



(12) 发明专利申请



(10) 申请公布号 CN 119522236 A

(43) 申请公布日 2025. 02. 25

(21) 申请号 202380050219.X

T • 马丁诺夫 R • 佩雷特

(22) 申请日 2023.05.12

(74) 专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所
(普通合伙) 44240

(30) 优先权数据

专利代理师 金辉

63/342,025 2022.05.13 US

63/380,551 2022.10.21 US

63/488,758 2023.03.06 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(51) Int.Cl.

2024.12.26

C07K 14/725 (2006.01)

A61K 35/17 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61P 35/00 (2006.01)

(86) PCT国际申请的申请数据

C07K 16/28 (2006.01)

PCT/US2023/066937 2023.05.12

C07K 16/32 (2006.01)

(87) PCT国际申请的公布数据

C12N 15/85 (2006.01)

W02023/220718 EN 2023.11.16

(71) 申请人 弗雷德哈钦森癌症中心

权利要求书9页 说明书115页

地址 美国

序列表 (电子公布) 附图77页

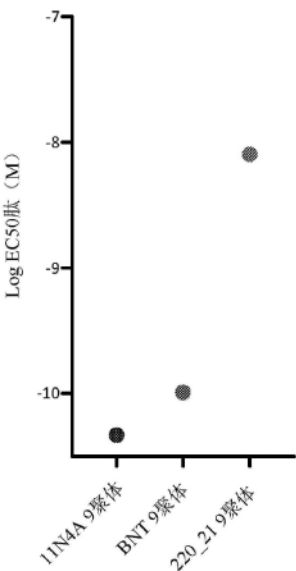
(72) 发明人 T • M • 施米特 P • D • 格林伯格

(54) 发明名称

对RAS新抗原具有特异性的结合蛋白及其用途

(57) 摘要

本公开提供了用于靶向Ras抗原以例如治疗或预防癌症的组合物和方法。所公开的实施例包括结合蛋白,如与Ras抗原:HLA复合物结合的T细胞受体。所公开的结合蛋白对抗原高度敏感,所述结合蛋白能够在低浓度的肽抗原下诱导宿主T细胞的激活。在某些实施例中,本公开的结合蛋白针对 (i) 来自人类蛋白质组的氨基酸序列和/或 (ii) 人类HLA等位基因是非同种异体反应性的,基本上是非同种异体反应性的和/或具有较低风险的同种异体反应性。编码此类结合蛋白的多核苷酸可以引入到宿主细胞,如T细胞中,并且所述细胞可以用在用于治疗各种癌症的免疫疗法中。



1. 一种结合蛋白,其包含:

(a) T细胞受体 (TCR) α 链可变 ($V\alpha$) 结构域,所述TCR $V\alpha$ 结构域包含SEQ ID NO.:16、17、42和43中的任一个中所示的互补决定区3 (CDR3 α) 氨基酸序列,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;和/或

(b) TCR β 链可变 ($V\beta$) 结构域,所述TCR $V\beta$ 结构域包含SEQ ID NO.:26、27、52和53中的任一个中所示的CDR3 β 氨基酸序列,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体,

其中所述结合蛋白能够与肽:HLA复合物结合,其中肽包含氨基酸序列VVVGAVGVGK (SEQ ID NO.:2) 或VVVGAVGVGK (SEQ ID NO.:3) 或由其组成,并且其中HLA包含HLA-A*11。

2. 根据权利要求1所述的结合蛋白,其中所述HLA包含HLA-A*11:01。

3. 根据权利要求1或2所述的结合蛋白,其中所述 $V\alpha$ 结构域和/或所述 $V\beta$ 结构域是人的、人源化的或嵌合的,并且优选地是人的。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的结合蛋白,其包含以下中所示的CDR3 α 和CDR3 β 氨基酸序列:(i) 分别为SEQ ID NO.:17和27,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;(ii) 分别为SEQ ID NO.:16和26,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;(iii) 分别为SEQ ID NO.:53和43,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;或(iv) 分别为SEQ ID NO.:52和42,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的结合蛋白,其包含:(i) 在所述 $V\alpha$ 结构域中,SEQ ID NO.:14或40中所示的CDR1 α 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;(ii) 在所述 $V\alpha$ 结构域中,SEQ ID NO.:15或41中所示的CDR2 α 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;(iii) 在所述 $V\beta$ 结构域中,SEQ ID NO.:24或50中所示的CDR1 β 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;(iv) 在所述 $V\beta$ 结构域中,SEQ ID NO.:25或51中所示的CDR2 β 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;或(v) (i) - (iv) 的任何组合。

6. 根据权利要求1至5中任一项所述的结合蛋白,其包含分别在SEQ ID NO.:14、15、16或17、24、25和26或27中所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

7. 根据权利要求1至5中任一项所述的结合蛋白,其包含分别在SEQ ID NO.:40、41、42或43、50、51和52或53中所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的结合蛋白,其中:

(i) 所述 $V\alpha$ 结构域包含与SEQ ID NO.:13或39中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成;和/或

(ii) 所述 $V\beta$ 结构域包含与SEQ ID NO.:23或49中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的结合蛋白,其中所述 $V\alpha$ 结构域包含与SEQ ID

NO.:13中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成,并且其中所述V β 结构域包含与SEQ ID NO.:23中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成。

10.根据权利要求1至8中任一项所述的结合蛋白,其中所述V α 结构域包含与SEQ ID NO.:39中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成,并且其中所述V β 结构域包含与SEQ ID NO.:49中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成。

11.根据权利要求1至10中任一项所述的结合蛋白,其中所述V α 结构域包含SEQ ID NO.:13中所示的氨基酸序列或由其组成,并且所述V β 结构域包含SEQ ID NO.:23中所示的氨基酸序列或由其组成。

12.根据权利要求1至10中任一项所述的结合蛋白,其中所述V α 结构域包含SEQ ID NO.:39中所示的氨基酸序列或由其组成,并且所述V β 结构域包含SEQ ID NO.:49中所示的氨基酸序列或由其组成。

13.根据权利要求1至12中任一项所述的结合蛋白,其进一步包含TCR α 链恒定结构域(C α)和/或TCR β 链恒定结构域(C β)。

14.根据权利要求13所述的结合蛋白,其中所述C α 包含与SEQ ID NO.:18、19、44、45和69中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成,或包含其中的任一个中所示的氨基酸序列或由其组成。

15.根据权利要求13或14所述的结合蛋白,其中所述C β 包含与SEQ ID NO.:28、29、54、55和70-73中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成,或包含其中的任一个中所示的氨基酸序列或由其组成。

16.根据权利要求13至15中任一项所述的结合蛋白,其中所述C α 和所述C β 包含与以下中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成,或包含以下中所示的氨基酸序列或由其组成:

- (i) 分别为SEQ ID NO.:18和28;
- (ii) 分别为SEQ ID NO.:19和29;
- (iii) 分别为SEQ ID NO.:44和54;或
- (iv) 分别为SEQ ID NO.:45和55。

17.根据权利要求13至16中任一项所述的结合蛋白,其中所述C α 、所述C β 或两者包含促进所述C α 与所述C β 优先配对的修饰。

18. 根据权利要求13至16中任一项所述的结合蛋白, 其中所述C α 和所述C β 各自包含引入的半胱氨酸残基, 所述半胱氨酸残基促进所述C α 与所述C β 的优先配对。

19. 根据权利要求13至16中任一项所述的结合蛋白, 其中所述C α 包含T48C取代并且所述C β 包含S57C取代, 以促进所述C α 与所述C β 的优先配对。

20. 根据权利要求1至19中任一项所述的结合蛋白, 其包含TCR α 链和TCR β 链, 其中所述TCR α 链和所述TCR β 链包含与以下中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成, 或包含以下中所示的氨基酸序列或由其组成:

- (i) 分别为SEQ ID NO.:12和22;
- (ii) 分别为SEQ ID NO.:20和30;
- (iii) 分别为SEQ ID NO.:12和30;
- (iv) 分别为SEQ ID NO.:20和22;
- (v) 分别为SEQ ID NO.:38和48;
- (vi) 分别为SEQ ID NO.:46和56;
- (vii) 分别为SEQ ID NO.:38和56;或
- (viii) 分别为SEQ ID NO.:46和48。

21. 根据权利要求1至20中任一项所述的结合蛋白, 其中所述结合蛋白包含TCR、单链TCR(scTCR)、单链T细胞受体可变片段(scTv)或嵌合抗原受体(CAR)。

22. 根据权利要求21所述的结合蛋白, 其中所述结合蛋白包含TCR。

23. 根据权利要求1至22中任一项所述的结合蛋白, 其中所述结合蛋白在CD137表面表达测定中对所述肽的功能亲和力包含至多100nM、至多50nM、至多25nM、至多10nM、至多1nM、至多750pM、至多500pM、至多250pM、至多100pM、至多75pM或至多60pM的EC50。

24. 一种分离的多核苷酸, 其编码根据权利要求1至23中任一项所述的结合蛋白。

25. 根据权利要求24所述的多核苷酸, 其包含与SEQ ID NO.:5-10和33-36中的任一个中所示的多核苷酸序列或其任何组合具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的多核苷酸, 或包含其中的任一个中所示的多核苷酸序列或其任何组合或由其组成。

26. 根据权利要求24或25所述的多核苷酸, 其进一步包含:

(i) 编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分, 其中, 任选地, 经编码的多肽是或包含CD8共受体 α 链;

(ii) 编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分, 其中, 任选地, 经编码的多肽是或包含CD8共受体 β 链;或

(iii) (i)的多核苷酸和(ii)的多核苷酸。

27. 根据权利要求26所述的多核苷酸, 其包含:

(a) 所述编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分;

(b) 所述编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分;以及

(c) 编码自切割肽的多核苷酸, 所述多核苷酸安置在(a)的所述多核苷酸与(b)的所述多核苷酸之间。

28. 根据权利要求26或27所述的多核苷酸,其进一步包含编码自切割肽并安置在以下之间的多核苷酸:

(1) 所述编码结合蛋白的多核苷酸与所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分;和/或

(2) 所述编码结合蛋白的多核苷酸与所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分。

29. 根据权利要求26至28中任一项所述的多核苷酸,其包含在框内可操作地连接的:

- (i) (pnCD8 α) - (pnSCP₁) - (pnCD8 β) - (pnSCP₂) - (pnBP);
- (ii) (pnCD8 β) - (pnSCP₁) - (pnCD8 α) - (pnSCP₂) - (pnBP);
- (iii) (pnBP) - (pnSCP₁) - (pnCD8 α) - (pnSCP₂) - (pnCD8 β);
- (iv) (pnBP) - (pnSCP₁) - (pnCD8 β) - (pnSCP₂) - (pnCD8 α);
- (v) (pnCD8 α) - (pnSCP₁) - (pnBP) - (pnSCP₂) - (pnCD8 β);或
- (vi) (pnCD8 β) - (pnSCP₁) - (pnBP) - (pnSCP₂) - (pnCD8 α),

其中pnCD8 α 是所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,

其中pnCD8 β 是所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,

其中pnBP是所述编码结合蛋白的多核苷酸,

并且其中pnSCP₁和pnSCP₂各自独立地是编码自切割肽的多核苷酸,其中所述多核苷酸和/或经编码的自切割肽任选地是相同的或不同的。

30. 根据权利要求26至29中任一项所述的多核苷酸,其中经编码的结合蛋白包含TCR α 链和TCR β 链,其中所述多核苷酸包含编码自切割肽、安置在编码TCR α 链的多核苷酸与编码TCR β 链的多核苷酸之间的多核苷酸。

31. 根据权利要求30所述的多核苷酸,其包含在框内可操作地连接的:

- (i) (pnCD8 α) - (pnSCP₁) - (pnCD8 β) - (pnSCP₂) - (pnTCR β) - (pnSCP₃) - (pnTCR α);
- (ii) (pnCD8 β) - (pnSCP₁) - (pnCD8 α) - (pnSCP₂) - (pnTCR β) - (pnSCP₃) - (pnTCR α);
- (iii) (pnCD8 α) - (pnSCP₁) - (pnCD8 β) - (pnSCP₂) - (pnTCR α) - (pnSCP₃) - (pnTCR β);
- (iv) (pnCD8 β) - (pnSCP₁) - (pnCD8 α) - (pnSCP₂) - (pnTCR α) - (pnSCP₃) - (pnTCR β);
- (v) (pnTCR β) - (pnSCP₁) - (pnTCR α) - (pnSCP₂) - (pnCD8 α) - (pnSCP₃) - (pnCD8 β);
- (vi) (pnTCR β) - (pnSCP₁) - (pnTCR α) - (pnSCP₂) - (pnCD8 β) - (pnSCP₃) - (pnCD8 α);
- (vii) (pnTCR α) - (pnSCP₁) - (pnTCR β) - (pnSCP₂) - (pnCD8 α) - (pnSCP₃) - (pnCD8 β);
- (viii) (pnTCR α) - (pnSCP₁) - (pnTCR β) - (pnSCP₂) - (pnCD8 β) - (pnSCP₃) - (pnCD8 α),

其中pnCD8 α 是所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,

其中pnCD8 β 是所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,

其中pnTCR α 是所述编码TCR α 链的多核苷酸,

其中pnTCR β 是所述编码TCR β 链的多核苷酸,

并且其中pnSCP₁、pnSCP₂和pnSCP₃各自独立地是编码自切割肽的多核苷酸,其中所述多核苷酸和/或经编码的自切割肽任选地是相同的或不同的。

32. 根据权利要求31所述的多核苷酸,其中所述pnSCP1编码T2A肽,所述pnSCP2编码P2A肽,并且所述pnSCP3编码P2A肽。

33. 根据权利要求24至32中任一项所述的多核苷酸,其编码与SEQ ID NO.:11、21、37、

47、31、32、57和58中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或包含其中的任一个中所示的氨基酸序列或由其组成。

34.根据权利要求33所述的多核苷酸,其编码(i)与SEQ ID NO.:11中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或包含其中所示的氨基酸序列或由其组成,以及(ii)与SEQ ID NO.:21中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或包含其中所示的氨基酸序列或由其组成。

35.根据权利要求33所述的多核苷酸,其编码(i)与SEQ ID NO.:37中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或包含其中所示的氨基酸序列或由其组成,以及(ii)与SEQ ID NO.:47中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或包含其中所示的氨基酸序列或由其组成。

36.根据权利要求24至35中任一项所述的多核苷酸,其是或包含多核苷酸序列,所述多核苷酸序列被密码子优化以在宿主细胞中表达,其中,任选地,所述宿主细胞是人免疫系统细胞,并且其中进一步任选地是T细胞。

37.一种表达载体,其包含与表达控制序列可操作地连接的根据权利要求24至36中任一项所述的多核苷酸。

38.根据权利要求37所述的表达载体,其中所述表达控制序列包含MSCV启动子。

39.根据权利要求37或权利要求38所述的表达载体,其中所述表达控制序列驱动编码所述CD8共受体 α 链的所述细胞外部分、所述CD8共受体 β 链的所述细胞外部分、所述TCR α 链和所述TCR β 链的单个mRNA的表达。

40.根据权利要求37至39中任一项所述的表达载体,其中所述载体能够将所述多核苷酸递送至宿主细胞。

41.根据权利要求40所述的表达载体,其中所述宿主细胞是造血祖细胞或人免疫系统细胞。

42.根据权利要求41所述的表达载体,其中所述人免疫系统细胞是CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤细胞、自然杀伤T细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞或其任何组合。

43.根据权利要求42所述的表达载体,其中所述T细胞是原初T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞或其任何组合。

44.根据权利要求37至43中任一项所述的表达载体,其中所述载体是病毒载体。

45.根据权利要求44所述的表达载体,其中所述病毒载体是慢病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。

46.根据权利要求44所述的表达载体,其中所述病毒载体是自失活慢病毒载体。

47.根据权利要求44或权利要求46所述的表达载体,其中所述病毒载体是第三代慢病毒载体。

48. 一种宿主细胞, 其被修饰以包含根据权利要求24至36中任一项所述的多核苷酸和/或根据权利要求37至47中任一项所述的表达载体和/或表达根据权利要求1至23中任一项所述的结合蛋白。

49. 根据权利要求48所述的宿主细胞, 其中经修饰的细胞包含造血祖细胞和/或人免疫细胞。

50. 根据权利要求49所述的宿主细胞, 其中所述免疫细胞包含T细胞、NK细胞、NK-T细胞、树突状细胞、巨噬细胞、单核细胞或其任何组合。

51. 根据权利要求50所述的宿主细胞, 其中所述免疫细胞包含 $CD4^+$ T细胞、 $CD8^+$ T细胞、 $CD4^-CD8^-$ 双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、原初T细胞、中央记忆T细胞、干细胞记忆T细胞、效应记忆T细胞或其任何组合,

其中, 任选地, 所述免疫细胞包含 $CD4^+$ T细胞和 $CD8^+$ T细胞, 其中, 进一步任选地, 所述 $CD4^+$ T细胞、所述 $CD8^+$ T细胞或两者包含 (i) 编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分, 其中, 任选地, 经编码的多肽是或包含CD8共受体 α 链; (ii) 编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分, 其中, 任选地, 经编码的多肽是或包含CD8共受体 β 链; 或 (iii) (i) 的多核苷酸和(ii)的多核苷酸。

52. 根据权利要求48至51中任一项所述的宿主细胞, 其中所述经修饰的细胞包含以下的染色体基因敲除: PD-1基因; LAG3基因; TIM3基因; CTLA4基因; HLA组分基因; TIGIT基因; TCR组分基因、FasL基因或其任何组合。

53. 根据权利要求52所述的宿主细胞, 其中所述染色体基因敲除包含选自以下的HLA组分基因的敲除: $\alpha 1$ 巨球蛋白基因、 $\alpha 2$ 巨球蛋白基因、 $\alpha 3$ 巨球蛋白基因、 $\beta 1$ 微球蛋白基因或 $\beta 2$ 微球蛋白基因。

54. 根据权利要求52或53所述的宿主细胞, 其中所述染色体基因敲除包含选自以下的TCR组分基因的敲除: TCR α 可变区基因、TCR β 可变区基因、TCR恒定区基因或其组合。

55. 一种组合物, 其包含根据权利要求48至54中任一项所述的宿主细胞以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

56. 根据权利要求55所述的组合物, 其包含至少约30%的经修饰的 $CD4^+$ T细胞, 所述组合物与(ii)包含至少约30%的经修饰的 $CD8^+$ T细胞的组合物以约1:1的比率组合。

57. 根据权利要求55或56所述的组合物, 其中所述组合物基本上不含原初T细胞。

58. 一种组合物, 其包含:

- (ix) 根据权利要求1至23中任一项所述的结合蛋白;
- (x) 根据权利要求24至36中任一项所述的多核苷酸;
- (xi) 根据权利要求37至47中任一项所述的表达载体; 和/或
- (xii) 根据权利要求48至54中任一项所述的宿主细胞, 以及药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂。

59. 一种用于治疗受试者的与KRAS G12V突变或NRAS G12V突变或HRAS G12V突变相关的疾病或病症的方法, 所述方法包含向所述受试者施用有效量的:

- (i) 根据权利要求1至23中任一项所述的结合蛋白;
- (ii) 根据权利要求24至36中任一项所述的多核苷酸;
- (iii) 根据权利要求37至47中任一项所述的表达载体;

(iv) 根据权利要求48至54中任一项所述的宿主细胞,其中,任选地,所述宿主细胞包含CD8+T细胞、CD4+T细胞或两者,并且其中,任选地,所述宿主细胞对于所述受试者是自体的、同种异体的或同基因的;和/或

(v) 根据权利要求55至58中任一项所述的组合物。

60. 根据权利要求59所述的方法,其中所述疾病或病症包含癌症,其中所述癌症任选地是实体癌或血液系统恶性病。

61. 根据权利要求59或60所述的方法,其中所述疾病或病症选自胰腺癌(pancreas cancer或pancreas carcinoma),任选地胰腺导管腺癌(PDAC);结直肠癌(colorectal cancer或colorectal carcinoma);肺癌,任选地非小细胞肺癌;胆道癌;子宫内膜癌(endometrial cancer或endometrial carcinoma);宫颈癌;卵巢癌;膀胱癌(bladder cancer);肝癌;髓系白血病,任选地髓系白血病,如急性髓系白血病;骨髓增生异常综合征;淋巴瘤,如非霍奇金氏淋巴瘤(Non-Hodgkin lymphoma);慢性粒单核细胞白血病;急性淋巴细胞白血病(ALL);尿道癌;小肠癌;乳腺癌(breast cancer或breast carcinoma);黑色素瘤(任选地皮肤黑色素瘤、肛门黑色素瘤或粘膜黑色素瘤);神经胶质瘤;低分化甲状腺癌;神经母细胞瘤;组织细胞和树突状细胞赘生物;1型神经纤维瘤病;横纹肌肉瘤;软组织肉瘤;膀胱癌(bladder carcinoma);肉瘤;胶质母细胞瘤;鳞状细胞肺癌;间变性星形细胞瘤;慢性髓系白血病;弥漫性大B细胞淋巴瘤;双重打击淋巴瘤;头颈癌;头颈鳞状细胞癌;肝细胞癌;恶性周围神经鞘瘤;套细胞淋巴瘤;骨髓增生异常/骨髓增殖性赘生物,不可分类;外周T细胞淋巴瘤;前列腺癌;难治性贫血伴原始细胞增多-2;肾细胞癌;横纹肌样瘤;神经鞘瘤;继发性AML;小细胞肺癌;疗法相关的AML;胸腺癌;甲状腺滤泡癌;甲状腺恶性赘生物;甲状腺癌;甲状腺腺癌;尿路上皮癌;结肠癌;结直肠腺癌;甲状腺乳头状癌;或其晚期或转移性版本。

62. 根据权利要求59至61中任一项所述的方法,其中所述结合蛋白、所述多核苷酸、所述载体、所述宿主细胞或所述组合物经肠胃外或静脉内施用于所述受试者。

63. 根据权利要求59至62中任一项所述的方法,其中所述方法包含向所述受试者施用多个剂量的(i) - (v)中的任何一者或多者。

64. 根据权利要求63所述的方法,其中所述多个剂量以约两周至约四周的施用间隔施用。

65. 根据权利要求59至64中任一项所述的方法,其中所述组合物包含所述宿主细胞或包含所述宿主细胞的所述组合物,并且其中所述方法包含以约 10^4 个细胞/kg至约 10^{11} 个细胞/kg的剂量向所述受试者施用所述宿主细胞或所述组合物。

66. 根据权利要求59至65中任一项所述的方法,其中所述方法包含任选地以单个剂量向所述受试者施用包含所述结合蛋白的至少 5×10^8 、至少 1×10^9 、至少 5×10^9 、至少 1×10^{10} 、至少 1.5×10^{10} 、至少 2×10^{10} 或至少 5×10^{10} 个活宿主细胞。

67. 根据权利要求59至65中任一项所述的方法,其中所述方法包含任选地以单个剂量向所述受试者施用包含所述结合蛋白的至多 5×10^9 、至多 1×10^{10} 、至多 1.5×10^{10} 、至多 2×10^{10} 、至多 5×10^{10} 、至多 1×10^{11} 或至多 5×10^{11} 个活宿主细胞。

68. 根据权利要求59至65中任一项所述的方法,其中所述方法包含任选地以单个剂量向所述受试者施用包含所述结合蛋白的约 5×10^9 、约 6×10^9 、约 7×10^9 、约 8×10^9 、约

9×10^9 、约 1×10^{10} 、约 1.1×10^{10} 、约 1.2×10^{10} 、约 1.3×10^{10} 、约 1.4×10^{10} 、约 1.5×10^{10} 、约 1.6×10^{10} 、约 1.7×10^{10} 、约 1.8×10^{10} 、约 1.9×10^{10} 或约 2×10^{10} 个活宿主细胞。

69. 根据权利要求59至65中任一项所述的方法, 其中所述方法包含任选地以单个剂量向所述受试者施用包含所述结合蛋白的约 5×10^9 至约 1×10^{11} 、约 5×10^9 至约 5×10^{10} 、约 5×10^9 至约 2×10^{10} 、约 5×10^9 至约 1.5×10^{10} 、约 5×10^9 至约 1×10^{10} 、约 1×10^{10} 至约 1×10^{11} 、约 1×10^{10} 至约 5×10^{10} 、约 1×10^{10} 至约 2×10^{10} 、或约 1×10^{10} 至约 1.5×10^{10} 个活宿主细胞。

70. 根据权利要求59至69中任一项所述的方法, 其进一步包含在施用所述结合蛋白、所述多核苷酸、所述载体、所述宿主细胞或所述组合物之前, 确定所述受试者表达HLA-A*11, 任选地HLA-A*11:01。

71. 根据权利要求59至70中任一项所述的方法, 其中所述方法进一步包含向所述受试者施用细胞因子。

72. 根据权利要求71所述的方法, 其中所述细胞因子包含IL-2、IL-15或IL-21。

73. 根据权利要求59至72中任一项所述的方法, 其中所述受试者已经接受或正在接受免疫检查点抑制剂和/或刺激性免疫检查点药剂的激动剂。

74. 根据权利要求1至23中任一项所述的结合蛋白、根据权利要求24至36中任一项所述的多核苷酸、根据权利要求37至47中任一项所述的表达载体、根据权利要求48至54中任一项所述的宿主细胞, 其中, 任选地, 所述宿主细胞包含CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞或两者, 和/或根据权利要求55至58中任一项所述的组合物, 其在用于治疗受试者的与KRAS G12V或NRAS G12V突变或HRAS G12V突变相关的疾病或病症的方法中使用, 其中, 任选地, 所述疾病或病症包含癌症, 其中, 进一步任选地, 所述癌症是实体癌或血液系统恶性病, 并且其中, 任选地, 所述疾病或病症选自胰腺癌(pancreas cancer或pancreas carcinoma), 任选地胰腺导管腺癌(PDAC); 结直肠癌(colorectal cancer或colorectal carcinoma); 肺癌, 任选地非小细胞肺癌; 胆道癌; 子宫内膜癌(endometrial cancer或endometrial carcinoma); 宫颈癌; 卵巢癌; 膀胱癌(bladder cancer); 肝癌; 髓系白血病, 任选地髓系白血病, 如急性髓系白血病; 骨髓增生异常综合征; 淋巴瘤, 如非霍奇金氏淋巴瘤; 慢性粒单核细胞白血病; 急性淋巴细胞白血病(ALL); 尿道癌; 小肠癌; 乳腺癌(breast cancer或breast carcinoma); 黑色素瘤(任选地皮肤黑色素瘤、肛门黑色素瘤或粘膜黑色素瘤); 神经胶质瘤; 低分化甲状腺癌; 神经母细胞瘤; 组织细胞和树突状细胞赘生物; 1型神经纤维瘤病; 横纹肌肉瘤; 软组织肉瘤; 膀胱癌(bladder carcinoma); 肉瘤; 胶质母细胞瘤; 鳞状细胞肺癌; 间变性星形细胞瘤; 慢性髓系白血病; 弥漫性大B细胞淋巴瘤; 双重打击淋巴瘤; 头颈癌; 头颈鳞状细胞癌; 肝细胞癌; 恶性周围神经鞘瘤; 套细胞淋巴瘤; 骨髓增生异常/骨髓增殖性赘生物, 不可分类; 外周T细胞淋巴瘤; 前列腺癌; 难治性贫血伴原始细胞增多-2; 肾细胞癌; 横纹肌样瘤; 神经鞘瘤; 继发性AML; 小细胞肺癌; 疗法相关的AML; 胸腺癌; 甲状腺滤泡癌; 甲状腺恶性赘生物; 甲状腺癌; 甲状腺腺癌; 尿路上皮癌; 结肠癌; 结直肠腺癌; 甲状腺乳头状癌; 或其晚期或转移性版本。

75. 根据权利要求1至23中任一项所述的结合蛋白、根据权利要求24至36中任一项所述的多核苷酸、根据权利要求37至47中任一项所述的表达载体、根据权利要求48至54中任一

项所述的宿主细胞,其中,任选地,所述宿主细胞包含CD8+T细胞、CD4+T细胞或两者,和/或根据权利要求55至58中任一项所述的组合物,其在制备用于治疗受试者的与KRAS G12V或NRAS G12V突变或HRAS G12V突变相关的疾病或病症的药物中使用,其中,任选地,所述疾病或病症包含癌症,其中,进一步任选地,所述癌症是实体癌或血液系统恶性病,并且其中,任选地,所述疾病或病症选自胰腺癌(pancreas cancer或pancreas carcinoma),任选地胰腺导管腺癌(PDAC);结直肠癌(colorectal cancer或colorectal carcinoma);肺癌,任选地非小细胞肺癌;胆道癌;子宫内膜癌(endometrial cancer或endometrial carcinoma);宫颈癌;卵巢癌;膀胱癌(bladder cancer);肝癌;髓系白血病,任选地髓系白血病,如急性髓系白血病;骨髓增生异常综合征;淋巴瘤,如非霍奇金氏淋巴瘤;慢性粒单核细胞白血病;急性淋巴细胞白血病(ALL);尿道癌;小肠癌;乳腺癌;黑色素瘤(任选地皮肤黑色素瘤、肛门黑色素瘤或粘膜黑色素瘤);神经胶质瘤;低分化甲状腺癌;神经母细胞瘤;组织细胞和树突状细胞赘生物;1型神经纤维瘤病;横纹肌肉瘤;软组织肉瘤;膀胱癌(bladder carcinoma);肉瘤;胶质母细胞瘤;鳞状细胞肺癌;间变性星形细胞瘤;慢性髓系白血病;弥漫性大B细胞淋巴瘤;双重打击淋巴瘤;头颈癌;头颈鳞状细胞癌;肝细胞癌;恶性周围神经鞘瘤;套细胞淋巴瘤;骨髓增生异常/骨髓增殖性赘生物,不可分类;外周T细胞淋巴瘤;前列腺癌;难治性贫血伴原始细胞增多-2;肾细胞癌;横纹肌样瘤;神经鞘瘤;继发性AML;小细胞肺癌;疗法相关的AML;胸腺癌;甲状腺滤泡癌;甲状腺恶性赘生物;甲状腺癌;甲状腺腺癌;尿路上皮癌;结肠癌;结直肠腺癌;甲状腺乳头状癌;或其晚期或转移性版本。

对RAS新抗原具有特异性的结合蛋白及其用途

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2022年5月13日提交的美国临时专利申请第63/342,025号、于2022年10月21日提交的美国临时专利申请第63/380,551号和于2023年3月6日提交的美国临时专利申请第63/488,758号的权益,所述美国临时专利申请的全部公开内容通过引用整体并入本文。

[0003] 对电子序列表的引用

[0004] 电子序列表的内容(502W0_SeqListing.xml;大小:189千字节;以及创建日期:2023年5月11日)通过引用整体并入本文。

背景技术

[0005] Ras家族蛋白是参与细胞内的信号传递的小GTP酶,包括例如细胞增殖的转导。示例性RAS蛋白包括KRAS(也称为C-K-RAS、CFC2、K-RAS2A、K-RAS2B、K-RAS4A、K-RAS4B、KI-RAS、KRAS1、KRAS2、NS、NS3、RALD、RASK2、K-ras、KRAS原癌基因、GTP酶和c-Ki-ras2)、HRAS和NRAS。破坏负生长信号传导的RAS蛋白中的突变可导致细胞的持续增殖。KRAS是多种人类癌症中最常见的突变的原癌基因之一,包括黑色素瘤、子宫内膜癌、甲状腺癌、胰腺癌、结直肠癌、乳腺癌、卵巢癌和肺癌,以及一些髓系白血病的情况,如AML。已经开发了靶向KRAS G12C的药理学抑制剂,但已报告癌症对这些抑制剂具有原发性和适应性耐药性(例如, Awad等人,《新英格兰医学杂志(NEJM)》384:2382-2393(2021))。需要靶向突变型RAS蛋白的新疗法。

附图说明

[0006] 图1A-1E涉及从健康人供体的T细胞组库中鉴定KRAS G12V特异性T细胞受体(TCR)。(图1A)(左)示出了用于从供体样品中鉴定HLA-A11限制性突变型KRAS(mKRAS)特异性T细胞系的方法,以及(右)在mKRAS G12V肽不存在(左)或存在(右)的情况下表达mKRAS特异性TCR的CD8+T细胞产生TNF α 的方法的示意图。(图1B)(顶部)用于对mKRAS反应性CD8+T细胞进行分选和测序和(底部)对CD8+T细胞以异源性表达mKRAS特异性TCR进行工程化的方法的示意图。分离出五十六个mKRAS特异性TCR(G12V特异性或G12D特异性),并进行了敏感性和细胞毒性测定。(图1C)在有和没有KRAS G12V突变型肽的情况下,T细胞克隆的体外富集倍数。(图1D)在不同浓度的KRAS G12V突变型肽的存在下,如通过在Nur77基因座控制下表达GFP的T细胞的百分比评估TCR转导的T细胞在体外的激活。如图例所示,T细胞被转导以表达TCR。(图1E)Log EC50 KRAS G12V 9聚体肽值(代表TCR转导的T细胞产生Nur77表达的半最大应答所需的KRAS G12V肽的浓度)。

[0007] 图2A-2C示出了TCR 11NA4(参见表1)的功能亲和力与TCR 220_21(SEQ ID NO.:61(V α)和62(V β))中所示的V结构域氨基酸序列)和TCR“BNT”(SEQ ID NO.:60中所示的V α 结构域氨基酸序列(含信号肽);SEQ ID NO.:59中所示的V β 结构域氨基酸序列(含信号肽))的功能亲和力的比较。(图2A)在指定浓度的KRAS G12V肽下表达CD137的TCR转导的原代CD8+T细

胞的百分比; (图2B) KRAS G12V肽的TCR的log EC50; (图2C) 在指定浓度的KRAS G12V肽下表达IFN- γ 的TCR转导的原代CD8+T细胞的百分比。

[0008] 图2D-2F示出了TCR 11N4A的功能亲合力(以通过宿主T细胞确定的CD137表达评估)。图2D表明,用TCR 11N4A转导的T细胞识别KRAS G12V 9聚体和10聚体肽;图2E示出了KRAS G12V 9聚体(左)和10聚体(右)肽的TCR的log EC50;值参考图2D中的曲线,并且示出了TCR 11N4A的强大功能亲合力(低皮摩尔EC50);并且图2F示出了TCR 11N4A没有识别KRAS G12G野生型肽。在图2E中,图表上的y轴值(从底部到顶部)为:-11、-10、-9、-8、-7、-6、-5。在图2F中,图表上的y轴值(从底部到顶部)为:0、20、40、60、80、100;x轴文本(从左到右)为:无肽;G12V₇₋₁₈ 10聚体;G12V₈₋₁₈ 9聚体;G12G₇₋₁₈ WT;G12G₈₋₁₈ WT。

[0009] 图2G示出,表达TCR 11N4A的经转导的T细胞响应于突变型KRAS G12V肽而被特异性激活,但未响应于野生型KRAS G12G 9聚体或10聚体肽而被特异性激活。将分选纯化的表达TCR 11N4A的供体T细胞的群体以1 μ g/mL暴露于突变型KRAS G12V 9聚体、野生型KRAS G12G 9聚体或10聚体或无肽对照16小时,并通过CD137(4-1BB)表达评估T细胞激活。

[0010] 图3A-3G示出了TCR转导的T细胞(通过表达CD137的TCR转导T细胞的百分比评估)对表达HLA-A11+KRAS G12V的肿瘤细胞系的识别。“UT”=未转导的,阴性对照。图3C示出了通过内源性KRAS G12V呈递在不同肿瘤细胞系内激活未转导的T细胞或11N4A-TCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的T细胞。

[0011] 在图3D-3F中,11N4A-TCR T细胞显示为“FH-KRAS-TCR”。图3D示出了11N4A-TCR细胞在一组不同肿瘤细胞系内被内源性加工和呈递的KRAS G12V抗原激活。(左)本研究中所使用的肿瘤细胞系的描述。(右)将表达HLA-A*11:01和KRAS G12V的指定的肿瘤细胞系与来自两个健康供体(D1和D2)的未转导的或11N4A-TCR T细胞以1:1的效应子与靶标比率培养20小时。通过流式细胞术CD137表面染色测量T细胞激活。图3E示出了11N4A-TCR细胞在一组不同肿瘤细胞系内响应于内源性加工和呈递的KRAS G12V抗原而分泌效应细胞因子。将表达HLA-A*11:01和KRAS G12V的指定的肿瘤细胞系与来自两个健康供体(D1和D2)的未转导的或11N4A-TCR T细胞培养20小时。收集图3D所示的来自共培养激活测定的上清液,并通过ELISA分析IFN γ 、TNF α 和IL-2细胞因子分泌。IU=基于IFN γ 重组蛋白的标准曲线计算的国际单位。图3F示出了11N4A-TCR T细胞在一组不同肿瘤细胞系内响应于内源性加工和呈递的KRAS G12V抗原而增殖。将表达HLA-A*11:01和KRAS G12V的指定的肿瘤细胞系与来自两个健康供体(D1和D2)的未转导的或11N4A-TCR T细胞以1:1的效应子与靶标比率培养6天。通过流式细胞术淋巴细胞计数测量T细胞增殖。T细胞计数以淋巴细胞计数/ μ L绘制。图3G示出,测试的一组不同肿瘤细胞系显示出一系列KRAS G12V抗原表达。(左)所指定的肿瘤细胞系的蛋白质印迹分析。细胞裂解物由按细胞数量归一化的肿瘤细胞制备。使用KRAS^{G12V}特异性抗体(MA5-42375,英杰公司(Invitrogen)),其中GAPDH特异性抗体用作负载对照(AB9483,艾博抗公司(Abcam))。(右)左侧蛋白质印迹数据的密度测定法分析,对所有测试的肿瘤细胞系的KRAS G12V表达与GAPDH表达的比率进行定量。

[0012] 图4A-4G涉及Incucyte杀伤测定中表达KRAS G12V特异性TCR的CD8+T细胞对表达HLA-A11+KRAS G12V的肿瘤细胞系的特异性杀伤。在此测定中,红色对象面积指示肿瘤细胞的存在。(图4A)不存在mKRAS特异性T细胞下的mKRAS肿瘤细胞生长的示意图。(图4B) IncuCyte®杀伤测定中的mKRAS+/HLA-A11+肿瘤细胞生长曲线。测试条件为仅肿瘤细胞、经

转导以表达TCR 11N4A的肿瘤细胞+T细胞和经转导以表达比较物TCR 220_21的肿瘤细胞。y轴上的红色对象面积显示肿瘤细胞生长。在72小时添加另外的肿瘤细胞。(图4C)来自另一个杀伤测定实验的数据。T细胞和SW480肿瘤细胞系以指定的效应子:靶标比率存在。(图4D) 11N4A转导的原代CD4⁺和CD8⁺T细胞跨多种肿瘤细胞激发对SW527、SW620和CFPAC-1肿瘤细胞系具有细胞毒性。在11N4A转导的(每个图表中的下曲线)或未转导(每个图表中的上曲线)的原代T细胞的存在下,在活肿瘤可视化测定中指定的HLA-A*11:01⁺、表达KRAS G12V的肿瘤细胞系的生长动力学。表达红色荧光蛋白的肿瘤细胞(SW527和SW620肿瘤细胞)或绿色荧光蛋白的肿瘤细胞(CFPAC-1肿瘤细胞)与TCR转导的或未转导的T细胞以10:1的效应子与靶标比率培养大约145小时,如所示,肿瘤汇合度被报告为整个研究中肿瘤细胞生长/活力的度量。在大约50和90小时添加另外的肿瘤细胞。(图4E) - (图4G): 11N4A-TCR细胞对一组不同肿瘤细胞系具有细胞毒性。在活肿瘤可视化测定中,与来自两个健康供体(D1和D2)的未转导的或11N4A-TCR T细胞培养的各种指定的HLA-A*11:01⁺、表达KRAS G12V的肿瘤细胞系的生长动力学。表达红色荧光蛋白的肿瘤细胞单独或与11N4A-TCR T细胞以10:1的效应子:靶标比率培养96小时。如所示,在整个研究中,如通过总红色对象面积(标记为肿瘤细胞汇合度)测量的肿瘤细胞汇合度被报告为肿瘤细胞生长/活力的度量。在(E) - (G)中,11N4A-TCR T细胞显示为“FH-KRAS-TCR”。

[0013] 图5A-5D涉及使用KRAS G12 9聚体肽和10聚体肽的诱变扫描实验,以表征TCR 11N4A的肽结合基序。(图5A)当存在G12V肽(显示为“G12V WT”)或G12V多肽的变体(其中指定位置处的氨基酸被丙氨酸、甘氨酸或苏氨酸替换)时,表达Nur77-GFP的TCR转导的T细胞百分比,如所示。顶部:KRAS G12 9聚体肽的突变扫描的结果。底部:KRAS G12 10聚体肽的突变扫描的结果。(图5B)当存在指定的9聚体肽时,表达激活标志物Nur77(与报告基因连接)的11N4A转导的CD8⁺T细胞的百分比。(图5C)用于从含有与TCR 11N4A结合基序类似的序列的人蛋白质组中鉴定序列的工作流程示意图,以及工作流程的结果。(图5D)使用图5C所示的工作流程搜索人蛋白质组的结果。对来自人蛋白质组的肽进行评分,用于预测其与HLA-A11的结合。

[0014] 图6A-6G示出,TCR 11N4A在人中具有低自身反应性风险。(图6A、图6B) 11N4A转导的T细胞对一组潜在交叉反应性肽的反应性(参见图5B)。(图6C)肽剂量应答曲线和(图6D)经计算的11N4A转导的T细胞对RAB7B肽与同源KRAS G12V肽的负log EC50。(图6E)表达CD137的11N4A转导的CD8⁺T细胞响应于过夜培养的百分比,所述过夜培养用一组全面的位置扫描肽进行,所述位置扫描肽在同源KRAS G12V肽(172个肽)的每个位置处含有每个可能氨基酸的取代。在此测定中,引起大于15%应答的肽被认为是阳性的。(图6F)(左)从ScanProsite搜索从(图6E)的数据中鉴定的潜在交叉反应性基序中鉴定的潜在交叉反应性肽。(右)通过分选纯化的原代CD8⁺T细胞的CD137表达(通过流式细胞术测定)经转导以表达TCR 11N4A或TCR 11N4A +CD8 $\alpha\beta$,并用100ng/ml的潜在交叉反应性肽培养过夜。(图6G) TCR 11N4A在体外不会导致交叉反应性肽应答。使用从两个健康供体的PBMC产生的11N4A-TCR肽刺激的T细胞进行的T细胞激活测定。TCR 11N4A-T细胞与1 μ g/ml的每种指定的肽温育18小时,随后是CD137表达的流式细胞术分析,作为T细胞激活的量度。(左)从丙氨酸扫描基序鉴定的人自体肽和(右)从XScan扫描基序鉴定的人自体肽(参见表2)。

[0015] 图7A和7B涉及评估TCR 11N4A的潜在同种异体反应性的筛选。(图7A)将表达不同

HLA等位基因的B淋巴母细胞系(B-LCL)与11N4A转导的CD8⁺T细胞温育,并评估T细胞的反应性,如通过IFN- γ 或CD137的表达所确定的。(图7B)同种异体反应性筛选的结果:有(顶部)或没有(底部)CD8 $\alpha\beta$ 的CD137+11N4A转导的T细胞针对表达常见HLA等位基因的B-LCL的百分比。

[0016] 图8示出了经工程化以表达TCR 11N4A和CD8 $\alpha\beta$ 共受体的CD8⁺和CD4⁺T细胞针对mKRAS:HLA-A11+肿瘤细胞的杀伤活性。

[0017] 图9A-9J示出了与TCR 11N4A相关的核苷酸(图9A-9G)和氨基酸(图9H-9J)序列以及编码或包含它们的表达构建体。

[0018] 图10A-10H示出了与TCR 11N6相关的核苷酸(图10A-10E)和氨基酸(图10F-10H)序列以及编码或包含它们的表达构建体。

[0019] 应当理解,并非图9A-10H中所示的所有序列都含有或注释了图例中指示的每个序列特征。CDR3序列是根据IMGT接合定义显示的。

[0020] 图11A-11D示出了在重复肿瘤激发测定中,原代11N4A TCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的T细胞针对各种肿瘤细胞系的细胞毒性,包括SW527(图11A)、CFPAC(图11B)、SW480(图11C)和SW620(图11D)。T细胞(“E”)和靶细胞(“T”)处于指定的E:T比率。

[0021] 图12A-12C示出了在SW527(图12A)、CFPAC(图12B)和SW620(图12C)肿瘤激发模型中经工程化以表达11N4A TCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体的原代CD4⁺和CD8⁺T细胞的稳健体内抗肿瘤活性。

[0022] 图13A-13E展示了,与单一处理11N4A TCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD4⁺T细胞或11N4A TCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD8⁺T细胞相比,通过组合处理11N4ATCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD4⁺T细胞和11N4A TCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD8⁺T细胞提高了体外和体内抗肿瘤功效。(图13A)在11N4A TCR-CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD4⁺T细胞、11N4A TCR-CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD8⁺T细胞或11N4ATCR-CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD4⁺和CD8⁺T的存在下,测量了表达HLA-A11+KRAS G12V的CFPAC-1肿瘤细胞系的生长动力学;(图13B)在腹膜内分别处理未转导的CD4⁺和CD8⁺T细胞、11N4A TCR-CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD4⁺T细胞、11N4ATCR-CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD8⁺T细胞或11N4ATCR-CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD4⁺和CD8⁺T细胞后,测量了接种在NSG免疫功能低下的小鼠中的CFPAC-Luc肿瘤细胞的肿瘤动力学。(图13C)-(图13E):CD8 $\alpha\beta$ 共受体(也可写成“CD8 α/β ”共受体)与I类TCR的组合改善了TCR工程化的T细胞的抗肿瘤应答。在仅原代CD4⁺T细胞、仅CD8⁺T细胞或用TCR 11N4A(图13C)或TCR 11N4A+CD8 $\alpha\beta$ 共受体(图13D)转导的组别的CD4⁺/CD8⁺T细胞(1:1比率)的存在下,HLA-A*11:01⁺、表达KRAS G12V的肿瘤细胞系(OVCAR-5)的生长动力学。不表达KRAS G12V的阴性对照肿瘤细胞系(PANC1)在(图13E)中使用。表达红色荧光蛋白的肿瘤细胞单独或与TCR转导的T细胞以1:1的效应子与靶标比率培养172小时,并且如所示,如通过NucLight Red总红色对象面积测量的肿瘤细胞汇合度被报告为整个研究中肿瘤细胞生长/活力的度量。在72和108小时添加另外的肿瘤细胞。

[0023] 图14示出,用TCR 11N4A和CD8 $\alpha\beta$ 共受体转导的T细胞在体外不显示细胞因子非依赖性生长。

[0024] 图15示出了11N4A-TCR模拟的T细胞产物对RAB7B肽没有应答。测试了范围为10^{-0.00001}mg/mL的KRAS G12V指数肽(阳性对照)和RAB7B的肽剂量,以评估两个供体产生的

11N4A-TCR模拟的T细胞产物的反应性。将9聚体和10聚体KRAS G12V和RAB7B肽以滴定剂量外源地添加到11N4A-TCR T细胞中,持续16小时,随后通过流式细胞术分析T细胞的CD137表达。

[0025] 图16示出了11N4A-TCR模拟的T细胞产物对过表达、内源地加工和呈递的RAB7B没有应答。表达标准 (SP) 或免疫蛋白酶体 (IP) 亚基的HEK293细胞或HeLa细胞经工程化以表达HLA-A11和RAB7B全长蛋白。CFPAC-1 (KRAS G12V⁺) 和PANC1 (KRAS G12V⁻) 分别用作阳性和阴性对照。将分选的CD4⁺或CD8⁺11N4A-TCR或未转导的 (UTD) T细胞产物与每种细胞系共培养16小时,随后通过流式细胞术分析T细胞的CD137表达。在此图中,11N4A-TCR T细胞显示为“FH-KRAS-TCR”。

[0026] 图17示出,在不存在细胞因子的情况下,11N4A-TCR模拟的产物不显示细胞生长。11N4A-TCR T细胞产物富集KRAS-G12V A11四聚体阳性T细胞,并在两个供体中用X VIVO 15+5%血清替代培养基+100U/mL IL-2中的抗CD3和抗CD28珠粒扩增10天。来自相同供体的未转导的原代T细胞 (UTD) 类似地并排扩增10天。在第10天,洗涤细胞并将其重悬于缺乏细胞因子的X VIVO 15+5%血清培养基中,并在35天内测量细胞生长动力学。在图17中,11N4A-TCR T细胞显示为“FH-KRAS-TCR”。

具体实施方式

[0027] 本公开总体上涉及对Ras新抗原具有特异性的结合蛋白、表达所述结合蛋白的经修饰的宿主 (例如,免疫) 细胞、编码所述结合蛋白的多核苷酸以及相关用途。突变的Ras蛋白 (例如,KRAS、NRAS、HRAS) 可以产生新抗原,包括全长KRAS蛋白 (SEQ ID NO.:1;UniProt KB P01116) 的位置12处或全长NRAS蛋白 (SEQ ID NO.:78;Uniprot KB P01111) 的位置12处或全长HRAS蛋白的位置12处 (SEQ ID NO.:79;Uniprot KB P01112) 的G→V突变。

[0028] 在本公开中,提供了能够与Ras新抗原结合的结合蛋白。在某些方面,提供了包含TCR V α 结构域和TCR V β 结构域的结合蛋白 (和宿主细胞,如免疫细胞,其包含编码本公开的Ras特异性结合蛋白的异源性多核苷酸),其中结合蛋白能够与Ras肽抗原:HLA复合物结合,其中Ras肽抗原包含SEQ ID NO:2或3中的任一个中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施例中,HLA包含HLA-A*11,如HLA-A*11:01。

[0029] 所公开的结合蛋白对抗原高度敏感,在某些实施例中所述结合蛋白能够在低浓度的肽抗原下诱导宿主T细胞的激活。在某些实施例中,在表达结合蛋白的 (例如,CD8⁺或CD4⁺) T细胞的群体或样品中,当存在[LogEC50小于-9M (例如,在-9M与-10M之间)]肽时,T细胞具有激活标志物Nur77的半最大表达。在某些实施例中,在表达结合蛋白的 (例如,CD8⁺或CD4⁺) T细胞的群体或样品中,当存在[LogEC50小于-10M (例如,在-10M与-11M之间)]时,T细胞具有CD137的半最大表达。在某些实施例中,在表达结合蛋白的 (例如,CD8⁺或CD4⁺) T细胞的群体或样品中,当存在[LogEC50小于-10M (例如,在-10M与-11M之间)]肽时,T细胞具有IFN- γ 的半最大表达。

[0030] 表达根据本公开的结合蛋白的宿主 (例如,T) 细胞在表达突变型KRAS的癌细胞系的存在下被激活 (例如,如通过CD137的表达所确定的),所述细胞系包括OVCAR5 (卵巢浆液性腺癌)、DAN-G (胰腺腺癌)、CFPAC1 (胰腺腺癌)、SW480 (结肠癌)、SW527 (乳腺癌) 和NCI-H441 (肺腺癌) 细胞系。

[0031] 在一些实施例中,表达根据本公开的结合蛋白的宿主细胞(例如,T细胞,如CD4+T细胞或CD8+T细胞)能够在体外特异性杀伤表达突变型KRAS的细胞(例如,SW480细胞,如以8:1的效应子:靶标比率、4:1的效应子:靶标比率或2:1的效应子:靶标比率)超过144小时,包括在再激发设置中在72小时添加另外的肿瘤细胞(即,另外的表达突变型KRAS的细胞)时。

[0032] 在某些实施例中,本公开的结合蛋白针对(i)来自人类蛋白质组的氨基酸序列和/或(ii)人类HLA等位基因是非同种异体反应性的,基本上是非同种异体反应性的和/或具有较低风险的同种异体反应性。

[0033] 在本文公开的实施例中的任何实施例中,结合蛋白可以是人的、人源化的或嵌合的。还提供了编码结合蛋白的多核苷酸、包含多核苷酸的载体以及包含多核苷酸和/或载体和/或表达结合蛋白的宿主细胞。目前公开的结合蛋白和宿主细胞(例如,T细胞、NK细胞、NK-T细胞)可用于治疗与KRAS新抗原相关的疾病或病症,例如,癌症。目前公开的结合蛋白还可以与人NRAS或人HRAS中产生的G12V抗原结合,所述蛋白在G12残基附近的区中包含与KRAS相同的序列。因此,所公开的组合物可用于治疗与包含G12V突变的KRAS新抗原、包含G12V突变的NRAS新抗原或包含G12V突变的HRAS新抗原或其任何组合相关的疾病或病症。

[0034] 还提供了目前公开的结合蛋白、多核苷酸、载体、宿主细胞和相关组合物用于治疗与如本文提供的KRAS、NRAS和/或HRAS突变相关的疾病或病症的方法和用途。

[0035] 还提供了包含将编码目前公开的结合蛋白的多核苷酸引入(或引入包含所述多核苷酸的载体)到宿主细胞或多个宿主细胞或宿主细胞的群体或样品中的方法。在一些实施例中,多核苷酸或载体进一步编码:包含CD8共受体 α 链的细胞外部分的多肽;包含CD8共受体 β 链的细胞外部分的多肽,或两者。在某些实施例中,一个或多个宿主细胞包含T细胞,如CD4+T细胞或CD8+T细胞。在某些实施例中,一个或多个宿主细胞包含原代T细胞。在某些实施例中,一个或多个宿主细胞包含外周血单核细胞(PBMC)。在一些实施例中,方法进一步包含培养一个或多个宿主细胞。在一些实施例中,一个或多个宿主细胞来自患有与KRAS G12V或NRAS G12V或HRAS G12V突变相关的疾病或病症的受试者。在一些实施例中,疾病或病症包含癌症。在一些实施例中,受试者对如HLA-A*11:01等HLA-A11的表达呈阳性。在某些实施例中,一个或多个宿主细胞来自健康受试者。在一些实施例中,方法在体外执行。在其它实施例中,方法离体执行。还提供了通过所述方法制备的宿主细胞、宿主细胞群体或宿主细胞样品。在一些实施例中,宿主细胞群体包含CD8+T细胞、CD4+T细胞或两者。在一些实施例中,方法进一步包含选择CD8+T细胞和CD4+T细胞并将其组合,以提供包含约1:1比率的CD8+T细胞与CD4+T细胞的组合物。

[0036] 在更详细地阐述本公开之前,提供本文使用的某些术语的定义可能有助于理解本公开。贯穿本公开阐述了另外的定义。

[0037] 在本说明书中,除非另有说明,否则任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应当理解为包括所述范围内的任何整数的值,以及在适当时其分数(如整数的十分之一和百分之一)。而且,除非另有说明,否则本文中所阐述的与如聚合物亚基、大小或厚度等任何物理特征相关的任何数目范围应被理解为包括所陈述的范围内的任何整数。如本文所使用的,除非另外说明,否则术语“约”意指所指示的范围、值或结构的 $\pm 20\%$ 。应当理解,如本文所使用的,术语“一个/一种(a)”和“一个/一种(an)”是指所列举的组分中的“一个或多

个”。替代方案(例如,“或”)的使用应理解为意指替代方案中的一个、两个或其任何组合。如本文所使用的,术语“包括”、“具有”和“包含”是同义使用的,所述术语和其变体旨在被解释为非限制性的。

[0038] 另外,应当理解,本申请公开了源自本文所述的结构和取代基的各种组合的单个化合物或化合物组,其程度与设定每种化合物或化合物组单个阐述的程度相同。因此,特定结构或特定取代基的选择在本公开的范围內。

[0039] 术语“基本上由……组成(consisting essentially of)”不等效于“包含(comprising)”,并且是指权利要求的指定材料或步骤,或指那些不实质上影响所要求保护的的主题的基本特性的材料或步骤。例如,当结构域、区、模块或蛋白质的氨基酸序列包括延伸、缺失、突变或其组合(例如,在氨基末端或羧基末端或结构域之间的氨基酸)时,蛋白质结构域、区或模块(例如,结合结构域、铰链区、接头模块)或蛋白质(其可以具有一个或多个结构域、区或模块)“基本上由”特定氨基酸序列组成,所述延伸、缺失、突变或其组合总共占结构域、区、模块或蛋白质的长度的至多20%(例如,至多15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%或1%)并且基本上不影响(即,不会使活性降低超过50%,如不超过40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或1%)结构域、区、模块或蛋白质的活性(例如,结合蛋白的靶结合亲和力或亲合力)。

[0040] 如本文所使用的,“蛋白质”或“多肽”是指氨基酸残基的聚合物。蛋白质适用于天然存在的氨基酸聚合物和其中一个或多个氨基酸残基是对应的天然存在的氨基酸的人工化学模拟物的氨基酸聚合物和非天然存在的氨基酸聚合物。在一些实施例中,“肽”(例如,肽抗原)是指长度为约8-10个氨基酸残基的聚合物。

[0041] 如本文所使用的,“造血祖细胞”是一种可以源自造血干细胞或胎儿组织的细胞,并且能够进一步分化为成熟细胞类型(例如,免疫系统细胞)。示例性造血祖细胞包括具有CD24^{Lo} Lin⁻CD117⁺表型的细胞或在胸腺中发现的细胞(称为祖胸腺细胞)。

[0042] 如本文所使用的,“免疫系统细胞”意指来源于骨髓中造血干细胞的免疫系统的任何细胞,所述造血干细胞产生两个主要谱系,髓系祖细胞(其产生髓系细胞,如单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、巨核细胞和粒细胞)和淋巴样祖细胞(其产生淋巴样细胞如T细胞、B细胞和自然杀伤(NK)细胞)。示例性免疫系统细胞包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、调节性T细胞、自然杀伤细胞、自然杀伤T细胞和树突状细胞。巨噬细胞和树突状细胞可以称为“抗原呈递细胞”或“APC”,它们是当APC表面上与肽复合的主要组织相容性复合物(MHC)受体与T细胞表面上的TCR相互作用时可以激活T细胞的特化细胞。

[0043] “T细胞”或“T淋巴细胞”是在胸腺中成熟并产生T细胞受体(TCR)的免疫系统细胞。T细胞可以是原初T细胞(“T_N”;未暴露于抗原;与TCM(本文所述)相比,CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127和CD45RA的表达增加,并且CD45RO的表达降低或无表达)、记忆T细胞(TM)(经历抗原和长寿命),包括干细胞记忆T细胞和效应细胞(经历抗原,细胞毒性的)。TM可以进一步分为中央记忆T细胞的亚群(TCM,表达CD62L、CCR7、CD28、CD95、CD45RO和CD127)和效应记忆T细胞(TEM,表达CD45RO,CD62L、CCR7、CD28和CD45RA表达降低)。效应T细胞(TE)是指表达CD45RA的经历抗原的CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞,与TCM相比,CD62L、CCR7和CD28的表达降低,并且对颗粒酶和穿孔素呈阳性(例如,在刺激时)。辅助T细胞(T_H)是CD4⁺细胞,其通过释放细胞因子影响其它免疫细胞的活性。CD4⁺T细胞可以激活和抑制适应性免疫应答,并且这两种

功能中的哪一种被诱导将取决于例如转录因子和其它细胞和信号的存在。T细胞可以使用已知技术收集,并且各种亚群或其组合可以通过已知技术富集或耗竭,如通过与抗体亲和力结合、流式细胞术或免疫磁性选择。其它示例性T细胞包括调节性T细胞,如CD4⁺CD25⁺(Foxp3⁺)调节性T细胞和Treg17细胞,以及Tr1、Th3、CD8⁺CD28⁻和Qa-1限制性T细胞。

[0044] “T细胞受体”(TCR)是指能够特异性结合与MHC受体结合的抗原肽的具有可变结合结构域、恒定结构域、跨膜区和短细胞质尾的免疫球蛋白超家族成员;参见例如,Janeway等人,《免疫生物学:健康和疾病中的免疫系统(Immunobiology:The Immune System in Health and Disease)》,第3版,当前生物学出版物(Current Biology Publications),第433页,1997)。TCR可以在细胞表面上或以可溶性形式存在,并且通常包含具有 α 和 β 链(分别称为TCR α 和TCR β)或 γ 和 δ 链(分别称为TCR γ 和TCR δ)的异二聚体。在某些实施例中,编码本公开的结合蛋白(例如,TCR)的多核苷酸可以被密码子优化,以增强在特定宿主细胞中的表达,例如免疫系统的细胞、造血干细胞、T细胞、原代T细胞、T细胞系、NK细胞或自然杀伤T细胞(Scholten等人,《临床免疫学(Clin. Immunol.)》119:135,2006)。可以表达本公开的结合蛋白和TCR的示例性T细胞包括CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞及其相关亚群(例如,原初、中央记忆、干细胞记忆、效应记忆)。

[0045] 与免疫球蛋白(例如,抗体)一样,TCR链(例如, α 链、 β 链)的细胞外部分可以在N末端含有两个免疫球蛋白结构域,一个可变结构域(例如, α 链可变结构域或V α 、 β 链可变结构域或V β ;通常是基于Kabat编号的氨基酸1至116(Kabat等人,《具有免疫学意义的蛋白质序列(Sequences of Proteins of Immunological Interest)》,美国健康与人类服务部(US Dept. Health and Human Services),美国国立卫生研究院公共卫生服务(Public Health Service National Institutes of Health),1991,第5版)),以及与细胞膜相邻的一个恒定结构域(例如, α 链恒定结构域或C α ,通常是基于Kabat的5个氨基酸117至259, β 链恒定结构域或C β ,通常是基于Kabat的氨基酸117至295)。此外,像免疫球蛋白一样,可变结构域含有被框架区(FR)分隔的互补决定区(CDR)(参见例如,Jores等人,《美国国家科学院院刊(Proc. Nat'l Acad. Sci. USA)》87:9138,1990;Chothia等人,《欧洲分子生物学学会杂志(EMBO J.)》7:3745,1988;另见Lefranc等人,《发展竞争免疫学(Dev. Comp. Immunol.)》27:55,2003)。如本公开中使用的TCR的来源可以来自各种动物物种,如人、小鼠、大鼠、兔或其它哺乳动物。

[0046] 术语“可变区”或“可变结构域”是指免疫球蛋白超家族结合蛋白(例如,TCR α 链或 β 链(或 γ 和 δ TCR的 γ 链和 δ 链))的结构域,其参与免疫球蛋白超家族结合蛋白(例如,TCR)与抗原的结合。天然TCR的 α 链和 β 链的可变结构域(分别为V α 和V β)通常具有类似的结构,其中每个结构域包含四个通常保守的框架区(FR)和三个CDR。V α 结构域由两个独立的DNA区段,即可变基因区段和连接基因区段(V-J)编码;V β 结构域由三个独立的DNA区段,即可变基因区段、多样性基因区段和连接基因区段(V-D-J)编码。单个V α 或V β 结构域可能足以赋予抗原结合特异性。此外,与特定抗原结合的TCR可以使用V α 或V β 结构域从与抗原结合以分别筛选互补的V α 或V β 结构域的文库的TCR中分离出来。

[0047] 术语“互补决定区”和“CDR”与“高变区”或“HVR”是同义的,并且在本领域中已知是指免疫球蛋白(例如,TCR)可变区内的氨基酸序列。CDR赋予抗原特异性和结合亲和力,并通过框架区在初级氨基酸序列中彼此分离。一般来说,每个TCR α 链可变区中有三个CDR(α

CDR1、 α CDR2、 α CDR3 (也分别鉴定为CDR1 α 、CDR2 α 和CDR3 α) 并且每个TCR β 链可变区中有三个CDR (β CDR1、 β CDR2、 β CDR3 (也分别鉴定为CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β))。在TCR中,CDR3被认为是负责识别经加工的抗原的主要CDR。一般来说,CDR1和CDR2主要或仅与MHC相互作用。

[0048] CDR1和CDR2在TCR可变区编码序列的可变基因区段内编码,而CDR3由跨越V α 可变和连接区段的区编码,或由跨越V β 可变、多样性和连接区段的区编码。因此,如果已知V α 或V β 的可变基因区段的同一性,则可以推断出其对应的CDR1和CDR2的序列;例如根据如本文所述的编号方案。与CDR1和CDR2相比,CDR3并且特别是CDR3 β ,由于重组过程期间核苷酸的添加和丢失,通常具有显著更大的多样性。

[0049] TCR可变结构域序列可以与编号方案(例如Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia和Aho)进行比对,允许使用例如ANARCI软件工具注释等效残基位置并比较不同分子(2016,《生物信息学(Bioinformatics)》15:298-300)。编号方案提供了TCR可变结构域中的框架区和CDR的标准化界定。在某些实施例中,根据IMGT编号方案鉴定或定义本公开的CDR(Lefranc等人,《发展竞争免疫学》27:55,2003;imgt.org/IMGIndex/V-QUEST.php)。在一些实施例中,CDR(例如,CDR3)根据IMGT接合定义来鉴定或定义。在一些实施例中,根据IMGT定义(或方案或方法)鉴定或定义CDR(例如,CDR3或结合蛋白的所有六个CDR)。根据IMGT鉴定或定义的CDR的实例在SEQ ID NO.:14-17(参考11N4A的V α 或TCR α)、24-27(参考TCR 11N4A的V β 或TCR β)、40-43(参考TCR 11N6的V α 或TCR α)和50-53(参考TCR 11N6的V β 或TCR β)中提供。在一些实施例中,根据Kabat编号方案或方法鉴定或定义本公开的CDR(或结合蛋白的所有六个CDR)。在一些实施例中,根据Chothia编号方案或方法鉴定或定义本公开的CDR(或结合蛋白的所有六个CDR)。在一些实施例中,根据EU编号方案或方法鉴定或定义本公开的CDR(或结合蛋白的所有六个CDR)。在一些实施例中,根据增强型Chothia编号方案或方法鉴定或定义本公开的CDR(或结合蛋白的所有六个CDR)。在一些实施例中,根据Aho编号方案或方法鉴定或定义本公开的CDR(或结合蛋白的所有六个CDR)。

[0050] 如本公开中使用的TCR的来源可以来自各种动物物种中的任何一种,如人、小鼠、大鼠、兔或其它哺乳动物。TCR恒定结构域序列可以来自例如人、小鼠、有袋动物(例如负鼠、袋狸、沙袋鼠)、鲨鱼或非人灵长类动物。在某些优选实施例中,TCR恒定结构域序列是人的或包含人序列的经工程化的变体。TCR恒定结构域可以经工程化以,例如,改善配对、表达、稳定性或这些的任何组合。参见,例如,Cohen等人,《癌症研究(Cancer Res)》,2007;Kuball等人,《血液(Blood)》,2007;和Haga-Friedman等人,《免疫学杂志(Journal of Immunology)》2009。TCR C α 和C β 的工程化的实例包括将天然氨基酸突变为半胱氨酸,从而在一个TCR恒定结构域的引入半胱氨酸与另一个TCR恒定结构域的天然半胱氨酸之间形成二硫键。此类突变可以包括,例如,C α 中的T48C、C β 中的T57C或S57C,或两者。还提供了其中同源TCR恒定结构域包含突变的实施例,使得例如,一个TCR恒定结构域(例如,C α 和C β 中的一个)包含引入的所谓的“腔”(例如,通过用一个或多个具有较小侧链的氨基酸替换一个或多个天然氨基酸而获得),并且另一个(例如,C α 和C β 中的另一个)包含补偿性所谓的“隆凸”(例如,通过用一个或多个具有较大侧链的氨基酸替换一个或多个天然氨基酸而获得),类似于用于促进抗体重链的优先配对的“杵臼”构型。还提供了其中TCR恒定结构域氨基酸被突变以引入或修饰电荷特性从而有利于经突变的恒定结构域配对的实施例。C α 和C β 中可以发生突变,以通过杵臼型机制或通过电荷配对机制促进特异性配对的实例在Voss等人,《免

疫学杂志》180(1):391-401(2008)doi.org/10.4049/jimmunol.180.1.391中提供;另见美国专利第9,062,127号。用于鉴定突变的位点的TCR恒定结构域突变、经突变的TCR恒定结构域和方法在这些文件中描述,通过引用并入本文。

[0051] 提高稳定性的突变可以包括 α 跨膜结构域中从序列LSVIGF到序列LLVIVL的突变(“L-V-L”突变;参见Haga-Friedman等人,《免疫学杂志》188:5538-5546(2012),其TCR突变和突变型TCR恒定结构域序列通过引用并入本文)。

[0052] 如本文所使用的,术语“CD8共受体”或“CD8”意指细胞表面糖蛋白CD8,无论是 α - α 同源二聚体还是 α - β 异二聚体。CD8共受体有助于细胞毒性T细胞(CD8⁺)的功能,并通过其细胞质酪氨酸磷酸化通路的信号传导发挥作用(Gao和Jakobsen,《今日免疫学(Immunol.Today)》21:630-636,2000;Cole和Gao,《细胞与分子免疫学(Cell.Mol.Immunol.)》1:81-88,2004)。有五(5)种人CD8 β 链同种型(参见UniProtKB标识符P10966)和单个人CD8 α 链同种型(参见UniProtKB标识符P01732)。

[0053] “CD4”是一种免疫球蛋白共受体糖蛋白,有助于CD4⁺细胞的TCR与抗原呈递细胞连通(参见Campbell和Reece,《生物学(Biology)》909(本杰明·卡明斯(Benjamin Cummings),第六版,2002))。CD4存在于如T辅助细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞等免疫细胞的表面上,并且包括在细胞处表面表达的四个免疫球蛋白结构域(D1至D4)。在抗原呈递期间,CD4与TCR复合物一起被募集,以与MHCII分子的不同区结合(CD4与MHCII β 2结合,而TCR复合物与MHCII α 1/ β 1结合)。不希望受理论束缚,据信,与TCR复合物紧密接近允许CD4相关激酶分子磷酸化存在于CD3的细胞质结构域上的免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)。这种活性被认为可以扩增由激活的TCR产生的信号,以便产生或募集各种类型的免疫系统细胞,包括T辅助细胞和免疫应答。

[0054] 在某些实施例中,TCR存在于T细胞(或T淋巴细胞)的表面上,并与CD3复合物缔合。“CD3”是六条链的多蛋白复合物(参见,Abbas和Lichtman,2003;Janeway等人,第172和178页,1999),其与T细胞中的抗原信号传导相关。在哺乳动物中,复合物包含CD3 γ 链、CD3 δ 链、两个CD3 ϵ 链和CD3 ζ 链的同源二聚体。CD3 γ 、CD3 β 和CD3 ϵ 链是含有单个免疫球蛋白结构域的免疫球蛋白超家族的相关细胞表面蛋白。CD3 γ 、CD3 β 和CD3 ϵ 链的跨膜区带负电荷,这据信允许这些链与T细胞受体链的带正电荷的区缔合。CD3 γ 、CD3 β 和CD3 ϵ 链的细胞内尾各自含有单个保守基序,被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM,而每个CD3 ζ 链具有三个保守基序。不希望受理论束缚,据信ITAM对于TCR复合物的信号传导能力很重要。本公开中使用的CD3可以来自各种动物物种,包括人、小鼠、大鼠或其它哺乳动物。

[0055] 如本文所使用的,“TCR复合物”是指由CD3与TCR缔合形成的复合物。例如,TCR复合物可以由以下构成:CD3 γ 链、CD3 β 链、两个CD3 ϵ 链、CD3 ζ 链的同源二聚体、TCR α 链和TCR β 链。可替代地,TCR复合物可以由以下构成:CD3 γ 链、CD3 β 链、两个CD3 ϵ 链、CD3 ζ 链的同源二聚体、TCR γ 链和TCR β 链。

[0056] 如本文所使用的,“TCR复合物的组分”是指TCR链(即TCR α 、TCR β 、TCR γ 或TCR δ)、CD3链(即CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 ζ)或由两条或更多条TCR链或CD3链形成的复合物(例如,TCR α 和TCR β 的复合物、TCR γ 和TCR δ 的复合物、CD3 ϵ 和CD3 δ 的复合物、CD3 γ 和CD3 ϵ 的复合物或TCR α 、TCR β 、CD3 γ 、CD3 δ 和两条CD3 ϵ 链的亚TCR复合物)。

[0057] “嵌合抗原受体”(CAR)是指一种融合蛋白,所述融合蛋白经工程化以含有两个或

更多个天然存在的氨基酸序列、结构域或基序,其以非天然存在或非天然存在于宿主细胞中的方式连接在一起,当融合蛋白存在于细胞的表面上时,可以作为受体发挥作用。CAR可以包括细胞外部分,所述细胞外部分包含与跨膜结构域连接的抗原结合结构域(例如,从免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子获得或源自其,如源自对癌症抗原具有特异性的TCR或从其获得的TCR结合结构域、源自抗体或从其获得的scFv、或源自NK细胞的杀伤免疫受体或从其获得的抗原结合结构域)和一个或多个细胞内信号传导结构域(任选地含有共刺激结构域)(参见,例如,Sadelain等人,《癌症发现(Cancer Discov.)》,3(4):388(2013);另见Harris和Kranz,《药理学科学趋势(Trends Pharmacol.Sci.)》,37(3):220(2016),Stone等人,《癌症免疫学与免疫疗法(Cancer Immunol.Immunother.)》63(11):1163(2014),和Walseng等人,《科学报告(Scientific Reports)》7:10713(2017),其中CAR构建体及其制备方法通过引用并入本文)。本公开的与Ras抗原特异性结合的CAR(例如,在肽:HLA复合物的上下文下)包含TCR V α 结构域和V β 结构域。

[0058] 本公开的任何多肽,如通过多核苷酸序列所编码的,可以包含“信号肽”(也称为前导序列、前导肽或转运肽)。信号肽将新合成的多肽靶向细胞内或细胞外的适当位置(例如,以插入或定位到细胞膜中,或由细胞分泌,或包含在细胞内)。在一些上下文下,信号肽的长度为约15个至约22个氨基酸。在定位(例如,膜插入)或分泌完成期间或一旦完成,可以从多肽中去除信号肽。在一些实施例中,信号肽从多肽中完全去除。在一些实施例中,少于全部但通常不超过一个、两个、三个、四个、五个或六个氨基酸的信号肽保留在多肽中,并且其余的信号肽被去除。具有信号肽的多肽在本文中称为“前蛋白”,并且其信号肽被去除的多肽在本文中被称为“成熟”蛋白或多肽。在本文公开的实施例中的任何实施例中,结合蛋白或融合蛋白包含或是成熟蛋白,或是或包含前蛋白。

[0059] “接头”是指连接两种蛋白质、多肽、肽、结构域、区或基序的氨基酸序列,并且可以提供与两个亚结合结构域的相互作用相容的间隔子功能,使得所得多肽保持与靶分子的特异性结合亲和力(例如,scTCR)或保持信号传导活性(例如,TCR复合物)。在某些实施例中,接头包含约两个至约35个氨基酸,例如,或约四个至约20个氨基酸,或约八个至约15个氨基酸或约15个至约25个氨基酸。示例性接头包括甘氨酸-丝氨酸接头。

[0060] 如本文所使用的,“抗原”或“Ag”是指引起免疫应答的免疫原性分子。此免疫应答可以涉及抗体产生、特异性免疫感受态细胞的激活或两者。抗原(免疫原性分子)可以是例如肽、糖肽、多肽、糖聚肽、多核苷酸、多糖、脂质等。显而易见,抗原可以合成、重组产生或源自生物样品。可以含有一种或多种抗原的示例性生物样品包括组织样品、肿瘤样品、细胞、生物流体或其组合。抗原可以由已经修饰或基因工程化以表达抗原的细胞产生,或由内源性(例如,未经人为干预的修饰或基因工程化)表达免疫原性的突变或多态性的细胞产生。

[0061] 如本文所使用的,“新抗原”是指含有结构变化、改变或突变的宿主细胞产物,所述结构变化、改变或突变产生了先前在受试者基因组中(即,在来自受试者的健康组织的样品中)未观察到的或被宿主免疫系统“看到”或识别的新抗原或抗原性表位,所述新抗原:(a)由细胞的抗原加工和转运机制加工,并与MHC(例如,HLA)分子缔合被呈递在细胞的表面上;和(b)引发免疫应答(例如,细胞(T细胞)应答)。新抗原可以来源于,例如,编码具有导致改变的或突变的产物的改变(取代、添加、缺失)的多核苷酸,或来源于将外源性核酸分子或蛋白质插入到细胞中,或来源于暴露于导致遗传变化的环境因素(例如,化学、放射性)。新抗

原可以与肿瘤抗原分开产生,或者可以由肿瘤抗原产生或与肿瘤抗原相关。“肿瘤新抗原”(或“肿瘤特异性新抗原”)是指包含与肿瘤细胞或肿瘤内多个细胞相关、由其产生或在其内产生的新抗原决定簇的蛋白质。肿瘤新抗原决定簇存在于例如抗原性肿瘤蛋白质或肽上,所述抗原性肿瘤蛋白质或肽含有由肿瘤细胞(例如,胰腺癌、肺癌、结直肠癌)的DNA编码的一种或多种体细胞突变或染色体重排,以及来自与病毒相关肿瘤(例如,宫颈癌、一些头颈癌)相关的病毒开放阅读框的蛋白质或肽上。当提及包含如本文所公开的突变的Ras抗原时,术语“抗原”和“新抗原”在本文中可互换地使用。

[0062] 术语“表位”或“抗原性表位”包括由同源结合分子,如免疫球蛋白、T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体或其它结合分子、结构域或蛋白质识别且特异性结合的任何分子、结构、氨基酸序列或蛋白质决定簇。表位决定簇通常含有如氨基酸或糖侧链等分子的化学活性表面分组,并且可以具有特定的三维结构特性和特定的电荷特性。

[0063] 如本文所使用的,术语“KRAS(或NRAS或HRAS)抗原(或新抗原)”或“KRAS(或NRAS或HRAS)肽抗原(或新抗原)”或“KRAS(NRAS或HRAS)肽”是指KRAS或NRAS或HRAS蛋白的天然或合成产生的肽部分,其长度范围为约7个氨基酸、约8个氨基酸、约9个氨基酸或约10个氨基酸,至多约20个氨基酸,并且包含至少一个由G12(例如,G12V)突变引起的氨基酸改变(其中位置12指的是SEQ ID NO:1中所示的全长KRAS蛋白序列;并且还指SEQ ID NO.:78和79中分别所示的全长NRAS和HRAS蛋白序列),所述肽可以与MHC(例如,HLA)分子形成复合物,并且本公开的对KRAS或NRAS或HRAS肽:MHC(例如,HLA)复合物具有特异性的结合蛋白可以与此类复合物特异性结合。示例性KRAS(或NRAS或HRAS)抗原包含具有SEQ ID NO.:2或3的氨基酸序列的肽、由其组成或基本上由其组成。

[0064] “主要组织相容性复合物”(MHC)是指将肽抗原递送至所有有核细胞的细胞表面的糖蛋白。MHC I类分子是具有跨膜 α 链(具有三个 α 结构域)和非共价缔合的 β 2微球蛋白的异二聚体。MHC II类分子由两种跨膜糖蛋白 α 和 β 构成,所述两种糖蛋白都横跨膜。每个链包含两个结构域。MHC I类分子将源自胞质溶胶的肽递送至细胞表面,在所述细胞表面处肽:MHC复合物被CD8⁺T细胞识别。MHC II类分子将源自囊泡系统的肽递送至细胞表面,在所述细胞表面处,所述肽被CD4⁺T细胞识别。人MHC被称为人白细胞抗原(HLA)。与“I类”MHC相对应的HLA从细胞内呈递肽,并且包括例如,HLA-A、HLA-B和HLA-C。等位基因包括例如,HLA A*11,如HLA-A*11:01。与“II类”MHC相对应的HLA从细胞外呈递肽,并且包括例如,HLA-DP、HLA-DM、HLA-DOA、HLA-DOB、HLA-DQ和HLA-DR。

[0065] 通过抗原呈递细胞(APC)(如树突状细胞、巨噬细胞、淋巴细胞或其它细胞类型)进行抗原处理,以及APC向T细胞进行抗原呈递的原理,包括免疫相容性(例如,共享与抗原呈递相关的MHC基因的至少一个等位基因形式)APC与T细胞之间的主要组织相容性复合物(MHC)限制性呈递的原理已经充分完善(参见例如,Murphy,《詹韦氏免疫生物学(Janeway's Immunobiology)》(第8版),2011纽约的加兰科学出版社(Garland Science,NY);第6章、第9章和第16章)。例如,源自胞质溶胶的经处理的抗原肽(例如,肿瘤抗原、细胞内病原体)的长度通常为约7个氨基酸至约11个氨基酸,并且将与I类MHC(HLA)分子缔合,而在囊泡系统(例如,细菌、病毒)中经处理的肽的长度将通常为约10个氨基酸至约25个氨基酸不等,并且与II类MHC(HLA)分子缔合。

[0066] 如本文所使用的,术语“KRAS特异性结合蛋白”是指与KRAS肽抗原或NRAS肽抗原或

HRAS肽抗原(或与KRAS或NRAS或HRAS肽抗原:HLA复合物,例如,在细胞表面上)结合的蛋白质或多肽,例如TCR、scTv、scTCR或CAR,并且不与不含KRAS或NRAS或HRAS肽抗原的肽结合,和与含有此类肽的HLA复合物结合。

[0067] 本公开的结合蛋白,如TCR、scTv、scTCR和CAR,含有对靶标具有特异性的结合结构域。如本文所使用的,“结合结构域”(也称为“结合区”或“结合部分”)是指具有与靶标(例如,KRAS或NRAS或HRAS肽或KRAS或NRAS或HRAS肽:MHC复合物)特异性和非共价缔合、联合或组合的能力的分子或其部分(例如,肽、寡肽、多肽、蛋白质)。结合结构域包括生物分子、分子复合物(即包含两个或更多个生物分子的复合物)或其它所关注的靶标的任何天然存在的、合成的、半合成的或重组产生的结合配偶体。示例性结合结构域包括免疫球蛋白可变区或包含所述免疫球蛋白可变区的单链构建体(例如,单链TCR(scTCR)或scTv)。

[0068] 在某些实施例中,Ras特异性结合蛋白以小于约 10^{-8} M、小于约 10^{-9} M、小于约 10^{-10} M、小于约 10^{-11} M、小于约 10^{-12} M或小于约 10^{-13} M的 K_d ,或以与本文提供的示例性Ras特异性结合蛋白(如本文提供的Ras特异性TCR中的任何Ras特异性TCR)所表现的亲和力约相同、至少约相同或大于所表现的亲和力或约为所表现的亲和力的亲和力与KRAS(或NRAS或HRAS)肽(或KRAS(或NRAS或HRAS):HLA复合物)结合,例如,如通过相同的测定测量。在某些实施例中,Ras特异性结合蛋白包含Ras特异性免疫球蛋白超家族结合蛋白或其结合部分。

[0069] 如本文所使用的,“与……特异性结合”或“对……具有特异性”是指结合蛋白(例如,TCR受体)或结合结构域(或其融合蛋白)与靶分子的缔合或联合,其亲和力或 K_a (即,特定结合相互作用的平衡缔合常数,单位为1/M)等于或大于 10^5M^{-1} (其等于这一缔合反应的缔合速率 $[k_{\text{on}}]$ 与解离速率 $[k_{\text{off}}]$ 的比率),而不与样品中的任何其它分子或组分显著缔合或联合。结合蛋白或结合结构域(或其融合蛋白)可以分为“高亲和力”结合蛋白或结合结构域(或其融合蛋白)或分类为“低亲和力”结合蛋白或结合结构域(或其融合蛋白)。“高亲和力”结合蛋白或结合结构域是指 K_a 为至少 10^7M^{-1} 、至少 10^8M^{-1} 、至少 10^9M^{-1} 、至少 10^{10}M^{-1} 、至少 10^{11}M^{-1} 、至少 10^{12}M^{-1} 或至少 10^{13}M^{-1} 的那些结合蛋白或结合结构域。“低亲和力”结合蛋白或结合结构域是指 K_a 为至多 10^7M^{-1} 、至多 10^6M^{-1} 、至多 10^5M^{-1} 的那些结合蛋白或结合结构域。可替代地,亲和力可以被定义为特定结合相互作用的平衡解离常数(K_d),单位为M(例如, 10^{-5}M 至 10^{-13}M)。

[0070] 在某些实施例中,受体或结合结构域可以具有“增强的亲和力”,这是指与野生型(或亲本)结合结构域相比,与靶抗原具有更强结合的选择的或经工程化的受体或结合结构域。例如,增强的亲和力可能是由于靶抗原的 K_a (平衡缔合常数)高于野生型结合结构域的 K_a 、由于靶抗原的 K_d (解离常数)小于野生型结合结构域的 K_d 、由于靶抗原的解离速率(k_{off})小于野生型结合结构域的解离速率,或其组合。

[0071] 已知多种测定用于鉴定与特定靶标特异性结合的本公开的结合结构域,以及确定结合结构域或融合蛋白亲和力,如蛋白质印迹、ELISA、分析超速离心、光谱法和表面等离子体共振(Biacore®)分析(参见例如,Scatchard等人,《纽约科学院年报(Ann.N.Y.Acad.Sci.)》51:660,1949;Wilson,《科学(Science)》295:2103,2002;Wolff等人,《癌症研究》53:2560,1993;以及美国专利第5,283,173号、第5,468,614号或等效物)。结合和结合亲和力也可以使用例如结合蛋白与经标记的HLA肽复合物或经标记的HLA肽复合物多聚体(例如,四聚体)结合时观察到的荧光强度来评估。

[0072] 在某些实施例中,单独的KRAS(或NRAS,或HRAS)特异性结合结构域(即,没有KRAS(或NRAS,或HRAS)特异性结合蛋白的任何其它部分)可以是可溶性的,并且可以与 K_d 小于约 10^{-8} M、小于约 10^{-9} M、小于约 10^{-10} M、小于约 10^{-11} M、小于约 10^{-12} M或小于约 10^{-13} M的KRAS(或NRAS,或HRAS)(或KRAS(或NRAS,或HRAS)肽,或KRAS(或NRAS,或HRAS)肽:HLA复合物)结合。在特定的实施例中,KRAS(或NRAS,或HRAS)特异性结合结构域包括KRAS(或NRAS,或HRAS)特异性scTCR(例如,单链 $\alpha\beta$ TCR蛋白,如包含 $V\alpha$ -L- $V\beta$ 、 $V\beta$ -L- $V\alpha$ 、 $V\alpha$ -C α -L- $V\alpha$ 或 $V\alpha$ -L- $V\beta$ -C β ,其中 $V\alpha$ 和 $V\beta$ 分别是TCR α 和 β 可变结构域,C α 和C β 分别是TCR α 和 β 恒定结构域,并且L是接头,如本文所述的接头)。在一些实施例中,KRAS(或NRAS,或HRAS)特异性结合结构域包括KRAS(或NRAS,或HRAS)特异性scTv(例如,单链TCR可变结构域蛋白,如 $V\alpha$ -L- $V\beta$ 或 $V\beta$ -L- $V\alpha$,其中 $V\alpha$ 和 $V\beta$ 分别是TCR α 和 β 可变结构域,并且L是接头,如本文所述的接头)。

[0073] 如本文所使用的,术语“功能亲合力”是指体外免疫细胞(例如,T细胞、NK细胞、NK-T细胞)对给定浓度的配体的应答的生物量度或激活阈值,其中生物量度可以包括细胞因子产生(例如,IFN- γ 产生、IL-2产生等)、细胞毒性活性、激活标志物(例如,CD137、Nur77)和增殖。例如,在体外通过例如产生细胞因子、表现细胞毒性活性或增殖而对低抗原剂量作出生物(免疫)应答的T细胞被认为具有高功能亲合力,而具有较低功能亲和力的T细胞在引发免疫反应之前需要更高量的抗原,类似于高亲合力T细胞。应当理解,功能亲合力不同于亲和力和亲合力。亲和力是指结合蛋白与其抗原/配体之间任何给定键的强度。一些结合蛋白是多价的,并且与多种抗原结合-在这种情况下,整体连接的强度是亲合力。

[0074] 功能亲合力与免疫应答的有效性之间存在许多相关性。一些离体研究表明,不同的T细胞功能(例如,增殖、细胞因子产生等)可以在不同的阈值下触发(参见例如,Betts等人,《免疫学杂志》172:6407,2004;Langenkamp等人,《欧洲免疫学杂志(Eur. J. Immunol.)》32:2046,2002)。影响功能亲和力的因素可以包括(a) TCR对pMHC复合物的亲和力,即TCR与pMHC之间相互作用的强度(Cawthon等人,《免疫学杂志》167:2577,2001), (b) 宿主细胞上的TCR的表达水平,以及在一些实施例中CD4或CD8共受体的表达水平和(c) 信号传导分子的分布和组成(Viola和Lanzavecchia,《科学》273:104,1996),以及减弱T细胞功能和TCR信号传导的分子的表达水平。

[0075] 在特定暴露时间后,诱导基线与最大应答之间的半最大应答(例如,由宿主细胞产生细胞因子或激活标志物;与经标记的肽:HLA多聚物结合时的荧光强度)所需的抗原浓度称为“半最大有效浓度”或“EC50”。EC50值通常表示为摩尔(摩尔/升)量,但其通常转换为如下对数值 $-\log_{10}(\text{EC50})$ 。例如,如果EC50等于 $1\mu\text{M}$ (10^{-6} M),则 $\log_{10}(\text{EC50})$ 值是-6。另一个使用的值是pEC50,它被定义为EC50的负对数($-\log_{10}(\text{EC50})$)。在上述实例中,等于 $1\mu\text{M}$ 的EC50的pEC50值为6。在某些实施例中,本公开的结合蛋白的功能亲合力将包含对结合蛋白促进T细胞激活和/或IFN- γ 产生的能力的量度,这可以使用本领域已知和本文所述的测定来测量。在某些实施例中,功能亲合力将包含对结合蛋白在与抗原结合后激活宿主细胞(如T细胞)的能力的量度。

[0076] 本文所公开的结合蛋白可以包含高功能亲合力,所述高功能亲合力可以例如促进针对甚至更低水平的(例如,HLA-A*11:01)呈递的KRAS G12突变型肽(如SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:3的KRAS G12V突变型肽)的免疫细胞效应子功能(例如,激活、增殖、细胞因子产生和/或细胞毒性)的激发。

[0077] 在一些实施例中,结合蛋白对KRAS G12(例如,G12V)突变型肽的log10EC50为约-6.0或更小、约-6.1或更小、约-6.2或更小、约-6.3或更小、约-6.4或更小、约-6.5或更小、约-6.6或更小、约-6.7或更小、约-6.8或更小、约-6.9或更小、约-7.0或更小、约-7.1或更小、约-7.2或更小、约-7.3或更小、约-7.4或更小、约-7.5或更小、约-7.6或更小、约-7.7或更小、约-7.8或更小、约-7.9或更小、约-8.0或更小、约-8.1或更小、约-8.2或更小、约-8.3或更小、约-8.4或更小、约-8.5或更小、约-8.6或更小、约-8.7或更小、约-8.8或更小、约-8.9或更小、约-9或更小、约-9.1或更小、约-9.2或更小、约-9.3或更小、约-9.4或更小、约-9.5或更小、约-9.6或更小、约-9.7或更小、约-9.8或更小、约-9.9或更小或约-10或更小。

[0078] 在一些实施例中,本文所公开的宿主细胞包含结合蛋白(例如,TCR),所述结合蛋白以以下EC50(例如,表达结合蛋白的T细胞群体达到半最大激活的肽剂量)与结合蛋白的靶抗原(例如,KRAS G12突变型肽,如KRAS G12V突变型肽,例如,存在于肽:HLA(例如,HLA-A*11:01)复合物中)结合:小于约100mM、小于约10mM、小于约1mM、小于约500μM、小于约100μM、小于约50μM、小于约10μM、小于约5μM、小于约4μM、小于约3μM、小于约2μM、小于约1μM、小于约900nM、小于约800nM、小于约700nM、小于约600nM、小于约500nM、小于约400nM、小于约300nM、小于约200nM、小于约100nM、小于约90nM、小于约80nM、小于约70nM、小于约60nM、小于约50nM、小于约40nM、小于约30nM、小于约20nM、小于约10nM、小于约5nM、小于约1nM、小于约900pM、小于约800pM、小于约700pM、小于约600pM、小于约500pM、小于约400pM、小于约300pM、小于约200pM、小于约100pM、小于约90pM、小于约80pM、小于约70pM、小于约60pM、小于约50pM、小于约40pM、小于约30pM、小于约20pM、小于约10pM、小于约5pM或小于约1pM。EC50可以通过鉴定达到T细胞群体半最大激活的肽剂量的测定来确定,例如,如在不同浓度的突变型肽的存在下暴露于靶细胞通过表达激活标志物(例如,CD137、CD69、颗粒酶B、CD107a、IFN-γ、TNF-α、IL-12、Nur77、细胞因子、白介素、干扰素)来反映。

[0079] 在一些实施例中,本文所公开的宿主细胞包含结合蛋白(例如,TCR),所述结合蛋白以以下EC50(例如,表达结合蛋白的T细胞群体达到半最大激活的肽剂量)与结合蛋白的靶抗原(例如,KRAS G12突变型肽,如KRAS G12V突变型肽,例如,存在于肽:HLA(例如,HLA-A*11:01)复合物中)结合:至少约100mM、至少约10mM、至少约1mM、至少约500μM、至少约100μM、至少约50μM、至少约10μM、至少约5μM、至少约4μM、至少约3μM、至少约2μM、至少约1μM、至少约900nM、至少约800nM、至少约700nM、至少约600nM、至少约500nM、至少约400nM、至少约300nM、至少约200nM、至少约100nM、至少约90nM、至少约80nM、至少约70nM、至少约60nM、至少约50nM、至少约40nM、至少约30nM、至少约20nM、至少约10nM、至少约5nM、至少约1nM、至少约900pM、至少约800pM、至少约700pM、至少约600pM、至少约500pM、至少约400pM、至少约300pM、至少约200pM、至少约100pM、至少约90pM、至少约80pM、至少约70pM、至少约60pM、至少约50pM、至少约40pM、至少约30pM、至少约20pM、至少约10pM、至少约5pM或至少约1pM。

[0080] 在一些实施例中,结合蛋白(例如,TCR)以以下KD与靶标(例如,KRAS G12突变型肽,如KRAS G12V突变型肽,例如,存在于肽:HLA(例如,HLA-A*11:01)复合物中)结合:小于约100mM、小于约10mM、小于约1mM、小于约500μM、小于约100μM、小于约50μM、小于约10μM、小于约5μM、小于约4μM、小于约3μM、小于约2μM、小于约1μM、小于约900nM、小于约800nM、小于约700nM、小于约600nM、小于约500nM、小于约400nM、小于约300nM、小于约200nM、小于约100nM、小于约90nM、小于约80nM、小于约70nM、小于约60nM、小于约50nM、小于约40nM、小于

约30nM、小于约20nM、小于约10nM、小于约5nM、小于约1nM、小于约900pM、小于约800pM、小于约700pM、小于约600pM、小于约500pM、小于约400pM、小于约300pM、小于约200pM、小于约100pM、小于约90pM、小于约80pM、小于约70pM、小于约60pM、小于约50pM、小于约40pM、小于约30pM、小于约20pM、小于约10pM、小于约5pM或小于约1pM。

[0081] 还设想融合蛋白,所述融合蛋白包含与抗体(例如IgG(1、2、3、4)、IgE、IgD、IgA、IgM及其变体)或其片段(例如,在一些实施例中,保留与一个或多个Fc受体、与C1q、与蛋白A、与蛋白G或其任何组合结合的片段)的恒定结构域(例如,重链恒定结构域或其组合,如Fc、CH2、CH3、CH4和/或CH1)连接的本公开的scTCR或scTv,并且包括免疫球蛋白重链单体和多聚体,如Fc二聚体;参见例如,Wong等人,《免疫学杂志》198:1增刊.(2017)。包含增强、减少或消除与例如FcRn或其它Fc受体结合或通过FcRn或其它Fc受体结合的突变的变体Fc多肽是已知的,并在本公开中设想。

[0082] 在某些实施例中,本公开的结合蛋白或融合蛋白(例如TCR、scTCR、CAR)由宿主细胞(例如,通过异源性表达结合蛋白或融合蛋白的T细胞、NK细胞或NK-T细胞)表达。此类宿主细胞对KRAS(或NRAS,或HRAS)肽抗原或KRAS(或NRAS,或HRAS)肽抗原:HLA复合物的亲和力可以通过例如以下来确定:将宿主细胞暴露于肽或暴露于肽:HLA复合物(例如,组织为四聚体)或暴露于抗原呈递细胞(APC),所述APC将肽呈递到宿主细胞,任选地以肽:HLA复合物的形式,并且然后测量宿主细胞的活性,例如细胞因子(例如,IFN- γ ; TNF α)的产生或分泌;宿主细胞信号传导或激活组分(例如,CD137(4-1BB))的表达增加;宿主细胞的增殖;或杀伤APC(例如,使用经标记的铬释放测定)。

[0083] 如本文所使用的,“核酸”或“核酸分子”或“多核苷酸”是指脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、寡核苷酸、多核苷酸、例如通过聚合酶链式反应(PCR)或体外翻译产生的其片段中的任何一种,并且也指通过连接、断裂、核酸内切酶作用或核酸外切酶作用中的任何一种产生的片段。在某些实施例中,本公开的核酸是通过PCR产生的。核酸可以由是天然存在的核苷酸(如脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸)的单体、天然存在的核苷酸的类似物(例如,天然存在的核苷酸的 α -对映异构形式)或两者的组合构成。经修饰的核苷酸可以具有糖部分或嘧啶或嘌呤碱基部分的修饰或替换。核酸单体可以通过磷酸二酯键或此类键的类似物连接。磷酸二酯键的类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、硫代苯胺磷酸酯、苯胺磷酸酯、氨基磷酸酯等。核酸单体可以包含硫代磷酸酯键、二硫代磷酸酯键或硒代磷酸酯键,或其任何组合。核酸分子可以是单链或双链的。

[0084] 术语“分离的”意指将材料从其原始环境(例如,如果其天然存在的话,则天然环境中)去除。例如,存在于活动物中的天然存在的核酸或多肽不是分离的,但与天然系统中的共存材料中的一些或全部共存材料分开的相同核酸或多肽是分离的。此类核酸可以是载体的一部分和/或此类核酸或多肽可以是组合物(例如,细胞裂解物)的一部分,并且仍然是分离的,因为此类载体或组合物不是所述核酸或多肽的天然环境的一部分。在一些实施例中,提供了分离的结合蛋白、多核苷酸、载体或宿主细胞。术语“基因”意指参与产生多肽链的DNA区段;其包括编码区之前和之后的区(前导和拖尾)以及个别编码区段(外显子)之间的间隔序列(内含子)。

[0085] 如本文所使用的,术语“重组”、“经工程化的”和“经修饰的”是指已经通过引入外源性核酸分子而修饰的细胞、微生物、核酸分子、多肽、蛋白质、质粒或载体,或指已经通过

人类干预而基因工程化的细胞或微生物,即通过引入异源性核酸分子而修饰,或指已经被改变使得内源性核酸分子或基因的表达为受控的、去调控的或组成型的细胞或微生物,其中此类改变或修饰可以通过基因工程引入。人产生的遗传改变可以包括,例如,引入编码一种或多种蛋白质或酶的核酸分子(其可以包括表达控制元件,如启动子)的修饰,或其它核酸分子的添加、缺失、取代,或细胞遗传物质的其它功能破坏或添加。示例性修饰包括来自参考或亲本分子的异源性或同源性多肽的编码区或其功能片段中的那些修饰。

[0086] 如本文所使用的,“突变”是指核酸分子或多肽分子序列分别与参考或野生型核酸分子或多肽分子相比的变化。突变可能引起序列的若干不同类型变化,包括核苷酸或氨基酸的取代、插入或缺失。在某些实施例中,突变是一个或三个密码子或氨基酸的取代,一个至约5个密码子或者氨基酸的缺失,或其组合。

[0087] “保守取代”在本领域中被认为是一个氨基酸取代另一个具有类似特性的氨基酸。示例性保守取代是本领域所熟知的(参见例如,第10页的WO 97/09433;Lehninger,《生物化学(Biochemistry)》,第2版;纽约州纽约的沃思出版社(Worth Publishers, Inc. NY, NY),第71-77页,1975;Lewin,《基因IV (Genes IV)》,纽约州的牛津大学出版社(Oxford University Press, NY)和马萨诸塞州剑桥市的细胞出版社(Cell Press, Cambridge, MA),第8页,1990)。

[0088] 在某些实施例中,与参考序列相比,根据本公开的蛋白质(例如,结合蛋白、免疫原性肽)包含变体序列(例如,与本文所公开的参考TCR CDR(例如,CDR3 β)相比的变体TCR CDR(例如,CDR3 β))。如本文所使用的,“变体”氨基酸序列、肽或多肽可以指与参考氨基酸序列相比具有一个、两个或三个氨基酸取代、缺失和/或插入的氨基酸序列(或肽或多肽)。在某些实施例中,变体氨基酸序列、肽或多肽保留了与参考分子基本上相同的功能(例如,对肽:HLA复合物的结合特异性和亲和力);例如,与参考TCR结合片段相比,如本文所公开的变体TCR片段保留了约50%、约60%、约70%、约80%、约90%、约95%、约99%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约90%、至少约95%、至少约99%或100%的抗原结合特异性和亲和力。

[0089] “改变的结构域”或“改变的蛋白质”是指与野生型基序、区、结构域、肽、多肽或蛋白质(例如,野生型TCR α 链、TCR β 链、TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域)具有至少85%(例如,至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%或至少99.9%)的不相同序列同一性的基序、区、结构域、肽、多肽或蛋白质。

[0090] 改变的结构域或改变的蛋白质或衍生物可以包括基于相同氨基酸的所有可能的密码子选择的改变的结构域或改变的蛋白质或衍生物和基于保守氨基酸取代的密码子选择。例如,以下六个组各自含有彼此保守取代的氨基酸:1)丙氨酸(ala;A)、丝氨酸(ser;S)、苏氨酸(thr;T);2)天冬氨酸(asp;D)、谷氨酸(glu;E);3)天冬酰胺(asn;N)、谷氨酰胺(gln;Q);4)精氨酸(arg;R)、赖氨酸(lys;K);5)异亮氨酸(ile;I)、亮氨酸(L)、甲硫氨酸(met;M)、缬氨酸(val;V);以及6)苯丙氨酸(phe;F)、酪氨酸(tyr;Y)、色氨酸(trp;W)。(另见第10页的WO97/09433,Lehninger,《生物化学》,第2版,纽约州纽约的沃思出版社,第71-77页,1975;Lewin《基因IV》,纽约州的牛津大学出版社和马萨诸塞州剑桥市的细胞出版社,第8页,

1990;Creighton,《蛋白质(Proteins)》,W.H.弗里曼出版公司(W.H.Freeman and Company) 1984)。另外,改变、添加或缺失经编码的序列中单个氨基酸或小百分比的氨基酸的单个取代、缺失或添加也是“保守取代”

[0091] 术语“构建体”是指含有重组核酸分子的任何多核苷酸。“转基因”或“转基因构建体”是指含有两个或更多个基因的构建体,所述基因以自然界中不存在排列可操作地连接。术语“可操作地连接(operably-linked)” (或本文“可操作地连接(operably linked)”)是指单个核酸片段上两个或更多个核酸分子的缔合,使得一者的功能受另一者影响。例如,当启动子可以影响编码序列的表达(即,所述编码序列在启动子的转录控制之下)时,启动子与编码序列可操作地连接。“未连接”意指相关遗传元件彼此不紧密相关并且一者的功能不影响另一者。在一些实施例中,转基因中存在的基因与表达控制序列(例如,启动子)可操作地连接。

[0092] 构建体(例如,转基因)可以存在于载体(例如,细菌载体、病毒载体)中或可以整合到基因组中。“载体”是能够转运另一种核酸分子的核酸分子。载体可以是例如质粒、粘粒、病毒、RNA载体或可以包括染色体、非染色体、半合成或合成核酸分子的线性或环状DNA或RNA分子。示例性载体是能够自主复制(游离型载体)或表达与其连接的核酸分子(表达载体)的载体。本文进一步描述了用于本公开的组合物和方法的载体。

[0093] 如本文所使用的,术语“表达”是指基于如基因等核酸分子的编码序列产生多肽的过程。所述过程可以包括转录、转录后控制、转录后修饰、翻译、翻译后控制、翻译后修饰或其任何组合。

[0094] 在将核酸分子插入到细胞中的上下文下,术语“引入”意指“转染”或“转化”或“转导”,并且包括提及将核酸分子掺入到真核或原核细胞中,其中核酸分子可以掺入到细胞的基因组(例如,染色体、质粒、质体或线粒体DNA)中,转化为自主复制子,或瞬时表达(例如,经转染的mRNA)。

[0095] 如本文所使用的,“异源性”或“外源性”核酸分子、构建体或序列是指不是宿主细胞天然的核酸分子或核酸分子的一部分,但可以与来自宿主细胞的核酸分子或核酸分子的一部分同源。异源性或外源性核酸分子、构建体或序列的来源可以来自不同的属或种。在某些实施例中,通过例如缀合、转化、转染、转导、电穿孔等将异源性或外源性核酸分子添加(即,不是内源性或天然的)到宿主细胞或宿主基因组中,其中所添加的分子可以整合到宿主基因组中或作为染色体外遗传物质存在(例如,作为质粒或其它形式的自复制载体),并且可以以多个拷贝存在。另外,“异源性”是指由引入到宿主细胞中的外源性核酸分子编码的非天然酶、蛋白质或其它活性,即使宿主细胞编码同源性蛋白质或活性。此外,包含“修饰”或“异源性”多核苷酸或结合蛋白的细胞包括所述细胞的后代,无论后代本身是否被转导、转染或以其它方式操纵或改变。

[0096] 如本文所描述的,多于一种异源性或外源性核酸分子可以作为独立的核酸分子、作为多个单独控制的基因、作为多顺反子核酸分子、作为编码融合蛋白的单个核酸分子或其任何组合引入到宿主细胞中。例如,如本文所公开的,宿主细胞可以经修饰以表达一种或多种异源性或外源性核酸分子,所述核酸分子编码对Ras抗原肽具有特异性的期望的TCR(例如,TCR α 和TCR β),并且任选地,如本文所公开的,还编码包含 α 链、 β 链或其一部分的CD8共受体多肽,如能够与MHC结合的细胞外部分。当两种或更多种外源性核酸分子引入到宿主

细胞中时,应当理解,两种或更多种外源性核酸分子可以作为单个核酸分子(例如,在单个载体上)引入、在独立的载体上引入、在单个位点或多个位点处整合到宿主染色体中或其任何组合。所提及的异源性核酸分子或蛋白质活性的数量是指编码核酸分子的数量或蛋白质活性的数量,并且不一定是指引入宿主细胞中的独立核酸分子的数量。

[0097] 如本文所使用的,术语“内源性”或“天然”是指通常存在于宿主细胞中的基因、蛋白质或活性。此外,与亲本基因、蛋白质或活性相比,经突变、过表达、改组、复制或以其它方式改变的基因、蛋白质或活性仍被认为对所述特定宿主细胞是内源性的或天然的。例如,来自第一基因的内源性控制序列(例如启动子、翻译衰减序列)可用于改变或调节第二天然基因或核酸分子的表达,其中第二天然基因或核酸分子的表达或调节不同于亲本细胞中的正常表达或调节。

[0098] 术语“同源”或“同源物”是指发现于或源自宿主细胞、物种或菌株的分子或活性。例如,异源性或外源性核酸分子可以与天然宿主细胞基因同源,并且可以任选地具有改变的表达水平、不同的序列、改变的活性或其任何组合。

[0099] 如本文所使用的,“序列同一性”是指在比对序列并引入空位(如果必要的话)以实现最大序列同一性百分比并且不将任何保守取代视为序列同一性的一部分之后,一个序列中与参考序列中的氨基酸残基或核碱基(分别)相同的氨基酸残基或核碱基的百分比。序列同一性百分比值可以使用如Altschul等人(1997),《核酸研究(Nucl. Acids Res.)》25: 3389-3402中定义的NCBI BLAST 2.0软件生成,其中将参数设置为默认值。另外或可替代地,例如,通过使用为此目的设计的计算机程序(如全局或局部比对算法)比较两个序列,可以确定两个序列之间的序列同一性程度。非限制性实例包括BLASTp、BLASTn、Clustal W、MAFFT、Clustal Omega、AlignMe、Praline、GAP、BESTFIT、Needle (EMBOSS)、Stretcher (EMBOSS)、GGEARCH2SEQ、Water (EMBOSS)、Matcher (EMBOSS)、LALIGN、SSEARCH2SEQ或另一种合适的方法或算法。全局比对算法,如Needleman和Wunsch算法,可用于在两个序列的整个长度上对其进行比对,使匹配的数量最大化并使空位的数量最小化。可以使用默认设置。

[0100] 为了生成两个氨基酸序列的相似性评分,可以使用评分矩阵为一些不相同的氨基酸(例如,保守的氨基酸取代、具有类似理化特性的氨基酸和/或在直系同源物、同源物或旁系同源物中表现出频繁取代的氨基酸)分配正评分,评分矩阵的非限制性实例包括PAM30、PAM70、PAM250、BLOSUM45、BLOSUM50、BLOSUM62、BLOSUM80和BLOSUM90。

[0101] 还设想了本公开的核酸分子的变体。变体核酸分子与如本文所描述的定义或参考多核苷酸的核酸分子至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%,并且优选地至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.9%相同,或者在约65°C-68°C下的0.015M氯化钠、0.0015M柠檬酸钠或约42°C下的0.015M氯化钠、0.0015M柠檬酸钠和50%甲酰胺的严格杂交条件下与多核苷酸杂交。核酸分子变体保留编码结合蛋白或其结合结构域的能力,所述融合蛋白或其结合结构域具有本文所描述的功能,如与靶分子结合。

[0102] 术语“分离的”意指将材料从其原始环境(例如,如果其天然存在的话,则天然环境中)去除。例如,存在于活动物中的天然存在的核酸或多肽不是分离的,但与天然系统中的共存材料中的一些或全部共存材料分开的相同核酸或多肽是分离的。此类核酸可以是载体的一部分和/或此类核酸或多肽可以是组合物(例如,细胞裂解物)的一部分,并且仍然是分离的,因为此类载体或组合物不是所述核酸或多肽的天然环境的一部分。术语“基因”意

指参与产生多肽链的DNA区段；其包括编码区之前和之后的区（前导和拖尾）以及个别编码区段（外显子）之间的间插序列（内含子）。

[0103] 在一些上下文下，如本文所使用的，术语“变体”是指所指的全长序列的至少一个片段，更具体地说，是指相对于全长序列在一个或两个末端处被一个或多个氨基酸截短的一个或多个氨基酸或核酸序列。此类片段包括或编码具有原始序列或其变体的至少6个、7个、8个、10个、12个、15个、20个、25个、50个、75个、100个、150个或200个连续氨基酸的肽。变体的总长度可以是至少6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、20个、25个、30个、40个、50个、60个、70个、80个、90个、100个或更多个氨基酸。

[0104] 在一些实施例中，术语“变体”不仅涉及至少一个片段，还涉及多肽或其片段，所述多肽或其片段包括与所指的参考氨基酸序列或其片段至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%相同的氨基酸序列，其中除多肽的生物活性或折叠或结构所必需的氨基酸之外的氨基酸被缺失或取代，一个或多个此类必需氨基酸以保守的方式被替换，和/或添加氨基酸使得保留多肽的生物活性。现有技术包括可用于比对两个给定核酸或氨基酸序列并用于计算同一性程度的各种方法（参见例如，Arthur Lesk(2008)，《生物信息学导论(Introduction to bioinformatics)》，牛津大学出版社，2008，第3版）。在一些实施例中，可以使用默认设置来使用Clustal W软件(Larkin,M.A.等人(2007).Clustal W和Clustal X版本2.0.《生物信息学》，23,2947-2948)。

[0105] 在某些实施例中，变体另外可以包括化学修饰，例如同位素标记或共价修饰，如糖基化、磷酸化、乙酰化、脱羧、瓜氨酸化、羟基化等。用于修饰多肽的方法是已知的，并且通常会被采用，以免消除或基本上降低多肽的期望活性。

[0106] 在一个实施例中，术语核酸分子的“变体”包括其互补链例如在严格条件下与参考或野生型核酸杂交的核酸。杂交反应的严格程度可由本领域普通技术人员容易地确定，并且通常是依赖于探针长度、洗涤温度和盐浓度的经验计算。一般来说，较长的探针需要较高的温度用于适当的退火，而较短的探针则不需要。杂交通常取决于变性DNA重新退火到互补链（存在于低于其熔化温度的环境中）的能力：探针与可杂交序列之间期望的同源性程度越高，可以使用的相对温度就越高。因此，较高的相对温度往往会使反应条件更加严格，而较低的温度则不会。有关杂交反应严格程度的另外的细节和解释，参见Ausubel,F.M.(1995)，《分子生物学实验指南(Current Protocols in Molecular Biology)》。约翰·威利父子公司(John Wiley&Sons,Inc.)。此外，本领域技术人员可以遵循德国宝灵曼公司(Boehringer Mannheim GmbH)(1993)过滤杂交的DIG系统用户指南(The DIG System Users Guide for Filter Hybridization)手册中给出的说明，德国曼海姆的德国宝灵曼公司(Boehringer Mannheim GmbH,Mannheim,Germany)和Liebl,W.,Ehrmann,M.,Ludwig,W.和Schleifer,K.H.(1991)《国际系统细菌学杂志(International Journal of Systematic Bacteriology)》41:255-260中给出的关于如何通过杂交鉴定DNA序列的说明。在一实施例中，对任何杂交都应用了严格的条件，即只有当探针与靶序列70%或更高相同时，才会发生杂交。对于靶序列具有较低同一性程度的探针可以杂交，但此类杂交体是不稳定的，并且将在严格条件下的洗涤步骤中被去除，例如，将盐的浓度降低至 $2\times\text{SSC}$ ，或任选地并且随后降

低至 $0.5 \times \text{SSC}$,而温度为例如约 50°C - 68°C 、约 52°C - 68°C 、约 54°C - 68°C 、约 56°C - 68°C 、约 58°C - 68°C 、约 60°C - 68°C 、约 62°C - 68°C 、约 64°C - 68°C 或约 66°C - 68°C 。在一实施例中,温度为约 64°C - 68°C 或约 66°C - 68°C 。可以将盐的浓度调节至 $0.2 \times \text{SSC}$ 或甚至 $0.1 \times \text{SSC}$ 。可以分离出与参考或野生型序列具有至少70%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%或至少99.5%同一性的程度的核酸序列。在一实施例中,如本文所使用的,术语核酸序列的变体是指编码与参考核酸序列相同的氨基酸序列及其变体的任何核酸序列,符合遗传密码的简并性。

[0107] “功能变体”是指与本公开的亲本或参考化合物在结构上类似或基本上结构上类似但在一些上下文中在组成上略有不同(例如,一个碱基、原子或官能团不同、被添加或被去除;或一个或多个氨基酸经突变、插入或缺失)的多肽或多核苷酸,使得多肽或经编码的多肽能够以至少50%的效率,优选地至少55%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.9%或至少100%的亲本多肽活性水平执行经编码的亲本多肽的至少一种功能。换句话说,当本公开的多肽或经编码的多肽的功能变体在所选择的测定中与亲本或参考多肽相比显示出不超过50%的性能降低时,如用于测量结合亲和力(例如,测量缔合(K_a)或解离(K_D)常数的Biacore®或四聚体染色)、亲合力或激活宿主细胞的测定,所述功能变体具有“类似结合”、“类似亲和力”或“类似活性”。如本文所使用的,“功能部分”或“功能片段”是指仅包含亲本或参考化合物的结构域、基序、部分或片段的多肽或多核苷酸,并且多肽或经编码的多肽保留与亲本或参考化合物的结构域、部分或片段相关的至少50%的活性,优选地至少55%、至少60%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.9%或至少100%的亲本多肽活性水平,或提供生物学益处(例如,效应子功能)。

[0108] 当本公开的多肽或经编码的多肽的“功能部分”或“功能片段”在所选择的测定中与亲本或参考多肽相比显示出不超过50%的性能降低时(优选地不超过20%或10%,或在亲和力方面与亲本或参考相比不超过log差异),如用于测量结合亲和力或测量效应子功能(例如,细胞因子释放)的测定,所述功能部分或片段具有“类似结合”或“类似活性”。设想了具体公开的结合蛋白和多核苷酸的功能变体。

[0109] “改变的结构域”或“改变的蛋白质”是指与野生型基序、区、结构域、肽、多肽或蛋白质(例如,野生型TCR α 链、TCR β 链、TCR α 恒定结构域或TCR β 恒定结构域)具有至少85%(例如,至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%、至少99%、至少99.1%、至少99.2%、至少99.3%、至少99.4%、至少99.5%、至少99.6%、至少99.7%、至少99.8%或至少99.9%)的不相同序列同一性的基序、区、结构域、肽、多肽或蛋白质。

[0110] 结合蛋白

[0111] 一方面,本公开提供了一种结合蛋白,所述结合蛋白包含T细胞受体(TCR) α 链可变($V\alpha$)结构域和TCR β 链可变($V\beta$)结构域,其中结合蛋白能够与肽:HLA复合物结合,其中肽包含SEQ ID NO.:2或SEQ ID NO.:3中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施例中,HLA包含HLA-A*11,任选地HLA-A*11:01。在目前公开的实施例中的任何实施例

中,结合蛋白可以由人免疫系统细胞(例如,T细胞)异源性表达。

[0112] 在某些实施例中,V α 结构域和/或V β 结构域各自独立地是人的、人源化的或嵌合的,并且优选地各自是人的。在一些实施例中,V α 结构域是人的,并且V β 结构域是人的。本文所公开的结合蛋白、组合物和方法可以利用源自人受试者的V α 结构域、V β 结构域或来自其的CDR,例如,源自对来自人受试者的分离T细胞或其群体进行测序。分离自人受试者的TCR V α 结构域、V β 结构域和来自其的CDR可以比来自其它来源的可变结构域和CDR具有有利的特性,如针对单个人HLA等位基因的转基因小鼠。例如,源自人受试者的V α 结构域、V β 结构域和CDR可以在体内针对全套人HLA分子所呈递的基本上全人多肽组进行负面胸腺选择,这可以降低结合蛋白对其它人类自身抗原交叉反应的可能性。

[0113] 在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白对由本文所公开的一个或多个HLA等位基因(例如表3中的HLA等位基因的一种或任何组合)所呈递的人蛋白质组基本上没有反应。反应性可以通过任何合适的方法来确定,如本申请的实例5-7和13中公开的方法。在一些实施例中,在肽浓度为500nM或更低、400nM或更低、300nM或更低、200nM或更低、100nM或更低、50nM或更低、10nM或更低、5nM或更低或1nM或更低时,没有观察到或预测到通过将结合蛋白转导的T细胞与由一个或多个HLA等位基因呈递的人蛋白质组结合而产生的显著应答。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白对肽:HLA复合物基本无反应性,其中所述肽包含SEQ ID NO.:118-148中的任一个中所示的氨基酸序列或由其组成。在一些实施例中,HLA包含HLA-A*11。在另外的实施例中,HLA包含HLA-A*11:01。

[0114] 在一些实施例中,结合蛋白包含源自患有疾病(如癌症)的受试者(例如,人受试者)的T细胞(例如,在T细胞中鉴定)的一个或多个可变结构域或一个或多个CDR。在一些实施例中,结合蛋白包含源自患有本文所公开的癌症的人受试者的T细胞的一个或多个可变结构域或一个或多个CDR。在一些实施例中,结合蛋白包含源自受试者(例如,人受试者)的T细胞的一个或多个可变结构域或一个或多个CDR,所述受试者患有与KRAS G12突变(如KRAS G12V或G12D突变)相关的疾病。在一些实施例中,结合蛋白包含源自受试者(例如,人受试者)的T细胞的一个或多个可变结构域或一个或多个CDR,所述受试者具有包含KRAS G12突变(如KRAS G12V或G12D突变)的细胞。

[0115] 在一些实施例中,结合蛋白包含源自健康受试者(例如,健康人受试者)的T细胞的一个或多个可变结构域或一个或多个CDR。在一些实施例中,健康受试者缺乏特定的病理诊断(例如,疾病诊断,如癌症诊断)。在一些实施例中,健康受试者缺乏特定的病理诊断,但包含不同的病理诊断(例如,缺乏癌症诊断,但包含高血压或II型糖尿病的诊断)。

[0116] 目前公开的结合蛋白能够被宿主细胞异源性表达,例如人免疫细胞,如T细胞。此外,目前公开的结合蛋白的表达可以赋予宿主细胞有利的特性;例如,对本公开的Ras抗原:HLA复合物具有结合特异性,在Ras抗原:HLA呈递肿瘤细胞等存在下具有改善的激活、增殖或杀伤活性。

[0117] 例如,在某些实施例中,当结合蛋白由免疫细胞(例如,人T细胞,任选地CD8+和/或CD4+T细胞、NK细胞或NK-T细胞)表达时,免疫细胞能够特异性杀伤表达包含SEQ ID NO.:2或3中所示的氨基酸序列或由其组成的肽的HLA-A*11:01⁺肿瘤细胞。例如,Incucyte®生物成像平台(Essen生物科学公司(Essen Bioscience))可以确定靶细胞的杀伤。在某些实施例中,此平台使用激活的胱天蛋白酶和经标记的(例如RapidRed或NucRed)肿瘤细胞信号,其

中测量重叠,并且增加的重叠面积等于通过凋亡的肿瘤细胞死亡。杀伤还可以使用4小时测定来确定,其中靶细胞负载有经标记的铬(^{51}Cr),并测量上清液中的 ^{51}Cr ,例如,在与表达本公开的结合蛋白的免疫细胞共温育4小时后。在某些实施例中,可以使用0.5:1、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、25:1、50:1或100:1等效应子:靶细胞的比率进行杀伤测定。

[0118] 在目前公开的实施例中的任何实施例中,当结合蛋白由免疫细胞(例如,人T细胞,任选地CD8⁺和/或CD4⁺T细胞、NK细胞或NK-T细胞)表达时,当存在表达肽的HLA-A11:01⁺肿瘤细胞,任选地进一步存在外源性IFN- γ 时,免疫细胞具有升高的Nur77表达,所述肽包含SEQ ID NO.:2或3中所示的氨基酸序列或由其组成,其中Nur77表达与以下相比升高:(i)当参考免疫细胞存在于肿瘤细胞中时,不表达结合蛋白的参考免疫细胞(即,与表达结合蛋白的免疫细胞具有相同的细胞类型,并且以其它方式与其在表型和/或基因型上至少基本相同或功能等同)的Nur77表达;和/或(ii)当不存在肿瘤细胞时和/或当不存在表达肽:HLA复合物的抗原呈递细胞时,表达结合蛋白的免疫细胞的Nur77表达,其中所述肽包含SEQ ID NO.:2或3中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,并且其中HLA任选地是HLA-A*11:01。例如,可以使用转基因表达构建体来确定Nur77的表达,所述转基因表达构建体包含与编码报告基因构建体的序列可操作地连接的Nur77基因座;例如,dTomato(参见Ahsouri和Weiss,《免疫学杂志》198(2):657-668(2017))。

[0119] 在目前公开的实施例中的任何实施例中,当结合蛋白由免疫细胞(例如,人T细胞,任选地CD8⁺和/或CD4⁺T细胞、NK细胞或NK-T细胞)表达时,当存在表达肽的HLA-A*02⁺肿瘤细胞,任选地进一步存外源性IFN- γ 时,免疫细胞具有升高的CD137(也称为4-1BB)表达,所述肽包含SEQ ID NO.:2或3中所示的氨基酸序列或由其组成,其中CD137表达与以下相比升高:(i)当参考免疫细胞存在于肿瘤细胞中时,不表达结合蛋白的参考免疫细胞的CD137表达;和/或(ii)当不存在肿瘤细胞时和/或当不存在表达肽:HLA复合物的抗原呈递细胞时,表达结合蛋白的免疫细胞的CD137表达,其中所述肽包含SEQ ID NO.:2或3中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,并且其中HLA任选地是HLA-A*11:01。CD137表达可以使用例如使用经标记的抗CD137抗体的流式细胞术来确定。在某些实施例中,CD137在16小时的测定后测量,其中免疫细胞与肽或表达肽的靶细胞共温育或用其进行刺激。

[0120] 在目前公开的实施例中的任何实施例中:(i)结合蛋白由与免疫细胞异源的多核苷酸编码;(ii)免疫细胞包含人CD8⁺T细胞、人CD4⁺T细胞或两者;(iii)表达包含SEQ ID NO.:2或3中所示的氨基酸序列或由其组成的肽的肿瘤细胞是HLA-A*11:01⁺;和/或(iv)肿瘤细胞包含OVCAR5(卵巢浆液性腺癌)、DAN-G(胰腺腺癌)、CFPAC1(胰腺腺癌)、SW480(结肠癌)、SW527(乳腺癌)或NCI-H441(肺腺癌)细胞。

[0121] 在某些实施例中,结合蛋白能够独立于CD8或在不存在CD8的情况下与肽:HLA复合物结合。CD8非依赖性结合可以通过在CD8阴性细胞(例如,CD4⁺T细胞、Jurkat细胞等)中表达结合蛋白并鉴定细胞与靶标的结合来确定。在一些实施例中,提供了结合蛋白,其包含:(a)T细胞受体(TCR) α 链可变(V α)结构域,所述TCR V α 结构域包含SEQ ID NO.:16、17、42和43中的任一个中所示的互补决定区3(CDR3 α)氨基酸序列,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;和/或(b)TCR β 链可变(V β)结构域,所述TCR V β 结构域包含SEQ ID NO.:26、27、52和53中的任一个中所示的CDR3 β 氨基酸序列,或其具有一个、两个或三个

任选地保守的氨基酸取代的变体,其中结合蛋白能够与肽:HLA复合物结合,其中肽包含氨基酸序列VVVGAVGVGK (SEQ ID NO.:2)或VVGAVGVGK (SEQ ID NO.:3)、基本上由其组成或由其组成,并且其中HLA包含HLA-A*11。在某些实施例中,HLA包含HLA-A*11:01。结合蛋白可以包含V α 结构域和V β 结构域。

[0122] V α 结构域和/或V β 结构域可以是人的、人源化的或嵌合的,并且优选地是人的。

[0123] 在某些实施例中,结合蛋白包含以下中所示的CDR3 α 和CDR3 β 氨基酸序列:(i)分别为SEQ ID NO.:17和27,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;(ii)分别为SEQ ID NO.:16和26,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;(iii)分别为SEQ ID NO.:53和43,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;或(iv)分别为SEQ ID NO.:52和42,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体。在某些实施例中,结合蛋白包含以下中所示的CDR3 α 和CDR3 β 氨基酸序列:(i)分别为SEQ ID NO.:17和27;(ii)分别为SEQ ID NO.:16和26;(iii)分别为SEQ ID NO.:53和43;或(iv)分别为SEQ ID NO.:52和42。

[0124] 在一些实施例中,结合蛋白进一步包含:(i)在所述V α 结构域中,SEQ ID NO.:14或40中所示的CDR1 α 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;(ii)在所述V α 结构域中,SEQ ID NO.:15或41中所示的CDR2 α 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;(iii)在所述V β 结构域中,SEQ ID NO.:24或50中所示的CDR1 β 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;(iv)在所述V β 结构域中,SEQ ID NO.:25或51中所示的CDR2 β 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;或(v) (i) - (iv)的任何组合。

[0125] 在一些实施例中,结合蛋白进一步包含:(i)在V α 结构域中,SEQ ID NO.:14或40中所示的CDR1 α 氨基酸序列;(ii)在V α 结构域中,SEQ ID NO.:15或41中所示的CDR2 α 氨基酸序列;(iii)在V β 结构域中,SEQ ID NO.:24或50中所示的CDR1 β 氨基酸序列;(iv)在V β 结构域中,SEQ ID NO.:25或51中所示的CDR2 β 氨基酸序列;或(v) (i) - (iv)的任何组合。

[0126] 在一些实施例中,结合蛋白进一步包含:(i)在V α 结构域中,SEQ ID NO.:14或40中所示的CDR1 α 氨基酸序列;(ii)在V α 结构域中,SEQ ID NO.:15或41中所示的CDR2 α 氨基酸序列;(iii)在V β 结构域中,SEQ ID NO.:24或50中所示的CDR1 β 氨基酸序列;以及(iv)在V β 结构域中,SEQ ID NO.:25或51中所示的CDR2 β 氨基酸序列。

[0127] 在某些实施例中,结合蛋白包含分别在SEQ ID NO.:14、15、16或17、24、25和26或27中所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

[0128] 在其它实施例中,结合蛋白包含分别在SEQ ID NO.:40、41、42或43、50、51和52或52中所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

[0129] 在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Kabat方法或编号方案从SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49的可变结构域序列或其组合中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Kabat方法从SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Kabat方法从SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Kabat方法从SEQ ID NO:13的可变结构域序列

中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α ,以及如通过Kabat方法从SEQ ID NO:23的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Kabat方法从SEQ ID NO:13的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和CDR3 α ,以及如通过Kabat方法从SEQ ID NO:23的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Kabat方法从SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α ,以及如通过Kabat方法从SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Kabat方法从SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和CDR3 α ,以及如通过Kabat方法从SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 。

[0130] 在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Chothia方法或编号方案从SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49的可变结构域序列或其组合中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Chothia方法从SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Chothia方法从SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Chothia方法从SEQ ID NO:13的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α ,以及如通过Chothia方法从SEQ ID NO:23的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Chothia方法从SEQ ID NO:13的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和CDR3 α ,以及如通过Chothia方法从SEQ ID NO:23的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Chothia方法从SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α ,以及如通过Chothia方法从SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Chothia方法从SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和CDR3 α ,以及如通过Chothia方法从SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 。

[0131] 在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过EU方法或编号方案从SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49的可变结构域序列或其组合中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过EU方法从SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过EU方法从SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过EU方法从SEQ ID NO:13的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α ,以及如通过EU方法从SEQ ID NO:23的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过EU方法从SEQ ID NO:13的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和CDR3 α ,以及如通过EU方法从SEQ ID NO:23的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过EU方法从SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α ,以及如通过EU方法从SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或

CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过EU方法从SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和CDR3 α ,以及如通过EU方法从SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 。

[0132] 在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过IMGT方法或编号方案(包括CDR3的IMGT和/或IMGT接合)从SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49的可变结构域序列或其组合中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过IMGT方法从SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过IMGT方法从SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过IMGT方法从SEQ ID NO:13的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α ,以及如通过IMGT方法从SEQ ID NO:23的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过IMGT方法从SEQ ID NO:13的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和CDR3 α ,以及如通过IMGT方法从SEQ ID NO:23的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过IMGT方法从SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α ,以及如通过IMGT方法从SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过IMGT方法从SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和CDR3 α ,以及如通过IMGT方法从SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 。

[0133] 在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过IMGT方法或编号方案(包括CDR3的IMGT和/或IMGT接合)从SEQ ID NO.:20中所示的氨基酸序列、SEQ ID NO.:30中所示的氨基酸序列、SEQ ID NO.:155中所示的氨基酸序列或其组合中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过IMGT方法从SEQ ID NO.:20中所示的氨基酸序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过IMGT方法从SEQ ID NO.:30或SEQ ID NO.:155中所示的氨基酸序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过IMGT方法从SEQ ID NO.:20中所示的氨基酸序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和CDR3 α ,以及如通过IMGT方法从SEQ ID NO.:30或SEQ ID NO.:155中所示的氨基酸序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 。

[0134] 在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过增强型Chothia方法或编号方案从SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49的可变结构域序列或其组合中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过增强型Chothia方法从SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过增强型Chothia方法从SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过增强型Chothia方法从SEQ ID NO:13的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α ,以及如通过增强型Chothia方法从SEQ ID NO:23的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一

些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过增强型Chothia方法从SEQ ID NO:13的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和CDR3 α ,以及如通过增强型Chothia方法从SEQ ID NO:23的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过增强型Chothia方法从SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α ,以及如通过增强型Chothia方法从SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过增强型Chothia方法从SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和CDR3 α ,以及如通过增强型Chothia方法从SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 。

[0135] 在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Aho方法或编号方案从SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:39、SEQ ID NO:49的可变结构域序列或其组合中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Aho方法从SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Aho方法从SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Aho方法从SEQ ID NO:13的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α ,以及如通过Aho方法从SEQ ID NO:23的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Aho方法从SEQ ID NO:13的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和CDR3 α ,以及如通过Aho方法从SEQ ID NO:23的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Aho方法从SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和/或CDR3 α ,以及如通过Aho方法从SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和/或CDR3 β 。在一些实施例中,本文所公开的结合蛋白包含如通过Aho方法从SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的CDR1 α 、CDR2 α 和CDR3 α ,以及如通过Aho方法从SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 。

[0136] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR1 α ,所述CDR1 α 包含SEQ ID NO:14或40的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的CDR1 α 序列。

[0137] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR2 α ,所述CDR2 α 包含SEQ ID NO:15或41的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的CDR2 α 序列。

[0138] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR3 α ,所述CDR3 α 包含SEQ ID NO:16、17、42或43的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的CDR3 α 序列。

[0139] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR1 β ,所述CDR1 β 包含SEQ ID NO:24或50的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的CDR1 β 序列。

[0140] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR2 β ,所述CDR2 β 包含SEQ ID NO:25或51的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的CDR2 β 序列。

[0141] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR3 β ,所述CDR3 β 包含SEQ ID NO:26、27、52或53的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的CDR3 β 序列。

[0142] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR1 α ,所述CDR1 α 相对于SEQ ID NO:14或40的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸取代,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的CDR1 α 序列。取代可以在CDR的N末端处、CDR的C末端处、CDR的氨基酸序列内或其组合。取代可以是保守的、非保守的或其组合。在一些实施例中,取代是保守的。

[0143] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR2 α ,所述CDR2 α 相对于SEQ ID NO:15或41的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸取代,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的CDR2 α 序列。取代可以在CDR的N末端处、CDR的C末端处、CDR的氨基酸序列内或其组合。取代可以是保守的、非保守的或其组合。在一些实施例中,取代是保守的。

[0144] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR3 α ,所述CDR3 α 相对于SEQ ID NO:16、17、42或43的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸取代,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的CDR3 α 序列。取代可以在CDR的N末端处、CDR的C末端处、CDR的氨基酸序列内或其组合。取代可以是保守的、非保守的或其组合。在一些实施例中,取代是保守的。

[0145] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR1 β ,所述CDR1 β 相对于SEQ ID NO:24或50的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸取代,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的CDR1 β 序列。取代可以在CDR的N末端处、CDR的C末端处、CDR的氨基酸序列内或其组合。取代可以是保守的、非保守的或其组合。在一些实施例中,取代是保守的。

[0146] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR2 β ,所述CDR2 β 相对于SEQ ID NO:25或51的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸取代,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的CDR2 β 序列。取代可以在CDR的N末端处、CDR的C末端处、CDR的氨基酸序列内或其组合。取代可以是保守的、非保守的或其组合。在一些实施例中,取代是保守的。

[0147] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR3 β ,所述CDR3 β 相对于SEQ ID NO:26、27、52或53的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸取代,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的CDR3 β 序列。取代可以在CDR的N末端处、CDR的C末端处、CDR的氨基酸序列内或其组合。取代可以是保守的、非保守的或其组合。在一些实施例中,取代是保守的。

[0148] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR1 α ,所述CDR1 α 相对于SEQ ID NO:14或40的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸插入和/或缺失,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的CDR1 α 序列。插入和/或缺失可以在CDR的N末端处、CDR的C末端处、CDR的氨基酸序列内或其组合。

[0149] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR2 α ,所述CDR2 α 相对于SEQ ID NO:15或41的氨

基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸插入和/或缺失,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的CDR2 α 序列。插入和/或缺失可以在CDR的N末端处、CDR的C末端处、CDR的氨基酸序列内或其组合。

[0150] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR3 α ,所述CDR3 α 相对于SEQ ID NO:16、17、42或43的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸插入和/或缺失,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的CDR3 α 序列。插入和/或缺失可以在CDR的N末端处、CDR的C末端处、CDR的氨基酸序列内或其组合。

[0151] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR1 β ,所述CDR1 β 相对于SEQ ID NO:24或50的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸插入和/或缺失,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的CDR1 β 序列。插入和/或缺失可以在CDR的N末端处、CDR的C末端处、CDR的氨基酸序列内或其组合。

[0152] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR2 β ,所述CDR2 β 相对于SEQ ID NO:25或51的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸插入和/或缺失,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的CDR2 β 序列。插入和/或缺失可以在CDR的N末端处、CDR的C末端处、CDR的氨基酸序列内或其组合。

[0153] 在一些实施例中,结合蛋白包含CDR3 β ,所述CDR3 β 相对于SEQ ID NO:26、27、52或53的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸插入和/或缺失,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的CDR3 β 序列。插入和/或缺失可以在CDR的N末端处、CDR的C末端处、CDR的氨基酸序列内或其组合。

[0154] 本文所公开的结合蛋白可以包含一个或多个框架区(FR)。例如,结合蛋白可以包含一个包含三个CDR和四个FR的可变结构域,或者两个各自包含三个CDR和四个FR的可变结构域。说明性FR氨基酸序列由SEQ ID NO:91-117和153提供。结合蛋白中使用的框架区可以是哺乳动物框架区。结合蛋白中使用的框架区可以是人框架区。结合蛋白中使用的框架区可以是经工程化的框架区。

[0155] 结合蛋白可以包含本文所公开的FR1、FR2和FR3和/或FR4。在一些实施例中,结合蛋白包含V α ,所述V α 包含FR1、FR2、FR3和FR4,所述FR1包含SEQ ID NO:91、103和115中的任一个中所示的氨基酸序列或其变体、基本上由其组成或由其组成,所述FR2包含SEQ ID NO:92、104中的任一个中所示的氨基酸序列或其变体、基本上由其组成或由其组成,所述FR3包含SEQ ID NO:93、95、105、107中的任一个中所示的氨基酸序列或其变体、基本上由其组成或由其组成,所述FR4包含SEQ ID NO:94、96、106和108中的任一个中所示的氨基酸序列或其变体、基本上由其组成或由其组成。在一些实施例中,结合蛋白包含V α ,所述V α 包含SEQ ID NO.:115中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,结合蛋白包含V α ,所述V α 包含SEQ ID NO.:91中所示的氨基酸序列。

[0156] 在一些实施例中,结合蛋白包含V β ,所述V β 包含FR1、FR2、FR3和FR4,所述FR1包含

SEQ ID NO:97、109和153中的任一个中所示的氨基酸序列或其变体、基本上由其组成或由其组成,所述FR2包含SEQ ID NO:98、110中的任一个中所示的氨基酸序列或其变体、基本上由其组成或由其组成,所述FR3包含SEQ ID NO:99、101、111、113中的任一个中所示的氨基酸序列或其变体、基本上由其组成或由其组成,所述FR4包含SEQ ID NO:100、102、112、114、116和117中的任一个中所示的氨基酸序列或其变体、基本上由其组成或由其组成。

[0157] 在一些实施例中,结合蛋白包含V β ,所述V β 包含SEQ ID NO.:153中所示的氨基酸序列。在一些实施例中,结合蛋白包含V β ,所述V β 包含SEQ ID NO.:97中所示的氨基酸序列。

[0158] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含如通过Kabat方法或编号方案从SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的FR1、FR2、FR3和FR4。在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含如通过Kabat方法从SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的FR1、FR2、FR3和FR4。

[0159] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含如通过Chothia方法或编号方案从SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的FR1、FR2、FR3和FR4。在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含如通过Chothia方法从SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的FR1、FR2、FR3和FR4。

[0160] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含如通过EU方法或编号方案从SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的FR1、FR2、FR3和FR4。在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含如通过EU方法从SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的FR1、FR2、FR3和FR4。

[0161] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含如通过IMGT方法或编号方案从SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的FR1、FR2、FR3和FR4。在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含如通过IMGT方法从SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的FR1、FR2、FR3和FR4。

[0162] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含如通过增强型Chothia方法或编号方案从SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的FR1、FR2、FR3和FR4。在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含如通过增强型Chothia方法从SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的FR1、FR2、FR3和FR4。

[0163] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含如通过Aho方法或编号方案从SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:39的可变结构域序列中鉴定的FR1、FR2、FR3和FR4。在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含如通过Aho方法从SEQ ID NO:23或SEQ ID NO:49的可变结构域序列中鉴定的FR1、FR2、FR3和FR4。

[0164] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含FR1,所述FR1包含SEQ ID NO:91、103或115的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的FR1序列。

[0165] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含FR2,所述FR2包含SEQ ID NO:92或104的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的FR2序列。

[0166] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含FR3,所述FR3包含SEQ ID NO:93、95、105或107的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的FR3序列。

[0167] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含FR4,所述FR4包含SEQ ID NO:94、96、106或108的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的FR4序列。

[0168] 在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含FR1,所述FR1包含SEQ ID NO:97或109的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的FR1序列。

[0169] 在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含FR2,所述FR2包含SEQ ID NO:98或110的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的FR2序列。

[0170] 在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含FR3,所述FR3包含SEQ ID NO:99、101、111或113的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的FR3序列。

[0171] 在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含FR4,所述FR4包含SEQ ID NO:100、102、112、114、116或117的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的FR4序列。

[0172] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含FR1,所述FR1相对于SEQ ID NO:91、103或115的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸取代,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的FR1序列。取代可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。取代可以是保守的、非保守的或其组合。在一些实施例中,取代是保守的。

[0173] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含FR2,所述FR2相对于SEQ ID NO:92或104的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸取代,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的FR2序列。取代可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。取代可以是保守的、非保守的或其组合。在一些实施例中,取代是保守的。

[0174] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含FR3,所述FR3相对于SEQ ID NO:93、95、105或107的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸取代,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的FR3序列。取代可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。取代可以是保守的、非保守的或其组合。在一些实施例中,取代是保守的。

[0175] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含FR4,所述FR4相对于SEQ ID NO:94、96、106或108的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸取代,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的FR4序列。取代可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。取代可以是保守的、非保守的或其组合。在一些实施例中,取代是保守的。

[0176] 在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含FR1,所述FR1相对于SEQ ID NO:97或109或153的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸取代,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的FR1序列。取代可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。取代可以是保守的、非保守的或其组合。在一些实施例中,取代是保守的。

[0177] 在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含FR2,所述FR2相对于SEQ ID NO:98或110的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸取代,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的FR2序列。取代可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。取代可以是保守的、非保守的或其组合。在一些实施例中,取代是保守的。

[0178] 在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含FR3,所述FR3相对于SEQ ID NO:99、101、111或113的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸取代,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的FR3序列。取代可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。取代可以是保守的、非保守的或其组合。在一些实施例中,取代是保守的。

[0179] 在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含FR4,所述FR4相对于SEQ ID NO:100、102、112、114、116或117的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸取代,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的FR4序列。取代可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。取代可以是保守的、非保守的或其组合。在一些实施例中,取代是保守的。

[0180] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含FR1,所述FR1相对于SEQ ID NO:91、103或115的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸插入和/或缺失,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的FR1序列。插入和/或缺失可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。

[0181] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含FR2,所述FR2相对于SEQ ID NO:92或104的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸插入和/或缺失,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的FR2序列。插入和/或缺失可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。

[0182] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含FR3,所述FR3相对于SEQ ID NO:93、95、105或107的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸插入和/或缺失,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的FR3序列。插入和/或缺失可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。

[0183] 在一些实施例中,结合蛋白包含V α 结构域,所述V α 结构域包含FR4,所述FR4相对于SEQ ID NO:94、96、106或108的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸插入和/或缺失,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:13或39的可变结构域中鉴定的FR4序列。插入和/或缺失可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。

[0184] 在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含FR1,所述FR1相对于SEQ ID NO:97或109或153的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸插入和/或缺失,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的FR1序列。插入和/或缺失可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。

[0185] 在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含FR2,所述FR2相对于SEQ ID NO:98或110的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸插入和/或缺失,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的FR2序列。插入和/或缺失可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。

[0186] 在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含FR3,所述FR3相对于SEQ ID NO:99、101、111或113的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸插入和/或缺失,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的FR3序列。插入和/或缺失可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。

[0187] 在一些实施例中,结合蛋白包含V β 结构域,所述V β 结构域包含FR4,所述FR4相对于SEQ ID NO:100、102、112、114、116或117的氨基酸序列包含至多一个、至多两个、至多三个、至多四个、至多五个或至多六个氨基酸插入和/或缺失,或如通过Kabat、Chothia、EU、IMGT、增强型Chothia或Aho方法从SEQ ID NO:23或49的可变结构域中鉴定的FR4序列。插入和/或缺失可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。

[0188] 结合蛋白可以包含TCR α FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3或FR4区;TCR β FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3或FR4区,或其组合。

[0189] 在一些实施例中:(i)V α 结构域包含与SEQ ID NO.:13或39中所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性或序列相似性的氨基酸序列,基本上由其组成或由其组成;和/或(ii)V β 结构域包含与SEQ ID NO.:23或154或49中所示的氨基酸序列具有至少75%、至少80%、至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%序列同一性或序列相似性

的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0190] 在一些实施例中, $V\alpha$ 结构域包含与 SEQ ID NO.:13 中所示的氨基酸序列具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 序列同一性或序列相似性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成, 并且 $V\beta$ 结构域包含与 SEQ ID NO.:23 或 154 中所示的氨基酸序列具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 序列同一性或序列相似性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0191] 在一些实施例中, $V\alpha$ 结构域包含与 SEQ ID NO.:39 中所示的氨基酸序列具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 序列同一性或序列相似性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成, 并且其中 $V\beta$ 结构域包含与 SEQ ID NO.:49 中所示的氨基酸序列具有至少 75%、至少 80%、至少 85%、至少 86%、至少 87%、至少 88%、至少 89%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98% 或至少 99% 序列同一性或序列相似性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0192] 在某些实施例中, $V\alpha$ 结构域包含 SEQ ID NO.:13 中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成, 并且 $V\beta$ 结构域包含 SEQ ID NO.:23 中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施例中, 结合蛋白包含 TCR β 链, 并且 TCR β 链包含紧邻 SEQ ID NO.:23 中所示的氨基酸序列 N 末端的氨基酸 K-A。在某些实施例中, $V\alpha$ 结构域包含 SEQ ID NO.:13 中所示的氨基酸序列, 并且 $V\beta$ 结构域包含 SEQ ID NO.:23 中所示的氨基酸序列。在某些实施例中, $V\alpha$ 结构域由 SEQ ID NO.:13 中所示的氨基酸序列组成, 并且 $V\beta$ 结构域由 SEQ ID NO.:23 中所示的氨基酸序列组成。在某些实施例中, $V\alpha$ 结构域基本上由 SEQ ID NO.:13 中所示的氨基酸序列组成, 并且 $V\beta$ 结构域基本上由 SEQ ID NO.:23 中所示的氨基酸序列组成。

[0193] 在一些实施例中, 提供了一种结合蛋白, 其包含 TCR α 链和 TCR β 链, 其中 TCR α 链包含 SEQ ID NO.:13 中所示的氨基酸序列, 并且 TCR β 链包含 SEQ ID NO.:23 或 154 中所示的氨基酸序列。

[0194] 在一些实施例中, 提供了一种结合蛋白, 其能够与肽:HLA 复合物结合, 其中肽包含 SEQ ID NO.:2 或 SEQ ID NO.:3、基本上由其组成或由其组成, 并且其中 HLA 任选地是 HLA-A*11, 进一步任选地 HLA-A*11:01。在某些实施例中, 结合蛋白包含第一多肽和第二多肽, 其中第一多肽包含 SEQ ID NO.:13 中所示的氨基酸序列, 并且第二多肽包含 SEQ ID NO.:23 或 154 中所示的氨基酸序列。第一多肽可以是或包含 TCR α 链和/或第二多肽可以是或包含 TCR β 链。在一些实施例中, 第一多肽是或包含 TCR α 链和/或第二多肽是或包含 TCR β 链。

[0195] 在某些实施例中, $V\alpha$ 结构域包含 SEQ ID NO.:39 中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成, 并且所述并且所述 $V\beta$ 结构域包含 SEQ ID NO.:49 中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。在某些实施例中, $V\alpha$ 结构域包含 SEQ ID NO.:39 中所示的氨基酸序列, 并且 $V\beta$ 结构域包含 SEQ ID NO.:49 中所示的氨基酸序列。在某些实施例中, $V\alpha$ 结构域由 SEQ ID NO.:39 中所示的氨基酸序列组成, 并且 $V\beta$ 结构域由 SEQ ID NO.:49 中所示的氨基

酸序列组成。在某些实施例中, $V\alpha$ 结构域基本上由 SEQ ID NO.:39 中所示的氨基酸序列组成, 并且 $V\beta$ 结构域基本上由 SEQ ID NO.:49 中所示的氨基酸序列组成。

[0196] 在一些实施例中, 提供了一种结合蛋白, 其包含 TCR α 链和 TCR β 链, 其中 TCR α 链包含 SEQ ID NO.:13 中所示的氨基酸序列, 并且 TCR β 链包含 SEQ ID NO.:23 或 154 中所示的氨基酸序列。

[0197] 在一些实施例中, 提供了一种结合蛋白, 其包含 TCR α 链和 TCR β 链, 其中 TCR α 链包含 SEQ ID NO.:20 中所示的氨基酸序列, 并且 TCR β 链包含 SEQ ID NO.:30 中所示的氨基酸序列。

[0198] 在一些实施例中, 提供了一种结合蛋白, 其包含 TCR α 链和 TCR β 链, 其中 TCR α 链包含 SEQ ID NO.:20 中所示的氨基酸序列, 并且 TCR β 链包含 SEQ ID NO.:155 中所示的氨基酸序列。

[0199] 在一些实施例中, 提供了一种结合蛋白, 其能够与肽:HLA 复合物结合, 其中肽包含 SEQ ID NO.:2 或 SEQ ID NO.:3, 基本上由其组成或由其组成, 并且其中 HLA 任选地是 HLA-A*11, 进一步任选地 HLA-A*11:01。在某些实施例中, 结合蛋白包含第一多肽和第二多肽, 其中第一多肽包含 SEQ ID NO.:20 中所示的氨基酸序列, 并且第二多肽包含 SEQ ID NO.:155 中所示的氨基酸序列。第一多肽可以是或包含 TCR α 链和/或第二多肽可以是或包含 TCR β 链。在一些实施例中, 第一多肽是或包含 TCR α 链和/或第二多肽是或包含 TCR β 链。

[0200] 在一些实施例中, 可变结构域包含相对于 SEQ ID NO:13、23、39 和 49 中的任一个具有一个或多个插入、缺失和/或取代的氨基酸序列。

[0201] 例如, 可变结构域可以包含相对于 SEQ ID NO:13、23、39 和 49 中的任一个具有至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 11 个、至少 12 个、至少 13 个、至少 14 个、至少 15 个、至少 16 个、至少 17 个、至少 18 个、至少 19 个、至少 20 个、至少 25 个或至少 30 个氨基酸插入的氨基酸序列。

[0202] 在一些实施例中, 可变结构域包含相对于 SEQ ID NO:13、23、39 和 49 中的任一个具有至多 1 个、至多 2 个、至多 3 个、至多 4 个、至多 5 个、至多 6 个、至多 7 个、至多 8 个、至多 9 个、至多 10 个、至多 11 个、至多 12 个、至多 13 个、至多 14 个、至多 15 个、至多 16 个、至多 17 个、至多 18 个、至多 19 个、至多 20 个、至多 25 个、至多 30 个、至多 35 个、至多 40 个、至多 45 个或至多 50 个氨基酸插入的氨基酸序列。

[0203] 在一些实施例中, 相对于 SEQ ID NO:13、23、39 和 49 中的任一个, 可变结构域包含 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、12 个、13 个、14 个、15 个、16 个、17 个、18 个、19 个、20 个、25 个、30 个、35 个、40 个、45 个或 50 个氨基酸插入。

[0204] 一个或多个插入可以在 N 末端处、C 末端处、氨基酸序列内或其组合。一个或多个插入可以是连续的、非连续的或其组合。

[0205] 在一些实施例中, 可变结构域包含相对于 SEQ ID NO:13、23、39 和 49 中的任一个具有至少 1 个、至少 2 个、至少 3 个、至少 4 个、至少 5 个、至少 6 个、至少 7 个、至少 8 个、至少 9 个、至少 10 个、至少 11 个、至少 12 个、至少 13 个、至少 14 个、至少 15 个、至少 16 个、至少 17 个、至少 18 个、至少 19 个、至少 20 个、至少 25 个或至少 30 个氨基酸缺失的氨基酸序列。

[0206] 在一些实施例中, 可变结构域包含相对于 SEQ ID NO:13、23、39 和 49 中的任一个具有至多 1 个、至多 2 个、至多 3 个、至多 4 个、至多 5 个、至多 6 个、至多 7 个、至多 8 个、至多 9 个、至

多10个、至多11个、至多12个、至多13个、至多14个、至多15个、至多16个、至多17个、至多18个、至多19个、至多20个、至多25个、至多30个、至多35个、至多40个、至多45个或至多50个氨基酸缺失的氨基酸序列。

[0207] 在一些实施例中,相对于SEQ ID NO:13、23、39和49中的任一个,可变结构域包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、45个或50个氨基酸缺失。

[0208] 一个或多个缺失可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。一个或多个缺失可以是连续的、非连续的或其组合。

[0209] 在一些实施例中,可变结构域包含相对于SEQ ID NO:13、23、39和49中的任一个具有至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少25个或至少30个氨基酸取代的氨基酸序列。

[0210] 在一些实施例中,可变结构域包含相对于SEQ ID NO:13、23、39和49中的任一个具有至多1个、至多2个、至多3个、至多4个、至多5个、至多6个、至多7个、至多8个、至多9个、至多10个、至多11个、至多12个、至多13个、至多14个、至多15个、至多16个、至多17个、至多18个、至多19个、至多20个、至多25个、至多30个、至多35个、至多40个、至多45个或至多50个氨基酸取代的氨基酸序列。

[0211] 在一些实施例中,相对于SEQ ID NO:13、23、39和49中的任一个,可变结构域包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、45个或50个氨基酸取代。

[0212] 一个或多个取代可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。一个或多个取代可以是连续的、非连续的或其组合。

[0213] 结合蛋白可以进一步包含TCR α 链恒定结构域(C α)和/或TCR β 链恒定结构域(C β)。TCR α 链恒定结构域(C α)和/或TCR β 链恒定结构域(C β)可以是人的。TCR α 链恒定结构域(C α)和/或TCR β 链恒定结构域(C β)可以是哺乳动物的。TCR α 链恒定结构域(C α)和/或TCR β 链恒定结构域(C β)可以是哺乳动物(例如,人)恒定结构域的经工程化的变体。在一些实施例中,C α 是人C α 的经工程化的变体和/或C β 是人C β 的经工程化的变体。在一些实施例中,C α 是人C α 的经工程化的变体并且C β 是人C β 的经工程化的变体。

[0214] 在一些实施例中,C α 包含与SEQ ID NO.:18、19、44、45和69中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或包含其中的任一个中所示的氨基酸序列或由其组成。

[0215] 在一些实施例中,C β 包含与SEQ ID NO.:28、29、54、55和70-73中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或包含其中的任一个中所示的氨基酸序列或由其组成。

[0216] 在某些实施例中,C α 和C β 包含与以下中所示的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、

至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成,或包含以下中所示的氨基酸序列或由其组成:(i)分别为SEQ ID NO.:18和28;(ii)分别为SEQ ID NO.:19和29;(iii)分别为SEQ ID NO.:44和54;或(iv)分别为SEQ ID NO.:45和55。

[0217] 结合蛋白可以包含(i)TCR α 链、TCR β 链、TCR γ 链或TCR δ 链的细胞外结构域;(ii)TCR α 链、TCR β 链、TCR γ 链或TCR δ 链的跨膜结构域;和/或(iii)TCR α 链、TCR β 链、TCR γ 链或TCR δ 链的细胞质结构域。结合蛋白可以包含全长或基本上全长的TCR α 链、TCR β 链、TCR γ 链和/或TCR δ 链。

[0218] 在一些实施例中,结合蛋白包含TCR α 链和TCR β 链,其中所述TCR α 链和所述TCR β 链包含与以下中所示的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成,或包含以下中所示的氨基酸序列或由其组成:(i)分别为SEQ ID NO.:12和22;(ii)分别为SEQ ID NO.:20和30;(iii)分别为SEQ ID NO.:12和30;(iv)分别为SEQ ID NO.:20和22;(v)分别为SEQ ID NO.:38和48;(vi)分别为SEQ ID NO.:46和56;(vii)分别为SEQ ID NO.:38和56;或(viii)分别为SEQ ID NO.:46和48。

[0219] 在一些实施例中,提供了第一多肽和第二多肽,其中(i)第一多肽包含氨基酸序列SEQ ID NO.:83、基本上由其组成或由其组成,和(ii)第二多肽包含SEQ ID NO.:85的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,其中第一多肽与第二多肽可以缔合以形成多肽二聚体。

[0220] 在一些实施例中,结合蛋白包含相对于SEQ ID NO:12、18-22、28-30、38、44-46、48、54-56和69中的任一个具有一个或多个插入、缺失和/或取代的氨基酸序列。

[0221] 例如,结合蛋白可以包含相对于SEQ ID NO:12、18-22、28-30、38、44-46、48、54-56和69中的任一个具有至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少25个或至少30个氨基酸插入的氨基酸序列。

[0222] 在一些实施例中,结合蛋白包含相对于SEQ ID NO:12、18-22、28-30、38、44-46、48、54-56和69中的任一个具有至多1个、至多2个、至多3个、至多4个、至多5个、至多6个、至多7个、至多8个、至多9个、至多10个、至多11个、至多12个、至多13个、至多14个、至多15个、至多16个、至多17个、至多18个、至多19个、至多20个、至多25个、至多30个、至多35个、至多40个、至多45个或至多50个氨基酸插入的氨基酸序列。

[0223] 在一些实施例中,相对于SEQ ID NO:12、18-22、28-30、38、44-46、48、54-56和69中的任一个,结合蛋白包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、45个或50个氨基酸插入。

[0224] 一个或多个插入可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。一个或多个插入可以是连续的、非连续的或其组合。

[0225] 在一些实施例中,结合蛋白包含相对于SEQ ID NO:12、18-22、28-30、38、44-46、48、54-56和69中的任一个具有至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少25个或至少30个氨基酸缺失的氨基酸序列。

[0226] 在一些实施例中,结合蛋白包含相对于SEQ ID NO:12、18-22、28-30、38、44-46、48、54-56和69中的任一个具有至多1个、至多2个、至多3个、至多4个、至多5个、至多6个、至多7个、至多8个、至多9个、至多10个、至多11个、至多12个、至多13个、至多14个、至多15个、至多16个、至多17个、至多18个、至多19个、至多20个、至多25个、至多30个、至多35个、至多40个、至多45个或至多50个氨基酸缺失的氨基酸序列。

[0227] 在一些实施例中,相对于SEQ ID NO:12、18-22、28-30、38、44-46、48、54-56和69中的任一个,结合蛋白包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、45个或50个氨基酸缺失。

[0228] 一个或多个缺失可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。一个或多个缺失可以是连续的、非连续的或其组合。

[0229] 在一些实施例中,结合蛋白包含相对于SEQ ID NO:12、18-22、28-30、38、44-46、48、54-56和69中的任一个具有至少1个、至少2个、至少3个、至少4个、至少5个、至少6个、至少7个、至少8个、至少9个、至少10个、至少11个、至少12个、至少13个、至少14个、至少15个、至少16个、至少17个、至少18个、至少19个、至少20个、至少25个或至少30个氨基酸取代的氨基酸序列。

[0230] 在一些实施例中,结合蛋白包含相对于SEQ ID NO:12、18-22、28-30、38、44-46、48、54-56和69中的任一个具有至多1个、至多2个、至多3个、至多4个、至多5个、至多6个、至多7个、至多8个、至多9个、至多10个、至多11个、至多12个、至多13个、至多14个、至多15个、至多16个、至多17个、至多18个、至多19个、至多20个、至多25个、至多30个、至多35个、至多40个、至多45个或至多50个氨基酸取代的氨基酸序列。

[0231] 在一些实施例中,相对于SEQ ID NO:12、18-22、28-30、38、44-46、48、54-56和69中的任一个,结合蛋白包含1个、2个、3个、4个、5个、6个、7个、8个、9个、10个、11个、12个、13个、14个、15个、16个、17个、18个、19个、20个、25个、30个、35个、40个、45个或50个氨基酸取代。

[0232] 一个或多个取代可以在N末端处、C末端处、氨基酸序列内或其组合。一个或多个取代可以是连续的、非连续的或其组合。

[0233] 在目前公开的实施例中的任何实施例中,结合蛋白可以包含TCR、单链TCR(scTCR)、scTv或嵌合抗原受体(CAR)。用于产生经工程化的TCR的方法描述于例如Bowerman等人,《分子免疫学(Mol. Immunol.)》,46(15):3000(2009)中,所述文献的技术通过引用并入本文。用于制备CAR的方法是本领域中已知的,并且描述于例如美国专利第6,410,319号;美国专利第7,446,191号;美国专利公开第2010/065818号;美国专利第8,822,647号;PCT公开第W0 2014/031687号;美国专利第7,514,537号;以及Brentjens等人,2007,《临床癌症研究(Clin.Cancer Res.)》13:5426中,所述文献的技术通过引用并入本文。在一些实施例中,结合蛋白包含可溶性TCR,其任选地与对CD3蛋白具有特异性的结合结构域(例如,scFv)融合。参见Elie Dolgin,《自然生物技术(Nature Biotechnology)》40:441-449(2022)。

[0234] 在目前公开的实施例中的任何实施例中,编码结合蛋白的多核苷酸可以进一步包含:(i) 编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,其中,任选地,经编码的多肽是或包含CD8共受体 α 链;(ii) 编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分,其中,任选地,经编码的多肽是或包含CD8共受体 β 链;或(iii) (i)的多核苷酸和(ii)的多核苷酸。不受理论束缚,在某些实施例中,与单独表达结合蛋白相比,结合

蛋白和CD8共受体蛋白或其与HLA分子功能性结合的部分的共表达或同时表达可以提高宿主细胞(例如,免疫细胞,如T细胞,任选地CD4⁺T细胞)的一种或多种期望的活性。应当理解,编码结合蛋白的多核苷酸和编码CD8共受体多肽的多核苷酸可以存在于单个核酸分子上(例如,在同一表达载体中),或者可以存在于宿主细胞中的单独的核酸分子上。

[0235] 在目前公开的实施例中的任何实施例中,CD8共受体 α 链可以包含SEQ ID NO.:87或信号肽被去除的SEQ ID NO.:87、基本上由其组成或由其组成。编码SEQ ID NO.:87的多核苷酸的实例在SEQ ID NO.:88中提供。在一些实施例中,CD8共受体 α 链包含与SEQ ID NO.:87或信号肽被去除的SEQ ID NO.:87的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%序列同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0236] 在目前公开的实施例中的任何实施例中,CD8共受体 β 链可以包含SEQ ID NO.:89或信号肽被去除的SEQ ID NO.:89、基本上由其组成或由其组成。编码SEQ ID NO.:89的多核苷酸的实例在SEQ ID NO.:90中提供。在一些实施例中,CD8共受体 β 链包含与SEQ ID NO.:89或信号肽被去除的SEQ ID NO.:89的氨基酸序列具有至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少97%或至少99%序列同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0237] 在某些另外的实施例中,多核苷酸包含:(a) 编码多肽的所述多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分;(b) 编码多肽的所述多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分;以及(c) 编码自切割肽的多核苷酸,所述多核苷酸安置在(a)的所述多核苷酸与(b)的所述多核苷酸之间。在另外的实施例中,多核苷酸包含编码自切割肽并安置在以下之间的多核苷酸:(1) 所述编码结合蛋白的多核苷酸与所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分;和/或(2) 所述编码结合蛋白的多核苷酸与所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分。

[0238] 在仍另外的实施例中,多核苷酸可以包含在框内可操作地连接的:(i) (pnCD8 α) - (pnSCP1) - (pnCD8 β) - (pnSCP2) - (pnBP); (ii) (pnCD8 β) - (pnSCP1) - (pnCD8 α) - (pnSCP2) - (pnBP); (iii) (pnBP) - (pnSCP1) - (pnCD8 α) - (pnSCP2) - (pnCD8 β); (iv) (pnBP) - (pnSCP1) - (pnCD8 β) - (pnSCP2) - (pnCD8 α); (v) (pnCD8 α) - (pnSCP1) - (pnBP) - (pnSCP2) - (pnCD8 β); 或(vi) (pnCD8 β) - (pnSCP1) - (pnBP) - (pnSCP2) - (pnCD8 α), 其中pnCD8 α 是所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,其中pnCD8 β 是所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,其中pnBP是所述编码结合蛋白的多核苷酸,并且其中pnSCP1和pnSCP2各自独立地是编码自切割肽的多核苷酸,其中所述多核苷酸和/或经编码的自切割肽任选地是相同的或不同的。(例如,P2A、T2A、F2A、E2A)。应当理解,自切割肽可以包含其N末端和/或C末端的接头。接头的实例是GSG。在一些实施例中,提供了一种T2A肽,其包含N末端GSG接头。在一些实施例中,GSG-T2A序列包含SEQ ID NO.:82、基本上由其组成或由其组成。在一些实施例中,GSG-P2A序列包含SEQ ID NO.:74、基本上由其组成或由其组成。

[0239] 在某些实施例中,所述经编码的结合蛋白包含TCR α 链和TCR β 链,其中所述多核苷酸包含编码自切割肽、安置在编码TCR α 链的多核苷酸与编码TCR β 链的多核苷酸之间的多核苷酸。在另外的实施例中,多核苷酸包含在框内可操作地连接的:(i) (pnCD8 α) - (pnSCP1) -

(pnCD8 β) - (pnSCP2) - (pnTCR β) - (pnSCP3) - (pnTCR α) ; (ii) (pnCD8 β) - (pnSCP1) - (pnCD8 α) - (pnSCP2) - (pnTCR β) - (pnSCP3) - (pnTCR α) ; (iii) (pnCD8 α) - (pnSCP1) - (pnCD8 β) - (pnSCP2) - (pnTCR α) - (pnSCP3) - (pnTCR β) ; (iv) (pnCD8 β) - (pnSCP1) - (pnCD8 α) - (pnSCP2) - (pnTCR α) - (pnSCP3) - (pnTCR β) ; (v) (pnTCR β) - (pnSCP1) - (pnTCR α) - (pnSCP2) - (pnCD8 α) - (pnSCP3) - (pnCD8 β) ; (vi) (pnTCR β) - (pnSCP1) - (pnTCR α) - (pnSCP2) - (pnCD8 β) - (pnSCP3) - (pnCD8 α) ; (vii) (pnTCR α) - (pnSCP1) - (pnTCR β) - (pnSCP2) - (pnCD8 α) - (pnSCP3) - (pnCD8 β) ; (viii) (pnTCR α) - (pnSCP1) - (pnTCR β) - (pnSCP2) - (pnCD8 β) - (pnSCP3) - (pnCD8 α) ,其中pnCD8 α 是编码多肽的所述多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,其中pnCD8 β 是所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,其中pnTCR α 是所述编码TCR α 链的多核苷酸,其中pnTCR β 是所述编码TCR β 链的多核苷酸,并且其中pnSCP1、pnSCP2和pnSCP3各自独立地是编码自切割肽的多核苷酸,其中所述多核苷酸和/或经编码的自切割肽任选地是相同的或不同的。在一些实施例中,SCP1包含SEQ ID NO.:82,SCP2包含SEQ ID NO.:74,并且SCP3包含SEQ ID NO.:74。

[0240] 另外或可替代地,编码结合蛋白的多核苷酸可以编码弗林蛋白酶切割位点或安置在两个其它多肽之间(例如,在TCR β 链与TCR α 链之间)的其它蛋白酶切割位点。

[0241] 在某些实施例中,本公开的经编码的多肽包含一个或多个接合氨基酸。“接合氨基酸”或“接合氨基酸残基”是指多肽的两个相邻基序、区或结构域之间的一个或多个(例如,2个至约10个)氨基酸残基,如结合结构域与相邻恒定结构域之间或TCR链与相邻自切割肽之间。接合氨基酸可以由编码融合蛋白的构建体的设计产生(例如,在编码融合蛋白的核酸分子的构建期间使用限制性酶位点产生的氨基酸残基),或由切割例如与本公开的经编码的结合蛋白的一个或多个结构域相邻的自切割肽产生(例如安置在TCR α 链与TCR β 链之间的P2A肽,其自切割可以在 α 链、TCR β 链或两者中留下一个或多个接合氨基酸)。

[0242] 在另外的实施例中,结合蛋白表达为转基因构建体的一部分,所述转基因构建体编码和/或本公开的宿主细胞可以编码:一个或多个另外的辅助蛋白,如安全开关蛋白;标签、选择标志物;CD8共受体 β 链;CD8共受体 α 链或两者;或其任何组合。PCT申请PCT/US2017/053112中描述了可用于编码和表达结合蛋白和辅助组分(例如,安全开关蛋白、选择标志物、CD8共受体 β 链或CD8共受体 α 链中的一个或多个)的多核苷酸和转基因构建体,其多核苷酸、转基因构建体和辅助组分(包括核苷酸和氨基酸序列)特此通过引用并入。应当理解,本公开的结合蛋白、安全开关蛋白、标签、选择标志物、CD8共受体 β 链或CD8共受体 α 链中的任何一种或全部可以由单个核酸分子编码,或者以由单独的核酸分子上存在的多核苷酸序列编码。

[0243] 示例性安全开关蛋白包括,例如,截短的EGF受体多肽(huEGFRt),其缺乏细胞外N末端配体结合结构域和细胞内受体酪氨酸激酶活性,但保留其天然氨基酸序列,具有I型跨膜细胞表面定位,并具有药物级抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗(cetuximab)(爱必妥(Erbitux)) tEGF受体的构象完整结合表位(tEGFr;Wang等人,《血液》118:1255-1263,2011);胱天蛋白酶多肽(例如,iCasp9;Straathof等人,《血液》105:4247-4254,2005;Di Stasi等人,《新英格兰医学杂志(N.Engl.J.Med.)》365:1673-1683,2011;Zhou和Brenner,《实验血液学(Exp.Hematol.)》pii:S0301-472X(16)30513-6.doi:10.1016/j.exphem.2016.07.011);RQR8(Philip等人,《血液》124:1277-1287,2014);源自人c-myc蛋

白 (Myc) 的10个氨基酸的标签 (Kieback等人,《美国国家科学院院刊》105:623-628,2008); 以及标志物/安全开关多肽,如RQR (CD20+CD34; Philip等人,2014)。

[0244] 可用于本公开的经修饰的宿主细胞的其它辅助组分包含允许鉴定、分选、分离、富集或追踪细胞的标记或选择标志物。例如,具有期望的特性的标记的宿主细胞 (例如,抗原特异性TCR和安全开关蛋白) 可以从样品中未标记的细胞中分选出来,并更有效地激活和扩增,用于包含在期望的纯度的产物中。

[0245] 如本文所使用的,术语“选择标志物”包含核酸构建体 (和经编码的基因产物), 其赋予细胞可识别的变化,允许检测和阳性选择用包含选择标志物的多核苷酸转导的免疫细胞。RQR是一种选择标志物,其包含CD20的主要细胞外环和两个最小CD34结合位点。在一些实施例中,编码RQR的多核苷酸包含编码16个氨基酸CD34最小表位的多核苷酸。在一些实施例中,CD34最小表位被掺入CD8共受体茎结构域的氨基末端位置处 (Q8)。在另外的实施例中,CD34最小结合位点序列可以与CD20的靶表位组合,以形成T细胞的致密标志物/自杀基因 (RQR8) (Philip等人,2014,通过引用并入本文)。此构建体允许选择表达所述构建体的宿主细胞,其中例如CD34特异性抗体与磁珠 (美天旎公司 (Miltenyi)) 结合,并利用临床上接受的药物抗体利妥昔单抗 (rituximab),所述抗体允许选择性缺失表达转基因的经工程化的T细胞 (Philip等人,2014)。

[0246] 另外的示例性选择标志物还包括通常不在T细胞上表达的若干种截短的I型跨膜蛋白:截短的低亲和力神经生长因子、截短的CD19和截短的CD34 (参见例如,Di Stasi等人,《新英格兰医学杂志》365:1673-1683,2011;Mavilio等人,《血液》83:1988-1997,1994; Fehse等人,《分子疗法 (Mol. Ther.)》1:448-456,2000;所述文献各自整体并入本文)。CD19和CD34的有用特征是现成的美天旎公司CliniMACs™选择系统的可用性,所述系统可以靶向这些标志物进行临床级分选。然而,CD19和CD34是相对大的表面蛋白,其可能会影响整合载体的载体包装容量和转录效率。还可以采用含有细胞外非信号传导结构域或各种蛋白质 (例如,CD19、CD34、LNGFR) 的表面标志物。任何选择标志物都可以采用,并且应当是良好生产规范所接受的。在某些实施例中,选择标志物用编码所关注的基因产物 (例如,本公开的结合蛋白,如TCR或CAR) 的多核苷酸表达。选择标志物的另外的实例包括,例如,如GFP、EGFP、 β -gal或氯霉素乙酰转移酶 (CAT) 等报告基因。在某些实施例中,选择标志物,例如CD34,由细胞表达,并且CD34可用于选择富集或分离 (例如,通过免疫磁性选择) 所关注的转导细胞,以用于本文所述的方法。如本文所使用的,CD34标志物与抗CD34抗体或例如scFv、TCR或与CD34结合的另一种抗原识别部分不同。

[0247] 在某些实施例中,选择标志物包含RQR多肽、截短的低亲和力神经生长因子 (tNGFR)、截短的CD19 (tCD19)、截短的CD34 (tCD34) 或其任何组合。

[0248] 关于RQR多肽,不希望受理论束缚,据信与宿主细胞表面的距离对于RQR多肽作为选择标志物/安全开关发挥作用很重要 (Philip等人,2010 (同上))。在一些实施例中,经编码的RQR多肽包含在经编码的CD8共受体的 β 链、 α 链或两者中,或其中之一或两者的片段或变体中。在具体实施例中,经修饰的宿主细胞包含编码iCasp9的异源性多核苷酸和编码重组CD8共受体蛋白的异源性多核苷酸,所述共受体蛋白包含含有RQR多肽的 β 链,并进一步包含CD8 α 链。

[0249] 在一些实施例中,经编码的CD8共受体包括 α 链或其片段或变体。人CD8共受体 α 链

前体的氨基酸序列是已知的,并且在例如UniProtKB-P30433(另见UniProtKB-P31783;-P10732;以及-P10731)处提供。在一些实施例中,经编码的CD8共受体包括 β 链或其片段或变体。人CD8共受体 β 链前体的氨基酸序列是已知的,并且在例如UniProtKB-P10966(另见UniProtKB-Q9UQ56;-E9PD41;Q8TD28;以及-P30434;以及-P05541)处提供。

[0250] 本公开的分离的多核苷酸可以进一步包含编码如本文所公开的安全开关蛋白、选择标志物、CD8共受体 β 链或CD8共受体 α 链的多核苷酸,或者可以包含编码其任何组合的多核苷酸。

[0251] 在目前公开的实施例中的任何实施例中,多核苷酸可以被密码子优化以在宿主细胞中表达。在一些实施例中,宿主细胞包含人免疫系统细胞,如T细胞、NK细胞或NK-T细胞(Scholten等人,《临床免疫学》119:135,2006)。密码子优化可以使用已知的技术和工具进行,例如,使用GenScript®OptimumGene™工具或GeneArt(生命技术公司(Life Technologies))。密码子优化的序列包括部分密码子优化的序列(即,密码子中的一个或多个密码子被优化以在宿主细胞中表达)和完全密码子优化的序列。应当理解,在其中多核苷酸编码超过一种多肽(例如,TCR α 链、TCR β 链、CD8共受体 α 链、CD8共受体 β 链和一种或多种自切割肽)的实施例中,每种多肽可以被独立地完全密码子优化、部分密码子优化或不被密码子优化。

[0252] 示例性结合蛋白“11N4A”和“11N6”的氨基酸和多核苷酸序列示出于表1中。

[0253] 表1:与TCR 11N4A和11N6相关的某些多核苷酸和氨基酸序列

[0254]

	TCR	
	11N4A	11N6
多核苷酸序列		
具有信号肽的 TCR α 链，原始多核苷酸	5	33
具有信号肽的 TCR α 链，cys 修饰的	86	
具有信号肽的 TCR β 链，原始多核苷酸	6	34
具有信号肽的 TCR β 链，cys 修饰的	84	
TCR β -P2A-TCR α ，密码子优化（A）	7	35
TCR β -P2A-TCR α ，密码子优化（B）	8	--
CD8 α -T2A-CD8 β -P2A-TCR β -P2A-TCR α ，密码子优化（A）	9	36
CD8 α -T2A-CD8 β -P2A-TCR β -P2A-TCR α ，密码子优化（B）	10	--
氨基酸序列		
具有信号肽的 TCR α 链，原始	11	37
无信号肽的 TCR α 链，原始	12	38
TCR α 链可变结构域，无信号肽	13	39
TCR α 链可变结构域，CDR1 α	14	40
TCR α 链可变结构域，CDR2 α	15	41
TCR α 链可变结构域，CDR3 α -IMGT 接合	16	42
TCR α 链可变结构域，CDR3 α -IMGT	17	43

	TCR	
	11N4A	11N6
TCR α 链恒定结构域, 原始	18	44
TCR α 链恒定结构域, cys 修饰的	19	45
无信号肽的 TCR α 链, cys 修饰的	20	46
具有信号肽的 TCR α 链, cys 修饰的	85	
具有信号肽的 TCR β 链, 原始	21	47
无信号肽的 TCR β 链, 原始	22	48
TCR β 链可变结构域, 无信号肽	23	49
[0255] TCR β 链可变结构域, CDR1 β	24	50
TCR β 链可变结构域, CDR2 β	25	51
TCR β 链可变结构域, CDR3 β -IMGT 接合	26	52
TCR β 链可变结构域, CDR3 β -IMGT	27	53
TCR β 链恒定结构域, 原始	28	54
TCR β 链恒定结构域, cys 修饰的	29	55
无信号肽的 TCR β 链, cys 修饰的	30	56
具有信号肽的 TCR β 链, cys 修饰的	83	
TCR β -P2A-TCR α	31	57
CD8 α -T2A-CD8 β -P2A-TCR β -P2A-TCR α	32	58

[0256] 还提供了一种多核苷酸,其包含 (i) 表达控制序列,所述表达控制序列与 (ii) 编码 SEQ ID NO.:17、27、16、26、53、43、52和42中的任一个中所示的氨基酸序列的序列可操作地连接。表达控制序列可以与 (ii) 的序列异源。(ii) 的序列可以被密码子优化,例如以在人T细胞中表达。

[0257] 载体

[0258] 另一方面,本公开提供了一种表达载体,其包含与表达控制序列可操作地连接的如本文所提供的任何多核苷酸。

[0259] 本文还提供了包含本公开的多核苷酸或转基因构建体的载体。载体的一些实例包括质粒、病毒载体、粘粒等。一些载体可以能够在其被引入的宿主细胞中自主复制(例如,具

有细菌复制起源的细菌载体和游离型哺乳动物载体),而其它载体可以整合到宿主细胞的基因组中,或者在引入到宿主细胞中时促进多核苷酸插入物的整合,并且从而与宿主基因组(例如,慢病毒载体、逆转录病毒载体)一起复制。另外,一些载体能够指导与其可操作地连接的基因的表达(这些载体可以称为“表达载体”)。根据相关实施例,还应进一步理解的是,如果一种或多种药剂(例如,编码如本文所述的多肽的多核苷酸)共同施用于受试者,则每种药剂可以存在于单独或相同的载体中,并且可以将多个载体(每个载体含有不同的药剂或相同的药剂)引入细胞或细胞群体或施用于受试者。

[0260] 在某些实施例中,本公开的多核苷酸可以与载体的某些元件可操作地连接。例如,实现多核苷酸序列所连接的编码序列的表达和加工所需的所述多核苷酸序列可以可操作地连接。表达控制序列可以包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效RNA加工信号,如剪接和聚腺苷酸化信号;稳定胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即,Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;以及增强蛋白质分泌的可能序列。如果表达控制序列与所关注的基因和以反式作用或隔一定距离作用以控制所关注的基因的表达控制序列邻接,则所述表达控制序列可以可操作地连接。

[0261] 在某些实施例中,载体包含质粒载体或病毒载体(例如,选自慢病毒载体或 γ -逆转录病毒载体的载体)。病毒载体包括逆转录病毒;腺病毒;细小病毒(例如,腺相关病毒);冠状病毒;负链RNA病毒,如正粘病毒(例如,流感病毒)、弹状病毒(例如,狂犬病和水疱性口炎病毒)、副粘病毒(例如,麻疹和仙台病毒(Sendai));正链RNA病毒,如小核糖核酸病毒和 α 病毒;以及双链DNA病毒,包括腺病毒、疱疹病毒(例如,1型和2型单纯疱疹病毒、埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)、巨细胞病毒)和痘病毒(例如,牛痘、鸡痘和金丝雀痘)。其它病毒包括例如诺沃克病毒(Norwalk virus)、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、乳多空病毒、嗜肝dna病毒和肝炎病毒。逆转录病毒的实例包括禽白血病-肉瘤、哺乳动物C型病毒、B型病毒、D型病毒、HTLV-BLV群、慢病毒和泡沫病毒(Coffin, J.M., 逆转录病毒科:病毒和其复制(Retroviridae: The viruses and their replication),《基础病毒学(Fundamental Virology)》,第三版;B.N.Fields等人编辑,费城利平科特-雷文出版社(Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia),1996)。

[0262] “逆转录病毒”是具有RNA基因组的病毒,所述RNA基因组使用逆转录酶逆转录成DNA,随后逆转录的DNA并入宿主细胞基因组中。“ γ 逆转录病毒”是指逆转录病毒科的一个属。 γ 逆转录病毒的实例包括小鼠干细胞病毒、鼠类白血病病毒、猫白血病病毒、猫肉瘤病毒和禽网状内皮组织增殖病毒。如本文所使用的,“慢病毒载体”意指用于基因递送的基于HIV的慢病毒载体,所述慢病毒载体可以为整合或非整合的,具有相对大的包装容量,并且可以转导一系列不同细胞类型。慢病毒载体通常在将三种(包装、包膜和转移)或更多种质粒瞬时转染到生产细胞中之后产生。类似于HIV,慢病毒载体通过病毒表面糖蛋白与细胞表面上受体的相互作用进入靶细胞。在进入时,病毒RNA经历逆转录,所述逆转录由病毒逆转录酶复合物介导。逆转录的产物为双股线性病毒DNA,其是病毒整合到经感染的细胞的DNA中的基质。在一些实施例中,慢病毒载体是自失活慢病毒载体。自失活慢病毒载体可以包含一种修饰,以防止载体的5'长末端重复序列(LTR)中的增强子和启动子元件转移到转导细胞,例如,包含在一轮逆转录后,病毒基因组的3'LTR中的缺失被转移到5'LTR中,产生不含LTR源性增强子或启动子元件的前病毒。在一些实施例中,慢病毒载体是第三代慢病毒载

体。第三代慢病毒载体可以利用分成两个或更多个质粒的包装系统,例如一个编码Rev并且一个编码Gag和Pol。第三代慢病毒载体可以利用包装系统,所述包装系统缺乏Tat或不需要Tat表达,而是包含例如与转移质粒上的异源性启动子融合的嵌合5'LTR。

[0263] 在某些实施例中,病毒载体可以是 γ 逆转录病毒,例如,莫洛尼鼠类白血病病毒(Moloney murine leukemia virus, MLV)源性载体。在其它实施例中,病毒载体可以是更复杂的逆转录病毒源性载体,例如,慢病毒源性载体。HIV-1源性载体属于此类别。其它实例包括源自HIV-2、FIV、马传染性贫血病毒、SIV和梅迪-维斯纳(Maedi-Visna)病毒(绵羊慢病毒)的慢病毒载体。使用逆转录病毒和慢病毒载体以及包装细胞来用含有TCR或CAR转基因的病毒颗粒转导哺乳动物宿主细胞的方法是本领域已知的并且先前已经在例如以下文献中描述:美国专利8,119,772;Walchli等人,《公共科学图书馆·综合(PLoS One)》6:327930,2011;Zhao等人,《免疫学杂志》174:4415,2005;Engels等人,《人类基因疗法(Hum. Gene Ther.)》14:1155,2003;Frecha等人,《分子疗法》18:1748,2010;和Verhoeven等人,《分子生物学方法(Methods Mol. Biol.)》506:97,2009。逆转录病毒和慢病毒载体构建体和表达系统也是可商购获得的。其它病毒载体也可以用于多核苷酸递送,包括DNA病毒载体,包括例如基于腺病毒的载体和基于腺相关病毒(AAV)的载体;源自单纯疱疹病毒(HSV)的载体,包括扩增子载体、复制缺陷型HSV和减毒HSV(Krisky等人,《基因疗法(Gene Ther.)》5:1517,1998)。

[0264] 针对基因疗法用途开发的其它载体也可以与本公开的组合物和方法一起使用。此类载体包括源自杆状病毒和 α 病毒的载体。(Jolly, D J. 1999. 新兴病毒载体(Emerging Viral Vectors.)第209-40页, Friedmann T. 编辑,《人类基因疗法的发展(The Development of Human Gene Therapy)》. 纽约:冷泉港实验室(New York: Cold Spring Harbor Lab),或质粒载体(如睡美人或其它转座子载体)。

[0265] 当病毒载体基因组包含要在宿主细胞中作为独立转录物表达的多种多核苷酸时,病毒载体还可以包含两种(或更多种)转录物之间的另外的序列,从而允许双顺反子或多顺反子表达。用于病毒载体中的此类序列的实例包括内部核糖体进入位点(IRES)、弗林蛋白酶切割位点、病毒2A肽或其任何组合。

[0266] 在某些实施例中,载体能够将多核苷酸或转基因构建体递送至宿主细胞(例如,造血祖细胞或人免疫系统细胞)。在具体实施例中,载体能够将多核苷酸或转基因构建体递送至人免疫系统细胞,例如CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、干细胞记忆T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞或其任何组合。在另外的实施例中,载体能够将转基因构建体递送至原初T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞或其任何组合。在一些实施例中,编码本公开的多核苷酸或转基因构建体的载体可以进一步包含编码核酸酶的多核苷酸,所述核酸酶可用于在宿主细胞中进行染色体敲除(例如,如本文所公开的CRISPR-Cas核酸内切酶或另一种核酸内切酶),或可用于在基因疗法替代或基因修复疗法中将治疗性多核苷酸或转基因或其部分递送至宿主细胞。可替代地,用于染色体敲除或基因替代或基因修复疗法的核酸酶可以独立于编码本公开的多核苷酸或转基因构建体的载体而递送至宿主细胞。

[0267] 在某些实施例中,载体能够将多核苷酸递送至宿主细胞。在另外的实施例中,宿主细胞是造血祖细胞或人免疫系统细胞。在另外的实施例中,人免疫系统细胞是CD4⁺T细

胞、CD8⁺T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤细胞、自然杀伤T细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞或其任何组合。在又另外的实施例中，T细胞是原初T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞或其任何组合。

[0268] 在目前公开的实施例中的任何实施例中，载体是病毒载体。在某些实施例中，病毒载体是慢病毒载体或 γ -逆转录病毒载体。

[0269] 可以使用的基于转座子的系统的实例包括但不限于睡美人(例如，源自鲑鱼的基因组)；背驮式(例如，源自鳞翅目细胞和/或小棕蝠(*Myotis lucifugus*))；mariner(例如，源自果蝇)；frog prince(例如，源自美洲豹蛙(*Rana pipiens*))；Tol2(例如，源自青鳉鱼(*medaka fish*))；和spinON。

[0270] 宿主细胞

[0271] 本文还提供了编码和/或表达结合蛋白(以及任选地一种或多种辅助蛋白，如本文提供的转导标志物、CD8共受体多肽等)的宿主细胞。在某些实施例中，提供了一种宿主细胞，其被修饰以包含本公开的多核苷酸和/或表达载体，和/或以表达本公开的结合蛋白。

[0272] 任何合适的宿主细胞都可以被修饰以包括编码本公开的结合蛋白的异源性多核苷酸，包括例如经修饰以包括异源性多核苷酸的免疫细胞，如T细胞、NK细胞或NK-T细胞。在一些实施例中，经修饰的免疫细胞包含CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞或两者。用于期望的核酸转染/转导T细胞的方法已经描述(例如，美国专利申请公开第US2004/0087025号)为具有使用期望的靶特异性的T细胞的过继性转移程序(例如，Schmitt等人，《人类基因(Hum.Gen.)》20:1240, 2009; Dossett等人，《分子疗法》17:742, 2009; Till等人，《血液》112:2261, 2008; Wang等人，《人类基因疗法》18:712, 2007; Kuball等人，《血液》109:2331, 2007; US2011/0243972; US 2011/0189141; Leen等人，《免疫学年度评论(Ann.Rev.Immunol.)》25:243, 2007)，使得基于本文的教导，可以设想将这些方法适用于目前公开的实施例。

[0273] 任何适当的方法均可用于转染或转导细胞，例如T细胞，或用于施用本方法的多核苷酸或组合物。已知的用于将多核苷酸递送至宿主细胞的方法包括，例如，使用阳离子聚合物、类脂分子和某些商业产品，例如IN-VIVO-JET PEI。其它方法包括离体转导、注射、电穿孔、DEAE-葡聚糖、超声装载、脂质体介导的转染、受体介导的转导、微粒轰击、转座子介导的转移等。转染或转导宿主细胞的仍另外的方法采用载体，本文将进一步详细描述。

[0274] 在某些实施例中，宿主细胞或经修饰的细胞包含造血祖细胞、干细胞(例如，iPSC)和/或或人免疫细胞。在一些实施例中，免疫细胞包含T细胞、NK细胞、NK-T细胞、树突状细胞、巨噬细胞、单核细胞或其任何组合。在另外的实施例中，免疫细胞包含CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞或其任何组合。在某些另外的实施例中，免疫细胞包含CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞。在某些仍另外的实施例中，CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞或两者包含(i) 编码多肽的多核苷酸，所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分，其中，任选地，经编码的多肽是或包含CD8共受体 α 链；(ii) 编码多肽的多核苷酸，所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分，其中，任选地，经编码的多肽是或包含CD8共受体 β 链；或(iii) (i)的多核苷酸和(ii)的多核苷酸。

[0275] 宿主细胞可以是外周血单核细胞(PBMC)。宿主细胞可以是淋巴样细胞。宿主细胞可以是淋巴细胞。宿主细胞可以是T细胞。宿主细胞可以是 $\alpha\beta$ T细胞(无论表达或不表达内源性 α - β TCR)。宿主细胞可以是 $\gamma\delta$ T细胞(无论表达或不表达内源性 γ - δ TCR)。宿主细胞可以

是B细胞。宿主细胞可以是自然杀伤(NK)细胞。宿主细胞可以是自然杀伤T(NKT)细胞。宿主细胞可以是哺乳动物细胞。宿主细胞可以是人细胞。

[0276] 宿主细胞可以是原代细胞。宿主细胞可以是永生化细胞。宿主细胞可以是细胞系。宿主细胞可以从干细胞分化,例如经诱导的多能干细胞(iPSC)、胚胎干细胞、造血干细胞(HSC)等。

[0277] 在上述实施例中的任何实施例中,宿主细胞(例如,免疫细胞)可以经修饰以减少或消除编码参与免疫信号传导或其它相关活动的多肽的一个或多个内源性基因的表达。示例性基因敲除包括编码PD-1、LAG-3、CTLA4、TIM3、TIGIT、FasL、HLA分子、TCR分子等的基因敲除。不希望受理论束缚,某些内源性表达的免疫细胞蛋白可以被接受经修饰的免疫细胞的同种异体宿主识别为外来物,这可能导致经修饰的免疫细胞(例如,HLA等位基因)的消除,或者可能下调经修饰的免疫细胞(例如,PD-1、LAG-3、CTLA4、FasL、TIGIT、TIM3)的免疫活性,或者可能干扰本公开的异源性表达的结合蛋白(例如,经修饰的T细胞的内源性TCR,与非Ras抗原结合,并且从而干扰与表达Ras抗原的细胞结合的经修饰的免疫细胞)的结合活性。

[0278] 因此,减少或消除此类内源性基因或蛋白质的表达或活性可以提高经修饰的细胞在自体或同种异体宿主环境中的活性、耐受性或持久性,并且可以允许细胞的普遍施用(例如,对任何接受者,无论HLA类型如何)。在某些实施例中,经修饰的细胞是供体细胞(例如,同种异体)或自体细胞。在某些实施例中,本公开的经修饰的细胞包含编码PD-1、LAG-3、CTLA4、TIM3、TIGIT、FasL、HLA组分(例如,编码 $\alpha 1$ 巨球蛋白、 $\alpha 2$ 巨球蛋白、 $\alpha 3$ 巨球蛋白、 $\beta 1$ 微球蛋白或 $\beta 2$ 微球蛋白的基因)或TCR组分(例如,编码TCR可变区或TCR恒定区的基因)的基因中的一个或多个基因的染色体基因敲除(参见例如,Torikai等人,《自然科学报告(Nature Sci.Rep.)》6:21757(2016);Torikai等人,《血液》119(24):5697(2012);和Torikai等人,《血液》122(8):1341(2013),所述文献的基因编辑技术、组合物和过继性细胞疗法通过引用整体并入本文)。

[0279] 如本文所使用的,术语“染色体基因敲除”是指宿主细胞中的遗传改变或引入的抑制剂,其阻止(例如,减少、延迟、抑制或消除)宿主细胞产生功能活性内源性多肽产物。导致染色体基因敲除的改变可以包括,例如,引入的无义突变(包括过早终止密码子的形成)、错义突变、基因缺失和链断裂,以及抑制宿主细胞中内源性基因表达的抑制性核酸分子的异源性表达。

[0280] 在某些实施例中,通过宿主细胞的染色体编辑进行染色体基因敲除或基因敲入。染色体编辑可以使用例如核酸内切酶进行。如本文所使用的,“核酸内切酶”是指能够催化多核苷酸链内磷酸二酯键的切割的酶。在某些实施例中,核酸内切酶能够切割靶向基因,从而灭活或“敲除”靶向基因。核酸内切酶可以是天然存在的、重组的、经基因修饰的或融合核酸内切酶。核酸内切酶引起的核酸链断裂通常通过同源重组或非同源端连接(NHEJ)的不同机制修复。在同源重组期间,供体核酸分子可用于供体基因“敲入”、用于靶基因“敲除”,并且任选地通过供体基因敲入或靶基因敲除事件灭活靶基因。NHEJ是一种容易出错的修复过程,其通常会导致切割位点处的DNA序列的变化,例如至少一个核苷酸的取代、缺失或添加。NHEJ可用于“敲除”靶基因。核酸内切酶的实例包括锌指核酸酶、TALE核酸酶、CRISPR-Cas核酸酶、大范围核酸酶和megaTAL。

[0281] 如本文所使用的,“锌指核酸酶”(ZFN)是指包含与非特异性DNA切割结构域融合的锌指DNA结合结构域的融合蛋白,如FokI核酸内切酶。约30个氨基酸的每个锌指基序与DNA的约3个碱基对结合,并且某些残基处的氨基酸可以进行变化以改变三联体序列特异性(参见例如,Desjarlais等人,《美国国家科学院院刊》90:2256-2260,1993;Wolfe等人,《分子生物学杂志(J.Mol.Biol.)》285:1917-1934,1999)。多个锌指基序可以串联连接,以产生对期望的DNA序列的结合特异性,如长度范围为约9个至约18个碱基对的区。作为背景,ZFN通过催化基因组中位点特异性DNA双链断裂(DSB)的形成来介导基因组编辑,并且通过同源定向修复促进了包含与DSB的位点处的基因组同源的侧接序列的转基因的靶向整合。可替代地,ZFN产生的DSB可以通过非同源端连接(NHEJ)修复导致靶基因的敲除,NHEJ是一种容易出错的细胞修复途径,其导致切割位点处的核苷酸的插入或缺失。在某些实施例中,基因敲除包含使用ZFN分子进行的插入、缺失、突变或其组合。

[0282] 如本文所使用的,“转录激活因子样效应子核酸酶”(TALEN)是指包含TALE DNA结合结构域和DNA切割结构域的融合蛋白,如FokI核酸内切酶。“TALE DNA结合结构域”或“TALE”由一个或多个TALE重复结构域/单元构成,每个结构域/单元通常具有高度保守的33-35个氨基酸序列,其中第12个和第13个氨基酸不同。TALE重复结构域参与TALE与靶DNA序列的结合。被称为重复可变二残基(RVD)的不同的氨基酸残基与特定的核苷酸识别相关。已经确定了这些TALE的DNA识别的天然(规范)代码,使得TALE的位置12和位置13处的HD(组氨酸-天冬氨酸)序列导致TALE与胞嘧啶(C)结合、NG(天冬酰胺-甘氨酸)与T核苷酸结合、NI(天冬酰胺-异亮氨酸)与A结合、NN(天冬酰胺-天冬酰胺)与G或A核苷酸结合、并且NG(天冬酰胺-甘氨酸)与T核苷酸结合。非规范(非典型)RVD也是已知的(参见例如,美国专利公开第US2011/0301073号,所述非典型RVD通过引用整体并入本文)。TALEN可用于指导T细胞的基因组中的位点特异性双链断裂(DSB)。非同源端连接(NHEJ)从双链断裂的两侧连接DNA,其中针对退火很少或没有序列重叠,从而引入了敲除基因表达的错误。可替代地,同源定向修复可以在DSB的位点处引入转基因,条件是转基因中存在同源侧接序列。在某些实施例中,基因敲除包含插入、缺失、突变或其组合,并使用TALEN分子进行。

[0283] 如本文所使用的,“成簇规则间隔短回文重复序列/Cas”(CRISPR/Cas)核酸酶系统是指一种以下系统:采用CRISPR RNA(crRNA)引导的Cas核酸酶来通过碱基配对互补性识别基因组内的靶位点(称为原间隔子),并且然后如果短的、保守的原间隔子相关基序(PAM)紧跟在互补靶序列的3'之后,则切割DNA。CRISPR/Cas系统基于Cas核酸酶的序列和结构分为三种类型(即,I型、II型和III型)。I型和III型中crRNA引导的监测复合物需要多个Cas亚基。研究最多的II型系统包含至少三个组分:RNA引导的Cas9核酸酶、crRNA和反式作用crRNA(tracrRNA)。tracrRNA包含一个双链体形成区。crRNA和tracrRNA形成双链体,所述双链体能够与Cas9核酸酶相互作用,并通过PAM上游crRNA上的间隔子与靶DNA上的原间隔子之间的沃森-克里克碱基配对(Watson-Crick base-pairing)将Cas9/crRNA:tracrRNA复合物引导到靶DNA上的特定位点。Cas9核酸酶切割由crRNA间隔子定义的区内的双链断裂。NHEJ的修复导致插入和/或缺失,这破坏了靶向基因座的表达。可替代地,可以通过同源定向修复在DSB的位点处引入具有同源侧接序列的转基因。crRNA和tracrRNA可以被工程化为单个向导RNA(sgRNA或gRNA)(参见例如,Jinek等人,《科学》337:816-21,2012)。另外,与靶位点互补的向导RNA的区可以被改变或编程以靶向期望的序列(Xie等人,《公共科学图书

馆·综合》9:e100448,2014;美国专利申请公开第US2014/0068797号、美国专利申请公开第US2014/0186843号;美国专利第8,697,359号和PCT公开第W0 2015/071474号;所述美国专利中的每一个通过引用并入)。在某些实施例中,基因敲除包含插入、缺失、突变或其组合,并使用CRISPR/Cas核酸酶系统进行。

[0284] 示例性gRNA序列和使用其敲除编码免疫细胞蛋白的内源性基因的方法包括在Ren等人,《临床癌症研究》23(9):2255-2266(2017)中描述的示例性gRNA序列和方法,所述文献的gRNA、CAS9 DNA、载体和基因敲除技术特此通过引用整体并入。

[0285] 如本文所使用的,也称为“归巢核酸内切酶”的“大范围核酸酶”是指由大识别位点(约12个至约40个碱基对的双链DNA序列)表征的脱氧核糖核酸内切酶。基于序列和结构基序,核酸酶可分为五个家族:LAGLIDADG、GIY-YIG、HNH、His-Cys盒和PD-(D/E)XK。示例性大范围核酸酶包括I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII,其识别序列是已知的(参见例如,美国专利第5,420,032号和第6,833,252号;Belfort等人,《核酸研究》25:3379-3388,1997;Dujon等人,《基因(Gene)》82:115-118,1989;Perler等人,《核酸研究》22:1125-1127,1994;Jasin,《遗传学趋势(Trends Genet.)》12:224-228,1996;Gimble等人,《分子生物学杂志》263:163-180,1996;Argast等人,《分子生物学杂志》280:345-353,1998)。

[0286] 在某些实施例中,天然存在的大范围核酸酶可用于促进选自PD-1、LAG3、TIM3、CTLA4、TIGIT、FasL、编码HLA的基因或编码TCR组分的基因的靶标的位点特异性基因组修饰。在其它实施例中,对靶基因具有新结合特异性的经工程化的大范围核酸酶用于位点特异性基因组修饰(参见例如,Porteus等人,《自然生物技术》23:967-73,2005;Sussman等人,《分子生物学杂志》342:31-41,2004;Epinat等人,《核酸研究》31:2952-62,2003;Chevalier等人,《分子细胞(Molec.Cell)》10:895-905,2002;Ashworth等人,《自然(Nature)》441:656-659,2006;Paques等人,《当代基因疗法(Curr.Gene Ther.)》7:49-66,2007;美国专利公开第US2007/0117128号;第US2006/0206949号;第US2006/0153826号;第US2006/0078552号;以及第US 2004/0002092号)。在另外的实施例中,使用归巢核酸内切酶产生染色体基因敲除,所述归巢核酸内切酶已被TALEN的模块化DNA结合结构域修饰,以制备称为megaTAL的融合蛋白。megaTAL不仅可用于敲除一个或多个靶基因,而且当与编码所关注的多肽的外源性供体模板结合使用时,还可用于引入(敲入)异源性或外源性多核苷酸。

[0287] 在某些实施例中,染色体基因敲除包含引入到宿主细胞(例如,免疫细胞)中的抑制性核酸分子,所述宿主细胞包含编码与肿瘤相关抗原特异性结合的抗原特异性受体的异源性多核苷酸,其中所述抑制性核酸分子编码靶特异性抑制剂,并且其中经编码的靶特异性抑制剂抑制宿主细胞中的(例如,PD-1、TIM3、LAG3、CTLA4、TIGIT、FasL、HLA组分或TCR组分,或其任何组合的)内源性基因表达。

[0288] 在某些实施例中,基因敲除包含插入、缺失、突变或其组合,并使用CRISPR/Cas核酸酶系统或碱基编辑系统进行(Komor,A.C.;Kim,Y.B.;Packer,M.S.;Zuris,J.A.;Liu,D.R.《自然》533,420-424(2016)。简而言之,碱基编辑是基因组编辑方法,其使用来自CRISPR系统的组分和其它酶一起直接将点突变引入到细胞DNA或RNA中,而不会使双链DNA断裂。某些DNA碱基编辑器包含与核碱基脱氨酶融合的催化失效的核酸酶,并且在一些情况下,包含DNA糖苷酶抑制剂。RNA碱基编辑器的功能类似,使用靶向RNA的组分。碱基编辑器直

接将一个碱基或碱基对转化为另一个碱基或碱基对,使得能够在非分裂细胞中有效地安装点突变,而不会产生过量的不期望的编辑副产物。参见例如,Rees H等人.《自然评论:遗传学(Nature Reviews Genetics)》(2018)。

[0289] 染色体基因敲除可以通过使用敲除程序或药剂后对宿主免疫细胞进行DNA测序来直接确认。染色体基因敲除也可以从敲除后基因表达的缺失(例如,由基因编码的mRNA或多肽产物的缺失)来推断。

[0290] 在某些实施例中,染色体基因敲除包含选自以下的HLA组分基因的敲除: α 1巨球蛋白基因、 α 2巨球蛋白基因、 α 3巨球蛋白基因、 β 1微球蛋白基因或 β 2微球蛋白基因。

[0291] 在某些实施例中,染色体基因敲除包含选自以下的TCR组分基因的敲除:TCR α 可变区基因、TCR β 可变区基因、TCR恒定区基因或其组合。

[0292] 在一些实施例中,与对照细胞的群体(例如,表达对照结合蛋白的细胞,所述对照结合蛋白对相同靶抗原具有特异性)相比,包含本文所公开的结合蛋白的宿主细胞的群体对结合蛋白的靶抗原表现出至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍、至少150倍、至少200倍、至少250倍、至少300倍、至少350倍、至少400倍、至少500倍、至少600倍、至少700倍、至少800倍、至少900倍、至少1000倍或至少5000倍增加的功能亲和力。宿主细胞可以包含结合蛋白(例如,本文所公开的包含V α 和V β 区和/或CDR的TCR),其与靶抗原(例如,KRAS G12突变型肽,如KRAS G12V突变型肽,例如存在于肽:HLA复合物中)结合。亲和力的增加可以是,例如,如通过用于确定暴露于表达或呈递靶抗原的靶细胞时表达激活标志物(例如,CD137、CD69、颗粒酶B、CD107a、IFN- γ 、TNF- α 、IL-12、细胞因子、白介素、干扰素)的测定,和/或用于确定EC50(例如,达到T细胞群体的半最大激活的肽剂量)的测定所确定的。在一些实施例中,宿主细胞和对照细胞都是T细胞,并且宿主细胞群体和对照细胞群体可以包含相同、约相同或基本上相同的组成或数量的T细胞类型(例如,CD4+、CD8+或两者)。

[0293] 在一些实施例中,与对照细胞的群体(例如,表达对照结合蛋白的细胞,所述对照结合蛋白对相同靶抗原具有特异性)相比,包含本文所公开的结合蛋白的宿主细胞的群体表现出至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少15倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少100倍、至少250倍或至少1000倍增加的靶细胞杀伤。例如,靶细胞的杀伤可以是,例如,如通过体外细胞毒性测定所确定的,例如,效应子与靶标比率为约0.5:1、1:1、2:1、3:1、4:1、5:1、6:1、7:1、8:1、9:1、10:1、20:1、25:1、50:1或100:1。在一些实施例中,宿主细胞和对照细胞都是T细胞,并且宿主细胞群体和对照细胞群体可以包含相同、约相同或基本上相同的组成或数量的T细胞类型(例如,CD4+、CD8+或两者)。

[0294] 在一些实施例中,与对照细胞的群体(例如,表达对照结合蛋白的细胞,所述对照结合蛋白对相同靶抗原具有特异性)相比,包含本文所公开的结合蛋白的宿主细胞的群体表现出至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、

至少80%、至少90%、至少2倍、至少3倍、至少4倍、至少5倍、至少6倍、至少7倍、至少8倍、至少9倍、至少10倍、至少11倍、至少12倍、至少13倍、至少14倍、至少15倍、至少20倍、至少30倍、至少40倍、至少50倍、至少60倍、至少70倍、至少80倍、至少90倍、至少100倍、至少150倍、至少200倍、至少250倍、至少300倍、至少350倍、至少400倍、至少500倍、至少600倍、至少700倍、至少800倍、至少900倍、至少1000倍或至少5000倍增加的激活。激活可以是,例如,如通过用于确定暴露于表达或呈递靶抗原的靶细胞时表达激活标志物(例如,CD137、CD69、颗粒酶B、CD107a、IFN- γ 、TNF- α 、IL-12、细胞因子、白介素、干扰素)的测定所确定的。在一些实施例中,宿主细胞和对照细胞都是T细胞,并且宿主细胞群体和对照细胞群体可以包含相同、约相同或基本上相同的组成或数量的T细胞类型(例如,CD4⁺、CD8⁺或两者)。

[0295] 在一些实施例中,包含本文所公开的结合蛋白的宿主细胞的群体对耗竭具有抗性,例如,在体外多次再激发(例如,持续至少50小时、至少100小时、至少150小时、至少200小时或至少250小时,任选地进行一次或多次再激发)时表现出有效肿瘤细胞杀伤,或在体内表现出对肿瘤生长的持续控制。

[0296] 在一些实施例中,与对照细胞的群体相比,包含本文所公开的结合蛋白的宿主细胞的群体对耗竭具有抗性,例如,在体外多次再激发(例如,持续至少50小时、至少100小时、至少150小时、至少200小时或至少250小时,任选地进行一次或多次再激发)时表现出优异的肿瘤细胞杀伤,或在体内表现出对肿瘤生长的优异控制。在一些实施例中,宿主细胞和对照细胞都是T细胞,并且宿主细胞群体和对照细胞群体可以包含相同、约相同或基本上相同的组成或数量的T细胞类型(例如,CD4⁺、CD8⁺或两者)。

[0297] 宿主细胞组合物和单位剂量

[0298] 另一方面,本文提供了包含本公开的经修饰的宿主细胞以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的组合物和单位剂量。

[0299] 在某些实施例中,宿主细胞组合物或单位剂量包含(i)包含至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的经修饰的CD4⁺T细胞的组合物,其与(ii)包含至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的经修饰的CD8⁺T细胞的组合物以约1:1的比率组合,其中所述单位剂量含有减少量的或基本上不含原初T细胞(即,与具有相当数量的PBMC的患者样品相比,单位剂量中存在的原初T细胞的群体少于约50%、少于约40%、少于约30%、少于约20%、少于约10%、少于约5%或少于约1%)。

[0300] 在一些实施例中,宿主细胞组合物或单位剂量包含(i)包含至少约50%的经修饰的CD4⁺T细胞的组合物,其与(ii)包含至少约50%的经修饰的CD8⁺T细胞的组合物以约1:1的比率组合,其中宿主细胞组合物或者单位剂量含有减少量的或基本上不含原初T细胞。在另外的实施例中,宿主细胞组合物或单位剂量包含(i)包含至少约60%的经修饰的CD4⁺T细胞的组合物,其与(ii)包含至少约60%的经修饰的CD8⁺T细胞的组合物以约1:1的比率组合,其中单位剂量含有减少量的或基本上不含原初T细胞。在另外的实施例中,宿主细胞组合物或单位剂量包含(i)包含至少约70%的经工程化的CD4⁺T细胞的组合物,其与(ii)包含至少约70%的经工程化的CD8⁺T细胞的组合物以约1:1的比率组合,其中单位剂量含有减少量的或基本上不含原初T细胞。在一些实施例中,宿主细胞组合物或单位剂量包含(i)包含至

少约80%的经修饰的CD4⁺T细胞的组合物,其与(ii)包含至少约80%的经修饰的CD8⁺T细胞的组合物以约1:1的比率组合,其中宿主细胞组合物或者单位剂量含有减少量的或基本上不含原初T细胞。在一些实施例中,宿主细胞组合物或单位剂量包含(i)包含至少约85%的经修饰的CD4⁺T细胞的组合物,其与(ii)包含至少约85%的经修饰的CD8⁺T细胞的组合物以约1:1的比率组合,其中宿主细胞组合物或者单位剂量含有减少量的或基本上不含原初T细胞。在一些实施例中,宿主细胞组合物或单位剂量包含(i)包含至少约90%的经修饰的CD4⁺T细胞的组合物,其与(ii)包含至少约90%的经修饰的CD8⁺T细胞的组合物以约1:1的比率组合,其中宿主细胞组合物或者单位剂量含有减少量的或基本上不含原初T细胞。

[0301] 在一些实施例中,组合物包含CD4⁺细胞群体,所述细胞群体包含(i)至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的经修饰的CD4⁺T细胞。在一些实施例中,组合物进一步包含CD8⁺细胞群体,所述细胞群体包含(ii)至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的经修饰的CD8⁺T细胞。

[0302] 在一些实施例中,宿主细胞组合物或单位剂量包含约1:1比率、约1:2比率、约1:3比率、约1:4比率、约1:5比率、约1:6比率、约1:7比率、约1:8比率、约1:9比率、约1:10比率、约2:1比率、约3:1比率、约4:1比率、约5:1比率、约6:1比率、约7:1比率、约8:1比率、约9:1比率、约10:1比率、约3:2比率或约2:3比率的CD4⁺与CD8⁺T细胞(例如,经修饰以包含或表达本文所公开的结合蛋白的CD4⁺T细胞与经修饰以包含或表达本文所公开的结合蛋白的CD8⁺T细胞)。

[0303] 在一些实施例中,宿主细胞组合物或单位剂量包含至少1:1、至少1:2、至少1:3、至少1:4、至少1:5、至少1:6、至少1:7、至少1:8、至少1:9、至少1:10、至少2:1、至少3:1、至少4:1、至少5:1、至少6:1、至少7:1、至少8:1、至少9:1、至少10:1、至少3:2或至少2:3比率的CD4⁺与CD8⁺T细胞。

[0304] 在一些实施例中,宿主细胞组合物或单位剂量包含至多1:1、至多1:2、至多1:3、至多1:4、至多1:5、至多1:6、至多1:7、至多1:8、至多1:9、至多1:10、至多2:1、至多3:1、至多4:1、至多5:1、至多6:1、至多7:1、至多8:1、至多9:1、至多10:1、至多3:2或至多2:3比率的CD4⁺与CD8⁺T细胞。

[0305] 在一些实施例中,宿主细胞组合物或单位剂量包含介于以下之间比率的CD4⁺与CD8⁺T细胞:约1:10与10:1、1:10与8:1、1:10与7:1、1:10与6:1、1:10与5:1、1:10与4:1、1:10与3:1、1:10与2:1、1:10与1:1、1:10与1:2、1:10与1:3、1:10与1:4、1:10与1:5、1:10与1:7、1:5与10:1、1:5与8:1、1:5与7:1、1:5与6:1、1:5与5:1、1:5与4:1、1:5与3:1、1:5与2:1、1:5与1:1、1:5与1:2、1:5与1:3、1:5与1:4、1:3与10:1、1:3与8:1、1:3与7:1、1:3与6:1、1:3与5:1、1:3与4:1、1:3与3:1、1:3与2:1、1:3与1:1、1:3与1:2、1:2与10:1、1:2与8:1、1:2与7:1、1:2与6:1、1:2与5:1、1:2与4:1、1:2与3:1、1:2与2:1、1:2与1:1、1:1与10:1、1:1与8:1、1:1与7:1、1:1与6:1、1:1与5:1、1:1与4:1、1:1与3:1、1:1与2:1、2:1与10:1、2:1与8:1、2:1与7:1、2:1与6:1、2:1与5:1、2:1与4:1、2:1与3:1、3:1与10:1、3:1与8:1、3:1与7:1、3:1与6:1、3:1与5:1、3:1与4:1、5:1与10:1、5:1与8:1、5:1与7:1或5:1与6:1。

[0306] 组合物、宿主细胞组合物或单位剂量中的CD4⁺T细胞可以是例如使用本文所公开的载体或多核苷酸修饰或工程化以表达本文所公开的CD8共受体的CD4⁺T细胞。

[0307] 应当理解,本公开的宿主细胞组合物或单位剂量可以包含本文所述的任何宿主细胞,或宿主细胞的任何组合。在某些实施例中,例如,宿主细胞组合物或单位剂量包含经修饰的CD8⁺T细胞、经修饰的CD4⁺T细胞或两者,其中这些T细胞被修饰以编码对Ras肽:HLA-A*11:01复合物具有特异性的结合蛋白。另外或可替代地,本公开的宿主细胞组合物或单位剂量可以包含如本文所述的任何宿主细胞或宿主细胞的组合,并且可以进一步包含经修饰的细胞(例如,免疫细胞,如T细胞),所述经修饰的细胞表达对不同的抗原(例如,不同的Ras抗原,或来自不同蛋白质或靶标的抗原,例如BCMA、CD3、CEACAM6、c-Met、EGFR、EGFRvIII、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EphA2、IGF1R、GD2、O-乙酰基GD2、O-乙酰基GD3、GHRHR、GHR、FLT1、KDR、FLT4、CD44v6、CD151、CA125、CEA、CTLA-4、GITR、BTLA、TGFB2、TGFB1、IL6R、gp130、Lewis A、Lewis Y、TNFR1、TNFR2、PD1、PD-L1、PD-L2、HVEM、MAGE-A(例如,包括MAGE-A1、MAGE-A3和MAGE-A4)、间皮素、NY-ESO-1、PSMA、RANK、ROR1、TNFRSF4、CD40、CD137、TWEAK-R、HLA、与HLA结合的肿瘤或病原体相关肽、与HLA结合的hTERT肽、与HLA结合的酪氨酸酶肽、与HLA结合的WT-1肽、LTβR、LIFRβ、LRP5、MUC1、OSMRβ、TCRα、TCRβ、CD19、CD20、CD22、CD25、CD28、CD30、CD33、CD52、CD56、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD86、CD123、CD171、CD276、B7H4、TLR7、TLR9、PTCH1、WT-1、HA¹-H、Robo1、α-甲胎蛋白(AFP)、卷曲蛋白、OX40、PRAME和SSX-2等)具有特异性的结合蛋白。例如,单位剂量可以包含表达与Ras-HLA复合物特异性结合的蛋白的经修饰的CD8⁺T细胞和表达与PSMA抗原特异性结合的蛋白(例如CAR)的经修饰的CD4⁺T细胞(和/或经修饰的CD8⁺T细胞)。还应理解,本文所公开的宿主细胞中的任何宿主细胞都可以以组合疗法施用。

[0308] 在本文所述的实施例中的任何实施例中,宿主细胞组合物或单位剂量包含相等或大约相等数量的经工程化的CD45RA⁻CD3⁺CD8⁺和经修饰的CD45RA⁻CD3⁺CD4⁺T_M细胞。

[0309] 在本文所述的实施例中的任何实施例中,宿主细胞组合物或单位剂量包含一个或多个经过CD62L阳性选择的细胞的群体(例如,CD4⁺或CD8⁺细胞),例如,以提高体内持久性。

[0310] 宿主细胞可以进行基因工程化,以在离体、体外或体内包含或表达结合蛋白。在一些实施例中,宿主细胞离体经基因工程化以表达结合蛋白。在一些实施例中,宿主细胞在体外经基因工程化以表达结合蛋白。在一些实施例中,宿主细胞在体内经基因工程化以表达结合蛋白。

[0311] 用途

[0312] 在另外的方面,本公开提供了用于治疗或预防受试者的与KRAS G12V或NRAS G12V突变或HRAS G12V突变相关的疾病或病症的复发的方法。此类疾病或病症包括,例如,癌症,如实体癌和血液系统恶性病。在某些示例性实施例中,所述疾病或病症包含胰腺癌(pancreas cancer或pancreas carcinoma),任选地胰腺导管腺癌(PDAC);结直肠癌(colorectal cancer或colorectal carcinoma);结肠癌;结直肠腺癌;肺癌,任选地非小细胞肺癌;胆道癌;子宫内膜癌(endometrial cancer或endometrial carcinoma);宫颈癌;卵巢癌;膀胱癌(bladder cancer);肝癌;髓系白血病,任选地髓系白血病,如急性髓系白血病;骨髓增生异常综合征;淋巴瘤,如非霍奇金氏淋巴瘤(Non-Hodgkin lymphoma);慢性粒单核细胞白血病;急性淋巴细胞白血病(ALL);尿道癌;小肠癌;乳腺癌(breast cancer或breast carcinoma);黑色素瘤(任选地皮肤黑色素瘤、肛门黑色素瘤或粘膜黑色素瘤);神经胶质瘤;低分化甲状腺癌;神经母细胞瘤;组织细胞和树突状细胞赘生物;1型神经纤维瘤

病;横纹肌肉瘤;软组织肉瘤;膀胱癌(bladder carcinoma);肉瘤;胶质母细胞瘤;鳞状细胞肺癌;间变性星形细胞瘤;慢性髓系白血病;弥漫性大B细胞淋巴瘤;双重打击淋巴瘤;头颈癌;头颈鳞状细胞癌;肝细胞癌;恶性周围神经鞘瘤;套细胞淋巴瘤;骨髓增生异常/骨髓增殖性赘生物,不可分类;外周T细胞淋巴瘤;前列腺癌;难治性贫血伴原始细胞增多-2;肾细胞癌;横纹肌样瘤;神经鞘瘤;继发性AML;小细胞肺癌;疗法相关的AML;胸腺癌;甲状腺滤泡癌;甲状腺恶性赘生物;甲状腺癌;甲状腺腺癌;尿路上皮癌或甲状腺乳头状癌。可以通过本文所公开的组合物或方法治疗的疾病或病症包括本文所公开的晚期或转移形式的癌症。

[0313] “治疗(treat)”或“治疗(treatment)”或“改善(ameliorate)”是指对受试者(例如,人或非人哺乳动物,如灵长类动物、马、猫、狗、山羊、小鼠或大鼠)的疾病、病症或病状的医学管理。一般来说,包含本公开的组合物(例如,包含结合蛋白、多核苷酸、载体、宿主细胞、宿主细胞组合物、单位剂量和/或免疫原性多肽)的适当剂量或治疗方案以足以引发治疗或预防益处的量施用。治疗或防治/预防益处包括改善的临床结果;减轻或缓解与疾病相关的症状;减少症状的发生;提高生活质量;更长的无病状态;减轻疾病的程度,稳定疾病状态;延缓疾病进展;缓解;存活;延长存活期;或其任何组合。

[0314] 如本文所使用的,“治疗有效量”或“有效量”是指足以产生治疗效果的组合物的量,所述治疗效果包括:改善的临床结果;减轻或缓解与疾病相关的症状;减少症状的发生;提高生活质量;更长的无病状态;减轻疾病的程度;稳定疾病状态;延缓疾病进展;缓解;存活;或以统计显著方式延长存活期。当提及单独施用的单独的活性成分或表达单个活性成分的细胞时,治疗有效量是指所述成分或单独表达所述成分的细胞的效果。当提及组合时,治疗有效量是指活性成分或组合的辅助活性成分与表达产生治疗效果的活性成分的细胞的组合量,无论连续还是同时施用。组合也可以是表达多于一种活性成分的细胞。

[0315] 术语“药学上可接受的赋形剂或载剂”或“生理学上可接受的赋形剂或载剂”是指生物相容的媒剂,例如本文将更详细地进行描述的生理盐水,所述媒剂适用施用于人或其它非人哺乳动物受试者,并且通常被认为是安全的或不会引起严重不良事件。

[0316] 如本文所使用的,“统计显著的”是指使用斯图登氏t检验(Students t-test)或其它适当的统计检验计算时p值为0.050或更低,并且表示所测量的特定事件或结果不太可能偶然出现。

[0317] 一般来说,可以通过本发明治疗的受试者为人和其它灵长类动物受试者,如用于兽医学目的的猴和猿。在前述实施例中的任何实施例中,受试者可以是人受试者。受试者可以是男性或女性,并且可以处于任何合适的年龄,包括婴儿、少年、青少年、成人和老年受试者。受试者可以是哺乳动物。如医学领域的技术人员所确定的,根据本公开的药物组合物可以以适于待治疗的疾病、病状或病症的方式施用。在上述实施例中的任何实施例中,如本文所述的经修饰的宿主细胞、宿主细胞组合物或单位剂量通过静脉内、腹膜内、肿瘤内、骨髓内、淋巴结内或脑脊液内施用,以便遇到靶细胞(例如,白血病细胞)。组合物的适当剂量、合适持续时间和施用频率将由如患者的病状;疾病、病状或病症的大小、类型和严重程度;活性成分的特定形式;以及施用的方法等因素确定。

[0318] 如本文所使用的,术语“过继性免疫疗法(adoptive immune therapy)”或“过继性免疫疗法(adoptive immunotherapy)”是指施用天然存在的或经基因工程化的疾病或抗原特异性免疫细胞(例如,T细胞)。过继性细胞免疫疗法可以是自体的(免疫细胞来自接受

者)、同种异体的(免疫细胞来自与接受者不同的相同物种的供体)或同基因的(免疫细胞来自与接受者基因相同或基本上基因相同的供体,例如单卵双胞胎)。

[0319] 在一些实施例中,受试者(例如,受试者中的至少一个细胞)表达Ras抗原,所述抗原包含SEQ ID NO:2-3中的任一个中所示的氨基酸序列或由其组成。

[0320] 在一些实施例中,受试者是HLA-A*11⁺(例如,HLA-A*11:01⁺)。

[0321] 在某些实施例中,方法包含在根据本公开施用疗法之前,确定受试者的一种或多种HLA类型和/或鉴定Ras抗原的存在。在一些实施例中,例如,在施用疗法之前,已经确定了受试者的一种或多种HLA类型和/或Ras抗原(例如,G12V突变)的存在,并且至少部分地基于HLA类型和/或Ras抗原的存在来施用疗法。在一些实施例中,方法进一步包含在施用前对受试者的肿瘤进行KRAS G12等位基因的基因分型。在一些情况下,在施用前确定受试者携带KRAS G12V等位基因。

[0322] HLA等位基因的表达可以通过例如基因测序(例如,高通量下一代测序(NGS))来确定。HLA表达的这种基因决定在本文中称为“HLA分型”,并且可以在获得HLA分型许可的临床实验室中通过分子方法进行确定。在一些实施例中,使用PCR扩增进行HLA分型,随后进行高通量NGS和随后的HLA决定。在此,可以在主要的HLA基因座(例如,HLA-A、HLA-B、HLA-C等)处确定HLA单倍型。

[0323] HLA分型可以使用任何已知的方法进行,包括例如蛋白质或核酸检测。核酸检测的实例包括基于序列的分型(SBT)和使用序列特异性寡核苷酸探针(SSOP)或序列特异性引物(SSP)。在某些实施例中,使用PCR扩增进行HLA分型,随后进行高通量下一代测序(NGS)和随后的HLA决定。在一些实施例中,使用可通过Scisco Genetics获得的系统(sciscogenetics.com/pages/technology.html,其内容通过引用整体并入本文)进行序列分型。用于HLA分型的其它方法包括,例如,Mayor等人《公共科学图书馆·综合》10(5):e0127153(2015)中公开的方法,所述方法和试剂通过引用并入本文。

[0324] 在特定实施例中,方法包含当受试者表达HLA-A*11:01时,施用包含经修饰的CD8⁺和/或经修饰的CD4⁺T细胞的组合物,所述细胞包含编码如本文提供的第二结合蛋白的异源性多核苷酸。

[0325] 在宿主细胞组合物或单位剂量的情况下,其中的细胞的量为至少一个细胞(例如,一个经修饰的CD8⁺T细胞亚群(例如,任选地包含记忆和/或原初CD8⁺T细胞);一个经修饰的CD4⁺T细胞亚群(例如,任选地包含记忆和/或原初CD4⁺T细胞))或更典型地大于10²个细胞,例如,至多10⁴个、至多10⁵个、至多10⁶个、至多10⁷个、至多10⁸个、至多10⁹个或超过10¹⁰个细胞。在某些实施例中,以约10⁴个至约10¹⁰个细胞/m²的范围,优选地约10⁵个至约10⁹个细胞/m²的范围施用细胞。在一些实施例中,施用的剂量包含至多约3.3x10⁵个细胞/kg。在一些实施例中,施用的剂量包含至多约1x10⁶个细胞/kg。在一些实施例中,施用的剂量包含至多约3.3x10⁶个细胞/kg。在一些实施例中,施用的剂量包含至多约1x10⁷个细胞/kg。在某些实施例中,以包含至多约5x10⁴个细胞/kg、5x10⁵个细胞/kg、5x10⁶个细胞/kg或至多约5x10⁷细胞/kg的剂量向受试者施用经修饰的免疫细胞。在某些实施例中,以包含至少约5x10⁴个细胞/kg、5x10⁵个细胞/kg、5x10⁶个细胞/kg或至多约5x10⁷细胞/kg的剂量向受试者施用经修饰的免疫细胞。细胞的数量将取决于组合物期望的最终用途,以及其中包括的细胞的类型。例如,经修饰以含有结合蛋白的细胞可以包含含有至少30%、至少35%、至少40%、至少

45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或更多此类细胞的细胞群体。对于本文提供的用途,细胞的体积通常为一升或更少、500ml或更少、250ml或更少或100ml或更少。在一些实施例中,所期望细胞的密度通常大于 10^4 个细胞/ml,并且通常大于 10^7 个细胞/ml,通常 10^8 个细胞/ml或更大。细胞可以在一段时间内作为单次输注或以多次输注施用。临床相关数量的免疫细胞可以分配到累积等于或超过 10^6 个、 10^7 个、 10^8 个、 10^9 个、 10^{10} 个或 10^{11} 个细胞的多次输注中。在某些实施例中,单位剂量的经修饰的免疫细胞可以与来自同种异体供体的造血干细胞共同施用(例如,同时或同期)。在一些实施例中,单位剂量中包含的经修饰的免疫细胞中的一个或多个经修饰的免疫细胞对于受试者是自体的。

[0326] 在一些实施例中,单位剂量包含以下、基本上由以下组成或由以下组成,或者多个单位剂量包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:至少 5×10^7 、至少 1×10^8 、至少 5×10^8 、至少 1×10^9 、至少 2.5×10^9 、至少 5×10^9 、至少 1×10^{10} 、至少 1.5×10^{10} 、至少 2×10^{10} 、至少 3×10^{10} 、至少 5×10^{10} 或至少 1×10^{11} 个例如编码、包含或表达如本文所公开的结合蛋白的活宿主细胞。

[0327] 在一些实施例中,单位剂量包含以下、基本上由以下组成或由以下组成,或者多个单位剂量包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:至多 1×10^8 、至多 5×10^9 、至多 1×10^{10} 、至多 1.5×10^{10} 、至多 2×10^{10} 、至多 2.5×10^{10} 、至多 3×10^{10} 、至多 4×10^{10} 、至多 5×10^{10} 、至多 1×10^{11} 、至多 5×10^{11} 或至多 2×10^{12} 个例如编码、包含或表达如本文所公开的结合蛋白的活宿主细胞。

[0328] 在一些实施例中,单位剂量包含以下、基本上由以下组成或由以下组成,或者多个单位剂量包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:约 1×10^8 、约 5×10^8 、约 1×10^9 、约 2×10^9 、约 3×10^9 、约 4×10^9 、约 5×10^9 、约 6×10^9 、约 7×10^9 、约 8×10^9 、约 9×10^9 、约 1×10^{10} 、约 1.1×10^{10} 、约 1.2×10^{10} 、约 1.3×10^{10} 、约 1.4×10^{10} 、约 1.5×10^{10} 、约 1.6×10^{10} 、约 1.7×10^{10} 、约 1.8×10^{10} 、约 1.9×10^{10} 、约 2×10^{10} 、约 3×10^{10} 、约 4×10^{10} 、约 5×10^{10} 、约 7.5×10^{10} 、约 10×10^{10} 或约 1×10^{11} 个例如编码、包含或表达如本文所公开的结合蛋白的活宿主细胞。

[0329] 在一些实施例中,单位剂量包含以下、基本上由以下组成或由以下组成,或者多个单位剂量包含以下、基本上由以下组成或由以下组成:约 1×10^8 至约 1×10^{11} 、约 1×10^8 至约 5×10^{10} 、约 1×10^8 至约 2×10^{10} 、约 1×10^8 至约 1.5×10^{10} 、约 1×10^8 至约 1×10^{10} 、约 1×10^8 至约 5×10^9 、约 1×10^9 至约 1×10^{11} 、约 1×10^9 至约 5×10^{10} 、约 1×10^9 至约 2×10^{10} 、约 1×10^9 至约 1.5×10^{10} 、约 1×10^9 至约 1×10^{10} 、约 1×10^9 至约 5×10^9 、约 5×10^9 至约 1×10^{11} 、约 5×10^9 至约 5×10^{10} 、约 5×10^9 至约 2×10^{10} 、约 5×10^9 至约 1.5×10^{10} 、约 5×10^9 至约 1×10^{10} 、约 1×10^{10} 至约 1×10^{11} 、约 1×10^{10} 至约 5×10^{10} 、约 1×10^{10} 至约 2×10^{10} 、约 1×10^{10} 至约 1.5×10^{10} 、约 1.5×10^{10} 至约 1×10^{11} 、约 1.5×10^{10} 至约 5×10^{10} 或约 1.5×10^{10} 至约 2×10^{10} 个例如编码、包含或表达如本文所公开的结合蛋白的活宿主细胞。

[0330] 在一些实施例中,接受经修饰的免疫细胞的受试者先前已经接受了淋巴细胞清除化疗。在另外的实施例中,淋巴细胞清除化疗包含环磷酰胺、氟达拉滨(fludarabine)、抗胸腺细胞球蛋白或其组合。

[0331] 在一些实施例中,方法进一步包含向受试者施用如本文所公开的免疫检查点分子

的抑制剂。

[0332] 还设想了包含如本文所公开的组合物(结合蛋白、多核苷酸、载体、宿主细胞、宿主细胞组合物、单位剂量和/或免疫原性多肽)以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂的药物组合物(即,组合物)。合适的赋形剂包括水、盐水、右旋糖、甘油等及其组合。在实施例中,如本文所公开的包含融合蛋白或宿主细胞的组合物进一步包含合适的输注介质。合适的输注介质可以是任何等渗培养基调配物,通常是生理盐水、Normosol R(雅培公司(Abbott))或Plasma-Lyte A(巴克斯特公司(Baxter)),可以使用5%的右旋糖水溶液、林格氏乳酸盐(Ringer's lactate)。输注介质可以补充有人血清白蛋白或其它人血清组分。

[0333] 如医学领域的技术人员所确定的,药物组合物可以以适于待治疗(或预防)的疾病或病状的方式施用。组合物的合适的剂量和合适的施用持续时间和频率将由如患者的健康状况、患者的体型(即,重量、质量或身体面积)、患者的病状的类型和严重程度、活性成分的特定形式和施用方法等因素确定。通常,合适的剂量和治疗方案以足以提供治疗和/或预防益处(如本文所描述的,包括临床结果改善,如完全或部分缓解更加频繁、或无病和/或整体生存期更长或症状严重程度减轻)的量提供组合物。

[0334] 如本文所述,药物组合物的有效量是指在所需的剂量下和所需的时间段内足以实现期望的临床结果或有益治疗的量。有效量可以以一次或多次施用进行递送。如果施用是针对已知或已确认患有疾病或疾病状态的受试者,则术语“治疗量”可用于指代治疗,而“预防有效量”可用于描述将有效量作为预防过程施用于易患或有患疾病或疾病状态(例如,复发)风险的受试者。

[0335] 本文所述的药物组合物可以存在于单位剂量或多剂量容器中,如密封的安瓿或小瓶。此类容器可以冷冻以保持调配物的稳定性,直到输注到患者体内为止。剂量将会变化,但是用于施用如本文所述的经修饰的免疫细胞的优选剂量为约 10^4 个细胞/ m^2 、约 5×10^4 个细胞/ m^2 、约 10^5 个细胞/ m^2 、约 5×10^5 个细胞/ m^2 、约 10^6 个细胞/ m^2 、约 5×10^6 个细胞/ m^2 、约 10^7 个细胞/ m^2 、约 5×10^7 个细胞/ m^2 、约 10^8 个细胞/ m^2 、约 5×10^8 个细胞/ m^2 、约 10^9 个细胞/ m^2 、约 5×10^9 个细胞/ m^2 、约 10^{10} 个细胞/ m^2 、约 5×10^{10} 个细胞/ m^2 或约 10^{11} 个细胞/ m^2 。在某些实施例中,单位剂量包含约 10^4 个细胞/ m^2 至约 10^{11} 个细胞/ m^2 的剂量的如本文所述的经修饰的免疫细胞。开发合适的给药和治疗方案,用于在各种治疗方案中使用本文所述的特定组合物,包括例如肠胃外或静脉内施用或调配物。

[0336] 如果主题组合物是肠胃外施用的,则组合物还可以包括无菌水溶液或油性溶液或悬浮液。合适的无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂包括水、林格氏溶液、等渗盐溶液、1,3-丁二醇、乙醇、丙二醇或聚乙二醇与水的混合物。水溶液或悬浮液可以进一步包含一种或多种缓冲剂,如乙酸钠、柠檬酸钠、硼酸钠或酒石酸钠。当然,在制备任何剂量单位调配物中所使用的任何材料都应当是药学上纯的并且在所用量方面基本上无毒。另外,活性化合物可以掺入缓释制剂和调配物中。如本文所使用的,剂量单位形式是指适合作为待治疗的受试者的单一剂量(unitary dosage)的物理分离单位;各单位可以含有预定量的经工程化的免疫细胞或活性化合物(其经计算以与适当的药物载剂联合产生期望的效果)。

[0337] 一般来说,适当的剂量和治疗方案以足以提供益处的量提供活性分子或细胞。与未经治疗的受试者相比,可以通过建立经治疗的受试者的改善的临床结果(例如,更频繁的缓解、完全或部分或更长的无病存活期)来监测此类应答。对肿瘤蛋白的预先存在的免疫应

答的增加通常与改善的临床结果相关联。此类免疫应答通常可以使用常规的标准增殖、细胞毒性或细胞因子测定来评估。

[0338] 对于防治用途,剂量应足以预防与疾病或病症相关的疾病、延迟其发作或减轻其严重程度。根据本文所描述的方法施用的免疫原性组合物的预防益处可以通过进行临床前(包括体外和体内动物研究)和临床研究并分析通过适当的统计学、生物学和临床方法和技术获得的数据来确定,所有这些都可以由本领域技术人员容易地实践。

[0339] 如本文所使用的,组合物的施用是指将其递送至受试者,而不管递送途径或方式如何。施用可以连续或间歇进行,以及肠胃外进行。组合物可以局部(例如,肿瘤内)或全身(例如,静脉内)施用。施用可以用于治疗已确认患有公认病状、疾病或疾病状态的受试者,或用于治疗易患或有患此类病状、疾病或疾病状态的风险的受试者。与辅助疗法的共同施用可以包括以任何顺序和任何给药时间表同时和/或依次递送多种药剂(例如,具有一种或多种细胞因子的经修饰的免疫细胞;免疫抑制疗法,如钙调神经磷酸酶抑制剂、皮质类固醇、微管抑制剂、低剂量的霉酚酸前药,或其任何组合)。

[0340] 在某些实施例中,向受试者施用多个剂量的本文所述的组合物,所述组合物可以以约两周至约四周的施用间隔施用。

[0341] 本公开的治疗或预防方法可以作为治疗过程或方案的一部分施用于受试者,其可以包含在施用本文公开的单位剂量、细胞或组合物之前或之后的另外的治疗。例如,在某些实施例中,接受单位剂量的经修饰的免疫细胞的受试者正在接受或先前已接受过造血细胞移植(HCT;包括骨髓性和非骨髓性HCT)。用于进行HCT的技术和方案是本领域中已知的,并且可以包含任何合适的供体细胞的移植,如源自脐带血、骨髓或外周血的细胞、造血干细胞、经动员的干细胞或来自羊水的细胞。因此,在某些实施例中,本公开的经修饰的免疫细胞可以在经修饰的HCT疗法中与造血干细胞一起或在造血干细胞之后不久施用。在一些实施例中,HCT包含供体造血细胞,所述供体造血细胞包含编码HLA组分的基因的染色体敲除,编码TCR组分的基因染色体敲除,或两者。

[0342] 在另外的实施例中,受试者在接受组合物或HCT之前已接受过淋巴细胞清除化疗。在某些实施例中,淋巴细胞清除化疗包含包括环磷酰胺、氟达拉滨、抗胸腺细胞球蛋白或其组合的调节方案。

[0343] 根据本公开的方法可以进一步包括在组合疗法中施用一种或多种另外的药剂以治疗疾病或病症。例如,在某些实施例中,组合疗法包含将本公开的组合物与免疫检查点抑制剂一起(同时、同期或依次)施用。在一些实施例中,组合疗法包含将本公开的组合物与刺激性免疫检查点药剂的激动剂一起施用。在另外的实施例中,组合疗法包含将本公开的组合物与次级疗法,如化疗剂、放射疗法、外科手术、抗体或其任何组合一起施用。

[0344] 如本文所使用的,术语“免疫抑制药剂(immune suppression agent)”或“免疫抑制药剂(immunosuppression agent)”是指提供抑制性信号以帮助控制或抑制免疫应答的一种或多种细胞、蛋白质、分子、化合物或复合物。例如,免疫抑制药剂包括部分或完全阻断免疫刺激;减少、预防或延缓免疫激活;或增加、激活或上调免疫抑制的分子。用于靶向(例如,用免疫检查点抑制剂)的示例性免疫抑制药剂包括PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、CTLA4、B7-H3、B7-H4、CD244/2B4、HVEM、BTLA、CD160、TIM3、GAL9、KIR、PVR1G (CD112R)、PVRL2、腺苷、A2aR、免疫抑制细胞因子(例如,IL-10、IL-4、IL-1RA、IL-35)、IDO、精氨酸酶、VISTA、TIGIT、

LAIR1、CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5、Treg细胞或其任何组合。

[0345] 免疫抑制药剂抑制剂(也称为免疫检查点抑制剂)可以是化合物、抗体、抗体片段或融合多肽(例如, Fc融合, 如CTLA4-Fc或LAG3-Fc)、反义分子、核酶或RNAi分子, 或低分子量有机分子。在本文所公开的实施例中的任何实施例中, 方法可以包含单独或以任何组合的本公开的组合物与以下免疫抑制组分中任何一种免疫抑制组分的一种或多种抑制剂。

[0346] 在某些实施例中, 本公开的组合物与PD-1抑制剂组合使用, 例如PD-1特异性抗体或其结合片段, 如匹地利珠单抗(pidilizumab)、纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)、MEDI0680(以前被称为AMP-514)、AMP-224、BMS-936558或其任何组合。在另外的实施例中, 本公开的组合物与PD-L1特异性抗体或其结合片段组合使用, 如BMS-936559、度伐单抗(durvalumab)(MEDI4736)、阿特珠单抗(atezolizumab)(RG7446)、阿维鲁单抗(avelumab)(MSB0010718C)、MPDL3280A或其任何组合。还设想了西米普利单抗(cemiplimab); IBI-308; 纳武单抗+瑞拉利单抗(relatlimab); BCD-100; 卡瑞利珠单抗(camrelizumab); JS-001; 斯巴达珠单抗(spartalizumab); 替雷利珠单抗(tislelizumab); AGEN-2034; BGBA-333+替雷利珠单抗; CBT-501; 多塔利单抗(dostarlimab); 度伐单抗+MEDI-0680; JNJ-3283; 盐酸帕唑帕尼+派姆单抗; 匹地利珠单抗; REGN-1979+西米普利单抗; ABBV-181; ADUS-100+斯巴达珠单抗; AK-104; AK-105; AMP-224; BAT-1306; BI-754091; CC-90006; 西米普利单抗+REGN-3767; CS-1003; GLS-010; LZM-009; MEDI-5752; MGD-013; PF-06801591; Sym-021; 替雷利珠单抗+帕米帕利(pamiparib); XmAb-20717; AK-112; ALPN-202; AM-0001; 拮抗阿尔茨海默氏病(Alzheimer's disease)的PD-1的抗体; BH-2922; BH-2941; BH-2950; BH-2954; 拮抗实体瘤的CTLA-4和PD-1的生物制剂; 针对肿瘤学靶向PD-1和LAG-3的双特异性单克隆抗体; BLSM-101; CB-201; CB-213; CBT-103; CBT-107; 细胞免疫疗法+PD-1抑制剂; CX-188; HAB-21; HEISCOIII-003; IKT-202; JTX-4014; MCLA-134; MD-402; mDX-400; MGD-019; 针对肿瘤学拮抗PDCD1的单克隆抗体; 针对肿瘤学拮抗PD-1的单克隆抗体; 针对肿瘤学抑制PD-1的溶瘤病毒; OT-2; PD-1拮抗剂+罗培干扰素 α -2b(ropeginterferon alfa-2b); PEGMP-7; PRS-332; RXI-762; STIA-1110; TSR-075; 针对肿瘤学靶向HER2和PD-1的疫苗; 针对肿瘤学和自身免疫性病症靶向PD-1的疫苗; XmAb-23104; 针对肿瘤学抑制PD-1的反义寡核苷酸; AT-16201; 针对肿瘤学抑制PD-1的双特异性单克隆抗体; IMM-1802; 针对实体瘤和血液肿瘤拮抗PD-1和CTLA-4的单克隆抗体; 纳武单抗生物仿制药; 针对肿瘤学激动CD278和CD28并拮抗PD-1的重组蛋白; 针对自身免疫性病症和炎性病症激动PD-1的重组蛋白; SNA-01; SSI-361; YBL-006; AK-103; JY-034; AUR-012; BGB-108; 针对实体瘤抑制PD-1、Gal-9和TIM-3的药物; ENUM-244C8; ENUM-388D4; MEDI-0680; 针对转移性黑色素瘤和转移性肺癌拮抗PD-1的单克隆抗体; 针对肿瘤学抑制PD-1的单克隆抗体; 针对肿瘤学靶向CTLA-4和PD-1的单克隆抗体; 针对NSCLC拮抗PD-1的单克隆抗体; 针对肿瘤学抑制PD-1和TIM-3的单克隆抗体; 针对肿瘤学抑制PD-1的单克隆抗体; 针对血液系统恶性病和实体瘤抑制PD-1和VEGF-A的重组蛋白; 针对肿瘤学拮抗PD-1的小分子; Sym-016; 伊纳利珠单抗(inebilizumab)+MEDI-0680; 针对转移性黑色素瘤靶向PDL-1和IDO的疫苗; 针对胶质母细胞瘤的抗PD-1单克隆抗体加细胞免疫疗法; 针对肿瘤学拮抗PD-1的抗体; 针对血液系统恶性病和细菌感染抑制PD-1/PD-L1的单克隆抗体; 针对HIV抑制PD-1的单克隆抗体; 或针对实体瘤抑制PD-1的小分子。

[0347] 在某些实施例中,本公开的本公开的组合物与LAG3抑制剂,如LAG525、IMP321、IMP701、9H12、BMS-986016或其任何组合组合使用。

[0348] 在某些实施例中,本公开的组合物与CTLA4的抑制剂组合使用。在特定实施例中,本公开的组合物与CTLA4特异性抗体或其结合片段组合使用,如伊匹单抗(ipilimumab)、曲美木单抗(tremelimumab)、CTLA4-Ig融合蛋白(例如,阿巴西普(abatacept)、贝拉西普(belatacept))或其任何组合。

[0349] 在某些实施例中,本公开的组合物与B7-H3特异性抗体或其结合片段组合使用,如依诺珠单抗(enoblituzumab) (MGA271)、376.96或两者。B7-H4抗体结合片段可以是scFv或其融合蛋白,如例如Dangaj等人,《癌症研究》73:4820,2013所述,以及美国专利第9,574,000号和PCT专利公开第W0/201640724A1号和第W0 2013/025779A1号中描述的抗体结合片段。

[0350] 在某些实施例中,本公开的组合物与CD244的抑制剂组合使用。

[0351] 在某些实施例中,本公开的组合物与BLTA、HVEM、CD160或其任何组合的抑制剂组合使用。例如PCT公开第W0 2010/084158号中描述了抗CD-160抗体。

[0352] 在某些实施例中,本公开细胞的组合物与TIM3的抑制剂组合使用。

[0353] 在某些实施例中,本公开的组合物与Gal9的抑制剂组合使用。

[0354] 在某些实施例中,本公开的组合物与腺苷信号传导的抑制剂(如诱饵腺苷受体)组合使用。

[0355] 在某些实施例中,本公开的组合物与A2aR的抑制剂组合使用。

[0356] 在某些实施例中,本公开的组合物与KIR抑制剂,如利鲁单抗(lirilumab) (BMS-986015)组合使用。

[0357] 在某些实施例中,本公开的组合物与抑制性细胞因子(通常是除TGF β 以外的细胞因子)或Treg发育或活性的抑制剂组合使用。

[0358] 在某些实施例中,本公开的组合物与IDO抑制剂组合使用,如左旋-1-甲基色氨酸、艾卡噪司他(epacadostat) (INCB024360;Liu等人,《血液》115:3520-30,2010)、依布硒啉(ebselen) (Terentis等人,《生物化学》49:591-600,2010)、吲哚莫德(indoximod)、NLG919 (Mautino等人,美国癌症研究协会2013年第104届年会(American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2013);2013年4月6日-10日)、1-甲基-色氨酸(1-MT)-替拉扎明或其任何组合。

[0359] 在某些实施例中,本公开的组合物与精氨酸酶抑制剂组合使用,如N(ω)-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)、N- ω -羟基-nor-1-精氨酸(nor-NOHA)、L-NOHA、2(S)-氨基-6-二羟硼基己酸(ABH)、S-(2-二羟硼基乙基)-L-半胱氨酸(BEC)或其任何组合。

[0360] 在某些实施例中,本公开的组合物与VISTA的抑制剂组合使用,如CA-170(马萨诸塞州列克星敦市居里公司(Curis, Lexington, Mass.))。

[0361] 在某些实施例中,本公开的组合物与TIGIT的抑制剂(例如,COM902(加拿大安大略多伦多Compugen公司(Compugen, Toronto, Ontario Canada))、CD155的抑制剂(例如,COM701(Compugen公司))或两者组合使用。

[0362] 在某些实施例中,本公开的组合物与PVRIG、PVRL2或两者的抑制剂组合使用。例如PCT公开第W0 2016/134333号中描述了抗PVRIG抗体。例如PCT公开第W0 2017/021526号中

描述了抗PVRL2抗体。

[0363] 在某些实施例中,本公开的组合物与LAIR1抑制剂组合使用。

[0364] 在某些实施例中,本公开的组合物与CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5或其任何组合的抑制剂组合使用。

[0365] 在某些实施例中,本公开的组合物与增加刺激性免疫检查点分子的活性的药剂(即,激动剂)组合使用。例如,本公开的组合物可以与CD137 (4-1BB) 激动剂(例如乌瑞芦单抗(urelumab))、CD134 (OX-40) 激动剂(例如MEDI6469、MEDI6383或MEDI0562)、来那度胺(lenalidomide)、泊马度胺(pomalidomide)、CD27激动剂(例如CDX-1127)、CD28激动剂(例如TGN1412、CD80或CD86)、CD40激动剂(例如,CP-870,893、rhuCD40L或SGN-40)、CD122激动剂(例如,IL-2)、GITR激动剂(例如,PCT专利公开第WO 2016/054638号中描述的人源化单克隆抗体)、ICOS (CD278) 激动剂(例如,GSK3359609、mAb 88.2、JTX-2011、Icos 145-1、Icos 314-8或其任何组合)组合使用。在本文所公开的实施例中的任何实施例中,方法可以包含单独或以任何组合施用本公开的组合物与刺激性免疫检查点分子的一种或多种激动剂,包括上述中的任何一种。

[0366] 在某些实施例中,组合疗法包含本公开的组合物和次级疗法,所述次级疗法包含以下中的一种或多种:对由非炎性实体瘤表达的癌症抗原具有特异性的抗体或其抗原结合片段、放射治疗、外科手术、化疗剂、细胞因子、RNAi或其任何组合。

[0367] 在某些实施例中,组合疗法方法包含施用本公开的组合物,并且进一步施用放射治疗或外科手术。放射疗法是本领域所熟知的,并且包括X射线疗法,如 γ 辐照和放射性药物疗法。适用于治疗受试者的给定癌症的外科手术和外科手术技术是本领域普通技术人员所熟知的。

[0368] 在某些实施例中,组合疗法方法包含施用本公开的组合物,并且进一步施用化疗剂。化疗剂包括但不限于染色质功能抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、微管抑制药物、DNA损伤剂、抗代谢物(如叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和糖修饰的类似物)、DNA合成抑制剂、DNA相互作用剂(如嵌入剂)和DNA修复抑制剂。说明性化疗剂包括但不限于以下组:抗代谢物/抗癌剂,如嘧啶类似物(5-氟尿嘧啶、氟尿苷、卡培他滨(capecitabine)、吉西他滨(gemcitabine)和阿糖胞苷(cytarabine))和嘌呤类似物、叶酸拮抗剂和相关抑制剂(巯基嘌呤、硫代鸟嘌呤、喷司他丁(pentostatin)和2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨(cladribine))) ;抗增殖/抗有丝分裂剂,包括天然产物,如长春花生物碱(长春碱、长春新碱和长春瑞滨)、微管干扰剂,如紫杉烷类(紫杉醇、多西他赛(docetaxel))、长春新碱、长春花碱、诺考达唑(nocodazole)、埃博霉素(epothilone)和诺维本(navelbine)、表鬼臼毒素(epidipodophyllotoxin)(依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide))、DNA破坏剂(放线菌素、安吡啶、蒽环类、博来霉素、白消安、喜树碱、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、癌得星(Cytosan)、更生菌素、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、六甲蜜胺奥沙利铂(hexamethylmelamineoxaliplatin)、异环磷酰胺、美法仑(melphalan)、二氯甲基二乙胺(merchlorehtamine)、丝裂霉素、米托蒽醌、亚硝基脲、普卡霉素、甲基苄肼、泰素(taxol)、泰索帝(taxotere)、替莫唑胺(temozolamide)、替尼泊苷(teniposide)、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷(VP 16)) ;抗生素,如更生菌素(放线菌素D)、柔红霉素、多柔比星(阿霉素)、伊达比星、蒽环类、米托蒽醌、博来霉素、普卡霉素(光神霉素)和丝裂霉素;酶(L-天冬酰胺

酶,其能系统地代谢L-天冬酰胺,并使没有能力合成自身天冬酰胺的细胞失去能力);抗血小板剂;抗增殖/抗有丝分裂的烷基化剂,如氮芥(二氯甲基二乙胺、环磷酰胺及其类似物、美法仑、苯丁酸氮芥)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(六甲蜜胺和噻替派(thiotepa))、烷基磺酸盐-白消安、亚硝基脲(卡莫司汀(carmustine)(BCNU)及类似物、链脲霉素)、三氮烯一达卡巴嗪(trazenes—dacarbazine)(DTIC);抗增殖/抗有丝分裂抗代谢药,如叶酸类似物(甲氨蝶呤);铂配位复合物(顺铂、卡铂)、甲基苄肼、羟基脲、米托坦(mitotane)、氨基葡萄糖(aminogluthetamide);激素、激素类似物(雌激素、他莫昔芬(tamoxifen)、戈舍瑞林(goserelin)、比卡鲁胺(bicalutamide)、尼鲁米特(nilutamide))和芳香酶抑制剂(来曲唑(letrozole)、阿那曲唑(anastrozole));抗凝血剂(肝素、合成肝素盐和其它凝血酶的抑制剂);纤维蛋白溶解剂(如组织凝血酶原激活剂、链激酶和尿激酶)、阿司匹林、双嘧达莫(dipyridamole)、噻氯匹定(ticlopidine)、氯吡格雷(clopidogrel)、阿昔单抗(abciximab);抗凝剂;抗分泌剂(贝莱维定(breveldin));免疫抑制剂(环孢霉素、他克莫司(tacrolimus)(FK-506)、西罗莫司(sirolimus)(雷帕霉素)、硫唑嘌呤、霉酚酸酯);抗血管生成化合物(TNP470、染料木素)和生长因子抑制剂(血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂、成纤维细胞生长因子(FGF)抑制剂);血管紧张素受体阻滞剂;一氧化氮供体;反义寡核苷酸;抗体(曲妥珠单抗(trastuzumab)、利妥昔单抗);嵌合抗原受体;细胞周期抑制剂和分化诱导剂(维甲酸(tretinoin));mTOR抑制剂、拓扑异构酶抑制剂(多柔比星(阿霉素)、安吡啶、喜树碱、柔红霉素、更生霉素、去羟甙甙(eniposide)、表柔比星、依托泊苷、伊达比星、伊立替康(irinotecan)(CPT-11)和米托蒽醌、托泊替康(topotecan)、伊立替康)、皮质类固醇(可的松(cortisone)、地塞米松(dexamethasone)、氢化可的松(hydrocortisone)、甲基强的松龙(methylprednisolone)、强的松(prednisone)和泼尼松龙(prednisolone));生长因子信号转导酶抑制剂;线粒体功能障碍诱导剂、毒素如霍乱毒素、蓖麻毒素、假单胞菌外毒素、百日咳杆菌腺苷酸环化酶毒素或白喉毒素和胰天蛋白酶激活剂;以及染色质干扰剂。

[0369] 细胞因子可用于操纵针对抗癌活性的宿主免疫应答。参见例如,Floros和Tahrini,《肿瘤学研讨会(Semin.Oncol.)》42(4):539-548,2015。可用于促进免疫抗癌或抗肿瘤应答的细胞因子包括,例如,单独的IFN- α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-24和GM-CSF或与本公开的组合物中的任何组合。

[0370] 本文还提供了用于调节过继性免疫疗法的方法,其中所述方法包含以有效消除受试者中的先前施用的经修饰的宿主细胞的量向先前已接受了本公开的经修饰的宿主细胞的受试者施用安全开关蛋白的同源化合物,所述经修饰的宿主细胞包含编码安全开关蛋白的异源性多核苷酸。

[0371] 在某些实施例中,安全开关蛋白包含tEGFR并且同源化合物是西妥昔单抗、或者安全开关蛋白包含iCasp9并且同源化合物是AP1903(例如,二聚体化AP1903)、或者安全开关蛋白包含RQR多肽并且同源化合物是利妥昔单抗、或者安全开关蛋白包含myc结合结构域并且同源化合物是对myc结合结构域具有特异性的抗体。

[0372] 在仍另外的方面,提供了用于制备本公开的组合物或单位剂量的方法。在某些实施例中,所述方法包含将(i)用本公开的载体转导的宿主细胞的等分试样与(ii)药学上可接受的载剂组合。在某些实施例中,本公开的载体用于转染/转导宿主细胞(例如,T细胞)以用于过继性转移疗法(例如,靶向癌症抗原)。

[0373] 在一些实施例中,所述方法进一步包含在等分之前,培养转导的宿主细胞,并选择已掺入(即表达)载体的经转导的细胞。在另外的实施例中,所述方法包含在培养和选择之后以及在等分之前,扩增经转导的宿主细胞。在本发明方法的实施例中的任何实施例中,可以将所制备的组合物或单位剂量进行冷冻或冷冻保存以供以后使用。根据本发明方法,任何合适的宿主细胞都可以用于制备组合物或单位剂量,包括例如造血干细胞、T细胞、原代T细胞、T细胞系、NK细胞或NK-T细胞。在具体实施例中,所述方法包含宿主细胞,其是CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞或两者。

[0374] 还提供了结合蛋白、多核苷酸、表达载体、宿主细胞、宿主细胞组合物、单位剂量和免疫原性多肽中的任一种,其单独或以任何组合服用,用于治疗受试者的与KRAS G12D突变或KRAS G12V或NRAS G12D突变或NRAS G12V突变或HRAS G12V突变或HRAS G12D突变相关的疾病或病症。

[0375] 还提供了结合蛋白、多核苷酸、表达载体、宿主细胞、宿主细胞组合物、单位剂量和免疫原性多肽中的任一种,其单独或以任何组合服用,用于制备用于治疗受试者的与KRAS G12D突变或KRAS G12V或NRAS G12D突变或NRAS G12V突变或HRAS G12V突变或HRAS G12D突变相关的疾病或病症的药物。

[0376] 在某些实施例中,所述疾病或病症包含癌症。在一些实施例中,所述癌症是实体癌或血液系统恶性病。在某些实施例中,所述疾病或病症选自胰腺癌(pancreas cancer或pancreas carcinoma),任选地胰腺导管腺癌(PDAC);结直肠癌(colorectal cancer或colorectal carcinoma);肺癌,任选地非小细胞肺癌;胆道癌;子宫内膜癌(endometrial cancer或endometrial carcinoma);宫颈癌;卵巢癌;膀胱癌(bladder cancer);肝癌;髓系白血病,任选地髓系白血病,如急性髓系白血病;骨髓增生异常综合征;淋巴瘤,如非霍奇金氏淋巴瘤;慢性粒单核细胞白血病;急性淋巴细胞白血病(ALL);尿道癌;小肠癌;乳腺癌(breast cancer或breast carcinoma);黑色素瘤(任选地皮肤黑色素瘤、肛门黑色素瘤或粘膜黑色素瘤);神经胶质瘤;低分化甲状腺癌;神经母细胞瘤;组织细胞和树突状细胞赘生物;1型神经纤维瘤病;横纹肌肉瘤;软组织肉瘤;膀胱癌(bladder carcinoma);肉瘤;胶质母细胞瘤;鳞状细胞肺癌;间变性星形细胞瘤;慢性髓系白血病;弥漫性大B细胞淋巴瘤;双重打击淋巴瘤;头颈癌;头颈鳞状细胞癌;肝细胞癌;恶性周围神经鞘瘤;套细胞淋巴瘤;骨髓增生异常/骨髓增殖性赘生物,不可分类;外周T细胞淋巴瘤;前列腺癌;难治性贫血伴原始细胞增多-2;肾细胞癌;横纹肌样瘤;神经鞘瘤;继发性AML;小细胞肺癌;疗法相关的AML;胸腺癌;甲状腺滤泡癌;甲状腺恶性赘生物;甲状腺癌;甲状腺腺癌;尿路上皮癌或甲状腺乳头状癌。在一些实施例中,所述方法包含肠胃外或静脉内施用主题组合物。在一些实施例中,所述方法包含向受试者施用多个剂量的结合蛋白、多核苷酸、表达载体、宿主细胞、宿主细胞组合物、单位剂量和/或免疫原性多肽。

[0377] 在某些实施例中,所述多个剂量以约两周至约四周的施用间隔施用。

[0378] 在某些实施例中,所述组合物包含经修饰的宿主细胞。在一些实施例中,所述方法包含以约 10^4 个细胞/kg至约 10^{11} 个细胞/kg的剂量向受试者施用经修饰的宿主细胞。

[0379] 在某些实施例中,其中所述方法进一步包含向所述受试者施用细胞因子。在一些实施例中,所述细胞因子包含IL-2、IL-15或IL-21。

[0380] 在某些实施例中,所述受试者已经接受或正在接受免疫检查点抑制剂和/或刺激

性免疫检查点药剂的激动剂。

[0381] 还提供了包含将编码本公开的结合蛋白的多核苷酸引入到宿主(例如,T)细胞中的方法。

[0382] 本公开还提供了以下非限制性列举的实施例。

[0383] 实施例1.一种结合蛋白,其包含:

[0384] (a) T细胞受体(TCR) α 链可变($V\alpha$)结构域,所述TCR $V\alpha$ 结构域包含SEQ ID NO.:16、17、42和43中的任一个中所示的互补决定区3(CDR3 α)氨基酸序列,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;和/或

[0385] (b) TCR β 链可变($V\beta$)结构域,所述TCR $V\beta$ 结构域包含SEQ ID NO.:26、27、52和53中的任一个中所示的CDR3 β 氨基酸序列,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体,

[0386] 其中所述结合蛋白能够与肽:HLA复合物结合,其中肽包含氨基酸序列VVVGAVGVGK (SEQ ID NO.:2)或VVGAVGVGK (SEQ ID NO.:3)、基本上由其组成或由其组成,并且其中HLA包含HLA-A*11。

[0387] 实施例2.根据实施例1所述的结合蛋白,其中所述HLA包含HLA-A*11:01。

[0388] 实施例3.根据实施例1或2所述的结合蛋白,其中所述 $V\alpha$ 结构域和/或所述 $V\beta$ 结构域是人的、人源化的或嵌合的,并且优选地是人的。

[0389] 实施例4.根据实施例1至3中任一项所述的结合蛋白,其包含以下中所示的CDR3 α 和CDR3 β 氨基酸序列:(i)分别为SEQ ID NO.:17和27,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;(ii)分别为SEQ ID NO.:16和26,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;(iii)分别为SEQ ID NO.:53和43,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;或(iv)分别为SEQ ID NO.:52和42,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体。

[0390] 实施例5.根据实施例1至4中任一项所述的结合蛋白,其包含:(i)在所述 $V\alpha$ 结构域中,SEQ ID NO.:14或40中所示的CDR1 α 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;(ii)在所述 $V\alpha$ 结构域中,SEQ ID NO.:15或41中所示的CDR2 α 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;(iii)在所述 $V\beta$ 结构域中,SEQ ID NO.:24或50中所示的CDR1 β 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;(iv)在所述 $V\beta$ 结构域中,SEQ ID NO.:25或51中所示的CDR2 β 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;或(v) (i) - (iv)的任何组合。

[0391] 实施例6.根据实施例1至5中任一项所述的结合蛋白,其包含分别在SEQ ID NO.:14、15、16或17、24、25和26或27中所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

[0392] 实施例7.根据实施例1至5中任一项所述的结合蛋白,其包含分别在SEQ ID NO.:40、41、42或43、50、51和52或53中所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

[0393] 实施例8.根据实施例1至7中任一项所述的结合蛋白,其中:

[0394] (i) 所述 $V\alpha$ 结构域包含与SEQ ID NO.:13或39中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少

94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成;和/或

[0395] (ii)所述V β 结构域包含与SEQ ID NO.:23或49中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0396] 实施例9.根据实施例1至8中任一项所述的结合蛋白,其中所述V α 结构域包含与SEQ ID NO.:13中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,并且其中所述V β 结构域包含与SEQ ID NO.:23中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,其中,任选地,所述结合蛋白包含SEQ ID NO.:154中所示的氨基酸序列。

[0397] 实施例10.根据实施例1至8中任一项所述的结合蛋白,其中所述V α 结构域包含与SEQ ID NO.:39中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,并且其中所述V β 结构域包含与SEQ ID NO.:49中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0398] 实施例11.根据实施例1至10中任一项所述的结合蛋白,其中所述V α 结构域包含SEQ ID NO.:13中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,并且所述V β 结构域包含SEQ ID NO.:23中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,其中,任选地,所述结合蛋白包含SEQ ID NO.:154中所示的氨基酸序列。

[0399] 实施例12.根据实施例1至10中任一项所述的结合蛋白,其中所述V α 结构域包含SEQ ID NO.:39中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,并且所述V β 结构域包含SEQ ID NO.:49中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0400] 实施例13.根据实施例1至12中任一项所述的结合蛋白,其进一步包含TCR α 链恒定结构域(C α)和/或TCR β 链恒定结构域(C β)。

[0401] 实施例14.根据实施例13所述的结合蛋白,其中所述C α 包含与SEQ ID NO.:18、19、44、45和69中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或包含其中的任一个中所示的氨基酸序列或由其组成。

[0402] 实施例15.根据实施例13或14所述的结合蛋白,其中所述C β 包含与SEQ ID NO.:28、29、54、55和70-73中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或包含其中的任一个中所示的氨基酸序列或由其组成。

[0403] 实施例16.根据实施例13至15中任一项所述的结合蛋白,其中所述C α 和所述C β 包

含与以下中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成,或包含以下中所示的氨基酸序列或由其组成:

[0404] (i) 分别为SEQ ID NO.:18和28;

[0405] (ii) 分别为SEQ ID NO.:19和29;

[0406] (iii) 分别为SEQ ID NO.:44和54;或

[0407] (iv) 分别为SEQ ID NO.:45和55。

[0408] 实施例17.根据实施例1至16中任一项所述的结合蛋白,其包含TCR α 链和TCR β 链,其中所述TCR α 链和所述TCR β 链包含与以下中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成,或包含以下中所示的氨基酸序列或由其组成:

[0409] (i) 分别为SEQ ID NO.:12和22;

[0410] (ii) 分别为SEQ ID NO.:20和30或155;

[0411] (iii) 分别为SEQ ID NO.:12和30或155;

[0412] (iv) 分别为SEQ ID NO.:20和22;

[0413] (v) 分别为SEQ ID NO.:38和48;

[0414] (vi) 分别为SEQ ID NO.:46和56;

[0415] (vii) 分别为SEQ ID NO.:38和56;或

[0416] (viii) 分别为SEQ ID NO.:46和48。

[0417] 实施例18.根据实施例1至17中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白包含TCR、单链TCR(scTCR)、单链T细胞受体可变片段(scTv)或嵌合抗原受体(CAR)。

[0418] 实施例19.根据实施例18所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白包含TCR。

[0419] 实施例20.一种分离的多核苷酸,其编码根据实施例1至19中任一项所述的结合蛋白。

[0420] 实施例21.根据实施例20所述的多核苷酸,其包含与SEQ ID NO.:5-10和33-36中的任一个中所示的多核苷酸序列或其任何组合具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的多核苷酸,或包含所示的多核苷酸序列或其任何组合或由其组成。

[0421] 实施例22.根据实施例20或21所述的多核苷酸,其进一步包含:

[0422] (i) 编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,其中,任选地,经编码的多肽是或包含CD8共受体 α 链;

[0423] (ii) 编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分,其中,任选地,经编码的多肽是或包含CD8共受体 β 链;或

[0424] (iii) (i)的多核苷酸和(ii)的多核苷酸。

[0425] 实施例23.根据实施例22所述的多核苷酸,其包含:

[0426] (a) 所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分;

[0427] (b) 所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分;以及

[0428] (c) 编码自切割肽的多核苷酸,所述多核苷酸安置在(a)的所述多核苷酸与(b)的所述多核苷酸之间。

[0429] 实施例24. 根据实施例22或23所述的多核苷酸, 其进一步包含编码自切割肽并安置在以下之间的多核苷酸:

[0430] (1) 所述编码结合蛋白的多核苷酸与所述编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分; 和/或

[0431] (2) 所述编码结合蛋白的多核苷酸与所述编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分。

[0432] 实施例25. 根据实施例22至24中任一项所述的多核苷酸, 其包含在框内可操作地连接的:

[0433] (i) (pnCD8 α) - (pnSCP₁) - (pnCD8 β) - (pnSCP₂) - (pnBP);

[0434] (ii) (pnCD8 β) - (pnSCP₁) - (pnCD8 α) - (pnSCP₂) - (pnBP);

[0435] (iii) (pnBP) - (pnSCP₁) - (pnCD8 α) - (pnSCP₂) - (pnCD8 β);

[0436] (iv) (pnBP) - (pnSCP₁) - (pnCD8 β) - (pnSCP₂) - (pnCD8 α);

[0437] (v) (pnCD8 α) - (pnSCP₁) - (pnBP) - (pnSCP₂) - (pnCD8 β); 或

[0438] (vi) (pnCD8 β) - (pnSCP₁) - (pnBP) - (pnSCP₂) - (pnCD8 α),

[0439] 其中pnCD8 α 是所述编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,

[0440] 其中pnCD8 β 是所述编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,

[0441] 其中pnBP是所述编码结合蛋白的多核苷酸,

[0442] 并且其中pnSCP₁和pnSCP₂各自独立地是编码自切割肽的多核苷酸, 其中所述多核苷酸和/或经编码的自切割肽任选地是相同的或不同的。

[0443] 实施例26. 根据实施例22至25中任一项所述的多核苷酸, 其中经编码的结合蛋白包含TCR α 链和TCR β 链, 其中所述多核苷酸包含编码自切割肽、安置在编码TCR α 链的多核苷酸与编码TCR β 链的多核苷酸之间的多核苷酸。

[0444] 实施例27. 根据实施例26所述的多核苷酸, 其包含在框内可操作地连接的:

[0445] (i) (pnCD8 α) - (pnSCP₁) - (pnCD8 β) - (pnSCP₂) - (pnTCR β) - (pnSCP₃) - (pnTCR α);

[0446] (ii) (pnCD8 β) - (pnSCP₁) - (pnCD8 α) - (pnSCP₂) - (pnTCR β) - (pnSCP₃) - (pnTCR α);

[0447] (iii) (pnCD8 α) - (pnSCP₁) - (pnCD8 β) - (pnSCP₂) - (pnTCR α) - (pnSCP₃) - (pnTCR β);

[0448] (iv) (pnCD8 β) - (pnSCP₁) - (pnCD8 α) - (pnSCP₂) - (pnTCR α) - (pnSCP₃) - (pnTCR β);

[0449] (v) (pnTCR β) - (pnSCP₁) - (pnTCR α) - (pnSCP₂) - (pnCD8 α) - (pnSCP₃) - (pnCD8 β);

[0450] (vi) (pnTCR β) - (pnSCP₁) - (pnTCR α) - (pnSCP₂) - (pnCD8 β) - (pnSCP₃) - (pnCD8 α);

[0451] (vii) (pnTCR α) - (pnSCP₁) - (pnTCR β) - (pnSCP₂) - (pnCD8 α) - (pnSCP₃) - (pnCD8 β);

[0452] (viii) (pnTCR α) - (pnSCP₁) - (pnTCR β) - (pnSCP₂) - (pnCD8 β) - (pnSCP₃) - (pnCD8 α),

[0453] 其中pnCD8 α 是所述编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,

[0454] 其中pnCD8 β 是所述编码多肽的多核苷酸, 所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,

[0455] 其中pnTCR α 是所述编码TCR α 链的多核苷酸,

[0456] 其中pnTCR β 是所述编码TCR β 链的多核苷酸,

[0457] 并且其中pnSCP₁、pnSCP₂和pnSCP₃各自独立地是编码自切割肽的多核苷酸,其中所述多核苷酸和/或经编码的自切割肽任选地是相同的或不同的。

[0458] 实施例28.根据实施例20至27中任一项所述的多核苷酸,其编码与SEQ ID NO.:11、21、37、47、31、32、57和58中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或包含其中的任一个中所示的氨基酸序列或由其组成。

[0459] 实施例29.根据实施例28所述的多核苷酸,其编码(i)与SEQ ID NO.:11中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或包含其中所示的氨基酸序列或由其组成,以及(ii)与SEQ ID NO.:21中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或包含其中所示的氨基酸序列或由其组成。

[0460] 实施例30.根据实施例29所述的多核苷酸,其编码(i)与SEQ ID NO.:37中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或包含其中所示的氨基酸序列或由其组成,以及(ii)与SEQ ID NO.:47中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或包含其中所示的氨基酸序列或由其组成。

[0461] 实施例31.根据实施例20至30中任一项所述的多核苷酸,其是或包含多核苷酸序列,所述多核苷酸序列被经密码子优化以在宿主细胞中表达,其中,任选地,所述宿主细胞是人免疫系统细胞,并且其中进一步任选地是T细胞。

[0462] 实施例32.一种表达载体,其包含与表达控制序列可操作地连接的根据实施例20至31中任一项所述的多核苷酸。

[0463] 实施例33.根据实施例32所述的表达载体,其中所述载体能够将所述多核苷酸递送至宿主细胞。

[0464] 实施例34.根据实施例33所述的表达载体,其中所述宿主细胞是造血祖细胞或人免疫系统细胞。

[0465] 实施例35.根据实施例34所述的表达载体,其中所述人免疫系统细胞是CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤细胞、自然杀伤T细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞或其任何组合。

[0466] 实施例36.根据实施例35所述的表达载体,其中所述T细胞是原初T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞或其任何组合。

[0467] 实施例37.根据实施例32至36中任一项所述的表达载体,其中所述载体是病毒载体。

[0468] 实施例38.根据实施例37所述的表达载体,其中所述病毒载体是慢病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。

[0469] 实施例39.一种宿主细胞,其被修饰以包含根据实施例20至31中任一项所述的多核苷酸和/或根据实施例32至38中任一项所述的表达载体和/或表达根据实施例1至19中任一项所述的结合蛋白。

[0470] 实施例40.根据实施例39所述的宿主细胞,其中经修饰的细胞包含造血祖细胞和/或人免疫细胞。

[0471] 实施例41.根据实施例40所述的宿主细胞,其中所述免疫细胞包含T细胞、NK细胞、NK-T细胞、树突状细胞、巨噬细胞、单核细胞或其任何组合。

[0472] 实施例42.根据实施例41所述的宿主细胞,其中所述免疫细胞包含CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、原初T细胞、中央记忆T细胞、干细胞记忆T细胞、效应记忆T细胞或其任何组合,

[0473] 其中,任选地,所述免疫细胞包含CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞,其中,进一步任选地,所述CD4⁺T细胞、所述CD8⁺T细胞或两者包含(i)编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,其中,任选地,经编码的多肽是或包含CD8共受体 α 链;(ii)编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分,其中,任选地,经编码的多肽是或包含CD8共受体 β 链;或(iii)(i)的多核苷酸和(ii)的多核苷酸。

[0474] 实施例43.根据实施例39至42中任一项所述的宿主细胞,其中所述经修饰的细胞包含以下的染色体基因敲除:PD-1基因;LAG3基因;TIM3基因;CTLA4基因;HLA组分基因;TIGIT基因;TCR组分基因、FasL基因或其任何组合。

[0475] 实施例44.根据实施例43所述的宿主细胞,其中所述染色体基因敲除包含选自以下的HLA组分基因的敲除: α 1巨球蛋白基因、 α 2巨球蛋白基因、 α 3巨球蛋白基因、 β 1微球蛋白基因或 β 2微球蛋白基因。

[0476] 实施例45.根据实施例33或34所述的宿主细胞,其中所述染色体基因敲除包含选自以下的TCR组分基因的敲除:TCR α 可变区基因、TCR β 可变区基因、TCR恒定区基因或其组合。

[0477] 实施例46.一种组合物,其包含根据实施例39至45中任一项所述的宿主细胞以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

[0478] 实施例47.根据实施例46所述的组合物,其包含至少约30%的经修饰的CD4⁺T细胞,所述组合物与(ii)包含至少约30%的经修饰的CD8⁺T细胞的组合物以约1:1的比率组合。

[0479] 实施例48.根据实施例46或47所述的组合物,其中所述组合物基本上不含原初T细胞。

[0480] 实施例49.一种组合物,其包含:

[0481] (i) 根据实施例1至19中任一项所述的结合蛋白;

[0482] (ii) 根据实施例20至31中任一项所述的多核苷酸;

[0483] (iii) 根据实施例32至38中任一项所述的表达载体;和/或

[0484] (iv) 根据实施例39至45中任一项所述的宿主细胞,

[0485] 以及药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂。

[0486] 实施例50.一种用于治疗受试者的与KRAS G12V突变或NRAS G12V突变或HRAS G12V突变相关的疾病或病症的方法,所述方法包含向所述受试者施用有效量的:

[0487] (i) 根据实施例1至19中任一项所述的结合蛋白;

[0488] (ii) 根据实施例20至31中任一项所述的多核苷酸;

[0489] (iii) 根据实施例32至38中任一项所述的表达载体;

[0490] (iv) 根据实施例39至45中任一项所述的宿主细胞,其中,任选地,所述宿主细胞包含CD8+T细胞、CD4+T细胞或两者,并且其中,任选地,所述宿主细胞对于所述受试者是自体的、同种异体的或同基因的;和/或

[0491] (v) 根据实施例46至49中任一项所述的组合物。

[0492] 实施例51. 根据实施例50所述的方法,其中所述疾病或病症包含癌症,其中所述癌症任选地是实体癌或血液系统恶性病。

[0493] 实施例52. 根据实施例50或51所述的方法,其中所述疾病或病症选自胰腺癌(pancreas cancer或pancreas carcinoma),任选地胰腺导管腺癌(PDAC);结直肠癌(colorectal cancer或colorectal carcinoma);肺癌,任选地非小细胞肺癌;胆道癌;子宫内膜癌(endometrial cancer或endometrial carcinoma);宫颈癌;卵巢癌;膀胱癌(bladder cancer);肝癌;髓系白血病,任选地髓系白血病,如急性髓系白血病;骨髓增生异常综合征;淋巴瘤,如非霍奇金氏淋巴瘤;慢性粒单核细胞白血病;急性淋巴细胞白血病(ALL);尿道癌;小肠癌;乳腺癌(breast cancer或breast carcinoma);黑色素瘤(任选地皮肤黑色素瘤、肛门黑色素瘤或粘膜黑色素瘤);神经胶质瘤;低分化甲状腺癌;神经母细胞瘤;组织细胞和树突状细胞赘生物;1型神经纤维瘤病;横纹肌肉瘤;软组织肉瘤;膀胱癌(bladder carcinoma);肉瘤;胶质母细胞瘤;鳞状细胞肺癌;间变性星形细胞瘤;慢性髓系白血病;弥漫性大B细胞淋巴瘤;双重打击淋巴瘤;头颈癌;头颈鳞状细胞癌;肝细胞癌;恶性周围神经鞘瘤;套细胞淋巴瘤;骨髓增生异常/骨髓增殖性赘生物,不可分类;外周T细胞淋巴瘤;前列腺癌;难治性贫血伴原始细胞增多-2;肾细胞癌;横纹肌样瘤;神经鞘瘤;继发性AML;小细胞肺癌;疗法相关的AML;胸腺癌;甲状腺滤泡癌;甲状腺恶性赘生物;甲状腺癌;甲状腺腺癌;尿路上皮癌或甲状腺乳头状癌。

[0494] 实施例53. 根据实施例50至52中任一项所述的方法,其中所述结合蛋白、所述多核苷酸、所述载体、所述宿主细胞或所述组合物经肠胃外或静脉内施用于所述受试者。

[0495] 实施例54. 根据实施例50至53中任一项所述的方法,其中所述方法包含向所述受试者施用多个剂量的(i) - (v)中的任何一者或多者。

[0496] 实施例55. 根据实施例54所述的方法,其中所述多个剂量以约两周至约四周的施用间隔施用。

[0497] 实施例56. 根据实施例50至55中任一项所述的方法,其中所述组合物包含所述宿主细胞或包含所述宿主细胞的所述组合物,并且其中所述方法包含以约 10^4 个细胞/kg至约 10^{11} 个细胞/kg的剂量向所述受试者施用所述宿主细胞或所述组合物。

[0498] 实施例57. 根据实施例50至56中任一项所述的方法,其进一步包含在施用所述结合蛋白、所述多核苷酸、所述载体、所述宿主细胞或所述组合物之前,确定所述受试者表达HLA-A*11,任选地HLA-A*11:01。

[0499] 实施例58. 根据实施例50至57中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包含向所述受试者施用细胞因子。

[0500] 实施例59. 根据实施例58所述的方法,其中所述细胞因子包含IL-2、IL-15或IL-21。

[0501] 实施例60. 根据实施例50至59中任一项所述的方法,其中所述受试者已经接受或正在接受免疫检查点抑制剂和/或刺激性免疫检查点药剂的激动剂。

[0502] 实施例61.根据实施例1至19中任一项所述的结合蛋白、根据实施例20至31中任一项所述的多核苷酸、根据实施例32至38中任一项所述的表达载体、根据实施例39至45中任一项所述的宿主细胞,其中,任选地,所述宿主细胞包含CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞或两者,和/或根据实施例46至49中任一项所述的组合物,其在用于治疗受试者的与KRAS G12V或NRAS G12V突变或HRAS G12V突变相关的疾病或病症的方法中使用,其中,任选地,所述疾病或病症包含癌症,其中,进一步任选地,所述癌症是实体癌或血液系统恶性病,并且其中,任选地,所述疾病或病症选自胰腺癌(pancreas cancer或pancreas carcinoma),任选地胰腺导管腺癌(PDAC);结直肠癌(colorectal cancer或colorectal carcinoma);肺癌,任选地非小细胞肺癌;胆道癌;子宫内膜癌(endometrial cancer或endometrial carcinoma);宫颈癌;卵巢癌;膀胱癌(bladder cancer);肝癌;髓系白血病,任选地髓系白血病,如急性髓系白血病;骨髓增生异常综合征;淋巴瘤,如非霍奇金氏淋巴瘤;慢性粒单核细胞白血病;急性淋巴细胞白血病(ALL);尿道癌;小肠癌;乳腺癌(breast cancer或breast carcinoma);黑色素瘤(任选地皮肤黑色素瘤、肛门黑色素瘤或粘膜黑色素瘤);神经胶质瘤;低分化甲状腺癌;神经母细胞瘤;组织细胞和树突状细胞赘生物;1型神经纤维瘤病;横纹肌肉瘤;软组织肉瘤;膀胱癌(bladder carcinoma);肉瘤;胶质母细胞瘤;鳞状细胞肺癌;间变性星形细胞瘤;慢性髓系白血病;弥漫性大B细胞淋巴瘤;双重打击淋巴瘤;头颈癌;头颈鳞状细胞癌;肝细胞癌;恶性周围神经鞘瘤;套细胞淋巴瘤;骨髓增生异常/骨髓增殖性赘生物,不可分类;外周T细胞淋巴瘤;前列腺癌;难治性贫血伴原始细胞增多-2;肾细胞癌;横纹肌样瘤;神经鞘瘤;继发性AML;小细胞肺癌;疗法相关的AML;胸腺癌;甲状腺滤泡癌;甲状腺恶性赘生物;甲状腺癌;甲状腺腺癌;尿路上皮癌或甲状腺乳头状癌。

[0503] 实施例62.根据实施例1至19中任一项所述的结合蛋白、根据实施例20至31中任一项所述的多核苷酸、根据实施例32至38中任一项所述的表达载体、根据实施例39至45中任一项所述的宿主细胞,其中,任选地,所述宿主细胞包含CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞或两者,和/或根据实施例46至49中任一项所述的组合物,其在制备用于治疗受试者的与KRAS G12V或NRAS G12V突变或HRAS G12V突变相关的疾病或病症的药物中使用,其中,任选地,所述疾病或病症包含癌症,其中,进一步任选地,所述癌症是实体癌或血液系统恶性病,并且其中,任选地,所述疾病或病症选自胰腺癌(pancreas cancer或pancreas carcinoma),任选地胰腺导管腺癌(PDAC);结直肠癌(colorectal cancer或colorectal carcinoma);肺癌,任选地非小细胞肺癌;胆道癌;子宫内膜癌(endometrial cancer或endometrial carcinoma);宫颈癌;卵巢癌;膀胱癌(bladder cancer);肝癌;髓系白血病,任选地髓系白血病,如急性髓系白血病;骨髓增生异常综合征;淋巴瘤,如非霍奇金氏淋巴瘤;慢性粒单核细胞白血病;急性淋巴细胞白血病(ALL);尿道癌;小肠癌;乳腺癌(breast cancer或breast carcinoma);黑色素瘤(任选地皮肤黑色素瘤、肛门黑色素瘤或粘膜黑色素瘤);神经胶质瘤;低分化甲状腺癌;神经母细胞瘤;组织细胞和树突状细胞赘生物;1型神经纤维瘤病;横纹肌肉瘤;软组织肉瘤;膀胱癌(bladder carcinoma);肉瘤;胶质母细胞瘤;鳞状细胞肺癌;间变性星形细胞瘤;慢性髓系白血病;弥漫性大B细胞淋巴瘤;双重打击淋巴瘤;头颈癌;头颈鳞状细胞癌;肝细胞癌;恶性周围神经鞘瘤;套细胞淋巴瘤;骨髓增生异常/骨髓增殖性赘生物,不可分类;外周T细胞淋巴瘤;前列腺癌;难治性贫血伴原始细胞增多-2;肾细胞癌;横纹肌样瘤;神经鞘瘤;继发性AML;小细胞肺癌;疗法相关的AML;胸腺癌;甲状腺滤泡癌;甲状腺恶性赘生

物;甲状腺癌;甲状腺腺癌;尿路上皮癌或甲状腺乳头状癌。

[0504] 实施例1a.一种结合蛋白,其包含:

[0505] (a) T细胞受体 (TCR) α 链可变 ($V\alpha$) 结构域,所述TCR $V\alpha$ 结构域包含SEQ ID NO.:16、17、42和43中的任一个中所示的互补决定区3 (CDR3 α) 氨基酸序列,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;和/或

[0506] (b) TCR β 链可变 ($V\beta$) 结构域,所述TCR $V\beta$ 结构域包含SEQ ID NO.:26、27、52和53中的任一个中所示的CDR3 β 氨基酸序列,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体,

[0507] 其中所述结合蛋白能够与肽:HLA复合物结合,其中肽包含氨基酸序列VVVGAVGVGK (SEQ ID NO.:2) 或VVGAVGVGK (SEQ ID NO.:3)、基本上由其组成或由其组成,并且其中HLA包含HLA-A*11。

[0508] 实施例2a.根据实施例1a所述的结合蛋白,其中所述HLA包含HLA-A*11:01。

[0509] 实施例3a.根据实施例1a或2a所述的结合蛋白,其中所述 $V\alpha$ 结构域和/或所述 $V\beta$ 结构域是人的、人源化的或嵌合的,并且优选地是人的。

[0510] 实施例4a.根据实施例1a至3a中任一项所述的结合蛋白,其包含以下中所示的CDR3 α 和CDR3 β 氨基酸序列:(i) 分别为SEQ ID NO.:17和27,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;(ii) 分别为SEQ ID NO.:16和26,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;(iii) 分别为SEQ ID NO.:53和43,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体;或(iv) 分别为SEQ ID NO.:52和42,或其具有一个、两个或三个任选地保守的氨基酸取代的变体。

[0511] 实施例5a.根据实施例1a至4a中任一项所述的结合蛋白,其包含:(i) 在所述 $V\alpha$ 结构域中,SEQ ID NO.:14或40中所示的CDR1 α 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;(ii) 在所述 $V\alpha$ 结构域中,SEQ ID NO.:15或41中所示的CDR2 α 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;(iii) 在所述 $V\beta$ 结构域中,SEQ ID NO.:24或50中所示的CDR1 β 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;(iv) 在所述 $V\beta$ 结构域中,SEQ ID NO.:25或51中所示的CDR2 β 氨基酸序列,或其具有一个或两个任选地保守的氨基酸取代的变体;或(v) (i) - (iv)的任何组合。

[0512] 实施例6a.根据实施例1a至5a中任一项所述的结合蛋白,其包含分别在SEQ ID NO.:14、15、16或17、24、25和26或27中所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

[0513] 实施例7a.根据实施例1a至5a中任一项所述的结合蛋白,其包含分别在SEQ ID NO.:40、41、42或43、50、51和52或53中所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

[0514] 实施例8a.根据实施例1a至7a中任一项所述的结合蛋白,其中:

[0515] (i) 所述 $V\alpha$ 结构域包含与SEQ ID NO.:13或39中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成;和/或

[0516] (ii) 所述 $V\beta$ 结构域包含与SEQ ID NO.:23或49中所示的氨基酸序列具有至少

85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0517] 实施例9a.根据实施例1a至8a中任一项所述的结合蛋白,其中所述V α 结构域包含与SEQ ID NO.:13中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,并且其中所述V β 结构域包含与SEQ ID NO.:23中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0518] 实施例10a.根据实施例1a至8a中任一项所述的结合蛋白,其中所述V α 结构域包含与SEQ ID NO.:39中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,并且其中所述V β 结构域包含与SEQ ID NO.:49中所示的氨基酸序列具有至少85%、至少86%、至少87%、至少88%、至少89%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0519] 实施例11a.根据实施例1a至10a中任一项所述的结合蛋白,其中所述V α 结构域包含SEQ ID NO.:13中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,并且所述V β 结构域包含SEQ ID NO.:23中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0520] 实施例12a.根据实施例1a至10a中任一项所述的结合蛋白,其中所述V α 结构域包含SEQ ID NO.:39中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,并且所述V β 结构域包含SEQ ID NO.:49中所示的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成。

[0521] 实施例13a.根据实施例1a至12a中任一项所述的结合蛋白,其进一步包含TCR α 链恒定结构域(C α)和/或TCR β 链恒定结构域(C β)。

[0522] 实施例14a.根据实施例13a所述的结合蛋白,其中所述C α 包含与SEQ ID NO.:18、19、44、45和69中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或包含其中的任一个中所示的氨基酸序列或由其组成。

[0523] 实施例15a.根据实施例13a或14a所述的结合蛋白,其中所述C β 包含与SEQ ID NO.:28、29、54、55和70-73中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列、基本上由其组成或由其组成,或包含其中的任一个中所示的氨基酸序列或由其组成。

[0524] 实施例16a.根据实施例13a至15a中任一项所述的结合蛋白,其中所述C α 和所述C β 包含与以下中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成,或包含以下中所示的氨基酸序列或由其组成:

[0525] (i) 分别为SEQ ID NO.:18和28;

- [0526] (ii) 分别为SEQ ID NO.:19和29;
- [0527] (iii) 分别为SEQ ID NO.:44和54;或
- [0528] (iv) 分别为SEQ ID NO.:45和55。
- [0529] 实施例17a.根据实施例13a至16a中任一项所述的结合蛋白,其中所述C α 、所述C β 或两者包含促进所述C α 与所述C β 优先配对的修饰。
- [0530] 实施例18.根据实施例13a至16a中任一项所述的结合蛋白,其中所述C α 和所述C β 各自包含引入的半胱氨酸残基,所述半胱氨酸残基促进所述C α 与所述C β 的优先配对。
- [0531] 实施例19a.根据实施例13a至16a中任一项所述的结合蛋白,其中所述C α 包含T48C取代并且所述C β 包含S57C取代,以促进所述C α 与所述C β 的优先配对。
- [0532] 实施例20a.根据实施例1a至19a中任一项所述的结合蛋白,其包含TCR α 链和TCR β 链,其中所述TCR α 链和所述TCR β 链包含与以下中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列或由其组成,或包含以下中所示的氨基酸序列或由其组成:
- [0533] (i) 分别为SEQ ID NO.:12和22;
- [0534] (ii) 分别为SEQ ID NO.:20和30;
- [0535] (iii) 分别为SEQ ID NO.:12和30;
- [0536] (iv) 分别为SEQ ID NO.:20和22;
- [0537] (v) 分别为SEQ ID NO.:38和48;
- [0538] (vi) 分别为SEQ ID NO.:46和56;
- [0539] (vii) 分别为SEQ ID NO.:38和56;
- [0540] (viii) 分别为SEQ ID NO.:46和48;或
- [0541] (ix) 分别为SEQ ID NO.:85和83。
- [0542] 实施例21a.根据实施例1a至20a中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白包含TCR、单链TCR(scTCR)、单链T细胞受体可变片段(scTv)或嵌合抗原受体(CAR)。
- [0543] 实施例22a.根据实施例21a所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白包含TCR。
- [0544] 实施例23a.根据实施例1至22a中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白在CD137表面表达测定中对所述肽的功能亲和力包含至多100nM、至多50nM、至多25nM、至多10nM、至多1nM、至多750pM、至多500pM、至多250pM、至多100pM、至多75pM或至多60pM的EC50。
- [0545] 实施例24a.一种分离的多核苷酸,其编码根据实施例1a至23a中任一项所述的结合蛋白。
- [0546] 实施例25a.根据实施例24a所述的多核苷酸,其包含与SEQ ID NO.:5-10和33-36中的任一个中所示的多核苷酸序列或其任何组合具有至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的多核苷酸,或包含所示的多核苷酸序列或其任何组合或由其组成。
- [0547] 实施例26a.根据实施例24a或25a所述的多核苷酸,其进一步包含:
- [0548] (i) 编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,其中,任选地,经编码的多肽是或包含CD8共受体 α 链;
- [0549] (ii) 编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分,其中,任选

地,经编码的多肽是或包含CD8共受体 β 链;或

[0550] (iii) (i)的多核苷酸和(ii)的多核苷酸。

[0551] 实施例27a.根据实施例26a所述的多核苷酸,其包含:

[0552] (a)所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分;

[0553] (b)所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分;以及

[0554] (c)编码自切割肽的多核苷酸,所述多核苷酸安置在(a)的所述多核苷酸与(b)的所述多核苷酸之间。

[0555] 实施例28a.根据实施例26a或27a所述的多核苷酸,其进一步包含编码自切割肽并安置在以下之间的多核苷酸:

[0556] (1)所述编码结合蛋白的多核苷酸与所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分;和/或

[0557] (2)所述编码结合蛋白的多核苷酸与所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分。

[0558] 实施例29a.根据实施例26a至28a中任一项所述的多核苷酸,其包含在框内可操作地连接的:

[0559] (i) (pnCD8 α) - (pnSCP₁) - (pnCD8 β) - (pnSCP₂) - (pnBP);

[0560] (ii) (pnCD8 β) - (pnSCP₁) - (pnCD8 α) - (pnSCP₂) - (pnBP);

[0561] (iii) (pnBP) - (pnSCP₁) - (pnCD8 α) - (pnSCP₂) - (pnCD8 β);

[0562] (iv) (pnBP) - (pnSCP₁) - (pnCD8 β) - (pnSCP₂) - (pnCD8 α);

[0563] (v) (pnCD8 α) - (pnSCP₁) - (pnBP) - (pnSCP₂) - (pnCD8 β);或

[0564] (vi) (pnCD8 β) - (pnSCP₁) - (pnBP) - (pnSCP₂) - (pnCD8 α),

[0565] 其中pnCD8 α 是所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,

[0566] 其中pnCD8 β 是所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,

[0567] 其中pnBP是所述编码结合蛋白的多核苷酸,

[0568] 并且其中pnSCP₁和pnSCP₂各自独立地是编码自切割肽的多核苷酸,其中所述多核苷酸和/或经编码的自切割肽任选地是相同的或不同的。

[0569] 实施例30a.根据实施例26a至29a中任一项所述的多核苷酸,其中经编码的结合蛋白包含TCR α 链和TCR β 链,其中所述多核苷酸包含编码自切割肽、安置在编码TCR α 链的多核苷酸与编码TCR β 链的多核苷酸之间的多核苷酸。

[0570] 实施例31a.根据实施例30a所述的多核苷酸,其包含在框内可操作地连接的:

[0571] (i) (pnCD8 α) - (pnSCP₁) - (pnCD8 β) - (pnSCP₂) - (pnTCR β) - (pnSCP₃) - (pnTCR α);

[0572] (ii) (pnCD8 β) - (pnSCP₁) - (pnCD8 α) - (pnSCP₂) - (pnTCR β) - (pnSCP₃) - (pnTCR α);

[0573] (iii) (pnCD8 α) - (pnSCP₁) - (pnCD8 β) - (pnSCP₂) - (pnTCR α) - (pnSCP₃) - (pnTCR β);

[0574] (iv) (pnCD8 β) - (pnSCP₁) - (pnCD8 α) - (pnSCP₂) - (pnTCR α) - (pnSCP₃) - (pnTCR β);

[0575] (v) (pnTCR β) - (pnSCP₁) - (pnTCR α) - (pnSCP₂) - (pnCD8 α) - (pnSCP₃) - (pnCD8 β);

[0576] (vi) (pnTCR β) - (pnSCP₁) - (pnTCR α) - (pnSCP₂) - (pnCD8 β) - (pnSCP₃) - (pnCD8 α);

[0577] (vii) (pnTCR α) - (pnSCP₁) - (pnTCR β) - (pnSCP₂) - (pnCD8 α) - (pnSCP₃) - (pnCD8 β);

- [0578] (viii) (pnTCR α) - (pnSCP₁) - (pnTCR β) - (pnSCP₂) - (pnCD8 β) - (pnSCP₃) - (pnCD8 α) ,
- [0579] 其中pnCD8 α 是所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,
- [0580] 其中pnCD8 β 是所述编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,
- [0581] 其中pnTCR α 是所述编码TCR α 链的多核苷酸,
- [0582] 其中pnTCR β 是所述编码TCR β 链的多核苷酸,
- [0583] 并且其中pnSCP₁、pnSCP₂和pnSCP₃各自独立地是编码自切割肽的多核苷酸,其中所述多核苷酸和/或经编码的自切割肽任选地是相同的或不同的。
- [0584] 实施例32a.根据实施例31a所述的多核苷酸,其中所述pnSCP1编码T2A肽,所述pnSCP2编码P2A肽,并且所述pnSCP3编码P2A肽。
- [0585] 实施例33a.根据实施例24a至32a中任一项所述的多核苷酸,其编码与SEQ ID NO.:11、21、37、47、31、32、57、58、84、86、88和90中的任一个中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或包含其中的任一个中所示的氨基酸序列或由其组成。
- [0586] 实施例34a.根据实施例33a所述的多核苷酸,其编码(i)与SEQ ID NO.:11中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或包含其中所示的氨基酸序列或由其组成,以及(ii)与SEQ ID NO.:21中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或包含其中所示的氨基酸序列或由其组成。
- [0587] 实施例35a.根据实施例33a所述的多核苷酸,其编码(i)与SEQ ID NO.:37中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或包含其中所示的氨基酸序列或由其组成,以及(ii)与SEQ ID NO.:47中所示的氨基酸序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列,或包含其中所示的氨基酸序列或由其组成。
- [0588] 实施例36a.根据实施例24a至35a中任一项所述的多核苷酸,其是或包含多核苷酸序列,所述多核苷酸序列被密码子优化以在宿主细胞中表达,其中,任选地,所述宿主细胞是人免疫系统细胞,并且其中进一步任选地是T细胞。
- [0589] 实施例37a.一种表达载体,其包含与表达控制序列可操作地连接的根据实施例24a至36a中任一项所述的多核苷酸。
- [0590] 实施例38a.根据实施例37a所述的表达载体,其中所述表达控制序列包含MSCV启动子。
- [0591] 实施例39a.根据实施例37a或实施例38a所述的表达载体,其中所述表达控制序列驱动编码所述CD8共受体 α 链的所述细胞外部分、所述CD8共受体 β 链的所述细胞外部分、所述TCR α 链和所述TCR β 链的单个mRNA的表达。
- [0592] 实施例40a.根据实施例37a至39a中任一项所述的表达载体,其中所述载体能够将所述多核苷酸递送至宿主细胞。

[0593] 实施例41a.根据实施例40a所述的表达载体,其中所述宿主细胞是造血祖细胞或人免疫系统细胞。

[0594] 实施例42a.根据实施例41a所述的表达载体,其中所述人免疫系统细胞是CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤细胞、自然杀伤T细胞、巨噬细胞、单核细胞、树突状细胞或其任何组合。

[0595] 实施例43a.根据实施例42a所述的表达载体,其中所述T细胞是原初T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞或其任何组合。

[0596] 实施例44a.根据实施例37a至43a中任一项所述的表达载体,其中所述载体是病毒载体。

[0597] 实施例45a.根据实施例44所述的表达载体,其中所述病毒载体是慢病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。

[0598] 实施例46a.根据实施例44a所述的表达载体,其中所述病毒载体是自失活慢病毒载体。

[0599] 实施例47a.根据实施例44a或实施例46a所述的表达载体,其中所述病毒载体是第三代慢病毒载体。

[0600] 实施例48a.一种宿主细胞,其被修饰以包含根据实施例24a至36a中任一项所述的多核苷酸和/或根据实施例37a至47a中任一项所述的表达载体和/或表达根据实施例1a至23a中任一项所述的结合蛋白。

[0601] 实施例49a.根据实施例48a所述的宿主细胞,其中经修饰的细胞包含造血祖细胞和/或人免疫细胞。

[0602] 实施例50a.根据实施例49a所述的宿主细胞,其中所述免疫细胞包含T细胞、NK细胞、NK-T细胞、树突状细胞、巨噬细胞、单核细胞或其任何组合。

[0603] 实施例51a.根据实施例50a所述的宿主细胞,其中所述免疫细胞包含CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、原初T细胞、中央记忆T细胞、干细胞记忆T细胞、效应记忆T细胞或其任何组合,

[0604] 其中,任选地,所述免疫细胞包含CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞,其中,进一步任选地,所述CD4⁺T细胞、所述CD8⁺T细胞或两者包含(i)编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 α 链的细胞外部分,其中,任选地,经编码的多肽是或包含CD8共受体 α 链;(ii)编码多肽的多核苷酸,所述多肽包含CD8共受体 β 链的细胞外部分,其中,任选地,经编码的多肽是或包含CD8共受体 β 链;或(iii)(i)的多核苷酸和(ii)的多核苷酸。

[0605] 实施例52a.根据实施例48a至51a中任一项所述的宿主细胞,其中所述经修饰的细胞包含以下的染色体基因敲除:PD-1基因;LAG3基因;TIM3基因;CTLA4基因;HLA组分基因;TIGIT基因;TCR组分基因、FasL基因或其任何组合。

[0606] 实施例53a.根据实施例52a所述的宿主细胞,其中所述染色体基因敲除包含选自以下的HLA组分基因的敲除: α 1巨球蛋白基因、 α 2巨球蛋白基因、 α 3巨球蛋白基因、 β 1微球蛋白基因或 β 2微球蛋白基因。

[0607] 实施例54a.根据实施例52a或53a所述的宿主细胞,其中所述染色体基因敲除包含选自以下的TCR组分基因的敲除:TCR α 可变区基因、TCR β 可变区基因、TCR恒定区基因或其组合。

[0608] 实施例55a.一种组合物,其包含根据实施例48a至54a中任一项所述的宿主细胞以及药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

[0609] 实施例56a.根据实施例55a所述的组合物,其包含至少约30%的经修饰的CD4⁺T细胞,所述组合物与(ii)包含至少约30%的经修饰的CD8⁺T细胞的组合物以约1:1的比率组合。

[0610] 实施例57a.根据实施例55a或56a所述的组合物,其中所述组合物基本上不含原初T细胞。

[0611] 实施例58a.一种组合物,其包含:

[0612] (v) 根据实施例1a至23a中任一项所述的结合蛋白;

[0613] (vi) 根据实施例24a至36a中任一项所述的多核苷酸;

[0614] (vii) 根据实施例37a至47a中任一项所述的表达载体;和/或

[0615] (viii) 根据实施例48a至54a中任一项所述的宿主细胞,

[0616] 以及药学上可接受的载剂、赋形剂或稀释剂。

[0617] 实施例59a.一种用于治疗受试者的与KRAS G12V突变或NRAS G12V突变或HRAS G12V突变相关的疾病或病症的方法,所述方法包含向所述受试者施用有效量的:

[0618] (i) 根据实施例1至23a中任一项所述的结合蛋白;

[0619] (ii) 根据实施例24a至36a中任一项所述的多核苷酸;

[0620] (iii) 根据实施例37a至47a中任一项所述的表达载体;

[0621] (iv) 根据实施例48a至54a中任一项所述的宿主细胞,其中,任选地,所述宿主细胞包含CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞或两者,并且其中,任选地,所述宿主细胞对于所述受试者是自体的、同种异体的或同基因的;和/或

[0622] (v) 根据实施例55a至58a中任一项所述的组合物。

[0623] 实施例60a.根据实施例59a所述的方法,其中所述疾病或病症包含癌症,其中所述癌症任选地是实体癌或血液系统恶性病。

[0624] 实施例61a.根据实施例59a或60a所述的方法,其中所述疾病或病症选自胰腺癌(pancreas cancer或pancreas carcinoma),任选地胰腺导管腺癌(PDAC);结直肠癌(colorectal cancer或colorectal carcinoma);肺癌,任选地非小细胞肺癌;胆道癌;子宫内膜癌(endometrial cancer或endometrial carcinoma);宫颈癌;卵巢癌;膀胱癌(bladder cancer);肝癌;髓系白血病,任选地髓系白血病,如急性髓系白血病;骨髓增生异常综合征;淋巴瘤,如非霍奇金氏淋巴瘤;慢性粒单核细胞白血病;急性淋巴细胞白血病(ALL);尿道癌;小肠癌;乳腺癌(breast cancer或breast carcinoma);黑色素瘤(任选地皮肤黑色素瘤、肛门黑色素瘤或粘膜黑色素瘤);神经胶质瘤;低分化甲状腺癌;神经母细胞瘤;组织细胞和树突状细胞赘生物;1型神经纤维瘤病;横纹肌肉瘤;软组织肉瘤;膀胱癌(bladder carcinoma);肉瘤;胶质母细胞瘤;鳞状细胞肺癌;间变性星形细胞瘤;慢性髓系白血病;弥漫性大B细胞淋巴瘤;双重打击淋巴瘤;头颈癌;头颈鳞状细胞癌;肝细胞癌;恶性周围神经鞘瘤;套细胞淋巴瘤;骨髓增生异常/骨髓增殖性赘生物,不可分类;外周T细胞淋巴瘤;前列腺癌;难治性贫血伴原始细胞增多-2;肾细胞癌;横纹肌样瘤;神经鞘瘤;继发性AML;小细胞肺癌;疗法相关的AML;胸腺癌;甲状腺滤泡癌;甲状腺恶性赘生物;甲状腺癌;甲状腺腺癌;尿路上皮癌;结肠癌;结直肠腺癌;甲状腺乳头状癌;或其晚期或转移性版本。

[0625] 实施例62a.根据实施例59a至61a中任一项所述的方法,其中所述结合蛋白、所述多核苷酸、所述载体、所述宿主细胞或所述组合物经肠胃外或静脉内施用于所述受试者。

[0626] 实施例63a.根据实施例59a至62a中任一项所述的方法,其中所述方法包含向所述受试者施用多个剂量的(i)-(v)中的任何一者或多者。

[0627] 实施例64a.根据实施例63a所述的方法,其中所述多个剂量以约两周至约四周的施用间隔施用。

[0628] 实施例65a.根据实施例59a至64a中任一项所述的方法,其中所述组合物包含所述宿主细胞或包含所述宿主细胞的所述组合物,并且其中所述方法包含以约 10^4 个细胞/kg至约 10^{11} 个细胞/kg的剂量向所述受试者施用所述宿主细胞或所述组合物。

[0629] 实施例66a.根据实施例59a至65a中任一项所述的方法,其中所述方法包含任选地以单个剂量向所述受试者施用包含所述结合蛋白的至少 5×10^8 、至少 1×10^9 、至少 5×10^9 、至少 1×10^{10} 、至少 1.5×10^{10} 、至少 2×10^{10} 或至少 5×10^{10} 个活宿主细胞。

[0630] 实施例67a.根据实施例59a至65a中任一项所述的方法,其中所述方法包含任选地以单个剂量向所述受试者施用包含所述结合蛋白的至多 5×10^9 、至多 1×10^{10} 、至多 1.5×10^{10} 、至多 2×10^{10} 、至多 5×10^{10} 、至多 1×10^{11} 或至多 5×10^{11} 个活宿主细胞。

[0631] 实施例68a.根据实施例59a至65a中任一项所述的方法,其中所述方法包含任选地以单个剂量向所述受试者施用包含所述结合蛋白的约 5×10^9 、约 6×10^9 、约 7×10^9 、约 8×10^9 、约 9×10^9 、约 1×10^{10} 、约 1.1×10^{10} 、约 1.2×10^{10} 、约 1.3×10^{10} 、约 1.4×10^{10} 、约 1.5×10^{10} 、约 1.6×10^{10} 、约 1.7×10^{10} 、约 1.8×10^{10} 、约 1.9×10^{10} 或约 2×10^{10} 个活宿主细胞。

[0632] 实施例69a.根据实施例59a至65a中任一项所述的方法,其中所述方法包含任选地以单个剂量向所述受试者施用包含所述结合蛋白的约 5×10^9 至约 1×10^{11} 、约 5×10^9 至约 5×10^{10} 、约 5×10^9 至约 2×10^{10} 、约 5×10^9 至约 1.5×10^{10} 、约 5×10^9 至约 1×10^{10} 、约 1×10^{10} 至约 1×10^{11} 、约 1×10^{10} 至约 5×10^{10} 、约 1×10^{10} 至约 2×10^{10} 、或约 1×10^{10} 至约 1.5×10^{10} 个活宿主细胞。

[0633] 实施例70a.根据实施例59a至69a中任一项所述的方法,其进一步包含在施用所述结合蛋白、所述多核苷酸、所述载体、所述宿主细胞或所述组合物之前,确定所述受试者表达HLA-A*11,任选地HLA-A*11:01。

[0634] 实施例71a.根据实施例59a至70a中任一项所述的方法,其中所述方法进一步包含向所述受试者施用细胞因子。

[0635] 实施例72a.根据实施例71a所述的方法,其中所述细胞因子包含IL-2、IL-15或IL-21。

[0636] 实施例73a.根据实施例59a至72a中任一项所述的方法,其中所述受试者已经接受或正在接受免疫检查点抑制剂和/或刺激性免疫检查点药剂的激动剂。

[0637] 实施例74a.根据实施例1a至23a中任一项所述的结合蛋白、根据实施例24a至36a中任一项所述的多核苷酸、根据实施例37a至47a中任一项所述的表达载体、根据实施例48a至54a中任一项所述的宿主细胞,其中,任选地,所述宿主细胞包含CD8⁺T细胞、CD4⁺T细胞或两者,和/或根据实施例55a至58a中任一项所述的组合物,其在用于治疗受试者的与KRAS G12V或NRAS G12V突变或HRAS G12V突变相关的疾病或病症的方法中使用,其中,任选地,所

述疾病或病症包含癌症,其中,进一步任选地,所述癌症是实体癌或血液系统恶性病,并且其中,任选地,所述疾病或病症选自胰腺癌(pancreas cancer或pancreas carcinoma),任选地胰腺导管腺癌(PDAC);结直肠癌(colorectal cancer或colorectal carcinoma);肺癌,任选地非小细胞肺癌;胆道癌;子宫内膜癌(endometrial cancer或endometrial carcinoma);宫颈癌;卵巢癌;膀胱癌(bladder cancer);肝癌;髓系白血病,任选地髓系白血病,如急性髓系白血病;骨髓增生异常综合征;淋巴瘤,如非霍奇金氏淋巴瘤;慢性粒单核细胞白血病;急性淋巴细胞白血病(ALL);尿道癌;小肠癌;乳腺癌(breast cancer或breast carcinoma);黑色素瘤(任选地皮肤黑色素瘤、肛门黑色素瘤或粘膜黑色素瘤);神经胶质瘤;低分化甲状腺癌;神经母细胞瘤;组织细胞和树突状细胞赘生物;1型神经纤维瘤病;横纹肌肉瘤;软组织肉瘤;膀胱癌(bladder carcinoma);肉瘤;胶质母细胞瘤;鳞状细胞肺癌;间变性星形细胞瘤;慢性髓系白血病;弥漫性大B细胞淋巴瘤;双重打击淋巴瘤;头颈癌;头颈鳞状细胞癌;肝细胞癌;恶性周围神经鞘瘤;套细胞淋巴瘤;骨髓增生异常/骨髓增殖性赘生物,不可分类;外周T细胞淋巴瘤;前列腺癌;难治性贫血伴原始细胞增多-2;肾细胞癌;横纹肌样瘤;神经鞘瘤;继发性AML;小细胞肺癌;疗法相关的AML;胸腺癌;甲状腺滤泡癌;甲状腺恶性赘生物;甲状腺癌;甲状腺腺癌;尿路上皮癌;结肠癌;结直肠腺癌;甲状腺乳头状癌;或其晚期或转移性版本。

[0638] 实施例75a.根据实施例1a至23a中任一项所述的结合蛋白、根据实施例24a至36a中任一项所述的多核苷酸、根据实施例37a至47a中任一项所述的表达载体、根据实施例48a至54a中任一项所述的宿主细胞,其中,任选地,所述宿主细胞包含CD8+T细胞、CD4+T细胞或两者,和/或根据实施例55a至58a中任一项所述的组合物,其在制备用于治疗受试者的与KRAS G12V或NRAS G12V突变或HRAS G12V突变相关的疾病或病症的药物中使用,其中,任选地,所述疾病或病症包含癌症,其中,进一步任选地,所述癌症是实体癌或血液系统恶性病,并且其中,任选地,所述疾病或病症选自胰腺癌(pancreas cancer或pancreas carcinoma),任选地胰腺导管腺癌(PDAC);结直肠癌(colorectal cancer或colorectal carcinoma);肺癌,任选地非小细胞肺癌;胆道癌;子宫内膜癌(endometrial cancer或endometrial carcinoma);宫颈癌;卵巢癌;膀胱癌(bladder cancer);肝癌;髓系白血病,任选地髓系白血病,如急性髓系白血病;骨髓增生异常综合征;淋巴瘤,如非霍奇金氏淋巴瘤;慢性粒单核细胞白血病;急性淋巴细胞白血病(ALL);尿道癌;小肠癌;乳腺癌(breast cancer或breast carcinoma);黑色素瘤(任选地皮肤黑色素瘤、肛门黑色素瘤或粘膜黑色素瘤);神经胶质瘤;低分化甲状腺癌;神经母细胞瘤;组织细胞和树突状细胞肿瘤;1型神经纤维瘤病;横纹肌肉瘤;软组织肉瘤;膀胱癌(bladder carcinoma);肉瘤;胶质母细胞瘤;鳞状细胞肺癌;间变性星形细胞瘤;慢性髓系白血病;弥漫性大B细胞淋巴瘤;双重打击淋巴瘤;头颈癌;头颈鳞状细胞癌;肝细胞癌;恶性周围神经鞘瘤;套细胞淋巴瘤;骨髓增生异常/骨髓增殖性赘生物,不可分类;外周T细胞淋巴瘤;前列腺癌;难治性贫血伴原始细胞增多-2;肾细胞癌;横纹肌样瘤;神经鞘瘤;继发性AML;小细胞肺癌;疗法相关的AML;胸腺癌;甲状腺滤泡癌;甲状腺恶性赘生物;甲状腺癌;甲状腺腺癌;尿路上皮癌;结肠癌;结直肠腺癌;甲状腺乳头状癌;或其晚期或转移性版本。

[0639] 序列

[0640] SEQ ID NO:1-wt KRAS全长(UniProt:P01116)

[0641] MTEYKLVVVG AGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET CLLDILDTAG QEEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNTKSF EDIHHYREI KRVKDSEDVP MVLVGNKCDL PSRTVDTKQA QDLARSYGIP FIETSAKTRQ RVEDAFYTLV REIRQYRLKK ISKEEKTGPGC VKIKKCIIM

[0642] SEQ ID NO:2-KRAS 7-16G12V

[0643] VVVGAVGVGK

[0644] SEQ ID NO:3-KRAS 8-16G12V

[0645] VVGAVGVGK

[0646] SEQ ID NO:4-TCR 11N4A的KRAS 8-16G12V结合基序

[0647] x-V-G-A-x-G-x-x-K

[0648] SEQ ID NO:5-具有信号肽的TCR 11N4A α 链-原始(WT)核苷酸序列

[0649] atggccatgctcctggggcatcagtgctgattctgtggcttcagccagactgggtaaacagtcaaca gaagaatgatgaccagcaagttaagcaaaattcaccatccctgagcgtccaggaaggaagaatttctattctgaac tgtgactataactaacagcatgtttgattatttccctatggtacaaaaataccctgtgaaggtcctacattcctga tatctataagttccattaaggataaaaatgaagatggaagattcactgtcttcttaaaaaagtccaagcacct ctctctgcacattgtgccctcccagcctggagactctgcagtgacttctgtgcagcaagtggtgttcaggaac acacctcttgtctttggaaagggcacaagactttctgtgattgcaaataccagaaccctgacctgccgtgtacc agctgagagactctaaatccagtgaagaagctgtctgcctattcaccgattttgattctcaaaaaatgtgtcaca aagtaaggattctgatgtgtatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagt gctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacacct tcttccccagcccagaaagttcctgtgatgtcaagctggctgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaaactt tcaaaacctgtcagtgattgggttccgaatcctcctcctgaaagtggccgggtttaatctgctcatgacgtgcgg ctgtggtccagctga

[0650] SEQ ID NO:6-具有信号肽的TCR 11N4A β 链-原始(WT)核苷酸序列atgggctccagg ctgctctgttgggtgctgctttgtctcctgggagcaggcccagtaaaaggctggagtcactcaaactccaagatctc tgatcaaaacgagaggacagcaagtgacactgagctgctcccctatctctgggcataggagtgtatcctggtacca acagaccccaggacaggcccttcagttcctctttgaatacttcagtgagacacagagaaacaaaggaaacttcctt ggctgattctcagggcgccagttctctaactctcgtcttgagatgaatgtgagcaccttggagctgggggactcgg ccctttatctttgcgccagcagcgtcgggactgtggagcagtgacttcgggccgggcaccaggtcacggtcacaga ggacctgaaaaacgtgttcccacccagagtcgctgtgtttgagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaag gccacactgggtgtgcctggccacaggttctaccccagcacgtggagctgagctgggtgggtgaatgggaaggagg tgcacagtggggtcagcacagacccgcagccccctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatactgcctgag cagccgcctgaggggtctcgggcaccttctggcagaacccccgcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacggg ctctcggagaatgacgagtgagaccaggtatagggccaaaacctgtcaccagatcgtcagcggcaggcctggggta gacgagactgtggcttcacctccgagttaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatgagatcttgcct aggggaaggccaccttgatgccgtgctggctcagtgccctcgtgctgatggccatggtcaagagaaaggattccaga ggctag

[0651] SEQ ID NO:7-TCR 11N4A TCR β -P2A-TCR α 多核苷酸-密码子优化A

[0652] ATGGGCTCTAGACTGTTGTGTTGGGTTCTGCTGTGCTGCTTGGAGCTGGACCTGTGAAAGCTGGAGTT ACCCAGACACCCAGATATCTGATCAAGACCAGAGGACAGCAGGTGACACTGAGCTGTAGCCCTATTTCTGGCCACAG

GAGCGTTAGCTGGTATCAGCAAAACACCCGGGCAGGGACTACAATTTCTATTTCGAGTACTTCAGCGAGACCCAGCGGA
ATAAGGGCAATTTTCTGTCAGATTTAGCGGCAGGCAGTTCAGCAACAGCAGAAGCGAGATGAACGTGAGCACCCCTG
GAATTAGGCGATTCTGCTCTGTACCTGTGTGCCCTTCTGTGGGAACAGTGGAGCAGTACTTTGGCCCCGGCACGAG
ACTGACAGTGACAGAGGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTAGCGAGGCCGAGATCA
GCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTACCCCGACCACGTGGAAGTGTCTTGGTGGGTC
AACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCGTGAAAGAGCAGCCCCGCCCTGAACGACAGCCG
GTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGC
AGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGTCTGCTGAG
GCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACCATCCTGTACGA
GATCCTGCTGGGCAAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGG
ACAGCCGGGGCGGTTCCGGAGCCACGAACCTCTCTGTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCC
ATGGCCATGTTACTAGGAGCGAGCGTGCTGATTCTGTGGTTACAGCCTGATTGGGTGAACCTCTCAGCAGAAGAACGA
CGATCAGCAGGTGAAGCAGAATAGCCCCTCTCTGTCTGTGCAGGAGGGCAGAATCTCTATCCTGAATTGCGACTACA
CCAACAGCATGTTGACTATTTTCTGTGGTACAAAAAATACCCCGCCGAGGGCCCTACATTCCTGATCAGCATCAGC
TCTATCAAGGACAAGAACGAGGATGGCAGATTTACCGTGTTCCCTGAACAAGAGCGCCAAGCACCTGAGCCTGCACAT
TGTGCCTTCTCAACCTGGCGATTCTGCTGTGTACTTTTGTGCTGCCTCTGGAGTGAGCGGCAATACACCTCTAGTGT
TCGGGAAGGGCACAAGACTGTCTGTTATTGCAAACATTCAAAACCCCGACCCTGCTGTGTACCAGCTGCGGGACAGC
AAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCAGAGCAAGGACAGCGA
CGTGATACATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCA
ACAAGAGCGACTTCGCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCAAGCCCCGAG
AGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACCTCCAGAACCTCAGCGTGAT
CGGCTTCCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0653] SEQ ID NO:8-11N4A TCR β -P2A-TCR α 多核苷酸-密码子优化B

[0654] ATGGGATCTAGATTGCTTTGTTGGGTGCTGCTGTGCCTGCTCGGAGCCGGACCTGTGAAAGCTGGCGTT
ACCCAGACACCTAGATACCTGATCAAGACCAGAGGCCAGCAAGTGACCCTGAGCTGCTCTCCTATCAGCGGCCACAG
AAGCGTGTCTGGTATCAGCAGACACCTGGACAGGGCCTGCAGTTCCTGTTTCGAGTACTTCAGCGAGACACAGCGGA
ACAAGGGCAACTTCCCCGGCAGATTTTCCGGCAGACAGTTTCAGCAACAGCCGCAGCGAGATGAACGTGTCCACACTG
GAAGTGGGCGACAGCGCCCTGTATCTGTGTGCCCTTCTGTGGGCACCGTGGAACAGTACTTTGGCCCTGGCACCAG
ACTGACCGTGACCGAGGATCTGAAGAACGTGTTCCACCTGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCA
GCCACACACAGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCCACCGGCTTCTATCCCGATCACGTGGAAGTGTCTTGGTGGGTC
AACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGTACCGATCCTCAGCCTCTGAAAGAGCAGCCCCGTCTGAACGACAGCAG
ATACTGCCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCAGAAACCACTTCAGATGCCAGGTGC
AGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGGATAGAGCCAAGCCTGTGACACAGATCGTGTCTGCCGAA
GCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGTCTGCCACAATCCTGTACGA
GATCCTGCTGGGCAAAGCCACTCTGTACGCCGTGCTGGTTTCTGCCCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGG
ATTCTAGAGGCGGATCCGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTTAAACAGGCCGGCGACGTGGAAGAGAACCCTGGACCT
ATGGCTATGCTGCTGGGAGCCTCTGTGCTGATCCTGTGGCTGCAACCCGATTGGGTCAACAGCCAGCAGAAGAACGA
CGACCAGCAAGTCAAGCAGAACAGCCCCAGCCTGAGCGTGCAAGAGGGCAGAATCAGCATCCTGAAGTGCAGTACA
CCAACCTCTATGTTGACTACTTTTCTGTGGTACAAGAAGTACCCCGCCGAGGGACCCACCTTCCTGATCAGCATCAGC

AGCATCAAGGACAAGAACGAGGACGGCCGGTTACCGTGTTTCTGAACAAGAGCGCCAAGCACCTGAGCCTGCACAT
CGTGCCTTCTCAGCCTGGCGATAGCGCCGTGTACTTTTGTGCTGCCAGCGCGTGTGTCAGGCAACACCCCTCTGGTTT
TTGGCAAGGGCACACGCCTGTCCGTGATCGCCAACATTCAGAACCCTGATCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACAGC
AAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTACCCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGA
CGTGTACATCACCGATAAGTGCCTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCA
ACAAGTCCGATTTTCGCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGTCCTGAG
TCCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAATCTGAGCGTGAT
CGGCTTCAGAATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGATTCAACCTGCTGATGACCCTCAGACTGTGGTCCAGCTGA

[0655] SEQ ID NO:9-CD8 α -T2A-CD8 β -P2A-11N4A TCR β -P2A-TCR α 多核苷酸密码子优化A

[0656] ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTTCTGCATGCCGCTAGACCCAGCCAG
TTCAGAGTGTCCCCTCTGGACAGAACCTGGAACCTGGGCGAGACAGTGGAACTGAAGTGCCAGGTGCTGCTGAGCAA
TCCTACCAGCGGCTGCAGCTGGCTGTTTCAGCCTAGAGGTGCTGCCGCCTCTCCTACCTTTCTGCTGTACCTGAGCC
AGAACAAGCCCCAAGGCCGCCGAAGGACTGGACACCCAGAGATTACGCGCAAGAGACTGGGCGACACCTTCGTGCTG
ACCCTGAGCGACTTCAGAAGAGAGAACGAGGGCTACTACTTCTGCAGCGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAG
CCACTTCGTGCCCGTGTTTCTGCCCCCAAGCCTACAACAACCCCTGCTCCTAGACCTCCTACACCAGCTCCTACAA
TCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCAGAAGCTTGTAGACCTGCTGCTGGCGGAGCCGTGCATACAAGAGGACTG
GATTTTCGCTGCGACATCTACATCTGGGCCCTCTGGCTGGAACATGTGGCGTGCTGCTGCTGTCCCTGGTCATCAC
CCTGTACTGCAACCACCGGAACAGGCGGAGAGTGTGCAAGTGCCCTAGACCTGTGGTCAAGAGCGGCGACAAGCCTA
GCCTGAGCGCCAGATATGTTGGCAGCGGAGAAGGCAGAGGCTCCCTGCTTACATGCGGCGACGTGGAAGAGAACCC
GGACCTATGAGGCCTAGACTGTGGCTGCTTCTGGCTGCCAGCTGACAGTGTGCACGGCAATTCTGTCTGCAGCA
GACCCCTGCCTACATCAAGGTGCAGACCAACAAGATGGTCATGCTGAGCTGCGAGGCCAAGATCAGCCTGTCCAACA
TGCGGATCTACTGGCTGCGGCAGAGACAGGCCCTAGCTCTGATAGCCACCACGAGTTTCTGGCCCTGTGGGATTCT
GCCAAGGGCACCATTACCGCGAGGAAGTGGAACAAGAGAAGATCGCCGTGTTCCGGGACGCCAGCAGATTATCCT
GAACCTGACCAGCGTGAAGCCCGAGGACAGCGGCATCTATTTCTGCATGATCGTGGGACGCCAGCAGATTATCCT
GCAAGGGAACACAGCTGAGCGTGGTGGACTTCCTGCCTACTACAGCCCAGCCTACCAAGAAGTCTACCCTGAAGAAA
CGCGTGTGCAGACTGCCAGGCCTGAGACACAAAAGGGCCCTCTGTGCAGCCCTATCACACTGGGATTGCTGGTGGC
TGGCGTTCTGGTCTGCTGGTGTCTCTGGGAGTTGCCATCCACCTGTGCTGTAGAAGAAGGCGGGCCAGACTGCGGT
TCATGAAGCAGTTCTACAAAGGCAGCGGCGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAACAAGCCGGCGACGTCGAGGAAAAT
CCTGGACCTATGGGCTCTAGACTGTTGTGTTGGGTTCTGCTGTGTCTGCTTGGAGCTGGACCTGTGAAAGCTGGAGT
TACCCAGACACCCAGATATCTGATCAAGACCAGAGGACAGCAGGTGACACTGAGCTGTAGCCCTATTTCTGGCCACA
GGAGCGTTAGCTGGTATCAGCAAACACCCGGGCGAGGACTACAATTTCTATTCGAGTACTTCAGCGAGACCCAGCGG
AATAAGGGCAATTTTCTGGCAGATTTAGCGGCAGGCAGTTCAGCAACAGCAGAAGCGAGATGAACGTGAGCACCCCT
GGAATTAGGCGATTCTGCTCTGTACCTGTGTGCCTCTTCTGTGGGAACAGTGGAGCAGTACTTTGGCCCCGGCACGA
GACTGACAGTGACAGAGGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTAGCGAGGCCGAGATC
AGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTACCCCGACCACGTGGAACGTCTTGGTGGGT
CAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCTGAAAGAGCAGCCCGCCCTGAACGACAGCC
GGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTG
CAGTTCTACGGCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGTCTGCTGA
GGCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACCATCCTGTACG

AGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAG
GACAGCCGGGGCGGTTCCGGAGCCACGAACTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCC
CATGGCCATGTTACTAGGAGCGAGCGTGCTGATTCTGTGGTTACAGCCTGATTGGGTGAACTCTCAGCAGAAGAACG
ACGATCAGCAGGTGAAGCAGAATAGCCCCCTCTGTCTGTGTCAGGAGGGCAGAATCTCTATCCTGAATTGCGACTAC
ACCAACAGCATGTTGCACTATTTTCTGTGGTACAAAAAATACCCCGCCGAGGGCCCTACATTCTGATCAGCATCAG
CTCTATCAAGGACAAGAACGAGGATGGCAGATTTACCGTGTTCCTGAACAAGAGCGCCAAGCACCTGAGCCTGCACA
TTGTGCCTTCTCAACCTGGCGATTCTGCTGTGTACTTTTGTGCTGCCTCTGGAGTGAGCGGCAATACACCTCTAGTG
TTCGGGAAGGGCACAAGACTGTCTGTTATTGCAAACATTCAAAACCCCGACCCTGCTGTGTACCAGCTGCGGGACAG
CAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCG
ACGTGTACATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCC
AACAAGAGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGA
GAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGAAAAGAGCTTCGAGACAGACCAACCTGAACTTCCAGAACCTCAGCGTGA
TCGGCTTCCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0657] SEQ ID NO: 10-CD8 α -T2A-CD8 β -P2A-11N4ATCR β -P2A-TCR α 多核苷酸密码子优化B

[0658] ATGGCATTGCCTGTTACAGCTCTGCTGCTGCCCTGGCTCTGCTTCTGCATGCTGCTAGACCCAGCCAG
TTCAGAGTGTCCTCTGGACAGAACCTGGAACCTGGGCGAGACAGTGGAAGTGAAGTGCCAGGTGCTGCTGAGCAA
TCCTACCAGCGGCTGCAGCTGGCTGTTTACGCTAGAGGTGCTGCCGCCTCTCCTACCTTTCTGCTGTACCTGAGCC
AGAACAAGCCCAAGGCCGCCGAAGGACTGGACACCCAGAGATTACGCGCAAGAGACTGGGCGACACCTTCGTGCTG
ACCCTGAGCGACTTCAGAAGAGAGAACGAGGGCTACTACTTCTGCAGCGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAG
CCACTTCGTGCCCCTGTTTCTGCCCCCAAGCCTACAACAACCCCTGCTCCTAGACCTCCTACACCAGCTCCTACAA
TCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCAGAAGCTTGTAGACCTGCTGCTGGCGGAGCCGTGCATACAAGAGGACTG
GATTTGCGCTGCGACATCTACATCTGGGCCCTCTGGCTGGAACATGTGGCGTGCTGCTGTCTCTGGTCATCAC
CCTGTACTGCAACCACCGGAACAGGCGGAGAGTGTGCAAGTGCCTAGACCTGTGGTCAAGAGCGGCGACAAGCCTA
GCCTGAGCGCCAGATATGTTGGCAGCGGAGAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGCGGCGACGTGGAAGAGAACCC
GGACCTATGAGGCCTAGACTGTGGCTGCTTCTGGCTGCCAGCTGACAGTGCTGCACGGCAATTCTGTCTCTGCAGCA
GACCCCTGCCTACATCAAGGTGCAGACCAACAAGATGGTCATGCTGAGCTGCGAGGCCAAGATCAGCCTGTCCAACA
TGCGGATCTACTGGCTGCGGCAGAGACAGGCCCTAGCAGCGATTCTCACCACGAGTTTCTGGCCCTGTGGGATAGC
GCCAAGGGAACCATTCACGGCGAGGAAGTGAACAAGAGAAGATCGCCGTGTTCCGGGACGCCAGCAGATTATCCT
GAACCTGACCAGCGTGAAGCCCGAGGACAGCGGCATCTATTTCTGCATGATCGTGGGCGAGCCCGAGCTGACATTTG
GCAAGGGAACACAGCTGAGCGTGGTGGACTTCCTGCCTACTACAGCCCAGCCTACCAAGAAGTCTACCCTGAAGAAA
CGCGTGTGCAGACTGCCAGGCCTGAGACACAAAAGGGCCCTCTGTGCAGCCCTATCACACTGGGATTGCTGGTGGC
TGGCGTTCTGGTCTGCTGGTTTCTCTGGGAGTTGCCATCCACCTGTGCTGCAGACGAGAAGGGCCAGACTGCGGT
TCATGAAGCAGTTCTACAAAGGCAGCGGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAACAAGCCGGCGACGTGAAGAAAAT
CCTGGACCAATGGGCGAGCAGACTGCTGTGCTGGGTTCTGCTGTGTCTGCTTGGAGCCGGACCTGTGAAAGCTGGCGT
GACCCAGACACCTAGATACCTGATCAAGACCAGAGGCCAGCAAGTGACACTGAGCTGTAGCCCCATCAGCGGCCACA
GAAGCGTGTCTGGTATCAGCAGACTCCTGGACAGGGCCTGCAGTTCCTGTTGAGTACTTCTCCGAGACACAGAGG
AACAAGGGCAACTTCCCCGGCAGATTCTCCGGCAGACAGTTCAGCAACTCCCGCAGCGAGATGAACGTGTCCACACT
GGAAGTGGGAGATAGCGCCCTGTACCTGTGTGCCTCTTCTGTGGGAACCGTGAACAGTACTTCGGCCCTGGCACAA
GACTGACCGTGACCGAGGACCTGAAGAACGTGTTCCACCTGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATC

TCTCACACCCAGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCCACCGGCTTCTATCCCGATCACGTGGAAGTGTCTTGGTGGGT
CAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCTGTGTACCGATCCTCAGCCACTGAAAGAGCAGCCCGCTCTGAACGACAGCA
GATACTGCCTGTCTCCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCAGAAACCACTTCAGGTGTCAGGTG
CAGTTTTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGATAGAGCCAAGCCTGTGACACAGATCGTGTCTGCCGA
AGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTTCTGTCTGCCACCATCCTGTACG
AGATCCTGCTGGGCAAAGCCACTCTGTACGCCGTGTTGGTGTCTGCCCTGGTGTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAG
GATTCTAGAGGCGGATCCGGAGCCACAAATTTCTCACTGCTGAAGCAGGCCGGGGATGTTGAGGAAAACCCAGGACC
TATGGCTATGCTGCTGGGAGCCTCTGTGCTGATCCTGTGGCTGCAACCCGATTGGGTCAACAGCCAGCAGAAGAACG
ACGACCAGCAAGTCAAGCAGAACAGCCCCAGCCTGAGCGTGCAAGAGGGCAGAATCAGCATCCTGAACTGCGACTAC
ACCAACTCTATGTTTCTGACTACTTTCTGTGGTACAAGAAGTACCCCGCCGAGGGACCCACCTTCCTGATCAGCATCAG
CAGCATCAAGGACAAGAACGAGGACGGCCGTTACCGTGTCTTCTGAACAAGAGCGCCAAGCACCTGAGCCTGCACA
TCGTGCCTTCTCAGCCTGGCGATAGCGCCGTGTACTTTTGTGCTGCCAGCGGCGTGTGTCAGGCAACACCCCTCTGGTT
TTTGGCAAGGGCACACGCCTGTCCGTGATCGCCAACATTCAGAACCCTGATCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACAG
CAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCG
ACGTGTACATCACCGATAAGTGCCTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCC
AACAAGTCCGATTTTCGCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGTCTGA
GTCCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACCAACCTGAACTTCCAGAATCTGAGCGTGA
TCGGCTTCAGAATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGATTCAACCTGCTGATGACCCTCAGACTGTGGTCCAGCTGA

[0659] SEQ ID NO:11-11N4A TCR α 链-原始蛋白,具有带下划线的信号肽

[0660] MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAE
GPTFLISISSIKDKNEDGRFTVFLNLSAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAASGVSGNTPLVFGKGTRLSVIANIQNP
DPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSI
IPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS*

[0661] SEQ ID NO:12-11N4A TCR α 链-原始蛋白,无信号肽

[0662] QQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEPTFLISISSIKDKNEDGRFT
VFLNLSAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAASGVSGNTPLVFGKGTRLSVIANIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFT
DFDSQTNVSQSKSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEK
SFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS*

[0663] SEQ ID NO:13-11N4ATCR α 链可变结构域,无信号肽

[0664] QQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEPTFLISISSIKDKNEDGRFTV
FLNLSAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAASGVSGNTPLVFGKGTRLSVIA

[0665] SEQ ID NO:14-11N4A TCR α 链可变结构域CDR1 α

[0666] NSMFDY

[0667] SEQ ID NO:15-11N4A TCR α 链可变结构域CDR2 α

[0668] ISSIKDK

[0669] SEQ ID NO:16-11N4A TCR α 链可变结构域CDR3 α -IMGT接合

[0670] CAASGVSGNTPLVF

[0671] SEQ ID NO:17-11N4A TCR α 链可变结构域CDR3 α -IMGT

[0672] AASGVSGNTPLV

- [0673] SEQ ID NO:18-11N4A TCR α 链恒定结构域(原始蛋白)
- [0674] NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVDYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS
DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0675] SEQ ID NO:19-11N4A TCR α 链恒定结构域(cys修饰的蛋白)
- [0676] NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVDYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS
DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0677] SEQ ID NO:20-11N4A TCR α 链,无信号肽,cys修饰的
- [0678] QQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTV
FLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAASGVSGNTPLVFGKGRSLSVIANIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF
DSQTNVSQSKDSVDYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFE
TDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
- [0679] SEQ ID NO:21-11N4A TCR β 链-原始蛋白,具有带下划线的信号肽
- [0680] MGRLLCWLCLLGAGPVKAGVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCSPISGHRVSWYQQTPGQGLQFLFEYF
SETQRNKG NFPGRFSGRQFSNSRSEMNVTLELGDSALYLCASSVGTVEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEP
SEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNPRNH
FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLM
MVKRKDSRG
- [0681] SEQ ID NO:22-11N4A TCR β 链-原始蛋白,无信号肽
- [0682] GVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCSPISGHRVSWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKG NFPGRFSGRQFSN
SRSEMNVTLELGDSALYLCASSVGTVEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFY
PDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA
KPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG
- [0683] SEQ ID NO:23-11N4A TCR β 链可变结构域,无信号肽
- [0684] GVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCSPISGHRVSWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKG NFPGRFSGRQFSN
SRSEMNVTLELGDSALYLCASSVGTVEQYFGPGTRLTVT
- [0685] SEQ ID NO:24-11N4A TCR β 链可变结构域CDR1 β
- [0686] SGHRS
- [0687] SEQ ID NO:25-11N4A TCR β 链可变结构域CDR2 β
- [0688] YFSETQ
- [0689] SEQ ID NO:26-11N4A TCR β 链可变结构域CDR3 β -IMGT接合
- [0690] CASSVGTVEQYF
- [0691] SEQ ID NO:27-11N4A TCR β 链可变结构域CDR3 β -IMGT
- [0692] ASSVGTVEQY
- [0693] SEQ ID NO:28-11N4A TCR β 链恒定结构域(原始蛋白)
- [0694] EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPA
LNDSRYCLSSRLRV SATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLS
ATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG*
- [0695] SEQ ID NO:29-11N4ATCR β 链恒定结构域(cys修饰的蛋白)
- [0696] EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL

NDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG

[0697] SEQ ID NO:30-11N4A TCR β 链,无信号肽(cys修饰的蛋白)

[0698] GVTQTTRYLIKTRGQQVTLSCSPI SGHRVSWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKGFPGRFSGRQFSN SRSEMNVTLELGDSALYLCASSVGTVEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFY PDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRA KPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG

[0699] SEQ ID NO:31-11N4A TCR β -P2A-TCR α 蛋白,具有带下划线的信号肽

[0700] MGSRLLCWVLLCLLGAGPVKAGVTQTTRYLIKTRGQQVTLSCSPI SGHRVSWYQQTPGQGLQFLFEY FSETQRNKGFPGRFSGRQFSNSRSEMNVTLELGDSALYLCASSVGTVEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVF EPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRGSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMAMLLGASV LILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQE GRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCA ASGVSGNTPLVFGKGTRLSVIANIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVYITDKCVLDMRS MDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSI IPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGF NLLMTLRLWSS*

[0701] SEQ ID NO:32 CD8 α -T2A-CD8 β -P2A-11N4A TCR β -P2A- α 蛋白,具有带下划线的信号肽

[0702] MALPVTALLPLALLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPT FLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPR PPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRP VVKSGDKPSLSARYVGSGEGRGSLTCGDVEENPGPMRPRLLWLLAAQLTVLHGNSVLQQT PAYIKVQTNKMVMLS CEAKISLSNMRIYWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDASRFILNLT SVKPEDSGIYFC MIVGSPELTFGKG TQLSVDFLPTTAQPTTKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITLGLLVAGVLVLLVSLGVAIH LCCRRRRARLRFMKQFYKGS GATNFSLLKQAGDVEENPGPMGSRLLCWVLLCLLGAGPVKAGVTQTTRYLIKTRGQ QVTLSCSPI SGHRVSWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKGFPGRFSGRQFSNSRSEMNVTLELGDSALYLCAS SVGTVEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCT DPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFT SESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRGSGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMAMLLGASV LILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNED GRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAASGVSGNTPLVFGKGTRLSVIANIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKDSVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSI IPEDTFFPSPESSCDVK LVEKSFETDTNLFQNL SVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS*

[0703] SEQ ID NO:33-11N6 TCR α -原始核苷酸序列

[0704] Atggaaactctcctgggagtgctctttggtgattctatggcttcaactggctagggtgaacagtcaaca gggagaagaggatcctcaggccttgagcatccaggagggtgaaaatgccaccatgaactgcagttacaaaactagt ataaacaatttacagtggtatagacaaaattcaggtagaggccttgccacctaattttaatacgttcaaatgaaa gagagaaacacagtggaagattaagagtcacgcttgacacttccaagaaaagcagttccttggtgatcacggcttc

ccgggcagcagacactgcttcttacttctgtgctacggaccctatgaacaccaatgcaggcaaataacctttggg
gatgggactacgctcactgtgaagccaaatatccagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagactctaaat
ccagtgacaagtctgtctgcctattcaccgattttgatttctcaacaaatgtgtcacaaagtaaggattctgatgt
gtatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaac
aaatctgacttttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttccccagcccagaaa
gttctgtgatgtcaagctggctcgagaaaagctttgaaacagatacgaacctaaactttcaaacctgtcagtgat
tgggttccgaatcctcctcctgaaagtggcgggttaatactgctcatgacgctgcggctgtgggtccagctga

[0705] SEQ ID NO:34-11N6 TCR β -原始核苷酸序列

[0706] atgggcaccaggtcctctgctggggcgccctctgtctcctgggagcagaactcacagaagctggagt
tgcccagctctcccagatataagattatagagaaaaggcagagtggtgttttttggtgcaatcctatatctggccat
gctaccttttactggtaccagcagatcctgggacagggcccaaagcttctgattcagtttcagaataacggtgtag
tggatgattcacagttgcctaaggatcgattttctgcagagaggtcaaaggagtagactccactctcaagatcca
acctgcaaagcttgaggactcggcgtgtatctctgtgccagcagccccctacggggggagcgtctcctacgagcag
tacttcggggccgggcaccaggtcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttcccacccgaggtcgtgtgtttg
agccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactgggtgtgcctggccacaggttctaccccagcca
cgtggagctgagctgggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtcagcacagacccgcagccccctcaaggag
cagcccgccctcaatgactccagatactgcctgagcagccgcctgagggtctcgccaccttctggcagaaccccc
gcaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggtctcggagaatgacgagtggaccaggatagggccaaacc
tgtcaccagatcgtcagcgccgaggcctggggtagagcagactgtggcttcacctccgagtcttaccagcaaggg
gtcctgtctgccaccatcctctatgagatcttgctaggggaaggccaccttgatgccgtgctgggtcagtgccctcg
tgctgatggccatggtcaagagaaaaggattccagaggctag

[0707] SEQ ID NO:35-11N6 TCR β -P2A- α 密码子优化

[0708] ATGGGCACAAGACTTCTCTGTTGGGCTGCACTGTGCTTGCTTGGAGCTGAGCTGACAGAAGCTGGAGTT
GCCCAATCTCCTAGGTACAAGATCATCGAGAAGCGGCAGTCTGTGGCCTTTTGGTGCAATCCCATTAGCGGACATGC
CACCCTGTACTGGTATCAGCAAAATCTGGGACAGGGCCCTAAACTGCTGATCCAGTTCCAGAATAACGGCGTGGTGG
ACGATTCTCAACTGCCTAAGGACCGGTTTTCTGCCGAGAGACTGAAAGGCGTTGATAGCACCCTGAAGATCCAACCT
GCCAAACTGGAGGATTCTGCCGTGTACCTGTGTGCTAGCAGCCCTTATGGAGGATCTGTGTCTTATGAGCAGTACTT
CGGACCTGGCACCAGACTGACCGTGACTGAAGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCTA
GCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTACCCGACCACGTGGAA
CTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGC
CCTGAACGACAGCCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACT
TCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAG
ATCGTGTCTGCTGAGGCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGC
CACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTGGTGTGATGGCCA
TGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGCGGTTCCGGAGCCACGAACCTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAA
GAAAACCCCGGTCCCATGGAGACACTGCTTGGCGTATCACTGGTGATTCTGTGGCTGCAACTGGCTAGAGTGAACCTC
TCAGCAGGGAGAAGAGGATCCTCAAGCTCTGAGCATTAGGAAGGCGAAAACGCAACCATGAATTGCTCATAACAAGA
CCAGCATCAACAACCTGCAGTGGTACCGGCAGAATAGCGGAAGAGGACTGGTTCACCTGATTTTAATCAGGTCTAAT
GAAAGGGAGAAGCACAGCGGCAGACTGAGAGTTACCCTGGACACATCCAAGAAATCTTCTTCTCTGCTGATTACAGC

CTCTAGAGCCGCCGATACAGCCAGCTACTTTTGTGCCACAGATCCCATGAACACCAATGCCGAAAGAGCACATTTCG
GCGATGGCACAACCCTGACAGTTAAGCCCAATATCCAGAATCCCGATCCTGCCGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAG
AGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACGT
GTACATCACCGATAAGTGCCTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACA
AGAGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGC
AGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTCAGCGTGATCGG
CTTCCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0709] SEQ ID NO: 36-CD8 α -T2A-CD8 β -P2A-11N6 TCR β -P2A- α 密码子优化

[0710] ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCCTCTGGCTCTGCTTCTGCATGCCGCTAGACCCAGCCAG
TTCAGAGTGTCCCCTCTGGACAGAACCTGGAACCTGGGCGAGACAGTGGAAGTGAAGTGCCAGGTGCTGCTGAGCAA
TCCTACCAGCGGCTGCAGCTGGCTGTTTACGCCTAGAGGTGCTGCCGCCTCTCCTACCTTTCTGCTGTACCTGAGCC
AGAACAAGCCCAAGGCCGCCGAAGGACTGGACACCCAGAGATTACGCGCAAGAGACTGGGCGACACCTTCGTGCTG
ACCCTGAGCGACTTCAGAAGAGAGAACGAGGGCTACTACTTCTGCAGCGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAG
CCACTTCGTGCCCCTGTTTCTGCCCCCAAGCCTACAACAACCCCTGCTCCTAGACCTCCTACACCAGCTCCTACAA
TCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCAGAAGCTTGTAGACCTGCTGCTGGCGGAGCCGTGCATACAAGAGGACTG
GATTTTCGCTGCGACATCTACATCTGGGCCCTCTGGCTGGAACATGTGGCGTGCTGCTGCTGTCCCTGGTCATCAC
CCTGTACTGCAACCACCGGAACAGGCGGAGAGTGTGCAAGTGCCTAGACCTGTGGTCAAGAGCGGCGACAAGCCTA
GCCTGAGCGCCAGATATGTTGGCAGCGGAGAAGGCAGAGGCTCCCTGCTTACATGCGGCGACGTGGAAGAGAACCC
GGACCTATGAGGCCTAGACTGTGGCTGCTTCTGGCTGCCAGCTGACAGTGTGCACGGCAATTCTGTCTGCAGCA
GACCCCTGCCTACATCAAGGTGCAGACCAACAAGATGGTCATGCTGAGCTGCGAGGCCAAGATCAGCCTGTCCAACA
TGCGGATCTACTGGCTGCGGCAGAGACAGGCCCTAGCTCTGATAGCCACCACGAGTTTCTGGCCCTGTGGGATTCT
GCCAAGGGCACCATTACGCGCAGGAAGTGAACAAGAGAAGATCGCCGTGTTCCGGGACGCCAGCAGATTATCCT
GAACCTGACCAGCGTGAAGCCCGAGGACAGCGGCATCTATTTCTGCATGATCGTGGGCAGCCCCGAGCTGACATTTG
GCAAGGGAACACAGCTGAGCGTGGTGGACTTCCTGCCTACTACAGCCCAGCCTACCAAGAAGTCTACCCTGAAGAAA
CGCGTGTGCAGACTGCCAGGCCTGAGACACAAAAGGGCCCTCTGTGCAGCCCTATCACACTGGGATTGCTGGTGGC
TGGCGTTCTGGTCTGCTGGTGTCTCTGGGAGTTGCCATCCACCTGTGCTGTAGAAGAAGGCGGGCCAGACTGCGGT
TCATGAAGCAGTTCTACAAAGGCAGCGGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAACAAGCCGGCGACGTGAGGAAAAT
CCTGGACCTATGGGCACAAGACTTCTCTGTTGGGTGCACTGTGCTTGCTTGAGCTGAGCTGACAGAAGCTGGAGT
TGCCCAATCTCCTAGGTACAAGATCATCGAGAAGCGGCAGTCTGTGGCCTTTTGGTGCAATCCCATTAGCGGACATG
CCACCCTGTACTGGTATCAGCAAATTCTGGGACAGGGCCCTAAACTGCTGATCCAGTTCCAGAATAACGGCGTGGTG
GACGATTCTCAACTGCCTAAGGACCGGTTTTCTGCCGAGAGACTGAAAGGCGTTGATAGCACCCCTGAAGATCCAACC
TGCCAAACTGGAGGATTCTGCCGTGTACCTGTGTGCTAGCAGCCCTTATGGAGGATCTGTGTCTTATGAGCAGTACT
TCGGACCTGGCACCAGACTGACCGTGAAGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTTCGAGCCT
AGCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTACCCCGACCACGTGGA
ACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCG
CCCTGAACGACAGCCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCA
TTCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCA
GATCGTGTCTGCTGAGGCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCG
CCACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTGGTGTGCTGATGGCC

ATGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGCGGTTCCGGAGCCACCAACTTCAGCCTGCTTAAACAGGCCGGCGACGTGGA
AGAGAACCCTGGACCTATGGAGACACTGCTTGGCGTATCACTGGTGATTCTGTGGCTGCAACTGGCTAGAGTGA
CTCAGCAGGGAGAAGAGGATCCTCAAGCTCTGAGCATTGAGGAAGGCGAAAACGCAACCATGAATTGCTCATACAAG
ACCAGCATCAACAACCTGCAGTGGTACCGGCAGAATAGCGGAAGAGGACTGGTTCACCTGATTTTAATCAGGTCTAA
TGAAAGGGAGAAGCACAGCGGCAGACTGAGAGTTACCCTGGACACATCCAAGAAATCTTCTTCTGCTGATTACAG
CCTCTAGAGCCGCCGATACAGCCAGCTACTTTTGTGCCACAGATCCCATGAACACCAATGCCGGAAGAGCACATTC
GGCGATGGCACAACCCTGACAGTTAAGCCCAATATCCAGAATCCCGATCCTGCCGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAA
GAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACG
TGTACATCACCGATAAGTGCCTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAAC
AAGAGCGACTTCGCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCAAGCCCCGAGAG
CAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTCCAGAACCTCAGCGTGATCG
GCTTCCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0711] SEQ ID NO:37-11N6 TCR α 链-原始蛋白,具有带下划线的信号肽

[0712] METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEGENATMNCSYKTSINNQLQWYRQNSGRGLVHLIL
IRSNEREKHSGRRLRVTLDTSKKSSLLITASRAADTASYFCATDPMNTNAGKSTFGDGTTLTVKPNIQNPDPVYQ
LRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF
FPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS*

[0713] SEQ ID NO:38-11N6 TCR α 链-原始蛋白,无信号肽

[0714] QQGEEDPQALS IQEGENATMNCSYKTSINNQLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKH

[0715] SGRLRVTLDTSKKSSLLITASRAADTASYFCATDPMNTNAGKSTFGDGTTLTVKPNIQNPDPVYQL
RDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF
PSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS*

[0716] SEQ ID NO:39-11N6 TCR α 链可变结构域,无信号肽

[0717] QQGEEDPQALS IQEGENATMNCSYKTSINNQLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRRLRVTLDTSK
SSLLITASRAADTASYFCATDPMNTNAGKSTFGDGTTLTVKP

[0718] SEQ ID NO:40-11N6 TCR α 链可变结构域CDR1 α

[0719] TSINN

[0720] SEQ ID NO:41-11N6 TCR α 链可变结构域CDR2 α

[0721] IRSNERE

[0722] SEQ ID NO:42-11N6 TCR α 链可变结构域CDR3 α -IMGT接合

[0723] CATDPMNTNAGKSTF

[0724] SEQ ID NO:43-11N6 TCR α 链可变结构域CDR3 α -IMGT

[0725] ATDPMNTNAGKST

[0726] SEQ ID NO:44-11N6 TCR α 链恒定结构域(原始蛋白)

[0727] NIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK
DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

[0728] SEQ ID NO:45-11N6 TCR α 链恒定结构域(cys修饰的蛋白)

[0729] NIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNK
DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

[0730] SEQ ID NO:46-11N6 TCR α 链,无信号肽,cys修饰的

[0731] QQGEEDPQALSIQEGENATMNC SYKTSINN LQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR LRVTLDTSKK
SSSLLITASRAADTASYFCATDPMNTNAGKSTFGDGTTLTVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNV
SQSKSDSYIITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLN
FQNL SVIGFRILL LKVAGFNLLMTLRLWSS

[0732] SEQ ID NO:47-11N6 TCR β 链原始蛋白,具有带下划线的信号肽

[0733] MGTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGP KLLIQFQ
NNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKI QPAKLEDSAVYLCASSPYGGSVS YEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEV
AVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WVVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQ
NPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSA
LVLMAMVKRKDSRG

[0734] SEQ ID NO:48-11N6 TCR β 链原始蛋白,无信号肽

[0735] GVAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGP KLLIQFQNNGVDDSQLPKDRFSAERLK
GVDSTLKI QPAKLEDSAVYLCASSPYGGSVS YEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL
ATGFYPDHVELS WVVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEW
TQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG

[0736] SEQ ID NO:49-11N6 TCR β 链可变结构域,无信号肽

[0737] GVAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGP KLLIQFQNNGVDDSQLPKDRFSAERLK
GVDSTLKI QPAKLEDSAVYLCASSPYGGSVS YEQYFGPGTRLTVT

[0738] SEQ ID NO:50-11N6 TCR β 链可变结构域CDR1 β

[0739] SGHAT

[0740] SEQ ID NO:51-11N6 TCR β 链可变结构域CDR2 β

[0741] FQNGV

[0742] SEQ ID NO:52-11N6 TCR β 链可变结构域CDR3 β -IMGT接合

[0743] CASSPYGGSVS YEQYF

[0744] SEQ ID NO:53-11N6 TCR β 链可变结构域CDR3 β -IMGT

[0745] ASSPYGGSVS YEQY

[0746] SEQ ID NO:54 11N6 TCR β 链恒定结构域(原始蛋白)

[0747] EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WVVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL
NDSRYCLSSRLRV SATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSAT
ILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG

[0748] SEQ ID NO:55-11N6 TCR β 链恒定结构域(cys修饰的蛋白)

[0749] EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WVVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL
NDSRYCLSSRLRV SATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSAT
ILYEILLGKATLYAVLV SALVLMAMVKRKDSRG

[0750] SEQ ID NO:56-11N6 TCR β 链(cys修饰的蛋白)

[0751] GVAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGP KLLIQFQNNGVDDSQLPKDRFSAERLK
GVDSTLKI QPAKLEDSAVYLCASSPYGGSVS YEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL
ATGFYPDHVELS WVVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEW

TQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSRG

[0752] SEQ ID NO:57-11N6 TCR β -P2A- α 蛋白,具有带下划线的信号肽

[0753] MGTRLLCWAALCCLGAELTEAGVAQSPRYKIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGP~~KL~~LIQFQ
QNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSPYGGSVS~~YEQYFGPG~~TRLTVTEDLKNVFP
EVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRV
SATFWQNP~~RNH~~FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAV
LVLSALVLMAMVKRKDSRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMETLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIEG
ENATMNC~~SYKTSINN~~LQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR~~LRV~~TLDTSKKSSSLITASRAADTASYFCATD
PMNTNAGKSTFGDGTTLVKPNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSM
DFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP~~ESS~~CDVKLVEKSFETDTNLFQNL~~SVIGFRILL~~LKVAGFN
LLMTLRLWSS*

[0754] SEQ ID NO:58-CD8 α -T2A-CD8 β -P2A-11N6 TCR β -P2A- α 蛋白,具有带下划线的信号肽

[0755] MALPVTALLPLALLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPT
FLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVL~~TLSDFR~~RENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPR
PPTPAPT~~IASQPL~~SLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRP
VVKSGDKPSLSARYVGS~~GEGR~~GSLLTCGDVEENPGPMR~~PRLWLLAAQLTVLHGNSVL~~QQTPAYIKVQTNKMVMLS
CEAKISLSNMRIYWL~~RQRQ~~APSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQE~~KIAVFRDASRFILN~~LTSVKPEDSGIYFC
MIVGSPELTFGKGTQLSVVD~~FLPTTAQPTTK~~STLKKRVCLRPETQKGPLCSPITLGLLVAGVLVLLVSLGVAIH
LCCRRRRARLRFMKQFYKSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGTRLLCWAALCCLGAELTEAGVAQSPRYKIEKRQ
SVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGP~~KL~~LIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLC
ASSPYGGSVS~~YEQYFGPG~~TRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVH
SGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP~~RNH~~FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRA
DCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSRGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMETL
LGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIEGENATMNC~~SYKTSINN~~LQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGR
LRVTLDTSKKSSSLITASRAADTASYFCATDPMNTNAGKSTFGDGTTLVKPNIQNPDAVYQLRDSKSSDKSVC
LFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSP~~ESS~~CDVKL
VEKSFETDTNLFQNL~~SVIGFRILL~~LKVAGFNLLMTLRLWSS*

[0756] SEQ ID NO:59-TCR BNT V β ,具有信号肽

[0757] MGTRLLCWAALCCLGAELTEAGVAQSPRYKIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGP~~KL~~LIQFQ
NNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSLADIYEQYFGPGTRLTVT

[0758] SEQ ID NO:60-TCR BNT V α ,具有信号肽

[0759] METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIEGENATMNC~~SYKTSINN~~LQWYRQNSGRGLVHLILIR
SNEREKHSGR~~LRV~~TLDTSKKSSSLITASRAADTASYFCATDRQSSGDKLTFGTGTRLAVRP

[0760] SEQ ID NO:61-(TCR 220_21V α)

[0761] GEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKDQRLTVLLNKKD
KHL~~SLRIAD~~TQTGDSAIYFCAEPIIGGNTPLVFGKGT~~RLSV~~IAN

[0762] SEQ ID NO:62(TCR 220_21V β)

[0763] GAGVSQSPRYKVAKRGQDVALRCDPISGHVSLFWYQQALGQGPEFLTYFQNEAQLDKSGLPSDRFFAER

PEGSVSTLKIQRTOQEDSAVYLCASSSEGLAGGPTAGELFFGEGSRLTVL

[0764] SEQ ID NO:63 (TCR 129_5V α)

[0765] AQSVTQPDIIHITVSEGLASLELRNYSYGATPYLFWYVQSPGQGLQLLLKYFSGDTLVQGIKGFEAEFKR
SQSSFNLKPSVHWSDAAEYFCAVGASGTYYIFGTGTRLKVLN

[0766] SEQ ID NO:64 (TCR 129_5V β)

[0767] DAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISGHNSLFWYRQTMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFSAKM
PNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCASSLALSIEQYFGPGTRLTVT

[0768] SEQ ID NO:65- [保留的]

[0769] SEQ ID NO:66- [保留的]

[0770] SEQ ID NO:67- [保留的]

[0771] SEQ ID NO:68- [保留的]

[0772] SEQ ID NO:69- 经工程化以包括苏氨酸至半胱氨酸和LVL突变的TCR C α 氨基酸序
列

[0773] NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKS
DFACANAFNNSIIPEDTFFPSPPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIVLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

[0774] SEQ ID NO:70-TRBC1氨基酸序列 (UniProt KB P01850)

[0775] EDLNKVFPPPEV AVFEPSEAEI SHTQKATLVC LATGFFPDHV ELSWWVNGKE VHSGVSTDPQ
PLKEQPALND SRYCLSSRLR VSATFWQNPR NHFRCQVQFY GLSENDEWTQ DRAKPVTQIV SAEAWGRADC
GFTSVSYQQG VLSATILYEI LLGKATLYAV LVSALVLMAM VKRKDF

[0776] SEQ ID NO:71-TRBC1氨基酸序列 (cys修饰的)

[0777] EDLNKVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPAL
NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSAT
ILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF

[0778] SEQ ID NO:72-TRBC2氨基酸序列 (UniProt KB A0A5B9)

[0779] EDLNKVFPPKV AVFEPSEAEI SHTQKATLVC LATGFYPDHV ELSWWVNGKEVHSGVSTDPQ
PLKEQPALND SRYCLSSRLR VSATFWQNPR NHFRCQVQFYGLSENDEWTQ DRAKPVTQIV SAEAWGRADC
GFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAV LVSALVLMAM VKRKDSRG

[0780] SEQ ID NO:73-TRBC2氨基酸序列 (cys修饰的)

[0781] EDLNKVFPPKV AVFEPSEAEI SHTQKATLVC LATGFYPDHV ELSWWVNGKEVHSGVCTDPQ
PLKEQPALND SRYCLSSRLR VSATFWQNPR NHFRCQVQFYGLSENDEWTQ DRAKPVTQIV SAEAWGRADC
GFTSESYQQG VLSATILYEILLGKATLYAV LVSALVLMAM VKRKDSRG

[0782] (SEQ ID NO.:74) 具有N末端GSG接头的猪捷申病毒-1 2A (P2A) 自切割肽

[0783] GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP

[0784] (SEQ ID NO.:75) Thoseaasigna病毒2A (T2A) 自切割肽

[0785] LEGGGEGRGSLTTCGDVEENPGPR

[0786] (SEQ ID NO.:76) 马鼻肺炎病毒 (ERAV) 2A (E2A) 自切割肽

[0787] QCTNYALLKLAGDVESNPGP

[0788] (SEQ ID NO.:77) 具有N末端G-S-G接头的口蹄疫病毒2A (F2A) 自切割肽

[0789] GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

- [0790] (SEQ ID NO.:78)NRAS(Uniprot KB P01111)
- [0791] MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET CLLDILDTAG QEEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNSKSF ADINLYREIQI KRVKDSDDVP MVLVGKNC DL PTRTVDTKQA HELAKSYGIP FIETSAKTRQ GVEDAFYTLV REIRQYRMKK LNSSDDGTQG CMGLPCVVM
- [0792] (SEQ ID NO.:79)HRAS(Uniprot KB P01112)
- [0793] MTEYKLVVVGAGGVGKSALT IQLIQNHFVD EYDPTIEDSY RKQVVIDGET CLLDILDTAG QEEYSAMRDQ YMRTGEGFLC VFAINNTKSF EDIHQYREIQI KRVKDSDDVP MVLVGKNC DL AARTVESRQA QDLARSYGIP YIETSAKTRQ GVEDAFYTLV REIRQHKLRL LNPPDESGPG CMSCKCVLS
- [0794] (SEQ ID NO.:80)KRAS 8-16野生型(G12)
- [0795] VVGAGGVGK
- [0796] (SEQ ID NO.:81)KRAS 7-16野生型(G12)
- [0797] VVVGAGGVGK
- [0798] (SEQ ID NO:82)具有N末端GSG接头的T2A自切割肽
- [0799] GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP
- [0800] (SEQ ID NO:83)11N4A TCR β 链,具有信号肽(cys修饰的蛋白),具有带下划线的信号肽
- [0801] MGSRLLCWVLLCLLGAGPVKAGVTQTPLYLIKTRGQQVTLS CSPISGHRSVSWYQQTPGQGLQFLFEYF SETQRNKG NFPGRFSGRQFSNSRSEMN VSTLELGDSALYLCASSVGTVEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEP SEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRV SATFWQNP RNH FRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLV SALVLM A MVKRKDSRG
- [0802] (SEQ ID NO:84)编码11N4A TCR β 链的多核苷酸,具有信号肽(cys修饰的蛋白)
- [0803] ATGGGCAGCAGACTGCTGTGCTGGGTTCTGCTGTGCTGCTTGGAGCCGGACCTGTGAAAGCTGGCGTG ACCCAGACACCTAGATACCTGATCAAGACCAGAGGCCAGCAAGTGACACTGAGCTGTAGCCCCATCAGCGCCACAG AAGCGTGTCTGCTGATCAGCAGACTCCTGGACAGGGCCTGCAGTTCCTGTTCTGAGTACTTCTCCGAGACACAGAGGA ACAAGGGCAACTTCCCCGGCAGATTCTCCGGCAGACAGTTCAGCAACTCCCGCAGCGAGATGAACGTGTCCACACTG GAACTGGGAGATAGCGCCCTGTACCTGTGTGCCTCTTCTGTGGGAACCGTGGAACAGTACTTCGGCCCTGGCACAAG ACTGACCGTGACCGAGGACCTGAAGAACGTGTTCCACCTGAGGTGGCCGTGTTCTGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCT CTCACACCCAGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCCACCGGCTTCTATCCCGATCACGTGGAACGTGCTTGGTGGGTC AACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGTACCGATCCTCAGCCACTGAAAGAGCAGCCCGCTCTGAACGACAGCAG A TACTGCCTGTCTCCAGACTGAGAGTGTCGCCACCTTCTGGCAGAACCCAGAAACCACTTCAGGTGTCAGGTGC AGTTTTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGAACCCAGGATAGAGCCAAGCCTGTGACACAGATCGTGTCTGCCGAA GCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTTCTGTCTGCCACCATCCTGTACGA GATCCTGCTGGGCAAAGCCACTCTGTACGCCGTGTTGGTGTCTGCCCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGG ATTCTAGAGGCG
- [0804] (SEQ ID NO:85)11N4A TCR α 链(cys修饰的蛋白),具有带下划线的信号肽
- [0805] MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEG PTF LISISSIKDKNEDGRFTVFLNLSAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAASGVSGNTPLVFGKGRLSVIANIQNPDP AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSI IPE

DTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

[0806] (SEQ ID NO:86) 编码11N4A TCR α 链的多核苷酸,具有信号肽(cys修饰的)

[0807] ATGGCTATGCTGCTGGGAGCCTCTGTGCTGATCCTGTGGCTGCAACCCGATTGGGTCAACAGCCAGCAG
AAGAACGACGACCAGCAAGTCAAGCAGAACAGCCCCAGCCTGAGCGTGCAAGAGGGCAGAATCAGCATCCTGAACCTG
CGACTACACCAACTCTATGTTGCTACTTTCTGTGGTACAAGAAGTACCCCGCCGAGGGACCCACCTTCCTGATCA
GCATCAGCAGCATCAAGGACAAGAACGAGGACGCGCGGTTACCGTGTTTCTGAACAAGAGCGCCAAGCACCTGAGC
CTGCACATCGTGCCTTCTCAGCCTGGCGATAGCGCCGTGTACTTTTGTGCTGCCAGCGCGTGTCAGGCAACACCCC
TCTGGTTTTTGGCAAGGGCACACGCCTGTCCGTGATCGCCAACATTCAGAACCCTGATCCTGCCGTGTACCAGCTGA
GAGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCAGAGCAAG
GACAGCGACGTGTACATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGC
CTGGTCCAACAAGTCCGATTTTCGCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAA
GTCCTGAGTCCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACCTCCAGAATCTG
AGCGTGATCGGCTTCAGAATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGATTCAACCTGCTGATGACCCTCAGACTGTGGTCCAG
CTGA

[0808] (SEQ ID NO:87) 具有带下划线的信号肽的CD8 α (氨基酸)

[0809] MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTF
LLYLSQNKPKAAEGLDTRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPP
TPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVK
SGDKPSLSARYV

[0810] (SEQ ID NO:88) 编码CD8 α 的多核苷酸(具有信号肽)

[0811] ATGGCATTGCCTGTTACAGCTCTGCTGCTGCCCCCTGGCTCTGCTTCTGCATGCTGCTAGACCCAGCCAG
TTCAGAGTGTCCCCTCTGGACAGAACCTGGAACCTGGGCGAGACAGTGGAAGTGAAGTGCCAGGTGCTGCTGAGCAA
TCCTACCAGCGGCTGCAGCTGGCTGTTTACGCTAGAGGTGCTGCCGCCTCTCCTACCTTTCTGCTGTACCTGAGCC
AGAACAAGCCCAAGGCCGCCGAAGGACTGGACACCCAGAGATTACGCGGCAAGAGACTGGGCGACACCTTCGTGCTG
ACCCTGAGCGACTTCAGAAGAGAGAACGAGGGCTACTACTTCTGCAGCGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAG
CCACTTCGTGCCCCTGTTTCTGCCCCCAAGCCTACAACAACCCCTGCTCCTAGACCTCCTACACCAGCTCCTACAA
TCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCAGAAGCTTGTAGACCTGCTGCTGGCGGAGCCGTGCATACAAGAGGACTG
GATTTTCGCTGCGACATCTACATCTGGGCCCTCTGGCTGGAACATGTGGCGTGCTGCTGCTGTCTCTGGTCATCAC
CCTGTACTGCAACCACCGGAACAGGCGGAGAGTGTGCAAGTGCCCTAGACCTGTGGTCAAGAGCGGCGACAAGCCTA
GCCTGAGCGCCAGATATGTT

[0812] (SEQ ID NO:89) 具有带下划线的信号肽的CD8 β

[0813] MRPRLWLLLAQLTVLHGNSVLQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRRQAPSSDSHHEF
LALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDLPTTAQPTK
KSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITLGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRRLRFMKQFYK

[0814] (SEQ ID NO:90) 编码CD8 β 的多核苷酸,具有信号肽

[0815] ATGAGGCCTAGACTGTGGCTGCTTCTGGCTGCCAGTGACAGTGCTGCACGGCAATTCTGTCTGCAG
CAGACCCCTGCCTACATCAAGGTGCAGACCAACAAGATGGTCATGCTGAGCTGCGAGGCCAAGATCAGCCTGTCCAA
CATGCGGATCTACTGGCTGCGGCAGAGACAGGCCCTAGCAGCGATTCTACACGAGTTTCTGGCCCTGTGGGATA
GCGCCAAGGAACCATTCACGGCGAGGAAGTGGAACAAGAGAAGATCGCCGTGTTCCGGGACGCCAGCAGATTTCATC

CTGAACCTGACCAGCGTGAAGCCCGAGGACAGCGGCATCTATTTCTGCATGATCGTGGGCAGCCCCGAGCTGACATT
TGGCAAGGGAACACAGCTGAGCGTGGTGGACTTCCTGCCTACTACAGCCCAGCCTACCAAGAAGTCTACCCTGAAGA
AACGCGTGTGCAGACTGCCAGGCCTGAGACACAAAAGGGCCCTCTGTGCAGCCCTATCACACTGGGATTGCTGGTG
GCTGGCGTTCTGGTCCTGCTGGTTTCTCTGGGAGTTGCCATCCACCTGTGCTGCAGACGCAGAAGGGCCAGACTGCG
GTTTCATGAAGCAGTTCTACAAA

- [0816] SEQ ID NO:91-11N4A α FR1 (IMGT)
[0817] DQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYT
[0818] SEQ ID NO:92-11N4A α FR2 (IMGT)
[0819] FLWYKKYPAEGPTFLIS
[0820] SEQ ID NO:93-11N4A α FR3 (IMGT)
[0821] NEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYFC
[0822] SEQ ID NO:94-11N4A α FR4 (IMGT)
[0823] FGKGTROLSVIA
[0824] SEQ ID NO:95-11N4A α FR3 (IMGT接合)
[0825] NEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYF
[0826] SEQ ID NO:96-11N4A α FR4 (IMGT接合)
[0827] GKGTROLSVIA
[0828] SEQ ID NO:97-来自11N4A β FR1 (IMGT)的序列
[0829] GVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCSPI
[0830] SEQ ID NO:98-11N4A β FR2 (IMGT)
[0831] VSWYQQTPGQGLQFLFE
[0832] SEQ ID NO:99-11N4A β FR3 (IMGT)
[0833] RNKGNFPGRFSGRQFSNSRSEMNVTLELGDSALYLC
[0834] SEQ ID NO:100-来自11N4A β FR4 (IMGT)的序列
[0835] FGPGTRLTV
[0836] SEQ ID NO:101-11N4A β FR3 (IMGT接合)
[0837] RNKGNFPGRFSGRQFSNSRSEMNVTLELGDSALYL
[0838] SEQ ID NO:102-来自11N4A β FR4 (IMGT接合)的序列
[0839] GPGTRLTV
[0840] SEQ ID NO:103-11N6 α FR1 (IMGT)
[0841] QQGEEDPQALSIQEGENATMNC SYK
[0842] SEQ ID NO:104-11N6 α FR2 (IMGT)
[0843] LQWYRQNSGRGLVHLIL
[0844] SEQ ID NO:105-11N6 α FR3 (IMGT)
[0845] KHSGRLRVTLDTSKKSSLLITASRAADTASYFC
[0846] SEQ ID NO:106-11N6 α FR4 (IMGT)
[0847] FGDGTTLTVKP
[0848] SEQ ID NO:107-11N6 α FR3 (IMGT接合)
[0849] KHSGRLRVTLDTSKKSSLLITASRAADTASYF

- [0850] SEQ ID NO:108-11N6 α FR4 (IMGT接合)
[0851] GDGTTLTVKP
[0852] SEQ ID NO:109-11N6 β FR1 (IMGT)
[0853] GVAQSPRYKIIIEKRQSVAFWCNPI
[0854] SEQ ID NO:110-11N6 β FR2 (IMGT)
[0855] LYWYQQILGQGPKLLIQ
[0856] SEQ ID NO:111-11N6 β FR3 (IMGT)
[0857] VDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLC
[0858] SEQ ID NO:112-11N6 β FR4 (IMGT)
[0859] FGPGLRLTVT
[0860] SEQ ID NO:113-11N6 β FR3 (IMGT接合)
[0861] VDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYL
[0862] SEQ ID NO:114-11N6 β FR4 (IMGT接合)
[0863] GPGTRLTVT
[0864] SEQ ID NO:115-包含11N4A α FR1 (IMGT) 的序列
[0865] QQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYT
[0866] SEQ ID NO:116-11N4A β FR4 (IMGT)
[0867] FGPGLRLTVT
[0868] SEQ ID NO:117-11N4A β FR4 (IMGT接合)
[0869] GPGTRLTVT
[0870] SEQ ID NO:118-CRNS1肽
[0871] VVGAGGVSK
[0872] SEQ ID NO:119-RASE肽
[0873] VVGASGVGK
[0874] SEQ ID NO:120-RAB7B肽
[0875] IVGAIGVGK
[0876] SEQ ID NO:121-[保留的]
[0877] SEQ ID NO:122-ITA8肽
[0878] IVGAFGTGK
[0879] SEQ ID NO:123-MIRO2肽
[0880] VVGARGVGK
[0881] SEQ ID NO:124-ARRD4肽
[0882] AVGAEGRVK
[0883] SEQ ID NO:125-SMC5肽
[0884] IVGANGTGK
[0885] SEQ ID NO:126-MOGS肽
[0886] EVGAKGQLK
[0887] SEQ ID NO:127-GKN2肽
[0888] NVGAGGCAK

[0889] SEQ ID NO:128-AFDDT肽
[0890] QMGAAGSGR
[0891] SEQ ID NO:129-ANKR9肽
[0892] PVGAAGSAR
[0893] SEQ ID NO:130-CFTR肽
[0894] VAGSTGAGK
[0895] SEQ ID NO:131-DYH2肽
[0896] IVGCTGSGK
[0897] SEQ ID NO:132-EP300肽
[0898] MNGSIGAGR
[0899] SEQ ID NO:133-FOXA2肽
[0900] AAGAAGSGK
[0901] SEQ ID NO:134-HTR5B肽
[0902] ASGAVGSAK
[0903] SEQ ID NO:135-LARP1肽
[0904] AAGAAGAGR
[0905] SEQ ID NO:136-MED1肽
[0906] NVGSTGVAK
[0907] SEQ ID NO:137-MOD5肽
[0908] ILGATGTGK
[0909] SEQ ID NO:138-MRP5肽
[0910] ICGSVGSGK
[0911] SEQ ID NO:139-NAL12肽
[0912] MQGAAGIGK
[0913] SEQ ID NO:140-PCGF6肽
[0914] TAGSVGAAGK
[0915] SEQ ID NO:141-RAB4B肽
[0916] VIGSAGTGK
[0917] SEQ ID NO:142-SCGR4肽
[0918] TCGSCGCGY
[0919] SEQ ID NO:143-3HIDH肽
[0920] VSGGVGAAR
[0921] SEQ ID NO:144-AFDDT-2肽
[0922] PMGGTGSGR
[0923] SEQ ID NO:145-BOLA3肽
[0924] ISGGCGAMY
[0925] SEQ ID NO:146-DYH9肽
[0926] VVGAGTGK
[0927] SEQ ID NO:147-KRA53肽

- [0928] SCGGCGSGY
- [0929] SEQ ID NO:148-SHRM1肽
- [0930] VNCSVGISR
- [0931] SEQ ID NO:149-丙氨酸扫描肽搜索字符串,9聚体
- [0932] V-X-G-A-X-G-X-X-K
- [0933] SEQ ID NO:150-丙氨酸扫描肽搜索字符串,10聚体
- [0934] X-X-V-G-A-V-G-X-X-K
- [0935] SEQ ID NO:151-丙氨酸扫描肽搜索字符串,9聚体
- [0936] X-X-G-A-X-G-X-X-K
- [0937] SEQ ID NO:152-Xscan肽搜索字符串
- [0938] [ANCQIMPSTV] - [ANCQILMSTV] -G- [CSA] - [ACQHIMTV] -G- [ACISTV] - [AEMG] - [RYK]
- [0939] SEQ ID NO:153-11N4AβFR1 (IMGT)
- [0940] KAGVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCSPI
- [0941] SEQ ID NO:154-KRAS G12V特异性结合蛋白多肽序列
- [0942] KAGVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCSPI SGHRSVSWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKG NFPGRFSGRQF
SNSRSEMNVTLELGDSALYLCASSVGTVEQYFGPGTRLTVT
- [0943] SEQ ID NO:155-KRAS G12V特异性结合蛋白多肽序列
- [0944] KAGVTQTPRYLIKTRGQQVTLSCSPI SGHRSVSWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKG NFPGRFSGRQF
SNSRSEMNVTLELGDSALYLCASSVGTVEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATG
FYDPHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD
RAKPVTVIIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSRG
- [0945] 实例
- [0946] 实例1
- [0947] 从健康供体的T细胞库中鉴定KRAS G12V特异性TCR
- [0948] 产生源自HLA-A11阳性健康供体PBMC的树突状细胞,用KRAS-G12V₇₋₁₆和KRAS-G12V₈₋₁₆肽辐照和脉冲。这些细胞与自体CD8⁺T细胞一起温育8-10天,以诱导抗原特异性CD8⁺T细胞的激活/扩增。然后用肽脉冲辐照的自体PBMC对这些多克隆T细胞系进行再刺激和扩增8-10天两次,以进一步扩增抗原特异性克隆。此过程在来自15个HLA匹配的供体中的每个供体的十个CD8⁺T细胞系内进行。(Ho WY, Nguyen HN, Wolf M, Kuball J, Greenberg PD. 用于从原初库产生用于免疫疗法的{CD8}+{T}细胞克隆的体外方法(In vitro methods for generating {CD8}+{T}-cell clones for immunotherapy from the naïve repertoire). 《免疫学方法杂志(J Immunol Methods.)》2006;310(1):40-52.doi:10.1016/j.jim.2005.11.023)。图1A。
- [0949] 为了鉴定具有强结合的TCR,用滴定浓度的同源KRAS G12V肽刺激T细胞过夜,并通过流式细胞术评估CD137上调。通过流式细胞术细胞分选分离表达CD137的细胞,并进行TCR β库分析(适应性生物技术公司(Adaptive Biotechnologies))。鉴定出在对低浓度的肽作出应答的CD137+群体中高度富集的TCR克隆型,并通过对类似分选的群体进行10x单细胞RNAseq分析(10x基因组学公司(10xgenomics))确定TCRα/β配对。(图1B)与用低和高肽浓度处理的总未分选的细胞相比,CD137+分选的群体中克隆型富集的代表性分析。(图1C)来自

经鉴定的克隆型的经配对的TCR α/β 序列被组装并合成为P2A连接的表达盒,并慢病毒转导到在Nur77基因座控制下表达GFP的报告基因Jurkat细胞中(Nur77-GFP-Jurkat)。通过分析A11靶细胞培养过夜后的GFP表达来评估每种TCR的肽剂量依赖性应答,所述A11靶细胞用如所示的浓度降低的肽进行脉冲。(图1D)通过非线性回归拟合剂量应答曲线,并使用Graphpad Prism计算EC50值。

[0950] 实例2

[0951] 原代CD8⁺T细胞中表达的KRAS-G12V特异性TCR的功能亲合力

[0952] 用KRAS-G12V特异性TCR转导原代CD8⁺T细胞,分选纯化并扩增。然后将分选纯化的T细胞与浓度降低的KRAS-G12V₈₋₁₆肽培养过夜,并通过流式细胞术评估CD137表达。通过非线性回归拟合剂量应答曲线,并使用Graphpad Prism计算EC50值。图2A、2B。在此实验中,将TCR 11N4A与KRAS G12V特异性TCR“220_21”(参见本文的SEQ ID NO.:61和62)以及具有由美国预授权公开第US2021/0340215A1号的SEQ ID NO.:54(V α)和57(V β)编码的可变结构域的TCR“BNT”(另见本文的SEQ ID NO.:59和60)进行比较。TCR β -P2A-TCR α 表达盒中的所有TCR均由慢病毒编码。

[0953] 使用类似的测定将TCR 11N4A与220_21以及其它TCR进行比较,测量IFN- γ 表达的肽抗原剂量应答。图2C。图2D-2F示出了TCR 11N4A的另外的功能亲合力数据。

[0954] TCR 11N4A在原代人CD8⁺T细胞中表达,并通过CD137表面表达测定在功能亲合力研究中进一步测试。TCR 11N4A对KRAS G12V₈₋₁₆ 9聚体(VVGAVGVGK;SEQ ID NO.:3)表现出强大的功能亲合力并对KRAS G12V₇₋₁₆ 10聚体(VVVGAVGVGK;SEQ ID NO.:2)肽表现出较小程度的功能亲合力,两者均在肽洗脱数据库中鉴定(Choi等人,2021),其中EC50分别为59.5pM和18.75nM。相比之下,TCR 11N4A对野生型KRAS 9聚体(VVGAGGVGK;SEQ ID NO:80)或10聚体(VVVGAGGVGK;SEQ ID NO:81)肽没有反应,表明对肿瘤限制性KRASG12V抗原具有特异性(图2G)。

[0955] 实例3

[0956] KRAS-G12V特异性TCR转导的T细胞对表达KRAS-G12V的肿瘤细胞系的识别

[0957] 用KRAS-G12V特异性TCR转导原代CD8⁺T细胞,分选纯化并扩增。将分选纯化的T细胞与表达突变型KRAS-G12V的肿瘤细胞系培养过夜。将用1mg/ml的KRAS-G12V₈₋₁₆肽培养的T细胞作为阳性对照包括在内。首先根据需要转导肿瘤系以表达HLA-A11,并针对HLA-A11表达进行分类纯化。通过测量响应于TCR信号传导的CD137表达来评估T细胞应答(图3A和3B)。图3C示出了通过内源性KRAS G12V呈递在不同肿瘤细胞系内激活未转导的T细胞或11N4A TCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的T细胞。通过测量响应于TCR信号传导的CD137表达来评估激活。与未转导的T细胞相比,11N4ATCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的T细胞显示出增强的激活。

[0958] 以下功效和安全性研究中使用的11N4A-TCR细胞产物(除非另有规定)是使用用于患者的方法产生的。简而言之,健康供体PBMC首先用磁珠进行CD4阳性选择。然后通过CD62L阳性选择纯化来自CD4选择的阴性级分流穿液,其含有大部分的CD8⁺T细胞。CD62L选择确保了CD8⁺T细胞亚群的下游转导,所述亚群具有改善的体内持久性,包括原初、中央记忆和干细胞记忆(Berger等人,2008;Gattinoni等人,2011;Wherry和Ahmed,2004)。以1:1的比率调配混合的CD4⁺和CD4-CD62L⁺细胞,并在用11N4A-TCR慢病毒转导前两天用IL-2、IL-21和TransAct(抗CD3/CD28)刺激。用外源性添加的IL-2进一步扩增细胞,并在10天后采集以构

成11N4A-TCR“模拟的”产物,其定义为与临床制备过程产生的细胞类似,但不用于输注到人体中。

[0959] 为了确认11N4A-TCR模拟的产物可以对内源性表达和呈递的KRAS G12V肽作出应答,对一组表达HLA-A*11:01和KRAS G12V抗原的肿瘤细胞系进行了测试,所述肿瘤细胞系源自旨在用于1期研究的适应症(图3D,左)。源自两个不同健康供体的11N4A-TCR模拟的产物通过与所有测试的表达KRAS G12V的肿瘤细胞系共培养而被特异性激活,而来自相同供体的未转导T细胞表现出最小激活(图3D,右)。重要的是,不表达KRAS G12V突变的两种癌细胞系PANC1和HUCCT1作为11N4A-TCR T细胞激活的阴性对照包括在内,其中仅观察到背景活性(图3D,右)。另外,在与所描述的肿瘤细胞系共培养后,评估了11N4A-TCR效应细胞因子的产生(图3E)。在与表达KRAS G12V的细胞系培养后,所有肿瘤细胞系均诱导了不同但显著的IFN γ 、TNF α 和IL-2分泌,而阴性对照肿瘤细胞不诱导11N4A-TCR T细胞分泌细胞因子。除了抗原特异性T细胞激活和效应细胞因子产生外,11N4A-TCR T细胞响应于表达KRAS G12V的肿瘤细胞而特异性增殖(图3F)。所有测试的表达KRAS G12V的肿瘤细胞系均导致11N4A-TCR产物的增殖增强,而阴性对照肿瘤细胞仅诱导了与未转导的T细胞对照类似的背景增殖。

[0960] 如通过蛋白质印迹分析所确定的,所测试的一组肿瘤细胞系显示出广泛的KRAS G12V表达(图3G,左)。与每个细胞系中的管家蛋白GAPDH相比,对KRAS G12V表达的分析揭示了肿瘤细胞系组内KRAS G12V表达的多样性(图3G,右),这可能与临床环境中患者群体内预期的KRAS G12V表达的多样性近似。如上所示(图3D-3F),11N4A-TCR能够对所有表达KRAS G12V的肿瘤细胞系作出应答,甚至是在测试的细胞系中表现出最低KRAS G12V表达的NCI-H441。这些数据表明,11N4A-TCR响应于患者预期的可变KRAS G12V表达而具有激活和介导抗肿瘤活性的潜力。

[0961] 实例4

[0962] 表达KRAS-G12V特异性TCR的CD8⁺T细胞特异性杀伤表达KRAS-G12V的肿瘤细胞系

[0963] 红色荧光SW480细胞是一种经转导以表达HLA-A11的表达KRAS-G12V的肿瘤细胞系,其与如所示的TCR转导的T细胞共培养,并使用IncuCyte S3显微镜和软件包通过活细胞成像随时间计数。与无处理孔相比,CD8⁺T细胞的细胞毒性通过每孔总红色靶细胞面积的减少来指示。在72小时时添加另外的肿瘤细胞,以评估在持续性抗原存在下经转导的T细胞对TCR介导的肿瘤细胞的裂解。三个越来越严格的效应子:靶细胞比率用于测量在T细胞有限的条件下TCR介导的相对肿瘤裂解。图4C中示出了数据。图4B中示出了来自另一个实验的数据。

[0964] 初步研究评估了11N4A-TCR工程化的原代CD4⁺和CD8⁺T细胞(不含CD8 α / β 共受体)对SW527、SW620和CFPAC-1肿瘤细胞系的功效。11N4A-TCR工程化的原代CD8⁺T细胞在活肿瘤可视化测定中显著消除了所有肿瘤细胞系的体外生长和存活,即使在同一测定中重复肿瘤激发后也是如此(图4D)。在代表临床环境中预期适应症的一大组KRAS G12V肿瘤细胞系内的体外细胞毒性测定中,对两个表达CD8 α / β 共受体的供体内使用11N4A-TCR模拟的产物的后续研究进行了测试。针对所有肿瘤细胞系,11N4A-TCR表现出稳健的细胞毒性活性(图4E-4G)。值得注意的是,11N4A-TCR针对NCI-H441表现出强效的细胞毒性活性,所述NCI-H441在通过蛋白质印迹分析测试的所有肿瘤细胞系中KRAS G12V的表达最低(图3G)。与所描述的激活和增殖研究一致(图3D-3F),11N4A-TCR没有显示出针对两种阴性对照癌细胞系PANC1

和HUCCT1的细胞毒性活性,所述两种阴性对照癌细胞系不表达KRAS G12V突变。

[0965] 实例5

[0966] 表征TCR 11N4A的肽结合基序的突变扫描

[0967] 为了评估TCR 11N4A的交叉反应性的可能性,进行了突变扫描以鉴定对TCR结合至关重要的肽残基。(图5A)合成了肽,其中同源KRAS-G12V肽的每个残基都变成了丙氨酸。同源9聚体肽的位置4(10聚体肽的位置5)已经含有丙氨酸,因此产生了在此位置处含有甘氨酸或苏氨酸的肽。TCR 11N4A转导的Nur77-GFP- Jurkat与用1mg/ml的每种肽脉冲的HLA-A11⁺B-LCL细胞培养过夜,随后对GFP表达进行流式细胞术分析。在9聚体的位置1、5、7或8处以及10聚体的对应位置处含有取代的肽仍然可以引起表达TCR 11N4A的细胞的应答,表明TCR 11N4A可以识别这些位置处具有其它氨基酸的肽(图5A和5B)。(图5C)使用ScanProsite(prosite.expasy.org/scanprosite/)使用搜索字符串:x-V-G-A-x-G-x-x-K(SEQ ID NO.: 4)对人类蛋白质组进行类似基序的搜索。图5D示出了所得的潜在交叉反应性肽,来自IEDB(NetPanMHC4.1)的预测的HLA-A11结合数据显示为百分位数等级(越低越好)和评分(越高越好)。这些数据包括两种肽,每种肽都出现在多种蛋白质中(RASE和RSLBB;野生型RAS蛋白RASH、RASK和RASN)。

[0968] 实例6

[0969] 11N4A对潜在交叉反应性肽的反应性的分析

[0970] (图6A、6B)将TCR 11N4A转导的供体源性CD8⁺T细胞与经鉴定的潜在交叉反应性肽或同源KRAS-G12V肽中的每种(1mg/ml)培养过夜,并通过流式细胞术评估激活诱导的CD137表达。除了RAB7B源性肽的低水平应答(<20%)外,未检测到来自任何肽的应答。(图6C)为了进一步评估TCR 11N4A对RAB7B肽的功能亲合力,将分选纯化的TCR 11N4A转导的T细胞与浓度降低的KRAS-G12V₈₋₁₆肽或RAB7B肽培养过夜,并通过流式细胞术评估CD137表达。通过非线性回归拟合剂量应答曲线,并使用Graphpad Prism计算EC50值(图6D)。

[0971] RAB7B肽的经计算的EC50为~35mg/ml,是一种非常高的肽浓度,会导致靶细胞表面上负载肽的MHC的密度比典型细胞的表面上呈递的任何特定肽/HLA-A2复合物的密度大若干个数量级。细胞通常呈递各种各样的经加工细胞蛋白,据报告,对于若干种良好呈递的自身肽,其密度在每个细胞10-150个肽/MHC复合物的范围内(Bossi G, Gerry AB, Paston SJ, Sutton DH, Hassan NJ, Jakobsen BK. 检查肽脉冲的T2细胞上肿瘤相关抗原的呈递(Examining the presentation of tumor-associated antigens on peptide-pulsed T2 cells).《肿瘤免疫学(Oncoimmunology)》.2013;2(11):e26840;Liddy N, Bossi G, Adams KJ, Lissina A, Mahon TM, Hassan NJ等人.单克隆TCR重定向的肿瘤细胞杀伤(Monoclonal TCR-redirected tumor cell killing).《自然医学(Nat Med.)》2012;18(6):980-7;Purbhoo MA, Sutton DH, Brewer JE, Mullings RE, Hill ME, Mahon TM等人.使用高亲和力T细胞受体对肿瘤细胞上NY-ESO-1/LAGE-1源性表位进行定量和成像(Quantifying and imaging NY-ESO-1/LAGE-1-derived epitopes on tumor cells using high affinity T cell receptors).《免疫学杂志》2006;176(12):7308-16)。为了特异性地表征肽浓度与T2细胞表位呈递之间的关系, Jakobson和同事使用可溶性、高亲和力TCR偶合单分子荧光显微镜来对肽脉冲的T2细胞上若干种良好表征的自身肽进行定量(Bossi G, Gerry AB, Paston SJ, Sutton DH, Hassan NJ, Jakobsen BK. 检查肽脉冲的T2细胞上肿瘤相关抗原的呈递.《肿

瘤免疫学》.2013;2(11):e26840)。此分析的结果表明,需要低纳摩尔范围(1-10nM)的肽浓度来接近所呈递的抗原的生理水平。

[0972] 相比之下,即使在10mg/ml (~10mM)的高剂量下,也仅观察到TCR 11N4A转导的T细胞的低水平应答(~25%的T细胞有应答,相比之下,>80%的T细胞对同源KRAS-G12V肽有应答)。重要的是,在100nM或更低的肽浓度下,没有观察到TCR 11N4A转导的T细胞的应答。这些数据支持TCR 11N4A转导的T细胞对RAB7B肽没有足够的亲和力来识别天然加工和呈递的表位。

[0973] 为了进一步评估TCR交叉反应性的潜力,将表达TCR 11N4A的CD8⁺T细胞与一组全面的位置扫描肽培养过夜,所述位置扫描肽在同源KRAS G12V肽(172个肽)的每个位置处含有每个可能氨基酸的取代。示出了响应于每种肽的表达CD137的T细胞的百分比(图6E),按肽位置排列。

[0974] 根据这些数据,确定了潜在的交叉反应性肽基序,并通过使用ScanProsite (prosite.expasy.org/scanprosite/) 搜索人类蛋白质组来鉴定与所述基序匹配的肽。在此测定中,引起大于15%应答的肽被认为是阳性的。从ScanProsite搜索中鉴定的潜在交叉反应性肽示出于表中(图6F,左)。RAB7B是突变扫描分析中唯一被鉴定为交叉反应性的肽,是xscan分析中唯一也被鉴定的肽,验证了这种类型的分析的实用性。合成了经鉴定的另外的肽,并以100ng/ml添加到分选纯化的原代CD8⁺T细胞,所述细胞经转导以表达TCR 11N4A或TCR 11N4A+CD8 $\alpha\beta$ 。过夜培养后,通过流式细胞术评估激活诱导的CD137表达。未检测到另外的已鉴定的肽中的任何肽的反应性(图6F,右)。

[0975] 进行了另外的研究,并且结果支持TCR 11N4A不识别候选的人自身肽。使用所描述的丙氨酸和Xscan数据,搜索字符串用于鉴定人类蛋白质组中所有潜在的交叉反应性自身肽。将来自丙氨酸扫描(X-X-G-A-X-G-X-X-K(9聚体)(SEQ ID NO.:151)或X-X-V-G-A-V-G-X-X-K(10聚体)(SEQ ID NO.:150))和Xscan([ANCQIMPSTV]-[ANCQILMSTV]-G-[CSA]-[ACQHIMTV]-G-[ACISTV]-[AEMG]-[RYK])(SEQ ID NO.:152)的搜索字符串输入到ScanProsite数据库(prosite.expasy.org/scanprosite/)中,并使用NetMHCpan 4.1鉴定出预测可能与HLA-A*11:01结合的自身肽(表2;(Andreatta和Nielsen,2016))。

[0976] 表2示出了通过计算机分析鉴定的潜在交叉反应性肽的分析结果。将来自丙氨酸扫描(V-X-G-A-X-G-X-X-K(9聚体)(SEQ ID NO.:149)或X-X-V-G-A-V-G-X-X-K(10聚体)(SEQ ID NO.:150))和Xscan([ANCQIMPSTV]-[ANCQILMSTV]-G-[CSA]-[ACQHIMTV]-G-[ACISTV]-[AEMG]-[RYK])(SEQ ID NO.:152)的搜索字符串输入到针对人类蛋白质组的ScanProsite数据库(prosite.expasy.org/scanprosite/)中,以鉴定在正常组织中表达的潜在的自身反应性肽。没有鉴定出与10聚体丙氨酸扫描搜索字符串匹配的肽。根据NetMHCpan 4.1计算的IEDB评分估计了所鉴定的肽与HLA-A*11:01等位基因结合的潜力,评分越高,表明结合的可能性越大。

[0977] 表2:

[0978]

基因名称	序列	HLA 搜索	IEDB 评分
基于丙氨酸扫描搜索			
CRNS1	VVGAGGVSK (SEQ ID NO.: 118)	HLA-A*11:01	0.74512
RASE	VVGASGVGK (SEQ ID NO.: 119)	HLA-A*11:01	0.690829
RAB7B	IVGAIGVGK (SEQ ID NO.: 120)	HLA-A*11:01	0.688497
RASH (与 SEQ ID NO.: 80 的 KRAS 肽相同)	VVGAGGVGK (SEQ ID NO.: 80)	HLA-A*11:01	0.638055
ITA8	IVGAFGTGK	HLA-A*11:01	0.561758

[0979]

基因名称	序列	HLA 搜索	IEDB 评分
	(SEQ ID NO.: 122)		
MIRO2	VVGARGVGK (SEQ ID NO.: 123)	HLA-A*11:01	0.480429
ARRD4	AVGAEGRVK (SEQ ID NO.: 124)	HLA-A*11:01	0.328175
SMC5	IVGANGTGK (SEQ ID NO.: 125)	HLA-A*11:01	0.308533
MOGS	EVGAKGQLK (SEQ ID NO.: 126)	HLA-A*11:01	0.113675
GKN2	NVGAGGCAK (SEQ ID NO.: 127)	HLA-A*11:01	0.06972
基于 XScan 搜索			
AFDDT	QMGAAGSGR (SEQ ID NO.: 128)	HLA-A*11:01	0.00474
ANKR9	PVGAAGSAR (SEQ ID NO.: 129)	HLA-A*11:01	0.002816
CFTR	VAGSTGAGK (SEQ ID NO.: 129)	HLA-A*11:01	0.150817

[0980]

基因名称	序列	HLA 搜索	IEDB 评分
	130)		
DYH2	IVGCTGSGK (SEQ ID NO.: 131)	HLA-A*11:01	0.069626
EP300	MNGSIGAGR (SEQ ID NO.: 132)	HLA-A*11:01	0.002772
FOXA2	AAGAAGSGK (SEQ ID NO.: 133)	HLA-A*11:01	0.271597
HTR5B	ASGAVGSAK (SEQ ID NO.: 134)	HLA-A*11:01	0.701693
LARP1	AAGAAGAGR (SEQ ID NO.: 135)	HLA-A*11:01	0.036351
MED1	NVGSTGVAK (SEQ ID NO.: 136)	HLA-A*11:01	0.425281
MOD5	ILGATGTGK (SEQ ID NO.: 137)	HLA-A*11:01	0.116715
MRP5	ICGSVGSBK (SEQ ID NO.: 138)	HLA-A*11:01	0.0073
NAL12	MQGAAGIGK	HLA-A*11:01	0.248652

[0981]

基因名称	序列	HLA 搜索	IEDB 评分
	(SEQ ID NO.: 139)		
PCGF6	TAGSVGA (SEQ ID NO.: 140)	HLA-A*11:01	0.271228
RAB4B	VIGSAGTGK (SEQ ID NO.: 141)	HLA-A*11:01	0.401558
RAB7B	IVGAIGVGK (SEQ ID NO.: 120)	HLA-A*11:01	0.688497
SCGR4	TCGSCGCGY (SEQ ID NO.: 142)	HLA-A*11:01	0.000111
3HIDH	VSGGVGAAR (SEQ ID NO.: 143)	HLA-A*11:01	0.07473
AFDDT-2	PMGGTGSGR (SEQ ID NO.: 144)	HLA-A*11:01	0.000336
BOLA3	ISGGCGAMY (SEQ ID NO.: 145)	HLA-A*11:01	0.005069
DYH9	VVGGAGTGK (SEQ ID NO.: 146)	HLA-A*11:01	0.496638

[0982]	基因名称	序列	HLA 搜索	IEDB 评分
	KRA53	SCGGCGSGY (SEQ ID NO.: 147)	HLA-A*11:01	0.000368
	SHRM1	VNGSVGISR (SEQ ID NO.: 148)	HLA-A*11:01	0.010494
	KRAS G12V 8-16 (参考)	VVGAVGVGK (SEQ ID NO.: 3)	HLA-A*11:01	0.755168

[0983] 使用实例13中描述的11N4A-TCR模拟的T细胞产物,使用类似于药物产品临床制备的方法进行了另外的研究。使用11N4A-TCR模拟的T细胞产物在2个供体内重新测试了由丙氨酸扫描基序鉴定的所有10种自身肽。对于任何肽,甚至RAB7B,都没有检测到11N4A-TCR的显著T细胞激活(图6G,左)。另外,对基于XScan基序鉴定的所有12种自身肽(包括RAB7B)进行了测试,其中没有检测到任何肽对11N4A-TCR模拟的T细胞产物的显著T细胞激活(图6G,右)

[0984] 实例7

[0985] 具有或不具有CD8_{AB}的TCR 11N4A的同种异体反应性筛选示出对表达常见HLA等位基因的B-LCL没有同种异体反应性

[0986] (图7A、7B) 为了确定TCR 11N4A是否对常见的非A11 HLA等位基因表现出同种异体反应性,用单独编码11N4ATCR的构建体或除11N4A TCR α 和 β 链之外编码CD8 α 和CD8 β 基因的替代性构建体转导分选纯化的原代CD8+T细胞,并与一组B-LCL细胞系培养过夜,所述细胞系表达美国群体中常见的多组HLA等位基因。通过流式细胞术评估过夜培养后激活诱导的CD137表达。

[0987] 还评估了覆盖美国群体中>95%的最常见HLA等位基因的大型淋巴母细胞系文库,其中没有检测到对经工程化以表达TCR 11N4A的T细胞的同种异体反应性应答。表达11N4A的T细胞没有表现出细胞因子非依赖性生长,其产物细胞数量迅速下降,这与未转导的T细胞对照没有区别。由于11N4A-TCR使用自体患者细胞作为T细胞工程化的起始材料,因此预期患者T细胞的内源性TCR库不会产生同种异体反应性应答。另外,使用EBV转化的人类B淋巴母细胞系(B-LCL)的文库来评估表达11N4A和CD8 α/β 共受体的原代人T细胞的潜在MHC I类HLA同种异体反应性,所述细胞系表达在人类群体中发现的多种和常见的HLA等位基因(下表3)。由于B-LCL通常不表达KRAS G12V,因此即使在HLA-A*11:01阳性B-LCL中,它们预期也不会引发11N4A-TCR识别。简而言之,健康供体源性T细胞用11N4A加CD8 α/β 共受体转导,并与每种B-LCL单独共培养,随后使用CD137表面表达评估T细胞激活。

[0988] 表3:

[0989]

LCL 系	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
JWP	A*02:01:01	A*33:01:01	B*07:02:01	B*15:01:01	C*03:04:01	C*07:02:01
MS	A*11:01:01	A*11:01:01	B*13:01:01	B*15:25:01	C*04:03:01	C*12:02:02
JAS	A*01:01:01	A*68:01:01	B*44:02:01	B*55:01:01	C*03:03:01	C*05:01:01
LCL-19	A*02:06:01	A*26:01:01	B*35:01:01	B*38:01:01	C*04:01:01	C*12:03:01
LCL-12	A*02:01:01	A*31:01:02	B*18:01:01	B*40:01:02	C*03:04:01	C*07:01:01
LCL-8	A*02:01:01	A*68:01:01	B*45:01:01	B*58:02:01	C*06:02:01	C*16:01:01
LCL-25	A*23:01:01	A*23:01:01	B*41:01:01	B*51:01:01	C*15:02:01	C*17:01:01
LCL-5	A*24:02:01	A*02:06:01	B*40:02:01	B*55:02:01	C*01:02:01	C*15:02:01
LCL-24	A*02:02:01	A*29:02:01	B*15:16:01	B*44:03:01	C*14:02:01	C*16:01:01
LCL-7	A*24:02:01	A*31:01:02	B*35:01:01	B*52:01:01	C*04:01:01	C*12:02:02
LCL-2	A*24:02:01	A*24:02:01	B*48:01:01	B*54:01:01	C*01:02:01	C*08:03:01
PAJ	A*01:01:01	A*03:01:01	B*08:01:01	B*49:01:01	C*07:01:01	C*07:01:01
X028	A*02:01:01	A*03:01:01	B*07:02:01	B*44:02:01	C*05:01:01	C*07:02:01
LCL-18	A*02:01:01	A*25:01:01	B*08:01:01	B*44:02:01	C*05:01:01	C*07:01:01
LCL-4	A*24:02:01	A*29:01:01	B*07:05:01	B*27:02:01	C*02:02:02	C*15:05:02
LCL-10	A*34:02:01	A*74:01:01	B*08:01:01	B*15:03:01	C*02:10:01	C*07:01:01
LCL-23	A*32:01:01	A*68:02:01	B*08:01:01	B*44:02:01	C*01:02:01	C*07:01:01

[0990]

LCL 系	HLA-A		HLA-B		HLA-C	
LCL-3	A*30:01:01	A*68:02:01	B*42:01:01	B*42:01:01	C*17:01:01	C*17:01:01
LCL-16	A*03:01:01	A*03:01:01	B*27:05:02	B*56:01:01	C*01:02:01	C*02:02:02
LCL-20	A*01:01:01	A*11:01:01	B*50:01:01	B*51:01:01	C*06:06:01	C*15:02:01
LCL-13	A*02:01:01	A*02:05:01	B*15:01:01	B*49:01:01	C*03:03:01	C*07:01:01
LCL-6	A*02:05:01	A*68:02:01	B*14:02:01	B*58:01:01	C*07:18:01	C*08:02:01
LCL-17	A*01:01:01	A*03:01:01	B*08:01:01	B*35:01:01	C*04:01:01	C*07:01:01
LCL-9	A*36:01:01	A*74:01:01	B*53:01:01	B*57:03:01	C*04:01:01	C*07:01:02
X009	A*02:01:01	A*23:01:01	B*27:05:02	B*44:03:01	C*01:02:01	C*04:01:01
LCL-11	A*30:01:01	A*33:01:01	B*53:01:01	B*81:01:01	C*04:01:01	C*08:04:01
DUCAF	A*30:02:01:01		B*18:01:01:01		C*05:01:01:01	
KAS116	A24:02:01:01		B*51:01:01:01		C*12:03:01:01	
SAVC	A*03:01:01:01		B*07:02:01		C*07:02:01:03	
KAS011	A*01:01:01:01		B*37:01:01		C*06:02:01:01	
WT8	A*03:01:01:01		B*07:02:01		C*07:02:01:03	
VAVY	A*01:01:01:01		B*08:01:01:01		C*07:01:01:01	
SA	A*24:02:01:01		B*07:02:01		C*07:02:01:03	
MGAR	A*26:01:01:01		B*08:01:01:01		C*07:01:01:01	
SCHU	A*03:01:01:01		B*07:02:01		C*07:02:01:03	
JBUSH	A*32:01:01		B*38:01:01		C*12:03:01:01	
QBL	A*26:01:01:01		B*18:01:01:01		C*05:01:01:01	
DEU	A*31:01:02:01		B*35:01:01:02		C*04:01:01:01	

[0991] 为了评估此B-LCL文库的覆盖范围是否足以代表1期研究中临床相关患者群体中HLA遗传多样性,从BeTheMatch网站提取了描述个体种族(非裔美国人、亚太岛民、高加索人种、西班牙裔、美洲原住民)的五个广义术语的美国HLA等位基因频率(Gragert等人,2013)。使用这些术语,从美国2020年人口普查中获得了单种族和多种族鉴定应答者的人口统计计数值。将鉴定为多个种族的人口普查应答者除以经鉴定的种族的数量,并将那些分数计数

添加到各自的单个种族总和中。使用这种方法,计算了美国每个报告的种族的比例。每个种族的BeTheMatch HLA等位基因频率根据每个种族在美国群体中的比例进行调整。从B-LCL文库中提取每个基因座(HLA-A、HLA-B和HLA-C)的独特HLA等位基因集,并对等位基因频率进行求和。根据哈迪-温伯格模型(Hardy-Weinberg model),将经求和的等位基因频率转换为基因型频率,以计算文库所代表的群体覆盖率。表4示出了含有等位基因中的至少一个等位基因的美国群体的百分比,对于每个HLA基因座(A、B和C),所述等位基因也存在于B-LCL细胞系文库中。对于HLA-A、HLA-B和HLA-C等位基因,>96.2%的美国群体具有这些等位基因中的至少一个等位基因。这些值被认为足以代表美国群体的遗传多样性,以具有临床相关性。

[0992] 表4:

[0993] B-LCL细胞系中每个HLA基因座处包含的含有等位基因中的至少一个等位基因的美国群体的百分比

[0994]	基因座	B-LCL文库中的美国群体覆盖率
	HLA-A	99.6%
	HLA-B	96.2%
	HLA-C	99.7%

[0995] 实例8

[0996] 表达TCR 11N4A和CD8共受体的CD4⁺T细胞的特异性杀伤活性

[0997] (图8)CD4⁺和CD8⁺T细胞经转导以表达TCR 11N4A和CD8 $\alpha\beta$ 共受体。使用IncuCyte测定评估经工程化的T细胞对mKRAS:HLA-A11+肿瘤细胞的杀伤活性。

[0998] 实例9

[0999] 原代11N4ATCR和CD8_{AB}共受体工程化的T细胞对多种肿瘤细胞系的细胞毒性

[1000] (图11A、11B、11C、11D)在单独的活肿瘤可视化测定中(仅肿瘤细胞),在未转导的原代T细胞(UTD)的存在下或在用TCR 11N4A和CD8 $\alpha\beta$ 共受体(11N4A TCR+CD8 $\alpha\beta$)转导的原代T细胞的存在下,指示的表达HLA-A11+、KRAS G12V的肿瘤细胞系的生长动力学。将标记有Incucyte Nuclight Rapid Red的肿瘤细胞(SW480、SW527和SW620肿瘤细胞)或表达绿色荧光蛋白的肿瘤细胞(CFPAC1肿瘤细胞)单独或与TCR转导或未转导的T细胞以指定的效应子与靶细胞的比率培养至多192小时,并在所指示的整个研究过程中测量总红色对象面积(对于SW480、SW527和SW620肿瘤细胞)或绿色对象面积(对于CFPAC1肿瘤细胞)作为肿瘤细胞生长和活力的度量。在此实验中,效应子:靶标比率是严格的,例如,对于SW527肿瘤细胞,效应子:靶标比率为0.5:1;并且对于CFPAC、SW480和SW620分别为2:1。在指定的时间点添加另外的肿瘤细胞,以评估经工程化的T细胞在多次肿瘤激发后继续应答的能力。结果表明,即使在多次肿瘤激发后,经工程化的T细胞也表现出稳健的癌症杀伤,并且因此不易于T细胞衰竭。

[1001] 实例10

[1002] 11N4A TCR和CD8_{AB}共受体工程化的T细胞的体内抗肿瘤功效

[1003] (图12A、12B、12C)在SW527、SW620和CFPAC肿瘤激发模型中,用TCR 11N4A和CD8 $\alpha\beta$ 共受体转导的原代CD4⁺和CD8⁺T细胞诱导了稳健的体内抗肿瘤活性。6-8周龄的NSG免疫功能低下小鼠分别皮下接种肿瘤细胞系:SW527(乳腺癌源性)、CFPAC(胰腺癌源性)和SW620

(结肠癌源性)。在肿瘤接种后第07天(SW527)、第10天(CFPAC)和第09天(SW620),将小鼠随机分组,并且每组五只小鼠IV给药未转导的原代T细胞对照和分别用TCR 11N4A和CD8 $\alpha\beta$ 共受体转导的原代T细胞。具体来说,接种SW527肿瘤细胞的小鼠组施用 3×10^6 个用TCR 11N4A和CD8 $\alpha\beta$ 共受体转导的T细胞;具有用TCR 11N4A和CD8 $\alpha\beta$ 共受体转导的 1×10^7 个T细胞的CFPAC1肿瘤细胞;以及具有用TCR 11N4A和CD8 $\alpha\beta$ 共受体转导的 3×10^6 个T细胞的SW620肿瘤细胞。通过卡尺测量追踪肿瘤动力学。结果表明,TCR 11N4A和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的T细胞在源自不同癌症类型的多种体内肿瘤模型中诱导了稳健的抗肿瘤活性。

[1004] 实例11

[1005] 11N4ATCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD4⁺和CD8⁺T细胞的体外和体内抗肿瘤功效

[1006] (图13A)在11N4ATCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD4⁺T细胞(显示为“CD4⁺TCR”)、11N4ATCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD8⁺T细胞(显示为“CD8⁺TCR”)、或以2:1的效应子与靶标比率的1:1比率的11N4ATCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞(显示为“CD4⁺TCR+CD8⁺TCR”)的存在下,对表达HLA-A11+、KRAS G12V的CFPAC-1肿瘤细胞系的生长动力学进行了188小时的跟踪。CFPAC1肿瘤细胞表达绿色荧光蛋白,使得能够通过Incucyte Zoom使肿瘤生长可视化188小时。在指定的时间点添加另外的肿瘤细胞,以评估11N4A TCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的T细胞在多次肿瘤激发后继续应答的能力。结果表明,含有CD4⁺和CD8⁺T细胞亚群的11N4A TCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的组表现出最高的肿瘤控制。不受理论束缚,这表明CD8⁺与CD4⁺T细胞之间的协调应答,可能是表达11N4A和CD8 $\alpha\beta$ 共受体的CD4⁺T细胞对KRAS G12V抗原作出应答,并触发辅助活性以支持CD8⁺T细胞杀伤。

[1007] (图13B)6-8周龄的NSG免疫功能低下小鼠腹膜内接种 1.25×10^5 个表达萤光素酶的CFPAC1-Luc肿瘤细胞,用于体内检测肿瘤生长。将小鼠随机分组,并在第10天(7×10^6 个T细胞)和第21天(8×10^6 个T细胞)(N=5)进行模拟物处理或用11N4A TCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD4⁺T细胞(显示为“CD4⁺TCR”)、11N4A TCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD8⁺T细胞(显示为“CD8⁺TCR”)、或以1:1的比率的11N4A TCR和CD8 $\alpha\beta$ 共受体工程化的CD4⁺T细胞和CD8⁺T细胞(显示为“CD4⁺TCR+CD8⁺TCR”)进行腹膜内处理。通过肿瘤细胞发光的全身IVIS成像追踪肿瘤动力学。结果表明,含有CD4⁺和CD8⁺T细胞亚群的组表现出最高的肿瘤控制,并且不受理论束缚,表明表达11N4A和CD8 $\alpha\beta$ 共受体的CD4⁺T细胞对KRAS G12V抗原有应答,并触发辅助活性以支持体内CD8⁺T细胞杀伤。

[1008] 为了测试CD8 α/β 共受体与TCR 11N4A在经工程化的T细胞中的共表达是否会引起药理学活性的提高,将来自健康供体的CD4⁺和CD8⁺T细胞单独地用含有TCR 11N4A或TCR 11N4A与CD8 α/β 共受体组合的慢病毒构建体转导。针对KRAS G12V阳性卵巢癌细胞系OVCAR5,在低效应子与靶标比率和重复的肿瘤再激发的条件下,测试构建体中的每个构建体的仅CD4⁺T细胞、仅CD8⁺T细胞或1:1比率的CD4⁺:CD8⁺T细胞的细胞毒性活性。尽管含有TCR 11N4A的单独的或组合的T细胞亚群仅表现出微弱的细胞毒性活性(图13C),但含有TCR 11N4A与CD8 α/β 共受体组合的所有组的杀伤活性均显著提高(图13D)。值得注意的是,仅表达CD8 α/β 共受体和TCR 11N4A的CD4⁺T细胞组表现出显著的抗肿瘤活性,这对于CD4⁺T细胞来说并不常见。通过添加CD8 α/β 共受体,也观察到仅CD8⁺T细胞组的抗肿瘤活性的改善,并且这可能是由于CD8 α/β 共受体的较高表达增强了对KRAS G12V靶标的结合亲和力。重要的是,具有CD8⁺和CD4⁺T细胞组合的组表现出最稳健的抗肿瘤活性,并支持TCR 11N4A+CD8 α/β

共受体T细胞(1:1:CD4+/CD8+)产物的协调的CD4+/CD8+T细胞应答可以使得CD4+T细胞辅助活性能够在恶劣的肿瘤微环境中维持抗肿瘤应答的假设(图13D)。针对不表达KRAS G12V靶抗原的胰腺细胞系PANC1,测试表达TCR 11N4A与CD8 α / β 共受体组合的相同T细胞亚群,这未表现出任何杀伤活性(图13E),支持即使在添加CD8 α / β 共受体后,TCR 11N4A介导脱靶效应的潜力较低。

[1009] 实例12

[1010] TCR 11N4A T细胞没有表现出细胞因子非依赖性生长

[1011] TCR 11N4A可以使用第三代自失活慢病毒载体递送用于T细胞工程化,这是一个在临床研究中证明有丰富经验和安全性的平台(Milone和O'Doherty,2018)。这些先进的慢病毒载体优先插入到内含子中而不优先插入到活性基因的启动子中。另外,进行了细胞因子非依赖性生长研究,以评估TCR 11N4A的慢病毒插入导致的T细胞转化的风险,这可能导致骨髓增殖性病症(图17)。结果显示,在不存在细胞因子的情况下,两个供体内的11N4A-TCR模拟T细胞产物的细胞数量随着时间的推移而下降,与未转导的(UTD)对照类似。从D8到D35,没有检测到测试产物中的任何测试产物的活细胞计数。这些数据表明,TCR 11N4A转化事件可能导致细胞产物的异常生长的可能性较低。

[1012] 图14还支持用TCR 11N4A和CD8 $\alpha\beta$ 共受体转导的T细胞的安全性。在去除外源性细胞因子支持后,与野生型未转导的T细胞类似,TCR 11N4A+CD8 $\alpha\beta$ 共受体转导的T细胞在体外没有显示出细胞因子非依赖性生长。如通过细胞因子非依赖性生长测定所评估的,具有TCR 11N4A和CD8 $\alpha\beta$ 共受体的原代T细胞没有显示出致癌转化的潜力,这进一步支持了TCR 11N4A的安全性。

[1013] 实例13

[1014] RAB7B的潜在交叉反应性肽的另外的表征

[1015] 为了充分评估11N4A-TCR对RAB7B的交叉反应性潜力,使用来自两个供体的模拟的T细胞产物进行了另外的研究。测试了KRAS G12V和RAB7B的另外的肽剂量滴定研究,以评估11N4A-TCR模拟的T细胞产物的反应性。模拟的T细胞产物与上述最初的RAB7B剂量滴定研究的不同之处在于,最终构建设计用于制备包括CD8 α / β 共受体。在两个供体内,用RAB7B仅检测到一个背景T细胞激活(图15),与图11一致。即使在高浓度肽下,11N4A-TCR模拟的T细胞产物缺乏对RAB7B的反应性,可能反映了较低亲和力和CD4⁺T细胞内含物稀释了较高亲和力和CD8⁺T细胞,但代表了11N4A-TCR模拟的T细胞产物的临床级制备方法。进行了另外的研究,以进一步评估TCR 11N4A对天然加工和呈递的RAB7B的潜在交叉反应性。HeLa或HEK293细胞经转导以过表达全长RAB7B和HLA-A*11:01。由于RAB7B可能被不同的组织依赖性蛋白体亚基加工,因此对表达标准蛋白体的HEK293细胞进行了测试,所述蛋白体具有或不具有外源性表达的免疫蛋白体亚基(Lahman等人,2022)。将单独的CD4⁺或CD8⁺11N4A-TCR或未转导的T细胞产物与表达不同蛋白体亚基的HeLa或HEK293细胞共培养一段时间,并评估CD137 T细胞激活。在测试的表达RAB7B的细胞系中的任何细胞系或PANC1阴性对照中没有检测到T细胞激活(图16)。如先前所描述的,阳性对照CFPAC-1KRAS G12V阳性肿瘤细胞系能够激活CD4⁺或CD8⁺11N4A-TCR T细胞。

[1016] 总之,11N4A对RAB7B的交叉反应性仅在使用高浓度的RAB7B肽和不完全代表11N4A-TCR产物的经工程化的T细胞产物中检测到。使用11N4A-TCR模拟的T细胞产物的另外

的研究没有通过肽剂量滴定或通过HEK293或HeLa细胞中过表达的、内源性加工的和呈递的RAB7B抗原检测到RAB7B交叉反应性。对潜在RAB7B脱靶抗原的此全面评估表明,在生理表达下,TCR 11N4A与此靶标交叉反应的可能性较低。

[1017] 上文所描述的各个实施例可以组合以提供另外的实施例。在本说明书中引用和/或在申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国申请、外国专利申请和非专利公开通过引用整体并入本文中,包括于2022年5月13日提交的美国临时专利申请第63/342,025号、于2022年10月21日提交的美国临时专利申请第63/380,551号以及于2023年3月6日提交的美国临时专利申请第63/488,758号。如果需要,可以修改实施例的各方面以采用各种专利、申请和公开的概念来提供又另外的实施例。

[1018] 鉴于以上详细描述,可以对实施例进行这些和其它改变。一般来说,在以下权利要求书中,所用术语不应被解释为将权利要求书限于本说明书和权利要求书中所公开的具体实施例,而应被解释为包括所有可能的实施例以及这份权利要求书所有权获得的等效物的全部范围。因此,权利要求书并不受本公开的限制。

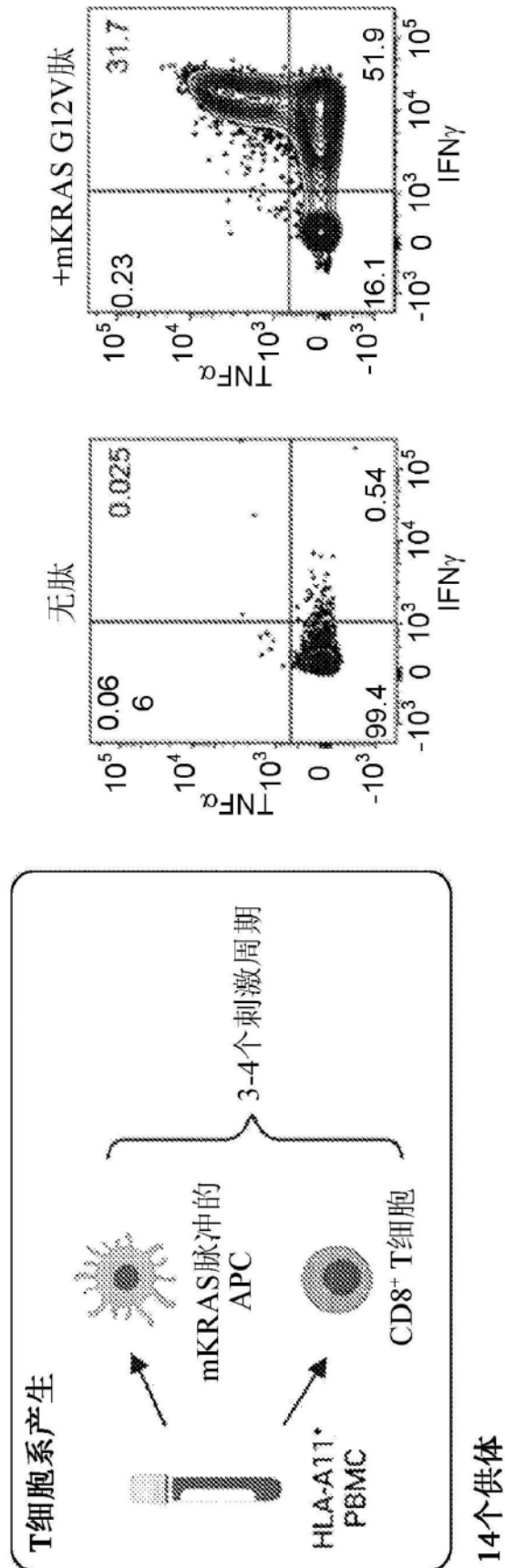


图1A

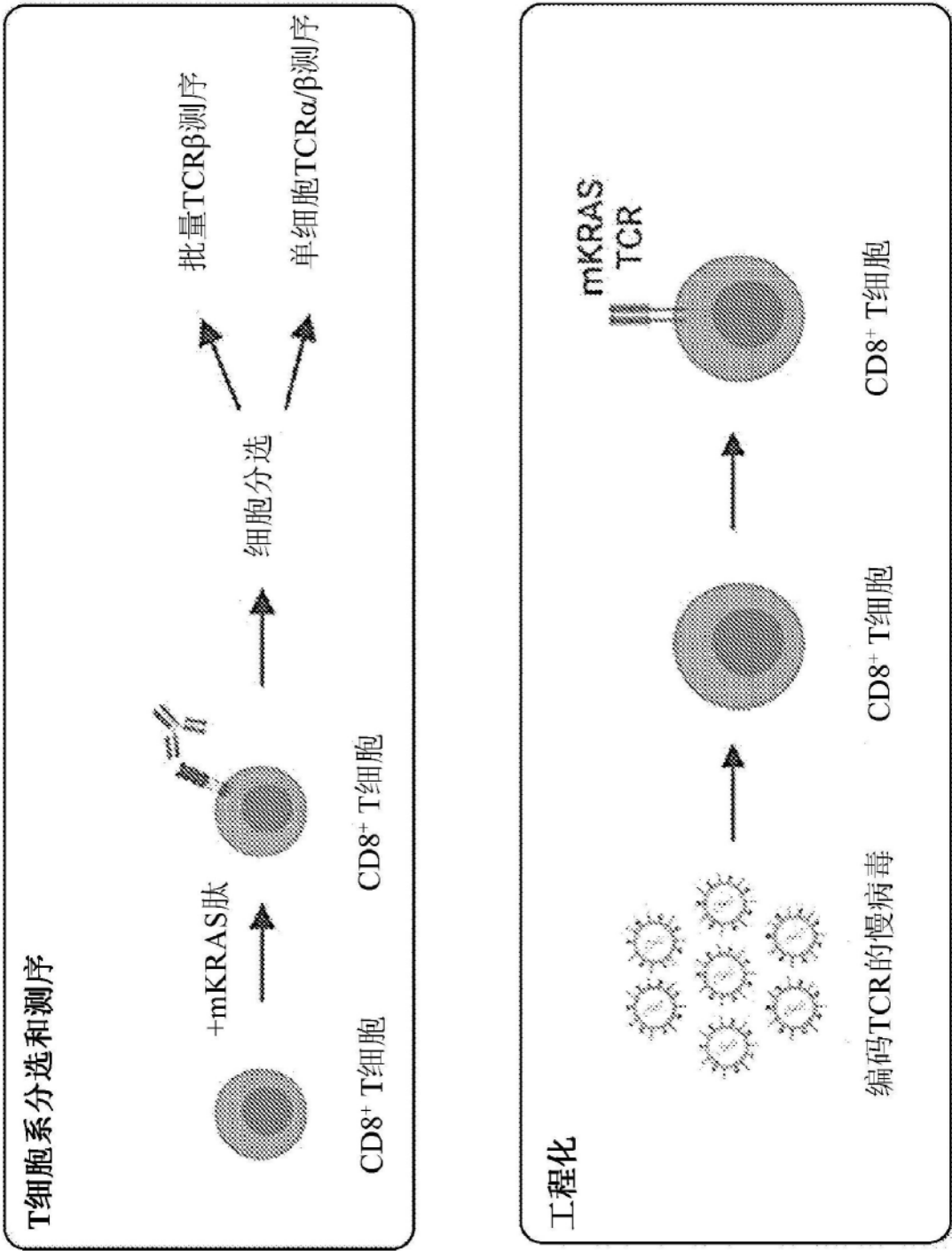


图1B

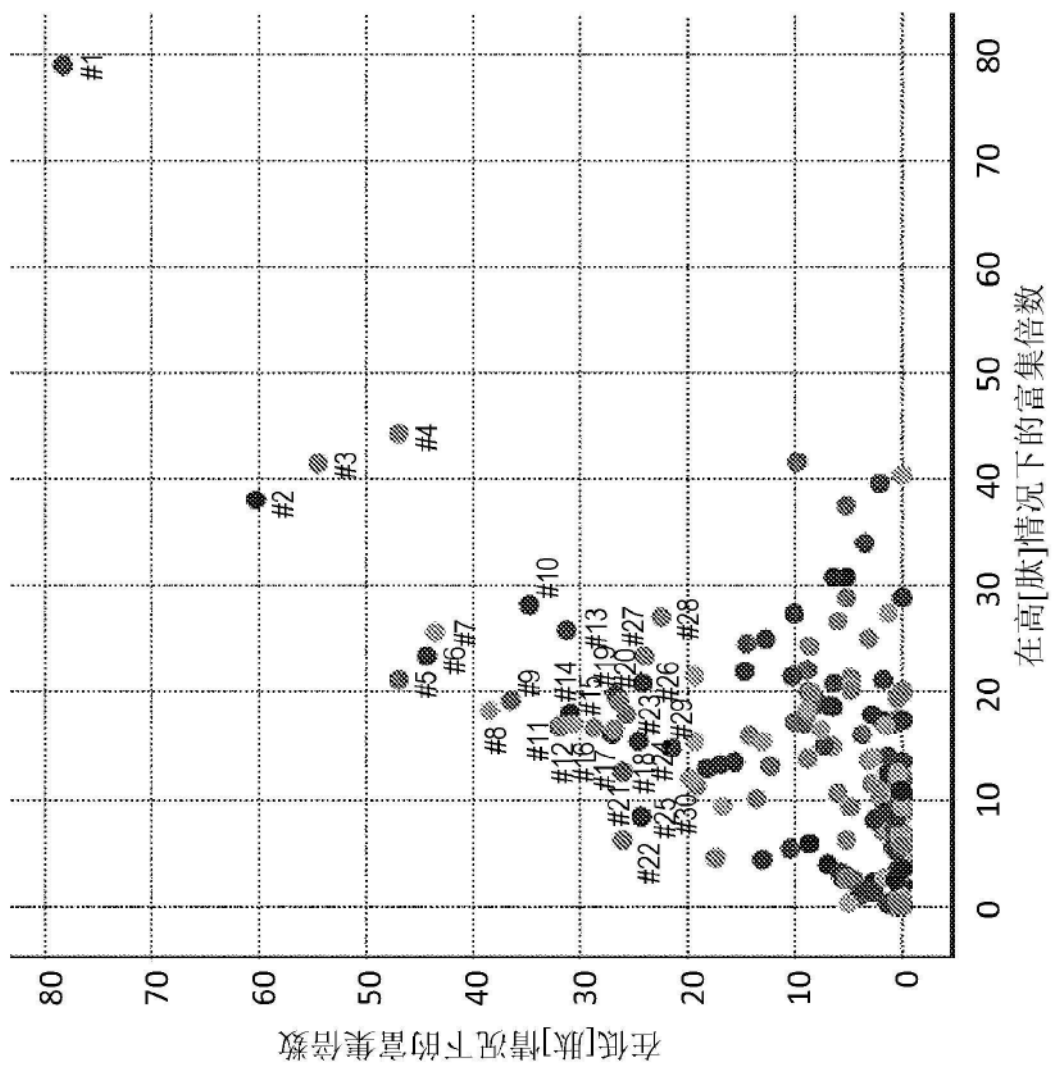


图1C

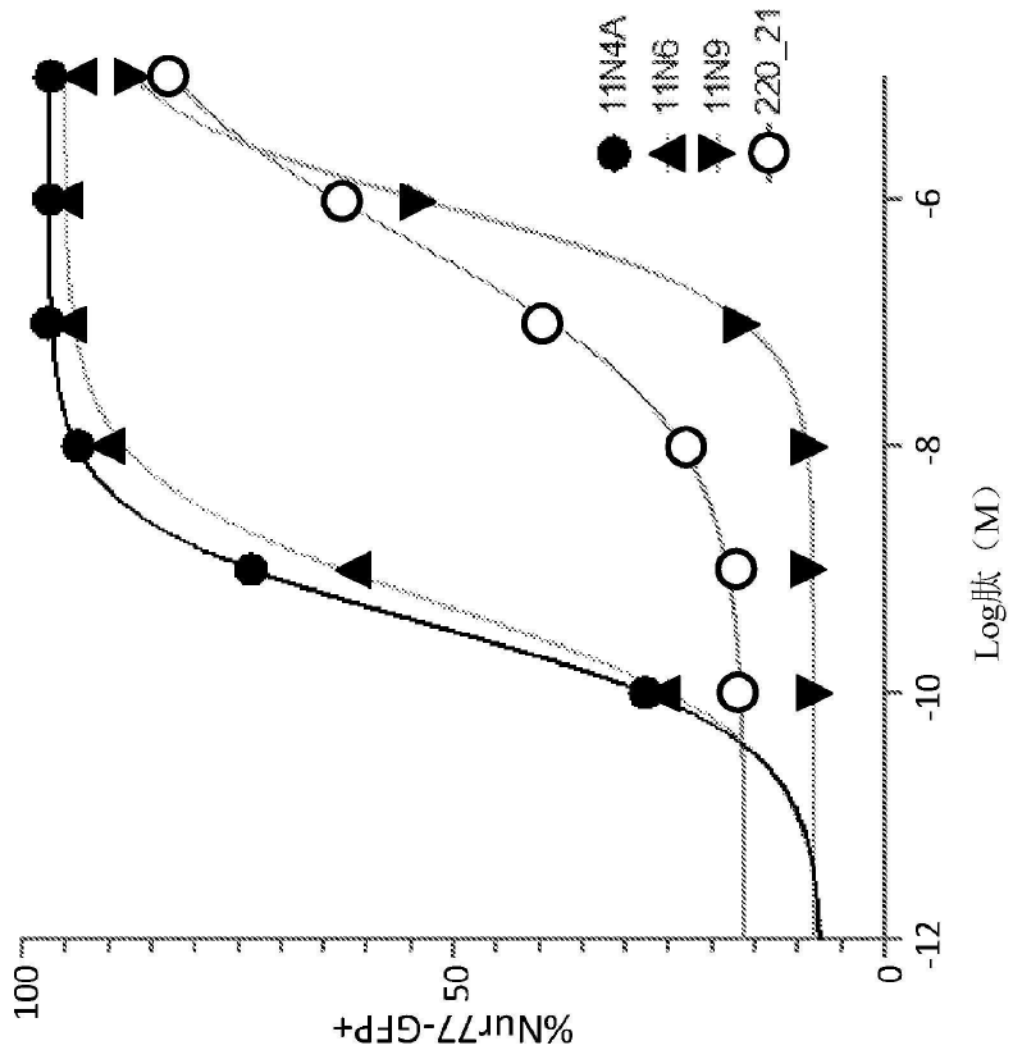


图1D

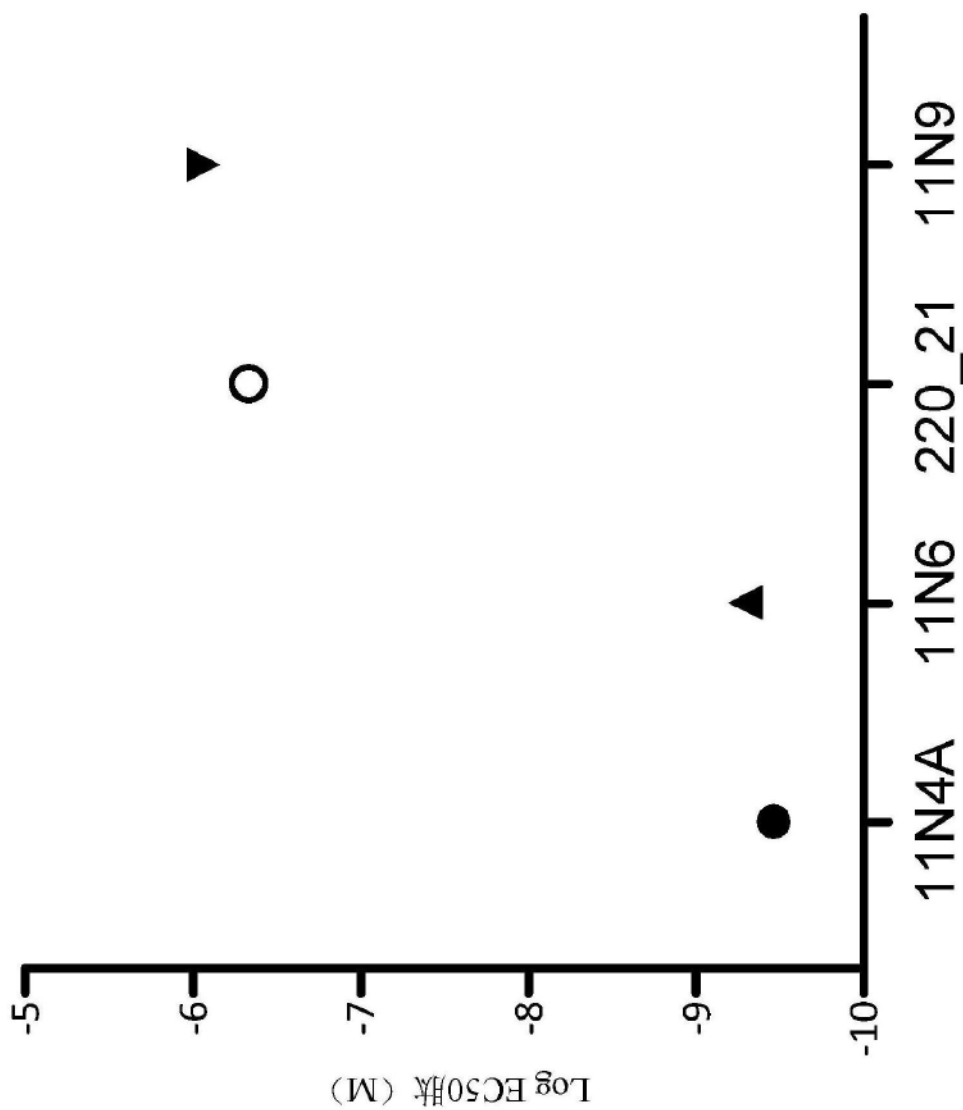


图1E

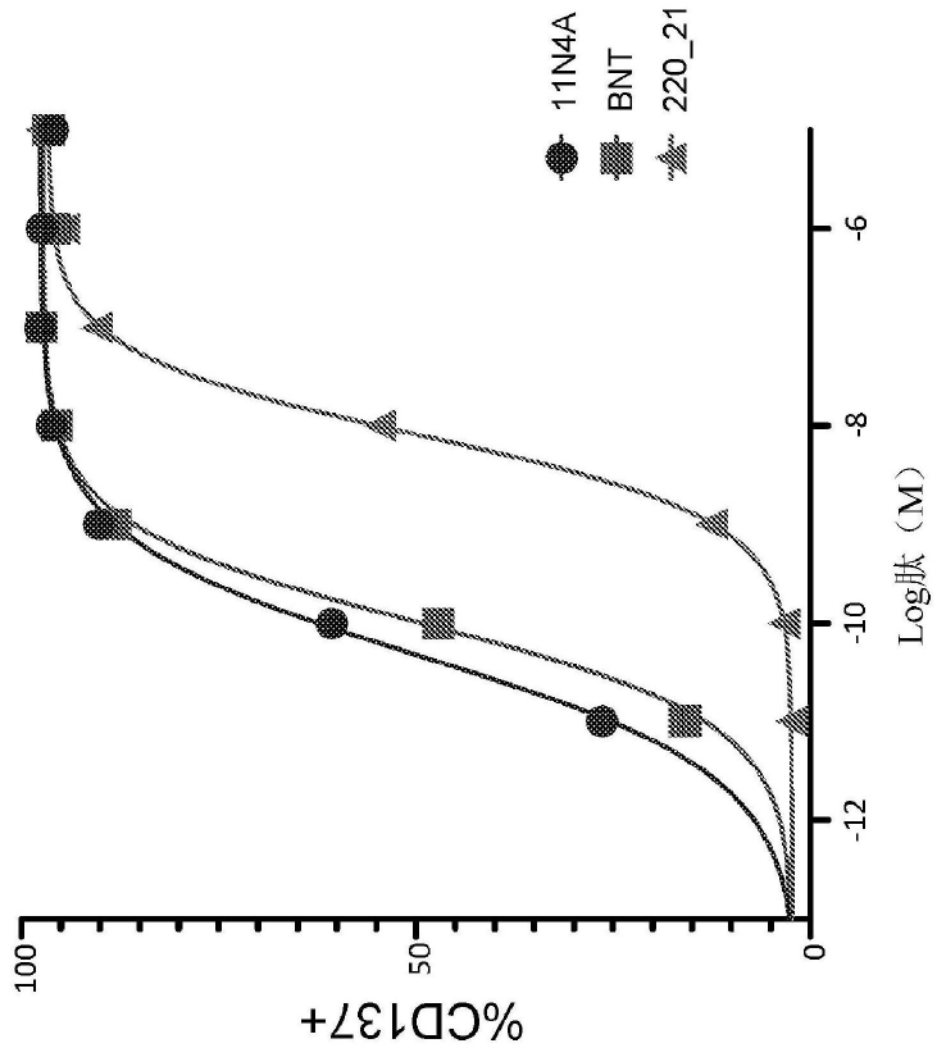


图2A

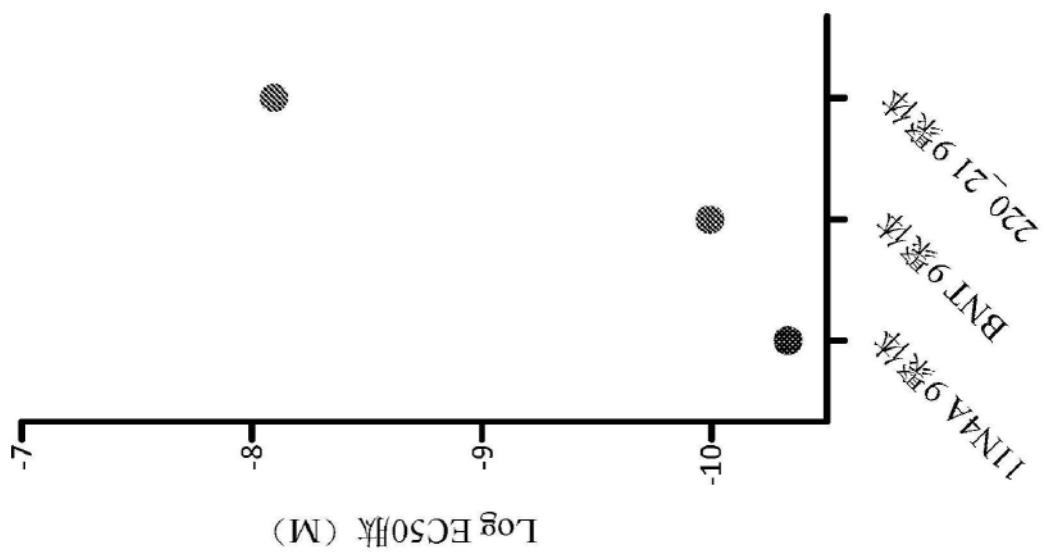


图2B

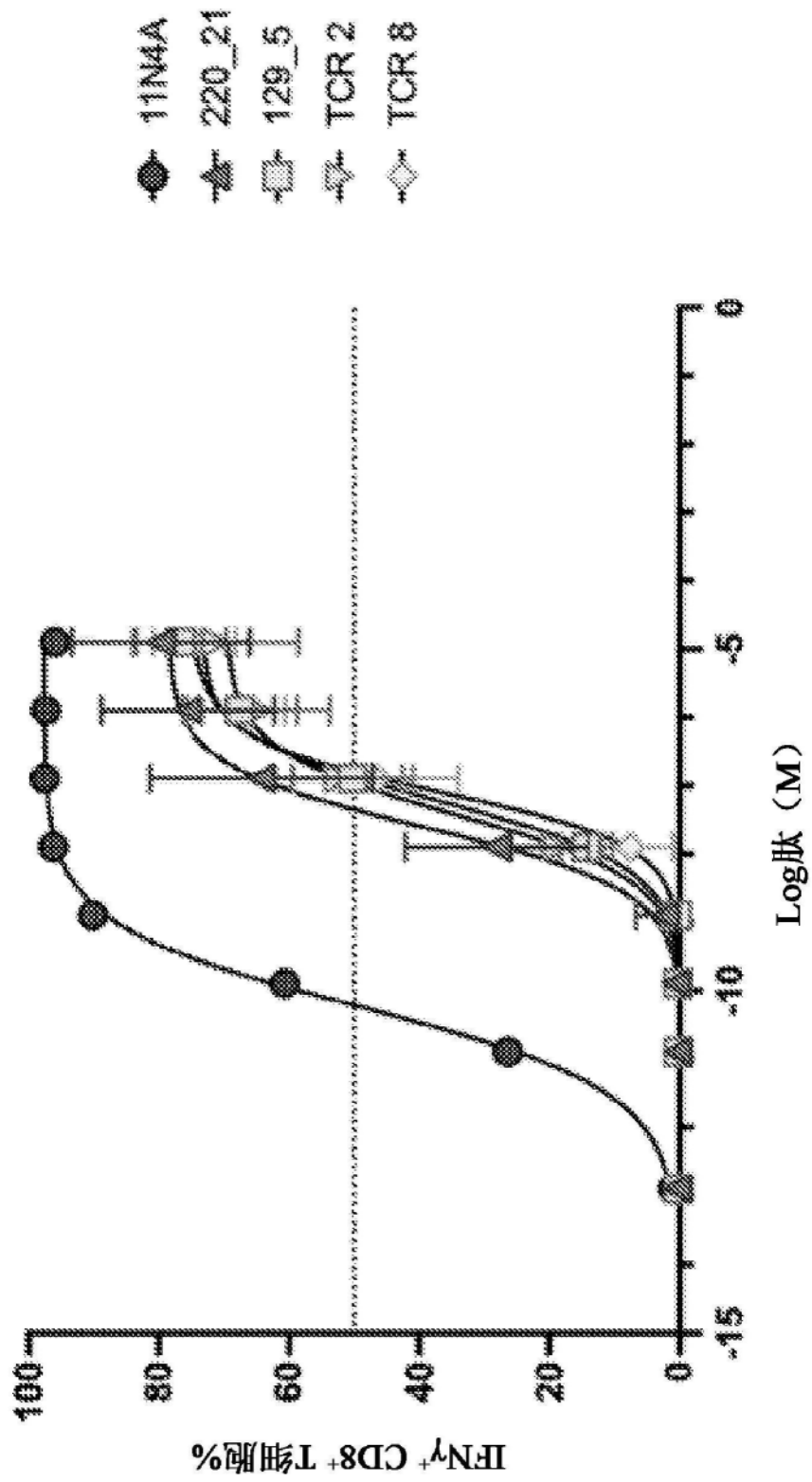


图2C

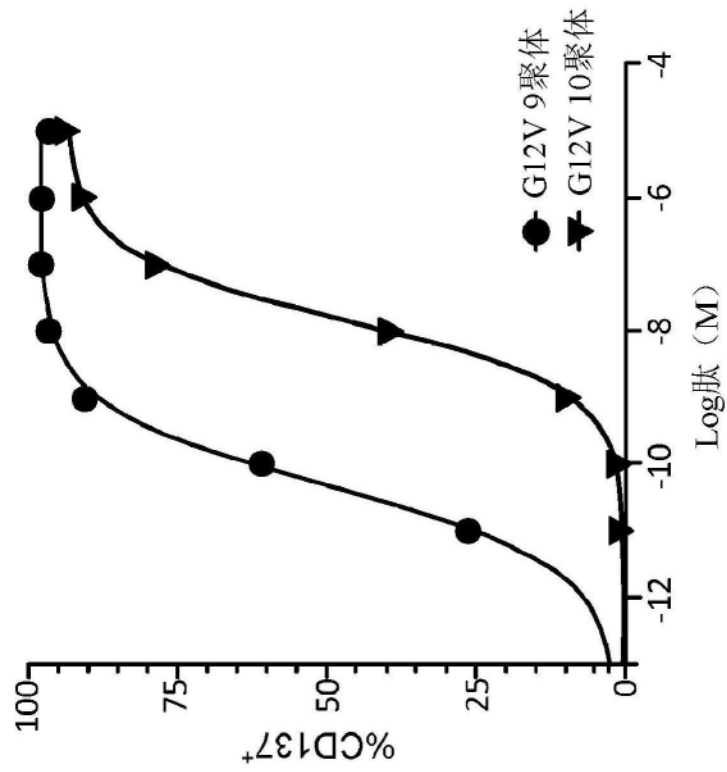


图2D

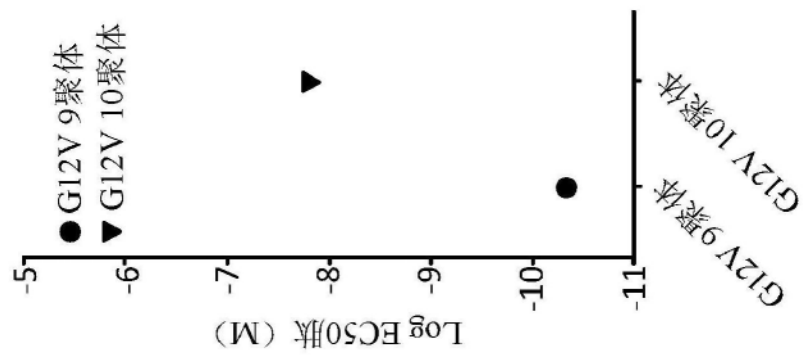


图2E

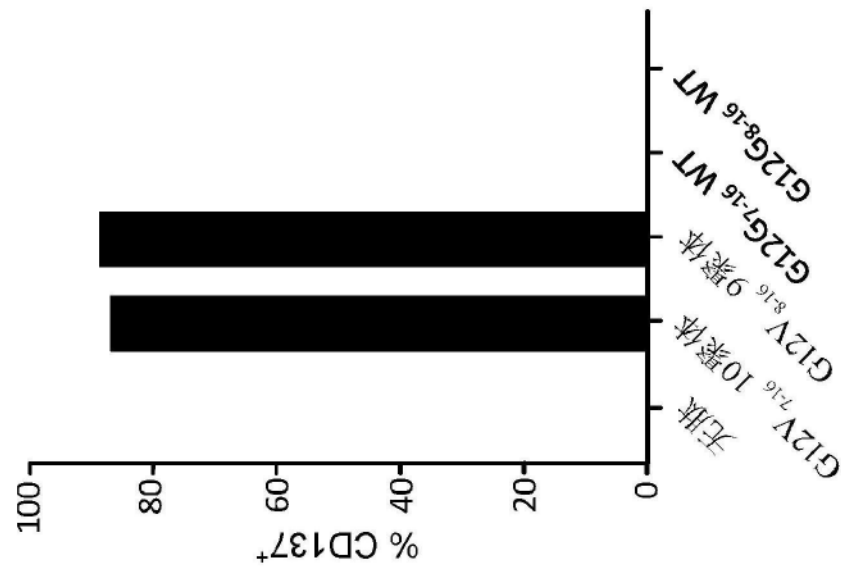


图2F

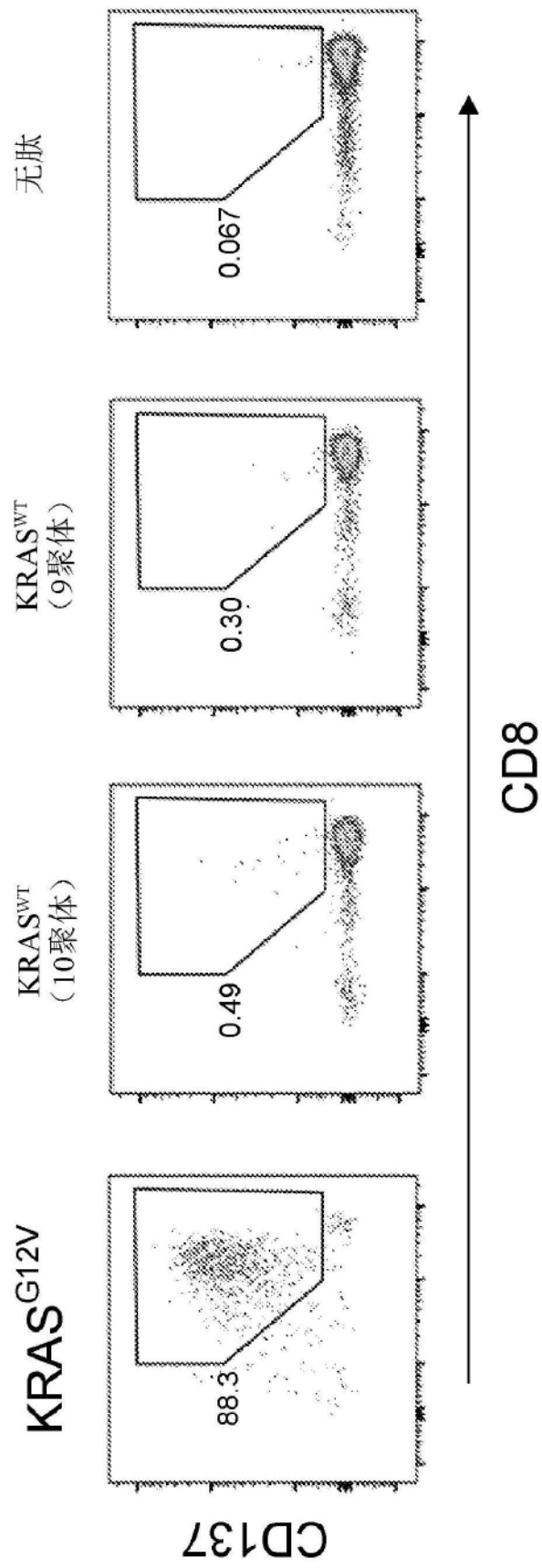


图2G

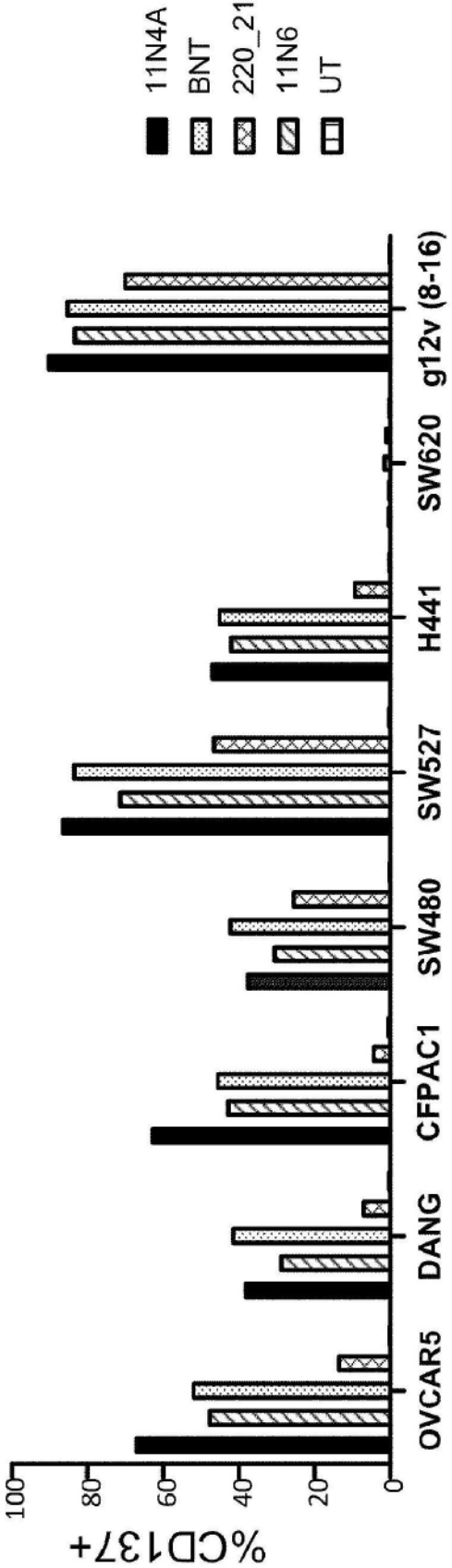


图3A

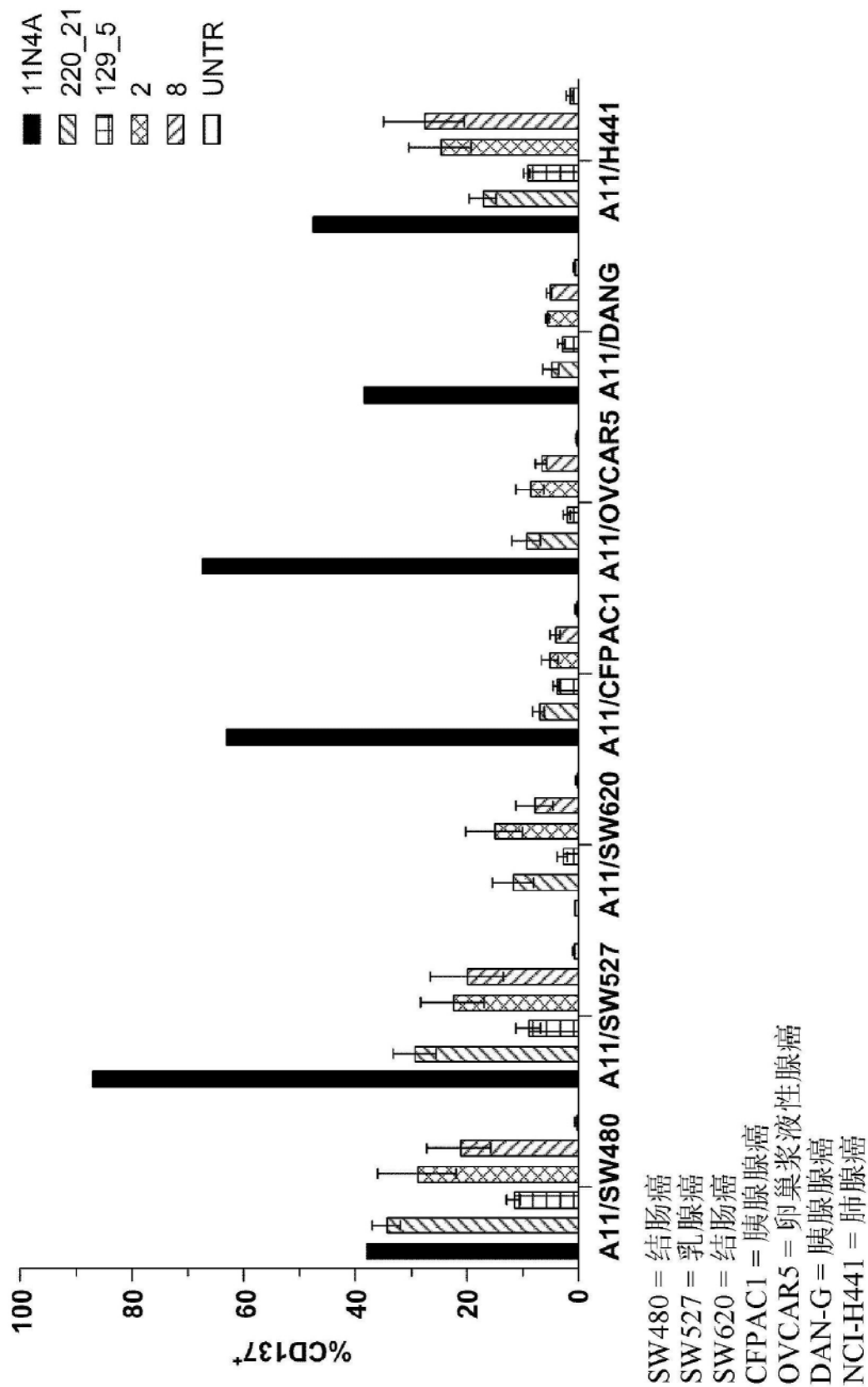


图3B

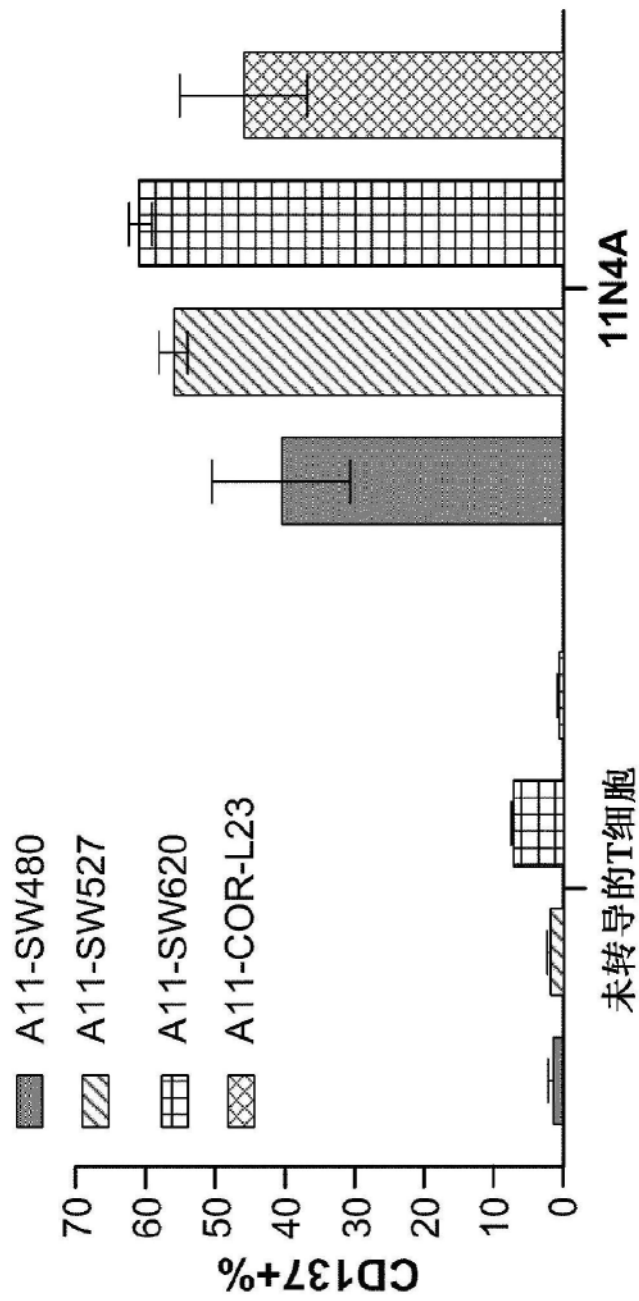


图3C

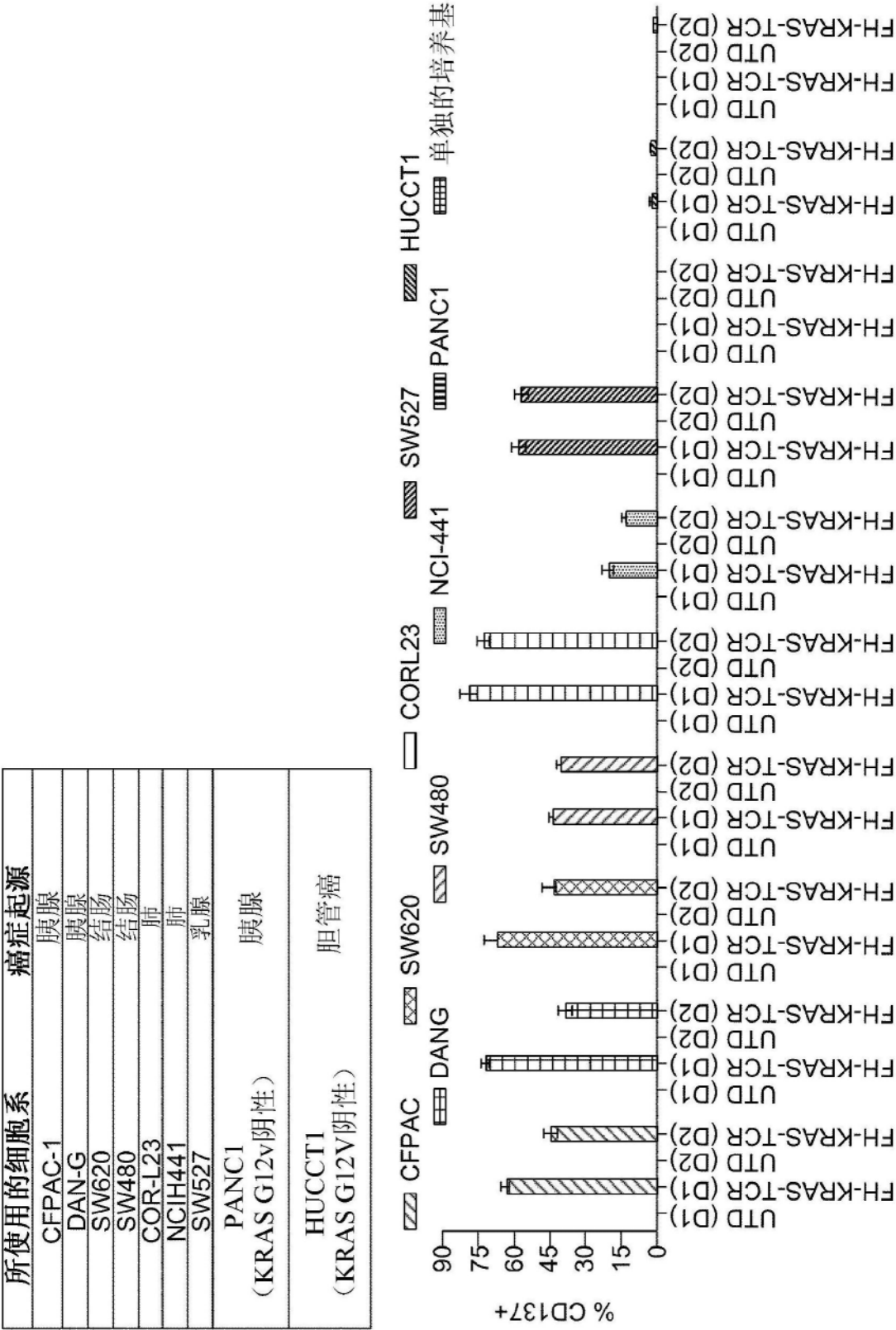


图3D

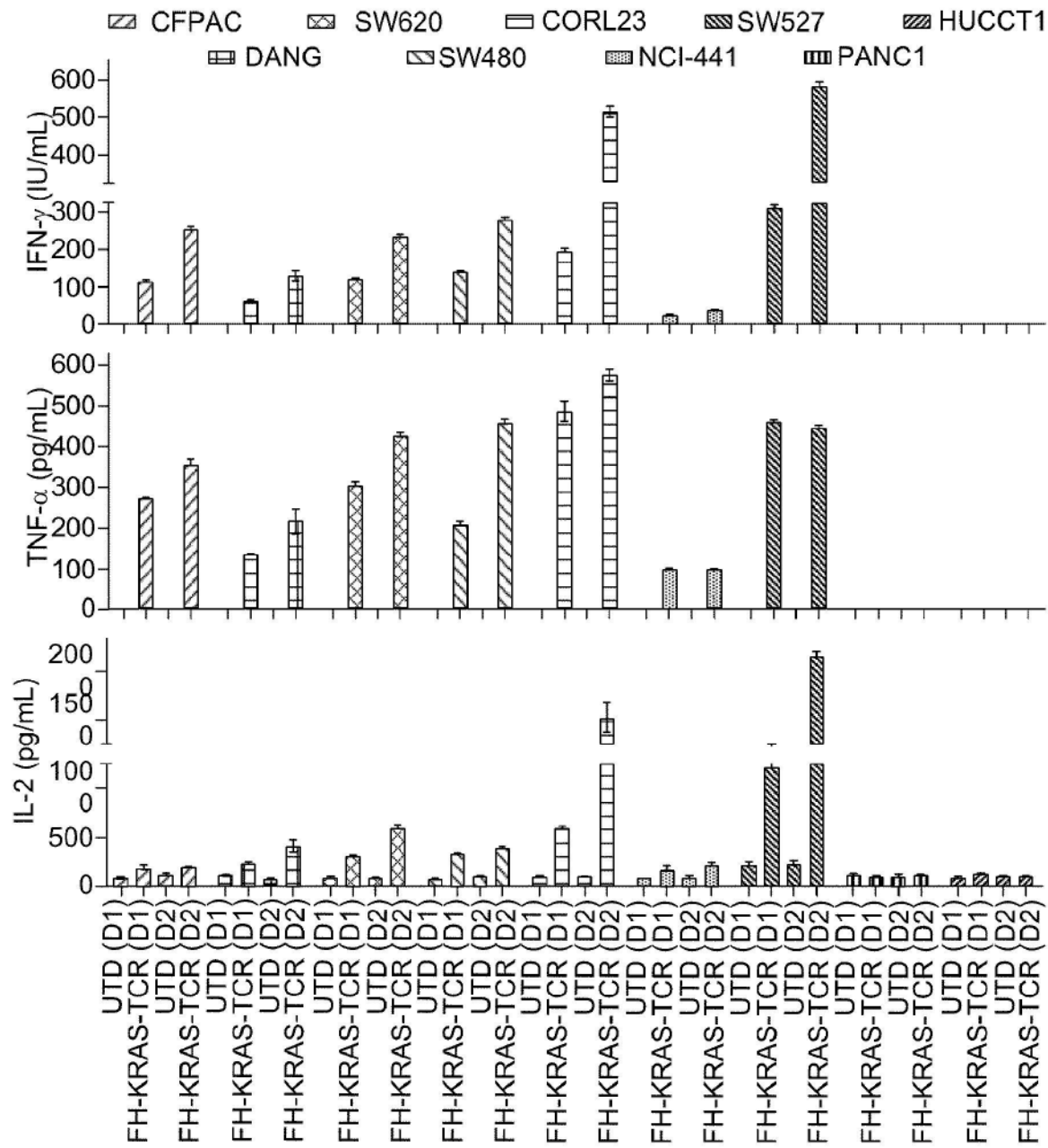


图3E

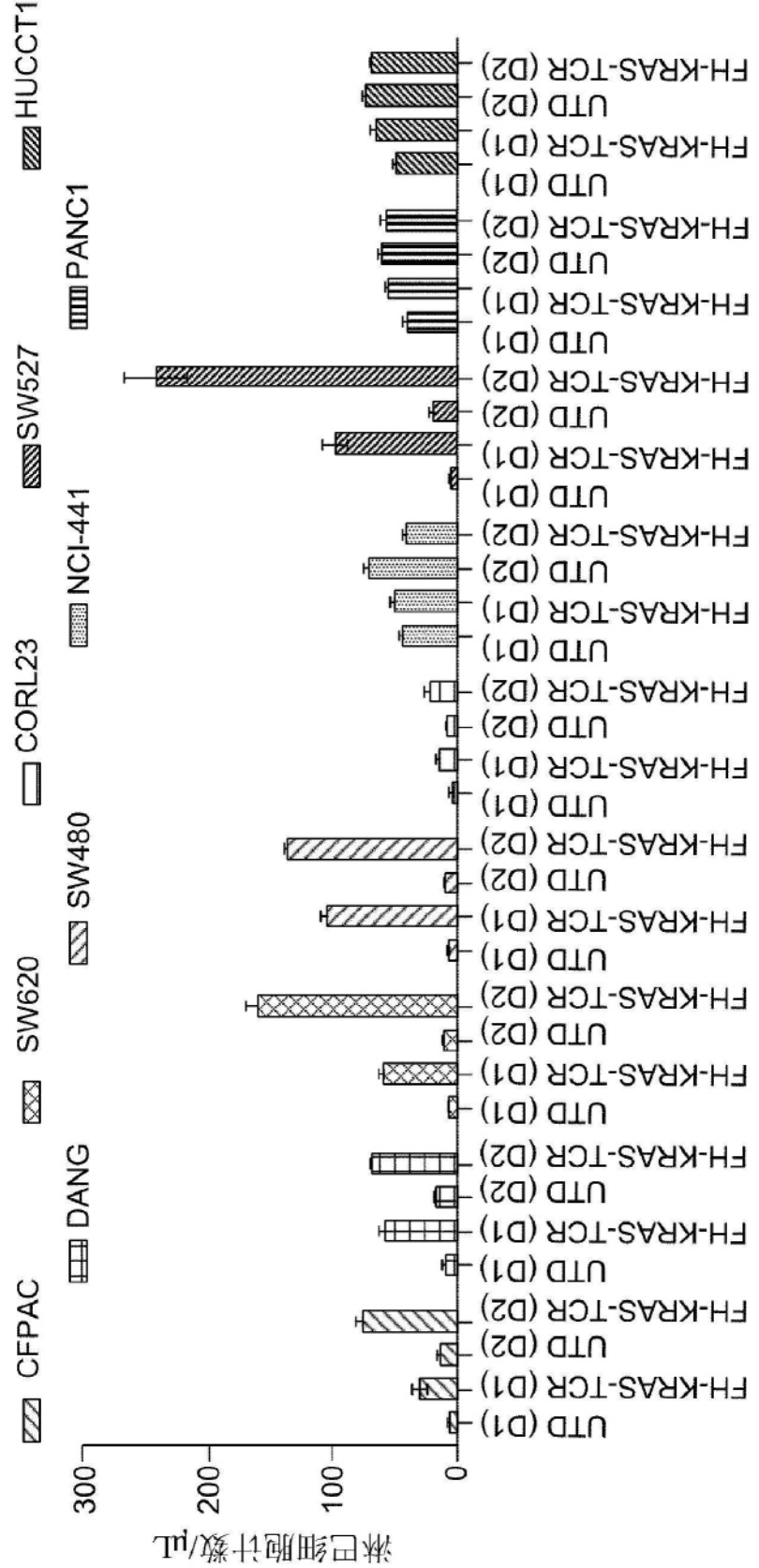


图3F

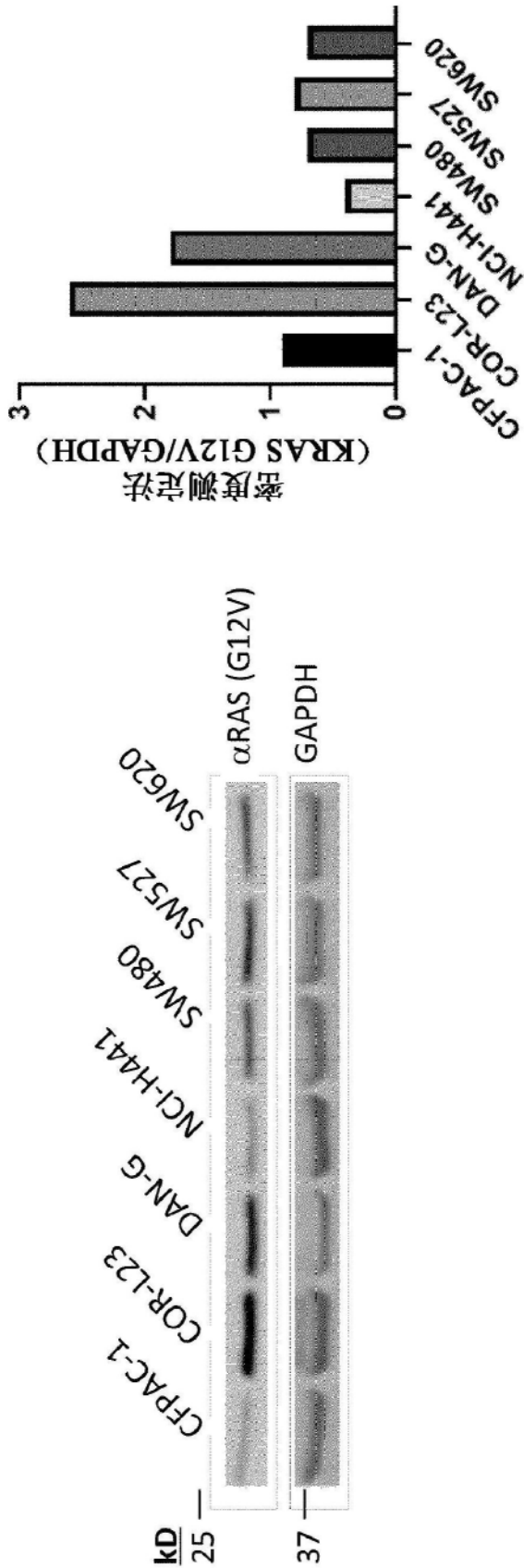


图3G

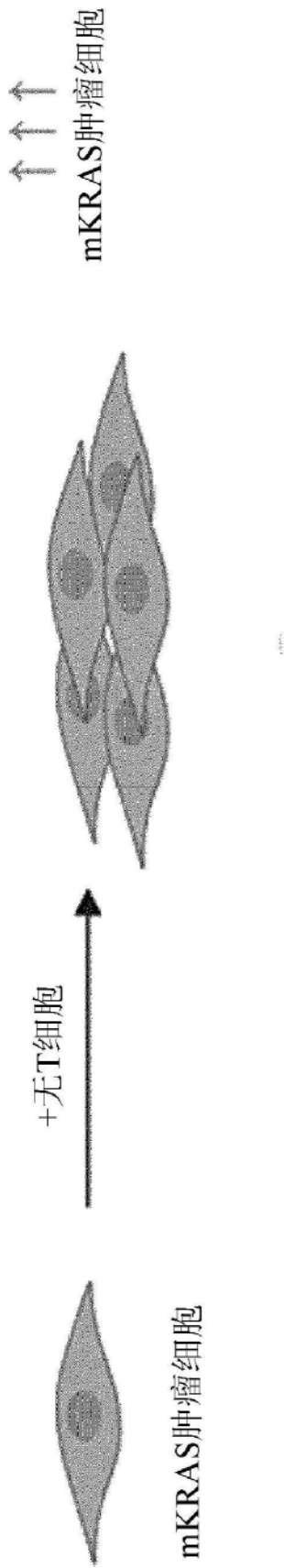


图4A

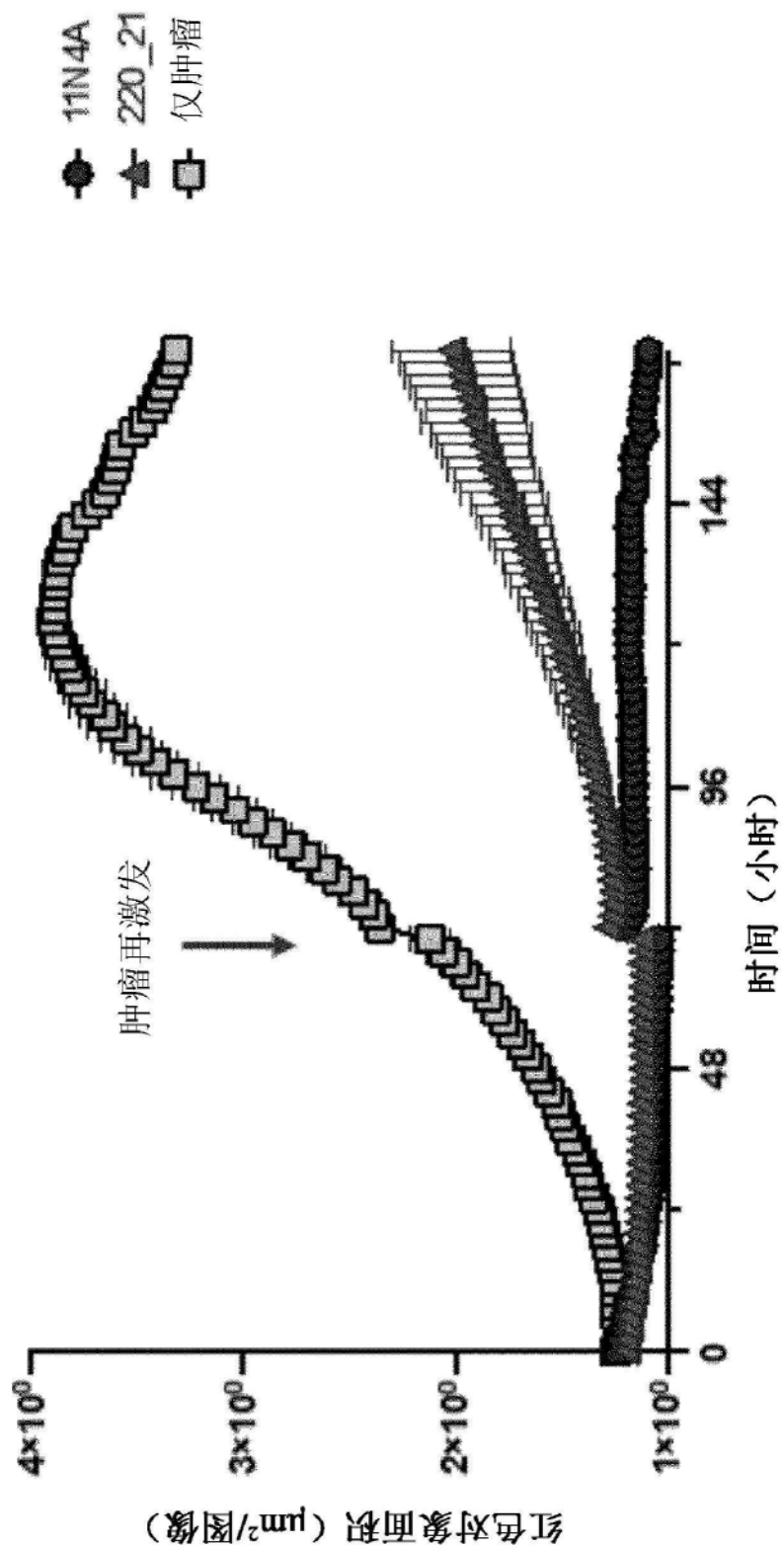


图4B

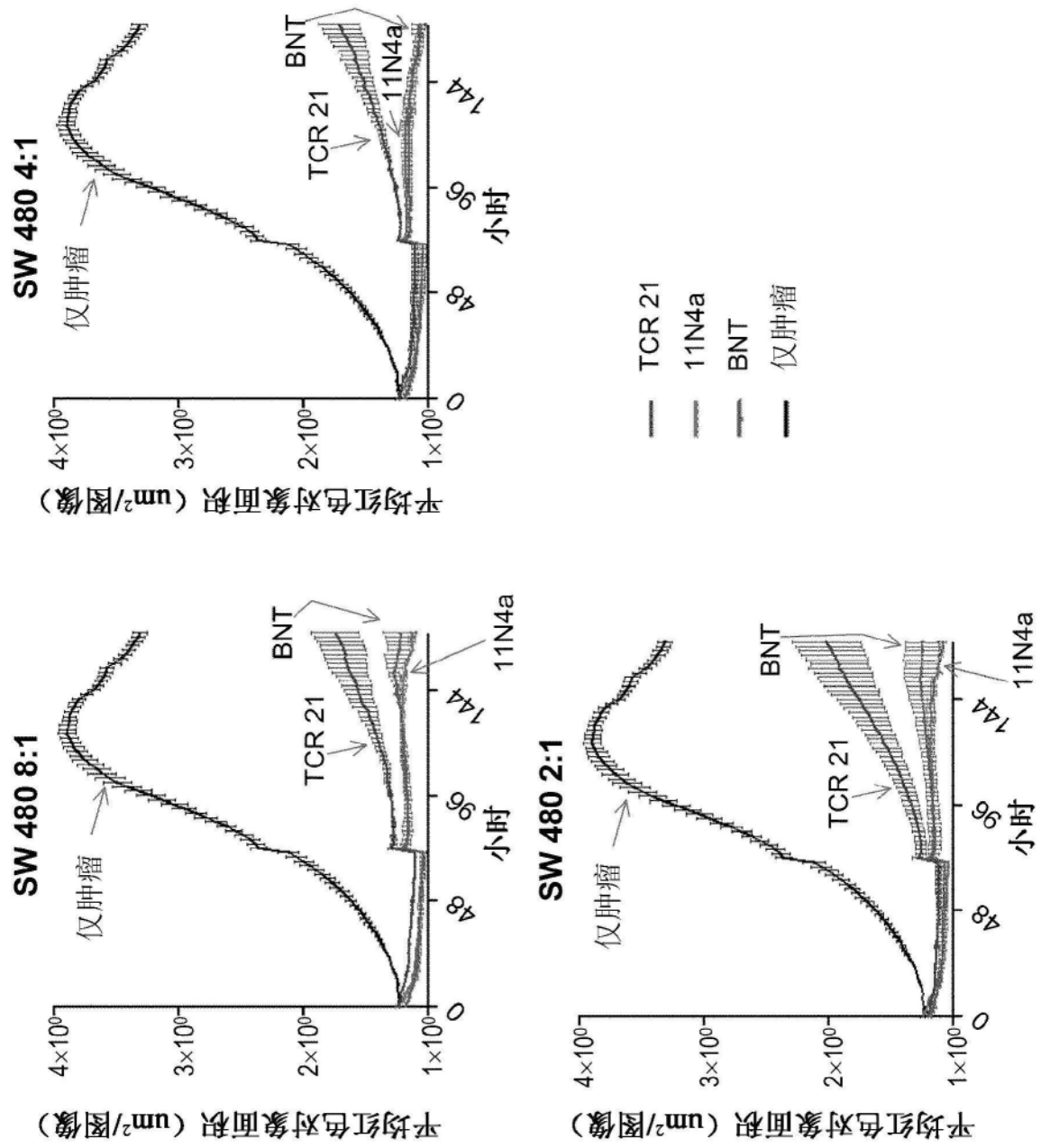


图4C

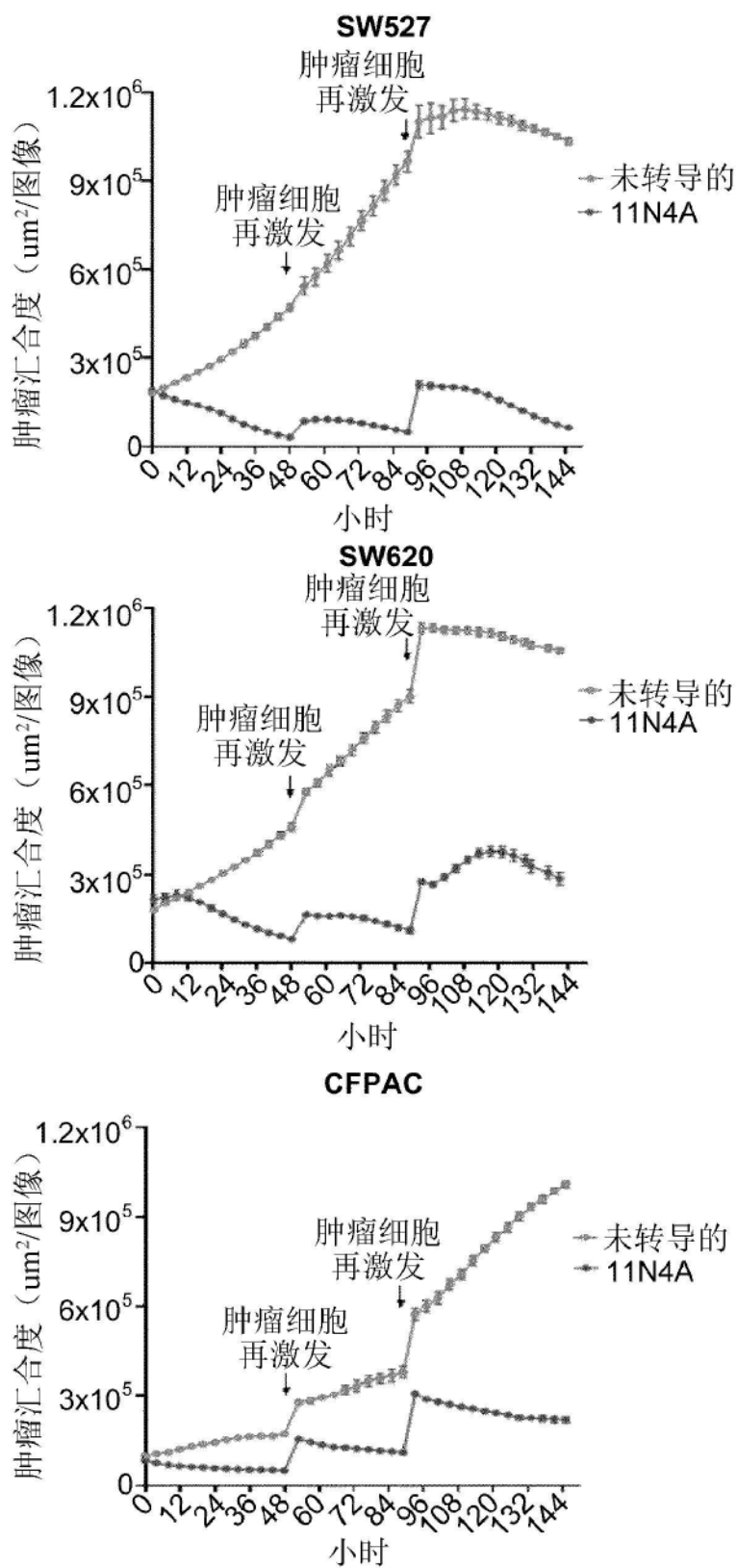


图4D

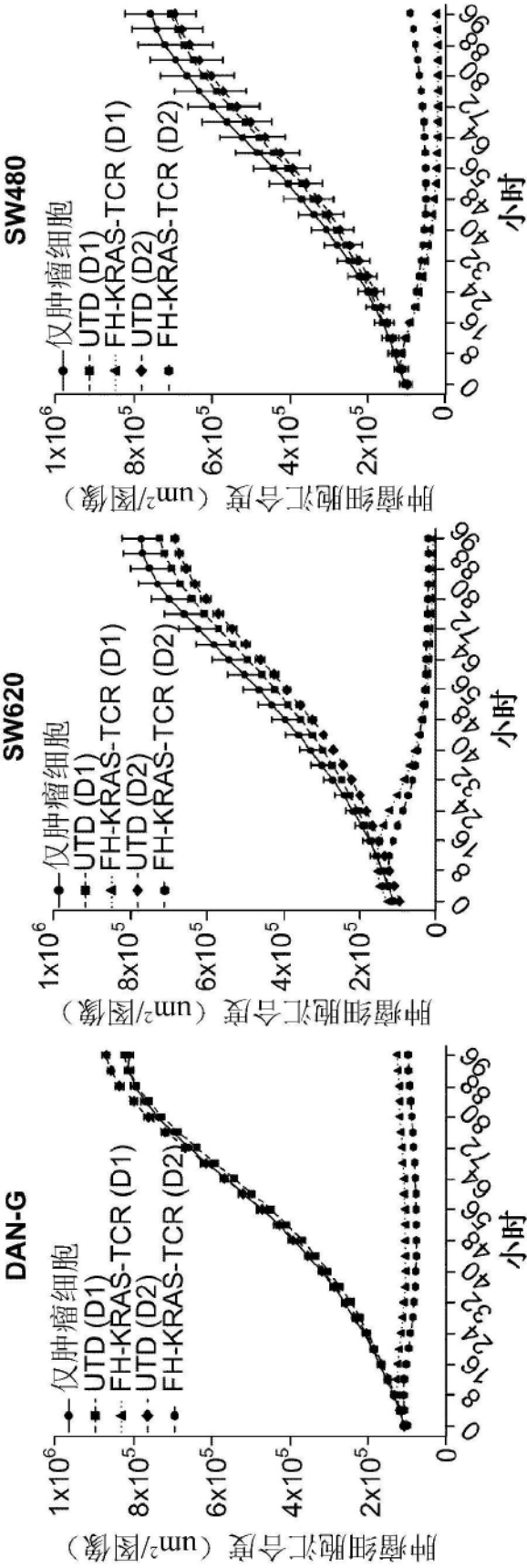


图4E

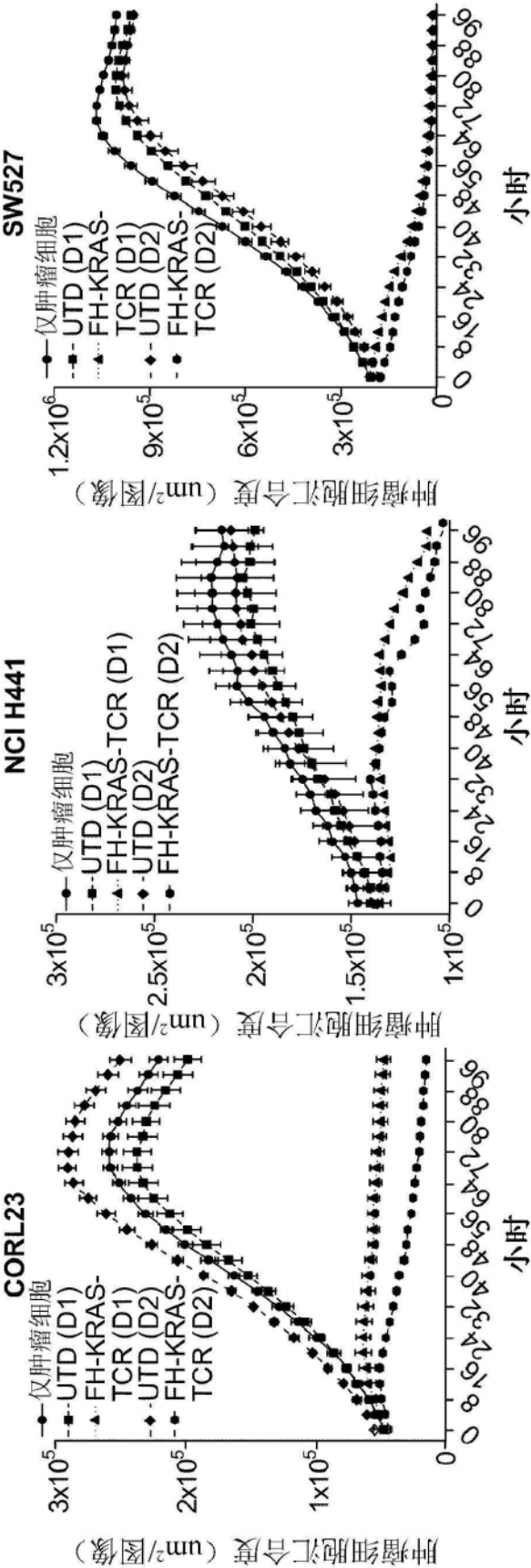


图4F

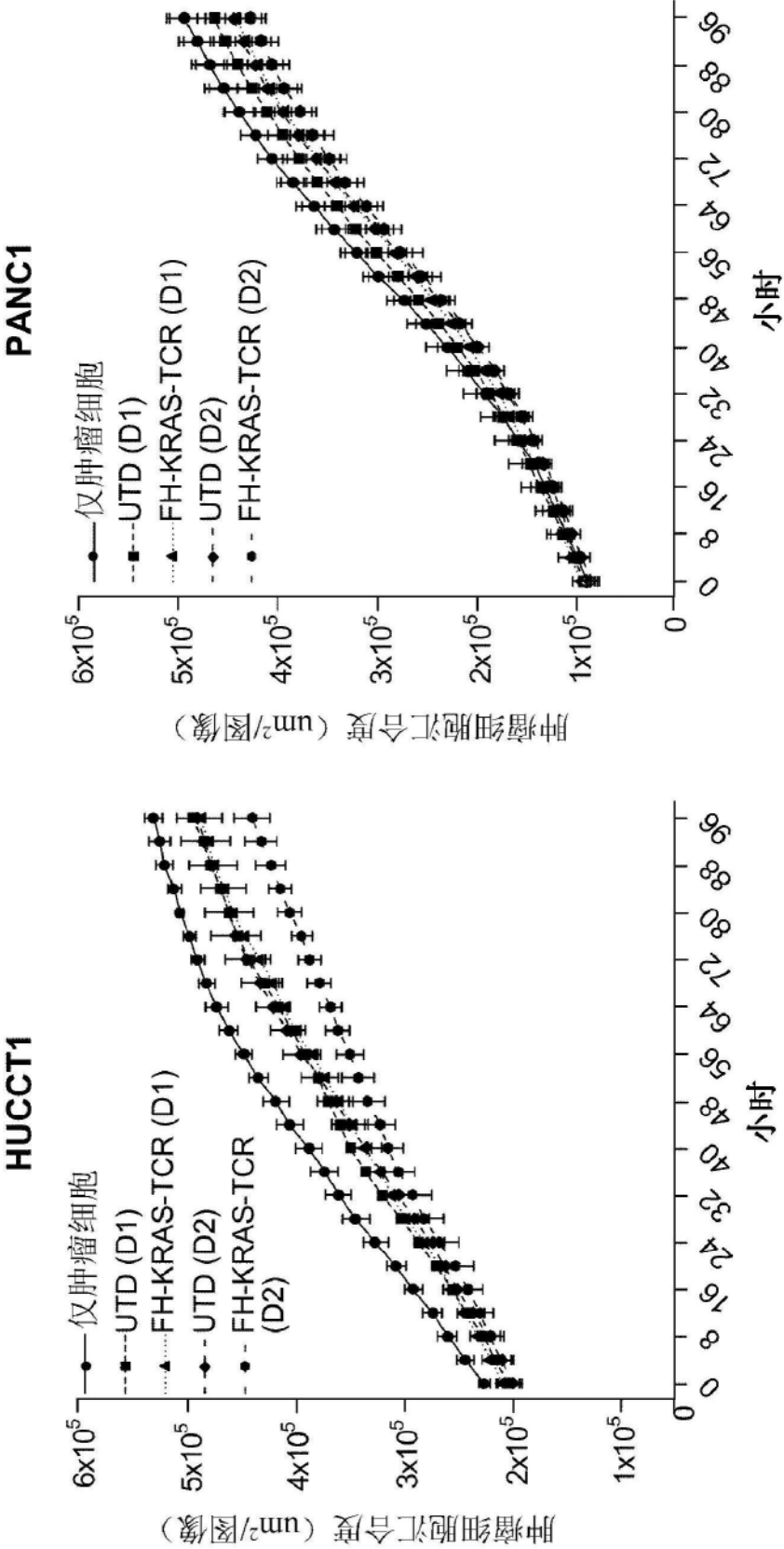


图4G

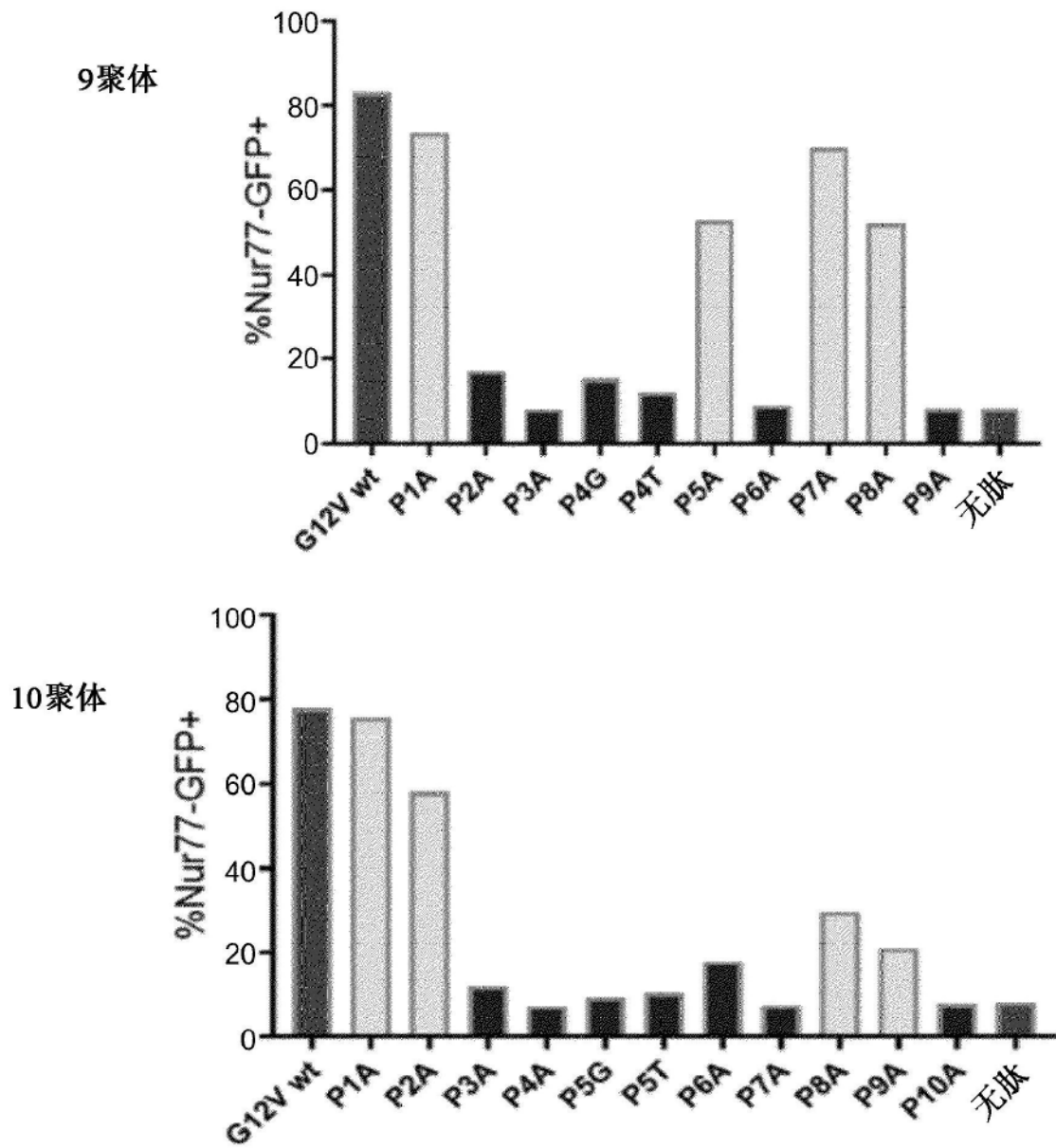


图5A

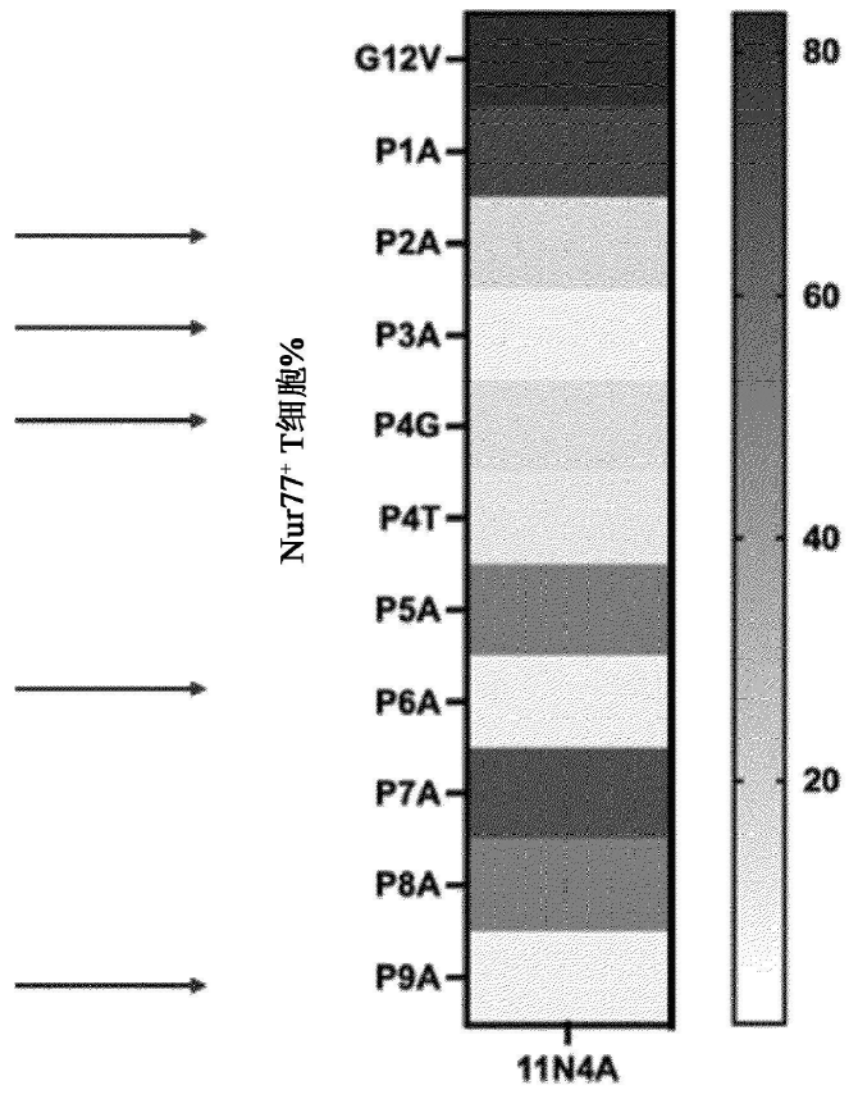


图5B

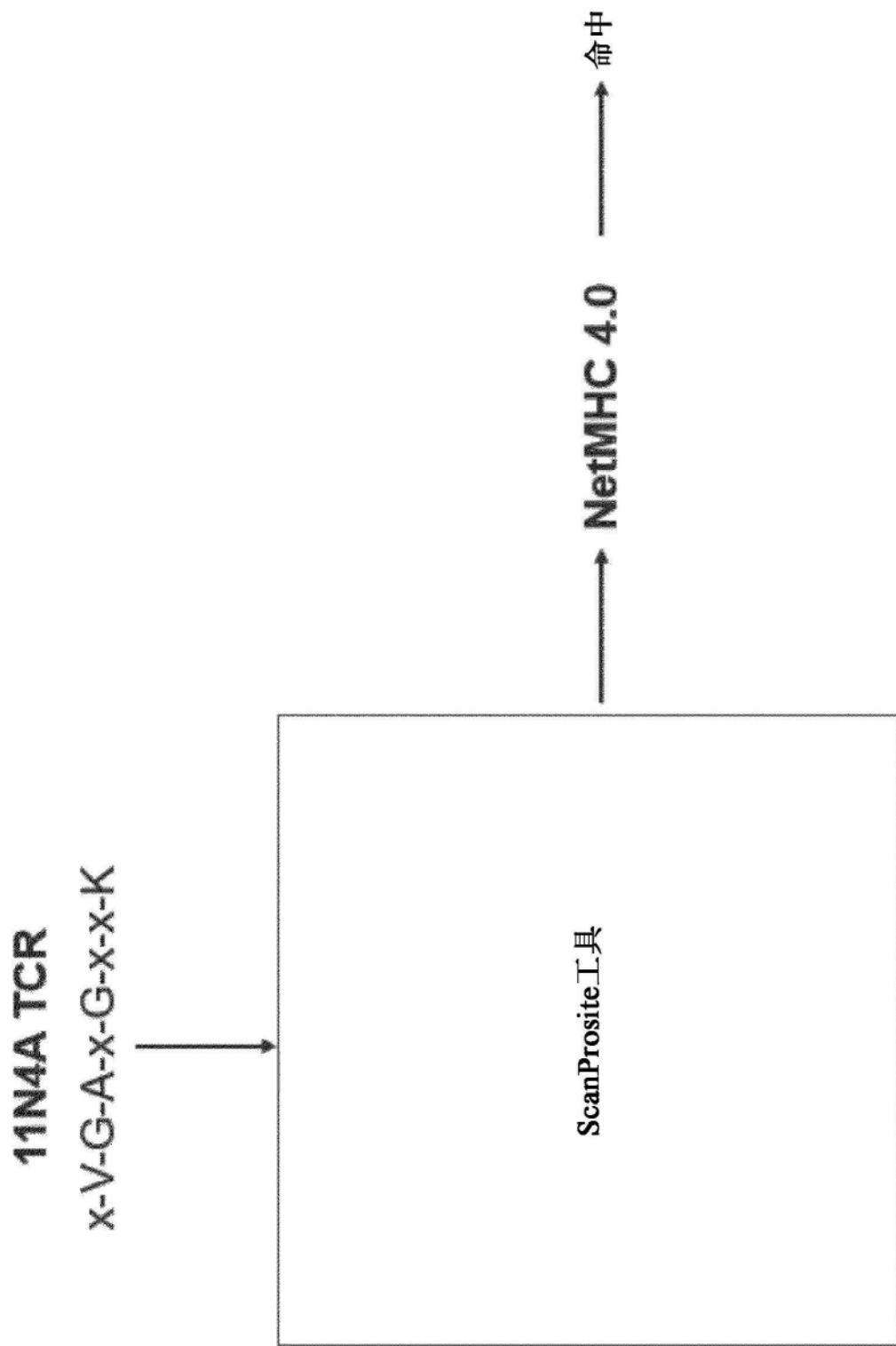


图5C

9聚体搜索字符串:		X-V-G-A-X-G-X-X-K			10次命中	
基因	肽	开始	结束	评分	等级	
RAB7B	IVGAIGVGK	13	21	0.688497	0.15	
ITA8	IVGAFGTGK	469	477	0.561758	0.24	
ARRD4	AVGAEGRVK	10	18	0.328175	0.55	
SMC5	IVGANGTGK	78	86	0.308533	0.59	
MOGS	EVGAKGQLK	220	228	0.113675	1.3	
GKN2	NVGAGGCAK	159	167	0.06972	1.7	
CRNS1	VVGAGGVSK	398	406	0.74512	0.1	
RASE	VVGASGVGK	46	54	0.690829	0.15	
RSLBB	VVGASGVGK	38	46	0.690829	0.15	
RASH	VVGAGGVGK	8	16	0.638055	0.18	
RASK	VVGAGGVGK	8	16	0.638055	0.18	
RASN	VVGAGGVGK	8	16	0.638055	0.18	
MIRO2	VVGARGVGK	421	429	0.480429	0.33	

图5D

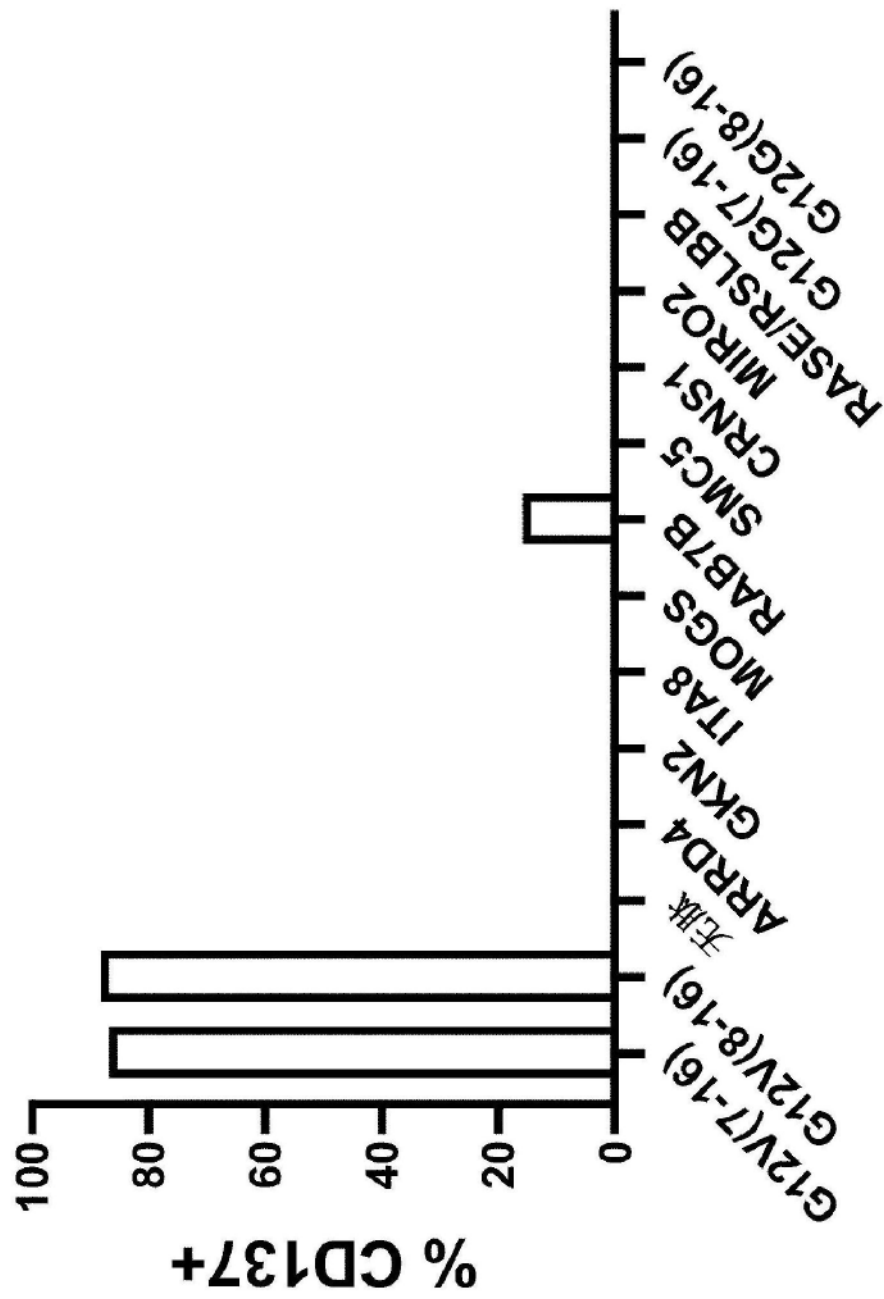


图6A

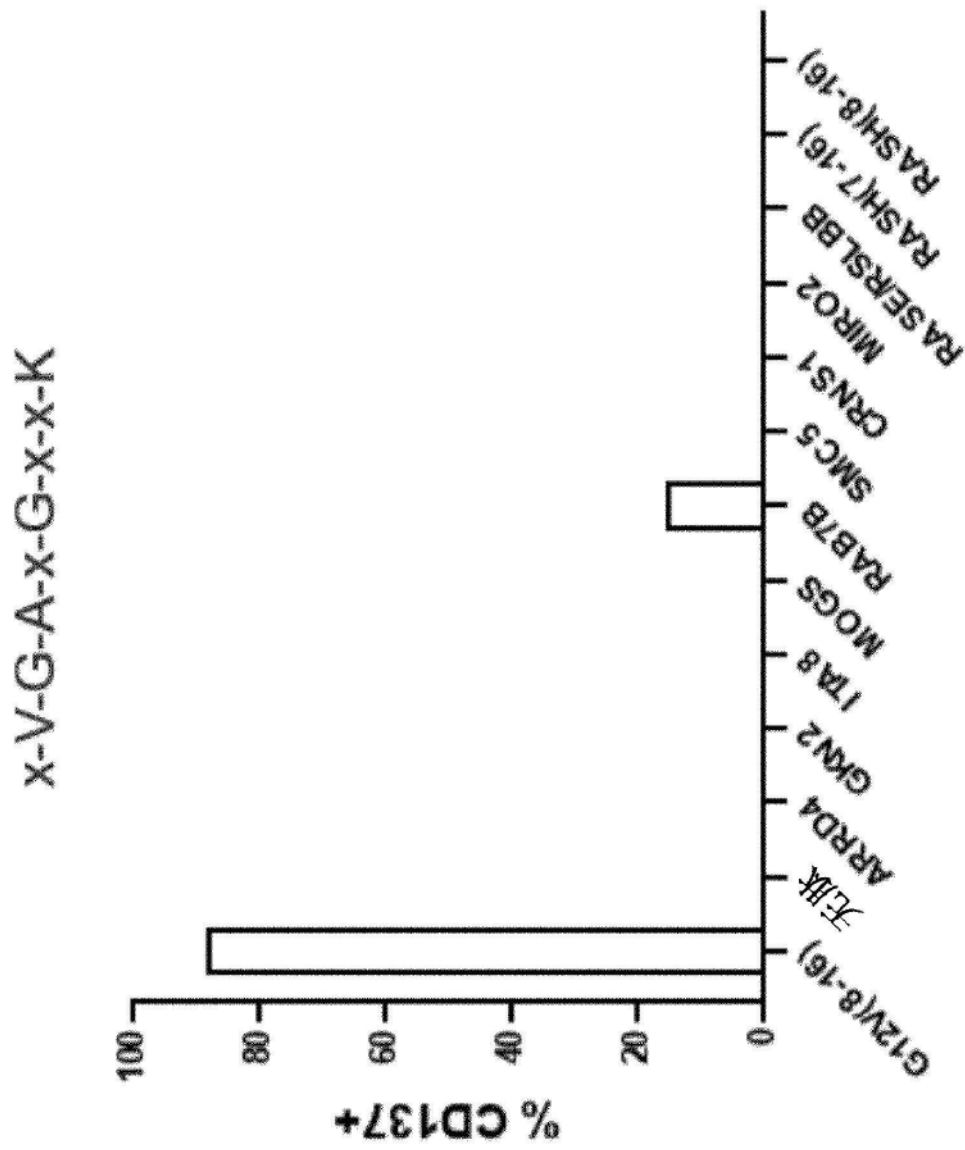


图6B

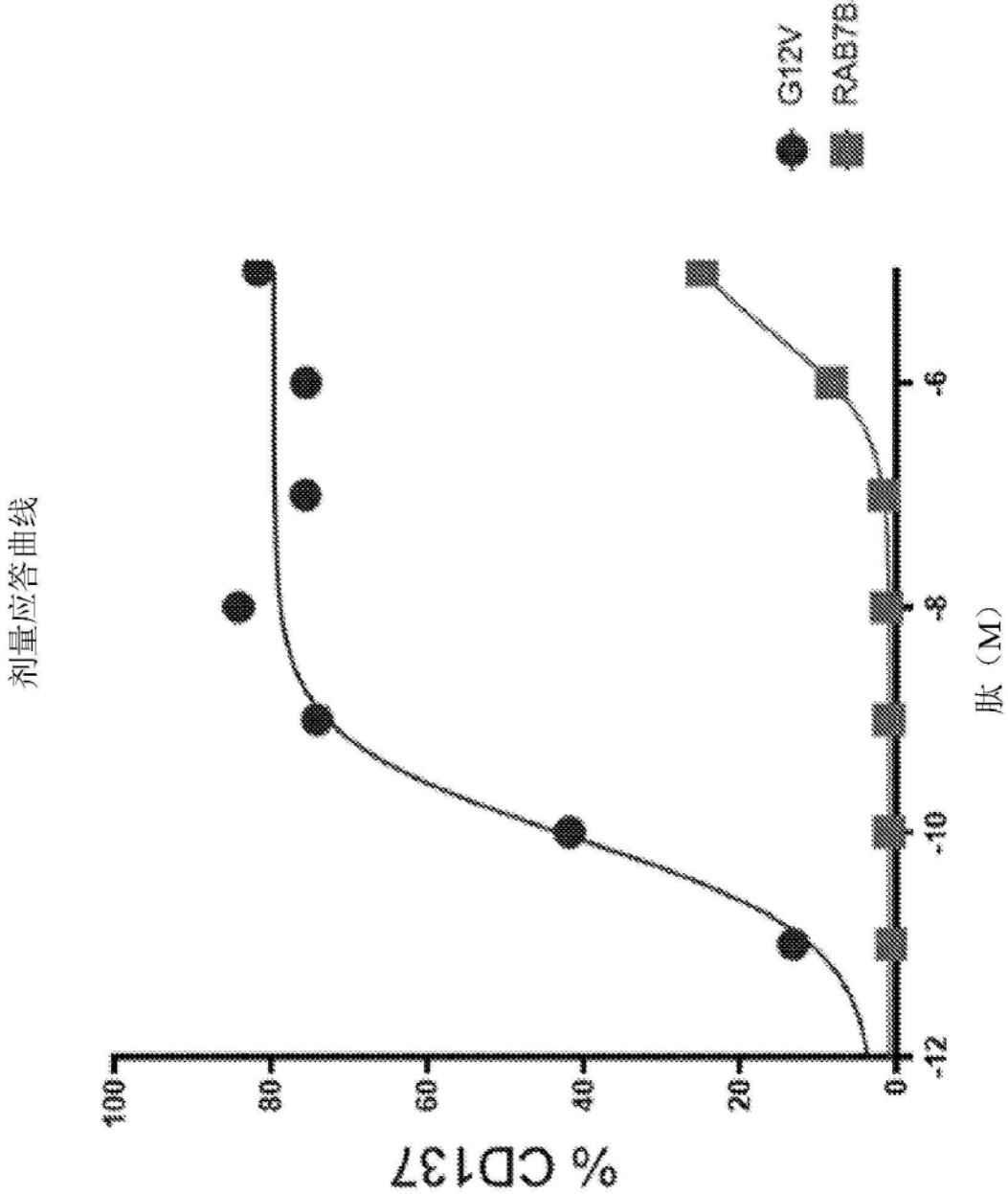


图6C

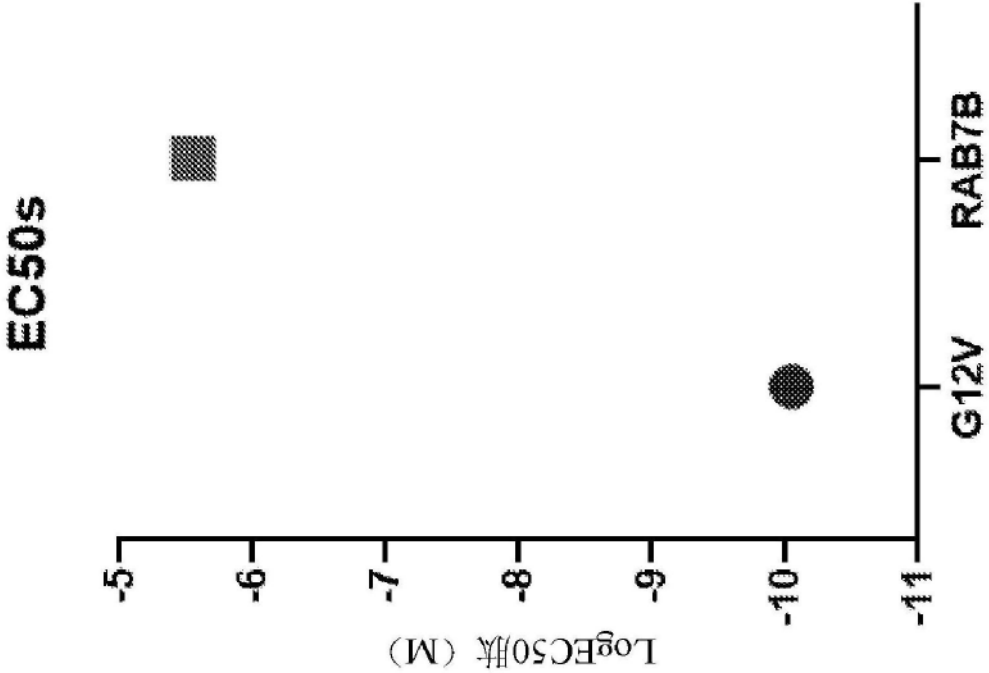


图6D

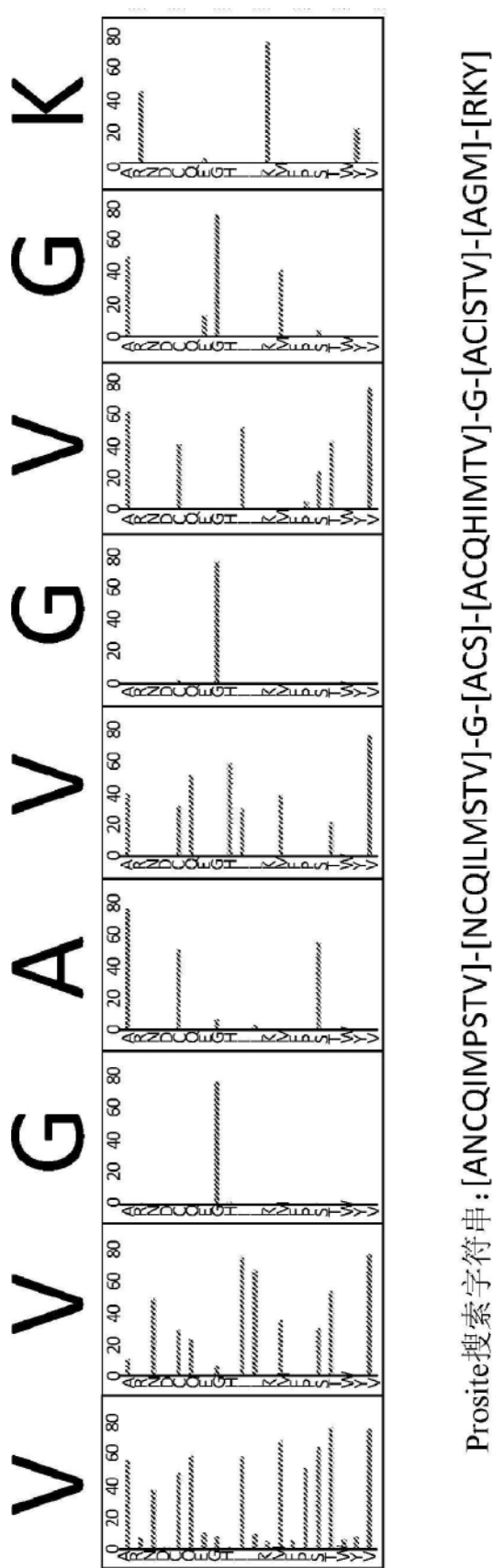


图6E

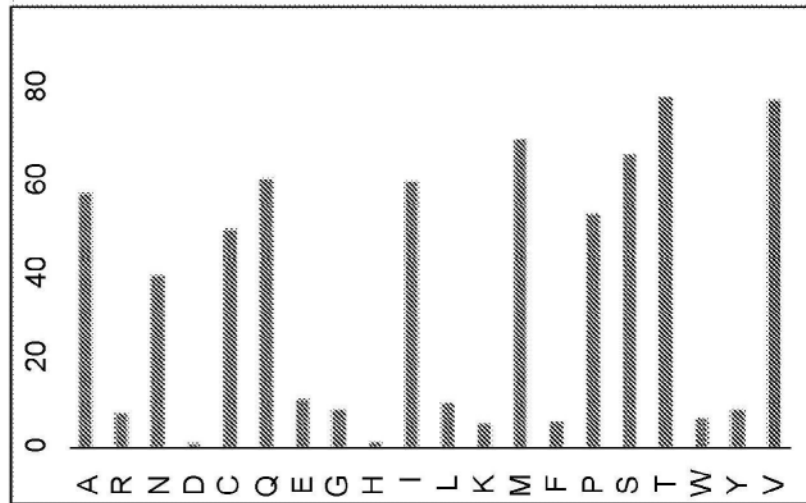
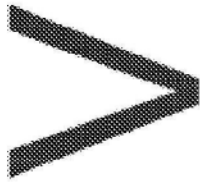


图6E,续

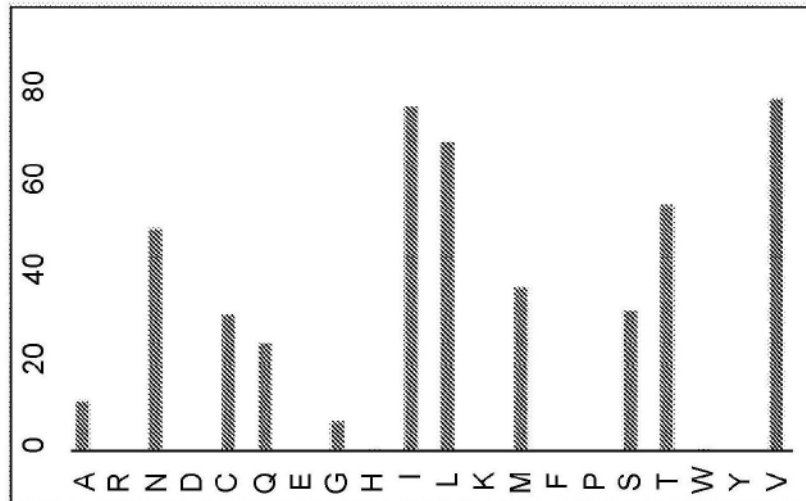
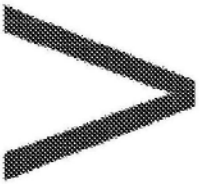


图6E,续

G

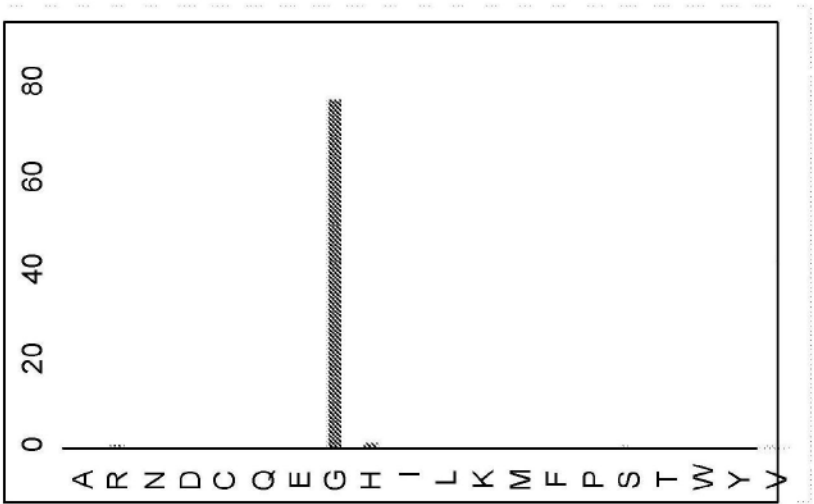


图6E, 续

A

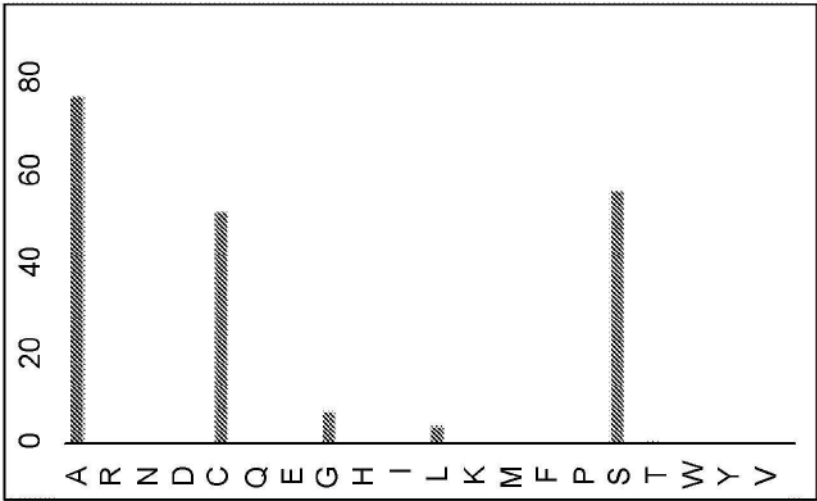


图6E, 续

V

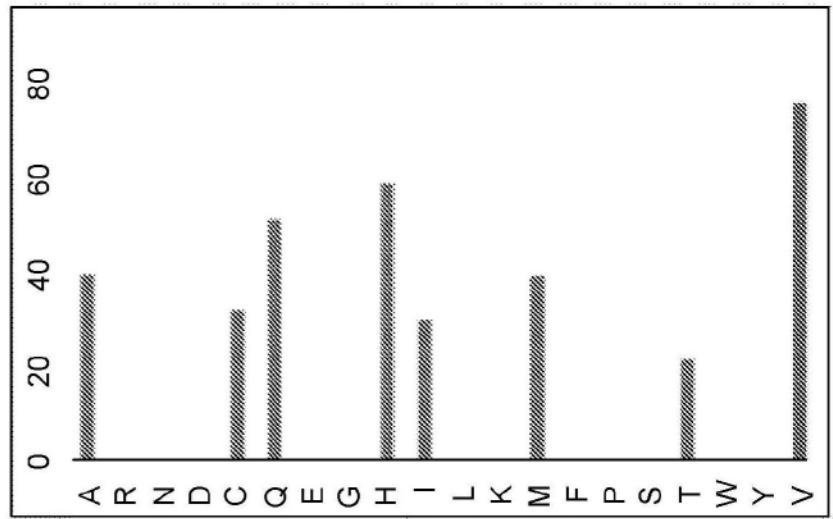


图6E, 续

G

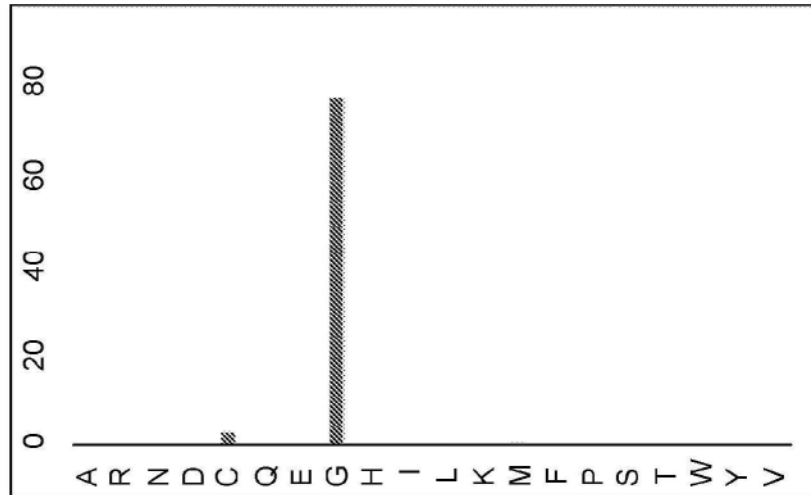


图6E, 续

V

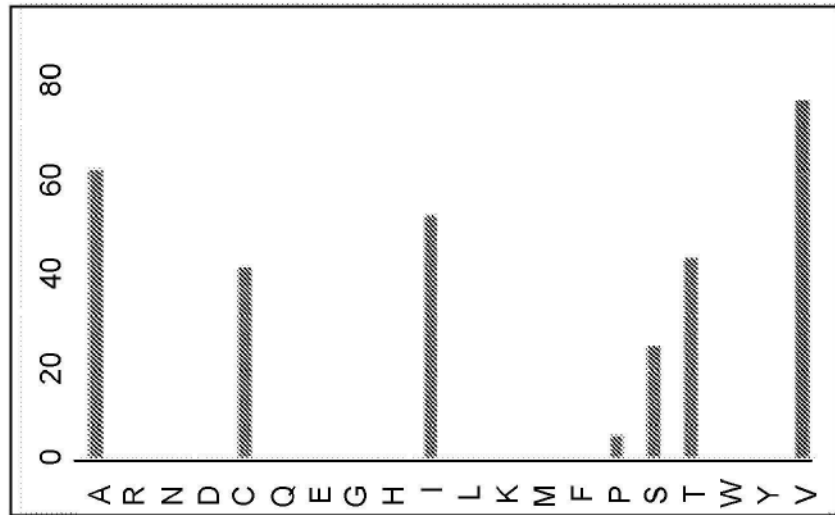


图6E, 续

G

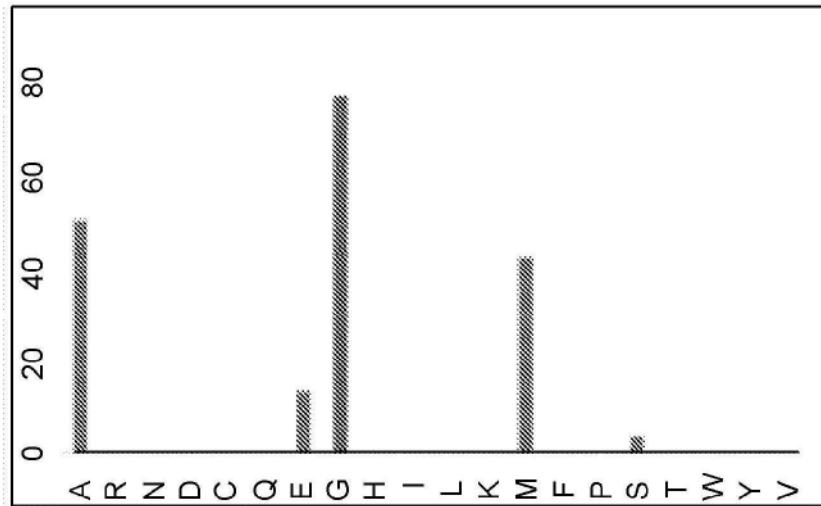


图6E, 续

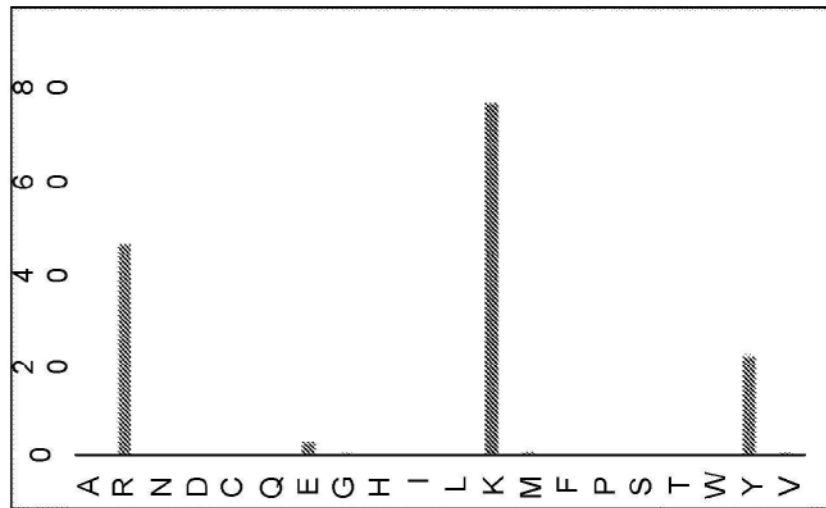
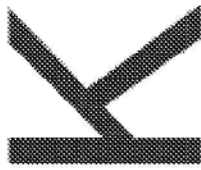


图6E, 续

基因	开始	结束	肽	评分	等级%
KRAS G12V	8	16	VVGAVGVGK	0.755168	0.1
HTR5B	1570	1578	ASGAVGSAK	0.701693	0.14
RAB7B	13	21	IVGAIGVGK	0.688497	0.15
MED1	1383	1391	NVGSTGVAK	0.425281	0.39
RAB4B	13	21	VIGSAGTGK	0.401558	0.43
NAL12	215	223	MQGAAGIGK	0.248652	0.72
MOD5	28	36	ILGATGTGK	0.116715	1.3
DYH2	2082	2090	IVGCTGSGK	0.069626	1.7
MRP5	593	601	ICGSVGSGK	0.0073	4.7
AFDDT	155	163	QMGAAGSGR	0.00474	5.5
ANKR9	240	248	PVGAAGSAR	0.002816	6.7
EP300	192	200	MNGSIGAGR	0.002772	6.7
SCGR4	80	88	TCGSCGCGY	0.000111	21

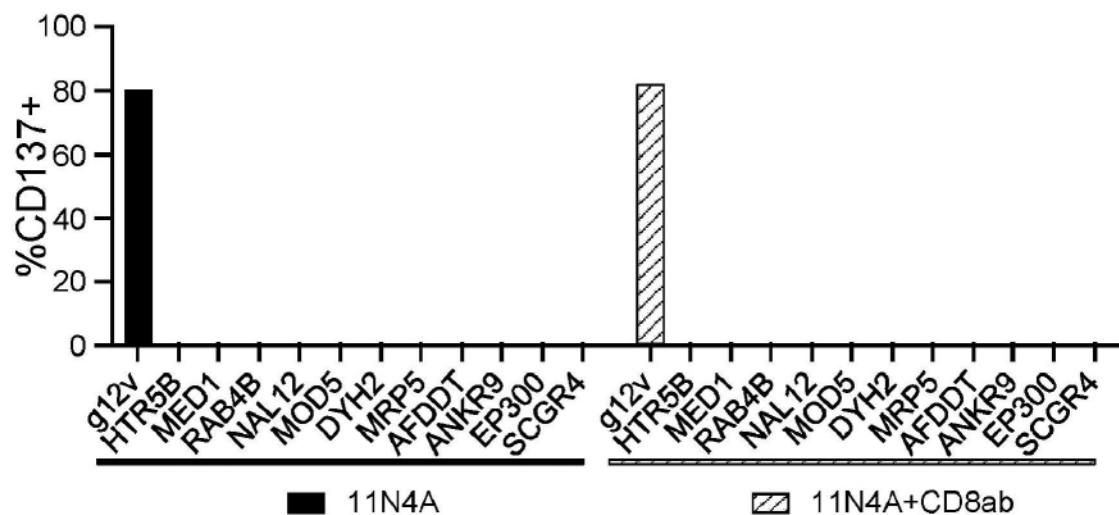


图6F

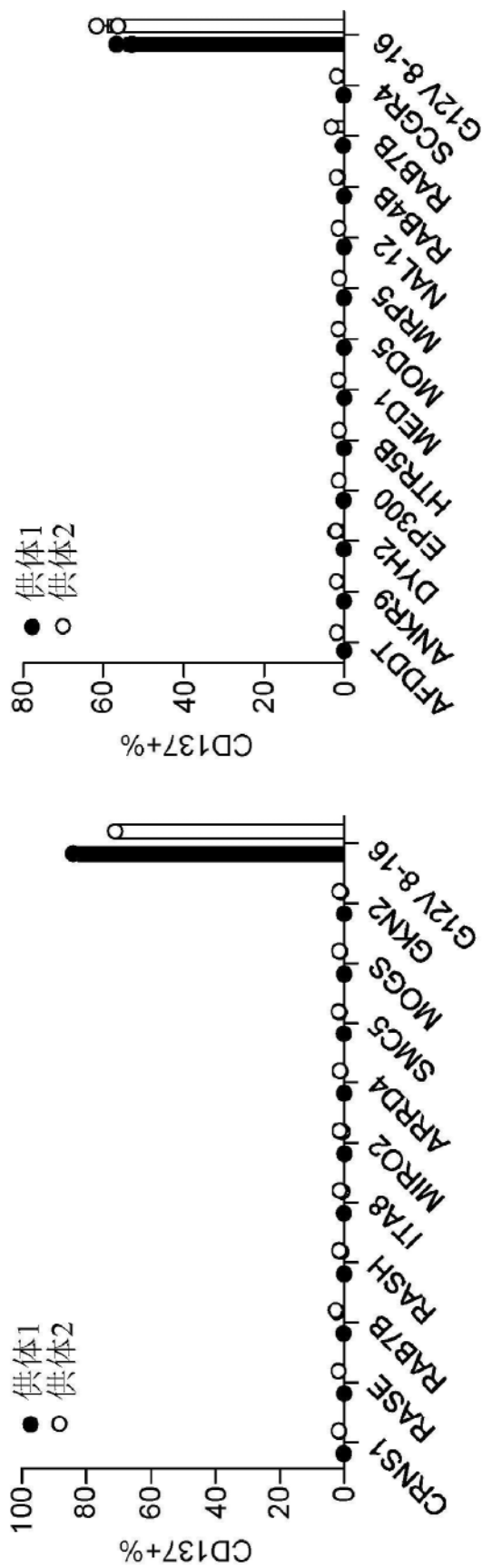


图6G

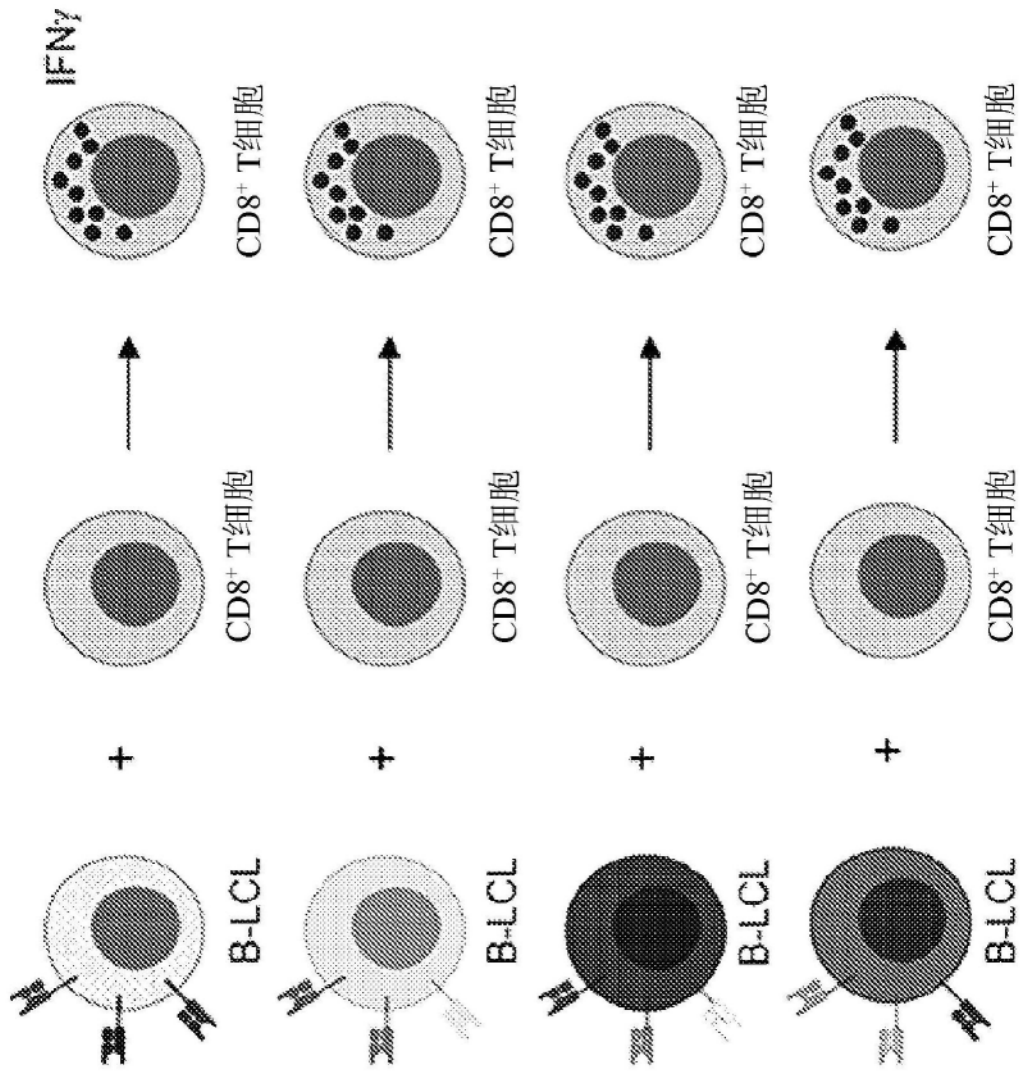


图7A

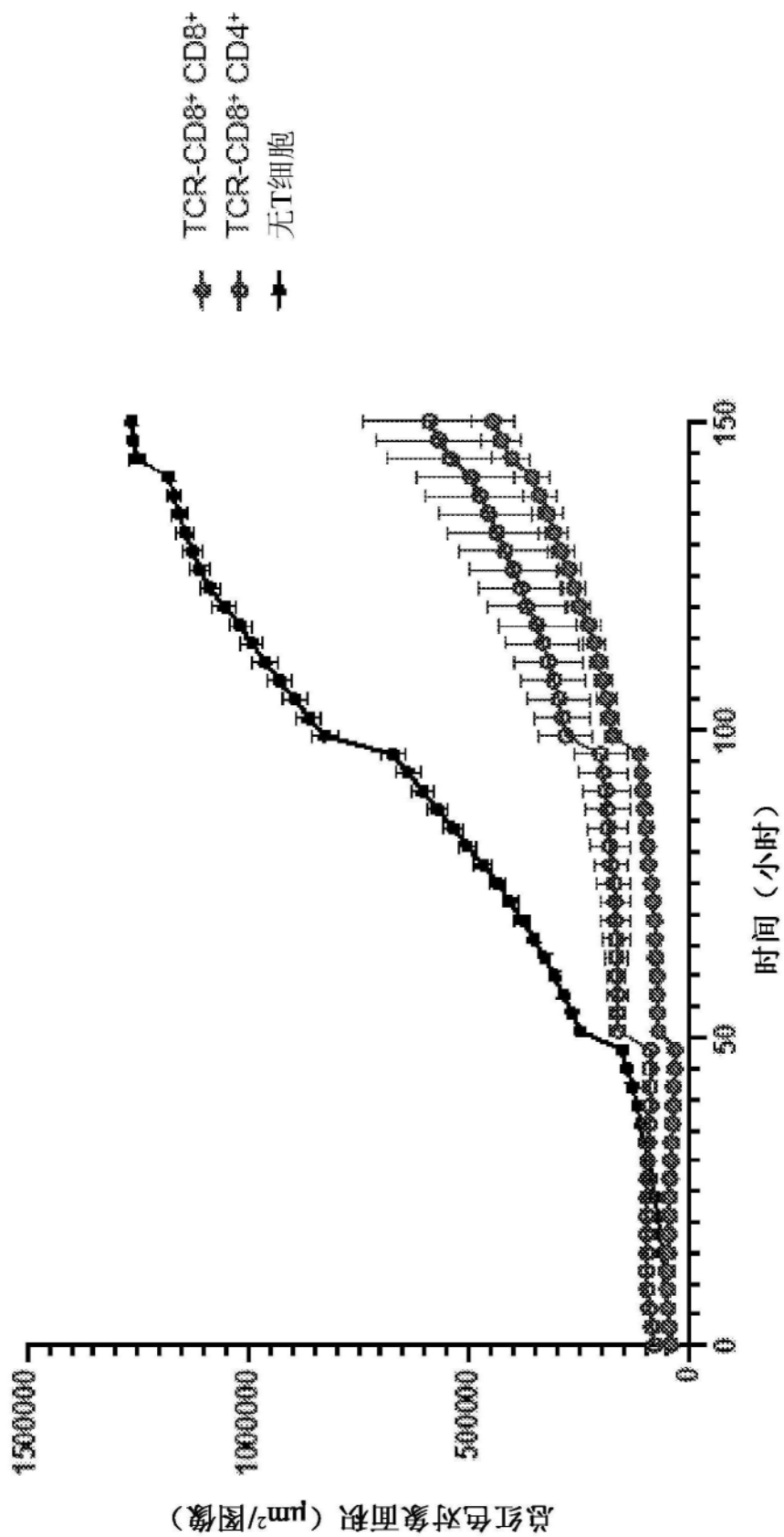


图8

11N4A TCRβ-P2A-α密码子优化A (SEQ ID NO.: 7)

ATGGGCTCTAGACTGTTGTGTTGGGTTCTGCTGTGCTGGAGCTGGACCTGTGAAAGCTGGAGTT
ATCCAGACACCCAGATATCTGATCAAGACCAAGGACAGCAGGTGACACTGAGCTGTAGCCCTAT ICT
GGGCCACAGGAGCGTTAGCTGGTATCAGCAACACCCGGCAGGGACTACAAATTTCTATTCGAGTACTTC
AGCGAGAGCCAGCGGAATAAGGGCAATTTCTGGCAGATTIAGCGCAGGCAGTTIAGCAACAGCAG
AAAGCGAGATGAACGTGAGCACCTTGGAATTAGGCGATTTCTGCTGTACCTTG IGIGCCCTTCTGTG
AAACAGTGGAGCAGTACTTTTGGCCCCGGCAGCAGACTGACAGTGACAGAGGACCTTGAAGAACGTGTTC
CCCCAGAGGTGGCCGTTCGAGCCTAGCGAGGCCGAGATCAGCCACCCAGAAAGCCACCTCGTG
TGCTTGGCCACCGCTTTACCCGACCAGTGGAACTGTCTTGGTCAACGGCAAGAGGTGCAC
AGCGGCGTCTGCACCGACCCACGCTTGAAAGAGCAGCCGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGCTG
AGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACTTCTGGCAGAAACCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAG
TTCTACGGCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGGGCCAAGCCGTGACCCAGATCGTGTC
TGCTGAGGCTGGGGCAGAGCCGATTGGGCTTTCACAGCGAGAGCTACCAAGCGGCGTGTGAGCG
CCACCATCTGTACGAGATCTGTGTGGCAAGGCCACCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTGGTGCT
GATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGCGGTTCCGGAGCCACGAACTTCTCTCTGTAAAGC
AAAGCAGGAGAGCTGGAGAAACCCCGTCCATGTTACTAGGAGCGAGCGTGTGATTCG
TGGTTACAGCCTGATTGGTGAACCTCTCAGCAGAAAGAACGACGATCAGCAGGTGAAGCAGAAATGCC
CTCTCTGCTGTGCAGGAGGGCAGAACTCTATCTGAAATTCGACTACACC AACAGCATGTTCCGACTAT
TTTTCTGTGTACAAAAATACCCGCCGAGGGCCCTACATTCCTGATCAGCACTCAGCTATCAAGGACA
AGAACCGAGGATGGCAGATTACCGTGTCTGAAACAAGAGCGCCAAGCACCTGAGCCTGCACATTGTGC
CTTCTCAACCTTGGCGATTCTGCTGTACTT IGTGTGCTCTGGAGTGAGCGGCAATACACCTCTAGT
GTTCGGGAAGGGCACAAAGACTGTCTGTTATTCGAAACATTCAAAACCCGACCTGTGTGTACCACT
GGCGGACAGCAAGAGCAGCGACAAAGAGCGTGTGCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGT
CCAGAGCAAGGACAGCAGCTGTACATCACCGATAAAGTGGTGTGGACATGGGAGCATGGACTTC
AAGAGCAACAGCGCGTGGCTGGTCCAAACAGAGCGACTTCGCTGCGCCAAACGCTTCAACAACAGC
ATTATCCCGAGGACACATTCTCCAAAGCCCGAGAGCAGCTGGGACGTGAAGCTGGTGGAAAGAG
CTTCGAGACAGACACCAACCTGAACCTTCAGAACTCAGCGTGAATCGGCTTCGGATCCTGCTGCTGAA
GGTGGCCGCTTCAACCTGCTGATGACCTTGGCGCTGTGTTCAGCTGA

图例:

CDR1 (α 和 β)CDR2 (α 和 β)CDR3 (α 和 β)

GSG接头/P2A

信号肽

图9B

CD8 α -T2A-CD8 β -P2A-11N4A TCR β -P2A- α 密码子优化A (SEQ ID NO.: 9)

ATGGCTCTGCCTGTGACAGCTCTGCTGCTGCTCTGGCTCTGCTTCTGCATGCCGCTAGACCCAGCCAGT
TCAGAGTGTCCCTCTGGACAGAACCTGGAACCTGGGCGAGACAGTGGAACTGAAGTGCCAGGTGCTG
CTGAGCAATCCTACCAGCGGCTGCACTGGCTGTTTCAGCCTAGAGGTGCTGCCGCCTCTCTACCTTTC
TGCTGTACCTGAGCCAGAACAAGCCCAAGGCCGCGGAAGGACTGGACACCCAGAGATTGAGCGGCAAG
AGACTGGGCGACACCTTCGTGCTGACCTGAGCGACTTCAGAAGAGAGAACGAGGGCTACTACTTCTGC
AGCGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCCTGTTTCTGCCCGCCAAGCCTACAA
CAACCCCTGCTCCTAGACCTCCTACACAGCTCCTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCAGA
AGCTTGTAGACCTGCTGCTGGCGGAGCCGTGCATACAAGAGGACTGGATTTCGCCTGCGACATCTACAT
CTGGGCCCCCTCTGGCTGGAACATGTGGCGTGCTGCTGCTGCTCCCTGGTCATCACCTGTACTGCAACCAC
CGGAACAGGCGGAGAGTGTGCAAGTGCCCTAGACCTGTGGTCAAGAGCGGCGACAAGCCTAGCCTGA
GCGCCAGATATGTT GGCAGCGGAGAAGGCAGAGGCTCCCTGCTTACATGCGGCGACGTGGAAGAGAA
CCCCGGACCTATGAGGCCCTAGACTGTGGCTGCTTCTGGCTGCCAGCTGACAGTGTGACGGCAATTC
TGTCTGCAGCAGACCCCTGCCCTACATCAAGGTGCAGACCAACAAGATGGTCATGCTGAGCTGCGAGGC
CAAGATCAGCCTGTCCAACATGCGGATCTACTGGCTGCGGCAGAGACAGGCCCTAGCTCTGATAGCCA
CCACGAGTTTCTGGCCCTGTGGGATTCTGCCAAGGGCACCATTACCGGCGAGGAAGTGGAACAAGAGA
AGATCGCCGTGTTCCGGGACGCCAGCAGATTATCCTGAACCTGACCAGCGTGAAGCCCCGAGGACAGC
GGCATCTATTCTGCATGATCGTGGGCGAGCCCCGAGCTGACATTTGGCAAGGGAACACAGCTGAGCGTG
GTGGACTTCCTGCCTACTACAGCCAGCCTACCAAGAAGTCTACCCTGAAGAAACGCGTGTGCAGACTG
CCCAGGCCCTGAGACACAAAAGGGCCCTCTGTGCAGCCCTATCACACTGGGATTGCTGGTGGCTGGCGTT
CTGGTCTGCTGGTGTCTCTGGGAGTTGCCATCCACCTGTGCTGTAGAAGAAGGCGGGCCAGACTGCCG
TTCATGAAGCAGTTCTACAAA GGCAGCGGCGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAACAAGCCGGCGACGTC
GAGGAAAATCCTGGACCT ATGGGCTCTAGACTGTTGTGTTGGGTTCTGCTGTGTCTGCTGGAGCTGGA
CCTGTGAAAGCTGGAGTTACCCAGACACCCAGATATCTGATCAAGACCAGAGGACAGCAGGTGACACT
GAGCTGTAGCCCTATT TCTGGCCACAGGAGCGTTAGCTGGTATCAGCAAACACCCGGGCGAGGACTACA
ATTTCTATTGAG TACTTCAGCGAGACCCAGCGGAATAAGGGCAATTTCTTGGCAGATTTAGCGGCAG
GCAGTTCAGCAACAGCAGAAAGCGAGATGAACGTGAGCACCTGGGAATTAGGCGATTCTGCTCTGTACCT
GTGTGCCTCTTCTGTGGGAACAGTGGAGCAGTACTTTGGCCCCGGCACGAGACTGACAGTGACAGAGG
ACCTGAAGAACGTGTTCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTGAGCCTAGCGAGGCCGAGATCAGCCACACCC
AGAAAGCCACCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTACCCCGACCACGTGGAAGTGTCTTGGTGGGTCA
ACGGCAAAGAGGTTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCCTGAAAGAGCAGCCCGCCCTGAAC

图例:

CDR1 (α 和 β)CDR2 (α 和 β)CDR3 (α 和 β)GSG接头/P2AGSG接头/T2A信号肽

图9D

CD8 α -T2A-CD8 β -P2A-11N4A TCR β -P2A- α 密码子优化A

(SEQ ID NO.: 9, 续)

GACAGCCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCGCCACCTTCTGGCAGAAACCCCGGAACCACT
 TTCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGGGCCCAAGCC
 CGTGACCCAGATCGTGTCTGCTGAGGCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACC
 AGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACCATCCTGTACGAGATCCTGTGGGCAAGGCCACCTGTACGCCGTGC
 TGGTGTCCGCCCTGGTGTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGCGGTTCGGGAGCCACG
AACTTCTCTCTGTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGTCCCATGGCCATGTTACTAGGA
GCGAGCGTGCTGATTCTGTGGTTACAGCCTGATTGGGTGAACTCTCAGCAGAAGAACGACGATCAGCA
 GGTGAAGCAGAATAGCCCCCTCTGTCTGTGTCAGGAGGGCAGAATCTCTATCCTGAATTGCGACTACAC
 CAACAGCATGTTCGACTATTTTCTGTGGTACAAAAAATAACCCCGCCGAGGGCCCTACATTCTGTATCAGC
ATCAGCTCTATCAAGGACAAGAAACGAGGATGGCAGATTTACCGTGTTCTGAACAAGAGCGCCAAGCAC
 CTGAGCCTGCACATTGTGCTTCTCAACCTGGCGATTCTGCTGTGTACTTTTGTGCTGCCTCTGGAGTGA
GCGGCAATACACCTCTAGTGTTCGGGAAGGGCACAAGACTGTCTGTTATTGCAAACATTCAAAACCCCG
 ACCCTGCTGTGTACCACTGCGGGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCTGTTTACCAGACTTCG
 ACAGCCAGACCAACGTGTCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGATAAGTGCGTGTCTGGAC
 ATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGCCTGCGC
 CAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGCAGCTGCGACGT
 GAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTCAGCGTGATCGGCTT
 CCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

图例:

CDR1 (α 和 β)CDR2 (α 和 β)CDR3 (α 和 β)GSG接头/P2A信号肽

图9E

CD8 α -T2A-CD8 β -P2A-11N4A TCR β -P2A- α 密码子优化B (SEQ ID NO.: 10)

ATGGCATTGCCTGTTACAGCTCTGCTGCTGCCCTGGCTCTGCTTCTGCATGCTGCTAGACCCAGCCAGTT
 CAGAGTGTCCCTCTGGACAGAACCTGGAACCTGGGCGAGACAGTGGAAGTGAAGTGCCAGGTGCTGC
 TGAGCAATCCTACCAGCGGCTGCAGCTGGCTGTTTCAGCCTAGAGGTGCTGCCGCTCTCCTACCTTTCT
 GCTGTACCTGAGCCAGAACAAGCCCAAGGCCGCCGAAGGACTGGACACCCAGAGATTGAGCGGCAAGA
 GACTGGGCGACACCTTCGTGCTGACCCTGAGCGACTTCAGAAGAGAGAACGAGGGCTACTACTTCTGCA
 GCGCCCTGAGCAACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCCGTGTTCCTGCCCGCCAAGCCTACAAC
 AACCCCTGCTCCTAGACCTCCTACACCAAGCTCCTACAATC6CCAGCCAGCCTCTGTCTCTGAGGCCAGAA
 GCTTGTAGACCTGCTGCTGGCGGAGCCGTGCATACAAGAGGACTGGATTTCGCTGCGACATCTACATC
 TGGGCCCTCTGGCTGGAACATGTGGCGTGTGCTGCTGTCTGCTGTCATCACCTGTACTGCAACCACC
 GGAACAGGCGGAGAGTGTGCAAGTGCCCTAGACCTGTGGTCAAGAGCGGCGACAAGCCTAGCCTGAG
 CGCCAGATATGTTGGCAGCGGAGAAAGGCAGAGGCAGCCTGCTTACATGCGGCGACGTGGAAGAGAAC
CCCGGACCTATGAGGCCTAGACTGTGGCTGCTTCTGGCTGCCAGCTGACAGTGCTGCACGGCAATTCT
 GTCCTGCAGCAGACCCCTGCCTACATCAAGGTGCAGACCAACAAGATGGTCATGCTGAGCTGCGAGGCC
 AAGATCAGCCTGTCCAACATGCGGATCTACTGGCTGCGGCGAGACAGGCCCTAGCAGCGATTCTCAC
 CACGAGTTTCTGGCCCTGTGGGATAGCGCCAAGGGAACCATTCACGGCGAGGAAGTGGAAACAAGAGAA
 GATCGCCGTGTTCCGGGACGCCAGCAGATTCATCCTGAACCTGACCAGCGTGAAGCCCCGAGGACAGCG
 GCATCTATTTCTGCATGATCGTGGGCGAGCCCCGAGCTGACATTTGGCAAGGGAACACAGCTGAGCGTGG
 TGGACTTCCTGCCTACTACAGCCCAGCCTACCAAGAAGTCTACCCTGAAGAAACGCGTGTGCAGACTGC
 CCAGGCCTGAGACACAAAAGGGCCCTCTGTGCAGCCCTATCACACTGGGATTGCTGGTGGCTGGCGTTC
 TGGTCTGCTGGTTTCTCTGGGAGTTGCCATCCACCTGTGCTGCAGACGCAGAAGGGCCAGACTGCGGT
 TCATGAAGCAGTTCTACAAAGGCAGCGGCGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAACAAGCCGGCGACGTCG
AAGAAAATCCTGGACCAATGGGCGAGCAGACTGCTGTGCTGGGTCTGCTGTGCTGCTTGGAGCCGGAC
CTGTGAAAGCTGGCGTGACCCAGACACCTAGATACCTGATCAAGACCAGAGGCCAGCAAGTGACACTG
 AGCTGTAGCCCCATCAGCGGCCACAGAAGCGTGTCTGGTATCAGCAGACTCCTGGACAGGGCCTGCA

Key:CDR1 (α 和 β)CDR2 (α 和 β)CDR3 (α 和 β)GSG接头/P2AGSG接头/T2A信号肽

图9F

CD8 α -T2A-CD8 β -P2A-11N4A TCR β -P2A- α 密码子优化B

(SEQ ID NO.: 10, 续)

GTTCCTGTTGAG TACTTCTCCGAGACACAG AGGAACAAGGGCAACTTCCCCGGCAGATTCTCCGGCAG
 ACAGTTCAGCAACTCCCCGAGCGAGATGAACGTGTCCACACTGGAAGTGGGAGATAGCGCCCTGTACCT
 G TGTGCCTCTTCTGTGGGAACCGTGGAAACAGTACTTC GGCCCTGGCACAAGACTGACCGTGACCGAGGA
 CCTGAAGAACGTGTTCCACCTGAGGTGGCCGTGTTGAGCCCTTCTGAGGCCGAGATCTCTCACACCCA
 GAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCCACCGGCTTCTATCCCGATCACGTGGAAGTGTCTTGGTGGGTCAAC
 GGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGTACCGATCCTCAGCCACTGAAAGAGCAGCCCCGCTCTGAACGA
 CAGCAGATACTGCCTGTCTCCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCAGAAACCACTTC
 AGGTGTGAGGTGCAGTTTTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGATAGAGCCAAGCCTGT
 GACACAGATCGTGTCTGCCGAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGCGAGAGCTACCAGC
 AGGGCGTTCTGTCTGCCACCATCCTGTACGAGATCCTGTCTGGGCAAAGCCACTCTGTACGCCGTGTTGGT
 GTCTGCCCTGGTGTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGATTCTAGAGGC GGATCCGGAGCCACAAATT
TCTCACTGCTGAAGCAGGCCGGGGATGTTGAGGAAAACCCAGGACCTATGGCTATGCTGCTGGGAGCC
TCTGTGCTGATCCTGTGGCTGCAACCCGATTGGGTCAACAGCCAGCAGAAGAACGACGACCAGCAAGTC
 AAGCAGAACAGCCCCAGCCTGAGCGTGCAAGAGGGCAGAATCAGCATCCTGAACTGCGACTACACC AA
CTCTATGTTGACTACTTTTCTGTGGTACAAGAAGTACCCCGCCGAGGGACCCACCTTCTGATCAGC ATC
AGCAGCATCAAGGACAAGAACGAGGACGGCCGGTTCACCGTGTCTGAACAAGAGCGCCAAGCACCT
 GAGCCTGCACATCGTGCTTCTCAGCCTGGCGATAGCGCCGTGTACTTT TGTGCTGCCAGCGGCGTGTCA
GGCAACACCCCTCTGGTTTTTGGCAAAGGGCACACGCTGTCCGTGATCGCCAACATTCAGAACCCCTGATC
 CTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACAGCAAGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTACCCGACTTCGAC
 AGCCAGACCAACGTGTCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACAT
 GCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGTCCGATTTCGCTGCGCCAA
 CGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTCCCAAGTCTGAGTCCAGCTGCGACGTGAAG
 CTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTCCAGAATCTGAGCGTGATCGGCTTCAGA
 ATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGATTCAACCTGCTGATGACCTCAGACTGTGGTCCAGCTGA

图例：

CDR1 (α 和 β)CDR2 (α 和 β)CDR3 (α 和 β)GSG接头/P2A信号肽

图9G

11N4A TCR α -原始蛋白 (SEQ ID NO.: 11)
MAMILGASVLILWLQPDWVNS QQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEG
PTFLISISIKDKNEDGRTVFLNKSAKHLSHIVPSQPGDSAVYF CAASGVSGNTPLVFGKGTRLSVIANIQNP
DPAVYQLRDSKSDKSVCLFTDFDSQTNVSQKDSDVITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANA
FNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS*

11N4A TCR β -原始蛋白 (SEQ ID NO.: 12)
MGSRLLCWVLLCLLGAGPVKA GVTQIPRYLIKTRGQQVTLSCSPISGHRSVSWYQQTPGQGLFEYFSET
QRNKGNFPGRFSGRQFSNSRSEMNVSTLELGDSALYLCASSVGTVEQYF GPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVF
EPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSRLRVSATF
WQNPRNHRCQQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGTSESYQQGVLSATILEILLGKAT
LYAVLSALVLMAMVKRKDSRG*

图例:

CDR1 (α 和 β)
 CDR2 (α 和 β)
 CDR3 (α 和 β)
 信号肽

图9H

11N4A TCRβ-P2A-α-蛋白 (SEQ ID NO.: 31)
MGSRLLCWVLLCLLGAGPVKA¹GVTQTIPRYLIKTRGQQVTLSCSPISGHRSVSWYQQTPGQGLQFLFEYFSET
QRNKGNFPGRFSGRQFSNSRSEMNVSTLELGDSALYLCASSVGTVEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVF
EPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPD²HVELSWVWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATF
WQNPRNHFRCCVQFYGLSENDEWTQDRAKPV³TQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKAT
LYAVLVSALVLMAMVKKRDSRGGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKN
DDQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISISSIKDKNEDGRFTVFLNKS⁴AKHL
SLHIVPSQPGDSAVYFCAASGVSGNTPLVFGKGTRLSVIANIQNPDP⁵AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN
VSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFET
DTNLFQNL⁶SVIGFRILLK⁷VAGFNLLMTLRLWSS*

图例:
CDR1 (α和β)
CDR2 (α和β)
CDR3 (α和β)
GSG接头/P2A
信号肽
半胱氨酸修饰的C

图9I

CD8 α -T2A-CD8 β -P2A-11N4A TCR β -P2A- α -蛋白 (SEQ ID NO.: 32)

MALPVTALLPLALLHAARPSQFRVSPLDRTWNIGETVELKCQVELSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLS
QNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTSDFRRENEGYFCSALSNSIMYFSHFVPLPAKPTTTPAPRPTP
APTIASQPLSRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIVWAPLAGTCGVLLSIVITLCNHRRRRVCKCPRPV
KSGDKPSLSARYVGSGEGRGSLITCGDVEENPGMRPRLWLLAAQLTVLHGNSVLQQTPAIKVQTNKMV
MLSCEAKISLSNMRIYWLRORQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTHGEEVEQEKIAVFRDASRFILNLSVKPEDS
GIVFCMIVGSPELTFGKTQLSVDFLPTTAQPTKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITLGLLVAGVLLYSL
GVAIHLCRRRRARLRFMIKQFYKGSGATNFSLLKQAGDVEENPGMGSRLLCWVLLCLLGAGPVKAGVTQF
PRYLIKTRGQQVTLSCSPISGHRSVWYQQTPGQGLQFLFEYFSETQRNKGNFPGRFSGRQFSNSRSEMNVS
TLELGDSALYLCASSVGTVEQYFGPGTRLTVTEDLKNVPPEVAVFPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVEL
SWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD
RAKPVTQIVSAEAWGRADCGTSESYQQVLSATILEILLGKATLYAVISAIVMAMVKRKDSRGGSGAT
NFSLLKQAGDVEENPGMAMLLGASVLILWLQPDWVNSQKNDDQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTN
SMFDYFLWYKKPAEGPTLISISIKDKNEDGRFTVLNKSAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAASGVSGNTPLV
FGKGTRLSVIANIQNPDPAVYQLRDSKSDKSVCLTDFDSQTNVSQSKDSDVITDKCVLDMRSMDFKSNS
AVAWSNKSDFACANAFNSIIPEDTTFPSPESSCDVKIVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLKVAGFNLMTL
REWSS*

图例:

CDR1 (α 和 β)CDR2 (α 和 β)CDR3 (α 和 β)

GSG接头/P2A

GSG接头/T2A

信号肽

半胱氨酸修饰的C

图9J

11N6 TCR β -P2A- α 密码子优化 (SEQ ID NO.: 35)

ATGGGCACAAGACTTCTCTGTGGGCTGCACTGTGCTGTGGAGCTGAGCTGACAGAAAGCTGGAGTT
 GCCAAATCTCTAGGTACAAGATCATCGAAGCGGCGAGTCTGTGGCCTTTGGTGCAATCCCAATTAGC
GGACATGCCACCCTGTACTGGTATCAGCAAAATCTGGACAGGGCCCTAAACTGCTGATCCAGTTCCAG
AATAACGGCGTGGTGGACGATTCTCAACTGCCCTAAGGACCGGTTTCTGCCGAGAGACTGAAGGGCGTT
 GATAGCACCTGAAGATCCAACTGCCAAACTGGAGGATTCTGCCGTGTACTG TGTGCTAGCAGCCCTT
ATGGAGGATCTGTCTTATGAGCAGTACTTCGGACCTGGCACCAGACTGACCGTGACTGAAGACCTGA
AGAACGTGTTCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCCAGCCTAGCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAA
 GCCACCTGCTGTGCTGGCCACCGGCTTTACCCCGACCACGTGGAACTGTCTTGGTGGTCAACGGC
 AAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCGAGCCCTGAAGAGCAGCCCGCCCTGAACGACAG
 CCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAAACCCCGGAACCACTTCAG
 ATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCTGAGCGAGAAACGACGAGTGGACCCAGGACCGGGCCAAAGCCCGTGA
 CCCAGATCGTGTCTGTGAGGCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTACCAGCGAGAGCTACCAAGCAG
 GGCGTGTGAGCGCCACCATCTGTACGAGATCTGTGTGGCAAGGCCACCTGTACGCCGTGTGGTG
 TCCGCCCTGGTGTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGC GGTTCCGGAGCCACGAACTT
CTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAGAAACCCGGTCCC ATGGAGACACTGCTTGGCGTATC
ACTGGTGATTCTGTGGCTGCAACTGGCTAGAGTGAACTCTCAGCAGGGAGAGGATCCTCAAGCTCT
 GAGCATTCAGGAAGGCGAAACGCAACCATGAATTGCTCATACAAGACCAGCATCAACAACCTGCAGTG
 GTACCGGCAGAAATAGCGGAAGAGGACTGGTTCACCTGATTTTAATCAGGTCIAATGAAAGGGAGAAAGC
 ACAGCGGCAGACTGAGAGTTACCTGGACACATCCAAGAAATCTTCTCTGCTGATTACAGCCTCTAG
 AGCCGCCGATACAGCCAGCTACTTTTGTGCCACAGATCCCATGAACCAATGCCGGAAAGAGCACATT
CGCGGATGGCACAACCCTGACAGTTAAGCCCAATATCCAGAAATCCGATCCTGCCGTGTACCAGCTGCG
 GGACAGCAAGAGCAGCAGAGCGTGTGCTGTGTCCAGACTTCGACAGCCAGACCAACGTTGCC
 AGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGATAAGTGGTGTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAG
 AGCAACAGCGCCGTGGCTGGTCCAAAGAGCGACTTCGCTGGCCCAACGCCCTCAACAACAGCATT
 ATCCCGAGGGACACATCTTCCCAAGCCCGAGAGCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAGAGCTTC
 GAGACAGACACCAACCTGAACCTCCAGAACTCAGCGTGATCGGCTTCCGGATCCTGCTGCTGAAGGTG
 GCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCTGCGGGCTGTGGTCCAGCTGA

图例:

CDR1 (α 和 β)
 CDR2 (α 和 β)
 CDR3 (α 和 β)

 GSG接头/P2A

 信号肽

图10B

CD8 α -T2A-CD8 β -P2A-11N6 TCR β -P2A- α 密码子优化 (SEQ ID NO.: 36, 续)

CCCAGGCGCTGAGACACAAAGGGCCCTCTGTGACGCCCTATCACACTGGGATTCCTGGTGGCTGGCGTT
 CTGGTCTCTGCTGCTCTGTGGAGTTGGCCATCCACCTGTGCTGTAGAAAGGGCGGCCAGACTGCGG
 TTCAATGAAGCAGTTCTACAAAGGCAGGGGCCACCACTTCAGCCTGCTGAAACAAGCCGGCGACGTC
 GAGGAAAI~~CC~~TGGACCTATGGGCACAAGACTTCTCIGITGGGCTGCACTGIGCTTGGCTTGGAGCTGAG
 CTGACAGAA~~AG~~CTGGAGTTGCCCAATCTCTAGGTACAGATCATCGAAGCGGCAGTCTGTGGCCTTT
 TGGTGCAATCCCATAGCGGACATGCCACCTGTACTGGTATCAGCAAAATTCTGGGACAGGGCCCTAAA
 CTGCTGATCCAGTCCAGATTAACGGCGTGGTGGACGATTCTCACTGCTAAGGACCGGTTTCTGCGG
 AGAGACTGAAAGGCGTTGATAGCACTGAGATCCAACTGCAACTGGAGGATTCGCGGTGTACC
 TGTGTGCTAGCAGCCCTTATGGAGGATCTGTCTTATGAGCAGTACTTCGGACCTGGCAACGAGACTGA
 CCGTGACTGAAGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTGAGCCCTAGCGAGGCCGAG
 ATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCTCGTGTGCTGGCCACCGCTTTTACCCCGAACACGTGGAACTGT
 CTTGGTGGGTCAACGGCAAGAGGTGCACAGCGGGCTGTGCACCGACCCCGAGCCCTGAAAGAGCAG
 CCGGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAAC
 CCGCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCACTTCTACGGCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGA
 CCGGGCCAAAGCCCGTGACCCAGATCGTGTCTGTGAGGCTGGGSCAGAGCCGATTGGGCTTCACCA
 GCGAGAGCTACCAGAGGGCGTGTGAGCGGCCACCATCTGTACGAGATCCTGTGGGCAAGGCCACC

图例:

CDR1 (α 和 β)
 CDR2 (α 和 β)
 CDR3 (α 和 β)
 GSG接头/P2A
 信号肽

图10D

11N6 TCR α -原始蛋白 (SEQ ID NO.: 37)

METLLGVSLVILWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEGENATMNCSYKTSINNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSN
EREKHSGRLRVTLDTSKSSLITASRAADTASYFCATDPMNTNAGKSTFGDGTTLVKPNIQNPDPAVYQL
RDSKSDKSVCLFTDFSQTNVSQSKDSDVITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIPE
DTFFSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS*

11N6 TCR β -原始蛋白 (SEQ ID NO.: 47)

MGTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQILGQGPKLLIQFQNNG
VWDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVILCASSPYGGSVSYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEV
AVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFPDHVELSWWNGKEVHSGVSTDPQPIKEQPALNDSRYCLSSRLRVS
ATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGTSESYQQGVLSATILYEILLG
KATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG*

图例:

CDR1 (α 和 β)
 CDR2 (α 和 β)
 CDR3 (α 和 β)

 信号肽

图10F

11N6 TCR β -P2A- α -蛋白 (SEQ ID NO.: 57)

MGTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILQQGPKLIIQFQNNNG
VVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSPYGGSVSEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEV
AVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVS
ATFWQNPRNHERCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSEYQQGVLSATILYEILLG
KATLYAVLSALVLMANVKRKDSRGGGATNFSLLKQAGDVEENPGPMETLLGVSLVILWLQLARVNSQQ
EEDPQALSIQEGENATMNCSYKTSINNLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRLRVTLDTSKSSLLITA
SRAADTASYFCATDPMNTNAGKSTFGDGTILTVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSDKSVCLFTDFDSQINVSQS
KDSDVYITDKQVIDMRSMDEKSNSAVAWSNKSDEACANAFNNSIPEDIFFPSESSCDVKLVEKSFEIDINL
NFQNLSVIGFRILLKVAGFNLLMTLRLWSS*

图例:

CDR1 (α 和 β)CDR2 (α 和 β)CDR3 (α 和 β)

GSG接头/P2A

信号肽

半胱氨酸修饰的C

图10G

CD8 α -T2A-CD8 β -P2A-11N6 TCR β -P2A- α -蛋白 (SEQ ID NO.: 58)

MALPVTAILLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNIGETVEIKQVILSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLEYLS
QNKPKAAEGLDTQRESGRELDTFVELSDRRENEGYFCSALSNSIMYFSHFVPELPAKPTTTPARPPTP
APTIASQPLSRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIVIWAPLAGTCGVLLSLVITLCNHRRRRVCKCPRPV
KSGDKPSLSARYVGSGEGRGSLITCGDVEENPGPMRPRLWLLAAQLTVLHGNSVLQTPAYIKVQTNKMV
MLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTHGEEVEQEKIAVFRDASRFILNLTSVKPEDS
GIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVDELPTTAQTKKRVCRIPRPETQKGPLCSPITLGLLVAGVLVLSL
GVAJHECCRRRRARLRFMIKQFYKGSGATNFSLLKQAGDVEENPGPMGTRLLCWAALLGAELTEAGVAQS
PRYKIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQILGQGPKLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQ
PAKLEDSAVYLCASSPYGGSVSYEQYFGPGTRLTVEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYP
DHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRVCLSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVFYGLSENDE
WTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSEYQQGVLSATILEILLGKATLYAVLSALVMAMVKRKDSRGG
SGATNFSLLKQAGDVEENPGPMETLLGVSLVLWLQLARVNSQQGEEDPQALSIQEGENATMNCSYKTSIN
NLQWYRQNSGRGLVHLILIRSNEREKHSGRLRVTLDTSKSSLLITASRAADIASYFCATDPMNTNAGKSTF
GDGTTLTVKPNIQNPDPAVVQLRDSKSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVITDKCVILDMRSMDEFKSNSA
VAWSNKSDFACANAFNNSIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFEIDTNLNFQNLSVIGFRILLKVAGENLMTLR
 LWSS*

图例:

CDR1 (α 和 β)
 CDR2 (α 和 β)
 CDR3 (α 和 β)
 GSG接头/P2A
 GSG接头/T2A
 信号肽
 半胱氨酸修饰的C

图10H

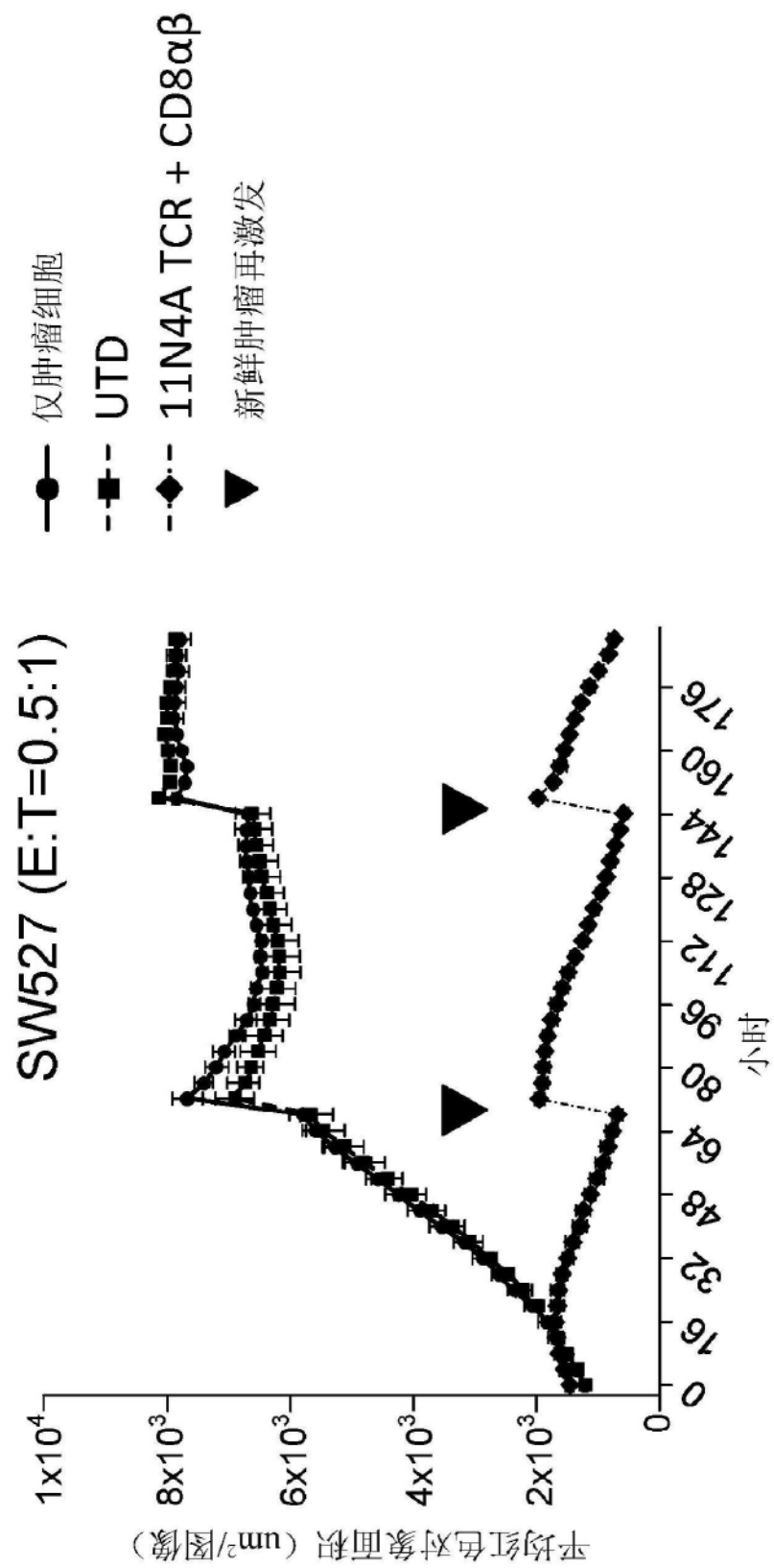


图11A

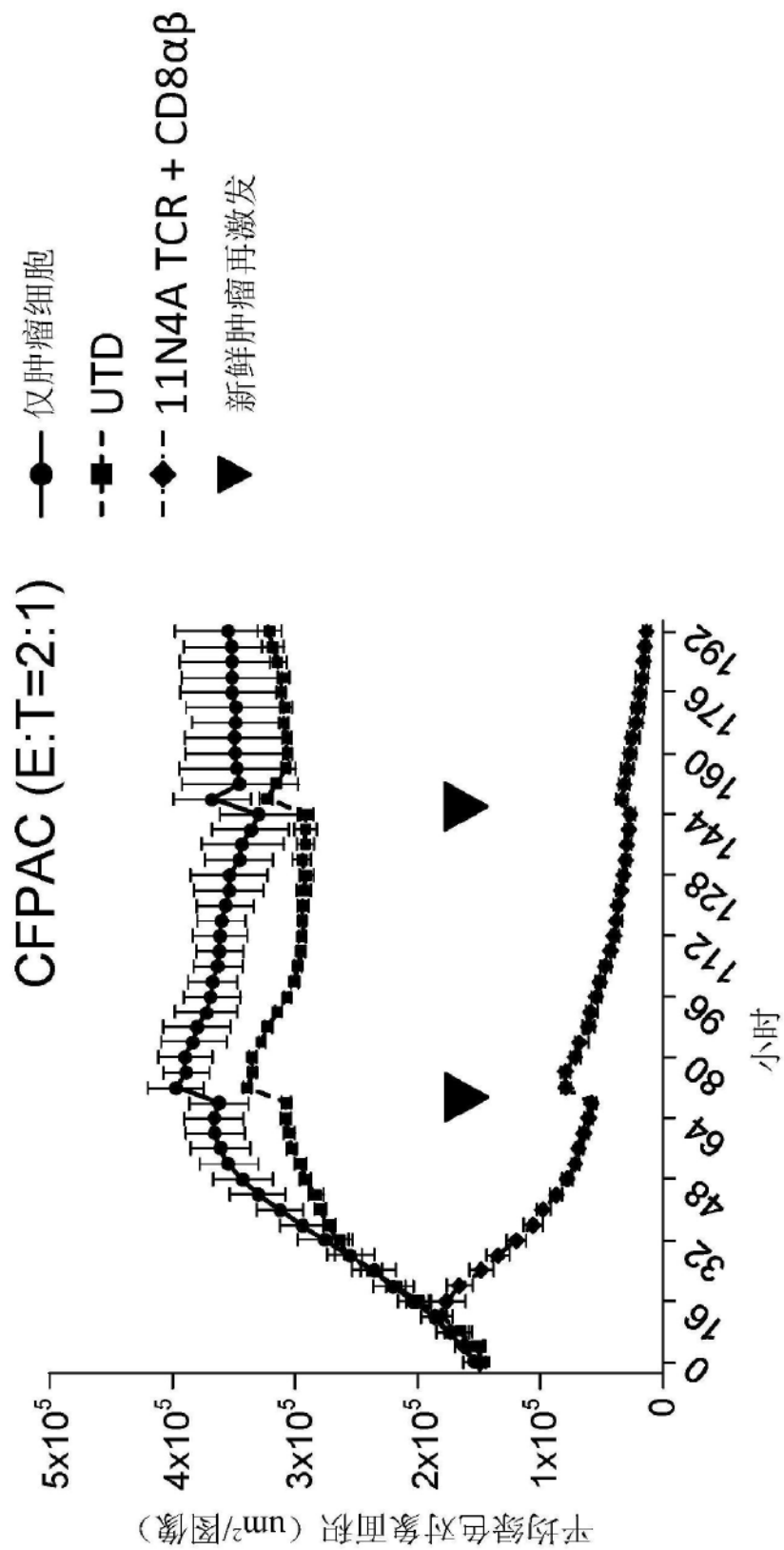


图11B

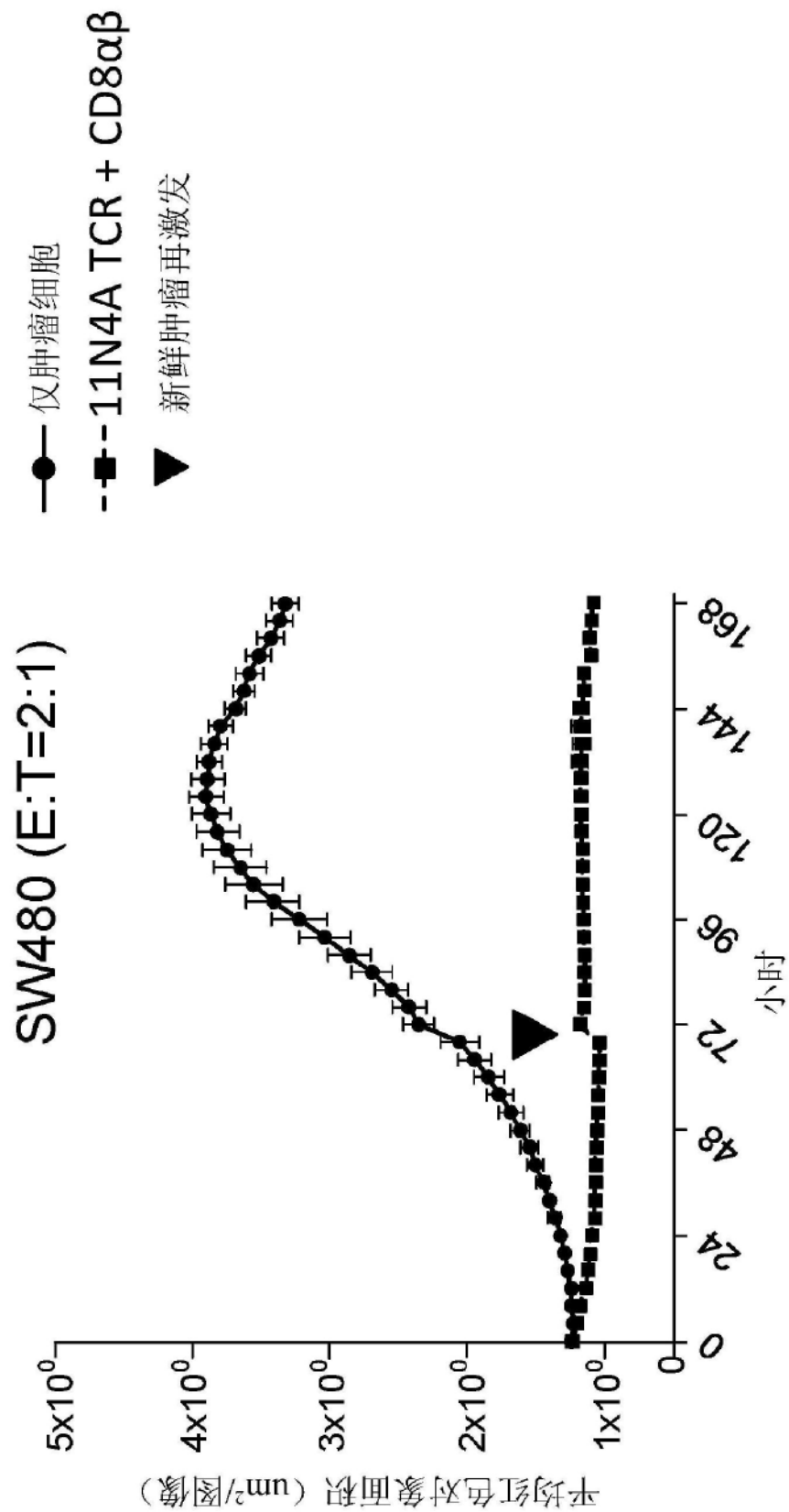


图11C

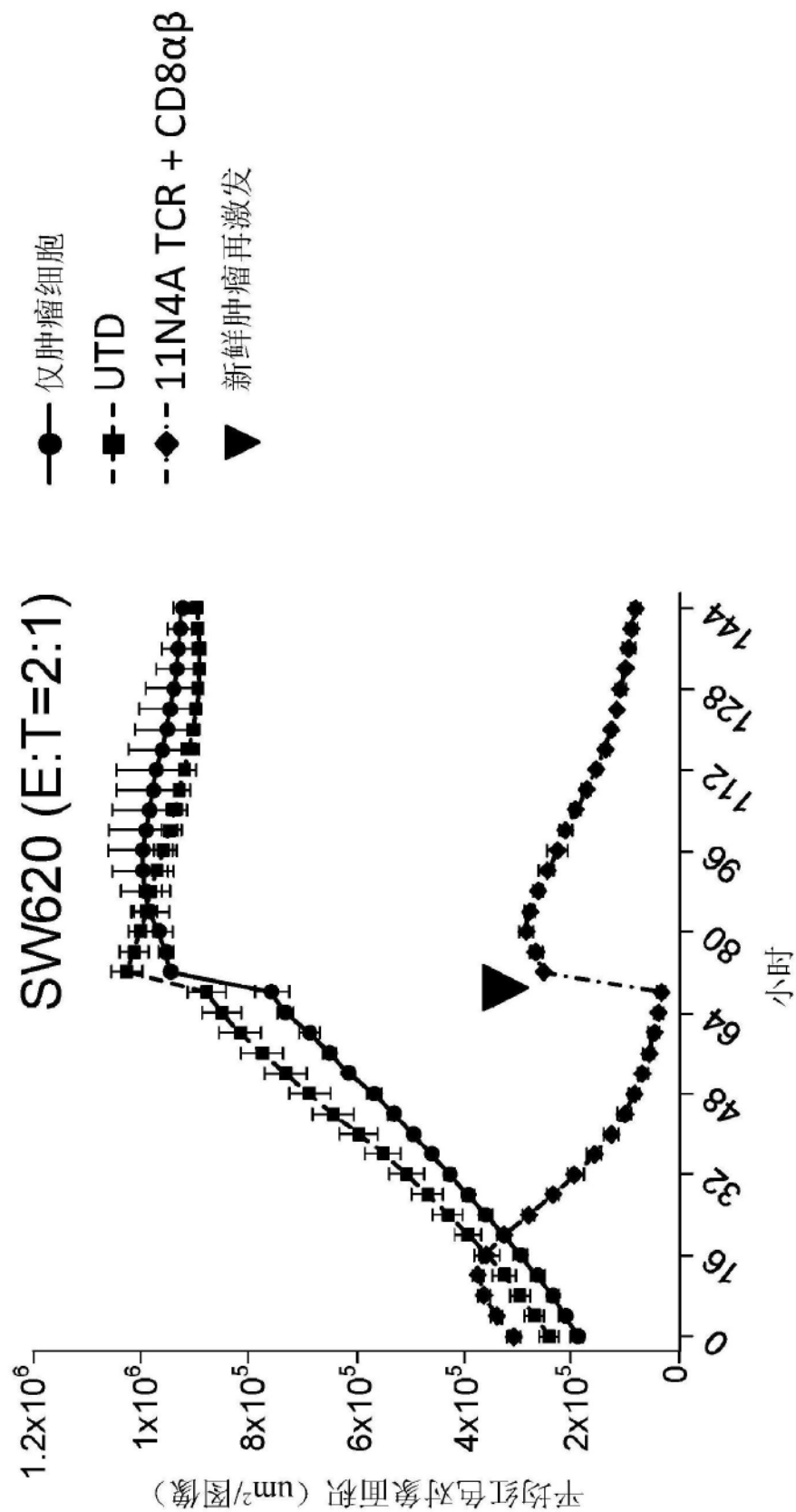


图11D

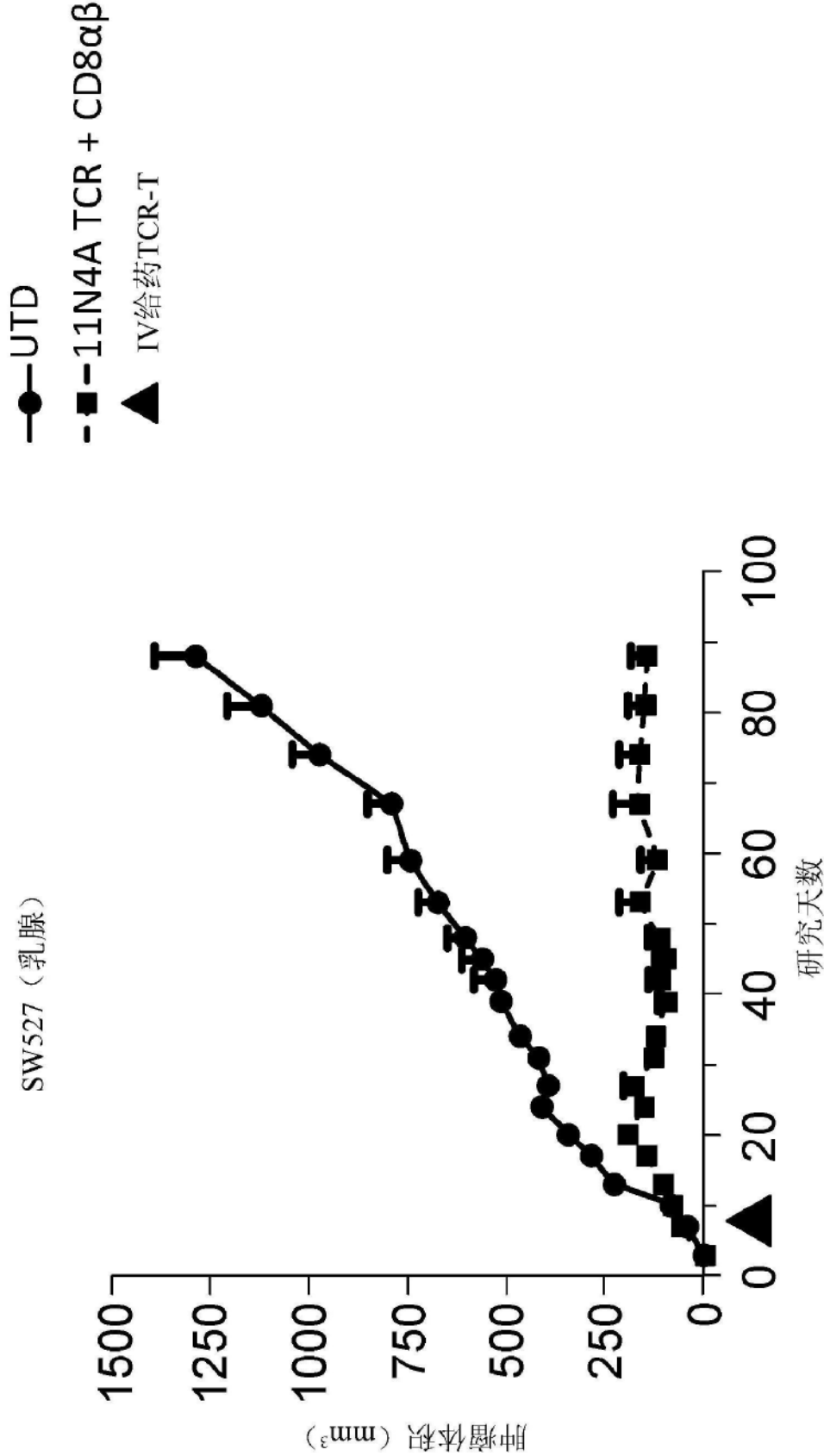


图12A

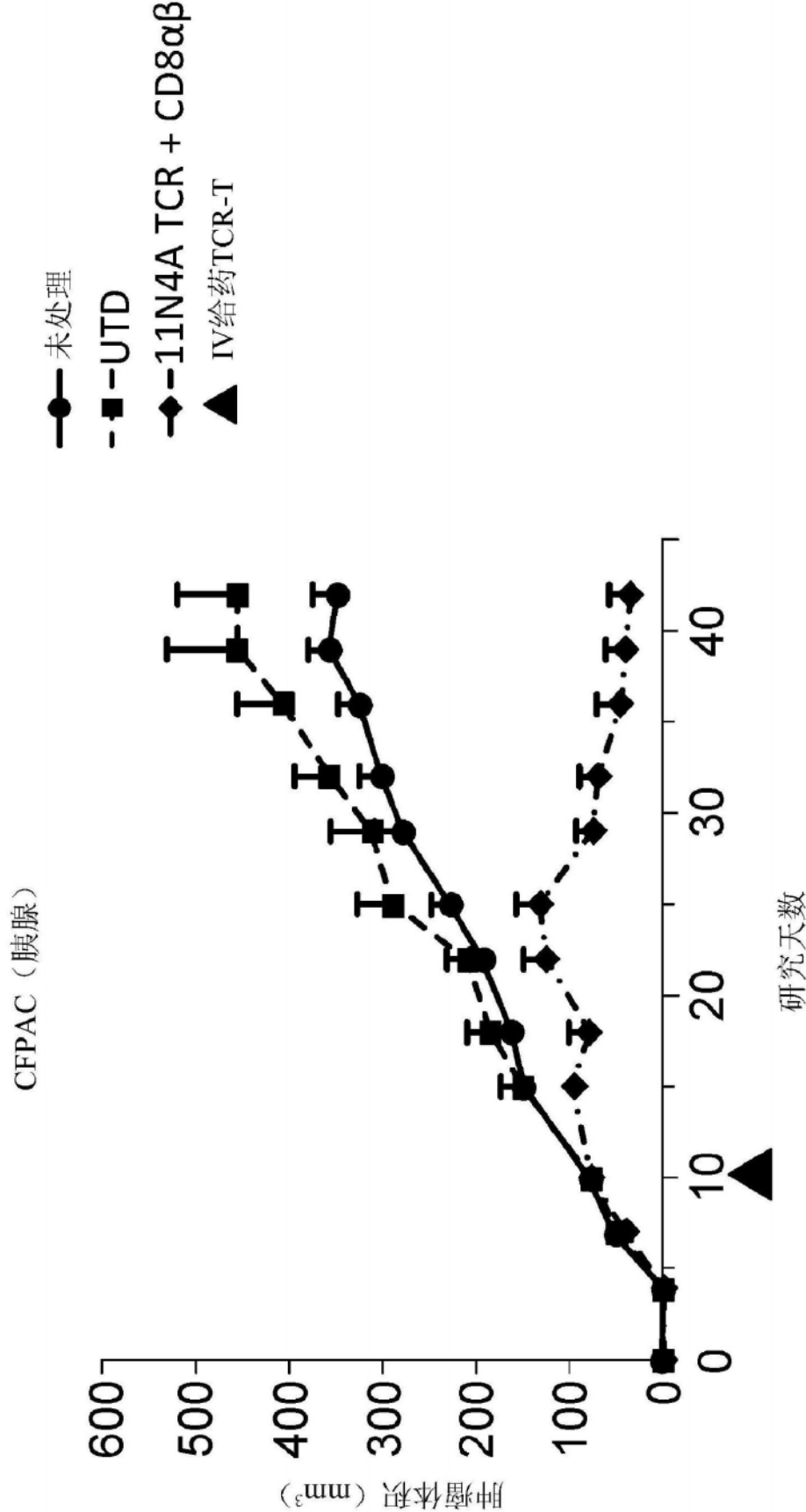


图12B

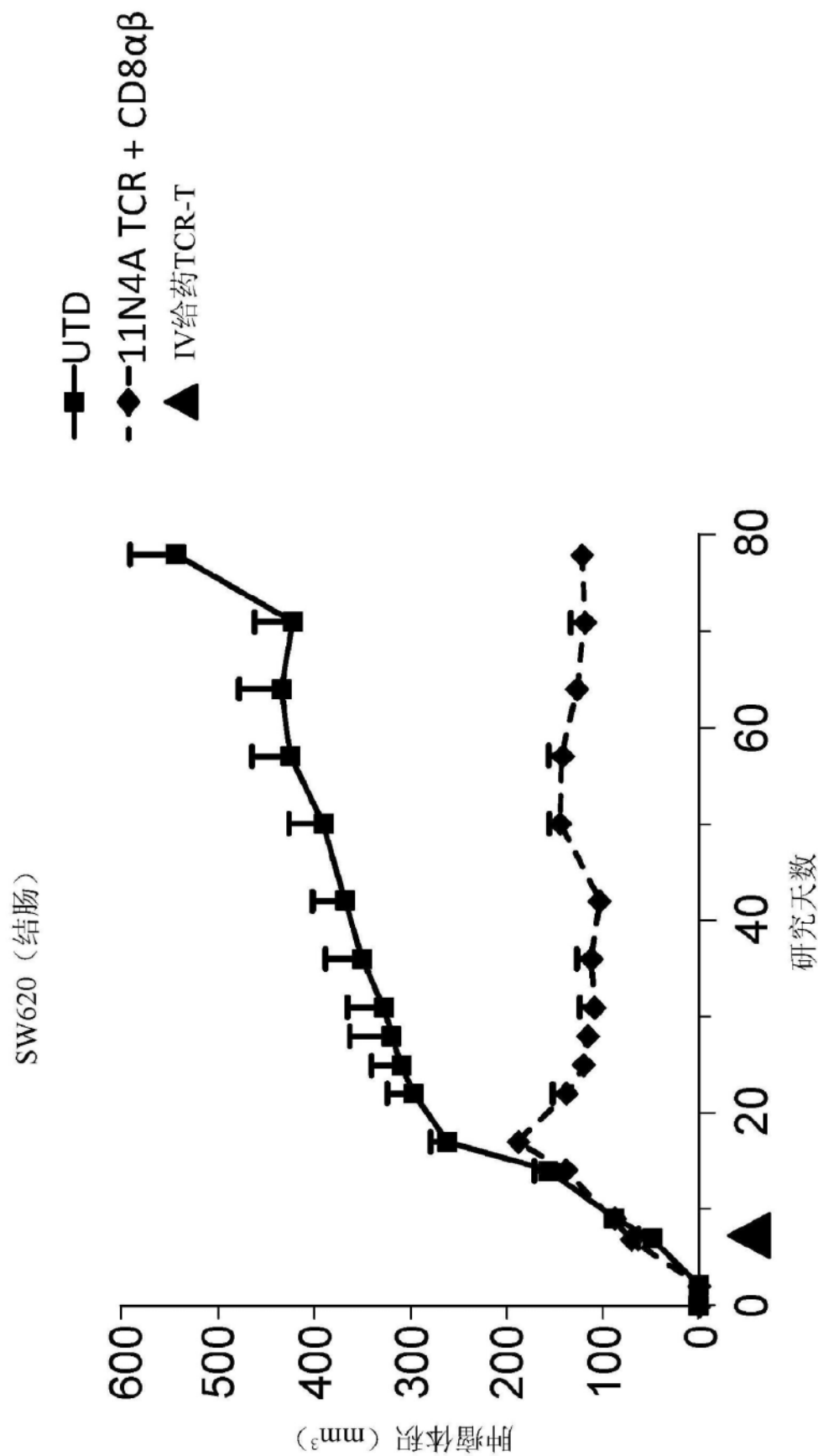


图12C

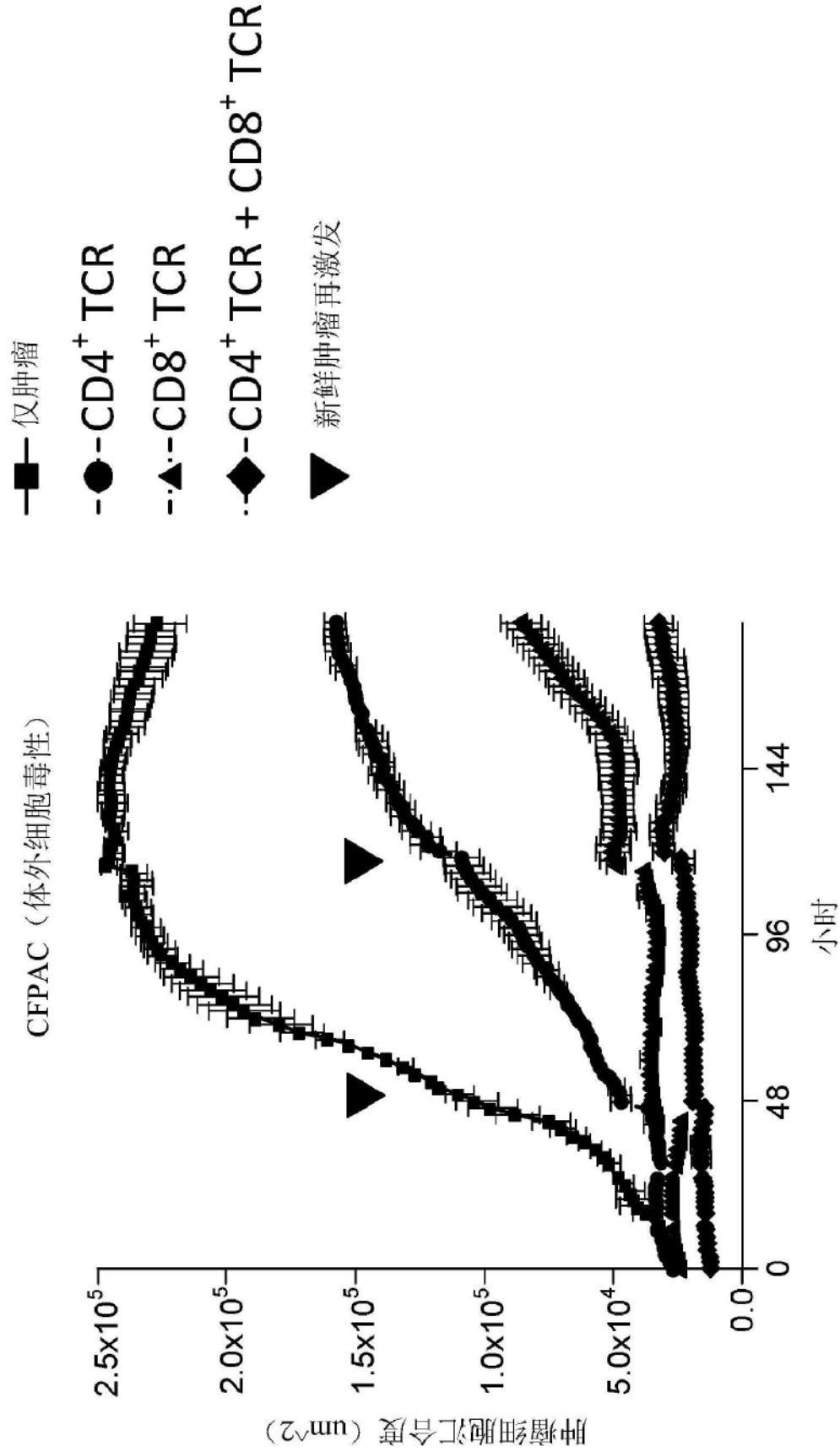


图13A

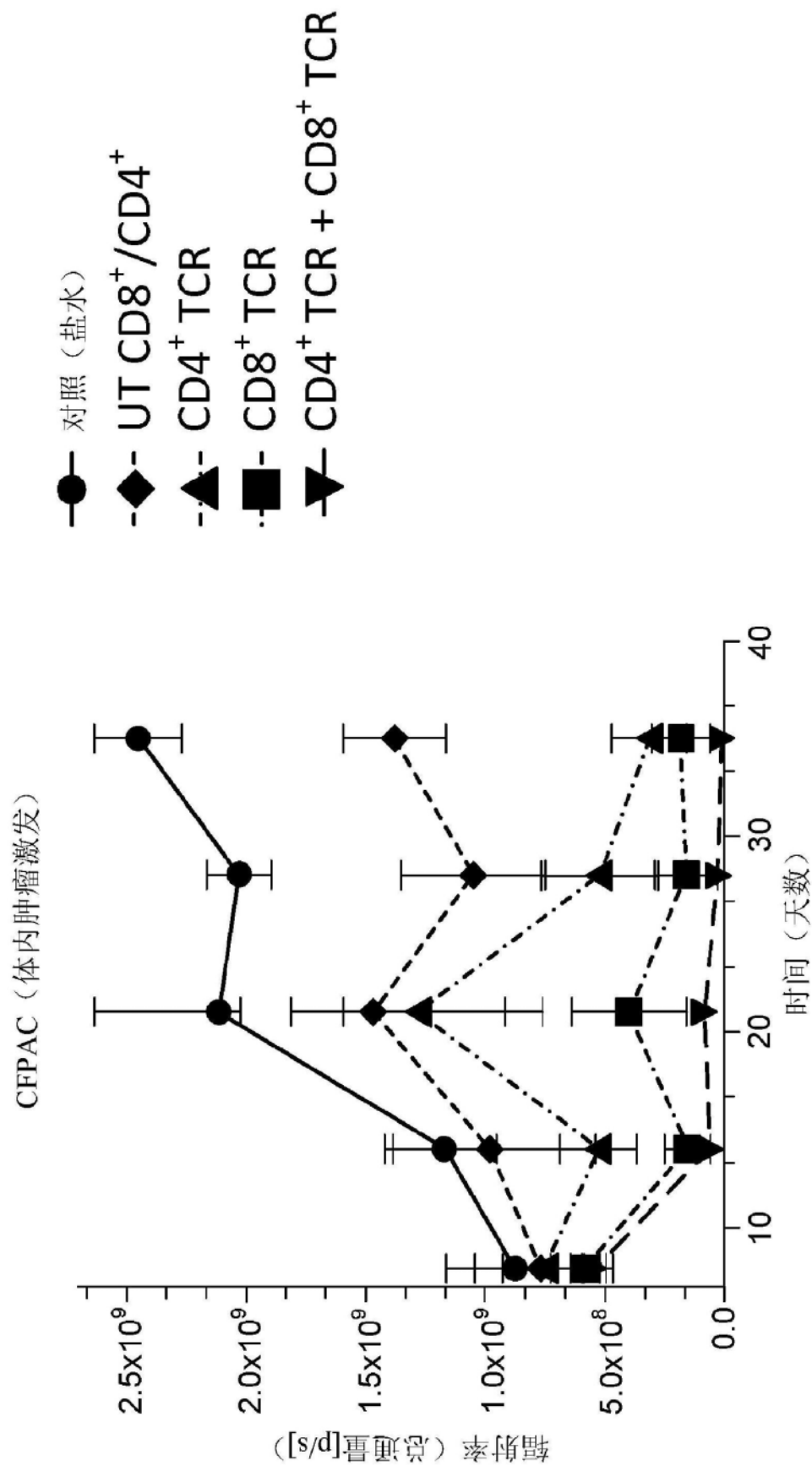


图13B

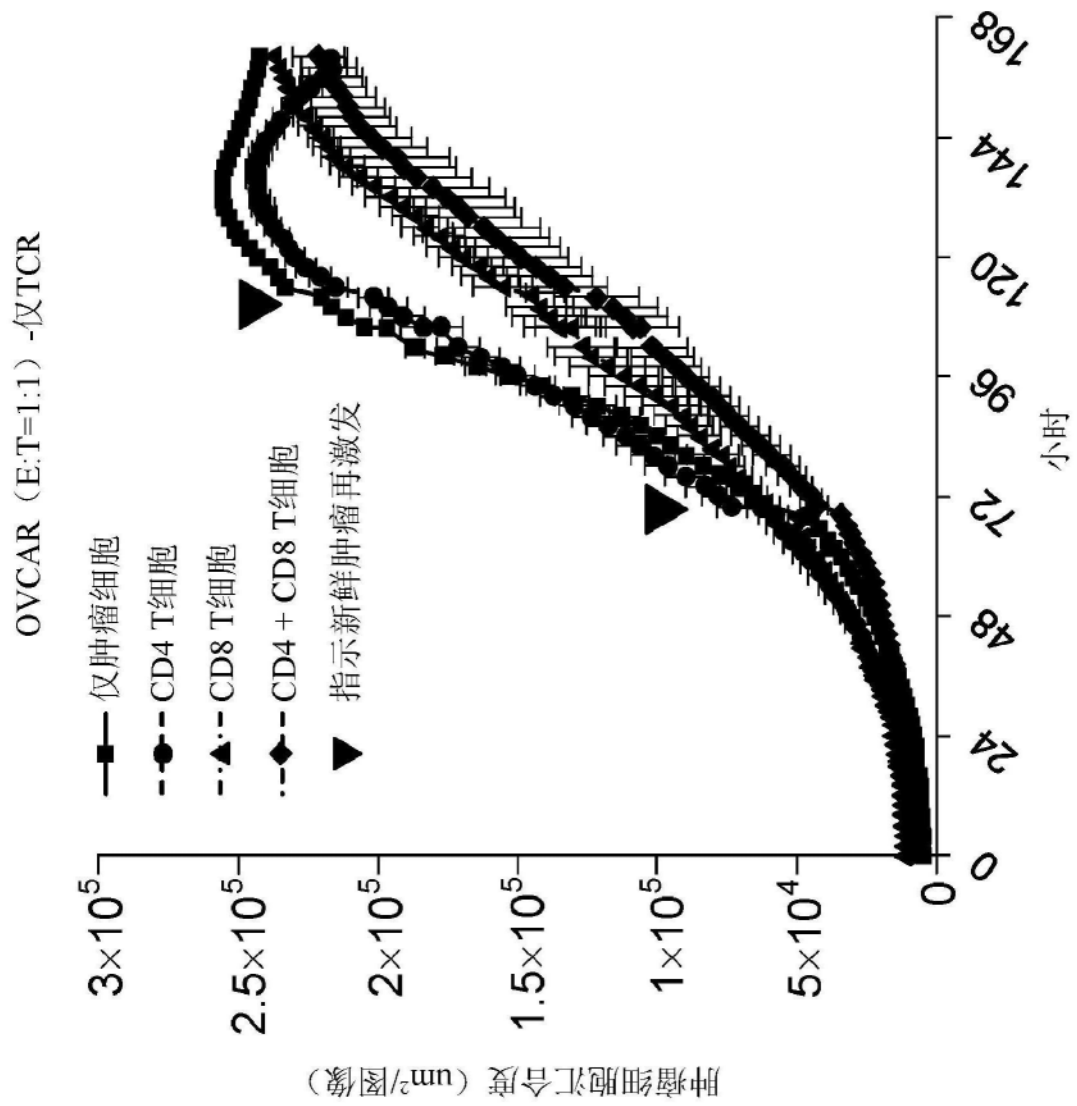


图13C

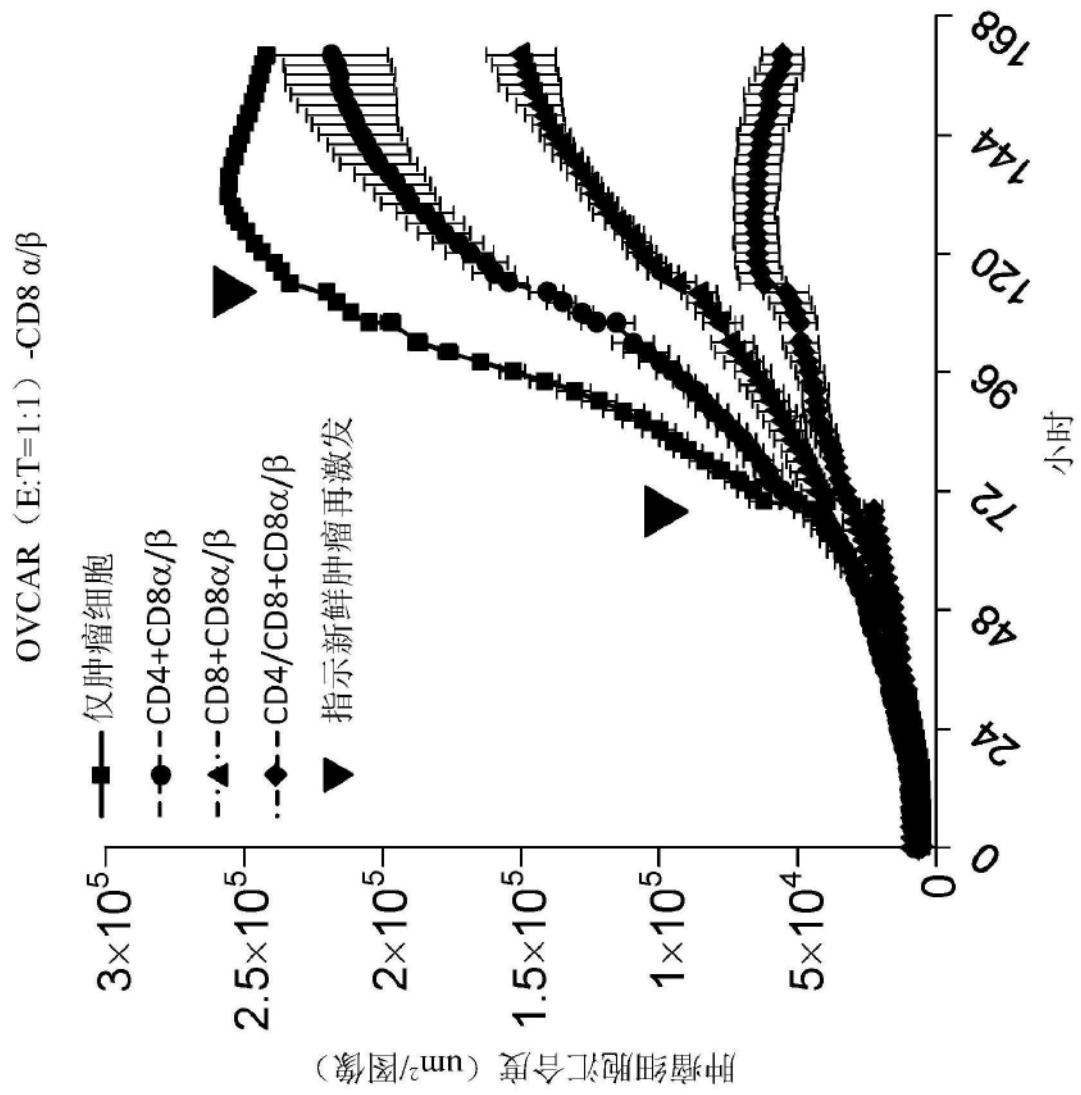


图13D

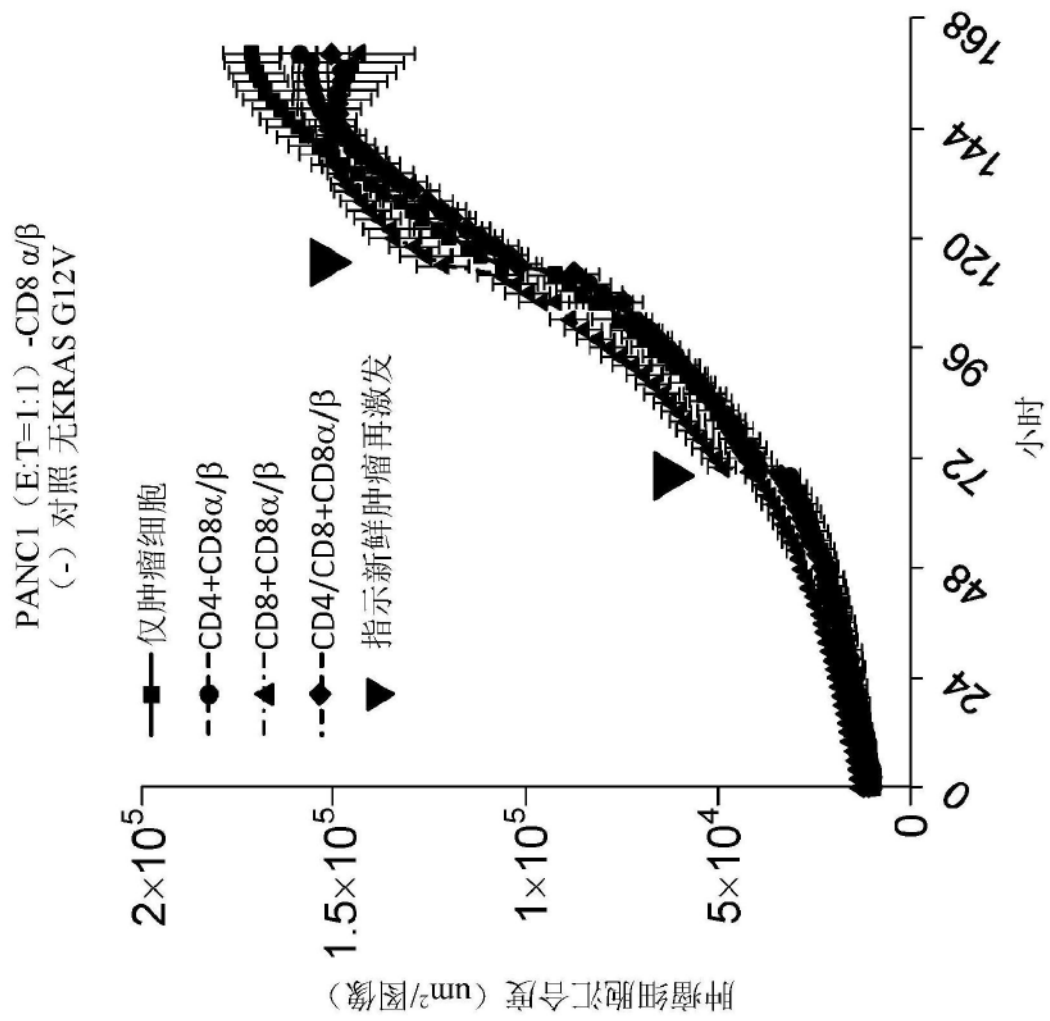


图13E

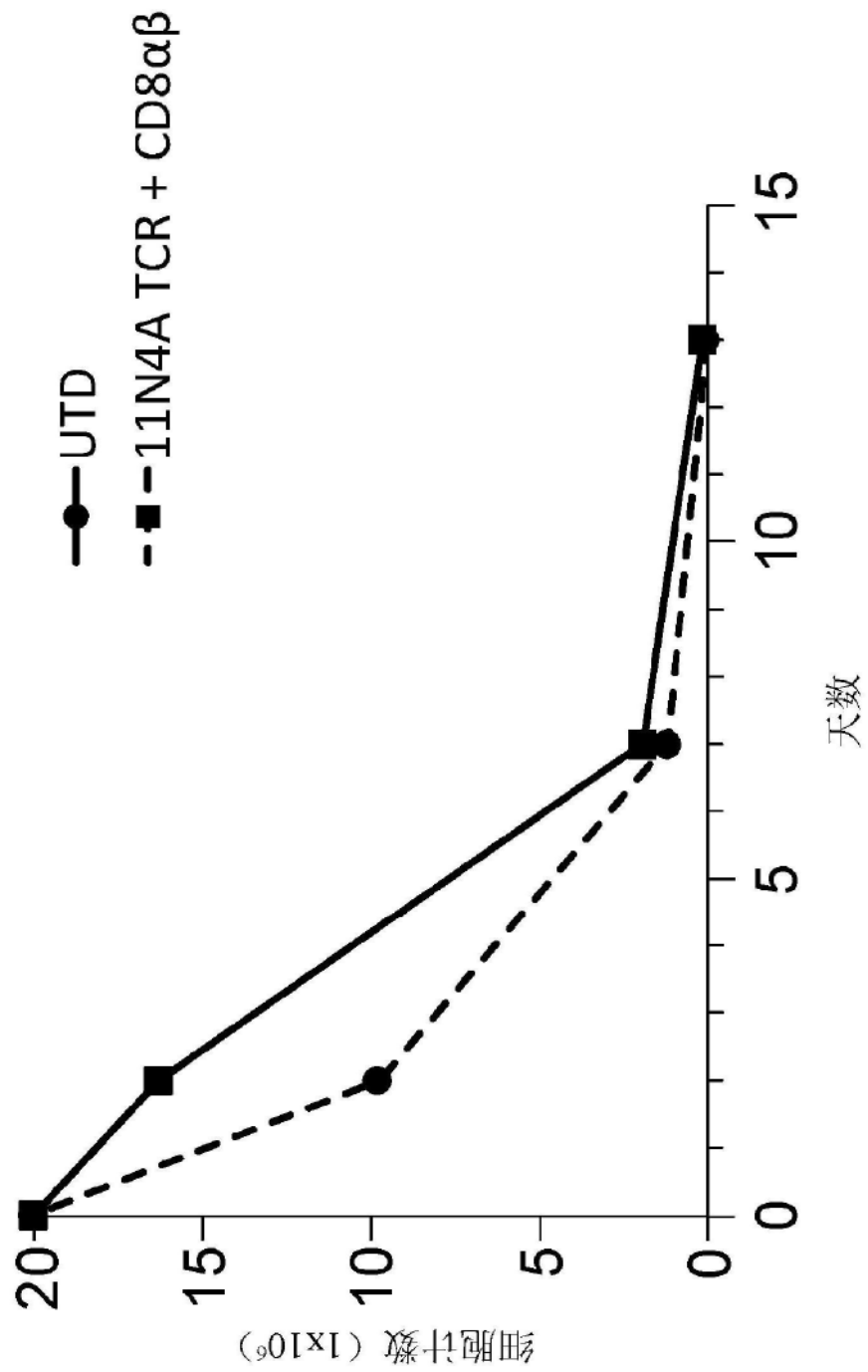


图14

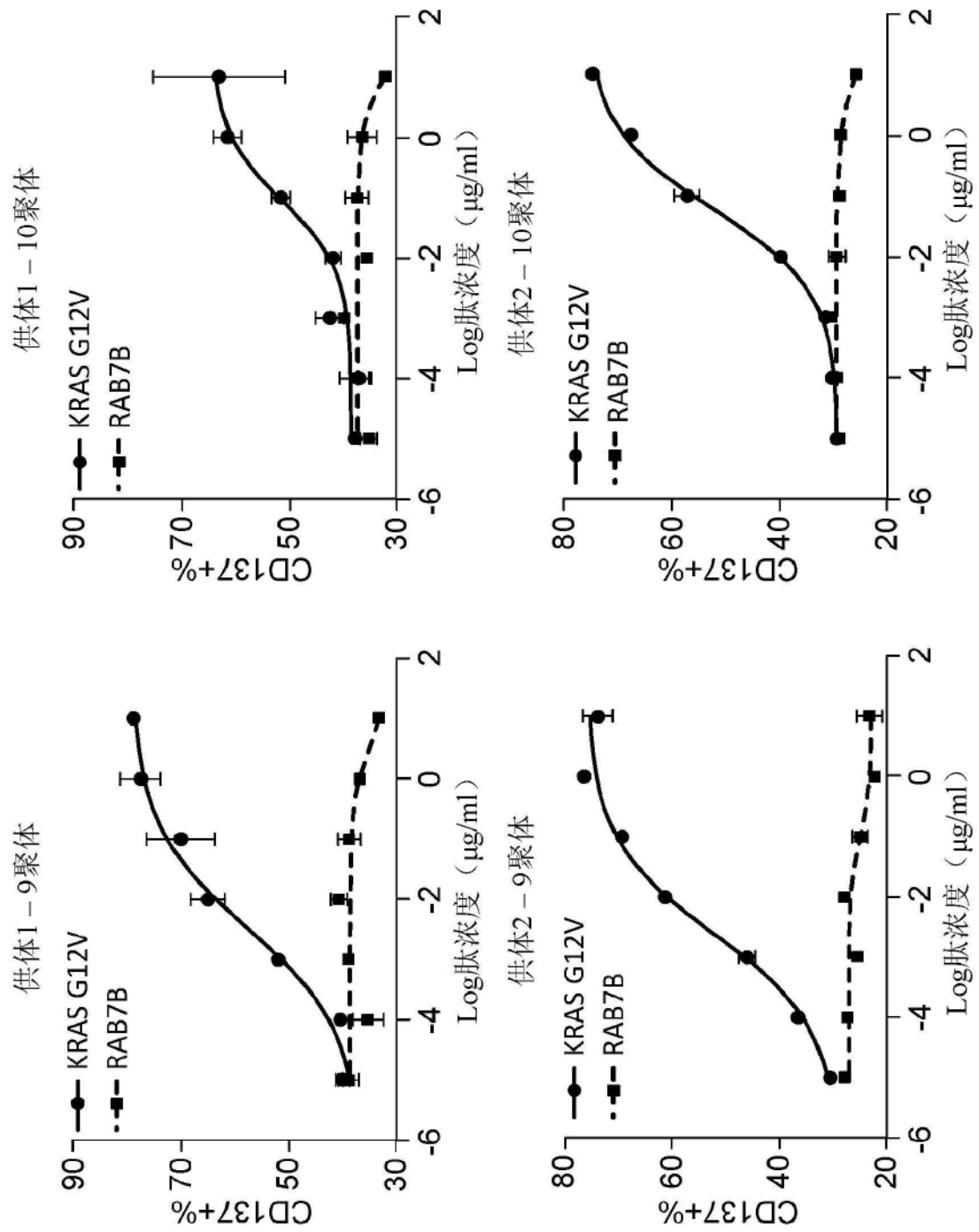


图15

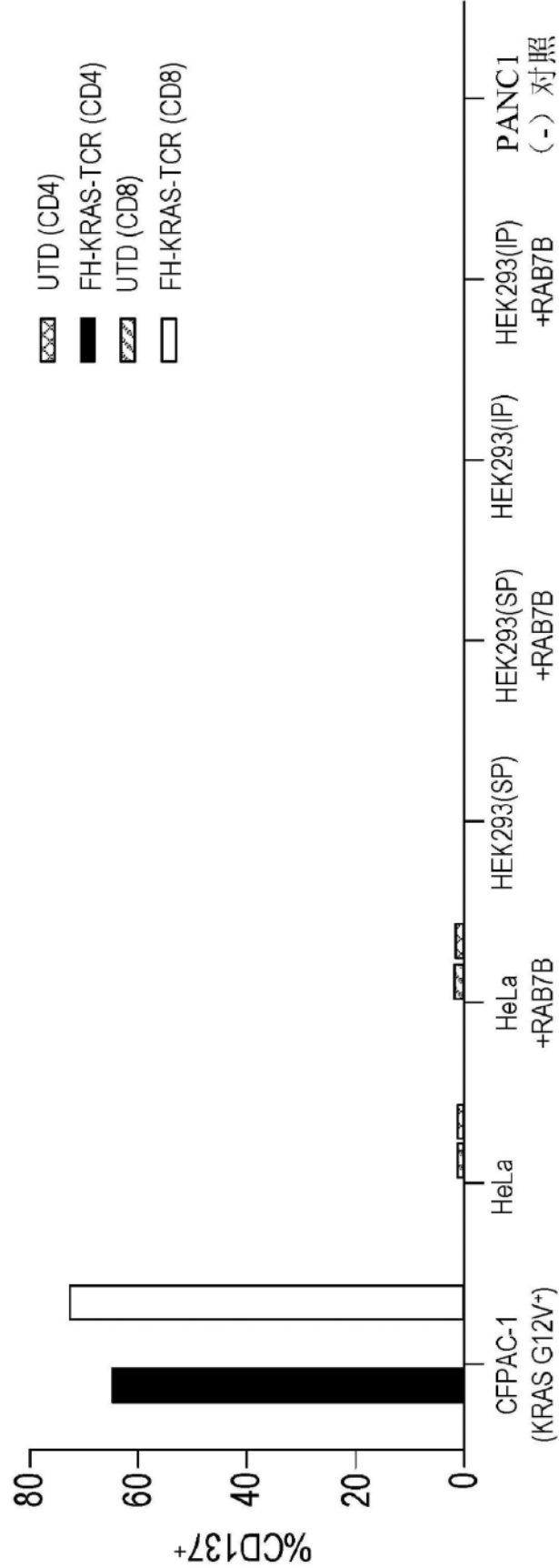


图16

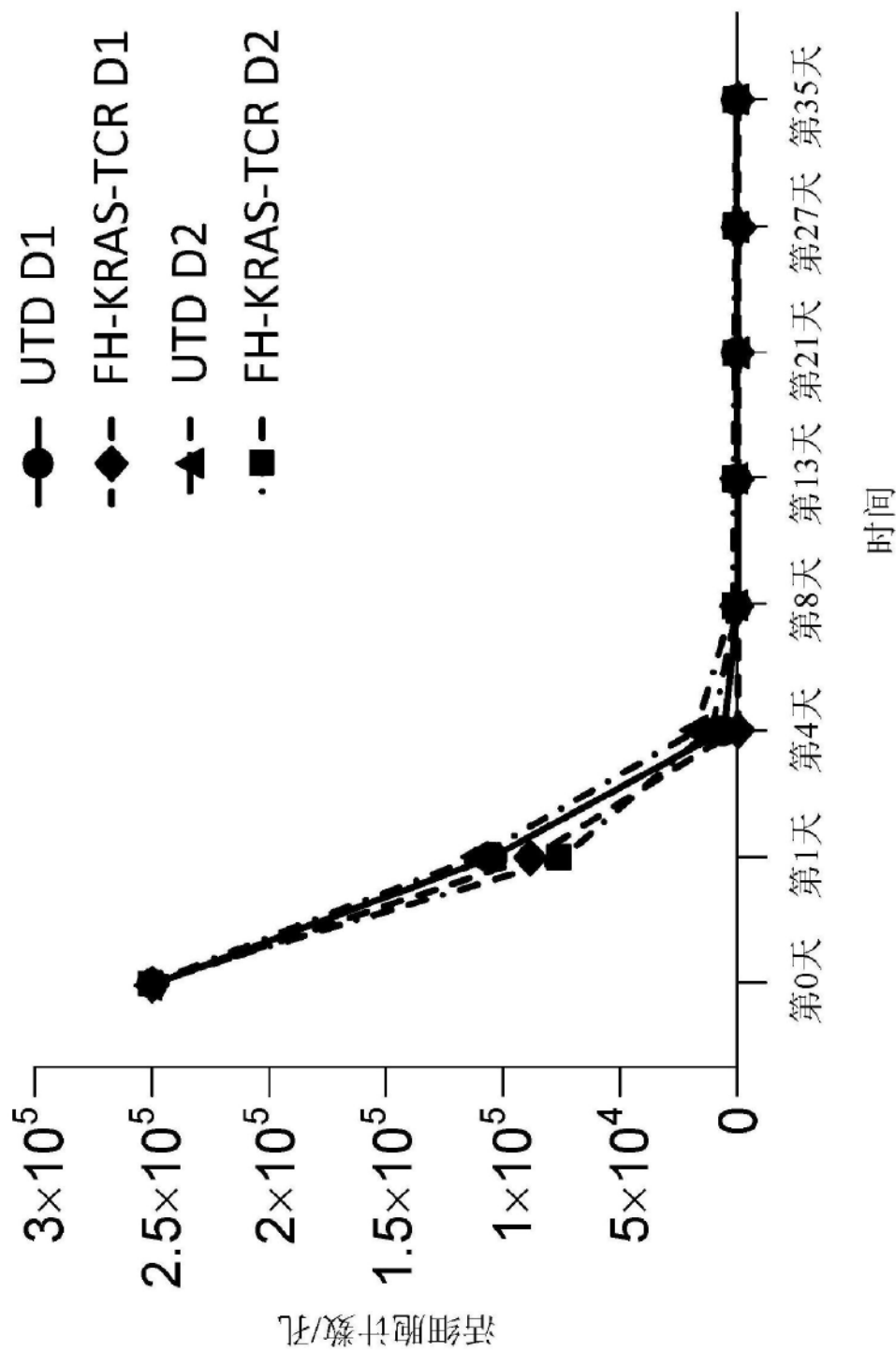


图17