



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 116867519 A

(43) 申请公布日 2023.10.10

(21) 申请号 202180092544.3

(22) 申请日 2021.12.01

(30) 优先权数据

63/119,753 2020.12.01 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2023.07.31

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2021/061453 2021.12.01

(87) PCT国际申请的公布数据

W02022/119955 EN 2022.06.09

(71) 申请人 约翰斯霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 S·迪纳波利 J·道格拉斯

E·H-C·徐 M·S·黄

K·W·金泽勒 M·柯尼格

B·J·莫格 N·帕帕多普洛斯

A·M·帕多尔 S·保罗

A·H·皮尔曼 B·沃格尔斯坦

S·周

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公司

31100

专利代理师 陶家蓉 杨昀

(51) Int.Cl.

A61K 39/395 (2006.01)

权利要求书2页 说明书35页

序列表25页 附图49页

(54) 发明名称

治疗T细胞癌症的方法和材料

(57) 摘要

本文献涉及用于治疗T细胞癌症的方法和材料。例如,含有一种或多种双特异性分子的组合可给予患有T细胞癌症的哺乳动物以治疗该哺乳动物。例如,提供了使用一种或多种双特异性分子治疗患有T细胞癌症的哺乳动物的方法和材料。

1. 一种双特异性分子,包括:

第一多肽,其包含可结合T细胞受体 $\beta$ 链可变(TRBV)多肽的第一抗原结合结构域;和  
第二多肽,其包含可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域。

2. 如权利要求1所述的双特异性分子,其中所述第一多肽选自单链可变片段(scFv)、抗原结合片段(Fab)、F(ab')<sub>2</sub>片段及其生物活性片段。

3. 如权利要求1-2中任一项所述的双特异性分子,其中所述TRBV多肽选自TRBV2多肽、TRBV3-1多肽、TRBV4-1多肽、TRBV4-2多肽、TRBV4-3多肽、TRBV5-1多肽、TRBV5-4多肽、TRBV5-5多肽、TRBV5-6多肽、TRBV5-8多肽、TRBV6-1多肽、TRBV6-2多肽、TRBV6-3多肽、TRBV6-4多肽、TRBV6-5多肽、TRBV6-6多肽、TRBV6-8多肽、TRBV6-9多肽、TRBV7-2多肽、TRBV7-3多肽、TRBV7-4多肽、TRBV7-6多肽、TRBV7-7多肽、TRBV7-8多肽、TRBV7-9多肽、TRBV9多肽、TRBV10-1多肽、TRBV10-2多肽、TRBV10-3多肽、TRBV11-1多肽、TRBV11-2多肽、TRBV11-3多肽、TRBV12-2多肽、TRBV12-3多肽、TRBV12-4多肽、TRBV12-5多肽、TRBV13多肽、TRBV14多肽、TRBV15多肽、TRBV16多肽、TRBV18多肽、TRBV19多肽、TRBV20-1多肽、TRBV24-1多肽、TRBV25-1多肽、TRBV27 TRBV28多肽、TRBV29-1多肽和TRBV30多肽。

4. 如权利要求3所述的双特异性分子,其中所述TRBV多肽是所述TRBV5-5多肽。

5. 如权利要求4所述的双特异性分子,其中能与所述TRBV5-5多肽结合的第一抗原结合结构域包括:

轻链,所述轻链包括具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1、具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2和具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3;和

重链,所述重链包括具有SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1、具有SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2和具有SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。

6. 如权利要求5所述的双特异性分子,其中所述轻链包含SEQ ID NO:7所示的氨基酸序列,和其中所述重链包含SEQ ID NO:8所示的氨基酸序列。

7. 如权利要求5所述的双特异性分子,其中所述轻链包含SEQ ID NO:38所示的氨基酸序列,和其中所述重链包含SEQ ID NO:39所示的氨基酸序列。

8. 如权利要求3所述的双特异性分子,其中所述TRBV多肽是所述TRBV12多肽。

9. 如权利要求8所述的双特异性分子,其中能与所述TRBV12多肽结合的第一抗原结合结构域包括:

轻链,所述轻链包括具有SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1、具有SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2和具有SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3;和

重链,所述重链包括具有SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1、具有SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2和具有SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。

10. 如权利要求9所述的双特异性分子,其中所述轻链包含SEQ ID NO:15所示的氨基酸序列,和其中所述重链包含SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列。

11. 如权利要求9所述的双特异性分子,其中所述轻链包含SEQ ID NO:40所示的氨基酸序列,和其中所述重链包含SEQ ID NO:41所示的氨基酸序列。

12. 如权利要求1所述的双特异性分子,其中所述第二多肽选自单链可变片段(scFv)、抗原结合片段(Fab)、F(ab')<sub>2</sub>片段及其生物活性片段。

13. 如权利要求1或权利要求12所述的双特异性分子,其中所述T细胞辅助受体多肽是

分化簇3(CD3)多肽。

14. 如权利要求13所述的双特异性分子,其中能与CD3多肽结合的所述第二抗原结合结构域包括:

轻链,所述轻链包括具有SEQ ID NO:17所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1、具有SEQ ID NO:18所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2和具有SEQ ID NO:19所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3;和

重链,所述重链包括具有SEQ ID NO:20所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1、具有SEQ ID NO:21所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2和具有SEQ ID NO:22所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。

15. 如权利要求14所述的双特异性分子,其中所述轻链包含SEQ ID NO:23所示的氨基酸序列,和其中所述重链包含SEQ ID NO:24所示的氨基酸序列。

16. 一种治疗患有T细胞癌症的哺乳动物的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物双特异性分子,所述双特异性分子包括:

第一多肽,其包含可结合T细胞受体β链可变(TRBV)多肽的第一抗原结合结构域;和  
第二多肽,其包含可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域。

17. 如权利要求16所述的方法,其中,所述哺乳动物是人。

18. 如权利要求16-17中任一项所述的方法,其中所述T细胞癌症是克隆T细胞癌症。

19. 如权利要求16-17中任一项所述的方法,其中所述T细胞癌症选自以下组:急性淋巴细胞白血病(ALL)、外周T细胞淋巴瘤(PTCL)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤(AITL)、T细胞幼淋巴细胞白血病(T-PLL)、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、肠病相关的T细胞淋巴瘤(EATL)、单型上皮样肠T细胞淋巴瘤(MEITL)、滤泡性T细胞淋巴瘤(FTCL)、淋巴结外周T细胞淋巴瘤(淋巴结PTCL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、T细胞大颗粒淋巴细胞白血病(T-LGL),结节外NK/T细胞淋巴瘤(NKTL)和肝脾T细胞淋巴瘤。

20. 如权利要求16-19中任一项所述的方法,其中所述哺乳动物体内的所述癌症细胞减少了至少95%。

21. 如权利要求16-19中任一项所述的方法,其中所述方法对提高所述哺乳动物的存活率是有效的。

22. 如权利要求21所述的方法,其中所述哺乳动物的存活率提高了至少37.5%。

23. 一种治疗患有乳糜泻的哺乳动物的方法,所述方法包括给予所述哺乳动物双特异性分子,所述双特异性分子包括:

第一多肽,其包含可结合T细胞受体β链可变(TRBV)多肽的第一抗原结合结构域;和  
第二多肽,其包含可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域。

24. 如权利要求23所述的方法,其中,所述哺乳动物是人。

25. 如权利要求23或24所述的方法,其中所述TRBV多肽选自TRBV4、TRBV6、TRBV7、TRBV9、TRBV20和TRBV29,并且其中所述T细胞辅助受体多肽是CD3多肽。

26. 如权利要求23或24所述的方法,其中所述TRBV多肽选自TRBV6-1、TRBV7-2、TRBV9-1、TRBV20-1和TRBV29-1,并且其中所述T细胞辅助受体多肽是CD3多肽。

## 治疗T细胞癌症的方法和材料

[0001] 相关申请的交叉参考

[0002] 本申请要求2020年12月1日提交的美国专利申请系列号63/119,753的权益。在先申请的公开内容被视为本申请公开内容的一部分(并通过引用纳入)。

[0003] 关于联邦资金的声明

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院授予的CA009071、AR048522、CA006973、CA062924、GM007309和CA230400拨款的政府支持下完成的。政府对这项发明有一定的权利。

[0005] 序列表

[0006] 本申请包含一个序列表,该序列表已以电子方式提交为ASCII文本文件44807-0384W0\_SL\_ST25.txt。ASCII文本文件创建于2021年11月30日,大小为335千字节。ASCII文本文件中的材料通过引用整体并入本文。

### 背景技术

#### 1. 技术领域

[0007] 本文献涉及用于治疗T细胞癌的方法和材料。例如,含有一种或多种双特异性分子的组合物可给予患有T细胞癌的哺乳动物以治疗该哺乳动物。例如,本申请提供了使用一种或多种双特异性分子治疗患有T细胞癌症的哺乳动物的方法和材料。

#### 2. 背景技术

[0009] T细胞癌是一种异质性恶性肿瘤,约占非霍奇金淋巴瘤的15%(Swerdlow等人,Blood 127:2375-2390(2016))和急性淋巴细胞白血病的20%(ALL;Han等人,Cancer Causes&Control 19:841-858(2008));和Dores等人,Blood 119:34-43(2012))。T细胞淋巴瘤和复发性T细胞ALL(T-ALL)的结果比同等的B细胞恶性肿瘤的结果更差,估计T细胞淋巴瘤的5年存活率仅为32%(Weisenburg等人,Blood 117:3402-3408(2011)),复发性T-ALL的5年存活率为7%(Fielding等人,Blood,109:944-950(2007))。

[0010] 恶性B或T细胞不表达不同于其非癌性对应物的细胞表面抗原。有几种针对B细胞恶性肿瘤的靶向免疫治疗剂靶向泛-B细胞抗原,如CD19或CD20,这是可行的,因为相关的正常B细胞再生障碍在临床上具有良好的耐受性。然而,针对泛T细胞抗原的类似策略是不可行的,因为由此产生的T细胞耗竭将导致临床上不可接受水平的免疫抑制。

### 发明内容

[0011] 本发明提供了治疗T细胞癌的方法和材料。在一些情况下,本文提供了可用于治疗T细胞癌的双特异性分子。例如,包括至少两个抗原结合结构域的双特异性分子,其中第一抗原结合结构域(例如,第一单链可变片段(scFv))可以结合T细胞受体β链可变(TRBV)多肽,而第二抗原结合结构域(例如第二scFv)可结合T细胞辅助受体多肽,可用于治疗患有T细胞癌症的哺乳动物(例如人类)。在一些情况下,本文提供了治疗T细胞癌的方法。例如,可将本文提供的一个或多个双特异性分子(例如,包含本文提供的一个或多个双特异性分子

的组合) 给予具有T细胞癌症的哺乳动物以治疗该哺乳动物。

[0012] 如本文所述, 可以通过靶向T细胞受体 (TCR) 抗原的特定亚组来治疗T细胞癌。例如, 靶向TRBV5-5和CD3的双特异性抗体可以刺激健康T细胞特异性裂解TRBV5-5<sup>+</sup>恶性T细胞。类似地, 靶向TRBV12和CD3的双特异性抗体可以刺激健康T细胞特异性裂解TRBV12<sup>+</sup>恶性T细胞。同样如本文所述, 靶向TRBV5-5和CD3的双特异性抗体以及靶向TRBV 12和CD3的双特异性抗体可以保存哺乳动物体内的大多数正常T细胞, 并且可以提高存活率。

[0013] VDJ重组结合等位基因排除, 导致30种T细胞受体 $\beta$ 链可变 (TRBV) 多肽中的一种在每个T细胞的表面上表达, 使得每种TRBV在1%至5%的总正常人外周血T细胞表面上表达。相反, 克隆性T细胞癌表达单一的TRBV多肽。具有如本文所述的治疗T细胞癌的能力 (例如, 通过给予一种或多种双特异性分子, 包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域) 提供了选择性耗竭克隆性T细胞癌同时保留大部分正常T细胞的独特和未曾实现的机会 (例如见图1A)。此外, 本文提供的双特异性分子 (例如包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子) 可用作T细胞癌的成本效益高的现成靶向治疗剂。

[0014] 总之, 本申请的一个方面以双特异性分子为特征, 其包括第一多肽, 所述第一多肽包含可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域, 和第二多肽, 其包含可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域。第一多肽可以是单链可变片段 (scFv)、抗原结合片段 (Fab)、F(ab')<sub>2</sub> 片段或其生物活性片段。TRBV多肽可以是TRBV2多肽、TRBV3-1多肽、TRBV4-1多肽、TRBV4-2多肽、TRBV4-3多肽、TRBV5-1多肽、TRBV5-4多肽、TRBV5-5多肽、TRBV5-6多肽、TRBV5-8多肽、TRBV6-1多肽、TRBV6-2多肽、TRBV6-3多肽、TRBV6-4多肽、TRBV6-5多肽、TRBV6-6多肽、TRBV6-8多肽、TRBV6-9多肽、TRBV7-2多肽、TRBV7-3多肽、TRBV7-4多肽、TRBV7-6多肽、TRBV7-7多肽、TRBV7-8多肽、TRBV7-9多肽、TRBV9多肽、TRBV10-1多肽、TRBV10-2多肽、TRBV10-3多肽、TRBV11-1多肽、TRBV11-2多肽、TRBV11-3多肽、TRBV12-2多肽、TRBV12-3多肽、TRBV12-4多肽、TRBV12-5多肽、TRBV13多肽、TRBV14多肽、TRBV15多肽、TRBV16多肽、TRBV18多肽、TRBV19多肽、TRBV20-1多肽、TRBV24-1多肽、TRBV25-1多肽、TRBV27TRBV28多肽、TRBV29-1多肽或TRBV30多肽。例如, TRBV多肽可以是TRBV5-5多肽。可与TRBV5-5多肽结合的第一抗原结合结构域可包括轻链, 所述轻链包括具有SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1、具有SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2和具有SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3; 并且可包括重链, 所述重链包括具有SEQ ID NO:4中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1、具有SEQ ID NO:5中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2和具有SEQ ID NO:6中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。在一些情况下, 轻链可以包括SEQ ID NO:7中所示的氨基酸序列, 重链可以包括SEQ ID NO:8中所示的氨基酸序列。在一些情况下, 轻链可以包括SEQ ID NO:38中所示的氨基酸序列, 重链可以包括SEQ ID NO:39中所示的氨基酸序列。例如, TRBV多肽可以是TRBV12多肽。可与TRBV12多肽结合的第一抗原结合结构域可包括轻链, 所述轻链包括具有SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1、具有SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2和具有SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3; 并且可包括重链, 所述重链包括具有SEQ ID NO:12中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1、具有SEQ ID NO:13中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2和具有SEQ ID NO:14中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。在一些情况下, 轻链可以包括SEQ ID NO:15中所示的氨基酸序列, 重链可以包括SEQ ID NO:16中所示的氨基酸序列。在一些情况下,

轻链可以包括SEQ ID NO:40中所示的氨基酸序列,重链可以包括SEQ ID NO:41中所示的氨基酸序列。第二多肽可以是scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>片段或其生物活性片段。T细胞辅助受体多肽可以是分化簇3(CD3)多肽或T细胞受体多肽。可与CD3多肽结合的第二抗原结合结构域可包括轻链,所述轻链包括具有SEQ ID NO:17所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1、具有SEQ ID NO:18所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2和具有SEQ ID NO:19所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3;并且可包括重链,所述重链包括具有SEQ ID NO:20中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1、具有SEQ ID NO:21中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2和具有SEQ ID NO:22中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。在一些情况下,轻链可以包括SEQ ID NO:23中所示的氨基酸序列,重链可以包括SEQ ID NO:24中所示的氨基酸序列。

[0015] 在另一个方面,本发明的特征是患T细胞癌的哺乳动物的治疗方法。所述方法可包括或基本上由以下组成:给予患有T细胞癌症的哺乳动物双特异性分子,所述双特异性分子包括第一多肽,其具有可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域,和第二多肽,其具有可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域。哺乳动物可以是人。T细胞癌症可以是克隆性T细胞癌症。T细胞癌症可以是急性淋巴细胞白血病(ALL)、外周T细胞淋巴瘤(PTCL)、血管免疫母细胞性T细胞淋巴瘤(AITL)、T细胞幼淋巴细胞白血病(T-PLL)、成人T细胞白血病/淋巴瘤(ATLL)、肠病相关的T细胞淋巴瘤(EATL)、单型上皮样肠T细胞淋巴瘤(MEITL)、滤泡性T细胞淋巴瘤(FTCL)、淋巴结外周T细胞淋巴瘤(淋巴结PTCL)、皮肤T细胞淋巴瘤(CTCL)、间变性大细胞淋巴瘤(ALCL)、T细胞大颗粒淋巴细胞白血病(T-LGL)、结节外NK/T细胞淋巴瘤(NKTL)或肝脾T细胞淋巴瘤。所述哺乳动物体内的所述癌症细胞减少了至少95%。该方法可以有效地提高哺乳动物的存活率(例如,可以有效地将哺乳动物的存活提高至少37.5%)。

[0016] 在另一个方面,本发明的特征是治疗患乳糜泻的哺乳动物的方法。所述方法可包括或基本上由以下组成:给予患有乳糜泻的哺乳动物双特异性分子,所述双特异性分子包括第一多肽,其具有可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域,和第二多肽,其具有可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域。哺乳动物可以是人。TRBV多肽可以是TRBV4多肽、TRBV6多肽、TRBV 7多肽、TRBV 9多肽、TRBV 20或TRBV29多肽,并且T细胞辅助受体多肽可以是CD3多肽。TRBV多肽可以是TRBV6-1多肽、TRBV7-2多肽、TRBV 9-1多肽、TRBV20-1多肽或TRBV29-1多肽,并且T细胞辅助受体多肽可以是CD3多肽。

[0017] 除非另外定义,本发明使用的所有技术和科学术语的意义与本发明所属领域普通技术人员通常所理解的相同。虽然在本发明的实施可以采用类似于或等同于本发明所述的那些方法和材料,但下文描述了合适的方法和材料。本发明中述及的所有出版物、专利申请、专利和其它参考文献都通过引用全文纳入本发明。若有抵触,以本包括定义在内的本申请说明书为准。此外,材料、方法和实施例都仅是说明性的,并不意在构成限制。

[0018] 附图和以下说明进一步详细说明了本发明的一种或多种实施方式。从说明书、附图以及权利要求中可以明显看出本发明的其他特征、目的和优点。

## 附图说明

[0019] 图1A-1E:TRBV特异性BsAb耗尽表达TRBV的同源T细胞,同时保留大多数非靶向T细胞。图1A:说明所提出的选择性TRBV消耗策略:人T细胞包括30个TRBV家族;TRBV1:橙色,TRBV5:红色,TRBV12:青色,TRBV20:绿色和TRBV30:紫色细胞。 $\alpha$ -V12结合表达TRBV12的T细

胞,导致选择性杀死TRBV12群,同时保留大多数剩余的非-TRBV12T细胞。图1B: $\alpha$ -V5、 $\alpha$ -V12和 $\alpha$ -C1BsAb分别由 $\alpha$ -CD3scFv(橙色)与 $\alpha$ -TRBV5-5(红色)、 $\alpha$ -TRBV12(青色)和 $\alpha$ -TRBC1(灰色)scFv连接而成。每个scFv由可变重链( $V_H$ )和可变轻链( $V_L$ )构成。图1C-1E:将 $1 \times 10^6$ 个正常人T细胞与 $\alpha$ -C1、 $\alpha$ -V5或 $\alpha$ -V12BsAb(0.5ng/ml)孵育17小时,然后对存活T细胞计数,并用流式细胞术评估存活T细胞中TRBC和TRBV的分布。数据显示为来自5个不同正常个体的平均活细胞计数。另见图8。

[0020] 图2A-2I:TRBC1、TRBV5-5或TRBV12的结合活化T细胞。图2A:描述 $\alpha$ -C1、 $\alpha$ -V5和 $\alpha$ -V12BsAb双向杀伤T细胞的图。 $\alpha$ -C1、 $\alpha$ -V5和 $\alpha$ -V12的常规作用机制;涉及将T细胞#1上的T细胞活化CD3分子(使用 $\alpha$ -CD3scFv)与T细胞#2(例如癌细胞)上的TRBC1(使用 $\alpha$ -C1)、TRBV5-5(使用 $\alpha$ -V5)或TRBV12(使用 $\alpha$ -V12)交联,导致T细胞#1介导对细胞#2的杀伤(“1”)。当靶细胞(细胞#2)也是一种T细胞,并且可以通过与 $\alpha$ -C1、 $\alpha$ -V5或 $\alpha$ -V12交联而活化时,它将能够发挥“效应”T细胞的作用并杀死T细胞#1(“2”)。图2B: $\alpha$ -CD3-CD19、 $\alpha$ -C1-CD19、 $\alpha$ -V5-CD19和 $\alpha$ -V12-CD19BsAb的草图,由抗-CD19scFv(黑色)与抗-CD3(橙色)、抗-C1(灰色)、抗TRBV5(红色)和抗TRBC1(灰色)scFv连接而成。图2C:图显示 $\alpha$ -V12-CD19BsAb将T细胞上的TRBV12与NALM6B细胞上的CD19交联,导致T细胞介导的NALM6B细胞杀伤。图2D和图2E:将 $5 \times 10^4$ 正常人T细胞与 $5 \times 10^4$ 野生型(WT)或CD19敲除(CD19-KO)NALM6B细胞(表达荧光素酶)和所示BsAb(0.5ng/ml)孵育17小时。IFN $\gamma$  ELISA用于评估正常人T细胞活化(图2D),发光用于评估活的NALM6B细胞(图2E)。在(图2D)和(图2E)中,柱状图表示使用三种不同的正常人T细胞的平均值 $\pm$ 标准误差。\*\*\* $P \leq 0.001$ ,\*\*\* $P \leq 0.0001$ ,采用Dunnett多重比较检验的单因素方差分析。图2F-图2I:将 $5 \times 10^4$ 靶NALM6B细胞(表达荧光素酶)与 $5 \times 10^4$ 正常人T细胞、TRBV5和TRBV12耗竭的T细胞(图2F)和(图2H)、或TRBV5(“TRBV5+”)富集的T细胞或TRBV12(“TRBV12+”)富集的T细胞(图2G)和(表2I)以及指示的BsAb(0.5ng/ml)一起孵育17小时。IFN $\gamma$ 检测用于评估正常人T细胞活化(图2F)和(图2G)。发光用于评估活的NALM6B细胞(图2H)和(图2I)。在图2F和图2H中,柱状图表示使用三种不同的正常人T细胞的平均值 $\pm$ 标准误差。\* $P \leq 0.05$ ,\*\* $P \leq 0.01$ 。\*\*\* $P \leq 0.001$ .ns,不显著,通过双尾配对t检验。在图2G和图2I中,柱状图代表三种不同人T细胞的平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。\*\*\*\* $P \leq 0.0001$ ,采用单因素方差分析和Sidak多重比较检验。

[0021] 图3A-3D:TRBV特异性BsAb在体外诱导T细胞因子对癌细胞的反应。图3A:在 $\alpha$ -C1或 $\alpha$ -V5或 $\alpha$ -V12(0.5ng/ml)存在下,将 $3.5 \times 10^4$ 正常人T细胞与 $3.5 \times 10^4$ 所示靶T细胞癌细胞品系孵育17小时。发光用于评估活Jurkat(图3A)和HPB-ALL(图3B)细胞。柱表示使用三种不同的正常人T细胞的平均值 $\pm$ 平均值标准误差。\*\*\*\* $P \leq 0.0001$ ,采用单因素方差分析和Sidak多重比较检验。图3B:将 $5 \times 10^4$ 正常人T细胞或TRBV5-或TRBV12耗竭的正常T细胞与 $5 \times 10^4$ Jurkat细胞或HPB-ALL细胞在所示BsAb(0.5ng/ml)存在下孵育17小时。然后通过IFN $\gamma$  ELISA评估T细胞活化。柱状图代表三种不同人类T细胞的平均值 $\pm$ 平均值标准误差。y:是;n:否;\*\* $P \leq 0.01$ 。\*\*\* $P \leq 0.001$ .ns,不显著,采用单因素方差分析和Sidak多重比较检验。(图3C)和(图3D)将 $5 \times 10^4$ 人T细胞与 $5 \times 10^4$ HPB-ALL细胞(图3C)或Jurkat T细胞(图3D)在指定浓度的 $\alpha$ -V5(图3C)或 $\alpha$ -V12(图3D)存在下孵育17小时。然后用Luminex试验测定T细胞因子的释放。每个分析物的 $EC_{50}$ (M)显示在相应的图表中。数据显示为三种不同人类T细胞的平均值 $\pm$ 平均值标准误差。

[0022] 图4A-4F: TRBV特异性BsAb在体外杀死T细胞癌症细胞。图4A和图4B: 将 $5 \times 10^4$ 人T细胞与 $5 \times 10^4$  Jurkat细胞(图4A)或HPB-ALL细胞(图4B)在指定浓度的 $\alpha$ -V12(图4A)、 $\alpha$ -V5(图4B)存在下孵育17小时。Jurkat和HPB-ALL细胞表达荧光素酶。发光用于评估活的Jurkat和HPB-ALL细胞。每个BsAb的 $EC_{50}$ (M)显示在相应的图表中。数据显示为三种不同正常人类T细胞的平均值 $\pm$ 平均值标准误差。图4C: 将 $5 \times 10^4$ 正常人T细胞与 $5 \times 10^4$ 野生型(WT)或TCR基因破坏(TCR-KO)的Jurkat细胞在所示BsAb(0.5ng/ml)存在下孵育17小时。图4D: 用WT或用TCR-KO HPB-ALL细胞进行相同的实验。所有Jurkat和HPB-ALL细胞均表达GFP。然后使用流式细胞术来评估CD3和GFP的表达。在图4C和图4D中,密度图旁边的数字表示存活细胞的百分比。图4E和图4F显示了使用来自3个不同人类供体的T细胞在每种治疗条件下肿瘤细胞百分数的汇总数据。柱表示平均值 $\pm$ 平均值标准误差。\*\*\*\* $P \leq 0.0001$ , ns, 不显著,通过方差分析和Sidak多重比较检验。另见图12。

[0023] 图5A-5F: TRBV特异性BsAb在体外杀死来自患者的T-ALL细胞。图5A: 流式细胞术分析两个具有表达TRBV12的循环淋巴母细胞的T-ALL患者样本。与图相邻的数字表示表达TRBV12的CD3+细胞的百分比。图5B和5C: 将 $5 \times 10^4$ 正常人T细胞与 $5 \times 10^4$ 患者来源的T-ALL靶细胞在所示BsAb(0.5ng/ml)存在下共培养17小时。通过测量上清液中的IFN $\gamma$ (患者1和患者2)(图5B),或通过流式细胞术分析指示的T细胞活化和耗竭标志物(对于患者1)来评估T细胞活化(图5C)。柱表示三次技术重复的平均值 $\pm$ 平均值标准误差。\*\*\*\* $P \leq 0.001$ ,采用单因素方差分析和Dunnnett多重比较检验。图5D: HLA-A3染色的正常人T细胞和患者来源的T-ALL恶性细胞的直方图。图5E和5F: 将 $5 \times 10^4$ 正常人T细胞与 $5 \times 10^4$ 患者来源的T-ALL靶细胞在 $\alpha$ -CD19或 $\alpha$ -V12BsAb(0.5ng/ml)存在下共培养17小时。然后进行HLA-A3和CD3的流式细胞术分析。图旁的数字表示代表性实验中通过流式细胞术计数的细胞数量(图5E),3次技术重复的数据如所示(图5F)。\*\*\*\* $P \leq 0.0001$ ,采用单因素方差分析和Turkey多重比较检验。

[0024] 图6A-6H: TRBV特异性BsAb可在体内特异性杀伤癌症细胞。图6A-6C: NSG小鼠静脉注射 $5 \times 10^6$ 正常人T细胞和 $5 \times 10^6$ WT或TCR-KO Jurkat细胞。用WT或用TCR-KO HPB-ALL细胞进行相同的实验。所有Jurkat和HPB-ALL细胞均表达荧光素酶和GFP。细胞注射后4天,在动物体内放置含有100 $\mu$ g $\alpha$ -CD19、 $\alpha$ -V12或 $\alpha$ -V5BsAb的腹膜泵,并在指定的日子进行BLI。代表两个独立实验之一的BLI数据(图6B)和(图6C)。图6D: 在指定的日子测量来自两个独立实验的合并辐射值,每组共有11只NSG小鼠。\*\*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.0001$ ,采用单因素方差分析和Sidak多重比较检验。图6E和6F: 在第19天收集的小鼠血液上进行流式细胞术用于检测指定处理后的循环WT Jurkat或HPB-ALL细胞(CD3+, GFP+, 右上象限)或循环TCR-KO Jurkat细胞或HPB-ALL细胞(CD3-, GFP+, 右下象限)或循环正常人T细胞(CD3+, GFP-, 左上象限)。对于每种癌症细胞类型,对六只不同NSG小鼠的循环癌细胞和T细胞计数进行评估。数据显示为均值 $\pm$ 均值标准误差, \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.0001$ ,采用单因素方差分析和Tukey多重比较检验。图6G和6H: WT或携带TCR-KO Jurkat(图6G)或HPB-ALL(图6H)的NSG小鼠在各种治疗后的Kaplan-Meier生存曲线。中位总生存期(OS) Jurkat WT/ $\alpha$ -CD19=36天, Jurkat WT/ $\alpha$ -V12=73天, Jurkat TCR-KO/ $\alpha$ -V12=46天。Jurkat WT/ $\alpha$ -CD19与Jurkat WT/ $\alpha$ -V12的危害比(HR)=0.18, \*\*\* $P < 0.0001$ ,对数秩(Mantel-Cox)检验。中位OS HPB-ALL WT/ $\alpha$ -CD19=40天, HPB-ALL WT/ $\alpha$ -V5=64天, HPB-ALL TCR-KO/ $\alpha$ -V5=33天。HPB-ALL WT/ $\alpha$ -CD19相对于HPB-ALL WT/ $\alpha$ -V5, HR=0.19, \*\*\*\* $P = 0.0001$ ,对数秩(Mantel-Cox)检验。生存数据汇集自2个独立实

验。

[0025] 图7A-7E:  $\alpha$ -V12和 $\alpha$ -V5BsAb特征。图7A: 纯化的 $\alpha$ -V12和 $\alpha$ -V5BsAb的考马斯蓝染色和蛋白质印迹(使用兔抗6xHis和HRP偶联的抗兔抗体)。图7B和7C: 纯化的 $\alpha$ -V12(图7B)或 $\alpha$ -V5(图7C)BsAb的分析色谱图, 显示为黑色。牛血清白蛋白(BSA)色谱图(对照)显示为红色。每个分析物的保留时间标记在峰值之上。图7D和图7E:  $\alpha$ -V12(图7D)或 $\alpha$ -V5(图7E)BsAb的差示扫描荧光分析显示相对荧光单位(“RFU”)对温度(“Temp”)的负导数。解链温度对应于曲线的一阶导数的峰值/最大值, 并在相应的图中表示。

[0026] 图8A-8H: TRBV和TRBC特异性BsAb在体外处理正常人T细胞。图8A和图8B: 将 $1 \times 10^6$ 个正常人T细胞与0.5ng/ml  $\alpha$ -V5或 $\alpha$ -V12BsAb(图8A)或 $\alpha$ -C1(图8B)孵育17小时, 然后计数存活T细胞数量, 并用流式细胞术评估存活T细胞中的TRBC和TRBV分布。该图显示了使用来自5个不同正常个体的T细胞的细胞计数(图8A)和(图8B)。图8C: 用CellTrace紫对TRBV5+流式分选的T细胞进行染色, 并以1:10的比例与TRBV5耗竭的正常人T细胞混合。然后将T细胞与 $\alpha$ -V5BsAb孵育17小时, 然后进行流式细胞分析。类似试验使用CellTrace紫染色的TRBV12+流式分选T细胞, 与TRBV12耗竭的正常人T细胞(1:10比例)混合, 然后与 $\alpha$ -V12BsAb孵育。使用3种不同的正常人T细胞供体重复实验。图8D和图8E: 用CellTrace紫对TRBC1流式分选的T细胞进行染色, 并以2:3的比例与TRBC1耗竭的正常人T细胞混合。然后将T细胞与 $\alpha$ -C1-BsAb孵育17小时, 然后进行流式细胞术分析(图8D)和活细胞计数(图8E)。图8F-图8H:  $1 \times 10^6$ 个正常人T细胞(“正常”)或T细胞耗竭(“耗竭”)的表达TRBC1的T细胞(图8F)或表达TRBV5和表达TRBV12的T细胞(图7G)或TRBV5富集(TRBV5+)和TRBV12富集(TRBV12+)T细胞(图8H)在没有(“否”)或含有 $\alpha$ -C1(图8D)、 $\alpha$ -V5或 $\alpha$ -V12BsAb(图8E)(0.5ng/ml)的情况下孵育17小时, 然后评估活细胞。图8F、图8G和图8H中的柱表示使用三种不同的正常人T细胞的平均值 $\pm$ 平均值标准误差。双尾配对t检验, \* $P \leq 0.05$ , \*\* $P \leq 0.01$ , \*\*\* $P \leq 0.001$ . ns, 不显著。

[0027] 图9A-9E: TRBC1、TRBV5-5或TRBV12的结合活化针对NALM6B细胞的T细胞。图9A:  $2 \times 10^5$ 野生型(WT)、CD19低或CD19敲除(CD19-KO)NALM6B细胞用人抗CD19抗体染色, 然后进行流式细胞分析。还显示了用同种型对照抗体作为对照染色的WT NALM6B细胞。图9B: 将 $5 \times 10^4$ 正常人T细胞与 $5 \times 10^4$ WT或CD19-KO NALM6B细胞与所示BsAb(0.5ng/ml)孵育17小时。用IL-2, TNF $\alpha$ 和IL-10ELISA评估正常人T细胞活化情况。柱表示使用三种不同的正常人T细胞的平均值 $\pm$ 平均值标准误差。\* $P \leq 0.05$ , \*\*\* $P \leq 0.0001$ , 采用Dunnnett多重比较检验的单因素方差分析。图9C: 将 $5 \times 10^4$ 正常人T细胞在存在或不存在 $5 \times 10^4$ WT NALM6B细胞的情况下与指定BsAb(0.5ng/ml)孵育17小时, 然后用流式细胞术分析指定的T细胞活化和耗竭标志物。柱表示使用三种不同的正常人T细胞的平均值 $\pm$ 平均值标准误差。单个柱状图下方的直方图显示了来自一个人T细胞供体的数据。\* $P \leq 0.05$ , \*\*\* $P \leq 0.0001$ , 采用Dunnnett多重比较检验的单因素方差分析。图9D和9E: 将 $5 \times 10^4$ 正常人T细胞在 $5 \times 10^4$ WT或CD19低NALM6B细胞(表达荧光素酶)存在下与所示BsAb(0.5ng/ml)孵育17小时。IFN $\gamma$  ELISA用于评估正常人T细胞活化(图9D), 发光用于评估活的NALM6B细胞(图9E)。在图9D和图9E中, 柱状图表示使用三种不同人类T细胞的平均值 $\pm$ 平均值标准误差。ns, 不显著, 通过双尾非配对t检验。

[0028] 图10A-10D:  $\alpha$ -C1-BsAb同时杀死表达TRBC1+和TRBC2+的T细胞。图10A:  $\alpha$ -C1杀伤TRBC2+HPB-ALL细胞的机制说明。 $\alpha$ -C1使TRBC1+T细胞(“T”) (使用 $\alpha$ -TRBC1scFv)与HPB-ALL细胞(“H”) (使用 $\alpha$ -CD3scFv)交联, 导致HPB-ALL的细胞死亡。图10B: 用TRBC1抗体对正常人T

细胞(“未耗竭”)或TRBC1耗竭的T细胞进行染色,并通过流式细胞术进行评估。显示了代表3个独立实验的直方图。图10C和10D:将 $5 \times 10^4$ 正常人未耗竭T细胞或TRBC1耗竭(“TRBC1耗竭”)T细胞与 $5 \times 10^4$ Jurkat细胞(TRBC1+)或HPB-ALL细胞(TRBC2+)和或不和 $\alpha$ -C1-BsAb(0.5ng/ml)孵育17小时。通过测量上清液中的IFN $\gamma$ 来评估T细胞的活化(图10C),并通过流式细胞术评估癌细胞的杀伤(图10D)。Jurkat(“J”)和HPB-ALL(“H”)细胞是GFP+和CD3+,正常人T细胞(“T”)是GFP-和CD3+。图中的数字表示存活细胞的百分比。流程图旁边的插图展示了 $\alpha$ -C1-BsAb介导的靶Jurkat和HPB-ALL细胞杀伤的机制。未耗竭的T细胞可以通过两种机制杀死Jurkat细胞(如“1”和“2”所示)。未耗竭的T细胞只能通过一种机制杀死HPB-ALL(如“2”所示)。TRBC1耗竭的T细胞(仅由TRBC2T细胞组成)可以使用机制“1”继续杀死Jurkat细胞,而TRBC1耗竭的T细胞(或TRBC2T细胞)不能杀死HPB-ALL细胞(图10D)。在图10C中,柱状图代表三次技术重复的平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。\*\*\* $P \leq 0.001$ .ns,不显著,采用单因素方差分析和Tukey多重比较检验。

[0029] 图11A-11B:T细胞癌症细胞系中细胞表面CD3和TRBV的表达。图11A和图11B:用同种型对照抗体或人抗CD3(图11A)或抗TRBV5-5和抗TRBV12特异性抗体(图11B)对 $2 \times 10^5$ 人T细胞癌衍生的细胞系进行染色,然后进行流式细胞分析。数据代表了2个独立试验。

[0030] 图12A-12F:TRBV特异性BsAb在体外活化健康T细胞,以杀死T细胞癌症细胞。将来自另外2个正常人个体(供体2和供体3)的 $5 \times 10^4$ 正常人T细胞与 $5 \times 10^4$ WT或TCR-KO Jurkat细胞在所示BsAb(0.5ng/ml)存在下孵育17小时。用WT或用TCR-KO HPB-ALL细胞进行相同的实验。图12A:所有Jurkat和HPB-ALL细胞均表达GFP。然后使用流式细胞术来评估CD3和GFP的表达。密度图旁边的数字表示存活细胞的百分比。图12B和图12C:将 $5 \times 10^4$ 正常人T细胞与 $5 \times 10^4$ WT Jurkat(图12B)或WT HPB-ALL细胞(图12C)与指定的BsAb(0.5ng/ml)孵育17小时,然后对指定的T细胞活化和耗竭标志物进行流式细胞术分析。柱表示使用三种不同的正常人T细胞的平均值 $\pm$ 平均值标准误差。\*\*\*\* $P \leq 0.0001$ ,采用单因素方差分析和Dunnett多重比较检验。图12D:用抗人CD4或CD8抗体对正常人T细胞或CD4耗竭的T细胞进行染色,并通过流式细胞术进行评估。图12E:将 $5 \times 10^4$ 正常人T细胞或CD4耗竭的T细胞与 $5 \times 10^4$ Jurkat细胞或HPB-ALL细胞(表达荧光素酶)在 $\alpha$ -CD19、 $\alpha$ -V12BsAb或 $\alpha$ -V5(0.5ng/ml)存在下孵育17小时。发光用于评估活的Jurkat或HPB-ALL细胞。柱表示使用来自三个不同正常人个体的T细胞的平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。\*\*\* $P \leq 0.0001$ ,通过双尾未配对t检验。图12F: $\alpha$ -V12或 $\alpha$ -V5BsAb与人血清一起孵育直到指定的时间点。通过将 $5 \times 10^4$ 正常人T细胞与 $5 \times 10^4$ Jurkat细胞或HPB-ALL细胞共培养来评估BsAb活性。图表显示了与来自三个不同正常人个体的T细胞孵育后存活的Jurkat或HPB-ALL细胞的百分比。

[0031] 图13A-13B:TCR $\beta$ 测序以评估 $\alpha$ -V12和 $\alpha$ -V5以及靶向特异性。图13A和图13B:将 $1 \times 10^5$ 个正常人T细胞和 $1 \times 10^5$ 个Jurkat细胞(图13A)或 $1 \times 10^5$ 个HPB-ALL细胞(图13B)与 $\alpha$ -CD19(绿色圆圈)或 $\alpha$ -V12(蓝色正方形)(图13A)或 $\alpha$ -V5(橙色正方形)(见图13B)BsAb(0.5ng/ml)孵育17小时。从细胞中纯化RNA,并使用TCR $\beta$ 测序来鉴定TRBV家族。数字代表三次技术重复的TRBV分布百分比的平均值 $\pm$ 平均值的标准误差。黑色箭头指向来自Jurkat细胞的TRBV12-3信号和来自HPB-ALL细胞的TRBV 5-5信号。箭头旁边的数字表示TRBV百分比。数据代表了2个独立试验。

[0032] 图14A-14C:TRBV5家族序列比对和结构分析。图14A和图14B:TRBV5家族谱系图(图

14A)和TRBV5家庭序列比对(图14B)。粗体的氨基酸残基在所有TRBV5家族成员中共有。位置20、81和101以绿色突出显示,并显示TRBV5-5和5-6共有的残基,但在其他TRBV5成员中不同。图14C:TRBV5-1结构(青色),插图显示氨基酸位置81(TRBV5-5/5-6中的D对5-1中的G或5-4/5-8中的P)和101(TRBV5-5/5-6中L对TRBV5-1/5-4/5-8中E)为小棒。TRBV5-5/5-6显示为黄色;TRBV5-1/5-4/5-8显示为深蓝色。

[0033] 图15A-15I:TRBV特异性BsAb在体内以低E:T比率活化人T细胞以特异性杀死T细胞癌。图15A:在第0天,将含有100 $\mu$ g $\alpha$ -V12或 $\alpha$ -V5BsAb的腹膜泵放置在3只NSG小鼠中,然后每天采集小鼠血液并检测指定BsAb。图15B和15C:NSG小鼠静脉注射0.5 $\times 10^6$ 正常人T细胞和2.5 $\times 10^6$ WT Jurkat细胞或WT HPB-ALL细胞。所有Jurkat和HPB-ALL细胞均表达荧光素酶和GFP。细胞注射后4天,在动物体内放置含有100 $\mu$ g $\alpha$ -CD19、 $\alpha$ -V12或 $\alpha$ -V5BsAb的腹膜泵。在指定日期进行小鼠血液采集和BLI。图15D和图15E:在指定日期测量各组的辐射值。 $*P \leq 0.05$ , $**P \leq 0.01$ ,通过未配对双尾t检验。图15F和15G:在第3日和第6日对收集的小鼠血清进行IFN $\gamma$ 和TNF $\alpha$ ELISA检测。图15H和图15I:对第3天和第6天采集的小鼠血液进行流式细胞分析,以检测循环正常人T细胞上的活化或耗竭标志物。数据显示为平均值 $\pm$ 平均值标准误差, $***P \leq 0.001$ ,通过单因素方差分析和Sidak多重比较检验。

### 具体实施方式

[0034] 本发明提供了治疗T细胞癌的方法和材料。在一些情况下,本文提供了可用于治疗T细胞癌的双特异性分子。例如,本文提供了包含至少两个抗原结合结构域的双特异性分子,其中第一抗原结合结构域(例如,第一scFv)可结合TRBV多肽,而第二抗原结合结构域可结合T细胞辅助受体多肽(例如第二scFv),可用于治疗患有T细胞癌症的哺乳动物(例如,人类)。本申请还提供了治疗T细胞癌的方法。例如,可将本文提供的一个或多个双特异性分子(例如,包含一个或更多双特异性分子的组合物)给予具有T细胞癌症的哺乳动物以治疗该哺乳动物。在一些情况下,本文提供的双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)可活化哺乳动物内的T细胞靶向(例如,靶向并破坏)表达可被双特异性分子靶向的TRBV多肽的T细胞。例如,表达可被本文提供的双特异性分子靶向的T细胞辅助受体多肽的T细胞可被活化以靶向(例如,靶向并破坏)表达可被双特异性分子靶向的TRBV多肽的T细胞(例如,癌性T细胞)。

[0035] 任何适当的哺乳动物(例如,具有T细胞癌症的哺乳动物)均可按本文所述进行治疗。例如,人类、非人灵长类动物(例如猴)、马、牛物种、猪物种、狗、猫、小鼠和大鼠可以如本文所述进行治疗。在一些情况下,可向患有T细胞癌症的人给予本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,双特异性分子包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域)。

[0036] 本文所述的材料和方法可用于治疗患有任何类型T细胞癌症的哺乳动物(例如人类)。在一些情况下,如本文所述治疗的T细胞癌症可以包括一个或多个实体肿瘤。在一些情况下,如本文所述治疗的T细胞癌症可能是血液癌症。在一些情况下,如本文所述治疗的T细胞癌症可能是原发性癌症。在一些情况下,如本文所述治疗的T细胞癌症可能是转移性癌症。在一些情况下,如本文所述治疗的T细胞癌症可能是难治癌症。在一些情况下,如本文所述

治疗的T细胞癌症可能是非霍奇金淋巴瘤。在一些情况下,如本文所述治疗的T细胞癌症可能是霍奇金淋巴瘤。可以如本文所述治疗的T细胞癌的实例包括但不限于ALL、PTCL、AITL、T-PLL、ATLL、EATL、MEITL、FTCL、结节性PTCL、CTCL、ALCL、T-LGL、NKTL和肝脾T细胞淋巴瘤。

[0037] 在一些情况下,本文提供的材料和方法可用于减少或消除患有T细胞癌症的哺乳动物(例如,人类)体内存在的癌细胞数量。例如,可以给予有需要的哺乳动物(例如,具有T细胞癌症的哺乳动物)本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,双特异性的分子包括可以结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可以结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域),以减少或消除哺乳动物中存在的癌症细胞数量。例如,本文所述的材料和方法可用于将患有癌症的哺乳动物体内存在的癌症细胞数量减少例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。例如,本文所述的材料和方法可用于将患有癌症的哺乳动物体内存在的一个或多个肿瘤的大小(例如体积)减少例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。在一些情况下,可以监测正在接受治疗的哺乳动物体内存在的癌细胞数量。任何合适的方法都可以用来确定哺乳动物体内存在的癌症细胞数量是否减少。例如,成像技术可以用于评估哺乳动物体内存在的癌症细胞数量。

[0038] 在一些情况下,本文提供的材料和方法可用于提高患有T细胞癌症的哺乳动物(例如,人类)的生存率。例如,可以给予有需要的哺乳动物(例如,具有T细胞癌症的哺乳动物)本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,双特异性的分子包括可以结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可以结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域),以改善哺乳动物生存。例如,本文所述的材料和方法可用于将患有癌症的哺乳动物的生存改善例如10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多。例如,本文所述的材料和方法可用于将患有癌症的哺乳动物的存活率提高例如,至少6个月(例如,大约6个月、大约8个月、约10个月、大约1年、大约1.5年、大约2年、大约2.5年、大约3年、大约4年、大约5年或更长)。

[0039] 在一些情况下,当给予有需要的哺乳动物(例如,患有T细胞癌症的哺乳动物)本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,双特异性的分子包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域)时,哺乳动物体内的大多数正常T细胞可以被保留。例如,本文所述的材料和方法可用于治疗具有本文所述T细胞癌症的哺乳动物,同时在哺乳动物体内保存例如50%、60%、70%、80%、90%、95%或更多的正常(例如非癌)T细胞。在一些情况下,当给予哺乳动物本文提供的一种或多种双特异性分子时,哺乳动物内约75%至约100%(例如,从约75%到约99%,从约75%到约95%,从约75%-约93%,从约75%-约90%,从约75%-约85%,从约80%-约100%,从约85%-约100%,从约90%-约100%,或从约95%-约100%)的正常T细胞可被保留。

[0040] 在一些情况下,本文所述的方法还可以包括鉴定患有T细胞癌症的哺乳动物。鉴定哺乳动物患有T细胞癌症的方法包括但不限于体检、实验室测试(例如血液和/或尿液)、活检、成像测试(例如X射线、PET/CT、MRI和/或超声)、核医学扫描(例如骨扫描)、内窥镜检查 and/或基因测试。一旦确定为患有T细胞癌症,可以给予哺乳动物或指示其自我给予本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,双特异性的分子包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域)。

[0041] 任何合适的双特异性分子都可以如本文所述给予哺乳动物(例如人)。在一些情况

下,双特异性分子可以包括至少两个(例如,两个、三个或四个)抗原结合结构域,其中第一抗原结合结构域(例如第一scFv)可以结合TRBV多肽,而第二抗原结合结构域(例如,第二scFv)可以结合T细胞辅助受体多肽。在一些情况下,本文提供的双特异性分子可包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域。

[0042] 本文提供的双特异性分子中的第一抗原结合结构域(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)可以是任何合适类型的抗原结合结构域。在一些情况下,可用于本文提供的双特异性分子的第一抗原结合结构域可包括免疫球蛋白轻链(V<sub>L</sub>)的可变区和免疫球蛋白重链(V<sub>H</sub>)的可变区。例如,可用于本文提供的双特异性分子中的第一抗原结合结构域可包括来自免疫球蛋白轻链的第一互补决定区(CDR)(V<sub>L</sub> CDR1)、来自免疫球蛋白轻链的第二CDR(V<sub>L</sub> CDR 2)和来自免疫球蛋白轻链的第三CDR(V<sub>L</sub> CDR3),来自免疫球蛋白重链的第一CDR(V<sub>H</sub> CDR1),来自免疫球蛋白重链的第二CDR(V<sub>H</sub> CDR2)和来自免疫球蛋白重链的第三CDR(V<sub>H</sub> CDR3)。可用作本文提供的双特异性分子中第一抗原结合结构域的抗原结合结构域的实例包括但不限于单链可变片段(scFv)、抗原结合片段(Fab)、F(ab')<sub>2</sub>片段、及其生物活性片段(例如保留结合靶分子如TRBV多肽能力的片段)。在一些情况下,可以用作本文提供的双特异性分子中的第一抗原结合结构域的抗原结合结构域可以是scFv。

[0043] 本文提供的双特异性分子中的第一抗原结合结构域(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)可结合任何合适的TRBV。可被本文提供的双特异性分子中的第一抗原结合结构域靶向的TRBV的例子包括但不限于TRBV2多肽、TRBV3-1多肽、TRBV4-1多肽、TRBV4-2多肽、TRBV4-3多肽、TRBV5-1多肽、TRBV5-4多肽、TRBV5-5多肽、TRBV5-6多肽、TRBV5-8多肽、TRBV6-1多肽、TRBV6-2多肽、TRBV6-3多肽、TRBV6-4多肽、TRBV6-5多肽、TRBV6-6多肽、TRBV6-8多肽、TRBV6-9多肽、TRBV7-2多肽、TRBV7-3多肽、TRBV7-4多肽、TRBV7-6多肽、TRBV7-7多肽、TRBV7-8多肽、TRBV7-9多肽、TRBV9多肽、TRBV10-1多肽、TRBV10-2多肽、TRBV10-3多肽、TRBV11-1多肽、TRBV11-2多肽、TRBV11-3多肽、TRBV12-2多肽、TRBV12-3多肽、TRBV12-4多肽、TRBV12-5多肽、TRBV13多肽、TRBV14多肽、TRBV15多肽、TRBV16多肽、TRBV18多肽、TRBV19多肽、TRBV20-1多肽、TRBV24-1多肽、TRBV25-1多肽、TRBV27TRBV28多肽、TRBV29-1多肽、和TRBV30多肽。在一些情况下,结合TRBV的第一抗原结合结构域对该TRBV是特异性的。例如结合TRBV的第一抗原结合结构域可以解离常数(K<sub>D</sub>)为约2nM至约30nM(例如,从约2nM至约25nM,从约2nM至约20nM,从约2nM至约15nM,自约2nM到约10nM,从约2nM到约5nM,从约5nM至约30nM,从约10nM至约30nM,从约15nM至约30nM,从约20nM至约30nM,从约25nM至约30nM,从约2.6nM到约25.2nM,从约5nm至约20nM,从约10nM至约15nM,从约5nM至约10nM,从约15nM至约20nM或从约20nM至约25nM)结合TRBV。在一些情况下,特异性结合TRBV的第一抗原结合结构域不结合(或基本上不结合)不同的TRBV。在一些情况下,本文提供的双特异性分子中的第一抗原结合结构域可以如其他地方所述(参见例如,Wang等人,Nat.Genet.,47,1426-1434(2015);和de Masson等人.,Sci.Transl.Med.,10,(2018))。

[0044] 在一些情况下,可用于本文提供的双特异性分子的第一抗原结合结构域可结合TRBV5-5多肽。例如,可以与TRBV5-5多肽结合的抗原结合结构域可以包括如下所述的每个CDR:

[0045]	序列	SEQ ID NO
V <sub>L</sub> CDR1	CSASQGISNYLN	1
V <sub>L</sub> CDR2	TSSLHSGV	2
V <sub>L</sub> CDR3	QQYSKLPRT	3
V <sub>H</sub> CDR1	AYGVN	4
V <sub>H</sub> CDR2	WGDGNTDYNSALK	5
V <sub>H</sub> CDR3	ATLYAMDY	6

[0046] 在一些情况下,可以结合TRBV5-5多肽的抗原结合结构域可以包括具有包括如SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1,包括如SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2,和包括如SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3的轻链。例如,可与TRBV5-5多肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,该轻链包括SEQ ID NO:7所示氨基酸序列。例如,可与TRBV5-5多肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,该轻链包括SEQ ID NO:38所示氨基酸序列。在一些情况下,可以结合TRBV5-5多肽的抗原结合结构域可以包括具有包括如SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1,包括如SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2,和包括如SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3的重链。例如,可与TRBV5-5多肽结合的抗原结合结构域可包括重链,该重链包括SEQ ID NO:8所示氨基酸序列。例如,可与TRBV5-5多肽结合的抗原结合结构域可包括重链,该重链包括SEQ ID NO:39所示氨基酸序列。在一些情况下,可与TRBV5-5多肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,所述轻链具有包括SEQ ID NO:1所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1、包括SEQ ID NO:2所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2和包括SEQ ID NO:3所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3;并且可包括重链,所述重链具有包括SEQ ID NO:4所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1、包括SEQ ID NO:5所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2和包括SEQ ID NO:6所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。例如,可以结合TRBV5-5多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,所述轻链包括SEQ ID NO:7所示氨基酸序列,并且可以包括重链,所述重链包括SEQ ID NO:8所示氨基酸序列。例如,可以结合TRBV5-5多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,所述轻链包括SEQ ID NO:38所示氨基酸序列,并且可以包括重链,所述重链包括SEQ ID NO:39所示氨基酸序列。

[0047] 在一些情况下,可用于本文提供的双特异性分子的第一抗原结合结构域可结合TRBV12多肽。例如,可以与TRBV12多肽结合的抗原结合结构域可以包括如下所述的每个CDR:

[0048]	序列	SEQ ID NO
V <sub>L</sub> CDR1	CRASSSVNYIYW	9
V <sub>L</sub> CDR2	YTSNLAPGVP	10
V <sub>L</sub> CDR3	QQFTSSPFT	11
V <sub>H</sub> CDR1	NFGMH	12
V <sub>H</sub> CDR2	YISSGSSTIYYADTLKG	13
V <sub>H</sub> CDR3	RGEGAMDY	14

[0049] 在一些情况下,可以结合TRBV12多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,其具有包括如SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1,包括如SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2,和包括如SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3。例如,可与TRBV12多肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,该轻链包括SEQ ID NO:15所示氨基酸序列。例如,可与TRBV12多

肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,该轻链包括SEQ ID NO:40所示氨基酸序列。在一些情况下,可以结合TRBV12多肽的抗原结合结构域可以包括重链,所述重链具有包括如SEQ ID NO:12所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1,包括如SEQ ID NO:13所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2,和包括如SEQ ID NO:14所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。例如,可与TRBV12多肽结合的抗原结合结构域可包括重链,该重链包括SEQ ID NO:16所示氨基酸序列。例如,可与TRBV12多肽结合的抗原结合结构域可包括重链,该重链包括SEQ ID NO:41所示氨基酸序列。在一些情况下,可与TRBV12多肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,所述轻链具有包括SEQ ID NO:9所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1、包括SEQ ID NO:10所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2和包括SEQ ID NO:11所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3;并且可包括重链,所述重链具有包括SEQ ID NO:12中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1、包括SEQ ID NO:13中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2和包括SEQ ID NO:14中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。例如,可以结合TRBV12多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,所述轻链包括SEQ ID NO:15所示氨基酸序列,并且可以包括重链,所述重链包括SEQ ID NO:16中所示氨基酸序列。例如,可以结合TRBV5-5多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,所述轻链包括SEQ ID NO:40所示氨基酸序列,并且可以包括重链,所述重链包括SEQ ID NO:41中所示氨基酸序列。

[0050] 在一些情况下,本文提供的双特异性分子中的第一抗原结合结构域(例如包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)可以如其他地方所述(例如,参见Beta Mark TCR Vbeta Repertoire试剂盒,25个测试,RUO,包装插入件.Beckman Coulter Life Sciences,技术文件(2009);以及美国专利号5,861,155,例如图1)。

[0051] 本文提供的双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)中的第二抗原结合结构域可以是任何合适类型的抗原结合结构域。在一些情况下,可用于本文提供的双特异性分子的第二抗原结合结构域可包括免疫球蛋白轻链的可变区(VL)和免疫球蛋白重链的可变区(VH)。例如,可用于本文提供的双特异性分子中的第二抗原结合结构域可包括来自免疫球蛋白轻链的第一互补决定区(CDR)(V<sub>L</sub> CDR1)、来自免疫球蛋白轻链的第二CDR(V<sub>L</sub> CDR2)和来自免疫球蛋白轻链的第三CDR(V<sub>L</sub> CDR3),来自免疫球蛋白重链的第一CDR(V<sub>H</sub> CDR1),来自免疫球蛋白重链的第二CDR(V<sub>H</sub> CDR2)和来自免疫球蛋白重链的第三CDR(V<sub>H</sub> CDR3)。可以用作本文提供的双特异性分子中第二抗原结合结构域的抗原结合结构域的实例包括但不限于scFv、Fab、F(ab')<sub>2</sub>片段及其生物活性片段(例如,保留结合靶分子如T细胞辅助受体多肽能力的片段)。在一些情况下,可以用作本文提供的双特异性分子中的第二抗原结合结构域的抗原结合结构域可以是scFv。

[0052] 本文提供的双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)中的第二抗原结合结构域可以结合任何合适的T细胞辅助受体多肽。可被本文提供的双特异性分子中的第二抗原结合结构域靶向的T细胞辅助受体多肽的实例包括但不限于CD3多肽和T细胞受体多肽。

[0053] 在一些情况下,可用于本文提供的双特异性分子的第二抗原结合结构域可结合CD3多肽。例如,可以与CD3多肽结合的抗原结合结构域可以包括如下所述的每个CDR:

[0054]

	序列	SEQ ID NO
--	----	-----------

V <sub>L</sub> CDR1	RASQDIRNYLN	17
V <sub>L</sub> CDR1	RASSSVSYMN	44
V <sub>L</sub> CDR1	SASSSVSYMN	45
V <sub>L</sub> CDR1	RSSTGAVTTSNYAN	46
V <sub>L</sub> CDR1	RASQSVSYMN	47
V <sub>L</sub> CDR2	(Y)YTSRLHS (第一个Y是任选的)	18
V <sub>L</sub> CDR2	DTSKVAS	48
V <sub>L</sub> CDR2	DTSKLAS	49
V <sub>L</sub> CDR2	GTNKRAP	50
V <sub>L</sub> CDR3	QQGNTLPWT	19
V <sub>L</sub> CDR3	QQWSSNPLT	51
V <sub>L</sub> CDR3	QQWSSNPFT	52
V <sub>L</sub> CDR3	ALWYSNLWV	53
V <sub>H</sub> CDR1	GYTMN	20
V <sub>H</sub> CDR1	RYTMH	54
V <sub>H</sub> CDR1	TYAMN	55
V <sub>H</sub> CDR2	LINPYKGVSTYNQKFKD	21
V <sub>H</sub> CDR2	YINPSRGYTNYNQKFK	56
V <sub>H</sub> CDR2	RIRSKYNNYATYYADSVKD	57
V <sub>H</sub> CDR2	YINPSRGYTNYADSVKG	58
V <sub>H</sub> CDR3	SGYYGDSDWYFDV	22
V <sub>H</sub> CDR3	YYDDHYCLDY	59
V <sub>H</sub> CDR3	HGNFGNSYVSWFAY	60

[0055] 在一些情况下,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,其具有包括如SEQ ID NO:17所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1,包括如SEQ ID NO:18所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2,和包括如SEQ ID NO:19所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3。例如,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,该轻链包括SEQ ID NO:23所示氨基酸序列。例如,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,该轻链包括SEQ ID NO:42所示氨基酸序列。

[0056] 在一些情况下,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,其具有包括如SEQ ID NO:44所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1,包括如SEQ ID NO:48所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2,和包括如SEQ ID NO:51所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3。例如,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,该轻链包括SEQ ID NO:61所示氨基酸序列。

[0057] 在一些情况下,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,其具有包括如SEQ ID NO:45所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1,包括如SEQ ID NO:49所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2,和包括如SEQ ID NO:52所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3。例如,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,该轻链包括SEQ ID NO:63所示氨基酸序列。

[0058] 在一些情况下,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,其具有包括如SEQ ID NO:46所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1,包括如SEQ ID NO:50所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2,和包括如SEQ ID NO:53所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3。例如,可与CD3多肽结合的抗原结合结

构域可包括轻链,该轻链包括SEQ ID NO:65所示氨基酸序列。

[0059] 在一些情况下,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,其具有包括如SEQ ID NO:47所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1,包括如SEQ ID NO:48所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2,和包括如SEQ ID NO:51所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3。例如,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,该轻链包括SEQ ID NO:67所示氨基酸序列。

[0060] 在一些情况下,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括重链,所述重链具有包括如SEQ ID NO:20所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1,包括如SEQ ID NO:21所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2,和包括如SEQ ID NO:22所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。例如,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括重链,该重链包括SEQ ID NO:24所示氨基酸序列。例如,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括重链,该重链包括SEQ ID NO:43所示氨基酸序列。

[0061] 在一些情况下,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括重链,所述重链具有包括如SEQ ID NO:54所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1,包括如SEQ ID NO:56所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2,和包括如SEQ ID NO:59所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。例如,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括重链,该重链包括SEQ ID NO:62所示氨基酸序列。

[0062] 在一些情况下,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括重链,所述重链具有包括如SEQ ID NO:54所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1,包括如SEQ ID NO:56所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2,和包括如SEQ ID NO:59所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。例如,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括重链,该重链包括SEQ ID NO:64所示氨基酸序列。

[0063] 在一些情况下,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括重链,所述重链具有包括如SEQ ID NO:55所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1,包括如SEQ ID NO:57所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2,和包括如SEQ ID NO:60所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。例如,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括重链,该重链包括SEQ ID NO:66所示氨基酸序列。

[0064] 在一些情况下,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括重链,所述重链具有包括如SEQ ID NO:54所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1,包括如SEQ ID NO:58所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2,和包括如SEQ ID NO:59所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。例如,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括重链,该重链包括SEQ ID NO:68所示氨基酸序列。

[0065] 在一些情况下,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,所述轻链具有包括SEQ ID NO:17所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1、包括SEQ ID NO:18所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2和包括SEQ ID NO:19所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3;并且可包括重链,所述重链具有包括SEQ ID NO:20中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1、包括SEQ ID NO:21中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2和包括SEQ ID NO:22中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。例如,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,所述轻链包括SEQ ID NO:23所示氨基酸序列,并且可以包括重链,所述重链包括SEQ ID NO:24中所示氨基酸序列。例如,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,所述轻链包括SEQ ID NO:42所示氨基酸序列,并且可以包括重链,所述重链包括SEQ ID NO:43中所示氨基酸序列。

[0066] 在一些情况下,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,所述轻链具有包括SEQ ID NO:44所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1、包括SEQ ID NO:48所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2和包括SEQ ID NO:51所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3;并且可包括重链,所述重链具有包括SEQ ID NO:54中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1、包括SEQ ID NO:56中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2和

包括SEQ ID NO:59中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。例如,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,所述轻链包括SEQ ID NO:61所示氨基酸序列,并且可以包括重链,所述重链包括SEQ ID NO:62中所示氨基酸序列。

[0067] 在一些情况下,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,所述轻链具有包括SEQ ID NO:45所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1、包括SEQ ID NO:49所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2和包括SEQ ID NO:52所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3;并且可包括重链,所述重链具有包括SEQ ID NO:54中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1、包括SEQ ID NO:56中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2和包括SEQ ID NO:59中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。例如,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,所述轻链包括SEQ ID NO:63所示氨基酸序列,并且可以包括重链,所述重链包括SEQ ID NO:64中所示氨基酸序列。

[0068] 在一些情况下,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,所述轻链具有包括SEQ ID NO:46所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1、包括SEQ ID NO:50所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2和包含SEQ ID NO:53所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3;并且可包括重链,所述重链具有包括SEQ ID NO:55中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1、包括SEQ ID NO:57中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2和包括SEQ ID NO:60中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。例如,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,所述轻链包括SEQ ID NO:65所示氨基酸序列,并且可以包括重链,所述重链包括SEQ ID NO:66中所示氨基酸序列。

[0069] 在一些情况下,可与CD3多肽结合的抗原结合结构域可包括轻链,所述轻链具有包括SEQ ID NO:47所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR1、包括SEQ ID NO:48所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR2和包括SEQ ID NO:51所示氨基酸序列的V<sub>L</sub> CDR3;并且可包括重链,所述重链具有包括SEQ ID NO:54中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR1、包括SEQ ID NO:58中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR2和包括SEQ ID NO:59中所示氨基酸序列的V<sub>H</sub> CDR3。例如,可以结合CD3多肽的抗原结合结构域可以包括轻链,所述轻链包括SEQ ID NO:67所示氨基酸序列,并且可以包括重链,所述重链包括SEQ ID NO:68中所示氨基酸序列。

[0070] 在一些情况下,本文提供的双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗体结合结构域的双特异性分子)中的第二抗原结合结构域可以如别处所述(参见,例如,Zhu等人,Journal of Immunology,155:1903-1910(1995);和Junttila等人,Cancer Research,74:5561-5571(2014))。

[0071] 在一些情况下,本文提供的双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)中的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域可以通过接头(例如,多肽接头)连接。接头可包含任何合适数目的氨基酸。例如,接头可包括约5个氨基酸至约20个氨基酸(例如约5个氨基酸至约18个氨基酸,约5个氨基酸至约15个氨基酸,约5个氨基酸至约12个氨基酸,约5个氨基酸至约10个氨基酸,约5个氨基酸至约8个氨基酸,约7个氨基酸至约20个氨基酸,约10个氨基酸至约20个氨基酸,约12个氨基酸至约20个氨基酸,约16个氨基酸至约20个氨基酸,约8个氨基酸至约16个氨基酸,约10个氨基酸至约12个氨基酸,约8个氨基酸至约12个氨基酸,约10个氨基酸至约15个氨基酸,或约12个氨基酸至约16个氨基酸)。在一些情况下,接头可以改变双特异性分子的柔性。在一些情况下,接头可以改变双特异性分子的可溶性。接头可包括任何合适氨基酸。在一些情况下,接头可以是富含甘氨酸的接头。在一些情况下,接头

可以是富含丝氨酸和/或苏氨酸的接头。接头可以任何顺序连接本文提供的双特异性分子中的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域。例如,接头可以将本文提供的双特异性分子中的第一抗原结合结构域的N-端与双特异性分子中的第二抗原结合结构域的C-端连接,或者反之亦然。可用于连接本文提供的双特异性分子中的第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域的接头的实例包括但不限于GGGGS接头(SEQ ID NO:25)、(GGGGS)<sub>3</sub>接头(SEQ ID NO:26)和GGSGSGSGSGSGGVD(SEQ ID NO:69)。

[0072] 在一些情况下,本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)可配制成组合物(例如药物组合物)用于哺乳动物(例如人)给药。例如,本文提供的一种或多种双特异性分子可配置成药学上可接受的组合物,以给予患有T细胞癌症的哺乳动物(例如,人类)。在一些情况下,本文提供的一种或多种双特异性分子可以与一种或多种药理学上可接受的运载体(添加剂)、赋形剂和/或稀释剂一起配制。可用于本文所述组合物的药理学上可接受的运载体、赋形剂和稀释剂的例子包括但不限于蔗糖、乳糖、淀粉(例如淀粉乙醇酸)、纤维素、纤维素衍生物(如微晶纤维素等改性纤维素,羟丙基纤维素(HPC)和纤维素醚羟丙基甲基纤维素(HPMC)等纤维素醚)、木糖醇、山梨醇、甘露醇、明胶、聚合物(如聚乙烯吡咯烷酮(PVP)、聚乙二醇(PEG)、交联聚乙烯吡咯烷酮(交联维酮)、羧甲基纤维素、聚乙烯-聚氧丙烯-嵌段聚合物和交联羧甲基纤维素钠(交联羧甲基纤维素钠(croscarmellose)))、氧化钛、偶氮染料、硅胶、火成二氧化硅、滑石、碳酸镁、植物硬脂酸、硬脂酸镁、硬脂酸铝、硬脂酸、抗氧化剂(如维生素A、维生素E、维生素C、棕榈酸视黄酯和硒)、柠檬酸、柠檬酸钠、对羟基苯甲酸酯(如对羟基苯甲酸甲酯和对羟基苯甲酸丙酯)、凡士林、二甲亚砷、矿物油、血清蛋白(如人血清白蛋白)、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、水、盐或电解质(如盐水、硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠和锌盐)、胶态二氧化硅、三硅酸镁、聚丙烯酸酯、蜡、羊毛脂、和卵磷脂。

[0073] 含有本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)的组合物(例如药物组合物)可以配制成任何合适的剂型。剂型的实例包括固体或液体形式,包括但不限于药丸、胶囊、片剂、凝胶、液体、悬浮液、溶液(例如无菌溶液)、缓释制剂和延迟释放制剂。

[0074] 含有本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)的组合物(例如药物组合物)可设计用于口服或胃肠外(例如,局部、皮下、静脉内、腹膜内、鞘内和脑室内)给药。当口服给予时,组合物可为丸剂、片剂或囊剂的形式。适用于胃肠外给药的组合物包括水性和非水性无菌注射溶液,其可包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂以及使得制剂与预期接受者的血液等渗的溶质;水性和非水性无菌悬浮液,其可包含助悬剂和增稠剂。制剂可存在于单位剂量或多剂量容器(例如,密封的安瓿和药瓶)中,并可以冷冻干燥(冻干)条件保存,临用前只需要加入无菌液体载体(例如,注射用水)即可使用。可由无菌粉末剂、颗粒剂和片剂制备临时注射溶液剂和混悬剂。

[0075] 含有本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)的组

合物(例如药物组合物)可局部或系统给药。例如,含有本文提供的一种或多种双特异性分子的组合物可以通过静脉注射对哺乳动物(例如,人)系统给药。例如,含有本文提供的一种或多种双特异性分子的组合物可以通过皮下注射对哺乳动物(例如,人)系统给药。

[0076] 本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)的有效量(例如有效剂量)可以根据T细胞癌症的严重程度、给药途径、对象的年龄和一般健康状况、赋形剂的使用、与其他治疗方法(如使用其他药物)共同使用的可能性,和/或治疗医生的判断来改变。

[0077] 含有本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)的组合物(例如,药物组合物)的有效量可以是可治疗具有T细胞癌的哺乳动物(例如人),且不会对哺乳动物产生显著毒性的任何量。本文提供的一种或多种双特异性分子的有效量可以是任何合适的量。有效量可以保持恒定或可以根据哺乳动物对治疗的反应以滑动量或可变剂量进行调整。多种因素可以影响特定应用所需使用的实际有效量。例如,给药频率,治疗持续时间,多种治疗剂的使用,给药途径以及病症(例如T细胞癌症)的严重程度可能需要增加或减少给予的实际有效量。

[0078] 含有本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)的组合物(例如,药物组合物)的给药频率可以是可治疗具有T细胞癌的哺乳动物(例如人),且不会对哺乳动物产生显著毒性的任何频率。例如,给药频率可以是每天一次、每周一次、每2周一次或每4周一次。在一些情况下,给药可以包括连续输注含有本文提供的一种或多种双特异性分子的组合物。给药频率可以保持恒定或可以在治疗的持续时间内变化。使用本文提供的含有一种或多种双特异性分子的组合物的治疗过程可以包括休息期。与有效量一样,多种因素可以影响用于特定应用的实际给药频率。例如,有效量,治疗持续时间,多种治疗剂的使用,给药途径以及病症(例如T细胞癌症)的严重程度可能需要增加或减少给药频率。

[0079] 给予含有本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)的组合物(例如,药物组合物)的有效给药持续时间可以是可治疗具有T细胞癌的哺乳动物(例如人),且不会对哺乳动物产生显著毒性的任何持续时间。例如,有效持续时间可以从几天到几周、几个月或几年不等。在一些情况下,治疗哺乳动物的有效持续时间可以在从大约一个月到大约10年的持续时间范围内。多种因素可以影响用于特定治疗的实际有效持续时间。例如,有效持续时间可随给药频率,有效量,多种治疗剂的使用,给药途径和正在治疗的病症(例如T细胞癌症)的严重性而变化。

[0080] 在一些情况下,本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)可被用作治疗患有T细胞癌症的哺乳动物(例如人类)的唯一活性剂。

[0081] 在一些情况下,本文所述的方法和材料可以包括一种或多种(例如,一种、两种、三种、四种、五种或多种)用于治疗患有T细胞癌症的哺乳动物(例如,人类)的额外治疗剂。例如,可以对有需要的哺乳动物(例如,具有T细胞癌症的哺乳动物)给予本文提供的一种或多

种双特异性分子(例如,双特异性的分子包括可以结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可以结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域)联合一种或多种抗癌剂。在一些情况下,抗癌剂可以是烷化剂。在一些情况下,抗癌剂可以是铂化合物。在一些情况下,抗癌剂可以是紫杉烷。在一些情况下,抗癌剂可以是促黄体激素释放激素(LHRH)激动剂。在一些情况下,抗癌剂可以是抗雌激素。在一些情况下,抗癌剂可以是芳香酶抑制剂。在一些情况下,抗癌剂可以是血管生成抑制剂。在一些情况下,抗癌剂可以是聚(ADP)-核糖聚合酶(PARP)抑制剂。在一些情况下,抗癌剂可以是拓扑异构酶抑制剂。在一些情况下,抗癌剂可以是皮质类固醇。在一些情况下,抗癌剂可以是抗体。在一些情况下,抗癌剂可以是抗体药物偶联物。抗癌剂的例子包括但不限于:白消安、顺铂、卡铂、紫杉醇、多西他赛)、白蛋白结合紫杉醇(nab-紫杉醇)、六甲蜜胺、卡培他滨、环磷酰胺、依托泊苷(vp-16)、吉西他滨、异环磷酰胺、伊立替康(cpt-11)、美法仑、培美曲塞、拓扑替康、长春瑞滨、戈舍瑞林、亮丙瑞林、他莫昔芬、来曲唑、阿那曲唑、依西美坦、贝伐单抗、奥拉帕尼、芦卡帕尼(rucaparib)、尼拉帕尼(niraparib)、环磷酰胺、多柔比星(脂质体多柔比星)、泼尼松、泼尼松龙、维多地布伦妥昔单抗、莫加单抗、本妥昔单抗及其任何组合。在一些情况下,一种或多种额外的治疗剂可以与本文提供的一种或多种双特异性分子一起给药(例如,在单一组合中)。在一些情况下,一种或多种额外的治疗剂可以独立于本文提供的一种或多种双特异性分子而给予。当独立于本文提供的一种或多种双特异性分子给予一种或多种额外治疗剂时,可首先给予本文提供的一种或多种双特异性分子,然后给予一种或多种额外治疗剂,或反之亦然。

[0082] 在一些情况下,本文所述的方法和材料可以包括对治疗T细胞癌有效的一种或多种(例如,一种、两种、三种、四种、五种或更多种)额外治疗(例如,治疗干预)。例如,可以对有需要的哺乳动物(例如,具有T细胞癌症的哺乳动物)给予本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,包括可以结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可以结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)联合一种或多种治疗干预。如本文所述可用于治疗T细胞癌症的治疗干预的示例包括但不限于癌症手术、放射治疗、化学治疗及其任何组合。在一些情况下,可以在给予本文提供的一种或多种双特异性分子的同时进行有效治疗T细胞癌的一种或者多种额外治疗。在一些情况下,可以在给予本文提供的一种或多种双特异性分子之前和/之后进行有效治疗T细胞癌的一种或者多种额外治疗。

[0083] 在一些情况下,本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)可用于治疗患有非癌症的疾病或紊乱的哺乳动物。例如,可将本文提供的一种或多种双特异性分子给予患有与克隆性T细胞扩增相关的疾病、紊乱或病况但非T细胞癌症的哺乳动物。在一些情况下,与克隆性T细胞扩增相关而非T细胞癌症的疾病、紊乱或病况可能是自身免疫性疾病。在一些情况下,与克隆性T细胞扩增相关而非T细胞癌症的疾病、紊乱或病况可能是与移植排斥有关。可使用本文提供的一种或多种双特异性分子靶向的与克隆T细胞扩增相关的疾病和紊乱的实例包括但不限于移植物抗宿主病(GVHD)、乳糜泻和多发性硬化。

[0084] 在一些情况下,本文所述的材料和方法可用于治疗患有乳糜泻的哺乳动物(例如,人类)。例如,本文提供的一种或多种双特异性分子(例如,包括可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽的第二抗原结合结构域的双特异性分子)可给予患有乳糜泻的哺乳动物(例如,人)以治疗该哺乳动物。在一些情况下,包括可结合与乳糜泻

相关的TRBV多肽的第一抗原结合结构域和可结合T细胞辅助受体多肽(例如CD3多肽)的第二抗原结合结构域的双特异性分子可给予患有乳糜泻的哺乳动物(例如人)以治疗该哺乳动物。在本文提供的双特异性分子用于治疗患有乳糜泻的哺乳动物的一些情况下,双特异性分子的第一抗原结合结构域可以结合选自由TRBV4、TRBV6、TRBV7、TRBV9、TRBV20和TRBV29组成的组的TRBV多肽,并且第二抗原结合结构域可结合T细胞辅助受体多肽(例如CD3多肽)。在本文提供的双特异性分子用于治疗患有乳糜泻的哺乳动物的一些情况下,双特异性分子的第一抗原结合结构域可以结合选自由TRBV6-1、TRBV7-2、TRBV9-1、TRBV20-1和TRBV29-1组成的组的TRBV多肽,并且第二抗原结合结构域可以结合T细胞辅助受体多肽(例如CD3多肽)。

[0085] 在一些情况下,本文所述的第一抗原结合结构域(例如,可结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域)可包含在可呈现于T细胞(CAR T细胞)上的嵌合抗原受体(CAR)中。例如,包含可结合TRBV多肽的抗原结合结构域的CAR T细胞可用于治疗患有T细胞癌症的哺乳动物。在一些情况下,可对具有T细胞癌症的哺乳动物给予CAR T细胞,其包括可结合本文提供的TRBV多肽以治疗哺乳动物的抗原结合结构域。包括可结合TRBV多肽的抗原结合结构域的CAR T细胞可用于任何类型的CAR T细胞治疗。CAR T细胞治疗可包括他处所述的那些(见例如Ali等,Blood,128(13):1688-700(2016);Sadelain等,Cancer Discov.,3(4):388-98(2013);Porter等,N.Engl.J.Med.,365(8):725-33(2011);和Macioccia等,Nat.Med.,23(12):1416-1423(2017))。

[0086] 在一些情况下,本文所述的第一抗原结合结构域(例如,可以结合TRBV多肽的第一抗原结合结构域)可以包含在抗体-药物偶联物(ADC)中。例如,包含可结合TRBV多肽的抗原结合结构域的ADC可用于治疗患有T细胞癌症的哺乳动物。在一些情况下,可对具有T细胞癌症的哺乳动物给予ADC,其包括可结合本文提供的TRBV多肽以治疗哺乳动物的抗原结合结构域。包括可以结合TRBV多肽的抗原结合结构域的ADC可包括任何类型的药物。可用于ADC的药物可包括他处所述的那些(见例如,Younes等,Lancet Oncol.,14(13):1348-56(2013);Hamblett等,Clin.Cancer.Res.,10(20):7063-70(2004);和Lewis Phillips等,Cancer Res.,68(22):9280-90(2008))。

[0087] 本发明将在以下实施例中进一步描述,其不限制权利要求中描述的本发明的范围。

[0088] 实施例

[0089] 实施例1:用于治疗T细胞癌的靶向TCR $\beta$ 链的双特异性抗体

[0090] 本实施例描述了靶向TRBC的BsAb,以及两种不同的靶向TRBV的BsAb的产生和评估用于治疗T细胞癌症。靶向TRBC的BsAb由于双向T细胞杀伤,可以根除T细胞癌和绝大多数健康的人类(正常)T细胞。靶向TRBV的BsAb可以在体外和体内耗竭癌性T细胞,同时保留大多数正常T细胞。

[0091] 结果

[0092] 靶向正常T细胞的BsAb

[0093] 抗TRBV5-5和抗-TRBV12scFv序列用于产生抗TRBV5-5和抗-TRBV12BsAb(此后分别表示为“ $\alpha$ -V5”和“ $\alpha$ -V12”),用于选择性靶向TRBV5-5<sup>+</sup>或TRBV12<sup>+</sup>T细胞(图1B,图7A和表1)。类似地,产生抗-TRBC1BsAb(此后表示为“ $\alpha$ -C1”)用于选择性靶向TRBC1<sup>+</sup>T细胞(图1B和表1)。

分析色谱显示纯度>99%的单体BsAb(图7B,C)。用差示扫描荧光法评价了 $\alpha$ -V12和 $\alpha$ -V5的热稳定性。 $\alpha$ -V5的单一解链温度( $T_m$ )为78°C, $\alpha$ -V12显示59°C和77°C的两个 $T_m$ (图7D,E)。这些数据表明,对于 $\alpha$ -V5,抗TRBV5-5scFv和抗CD3scFv均在78°C展开,而对于 $\alpha$ -V12,抗TRBV12scFv在59°C时展开,抗CD3scFv在77°C处展开。发现1.5%至2%和3.5%至5%的正常人T细胞分别表达TRBV5-5和TRBV12(图1C,D)。大约35-45%的人T细胞表达TRBC1,其余表达TRBC2(图1C,E)。来自健康个体的T细胞体外暴露于 $\alpha$ -V5和 $\alpha$ -V12治疗,分别导致TRBV5-5<sup>+</sup>和TRBV12<sup>+</sup>细胞的完全丧失(图1C、D和图8A)。类似地,健康个体的T细胞暴露于 $\alpha$ -C1导致TRBC1<sup>+</sup>T细胞的大量损失(图1C、E和图8B)。然而,由TRBV-和TRBC特异性BsAb介导的非靶向T细胞的损失存在重大差异。 $\alpha$ -V5BsAb耗竭了14.1%(平均值)不表达TRBV5-5的T细胞, $\alpha$ -V12清除了13.3%(平均)不表达TRBV12的T细胞(图1C)。相反, $\alpha$ -C1根除了80.0%(平均值)不表达TRBC1的T细胞(图1C)。因此, $\alpha$ -C1导致大多数总T细胞的耗竭,而 $\alpha$ -V5或 $\alpha$ -V12保留了大多数T细胞(图1C)。为了证实BsAb介导的TCR内化或TCR表位阻断不会干扰随后对不同T细胞亚型的基于抗体的分析,使用CellTrace紫染色的靶细胞(TRBV5<sup>+</sup>、TRBV12<sup>+</sup>或TRBC1<sup>+</sup>T细胞)。 $\alpha$ -V5和 $\alpha$ -V12暴露导致CellTrace紫染色的TRBV5<sup>+</sup>和TRBV12<sup>+</sup>细胞的耗竭(图8C),并且 $\alpha$ -C1导致TRBC1<sup>+</sup>和TRBC2<sup>+</sup>细胞的大量损失(图8D,E)。

[0094]

表 1.  $\alpha$ -TRBV5-5,  $\alpha$ -TRBV12,  $\alpha$ -TRBC1,  $\alpha$ -CD19 和  $\alpha$ -CD3 scFv 的亲合力和序列

scFv	亲和力	V <sub>L</sub>	SEQ ID	V <sub>H</sub>	SEQ ID
$\alpha$ -TRBV5-5 (克隆 TM23)	25.2 nM	DIQMTQTSSLSASLGDRLVTTTCSASQGIS NYLNWYQQKPDGTVKLLIYTTSSLHSGV PSRFGSGSGTDYSLTISNLEPEDIAITYC QQYSKLPRTFGGGTKVEIK	7	QVQLKESGPGLVAPSQSLSIITCTVSGFSLTA YGVNWVRQPPGKGLWLGMIWGDGNTD YNSALKSRLSISKDINSKSOVFLKMNSLQTD DTARYYCARDRVTAATLYAMDYWGQGTSTV TVSS	8
$\alpha$ -TRBV12 (克 隆 16G8)	2.6 nM	ENVLTQSPAIMASLGEKVTMSCRASSV NYIYWYQQKSDASPKLWIYYTSNLAGPV PTRFGSGSGNSYSLTISSEMEGEDAAITYY CQQTSSPFTFGGGTKLEIK	15	DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFS NFGMHWVRQAPGKGLWVAYISSGSSTIY YADTLKGRFTISRDNPKNTLFLQMTSLRSE DTAMYVCARRGEGAMDYWGQGTSTVTVSS	16
$\alpha$ -TRBC1 (克隆 Jovi-1)	0.4 nM	DVVMTQSPSLPVS LGDQASISCRSSQRL VHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVVS NRFPGVDRFSGSGSDTFLKISRVEAED LGIYFCSQSTHVPYTFGGGKLEIKR	27	EVRLQQSGPDLIKPGASVKMSCKASGYTFT GYVMHWVKQRPQGQGLEWIGFINPYNDIQ SNERFRGKATLTSDKSSTAYMELSSLTSE DSAVYVCARGAGYDFGAYRFFDFWGGQ TTLTVSS	28
$\alpha$ -CD19 (克隆 HD37)	0.3 nM	DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQVVD YDGSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNL VSGIPRFRSGSGSDTFLNIHPVEKVDAA TYHCQQSTEDPWTFGGGKLEIK	29	QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFS SYWMNWVKQRPQGQGLEWIGQIWPGDGDT NYNGKFKGKATLTADESSSTAYMQLSSLA SEDSA VYFCARRETTTVGRYYYAMDYWG QGTTVTVSS	30
$\alpha$ -CD3 (克隆 UCHT1.v9)	4.7 nM	DIQMTQSPSSLSASVGDRLVTTTCRASQDIR NYLNWYQQKPKGAPKLLIYTSRLESGV PSRFGSGSGTDYTLTISSLQPEDFAITYC QQGNLTPWTFGGGKLEIK	23	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFT GYTMNWVRQAPGKGLWVVALINPYKGVV TYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNLSLR AEDTAVYYCARSQYGGSDWYFDVWGGQ GTLVTVSS	24

[0095]

BsAb 靶向不表达相关 TRBV 或 TRBC 的 T 细胞的基础

[0096]

为了检查 BsAb 是否导致杀死不表达相关 TRBV 或 TRBC 链的 T 细胞, 从人 T 细胞中耗竭

TRBC1<sup>+</sup>细胞,然后将耗竭的T细胞暴露于 $\alpha$ -C1。在表达TRBC1的T细胞耗竭后,暴露于 $\alpha$ -C1不会导致剩余T细胞统计学显著的杀伤(图8F)。类似地,在表达TRBV5或TRBV12的T细胞耗竭后,暴露于 $\alpha$ -V5或 $\alpha$ -V12不会导致剩余T细胞统计学显著的杀伤(图8G)。此外,TRBV5<sup>+</sup>或TRBV12<sup>+</sup>T细胞的纯群体在分别暴露于 $\alpha$ -V5和 $\alpha$ -V12后经历了几乎完全细胞损失(图8H)。这些结果表明,所有三种BsAb的作用取决于处理的T细胞中相关TRBV或TRBC链的存在。

[0097] 示范性BsAb分子(图1B)可以由一个与TRBC或TRBV区域(仅由靶T细胞亚群表达)相互作用的scFv臂和另一个与CD3 $\epsilon$ 亚基相互作用的scFv臂组成(在所有T细胞上表达)。接下来检查了这种示例性BsAb分子是否可以诱导双向杀伤(其中BsAb的交联诱导“效应”和“靶”T细胞的活化,从而杀死交联的“效应”T细胞(表达任何TCR;图2A)。例如, $\alpha$ -C1交联可以活化TRBC1<sup>+</sup>T细胞并杀死偶联的TRBC2<sup>+</sup>T细胞。这将导致表达TRBC1和TRBC2的T细胞的杀伤,导致观察到几乎完全T细胞耗竭(图1C)。类似地, $\alpha$ -V5或 $\alpha$ -V12将导致不表达TRBV5-5或V12的T细胞的双向杀伤。相反,用于非T细胞癌症靶向策略的BsAb针对癌细胞表面抗原,不会活化靶标癌细胞,导致单向杀伤。产生了三种额外的BsAb。这些使用了上述相同的TRBV或TRBC scFv,但用 $\alpha$ -CD19scFv取代了 $\alpha$ -CD3scFv(图2B和表1)。这使我们能够测试TRBC1、TRBV5-5或TRBV12的结合是否足以活化T细胞并随后杀死CD19<sup>+</sup>B细胞(图2C)。使用靶向CD19的常规BsAb作为阳性对照,其中抗CD3的scFv与CD19特异性scFv连接。在四种BsAb中任一种存在的情况下,CD19<sup>+</sup>靶标NALM6B细胞与正常T细胞的共培养导致细胞因子的产生,包括干扰素 $\gamma$ (IFN $\gamma$ )、白细胞介素2(IL-2)、肿瘤坏死因子 $\alpha$ (TNF $\alpha$ )和白细胞介素10(IL-10)(图2D和图9B)。还导致T细胞活化标志物的表达,包括CD25、诱导型T细胞共刺激(ICOS)、4-1BB,以及衰竭标志物的表达,包括淋巴细胞-活化基因3(LAG-3)、程序性死亡1(PD-1)(图9C)以及靶向NALM6B细胞杀伤(图2E),尽管水平不同。T细胞细胞因子的产生和NALM6B细胞的细胞毒性依赖于NALM6CD19的表达,因为NALM6的CD19敲除(图9A)消除了这些影响(图2D、图9B和图2E)。在野生型NALM6B细胞和表达较低水平CD19的NALM6B细胞之间,用BsAb没有观察到IFN $\gamma$ 产生或NALM6B细胞毒性的差异(图9A、D和E)。为了证明这些作用的特异性,在BsAb的存在下将TRBC1<sup>+</sup>、TRBV5<sup>+</sup>或TRBV12<sup>+</sup>T细胞与NALM6B细胞共培养之前,从T细胞池中耗竭它们。在 $\alpha$ -V5-CD19和 $\alpha$ -V12-CD19存在下与NALM6B细胞共培养后,这些耗竭的T细胞保持失活,如它们不能产生IFN $\gamma$ 所示(图2F)。类似地,耗竭的T细胞不能杀死NALM6B细胞(图2H)。向TRBV5和TRBV12富集的人T细胞中添加 $\alpha$ -V5-CD19和 $\alpha$ -V12-CD19使IFN $\gamma$ 的产生和杀伤能力恢复到 $\alpha$ -CD3-CD19和 $\alpha$ -C1-CD19处理条件下的水平(图2,G和I)。

[0098] 与暴露于 $\alpha$ -V5-CD19和 $\alpha$ -V12-CD19相比,暴露于 $\alpha$ -CD3-CD19和 $\alpha$ -C1-CD19导致显著更高的IFN $\gamma$ 水平和NALM6细胞毒性。这种观察结果有两个潜在的原因。首先,大约35-45%的人T细胞表达TRBC1,而1.5%至5%的正常T细胞表达TRBV5-5或TRBV12(图1C,D)因此, $\alpha$ -CD3-CD19和 $\alpha$ -C1-CD19产生的效应细胞与靶标(E:T比)远高于 $\alpha$ -V5-CD19和 $\alpha$ -V12-CD19。 $\alpha$ -CD3和 $\alpha$ -TRBC1scFv的T细胞活化电位也可能高于 $\alpha$ -TRBV 5-5或 $\alpha$ -TRBV12scFv。后一种可能性被排除在外,即在 $\alpha$ -V5或 $\alpha$ -V12存在下,与TRBV5<sup>+</sup>或TRBV12<sup>+</sup>富集的T细胞共培养的NALM6细胞产生的IFN $\gamma$ 和细胞毒性与用 $\alpha$ -CD3和 $\alpha$ -C1BsAb观察到的类似(图2G和2I)。

[0099] 进行了类似的实验,证明 $\alpha$ -C1可以通过双向杀伤介导表达TRBC2的克隆性肿瘤T细胞的死亡,即使这些肿瘤T细胞不表达TRBC1(图10A至D)。 $\alpha$ -C1暴露诱导针对TRBC1<sup>+</sup>(Jurkat)和TRBC2<sup>+</sup>(HPB-ALL)细胞的IFN $\gamma$ 产生(图10C)。TRBC1<sup>+</sup>T细胞亚群的耗竭限制了 $\alpha$ -

C1诱导的针对HPB-ALL细胞的IFN  $\gamma$  产生(图10C)。流式细胞术分析还显示,使用未耗竭的T细胞, $\alpha$ -C1介导HPB-ALL细胞死亡,而TRBC1+T细胞耗竭逆转了这种作用(图10D)。正常TRBC1+T细胞的耗竭不影响 $\alpha$ -C1诱导的对Jurkat细胞的IFN  $\gamma$  反应(图10C)或 $\alpha$ -C1介导的Jurkat细胞杀伤(图10D),因为 $\alpha$ -C1通过CD3在这些细胞上与Jurkat上的TRBC1交联来活化剩余的正常TRBC2<sup>+</sup>T细胞。结论是,有效的双向杀伤可以通过靶向TRBC1、TRBV5-5或TRBV12的BsAb介导。靶向TRBV5-5或V12的BsAb可用于靶向表达这些受体的T细胞而不耗竭大多数T细胞的原因是,正常T细胞群中TRBV5-5<sup>+</sup>或TRBV12<sup>+</sup>细胞的数量远小于TRBC1<sup>+</sup>细胞的数量。

[0100] TRBV靶向的BsAb在体外诱导T细胞对癌症细胞的细胞因子反应。

[0101] 人类T细胞癌衍生细胞系重排了TCR $\beta$ 基因并表达了克隆性TRBV。观察到T-ALL衍生的Jurkat、HPB-ALL和CCRF-CEM T细胞系保留了如抗CD3抗体评估的细胞表面TCR表达,而MOLT3细胞则没有(图11A)。Jurkat和HPB-ALL细胞也分别表达表面TRBV12和TRBV5-5(图11B)。为了评估BsAb对T细胞恶性肿瘤的活性,在存在或不存在不同的BsAb的情况下,共同培养正常T细胞与T细胞癌症细胞系。

[0102] 暴露于 $\alpha$ -C1后,在没有任何癌症细胞的情况下,观察到基线IFN  $\gamma$  生成量增加, $\alpha$ -V5和 $\alpha$ -V12的增加程度较小(图3A)。在HPB-ALL (TRBV5-5<sup>+</sup>) 和Jurkat (TRBV12-3) 细胞存在的情况下, $\alpha$ -V5和 $\alpha$ -V12分别使T细胞IFN  $\gamma$  分泌增加到基线以上。为了证实在没有靶标癌症细胞的情况下,基线IFN  $\gamma$  的产生是由于正常T细胞中存在少量的TRBV5-5<sup>+</sup>和TRBV12<sup>+</sup>T细胞,这些细胞在暴露于BsAb之前被耗竭。TRBV5和TRBV12耗竭的T细胞不能分别响应 $\alpha$ -V5和 $\alpha$ -V12产生IFN  $\gamma$  (图3B)。作为该实验的对照,研究表明,在 $\alpha$ -C1BsAb存在的情况下,TRBV5-5<sup>+</sup>和TRBV12<sup>+</sup>T细胞的耗竭不会影响IFN  $\gamma$  的产生(图3B)。此外,当在 $\alpha$ -V5存在下与HPB-ALL (TRBV5-5<sup>+</sup>) 细胞共培养时,TRBV5耗竭的T细胞分泌IFN  $\gamma$ 。类似地,在 $\alpha$ -V12存在下与Jurkat (TRBV12-3<sup>+</sup>) 细胞共培养的TRBV12耗竭的T细胞也分泌IFN  $\gamma$ 。这也表明TRBV耗竭过程本身并没有导致正常T细胞功能的丧失。通过 $\alpha$ -V5和 $\alpha$ -V12活化T细胞是多功能的,伴随着多种细胞因子的释放,包括TNF- $\alpha$ 、IL-2、白细胞介素-5 (IL-5) 和粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子 (GM-CSF) 以及IFN  $\gamma$  (图3,C和D)。

[0103] 作为对这些BsAb特异性的进一步对照,在Jurkat和HPB-ALL细胞系中基于CRISPR破坏TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 恒定区创建了同基因癌症细胞。通过细胞-表面TRBV12或TRBV5-5的缺失(图11B)和细胞表面CD3的表达(图4,C和D)证实了所导致的TCR敲除(KO)。TCR-KO后,在 $\alpha$ -V5存在下,HPB-ALL细胞与正常T细胞共培养时,未观察到测试的IFN  $\gamma$  或其他四种细胞因子的显著增加(图3C)。类似地,在 $\alpha$ -V12存在下,TCR-KO Jurkat细胞与正常T细胞共培养后,观察到细胞因子几乎没有增加(图3D)。

[0104] TRBV-靶向的BsAb体外杀伤癌症细胞株

[0105] 为了评估细胞毒性,在存在浓度增加的 $\alpha$ -V12或 $\alpha$ -V5BsAb的情况下,将正常人T细胞与Jurkat或HPB-ALL细胞共同培养(图4A,B)。在0.01nM(0.57ng/mL)浓度的 $\alpha$ -V12和 $\alpha$ -V5下观察到几乎完全的Jurkat和HPB-ALL细胞毒性。癌症细胞系也经工程改造成表达GFP。当在 $\alpha$ -V12存在下与正常T细胞共培养时,表达GFP的Jurkat细胞被消除(图4C、E和图12A)。暴露于 $\alpha$ -V12和正常T细胞对TCR-KO Jurkat细胞没有显著影响(图4C、E和图12A)。类似地,当在 $\alpha$ -V5存在下与正常T细胞共培养时,表达GFP的HPB-ALL细胞被消除,并且这种消除在TCR-KO HPB-ALL细胞中不存在(图4D、F和图12A)。作为该实验的另一个对照,研究表明当与正常

T细胞孵育时, $\alpha$ -CD19BsAb对Jurkat或HPB-ALL细胞没有影响(图4,C至F和图12A)。在靶Jurkat细胞存在的情况下, $\alpha$ -V12还诱导正常人T细胞上活化和耗竭标志物的表达(图12B)。类似地,在靶HPB-ALL细胞存在的情况下, $\alpha$ -V5介导正常人T细胞上活化和耗竭标志物的表达(图12C)。从正常人T细胞中去除CD4辅助T细胞,未观察到 $\alpha$ -V12和 $\alpha$ -V5活性损失(图12D,E)。此外,在共培养前将BsAb与人血清孵育96小时后,保留了 $\alpha$ -V12和 $\alpha$ -V5的细胞毒性功能(图12F)。

[0106] 为了确定 $\alpha$ -V12是否影响表达TRBV12以外的TRBV家族的T细胞,如上所述,在 $\alpha$ -CD19或 $\alpha$ -V12的存在下共同培养Jurkat细胞和正常T细胞。然后进行TRBV基因测序以测量存活细胞中TRBV耗竭百分比。与暴露于 $\alpha$ -CD19相比,暴露于 $\alpha$ -V12后TRBV12-3水平显著降低(98.9%) (图13A)。TRBV12-3信号的绝大多数当然来源于Jurkat细胞而不是正常T细胞。除了TRBV12-4减少了36.5%外,其他TRBV家族成员未受影响(图13A)。对HPB-ALL细胞进行了类似的分析。与暴露于 $\alpha$ -CD19后相比,暴露于 $\alpha$ -V5后TRBV5-5水平显著降低(98.3%) (图13B)。TRBV5-5信号的绝大多数来源于HPB-ALL细胞,而不是正常T细胞。同样,除了TRBV5-6,其减少了91.6% (图13B),其他TRBV家族成员未受影响。 $\alpha$ -V5BsAb中使用的靶向TRBV5-5的scFv序列来源于最初针对TRBV5-5抗原产生的抗体,因此,考虑到TRBV5-5和TRBV5-6在TRBV5家族成员中最相似,表达TRBV5-6的T细胞受到 $\alpha$ -V5暴露的影响并不奇怪(图14A,B)。TRBV5家族成员的序列比对显示,氨基酸残基D20、D81和I101对TRBV5-5和TRBV5-6都是共同的,但与其他TRBV5成员不同,并且其他TRBV5家族成员中残基81和101的差异也导致了主要的电荷差异(图14C)。

[0107] 靶向TRBV的BsAb在体外杀死来自患者的T-ALL细胞。

[0108] 从T-ALL患者中收集原发性恶性细胞。流式细胞术鉴定出两名患者(患者1和患者2)有大量的TRBV12<sup>+</sup>群体,表明存在单克隆癌症细胞(图5A)。来自患者1和2的T-ALL细胞在 $\alpha$ -V12存在下与正常T细胞共培养,导致显著的IFN  $\gamma$  分泌(图5B),以及正常人供体T细胞上活化和耗竭标志物的表达(图5C)。HLA-A3表达用于区分来源于两个健康人供体的正常T细胞和患者来源的T-ALL细胞(图5D)。供体2的T细胞(HLA-A3<sup>+</sup>)与患者-1(HLA-A3<sup>-</sup>)恶性细胞以及 $\alpha$ -V12的共培养显示患者来源的恶性细胞耗竭(图5E,F)。类似地,供体-1(HLA-A3<sup>-</sup>)T细胞与患者-2(HLA-A3<sup>+</sup>)恶性细胞的共培养也显示出恶性细胞的耗竭。在这两种情况下,正常人T细胞相对不受 $\alpha$ -V12暴露的影响(图5E,F),因为表达TRBV12的细胞在正常T细胞中比例较低(图1C,D)。

[0109] 靶向TRBV的BsAb在体内杀死癌症细胞

[0110] 为了评估体内疗效,将表达荧光素酶的Jurkat或HPB-ALL癌症细胞静脉注射到NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>I12rg<sup>tm1Wj1</sup>/SzJ(NSG)小鼠中,建立了两种弥散性异种移植模型(图6,A至C)。所有小鼠也通过静脉注射接受人T细胞。对于Jurkat模型,在Jurkat和正常人T细胞接种后第4天开始,当Jurkat细胞已经广泛弥散时,通过腹膜泵递送 $\alpha$ -V12BsAb(图6,A和B)。腹膜泵能够在植入后至少2周内保持显著的 $\alpha$ -V12和 $\alpha$ -V5血清浓度(图15A)。生物发光成像(BLI)显示,在用 $\alpha$ -V12治疗的小鼠中,肿瘤负荷显著降低(图6,B和D)。使用两个对照来记录这种减少的特异性,一个用于BsAb,另一个用于细胞。BsAb对照:当用 $\alpha$ -CD19而不是 $\alpha$ -V12治疗携带Jurkat癌的小鼠时,通过BLI评估,肿瘤负荷显著更高(图6,B和D)。细胞对照:当携带来源于Jurkat TCR-KO细胞的弥散性癌症的小鼠用 $\alpha$ -V12处理后,与携带WT Jurkat细胞的小鼠

相比,肿瘤负荷显著更高(图6,B和D)。第二个弥散性癌症模型用于记录这些体内结果的再现性。除了用HPB-ALL细胞代替Jurkat细胞和用 $\alpha$ -V5代替 $\alpha$ -V12外,实验方法与Jurkat细胞模型中描述的方法相同(图6A,C)。在用 $\alpha$ -V5处理的小鼠中,BLI再次显示出显著的发光减少(图6,C和D)。用 $\alpha$ -CD19的类似治疗或携带来源于HPB-ALL TCR-KO细胞的弥散性癌症的小鼠也显示出与Jurkat模型中的观察结果相似的肿瘤生长(图6,C和D)。接种癌症细胞19天后(开始BsAb治疗15天后),对小鼠血液进行流式细胞术分析,结果显示所有治疗组均保留正常的人类T细胞(图6,E和F)。此外,在 $\alpha$ -CD19处理的小鼠中有大量的循环Jurkat和HPB-ALL白血病细胞(图6,E和F)。与此形成鲜明对比的是,在这些实验中, $\alpha$ -V12和 $\alpha$ -V5处理的小鼠的循环白血病细胞显著减少(图6,E和F)。循环白血病细胞的这种减少与 $\alpha$ -V12和 $\alpha$ -V5处理的小鼠的显著生存益处有关(图6,G和H)。 $\alpha$ -CD19处理的小鼠出现后肢瘫痪,导致需要安乐死。分别用 $\alpha$ -V12或 $\alpha$ -V5处理的携带Jurkat或HPP-ALL癌症的小鼠没有发生后肢瘫痪。这些小鼠最终死亡(图6,G和H),并在死亡时表现出典型的移植物抗宿主病(GVHD)特征。然而,如果在人类中使用这种方法,只需要给予BsAb,而不需要给予T细胞。在人类T细胞癌中,另一个挑战是恶性T细胞的数量往往超过健康的效应T细胞。为了确定较低数量的人效应T细胞是否能够在体内充分根除T细胞肿瘤,向NSG小鼠注射 $0.5 \times 10^6$ 人T细胞和 $2.5 \times 10^6$ 肿瘤细胞(Jurkat或HPB-ALL细胞)(图15B)。BLI显示, $\alpha$ -V12和 $\alpha$ -V5处理均可显著降低肿瘤负担(图15C至E)。 $\alpha$ -V12和 $\alpha$ -V5处理也导致IFN $\gamma$ 和TNF $\alpha$ 细胞因子产生增加(图15F,G)以及正常人T细胞上T细胞活化和耗竭标志物的表达(图15H,I)。

[0111] 这些结果共同表明,靶向TRBV的BsAb可以在体外和体内耗竭克隆性癌性T细胞,同时保留大多数正常T细胞。因此,靶向TRBV的BsAb可用于治疗T细胞癌,同时避免与治疗相关的免疫抑制。

[0112] 方法

[0113] 细胞系和原代T细胞

[0114] Jurkat(克隆E6-1)、CCRF-CEM、MOLT-3、(ATCC,Manassas,VA)、HPB-ALL(DSMZ,德国)和NALM6细胞在补充有10%HyClone胎牛血清(FBS,GE Healthcare SH30071.03,芝加哥,IL)和1%青霉素-链霉素(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)的RPMI-1640(ATCC,30-2001)中培养。HEK293FT(ThermoFisher Scientific,Waltham,MA)在补充有10%FBS、2mM GlutaMAX(ThermoFisher Scientific,35050061)、0.1mM MEM非必需氨基酸(ThermoFisher Scientific,11140050)、1%青霉素-链霉素和500 $\mu$ g/mL遗传霉素(ThermoFisher Scientific,10131027)的DMEM(ThermoFisher Scientific,11995065)中培养。通过Ficoll Paque Plus(GE Healthcare,GE17-1440-02)密度梯度离心从白细胞去除术样品(Stem Cell Technologies,Vancouver,BC或Astarte Biologics,Bothell,WA)中分离PBMC。从PBMC中扩增人T细胞,或者添加15ng/mL的抗-人CD3抗体(克隆OKT3,BioLegend,San Diego,CA,317325),或者用人T-活化剂CD3/CD28Dynabeads(ThermoFisher Scientific,11131D)以1:5的珠:细胞比扩增三天。T细胞在含有10%FBS、1%青霉素链霉素、100IU/mL重组人IL-2(阿地白介素,Prometheus Therapeutics and Diagnostics,加利福尼亚州圣地亚哥),和5ng/mL重组人类IL-7(BioLegend,581906)的RPMI-1640中培养。

[0115] 细胞染色、流式细胞术和细胞分选

[0116] 将细胞以 $1 \times 10^6$ 个细胞/mL悬浮在流动染色缓冲液(含有0.5%BSA、2mM EDTA、

0.1%叠氮化钠的PBS)或流动分选缓冲液(含4%FBS的PBS)中,并与适当的抗体在冰上孵育30分钟。使用的抗体是:Brilliant Violet (BV) -711抗人CD3(克隆OKT3BioLegend#317328);APC-抗人CD45(克隆HI30BioLegend#304012);APC-抗人CD19(克隆HIB19,Biolegend#302212),PE-抗人CD4(克隆RPA-T4,Biolegend#300508),APC-抗人CD8(克隆SK1,Biolegend#344722),PE-抗人CB1TCR(克隆JOVI.1BD#565776),PE-抗人HLA-A3(克隆GAP.A3BD#566605),PE-TCR  $\nu\beta 5.1$ (克隆ImmU157),PE-TCR  $\nu\beta 5.3$ (克隆3D11),PE-TCR  $\nu\beta 5.2$ (克隆36213),FITC-TCR  $\nu\beta 8$ (克隆56C5.2Beckman Coulter),BV-421-抗人CD25(Biolegend#302630),APC-抗人ICOS(Biolegend#313510),BV-750-抗人-41BB(Biolegend#309844),BV-421-抗人LAG3(Biolegend#369314),和APC-抗人-PD1(Biolegend#329908)。使用LSRII流式细胞仪分析或使用BD FACSAria II(Becton Dickinson,Mansfield,MA)分选染色的细胞。使用活力染料(活/死可固定近-IR,L10119;Aqua死细胞染色试剂盒L34957Invitrogen)和正向和侧向散射特性对单个活细胞进行门控。根据制造商说明进行CellTrace紫染色(ThermoFisher C34557)。

[0117] TRBC、TRBV和CD4耗竭或富集

[0118] 对于TRBC1T细胞耗竭,用PE-小鼠抗人CB1TCR(终浓度 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ )对 $1\times 10^8$ 个正常T细胞进行染色,然后进行PE阴性(TRBC1耗竭的)细胞分选。对于TRBV5T细胞耗竭或富集,用PE-TCR  $\nu\beta 5.3$ (结合TRBV5-5)和PE-TCR  $\nu\beta 5.2$ (结合TRBV 5-6)对 $1\times 10^8$ 个正常T细胞进行染色,然后进行PE阴性(TRBV5耗竭)或PE阳性(TRBV5富集)细胞分选。对于TRBV12T细胞耗竭或富集,用FITC-TCR  $\nu\beta 8$ (结合TRBV12-3和TRBV12-4T细胞)对 $1\times 10^8$ 个正常T细胞进行染色,然后进行FITC阴性(TRBV12耗竭的)或FITC阳性(TRBV12富集的)细胞分选。或者,使用EasyStep PE阳性选择试剂盒II(StemCell Technologies,17684)进行细胞分离。对于CD4T细胞耗竭,用PE抗人CD4染色正常T细胞,然后用EasySep PE阳性选择试剂盒II染色,用于CD4阴性(CD4耗竭的)细胞分离。

[0119] 双特异性抗体的产生、纯化和稳定性

[0120]  $\alpha$ -TRBV5-5、 $\alpha$ -TRBV12、 $\alpha$ -TRBC1和 $\alpha$ -CD19scFv序列(表1)由GeneArt(ThermoFisher Scientific)合成。scFv序列使用以下N-至C-末端格式以单链双抗体形式表达:IL-2信号序列,抗-TRBV/TRBC/CD19可变轻链(VL),GGGGS接头(SEQ ID NO:25), $\alpha$ -CD3可变重链(VH),(GGGGS)<sub>3</sub>接头(SEQ ID NO:26), $\alpha$ -CD3VL,GGGGS接头(SEQ ID NO:25),抗-TRBV/TRBC/CD19VH,和6x HIS标签,并克隆入pcDNA3.4载体(ThermoFisher Scientific)。BsAbs通过JHU真核组织培养核心设施(JHU Eukaryotic Tissue Culture Core Facility)或GeneArt表达和纯化。对于来自JHU真核组织培养核心设施的BsAb表达。用聚乙烯亚胺(PEI)以1:3的比例将1mg质粒转染到HEK293F细胞的1L悬浮培养物中,密度为 $2\times 10^6$ 个细胞/mL。将新转染的HEK293F细胞在Freestyle293表达培养基中在37°C、170rpm和5%CO<sub>2</sub>下生长5天。随后,通过离心收获培养基,用0.22 $\mu\text{m}$ 单位过滤,并使用镍亲和层析纯化BsAb。为此,将2mL的Ni-NTA-His-Bind(Millipore Sigma,70666-6)树脂加入过滤的上清液中,并在4°C在定轨振荡器中孵育过夜。通过重力色谱柱(Econo Pac色谱柱7321010,Bio-Rad,Hercules,CA)捕获上清液-树脂混合物,并用磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的20mM咪唑(GE Healthcare,45-000-007)洗涤。用500mM咪唑洗脱所需BsAb,并使用7k MWC0 Zeba旋转脱盐柱(ThermoFisher Scientific,89883)将其脱盐到PBS中。通过SDS-PAGE凝胶电泳(Mini-PROTEAN TGX无染色

预制凝胶, Bio-Rad, 4568095) 和/或使用BCA蛋白质测定法 (Pierce, ThermoFisher, 23225) 对蛋白质进行定量。蛋白质与7%甘油一起储存在-80℃下。或者, BsAb由GeneArt在Expi293s中生产, 并用HisTrap柱 (GE Healthcare, 17-5255-01) 纯化, 然后用HiLoad Superdex 200 26/600柱 (GE Health, 28989336) 进行尺寸排阻色谱。使用TSKgel G3000SWxl柱 (TOSOH Bioscience), 在pH 7下使用50mM磷酸钠和300mM氯化钠的流动缓冲液, 以1.0ml/分钟的流速进行分析色谱。BsAb考马斯蓝染色 (ThermoFisher Scientific, 20278) 和抗组氨酸蛋白质印迹使用GeneArt的抗6x-His标签抗体 (ThermoFisher Scientific, MA1-21315) 进行。

[0121] 通过差示扫描荧光法评估了 $\alpha$ -V12和 $\alpha$ -V5BsAb的热稳定性, 该荧光法监测在温度诱导变性时暴露与蛋白质疏水区域结合的染料的荧光。通过将2 $\mu$ L浓度为1mg/mL的纯化的 $\alpha$ -V12或 $\alpha$ -V5BsAb和2 $\mu$ L 50X SYPRO橙色染料 (Invitrogen S6650) 在pH 7.4磷酸盐缓冲液 (PBS, Gibco, 10010023) 中混合, 在白色低轮廓96孔未衬里聚合酶链反应板 (Bio-Rad, MLL9651) 中建立反应混合物。用光学透明膜密封板, 并离心1000xg 30秒。热扫描在25至100℃ (1℃/分钟温度梯度) 使用CFX9Connect实时聚合酶链反应装置 (BioRad) 进行。使用CFX管理软件 (Bio-Rad), 从解链曲线负一阶导数的最大值计算蛋白质去折叠/解链温度 ( $T_m$ )。通过将BsAb与浓度为0.05 $\mu$ g/mL的人血清 (Millipore Sigma#H4522) 在37℃培养箱中孵育0、24和96小时来评估血清稳定性。在每个时间点, 收集人血清BsAb混合物并在-80℃下冷冻, 直到通过共培养测定进行BsAb功能分析。

#### [0122] CRISPR基因编辑

[0123] Alt-R CRISPR系统 (Integrated DNA Technologies, Coralville, IA) 用于产生TCR敲除Jurkat和HPB-ALL细胞系以及CD19敲除和CD19低表达NALM6克隆。为了敲除TCR, 靶向TRA恒定区 (AGAGTCTCTCAGCTGGTACA; SEQ ID NO:31)、TRB恒定区 (AGAGGTGCCGAGCCCTC; SEQ ID NO:32) 的Alt-R CRISPR-Cas9crRNA和Alt-R CRISPR-Cas9tracrRNA (IDT, 1072533) 以100 $\mu$ M重新悬浮在无核酸酶双链缓冲液中。根据制造商的说明, 在95℃下以1:1摩尔比将crRNA和tracrRNA双链化5分钟, 然后缓慢冷却至室温。然后使双链化RNA与Cas9核酸酶以1.2:1摩尔比混合15分钟。将总共40pmol的Cas9RNP与gRNA复合物与500,000个细胞在20 $\mu$ L OptiMEM (ThermoFisher, 51985091) 中混合。将该混合物加到0.1cm比色皿 (Bio-Rad) 内, 并使用ECM 2001 (BTX, Holliston, MA) 在90V和15ms电穿孔。立即将细胞转移到完全生长培养基中培养7天。通过限制性稀释建立单细胞克隆, 并使用Quick-DNA 96试剂盒 (Zymo Research, Irvine, CA, D3010) 分离基因组DNA。对CRISPR切割位点侧翼的区域进行PCR扩增 (TCR $\alpha$ 正向引物: GCCTAAGTTGGAGACCAC (SEQ ID NO:33), 反向引物: GAAGCAAGGAAACAGCCTGC (SEQ ID NO:34); TCR $\beta$ 正向引物: TCGCTGTGTTAGCCATCAGA (SEQ ID NO:35), 反向引物: ATGAACCACAGGTGCCCAATTC (SEQ ID NO:36) 和Sanger测序以选择TCR $\alpha$ -/ $\beta$ -克隆。TRA和TRB链基因的破坏由表面CD3表达的丧失证实。

[0124] 为了产生CD19敲除和低CD19的NALM6克隆, 在室温下将Alt-R CRISPR sgRNA (CGAGGAACCTTAGTGA; SEQ ID NO:37) 与Cas9核酸酶 (IDT) 以2:1摩尔比复合15分钟。然后, 将50皮摩尔的Cas9RNP与200,000个NALM6细胞混合, 再悬浮在20 $\mu$ L SF缓冲液 (Lonza) 中, 并使用脉冲代码CV-104用4D Nucleofector X单元 (Lonza) 在16孔比色皿条中电穿孔。细胞在完全生长培养基中培养7天, 然后稀释平板以选择单个克隆。用抗-人CD19抗体通过流式细胞

术染色来表征克隆细胞表面的CD19水平。

[0125] 逆转录病毒转导

[0126] 将非组织培养物处理的平板在4℃下用PBS中的100μL RetroNectin (Clontech Takara, Mountain View, CA, T202, 20μg/mL) 包被过夜, 然后在室温下用10%FBS封闭1小时。将逆转录病毒(RediFect Red-FLuc-GFP, PerkinElmer CLS960003) 和 $2 \times 10^5$ 靶细胞加入每个孔中, 并在20℃下以2000x g离心1小时。将平板在37℃下孵育两天, 之后将细胞扩增至6孔平板。通过基于GFP表达的FACS (BD FACSAria II) 分离转导的细胞。

[0127] TCR测序

[0128] 用Qiagen AllPrep DNA/RNA Micro试剂盒 (Qiagen, 80284) 从样品中分离总RNA。使用Agilent TapeStation系统验证RNA质量。使用5'RACE (cDNA末端的快速扩增) 方法制备TCR测序文库, 该方法由以下组成: cDNA合成步骤, 然后用TCRβ恒定区的基因特异性引物进行两个PCR步骤。使用Illumina MiSeq平台对文库进行测序。使用MIGEC、MiXCR和VDJtools分析读数。克隆型的频率计算为代表克隆型的UID (独特分子标识符条形码) 在样本中所有UID中的比例。以下非功能性TRBV (在IMGT中被列为假基因或开放阅读框) 被排除在分析之外; TRBV1, TRBV3-2, TRBV5-2, TRBV5-3, TRBV5-7, TRBV6-7, TRBV7-1, TRBV7-5, TRBV8, TRBV12-1, TRBV12-2, TRBV21, TRBV22, TRBV23-1, TRBV26。

[0129] TRBV序列和结构比对

[0130] PDB ID 5BRZ、6EH5、4P4K和4QRR的结构在结构上对齐, 并且从5BRZ中提取残基2-95, 对应于TRBV 5.1的TCRβ可变区。为了模拟TRBV 5.4、5.5、5.6和5.8, 使用Coot在81和101位进行了计算机内突变。数字以PyMOL (v2.2.3, Schrödinger, LLC, New York, NY) 呈现。相关TRBV序列的比对使用ClustalOmega进行, 并使用Escript显示。

[0131] 共培养

[0132] 使用96孔平底组织培养处理板建立共培养物, 每个孔在总共100μL体积的RPMI培养基中包含 $5 \times 10^4$ 个正常人T细胞 (效应细胞)、 $5 \times 10^4$ 靶细胞 (如文所示) 和BsAb (如文中所示的浓度)。共培养物在37℃孵育17小时。用人IFN-γ Quantikine ELISA试剂盒 (R&D Systems, Minneapolis, MN, SIF50C), 人IL-2 Quantikine ELISA试剂盒 (R&D Systems, S2050), 人TNF-α Quantikine ELISA试剂盒 (R&D Systems, STA00D), 人IL-10 Quantikine ELISA试剂盒 (R&D Systems, S1000B), 或Luminex分析 (13重-Immunology Multiplex测定, Millipore Sigma, USA, HMHEMAG-34K) 在Bio-Plex 200系统 (Bio-Rad) 上进行上清液的细胞因子分析。对于表达荧光素酶的靶细胞, 根据制造商的说明书, 通过Steady-Glo荧光素酶测定法 (E2510, Promega, Madison, WI) 测定细胞存活率。存活率计算为发光信号与无抗体或对照抗体条件的比率: (抗体孔发光) / (无抗体或对照抗体孔发光)。或者, 通过基于流式细胞术的GFP表达 (对于表达GFP的肿瘤细胞系) 或不同的HLA表达 (对于患者来源的肿瘤细胞) 来量化肿瘤细胞。对于在没有靶肿瘤细胞的情况下检测BsAb对健康T细胞的影响的实验, 将 $1 \times 10^6$ 个正常人T细胞与BsAb (文中规定的浓度) 在总体积为1mL的RPMI培养基中孵育, 并在37℃下孵育17小时。通过在血细胞仪上计数台盼蓝染色的细胞来定量活的T细胞。

[0133] T-ALL患者样本采集

[0134] 根据约翰·霍普金斯机构审查委员会 (IRB:NA\_00028682和NA\_000286 82) 批准的

血液系统恶性肿瘤细胞库协议(J0969)或约翰·霍普金儿童白血病库协议(J 0968)收集T细胞癌症患者样本。

[0135] 动物试验

[0136] 根据JHU动物护理和使用委员会批准的研究方案M018M79,对从Johns Hopkins Sidney Kimmel综合癌症中心动物资源设施获得的6至8周龄雌性NOD.Cg-Prkdc<sup>scid</sup>I12rg<sup>tm1Wjl</sup>/SzJ(NSG)小鼠进行维持。通过尾静脉注射癌症细胞系和人类T细胞。使用30G针头用BsAb填充两周的微渗泵(型号1002,ALZET,Cupertino,CA),如文中所示。使用无菌手术技术将泵置于每只小鼠的腹膜空间中。对于生存研究,动物随访至第80天,或在出现瘫痪或移植物抗宿主病迹象(驼背、毛皮褶皱、脱屑或裸露皮肤、活动减少)时处死。使用IVIS系统(PerkinElmer,USA)测量小鼠生物发光。在成像之前,在诱导室中使用吸入异氟烷麻醉小鼠。诱导后,小鼠腹腔注射荧光素(150 $\mu$ l,RediJect D-荧光素超生物发光底物,PerkinElmer,770505),5分钟后置于成像室中。使用Living Image软件(4.7.2版,珀金埃尔默)分析发光图像。为了基于流动检测小鼠血液中的肿瘤细胞和正常人T细胞,通过小鼠颊部出血在EDTA处理的微囊(Sarstedt Inc,NC9299309)中收集100 $\mu$ L血液,然后用1mL ACK裂解缓冲液(Quality Biological,118-156-721)孵育10分钟,用小鼠和人TrueStain FcX-Fc受体封闭溶液(BioLegend,101320422302)和细胞表面染色抗体在流动染色缓冲液中重悬。将10 $\mu$ L计数珠(Precision Count beads,BioLegend,424902)添加到每个试管中等体积(300 $\mu$ L)的细胞悬浮液中。基于对每个样品采集500个珠来计数肿瘤细胞(GFP<sup>+</sup>、CD3<sup>+</sup>)或T细胞(GFP<sup>-</sup>、CD3<sup>+</sup>)。为了检测细胞因子和BsAb,将小鼠血液收集在eppendorf管中,在室温下使其凝结30分钟,然后以1000xg4 $^{\circ}$ C离心5分钟。收集血清并在-80 $^{\circ}$ C下储存,直到细胞因子(根据制造商说明)或BsAb-ELISA。对于BsAb-ELISA,将小鼠血清在生物素化的重组人CD3 $\epsilon$ 和CD3 $\delta$ (Acro Biosystems,DE,USA,

[0137] #CDD-H52W4)包被的链霉亲和素板(R&D Systems,#CP004)中孵育,然后使用HRP偶联的抗人 $\kappa$ 轻链抗体(ThermoFisher Scientific,#A18853)进行检测。

[0138] 统计学分析

[0139] 平均值 $\pm$ 平均值的标准误差用于总结数据。斯氏t检验用于比较两个样本之间正态分布变量的平均值差异。对于三个或三个以上的组,使用Tukey多重比较检验(当比较所有组时)或Dunnett检验(当将测试组与一个对照组进行比较时)或Sidak检验(当对两个选择组进行比较)的单因素方差分析, $\alpha=0.05$ 。Kaplan-Meier方法用于生成中位生存率,并通过对数秩检验估计危害比。Prism 8.0版软件(GraphPad,La Jolla,加利福尼亚州)用于统计分析和图形制作。

[0140] 序列表

[0141] SEQ ID NO:1

[0142] 抗-TRBV5-5V<sub>L</sub> CDR1

[0143] CSASQGISNYLN

[0144] SEQ ID NO:2

[0145] 抗-TRBV5-5V<sub>L</sub> CDR2

[0146] TSSLHSGV

[0147] SEQ ID NO:3

- [0148] 抗-TRBV5-5V<sub>L</sub> CDR3  
[0149] QQYSKLPRT  
[0150] SEQ ID NO:4  
[0151] 抗-TRBV5-5V<sub>H</sub> CDR1  
[0152] AYGVN  
[0153] SEQ ID NO:5  
[0154] 抗-TRBV5-5V<sub>H</sub> CDR2  
[0155] WGDGNTDYN SALK  
[0156] SEQ ID NO:6  
[0157] 抗-TRBV5-5V<sub>H</sub> CDR3  
[0158] ATLYAMDY  
[0159] SEQ ID NO:7  
[0160] 抗-TRBV5-5V<sub>L</sub>  
[0161] DIQMTQTSSLSASLGDRVTITCSASQGISNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGSGT  
DYSLTISNLEPEDIATYYCQQYSKLPRTFGGGTKVEIK  
[0162] SEQ ID NO:8  
[0163] 抗-TRBV5-5V<sub>H</sub>  
[0164] QVQLKESG PGLVAPSQSL SITCTVSGFSLTAYGVNWRQPPGKGLEWLGMIWGDGNTDYN SALKSRLSI  
SKDNSKSQVFLKMNSLQTD TARYYCARDRV TATLYAMDYWGQGT SVTVSS  
[0165] SEQ ID NO:9  
[0166] 抗-TRBV12V<sub>L</sub> CDR1  
[0167] CRASSSVNYIYW  
[0168] SEQ ID NO:10  
[0169] 抗-TRBV12V<sub>L</sub> CDR2  
[0170] YTSNLAPGVP  
[0171] SEQ ID NO:11  
[0172] 抗-TRBV12V<sub>L</sub> CDR3  
[0173] QQFTSSPFT  
[0174] SEQ ID NO:12  
[0175] 抗-TRBV12V<sub>H</sub> CDR1  
[0176] NFGMH  
[0177] SEQ ID NO:13  
[0178] 抗-TRBV12V<sub>H</sub> CDR2  
[0179] YISSGSSTIYYADTLKG  
[0180] SEQ ID NO:14  
[0181] 抗-TRBV12V<sub>H</sub> CDR3  
[0182] RGE GAMDY  
[0183] SEQ ID NO:15  
[0184] 抗-TRBV12V<sub>L</sub>

- [0185] ENVLTQSPAIMASASLGEKVTMSCRASSSVNYIYWYQQKSDASPKLWIYYTSLNLAGVPTRFSGSGSGN  
SYSLTISSMEGEDAATYYCQQFTSSPFTFGQGTKLEIKSEQ ID NO:16
- [0186] 抗-TRBV12V<sub>H</sub>
- [0187] DVQLVESGGGLVQPGGSRKLSAASGFTFSNFGMHWRQAPDKGLEWVAYISSGSSTIYYADTLKGRFT  
ISRDNPKNTLFLQMTSLRSEDTAMYYCARRGEGAMDYWGQTSVTVSS
- [0188] SEQ ID NO:17
- [0189] 抗-CD3V<sub>L</sub> CDR1
- [0190] RASQDIRNYLN
- [0191] SEQ ID NO:18
- [0192] 抗-CD3V<sub>L</sub> CDR2
- [0193] (Y)YTSRLHS (第一个Y是任选的)
- [0194] SEQ ID NO:19
- [0195] 抗-CD3V<sub>L</sub> CDR3
- [0196] QQGNTLPWT
- [0197] SEQ ID NO:20
- [0198] 抗-CD3V<sub>H</sub> CDR1
- [0199] GYTMN
- [0200] SEQ ID NO:21
- [0201] 抗-CD3V<sub>H</sub> CDR2
- [0202] LINPYKGVSTYNQKFKD
- [0203] SEQ ID NO:22
- [0204] 抗-CD3V<sub>H</sub> CDR3
- [0205] SGYYGSDWYFDV
- [0206] SEQ ID NO:23
- [0207] 抗-CD3UCHT1V<sub>L</sub>
- [0208] DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDIRNYLNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLHSGVPSKFSGSGSG  
TDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNTLPWTFAGGTKLEIKSEQ ID NO:24
- [0209] 抗-CD3UCHT1V<sub>H</sub>
- [0210] EVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKNLEWMGLINPYKGVSTYNQKFKDKAT  
LTVDKSSSTAYMELLSLTSEDSAVYYCARSYYGSDWYFDVWGAGTTVTVSS
- [0211] SEQ ID NO:25
- [0212] 多肽接头
- [0213] GGGGS
- [0214] SEQ ID NO:26
- [0215] 多肽接头
- [0216] (GGGS)<sub>3</sub>
- [0217] SEQ ID NO:27
- [0218] 抗-TRBC1V<sub>L</sub>
- [0219] DVVMTQSPLSLPVSLGDQASISCRSSQRLVHNSNGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYRVSNRFPQVPDRFSG

SGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYFCSQSTHVPYTFGGGTKLEIKR

[0220] SEQ ID NO:28

[0221] 抗-TRBC1V<sub>H</sub>

[0222] EVRLQQSGPDLIKPGASVKMSCKASGYTFTGYVMHWKQRPQGQLEWIGFINPYNDDIQSNERFRGKAT  
LTSDKSSTTAYMELSSLTSEDSAVYYCARGAGYNFDGAYRFFDFWGGQTTTLTVSS

[0223] SEQ ID NO:29

[0224] 抗-CD19V<sub>L</sub>

[0225] DIQLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSYLNWYQQIPGQPPKLLIYDASNLVSGIPPRFSGS  
GSGTDFTLNIHPVEKVDAATYHCQQSTEDPWTFGGGGTKLEIK

[0226] SEQ ID NO:30

[0227] 抗-CD19V<sub>H</sub>

[0228] QVQLQQSGAELVRPGSSVKISCKASGYAFSSYWMNWVKQRPQGQLEWIGQIWPGDGDTNYNGKFKGKAT  
LTADESSSTAYMQLSSLASEDSAVYFCARRETTTVGRYYYAMDYWGQGTTVTVSS

[0229] SEQ ID NO:31

[0230] 靶向TRA恒定区的crRNA

[0231] AGAGTCTCTCAGCTGGTACA

[0232] SEQ ID NO:32

[0233] 靶向TRB恒定区的crRNA

[0234] AGAAGGTGGCCGAGACCCTC

[0235] SEQ ID NO:33

[0236] PCR引物

[0237] GCCTAAGTTGGGGAGACCAC

[0238] SEQ ID NO:34

[0239] PCR引物

[0240] GAAGCAAGGAAACAGCCTGC

[0241] SEQ ID NO:35

[0242] PCR引物

[0243] TCGCTGTGTTTGAGCCATCAGA

[0244] SEQ ID NO:36

[0245] PCR引物

[0246] ATGAACCACAGGTGCCCAATTC

[0247] SEQ ID NO:37

[0248] 靶向CD19的sgRNA

[0249] CGAGGAACCTCTAGTGGTGA

[0250] SEQ ID NO:38

[0251] 抗-TRBV5-5V<sub>L</sub>

[0252] DIQMTQSPSSLSASVGDRTITCSASQGISNYLNWYQQTPGKAPKLLIYYTSSLHSGVPSRFSGSGGT  
DYFTFISSLOPEDIATYYCQQYKLPRTFGQGTKLQIT

[0253] SEQ ID NO:39

- [0254] 抗-TRBV5-5V<sub>H</sub>
- [0255] QVQLQESGPGLVLRPSQSLSITCTVSGFSLTAYGVNWRQPPGRGLEWLGMIWGDGNTDYN SALKSRVTM  
LKDTSKNQFSLRLSSVTAADTAVYYCARDRV TATLYAMDYWGQGS LVTVSS
- [0256] SEQ ID NO:40
- [0257] 抗-TRBV12V<sub>L</sub>
- [0258] DIQMTTQSPSSLSASVGDRVTITCRASSSVNYIYWYQQTPGKAPKLLIYYTSNLAPGVPSRFSGSGSGT  
DYTFTISSLQPEDITYYCQQFTSSPFTFGSGTKLQIT
- [0259] SEQ ID NO:41
- [0260] 抗-TRBV12V<sub>H</sub>
- [0261] EVQLVESGGGVVQPGGSRKLSCTSSSGFTFSNFGMHWRQAPGKGLEWVAYISSGSSTIYYADTLKGRFT  
ISRDN SKNTLFLQMDSLRPEDTGVYFCARRGEGAMDYWGQGS VTVSS
- [0262] SEQ ID NO:42
- [0263] 抗-CD3UCHT1v9V<sub>L</sub>
- [0264] DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGSGT  
DYTLTSSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIK
- [0265] SEQ ID NO:43
- [0266] 抗-CD3UCHT1v9V<sub>H</sub>
- [0267] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFT  
ISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARS GYYGDS DWYFDVWGQGT LVTVSS
- [0268] SEQ ID NO:44
- [0269] 抗-CD3V<sub>L</sub> CDR1
- [0270] RASSSVSYMN
- [0271] SEQ ID NO:45
- [0272] 抗-CD3V<sub>L</sub> CDR1
- [0273] SASSSVSYMN
- [0274] SEQ ID NO:46
- [0275] 抗-CD3V<sub>L</sub> CDR1
- [0276] RSSTGAVTTSNYAN
- [0277] SEQ ID NO:47
- [0278] 抗-CD3V<sub>L</sub> CDR1
- [0279] RASQSVSYMN
- [0280] SEQ ID NO:48
- [0281] 抗-CD3V<sub>L</sub> CDR2
- [0282] DTSKVAS
- [0283] SEQ ID NO:49
- [0284] 抗-CD3V<sub>L</sub> CDR2
- [0285] DTSKLAS
- [0286] SEQ ID NO:50
- [0287] 抗-CD3V<sub>L</sub> CDR2

[0288] GTNKRAP  
[0289] SEQ ID NO:51  
[0290] 抗-CD3V<sub>L</sub> CDR3  
[0291] QQWSSNPLT  
[0292] SEQ ID NO:52  
[0293] 抗-CD3V<sub>L</sub> CDR3  
[0294] QQWSSNPFT  
[0295] SEQ ID NO:53  
[0296] 抗-CD3V<sub>L</sub> CDR3  
[0297] ALWYSNLWV  
[0298] SEQ ID NO:54  
[0299] 抗-CD3V<sub>H</sub> CDR1  
[0300] RYTMH  
[0301] SEQ ID NO:55  
[0302] 抗-CD3V<sub>H</sub> CDR1  
[0303] TYAMN  
[0304] SEQ ID NO:56  
[0305] 抗-CD3V<sub>H</sub> CDR2  
[0306] YINPSRGYTNYNQKFK  
[0307] SEQ ID NO:57  
[0308] 抗-CD3V<sub>H</sub> CDR2  
[0309] RIRSKYNNYATYYADSVKD  
[0310] SEQ ID NO:58  
[0311] 抗-CD3V<sub>H</sub> CDR2  
[0312] YINPSRGYTNYADSVKG  
[0313] SEQ ID NO:59  
[0314] 抗-CD3V<sub>H</sub> CDR3  
[0315] YYDDHYCLDY  
[0316] SEQ ID NO:60  
[0317] 抗-CD3V<sub>H</sub> CDR3  
[0318] HGNFGNSYVSWFAY  
[0319] SEQ ID NO:61  
[0320] 抗-CD3L2K-07V<sub>L</sub>  
[0321] DIQLTQSPAIMASASPGEKVTMTCRASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPYRFSGSGSGTS  
YSLTISSMEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELK  
[0322] SEQ ID NO:62  
[0323] 抗-CD3L2K-07V<sub>H</sub>  
[0324] DIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPQQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKAT  
LTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS

- [0325] SEQ ID NO:63
- [0326] 抗-CD30KT3V<sub>L</sub>
- [0327] QIVLTQSPAIMASASPGEKVTMTCSASSSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRGSGSGTS  
YSLTISGMEAEDAATYYCQQWSSNPFTFGSGTKLEIN
- [0328] SEQ ID NO:64
- [0329] 抗-CD30KT3V<sub>H</sub>
- [0330] QVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGQLEWIGYINPSRGYTNYNQKFKDKAT  
LTTDKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTLTVSS
- [0331] SEQ ID NO:65
- [0332] 抗-CD3hXR32V<sub>L</sub>
- [0333] QAVVTQEPSLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGTNKRAPWTPARFSGSLL  
GGKAALTITGAQAEDAADYYCALWYSNLWVFGGGTKLTVL
- [0334] SEQ ID NO:66
- [0335] 抗-CD3hXR32V<sub>H</sub>
- [0336] EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFNTYAMNWVRQAPGKQLEWVARIRSKYNNYATYYADSVKDR  
FTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTTLTVSS
- [0337] SEQ ID NO:67
- [0338] 抗-CD3diL2K V<sub>L</sub>
- [0339] DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGSGTD  
YSLTINSLEAEDAATYYCQQWSSNPLTFGGGKVEIK
- [0340] SEQ ID NO:68
- [0341] 抗-CD3diL2K V<sub>H</sub>
- [0342] DVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQLEWIGYINPSRGYTNYADSVKGRFT  
ITTDKSTSTAYMELSSLRSEDATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTTVTVSS
- [0343] SEQ ID NO:69
- [0344] 多肽接头
- [0345] GSGSGSGSGSGGVD
- [0346] 其他实施方式
- [0347] 应理解,虽然本发明已经结合具体实施方式进行了描述,但前述描述旨在说明而不是限制由所附权利要求书的范围所限定的本发明的范围。其它方面、优点和改进均在权利要求书的范围内。



<213> 人工

<220>

<223> 抗-TRBV5-5 VH CDR1

<400> 4

Ala Tyr Gly Val Asn

1 5

<210> 5

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-TRBV5-5 VH CDR2

<400> 5

Trp Gly Asp Gly Asn Thr Asp Tyr Asn Ser Ala Leu Lys

1 5 10

<210> 6

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-TRBV5-5 VH CDR3

<400> 6

Ala Thr Leu Tyr Ala Met Asp Tyr

1 5

<210> 7

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-TRBV5-5 VL

<400> 7

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr

20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly

50 55 60







	35		40		45														
	Ala	Tyr	Ile	Ser	Ser	Gly	Ser	Ser	Thr	Ile	Tyr	Tyr	Ala	Asp	Thr	Leu			
	50					55						60							
	Lys	Gly	Arg	Phe	Thr	Ile	Ser	Arg	Asp	Asn	Pro	Lys	Asn	Thr	Leu	Phe			
	65					70					75				80				
	Leu	Gln	Met	Thr	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Tyr	Cys			
					85					90					95				
	Ala	Arg	Arg	Gly	Glu	Gly	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Ser			
				100					105					110					
	Val	Thr	Val	Ser	Ser														
				115															
<210>	17																		
<211>	11																		
<212>	PRT																		
<213>	人工																		
<220>																			
<223>	抗-CD3 VL CDR1																		
<400>	17																		
	Arg	Ala	Ser	Gln	Asp	Ile	Arg	Asn	Tyr	Leu	Asn								
	1			5						10									
<210>	18																		
<211>	8																		
<212>	PRT																		
<213>	人工																		
<220>																			
<223>	抗-CD3 VL CDR2																		
<220>																			
<221>	MISC_FEATURE																		
<222>	(1) .. (1)																		
<223>	位置1的Y是任选的																		
<400>	18																		
	Tyr	Tyr	Thr	Ser	Arg	Leu	His	Ser											
	1			5															
<210>	19																		
<211>	9																		
<212>	PRT																		
<213>	人工																		
<220>																			
<223>	抗-CD3 VL CDR3																		

<400> 19

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr

1 5

<210> 20

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 VH CDR1

<400> 20

Gly Tyr Thr Met Asn

1 5

<210> 21

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 VH CDR2

<400> 21

Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 22

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 VH CDR3

<400> 22

Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val

1 5 10

<210> 23

<211> 107

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 UCHT1 VL

<400> 23

Asp Ile Gln Met Thr Gln Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly

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

<210> 24

<211> 122

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 UCHT1 VH

<400> 24

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

<210> 25

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工  
 <220>  
 <223> 多肽接头  
 <400> 25  
 Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5  
 <210> 26  
 <211> 15  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 多肽接头  
 <400> 26  
 Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
 1 5 10 15  
 <210> 27  
 <211> 113  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 抗-TRBC1 VL  
 <400> 27  
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Arg Leu Val His Ser  
 20 25 30  
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser  
 35 40 45  
 Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Pro Gly Val Pro  
 50 55 60  
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile  
 65 70 75 80  
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Phe Cys Ser Gln Ser  
 85 90 95  
 Thr His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys  
 100 105 110  
 Arg  
 <210> 28  
 <211> 124

<212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 抗-TRBC1 VH  
 <400> 28  
 Glu Val Arg Leu Gln Gln Ser Gly Pro Asp Leu Ile Lys Pro Gly Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Tyr  
                   20                   25                   30  
 Val Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                   40                   45  
 Gly Phe Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Asp Ile Gln Ser Asn Glu Arg Phe  
                   50                   55                   60  
 Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ser Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Ala Arg Gly Ala Gly Tyr Asn Phe Asp Gly Ala Tyr Arg Phe Phe Asp  
                   100                   105                   110  
 Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
                   115                   120  
 <210> 29  
 <211> 111  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 抗-CD19 VL  
 <400> 29  
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp  
                   20                   25                   30  
 Gly Asp Ser Tyr Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Ile Pro Gly Gln Pro Pro  
                   35                   40                   45  
 Lys Leu Leu Ile Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Val Ser Gly Ile Pro Pro  
                   50                   55                   60  
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Asn Ile His  
 65                   70                   75                   80  
 Pro Val Glu Lys Val Asp Ala Ala Thr Tyr His Cys Gln Gln Ser Thr

	85		90		95
Glu Asp Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys					
	100		105		110
<210>	30				
<211>	124				
<212>	PRT				
<213>	人工				
<220>					
<223>	抗-CD19 VH				
<400>	30				
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ser					
1	5		10		15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Ser Tyr					
	20		25		30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile					
	35		40		45
Gly Gln Ile Trp Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Gly Lys Phe					
	50		55		60
Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Glu Ser Ser Ser Thr Ala Tyr					
65	70		75		80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys					
	85		90		95
Ala Arg Arg Glu Thr Thr Thr Val Gly Arg Tyr Tyr Tyr Ala Met Asp					
	100		105		110
Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser					
	115		120		
<210>	31				
<211>	20				
<212>	DNA				
<213>	人工				
<220>					
<223>	编码靶向TRA恒定区的crRNA的核酸				
<400>	31				
agagtctctc agctgtaca					
<210>	32				
<211>	20				
<212>	DNA				
<213>	人工				
<220>					

<223> 编码靶向TRB恒定区的crRNA的核酸	
<400> 32	
agaaggtggc cgagaccctc	20
<210> 33	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 33	
gcctaagttg gggagaccac	20
<210> 34	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 34	
gaagcaagga aacagcctgc	20
<210> 35	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 35	
tcgctgtgtt tgagccatca ga	22
<210> 36	
<211> 22	
<212> DNA	
<213> 人工	
<220>	
<223> PCR引物	
<400> 36	
atgaaccaca ggtgcccaat tc	22
<210> 37	
<211> 20	
<212> DNA	
<213> 人工	

<220>  
 <223> 编码靶向CD19的sgRNA的核酸  
 <400> 37  
 cgaggaacct ctagtggatga 20  
 <210> 38  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 抗-TRBV5-5 VL  
 <220>  
 <221> MISC\_FEATURE  
 <222> (79) .. (79)  
 <223> 残基78处的X是焦赖氨酸  
 <400> 38  
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Ser Ala Ser Gln Gly Ile Ser Asn Tyr  
 20 25 30  
 Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Thr Ser Ser Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Phe Thr Ile Ser Ser Leu Xaa Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Ser Lys Leu Pro Arg  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Gln Ile Thr  
 100 105  
 <210> 39  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 抗-TRBV5-5 VH  
 <400> 39  
 Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Arg Pro Ser Gln  
 1 5 10 15  
 Ser Leu Ser Ile Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Ala Tyr

	20		25		30														
Gly	Val	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Pro	Pro	Gly	Arg	Gly	Leu	Glu	Trp	Leu				
	35						40					45							
Gly	Met	Ile	Trp	Gly	Asp	Gly	Asn	Thr	Asp	Tyr	Asn	Ser	Ala	Leu	Lys				
	50						55					60							
Ser	Arg	Val	Thr	Met	Leu	Lys	Asp	Thr	Ser	Lys	Asn	Gln	Phe	Ser	Leu				
65					70					75					80				
Arg	Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala				
					85					90					95				
Arg	Asp	Arg	Val	Thr	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Met	Asp	Tyr	Trp	Gly	Gln				
			100					105							110				
Gly	Ser	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser												
	115						120												
<210>	40																		
<211>	106																		
<212>	PRT																		
<213>	人工																		
<220>																			
<223>	抗-TRBV12 VL																		
<400>	40																		
Asp	Ile	Gln	Met	Thr	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val				
1				5					10					15					
Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Ser	Ser	Val	Asn	Tyr				
			20					25					30						
Ile	Tyr	Trp	Tyr	Gln	Gln	Thr	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile				
			35					40					45						
Tyr	Tyr	Thr	Ser	Asn	Leu	Ala	Pro	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly				
			50			55						60							
Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Tyr	Thr	Phe	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro				
65					70					75					80				
Glu	Asp	Ile	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Phe	Thr	Ser	Ser	Pro	Phe	Thr				
					85					90					95				
Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Lys	Leu	Gln	Ile	Thr										
			100					105											
<210>	41																		
<211>	117																		
<212>	PRT																		
<213>	人工																		
<220>																			



<210> 43  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 抗-CD3 UCHT1v9 VH  
 <400> 43  
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr  
                   20                   25                   30  
 Thr Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
                   35                   40                   45  
 Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe  
                   50                   55                   60  
 Lys Asp Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Ala Arg Ser Gly Tyr Tyr Gly Asp Ser Asp Trp Tyr Phe Asp Val Trp  
                   100                   105                   110  
 Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
                   115                   120  
 <210> 44  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 抗-CD3 VL CDR1  
 <400> 44  
 Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn  
 1                   5                   10  
 <210> 45  
 <211> 10  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 抗-CD3 VL CDR1  
 <400> 45

Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 46

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 VL CDR1

<400> 46

Arg Ser Ser Thr Gly Ala Val Thr Thr Ser Asn Tyr Ala Asn

1 5 10

<210> 47

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 VL CDR1

<400> 47

Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn

1 5 10

<210> 48

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 VL CDR2

<400> 48

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser

1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 VL CDR2

<400> 49

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser

1 5

<210> 50

<211> 7  
<212> PRT  
<213> 人工  
<220>  
<223> 抗-CD3 VL CDR2  
<400> 50  
Gly Thr Asn Lys Arg Ala Pro  
1                   5  
<210> 51  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工  
<220>  
<223> 抗-CD3 VL CDR3  
<400> 51  
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
1                   5  
<210> 52  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工  
<220>  
<223> 抗-CD3 VL CDR3  
<400> 52  
Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr  
1                   5  
<210> 53  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工  
<220>  
<223> 抗-CD3 VL CDR3  
<400> 53  
Ala Leu Trp Tyr Ser Asn Leu Trp Val  
1                   5  
<210> 54  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 VH CDR1

<400> 54

Arg Tyr Thr Met His

1                    5

<210> 55

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 VH CDR1

<400> 55

Thr Tyr Ala Met Asn

1                    5

<210> 56

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 VH CDR2

<400> 56

Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe Lys

1                    5                    10                    15

<210> 57

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 VH CDR2

<400> 57

Arg Ile Arg Ser Lys Tyr Asn Asn Tyr Ala Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser

1                    5                    10                    15

Val Lys Asp

<210> 58

<211> 17

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 VH CDR2

<400> 58

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

Gly

<210> 59

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 VH CDR3

<400> 59

Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr  
1 5 10

<210> 60

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 VH CDR3

<400> 60

His Gly Asn Phe Gly Asn Ser Tyr Val Ser Trp Phe Ala Tyr  
1 5 10

<210> 61

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 L2K-07 VL

<400> 61

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Tyr Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu  
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
 85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys  
 100 105

<210> 62

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 L2K-07 VH

<400> 62

Asp Ile Lys Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
 20 25 30

Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
 35 40 45

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

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

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

Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly  
 100 105 110

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 63

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 OKT3 VL

<400> 63

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Arg Trp Ile Tyr

35	40	45	
Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala His Phe Arg Gly Ser			
50	55	60	
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Gly Met Glu Ala Glu			
65	70	75	80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Phe Thr			
	85	90	95
Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Asn			
	100	105	
<210>	64		
<211>	119		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	抗-CD3 OKT3 VH		
<400>	64		
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala			
1	5	10	15
Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr			
	20	25	30
Thr Met His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile			
	35	40	45
Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Asn Gln Lys Phe			
50	55	60	
Lys Asp Lys Ala Thr Leu Thr Thr Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys			
	85	90	95
Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
	115		
<210>	65		
<211>	109		
<212>	PRT		
<213>	人工		
<220>			
<223>	抗-CD3 hXR32 VL		
<400>	65		

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

<210> 66

<211> 125

<212> PRT

<213> 人工

<220>

<223> 抗-CD3 hXR32 VH

<400> 66

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

<210> 67

<211> 106

<212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 抗-CD3 diL2K VL  
 <400> 67  
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1                   5                   10                   15  
 Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met  
                   20                   25                   30  
 Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr  
                   35                   40                   45  
 Asp Thr Ser Lys Val Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser  
                   50                   55                   60  
 Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu  
 65                   70                   75                   80  
 Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
                   85                   90                   95  
 Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
                   100                   105  
 <210> 68  
 <211> 119  
 <212> PRT  
 <213> 人工  
 <220>  
 <223> 抗-CD3 diL2K VH  
 <400> 68  
 Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala  
 1                   5                   10                   15  
 Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg Tyr  
                   20                   25                   30  
 Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile  
                   35                   40                   45  
 Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser Val  
                   50                   55                   60  
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr  
 65                   70                   75                   80  
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys  
                   85                   90                   95  
 Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

	100		105		110	
Thr Thr Val	Thr Val Ser Ser					
	115					
<210>	69					
<211>	16					
<212>	PRT					
<213>	人工					
<220>						
<223>	多肽接头					
<400>	69					
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Val Asp						
1	5		10		15	

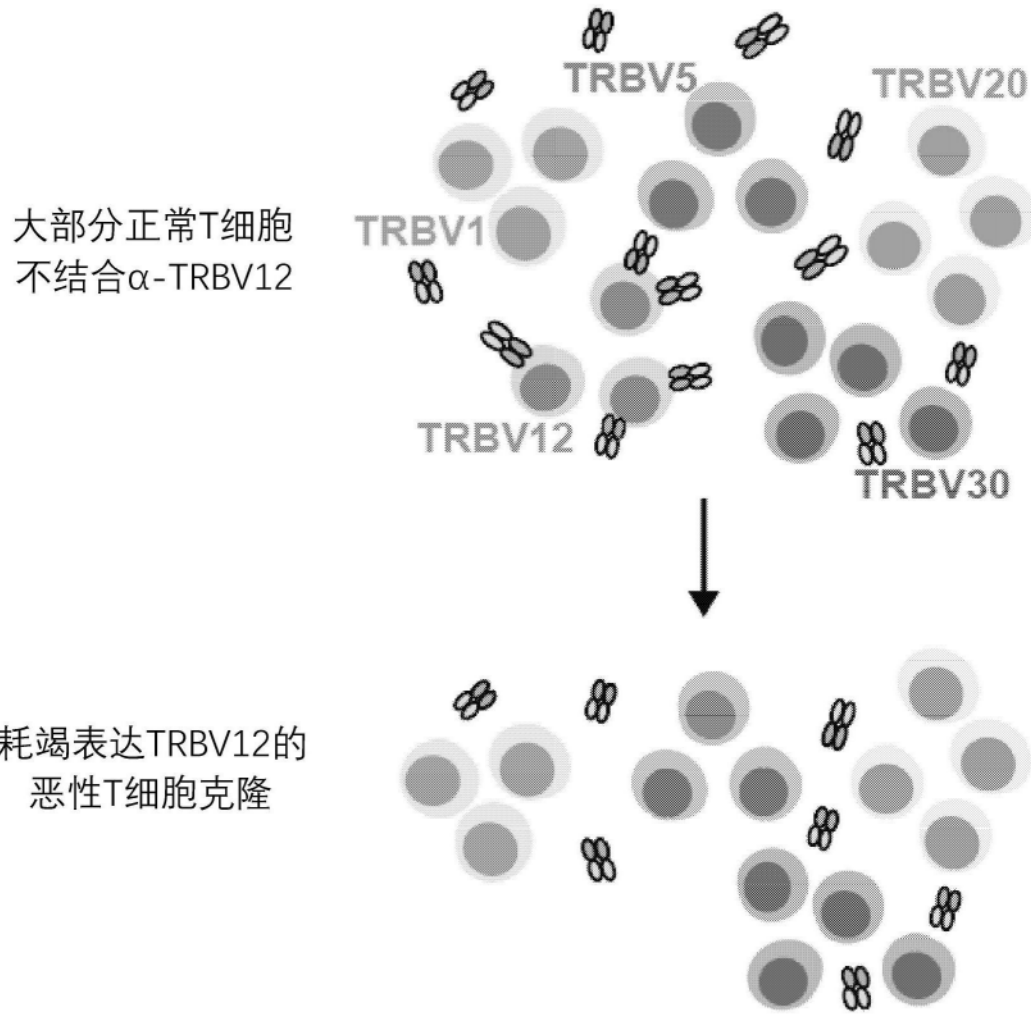


图1A

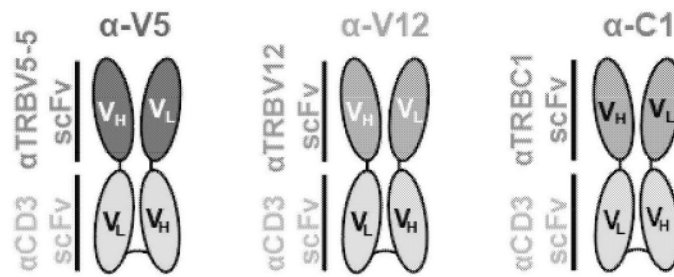


图1B

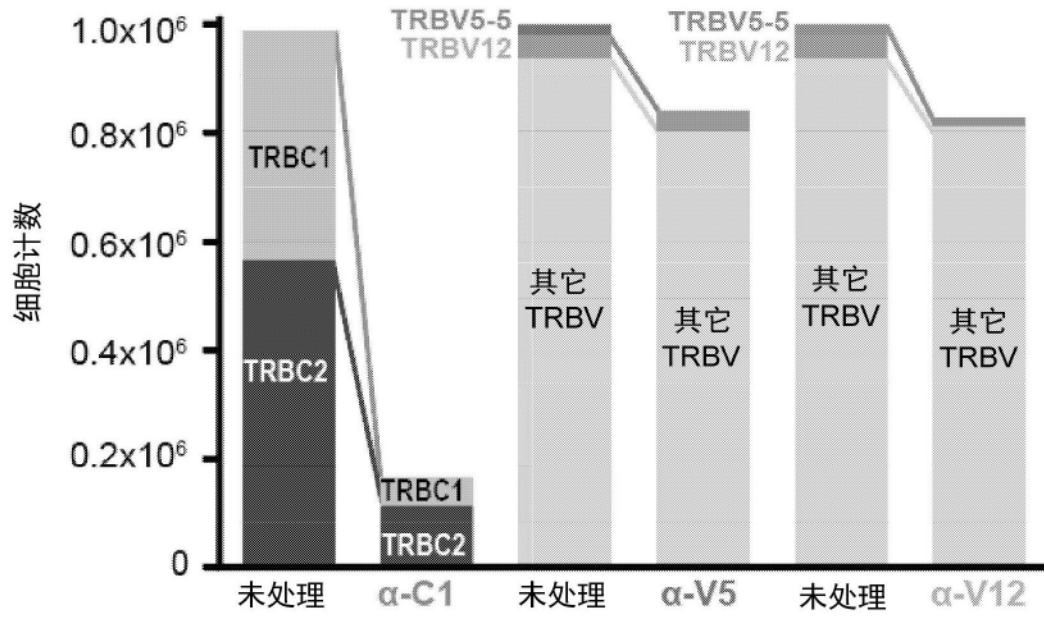


图1C

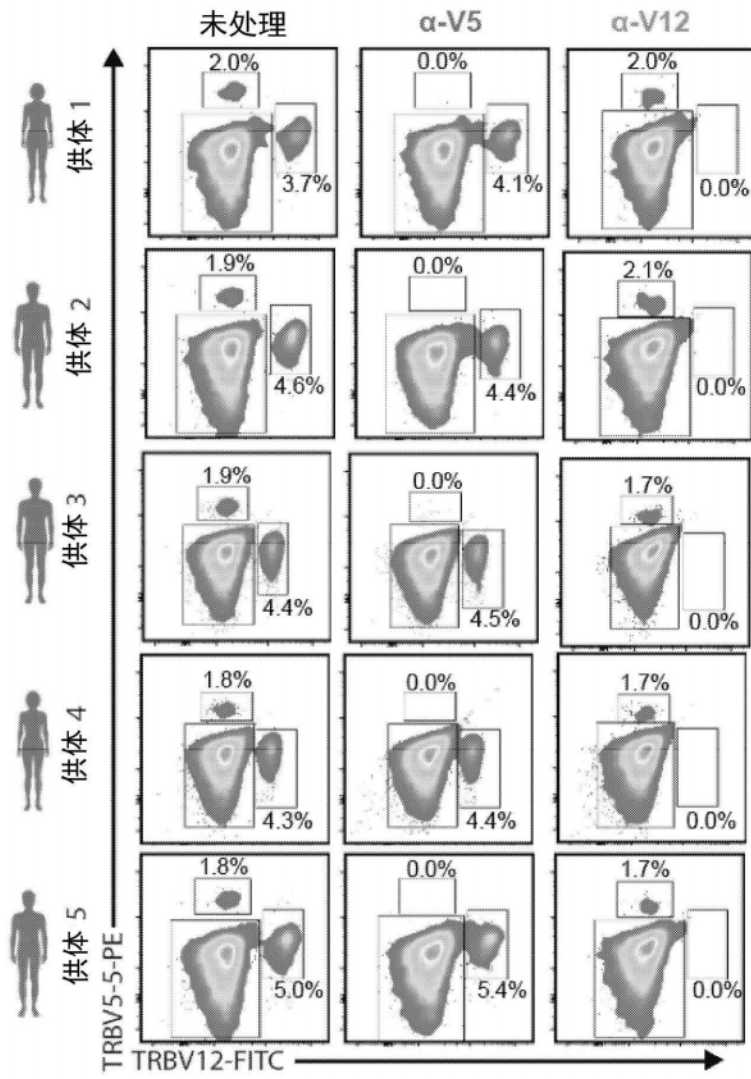


图 1D

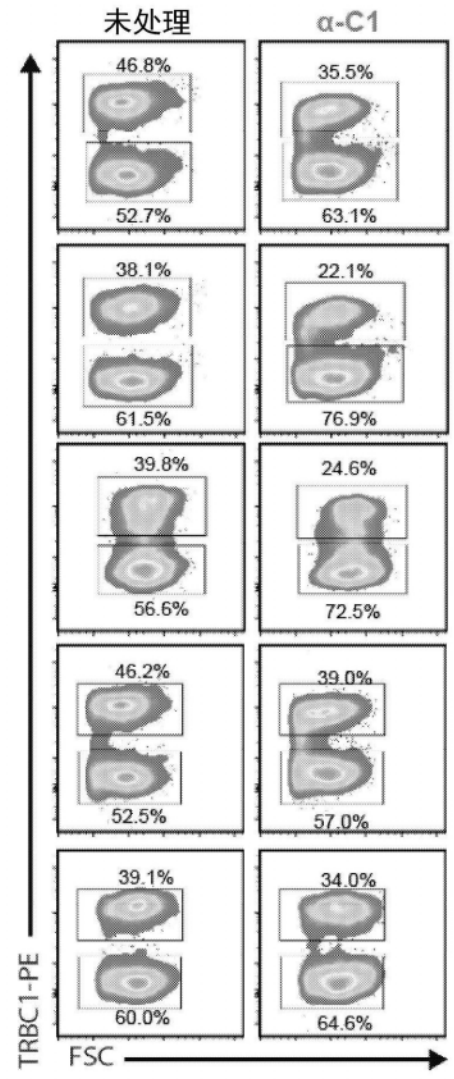


图 1E

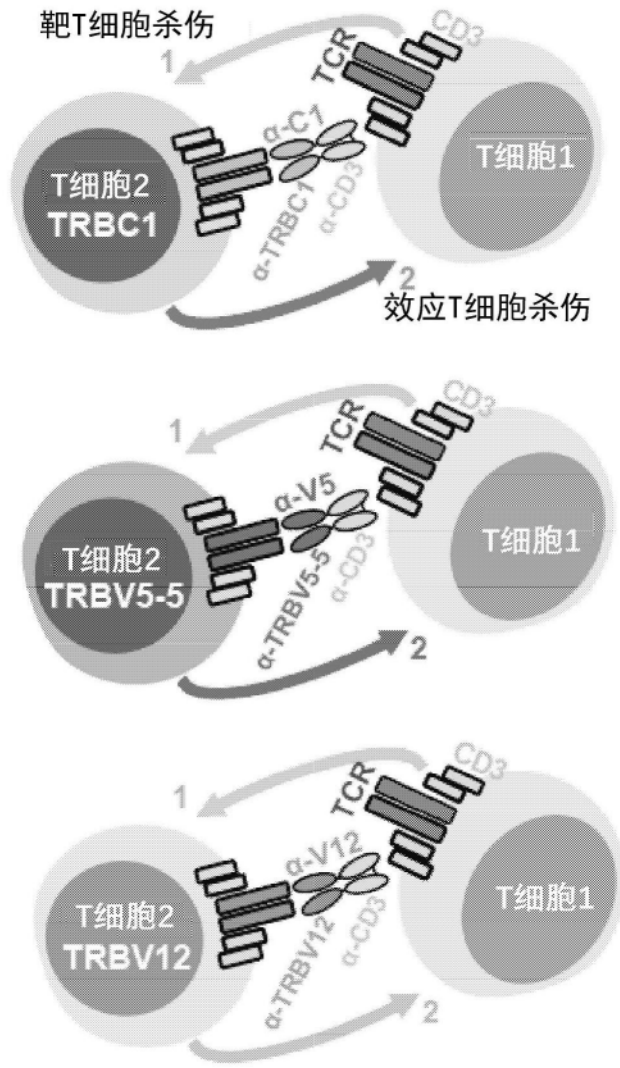


图2A

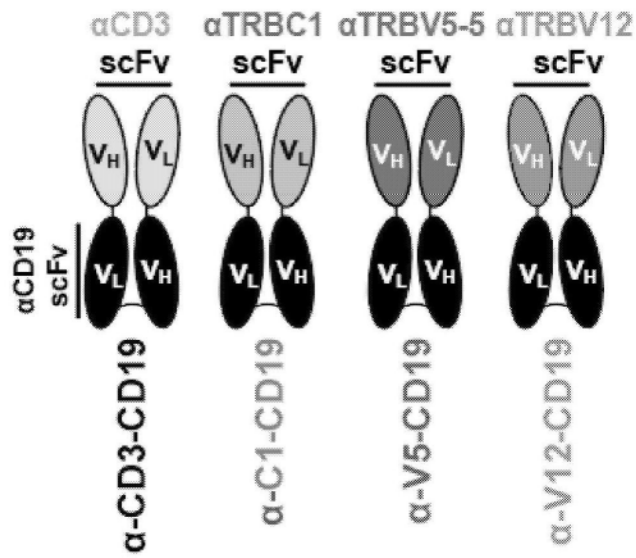


图2B

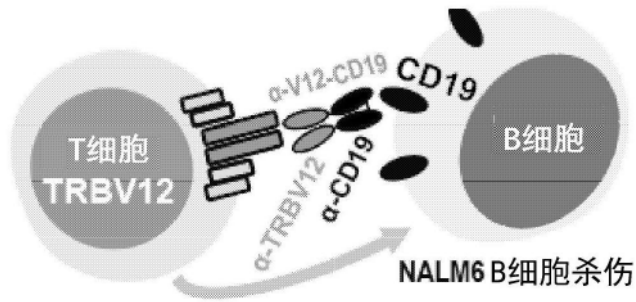


图2C

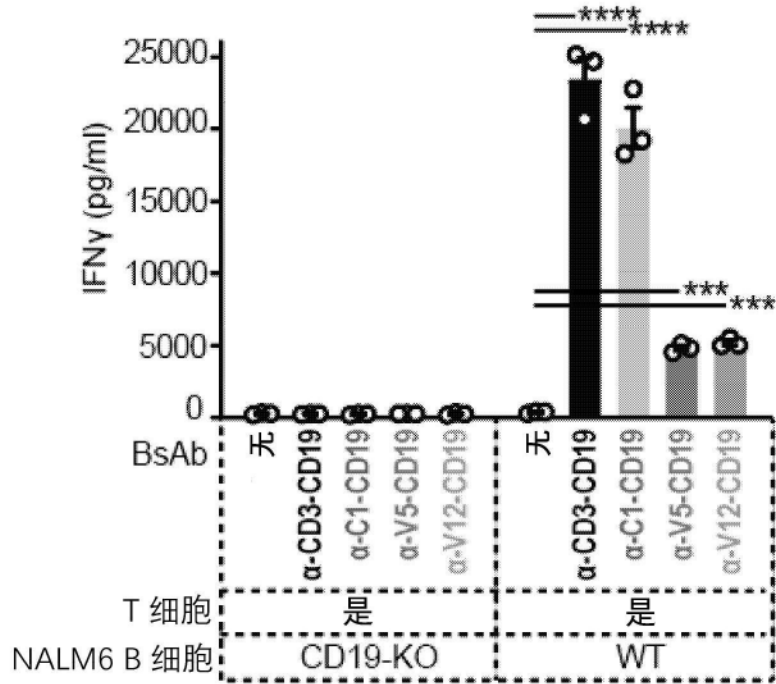


图2D

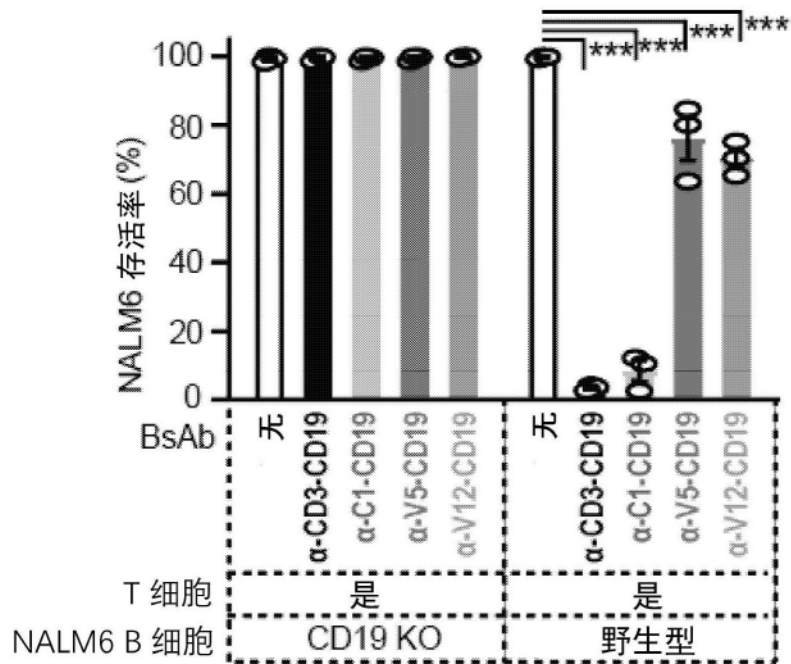


图2E

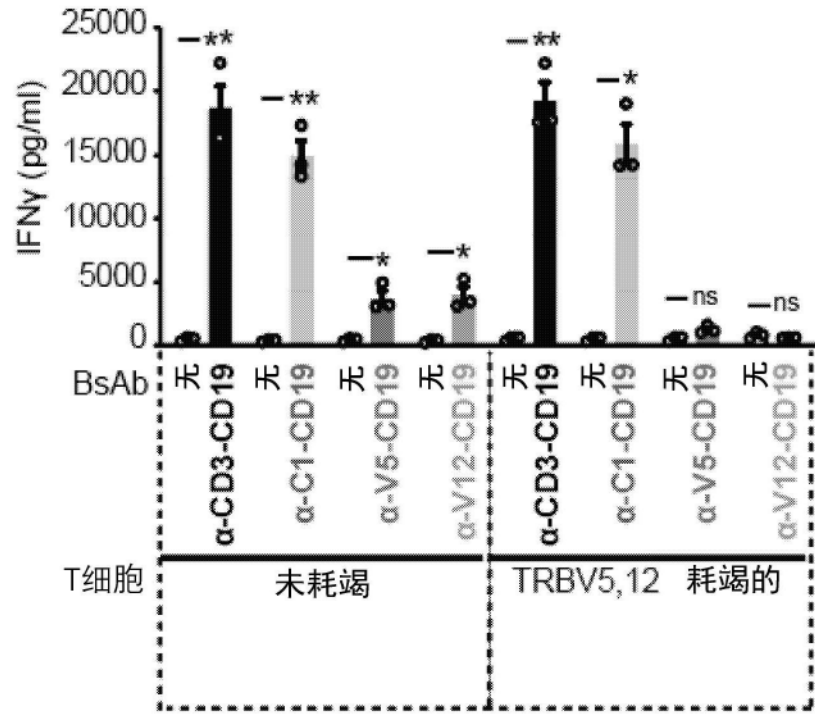


图2F

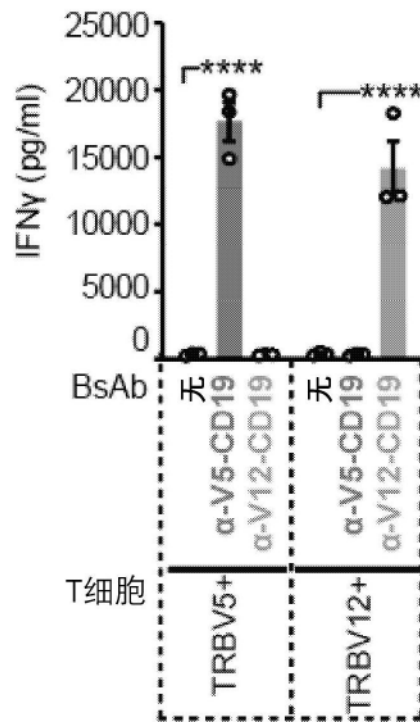


图2G

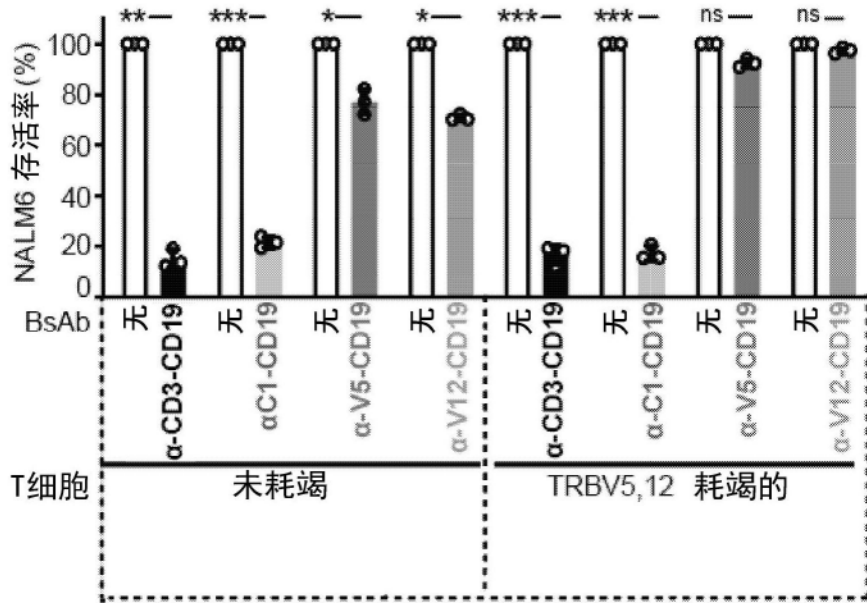


图2H

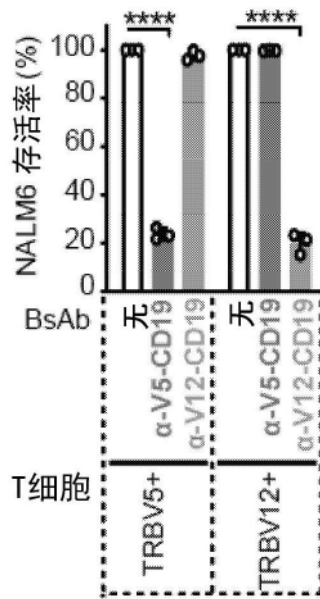


图2I

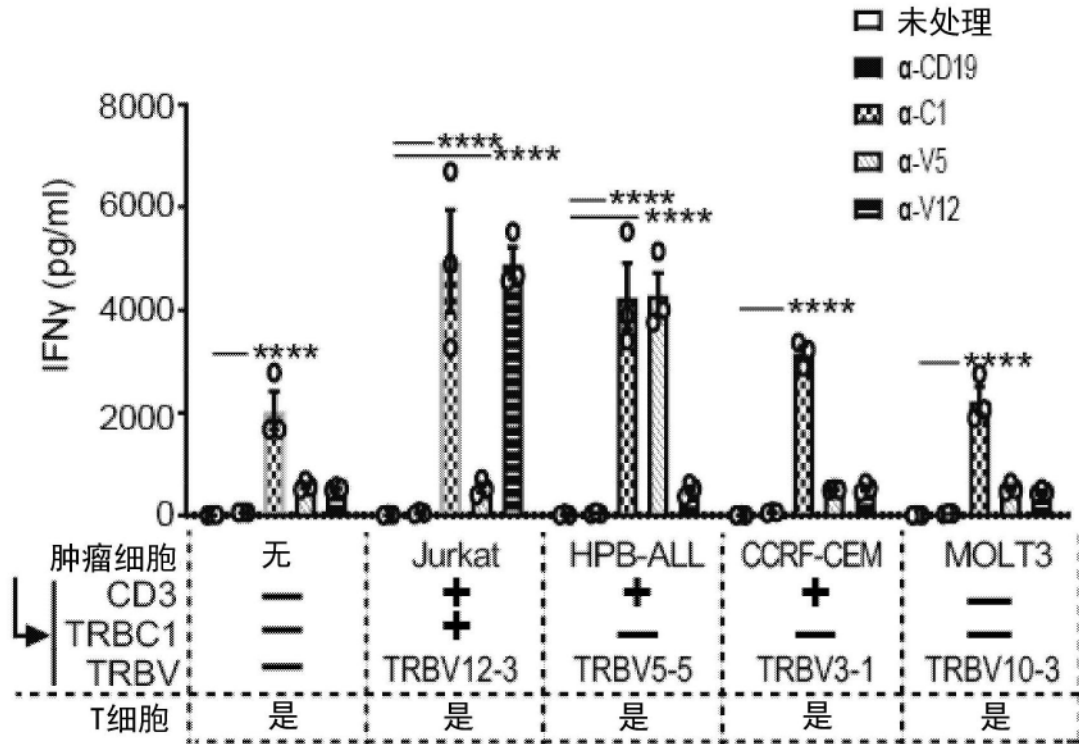


图3A

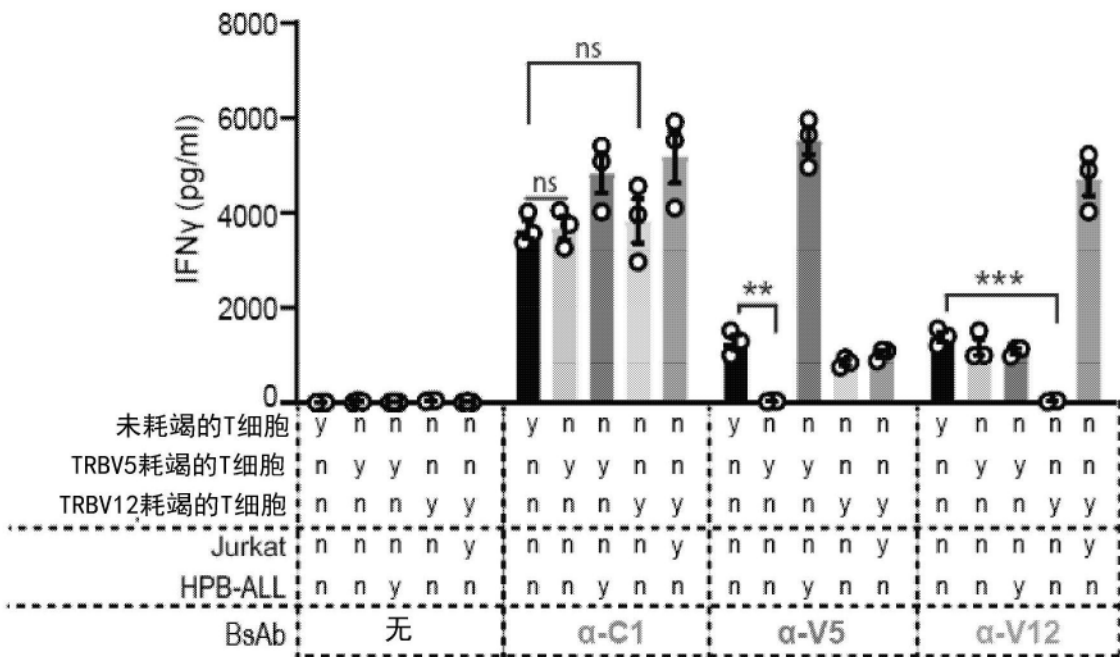


图3B

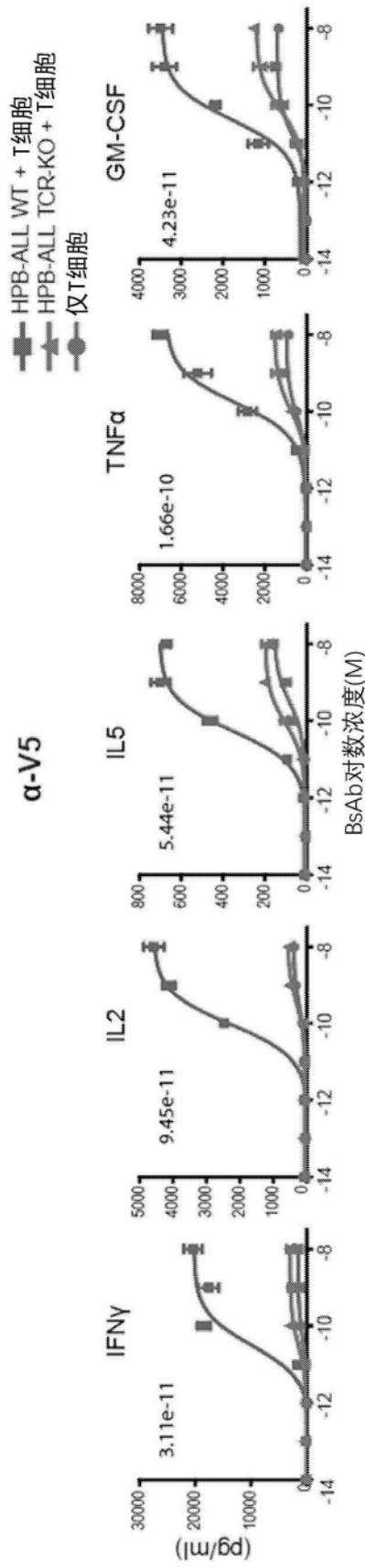


图3C

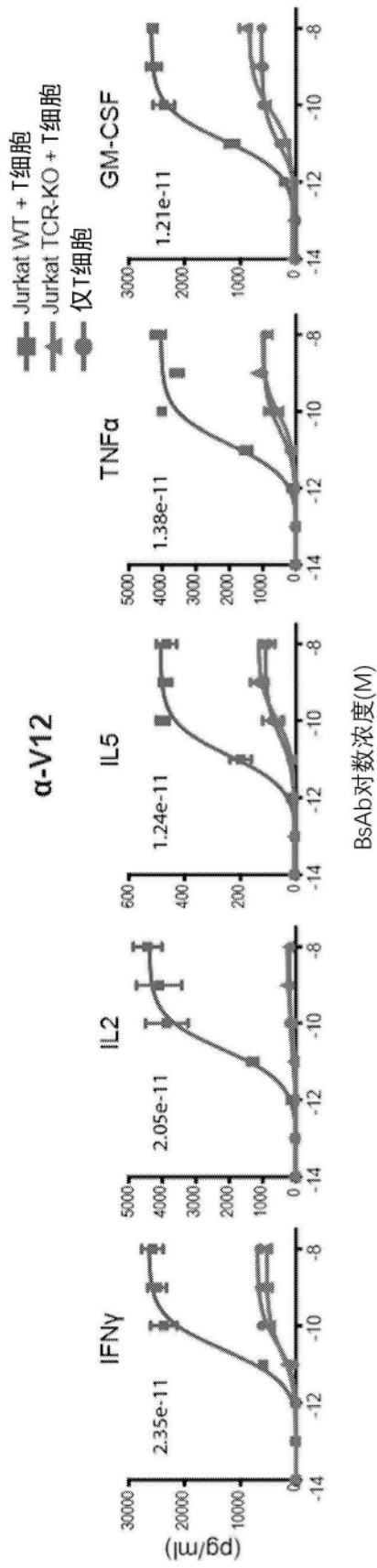


图3D

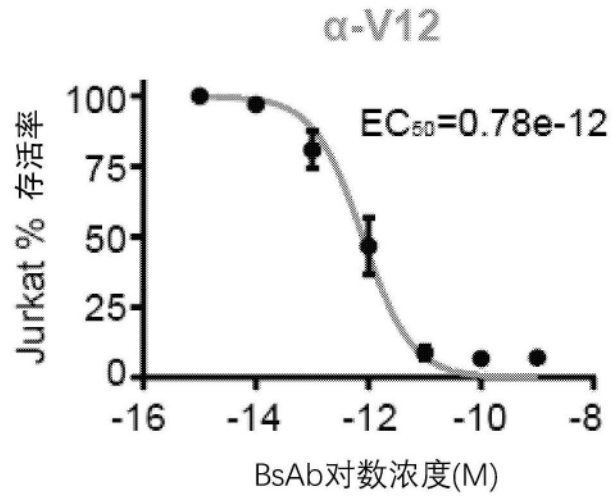


图4A

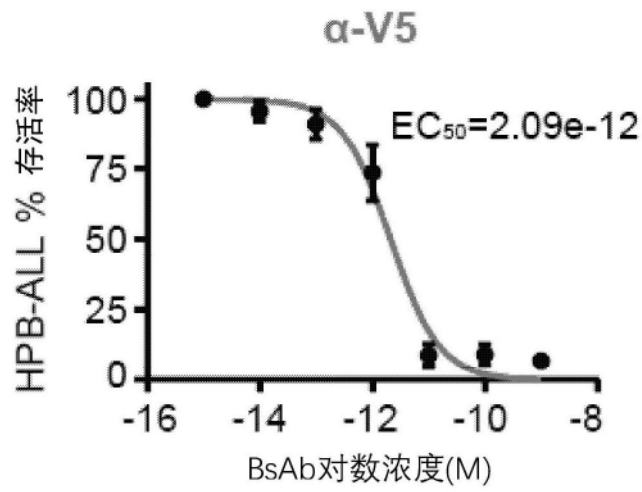


图4B

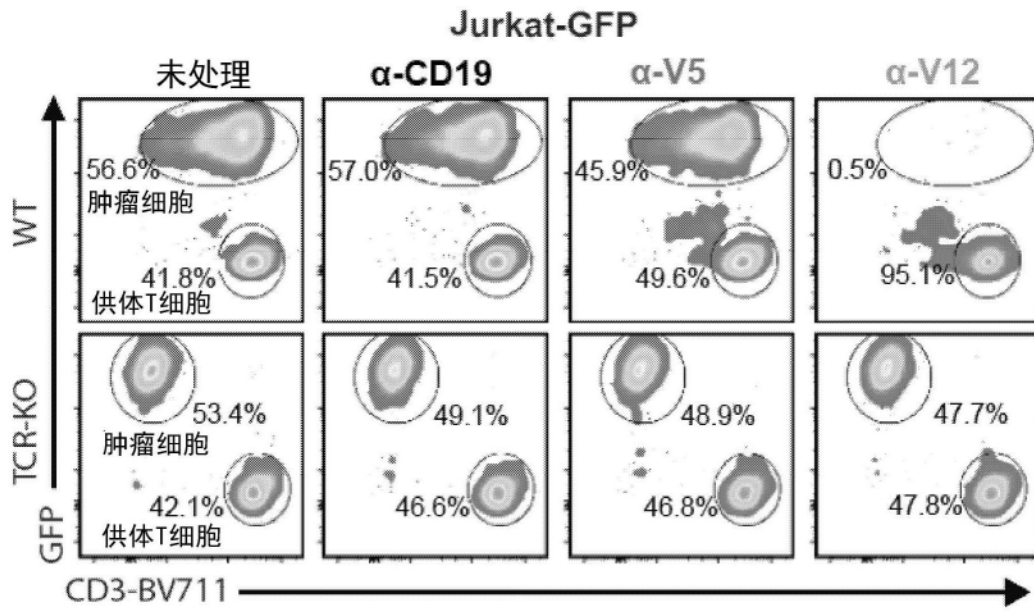


图4C

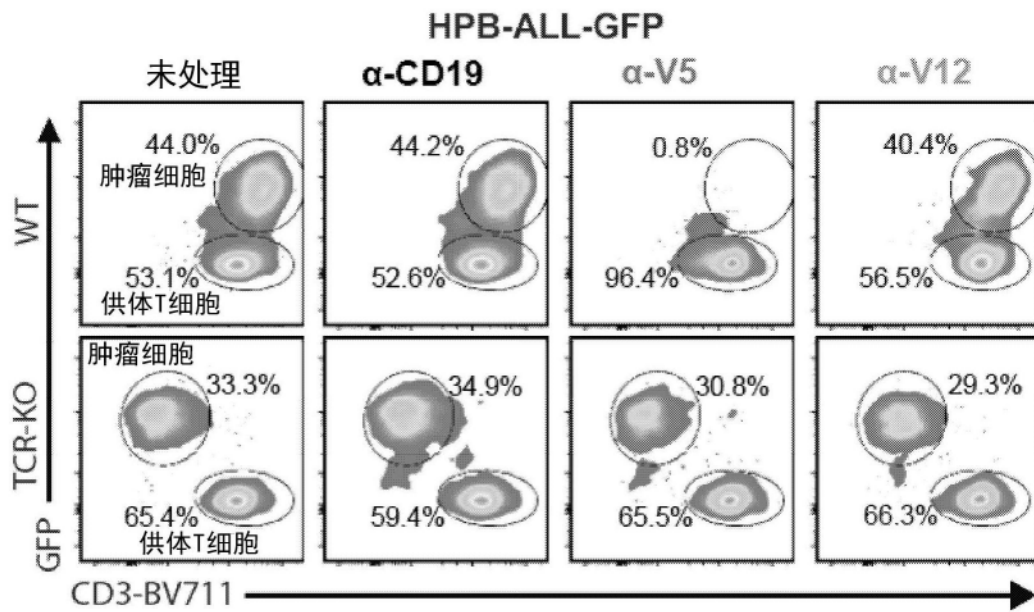


图4D

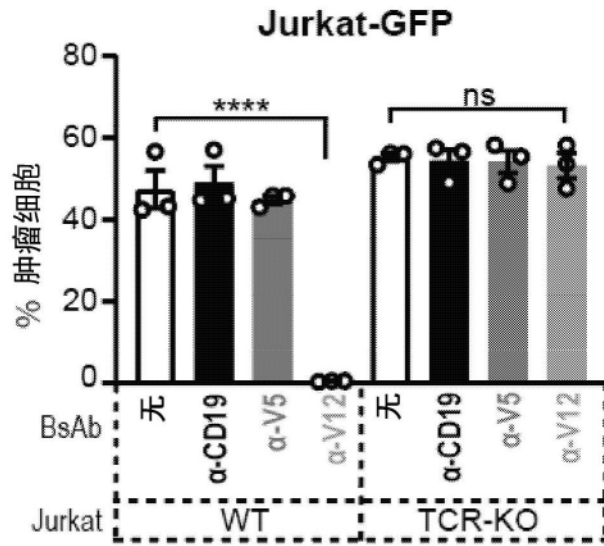


图4E

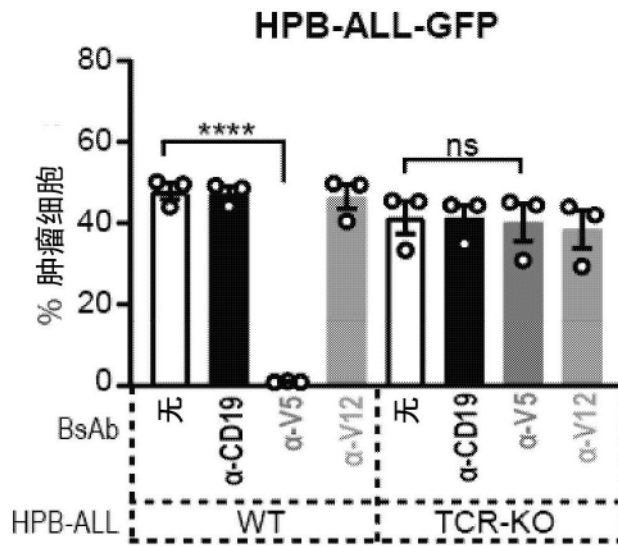


图4F

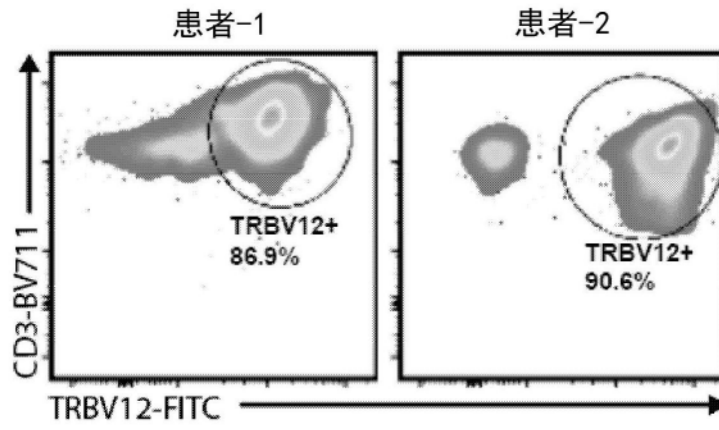


图5A

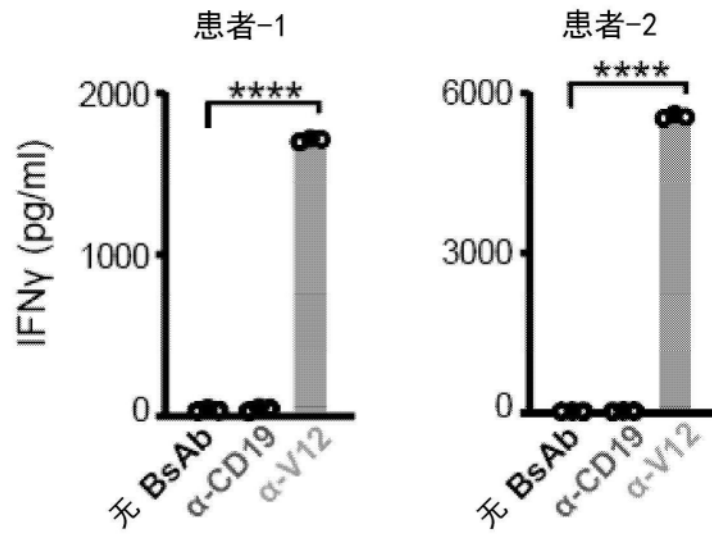


图5B

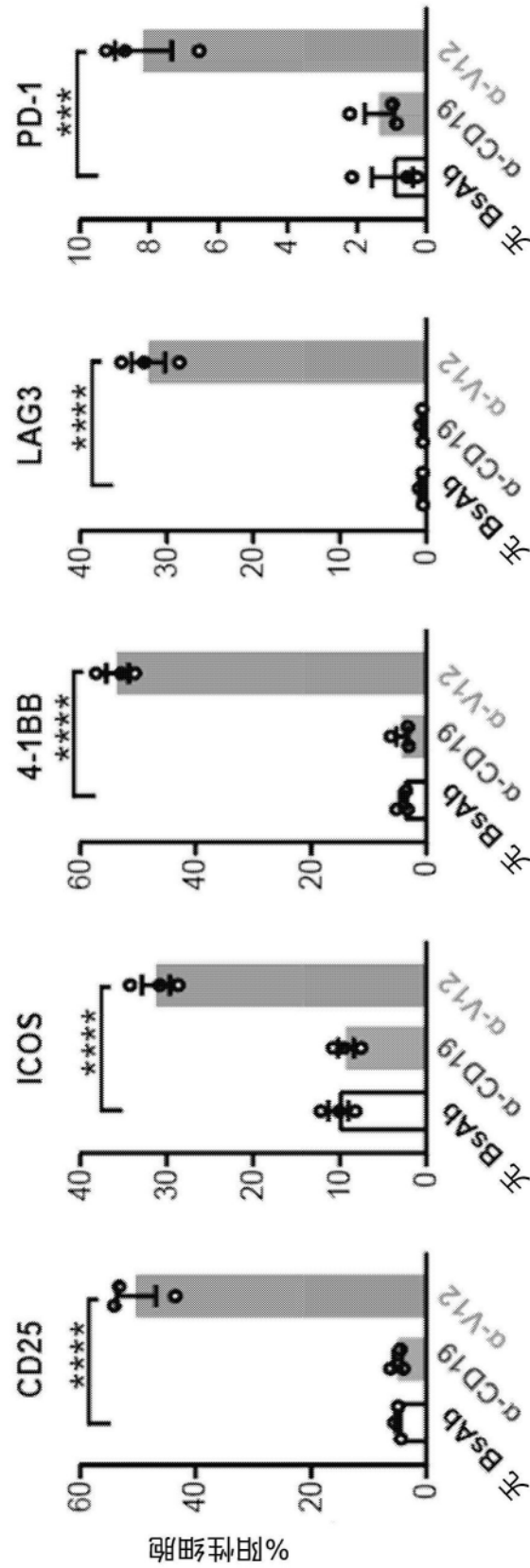


图5C

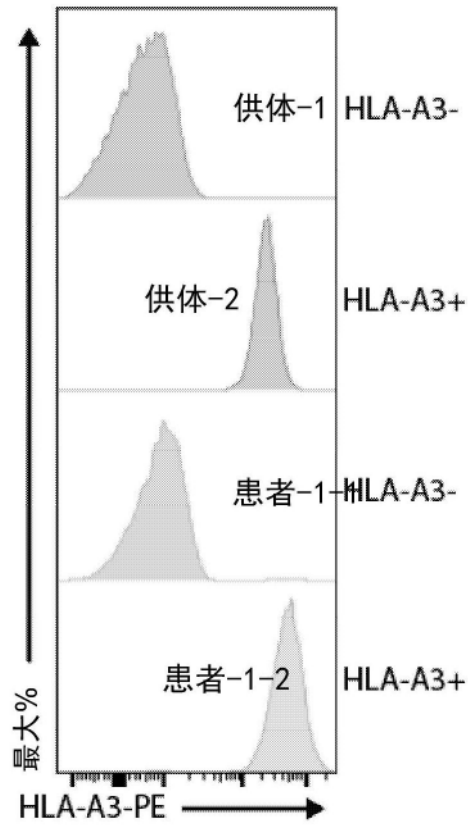


图5D

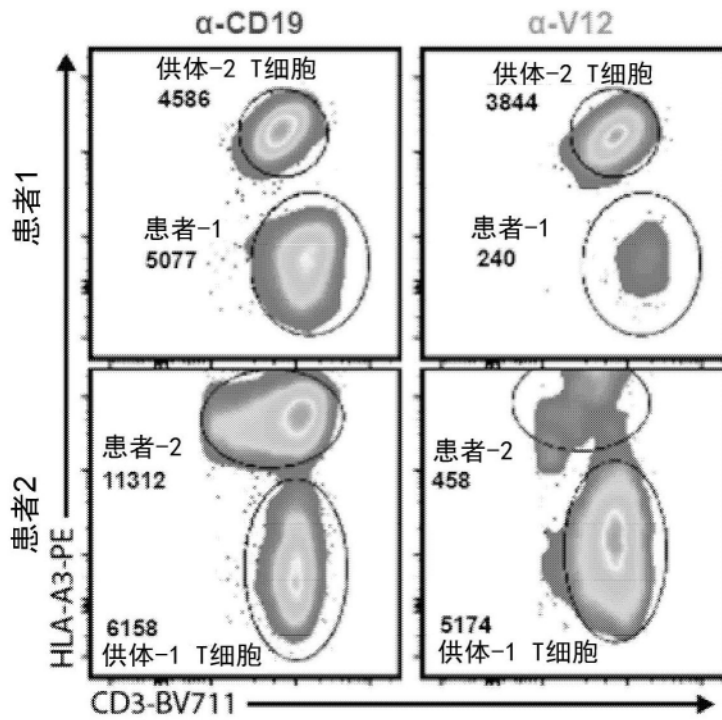


图5E

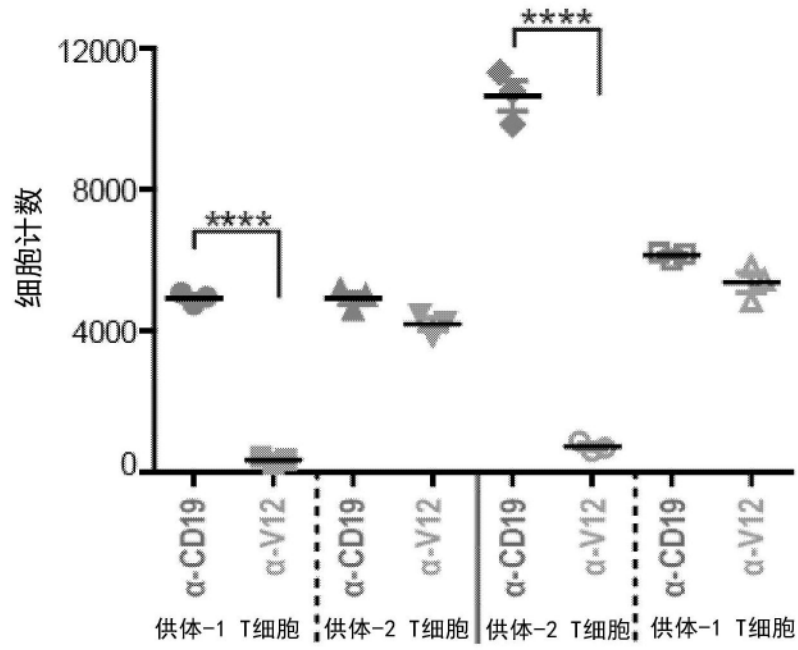


图5F

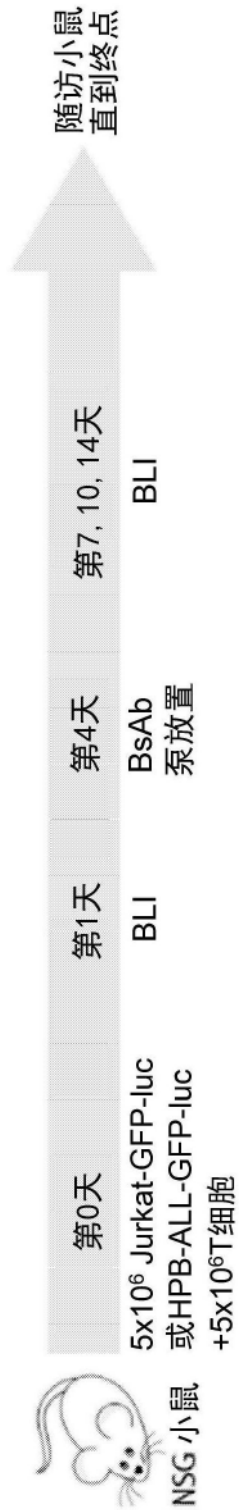


图6A

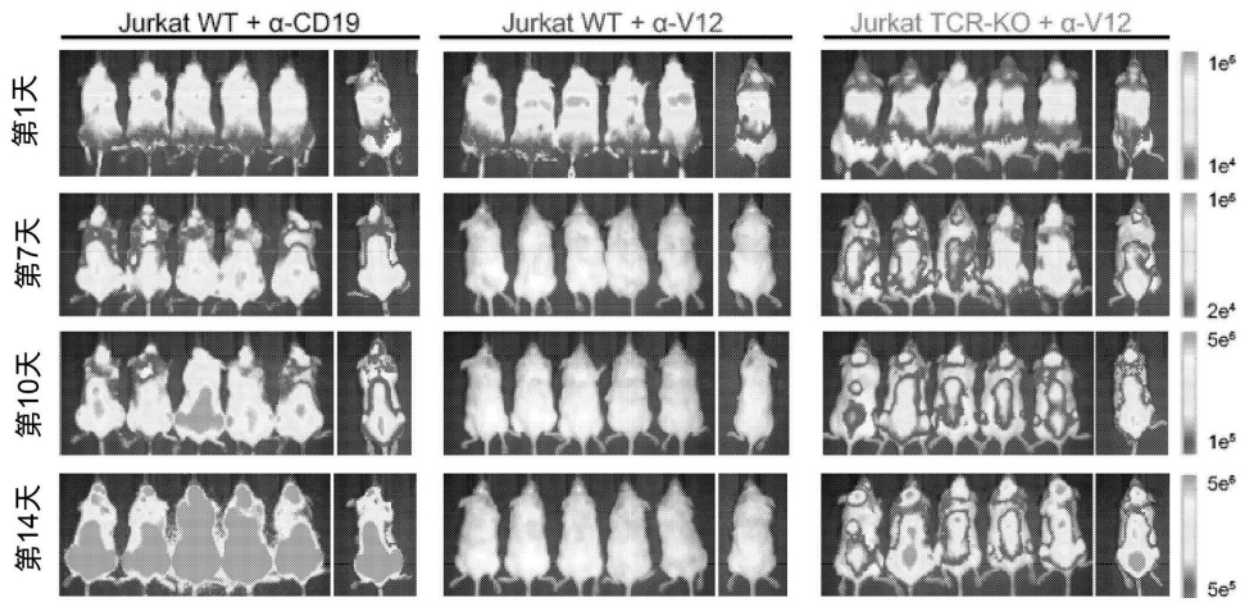


图6B

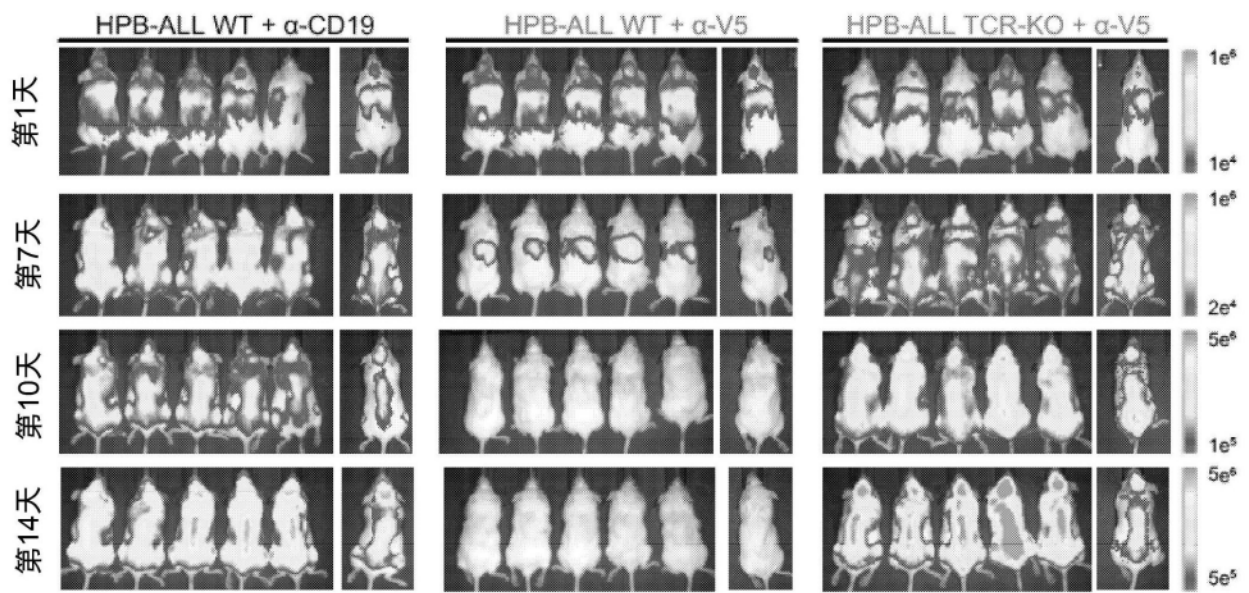


图6C

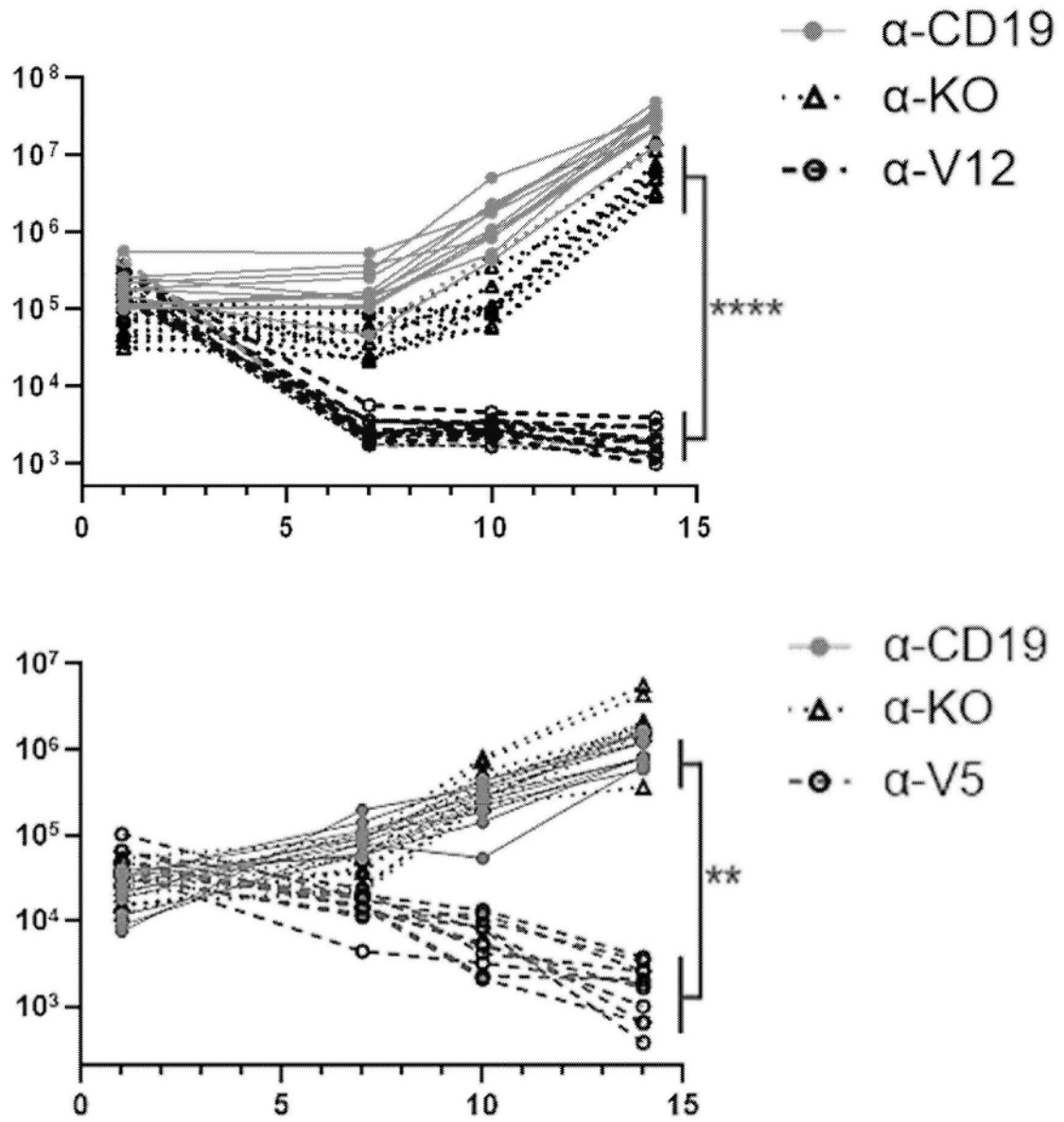


图6D

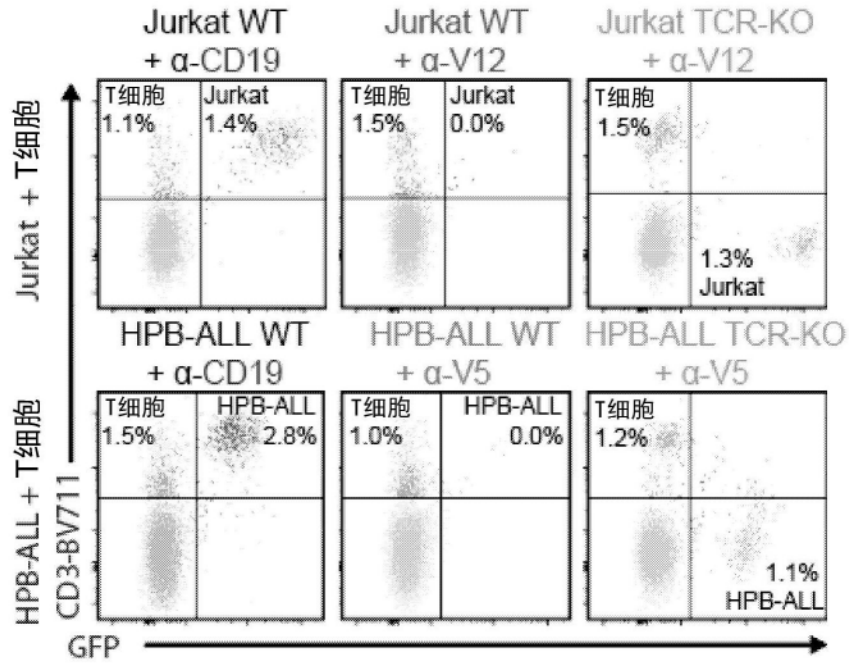


图6E

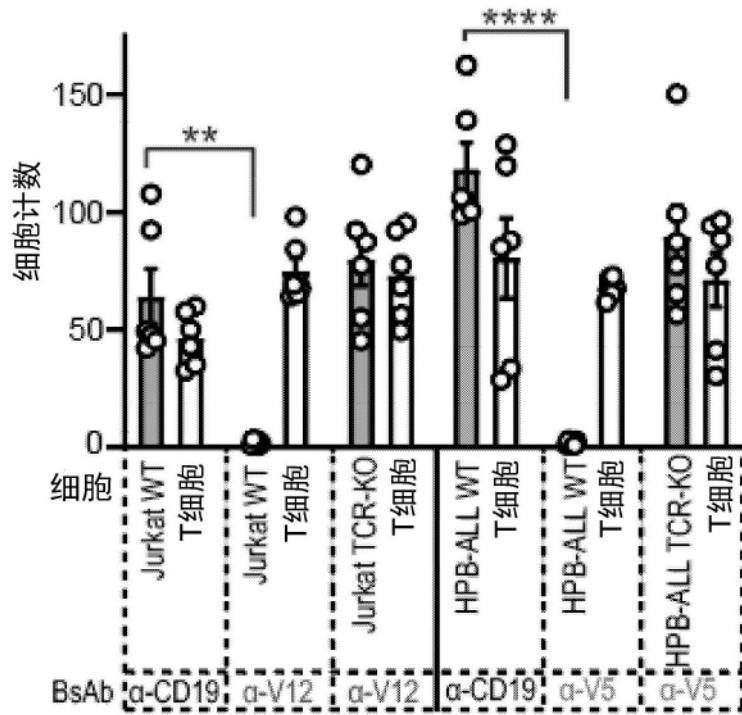


图6F

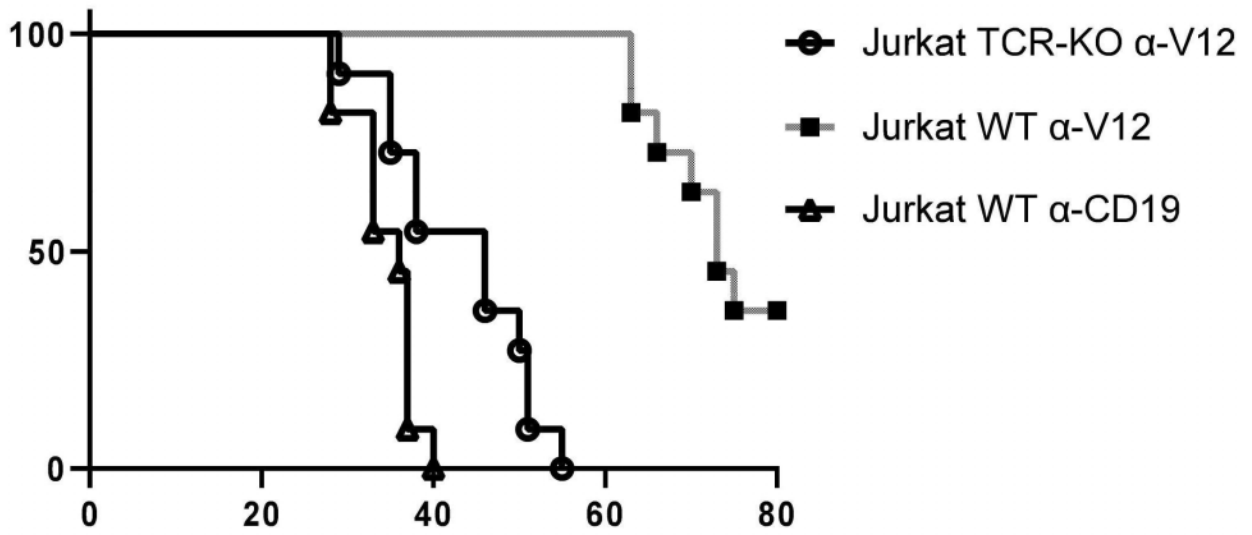


图6G

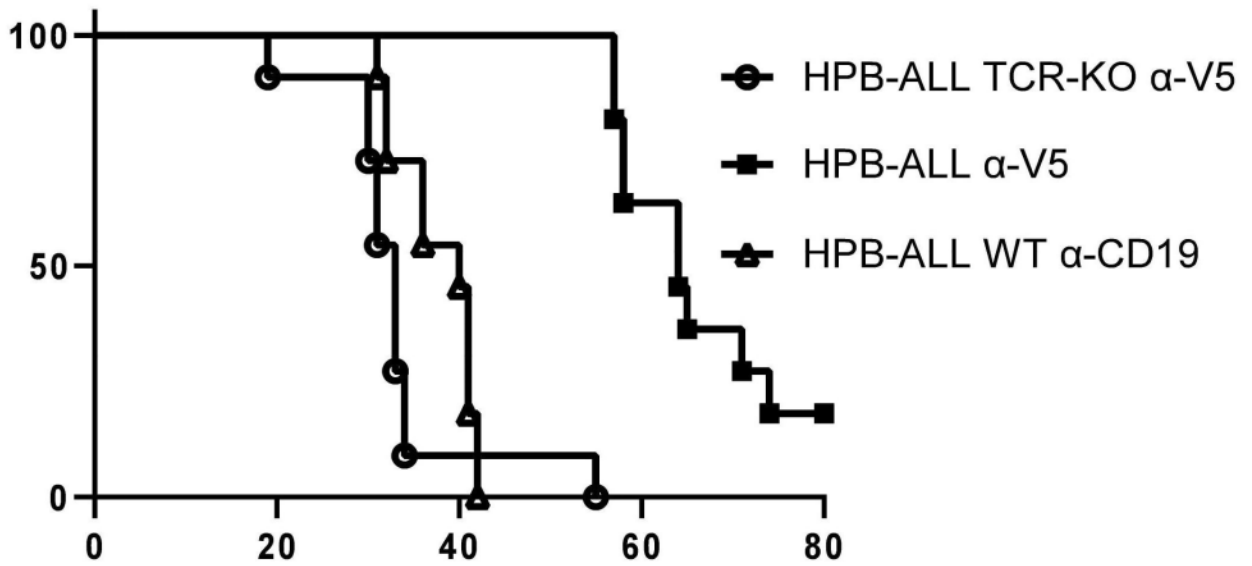


图6H

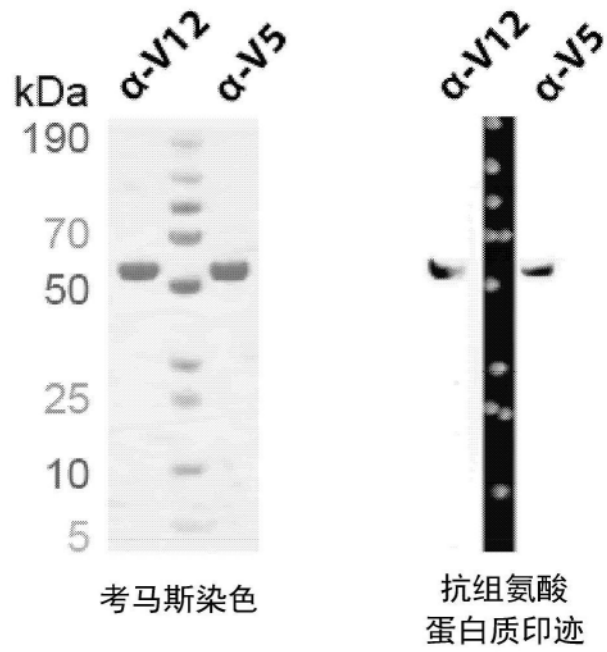


图7A

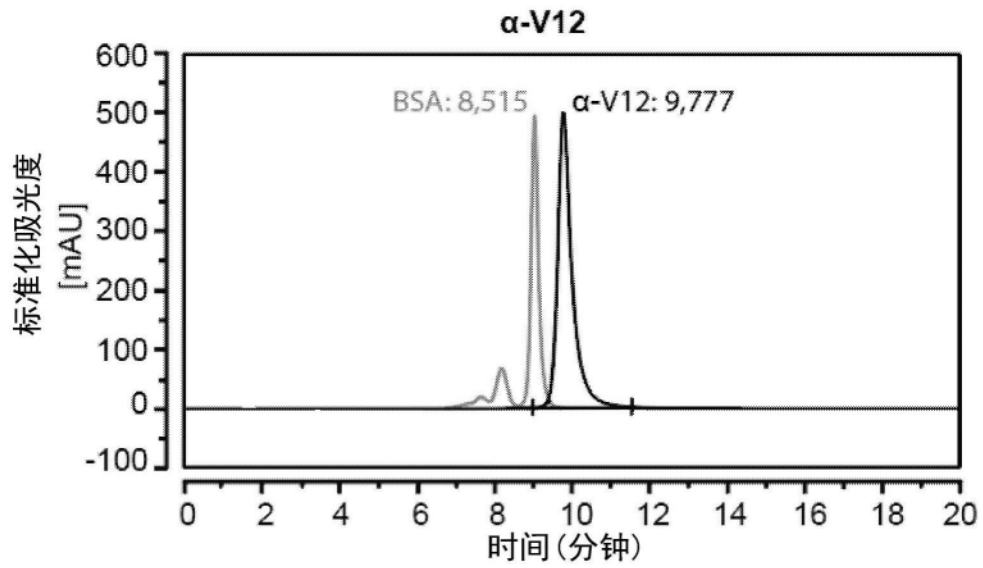


图7B

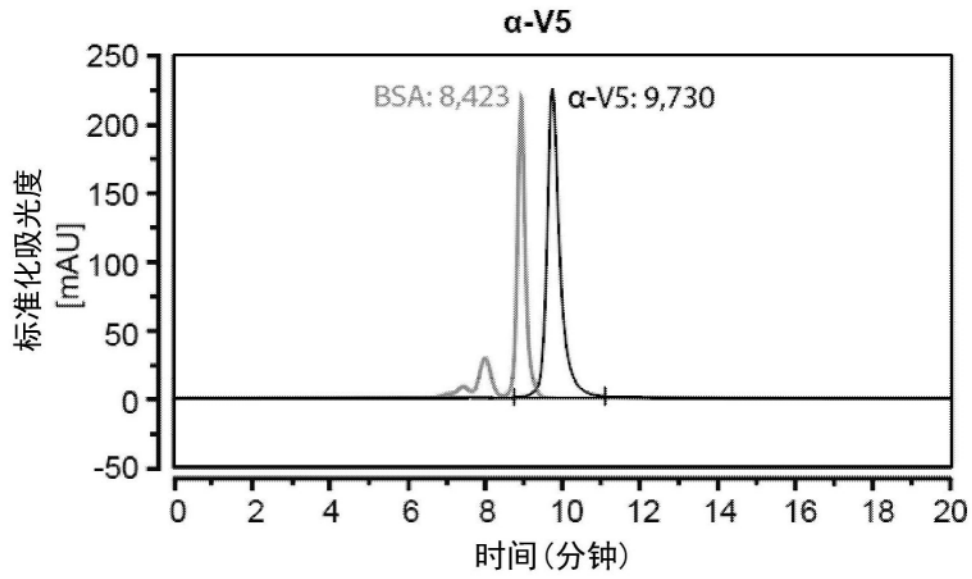


图7C

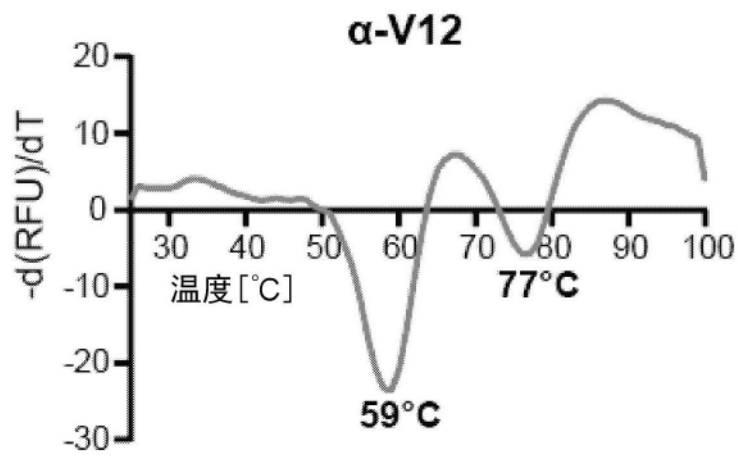


图7D

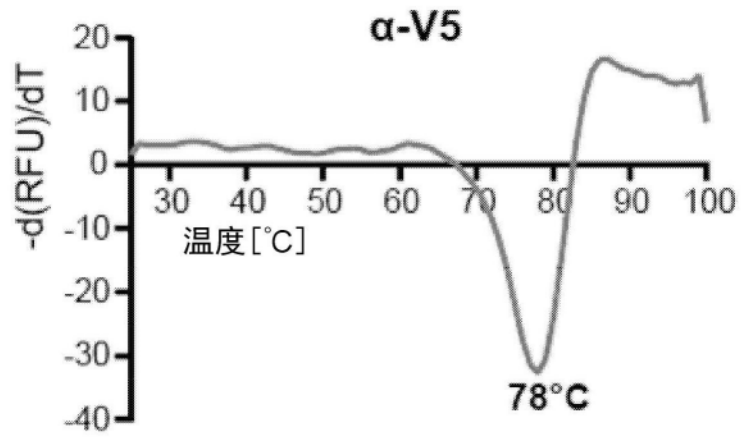


图7E

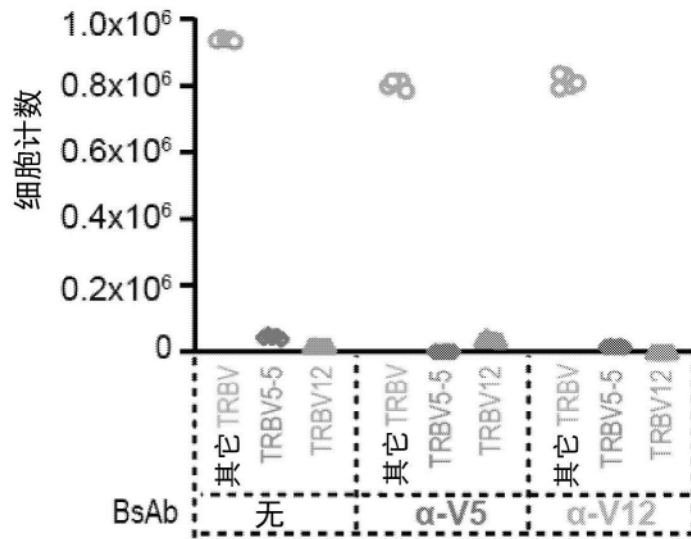


图8A

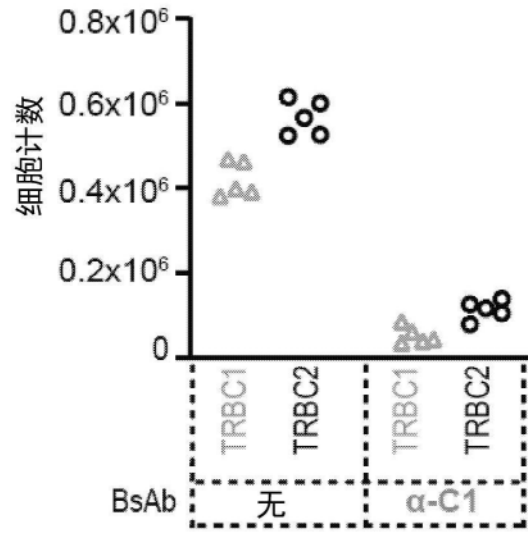


图8B

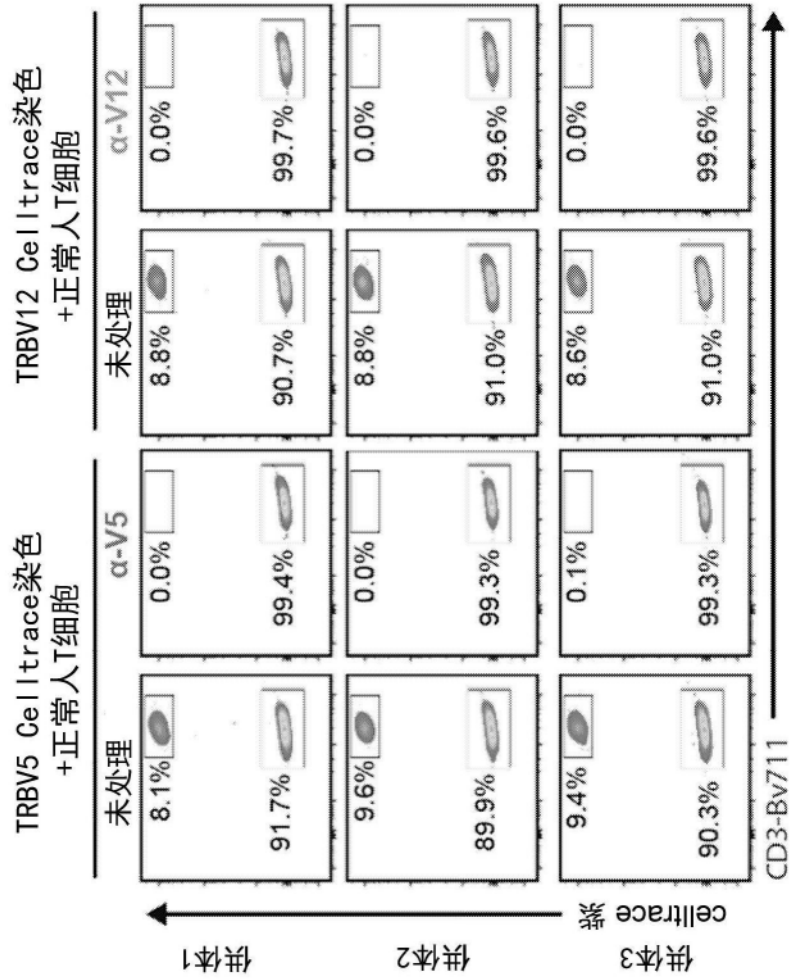


图8C

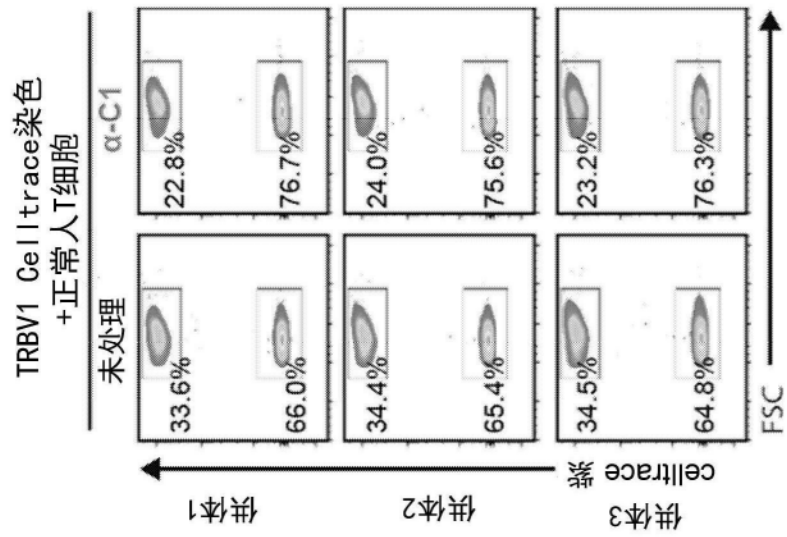


图8D

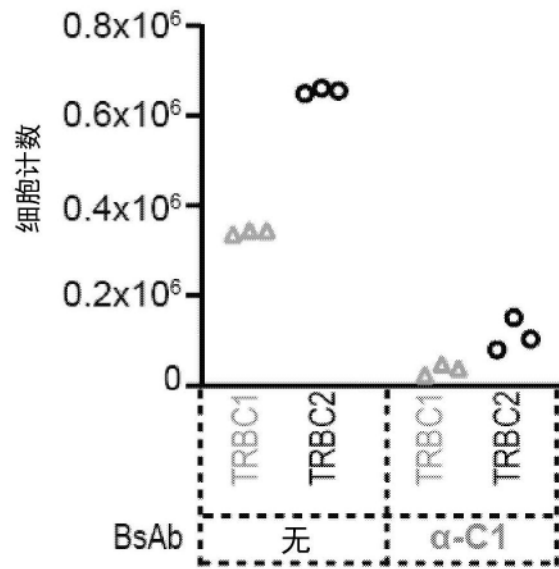


图8E

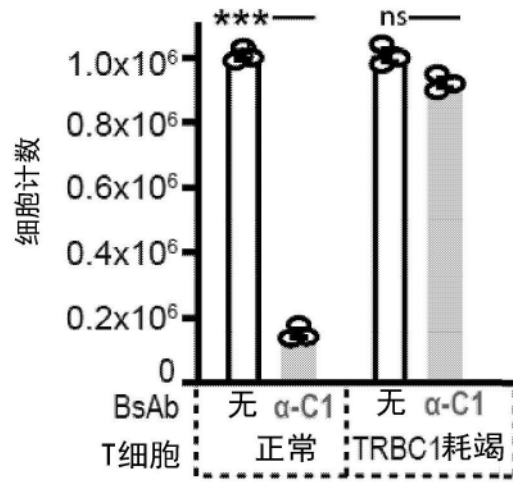


图8F

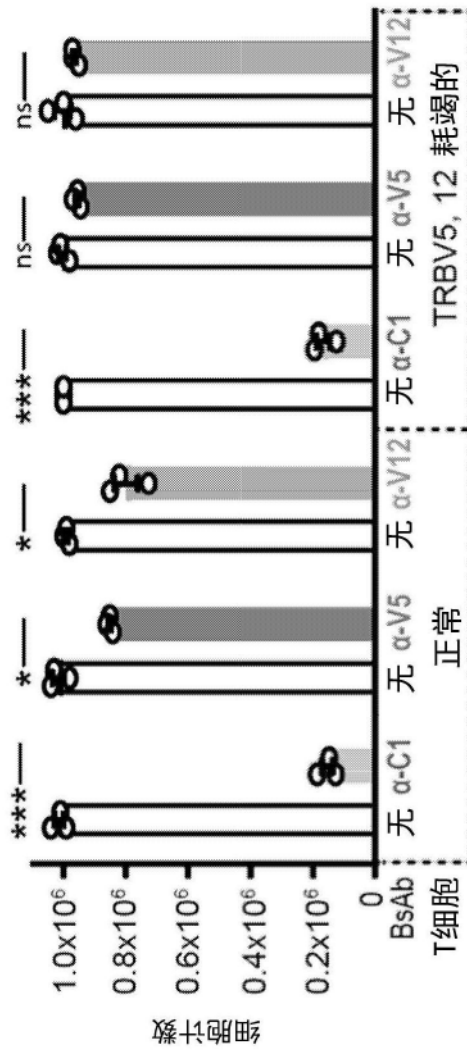


图8G

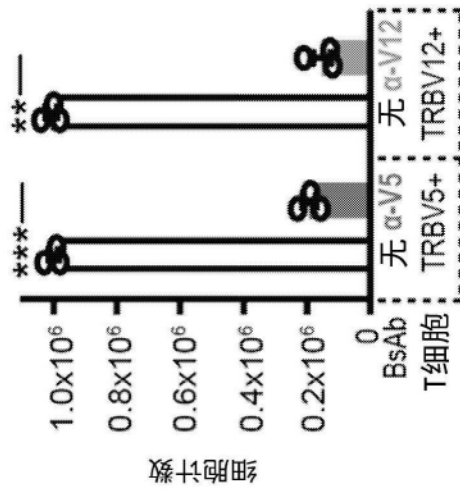


图8H

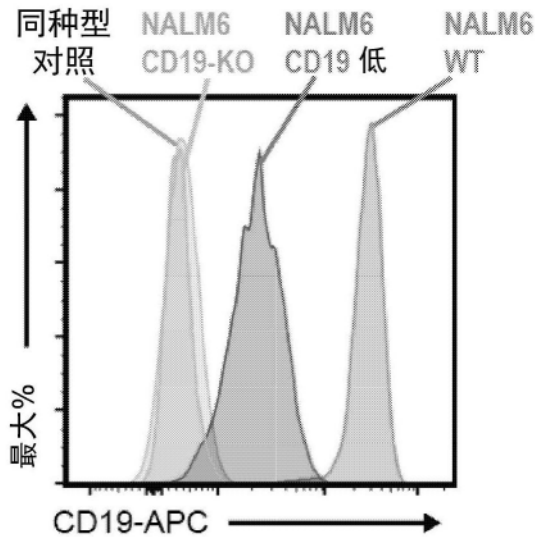


图9A

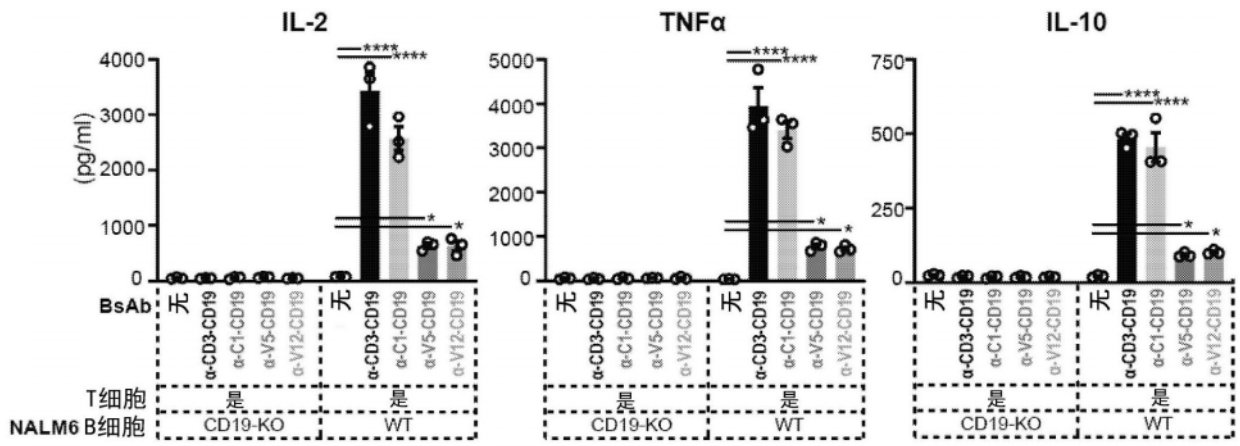


图9B

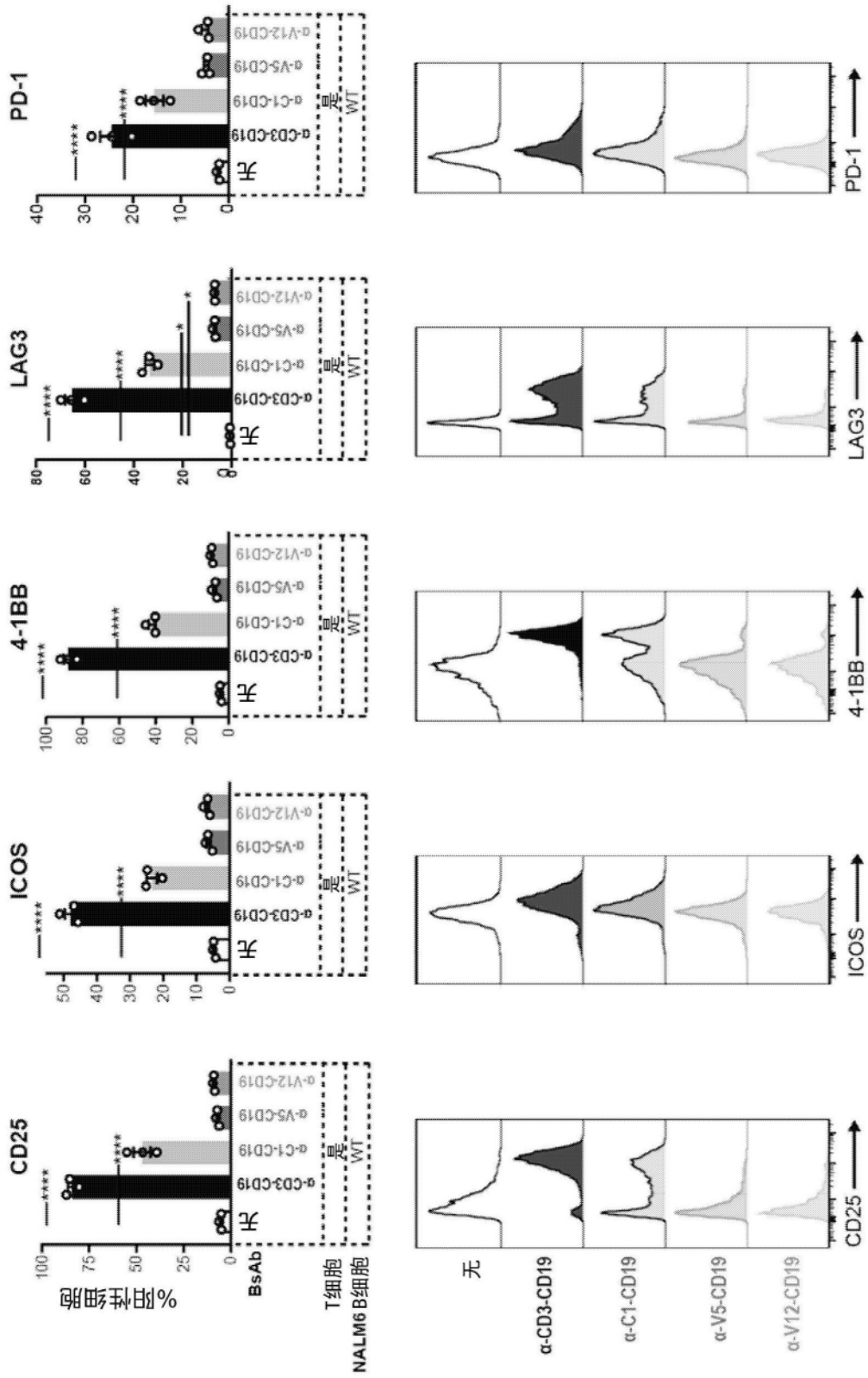


图9C

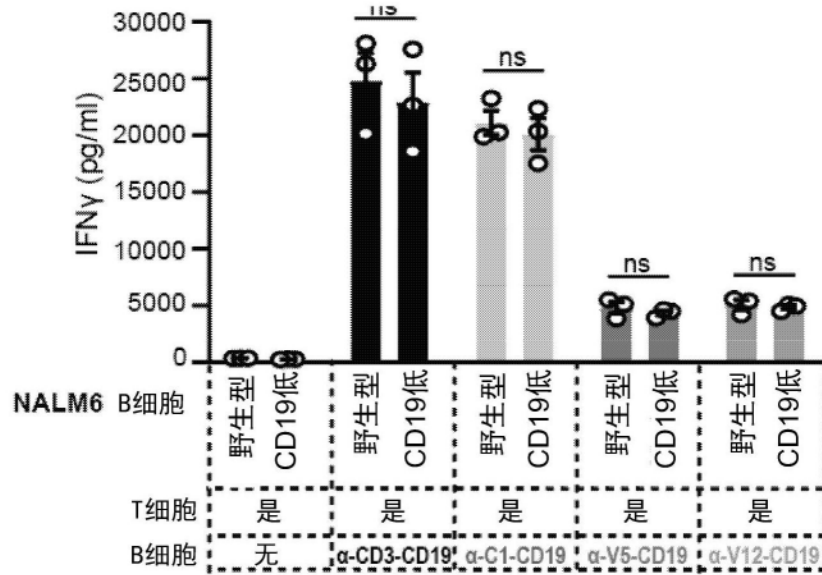


图9D

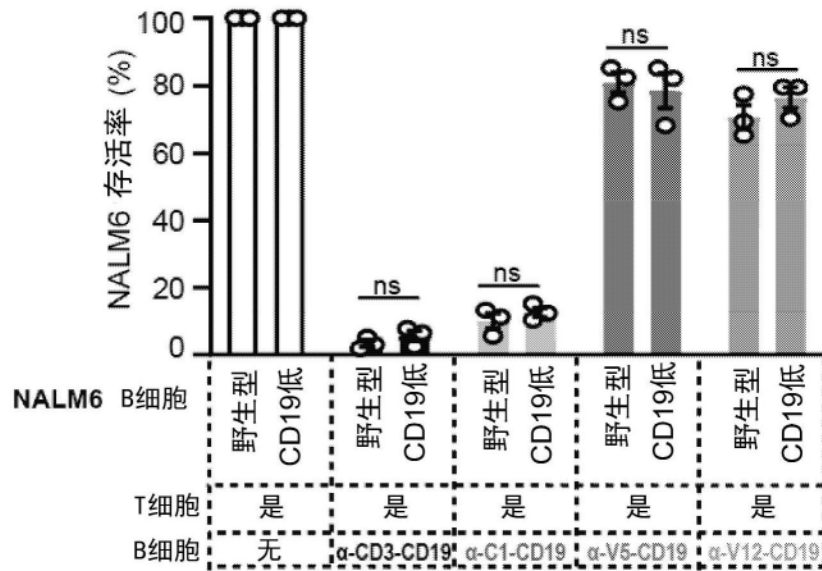


图9E

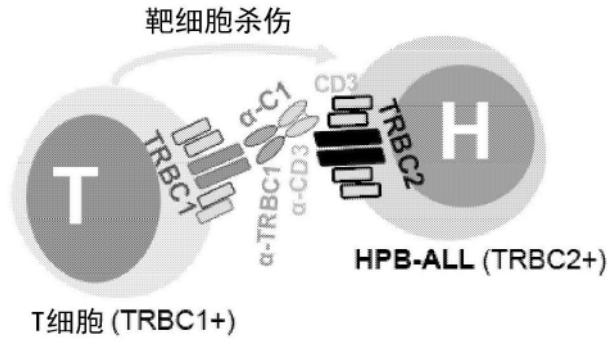


图10A

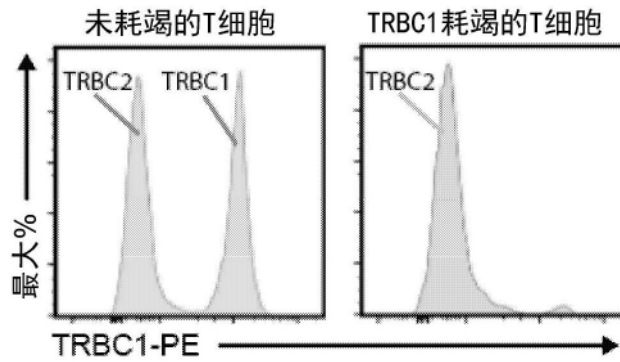


图10B

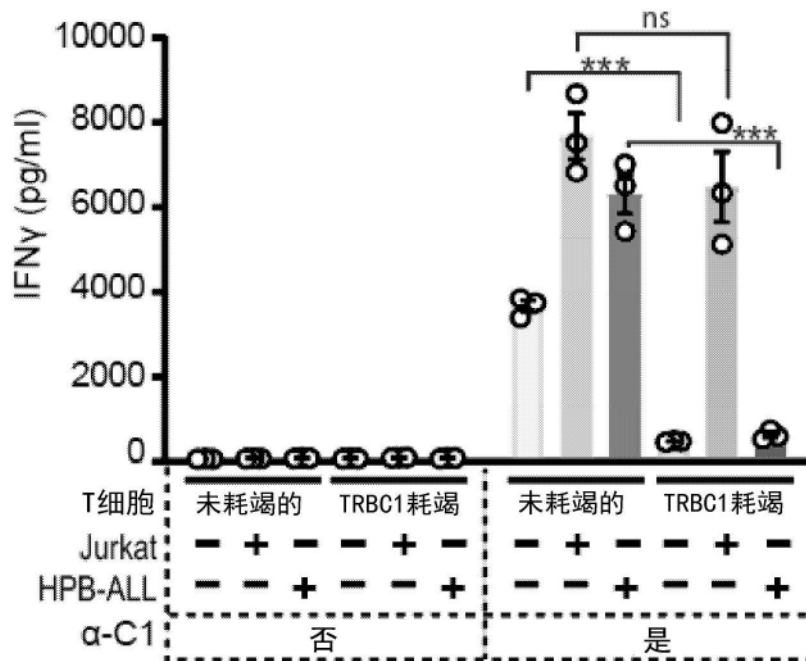


图10C

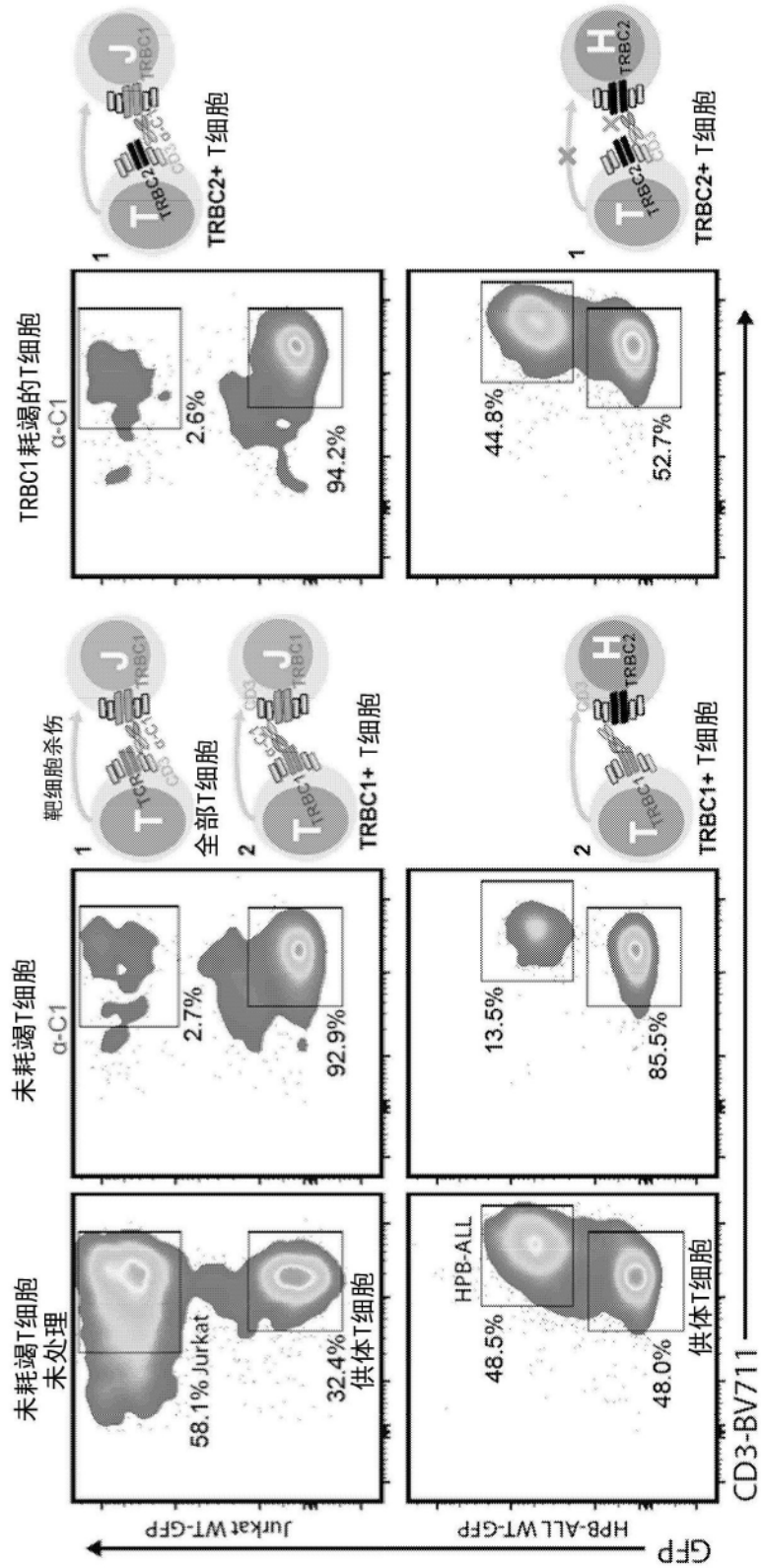


图10D

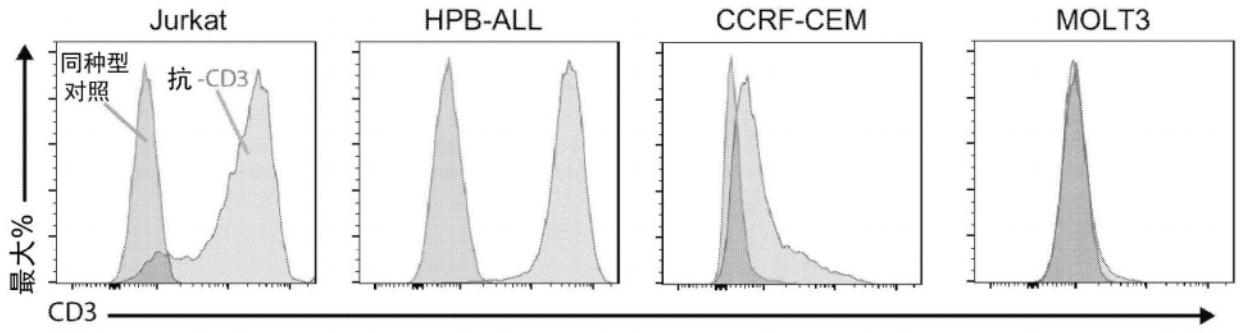


图11A

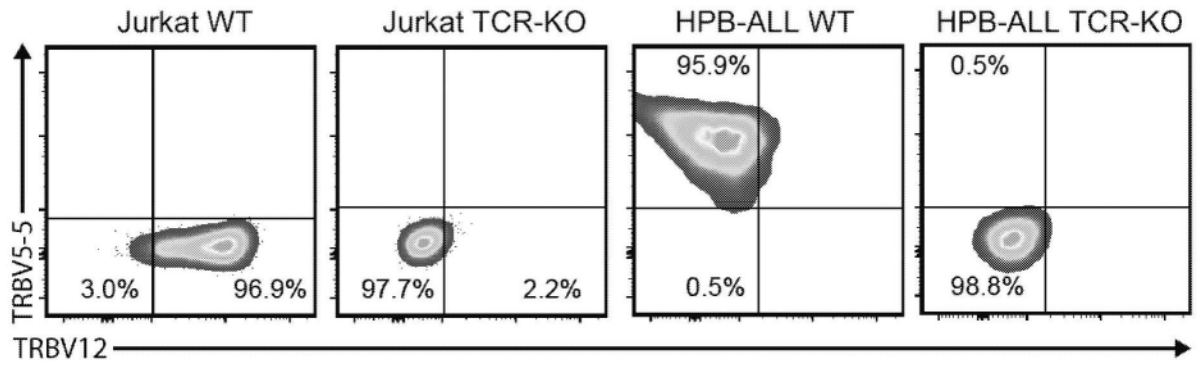


图11B

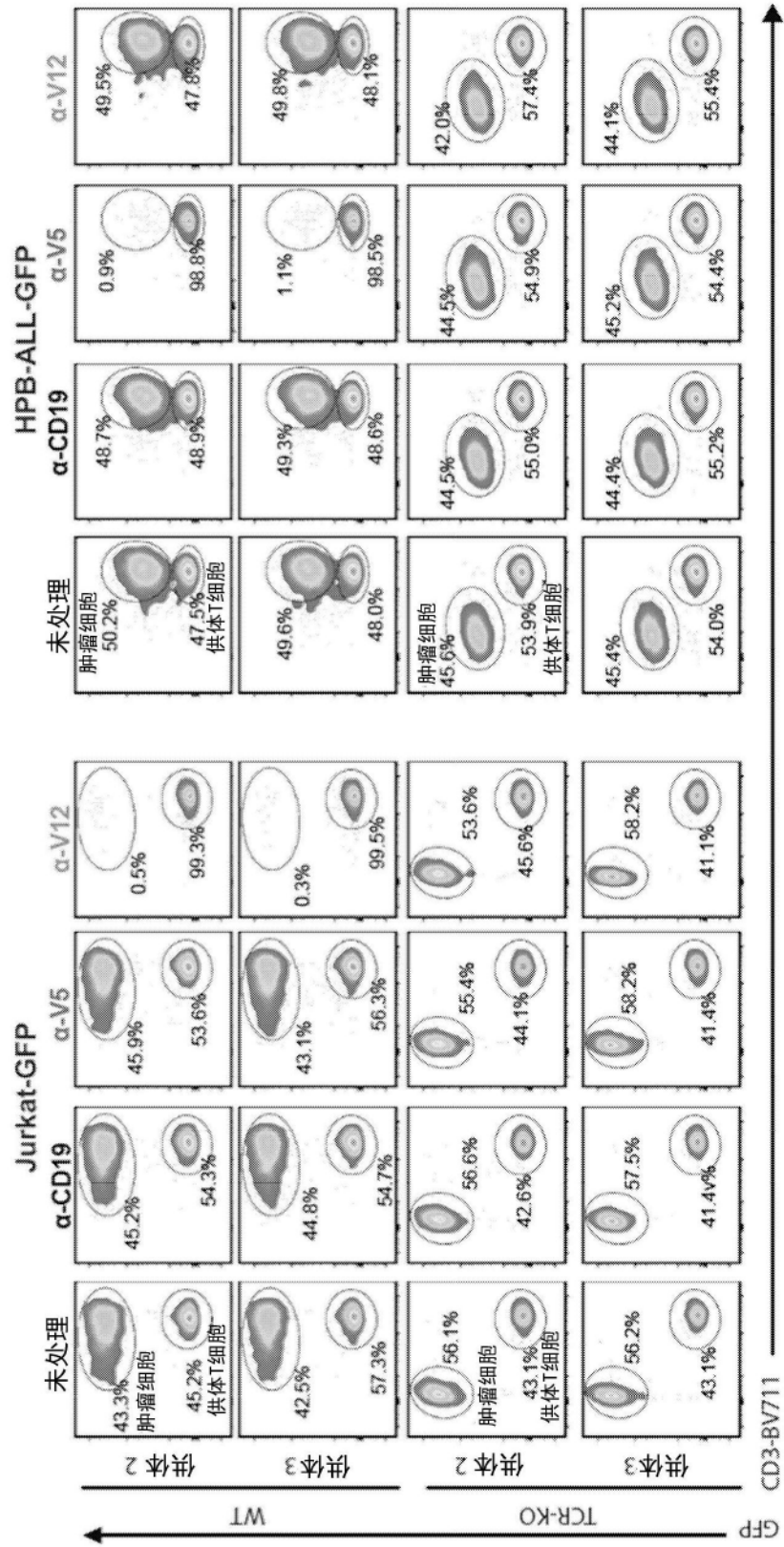


图12A

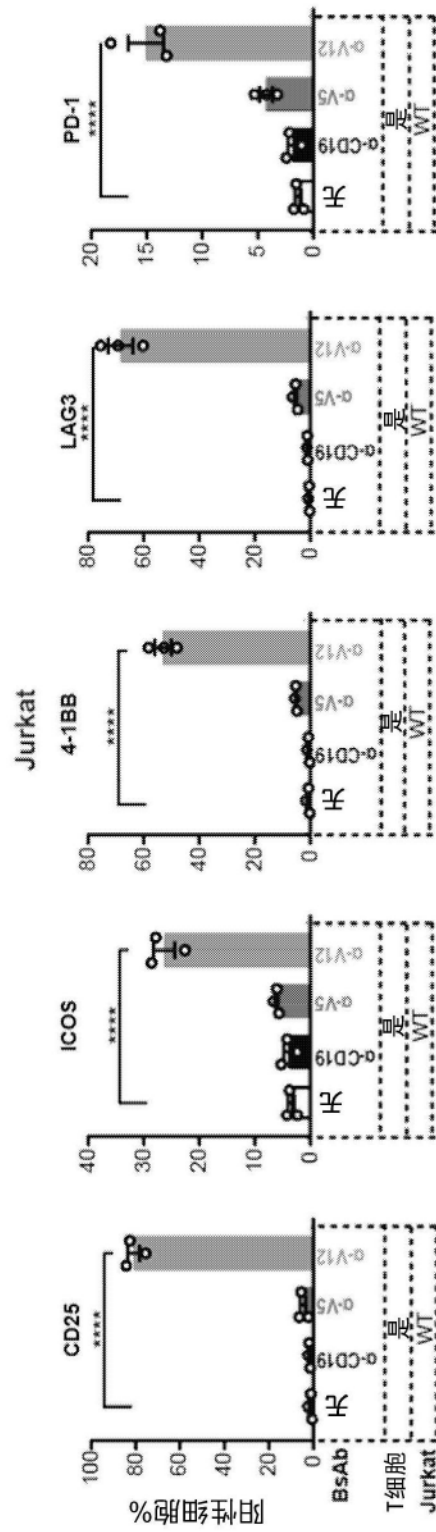


图12B

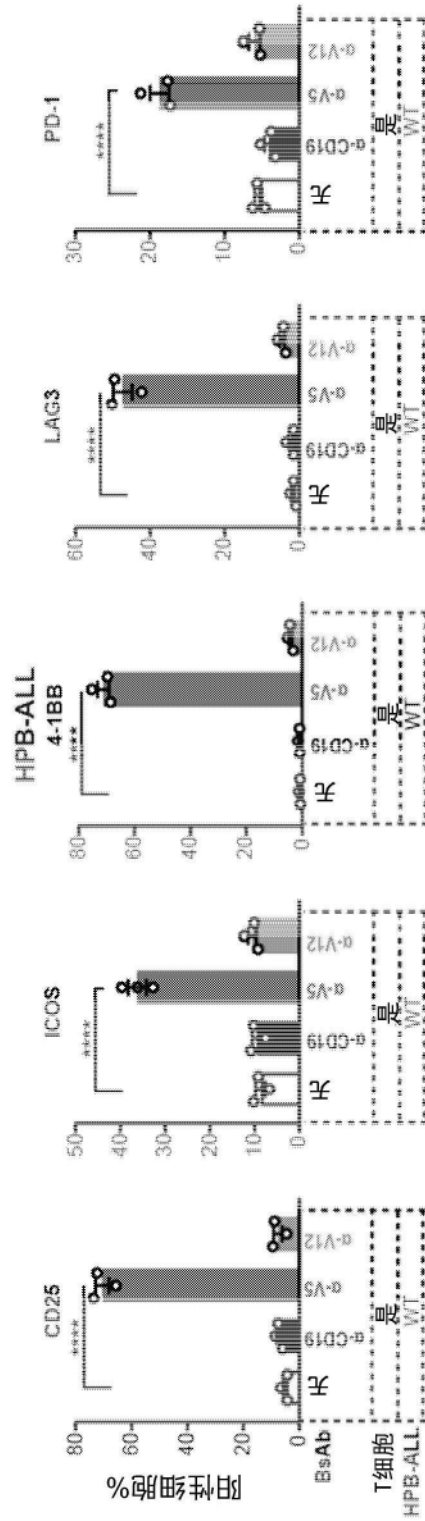


图12C

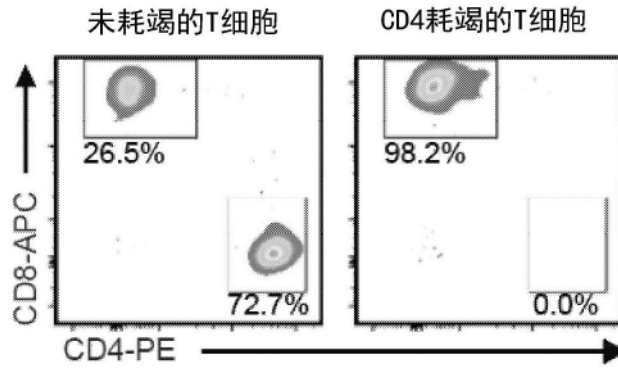


图12D

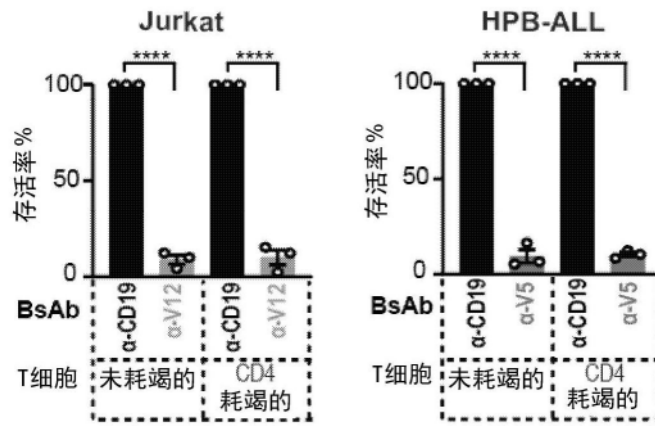


图12E

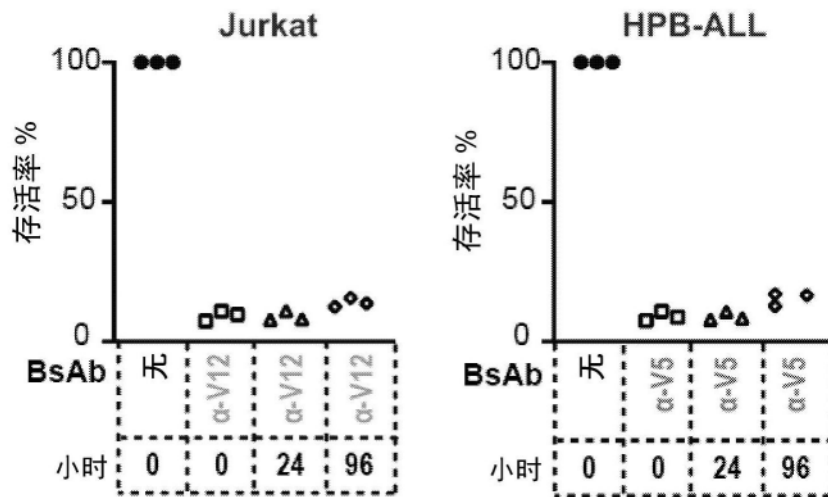


图12F

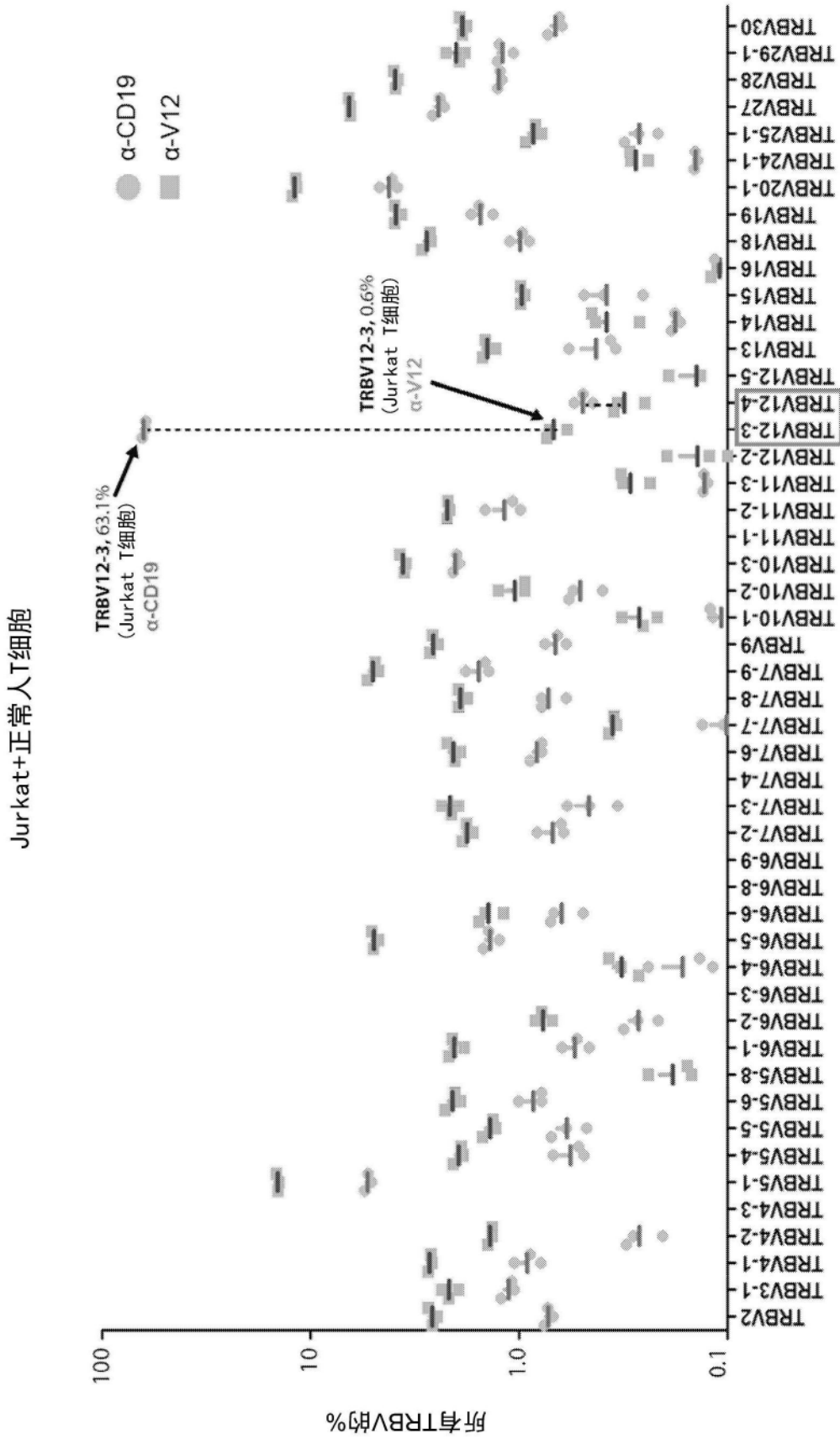


图13A

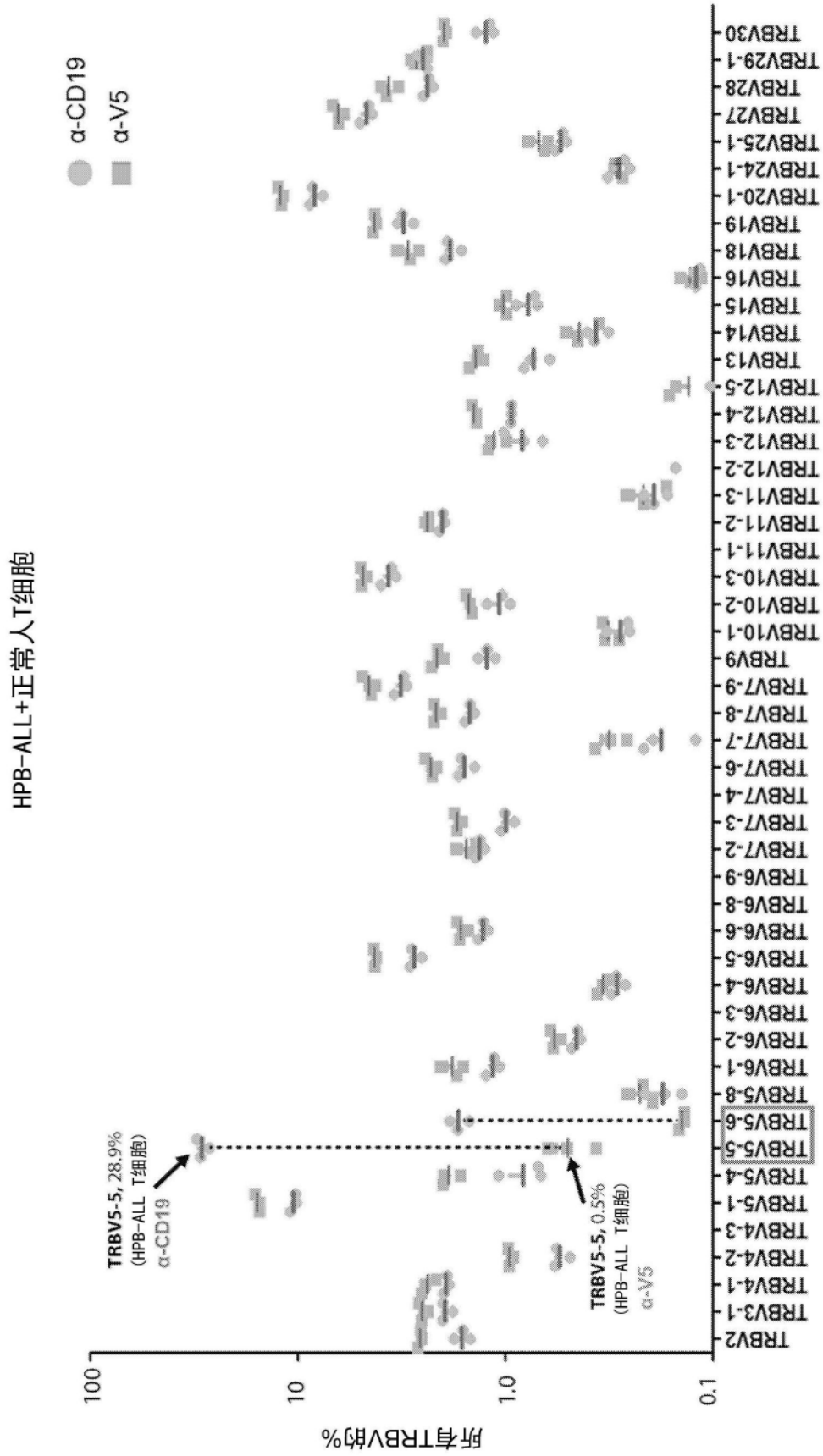


图13B

TRBV5家族系统发育图

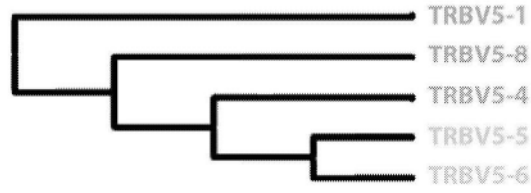


图14A

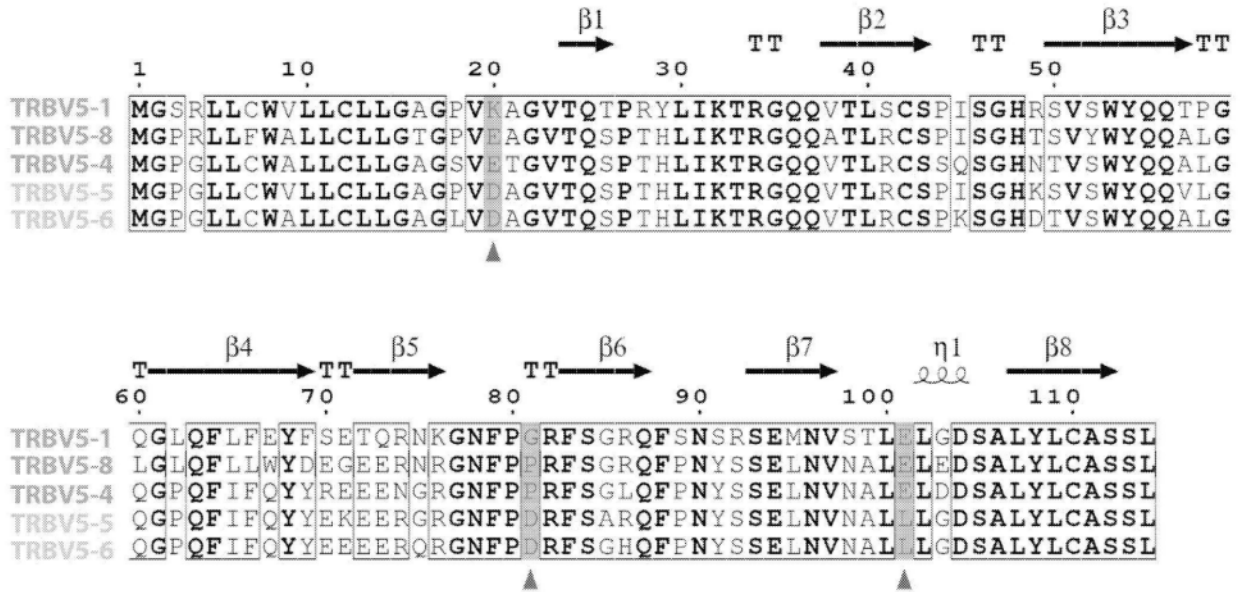


图14B

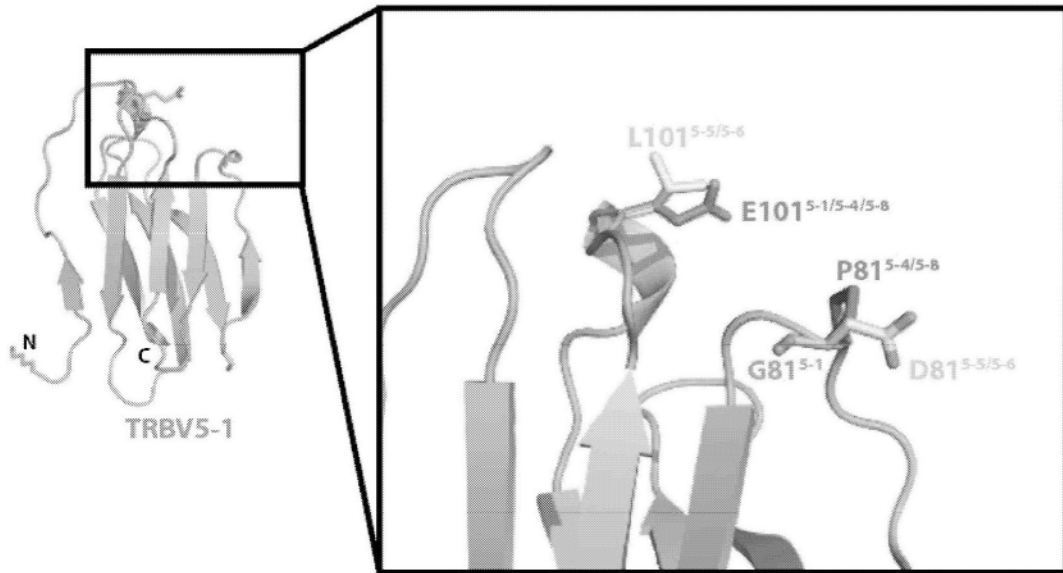


图14C

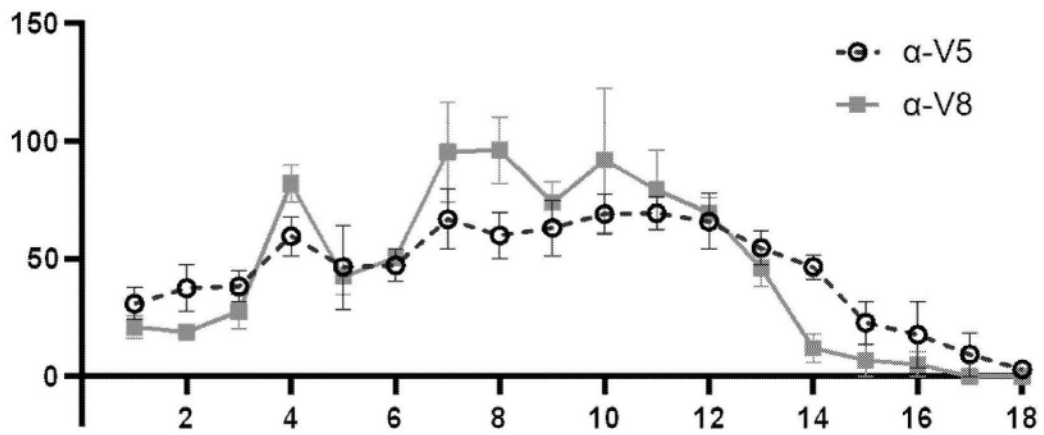


图15A

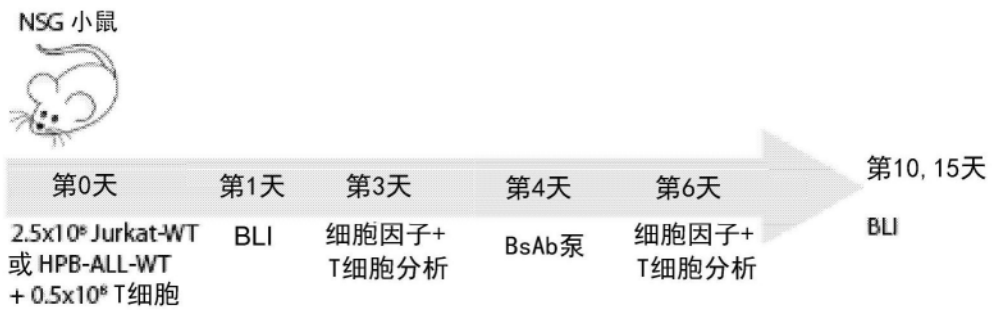


图15B

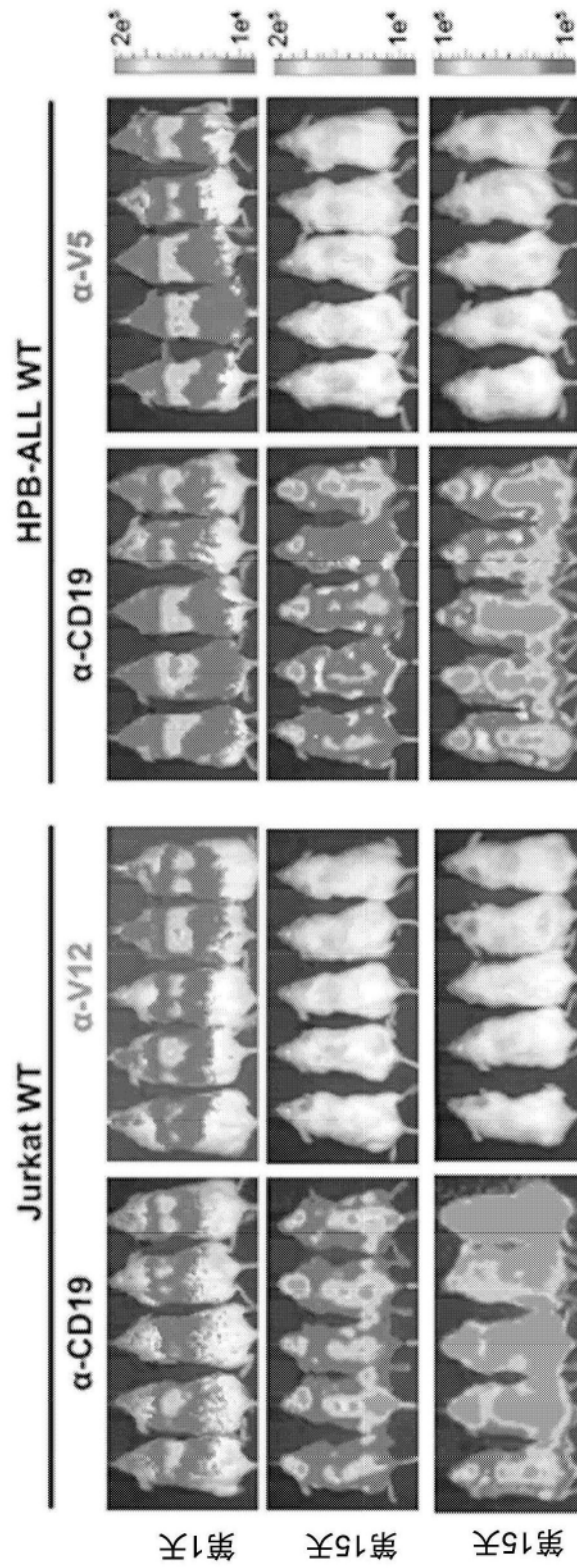


图15C

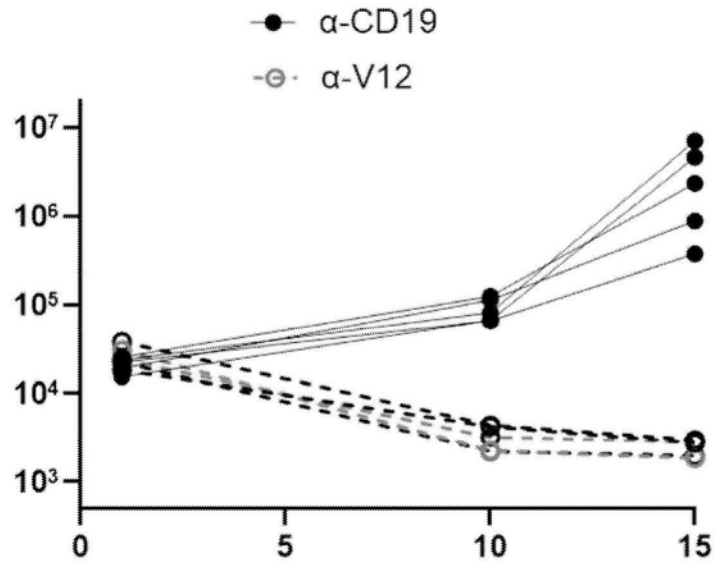


图15D

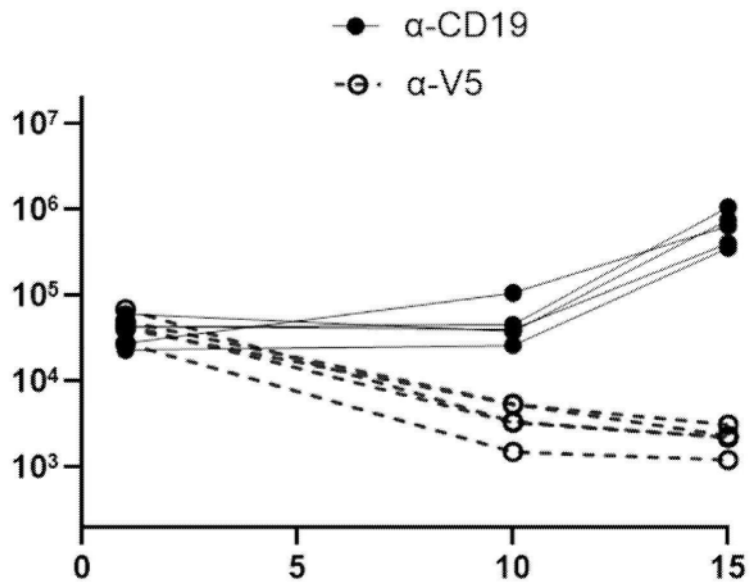


图15E

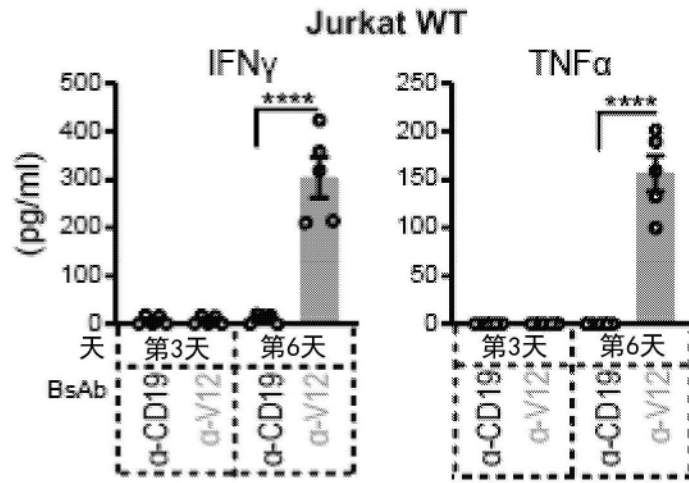


图15F

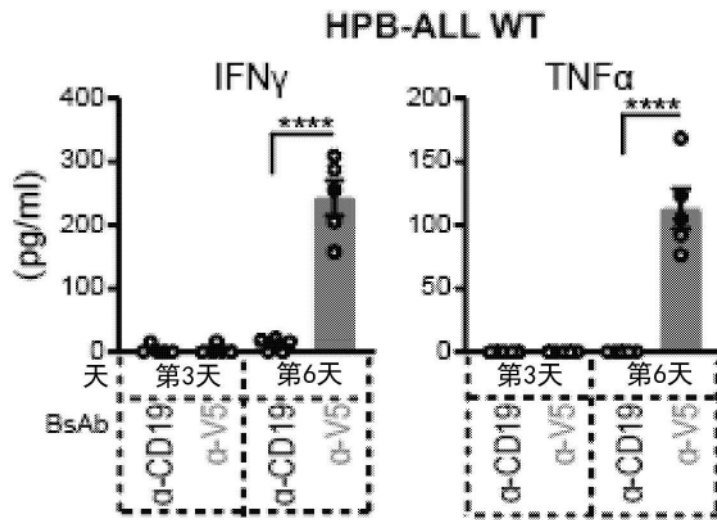


图15G

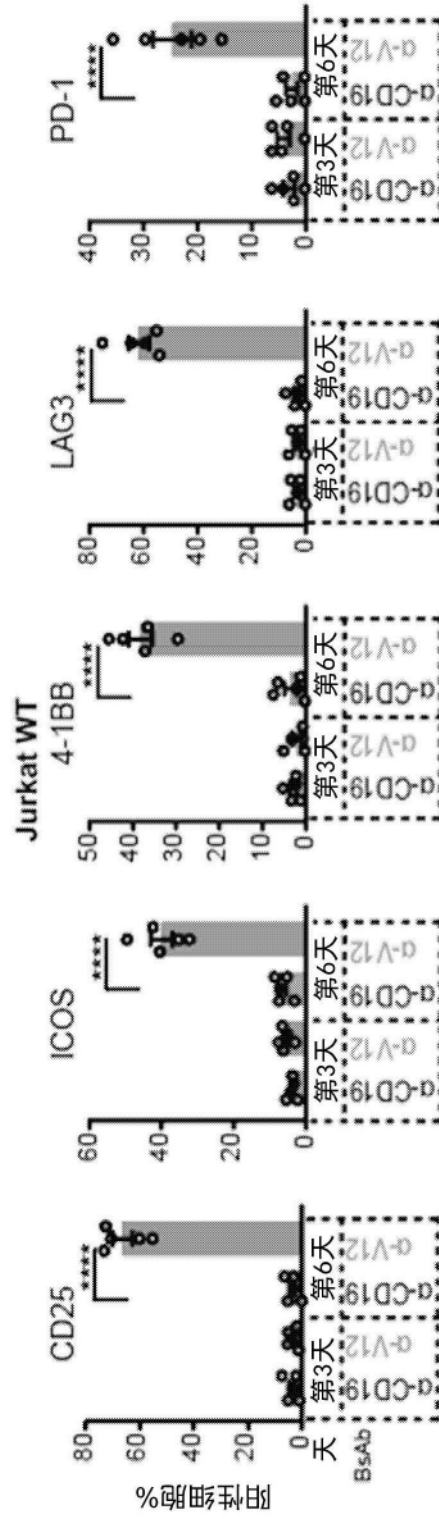


图15H

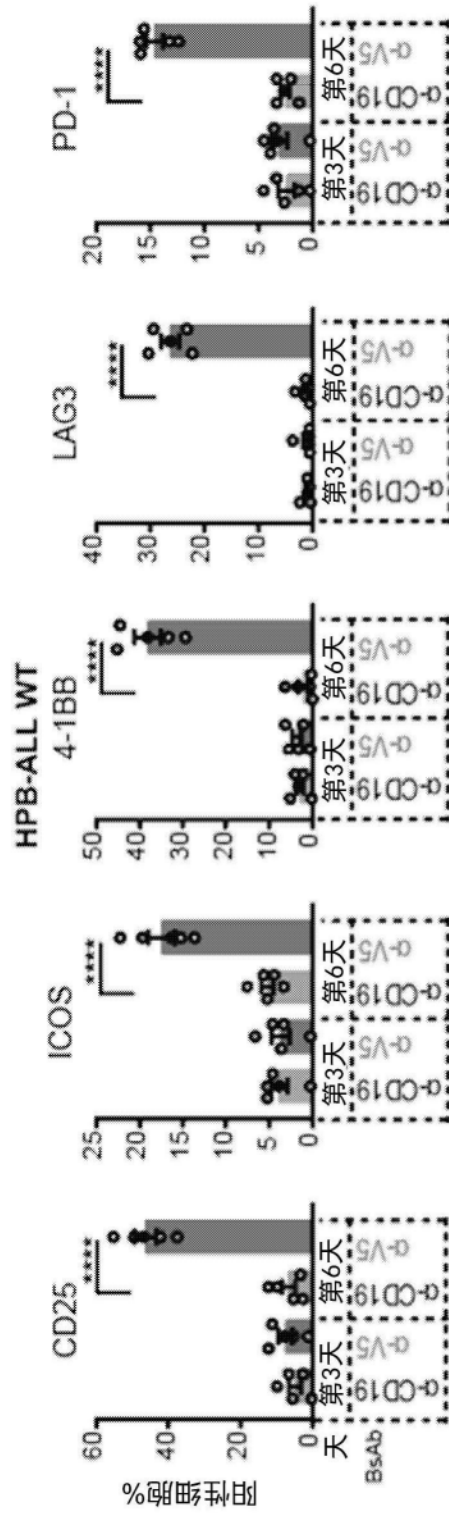


图15I