(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 107074932 A
(43)申请公布日 2017.08.18

(21)申请号 201480082932.3

(22)申请日 2014.10.02

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2017.04.25

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2014/058796 2014.10.02

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2016/053338 EN 2016.04.07

(71)申请人 美国卫生和人力服务部
地址 美国马里兰州

(72)发明人 埃里克·特兰 卢勇成
保罗·E·罗宾斯
史蒂文·A·罗森伯格

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理有限责任公司 11204
代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.
C07K 14/725(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)

权利要求书2页 说明书39页
序列表23页 附图9页

(54)发明名称

分离对癌症特异性突变具有抗原特异性的T细胞受体的方法

(57)摘要

公开了分离对由癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列具有抗原特异性的TCR的方法，所述方法包括：鉴定患者癌细胞的核酸中的一个或多个基因，每个基因含有编码突变的氨基酸序列的癌症特异性突变；诱导患者的自体APC以呈递突变的氨基酸序列；将患者的自体T细胞与呈递突变的氨基酸序列的自体APC共培养；选择自体T细胞；并从所选的自体T细胞中分离编码TCR的核苷酸序列，其中所述TCR对由癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列具有抗原特异性。还公开了制备一个细胞群、多个细胞群、TCR、药物组合物的相关方法，以及治疗或预防癌症的方法。

CN 107074932 A

1.分离对由癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞受体(TCR)或其抗原结合部分的方法,所述方法包括:

鉴定患者癌细胞的核酸中的一个或多个基因,每个基因含有编码突变的氨基酸序列的癌症特异性突变;

诱导患者的自体抗原呈递细胞(APC)以呈递突变的氨基酸序列;

将患者的自体T细胞与呈递突变的氨基酸序列的自体APC共培养;

选择(a)与呈递突变的氨基酸序列的自体APC共培养,并且(b)对在患者表达的主要组织相容性复合体(MHC)分子的环境下所呈递的突变的氨基酸序列具有抗原特异性的自体T细胞;和

从所选的自体T细胞中分离编码TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列,其中所述TCR或其抗原结合部分对由癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列具有抗原特异性。

2.如权利要求1所述的方法,其中诱导所述患者的自体APC以呈递所述突变的氨基酸序列,包括用包含所述突变的氨基酸序列的肽或肽库对APC进行脉冲,所述库中的各个肽包含不同的突变的氨基酸序列。

3.如权利要求1所述的方法,其中诱导所述患者的自体APC以呈递所述突变的氨基酸序列,包括将编码所述突变的氨基酸序列的核苷酸序列引入到所述APC。

4.如权利要求3所述的方法,其中引入到自体APC的所述核苷酸序列是串联小基因(TMG)构建体,每个小基因包含不同的基因,每个基因包含编码突变的氨基酸序列的癌症特异性突变。

5.如权利要求1-4中任一项所述的方法,其还包括从所述患者获得肿瘤的多个碎块,将来自所述多个碎块中的每一个的自体T细胞分别与呈递所述突变的氨基酸序列的自体APC共培养,并且分别评估来自所述多个碎块中的每一个的T细胞对突变的氨基酸序列的抗原特异性。

6.如权利要求1-5中任一项所述的方法,其中选择对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的自体T细胞,包括选择性培育对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的自体T细胞。

7.如权利要求1-6中任一项所述的方法,其中选择对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的自体T细胞,包括选择表达以下的任一种或多种的T细胞:程序性细胞死亡因子1(PD-1)、淋巴细胞活化基因3(LAG-3)、T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域-3(TIM-3)、4-1BB、OX40和CD107a。

8.如权利要求1-7中任一项所述的方法,其中选择对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的自体T细胞,包括选择这样的T细胞:(i)相比由阴性对照分泌的一种或多种细胞因子的量,在与呈递所述突变的氨基酸序列的APC共培养时分泌更多量的一种或多种细胞因子,或者(ii)其中相比分泌一种或多种细胞因子的阴性对照T细胞的数量,在与呈递所述突变的氨基酸序列的APC共培养时至少两倍数量的T细胞分泌一种或多种细胞因子。

9.如权利要求8所述的方法,其中所述一种或多种细胞因子包括:干扰素(IFN)-γ、白细胞介素(IL)-2、肿瘤坏死因子-α(TNF-α)、粒细胞/单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-17和IL-22。

10.如权利要求1-9中任一项所述的方法,其中鉴定癌细胞的核酸中的一个或多个基因,包括对所述癌细胞的全外显子组、全基因组或全转录组进行测序。

11.制备对由癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列具有抗原特异性的表达TCR或其抗原结合部分的细胞群的方法，所述方法包括：

根据权利要求1-10中任一项所述的方法分离TCR或其抗原结合部分，和

将编码分离的TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列引入到外周血单核细胞(PBMC)以获得表达所述TCR或其抗原结合部分的细胞。

12.如权利要求11所述的方法，其还包括扩增表达所述TCR或其抗原结合部分的PBMC的数量。

13.根据权利要求1-10中任一项所述的方法分离的TCR或其抗原结合部分。

14.根据权利要求11或12制备的分离的细胞群。

15.药物组合物，其包含：(a)权利要求13所述的TCR或其抗原结合部分或(b)权利要求14所述的分离的T细胞群以及药学上可接受的载体。

16.权利要求13所述的TCR或其抗原结合部分、权利要求14所述的分离的细胞群或权利要求15所述的药物组合物，其用于治疗或预防哺乳动物的癌症。

17.如权利要求16所述用途的TCR或其抗原结合部分、分离的细胞群或药物组合物，其中所述癌症是上皮癌。

18.如权利要求16所述用途的TCR或其抗原结合部分、分离的细胞群或药物组合物，其中所述癌症是胆管癌、黑素瘤、结肠癌或直肠癌。

19.如权利要求16-18中任一项所述用途的分离的细胞群或包含所述分离的细胞群的药物组合物，其中所述PBMC是患者自体的。

20.如权利要求16-18中任一项所述用途的分离的细胞群或包含所述分离的细胞群的药物组合物，其中所述PBMC对于患者是同种异体的。

分离对癌症特异性突变具有抗原特异性的T细胞受体的方法

[0001] 通过引用并入电子提交材料

[0002] 通过引用整体并入本文的是，与本申请同时提交并且识别如下的计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表：文件名为“718291ST25.TXT”的29,577字节ASCII(文本)，日期为2014年9月15日。

背景技术

[0003] 采用经遗传工程化以表达抗癌抗原T细胞受体(TCR)的细胞的过继性细胞疗法(ACT)，可在一些癌症患者中产生积极的临床反应。然而，成功应用TCR-工程化的细胞来广泛治疗癌症和其他疾病的障碍依然存在。例如，特异性识别癌抗原的TCR可能难以鉴定和/或从患者分离。因此，需要获得癌症反应性TCR的改进方法。

[0004] 发明概述

[0005] 本发明的一个实施方案提供了分离对由癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列具有抗原特异性的TCR或其抗原结合部分的方法，所述方法包括：鉴定患者癌细胞的核酸中的一个或多个基因，每个基因含有编码突变的氨基酸序列的癌症特异性突变；诱导患者的自体抗原呈递细胞(APC)以呈递突变的氨基酸序列；将患者的自体T细胞与呈递突变的氨基酸序列的自体APC共培养；选择(a)与呈递突变的氨基酸序列的自体APC共培养，并且(b)对在患者表达的主要组织相容性复合体(MHC)分子的环境下所呈递的突变的氨基酸序列具有抗原特异性的自体T细胞；以及从所选的自体T细胞分离编码TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列，其中所述TCR或其抗原结合部分对由癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列具有抗原特异性。

[0006] 本发明的另一个实施方案提供了制备表达对由癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列具有抗原特异性的TCR或其抗原结合部分的细胞群的方法，所述方法包括：鉴定患者的癌细胞的核酸中的一个或多个基因的基因，每个基因含有编码突变的氨基酸序列的癌症特异性突变；诱导患者的自体APC以呈递突变的氨基酸序列；将患者的自体T细胞与呈递突变的氨基酸序列的自体APC共培养；选择(a)与呈递突变的氨基酸序列的自体APC共培养，并且(b)对在患者表达的MHC分子的环境下所呈递的突变的氨基酸序列具有抗原特异性的自体T细胞；从所选的自体T细胞分离编码TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列，其中所述TCR或其抗原结合部分对由癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列具有抗原特异性；并将编码所述分离的TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列引入到外周血单核细胞(PBMC)，以获得表达所述TCR或其抗原结合部分的细胞。

[0007] 本发明的其它实施方案提供了相关细胞群、TCR或其抗原结合部分、药物组合物，以及治疗或预防癌症的方法。

附图说明

[0008] 图1A示出了用OKT3或用绿色荧光蛋白(GFP)RNA或指定的串联小基因(TMG)构建体转染的树突状细胞(DC)与3737-TIL共培养20小时后，由干扰素(IFN)-γ酶联免疫斑点

(ELISPOT)测定法测量的每1×10^3(1e3)个细胞的斑点数量的曲线图。“>”表示每1×10^3个细胞大于500个斑点。模拟(mock)转染的细胞仅用转染试剂处理，而不加入核酸。

[0009] 图1B示出了与OKT3或用GFP RNA、TMG-1或指定的野生型(wt)基因ALK、CD93、ERBB2IP、FCER1A、GRXCR1、KIF9、NAGS、NLRP2或RAC3转染的树突状细胞(DC)共培养后，是OX40+的CD4+3737-TIL的百分比的曲线图。模拟转染的细胞仅用转染试剂处理，而不加入核酸。

[0010] 图2A-2C示出了对于与用TMG-1(A)或624-CIITA细胞(B)和(C)(其不与任何东西预孵育)或指定的HLA封闭性抗体(针对MHC-I、MHC-II、HLA-DP、HLA-DQ或HLA-DR)转染的DC共培养的3737-TIL(A)、DMF5T细胞(B)或T4T细胞(C)，在20小时通过IFN-γELISPOT测定法测量的每1×10^3(1e3)个细胞的斑点数量的曲线图(A-C)。

[0011] 图2D示出了对于与用DMSO、突变的(mut)ALK或突变的(mut)ERBB2IP 25-AA长肽脉冲过夜的自体DQ-0301/-0601B细胞(灰色条)或者在HLA-DQ 05/0601基因座(黑色条)或HLA-DQ-0201/0301基因座(非阴影条)部分匹配的同种异体EBV-B细胞共培养的3737-TIL，在20小时通过IFN-γELISPOT测定法测量的每1×10^3(1e3)个细胞的斑点数量的曲线图。ETGHLENGNKYPNLE(SEQ ID NO:53)；

[0012] 图2E示出了对于与用mut ERBB2IP 25-AA肽TSFLSINSKEETGHLENGNKYPNLE(SEQ ID NO:73)或指定截短的mut ERBB2IP肽FLSINSKEETGHLENGNKYPNLE(SEQ ID NO:30)、SINSKEETGHLENGNKYPNLE(SEQ ID NO:31)、NSKEETGHLENGNKYPNLE(SEQ ID NO:32)、KEETGHLENGNKYPNLE(SEQ ID NO:33)、ETGHLENGNKYPNLE(SEQ ID NO:53)、TSFLSINSKEETGHL(SEQ ID NO:34)、TSFLSINSKEETGHLEN(SEQ ID NO:35)、TSFLSINSKEETGHLENGN(SEQ ID NO:36)、TSFLSINSKEETGHLENGNKY(SEQ ID NO:37)或TSFLSINSKEETGHLENGNKYPN(SEQ ID NO:38)脉冲过夜的自体B细胞共培养的3737-TIL，在20小时通过IFN-γELISPOT测定法测量的每1×10^3(1e3)个细胞的斑点数量的曲线图。

[0013] 图3A示出了通过对活的CD4+(阴影的)或CD8+(非阴影的)T细胞设门的流式细胞术所测量的3737-TIL中的各种TCR Vβ克隆型的百分比的曲线图。

[0014] 图3B示出了在第0天(由箭头指示)的3737-TIL的过继性细胞转移之前和之后指定天数所测量的患者3737血清样品中检测到的IFN-γ水平(pg/ml)的曲线图。误差条是平均的标准差(SEM)。

[0015] 图3C示出了相对于第0天的细胞转移(由箭头指示)的指定月数时的总肿瘤负荷(圆形)(测量为治疗前基线的百分比)或者在肺(三角形)或肝(正方形)中的肿瘤负荷的曲线图。

[0016] 图3D示出了通过流式细胞术测量的CD4+Vβ22-OX40+3737-TIL中的各种TCR Vβ克隆型的百分比的曲线图。

[0017] 图4A和4B示出了在用3737-TIL的过继性细胞转移之前和之后不同时间的患者3737的血液(圆形)中、细胞转移前的肿瘤(菱形)中和细胞转移后的各种肿瘤(Tu-1-Post(正方形)、Tu-2-Post(▲)和Tu-3-Post(▼))中，两种ERBB2IP-突变特异性TCRβ-CDR3克隆型Vβ22+(A)和Vβ5.2+(B)的频率。阴影条表示在转移的细胞(3737-TIL)中，两种ERBB2IP-突变特异性TCRβ-CDR3克隆型Vβ22+(A)和Vβ5.2+(B)的频率。“X”表示“未检测到”。

[0018] 图4C示出了在3737-TIL(T细胞)和过继性细胞转移之前(TU-Pre)和之后(Tu-1-

post、Tu-2-post和Tu-3-post)的各种肿瘤中,ERBB2IP相对于ACTB的表达的曲线图。

[0019] 图4D示出了在相对于细胞转移(用箭头表示)的指定月数时的总肿瘤负荷(圆形)(测量为治疗前基线的百分比)或者在肺(三角形)或肝(正方形)中的肿瘤负荷。

[0020] 图5A是串联小基因(TMG)构建体的实例的示意图,其编码在其N末端和C末端侧翼有6个鉴定的突变氨基酸残基(两侧有12个氨基酸)的多肽。突变的KIF2C序列是DSSLQARLFPGLTIKIQRSNGLIHS(SEQ ID NO:57)。

[0021] 图5B示出了与自体黑素细胞或与用HLA-A*0205和TMG构建体RJ-1(如图9A所示的结构)、RJ-2、RJ-3、RJ-4、RJ-5、RJ-6、RJ-7、RJ-8、RJ-9、RJ-10、RJ-11、RJ-12或空载体共转染的COS-7细胞共培养过夜的TIL 2359T细胞所分泌的IFN-γ水平(pg/mL)的曲线图。

[0022] 图5C示出了与用HLA-A*0205和RJ-1变体(其中在表中被表示为"wt"的基因被转换回WT序列)转染的COS-7细胞共培养的TIL 2359所分泌的IFN-γ水平(pg/mL)的曲线图。所述KIF2C WT序列是DSSLQARLFPGLAIKIQRSNGLIHS(SEQ ID NO:65)。

[0023] 图5D示出了与用空载体、KIF2C WT或突变的KIF2C的cDNA构建体与HLA的cDNA构建体(从左到右鉴定各个阴影条:HLA-A*0101(非阴影条)、HLA-A*0201(灰色条)或HLA-A*0205(黑色条))一起转染的COS-7细胞共培养的TIL 2359所分泌的IFN-γ水平(pg/mL)的曲线图。

[0024] 图5E示出了与用各种浓度(μM)的$KIF2C_{10-19}$WT(RLFPGLAIKI;SEQ ID NO:58)(图中底部线)或突变的$KIF2C_{10-19}$(RLFPGLTIKI;SEQ ID NO:59)(图中顶部线)脉冲的稳定表达HLA-A*0205的HEK293细胞共培养过夜的TIL 2359T细胞所分泌的IFN-γ水平(pg/mL)的曲线图。

[0025] 图6A示出了与自体黑素细胞或与用空载体或选自DW-1至DW-37的TMG构建体转染的稳定表达HLA-C*0701的HEK293细胞共培养的TIL 2591T细胞所分泌的IFN-γ水平(pg/mL)的曲线图。

[0026] 图6B示出了TMG构建体DW-6结构的示意图。突变的POLA2序列是TIIEGTRSSGSHFVFVPSLRDVHHE(SEQ ID NO:64)。

[0027] 图6C示出了与用HLA-C*0701和DW-6变体(其中在表中被表示为"wt"的基因被转换回WT序列)转染的COS-7细胞共培养的TIL 2591所分泌的IFN-γ水平(pg/mL)的曲线图。所述POLA2WT序列是TIIEGTRSSGSHLVFVPSLRDVHHE(SEQ ID NO:66)。

[0028] 图6D示出了与用空载体、POLA2WT或突变的POLA2的cDNA构建体与HLA的cDNA构建体(从左到右鉴定各个条:HLA-C*0401(非阴影条)、HLA-C*0701(灰色条)或HLA-C*0702(黑色条))一起转染的COS-7细胞共培养的TIL 2591所分泌的IFN-γ水平(pg/mL)的曲线图。

[0029] 图6E示出了与用各种浓度(μM)的$POLA2_{413-422}$WT(TRSSGSHLVF;SEQ ID NO:67)(图中底部线)或突变的$POLA2_{413-422}$(TRSSGSHFVF;SEQ ID NO:68)(图中顶部线)脉冲的稳定表达HLA-C*0701的HEK293细胞共培养过夜的TIL 2591T细胞所分泌的IFN-γ水平(pg/mL)的曲线图。

[0030] 图7A-7F是在第二次施用突变反应性细胞之前(A-C)和六个月之后(D-F),所获得的患者3737的肺部计算机断层成像(CT)扫描。箭头指向癌性病变。

[0031] 发明详述

[0032] 本发明的一个实施方案提供了分离对由癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序

列具有抗原特异性的TCR或其抗原结合部分的方法。本发明提供了许多优点。例如，本发明的方法可以一次快速评估由患者的所有MHC分子限制的大量突变，其可以鉴定患者的突变反应性T细胞的全部组成成分。另外，通过区分免疫原性癌症突变与(a)沉默性癌症特异性突变(其不编码突变的氨基酸序列)和(b)编码非免疫原性氨基酸序列的癌症特异性突变，本发明的方法可鉴定可以被TCR或其抗原结合部分靶向的一种或多种癌症特异性的突变的氨基酸序列。此外，本发明可提供对由患者独有的癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列具有抗原特异性的TCR和其抗原结合部分，从而提供了可用于治疗或预防患者的癌症的“个性化”TCR和其抗原结合部分。本发明的方法还可以避免鉴定癌抗原的传统方法中固有的技术偏见，例如使用cDNA文库的那些技术偏见，并且也可以比那些方法更省时和省力。例如，本发明的方法可以选择突变反应性T细胞，而不将所述T细胞与可能难以产生的肿瘤细胞系(尤其是例如上皮癌)共培养。不受特定理论或机制的限制，据信本发明的方法可鉴定和分离这样的TCR或其抗原结合部分，其靶向破坏癌细胞而最小化或消除对正常非癌细胞的破坏，从而降低或消除毒性。因此，本发明还可以提供这样的TCR或其抗原结合部分，其成功地治疗或预防癌症，例如对其它类型的治疗(如单独化疗、手术或放射)没有反应的癌症。

[0033] 所述方法可以包括鉴定患者癌细胞的核酸中的一个或多个基因，每个基因含有编码突变的氨基酸序列的癌症特异性突变。癌细胞可以从来源自患者的任何身体样品中获得，其中所述患者含有或预期含有肿瘤或癌细胞。身体样品可以是任何组织样品，如血液、从原发性肿瘤或从肿瘤转移获得的组织样品或任何其他含有肿瘤或癌细胞的样品。癌细胞的核酸可以是DNA或RNA。

[0034] 为了鉴定癌症特异性突变，所述方法可以进一步包括对正常非癌性细胞的核酸(如DNA或RNA)进行测序，并将癌细胞的序列与正常非癌性细胞的序列进行比较。正常的非癌细胞可以从患者或不同的个体获得。

[0035] 癌症特异性突变可以是编码突变的氨基酸序列(也称为“非沉默突变”)并且在癌细胞中表达而不在正常非癌细胞中表达的任何基因中的任何突变。可以在本发明方法中鉴定的癌症特异性突变的非限制性实例包括：错义、无义、插入、缺失、复制、移码和重复扩增突变。在本发明的一个实施方案中，所述方法包括鉴定至少一个含有编码突变的氨基酸序列的癌症特异性突变的基因。然而，可以使用本发明方法鉴定的含有此类癌症特异性突变的基因的数量不受限制，并且可以包括多于一个基因(例如，约2个、约3个、约4个、约5个、约10个、约11个、约12个、约13个、约14个、约15个、约20个、约25个、约30个、约40个、约50个、约60个、约70个、约80个、约90个、约100个、约150个、约200个、约400个、约600个、约800个、约1000个、约1500个、约2000个或更多个，或由前述值中任意两个所限定的范围)。同样，在本发明的一个实施方案中，所述方法包括鉴定至少一个编码突变的氨基酸序列的癌症特异性突变。然而，可使用本发明的方法鉴定的此类癌症特异性突变的数量不受限制，并且可包括多于一个的癌症特异性突变(例如，约2个、约3个、约4个、约5个、约10个、约11个、约12个、约13个、约14个、约15个、约20个、约25个、约30个、约40个、约50个、约60个、约70个、约80个、约90个、约100个、约150个、约200个、约400个、约600个、约800个、约1000个、约1500个、约2000个或更多个，或由前述值中的任意两个所限定的范围)。在鉴定了多于一个癌症特异性突变的实施方案中，所述癌症特异性突变可以位于相同的基因或不同的基因中。

[0036] 在一个实施方案中，鉴定癌细胞的核酸中一个或多个基因包括对癌细胞的整个外

显子组、全基因组或整个转录组进行测序。测序可以按本领域已知的任何合适的方式进行。可用于本发明方法的测序技术的实例包括下一代测序(NGS)(也称为“大规模平行测序技术”)或第三代测序。NGS是指基于非Sanger法的高通量DNA测序技术。使用NGS,可以平行地对数百万或数十亿的DNA链进行测序,产生了显著更多的通量并使对常用于基因组的Sanger法测序的片段克隆方法的需要最小化。在NGS中,可以通过将整个基因组断裂成小片而沿着整个基因组平行地随机读取核酸模板。NGS可以有利地在非常短的时间内,例如在约1至约2周内,优选在约1至约7天内,或最优选在少于约24小时的时间内提供全基因组、外显子组或转录组的核酸序列信息。可商购或在文献中描述的多个NGS平台可用于本发明方法中,例如,以下文献中描述的那些:Zhang等人,J.Genet.Genomics,38(3):95-109(2011)和Voelkerding等人,Clinical Chemistry,55:641-658(2009)。

[0037] NGS技术和平台的非限制性实例包括:边合成边测序(也被称为“焦磷酸测序”)(如所实施,例如,使用GS-FLX 454基因组测序仪,454Life Sciences(Branford,CT)、ILLUMINA SOLEXA基因组分析仪(Illumina Inc.,San Diego,CA)或ILLUMINA HISEQ 2000基因组分析仪(Illumina),或如所描述,例如,Ronaghi等人,Science,281(5375):363-365(1998)),边连接边测序(如所实施,例如,使用SOLID平台(Life Technologies公司,Carlsbad,CA)或POLONATOR G.007平台(Dover System,Salem,NH)),单分子测序(如所实施,例如,使用PACBIO RS系统(Pacific Biosciences(Menlo Park,CA)或HELISCOPE平台(Helicos Biosciences(Cambridge,MA)),用于单分子测序的纳米技术(如所实施,例如,使用Oxford Nanopore Technologies(Oxford,UK)的GRIDON平台,由Nabsys(Providence,RI)开发的杂交辅助的纳米孔测序(HANS)平台和具有DNA纳米球(DNB)技术(称为探针-锚连接(cPAL))的基于连接酶的DNA测序平台),用于单分子测序的基于电子显微镜的技术,以及离子半导体测序。

[0038] 所述方法可以包括诱导患者的自体抗原呈递细胞(APC),以呈递突变的氨基酸序列。所述APC可以包括呈递与其细胞表面上的主要组织相容性复合体(MHC)分子结合的蛋白的肽片段的任何细胞。APC可以包括例如巨噬细胞、DC、朗格汉斯(langerhans)细胞、B淋巴细胞和T细胞中的任何一种或多种。优选地,所述APC是DC。通过使用来自患者的自体APC,本发明的方法可以有利地鉴定对由在患者表达的MHC分子的环境下所呈递的癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列具有抗原特异性的TCR和其抗原结合部分。MHC分子可以是患者表达的任何MHC分子,包括但不限于:I类MHC、II类MHC、HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-DM、HLA-DO、HLA-DP、HLA-DQ和HLA-DR分子。本发明的方法可以有利地鉴定在患者表达的任何MHC分子的环境下所呈递的突变的氨基酸序列,而不使用例如表位预测算法来鉴定MHC分子或突变的氨基酸序列,其可以仅用于选择少数I类MHC等位基因,并且可能受限于选择突变反应性T细胞的试剂的有限利用度(例如,不完全的MHC四聚体组)。因此,在本发明的一个实施方案中,本发明的方法有利地鉴定在患者表达的任何MHC分子的环境下所呈递的突变的氨基酸序列,并且不限于任何特定的MHC分子。优选地,自体APC是抗原阴性自体APC。

[0039] 可以使用本领域已知的任何合适的方法诱导患者的自体APC以呈递突变的氨基酸序列。在本发明的一个实施方案中,诱导患者的自体APC以呈递突变的氨基酸序列,包括用包含突变的氨基酸序列的肽或肽库来脉冲自体APC,所述肽库中的各个肽包含不同的突变的氨基酸序列。所述肽库中的各个突变的氨基酸序列可以由含有癌症特异性突变的基因编

码。在这点上，自体APC可以与包含突变的氨基酸序列的肽或肽库以使得APC内化所述肽并在细胞膜上显示结合到MHC分子上的突变的氨基酸序列的方式进行培养。在鉴定多于一个基因，每个基因含有编码突变的氨基酸序列的癌症特异性突变的一个实施方案中，所述方法可以包括用肽库脉冲自体APC，所述肽库中每个肽包含不同的突变的氨基酸序列。脉冲APC的方法是本领域已知的，并且描述于例如Solheim(Ed.)，Antigen Processing and Presentation Protocols(Methods in Molecular Biology)，Human Press，(2010)。用以脉冲APC的肽可以包括由癌症特异性突变编码的突变的氨基酸。所述肽还进一步包括在突变的氨基酸的每个羧基侧和氨基侧上的来自由鉴定的基因编码的内源蛋白的任何合适数量的连续氨基酸。在突变每一侧的侧翼的来自内源蛋白的连续氨基酸的数量不受限制，并且可以是例如，约4、约5、约6、约7、约8、约9、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约16、约17、约18、约19、约20，或由前述值中的任意两个所定义的范围。优选地，所述肽包括在突变的氨基酸的每一侧上的来自内源蛋白的约12个连续氨基酸。

[0040] 在本发明的一个实施方案中，诱导患者的自体APC以呈递突变的氨基酸序列，包括将编码突变的氨基酸序列的核苷酸序列引入到APC中。将核苷酸序列引入APC中，使得APC在细胞膜上表达并显示结合到MHC分子上的突变的氨基酸序列。编码突变的氨基酸的核苷酸序列可以是RNA或DNA。将核苷酸序列引入到APC中，可以按本领域已知的多种不同方式中任一种进行，其描述于，例如Solheim等人(同上)。可用于将核苷酸序列引入到APC的技术的非限制性实例，包括转化、转导、转染和电穿孔。在鉴定多于一个基因的实施方案中，所述方法可以包括制备多于一个核苷酸序列，各自编码由不同基因编码的突变的氨基酸序列，并将各个核苷酸序列引入到不同的自体APC群中。在这方面，可以获得多个自体APC群，每个群表达和展示不同的突变的氨基酸序列。

[0041] 在鉴定多于一个基因，每个基因含有编码突变的氨基酸序列的癌症特异性突变的实施方案中，所述方法可以包括引入编码多于一个基因的核苷酸序列。在这方面，在本发明的一个实施方案中，引入到自体APC的核苷酸序列是TMG构建体，每个小基因包含不同的基因，各个基因包括编码突变的氨基酸序列的癌症特异性突变。如本文关于本发明的其他方面所述，每个小基因可以编码由本发明的方法鉴定的一个突变，突变的每侧侧翼连接有任何合适数量的来自由鉴定的基因编码的内源蛋白的连续氨基酸。构建体中的小基因的数量没有限制，并且可以包括例如，约5、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约20、约25、或更多，或由前述值中的任意两个所限定的范围。所述APC在细胞膜上表达由所述TMG构建体编码的突变的氨基酸序列并显示突变的氨基酸序列(其结合到MHC分子)。在一个实施方案中，所述方法可以包括制备多于一个TMG构建体，每个构建体编码不同组的由不同基因编码的突变的氨基酸序列，并将每个TMG构建体引入到不同的自体APC群。在这方面，可以得到多个自体APC群，各个群表达和显示由不同TMG构建体编码的突变的氨基酸序列。

[0042] 所述方法可以包括用呈递突变的氨基酸序列的自体APC培养患者的自体T细胞。T细胞可以从患者中许多来源获得，包括但不限于：肿瘤、血液、骨髓、淋巴结、胸腺、或其它组织或流体。T细胞可以包括任何类型的T细胞并且可以是任何发育阶段，包括但不限于：CD4+/CD8+双阳性T细胞、CD4+辅助性T细胞(例如Th1和Th2细胞)、CD8+T细胞(例如、细胞毒性T细胞)、肿瘤浸润细胞(例如、肿瘤浸润淋巴细胞(TIL))、外周血T细胞、记忆T细胞、初始T细胞等。T细胞可以是CD8+T细胞、CD4+T细胞、或CD4+T细胞和CD8+T细胞二者。所述方法可包括

将自体T细胞和自体APC共培养，以使T细胞遇到由APC以这样的方式呈递的突变的氨基酸序列，即自体T细胞特异性结合并免疫识别由APC呈递的突变的氨基酸序列。在本发明的一个实施方案中，自体T细胞与自体APC直接接触共培养。

[0043] 所述方法可以包括选择此类自体T细胞，其：(a)与呈递突变的氨基酸序列的自体APC共培养，并且(b)对在患者表达的MHC分子的环境下所呈递的突变的氨基酸序列具有抗原特异性。如本文所用，短语“抗原特异性”是指，由所述自体T细胞表达的TCR或其抗原结合部分可特异性结合并免疫识别由癌症特异性突变所编码的突变的氨基酸序列。所述选择可以包括鉴定对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞，并将它们与对突变的氨基酸序列不具有抗原特异性的T细胞分离。可以按任何合适的方式来选择对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的自体T细胞。在本发明的一个实施方案中，所述方法包括扩增自体T细胞的数量，例如在选择自体T细胞之前，通过与T细胞生长因子如白细胞介素(IL)-2或IL-15共培养，或如本文中关于本发明其它方面中所述。在本发明的一个实施方案中，所述方法不包括在选择自体T细胞之前，用T细胞生长因子如IL-2或IL-15扩增自体T细胞的数量。

[0044] 例如，在与呈递突变的氨基酸序列的APC共培养自体T细胞时，对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞可表达各种T细胞活化标志物中的任意一种或多种，所述标志物可被用于鉴定对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞。此类T细胞活化标志物可包括但不限于：程序性细胞死亡因子1(PD-1)、淋巴细胞活化基因3(LAG-3)、T细胞免疫球蛋白和粘蛋白结构域3(TIM-3)、4-1BB、OX40和CD107a。因此，在本发明的一个实施方案中，选择对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的自体T细胞，包括选择表达以下物质中任何一种或多种的T细胞：PD-1、LAG-3、TIM-3、4-1BB、OX40和CD107a。表达一种或多种T细胞活化标志物的细胞，可以基于标志物的表达，采用本领域已知的各种技术中任一种进行分选，例如，荧光激活的细胞分选(FACS)或磁激活的细胞分选(MACS)，其描述于例如，Turcotte等人，Clin.Cancer Res.,20(2):331-43(2013)以及Gros等人，J.Clin.Invest.,124(5):2246-59(2014)。

[0045] 在本发明的另一个实施方案中，选择对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的自体T细胞，包括选择这样的T细胞：(i)相比由阴性对照分泌的一种或多种细胞因子的量，在与呈递突变的氨基酸序列的APC共培养时分泌更多量的一种或多种细胞因子，或者(ii)相比分泌一种或多种细胞因子的阴性对照T细胞的数量，其中在与呈递突变的氨基酸序列的APC共培养时至少两倍数量的T细胞分泌一种或多种细胞因子。所述一种或多种细胞因子可以包括任何的细胞因子，通过T细胞分泌所述细胞因子是T细胞活化的特性(例如，由特异性结合并免疫识别突变的氨基酸序列的T细胞表达的TCR)。细胞因子的非限制性实例(细胞因子的分泌是T细胞活化的特征)包括：IFN-γ、IL-2和肿瘤坏死因子α(TNF-α)、粒细胞/单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-17和IL-22。

[0046] 例如，如果相比于阴性对照分泌的IFN-γ的量，在与以下物质共培养时所述T细胞、或表达所述TCR或其抗原结合部分的T细胞分泌至少两倍的IFN-γ：(a)用一定浓度的包含突变的氨基酸序列的肽(例如，约0.05ng/mL至约10μg/mL，例如，0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL、100ng/mL、1μg/mL、5μg/mL或10μg/mL)脉冲的抗原-阴性APC，或(b)其中导入有编码突变的氨基酸序列的核苷酸序列的APC，则TCR或其抗原结合部分，或者表达所述TCR或其抗原结合部分的T细胞可以被认为是对突变的氨基酸序列具有“抗原特异

性”。阴性对照可以是，例如(i)表达TCR或其抗原结合部分的T细胞，其与以下物质共培养：(a)用相同浓度的不相关肽(例如，野生型氨基酸序列，或一些具有与突变的氨基酸序列不同的序列的其他肽)脉冲的抗原-阴性APC，或(b)其中导入有编码不相关肽序列的核苷酸序列的APC，或者(ii)与以下物质共培养的未转导的T细胞(例如，来自不表达TCR或其抗原结合部分的PBMC)：(a)用相同浓度的包含突变的氨基酸序列的肽脉冲的抗原-阴性APC，或(b)其中导入有编码突变的氨基酸序列的核苷酸序列的APC。如果相比于阴性对照(例如，如上所述的任一阴性对照)，在与用较高浓度的包含突变的氨基酸序列的肽脉冲的抗原-阴性APC共培养时，T细胞或表达TCR或其抗原结合部分的T细胞分泌更多量的IFN-γ，则TCR或其抗原结合部分，或表达所述TCR或其抗原结合部分的T细胞也可对突变的氨基酸序列具有“抗原特异性”。可通过本领域已知的方法，例如酶联免疫吸附测定(ELISA)来测量IFN-γ分泌。

[0047] 可选地或另外地，如果相比于分泌IFN-γ的阴性对照T细胞的数量，在与以下物质共培养时至少两倍数量的T细胞或表达TCR或其抗原结合部分的T细胞分泌IFN-γ：(a)用一定浓度的包含突变的氨基酸序列的肽脉冲的抗原-阴性APC，或(b)其中导入有编码突变的氨基酸序列的核苷酸序列的APC，则TCR或其抗原结合部分，或者表达所述TCR或其抗原结合部分的T细胞，可以被认为是对突变的氨基酸序列具有“抗原特异性”。肽的浓度和阴性对照可以如本文中关于本发明其它方面所述。可以通过本领域已知的方法(例如ELISPOT)来测量分泌IFN-γ的细胞数量。

[0048] 而对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞，可以既(1)表达本文所述的任何一种或多种T细胞活化标志物，也(2)分泌如本文所述的更多量的一种或多种细胞因子，在本发明的实施方案中，对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞，可以表达任何一种或多种T细胞活化标志物而不分泌更多量的一种或多种细胞因子，或者可以分泌更多量的一种或多种细胞因子而不表达任何一种或多种T细胞活化标志物。

[0049] 在本发明的另一个实施方案中，选择对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的自体T细胞，包括选择性培育对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的自体T细胞。在这方面，所述方法可以包括以这样的方式将自体T细胞与自体APC共培养，即相比于对突变的氨基酸序列不具有抗原性特异性的T细胞，该方式有利于对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞的生长。因此，提供了这样的T细胞群，其中相比于对突变的氨基酸序列不具有抗原特异性的T细胞，对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞所占的比例较高。

[0050] 在本发明的一个实施方案，所述方法进一步包括获得来自患者肿瘤的多个碎块，分别地将来自所述多个碎块中每一个的自体T细胞与本文中针对本发明其它方面所描述的呈递突变的氨基酸序列的自体APC共培养，并分别评估对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的来自所述多个碎块中每一个的T细胞(如本文中针对本发明其它方面所述)。

[0051] 在本发明的一个实施方案中，其中将T细胞与表达多个突变的氨基酸序列(例如，由TMG构建体编码的多个突变的氨基酸序列或在脉冲到自体APC的肽库中的多个突变的氨基酸序列)的自体APC共培养，选择所述自体T细胞还进一步包括分别评估对多个突变的氨基酸序列中的每个具有抗原特异性的自体T细胞。例如，本发明的方法还进一步包括分别诱导患者的自体APC以呈递由所述构建体编码的各个突变的氨基酸序列(或包括在所述肽库中的)(如本文中针对本发明其它方面所述)(例如，通过提供分别的APC群，其各个呈递由所

述构建体编码的不同的突变的氨基酸序列(或包括在所述肽库中的))。所述方法还进一步包括分别地将患者的自体T细胞与呈递各个突变的氨基酸序列的自体APC的不同群共培养(如本文中针对本发明其它方面所述)。所述方法还进一步包括分别选择这样的自体T细胞,其:(a)是与呈递突变的氨基酸序列的自体APC共培养,并且(b)对在患者表达的主要组织相容性复合体(MHC)分子的环境下所呈递的突变的氨基酸序列具有抗原特异性,如本文中针对本发明其它方面所述。在这方面,所述方法可以包括确定其中由编码多个突变的氨基酸序列(或包括在所述肽库中的)的TMG构建体编码的突变的氨基酸序列被自体T细胞免疫识别(例如,通过消除处理)。

[0052] 方法可进一步包括从所选的自体T细胞中分离编码TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列,其中TCR或其抗原结合部分对由癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列具有抗原特异性。在本发明的一个实施方案中,在分离编码TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列之前,可以扩增对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的所选自体T细胞的数量。扩增T细胞的数量,可以通过众多本领域公知的方法中任一方法来实现,其描述于例如,美国专利第8,034,334号;美国专利第8,383,099号;美国专利申请公开第2012/0244133号;Dudley等人,J.Immunother.,26:332-42(2003);以及Riddell等人,J.Immunol.Methods,128:189-201(1990)。在一个实施方案中,通过将T细胞与OKT3抗体、IL-2和饲养PBMC(例如,经辐照的同种异体PBMC)培养来进行T细胞数量的扩增。在本发明的另一实施方案中,在分离编码TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列之前,所选的对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的自体T细胞的数量没有被扩增。

[0053] 如本文所用,TCR的“抗原结合部分”是指包含TCR的连续氨基酸的任何部分(其是TCR的一部分),只要该抗原结合部分特异性地结合到由如本发明其它方面所述的鉴定的基因编码的突变的氨基酸序列。术语“抗原结合部分”是指本发明的TCR的任何部分或片段,所述部分或片段保留了TCR(母体TCR)的生物学活性(其是TCR的一部分)。抗原结合部分包括,例如TCR的那些与亲本TCR相比时,以类似程度、相同程度或更高程度,保留了特异性结合突变的氨基酸序列或者检测、治疗或预防癌症的能力的部分。参考亲本TCR,官能部分可以包括,例如,亲本TCR的约10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%或更多。

[0054] 抗原结合部分可包括本发明TCR的α链和β链的任一个或两者的抗原结合部分,如包含本发明TCR的α链和/或β链的可变区的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3中的一个或多个的部分。在本发明的一个实施方案中,抗原结合部分可包括α链的CDR1(CDR1α)、α链的CDR2(CDR2α)、α链的CDR3(CDR3α)、β链的CDR1(CDR1β)、β链的CDR2(CDR2β)、β链的CDR3(CDR3β)的氨基酸序列,或其任意组合。优选地,抗原结合部分包含CDR1α、CDR2α和CDR3α的氨基酸序列;CDR1β、CDR2β和CDR3β的氨基酸序列;或本发明TCR的全部CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β的氨基酸序列。

[0055] 在本发明的一个实施方案中,抗原结合部分可以包括,例如,包括如上所列的CDR区的组合的本发明TCR的可变区。在这方面,抗原结合部分可包括本发明TCR的α链的可变区(Vα)的氨基酸序列、β链的可变区(Vβ)的氨基酸序列或者Vα和Vβ两者的氨基酸序列。

[0056] 在本发明的一个实施方案中,抗原结合部分可包括可变区和恒定区的组合。在这方面,抗原结合部分可包括本发明TCR的α链或β链、或α链和β链两者的全长。

[0057] 可以按本领域已知的任何合适的方式,从所选的自体T细胞中分离编码TCR或其抗

原结合部分的核苷酸序列。例如，方法可以包括使用已建立的分子克隆技术和试剂(例如，使用TCR-α和-β链恒定引物的cDNA末端的5'快速扩增(RACE)聚合酶链式反应(PCR))，从自体T细胞中分离RNA，并对TCR或其抗原结合部分进行测序。

[0058] 在本发明的一个实施方案，方法可以包括，采用如描述于Green等人(Eds.)，Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press;4th Ed.(2012)中已建立的分子克隆技术，将编码TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列克隆到重组表达载体中。出于本文目的，术语"重组表达载体"是指当构建体包含编码mRNA、蛋白、多肽或肽的核苷酸序列，并且载体与细胞在足以使得mRNA、蛋白、多肽或肽在细胞内表达的条件下相接触时，允许宿主细胞表达mRNA、蛋白、多肽或肽的遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体。本发明的载体，作为一个整体，不是天然存在的。然而，载体的部分可以是天然存在的。重组表达载体可以包含任何类型的核苷酸，这包括但不限于DNA和RNA，其可以是单链的或双链的，合成的或部分从天然来源获得的，并且其可以包含天然的、非天然的或改变的核苷酸。所述重组表达载体可以包含天然存在的、非天然存在的核苷酸间连接，或这两种类型的连接。优选地，所述非天然存在的或改变的核苷酸或者核苷酸间连接不妨碍载体的转录或复制。

[0059] 本发明的重组表达载体可以是任何合适的重组表达载体，并且可以用于转化或转染任何合适的宿主细胞。合适的载体包括那些设计用于繁殖和扩增、或用于表达或用于这二者的载体，如质粒和病毒。所述载体可以选自:转座子/转座酶、pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene,LaJolla,CA)、pET系列(Novagen,Madison,WI)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,Uppsala,Sweden)和pEX系列(Clontech,Palo Alto,CA)。也可以使用噬菌体载体，如λGT10、λGT11、λZap II(Stratagene)、λEMBL4和λNM1149。植物表达载体的实例包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。优选地，重组表达载体是病毒载体，例如逆转录病毒载体。

[0060] 通过本发明方法分离的TCR或其抗原结合部分可用于制备用于过继性细胞疗法的细胞。在这方面，本发明的一个实施方案提供了制备表达对由癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列具有抗原特异性的TCR或其抗原结合部分的细胞群的方法，所述方法包括，如本文中针对本发明其它方面所述的分离TCR或其抗原结合部分，以及将编码分离的TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列引入到PBMC中以获得表达TCR或其抗原结合部分的细胞。

[0061] 可以按本领域中已知的多种不同方式中的任一方式，将编码分离的TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列(例如，重组表达载体)引入到PBMC中，所述方式描述于例如Green等人(同上)。可用于将核苷酸序列引入到PBMC中的技术的非限制性实例包括转化、转导、转染和电穿孔。

[0062] 在本发明的一个实施方案中，所述方法包括将编码分离的TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列引入到患者自体的PBMC中。在这方面，通过本发明方法鉴定和分离的TCR或其抗原结合部分，可对于每个患者是个性化的。然而，在另一个实施方案中，本发明方法可以鉴定和分离对由频发性(也称为"热点")癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列具有抗原特异性的TCR或其抗原结合部分。在这方面，该方法可以包括将编码分离的TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列引入到对于患者为同种异体的PBMC中。例如，该方法可以包括将编

码分离的TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列引入到另一患者的PBMC中，所述另一患者的肿瘤在相同的MHC分子环境中表达相同的突变。

[0063] 在本发明的一个实施方案中，PBMC包括T细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞，例如，如本文中针对本发明其它方面所述的那些T细胞中的任何T细胞。不束缚于特定的理论或机理，据信，相比于更加分化的“较老的”T细胞，更少分化的“较年轻的”T细胞可能与更大的体内持久性、增殖和抗肿瘤活性中的任一种或多种相关。因此，本发明的方法可有利地鉴别和分离对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的TCR或其抗原结合部分，并将TCR或其抗原结合部分引入到“较年轻的”T细胞中，其中相比于可以分离TCR或其抗原结合部分的“较老的”T细胞（例如，在患者肿瘤中的效应细胞），“较年轻的”T细胞可提供更大的体内持久性、增殖和抗肿瘤活性中的任一种或多种。

[0064] 在本发明的一个实施方案中，该方法进一步包括扩增表达TCR或其抗原结合部分的PBMC的数量。例如，如本文针对本发明的其它方面所述，可以扩增PBMC的数量。在这方面，本发明的方法可有利地产生大量的对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞。

[0065] 本发明的另一个实施方案，提供了通过本文针对本发明的其它方面所述的方法中任一种分离的TCR或其抗原结合部分。本发明的一个实施方案提供了包含两种多肽（即多肽链）的TCR，所述多肽如TCR的α链、TCR的β链、TCR的γ链、TCR的δ链或其组合。本发明的另一个实施方案提供了包含如本文针对本发明的其它方面所述的一个或多个CDR区、一个或多个可变区、或者TCR的α链和β链中的一个或两者的TCR的抗原结合部分。本发明的TCR或其抗原结合部分的多肽可包括任何氨基酸序列，只要TCR或其抗原结合部分对由癌特异性突变编码的突变的氨基酸序列具有抗原特异性。

[0066] 本发明的另一个实施方案提供了根据如本文中针对本发明其它方面所述的方法中任一种制备的分离的细胞群。所述细胞群可以是异质群，其包含表达分离的TCR或其抗原结合部分的PBMC，以及至少一种其他的不表达分离的TCR或其抗原结合部分的细胞，例如宿主细胞（例如PBMC），或者除T细胞以外的细胞，例如B细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、红细胞、肝细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌细胞、脑细胞等。或者，细胞群可以是基本上同质的细胞群，其中细胞群主要包含表达分离的TCR或其抗原结合部分的PBMC（例如，基本上由PBMC组成）。细胞群也可以是克隆的细胞群，其中细胞群的所有细胞是单个表达分离的TCR或其抗原结合部分的PBMC的克隆，使得细胞群的所有细胞都表达分离的TCR或其抗原结合部分。在本发明的一个实施方案中，细胞群是包含如本文所述的表达分离的TCR或其抗原结合部分的PBMC的克隆细胞群。通过将编码分离的TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列引入到PBMC中，本发明的方法可有利地提供了包含高比例的表达分离的TCR并对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的PBMC细胞的细胞群。在本发明的一个实施方案中，约1％至约100％，例如约1％、约5％、约10％、约15％、约20％、约25％、约30％、约35％、约40％、约45％、约50％、约55％、约60％、约65％、约70％、约75％、约80％、约85％、约90％、约95％、约96％、约97％、约98％、约99％、或约100％，或前述值中任何两个所限定的范围的细胞群，包含表达分离的TCR并对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的PBMC细胞。不受特定理论或机理的束缚，据信包含高比例的表达分离的TCR并对突变的氨基酸序列具有抗原特异性的PBMC细胞的细胞群，具有较低比例的可能阻碍PBMC细胞功能（例如，PBMC细胞靶向破坏癌细胞和/或治疗或预防癌症的能力）的不相关细胞。

[0067] 本发明的TCR或其抗原结合部分以及细胞群可以被配制成组合物，如药物组合物。在这方面，本发明提供了包含本发明的TCR或其抗原结合部分或细胞群中任一种以及药学上可接受的载体的药物组合物。本发明的药物组合物可以包含与另外的药学活性剂或药物(如化学治疗剂，例如，天冬酰胺酶、白消安(busulfan)、卡铂、顺铂、柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、氟尿嘧啶、吉西他滨(gemcitabine)、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱、长春新碱等)组合的本发明的TCR或其抗原结合部分或者细胞群。

[0068] 优选地，所述载体是药学上可接受的载体。对于药物组合物，载体可以是所考虑的那些常规用于特定的本发明的TCR或其抗原结合部分或细胞群的任一种载体。这类药学上可接受的载体是本领域技术人员公知的，且很容易提供给公众。优选地，所述药学上可接受的载体是在使用条件下无有害副作用或毒性的载体。

[0069] 部分地将由特定的本发明的TCR、其抗原结合部分、或细胞群以及用于施用本发明的TCR、其抗原结合部分、或细胞群的具体方法来确定载体的选择。因此，存在多种本发明药物组合物的合适制剂。合适的制剂可以包括那些用于口服、肠胃外、皮下、静脉内、肌内、动脉内、鞘内或腹膜内施用的制剂中任一种。多于一种的途径可用于施用本发明的TCR或细胞群，并且在某些情况下，特定途径可提供比另一种途径更直接和更有效的反应。

[0070] 优选地，本发明的TCR、其抗原结合部分、或细胞群通过注射施用，例如，静脉内施用。当要施用本发明的细胞群时，用于注射的所述细胞的药学上可接受的载体，可以包括任何等渗载体，例如，生理盐水(约0.90％w/v的NaCl水溶液，约300mOsm/L的NaCl水溶液，或每升水约9.0g的NaCl)、NORMOSOL R电解液(Abbott,Chicago,IL)、PLASMA-LYTE A(Baxter,Deerfield,IL)、约5％右旋糖水溶液或乳酸林格氏液。在一个实施方案中，药学上可接受的载体中补充有人血清白蛋白。

[0071] 可以预期的是，本发明的TCR、其抗原结合部分、细胞群和药物组合物可用于治疗或预防癌症的方法。不受特定理论或机制的束缚，本发明的TCR或其抗原结合部分，被认为是特异性地结合由癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列，使得TCR或其抗原结合部分(当其通过细胞表达时)能够介导针对表达突变的氨基酸序列的靶细胞的免疫应答。在这方面，本发明提供了治疗或预防哺乳动物的癌症的方法，其包括以能有效地治疗或预防哺乳动物的癌症的量向哺乳动物施用如本文所述的药物组合物、TCR、其抗原结合部分、或细胞群中的任一种。

[0072] 如本文所用，术语“治疗”和“预防”以及由此衍生的词语，并不一定意味着100％或完全的治疗或预防。相反，存在被本领域普通技术人员识别为具有潜在益处或治疗效果的不同程度的治疗或预防。在这方面，本发明的方法可以提供对哺乳动物中癌症的任何水平的任何量的治疗或预防。此外，本发明的方法提供的治疗或预防可包括对被治疗或预防的癌症的一种或多种病况或症状的治疗或预防。例如，治疗或预防可以包括促进肿瘤的消退。此外，出于本文的目的，“预防”可以包括延迟癌症或其症状或其病况的发作。

[0073] 出于本发明的目的，所施用的本发明的TCR、其抗原结合部分、细胞群或药物组合物的数量或剂量(例如，当施用本发明的细胞群时的细胞数量)应足以在合理的时间框架内在哺乳动物中起作用(例如，治疗或预防性应答)。例如，本发明的TCR、其抗原结合部分、细胞群或药物组合物的剂量应足以结合到由癌症特异性突变编码的突变的氨基酸序列，或从

施用时间起在约2小时或更长时间(例如,12至24小时或更长时间)的期间检测、治疗或预防癌症。在某些实施方案中,时间段可以是甚至更长。通过所施用的特定的本发明的TCR、其抗原结合部分、细胞群或药物组合物的功效和哺乳动物(例如人)的病况,以及待治疗的哺乳动物(例如人)的体重来确定剂量。

[0074] 用于确定施用剂量的许多测定方法在本领域是已知的。出于本发明的目的,一种测定方法,其包括当向哺乳动物组(其各自给予不同剂量的T细胞)中的哺乳动物施用给定剂量的此类T细胞时,比较靶细胞被溶解或表达本发明的TCR或其抗原结合部分的T细胞分泌的IFN-γ的程度,这种测定方法可用于确定向哺乳动物施用的起始剂量。当施用一定剂量时,靶细胞被溶解或T细胞分泌的IFN-γ的程度可通过本领域已知的方法来测定。

[0075] 也可以通过可能伴随特定的本发明的TCR、其抗原结合部分、细胞群或药物组合物施用的任何不良副作用的存在、性质和程度来确定本发明的TCR、其抗原结合部分、细胞群或药物组合物的剂量。通常,主治医师将考虑各种因素如年龄、体重、健康状况、饮食、性别、待施用的本发明的TCR、其抗原结合部分、细胞群或药物组合物、施用途径以及受治疗的病况的严重程度来决定用于治疗各个个体患者的本发明的TCR、其抗原结合部分、细胞群或药物组合物的剂量。

[0076] 在一个实施方案中,其中待施用的本发明细胞群、每次输注所施用的细胞数量可以变化,例如100万至1000亿个细胞;然而,低于或高于该示例性范围的量都在本发明的范围之内。例如,本发明的宿主细胞的每日剂量可以是约100万至约1500亿个细胞(例如,约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞、约600亿个细胞、约800亿个细胞、约1000亿个细胞、约1200亿个细胞、约1300亿个细胞、约1500亿个细胞或由前述值中任意两个所限定的范围),优选约1000万至约1300亿个细胞(例如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞、约1000亿个细胞、约1100亿个细胞、约1200亿个细胞、约1300亿个细胞或由前述值中任意两个所限定的范围),更优选约1亿个细胞至约1300亿个细胞(例如,约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞、约1000亿个细胞、约1100亿个细胞、约1200亿个细胞,约1300亿个细胞或由前述值中任意两个所限定的范围)。

[0077] 出于本发明方法的目的,其中细胞群施用时,所述细胞对于哺乳动物可以是同种异体的细胞或是自体的细胞。优选地,所述细胞对于哺乳动物是自体的细胞。

[0078] 本发明的另一个实施方案提供了用于治疗或预防哺乳动物的癌症的如本文所述的TCR、其抗原结合部分、分离的细胞群或药物组合物中的任一种。

[0079] 癌症可以有利地是任何癌症,包括以下任一种:急性淋巴细胞癌、急性骨髓性白血病、腺泡状横纹肌肉瘤、骨癌、脑癌、乳腺癌,肛门、肛管或肛门直肠的癌症,眼癌、肝内胆管癌、关节癌,颈部、胆囊或胸膜的癌症,鼻、鼻腔或中耳的癌症,口腔癌、阴道癌、外阴癌、胆管癌、慢性淋巴细胞白血病、慢性髓细胞癌、结肠癌、食道癌、子宫颈癌、胃肠道良性肿瘤、神经胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌、恶性间皮瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、口咽癌、卵巢癌、阴茎癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌和肠系膜癌、

咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、输尿管癌、膀胱癌、实体瘤和液体肿瘤。优选地，所述癌症是上皮癌。在一个实施方案中，所述癌症是胆管癌、黑素瘤、结肠癌或直肠癌。

[0080] 在本发明方法中提到的哺乳动物可以是任何哺乳动物。如本文所用，术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物，包括但不限于：啮齿目哺乳动物如小鼠和仓鼠，以及兔形目的哺乳动物如兔。优选的哺乳动物来自食肉目，包括猫科(猫)和犬科(狗)。优选地，哺乳动物来自偶蹄目，包括牛科(牛)和猪科(猪)，或者奇蹄目，包括马科(马)。优选地，所述哺乳动物是灵长目、猿目(Ceboids)或猴目(Simoids)(猴)、或类人猿目(人和类人猿)。更优选的哺乳动物是人类。在特别优选的实施方案中，所述哺乳动物是表达癌症特异性突变的患者。

[0081] 下面的实施例进一步说明本发明，但当然不应解释为以任何方式限制其范围。

实施例

[0082] 以下给出实施例1-7的材料和方法。

[0083] 全外显子组测序

[0084] 通过个人基因组诊断(Personal Genome Diagnostics)(PGDx,Baltimore,MD)进行冷冻保存的肿瘤组织(包埋于OCT)和正常外周血细胞的全外显子组测序，其描述于Jones等人，Science 330:228-231(2010)。对于肿瘤和正常(PBMC)的DNA，在各个碱基的明显高质量序列读取的平均数分别为155和160。

[0085] 患者治疗和用于过继性细胞疗法的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的产生

[0086] 患者3737招募自伦理委员会(IRB)批准的协议：“在转移性消化道癌中经淋巴耗尽方案后，采用短期培养的自体肿瘤浸润淋巴细胞进行II期研究”(试验登记ID：NCT01174121)，其被设计为评估在胃肠道癌患者中自体的离体扩增的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)的过继性转移的安全性和有效性。

[0087] 如Jin等人，J.Immunother.,35:283-292(2012)所述，产生用于患者第一治疗的TIL。简言之，将切除的肿瘤被细切成大约1-2mm的碎块，并将单个碎块置于容纳有2ml含有高剂量IL-2(6000IU/ml,Chiron,Emeryville,CA)的完全培养基(CM)的24孔板的孔中。CM由补充有10％的自有(in-house)人血清、2mM的L-谷氨酰胺、25mM的HEPES和10μg/ml庆大霉素的RPMI组成。另外，将混合瘤消化产物培养在含有高剂量IL-2的CM中。T细胞开始长出后(2-3周之间)，将来自所选择的培养物的5×10^6个T细胞，在采用辐照的同种异体PBMC以1比100的比例于400ml的补充有5％人AB血清、3000IU/ml的IL-2和30ng/ml的OKT3抗体(Miltenyi Biotec,Bergisch Gladbach,Germany)的50/50培养基中于气体可渗透的G-Rex100瓶内进行快速扩增。50/50培养基是由CM与AIM-V的1:1混合物组成。所有细胞在37℃、5％的CO_2下进行培养。在输注前两周快速扩增细胞数量。在接收424亿个总T细胞以及4个剂量的高剂量IL-2之前，患者3737经历了由环磷酰胺和氟达拉滨(fludarabine)组成的非清髓性淋巴耗尽方案。

[0088] 以与第一治疗类似的方式，产生用于患者的第二治疗的TIL，并有以下改变。第一治疗产物(患者3737-TIL)由5个单独的TIL培养物组合而成。单独评估这5个培养物的CD4和Vβ22表达以及对突变ERBB2IP的反应性，并且发现，在一个培养中Vβ22+ERBB2IP突变反应性CD4+T细胞高度富集。如上所述，然后，将这一TIL培养物(在初始生长后有高剂量IL-2)快速

扩增。在接收1260亿个总T细胞以及4个剂量的高剂量IL-2之前，患者3737经历了和第一治疗相同的非清髓性淋巴耗尽方案。

[0089] TMG构建体的生成

[0090] 简言之，对于由全外显子组测序鉴定的各个非同义替换突变，制造了编码相应的氨基酸变化并侧接有野生型蛋白序列的12个氨基酸的“小基因”构建体。多个小基因被基因融合在一起以产生TMG构建体。对这些小基因构建体进行密码子优化，并合成为DNA串构建体(Life Technologies,Carlsbad CA)。然后采用In-Fusion技术(Clontech,Mountain View,CA)将TMG克隆到pcDNA3.1载体。使用定点诱变以产生9个“野生型逆转”的TMG-1构建体(Gene Oracle,Mountain View,CA)。所有TMG的核苷酸序列通过标准Sanger测序(Macrogen和Gene Oracle)进行验证。

[0091] 自体APC的产生

[0092] 采用塑料粘附法产生单核细胞衍生的未成熟的DC。简言之，将自体提取的样品解冻、洗涤，并用纯AIM-V培养基(Life Technologies)设定为5-10×10^6个细胞/ml，然后以约1×10^6个细胞/cm^2在适当大小的组织培养烧瓶中进行孵育并于37℃、5％的CO_2下进行孵育。90分钟(min)后，收集非贴壁细胞，并且用AIM-V培养基剧烈洗涤烧瓶，然后用AIM-V培养基再孵育60min。然后用AIM-V培养基再次剧烈洗涤烧瓶，然后用DC培养基孵育贴壁细胞。DC培养基包含含有5％人血清(收集并自己处理的)、100U/ml的青霉素和100μg/ml的链霉素、2mM的L-谷氨酰胺、800IU/ml的GM-CSF和800U/ml的IL-4(培养基补充物来自Life Technologies，细胞因子来自Peprotech)的RPMI。第3天，将新鲜的DC培养基加入到培养物中。在初始刺激后的5-7天，在实验中使用新鲜的或冷冻/解冻的DC。在所有实验中，采用流式细胞术用以对表达CD11c、CD14、CD80、CD86和HLA-DR(均来自BD Bioscience)的细胞进行分型，以确保细胞主要是未成熟的DC(CD11c+、CD14-、$CD80^{低}$、CD86+和HLA-DR+；数据未示出)。

[0093] 采用CD40L和IL-4刺激法产生抗原呈递B细胞。简言之，使用人CD19微珠(Miltenyi Biotec)以从自体提取的样品正选择B细胞。然后将CD19+细胞与稳定表达CD40L的辐照(6000拉德)的3T3细胞(3T3-CD40L)以大约1:1的比例在B细胞培养基中培养。B细胞培养基包含补充有7.5-10％人血清(自有)的IMDM培养基(Life Technologies)、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素(Life Technologies)、10μg/mL庆大霉素(CellGro,Manassas,VA)、2mM的L-谷氨酰胺(Life Technologies)和200U/ml的IL-4(Peprotech)。第3天开始加入新鲜的B细胞培养基，并且在之后每2-3天添加或更换培养基。根据需要还加入另外的辐照的3T3-CD40L饲养细胞。在初始刺激后2-3周将抗原呈递B细胞用于实验中。

[0094] 产生体外转录的RNA(IVT)RNA

[0095] 用限制性内切酶Sac II将编码串联小基因的质粒线性化。用Not I将编码GFP的对照pcDNA3.1/V5-His-TOPO载体线性化。用EDTA、乙酸钠和乙醇沉淀终止限制性消化。通过标准的琼脂糖凝胶电泳来验证完整的质粒消化物。按照制造商的指示，使用Message Machine T7Ultra试剂盒(Life Technologies)，将约1μg线性化的质粒用于产生IVT RNA。使用氯化锂法沉淀RNA，并且使用NanoDrop分光光度计评估RNA的纯度和浓度。然后将RNA等分至微管中，并储存于-80℃直至使用。

[0096] RNA转染

[0097] 收获APC(DC或B细胞)，用PBS洗涤一次，然后以10-30×10^6个细胞/ml重悬于Opti-MEM(Life Technologies)中。将IVT RNA(4μg或8μg)等分到2mm间隙的电穿孔槽底部，并将50μl或100μl的APC直接加入到该电穿孔槽。因此，在电穿孔中使用的最终RNA浓度为80μg/mL。使用BTX-830的方波电穿孔仪进行电穿孔。将DC用150V，10ms，1个脉冲进行电穿孔，并将B细胞用150V，20ms，1个脉冲进行电穿孔。如用GFP RNA(数据未示出)所评估，采用这些设置的转染效率通常为70％-90％。所有步骤都在室温下进行。在电穿孔之后，将细胞立即转移至容纳有补充了合适细胞因子的DC细胞或B细胞培养基的聚丙烯管中。转染的细胞在37℃、5％CO_2下过夜(12-14h)孵育。细胞在用于共培养测定前，用PBS洗涤一次。

[0098] 肽脉冲

[0099] 收获自体B细胞，洗涤，然后以1×10^6个细胞/ml重悬于补充有IL-4的B细胞培养基中，然后在37℃、5％CO_2下，用1μg/ml的25-mer肽孵育过夜(12-14h)。脉冲过夜后，然后用PBS洗涤B细胞两次，然后重悬于T细胞培养基中，并立即用于共培养测定法中。所用的肽为：突变的ERBB2IP(TSFLSINSKEETGHLENGNKYPNLE(SEQ ID NO:73))；野生型ERBB2IP(TSFLSINSKEETEHLENGNKYPNLE(SEQ ID NO:45))；以及作为阴性对照的，突变的ALK(RVLKGGSVRKLRHAKQLVLELGEEA(SEQ ID NO:46))。突变ERBB2IP肽购自三个不同来源(GenScript,Piscataway,NJ、Peptide 2.0,Chantilly,VA以及SelleckChem,Houston TX)并且均产生相同的体外结果，而野生型ERBB2IP和突变的ALK肽购自Peptide 2.0。为了培养同种异体EBV-B细胞，使用含有10％的FBS、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素(Life Technologies)、10μg/ml庆大霉素(CellGro)和2mM的L-谷氨酰胺的RPMI培养基，以代替B细胞培养基。

[0100] T细胞分选、扩增和克隆

[0101] 在需要细胞分选的所有实验中使用BD FACSAria IIu和BD FACSJazz。在指定实验中，利用过量辐照(4000拉德)的同种异体饲养细胞(汇合三个不同供体的白细胞清除样品)，在含有30ng/ml抗-CD3抗体(OKT3)和3000IU/ml的IL-2的50/50培养基中，扩增所分选的T细胞。以每孔5e4饲养细胞和每孔1-2个T细胞的上述刺激条件，在96孔圆底平板中进行有限稀释克隆。在刺激后大约1周开始交换培养基，然后每隔一天或按需要交换培养基。初始刺激后大约2-3周，通常将细胞用于测定或进一步扩增。

[0102] 共培养测定：IFN-γ ELISPOT和ELISA，针对细胞表面活化标志物的流式细胞术，和细胞内细胞因子染色(ICS)

[0103] 当DC被用作APC时，96孔平底或圆底平板的各个孔使用大约3.5×10^4至7×10^4个DC。当B细胞被用作APC时，96孔圆底平板的各个孔使用大约2×10^5个细胞。在ELISPOT测定中，每个孔使用1×10^3至1×10^4个效应T细胞，并且在流式细胞术测定中，每个孔使用1×10^5效应T细胞。通常将T细胞解冻，并在含IL-2的50/50培养基(3000IU/ml的IL-2)中恢复两天，然后在共培养测定之前用PBS洗涤(3×)。在没有外源性添加细胞因子的情况下进行所有的共培养。对于所有测定，使用板结合的OKT3(0.1μg/ml或1μg/ml)作为阳性对照。

[0104] 在涉及HLA封闭性抗体的实验中，使用下列抗体：泛-II类(克隆：IVA12)、泛-I类(克隆：W6/32)、HLA-DR(克隆：HB55)、HLA-DP(克隆：B7/21)和HLA-DQ(克隆：SPV-L3)。与T细胞共培养之前，在37℃、5％CO_2下用20-50μg/ml的指定抗体封闭细胞1-2小时。T4是用对酪氨酸酶表位具有反应性的HLA-DR4限制性TCR转导的T细胞。DMF5是对MART-1具有反应性的

HLA-A2限制性T细胞系。624-CIITA是HLA-A2和HLA-DR4阳性黑素瘤细胞系，由于CIITA(II类，MHC，反式激活因子)的异位表达，其稳定表达MHC-II，并且对MART-1和酪氨酸酶表达呈阳性。

[0105] 对于IFN-γELISPOT测定法，简言之，将ELIIP平板(Millipore，MAIPSWU)每孔用50μl的70％乙醇预处理2分钟，用PBS洗涤3次，然后用50μl的10μg/ml的IFN-γ捕获抗体(Mabtech，克隆：1-D1K)包被，并在冰箱中孵育过夜。对于OKT3对照，用IFN-γ捕获抗体(10μg/ml)和OKT3(1μg/ml)的混合物包被孔。在共培养之前，用PBS将板洗涤3次，随后用50/50培养基在室温下(RT)封闭至少1小时。共培养20-24小时后，将细胞轻弹出平板，用PBS+0.05％吐温-20(PBS-T)洗涤6次，然后以100μl/孔用经0.22μm过滤的1μg/mL生物素化抗人IFN-γ检测抗体溶液(MABTECH，克隆：7-B6-1)于室温孵育2小时。然后将板用PBS-T洗涤3次，接着用100μl/孔的链霉亲和素-ALP(Mabtech，Cincinatti，OH，1:3000稀释)孵育1小时。然后用PBS将板洗涤6次，随后用100μl/孔的0.45μm过滤的BCIP/NBT底物溶液(KPL，Inc.)显色。通过用冷自来水彻底冲洗，停止反应。扫描ELISPOT平板并使用免疫斑点平板读取器和相关软件(Cellular Technologies，Ltd，Shaker Heights，OH)计数。

[0106] 在刺激后大约t＝22-26小时，通过流式细胞术评估T细胞活化标志物OX40和4-1BB的表达。简言之，将细胞丸粒化，用FACS缓冲液(补充有1％的FBS和2mM的EDTA的1X PBS)洗涤，然后于黑暗中在4℃用合适的抗体染色大约30分钟。在从BD FACSCanto II流式细胞仪上采集之前，用FACS缓冲液将细胞洗涤至少一次。所有数据均对活的(PI阴性的)单个细胞设门。

[0107] 使用细胞内细胞因子染色(ICS)和流式细胞术评估细胞因子产生。简言之，在靶细胞和效应细胞在96孔板的孔中合并后，将GolgiStop和GolgiPlug两者加入到培养物(BD Biosciences)中。按制造商建议浓度的1/2使用GolgiStop和GolgiPlug。在刺激后t＝6小时，根据制造商的说明书，使用Cytofix/Cytoperm试剂盒(BD Biosciences，San Jose，CA)处理细胞。简言之，使细胞丸粒化，用FACS缓冲液洗涤，然后将细胞表面标志物染色(如上所述)。然后在固定和透化之前，将细胞用FACS缓冲液洗涤2次。然后用Perm/Wash缓冲液洗涤细胞，并于黑暗中在4℃用针对细胞因子的抗体染色30分钟。在从FACSCantoII流式细胞仪上采集之前，将细胞用Perm/Wash缓冲液洗涤2次并重悬于FACS缓冲液中。使用FLOWJO软件(TreeStar Inc)分析所有流式细胞术数据。

[0108] 按照制造商(Thermo Scientific，Waltham，MA)的指导，使用人IFN-γELISA试剂盒检测血清样品中的IFN-γ。

[0109] 流式细胞术的抗体

[0110] 将以下滴定的抗人抗体用于细胞表面染色：CCR7-FITC(克隆：150503)，CD45RO-PE-Cy7(克隆：UCHL1)，CD62L-APC(克隆：DREG-56)，CD27-APC-H7(克隆：M-T271)，CD4-efluor 605NC(克隆：OKT4)，CD57-FITC(克隆：NK-1)，CD28-PE-Cy7(克隆：CD28.2)，CD127-APC(克隆：eBioRDR5)，CD3-AF700(克隆：UCHT1)，CD4-FITC，PE-Cy7，APC-H7(克隆：SK3)，CD8-PE-Cy7(克隆：SK1)，Vβ22-PE(克隆：IMMU 546)，Vβ5.2-PE(克隆：36213)，OX40-PE-Cy7或FITC(克隆：Ber-ACT35)，4-1BB-APC(克隆：4B4-1)和CD107a-APC-H7(克隆：H4A3)。除CD4-efluor605NC(eBioscience)、Vβ22-PE和Vβ5.2-PE(Beckman Coulter)，以及4-1BB-APC和OX40-PE-Cy7(BioLegend)之外，所有抗体均来自BD Biosciences。将下列最佳滴定的抗人

抗体用于细胞内细胞因子染色:IFN-γ-FITC(克隆:4S.B3),IL-2-APC(克隆:MQ1-17H12),TNF-PerCPCy5.5或APC(克隆:MAb11),IL-17-PE(克隆:eBio64DEC17)和IL-4-PE-Cy7(克隆:8D4-8)。除IL-4-PE-Cy7(BD Bioscience)之外,所有ICS抗体来自eBioscience。使用IO Mark B Mark TCR V试剂盒以评估全部TCR-Vβ(Beckman Coulter)。

[0111] ERBB2IP突变的测序

[0112] 用Sanger测序来验证通过全外显子组测序发现的ERBB2IP突变。使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen),从速冻T细胞或肿瘤组织(OCT块)提取总RNA。然后,使用ThermoScript逆转录酶与寡-dT引物(LifeTechnologies),将总RNA反转录成cDNA。然后在PCR中使用正常cDNA和肿瘤cDNA作为模板,并将以下ERBB2IP引物侧接于该突变:ERBB2IP Seq正向:5'-TGT TGA CTC AAC AGC CAC AG-3'(SEQ ID NO:47);以及ERBB2IP Seq反向:5'-CTG GAC CAC TTT TCT GAG GG-3'(SEQ ID NO:48)。使用Phusion DNA聚合酶(Thermo Scientific)和推荐的三步法(58℃的退火温度(15秒)和72℃延伸(30秒))。通过标准的琼脂糖凝胶电泳和凝胶提取(Clontech)分离PCR产物。使用相同的PCR引物(Macrogen)将产物直接测序。

[0113] 定量PCR

[0114] 使用RNeasy Mini试剂盒(Qiagen,Venlo,Netherlands)从速冻T细胞或肿瘤组织(OCT块)提取总RNA。然后,使用qScript cDNA超混合液(Quanta Biosciences,Gaithersburg,MD)将总RNA反转录成cDNA。针对人β-肌动蛋白(目录号#:401846)和ERBB2IP(目录号#:4331182)的基因特异性Taqman引物和探针集购自Life Technologies。使用7500快速实时PCR仪,采用TAQMAN Fast Advanced Master Mix(均来自Applied Biosystems)进行定量PCR。通过标准的琼脂糖凝胶电泳来验证扩增产物的特异性。所有计算的阈值循环数(Ct)为30或更低。

[0115] TCR-Vβ深度测序

[0116] 通过immunoSEQ(Adaptive Biotechnologies,Seattle,WA)对使用DNeasy血液和组织试剂盒(Qiagen)从外周血细胞、T细胞和冷冻肿瘤组织中分离出的基因组DNA进行TCR-Vβ深度测序。各个样品的总生产性TCR的读取数范围为279,482至934,672。仅将生产性TCR重排用于计算TCR频率。

[0117] TCR测序和ERBB2IP-突变反应性TCR的构建

[0118] 将T细胞丸粒化,并分离总RNA(RNeasy Mini试剂盒,Qiagen)。然后,按照制造商的指导(SMARTer RACE cDNA扩增试剂盒,Clontech),使用TCR-α和-β链恒定引物,使总RNA经历5'RACE。试剂盒的方案1被用于PCR,其中对延长时间有调整(2min,而不是3min)。α和β链恒定引物的序列是:TCR-α,5'-GCC ACA GCA CTG TGC TCT TGA AGT CC-3'(SEQ ID NO:49);TCR-β,5'-CAG GCA GTA TCT GGA GTC ATT GAG-3(SEQ ID NO:50)。然后通过标准琼脂糖凝胶电泳和凝胶提取(Clontech)分离TCR的PCR产物。然后将产物直接测序,或TOPO-TA克隆然后单个菌落测序(Macrogen)。对于已知Vβ22+T细胞克隆的测序,使用qScript cDNA超混合液(Quanta Biosciences)从RNA生成cDNA。然后,在PCR中使用这些cDNA作为模板,并使用TCR-β恒定引物(上述)和Vβ22特异性引物:5'-CAC CAT GGA TAC CTG GCT CGT ATG C-3'(SEQ ID NO:51)。通过标准琼脂糖凝胶电泳和凝胶提取(Clontech)分离PCR产物。将产物直接测序(Macrogen),使用巢式TCR-β链恒定引物:5'-ATT CAC CCA CCA GCT CAG-3'(SEQ ID NO:52)。

[0119] 通过将Vβ22+TCR-αV-D-J区与小鼠TCR-α恒定链融合并将Vβ22+TCR-β-V-D-J区与小鼠TCR-β恒定链融合，以完成Vβ22+ERBB2IP突变TCR的构建。α和β链被弗林蛋白酶(furin) SGSG P2A接头隔开。小鼠TCR恒定区的使用促进了引入的TCR的配对，并且也有利于使用对小鼠TCR-β链具有特异性的抗体(eBioscience)，通过流式细胞术来鉴定阳性转导的T细胞。合成TCR构建体并将其克隆到MSGV1逆转录病毒载体(Gene Oracle)中。

[0120] 外周血T细胞的TCR转导

[0121] 将自体提取的样品融化，并在T细胞培养基中设置为2×10^6个细胞/ml，所述T细胞培养基由RPMI培养基和补充有5％自有人血清、10μg/ml的庆大霉素(CellGro)、100U/ml的青霉素和100μg/ml的链霉素、1.25μg/ml两性霉素B(Fungizone)和2mM的L-谷氨酰胺(均来自Life Technologies)的AIM-V培养基的50/50混合物组成。逆转录病毒转导前，在24孔板中，用50ng/ml的可溶性OKT3(Miltenyi Biotec)和300IU/ml的重组人(rhu)IL-2(Chiron)刺激2×10^6个细胞(1ml)2天。为了产生瞬时逆转录病毒上清液，使用Lipofectamine 2000(Life Technologies)，将编码Vβ22阳性、ERBB2IP突变特异性TCR的逆转录病毒载体MSGV1(1.5μg/孔)以及包膜编码质粒RD114(0.75μg/孔)共转染进逆转录病毒包装细胞系293GP(6-孔聚-D-赖氨酸包被的板，每孔1×10^6个细胞，在转染前一天接种)。在转染后42-48h，收集逆转录病毒上清液，用DMEM培养基以1:1稀释，然后于32℃在2,000g下离心2小时到retronectin包被的(10μg/mL，Takara)、非组织培养处理的6-孔板。然后，活化的T细胞(每孔2×10^6个细胞，在含IL-2的T细胞培养基中为0.5×10^6个细胞/ml)，以300g离心10分钟到逆转录病毒板。将活化的T细胞过夜转导，从板中除去并进一步培养于含IL-2的T细胞培养基中。GFP和模拟转导对照包括在转导实验中。通常在逆转录病毒转导后10-14天分析细胞。

[0122] 实施例1

[0123] 该实施例表明了鉴定患者癌细胞的核酸中的一个或多个基因的方法，每个基因含有编码突变的氨基酸序列的癌症特异性突变。

[0124] 一名进行了多种化疗方案的患有广泛转移的胆管癌的43岁女性(患者(Pt.)3737)被登记到针对胃肠道(GI)癌患者的基于TIL的过继性细胞疗法(ACT)的方案中。患者3737的临床特性如表1所示。

[0125] 表1

[0126]

性别	年龄	主要的	转移位点	治疗之前	IL-2之前	采集位点*	ECOG+状态	HLA-I	HLA-II
F	43	肝内胆管癌(低分化的)	肺，肝	顺铂+吉西他滨，吉西他滨，泰索帝(taxotere)	无	肺	0	A*26 B*38 B*52 C*12	DRB1*0405 DRB1*1502 DQB1*0301 DQB1*0601 DPB1*0401 DPB1*10401

[0127] *用于产生TIL和全外显子组测序的采集位点

[0128] +功能状态:ECOG，东部肿瘤协作组

[0129] 将肺转移切除，并用作全外显子组测序和产生治疗用T细胞的来源。表2示出了由来自患者3737的转移性肺节结的全外显子组测序所鉴定的体细胞突变。通过苏木精和伊红(H&E)染色切片的病理分析估计肿瘤结节是大约70％的肿瘤。全外显子组测序揭示了26个非同义突变(表2)。

[0130] 表 2

基因符号	基因描述	转录物登记号	突变位置		突变类型	结果	% 突变读取*
			核苷酸(基因组的)	氨基酸(蛋白质)			
ALK	间变性淋巴瘤受体酪氨酸酸激酶	CCDS33172.1	chr2_29996620-29996620_C_T	137R>H	替换	非同义编码	30%
AR	雄激素受体	CCDS14387.1	chrX_66858483-66858483__C	NA	插入	移码	31%
CD93	CD93 分子	CCDS13149.1	chr20_23012929-23012929_C_T	634R>Q	替换	非同义编码	26%
DIP2C	DIP2 Disco-相互作用蛋白 2 同系物 C (果蝇)	CCDS7054.1	chr10_365545-365545_C_T	NA	替换	剪接位点受体	25%
ERBB2IP	Erbb2 相互作用蛋白	CCDS3990.1	chr5_65385316-65385316_A_G	805E>G	替换	非同义编码	59%
FCER1A	IgE 的 Fc 片段; 高亲和力 I; 受体对于; α 多肽	CCDS1184.1	chr1_157544227-157544227_G_C	219D>H	替换	非同义编码	30%
GRXCR1	谷氧还蛋白; 富含半胱氨酸 1	CCDS43225.1	chr4_42590102-42590102_C_T	21A>V	替换	非同义编码	18%
HLA-DOA	HLA II 类组织相容性抗原, DO α 链前体	CCDS4763.1	chr6_33085209-33085209_C_T	NA	替换	剪接位点供体	36%
KIF9	驱动蛋白家族成员 9	CCDS2752.1	chr3_47287859-47287859_T_C	155T>A	替换	非同义编码	20%
KLHL6	Kelch 样 6 (果蝇)	CCDS3245.2	chr3_184692410-184692413_CAGA_	NA	缺失	移码	20%

[0131]

基因符号	基因描述	转录物登记号	突变位置		突变类型	结果	% 突变读取*
			核苷酸(基因组的)	氨基酸(蛋白质)			
LHX9	LIM 同源框 9	CCDS1393.1	chr1_196164923-196164923_A_	NA	缺失	移码	21%
LONRF3	LON 肽酶 N-末端结构域和环指 3	CCDS35374.1	chrX_118007666-118007666_A_C	NA	替换	剪接位点供体	10%
NAGS	N-乙酰谷氨酸合成酶	CCDS11473.1	chr17_39440355-39440355_G_A	412R>H	替换	非同义编码	29%
NLRP2	NLR 家族，含脓素(pyrin)结构域 2	CCDS12913.1	chr19_60186650-60186650_G_T	591S>I	替换	非同义编码	32%
PDZD2	含 PDZ 结构域 2	CCDS34137.1	chr5_32124833-32124833_A_	NA	缺失	移码	30%
POU5F2	POU 结构域，类别 5，转录因子 2	NM_153216	chr5_93102847-93102847_A_C	60V>G	替换	非同义编码	34%
RAC3	ras-相关的 C3 肉毒杆菌毒素底物 3 (Rho 家族，小 GTP 结合蛋白 Rac3)	CCDS11798.1	chr17_77584690-77584690_C_A	125T>N	替换	非同义编码	27%
RAP1GDS1	RAP1，GTP-GDP 解离刺激因子 1	CCDS43253.1	chr4_99532209-99532209_C_A	198L>I	替换	非同义编码	19%
RASA1	RAS p21 蛋白活化剂(GTP 酶活化蛋白) 1	CCDS34200.1	chr5_86703757-86703757_C_T	589R>C	替换	非同义编码	63%
RETSAT	视黄醇饱和酶(全反式视黄醇 13，14-还原酶)	CCDS1972.1	chr2_85424308-85424308_C_T	553R>K	替换	非同义编码	11%

[0132]

基因符号	基因描述	转录物登记号	突变位置		突变类型	结果	% 突变读取*
			核苷酸(基因组的)	氨基酸(蛋白质)			
SEC24D	SEC24 家族; 成员 D (酿酒酵母)	CCDS3710.1	chr4_119872085-119872085_A_G	901M>T	替换	非同义编码	18%
SENP3	SUMO1/sentrin/SMT3 特异性肽酶 3	ENST00000321337	chr17_7408824-7408824_A_G	292M>V	替换	非同义编码	33%
SLIT1	slit 同系物 1 (果蝇)	CCDS7453.1	chr10_98753840-98753840_G_C	1280N>K	替换	非同义编码	45%
TARBP1	TAR (HIV-1) RNA 结合蛋白 1	CCDS1601.1	chr1_232649342-232649342_C_A	655G>V	替换	非同义编码	18%
TGM6	转谷氨酰胺酶 6	CCDS13025.1	chr20_2332325-2332325_G_A	398D>N	替换	非同义编码	51%
TTC39C	三角形四肽重复结构域 39C	CCDS32804.1	chr18_19966475-19966475_A_C	503N>T	替换	非同义编码	24%

[0133] 实施例2

[0134] 此实施例表明了如下方法:诱导患者的自体APC以呈递突变的氨基酸序列;将患者

的自体T细胞群与呈递突变的氨基酸序列的自体APC共培养;以及选择如下自体T细胞,其:(a)是与呈递突变的氨基酸序列的自体APC共培养,且(b)对在患者表达的MHC分子的环境下所呈递的突变的氨基酸序列具有抗原特异性。

[0135] 针对实施例1中鉴定的各个突变,设计小基因构建体,其编码每侧侧接有来自内源性蛋白的12个氨基酸的突变的氨基酸。将多个小基因串联合成以产生串联小基因(TMG)构建体(表3)。在表3中,下划线表示突变氨基酸和通过点突变或者核苷酸插入或缺失编码的新序列。针对剪接位点供体突变(HLA-DOA和LONRF3),基于这些突变阻止在该位点剪接的假设,设计突变体小基因转录物,其持续到下游内含子直到下一个终止密码子。不评估DIP2C的剪接位点受体突变。

[0136] 表3

[0137]

TMG	突变的基因	突变的小基因氨基酸序列	TMG 氨基酸序列
1	ALK	RVLKGGSVRKLR**H**AKQLVLELGEEA (SEQ ID NO: 1)	RVLKGGSVRKLR**H**AKQLVLELGEEAQNAADSYSWVPE**Q**AESRAMENQYSPTSFLSINSKEET**G**HLENGNKYPNLEFIPLLVVILFAV**H**TGLFISTQQQVTESDRPRKVRFRI**V**SSHSGRVLKEVYEIYNESLFDLLS**A**LPYVGPSVTPMTGKKLRDDYLASL**H**PRLHSIYVSEGYPDIKQELLRCDI**I**CKGGHSTVTDLQVGTKLDLRDDKD**N**IERLRDKKLAPI (SEQ ID NO: 26)
	CD93	QNAADSYSWVPE**Q**AESRAMENQYSP (SEQ ID NO: 2)	
	ERBB2IP	TSFLSINSKEET**G**HLENGNKYPNLE (SEQ ID NO: 3)	
	FCER1A	FIPLLVVILFAV**H**TGLFISTQQQVT (SEQ ID NO: 4)	
	GRXCR1	ESDRPRKVRFRI**V**SSHSGRVLKEVY (SEQ ID NO: 5)	
	KIF9	EIYNESLFDLLS**A**LPYVGPSVTPMT (SEQ ID NO: 6)	
	NAGS	GKKLRDDYLASL**H**PRLHSIYVSEGY (SEQ ID NO: 7)	
	NLRP2	PDIKQELLRCDI**I**CKGGHSTVTDLQ (SEQ ID NO: 8)	
	RAC3	VGTKLDLRDDKD**N**IERLRDKKLAPI (SEQ ID NO: 9)	
2	RAP1GDS1	VKLLGIHCQNAA**I**TEMCLVAFGNLA (SEQ ID NO: 10)	VKLLGIHCQNAA**I**TEMCLVAFGNLANLRKSSPGTSNK**C**LRQVSSLVLHIELGRLHPCVMASL**K**AQSPIPNLYLTGLLPIHTLDVKST**T**LPAAVRCSESRLMTMDNFGKHYTL**K**SEAPLYVGGMPVMTMDNFGKHYTL**K**SEAPLYVGGMPVHDGPFVFAEVNA**N**YITWLWHEDESRQAKEDFSGYDFE**T**RLHVRIHAALASPAVRPGICPGPD**G**WRIPLGPLPHEF (SEQ ID NO: 27)
	RASA1	NLRKSSPGTSNK**C**LRQVSSLVLHIE (SEQ ID NO: 11)	
	RETSAT	LGRLHPCVMASL**K**AQSPIPNLYLTG (SEQ ID NO: 12)	
	SEC24D	LLPIHTLDVKST**T**LPAAVRCSESRL (SEQ ID NO: 13)	
	SLIT1	MTMDNFGKHYTL**K**SEAPLYVGGMPV (SEQ ID NO: 14)	
	TARBP1	AVDVEGMKTQYS**V**KQRTENVLRIFL (SEQ ID NO: 15)	
	TGM6	HDGPFVFAEVNA**N**YITWLWHEDESR (SEQ ID NO: 16)	
	TTC39C	QAKEDFSGYDFE**T**RLHVRIHAALAS (SEQ ID NO: 17)	
	POU5F2	PAVRPGICPGPD**G**WRIPLGPLPHEF (SEQ ID NO: 18)	
3	SENP3	VAQELFQGSDLG**V**AEEAERPGEKAG (SEQ ID NO: 19)	VAQELFQGSDLG**V**AEEAERPGEKAGGTATTLTDLTNP**LSL**THIRRIVPGAVS**DGRMGSWRAPPTLS**VPASPLTLLQSHFRQQARVRHLSQEFGWLQITP**PGIPVHESTATLQHYSSGWAEKSKIL**SPDSKIQMVSSSQK**RALLCLIALLSRKQTWKIRTCLRRVRQKCF**TLLSPQEAGATK**DECEGEEGAAGSRDLRSWVT**EETGMPNKASKQ**GPGSTQREGSLEEIPGLTNIYKLLTSVWGLLRLWVWGPALAFTSCVTSEIAMRLL** (SEQ ID NO: 28)
	LHX9	GTATTLTDLTNP**LSL** (SEQ ID NO: 20)	
	KLHL6	THIRRIVPGAVS**DGRMGSWRAPPTLS**VPASPLTLLQSHFRQQARV (SEQ ID NO: 21)	
	AR	RHLSQEFGWLQITP**PGIPVHESTATLQHYSSGWAEKSKIL** (SEQ ID NO: 22)	
	PDZD2	SPDSKIQMVSSSQK**RALLCLIALLSRKQTWKIRTCLRRVRQKCF** (SEQ ID NO: 23)	
	HLA-DOA	TLLSPQEAGATK**DECEGEEGAAGSRDLRSWVT** (SEQ ID NO: 24)	
	LONRF3	EETGMPNKASKQ**GPGSTQREGSLEEIPGLTNIYKLLTSVWGLLRLWVWGPALAFTSCVTSEIAMRLL** (SEQ ID NO: 25)	

[0138] 然后，将TMG构建体用作模板以产生体外转录的(IVT)RNA。然后将这些IVT TMG RNA中的每一个单独转染到自体APC(DC)中，随后与TIL共培养以确定是否有任何加工并且所呈递的突变的抗原被TIL识别。据观察，3737-TIL对在TMG-1而非TMG-2或TMG-3中呈递的突变抗原具有反应性(图1A)。此外，所述反应性在CD4+T细胞群中占多数，这由活化标志物

OX40和4-1BB的上调所证实(表4A和表4B)。表4A和表4B示出了由流式细胞术检测到的3737-TIL百分比,在与和非特异性刺激物OKT3培养的DC、或用绿色荧光蛋白(GFP)RNA转染的DC共培养后,其具有指定的表型,或者具有由全外显子组测序鉴定的编码各种突变的指定的串联小基因(TMG)构建体。模拟转染的细胞仅用转染试剂处理而不添加核酸。数据对活CD3+细胞设门。

[0139] 表4A

[0140]

	4-1BB-/CD4-	4-1BB+/CD4-	4-1BB-/CD4+	4-1BB+/CD4+
模拟	49	0	51	0
GFP	49	0	51	0
TMG-1	47	4	38	11
TMG-2	47	0	53	0
TMG-3	48	0	52	0
OKT3	4	41	23	32

[0141] 表4B

[0142]

	OX40-/CD4-	OX40+/CD4-	OX40-/CD4+	OX40+/CD4+
模拟	49	0	51	0
GFP	48	0	51	1
TMG-1	49	2	16	33
TMG-2	47	0	53	0
TMG-3	48	0	52	0
OKT3	38	6	11	45

[0143] 尽管在CD4-阴性(CD8+)T细胞群中观察到一些4-1BB上调,对这些细胞进行分选,没有发现针对TMG的反应性。为了确定TMG-1的9个突变中哪个被3737-TIL识别,合成了另外9个TMG-1构建体,每个都含有突变之一回复到野生型序列的逆转。3737-TIL针对TMG-1的反应性仅在当ERBB2相互作用蛋白(ERBB2IP)突变被回复到野生型序列时消除,这表明TIL特异性识别ERBB2IP^{E805G}突变(图1B)。

[0144] 分子上表征ERBB2IP-突变反应性T细胞应答。进行IFN-γELISPOT测定,并在20小时测定结果。将患者3737-TIL与用预孵育时没有加任何东西的TMG-1转染的DC或指定的HLA-封闭性抗体(抗MHC-I、MHC-II、HLA-DP、HLA-DQ或HLA-DR)共培养(图2A)。作为抗体封闭的对照,HLA-A2限制性的MART-反应性T细胞DMF5(图2B)和HLA-DR限制性的酪氨酸酶-反应性T细胞T4(图2C),均与MART和预孵育时没有加任何东西的酪氨酸酶阳性624-CIITA黑素瘤细胞系或指定的HLA-封闭性抗体共培养。3737-TIL的应答被抗-HLA-DQ抗体封闭(图2A)。

[0145] 进行另外的IFN-γELISPOT测定,并在20小时测定结果。将患者3737-TIL与已用DMSO、突变的(mut)ALK或mut ERBB2IP 25-AA长肽(图2D)脉冲过夜的在HLA-DQ基因座部分匹配的自体B细胞或同种异体EBV-B细胞共培养。

[0146] 进行另外的IFN-γELISPOT测定,并在20小时测定结果。将患者3737-TIL与已用mut ERBB2IP 25-AA肽、或指定的截短的mut ERBB2IP肽(图2E)脉冲过夜的自体B细胞共培

养。

[0147] 如图2A-2E所示，3737-TIL应答是由HLA-DQB1*0601等位基因限制，且最小表位位于13个氨基酸序列NSKEETGHLENGN(SEQ ID NO:29)之内。

[0148] 实施例3

[0149] 该实施例表明了用实施例2中鉴定的ERBB2IP特异性CD4+T细胞的TCR-Vβ22链(与其α链匹配)进行基因改造的自体开放全体(open repertoire)外周血T细胞，被赋予针对突变ERBB2IP肽的特定反应性。

[0150] 使用OX40作为活化标志物，通过在抗原特异性活化后对它们进行分选，来表征实施例2中鉴定的突变的ERBB2IP-特异性CD4+T细胞的克隆性。然后，将这些细胞进行整体扩增，并通过有限稀释进行克隆。基于流式细胞术对全体TCR-Vβ的测量表明，整体扩增群是大于95％的Vβ22+，并且评估的10/11克隆是纯的Vβ22+。TCR序列分析揭示在测试的6/6的Vβ22+克隆中是相同的TCRβV-D-J序列(表5)，这表明大部分ERBB2IP-突变反应性T细胞包含一个主要的Vβ22+T细胞克隆。

[0151] 表5

[0152]

TCR Vβ	V-D-J 核苷酸序列 (CDR3 加下划线)	V-D-J 氨基酸序列(CDR3 加下划线)	具有指定的 V-D-J 的 Vβ22 (TRBV2)克隆数
Vβ22 (TRBV2)	GAACCTGAAGTCACCCAGACTCCCA GCCATCAGGTCACACAGATGGGACA GGAAGTGATCTTGCGCTGTGTCCCCA TCTCTAATCACTTATACTTCTATTGGT ACAGACAAATCTTGGGGCAGAAAGT CGAGTTTCTGGTTTCCTTTTATAATAA TGAAATCTCAGAGAAGTCTGAAATAT TCGATGATCAATTCTCAGTTGAAAGG CCTGATGGATCAAATTTCACTCTGAA GATCCGGTCCACAAAGCTGGAGGAC TCAGCCATGTACTTCTGTGCCAGCAG CCTGGGTGACAGGGGTAATGAAAAACT GTTTTTTGGCAGTGGAACCCAGCTCT CTGTCTTGG (SEQ ID NO: 39)	EPEVTQTPSHQ VTQMGQEVILR CVPISNHLYFY YRQILGQKVEF LVSFYNNEISEK SEIFDDQFSVER PDGSNFTLKIRS TKLEDSAMYFC ASSLGDRGNEK LFFGSGTQLSV L (SEQ ID NO: 40)	6/6

[0153] 当用突变的ERBB2IP肽刺激时，表达该Vβ22TCR的T细胞克隆特异性产生细胞因子IFN-γ(表6)。将CD4+Vβ22+克隆与OKT3或用野生型(wt)ERBB2IP、突变的(mut)ALK或mut ERBB2IP 25-AA长肽脉冲过夜的自体B细胞共培养6小时。表6示出了通过流式细胞术测量的共培养后产生细胞内IFN-γ(IFN-γ+)或不产生细胞内IFN-γ(IFN-γ-)的CD4+Vβ22+和Vβ22-克隆的百分比。数据代表共享相同TCR-Vβ序列的2个克隆。

[0154] 表6

[0155]

	IFN-γ-/Vβ22-	IFN-γ+/Vβ22-	IFN-γ-/Vβ22+	IFN-γ+/Vβ22+
mutALK	1	0	98	1
wtERBB2IP	1	0	99	0
mutERBB2IP	1	0	19	80

OKT3	3	4	59	34

[0156] 此外，用该TCR-Vβ22链(与其α链匹配)进行基因改造的自体开放全体外周血T细胞(表7)被赋予针对突变ERBB2IP肽的特定反应性(表8A和8B)，这表明该TCR特异性识别ERBB2IP^{E805G}突变。用来自Vβ22+克隆(表8A)的TCR转导(Td)自体开放全体外周血T细胞，或仅用转导试剂处理而不添加核酸(模拟)(表8B)，然后评估如表6所述的反应性。内源Vβ22+TCR的恒定区与小鼠恒定区交换，这允许使用针对小鼠TCRβ恒定区(mTCRβ)的抗体检测所引入的TCR。将板结合的OKT3用作在所有测定中的对照。表8A和8B示出了通过流式细胞术测量的产生细胞内IFN-γ(IFN-γ+)或不产生细胞内IFN-γ(IFN-γ-)的mTCRβ+和mTCRβ-细胞的百分比。

[0157] 表7

[0158]

TCR Vα	V-J 核苷酸序列 (CDR3 加下划线)	V-J 氨基酸序列 (CDR3 加下划线)
TRAV26-2	GATGCTAAGACCACACAGCCAAATTCAA TGGAGAGTAACGAAGAAGAGCCTGTTC ACTTGCCTTGTAACCACTCCACAATCAG TGGAACTGATTACATACATTGGTATCGAC AGCTTCCCTCCCAGGGTCCAGAGTACGT GATTCATGGTCTTACAAGCAATGTGAAC AACAGAATGGCCTCTCTGGCAATCGCTG AAGACAGAAAGTCCAGTACCTTGATCCT GCACCGTGCTACCTTGAGAGATGCTGCT GTGTACTACTGCATCCTGAGACGTCTTAA CGACTACAAGCTCAGCTTTGGAGCCGGA ACCACAGTAACTGTAAGAGCAA (SEQ ID NO: 41)	DAKTTQPNSMESNEEEP VHLPCNHSTISGTDYIHW YRQLPSQGPEYVIHGLTS NVNNRMA SLAIAEDRKSSTLILHRAT LRDAAVYYCILRRLNDYK LSFGAGTTVTVRA (SEQ ID NO: 42)

[0159] 表8A

[0160]

	IFN-γ-/mTCRβ-	IFN-γ+/mTCRβ-	IFN-γ-/mTCRβ+	IFN-γ+/mTCRβ+
mutALK	16	0	84	0
wtERBB2IP	15	0	85	0
mutERBB2IP	19	0	69	12
OKT3	14	2	74	10

[0161] 表8B

[0162]

	IFN-γ-/mTCRβ-	IFN-γ+/mTCRβ-	IFN-γ-/mTCRβ+	IFN-γ+/mTCRβ+
mutALK	99	1	0	0
wtERBB2IP	100	0	0	0
mutERBB2IP	100	0	0	0
OKT3	83	17	0	0

[0163] 实施例4

[0164] 该实施例表明了使用实施例2中鉴定的自体细胞治疗癌症的方法。

[0165] 患者3737接受424亿含有TIL的CD4+ERBB2IP突变反应性T细胞的过继性转移，随后4个剂量的IL-2以增强T细胞增殖和功能。对于治疗，患者3737接受肺部病变切除。然后将肿瘤切碎成小碎片，并与高剂量IL-2孵育以扩增肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。在IL-2中将细胞数量初步扩增后，使用快速扩增方案(REP)(包括辐照的同种异体外周血饲养细胞、OKT3和IL-2)将所选择的TIL培养物的数量进一步扩增2周。在细胞输注前，用环磷酰胺(CTX:60mg/kg，一天一次，为期两天)对患者进行预调节，接着用氟达拉滨(Flu:25mg/m^2，为期5天)预调节。患者3737-TIL包含含有超过100亿(25％)ERBB2IP突变反应性T细胞的424亿TIL，并在第0天施用，然后每8小时施用IL-2(阿地白介素，7.2e5IU/kg)。患者接收共计4个剂量的IL-2。

[0166] 将3737-TIL与用TMG-1或编码野生型(wt)ERBB2IP逆转的TMG-1转染的DC共培养，并在刺激后24小时使用流式细胞术评估CD4+T细胞上的OX40和Vβ22表达。将板结合的OKT3刺激用作阳性对照。流式细胞术分析表明，所施用的整个3737-TIL产物的大约25％包含Vβ22+、突变反应性T细胞(图3A，表9)，等同于输注超100亿ERBB2IP突变特异性CD4+T细胞。表9示出了通过流式细胞术测量的表达OX40(OX40+)或不表达OX40(OX40-)的Vβ22+和Vβ22-细胞的百分比。

[0167] 在3737-TIL的过继细胞转移之前和之后，对患者3737的血清样品进行IFN-γ ELISA测定。结果示于图3B。如图3B所示，细胞输注后的头五天，患者血清中检测到升高的IFN-γ水平。

[0168] 虽然在细胞输注之前，患者有进展性疾病的明确证据，但两个月的随访观察到肿瘤消退，以及所有的目标肺和肝的病变持续消退，处理后7个月达到30％的最大降低(图3C)。细胞输注后患者经历大约13个月的疾病稳定，此后仅在肺(而非肝)中观察到疾病进展。

[0169] 表9

[0170]

	Vβ22-/OX40-	Vβ22-/OX40+	Vβ22+/OX40-	Vβ22+/OX40+
TMG-1 wtERBB2IP	45	0	55	0
TMG-1	33	12	3	52
OKT3	19	31	6	44

[0171] 实施例5

[0172] 该实施例表明了实施例4的细胞在体外的表型和功能。

[0173] 为了确定是否有证据表明CD4+ERBB2IP突变反应性T细胞在疾病稳定中发挥了作用，对细胞在体外的表型和功能进行评估。将3737-TIL与用野生型(wt)ERBB2IP、突变(mut)ALK或mut ERBB2IP 25-AA长肽脉冲过夜的自体B细胞共培养6小时。在CD4+群中，使用流式细胞术评估Vβ22的表达并检测细胞内产生的IFN-γ(表10A)、肿瘤坏死因子(TNF)(表10B)和IL-2(表10C)。具有指定的表型的细胞百分比示于表10A-10C。表10D显示了表达指定的细胞因子数量的Vβ22+细胞的百分比。据发现，Vβ22+ERBB2IP-突变反应性CD4+T细胞是多官能的Th1细胞，当用突变的ERBB2IP肽刺激，诱导IFN-γ、TNF和IL-2(表10A-10C)的稳健共表达，但很少或没有IL-4或IL-17。

[0174] 表10A

[0175]

	Vβ22-/IFN-γ-	Vβ22-/IFN-γ+	Vβ22+/IFN-γ-	Vβ22+/IFN-γ+
mutALK	45	0	55	0
wtERBB2IP	44	0	56	0
mutERBB2IP	40	8	6	47
OKT3	29	33	24	14

[0176] 表10B

[0177]

	Vβ22-/TNF-	Vβ22-/TNF+	Vβ22+/TNF-	Vβ22+/TNF+
mutALK	45	0	55	0
wtERBB2IP	43	1	56	0
mutERBB2IP	37	10	3	50
OKT3	10	52	6	32

[0178] 表10C

[0179]

	Vβ22-/IL-2-	Vβ22-/IL-2+	Vβ22+/IL-2-	Vβ22+/IL-2+
mutALK	45	0	55	0
wtERBB2IP	43	1	56	0
mutERBB2IP	38	10	5	47
OKT3	27	36	23	14

[0180] 表10D

[0181]

No.细胞因子(针对Vβ22+设门)	mutALK	wtERBB2IP	OKT3	mutERBB2IP
0	99%	98%	12%	11%
1+	1%	2%	30%	
2+	没有	没有	24%	
3+	没有	没有	34%	89%

[0182] 进一步表型特征表明，这些细胞主要是具有细胞溶解潜能的效应记忆CD4+T细胞(表11和12)。通过流式细胞术评估患者3737-TIL的Vβ22的表达(代表ERBB2IP-突变反应性T细胞)和T细胞分化标志物CD28、CD45RO、CD57、CCR7、CD127、CD62L和CD27的表达。数据对活的CD3+CD4+细胞设门。用同型染色或未染色细胞设置正象限门和负象限门。具有指定的表型的细胞的百分比示于表11。实验中包括人外周血细胞(包含所有分化阶段的T细胞)，以确保抗体工作。

[0183] 表11

[0184]

Vβ22-/CD28-	Vβ22-/CD28+	Vβ22+/CD28-	Vβ22+/CD28+
1	56	1	42
Vβ22-/CD45RO-	Vβ22-/CD45RO+	Vβ22+/CD45RO-	Vβ22+/CD45RO+
0	57	0	43
Vβ22-/CD57-	Vβ22-/CD57+	Vβ22+/CD57-	Vβ22+/CD57+

48	9	42	1
Vβ22-/CCR7-	Vβ22-/CCR7+	Vβ22+/CCR7-	Vβ22+/CCR7+
57	0	43	0
Vβ22-/CD127-	Vβ22-/CD127+	Vβ22+/CD127-	Vβ22+/CD127+
25	32	21	22
Vβ22-/CD62L-	Vβ22-/CD62L+	Vβ22+/CD62L-	Vβ22+/CD62L+
49	8	42	1
Vβ22-/CD27-	Vβ22-/CD27+	Vβ22+/CD27-	Vβ22+/CD27+
57	0	43	0

[0185] 将患者3737-TIL与OKT3或用野生型(wt)ERBB2IP、突变(mut)ALK或mut ERBB2IP 25-AA长肽脉冲过夜的自体B细胞共培养6小时。在共培养开始时，加入对脱粒标志物CD107a具有特异性的抗体。使用流式细胞术以评估Vβ22的表达，并检测CD107a的细胞表面移动。数据对CD4+群设门。具有指定的表型的细胞的百分比示于表12。

[0186] 表12

[0187]

	Vβ22-/CD107a-	Vβ22-/CD107a+	Vβ22+/CD107a-	Vβ22+/CD107a+
mutALK	51	0	48	1
wtERBB2IP	51	1	48	0
mutERBB2IP	53	6	19	22
OKT3	42	19	26	13

[0188] 可见在3737-TIL中存在多官能Vβ22-阴性、ERBB2IP-突变反应性CD4+T细胞的小群(表9和10)。通过FACS分选这些Vβ22-阴性细胞，接着在含IL-2的培养基中休息2天，然后与用野生型(wt)ERBB2IP、突变(mut)ALK或mut ERBB2IP 25-AA长肽脉冲过夜的自体B细胞共培养。在刺激后6小时(h)在CD4+群中，用流式细胞术来评估Vβ22的表达，并检测细胞内产生的IL-2(表13C)、TNF(表13B)和IFN-γ(表13A)。具有指定表型的细胞百分比示于表13A-13C。

[0189] 表13A

[0190]

	Vβ22-/IFN-γ-	Vβ22-/IFN-γ+	Vβ22+/IFN-γ-	Vβ22+/IFN-γ+
mutALK	99	0	1	0
wtERBB2IP	99	0	1	0
mutERBB2IP	85	14	0	1
OKT3	50	49	0	1

[0191] 表13B

[0192]

	Vβ22-/TNF-	Vβ22-/TNF+	Vβ22+/TNF-	Vβ22+/TNF+
mutALK	99	0	1	0
wtERBB2IP	97	2	1	0
mutERBB2IP	78	21	0	1

OKT3	9	90	0	1

[0193] 表13C

[0194]

	Vβ22-/IL-2-	Vβ22-/IL-2+	Vβ22+/IL-2-	Vβ22+/IL-2+
mutALK	99	0	1	0
wtERBB2IP	97	2	1	0
mutERBB2IP	78	21	0	1
OKT3	36	63	0	1

[0195] 刺激后24小时在CD4+群中，用流式细胞术以评估OX40和Vβ22的表达。对上调OX40的细胞进行分选，并扩增所述细胞的数量，并通过流式细胞术分析全体TCR-Vβ。结果示于图3D。分选Vβ22-阴性细胞，随后活化这些细胞，这表明了在3737-TIL中存在对该表位具有反应性的一个或多个另外的克隆型(表13A-13C)，其中最主要的克隆型是Vβ5.2(图3D)。

[0196] 将如图3D所示的分选的细胞与用wt ERBB2IP、mut ALK或mut ERBB2IP 25-AA长肽脉冲过夜的自体B细胞共培养6小时。在CD4+群中，用流式细胞术来评估Vβ5.2的表达，并检测细胞内产生的IL-2(表14C)、TNF(表14B)和IFN-γ(表14A)。表15显示了表达指定细胞因子数量的Vβ5.2+细胞的百分比。

[0197] 表14A

[0198]

	Vβ5.2-/IFN-γ-	Vβ5.2-/IFN-γ+	Vβ5.2+/IFN-γ-	Vβ5.2+/IFN-γ+
mutALK	51	0	49	0
wtERBB2IP	54	0	46	0
mutERBB2IP	42	13	20	25
OKT3	28	23	25	24

[0199] 表14B

[0200]

	Vβ5.2-/TNF-	Vβ5.2-/TNF+	Vβ5.2+/TNF-	Vβ5.2+/TNF+
mutALK	50	2	48	0
wtERBB2IP	52	2	46	0
mutERBB2IP	33	21	3	43
OKT3	5	46	3	46

[0201] 表14C

[0202]

	Vβ5.2-/IL-2-	Vβ5.2-/IL-2+	Vβ5.2+/IL-2-	Vβ5.2+/IL-2+
mutALK	51	1	48	0
wtERBB2IP	54	1	45	0
mutERBB2IP	38	17	14	31
OKT3	31	21	27	21

[0203] 表15

[0204]

No. 细胞因子(针对Vβ5.2+设门)	mutALK	wtERBB2IP	mutERBB2IP	OKT3
0	98%	98%	3%	6%
1+	2%	2%	11%	25%
2+	没有	没有	36%	36%
3+	没有	没有	50%	33%

[0205] 对用突变的ERBB2IP刺激时上调OX40的Vβ22-阴性细胞进行分选，并扩增所述细胞的数量。然后，分离来自这些细胞中的RNA，并用TCR-β恒定链引物进行5'互补DNA末端(5' RACE)的快速扩增，以鉴定表达的TCR-Vβ序列。在聚合酶链式反应(PCR)产物上进行TOPO-TA克隆，然后对单个克隆进行测序。流式细胞术证实了这些T细胞的40-50％是Vβ5.2(TRBV5-6)。通过Sanger测序，3/7的TOPO-TA克隆是具有如表16所示的序列的Vβ5.2(TRBV5-6)。表16示出了Vβ22-阴性ERBB2IP突变反应性T细胞的最频繁的TCRβV-D-J序列。

[0206] 表16

[0207]

TCR Vβ	V-D-J 核苷酸序列 (CDR3 加下划线)	V-D-J 氨基酸序列 (CDR3 加下划线)	具有指定 V-D-J 的 TOPO-TA 克隆数
Vβ5.2 (TRBV5-6)	GACGCTGGAGTCACCCAAAGTCCCACAC ACCTGATCAAAACGAGAGGACAGCAAGT GACTCTGAGATGCTCTCCTAAGTCTGGGC ATGACACTGTGTCCTGGTACCAACAGGC CCTGGGTCAGGGGCCCCAGTTTATCTTTC AGTATTATGAGGAGGAAGAGAGACAGAG AGGCAACTTCCCTGATCGATTCTCAGGTC ACCAGTTCCCTAACTATAGCTCTGAGCTG AATGTGAACGCCTTGTTGCTGGGGGACT CGGCCCTCTATCTCTGTGCCAGCAGCAAA GGCCCGGGAGGCAACTACGAGCAGTACT TCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCAC AG (SEQ ID NO: 43)	DAGVTQSPTHLI KTRGQQVTLRC SPKSGHDTVSW YQQALGQGPQF IFQYYEEEERQR GNFPDRFSGHQ FPNYSSELNVN ALLLGDSALYL CASSKGPGGNY EQYFGPGTRLTV T (SEQ ID NO: 44)	3/7

[0208] 大多数Vβ5.2+细胞以抗原特异性方式产生多种细胞因子(表14A-14C、表15和表16)。可见存在识别突变的ERBB2IP的Vβ5.2-阴性(和Vβ22-阴性)CD4+T细胞小群(表14A-14C和表15)。因此，用于治疗患者3737的TIL包含至少三个识别ERBB2IP中相同突变的不同的多官能CD4+T细胞克隆，这表明该突变是高度免疫原性的。

[0209] 实施例6

[0210] 该实施例表明了实施例4的细胞在体内的持久性。

[0211] 为了确定是否有证据表明CD4+ERBB2IP-突变反应性T细胞对病情稳定起作用，对所述细胞的体内持久性进行评价。TCR-Vβ深度测序揭示了，这些克隆型是罕见的或在ACT之前的外周血中是不可检测的(图4A和图4B)。ACT后十天，在外周血中两个克隆大于总T细胞的2％，但细胞输注后34天减少至低于0.3％(图4A和图4B)。经ACT后近一年半时切除的三个肺转移，被ERBB2IP突变反应性T细胞浸润(图4A和4B)，这表明了这些细胞促进了癌症消退和病情稳定。该Vβ22+ERBB2IP突变反应性克隆是在肿瘤结节-3(Tu-3-Post)中检测到的最

频繁的克隆，并代表了肿瘤中总T细胞的近8％(图4A和图4B)，而在肿瘤结节-1和-2中，该克隆分别是第2和第12常见。Vβ5.2+ERBB2IP-突变反应性克隆，相比它在所有三个肿瘤结节的血液中的频率也是富集的(图4A和4B)。因此，在接收超过100亿个在转移性病变中浸润和持续的ERBB2IP-突变特异性的多官能Th1细胞后，患者3737经历了肿瘤消退且病情稳定一年以上。

[0212] 对患者3737-TIL(T细胞)和过继性细胞转移之前(Tu-Pre)和之后的肿瘤中的ERBB2IP表达进行逆转录酶定量PCR(RT-qPCR)分析。在细胞输注后大约17个月切除三个独立的转移性肺病变(Tu-1、-2、-3-Post)。结果如图4C所示，并且是相对于β-肌动蛋白(ACTB)。从如图4C所述的cDNA样品中PCR扩增含有突变的ERBB2IP基因的350个碱基对(bp)的片段，并进行Sanger测序。突变的位置在编码序列的核苷酸位置2414，对应于在氨基酸序列的805位置上的改变。如通过定量RT-PCR所确定，观察到在原发性和复发性肺病变中相对高水平的ERBB2IP表达(图4C)，且Sanger测序验证了ERBB2IP突变在所有的肿瘤病变中的存在。

[0213] 在ACT之前和之后，对T细胞浸润和MHC表达进行免疫组织化学分析。在第一次ACT后约17个月收获ACT后的肿瘤。所有染色均包括阳性对照(扁桃体)。T细胞浸润和肿瘤的MHC原位表达分别总结于表17和表18。

[0214] 表17

[0215]

肿瘤结节	CD3		CD8		CD4	
	肿瘤	基质	肿瘤	基质	肿瘤	基质
Pre-1A	0-1	1	0-1	1	0-1	1
Pre-2A	0-1	1	0-1	1	0	0
Pre-3A	0	0-1	0	0-1	0	0
Pre-3B	0-1	1	0-1	0-1	0-1	1
Post-1A	1	1	1	1	0-1	1
Post-1B	1	2	1-2	2	1	2
Post-2A	0-1	1	0-1	1	0-1	0-1

[0216] 0，无浸润

[0217] 1，极少至很少

[0218] 2，中等密度

[0219] 3，非常密集

[0220] 表18

[0221]

肿瘤结节	HLA-I	HLA-II(HLA-DR)
Pre-1A	1-2，>50％	0
Pre-2A	1-2，>50％	0
Pre-3A	1，>50％	0
Pre-3B	2，>50％	0
Post-1A	2-3，>50％	0
Post-1B	3，>50％	0

Post-2A	2,>50%	0

[0222] >50%表示大于50%的肿瘤细胞为阳性。

[0223] 0,阴性

[0224] 1,弱阳性

[0225] 2,中度阳性

[0226] 3,强阳性

[0227] 实施例7

[0228] 该实施例表明了突变反应性Th1细胞对于实施例4的抗肿瘤响应的贡献。

[0229] 为了具体评价突变反应性Th1细胞对体内抗肿瘤响应的贡献,产生了包含大于95%的Vβ22+ERBB2IP-突变反应性Th1细胞(约1200亿突变反应性细胞)的TIL产物,并过继性转移到患者3737。

[0230] 对用于再治疗的TIL产物进行流式细胞术分析。表19示出了在对CD3设门后,97%为CD4+/CD8-,且在这些中,在进一步对CD4+细胞设门后,98%为Vβ22+(表20)。将再治疗的TIL与用野生型(wt)或突变的(mut)ERBB2IP 25-AA长肽脉冲过夜的自体B细胞共培养6小时。用流式细胞术来检测CD4+群中细胞内TNF的产生(表20)。

[0231] 表19

[0232]

CD8-/CD4-	CD8-/CD4+	CD8+/CD4-	CD8+/CD4+
0	97	3	0

[0233] 表20

[0234]

	Vβ22-/TNF-	Vβ22-/TNF+	Vβ22+/TNF-	Vβ22+/TNF+
wtERBB2IP	2	0	98	0
mutERBB2IP	1	3	3	93

[0235] 再次,患者经历了目标病变的减少,但不同于第一治疗,即使在第一个月的随访就观察到肿瘤消退,并在第二治疗后4个月时的随访中肿瘤持续消退(图4D)。第二治疗后8个月时的随访中肿瘤持续消退。

[0236] 第二次施用突变反应性细胞后六个月,对患者3737肺部进行计算机断层成像(CT)扫描,所获得的图像如图7A-C所示。将这些图像与第二次施用突变反应性细胞之前所获得的图像进行比较(图7D-7F)。如图7A-7F所示,观察到癌病变中大约36%的降低,其提供了按实体瘤中响应评价标准(RECIST)的标准的部分响应(PR)。

[0237] 第二次施用突变反应性细胞后八个月,对患者3737的肝和肺进行正电子发射断层成像(PET)扫描。据观察,目标病变持续萎缩。施用放射性标记的葡萄糖类似物(FDG(氟脱氧葡萄糖))以评估肿瘤对葡萄糖的摄取,用以测量肿瘤的代谢活性。PET扫描表明了在2个肝病变中都没有葡萄糖摄取,而在肺病变中仅有一些摄取。

[0238] 实施例8-10

[0239] 下面给出实施例8-10的材料和方法。

[0240] 患者材料和细胞系

[0241] 在美国国家癌症研究所的机构审查委员会批准的临床试验的过程中,获得所有的

患者材料。Dudley等人,J.Clin.Oncol.,26:5233-9(2008)描述了患者2359和患者2591被登记在临床试验中(分别为试验登记ID:NCT00096382和ID:NCT00335127)。自接受切除的患者建立TIL细胞系和肿瘤细胞系。通过Dudley等人,J.Immunother.,26:332-42(2003)描述的方法产生用于该研究的TIL。简言之,将肿瘤碎块切出,并培养在含IL-2的培养基中。筛选数量扩增的TIL培养物,以识别自体或HLA-匹配的肿瘤,并使用快速扩增方案(REP)与IL-2、抗-CD3抗体和辐照的饲养细胞,将反应性TIL的数量扩增至大数量以用于患者输注(Riddell等人,Science,257:238-41(1992))。小部分TIL进行第二次REP。对于共培养测定,在96孔板上用200μL培养基(补充有5%人血清的AIM-V培养基),将T细胞和肿瘤细胞以1:1的比例培养16小时(hr)。

[0242] 为了评估有临床活性的TIL的抗原反应性,研究了对过继性TIL治疗经历持久完全响应的两名转移性黑素瘤患者。患者2359在右膝患有原发性皮肤黑素瘤,其转移到大腿、髂和腹股沟淋巴结。这一个体经历了响应自体TIL转移的所有转移性病变的完全消退,其持续到治疗后8年多。患者2591患有原发性背部黑素瘤,其转移到腹壁、肠系膜淋巴结、右结肠和锁骨上淋巴结。这一个体经历了响应自体TIL转移的所有转移性病变的完全消退并在治疗后9年保持无病状态。

[0243] 全外显子组测序

[0244] 所述方法描述于Robbins等人,Nat.Med.,19:747-52(2013)。在个人基因组诊断公司(Personal Genome Diagnostics)(Baltimore,MD)进行基因组DNA纯化、文库构建、大约20,000个编码基因的外显子组捕获以及肿瘤和正常样品的新一代测序。简言之,将来自肿瘤和正常样品的基因组DNA片段化,并用于Illumina TRUSEQ文库构建(Illumina,San Diego,CA)。使用Agilent SURESELECT 50Mb试剂盒(第3版),按照制造商的指导(Agilent,Santa Clara,CA)在溶液中捕获外显子区域。利用HISEQ 2000基因组分析仪(Illumina)进行双端测序(从每个片段的每个末端产生100个碱基)。将序列数据与参考人类基因组序列匹配,并通过比较肿瘤和正常DNA的超过5000万个碱基来确定序列改变。对于每个样品,获得超过80亿个碱基的序列数据,并且高的碱基分数来自所捕获的编码区。在肿瘤和正常样品中分析超过4300万个碱基的靶DNA,并且在正常和肿瘤DNA样品的每个碱基处获得平均42-51个读取。

[0245] 通过个人基因组诊断和基因组技术访问中心、华盛顿大学医学院的基因组学和医学病理学服务部门进行生物信息学分析。使用CASAVA 1.6软件(Illumina)的ELAND算法,将标签与人类基因组参考序列(hg18)进行比对。使用Illumina的BASECALL软件的Chastity过滤器以选择用于后续分析的序列读取。然后将CASAVA 1.6软件的ELANDv2算法应用于鉴定点突变和小插入以及缺失。从分析中移除已记录在dbSNP中的已知多态性。如Jones等人,Science,330:228-31(2010)中所述,过滤并目测潜在的体细胞突变。

[0246] 串联小基因库的构建

[0247] 从全外显子组测序数据中鉴定黑素瘤样品的非同义突变。合成串联小基因构建体,其编码含有侧接于其N-和C-末端的6个鉴定的突变氨基酸残基(两侧12个氨基酸)的多肽(Integrated DNA Technologies,Coralville,Iowa),然后按照制造商的指导,使用IN-FUSION Advantage PCR克隆试剂盒(Clontech),将其克隆到pcDNA3.1表达载体。

[0248] IFN-γELISPOT测定

[0249] 使用包被有15μg/mL的单克隆抗-IFN-γ抗体1D1K(Mabtech,Inc.,Cincinnati,OH)的96-孔PVDF膜过滤板(EMD Millipore,Billerica,MA),在IFN-γELISPOT测定中定量对肿瘤细胞系和肽-脉冲的靶细胞的响应。使用1μg/ml的生物素化的抗IFN-γ抗体7-B6-1(Mabtech)检测结合的细胞因子。将表达HLA-A*0201、HLA-A*0205或HLA-C*0701的HEK293细胞,在37℃下用肽进行脉冲2小时。使用下列肽:MART-1:AAGIGILTV(SEQ ID NO:54),突变的KIF2C:RLFPGLTIKI(SEQ ID NO:55),突变的POLA2:TRSSGSHFVF(SEQ ID NO:56)。将T细胞与靶细胞或含有50ng/ml的PMA加1μM离子霉素(PMA/I)的培养基共培养过夜。计算每10^5个T细胞的点数量。

[0250] 实施例8

[0251] 该实施例表明了TIL 2359识别通过小基因文库筛选所评估的突变抗原。

[0252] 使用基于由肿瘤和正常DNA的外显子组分析鉴定的非同义突变而生成的TMG构建体,评估TIL 2359的反应性。每个TMG构建体编码多达6个单独的小基因片段,其对应于由存在于正常基因产物中的12个另外的密码子侧接于两侧的突变密码子。一个实例示于图5A。

[0253] 基于从Mel 2359鉴定的含非同义点突变的外显子组DNA序列,用编码71个小基因的12个串联小基因之一,单独瞬时转染COS-7细胞。也用HLA-A*0205、用于由此TIL识别的自体肿瘤细胞的主要HLA限制元件,共转染这些COS-7细胞。这些转染子与TIL 2359共培养,导致识别12个TMG构建体之一(RJ-1)(图5B)。如图5A所示,RJ-1编码EPHB2、KIF2C、SLC44A5、ABCA4、DENND4B和EPRS基因的突变片段。随后,形成了6个RJ-1变体构建体,其中每一个编码WT而不是存在于6个小基因之一中的突变残基(图5C)。TIL 2359识别与HLA-A*0205加6个单独转染的RJ-1变体中的5个共转染的COS-7细胞,但不能识别编码WTKIF2C序列的变体,这表明该小基因编码由TIL 2359识别的突变表位(图5C)。为了进一步测试这一观察,用WT或扩增自Mel 2359的突变的全长KIF2C cDNA转录物,与HLA-A*0101、HLA-A*0201或HLA-A*0205cDNA一起,共转染COS-7细胞。共培养实验表明,TIL 2359T细胞以HLA-A*0205-限制的方式识别用突变的而不是野生(WT)的KIF2C基因产物共转染的COS-7细胞(图5D)。

[0254] 突变的KIF2C编码区在核苷酸46包含单个C到A的颠换,这导致在天然蛋白KIF2C的位置16处用苏氨酸替换了丙氨酸。外显子组测序结果表明,来自Mel 2359的DNA仅对应于在位置46的突变残基而不是正常残基,其结果由Mel 2359DNA的直接Sanger测序证实,这表明在这一基因座杂合性的丢失。为了鉴定由TIL 2359识别的突变KIF2C表位,合成了被预测为以高亲和力结合至HLA-A*0205的包含KIF2C突变的肽(Hoof et al.,Immunogenetics,61:1-13(2009)),并对稳定表达HLA-A*0205的HEK293细胞进行脉冲(表21)。用对应于残基10-19的十聚体脉冲的HEK293-A*0205细胞,刺激了从TIL 2359T细胞释放高水平IFN-γ,并且所述肽在0.1nM的最小浓度被识别。相反,相应的WT肽在高达10μM的浓度没有诱导明显的IFN-γ释放(图5E)。

[0255] 表21

[0256]

氨基酸位置	突变的肽	预测的 HLA-A*0205 结合亲和力(nM)	共培养结果 [IFN-γ (pg/mL)]
10-19	RLFPGLTIKI (SEQ ID NO: 59)	55.21	10690
10-17	RLFPGLTI (SEQ ID NO: 60)	132.35	121.5
15-25	LTIKIQRSNGL (SEQ ID NO: 61)	251.33	31.5
7-17	LQARLFPGLTI (SEQ ID NO: 62)	293.83	27
7-16	LQARLFPGLT (SEQ ID NO: 63)	1549.33	24

[0257] 实施例9

[0258] 该实施例表明了TIL 2591识别由小基因库筛选鉴定的突变抗原。

[0259] 基于包含从Mel 2591鉴定的非同义点突变的外显子组DNA序列，通过合成编码217个小基因的37个TMG构建体，鉴定由TIL 2591识别的突变的T细胞抗原。在多个HLA限制元件的环境下，TIL 2591识别自体肿瘤细胞。因此，稳定表达分离自Mel 2591的6个MHC I类HLA分子中每一个的HEK293细胞系，被37个TMG构建体单独地瞬时转染，随后与TIL 2591过夜共培养。初步结果表明，TIL 2591识别用小基因DW-6瞬时转染的HLA-C*0701^{+}HEK293细胞(HEK293-C*0701)，但不能显著响应其他小基因构建体(图6A)。然后，在DW-6串联构建体中6个单独的突变小基因中的每一个(图6B)被单独回复为WT序列(图6C)。对WT变体的响应的评估表明，除了编码WT POLA2片段的构建体之外，TIL 2591识别用DW-6变体中每一个转染的COS-7细胞(图6C)。为了测试这些发现，用WT或突变的全长POLA2的cDNA构建体，与HLA-C*0401、HLA-C*0701或HLA-C*0702的cDNA一起转染COS-7细胞。TIL 2591T细胞仅识别用HLA-C*0701加突变POLA2构建体而非对应的WT转录物转染的靶细胞(图6D)。在POLA2编码区的核苷酸1258的单个C至T的转换，导致在WT POLA2蛋白的420位置用亮氨酸替换苯丙氨酸。Sanger测序表明，基因组DNA和来自Mel 2591RNA的cDNA都包含WT和在1258位置的突变核苷酸，因而从患者2591的PBMC分离的基因组DNA对应于WT序列，这表明，这表示了在Mel 2591细胞中的杂合体细胞突变。

[0260] 然后，使用HLA-C*0701结合算法以鉴定在位置420与突变的亮氨酸残基重叠的候选POLA2肽(表22)。共培养结果表明，用对应于突变POLA2的残基413-422的十聚体脉冲的HLA-C*0701^{+}HEK293细胞，在10nM的最小浓度刺激从TIL 2591T细胞释放IFN-γ。相反，相应的WT肽在高达10μM的浓度没有诱导显著的IF-γ释放(图6E)。

[0261] 表22

[0262]

氨基酸位置	突变的肽	预测的 HLA-C*0701 结合亲和力(nM)	共培养结果 [IFN-γ (pg/mL)]
413-422	TRSSGSHFVF (SEQ ID NO: 68)	147.35	1106
413-423	TRSSGSHFVFV (SEQ ID NO: 69)	280.38	50
413-421	TRSSGSHFV (SEQ ID NO: 70)	285.90	60
413-420	TRSSGSHF (SEQ ID NO: 71)	518.82	48
420-429	FVFVPSLRDV (SEQ ID NO: 72)	599.44	39

[0263] 然后使用IFN-γ酶联免疫斑点(ELISPOT)测定法，估计在识别突变的KIF2C的TIL 2359和识别突变的POLA2的TIL 2591中的T细胞比例。TIL 2359在响应用突变的KIF2C表位

脉冲的HLA-A*0205^{+}细胞时，产生大约2000个斑点(每100,000个T细胞)，这类似于响应自体黑素瘤时所观察到的(表23)。TIL 2591在响应HLA-A2限制的MART-1表位时，生成多于7,000个斑点，而仅有部分T细胞对HLA-C*0701限制的突变的POLA2表位有反应(表23)。

[0264] 表23

[0265]

	TIL 2359 每 1 x 10^5 个细胞的斑点
Mel 2359	1698
293-A*0205	189
293-A*0205 + KIF2Cmut	2057
	TIL 2591 每 1 x 10^5 个细胞的斑点
Mel 2591	11344
293-A*02	999
293-A*02 + MART-1	7404
293-C*0701	906
293-C*0701 + POLA2 mut	1280

[0266] 实施例10

[0267] 该实施例表明了鉴定对存在于由小基因文库筛选鉴定出的胃肠道(GI)癌中的突变抗原具有反应性的T细胞的方法。

[0268] 对来自GI癌症患者的转移性病变进行全外显子组测序以确定突变。接着，生成编码各个突变的小基因构建体并将其转染到自体APC，以允许由肿瘤表达的所有突变的加工和呈递。然后，将这些APC与肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)共培养，并且通过IFN-γ ELISPOT以及经流式细胞术的4-1BB和OX40上调来确定对突变的T细胞反应性。

[0269] 在一名结肠癌患者中，评价119个突变的突变反应性。发现数个(但不是全部)TIL培养物包含高度可变比例的特异性识别CASP8中的突变(67F→V)的CD8+T细胞。当进一步体外扩增时，这些突变反应性CD8+T细胞在培养物中显著超越其它细胞。向患者施用40.3×10^9的TIL(其估计包含约0.31％(约1.27亿)突变反应性细胞)，在施用细胞后大约6周时的第一个随访中没有导致临床反应。患者大约6周后死亡。不束缚于特定的理论或机理，据信，在治疗之前疾病的很晚阶段、病人整体状况差以及在给予过继性细胞治疗之前患者对淋巴细胞清除化疗的耐受性差中的任何一个或多个可能就是对患者死亡起作用的因素。对突变的CASP8具有反应性的TCR是分离自TIL，并且经转导以表达TCR的T细胞对用突变的CASP8脉冲的DC具有反应性。

[0270] 在另一直肠癌患者中，评估155个突变的突变反应性。发现了至少3个不同的突变反应性，2个包括CD8+T细胞应答及1个CD4+应答。向患者施用突变反应性TIL，最初导致在治疗后约1.5个月时的混合应答，但在治疗后大约3.5个月时病人后续发展出进展性疾病。从CD4+TIL和CD8+TIL分离出了潜在的突变反应性TCR。

[0271] 在第三个患者(胆管癌)中，没有检测到对所测试的38个突变的T细胞反应性。对于该患者，“突变调用(mutation call)”阈值被降低，而将评估另外的125个推定的突变。所述“突变调用”是使用生物信息学将该序列鉴定为突变时的任意设定的阈值。在这种情况下，

作为第一次通过，该阈值是相对高的(例如，提供了所鉴定的突变为真突变的高水平的置信度)。然后将阈值降低，从而提供了所鉴定的突变为真突变的较低水平的置信度，然而，所鉴定的突变为真突变的可能性依然存在。

[0272] 这些数据表明，在转移性胃肠道癌中，对人类免疫系统加载针对体细胞突变的T细胞应答的能力可能不是罕见事件。该研究还在进行。

[0273] 在此引用的所有参考文献(包括出版物、专利申请和专利)通过引用并入本文，其程度如同每个参考文献单独地且具体地指示为通过引用并入本文，并以其全部内容在本文中阐述。

[0274] 除非本文另有说明或与上下文明显矛盾，在描述本发明的上下文中(尤其是在所附权利要求的上下文中)，所用术语“一个/一种(a/an)”和“该/所述(the)”和“至少一个”以及类似的表示，将被解释为涵盖了单数和复数。除非本文另有说明或与上下文明显矛盾，使用术语“至少一个”，随后列举一个或多个项目(例如，“A和B中的至少一个”)应被解释为是指选自所列项目的一个项目(A或B)，或者两个或更多个所列项目的任意组合(A和B)。除非另有说明，术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”将被解释为开放式术语(即，意味着“包括，但不限于”)。除非本文另有说明，本文中提及的数值范围仅旨在用作单独提及每一个单独的值落在该范围内的简约表现方法，并且每个单独的值如同被本文单独列举而并入到说明书中。除非本文另有说明或与上下文明显矛盾，本文所述的所有方法可以以任何合适的顺序进行。除非另有要求，本文提供的任何和所有实例或示例性语言(例如，“诸如”)的使用，仅旨在更好地阐明本发明且对本发明的范围不构成限制。说明书中的任何语言都不应被解释为表示出对实施本发明所必需的任何未要求保护的元素。

[0275] 本文描述了本发明的优选实施例，包括发明人已知的用于实施本发明的最佳模式。对本领域普通技术人员而言，在阅读以上描述后，这些优选实施例的各种变型是显而易见的。本发明人预期本领域技术人员在适当情况下将采用这些变型，并且发明人期望本发明以不同于本文所具体描述的方式实施。因此，本发明包括由适用法律允许的所附权利要求书所述的主题的所有修改和等效物。此外，除非本文另有说明或与上下文明显矛盾，在所有可能的变型中上述元素的任意组合都包含在本发明中。

序列表

<110> 美国卫生和人力服务部

<120> 分离对癌症特异性突变具有抗原特异性的T细胞受体的方法

<130> 718291

<160> 73

<170> PatentIn 3.5版

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 1

Arg Val Leu Lys Gly Gly Ser Val Arg Lys Leu Arg His Ala Lys Gln
1 5 10 15
Leu Val Leu Glu Leu Gly Glu Glu Ala
20 25

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 2

Gln Asn Ala Ala Asp Ser Tyr Ser Trp Val Pro Glu Gln Ala Glu Ser
1 5 10 15
Arg Ala Met Glu Asn Gln Tyr Ser Pro
20 25

<210> 3

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 3

Thr Ser Phe Leu Ser Ile Asn Ser Lys Glu Glu Thr Gly His Leu Glu
1 5 10 15
Asn Gly Asn Lys Tyr Pro Asn Leu Glu

20 25

<210> 4
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 4
Phe Ile Pro Leu Leu Val Val Ile Leu Phe Ala Val His Thr Gly Leu
1 5 10 15
Phe Ile Ser Thr Gln Gln Gln Val Thr
20 25
<210> 5
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 5
Glu Ser Asp Arg Pro Arg Lys Val Arg Phe Arg Ile Val Ser Ser His
1 5 10 15
Ser Gly Arg Val Leu Lys Glu Val Tyr
20 25
<210> 6
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 6
Glu Ile Tyr Asn Glu Ser Leu Phe Asp Leu Leu Ser Ala Leu Pro Tyr
1 5 10 15
Val Gly Pro Ser Val Thr Pro Met Thr
20 25
<210> 7
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的
<400> 7
Gly Lys Lys Leu Arg Asp Asp Tyr Leu Ala Ser Leu His Pro Arg Leu
1 5 10 15
His Ser Ile Tyr Val Ser Glu Gly Tyr
20 25
<210> 8
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 8
Pro Asp Ile Lys Gln Glu Leu Leu Arg Cys Asp Ile Ile Cys Lys Gly
1 5 10 15
Gly His Ser Thr Val Thr Asp Leu Gln
20 25
<210> 9
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 9
Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg Asp Asp Lys Asp Asn Ile Glu Arg
1 5 10 15
Leu Arg Asp Lys Lys Leu Ala Pro Ile
20 25
<210> 10
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 10
Val Lys Leu Leu Gly Ile His Cys Gln Asn Ala Ala Ile Thr Glu Met
1 5 10 15
Cys Leu Val Ala Phe Gly Asn Leu Ala
20 25

<210> 11
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 11
Asn Leu Arg Lys Ser Ser Pro Gly Thr Ser Asn Lys Cys Leu Arg Gln
1 5 10 15
Val Ser Ser Leu Val Leu His Ile Glu
20 25
<210> 12
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 12
Leu Gly Arg Leu His Pro Cys Val Met Ala Ser Leu Lys Ala Gln Ser
1 5 10 15
Pro Ile Pro Asn Leu Tyr Leu Thr Gly
20 25
<210> 13
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 13
Leu Leu Pro Ile His Thr Leu Asp Val Lys Ser Thr Thr Leu Pro Ala
1 5 10 15
Ala Val Arg Cys Ser Glu Ser Arg Leu
20 25
<210> 14
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的

<400> 14

Met Thr Met Asp Asn Phe Gly Lys His Tyr Thr Leu Lys Ser Glu Ala
1 5 10 15
Pro Leu Tyr Val Gly Gly Met Pro Val
20 25

<210> 15
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 15

Ala Val Asp Val Glu Gly Met Lys Thr Gln Tyr Ser Val Lys Gln Arg
1 5 10 15
Thr Glu Asn Val Leu Arg Ile Phe Leu
20 25

<210> 16
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 16

His Asp Gly Pro Phe Val Phe Ala Glu Val Asn Ala Asn Tyr Ile Thr
1 5 10 15
Trp Leu Trp His Glu Asp Glu Ser Arg
20 25

<210> 17
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 17

Gln Ala Lys Glu Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Thr Arg Leu His
1 5 10 15
Val Arg Ile His Ala Ala Leu Ala Ser
20 25

<210> 18

<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 18
Pro Ala Val Arg Pro Gly Ile Cys Pro Gly Pro Asp Gly Trp Arg Ile
1 5 10 15
Pro Leu Gly Pro Leu Pro His Glu Phe
20 25
<210> 19
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 19
Val Ala Gln Glu Leu Phe Gln Gly Ser Asp Leu Gly Val Ala Glu Glu
1 5 10 15
Ala Glu Arg Pro Gly Glu Lys Ala Gly
20 25
<210> 20
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 20
Gly Thr Ala Thr Thr Leu Thr Asp Leu Thr Asn Pro Leu Ser Leu
1 5 10 15
<210> 21
<211> 45
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 21
Thr His Ile Arg Arg Ile Val Pro Gly Ala Val Ser Asp Gly Arg Met
1 5 10 15

Gly Ser Trp Arg Ala Pro Pro Thr Leu Ser Val Pro Ala Ser Pro Leu
20 25 30
Thr Leu Leu Gln Ser His Phe Arg Gln Gln Ala Arg Val
35 40 45

<210> 22
<211> 40
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 22

Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln Ile Thr Pro Pro Gly
1 5 10 15
Ile Pro Val His Glu Ser Thr Ala Thr Leu Gln His Tyr Ser Ser Gly
20 25 30
Trp Ala Glu Lys Ser Lys Ile Leu
35 40

<210> 23
<211> 44
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 23

Ser Pro Asp Ser Lys Ile Gln Met Val Ser Ser Ser Gln Lys Arg Ala
1 5 10 15
Leu Leu Cys Leu Ile Ala Leu Leu Ser Arg Lys Gln Thr Trp Lys Ile
20 25 30
Arg Thr Cys Leu Arg Arg Val Arg Gln Lys Cys Phe
35 40

<210> 24
<211> 32
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 24

Thr Leu Leu Ser Pro Gln Glu Ala Gly Ala Thr Lys Asp Glu Cys Glu
1 5 10 15

Gly Glu Glu Gly Ala Ala Gly Ser Arg Asp Leu Arg Ser Trp Val Thr
20 25 30

<210> 25
<211> 67
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 25

Glu Glu Thr Gly Met Pro Asn Lys Ala Ser Lys Gln Gly Pro Gly Ser
1 5 10 15
Thr Gln Arg Glu Gly Ser Leu Glu Glu Ile Pro Gly Leu Thr Asn Ile
20 25 30
Tyr Lys Leu Leu Thr Ser Val Trp Gly Leu Leu Arg Leu Trp Val Trp
35 40 45
Gly Pro Ala Leu Ala Phe Thr Ser Cys Val Thr Ser Glu Ile Ala Met
50 55 60
Arg Leu Leu
65

<210> 26
<211> 225
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 26

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

100 105 110

Val Ser Ser His Ser Gly Arg Val Leu Lys Glu Val Tyr Glu Ile Tyr
115 120 125

Asn Glu Ser Leu Phe Asp Leu Leu Ser Ala Leu Pro Tyr Val Gly Pro
130 135 140

Ser Val Thr Pro Met Thr Gly Lys Lys Leu Arg Asp Asp Tyr Leu Ala
145 150 155 160

Ser Leu His Pro Arg Leu His Ser Ile Tyr Val Ser Glu Gly Tyr Pro
165 170 175

Asp Ile Lys Gln Glu Leu Leu Arg Cys Asp Ile Ile Cys Lys Gly Gly
180 185 190

His Ser Thr Val Thr Asp Leu Gln Val Gly Thr Lys Leu Asp Leu Arg
195 200 205

Asp Asp Lys Asp Asn Ile Glu Arg Leu Arg Asp Lys Lys Leu Ala Pro
210 215 220

Ile
225

<210> 27

<211> 225

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 27

Val Lys Leu Leu Gly Ile His Cys Gln Asn Ala Ala Ile Thr Glu Met
1 5 10 15

Cys Leu Val Ala Phe Gly Asn Leu Ala Asn Leu Arg Lys Ser Ser Pro
20 25 30

Gly Thr Ser Asn Lys Cys Leu Arg Gln Val Ser Ser Leu Val Leu His
35 40 45

Ile Glu Leu Gly Arg Leu His Pro Cys Val Met Ala Ser Leu Lys Ala
50 55 60

Gln Ser Pro Ile Pro Asn Leu Tyr Leu Thr Gly Leu Leu Pro Ile His
65 70 75 80

Thr Leu Asp Val Lys Ser Thr Thr Leu Pro Ala Ala Val Arg Cys Ser
85 90 95

Glu Ser Arg Leu Met Thr Met Asp Asn Phe Gly Lys His Tyr Thr Leu
100 105 110

Lys Ser Glu Ala Pro Leu Tyr Val Gly Gly Met Pro Val Met Thr Met

115 120 125

Asp Asn Phe Gly Lys His Tyr Thr Leu Lys Ser Glu Ala Pro Leu Tyr
130 135 140

Val Gly Gly Met Pro Val His Asp Gly Pro Phe Val Phe Ala Glu Val
145 150 155 160

Asn Ala Asn Tyr Ile Thr Trp Leu Trp His Glu Asp Glu Ser Arg Gln
165 170 175

Ala Lys Glu Asp Phe Ser Gly Tyr Asp Phe Glu Thr Arg Leu His Val
180 185 190

Arg Ile His Ala Ala Leu Ala Ser Pro Ala Val Arg Pro Gly Ile Cys
195 200 205

Pro Gly Pro Asp Gly Trp Arg Ile Pro Leu Gly Pro Leu Pro His Glu
210 215 220

Phe
225

<210> 28
<211> 268
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 28

Val Ala Gln Glu Leu Phe Gln Gly Ser Asp Leu Gly Val Ala Glu Glu
1 5 10 15

Ala Glu Arg Pro Gly Glu Lys Ala Gly Gly Thr Ala Thr Thr Leu Thr
20 25 30

Asp Leu Thr Asn Pro Leu Ser Leu Thr His Ile Arg Arg Ile Val Pro
35 40 45

Gly Ala Val Ser Asp Gly Arg Met Gly Ser Trp Arg Ala Pro Pro Thr
50 55 60

Leu Ser Val Pro Ala Ser Pro Leu Thr Leu Leu Gln Ser His Phe Arg
65 70 75 80

Gln Gln Ala Arg Val Arg His Leu Ser Gln Glu Phe Gly Trp Leu Gln
85 90 95

Ile Thr Pro Pro Gly Ile Pro Val His Glu Ser Thr Ala Thr Leu Gln
100 105 110

His Tyr Ser Ser Gly Trp Ala Glu Lys Ser Lys Ile Leu Ser Pro Asp
115 120 125

Ser Lys Ile Gln Met Val Ser Ser Ser Gln Lys Arg Ala Leu Leu Cys

130 135 140

Leu Ile Ala Leu Leu Ser Arg Lys Gln Thr Trp Lys Ile Arg Thr Cys
145 150 155 160
Leu Arg Arg Val Arg Gln Lys Cys Phe Thr Leu Leu Ser Pro Gln Glu
165 170 175
Ala Gly Ala Thr Lys Asp Glu Cys Glu Gly Glu Glu Gly Ala Ala Gly
180 185 190
Ser Arg Asp Leu Arg Ser Trp Val Thr Glu Glu Thr Gly Met Pro Asn
195 200 205
Lys Ala Ser Lys Gln Gly Pro Gly Ser Thr Gln Arg Glu Gly Ser Leu
210 215 220
Glu Glu Ile Pro Gly Leu Thr Asn Ile Tyr Lys Leu Leu Thr Ser Val
225 230 235 240
Trp Gly Leu Leu Arg Leu Trp Val Trp Gly Pro Ala Leu Ala Phe Thr
245 250 255
Ser Cys Val Thr Ser Glu Ile Ala Met Arg Leu Leu
260 265

<210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 29
Asn Ser Lys Glu Glu Thr Gly His Leu Glu Asn Gly Asn
1 5 10

<210> 30
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 30
Phe Leu Ser Ile Asn Ser Lys Glu Glu Thr Gly His Leu Glu Asn Gly
1 5 10 15
Asn Lys Tyr Pro Asn Leu Glu
20

<210> 31
<211> 21

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 31
Ser Ile Asn Ser Lys Glu Glu Thr Gly His Leu Glu Asn Gly Asn Lys
1 5 10 15
Tyr Pro Asn Leu Glu
20
<210> 32
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 32
Asn Ser Lys Glu Glu Thr Gly His Leu Glu Asn Gly Asn Lys Tyr Pro
1 5 10 15
Asn Leu Glu
<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 33
Lys Glu Glu Thr Gly His Leu Glu Asn Gly Asn Lys Tyr Pro Asn Leu
1 5 10 15
Glu
<210> 34
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 34
Thr Ser Phe Leu Ser Ile Asn Ser Lys Glu Glu Thr Gly His Leu
1 5 10 15
<210> 35

<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 35
Thr Ser Phe Leu Ser Ile Asn Ser Lys Glu Glu Thr Gly His Leu Glu
1 5 10 15
Asn
<210> 36
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 36
Thr Ser Phe Leu Ser Ile Asn Ser Lys Glu Glu Thr Gly His Leu Glu
1 5 10 15
Asn Gly Asn
<210> 37
<211> 21
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 37
Thr Ser Phe Leu Ser Ile Asn Ser Lys Glu Glu Thr Gly His Leu Glu
1 5 10 15
Asn Gly Asn Lys Tyr
20
<210> 38
<211> 23
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 38
Thr Ser Phe Leu Ser Ile Asn Ser Lys Glu Glu Thr Gly His Leu Glu
1 5 10 15

Asn Gly Asn Lys Tyr Pro Asn
20

<210> 39
<211> 346
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 39
gaacctgaag tcacccagac tcccagccat caggtcacac agatgggaca ggaagtgatc 60
ttgcgctgtg tccccatctc taatcactta tacttctatt ggtacagaca aatcttgggg 120
cagaaagtcg agtttctggt ttccttttat aataatgaaa tctcagagaa gtctgaaata 180
ttcgatgatc aattctcagt tgaaaggcct gatggatcaa atttcactct gaagatccgg 240
tccacaaagc tggaggactc agccatgtac ttctgtgcca gcagcctggg tgacaggggt 300
aatgaaaaac tgtttttttgg cagtggaacc cagctctctg tcttgg 346
<210> 40
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 40
Glu Pro Glu Val Thr Gln Thr Pro Ser His Gln Val Thr Gln Met Gly
1 5 10 15
Gln Glu Val Ile Leu Arg Cys Val Pro Ile Ser Asn His Leu Tyr Phe
20 25 30
Tyr Tyr Arg Gln Ile Leu Gly Gln Lys Val Glu Phe Leu Val Ser Phe
35 40 45
Tyr Asn Asn Glu Ile Ser Glu Lys Ser Glu Ile Phe Asp Asp Gln Phe
50 55 60
Ser Val Glu Arg Pro Asp Gly Ser Asn Phe Thr Leu Lys Ile Arg Ser
65 70 75 80
Thr Lys Leu Glu Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Gly
85 90 95
Asp Arg Gly Asn Glu Lys Leu Phe Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Ser
100 105 110
Val Leu

<210> 41
<211> 331

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 41
gatgctaaga ccacacagcc aaattcaatg gagagtaacg aagaagagcc tgttcacttg 60
ccttgtaacc actccacaat cagtggaact gattacatac attggtatcg acagcttccc 120
tcccagggtc cagagtacgt gattcatggt cttacaagca atgtgaacaa cagaatggcc 180
tctctggcaa tcgctgaaga cagaaagtcc agtaccttga tcctgcaccg tgctaccttg 240
agagatgctg ctgtgtacta ctgcatcctg agacgtctta acgactacaa gctcagcttt 300
ggagccggaa ccacagtaac tgtaagagca a 331
<210> 42
<211> 110
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 42
Asp Ala Lys Thr Thr Gln Pro Asn Ser Met Glu Ser Asn Glu Glu Glu
1 5 10 15
Pro Val His Leu Pro Cys Asn His Ser Thr Ile Ser Gly Thr Asp Tyr
20 25 30
Ile His Trp Tyr Arg Gln Leu Pro Ser Gln Gly Pro Glu Tyr Val Ile
35 40 45
His Gly Leu Thr Ser Asn Val Asn Asn Arg Met Ala Ser Leu Ala Ile
50 55 60
Ala Glu Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Ile Leu His Arg Ala Thr Leu
65 70 75 80
Arg Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Ile Leu Arg Arg Leu Asn Asp Tyr
85 90 95
Lys Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Arg Ala
100 105 110
<210> 43
<211> 343
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 43

gacgctggag tcacccaaag tcccacacac ctgatcaaaa cgagaggaca gcaagtgact 60
ctgagatgct ctcctaagtc tgggcatgac actgtgtcct ggtaccaaca ggccctgggt 120
caggggcccc agtttatctt tcagtattat gaggaggaag agagacagag aggcaacttc 180
cctgatcgat tctcaggtca ccagttccct aactatagct ctgagctgaa tgtgaacgcc 240
ttgttgctgg gggactcggc cctctatctc tgtgccagca gcaaaggccc gggaggcaac 300
tacgagcagt acttcgggcc gggcaccagg ctcacggtca cag 343

<210> 44
<211> 114
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 44

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

<210> 45
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 45

Thr Ser Phe Leu Ser Ile Asn Ser Lys Glu Glu Thr Glu His Leu Glu
1 5 10 15
Asn Gly Asn Lys Tyr Pro Asn Leu Glu
20 25

<210> 46
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 46
Arg Val Leu Lys Gly Gly Ser Val Arg Lys Leu Arg His Ala Lys Gln
1 5 10 15
Leu Val Leu Glu Leu Gly Glu Glu Ala
20 25
<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 47
tgttgactca acagccacag 20
<210> 48
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 48
ctggaccact tttctgaggg 20
<210> 49
<211> 26
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 49
gccacagcac tgtgctcttg aagtcc 26
<210> 50
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成的
<400> 50
caggcagtat ctggagtcat tgag 24
<210> 51
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 51
caccatggat acctggctcg tatgc 25
<210> 52
<211> 18
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 52
attcacccac cagctcag 18
<210> 53
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 53
Glu Thr Gly His Leu Glu Asn Gly Asn Lys Tyr Pro Asn Leu Glu
1 5 10 15
<210> 54
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 54
Ala Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5
<210> 55

<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 55
Arg Leu Phe Pro Gly Leu Thr Ile Lys Ile
1 5 10
<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 56
Thr Arg Ser Ser Gly Ser His Phe Val Phe
1 5 10
<210> 57
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 57
Asp Ser Ser Leu Gln Ala Arg Leu Phe Pro Gly Leu Thr Ile Lys Ile
1 5 10 15
Gln Arg Ser Asn Gly Leu Ile His Ser
20 25
<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 58
Arg Leu Phe Pro Gly Leu Ala Ile Lys Ile
1 5 10
<210> 59
<211> 10

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 59
Arg Leu Phe Pro Gly Leu Thr Ile Lys Ile
1 5 10
<210> 60
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 60
Arg Leu Phe Pro Gly Leu Thr Ile
1 5
<210> 61
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 61
Leu Thr Ile Lys Ile Gln Arg Ser Asn Gly Leu
1 5 10
<210> 62
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 62
Leu Gln Ala Arg Leu Phe Pro Gly Leu Thr Ile
1 5 10
<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的
<400> 63
Leu Gln Ala Arg Leu Phe Pro Gly Leu Thr
1 5 10
<210> 64
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 64
Thr Ile Ile Glu Gly Thr Arg Ser Ser Gly Ser His Phe Val Phe Val
1 5 10 15
Pro Ser Leu Arg Asp Val His His Glu
20 25
<210> 65
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 65
Asp Ser Ser Leu Gln Ala Arg Leu Phe Pro Gly Leu Ala Ile Lys Ile
1 5 10 15
Gln Arg Ser Asn Gly Leu Ile His Ser
20 25
<210> 66
<211> 25
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 66
Thr Ile Ile Glu Gly Thr Arg Ser Ser Gly Ser His Leu Val Phe Val
1 5 10 15
Pro Ser Leu Arg Asp Val His His Glu
20 25
<210> 67
<211> 10

<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 67
Thr Arg Ser Ser Gly Ser His Leu Val Phe
1 5 10
<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 68
Thr Arg Ser Ser Gly Ser His Phe Val Phe
1 5 10
<210> 69
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 69
Thr Arg Ser Ser Gly Ser His Phe Val Phe Val
1 5 10
<210> 70
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成的
<400> 70
Thr Arg Ser Ser Gly Ser His Phe Val
1 5
<210> 71
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成的

<400> 71

Thr Arg Ser Ser Gly Ser His Phe
1 5

<210> 72

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 72

Phe Val Phe Val Pro Ser Leu Arg Asp Val
1 5 10

<210> 73

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 73

Thr Ser Phe Leu Ser Ile Asn Ser Lys Glu Glu Thr Gly His Leu Glu
1 5 10 15

Asn Gly Asn Lys Tyr Pro Asn Leu Glu
20 25

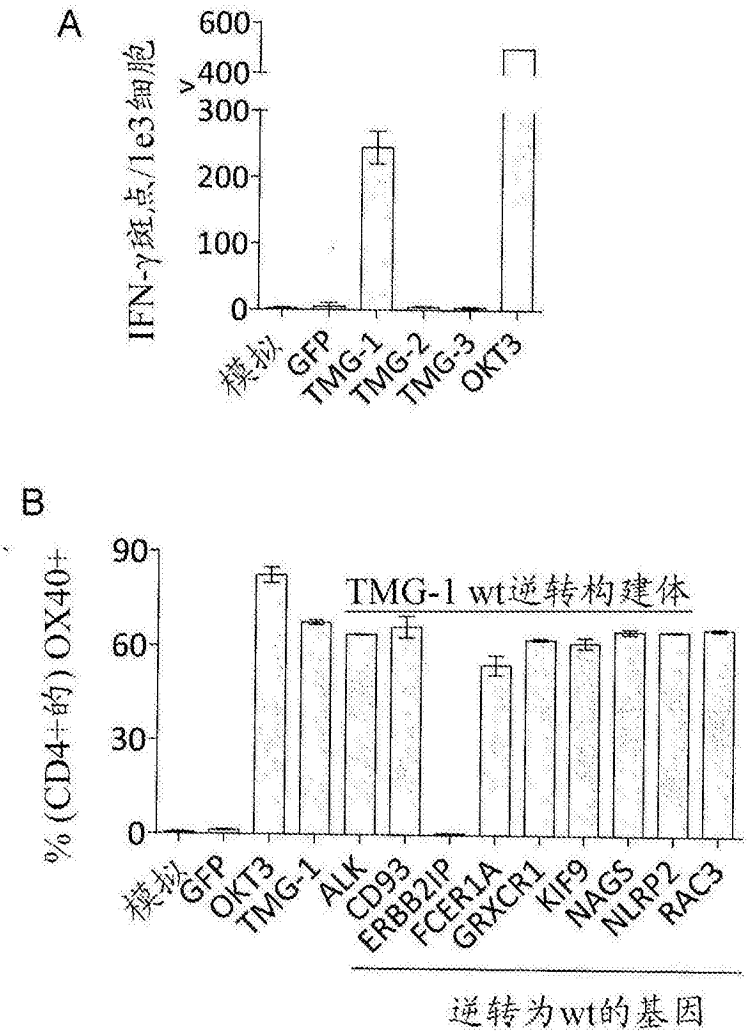

A
IFN-γ斑点/1e3细胞
600
400
300
200
100
0
模拟
GFP
TMG-1
TMG-2
TMG-3
OKT3
B
% (CD4+的) OX40+
90
60
30
0
TMG-1 wt逆转构建体
模拟
GFP
OKT3
TMG-1
ALK
CD93
ERBB2IP
FCER1A
GRXCR1
KIF9
NAGS
NLRP2
RAC3
逆转为wt的基因

图1

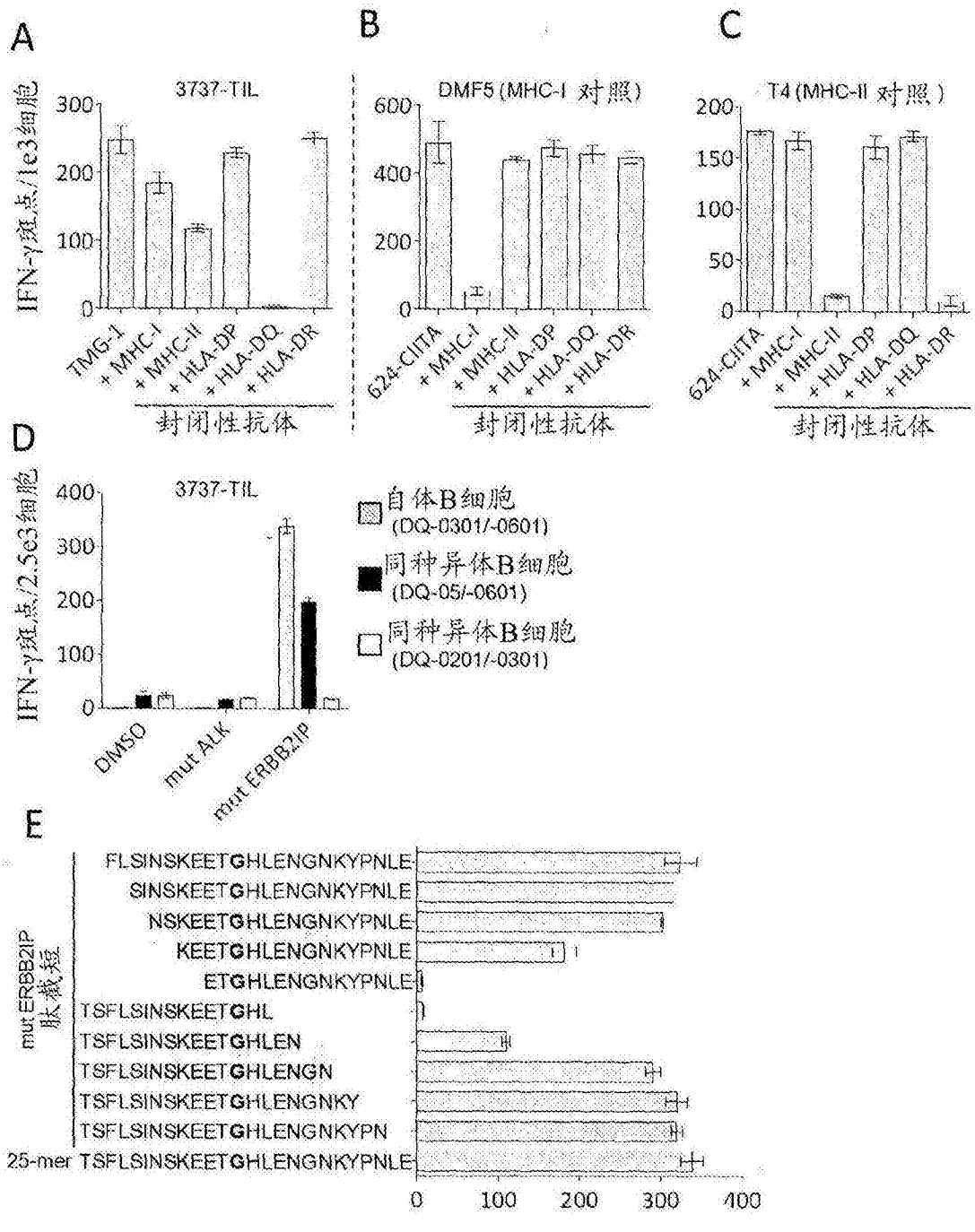

A
3737-TIL
IFN-γ斑点/1e3细胞
300
200
100
0
TMG-1
+ MHC-I
+ MHC-II
+ HLA-DP
+ HLA-DQ
+ HLA-DR
封闭性抗体
B
DMF5 (MHC-I 对照)
600
400
200
0
624-CIITA
+ MHC-I
+ MHC-II
+ HLA-DP
+ HLA-DQ
+ HLA-DR
封闭性抗体
C
T4 (MHC-II 对照)
200
150
100
50
0
624-CIITA
+ MHC-I
+ MHC-II
+ HLA-DP
+ HLA-DQ
+ HLA-DR
封闭性抗体
D
3737-TIL
IFN-γ斑点/2.5e3细胞
400
300
200
100
0
DMSO
mut ALK
mut ERBB2IP
自体B细胞
(DQ-0301/-0601)
同种异体B细胞
(DQ-05/-0601)
同种异体B细胞
(DQ-0201/-0301)
E
mut ERBB2IP
肽截短
25-mer
FLSINSKEETGHLENGNKYPNLE
SINSKEETGHLENGNKYPNLE
NSKEETGHLENGNKYPNLE
KEETGHLENGNKYPNLE
ETGHLENGNKYPNLE
TSFLSINSKEETGHL
TSFLSINSKEETGHLEN
TSFLSINSKEETGHLENGN
TSFLSINSKEETGHLENGNKY
TSFLSINSKEETGHLENGNKYPN
TSFLSINSKEETGHLENGNKYPNLE
0
100
200
300
400

图2

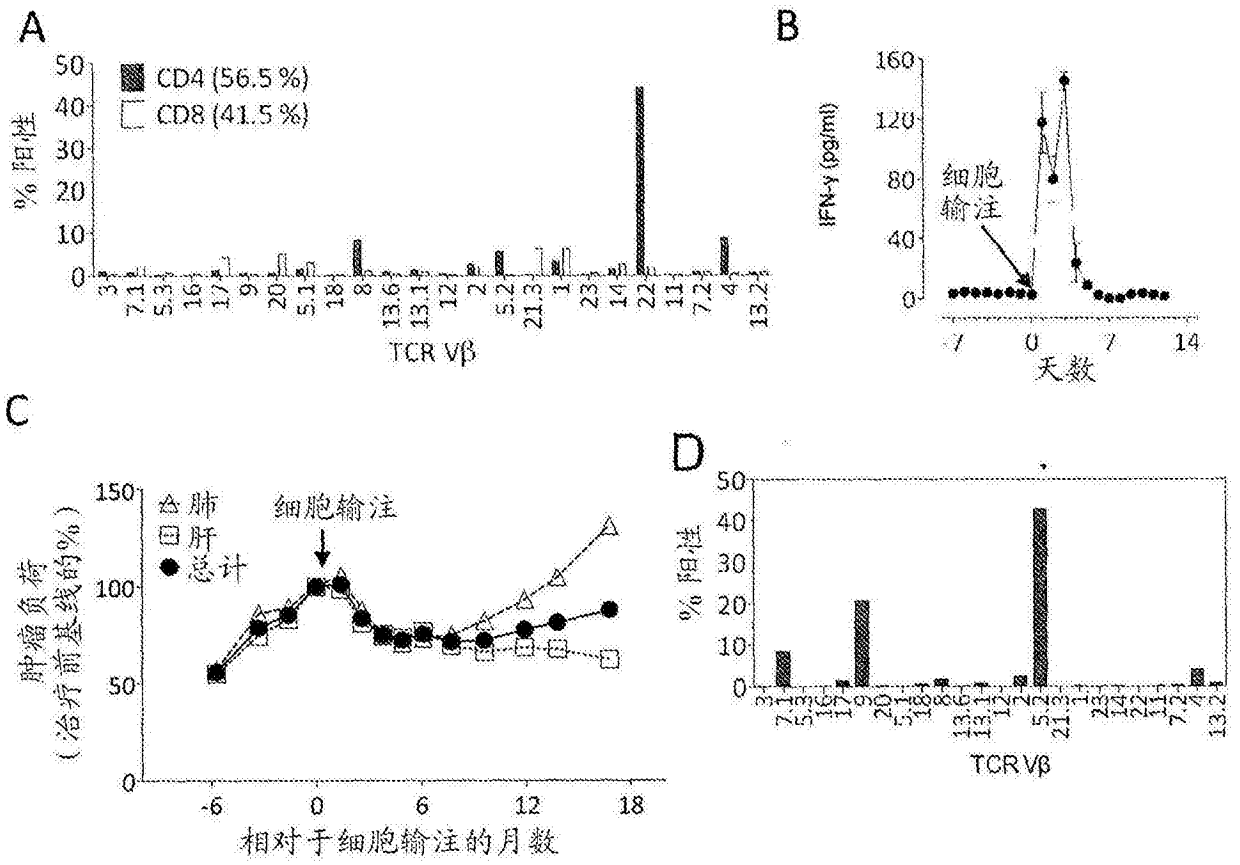

A
CD4 (56.5 %)
CD8 (41.5 %)
% 阳性
TCR Vβ
B
IFN-γ (pg/ml)
细胞输注
天数
C
肺
肝
总计
细胞输注
肿瘤负荷
（治疗前基线的%）
相对于细胞输注的月数
D
% 阳性
TCR Vβ

图3

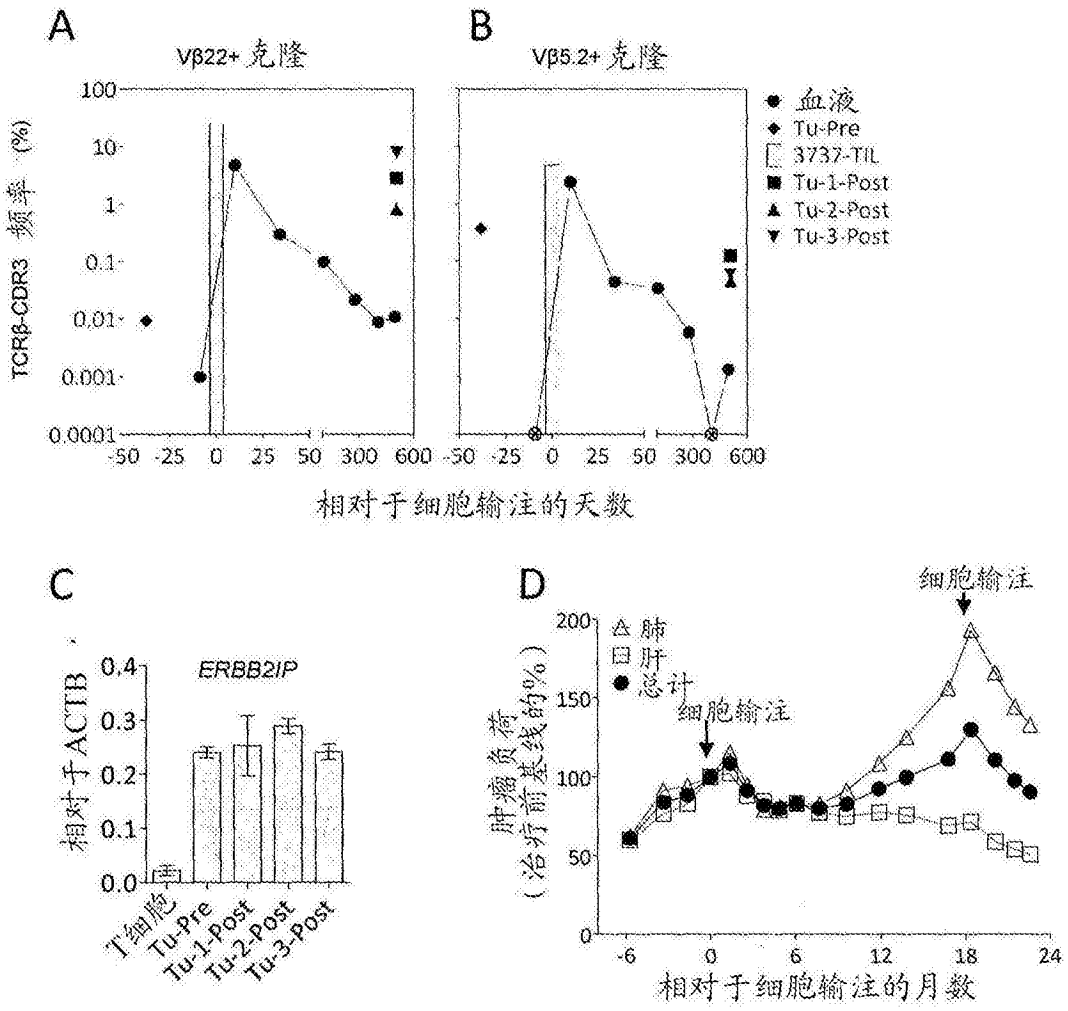

A
Vβ22+ 克隆
B
Vβ5.2+ 克隆
TCRβ-CDR3 频率 (%)
100
10
1
0.1
0.01
0.001
0.0001
-50 -25 0 25 50 300 600
相对于细胞输注的天数
血液
Tu-Pre
3737-TIL
Tu-1-Post
Tu-2-Post
Tu-3-Post
C
ERBB2IP
相对于ACTB
0.4
0.3
0.2
0.1
0.0
T细胞
Tu-Pre
Tu-1-Post
Tu-2-Post
Tu-3-Post
D
细胞输注
肺
肝
总计
细胞输注
肿瘤负荷
(治疗前基线的%)
200
150
100
50
0
-6 0 6 12 18 24
相对于细胞输注的月数

图4

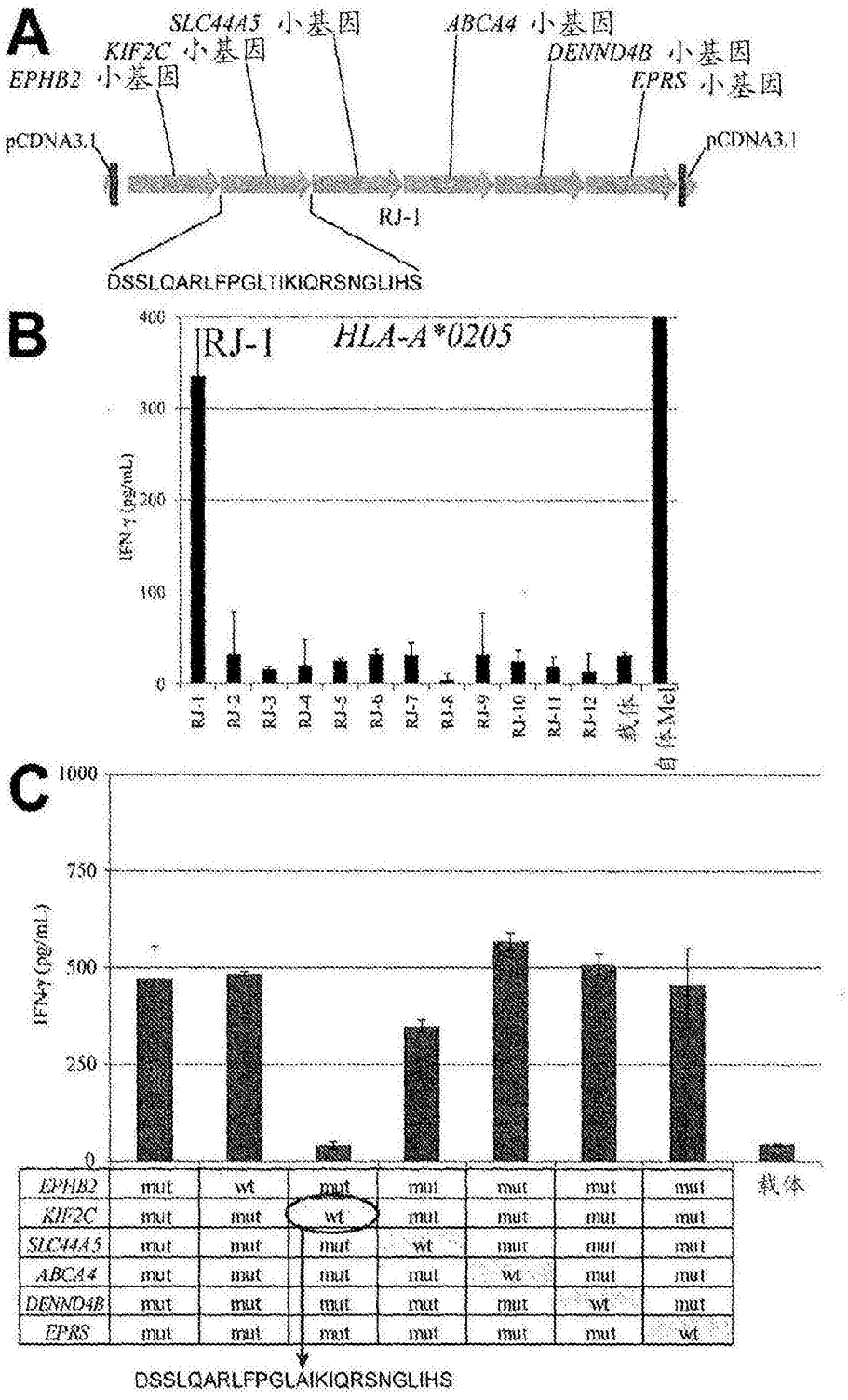

A
EPHB2 小基因
KIF2C 小基因
SLC44A5 小基因
ABCA4 小基因
DENND4B 小基因
EPRS 小基因
pCDNA3.1
pCDNA3.1
RJ-1
DSSLQARLFPGLTIKIQRSNGLIHS
B
RJ-1 HLA-A*0205
IFN-γ (pg/mL)
400
300
200
100
0
RJ-1
RJ-2
RJ-3
RJ-4
RJ-5
RJ-6
RJ-7
RJ-8
RJ-9
RJ-10
RJ-11
RJ-12
载体
自体Mel
C
IFN-γ (pg/mL)
1000
750
500
250
0
载体
EPHB2 mut wt mut mut mut mut mut
KIF2C mut mut wt mut mut mut mut
SLC44A5 mut mut mut wt mut mut mut
ABCA4 mut mut mut mut wt mut mut
DENND4B mut mut mut mut mut wt mut
EPRS mut mut mut mut mut mut wt
DSSLQARLFPGLAIKIQRSNGLIHS

图5A-C

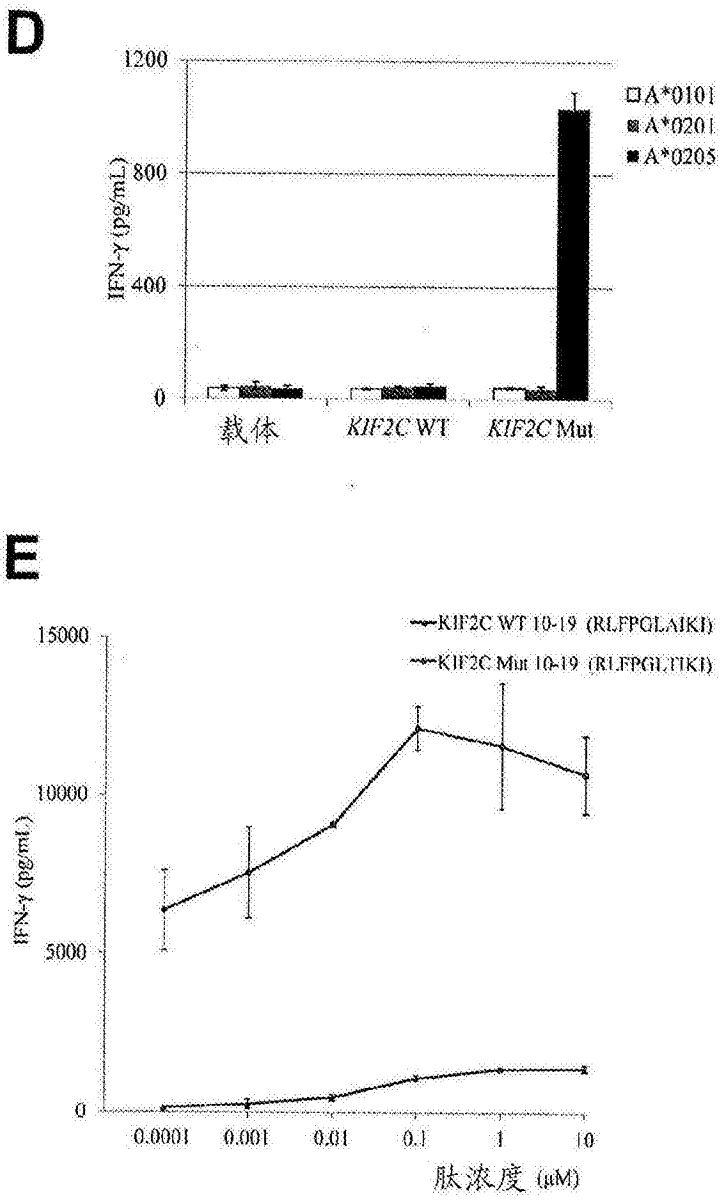

D
1200
800
400
0
IFN-γ (pg/mL)
A*0101
A*0201
A*0205
载体
KIF2C WT
KIF2C Mut
E
15000
10000
5000
0
IFN-γ (pg/mL)
KIF2C WT 10-19 (RLFPGLAIKI)
KIF2C Mut 10-19 (RLFPGLITKI)
0.0001
0.001
0.01
0.1
1
10
肽浓度 (μM)

图5D-E

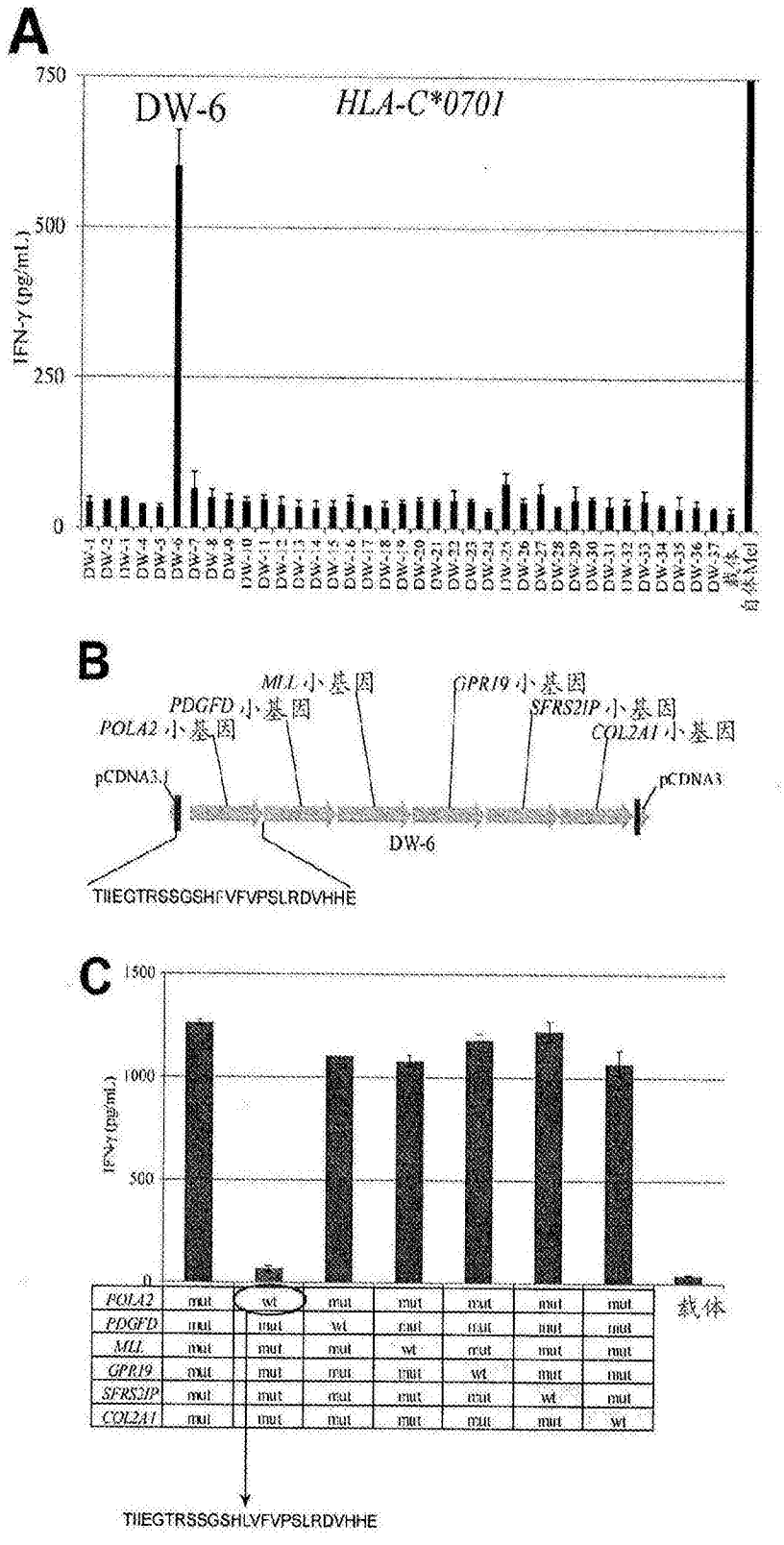

A
DW-6
HLA-C*0701
IFN-γ (pg/mL)
750
500
250
0
B
MLL 小基因
PDGFD 小基因
GPR19 小基因
SFRS2IP 小基因
POLA2 小基因
COL2A1 小基因
pCDNA3.1
pCDNA3
DW-6
TIIEGTRSSGSHLVFVPSLRDVHHE
C
1500
1000
500
0
IFN-γ (pg/mL)
POLA2 mut wt mut mut mut mut mut
PDGFD mut mut wt mut mut mut mut
MLL mut mut mut wt mut mut mut
GPR19 mut mut mut mut wt mut mut
SFRS2IP mut mut mut mut mut wt mut
COL2A1 mut mut mut mut mut mut wt
载体
TIIEGTRSSGSHLVFVPSLRDVHHE

图6A-C

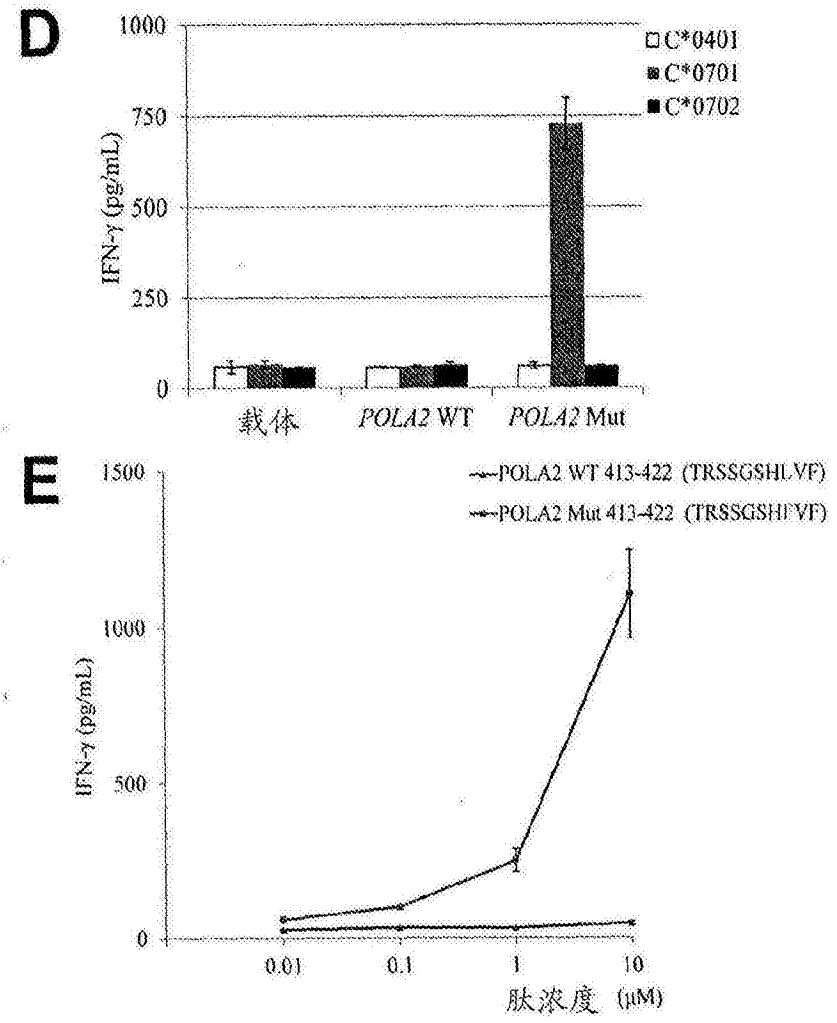

D
1000
750
500
250
0
IFN-γ (pg/mL)
C*0401
C*0701
C*0702
载体
POLA2 WT
POLA2 Mut
E
1500
1000
500
0
IFN-γ (pg/mL)
POLA2 WT 413-422 (TRSSGSHLVF)
POLA2 Mut 413-422 (TRSSGSHFVF)
0.01
0.1
1
10
肽浓度 (μM)

图6D-E

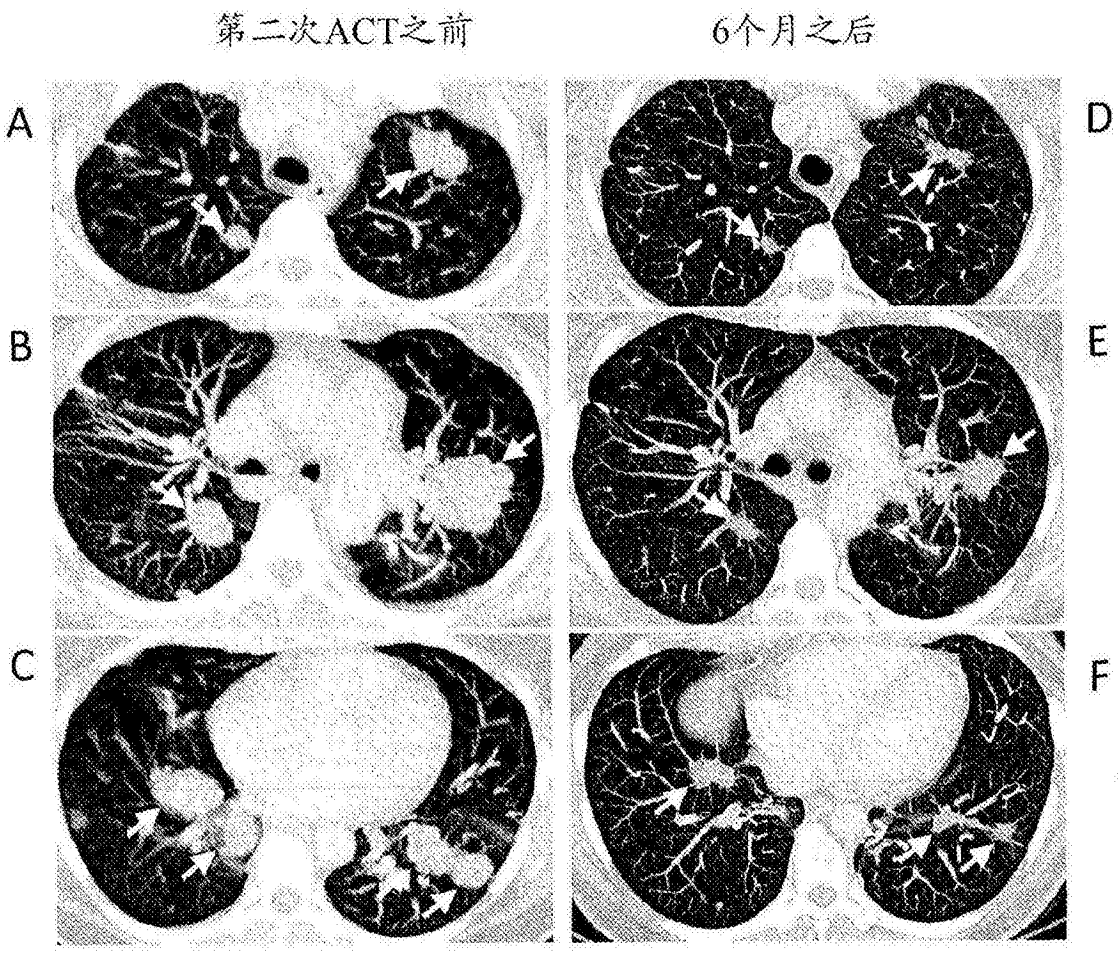


图7