NO:42和78-180组成的组,或选自与SEQ ID NO:42和78-180之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV,并且其中特异性结合CD123的ISV如本文进一步所描述的。

[1057] 除了如上所述的结合TCR的ISV之外,在本发明的多特异性多肽中,特异性结合CD123的一个或更多个ISV与56A10和/或55F03相关。

[1058] 因此,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[1059] i) CDR1选自由以下组成的组:

[1060] a) SEQ ID NO:11-16;或

[1061] b) 与SEQ ID NO:11-16之一的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述4、3、2或1个氨基酸差异存在于CDR1的位置3、6、7和/或8处(根据Kabat编号的位置28、31、32和/或33);条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[1062] 和

[1063] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[1064] c) SEQ ID NO:17-20;或

[1065] d) 与SEQ ID NO:17-20之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR2的位置3、6和/或10(根据Kabat编号的位置52、54和/或58);条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[1066] 和

[1067] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[1068] e) SEQ ID NO:21-25;或

[1069] f) 与SEQ ID NO:21-25之一的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中所述3、2或1个氨基酸差异存在于CDR3的位置3、4和/或5处(根据Kabat编号的位置97、98和/或99);条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[1070] 在一个方面,一个或更多个特异性结合CD123的ISV可以是与56A10相关的ISV。

[1071] 因此,本发明涉及如上所述的多特异性多肽,其中一个或更多个特异性结合CD123

的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1选自由以下组成的组:

[1072] a) SEQ ID NO:11;或

[1073] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1074] -在位置3处T已经变为S或P;

[1075] -在位置6处I已经变为S;

[1076] -在位置7处N已经变为D;和/或

[1077] -在位置8处D已经变为V或A;

[1078] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[1079] 在另一方面,本发明涉及如上所述的多特异性多肽,其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR2是SEQ ID NO:17。

[1080] 在另一方面,本发明涉及如上所述的多特异性多肽,其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR3选自由以下组成的组:

[1081] a) SEQ ID NO:21;或

[1082] b) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1083] -在位置3处P已经变为A;

[1084] 条件是与包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[1085] 因此,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[1086] i) CDR1选自由以下组成的组:

[1087] a) SEQ ID NO:11;或

[1088] b) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有4、3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1089] -在位置3处T已经变为S或P;

[1090] -在位置6处I已经变为S;

[1091] -在位置7处N已经变为D;和/或

[1092] -在位置8处D已经变为V或A;

[1093] 条件是与包含不具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽的结合相比,包含具有4、3、2或1个氨基酸差异的CDR1的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[1094] 和

[1095] ii) CDR2是SEQ ID NO:17;

[1096] 和

[1097] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[1098] c) SEQ ID NO:21; 或

[1099] d) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列具有1个氨基酸差异的氨基酸序列, 其中

[1100] - 在位置3处P已经变为A;

[1101] 条件是与包含不具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比, 包含具有1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合, 所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[1102] 在另一方面, 本发明涉及多特异性多肽, 其中特异性结合TCR的ISV如本文所述, 并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成, 其中CDR1选自由SEQ ID NO:11-15组成的组, CDR2为SEQ ID NO:17, CDR3选自由SEQ ID NO:21-22组成的组。

[1103] 因此, 本发明涉及多特异性多肽, 其中特异性结合TCR的ISV如本文所述, 并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成, 其中CDR1为SEQ ID NO:11, CDR2为SEQ ID NO:17, 和CDR3为SEQ ID NO:21。

[1104] 在优选的方面, 本发明涉及多特异性多肽, 其中特异性结合TCR的ISV如本文所述, 并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV选自由SEQ ID NO:1-6组成的组, 或选自与SEQ ID NO:1-6之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的ISV。

[1105] 除以上之外, 或另外, 特异性结合CD123的ISV可以是与55F03相关的ISV。

[1106] 因此, 本发明还涉及如上所述的多特异性多肽, 其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成, 其中CDR1是SEQ ID NO:16。

[1107] 在另一方面, 本发明涉及如上所述的多特异性多肽, 其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成, 其中CDR2选自由以下组成的组:

[1108] a) SEQ ID NO:18; 或

[1109] b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列, 其中

[1110] - 在位置3处Y已经变为W;

[1111] - 在位置6处N已经变为S; 和/或

[1112] - 在位置10处Q已经变为E;

[1113] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV的结合相比, 包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合, 所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[1114] 在另一方面, 本发明涉及如上所述的多特异性多肽, 其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成, 其中CDR3选自由以下组成的组:

[1115] a) SEQ ID NO:23; 或

[1116] b) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列, 其中

[1117] -在位置4处E已经变为R;和/或

[1118] -在位置5处T已经变为D或Y;

[1119] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的ISV以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[1120] 因此,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中:

[1121] i) CDR1是SEQ ID NO:16;

[1122] 和

[1123] ii) CDR2选自由以下组成的组:

[1124] a) SEQ ID NO:18;或

[1125] b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列具有3、2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1126] -在位置3处Y已经变为W;

[1127] -在位置6处N已经变为S;和/或

[1128] -在位置10处Q已经变为E;

[1129] 条件是与包含不具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽的结合相比,包含具有3、2或1个氨基酸差异的CDR2的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的;

[1130] 和

[1131] iii) CDR3选自由以下组成的组:

[1132] c) SEQ ID NO:23;或

[1133] d) 与SEQ ID NO:23的氨基酸序列具有2或1个氨基酸差异的氨基酸序列,其中

[1134] -在位置4处E已经变为R;和/或

[1135] -在位置5处T已经变为D或Y;

[1136] 条件是与包含不具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽的结合相比,包含具有2或1个氨基酸差异的CDR3的多肽以大约相同的或更高的亲和力与CD123结合,所述亲和力如通过表面等离振子共振所测量的。

[1137] 在另一方面,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1为SEQ ID NO:16,CDR2选自由SEQ ID NO:18-20组成的组,CDR3选自由SEQ ID NO:23-25组成的组。

[1138] 因此,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV基本上由4个框架区(分别为FR1至FR4)和3个互补决定区(分别为CDR1至CDR3)组成,其中CDR1为SEQ ID NO:16,CDR2为SEQ ID NO:18,和CDR3为SEQ ID NO:23。

[1139] 在优选的方面,本发明涉及多特异性多肽,其中特异性结合TCR的ISV如本文所述,并且其中一个或更多个特异性结合CD123的ISV选自由SEQ ID NO:7-10组成的组,或者选自与SEQ ID NO:7-10之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序

列同一性的ISV。

[1140] 如对于单特异性多肽所广泛描述的,存在于本发明的多特异性多肽中的免疫球蛋白单可变结构域可以由轻链可变结构域序列(例如 V_L 序列)或重链可变结构域序列(例如 V_H 序列)组成;它们可以由衍生自常规四链抗体的重链可变结构域序列组成,或由衍生自重链抗体的重链可变结构域序列组成。在优选的方面,它们由以下各项组成:结构域抗体(或适合用作结构域抗体的氨基酸)、单结构域抗体(或适合用作单结构域抗体的氨基酸)、“dAb”(或适合用作dAb的氨基酸)、纳米抗体(包括但不限于 V_{HHH})、人源化VHH、骆驼源化VH、或通过亲和力成熟获得的VHH序列。免疫球蛋白单可变结构域可以由部分或完全人源化的纳米抗体,或部分或完全人源化的VHH组成。免疫球蛋白单可变结构域还可含有(如本文所述)的突变,该突变有效预防或减少所谓的“预先存在的抗体”与本发明的免疫球蛋白单可变结构域和构建体的结合。在本发明的优选方面,包含在本发明的多特异性多肽中的免疫球蛋白单可变结构域是本发明的一个或更多个单特异性多肽,如本文所定义的。

[1141] 优选的本发明多肽可选自由SEQ ID NO:47、49、52、53、55、56和58-61(参见表A-7)组成的组。在另外的方面,所述多肽选自由SEQ ID NO:47、49、52、53、55、56和58-61组成的组,或选自与SEQ ID NO:47、49、52、53、55、56和58-61之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的多肽。

[1142] 如本文进一步所描述的,本发明的多特异性多肽可包含一个或多个其他基团、残基,结构部分或结合单元以形成“本发明的多肽”或“本发明的构建体”。例如,这种结合单元可以是增加多肽的半衰期的氨基酸序列(在本文中也称为“半衰期延长”和“半衰期延长的构建体”)。根据本发明的具体但非限制性的方面,除了一个或更多个针对CD123的免疫球蛋白单可变结构域和一个针对TCR的免疫球蛋白单可变结构域之外,本发明的多肽因此可含有至少一个针对血清白蛋白(例如人血清白蛋白)的免疫球蛋白单可变结构域。因此,本发明涉及如本文所述的构建体,其中向多肽提供增加的半衰期的所述结合单元是结合血清白蛋白的免疫球蛋白单可变结构域。在另外的方面,本发明涉及如本文所述的构建体,其中结合血清白蛋白的所述ISV基本上由单结构域抗体、dAb、纳米抗体、VHH、人源化VHH或骆驼源化VH组成。

[1143] 在优选的方面,结合血清白蛋白的ISV选自由SEQ ID NO:43或351至362组成的组。

[1144] 在优选的方面,ISV直接地彼此连接,或经由接头彼此连接。

[1145] 本发明的优选构建体可选自由SEQ ID NO:63-67组成的构建体组,或与SEQ ID NO:63-67之一具有大于80%、大于85%、大于90%、大于95%或甚至大于99%的序列同一性的构建体。

[1146] 在优选的方面,构建体选自由SEQ ID NO:63-67组成的组。

[1147] 在施用后,本发明的半衰期延长的构建体将不会通过肾清除被瞬间去除。因此,半衰期延长将有助于有利的PK特征。因此,不需要连续静脉内输注,从而患者依从性将得到改善。在具体的方面,本发明的构建体不需要连续输注。

[1148] 同样如对于单特异性多肽所广泛描述的,本发明的多特异性多肽或本发明的构建体可进一步包含突变,该突变有效预防或减少所谓的“预先存在的抗体”与本发明的多肽和构建体的结合。为此目的,本发明的多肽和构建体可含有C端延伸(X)_n(其中n为1至10,优选1至5,例如1、2、3、4或5(并且优选1或2,例如1);并且每个X是(优选天然存在的)氨基酸残

基,该氨基酸残基独立地选自且优选独立地选自由丙氨酸(A)、甘氨酸(G)、缬氨酸(V)、亮氨酸(L)或异亮氨酸(I)组成的组),如本文所描述的。

[1149] 因此,本发明涉及本发明的多肽或构建体,其进一步包含C端延伸(X)n,其中n为1至5,例如1、2、3、4或5,并且其中X是天然存在的氨基酸,优选不是半胱氨酸。

[1150] 更具体地,本发明涉及多肽或构建体,其中所述多肽或构建体选自由SEQ ID NO: 338-342组成的组。

[1151] 用于制备本发明的多价或多特异性多肽的方法可以包含至少以下步骤:以合适的方式,将本发明的两个或更多个免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽和例如一个或更多个接头连接在一起。本发明的免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽(和接头)可通过本领域已知的任何方法和如本文进一步所描述的进行偶联。优选的技术包括将编码本发明的免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽(和接头)的核酸序列进行连接,以制备表达多价或多特异性多肽的遗传构建体。用于连接氨基酸或核酸的技术对于技术人员来说是清楚的,并且再次参考标准手册,例如如上所述的Sambrook等人和Ausubel等人,以及下面的实施例。

[1152] 因此,本发明还涉及本发明的免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽在制备本发明的多价多肽或多特异性多肽中的用途。用于制备多价或多特异性多肽的方法包括将本发明的一个或更多个免疫球蛋白单可变结构域和/或多肽与本发明的至少一个另外的免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽连接,任选地经由一个或更多个接头连接。然后将本发明的免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽用作在提供和/或制备多价或多特异性多肽中的结合结构域或结合单元,该多肽包含两个(例如在二价多肽中)、三个(例如在三价多肽中)或更多个(例如在多价多肽中)结合单元。在这一方面,本发明的免疫球蛋白可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽可用作在提供和/或制备多价或多特异性如双特异性或三特异性多肽中的结合结构域或结合单元,其中该多肽包含两个、三个或更多个结合单元。

[1153] 因此,本发明还涉及本发明的免疫球蛋白单可变结构域和/或特别是单价或单特异性多肽(如本文所述)在制备多价或多特异性多肽中的用途。用于制备多价或多特异性多肽的方法包括将本发明的免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽与本发明的至少一个另外的免疫球蛋白单可变结构域、单价多肽和/或单特异性多肽连接,任选地经由一个或更多个接头(如本文进一步所描述的)连接。

[1154] 本发明的构建体

[1155] 本发明的单特异性多肽和本发明的多特异性多肽可以进一步包含或可以不包含一个或更多个其他基团、残基、结构部分或结合单位(这些单价多肽以及多价多肽(具有或不具有另外的基团、残基、结构部分或结合单元)均称为“本发明的构建体”)。如果存在,这些另外的基团、残基、结构部分或结合单元可以或可以不为免疫球蛋白单可变结构域(和/或其存在于其中的多肽)提供另外的功能,并且可以改变或可以不改变免疫球蛋白单可变结构域的性质。

[1156] 例如,这种另外的基团、残基、结构部分或结合单元可以是一个或更多个附加的氨基酸序列,使得多肽是(融合)蛋白质或(融合)多肽。在优选但非限制性的方面,所述一个或更多个其他的基团、残基、结构部分或结合单元是免疫球蛋白。甚至更优选地,所述一个或

更多个其他的基团、残基、结构部分或结合单位是选自由以下各项组成的组的免疫球蛋白单可变结构域:结构域抗体、适合用作结构域抗体的氨基酸、单结构域抗体、适合用作单结构域抗体的氨基酸、“dAb”、适合用作dAb的氨基酸、或纳米抗体(例如诸如VHH、人源化VHH或骆驼源化VH)。

[1157] 如上所述,可以连接附加的结合单元,例如具有不同抗原特异性的免疫球蛋白单可变结构域,以形成多特异性构建体。通过组合两种或更多种特异性的免疫球蛋白单可变结构域,可以形成双特异性、三特异性等构建体。例如,根据本发明的多肽可包含本发明的单特异性或多特异性多肽,和一个或更多个针对另一靶标(即,不同于CD123或TCR)的免疫球蛋白单可变结构域。这种构建体及其(本领域技术人员可容易想到的)修饰都包括在本文所用的术语“本发明的构建体”中。

[1158] 在上述构建体中,一个、两个或更多个免疫球蛋白单可变结构域和一个或更多个基团、残基、结构部分或结合单元可以直接地彼此连接和/或经由一个或更多个合适的接头或间隔子连接。例如,当一个或更多个基团、残基、结构部分或结合单元是氨基酸序列时,接头也可以是氨基酸序列,因此所得到的构建体是融合(蛋白质)或融合(多肽)。

[1159] 一个或更多个另外的基团、残基、结构部分或结合单元可以是任何合适的和/或期望的氨基酸序列。另外的氨基酸序列可以或可以不改变、更改或以其他方式影响本发明多肽的(生物学)性质,并且可以或可以不向本发明的多肽添加另外的功能。优选地,所述另外的氨基酸序列使得其赋予本发明的多肽一种或更多种所需的性质或功能。

[1160] 这种氨基酸序列的实例对于本领域技术人员而言是清楚的,并且通常可包含基于常规抗体及其片段(包括但不限于ScFv和单结构域抗体)的肽融合中所使用的所有氨基酸序列。例如,参考Hol1iger和Hudson的综述(2005, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136)。

[1161] 例如,这种氨基酸序列可以是这样的氨基酸序列:相比于本发明的多肽本身,该氨基酸序列增加本发明构建体的半衰期、溶解度或吸收,降低免疫原性或毒性,消除或减弱不期望的副作用,和/或赋予其他有利性质和/或降低不期望的性质。这种氨基酸序列的一些非限制性实例是血清蛋白,例如人血清白蛋白(参见例如WO 00/27435)或半抗原分子(例如被循环抗体识别的半抗原,参见例如WO 98/22141)。

[1162] 在本发明的具体但非限制性方面中(其将在本文中进一步描述),本发明的构建体与作为其来源的免疫球蛋白单可变结构域或多肽相比可以在血清中具有增加的半衰期(如本文进一步所描述的)。例如,本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽可以与一个或多个延长半衰期的基团或结构部分(例如聚乙二醇分子(PEG))连接(以化学方式或其它方式),以提供具有增加的半衰期的本发明多肽的衍生物。

[1163] 在本发明的一个具体方面,制备了相比于相应的本发明多肽具有增加的半衰期的构建体。包含这种半衰期延长的结构部分的本发明构建体的实例例如包括但不限于,构建体,其中免疫球蛋白单可变结构域适当地与一个或更多个血清蛋白或其片段(例如(人)血清白蛋白或其适当片段)或与一个或更多个能结合血清蛋白(如血清白蛋白(如人血清白蛋白))、血清免疫球蛋白(如IgG),转铁蛋白或WO 04/003019中所列的其他血清蛋白之一的结合单元(例如,诸如,结构域抗体、适合用作结构域抗体的氨基酸、单结构域抗体、适合用作单结构域抗体的氨基酸、“dAb”、适合用作dAb的氨基酸、纳米抗体、VHH、人源化VHH或骆驼源化VH)连接;多肽,其中免疫球蛋白单可变结构域与Fc部分(例如人Fc)或其合适部分或片段

连接；或者构建体，其中一个或更多个免疫球蛋白单可变结构域与一个或更多个能结合血清蛋白的小蛋白质或肽（例如但不限于WO 91/01743、WO 01/45746或WO 02/076489中所描述的蛋白质和肽）适当连接。还参考WO 03/002609和WO 04/003019中描述的dAb，并参考Harmsen等人（2005, Vaccine 23:4926-4942）；参考EP 0368684，以及参考Ablynx N.V.的WO 08/028977、WO 08/043821、WO 08/043822、WO 08/068280、WO 09/127691和WO 11/095545。

[1164] 根据本发明的具体但非限制性方面，除了一个或更多个针对CD123的免疫球蛋白单可变结构域，和/或一个针对TCR的免疫球蛋白单可变结构域之外，本发明的构建体可含有至少一个结合血清白蛋白（如人血清白蛋白）的免疫球蛋白单可变结构域。因此，本发明涉及如本文所述的构建体，其中为构建体提供增加的半衰期的所述结合单元是结合血清白蛋白的免疫球蛋白单可变结构域。在另外的方面，本发明涉及如本文所述的构建体，其中结合血清白蛋白的所述ISV基本上由单结构域抗体、dAb、纳米抗体、VHH、人源化VHH或骆驼源化VH组成。

[1165] 结合血清白蛋白的ISV可以是本领域中描述的任何ISV。

[1166] 在一个方面，结合人血清白蛋白的免疫球蛋白单可变结构域可以如上文引用的Ablynx N.V.的申请中所一般描述的（参见例如WO 04/062551）。提供增加的半衰期且可用于本发明构建体中的一些优选的纳米抗体包括WO 06/122787中公开的纳米抗体ALB-1至ALB-10（参见表II和III），以及在WO 2012/175400或WO 2015/173325中公开的纳米抗体（例如，WO 2012/175400的SEQ ID NO:1-11，WO 2015/173325的SEQ ID NO:19）和来自临时申请US 62/256,841、US 62/335,746、US 62/349,294和相应的国际申请WO 2017/085172的纳米抗体，其中WO 2017/085172要求这三个美国临时申请的优先权且由受让人命名为“Improved serum albumin binders”。

[1167] 在一个方面，本发明涉及如本文所述的多肽，其中结合血清白蛋白的所述ISV基本上由4个框架区（分别为FR1至FR4）和3个互补决定区（分别为CDR1至CDR3）组成，其中CDR1是GFTFSSFGMS（SEQ ID NO:363）或GFTFRSFGMS（SEQ ID NO:364），CDR2是SISGSGSDTL（SEQ ID NO:365），CDR3是GGSLSR（SEQ ID NO:366）。

[1168] 提供增加的半衰期且可用于本发明构建体中的一些特别优选的纳米抗体包括也被称为Alb8、Alb23、Alb129、Alb132、Alb11、Alb11 (S112K) -A、Alb82、Alb82-A、Alb82-AA、Alb82-AAA、Alb82-G、Alb82-GG、Alb82-GGG（表B-2）的免疫球蛋白单可变结构域。

[1169] 因此，本发明涉及如本文所述的构建体，其中结合血清白蛋白的所述ISV选自由SEQ ID NO:43或351至362组成的组。

[1170] 表B-2：用于本发明的构建体中的结合HSA的免疫球蛋白单可变结构域

[1171]

ISV	SE	序列
	Q	
	ID	
	NO	
Alb8	43	EVQLVESGGGLVQPGNRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGTIVSS
Alb23	351	EVQLLESGGGLVQPGNRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGTIVSS
Alb12	352 9	EVQLVESGGGVVQPGNRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLRSSQGTIVSSA
Alb13	353 2	EVQLVESGGGVVQPGNRLSCAASGFTFRSFGMSWVRQAPGKGPEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRPEDTATYYCTIGGSLRSSQGTIVSSA
Alb11	354	EVQLVESGGGLVQPGNRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGTIVSS
Alb11 (S112 K)-A	355	EVQLVESGGGLVQPGNRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGSD TLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTAVYYCTIGGSLRSSQGTIVKVSSA
Alb82	356	EVQLVESGGGVVQPGNRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGTIVSS
Alb82 -A	357	EVQLVESGGGVVQPGNRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLRSSQGTIVSSA

ISV	SE	序列
	Q	
	ID	
	NO	
[1172]	Alb82 -AA	358 EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLTVSSA A
	Alb82 -AAA	359 EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLTVSSA AA
	Alb82 -G	360 EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLTVSSG
	Alb82 -GG	361 EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLTVSSG G
	Alb82 -GGG	362 EVQLVESGGGVVQPGNSLRLSCAASGFTFSSFGMSWVRQAPGKGLEWVSSISGSGS DTLYADSVKGRFTISRDNAKTTLYLQMNSLRPEDTALYYCTIGGSLSRSSQGTLTVSSG GG

[1173] 通常,具有增加的半衰期的本发明的构建体优选具有这样的半衰期:该半衰期是本发明的相应免疫球蛋白单可变结构域或多肽本身的半衰期的至少1.5倍,优选至少2倍,例如至少5倍,例如至少10倍或大于20倍大。

[1174] 通常,具有增加的半衰期的本发明的构建体优选具有比本发明的相应免疫球蛋白单可变结构域或多肽本身的半衰期增加大于1小时,优选大于2小时,更优选大于6小时,例如大于12小时,或甚至大于24、48或72小时的半衰期。

[1175] 在另一个优选但非限制性的方面,本发明的这种构建体表现出在人中至少约12小时,优选至少24小时,更优选至少48小时,甚至更优选至少72小时或更长的血清半衰期。例如,本发明的构建体可具有至少5天(例如约5至10天),优选至少9天(例如约9至14天),更优选至少约10天(例如约10至15天),或至少约11天(例如约11至16天),更优选至少约12天(例如约12至18天或更长),或大于14天(例如约14至19天)的半衰期。

[1176] 在本发明中证实了在构建体本身中包含靶向白蛋白的结合单元对获得的效力或功效不具有重要影响。尽管在HSA存在下观察到功效/效力的轻微损失,但是半衰期延长的TCR结合多特异性多肽在CD123表达细胞杀伤中仍然是有效的。已经证实,基于白蛋白的药物递送对于实现改善的癌症疗法是有用的,这很大程度上归因于其通过增强的渗透性和滞留效应被动靶向肿瘤以及肿瘤细胞对作为能量和氨基酸来源的白蛋白的需求增加。

[1177] 根据一个具体方面,本发明的一个或多个多肽可以(任选地通过合适的接头或较

链区)与以下连接:一个或多个恒定结构域(例如,可以用作Fc部分的一部分/形成Fc部分的2或3个恒定结构域),Fc部分和/或一个或多个抗体部分、片段或结构域,其中该抗体部分、片段或结构域赋予本发明多肽一种或多种效应子功能和/或可赋予与一个或更多个Fc受体结合的能力。例如,为此目的,并且不限于此,一个或多个另外的氨基酸序列可以包含抗体的一个或多个C_H2和/或C_H3结构域,例如来自重链抗体(如本文所述)和更优选来自常规的人四链抗体;和/或可以形成Fc区(的部分),例如来自IgG(例如来自IgG1、IgG2、IgG3或IgG4),来自IgE或来自另一种人Ig如IgA、IgD或IgM。例如,WO 94/04678描述了包含骆驼科V_{HH}结构域或其人源化衍生物(即纳米抗体)的重链抗体,其中骆驼科C_H2和/或C_H3结构域已经被C_H2和C_H3结构域取代,以便提供由2个重链组成的免疫球蛋白,每个重链包含纳米抗体和人C_H2和C_H3结构域(但没有C_H1结构域),该免疫球蛋白具有由C_H2和C_H3结构域提供的效应子功能,并且该免疫球蛋白可以在没有任何轻链存在的情况下起作用。可以与本发明的多肽适当连接以提供效应子功能的其他氨基酸序列对于技术人员而言是清楚的,并且可以基于期望的效应子功能进行选择。例如,参考WO 04/058820、WO 99/42077、WO 02/056910和WO 05/017148,以及以上Holliger和Hudson的综述;并参考WO 09/068628。与本发明的相应多肽相比,本发明的多肽与Fc部分的偶联也可导致增加的半衰期。对于一些应用,使用赋予增加的半衰期而没有任何生物学上显著的效应子功能的Fc部分和/或恒定结构域(即,C_H2和/或C_H3结构域)也可以是合适的甚至是优选的。包含一个或多个本发明多肽和一个或多个恒定结构域且具有增加的体内半衰期的其他合适构建体对于技术人员是清楚的,并且其可以例如包含与C_H3结构域连接的多肽,任选地经由接头序列。通常,具有增加的半衰期的任何融合蛋白或衍生物优选具有大于50kDa的分子量,即肾吸收的临界值。

[1178] 在另一个具体但非限制性的方面,本发明的多肽可以(任选地通过合适的接头或铰链区)连接至天然存在的、合成的或半合成的恒定结构域(或类似物、变体、突变体、部分或其片段),该恒定结构域自身缔合成二聚体的趋势降低(或基本上没有)(即,与常规四链抗体中天然存在的恒定结构域相比)。这种单体(即非自身缔合)Fc链变体或其片段对于技术人员来说是清楚的。例如,He1m等人(J.Biol.Chem.271:7494,1996)描述了可用于本发明多肽链的单体Fc链变体。

[1179] 此外,这样的单体Fc链变体优选使得它们仍然能够结合补体或相关的Fc受体(取决于它们来源的Fc部分),和/或使得它们仍然具有一些或者全部的衍生它们的Fc部分的效应子功能(或者仍然适合于预期用途的降低水平)。备选地,在本发明的这种多肽链中,单体Fc链可用于赋予多肽链增加的半衰期,在这种情况下,单体Fc链也可以不具有或基本上不具有效应子功能。

[1180] 另外的氨基酸残基可以或不可以改变、更改或以其他方式影响本发明多肽的其他(生物学)性质,并且可以或不可以向本发明的多肽添加另外的功能。例如,这种氨基酸残基:

[1181] a) 可以包含N端Met残基,例如由于在异源宿主细胞或宿主生物体中表达的结果。

[1182] b) 可以形成信号序列或前导序列,其指导多肽在合成分泌(例如,以便提供本发明多肽的前体(pre-),原体(pro-)或前原体(propre-)形式,取决于用于表达本发明多肽的宿主细胞)。合适的分泌前导肽对于技术人员来说是清楚的,并且可以如本文进一步所描述的。通常,这种前导序列将与多肽的N端连接,尽管本发明在其最广泛的意义上

不限于此；

[1183] c) 可以形成“标签”，例如允许或促进多肽纯化的氨基酸序列或残基，例如使用针对所述序列或残基的亲和技术。此后，可以去除所述序列或残基（例如通过化学或酶促切割）以提供多肽（为此目的，标签可任选地经由可切割的接头序列与氨基酸序列或多肽序列连接，或含有可切割的基序）。这些残基的一些优选但非限制性的实例是多个组氨酸残基、谷胱甘肽残基和myc标签，例如AAAEQKLISEEDLNGAA (SEQ ID NO:367)；

[1184] d) 可以是已经官能化和/或可以用作官能团连接位点的一个或多个氨基酸残基。合适的氨基酸残基和官能团对于技术人员是清楚的，包括但不限于本文提及的用于本发明多肽衍生物的氨基酸残基和官能团。

[1185] 在本发明的构建体中，两个或更多个结构单元、ISV或纳米抗体和任选地一个或多个多肽、一个或多个其他基团、药物、活性剂、残基、结构部分或结合单元可以直接地彼此连接（如例如在WO 99/23221中所描述的）和/或可以经由一个或多个合适的间隔子或接头或其任何组合彼此连接。

[1186] 用于本发明构建体的合适的间隔子或接头对于本领域技术人员来说是清楚的，并且通常可以是本领域中用于连接氨基酸序列和/或其他基团、药物、活性剂、残基、结构部分或结合单元的任何接头或间隔子。优选地，所述接头或间隔子适用于构建旨在用于药学用途的多肽和/或构建体。

[1187] 一些特别优选的间隔子包括本领域中用于连接抗体片段或抗体结构域的间隔子和接头。这些包括上文引用的一般背景技术中提到的接头，以及例如本领域中用于构建双抗体或ScFv片段的接头（然而，在这方面，应当注意，在双抗体和ScFv片段中，所使用的接头序列应具有一定长度、一定程度的柔性和其他性质，该其他性质允许相关的V_H和V_L结构域聚集在一起以形成完整的抗原结合位点，然而对于本发明多肽中所用的接头的长度或柔性没有特别限制，原因在于每个免疫球蛋白单可变结构域本身形成完整的抗原结合位点）。

[1188] 例如，接头可以是合适的氨基酸序列，并且尤其是1和50个之间，优选1和30个之间，例如1至10个之间的氨基酸残基的氨基酸序列。这种氨基酸序列的一些优选实例包括例如类型(gly_xser_y)_z的gly-ser接头，例如WO 99/42077中所述的(gly₄ser)₃或(gly₃ser₂)₃，和本文提及的Ablynx的申请（参见例如WO 06/040153和WO 06/122825）中描述的GS30、GS15、GS9和GS7接头，以及铰链样区域如天然存在的重链抗体或类似序列的铰链区（如WO 94/04678中所述）。

[1189] 一些其他特别优选的接头在表B-3中描述，其中35GS (SEQ ID NO:334) 是特别优选的。

[1190] 因此，本发明涉及多肽，其中ISV经由选自由SEQ ID NO:325至336组成的组的接头彼此连接。

[1191] 表B-3:接头

接头	SEQ ID	序列
	NO	
5GS	325	GGGGS
7GS	326	SGGSGGS
9GS	327	GGGGSGGGS
10GS	328	GGGGSGGGGS
15GS	329	GGGGSGGGGSGGGGS
[1192]	18GS	GGGGSGGGGSGGGGGGGS
	20GS	GGGGSGGGGSGGGGSGGGGS
	25GS	GGGGSGGGGSGGGSGGGSGGGGS
	30GS	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGS
	35GS	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG GGS
	40GS	GGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGG

接头	SEQ ID	序列
	NO	
		GGSGGGSGGGGS
Poly-A	336	AAA

[1194] 其他合适的接头通常包含有机化合物或聚合物,特别是适用于药用蛋白质中的那些。例如,聚(乙二醇)结构部分已被用于连接抗体结构域,参见例如WO 04/081026。

[1195] 包括在本发明的范围内的是,所使用的接头的长度、柔性程度和/或其他性质(尽管不是至关重要,因为其通常用于在ScFv片段中使用的接头)可以对本发明的最终多肽的性质具有一些影响,包括但不限于对CD123和/或TCR或对一种或多种其他抗原的亲和力、特异性或亲合力。基于本文公开的内容,任选地在一些有限的常规实验后,技术人员将能够确定用于本发明的特定多肽的最佳接头。

[1196] 例如,在包含针对第一和第二靶标的结构单元、ISV或纳米抗体的本发明的多价或多特异性多肽中,接头的长度和柔性优选是这样的:其允许存在于多肽中的本发明各个结构单元、ISV或纳米抗体结合于其同源靶标,例如各个靶标上的抗原决定簇。再次,基于本文的公开内容,任选地在一些有限的常规实验之后,技术人员将能够确定用于本发明的特定多肽的最佳接头。

[1197] 还在本发明的范围内的是,使用的接头赋予本发明的多肽或构建体一种或多种其他有利性质或功能性,和/或提供一个或更多个用于形成衍生物和/或用于连接官能团(例如如本文所述用于本发明的多肽的衍生物)的位点。例如,含有一个或更多个带电氨基酸残基的接头可以提供改善的亲水性质,而形成或含有小的表位或标签的接头可以用于检测、鉴定和/或纯化的目的。再次,基于本文中的公开内容,任选地在一些有限的常规实验后,技术人员将能够确定用于本发明的特定多肽或构建体的最佳接头。

[1198] 最后,当两个以上接头用于本发明的多肽或构建体中时,这些接头可以相同或不同。再次,基于本文中的公开内容,任选地在一些有限的常规实验后,技术人员将能够确定用于本发明的特定多肽或构建体中的最佳接头。

[1199] 通常,为了易于表达和生产,本发明的多肽或构建体将是线性多肽。然而,在其最广泛的意义上,本发明不限于此。例如,当本发明的多肽包含三个或更多个氨基酸序列、ISV或纳米抗体时,可能通过使用具有三个或更多个“臂”的接头将它们连接,每个“臂”与氨基酸序列、ISV或纳米抗体连接,从而提供“星形”构建体。尽管通常不太优选,但仍可能使用圆形构建体。

[1200] 因此,本发明涉及如本文所述的多肽,其中所述第一ISV和所述第二ISV以及可能的所述第三ISV和/或所述结合血清白蛋白的ISV直接地彼此连接或经由接头连接。

[1201] 本发明还包括构建体,该构建体包含本发明的免疫球蛋白单可变结构域或多肽,并且还包含标签或其他的功能结构部分,例如毒素、标记物、放射化学物质等。

[1202] 备选地,附加的基团、残基、结构部分或结合单元可以是例如化学基团、残基、结构部分,其本身可以是或可以不是生物学和/或药理学活性的。例如但不限于,这种基团可以与两个或更多个免疫球蛋白单可变结构域或单价多肽连接,以便提供本发明多肽的“衍生物”。

[1203] 因此,在其最广泛的意义上,本发明还包含本发明多肽的衍生物。这些衍生物通常可以通过对本发明多肽和/或形成本发明的多肽的一个或多个氨基酸残基进行修饰,特别是化学和/或生物学(例如,酶促)修饰来获得。

[1204] 这种修饰的实例,以及多肽序列内可以以这种方式(即在蛋白质主链上但优选在侧链上)修饰的氨基酸残基的实例,可用于引入这种修饰的方法和技术,和这些修饰的潜在用途和优点对于技术人员是清楚的(还参见Zangi等人2013,Nat.biotechnol.31:898-907)。

[1205] 例如,这种修饰可以包括将一个或更多个官能团、残基或结构部分引入(例如,通过共价连接或以任何其它合适的方式)到本发明的多肽之中或之上,特别是一种或更多种赋予本发明多肽一种或更多种所期望的性质或功能的官能团、残基或结构部分。这种官能团的实例对于技术人员来说是清楚的。

[1206] 例如,这种修饰可以包括引入(例如,通过共价结合或以任何其他合适的方式)一

种或更多种官能团,所述官能团增加本发明多肽的半衰期、溶解度和/或吸收,降低本发明多肽的免疫原性和/或毒性,消除或减弱本发明多肽的任何不期望的副作用,和/或赋予其它有利性质和/或降低本发明多肽的不期望的性质;或者前述两种或更多种的任何组合。这种官能团和用于引入它们的技术的实例对于本领域技术人员来说是清楚的,并且通常可以包括上文引用的一般背景技术中提到的所有官能团和技术,以及本身已知的用于药物蛋白质修饰的官能团和技术,特别是用于抗体或抗体片段(包括ScFv和单结构域抗体)修饰,其参考例如Remington (1980, *Pharmaceutical Sciences*, 第16版, Mack Publishing Co., Easton, PA, 1980)。这种官能团可以例如直接地(如共价地)与本发明的多肽连接,或任选地经由合适的接头或间隔子连接,再次这对于技术人员来说也是清楚的。

[1207] 一个具体实例是本发明的衍生多肽,其中本发明的多肽已经过化学修饰以增加其半衰期(例如,通过聚乙二醇化)。这是用于增加药物蛋白质的半衰期和/或降低其免疫原性的最广泛使用的技术之一,并且包括连接合适的药理学可接受的聚合物,例如聚(乙二醇)(PEG)或其衍生物(例如甲氧基聚(乙二醇)或mPEG)。通常,可以使用聚乙二醇化的任何合适形式,例如本领域中用于抗体和抗体片段(包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv)的聚乙二醇化;参考例如Chapman (2002, *Nat. Biotechnol.* 54:531-545)、Veronese和Harris (2003, *Adv. Drug Deliv. Rev.* 54:453-456)、Harris和Chess (2003, *Nat. Rev. Drug. Discov.* 2:214-221)和WO 04/060965。用于蛋白质聚乙二醇化的各种试剂也可商购获得,例如来自美国的Nektar Therapeutics。

[1208] 优选地,使用定点聚乙二醇化,尤其是通过半胱氨酸残基(参见例如Yang等人(2003, *Protein Engineering* 16:761-770))。例如,为此目的,PEG可以与天然存在于本发明多肽中的半胱氨酸残基连接,可以修饰本发明的多肽以便适当地引入一个或更多个半胱氨酸残基用于连接PEG,或者包含一个或更多个用于连接PEG的半胱氨酸残基的氨基酸序列可以与本发明多肽的N端和/或C端融合,所有这些都使用技术人员已知的蛋白质工程技术。

[1209] 优选地,对于本发明的多肽,使用分子量大于5000,例如大于10,000且小于200,000,例如小于100,000的PEG;例如,在20,000-80,000的范围内。

[1210] 另一种通常不太优选的修饰包括N-连接或O-连接的糖基化,通常作为共翻译和/或翻译后修饰的一部分,这取决于用于表达本发明多肽的宿主细胞。

[1211] 又另一种修饰可以包括引入一个或更多个可检测标记或其他信号产生基团或结构部分,这取决于本发明标记多肽的预期用途。合适的标记和用于连接、使用和检测它们的技术对于技术人员来说是清楚的,并且例如包括但不限于荧光标记(例如荧光素、异硫氰酸酯、罗丹明、藻红蛋白、藻蓝蛋白、别藻蓝蛋白、邻苯二甲醛、和荧光胺和荧光金属如¹⁵²Eu或其他来自镧系元素的金属),磷光标记,化学发光标记或生物发光标记(如鲁米那、异鲁米诺、芳香吖啶酯、咪唑、吖啶盐、草酸酯、二氧杂环丁烷或GFP及其类似物),放射性同位素(如³H、¹²⁵I、³²P、³⁵S、¹⁴C、⁵¹Cr、³⁶Cl、⁵⁷Co、⁵⁹Fe和⁷⁵Se),金属,金属螯合物或金属阳离子(如金属阳离子,如^{99m}Tc、¹²³I、¹¹¹In、¹³¹I、⁹⁷Ru、⁶⁷Cu、⁶⁷Ga和⁶⁸Ga或特别适用于体内、体外或原位诊断和成像的其他金属或金属阳离子,如(¹⁵⁷Gd、⁵⁵Mn、¹⁶²Dy、⁵²Cr和⁵⁶Fe)),以及发色团和酶(如苹果酸脱氢酶、葡萄球菌核酸酶、δ-V-甾体异构酶、酵母醇脱氢酶、α-甘油磷酸脱氢酶、磷酸丙糖异构酶,生物素亲和素过氧化物酶、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-VI-磷酸脱氢酶、

葡萄糖淀粉酶和乙酰胆碱酯酶)。其他合适的标记对于技术人员来说是清楚的,并且例如包括可以使用NMR或ESR光谱检测的结构部分。

[1212] 本发明的这种标记的多肽可以例如用于体外、体内或原位测定(包括本身已知的免疫测定,例如ELISA、RIA、EIA和其他的“夹心测定”等)以及体内诊断和成像目的,这取决于具体标记的选择。

[1213] 如技术人员所清楚的,另一种修饰可以包括引入螯合基团,例如螯合上面提到的金属或金属阳离子之一。合适的螯合基团例如包括但不限于二亚乙基-三胺五乙酸(DTPA)或乙二胺四乙酸(EDTA)。

[1214] 又另一种修饰可以包括引入官能团,该官能团是特异性结合对如生物素-(链霉)亲和素结合对的一部分。这种官能团可用于将本发明的多肽连接至与该结合对的另一半相结合的另一蛋白质、多肽或化学化合物,即通过形成结合对。例如,本发明的多肽可以与生物素缀合,并与缀合至亲和素或链霉亲和素的另一蛋白、多肽、化合物或载体连接。例如,本发明的这种缀合多肽可用作报告子,例如在其中可检测信号产生剂与亲和素或链霉亲和素缀合的诊断系统中。这种结合对也可以例如用于将本发明的多肽与载体结合,该载体包括适合于药学目的的载体。一个非限制性实例是Cao和Suresh(2000, *Journal of Drug Targeting* 8:257)所描述的脂质体制剂。此类结合对也可用于将治疗活性剂与本发明的多肽连接。

[1215] 其他潜在的化学和酶促修饰对于技术人员来说是清楚的。也可以出于研究目的引入这种修饰(例如,研究功能-活性关系)。例如,参考Lundblad和Bradshaw(1997, *Biotechnol. Appl. Biochem.* 26:143-151)。

[1216] 优选地,衍生物使得它们以如本文所定义的(即,如对于本发明多肽所定义的)亲和力(适当地测量和/或表达为 K_D 值(实际或表观)、 K_A 值(实际或表观)、 k_{on} 速率和/或 k_{off} 速率,或备选地为 IC_{50} 值,如本文所进一步描述的)与CD123和/或TCR结合。

[1217] 本发明的此类多肽及其衍生物也可以是基本上分离的形式(如本文所定义)。

[1218] 本发明还涉及用于制备本文所述多肽、核酸、宿主细胞和组合物的方法。

[1219] 本发明的多肽和构建体可以以本身已知的方式制备,如本领域技术人员从本文的进一步描述中所清楚的。例如,本发明的多肽和构建体可以以本身已知的用于制备抗体且尤其用于制备抗体片段(包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv片段)的任何方式制备。用于制备多肽、构建体和核酸的一些优选但非限制性的方法包括本文所述的方法和技术。

[1220] 用于产生本发明的多肽或构建体(其可通过编码其的核酸的表达而获得)的方法可包括以下步骤:

[1221] -在合适的宿主细胞或宿主生物体(在本文中也称为“本发明的宿主”)中或在另一合适的表达系统中,表达编码本发明的所述多肽或构建体的核酸(在本文中也称为“本发明的核酸”),

[1222] 可选地,随后是:

[1223] -分离和/或纯化由此获得的本发明的多肽或构建体。

[1224] 特别地,这种方法可以包括以下步骤:

[1225] -在使得本发明的所述宿主表达和/或产生至少一种本发明的多肽或构建体(其是这样的:可通过表达编码其的核酸而获得)的条件下,培养和/或维持本发明的宿主;

[1226] 可选地,随后是:

[1227] -分离和/或纯化由此获得的本发明的多肽或构建体。

[1228] 因此,本发明还涉及编码本发明的多肽或构建体(其使得可通过表达编码其的核酸获得)的核酸或核苷酸序列(也称为“本发明的核酸”)。本发明的核酸可以是单链或双链DNA或RNA的形式,并且优选为双链DNA的形式。例如,本发明的核苷酸序列可以是基因组DNA、cDNA或合成DNA(例如具有特别适于在预期的宿主细胞或宿主生物体中表达的密码子选择的DNA)。

[1229] 根据本发明的一个方面,本发明的核酸是基本上分离的形式,如本文所定义的。本发明的核酸还可以是载体的形式、存在于载体中和/或是载体的一部分,例如诸如质粒、粘粒或YAC,其也可以是基本上分离的形式。

[1230] 基于本文给出的关于本发明的多肽或构建体(它们使得它们可通过表达编码其的核酸而获得)的信息,本发明的核酸可以以本身已知的方式制备或获得,和/或可以从合适的天然来源分离。而且,如本领域技术人员将清楚的,为了制备本发明的核酸,数个核苷酸序列(诸如编码本发明的免疫球蛋白单可变结构域的至少一个核苷酸序列)和例如编码一个或多个接头的核酸还可以以适当的方式连接在一起。

[1231] 用于产生本发明核酸的技术对于技术人员将是清楚的,并且可以例如包括但不限于自动化DNA合成;定点突变;组合两个或更多个天然存在的和/或合成的序列(或其两个或更多个部分),引入导致表达截短的表达产物的突变;引入一个或多个限制性位点(例如,以产生使用合适的限制酶可以容易地酶切和/或连接的盒和/或区域),和/或使用一个或多个“错配”引物通过PCR反应引入突变。这些和其他技术对于技术人员将是清楚的,并且再次参考标准手册,例如如上所述的Sambrook等人和Ausubel等人,以及下面的实施例。

[1232] 如本领域技术人员将清楚的,本发明的核酸还可以是遗传构建体的形式、存在于遗传构建体中和/或是遗传构建体的一部分。所述遗传构建体通常包含本发明的至少一种核酸,该核酸任选地连接至本身已知的遗传构建体的一个或多个元件,诸如例如一个或多个合适的调控元件(诸如合适的启动子、增强子、终止子等)和本文提及的遗传构建体的另外的元件。包含本发明的至少一种核酸的所述遗传构建体也将在本文中称为“本发明的遗传构建体”。

[1233] 本发明的遗传构建体可以是DNA或RNA,并且优选是双链DNA。本发明的遗传构建体还可以是适于转化预期的宿主细胞或宿主生物体的形式,适于整合到预期的宿主细胞的基因组DNA中的形式,或适于在预期的宿主生物体中的独立复制、维持和/或遗传的形式。例如,本发明的遗传构建体可以是载体的形式,诸如例如质粒、粘粒、YAC、病毒载体或转座子。特别地,载体可以是表达载体,即能够提供体外和/或体内(例如在合适的宿主细胞、宿主生物体和/或表达系统中)表达的载体。

[1234] 在优选但非限制性的方面,本发明的遗传构建体包含

[1235] a) 至少一种本发明的核酸;有效连接至

[1236] b) 一个或更多个调控元件,例如启动子和任选地合适的终止子;

[1237] 并且还任选地

[1238] c) 本身已知的遗传构建体的一个或更多个另外的元件;

[1239] 其中术语“调控元件”、“启动子”、“终止子”和“有效连接”具有它们在本领域中的

通常含义(如本文进一步描述的);并且其中存在于遗传构建体中的所述“另外的元件”可以是例如3'-或5'-UTR序列、前导序列、选择标记、表达标记/报告基因和/或可以促进或增加转化或整合(的效率)的元件。用于所述遗传构建体的这些和其它合适的元件对技术人员将是清楚的,并且可以例如取决于所使用的构建体的类型;预期的宿主细胞或宿主生物体;感兴趣的本发明的核苷酸序列的表达方式(例如通过组成型、瞬时或诱导表达);和/或要使用的转化技术。例如,本身已知用于抗体和抗体片段(包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv片段)的表达和生产的调控序列、启动子和终止子可以以基本类似的方式使用。

[1240] 优选地,在本发明的遗传构建体中,所述至少一种本发明的核酸和所述调控元件,以及任选地所述一个或更多个另外的元件彼此“有效连接”,通常这意味着它们彼此具有功能关系。例如,如果所述启动子能够启动或以其他方式控制/调控编码序列的转录和/或表达(其中所述编码序列应理解为“在”所述启动子的“控制下”),则认为启动子与编码序列“有效连接”。通常,当两个核苷酸序列有效连接时,它们将处于相同的取向并且通常也处于相同的阅读框中。它们通常也将是基本上连续的,尽管这也可能不是必需的。

[1241] 优选地,本发明的遗传构建体的调控的和另外的元件是这样的:它们能够在预期的宿主细胞或宿主生物中提供其预期的生物学功能。

[1242] 例如,启动子、增强子或终止子应当在预期的宿主细胞或宿主生物体中“有效”,通过这样,这意味着(例如)所述启动子应当能够启动或以其他方式控制/调节其有效连接(如本文所定义)的核苷酸序列如编码序列的转录和/或表达。

[1243] 一些特别优选的启动子包括但不限于本身已知的用于在本文提及的宿主细胞中表达的启动子;和尤其是用于在细菌或酵母细胞中表达的启动子,例如本文提及的那些和/或实施例中使用的那些。

[1244] 选择标记应该是这样的,它允许(即,在适当的选择条件下)将已用本发明的核苷酸序列(成功)转化的宿主细胞和/或宿主生物体与未被(成功)转化的宿主细胞/生物体区分开。这些标记的一些优选但非限制性的实例是提供抗生素(例如卡那霉素或氨苄青霉素)抗性的基因,提供耐温性的基因,或在培养基中不存在某些因子、化合物和/或(食物)组分的情况下允许宿主细胞或宿主生物体维持的基因,其中所述因子、化合物和/或(食物)组分对于非转化细胞或生物体的存活是必需的。

[1245] 前导序列应该是这样的,在预期的宿主细胞或宿主生物体中,它允许期望的翻译后修饰,和/或是这样的,它将转录的mRNA导向细胞的期望部分或细胞器。前导序列还可以允许从所述细胞分泌表达产物。因此,前导序列可以是在宿主细胞或宿主生物中可操作的任何原(pro-)序列,前(pre-)序列或前原(propre)序列。在细菌细胞中表达可能不需要前导序列。例如,可以以基本上类似的方式使用本身已知的用于表达和产生抗体和抗体片段(包括但不限于单结构域抗体和ScFv片段)的前导序列。

[1246] 表达标记或报告基因应该是这样的,在宿主细胞或宿主生物体中,它允许检测遗传构建体(上存在的基因或核苷酸序列)的表达。表达标记还可任选地允许表达产物的定位,例如,在细胞的特定部分或细胞器中,和/或在多细胞生物体的特定细胞、组织、器官或部分中。所述报告基因也可以表达为与本发明的ISV、多肽或构建体的蛋白融合体。一些优选但非限制性的实例包括荧光蛋白,例如GFP。

[1247] 合适的启动子、终止子和另外的元件的一些优选但非限制性的实例包括可用于在

本文提及的宿主细胞中表达的那些;特别是适合在细菌或酵母细胞中表达的那些,例如本文提及的那些和/或下文实施例中使用的那些。对于可以在本发明的遗传构建体中存在/使用的启动子、选择标记、前导序列、表达标记和另外元件的一些(进一步)非限制性实例,例如终止子、转录和/或翻译增强子和/或或整合因子,参考一般手册例如上述的Sambrook等人和Ausubel等人,以及参考在WO 95/07463、WO 96/23810、WO 95/07463、WO 95/21191、WO 97/11094、WO 97/42320、WO 98/06737、WO 98/21355、US 7,207,410、US 5,693,492和EP 1085089中给出的实施例。其他实施例对技术人员将是清楚的。还参考上文引用的一般背景技术和本文引用的另外的参考文献。

[1248] 本发明的遗传构建体通常可以通过将本发明的核苷酸序列与上述一个或更多个另外的元件适当地连接来提供,例如使用在一般手册诸如上述Sambrook等人和Ausubel等人中描述的技术。

[1249] 通常,通过将本发明的核苷酸序列插入本身已知的合适(表达)载体中,可以获得本发明的遗传构建体。合适的表达载体的一些优选但非限制性的实例是在下面的实施例中使用的那些,以及本文提及的那些。

[1250] 本发明的核酸和/或本发明的遗传构建体可用于转化宿主细胞或宿主生物体,即用于表达和/或生产本发明的多肽或构建体(其是这样的,它可通过表达编码其的核酸而获得)。宿主优选是非人类宿主。合适的宿主或宿主细胞对于技术人员将是清楚的,并且可以是例如任何合适的真菌、原核或真核细胞或细胞系,或任何合适的真菌、原核或(非人)真核生物体,例如:

[1251] -细菌菌株,包括但不限于革兰氏阴性菌株,诸如大肠杆菌(*Escherichia coli*)的菌株;变形杆菌属(*Proteus*)的菌株,例如奇异变形杆菌(*Proteus mirabilis*);假单胞菌属(*Pseudomonas*)的菌株,例如荧光假单胞菌(*Pseudomonas fluorescens*);和革兰氏阳性菌株,诸如芽孢杆菌属(*Bacillus*)的菌株,例如枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或短芽孢杆菌(*Bacillus brevis*);链霉菌属(*Streptomyces*)的菌株,例如浅青紫链霉菌(*Streptomyces lividans*);葡萄球菌属(*Staphylococcus*)的菌株,例如肉葡萄球菌(*Staphylococcus carnosus*);和乳球菌属(*Lactococcus*)的菌株,例如乳酸乳球菌(*Lactococcus lactis*);

[1252] -真菌细胞,包括但不限于来自木霉属(*Trichoderma*)物种的细胞,例如来自里氏木霉(*Trichoderma reesei*);来自链孢霉属(*Neurospora*)物种的细胞,例如来自粗糙链孢霉(*Neurospora crassa*);来自粪壳属(*Sordaria*)物种的细胞,例如来自大孢粪壳(*Sordaria macrospora*);来自曲霉属(*Aspergillus*)物种的细胞,例如来自黑曲霉(*Aspergillus niger*)或来自酱油曲霉(*Aspergillus sojae*);或来自其它丝状真菌;

[1253] -酵母细胞,包括但不限于来自酵母属(*Saccharomyces*)物种的细胞,例如酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*);来自裂殖酵母属(*Schizosaccharomyces*)物种的细胞,例如栗酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*);来自毕赤酵母属(*Pichia*)物种的细胞,例如巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)或甲醇毕赤酵母(*Pichia methanolica*);来自汉逊酵母属(*Hansenula*)物种的细胞,例如多形汉逊酵母(*Hansenula polymorpha*);来自克鲁维酵母属(*Kluyveromyces*)物种的细胞,例如乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*);来自Arxula物种的细胞,例如Arxula adeninivorans;来自耶氏酵母属(*Yarrowia*)物种的细胞,

例如解脂耶氏酵母 (*Yarrowia lipolytica*)；

[1254] - 两栖动物细胞或细胞系, 诸如爪蟾卵母细胞 (*Xenopus oocytes*)；

[1255] - 来源于昆虫的细胞或细胞系, 诸如来源于鳞翅目的细胞/细胞系, 包括但不限于斜纹夜蛾属 (*Spodoptera*) SF9和Sf21细胞或来源于果蝇属 (*Drosophila*) 的细胞/细胞系, 诸如Schneider和Kc细胞；

[1256] - 植物或植物细胞, 例如在烟草植物中; 和/或

[1257] - 哺乳动物细胞或细胞系, 例如来源于人的细胞或细胞系, 来自哺乳动物的细胞或细胞系, 包括但不限于CHO-细胞, BHK-细胞 (例如BHK-21细胞) 和人细胞或细胞系诸如HeLa、COS (例如COS-7) 和PER.C6细胞；

[1258] 以及本身已知的用于表达和产生抗体和抗体片段 (包括但不限于(单)结构域抗体和ScFv片段) 的所有其他宿主细胞或(非人类)宿主, 这对于技术人员来说将是清楚的。还参考上文引用的一般背景领域, 以及参考例如WO 94/29457; WO 96/34103; WO 99/42077; Frenken等人 (1998, *Res Immunol*. 149: 589-599); Riechmann和Muylleermans (1999), 同上; van der Linden (2000, *J. Biotechnol.* 80: 261-270); Joosten等人 (2003, *Microb. Cell Fact.* 2: 1); Joosten等人 2005, (*Appl. Microbiol. Biotechnol.* 66: 384-392); 以及本文引用的其他参考文献。

[1259] 本发明的多肽或构建体也可以表达为所谓的“胞内抗体”, 如例如WO 94/02610、WO 95/22618和US 7,004,940; WO 03/014960; Cattaneo和Biocca (1997, *Intracellular Antibodies: Development and Applications* Landes and Springer-Verlag); 和Kontermann (2004, *Methods* 34: 163-170) 中所描述的。

[1260] 本发明的多肽或构建体还可以例如在转基因哺乳动物的乳汁中产生, 例如在兔、奶牛、山羊或绵羊的乳汁中 (参见例如US 6,741,957、US 6,304,489和US 6,849,992, 用于将转基因引入到哺乳动物中的一般技术), 在植物或植物的部分中, 包括但不限于它们的叶、花、果实、种子、根或块茎 (例如在烟草、玉米、大豆或苜蓿中) 或在例如家蚕 *Bombyx mori* 的蛹中。

[1261] 此外, 本发明的多肽或构建体也可以在无细胞表达系统中表达和/或产生, 并且这种系统的合适实例对于技术人员将是清楚的。一些优选但非限制性的实例包括在小麦胚芽系统中的表达; 在兔网织红细胞裂解物中的表达; 或在大肠杆菌Zubay系统中的表达。

[1262] 优选地, 在本发明中, 使用(体内或体外)表达系统如细菌表达系统, 其以适于药学用途的形式提供本发明的多肽或构建体, 并且此类表达系统对于技术人员来说将再次是清楚的。如本领域技术人员还清楚的, 可以使用肽合成技术制备适于药学用途的本发明的多肽或构建体。

[1263] 对于工业规模的生产, 用于(工业)生产免疫球蛋白单可变结构域或含有免疫球蛋白单可变结构域的多肽治疗剂的优选异源宿主, 包括适合于大规模表达/生产/发酵, 特别是用于大规模药物表达/生产/发酵的大肠杆菌、毕赤酵母、酿酒酵母菌株。这种菌株的合适实例对于技术人员来说将是清楚的。这种菌株和生产/表达系统也可由诸如Biovitrum (Uppsala, Sweden) 的公司获得。

[1264] 备选地, 哺乳动物细胞系, 特别是中国仓鼠卵巢 (CHO) 细胞, 可用于大规模表达/生产/发酵, 特别是用于大规模药物表达/生产/发酵。再次, 这些表达/生产系统也可由上面提

到的一些公司获得。

[1265] 对特定表达系统的选择将部分地取决于某些翻译后修饰的需要,更具体地说是糖基化。期望或需要糖基化的含有免疫球蛋白单可变结构域的重组蛋白的生产,需要使用具有使表达蛋白糖基化的能力的哺乳动物表达宿主。在这方面,技术人员将清楚,所获得的糖基化模式(即,附着的残基的种类、数量和位置)将取决于用于表达的细胞或细胞系。优选地,使用人细胞或细胞系(即,产生基本上具有人糖基化模式的蛋白质),或使用另一种哺乳动物细胞系,其可以提供与人糖基化基本上相同和/或功能相同的糖基化模式或至少模拟人糖基化。通常,原核宿主例如大肠杆菌不具有使蛋白质糖基化的能力,并且使用低等真核生物例如酵母通常导致与人糖基化不同的糖基化模式。然而,应该理解,所有上述宿主细胞和表达系统均可用于本发明,这取决于待获得的期望多肽或构建体。

[1266] 因此,根据本发明的一个非限制性方面,本发明的多肽或构建体是糖基化的。根据本发明的另一个非限制性方面,本发明的多肽或构建体是非糖基化的。

[1267] 根据本发明的一个优选但非限制性的方面,本发明的多肽或构建体在细菌细胞中产生,特别是适于大规模药物生产的细菌细胞,例如上述菌株的细胞。

[1268] 根据本发明的另一个优选但非限制性的方面,本发明的多肽或构建体在酵母细胞中产生,特别是适于大规模药物生产的酵母细胞,例如上述物种的细胞。

[1269] 根据本发明的又一个优选但非限制性的方面,本发明的多肽或构建体在哺乳动物细胞中产生,特别是在人细胞中或在人细胞系的细胞中产生,更特别是在适用于大规模药物生产的人细胞或人细胞系的细胞中,例如上文提到的细胞系。

[1270] 当在宿主细胞中的表达用于产生本发明的多肽或构建体时,本发明的多肽或构建体可以在细胞内(例如,在胞质溶胶中,在周质中或在包含体中)产生,然后从宿主细胞中分离,并任选地进一步纯化;或者可以在细胞外产生(例如,在培养宿主细胞的培养基中),然后从培养基中分离,并任选地进一步纯化。当使用真核宿主细胞时,通常优选细胞外产生,因为这极大地促进了所获得的多肽或构建体的进一步分离和下游加工。细菌细胞如上述大肠杆菌菌株正常地不会在细胞外分泌蛋白质,除了少数蛋白质种类如毒素和溶血素,并且大肠杆菌中的分泌产生是指蛋白质跨越内膜转运至周质间隙。与胞质生产相比,周质生产提供了若干优势。例如,在通过特异性信号肽酶切割分泌信号序列后,分泌产物的N端氨基酸序列可以与天然基因产物相同。而且,周质中的蛋白酶活性似乎比在细胞质中少得多。此外,由于周质中较少的污染蛋白质,蛋白质纯化更简单。另一个优点是可以形成正确的二硫键,因为周质提供比细胞质更具氧化性的环境。在大肠杆菌中过表达的蛋白质通常存在于不溶性聚集体中,即所谓的包含体。这些包含体可位于胞质溶胶或周质中;从这些包含体中回收生物活性蛋白质需要变性/重折叠过程。许多重组蛋白包括治疗蛋白是从包含体中回收的。备选地,如本领域技术人员所清楚的,可以使用经过遗传修饰以分泌所需蛋白质特别是本发明的多肽或构建体的重组细菌菌株。

[1271] 因此,根据本发明的一个非限制性方面,本发明的多肽或构建体是已经在细胞内产生并且已经从宿主细胞中分离的多肽或构建体,特别是从细菌细胞或从细菌细胞的包含体中分离的多肽或构建体。根据本发明的另一个非限制性方面,本发明的多肽或构建体是已经在细胞外产生并且已经从培养宿主细胞的培养基中分离的多肽或构建体。

[1272] 用于与这些宿主细胞一起使用的一些优选但非限制性的启动子包括:

[1273] - 用于在大肠杆菌中表达: lac启动子(及其衍生物,如lacUV5启动子);阿拉伯糖启动子;噬菌体λ的左-(PL)和右(PR)启动子;trp操纵子的启动子;杂合lac/trp启动子(tac和trc);T7-启动子(更具体地,T7-噬菌体基因10的启动子)和其他T-噬菌体启动子;Tn10四环素抗性基因的启动子;上述启动子的工程变体,其包括外来调控操纵子序列的一个或更多个拷贝;

[1274] - 用于在酿酒酵母中表达:组成型:ADH1(醇脱氢酶1)、ENO(烯醇酶)、CYC1(细胞色素c iso-1)、GAPDH(甘油醛-3-磷酸脱氢酶)、PGK1(磷酸甘油酸激酶)、PYK1(丙酮酸激酶);调控的:GAL1,10,7(半乳糖代谢酶)、ADH2(醇脱氢酶2)、PH05(酸性磷酸酶)、CUP1(铜金属硫蛋白);异源的:CaMV(花椰菜花叶病毒35S启动子);

[1275] - 用于在毕赤酵母中表达:AOX1启动子(醇氧化酶I);

[1276] - 用于在哺乳动物细胞中表达:人巨细胞病毒(hCMV)即时早期增强子/启动子;人巨细胞病毒(hCMV)即时早期启动子变体,其含有两个四环素操纵基因序列,使得启动子可被Tet阻遏物调控;单纯疱疹病毒胸苷激酶(TK)启动子;劳斯肉瘤病毒长末端重复序列(RSV LTR)增强子/启动子;来自人、黑猩猩、小鼠或大鼠的延伸因子1α(hEF-1α)启动子;SV40早期启动子;HIV-1长末端重复启动子;β-肌动蛋白启动子。

[1277] 用于与这些宿主细胞一起使用的一些优选但非限制性的载体包括:

[1278] - 用于在哺乳动物细胞中表达的载体:pMAMneo(Clontech),pcDNA3(Invitrogen)、pMC1neo(Stratagene)、pSG5(Stratagene),EB0-pSV2-neo(ATCC 37593)、pBPV-1(8-2)(ATCC 37110)、pdBPV-MMTneo(342-12)(ATCC 37224)、pRSVgpt(ATCC37199)、pRSVneo(ATCC37198)、pSV2-dhfr(ATCC 37146)、pUCTag(ATCC 37460)和1ZD35(ATCC 37565),以及基于病毒的表达系统,例如基于腺病毒的表达系统;

[1279] - 用于在细菌细胞中表达的载体:pET载体(Novagen)和pQE载体(Qiagen);

[1280] - 用于在酵母或其他真菌细胞中表达的载体:pYES2(Invitrogen)和毕赤酵母表达载体(Invitrogen);

[1281] - 用于在昆虫细胞中表达的载体:pBlueBacII(Invitrogen)和其他杆状病毒载体;

[1282] - 用于在植物或植物细胞中表达的载体:例如基于花椰菜花叶病毒或烟草花叶病毒的载体,土壤杆菌属(Agrobacterium)的合适菌株或基于Ti质粒的载体。

[1283] 用于与这些宿主细胞一起使用的一些优选但非限制性的分泌序列包括:

[1284] - 用于细菌细胞如大肠杆菌中:Pe1B、B1a、OmpA、OmpC、OmpF、OmpT、St II、PhoA、PhoE、MalE、Lpp、LamB等;TAT信号肽,溶血素C端分泌信号;

[1285] - 用于酵母中:α-交配因子前原序列、磷酸酶(pho1)、转化酶(Suc)等;

[1286] - 用于哺乳动物细胞中:目标蛋白质来源于真核生物时的固有信号;小鼠Igκ-链V-J2-C信号肽;等等。

[1287] 用于转化本发明宿主或宿主细胞的合适技术对于技术人员来说是清楚的,并且可以取决于预期的宿主细胞/宿主生物以及待使用的遗传构建体。再次参考上述手册和专利申请。

[1288] 转化后,可以进行检测和选择已经用本发明的核苷酸序列/遗传构建体成功转化的那些宿主细胞或宿主生物体的步骤。这可以是例如存在于本发明遗传构建体中的选择标记的选择步骤,或涉及检测本发明多肽或构建体的步骤,例如使用特异性抗体。

[1289] 转化的宿主细胞(其可以是稳定细胞系的形式)或宿主生物体(其可以是稳定突变系或菌株的形式)形成本发明的另外方面。

[1290] 优选地,这些宿主细胞或宿主生物体是这样的:它们表达或(至少)能够表达(例如在合适的条件下)本发明的多肽或构建体(并且在宿主生物体的情况下:在其至少一个细胞、部分、组织或器官中)。本发明还包括本发明的宿主细胞或宿主生物体的下一代、后代和/或子代,其可以例如通过细胞分裂或通过有性或无性繁殖获得。

[1291] 因此,在另一方面,本发明涉及表达(或在适当情况下能够表达)本发明的多肽或构建体;和/或含有编码本发明的多肽或构建体的核酸的宿主或宿主细胞。这种宿主或宿主细胞的一些优选但非限制性的实例可如WO 04/041867、WO 04/041865或WO 09/068627中通常描述的。例如,本发明的多肽或构建体可以有利地在酵母菌株如毕赤酵母的菌株中表达、产生或制造。还参考WO 04/25591、WO 10/125187、WO 11/003622和WO 12/056000,其还描述了免疫球蛋白单可变结构域和包含其的多肽在毕赤酵母和其他宿主/宿主细胞中的表达/产生。

[1292] 为了产生/获得本发明的多肽或构建体的表达,转化的宿主细胞或转化的宿主生物体通常可以在使得本发明的(所需)多肽或构建体表达/产生的条件下保持、维持和/或培养。合适的条件对于技术人员将是清楚的,并且通常将取决于所使用的宿主细胞/宿主生物体,以及控制本发明的(相关)核苷酸序列表达的调控元件。再次参考在关于本发明遗传构建体的段落中如上提及的手册和专利申请。

[1293] 通常,合适的条件可以包括使用合适的培养基,存在合适的食物来源和/或合适的营养物,使用合适的温度,并且任选地存在合适的诱导因子或化合物(例如当本发明的核苷酸序列处于诱导性启动子的控制下时);全部这些可以由技术人员选择。再次,在这样的条件下,本发明的多肽或构建体可以以组成型方式表达,以瞬时方式表达,或者仅当适当诱导时表达。

[1294] 本领域技术人员还将清楚的是,本发明的多肽或构建体可以(首先)以未成熟形式产生(如上所述),然后可以对其进行翻译后修饰,这取决于所使用的宿主细胞/宿主生物体。而且,本发明的多肽或构建体可以是糖基化的,这也取决于所使用的宿主细胞/宿主生物体。

[1295] 然后可以使用本身已知的蛋白质分离和/或纯化技术,诸如(制备)色谱和/或电泳技术、示差沉淀技术、亲和技术(例如,使用与本发明的多肽或构建体融合的特异性可切割氨基酸序列)和/或制备性免疫技术(即,使用针对待分离的多肽或构建体的抗体),从宿主细胞/宿主生物体和/或从培养所述宿主细胞或宿主生物体的培养基分离本发明的多肽或构建体。

[1296] 本发明的组合物

[1297] 本发明进一步涉及产品或组合物,其含有或包含至少一种本发明的多肽或构建体和/或至少一种本发明的核酸,以及任选地本身已知的这种组合物的一种或多种另外的组分,即取决于组合物的预期用途。

[1298] 通常,对于药物用途,本发明的多肽或构建体可以配制成药物制剂或组合物,其包含至少一种本发明的多肽或构建体和至少一种药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂和/或佐剂,以及任选地一种或多种另外的药学活性多肽和/或化合物。通过非限制性实例,这

样的制剂可以是适于口服施用、适于肠胃外施用(例如静脉内、腹膜内、皮下、肌内、管腔内、动脉内或鞘内施用)、适于局部施用、适于通过吸入、皮肤贴剂、植入物、栓剂等施用的形式,其中胃肠外施用是优选的。这些合适的施用形式-其可以是固体、半固体或液体,取决于施用方式-以及用于制备其的方法和载体,对于技术人员而言是清楚的,并且在本文中进一步描述。这种药物制剂或组合物在本文中通常称为“药物组合物”。用于非人类生物体中的组合物的药物制剂在本文中通常称为“兽医用组合物”。根据本文的进一步描述,这种组合物的一些优选但非限制性的实例将变得清楚。

[1299] 因此,在另外的方面,本发明涉及药物组合物,其含有至少一种本发明的多肽或构建体和至少一种合适的载体、稀释剂或赋形剂(即,适用于药学用途),和任选地一种以上另外的活性物质。在特定的方面,本发明涉及药物组合物,其含有选自SEQ ID NO:1-10、47、49、52、53、55、56、58-61、63-67和338-342中任一项的本发明的多肽或构建体,和至少一种合适的载体、稀释剂或赋形剂(即适用于药物用途),和任选地一种或以上另外的活性物质。

[1300] 短语“药学上可接受的”在本文中用于指这样的那些化合物、材料、组合物和/或剂型:在合理的医学判断范围内,其适合用于接触人类和动物的组织,且没有过度的毒性、刺激、变应性应答或其它问题或并发症,与合理的收益/风险比相称。

[1301] 本文使用的短语“药学上可接受的载体”是指参与从一个器官或身体的一部分向另一个器官或身体的另一部分运送或运输主题化合物的药学上可接受的材料、组合物或载体,诸如液体或固体填充剂、稀释剂、赋形剂或溶剂包封材料。每种载体必须是“可接受的”,其含义是,与制剂的其它成分相容,且对患者无害。

[1302] 通常,本发明的多肽和构建体可以以本身已知的任何合适的方式配制和施用。例如,参考上面引用的一般背景技术(尤其参考WO 04/041862、WO 04/041863、WO 04/041865、WO 04/041867和WO 08/020079)以及标准手册,例如Remington's Pharmaceutical Sciences,第18版,Mack Publishing Company,USA(1990)、Remington, the Science and Practice of Pharmacy,第21版,Lippincott Williams and Wilkins (2005);或the Handbook of Therapeutic Antibodies (S.Dubel,Ed.),Wiley,Weinheim,2007(参见例如第252-255页)。

[1303] 例如,本发明的多肽或构建体可以以本身已知的用于常规抗体和抗体片段(包括ScFv和双抗体)和其他药学活性蛋白质的任何方式配制和施用。这些制剂和其制备方法对于技术人员来说是清楚的,例如包括适于肠胃外施用的制剂(例如,静脉内、腹膜内、皮下、肌内、管腔内、动脉内或鞘内施用)。

[1304] 用于肠胃外施用的制剂可以是例如适于输注或注射的无菌溶液、悬浮液、分散液或乳液。用于这种制剂的合适载体或稀释剂例如包括但不限于WO 08/020079的第143页上提及的那些。通常,水溶液或悬浮液是优选的。

[1305] 本发明的多肽或构建体可以通过输注或注射静脉内或腹腔内施用。本发明的多肽或构建体的溶液可以在水中制备,任选地与无毒表面活性剂混合。分散剂也可以在甘油、液体聚乙二醇、三乙酸甘油酯及其混合物和油中制备。在通常的储存和使用条件下,这些制剂含有防腐剂以防止微生物的生长。

[1306] 适用于肠胃外施用的药物组合物包含一种或多种免疫球蛋白单可变结构域、多肽或构建体,其与一种以上药学上可接受的无菌等渗水性或非水性溶液、分散液、悬浮液或乳

液或者可以在使用前重构为无菌可注射溶液或分散液的灭菌粉末组合,它们可以含有糖、醇、抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂、使制剂与预期接受者的血液等渗的溶质或悬浮剂或增稠剂。

[1307] 可以用于药物组合物中的合适的水性和非水性载体的实例包括水,乙醇,多元醇(诸如甘油、丙二醇、聚乙二醇等),及其合适的混合物,植物油(诸如橄榄油)和可注射的有机酯(诸如油酸乙酯)。例如,通过使用包衣材料(诸如卵磷脂)、通过在分散液的情况下保持所需的粒度,以及通过使用表面活性剂可以保持适当的流动性。

[1308] 这些组合物还可以含有佐剂,诸如防腐剂、湿润剂、乳化剂和分散剂。通过包含各种抗细菌剂和抗真菌剂,例如对羟基苯甲酸酯(paraben)、氯丁醇、苯酚、山梨酸、硫柳汞等,可以确保防止微生物对主题化合物的作用。将等渗剂(诸如糖、氯化钠等)包含在组合物中也是所期望的。另外,可通过包含延迟吸收的物质(诸如单硬脂酸铝和明胶)来实现可注射药物形式的延长的吸收。

[1309] 在一些情况下,为了延长药物的效果,期望减缓从皮下或肌内注射的药物吸收。这可以通过使用具有差的水溶性的结晶或无定形材料的液体悬浮液来完成。然后,药物的吸收速率取决于其溶解速率,而溶解速率又可以取决于晶体大小和结晶形式。备选地,肠胃外施用的药物形式的延迟吸收通过将药物溶解或悬浮于油性载体中来完成。

[1310] 通过在生物可降解的聚合物如聚乳酸-聚乙交酯中形成主题化合物的微囊基质来制得可注射的储存形式。取决于药物与聚合物的比例以及使用的特定聚合物的性质,可以控制药物释放的速率。其它生物可降解的聚合物的实例包括聚(原酸酯)和聚-(酸酐)。还通过将药物包裹在与身体组织相容的脂质体或微乳剂中来制备储存可注射制剂。

[1311] 适于注射或输注的药物剂型可包括无菌水性溶液或分散液或包含活性成分的无菌粉末,该无菌粉末适于临时制备无菌可注射或可输注的溶液或分散液,任选地包封在脂质体中。在所有情况下,最终剂型必须是无菌的、流动的并且在制造和储存条件下是稳定的。

[1312] 通过以下方法制备无菌可注射溶液:根据需要,将本发明的多肽或构建体在适当的溶剂中以所需的量与上面列举的几种其它成分合并,然后过滤灭菌。在用于制备无菌可注射溶液的无菌粉末的情况下,优选的制备方法是真空干燥和冷冻干燥技术,其产生活性成分与先前无菌过滤溶液中存在的任何额外所需成分的粉剂。

[1313] 用于治疗所需的本发明多肽或构建体的量不仅随所选择的特定多肽或构建体而变化,而且随施用途径、所治疗病症的性质和患者的年龄和状况而变,并最终将由主治医师或临床医生自行决定。此外,本发明的多肽或构建体的剂量也会变化。

[1314] 所需剂量可方便地以单剂量或作为以适当间隔施用的分份剂量存在,例如以每天二、三、四或更多个子剂量。子剂量本身可以进一步被分成例如许多离散的松散间隔施用。

[1315] 施用方案可包括长期的日常治疗。“长期”是指至少两周,优选数周、数月或数年的持续时间。本领域普通技术人员仅使用本文教导的常规实验可确定该剂量范围内的必要修改。参见Remington's Pharmaceutical Sciences (Martin, E.W., ed. 4), Mack Publishing Co., Easton, PA。在任何并发症的情况下,剂量也可以由个体医师调整。

[1316] 在另一个方面,提供了药盒,其包含本发明的多肽或构建体、本发明的核酸、本发明的表达载体或本发明的宿主或宿主细胞。药盒还可包含一个或更多个含有所述多肽或构建体的小瓶和使用说明书。药盒还可以含有用于施用本发明的多肽或构建体的工具,例如

注射器、注入器等。

[1317] 本发明的多肽、构建体或组合物的用途

[1318] 本发明进一步涉及本文所述的多肽、构建体、核酸、宿主细胞和组合物的应用和用途,以及用于预防和/或治疗CD123相关疾病或病症的方法。根据本文的进一步描述,一些优选但非限制性的应用和用途将变得清楚。

[1319] 本发明的多肽、构建体和组合物通常可用于在CD123表达细胞(的位点)处激活T细胞;例如以溶解CD123表达细胞。本发明的多肽和构建体同时与T细胞上的TCR和肿瘤细胞上的CD123结合,诱导细胞活化和随后CD123表达细胞的溶解(杀伤)。当不与CD123表达细胞结合时,本发明的多肽和构建体几乎不显示任何T细胞活化。因此,本发明的多肽和构建体的靶标独立的溶解(即,没有CD123表达的细胞溶解)是最小的。

[1320] 因此,在一个方面,与在相同条件下但不存在本发明多肽或构建体的CD123表达细胞的数量相比,本发明的多肽、构建体和组合物引起CD123表达细胞的溶解,其平均溶解百分比为至少10%,优选至少15%,例如至少16%、17%、18%、19%或20%或更多,例如30%或更多,其以本身已知的任何合适方式进行测量,例如,使用本文所述的测定法之一(例如重定向的人T细胞介导的杀伤基于流式细胞术的测定法,如实施例部分中所述)。

[1321] 除此之外或同时,通过本发明多肽、构建体和组合物的T细胞活化诱导的CD123阴性细胞溶解是在相同条件下但不存在本发明多肽或构建体的情况下CD123阴性细胞数量的约10%以下,例如9%或更低,例如8、7或6%或甚至更低,其以本身已知的任何合适方式进行测量,例如使用本文所述的测定法之一(例如重定向的人T细胞介导的杀伤基于流式细胞术的测定法,如实施例部分中所述)。

[1322] 所述CD123表达细胞的杀伤在这样的疾病或病症中是有利的:其中这种CD123表达细胞的存在是充足的和/或是不期望的。

[1323] 因此,在一个方面,本发明提供用作药物的多肽、构建体或组合物。

[1324] 在另外的方面,本发明提供了本发明的多肽或构建体或包含本发明的多肽或构建体的组合物,用于预防、治疗和/或改善CD123相关的疾病或病症。

[1325] 更特别地,本发明提供了本发明的多肽或构建体或包含本发明的多肽或构建体的组合物,用于预防、治疗和/或改善CD123相关的疾病或病症,其中CD123相关的疾病或病症是增殖性疾病或炎性病症。

[1326] 本发明还涉及用于预防、治疗和/或改善CD123相关的疾病或病症的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用药学活性量的本发明的多肽或构建体,和/或包含其的组合物。

[1327] 特别地,本发明涉及如上所述的方法,其中CD123相关疾病或病症是增殖性疾病或炎性病症。

[1328] 炎性病症可以是通过杀死CD123表达细胞来预防、治疗和/或改善的任何炎性病症。

[1329] 在一个方面,炎性病症选自由自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎组成的组。

[1330] 因此,本发明涉及用于预防、治疗和/或改善炎性病症的多肽、构建体或组合物,其中所述炎性病症选自由自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎组成的

组。

[1331] 因此,本发明还涉及用于预防、治疗和/或改善炎性病症的方法,其中所述炎性病症选自由自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎组成的组,所述方法包括向有此需要的受试者施用药学活性量的至少一种本发明的多肽或构建体或本发明的组合物。

[1332] 增殖性疾病可以是通过杀死CD123表达细胞来预防、治疗和/或改善的任何增殖性疾病。

[1333] 在一个方面,所述增殖性疾病是癌症。基于本文的公开内容,技术人员将清楚与CD123过表达相关的癌症的实例,并且例如包括(不限于)以下癌症:淋巴瘤(包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞浆样树突细胞肿瘤、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤。

[1334] 因此,本发明涉及用于预防、治疗和/或改善癌症的多肽、构建体或组合物,其中所述癌症选自淋巴瘤(包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞浆样树突细胞肿瘤、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤。

[1335] 因此,本发明还涉及预防、治疗和/或改善癌症的方法,其中所述癌症选自淋巴瘤(包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞样树突细胞瘤、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤,所述方法包括向有此需要的受试者施用药学活性量的至少一种本发明的多肽或构建体或本发明的组合物。

[1336] 本发明还涉及本发明的多肽或构建体或本发明的组合物在制备药物中的用途。

[1337] 在另外的方面,本发明涉及本发明的多肽或构建体或包含其的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善CD123相关疾病或病症的药物中的用途。

[1338] 更特别地,本发明涉及本发明的多肽或构建体或包含其的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善CD123相关疾病或病症的药物中的用途,其中CD123相关疾病或病症是增殖性疾病或炎性病症。

[1339] 在一个方面,本发明涉及本发明的多肽或构建体或包含其的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善炎性病症的药物中的用途,其中所述炎性病症选自由自身免疫性狼疮(SLE)、变态反应、哮喘和类风湿性关节炎组成的组。

[1340] 在另一方面,本发明涉及本发明的多肽或构建体或包含其的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善增殖性疾病的药物中的用途,其中所述增殖性疾病是癌症。基于本文的公开内容,技术人员将清楚与CD123过表达相关的癌症的实例,并且例如包括(不限于)以下癌症:淋巴瘤(包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞浆样树突细胞肿瘤、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤。

[1341] 因此,本发明还涉及本发明的多肽或构建体或包含其的组合物在制备用于预防、治疗和/或改善癌症的药物中的用途,其中所述癌症选自由以下组成的组:淋巴瘤(包括伯基特淋巴瘤、霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤)、白血病(包括急性髓性白血病、慢性髓性白血病、急性B淋巴母细胞白血病、慢性淋巴细胞白血病和毛细胞白血病)、骨髓增生异常综合征、原代浆细胞浆样树突细胞肿瘤、系统性肥大细胞增多症和多发性骨髓瘤。

[1342] 在本发明的上下文中,术语“预防、治疗和/或改善”不仅包括预防、治疗和/或改善疾病,还通常包括预防疾病的发作,减缓或逆转疾病的进展,预防或减缓与疾病相关的一种或多种症状的发作,减少和/或减轻与疾病相关的一种或多种症状,降低疾病和/或与其相关的任何症状的严重性和/或持续时间,和/或防止疾病和/或与其相关的任何症状的严重性的进一步增加,预防、减少或逆转由疾病引起的任何生理损伤,以及通常对受治疗的患者有益的任何药理作用。

[1343] 如本文可互换使用的,术语“药学有效量”或“药学活性量”是指在CD123表达细胞存在的情况下,足以激活T细胞的量。在CD123相关疾病的背景下,它指多肽、构建体或药物组合物单独的或与另一种疗法组合的量,其在预防、治疗和/或改善CD123相关疾病中提供治疗益处。在关于本发明多特异性多肽或构建体的量的使用中,该术语可包括改善整体疗法,减少或避免不希望的作用,或增强与另一种疗法的治疗功效或协同作用的量。

[1344] 如本文所用,术语“疗法”是指可用于治疗、预防和/或控制CD123相关疾病(例如炎性病症或增殖性疾病)的任何方案、方法和/或药剂。在某些实施方案中,术语“疗法(therapies)”和“疗法(therapy)”是指用于治疗、预防和/或控制CD123相关疾病(例如炎性病症或增殖性疾病)或本领域技术人员(诸如医务人员)已知的其一种或多种症状的生物疗法、支持疗法和/或其它疗法。

[1345] 在另一方面,本发明涉及用于免疫疗法,特别是用于被动免疫疗法的方法,该方法包括向患有CD123相关疾病或具有患CD123相关疾病的风险的受试者施用药学活性量的本发明的多肽或构建体和/或包含其的药物组合物。

[1346] 待治疗的受试者可以是任何温血动物,但特别是哺乳动物,更特别是人。如技术人员所清楚的,待治疗的受试者特别是患有本文提及的疾病和病症或处于所述疾病和病症风险中的人。

[1347] 通常,根据本发明的多肽或构建体和/或包含其的组合物可以以任何合适的方式施用。例如(但不限于)根据本发明的多肽和包含其的组合物可以口服施用,肠胃外(例如,静脉内、腹膜内、皮下、肌内、管腔内、动脉内或鞘内或通过避开胃肠道的任何其他施用途径)施用,鼻内施用,透皮施用,局部施用,通过栓剂施用,通过吸入施用,再次取决于所使用的具体药物制剂或组合物。根据待预防或治疗的疾病或病症以及临床医生熟知的其他因素,临床医生将能够选择合适的施用途径和用于这种施用的合适的药物制剂或组合物。

[1348] 在优选的方面,本发明的多肽或构建体或包含其的组合物通过静脉内(例如(但不限于),通过输注或推注)或皮下施用。

[1349] 根据适于预防、治疗和/或改善CD123相关疾病的治疗方案,施用本发明的多肽或构建体和/或包含其的组合物。临床医生通常能够确定合适的治疗方案,这取决于以下因素:诸如待治疗的疾病类型、疾病的阶段、疾病的严重程度和/或其症状的严重程度、待使用的本发明的具体多肽和构建体、具体的给药途径和待使用的药物制剂或组合物、患者的年

龄、性别、体重、饮食、一般状况,和临床医生熟知的类似因素。

[1350] 通常,治疗方案包括以一种或多种药学有效量或剂量施用一种或多种本发明的多肽或构建体,或一种或多种包含其的组合物。施用的具体量或剂量可以由临床医生再次基于上面引用的因素来确定。

[1351] 通常,为了预防、治疗和/或改善CD123相关疾病,并且取决于待治疗的CD123相关疾病(例如,增殖性疾病(包括癌症)或炎性病症)的类型、待治疗的疾病的阶段、待使用本发明的多肽或构建体的效力、具体的给药途径和所用的具体药物制剂或组合物,本发明的多肽通常以每日每千克体重1克和1微克之间的量给药。临床医生通常能够根据本文提及的因素确定合适的日剂量。还将清楚的是,在具体情况下,临床医生可以选择偏离这些量,例如基于上面引用的因素和其专家判断。通常,从对于针对相同靶标的相当的常规抗体或抗体片段通过基本上相同的途径施用的通常的量,可以获得关于施用量的一些指导,然而同时考虑亲和力/亲合力、功效、生物分布、半衰期的差异和技术人员熟知的类似因素

[1352] 通常,在上述方法中,将使用本发明的单一多肽或构建体。然而,组合使用两种或多种本发明的多肽或构建体也在本发明的范围内。

[1353] 本发明的多肽或构建体或包含其的组合物还可以与一种或多种另外的药学活性化合物或成分(principle)组合使用,即作为组合治疗方案,其可以生产或可以不产生协同效应。再次,临床医生将能够基于上面引用的因素和其专家判断选择这些另外的化合物或成分,以及合适的组合治疗方案。

[1354] 特别地,本发明的多肽、构建体和组合物可以与其他药学活性化合物或成分组合使用,所述其他药学活性化合物或成分用于或可用于预防、治疗和/或改善CD123相关疾病(例如,增殖性疾病(包括癌症)或炎性病症),其结果可以获得或不获得协同效应。所述化合物和成分的实例,以及施用它们的途径、方法和药物制剂或组合物是临床医生所清楚的。

[1355] 这种化合物和成分,以及用于施用它们的途径、方法和药物制剂或组合物的实例是临床医生所清楚的,并且包括(不限于):蒽环类药物(柔红霉素、多柔比星、伊达比星、米托蒽醌、柔红霉素苯腙)、阿糖胞苷(AML)、造血生长因子、去甲基化剂(如地西他滨或氮杂胞苷)、全反式维甲酸、三氧化二砷,DNA甲基转移酶抑制剂、美法仑、泼尼松,来那度胺、环磷酰胺、沙利度胺、地塞米松、硼替佐米、氟达拉滨、皮质类固醇、长春新碱、拉布立酶、L-天冬酰胺酶、聚乙二醇化天冬酰胺酶、克拉屈滨、喷司他丁、阿霉素、博来霉素、长春碱、达卡巴嗪;或其任何组合。

[1356] 当两种或更多种物质或成分用作组合的治疗方案的一部分时,它们可以通过相同的施用途径或者通过不同的施用途径在基本上相同的时间或在不同时间(例如,基本上同时地、连续地或者根据备选方案)施用。当所述物质或成分通过相同的施用途径同时施用时,它们可以作为不同的药物制剂或组合物或者作为组合的药物制剂或组合物的一部分进行施用,这是技术人员所清楚的。

[1357] 此外,当两种或更多种活性物质或成分用作组合治疗方案的一部分时,每种物质或成分可以与当所述化合物或成分独自使用时相同的量或根据相同的方案施用,并且这种组合使用可以导致或可以不导致协同效应。然而,当两种或更多种活性物质或成分的组合使用导致协同效应时,还可以减少待施用的一种、更多种或所有物质或成分的量,同时仍然实现期望的治疗作用。例如,这可以用于避免、限制或减少任何不希望的副作用,同时仍

然获得所需的药物或治疗效果,其中该副作用与当所述一种或更多种物质或成分以其通常的量使用时,该一种或更多种物质或成分的使用相关。

[1358] 根据本发明所使用的治疗方案的有效性可以对于所涉及的疾病或病症本身已知的任何方式确定和/或遵循,如临床医生所清楚的。临床医生还能够,在适当的情况下并根据具体情况,改变或修改特定的治疗方案,以达到理想的治疗效果,以避免、限制或减少不必要的副作用,和/或以便在一方面实现期望的治疗效果和另一方面避免、限制或减少不期望的副作用之间实现适当的平衡。

[1359] 通常,遵循治疗方案直至达到所期望的治疗效果和/或只要保持所期望的治疗效果即可。再次,这可以由临床医生确定。

[1360] 基于本文的公开内容,本领域技术人员将清楚本发明的多肽或构建体、核酸、遗传构建体和宿主以及宿主细胞的进一步用途。

[1361] 本说明书中说明和讨论的方面仅意在教导本领域技术人员本发明人已知实现和使用本发明的最佳方式。如本领域技术人员根据上述教导理解的,在不偏离本发明的情况下,本发明的上述方面的改进和变化形式是可能的。因此要理解,在权利要求和其等同方案的范围内,本发明可以除了如具体描述的之外实施。

[1362] 现在,将通过如下非限制性优选方面、实施例和附图进一步描述本发明。

[1363] 本申请中引用的所有参考文献(包括文献参考文献、公开的专利、公开的专利申请和共同待定的专利申请)的全部内容通过引用明确并入本文,尤其是对于上文参考的教导。

实施例

[1364] 实施例1:与TCR相关的材料和方法

[1365] 1.1 TCR $\alpha\beta$ /CD3转染的细胞系

[1366] 产生瞬时和稳定的CHO-K1 (ATCC:CCL-61)、HEK293H (Life technologies, 11631-017)、L1ana (来自美洲驼脐带细胞的成纤维细胞) 细胞系,其具有完整人T细胞受体 (TCR) 复合物的全部6个链的重组过表达。为此,将TCR alpha (α) 和TCR beta (β) 链的编码序列克隆到来源于pcDNA3.1的载体中,位于CMV启动子的下游,并将2A样病毒肽序列插入到两个链之间以在多蛋白的翻译期间诱导核糖体跳跃 (ribosomal skipping)。在相同的载体中,将CD3复合物的 ϵ 、 δ 、 γ 和 ζ 链的编码序列克隆到另外的CMV启动子的下游,也使用相应链之间的2A样病毒肽序列。另外,使用单一基因载体,如上所述产生具有重组过表达人CD3的4个链的稳定HEK293H克隆。

[1367] 使用的人CD3和人TCR α / β 恒定结构域的序列衍生自UniProtKB (CD3 δ :P04234, CD3 γ :P09693, CD3 ϵ :P07766, CD3 ζ :P20963, TCR α :P01848和TCR β :P01850; 分别为SEQ ID NO:70至75)。人TCR α / β 可变结构域的序列衍生自晶体结构序列 (PDB编码: 2IAN、2XN9和3TOE) (人TCR α 可变结构域衍生自2IAN、2XN9和3TOE, 分别具有SEQ ID NO:343、76和345; 人TCR β 可变结构域衍生自2IAN、2XN9和3TOE, 分别具有SEQ ID NO:344、77和346)。

[1368] 通过流式细胞术,使用功能性小鼠 IgG2b抗-人TCR α / β 抗体、克隆BW242/412 (Miltenyi, 130-098-219) 以及功能性小鼠 IgG2a抗-CD3PE标记的抗体、克隆OKT-3 (eBioscience, 12-0037) 来确认人T细胞受体复合物的细胞表面表达 (图1)。

[1369] 1.2 可溶性重组TCR α / β 蛋白

[1370] 在内部产生可溶性人和食蟹猴/猕猴TCR α / β 蛋白。人TCR α / β 恒定结构域的细胞外部分的序列衍生自UniProtKB (TCR α :P01848和TCR β :P01850; 分别为SEQ ID NO:74和75)。人TCR α / β 可变结构域衍生自晶体结构序列 (PDB编码: 2XN9; 对于 α 和 β 链分别为SEQ ID NO:76和77)。

[1371] 食蟹猴/猕猴TCR α / β 恒定结构域的细胞外部分的序列分别源自GenBank文件 EHH63463和AEA41868 (SEQ ID NO:347和348)。食蟹猴/猕猴TCR α / β 可变结构域的序列来源于AEA41865和AEA41866 (对于 α 和 β 链分别为SEQ ID NO:349和350)。

[1372] 将人TCR α / β (2XN9) 或食蟹猴/猕猴TCR α / β 的细胞外结构域与拉链蛋白编码序列融合 (O'Shea等1993 *Curr. Biol.* 3 (10): 658-667), 由CHOK1SV细胞 (Lonza) 使用Lonza's GS基因表达系统TM产生, 并随后纯化。

[1373] 在ELISA结合测定中评价TCR α / β 拉链蛋白的质量。将Maxisorp 96孔ELISA板 (Nunc) 用2 μ g/mL可溶性重组人TCR α / β (2XN9) -拉链蛋白或可溶性重组食蟹猴TCR α / β -拉链蛋白包被。温育过夜后, 洗涤平板并用PBS+1% 酪蛋白在室温下封闭1小时。接下来, 将平板与功能性标志标记的纳米抗体或功能性小鼠IgG抗非人灵长类/大鼠TCR α / β 抗体, 克隆R73 (eBioscience, 16-5960) 的系列稀释液在室温下温育1小时, 同时摇动, 再次洗涤, 并将平板分别与单克隆ANTI-FLAG M2-过氧化物酶 (HRP) (Sigma, A8592)、过氧化物酶-缀合的兔抗小鼠免疫球蛋白 (Dako, P0260) 一起温育。1小时后, 加入TMB One溶液 (Promega, G7431)。用2M H₂SO₄终止反应, 并使用Tecan sunrise 4通过测量450nm处的OD来确定剂量依赖性结合 (图2)。

[1374] 实施例2: 用TCR/CD3免疫美洲驼, 仅重链的抗体片段库的克隆和噬菌体的制备

[1375] 2.1 免疫

[1376] 提出了在骆驼科 (例如美洲驼和羊驼) 中产生针对T细胞受体 (TCR) α 和/或 β 恒定链的仅有重链的抗体。尽管天然T细胞受体复合物由CD3 (γ 、 δ 、 ϵ 和 ζ 链) 以及TCR α 和 β 链组成, 但假设缺乏CD3链将有助于接近TCR的恒定结构域。特别是因为CD3链横向环绕, 并且限制了对TCR α 和 β 链的恒定结构域的接近。与我们对其他靶标的经验证据相反, 获得针对TCR α 或 β 链的免疫应答并不像预期的那样直接。

[1377] 在最终方法中, 经伦理委员会批准后 (CRIA, LA1400575, 比利时-EC2012#1), 发明人尝试了用编码T细胞复合物的DNA的复合免疫方案。简而言之, 根据标准方案, 用pVAX1-人TCR (2IAN) /CD3 (在实施例1.1中描述的) 质粒载体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 和用pVAX1-人TCR α / β (2XN9) /CD3 (在实施例1.1中描述的) 质粒载体 (Invitrogen, Carlsbad, CA, USA) 对3只额外的美洲驼进行免疫。两只美洲驼另外接受1次原代人T细胞的皮下注射。使用RosetteSep (StemCell Technologies, #15061), 从来自健康志愿者的血沉棕黄层 (Buffy Coat) 血液 (根特血库) 中收集人T细胞, 随后根据生产商的说明书在Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare#17-1440-03) 上富集并储存在液氮中。解冻后, 将细胞洗涤, 并重新悬浮于来自Gibco的D-PBS中, 并在注射前保持在冰上。

[1378] 2.2 仅重链的抗体片段库的克隆和噬菌体的制备

[1379] 每只动物在注射一种免疫抗原后收集血样。从这些血样中, 根据制造商的说明书 (Amersham Biosciences, Piscataway, NJ, USA) 使用Ficoll-Hypaque制备PBMC。对于每只免疫的美洲驼, 通过汇集从源自免疫方案的某个子集 (即, 在一种免疫抗原之后) 的样品中分

离的总RNA来构建文库。

[1380] 简言之,通过特定的限制性位点将PCR扩增的VHH库克隆到经设计用于促进VHH文库的噬菌体展示的载体中。载体来源于pUC119。与VHH编码序列同框,载体编码C端3xFLAG和His6标签。根据标准方案(参见例如WO 04/041865、WO 04/041863、WO 04/062551、WO 05/044858和其它现有技术和本文引用的Ablynx N.V.递交的申请)制备噬菌体。

[1381] 实施例3:通过噬菌体展示选择TCR/CD3特异性VHH

[1382] 绝大多数所选的VHH针对TCR α 或TCR β 链的可变区。因此,发明人必须设计出不同的选择和反选择策略。

[1383] 简而言之,应用多种选择条件,从所有美洲驼获得并克隆为噬菌体文库的VHH库用于不同的选择策略中。使用具有与免疫过程中所使用的相同可变结构域的人TCR/CD3转染细胞系的选择仅产生可变结构域结合物。因此,在选择期间使用含有不同可变TCR α / β 结构域(转染细胞(在实施例1.1中所述)、可溶性蛋白质(在实施例1.2中所述)或人原代T细胞(如实施例2.1中所述分离))的工具,并证明对于鉴定恒定结构域结合物至关重要。选择期间的其他变量包括:抗原呈递方法(当使用细胞时在溶液中或当蛋白质时包被在平板上)、抗原浓度、使用的直向同源物(人或食蟹猴重组TCR α / β 蛋白)和选择轮次的数量。所有固体包被相选择在Maxisorp 96孔板(Nunc, Wiesbaden, Germany)中进行。

[1384] 选择如下进行:用于固体和溶液相选择形式的TCR α / β -CD3抗原制剂如上所述以多种浓度呈现。与噬菌体文库一起温育2小时后,然后充分洗涤,用胰蛋白酶(1mg/mL)洗脱结合的噬菌体15分钟。通过应用0.8mM蛋白酶抑制剂ABSF立即中和胰蛋白酶蛋白酶活性。作为对照,平行进行无抗原的选择。

[1385] 噬菌体输出用于感染大肠杆菌以分析单个VHH克隆。根据标准方案(参见例如WO 03/035694、WO 04/041865、WO 04/041863、WO 04/062551和其它现有技术和本文引用的Ablynx N.V.递交的申请)制备周质提取物。

[1386] 实施例4:筛选、序列分析和纯化

[1387] 4.1在流式细胞术测定中筛选结合TCR/CD3的纳米抗体

[1388] 使用人TCR/CD3转染的CHO-K1或HEK293H细胞和相应的CHO-K1或HEK293H参考细胞系,在混合细胞系设置中,对周质提取物筛选表达TCR/CD3结合的细胞。为此,一大批参考细胞系用8 μ M PKH26标记并冷冻。将5 \times 10⁴个PKH标记的参考细胞与5 \times 10⁴个靶细胞混合,并与周质提取物在4°C温育30分钟,并洗涤3次。接下来,将细胞与1 μ g/mL单克隆ANTI-FLAG[®]M2抗体(Sigma-Aldrich, F1804)在4°C温育30分钟,再次洗涤,并与5 μ g/mL别藻蓝蛋白(APC) AffiniPure山羊抗-小鼠IgG(Jackson Immunoresearch, 115-135-164)在4°C温育30分钟。将样品洗涤,重新悬浮于FACS缓冲液(来自Gibco的D-PBS,具有来自Sigma的10%FBS和来自Merck的0.05%叠氮化钠)中,然后通过BD FACSArray进行分析。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在该门中,在收获期间计数20,000个细胞。基于PKH26-SSC分布,选择PKH标记的亲本群体和人类TCR/CD3未标记的靶标群体。对于这2个群体,计算平均APC值。

[1389] 4.2在人T细胞活化测定中筛选结合TCR/CD3的纳米抗体

[1390] 经过多次尝试,结果显示,根据标准方案(即包被到96孔板上),通过抗体或纳米抗体,纯化的人T细胞的激活是不够灵敏的(数据未显示)。

[1391] 为了评估活性,基于珠偶联的T细胞活化开发了不同的测定法。简言之,用单克隆小鼠抗-FLAG®M2抗体(Sigma-Aldrich, F1804) (15μg/1E7珠) 包被 Dynabeads®山羊抗-小鼠IgG(ThermoFisher Scientific, 11033)。在4°C温育2小时后,将Dynabeads®洗涤并与80μl周质提取物在4°C温育20分钟,同时震荡。在将珠复合物与可溶性小鼠抗-CD28抗体(Pelicluster CD28-Sanquin, M1650)一起添加至纯化的原代人T细胞(如实施例2.1中所述分离)之前,洗掉非偶联的纳米抗体。作为对照条件,使用未刺激的人T细胞。简言之,将与单克隆小鼠抗-FLAG®M2抗体偶联的Dynabeads®山羊抗-小鼠IgG(ThermoFisher Scientific, 11033)在含有不相关的纳米抗体的80μl周质提取物中温育。在洗涤步骤期间去除未偶联的纳米抗体之后,将不相关的纳米抗体-珠复合物加入到纯化的原代人T细胞中。在37°C和5%CO₂温育24小时后,通过使用单克隆小鼠抗人CD69PE(BD Biosciences, 557050)在流式细胞术中测量CD69表达水平来确定人T细胞的活化状态。

[1392] 4.3所获得的纳米抗体的序列分析

[1393] 将在流式细胞术结合筛选和T细胞活化测定中评分为阳性的纳米抗体进行测序。

[1394] 序列分析导致了纳米抗体T0170056G05及其不同的家族成员的鉴定,代表总共104个不同的克隆(SEQ ID NO:42和78-180)。提供了相应的比对(表A-1)。

[1395] 针对T0170056G05的家族成员的CDR的序列可变性描述于下表中。

[1396] 表B-4

56G05		CDR1									
Kabat 编号		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
绝对编号		1	2	3	4	5*	6	7	8	9	10
56G05 序列		G	D	V	H	K	I	N	F	L	G
变异		A			Y	L	L		I		S
变异		S							V		
变异		E									
变异		G									

[1398] *在位置5是L的情况下,则位置6也是L。

[1399] 表B-5

56G05		CDR2									
Kabat 编号		50	51	52	53	54	55	56	57	58	
绝对编号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
56G05 序列		H	I	S	I	G	D	Q	T	D	
变异		T		T		S		D	V	A	
变异		R		A		A		E	A	Q	
变异								T		N	
变异								A		V	
变异								V		S	

[1401] 表B-6

[1402]	56G05	CDR3								
	Kabat 编号	95	96	97	98	99	100	100a	101	102
[1403]	绝对编号	1	2	3	4	5	6	7	8	9
	56G05 序列	F	S	R	I	Y	P	Y	D	Y
	变异	Y			L	W			N	
	变异	G							S	
	变异	L								

[1404] 4.4 单价纳米抗体的纯化

[1405] 选择鉴定的家族的两个代表性的纳米抗体,并在大肠杆菌TG1中表达为三联Flag, His6-标记的蛋白。通过加入1mM IPTG诱导表达,并且让其在37℃继续4小时。在离心细胞培养物后,通过冻融沉淀制备周质提取物。将这些提取物用作起始材料,并且通过IMAC和尺寸排阻层析(SEC)纯化纳米抗体。

[1406] 将纳米抗体纯化至95%纯度,如通过SDS-PAGE评价的(数据未显示)。

[1407] 实施例5:抗TCR纳米抗体与CHO-K1细胞上表达的人TCR/CD3和与纯化的原代人T细胞的结合

[1408] 通过流式细胞术评价纯化的单价抗TCR纳米抗体与CHO-K1细胞上表达的人TCR α / β (2XN9)/CD3和与纯化的原代人T细胞的剂量依赖性结合。简言之,收获细胞并转移至V底96孔板(1×10^5 个细胞/孔),并使纳米抗体的连续稀释液(从 $1 \mu\text{M}$ 开始)在4℃在FACS缓冲液中缔合30分钟。通过离心将细胞洗涤三次,并用 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 单克隆小鼠ANTI-FLAG[®]M2抗体(Sigma-Aldrich, F1804)在4℃探测30分钟,再次洗涤,并在4℃与 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗小鼠IgG(Jackson Immunoresearch 115-116-071)温育30分钟。温育之后,用FACS缓冲液将细胞洗涤3次。随后,将细胞重悬于补充有5nM TOPRO3(Molecular Probes, T3605)的FACS缓冲液中,以区分活细胞和死细胞,其中死细胞在门控(gating)过程中被除去。使用FACS阵列流式细胞仪(BD Biosciences)和流动软件(Flowing Software)分析细胞。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在该门中,在获取期间计数10000个细胞。从该群体中排除TOPRO+细胞(死细胞),并计算中值PE值。

[1409] 结果显示在图3中。从剂量响应曲线获得的EC50值在表C-1中呈现。

[1410] 表C-1:抗TCR单价纳米抗体用于结合CHO-K1人TCR α / β (2XN9)-/CD3细胞和用于结合纯化的原代T细胞的EC50(M),如在流式细胞术中所测定的。

[1411]	CHO-K1 TCR α / β (2XN9)/CD3				原代人T细胞		
	样品 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
	T0170055A02	8.4E-09	7.2E-09	9.7E-09	9.1E-08	8.1E-08	1.0E-07
	T0170056G05	8.9E-09	8.3E-09	9.4E-09	9.1E-08	8.3E-08	9.9E-08

[1412] 纳米抗体明显与CHO-K1细胞上表达的人TCR/CD3结合。纳米抗体也与纯化的原代人T细胞结合,尽管与CHO-K1人TCR α / β (2XN9)/CD3细胞相比具有略低的效力。

[1413] 实施例6:结合表位的确定

[1414] 如实施例5所述,在流式细胞术中,评价纯化的单价抗TCR纳米抗体与表达于HEK293H细胞上的人TCR α/β (2IAN)/CD3的结合,并将其与用人CD3转染的HEK293H细胞的结合进行比较。将开始于1 μ M的T0170055A02和T0170056G05的稀释系列应用于细胞。包括作为TCR/CD3阴性细胞系的亲本HEK293H细胞系。

[1415] 结果显示在图4中。从剂量响应曲线获得的EC50值描述于表C-2中。

[1416] 表C-2:抗-TCR单价纳米抗体用于结合在HEK293H细胞上表达的人TCR α/β (2IAN)/CD3或人CD3的EC50(M),如在流式细胞术中所测定的。

样品 ID	HEK293H wt		HEK293H CD3		HEK293H TCR/CD3	
	EC50	1 μ M 的 MCF	EC50	1 μ M 的 MCF	EC50	1 μ M 的 MCF
T0170055A02	未拟合	246	未拟合	1194	5.5E-08	91229
T0170056G05	未拟合	299	未拟合	352	8.4E-08	86510

[1418] 纳米抗体明显与在HEK293H上表达的人TCR(2IAN)/CD3结合,但不与仅用人CD3转染的HEK293H细胞结合,也不与HEK293H亲本细胞系结合。总之,2个克隆与人TCR α/β 特异性结合。未观察到与人CD3的结合。

[1419] 实施例7:抗TCR纳米抗体与可溶性重组人TCR α/β 蛋白的结合

[1420] 7.1ELISA中抗TCR纳米抗体与人T细胞受体蛋白的结合

[1421] 使用2 μ g/ml直接包被的可溶性重组人TCR α/β 蛋白,在ELISA(如实施例1.2中所述)中评估纯化的单价TCR纳米抗体与可溶性重组人TCR α/β 蛋白的结合。

[1422] 结果显示在图5中。从剂量响应曲线获得的EC50值描述于表C-3中。

[1423] 表C-3:抗TCR单价纳米抗体用于结合可溶性重组人TCR α/β (2XN9)蛋白的EC50(M),如ELISA中所测定的。

样品ID	EC50(M)	95%LCI	95%UCI
T0170055A02	1.9E-09	1.7E-09	2.2E-09
T0170056G05	4.0E-09	3.5E-09	4.6E-09

[1425] 与可溶性重组人TCR α/β 蛋白结合的抗TCR纳米抗体。

[1426] 7.2BLI中抗TCR纳米抗体与人T细胞受体蛋白的结合

[1427] 在Octet RED384仪器(Pall ForteBio Corp.)上使用Bio-Layer干涉测量法(BLI)测量结合亲和力。通过NHS/EDC偶联化学将重组人可溶性TCR α/β (2XN9)拉链蛋白共价固定在胺反应性传感器(ForteBio)上。对于动力学分析,首先将传感器浸入运行缓冲液(10mM Hepes, 150mM NaCl, 0.05% p20, pH7.4, 来自GE Healthcare Life Sciences)中以确定基线设定。随后,将传感器浸入含有不同浓度的纯化纳米抗体(范围在1.4nM和1mM之间)的孔中用于结合步骤(180s),并转移至含有运行缓冲液的孔中用于解离(15分钟)步骤。使用ForteBio数据分析软件,应用1:1交互模型,计算亲和常数(KD)。

[1428] 结果如图6所示。结合特性列于表C-4中。

[1429] 表C-4:抗TCR单价纳米抗体用于结合可溶性重组人TCR α/β (2XN9)蛋白的动力学分析,如用Octet RED384仪器所测定的。

人可溶性 TCR α / β (2XN9)拉链蛋白			
样品 ID	kon(1/Ms)	koff(1/s)	KD (M)
T0170055A02	4.9E+04	8.4E-04	1.7E-08
T0170056G05	5.0E+04	1.2E-03	2.4E-08

- [1431] 使用BLI对人可溶性TCR α / β (2XN9)拉链蛋白确定的结合亲和力显示与在流式细胞术中对CHO-K1人TCR α / β (2XN9)/CD3细胞确定的亲和力的相关性(参见实施例5)。
- [1432] 实施例8:抗TCR纳米抗体与重组食蟹猴可溶性TCR α / β 蛋白的结合
- [1433] 8.1ELISA中抗TCR纳米抗体与食蟹猴T细胞受体蛋白的结合
- [1434] 使用2 μ g/ml直接包被的重组食蟹猴可溶性TCR α / β 拉链蛋白,在ELISA(如实施例1.2中所述)中评估纯化的单价抗TCR纳米抗体与重组食蟹猴可溶性TCR α / β 蛋白的结合。
- [1435] 从剂量响应曲线获得的EC50值描述于表C-5中。示例性结果如图7所示。
- [1436] 表C-5:抗TCR单价纳米抗体用于结合重组食蟹猴可溶性TCR α / β 拉链蛋白的EC50(M),如ELISA中所测定的。

样品ID	EC50 (M)	95%LCI	95%UCI
T0170055A02	1.6E-07	1.5E-07	1.7E-07
T0170056G05	7.7E-08	6.6E-08	9.1E-08

- [1438] 结果表明,抗TCR纳米抗体与重组食蟹猴可溶性TCR α / β 拉链蛋白结合。
- [1439] 8.2BLI中抗TCR纳米抗体与食蟹猴T细胞受体蛋白的结合
- [1440] 在Octet RED384仪器(Pall ForteBio Corp.)上使用Bio-Layer干涉测量法(BLI)测量单价抗TCR纳米抗体的结合亲和力,基本上如实施例7.2中所述,使用重组食蟹猴可溶性TCR α / β 蛋白。
- [1441] 结果如图8所示。抗TCR纳米抗体的结合特征列于表C-6中。
- [1442] 表C-6:抗TCR单价纳米抗体用于结合重组食蟹猴可溶性TCR α / β 拉链蛋白的动力学分析,如用Octet RED384仪器所测定的。

样品ID	kon(1/Ms)	koff(1/s)	KD (M)
T0170055A02	1.1E+05	2.4E-02	2.1E-07
T0170056G05	1.1E+05	1.6E-02	1.5E-07

- [1444] 与重组人可溶性TCR α / β (2XN9)拉链蛋白相比,纳米抗体以10倍低的亲和力与重组食蟹猴可溶性TCR α / β 蛋白结合。
- [1445] 实施例9:纯化的原代人T细胞活化能力的确定
- [1446] 在人T细胞活化测定中评价纯化的单价抗TCR纳米抗体的功能性。用单克隆小鼠ANTI-FLAG® M2抗体(Sigma-Aldrich, F1804, 15 μ g/1E7珠)包被Dynabeads®山羊抗小鼠IgG(ThermoFisher Scientific, 11033)。在4°C温育2小时后,将Dynabeads®洗涤并与固定(1 μ g)量的纯化的Flag标记的纳米抗体在4°C温育20分钟,同时震荡。在将珠复合物与可溶性小鼠抗-CD28抗体(Pelicluster CD28-Sanquin, M1650)一起添加至从不同健康供体分离的纯化的原代人T细胞(如实施例2.1中所述分离)之前,洗掉未偶联的纳米抗体。另外,在没有事先捕获到抗小鼠IgG Dynabeads®的情况下和在抗CD28抗体的存在下,通过将纳米抗体与纯化的原代人T细胞温育来评价纳米抗体的单价TCR结合的效果。在37°C和5%CO₂温育

24小时后,通过使用单克隆小鼠抗-人CD69PE(BD Biosciences,557050)在流式细胞术中测量CD69表达来监测纯化的原代人T细胞的活化状态。

[1447] 总之,抗TCR纳米抗体在捕获到抗小鼠IgG Dynabeads®上之后显示出明显的CD69上调。无关的纳米抗体未显示任何CD69上调(图9A)。此外,溶液中呈现的纳米抗体均不能活化纯化的原代人T细胞,如通过增加的CD69表达所测量的(图9B)。

[1448] 实施例10:用CD123免疫美洲驼、仅重链的抗体片段库的克隆及噬菌体的制备

[1449] 10.1免疫

[1450] 根据标准方案,使用Stimune作为佐剂(Cedi Diagnostics,Lelystad,The Netherlands)通过颈部肌内注射,用人CD123的重组His-标记的细胞外结构域(R&D Systems,301-R3/CF)免疫三只美洲驼。

[1451] 通过ELISA,分析在第35天取得的免疫血清样品对吸附的hCD123的抗原特异性结合。所有美洲驼显示出优异的IgG 1介导的血清应答,以及良好至中度的重链介导的针对hCD123的应答。

[1452] 10.2仅重链的抗体片段库的克隆及噬菌体的制备

[1453] 每只动物,在最后一次注射免疫抗原后4和8天收集100mL血液样品。从这些血液样品中,根据制造商的说明书(Amersham Biosciences,Piscataway,NJ,USA)使用Ficoll-Hypaque制备PBMC。对于每只免疫的美洲驼,通过汇集从不同血液样品中分离的总RNA来构建文库。

[1454] 简而言之,通过特定的限制性位点将PCR扩增的VHH库克隆到经设计用于促进VHH文库的噬菌体展示的噬菌粒载体中。载体来源于pUC119。与VHH编码序列同框,载体编码C端3xFLAG和HIS6标签。根据标准方案(参见例如WO 04/041865、WO 04/041863、WO 04/062551、WO 05/044858和其它现有技术和本文引用的Ablynx N.V.递交的申请)制备噬菌体。

[1455] 实施例11:通过噬菌体展示选择CD123特异性VHH

[1456] 应用多种选择条件,从所有美洲驼获得并克隆为噬菌粒文库的VHH库用于不同的选择策略中。变量包括:i) CD123抗原的来源(在人细胞中产生的重组蛋白或在细胞上过表达的全长蛋白),ii) 抗原呈递(当使用生物素化的重组胞外域时在溶液中,对于非生物素化的Fc融合胞外域直接包被在平板上),和iii) 抗原浓度。

[1457] 简而言之,将过表达CD123(内部产生)、生物素化的人CD123(R&D Systems,301-R3/CF,内部生物素化)和板包被的人CD123-Fc(Sino Biologicals,10518-H08H)的HEK293T细胞与不同文库的 2×10^{11} 噬菌体颗粒温育1小时-2小时,然后充分洗涤;用胰蛋白酶(1mg/mL)洗脱结合的噬菌体15分钟,然后通过应用0.8mM蛋白酶抑制剂ABSF立即中和蛋白酶活性。作为对照,平行进行具有亲本细胞系的选择或无抗原的选择。

[1458] 噬菌体输出用于感染大肠杆菌以分析单个VHH克隆。根据标准方案(参见例如WO 03/035694、WO 04/041865、WO 04/041863、WO 04/062551和其它现有技术和本文引用的Ablynx N.V.递交的申请)制备周质提取物。

[1459] 实施例12:筛选结合CD123的纳米抗体

[1460] 12.1在结合ELISA中筛选

[1461] 在结合ELISA中,在人CD123(R&D Systems,301-R3)上筛选周质提取物。为此,用人CD123(1 μ g/mL)包被微量滴定板,并在4°C温育过夜。将平板在室温下用PBS中的4%Marvel

封闭1小时。用PBS-Tween洗涤平板。将周质提取物(在具有2%Marvel的PBS中稀释1/10)在室温温育至少1小时。用PBS-Tween洗涤平板,然后用具有1%Marvel的PBS中的单克隆ANTI-FLAG M2-过氧化物酶(HRP)(Sigma,A8592,1/5000)检测VHH的结合。用底物esTMB(Nalgene)进行染色,并在15分钟后于450nm测量信号。

[1462] 12.2在流式细胞术中筛选

[1463] 在96孔形式中,在流式细胞术测定中,在瞬时转染的HEK293T-hCD123细胞上筛选周质提取物。此外,评价与内源性表达IL-3R的MOLM-13细胞的结合,以确认在异二聚体受体复合物中IL-3R β 配偶体的存在下与IL-3R β 的结合。为此,将细胞(1×10^5 细胞/孔/0.1mL)与周质提取物(1:10稀释)在4°C下在FACS缓冲液(来自Invitrogen的D-PBS,具有来自Sigma的10%FBS,和来自Merck的0.05%叠氮化钠)中温育30分钟。将细胞洗涤3次,并与1 μ g/ml单克隆ANTI-FLAG[®]M2抗体(Sigma-Aldrich,F1804)在4°C温育30分钟,再次洗涤,并与山羊抗小鼠RPE标记的抗体(Jackson Immunoresearch,115-116-071,1:100)在4°C温育30分钟。洗涤样品,与TOPRO3一起温育,以在FACS缓冲液中染色死细胞,并在FACSAarray装置(BD)上评价荧光。

[1464] 12.3纳米抗体的测序分析

[1465] 将在结合ELISA和流式细胞术测定中评分为阳性的纳米抗体进行测序。序列分析导致了纳米抗体A0110056A10和A0110055F03及其不同家族成员的鉴定。分别在表A-2和表A-3中提供了相应的比对。

[1466] 针对A0110056A10的家族成员的CDR的序列可变性描述于下表中。

[1467] 表B-7

56A10		CDR1									
Kabat 编号		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
绝对编号		1	2	3*	4	5	6**	7	8	9	10
56A10 序列		G	I	T	S	K	I	N	D	M	G
变异			S			S	D	V			
变异				P				A			

[1469] *在位置3是S的情况下,则位置7是D。

[1470] **在位置6是I的情况下,则位置8是D。

[1471] 表B-8

56A10		CDR2									
Kabat 编号		50	51	52	53	54	55	56	57	58	
绝对编号		1	2	3	4	5	6	7	8	9	
56A10 序列		S	I	T	A	T	G	T	T	N	
变异											

[1473] 变异

[1474] 表B-9

56A10		CDR3						
Kabat 编号		95	96	97	98	99	100	101
[1475]	绝对编号	1	2	3	4	5	6	7
	56A10 序列 变异	F	P	P	I	S	N	F

55F03		CDR1									
Kabat 编号		26	27	28	29	30	31	32	33	34	35
[1478]	绝对编号	1	2	3*	4	5	6**	7	8	9	10
	55F03 序列 变异	G	R	T	F	S	S	Y	V	M	G

55F03		CDR2									
Kabat 编号		50	51	52	52a	53	54	55	56	57	58
[1480]	绝对编号	1	2	3	4	5	6*	7	8	9	10
	55F03 序列 变异	A	I	Y	W	S	N	G	K	T	Q
				W		S					E

55F03		CDR3															
Kabat 编号		95	96	97	98	99	100	100a	100b	100c	100d	100e	100f	100g	100h	101	102
[1483]	绝对编号	1	2	3	4*	5	6	7	8	9	10	11	12	13	14	15	16
	55F03 序列 变异	D	K	D	E	T	G	F	R	T	L	P	I	A	Y	D	Y
	变异			R	D												
	变异				Y												

[1481] *在位置6是S的情况下,则位置10是E。

[1482] 表B-12

- [1484] *在位置4是R的情况下,则位置5是D或Y。
- [1485] 12.4单价纳米抗体的纯化
- [1486] 选择每个家族的代表性纳米抗体,并在大肠杆菌TG1中表达为三联FLAG,His6-标记的蛋白。通过加入1mM IPTG诱导表达,并且让其在37°C继续4小时。在离心细胞培养物后,通过冻融沉淀制备周质提取物。将这些提取物用作起始材料,并且通过IMAC和尺寸排阻层析(SEC)纯化纳米抗体。将纳米抗体纯化至95%纯度,如通过SDS-PAGE评价的(数据未显示)。
- [1487] 实施例13:用于表征的额外细胞系

[1488] 13.1CD123转染的细胞系

[1489] 使用Flp-InTM定点重组技术(通过Flp重组酶介导的整合用于产生稳定的哺乳动物表达细胞系的Flp-InTM系统(Invitrogen, K601001, K601002))产生具有重组过表达CD123的稳定的HEK293 Flp-In(Invitrogen, R750-07)和CHO Flp-In(Invitrogen, R758-07)细胞系。因此,通过来自于酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae)的Flp重组酶(pOG44),在FRT(Flp重组靶标)位点处的特定基因组位置处发生DNA整合。Flp-InTM宿主细胞系和表达质粒(pcDNA5)都含有该FRT位点,从而允许单个同源DNA重组。人CD123的序列来源于NCBI RefSeq NP_002174,食蟹猴CD123的序列来源于NCBI genbank no.EHH61867.1(分别为SEQ ID NO:68和69)。使用小鼠单克隆抗CD123抗体(BD Biosciences, 554527)和小鼠IgG2a同种型对照(BD Bioscience, 16-4724-85),通过流式细胞术确认人和食蟹猴CD123的细胞表面表达。简而言之,收获细胞(1×10^5 个细胞/孔)并转移至V-底96孔板(Greiner Bio-one, 651180),并在4°C用小鼠单克隆抗CD123抗体(0.25 μ g/ml)和小鼠IgG2a同种型对照(0.25 μ g/ml)染色。温育30分钟后,通过离心沉淀细胞,并用FACS缓冲液(来自Gibco的D-PBS,具有10%FBS(Sigma, F7524)和0.05%叠氮化钠(Acros organics, 190380050))洗涤3次。接下来,将细胞与5 μ g/ml R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗小鼠IgG(Jackson Immunoresearch, 115-116-071)在4°C温育30分钟。温育后,用FACS缓冲液洗涤细胞3次。随后,将细胞重悬于补充有5nM TOPRO3(Molecular Probe, T3605)的FACS缓冲液中,以区分活细胞和死细胞。使用FACS阵列流式细胞仪(BD Biosciences)和流动软件(Flowing Software)分析细胞。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在该门中,在获取期间计数10000个细胞。从该群体中排除TOPRO+细胞(死细胞),并计算中值PE值。数据如图10所示。

[1490] 13.2U937、MOLM-13、KG1a和NCI-H929细胞系

[1491] 在流式细胞术中,使用APC标记的小鼠单克隆抗CD123抗体(BD Biosciences, 560087)和APC标记的同种型对照(Biolegend, 400220)来测定MOLM-13(DSMZ, ACC-554)、U-937(ATCC®, CRL-1593.2TM)、KG1a(ATCC®, CCL246.1TM)和NCI-H929(DSMZ, ACC-163)上人CD123的表达水平。简言之,收获细胞,并以 1×10^7 个细胞/ml的密度悬浮于具有25 μ g人Fc block(BD Biosciences, 564220)的FACS缓冲液中,并在室温下温育10分钟。接下来,将细胞稀释至 1×10^6 个细胞/ml的细胞浓度,并转移至V底96孔板(1×10^5 个细胞/孔)。细胞在4°C用APC标记的小鼠单克隆抗CD123抗体(稀释10倍)和APC标记的同种型对照(稀释10倍)染色。温育30分钟后,将细胞洗涤3次,并在4°C下在补充有1 μ g/ml碘化丙啶(PI)(Sigma, P4170)的FACS缓冲液中重悬浮30分钟,然后通过BD FACSCanto和流动软件进行分析。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在P1内计数10000个细胞。从该群体中排除PI+细胞(死细胞),并计算中值APC值。数据如图11所示。

[1492] 另外,根据制造商的说明书,使用QIFIKIT(Dako, K0078)确定每个细胞的受体数。数据显示在表C-7中。

[1493] 表C-7:每个细胞的CD123分子数。

	MOLM-13	KG1a
CD123分子/细胞	6543	3353

[1495] 实施例14:单价抗CD123纳米抗体与内源性CD123表达细胞系的结合

[1496] 通过流式细胞术,评价纯化的单价抗CD123纳米抗体与内源性CD123表达细胞系MOLM-13和KG1a的剂量依赖性结合。简言之,收获细胞并转移至V-底96孔板(1×10^5 个细胞/孔),并使纳米抗体的连续稀释液(从 $1 \mu\text{M}$ 开始)在 4°C 在FACS缓冲液中缔合30分钟。通过离心将细胞洗涤三次,并用单克隆小鼠ANTI-FLAG® M2抗体(Sigma-Aldrich,F1804)在 4°C 下探测30分钟,再次洗涤,并在 4°C 与 $5 \mu\text{g}/\text{ml}$ R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗小鼠IgG(Jackson Immunoresearch 115-116-071)温育30分钟。温育之后,用FACS缓冲液将细胞洗涤3次。随后,将细胞重悬于补充有5nM TOPRO3 (Molecular Probe, T3605) 的FACS缓冲液中,以区分活细胞和死细胞,其中死细胞在门控过程中被除去。使用FACS阵列流式细胞仪(BD Biosciences)和流动软件分析细胞。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在该门中,在获取期间计数10000个细胞。从该群体中排除TOPRO+细胞(死细胞),并计算中值PE值

[1497] 纳米抗体与MOLM-13和KG1a的结合显示在图12中。从剂量响应曲线获得的EC50值描述于表C-8中。

[1498] 表C-8:单价抗CD123纳米抗体用于与MOLM-13和KG1a结合的EC50 (M),如在流式细胞术中所测定的。

[1499]	MOLM-13				KG1a		
	样品 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
	A0110056A10	6.3E-10	3.8E-10	8.8E-10	5.0E-10	2.4E-10	7.6E-10
	A0110055F03	>1E-07			>1E-07		

[1500] 两种纳米抗体与CD123内源表达细胞(MOLM-13、KG1a)结合。

[1501] 实施例15:单价抗CD123纳米抗体与转染细胞上CD123的结合

[1502] 通过流式细胞术,评价纯化的单价抗CD123纳米抗体与过表达人CD123的CHO-K1和过表达食蟹猴CD123的HEK293细胞的剂量依赖性结合。

[1503] 为了检测A0110055F03的结合,收获细胞并转移至V底96孔板(1×10^5 个细胞/孔)。将A0110055F03的连续稀释液(从 100nM 开始)在 4°C 下在FACS缓冲液中缔合30分钟。通过离心将细胞用FACS缓冲液洗涤3次,并用 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 单克隆小鼠ANTI-FLAG® M2抗体(Sigma-Aldrich,F1804)在 4°C 探测30分钟,以检测结合的纳米抗体。用 $0.5 \mu\text{g}/\text{ml}$ R-藻红蛋白AffiniPure F(ab')₂片段山羊抗小鼠IgG(Jackson Immunoresearch, 115-116-071)在 4°C 下进行30分钟检测。洗涤细胞并与TOPRO3一起温育以染色死细胞,其中死细胞随后在门控过程中被除去。然后通过BD FACSArray分析细胞。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在该门中,在获取期间计数10000个细胞。从该群体中排除TOPRO+细胞(死细胞),并计算中值PE值。

[1504] 为了检测A0110056A10的结合,收获细胞并转移至V底96孔板(1×10^5 个细胞/孔)。将Alexa647标记的A0110056A10的连续稀释液(从 100nM 开始)在 4°C 下在FACS缓冲液中缔合30分钟。温育30分钟后,通过离心沉淀细胞并用FACS缓冲液洗涤3次。随后,将细胞重悬于补充有 $1 \mu\text{g}/\text{ml}$ 碘化丙啶的FACS缓冲液中,以区分活细胞和死细胞。使用FACS阵列流式细胞仪(BD Biosciences)和流动软件分析细胞。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在该门中,在获取期间计数10000个细胞。从该群体中排除PI+细胞(死细胞),并计算中值APC值。

[1505] 对于纳米抗体A0110056A10和A0110055F03,纳米抗体与CD123转染的细胞系和参考细胞系的结合分别示于图13和图14中。从剂量响应曲线获得的EC50值描述于表C-9中。

[1506] 表C-9:单价抗CD123纳米抗体用于与huCD123和cyCD123转染的细胞结合的EC50 (M),如在流式细胞术中所测定的。

[1507]		HEK Flp-In cyCD123 转染的细胞			CHO Flp-In huCD123 转染的细胞			
		样品 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
		A0110056A10	2.48E-09	1.90E-09	3.20E-09	9.74E-10	8.50E-10	1.11E-09
		A0110055F03	2.53E-09	2.04E-09	3.14E-09	5.94E-09	1.00E-09	3.52E-08

[1508] 两种纳米抗体均与CD123转染的细胞系结合。两种纳米抗体都是人-食蟹猴CD123交叉反应的。

[1509] 实施例16:在流式细胞术中,纳米抗体竞争结合在细胞上表达的CD123

[1510] 为了研究CD123纳米抗体是否相互竞争,建立了纳米抗体竞争测定。为此,用Alexa647标记大批A0110056A10并冷冻。接下来,收获细胞并转移至V底96孔板(1×10^5 个细胞/孔),并与纳米抗体的连续稀释液和固定浓度的A0110056A10-Alexa647(对于MOLM-13为0.7nM,对于CHO Flp-In人CD123为0.5nM)混合。测定中使用的A0110056A10-Alexa647浓度低于A0110056A10-Alexa647与各自细胞结合的EC50值(结合曲线描绘于图15中)。在4°C温育90分钟后,在流式细胞术中测定A0110056A10-Alexa647的结合。另外,洗涤细胞3次,并重悬于补充有1 μ g/ml碘化丙啶的FACS缓冲液中,在4°C温育30分钟,然后通过BD FACSArray进行分析。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在P1内计数10000个细胞。从该群体中排除PI+细胞(死细胞),并计算中值APC值。

[1511] 结果显示在图16中。从剂量响应曲线获得的IC₅₀值描述于表C-10中。

[1512] 表C-10:在A0110056A10纳米抗体竞争测定中,单价抗CD123纳米抗体的IC₅₀ (M)。

[1513]		MOLM-13			CHO Flp-In 人 CD123			
		样品 ID	IC ₅₀ (M)	95% LCI	95% UCI	IC ₅₀ (M)	95% LCI	95% UCI
		A0110056A10	1.4E-09	1.1E-09	1.8E-09	6.7E-09	5.3E-09	8.5E-09
		A0110055F03	>1E-07			/	/	/

正如预期的那样,

未标记的A0110056A10与A0110056A10-Alexa647竞争结合MOLM-13细胞上的CD123和转染的CHO Flp-In细胞上表达的人CD123。纳米抗体A0110055F03不与A0110056A10-Alexa647竞争结合人CD123转染的CHO Flp-In细胞上的CD123。在MOLM-13细胞系上,A0110055F03仅在测试的最高浓度下与A0110056A10-Alexa647竞争。

[1514] 实施例17:流式细胞术中,与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争结合细胞上表达的CD123

[1515] 为了检查抗CD123纳米抗体是否与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争结合细胞上的人CD123,使用如实施例16中所述的基于流式细胞术的方法进行小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争测定。为此,将纳米抗体的连续稀释液和EC30浓度的APC标记的小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)(BD Biosciences, 560087)与细胞一起温育90分钟,之后在流式细胞术中确定抗体结合。APC标记的小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)与MOLM-13和人CD123转染的CHO Flp-In细胞的结合曲线描绘于图17中。

[1516] 竞争实验的结果显示在图18中。从剂量响应曲线获得的IC₅₀值描述于表C-11中。

[1517] 表C-11:小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争测定中,单价抗CD123纳米抗体的

IC₅₀ (M)。

[1518]		MOLM-13			CHO Flp-In 人 CD123		
		样品 ID	IC ₅₀ (M)	95% LCI	95% UCI	IC ₅₀ (M)	95% LCI
		A0110056A10	1.1E-09	1.1E-09	1.2E-09	6.5E-09	6.1E-09
		A0110055F03	4.8E-07	1.8E-07	1.2E-06		6.9E-09

[1519] 在MOLM-13和人CD123转染的CHO Flp-In细胞上,纳米抗体A0110056A10显示与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争;因此,小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)和纳米抗体A0110056A10的表位至少部分重叠。在MOLM-13细胞上,A0110055F03与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争。在人CD123转染的CHO Flp-In细胞系上不存在与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)的竞争,这可能是纳米抗体A0110055F03对人CD123的较低亲和力的结果。

[1520] 实施例18:在ELISA中,与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争结合重组人CD123

[1521] 为了研究抗CD123纳米抗体是否与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争结合重组人CD123蛋白,使用基于ELISA的方法进行竞争测定。简言之,将小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)(BD Biosciences,554527)以1 μ g/ml包被在PBS中。在4℃温育过夜后,在室温下用酪蛋白(在PBS中1%)封闭平板。接下来,加入单价抗CD123纳米抗体和4nM内部生物素化的CD123重组蛋白(R&D Systems,301-R3/CF)的连续稀释液,并在室温下在PBS+0.1%酪蛋白+0.05%Tween中温育1小时。内部生物素化的CD123重组蛋白的浓度基于EC30值,该EC30值是从内部生物素化的CD123重组蛋白与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)的结合获得的(结合曲线描绘于图19)。将未包被的小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)作为阳性对照,不相关的抗卵溶菌酶纳米抗体cAbLys作为阴性对照。使用Tecan Hydrospeed洗涤器,用PBS+0.05%Tween洗涤平板,在PBS+0.1%酪蛋白+0.05%Tween中,通过1 μ g/ml胞外过氧化物酶(extravidine peroxidise)(Sigma,E2886)检测7G3相关的生物素化CD123,然后用esTMB底物显色。用1M HC1终止反应,并使用Tecan Infinite M1000测量OD450nm处的吸收。

[1522] 结果显示在图20中。从剂量响应曲线获得的IC₅₀值描述于表C-12中。

[1523] 表C-12:7G3竞争ELISA中,单价纳米抗体A0110056A10的IC₅₀ (M)。

[1524]	样品ID	IC ₅₀ (M)	95% LCI	95% UCI
	A0110056A10	3.1E-09	1.5E-09	6.5E-09

[1525] 在A0110056A10和小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)之间观察到竞争结合重组人CD123蛋白。A0110055F03不与小鼠单克隆抗CD123抗体(克隆7G3)竞争结合重组人CD123蛋白。

[1526] 实施例19:单价抗CD123纳米抗体与人CD123蛋白的结合(SPR)

[1527] 在ProteOn XPR36仪器上,通过基于SPR的测定评价纯化的CD123特异性纳米抗体对人CD123的结合亲和力。此外,使用EDC和NHS化学,通过胺偶联将重组CD123(R&D Systems,301-R3-025/CF)固定在CM5芯片上。通过一步动力学方法将纯化的纳米抗体以不同浓度(4.2nM和1000nM之间)注射2分钟用于动力学分析。流速为45 μ l/min,ProteOn运行缓冲液(PBS,pH 7.4,0.005%Tween 20)用作运行缓冲液。1000nM样品的解离时间为15分钟。通过拟合1:1相互作用模型(Langmuir结合模型)进行缔合/解离数据的评价。

[1528] 表C-13:使用直接包被的人CD123蛋白,在Proteon中测定的单价抗CD123纳米抗体的结合特性。

[1529]

样品ID	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
A0110056A10	5.3E+05	7.9E-04	1.5E-09
A0110055F03	2.5E+04	3.9E-03	1.6E-07

[1530] 单价抗CD123纳米抗体与人CD123结合的KD值与细胞上的结合数据相关。与A0110055F03相比,A0110056A10具有更好的亲和力。

[1531] 实施例20:CD123/TCR多特异性多肽和对照多肽的构建

[1532] 为了获得能够与T细胞接合的多肽,将CD123纳米抗体与抗TCR (T细胞受体) 纳米抗体T0170056G05 (SEQ ID NO:42) 连接。后者是特异性结合TCRa/β恒定结构域的纳米抗体。(参见由Ablynx N.V于2016年5月13日提交的题为“T cell recruiting polypeptides based on TCR alpha/beta reactivity”的WO 2016/180969)。

[1533] T细胞接合多肽的治疗活性可以通过同时靶向肿瘤相关抗原上的多个表位来改善。肿瘤细胞不仅可以通过在治疗中下调靶向抗原来产生逃逸机制,而且还可以通过引入(点-)突变来产生逃逸机制。同时靶向抗原上的多个表位可能会降低产生肿瘤逃逸变体的可能性。此外,靶向单个抗原上的多个表位可以增加结合的亲和力(亲合力效应)。对于该多价肿瘤抗原靶向概念,对CD123抗原具有反应性的两个纳米抗体与针对TCR/CD3复合物的纳米抗体T0170056G05连接。

[1534] 各种纳米抗体的特定顺序在格式内变化。效应子和肿瘤纳米抗体与35GS接头遗传连接,随后根据标准方案在酵母菌毕赤酵母中表达(多特异性多肽)。平行地,通过用不相关的抗卵溶菌酶纳米抗体cAbLys或抗RSV纳米抗体RSV007B02 (Q108L) 替换一种或两种肿瘤反应性纳米抗体来产生无关多肽。

[1535] 产生的多肽列于表C-14中。

[1536] 表C-14:多特异性多肽的样品ID和描述。

样品 ID	SEQ ID NO*	描述
T017000113	46	A0110055F03-35GS-cAbLys3(D1E,Q5V,A6E,Q108L)-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000114	47	A0110055F03-35GS-A0110056A10-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000115	48	A0110056A10-35GS-cAbLys3(D1E,Q5V,A6E,Q108L)-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000116	49	A0110056A10-35GS-A0110055F03-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000120	50	cAbLys3(D1E,Q5V,A6E,Q108L)-35GS-A0110055F03-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000121	51	cAbLys3(D1E,Q5V,A6E,Q108L)-35GS-A0110056A10-35GS-T0170056G05-FLAG3-HIS6
T017000125	42	T0170056G05-HIS6
T017000126	52	A0110055F03(E1D)-35GS-A0110056A10-35GS-T0170056G05-A
T017000128	53	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110056A10-A
T017000129	54	T0170056G05(E1D)-35GS-RSV007B02(Q108L)-A
T017000130	55	A0110056A10(E1D)-35GS-A0110055F03-35GS-T0170056G05-A
T017000131	56	A0110056A10(E1D)-35GS-T0170056G05-A
T017000132	57	RSV007B02(E1D,Q108L)-35GS-T0170056G05-A
T017000134	58	A0110056A10(E1D)-35GS-T0170056G05-35GS-A0110055F03-A
T017000135	59	A0110055F03(E1D)-35GS-T0170056G05-35GS-A0110056A10-A
T017000138	60	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110056A10-35GS-A0110055F03-A
T017000139	61	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110055F03-35GS-A0110056A10-A

[1538] *SEQ ID NO对应于没有C端标签或A1a延伸的多特异性多肽的序列。

[1539] 实施例21:在流式细胞术中,A0110056A10和多特异性CD123/TCR多肽之间竞争结合细胞上表达的CD123

[1540] 如实施例16中所述,在A0110056A10竞争测定中评价CD123/TCR多特异性多肽与人或食蟹猴CD123的结合。在与MOLM-13和CHO F1p-In huCD123细胞结合之后,评价与食蟹猴CD123转染的HEK F1p-In细胞的结合。

[1541] 为此,一批A0110056A10用Alexa647标记并冷冻。接下来,收获细胞并转移至V底96孔板(1×10^5 个细胞/孔),并与多特异性结合多肽的连续稀释液(从 $1 \mu\text{M}$ 开始)和固定浓度的A0110056A10-Alexa647混合。测定中使用的浓度(对于MOLM-13为 0.4nM ,对于CHO F1p-In人CD123和HEK F1p-In食蟹猴CD123为 0.9nM)低于A0110056A10-Alexa647与各自细胞结合的EC50值(结合曲线描绘于图21中)。在 4°C 温育90分钟后,如实施例16所述,在流式细胞术中确定A0110056A10-Alexa647的结合。A0110056A10和T017000129分别作为阳性和阴性对照,。

[1542] 结果显示在图22中。从剂量响应曲线获得的 IC_{50} 值描述于表C-15和表C-16中。

[1543] 表C-15:在MOLM-13细胞上,A0110056A10纳米抗体竞争测定中CD123/TCR多特异性多肽和对照的 IC_{50} (M)。

样品 ID	MOLM-13		
	IC_{50} (M)	95% LCI	95% UCI
T017000121	2.6E-08	2.2E-08	3.1E-08
T017000128	3.1E-09	2.6E-09	3.6E-09
T017000138	3.5E-09	3.0E-09	4.1E-09
T017000139	3.7E-09	3.1E-09	4.4E-09
T017000116	1.8E-09	1.5E-09	2.2E-09
A0110056A10	1.1E-09	8.7E-10	1.3E-09

[1545] 表C-16:在CD123转染的细胞上,A0110056A10纳米抗体竞争测定中CD123/TCR多特异性多肽和对照的IC₅₀ (M)。

[1546]	HEK Flp-In cyCD123 转染的细胞			CHO Flp-In huCD123 转染的细胞			
	样品 ID	IC ₅₀ (M)	95% LCI	95% UCI	IC ₅₀ (M)	95% LCI	95% UCI
	T017000121	1.1E-07	9.6E-08	1.3E-07	2.3E-08	1.9E-08	2.7E-08
	T017000128	3.1E-08	2.6E-08	3.6E-08	5.8E-09	5.4E-09	6.2E-09
[1547]	T017000138	1.2E-08	1.0E-08	1.4E-08	3.6E-09	2.8E-09	4.6E-09
	T017000139	1.1E-08	9.6E-09	1.3E-08	3.3E-09	2.7E-09	4.1E-09
	T017000116	5.6E-09	4.8E-09	6.4E-09	1.6E-09	1.4E-09	1.9E-09
	A0110056A10	7.0E-09	6.1E-09	8.1E-09	1.9E-09	1.7E-09	2.3E-09

[1548] 所有测试的多特异性多肽显示与人和食蟹猴CD123表达细胞结合,证实人食蟹猴CD123交叉反应。对于A0110056A10不在N端位置的多肽,观察到亲和力的小幅下降。

[1549] 实施例22:在流式细胞术中,T0170056G05和CD123/TCR多特异性多肽之间竞争结合细胞上表达的人TCR/CD3

[1550] 通过流式细胞术在T0170056G05竞争测定中,评价CD123/TCR多特异性多肽与人TCR/CD3的结合。为此,将大批T0170056G05用生物素标记并冷冻。接下来,收获CHO-K1人TCR/CD3表达细胞并转移至V底96孔板(1×10^5 个细胞/孔),并与多特异性结合多肽的连续稀释液(从 $1\mu\text{M}$ 开始)和固定浓度的生物素化的T0170056G05在FACS缓冲液中混合。测定中使用的生物素化的T0170056G05的浓度(30nM)低于与细胞结合的EC50值(数据未显示)。在4°C温育90分钟后,在流式细胞术中确定生物素化的T0170056G05纳米抗体的结合。此外,洗涤细胞3次,并在FACS缓冲液中重悬于链霉亲和素-PE(ebioscience,12-4317-87,1000倍稀释)中,并在4°C温育30分钟。然后,将细胞洗涤3次,并在FACS缓冲液+ $1\mu\text{g}/\text{mL}$ TOPRO(Molecular Probe,T3605)中于4°C重悬浮30分钟,然后通过BD FACSCanto进行分析。首先,基于FSC-SSC分布,选择代表多于80%的总细胞群的的P1群。在P1内计数10000个细胞。从该群体中排除TOPRO+细胞(死细胞),并计算中值PE值。将T0170056G05作为阳性对照。

[1551] 结果显示在图23中。从剂量响应曲线获得的IC₅₀值描述于表C-17中。

[1552] 表C-17:T0170056G05竞争测定中,CD123/TCR多特异性多肽和对照纳米抗体的IC₅₀ (M)。

[1553]	CHO-K1 huTCR/CD3			
	样品 ID	IC ₅₀ (M)	95% LCI	95% UCI
	T017000138	5.9E-08	5.5E-08	6.4E-08
	T017000139	4.9E-08	4.5E-08	5.2E-08
	T017000129	1.8E-07	1.7E-07	1.9E-07
	T017000128	5.7E-08	5.3E-08	6.1E-08
[1554]	T017000116	>1E-07		
	T0170056G05	5.5E-08	5.2E-08	5.9E-08

[1555] 证实了CD123/TCR多特异性多肽与细胞上表达的人TCR/CD3的结合。由于TCR纳米抗体的C端位置,观察到CD123/TCR多特异性多肽T017000116与单价TCR纳米抗体的亲和力下降。

[1556] 实施例23:流式细胞术中,T017000099和CD123/TCR多特异性多肽之间对在细胞上表达的食蟹猴TCR/CD3的竞争结合

[1557] 在流式细胞术中,在T01700099(二价T0170056G01,SEQ ID NO:337)竞争测定中,评价CD123/TCR多特异性多肽与食蟹猴TCR/CD3的结合。为此,收获HSC-F (JCRB, JCRB1164) 食蟹猴TCR/CD3表达细胞并转移至V底96孔板 (1×10^5 细胞/孔), 并与CD123/TCR多特异性多肽的连续稀释液(从 $1 \mu\text{M}$ 开始) 和500nM T01700099在FACS缓冲液中混合。在4°C温育90分钟后, 通过离心将细胞用FACS缓冲液洗涤3次, 并用 $1 \mu\text{g}/\text{mL}$ 单克隆小鼠ANTI-FLAG® M2抗体 (Sigma-Aldrich, F1804) 在4°C探测30分钟, 以检测结合的T01700099。用 $5 \mu\text{g}/\text{mL}$ 别藻蓝蛋白 (APC) AffiniPure山羊抗小鼠IgG (Jackson Immunoresearch, 115-135-164) 在4°C下进行检测30分钟。洗涤细胞并与碘化丙啶一起温育以染色死细胞, 其中死细胞随后在门控过程中被除去。然后通过BD FACSArray分析细胞。首先, 基于FSC-SSC分布, 选择代表多于80%的总细胞群的P1群。在该门中, 在获取期间计数10000个细胞。从该群体中排除PI+细胞(死细胞), 并计算中值APC值。T017000125作为阳性对照。

[1558] 结果显示在图24中。从剂量响应曲线获得的 IC_{50} 值描述于表C-18中。

[1559] 表C-18: T017000099竞争测定中, CD123/TCR多特异性多肽和对照纳米抗体的 IC_{50} (M)。

样品 ID	HSC-F		
	IC_{50} (M)	95% LCI	95% UCI
T017000125	3.7E-07	2.5E-07	5.3E-07
T017000128	6.3E-07	4.4E-07	8.8E-07
T017000129	5.2E-07	3.7E-07	7.2E-07
T017000138	4.4E-07	3.2E-07	6.2E-07
T017000139	6.4E-07	4.5E-07	9.2E-07

[1561] 对于在N端具有TCR结合纳米抗体的所有CD123/TCR多特异性多肽, 观察到与食蟹猴TCR/CD3的结合。

[1562] 实施例24: 单价纳米抗体和多特异性多肽与人CD123蛋白的结合 (SPR)

[1563] 在ProteOn XPR36仪器上, 通过基于SPR的亲和力测定评价CD123/TCR多特异性多肽的结合亲和力。此外, 使用EDC和NHS化学, 通过胺偶联将重组CD123 (R&D Systems, 301-R3-025/CF) 固定在CM5芯片上。通过一步动力学方法将纯化的纳米抗体以不同浓度(在 4.2nM 和 1000nM 之间) 注射2分钟用于动力学分析。 1000nM 样品的解离时间为15分钟。流速为 $45 \mu\text{l}/\text{min}$, ProteOn运行缓冲液 (PBS, pH 7.4, 0.005% Tween 20) 用作运行缓冲液。通过拟合1:1相互作用模型 (Langmuir结合模型) 进行缔合/解离数据的评价。结合特性列于表C-19中。

[1564] 表C-19: 使用直接包被的人CD123蛋白, 在Proteon中测定的多特异性多肽的结合特性。

样品 ID	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	
T017000120	1.5E+04	2.5E-03	1.7E-07	由于先前多肽的不完全再生(T017000116), 数值仅作参考
T017000121	4.0E+04	8.6E-04	2.2E-08	
T017000113	2.0E+04	3.2E-03	1.6E-07	
T017000115	3.3E+05	5.1E-04	1.5E-09	
T017000114	8.4E+04	1.9E-04	2.3E-09	
T017000116	2.4E+05	2.1E-04	8.8E-10	

[1566] 单价纳米抗体和多特异性多肽对人IL-3R α 的KD与细胞上的结合数据相关。含有两个IL-3R α 结构单元的多肽T017000116具有最佳的KD。

[1567] 实施例25:在基于流式细胞术的测定中,通过CD123/TCR多特异性多肽,重定向人T细胞介导的CD123靶细胞的杀伤

[1568] 为了评价CD123/TCR多特异性多肽是否能够杀死肿瘤细胞,用分离的人T细胞作为效应细胞进行细胞毒性测定。

[1569] 此外,使用RosetteSep (StemCell Technologies, 15061) 从来自健康志愿者的血沉棕黄层 (Buffy Coat) 血液 (根特血库) 中收集人T细胞,然后根据制造商的说明书在 Ficoll-PaqueTM PLUS (GE Healthcare #17-1440-03) 上富集。在流式细胞术测定中,用抗CD3 (eBioscience, 12-0037-73) 、抗CD8 (BDBiosciences, 555367) 、抗CD4 (BD Biosciences, 345771) 、抗CD45R0 (BD Biosciences, 555493) 、抗CD45RA (BDBiosciences, 550855) 、抗CD19 (BDBiosciences, 555413) 、抗CD25 (BDBiosciences, 557138) 和抗CD69 (BDBiosciences, 557050) 荧光标记的抗体检查纯化的人T细胞的质量和纯度。将细胞在液氮中冷冻。

[1570] 使用PKH26红色荧光细胞接头试剂盒 (Sigma, PKH26GL-1KT) ,根据制造商的说明,将表达人CD123的MOLM-13和KG1a细胞用8 μ M PKH-26膜染料标记,并用作靶细胞。将2.5 \times 10⁵效应细胞 (即人原代T细胞) 和2.5 \times 10⁴靶细胞 (即PKH标记的MOLM-13或KG1a细胞) 在96孔V底板中共温育 (效应细胞与靶细胞比例为10:1) 。为了测量浓度依赖性细胞溶解,将CD123/TCR多特异性多肽的连续稀释液加入细胞中,并在5% CO₂环境中于37°C温育18小时。将纳米抗体A0110056A10和多肽T017000129和T017000132作为阴性对照。温育后,通过离心沉淀细胞并用FACS缓冲液洗涤。随后,将细胞重悬于补充有5nM TOPRO3 (Molecular Probe, T3605) 的FACS缓冲液中,以区分活细胞和死细胞。使用FACS阵列流式细胞仪 (BD Biosciences) 分析细胞。每个样品,获得80 μ l的总样品体积。在PKH26阳性细胞上设定门控,并在该群体内测定TOPRO3阳性细胞。将T017000129、T017000132和A0110056A10作为阴性对照。

[1571] 对于MOLM-13和KG1a细胞,示例性结果分别显示在图25和图26中。对于MOLM-13和KG1a细胞,EC₅₀值分别描述于表C-20和表C-21中。

[1572] 表C-20:在基于流式细胞术的测定中,重定向的人T细胞介导的MOLM-13细胞杀伤的CD123/TCR多特异性多肽的EC50 (M) 和%溶解。

样品ID	EC50 (M)	95%LCI	95%UCI	%溶解
T017000116	2.2E-10	1.1E-10	4.5E-10	17
T017000128	1.5E-10	9.4E-11	2.5E-10	20
T017000135	1.1E-11	8.1E-12	1.5E-11	33

T017000138	2.3E-11	1.5E-11	3.7E-11	22
T017000139	2E-11	1.4E-11	2.9E-11	29
T017000134	3E-10	1E-10	9.2E-10	9

[1574] 表C-21:在基于流式细胞术的测定中,重定向的人T细胞介导的KG1a细胞杀伤的CD123/TCR多特异性多肽的EC50 (M) 和%溶解。

样品ID	EC50 (M)	95%LCI	95%UCI	%溶解
T017000114	2.4E-10	1.5E-10	3.6E-10	7
T017000116	4.2E-10	2.4E-10	7.3E-10	5
T017000128	8.7E-10	7.0E-10	1.1E-09	28
T017000135	5.1E-11	4.1E-11	6.5E-11	18
T017000138	2.8E-10	2.2E-10	3.4E-10	24
T017000139	1.1E-10	8.5E-11	1.3E-10	27

[1576] CD123/TCR多特异性多肽诱导人T细胞介导的CD123阳性细胞系的杀伤。显然优选TCR纳米抗体在多特异性多肽中的位置。通常,在N端位置具有抗TCR纳米抗体的多肽显示出最佳的杀伤潜力。与仅具有一个CD123纳米抗体的多肽T017000128相比,具有两个CD123反应性纳米抗体的多肽T017000135、T017000138和T017000139显示出改善的效力。这些结果证明CD123/TCR多特异性多肽可以诱导T细胞介导的肿瘤靶标阳性细胞系的杀伤,并且在单个抗原上靶向多个表位改善了功能性(亲合力效应)。

[1577] 此外,多肽T017000138和T017000139(均是在N端位置具有TCR反应性纳米抗体的三价多肽)的比较显示了CD123纳米抗体的取向对效力和功效有影响。

[1578] 单价CD123结构单元和含有TCR结构单元的无关多肽不诱导任何靶细胞杀伤,证实需要将T细胞和靶细胞与多特异性CD123/TCR多肽交联以诱导杀伤。

[1579] 使用来自不同供体的纯化的T细胞确认结果(数据未显示)。

[1580] 实施例26:在基于流式细胞术的测定中,通过多特异性CD123/TCR多肽,重定向的食蟹猴T细胞介导的CD123靶细胞的杀伤

[1581] 为了证实CD123/TCR多特异性多肽的人-食蟹猴TCR交叉反应性,在食蟹猴T细胞介导的CD123阳性肿瘤细胞杀伤测定中评价多肽。简言之,在 2.5×10^5 效应细胞(即食蟹猴原代T细胞)存在下,将多特异性多肽与 2.5×10^4 PKH标记的靶细胞(即MOLM-13或KG1a细胞)温育,对应于效应细胞与靶细胞的比率(E:T比率)为10:1,如实施例25中所述。使用Pan T细胞分离试剂盒(MACS, 130-091-993),通过Pharmacology and Toxicology GmbH&Co.KG的LPT实验室将T细胞分离。将纳米抗体A0110056A10和多肽T017000129和T017000132作为阴性对照。

[1582] 对于MOLM-13和KG1a细胞,示例性结果分别显示在图27和图28中。对于MOLM-13和KG1a细胞,EC₅₀值分别描述于表C-22和表C-23中。

[1583] 表C-22:在基于流式细胞术的测定中,重定向的食蟹猴T细胞介导的MOLM-13细胞杀伤的CD123/TCR多特异性多肽的EC50 (M) 和%溶解。

样品ID	EC50 (M)	95%LCI	95%UCI	%溶解
T017000116	3.9E-10	2.4E-10	6.2E-10	15
T017000128	1.8E-10	1.5E-10	2.3E-10	50

T017000138	1.7E-11	1.3E-11	2.2E-11	47
T017000139	1.1E-11	8.9E-12	1.4E-11	55

[1585] 表C-23:在基于流式细胞术的测定中,重定向的食蟹猴T细胞介导的KG1a细胞杀伤的CD123/TCR多特异性多肽的EC50 (M) 和%溶解。

1586	样品ID	EC50 (M)	95%LCI	95%UCI	%溶解
	T017000114	1.9E-10	1.3E-10	2.8E-10	7
	T017000116	3.7E-10	2.9E-10	4.7E-10	14
	T017000128	3.2E-10	2.7E-10	3.7E-10	38
	T017000135	2.4E-11	2.0E-11	2.9E-11	22
	T017000138	8.8E-11	7.6E-11	1.0E-10	38
	T017000139	2.6E-11	2.3E-11	3.0E-11	42

[1587] 除T017000134外,所有CD123/TCR多特异性多肽均诱导食蟹猴T细胞介导的CD123阳性MOLM-13或KG1a细胞系的杀伤。在N端位置具有TCR反应性纳米抗体的多肽是最有效力或功效的。与含有仅一个CD123反应性纳米抗体的多肽T017000128相比,多肽T017000138和T017000139(均为具有两个CD123反应性纳米抗体的三价多肽)均显示出改善的效力。单价抗CD123纳米抗体和含有TCR结构单元的无关多肽不诱导任何靶细胞杀伤,证实需要将T细胞和靶细胞与多特异性CD123/TCR多肽交联以诱导杀伤。

[1588] 使用来自不同食蟹猴的纯化的T细胞确认结果(数据未显示)。

[1589] 实施例27:在重定向的食蟹猴T细胞介导的CD123靶细胞杀伤期间,通过CD123/TCR多特异性多肽的食蟹猴T细胞活化

[1590] 为了监测用多特异性CD123/TCR多肽处理食蟹猴T细胞和CD123阳性MOLM-13细胞后的T细胞活化,在 2.5×10^5 原代T存在的情况下,将多肽与 2.5×10^4 个靶细胞在37°C温育72小时(E:T=10:1),如实施例26中所述。在流式细胞术中,通过监测CD4/CD8 T细胞群上的CD25上调来测量食蟹猴T细胞活化。

[1591] 另外,在72小时温育后,通过离心收集效应细胞和靶细胞,并将其悬浮在含有25 μ g/ml人Fc block(BD Bioscience,564220)的FACS缓冲液中,并在室温(RT)温育10分钟。接下来,在FACS缓冲液中,用单克隆小鼠抗CD4-APC(Biolegend,300505)(200倍稀释)、单克隆小鼠抗CD8 APC(BDBiosciences,555366)(50倍稀释)和单克隆抗CD25 PE(BD Biosciences,557138)(50倍稀释)抗体在4°C下将细胞染色30分钟。温育后,通过离心沉淀细胞并用FACS缓冲液洗涤。随后,将细胞重悬于FACS缓冲液中,并使用FACS Canto流式细胞仪(BD Biosciences)进行分析。每个样品,获得30 μ l的总样品体积。基于SSC-APC图对T细胞进行门控。从该群体中计算平均PE值。

[1592] 数据显示在图29中。对于T017000139获得的EC₅₀值描述于表C-24中。

[1593] 表C-24:在基于流式细胞术的测定中,在重定向的食蟹猴T细胞介导的MOLM-13细胞杀伤期间,通过T017000139,食蟹猴T细胞上CD25上调的EC50 (M)。

1594	样品ID	EC50 (M)	95%LCI	95%UCI
	T017000139	6.0E-11	5.1E-11	7.1E-11

[1595] 当T细胞与CD123阳性MOLM-13靶细胞和单价TCR或CD123结合结构单元T0170056G05、A0110055F03或A0110056A10或无关多价多肽T017000129一起温育时,未观察

到CD25上调。在与CD123阳性MOLM-13靶细胞和T017000139多特异性多肽温育后,数据显示食蟹猴原代T细胞上的CD25上调。

[1596] 以剂量依赖性方式杀死MOLM-13细胞(图25,表C-22),表明了多特异性CD123/TCR结合多肽在重定向杀伤期间诱导T细胞活化。

[1597] 同样地,当与靶细胞和单价结构单元和不相关的多特异性多肽一起温育时,T细胞未被活化,这表明需要将T细胞和靶细胞与TCR/CD123多特异性多肽交联以诱导CD25上调。

[1598] 实施例28:在基于xCELLigence的测定中,通过多特异性CD123/TCR结合多肽,重定向的人T细胞介导的CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤

[1599] 在基于xCELLigence的测定中,表征TCR/CD123结合多肽用于重定向的人T细胞介导的人CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤。在该测定中,测量由靶细胞粘附到电极表面诱导的阻抗的波动。T细胞是非粘附的,因此不会影响阻抗测量。xCELLigence仪器(Roche)定量电阻抗的变化,将它们显示为称为细胞指数的无量纲参数,其与细胞覆盖的组织培养孔的总面积成正比。简言之,将xCELLigence站置于37°C的5%CO₂培养箱中。将50μl测定培养基加入到E-平板96(ACEA Biosciences;05232368001)的每个孔中,并在xCELLigence系统上进行空白读数,以测量不存在细胞时的背景阻抗。随后,将2×10⁴人CD123转染的CHO F1p-In或CHO F1p-In参照细胞接种到E-板96上,并加入50μl连续稀释的多特异性多肽。在室温下30分钟后,每孔加入50μl人T细胞(3×10⁵),以具有15:1的效应细胞与靶细胞比率。将平板置于xCELLigence站中,每15分钟测量阻抗,持续3天。使用结果中指示的固定时间点分析数据。

[1600] 在该测定中获得的IC₅₀值列于表C-25中。结果描绘于图30、图31和图32中。

[1601] 表C-25:在基于xCELLigence的测定中,使用15比1效应细胞比靶细胞比率,在接种后50小时进行分析,用于重定向的人T细胞介导的人CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤的T013700139的IC₅₀(M)。

[1602]	样品ID	IC ₅₀ (M)	95%LCI	95%UCI
	T017000139	2.4E-10	2.0E-10	2.8E-10

[1603] 获得的数据证实了在基于流式细胞术的杀伤测定中获得的结果,即CD123/TCR多特异性多肽可以诱导人T细胞介导的CD123阳性细胞系的杀伤(图30),并且在不存在T细胞的情况下没有观察到杀伤活性(图32)。此外,仅当存在CD123肿瘤靶抗原时,才观察到T细胞介导的杀伤(参见图31,用参考细胞系没有杀伤),表明多特异性多肽严重依赖于其用于诱导细胞毒性的靶标。

[1604] 单价纳米抗体A0110056A10和T0170056G05以及无关多肽T017000129不诱导靶细胞杀伤,证实需要将T细胞和靶细胞与多特异性CD123/TCR结合多肽交联以诱导杀伤。

[1605] 使用来自不同供体的纯化的T细胞确认结果(数据未显示)。

[1606] 实施例29:在基于xCELLigence的测定中,通过多特异性CD123/TCR结合多肽,重定向的食蟹猴T细胞介导的CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤

[1607] 为了证实多特异性多肽的交叉反应性,如实施例28中所述,在基于xCELLigence的测定中,在重定向的食蟹猴T细胞介导的食蟹猴CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤中评价所述多肽。

[1608] 在该测定中获得的IC50值列于表C-26中。结果描绘于图33、图34和图35中。

[1609] 表C-26:在基于xCELLigence的测定中,使用15比1的效应细胞比靶细胞比率,在接种后80小时进行分析,用于重定向的食蟹猴T细胞介导的食蟹猴CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤的T013700139的IC₅₀ (M)。

[1610]

样品ID	IC ₅₀ (M)	95% LCI	95% UCI
T017000139	1.1E-11	2.7E-12	4.8E-11

[1611] CD123/TCR多特异性多肽T017000139可诱导食蟹猴T细胞介导的CD123阳性细胞系的杀伤(图33),并且在不存在T细胞时未观察到杀伤活性(图35)。此外,仅当存在食蟹猴CD123肿瘤靶抗原时,才观察到T细胞介导的杀伤(图34),这表明多特异性多肽严重依赖于其用于诱导细胞毒性的靶标。

[1612] 单价纳米抗体A0110056A10和T0170056G05以及无关多肽T017000129不诱导靶细胞杀伤,证实需要将T细胞和靶细胞与多特异性CD123/TCR结合多肽交联以诱导杀伤。

[1613] 在基于xCELLigence的杀伤测定中证实了多特异性多肽T017000139的人-食蟹猴CD123和TCR交叉反应性。

[1614] 使用来自不同供体的纯化的T细胞确认结果(数据未显示)。

[1615] 实施例30:重定向杀伤期间,多特异性CD123/TCR结合多肽对细胞因子产生的影响

[1616] 基于xCELLigence测定,在人和食蟹猴T细胞介导的CD123杀伤期间,监测细胞因子释放的诱导。通过ELISA测量细胞因子IFN- γ 和IL-6的释放。简言之,在存在纯化的人或食蟹猴原代T细胞(3×10^5 细胞/孔)和多特异性TCR/CD123结合多肽连续稀释液(从125nM开始)或固定浓度(125nM)的无关多肽的情况下,将人CD123转染的CHO-K1细胞(2×10^4 细胞/孔)接种在E-平板96中,如实施例28中所述。在将人或食蟹猴原代T细胞/多肽加入平板后72小时,在上清液中测量通过人原代T细胞的人IFN- γ 和人IL-6的产生和通过食蟹猴原代T细胞的食蟹猴IFN- γ 产生。

[1617] 根据制造商的说明书,使用人IL-6Quantikine ELISA试剂盒(R&Dsystems, D6050)在ELISA中测量人IL-6的释放。如下测定IFN- γ 的释放:Maxisorp 96孔ELISA板(Nunc)分别用抗人IFN- γ 抗体(BDBiosciences, 551221)、抗食蟹猴IFN- γ 抗体(Biolegend, 507502)包被。温育过夜后,洗涤板并用PBS+2% BSA在室温下封闭1小时。接下来,将平板与100 μ l上清液(2倍稀释)和1 μ g/ml生物素化的抗IFN- γ 抗体(BD Biosciences, 554550)温育2小时30分钟,同时摇动,再次洗涤并与链霉亲和素-HRP(Dakocytomation, P0397)温育。30分钟后,加入TMB One溶液(Promega, G7431)。用2M H₂SO₄终止反应,并使用Tecan sunrise 4通过测量405nm处的OD来确定IFN- γ 的多肽剂量依赖性产生。

[1618] IFN- γ 的结果显示在图36中。IL-6的结果显示在图37中。在这些测定中获得的EC50值列于表C-27和表C-28中。

[1619] 表C-27:在基于xCELLigence的测定中,在重定向的T细胞介导的CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤期间,用于IFN- γ 分泌的TCR/CD123结合多肽的EC50 (M)。

[1620]

样品 ID	人 T 细胞			食蟹猴 T 细胞		
	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000128	8.6E-11	6.6E-11	1.1E-10	1.0E-10	3.7E-11	2.9E-10
T017000135	2.0E-09	1.3E-09	3.1E-09	/	/	/
T017000138	4.0E-10	2.3E-10	7.0E-10	8.7E-10	2.1E-10	3.6E-09
T017000139	1.0E-09	5.9E-10	1.9E-09	2.3E-09	7.8E-10	6.6E-09

[1621]	T017000116	8.1E-09	4.6E-09	1.4E-08	/	/	/
--------	------------	---------	---------	---------	---	---	---

[1622] 表C-28:在基于xCELLigence的测定中,在重定向的人T细胞介导的CD123转染的贴壁靶细胞的杀伤期间,用于人IL-6分泌的TCR/CD123结合多肽的EC50 (M)。

样品 ID	人 T 细胞		
	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
T017000128	6.9E-11	3.8E-11	1.3E-10
T017000135	5.9E-10	3.0E-10	1.2E-09
T017000138	3.8E-11	1.8E-11	8.1E-11
T017000139	4.8E-10	2.6E-10	9.0E-10
T017000116	9.6E-09	5.6E-09	1.6E-08

[1624] 当过表达CD123的CHO Flp-In细胞和原代T细胞与CD123/TCR结合多肽温育时,观察到细胞因子的产生。无关多肽T017000129和T017000132不诱导细胞因子产生。

[1625] 实施例31:在健康PBMC中,通过多特异性CD123/TCR多肽,重定向的自体T细胞浆细胞样树突细胞(pDC)和嗜碱性粒细胞的消耗

[1626] 将冷冻保存的外周血单核细胞(PBMC)解冻并用测定培养基(RMPI 1640+10%FBS)洗涤。在96孔V底平板中,将 2×10^5 个PBMC与多特异性多肽的连续稀释液在200 μ L测定培养基中温育,并在37°C在5%CO₂培养箱中温育。在指定的时间点,在4°C将细胞用单克隆小鼠抗CD14-APC(Biolegend,301808)、抗CD16-APC(Biolegend,302012)、抗CD19-APC(Biolegend,302212)、抗CD20-APC(Biolegend,302312)、抗CD56-APC(Biolegend,318310)、抗CD123-PE(Biolegend,306006)和抗HLA-DR-FITC(Biolegend,307603)抗体染色。简而言之,收获细胞并用FACS缓冲液(来自Gibco的D-PBS,具有来自Sigma的10%FBS和来自Merck的0.05%叠氮化钠)洗涤一次,并在室温下重悬于0.5 μ g/ml的25 μ l人BD Fc Block(BD BD Biosciences,564220,1000倍稀释)中10分钟。接下来,加入25 μ l抗体,并根据制造商的说明在4°C下温育30分钟。将含有PBMC的单独孔重悬于补充有5nM TOPRO3(Molecular Probe针,T3605)的FACS缓冲液中,以区分活细胞群和死细胞群。将样品洗涤3次,重悬于FACS缓冲液(来自Gibco的D-PBS,具有来自Sigma的10%FBS和来自Merck的0.05%叠氮化钠)中,然后通过装备有FACSDiva软件的FACS Canto(BD)细胞计数器进行分析。每个样品,获得75 μ l的总样品体积。使用FACSDiva和流动软件进行数据分析。

[1627] 基于含有TOPRO染色的孔,设定门控以排除死细胞。将人和食蟹猴pDC和嗜碱性粒细胞鉴定为谱系标记物(CD16、CD20、CD19、CD56)阴性/CD123阳性群体。

[1628] 结果描绘于图38中。

[1629] 在5小时的温育时间后,观察到CD123/TCR多特异性多肽分别对人或食蟹猴CD123阳性群体的消耗。当靶向纳米抗体被无关的纳米抗体取代时,未观察到CD123阳性群体的消耗,表明需要将T细胞和靶细胞与TCR/CD123多特异性多肽交联以诱导消耗。

[1630] 使用来自3个不同人供体的PBMC和来自2个不同食蟹猴的PBMC重复测定,证实了TCR/CD123多特异性多肽的功能性。

[1631] 实施例32:在健康人PBMC样品中,通过多特异性CD123/TCR结合多肽,重定向的自体人T细胞单核细胞的消耗

[1632] 为了评估单核细胞的消耗,如上所述进行测定,使用冷冻保存的人PBMC,将其解冻并用测定培养基(RMPI 1640+10%FBS)洗涤,并与多特异性多肽的连续稀释液温育5小时或

24小时。如上所述进行细胞染色。单核细胞被鉴定为CD14+群体。

[1633] 结果描绘于图39中。

[1634] 温育5小时后,对于TCR/CD123多特异性多肽和不相关的纳米抗体,未观察到单核细胞消耗。24小时后,对于TCR/CD123多特异性多肽观察到单核细胞消耗,而对于无关多肽未观察到单核细胞消耗。使用来自3个不同供体的PBMC重复测定,证实了TCR/CD123多特异性多肽的功能性。

[1635] 实施例33:在健康人PBMC样品中,在重定向T细胞杀伤自体CD123阳性细胞期间,多特异性CD123/TCR结合多肽对人T细胞的活化。

[1636] 为了表征在TCR/CD123多特异性多肽介导的消耗期间T细胞的活化,如上所述进行自体PBMC测定,并在温育24小时后通过测量CD69的上调来监测人T细胞的活化状态。简言之,在24小时的温育时间后,将细胞用单克隆小鼠抗CD3-FITC抗体(BD Biosciences, 555332)在4°C染色30分钟以鉴定人T细胞,和用单克隆小鼠抗人CD69-PE抗体(BD Biosciences, 557050)在4°C染色30分钟以评估T细胞活化。将细胞洗涤3次,重悬于FACS缓冲液(来自Gibco的D-PBS,具有来自Sigma的10%FBS和来自Merck的0.05%叠氮化钠)中,然后通过装备有FACS Diva软件的FACS Canto(BD)细胞计数器进行分析。每个样品,获得75μl的总样品体积。使用FACS Diva和流动软件进行数据分析。

[1637] 示例性结果显示在图40中。

[1638] 当PBMC与多特异性CD123/TCR结合多肽温育时,数据显示人CD3+T细胞上CD69的剂量依赖性上调。与单价纳米抗体或不相关多肽温育不会导致CD69上调。

[1639] 实施例34:在基于流式细胞术的测定中,用于重定向的T细胞介导的CD123靶细胞杀伤的无关多肽的表征

[1640] 为了评估TCR纳米抗体T0170056G05的安全性,如在实施例25和26中所描述的,使用10:1的E:T比率,在重定向的T细胞介导的靶标杀伤测定中进行无关多肽(单价纳米抗体和多价多肽T017000129)的深入分析。将多肽T017000139作为阳性对照。

[1641] 使用KG1a靶细胞的结果显示在图41中,使用MOLM-13的结果显示在图42中。获得的EC50值列于表C-29和表C-30中。

[1642] 表C-29:在基于流式细胞术的测定中,用于重定向的T细胞介导的CD123阳性KG1a细胞杀伤的T017000139的EC50(M)。

[1643]	样品 ID	人 T 细胞			食蟹猴 T 细胞		
		EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
		8.1E-11	7.4E-11	8.9E-11	1.7E-11	9.7E-12	3.1E-11

[1644] 表C-30:在基于流式细胞术的测定中,用于重定向的T细胞介导的CD123阳性MOLM-13细胞杀伤的T017000139的EC50(M)。

[1645] 实验1

[1646]	食蟹猴 T 细胞			
	样品 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
	T017000139	6E-11	5.1E-11	7.1E-11

[1647] 实验2

	人 T 细胞	食蟹猴 T 细胞
--	--------	----------

[1649]	样品 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
	T017000139	3.0E-11	1.9E-11	4.7E-11	3.1E-11	1.9E-11	5.1E-11

[1650] 当使用人和食蟹猴T细胞时,阳性对照T017000139表现如预期。单价结构单元和无关多肽T017000129(CD123结构单元均被不相关的结构单元替换)均未诱导CD123阳性细胞的杀伤,证实了TCR/CD123多特异性多肽的特异性。

[1651] 实施例35:在人重定向杀伤期间,多特异性CD123/TCR结合多肽对细胞因子产生的影响

[1652] 基于基于FACS的读数,在人T细胞介导的CD123杀伤测定期间,监测细胞因子释放的诱导。通过ELISA测量人细胞因子IFN- γ 和IL-6的释放。简言之,如实施例25中所述,在存在纯化的人原代T细胞(3×10^5 个细胞/孔)和多特异性TCR/CD123结合多肽或无关多肽的连续稀释液的情况下,将MOLM-13或KG1a接种在V底96孔板(2×10^4 细胞/孔)中。如实施例30中所述,在将人原代T细胞/多肽加入平板中72小时后,测量上清液中人原代T细胞的人IFN- γ 和IL-6的产生。

[1653] 结果显示在图43A、43B和43C中。在该测定中获得的EC50值列于表C-31和表C-32中。

[1654] 表C-31:在基于流式细胞术的测定中,在重定向的人T细胞介导的CD123阳性MOLM-13或KG1a细胞杀伤期间,用于人IFN- γ 分泌的TCR/CD123结合多肽的EC50 (M)。

[1655]	MOLM-13			KG1a			
	样品 ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
	T017000139	3.4E-10	2.5E-10	4.6E-10	3.2E-11	1.9E-11	5.4E-11

[1656] 表C-32:在基于流式细胞术的测定中,在重定向的人T细胞介导的CD123阳性MOLM-13细胞杀伤期间,用于人IL-6分泌的TCR/CD123结合多肽的EC50 (M)。

[1657]	样品ID	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI
	T017000139	2.3E-11	1.5E-11	3.5E-11

[1658] 当MOLM-13或KG1a细胞和人原代T细胞与CD123/TCR结合多肽一起温育时,观察到细胞因子产生。无关多肽T017000129不诱导细胞因子产生。

[1659] 实施例36:使用CD123阴性细胞系,在基于流式细胞术的测定中,用于多特异性CD123/TCR结合多肽的靶标独立的重定向的人或食蟹猴效应T细胞杀伤的表征

[1660] 为了评价多特异性多肽的CD123独立的重定向杀伤,在基于流式细胞术的杀伤测定中评价CD123阴性U-937和NCI-H929细胞系。根据制造商的说明,使用PKH26红色荧光细胞接头试剂盒(Sigma,PKH26GL-1KT),将U-937和NCI-H929细胞用8 μ M PKH-26膜染料标记,并用作靶细胞。如实施例25和26中所述,使用原代人或食蟹猴T细胞进行测定(E:T=10:1)。

[1661] 对于NCI-H929和U-937细胞,示例性结果分别显示在图44和图45中。

[1662] TCR/CD123多特异性多肽和无关多肽仅显示出最小的T细胞重定向的U-937杀伤活性(小于6%),表明多特异性多肽对于结合CD123具有良好的特异性。

[1663] 实施例37:使用CD123阴性细胞系,在重定向效应T细胞杀伤测定期间,用于多特异性CD123/TCR结合多肽的T细胞活化的表征

[1664] 为了监测在用多特异性CD123/TCR结合多肽处理T细胞和CD123阴性细胞之后的T细胞活化,在 2.5×10^5 个原代T细胞的存在下,将多肽分别与 2.5×10^4 个U-937和NCI-H929靶

细胞在37°C温育24小时 (E:T=10:1), 如实施例25和26中所述。使用单克隆小鼠抗CD4-APC (Biolegend, 300505)、单克隆小鼠抗CD8 APC (BD Biosciences, 555366) 和单克隆抗CD25 (BD Biosciences, 557138) 抗体, 如实施例27所述, 如在流式细胞术中所测量的, 通过监测72小时温育之后CD4/CD8 T细胞群上的CD25上调来评价T细胞活化(如前所述)。

[1665] 示例性结果显示在图46中。

[1666] 与多特异性多肽和U-937或NCI-929CD123阴性细胞系一起温育后对T细胞活化的评价显示, 对于任何多特异性多肽, CD25仅有极小的上调。因此, 在存在CD123阴性靶细胞的情况下, 仅有极少的T细胞活化或被T细胞杀伤。

[1667] 实施例38: 在人重定向杀伤期间, 用于多特异性CD123/TCR结合多肽的细胞因子产生的表征

[1668] 基于基于FACS的读数, 在人T细胞介导的杀伤测定期间, 监测细胞因子释放的非特异性诱导。通过ELISA测量细胞因子IFN- γ 和IL-6的释放。简言之, 如实施例25所述, 在存在纯化的人原代T细胞 (3×10^5 细胞/孔) 和多特异性TCR/CD123结合多肽或无关多肽的连续稀释液的情况下, 将NCI-H929接种在V底96孔板 (2×10^4 细胞/孔) 中。如实施例30所述, 在将人原代T细胞/多肽加入平板中72小时后, 在上清液中测量人原代T细胞的IFN- γ 和IL-6的产生。结果如图47所示。

[1669] 当CD123阴性NCI-H929细胞系和人原代T细胞与CD123/TCR结合多肽一起温育时, 未观察到细胞因子的产生。

[1670] 实施例39: 在重定向杀伤期间, 多特异性CD123/TCR结合多肽对T细胞增殖的影响

[1671] 为了研究多特异性CD123/TCR结合多肽对人T细胞增殖的影响, 将 γ 辐射的 (100Gy) MOLM-13细胞连同多特异性多肽和人原代T细胞 (2×10^5 个细胞/孔) 一起接种在96孔平底微量滴定板 (Greiner bio-one, 655 180, 2×10^4 细胞/孔) 中, 并于37°C在空气中 $5\% \text{CO}_2$ 的湿润气氛中温育72小时。接下来, 用 3H -胸苷 (3H -Tdr, New England Nuclear, Boston, MA, 20Ci/mM比活性) 脉冲细胞约18小时, 在玻璃纤维滤条上收获细胞, 然后通过液体闪烁计数进行计数。

[1672] 示例性结果显示在图48中。

[1673] CD123/TCR多特异性多肽以剂量依赖性方式诱导T细胞增殖。对于无关多肽T017000129, 没有观察到T细胞增殖。

[1674] 平行地, 在不存在靶细胞时, 评估多特异性CD123/TCR结合多肽对人T细胞增殖的影响。此外, 将多特异性多肽和人原代T细胞 (2×10^5 个细胞/孔) 于37°C在空气中 $5\% \text{CO}_2$ 的湿润气氛中温育72小时。如上所述测量增殖。数据如图49所示。

[1675] 实施例40: 预活化T细胞与未活化T细胞的溶解性能

[1676] 为了测试T细胞在刺激条件下响应多天温育时间的溶解性能, 将原代人T细胞(如实施例25中所述分离)解冻, 并使用Dynabeads®人T活化剂CD3/CD28进行预活化 (Gibco-Technologies, 11132D) (使用2:1的T细胞与珠子比率)。3天后, 用新鲜珠替换该珠持续另外三天。接下来, 移除珠并在MOLM-13靶标杀伤测定中评价预活化和未活化的T细胞。简而言之, 将来自相同供体的未活化或CD3/CD28预活化的原代T细胞与PKH标记的MOLM-13细胞以不同的E:T比例 (8:1、2:1、1:2、1:4) 混合, 和与T017000114的连续稀释液混合, 或与PKH标记的KG1A细胞以不同的E:T比例 (2:1、1:2、1:4、1:8) 混合, 和与T017000139的连续稀释液混

合。如上文实施例25中所述,在温育24小时后进行细胞毒性读数。

[1677] 对于MOLM-13和KG1a细胞,结果分别显示在图50和图51中。对于MOLM-13和KG1a细胞,在该测定中获得的EC50值分别列于表C-33和表C-34中。

[1678] 表C-33:使用预活化和未活化的T细胞,在基于流式细胞术的测定中,用于重定向的人T细胞介导的MOLM-13细胞杀伤的T017000114的EC50 (M) 和%溶解。

样品 ID	非活化 T 细胞				预活化 T 细胞			
	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	%溶解	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	%溶解
T017000114 E:T 比率 8:1	1.4E-09	2.4E-10	7.8E-09	12	2.4E-10	1.9E-10	3.2E-10	43
	1.9E-09	6.2E-12	6.0E-07	10	6.8E-10	4.7E-10	9.9E-10	31
					1.0E-09	4.0E-10	2.6E-09	18

[1680] 表C-34:使用预活化和未活化的T细胞,在基于流式细胞术的测定中,用于重定向的人T细胞介导的KG1a细胞杀伤的T017000139的EC50 (M) 和%溶解。

样品 ID	非活化 T 细胞				预活化 T 细胞			
	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	%溶解	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	%溶解
T017000139 E:T 比率 2:1	1.4E-10	8.1E-11	2.5E-10	19	4.5E-11	2.2E-11	9.1E-11	43
	7.7E-11	3.0E-12	2.0E-09	8	4.9E-11	2.2E-11	1.1E-10	20

T017000139 E:T 比率 1:4	9.2E-11	2.8E-12	3.0E-09	4	5.8E-11	3.1E-11	1.1E-10	13
T017000139 E:T 比率 1:8	3.4E-11	1.9E-13	6.1E-09	3	5.6E-11	2.3E-11	1.4E-10	8

[1683] 在所测试的所有E:T比率下,预活化的T细胞比未活化的T细胞更有效地溶解靶细胞。用抗CD3/抗CD28预刺激效应细胞导致更高的溶解速率。

[1684] 实施例41:半衰期延长(HLE)的多特异性CD123/TCR结合多肽和对照多肽的构建

[1685] 将ALB11(SEQ ID NO:43)(其是与人血清白蛋白(HSA)结合的纳米抗体)与CD123/TCR结合多肽连接,以增加格式化分子的体内半衰期(WO 06/122787)。使用35GS接头可产生在N端具有TCR α / β 募集纳米抗体和在C端具有CD123肿瘤靶向纳米抗体或白蛋白靶向纳米抗体的许多格式,并且所述格式如上所述进行表达。通过用不相关的抗RSV纳米抗体替换结合肿瘤抗原的纳米抗体来产生不相关的多肽。表C-35中显示了所探讨格式的概述。

[1686] 表C-35:HLE构建体的样品ID和描述。

样品 ID	SEQ ID NO*	描述
A022600009	62	T0170056G05-35GS-RSV007B02(Q108L)-35GS-ALB11
T017000142	63	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110056A10-35GS-ALB11-A
T017000143	64	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110056A10-35GS-A0110055F03-35GS-ALB11-A
T017000144	65	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110056A10-35GS-ALB11-35GS-A0110055F03-A
T017000145	66	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110055F03-35GS-A0110056A10-35GS-ALB11-A
T017000146	67	T0170056G05(E1D)-35GS-A0110055F03-35GS-ALB11-35GS-A0110056A10-A

[1688] *SEQ ID NO对应于不具有C端标签或A1a延伸的多特异性多肽的序列

[1689] 实施例42:多特异性募集多肽中ALB11的白蛋白结合性质

[1690] 在Biacore T100仪器上,通过基于SPR的亲和力测定,测量半衰期延长的多特异性多肽分别与人或食蟹猴血清白蛋白(SA)的结合亲和力。此外,使用EDC和NHS化学,通过胺偶联分别将人(Sigma, A3782)或食蟹猴SA(内部产生)固定在CM5芯片上。将TCR/CD123结合多肽以不同浓度(6.2和500nM之间)注射2分钟,并使其以45μl/min的流速解离15分钟。在样品注射之间,用10mM甘氨酸-HCl pH1.5使表面再生。HBS-EP+用作运行缓冲液。使用BIAEvaluation软件(该软件具有使用单循环动力学1:1结合模型的算法),从传感图计算动力学常数。由得到的缔合和解离速率常数ka和kd来计算亲和常数KD,并示于表C-36中。

[1691] 表C-36:HLE多特异性多肽中ALB11的白蛋白结合性质。

	人 SA			食蟹猴 SA		
	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)	ka (1/Ms)	kd (1/s)	KD (M)
T017000142	1.1E+05	7.2E-03	6.9E-08	9.0E+04	7.3E-03	8.1E-08
T017000143	1.6E+05	9.5E-03	5.9E-08	1.2E+05	9.4E-03	7.6E-08
T017000144	9.1E+04	7.8E-03	8.5E-08	7.4E+04	8.1E-03	1.1E-07
T017000145	1.1E+05	8.5E-03	7.6E-08	1.0E+05	9.9E-03	9.8E-08
T017000146	8.4E+04	8.5E-03	1.0E-07	6.8E+04	8.8E-03	1.3E-07
A022600009	1.1E+05	8.0E-03	7.5E-08	8.5E+04	8.0E-03	9.4E-08
ALB11	5.3E+05	1.6E-03	3.0E-09	5.1E+05	1.6E-03	3.2E-09

[1693] 将ALB11结构单元格式化为多特异性募集多肽,导致了与人和食蟹猴血清白蛋白结合的亲和力的可允许的下降。

[1694] 实施例43:在基于流式细胞术的测定中,通过HLE CD123/TCR结合多肽,重定向的T细胞介导的MOLM-13靶细胞的杀伤

[1695] 由于添加ALB11纳米抗体以及与血清白蛋白(SA)的结合可能影响多肽的效力,因此不存在或存在30μM SA的情况下,如实施例25和26所述,基于流式细胞术测定,评价HLE CD123/TCR结合多肽用于重定向人和食蟹猴T细胞介导的CD123阳性MOLM-13靶细胞的杀伤。

[1696] 在该测定中获得的EC50值列于表C-37中。结果描绘于图52中。

[1697] 表C-37:在基于流式细胞术的测定中,使用10:1的E:T比率,用于重定向T细胞介导的MOLM-13细胞杀伤的HLE CD123/TCR结合多肽的EC50 (M) 和%溶解。

样品 ID	人 T 细胞				食蟹猴 T 细胞				
	%溶解	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	%溶解	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	
[1698]	T017000138	21	1.1E-10	8.8E-11	1.3E-10	54	1.5E-10	1.1E-10	2.1E-10
	T017000144	23	2.7E-11	2.0E-11	3.6E-11	56	2.3E-11	1.7E-11	3.0E-11
	T017000144+SA	24	2.6E-10	1.9E-10	3.5E-10	52	1.1E-10	9.3E-11	1.2E-10
	T017000139	20	2.0E-11	9.3E-12	4.4E-11	56	2.9E-11	2.3E-11	3.5E-11
	T017000146	21	2.5E-11			57	2.9E-11	2.3E-11	3.7E-11
	T017000146 + SA	25	2.3E-10	1.7E-10	2.9E-10	44	1.6E-10	1.3E-10	1.9E-10

[1699] 所有HLE多特异性CD123/TCR结合多肽均显示人和食蟹猴T细胞对MOLM-13细胞的剂量依赖性杀伤。在多肽中包含ALB11不会降低效力。加入HSA或CSA后,观察到效力的小幅下降,而功效不受影响。

[1700] 实施例44:在基于流式细胞术的测定中,通过HLE CD123/TCR结合多肽,重定向的T细胞介导的KG1a靶细胞的杀伤

[1701] 在不存在或存在30μM血清白蛋白的情况下,如实施例24和25中所述,基于流式细胞术测定,还评价了半衰期延长的TCR/CD123结合多肽用于重定向的人和食蟹猴T细胞介导的CD123 KG1a靶细胞的杀伤。

[1702] 在该测定中获得的EC50值列于表C-38中。结果描绘于图53中。

[1703] 表C-38:使用10:1的E:T比率,在基于流式细胞术的测定中,用于重定向的T细胞介导的KG1a细胞杀伤的HLE CD123/TCR结合多肽的EC50 (M) 和%溶解。

样品 ID	人 T 细胞				食蟹猴 T 细胞				
	%溶解	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	%溶解	EC50 (M)	95% LCI	95% UCI	
[1704]	T017000138	64	1.6E-10	1.3E-10	2.0E-10	21	2.8E-11	2.3E-11	3.4E-11
	T017000143	62	1.9E-10	1.6E-10	2.3E-10	25	4.7E-11	2.9E-11	7.5E-11
	T017000144	67	4.1E-11	3.4E-11	5.0E-11	28	6.3E-12	9.3E-13	4.3E-11
	T017000143+SA	60	1.4E-09	1.0E-09	1.9E-09	25	8.6E-10	7.1E-10	1.0E-09
	T017000144+SA	58	2.9E-10	2.4E-10	3.6E-10	29	6.6E-11	3.4E-11	1.3E-10
	T017000139	67	8.1E-11	7.4E-11	8.9E-11	34	1.7E-11	9.7E-12	3.1E-11
	T017000145	65	7.4E-11	6.4E-11	8.6E-11	35	1.6E-11	1.1E-11	2.4E-11
	T017000146	64	6.6E-11	5.9E-11	7.4E-11	34	1.5E-11	7.2E-12	3.0E-11
	T017000145+SA	51	5.9E-10	4.9E-10	7.2E-10	32	1.2E-10	7.4E-11	1.9E-10
	T017000146+SA	60	6.8E-10	5.8E-10	8.0E-10	36	2.0E-10	1.1E-10	3.5E-10
	T017000128	55	3.1E-10	3.0E-10	3.3E-10	32	2.8E-10	1.3E-10	6.1E-10
	T017000142	59	6.8E-10	6.2E-10	7.5E-10	29	2.2E-10	1.4E-10	3.6E-10
	T017000142+SA	48	3.1E-09	3.0E-09	3.3E-09	20	3.2E-10	2.9E-10	3.5E-10

[1705] 所有HLE多特异性CD123/TCR结合多肽均显示人和食蟹猴T细胞对KG1a细胞的剂量依赖性杀伤。在多肽中包含ALB11不会降低效力。加入HSA或CSA后,观察到效力的小幅下降,而功效不受影响。

[1706] 实施例45:在重定向杀伤期间,HLE多特异性CD123/TCR结合多肽T017000144对细胞因子产生的影响

[1707] 基于基于FACS的读数,在人T细胞介导的杀伤测定期间,监测细胞因子释放的诱导。通过ELISA测量IFN-γ 和IL-6的释放。简而言之,如实施例35所述,在存在纯化的人原代T细胞(3×10^5 个细胞/孔)和多特异性TCR/CD123结合多肽或无关多肽的连续稀释液的情况下

下,将MOLM-13(2×10^4 个细胞/孔)接种在V底96孔板中。如实施例30中所述,在将人原代T细胞/多肽加入平板中72小时后,测量上清液中人原代T细胞的IFN- γ 和IL-6的产生。

[1708] 在该测定中获得的EC50值列于表C-39和表C-40中。结果描绘于图54中。

[1709] 表C-39:在基于流式细胞术的测定中,在重定向的人T细胞介导的CD123阳性MOLM-13细胞杀伤期间,用于人IFN- γ 分泌的TCR/CD123结合多肽的EC50(M)。

[1710]	样品ID	EC50 (M)	95%LCI	95%UCI
	T017000139	3.4E-10	2.5E-10	4.6E-10
	T017000144	1.9E-10	1.3E-10	2.9E-10

[1711] 表C-40:在基于流式细胞术的测定中,在重定向的人T细胞介导的CD123阳性MOLM-13细胞杀伤期间,用于人IL-6分泌的TCR/CD123结合多肽的EC50(M)。

[1712]	样品ID	EC50 (M)	95%LCI	95%UCI
	T017000139	2.3E-11	1.5E-11	3.5E-11
	T017000144	1.6E-11	9.9E-12	2.7E-11

[1713] 当MOLM-13细胞和人原代T细胞与HLE CD123/TCR结合多肽T017000144一起温育时,观察到细胞因子的产生。无关多肽T017000129不诱导细胞因子产生。

[1714] 实施例46:在重定向杀伤期间,HLE多特异性CD123/TCR结合多肽对T细胞增殖的影响

[1715] 为了研究HLE多特异性CD123/TCR结合多肽对人T细胞增殖的影响,将 γ 辐射的(100Gy)MOLM-13细胞(2×10^4 细胞/孔)连同HLE多特异性多肽T017000144和人原代T细胞(2×10^5 个细胞/孔)一起接种在96孔平底微量滴定板中,并在不存在SA的情况下,于37°C在空气中5X CO_2 的湿润气氛中温育72小时。将T017000129作为阴性对照。接下来,用 ^3H -胸昔(^3H -Tdr,New England Nuclear,Boston,MA,20Ci/mM比活性)脉冲细胞约18小时,在玻璃纤维滤条上收获细胞,然后通过液体闪烁计数进行计数。

[1716] 示例性结果显示在图55中。

[1717] HLE CD123/TCR多特异性多肽T017000144以剂量依赖性方式诱导T细胞增殖。对于无关多肽T017000129,没有观察到T细胞增殖。

[1718] 实施例47:在健康人PBMC样品和健康食蟹猴PBMC中,通过HLE CD123/TCR多特异性多肽,重定向的自体T细胞浆细胞样树突细胞(pDC)和嗜碱性粒细胞的消耗

[1719] 如实施例31中所述,在不存在SA的情况下,在人和食蟹猴自体PBMC测定中进一步评价HLE构建体。在5小时的温育时间后,评价多特异性多肽对CD123阳性细胞的消耗(pDC:谱系阴性,CD123阳性,HLA-DR阳性;以及嗜碱性粒细胞:谱系阴性,CD123阳性,HLA-DR阴性)。

[1720] 对于人和食蟹猴PBMC,结果分别描绘于图56和图57中。

[1721] HLE CD123/TCR多特异性多肽能够通过重定向的T细胞消耗人和食蟹猴PBMC中的CD123+pDC和嗜碱性粒细胞。T017000144是最有力的多肽。5小时后在PBMC测定中,由一个TCR结构单元、ALB11和仅一个CD123结构单元组成的多肽T017000142未显示出功能性。在自体设置中证实了HLE CD123/TCR多特异性多肽的人食蟹猴交叉反应性。

[1722] 实施例48:健康人PBMC样品中,通过HLE CD123/TCR多特异性多肽,重定向的自体T细胞单核细胞的消耗

[1723] 在不存在SA的情况下,在24小时温育时间后,评价HLE多特异性多肽在自体人PBMC环境中对单核细胞(CD14+细胞)的消耗。如实施例32中所述的进行测定。

[1724] 结果如图58所示。

[1725] HLE多特异性多肽能够通过重定向的T细胞消耗人PBMC内的CD123+单核细胞。T017000144是最有效力的多肽。24小时后在自体单核细胞消耗测定中,由一个TCR结构单元、ALB11和仅一个CD123结构单元组成的多肽T017000142显示出功能性。

[1726] 实施例49:非人灵长类动物模型中的体内功效和安全性

[1727] 在非人灵长类动物模型中,评价非HLE和HLE多特异性CD123/TCR结合纳米抗体的体内功效和安全性。

[1728] 用参考化合物处理的动物作为阳性对照。将用非HLE IRR/TCR结合多肽的处理用作多特异性多肽的CD123靶向结构部分的特异性对照。在对食蟹猴进行7天NaCl输注“预处理”后,将参考化合物和非HLE多特异性CD123/TCR结合多肽通过连续静脉输注而施用。根据表C-41,以每周剂量递增方案,以与参考化合物的等摩尔剂量将非HLE多特异性CD123/TCR结合多肽施用4周作为4天打开输注/3天关闭输注。根据表C-41,以每周剂量递增方案,在第1、2、3、8、15和22天,通过静脉内推注将HLE多特异性CD123/TCR结合多肽向食蟹猴施用。

[1729] 表C-41:治疗方案。

组	化合物	剂量水平 (ng/kg/天)				施用途径
		测试周 1	测试周 2	测试周 3	测试周 4	
[1730]	1 参考	D1-5: 100	D8-12: 300	D15-19: 600	D22-26: 1000	连续 24 小时输注
	2 不相关/TCR 多肽	D1-5: 49.5	D8-12: 148.4	D15-19: 296.8	D22-26: 494.6	连续 24 小时输注
	3 非 HLE CD123/TCR 多肽	D1-5: 74.0	D8-12: 222.1	D15-19: 444.3	D22-26: 740.4	连续 24 小时输注
	4 HLE CD123/TCR 多肽	D1: 0.6 D2: 0.4 D3: 0.34	D8: 2.21	D15: 4.42	D22: 7.13	静脉内推注

[1731] 在测试前7天、前4天,第1天(给药前+给药后4小时)、第4天、第8天(给药前+给药后4小时)、第11天、第15天(给药前+给药后4小时)、第18天、第22天(给药前+给药后4小时)、第25天、第29天、第32天和第36天使用流式细胞术和差异血细胞计数,如表C-42中所述,通过测量T细胞子集来监测来自血液的T细胞再分布。

[1732] 在测试前7天、前4天,第1天(给药前+给药后4小时)、第4天、第8天(给药前+给药后4小时)、第11天、第15天(给药前+给药后4小时)、第18天、第22天(给药前+给药后4小时)、第25天、第29天、第32天和第36天使用流式细胞术和血液中差异血细胞计数,如表C-43中所详述,通过评估PBMC中CD123+细胞的百分比和数量来评估体内功效。

[1733] 在测试前7天、前4天、第1天(给药后4小时)、第4天、第8天(给药后4小时)、第11天、第15天(给药后4小时)、第18天、第22天(给药后4小时)、第25天、第29天、第32天和第36天,通过评价血清中的细胞因子(IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12(p70)、TNF- α 、TNF- β 、IFN- γ)来评估安全性。

[1734] 表C-42:用于血液T细胞表型分析的标记组合。

标记	细胞	单元
CD3+CD4+	T 辅助细胞(Th)	PBMC 的百分比和细胞/ μ L
CD3+CD8+	细胞毒性 T 细胞 (Tc)	PBMC 的百分比和细胞/ μ L
CD25+CD3+CD4+	活化的 Th	CD3+CD4+的百分比和细胞/ μ L
CD25+CD3+CD8+	活化的 Tc	CD3+CD8+的百分比和细胞/ μ L
PD1+CD3+CD4+	在 Th 上 PD (程序性细胞死亡蛋白)上调	CD3+CD4+的百分比和细胞/ μ L
PD1+CD3+CD8+	在 Tc 上 PD 上调	CD3+CD8+的百分比和细胞/ μ L
CD25+PD1+CD3+CD4+	在活化的 Th 上, PD 上调	CD3+CD4+CD25+的百分比和细胞/ μ L
CD25+PD1+CD3+CD8+	在活化的 Tc 上, PD 上调	CD3+CD8+CD25+的百分比和细胞/ μ L

[1735] 表C-43:用于评价CD123+细胞消耗的标记组合。

标记	细胞	单位
CD14 ^{-low} CD123+	基于 CD123 标记的 pDC (浆细胞样树突细胞)和嗜碱性粒细胞和 mDCs (骨髓树突细胞)	PBMC 的百分比和细胞/ μ L
CD14 ^{-low} CD303+	基于 CD303 标记的 pDC	PBMC 的百分比和细胞/ μ L
CD14 ^{-low} CD123+CD303+	CD123 和 CD303 之间的重叠	PBMC 的百分比和细胞/ μ L
CD14+	单核细胞	PBMC 的百分比和细胞/ μ L
CD14+CD123+	CD123+ 单核细胞	CD14+的百分比和细胞/ μ L
CD123+	基于 CD123 的靶细胞的绝对数目	PBMC 的百分比和细胞/ μ L
CD303+	CD303 细胞的绝对数目	PBMC 的百分比和细胞/ μ L

[1736] 在给药前7天、前4天、给药第1天(给药前+给药后4小时)、第4天、第8天(给药前+给药后4小时)、第11天、第15天(给药前+给药后4小时)、第18天、第22天(给药前+给药后4小时)、第25天、第29天、第32天和第36天,收集用于PK分析的血清样品。

[1737] 在给药前7天、给药第1天(给药前)、第8天(给药前)、第15天(给药前)、第22天(给药前)、第29天和第36天,收集用于ADA分析的血清样品。

[1740] 在第4天和第25天,如实施例25所述,从所有动物分离血液T细胞,并在耗竭(exhaustion)试验中进行测试。

[1741] 在第29天,对第2组动物进行尸检。在第36天,对所有剩余的动物进行尸检。

[1742] 实施例50:非人灵长类动物模型中的体内功效和安全性-多特异性CD123/TCR结合纳米抗体,实验结果

[1743] 在非人灵长类动物模型中,评价多特异性CD123/TCR结合多肽T017000139的体内功效和安全性。

[1744] 用参考化合物(MGD006,Macrogenics)处理的动物作为阳性对照。将用无关/TCR结合多肽T017000129的处理用作多特异性多肽的CD123靶向结构部分的特异性对照。在对食蟹猴进行7天NaCl输注“预处理”后,将参考化合物、无关/TCR结合多肽和多特异性CD123/TCR结合多肽通过连续静脉内输注而施用。根据表C-44,以每周剂量递增方案,以与参考化合物的等摩尔剂量将无关/TCR结合多肽和多特异性CD123/TCR结合多肽施用4周作为4天打开/3天关闭输注。

[1745] 表C-44:治疗方案。

组	化合物	剂量水平(ng/kg/天)				施用途径
		测试周 1 (D1-5)	测试周 2 (D8-12)	测试周 3 (D15-19)	测试周 4 (D22-26)	
[1746]	1 参考化合物 (MGD006)	100	300	600	1000	连续 24 小时输 注
	2 无关/TCR 多肽 (T017000129)	49.5	148.4	296.8	494.6	连续 24 小时输 注
	3 CD123/TCR 多肽 (T017000139)	74.0	222.1	444.3	740.4	连续 24 小时输 注

[1747] 在测试前7天、前4天,第1天(给药前+给药后4小时)、第4天、第8天(给药前+给药后4小时)、第11天、第15天(给药前+给药后4小时)、第18天、第22天(给药前+给药后4小时)、第25天、第29天、第32天和第36天,通过使用流式细胞术测量T细胞子集来监测来自血液的T细胞再分布。

[1748] 如图59所示,在用参考化合物处理的阳性对照组中,循环CD4⁺CD3⁺和CD8⁺CD3⁺T细胞的数量在不同的给药周期期间波动,表明运输和/或靠边化,而不是消耗。相反,用CD123/TCR多肽处理或用无关/TCR多肽处理不会导致CD4⁺CD3⁺或CD8⁺CD3⁺T细胞数量的强烈波动。

[1749] 在测试前7天、前4天,第1天(给药前+给药后4小时)、第4天、第8天(给药前+给药后4小时)、第11天、第15天(给药前+给药后4小时)、第18天、第22天(给药前+给药后4小时)、第25天、第29天、第32天和第36天,通过在血液中使用流式细胞术测量PBMC中CD123⁺CD14⁻细胞的数量,来研究循环CD123⁺CD14⁻细胞数作为药效学终点,以便评价体内功效。

[1750] 结果如图60所示。用参考化合物MGD006(阳性对照)处理的动物中CD123⁺CD14⁻细胞被消耗,尽管在第4次给药周期中观察到功效丧失。从第一次给药周期中,用CD123/TCR多肽处理导致血液中CD123⁺CD14⁻细胞的消耗,其持续到第4次和最后的给药周期。在用无关/TCR多肽处理的动物中,未观察到CD123⁺CD14⁻细胞的显著消耗。

[1751] 接下来,研究PD-1在循环CD4⁺CD3⁺T细胞和CD8⁺CD3⁺T细胞上的表达作为替代标记,以评估体内T细胞耗竭。为此,在测试前7天、前4天,第1天(给药前+给药后4小时)、第4天、第8天(给药前+给药后4小时)、第11天、第15天(给药前+给药后4小时)、第18天、第22天(给药前+给药后4小时)、第25天、第29天、第32天和第36天,在血液中使用流式细胞术,测量PBMC中PD-1的表达。

[1752] 结果如图61所示。用参考化合物MGD006(阳性对照)处理的动物中,大多数CD4⁺CD3⁺T细胞和CD8⁺CD3⁺T细胞上的PD-1表达强烈增加,并在给药终止后在大约一半的CD4⁺CD3⁺T细胞和CD8⁺CD3⁺T细胞上保持。相反,在整个给药周期中,用CD123/TCR多肽或无关/TCR多肽处理后,PD-1表达保持在基线。

[1753] 在测试前7天、前4天、第1天(给药后4小时)、第4天、第8天(给药后4小时)、第11天、第15天(给药后4小时)、第18天、第22天(给药后4小时)和第25天,通过评价血清中的细胞因子(IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-6、IL-8、IL-10、IL-12(p70)、TNF- α 、TNF- β 、IFN- γ)来评估安全性。

[1754] 以下细胞因子的水平仍低于测定法的检测限:IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-5、IL-10、IL-12(p70)、TNF- α 、TNF- β 和IFN- γ 。在第一次给药周期开始时,在阳性对照组中检测到低浓度的白细胞介素-6。这种增加是短暂的,并仅在一只动物中。在用CD123/TCR多肽处理的组中,一只动物在给药前显示可检测的IL-6浓度,并且一只动物在第二给药周期开始时显示短暂的微小的增加,表明操纵应激(manipulative stress)。在用无关/TCR多肽处理的组中,一只动物在第三次给药周期中显示出IL-6的短暂微小增加,再次表明操纵应激。来自IL-6测量的结果描绘于图62中。

表 A-1: TCR A 族结合物的序列比对-第1部分

		1	10	20	30	40	50	60	70	78
Kabat #		:								
SEQ ID NO: 42	T0170MP056G05	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCVASQDVKINFLGVYRQAPKEREKUHISTGDTQADSAKGRFTISRDSEKNNV								
SEQ ID NO: 85	T0170MP053D01		K...A...A...		T.E...M...T.T...DV					
SEQ ID NO: 136	T0170MP067D01		K...A...A...		T.E...M...T.T...EV					
SEQ ID NO: 124	T0170MP056F01		K.P.A...A...		T.E...M...T.T...EV					
SEQ ID NO: 152	T0170MP069A06		K...A...A...		T.E...M...T.T...EV					
SEQ ID NO: 141	T0170MP067F02		K...A...A...		T.E...M...T.T...EV					
SEQ ID NO: 142	T0170MP068C03		K...A...A...		T.E...M...T.T...EV					
SEQ ID NO: 103	T0170MP055E05		K...A...A...		T.E...M...T.T...EV					
SEQ ID NO: 96	T0170MP055C02		K...A...A...		T.E...M...T.T...EV					
SEQ ID NO: 137	T0170MP067D06		K...A...A...		T.E...M...T.T...EV					
SEQ ID NO: 105	T0170MP055F03						S...E...			
SEQ ID NO: 130	T0170MP061A02						A.S...E...			
SEQ ID NO: 122	T0170MP056D11						R...S...E...			
SEQ ID NO: 153	T0170MP069B02									
SEQ ID NO: 172	T0170MP070G02									
SEQ ID NO: 79	T0170MP028B01									
SEQ ID NO: 81	T0170MP028G06									
SEQ ID NO: 106	T0170MP055F06									
SEQ ID NO: 78	T0170MP027A05									
SEQ ID NO: 83	T0170MP040C01									
SEQ ID NO: 80	T0170MP028F10									
SEQ ID NO: 82	T0170MP029F08									
SEQ ID NO: 90	T0170MP055A08									
SEQ ID NO: 109	T0170MP055G09									
SEQ ID NO: 145	T0170MP068D05									
SEQ ID NO: 151	T0170MP068F08									
SEQ ID NO: 171	T0170MP070F11									
SEQ ID NO: 163	T0170MP069E11									
SEQ ID NO: 175	T0170MP084B07									
SEQ ID NO: 87	T0170MP055A01									
SEQ ID NO: 88	T0170MP055A02									
SEQ ID NO: 99	T0170MP055D03									
SEQ ID NO: 101	T0170MP055D10									
SEQ ID NO: 147	T0170MP068E01									
SEQ ID NO: 177	T0170MP084E03									

[1756]

表 A-1: TCR A 簇结合物的序列比对-第 1 部分续

Kabat #	79	90	100	110
SEQ ID NO: 42	:	abc	ia	l
SEQ ID NO: 85	YLOMNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS			
SEQ ID NO: 136	T0170MP056G05	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 124	T0170MP053D01	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 152	T0170MP056E01	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 141	T0170MP069A06	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 142	T0170MP067F02	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 103	T0170MP055E05	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 96	T0170MP055C02	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 137	T0170MP067D06	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 105	T0170MP055F03	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 130	T0170MP061A02	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 122	T0170MP056D11	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 153	T0170MP069B02	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 172	T0170MP070G02	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 79	T0170MP028B01	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 81	T0170MP028G06	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 106	T0170MP055F06	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 78	T0170MP027A05	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 83	T0170MP040C01	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 80	T0170MP028F10	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 82	T0170MP029F08	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 90	T0170MP055A08	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 109	T0170MP055G09	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 145	T0170MP068D05	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 151	T0170MP068F08	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 171	T0170MP070F11	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 163	T0170MP069E11	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 175	T0170MP084B07	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 87	T0170MP055A01	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 88	T0170MP055A02	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 99	T0170MP055D03	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 101	T0170MP055D10	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 147	T0170MP068E01	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		
SEQ ID NO: 177	T0170MP084E03	YLQNSLKPEDTAVYFCRAFSRIVPFDYAGQSTLVVSS		

[1757]

表 A-1: TCR A 簇结合物的序列比对-第 2 部分

		1	10	20	30	40	50	60	70	78
Kabat #		:	:	:	:	:	:	:	:	
SEQ ID NO: 42	T0170MP0556G05	EVQIVESGGGLVQPGGSLRLSCVASGVHKINFGLWYRQAPGKEREKVAHISIGDQTYADSAKGRTFISRDESKNMV								
SEQ ID NO: 178	T0170MP084E05									
SEQ ID NO: 107	T0170MP055E08									
SEQ ID NO: 114	T0170MP056C01									
SEQ ID NO: 126	T0170MP056G02									
SEQ ID NO: 133	T0170MP067A03									
SEQ ID NO: 135	T0170MP067C09									
SEQ ID NO: 150	T0170MP068E06									
SEQ ID NO: 158	T0170MP069D02									
SEQ ID NO: 169	T0170MP070D07									
SEQ ID NO: 176	T0170MP084C02									
SEQ ID NO: 131	T0170MP061B04									
SEQ ID NO: 159	T0170MP069D07									
SEQ ID NO: 113	T0170MP056B11									
SEQ ID NO: 180	T0170MP084E10									
SEQ ID NO: 116	T0170MP056C03									
SEQ ID NO: 156	T0170MP069C04									
SEQ ID NO: 121	T0170MP056D02									
SEQ ID NO: 132	T0170MP067A01									
SEQ ID NO: 134	T0170MP067B06									
SEQ ID NO: 164	T0170MP069E05									
SEQ ID NO: 179	T0170MP084F04									
SEQ ID NO: 98	T0170MP055C10									
SEQ ID NO: 86	T0170MP053E10									
SEQ ID NO: 92	T0170MP055B01									
SEQ ID NO: 155	T0170MP069C01									
SEQ ID NO: 138	T0170MP067D09									
SEQ ID NO: 139	T0170MP067E03									
SEQ ID NO: 120	T0170MP056D01									
SEQ ID NO: 140	T0170MP067E06									
SEQ ID NO: 162	T0170MP069E09									
SEQ ID NO: 157	T0170MP069C05									
SEQ ID NO: 166	T0170MP070B08									
SEQ ID NO: 89	T0170MP055A03									
SEQ ID NO: 118	T0170MP056C07									

[1758]

表 A-1: TCR A 族结合物的序列比对-第 2 部分续

		79	80	90	100
	Kabat #	:	abc		
SEQ ID NO: 42	T0170FMP056G05	YLQMSLKLPEDTAVFCRAFSRTPYDYGQGTIVSS			
SEQ ID NO: 178	T0170FMP084E05				
SEQ ID NO: 107	T0170FMP056C01				
SEQ ID NO: 114	T0170FMP056G08				
SEQ ID NO: 126	T0170FMP056G02				
SEQ ID NO: 133	T0170FMP067A03				
SEQ ID NO: 135	T0170FMP067C09				
SEQ ID NO: 150	T0170FMP068F06				
SEQ ID NO: 158	T0170FMP069D02				
SEQ ID NO: 169	T0170FMP070D07		A		
SEQ ID NO: 176	T0170FMP084C02		D		
SEQ ID NO: 131	T0170FMP061B04			A	
SEQ ID NO: 159	T0170FMP069D07			A	
SEQ ID NO: 113	T0170FMP056B11				
SEQ ID NO: 180	T0170FMP084F10				
SEQ ID NO: 116	T0170FMP056C03				Q
SEQ ID NO: 156	T0170FMP069C04				
SEQ ID NO: 121	T0170FMP056D02				
SEQ ID NO: 132	T0170FMP067A01				
SEQ ID NO: 134	T0170FMP067B06				
SEQ ID NO: 164	T0170FMP069F05			L	
SEQ ID NO: 179	T0170FMP084F04			A	
SEQ ID NO: 98	T0170FMP055C10	H			
SEQ ID NO: 86	T0170FMP053E10				
SEQ ID NO: 92	T0170FMP055B01				
SEQ ID NO: 155	T0170FMP069C01				
SEQ ID NO: 138	T0170FMP067D09		L, N		
SEQ ID NO: 139	T0170FMP067E03		L, N		
SEQ ID NO: 120	T0170FMP056D01	H		L	
SEQ ID NO: 140	T0170FMP067E06			G	
SEQ ID NO: 162	T0170FMP069E09			L	
SEQ ID NO: 157	T0170FMP069C05			G	
SEQ ID NO: 166	T0170FMP070B08		V	L	
SEQ ID NO: 89	T0170FMP055A03			G	
SEQ ID NO: 118	T0170FMP056C07			G	

表 A-1: TCRA 簇结合物的序列比对-第 3 部分

		1	10	20	30	40	50	60	70	78
Kabat #										
SEQ ID NO: 42	T0170PMP056G05									
SEQ ID NO: 168	T0170PMP070C09									
SEQ ID NO: 174	T0170PMP08JB04									
SEQ ID NO: 110	T0170PMP052A02									
SEQ ID NO: 108	T0170PMP055G05									
SEQ ID NO: 154	T0170PMP06JB08									
SEQ ID NO: 97	T0170PMP055C06									
SEQ ID NO: 100	T0170PMP05D06									
SEQ ID NO: 102	T0170PMP055B01									
SEQ ID NO: 104	T0170PMP055F02									
SEQ ID NO: 115	T0170PMP056G02									
SEQ ID NO: 173	T0170PMP070G06									
SEQ ID NO: 165	T0170PMP069G08									
SEQ ID NO: 170	T0170PMP070E07									
SEQ ID NO: 146	T0170PMP066D07									
SEQ ID NO: 127	T0170PMP056G11									
SEQ ID NO: 143	T0170PMP061C07									
SEQ ID NO: 160	T0170PMP069E02									
SEQ ID NO: 144	T0170PMP068C11									
SEQ ID NO: 148	T0170PMP061E08									
SEQ ID NO: 123	T0170PMP056E02									
SEQ ID NO: 112	T0170PMP056A10									
SEQ ID NO: 116	T0170PMP05610									
SEQ ID NO: 93	T0170PMP055B02									
SEQ ID NO: 111	T0170PMP056A08									
SEQ ID NO: 117	T0170PMP056C04									
SEQ ID NO: 129	T0170PMP05D06									
SEQ ID NO: 84	T0170PMP05A03									
SEQ ID NO: 161	T0170PMP069E07									
SEQ ID NO: 95	T0170PMP055B13									
SEQ ID NO: 125	T0170PMP056F08									
SEQ ID NO: 167	T0170PMP070B09									
SEQ ID NO: 149	T0170PMP068F04									
SEQ ID NO: 91	T0170PMP055A10									
SEQ ID NO: 94	T0170PMP055B03									
SEQ ID NO: 128	T0170PMP057B02									

[1760]

表 A-1: TCR A簇结合物的序列比对-第 3 部分续

		79	90	100	110
Kabat #	:	abc	i	a	
SEQ ID NO: 42	TO17QFMP056G05	YLQMNISLRKPEDTAVYFCRAFSRITYDYWGQGTIVTSS			
SEQ ID NO: 168	TO17QFMP070C09			G.....	
SEQ ID NO: 174	TO17QFMP082B04			G.....	
SEQ ID NO: 119	TO17QFMP056A02			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 108	TO17QFMP055G05			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 154	TO17QFMP069B08			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 97	TO17QFMP055C06			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 100	TO17QFMP055D06	F.....N.....		G.....	Q.....
SEQ ID NO: 102	TO17QFMP055E01			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 104	TO17QFMP055F02			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 115	TO17QFMP056C02			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 173	TO17QFMP070G06			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 165	TO17QFMP069G08			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 170	TO17QFMP070E07			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 146	TO17QFMP068D07			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 127	TO17QFMP056G11			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 143	TO17QFMP068C07			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 160	TO17QFMP069E02			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 144	TO17QFMP068C11			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 148	TO17QFMP068E08		R.....	G.....	Q.....
SEQ ID NO: 123	TO17QFMP056E02			G.....	Q.....
SEQ ID NO: 112	TO17QFMP056A10		R.....	G.....	Q.....
SEQ ID NO: 119	TO17QFMP056C10		R.....	G.....	Q.....
SEQ ID NO: 93	TO17QFMP055B02		R.....	G.....	Q.....
SEQ ID NO: 111	TO17QFMP056A08		R.....	G.....	Q.....
SEQ ID NO: 117	TO17QFMP056C04		R.....	G.....	H.....
SEQ ID NO: 129	TO17QFMP057D06		R.....	G.....	Q.....
SEQ ID NO: 84	TO17QFMP053A03		R.....	G.....	Q.....
SEQ ID NO: 161	TO17QFMP069E07		G,R.....	G.....	Q.....
SEQ ID NO: 95	TO17QFMP055B11		R.....	G.....	Q.....
SEQ ID NO: 125	TO17QFMP056F03		R.....	G.....	Q.....
SEQ ID NO: 167	TO17QFMP070B09		N,R.....	G.....	Q.....
SEQ ID NO: 149	TO17QFMP068F04		R.....	G.....	Q.....
SEQ ID NO: 91	TO17QFMP055A10		R.....	G.....	R,Q.....
SEQ ID NO: 94	TO17QFMP055B03		R.....	G.....	Q.....
SEQ ID NO: 128	TO17QFMP057B02		R.....	L.....H,G,L.....N.....	Q.....

[1761]

表 A-2: CD123 结合纳米抗体 A0110056A10 及其家族成员的序列比对。

	Kabat #	1	10	20	30	40	50	60	70
SEQ ID NO: 1	A0110PMP056A10	:	EVQLVKSGGLVQAGGSLRLSCASGITSKINDGMWYQRTGNYPREVVASITATGTTNVRDSVKGRETISRDNAKSTV						
SEQ ID NO: 2	A0110PMP055A10	:E.....	N.....S.....SDA.....	K.....				
SEQ ID NO: 3	A0110PMP055B11	:E.....	N.....S.....S.A.....	K.....				
SEQ ID NO: 3	A0110PMP055B12	:E.....	N.....S.A.....	K.....				
SEQ ID NO: 4	A0110PMP056D09	:E.....	P.....P.....					
SEQ ID NO: 5	A0110FMP056G10	:E.....						
SEQ ID NO: 6	A0110PMP057B09	:E.....	S.....V.....	K.....				
SEQ ID NO: 2	A0110PMP057D11	:E.....	N.....S.....SDA.....	K.....				
	Kabat #	80	90	100	110				
SEQ ID NO: 1	A0110PMP056A10	:	abc						
SEQ ID NO: 2	A0110PMP055A10	:				
SEQ ID NO: 3	A0110PMP055B11	:	Q.....			
SEQ ID NO: 3	A0110PMP055B12	:	Q.....			
SEQ ID NO: 4	A0110PMP056D09	:	Q.....			
SEQ ID NO: 5	A0110PMP056G10	:	Q.....			
SEQ ID NO: 6	A0110PMP057B09	:	Q.....			
SEQ ID NO: 2	A0110PMP057D11	:	Q.....			

表 A-3: CD123 结合纳米抗体 A0110055F03 及其家族成员的序列比对。

[1762]

		1	10	20	30	40	50	60	70
SEQ ID NO: 7	Kabat # :	1	1	1	1	1	1	1	1
	A0110FME055F03 :	EVOLVESGGGLVQAGGGLRLSCAASGRTFSSYVVMGFRQAPGKERE							
SEQ ID NO: 8	A0110FME055A04 :
SEQ ID NO: 9	A0110FME056C03 :
SEQ ID NO: 10	A0110FME056G01 :
SEQ ID NO: 7	Kabat # :	80	80	90	90	100	100	110	110
	A0110FME055F03 :	abc	abc	abc	abc	abcde	abcde	abcde	abcde
SEQ ID NO: 8	A0110FME055A04 :	LOMNSLNPEDTAVYYCVA	DKDETGFRTLPIAYD	YNGQGTQV	YSS	RD	RD	RD	RD
SEQ ID NO: 9	A0110FME056C03 :
SEQ ID NO: 10	A0110FME056G01 :

表 A-4: CD123 结合结构单元的 CDR 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO。第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Konermann, 2010 确定。

[1763]

SEQ	纳米抗体	SEQ	FR1	SEQ	CDR1	SEQ	FR2	SEQ	CDR2	SEQ	FR3	SEQ	CDR3	SEQ	FR4
1	A0110FMP 056A10	26	EVQLVKGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	11	GITSKIN DMG	30	WYRQTPGNY REVA	17	SITATG TTN	34	YRD SVKGRFTISRDNAKNTV YLQ MNSLKPEDTTVYYCNT	21	FPPISNF	40	WQGTL VTVSS
2	A0110PMP 055A10 / A0110FMP 057D11	27	EVQLVEGGGLVQ AGGSLRLSCAAN	12	GISSKSD AMG	31	WYRQTPGKY REVA	17	SITATG TTN	35	YRD SVKGRFTISRDNAKNTV YLQ MNSLKPEDTTVYYCNT	22	FPAISNF	41	WQGTL VTVSS
3	A0110FMP 055B11 / A0110PMP 055B12	27	EVQLVEGGGLVQ AGGSLRLSCAAN	13	GITSKSN AMG	31	WYRQTPGKY REVA	17	SITATG TTN	35	YRD SVKGRFTISRDNAKNTV YLQ MNSLKPEDTTVYYCNT	22	FPAISNF	41	WQGTL VTVSS
4	A0110FMP 056D09	28	EVQLVEGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	14	GIPSKIN DMG	32	WFRQTPGNY REVA	17	SITATG TTN	35	YRD SVKGRFTISRDNAKNTV YLQ MNSLKPEDTTVYYCNT	21	FPPISNF	40	WQGTL VTVSS
5	A0110FMP 056G10	28	EVQLVEGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	11	GITSKIN DMG	30	WYRQTPGNY REVA	17	SITATG TTN	34	YRD SVKGRFTISRDNAKNTV YLQ MNSLKPEDTTVYYCNT	21	FPPISNF	40	WQGTL VTVSS
6	A0110FMP 057B09	28	EVQLVEGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	15	GITSKSN VMG	31	WYRQTPGKY REVA	17	SITATG TTN	35	YRD SVKGRFTISRDNAKNTV YLQ MNSLKPEDTTVYYCNT	22	FPAISNF	41	WQGTL VTVSS
7	A0110FMP 055F03	29	EVQLVEGGGLVQ AGGPLRLSCAAS	16	GRTFSSY VMG	33	WFRQAPGKE REFVA	18	AIYWSN GKTQ	36	YTD SVKGRFTISGDNAKNTV YLQ MNSLKPEDTTVYYCVA	23	DKDEIGFRTL	41	WQGTL VTVSS
8	A0110FMP 055A04	28	EVQLVEGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	16	GRTFSSY VMG	33	WFRQAPGKE REFVA	19	AIYWS GKT	37	YTD SVKGRFTISGDNAKNTV YLQ MNSLKPEDTTVYYCVA	24	DKDRDGFRTL	41	WQGTL VTVSS
9	A0110FMP 056C03	28	EVQLVEGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	16	GRTFSSY VMG	33	WFRQAPGKE REFVA	19	AIYWS GKT	38	YTD SVKGRFTISGDNAKNTV YLQ MNSLKPEDTTVYYCVA	25	DKDRYGFRTL	41	WQGTL VTVSS
10	A0110FMP 056G01	28	EVQLVEGGGLVQ AGGSLRLSCAAS	16	GRTFSSY VMG	33	WFRQAPGKE REFVA	20	AIWSS GKT	39	YTD SVKGRFTISGDNAKNTV YLQ MNSLKPEDTTVYYCVA	24	DKDRDGFRTL	41	WQGTL VTVSS

[1764]

表 A-5-第1部分：TCR 结合结构单元的 CDR 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合，即 FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO。第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO，即 FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

SEQ	纳米抗体	SEQ	FR1	SEQ	CDR1	SEQ	FR2	SEQ	CDR2	SEQ	FR3	SEQ	CDR3	SEQ	FR4	
42	T0170FMP226	EVQLVESGGGLVQF181	GDVH ¹ KIN251WYRQAPGKE	192	HISIGD277YADSAKGRFTISRDEAKNMV	218	FSRIPYDY	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	
	056G05	GGSLRLSCVAS	FLG	REKVA	QTD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	278	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYN	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL
78	T0170FMP227	EVQLVESGGGLVQF182	GSVH ¹ KIN252WYRQAPGKE	193	TITIGD278YADSAKGRFTISRDEAKNMV	217	GSRLYPYN	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	
	027A05	GGSLRLSCVAS	FLG	RELVA	TTD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	279	YADYAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYN	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL
79	T0170FMP227	EVQLVESGGGLVQF182	GSVH ¹ KIN253WYRQAPGKE	193	TITIGD279YADYAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYN	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	
	028B01	GGSLRLSCVAS	FLG	RGVVA	TTD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYN	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL
80	T0170FMP228	EVQLVESGGGLVQF182	GSVH ¹ KIN254WYRQAPGKE	194	TITIGD280YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYN	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	
	028F10	GRSLRLPCASA	FLG	REMVVA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	279	YADYAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYN	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL
81	T0170FMP227	EVQLVESGGGLVQF182	GSVH ¹ KIN252WYRQAPGKE	193	TITIGD279YADYAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYN	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	
	028G06	GGSLRLSCVAS	FLG	RELVA	TTD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYN	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL
82	T0170FMP227	EVQLVESGGGLVQF182	GSVH ¹ KIN254WYRQAPGKE	194	TITIGD280YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYN	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	
	029F08	GGSLRLSCVAS	FLG	REMVVA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYN	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL
83	T0170FMP227	EVQLVESGGGLVQF182	GSVH ¹ KIN252WYRQAPGKE	193	TITIGD280YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYN	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	
	040C01	GGSLRLSCVAS	FLG	RELVA	TTD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	281	YSHFAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRLYPYN	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL
84	T0170FMP229	EVQLVESGGGLVQF183	GSVH ¹ LLIN254WYRQAPGKE	195	HITIAD281YSHFAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRLYPYN	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	
	053A03	GGSLRLSCVAS	FLG	REMVVA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	282	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYN	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL
85	T0170FMP230	EVQLVESGGGLVQF184	GAVH ¹ KIN255WYRQPEKE	196	TITIGD282YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYN	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	
	053D01	GGSLKLSCVAS	FLG	REMVVA	DVD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	283	YAESAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRLYPYN	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL
86	T0170FMP231	EVQLVESGGGLVQF185	GDVH ¹ KIN256WYRQAPKE	197	HITIAD283YAESAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIPYNY	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	
	053E10	GGSLRLSCRAS	TLG	REMVVA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	284	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIPYNY	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL
87	T0170FMP232	EVQLVESGGGLVQF185	GDVH ¹ KIN256WYRQAPKE	197	HITIAD280YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIPYNY	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	
	055A01	GGSLRLSCVAS	TLG	REMVVA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIPYNY	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL
88	T0170FMP227	EVQLVESGGGLVQF185	GDVH ¹ KIN256WYRQAPKE	197	HITIAD280YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIPYNY	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	
	055A02	GGSLRLSCVAS	TLG	REMVVA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRLYPYN	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL
89	T0170FMP226	EVQLVESGGGLVQF181	GDVH ¹ KIN251WYRQAPKE	198	HITIGD280YADSAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRLYPYN	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	
	055A03	GGSLRLSCVAS	FLG	REKVA	QAD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	281	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYN	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL
90	T0170FMP233	EVQLVESGGGSVQF182	GSVH ¹ KIN254WYRQAPKE	194	TITIGD284YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPYN	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	
	055A08	GGSLRLSCVAS	FLG	REMVVA	ATD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA	285	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRLYPYN	322	WGRGTO	322	WGRGTO	322	WGRGTO
91	T0170FMP227	EVQLVESGGGLVQF183	GSVH ¹ LLIN254WYRQAPKE	199	HISIAD285YADSAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRLYPYN	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	320	WQGQTL	
	055A10	GGSLRLSCVAS	FLG	REMVVA	ATD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA	283	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIPYNY	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL
92	T0170FMP231	EVQLVESGGGLVQF185	GSVH ¹ KIN256WYRQAPKE	200	HITIGD283YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIPYNY	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	321	WQGQTL	
	055B01	GGSLRLSCRAS	LLG	REMVVA	ATV											

表 A-5-第 2 部分：TCR 结合结构单元的 CDR 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合，即 FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO。第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO，即 FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

[1765]

SEQ	纳米抗体	SEQ FR1	SEQ CDR1	SEQ FR2	SEQ CDR2	SEQ FR3	SEQ CDR3	SEQ FR4
93	T0170PMP227	EVOLVESSGGLVQPI183	GSVHLIN257	WYRQAPGKE	195	HITIAD281	YSHFAKGRETISRDEAKMV	220
055B02	GGSLRLSCAAS	FLG	REMYA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA		GSRIYPYDY	320
94	T0170PMP234	EVOLVESSGGLVQPI183	GSVHLIN254	WYRQAPGKE	195	HITIAD285	YAHFAKGRETISRDEAKMV	220
055B03	GGSLRLSCAAS	FLG	REMYA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA		GSRIYPYDY	321
95	T0170PMP227	EVOLVESSGGLVQPI183	GSVHLIN254	WYRQAPGKE	195	HITIAD285	YAHFAKGRETISRDEAKMV	220
055B11	GGSLRLSCAAS	FLG	REMYA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA		GSRIYPYDY	320
96	T0170PMP230	EVOLVESSGGLVQPI184	GAVHKIN255	WYRQAPEKE	201	HITIGD286	YADSAKGRETISRDEAKMV	219
055C02	GGSLRLSCAAS	FLG	REMYA	EVD	YLOMNTSLKPEDTAVYFCRA		GSRLYPNY	321
97	T0170PMP235	EVOLVESSGGLVHPI181	GDVHKIN258	WHRQPPGKE	202	HITIGD287	YADSAKGRETISRDEAKMV	220
055C06	GGSLRLSCAAS	FLG	REKVA	YTD	YLOMNLNKKPEDTAVYFCRA		GSRIYPYDY	321
98	T0170PMP227	EVOLVESSGGLVQPI186	GDVHKIN256	WYRQAPAKE	197	HITIGD288	YADSAKGRETISRDEAKMV	221
055C10	GGSLRLSCAAS	FLG	REMYA	ATD	YLOMNLNKKPEDTAVYFCRA		GSRLYPNY	321
99	T0170PMP227	EVOLVESSGGLVQPI185	GDVHKIN256	WYRQAPAKE	203	HITIGD289	YADSAKGRETISRDEAKMV	221
055D03	GGSLRLSCAAS	ILG	REMYA	ATN	YLOMNLNKKPEDTAVYFCRA		GSRIYPYNY	320
100	T0170PMP227	EVOLVESSGGLVQPI181	GDVHKIN259	WHRQAPGKE	202	HITIGD289	YADSAKGRETISRDEAKMV	220
055D06	GGSLRLSCAAS	FLG	REKVA	YTD	YLOMNLNKKPEDTAVYFCRA		GSRIYPYNY	320
101	T0170PMP227	EVOLVESSGGLVQPI185	GDVHKIN256	WYRQAPAKE	197	HITIGD290	YADSAKGRETISRDEAKMV	221
055D10	GGSLRLSCAAS	ILG	REMYA	ATD	YLOMNLNKKPEDTAVYFCRA		GSRIYPYNY	321
102	T0170PMP227	EVOLVESSGGLVQPI187	GEVYKIN251	WYRQAPGKE	204	HITIAD291	YADFAKGRETISRDEAKMV	222
055E01	GGSLRLSCAAS	FLG	REKVA	VAD	YLOMNLNKKPEDTAVYFCRA		GSRIYPYDY	321
103	T0170PMP230	EVOLVESSGGLVQPI184	GAVHKIN260	WYRQAPEKE	205	TITIGD292	YADSAKGRETISRDEAKMV	219
055E05	GGSLRLSCAAS	FLG	REMYA	EVD	YLOMNTSLKPEDTAVYFCRA		GSRLYPNY	321
104	T0170PMP227	EVOLVESSGGLVQPI187	GEVYKIN251	WYRQAPGKE	204	HITIAD291	YADFAKGRETISRDEAKMV	222
055F02	GGSLRLSCAAS	FLG	REKVA	VAD	YLOMNLNKKPEDTAVYFCRA		GSRIYPYNY	320
105	T0170PMP226	EVOLVESSGGLVQPI185	GDVHKIN251	WYRQAPGKE	206	HISID293	YAESAKGRETISRDEAKMV	218
055F03	GGSLRLSCAAS	ILG	REKVA	QTD	YLOMNLNKKPEDTAVYFCRA		GSRIYPYDY	320
106	T0170PMP227	EVOLVESSGGLVQPI182	GSVHLIN252	WYRQAPGKE	194	TITIGD279	YADYAKGRETISRDEAKMV	219
055F06	GGSLRLSCAAS	FLG	RELYA	ATD	YLOMNLNKKPEDTAVYFCRA		GSRLYPNY	320
107	T0170PMP227	EVOLVESSGGLVQPI185	GDVHKIN256	WYRQAPAKE	197	HITIGD294	YADSAKGRETISRDEAKMV	221
055F08	GGSLRLSCAAS	ILG	REMYA	ATD	YLOMNLNKKPEDTAVYFCRA		GSRLYPNY	320
108	T0170PMP227	EVOLVESSGGLVQPI181	GDVHKIN259	WHRQAPGKE	197	HITIGD280	YADSAKGRETISRDEAKMV	220
055G05	GGSLRLSCAAS	FLG	REKVA	ATD	YLOMNLNKKPEDTAVYFCRA		GSRIYPYDY	321

[1766]

表 A-5-第 3 部分：TCR 结合结构单元的 CDR 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合，即 FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO。第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO，即 FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

SEQ	纳米抗体	SEQ	FR1	SEQ	CDR1	SEQ	FR2	SEQ	CDR2	SEQ	FR3	SEQ	CDR3	SEQ	FR4
109	T0170PMP233	EVQLVESGGGSVQF182	GSVHKIN261	WYRQAPGKE	194	TITIGD284	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPPNY	321	WGQGTQ				
055G09	GGSILRLSCAAS	ELG	REYVA		ATD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			
110	T0170PMP236	EVQLVESGGGLVQF181	GDYHKIN251	WYRQAPGKE	207	HITIGD280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	222	GSRIWPPDY	321	WGQGTQ				
056A02	GGSILRLSCAAS	ELG	REYVA		QTD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			
111	T0170PMP227	EVQLVESGGGLVQF183	GSVHLIN254	WYRQAPGKE	195	HITIAD281	YSHFAKGRTFISRDEAKNMV	220	GSRIYPPDY	320	WGQGTQ				
056A08	GGSILRLSCAAS	ELG	REYVA		ATD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			
112	T0170PMP229	EVQLVESGGGLVQF183	GSVHLIN262	WYRQAPGKE	195	HITIAD281	YSHFAKGRTFISRDEAKNMV	220	GSRIWPPDY	321	WGQGTQ				
056A10	GGSILRLSCAAS	ELG	RGVVA		ATD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			
113	T0170PMP237	EVQLVESGGGLVQF185	GDYHKIN256	WYRQAPAKE	197	HITIGD280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPPNY	320	WGQGTQ				
056B11	GGSILRLSCAAS	ILG	REYVA		ATD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			
114	T0170PMP227	EVQLVESGGGLVQF188	GGVHKIN256	WYRQAPAKE	197	HITIGD280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPPNY	320	WGQGTQ				
056C01	GGSILRLSCAAS	ILG	REYVA		ATD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			
115	T0170PMP227	EVQLVESGGGLVQF187	GEVYKIN251	WYRQAPGKE	204	HITIAD295	YADEAQRFTISRDEAKNMV	222	GSRIWPPDY	321	WGQGTQ				
056C02	GGSILRLSCAAS	FLG	REYVA		VAD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			
116	T0170PMP227	EVQLVESGGGLVQF185	GDYHKIN256	WYRQAPAKE	208	HITIGD280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPPNY	321	WGQGTQ				
056C03	GGSILRLSCAAS	ILG	REYVA		ATD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			
117	T0170PMP227	EVQLVESGGGLVQF183	GSVHLIN254	WYRQAPGKE	195	HITIAD281	YSHFAKGRTFISRDEAKNMV	220	GSRIYPPDY	321	WGQGTQ				
056C04	GGSILRLSCAAS	FLG	REYVA		ATD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			
118	T0170PMP226	EVQLVESGGGLVQF181	GDYHKIN251	WYRQAPGKE	198	HITIGD280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	220	GSRIYPPNY	324	WGQGTQ				
056C07	GGSILRLSCAAS	FLG	REYVA		QAD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			
119	T0170PMP229	EVQLVESGGGLVQF183	GSVHLIN263	WYRQAPGKE	195	HITIAD281	YSHFAKGRTFISRDEAKNMV	220	GSRIYPPDY	323	WGQGTQ				
056C10	GGSILRLSCAAS	FLG	REYVA		ATD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			
120	T0170PMP238	EVQLVESGGDLVQF181	GDYHKIN254	WYRQAPGKE	195	HITIAD296	YAEFAKGRTFISRDEAKNMV	223	GSRIYPPNY	321	WGQGTQ				
056D01	GGSILRLSCAAS	FLG	REYVA		ATD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			
121	T0170PMP227	EVQLVESGGGLVQF185	GDYHKIN256	WYRQAPKE	197	HITIGD280	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	221	YSRIYPPNY	322	WGQGTQ				
056D02	GGSILRLSCAAS	ILG	REYVA		ATD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			
122	T0170PMP226	EVQLVESGGGLVQF185	GDYHKIN251	WYRQAPGKE	209	RISISD293	YAESARGRTFISRDEAKNMV	218	FSRIYPPDY	320	WGQGTQ				
056D11	GGSILRLSCAAS	ILG	REYVA		QTD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			
123	T0170PMP239	EVQLVESGGGLVQF187	GEVYKIN251	WYRQAPGKE	204	HITIAD297	YADEAQRGLTISRDEAKNMV	222	GSRIWPPDY	320	WGQGTQ				
056E02	GGSILRLSCAAS	FLG	REYVA		VAD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			
124	T0170PMP240	EVQLVESGGGLVQF184	GAVHKIN255	WYRQTPKE	205	TITIGD282	YADSAKGRFTISRDEAKNMV	219	GSRLYPPNY	320	WGQGTQ				
056F01	GGSILKLPCCAS	FLG	REYVA		EVD	YLOMNSLSPEDTAVYFCRA						VTVSS			

表 A-5-第 4 部分：TCR 结合结构单元的 CDR 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合，即 FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO。第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO，即 FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

[1767]

SEQ	纳米抗体	SEQ FRI1	SEQ CDR1	SEQ FRI2	SEQ CDR2	SEQ FRI3	SEQ CDR3	SEQ FRI4
125	T0170FMP241	EVOLVESGGGLVQF183	GSVHLIN254	WYRQAPKE	195HITIAD	205YAHFAKGRTFISRDEAKNMV	220GSRIYPYD	320GGQGTL
056F08	GGSLRLSCAAS	FLG	REMYA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS
126	T0170FMP242	EVOLVESGGGLAQF185	GDVHKIN256	WYRQAPKE	197HITIGD	280YADSAGKGRFTISRDEAKNMV	221YSRIYPYV	320GGQGTL
056G02	GGSLRLSCAAS	ILG	REMYA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS
127	T0170FMP227	EVOLVESGGGLVQF187	GEVYKIN251	WYRQAPKE	210HITIAD	298YADEFAKGRTFISRDEAKNMV	222GSRIYPYD	321GGQGTL
056G11	GGSLRLSCAAS	FLG	REMYA	EAD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS
128	T0170FMP243	EVOLVESGGGVQF189	GSVYKIN264	WYRQAPGE	211TITIGD	299YADSAGKGRFTISRDEAKNMV	219GSRLYPYV	321GGQGTL
057B02	GGSLRLSCAAS	FLS	RELYA	EAD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS
129	T0170FMP227	EVOLVESGGGLVQF183	GSVHLIN254	WYRQAPKE	195HITIAD	281YSHFAKGRTFISRDEAKNMV	220GSRIYPYD	321GGQGTL
057D06	GGSLRLSCAAS	FLG	REMYA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS
130	T0170FMP226	EVOLVESGGGLVQF185	GDVHKIN251	WYRQAPKE	212HIAISD	293YAESAKGRTFISRDEAKNMV	218FSRIYPYD	320GGQGTL
061A02	GGSLRLSCVAS	ILG	REYVA	OTD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS
131	T0170FMP227	EVOLVESGGGLVQF185	GDVHKIN256	WYRQAPKE	197HITIGD	300YADSAGKGRFTISRDEAKNMV	221YSRIYPYV	320GGQGTL
061B04	GGSLRLSCAAS	ILG	REMYA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS
132	T0170FMP227	EVOLVESGGGLVQF185	GDVHKIN265	WYRQAPKE	197HITIGD	280YADSAGKGRFTISRDEAKNMV	221YSRIYPYV	321GGQGTL
067A01	GGSLRLSCAAS	ILG	RGMYA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS
133	T0170FMP227	EVOLVESGGGLVQF185	GDVHKIN266	WYRQAPKE	197HITIGD	280YADSAGKGRFTISRDEAKNMV	221YSRIYPYV	320GGQGTL
067A03	GGSLRLSCAAS	ILG	HEMYA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS
134	T0170FMP227	EVOLVESGGGLVQF185	GDVHKIN267	WYRQAPKE	197HITIGD	280YADSAGKGRFTISRDEAKNMV	221YSRIYPYV	321GGQGTL
067B06	GGSLRLSCAAS	ILG	REMYA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS
135	T0170FMP227	EVOLVESGGGLVQF185	GDVHKIN256	WYRQAPKE	197HITIGD	301YADSAGKGRFTISRDEAKNMV	221YSRIYPYV	320GGQGTL
067C09	GGSLRLSCAAS	ILG	REMYA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS
136	T0170FMP230	EVOLVESGGGLVQF184	GAVHKIN255	WYRQYPEKE	205TITIGD	282YADSAGKGRFTISRDEAKNMV	219GSRLYPYV	320GGQGTL
067D01	GGSLRLSCAAS	FLG	REMYA	EVD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS
137	T0170FMP230	EVOLVESGGGLVQF184	GAVHKIN260	WYRQAPKE	205TITIGD	302YADSAGKGRFTISRDEAKNMV	223GSRIYPYV	321GGQGTL
067D06	GGSLRLSCAAS	FLG	REMYA	EVD	YLOMNTSLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS
138	T0170FMP227	EVOLVESGGGLAQF185	GDVHKIN256	WYRQAPKE	213HITIGD	303YAGSAKGRTFISRDEAKNMV	221YSRIYPYV	320GGQGTL
067D09	GGSLRLSCAAS	ILG	REMYA	ATS	YLOLNNLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS
139	T0170FMP227	EVOLVESGGGLVQF185	GDVHKIN256	WYRQAPKE	213HITIGD	304YADSAGKGRFTISRDEAKNMV	221YSRIYPYV	320GGQGTL
067E03	GGSLRLSCAAS	ILG	REMYA	ATS	YLOLNNLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS
140	T0170FMP238	EVOLVESGGDLVQF181	GDVHKIN254	WYRQAPKE	195HITIAD	305YAEFAKGRTFISRDEAKNMV	223GSRIYPYV	321GGQGTL
067E06	GGSLRLSCAAS	FLG	REMYA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVYFCRA	YTVSS	YTVSS	YTVSS

表 A-5 第 5 部分：TCR 结合结构单元的 SEQ 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合，即 FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO。第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO，即 FRI-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

[1768]

SEQ	纳米抗体	SEQ	FR1	SEQ	CDR1	SEQ	FR2	SEQ	CDR2	SEQ	FR3	SEQ	CDR3	SEQ	FR4
141	T0170PMP230	EVOLVESGGGLVQPI84	GAVHKIN255	WYRQPEKE	205	TITIGD	306	YAHSAKGRETISRDEAKMV	219	GSRLYPNY	321	#GQGTQ			
142	T0170PMP230	EVOLVESGGGLVQPI84	GAVHKIN255	WYRQPEKE	214	TITIGD	282	YADSAKGRETISRDEAKMV	219	GSRLYPNY	321	#GQGTQ		VTVSS	
143	T0170PMP227	EVOLVESGGGLVQPI87	GEVYKIN251	WYRQAPKE	210	HITIAD	291	YADFAKGRETISRDEAKMV	222	GSRIWPYDY	321	#GQGTQ		VTVSS	
144	T0170PMP227	EVOLVESGGGLVQPI87	GEVYKIN251	WYRQAPKE	210	HITIAD	291	YADFAKGRETISRDEAKMV	220	GSRIYPYDY	321	#GQGTQ		VTVSS	
145	T0170PMP244	EVOLVESGGGSVQPI82	GSVHKIN254	WYRQAPKE	194	TITIGD	284	YADSAKGRETISRDEAKMV	219	GSRLYPNY	321	#GQGTQ		VTVSS	
146	T0170PMP227	EVOLVESGGGLVQPI87	GEVYKIN251	WYRQAPKE	204	HITIAD	307	YADFAKGRETISRDEAKMV	222	GSRIWPYDY	320	#GQGTQ		VTVSS	
147	T0170PMP245	EVOLVESGGGLVQPI85	GDVHKIN256	WYRQAPKE	197	HITIGD	280	YADSAKGRETISRDEAKMV	221	YSRIYPNY	320	#GQGTQ		VTVSS	
148	T0170PMP227	EVOLVESGGGLVQPI87	GEVYKIN251	WYRQAPKE	210	HITIAD	308	YADFAKGRETISRDEAKMV	222	GSRIWPYDY	321	#GQGTQ		VTVSS	
149	T0170PMP227	EVOLVESGGGLVQPI83	GSVHLIN254	WYRQAPKE	215	HITIAD	309	YSFAKGRETISRDEAKMV	220	GSRIYPYDY	321	#GQGTQ		VTVSS	
150	T0170PMP227	EVOLVESGGGLVQPI85	GDVHKIN256	WYRQAPKE	197	HITIGD	310	YADSAKGRETISRDEAKMV	221	YSRIYPNY	320	#GQGTQ		VTVSS	
151	T0170PMP233	EVOLVESGGGSVQPI82	GSVHRIN268	WYRQAPKE	194	TITIGD	284	YADSAKGRETISRDEAKMV	219	GSRLYPNY	321	#GQGTQ		VTVSS	
152	T0170PMP230	EVOLVESGGGLVQPI84	GAVHKIN255	WYRQPEKE	205	TITIGD	311	YEDSAKGRETISRDEAKMV	219	GSRLYPNY	320	#GQGTQ		VTVSS	
153	T0170PMP246	EVOLVESGGGLVRP185	GDVHKIN251	WYRQAPKE	206	HISID	293	YAESAKGRETISRDEAKMV	218	FSRIYPYDY	321	#GQGTQ		VTVSS	
154	T0170PMP227	EVOLVESGGGLVQPI90	GDYKIN259	WHRQAPKE	197	HITIGD	280	YADSAKGRETISRDEAKMV	220	GSRIYPYDY	320	#GQGTQ		VTVSS	
155	T0170PMP231	EVOLVESGGGLVQPI85	GDVHRIN269	WYRQAPKE	197	HITIGD	283	YAESAKGRETISRDEAKMV	221	YSRIYPNY	321	#GQGTQ		VTVSS	
156	T0170PMP227	EVOLVESGGGLVQPI85	GDVHKIN270	WYRQAPKG	197	HITIGD	280	YADSAKGRETISRDEAKMV	221	YSRIYPNY	321	#GQGTQ		VTVSS	
157	069A04	GGSLRLSCAAS	ILG	REMYA	ATD			YLOMNSLKPEDTAVYFCRA							

表 A-5-第 6 部分: TCR 结合结构单元的 CDR 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO。第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

SEQ	纳米抗体	SEQ	FR1	SEQ	CDR1	SEQ	FR2	SEQ	CDR2	SEQ	FR3	SEQ	CDR3	SEQ	FR4
157	T0170PMP	238	EVOLVESGGDLVQF181	GDVHKIN254	MYRQAPGKE	195	HITIAD	305	YAEFAKGRETISRDEPKMV	224	GSRIYPYSY	321	WGQGTQ		
069C05	GGSLRLSCAAS		FLG	RENVIA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVLCRA						WTVSS			
158	T0170PMP	247	EVOLVESGGGVYQF185	GDVHKIN256	MYRQAPAKE	197	HITIGD	280	YADSAKGRETISRDEAKMV	221	YSRILYPYN	320	WGQGTQ		
069D02	GGSLRLSCAAS		ILG	RENVIA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVFCRA						WTVSS			
159	T0170PMP	227	EVOLVESGGGLVQF185	GDVHKIN271	MYRQAPAKE	197	HITIGD	300	YADSAKGRETISRDEAKMV	221	YSRILYPYN	320	WGQGTQ		
069D07	GGSLRLSCAAS		ILG	RENVIA	ATD	YLOMNSLKPEDTAAVFCRA						WTVSS			
160	T0170PMP	227	EVOLVESGGGLVQF187	GEVYKIN251	MYRQAPGKE	210	HITIAD	291	YADEFAKGRETISRDEAKMV	222	GSRIWPYDV	320	WGQGTQ		
069E02	GGSLRLSCAAS		FLG	REKVA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVFCRA						WTVSS			
161	T0170PMP	227	EVOLVESGGGLVQF183	GSVHLIN254	MYRQAPGKE	195	HITIAD	312	YSHFAKGRETISRDEAKMV	220	GSRIYPYDV	320	WGQGTQ		
069E07	GGSLRLSCAAS		FLG	RENVIA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVFCRA						WTVSS			
162	T0170PMP	227	EVOLVESGGGLVQF181	GDVHKIN254	MYRQAPGKE	195	HITIAD	305	YAEFAKGRETISRDEPKMV	223	GSRIYPYN	321	WGQGTQ		
069E09	GGSLRLSCAAS		FLG	RENVIA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVLCRA						WTVSS			
163	T0170PMP	227	EVOLVESGGGLVQF191	GEVYKIN272	MYRQCPGKE	194	HITIGD	280	YADSAKGRETISRDEAKMV	225	LSRILYPYN	320	WGQGTQ		
069E11	GGSLRLSCAAS		ILG	RDMDVA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVFCRA						WTVSS			
164	T0170PMP	227	EVOLVESGGGLVQF185	GDVHKIN256	MYRQAPAKE	197	HITIGD	313	YADSAKGRETISRDEAKMV	221	YSRILYPYN	321	WGQGTQ		
069F05	GGSLRLSCAAS		ILG	RENVIA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVLCRA						WTVSS			
165	T0170PMP	227	EVOLVESGGGLVQF187	GEVYKIN273	MYRQAPGKE	204	HITIAD	291	YADEFAKGRETISRDEAKMV	222	GSRIWPYDV	320	WGQGTQ		
069G08	GGSLRLSCAAS		FLG	REKVA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVFCRA						WTVSS			
166	T0170PMP	238	EVOLVESGGDLVQF181	GDVHKIN254	MYRQAPGKE	195	HITIAD	314	YADFAKGRETISRDEAKMV	223	GSRIYPYN	320	WGQGTQ		
070B08	GGSLRLSCAAS		FLG	RENVIA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVLCRA						WTVSS			
167	T0170PMP	227	EVOLVESGGGLVQF183	GSVHLIN251	MYRQAPGKE	195	HITIAD	315	YSHFAKGRETISRDEAKMV	220	GSRIYPDV	320	WGQGTQ		
070B09	GGSLRLSCAAS		FLG	REKVA	ATD	YLOMNLRLKPEDTAVFCRA						WTVSS			
168	T0170PMP	248	EVOLVESGGGLVQF181	GDVHKIN251	MYRQAPGKE	198	HITIGD	280	YADSAKGRETISRDEAKMV	220	GSRIYPYDV	320	WGQGTQ		
070C09	GGSPRLSCAAS		FLG	REKVA	ATD	YLOMNSLKPEDTAVFCRA						WTVSS			
169	T0170PMP	227	EVOLVESGGGLVQF185	GDVHKIN256	MYRQAPAKE	197	HITIGD	316	YADSAKGRETISRDEAKMV	221	YSRILYPYN	320	WGQGTQ		
070D07	GGSLRLSCAAS		ILG	RENVIA	ATD	YLOMNLRLKPEDTAVFCRA						WTVSS			
170	T0170PMP	227	EVOLVESGGGLVQF187	GEVYKIN251	MYRQAPGKE	204	HITIAD	298	YADFAKGRETISRDEAKMV	222	GSRIWPYDV	320	WGQGTQ		
070E07	GGSLRLSCAAS		FLG	REKVA	ATD	YLOMNLRLKPEDTAVFCRA						WTVSS			
171	T0170PMP	233	EVOLVESGGGVQF182	GSVHKIN274	MYCQAPGKE	194	HITIGD	284	YADSAKGRETISRDEAKMV	219	GSRILYPYN	321	WGQGTQ		
070F11	GGSLRLSCAAS		FLG	RENVIA	ATD	YLOMNSLSPEDTAVFCRA						WTVSS			
172	T0170PMP	226	EVOLVESGGGNQF185	GDVHKIN251	MYRQAPGKE	206	HISID	317	YAESAKGRETISRDESKMV	218	FSRILYPDV	321	WGQGTQ		
070G02	GGSLRLSCAAS		ILG	REKVA	ATD	YLOMNSLKPEDAAVLCRA						WTVSS			

表 A-5-第 7 部分: TCR 结合结构单元的 CDR 和框架序列加上式 I 中提供的优选组合, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO。第一栏是指完整 ISV 的 SEQ ID NO, 即 FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4。CDR1、CDR2 和 CDR3 根据 Kontermann, 2010 确定。

SEQ	纳米抗体	SEQ	FR1	SEQ	CDR1	SEQ	FR2	SEQ	CDR2	SEQ	FR3	SEQ	CDR3	SEQ	FR4
173	T0170FMP	234	EVQLVESGGGLVQF	187	GEVHKIN	251	WYRQAPGKE	204	HITID	291	YADFAKGRFTISRDEAKNIV	222	GSRIYFPYD	321	WQGQTQ
070G06	GGSLRPLSCAAS		FLG	REKVA		VAD		YLQMN	NSLKP	PEDTA	VYFCRA		VYVSS		VYVSS
174	T0170FMP	249	EVQLVESGGGLVQF	181	GDVHKIN	251	WYRQAPGKE	216	HITID	280	YADSAKGRFTISRDEAKNIV	220	GSRIYFPYD	320	WQGQTQ
082B04	GGSLRPLSCVAS		FLG	REKVA		QAD		YLQMN	NSLKP	PEDTA	VYFCRA		VYVSS		VYVSS
175	T0170FMP	227	EVQLVESGGGLVQF	191	GEVHKIN	275	WYRQAPGKE	217	TITGD	280	YADSAKGRFTISRDEAKNIV	225	LSRPLYPYN	320	WQGQTQ
084B07	GGSLRPLSCAAS		ILG	RDVVA		ETQ		YLQMN	NSLKP	PEDTA	VYFCRA		VYVSS		VYVSS
176	T0170FMP	227	EVQLVESGGGLVQF	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITID	318	YADSAKGRFTISRDEAKNIV	221	YSRIYPYN	320	WQGQTQ
084C02	GGSLRPLSCAAS		LG	REMVA		ATD		YLQND	SLKP	PEDTA	VYFCRA		VYVSS		VYVSS
177	T0170FMP	227	EVQLVESGGGLVQF	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITID	319	YADSAKGRFTISRDEAKNIV	221	YSRIYPYN	320	WQGQTQ
084E03	GGSLRPLSCAAS		ILG	REMVA		ATD		YLQMN	SLKP	PEDTA	VYFCRA		VYVSS		VYVSS
178	T0170FMP	227	EVQLVESGGGLVQF	185	GDVHKIN	276	WYRQAPAKE	197	HITID	280	YADSAKGRFTISRDEAKNIV	221	YSRIYPYN	320	WQGQTQ
084E05	GGSLRPLSCAAS		LG	REMVA		ATD		YLQMN	SLKP	PEDTA	VYFCRA		VYVSS		VYVSS
179	T0170FMP	227	EVQLVESGGGLVQF	185	GDVHKIN	276	WYRQAPAKE	197	HITID	300	YADSAKGRFTISRDEAKNIV	221	YSRIYPYN	321	WQGQTQ
084F04	GGSLRPLSCAAS		LG	REMVA		ATD		YLQMN	SLKP	PEDTA	VYFCRA		VYVSS		VYVSS
180	T0170FMP	250	EVQLVESGGGLVQF	185	GDVHKIN	256	WYRQAPAKE	197	HITID	280	YADSAKGRFTISRDEAKNIV	221	YSRIYPYN	320	WQGQTQ
084F10	GGSLRPLSCAAS		LG	REMVA		ATD		YLQMN	SLKP	PEDTA	VYFCRA		VYVSS		VYVSS

表 A-6: 对照纳米抗体的序列。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO, “ID”是指识别名称, “序列”表示氨基酸序列。

SEQ	ID	序列
44	RSV7B2 (Q108L)	EVQLVESGGGLVQAGDSLRLSCAASGRFTESYAMGWFRQAPGKEREETVAASWSDGSTYYADSVKGRTFTISRDNAKNTVYLOMNSLKPEDTAVYYCA
45	cAbLys3 D1E, Q5V, A6 E, Q108L)	EVQLVESGGGSVQAGGSLRLSCAASGTYTIGPYCMGWFRQAPGKEREQVAAINMGGITYYADSSVKGRFTISQDNAKNTVYLLMNSLEPEDTAIYYCA

[1771]

表 A-7-第 1 部分：多特异性多肽的序列。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO；“ID”是指识别名称；“序列”表示氨基酸序列。

[1772]

表 A-7-第 2 部分：多特异性多肽的序列。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO；“ID”是指识别名称；“ID”表示氨基酸序列。

表 A-7-第 3 部分：多特异性多肽的序列。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO；“ID”是指识别名称；“序列”表示氨基酸序列。

表 A-7-第 4 部分：多特异性多肽的序列。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO；“ID”是指识别名称；“序列”表示氨基酸序列。

[1776]

表 A-7-第 5 部分：多特异性多肽的序列。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO；“ID”是指识别名称；“序列”表示氨基酸序列。

说 明 书

表 A-8-第 1 部分：CD123 的序列和 TCR 复合物的组分。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO；“ID”是指识别名称；“序列”表示氨基酸

序列		
SEQ	ID	序列
68	人 (NP_002174)	MVLLWLTLLIALPCLLQTKEDDPNPPITNLPMKAKAQQLTWDLNPNVTIDIECVKDADYSMPAVNNSYCFQFGAIISLCVETNYTVRVANPPFSTWILFPENSGPWAGAENLTCWIHDVDFLSCSWAVGPAPALVQYDLYLNVAANRQQYECLHYKRTDAQGTRIGCRFDDISRLSSGSQSSHILVRGRSAAFGIPCTDKFVVFSSQIEILTPPMNTAKCNKTHSFHMWKMESSHFNRKFRYELQIKRMQPVITEQVRDRTSFQLLNPCTYVQIRARERVYEFLSAWSTPQRFECQEEGANTRAWRTSLIALGTLJALVCVTVICRRLVMQRLFPRIPHMKDPIGDQFQNDKLVWEAGKAGLECLVTEQVWVQKT
69	食蟹猴 CD123 (EHH61867.1)	MTLLWLTLVATPCLLRTKEDDPNAPIRNLRMKEIKAQQLMWDLNPNVTDVECIKGTDYSMPAMNSYCFQGAISLCVETNYTVRVASPPFSTWILFPENS GTP RAGAENLTCWVHDVDFLSCSWVGPAPADVQYDLYLNPNSSHEQYRCLHYKTDARGTOIGCRFDDIAPLSRGSGQSSHILVRGRSAAVSIPCTDKFVFFSQIERTLTPPMNTGECNETHSFMEHWKMKSHENRKFRYELRIQKRMQPVRTVEFLSAWSTPQRFECQEEGASRAWRTSLIALGTLALLCFLICRRLVMQRLFPRIPHMKDPIGDTFQODKLVWEAGKAGLECLVTEQVWVET
70	人 (P04234)	δ MEHSTFLSGLVATLQLSQVSPFKIPIEELDRVFTVNCNTSITWVEGTVGFLLSITRDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDESTVQHYRMQSCVELDPATVAGITVTDVATLILALGVFCFAGHETGRILSGAATDQTLRNDDQVYQLRDRDDAQYSHLGGNWARNK
71	人 (P09693)	γ MEQGGKGLAVLILAIILQGTLAQS1KGNHLYRKVYDQEDGSVLLTCDAEAKNTIWFKDGKMIIGFLTEDKKWNLGSNAKDPRGMYQCKGQSNKSKP1QVYRMCQNCIEELNAATISGFLFAEIVS1FVLLAVGYYFIAGQDGVRQSRASDKOTLLPNDQLYQPLKDRDDQYSHLQGNQLRRN
72	人 (P07766)	ε MQSGTHWRVLGLCLLSVGWQDGNEEMGGITQTPYKVLSISGTTVILTCPOYPGSEIILWQHNDKNIIGDDEDDKNIIGSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFVLYLRAVCENCMDVMSVATIVIVDICITGGLLLVVYWSKRNRAKAKPVTGAGAGGRQRGONKERPPVVPNPDYEPIRKGQRDLYSGLNQRRI
73	人 (P20963)	ζ MKWKALFTAAIQLAQALPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGLIFTYGVILTAFLRLVKFSSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREYDVIDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNELOQKDKMAEAYSE1GMKGERRPGKGDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR
74	人 TCR α 恒定结 构域 (P01848)	PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVQSQQSKDSDVYTIDKTVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSTIPEITFFPSPESSC DVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLKYAGFNLLMTLRLWSS
75	人 TCR β 恒定结 构域	EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVLVCLATGFPDPDHDVVELSWWNGKEVHSGVSTDQPLKEQPALINDSRCLSSRLRVSATETWQNPBNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPTQIVSAEAWGRADCGETSVSYQGGVLSATILEYILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF

[1778]

SEQ	ID	序列
76	来源于 2XN9 的人 TCR α 可变结构域	QLLQSPQFLS1QEGENLTIVCNSSSVFSS1QWYRQEPGEGPVLIIVTGTGEVKKLKRLTQFGDARKDSSLHTAAQPGDTGLYLCAGAGSQGNLIFGKGTKLCSVK

表 A-8-第2部分：CD123 的序列和 TCR 复合物的组分。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO；“ID”是指识别名称；“序列”表示氨基酸序列

SEQ	ID	序列
77	衍生自 2XN9 的人 TCR β 可变结构域	DGGITQSPKYLFRKEGVNVLTSCEQNLNHDAMYWWYRCDPGQGLRLIYYSQIINVNDFQKGDIAGYSVSREKKESFPLIVTSAQKNPTAFAFYLCASSRSSYEQYFGPGTRLTVT
343	衍生自 2IAN 的人 TCR α 可变结构域	IQVEQSPPDLLIQLQEGANSTLRCNFSDSVNNLQWFHQNWPWGQLINLFYIPIPSGTKQNGLRSATVATERSSLIYISSQTDGSVYFCAAIQLQGAQKLVFGQGTRLTIN
344	衍生自 2IAN 的人 TCR β 可变结构域	NAGVTTQTPKFRILKIGQSMTLQCTQDMNHNNYWWYRQDPGMGLKLIIYYSVVGAGITDKGEVPGNGNVNRSRSTTEDFPLRLEAPSQTISVYFCASTYHGTGYFGEWSWLTVV
345	衍生自 3TOE 的人 TCR α 可变结构域	GDAKTTQPNMSMESNEEFPVHLPCNHNSTISGTDYIHWWYRQLPSQGPPEYVIHGLTSNVNNRMASLAIADEDRKSSTLILHRAILDAAVYYCTVYGGATNKLIFFGTGTLLAQV
346	衍生自 3TOE 的人 TCR β 可变结构域	VVSQHPSWVIAKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLIMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDDSSFYICSARGGSYNSPPLHFGNGTRLTVT
347	食蟹猴 TCR α 恒定结构域	PYIQNPDPDAVYQLRGSKSNDTSVCLFTDDFDSDVNNVSQSKDSDVHITDKTVLDMRSMDFKNSNGAVAWSNKSDFACTSAFKDSVLPADTEFFPSPESSC

[1779]

表 A-8-第 3 部分：CD123 的序列和 TCR 复合物的组分。“SEQ”是指给定的 SEQ ID NO；“ID”是指识别名称；“序列”表示氨基酸

序列		序列	
SEQ	ID	恒河猴 TCR β 恒定结构域	恒河猴 TCR α 可变结构域
348		EDIKKVFPFPKVAVEPEPSEAEIISHTQKATLVLVCLATGFXPDHVELSWWWNGKEVHSGVSTDQDQPIKEQPALEDSRYSLSSRLRVSATFWHNPRNHFRC QVQFYGLSEDDEWTEDRDKPITQKISAEAWGRADC	QQIMQIPQYQHVQEGEDFTTYCNSSSTTLSENITQWYKQRPGGHPVFLIMLKSGEVKKQKRLIFQFGEAKNSSLHITATQTITDVGTYYFCATTGVNNL FFGTGTRLTVL
349			
350		AGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHDMYWRQDPGMGLRLIHYSVGEGSTEKGEVPGYNVTRSNTEDFPLRLESAMPSQTSVYFCA SSYWTGRSYEQYFGPGRRLTVI	

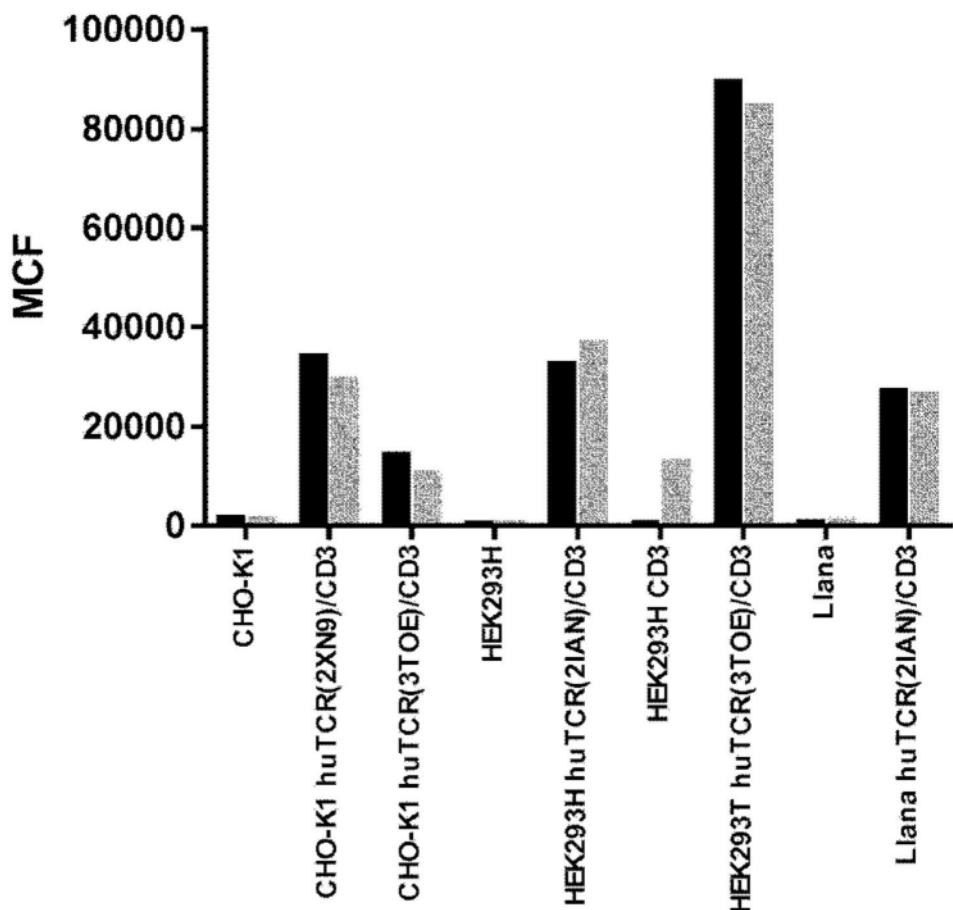


图1

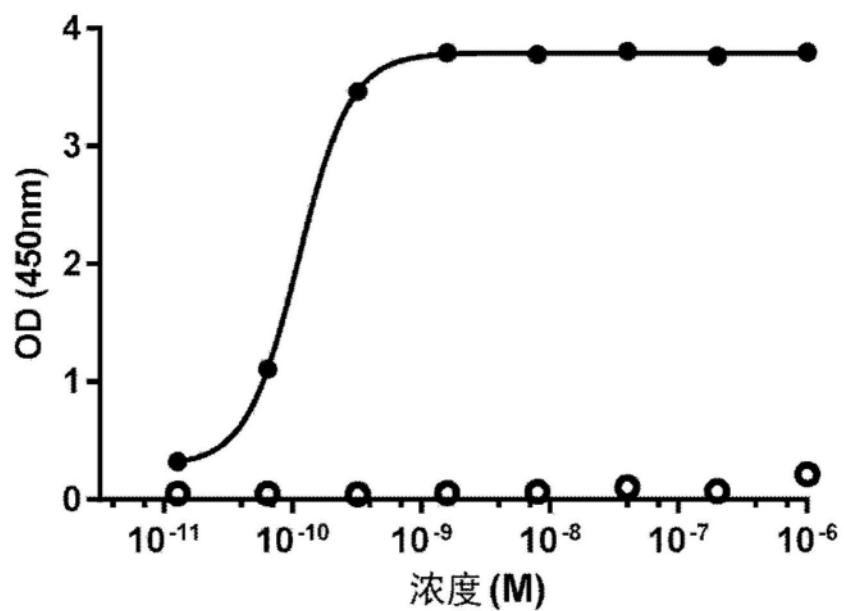
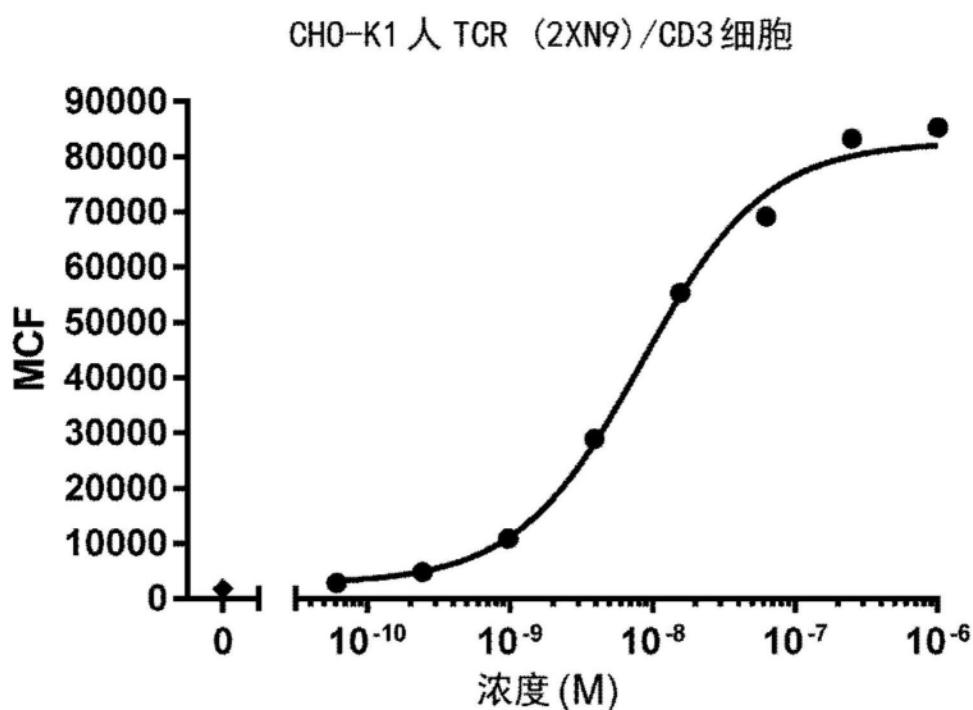


图2

A.



B.

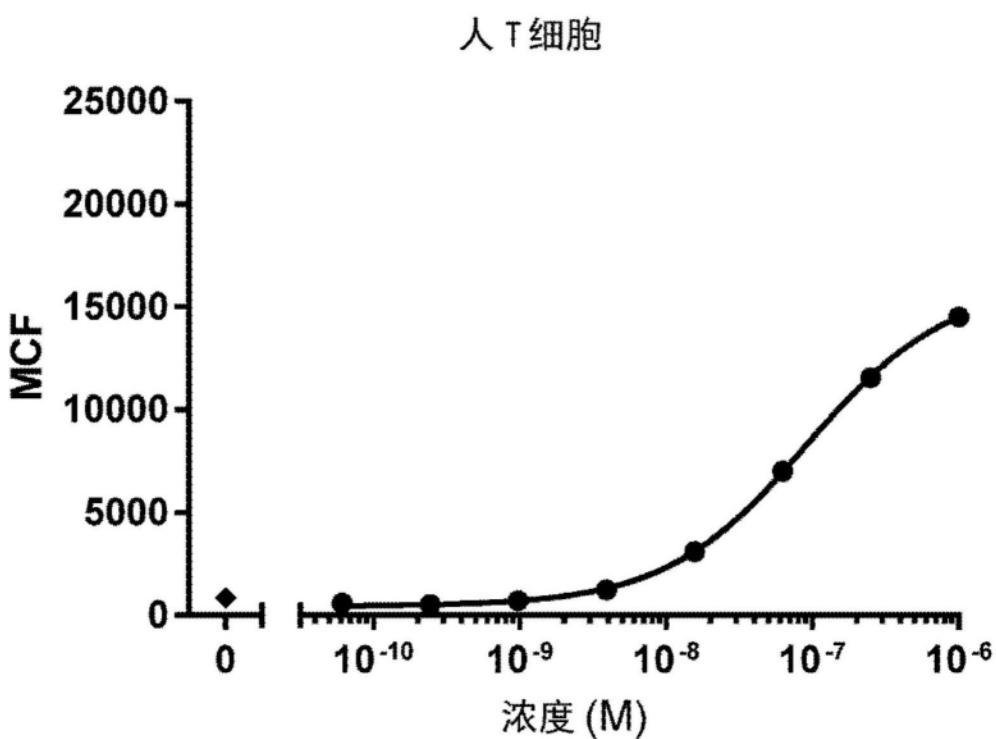
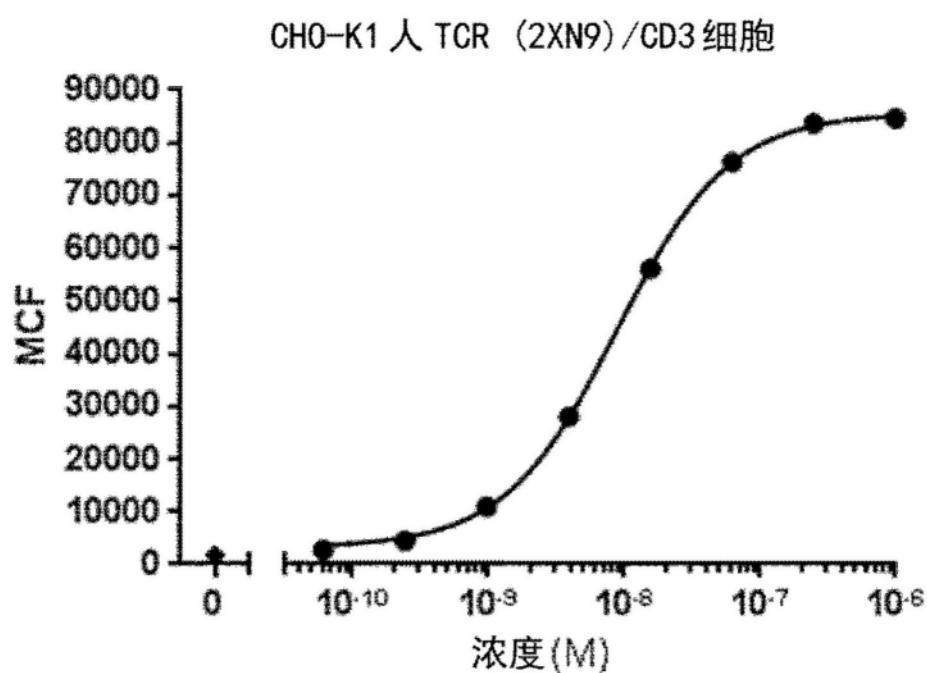


图3

C.



D.

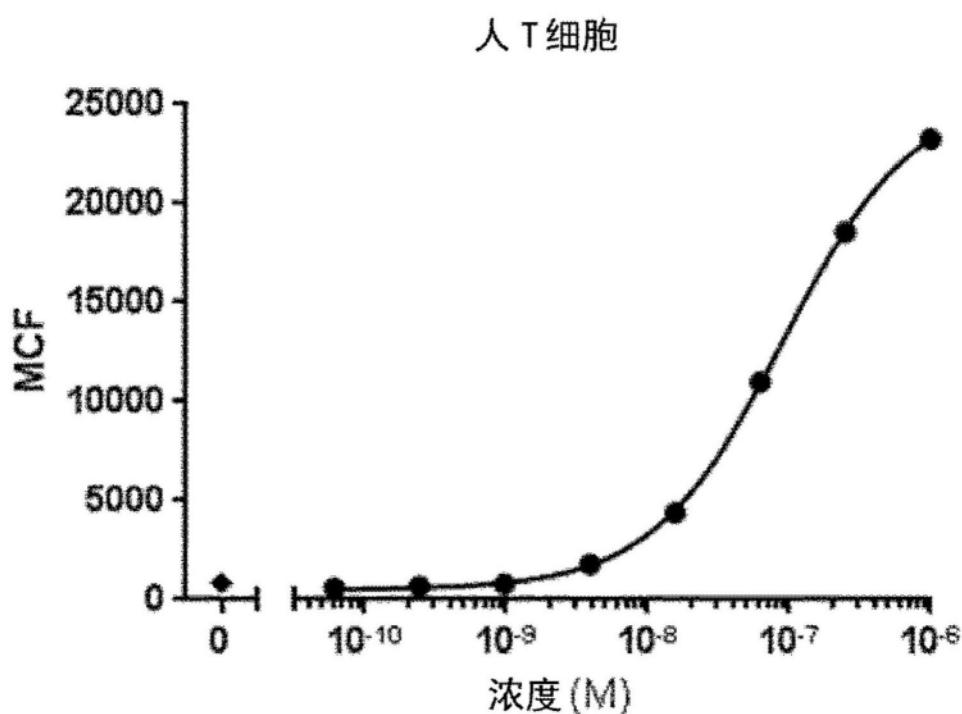
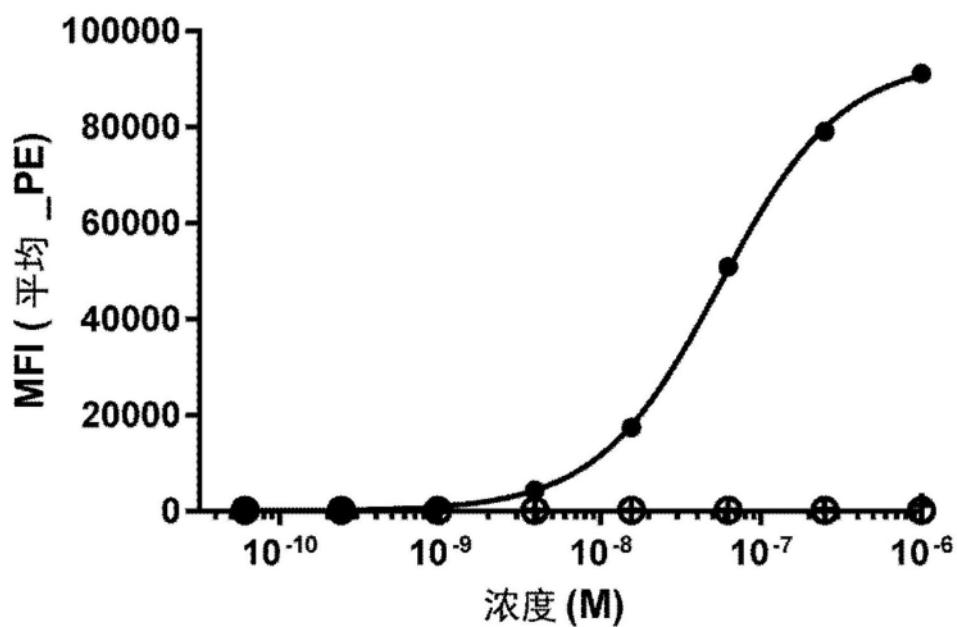


图3 (续)

A.

T0170055A02



B.

T0170056G05

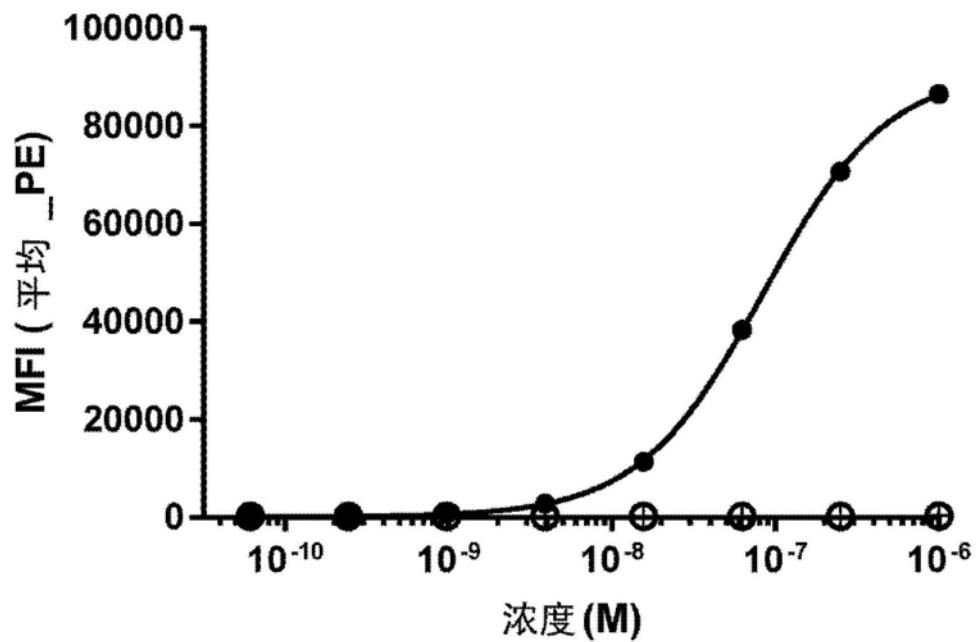
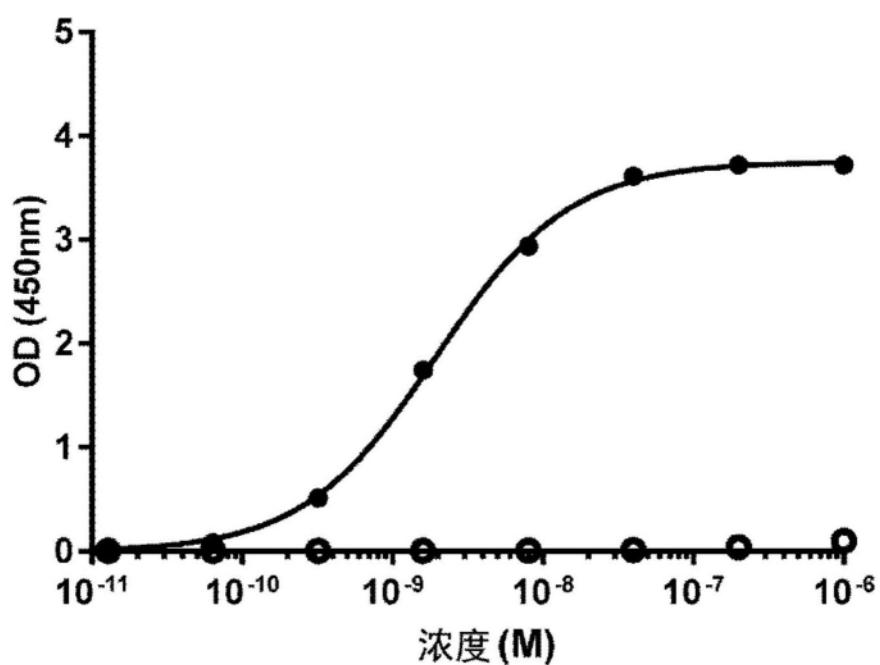


图4

A.

T0170055A02



B.

T0170056G05

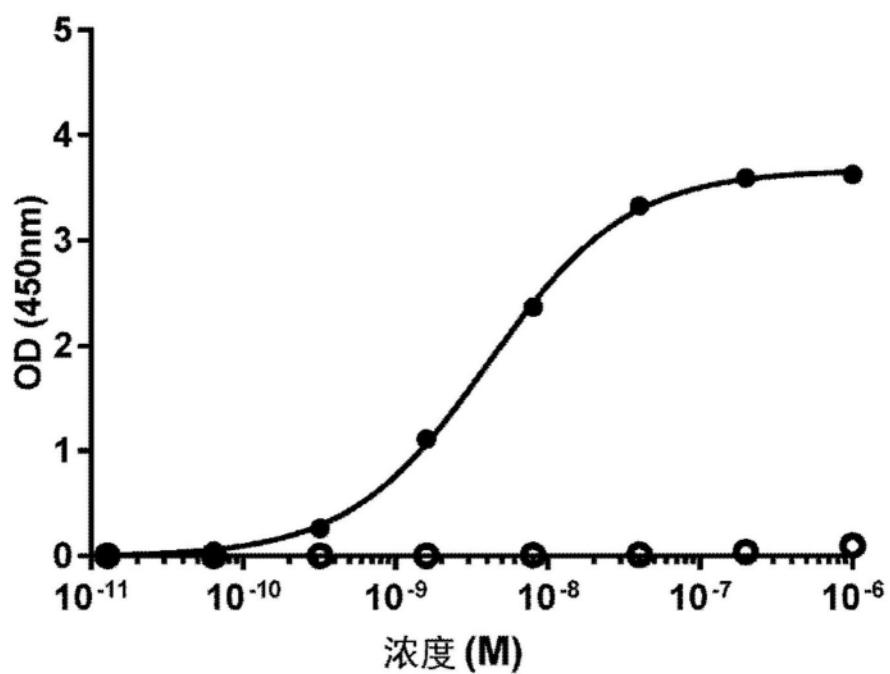
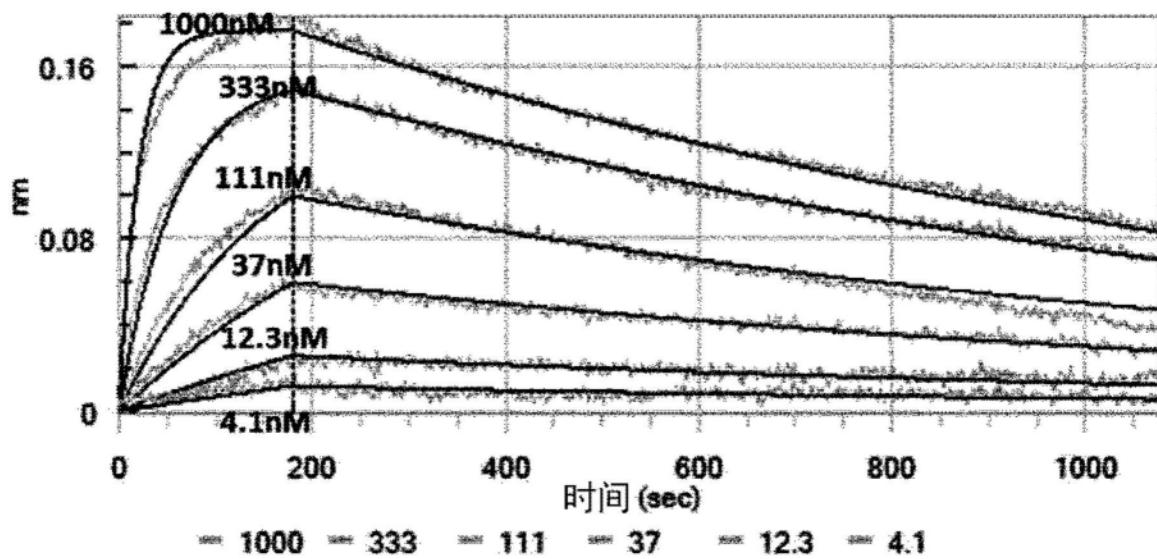


图5

A.



B.

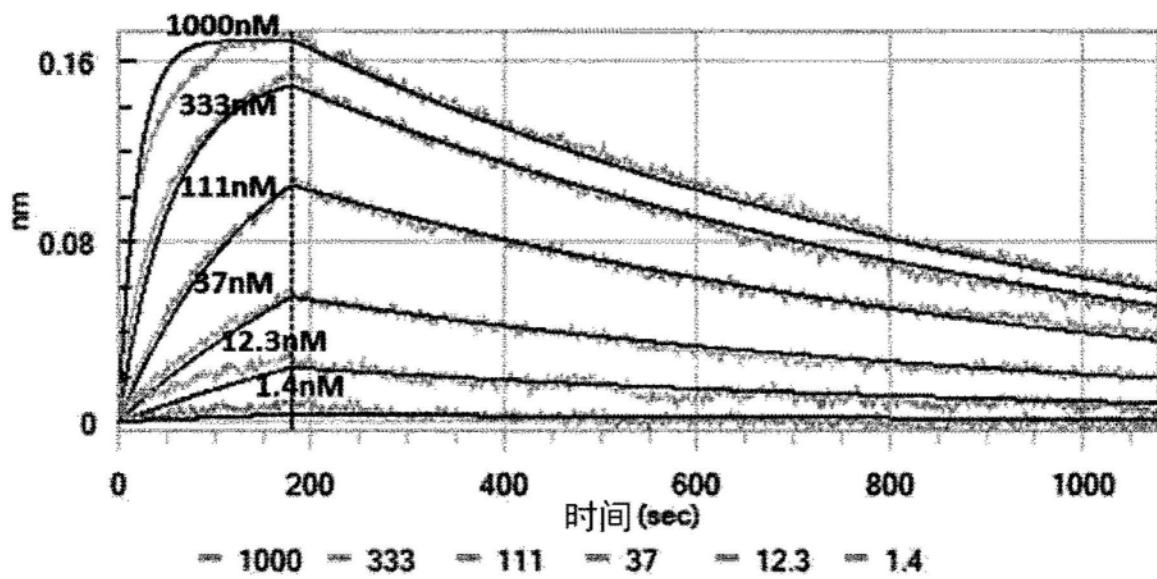
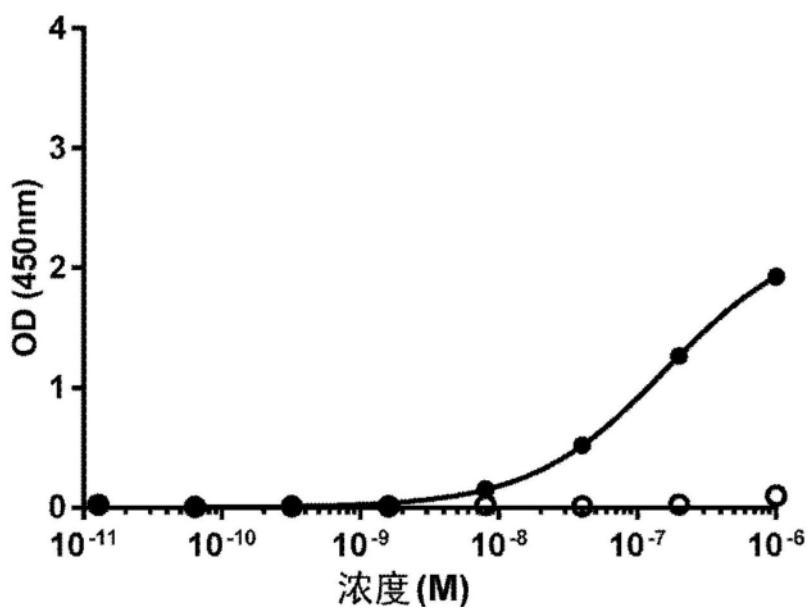


图6

A.

T0170055A02



B.

T0170056G05

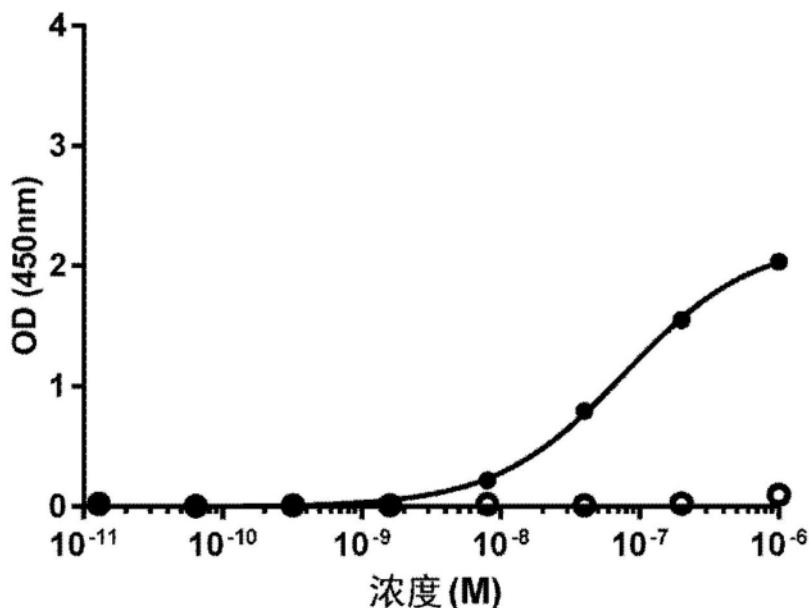
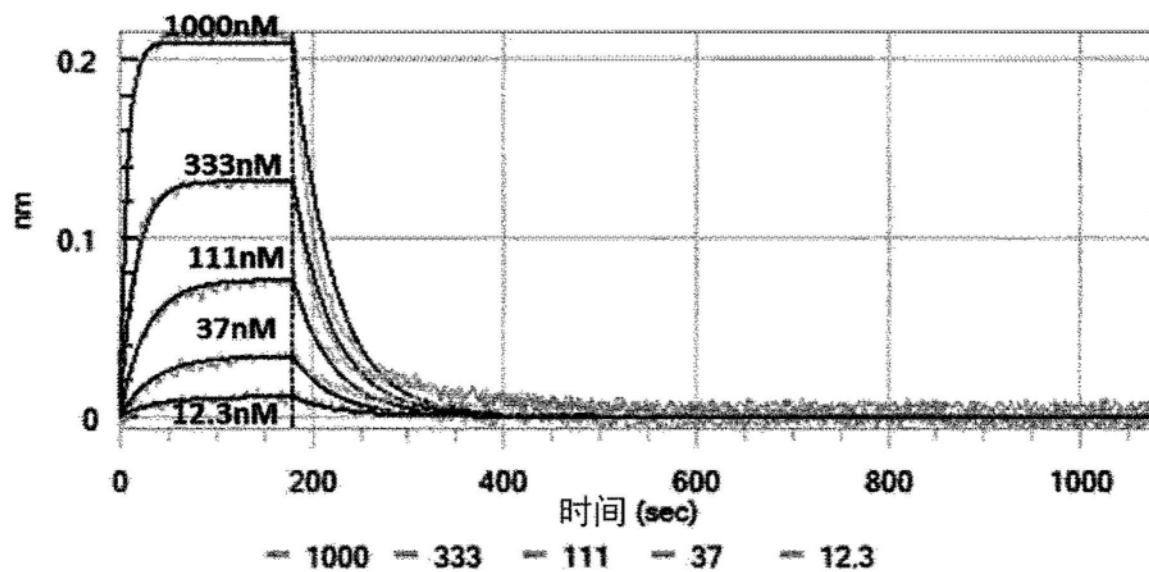


图7

A.



B.

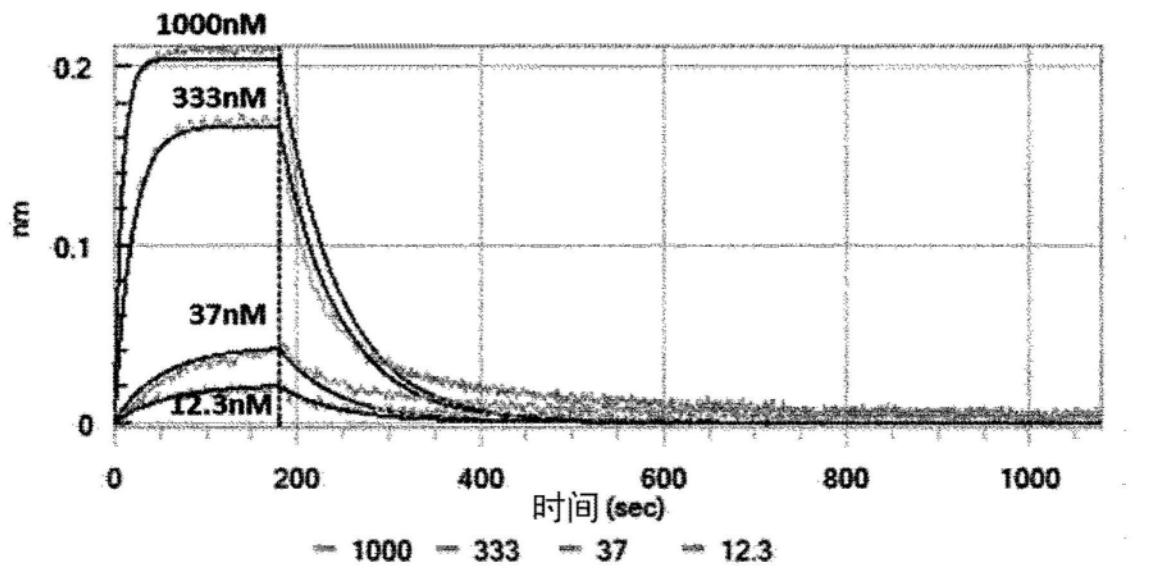
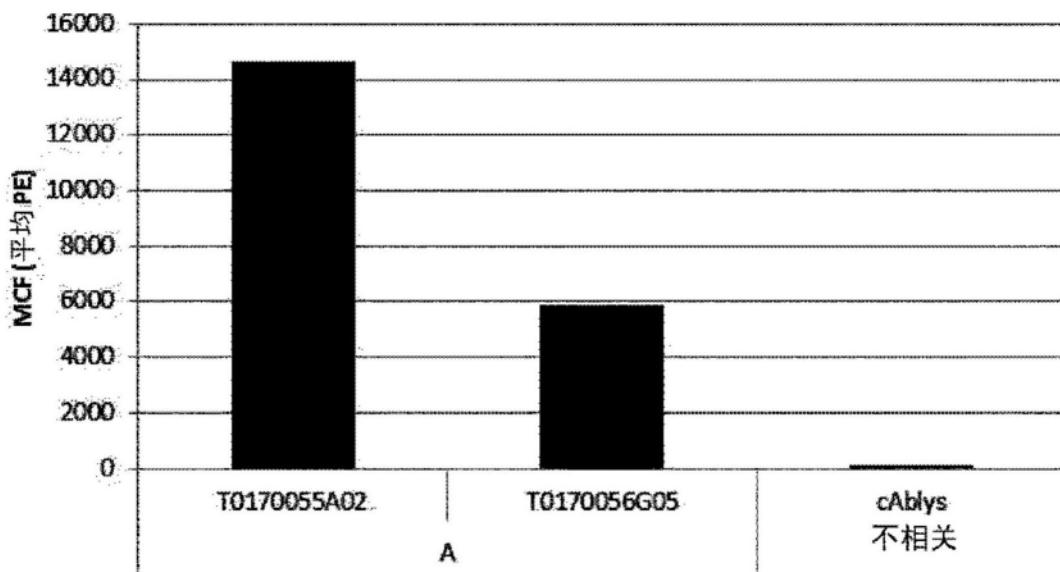


图8

A.



B.

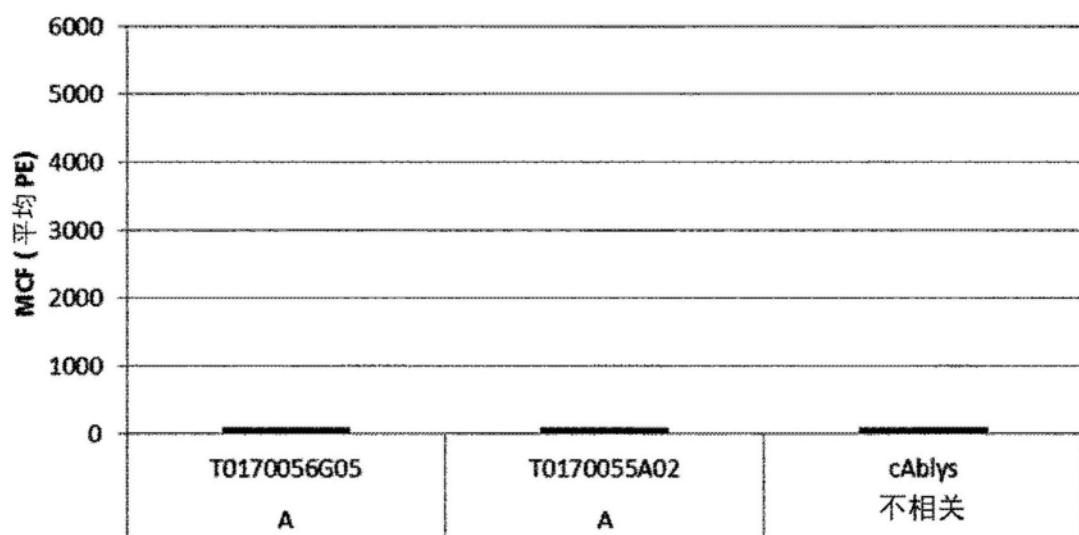


图9

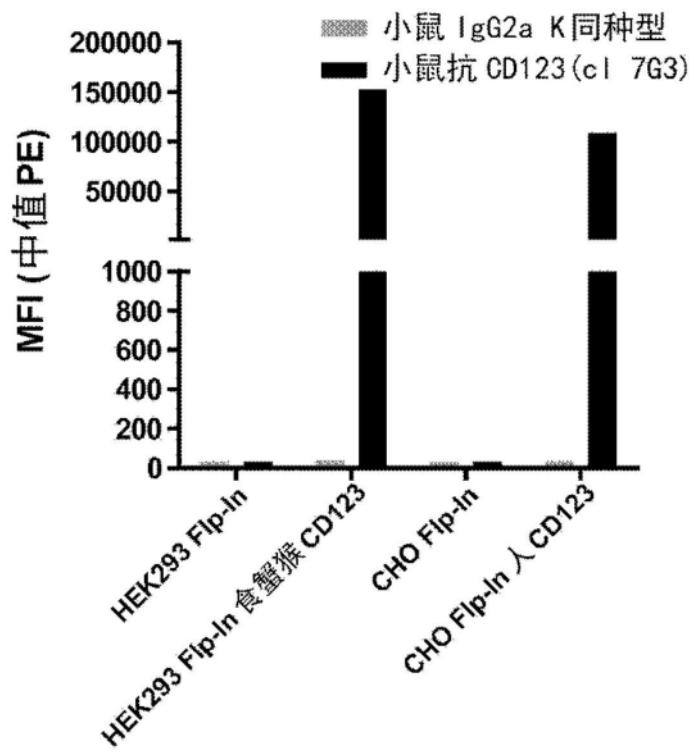


图10

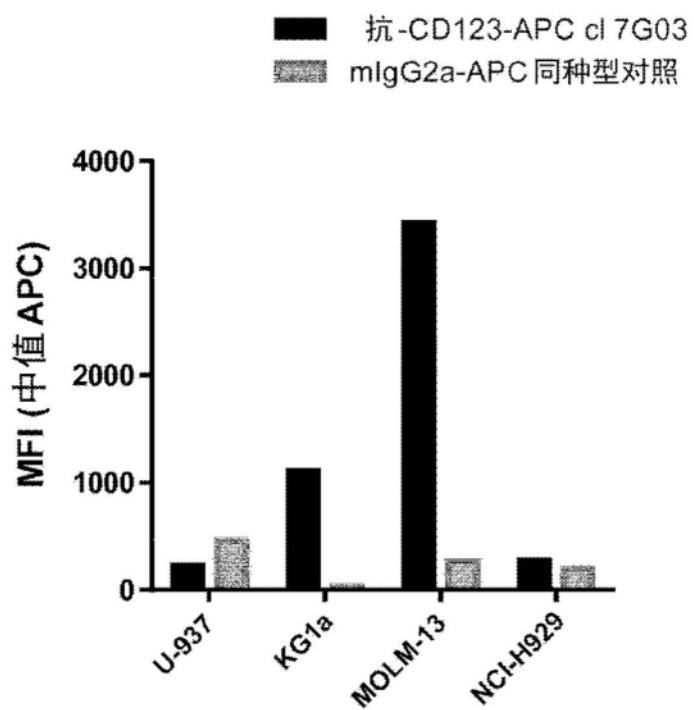
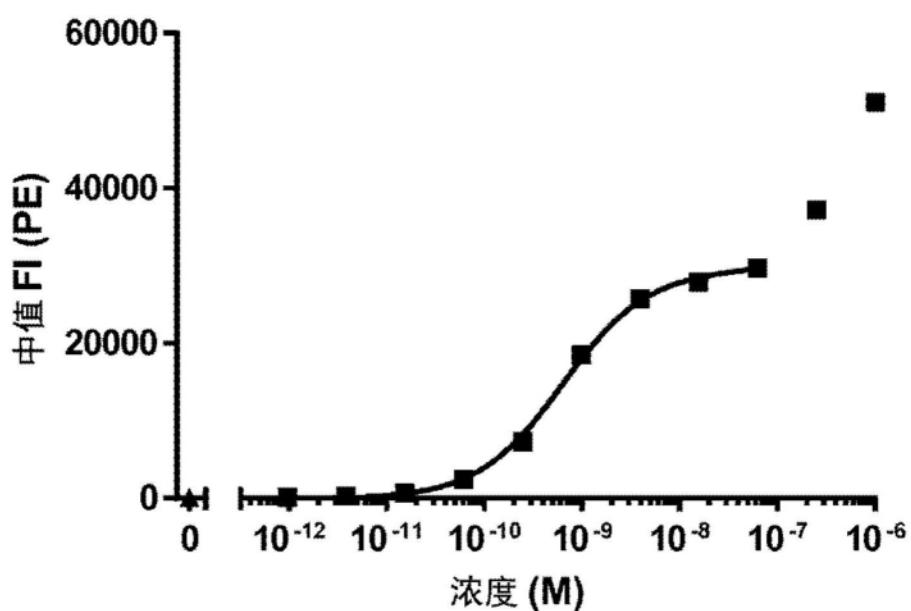


图11

A.

MOLM-13



B.

MOLM-13

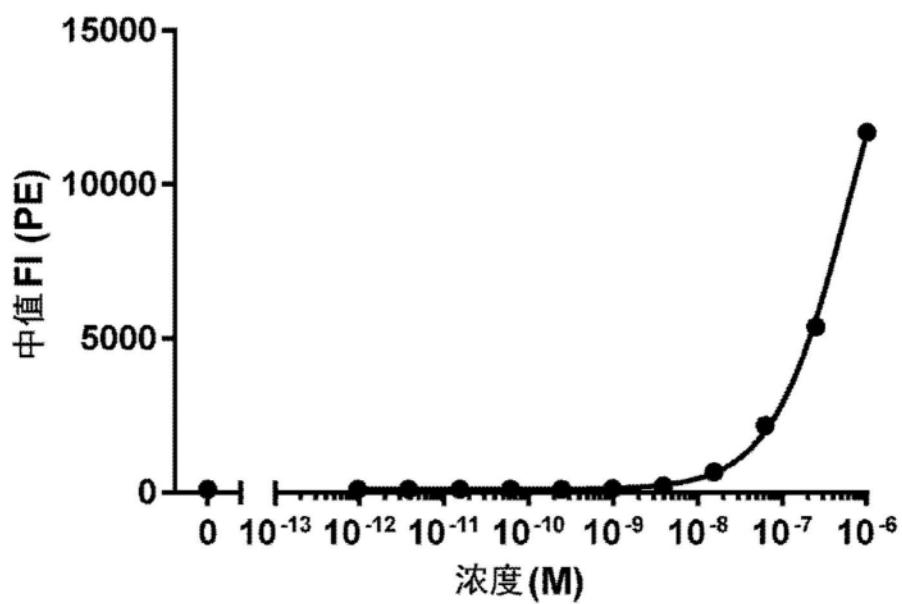
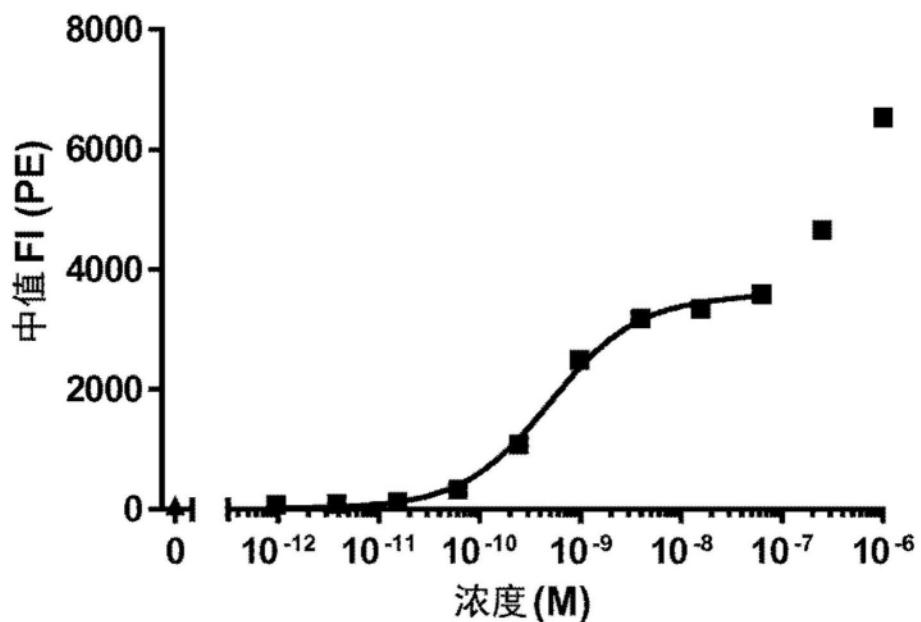


图12

C.

KG1a



D.

KG1a

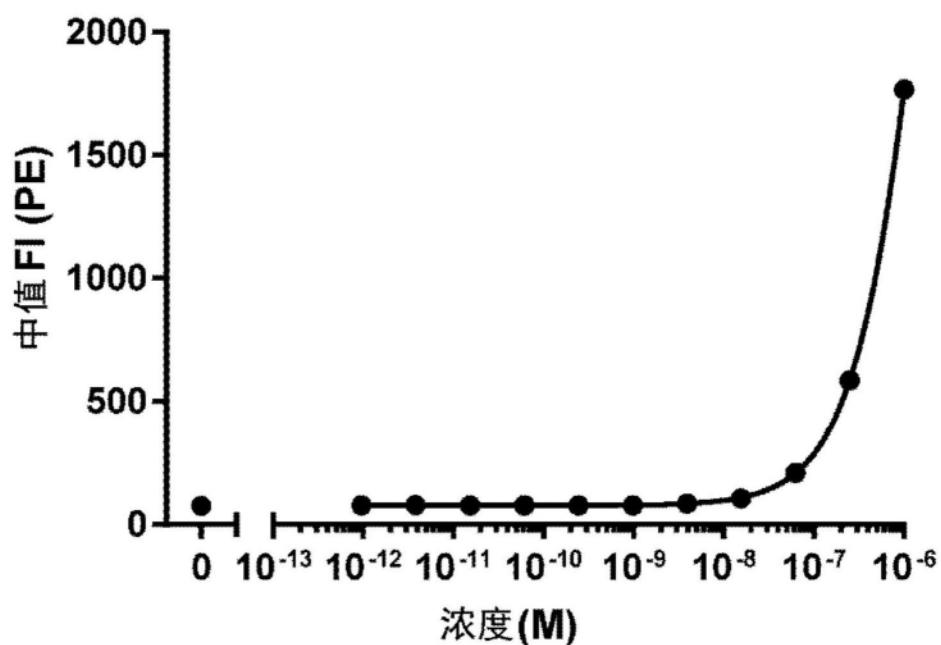
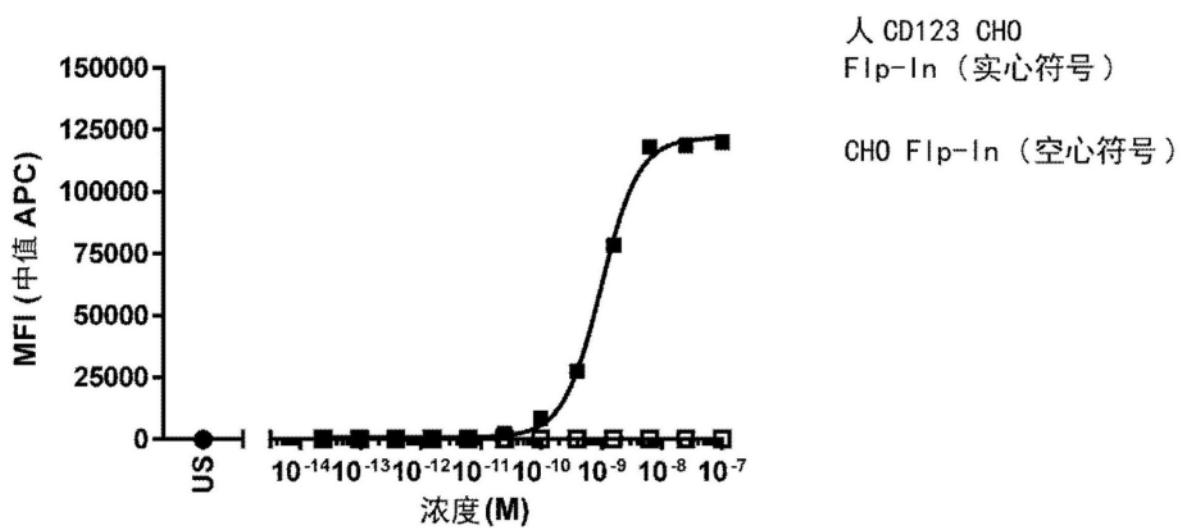


图12(续)

A.



B.

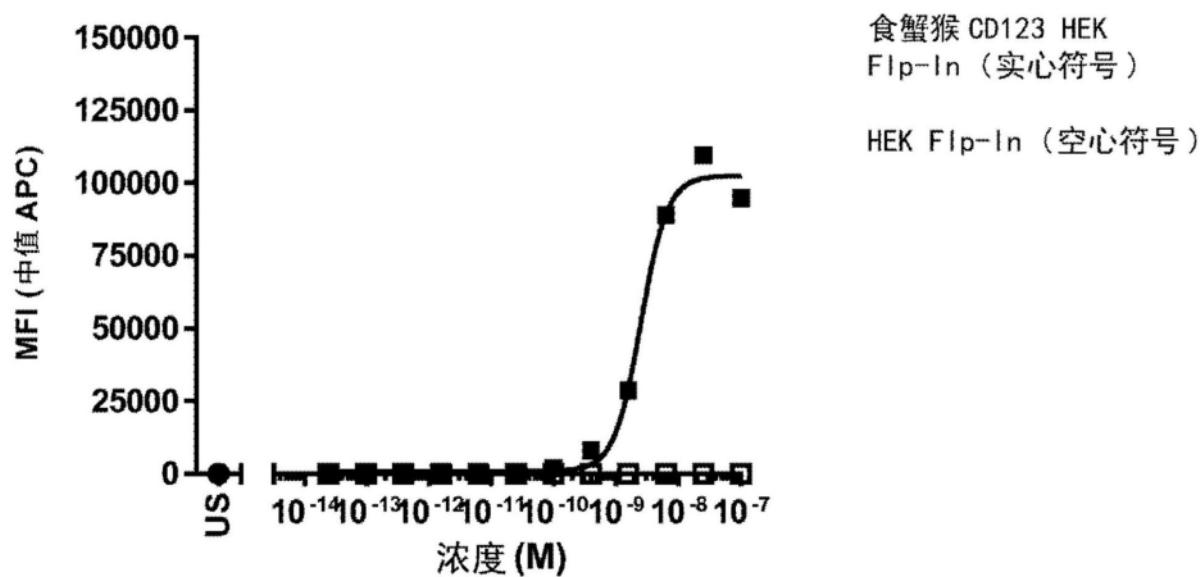
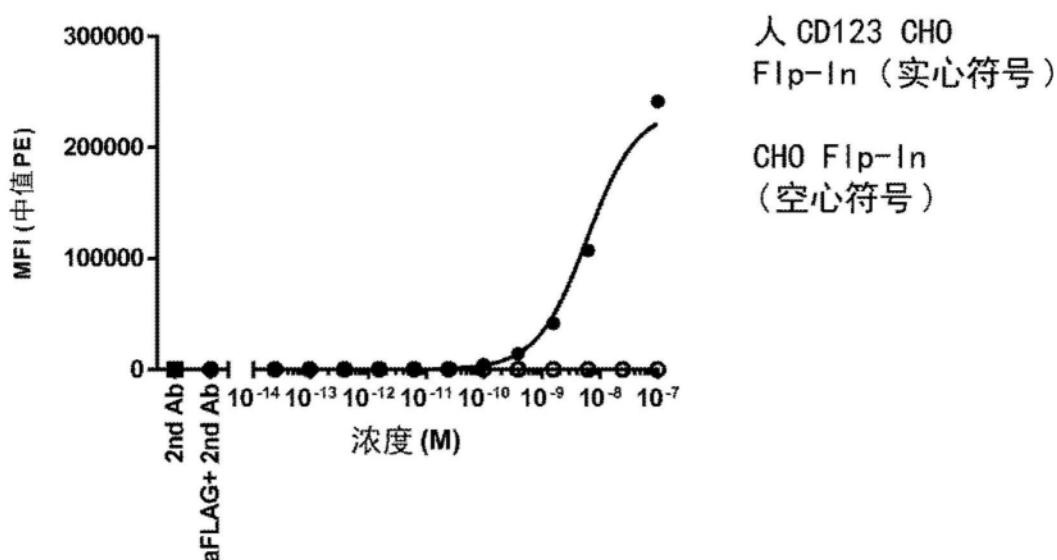


图13

A.



B.

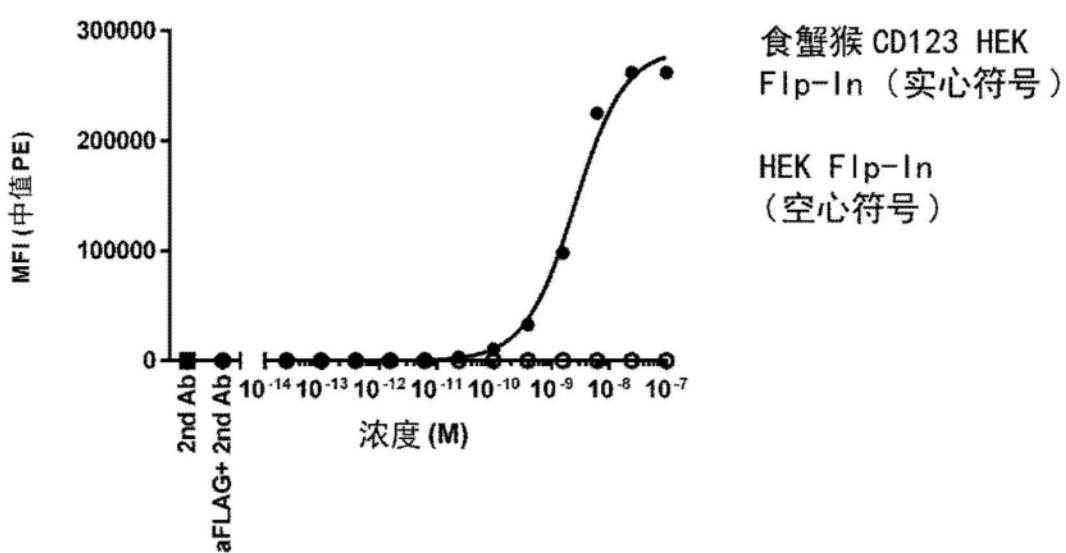
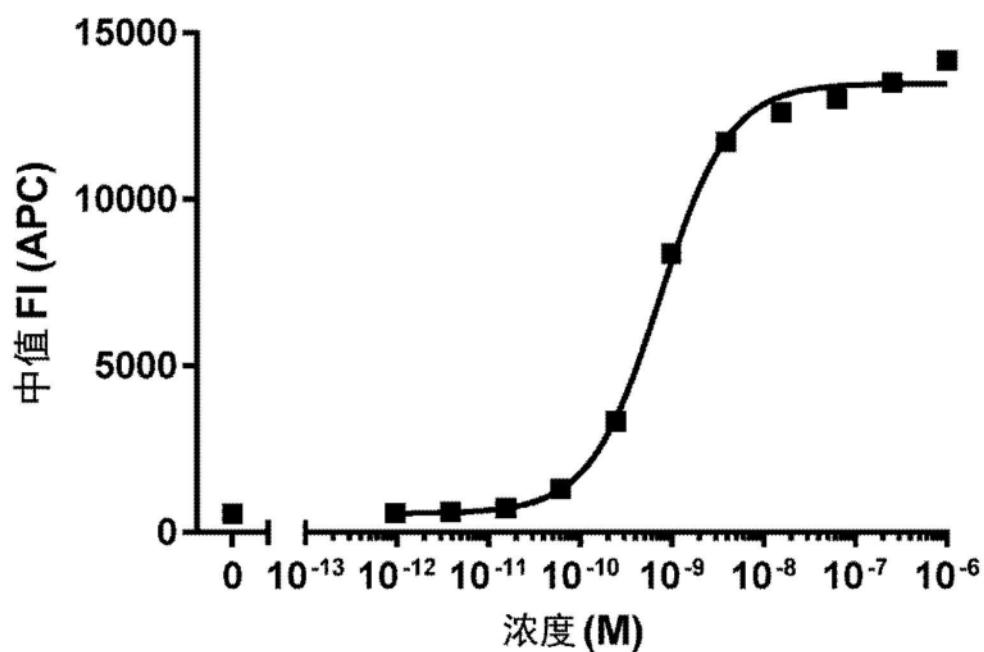


图14

A.

MOLM-13

B.

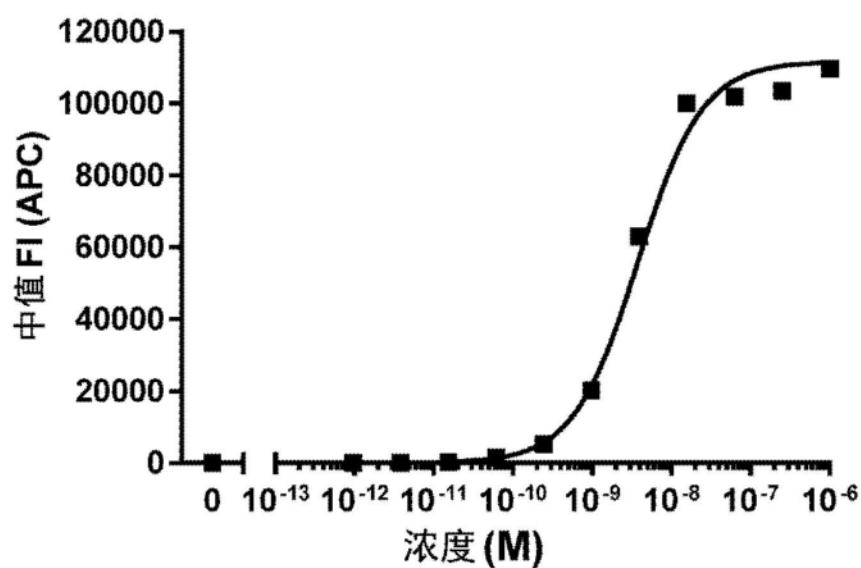
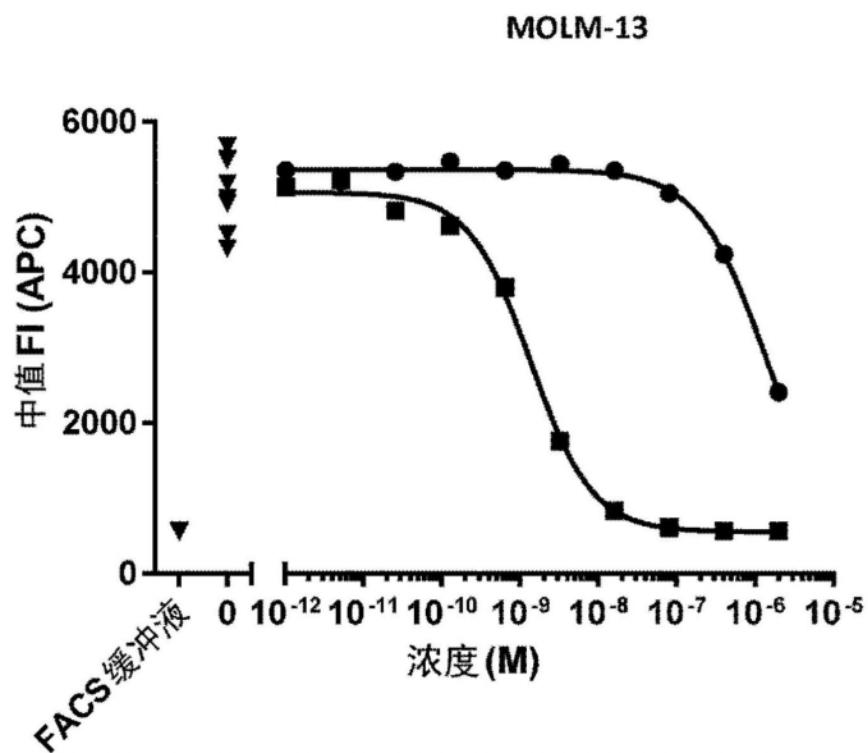
CHO Flip-In 人 CD123

图15

A.



B.

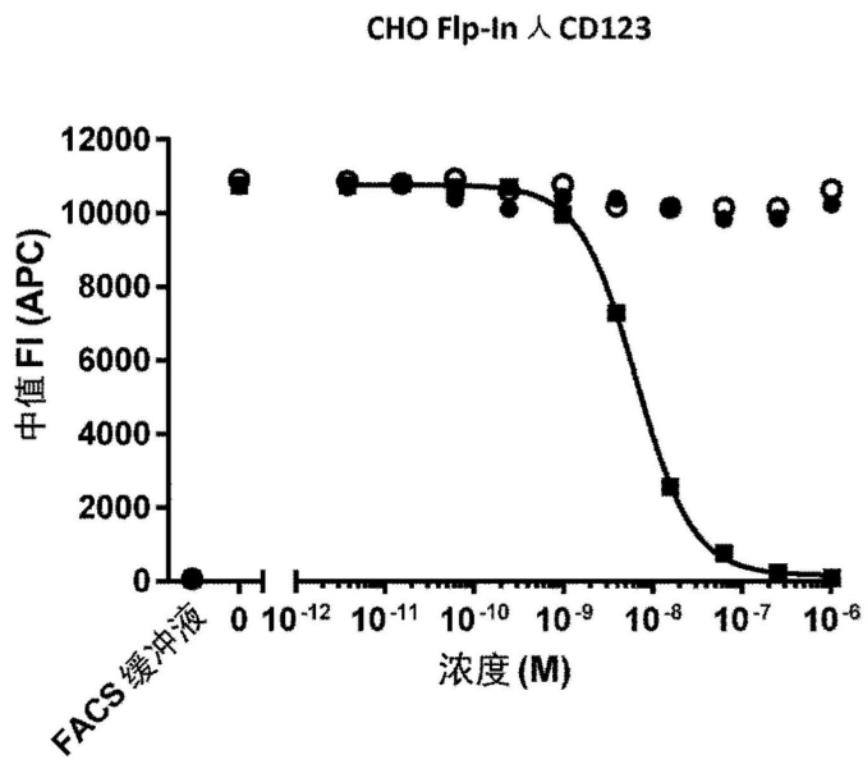
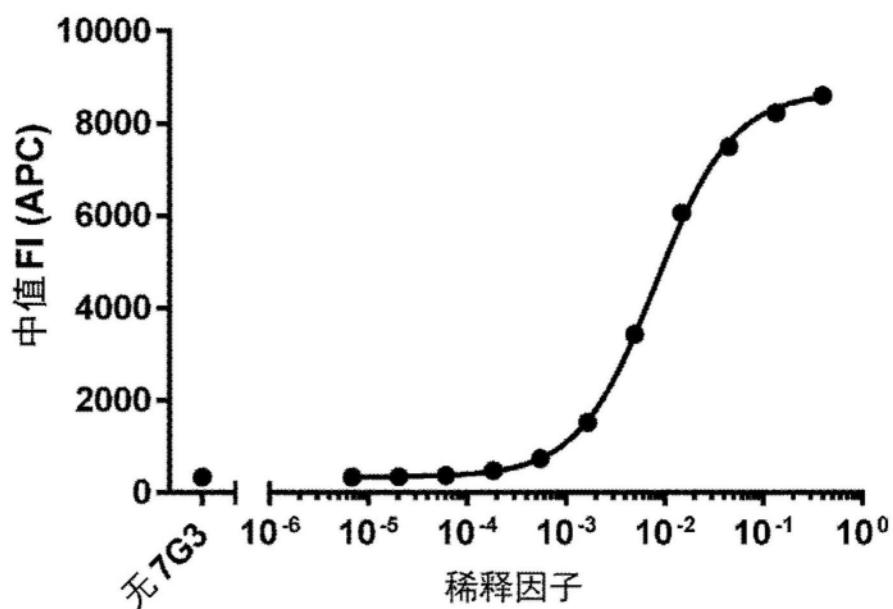


图16

A.

MOLM-13



B.

CHO Flip-In 人 CD123

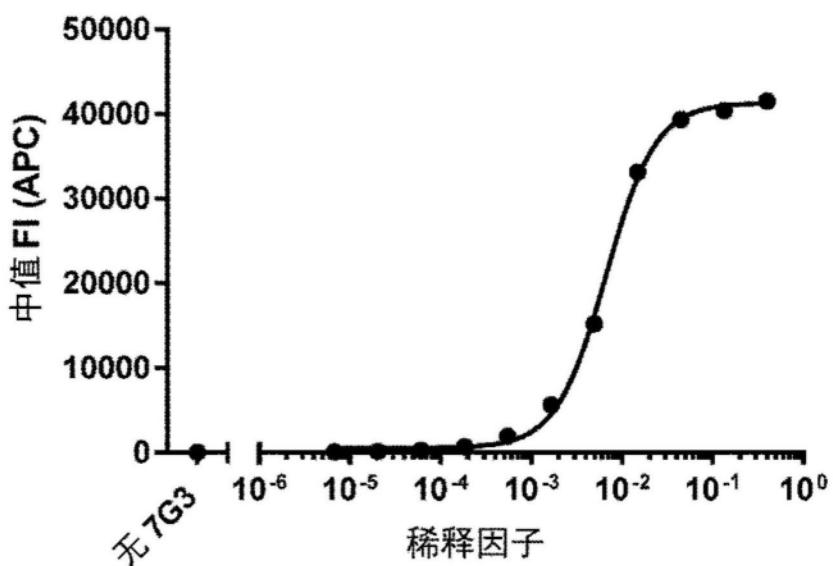
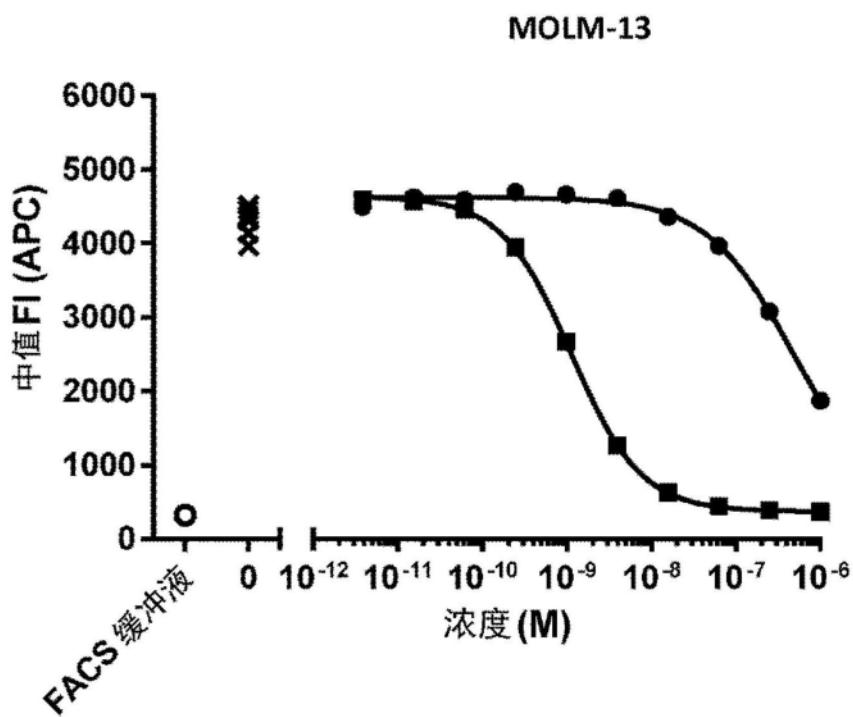


图 17

A.



B.

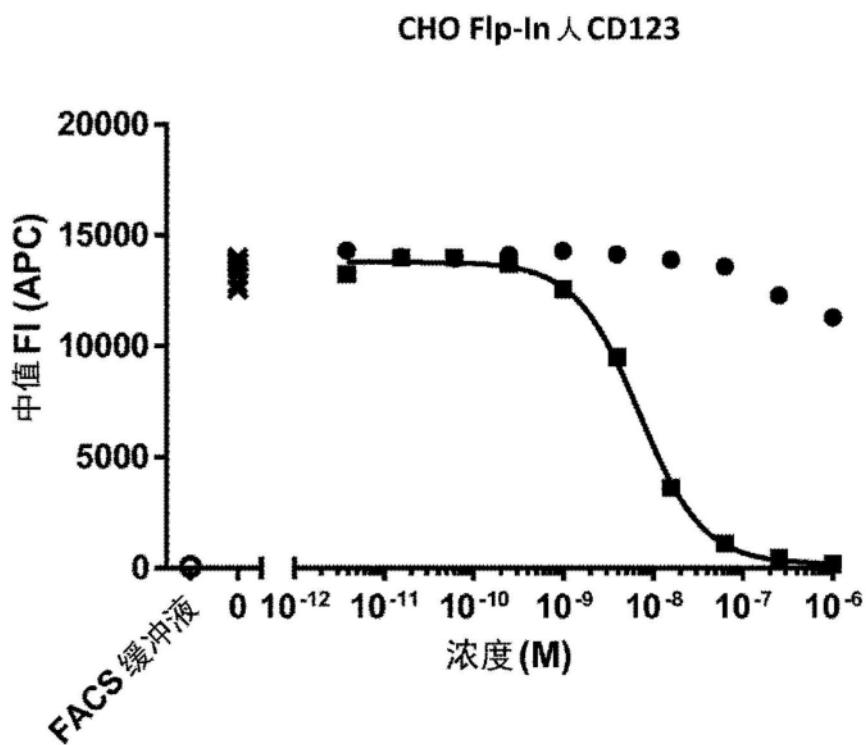


图18

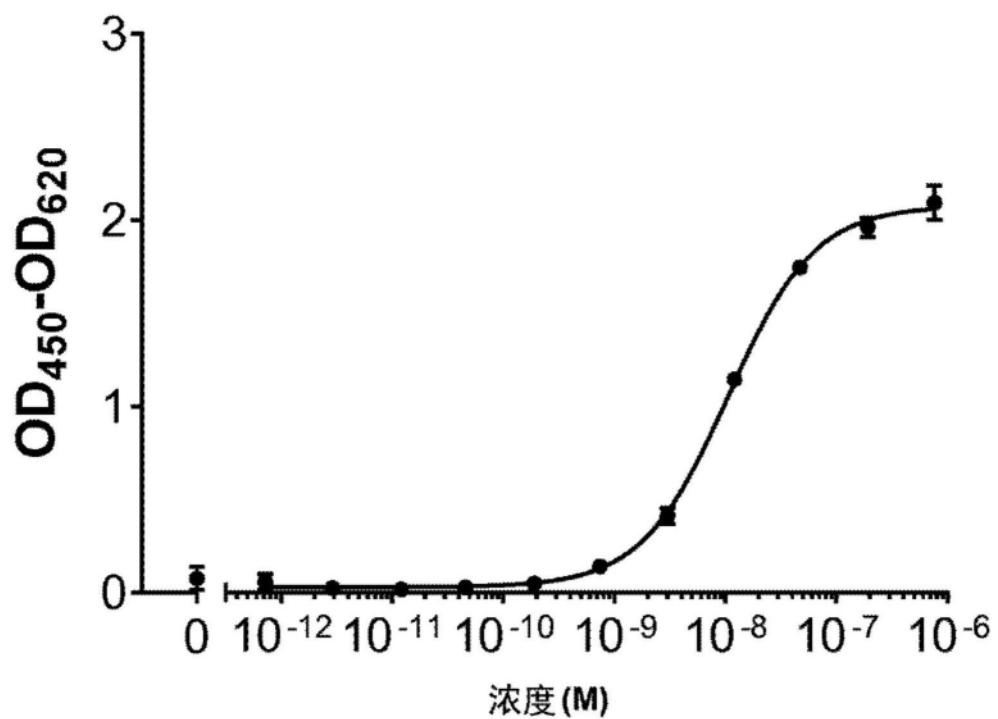
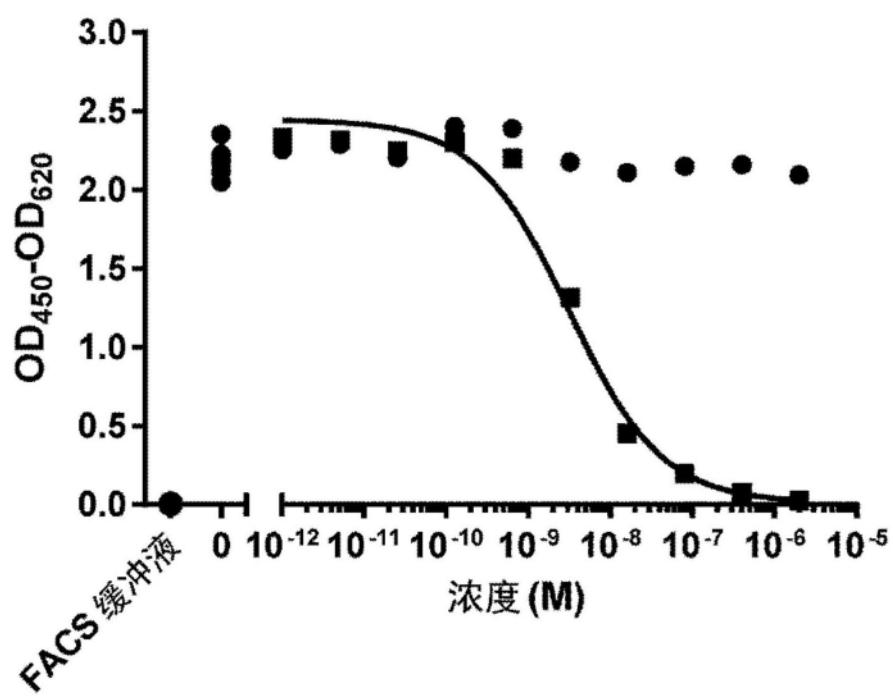


图19

A.



B.

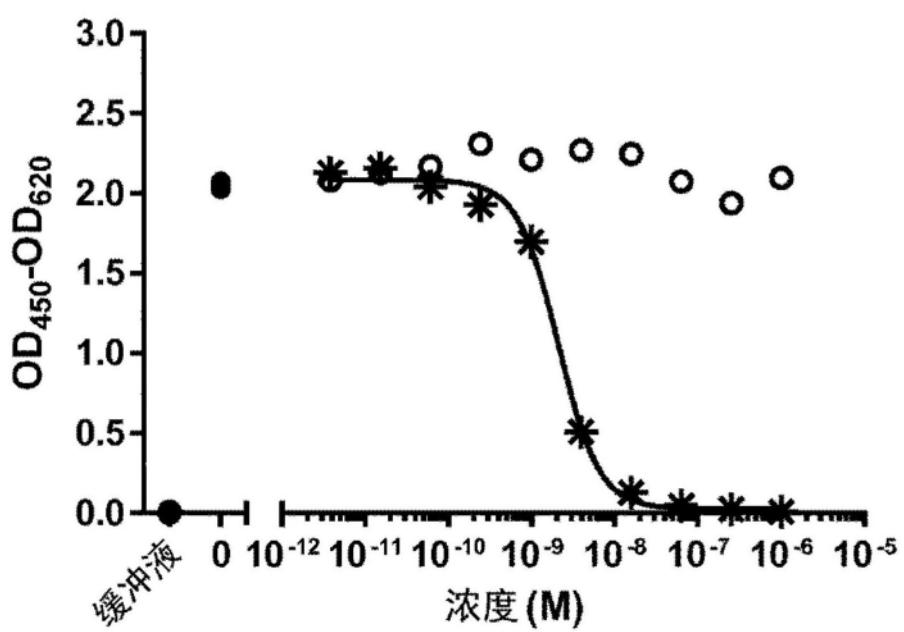
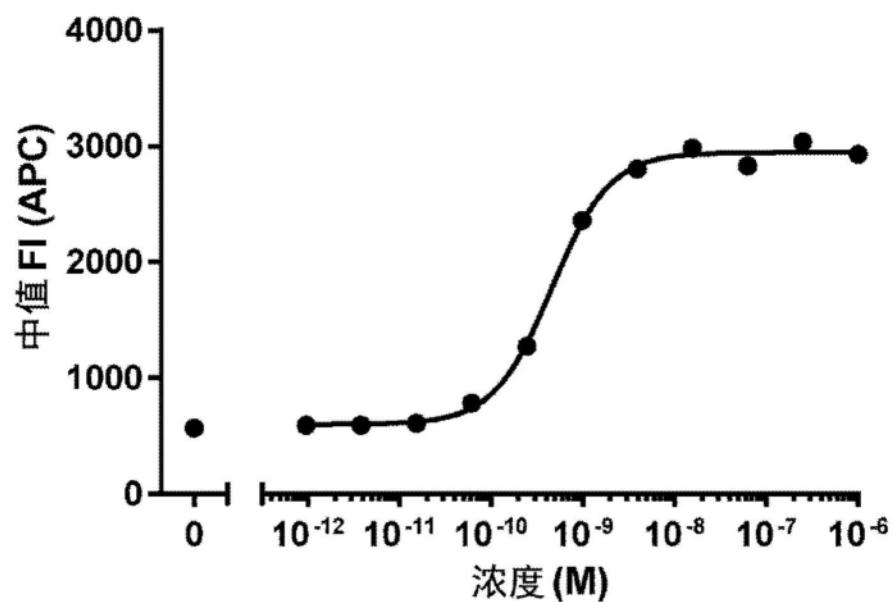


图20

A.

MOLM-13



B.

CHO Flp-In 人 CD123

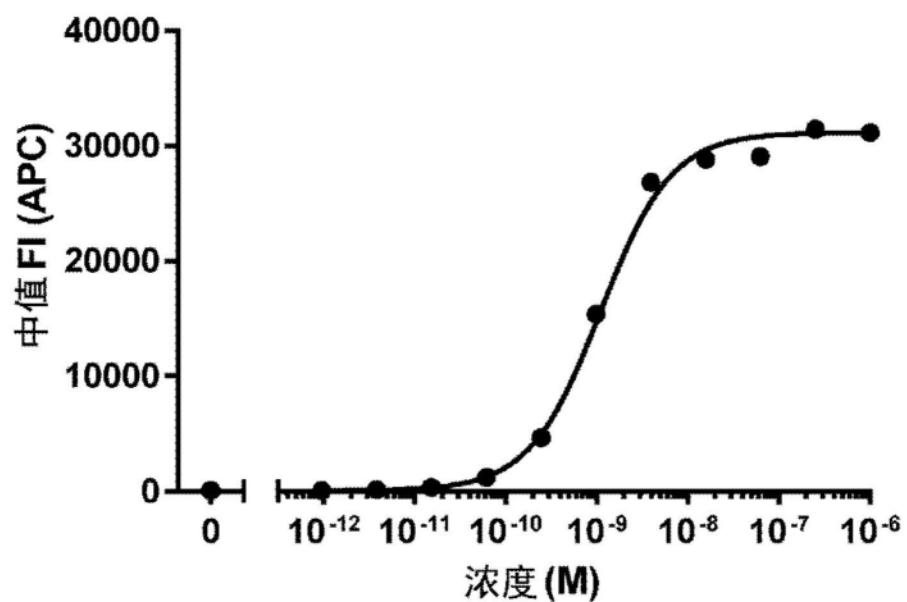


图21

C.

HEK Flip-In 食蟹猴 CD123

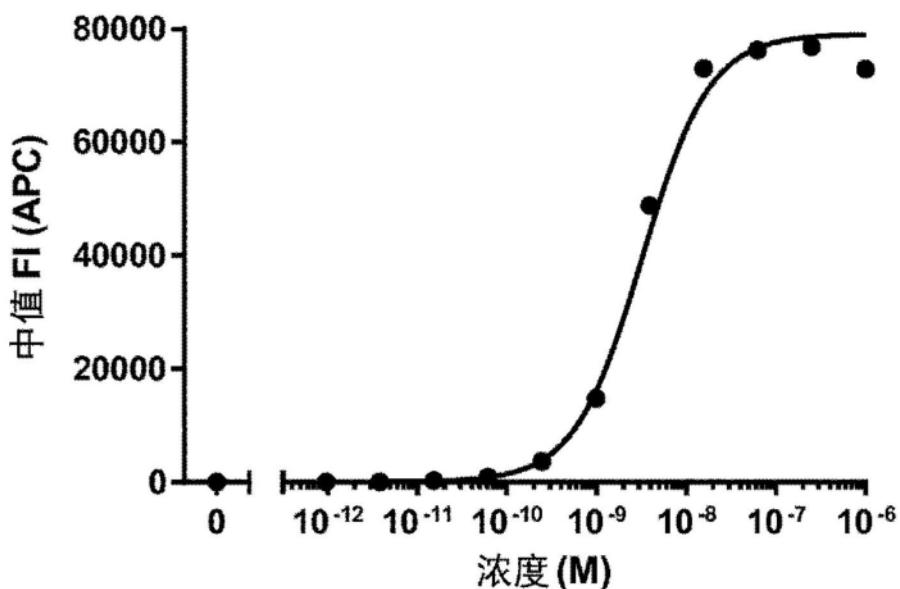


图21(续)

A.

MOLM-13

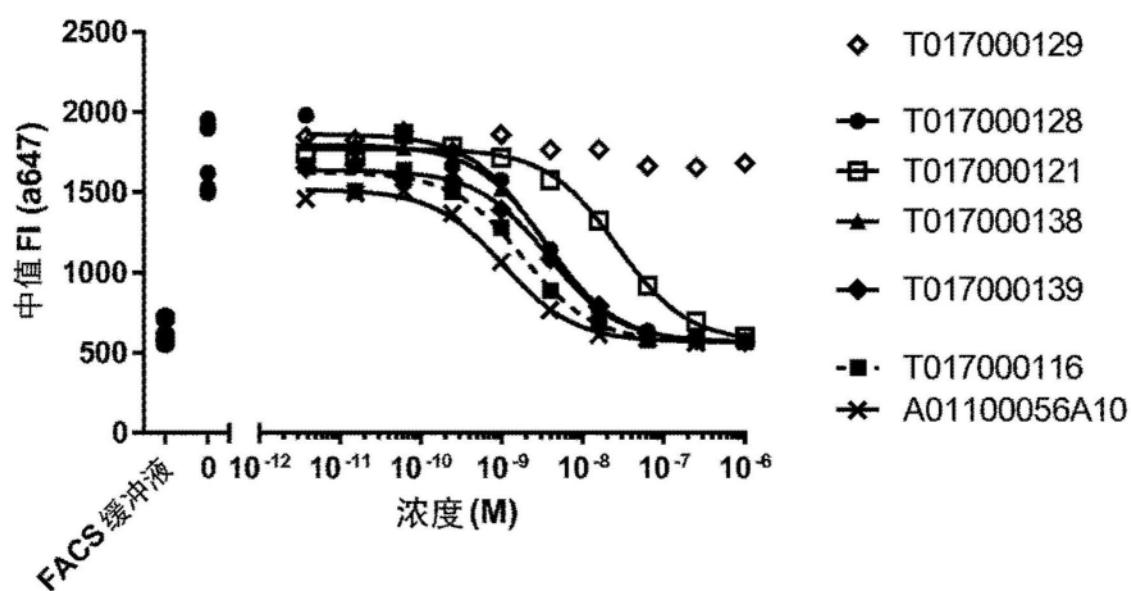
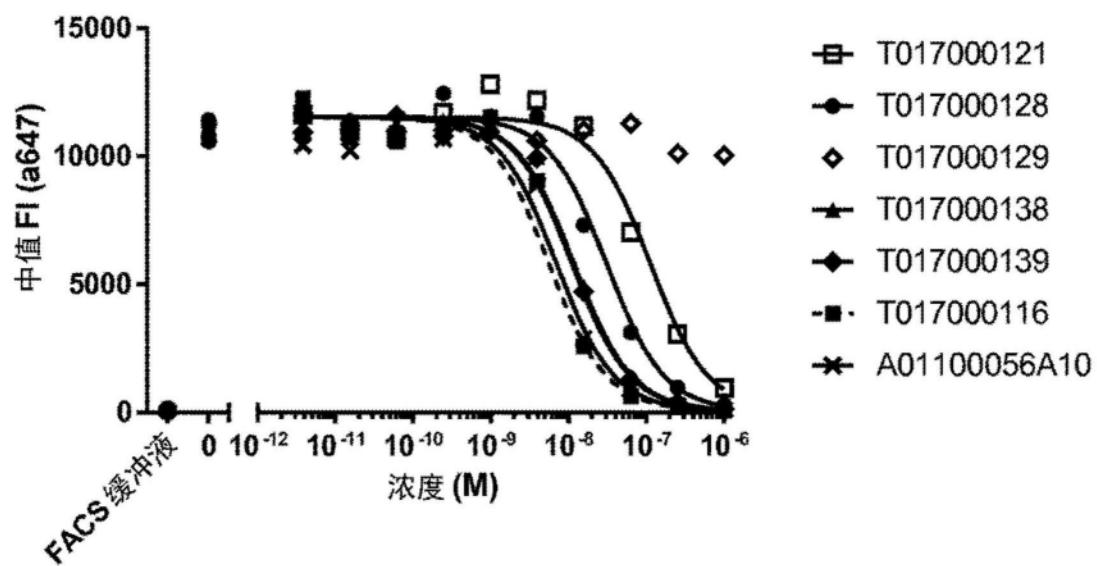


图22

B.

HEK293 Flp-In 食蟹猴 CD123



C.

CHO Flp-In 人 CD123

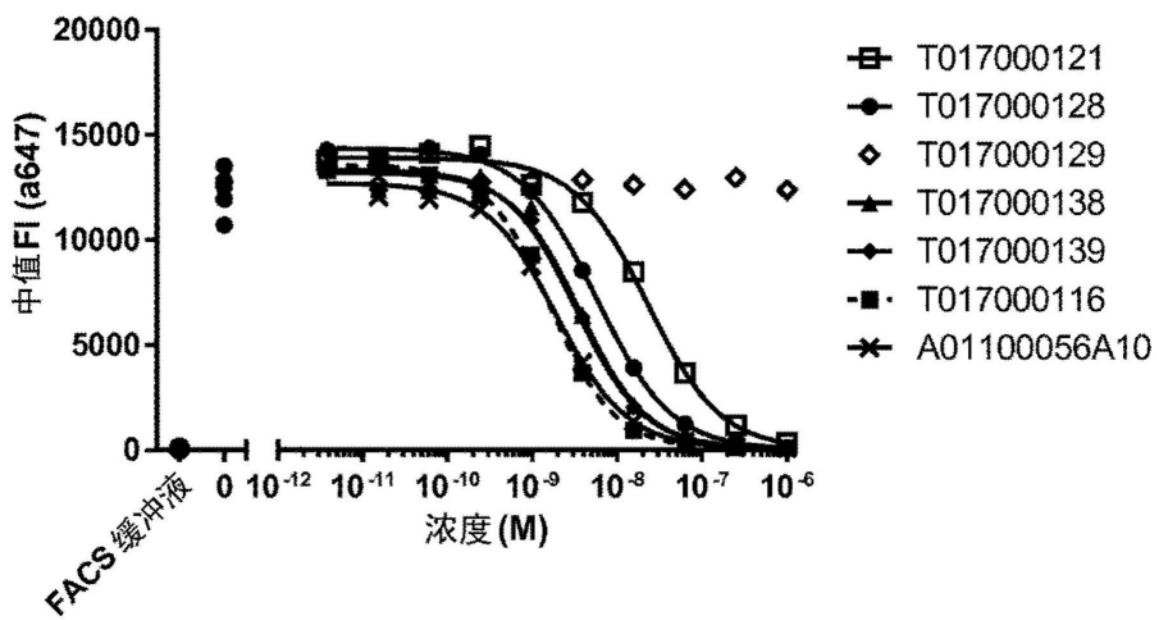


图22 (续)

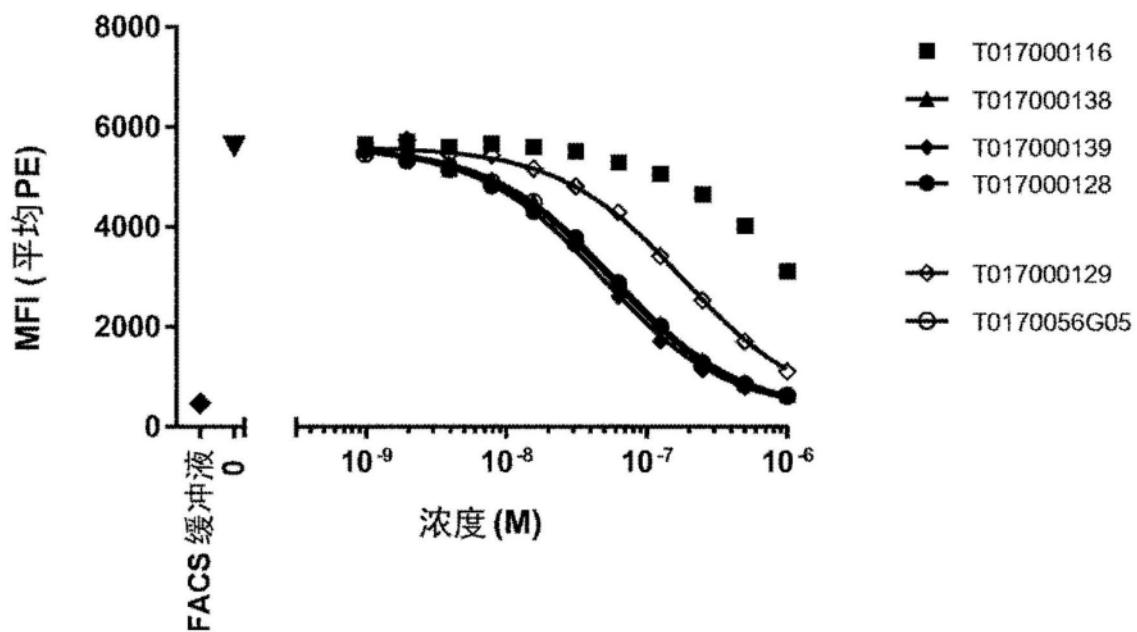


图23

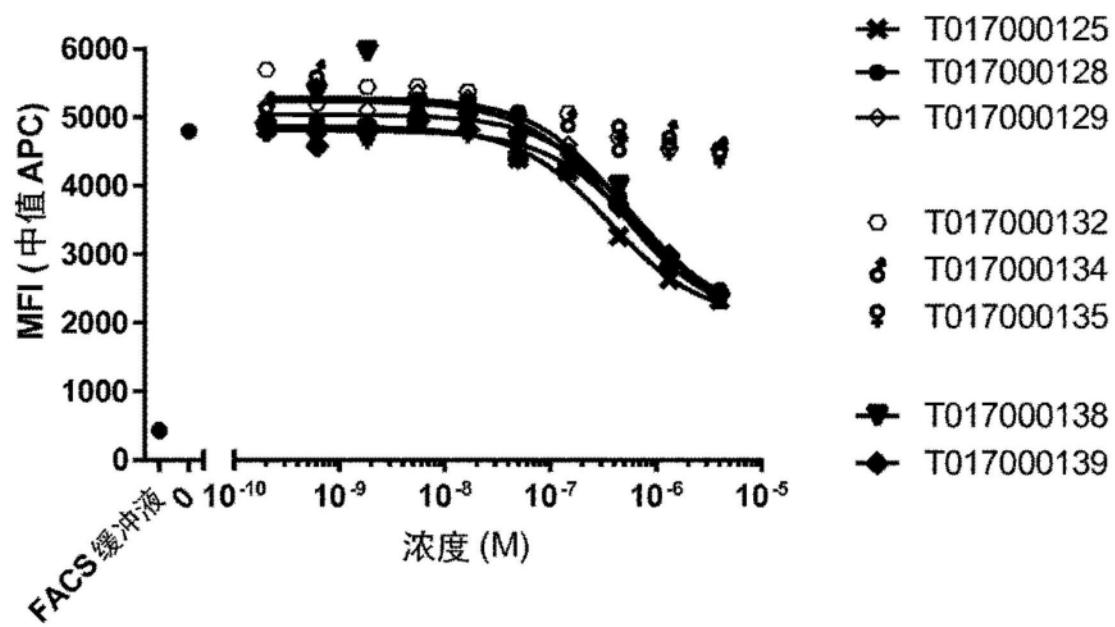


图24

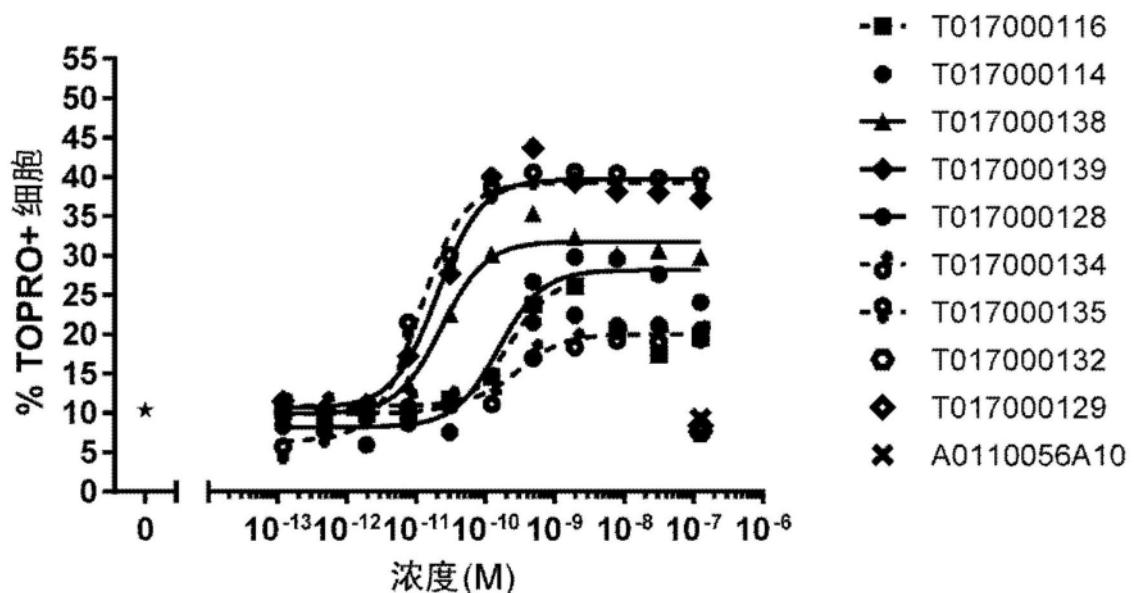


图25

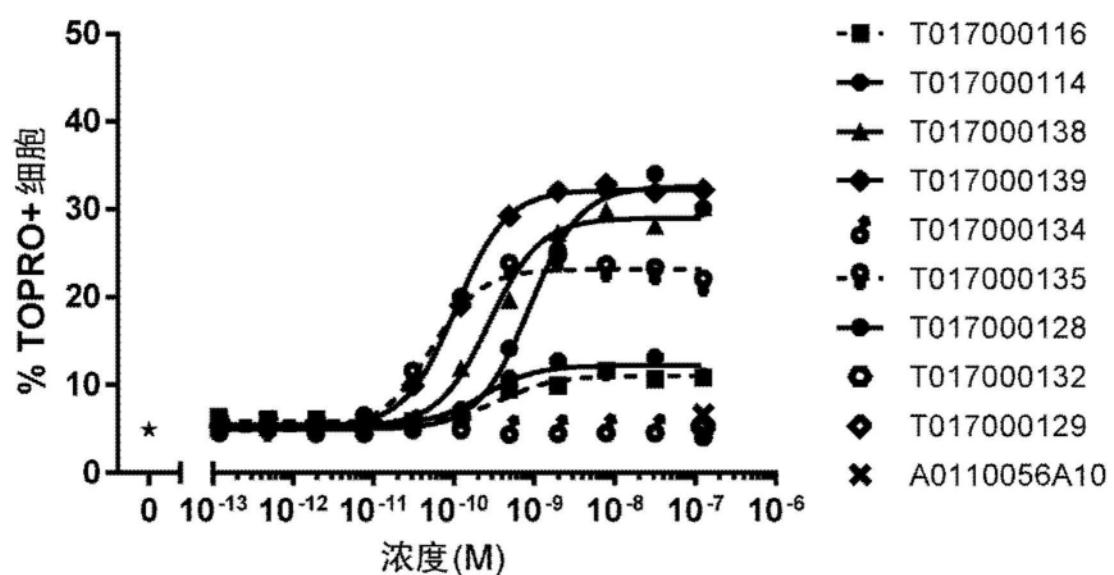


图26

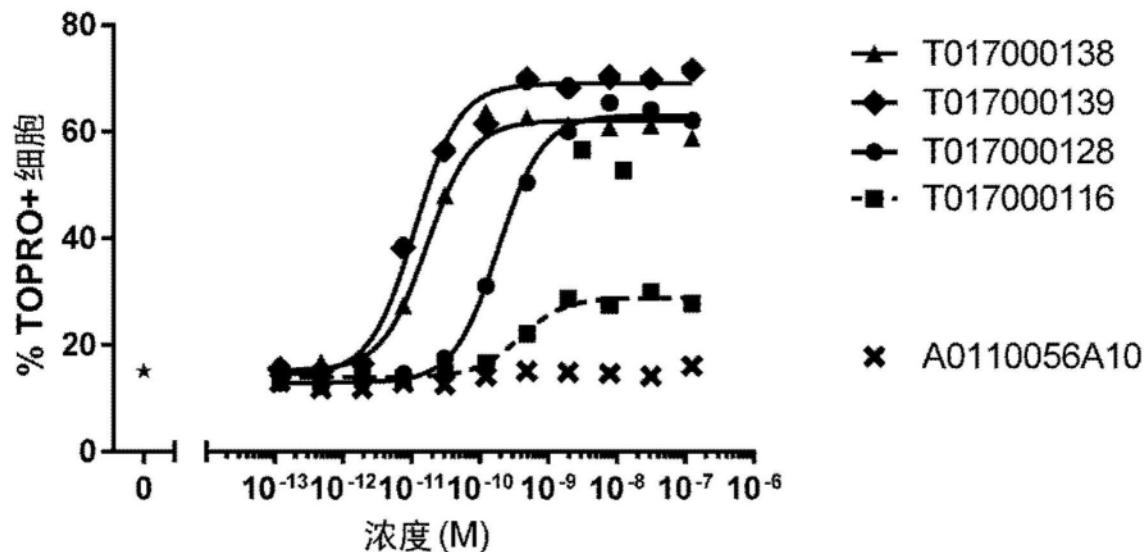


图27

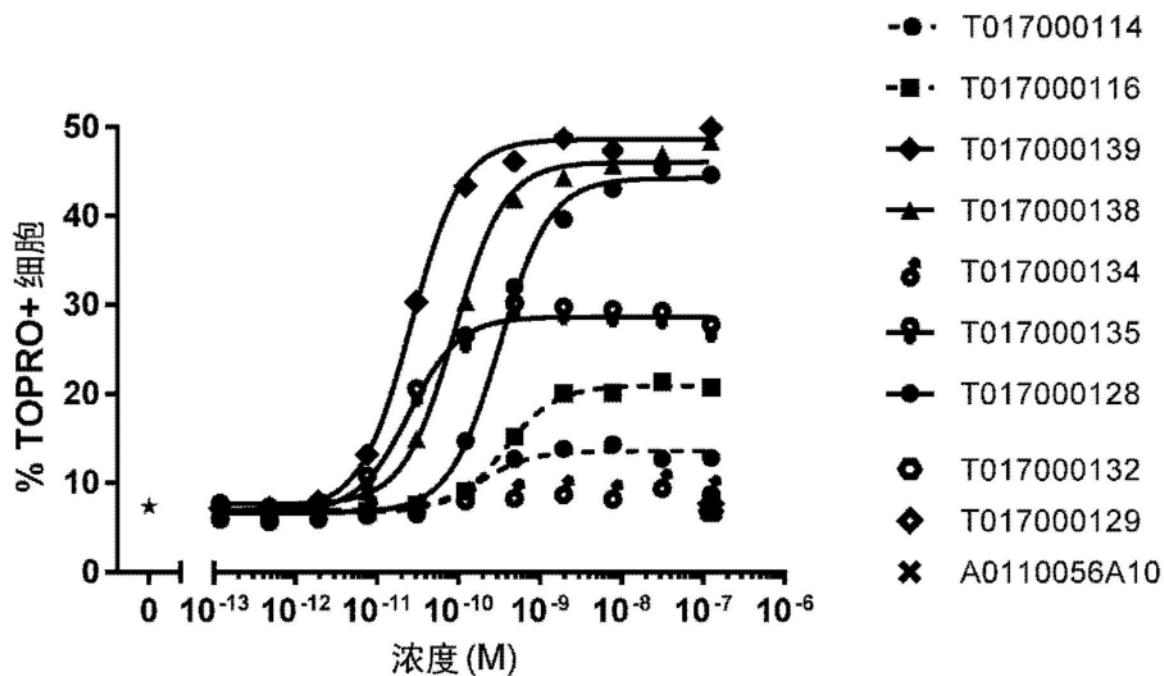


图28

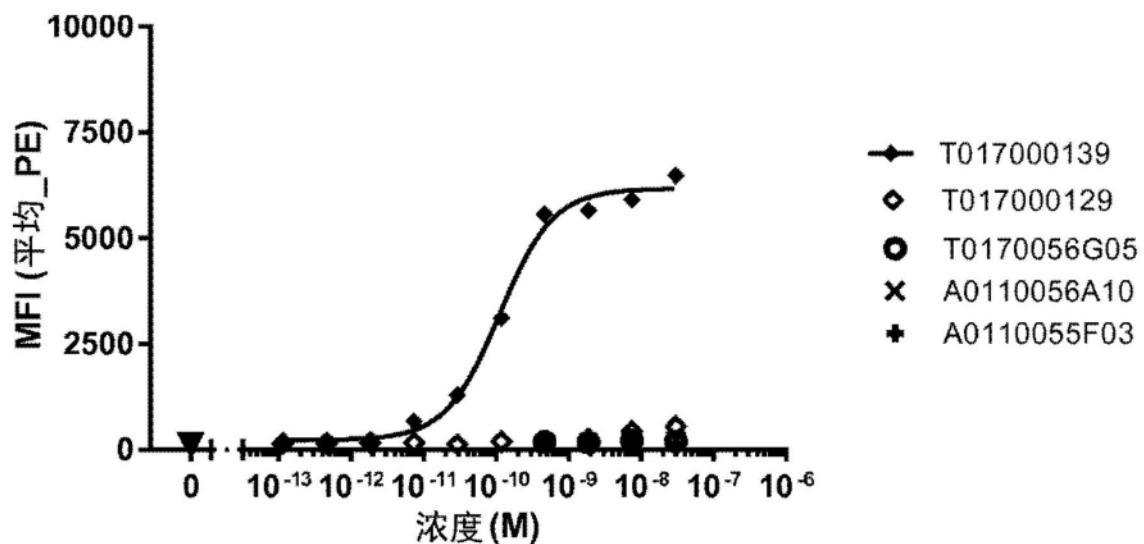


图29

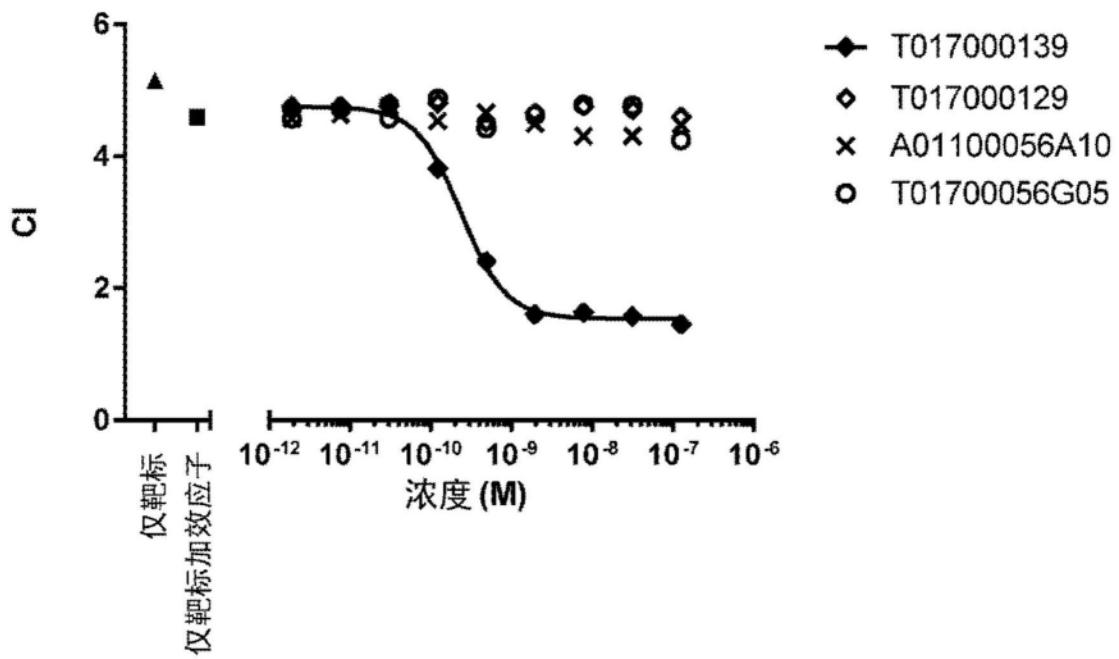


图30

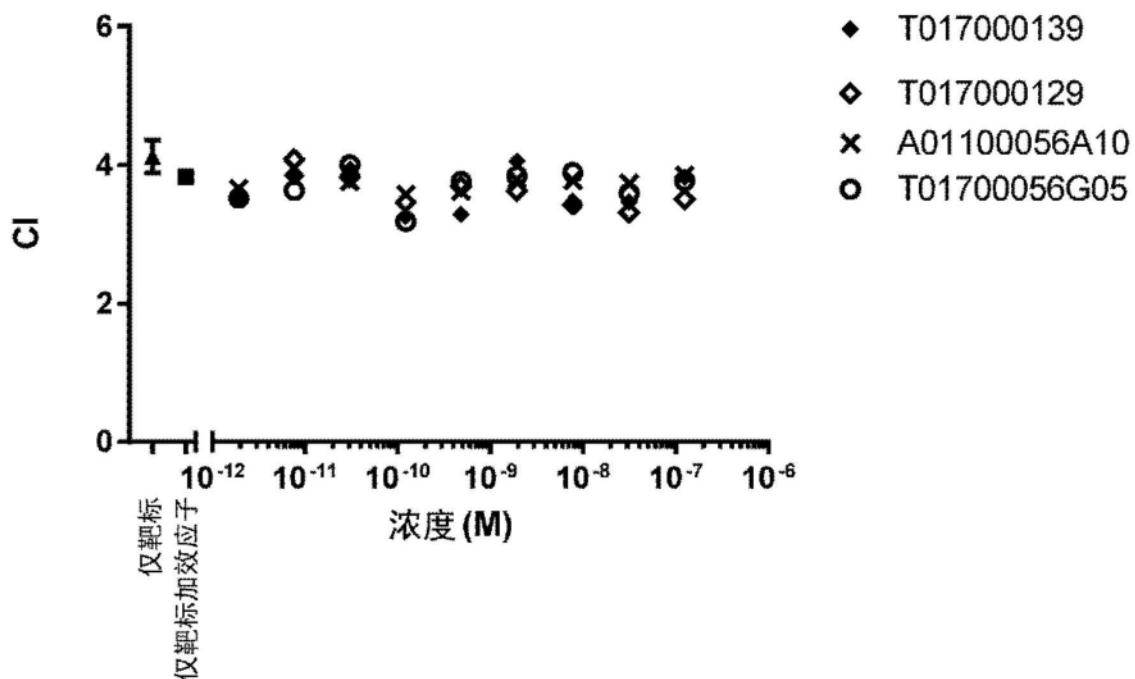


图31

A.

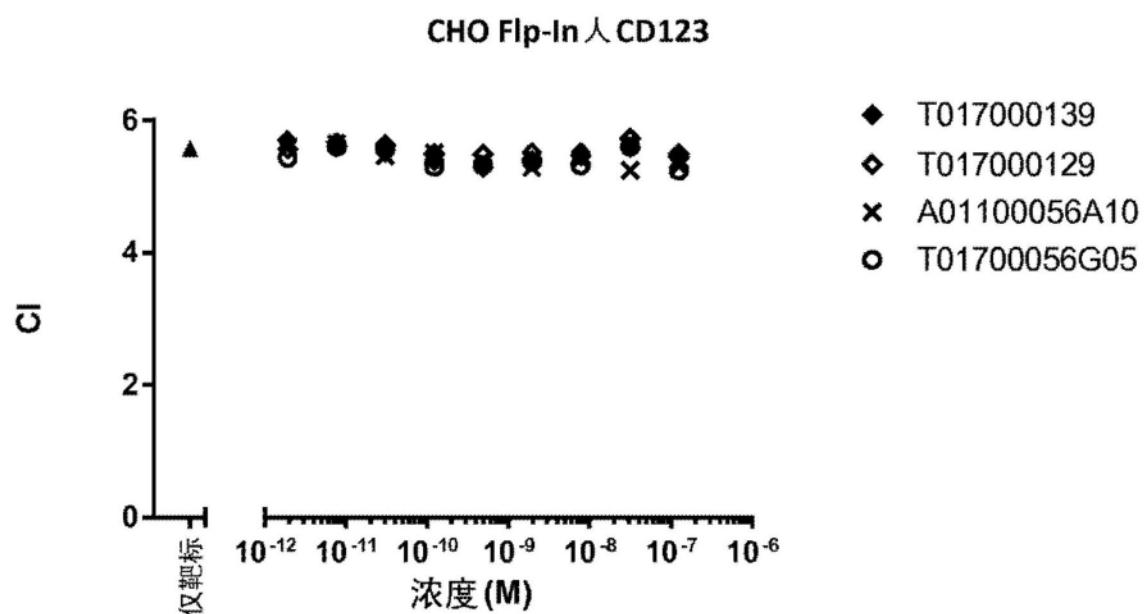


图32

B.

CHO Flip-In 亲本

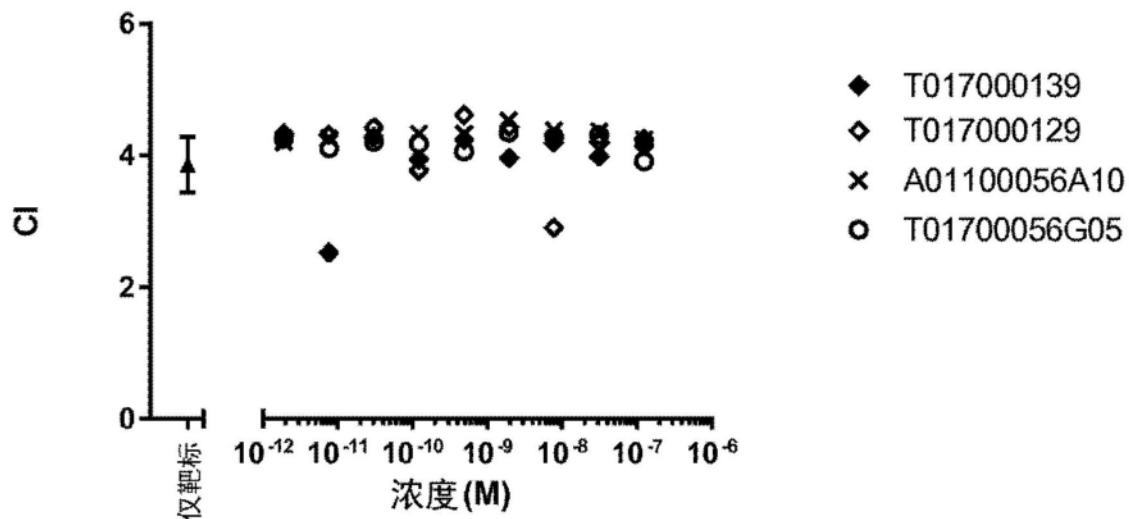


图32(续)

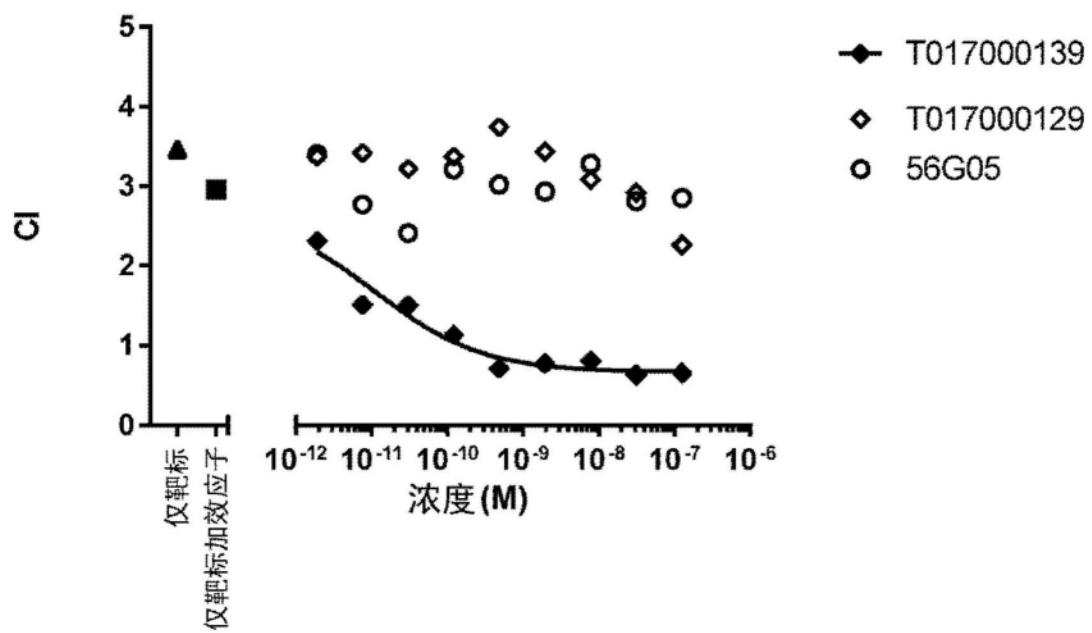
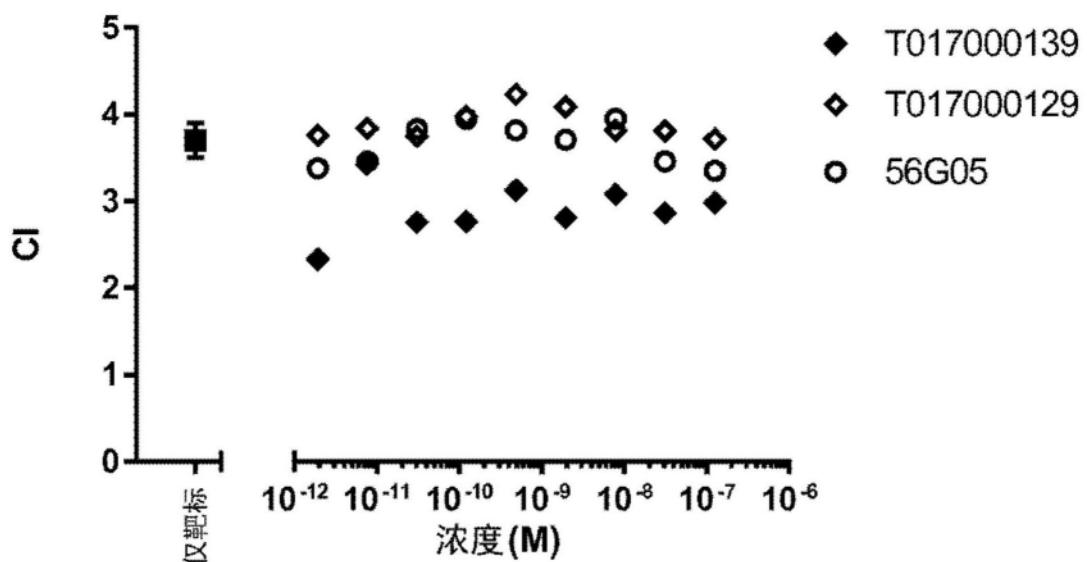


图33



A.

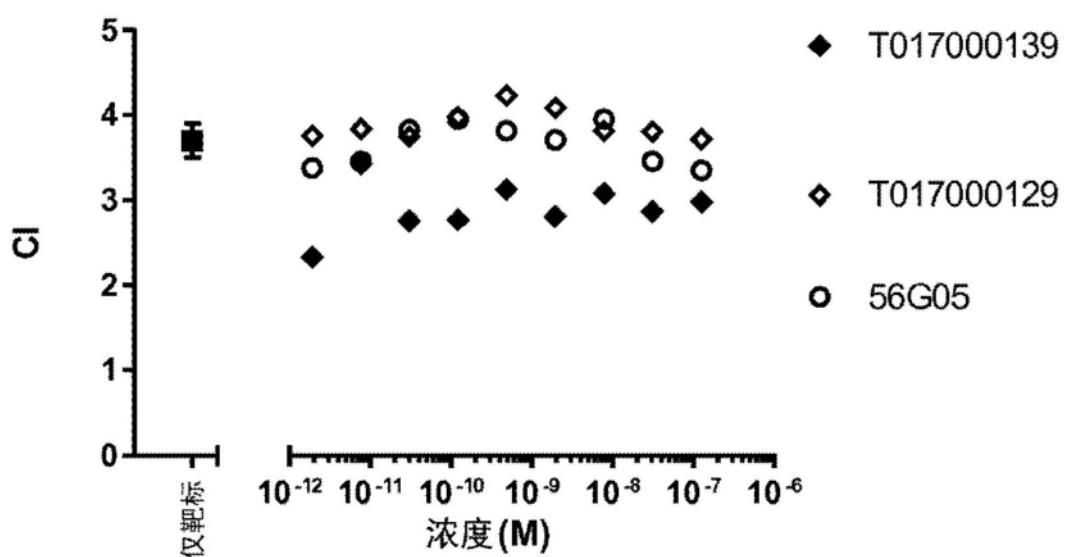
HEK Flp-In 食蟹猴 CD123

图35

B.

HEK Flip-In 亲本

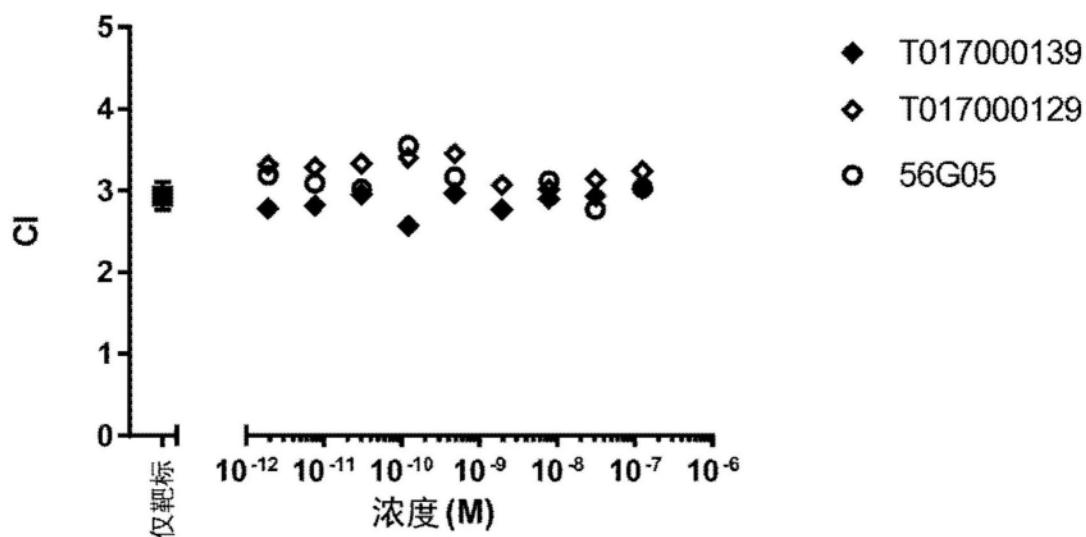


图35 (续)

A.

CHO Flip-In 人 CD123+ 人 T 细胞

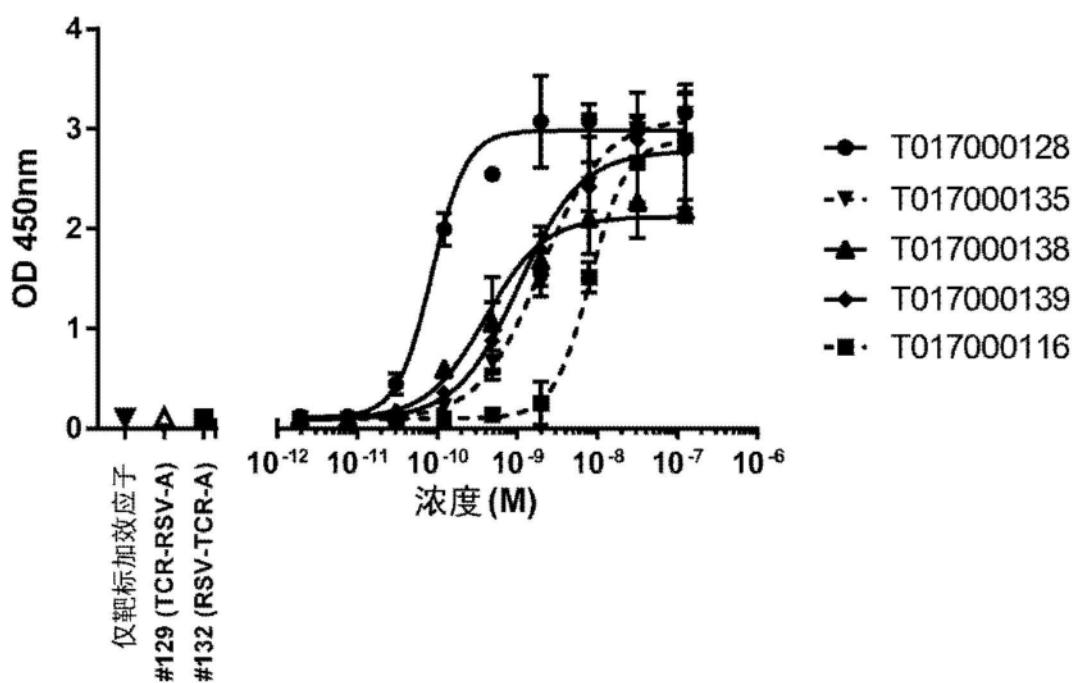


图36

B.

CHO Flp-In 人 CD123+ 食蟹猴 T 细胞

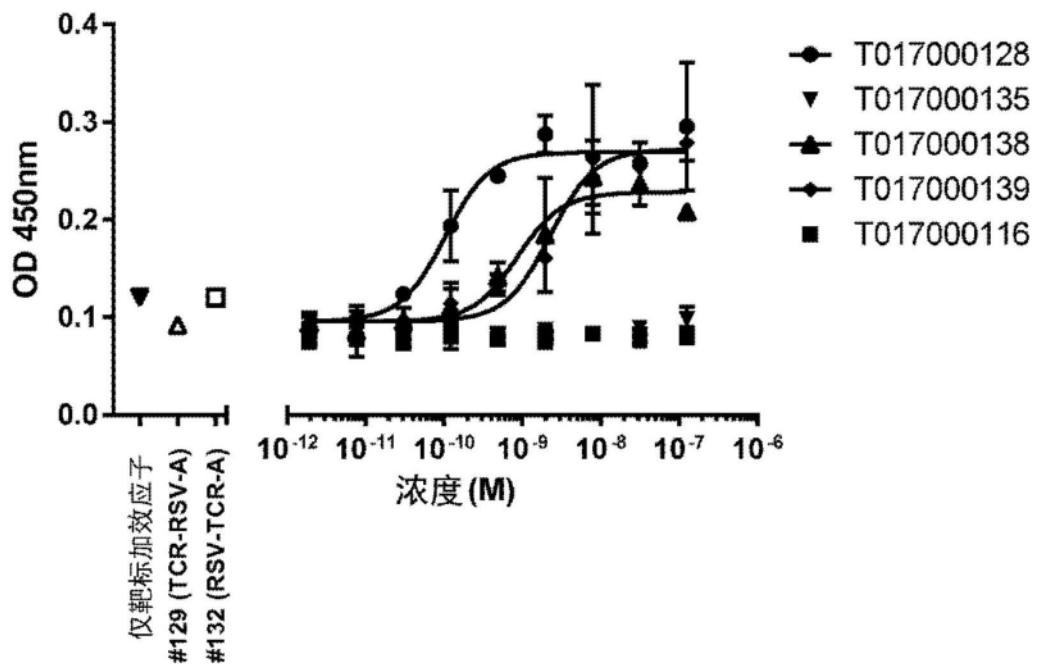


图36 (续)

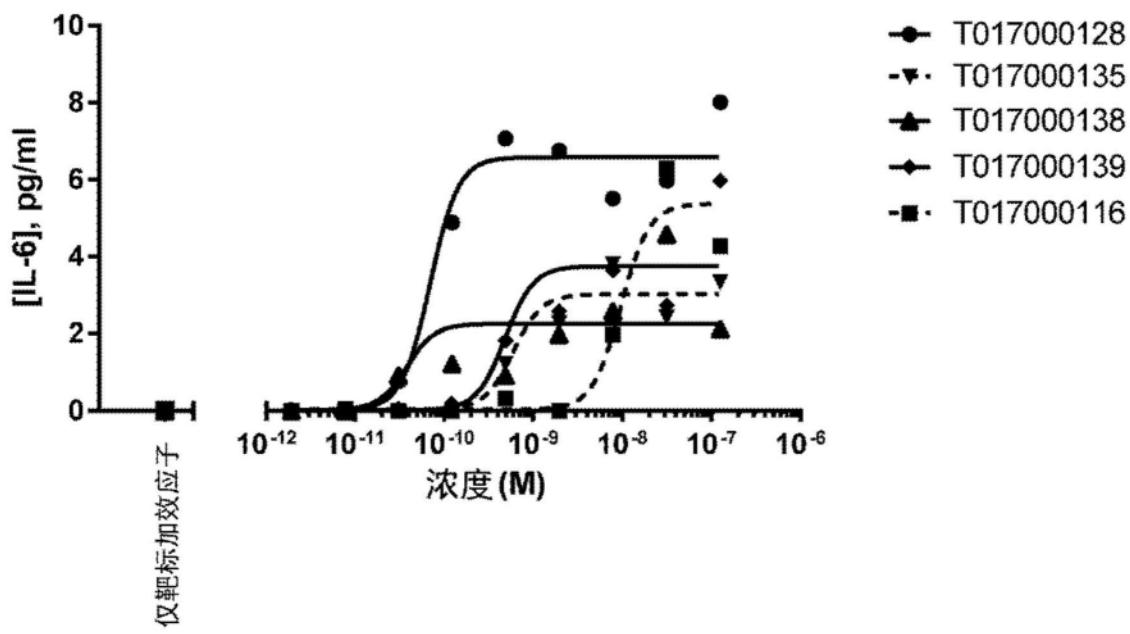
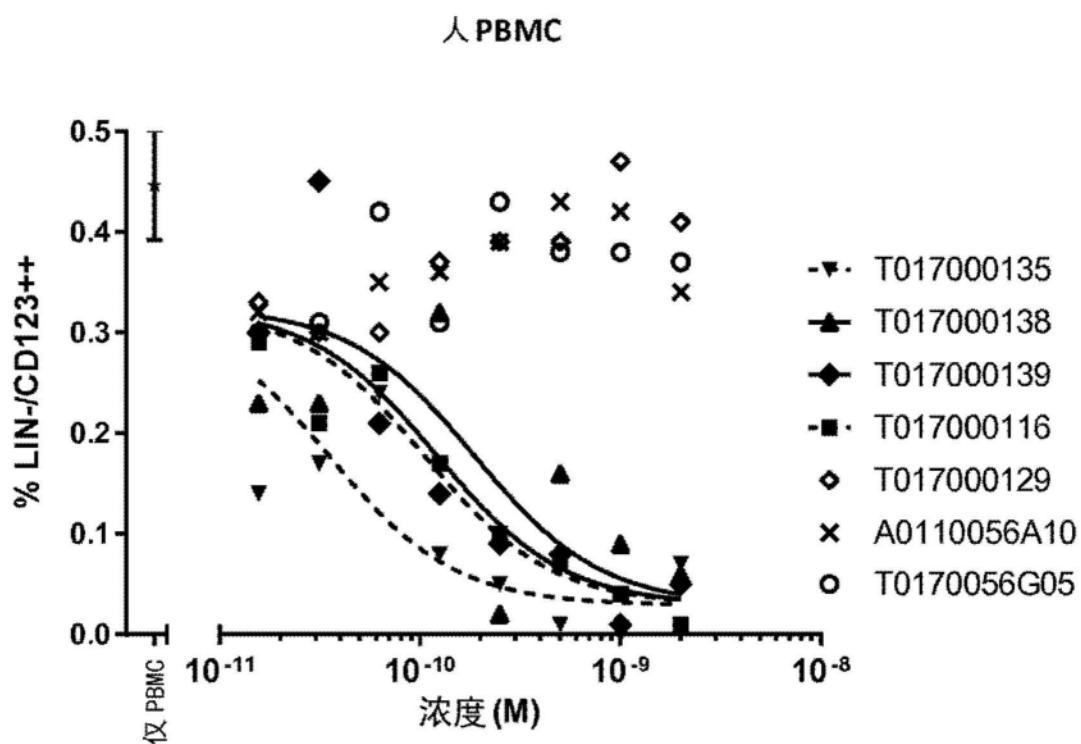


图37

A.



B.

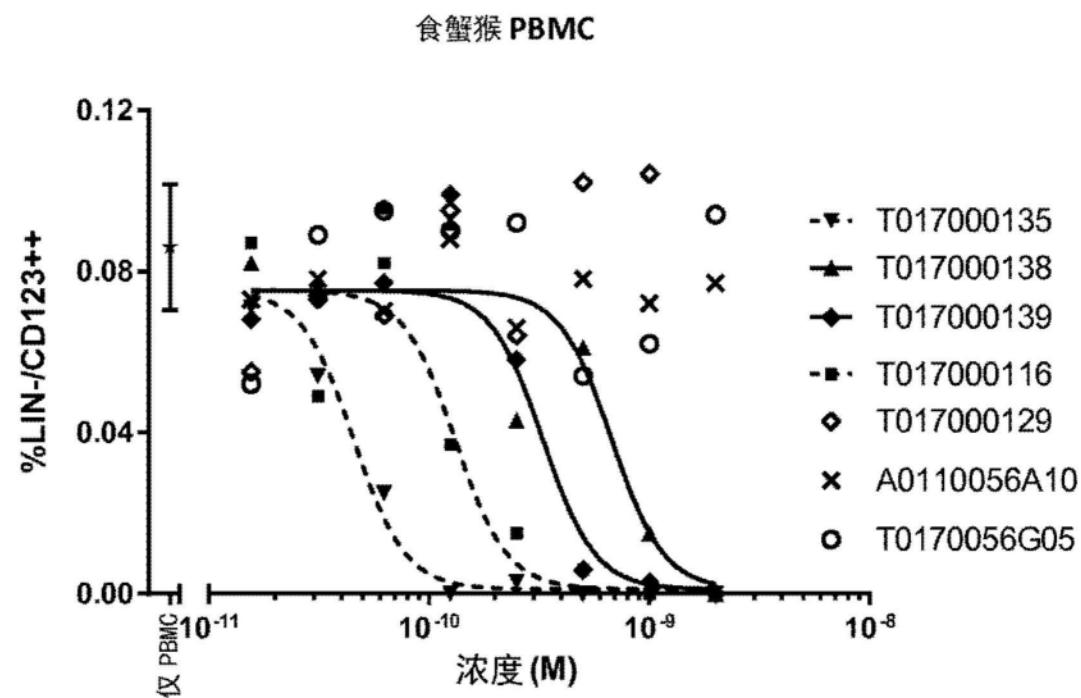
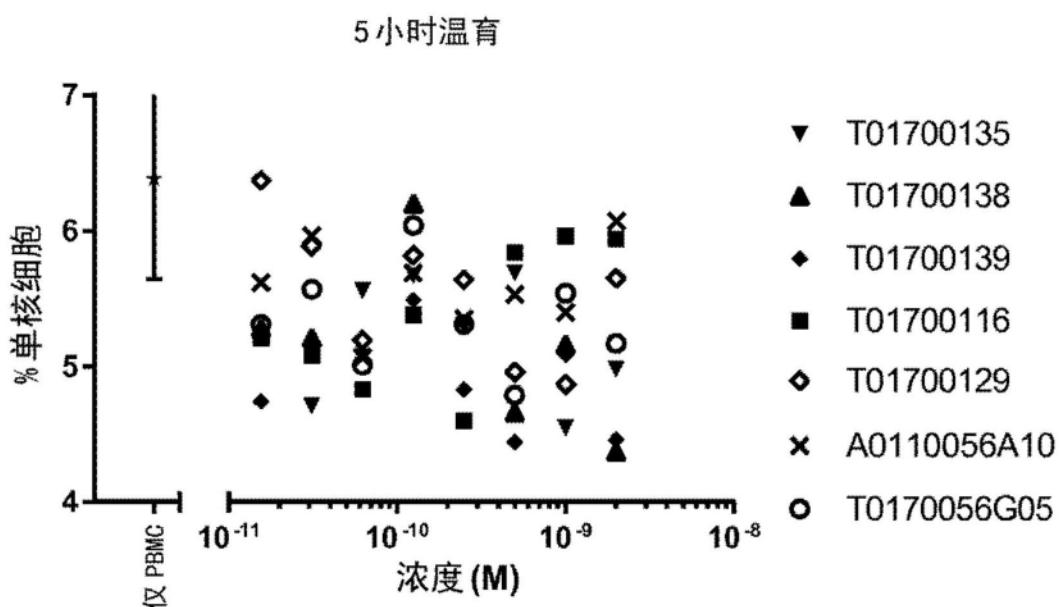


图38

A.



B.

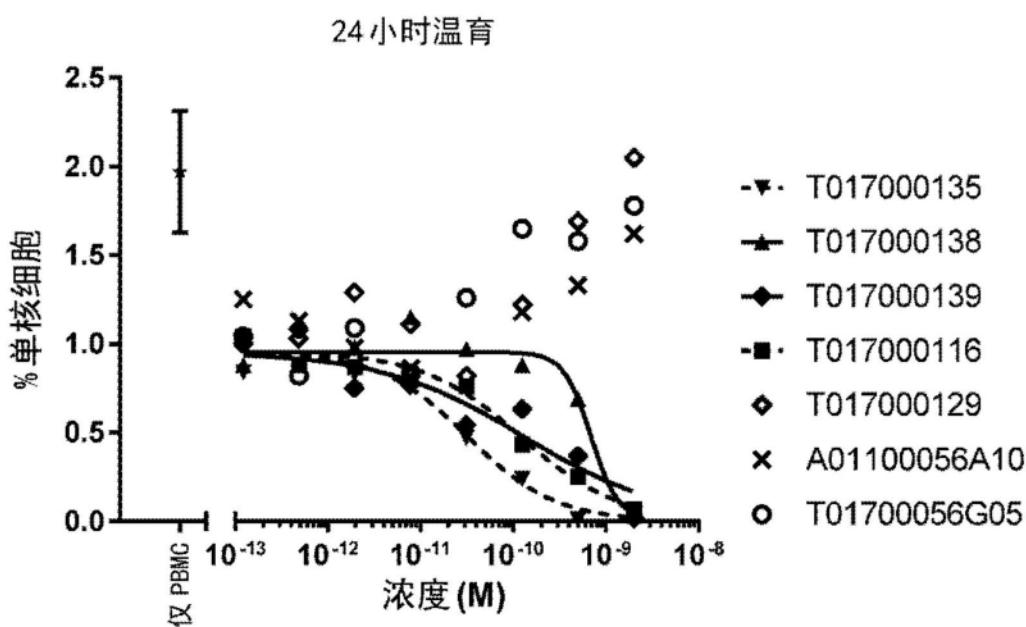


图39

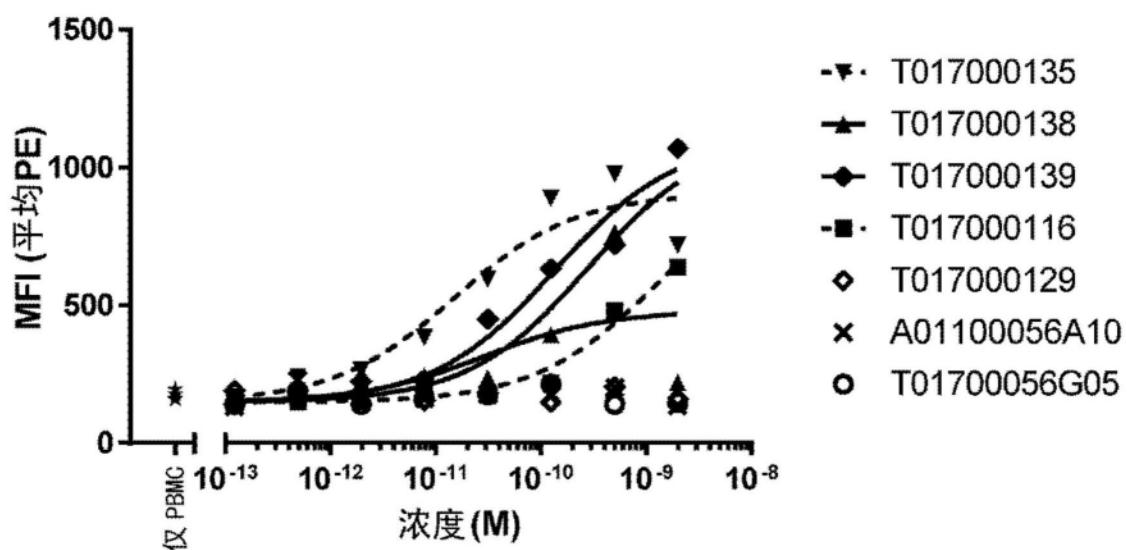
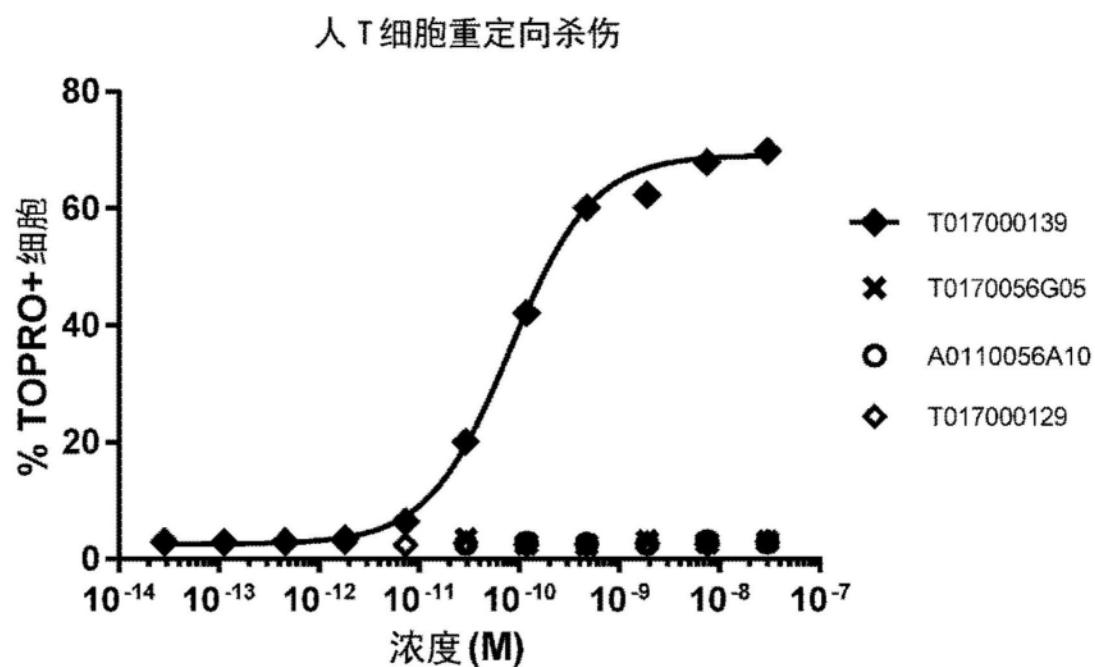


图40

A.



B.

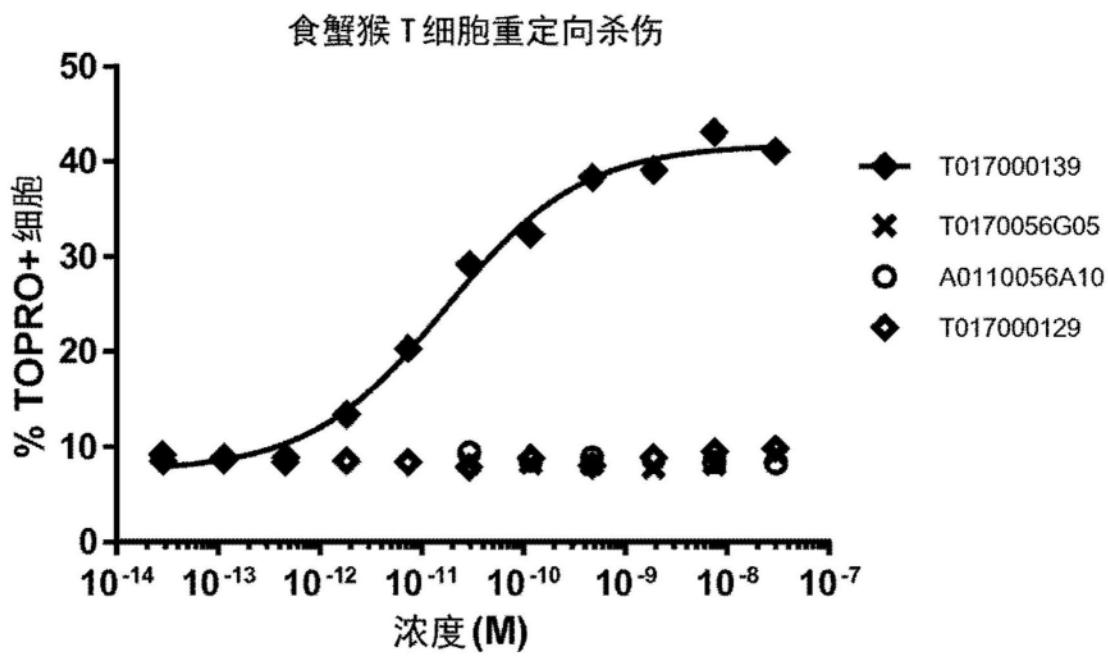
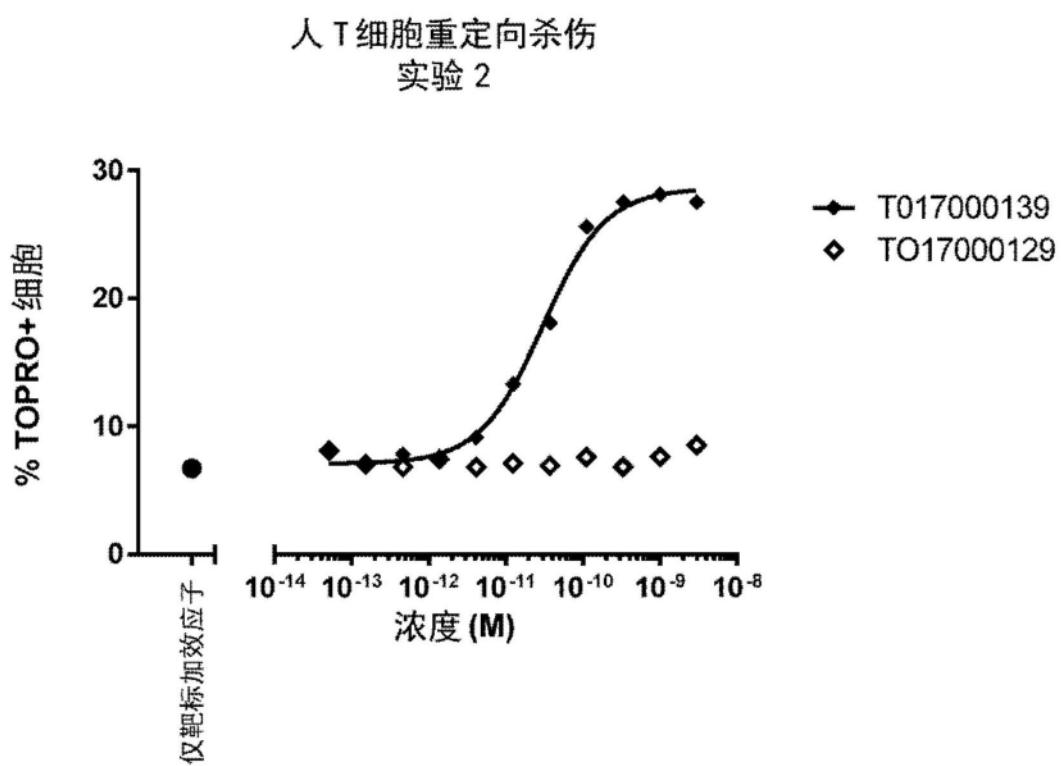


图41

A.



B.

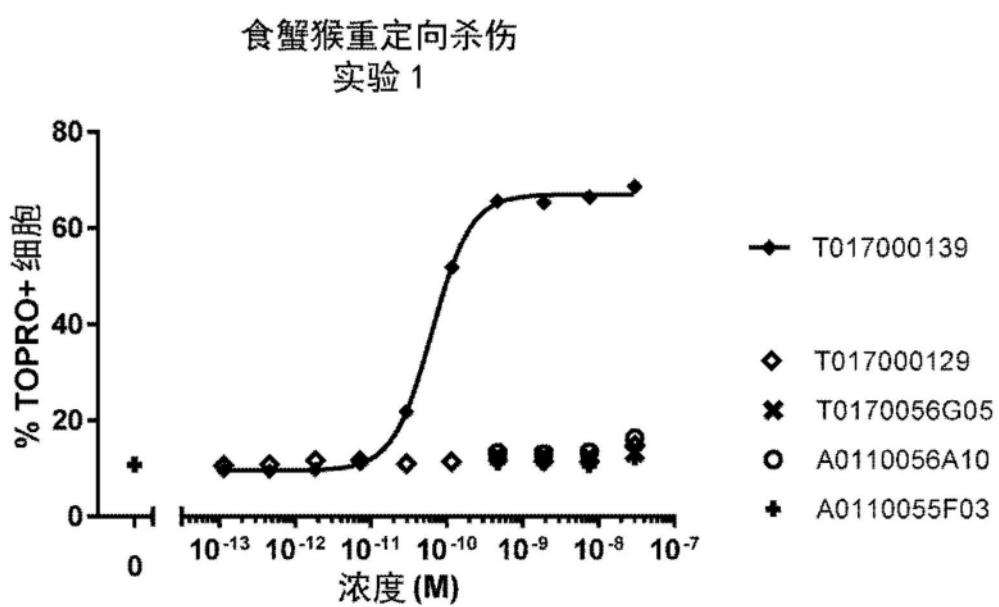


图42

C.

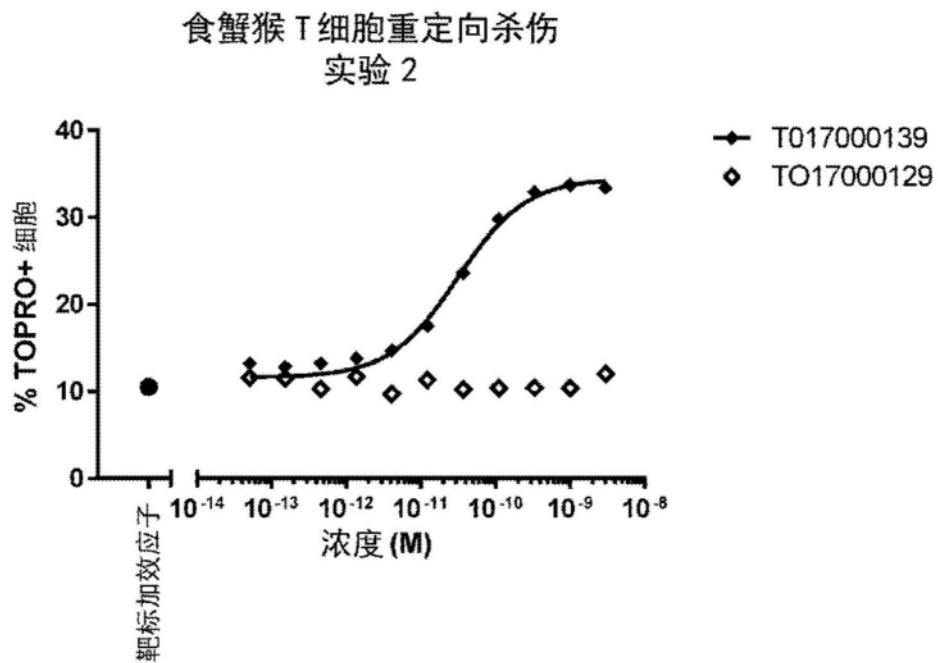


图42 (续)

A.

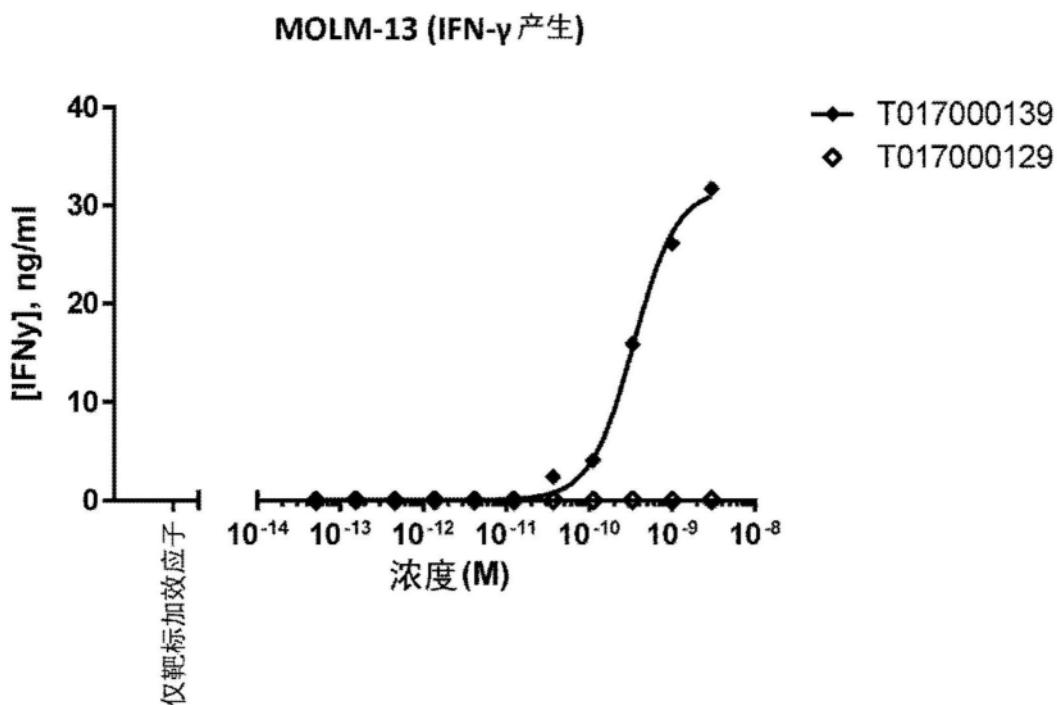
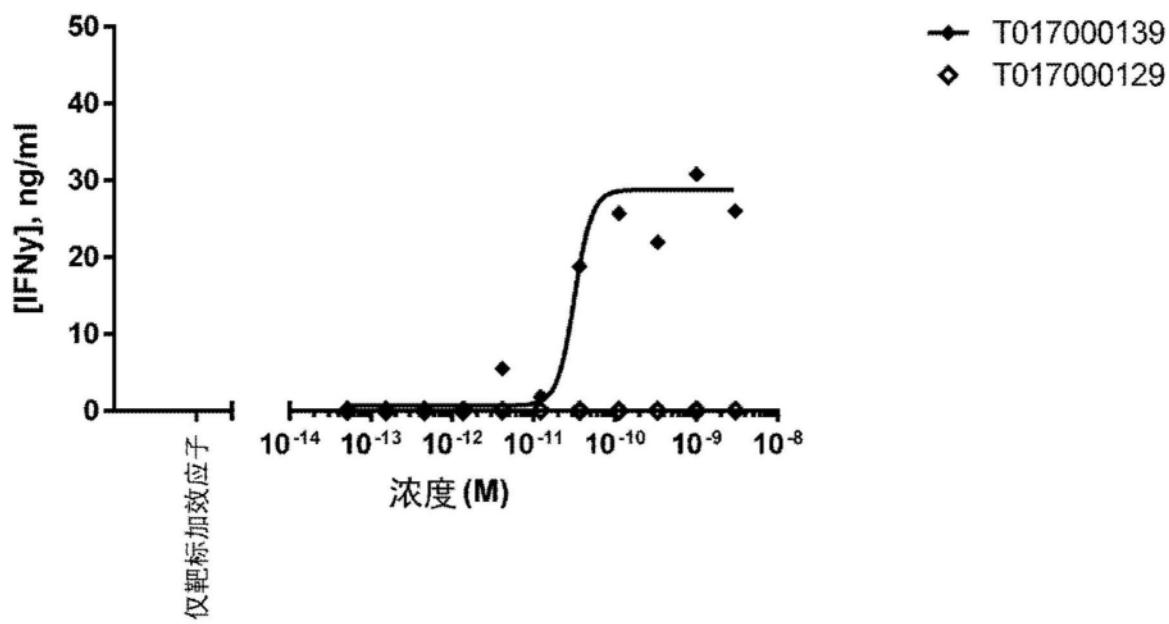


图43

B.

KG1a (IFN- γ 产生)

C.

MOLM-13 (IL-6 产生)

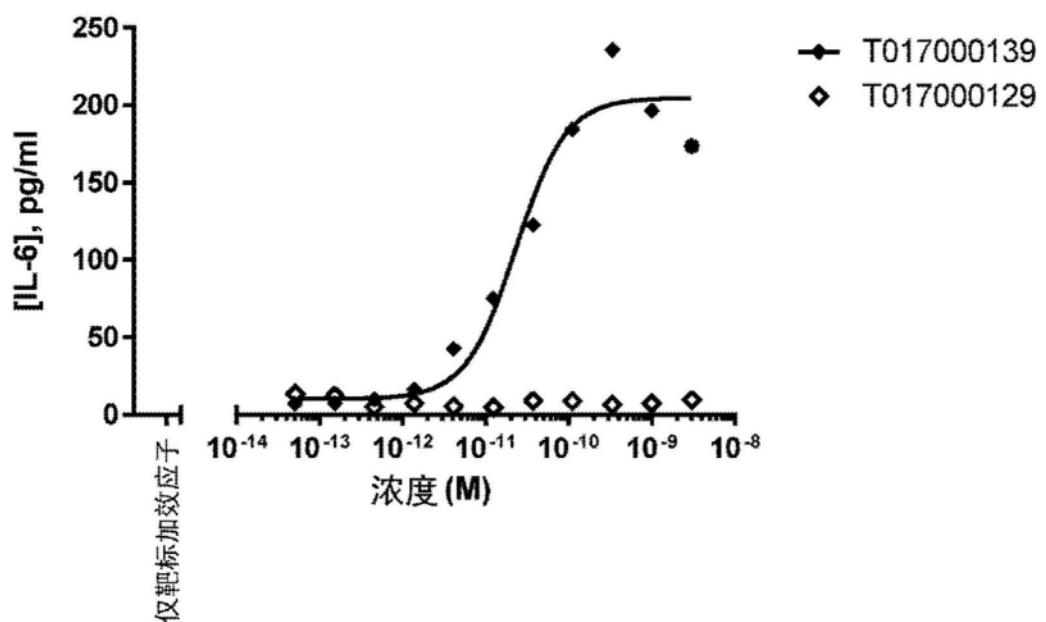
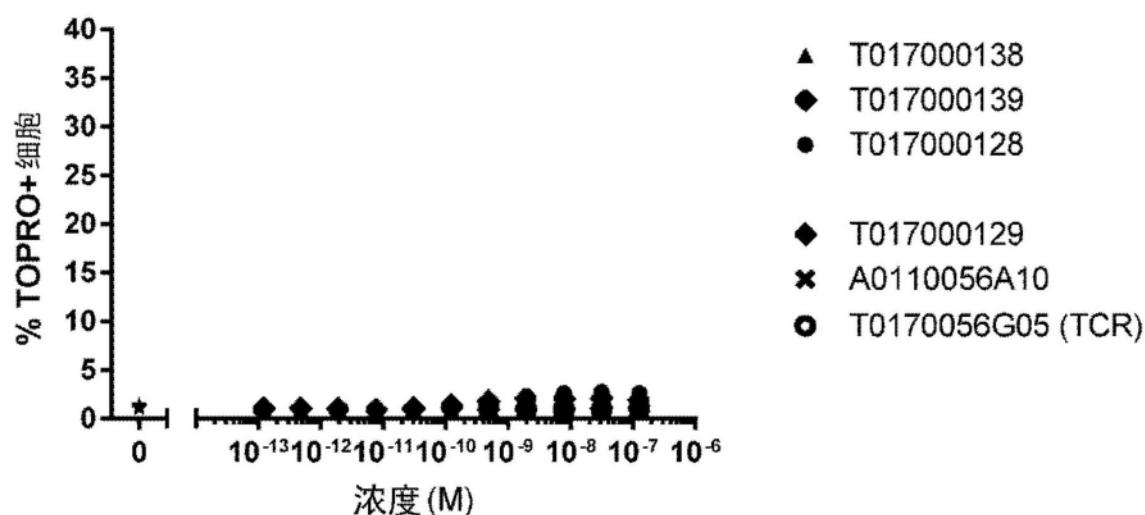


图43(续)

A.



B.

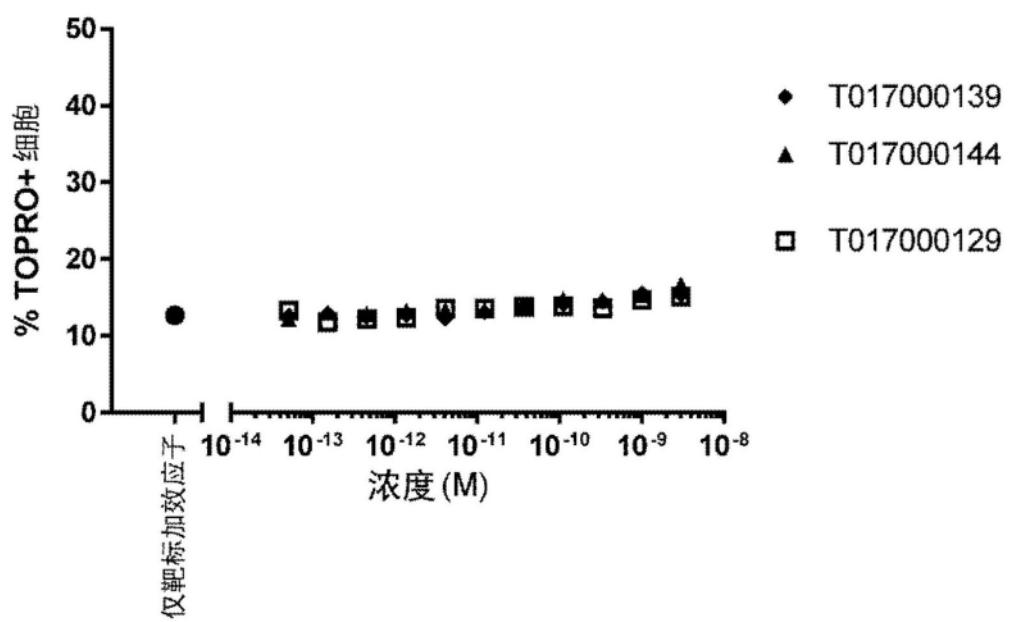
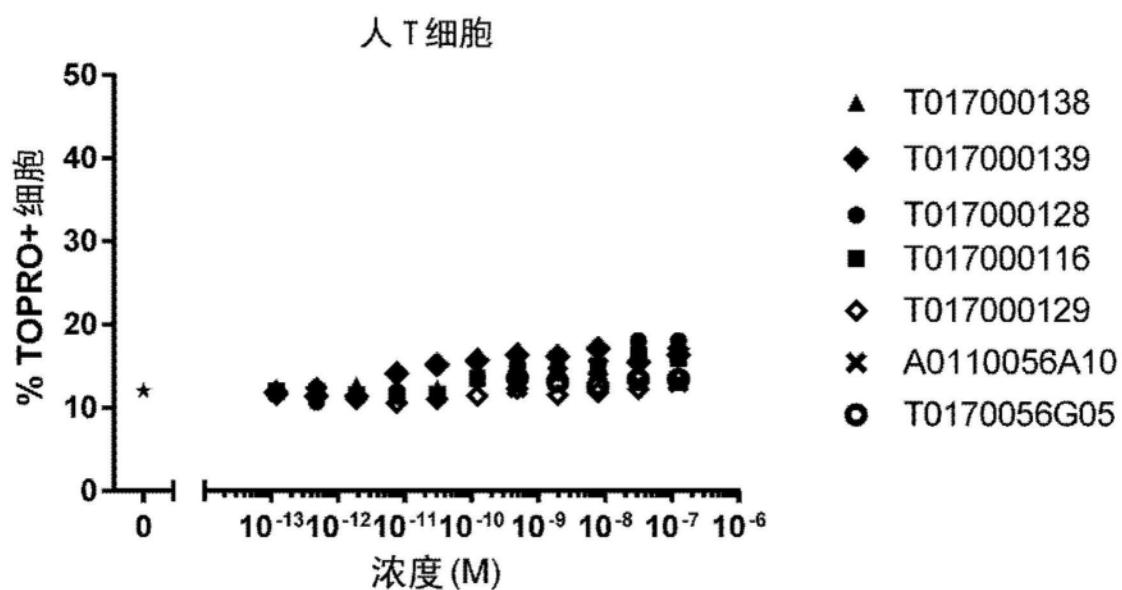


图44

A.



B.

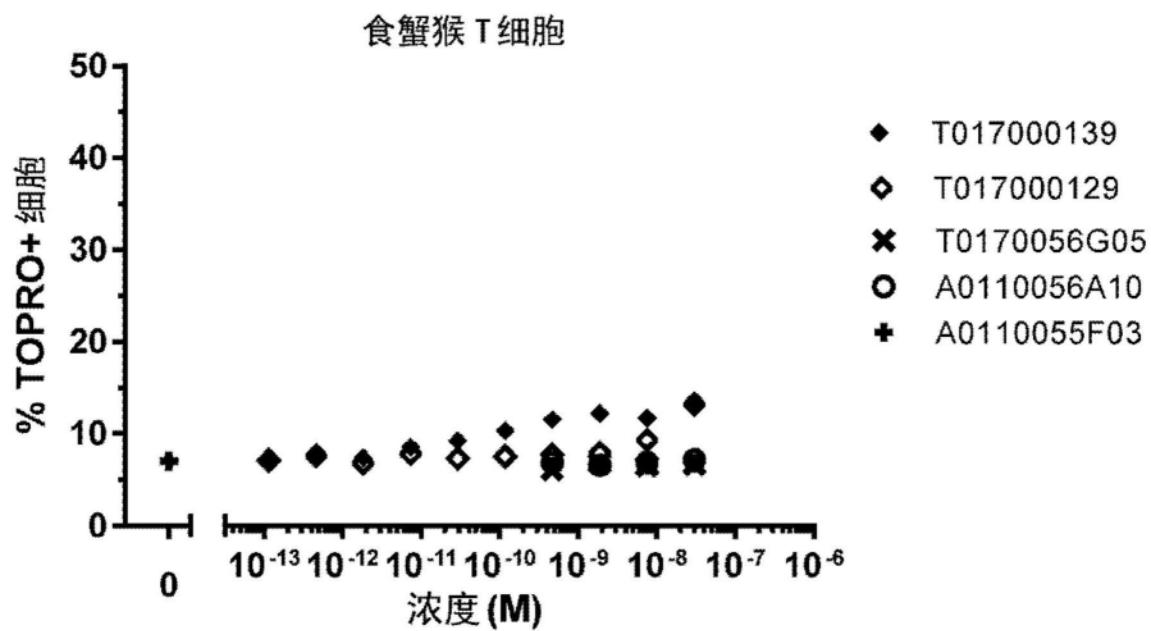
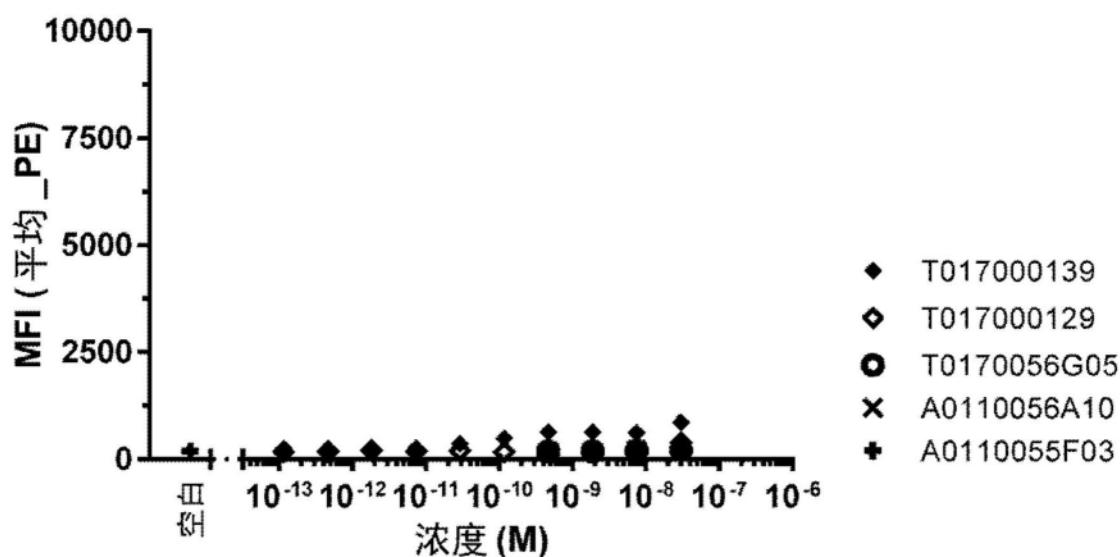


图45

A.

U-937 + 食蟹猴 T 细胞



B.

NCI-H929 + 人 T 细胞

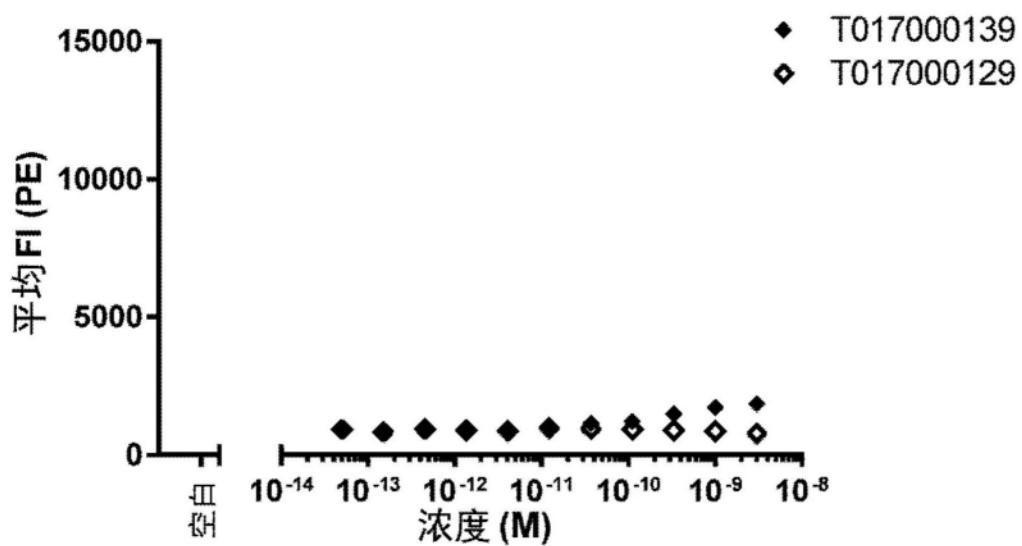
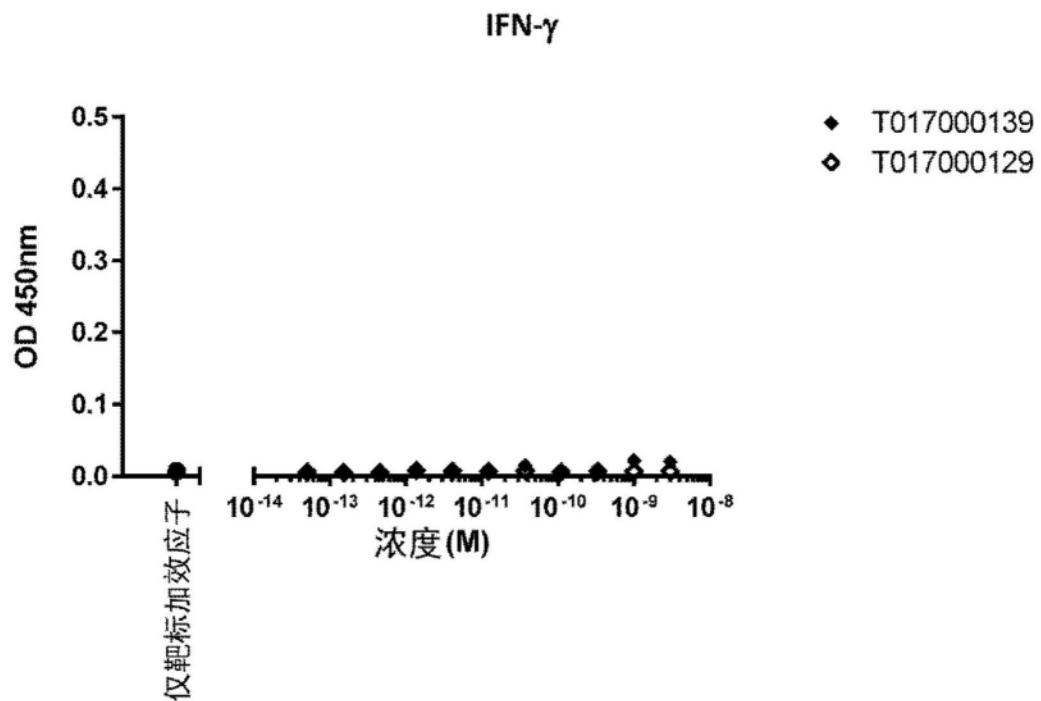


图46

A.



B.

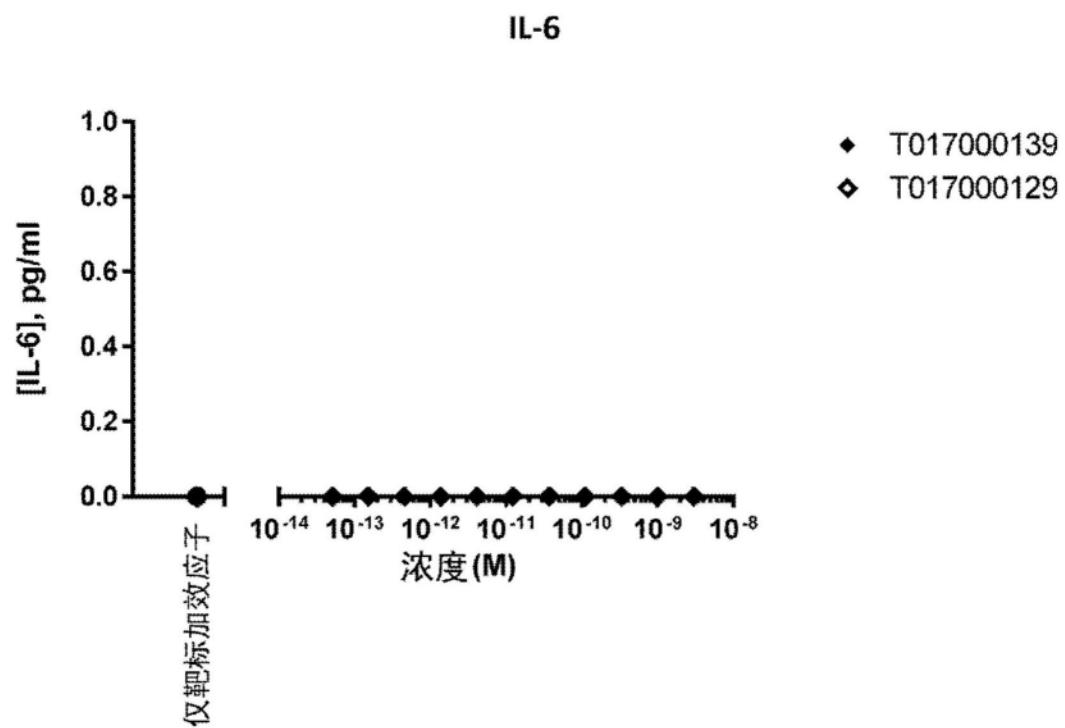
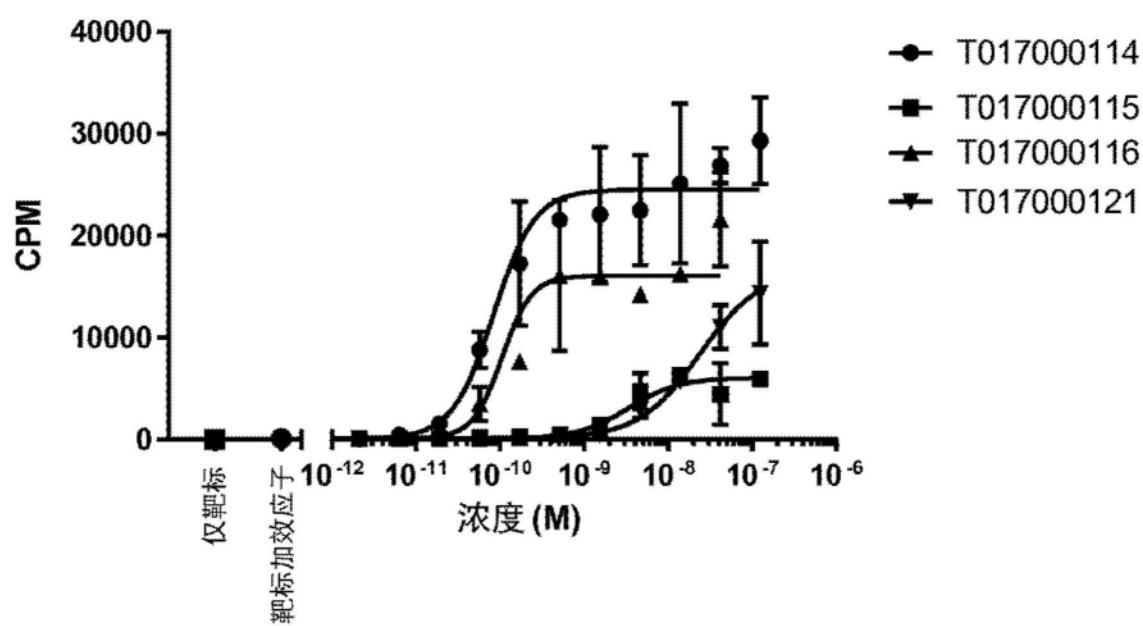


图47

A.



B.

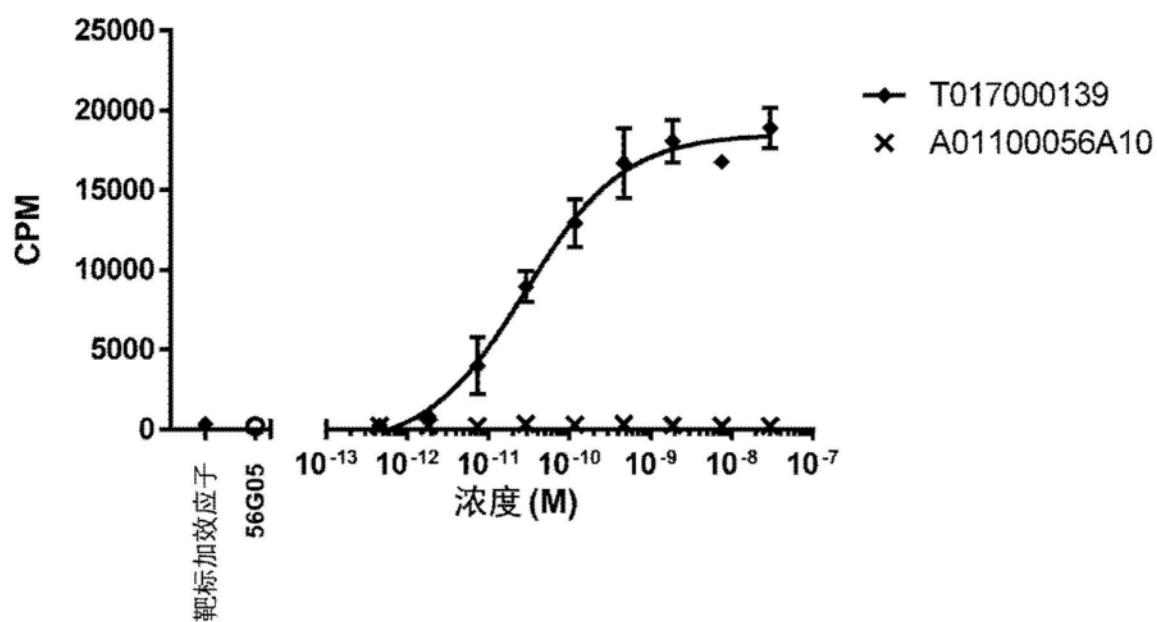


图48

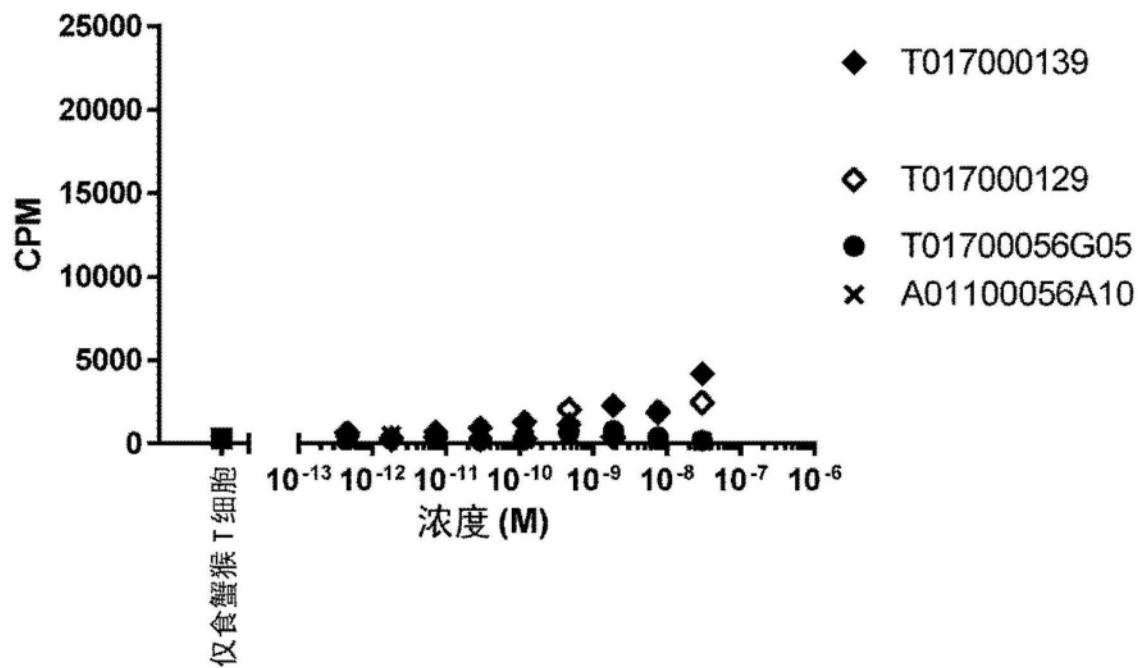


图49

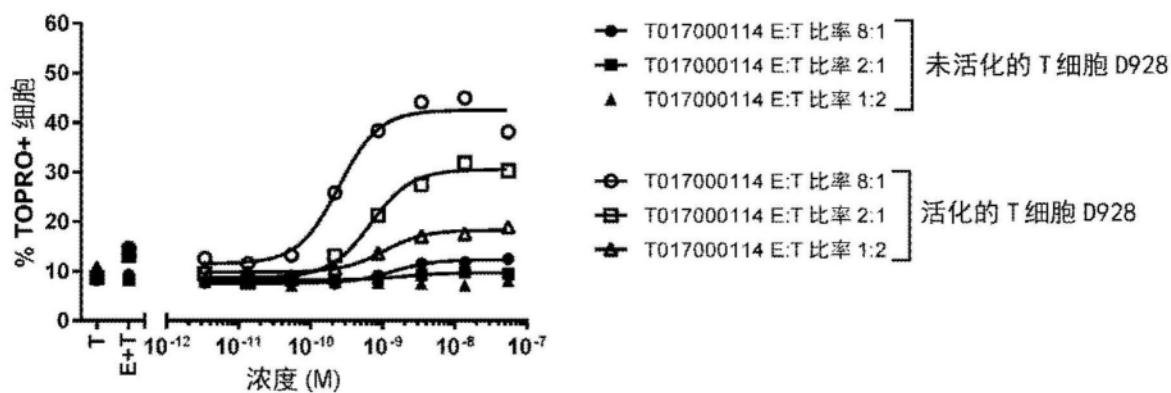


图50

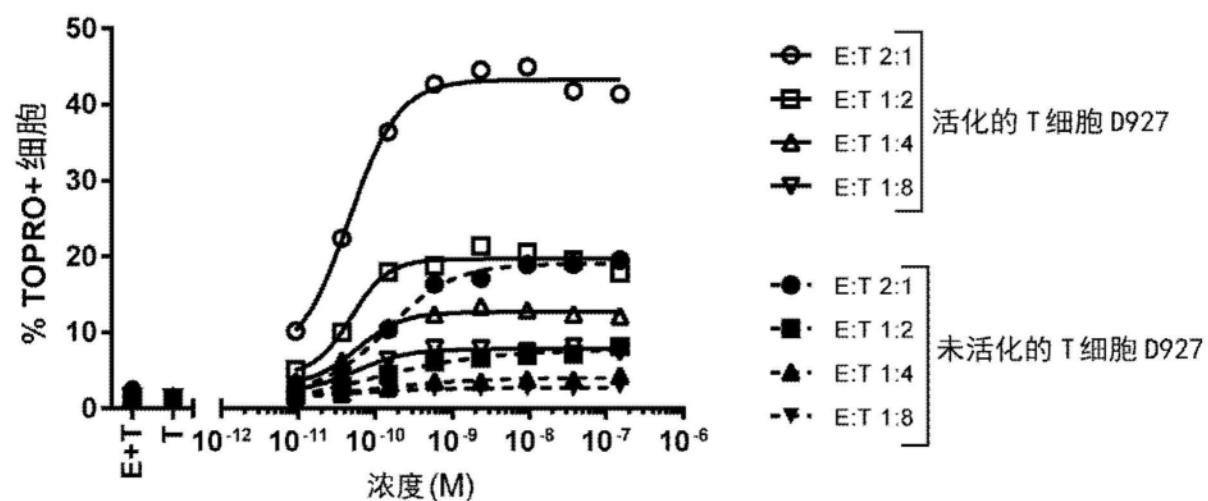
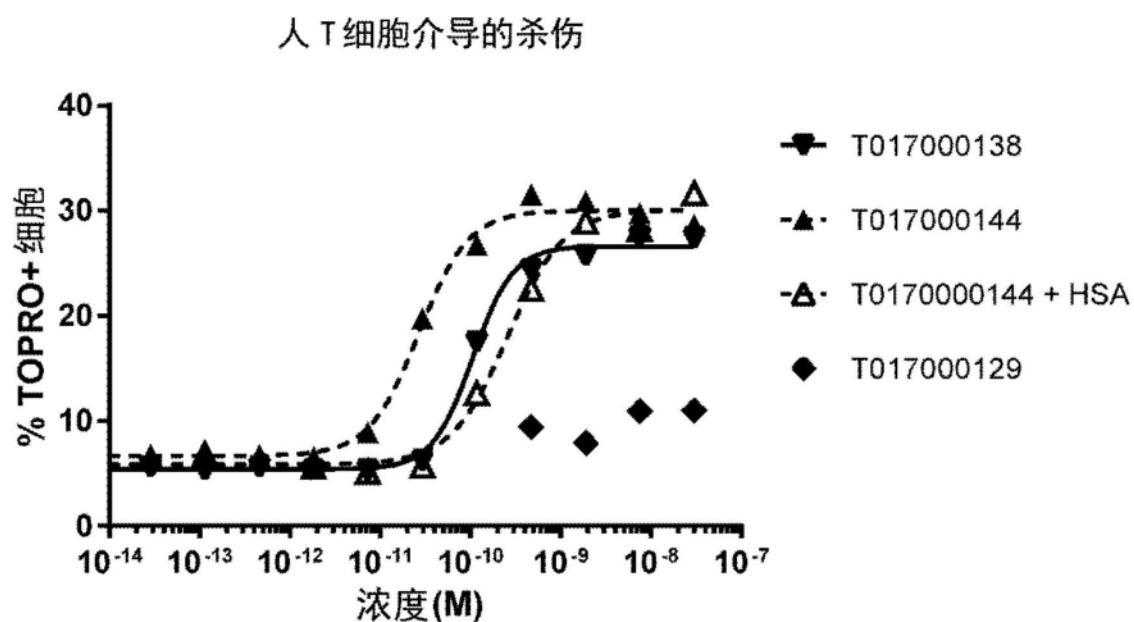


图51

A.



B.

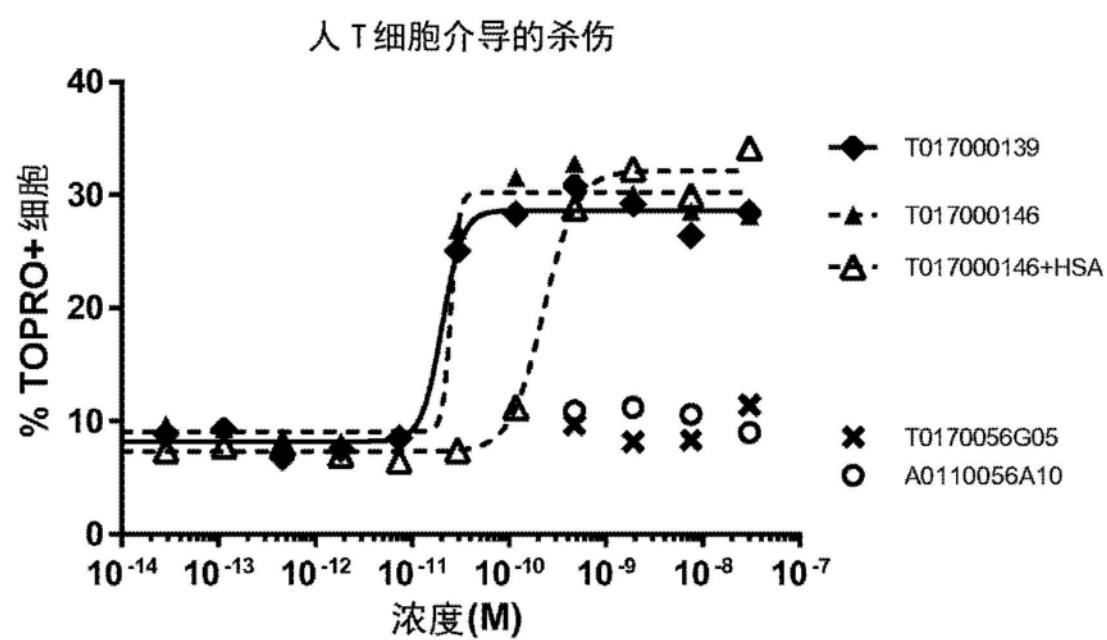
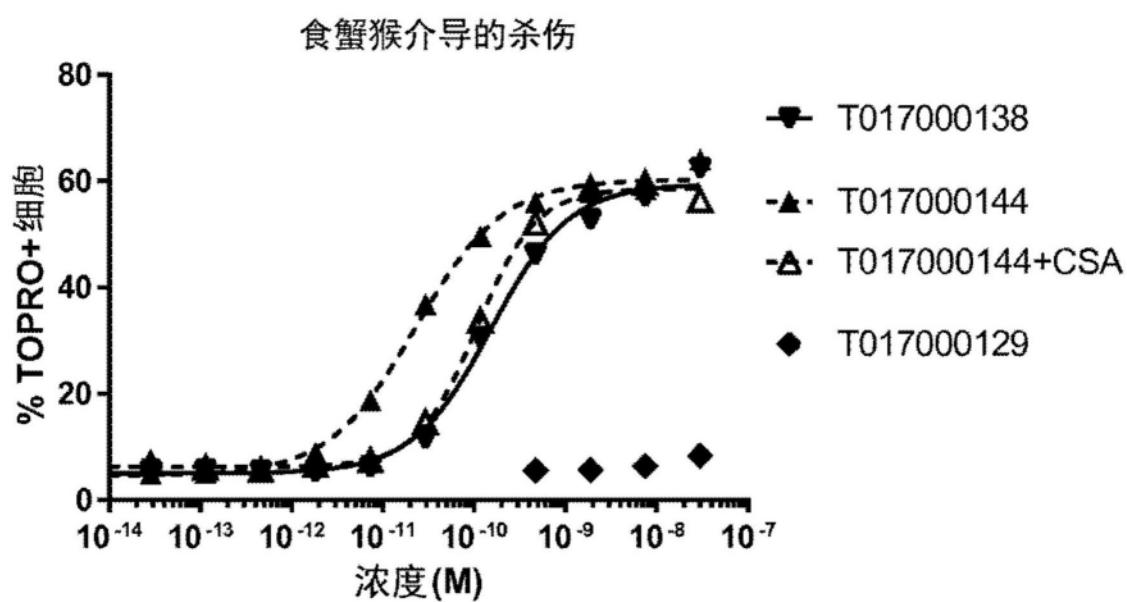


图52

C.



D.

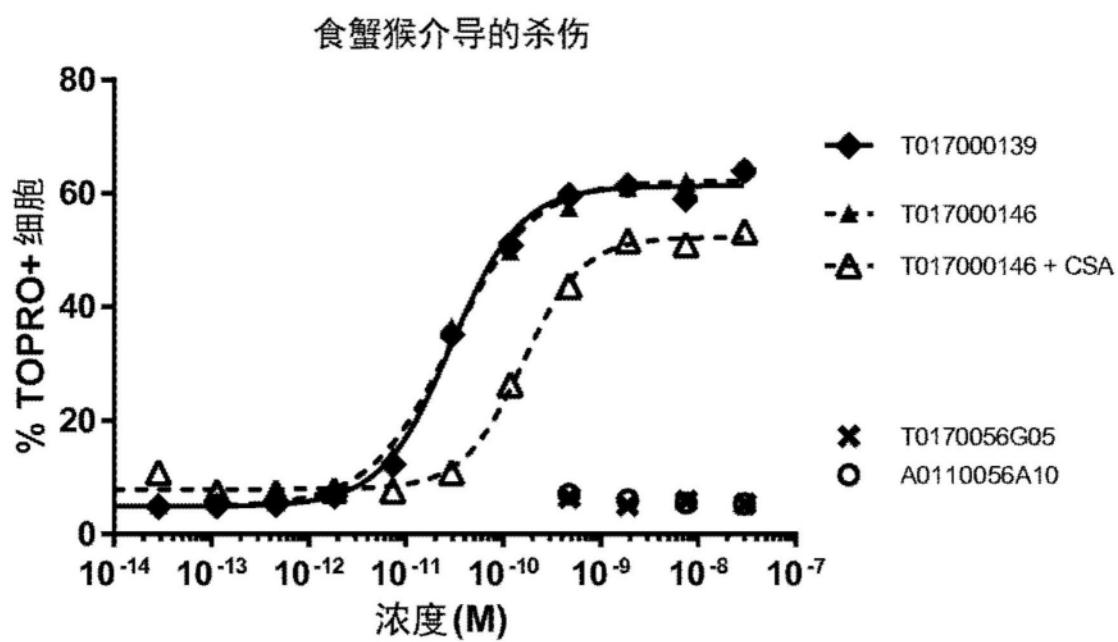
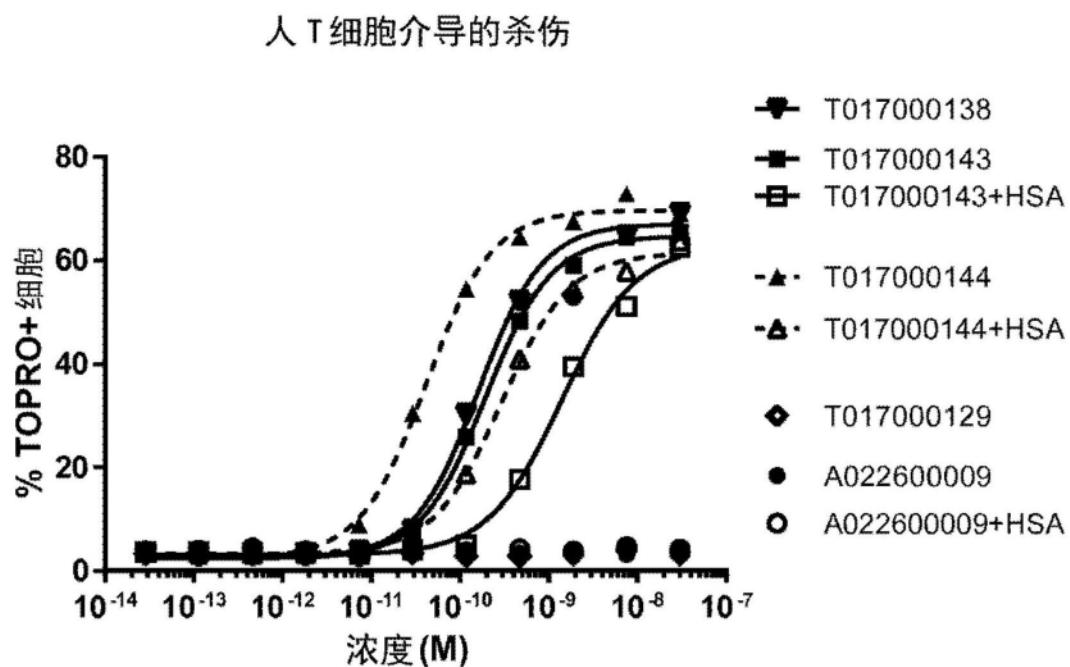


图52(续)

A.



B.

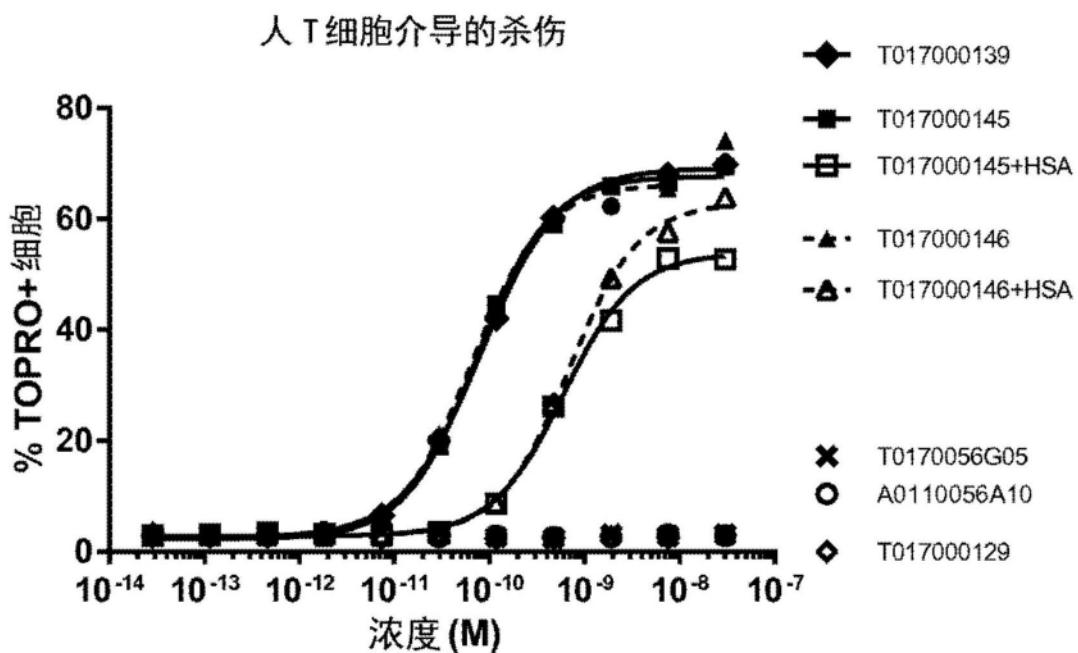
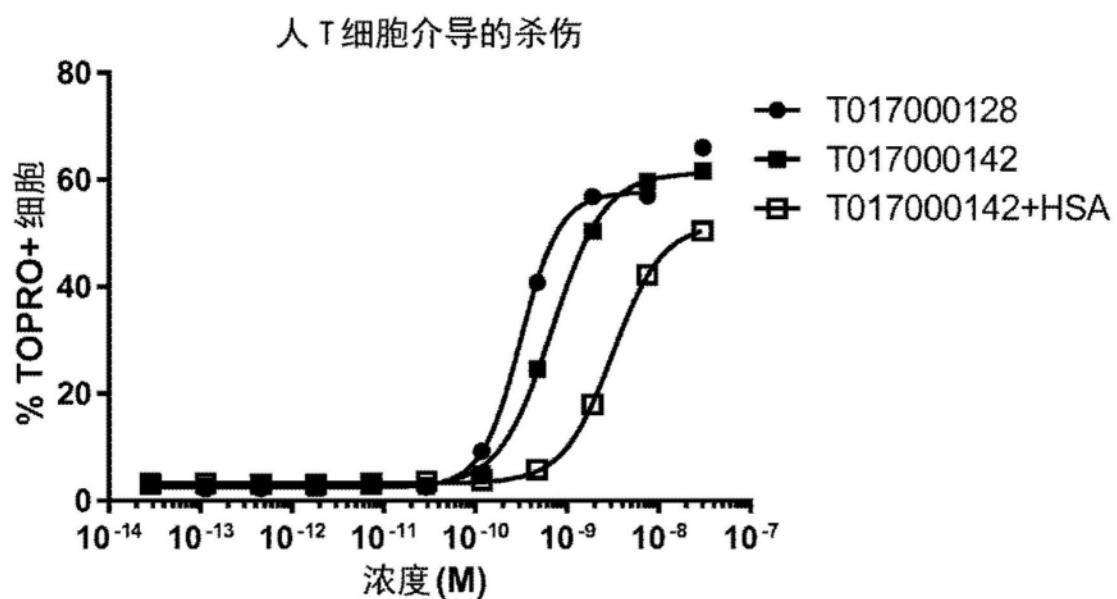


图53

C.



D.

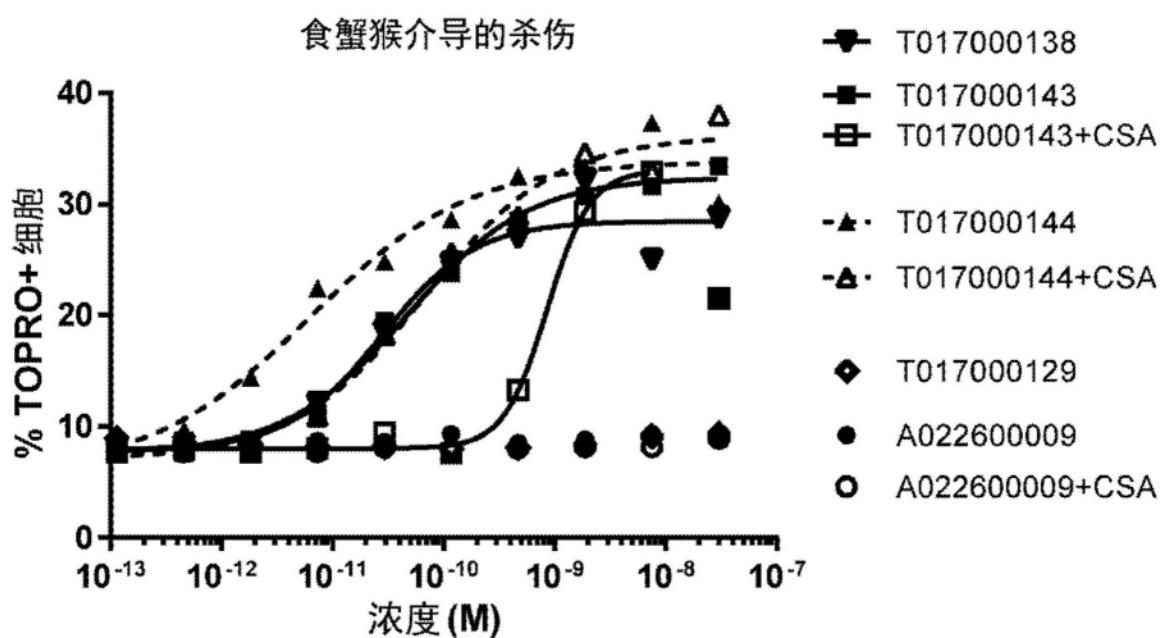
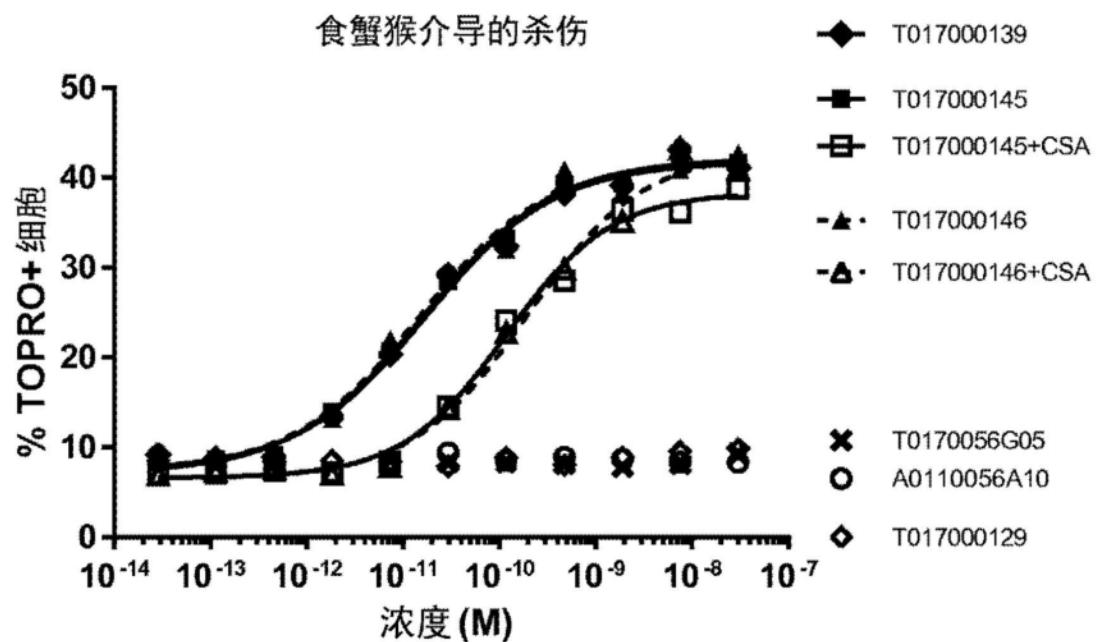


图53(续)

E.



F.

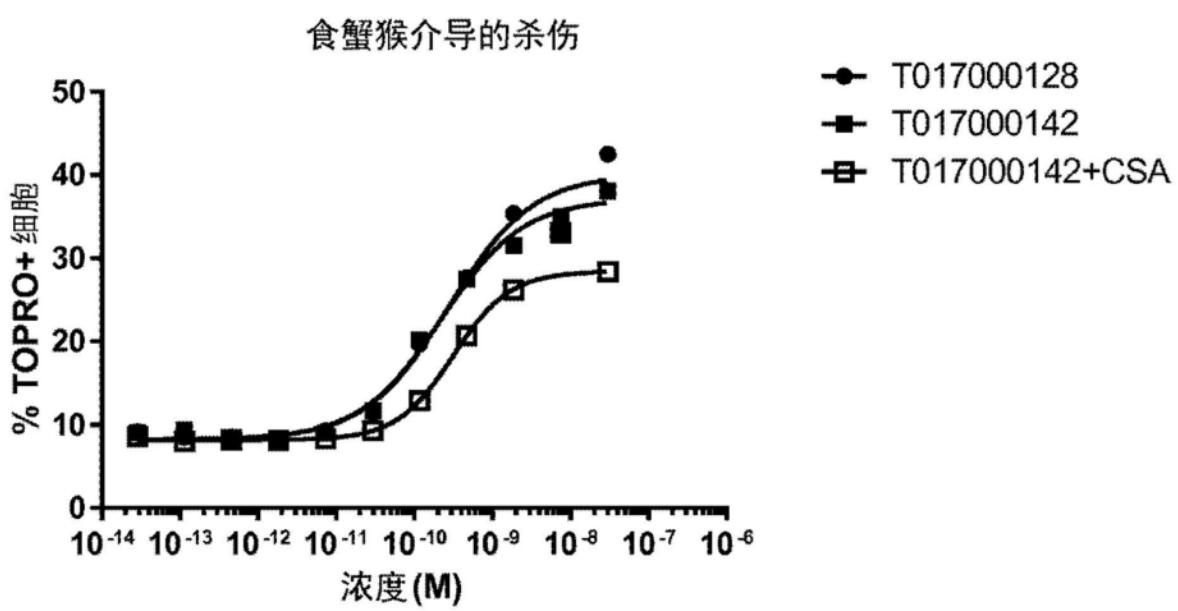
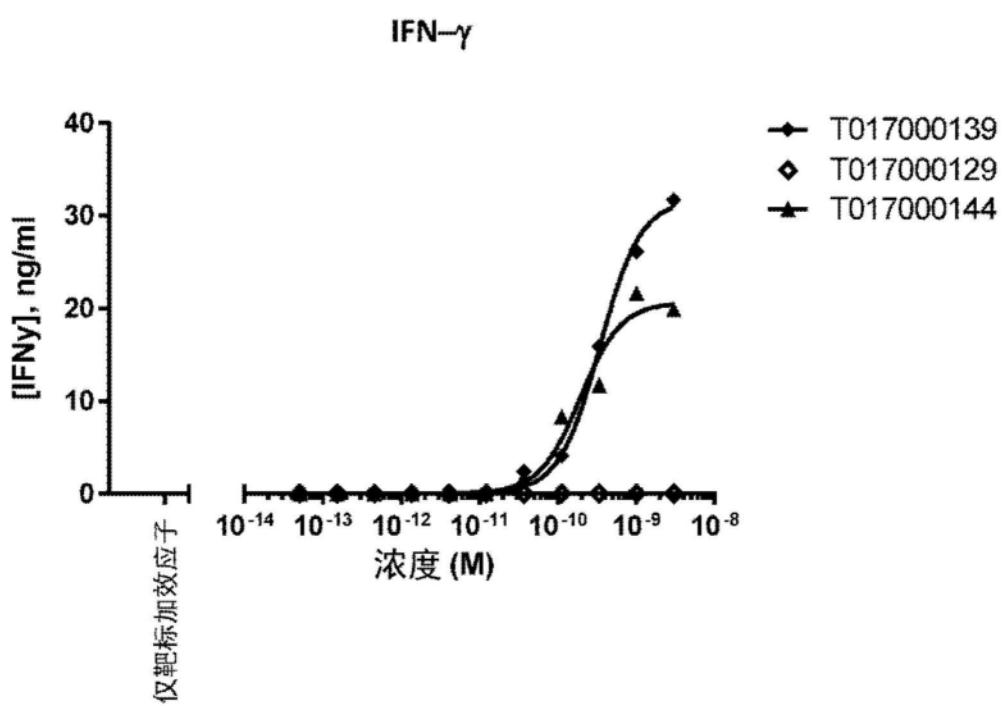


图53(续)

A.



B.

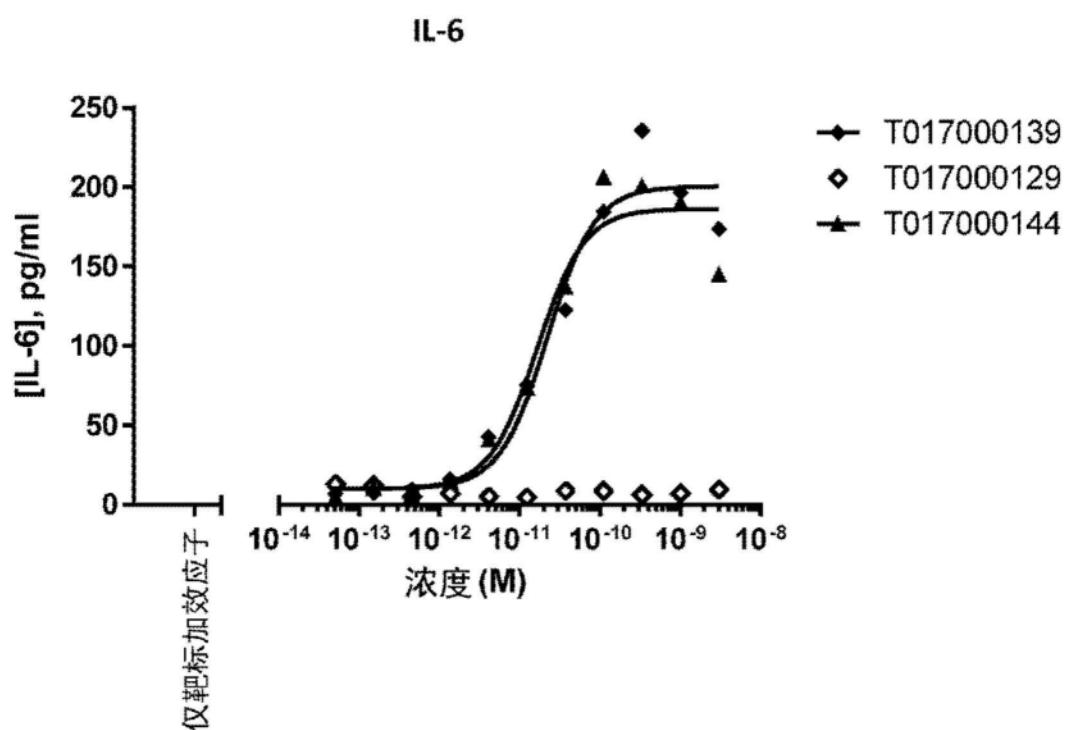


图54

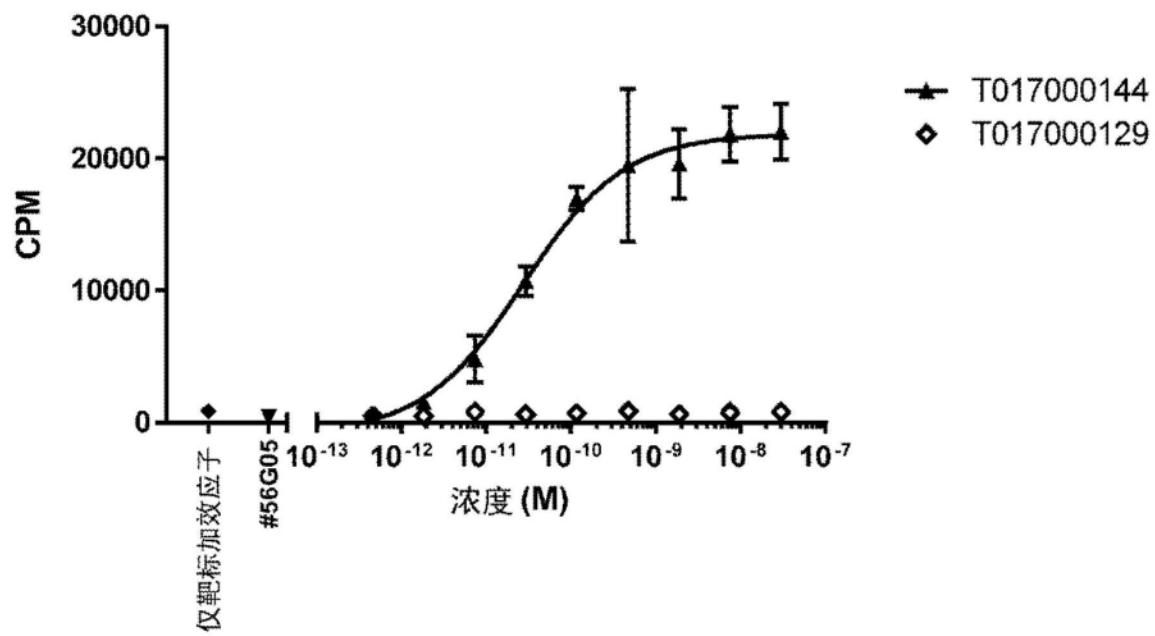


图55

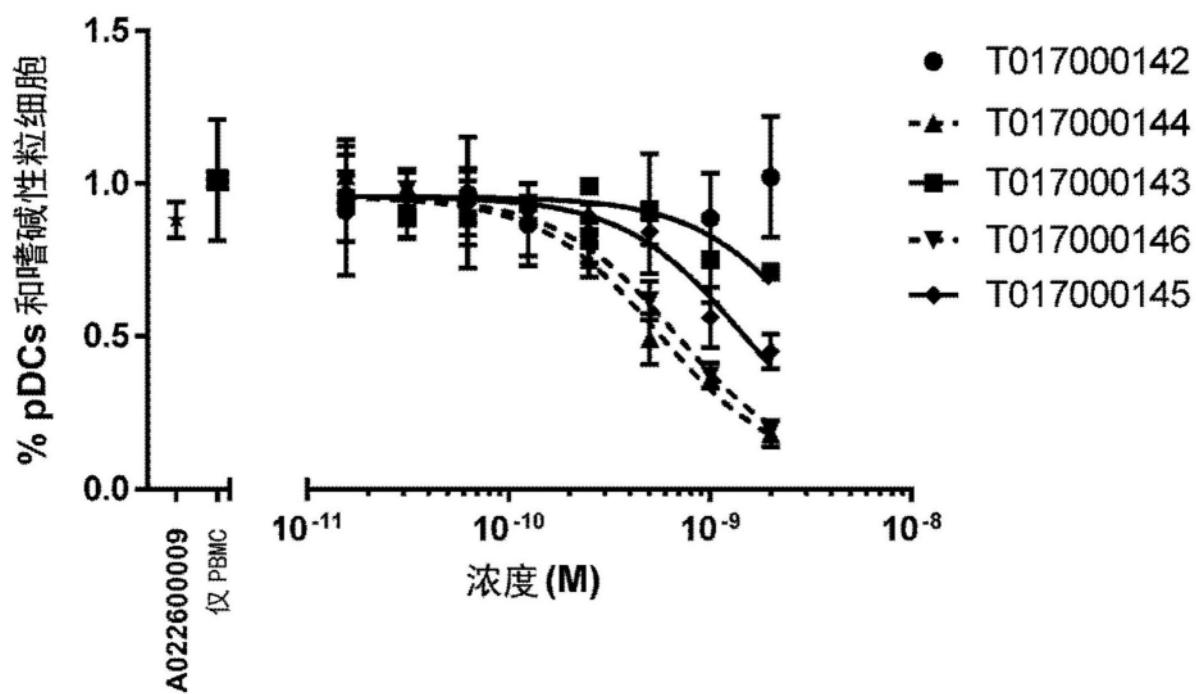


图56

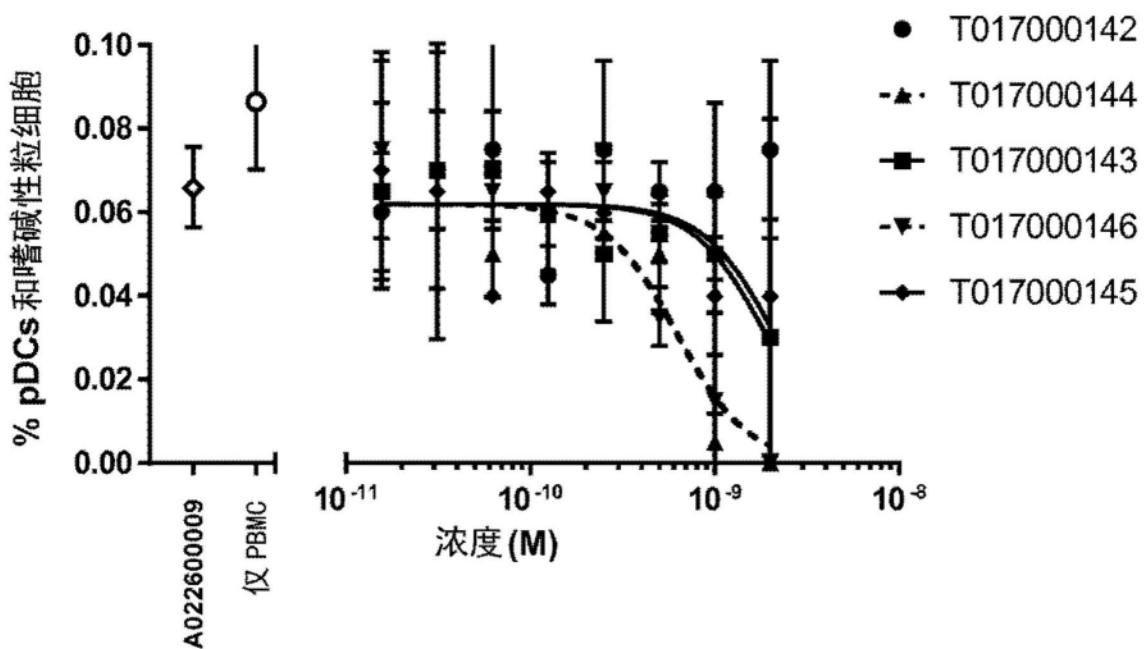


图57

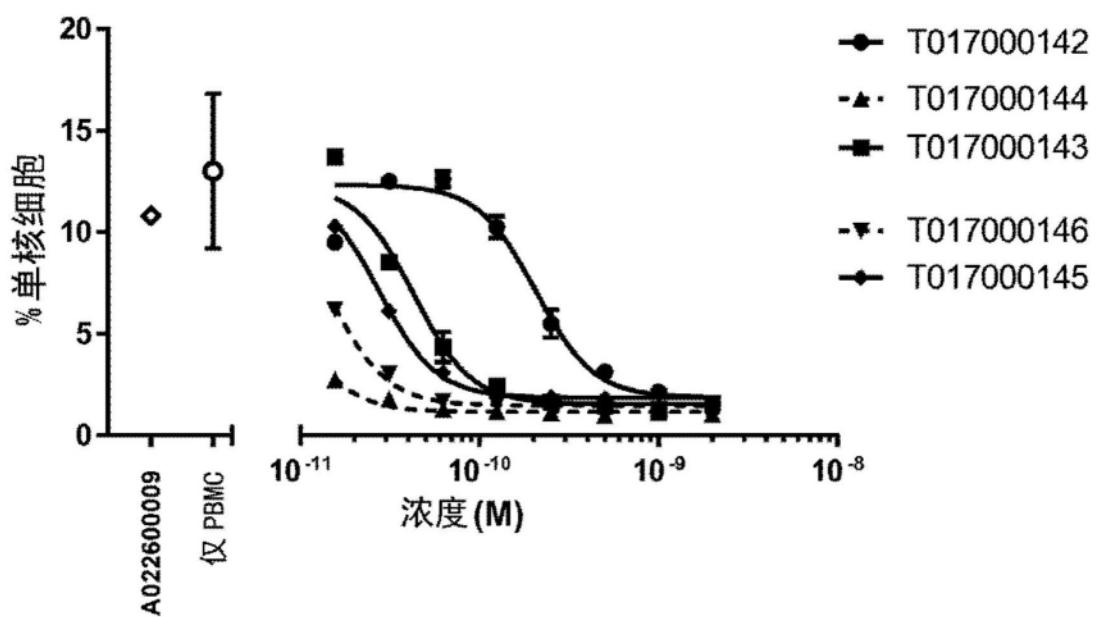
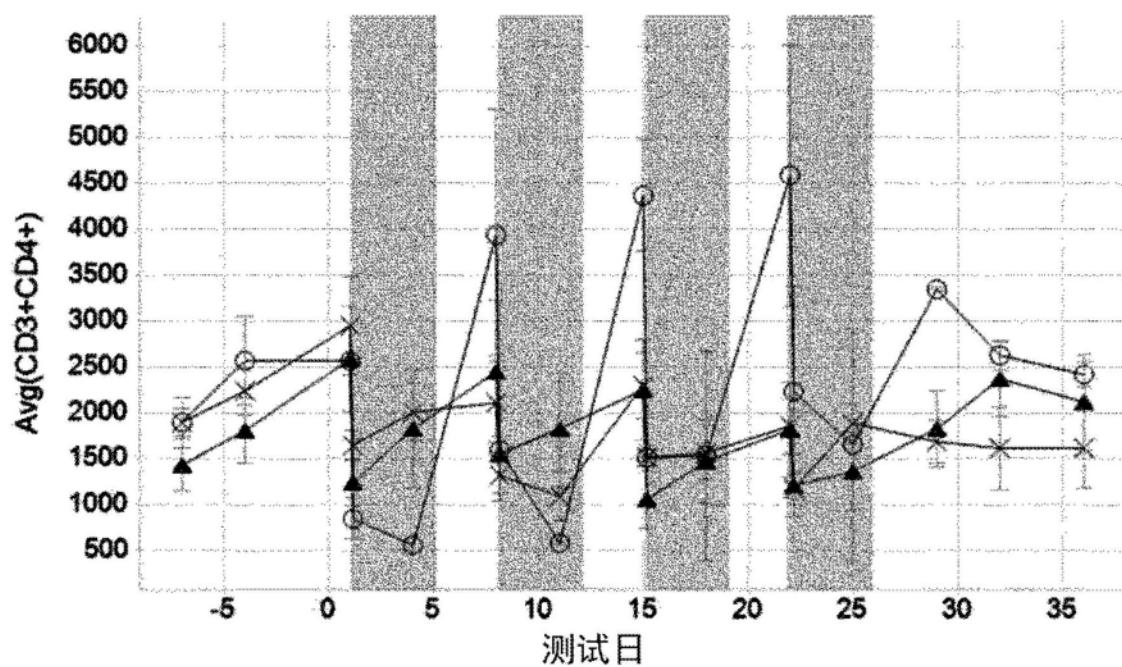


图58

A.



B.

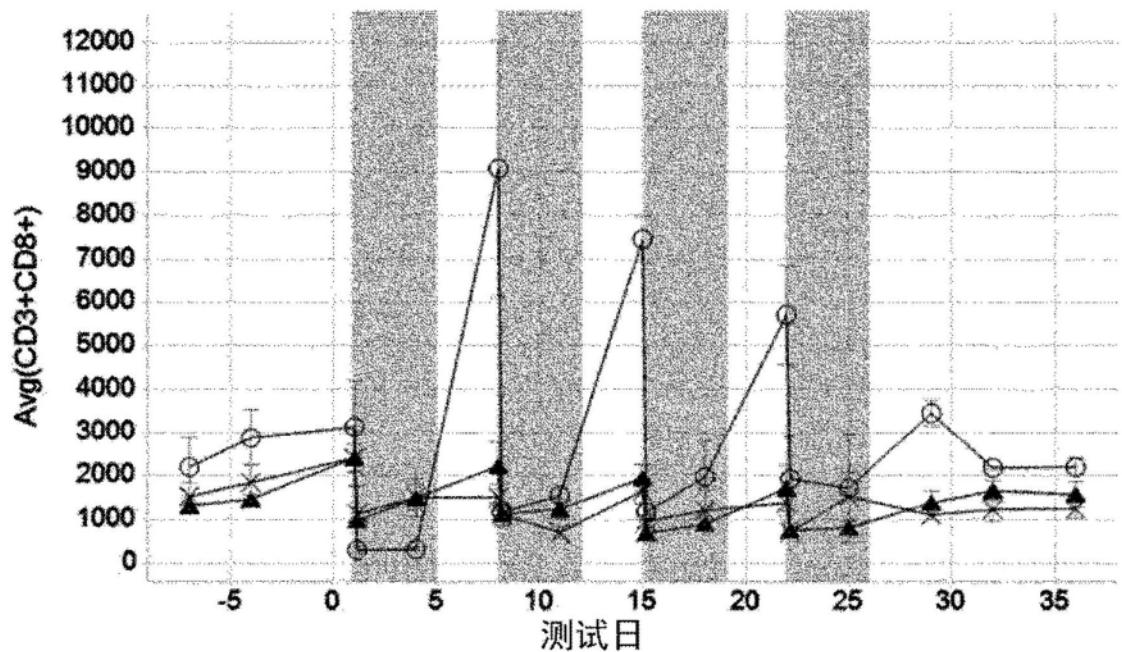


图59

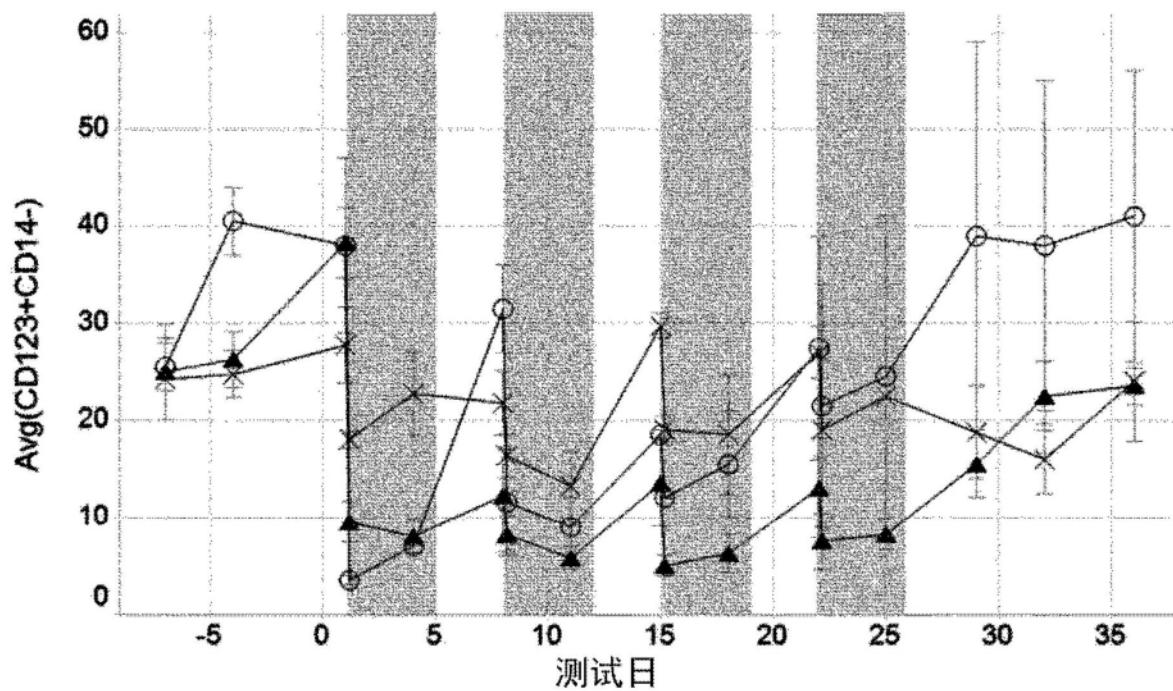
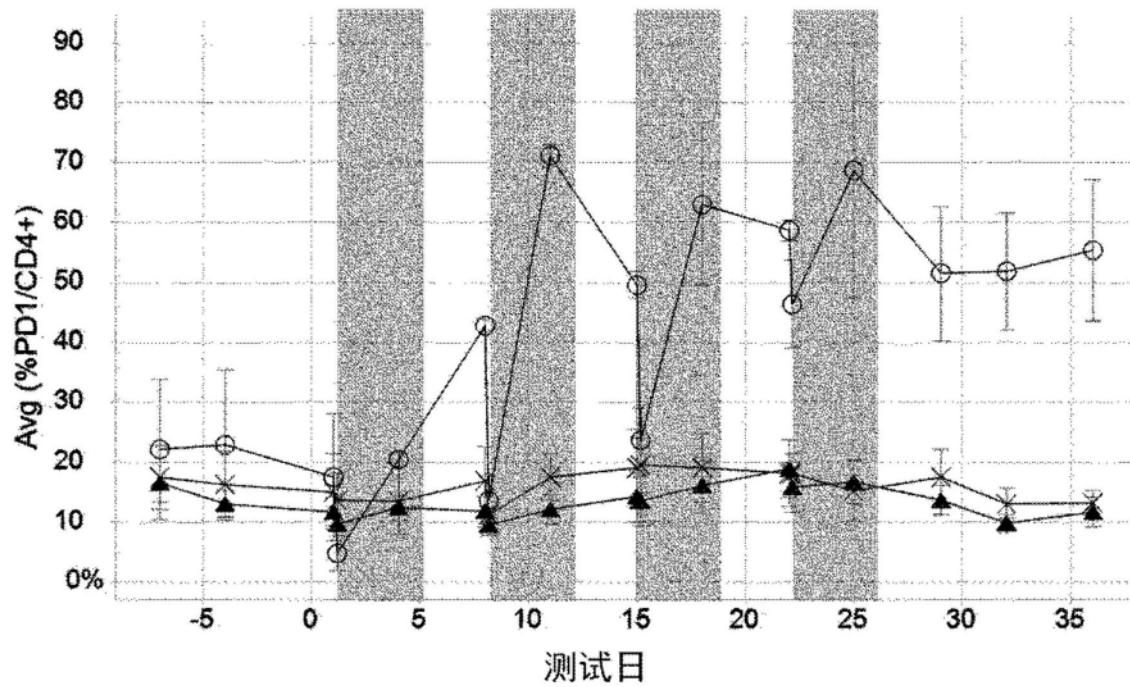


图60

A.



B.

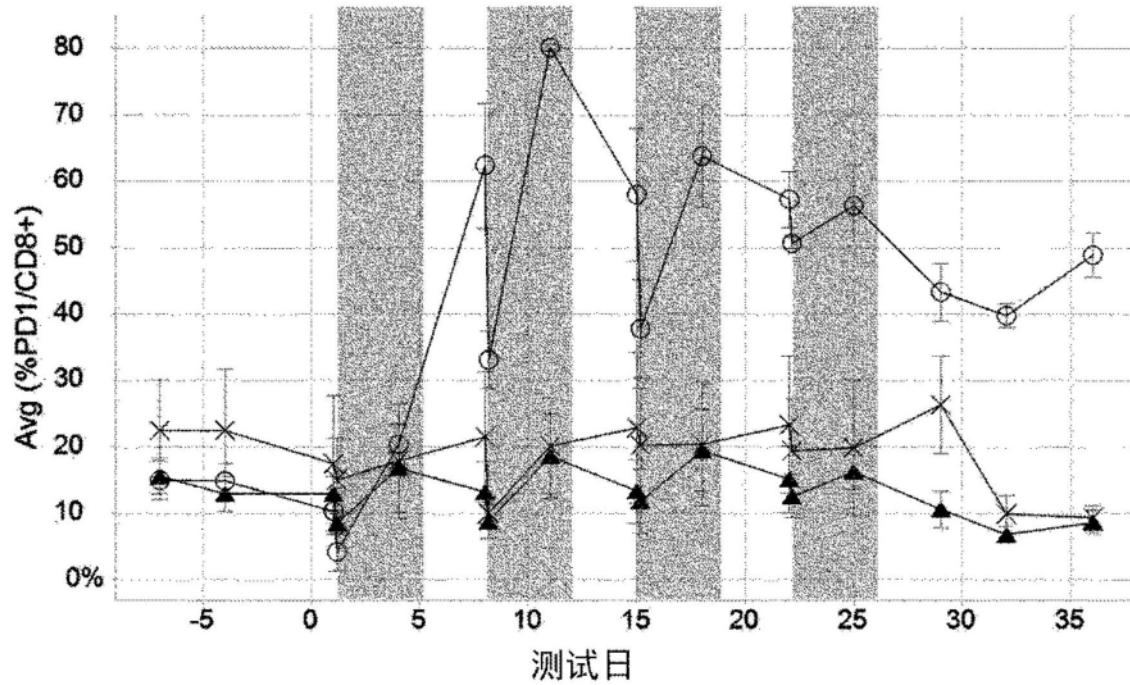


图61

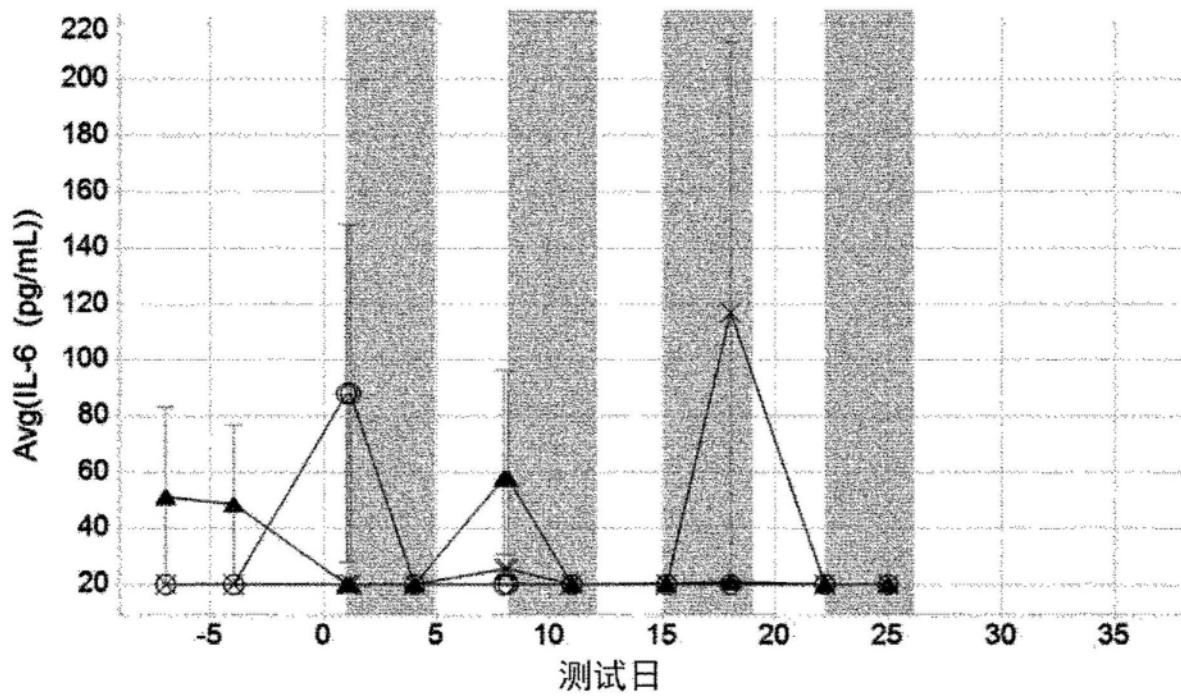


图62