



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 119954959 A

(43) 申请公布日 2025. 05. 09

(21) 申请号 202510015884.6

C12N 15/13 (2006.01)

(22) 申请日 2020.03.11

A61P 35/02 (2006.01)

(30) 优先权数据

62/816464 2019.03.11 US

(62) 分案原申请数据

202080034083.X 2020.03.11

(71) 申请人 詹森生物科技公司

地址 美国宾夕法尼亚州

(72) 发明人 R·贾尼桑 I·S·格雷瓦尔

M·A·塞普尔维达

(74) 专利代理机构 中国专利代理(香港)有限公

司 72001

专利代理师 李志强 彭昶

(51) Int. Cl.

C07K 16/46 (2006.01)

权利要求书1页 说明书47页

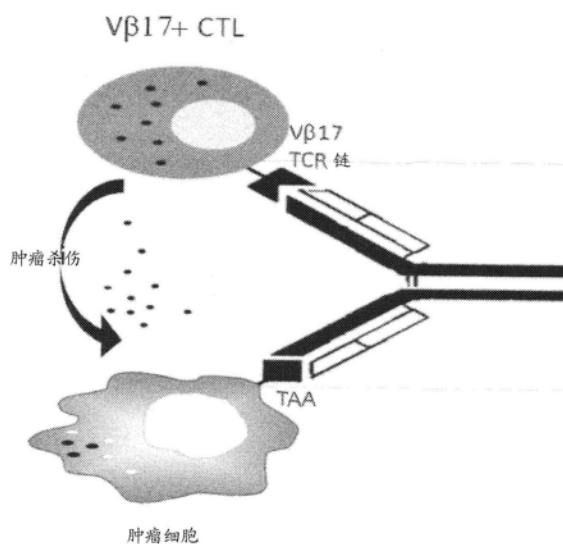
序列表(电子公布) 附图11页

(54) 发明名称

抗V β 17/抗CD123双特异性抗体

(57) 摘要

本发明描述了抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段。本发明还描述了编码所述抗体的核酸、包含所述抗体的组合物、产生所述抗体的方法,以及使用所述抗体的方法。



1. 一种分离的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段,所述分离的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段包含:

- a. 第一重链(HC1);
- b. 第二重链(HC2);
- c. 第一轻链(LC1);以及
- d. 第二轻链(LC2),

其中HC1与LC1缔合并且HC2与LC2缔合,并且其中HC1包含重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3,所述重链互补决定区分别包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列,并且LC1包含轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,所述轻链互补决定区分别包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列,以形成第一抗原的结合位点,并且其中HC2和LC2形成第二抗原的结合位点。

2. 根据权利要求1所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述第一抗原的所述结合位点与CD8⁺T细胞或CD4⁺T细胞上的V β 17结合。

3. 根据权利要求1或2所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述第二抗原的所述结合位点与存在于癌细胞的表面上的肿瘤抗原结合。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的V β 17双特异性抗体或抗原结合片段,其中HC1和LC1是人源化的。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段,其中HC2和LC2与CD123结合。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段为IgG同种型。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段为IgG4同种型。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段在体外以小于约0.2pM的EC₅₀诱导癌细胞的CD8⁺或CD4⁺T细胞依赖性细胞毒性。

9. 一种分离的核酸,所述分离的核酸编码根据权利要求1至8中任一项所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段的所述HC1和所述LC1。

10. 一种分离的核酸,所述分离的核酸编码根据权利要求1至8中任一项所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段的所述HC2和所述LC2。

抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体

[0001] 本申请是原案申请日为2020年3月11日、申请号为202080034083.X (国际申请号为PCT/IB2020/000342)、发明名称为“抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体”的专利申请的分案申请。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本申请要求2019年3月11日提交的美国临时申请62/816,464的优先权,该临时申请的公开内容全文以引用方式并入本文。

技术领域

[0004] 本发明涉及单克隆抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体、编码所述抗体的核酸和表达载体、含有所述载体的重组细胞,以及包含所述抗体的组合物。还提供了制备所述抗体的方法,以及使用所述抗体杀死癌细胞的方法。

[0005] 以电子方式提交的参考序列表

[0006] 本申请包含序列表,该序列表作为ASCII格式的序列表经由EFS-Web以电子方式递交,文件名为“PRD4012WOPCT Sequence Listing”,并且创建日期为2020年3月11日,并且大小为85kb。经由EFS-Web提交的该序列表是本说明书的一部分并且全文以引用方式并入本文。

背景技术

[0007] 细胞毒性T细胞(例如,CD8+T细胞)可以用于直接杀死癌细胞。找到将细胞毒性T细胞引导至癌细胞的方法可以导致杀死此类细胞和抑制癌细胞增殖。已经证明,可以活化对抗表达癌相关抗原的癌细胞的细胞毒性T细胞,方式为使用结合细胞毒性T细胞和癌细胞两者的双特异性抗体,使所述细胞毒性T细胞与癌细胞在延长的时间段内紧密靠近。杀死癌细胞的这种方法存在多种潜在的繁杂之事,诸如选择介导T细胞活化的T细胞抗原和癌细胞抗原、选择在双特异性抗体的情况下将具有充分的亲和力以介导结合的亲本抗体,以及选择将活化T细胞以特异性地起到对抗癌细胞的作用而不是引发非特异性T细胞活化的癌细胞抗原。这些繁杂之事仅在试图活化T细胞以破坏动物受试者中的癌细胞的情况下才会组合到一起。

发明内容

[0008] 本文提供了能够结合Vβ17(与T细胞相关联的抗原)和CD123(与癌细胞相关联的抗原)的双特异性抗体。细胞毒性T细胞表达由α链和β链组成的T细胞受体,诸如Vβ17。假设双特异性抗体与Vβ17和癌相关抗原(诸如CD123)结合可以将细胞毒性T细胞引导至表达抗原的癌细胞。利用这种双特异性抗体来将细胞毒性T细胞募集或重定向至表达抗原的癌细胞,并且可以允许T细胞杀死癌细胞。

[0009] 在一个一般方面,本公开涉及与Vβ17和CD123结合的分离的双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0010] 本文提供了分离的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段。该分离的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段包含：

[0011] a. 第一重链 (HC1)；

[0012] b. 第二重链 (HC2)；

[0013] c. 第一轻链 (LC1)；以及

[0014] d. 第二轻链 (LC2)，

[0015] 其中HC1与LC1缔合并且HC2与LC2缔合，并且其中HC1包含重链互补决定区1 (HCDR1)、HCDR2和HCDR3，所述重链互补决定区分别包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列，并且LC1包含轻链互补决定区1 (LCDR1)、LCDR2和LCDR3，所述轻链互补决定区分别包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列，以形成第一抗原的结合位点，并且其中HC2和LC2形成第二抗原的结合位点。在某些实施方案中，第一抗原的结合位点与CD8+T细胞或CD4+T细胞的表面上的V β 17结合。在某些实施方案中，第二抗原的结合位点与存在于癌细胞的表面上的肿瘤抗原结合。

[0016] 在某些实施方案中，双特异性抗体与存在于CD8+T细胞或CD4+T细胞的表面上的V β 17的结合以及与存在于癌细胞的表面上的肿瘤抗原的结合导致杀死癌细胞。

[0017] 在某些实施方案中，HC2和LC2与CD123结合。

[0018] 在某些实施方案中，双特异性抗体或其抗原结合片段为IgG同种型，诸如IgG4。

[0019] 在某些实施方案中，双特异性抗体或其抗原结合片段在体外以小于约0.2pM的EC₅₀诱导癌细胞的CD8+或CD4+T细胞依赖性细胞毒性。

[0020] 还提供了分离的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0021] 该抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段包含：

[0022] a. 第一重链 (HC1)；

[0023] b. 第二重链 (HC2)

[0024] c. 第一轻链 (LC1)；以及

[0025] d. 第二轻链 (LC2)，其中HC1与LC1缔合并且HC2与LC2缔合，并且其中HC1包含重链互补决定区1 (HCDR1)、HCDR2和HCDR3，所述重链互补决定区分别包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列，并且LC1包含轻链互补决定区1 (LCDR1)、LCDR2和LCDR3，所述轻链互补决定区分别包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列，以形成特异性结合V β 17的第一抗原的结合位点，并且其中HC2包含重链互补决定区1 (HCDR1)、HCDR2和HCDR3，所述重链互补决定区分别包含SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36的氨基酸序列，并且LC2包含轻链互补决定区1 (LCDR1)、LCDR2和LCDR3，所述轻链互补决定区分别包含SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39的氨基酸序列，以形成特异性结合CD123的第二抗原的结合位点。在某些实施方案中，HC1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列并且LC1包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列，并且HC2包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列并且LC2包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。在某些实施方案中，V β 17位于CD8+T细胞或CD4+T细胞的表面上。在某些实施方案中，CD123位于癌细胞的表面上。在某些实施方案中，双特异性抗体或其抗原结合片段在体外以小于约0.2pM的EC₅₀诱导癌细胞的CD8+或CD4+T细胞依赖性细胞毒性。

[0026] 在某些实施方案中，抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段是嵌合的、

部分人源化的或完全人源化的。

[0027] 还提供了分离的人源化V β 17单克隆抗体或其抗原结合片段。该分离的人源化V β 17单克隆抗体或其抗原结合片段可以包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,分离的人源化V β 17单克隆抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

[0028] 还提供了编码本文所公开的单克隆抗体或其抗原结合片段和本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段的分离的核酸。

[0029] 还提供了包含编码本文所公开的单克隆抗体或其抗原结合片段和本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段的分离的核酸的载体。

[0030] 还提供了包含载体的宿主细胞,该载体包含本文所公开的分离的核酸。

[0031] 还提供了将表达V β 17的CD8+或CD4+T细胞引导至癌细胞的方法。所述方法包括使表达V β 17的CD8+或CD4+T细胞与本文所公开的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段接触。使表达V β 17的CD8+T细胞或CD4+T细胞与抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段接触可以将表达V β 17的CD8+T细胞或CD4+T细胞引导至癌细胞。

[0032] 还提供了用于抑制癌细胞生长或增殖的方法。所述方法包括使癌细胞与本文所公开的双特异性抗体接触。使癌细胞与所述抗体接触可以例如抑制癌细胞的生长或增殖,或者促进T细胞介导的癌细胞杀伤。

[0033] 还提供了产生本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段的方法。所述方法包括在产生重链和轻链或其抗原结合片段的条件下培养包含编码双特异性抗体的一个重链和轻链对的核酸的细胞,以及从细胞或培养物回收双特异性抗体或其抗原结合片段的重链和轻链。在收集双特异性抗体的两条臂的重链和轻链后,在适于允许自组装的条件下将重链和轻链对混合,之后收集自组装的双特异性抗体。

[0034] 还提供了产生包含本文所公开的双特异性抗体或抗原结合片段的组合物(诸如缓冲组合物或经纯化的组合物等)的方法。例如,所述方法可以包括将双特异性抗体或其抗原结合片段与对于双特异性抗体的储存和使用可接受的缓冲液组合。

[0035] 还提供了包括本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段及其包装的试剂盒。

附图说明

[0036] 结合附图进行阅读时,能够更好地理解前述发明内容和以下对本专利申请的优选实施方案的详细说明。但是,应当理解,本专利申请不限于附图中示出的精确实施方案。

[0037] 图1示出了展示结合抗V β 17/抗肿瘤抗原双特异性抗体以将T细胞募集到癌细胞并且诱导癌细胞死亡的示意图。

[0038] 图2A至图2B示出了V β 17+CD8+T细胞存在于健康受试者中,并且在与M1肽一起培养后,这些细胞可以在体外扩增。图2A示出了来自健康受试者的门控外周血单核细胞(PBMC)关于在细胞表面上表达V β 17的CD8+T细胞(V β 17+)的FACS直方图。图2B示出了各种供体的HLA亚型,以及鉴定的V β 17+CD8+T细胞在第0天和在用M1肽体外扩增14天(第14天)之后的存在百分比。

[0039] 图3示出V β 17+CD8+T细胞具有杀伤细胞毒性细胞的标志。柱形图指示了在第0天(无M1)和用M1肽刺激后第14天(+M1),门控PBMC上关于在细胞表面上表达V β 17的CD8+T细胞

(V β 17+)的CD107a、CD69、颗粒酶B(Gzb)和干扰素- γ (IFN γ)的表达。

[0040] 图4示出了VB11[抗V β 17/抗CD123]双特异性抗体以及VB13[V β 17null对照双特异性]抗体与CD8+T细胞的结合。从来自3个不同供体(D203517、HPU09381和HPU08694)的PBMC分离的CD8+T细胞呈现的数据。下表中各图均以nM表示结合的EC₅₀值。

[0041] 图5示出了V β 17和CD123双特异性(VB11)抗体以及V β 17null对照双特异性(VB13)抗体与AML癌细胞系的结合。呈现的数据示出了双特异性抗体与Kasumi3 AML细胞系的结合。图下面的表以nM表示结合的EC₅₀值。

[0042] 图6示出了诱导AML癌细胞的有效杀伤的双特异性抗体对V β 17+T细胞的重定向。左图中的数据示出了在效应物与靶标(E:T)比为0.5:1时对Kasumi3癌细胞的杀伤以及双特异性抗体的剂量滴定。中间图中的数据示出了在E:T比为1:1时对Kasumi3癌细胞的杀伤以及双特异性抗体的剂量滴定。右图中的数据示出了在E:T比为5:1时对Kasumi3癌细胞的杀伤以及双特异性抗体的剂量滴定。图下面的表显示了从上面的图计算的EC₅₀值(以pM给出)。

[0043] 图7A至图7B示出了抗V β 17/抗CD123双特异性抗体(VB11)和V β 17null双特异性抗体(VB13)与分离自PBMC的CD8+T细胞的特异性结合。图7A示出了来自健康受试者(左图,V β 17未耗尽)和来自使用负选择的耗尽了V β 17+T细胞的PBMC(右图,V β 17耗尽)的门控PBMC关于在细胞表面上表达V β 17的CD8+T细胞(V β 17+)的FACS直方图。图7B示出了抗V β 17/抗CD123双特异性抗体(VB11)和V β 17null双特异性抗体(VB13)与来自图7A的CD8+T细胞的特异性结合。双特异性抗体的剂量响应在图中示出。图下面的表显示了从上面的图计算的结合EC₅₀值(以nM给出)。

[0044] 图8示出了V β 17双特异性抗体特异性募集V β 17T细胞以杀死Kasumi3癌细胞。左图示出了当从包含在细胞表面(未接触的CD8+T细胞)上表达V β 17的CD8+T细胞(V β 17+)的PBMC中分离效应细胞时,对Kasumi3 AML细胞系的杀伤。插图示出在效应细胞群中存在10.1%的V β 17+CD8+T细胞。右图示出了当从PBMC中分离效应CD8+T细胞,但通过负选择耗尽了V β 17+T细胞时,对Kasumi3 AML细胞系的杀伤。插图示出在效应细胞群中存在微量(0.086%)的V β 17+CD8+T细胞群。

[0045] 图9A至图9B示出了当使用V β 17双特异性抗体时,没有T细胞的泛活化。图9A示出了V β 17+门控CD8+T细胞和V β 17-门控CD8+T细胞的FACS图。当用V β 17双特异性抗体活化T细胞时,V β 17+CD8+T细胞上的CD69(62.5%)相比于V β 17-CD8+T细胞(1.80%)存在高水平上调。图9B示出了当使用V β 17双特异性抗体活化时,V β 17+门控CD8+T细胞和V β 17-门控CD8+T细胞上的CD69上调的柱形图。

[0046] 图10示出了来自HLA A2阴性供体的V β 17+T细胞也是效应杀伤细胞,并且不需要预先刺激V β 17+细胞。Kasumi3癌细胞的V β 17双特异性抗体介导的有效细胞毒性由含有来自HLA A2阴性供体(HPU 09381)的V β 17+T细胞的PBMC示出。

具体实施方式

[0047] 本说明书中包括的对文件、行为、材料、装置、文章等的讨论旨在为本发明提供上下文。此类讨论并不是承认这些事项中的任一事项或全部事项均相对于所公开或受权利要求书保护的发明形成现有技术的一部分。

[0048] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语的含义与本发明所属领域的

普通技术人员通常所理解的含义相同。否则,本文所用的某些术语具有本说明书中所述的含义。

[0049] 除非另有说明,否则任何数值,例如本文所述的浓度或浓度范围,应理解为在所有情况下均由术语“约”修饰。因此,数值通常包括所述值 $\pm 10\%$ 。例如,1mg/mL的浓度包括0.9mg/mL至1.1mg/mL。同样,1%至10% (w/v) 的浓度范围包括0.9% (w/v) 至11% (w/v)。除非上下文另有明确指示,否则如本文所用,使用的数值范围明确地包括所有可能的子范围、该范围之内所有单个数值,包括此类范围之内整数和该范围之内分数。

[0050] 除非另有说明,否则在一系列元素之前的术语“至少”应理解为指代系列中的每个元素。本领域的技术人员将会认识到、或仅使用常规实验就能够确定本文所述发明的具体实施方案的多种等同物。此类等同物旨在由本发明所涵盖。

[0051] 应该注意的是,除非上下文清楚地指明,否则如本文和所附权利要求中所用的单数形式“一个/一种”和“所述/该”包括复数引用物。

[0052] 如本文所用,术语“包含”、“包括”、“具有”或“含有”或其任何其他变型应被理解是指包括指明的整数或整数组,但不排除任何其他整数或整数组,并且旨在是非排他性的或开放式的。例如,包含元素列表的组合物、混合物、过程、方法、制品或设备不一定仅限于那些元素,而是可以包括这些组合物、混合物、过程、方法、制品或设备未明确列出或固有的其他元素。此外,除非明确地指明相反,否则“或”是指包括性的或而不是指排他性的或。例如,条件A或B由以下任一项满足:A为真(或存在)而B为假(或不存在),A为假(或不存在)而B为真(或存在),以及A和B均为真(或存在)。

[0053] 如本文所用,多个列举的要素之间的连接术语“和/或”被理解为包含单个选项和组合选项两者。例如,在两个要素由“和/或”连接的情况下,第一种选项是指在没有第二个要素的情况下适用第一个要素。第二种选项是指在没有第一个要素的情况下适用第二个要素。第三种选项是指适合一起使用第一要素和第二要素。这些选项中的任一种均被理解为落在含义内,并且因此满足如本文所用的术语“和/或”的要求。多于一种选项的并行适用性也被理解为落在含义内,并且因此满足术语“和/或”的要求。

[0054] 还应当理解,当提及优选发明的部件的尺寸或特性时,本文使用的“约”、“大约”、“大致”、“基本上”和类似的术语表示所描述的尺寸/特性不是严格的边界或参数,并且不排除在功能上相同或相似的微小变化,如本领域普通技术人员所理解的。至少,包括数值参数的这种参考将包括使用本领域已接受的数学和工业原理(例如,舍入、测量或其他系统误差、制造公差等)的变化,不会改变最低有效数字。

[0055] 在两条或更多条核酸或多肽序列(例如,抗 $\nu\beta 17$ /抗CD123双特异性抗体和编码这些抗体的多核苷酸、 $\nu\beta 17$ 多肽和编码这些多肽的 $\nu\beta 17$ 多核苷酸、CD123多肽和编码这些多肽的CD123多核苷酸)的上下文中,术语“相同”或百分比“同一性”是指当进行比较和比对以获得最大对应时,相同的或者具有相同的氨基酸残基或核苷酸的指定百分比的两条或更多条序列或子序列,如使用以下序列比较算法之一或通过目视检查所测量的。

[0056] 对于序列比对,通常将一个序列作为参考序列,将测试序列与其进行对比。当使用序列比对算法时,将测试序列和参考序列输入计算机中,指定子序列坐标(如果必要的话),并指定序列算法的程序参数。然后,序列比较算法基于指定的程序参数来计算对于测试序列相对于参考序列的序列同一性百分比。

[0057] 用于比较的最佳序列比对可以例如通过以下方式进行:Smith和Waterman的局部同源性算法(Adv. Appl. Math. 2:482 (1981))、Needleman和Wunsch的同源性比对算法(J. Mol. Biol. 48:443 (1970))、Pearson和Lipman的相似性搜索方法(Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 85:2444 (1988))、这些算法的计算机化实施(Wisconsin Genetics Software Package中的GAP、BESTFIT、FASTA和TFASTA, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, WI), 或目视检查(大致参见Current Protocols in Molecular Biology, F.M. Ausubel等人编辑, Current Protocols, Greene Publishing Associates, Inc. 和 John Wiley & Sons, Inc. 的合资企业(1995年增补版)(Ausubel))。

[0058] 适用于确定序列同一性百分比和序列相似性的算法的示例是BLAST和BLAST 2.0算法, 其分别描述于Altschul等人1990年的J. Mol. Biol. 215:403-410和Altschul等人1997年的Nucleic Acids Res. 25:3389-3402。用于执行BLAST分析的软件可通过国家生物技术信息中心公开获得。该算法涉及首先通过识别查询序列中长度为W的短字词来识别高评分序列对(HSP), 当与数据库序列中相同长度的字词比对时, 该短字词匹配或满足一些正值阈值分数T。T被称为邻近字词分数阈值(Altschul等人, 出处同上)。这些初始邻近字词命中充当用于发起搜索以找到包含它们的较长HSP的种子。然后将字词命中沿每个序列在两个方向上延伸, 只要可增加累积的比对分数。

[0059] 对于核苷酸序列, 使用参数M(一对匹配残基的奖励分数; 始终>0)和N(错配残基的处罚分数; 始终<0)来计算累积分数。对于氨基酸序列, 评分矩阵用于计算累积分数。字词命中在每个方向上的延伸在以下情况下停止: 累积比对分数从其最大实现值下降数量X; 累积分数由于一个或多个负分数残基比对的累积而变为零或更低; 或到达任一序列的末端。BLAST算法参数W、T和X确定比对的灵敏度和速度。BLASTN程序(用于核苷酸序列)默认使用字长(W) 11、期望值(E) 10、M=5、N=-4以及两条链的比较。对于氨基酸序列, BLASTP程序默认使用字长(W) 3、期望值(E) 10以及BLOSUM62评分矩阵(参见Henikoff和Henikoff的Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89:10915 (1989))。

[0060] 除了计算序列同一性百分比之外, BLAST算法还对两条序列之间的相似性进行统计分析(参见例如Karlin和Altschul的Proc. Nat'l Acad. Sci. USA 90:5873-5877 (1993))。BLAST算法提供的一种相似性量度是最小总和概率(P(N)), 其提供了两条核苷酸或氨基酸序列之间偶然发生匹配的概率的指示。例如, 如果在测试核酸与参考核酸的比较中最小总和概率小于约0.1, 更优选地小于约0.01, 并且最优选地小于约0.001, 则认为核酸类似于参考序列。

[0061] 两个核酸序列或多肽基本上相同的另一个指示是通过第一核酸编码的多肽与通过第二核酸编码的多肽免疫地交叉反应, 如下所述。因此, 多肽通常与第二多肽基本上相同, 例如, 其中两个肽仅通过保守置换而不同。两个核酸序列基本上相同的另一个指示是, 两个分子在严格条件下彼此杂交。

[0062] 抗体

[0063] 本文描述了分离的抗Vβ17双特异性抗体或其抗原结合片段、编码所述抗体的核酸和表达载体、含有所述载体的重组细胞, 以及包含所述抗体的组合物。本发明此外涉及分离的抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段、编码所述抗体的核酸和表达载体、含有所述载体的重组细胞, 以及包含所述双特异性抗体的组合物。还提供了制备所述抗体的

方法,以及使用所述抗体治疗疾病(包括癌症)的方法。本文所公开的抗体具有一种或多种期望的功能特性,包括但不限于与vβ17和/或CD123的高亲和力结合、对vβ17和/或CD123的高特异性,以及当单独施用或与其他抗癌疗法联合施用时治疗或预防癌症的能力。

[0064] 如本文所用,术语“抗体”广义地使用,并且包括免疫球蛋白或抗体分子,包括人抗体、人源化抗体、复合抗体和嵌合抗体以及单克隆或多克隆抗体片段。一般来讲,抗体是蛋白质或肽链,其对于特定抗原表现出结合特异性。抗体结构是众所周知的。根据重链恒定结构域氨基酸序列,可将免疫球蛋白指定为五大类(即IgA、IgD、IgE、IgG和IgM)。IgA和IgG进一步亚分类为同种型IgA1、IgA2、IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。基于其恒定结构域的氨基酸序列,可将脊椎物种的抗体轻链指定为两种完全不同的类型即κ和λ中的一种。因此,本发明的抗体可含有κ或λ轻链恒定域。根据具体实施方案,本文所公开的抗体包括来自小鼠抗体或人抗体的重链恒定区和/或轻链恒定区。除重链和轻链恒定域之外,抗体还包含由轻链可变区和重链可变区组成的抗原结合区,每个可变区包含三个域(即,互补决定区1-3;CDR1、CDR2和CDR3)。轻链可变区结构域替代性地被称为LCDR1、LCDR2和LCDR3,并且重链可变区结构域替代性地被称为HCDR1、HCDR2和HCDR3。

[0065] 如本文所用,术语“分离的抗体”是指基本上不含具有不同抗原特异性的其他抗体的抗体(例如,与vβ17特异性结合的分离的抗体基本上不含不与vβ17结合的抗体;与CD123特异性结合的分离的抗体基本上不含不与CD123结合的抗体)。另外,分离的抗体可基本上不含其他细胞物质和/或化学物质。

[0066] 如本文所用,术语“单克隆抗体”是指从一组基本上均质的抗体获得的抗体,即,除了可能以少量存在的可能天然存在的突变之外,构成该组的各个抗体是相同的。本文所公开的单克隆抗体可以通过杂交瘤方法、噬菌体展示技术、单淋巴细胞基因克隆技术或通过重组DNA方法制备。例如,单克隆抗体可以由包括获自转基因非人动物诸如转基因小鼠或大鼠的B细胞的杂交瘤产生,转基因非人动物具有包含人重链转基因和轻链转基因的基因组。

[0067] 如本文所用,术语“抗原结合片段”是指抗体片段,诸如像,双抗体、Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv片段、二硫键稳定Fv片段(dsFv)、(dsFv)₂、双特异性dsFv(dsFv-dsFv')、二硫键稳定双抗体(ds双抗体)、单链抗体分子(scFv)、单结构域抗体(sdab)、scFv二聚体(二价双抗体)、由包含一个或多个CDR的抗体的一部分形成的多特异性抗体、骆驼化单结构域抗体、纳米抗体、结构域抗体、二价结构域抗体或结合抗原但不包含完整抗体结构的任何其他抗体片段。抗原结合片段能够结合至与亲本抗体或亲本抗体片段结合的抗原相同的抗原。根据具体实施方案,抗原结合片段包含轻链可变区、轻链恒定区和重链的Fd区段。根据其他具体实施方案,抗原结合片段包含Fab和F(ab')。

[0068] 如本文所用,术语“人源化抗体”是指被修饰成提高与人抗体的序列同源性的非人抗体,使得抗体的抗原结合特性得以保留,但其在人体内的抗原性下降。

[0069] 如本文所用,术语“多特异性抗体”是指包含多个免疫球蛋白可变结构域序列的抗体,其中该多个免疫球蛋白可变结构域序列中的第一免疫球蛋白可变结构域序列对第一表位具有结合特异性,并且该多个免疫球蛋白可变结构域序列中的第二免疫球蛋白可变结构域序列对第二表位具有结合特异性。在一个实施方案中,第一表位和第二表位不重叠或基本上不重叠。在一个实施方案中,第一表位和第二表位在不同的抗原,例如不同的蛋白质(或多聚蛋白质的不同亚基)上。在一个实施方案中,多特异性抗体包含第三、第四或第五免

疫球蛋白可变域。在一个实施方案中,多特异性抗体是双特异性抗体分子、三特异性抗体分子或四特异性抗体分子。

[0070] 如本文所用,术语“双特异性抗体”是指结合不超过两个表位或两个抗原的多特异性抗体。双特异性抗体的特征在于对第一表位(例如,V β 17抗原上的表位)具有结合特异性的第一免疫球蛋白重链和轻链对,以及对第二表位(例如,CD123抗原上的表位)具有结合特异性的第二免疫球蛋白重链和轻链对。在一个实施方案中,第一表位和第二表位在不同的抗原,例如不同的蛋白质(或多聚蛋白质的不同亚基)上。在一个实施方案中,双特异性抗体包含对第一表位具有结合特异性的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列以及对第二表位具有结合特异性的重链可变结构域序列和轻链可变结构域序列。在一个实施方案中,双特异性抗体包含对第一表位具有结合特异性的半抗体或其片段以及对第二表位具有结合特异性的半抗体或其片段。在一个实施方案中,双特异性抗体包含对第一表位具有结合特异性的scFv或其片段以及对第二表位具有结合特异性的scFv或其片段。在一个实施方案中,第一表位位于V β 17上,并且第二表位位于CD123上。在一个实施方案中,第一表位位于V β 17上,并且第二表位位于PD-1、PD-L1、CTLA-4、EGFR、HER-2、CD19、CD20、CD3和/或其他肿瘤相关的免疫抑制因子或表面抗原上。

[0071] 如本文所用,术语“半抗体”是指与一条免疫球蛋白轻链缔合的一条免疫球蛋白重链。示例性半抗体以SEQ ID NO:28示出。本领域的技术人员将容易理解,半抗体可以涵盖其片段并且还可以具有由单个可变结构域组成的抗原结合结构域,例如来源于骆驼科。

[0072] 如本文所用,术语“V β 17”是指响应于细胞毒性T细胞上的免疫应答而表达的T细胞受体。表达V β 17的CD8+T细胞通常响应于受试者暴露于甲型流感病毒而产生。表达V β 17的CD8+T细胞响应于受试者暴露于流感而提供很大的回忆。术语“V β 17”包括由细胞(包括T细胞)天然表达或者能够在用编码所述多肽的基因或cDNA转染的细胞上表达的任何V β 17变体、同种型和物种同源物。除非另外指明,否则优选地,V β 17为人V β 17。人V β 17氨基酸序列由GenBank登录号AAB49730.1提供。

[0073] 术语“CD123”是指存在于细胞上的有助于传递白介素-3(一种在免疫系统中很重要的可溶性细胞因子)的信号的分子。CD123也可以称为“白介素-3受体”。该受体属于I型细胞因子受体家族,并且是具有与共同的 β 亚基(β c或CD131)配对的独特 α 链的异源二聚体。CD123受体可以存在于多能祖细胞上,并且可以在细胞内诱导酪氨酸磷酸化并促进造血细胞系内的增殖和分化。CD123也可以在急性髓系白血病(AML)亚型中表达。除非另外指明,否则术语“CD123”包括由细胞(包括T细胞)天然表达或者能够在用编码那些多肽的基因或cDNA转染的细胞上表达的任何CD123变体、同种型和物种同源物,优选地“CD123”是人CD123。人CD123氨基酸序列由GenBank登录号AY789109.1提供。

[0074] 如本文所用,“与V β 17特异性结合”的抗体是指以 1×10^{-7} M或更小,优选地 1×10^{-8} M或更小,更优选地 5×10^{-9} M或更小、 1×10^{-9} M或更小、 5×10^{-10} M或更小或者 1×10^{-10} M或更小的KD与V β 17结合、优选地与人V β 17结合的抗体。术语“KD”是指从Kd对Ka的比(即Kd/Ka)获得并且表示为摩尔浓度(M)的解离常数。根据本公开,抗体的KD值可以使用本领域中的方法确定。例如,抗体的KD可通过使用表面等离子共振,诸如通过使用生物传感器系统(例如Biacore[®]系统),或者通过使用生物层干涉测量技术(诸如Octet RED96系统)来确定。

[0075] 如本文所用,“与CD123特异性结合”的抗体是指以 1×10^{-7} M或更小,优选地 1×10^{-8} M或更小,更优选地 5×10^{-9} M或更小、 1×10^{-9} M或更小、 5×10^{-10} M或更小或者 1×10^{-10} M或更小的KD与CD123结合、优选地与人CD123结合的抗体。术语“KD”是指从Kd对Ka的比(即Kd/Ka)获得并且表示为摩尔浓度(M)的解离常数。根据本公开,抗体的KD值可以使用本领域中的方法确定。例如,抗体的KD可通过使用表面等离子共振,诸如通过使用生物传感器系统(例如Biacore[®]系统),或者通过使用生物层干涉测量技术(诸如Octet RED96系统)来确定。

8°M 或更小,更优选地 $5 \times 10^{-9}\text{M}$ 或更小、 $1 \times 10^{-9}\text{M}$ 或更小、 $5 \times 10^{-10}\text{M}$ 或更小或者 $1 \times 10^{-10}\text{M}$ 或更小的KD与CD123结合、优选地与人CD123结合的抗体。术语“KD”是指从Kd对Ka的比(即Kd/Ka)获得并且表示为摩尔浓度(M)的解离常数。根据本公开,抗体的KD值可以使用本领域中的方法确定。例如,抗体的KD可通过使用表面等离子共振,诸如通过使用生物传感器系统(例如Biacore[®]系统),或者通过使用生物层干涉测量技术(诸如Octet RED96系统)来确定。

[0076] 抗体KD的值越小,抗体与靶抗原结合的亲和力越高。

[0077] 根据一个具体方面,本发明涉及分离的 $\text{V}\beta 17$ 双特异性抗体或其抗原结合片段,其包含:(a)第一重链(HC1);(b)第二重链(HC2);(c)第一轻链(LC1);以及(d)第二轻链(LC2)。HC1可以与LC1缔合,并且HC2可以与LC2缔合。HC1可以包含重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3,所述重链互补决定区分别包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列,并且LC1可以包含轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,所述轻链互补决定区分别包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0078] HC1和LC1形成第一抗原的结合位点,并且HC2和LC2形成第二抗原的结合位点。以举例的方式,第一抗原的结合位点可以与CD8+T细胞或CD4+T细胞上的 $\text{V}\beta 17$ 结合,并且第二抗原的结合位点可以例如与存在于癌细胞的表面上的肿瘤抗原结合。 $\text{V}\beta 17$ 双特异性抗体与存在于CD8+T细胞或CD4+T细胞的表面上的 $\text{V}\beta 17$ 结合以及与存在于癌细胞的表面上的肿瘤抗原结合可以例如导致杀死癌细胞。

[0079] 本文还提供了抗 $\text{V}\beta 17$ /抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段,其包含抗 $\text{V}\beta 17$ 抗体或其抗原结合片段以及抗CD123抗体或其抗原结合片段。在某些实施方案中,该抗 $\text{V}\beta 17$ /抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段包含:(a)第一重链(HC1);(b)第二重链(HC2);(c)第一轻链(LC1);以及第二轻链(LC2)。HC1与LC1缔合,并且HC2与LC2缔合。在某些实施方案中,HC1包含重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3,所述重链互补决定区分别包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列,并且LC1包含轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,所述轻链互补决定区分别包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列。在某些实施方案中,HC2包含重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3,所述重链互补决定区分别包含SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36的氨基酸序列,并且LC2包含轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,所述轻链互补决定区分别包含SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39的氨基酸序列。

[0080] 在某些实施方案中,HC1可以例如包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列并且LC1可以例如包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,以形成特异性结合 $\text{V}\beta 17$ 的第一抗原的结合位点。HC2可以例如包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列并且LC2可以例如包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列,以形成特异性结合CD123的第二抗原的结合位点。

[0081] 在某些实施方案中, $\text{V}\beta 17$ 位于CD8+T细胞或CD4+T细胞的表面上。在某些实施方案中,CD123位于癌细胞(例如白血病细胞)的表面上。

[0082] 在一些实施方案中,本文所公开的双特异性抗体可以采取经由如本文所述的受控Fab臂交换获得的双体抗体、交叉抗体或双特异性抗体的形式。

[0083] 在一些实施方案中,所述双特异性抗体包括具有促进异源二聚化的互补CH3结构域的IgG样分子;重组IgG样双靶向分子,其中该分子的两侧各自含有至少两种不同抗体的Fab片段的一部分或Fab片段;IgG融合分子,其中全长IgG抗体与额外的Fab片段或Fab片段

的部分融合;Fc融合分子,其中单链Fv分子或稳定的双体抗体与重链恒定结构域、Fc区或其部分融合;Fab融合分子,其中不同的Fab片段融合在一起;基于ScFv和双体抗体的重链抗体(例如结构域抗体、纳米抗体),其中不同的单链Fv分子或不同的双体抗体或不同的重链抗体(例如结构域抗体、纳米抗体)彼此融合或与另一蛋白或载体分子融合。

[0084] 在一些实施方案中,具有互补CH3结构域分子的IgG样分子包括Triomab/Quadroma (Trion Pharma/Fresenius Biotech)、杵臼结构(Knobs-into-Holes)抗体(Genentech)、CrossMAbs (Roche) 和静电配对体(electrostatically-matched) (Amgen)、LUZ-Y (Genentech)、链交换工程化结构域体(Strand Exchange Engineered Domain body) (SEEDbody) (EMD Serono)、Biclonic (Merus) 和DuoBody (Genmab A/S)。

[0085] 在一些实施方案中,重组IgG样双靶向分子包括双重靶向(DT)-Ig (GSK/Domantis)、二合一抗体(Genentech)、交联MAbs (Karmanos Cancer Center)、mAb2 (F-Star) 和CovX体(CovX/Pfizer)。

[0086] 在一些实施方案中,IgG融合分子包括双重可变结构域(DVD)-Ig (Abbott)、IgG样双特异性抗体(InnClone/Eli Lilly)、Ts2Ab (MedImmune/AZ) 和BsAb (Zymogenetics)、HERCULES (Biogen Idec) 以及TvAb (Roche)。

[0087] 在一些实施方案中,Fc融合分子可以包括ScFv/Fc融合体(Academic Institution)、SCORPION (Emergent BioSolutions/Trubion, Zymogenetics/BMS)、双重亲和力和再靶向技术(Fc-DART) (MacroGenics) 以及Dual (ScFv)₂-Fab (中国国家抗体医药研究中心(National Research Center for Antibody Medicine--China))。

[0088] 在一些实施方案中,Fab融合双特异性抗体包括F(ab)₂ (Medarex/AMGEN)、Dual-Action或Bis-Fab (Genentech)、Dock-and-Lock (DNL) (ImmunoMedics)、二价双特异性抗体(Biotechnol) 和Fab-Fv (UCB-Celltech)。基于ScFv的、基于双价抗体的结构域抗体包括但不限于双特异性T细胞衔接器(BiTE) (Micromet)、串联双价抗体(Tandab) (Affimed)、双亲和重靶向技术(DART) (MacroGenics)、单链双价抗体(Academic)、TCR样抗体(AIT, ReceptorLogics)、人血清白蛋白ScFv融合体(Merrimack) 和COMBODY (Epigen Biotech)、双重靶向纳米抗体(Ablynx)、双重靶向仅重链结构域抗体。

[0089] 本文所公开的全长双特异性抗体可以例如使用两个单特异性二价抗体之间的Fab臂交换(或半分子交换)通过下列方式产生:在每个半分子中的重链CH3交界处引入置换以促成两个在体外无细胞环境中或使用共表达而具有不同特异性的抗体半分子的异源二聚体形成。Fab臂交换反应是二硫键异构化反应和CH3结构域解离-缔合的结果。亲本单特异性抗体的铰链区中的重链二硫键减少。亲本单特异性抗体之一的所得游离半胱氨酸与第二亲本单特异性抗体分子的半胱氨酸残基形成重链间二硫键,同时亲本抗体的CH3结构域通过解离-缔合而释放和重新形成。可以对Fab臂的CH3结构域进行工程改造,以促成异源二聚化而非同源二聚化。所得产物是具有两条Fab臂或半分子的双特异性抗体,这两条Fab臂或半分子各自结合不同的表位,即Vβ17上的表位和肿瘤抗原上的表位。

[0090] 如本文所用,“同源二聚化”是指具有相同CH3氨基酸序列的两条重链的相互作用。如本文所用,“同源二聚体”是指具有含有相同CH3氨基酸序列的两条重链的抗体。

[0091] 如本文所用,“异源二聚化”是指具有不同CH3氨基酸序列的两条重链的相互作用。如本文所用,“异源二聚体”是指具有含有不同CH3氨基酸序列的两条重链的抗体。

[0092] “杵臼结构”策略(参见例如,PCT国际公布WO 2006/028936)可用于产生全长双特异性抗体。简而言之,在人IgG中形成CH3结构域的交界的选定氨基酸可在影响CH3结构域相互作用的位置处突变,从而促进异源二聚体形成。将具有小侧链(臼)的氨基酸引入特异性地结合第一抗原的抗体的重链中,并将具有大侧链(杵)的氨基酸引入特异性地结合第二抗原的抗体的重链中。在两种抗体共表达后,由于具有“臼”的重链与具有“杵”的重链的优先相互作用而形成异源二聚体。形成杵臼结构的示例性CH3置换对(表示为第一重链的第一CH3结构域中的修饰位置/第二重链的第二CH3结构域中的修饰位置)是:T366Y/F405A、T366W/F405W、F405W/Y407A、T394W/Y407T、T394S/Y407A、T366W/T394S、F405W/T394S和T366W/T366S_L368A_Y407V。

[0093] 还可以使用其他策略,诸如通过在一个CH3表面置换带正电荷的残基并且在第二CH3表面置换带负电荷的残基使用静电相互作用促进重链异源二聚化,如美国专利公布号US2010/0015133、美国专利公布号US2009/0182127、美国专利公布号US2010/028637或美国专利公布号US2011/0123532中所述。在其他策略中,可以通过下面的置换(表示为第一重链的第一CH3结构域中的经修饰位置/第二重链的第二CH3结构域中的经修饰位置)促进异源二聚化:L351Y_F405AY407V/T394W、T366I_K392M_T394W/F405A_Y407V、T366L_K392M_T394W/F405A_Y407V、L351Y_Y407A/T366A_K409F、L351Y_Y407A/T366V_K409F_Y407A/T366A_K409F或T350V_L351Y_F405A_Y407V/T350V_T366L_K392L_T394W,如美国专利公布号US2012/0149876或美国专利公布号US2013/0195849中所述。

[0094] 除了上述方法之外,本文所公开的双特异性抗体可以在体外的无细胞环境中产生,方式为:在两个单特异性同源二聚抗体的CH3区域中引入非对称突变并且由两个亲本单特异性同源二聚抗体在还原条件下形成双特异性异源二聚抗体,以允许根据国际专利公布号W02011/131746所述的方法实现二硫键异构化。在所述方法中,将第一单特异性二价抗体(例如,抗CD33抗体)和第二单特异性二价抗体(例如,抗CD3抗体)工程改造为在CH3结构域处具有促进异源二聚体稳定性的某些置换;将这些抗体在足以使铰链区中的半胱氨酸发生二硫键异构化的还原条件下一起温育;从而通过Fab臂交换产生双特异性抗体。温育条件可以任选地恢复到非还原条件。可使用的示例性还原剂为2-巯基乙胺(2-MEA)、二硫苏糖醇(DTT)、二硫赤藓糖醇(DTE)、谷胱甘肽、三(2-羧乙基)膦(TCEP)、L-半胱氨酸和 β -巯基乙醇,优选为选自2-巯基乙胺、二硫苏糖醇和三(2-羧乙基)膦的还原剂。例如,可使用如下条件:在至少25mM 2-MEA的存在下或至少0.5mM二硫苏糖醇的存在下,在5-8的pH例如pH7.0或pH7.4,至少20℃的温度下,温育至少90分钟。

[0095] 在某些实施方案中,抗V β 17抗体或其抗原结合片段包含具有以下多肽序列的重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2、HCDR3以及轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3:

[0096] a. 分别为SEQ IDNO:1、2、3、4、5和6;

[0097] 并且抗CD123抗体或其抗原结合片段包含具有以下多肽序列的重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2、HCDR3以及轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3:

[0098] 1. 分别为SEQID NO:34、35、36、37、38和39。

[0099] 根据另一个具体方面,本发明涉及诱导抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)的分离的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段。该双特异性抗体或其抗原结合片段能够例如在体外诱导ADCC。该双特异性抗体或其抗原结合片段能够以小于约1pM的EC₅₀诱

导ADCC。在某些实施方案中,EC₅₀小于约1pM、小于约0.9pM、小于约0.8pM、小于约0.7pM、小于约0.6pM、小于约0.5pM、小于约0.4pM、小于约0.300pM、小于约0.2pM、小于约0.19pM、小于约0.18pM、小于约0.17pM、小于约0.16pM、小于约0.15pM、小于约0.14pM、小于约0.13pM、小于约0.12pM、小于约0.11pM、小于约0.1pM、小于约0.09pM、小于约0.08pM、小于约0.07pM、小于约0.06pM、小于约0.05pM、小于约0.04pM、小于约0.03pM、小于约0.02pM,或小于约0.01pM。在某些实施方案中,该抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段包含IgG1、IgG2、IgG3或IgG4主链。在一个这样的实施方案中,抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段具有IgG4同种型的抗体主链。

[0100] 在本文所述的一些实施方案中,抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体的免疫效应特性可以通过本领域技术人员已知的技术经由Fc修饰得到增强或沉默。例如,Fc效应子功能诸如C1q结合、补体依赖性细胞毒性(CDC)、抗体依赖性细胞介导的细胞毒性(ADCC)、抗体依赖性细胞介导的吞噬作用(ADCP)、细胞表面受体(例如B细胞受体;BCR)的下调等,可通过修饰促成这些活性的Fc中的残基来提供和/或控制。

[0101] “抗体依赖性细胞介导的细胞毒性”或“ADCC”是指细胞介导的反应,在该反应中,表达Fc受体(FcR)的非特异性细胞毒性细胞(例如自然杀伤(NK)细胞、嗜中性粒细胞和巨噬细胞)识别靶细胞上的结合抗体并随后致使靶细胞裂解。

[0102] 抗体诱导ADCC的能力可以通过工程改造其寡糖成分来增强。人IgG1或IgG3在Asn297处被熟知的双分枝G0、G0F、G1、G1F、G2或G2F形式的大多数聚糖N-糖基化。未工程化的CHO细胞所产生的抗体通常具有约至少85%的聚糖岩藻糖含量。从连接到Fc区的双分枝复合物型低聚糖去除核心岩藻糖,经由改善的Fc γ RIIIa结合来增强抗体的ADCC,而不会改变抗原结合或CDC活性。此类抗体可以使用所报告的用于引起具有双分枝复合物型Fc低聚糖的相对较高去岩藻糖基化抗体的成功表达的不同方法实现,这些方法诸如控制培养物渗透压(Konno等人,Cytotechnology 64:249-65,2012)、应用变体CHO细胞系Lec13作为宿主细胞系(Shields等人,JBiol Chem 277:26733-26740,2002)、应用变体CHO细胞系EB66作为宿主细胞系(Olivier等人,MAbs;2(4),2010;Epub ahead of print;PMID:20562582)、应用大鼠杂交瘤细胞系YB2/0作为宿主细胞系(Shinkawa等人,J Biol Chem 278:3466-3473,2003)、引入特异性地针对α-1,6-岩藻糖基转移酶(FUT8)基因的小干扰RNA(Mori等人,Biotechnol Bioeng 88:901-908,2004),或者共表达β-1,4-N-乙酰葡萄糖胺基转移酶III和高尔基体α-甘露糖苷酶II或强效α-甘露糖苷酶I抑制剂、几夫碱(Ferrara等人,J Biol Chem 281:5032-5036,2006;Ferrara等人,Biotechnol Bioeng93:851-861,2006;Xhou等人,Biotechnol Bioeng,99:652-65,2008)。

[0103] 在本文所述的一些实施方案中,还可以通过抗体Fc中的某些置换来增强由抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体引发的ADCC。示例性置换包括例如在氨基酸位置256、290、298、312、356、330、333、334、360、378或430(根据EU索引对残基进行编号)处的置换,如美国专利号6,737,056中所述。

[0104] 根据另一个具体方面,本发明涉及分离的抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段,其能够在表达Vβ17的细胞和/或表达CD123的细胞中诱导T细胞依赖性细胞毒性。该双特异性抗体或其抗原结合片段可以例如在体外在表达Vβ17的细胞和/或表达CD123的细胞中以小于约2nM的EC₅₀值诱导T细胞依赖性细胞毒性。在某些实施方案中,EC₅₀小于约

2.0nM、小于约1.9nM、小于约1.8nM、小于约1.7nM、小于约1.6nM、小于约1.5nM、小于约1.4nM、小于约1.3nM、小于约1.2nM、小于约1.1nM、小于约1.0nM、小于约0.9nM、小于约0.8nM、小于约0.7nM、小于约0.6nM、小于约0.5nM、小于约0.4nM、小于约0.3nM、小于约0.2nM以及小于约0.1nM。

[0105] 根据另一个具体方面,本发明涉及分离的抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段,其中该抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段是嵌合的。

[0106] 根据另一个具体方面,本发明涉及分离的抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段,其中该抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段是人的或人源化的。

[0107] 在另一个一般方面,本发明涉及分离的人源化Vβ17单克隆抗体或其抗原结合片段。该分离的人源化Vβ17单克隆抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列具有至少85%、优选地90%、更优选地95%或更高(诸如95%、96%、97%、98%或99%)的同一性的氨基酸序列。在某些实施方案中,该人源化Vβ17单克隆抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

[0108] 在另一个一般方面,本发明涉及编码本文所公开的单克隆抗体或其抗原结合片段的分离的核酸。在另一个一般方面,本发明涉及编码本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段的分离的核酸。本领域的技术人员将理解,可以改变(例如置换、缺失、插入等)蛋白质的编码序列而不改变蛋白质的氨基酸序列。因此,本领域的技术人员将理解,可以变更编码本文所公开的单克隆抗体和/或双特异性抗体的核酸序列,而不改变蛋白质的氨基酸序列。

[0109] 在另一个一般方面,本发明涉及包含本文所公开的分离的核酸的载体。根据本公开,可使用本领域的技术人员已知的任何载体,诸如质粒、粘端质粒、噬菌体载体或病毒载体。在一些实施方案中,载体是重组表达载体,诸如质粒。载体可包括建立表达载体的常规功能的任何元件,例如启动子、核糖体结合元件、终止子、增强子、选择标记和复制起点。启动子可为组成型、诱导型或阻抑型启动子。能够向细胞递送核酸的多种表达载体在本领域中是已知的,并且在本文可用于在细胞中产生抗体或其抗原结合片段。常规克隆技术或人工基因合成可以用于根据本文所公开的实施方案生成重组表达载体。根据本公开,此类技术是本领域技术人员所熟知的。

[0110] 在另一个一般方面,本发明涉及包含编码本文所公开的单克隆抗体和/或双特异性抗体或者其抗原结合片段的分离的核酸的宿主细胞。鉴于本公开,本领域的技术人员已知的任何宿主细胞都可以用于重组表达本文所公开的抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,宿主细胞是大肠杆菌TG1或BL21细胞(用于表达例如scFv或Fab抗体)、CHO-DG44或CHO-K1细胞或HEK293细胞(用于表达例如全长IgG抗体)。根据具体实施方案,通过常规方法诸如化学转染、热休克或电穿孔将重组表达载体转化到宿主细胞中,其中将该重组表达载体稳定整合到宿主细胞基因组中,使得重组核酸有效表达。

[0111] 在另一个一般方面,本发明涉及产生本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段的方法。所述方法包括在产生本文所公开的双特异性抗体或其抗原结合片段的条件下培养包含编码双特异性抗体或其抗原结合片段的核酸的细胞,以及从该细胞或细胞培养物(例如,从上清液)回收抗体或其抗原结合片段。可从细胞收获表达的抗体或其抗原结合片段并且根据本领域已知以及如本文所述的常规技术进行纯化。

[0112] 使用方法

[0113] 在另一个一般方面,本发明涉及靶向癌细胞的表面上的CD123的方法,该方法包括使癌细胞暴露于抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0114] 与V β 17和/或CD123结合的双特异性抗体及其抗原结合片段的功能活性可以通过本领域已知的和如本文所述的方法来表征。用于表征与V β 17和/或CD123结合的抗体及其抗原结合片段的方法包括但不限于亲和力和特异性测定,包括Biacore、ELISA和OctetRed分析;通过FACS检测抗体与癌细胞上的CD123的结合的结合测定;检测抗体与CD8+T细胞或CD4+T细胞上的V β 17的结合的结合测定。根据具体的实施方案,用于表征与V β 17和/或CD123结合的抗体及其抗原结合片段的方法包括以下所述的那些。

[0115] 在另一个一般方面,本发明涉及将表达V β 17的CD8+T细胞或CD4+T细胞引导至癌细胞的方法。所述方法包括使表达V β 17的CD8+T细胞或CD4+T细胞与抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段接触,其中抗体或抗体片段将表达V β 17的CD8+T细胞或CD4+T细胞引导至在其表面上具有CD123的癌细胞。

[0116] 在另一个一般方面,本发明涉及用于抑制癌细胞生长或增殖的方法。所述方法包括使表达V β 17的CD8+T细胞与抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段接触,其中使癌细胞与抗体或抗体片段接触抑制癌细胞的生长或增殖。

[0117] 根据本发明的实施方案,所述抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段可以在缓冲组合物中提供以便储存或使用。用于储存所述抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段的合适缓冲液将通过使储存时的变质最小化、不促进抗体或抗体片段的聚集或者使对储存容器的粘附最小化,来起到维持抗体或抗体片段的稳定性的作用。

[0118] 实施方案

[0119] 本发明提供了以下非限制性实施方案。

[0120] 实施方案1为一种分离的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段,所述分离的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段包含:

[0121] a. 第一重链(HC1);

[0122] b. 第二重链(HC2);

[0123] c. 第一轻链(LC1);以及

[0124] d. 第二轻链(LC2),

[0125] 其中HC1与LC1缔合并且HC2与LC2缔合,并且其中HC1包含重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3,所述重链互补决定区分别包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列,并且LC1包含轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,所述轻链互补决定区分别包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列,以形成第一抗原的结合位点,并且其中HC2和LC2形成第二抗原的结合位点。

[0126] 实施方案2为根据实施方案1所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述第一抗原的所述结合位点与CD8+T细胞或CD4+T细胞上的V β 17结合。

[0127] 实施方案3为根据实施方案1或2所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述第二抗原的所述结合位点与存在于癌细胞的表面上的肿瘤抗原结合。

[0128] 实施方案4为根据实施方案1至3中任一项所述的V β 17双特异性抗体或抗原结合片段,其中HC1和LC1是人源化的。

[0129] 实施方案5为根据实施方案1至4中任一项所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段,其中HC2和LC2与CD123结合。

[0130] 实施方案6为根据实施方案1至5中任一项所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段为IgG同种型。

[0131] 实施方案7为根据实施方案1至6中任一项所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段为IgG4同种型。

[0132] 实施方案8为根据实施方案1至7中任一项所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述双特异性抗体或其抗原结合片段在体外以小于约0.2pM的EC₅₀诱导癌细胞的CD8+或CD4+T细胞依赖性细胞毒性。

[0133] 实施方案9为一种分离的核酸,所述分离的核酸编码根据实施方案1至8中任一项所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段的HC1和LC1。

[0134] 实施方案10为一种分离的核酸,所述分离的核酸编码根据实施方案1至8中任一项所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段的HC2和LC2。

[0135] 实施方案11为一种载体,所述载体包含根据实施方案9或实施方案10所述的分离的核酸。

[0136] 实施方案12为一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据实施方案11所述的载体。

[0137] 实施方案13为一种缓冲组合物,所述缓冲组合物包含根据实施方案1至8中任一项所述的分离的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段,以及缓冲溶液。

[0138] 实施方案14为一种分离的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段,其包含:

[0139] a. 第一重链(HC1);

[0140] b. 第二重链(HC2)

[0141] c. 第一轻链(LC1);以及

[0142] d. 第二轻链(LC2),其中HC1与LC1缔合并且HC2与LC2缔合,并且其中HC1包含重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3,所述重链互补决定区分别包含SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3的氨基酸序列,并且LC1包含轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,所述轻链互补决定区分别包含SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6的氨基酸序列,以形成特异性结合V β 17的第一抗原的结合位点,并且其中HC2包含重链互补决定区1(HCDR1)、HCDR2和HCDR3,所述重链互补决定区分别包含SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35和SEQ ID NO:36的氨基酸序列,并且LC2包含轻链互补决定区1(LCDR1)、LCDR2和LCDR3,所述轻链互补决定区分别包含SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38和SEQ ID NO:39的氨基酸序列,以形成特异性结合CD123的第二抗原的结合位点。

[0143] 实施方案15为根据实施方案14所述的分离的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或抗原结合片段,其中HC1包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列并且LC1包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列,并且其中HC2包含SEQ ID NO:15的氨基酸序列并且LC2包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

[0144] 实施方案16为根据实施方案14或实施方案15所述的分离的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段,其中所述V β 17位于CD8+T细胞或CD4+T细胞的表面上。

[0145] 实施方案17为根据实施方案14至16中任一项所述的分离的抗V β 17/抗CD123双特

异性抗体或其抗原结合片段,其中所述CD123位于癌细胞的表面上。

[0146] 实施方案18为根据实施方案14至17中任一项所述的分离的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段,其中双特异性抗体或其抗原结合片段在体外以小于约0.2pM的EC₅₀诱导癌细胞的CD8+或CD4+T细胞依赖性细胞毒性。

[0147] 实施方案19为一种分离的核酸,所述分离的核酸编码根据实施方案14至18中任一项所述的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段的所述HC1和所述LC1。

[0148] 实施方案20为一种分离的核酸,所述分离的核酸编码根据实施方案14至18中任一项所述的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段的所述HC2和所述LC2。

[0149] 实施方案21为一种载体,所述载体包含根据实施方案19或实施方案20所述的分离的核酸。

[0150] 实施方案22为一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据实施方案21所述的载体。

[0151] 实施方案23为一种缓冲组合物,所述缓冲组合物包含根据实施方案14至18中任一项所述的分离的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段,以及缓冲溶液。

[0152] 实施方案24为一种将表达V β 17的CD8+T细胞或CD4+T细胞引导至癌细胞的方法,所述方法包括使表达V β 17的CD8+T细胞或CD4+T细胞与根据实施方案1至8或14至18中任一项所述的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段接触,其中使所述表达V β 17的CD8+T细胞或CD4+T细胞与所述抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段接触将所述表达V β 17的CD8+T细胞或CD4+T细胞引导至在其表面上具有CD123的癌细胞。

[0153] 实施方案24(a)为根据实施方案24所述的方法,其中使所述表达V β 17的CD8+T细胞或CD4+T细胞与根据实施方案1至8或14至18中任一项所述的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体接触。

[0154] 实施方案24(b)为根据实施方案24所述的方法,其中使所述表达V β 17的CD8+T细胞或CD4+T细胞与根据实施方案1至8或14至18中任一项所述的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体片段接触。

[0155] 实施方案25为一种用于抑制在其表面上表达CD123的癌细胞的生长或增殖的方法,所述方法包括使所述癌细胞与根据实施方案1至8或14至18中任一项所述的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其片段接触,其中使所述癌细胞与所述抗体或抗体片段接触抑制所述癌细胞的生长或增殖。

[0156] 实施方案25(a)为根据实施方案25所述的方法,其中所述表达CD123的癌细胞在表达V β 17的CD8+T细胞的存在下,同时与抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其片段接触。

[0157] 实施方案25(b)为根据实施方案25或25(a)所述的方法,其中使所述表达CD123的癌细胞与根据实施方案1至8或14至18中任一项所述的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体接触。

[0158] 实施方案25(c)为根据实施方案25或25(a)所述的方法,其中使所述表达CD123的癌细胞与根据实施方案1至8或14至18中任一项所述的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体片段接触。

[0159] 实施方案26为一种试剂盒,所述试剂盒包括根据实施方案1至8中任一项所述的V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段及其包装。

[0160] 实施方案27为一种试剂盒,所述试剂盒包括根据实施方案14至18中任一项所述的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段及其包装。

[0161] 实施方案28为一种产生V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括在产生所述V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段的条件下培养根据实施方案12所述的宿主细胞,以及从所述细胞或培养物回收所述V β 17双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0162] 实施方案29为一种产生根据实施方案14至18中任一项所述的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段的方法,所述方法包括在产生所述抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段的条件下培养根据实施方案22所述的宿主细胞,以及从所述细胞或培养物回收所述抗V β 17/抗CD123双特异性抗体或其抗原结合片段。

[0163] 实施方案30为一种分离的人源化V β 17单克隆抗体或其抗原结合片段,所述V β 17单克隆抗体或其抗原结合片段包含与SEQ ID NO:28的氨基酸序列具有至少95%同一性的氨基酸序列。

[0164] 实施方案31为根据实施方案30所述的分离的人源化V β 17单克隆抗体或其抗原结合片段,其中所述V β 17单克隆抗体或其抗原结合片段包含SEQ ID NO:28的氨基酸序列。

[0165] 实施方案32为一种分离的核酸,所述分离的核酸编码根据实施方案30或实施方案31所述的人源化V β 17单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0166] 实施方案33为一种载体,所述载体包含根据实施方案32所述的分离的核酸。

[0167] 实施方案34为一种宿主细胞,所述宿主细胞包含根据实施方案33所述的载体。

[0168] 实施方案35为一种缓冲组合物,所述缓冲组合物包含根据实施方案30或实施方案31所述的分离的人源化V β 17单克隆抗体或其抗原结合片段。

[0169] 实施例

[0170] 以下实施例基于这样的前提:源自流感病毒的肽M1能够扩增一组选择的T细胞。这些细胞表达TCR-单倍型-V β 17,并且这些细胞中的大多数表现出肿瘤靶细胞的有效细胞毒性。然后使用双特异性抗体来利用这种能力,所述双特异性抗体被构建成使得一条臂与V β 17结构结合,而另一条臂与由癌细胞表达的抗原结合。因此,所述双特异性抗体将效应细胞和靶细胞桥接在一起,从而导致癌细胞杀伤。这种作用机制在图1中概述的示意图中描述。

[0171] 随后的实施例可以被分成以下类别:(1)产生能够与CTL上的T细胞受体(TCR)的V β 17臂结合的双特异性抗体(实施例1和实施例2);以及(2)由体外扩增的CTL进行的双特异性抗体启动的靶细胞杀伤的证据(实施例3)。

[0172] 实施例1:抗V β 17mAbE17.5F的人框架适应

[0173] 小鼠IgG1抗人T细胞受体V β 17克隆E17.5F获自BeckmanCoulter, Inc. (Brea, CA)。样品制备和LC/MSMS分析在Protea Bioscience Inc. (Morgantown, WV) 进行。将样品还原并烷基化,分成七份等分试样,用胰蛋白酶/LysC、胰凝乳蛋白酶、LysC、胃蛋白酶和AspN、弹性蛋白酶和蛋白酶K酶进行蛋白水解消化。使用ZipTip C18移液管末端将所得的肽脱盐,并且使用反相层析在线分离。在Thermo Q-Exactive质谱仪上使用HCD碎片化进行质谱分析。使用PEAKS软件,通过将从头序列标签与基于IMGT的抗体序列数据库进行匹配,来分析MS数据集。使用从头鉴定的肽的重叠群序列组装来指定序列中的空位。通过检查MS/MS谱确认所有的CDR和超突变。

[0174] 所获得的序列在表1和表2中示出。

[0175] 表1:TCR V β 17克隆E17.5F的CDR序列

[0176]	抗体	HCDR1	SEQ ID NO:	HCDR2	SEQ ID NO:	HCDR3	SEQ ID NO:
	E17.5F	GYSITSGYFWN	1	YISYDGSNN	2	PSPGTGYAVDY	3
	抗体	LCDR1	SEQ ID NO:	LCDR2	SEQ ID NO:	LCDR3	SEQ ID NO:
	E17.5F	RSSQSLVHSNGNTYLH	4	KVSNRFS	5	SQSTHVPFT	6

[0177] 表2:TCR Vb17克隆E17.5F的重链序列和轻链序列

[0178]	mAb ID	重链氨基酸序列	SEQ ID NO:
	B17B 01	NVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVAGYSITSGYFWNWIRQFPGN KLEWMGYISYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTE DTATYYCASPPGTGYAVDYWGQTSVTVSSAKTTPPSVYPLAP GSAAQTNSMVTLGCLVKGYFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVL QSDLYTLSSSVTPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKVDKIVPRDC GCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPKDVLITLTPKVTCVVVDISKDDPE VQFSWFVDDVEVHTAQTKEPREEQINSTFRSVSELPIMHQDWLNG KEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKITYGRPKAPQVYTIPPPKEQMAKD KVSLTCMITNFFPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDGSYF VYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGLNHHTTEKSLSHSPGK	7
		轻链氨基酸序列	SEQ ID NO:
	B17B 01	NVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQK PGQSPKFLIYKVSNRFSQVPDRFSGGGSGTEFTLKISRVEAEDLGV YFCSQSSTHVPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFYPKDINVWKIDGSEKQNGVLNSWTDQDSKSTYS MSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRECE	8

[0179] 对序列进行改变以制备双特异性抗体(表3)。所述改变包括以下各项:(1)重链的框架突变Asn1不保守,因此该序列已被修饰成具有DVQLW序列;(2)在Fc中鉴定的另一个突变K337Y被认为是非特征性的,因此合成了没有该突变的构建体;以及(3)在重链上观察到一个潜在的二次糖基化位点,因此合成了具有和不具有N连接位点(N82a,基于Chothia编号)的两种型式的这种mAb。

[0180] 表3:Vβ17克隆E17.5F抗体变体的重链序列和轻链序列

[0181]

mAb ID	重链氨基酸序列	SEQ ID NO:
B17B 1	NVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVAGYSITSGYFWNWIRQFPGN KLEWMGYISYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTE DTATYYCASPSPGTGYAVDYWGQGTSTVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESK YGPCCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LSDSGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKS LSLSLGK	9
B17B 2	DVQLKESGPGLVKPSQSLSVTCSVTGYSITSGYYWNWYRQFPGN KLEWMGYISYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKNQILLKLTVTTE DTATYYCTRPSPGTGYAVDYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAP CSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVL QSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESK YGPCCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDV SQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP SQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPV LSDSGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHREALHNHYTQKS LSLSLGK	11
	轻链氨基酸序列	SEQ ID NO:
B17B 1	NVVMQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQK PGQSPKFLIYKVSNRFSGVPDRFSGGSGTEFTLKISRVEAEDLGV YFCSQSTHVPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYS MSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRECE	10
B17B 2	DIVMTQSPDLSAVSLGERATINCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQQK PGQPPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAV YYCSQSTHVPFTFGQGTKEIKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGAS VVCFLNNFYPKDINVKWKIDGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYS MSSTLTTLTKDEYERHNSYTCEATHKSTSTSPIVKSFNRECE	12

[0182] 这两种抗体 (B17B1和B17B2) 在HEK293Expi细胞中表达。测试上清液的V β 17结合 (B17B1和B17B2), 只有B17B1显示结合。因此, B17B1被表达为具有带Fc置换的IgG4恒定区。

[0183] 使用人构架适应 (HFA) 方法将抗人TCR V β 17小鼠mAb B17B1人源化 (Fransson J等人, J.Mol.Biol.2010;398:214-231)。为了寻找人源化重链和轻链的最佳组合, 选择了几种人V区序列进行测试 (表4)。人种系的选择仅基于框架 (FR) 区中与小鼠抗体的总体序列相似性。在该选择中既不考虑CDR序列, 也不考虑它们的长度或规范结构。

[0184] HFA中使用的CDR定义在 (Fransson J等人, J.Mol.Biol.2010;398:214-231) 中有所描述并且对应于Martin的定义 (Abhinandan KR和Martin AC., Mol.Immunol.2008;45:3832-3839)。CDR (表1) 如下所述定义 (使用Chothia编号方案 [Chothia C和Lesk A.J.Mol.Biol.1987;196:901-917]):

[0185] HCDR1 (SEQ ID NO:1) 26-35

[0186] HCDR2 (SEQ ID NO:2) 50-58

[0187] HCDR3 (SEQ ID NO:3) 95-102

- [0188] LCDR1 (SEQ ID NO:4) 24-34
 [0189] LCDR2 (SEQ ID NO:5) 50-56
 [0190] LCDR3 (SEQ ID NO:6) 89-97
 [0191] 所选择的人种系在表4中提供 (以IMGT符号)。
 [0192] 表4:VH变体和VL变体

Ab VH	序列	SEQ ID NO :
B17H 1	NVQLQESGPGLVKPSQSLSTCSVAGYSITSGYFWNWIRQFPGNKLEWMG <u>YISYDGSNNYNPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTATYYCASPPG</u> <u>TGYAVDYGQGTSTVTVSS</u>	25
B17H 3	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAASGY SITSGYFWN WVRQAPGKGLEWVS <u>YISYDGSNNY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAK <u>PSP</u> <u>GTGYAVDYGQGT</u> LVTVSS	19
[0193] B17H 4	EVQLLES GGGLV QPGGSLRLSCAASGY SITSGYFWN WVRQAPGKGLEWVS <u>YISYDGSNNY</u> ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMN SLRAEDTAVYYCAS <u>PSPG</u> <u>TGYAVDYGQGT</u> LVTVSS	20
B17H 5	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITSGYFWNWIRQPPGKGLEWIGYIS <u>YDGSNNYNPSLKS</u> RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAS <u>PSPGTGY</u> <u>AVDYGQGT</u> LVTVSS	21
Ab VL	序列	SEQ ID NO :
B17L1	NVVM TQTPLSLP VS LG DQASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYLQKPGQSPKFLI Y <u>KVSNRFS</u> GV PDRFSGGSG TEFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPFTFGSGT	26
	KL EIK	
B17L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQKPGKAPKLLI Y <u>KVSNRFS</u> GV PSRFS SGSGTDFTLTIS SLQ PEDFATYYCSQSTHVPFTFGQGTK L EIK	22
[0194] B17L4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQKPGKAPKFLI Y <u>KVSNRFS</u> GV PSRFS SGSGTDFTLTIS SLQ PEDFATYYCSQSTHVPFTFGQGTK L EIK	23
B17L5	DVVM TQSPLSLP VT LG QPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWFQRPQGSPRFLI Y <u>KVSNRFS</u> GV PDRFSGGSG TDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPFTFGQGT KL EIK	24

- [0195] CDR 1至3标有下划线
 [0196] 在已知对于VL/VH配对和CDR构象很重要的FR位置处引入几种变体中的“回复突变”。所选择的人种系在表5中提供 (以IMGT符号),其中注明了回复突变。
 [0197] 表5:所选的J区

[0198]	J 区	序列	SEQ ID NO:
	IGHJ1*01 HC	WGQGTLLVTVSS	42
	IGKJ2*01 LC	FGQGTTKLEIK	43

[0199] 将三条重链和三条轻链的所有九个成对组合的氨基酸序列反向翻译成DNA,并且使用基因合成技术(美国专利号6,670,127、美国专利号6,521,427)制备cDNA。使用标准分子生物学技术,使用具有CMV启动子的内部表达载体将重链(HC)可变区亚克隆到人IgG4恒定区上。使用标准分子生物学技术,使用具有CMV启动子的内部表达载体将轻链(LC)可变区亚克隆到人 λ 恒定区上。将所得的质粒转染到HEK EXPI细胞(LifeTechnologies;Carlsbad, CA)中,并且表达mAb。通过使用蛋白A柱(hiTrapMabSelect SuRe柱)的标准方法进行纯化。洗脱后,将收集物透析至D-PBS(pH 7.2)。

[0200] 表6:九种人源化V β 17抗体的重链和轻链

[0201]	mAb	Hc	SEQ ID NO:	Lc	SEQ ID NO:	浓度 (μ g/mL)
	B17B14	B17H3	19	B17L3	22	686.3
	B17B15	B17H3	19	B17L4	23	13.8
	B17B16	B17H3	19	B17L5	24	14.6
	B17B17	B17H4	20	B17L3	22	335.1
	B17B18	B17H4	20	B17L4	23	45.2
	B17B19	B17H4	20	B17L5	24	27.5
	B17B20	B17H5	21	B17L3	22	602.1
	B17B21	B17H5	21	B17L4	23	570.9
	B17B22	B17H5	21	B17L5	24	320.5

[0202] 通过ELISA筛选人源化抗体与TCRV β 17 (SEQ ID NO:27)/Va10.2-Fc (SEQ ID NO:44)融合蛋白的结合。将生物素化的TCRV β 17/Va10.2-Fc融合蛋白添加到链霉抗生物素蛋白包被的ELISA板中。洗去未结合的蛋白质,并且以一系列浓度(0.01 μ g/mL至10 μ g/mL)添加mAb。洗涤板,并且添加抗 κ :HRP检测抗体。洗涤板,添加化学发光检测试剂,并且在Perkin Elmer EnVision读板机上读取板的发光。B17B20和B17B21示出与TCR-V β 17蛋白质的阳性结合。B17B22示出与该蛋白质的弱结合。然后如上所述纯化这些抗体以供进一步研究。B17B21证明与重组TCR-V β 17蛋白质和M1刺激的T细胞的结合最好,因此被选择为供进一步的功能研究(尤其是作为双特异性抗体进行对癌细胞的T细胞重定向杀伤)的分子。

[0203] 因此,B17B21(抗V β 17)和I3RB217(抗CD123抗体)的可变区序列用于产生双特异性抗体,该双特异性抗体将针对急性髓系白血病(AML)细胞的T细胞重定向杀伤进行测试。

[0204] 实施例2. 抗V β 17/抗CD123双特异性抗体的制备

[0205] VB11(抗V β 17/抗CD123)和VB13(V β 17 $\times$ Null)双特异性抗体以杵臼结构的形式作为全长抗体产生,得到人IgG4,如前所述(Atwell等人,J.Mol.Biol.270:26-35,1997)。使用基于克隆技术的标准PCR限制性酶将编码可变区的核酸序列亚克隆到含有IgG4表达盒恒定区的定制哺乳动物表达载体中。通过在中国仓鼠卵巢细胞系中瞬时转染来表达所述双特异性抗体。所述抗体最初通过Mab Select SuRe蛋白质A柱(GE healthcare,Piscataway,New Jersey)来纯化(Brown、Bottomley等人,1998)。用pH7.2的磷酸盐缓冲盐水(PBS)来平衡柱,并且以2mL/min的流速将发酵上清液上样。上样后,将柱用PBS(4CV)洗涤,然后在pH 3.5的

30mM乙酸钠中洗脱。将含有蛋白质峰的级分合并在一起,并且通过添加1%的3M乙酸钠(pH 9.0)中和至pH 5.0,所述蛋白质峰通过Akta Explorer(GE healthcare)中280nm处的吸光度进行监测。作为精制步骤,在制备型尺寸排阻色谱(SEC)上使用Superdex 200柱(GE healthcare)将所述抗体纯化。通过内毒素测量和SDS聚丙烯酰胺凝胶电泳在还原条件和非还原条件下评估样品的完整性。抗Vβ17/抗CD123的最终蛋白质浓度为0.48mg/ml,并且Vβ17×Nu11的最终蛋白质浓度为0.24mg/mL。基于这些蛋白质浓度,抗Vβ17/抗CD123和Vβ17×Nu11的最终EU水平分别为2.053EU/mg和4.219EU/mg。

[0206] 表7:在CHO细胞中表达的半抗体的序列

mAb ID	“杵”臂和“白”臂的氨基酸序列	SEQ ID NO:
B17B21 (Vβ17半抗体)	MAVWWTLLFLMAAAQSIQADIQMTQSPSSLSASVGDRVITIC RSSQSLVHSNGNTYLHWYQQKPGKAPKFLIYKVSNRFSGVPSR FSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCSQSTHVPFTFGQGTKLEI KRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWK VDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVY ACEVTHQGLSPVTKSFNRGECGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSS GSGSESKSTGGSQVQLQESGPGLVKPSSETLSLTCTVSGYSITSG YFWNWIRQPPGKGLEWIGYISYDGSNNYNPSLKSRTISRDT KNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASPSPTGYAVDYWGQGTLLT VSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTKYTCNV DHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPK DTLMISRTPEVTCVVDVVSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKT KPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSS IEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPS DIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRLLTVDKSRWQ EGNVFSCSVMHEALHNRFTQKSLSLSLGK	28
I3RB217 (CD123半抗体)	MAVWWTLLFLMAAAQSIQAEIVLTQSPGTLSPGERATLSCR ASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDYGFPTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSPVTKSFNRGECGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGS ESKSTGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIS WVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQGQVTISADKSIST	30

[0208]

	AYLQWSSLKASDTAMYYCARGDGSTDLDYWGQGT LVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNV DHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	
B23B4 9 (Null 半抗 体)	MAWVWTLFLMAAAQSIQAEIVLTQSPGTLSPGERATLSCR ASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGS GTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDYGFPWTFGQGTKVEIKRTV AAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNA LQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGECGGSEGKSSGSGSESKSTEGKSSGSGS ESKSTGGSEVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIS WVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSITRYSPSFQGGQVTISADKSIST AYLQWSSLKASDTAMYYCARGDGSTDLDYWGQGT LVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGA LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLG TKTYTCNV DHKP SNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREE QFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTIS KAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGN VFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK	
	半抗体 DNA 序列	
B17B2 1 (Vβ17 半抗 体)	ATGGCCTGGGTGTGGACCCTGCTGTTCTGATGGCCGCCGC CCAGAGCATCCAGGCCGACATCCAGATGACCCAGAGCCCA AGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACCGCGTGACCATCAC CTGCCGCAGCAGCCAGAGCCTGGTGACAGCAACGGCAAC ACCTACCTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCC AAAGTTCCTGATCTACAAGGTGAGCAACCGCTTCAGCGGCG TGCCAAGCCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTC ACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTTCGCCAC CTACTACTGCAGCCAGAGCACCCACGTGCCATTACCTTCG GCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGCACCGTGCCGC CCCAAGCGTGTTTCATCTTCCCACCAAGCGACGAGCAGCTGA AGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTC TACCCACGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACG CCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCA GGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCCCTG ACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACG CCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCAGTGACC AAGAGCTTCAACCGCGGCGAGTGCGGCGGCAGCGAGGGCA AGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCACCGAGGG CAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCACCGGC GGCAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCAGGCCTGG TGAAGCCAAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGC	29

[0209]

GGCTACAGCATCACCAGCGGCTACTTCTGGAAGTGGATCCG
CCAGCCACCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCTACATCA
GCTACGACGGCAGCAACAACCTACAACCCAAGCCTGAAGAG
CCGCGTGACCATCAGCCGCGACACCAGCAAGAACCAGTTCA
GCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGACACCGCCGTG
TACTACTGCGCCAGCCCAAGCCCAGGCACCGGCTACGCCGT
GGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGAGCAGC
GCCAGCACCAAGGGCCCCAAGCGTGTTCCCACTGGCCCCATG
CAGCCGCAGCACCAGCGAGAGCACCAGCCGCCCTGGGCTGCC
TGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCAGTGACCGTGAGCTGG
AACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCAGC
CGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTG
TGACCGTGCCAAGCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACC
TGCAACGTGGACCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTGGACA
AGCGCGTGAGAGCAAGTACGGCCCCACCATGCCACCACATGC
CCAGCCCCAGAGGGCCGCCGGCGGCCCAAGCGTGTTCTCTGT
CCCACCAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACCC
CAGAGGTGACCTGCGTGTTGGTGGACGTGAGCCAGGAGGA
CCCAGAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGG
TGCAACGCAAGACCAAGCCACGCGAGGAGCAGTTCAA
CAGCACCTACCGCGTGTTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACC
AGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAG
CAACAAGGGCCTGCCAAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGC
AAGGCCAAGGGCCAGCCACGCGAGCCACAGGTGTACACCC
TGCCACCAAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAG
CCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGCTTCTACCCAAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAATA
CAAGACCACCCACCAAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCT
TCCTGGTGAGCCGCCTGACCGTGGAACAAGAGCCGCTGGCAG
GAGGGCAACGTGTTCACTGCTGACGCGTGATGCACGAGGCCCT
GCACAACCGCTTACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCTGG
GCAAGATGGCCTGGGTGTGGACCCTGCTGTTCTCTGATGGCC
GCCGCCAGAGCATCCAGGCCGACATCCAGATGACCCAGA
GCCCAAGCAGCCTGAGCGCCAGCGTGGGCGACCGCGTGAC
CATCACCTGCCGAGCAGCCAGAGCCTGGTGCACAGCAACG
GCAACACCTACCTGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAA
GGCCCCAAAGTTCTCTGATCTACAAGGTGAGCAACCGCTTCA
GCGGCGTGCCAAGCCGCTTACGCGGCAGCGGCAGCGGCAC
CGACTTCACCCTGACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACT
TCGCCACCTACTACTGCAGCCAGAGCACCCACGTGCCATTC
ACCTTCGGCCAGGGCACCAAGCTGGAGATCAAGCGCACCGT
GGCCGCCCCAAGCGTGTTTCATCTTCCCACCAAGCGACGAGC
AGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGCGTGTTGTGCCTGCTGAAC
AACTTCTACCCACGCGAGGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTGG
ACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGAC
CGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGC
ACCCTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGG
TGACGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCA
GTGACCAAGAGCTTCAACCGCGGCGAGTGCGGCGGCAGCG

[0210]

	AGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCAC CGAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGC ACCGGCGGCAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAGAGCGGCCAG GCCTGGTGAAGCCAAGCGAGACCCTGAGCCTGACCTGCACC GTGAGCGGCTACAGCATCACCAGCGGCTACTTCTGGAAGT GATCCGCCAGCCACCAGGCAAGGGCCTGGAGTGGATCGGCT ACATCAGCTACGACGGCAGCAACAATAACAACCAAGCCTG AAGAGCCGCGTGACCATCAGCCGCGACACCAGCAAGAACC AGTTCAGCCTGAAGCTGAGCAGCGTGACCGCCGCCGACACC GCCGTGTACTACTGCGCCAGCCCAAGCCCAGGCACCGGCTA CGCCGTGGACTACTGGGGCCAGGGCACCCCTGGTGACCGTGA GCAGCGCCAGCACCAAGGGCCCAAGCGTGTTCCCACTGGCC CCATGCAGCCGCGAGCACCAGCGAGAGCACCAGCCGCCCTGG GCTGCCTGGTGAAGGACTACTTCCCAGAGCCAGTGACCGTG AGCTGGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACCTT CCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCA GCGTGGTGACCGTGCCAAGCAGCAGCCTGGGCACCAAGAC CTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCAAGCAACACCAAG GTGGACAAGCGCGTGGAGAGCAAGTACGGCCCACCATGCC CACCATGCCCAGCCCCAGAGGCCGCGGCGGCCCAAGCGTG TTCCTGTTCCCAACCAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCAG CCGCACCCCAGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGAGCC AGGAGGACCCAGAGGTGACGTTCAACTGGTACGTGGACGG CGTGGAGGTGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGCGAGGAG CAGTTCAACAGCACCTACCGCGTGGTGAGCGTGCTGACCGT GCTGCACCAGGACTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGC AAGGTGAGCAACAAGGGCCTGCCAAGCAGCATCGAGAAGA CCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCACGCGAGCCACAGGT GTACACCCTGCCACCAAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAAC CAGGTGAGCCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGCTTCTACCCAAG CGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAG AACAACTACAAGACCACCCACACAGTGCTGGACAGCGACG GCAGCTTCTTCCTGGTGAGCCGCTGACCGTGGACAAGAGC CGCTGGCAGGAGGGCAACGTGTTACGCTGCAGCGTGATGCA CGAGGCCCTGCACAACCGCTTACCCAGAAGAGCCTGAGCC TGAGCCTGGGCAAGTGATAG	
I3RB21 7 (CD1 23 半抗 体)	ATGGCCTGGGTGTGGACCCTGCTGTTTCCTGATGGCCGCCGC CCAGAGCATCCAGGCCGAGATCGTGCTGACCCAGAGCCAG GCACCCTGAGCCTGAGCCCAGGCGAGCGCGCCACCCTGAGC TGCCGCGCCAGCCAGAGCGTGAGCAGCAGCTACCTGGCCTG GTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGGCCCCACGCCTGCTGATCT ACGGCGCCAGCAGCCGCGCCACCGGCATCCCAGACCGCTTC AGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGACCATCAG CCGCTGGAGCCAGAGGACTTCGCCGTGTACTACTGCCAGC AGGACTACGGCTTCCCATGGACCTTCGGCCAGGGCACCAAG GTGGAGATCAAGCGCACCGTGCCGCCCCCAAGCGTGTTTCAT CTTCCACCAAGCGACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCC AGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAATTCTACCCACGCGAGGC CAAGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTGCAGAGCGGC	31

[0211]

	AACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAAGGACA GCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTTGACCCTGAGCAAGGCC GACTACGAGAAGCACAAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCC ACCAGGGCCTGAGCAGCCCAGTGACCAAGAGCTTCAACCGC GGCGAGTGCggcggcagcgagggcaagagcagcggcagcggcagcgagagcaaga gcaccgagggcaagagcagcggcagcggcagcgagagcaagagcaccggcggcagcGA GGTGCAGCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAGAAGCCA GGCGAGAGCCTGAAGATCAGCTGCAAGGGCAGCGGCTACA GCTTACCAGCTACTGGATCAGCTGGGTGCGCCAGATGCCA GGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCATCATCGACCCAAGCG ACAGCGACACCCGCTACAGCCCAAGCTTCCAGGGCCAGGTG ACCATCAGCGCCGACAAGAGCATCAGCACCGCCTACCTGCA GTGGAGCAGCCTGAAGGCCAGCGACACCGCCATGTACTACT GCGCCCGCGGCGACGGCAGCACCGACCTGGACTACTGGGG CCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCACCAAG GGCCCAAGCGTGTTCCCACTGGCCCCATGCAGCCGCAGCAC CAGCGAGAGCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACT ACTTCCAGAGCCAGTGACCGTGAGCTGGAACAGCGGCGCC CTGACCAGCGGCGTGACACCTTCCCAGCCGTGCTGCAGAG CAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACCGTGCCAA GCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGAC CACAAGCCAAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGCGTGAGGA GCAAGTACGGCCACCATGCCCACCATGCCCAGCCCCAGAG GCCGCCGGCGGCCCAAGCGTGTTCTGTTCACCAAAAGCC AAAGGACACCTGATGATCAGCCGCACCCCAGAGGTGACCT GCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAGGACCCAGAGGTGCA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCACAACGCCA AGACCAAGCCACGCGAGGAGCAGTTCAACAGCACCTACCG CGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAACAAGGGCCT GCCAAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGC CAGCCACGCGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCACCAAGCCA GGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGTGGTGCTG GTGAAGGGCTTCTACCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAACACTACAAGACCACCCA CCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGTACAGCCG CCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGGAGGGCAACGTG TTCAGCTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTA CACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG	
B23B4 9 (Null 半抗 体)	ATGGCCTGGGTGTGGACCCTGCTGTTCTGATGGCCGCCGC CCAGAGCATCCAGGCCGACATCGTGATGACCCAGAGCCAG ACAGCCTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGCGCCACCATCAAC TGCCGCGCCAGCCAGAGCGTGGACTACAACGGCATCAGCTA CATGCACTGGTACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCAAAG CTGCTGATCTACGCCGCCAGCAACCCAGAGAGCGGCGTGCC AGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCC TGACCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTGGCCGTGTAC TACTGCCAGCAGATCATCGAGGACCCATGGACCTTCGGCCA GGGCACCAAGGTGGAGATCAAGCGCACCGTGGCCGCCCA	

[0212]

AGCGTGTTTCATCTTCCCACCAAGCGACGAGCAGCTGAAGAG
 CGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACTTCTACC
 CACGCGAGGCCAAGGTGTCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCT
 GCAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGAC
 AGCAAGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCTGACCTT
 GAGCAAGGCCGACTACGAGAAGCACAAGGTGTACGCCTGC
 GAGGTGACCCACCAGGGCCTGAGCAGCCCAGTGACCAAGA
 GCTTCAACCGCGGCGAGTGCGGCGGCAGCGAGGGCAAGAG
 CAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCACCGAGGGCAAG
 AGCAGCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCACCGGCGGCA
 GCCAGATCACCTGAAGGAGAGCGGCCCAACCCTGGTGAA
 GCCAACCCAGACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCAGCGGCT
 TCAGCCTGAGCACCAAGCGGCATGGGCGTGAGCTGGATCCGC
 CAGCCACCAGGCAAGGCCCTGGAGTGGCTGGCCCACATCTA
 CTGGGACGACGACAAGCGCTACAACCCAAGCCTGAAGAGC
 CGCCTGACCATCACCAAGGACACCAGCAAGAACCAGGTGG
 TGCTGACCATGACCAACATGGACCCAGTGGACACCGCCACC
 TACTACTGCGCCCGCCTGTACGGCTTCACCTACGGCTTCGCC
 TACTGGGGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAG
 CACCAAGGGCCCAAGCGTGTTCCCACTGGCCCCATGCAGCC
 GCAGCACCAAGCGAGAGCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTG
 AAGGACTACTTCCCAGAGCCAGTGACCGTGAGCTGGAACAG
 CGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCAGCCGTGC
 TGCAGAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACC
 GTGCCAAGCAGCAGCCTGGGCACCAAGACCTACACCTGCAA
 CGTGGACCACAAGCCAAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGC
 GTGGAGAGCAAGTACGGCCCCACCATGCCACCATGCCACG
 CCCAGAGGCCGCCGGCGGCCCAAGCGTGTTCCCTGTTCCCAC
 CAAAGCCAAAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACCCCAGA
 GGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCAGGAGGACCCA
 GAGGTGCAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCA
 CAACGCCAAGACCAAGCCACGCGAGGAGCAGTTCAACAGC
 ACCTACCGCGTGGTGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGA
 CTGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAAC
 AAGGGCCTGCCAAGCAGCATCGAGAAGACCATCAGCAAGG
 CCAAGGGCCAGCCACGCGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCA
 CCAAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGGTGAGCCTGT
 GGTGCCTGGTGAAGGGCTTCTACCCAAGCGACATCGCCGTG
 GAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAACACTACAAGA
 CCACCCACCAGTGCTGGACAGCGACGGCAGCTTCTTCTGT
 TACAGCCGCCTGACCGTGACCAAGAGCCGCTGGCAGGAGG
 GCAACGTGTTTACGTGCAGCGTGATGCACGAGGCCCTGCAC
 AACCACTACACCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCTGGGCA
 AG

[0213] 表8:Vβ17双特异性抗体的重链序列和轻链序列

[0214]

双特异性 抗体		氨基酸序列
抗 V β 17/ 抗 CD123	重链 1 B17B21 (SEQ ID NO: 13)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITSGYFW NWIRQPPGKGLEWIGYISYDGSNNYNPSLKSRTI SRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASPSPGTG YAVDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT FPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRLLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSLG K
	轻链 1 B17B21 (SEQ ID NO: 14)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGN TYLHWYQQKPGKAPKFLIYKVSNRFSGVPSRFSG SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPFTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGC
	重链 2 I3RB217 (SEQ ID NO: 15)	EVQLVQSGAEVKKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIS WVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQGGQVT ISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYCYCARGDGST DLDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSE STAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFP AVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDHK SNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWY VDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAV EWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLLTV KSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSLG K
	轻链 2 I3RB217 (SEQ ID NO: 16)	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLA WYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGT DFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDYGFPTFGQGTK VEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNF YPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDST YLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVT KSFNREGC
V β 17 x Null	重链 1 B17B21 (SEQ ID NO: 13)	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITSGYFW NWIRQPPGKGLEWIGYISYDGSNNYNPSLKSRTI SRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCASPSPGTG YAVDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRST SESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHT

[0215]

		FPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVDH KPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEAAAGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQP REPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAVKGFYPSDIA VEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRLLTV DKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNRTQKSLSLSLG K
	轻链 1 B17B21 (SEQ ID NO: 14)	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGN TYLHWYQQKPGKAPKFLIYKVSNRFGVPSRFSG SGSGTDFLTITSLQPEDFATYYCSQSTHVPFTFGQ GTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGEC
	重链 2 Null (SEQ ID NO: 17)	QITLKESGPTLVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMGV SWIRQPPGKALEWLAHIYWDDDKRYNPSSLKSRLT ITKDTSKNQVVLTMNTMDPVDATATYYCARLYGF TYGFAYWGQGLTVTVSSASTKGPSVFPLAPCSRS TSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVH TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGKTYTCNVD HKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCAPEAAAGGPSV FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTV LHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSD IAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSRLLT VDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSL LGK
	轻链 2 Null (SEQ ID NO: 18)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVDYNGIS YMHYQQKPGQPPKLLIYAASNPESGVPRDFSGS GSGTDFLTITSLQAEDVAVYYCQQIIEDPWTFGQ GTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLL NNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNREGEC

[0216] 实施例3.使用Kasumi-3细胞和人CD8⁺T细胞评价抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体的结合特性和细胞毒性特性

[0217] 刺激和扩增来自总PBMC的Vβ17⁺CD8⁺T细胞

[0218] 为了扩增Vβ17⁺CD8⁺T细胞,用1μg/mL流感MP 58肽(DMSO中)刺激来自HLA-A2供体(HPU-08694)的完整PBMC。在培养期的第8天和第14天,测定总体CD8⁺T细胞中Vβ17⁺细胞的频率。为了对总体CD8⁺T细胞中Vβ17⁺细胞的频率进行计数,首先对总体活PBMC进行门控,排除双峰,对总体CD8⁺T细胞进行门控,然后对Vβ17⁺细胞进行门控(图3)。与第0天总体CD8⁺T细胞中Vβ17⁺细胞的频率相比,在培养期的第8天观察到这些细胞的显著扩增(图3)。在第8天,CD8⁺T细胞中的较大部分是该供体中的Vβ17⁺细胞(图3)。

[0219] 抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体结合测定

[0220] 有关Kasumi-3细胞

[0221] 为了理解抗V β 17/抗CD123双特异性抗体的结合动力学,将Kasumi-3细胞与各种浓度(浓度范围从5 μ g/mL至0 μ g/mL)的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体和V β 17XNULL臂对照一起温育。用小鼠抗人IgG4 Fc-PE二抗检测细胞结合的双特异性抗体。表9示出了当用不同浓度的双特异性抗体处理时,对PE(二抗)阳性的Kasumi-3细胞的频率。抗V β 17/抗CD123和NULLXCD123的EC₅₀分别被确定为6nM和42.7nM(表9)。

[0222] 表9:双特异性抗体对Kasumi-3细胞的结合亲和力

浓度 (μ g/mL)	抗 V β 17/抗 CD123	V β 17XNULL	NULLXCD123
5	87.37	-0.02	47.47
1.667	74.37	0.09	16.37
0.556	24.07	0.15	1.2
0.185	1.65	0.35	0.31
0.062	0.32	0.12	0.04
0.021	0.16	0.14	0.05
0.007	0.23	0.19	-0.06
0.002	0.04	-0.09	-0.04
0.001	0.09	0	-0.18
EC ₅₀ (μ g/mL)	0.9	ND	6.4
EC ₅₀ (nM)	6	ND	42.7

[0224] 通过流式细胞术测定双特异性抗体对Kasumi-3细胞的结合亲和力。半最大有效浓度(EC₅₀)值被计算为产生50%最大结合(PE阳性细胞)的双特异性浓度。ND:未测定。

[0225] 关于富集的CD8⁺T细胞

[0226] 将富集的用流感MP 58肽刺激的CD8⁺T细胞(来自第14天的培养物)与各种浓度的抗V β 17/抗CD123双特异性抗体和V β 17XNULL臂对照抗体一起温育。使用小鼠抗人IgG4 Fc-PE二抗来检测所述双特异性抗体。表10示出了当用不同浓度的双特异性抗体处理时,对PE(二抗)阳性的CD8⁺T细胞的频率。抗V β 17/抗CD123和V β 17XNULL的EC₅₀分别被确定为9.0nM和18.7nM(表10)。

[0227] 表10:双特异性抗体对CD8⁺T细胞的结合活性

浓度 (μ g/mL)	抗 V β 17/抗 CD123	V β 17XNULL	NULLXCD123
20	74.7	76.2	0.1
10	72.4	75.4	0.4
5	70.8	64.6	0.3
2.5	64.8	42.5	0.5
1.25	38.0	32.4	0.4
0.625	41.4	21.7	-0.1
0.3125	26.5	11.8	0.8
0.15625	19.9	3.4	0.6
0.078125	10.8	1.8	0.7
EC ₅₀ (μ g/mL)	1.35	2.80	ND
EC ₅₀ (nM)	9	18.7	ND

[0229] 通过流式细胞术测定双特异性抗体对CD8⁺T细胞的结合亲和力。半最大有效浓度(EC₅₀)值被计算为产生50%最大结合(PE阳性细胞)的抗体浓度。ND:未测定

[0230] 双特异性介导的细胞毒性测定

[0231] 为了分析抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体介导的细胞毒性的效能,从培养的第14天起,将CFSE标记的靶(Kasumi-3)细胞与刺激过的CD8⁺T细胞(效应物)以0.5:1、1:1、5:1的效应物与靶标(E:T)比与各种浓度的抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体和Vβ17XNULL臂对照抗体一起共培养14小时和24小时。通过使用可商购获得的抗CD123抗体来检查靶Kasumi-3细胞上的CD123表达。用CFSE标记靶细胞(Kasumi-3),以便在流式细胞术分析期间将它们鉴定为CFSE⁺。共培养期后,添加7-AAD以分析7-AAD⁺CFSE⁺细胞的百分比,作为细胞毒性的量度。减去在不存在双特异性抗体的情况下观察到的基础细胞毒性,以获得响应于双特异性抗体的特异性细胞毒性。用单个供体(HPU-08694)进行一次测定。抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体在采用0.5:1、1:1和5:1的ET比的情况下,在14小时的时间点的EC₅₀分别为3.7pM、0.1pM和0.133pM(表11)。

[0232] 表11:将流感MP 58肽刺激过的CD8⁺T细胞与Kasumi-3细胞以0.5:1、1:1和5:1的ET比共培养14小时后,各种双特异性抗体的EC₅₀值的汇总。

双特异性抗体	EC ₅₀ (ng/mL)		
	E:T 比 (0.5:1)	E:T 比 (1:1)	E:T 比 (5:1)
NULLXCD123	UD	UD	UD
Vβ17XNULL	UD	UD	UD
抗 Vβ17/抗 CD123	0.55	0.015	0.02

[0233]

双特异性抗体	EC ₅₀ (pM)		
	E:T 比 (0.5:1)	E:T 比 (1:1)	E:T 比 (5:1)
NULLXCD123	UD	UD	UD
Vβ17XNULL	UD	UD	UD
抗 Vβ17/抗 CD123	3.7	0.1	0.133

[0234] UD:不可检测,因为活性对于正确的曲线拟合来说太低。

[0235] 抗Vβ17/抗CD123双特异性抗体在采用0.5:1、1:1和5:1的ET比的情况下,在24小时的时间点的EC₅₀分别为0.4pM、0.2pM和1.0pM(表12)。

[0236] 表12:将流感MP 58肽刺激过的CD8⁺T细胞与Kasumi-3细胞以0.5:1、1:1和5:1的ET比共培养24小时后,各种双特异性抗体的EC₅₀值的汇总。

双特异性抗体	EC ₅₀ (ng/mL)		
	E:T 比 (0.5:1)	E:T 比 (1:1)	E:T 比 (5:1)
NULLXCD123	UD	UD	UD
Vβ17XNULL	UD	UD	UD
抗 Vβ17/抗 CD123	0.06	0.03	0.15

[0237]

双特异性抗体	EC ₅₀ (pM)
--------	-----------------------

		E:T 比 (0.5:1)	E:T 比 (1:1)	E:T 比 (5:1)
[0238]	NULLXCD123	UD	UD	UD
	Vβ17XNULL	UD	UD	UD
	抗 Vβ17/抗 CD123	0.4	0.2	1.0

[0239] UD:不可检测

[0240] 类似地,以ET比0.5:1、1:1、5:1培养14小时(表13)和24小时(表14),测试了抗Vβ17/抗CD123双特异性介导的未刺激过的CD8⁺T细胞的细胞毒性。在5ng/ml的抗Vβ17/抗CD123双特异性浓度下和14小时的时间点处,采用0.5:1和1:1的ET比的未刺激过的CD8⁺T细胞分别示出2.8%和9.8%的靶细胞细胞毒性(表13),相比之下,刺激过的CD8⁺T细胞示出77%和73%的细胞毒性。采用5:1的ET比时,未刺激过的CD8⁺T细胞表现出31.65%的靶细胞毒性,相比之下,刺激过的CD8⁺T细胞表现出70.9%的靶细胞毒性。从24小时的时间点获得类似的结果(表12、表15、表16和表17)。在所测试的最高浓度(5ng/ml)的抗Vβ17/抗CD123双特异性下,未刺激过的CD8⁺T细胞在采用较高的ET比时对靶细胞表现出较高的细胞毒性。

[0241] 表13:采用各种ET比将未刺激过的CD8⁺T细胞培养14小时的细胞毒性测定。当用不同浓度的双特异性抗体处理时,CFSE阳性细胞和7-AAD阳性细胞的频率。

	双特异性抗体	浓度 (ng/mL)	E:T 比 (0.5:1)	E:T 比 (1:1)	E:T 比 (5:1)
[0242]	NULLXCD123	5	1.3	-0.6	-0.45
		0.005	1.3	-0.5	0.45
	Vβ17XNULL	5	-0.6	-0.8	3.25
		0.005	-0.3	1	-1.35
	抗 Vβ17/抗 CD123	5	2.8	9.8	31.65
		0.005	0.1	3.2	12.25

[0243] 表14:采用各种ET比将未刺激过的CD8⁺T细胞培养24小时的细胞毒性测定。当用不同浓度的双特异性抗体处理时,CFSE阳性细胞和7-AAD阳性细胞的频率。

未刺激过的 CD8 ⁺ T 细胞					
		浓度 (ng/mL)	E:T 比 (0.5:1)	E:T 比 (1:1)	E:T 比 (5:1)
[0244]	NULLXCD123	5	-1.3	-0.55	-4.85
		0.005	-2	-0.85	-2.95
	Vβ17XNULL	5	-0.8	-1.35	10.85
		0.005	-1	-1.05	-1.95
	抗 Vβ17/抗 CD123	5	4.8	11.55	30.65
		0.005	1.5	1.75	10.95

[0245] 表15:在采用0.5:1ET比(刺激过的CD8⁺T细胞:Kasumi-3细胞)的情况下,温育14小时后的细胞毒性测定。当用不同浓度的双特异性抗体以0.5:1ET比处理14小时时,CFSE阳性细胞和7-AAD阳性细胞的频率。

[0246]

浓度 (ng/mL)	NULLXCD123	Vβ17XNULL	抗 Vβ17/抗 CD123
50	3.47	2.57	77.07
5	2.67	2.17	77.47
0.5	-0.73	1.87	46.77
0.05	0.77	1.67	3.77
0.005	-0.03	1.47	1.97
0.0005	0.67	1.07	2.17
0.00005	1.67	0.17	0.17
0.000005	-0.43	3.27	0.87
EC ₅₀ (ng/mL)	ND	ND	0.55
EC ₅₀ (pM)	ND	ND	3.7

[0247] 半最大有效浓度 (EC₅₀) 值被计算为产生 50 % 最大细胞毒性 (CFSE⁺7AAD⁺) 细胞的抗体浓度。ND: 未测定。

[0248] 表16: 在采用1:1ET比 (刺激过的CD8⁺T细胞:Kasumi-3细胞) 的情况下, 温育14小时后的细胞毒性测定。当用不同浓度的双特异性抗体以1:1ET比处理14小时时, CFSE阳性细胞和7-AAD阳性细胞的频率。

[0249]

浓度 (ng/mL)	NULLXCD123	Vβ17XNULL	抗 Vβ17/抗 CD123
50	0.6	-0.5	76.0
5	0.1	0.9	73.0
0.5	1.0	0.9	77.9
0.05	0.4	1.8	59.4
0.005	1.8	0.9	36.8

[0250]

0.0005	0.9	1.1	18.0
0.00005	0.7	0.9	6.1
0.000005	1.6	0.8	1.9
EC ₅₀ (ng/mL)	ND	ND	0.015
EC ₅₀ (pM)	ND	ND	0.1

[0251] 半最大有效浓度 (EC₅₀) 值被计算为产生 50 % 最大细胞毒性 (CFSE⁺7AAD⁺) 细胞的抗体浓度。ND: 未测定

[0252] 表17: 在采用5:1E:T比 (刺激过的CD8⁺T细胞:Kasumi-3细胞) 的情况下, 温育14小时后的细胞毒性测定。当用不同浓度的双特异性抗体以5:1ET比处理14小时时, CFSE阳性细胞和7-AAD阳性细胞的频率。

[0253]

浓度 (ng/mL)	NULLXCD123	Vβ17XNULL	抗 Vβ17/抗 CD123
50	2.3	0.0	70.2
5	3.1	2.7	70.9
0.5	1.8	4.4	74.5
0.05	3.0	1.5	73.2
0.005	2.1	1.6	2.5
0.0005	2.9	3.5	1.4
0.00005	3.2	5.5	2.5
0.000005	4.1	4.4	4.8
EC ₅₀ (ng/mL)	UD	UD	0.02
EC ₅₀ (pM)	UD	UD	0.13

[0254] 半最大有效浓度 (EC₅₀) 值被计算为产生 50 % 最大细胞毒性 (CFSE⁺7AAD⁺) 细胞的抗体浓度。UD: 不可检测。

[0255] 本领域的技术人员应当理解, 在不脱离本发明的广义的发明构思的情况下, 可对上述实施方案作出修改。因此, 应当理解, 本发明不局限于所公开的特定实施方案, 但本发明旨在涵盖在本发明实质和范围内的修改, 如本说明书所定义。

[0256]

SEQ ID NO:	类型	物种	说明	序列
1	PRT	小鼠	B17B01-HCDR1	GYSITSGYFWN
2	PRT	小鼠	B12B01-HCDR2	YISYDGSNN

[0257]

3	PRT	小鼠	B12B01-HCDR2	PSPGTGYAVDY
4	PRT	小鼠	B17B01-LCDR1	RSSQSLVHSNGNTYLH
5	PRT	小鼠	B12B01-LCDR2	KVSNRFS
6	PRT	小鼠	B12B01-LCDR2	SQSTHVPFT
7	PRT	小鼠	B17B01-HC	NVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVAGYSITS GYFWNWIRQFPGNKLEWMGYISYDGSNNY NPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTA TYYCASPSPGTGYAVDYWGQGTSTVTSSA KTPPSVYPLAPGSAAQTNSMVTLGCLVKG YFPEPVTVTWNSGSLSSGVHTFPAVLQSDLY TLSSSVTVPSSTWPSQTVTCNVAHPASSTKV DKKIVPRDCGCKPCICTVPEVSSVFIFPPKPK DVLITLTPKVTCVVVDISKDDPEVQFSWFV DDVEVHTAQTKPREEQINSTFRSVSELPIMH QDWLNGKEFKCRVNSAAFPAPIEKTISKTYG RPKAPQVYTIPPPKEQMAKDKVSLTCMITNF FPEDITVEWQWNGQPAENYKNTQPIMDTDG SYFVYSKLVNQKSNWEAGNTFTCSVLHEGL HNHHTEKSLSHSPGK
8	PRT	小鼠	B17B01-LC	NVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVH SNGNTYLHWYLQKPGQSPKFLIYKVSNRFS GVPDRFSGGGSGTEFTLKISRVEAEDLGVYF CSQSTHVPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVISFP PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVWKWI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN NEC
9	PRT	小鼠	B17B1-HC	NVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVAGYSITS GYFWNWIRQFPGNKLEWMGYISYDGSNNY NPSLKNRISITRDTSKNQFFLKLNSVTTEDTA TYYCASPSPGTGYAVDYWGQGTSTVTSSAS TKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYF PEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYS LSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPP PVLDSGDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
10	PRT	小鼠	B17B1-LC	NVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVH SNGNTYLHWYLQKPGQSPKFLIYKVSNRFS GVPDRFSGGGSGTEFTLKISRVEAEDLGVYF

[0258]

				CSQSTHVPFTFGSGTKLEIKRADAAPTVSIFP PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN NEC
11	PRT	小鼠	B17B2- HC	DVQLKESGPGLVKPSQSLSVTCSVTGYSITS GYYWNWYRQFPGNKLEWMGYISYDGSNN YNPSLKNRISITRDTSKNQILLKLTYYTTEDT ATYYCTRSPGTGYAVDYWGQGLVTVSS ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKD YFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGL YSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTK VDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFP PKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFLLYSKLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNHYTQKSLSLGLGK
12	PRT	小鼠	B17B2- LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLVH SNGNTYLHWYQQKPGQPPKLLIYKVSNRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYY CSQSTHVPFTFGQGTKVEIKRADAAPTVSIFP PSSEQLTSGGASVVCFLNNFYPKDINVKWKI DGSERQNGVLNSWTDQDSKDSTYSMSSTLT LTKDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFN NEC
13	PRT	人工合 成	B17B21- HC	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITS GYFWNWIRQPPGKLEWIGYISYDGSNNYN PSLKSRTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCASPSPGTGYAVDYWGQGLVTVSSA STKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDY FPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY SLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKV DKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFP KPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSDQEDPEVQF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVS VLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEK TISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSL SCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP PVLDSGDGSFLLVSRLTVDKSRWQEGNVFSC SVMHEALHNRTQKSLSLGLGK
14	PRT	人工合 成	B17B21- LC	DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRSSQSLVHS NGNTYLHWYQQKPGKAPKFLIYKVSNRFSG VPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCS QSTHVPFTFGQGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPS DEQLKSGTASVCLLNNFYPREAKVQWKV DNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYLSSTLT

[0259]

				SKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
15	PRT	人	I3RB217-HC	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCARGDGSTDLDYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
16	PRT	人	I3RB217-LC	EIVLTQSPGTLSSLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDYGFPTWFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
17	PRT	人	Null-HC	QITLKESGPTLVKPTQTLTLCTFSGFSLSTSGMGVSWIRQPPGKALEWLAHIYWDDEKRYNPSLKSRLTITKDTSKNQVVLMTNMDPVDATYYCARLYGFTYGFAYWGQGTLLTVSSASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGKTYTCNVDPHKPSNTKVDKRVESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVDSQEDPEVQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLGLK
18	PRT	人	Null-LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCRASQSVQDYNIGISYMHYQQKPGQPPKLLIYAASNPESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQIIEDPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKSTYLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
19	PRT	人工合	B17H3	EVQLLESGGGLVQPGSLRLSCAASGYSITS

[0260]

		成		GYFWNWVRQAPGKGLEWVSYSYDGSNNY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCAKPSPGTGYAVDYWGQGT LTVTS
20	PRT	人工合 成	B17H4	EVQLLES GGG LVQP GGS LRLSCAASGYSITS GYFWNWVRQAPGKGLEWVSYSYDGSNNY ADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAED TAVYYCASPSPGTGYAVDYWGQGT LTVTS S
21	PRT	人工合 成	B17H5	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITS GYFWNWIRQPPGKGLEWIGYISYDGSNNYN PSLKSRVTISRDT SKNQFSLKLSSVTAADTA VYYCASPSPGTGYAVDYWGQGT LTVSS
22	PRT	人工合 成	B17L3	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQSLVHS NGNTYLHWYQQKPGKAPKLLIYKVS NRFSG VPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCS QSTHVPFTFGQGTKLEIK
23	PRT	人工合 成	B17L4	DIQMTQSPSSLSASVGDRVITITCRSSQSLVHS NGNTYLHWYQQKPGKAPKFLIYKVS NRFSG VPSRFGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCS QSTHVPFTFGQGTKLEIK
24	PRT	人工合 成	B17L5	DVVMTQSPLSLPVT LGQPASISCRSSQSLVH SNGNTYLHWYQQRP GQS PRFLIYKVS NRFS GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYY CSQSTHVPFTFGQGTKLEIK
25	PRT	人工合 成	B17H1	NVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCSVAGYSITS GYFWNWIRQFPGNKLEWMGYISYDGSNNY NPSLKNRISITRDT SKNQFFLKLNSVTTEDTA TYYCASPSPGTGYAVDYWGQGT SVTVSS
26	PRT	人工合 成	B17L1	NVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVH SNGNTYLHWY LQKPGQSPKFLIYKVS NRFS GVPDRFSGGGSGTEFTLKISRVEAEDLG VYF CSQSTHVPFTFGSGTKLEIK
27	PRT	人	TCR- V β 17	MAWVWTLFLMAAAQSIQAVDGGITQSPK YLFRKEGQNVTLSC EQNLNHDAMYWYRQD PGQGLRLIYYSQIVNDFQKG DIAEGYSVSRE KKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSRSSYE QYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNG KEVHSGVSTD PQPLKEQPALNDSRYSLSSRL RVSATFWQNPRNHFR CQVQFYGLSENDEW TQDRAKPVTQIVSAEAWGRADepkscdkthtcpp cpapeLLggpsvflfppkpkdtlmisrtpevtcvvDvshedpe vkfnwyvdgvevhnakt preeqynstyrvsvltvlhqdwlng keykckvsnkalpapiektiskakgpprepqvyVlppsreemtk nqvsLclvkgfypsdiavewesngqpennyLtWppvldsdg

[0261]

				sfflyskltvdksrwqqgnvfscsvmhcalhnhytqkslspsg
28	PRT	人工合成	B17B21 半抗体	MAVWVWTLFLMAAAQSIQADIQMTQSPSSL SASVGDRVTITCRSSQSLVHSNGNTYLHWY QQKPGKAPKFLIYKVSNRFSGVPSRFSGSGS GTDFTLTISSLQPEDFATYYCSQSTHVPFTFG QGTELEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS VVCLLNNFYPPREAKVQWKVDNALQSGNSQ ESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGSEGKS SGSGSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGSQVQL QESGPGLVKPSETLSLTCTVSGYSITSGYFW NWIRQPPGKGLEWIGYISYDGSNNYNPSLKS RVTISRDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA SPSPGTGYAVDYWGQGLTVTVSSASTKGPS VFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSV VTPSSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRV ESKYGPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKD TLMISRTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYV DGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKA KGQPREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLSCAV KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLD SDGSFFLVSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMH EALHNRFTQKSLSLSLGK
29	DNA	人工合成	B17B21 半抗体	ATGGCCTGGGTGTGGACCCTGCTGTTCTT GATGGCCGCCGCCAGAGCATCCAGGCCG ACATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGC CTGAGCGCCAGCGTGGGCGACCGCGTGAC CATCACCTGCCGAGCAGCCAGAGCCTGG TGCACAGCAACGGCAACACCTACCTGCAC TGGTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCC AAAGTTCCTGATCTACAAGGTGAGCAACC GCTTCAGCGGCGTGCCAAGCCGCTTCAGC GGCAGCGGCGGCGGACCGACTTCACCTT GACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACT TCGCCACCTACTACTGCAGCCAGAGCACC CACGTGCCATTACCTTCGGCCAGGGCAC CAAGCTGGAGATCAAGCGCACCGTGGCCG CCCCAAGCGTGTTTCATCTTCCACCAAGC GACGAGCAGCTGAAGAGCGGACCGCCA GCGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTAC CCACGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGG TGGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGC CAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCA AGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACC CTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAA GCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCC ACCAGGGCCTGAGCAGCCCAGTGACCAAG

[0262]

AGCTTCAACCGCGGCGAGTGCGGCGGCAG
CGAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGC
GAGAGCAAGAGCACCGAGGGCAAGAGCA
GCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCAC
CGGCGGCAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAG
AGCGGCCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGCG
AGACCTTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGC
GGCTACAGCATCACCAGCGGCTACTTCTG
GAACTGGATCCGCCAGCCACCAGGCAAGG
GCCTGGAGTGGATCGGCTACATCAGCTAC
GACGGCAGCAACAATAACCAAGCCT
GAAGAGCCGCGTGACCATCAGCCGCGACA
CCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTG
AGCAGCGTGACCGCCGCCGACACCGCCGT
GTACTACTGCGCCAGCCCAAGCCCAGGCA
CCGGCTACGCCGTGGACTACTGGGGCCAG
GGCACCTTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAG
CACCAAGGGCCCAAGCGTGTTCCCACTGG
CCCCATGCAGCCGCAGCACCAGCGAGAGC
ACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGA
CTACTTCCCAGAGCCAGTGACCGTGAGCT
GGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG
CACACCTTCCCAGCCGTGCTGCAGAGCAG
CGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGA
CCGTGCCAAGCAGCAGCCTGGGCACCAAG
ACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCC
AAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGCGTG
GAGAGCAAGTACGGCCCACCATGCCACC
ATGCCAGCCCCAGAGGCCGCCGGCGGCC
CAAGCGTGTTCTGTTCACCAAAAGCCA
AAGGACACCCTGATGATCAGCCGCACCCC
AGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGACGTGA
GCCAGGAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAAC
TGGTACGTGGACGGCGTGAGGTGCACAA
CGCCAAGACCAAGCCACGCGAGGAGCAG
TTCAACAGCACCTACCGCGTGGTGAGCGT
GCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGA
ACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAG
CAACAAGGGCCTGCCAAGCAGCATCGAG
AAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC
CACGCGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCA
CCAAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAACC
AGGTGAGCCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGC
TTCTACCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTG
GGAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAAC
TACAAGACCACCCACCAAGTGCTGGACAG
CGACGGCAGCTTCTTCCTGGTGAGCCGCC
TGACCGTGAGCAAGAGCCGCTGGCAGGA
GGGCAACGTGTTCAAGCTGCAGCGTGATGC

[0263]

ACGAGGCCCTGCACAACCGCTTCACCCAG
AAGAGCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAGAT
GGCCTGGGTGTGGACCCTGCTGTTCCCTGA
TGGCCGCCGCCAGAGCATCCAGGCCGAC
ATCCAGATGACCCAGAGCCCAAGCAGCCT
GAGCGCCAGCGTGGGCGACCGCGTGACCA
TCACCTGCCGCAGCAGCCAGAGCCTGGTG
CACAGCAACGGCAACACCTACCTGCACTG
GTACCAGCAGAAGCCAGGCAAGGCCCA
AAGTTCCTGATCTACAAGGTGAGCAACCG
CTTCAGCGGCGTGCCAAGCCGCTTCAGCG
GCAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTG
ACCATCAGCAGCCTGCAGCCAGAGGACTT
CGCCACCTACTACTGCAGCCAGAGCACCC
ACGTGCCATTACCTTCGGCCAGGGCACC
AAGCTGGAGATCAAGCGCACCGTGCGCCG
CCCAAGCGTGTTTCATCTTCCCACCAAGCG
ACGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAG
CGTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACC
CACGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGT
GGACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGC
CAGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCA
AGGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACC
CTGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAA
GCACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCC
ACCAGGGCCTGAGCAGCCAGTGACCAAG
AGCTTCAACCGCGGCGAGTGCGGCGGCAG
CGAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGC
GAGAGCAAGAGCACCGAGGGCAAGAGCA
GCGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCAC
CGGCGGCAGCCAGGTGCAGCTGCAGGAG
AGCGGCCAGGCCTGGTGAAGCCAAGCG
AGACCCTGAGCCTGACCTGCACCGTGAGC
GGCTACAGCATCACCAGCGGCTACTTCTG
GAACTGGATCCGCCAGCCACCAGGCAAGG
GCCTGGAGTGGATCGGCTACATCAGCTAC
GACGGCAGCAACAACCTACAACCCAAGCCT
GAAGAGCCGCGTGACCATCAGCCGCGACA
CCAGCAAGAACCAGTTCAGCCTGAAGCTG
AGCAGCGTGACCGCCGCCGACACCGCCGT
GTACTACTGCGCCAGCCCAAGCCCAGGCA
CCGGCTACGCCGTGGACTACTGGGGCCAG
GGCACCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAG
CACCAAGGGCCCAAGCGTGTTCCCACTGG
CCCCATGCAGCCGCAGCACCCAGCGAGAGC
ACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGA
CTACTTCCCAGAGCCAGTGACCGTGAGCT
GGAACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTG
CACACCTTCCCAGCCGTGCTGCAGAGCAG

[0264]

				CGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGA CCGTGCCAAGCAGCAGCCTGGGCACCAAG ACCTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCC AAGCAACACCAAGGTGGACAAGCGCGTG GAGAGCAAGTACGGCCCCACCATGCCACC ATGCCCAGCCCCAGAGGCCGCCGGCGGCC CAAGCGTGTTCTGTTCACCAAAAGCCA AAGGACACCCTGATGATCAGCCGACCCCC AGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGA GCCAGGAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAAC TGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAA CGCCAAGACCAAGCCACGCGAGGAGCAG TTCAACAGCACCTACCGCGTGGTGAGCGT GCTGACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGA ACGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAG CAACAAGGGCCTGCCAAGCAGCATCGAG AAGACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGC CACGCGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCA CCAAGCCAGGAGGAGATGACCAAGAACC AGGTGAGCCTGAGCTGCGCCGTGAAGGGC TTCTACCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTG GGAGAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAAC TACAAGACCACCCACCAGTGCTGGACAG CGACGGCAGCTTCTTCCTGGTGAGCCGCC TGACCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGGA GGGCAACGTGTTTACGTGCAGCGTGATGC ACGAGGCCCTGCACAACCGCTTACCCAG AAGAGCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAGTG ATAG
30	PRT	人工合成	I3RB217 半抗体	MAWVWTLFLMAAAQSIQAEIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF LTISRLEPEDFAVYYCQQDYGFPWTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNFPYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGSEGKSSGS GSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVQS GAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVR QMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR GDGSTDLDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGTKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ

[0265]

				PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLGLGK
31	DNA	人工合成	I3RB217 半抗体	ATGGCCTGGGTGTGGACCTGCTGTTCT GATGGCCGCGCCAGAGCATCCAGGCCG AGATCGTGCTGACCCAGAGCCCAGGCACC CTGAGCCTGAGCCCAGGCGAGCGGCCAC CCTGAGCTGCCGCGCCAGCCAGAGCGTGA GCAGCAGCTACCTGGCCTGGTACCAGCAG AAGCCAGGCCAGGCCCCACGCCTGCTGAT CTACGGCGCCAGCAGCCGCGCCACCGGCA TCCCAGACCGCTTCAGCGGCAGCGGCAGC GGCACCGACTTCACCCTGACCATCAGCCG CCTGGAGCCAGAGGACTTCGCCGTGTACT ACTGCCAGCAGGACTACGGCTTCCCATGG ACCTTCGGCCAGGGCACCAAGGTGGAGAT CAAGCGCACCGTGGCCGCCCCAAGCGTGT TCATCTTCCCACCAAGCGACGAGCAGCTG AAGAGCGGCACCGCCAGCGTGGTGTGCCT GCTGAACAACCTTCTACCCACGCGAGGCCA AGGTGCAGTGGAAGGTGGACAACGCCCTG CAGAGCGGCAACAGCCAGGAGAGCGTGA CCGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTA CAGCCTGAGCAGCACCTGACCCTGAGCA AGGCCGACTACGAGAAGCACAAAGGTGTA CGCCTGCGAGGTGACCCACCAGGGCCTGA GCAGCCCAGTGACCAAGAGCTTCAACCGC GGCGAGTGCggcggcagcgagggcaagagcagcggcag cggcagcgagagcaagagcaccgagggcaagagcagcggcagc ggcagcgagagcaagagcaccggcggcagcGAGGTGCA GCTGGTGCAGAGCGGCGCCGAGGTGAAG AAGCCAGGCGAGAGCCTGAAGATCAGCT GCAAGGGCAGCGGCTACAGCTTACCAGC TACTGGATCAGCTGGGTGCGCCAGATGCC AGGCAAGGGCCTGGAGTGGATGGGCATC ATCGACCCAAGCGACAGCGACACCCGCTA CAGCCCAAGCTTCCAGGGCCAGGTGACCA TCAGCGCCGACAAGAGCATCAGCACCGCC TACCTGCAGTGGAGCAGCCTGAAGGCCAG CGACACCGCCATGTACTACTGCGCCCGCG GCGACGGCAGCACCGACCTGGACTACTGG GGCCAGGGCACCTGGTGACCGTGAGCAG CGCCAGCACCAAGGGCCCAAGCGTGTTCC CACTGGCCCCATGCAGCCGCAGCACCAAGC GAGAGCACCGCCGCCCTGGGCTGCCTGGT GAAGGACTACTTCCCAGAGCCAGTGACCG TGAGCTGGAACAGCGGCGCCCTGACCAGC GGCGTGCACACCTTCCCAGCCGTGCTGCA

[0266]

				GAGCAGCGGCCTGTACAGCCTGAGCAGCG TGGTGACCGTGCCAAGCAGCAGCCTGGGC ACCAAGACCTACACCTGCAACGTGGACCA CAAGCCAAGCAACACCAAGGTGGACAAG CGCGTGGAGAGCAAGTACGGCCCACCATG CCCACCATGCCAGCCCCAGAGGCCGCCG GCGGCCCAAGCGTGTTCTGTTCACCA AAGCCAAAGGACACCCTGATGATCAGCCG CACCCCAGAGGTGACCTGCGTGGTGGTGG ACGTGAGCCAGGAGGACCCAGAGGTGCA GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGG TGCACAACGCCAAGACCAAGCCACGCGA GGAGCAGTTCAACAGCACCTACCGCGTGG TGAGCGTGCTGACCGTGCTGCACCAGGAC TGGCTGAACGGCAAGGAGTACAAGTGCA AGGTGAGCAACAAGGGCCTGCCAAGCAG CATCGAGAAGACCATCAGCAAGGCCAAG GGCCAGCCACGCGAGCCACAGGTGTACAC CCTGCCACCAAGCCAGGAGGAGATGACCA AGAACCAGGTGAGCCTGTGGTGCCTGGTG AAGGGCTTCTACCCAAGCGACATCGCCGT GGAGTGGGAGAGCAACGGCCAGCCAGAG AACAAC TACAAGACCAACCCACCAGTGCT GGACAGCGACGGCAGCTTCTTCCTGTACA GCCGCTGACCGTGGACAAGAGCCGCTGG CAGGAGGGCAACGTGTTTACGTGCAGCGT GATGCACGAGGCCCTGCACAACCACTACA CCCAGAAGAGCCTGAGCCTGAGCCTGGGC AAG
32	PRT	人工合成	B23B49 半抗体	MAVWVTLLFLMAAAQSIQAEIVLTQSPGTL SLSPGERATLSCRASQSVSSSYLAWYQQK GQAPRLLIYGASSRATGIPDRFSGSGSGTDF LTISRLEPEDFAVYYCQQDYGFPTFGQGT KVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDYSLSTLTLSKADYEKHKVYA CEVTHQGLSSPVTKSFNRGECGGSEGKSSGS GSESKSTEGKSSGSGSESKSTGGSEVQLVQS GAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWISWVR QMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQGGV TISADKSISTAYLQWSSLKASDTAMYYCAR GDGSTDLDYWGQGTTLTVSSASTKGPSVFP LAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPTVSW NSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVP SSSLGKTYTCNVDPKPSNTKVDKRVESKY GPPCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMIS RTPEVTCVVVDVSQEDPEVQFNWYVDGVE VHNAKTKPREEQFNSTYRVVSVLTVLHQD WLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQ

[0267]

				PREPQVYTLPPSQEEMTKNQVSLWCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPVLDSG SFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEAL HNHYTQKSLSLGLK
33	DNA	人工合 成	B23B49 半抗体	ATGGCCTGGGTGTGGACCTGTCTGTTCT GATGGCCGCCGCCAGAGCATCCAGGCCG ACATCGTGATGACCCAGAGCCCAGACAGC CTGGCCGTGAGCCTGGGCGAGCGCGCCAC CATCAACTGCCGCGCCAGCCAGAGCGTGG ACTACAACGGCATCAGCTACATGCACTGG TACCAGCAGAAGCCAGGCCAGCCACCAA AGCTGCTGATCTACGCCGCCAGCAACCCA GAGAGCGGCGTGCCAGACCGCTTCAGCGG CAGCGGCAGCGGCACCGACTTCACCCTGA CCATCAGCAGCCTGCAGGCCGAGGACGTG GCCGTGTACTACTGCCAGCAGATCATCGA GGACCCATGGACCTTCGGCCAGGGCACCA AGGTGGAGATCAAGCGCACCGTGGCCGCC CCAAGCGTGTTTCATCTTCCACCAAGCGA CGAGCAGCTGAAGAGCGGCACCGCCAGC GTGGTGTGCCTGCTGAACAACCTTCTACCC ACGCGAGGCCAAGGTGCAGTGGAAGGTG GACAACGCCCTGCAGAGCGGCAACAGCC AGGAGAGCGTGACCGAGCAGGACAGCAA GGACAGCACCTACAGCCTGAGCAGCACCC TGACCCTGAGCAAGGCCGACTACGAGAAG CACAAGGTGTACGCCTGCGAGGTGACCCA CCAGGGCCTGAGCAGCCCAGTGACCAAGA GCTTCAACCGCGGCGAGTGCGGCGGCAGC GAGGGCAAGAGCAGCGGCAGCGGCAGCG AGAGCAAGAGCACCGAGGGCAAGAGCAG CGGCAGCGGCAGCGAGAGCAAGAGCACC GGCGGCAGCCAGATCACCTGAAGGAGA GCGGCCCAACCCTGGTGAAGCCAACCCAG ACCCTGACCCTGACCTGCACCTTCAGCGG CTTCAGCCTGAGCACCAGCGGCATGGGCG TGAGCTGGATCCGCCAGCCACCAGGCAAG GCCCTGGAGTGGCTGGCCCACATCTACTG GGACGACGACAAGCGCTACAACCCAAGC CTGAAGAGCCGCCTGACCATCACAAGGA CACCAGCAAGAACCAGGTGGTGCTGACCA TGACCAACATGGACCCAGTGGACACCGCC ACCTACTACTGCGCCCGCCTGTACGGCTTC ACCTACGGCTTCGCCTACTGGGGCCAGGG CACCTGGTGACCGTGAGCAGCGCCAGCA CCAAGGGCCCAAGCGTGTTCCCACTGGCC CCATGCAGCCGCAGCACCAGCGAGAGCAC CGCCGCCCTGGGCTGCCTGGTGAAGGACT ACTTCCAGAGCCAGTGACCGTGAGCTGG

[0268]

				AACAGCGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCA CACCTTCCCAGCCGTGCTGCAGAGCAGCG GCCTGTACAGCCTGAGCAGCGTGGTGACC GTGCCAAGCAGCAGCCTGGGCACCAAGAC CTACACCTGCAACGTGGACCACAAGCCAA GCAACACCAAGGTGGACAAGCGCGTGGA GAGCAAGTACGGCCCACCATGCCCACCAT GCCCAGCCCCAGAGGCCGCCGGCGGCCCA AGCGTGTTCTGTTCCTGTTCCCAACAAAGCCAAA GGACACCCTGATGATCAGCCGCACCCAG AGGTGACCTGCGTGGTGGTGGACGTGAGC CAGGAGGACCCAGAGGTGCAGTTCAACTG GTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCACAACG CCAAGACCAAGCCACGCGAGGAGCAGTTC AACAGCACCTACCGCGTGGTGGACGTGCT GACCGTGCTGCACCAGGACTGGCTGAACG GCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTGAGCAA CAAGGGCCTGCCAAGCAGCATCGAGAAG ACCATCAGCAAGGCCAAGGGCCAGCCAC GCGAGCCACAGGTGTACACCCTGCCACCA AGCCAGGAGGAGATGACCAAGAACCAGG TGAGCCTGTGGTGCCTGGTGAAGGGCTTC TACCCAAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGA GAGCAACGGCCAGCCAGAGAACAACACTAC AAGACCACCCACCAGTGCTGGACAGCGA CGGCAGCTTCTTCCTGTACAGCCGCCTGA CCGTGGACAAGAGCCGCTGGCAGGAGGG CAACGTGTTTCACTGCAGCGTGATGCACG AGGCCCTGCACAACCACTACACCCAGAAG AGCCTGAGCCTGAGCCTGGGCAAG
34	PRT	人工合成	HCDR1	SYWIS
35	PRT	人工合成	HCDR2	IIDPSDSDTRYSPSFQG
36	PRT	人工合成	HCDR3	GDGSTDLDY
37	PRT	人工合成	LCDR1	RASQSVSSSYL
38	PRT	人工合成	LCDR2	GASSRAT
39	PRT	人工合成	LCDR3	QQDYGFPWT
40	PRT	人工合成	HC	EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTS YWISWVRQMPGKGLEWMGIIDPSDSDTRYSPSFQ QVVTISADKSISTAYLQWSSLKASDTA MYYCARGDGSTDLDYWGQGTLLTVSS
41	PRT	人工合成	LC	EIVLTQSPGTLSPGERATLSCRASQSVSSS

[0269]

		成		YLAWYQQKPGQAPRLLIYGASSRATGIPDR FSGSGSGTDFTLTISRLEPEDFAVYYCQQDY GFPWTFGQGTKVEIK
42	PRT	人工合成	IGHJ1*01 HC	WGQGTLLTVSS
43	PRT	人工合成	IGKJ2*01 LC	FGQGTKLEIK
44	PRT	人工合成	Va10.2_F c	MAWVWTLLFLMAAAQSIQAQLLEQSPQFLS IQEENLTVYCNSSSVFSSLQWYRQEPGEGP VLLVTVTGGEVKKLKRLTFQFGDARKDSS LHITAAQPGDTGLYLCAGAGSQGNLIFGKG TKLSVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCL FTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRS MDFKSNSA VAWSNKSDFACANAFNNSIPE DTFFPSepkscdkthtcppcpapeLLggpsvflfppkpkdtl misrtpevtcvvvDvshedpevkfnwyvdgvevhnaktkpree qynstyrvsvltvlhqdwlngkeykckvsnkalpapiektiska kgqprepqvyVYppsreemtknqvslclvkgfypsdiavewe sngqpennykttpvldsdgsfAlVskltvdksrwqqgnvfscs vmhealhnhytqkslspsg

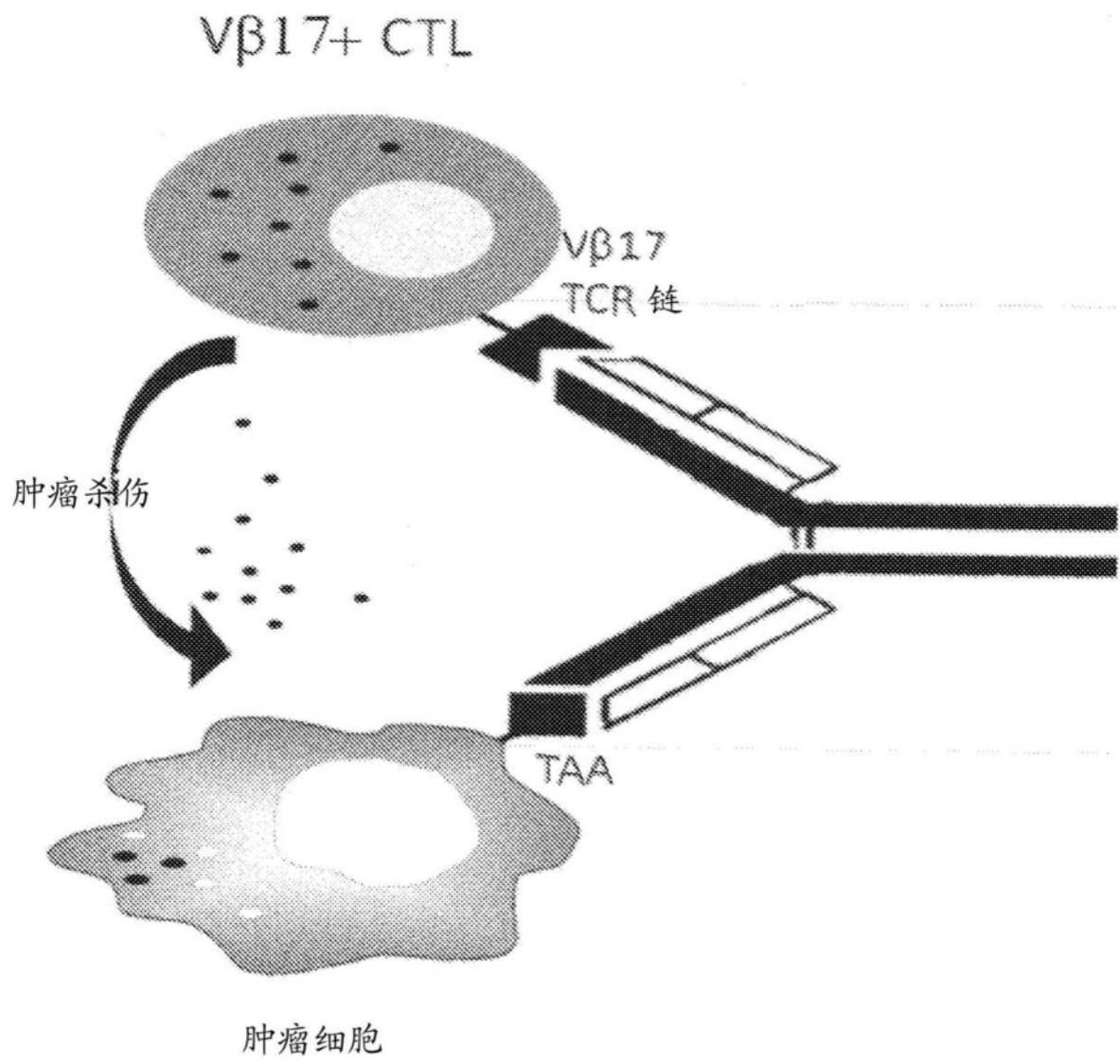


图1

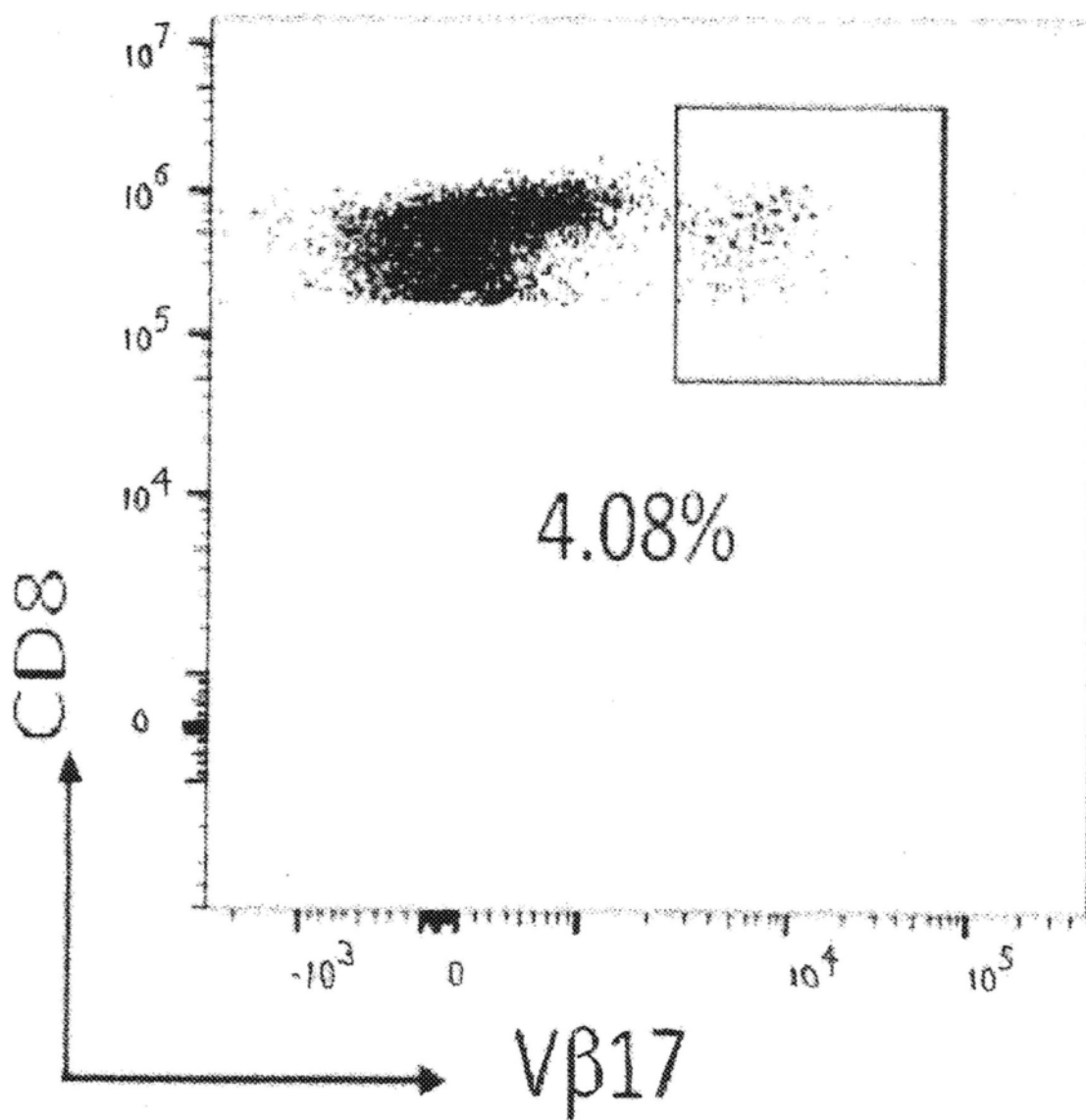


图2A

供体	HLA 状态	CD8 T细胞中的 V β 17+的% (第0天)	CD8 T细胞中的V β 17+的% (第14天)
HPU-03033	A2	5.45	14.4
HPU-07540	A2	3.70	34.4
HPU-08694	A2	3.88	75
17043595	A*0201	2	15
14035473	A*0201	2.8	40.7
15036948	A*0201	3.64	43.0

图2B

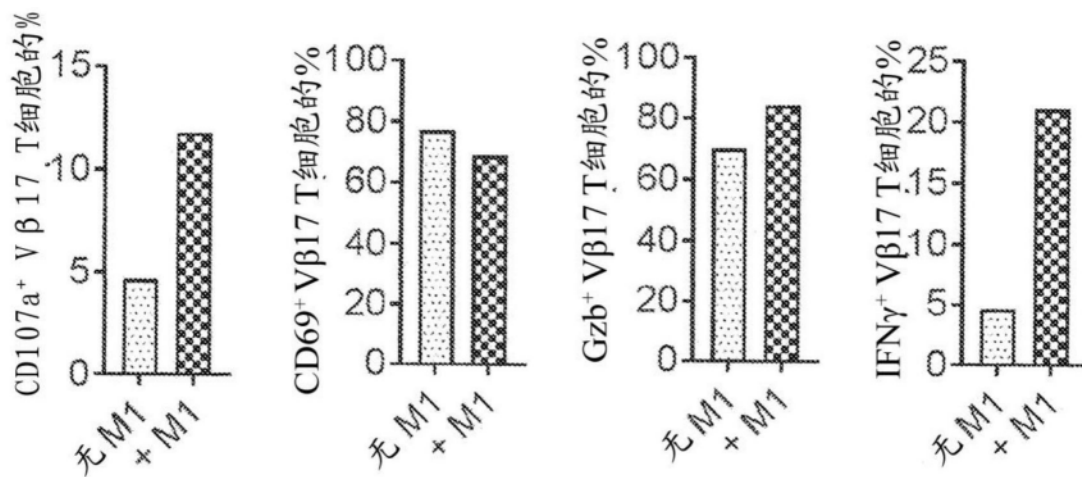


图3

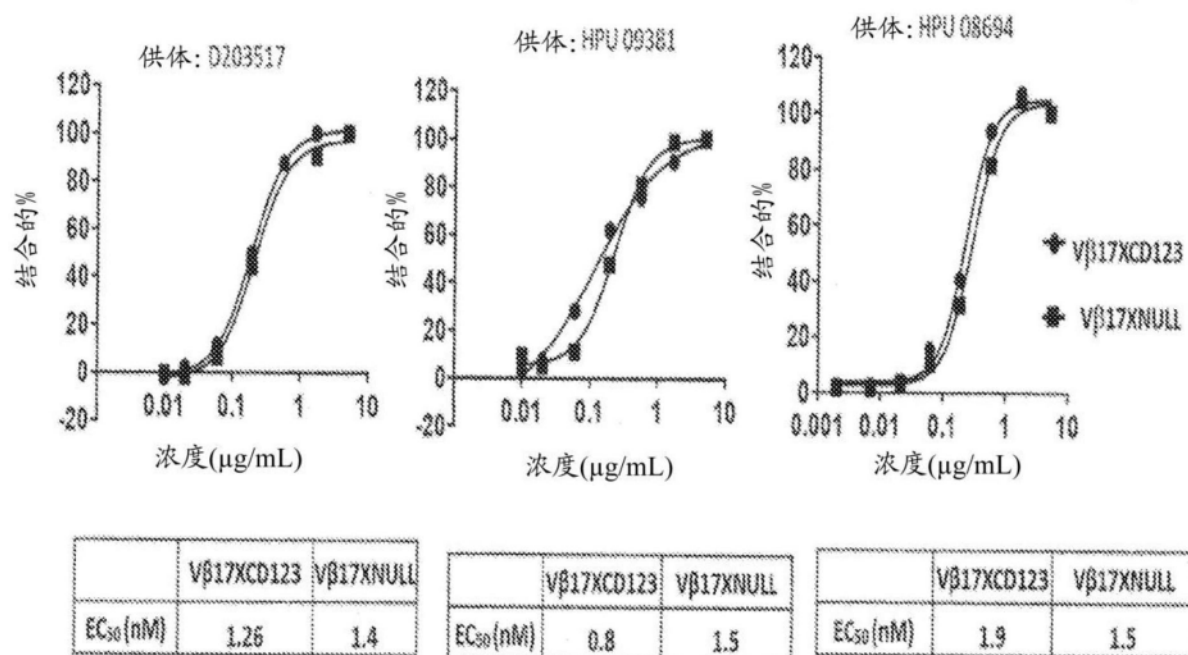


图4

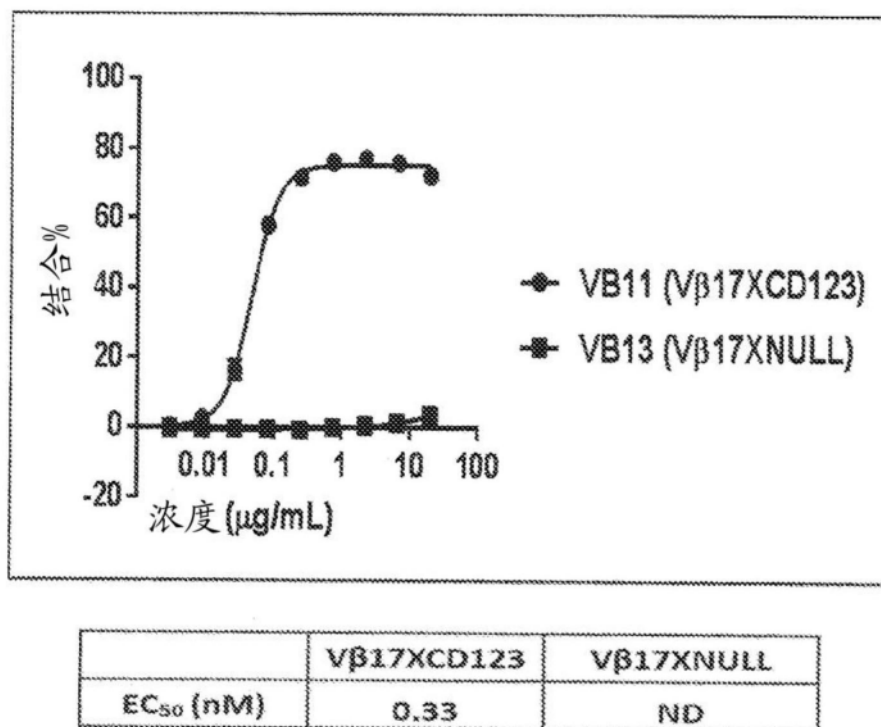
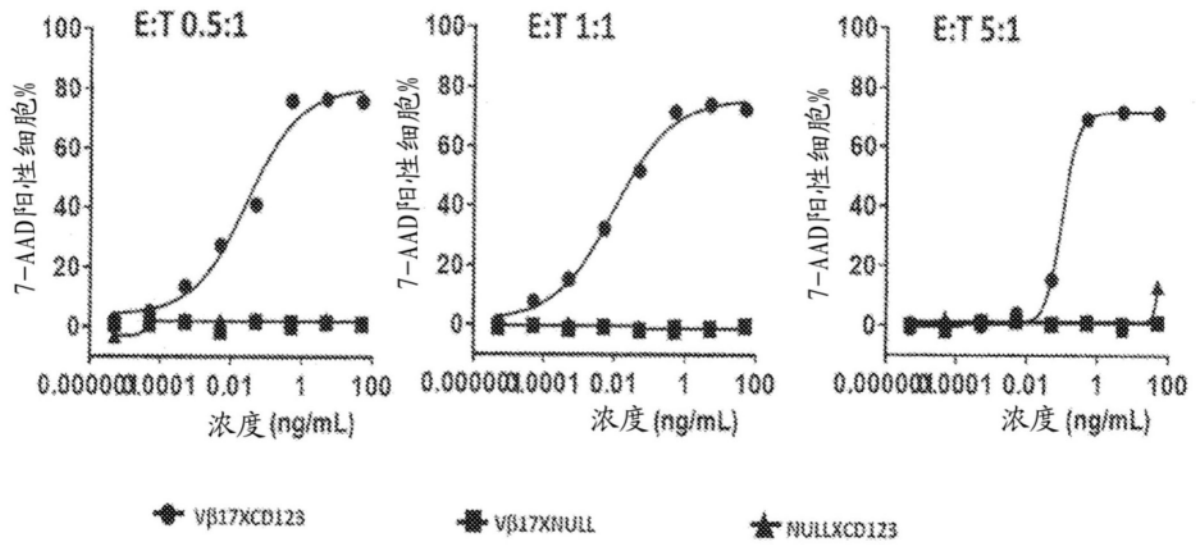


图5



EC₅₀ (pM)

ET比	0.5:1	1:1	5:1
NULLXCD123	ND	ND	ND
Vβ17XNULL	ND	ND	ND
Vβ17XCD123	0.4	0.2	1.0

图6

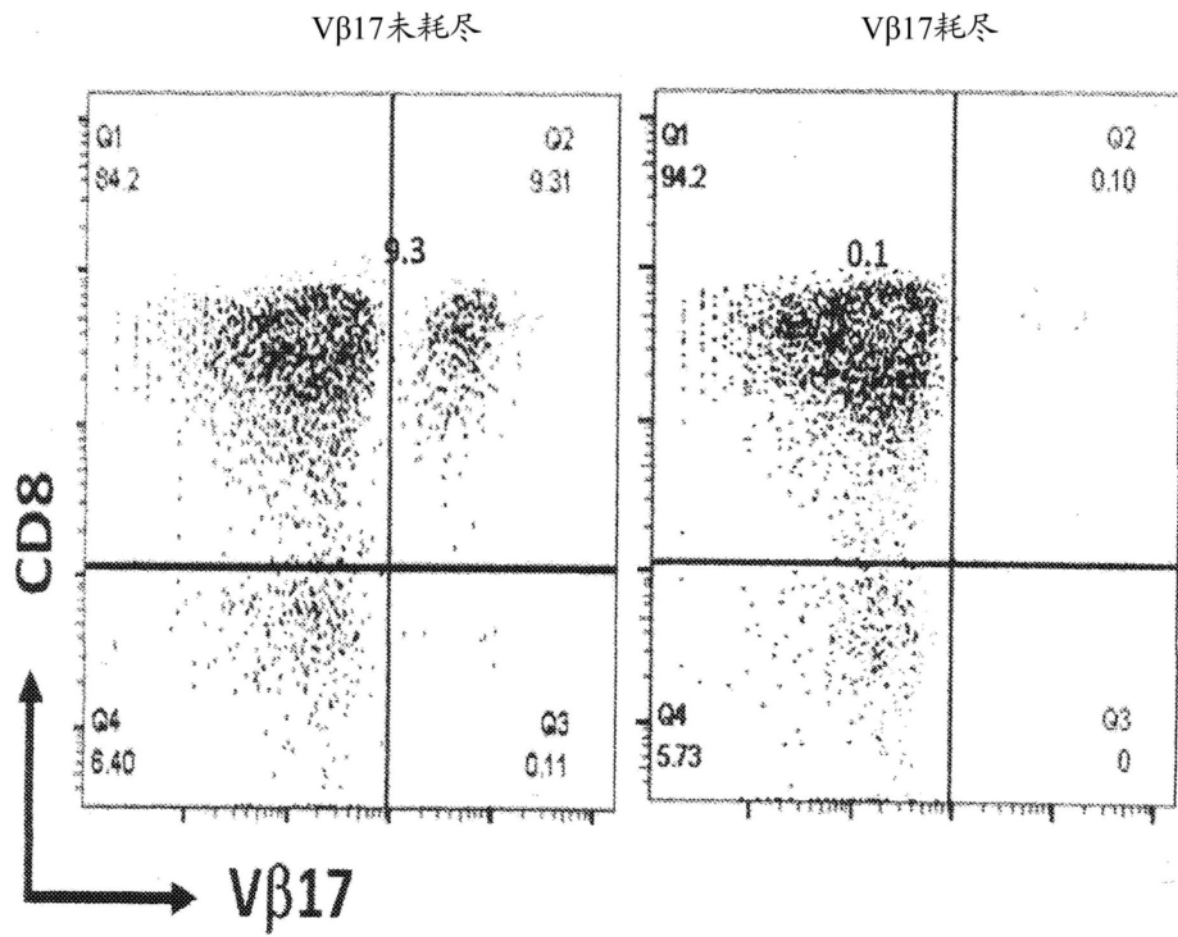
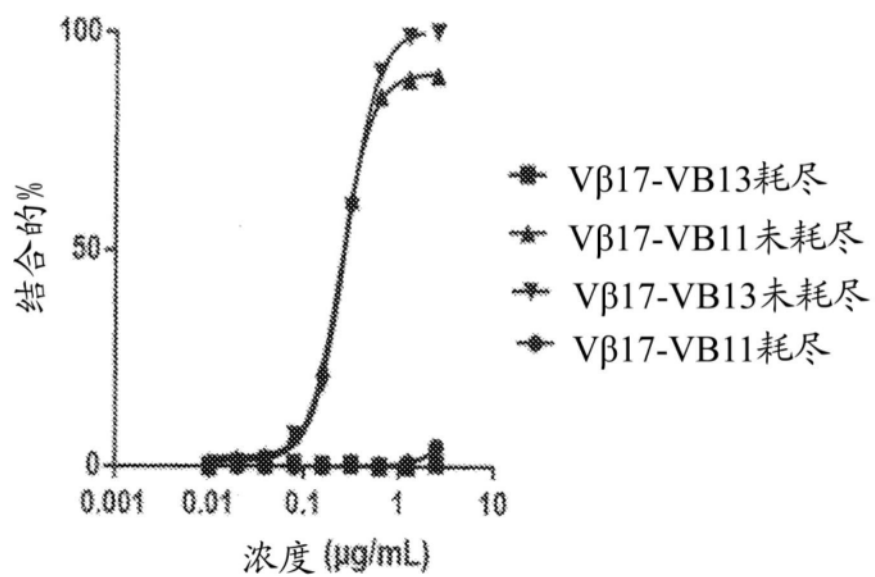


图7A



	EC50 (nM)
VB11	12.2
VB13	12.6

图7B

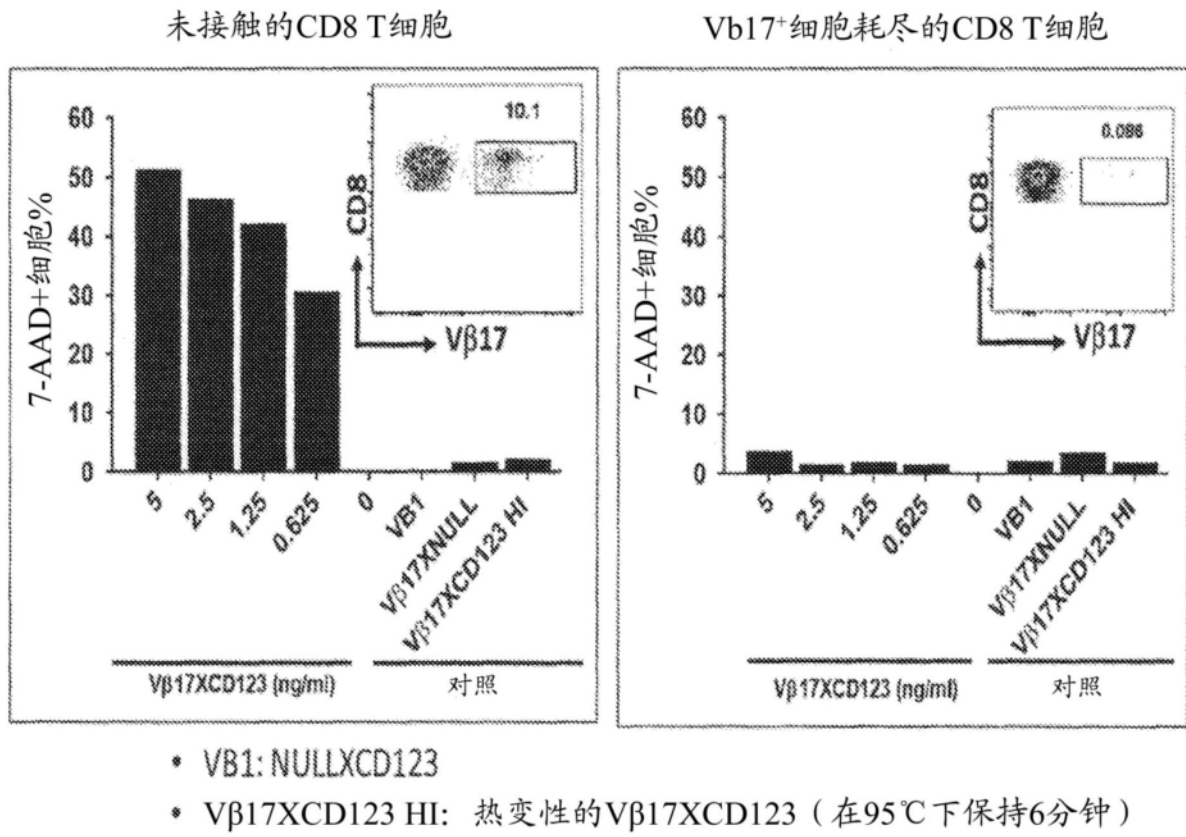


图8

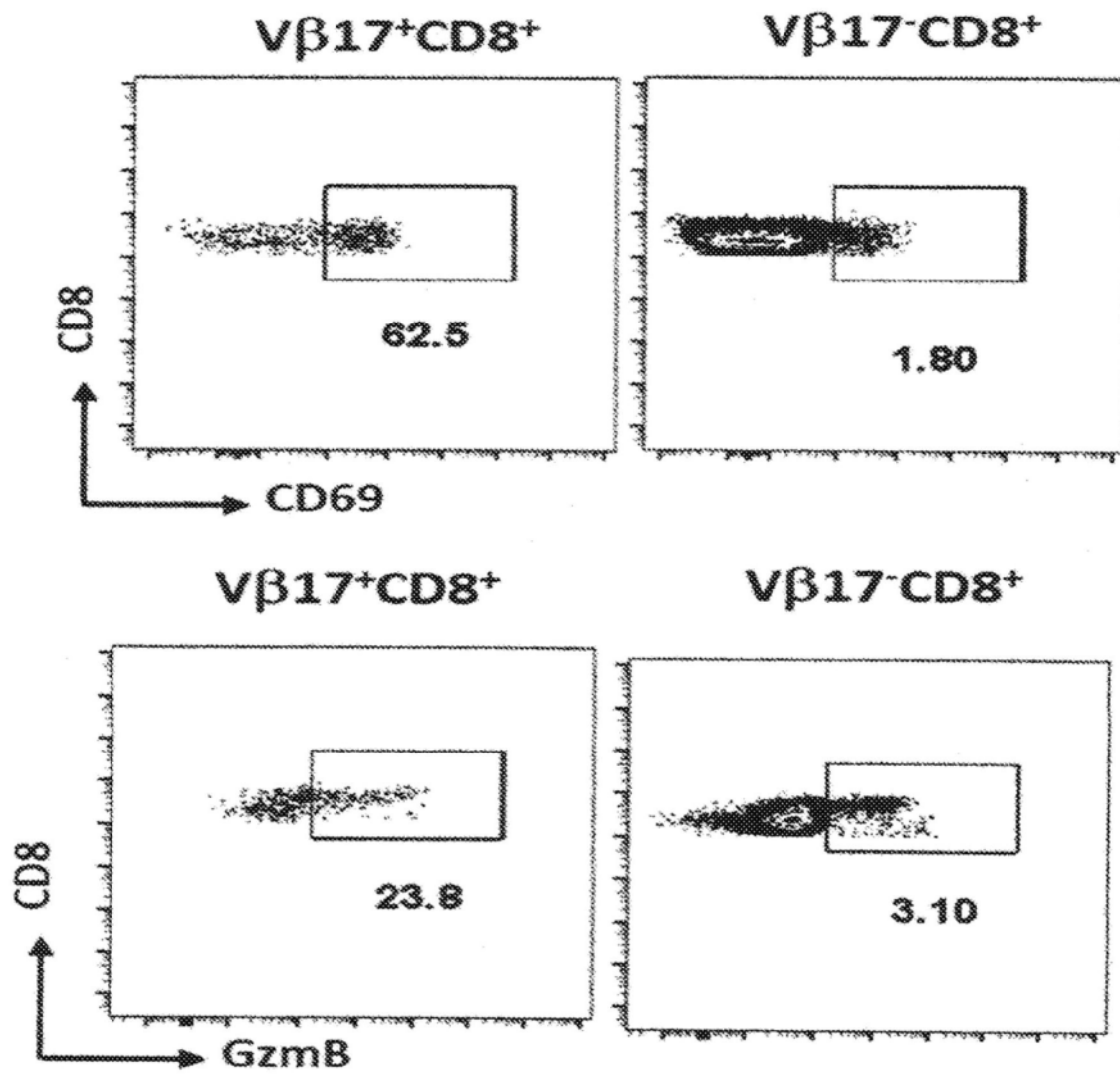


图9A

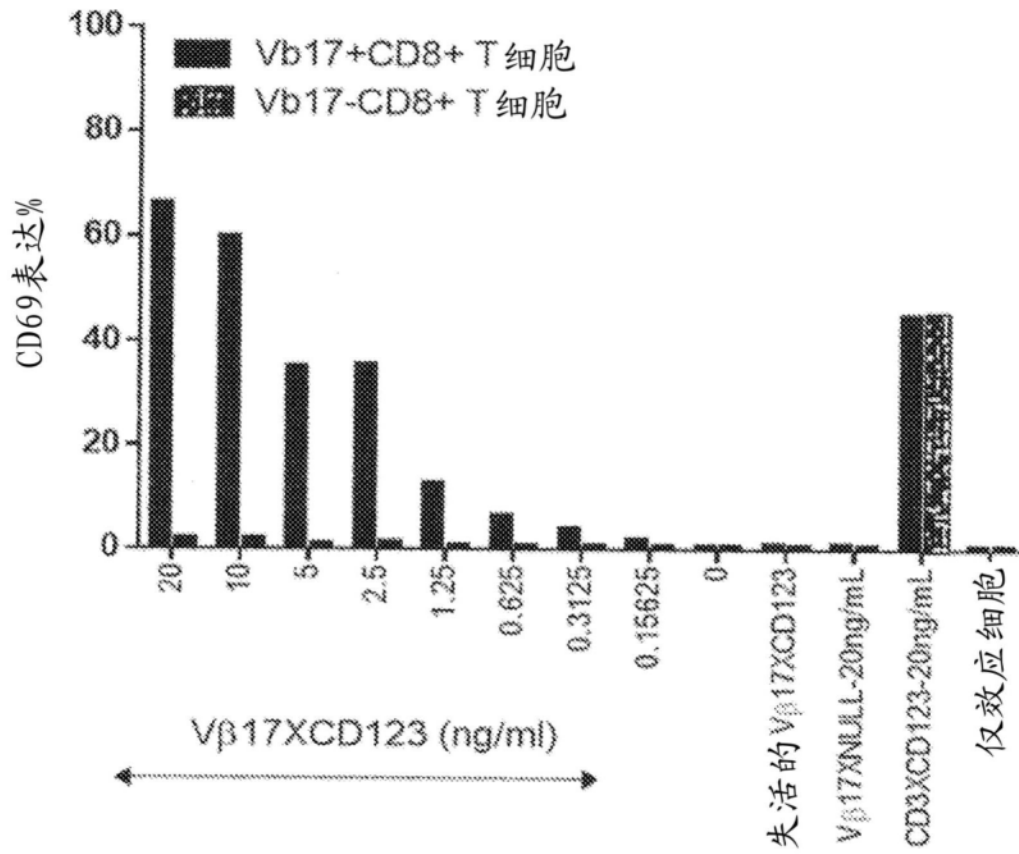


图9B

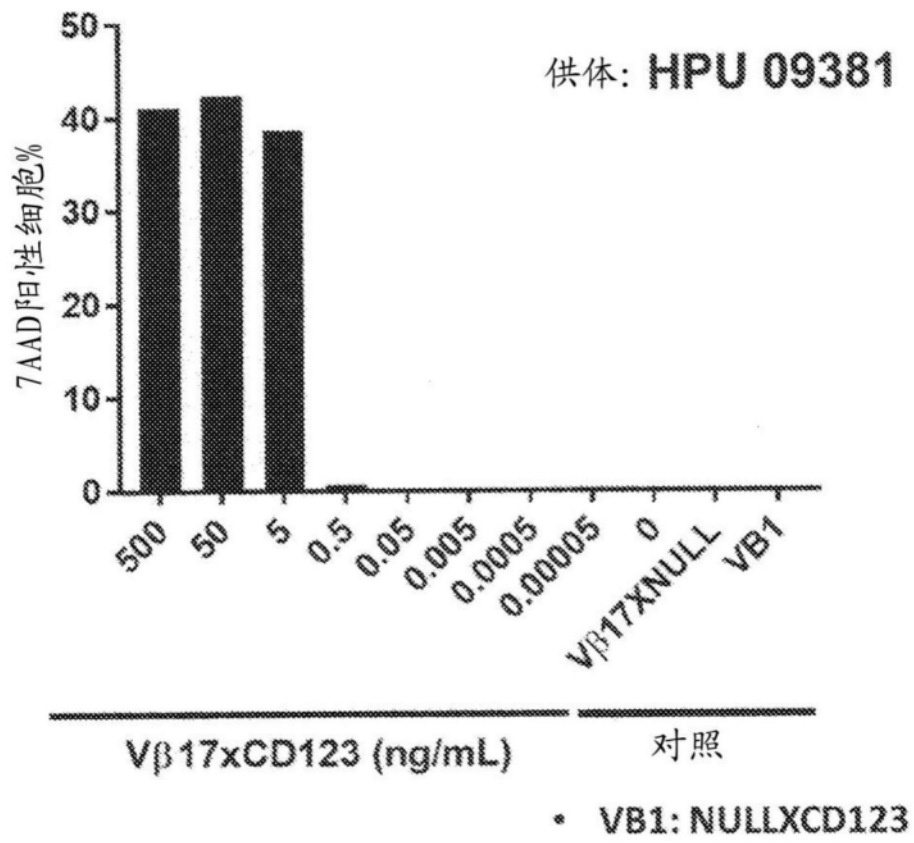


图10