



(21) 申请号 201780051883.0

(22) 申请日 2017.06.27

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 110291402 A

(43) 申请公布日 2019.09.27

(30) 优先权数据
62/355,211 2016.06.27 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2019.02.22

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/US2017/039596 2017.06.27

(87) PCT国际申请的公布数据
W02018/005559 EN 2018.01.04

(73) 专利权人 朱诺治疗学股份有限公司
地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 S·U·塔瑞恩 J·萨松
M·弗洛里奇

(74) 专利代理机构 北京坤瑞律师事务所 11494
专利代理师 封新琴

(51) Int.Cl.

G01N 33/68 (2006.01)

C12N 15/10 (2006.01)

C12N 15/869 (2006.01)

(56) 对比文件

WO 2014138209 A1, 2014.09.12

WO 0067761 A1, 2000.11.16

CN 1440462 A, 2003.09.03

CN 1561229 A, 2005.01.05

CN 104404040 A, 2015.03.11

WO 2015143558 A1, 2015.10.01

US 2013136768 A1, 2013.05.30

WO 2004015395 A2, 2004.02.19

US 2010316667 A1, 2010.12.16

CN 1367830 A, 2002.09.04

Pingping Sun 等.Conformational B-cell epitope prediction method based on antigen preprocessing and mimotopes analysis.Biomed Res Int ..2015,2015全文.

审查员 陈亚文

权利要求书6页 说明书104页
序列表23页

(54) 发明名称

鉴定肽表位的方法、结合此类表位的分子和相关用途

(57) 摘要

提供了鉴定抗原的主要组织相容性复合物(MHC)分子的肽表位的方法,该抗原是如肿瘤抗原、自身免疫抗原或病原性抗原。在一些实施方案中,该方法涉及使用含有编码该抗原的核酸分子的巨细胞病毒在产生该抗原的特定肽表位的条件下感染细胞。还提供了鉴定与在MHC分子的背景下的肽表位结合的肽结合分子的方法。在一些实施方案中,该肽结合分子是T细胞受体(TCR)或抗体,包括其抗原结合片段和其嵌合抗原受体(CAR)。还提供了遗传工程化含有此类肽结合分子的细胞的方法,以及此类遗传工程化的细胞,包括组合物及其在过继细胞疗法中的用途。

1. 一种鉴定肽表位的方法,其包括:

a) 在体外向细胞中引入包含编码靶抗原的异源核酸的重组巨细胞病毒CMV载体颗粒,其中所述CMV载体颗粒不表达活性UL128和/或UL130蛋白或其直系同源物,并且其中该UL128和/或UL130缺陷的CMV载体产生T细胞应答,所述T细胞应答的特征在于产生通用的、超表位的和/或非常规的肽表位;并且

b) 在引入后,检测或鉴定在该细胞的表面上的在MHC分子的背景下的一种或多种肽,其中在MHC分子的背景下的该一种或多种肽包含该靶抗原的肽表位。

2. 权利要求1的方法,其还包括在该细胞上鉴定与在MHC分子的背景下的该一种或多种肽中的至少一种结合的肽结合分子或其抗原结合片段。

3. 权利要求1或2的方法,其中该CMV载体颗粒在编码UL128和/或UL130的开放阅读框或编码UL128和/或UL130的直系同源物的开放阅读框中被改变。

4. 权利要求1或2的方法,其中该CMV载体颗粒在编码UL128和/或UL130或其直系同源物的开放阅读框中包含点突变、移码突变或缺失。

5. 权利要求1或2的方法,其中该CMV载体颗粒是哺乳动物CMV载体颗粒。

6. 权利要求1或2的方法,其中该CMV载体颗粒是灵长类动物或人CMV载体颗粒。

7. 权利要求1或2的方法,其中该CMV载体颗粒是恒河猴CMV载体颗粒。

8. 权利要求7的方法,其中该CMV载体颗粒是RhCMV 68-1。

9. 权利要求1或2的方法,其中该CMV载体颗粒包含与亲本CMV基因组相比在编码UL128和/或UL130的开放阅读框中已经被修饰的基因组。

10. 权利要求9的方法,其中与亲本CMV基因组相比,编码UL128和/或UL130的开放阅读框的全部或功能活性部分被缺失。

11. 权利要求9的方法,其中该亲本CMV基因组是选自AD169、Davis、Toledo、Towne或Merlin、其感染性细菌人工染色体BAC或临床分离株的人CMV基因组。

12. 权利要求1或2的方法,其中该CMV载体颗粒不表达活性UL11蛋白或UL11蛋白的直系同源物,或者在编码UL11或UL11的直系同源物的开放阅读框中被改变。

13. 权利要求1或2的方法,其中该MHC分子是MHC Ia类、MHC II类或MHC-E分子。

14. 权利要求1或2的方法,其中该细胞是原代细胞或是细胞系。

15. 权利要求1或2的方法,其中该细胞能够被该CMV载体颗粒感染。

16. 权利要求1或2的方法,其中该细胞选自成纤维细胞、内皮细胞、B细胞、树突细胞、巨噬细胞和人工抗原呈递细胞。

17. 权利要求16的方法,其中该成纤维细胞是细胞系或原代成纤维细胞。

18. 权利要求1或2的方法,其中该细胞是人细胞。

19. 权利要求1或2的方法,其中该MHC分子是人的。

20. 权利要求1或2的方法,其中:

该MHC分子是选自HLA-A2、HLA-A1、HLA-A3、HLA-A24、HLA-A28、HLA-A31、HLA-A33、HLA-A34、HLA-B7、HLA-B45和HLA-Cw8的MHC Ia类分子;

该MHC分子是MHC Ia类分子,其为HLA-A*24、HLA-A*02或HLA-A*01;该MHC分子是选自HLA-DR1、HLA-DR3、HLA-DR4、HLA-DR7、HLA-DR52、HLA-DQ1、HLA-DQ2、HLA-DQ4、HLA-DQ8和HLA-DP1的MHC II类分子;或

该MHC分子是MHC-E分子,其为HLAE*01:01或HLA E*0103。

21. 权利要求1或2的方法,其中该细胞被遗传地或重组地工程化以表达该MHC分子。

22. 权利要求1或2的方法,其中:

(1) 在向该细胞中引入该CMV载体颗粒之前或与此同时,已经将或将该细胞与激活剂或刺激剂一起孵育;或者

(2) 该方法还包括在向该细胞中引入该CMV载体颗粒之前或与此同时,将该细胞与激活剂或刺激剂一起孵育。

23. 权利要求22的方法,其中与不存在所述激活或刺激的情况下该细胞的表面上该MHC分子的存在相比,与该激活或刺激条件一起孵育增加该细胞的表面上该MHC分子的存在。

24. 权利要求23的方法,其中表达增加至少1.2倍。

25. 权利要求22的方法,其中该激活或刺激在干扰素 γ 的存在下实现。

26. 权利要求1或2的方法,其中该细胞在编码该细胞中的MHC Ia类分子的基因中被阻遏和/或被破坏和/或该细胞不表达MHC Ia类分子。

27. 权利要求26的方法,其中编码该MHC Ia类分子的基因是HLA-A、HLA-B或HLA-C基因。

28. 权利要求26的方法,其中该阻遏由抑制性核酸分子实现。

29. 权利要求28的方法,其中该抑制性核酸分子包含RNA干扰剂。

30. 权利要求28的方法,其中该抑制性核酸分子是或包含或编码小干扰RNA siRNA、微小RNA改造的shRNA、短发夹RNA shRNA、发夹siRNA、微小RNAmiRNA前体或微小RNA miRNA。

31. 权利要求26的方法,其中该基因的破坏由基因编辑核酸酶、锌指核酸酶ZFN、成簇的规则间隔短回文核酸CRISPR/Cas9和/或TAL效应核酸酶TALEN介导。

32. 权利要求26的方法,其中与不存在所述破坏的情况下该细胞中的表达相比,该MHC Ia类分子在该细胞中的表达降低至少50%。

33. 权利要求1或2的方法,其中该靶抗原是蛋白质或多肽。

34. 权利要求1或2的方法,其中该靶抗原是肿瘤抗原、自身免疫抗原、炎性抗原或病原性抗原。

35. 权利要求34的方法,其中该病原性抗原是细菌抗原或病毒抗原。

36. 权利要求1或2的方法,其中该靶抗原是已知或预先确定的。

37. 权利要求1或2的方法,其中该靶抗原是肿瘤抗原,并且该肿瘤抗原选自神经胶质瘤相关抗原、 β -人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白AFP、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2AS、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、黑色素-A/MART-1、WT-1、S-100、MBP、CD63、MUC1、p53、Ras、细胞周期蛋白B1、HER-2/neu、癌胚抗原CEA、gp100、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B3、MAGE-B4、MAGE-C1、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15、酪氨酸酶、 β -连环蛋白、NY-ESO-1、LAGE-1a、PP1、MDM2、MDM4、EGVfIII、Tax、SSX2、端粒酶、TARP、pp65、CDK4、波形蛋白、S100、eIF-4A1、IFN诱导型p78、和黑素转铁蛋白p97、尿路斑块蛋白II、前列腺特异性抗原PSA、人激肽释放酶hK2、前列腺特异性膜抗原PSM、和前列腺酸性磷酸酶PAP、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白B2、BA-46、Bcr-abl、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、半胱天冬酶8、FRa、CD24、CD44、CD133、CD166、epCAM、CA-125、HE4、Oval、雌激素受体、孕酮受体、uPA、PAI-1、CD19、CD20、CD22、ROR1、CD33/IL3Ra、c-

Met、PSMA、糖脂F77、GD-2、胰岛素生长因子IGF-I、IGF-II、IGF-I受体和间皮素。

38. 权利要求1或2的方法, 其中该靶抗原是选自甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒HCV、人乳头瘤病毒HPV、肝炎病毒感染、爱泼斯坦-巴尔病毒EBV、人疱疹病毒8HHV-8、人T细胞白血病病毒-1HTLV-1、人T细胞白血病病毒-2HTLV-2和巨细胞病毒CMV的病毒抗原。

39. 权利要求38的方法, 其中该病毒抗原是选自HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-33和HPV-35的HPV抗原。

40. 权利要求38的方法, 其中该病毒抗原是选自爱泼斯坦-巴尔核抗原EBNA-1、EBNA-2、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-前导蛋白EBNA-LP, 潜伏膜蛋白LMP-1、LMP-2A和LMP-2B, EBV-EA、EBV-MA和EBV-VCA的EBV抗原。

41. 权利要求38的方法, 其中该病毒抗原是HTLV抗原, 其为TAX。

42. 权利要求38的方法, 其中该病毒抗原是HBV抗原, 其为乙型肝炎核心抗原或乙型肝炎包膜抗原。

43. 权利要求1或2的方法, 其中检测或鉴定在MHC分子的背景下的一种或多种肽包括从该细胞的裂解物中提取肽或从细胞表面洗脱肽;

从该细胞中分离该一种或多种MHC分子并且从该MHC分子洗脱该一种或多种相关肽。

44. 权利要求43的方法, 其中分离该一种或多种MHC分子包括溶解该细胞并且通过免疫沉淀或免疫亲和层析选择该MHC分子。

45. 权利要求43的方法, 其中该一种或多种肽在弱酸或稀酸的存在下从该细胞的裂解物中提取或从细胞表面或MHC分子洗脱。

46. 权利要求43的方法, 其包括分级、分离或纯化该一种或多种肽。

47. 权利要求46的方法, 其包括对该一种或多种肽测序。

48. 权利要求1或2的方法, 其包括确定在MHC分子的背景下鉴定的肽表位是否引发抗原特异性免疫应答。

49. 权利要求48的方法, 其中该抗原特异性免疫应答是细胞毒性T细胞应答或体液T细胞应答。

50. 权利要求49的方法, 其中该T细胞是原代T细胞或T细胞克隆。

51. 权利要求50的方法, 其中该T细胞来源于健康或正常受试者或者携带病原体或携带肿瘤的受试者。

52. 权利要求51的方法, 其中该携带病原体或携带肿瘤的受试者已经或可能已经暴露于该靶抗原。

53. 权利要求51的方法, 其中该受试者是携带肿瘤的受试者, 并且该肿瘤是黑色素瘤、肉瘤、乳腺癌、肾癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、头颈部鳞状肿瘤或肺鳞癌。

54. 权利要求53的方法, 其中该T细胞来源于正常或健康受试者, 并且该T细胞在体外用所鉴定的肽表位引发。

55. 权利要求1或2的方法, 其包括:

检测或鉴定在对照细胞的表面上形成的在MHC分子的背景下的一种或多种肽, 所述对照细胞未引入该CMV载体颗粒或引入了缺乏编码该靶抗原的异源核酸的CMV载体颗粒; 并且

鉴定与该对照细胞相比引入了含有该异源核酸的CMV载体颗粒的细胞特有的在MHC分

子的背景下的一种或多种肽,从而鉴定该肽靶抗原的该一种或多种肽表位。

56. 权利要求1或2的方法,其中该肽表位是非典型肽表位。

57. 权利要求1或2的方法,其中该肽表位具有8至50个氨基酸的长度。

58. 权利要求1或2的方法,其中该肽表位对所结合的MHC具有IC₅₀大于200nM的结合亲和力。

59. 权利要求1或2的方法,其中该肽表位对所结合的MHC具有IC₅₀小于500nM的结合亲和力。

60. 权利要求1或2的方法,其中该肽表位能够在受试者体内诱导CD4+和/或CD8+免疫应答。

61. 权利要求60的方法,其中该肽表位能够在该受试者体内诱导CD8+免疫应答。

62. 权利要求1或2的方法,其中该肽表位与相同类型或超类型的至少两种MHC分子结合。

63. 权利要求60的方法,其中该免疫应答在群体中的在MHC基因座处遗传上不同的大于50%的受试者中引发。

64. 权利要求63的方法,其中该免疫应答在所述群体中大于80%的受试者中引发。

65. 权利要求63的方法,其中该受试者群体是人类。

66. 权利要求1或权利要求2的方法,其中该通用肽表位或超表位能够结合MHC II类分子。

67. 权利要求66的方法,其中该通用肽表位或超表位能够诱导CD8+T细胞应答和/或CD4+T细胞应答。

68. 权利要求67的方法,其中该通用肽表位或超表位能够诱导CD8+T细胞应答。

69. 权利要求1或权利要求2的方法,其中该通用肽表位或超表位能够结合MHC E类分子。

70. 权利要求1或2的方法,其在体外进行。

71. 权利要求1或2的方法,其中:

该CMV载体颗粒编码UL40和US28;或

该CMV载体表达一种或多种活性UL40蛋白和/或活性US28蛋白。

72. 权利要求1或2的方法,其中将含有编码活性UL40的一个或多个开放阅读框和/或编码活性US28的一个或多个开放阅读框的异源核酸插入该CMV载体颗粒中。

73. 权利要求2的方法,其中该肽结合分子或其抗原结合片段的鉴定包括:

i) 在该细胞上评估多种候选肽结合分子或其抗原结合片段与在MHC分子的背景下的该至少一种肽的结合;并且

ii) 从该多种中鉴定与在MHC分子的背景下的该至少一种肽结合的一种或多种肽结合分子。

74. 权利要求73的方法,其中该多种候选肽结合分子包含一种或多种T细胞受体TCR、TCR的一个或多个抗原结合片段或者一种或多种抗体或其抗原结合片段。

75. 权利要求73的方法,其中该多种候选肽结合分子包含至少2种不同分子。

76. 权利要求73的方法,其中:

该多种候选肽结合分子包含从来自受试者或受试者群体的样品获得的一种或多种候

选肽结合分子;或者

该多种候选肽结合分子包含在从来自受试者的样品获得的亲本支架肽结合分子中包含突变的一种或多种候选肽结合分子。

77. 权利要求76的方法, 其中该受试者或受试者群体是正常或健康受试者或者是患病受试者。

78. 权利要求77的方法, 其中该患病受试者是携带肿瘤的受试者。

79. 权利要求76的方法, 其中该多种候选肽结合分子包含TCR或其抗原结合片段, 并且该受试者已经用该靶抗原的肽表位接种; 和/或其中:

该多种候选肽结合分子包含TCR或其抗原结合片段, 并且该样品包含T细胞; 或

该多种候选肽结合分子包含抗体或其抗原结合片段, 并且该样品包含B细胞。

80. 权利要求76的方法, 其中该受试者是人或啮齿动物。

81. 权利要求76的方法, 其中该受试者是HLA转基因小鼠和/或是人TCR转基因小鼠。

82. 权利要求76的方法, 其中该样品包含外周血单核细胞PBMC或肿瘤浸润性淋巴细胞TIL。

83. 权利要求74的方法, 其中TCR的该抗原结合片段是单链TCRscTCR。

84. 权利要求76的方法, 其中该样品选自血液、骨髓和脾和/或该样品包含PBMC、脾细胞或骨髓细胞。

85. 权利要求79的方法, 其中该抗体或其抗原结合片段是IgM衍生的抗体或抗原结合片段。

86. 权利要求73的方法, 其中:

该候选肽结合分子存在于天然抗体文库中; 或

与亲本肽结合分子相比, 该候选肽结合分子包含一个或多个氨基酸突变。

87. 权利要求73的方法, 其中该候选肽结合分子是单链可变片段scFv。

88. 权利要求86的方法, 其中该一个或多个氨基酸突变包含该分子的一个或多个互补决定区CDR中的突变。

89. 权利要求73的方法, 其中该候选肽结合分子存在于展示文库中。

90. 权利要求89的方法, 其中该展示文库选自细胞表面展示文库、噬菌体展示文库、核糖体展示文库、mRNA展示文库和dsDNA展示文库。

91. 权利要求73的方法, 其中在评估该多种候选肽结合分子或其抗原结合片段与该MHC-肽复合物的结合之前, 该方法包括:

用包含该MHC-肽复合物的免疫原免疫宿主; 并且

从该宿主收集样品, 其中该样品包含该候选肽结合分子。

92. 权利要求91的方法, 其中该宿主是人或啮齿动物。

93. 权利要求92的方法, 其中该样品是血液、血清或血浆。

94. 权利要求73的方法, 其中:

所鉴定的肽结合分子或其抗原结合片段对该MHC-肽复合物表现出解离常数 K_D 从 10^{-5} M至 10^{-13} M的结合亲和力; 或者

所鉴定的肽结合分子对该MHC-肽复合物表现出 K_D 小于 10^{-5} M的结合亲和力。

95. 权利要求37的方法, 其中:

所述MUC1为MUC1-8;或者所述酪氨酸酶为酪氨酸酶相关蛋白1或酪氨酸酶相关蛋白2。
96. 权利要求30的方法,其中所述miRNA为miRNA前体。

鉴定肽表位的方法、结合此类表位的分子和相关用途

[0001] 相关申请

[0002] 本申请要求2016年6月27日提交的标题为“鉴定肽表位的方法、结合此类表位的分子和相关用途(METHOD OF IDENTIFYING PEPTIDE EPITOPES, MOLECULES THAT BIND SUCH EPITOPES AND RELATED USES)”的美国临时专利申请62/355,211的优先权权益,将其内容出于所有目的通过引用以其整体特此并入。

[0003] 通过引用并入序列表

[0004] 本申请是连同电子格式的序列表一起提交的。该序列表被提供为创建于2017年6月27日的标题为735042002140seqlist.txt的文件,其大小是39.7千字节。将该序列表的电子格式的信息通过引用以其整体并入。

技术领域

[0005] 本公开文本涉及使用巨细胞病毒载体鉴定抗原的肽表位的方法。在一些实施方案中,该抗原是肿瘤抗原、自身免疫抗原或病原性抗原。在一些实施方案中,该方法涉及在产生在MHC分子的背景下的特定肽表位的条件下向细胞中引入含有编码抗原的核酸分子的巨细胞病毒病毒颗粒。在一些实施方案中,该肽表位是非典型肽表位。本公开文本还涉及鉴定与在MHC分子的背景下的肽表位结合的肽结合分子(如T细胞受体(TCR)、抗体或其结合片段)(即,MHC-肽结合分子)的方法。本公开文本还涉及遗传工程化含有此类MHC-肽结合分子的细胞的方法,包括遗传工程化的细胞和组合物及其在过继细胞疗法中的用途。

[0006] 发明背景

[0007] 多种策略可用于鉴定抗原的T细胞表位,其可以用于设计疫苗或开发针对此类表位的治疗性结合分子(例如TCR或抗体)。在一些情况下,用于鉴定肽表位的现有方法限于鉴定已知抗原的典型肽表位,通常基于生物信息学分析和/或基于表位在经典MHC I类和/或MHC II类分子上的呈递。需要改进的策略来鉴定独特的T细胞表位,这可以增加TCR和其他结合分子的设计和开发的靶标,以用于开发治疗性分子,包括在过继免疫疗法中,用于在治疗癌症、感染性疾病和自身免疫疾病中使用。提供了满足此类需求的方法、细胞和组合物。

[0008] 发明概述

[0009] 本文提供了利用重组巨细胞病毒(CMV)载体颗粒鉴定肽表位和/或鉴定识别在MHC分子的背景下的此类肽表位的肽结合分子(例如TCR或CAR样TCR)的方法。

[0010] 在一些实施方案中,本文提供了鉴定肽表位的方法,包括向细胞中引入含有编码靶抗原的异源核酸的重组巨细胞病毒(CMV)载体颗粒,并且检测或鉴定在该细胞的表面上的在MHC分子的背景下的一种或多种肽,其中在MHC分子的背景下的该一种或多种肽包含该靶抗原的肽表位。

[0011] 在一些实施方案中,该方法还包括在该细胞上鉴定与在MHC分子的背景下的该一种或多种肽中的至少一种结合的肽结合分子或其抗原结合片段。

[0012] 在一些方面中,本文提供了鉴定与肽表位结合的肽结合分子或其抗原结合片段的方法,包括向细胞中引入含有编码靶抗原的异源核酸的重组巨细胞病毒(CMV)载体颗粒,并

且在该细胞上鉴定与在MHC分子的背景下的至少一种肽结合的肽结合分子或其抗原结合片段。

[0013] 在一些实施方案中,该方法还包括在鉴定该肽结合分子或其抗原结合片段之前或之后,通过检测或鉴定在该细胞的表面上的在MHC分子的背景下的一种或多种肽来鉴定肽表位。

[0014] 在一些方面中,该CMV载体颗粒不表达活性UL128和/或UL130蛋白或其直系同源物。在一些情况下,该CMV载体颗粒在编码UL128和/或UL130的开放阅读框或编码UL128和/或UL130的直系同源物的开放阅读框中被改变。

[0015] 在一些方面中,该CMV载体颗粒不表达活性UL128和UL130蛋白或UL128和UL130蛋白的直系同源物。在一些情形中,该CMV载体颗粒在编码UL128和UL130的开放阅读框或编码UL128和UL130的直系同源物的开放阅读框中被改变。在一些情况下,该CMV载体颗粒在编码UL128和/或UL130或其直系同源物的开放阅读框中含有点突变、移码突变或缺失。

[0016] 在一些实施方案中,该CMV载体颗粒是哺乳动物CMV载体颗粒。在一些情况下,该CMV载体颗粒是灵长类动物或人CMV载体颗粒。在一些方面中,该CMV载体颗粒是恒河猴CMV载体颗粒。在一些情况下,该CMV载体颗粒是RhCMV 68-1。在一些实施方案中,该CMV载体颗粒是人CMV载体颗粒。

[0017] 在一些方面中,该CMV载体颗粒含有与亲本CMV基因组相比在编码UL128和/或UL130的开放阅读框中已经被修饰的基因组。在一些情况下,与亲本CMV基因组相比,编码UL128和/或UL130的开放阅读框的全部或功能活性部分被缺失。在一些实施方案中,该亲本CMV基因组是选自AD169、Davis、Toledo、Towne或Merlin、其感染性细菌人工染色体(BAC)或临床分离株的人CMV基因组。在一些实施方案中,该CMV载体颗粒还不表达活性UL11蛋白或UL11蛋白的直系同源物,或者在编码UL11或UL11的直系同源物的开放阅读框中被改变。

[0018] 在一些情况下,该细胞是原代细胞或是细胞系。在一些实施方案中,该细胞能够被该CMV载体颗粒感染。在一些方面中,该细胞选自成纤维细胞、内皮细胞、B细胞、树突细胞、巨噬细胞和人工抗原呈递细胞。在一些情形中,该细胞是成纤维细胞。在一些这样的情形中,该成纤维细胞是细胞系或原代成纤维细胞。在一些实施方案中,该细胞是人细胞。

[0019] 在一些情形中,该MHC分子是MHC Ia类、MHC II类或MHC-E分子。在一些实施方案中,该MHC分子是人的。在一些例子中,该MHC分子是MHC Ia类分子,如HLA-A2、HLA-A1、HLA-A3、HLA-A24、HLA-A28、HLA-A31、HLA-A33、HLA-A34、HLA-B7、HLA-B45或HLA-Cw8。在一些方面中,该MHC分子是MHC Ia类分子,其为HLA-A*24、HLA-A*02或HLA-A*01。在一些实施方案中,该MHC分子是选自HLA-DR1、HLA-DR3、HLA-DR4、HLA-DR7、HLA-DR52、HLA-DQ1、HLA-DQ2、HLA-DQ4、HLA-DQ8和HLA-DPI的MHC II类分子。在一些方面中,该MHC分子是MHC-E分子,其为HLAE*01:01或HLAE*0103。

[0020] 在一些实施方案中,该细胞被遗传地或重组地工程化以表达该MHC分子。在一些情况下,在向该细胞中引入该CMV载体颗粒之前或与此同时,已经将或将该细胞与激活剂或刺激剂一起孵育。在一些方面中,该方法还包括在向该细胞中引入该CMV载体颗粒之前或与此同时,将该细胞与激活剂或刺激剂一起孵育。在一些方面中,与不存在所述激活或刺激的情况下该细胞的表面上该MHC分子的存在相比,与该激活或刺激条件一起孵育增加该细胞的表面上该MHC分子的存在。在一些这样的方面中,表达增加至少1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、

5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。在一些实施方案中,该激活或刺激在干扰素 γ 的存在下实现。

[0021] 在一些实施方案中,该细胞在编码该细胞中的MHC Ia类分子的基因中被阻遏和/或被破坏和/或该细胞不表达MHC Ia类分子。在一些方面中,编码该MHC Ia类分子的基因是HLA-A、HLA-B或HLA-C基因。在一些情况下,该阻遏由抑制性核酸分子实现。在一些实施方案中,该抑制性核酸分子含有RNA干扰剂。在一些方面中,该抑制性核酸分子是或含有或编码小干扰RNA(siRNA)、微小RNA改造的shRNA、短发夹RNA(shRNA)、发夹siRNA、微小RNA(miRNA前体)或微小RNA(miRNA)。在一些情况下,该基因的破坏由基因编辑核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、成簇的规则间隔短回文核酸(CRISPR)/Cas9和/或TAL效应核酸酶(TALEN)介导。在一些实施方案中,与不存在所述破坏的情况下该细胞中的表达相比,该MHC Ia类分子在该细胞中的表达降低至少50%、60%、70%、80%、90%或95%。

[0022] 在一些实施方案中,该靶抗原是蛋白质或多肽。在一些情形中,该靶抗原是肿瘤抗原、自身免疫抗原、炎性抗原或病原性抗原。在一些方面中,该病原性抗原是细菌抗原或病毒抗原。在一些实施方案中,该靶抗原是已知或预先确定的。

[0023] 在一些方面中,该靶抗原是肿瘤抗原,如神经胶质瘤相关抗原、 β -人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(AFP)、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、黑色素-A/MART-1、WT-1、S-100、MBP、CD63、MUC1(例如MUC1-8)、p53、Ras、细胞周期蛋白B1、HER-2/neu、癌胚抗原(CEA)、gp100、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A11、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B3、MAGE-B4、MAGE-C1、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15、酪氨酸酶(例如酪氨酸酶相关蛋白1(TRP-1)或酪氨酸酶相关蛋白2(TRP-2))、 β -连环蛋白、NY-ESO-1、LAGE-1a、PP1、MDM2、MDM4、EGFvIII、Tax、SSX2、端粒酶、TARP、pp65、CDK4、波形蛋白、S100、eIF-4A1、IFN诱导型p78、和黑素转铁蛋白(melanotransferrin)(p97)、尿路斑块蛋白(Uroplakin)II、前列腺特异性抗原(PSA)、人激肽释放酶(huK2)、前列腺特异性膜抗原(PSM)、和前列腺酸性磷酸酶(PAP)、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白B2、BA-46、Bcr-abl、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、半胱天冬酶8、FRa、CD24、CD44、CD133、CD166、epCAM、CA-125、HE4、Oval、雌激素受体、孕酮受体、uPA、PAI-1、CD19、CD20、CD22、ROR1、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂F77、GD-2、胰岛素生长因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I受体或间皮素。

[0024] 在一些实施方案中,该靶抗原是病毒抗原,如甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒(HCV)、人乳头瘤病毒(HPV)、肝炎病毒感染、爱泼斯坦-巴尔病毒(Epstein-Barr virus,EBV)、人疱疹病毒8(HHV-8)、人T细胞白血病病毒-1(HTLV-1)、人T细胞白血病病毒-2(HTLV-2)或巨细胞病毒(CMV)。在一些情况下,该病毒抗原是HPV抗原,如HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-33和HPV-35。

[0025] 在一些实施方案中,该病毒抗原是EBV抗原,如爱泼斯坦-巴尔核抗原(EBNA)-1、EBNA-2、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-前导蛋白(EBNA-LP)、潜伏膜蛋白LMP-1、LMP-2A和LMP-2B、EBV-EA、EBV-MA和EBV-VCA。在一些实施方案中,该病毒抗原是HTLV抗原,其为TAX。在一些实施方案中,该病毒抗原是HBV抗原,其为乙型肝炎核心抗原或乙型肝炎包膜抗原。

[0026] 在一些方面中,检测或鉴定在MHC分子的背景下的一种或多种肽包括从该细胞的裂解物中提取肽或从细胞表面洗脱肽。在一些实施方案中,检测或鉴定在MHC分子的背景下的一种或多种肽包括从该细胞中分离该一种或多种MHC分子并且从该MHC分子洗脱该一种或多种相关肽。在一些情况下,分离该一种或多种MHC分子包括溶解该细胞并且通过免疫沉淀或免疫亲和层析选择该MHC分子。在一些实施方案中,该一种或多种肽在弱酸或稀酸的存在下从该细胞的裂解物中提取或从细胞表面或MHC分子洗脱。在一些情况下,该方法还包括分级、分离或纯化该一种或多种肽。在一些实施方案中,该方法还包括对该一种或多种肽测序。

[0027] 在一些实施方案中,该方法还包括确定在MHC分子的背景下鉴定的肽表位是否引发抗原特异性免疫应答。在一些方面中,该抗原特异性免疫应答是细胞毒性T细胞应答或体液T细胞应答。

[0028] 在一些方面中,该T细胞是原代T细胞或T细胞克隆。在一些实施方案中,该T细胞来源于健康或正常受试者或者携带病原体或携带肿瘤的受试者。在一些情形中,该携带病原体或携带肿瘤的受试者已经或可能已经暴露于该靶抗原。在一些情况下,该受试者是携带肿瘤的受试者,并且该肿瘤是黑色素瘤、肉瘤、乳腺癌、肾癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、头颈部鳞状肿瘤或肺鳞癌。在一些实施方案中,该T细胞来源于正常或健康受试者,并且该T细胞在体外用所鉴定的肽表位引发。

[0029] 在一些实施方案中,该方法包括检测或鉴定在对照细胞的表面上形成的在MHC分子的背景下的一种或多种肽,所述对照细胞未引入该CMV载体颗粒或引入了缺乏编码该靶抗原的异源核酸的CMV载体颗粒。在一些情况下,该方法还包括鉴定与该对照细胞相比引入了含有该异源核酸的CMV载体颗粒的细胞特有的在MHC分子的背景下的一种或多种肽,从而鉴定该肽靶抗原的该一种或多种肽表位。

[0030] 在一些实施方案中,该肽表位是非典型肽表位。在一些方面中,该肽表位具有8至50个氨基酸、8至13个氨基酸、9至22个氨基酸或11至42个氨基酸的长度。在一些实施方案中,该肽表位对所结合的MHC具有IC₅₀大于200nM、300nM、400nM、500nM、600nM、700nM、800nM、900nM、1000nM或更大的结合亲和力。在一些情况下,该肽表位对所结合的MHC具有IC₅₀小于500nm、400nM、300nM、200nM、100nM、50nM或更小的结合亲和力。

[0031] 在一些实施方案中,该肽表位能够在受试者体内诱导CD4+和/或CD8+免疫应答。在一些情况下,该肽表位能够在该受试者体内诱导CD8+免疫应答。在一些情况下,该肽表位是通用肽表位和/或超表位(supertope)。在一些实施方案中,该肽表位与相同类型或超类型的至少两种、至少三种、至少四种、至少五种或更多种MHC分子结合。

[0032] 在一些实施方案中,该免疫应答在群体中的在MHC基因座处遗传上不同的大多数受试者中引发。

[0033] 在一些方面中,该免疫应答在群体中大于50%、60%、70%、80%、90%或更多的受试者中引发。在一些实施方案中,该受试者群体是人类。

[0034] 在一些情况下,该通用肽表位或超表位能够结合MHC II类分子。在一些情形中,该通用肽表位或超表位能够诱导CD8+ T细胞应答和/或CD4+ T细胞应答。在一些实施方案中,该通用肽表位或超表位能够诱导CD8+ T细胞应答。在一些例子中,该通用肽表位或超表位能够结合MHC E类分子。

[0035] 在一些实施方案中,该方法在体外进行。

[0036] 在一些方面中,提供了通过本文所提供的任何方法鉴定的肽表位。在一些情境下,该肽表位能够结合MHC Ia类分子。在一些情况下,该肽表位能够结合MHC II类分子。在一些情形中,该肽表位能够结合MHC E分子。

[0037] 在一些实施方案中,提供了稳定的MHC-肽复合物,其含有在MHC分子的背景下本文所提供的任何肽表位。在一些实施方案中,该稳定的MHC-肽复合物存在于细胞表面上。

[0038] 在一些情况下,该肽结合分子或其抗原结合片段的鉴定包括在该细胞上评估多种候选肽结合分子或其抗原结合片段与在MHC分子的背景下的该至少一种肽的结合。在一些方面中,该肽结合分子或其抗原结合片段的鉴定包括从该多种中鉴定与在MHC分子的背景下的该至少一种肽结合的一种或多种肽结合分子。

[0039] 在一些方面中,提供了鉴定结合MHC-肽复合物的肽结合分子或其抗原结合片段的方法。在一些情况下,该方法包括评估多种候选肽结合分子或其抗原结合片段与本文所提供的任何MHC-肽复合物的结合。在一些方面中,该方法包括从该多种中鉴定与该复合物结合的一种或多种肽结合分子。

[0040] 在一些实施方案中,提供了鉴定结合MHC-肽复合物的肽结合分子或其抗原结合片段的方法。在一些情形中,该方法包括通过本文所提供的任何方法鉴定靶抗原的肽表位。在一些情况下,该方法包括评估多种候选肽结合分子或其抗原结合片段与含有该肽表位的稳定的MHC-肽复合物的结合。在一些情形中,该方法还包括从该多种中鉴定与该MHC-肽复合物结合的一种或多种肽结合分子或其抗原结合片段。

[0041] 在一些例子中,该多种候选肽结合分子包括一种或多种T细胞受体(TCR)、TCR的一个或多个抗原结合片段或者一种或多种抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该多种候选肽结合分子含有至少2、5、10、100、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 种或更多的不同分子。

[0042] 在一些实施方案中,该多种候选肽结合分子包括从来自受试者或受试者群体的样品获得的一种或多种候选肽结合分子。在一些情况下,该多种候选肽结合分子包括在从来自受试者的样品获得的亲本支架肽结合分子中含有突变的一种或多种候选肽结合分子。在一些方面中,该受试者或受试者群体是正常或健康受试者或者是患病受试者。在一些情况下,该患病受试者是携带肿瘤的受试者。

[0043] 在一些实施方案中,该候选肽结合分子含有TCR或其抗原结合片段,并且该受试者已经用该靶抗原的肽表位接种。

[0044] 在一些方面中,该受试者是人或啮齿动物。在一些情况下,该受试者是HLA转基因小鼠和/或是人TCR转基因小鼠。

[0045] 在一些情形中,该候选肽结合分子含有TCR或其抗原结合片段,并且该样品包括T细胞。在一些情况下,该样品含有外周血单核细胞(PBMC)或肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)。

[0046] 在一些例子中,TCR的该抗原结合片段是单链TCR(scTCR)。

[0047] 在一些实施方案中,该多种候选肽结合分子包含抗体或其抗原结合片段,并且该样品包含B细胞。在一些实施方案中,该样品选自血液、骨髓和脾和/或该样品包含PBMC、脾细胞或骨髓细胞。

[0048] 在一些情况下,该抗体或其抗原结合片段是IgM衍生的抗体或抗原结合片段。在一

些方面中,该候选肽结合分子存在于天然抗体文库中。在一些实施方案中,该候选肽结合分子是单链可变片段(scFv)。在一些方面中,与亲本肽结合分子相比,该候选肽结合分子含有一个或多个氨基酸突变。在一些实施方案中,该一个或多个氨基酸突变包括该分子的一个或多个互补决定区(CDR)中的突变。

[0049] 在一些情形中,该候选肽结合分子存在于展示文库中。在一些例子中,该展示文库是细胞表面展示文库、噬菌体展示文库、核糖体展示文库、mRNA展示文库或dsDNA展示文库。

[0050] 在一些实施方案中,在评估该多种候选肽结合分子或其抗原结合片段与该MHC-肽复合物的结合之前,该方法包括用包含该MHC-肽复合物的免疫原免疫宿主。在一些情况下,该方法还包括从该宿主收集样品。在一些实施方案中,该样品含有该候选肽结合分子。

[0051] 在一些实施方案中,该宿主是人或啮齿动物。

[0052] 在一些方面中,该样品是血液、血清或血浆。

[0053] 在一些情形中,所鉴定的肽结合分子或其抗原结合片段对该MHC-肽复合物表现出解离常数(K_D)从或从约 10^{-5} M至 10^{-13} M、 10^{-5} M至 10^{-9} 或 10^{-7} M至 10^{-12} M的结合亲和力。在一些情况下,所鉴定的肽结合分子对该MHC-肽复合物表现出KD小于或小于约 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或更小的结合亲和力。

[0054] 在一些方面中,提供了通过本文所提供的任何方法鉴定的肽结合分子或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该肽结合分子或其抗原结合片段是TCR或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该肽结合分子或其抗原结合片段是抗体或其抗原结合片段。

[0055] 在一些实施方案中,提供了重组抗原受体,如含有本文所提供的任何肽结合分子或其抗原结合片段的那些。在一些实施方案中,该重组抗原受体是嵌合抗原受体(CAR)。

[0056] 在一些方面中,提供了遗传工程化的细胞,如表达本文所提供的任何肽结合分子或其抗原结合片段或重组抗原受体的细胞。在一些实施方案中,该遗传工程化的细胞是T细胞。在一些情况下,该T细胞是CD4+或CD8+ T细胞。

[0057] 在一些实施方案中,提供了CD8+遗传工程化的细胞,如表达肽结合分子或其抗原结合片段或者含有肽结合分子或其抗原结合片段的重组抗原受体。在一些情况下,该肽结合分子或其抗原结合片段特异性结合在MHC II类分子的背景下呈递的肽表位。在一些情境下,该肽结合分子是抗体或其抗原结合片段。在一些方面中,

[0058] 该重组抗原受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

[0059] 在一些方面中,该CD8+遗传工程化的细胞还表达第二肽结合分子或其抗原结合片段或者含有第二肽结合分子或其抗原结合片段的重组抗原受体。在一些情形中,该第二肽结合分子或其抗原结合片段特异性结合在MHC Ia类分子或MHC-E分子的背景下呈递的肽表位。

[0060] 在一些方面中,提供了含有本文所提供的任何肽结合分子或其抗原结合片段、重组抗原受体或遗传工程化的细胞的组合物。

[0061] 在一些实施方案中,提供了组合物,如含有CD4+和CD8+ T细胞的那些,每个细胞被工程化以表达包含肽结合分子或其抗原结合片段的重组抗原受体,该肽结合分子或其抗原结合片段结合在MHC II类分子的背景下呈递的肽表位。在一些情况下,该CD4+和CD8+细胞表达相同的肽结合分子或其抗原结合片段。在一些例子中,该肽结合分子或其抗原结合片段是T细胞受体(TCR)、TCR的抗原结合片段、抗体或抗体的抗原结合片段。在一些情况下,该

重组抗原受体是嵌合抗原受体(CAR)。

[0062] 在一些实施方案中,该组合物中的CD8⁺ T细胞用含有第二肽结合分子或其抗原结合片段的重组抗原受体进一步工程化,该第二肽结合分子或其抗原结合片段与在MHC Ia类分子或MHC-E分子的背景下呈递的肽表位特异性结合。

[0063] 在一些方面中,该组合物中CD4⁺与CD8⁺细胞的比例在5:1或约5:1与1:5或约1:5之间、在1:3或约1:3与3:1或约3:1之间、在2:1或约2:1与1:5或约1:5之间或者在2:1或约2:1与1:5或约1:5之间。

[0064] 在一些情况下,该组合物含有药学上可接受的载体。

[0065] 在一些方面中,提供了治疗疾病或病症的方法,包括向受试者给予本文所提供的任何组合物。在一些方面中,该重组抗原受体和与该疾病或病症相关的抗原结合。在一些实施方案中,该疾病或病症是癌症。

[0066] 发明详述

[0067] I. 巨细胞病毒载体用于鉴定新的或独特的T细胞表位的用途

[0068] 在一些方面中,提供了鉴定肽表位的方法,该肽表位包括衍生自靶蛋白抗原(如肿瘤抗原、自身免疫抗原或病原性抗原)的肽表位。在一些实施方案中,该方法涉及向细胞中引入含有编码异源蛋白或靶抗原的核酸分子的重组巨细胞病毒(CMV)载体颗粒(例如具有在编码UL128和/或UL130的ORF中被改变和/或编码无活性UL128和/或UL130蛋白的CMV基因组)。在一些实施方案中,该异源抗原是细胞内肿瘤抗原、病原性抗原(例如病毒抗原,如致癌病毒抗原)或自身免疫抗原。在一些实施方案中,该CMV载体颗粒编码并且表达至少一种活性UL40蛋白和/或至少一种活性US28蛋白。在一些实施方案中,该活性UL40和/或US28蛋白可以是UL40或US28的直向同源物或同源物。在一些实施方案中,该CMV载体颗粒含有活性US28蛋白或其同源物的多于一个编码序列,如活性US28蛋白或其同源物的二至五个编码序列。

[0069] 在一些实施方案中,该方法包括在由该核酸分子编码的所表达的异源蛋白能够被加工或被加工以在由该细胞表达的主要组织相容性(MHC)的背景下产生肽表位以产生MHC-肽复合物的条件下培养或孵育该细胞。在一些实施方案中,该方法包括鉴定或检测作为MHC-肽复合物的一部分展示或呈递的肽表位,在一些情况下,该方法可以包括确定此类肽表位的序列。

[0070] 在一些实施方案中,该CMV载体颗粒是这样的载体颗粒,其中在感染细胞后,细胞机器表现出加工和/或在MHC分子的背景下呈递该异源抗原的一个或多个通用的、超表位的和/或非典型的表位的能力。在一些实施方案中,该病毒载体是或者衍生自缺乏某些开放阅读框(ORF)活性从而促进通用的、超表位的和/或非典型的表位的加工、展示和/或呈递的CMV毒株。在一些实施方案中,该方法导致在细胞表面上呈递或展示非典型肽表位。在一些实施方案中,该CMV载体颗粒能够加工并展示在MHC分子的背景下的非典型表位、通用表位和/或超表位。

[0071] 在一些情况下,该方法导致鉴定可以在受试者(如人类受试者)的体内产生或可能产生或产生的肽表位。在一些实施方案中,所提供的方法在体外进行。

[0072] 在一些情况下,该异源抗原可以是在细胞表面上表达或天然表达的抗原、和/或在细胞或其区室(例如,细胞器)内部表达或天然表达的抗原、和/或作为膜内在蛋白的抗原。

在一些实施方案中,该异源抗原可以是宿主来源的蛋白质,如某些肿瘤抗原和/或自身抗原。在一些实施方案中,该异源抗原具有外源来源,如非宿主细胞蛋白,如细菌或病毒来源的蛋白质。在一些情况下,该异源抗原是与致病或患病状态或病症相关的抗原。在所提供的方法的一些实施方案中,该异源蛋白或抗原包括含有或潜在地含有一个或多个肽表位的那些,该一个或多个肽表位在MHC分子的背景下可能被TCR或其抗原结合部分(或其他肽结合分子)识别,例如在处理该多肽并且在这种MHC分子的背景下在细胞表面上作为肽片段展示这种表位之后。

[0073] 通常,本领域中用于鉴定肽表位的方法主要集中于典型肽表位的鉴定,该典型肽表位是表现出经典MHC I类或II类结合的保守序列基序和/或长度的肽。在许多方面中,已经利用生物信息学方法基于结合亲和力、长度和/或一个或多个典型锚定残基的存在来预测肽表位。在一些实施方案中,典型(或经典)MHC I类限制性肽表位的长度在约8与约11个残基之间,并且含有参与由特定MHC等位基因编码的结合蛋白的保守残基。在一些实施方案中,典型MHC II类限制性肽表位通常比经典I类表位长,如通常长度在约9与25个残基之间,如长度在15与25个残基或13与18个残基之间,并且在一些情况下,含有约9个氨基酸或约12个氨基酸的结合核心区。在一些实施方案中,基于它们对MHC的结合亲和力鉴定典型肽,由此各种方法选择出与MHC分子具有中等到高亲和力结合相互作用的结合物。在一些实施方案中,大多数已知或典型MHC肽表位被鉴定为IC₅₀值小于500nM(如小于200nM或小于50nM)的肽表位。

[0074] 然而,在一些情形中,结合亲和力、长度或典型锚定并不总是指示免疫反应性。在一些情况下,已经报道了长度长于11个氨基酸的MHC I类表位(Tynan等人(2005) *Nat. Immunol.*, 6:1114-1122; Samino等人(2006) *J. Biol. Chem.*, 281:6358-6365)。在其他情况下,有效地诱导免疫应答并不一定需要存在强肽结合,特别是在该MHC-肽复合物因为T细胞刺激而充分表现在细胞表面的情况下(Bredenbeck等人(2005) *J. Immunol.*, 174:6716-6724)。在一些方面中,能够引发抗黑色素瘤免疫的黑色素瘤相关肽表位是缺乏保守锚定残基和/或表现出较低结合亲和力的非典型肽表位(Bredenbeck等人(2005))。

[0075] 由于经典MHC I类和MHC II类分子的混杂性,在许多情况下,典型肽表位不表现出对某一类别或类型的不同MHC等位基因的广泛识别。因此,鉴定限于经典MHC分子的典型肽表位的方法可能不代表在群体中大部分受试者中有广泛反应性或存在的肽表位。

[0076] 此外,在一些情况下,并非所有肽表位都在经典MHC分子的背景下呈递。在一项示例性研究中,发现共有的前列腺/结肠癌抗原呈递在具有有限或无多态性的非经典MHC I样分子上(Housseau等人(1999) *J. of Immunol.*, 163:6330-6337)。MHC-E(也称为HLA-E)是一种可以在肿瘤细胞上过表达的非经典MHC I样分子。在一些方面中,MHC-E可以与被MHC I类识别的肽结合,尽管以较低的亲和力(Pietra等人(2010) *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 1-8)。在一些方面中,HLA-E还可以呈递非典型或非常规肽(Pietra等人(2010))和/或超表位。CD8⁺ T细胞可以通过其 $\alpha\beta$ TCR识别MHC-E-肽复合物,并且诱导HLA-E限制性CD8⁺ T细胞应答。

[0077] 由于免疫反应性(包括抗肿瘤应答)不受典型表位的加工和呈递的限制,因此需要其他方法来鉴定MHC限制性肽表位,包括能够引发对目标抗原(如肿瘤抗原)的免疫应答的表位。在一些方面中,本文所提供的方法允许鉴定通用表位、超表位和/或非常规或非典型

肽表位。

[0078] 在一些实施方案中,所提供的向细胞中引入含有编码异源蛋白或靶抗原的核酸分子的重组巨细胞病毒(CMV)载体颗粒的方法可以促进通用表位、超表位和/或非常规或非典型肽表位的产生和鉴定。在一些实施方案中,该CMV载体颗粒包含含有UL128和/或UL130开放阅读框(ORF)的修饰(如突变或缺失)的基因组,该修饰在一些情况下可以规避CMV的否则将减少或阻止此类表位的产生的免疫逃避机制。通常,在CMV中含有功能活性UL128和/或UL130 ORF的CMV(如恒河猴CMV(RhCMV))不能诱导免疫应答,并且在一些情况下,这是由于无法产生通用的、超表位的和/或非典型的(或非常规的)肽表位(参见例如Hansen等人(2013) *Science*, 340:1237874; WO2014/138209)。在一些实施方案中,该UL128和/或UL130 ORF的修饰(如突变或缺失)可以规避这种逃避机制。例如,命名为68-1的示例性RhCMV载体(其缺乏少UL128 ORF并且通过缺失命名为rh157.4的第二外显子而在UL130 ORF中被截短)能够产生通用的、超表位的和/或非典型的(或非常规的)肽表位(Hansen等人,2013;国际公开的PCT申请号WO2014/138209)。在一些实施方案中,UL128和/或UL130缺陷型CMV载体产生T细胞应答,其特征产生在于产生通用的、超表位的和/或非常规的肽表位,包括产生可以在不同的MHC单倍型中普遍识别的特定决定簇(Hansen等人,2013)。

[0079] 在一些实施方案中,该CMV颗粒包含表达活性UL40蛋白或其同源物的一个或多个基因和/或表达活性US28或其同源物的一个或多个基因。在一些实施方案中,该活性UL40蛋白和US28蛋白由该CMV天然的基因编码。在一些实施方案中,该CMV被修饰成插入编码活性UL40蛋白、US28蛋白和/或其同源物的一个或多个核苷酸序列。

[0080] 在一些实施方案中,所表达的UL40多肽含有具有氨基酸序列VMAPRTLIL (SEQ ID NO:9)、VMAPRTLLL (SEQ ID NO:5)、VMAPRTLVL (SEQ ID NO:6)、VMAPRALLL (SEQ ID NO:62)、VMAPRTVLL (SEQ ID NO:7)、VMAPRTLFL (SEQ ID NO:8)或SQAPLPCVL (SEQ ID NO:63)的VL9肽,其能够结合MHC-E结合沟(Pietra等人PNAS.2003;100(19):10896-10901;Tomasec等人, *Science*.2000;287(5455):1031-1033;WO 2016/130693)。在具体实施方案中,该VL9肽具有氨基酸序列VMAPRTLIL (SEQ ID NO:9)。在一些实施方案中,所编码的UL40多肽中的一种或多种含有氨基酸序列MNKFSNTRIGFTCA (SEQ ID NO:64),其参与HAP-E表达的TAP非依赖性上调(Prod'homme等人, *J Immunol*.2012;188(6):2794-2804)。

[0081] 在一些实施方案中,该CMV颗粒包含趋化因子结合受体、US28或其一种或多种同源物的一个或多个编码序列的一个或多个拷贝。

[0082] 在一些实施方案中,所提供的方法可以用于鉴定和/或检测在经典MHC I类分子或MHC II类分子的背景下的肽,或鉴定和/或检测在非经典MHC分子(如MHC-E)的背景下的肽。在一些实施方案中,所提供的方法还可以包括鉴定或获得结合在这种MHC分子的背景下的该肽(如结合含有该肽的MHC-肽复合物)的肽结合分子(例如TCR或TCR样抗体或其抗原结合片段)。

[0083] 在一些实施方案中,所提供的方法可以用于鉴定和/或检测在MHC II类分子的背景下的肽。在一些实施方案中,缺乏活性UL128和/或UL130蛋白的表达的CMV载体(如命名为68.1的示例性RhCMV载体)可以产生MHC I类和MHC II类限制性T细胞应答,包括MHC-I和MHC-II限制性CD8⁺ T细胞应答。因此,与MHC-II仅与CD4⁺ T细胞应答相关的教条相反,在一些方面中,某些CMV毒株能够在不存在CD4共受体的情况下促进MHC-II限制性CD8⁺ T细胞应

答(Hansen等人,2013)。在一些情况下,CMV产生的MHC-II限制性表位可以引发CD4⁺ T细胞应答和CD8⁺ T细胞应答(Hansen等人,2013)。

[0084] 因此,在所提供的方法的一些方面中,该方法可以导致鉴定或检测能够在MHC-II类分子的背景下识别并且能够引发CD4⁺和CD8⁺ T细胞应答的肽表位。在一些实施方案中,可以利用鉴定此类肽表位的能力来产生和/或工程化能够引发或诱导针对相同肽-MHC II类的CD4⁺和CD8⁺ T细胞应答的重组受体。在一些实施方案中,所提供的方法还可以包括鉴定或获得结合在MHC分子的背景下的该肽(如结合含有该肽的MHC II类-肽复合物)的肽结合分子(例如TCR或TCR样抗体或其抗原结合片段)。在一些实施方案中,在识别该肽表位(如MHC-肽复合物)后,该TCR(或其他肽结合分子)产生或触发针对该T细胞的激活信号,其诱导CD4⁺和/或CD8⁺ T细胞应答,如T细胞增殖、细胞因子产生、细胞毒性T细胞应答或其他应答。

[0085] 在一些实施方案中,所提供的方法可以用于鉴定和/或检测在非经典MHC分子(如MHC-E分子)的背景下的肽。在一些实施方案中,缺乏活性UL128和/或UL130蛋白的表达的CMV载体(如命名为68.1的示例性RhCMV载体)能够产生高百分比的作为MHC-E限制性应答的CD8⁺ T细胞应答(参见例如Wu等人“Universal,MHC-E-restricted CD8 T cell responses participate in cytomegalovirus vaccine vector-induced protection against SIV,”Oral Abstract at 20th International Aids Conference,澳大利亚墨尔本,2014年7月20日-25日)。在一些方面中,所提供的方法还可以包括鉴定或获得结合在MHC-E分子的背景下的该肽(如结合含有该肽的MHC-E-肽复合物)的肽结合分子(例如TCR或TCR样抗体或其抗原结合片段)。

[0086] 在一些实施方案中,该CMV载体颗粒能够加工并展示在MHC的背景下的典型肽表位。在一些情形中,CMV可以通过阻止针对典型肽表位的CD8⁺ T细胞应答的发展而逃避免疫系统(Hansen等人(2013))。例如,在一些实施方案中,CMV阻止典型表位产生或识别的能力可以由UL11蛋白介导。在一些情况下,缺乏活性UL11蛋白的CMV病毒载体颗粒可以引发针对典型表位的CD8⁺ T细胞应答(Hansen等人,2013)。在所提供的方法的方面中,该方法涉及向细胞中如通过感染或转导而引入缺乏活性UL11蛋白并且表达异源抗原(如肿瘤抗原,例如病毒肿瘤抗原)的CMV载体。

[0087] 在一些实施方案中,在向该细胞中引入编码该异源抗原的CMV载体颗粒和/或提供引入了编码该异源抗原的CMV载体颗粒的细胞后,该方法可以包括鉴定、检测和/或分离该肽表位,如在MHC分子的背景下存在于细胞表面上的肽。在一些情况下,此类方法可以包括熟练技术人员已知的从细胞中分离MHC结合的肽的许多方法中的任何一种,包括但不限于酸化裂解物的分析、肽从细胞表面的洗脱和/或MHC-肽复合物例如从洗涤剂溶解的细胞裂解物中的免疫亲和纯化。在一些实施方案中,该方法包括鉴定或确定所呈递或展示的肽的序列,评估所呈递或展示的肽对MHC的亲合力和/或评估或确定所呈递或展示的肽表位的免疫反应性(例如CTL应答)。

[0088] 在一些方面中,还提供了在MHC的背景下鉴定与抗原的肽表位结合的MHC-肽结合分子(例如TCR或抗体分子)的方法。在一些实施方案中,此类所鉴定的分子可以用于产生重组受体,包括TCR或CAR。在一些方面中,此类重组受体可以用于工程化细胞(如T细胞),以用于过继细胞疗法。

[0089] A. 编码异源抗原的巨细胞病毒载体和病毒颗粒

[0090] 在所提供的方法的方面中,该方法涉及向细胞中如通过感染或转导引入具有在编码UL128和/或UL130的ORF中被改变和/或编码无活性UL128和/或UL130蛋白并且含有编码异源抗原(如肿瘤抗原或病毒抗原)的核酸的基因组的CMV载体。在一些实施方案中,此类细胞可以加工该异源抗原以产生通用的、超表位的和/或非典型的肽表位,其可以在MHC I类和/或MHC II类分子的背景下在细胞表面上呈递。

[0091] 通常,UL128和UL130在灵长类动物与人CMV之间(包括在恒河猴CMV(RhCMV)与人CMV(HCMV)之间)在结构上和功能上是保守的。例如,在恒河猴和人中,UL128和UL130参与介导CMV进入和感染内皮细胞和上皮细胞,但不参与CMV进入和感染成纤维细胞(Lilia等人(2008)PNAS,105:19950-19955)。在一些情况下,UL128和UL130是含有gH、gL、UL128、UL130和UL131(其介导病毒体包膜与某些细胞类型(如内皮细胞和上皮细胞)上的质膜的相互作用和/或融合)的五聚体复合物的一部分。在一些情况下,已经显示此区域的缺失导致CMV进入上皮细胞或内皮细胞的效率降低(Lilja等人(2008)PNAS,105:19950-19955)。人CMV和恒河猴CMV中UL128蛋白的编码序列各自含有两个内含子和三个外显子。人CMV中UL130的编码序列是不含有任何内含子的未剪接转录物,而恒河猴UL130含有两个外显子,命名为rh157.4和RhUL130。RhCMV rh157.4和RhUL130的剪接产物分别与两个ORF的三分之二羧基末端和三分之一氨基末端内的HCMV UL130同源(Lilaj等人2008)。人和恒河猴UL130具有带电氨基酸和半胱氨酸残基的位置保守性(Schuessler等人(2010)J.Virol.,84:9019)。

[0092] 在一些实施方案中,通过所提供的方法引入细胞中的CMV载体颗粒在编码UL128和/或UL130或其直系同源物的开放阅读框(ORF)中被改变。在一些实施方案中,所改变的ORF导致无活性蛋白质。在一些实施方案中,该CMV载体不能表达活性UL128蛋白。在一些实施方案中,该CMV载体不能表达活性UL130蛋白。在一些实施方案中,该CMV载体不能表达活性UL128并且不能表达活性UL130蛋白。

[0093] 编码UL128和UL130蛋白的核酸序列可在公共数据库(包括国家生物技术信息中心(NCBI)的那些)中获得。举例来说,参考HCMV,例如在GenBank登录号DQ208272-DQ208294提供了UL128序列,并且在GenBank登录号DQ208254-208270和DQ011966-DQ011969提供了UL130序列。人CMV UL128的开放阅读框的长度为约506-526个核苷酸,如长度为约516个核苷酸。在一些情况下,该开放阅读框编码长度为约162至约182个氨基酸(如长度为约172个氨基酸)的蛋白质。人CMV UL130的开放阅读框的长度为约635-695个核苷酸,如长度为约645个核苷酸或长度为约690个核苷酸。该开放阅读框编码长度为约205至约225个氨基酸(如长度为约215个氨基酸)的蛋白质。

[0094] 在一些实施方案中,缺乏活性UL128和/或UL130蛋白的CMV载体可以含有活性US11蛋白。在一些实施方案中,缺乏活性UL128和/或UL130蛋白的CMV载体也含有活性UL11蛋白。在一些实施方案中,缺乏活性UL128和/或UL130蛋白的CMV载体可以含有活性US131蛋白,其在一些方面中可以参与CMV的超感染(WO2014/138209)。在一些实施方案中,缺乏活性UL128和/或UL130蛋白的CMV载体可以缺乏活性US131蛋白。

[0095] 在一些实施方案中,UL40和/或US28的一个或多个编码序列保留在该CMV载体中,或者该CMV载体被修饰成插入一个或多个编码序列,导致表达一种或多种UL40蛋白、和/或一种或多种US28蛋白和/或其同源物。在一些实施方案中,该一种或多种UL40蛋白和/或一种或多种US28蛋白和/或其同源物的表达增强MHC-E限制性CD8⁺ T细胞的产生。

[0096] UL40 信号肽调节HLA-E和gpUL18的细胞表面表达(Prod' homme等人, J Immunol.2012;188(6):2794-2804)。在一些实施方案中,所表达的UL40多肽含有具有氨基酸序列VMAPRTLIL(SEQ ID NO:9)、VMAPRTLLL(SEQ ID NO:5)、VMAPRTLVL(SEQ ID NO:6)、VMAPRALLL(SEQ ID NO:62)、VMAPRTVLL(SEQ ID NO:7)、VMAPRTLFL(SEQ ID NO:8)或SQAPLPCVL(SEQ ID NO:63)的VL9肽,其能够结合MHC-E结合沟(Pietra等人PNAS.2003;100(19):10896-10901;Tomasec等人,Science.2000;287(5455):1031-1033;WO 2016/130693)。在具体实施方案中,该VL9肽具有氨基酸序列VMAPRTLIL(SEQ ID NO:9)。在一些实施方案中,所编码的UL40多肽中的一种或多种含有氨基酸序列MNKFSNTRIGFTCA(SEQ ID NO:64),其参与HAP-E表达的TAP非依赖性上调(Prod' homme等人, J Immunol.2012;188(6):2794-2804)。

[0097] 编码UL40蛋白的核酸序列可在公共数据库(包括国家生物技术信息中心(NCBI)的那些)中获得。举例来说,参考HCMV,例如在GenBank登录号JQ060965-JQ060996和GenBank登录号AH013698的补充位置32068-32733提供了提供UL40序列。在GenBank登录号AAS48945提供了UL40的示例性氨基酸序列。

[0098] HCMV US28和RhCMV US28的五种串联同源物(RhUS28.1、RhUS28.2、RhUS28.3、RhUS28.4和RhUS28.5)具有很少序列同一性(Penfold等人, J Virol.203;77(19):10404-10413)。然而,它们都具有七跨膜蛋白的特征,包括具有显著序列相似性的疏水性和亲水性的保守交替区域以及G偶联蛋白受体的“DRY盒”基序。US28已经牵涉于增殖、血管形成、血管生成和代谢重编程以促进HCMV介导的肿瘤发生。在一些实施方案中,活性US28或US28同源物的表达可以在MHC-E限制性T细胞应答的诱导中起作用。编码US28蛋白的核酸序列可在公共数据库(包括国家生物技术信息中心(NCBI)的那些)中获得。在GenBank登录号AF498083以及GenBank登录号AH013698的位置153091-154155处提供了示例性US28序列。在GenBank登录号AAS49025和AAA98741提供了US28的示例性氨基酸序列。

[0099] 在一些实施方案中,CMV载体含有一个或多个内源UL40和/或一个或多个内源US28蛋白编码序列,其能够分别表达活性UL40和/或US28蛋白。在一些实施方案中,CMV载体被修饰成插入活性UL40和/或US28蛋白的一个或多个编码序列。在一些实施方案中,CMV载体含有表达活性UL40蛋白的一个或多个编码序列和表达活性US28蛋白的一个或多个编码序列。

[0100] 在一些实施方案中,该CMV载体是动物CMV载体,如哺乳动物CMV载体。在一些实施方案中,该CMV载体是动物CMV载体,如灵长类动物CMV载体,例如黑猩猩CMV(CCMV)、猿猴CMV(SCMV)、恒河猴CMV(RhCMV)载体。在一些实施方案中,该CMV载体是人CMV(HCMV)载体。在一些实施方案中,该CMV载体是能够感染细胞(如人细胞)的载体。在一些实施方案中,该CMV载体是能够感染、进入成纤维细胞(如人成纤维细胞)和/或在其中复制的载体。

[0101] 通常,该CMV载体被包封成形成具感染性和生物学活性的病毒颗粒。在一些实施方案中,该CMV载体不需要包括整个基因组。例如,在一些方面中,除了UL128和/或UL130之外,某些基因可以被缺失,如以使该病毒减毒,只要所得病毒仍然能够感染所需宿主。

[0102] 在一些实施方案中,该CMV载体是已知缺乏功能性或活性UL128和/或UL130基因座的分离的CMV毒株。在一些实施方案中,该CMV毒株可以是野生型毒株、临床毒株、减毒毒株或经修饰毒株,如遗传工程化的或重组的毒株。在一些实施方案中,该CMV载体是临床分离株。在一些实施方案中,该CMV载体是实验室毒株。在一些实施方案中,该CMV载体已经在成

纤维细胞系中传代。例如,UL128或UL130基因座中的一个或两个中的突变可以在成纤维细胞中连续传代后在毒株中频繁发生(参见例如Akter等人(2003),*Journal of General Virology*,84:1117-1122;Hahn等人(2004)*Journal of Virology*,78:10023-10033)。

[0103] 在一些实施方案中,该CMV载体是HCMV毒株Merlin,其在UL128基因座中含有引入终止密码子导致过早的翻译终止的移码突变(ATCC号VR-1590;登录号:AY446894)。在一些实施方案中,该CMV载体是命名为Heberling的CCMV毒株(登录号AF480884)或命名为Colburn的SCMV(登录号FJ483969),其各自在UL128的外显子2中含有移码。在一些实施方案中,该CMV载体是HCMV毒株Toledo,其由于在UL128基因座中的倒位而缺乏外显子3(ATCC号CRL-2631;登录号GU937742)。在一些实施方案中,该CMV载体是HCMV毒株Towne,其含有改变UL130的最后11个氨基酸的移码突变(ATCC号VR-977;登录号FJ616285)。在一些实施方案中,该CMV载体是命名为68-1的RhCMV载体,其缺失UL128以及UL130的第二外显子(即rh157.4;ATCC号VR-677,登录号AY186194)。

[0104] 在一些实施方案中,该CMV载体衍生自作为感染性细菌人工染色体(BAC;参见例如Paredes和Yu(2012)*Curr Protoc Microbiol.*,第14章:Unit14E 14;Brune等人“Manipulating cytomegalovirus genomes by BAC mutagenesis:Strategies and applications,”在*CytomegaloViruses:Molecular Biology and Immunology*,出版社:凯斯特学术出版社(Caister Academic Press),编辑:Matthias J.Reddehase,第61-69页)克隆的CMV毒株。在一些情况下,在大肠杆菌(*E.coli*)中作为BAC维持的CMV基因组可以用作CMV基因组诱变的模板。已经作为感染性细菌人工染色体(BAC)克隆并测序的CMV菌株在本领域是已知的(Murphy,E等人2003,*Proc.Natl.Acad.Sci.USA* 100:14976-14981)。示例性CMV BAC序列可在GenBank登录号AC146999(实验室毒株AD169);AC146851(实验室毒株Towne);AC146904(临床分离株PH);AC146905(临床样分离株Toledo);AC146906(临床分离株TR);AC146907(临床分离株FIX)和JQ795930(RhCMV 68-1)获得。在一些实施方案中,可以通过将相应的BAC DNA转染到真核细胞中(如转染到MRC-5细胞中)而从BAC获得经重构的病毒。

[0105] 在一些实施方案中,由于在动物CMV中编码UL128或UL130的核酸序列或其直系同源基因中存在突变,该CMV载体不表达活性UL128或UL130蛋白。在一些实施方案中,该突变可以是导致缺乏活性UL128或UL130蛋白的表达的任何突变。在一些实施方案中,此类突变可以包括点突变、移码突变、少于所有编码该蛋白质的序列的缺失(截短突变)或所有在编码UL128或UL130的基因中的核酸序列的缺失。

[0106] 在一些实施方案中,该CMV载体是经修饰的CMV载体,其在其基因组中与该病毒的亲本毒株相比被改变,如通过突变(例如通过添加、缺失或替换核苷酸)编码UL128或UL130中的一者或两者的ORF,从而导致一种或两种所编码的蛋白质无活性。在一些实施方案中,产生经修饰的毒株,使得UL128和UL130蛋白都缺失、缺乏或以其他方式无活性。通常,经修饰的病毒在该病毒的基因组中具有一个或多个截短、突变、插入或缺失。可以使用本领域技术人员已知的任何方法(如遗传工程和重组DNA方法)进行修饰。例如,已经描述了修饰CMV中UL128和UL130中的一者或两者的基因座的方法,包括通过缺失(参见例如Hahn等人(2004)*J.Virol.*,78:10023-10033;Wang等人(2005)*PNAS*,102:18153-18158;美国专利号7,700,350)。在一些情况下,同源重组可以用于在核酸序列中引入突变或将核酸分子插入目

靶序列中或使其缺失。经修饰的病毒可以具有一个或多个修饰的内源病毒基因和/或一个或多个修饰的基因间区。

[0107] 在一些实施方案中,对含有完整或活性UL128或UL130蛋白的亲本CMV毒株进行修饰。在一些实施方案中,对含有无活性UL128或UL130但其中UL128或UL130中的另一个有活性的亲本CMV毒株进行修饰。在一些情况下,该亲本CMV毒株可以是临床分离株、实验室毒株或BAC克隆。示例性亲本CMV毒株包括但不限于HCMV毒株AD169(登录号BK000394或AC146999;ATCC号VR-537)、HCMV毒株Davis(ATCC号VR-807)、HCMV临床分离株PH(登录号AC146904)、临床分离株FIX(登录号AC146907)、HCMV临床分离株VR1814(参见例如Hahn等人(2004) *Journal of Virology*, 78:10023)。其他示例性亲本CMV毒株包括上述任何毒株或BAC克隆,如HCMV毒株Merlin、Toledo或Towne, RhCMV毒株68-1, CCMV毒株Heberling或SCMV毒株Colburn。

[0108] 在一些实施方案中,由于在该载体的基因组中存在核酸序列而修饰了该病毒的亲本菌株,该载体包含抑制UL128或UL130蛋白的表达的核酸序列。在一些实施方案中,该核酸序列是反义、RNAi、siRNA或miRNA序列。

[0109] 1. 异源核酸

[0110] 在一些实施方案中,用于实践该方法,CMV载体(例如其具有在编码UL128和/或UL130的ORF中被改变和/或编码无活性UL128和/或UL130蛋白和/或编码UL40和/或US28的基因组)可以具有插入该病毒的基因组中的一个或多个重组(如异源)核酸序列。在一些实施方案中,该异源核酸序列呈用于表达异源蛋白的基因表达盒的形式。在一些实施方案中,该异源核酸序列编码靶抗原。

[0111] 术语“异源核酸”是指一般不由表达它的CMV病毒颗粒在体内产生并且因此通常不是引入它的CMV病毒的一般内源的核酸。在一些实施方案中,异源核酸可以指来自除CMV之外的另一种病毒(如来自另一种生物,包括相同物种或另一种物种)的核酸分子。在一些实施方案中,异源核酸的例子包括但不限于编码癌抗原、病原体特异性抗原(如细菌抗原或非CMV病毒抗原)的核酸、或编码表达该核酸的CMV病毒颗粒中一般不存在的抗原的任何其他核酸。由异源核酸编码的蛋白质可以在该病毒内表达,分泌或表达在已经作为异源蛋白引入该异源核酸的病毒的表面上。因此,术语“异源蛋白”(也称为外源蛋白、外源多肽、外来蛋白或外来多肽)是指一般不由该CMV病毒产生或不衍生自该CMV病毒的蛋白质抗原。下文描述了示例性异源抗原和编码异源抗原的核酸分子。

[0112] 在一些实施方案中,插入该CMV病毒的基因组中的核酸分子编码可以为全长抗原多肽或其免疫原性和/或抗原性片段的抗原。在一些方面中,该抗原可以是已知在受试者中触发或诱导免疫应答的蛋白质或多肽。在一些实施方案中,该蛋白质或多肽已知含有或潜在地可能含有可以被免疫系统识别的一个或多个MHC限制性肽表位。在一些方面中,当使用片段时,合适的免疫原性序列是已知的或者可以使用常规技术人员已知的方法确定。参见例如,Ausubel, F.M.等人,1998, *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, 第11.15章。通常,所表达的异源多肽的长度为至少6个氨基酸,更通常为至少约8个并且有时为至少约10个、至少约20个、至少约50个残基或甚至全长。

[0113] 在一些实施方案中,CMV载体可以被修饰成含有编码异源抗原的核酸序列。将异源核酸插入CMV载体中的方法在本领域是已知的,如描述于:欧洲专利申请0 277 773 A1;美

国专利号5,830,745、6,713,070、6,692,954、5,721,354;美国公布的专利申请US2009029755;或国际PCT公布的申请W02014/138209中。

[0114] 在一些实施方案中,可以将该异源抗原插入任何CMV载体(如本文描述的任何CMV载体)中。在一些实施方案中,可以通过将编码异源蛋白的核酸序列添加到该病毒的基因组中来修饰该CMV载体。在一些实施方案中,可以通过用编码该异源蛋白的核酸序列插入替换该病毒的基因组的一部分来修饰该CMV载体。在一些实施方案中,用于制备含有编码异源抗原的核酸的病毒的方法可以包括使用本领域熟知的用于修饰病毒的标准方法。在一些方面中,修饰方法包括例如体外重组技术、合成方法、直接克隆和体内重组方法如例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,冷泉港实验室出版社(Cold Spring Harbor Laboratory Press),纽约州冷泉港(1989)中所描述。

[0115] 在一些实施方案中,该修饰可以特异性地针对病毒基因组中的特定序列。该修饰可以针对病毒基因组的多个区域中的任何一个,包括但不限于病毒基因组的调节序列、基因编码序列、基因间序列、没有已知作用的序列或非必需区域。可供修饰的病毒基因组的多个区域在本领域对于许多病毒(包括CMV)是容易已知的。在一些实施方案中,将异源核酸分子通常在基因间区或编码非必需病毒基因产物的基因座中插入病毒基因组中。例如,在一些实施方案中,编码该异源抗原的核苷酸序列通常被插入或代替该病毒的基因组中的非必需基因或区域。在一些实施方案中,通常插入对于在细胞培养物中复制不是必需的基因(例如pp65(UL83)基因)中。在一些实施方案中,插入可以在可以通过补充细胞系补偿的基因中(例如IE1,参见Mocarski等人,1996,PNAS 93:11231)。在一些实施方案中,可以插入非必需非编码区中,以使内源CMV基因组不受影响。

[0116] 在一些实施方案中,通过体内重组插入该异源核酸。在一些实施方案中,可以在供体DNA的存在下在细胞相容性培养基中用CMV DNA转染细胞,该供体DNA含有侧翼为与CMV基因组的部分同源的DNA序列的异源DNA,由此将该异源DNA引入CMV的基因组中。在一些实施方案中,来自CMV基因组的一个或多个区域可以被缺失,并且可以将编码该异源抗原的核苷酸序列插入所缺失区域中。在一些实施方案中,可以通过切割CMV DNA以获得经切割的CMV DNA,将异源DNA连接到经切割的CMV DNA以获得杂合CMV-异源DNA,用该杂合CMV-异源DNA转染细胞来插入该异源DNA。在一些实施方案中,可以将该异源DNA插入CMV中以便导致该DNA的稳定整合及其表达的任何方向产生经遗传工程化的CMV载体。在一些实施方案中,转染属于成纤维细胞,如原代成纤维细胞或已知允许CMV生长的其他细胞系。

[0117] 在一些实施方案中,表达异源基因产物的经工程化的或重组的CMV可以通过直接克隆产生。在此类方法中,例如,任选地与启动子可操作地连接的异源核酸的侧翼可以为用于插入该靶病毒中的独特限制性内切核酸酶位点中的限制性内切核酸酶切割位点。在一些方面中,该病毒DNA可以使用标准技术纯化,并且用序列特异性限制性内切核酸酶切割,其中该序列是病毒基因组中的独特位点。可以利用病毒基因组中的任何独特位点,条件是该位点处的修饰不会干扰病毒复制。

[0118] 在一些方面中,可以回收含有编码异源抗原的核酸的经工程化的CMV。在一些实施方案中,该供体DNA可以包括选择性标记,如gpt、 β -半乳糖苷酶、GFP或其他标记。在一些实施方案中,遗传工程化的或重组的病毒可以通过在含有该选择性标记的选择剂的培养基中(例如在含有霉酚酸的培养基中)生长来选择或者在施加显色底物(如X-gal)后通过蓝斑表

型来鉴定。在一些实施方案中,可以对工程化的病毒进行噬斑纯化和表征,如通过限制酶分析或Southern印迹程序。在一些实施方案中,可以利用质粒穿梭载体促进工程化的或重组的病毒的构建和产生(参见例如Spaete和Mocarski, (1987) *Proc. Nat. Acad. Sci.*, 84:7213-17)。

[0119] 在一些实施方案中,编码异源抗原的核酸可以包括一个或多个核酸控制序列或调节序列,其可以用于控制插入该病毒的该一个或多个异源基因的表达。根据已知因素和设计偏好,本领域技术人员可获得各种此类控制或调节序列。在一些实施方案中,该另外的核酸控制或调节序列可以包括但不限于启动子、增强子、IRES、内含子和其他元件。通常,此类其他控制或调节序列与编码该异源蛋白的核酸分子可操作地连接。在一些实施方案中,该表达盒还可以包括功能性截短的多腺苷酸化信号,如SV40多腺苷酸化信号。在一些实施方案中,该多腺苷酸化信号是截短的,但是是功能性的。

[0120] 在一些实施方案中,编码该异源抗原的核酸可以包括启动子。在一些实施方案中,异源核酸分子可以作为表达盒来提供,该表达盒与用于表达该异源蛋白的启动子可操作地连接。例如,在一些实施方案中,编码该异源抗原的核酸本身可以包括用于驱动在该CMV载体中表达的启动子。

[0121] 在一些实施方案中,该启动子是天然启动子或者是非天然启动子。在一些实施方案中,该启动子可以是内源CMV启动子,如HCMV、rhCMV、鼠或其他CMV启动子。在一些实施方案中,该异源核酸可以与内源CMV基因框内融合,并且因此在内源启动子的控制下。在一些实施方案中,该启动子可以是产生足够水平表达的一些其他病毒或细胞启动子。在一些实施方案中,该启动子可以是非病毒启动子,如EF1 α 启动子或SV40早期启动子。在一些实施方案中,该启动子可以是截短的转录活性启动子,如含有由该病毒提供的反式激活蛋白反式激活的区域和衍生出该截短的转录活性启动子的全长启动子的最小启动子区域的启动子。通常,启动子由对应于最小启动子的DNA序列和上游调节序列的缔合组成。在一些情况下,最小启动子由CAP位点加TATA盒(基本转录水平、不受调节的转录水平的最小序列)组成。在一些情况下,上游调控序列由上游元件和增强子序列组成。可以使用任何合适的启动子,包括合成的和天然存在的以及经修饰的启动子。示例性启动子包括合成启动子,包括合成的病毒和动物启动子。

[0122] 在一些实施方案中,异源核酸分子可以限于该异源抗原的编码DNA。在一些情况下,该核酸分子或构建体可以相对于内源CMV启动子以这样的方向放置,使得其与该启动子可操作地连接并且由此表达。

[0123] 在一些实施方案中,可以将编码该异源抗原的核酸的多个拷贝插入该病毒的基因组中,或者可以使用强或早期启动子或早期和晚期启动子或其任何组合,以便扩增或增加表达。因此,在一些情况下,编码该异源抗原的核酸可以相对于CMV内源启动子适当地定位,或者那些启动子可以易位以与编码该异源抗原的DNA一起插入在另一个位置。在一些方面中,编码多于一种异源抗原的核酸可以包装在该CMV载体中。

[0124] 异源抗原

[0125] 在一些实施方案中,该CMV载体(例如具有在编码UL128和/或UL130的ORF中被改变和/或编码无活性UL128和/或UL130蛋白的CMV基因组)是含有编码异源蛋白的核酸分子的重组载体,该异源蛋白是多肽抗原或其片段,包括来自病原体、细胞基因、肿瘤抗原或病毒

的抗原。在一些实施方案中,该抗原是肿瘤相关抗原、与自身免疫疾病或炎性疾病相关的特定细胞类型表达的抗原或衍生自病毒病原体或细菌病原体的抗原。在一些实施方案中,该异源抗原是参与疾病的抗原。在一些实施方案中,该疾病可以由恶性肿瘤或细胞转化引起,如癌症。在一些实施方案中,该抗原可以是来自肿瘤或癌细胞的细胞内蛋白质抗原,如肿瘤相关抗原。在一些实施方案中,该疾病可以由感染(如由细菌或病毒感染)引起。在一些实施方案中,该抗原是病毒相关的癌抗原。在一些实施方案中,该疾病可以是自身免疫疾病。其他靶标包括The HLA Factsbook (Marsh等人(2000))中列出的那些和本领域已知的其他靶标。

[0126] 在一些实施方案中,该异源抗原是与肿瘤或癌症相关的抗原。在一些实施方案中,肿瘤或癌抗原是可以在恶性细胞上发现、在恶性细胞内发现的抗原,或者是肿瘤细胞生长的培养基。在一些实施方案中,肿瘤或癌抗原是主要由肿瘤细胞或癌细胞表达或过表达的抗原。在一些实施方案中,肿瘤抗原包括但不限于突变的肽、分化抗原和过表达的抗原,所有这些都可以用作治疗的靶标。

[0127] 在一些实施方案中,该肿瘤或癌抗原是淋巴瘤(例如,非霍奇金淋巴瘤或霍奇金淋巴瘤)抗原、B细胞淋巴瘤癌抗原、白血病抗原、骨髓瘤(即,多发性骨髓瘤或浆细胞骨髓瘤)抗原、急性淋巴细胞白血病抗原、慢性髓性白血病抗原或急性髓系白血病抗原。在一些实施方案中,该癌抗原是在癌症中过表达或与其相关的抗原,该癌症是腺癌,如胰腺腺癌、结肠腺癌、乳腺腺癌、卵巢腺癌、肺腺癌、前列腺腺癌、头颈腺癌,包括多发性骨髓瘤和一些B细胞淋巴瘤。在一些实施方案中,该抗原与癌症相关,该癌症是如前列腺癌、肺癌、乳腺癌、卵巢癌、胰腺癌、皮肤癌、肝癌(例如,肝细胞腺癌)、肠癌或膀胱癌。

[0128] 已经鉴定了许多肿瘤抗原并且它们在本领域是已知的,包括MHC限制性T细胞限定的肿瘤抗原(参见例如cancerimmunity.org/peptide/;Boon和Old(1997) Curr Opin Immunol, 9,681-3;Cheever等人(2009) Clin Cancer Res, 15,5323-37)。这些肿瘤抗原包括突变的肽、分化抗原和过表达的抗原,所有这些都可以用作治疗的靶标。

[0129] 在一些实施方案中,该异源抗原是肿瘤抗原,其可以为神经胶质瘤相关抗原、 β -人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(AFP)、B细胞成熟抗原(BCMA, BCM)、B细胞激活因子受体(BAFFR, BR3)、和/或跨膜激活因子和CAML相互作用因子(TACI)、Fc受体样5(FCRL5, FcRH5)、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、黑色素-A/MART-1、WT-1、S-100、MBP、CD63、MUC1(例如MUC1-8)、p53、Ras、细胞周期蛋白B1、HER-2/neu、癌胚抗原(CEA)、gp100、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A11、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B3、MAGE-B4、MAGE-C1、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15、酪氨酸酶(例如酪氨酸酶相关蛋白1(TRP-1)或酪氨酸酶相关蛋白2(TRP-2))、 β -连环蛋白、NY-ESO-1、LAGE-1a、PP1、MDM2、MDM4、EGFvIII、Tax、SSX2、端粒酶、TARP、pp65、CDK4、波形蛋白、S100、eIF-4A1、IFN诱导型p78、和黑素转铁蛋白(p97)、尿路斑块蛋白II、前列腺特异性抗原(PSA)、人激肽释放酶(huK2)、前列腺特异性膜抗原(PSM)、和前列腺酸性磷酸酶(PAP)、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白B2、BA-46、 β -连环蛋白、Bcr-abl、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、半胱天冬酶8或B-Raf抗原。其他肿瘤抗原可以包括衍生自FRa、CD24、CD44、CD133、CD166、epCAM、CA-125、HE4、Oval、雌激素受体、孕酮受体、uPA、PAI-1、CD19、CD20、

CD22、ROR1、间皮素、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂F77、GD-2、胰岛素生长因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I受体和间皮素的任何肿瘤抗原。特异性肿瘤相关抗原或T细胞表位是已知的(参见例如van der Bruggen等人(2013)Cancer Immun,可在www.cancerimmunity.org/peptide/获得;Cheever等人(2009)Clin Cancer Res,15,5323-37)。

[0130] 在一些实施方案中,该异源抗原是病毒抗原。已经鉴定了许多病毒抗原靶标并且它们是已知的,包括衍生自HIV、HTLV和其他病毒中的病毒基因组的肽(参见例如Addo等人(2007)PLoS ONE,2,e321;Tsomides等人(1994)J Exp Med,180,1283-93;Utz等人(1996)J Virol,70,843-51)。示例性病毒抗原包括但不限于来自甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒(例如,HBV核心和表面抗原(HBVC,HBV))、丙型肝炎病毒(HCV)、爱泼斯坦-巴尔病毒(例如EBVA)、人乳头瘤病毒(HPV;例如E6和E7)、人类免疫缺陷型1型病毒(HIV1)、卡波西肉瘤疱疹病毒(KSHV)、人乳头瘤病毒(HPV)、流感病毒、拉沙病毒、HTLN-1、HIN-1、HIN-II、CMN、EBN或HPN的抗原。在一些实施方案中,该靶蛋白是细菌抗原或其他病原性抗原,如结核分枝杆菌(*Mycobacterium tuberculosis*,MT)抗原、锥虫(例如克氏锥虫(*Tiypansoma cruzi*,*T.cruzi*))抗原(如表面抗原(TSA))或疟疾抗原。特异性病毒抗原或表位或其他病原性抗原或肽表位是已知的(参见例如Addo等人(2007)PLoS ONE,2,e321;Anikeeva等人(2009)Clin Immunol,130,98-109)。

[0131] 在一些实施方案中,该抗原是衍生自与癌症相关的病毒(如致癌病毒)的抗原。例如,致癌病毒是已知某些病毒感染导致不同类型癌症发展的病毒,例如甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒(例如,HBV核心和表面抗原(HBVC,HBV))、丙型肝炎病毒(HCV)、人乳头瘤病毒(HPV)、肝炎病毒感染、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、人疱疹病毒8型(HHV-8)、人T细胞白血病病毒-1(HTLV-1)、人T细胞白血病病毒-2(HTLV-2或巨细胞病毒(CMV)抗原。

[0132] 在一些实施方案中,该病毒抗原是HPV抗原,其在一些情况下可以导致患宫颈癌的更大风险。在一些实施方案中,该抗原可以是HPV-16抗原、和HPV-18抗原、和HPV-31抗原、HPV-33抗原或HPV-35抗原。在一些实施方案中,该病毒抗原是HPV-16抗原(例如,HPV-16的E1、E2、E6和/或E7蛋白的血清反应区,参见例如美国专利号6,531,127)或HPV-18抗原(例如,HPV-18的L1和/或L2蛋白的血清反应区,如美国专利号5,840,306中所描述)。

[0133] 在一些实施方案中,该病毒抗原是HBV或HCV抗原,其在一些情况下可以导致比HBV或HCV阴性受试者患肝癌的更大风险。例如,在一些实施方案中,该异源抗原是HBV抗原,如乙型肝炎核心抗原或乙型肝炎包膜抗原(US2012/0308580)。

[0134] 在一些实施方案中,该病毒抗原是EBV抗原,其在一些情况下可以导致比EBV阴性受试者患伯基特淋巴瘤、鼻咽癌和霍奇金病的更大风险。例如,EBV是在一些情况下发现与许多不同组织来源的人类肿瘤相关的人疱疹病毒。虽然主要发现为无症状感染,但是EBV阳性肿瘤的特征在于病毒基因产物(如EBNA-1、LMP-1和LMP-2A)的活跃表达。在一些实施方案中,该异源抗原是EBV抗原,其可以包括爱泼斯坦-巴尔核抗原(EBNA)-1、EBNA-2、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-前导蛋白(EBNA-LP),潜伏膜蛋白LMP-1、LMP-2A和LMP-2B,EBV-EA、EBV-MA或EBV-VCA。

[0135] 在一些实施方案中,该病毒抗原是HTLV-1或HTLV-2抗原,其在一些情况下可以导致比HTLV-1或HTLV-2阴性受试者患T细胞白血病的更大风险。例如,在一些实施方案中,该异源抗原是HTLV抗原,如TAX。

[0136] 在一些实施方案中,该病毒抗原是HHV-8抗原,其在一些情况下可以导致比HHV-8阴性受试者患卡波西肉瘤的更大风险。在一些实施方案中,该异源抗原是CMV抗原,如pp65或pp64(参见美国专利号8361473)。

[0137] 在一些实施方案中,该异源抗原是自身抗原,如与自身免疫疾病或障碍相关的多肽的抗原。在一些实施方案中,该自身免疫疾病或障碍可以是多发性硬化(MS)、类风湿性关节炎(RA)、干燥综合征、硬皮病、多肌炎、皮肌炎、系统性红斑狼疮、幼年型类风湿性关节炎、强直性脊柱炎、重症肌无力(MG)、大疱性类天疱疮(真皮-表皮连接处的基底膜的抗体)、天疱疮(粘多糖蛋白复合物或细胞内水泥物质的抗体)、肾小球肾炎(肾小球基底膜的抗体)、古德帕斯丘综合征、自身免疫性溶血性贫血(红细胞的抗体)、桥本病(甲状腺的抗体)、恶性贫血(内因子的抗体)、特发性血小板减少性紫癜(血小板的抗体)、格拉夫病或艾迪生病(甲状腺球蛋白的抗体)。在一些实施方案中,该自身抗原(如与上述自身免疫疾病之一相关的自身抗原)可以是胶原蛋白(如II型胶原蛋白)、分枝杆菌热休克蛋白、甲状腺球蛋白、乙酰胆碱受体(AcHR)、髓鞘碱性蛋白(MBP)或蛋白脂质蛋白(PLP)。特异性自身免疫相关表位或抗原是已知的(参见例如Bulek等人(2012)Nat Immunol,13,283-9;Harkioliaki等人(2009)Immunity,30,348-57;Skowera等人(2008)J Clin Invest,118,3390-402)。

[0138] 2. 病毒的繁殖和产生

[0139] 通常,含有编码异源蛋白或抗原的核酸的重组CMV载体(例如具有在编码UL128和/或UL130的ORF中被改变和/或编码无活性UL128和/或UL130蛋白的CMV基因组)可以通过本领域熟知的方法繁殖和产生以形成具感染性和生物学活性的病毒载体颗粒。在一些实施方案中,该载体在合适的宿主细胞中繁殖。例如,该细胞可以包括培养的细胞系或原代细胞。用于繁殖载体颗粒的宿主细胞可以是易受病毒感染的任何适当的一种或多种宿主细胞,如成纤维细胞,例如人包皮成纤维细胞(HFF)。在一些情况下,在适当的感染复数(MOI)(如或约0.01pfu/细胞的MOI)下用载体颗粒感染该细胞用于在该细胞中感染和繁殖载体。通常,使该细胞生长直至观察到对该细胞的细胞病变效应,例如当细胞集拢时。为了收获载体颗粒,可以收集细胞上清液并离心或沉淀以除去碎片。在一些情况下,可以从细胞级分中收获载体颗粒,如在该细胞的超声处理后。在一些实施方案中,可以在蔗糖密度梯度上纯化载体颗粒。

[0140] 在一些实施方案中,可以使用本领域已知的标准程序定量或确定病毒原液的浓度(参见例如Boeckh和Boivin(1998)Clinical Microbiology Reviews,11:533-554;Landry等人(2000)Antimicrob. Agents Chemother.,44:688-692)。在一些实施方案中,计算感染性病毒体数的方法包括噬斑测定,其中使该病毒的滴定物在细胞单层上生长,并且在数天至数周后计数噬斑数。例如,确定感染滴度,如通过噬斑测定,例如评估细胞病变效应(CPE)的测定。在一些实施方案中,通过在用琼脂糖覆盖的单层细胞(如HFF细胞)上连续稀释病毒来进行CPE测定。在孵育一段时间以达到细胞病变效应(如约3至28天,通常7至10天)后,可以固定该细胞并确定噬斑的存在。在一些实施方案中,可以使用终点稀释(TCID₅₀)方法确定病毒滴度,该方法确定50%的细胞培养物被感染时的病毒稀释度,并且因此通常可以确定在一定范围(如一个对数)内的滴度。在一些方面中,可以确定病毒颗粒总数的其他方法包括但不限于免疫组织化学染色方法,其利用识别病毒抗原的抗体并且可以通过显微镜检查或FACS分析可视化;光吸收,如在260nm下;和病毒核酸的测量,如通过PCR、RT-PCR或通过

用荧光染料标记的定量。

[0141] 在一些实施方案中,病毒滴度的范围可以从 10^2 至 10^8 pfu/mL。在一些实施方案中,在用于所提供的方法之前,可以浓缩该病毒以便随后根据需要稀释。例如,在一些情况下,可以在相对浓缩的溶液中制备病毒,使得在该测定中仅需要小体积。例如,如果向96孔板中的细胞中加入 1×10^6 pfu的病毒,则能以 1×10^8 pfu/mL的浓度制备该病毒,使得每孔仅加入10 μ L。取决于具体应用,特定浓度可以由本领域技术人员凭经验确定。

[0142] 在一些实施方案中,一旦该载体颗粒已经纯化(或达到所需纯度)并且已经确定滴度,该载体颗粒便可以在最佳地保持其感染完整性的条件下储存。通常,载体颗粒储存在黑暗中,因为光随时间使该病毒失活。在一些情况下,储存中的病毒稳定性可能取决于温度。通常,尽管一些病毒是热稳定的,但是大多数病毒在室温下不稳定超过一天,表现出降低的活力(Newman等人,(2003) J. Inf. Dis. 187:1319-1322)。对于病毒的短期储存(例如,长达1天、2天、4天或7天),通常建议大约4 $^{\circ}$ C的温度。通常,对于长期储存,大多数病毒可以保存在-20 $^{\circ}$ C、-70 $^{\circ}$ C或-80 $^{\circ}$ C,在这些温度下推出病毒可以稳定6个月到一年或甚至更长时间。在一些情况下,病毒可以储存在-190 $^{\circ}$ C(液氮)。适于储存特定病毒的方法和条件在本领域是已知的,并且可以用于储存本文提供的方法中使用的病毒。

[0143] 通常,在即将使用之前,可以在合适的培养基中以适当的浓度制备该载体颗粒,并且可以将其保持在低温下,如在冰上,直至使用。如果将该病毒冻干或以其他方式干燥用于储存,则可以在适当的水溶液中使其重构。制备该病毒的水溶液通常是该测定中使用的培养基(例如,DMEM或RPMI)或相容的溶液,如缓冲盐水溶液(例如,PBS、TBS、Hepes溶液)。

[0144] B. 向细胞中引入CMV载体颗粒和产生在MHC分子的背景下的肽

[0145] 在一些实施方案中,本文所提供的方法包括使含有编码重组或异源抗原的核酸的CMV载体颗粒(例如具有在编码UL128和/或UL130的ORF中被改变和/或编码无活性UL128和/或UL130蛋白的CMV基因组)与细胞接触或者向细胞中引入含有编码重组或异源抗原的核酸的CMV载体颗粒(例如具有在编码UL128和/或UL130的ORF中被改变和/或编码无活性UL128和/或UL130蛋白的CMV基因组)。在一些实施方案中,在一种或多种肽抗原(在一些情况下,包括所表达的异源蛋白的一种或多种肽抗原)由该细胞表达,加工并在主要组织相容性复合物(MHC)分子的背景下呈递在该细胞的表面上的条件下向该细胞中引入该CMV载体颗粒。

[0146] 通常,与该CMV载体颗粒接触的细胞是表达MHC的细胞,即MHC表达细胞。该细胞可以是一般在细胞表面上表达MHC的细胞,其被诱导以表达和/或上调MHC在细胞表面上的表达或被工程化以在细胞表面上表达MHC分子。在一些实施方案中,该MHC分子在人细胞中表达,并且称为人白细胞抗原(HLA)分子。在一些实施方案中,该MHC含有多态性肽结合位点或结合沟,其在一些情况下可以与多肽的肽抗原(包括由细胞机器加工的肽抗原)复合。在一些情况下,MHC分子可以在细胞表面上展示或表达,包括作为与肽的复合物,即MHC-肽复合物,以用于在T细胞上呈递处于TCR或其他肽结合分子可识别的构象的抗原。

[0147] 在一些实施方案中,该MHC可以是MHC II类分子。在一些实施方案中,该MHC可以是MHC I类分子,包括经典MHC I类或非经典MHC I类。通常,MHC I类分子是异二聚体,其具有跨越 α 链的膜,在一些情况下具有三个 α 结构域和非共价缔合的 β 2微球蛋白。通常,MHC II类分子由两种跨膜糖蛋白 α 和 β 组成,两者通常都跨越膜。MHC分子可以包括MHC的有效部分,其含有用于结合肽的一个或多个抗原结合位点和被适当的结合分子(如TCR)识别所必需的序

列。在一些实施方案中,MHC I类分子将源自胞质溶胶的肽递送至细胞表面,在此处肽:MHC复合物被T细胞(如通常为CD8⁺T细胞)识别。在一些实施方案中,MHC II类分子将源自囊泡系统的肽递送至细胞表面,在此处它们通常被CD4⁺T细胞识别,但是在一些情况下被CD8⁺T细胞识别。通常,MHC分子由一组连锁基因座编码,其小鼠中统称为H-2并且在人中统称为人白细胞抗原(HLA)。因此,通常人MHC也可以称为人白细胞抗原(HLA)。

[0148] 在一些方面中,该细胞表达MHC II类分子,例如HLAII类分子。

[0149] 在一些方面中,该细胞表达MHC I类分子,例如HLA I类分子。在一些实施方案中,MHC I类分子可以包括经典或非经典MHC I类分子,它们的不同之处在于其多态性。在一些情况下,I类分子包括高度多态性的经典MHC Ia类或HLA Ia类分子(例如HLA-A:3129个等位基因,2245种蛋白质;HLA-B:39779个等位基因,2938种蛋白质;和HLA-C(或HLA-CW):2740个等位基因,1941种蛋白质)和较少多态的非经典MHC Ib类或HLA-Ib分子(HLA-E:17个等位基因,6种蛋白质;HLA-F:22个等位基因,4种蛋白质;和HLA-G:50个等位基因,16种蛋白质),基于2015年8月在EBML-EBI网站www.ebi.ac.uk/imgt/hla/stats.html上发布的信息。在一些方面中,该MHC I类分子是经典MHC(如HLA-A、B或C分子),在这种情况下,在一些实施方案中,所提供的方法可以用于鉴定在经典MHC Ia类(例如HLA-A、B或C)的背景下呈递的肽表位(如非典型肽表位)。在一些方面中,该MHC I类分子是非经典MHC(如MHC-E分子,例如HLA-E分子),在这种情况下,在一些实施方案中,所提供的方法可以用于鉴定在非经典MHC Ib类的背景下(如在MHC-E(例如HLA-E)的背景下)呈递的肽表位(如非典型肽表位)。

[0150] 在一些方面中,本文所提供的方法包括向MHC表达细胞中引入含有编码异源抗原的核酸的重组CMV载体颗粒(例如具有在编码UL128和/或UL130的ORF中被改变和/或编码无活性UL128和/或UL130蛋白的CMV基因组),该MHC表达细胞是如表达或被工程化以表达或被诱导以表达MHC分子或者上调其表达的原代细胞或细胞系。

[0151] 在一些实施方案中,该细胞是能够被该CMV载体颗粒感染的细胞,该CMV载体颗粒包括具有在编码UL128和/或UL130的ORF中被改变和/或编码无活性UL128和/或UL130蛋白的基因组的CMV病毒。在一些实施方案中,该细胞是细胞系。在一些实施方案中,该细胞是原代细胞。具有确定的MHC分子的大量细胞(如细胞系)在本领域是已知的并且可容易获得。在一些实施方案中,该细胞可以获得自私人或商业来源,如美国典型培养物保藏中心(American Type Culture Collection,ATCC)、国立普通医学科学研究所(National Institute of General Medical Sciences,NIGMS)人类遗传细胞储存库(Human Genetic Cell Repository)或ASHI储存库(ASHI Repository)或者欧洲细胞培养物保藏中心(European Collection of Cell Cultures,ECACC)。

[0152] 在一些实施方案中,该细胞是有核细胞。在一些实施方案中,该细胞是抗原呈递细胞。在一些实施方案中,该细胞是巨噬细胞、树突细胞、B细胞、内皮细胞或成纤维细胞。在一些实施方案中,该细胞是内皮细胞,如内皮细胞系或原代内皮细胞。在一些实施方案中,该细胞是成纤维细胞,如成纤维细胞系或原代成纤维细胞。

[0153] 例如,在一些实施方案中,该细胞是成纤维细胞系。在一些情况下,该成纤维细胞系是人的。由取自个体的正常成纤维细胞以及恶性成纤维细胞建立的人成纤维细胞系可以从ATCC、ECACC或者其他私人或商业来源获得。各种成纤维细胞系(包括人细胞系)在本领域是已知的。示例性成纤维细胞系包括但不限于HS27(ATCC号CRL-1634)、BJ(ATCC号CRL-

2522)、Hs68 (ECACC号89051701)、Wi-38 (ATCC号CCL-75)、MRC-5 (ATCC号CCL-171)、MRC-9 (ATCC号CCL-212)或Cir du Chat (ATCC号CCL-90)、M1DR1/Ii/DM。

[0154] 原代成纤维细胞(如原代人成纤维细胞)也可以从原代组织或活检样品获得。在一些情况下,该成纤维细胞可以从来自组织(如来自皮肤、包皮或头皮的结缔组织)的活检样本获得。在一些方面中,该成纤维细胞是真皮成纤维细胞。原代成纤维细胞可以直接使用或者可以在使用前培养,例如多次传代,如多达2、4、6、8、10次或更多次传代。在一些情况下,此类细胞可以从已知或确定HLA类型的受试者获得。原代成纤维细胞也可以从商业或私人来源获得。原代成纤维细胞的非限制性例子包括例如新生儿或成人来源的人真皮成纤维细胞,其可从ThermoFisher Scientific (加利福尼亚州卡尔斯巴德;目录号C-004-5C或C-013-5C)、ATCC (ATCC号PCS-201-012或PCS-201-010)、Cell Systems (华盛顿州柯克兰;目录号CSC 2FF4)获得。

[0155] 在一些实施方案中,该细胞是人工抗原呈递细胞(aAPC)。通常,aAPC包括天然APC的特征,包括MHC分子、刺激和共刺激分子、Fc受体、粘附分子的表达和/或产生或分泌细胞因子(例如IL-2)的能力。一般,aAPC是缺乏上述中的一种或多种的表达并且通过引入(例如通过转染或转导)来自MHC分子、低亲和力Fc受体(CD32)、高亲和力Fc受体(CD64)、以下中的一种或多种的缺失元件中的一种或多种而产生的细胞系:共刺激信号(例如CD7、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、PD-L1、PD-L2、4-1BBL、OX40L、ICOS-L、ICAM、CD30L、CD40、CD70、CD83、HLA-G、MICA、MICB、HVEM、淋巴毒素β受体、ILT3、ILT4、3/TR6或B7-H3配体;或者与CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、To11配体受体或CD83配体特异性结合的抗体)、细胞粘附分子(例如ICAM-1或LFA-3)和/或细胞因子(例如IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-21、干扰素-α (IFNα)、干扰素-β (IFNβ)、干扰素-γ (IFNγ)、肿瘤坏死因子-α (TNFα)、肿瘤坏死因子-β (TNFβ)、粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)和粒细胞集落刺激因子(GCSF))。在一些情况下,aAPC一般不表达MHC分子,但是可以被工程化以表达MHC分子,或者在一些情况下,被诱导或可以被诱导以表达MHC分子,如通过用细胞因子刺激。在一些情况下,aAPC也可以加载刺激配体,其可以包括例如抗CD3抗体、抗CD28抗体或抗CD2抗体。可以用作用于产生aAPC的骨架的示例性细胞系是K562细胞系或成纤维细胞系。各种aAPC在本领域是已知的,参见例如美国专利号8,722,400,公开的申请号US2014/0212446;Butler和Hirano (2014) Immunol Rev., 257 (1): 10.1111/imr.12129;Suhoshki等人(2007) Mol. Ther., 15:981-988)。

[0156] 确定或鉴定细胞表达的特定MHC或等位基因完全在熟练技术人员的水平内。在一些实施方案中,在使细胞与CMV病毒接触之前,可以评估或确认特定MHC分子的表达,如通过使用对该特定MHC分子具特异性的抗体。MHC分子的抗体在本领域是已知的,如下文描述的任何抗体。

[0157] 在一些实施方案中,该细胞可以被选择为表达具有所需MHC限制的MHC等位基因。在一些实施方案中,细胞(如细胞系)的MHC分型在本领域是熟知的。在一些实施方案中,细胞(如从受试者获得的原代细胞)的MHC分型可以使用本领域熟知的程序确定,如通过使用分子单倍型测定(BioTest ABC SSPtray, BioTest Diagnostics Corp., 新泽西州丹维尔; SeCore Kits, Life Technologies, 纽约州格兰德岛)进行组织分型。在一些情况下,如通过使用基于序列的分型(SBT)进行细胞的标准分型以确定HLA基因型完全在熟练技术人员的

水平内 (Adams等人, (2004) *J. Transl. Med.*, 2:30; Smith (2012) *Methods Mol Biol.*, 882: 67-86)。在一些情况下, 细胞 (如成纤维细胞) 的HLA分型是已知的。例如, 人胎肺成纤维细胞系MRC-5是HLA-A*0201、A29、B13、B44Cw7 (C*0702); 人包皮成纤维细胞系Hs68是HLA-A1、A29、B8、B44、Cw7、Cw16; 并且WI-38细胞系是A*6801、B*0801 (Solache等人 (1999) *J Immunol*, 163:5512-5518; Ameres等人 (2013) *PloS Pathog.* 9:e1003383)。人转染子成纤维细胞系M1DR1/Ii/DM表达HLA-DR和HLA-DM (Karakikes等人 (2012) *FASEB J.*, 26:4886-96)。

[0158] 在一些实施方案中, 该CMV载体颗粒所接触或引入其中的细胞是被刺激以诱导或上调MHC分子的表达 (如通过使用刺激剂或激活剂) 的细胞。示例性刺激剂或激活剂包括但不限于IFN γ 、TNF α 、IL1 β 、丝裂霉素C、佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯 (PMA) 或离子霉素中的一种或多种, 如通常为IFN γ 。例如, 像大多数细胞一样, 成纤维细胞表达低水平的MHC I类分子, 但是当用干扰素 γ 诱导时, 表达通常可以被上调 (Volpi等人 (2000) *Journal of Cell Science*, 113:1565-1576)。在一些情况下, 成纤维细胞不表达MHC II类分子, 但是MHC II类表达可以在刺激剂 (如干扰素 γ) 的存在下诱导 (Volpi等人2000)。在一些实施方案中, MHC分子 (如MHC I类、MHC II类或MHC-E分子) 的细胞表面表达可以通过在刺激量 (通常为50U/mL至500U/mL, 如通常为至少100U/mL或至少200U/mL) 的刺激剂 (例如干扰素 γ) 的存在下以从或从约30%至60% (例如约40%) 的汇合率孵育细胞 (如细胞培养物) 来诱导或上调。在一些实施方案中, 细胞 (如成纤维细胞) 可以与该刺激剂 (如干扰素 γ) 一起孵育10分钟或约10分钟与96小时之间, 如至少30分钟、1、时、6小时、12小时、24小时、48小时或72小时。

[0159] 在一些实施方案中, 该CMV载体颗粒所接触或引入其中的细胞是被工程化或转染以表达MHC分子的细胞。在一些实施方案中, 可以通过遗传修饰亲代细胞系来制备细胞系。在一些实施方案中, 该细胞一般缺乏特定MHC分子并且被工程化以表达这种特定MHC分子。在一些实施方案中, 使用重组DNA技术遗传工程化该细胞。在一些实施方案中, 从受试者的血液中分离MHC分子的一条或两条链, 如使用简并引物通过PCR扩增。在一些实施方案中, 合成地产生MHC分子的一条或两条链, 如基于容易获得的MHC等位基因的已知序列信息。在一些实施方案中, 核酸 (如载体, 包括特定HLA等位基因) 可从商业或私人来源 (如从可在万维网的ihwg.org/hla获得的International Histocompatibility Working Group) 获得。

[0160] 在一些实施方案中, 可以将特定目标MHC分子 (如特定MHC类和/或等位基因) 的链克隆到表达载体中。在一些实施方案中, 用于产生表达载体的方法可以通过标准重组DNA技术。通过本领域已知的方法进行表达载体的构建和来自适当DNA序列的重组产生。例如, 标准技术用于DNA和RNA分离、扩增和克隆。通常, 根据制造商的说明书进行涉及DNA连接酶、DNA聚合酶和限制性内切核酸酶的酶促反应。这些技术和各种其他技术通常根据Sambrook等人, *Molecular Cloning--A Laboratory Manual*, 冷泉港实验室 (Cold Spring Harbor Laboratory), 纽约州冷泉港, 1989进行。此类程序在本领域是熟知的。

[0161] 在一些实施方案中, 限制性位点可以被包括在该基因序列中以帮助插入表达载体中和操纵该基因序列。可以将该序列插入表达载体中。在一些实施方案中, 该表达载体是哺乳动物表达载体或病毒表达载体。在一些实施方案中, 该表达载体是逆转录病毒表达载体, 如慢病毒表达载体。在一些实施方案中, 该表达载体可以是pCR2.1、pLNCx、pcDNA、pEAK、pBluescript或pUC18载体。在一些实施方案中, 编码特定HLA等位基因的核酸 (如载体) 可从商业或私人来源获得, 例如从在www.ihwg.org/hla.可获得的International

Histocompatibility Working Group(中国北京)、GeneCopoeia(马里兰州罗克维尔)、DNASU Plasmid Repository(亚利桑那州立大学,亚利桑那州坦佩)、Addgene(马萨诸塞州剑桥)等获得。例如,编码MHC-E(即HLA-E)的许多表达质粒中的任何一种(包括哺乳动物和慢病毒表达载体)可从Sino Biological, Inc.(参见例如,目录号HG13375)、GeneCopoeia(目录号LPP-Q0324)等获得。

[0162] 在一些实施方案中,将编码该MHC分子链的一种或多种表达载体或载体引入细胞中,如通过转染或转导。通常,取决于所用的宿主细胞,使用适合于此类细胞的标准技术进行转染或转导。常见的转染方法包括但不限于脂质转染、显微注射、电穿孔、使用磷酸钙的方法或基于病毒的递送方法。在一些实施方案中,可以在有利于该MHC分子的表达和在细胞表面上表达的条件下培养经转化的细胞。在一些实施方案中,表达是瞬时的。在一些实施方案中,表达是稳定的。在一些实施方案中,与该CMV载体颗粒接触或引入其中的MHC表达细胞稳定地或瞬时地表达MHC分子。

[0163] 在一些实施方案中,表达特定MHC分子的细胞(如被工程化或转染以表达这种特定MHC分子的细胞)是缺乏或使其缺乏另一类别的另一种MHC分子的表达的细胞。例如,如果该细胞被工程化或转染以表达MHC II类分子或MHC-E分子,则这种细胞可能缺乏或可能使其缺乏MHC I类分子(通常为HLA-A、B或C分子)的内源表达。在一些实施方案中,表达MHC II类分子或MHC-E分子的细胞(如分别被工程化或转染以表达MHC I类或MHC-E分子的细胞)是可以正常表达MHC I类分子(如HLA-A、B或C),但是编码这种MHC I类的基因(如HLA A、B或C基因)的表达、活性和/或功能被阻遏或被破坏的细胞。下文描述了用于阻遏或破坏基因(如HLAA、B或C基因)的示例性方法。

[0164] 在一些实施方案中,该细胞是在细胞表面上表达经典MHC I类分子(MHC Ia类分子)的细胞。在一些实施方案中,所提供的方法涉及提供或制备这样的细胞,其中已经将或将编码异源抗原的CMV载体颗粒引入MHC-I类表达细胞中以用于展示在MHC-I类分子的背景下的肽表位。在一些实施方案中,该方法可以用于鉴定衍生自肿瘤相关抗原(TAA)的MHC I类限制性肽。在一些实施方案中,该方法可以用于鉴定衍生自病毒抗原(包括在病毒相关癌症中发现的抗原)的MHC I类限制性肽。在一些实施方案中,该MHC-I-肽复合物可以被CD8+细胞毒性T淋巴细胞(CTL)识别。在一些实施方案中,所鉴定的MHC I类限制性肽或表位可以用作开发或鉴定特异性识别在MHC I类的背景下的肽靶标的分子中的靶标。

[0165] 在一些实施方案中,该MHC Ia类表达细胞是原代细胞。在一些实施方案中,该MHC Ia类表达细胞是细胞系。在一些实施方案中,该MHC Ia类表达细胞是人细胞。在一些方面中,本文所提供的方法包括向MHC Ia类表达细胞中引入含有编码异源抗原的核酸的重组CMV载体颗粒(例如具有在编码UL128和/或UL130的ORF中被改变和/或编码无活性UL128和/或UL130蛋白的CMV基因组),该MHC Ia类表达细胞是如表达或被工程化以表达或被诱导以表达MHC Ia类分子或者上调其表达的原代细胞或细胞系。在一些实施方案中,本文所提供的方法产生一种或多种肽抗原,如由该CMV载体编码的异源抗原的一种或多种肽抗原,其由该细胞表达,加工并在MHC Ia类分子的背景下呈递在该细胞的表面上。

[0166] 通常,大多数有核细胞表达MHC Ia类分子。在一些实施方案中,细胞可以被诱导以表达MHC Ia类分子。在一些实施方案中,细胞可以被工程化以表达MHC Ia类分子,如特定MHC Ia类等位基因。例如,在一些实施方案中,该MHC Ia类表达细胞是通过用Ia类HLA α 链遗

传修饰亲本细胞系(如哺乳动物细胞系(例如人细胞系))而制备的细胞。在一些实施方案中,该细胞系可以任选地用 β 2-微球蛋白遗传修饰,例如如果该亲本细胞不表达内源 β 2-微球蛋白的话。在一些实施方案中,可以将单个Ia类 α 等位基因引入该细胞中,如通过使用表达载体。在一些实施方案中,可以将单个Ia类 α 等位基因和 β 2-微球蛋白引入细胞中,同时或以任何顺序依次引入该细胞中,如通过使用一种或多种表达载体。

[0167] 在一些实施方案中,该MHC Ia类表达细胞表达MHC Ia类等位基因,其可以是已知存在于受试者(如人受试者)体内的任何等位基因。在一些实施方案中,该MHC Ia类等位基因是HLA-A2、HLA-A1、HLA-A3、HLA-A24、HLA-A28、HLA-A31、HLA-A33、HLA-A34、HLA-B7、HLA-B45或HLA-Cw8等位基因。在一些实施方案中,该MHC Ia类等位基因可以是表1A中列出的任何等位基因,所列项包括在美国人群中最常见的MHC Ia类等位基因。

[0168]

表1A: HLA I类		
I类	等位基因	在人群中的频率
1	HLA-A*01:01	12.94
2	HLA-A*02:01	42.88
3	HLA-A*02:03	0.19
4	HLA-A*02:06	1.55
5	HLA-A*03:01	13.50
6	HLA-A*11:01	11.60
7	HLA-A*23:01	8.30
8	HLA-A*24:02	22.56

[0169]

9	HLA-A*26:01	5.36
10	HLA-A*30:01	6.29
11	HLA-A*30:02	5.21
12	HLA-A*31:01	6.87
13	HLA-A*32:01	3.71
14	HLA-A*33:01	2.62
15	HLA-A*68:01	6.36
16	HLA-A*68:02	4.79
17	HLA-B*07:02	12.96
18	HLA-B*08:01	9.23
19	HLA-B*15:01	6.54
20	HLA-B*35:01	13.03
21	HLA-B*40:01	9.79
22	HLA-B*44:02	7.22
23	HLA-B*44:03	8.96
24	HLA-B*51:01	8.51
25	HLA-B*53:01	7.26
26	HLA-B*57:01	3.49
27	HLA-B*58:01	4.82

[0170] 在一些实施方案中,该MHC Ia类等位基因是HLA-A2等位基因,其在一些群体中由该群体的大约50%表达。在一些实施方案中,该HLA-A2等位基因可以是HLA-A*0201、*0202、*0203、*0206或*0207基因产物。在一些情况下,不同群体之间的亚型频率可能存在差异。例如,在一些实施方案中,多于95%的HLA-A2阳性高加索人群是HLA-A*0201,而在中国人群中,据报道HLA-A*0201的频率为大约23%,HLA-A*0207的频率为大约45%,HLA-A*0206的频率为大约8%并且HLA-A*0203的频率为大约23%。在一些实施方案中,该MHC分子是HLA-A*0201。

[0171] 在一些实施方案中,该细胞是在细胞表面上表达MHC II类分子的细胞。在一些实施方案中,该方法可以用于鉴定与致病或患病状态相关的MHC II类限制性肽,如通用的、超表位的和/或非典型的肽。MHC II类分子在抗原呈递细胞(APC)(如树突细胞、巨噬细胞或B细胞)上组成性地表达。在一些方面中,肿瘤部位的APC可以对肿瘤细胞取样,吞噬和加工肿瘤抗原,其可以在MHC I类或MHC II类分子的背景下呈递以用于被CD8⁺和CD4⁺ T细胞识别。在一些情况下,除了APC之外,许多肿瘤细胞也表达MHC II类分子。抗原特异性CD4⁺ T辅助细胞的激活在诱导和维持抗肿瘤应答中起作用。在一些方面中,激活的CD4⁺ T细胞可以分泌为CD8⁺ T淋巴细胞提供帮助的因子,如通过将CD8⁺ T细胞募集到肿瘤部位和/或促进CD8⁺ T细胞引发。

[0172] 在一些实施方案中,所提供的方法涉及提供或制备这样的细胞,其中已经将或将

编码异源抗原的CMV载体颗粒引入MHC-II类表达细胞中以用于展示在MHC-II类分子的背景下的肽表位。在一些实施方案中,该方法可以用于鉴定衍生自肿瘤相关抗原(TAA)的MHC II类限制性肽。在一些实施方案中,该方法可以用于鉴定衍生自病毒抗原(包括在病毒相关癌症中发现的抗原)的MHC II类限制性肽。在一些实施方案中,该MHC II类-肽复合物被CD4+ T细胞识别。在一些实施方案中,该MHC II类肽复合物被CD8+ T细胞识别。在一些实施方案中,该MHC II类肽复合物被CD8+ T细胞和CD4+ T细胞识别。在一些实施方案中,此类表位可以用作开发或鉴定在APC或肿瘤细胞(包括携带如衍生自病毒感染的癌细胞的肿瘤抗原或病毒抗原的细胞)的表面上特异性识别在MHC II类的背景下的肽靶标的分子的靶标。

[0173] 在一些实施方案中,该MHC II类表达细胞是原代细胞。在一些实施方案中,该MHC II类表达细胞是细胞系。在一些实施方案中,该MHC II类表达细胞是人细胞。在一些方面中,本文所提供的方法包括向MHC II类表达细胞中引入含有编码异源抗原的核酸的重组CMV载体颗粒(具有在编码UL128和/或UL130的ORF中被改变和/或编码无活性UL128和/或UL130蛋白的CMV基因组),该MHC II类表达细胞是如表达或被工程化以表达或被诱导以表达MHC II类分子的原代细胞或细胞系。在一些实施方案中,本文所提供的方法产生一种或多种肽抗原,如由该CMV载体编码的异源抗原的一种或多种肽抗原,其由该细胞表达,加工并在这种MHC II类分子的背景下呈递在该细胞的表面上。

[0174] 通常,MHC II类分子主要在免疫细胞上表达,特别是抗原呈递细胞(APC),如B细胞、树突细胞、单核细胞、巨噬细胞,并且在一些情况下是成纤维细胞。在一些实施方案中,细胞可以被诱导以表达MHC II类分子。例如,在一些实施方案中,细胞(如成纤维细胞)可以被刺激或激活以上调MHC II类在细胞表面上的表达,如通过使用干扰素 γ 或其他刺激剂。在一些实施方案中,细胞(如成纤维细胞)可以被工程化以表达MHC II类分子,如特定MHC II类等位基因。例如,在一些实施方案中,该MHC II类表达细胞是通过用II类 α 链和II类 β 链遗传修饰亲代细胞系而制备的细胞。

[0175] 在一些实施方案中,该MHC II类表达细胞表达MHC II类等位基因,其可以是已知存在于受试者(如人受试者)体内的任何等位基因。在一些实施方案中,该MHC等位基因可以是但不限于DR1、DR3、DR4、DR7、DR52、DQ1、DQ2、DQ4、DQ8和DP1。在一些实施方案中,该MHC II类等位基因可以是表1B中列出的任何等位基因,所列项包括在美国人群中最常见的MHC II类等位基因。在一些实施方案中,该MHC II类等位基因是HLA-DRB1*0101、HLA-DRB*0301、HLA-DRB*0701、HLA-DRB*0401和HLA-DQB1*0201。

表1B: HLA II类

II类	等位基因	在人群中的频率	II类	等位基因	在人群中的频率
1	HLA-DRB1*01:01	13.62	29	HLA-DQA1*01:02/DQB1*05:02	21.13
2	HLA-DRB1*15:01	22.86	30	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:02	30.74
3	HLA-DRB1*03:01	21.82	31	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:02	31.56
4	HLA-DRB1*04:01	15.54	32	HLA-DQA1*01:02/DQB1*06:04	19.00
5	HLA-DRB1*11:01	10.92	33	HLA-DQA1*05:01/DQB1*03:01	80.58
6	HLA-DRB1*13:01	9.86	34	HLA-DQA1*02:01/DQB1*02:02	27.99
7	HLA-DRB1*07:01	19.84	35	HLA-DQA1*03:01/DQB1*03:01	49.92
8	HLA-DRB1*01:01	4.06	36	HLA-DQA1*02:01/DQB1*03:03	23.32
9	HLA-DRB1*01:02	1.85	37	HLA-DQA1*03:03/DQB1*03:03	20.22
10	HLA-DRB1*04:02	6.28	38	HLA-DPA1*01:03/DPB1*01:01	99.83
11	HLA-DRB1*04:05	1.22	39	HLA-DPA1*01:03/DPB1*02:01	99.83
12	HLA-DRB1*04:07	2.78	40	HLA-DPA1*01:03/DPB1*03:01	99.82
13	HLA-DRB1*04:08	1.26	41	HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:01	99.88
14	HLA-DRB1*08:04	0.86	42	HLA-DPA1*01:03/DPB1*04:02	99.86
15	HLA-DRB1*09:01	5.33	43	HLA-DPA1*01:03/DPB1*05:01	99.81
16	HLA-DRB1*10:01	2.78	44	HLA-DPA1*02:01/DPB1*01:01	23.54
17	HLA-DRB1*11:02	0.94	45	HLA-DPA1*02:01/DPB1*02:01	24.11
18	HLA-DRB1*11:03	0.74	46	HLA-DPA1*02:01/DPB1*03:01	17.63
19	HLA-DRB1*11:04	4.76	47	HLA-DPA1*02:01/DPB1*04:01	46.73
20	HLA-DRB1*15:02	0.78	48	HLA-DPA1*02:01/DPB1*04:02	38.04
21	HLA-DRB1*15:03	1.22	49	HLA-DPA1*02:01/DPB1*05:01	13.24
22	HLA-DRB1*16:01	4.06	50	HLA-DPA1*02:01/DPB1*06:01	8.59
23	HLA-DRB1*16:02	0.84	51	HLA-DPA1*02:01/DPB1*09:01	7.26
24	HLA-DRB3*02:02	0.00	52	HLA-DPA1*02:01/DPB1*11:01	9.98
25	HLA-DRB3*03:01	0.00	53	HLA-DPA1*02:01/DPB1*13:01	11.55
26	HLA-DRB5*01:01	0.00	54	HLA-DPA1*02:01/DPB1*14:01	7.98
27	HLA-DQA1*01:01/DQB1*05:01	30.57	55	HLA-DPA1*02:01/DPB1*15:01	7.73
28	HLA-DQA1*05:01/DQB1*02:01	76.17	56	HLA-DPA1*02:01/DPB1*17:01	10.40

[0176] 在一些实施方案中,该细胞是表达非经典MHC分子的细胞。例如,在一些情况下,该细胞是在细胞表面上表达MHC-E分子(例如HLA-E分子)的细胞。在一些实施方案中,该方法可以用于鉴定与致病或患病状态相关的MHC-E限制性肽,如通用的、超表位的和/或非典型的肽。通常,MHC-E(或HLA-E)是非经典MHC I类分子,其由人体内的HLA-E基因或另一物种中的直系同源物或同源物编码。例如,小鼠中的该同源物称为Qa-1b。该MHC I类MHC-E基因在整个组织中普遍表达,尽管在一些情况下,其水平远低于其他非经典MHC I类基因MHC-G和MHC-F(参见Strong等人,J BiolChem.2003年2月14日;278(7):5082-90)。MHC-E等位基因表现出比其经典MHC I类(即HLA-A、B和C)对应物少得多的等位基因多态性。例如,在人中只有两个已知的MHC-E等位基因,即等位基因E*0101和E*0103,它们在不同的群体中以大致相等

的频率被发现,并且在位置107处仅有一个氨基酸不同(Pietra等人(2010) *Journal of Biomedicine and Biotechnology*)。通常,像经典MHC分子一样,MHC-E作为含有 α 重链和轻链(也称为 β -2微球蛋白)的异二聚体存在。在一些情况下,已知MHC-E分子与衍生自经典MHC I类分子的信号肽的肽(例如九聚肽)结合,该肽稳定细胞表面上的MHC-E,并且在一些情况下,可以被NK细胞识别以调节NK细胞激活。例如,在一些方面中,MHC-E可以结合抑制性NK细胞受体CD94/NKG2A以抑制NK细胞的活性。在一些情况下,与肽复合的MHC-E也可以与CD8+细胞上表达的TCR相互作用(Pietra等人(2010) *Journal of Biomedicine and Biotechnology*, 文章ID 907092)。已经发现HLA-E的表达在各种肿瘤类型中增加并且与更差的临床结果相关(参见例如,de Kruijf等人, *J Immunol.* 2010 Dec 15;185(12):7452-9)。

[0179] 在一些实施方案中,所提供的方法涉及提供或制备这样的细胞,其中已经将或将编码异源抗原的CMV载体颗粒引入MHC-E类表达细胞中以用于在MHC-E类分子的背景下展示肽表位。在一些实施方案中,该方法可以用于鉴定衍生自肿瘤相关抗原(TAA)的MHCE限制性肽。在一些实施方案中,该方法可以用于鉴定衍生自病毒抗原(包括在病毒相关癌症中发现的抗原)的MHC-E限制性肽。在一些实施方案中,该MHC-E-肽复合物被CD8+ T细胞识别和/或与CTL应答相关。在一些实施方案中,所鉴定的MHC-E限制性肽或表位可以用作开发或鉴定特异性识别在MHC-E的背景下的肽靶标的分子中的靶标。

[0180] 在一些实施方案中,该MHC-E表达细胞是原代细胞。在一些实施方案中,该MHC-E表达细胞是细胞系。在一些实施方案中,该MHC-E表达细胞是人细胞。在一些方面中,本文所提供的方法包括向MHC-E表达细胞中引入含有编码异源抗原的核酸的重组CMV病毒(例如具有在编码UL128和/或UL130的ORF中被改变和/或编码无活性UL128和/或UL130蛋白的CMV基因组),该MHC-E表达细胞是如表达或被工程化以表达或被诱导以表达MHC-E分子的原代细胞或细胞系。在一些实施方案中,本文所提供的方法产生一种或多种肽抗原,如由该CMV载体编码的异源抗原的一种或多种肽抗原,其由该细胞表达,加工并在MHC-E分子的背景下呈递在该细胞的表面上。

[0181] 通常,MHC-E分子常见地在内皮细胞、成纤维细胞和免疫细胞(例如B细胞、T细胞、NK细胞、单核细胞、巨噬细胞)上表达。在一些实施方案中,细胞(如成纤维细胞)可以被诱导以表达MHC-E分子。在一些方面中,用CMV感染细胞(如感染成纤维细胞)诱导MHC-E在此类细胞的表面上的表达,例如在使该细胞与CMV接触或引入其中之后长达6小时、8小时、12小时或24小时(例如Roller等人(2014) *J. Clin. Invest.*, 124:5305-5316)。在一些情况下,细胞(如成纤维细胞)可以被刺激或激活以上调MHC-E在细胞表面上的表达,如通过使用干扰素 γ 或其他刺激剂。

[0182] 在一些实施方案中,细胞可以被工程化以表达MHC-E分子,如特定MHC-E等位基因。在一些实施方案中,可以向细胞中引入编码MHC-E的核酸分子,该细胞是如一般不表达MHC-E、不在细胞表面表达MHC-E和/或能以低水平表达MHC-E的细胞。通常,使用重组DNA技术(例如使用如上所述的方法)遗传工程化该细胞。示例性MHC-E(例如等位基因E*01:01)的序列在SEQ ID NO:1 (GenBank号AAH02578.1或UniProt号P13747.3)中列出,并且由在SEQ ID NO:2 (GenBank号BC002578)中列出的核苷酸序列编码。示例性MHC-E(例如等位基因E*0103)的序列在SEQ ID NO:3 (GenBank号NP_005507)中列出,并且由在SEQ ID NO:4 (GenBank号

NM_005516.5)中列出的核苷酸序列编码。

[0183] 在一些实施方案中,可以通过添加衍生自MHC I类分子的肽来稳定MHC-E在细胞表面上的表达。在一些实施方案中,该肽是MHC I类分子前导序列的肽。例如,在一些情况下,MHC-E在细胞的表面上的表达在衍生自MHC I类前导序列的肽的存在下增加,以用于组装该MHC-E复合物(Lee等人(1998) *Journal of Immunology*, 160:4951-4960; Braud等人(1998) *Current Biology*, 8:1-10)。在一些情况下,可以外源地添加该肽并与细胞一起孵育,在这种情况下,可能不需要与抗原加工相关的转运蛋白(TAP)。在一些情况下,该肽由该细胞加工,在其中它可以通过TAP递送到内质网(ER)中以用于结合新生的MHC-E分子。因此,在一些实施方案中,该细胞可以含有TAP。在一些实施方案中,该细胞可以是TAP缺陷型的。

[0184] 例如,在一些实施方案中,通过将对应于MHC I类分子的前导序列的外源肽与用MHC-E转染的细胞一起孵育(如在从或从约22℃至30℃(如通常为26℃±3℃)的温度下孵育)可以稳定细胞的表面上的MHC-E表达。在一些实施方案中,该肽是九聚体。在一些实施方案中,该肽衍生自MHC I类分子的前导序列,其中甲硫氨酸存在于位置2处,并且亮氨酸存在于该九聚体的羧基末端位置处。在一些实施方案中,该肽衍生自MHC I类分子的前导序列,该MHC I类分子为HLA-A、HLA-B、HLA-C或HLA-G。在一些实施方案中,该肽衍生自MHC I类分子的前导序列,该MHC I类分子为HLA-A*0101、HLA-A*0201、HLA-A*0211、HLA-A*0301、HLA-A*2403、HLA-A*2501、HLA-A*3601、HLA-A*0702、HLA-A*0801、HLA-B*6501、HLA-Cw*0401、HLA-Cw*1502、HLA-G。在一些实施方案中,该肽具有对应于MHC I类前导序列的氨基酸3-11的氨基酸序列。在一些实施方案中,该肽具有SEQ ID NO:5-9中的任一个中列出的氨基酸序列。

[0185] 在一些实施方案中,可以通过用MHC I类分子和MHC-E共转染细胞来稳定细胞的表面上的MHC-E表达。在一些实施方案中,该MHC I类分子是这样的分子,其中在其前导序列的残基3-11内,甲硫氨酸存在于位置2处并且亮氨酸存在于羧基末端位置处。在一些实施方案中,该MHC I类分子是HLA-A、HLA-B、HLA-C或HLA-G。在一些实施方案中,该MHC I类分子是HLA-A*0101、HLA-A*0201、HLA-A*0211、HLA-A*0301、HLA-A*2403、HLA-A*2501、HLA-A*3601、HLA-A*0702、HLA-A*0801、HLA-B*6501、HLA-Cw*0401、HLA-Cw*1502或HLA-G。

[0186] 在一些实施方案中,为了在细胞的表面上表达MHC-E,如以稳定这种MHC-E在细胞表面上的表达,可以将含有与该MHC-E成熟蛋白融合的MHC I类分子的前导序列的杂合MHC-E基因转染到细胞中。在一些实施方案中,该杂合分子含有与该MHC-E成熟蛋白融合的MHC I类分子的启动子和前导序列。在一些实施方案中,该MHC I类分子是这样的分子,其中在其前导序列的残基3-11内,甲硫氨酸存在于位置2处并且亮氨酸存在于羧基末端位置处。在一些实施方案中,该前导序列可以衍生自MHC I类分子,其为HLA-A、HLA-B、HLA-C或HLA-G。在一些实施方案中,该前导序列来自MHC I类分子,其为HLA-A*0101、HLA-A*0201、HLA-A*0211、HLA-A*0301、HLA-A*2403、HLA-A*2501、HLA-A*3601、HLA-A*0702、HLA-A*0801、HLA-B*6501、HLA-Cw*0401、HLA-Cw*1502或HLA-G。例如,这种杂合体的一个例子是含有HLA-A2启动子和信号序列以及HLA-E成熟蛋白质序列的AEH杂合基因,其在一些情况下可以产生与由HLA-E基因编码的蛋白质相同,但是可以在细胞表面上稳定表达的成熟蛋白质(参见例如Lee等人(1998) *Journal of Immunology*, 160:4951-4960)。

[0187] 在一些实施方案中,该细胞系可以任选地用β2-微球蛋白遗传修饰,例如如果该亲

本细胞不表达内源 β 2-微球蛋白的话。在一些实施方案中,将单个MHC-E重链引入该细胞中,如通过使用表达载体。在一些实施方案中,将MHC-E重链和 β 2-微球蛋白同时或以任何顺序依次引入,如通过使用一种或多种表达载体。

[0188] 通常,用CMV感染细胞的方法在本领域是熟知的。通常,引入细胞或使其在体外与病毒接触。感染可以在病毒的从或从约1至100的感染复数(“MOI”) (如通常MOI为从或从约2至50、2至20或2至10,例如至少或约至少或约2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20)下进行。

[0189] 在一些实施方案中,使该细胞如在特定MOI下与该病毒接触一段适于将该病毒摄入该细胞中的时间。在一些情况下,该病毒和细胞的接触持续一段不会导致细胞病变效应、溶解或杀死该细胞的时间。通常,该细胞与病毒接触的特定时间段可以取决于许多因素,如被感染的特定细胞类型、该病毒的MOI、细胞密度和熟练技术人员已知的其他因素。在一些实施方案中,使病毒与细胞接触从或从约0.5小时至5小时(如长达或约1小时、2小时或3小时),以允许该细胞吸收该病毒。在一些情况下,可以从该细胞中洗涤或去除该病毒,并且可以将该细胞进一步培养或孵育另外的时间段,如以允许病毒蛋白表达(包括异源抗原的表达)、肽加工和/或经加工的肽在细胞表面上的呈递。例如,在一些实施方案中,可以将该细胞进一步培养或孵育至少1小时、2小时、3小时、4小时、5小时、6小时、12小时或24小时。

[0190] 在一些实施方案中,在向细胞中引入含有编码异源抗原的核酸的重组CMV病毒颗粒(例如具有在编码UL128和/或UL130的ORF中被改变和/或编码无活性UL128和/或UL130的CMV基因组)之后,所提供的方法包括鉴定或检测在MHC分子的背景下在细胞表面上加工或呈递的肽。

[0191] 用于阻遏或破坏细胞中的MHC基因的方法

[0192] 在一些实施方案中,表达MHC分子的细胞(如通常为被工程化或转染以表达MHC II类分子或MHC-E分子的细胞)是可以正常表达经典MHC Ia类分子(如HLA-A、B或C),但是编码这种经典MHC Ia类的基因(如HLA-A、-B或-C基因)的表达、活性和/或功能被阻遏或被破坏的细胞。在具体例子中,基因阻遏或破坏是通过靶向MHC I类分子(如HLA-A、-B或-C分子)的重链引起的。阻遏或破坏基因的方法在本领域是熟知的,并且在一些方面中,可以包括使用抑制性核酸分子或基因编辑方法。在一些实施方案中,在使用此类方法(包括本文描述的任何方法)阻遏或破坏该基因之后,受阻遏或破坏的MHC分子(如HLA-A、B或C分子)在细胞表面上的表达不超过该分子在相同MHC I类基因未被阻遏或破坏的相同细胞上的表达的50%、40%、30%、20%、10%、5%或更少。在一些实施方案中,可以经由标准程序评估表达水平或程度。在一些实施方案中,可以使用HLA特异性抗体来选择或鉴定该细胞。示例性抗体在本领域是已知的,并且非限制性例子描述在本文其他地方。在一些实施方案中,通过流式细胞术确认具体MHC表达。在一些实施方案中,可以使用等位基因特异性PCR来确定基因表达水平,并且因此确定基因修饰。

[0193] 在一些实施方案中,使用作为RNA干扰剂的抑制性核酸分子实现基因阻遏,该抑制性核酸分子可以用于选择性抑制或阻遏该基因的表达。例如,基因阻遏可以通过RNA干扰(RNAi)、短干扰RNA(siRNA)、短发夹(shRNA)、反义和/或核酶进行。在一些实施方案中,RNA干扰剂还可以包括可以在细胞内加工以产生shRNA的其他RNA种类,包括但不限于与天然存在的miRNA前体或miRNA样RNA的设计前体相同的RNA种类。

[0194] 在一些实施方案中, RNA干扰剂是至少部分双链的RNA, 其具有本领域已知的通过RNAi机制介导基因表达的抑制的分子特有的结构或包含彼此杂交以形成这种结构的至少部分互补的部分的RNA链。当RNA含有彼此杂交的互补区域时, 该RNA将被说成自我杂交。在一些实施方案中, 抑制性核酸(如RNA干扰剂)包括与靶基因基本上互补的部分。在一些实施方案中, 被靶向转录物的RNA干扰剂也可以被认为被靶向编码和指导该转录物的合成的基因。在一些实施方案中, 靶区域可以是靶转录物的与RNA干扰剂的反义链杂交的区域。在一些实施方案中, 靶转录物可以是作为RNA干扰抑制的靶标的任何RNA。

[0195] 在一些实施方案中, 认为RNA干扰剂被“靶向”转录物和编码该转录物的基因, 如果(1) 该RNAi剂包含在长度为约15-29个核苷酸的区域(例如长度为至少大约15、大约17、大约18或大约19个核苷酸的区域)上与该转录物至少大约80%、大约85%、大约90%、大约91%、大约92%、大约93%、大约94%、大约95%、大约96%、大约97%、大约98%、大约99%或大约100%互补的部分(例如, 链); 和/或(2) 由该RNAi剂的一条链的一串15个核苷酸和该转录物的15个核苷酸部分在于哺乳动物细胞的细胞质或细胞核内通常发现的条件(不包括温度)下形成的双链体的 T_m 比由该RNA干扰剂及其完全互补体的相同15个核苷酸形成的双链体的 T_m 低不超过大约15°C或不超过大约10°C; 和/或(3) 该转录物的稳定性在该RNA干扰剂的存在下与不存在它的情况下相比降低的话。

[0196] 在一些实施方案中, RNA干扰剂任选地包括一种或多种核苷酸类似物或修饰。本领域普通技术人员将认识到RNAi剂可以包括核糖核苷酸、脱氧核糖核苷酸、核苷酸类似物、经修饰的核苷酸或主链等。在一些实施方案中, 可以在转录后修饰RNA干扰剂。在一些实施方案中, RNA干扰剂可以含有杂交或自我杂交以形成以下结构的一条或多条链, 该结构包括长度在约15-29个核苷酸之间的双链体部分, 任选地在该双链体内具有一个或多个错配的或未配对的核苷酸。

[0197] 在一些实施方案中, 该RNA干扰剂是短的干扰RNA(siRNA), 其通常是包括长度在约15-29个核苷酸之间的双链部分并且任选地还在任一条链或两条链上包括单链突出端{例如, 长度为1-6个核苷酸}的核酸。在一些实施方案中, 该双链部分的长度可以在17-21个核苷酸之间, 例如长度为19个核苷酸。在一些实施方案中, 该突出端存在于每条链的3'端, 可以是约或大约2至4个核苷酸长, 并且可以由DNA或核苷酸类似物组成。siRNA可以由杂交在一起的两条RNA链形成, 或者可以可替代地由较长的双链RNA或由包括自我杂交部分的单RNA链(如短发夹RNA)产生。本领域普通技术人员将理解, 在由两条siRNA链形成的双链体中可以存在一个或多个错配或未配对的核苷酸。在一些实施方案中, siRNA的一条链(“反义”或“指导”链)包括与靶核酸(例如, mRNA转录物)杂交的部分。在一些实施方案中, 该反义链与该靶标在约15-29个核苷酸(有时在17-21个核苷酸之间, 例如19个核苷酸)上完全互补, 这意味着该siRNA与该靶转录物在此长度上在没有单个错配的情况下杂交。然而, 本领域普通技术人员将理解, 在该siRNA链和该靶转录物之间形成的双链体中可以存在一个或多个错配或未配对的核苷酸。

[0198] 在一些实施方案中, 短发夹RNA(shRNA)是包含至少两个互补部分和至少一个单链部分的核酸分子, 该至少两个互补部分杂交或能够杂交以形成足够长以介导RNAi(通常长度在15-29个核苷酸之间)的双链体结构, 并且该至少一个单链部分通常长度在大约1与10个核苷酸之间, 其形成连接形成该双链体的两个序列的末端的环。在一些实施方案中, 该结

构还可以包含突出端。在一些实施方案中,通过该shRNA的自我互补部分的杂交形成的双链体可以具有与siRNA类似的性质,并且在一些情况下,可以通过保守的细胞RNAi机器将shRNA加工成siRNA。因此,shRNA可以是siRNA的前体,并且可以类似地能够抑制靶转录物的表达。在一些实施方案中,shRNA包括与靶核酸(例如,mRNA转录物)杂交,并且可以在约15-29个核苷酸(有时在17-21个核苷酸之间,例如19个核苷酸)上与该靶标完全互补的部分。然而,本领域普通技术人员将理解,在该shRNA链和该靶转录物之间形成的双链体中可以存在一个或多个错配或未配对的核苷酸。

[0199] 在一些实施方案中,该shRNA包含具有结构A-B-C或C-B-A的核苷酸(例如DNA)序列。在一些实施方案中,该盒包含至少两个DNA区段A和C或C和A,其中所述至少两个区段中的每一个处于如上定义的单独启动子(如P₀₁ III启动子,包括诱导型U6、H1等)的控制之下。在上述区段中:A可以是与待敲除的基因(例如HLA-A、B或C基因)至少90%或100%互补的15至35bp或19至29bp的DNA序列;B可以是具有形成所表达的RNA发夹分子的环的5至9bp的间隔子DNA序列;并且C可以是与序列A至少85%互补的15至35或19至29bp的DNA序列。

[0200] 使用RNA干扰技术(如siRNA或shRNA)以阻遏MHC I类分子(如HLA-A、-B或-C分子)的细胞表达的方法完全在熟练技术人员的水平内。在一些实施方案中,可以利用等位基因特异性序列来特异性阻遏、下调和/或破坏特定HLA等位基因的表达。在一些实施方案中,可以利用HLA-A、-B、-C共有序列来阻遏、下调和/或破坏HLA-A、-B和-C基因座中的每一个的表达。例如,已经描述了使用RNA干扰技术(包括等位基因特异性或共有序列)靶向此类分子的方法(参见例如,Gonzalez等人(2004) *Molecular Therapy*, 11:811-818; Haga等人(2006) *Transplant Proc.*, 38:3184-3188; Figueiredo等人(2006) *J. Mol. Med.*, 84:425-37; Figueiredo等人(2007) *Transfusion*, 47:18-27; Hacke等人(2009) *Immunol. Res.*, 44:112-126; Lemp等人(2013) *Clin. Transpl.*, 93-101)。等位基因特异性(例如HLA-A)的siRNA序列的非限制性例子在SEQ ID NO:28-31中列出,并且泛特异性(即共有的,如针对HLA-A、-B、-C中的保守区域)的siRNA序列的非限制性例子在SEQ ID NO:32-35中列出。等位基因特异性(例如,HLA-A)或作为共有HLA-A、-B、-C序列的shRNA序列的非限制性例子分别在SEQ ID NO:36或37中列出。可商购的试剂(如siRNA或shRNA试剂)也是容易获得的,参见例如从Santa Cruz Biotechnology (HLA-A,目录号sc-42908和相关试剂;HLA-B,目录号sc-42922和相关试剂;以及HLA-C,目录号sc-105525和相关试剂)。

[0201] 在一些实施方案中,通过在该基因中实现破坏(如敲除、插入、错义或移码突变(如双等位基因移码突变)、缺失全部或部分基因(例如一个或多个外显子或其部分)和/或敲入)来进行基因抑制。在一些方面中,另一种MHC I类(例如HLA-A、B或C)的破坏通过基因编辑进行,如使用DNA结合蛋白或DNA结合核酸,其在被靶向破坏的区域处与该基因特异性结合或杂交。在一些方面中,该破坏导致该基因的外显子内的缺失、突变和/或插入,如在第一或第二外显子内。

[0202] 在一些方面中,该蛋白质或核酸与基因编辑核酸酶偶联或复合,如以嵌合或融合蛋白的形式。在一些实施方案中,此类破坏由抑制性核酸分子实现,该抑制性核酸分子可以编码特别设计被靶向基因或其部分的序列的序列特异性或靶向核酸酶,包括DNA结合靶向核酸酶和基因编辑核酸酶(如锌指核酸酶(ZFN)和转录激活因子样效应核酸酶(TALEN))以及RNA指导的核酸酶(如CRISPR相关核酸酶(Cas))。

[0203] 锌指、TALE和CRISPR系统结合结构域可以“被工程化”以与预先确定的核苷酸序列结合,例如通过工程化(改变一个或多个氨基酸)天然存在的锌指或TALE蛋白的识别螺旋区。工程化的DNA结合蛋白(锌指或TALE)是非天然存在的蛋白质。设计的合理标准包括应用替换规则和计算机化算法,以用于处理存储现有ZFP和/或TALE设计和绑定数据的信息的数据库中的信息。参见例如,美国专利号6,140,081、6,453,242和6,534,261;还参见WO 98/53058、WO 98/53059、WO 98/53060、WO 02/016536和WO 03/016496以及美国公开号20110301073。

[0204] 在一些实施方案中,使用与效应蛋白(如内切核酸酶)融合的DNA靶向分子进行阻遏,该DNA靶向分子包括DNA结合蛋白,如一种或多种锌指蛋白(ZFP)或转录激活因子样蛋白(TAL)。例子包括ZFN、TALE和TALEN。参见Lloyd等人,Frontiers in Immunology,4(221),1-7(2013)。

[0205] ZFP或其结构域是蛋白质或者较大蛋白质内的结构域,其以序列特异性方式通过一个或多个锌指结合DNA,锌指是通过锌离子配位而稳定其结构的结合结构域内氨基酸序列的区域。术语锌指DNA结合蛋白通常缩写为锌指蛋白或ZFP。ZFP包括靶向特定DNA序列、通常为9-18个核苷酸长、通过单个指的组装产生的人工ZFP结构域。ZFP包括以下那些,其中单个指结构域长度为大约30个氨基酸且含有 α 螺旋,该 α 螺旋含有通过锌与单个 β 转角两个半胱氨酸配位的两个不变的组氨酸残基,并且具有两个、三个、四个、五个或六个指。通常,可以通过在锌指识别螺旋上的四个螺旋位置(-1、2、3和6)处进行氨基酸取代来改变ZFP的序列特异性。因此,在一些实施方案中,该ZFP或含有ZFP的分子是非天然存在的,例如被工程化以与选择的靶位点结合。

[0206] 在一些实施方案中,该DNA靶向分子是或包含与DNA切割结构域融合以形成锌指核酸酶(ZFN)的锌指DNA结合结构域。在一些实施方案中,融合蛋白包含来自至少一种IIS型限制酶的切割结构域(或切割半结构域)和一个或多个锌指结合结构域(其可以被或可以不被工程化)。在一些实施方案中,该切割结构域来自IIS型限制性内切核酸酶Fok I。Fok I通常催化DNA的双链切割,在一条链上距其识别位点9个核苷酸处,并且在另一条链上距其识别位点13个核苷酸处。参见例如,美国专利号5,356,802、5,436,150和5,487,994;以及Li等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:4275-4279;Li等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:2764-2768;Kim等人(1994a)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 91:883-887;Kim等人(1994b)J.Biol.Chem.269:31,978-31,982。]

[0207] 许多基因特异性的工程化的锌指是可商购的。例如,Sangamo Biosciences(美国加利福尼亚州列治文)已经与Sigma-Aldrich(美国密苏里州圣路易斯)合作开发了一个用于锌指构建的平台(CompoZr),允许研究人员一并绕过锌指构建和验证,并为数千种蛋白质提供了特异性靶向锌指。Gaj等人,Trends in Biotechnology,2013,31(7),397-405。在一些实施方案中,使用或定制设计可商购的锌指。(参见例如,Sigma-Aldrich目录号CSTZFND、CSTZFN、CTI1-1KT和PZD0020)。使用ZFN阻遏或破坏MHC I类分子的细胞表达的方法在本领域是已知的(参见例如Torikai等人(2013)Blood,122:1341-1349,其描述了用于如在HLA-等位基因HLA-A*03:01或HLA-A*02:01中破坏HLA-A基因座的方法)。

[0208] 在一些情况下,使用成簇的规则间隔短回文重复序列(CRISPR)和CRISPR相关(Cas)蛋白进行阻遏。参见Sander和Joung,Nature Biotechnology,32(4):347-355。通常,

“CRISPR系统”共同地是指转录物和涉及CRISPR相关(“Cas”)基因的表达或指导其活性的其他元件,包括编码Cas基因的序列、tracr(反式激活CRISPR)序列(例如tracrRNA或活性部分tracrRNA)、tracr配对序列(涵盖“同向重复序列”和在內源CRISPR系统的背景下的tracrRNA加工的部分同向重复序列)、指导序列(在內源CRISPR系统的背景下也称为“间隔子(spacer)”)和/或来自CRISPR基因座的其他序列和转录物。

[0209] 在一些实施方案中,该CRISPR/Cas核酸酶或CRISPR/Cas核酸酶系统包括与DNA特异性结合的非编码RNA分子(指导)RNA(gRNA)和具有核酸酶功能性(例如,两个核酸酶结构域)的Cas蛋白(例如,Cas9)。通常,指导序列是与靶多核苷酸序列(如编码MHC I类分子(例如HLA-A、-B或-C)的基因)具有足够的互补性以与该靶序列杂交并且指导该CRISPR复合物与该靶序列的序列特异性结合的任何多核苷酸序列。通常,在CRISPR复合物形成的背景下,“靶序列”一般是指指导序列被设计为与其具有互补性的序列,其中在该靶序列与指导序列之间的杂交促进CRISPR复合物的形成。如果存在足够的互补性以引起杂交并促进CRISPR复合物的形成,则不一定需要完全互补性。在一些实施方案中,当使用合适的比对算法进行最佳比对时,在指导序列与其相应的靶序列之间的互补程度是约或多于约50%、60%、75%、80%、85%、90%、95%、97.5%、99%或更多。在一些实施方案中,指导序列被选择为降低该指导序列内的二级结构的程度。可以通过任何合适的多核苷酸折叠算法来确定二级结构。

[0210] 在一些实施方案中,将与指导序列组合(并任选地与其复合)的CRISPR酶(例如Cas9核酸酶)递送至该细胞。在一些实施方案中,CRISPR系统的一种或多种元件衍生自I型、II型或III型CRISPR系统。在一些实施方案中,CRISPR系统的一种或多种元件衍生自包含內源CRISPR系统的特定生物,如酿脓链球菌(*Streptococcus pyogenes*)。

[0211] 使用CRISPR系统以敲除特定MHC I类(如HLA-A、-B或-C)的方法在本领域是已知的(参见例如Sanjana等人(2014)Nat.Methods,11:783-4)。在一种示例性方法中,将Cas9核酸酶(例如,其由来自金黄色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)或来自酿脓链球菌的mRNA编码,例如pCW-Cas9,Addgene#50661,Wang等人(2014)Science,3:343-80-4;或可从Applied Biological Materials (ABM;加拿大)以目录号K002、K003、K005或K006获得的核酸酶或切口酶慢病毒载体)和对该靶抗原基因具特异性的指导RNA引入细胞中,例如使用慢病毒递送载体或用于转移到细胞的许多已知递送方法或载体中的任何一种,如用于递送Cas9分子和指导RNA的许多已知方法或载体中的任何一种。还可以产生非特异性或空载体对照细胞。可以使用用于评估细胞中的基因破坏的许多众所周知的测定中的任何一种来评估基因的敲除程度(例如,转移后24至72小时)。例如,示例性指导RNA序列可以包括SEQ ID NO:10-27中列出的任何序列。用于经由CRISPR敲除特定MHC I类(如HLA-A、-B或-C)的可商购的试剂盒、gRNA载体和供体载体也是容易获得的。例如,用于敲除HLA-A基因的试剂可从例如GeneCopoeia(参见例如目录号HTN262410或HTN208849)、Origene Technologies(目录号KN200661)获得。在另一个例子中,用于敲除HLA-B基因的试剂可从例如Santa Cruz Biotechnology,Inc.(参见例如目录号sc-400627)获得。在又一个例子中,用于敲除HLA-C基因的试剂可从例如Santa Cruz Biotechnology,Inc.(参见例如目录号sc-401517)获得。

[0212] 在一些实施方案中,将能够诱导编码经典MHC I类(如HLA-A、-B或-C)的基因的遗传破坏(如敲低或敲除)的试剂作为复合物(如核糖核蛋白(RNP)复合物)引入。RNP复合物包括一连串核糖核苷酸(如RNA或gRNA分子)和多肽(如Cas9蛋白或其变体)。在一些实施方案

中,将该Cas9蛋白作为RNP复合物递送,该RNP复合物包含Cas9蛋白和gRNA分子,例如被靶向编码经典MHC I类(如HLA-A、-B-或-C)的基因的gRNA。在一些实施方案中,将包括被靶向编码经典MHC类的基因(例如编码HLA-A、-B-或-C的基因)的一种或多种gRNA分以及Cas9酶或其变体的RNP经由物理递送(例如,电穿孔、粒子枪、磷酸钙转染、细胞压缩或挤压)、脂质体或纳米颗粒直接引入该细胞中。

[0213] 在一些实施方案中,可以使用用于评估细胞中的基因破坏的许多众所周知的测定中的任何一种来评估在不同时间点(例如,引入试剂后24至72小时)的基因(例如,编码经典MHC I类分子(例如HLA-A、-B-或-C)的基因)的敲除程度。可以使用用于评估细胞中的基因表达的许多众所周知的测定中的任何一种(如用以确定转录或蛋白质表达或细胞表面表达的水平)的测定)来评估在不同时间点(例如,引入试剂后24至72小时)的基因的敲除程度。

[0214] 在一些实施方案中,在引入编码该异源抗原的CMV载体颗粒之前或与此同时,该一种或多种MHC分子与内源肽的相互作用被减少、逆转和/或抑制。在一些实施方案中,该细胞可以剥离与细胞表面上的MHC结合的内源肽。在一些实施方案中,可以通过将细胞在低pH(例如从或从约2-3的pH)下孵育一短时间(如孵育从或从约1分钟至1小时,如5分钟至30分钟)而将内源肽从该细胞的表面剥离。在一些实施方案中,编码与抗原呈递相关的转运蛋白(TAP)的基因在该细胞中被破坏和/或被阻遏,从而阻断该分子的细胞内肽供应。例如,在一些实施方案中,将表现出TAP基因互补性的抑制性核酸分子(例如,RNAi)引入该细胞中。

[0215] C. 鉴定和检测肽表位

[0216] 在一些实施方案中,本文所提供的方法包括检测和/或鉴定与细胞的表面上的MHC分子复合的肽表位,在该细胞中引入了含有编码该异源抗原或蛋白质的核酸的重组CMV载体颗粒(例如具有在编码UL128和/或UL130的ORF中被改变和/或编码无活性UL128和/或UL130蛋白的CMV基因组)。通常,该肽表位(或T细胞表位)是可以衍生自或基于该异源抗原的片段的肽,当在该细胞中从该CMV载体颗粒表达时,其已经被加工并且能够与MHC分子缔合或与其形成复合物,以呈递在该细胞的表面上。在一些实施方案中,该MHC分子和肽表位通过该肽在该MHC分子的结合沟或裂缝中的非共价相互作用而复合或缔合。

[0217] 在一些实施方案中,检测和/或鉴定肽表位包括从结合的MHC分子中分离肽的方法,如通过从细胞裂解物、细胞表面和/或从分离的MHC分子中提取或洗脱在MHC分子的背景下存在的肽。用以从细胞中分离MHC结合的肽的方法在本领域是已知的,并且包括但不限于酸化细胞裂解物的分析、肽从细胞表面的洗脱或MHC-肽复合物从溶解的细胞裂解物中的免疫亲和纯化。在一些实施方案中,在弱酸或稀酸的存在下分离(如提取或洗脱)该肽。在一些实施方案中,可以在用酸(如三氟乙酸(TFA))处理后,从全细胞裂解物中提取肽,然后通过反相高压液相层析(RP-HPLC)或其他分级方法进行分级。在一些实施方案中,可以利用非溶解方法,其中通过在酸性缓冲液(如pH约3.3的含有柠檬酸盐的等渗缓冲液)的存在下孵育细胞来回收细胞表面缔合肽,这可以促进肽从细胞表面的解离而不影响细胞活力。在一些实施方案中,可以利用MHC分子从细胞表面的免疫亲和层析和/或免疫沉淀来分离特定MHC分子,然后用酸处理以解离或洗脱结合的肽。

[0218] 在一些实施方案中,通过评估或筛选免疫学读数(如T细胞测定)可以从级分、提取物或洗脱液样品中鉴定目标肽,以确认特定肽表位的存在或以定量不同细胞类型中的已知表位。在一些实施方案中,检测和/或鉴定肽表位包括确定特定肽(或含有肽的级分、提取物

或洗脱液)是否能够诱导T细胞应答(如细胞毒性(例如CD8+)或辅助性(例如,CD4+)T细胞应答)。在一些实施方案中,可以分离或纯化被MHC分子结合或识别和/或能够在MHC分子的背景下诱导免疫应答的肽表位。在一些实施方案中,确定该肽表位的序列。

[0219] 在一些实施方案中,检测和/或鉴定MHC-肽复合物的方法可以包括评估细胞的表面上的MHC的稳定性(Terrazzano等人(2007) *Journal of Immunology*, 179:372-381)。在一些实施方案中,该MHC是MHC Ia类或MHC-E分子,其在一些情况下在肽的存在下表现出增加的表达和/或稳定化。在一些实施方案中,在向该细胞中引入该CMV载体颗粒之后,并且在产生加工的肽的条件下,可以回收该细胞并分析MHC的细胞表面表达,如通过流式细胞术。熟练技术人员熟悉稳定化测定并且可以凭经验确定进行此类测定的条件。在一些实施方案中,可以用抗MHC特异性抗体(如本领域已知的任何抗体,包括本文描述的示例性抗体)来确定MHC分子(如MHC Ia类或MHC-E分子)的表面表达。还可以评估未引入含有编码该异源抗原的核酸的CMV病毒颗粒的对照细胞。

[0220] 在一些实施方案中,检测和/或鉴定肽的方法包括从特定细胞或细胞系(如根据所提供的方法引入了CMV载体颗粒的细胞)的表面分离或分开MHC分子,并且确定或评估肽与的结合。例如,检测、分离和/或鉴定肽的方法可以涉及细胞的裂解,MHC分子从细胞裂解物中的亲和纯化以及肽从MHC的随后洗脱和分析(Falk等人(1991) *Nature*, 351:290; Kowalewski和Stevanovic(2013). *Biochemical Large-Scale Identification of Class I Ligands*. 在 *Antigen Processing: Methods and Protocols*, *Methods in Molecular Biology*, 第960卷, 第12章(第145-157页; 和美国专利5,989,565)。在一些情况下,亲和纯化可以涉及免疫沉淀或亲和层析。在一些情况下,可以使用离子交换层析、凝集素层析、尺寸排阻高效液相层析中的一种或多种和上述任何的组合。

[0221] 在一些实施方案中,利用免疫沉淀来分离MHC分子,如特定MHC类或特定MHC等位基因。通常,免疫沉淀方法利用对特定MHC类或MHC等位基因具特异性的抗体,如单克隆抗体。例如,在一些方面中,可以使用等位基因特异性抗体。在一些情况下,可以使用通常识别多于一个MHC等位基因(如特定的一种或多种MHC类别)的广泛反应性或单态性抗体。根据细胞表达的特定MHC和/或所需的MHC检测的特异性选择特定抗体在熟练技术人员的水平内。各种抗MHC抗体(包括抗HLA抗体)在本领域是熟知的,并且可从商业和私人来源获得。示例性抗体描述于表2中。

[0222]

表2: 抗MHC抗体		
抗HLA	名称	来源或参考文献
HLA-A	EP1395Y	Abcam(马萨诸塞州剑桥), 目录号Ab52922
HLA-A2	BB7.2	ATCC HB-82
HLA-A3	GAPA3	ATCC, HB122
HLA-A23, A24	0041HA	Sanbio(荷兰)编号0041HA
HLA-11, 24, 1	A11.1M	ATCC, HB164

[0223]

表2: 抗MHC抗体		
HLA-B13, B62, B15	4i109	Abcam编号ab36184
HLA-C	多克隆	Abcam目录号ab168393
泛HLA-I类(例如HLA-A、-B、-C和HLA-E)	W6/32	ATCC, HB95
	B9.12.1	Beckman Coulter, 目录号IM0107
HLA-B,C单态性	B.1.23.2	INSERM-CNRS
HLA-DR	L243	BioLegend, 目录号307602
	DASS-397D15.1 (FLJ51114)	Abcam目录号ab118347
HLA-DR, HLA-DP	HL-40	Abcam目录号ab8085
HLA-DP	多克隆	Abcam目录号ab153886
HLA-DQ	SPV-L3	Abcam目录号ab23632
HLA-E	MEM-E/07	LifeSpan Biosciences, Inc. 目录号LS-B3730
HLA-E	MEM-E/08	Abcam编号ab11821
HLA-E	3D12	eBioscience (加利福尼亚州圣地亚哥), 目录号12-9953
HLA-E, HLA-C	DT9	Merck Millipore (马萨诸塞州比勒利卡) 目录号MABF233
HLA-E	各种	US2014/0010825; WO2014/008206; WO2012094252

[0224] 在一些实施方案中,肽级分可以进一步与该MHC-肽复合物分离。在一些实施方案中,肽可以通过熟练技术人员熟知的方法从该MHC分子中解离,例如通过使该复合物暴露于各种变性方法中的任何一种,如热、pH、洗涤剂、盐、离液剂或其组合。例如,在一些实施方案中,在分离后,可以洗脱与经分离的MHC分子的肽结合沟结合的肽,如使用酸处理。

[0225] 在一些实施方案中,可以通过反相高效液相层析(HPLC)将肽级分与该MHC分子进一步分离并测序。在一些实施方案中,肽可以通过熟练技术人员熟知的其他方法分离,如过滤、超滤、电泳、尺寸层析、用特异性抗体沉淀、离子交换层析或等电聚焦。在一些实施方案中,可以通过质谱(MS)、液相层析MS(LC-MS)、串联MS(LC-MS/MS)或MALDI-MS分析洗脱的肽。

[0226] 在一些实施方案中,可以通过酸提取和HPLC分离来分开或分离与细胞的表面上的MHC分子结合的肽。例如,可以例如用三氟乙酸、柠檬酸盐磷酸盐缓冲液或其他合适的酸性缓冲液将细胞酸化至约 2 ± 0.5 至 3 ± 0.5 的pH。在一些情况下,可以将酸处理过的细胞均质化,并且在离心后将肽洗脱到上清液中。在一些情况下,可以通过可包括尺寸排阻层析、固相提取、真空离心及其组合的方法从该上清液中提取或获得低分子量化合物。在一些情况下,肽的分离可以通过HPLC进行,并且可以通过调节流速、梯度类型和熟练技术人员已知的

其他参数将肽洗脱为不同的级分。

[0227] 在一些实施方案中,差减方法可以通过对未引入该异源抗原的对照细胞进行免疫亲和纯化和肽洗脱来进行。在一些实施方案中,该对照细胞是引入了不含编码该异源抗原的核酸分子的空CMV载体颗粒的细胞。在一些实施方案中,该对照细胞是在不引入任何CMV载体颗粒的情况下孵育的细胞。在一些实施方案中,可以例如通过质谱法比较来自测试和对照细胞样品的肽。在一些实施方案中,只有引入了编码该异源抗原的CMV载体颗粒的细胞的分布(profile)中包含的肽才可以用于鉴定肽表位,如通过后续测序。

[0228] 在一些实施方案中,可以对经分离的肽测序。在一些实施方案中,可以根据诸如埃德曼降解等标准技术进行经分离的肽的测序。在一些实施方案中,可以进行单个肽的质谱测序。在一些实施方案中,可以将经测序的肽与该靶抗原和经鉴定存在于该靶抗原中的特定肽的序列进行比较。

[0229] 在一些实施方案中,该肽通常是多肽(例如异源抗原)的小于全长但长度大于或等于2个氨基酸的部分,如长度大于或等于2个且小于或等于50或40个氨基酸的部分。在一些实施方案中,该肽的长度在7与50个氨基酸之间、11与50个氨基酸之间、长度在11与42个氨基酸之间、8与20个氨基酸之间、10与17个氨基酸之间、7与13个氨基酸之间或8与10个氨基酸之间。在一些实施方案中,通过该方法鉴定的肽的长度大于或大于约7个氨基酸,如是或是约8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50个或更多个氨基酸。在一些实施方案中,该肽具有7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19或20个氨基酸的长度。

[0230] 在一些实施方案中,所鉴定的肽表位可以是非典型(或非常规)表位和/或引发非典型应答。在一些情况下,非常规表位或非典型表位是这样的肽表位,其在MHC分子上展示或呈递,但是可能不表现出MHC结合的保守序列基序(例如由于不存在一个或多个锚定残基),可以表现出与MHC分子的较低或中等亲和力结合相互作用和/或可以比常规或典型肽表位具有更长的长度。因此,非典型表位可以是不表现出针对MHC相互作用的典型序列基序、长度和/或结合亲和力的表位。

[0231] 在一些实施方案中,该肽表位能够在MHC-I类、MHC-II类或MHC-E分子的背景下结合。在一些实施方案中,该肽可以比一般在此类分子的背景下结合的典型肽长。在一些实施方案中,MHC-I限制性肽(包括经典MHC-Ia或非经典MHC-E分子)具有大于11个氨基酸(如大于12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30个氨基酸)的长度。在一些实施方案中,MHC-II限制性肽具有大于25个氨基酸(如大于26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50个或更多个氨基酸)的长度。

[0232] 在一些实施方案中,可以制备该肽,如以用于进一步分析或测试。在一些实施方案中,可以使用本领域已知的技术在溶液中或在固体支持物上合成该肽。在一些实施方案中,可以使用自动肽合成仪合成肽。各种自动合成仪是可商购的并且可以根据已知的方案使用。在一些实施方案中,可以手动合成该肽。用于肽合成的方法在本领域是已知的或进行了描述,参见例如,参见例如,Stewart和Young,Solid Phase Peptide Synthesis,第2版,Pierce Chemical Co.,伊利诺伊州罗克福德(1984);Hunkapiller等人,(1984) Nature, 310:105-11;Bodanszky,Principles of Peptide Synthesis,Springer Verlag(1984)。

[0233] 在一些实施方案中,可以在与MHC分子接触之前分离和纯化肽。在一些实施方案

中,用于纯化或分离的合适方法包括例如层析(例如,离子交换层析、亲和层析、尺寸分级柱层析、高压液相层析)、离心、差异溶解度或用于纯化肽或蛋白质的其他合适技术。在一些实施方案中,可以标记该肽(例如用放射性标记、发光标记、化学发光标记或亲和标签),如以促进纯化、分离和/或活性(例如结合)的评估。

[0234] 在一些实施方案中,该方法允许鉴定对结合的MHC具有结合亲和力(如通过最大抑制浓度(IC₅₀)确定的)的肽表位,该结合亲和力是高亲和力、中等亲和力或在一些情况下低亲和力。在一些实施方案中,可以通过确定将标记的报道肽的结合减少50%所需的浓度来测量结合的IC₅₀来评估肽的相对结合能力或亲和力。

[0235] 在一些实施方案中,确定该肽表位的结合亲和力。确定肽对MHC分子的亲和力的方法在本领域是熟知的(参见例如在PCT公开WO 94/20127和WO 94/03205中)。在一些实施方案中,结合测定可以涉及相对于放射性碘标记的参考肽的结合评估肽与纯化的MHC分子结合。可替代地,可以通过免疫荧光染色和流动显微荧光测定法评估表达空MHC分子(即缺乏任何结合的肽的细胞表面HLA分子)的细胞的肽结合。可以用于评估肽结合的其他测定包括肽依赖性I类装配测定和/或通过肽竞争抑制CTL识别。在一些情况下,还可以使用其他测定系统来确定结合,包括使用以下的那些:活细胞(例如,Ceppellini等人,Nature 339:392(1989);Christnick等人,Nature 352:67(1991);Busch等人,Int.Immunol.2:443(1990);Hill等人,J Immunol.147:189(1991);del Guercio等人,J Immunol.154:685(1995))、使用洗涤剂裂解物的无细胞系统(例如,Cerundolo等人,J Immunol.21:2069(1991))、固定化的纯化的MHC(例如,Hill等人,J Immunol.152:2890(1994);Marshall等人,J Immunol.152:4946(1994))、ELISA系统(例如,Reay等人,EMBO J 11:2829(1992))、表面等离子体共振(例如,Khilko等人,J Biol.Chem.268:15425(1993))、高通量可溶相测定(Hammer等人,J.Exp.Med.180:2353(1994))和使用变性MHC分子的基于ELISA的重折叠测定(Sylvester-Hyid等人(2002)Tissue Antigens,59:251-8))。

[0236] 在一些实施方案中,通过基于肽稳定在细胞表面上表达的MHC I类分子(如MHC Ia类或MHC-E分子)的能力的稳定性测定来确定亲和力。在一些情况下,可以用目标MHC等位基因转染TAP缺陷型细胞系,如T2、K562或RMA-S。可以在各种测定中的任何一种中使用抗MHC抗体(如泛MHC I类抗体)例如通过流式细胞术来检测稳定化的MHC I类复合物。在一些情况下,可以相对于非结合阴性对照评估或比较结合。

[0237] 在一些实施方案中,使用肽依赖性重折叠测定来确定亲和力(Strong等人(2003)J Biol.Chem.,278:5082-5090;Sylvester-Hyid等人(2002)Tissue Antigens,59:251-8)。例如,在一个示例性实施方案中,在 β 2m、重链和各种浓度的肽的存在下评估MHC I类分子的重折叠,其可以孵育适当的时间以进行重折叠(例如在或在约4℃与8℃之间并且在一些情况下在室温下(例如在或在约21℃与25℃之间)30分钟至3小时(例如约1至2小时))。可以例如在夹心ELISA或其他类似方法中使用MHC特异性抗体检测重折叠的MHC。在一些实施方案中,可以将存在或不存在各种浓度的肽时重折叠的MHC的相对量与标准进行品比较。例如,对于MHC-E,可以将重折叠与使用已知结合MHC-E的九聚体肽(例如HLA-B7九聚体;VMAPRTLVL, SEQ ID NO:6)实现的组装体进行比较。在一些实施方案中,可以基于产生半最大组装的肽浓度确定相对结合亲和力。

[0238] 在一些实施方案中,使用竞争测定(如竞争放射免疫测定)用已知或参考肽确定结

合亲和力。例如,在一些方面中,可以通过比较测试肽与已知或参考结合肽的升高浓度来确定相对亲和力。在一些实施方案中,可以确定结合的 IC_{50} ,其是结合测定中观察到已知或参考肽的结合的50%抑制时的肽浓度。在一些情况下,如取决于运行该测定的条件(即限制MHC蛋白和标记的肽浓度),这些值可以近似于 K_D 值。在一些实施方案中,可以相对于参考或已知肽表示结合。

[0239] 在一些实施方案中,可以评估肽与特定MHC类型(如工程化的细胞系、PBMC、白血病细胞系或EBV转化的T细胞系)的细胞的表面上的MHC的结合。在一些实施方案中,可以用已知与相同或不同MHC分子结合的过量未标记肽进行结合测定(如竞争测定)。在一些实施方案中,可以评估与表达相同或不同MHC类型的细胞的结合。在一些实施方案中,可以测试肽与相同超类型的其他MHC分子的结合。在一些实施方案中,可以确定与特定MHC或MHC等位基因的结合同样具有特异性和/或选择性。

[0240] 在一些实施方案中,该肽对结合MHC具有高、中等或低亲和力的亲和力。通常,对MHC I类分子的“高亲和力”被定义为以50nM或更小的 IC_{50} 或 K_D 值结合,对MHC I类分子的“中等亲和力”被定义为以在约50和约500nM之间的 IC_{50} 或 K_D 值结合,并且对MHC I类分子的“低亲和力”被定义为以大于500nM(如通常在约500nM与约5000nM之间)的 IC_{50} 或 K_D 值结合。对于MHC II类分子,通常,关于与MHC II类分子的结合的“高亲和力”被定义为以100nM或更小的 IC_{50} 或 K_D 值结合;关于与MHC II类分子的结合的“中等亲和力”被定义为以在约100与约1000nM之间的 IC_{50} 或 K_D 值结合;并且关于与MHC II类分子的结合的“低亲和力”被定义为以大于1000nM(如通常在约1000nM与约5000nM之间)的 IC_{50} 或 K_D 值结合。

[0241] 在一些实施方案中,非典型肽可以包括对MHC分子表现出比否则针对典型肽表位观察到的更低亲和力的肽。在一些实施方案中,通过所提供的方法鉴定的肽表位具有 IC_{50} 在或在约200nM与5000nM(如通常大于200nM且小于4000nM、2000nM、1000nM或500nM)的结合亲和力。在一些实施方案中,肽表位(如通用、超类型和/或非典型肽表位)可以包括对MHC分子(如MHC Ia类、MHC-E或MHC II类分子)具有 IC_{50} 或 K_D 值小于或约小于5000nM、4000nM、3000nM、2000nM、1000nM、900nM、800nM、700nM、600nM、500nM、400nM、300nM、200nM、100nM或更小的亲和力的肽。在一些实施方案中,该结合亲和力是中等或低亲和力。例如,在一些实施方案中,该肽对MHC分子(如MHC Ia类、MHC-E或MHC II类分子)具有 IC_{50} 或 K_D 值大于50nM或100nM或更大(如大于200nM、500nM或1000nM,但是通常小于5000nM)的结合亲和力。

[0242] 在一些实施方案中,检测和/或鉴定肽表位的方法包括评估在细胞的表面上在MHC分子的背景下展示的肽(如在根据所提供的方法引入编码异源蛋白抗原的CMV载体颗粒后)是否是能够诱导免疫应答的T细胞表位。

[0243] 在一些实施方案中,在检测和/或鉴定与MHC分子结合的肽表位之后(如使用上述任何程序),所提供的方法还包括测试对该肽(如纯化的或分离的肽)的T细胞应答。在一些实施方案中,可以鉴定引发T细胞应答的肽表位。

[0244] 在一些实施方案中,通过评估该肽诱导辅助细胞或细胞介导的免疫应答的功能活性,可以验证该肽是免疫表位。在一些实施方案中,可以评估该肽作为来源于用该肽体外引发的健康受试者或来源于感染或患病(例如携带肿瘤的)受试者的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的靶标的能力。在一些实施方案中,可以使用肿瘤特异性CTL克隆评估CTL活性。在一些实施方案中,可以使用类似测定评估该肽刺激辅助性T淋巴细胞(HTL)应答的能力。在一

些实施方案中,可以评估与MHC II类分子结合的肽的HTL应答和/或CTL应答。在一些实施方案中,可以评估与MHC I类分子(如MHC Ia类或MHC-E)结合的肽的CTL应答。此类测定可以在体外或在体内进行。在一些实施方案中,检测T细胞应答的方法包括增殖测定、淋巴因子分泌测定、直接细胞毒性测定和有限稀释测定。

[0245] 在一些实施方案中,可以将与该肽的HLA限制匹配的抗原呈递细胞与肽一起温育,并且测定在应答细胞群中诱导CTL应答的能力。在一些实施方案中,通过在体外(如在组织培养中)将CTL前体淋巴细胞与抗原呈递细胞来源和该肽一起孵育来诱导此类应答。在一些情况下,抗原呈递细胞可以是外周血单核细胞、巨噬细胞、树突细胞或激活的B细胞。在一些实施方案中,可以使用用MHC分子工程化或转染的细胞。在一些情况下,可以使用已经用MHC基因(如MHC I类基因)转染并且在其用内部加工的肽加载I类分子的能力方面有缺陷的突变型哺乳动物细胞系来评估该肽诱导体外原发性CTL应答的能力。在一些情况下,外周血单核细胞(PBMC)或CD8⁺细胞可以用作CTL前体或应答细胞的来源。在一些实施方案中,将PBMC分级以获得抗原呈递细胞和自体T细胞(如CD8⁺ T细胞)的来源。可替代地,该抗原呈递系统可以包含特定T细胞系/克隆和/或特定抗原呈递细胞类型。已经描述了许多体外CTL刺激方案,并且选择使用哪种方案完全在熟练技术人员知识范围内。

[0246] 在一些实施方案中,可以将抗原呈递细胞与肽一起温育,这之后然后将载有肽的抗原呈递细胞与该应答细胞群在经优化的培养条件下一起孵育。在一些实施方案中,该肽以10与40 μ g/ml之间的浓度提供。在一些实施方案中,将该肽与该抗原呈递细胞预孵育范围从1至18小时的时间段。在一些实施方案中,可以在此时间段期间添加 β 2-微球蛋白(例如4 μ g/ml)以增强结合。在一些实施方案中,可以将该抗原呈递细胞在孵育期间保持在室温下(Ljunggren, H.-G.等人, *Nature*, 346:476-480, (1990))或用酸预处理(Zeh, H.J., Ili等人, *Hum. Immunol.*, 39:79-86, (1994)),以促进产生变性的I类MHC分子,其然后可以结合该肽。在肽加载抗原呈递细胞后,可以将该前体CTL(应答物)添加到该肽已经结合的抗原呈递细胞(刺激物)中,例如以在5:1与50:1之间(如在10:1与20:1之间)的应答物比刺激物比例。细胞的共培养在可以产生CTL应答细胞的条件下(即在引发CD8⁺细胞的条件下)进行。例如,在一些实施方案中,共培养在IL-2或其他刺激性细胞因子(如IL-1、IL-7和IL-12)的存在下进行。在一个示例性实施方案中,细胞的共培养在37 $^{\circ}$ C下在RPMI 1640、10%胎牛血清、2mM L-谷氨酰胺和IL-2(5-20单位/ml)中进行,并且任选地添加IL-1、IL7或IL-12中的一种或多种。在一些实施方案中,每2-4天将新鲜的含IL-2的培养基加入该培养物中,例如通过除去一半旧培养基并用等体积的新鲜培养基补充它。在一些实施方案中,在7-10天之后,并且通常此后每7-10天,用如上所述结合肽的抗原呈递细胞再刺激该CTL。在一些实施方案中,在其整个培养过程中,如上所述将新鲜的含IL-2的培养基加入该细胞中。在一些实施方案中,可能需要三到四轮刺激,有时多达五到八轮刺激,以产生可以在体外测量的CTL应答。在一些实施方案中,通过用抗CD3抗体处理,该肽特异性CTL可以进一步扩增至大量。例如,参见(Riddell, S.R.和Greenberg, P.D., *J. Immunol. Methods*, 128:189-201, (1990); Walter, E.A.等人, *N. Engl. J. Med.*, 333:1038-1044, (1995))。

[0247] 在一些实施方案中,可以直接从分离自感染或患病受试者(如携带肿瘤或癌症的受试者)的PBMC评估CTL活性,而无需体外引发(参见例如Bredenbeck等人(2005) *J. Immunol.*, 174:6716-6724)。例如,在一些实施方案中,可以将肽直接添加到从该受试者

的外周血分离的PBMC细胞中。在一些情况下,作为对照,可以评估来自同一受试者的不含肽的PBMC的CTL活性。在一些实施方案中,该癌症已知或可能表达已经衍生出通过所提供的方法鉴定的肽的肿瘤抗原。在一些实施方案中,该受试者患有肉瘤、黑色素瘤、乳腺癌、肾癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、头颈部鳞状肿瘤或肺鳞癌。

[0248] 在一些实施方案中,可以利用CTL克隆(如肿瘤特异性CTL克隆)评估CTL活性。用于产生CTL克隆的方法是熟练技术人员已知的。在一个示例性实施方案中,CTL克隆可以通过在抗原呈递细胞的存在下用抗原刺激CD8⁺ T细胞,然后是抗原特异性CD8⁺ T细胞的持续抗原特异性扩增以产生克隆的CTL系来获得。

[0249] 在一些实施方案中,可以确定该CTL激活。存在多种用于测定CTL活性的技术。在一些实施方案中,可以通过测定该培养物中裂解放射性标记的靶细胞(如特异性肽脉冲的靶标)的CTL的存在来评估CTL活性。这些技术包括用放射性核素(如Na₂⁵¹CrO₄或³H-胸苷)标记靶细胞,并且测量放射性核素从该靶细胞中的释放或保留作为细胞死亡的指标。在一些实施方案中,已知CTL在被适当的靶细胞(如表达相关MHC分子和相应肽的肿瘤细胞)刺激时释放多种细胞因子,并且可以通过测量细胞因子释放来确定此类表位特异性CTL的存在。此类细胞因子的非限制性例子包括IFN- γ 、TNF- α 和GM-CSF。这些细胞因子的测定在本领域是熟知的,并且它们的选择留给熟练技术人员。用于测量靶细胞死亡和细胞因子释放作为CTL反应性的量度的方法学在Coligan, J.E.等人(Current Protocols in Immunology, 1999, John Wiley&Sons, Inc., 纽约)中给出。

[0250] 在一些实施方案中,表位验证可以涉及测试通过该方法鉴定的肽激活CD4⁺(即HTL激活)的能力。在一些实施方案中,还可以使用本领域技术人员已知的技术评估HTL激活,如T细胞增殖或淋巴因子分泌(参见例如Alexander等人, Immunity 1:751-761, 1994)。在一些实施方案中,该CD4⁺ T细胞可以来自健康受试者或来自感染或疾病受试者(例如肿瘤受试者)。在一些实施方案中,可以在有和没有肽的情况下培养全外周血单核细胞(PBMC),并且可以测量它们的增殖反应,例如通过将³H-胸苷掺入其DNA中。在一些情况下,为了确认增殖的T细胞是CD4⁺细胞,可以加入与T细胞上的CD4⁺分子结合的抑制性抗体以抑制此类细胞的增殖。在一些情况下,可以从PBMC中纯化CD4⁺ T细胞,并且在表达适当的MHC II类分子的抗原呈递细胞的存在下测试对该肽的增殖反应。示例性抗原呈递细胞包括例如B淋巴细胞、单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、其永生化细胞,或者可以是全PBMC或人工抗原呈递细胞。在一些情况下,该抗原呈递细胞可以内源地表达目标MHC II类分子,或者可以用编码此类分子的多核苷酸转染或工程化。在一些实施方案中,在该测定之前,该抗原呈递细胞可以通过用例如电离辐射或丝裂霉素C处理而变得非增殖。

[0251] 在一些实施方案中,可以测量CD4⁺ T细胞的细胞因子的产生作为HTL应答的指标。在一些情况下,此类测量的细胞因子可以包括但不限于白细胞介素-2(IL-2)、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-4(IL-4)、TNF- α 、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-12(IL-12)或TGF- β 。用于测量细胞因子的测定在本领域是熟知的,并且包括但不限于ELISA、细胞内细胞因子染色、流式微珠阵列、RT-PCR、ELISPOT、流式细胞术以及在测试样品的存在下测试对相关细胞因子有响应的细胞的响应性(例如增殖)的生物测定。

[0252] 在一些实施方案中,可替代地,可以基于其刺激免疫应答或诱导T细胞反应性的能力来鉴定肽表位。因此,在一些实施方案中,可以在不需要首先确定肽是否被特定MHC分子

结合和/或从其中洗脱的情况下进行该方法。例如,在一些实施方案中,检测和/或鉴定肽表位的方法包括评估或确定在细胞的表面上在MHC分子的背景下展示的肽(如在根据所提供的方法引入编码异源蛋白抗原的CMV载体颗粒后)是否是能够诱导免疫应答的T细胞表位。在一些实施方案中,肽抗原的来源是通过在所表达的异源蛋白的一种或多种肽抗原表达,加工并在主要组织相容性复合物(MHC)分子的背景下呈递在该细胞的表面上的条件下向该细胞中引入该CMV载体颗粒而获得的肽表达细胞。这样得到的肽表达细胞可以直接用作该肽来源,以评估对从健康或者感染或患病受试者(例如携带肿瘤的受试者)的应答细胞或效应细胞(如全血管外周血单核细胞(PBMC)、CD4⁺或CD8⁺ T细胞)的刺激。可以使用本领域已知的方法(包括上述任何方法)评估细胞毒性或辅助性T细胞应答。在一些实施方案中,如果评估T细胞应答,则可以鉴定,分离或纯化该肽,如通过上述免疫亲和和洗脱方法。在一些实施方案中,可以将未引入编码该异源抗原的CMV载体颗粒的细胞用作对照。

[0253] 在一些实施方案中,所鉴定的肽或表位(如通用的、超表位的和/或非典型的肽或表位)引发T细胞应答。在一些实施方案中,在含有已经暴露于该肽或与其接触的CD4⁺和/或CD8⁺细胞的细胞群的背景下引发该一种或多种T细胞应答。在一个具体例子中,可以用该肽刺激从受试者(如患有肿瘤或癌症的受试者)获得的外周血单核细胞(PBMC)并评估其激活。用于评估T细胞激活的各种测定在本领域是熟知的。

[0254] 在一些实施方案中,评估所鉴定或检测的肽的免疫学读数,如使用T细胞测定。在一些实施方案中,所鉴定的表位可以激活CD8⁺ T细胞应答。在一个实施方案中,可以通过使用测定来监测CTL反应性来评估CD8⁺ T细胞应答,该测定包括但不限于通过⁵¹Cr释放的靶细胞裂解或检测干扰素 γ 释放(如通过酶联免疫吸附斑点测定(ELISA)、细胞内细胞因子染色或ELISPOT)。在一些实施方案中,所鉴定的表位可以激活CD4⁺ T细胞应答。在一些方面中,可以通过测量增殖的测定来评估CD4⁺ T细胞应答,例如通过将[3H]-胸苷掺入细胞DNA和/或通过细胞因子的产生,如通过ELISA、细胞内细胞因子染色或ELISPOT。在一些情况下,该细胞因子可以包括例如白细胞介素-2(IL-2)、干扰素- γ (IFN- γ)、白细胞介素-4(IL-4)、TNF- α 、白细胞介素-6(IL-6)、白细胞介素-10(IL-10)、白细胞介素-12(IL-12)或TGF β 。在一些实施方案中,所鉴定的表位(如MHC II类表位)可以引发或激活CD4⁺ T细胞应答和CD8⁺ T细胞应答。

[0255] 在一些实施方案中,携带或表达人HLA基因的转基因小鼠的免疫可以用于确定肽表位的免疫原性。几种转基因小鼠品系是已知的并且已经表征。这些包括但不限于已经表征了具有人HLA-A2.1、HLA-A11(其可以另外用于分析HLA-A3表位)、HLA-B7等位基因、HLA-A1和HLA-A24的小鼠。此外,已经开发出HLA-DR1和HLA-DR3小鼠模型。根据本领域的原理,根据需要产生具有其他HLA等位基因的其他转基因小鼠模型。此类小鼠可以用肽免疫,该肽在一些情况下在不完全弗氏佐剂中乳化,并且此后可以测试任何得到的T细胞识别已经被编码该目标肽的基因肽脉冲或用其转染的靶细胞的能力。在一些实施方案中,可以使用上述细胞毒性测定法分析CTL应答。在一些实施方案中,可以使用例如如上所述的T细胞增殖或淋巴因子分泌测定来分析HTL应答。

[0256] 在一些实施方案中,所鉴定的肽表位可以是通用肽表位和/或引发通用T细胞应答。在一些情况下,通用肽表位是这样的肽,其被多个HLA/MHC识别和展示,并且因此能够在相同物种的大多数受试者(包括在MHC基因座处遗传上不同的受试者)中引发免疫应答,如

CD4⁺或CD8⁺免疫应答。在一些情况下,通用肽表位可以在特定物种(如哺乳动物或人物种)的群体内在MHC基因座处遗传上不同的大于50%的受试者(如通常在暴露于这种肽抗原的受试者群体的大于60%、70%、80%、90%或更多中)引发这种免疫应答。例如,在一些情况下,具有通用表位序列的肽可以在来自相同物种的在MHC基因座中遗传上不同的的大多数的受试者的样品中诱导T细胞的增殖,诱导细胞毒性T细胞应答和/或诱导体液免疫应答。在一些情况下,通用肽表位可以是MHC I类限制性的或MHC II类限制性的。在一些情况下,通用肽表位可以表现出混杂的表现并且表现出MHC-I类和MHC-II类限制。在一些情况下,通用表位是超表位。

[0257] 在一些实施方案中,所鉴定的肽表位可以是超表位和/或引发超表位应答。在一些情况下,超表位是这样的肽表位,其可以是高度混杂的表位,代表被相同MHC(或HLA)超类型的不同MHC等位基因识别或呈递的共同表位或肽,如由于一级或三级结构相似性和/或重叠或共享的肽结合基序。在一些实施方案中,超表位可以引发CD8⁺ T细胞应答。在一些情况下,超表位或超表位应答与MHC-E分子(如HLA-E)的识别相关,该MHC-E分子能够识别比经典MHC(如MHC Ia类)分子更广泛的肽库。在一些实施方案中,所鉴定的肽表位是这样的肽表位,其可以在特定物种(如哺乳动物或人物种)的群体内在MHC基因座处遗传上不同的大于50%的受试者(如通常在暴露于这种肽抗原的受试者群体的大于60%、70%、80%、90%或更多中)引发免疫应答(如CD8⁺和/或CD4⁺免疫应答)。

[0258] 在一些情况下,所提供的方法可以用于鉴定与其中天然加工或呈递此类肽表位的疾病或病症相关的肽表位(如通用的、超表位的或非典型的肽表位)。在一些方面中,与致病状态相关的免疫调节机制的存在和/或免疫调节的变化可以支持在特定疾病或病症中相对于常规表位来加工或呈递通用的、超表位的和/或非典型的表位。在一些实施方案中,该方法可以用于鉴定与肿瘤或癌症相关的肽表位。在一些实施方案中,该方法可以用于鉴定与感染性疾病(包括病毒相关的癌症)相关的肽表位。

[0259] 在一些实施方案中,该方法可以用于鉴定与致病或患病状态相关的MHC I类限制性肽,如通用的、超表位的和/或非典型的肽。MHC I类分子存在于大多数所有有核细胞上,并且在一些方面中,通过呈递或展示衍生自细胞内病原体和肿瘤抗原的肽而允许T细胞免疫监视。该MHC-肽复合物可以被细胞毒性T淋巴细胞(CTL)识别,导致细胞毒性杀死那些携带衍生自该细胞内的感染或肿瘤剂的配体的细胞。

[0260] II. 鉴定与在MHC分子的背景下的肽结合的分子的方法

[0261] 在一些实施方案中,还提供了用于选择或筛选与在MHC分子的背景下展示的肽表位(即MHC-肽复合物)结合的分子的方法。在一些实施方案中,该肽表位是通过所提供的方法鉴定的任何肽表位。在一些实施方案中,该肽表位是通用的、超表位的和/或非典型的肽表位。在一些实施方案中,该肽结合分子(即MHC-肽结合分子)是具有与在MHC分子的背景下如在细胞的表面上呈递或展示的肽表位(MHC-肽复合物)结合(例如特异性结合)的能力的分子或其部分。示例性肽结合分子包括表现出与MHC-肽复合物结合的特异性能力的T细胞受体或抗体或其抗原结合部分,包括其单链免疫球蛋白可变区(例如,scTCR、scFv)。在一些实施方案中,该肽结合分子是TCR或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该肽结合分子是抗体,如TCR样抗体或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该肽结合分子是TCR样CAR,其含有抗体或其抗原结合片段,如TCR样抗体,如已经工程化以与MHC-肽复合物结合的抗体。在

一些实施方案中,该肽结合分子可以衍生自天然来源,或者它可以部分或完全合成地或重组地产生。

[0262] 在一些实施方案中,可以通过使一种或多种候选肽结合分子(如一种或多种候选TCR分子、抗体或其抗原结合片段)与MHC-肽复合物接触,并且评估该一种或多种候选结合分子中的每一种是否与该MHC-肽复合物结合(如特异性结合)来鉴定与肽表位结合的结合分子。该方法可以在体外、离体地或在体内进行。

[0263] 在一些实施方案中,该方法包括使多种结合分子或其文库(如多种TCR或抗体或其文库)与MHC限制性表位接触,并且鉴定或选择特异性结合这种表位的分子。在一些实施方案中,可以筛选或评估含有多多种不同结合分子(如多种不同TCR或多种不同抗体)的文库或集合与MHC限制性表位的结合。在一些实施方案中,如用于选择特异性结合MHC限制性肽的抗体分子,可以利用杂交瘤方法。

[0264] 在一些实施方案中,可以利用这样的筛选方法,其中使多种候选结合分子(如候选结合分子的文库或集合)同时或依次与肽结合分子单独接触。可以鉴定或选择与特定MHC-肽复合物特异性结合的文库成员。在一些实施方案中,候选结合分子的该文库或集合可以含有至少2、5、10、100、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 种或更多的不同肽结合分子。

[0265] 在一些实施方案中,可以利用该方法鉴定对多于一种MHC单倍型或多于一个MHC等位基因表现出结合的肽结合分子(如TCR或抗体)。在一些实施方案中,该肽结合分子(如TCR或抗体)特异性结合或识别在多种MHC I类单倍型或多个MHC I类等位基因的背景下呈递的肽表位。在一些实施方案中,该肽结合分子(如TCR或抗体)特异性结合或识别在多种MHC II类单倍型或多个MHC II类等位基因的背景下呈递的肽表位。在一些实施方案中,该肽结合分子(如TCR或抗体)特异性结合或识别在MHC-E等位基因(如HLA-E*0101和/或HLA-E*0103等位基因)的背景下呈递的肽。

[0266] 在一些实施方案中,该肽结合分子与例如与MHC分子复合的肽表位以等于或大于 10^5M^{-1} 的亲合力或 K_A (即,以 $1/\text{M}$ 为单位的特定结合相互作用的平衡缔合常数)(其等于此缔合反应的结合速率 $[k_{\text{on}}]$ 与解离速率 $[k_{\text{off}}]$ 的比率)结合(如特异性结合)。在一些实施方案中,该TCR(或其他肽结合分子)对该靶多肽的T细胞表位表现出缔合常数 K_A 或半衰期范围从或从约 10^6M^{-1} 至 10^{10}M^{-1} (如从或从约 10^6M^{-1} 至 10^8M^{-1})的结合亲合力。在一些实施方案中,结合亲合力可以分类为高亲合力或低亲合力。例如,在一些情况下,表现出与特定表位的高亲合力结合的结合分子(例如TCR)与这种表位以至少 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 K_A 相互作用。在一些情况下,表现出低亲合力结合的结合分子(例如TCR)表现出高达 10^7M^{-1} 、高达 10^6M^{-1} 、高达 10^5M^{-1} 的 K_A 。可替代地,亲合力可以被定义为以 M 为单位(例如, 10^{-5}M 至 10^{-13}M)的特定结合相互作用的平衡解离常数(K_D)。在一些实施方案中,所鉴定的肽结合分子对在MHC-E分子的背景下的肽表现出 K_D 为 10^{-5}M 至 10^{-13}M 、 10^{-5}M 至 10^{-9}M 或 10^{-7}M 至 10^{-12}M (如小于或小于约 10^{-5}M 、 10^{-6}M 、 10^{-7}M 、 10^{-8}M 、 10^{-9}M 、 10^{-10}M 、 10^{-11}M 、 10^{-12}M 、 10^{-13}M 或更小)的结合亲合力。

[0267] 通常,肽结合分子与例如与MHC复合的肽表位的特异性结合受含有一个或多个互补决定区(CDR)的抗原结合位点的存在的支配。通常,应理解特异性结合并不意味着特定肽表位(例如,在与MHC的复合物中)是MHC-肽分子可以结合的唯一物质,因为也可能发生与其他分子的非特异性结合相互作用。在一些实施方案中,肽结合分子与MHC-肽复合物的结合

比与此类其他分子(例如MHC-肽复合物以外的分子或不相关(对照)MHC-肽复合物)的结合具有更高的亲和力,如比对此类其他分子的结合亲和力高至少约2倍、至少约10倍、至少约20倍、至少约50倍或至少约100倍。

[0268] 在一些实施方案中,通过用有效量的含有特定MHC-肽复合物的免疫原免疫宿主主可以产生与MHC-肽复合物结合(如特异性结合)的抗体或其抗原结合部分。在一些实施方案中,可以从该宿主中分离该抗体或其部分,并且评估与该MHC-肽复合物的结合以确认与其特征特异性结合。

[0269] 已知多种用于评估结合亲和力和/或确定结合分子是否与特定配体(例如MHC-肽复合物)特异性结合的测定。例如通过使用本领域熟知的许多结合测定中的任何一种确定TCR对靶多肽的T细胞表位的结合亲和力在熟练技术人员的水平内。例如,在一些实施方案中,BIAcore机器可以用于确定两种蛋白质之间复合物的结合常数。可以通过监测当缓冲液通过芯片时折射率相对于时间的变化来确定复合物的解离常数(K_D)。用于测量一种蛋白质与另一种蛋白质的结合的其他合适的测定包括例如免疫测定(如酶联免疫吸附测定(ELISA)和放射免疫测定(RIA))或通过借助荧光、紫外吸收、圆二色性或核磁共振(NMR)监测蛋白质的光谱或光学性质的变化来确定结合。其他示例性测定包括但不限于Western印迹、ELISA、分析超速离心、光谱学和表面等离子体共振(Biacore®)分析(参见例如,Scatchard等人,Ann.N.Y.Acad.Sci.51:660,1949;Wilson,Science 295:2103,2002;Wolff等人,Cancer Res.53:2560,1993;和美国专利号5,283,173、5,468,614或等效专利)、流式细胞术、测序和用于检测所表达的核酸的其他方法。在一个例子中,通过评估与各种浓度的四聚体的结合来测量对TCR的表观亲和力,例如通过使用标记的四聚体的流式细胞术。在一个例子中,如下测量TCR的表观 K_D :在一系列浓度下使用标记的四聚体的2倍稀释物,然后通过非线性回归确定结合曲线,表观 K_D 被确定为产生半最大结合的配体浓度。

[0270] 在一些实施方案中,该方法可以用于鉴定这样的结合分子,其仅在特定肽存在于复合物中时结合,并且如果特定肽不存在或者如果存在另一种非重叠或无关肽则不结合。在一些实施方案中,该结合分子在不存在结合的肽的情况下基本上不结合该MHC和/或不存在该MHC的情况下基本上不结合该肽。在一些实施方案中,该结合分子是至少部分特异性的。在一些实施方案中,如果存在特定肽,则示例性的所鉴定的结合分子可以与MHC-肽复合物结合,并且如果存在相对于特定肽具有一个或两个取代的相关肽也结合。

[0271] 在一些实施方案中,所鉴定的抗体(如TCR样抗体)可以用于产生或生成含有与MHC-肽复合物特异性结合的非TCR抗体的嵌合抗原受体(CAR)。

[0272] 在一些实施方案中,鉴定肽结合分子(如TCR或TCR样抗体或TCR样CAR)的方法可以用于工程化表达或含有肽结合分子的细胞。在一些实施方案中,细胞或工程化的细胞是T细胞。在一些实施方案中,该T细胞是CD4+或CD8+ T细胞。在一些实施方案中,该肽结合分子识别MHC I类肽复合物、MHC II类肽复合物和/或MHC-E肽复合物。在一些实施方案中,特异性识别在MHC II类的背景下的肽的肽结合分子(如TCR或抗体或CAR)可以用于工程化CD4+和CD8+细胞。在一些实施方案中,还提供了表达或含有相同MHC结合分子(如相同TCR、抗体或CAR)以用于识别在MHC II类的背景下呈递的肽的工程化的CD4+和CD8+ T细胞的组合物。在任何这样的实施方案中,该细胞可以用于过继细胞疗法的方法中。

[0273] A. 结合分子和文库

[0274] 在一些实施方案中,该肽结合分子是TCR或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该肽结合分子是抗体或其抗原结合片段,如TCR样抗体。在一些实施方案中,该肽结合分子可以衍生自天然来源,或者可以部分或完全合成地或重组地产生。

[0275] 在一些实施方案中,评估一种或多种结合分子与特定肽表位(如使用上述任何方法鉴定的肽表位)的结合。

[0276] 在一些实施方案中,可以产生含有结合分子(如TCR或抗体或其抗原结合片段)的多种变体的文库。

[0277] 在一些实施方案中,可以产生含有结合分子的文库或集合(每种结合分子具有存在于受试者的基因组中的序列,并且评估其结合。在一些实施方案中,可以产生结合分子的文库或集合(其中一个或多个成员已经进化、随机化和/或诱变,如通过定向进化方法),并且评估其结合。

[0278] 1. T细胞受体(TCR)

[0279] 在所提供的方法的方面中,该肽结合分子是T细胞受体(TCR)或其抗原结合片段。

[0280] 在一些实施方案中,“T细胞受体”或“TCR”是这样的分子,其含有可变 α 和 β 链(也分别称为TCR α 和TCR β)或可变 γ 和 δ 链(也分别称为TCR γ 和TCR δ)或其抗原结合部分,并且能够与和MHC分子结合的肽特异性结合。在一些实施方案中,该TCR呈 $\alpha\beta$ 形式。通常,以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在的TCR一般在结构上相似,但是表达它们的T细胞可以具有不同的解剖位置或功能。TCR可以在细胞的表面上发现或以可溶形式发现。通常,发现TCR在T细胞(或T淋巴细胞)的表面上,在此处它通常负责识别与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的抗原。

[0281] 除非另有说明,否则术语“TCR”应理解为涵盖完整的TCR以及其抗原结合部分或其抗原结合片段。在一些实施方案中,该TCR是完整或全长TCR,包括呈 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式的TCR。在一些实施方案中,该TCR是这样的抗原结合部分,其少于全长TCR但与在MHC分子中结合的特定肽结合(如与MHC-肽复合物结合)。在一些情况下,TCR的抗原结合部分或片段可以仅含有全长或完整TCR的结构域的一部分,但是仍能够结合与完整TCR结合的肽表位(如MHC-肽复合物)。在一些情况下,抗原结合部分含有TCR的可变结构域(如TCR的可变 α 链和可变 β 链),足以形成用于与特定MHC-肽复合物结合的结合位点。通常,TCR的可变链含有参与该肽、MHC和/或MHC-肽复合物的识别的互补决定区(CDR)。

[0282] 在一些实施方案中,该TCR的可变结构域含有高变环或CDR,其通常是抗原识别和结合能力和特异性的主要贡献者。在一些实施方案中,TCR的CDR或其组合形成给定TCR分子的全部或基本上全部的抗原结合位点。TCR链的可变区内的各种CDR通常由框架区(FR)(其与CDR相比通常在TCR分子中展示出较小的可变性)分开(参见例如,Jores等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.U.S.A.87:9138,1990;Chothia等人,EMBO J.7:3745,1988;还参见Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.27:55,2003)。在一些实施方案中,CDR3是负责抗原结合或特异性的主要CDR,或者是在给定TCR可变区的用于该肽-MHC复合物的加工肽部分的抗原识别和/或用于与其相互作用的三个CDR中最重要的CDR。在一些情境下,该 α 链的CDR1可以与某些抗原肽的N-末端部分相互作用。在一些情境下,该 β 链的CDR1可以与该肽的C-末端部分相互作用。在一些情境下,CDR2对与该MHC-肽复合物的MHC部分的相互作用或识别具有最强的作用或者是主要的负责CDR。在一些实施方案中,该 β -链的可变区可以含有另外的高变区(CDR4或HVR4),其通常参与超抗原结合而非抗原识别(Kotb(1995)Clinical Microbiology

Reviews,8:411-426)。

[0283] 在一些实施方案中,TCR含有可变 α 结构域(V_α)和/或可变 β 结构域(V_β)或其抗原结合片段。在一些实施方案中,TCR的 α -链和/或 β -链还可以含有恒定结构域、跨膜结构域和/或短胞质尾(参见例如,Janeway等人,Immunobiology:The Immune System in Health and Disease,第3版,Current Biology Publications,第4页:33,1997)。在一些实施方案中,该 α 链恒定结构域由TRAC基因(IMG T命名法)编码或是其变体。在一些实施方案中,该 β 链恒定区由TRBC1或TRBC2基因(IMG T命名法)编码或是其变体。在一些实施方案中,该恒定结构域与细胞膜相邻。例如,在一些情况下,由两条链形成的TCR的细胞外部分含有两个膜近端恒定结构域和两个膜远端可变结构域,其中可变结构域各自含有CDR。

[0284] 确定或鉴定TCR的各种结构域或区域在熟练技术人员的水平内。在一些方面中,TCR的残基是已知的或者可以根据国际免疫遗传学信息系统(IMG T)编号系统鉴定(参见例如www.imgt.org;还参见,Lefranc等人(2003)Developmental and Comparative Immunology,2&55-77;和The T Cell Factsbook第2版,Lefranc and LeFranc Academic Press 2001)。使用此系统,TCR V_α 链和/或 V_β 链内的CDR1序列对应于残基编号27-38(包括端值)之间存在的氨基酸,TCR V_α 链和/或 V_β 链内的CDR2序列对应于残基编号56-65(包括端值)之间存在的氨基酸,并且TCR V_α 链和/或 V_β 链内的CDR3序列对应于残基编号105-117(包括端值)之间存在的氨基酸。

[0285] 在一些实施方案中,该TCR可以是如通过一个或多个二硫键连接的两条链 α 和 β (或任选地 γ 和 δ)的异二聚体。在一些实施方案中,该TCR的恒定结构域可以含有短连接序列,其中半胱氨酸残基形成二硫键,从而连接该TCR的两条链。在一些实施方案中,TCR可以在 α 链和 β 链中的每一个中具有另外的半胱氨酸残基,使得该TCR在恒定结构域中含有两个二硫键。在一些实施方案中,恒定和可变结构域中的每一个含有由半胱氨酸残基形成的二硫键。

[0286] 在如所述的一些实施方案中,该TCR可以含有引入的一个或多个二硫键。在一些实施方案中,不存在天然二硫键。在一些实施方案中,形成天然链间二硫键的一个或多个天然半胱氨酸(例如在 α 链和 β 链的恒定结构域中)被另一种残基(如丝氨酸或丙氨酸)取代。在一些实施方案中,可以通过将 α 链和 β 链上(如在 α 链和 β 链的恒定结构域中)的非半胱氨酸残基突变为半胱氨酸来形成引入的二硫键。TCR的示例性非天然二硫键描述于公开的国际PCT号W02006/000830和W02006037960中。在一些实施方案中,可以在 α 链的残基Thr48和 β 链的残基Ser57处、在 α 链的残基Thr45和 β 链的残基Ser77处、在 α 链的残基Tyr10和 β 链的残基Ser17处、在 α 链的残基Thr45和 β 链的残基Asp59处和/或在 α 链的残基Ser15和 β 链的残基Glu15处引入半胱氨酸。在一些实施方案中,重组TCR中非天然半胱氨酸残基的存在(例如产生一个或多个非天然二硫键)可以有利于在引入它的细胞中产生所需重组TCR,而不是表达含有天然TCR链的错配TCR对。

[0287] 在一些实施方案中,该TCR链含有跨膜结构域。在一些实施方案中,该跨膜结构域带正电荷。在一些情况下,该TCR链含有胞质尾。在一些方面中,该TCR的每条链(例如 α 或 β)可以具有一个N-末端免疫球蛋白可变结构域、一个免疫球蛋白恒定结构域、跨膜区和C-末端处的短胞质尾。在一些实施方案中,TCR(例如经由胞质尾)与参与介导信号转导的CD3复合物的不变蛋白质缔合。在一些情况下,该结构允许该TCR与其他分子(像CD3)及其亚基缔合。例如,含有恒定结构域与跨膜区的TCR可以将该蛋白质锚定在细胞膜中并与该CD3信号

传导装置或复合物的不变亚基缔合。CD3信号传导亚基(例如CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 ζ 链)的细胞内尾含有参与该TCR复合物的信号传导能力的基于免疫受体酪氨酸的一个或多个激活基序或ITAM。

[0288] 在一些实施方案中,该TCR或其抗原结合部分可以是重组产生的天然蛋白质或其突变形式(其中一种或多种特性(如结合特征)已经被改变)。在一些实施方案中,TCR可以来源于各种动物物种之一,如人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。

[0289] 在一些实施方案中,该TCR是全长TCR。在一些实施方案中,该TCR是抗原结合部分。在一些实施方案中,该TCR是二聚体TCR(dTCR)。在一些实施方案中,该TCR是单链TCR(scTCR)。TCR可以是细胞结合的或呈可溶形式。在一些实施方案中,出于所提供的方法的目的,该TCR呈在细胞的表面上表达的细胞结合形式。

[0290] 在一些实施方案中,dTCR含有第一多肽(其中对应于TCR α 链可变区序列的序列与对应于TCR α 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合)和第二多肽(其中对应于TCR β 链可变区序列的序列与对应于TCR β 链恒定区细胞外序列的序列的N末端融合),该第一和第二多肽通过二硫键连接。在一些实施方案中,该键可以对应于天然二聚体 $\alpha\beta$ TCR中存在的天然链间二硫键。在一些实施方案中,该链间二硫键不存在于天然TCR中。例如,在一些实施方案中,可以将一个或多个半胱氨酸掺入dTCR多肽对的恒定区细胞外序列中。在一些情况下,可能需要天然和非天然二硫键。在一些实施方案中,该TCR含有跨膜序列以锚定至膜。

[0291] 在一些实施方案中,dTCR含有TCR α 链(其含有可变 α 结构域、恒定 α 结构域和附接至恒定 α 结构域的C-末端的第一二聚化基序)和TCR β 链(其包含可变 β 结构域、恒定 β 结构域和附接至恒定 β 结构域的C-末端的第一二聚化基序),其中第一和第二二聚化基序容易相互作用以在第一二聚化基序中的氨基酸与第二二聚化基序中的氨基酸之间形成共价键,将该TCR α 链和TCR β 链连接在一起。

[0292] 在一些实施方案中,该TCR是scTCR,其是含有能够与MHC-肽复合物结合的 α 链和 β 链的单氨基酸链。通常,scTCR可以使用本领域技术人员已知的方法产生,参见例如,国际公开的PCT号W0 96/13593、W0 96/18105、W099/18129、W0 04/033685、W02006/037960、W02011/044186;美国专利号7,569,664;以及Schlueter, C. J. 等人J. Mol. Biol. 256, 859 (1996)。

[0293] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由对应于TCR α 链可变区的氨基酸序列构成)、第二区段(其由对应于TCR β 链可变区序列(该序列与对应于TCR β 链恒定结构域细胞外序列的氨基酸序列的N末端融合)的氨基酸序列构成)和接头序列(其将该第一区段的C末端连接至该第二区段的N末端)。

[0294] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由对应于TCR β 链可变区的氨基酸序列构成)、第二区段(其由对应于TCR α 链可变区序列(该序列与对应于TCR α 链恒定结构域细胞外序列的氨基酸序列的N末端融合)的氨基酸序列构成)和接头序列(其将该第一区段的C末端连接至该第二区段的N末端)。

[0295] 在一些实施方案中,scTCR含有第一区段(其由与 α 链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的 α 链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列 β 链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的 β 链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将该第一区段的C末端连接至该第二区段的N末端)。

[0296] 在一些实施方案中, scTCR含有第一区段(其由与β链细胞外恒定结构域序列的N末端融合的TCRβ链可变区序列构成)和第二区段(其由与序列α链细胞外恒定和跨膜序列的N末端融合的α链可变区序列构成)以及任选地接头序列(其将该第一区段的C末端连接至该第二区段的N末端)。

[0297] 在一些实施方案中, 对于待结合MHC-肽复合物的scTCR, 该α和β链必须配对, 使得其可变区序列定向用于这种结合。促进scTCR中α和β配对的各种方法在本领域是熟知的。在一些实施方案中, 包括接头序列, 其连接α和β链以形成单多肽链。在一些实施方案中, 该接头应该具有足够的长度以跨越该α链的C末端与该β链的N末端之间的距离, 或反之亦然, 同时还确保接头长度不那么长以使其阻断或减少该scTCR与该靶肽-MHC复合物的结合。

[0298] 在一些实施方案中, scTCR的连接该第一和第二TCR区段的接头可以是能够形成单多肽链同时保留TCR结合特异性的任何接头。在一些实施方案中, 该接头序列可以例如具有式-P-AA-P-, 其中P是脯氨酸, 并且AA代表氨基酸序列, 其中氨基酸是甘氨酸和丝氨酸。在一些实施方案中, 该第一和第二区段配对, 使得其可变区序列定向用于这种结合。因此, 在一些情况下, 该接头具有足够的长度以跨越该第一区段的C末端与该第二区段的N末端之间的距离, 或反之亦然, 但是不能太长以阻断或减少该scTCR与该靶配体的结合。在一些实施方案中, 该接头可以含有从或从约10至45个氨基酸, 如10至30个氨基酸或26至41个氨基酸残基, 例如29、30、31或32个氨基酸。在一些实施方案中, 该接头具有式-PGGG-(SGGG)₅-P-或-PGGG-(SGGG)₆-P-, 其中P是脯氨酸, G是甘氨酸, 并且S是丝氨酸(SEQ ID NO:38或55)。在一些实施方案中, 该接头具有序列GSADDAKKDAKKDGKS(SEQ ID NO:40)。

[0299] 在一些实施方案中, scTCR在该单氨基酸链的残基之间含有二硫键, 其在一些情况下可以促进该单链分子的α与β区之间配对的稳定性(参见例如美国专利号7,569,664)。在一些实施方案中, 该scTCR含有共价二硫键, 其将该单链分子的α链恒定结构域的免疫球蛋白区的残基连接至β链恒定结构域的免疫球蛋白区的残基。在一些实施方案中, 该二硫键对应于天然dTCR中存在的天然二硫键。在一些实施方案中, 天然TCR中不存在该二硫键。在一些实施方案中, 该二硫键是引入的非天然二硫键, 例如通过将一个或多个半胱氨酸掺入该scTCR多肽的第一和第二链区的恒定区细胞外序列中。示例性半胱氨酸突变包括如上所述的任何突变。在一些情况下, 可以存在天然和非天然二硫键。

[0300] 在一些实施方案中, scTCR是非二硫键连接的截短的TCR, 其中与其C-末端融合的异源亮氨酸拉链促进链缔合(参见例如国际公开的PCT号W099/60120)。在一些实施方案中, scTCR含有经由肽接头与TCRβ可变结构域共价连接的TCRα可变结构域(参见例如, 国际公开的PCT号W099/18129)。

[0301] 在一些实施方案中, 该TCR是可溶性TCR。在一些实施方案中, 该可溶性TCR具有如W099/60120或W03/020763中所述的结构。在一些实施方案中, 该TCR不含对应于跨膜序列的序列, 该跨膜序列例如以允许膜锚定到表达它的细胞中。在一些实施方案中, 该TCR不含对应于胞质序列的序列。

[0302] 在一些实施方案中, 任何TCR(包括dTCR或scTCR)可以与在T细胞的表面上产生活性TCR的信号传导结构域连接。在一些实施方案中, 该TCR在细胞的表面上表达。在一些实施方案中, 该TCR确实含有对应于跨膜序列的序列。在一些实施方案中, 该跨膜结构域可以是Cα或Cβ跨膜结构域。在一些实施方案中, 该跨膜结构域可以来自非TCR来源, 例如来自CD3z、

CD28或B7.1的跨膜区。在一些实施方案中,该TCR确实含有对应于胞质序列的序列。在一些实施方案中,该TCR含有CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方案中,该TCR能够与CD3形成TCR复合物。

[0303] 在一些实施方案中,该TCR或其抗原结合片段对MHC-肽复合物或配体以在或约在 10^{-5} 与 10^{-12} M之间以及其中的所有单个值和范围的平衡结合常数表现出亲和力。

[0304] 在一些实施方案中,该TCR可以获得自己知的TCR序列,如 α 、 β 链的序列,其基本上全长的编码序列是容易获得的。用于从细胞来源获得全长TCR序列(包括V链序列)的方法是熟知的。在一些实施方案中,编码该TCR的核酸可以从多种来源获得,如通过公开可获得的TCR DNA序列的聚合酶链式反应(PCR)扩增。在一些实施方案中,该TCR获得自生物来源,如获得自来自T细胞(例如细胞毒性T细胞)、T细胞杂交瘤或其他公开可获得的来源的细胞。在一些实施方案中,该T细胞可以从如来自正常(或健康)受试者或患病受试者的体内分离的细胞获得,包括存在于外周血单核细胞(PBMC)或肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)中的T细胞。在一些实施方案中,该T细胞可以是培养的T细胞杂交瘤或克隆。在一些实施方案中,该TCR或其抗原结合部分可以从TCR序列的知识合成地产生。

[0305] 在一些实施方案中,编码TCR(如 α 和 β 链)的一种或多种核酸可以通过PCR、克隆或其他合适的方法扩增,并且克隆到合适的表达载体中。该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。合适的载体包括设计用于繁殖和扩增或用于表达或用于两者的那些,如质粒和病毒。

[0306] 在一些实施方案中,该载体可以是以下系列的载体:pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene,加利福尼亚州拉霍亚)、pET系列(Novagen,威斯康星州麦迪逊)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,瑞典乌普萨拉)或pEX系列(Clontech,加利福尼亚州帕罗奥图)。在一些情况下,也可以使用噬菌体载体,如 λ G10、 λ GT11、 λ ZapII(Stratagene)、 λ EMBL4和 λ NM1149。在一些实施方案中,可以使用植物表达载体,并且包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。在一些实施方案中,动物表达载体包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。在一些实施方案中,使用病毒载体,如逆转录病毒载体。

[0307] 在一些实施方案中,可以使用标准重组DNA技术来制备该重组表达载体。在一些实施方案中,载体可以含有调节序列,如转录和翻译起始和终止密码子,其对引入载体的宿主(例如,细菌、真菌,植物或动物)的类型具特异性,酌情并考虑该载体是基于DNA还是基于RNA。在一些实施方案中,该载体可以含有与编码该TCR或抗原结合部分(或其他肽结合分子)的核苷酸序列可操作地连接的非天然启动子。在一些实施方案中,该启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子和在鼠干细胞病毒的长末端重复序列中发现的启动子。还考虑了熟练技术人员已知的其他启动子。

[0308] 在一些实施方案中,为了产生编码TCR的载体,该 α 和 β 链可以从总cDNA(其分离自表达该目标TCR的T细胞克隆)进行PCR扩增并克隆到表达载体中。在一些实施方案中,该 α 和 β 链可以合成地产生。在一些实施方案中,将该 α 和 β 链克隆到同一载体中。在一些实施方案中,转录单元可以被工程化以含有IRES(内部核糖体进入位点)的双顺反子单元,其允许通过来自单个启动子的信息来共表达基因产物(例如编码 α 和 β 链)。可替代地,在一些情况下,单个启动子可以指导RNA的表达,其在单个开放阅读框(ORF)中含有通过编码自切割肽(例

如,2A序列)或蛋白酶识别位点(例如,弗林蛋白酶)的序列彼此分开的多个基因(例如,编码 α 和 β 链))。因此,该ORF编码单个多肽,其在翻译期间(在2A的情况下)或翻译后被切割成单个蛋白质。在一些情况下,该肽(如T2A)可以导致核糖体跳过(核糖体跳跃)2A元件C-末端处的肽键的合成,这导致2A序列末端与下一个肽下游之间的分离(参见例如,de Felipe. *Genetic Vaccines and Ther.* 2:13 (2004) 和 de Felipe 等人 *Traffic* 5:616-626 (2004))。可以用于本文公开的方法和核酸中的2A序列的例子包括但不限于来自口蹄疫病毒的2A序列(F2A,例如SEQ ID NO:60)、来自马鼻肺炎病毒的2A序列(E2A,例如SEQ ID NO:59)、来自明脉扁刺蛾 β 四体病毒(*Thosea asigna virus*)的2A序列(T2A,例如SEQ ID NO:46或56)和来自猪捷申病毒(*porcine teschovirus*)-1的2A序列(P2A,例如SEQ ID NO:57或58),如美国专利公开号20070116690中所述。在一些实施方案中,将该 α 和 β 链克隆到不同的载体中。在一些实施方案中,将所产生的 α 和 β 链掺入逆转录病毒(例如慢病毒)载体中。

[0309] 在一些实施方案中,可以产生或获得多种TCR或抗原结合片段(例如其文库)。

[0310] 在一些实施方案中,可以通过从分离自受试者的T细胞(包括存在于PBMC、脾或其他淋巴器官中的细胞)扩增V α 和V β 库来产生TCR文库。在一些情况下,T细胞可以从肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)中扩增。在一些实施方案中,TCR文库可以从CD4⁺或CD8⁺细胞产生。在一些实施方案中,该TCR可以从正常或健康受试者的T细胞来源扩增,即正常TCR文库。在一些实施方案中,该TCR可以从患病受试者的T细胞来源扩增,即患病TCR文库。在一些实施方案中,使用简并引物扩增V α 和V β 的基因库,如通过在从人获得的样品(如T细胞)中进行RT-PCR。在一些实施方案中,scTv文库可以从天然V α 和V β 文库组装,其中扩增的产物被克隆或组装以通过接头分开。取决于受试者和细胞的来源,该文库可以是HLA等位基因特异性的。

[0311] 可替代地,在一些实施方案中,TCR文库可以通过亲本或支架TCR分子的诱变或多样化产生。例如,在一些方面中,可以给受试者(例如,人或其他哺乳动物,如啮齿动物)接种肽(如通过本发明方法鉴定的肽)。在一些实施方案中,可以从该受试者获得样品,如含有血液淋巴细胞的样品。在一些情形中,可以从该样品(例如,该样品中含有的T细胞)中扩增出结合分子(例如,TCR)。在一些实施方案中,可以选择抗原特异性T细胞,如通过筛选以评估针对该肽的CTL活性。在一些方面中,可以选择例如存在于抗原特异性T细胞上的TCR,如通过结合活性,例如对该抗原的特定亲和力或亲合力。在一些方面中,该TCR经受定向进化,如通过诱变例如该 α 或 β 链。在一些方面中,该TCR的CDR内的特定残基被改变。在一些实施方案中,可以通过亲和力成熟来修饰选择的TCR。在一些方面中,选择的TCR可以用作针对该抗原的亲本支架TCR。

[0312] 在一些实施方案中,该受试者是人,如患有癌症(例如,黑色素瘤)的人。在一些实施方案中,该受试者是啮齿动物,如小鼠。在一些这样的实施方案中,该小鼠是转基因小鼠,如表达人MHC(即HLA)分子(如HLA-A2)的小鼠。参见Nicholson等人, *Adv Hematol.* 2012; 2012:404081。

[0313] 在一些实施方案中,该受试者是表达人TCR的转基因小鼠或者是抗原阴性小鼠。参见Li等人, *Nat Med.* 2010年9月; 16(9):1029-34; Obenaus等人, *Nat Biotechnol.* 2015年4月; 33(4):402-7。在一些方面中,该受试者是表达人HLA分子和人TCR的转基因小鼠。

[0314] 在一些实施方案中,例如在该受试者是转基因HLA小鼠的情况下,所鉴定的TCR被修饰成例如是嵌合的或人源化的。在一些方面中,该TCR支架被修饰,如类似于已知的抗体

人源化方法。

[0315] 在一些实施方案中,使用这种支架分子产生TCR文库。

[0316] 例如,在一些实施方案中,该文库包括与亲本或支架TCR分子相比已经被修饰或被工程化的TCR或其抗原结合部分。在一些实施方案中,定向进化方法可以用于产生具有改变的特性(如对特定MHC-肽复合物具有更高的亲和力)的TCR。在一些实施方案中,展示方式涉及工程化或修饰已知的亲本或参考TCR。例如,在一些情况下,野生型TCR可以用作模板以用于产生诱变的TCR,其中CDR的一个或多个残基被突变,并且选择具有所需改变的特性(如对所需靶抗原具有更高的亲和力)的突变体。在一些实施方案中,通过展示方法实现定向进化,该展示方法包括但不限于酵母展示(Holler等人(2003)Nat Immunol,4,55-62;Holler等人(2000)Proc Natl Acad Sci U S A,97,5387-92)、噬菌体展示(Li等人(2005)Nat Biotechnol,23,349-54)或T细胞展示(Chervin等人(2008)J Immunol Methods,339,175-84)。

[0317] 在一些实施方案中,该文库可以是可溶的。在一些实施方案中,该文库是展示文库,其中该TCR展示在噬菌体或细胞的表面上,或附着于颗粒或分子,如细胞、核糖体或核酸(例如,RNA或DNA)。通常,该TCR文库(包括正常和疾病TCR文库或多样化文库)能以任何形式产生,包括作为异二聚体或以单链形式。在一些实施方案中,该TCR的一个或多个成员可以是双链异二聚体。在一些实施方案中,可以通过引入二硫键来促进V α 和V β 链的配对。在一些实施方案中,该TCR文库的成员可以是TCR单链(scTv或ScTCR),其在一些情况下可以包括通过接头分开的V α 和V β 链。此外,在一些情况下,在从该文库中筛选和选择TCR后,选择的成员能以任何形式产生,如全长TCR异二聚体或单链形式或作为其抗原结合片段。

[0318] 2. 抗体或抗原结合片段

[0319] 在所提供的方法的方面中,该MHC-肽结合分子是这样的抗体或抗原结合片段,其当在MHC分子的背景下展示或呈递时可以表现出对T细胞表位或肽表位的结合特异性,即该抗体或抗原结合部分可以是TCR样抗体。在一些实施方案中,该抗体或其抗体结合部分对特定MHC-肽复合物具有反应性,其中该抗体或抗体片段可以区分该特定MHC-肽复合物与单独的MHC分子、单独的特定肽以及在一些情况下MHC和无关肽的复合物。在一些实施方案中,抗体或其抗原结合部分可以表现出比T细胞受体更高的结合亲和力,该T细胞受体包括可以表现出对相同MHC-肽复合物的结合特异性的TCR。

[0320] 本文中的术语“抗体”在最广泛的意义上使用,并且包括多克隆和单克隆抗体,包括完整抗体和功能性(抗原结合)抗体片段,包括片段抗原结合(Fab)片段、F(ab')₂片段、Fab'片段、Fv片段、重组IgG(rIgG)片段、能够特异性结合抗原的可变重链(V_H)区、单链抗体片段(包括单链可变片段(scFv))以及单结构域抗体(例如,sdAb、sdFv、纳米抗体)片段。该术语涵盖免疫球蛋白的遗传工程化的和/或以其他方式修饰的形式,如胞内抗体、肽体(peptibody)、嵌合抗体、全人抗体、人源化抗体和异缀合抗体(heteroconjugate antibody)、多特异性(例如,双特异性)抗体、双抗体、三抗体和四抗体、串联di-scFv、串联tri-scFv。除非另有说明,否则术语“抗体”应理解为涵盖其功能性抗体片段。该术语还涵盖完整或全长抗体,包括任何类别或亚类(包括IgG及其亚类、IgM、IgE、IgA和IgD)的抗体。

[0321] 在一些实施方案中,抗体的重链和轻链可以是全长的或者可以是抗原结合部分(Fab、F(ab')₂、Fv或单链Fv片段(scFv))。在其他实施方案中,该抗体重链恒定区选自例如

IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD和IgE,特别是选自例如IgG1、IgG2、IgG3和IgG4,更特别是IgG1(例如,人IgG1)。在另一个实施方案中,该抗体轻链恒定区选自例如 κ 或 λ ,特别是 κ 。

[0322] 所提供的抗体包括抗体片段。“抗体片段”是指不同于完整抗体的分子,其包含完整抗体的结合完整抗体所结合的抗原的一部分。抗体片段的例子包括但不限于Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂;双抗体;线性抗体;可变重链(V_H)区;单链抗体分子,如scFv和单结构域V_H单抗;以及由抗体片段形成的多特异性抗体。在具体实施方案中,该抗体是包含可变重链区和/或可变轻链区的单链抗体片段,如scFv。

[0323] 术语“可变区”或“可变结构域”是指抗体重链或轻链的参与抗体与抗原的结合的结构域。天然抗体的重链和轻链的可变结构域(分别为V_H和V_L)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守的框架区(FR)和三个CDR。(参见例如,Kindt等人Kuby Immunology,第6版,W.H.Freeman and Co.,第91页(2007))。单个V_H或V_L结构域可以足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用来自结合抗原的抗体的V_H或V_L结构域分离结合该特定抗原的抗体,以分别筛选互补的V_L或V_H结构域的文库。参见例如,Portolano等人,J.Immunol.150:880-887(1993);Clarkson等人,Nature 352:624-628(1991)。

[0324] 单结构域抗体是包含抗体的全部或部分重链可变结构域或者全部或部分轻链可变结构域的抗体片段。在某些实施方案中,单结构域抗体是人单结构域抗体。

[0325] 抗体片段可以通过各种技术制备,包括但不限于完整抗体的蛋白水解消化以及通过重组宿主细胞产生。在一些实施方案中,该抗体是重组产生的片段,如包含不天然存在的排列(如具有通过合成接头(例如,肽接头)连接的两个或更多个抗体区或链的那些)的片段,和/或是可以不通过酶消化天然存在的完整抗体来产生的片段。在一些方面中,该抗体片段是scFv。

[0326] “人源化”抗体是这样的抗体,其中所有或基本上所有CDR氨基酸残基衍生自非人CDR并且所有或基本上所有FR氨基酸残基衍生自人FR。人源化抗体任选地可以包括衍生自人抗体的抗体恒定区的至少一部分。非人抗体的“人源化形式”是指该非人抗体的变体,其经历人源化以通常降低对人的免疫原性,同时保留亲本非人抗体的特异性和亲和力。在一些实施方案中,人源化抗体中的一些FR残基被来自非人抗体(例如,衍生出CDR残基的抗体)的相应残基取代,例如以恢复或改善抗体特异性或亲和力。

[0327] 在一些实施方案中,产生抗体或抗原结合片段文库。在一些方面中,该文库含有各种各样的多肽,其各自包括免疫球蛋白结构域,例如免疫球蛋白可变结构域。

[0328] 在一些实施方案中,该抗体文库含有包括VH结构域和VL结构域的多肽。该文库可以包括作为Fab片段(例如,使用两条多肽链)或单链Fv(例如,使用单多肽链)的抗体。也可以使用其他形式。

[0329] 如在Fab和其他形式的情况下,该抗体可以包括恒定区作为轻链或重链的一部分。在一个实施方案中,每条链包括一个恒定区,例如如在Fab的情况下。在其他实施方案中,包括另外的恒定区。

[0330] 在一些实施方案中,可以产生或获得多种抗体或抗原结合片段(例如其文库)。在一些实施方案中,此类方法已经用于产生TCR样抗体或抗原结合部分(参见例如美国公开申请号US 2002/0150914、US 2003/0223994、US 2004/0191260、US 2006/0034850、US 2007/

00992530、US20090226474、US20090304679；和国际PCT公开号WO 03/068201）。

[0331] 在一些方面中，抗体文库由来自免疫球蛋白基因（包括来自正常（或健康）受试者或患病受试者的免疫球蛋白基因）的核酸构建。在一些情况下，该核酸分子可以代表天然种系免疫球蛋白基因。该核酸通常包括编码VH和/或VL结构域的核酸。下文描述了编码免疫球蛋白的核酸的来源。在一些实施方案中，该核酸分子可以通过扩增获得，该扩增可以包括PCR扩增方法，例如用与特定IgG同种型（例如，IgM）的保守恒定区退火的引物，或另一种扩增方法（参见例如Zhu和Dimitrov (2009) *Methods Mol Biol.*, 525:129; Hustt等人 (2012) *Methods in Molecular Biology*, 907:85-107)。在一些实施方案中，该核酸分子可以通过编码VH和/或VL链的已知种系区段的计算机模拟重排获得（参见例如公开的PCT申请号W02010/054007）。通常，无论是通过扩增还是通过计算机模拟方法，多个VH结构域可以与多个VL结构域重组。在一些情况下，可以获得大量VH基因和VL基因，使得可能的组合的数量使得一些新形成的组合将表现出抗原特异性结合活性的可能性相当高，例如如果最终的库大小足够大的话。

[0332] 编码免疫球蛋白结构域的核酸可以从例如人、灵长类动物、小鼠、兔、骆驼或啮齿动物的免疫细胞中获得。任何细胞都可以用作文库的来源。在一些情况下，免疫球蛋白基因可以从血液淋巴细胞、骨髓、脾或其他含免疫球蛋白的来源获得。在一些实施方案中，该文库的细胞来源可以是PBMC、脾细胞或骨髓细胞。在一些情况下，免疫球蛋白基因从B细胞获得。在一个例子中，针对特定特性选择该细胞。可以选择处于不同成熟阶段的B细胞。在另一个例子中，该B细胞是天然的。在一些实施方案中，可以使用来自人供体的T细胞。

[0333] 在一些实施方案中，该抗体文库可以包括IgM衍生的抗体基因，其通常代表非免疫或天然抗体基因，即有时称为天然抗体文库。例如，在一些实施方案中，已经构建了抗体片段的天然文库，例如通过从分离自外周血淋巴细胞、骨髓或脾细胞的未免疫供体的B细胞的IgM RNA克隆重排的V基因（参见例如，Griffiths等人，*EMBO Journal*, 12 (2), 725-734, 1993, Marks等人，*J. Mol. Biol.*, 222, 581-597, 1991）。在一些实施方案中，该抗体文库可以包括IgG衍生的抗体基因，尽管基于IgG的文库通常偏向于特定抗原。

[0334] 在一个实施方案中，使用荧光激活细胞分选 (FACS) 来分选表达表面结合的IgM、IgD或IgG分子的B细胞。此外，可以分离表达IgG的不同同种型的B细胞。在另一个实施方案中，在体外培养该B或T细胞。可以在体外刺激该细胞，例如通过用饲养细胞培养或通过添加有丝分裂原或其他调节试剂，如CD40、CD40配体或CD20的抗体、佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯、细菌脂多糖、伴刀豆球蛋白A、植物凝集素或商陆促分裂原。

[0335] 在一些实施方案中，该细胞分离自患有疾病或障碍（例如，癌症或免疫障碍）的受试者。该受试者可以是人或非人动物，例如人类疾病的动物模型或患有类似障碍的动物。在一些实施方案中，该抗体文库是免疫文库，如由从感染或患病受试者获得的抗体构建。在一些实施方案中，免疫文库可以含有这样的抗体成员，其具有比使用天然抗体文库或来自正常或健康受试者的抗体文库获得的更高的亲和力结合。

[0336] 在一些实施方案中，该细胞已经激活了体细胞超突变程序。可以刺激细胞以经历免疫球蛋白基因的体细胞诱变，例如通过用抗免疫球蛋白、抗CD40和抗CD38抗体处理（参见例如，Bergthorsdottir等人 (2001) *J. Immunol.* 166:2228）。在另一个实施方案中，该细胞是天然的。

[0337] 编码免疫球蛋白可变结构域的核酸可以通过以下示例性方法从天然库中分离。首先,从免疫细胞中分离RNA。分离全长(即加帽的)mRNA(例如通过用小牛肠磷酸酶降解未加帽的RNA)。然后用烟草酸焦磷酸酶除去该帽,并且使用逆转录产生cDNA。

[0338] 第一(反义)链的逆转录可以用任何合适的引物以任何方式进行。参见例如,de Haard等人(1999) *J. Biol. Chem.* 274:18218-30。引物结合区在不同的免疫球蛋白中可以是恒定的,例如为了逆转录免疫球蛋白的不同同种型。该引物结合区也可以对免疫球蛋白的特定同种型具特异性。通常,引物对编码至少一个CDR的序列3'的区域具特异性。在另一个实施方案中,可以使用聚-dT引物(例如,针对重链基因)。

[0339] 可以将合成序列连接到逆转录链的3'端。合成序列可以用作引物结合位点,以用于在逆转录后的PCR扩增期间结合正向引物。使用合成序列可以避免使用不同正向引物库来完全捕获可用多样性的需要。

[0340] 然后扩增可变结构域编码基因,例如使用一轮或多轮。如果使用多轮,则可以使用巢式引物来提高保真度。然后将扩增的核酸克隆到文库载体中。

[0341] 可以使用用于扩增核酸序列的任何方法进行扩增。可以使用最大化并且不偏向多样性的方法。多种技术可以用于核酸扩增。聚合酶链式反应(PCR;美国专利号4,683,195和4,683,202,Saiki等人(1985) *Science* 230,1350-1354)利用不同温度的循环来驱动核酸合成轮次。基于转录的方法利用RNA聚合酶的RNA合成来扩增核酸(美国专利号6,066,457;美国专利号6,132,997;美国专利号5,716,785;Sarkar等人, *Science* (1989) 244:331-34; Stofler等人, *Science* (1988) 239:491)。NASBA(美国专利号5,130,238;5,409,818和5,554,517)利用转录、逆转录和基于RnaseH的降解的循环来扩增DNA样品。仍其他扩增方法包括滚环扩增(RCA;美国专利号5,854,033和6,143,495)和链置换扩增(SDA;美国专利号5,455,166和5,624,825)。

[0342] 抗体文库可以通过许多方法构建(参见例如,WO 00/70023)。此外,每种方法的要素可以与其他方法的那些组合。可以使用该方法,使得将变异引入单个免疫球蛋白结构域(例如,VH或VL)或多个免疫球蛋白结构域(例如,VH和VL)中。可以将该变异引入免疫球蛋白可变结构域中,例如在CDR1、CDR2、CDR3、FR1、FR2、FR3和FR4中的一个或多个的区域中,提及重链和轻链可变结构域中任一者和两者的此类区域。在一个实施方案中,将变异引入给定可变结构域的所有三个CDR中。在另一个实施方案中,将该变异引入例如重链可变结构域的CDR1和CDR2中。任何组合都是可行的。在一种方法中,通过将编码CDR的不同寡核苷酸插入该核酸的相应区域中来构建抗体文库。可以使用单体核苷酸或三核苷酸合成该寡核苷酸。例如,Knappik等人(2000) *J. Mol. Biol.* 296:57-86描述了用于使用三核苷酸合成和具有用于接受寡核苷酸的工程化的限制性位点的模板来构建CDR编码寡核苷酸的方法。

[0343] 在一些实施方案中,该文库含有编码抗体或抗体片段的核酸。该核酸分子可以单独产生,使得在表达时形成抗体。例如,可以产生编码抗体的VH链的核酸分子和/或可以产生编码抗体的VL链的核酸分子。在一些方面中,在细胞中共表达该核酸分子后,产生抗体。可替代地,可以产生scFv文库,其中可以产生编码抗体的变体VH和VL链(通常通过接头分开)的单个核酸分子。

[0344] 在本文的任何文库中,该核酸分子还可以进一步含有该抗体的铰链区和/或恒定区(例如CL或CH1、CH2和/或CH3)的核苷酸。此外,该核酸分子任选地可以包括编码肽接头的

核苷酸。本文描述了用于产生和表达抗体的方法,并且其可以适用于在产生任何抗体文库中使用。因此,该抗体文库可以包括作为全长抗体或其抗体片段的成员。在一些实施方案中,抗体文库是scFv文库。在一些实施方案中,抗体文库是Fab文库。此外,应理解,在从该文库中筛选和选择抗体后,能以任何形式(如全长抗体或作为抗体片段)产生选择的成员。

[0345] B. 筛选方法

[0346] 在一些实施方案中,该方法包括提供候选结合分子的文库(如抗体文库或TCR文库,包括如上所述的任何文库),并且筛选该文库以鉴定与肽表位(例如MHC-肽复合物)(如使用所提供的方法鉴定的非典型表位)结合的成员。在一些实施方案中,该文库的形式可以是表达文库,如展示文库。

[0347] 在一些实施方案中,该筛选方法导致基于指示结合的活性或特性的确定从多种候选结合分子(例如对应地多种TCR、抗体或其部分,如此类分子的集合或文库)中鉴定或选择蛋白质(如结合分子,例如TCR、抗体或其抗原结合片段)。在一些情况下,指示结合的活性或特性可以包括在获得结合和/或与结合相关的活性的调节的绝对值和/或获得结合或活性水平的指标、比率、百分比、视觉或其他值或量度的意义上的结合的定量和/或定性确定。评估可以是直接的或间接的。筛选能以多种方式中的任何一种进行。

[0348] 在一些实施方案中,筛选方法涉及包括使该多种结合分子或其文库的成员与靶抗原或配体(例如MHC-肽复合物)接触,并且评估特性或活性,例如通过评估与靶配体或抗原的直接结合(例如结合亲和力)的测定。在一些实施方案中,筛选方法包括使该文库的一个或多个成员与MHC-肽复合物接触,洗涤或去除未结合的结合分子,并且检测或鉴定与该MHC-肽复合物结合的分子。在一些情况下,该文库的成员可以被可检测地标记或可以被检测,从而便于检测结合物。在其他情况下,可以通过随后的阳性结合物的富集和测序来鉴定结合分子。

[0349] 在一些实施方案中,该筛选测定可以是高通量的。例如,在一些情况下,可以通过评估大量分子(如通常为数十至数百到数千至数十万种分子)的结合或活性来进行筛选。高通量方法可以手动进行,或者可以是自动的,如使用机器人或软件。

[0350] 在一些实施方案中,可以单独和分开筛选该文库的每种结合分子与MHC-肽复合物的结合。在一些实施方案中,筛选可以在可寻址文库中进行。可以利用本领域已知的任何可寻址阵列技术筛选文库成员,包括抗体或TCR。例如,候选结合分子可以在物理上彼此分开,如通过在空间阵列中格式化,如一个或多个多孔板,使得该板的每个单独的点对应于一个单独的抗体或TCR。多孔板可以包括但不限于12孔板、24孔板、48孔板、96孔板、384孔板和1536孔板。在一些情形中,该阵列的位置(例如该阵列的每个孔)中每个成员的身份是已知的。在一些实施方案中,可以存在可溶性或细胞表达的MHC-肽复合物,例如添加到该阵列的每个位置,以允许该文库的成员与该靶抗原或配体接触。

[0351] 在一些实施方案中,可以合并和筛选该候选结合分子,如以不可寻址的形式。此类其他不可寻址形式的例子包括通过展示,特别是有助于筛选该文库的成员的一种或多种活性(例如,与肽表位(如可溶性或细胞表达的MHC-肽复合物)的结合)的任何展示形式。在一些实施方案中,使用展示技术筛选文库,其中在该文库的各个分子(表型)与编码它们的遗传信息(基因型)之间存在物理联系。在一些实施方案中,候选结合分子可以作为展示文库提供,其中该文库的每个蛋白质成员与其核酸(例如cDNA)在限定的颗粒(如丝状噬菌体、核

糖体或细胞)中物理地联系。展示文库方法在本领域是已知的,并且包括但不限于细胞展示、噬菌体展示、mRNA展示、核糖体展示和DNA展示。

[0352] 在一些实施方案中,评估该一种或多种结合分子(如候选结合分子的文库)与含有T细胞表位的MHC-肽复合物的结合。在一些情况下,可以使用已经例如通过引入含有编码抗原的异源核酸的CMV载体颗粒而转移了该抗原的MHC表达细胞来直接淘选此类文库以鉴定与在该细胞的表面上在MHC下展示的抗原的MHC限制性表位结合的一种或多种结合分子。可替代地,在该肽表位的身份或序列已知(如通过使用所提供的方法鉴定该肽)的实施方案中,该肽可以与匹配肽限制的MHC分子复合以使用无细胞或基于细胞的方法中的任何一种来产生稳定的MHC-肽复合物。在一些实施方案中,可以针对此类文库筛选可以是可溶的或在细胞上表达的稳定的MHC-肽复合物,以鉴定与该MHC-肽复合物结合的一种或多种结合分子。

[0353] 在一些实施方案中,进行筛选测定以评估与特定肽表位(如使用上述任何方法鉴定的肽表位)的结合。在一些方面中,该肽在MHC分子的背景下稳定地展示,该MHC分子与该肽的MHC限制相匹配。在一些情况下,基于在上述方法中选择或鉴定该肽表位所用的MHC限制,与该肽的MHC限制相匹配的MHC分子是已知的。在一些实施方案中,可以进行许多MHC肽结合测定中的任何一种(如上述任何一种),以确认或确定该肽对该MHC分子的结合亲和力。

[0354] 制备或产生稳定的MHC-肽复合物的方法在本领域是熟知的。为了评估结合,在一些情况下,该MHC-肽复合物可以附着于固体支持物,从细胞表达,以可溶形式表达或以可以评估与其结合的方式另外提供。在一些实施方案中,可以标记和重组表达该复合物的MHC组分。在一些实施方案中,用该肽(例如,合成产生的肽)重构该重组MHC。在一些实施方案中,该MHC-肽复合物附着于支持物,例如附着于顺磁珠或其他磁响应颗粒。

[0355] 在一些实施方案中,可以制备和纯化MHC分子,然后可以在该MHC-肽复合物的特定肽表位的存在下使这些蛋白质在体外变性和重折叠。在一些实施方案中,细菌纯化和重折叠改善该MHC-肽复合物的同质性。在一些实施方案中,在体外掺入该复合物中的特定目标肽不必与大量细胞肽竞争结合该MHC复合物,并且例如产生用于结合该展示文库的同源靶标。在一些实施方案中,可以用此纯化的复合物淘选该展示文库,以鉴定该文库的结合该MHC-肽复合物的成员。在一些情况下,表达可以在细菌系统中,由此可以从包涵体中纯化该MHC分子。对于MHC I类分子(例如经典MHC Ia类或非经典MHC-E分子),也可以制备和纯化 β 2-微球蛋白以用于该复合物的重折叠。在一些实施方案中,可以共价连接该 α 链和 β 2微球蛋白,如通过大约15个氨基酸的接头,例如如Denkberg和Reiter (2000) Eur. J Immunol. 30: 3522-32中所述。在一些实施方案中,该链之一(如 α 链)可以包括纯化手柄,如生物素化的BirA序列或六组氨酸标签。在一些实施方案中,可以用此纯化的复合物淘选该展示文库,以鉴定该文库的结合该MHC-肽复合物的成员。

[0356] 在一些实施方案中,该MHC复合物可以在细胞的表面上表达。在一些实施方案中,用表达MHC蛋白的核酸转染细胞,该MHC蛋白具有与目标肽的限制相匹配的等位基因,并且经转染的细胞加载该肽。在一些实施方案中,表达该MHC-肽复合物的目标细胞附着于支持物。在一些实施方案中,可以用该细胞表达的MHC-肽复合物淘选该展示文库,以鉴定该文库的结合该MHC-肽复合物的成员。

[0357] 在一些实施方案中,可以通过评估此类分子与(如根据上述方法)引入了该CMV载

体颗粒的细胞的表面上的MHC-肽复合物的结合来直接鉴定与靶抗原的肽表位结合的结合分子。因此,在一些实施方案中,在阐明与其结合的结合分子之前不需要鉴定和/或检测被特定MHC分子结合和/或从其中洗脱的肽表位或者当在MHC分子的背景下在表面上表达时能够诱导免疫应答的肽表位。在一些情况下,在引入编码异源靶抗原的CMV载体颗粒后,由该细胞产生特定MHC-肽复合物,该异源靶抗原被表达,加工并且来自它的肽表位在MHC分子的背景下在细胞表面上展示。在一些实施方案中,所展示的MHC-肽复合物可以含有表位,该表位是该靶抗原的超表位的、通用的或非典型的表位,并且可以利用该筛选测定来鉴定其结合分子。

[0358] 例如,在一些实施方案中,提供了鉴定与肽表位结合的结合分子(例如TCR、抗体或其抗原结合片段)的方法,该方法包括:a)向细胞(例如MHC表达细胞)中引入CMV载体颗粒,该CMV载体颗粒含有编码靶抗原(例如本文所述的任何一种,如肿瘤抗原或病毒抗原)的异源核酸分子;b)使该细胞与一种或多种肽结合分子或其抗原结合片段(如多种肽结合分子(例如展示文库))接触;并且c)鉴定与该MHC-肽复合物特异性结合的肽结合分子或抗原结合片段。该CMV载体颗粒可以是如上所述的任何CMV载体颗粒,如具有在编码UL128和/或UL130的ORF中被改变和/或编码无活性UL128和/或UL130蛋白的基因组的CMV。在一些实施方案中,在一种或多种肽抗原(在一些情况下,包括所表达的异源蛋白的一种或多种肽抗原)由该细胞表达,加工并在主要组织相容性复合物(MHC)分子的背景下呈递在该细胞的表面上的条件下引入该CMV载体颗粒。

[0359] 在一些实施方案中,本文所提供的筛选方法(如展示文库筛选方法)可以包括丢弃与非靶分子结合的文库成员的选择或筛选过程。非靶分子的例子可以包括不与MHC结合的肽表位、不被肽结合的MHC、被与目标肽不同的肽结合的MHC和/或被目标肽结合但具有与目标MHC不同的等位基因的MHC。可以使用阴性选择筛选。例如,在一些实施方案中,阴性筛选步骤可以用于区分该靶MHC-肽复合物和相关的非靶分子或非靶分子。在一些实施方案中,可以使该文库(例如TCR或抗体文库,如展示文库)与该非靶分子接触。可以收集该样品的不结合该非靶标的成员并将其用于随后的与该靶MHC-肽复合物的结合的选择或筛选和/或甚至用于随后的阴性选择。该阴性选择步骤可以在选择与该靶MHC-肽复合物结合的文库成员之前或之后。

[0360] 在一些实施方案中,可以使集合或文库(如展示文库)与可溶性或细胞结合形式的靶MHC-肽复合物接触。在一些实施方案中,分离和表征该文库的与该靶MHC-肽复合物结合(如与该细胞结合)的成员。

[0361] 1.展示文库

[0362] 在一些实施方案中,该方法包括使其中多种不同的TCR或抗体结合分子展示在表面上的多样性文库的成员与非典型肽MHC-复合物接触,检测该文库成员与所述给定肽-MHC复合物之间的结合,分离检测为与给定肽-MHC复合物结合的文库成员,并且任选地在扩增过程中使分离的文库成员倍增。在一些实施方案中,通过使多种TCR或抗体样TCR结合分子与目标肽-MHC复合物接触来进行该方法。

[0363] 在一些实施方案中,使用展示文库鉴定于该MHC-肽复合物结合并识别该复合物的肽部分的结合分子。在一些实施方案中,展示文库是结合分子的集合,如TCR或抗原结合部分的文库或抗体或抗原结合部分的文库。在一些实施方案中,在选择中,用该MHC-肽复合物

探测结合分子,并且如果该结合分子与该MHC-肽复合物结合,则通常通过保留在支持物上来鉴定展示文库成员。

[0364] 在一些实施方案中,从该支持物中回收保留的展示文库成员并进行分析。在一些实施方案中,该分析可以包括在相似或不相似条件下的扩增和随后的选择。例如,在一些实施方案中,可以交替进行阳性选择和阴性选择。在一些实施方案中,该分析还可以包括确定该结合分子的氨基酸序列和该结合分子的纯化,如以用于详细表征。

[0365] 多种形式可以用于展示文库。例子包括以下内容。

[0366] a.噬菌体展示

[0367] 在一些实施方案中,使用噬菌体展示文库,如利用病毒(如噬菌体)的文库。在一些实施方案中,可以通过利用噬菌体抗体文库产生潜在地与MHC-肽复合物结合的结合分子,例如抗体或其抗原结合部分或TCR或其抗原结合部分。噬菌体展示是一种广泛使用的用于筛选潜在结合分子的文库的与特定抗原结合的能力的方法。通常,噬菌体展示是一种基于细胞的方法,其中蛋白质或肽在噬菌体的表面上单独表达为与外壳蛋白的融合物,同时相同的噬菌体颗粒携带编码该蛋白质或肽的DNA (Smith, G. P. (1985) *Science* 228:1315-1317)。在一些情况下,通过特异性结合反应实现噬菌体的选择,该特异性结合反应涉及识别该蛋白质或肽,使得能够分离和克隆特定噬菌体,并且回收和繁殖或表达该蛋白质或肽的DNA。在一些实施方案中,用目标靶抗原(如可溶性抗原、固定化抗原或细胞表达的抗原)淘选噬菌体文库。

[0368] 在利用噬菌体展示的一些实施方案中,目标蛋白质与病毒外壳蛋白的N-末端融合 (Scott和Smith(1990) *Science*, 249, 386-90)。在一些这样的实施方案中,该结合分子与噬菌体外壳蛋白共价连接。在一些实施方案中,该连接源自编码与外壳蛋白融合的结合分子的核酸的翻译。在一些实施方案中,该连接可以包括柔性肽接头、蛋白酶位点或由于终止密码子的抑制而掺入的氨基酸。噬菌体展示描述于例如Ladner等人的美国专利号5,223,409; Smith(1985) *Science* 228:1315-1317; WO 92/18619; WO 91/17271; WO 92/20791; WO 92/15679; WO 93/01288; WO 92/01047; WO 92/09690; WO 90/02809; de Haard等人(1999) *J. Biol. Chem* 274:18218-30; Hoogenboom等人(1998) *Immunotechnology* 4:1-20; Hoogenboom等人(2000) *Immunol Today* 2:371-8; Fuchs等人(1991) *Bio/Technology* 9:1370-1372; Hay等人(1992) *Hum Antibod Hybridomas* 3:81-85; Huse等人(1989) *Science* 246:1275-1281; Griffiths等人(1993) *EMBO J* 12:725-734; Hawkins等人(1992) *JMol Biol* 226:889-896; Clackson等人(1991) *Nature* 352:624-628; Gram等人(1992) *PNAS* 89:3576-3580; Garrard等人(1991) *Bio/Technology* 9:1373-1377; Rebar等人(1996) *Methods Enzymol* 267:129-49; Hoogenboom等人(1991) *Nuc Acid Res* 19:4133-4137; 和Barbas等人(1991) *PNAS* 88:7978-7982中。

[0369] 已经开发了丝状噬菌体(噬菌体f1、fd和M13)以及其他噬菌体(例如T7噬菌体和λ形噬菌体;参见例如, Santini(1998) *J. Mol. Biol* 282:125-135; Rosenberg等人(1996) *Innovations* 6:1-6; Houshm等人(1999) *Anal Biochem* 268:363-370)的噬菌体展示系统。在一些实施方案中,该丝状噬菌体展示系统使用与次要外壳蛋白(如基因III蛋白)和基因VIII蛋白(一种主要外壳蛋白)的融合物,但是也可以使用与其他外壳蛋白(如基因VI蛋白、基因VII蛋白、基因IX蛋白或其结构域)的融合物(参见例如, WO 00/71694)。在一些实施方

案中,融合至基因III蛋白的结构域,例如锚定结构域或“残基(stump)”(关于基因III蛋白锚定结构域的描述,参见例如美国专利号5,658,727)。

[0370] 在一些实施方案中,可以使展示该结合分子的噬菌体生长并使用标准噬菌体制备方法(例如PEG沉淀)从生长培养基中收获。

[0371] 在一些实施方案中,在选择单个展示噬菌体后,鉴定编码选择的结合分子的核酸,如通过使用选择的噬菌体感染细胞。在一些实施方案中,可以挑选单个菌落或噬斑,并且可以分离该核酸并测序。

[0372] 在一些实施方案中,可以使用主要在丝状噬菌体上表达的抗体文库。在一些方面中,可以如上所述获得免疫球蛋白基因以用于产生文库。在一些方面中,这些文库的原料是来源于免疫人或实验室动物的B细胞的mRNA。在一些情形中,通过RT-PCR分开扩增VH和VL基因库,各自使用一组特定的引物。在一些方面中,然后可以随机改组编码VH和VL链的所得基因并将其克隆到载体中,该载体可以驱动它们在噬菌体上作为scFv或Fab片段的表达。以这种方式,可以在丝状噬菌体的表面上形成和展示大的抗体库。

[0373] 示例性抗体文库包括如美国专利号5,969,108中所述的那些,该专利描述了编码多聚体特异性结合对成员的相应链(如抗体的VH和VL链)的DNA的文库,其中所述结合对成员以功能形式展示在含有编码所述结合对成员或其多肽组分的DNA的分泌型重组遗传展示包装的表面,借助于该特异性结合对成员或其多肽表达为与该重组遗传展示包装的衣壳组分的融合物。因此获得具有其表达的不同链的抗体成员,一条链与衣壳组分融合,并且另一条呈游离形式以用于与融合配偶体多肽缔合。在噬菌粒中作为表达载体包装产生据称在抗体VL和VH链中具有比通过常规方法产生的大得多的多样性的抗体文库。示例性抗体文库还包括如美国专利号5,498,531和5,780,272中所述的那些,该专利描述了用于产生编码嵌合基因产物的多样化的核糖核酸群的体外内含子介导的组合方法,该组合方法包括在反式剪接的条件下混合多样化的剪接构建体组。在一些情况下,此类方法可以用于产生不同的抗体文库。

[0374] 在一些实施方案中,可以产生突变型Fab、scFv或其他抗体形式的噬菌体展示文库,例如其中该文库的成员在一个或多个CDR的一个或多个残基处被突变。此类方法的例子在本领域是已知的(参见例如美国公开的申请号US20020150914、US2014/0294841;和Cohen CJ.等人(2003) *J Mol. Recogn.* 16:324-332)。

[0375] 噬菌体展示文库也可以用于展示和筛选TCR或其抗原结合部分。在一些情况下,已经使用此类方法工程化各种TCR以获得更高的亲和力(Li等人(2005) *Nat Biotechnol*, 23, 349-54;Sami等人(2007) *Protein Eng Des Sel*, 20, 397-403;Varela-Rohena等人(2008) *Nat Med*, 14, 1390-5)。在一些实施方案中,TCR的噬菌体展示可以涉及在两个C结构域之间引入非天然二硫键以促进 α 链和 β 链的配对。在一些情况下,用于噬菌体展示TCR的系统使用全长(V α C α /V β C β)异二聚体蛋白。

[0376] b. 细胞展示

[0377] 在一些实施方案中,该文库是细胞展示文库。因此,在一些实施方案中,结合分子展示在细胞的表面上。在一些实施方案中,可以通过利用细胞展示文库产生潜在地与MHC-肽复合物结合的分子,例如抗体或其抗原结合部分或TCR或其抗原结合部分。细胞展示是一种广泛使用的用于筛选潜在结合分子的文库的与特定抗原结合的能力的方法。通常,

细胞展示是一种基于细胞的方法,其中蛋白质或肽在细胞的表面上单独表达。通过特异性结合反应实现细胞的选择,该特异性结合反应涉及识别该蛋白质或肽,使得能够分离和克隆特定细胞,并且回收和繁殖或表达该蛋白质或肽。在一些实施方案中,用目标靶抗原(如可溶性抗原、固定化抗原或细胞表达的抗原)淘选细胞展示文库。

[0378] 在一些实施方案中,该细胞是例如真核细胞或原核细胞。示例性原核细胞包括大肠杆菌细胞、枯草芽孢杆菌(*B. subtilis*)细胞或孢子。示例性真核细胞包括酵母(例如,酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、粟酒裂殖酵母(*Schizosaccharomyces pombe*)、汉逊酵母属(*Hansenula*)或巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*))。酵母表面展示描述于例如 Boder和Wittrup(1997)*Nat. Biotechnol.* 15:553-557中。2001年10月1日提交的美国临时专利申请序列号60/326,320描述了一种酵母展示系统,其可以用于展示免疫球蛋白,如Fab片段。

[0379] 在一些实施方案中,将编码免疫球蛋白可变结构域的核酸克隆到用于酵母展示的载体中。在一些实施方案中,该克隆将编码至少一个可变结构域的核酸与编码酵母细胞表面蛋白(例如,Flo1、 α -凝集素、 α -凝集素或其衍生的片段,如Aga2p、Aga1p)的片段的核酸连接。在一些实施方案中,这些蛋白质的结构域可以通过GPI锚(例如 α -凝集素、 α -凝集素或其衍生的片段,如Aga2p、Aga1p)或通过跨膜结构域(例如,Flo1)锚定由多样化核酸序列编码的多肽。在一些实施方案中,该载体可以被配置成在细胞表面上表达两条多肽链,使得其中一条链与该酵母细胞表面蛋白连接。例如,该两条链可以是免疫球蛋白链。

[0380] 在一些实施方案中,产生肽结合分子(例如,TCR)并在酵母展示系统中展示,例如如US20150191524中所述。例如,酵母展示可以允许目标蛋白质在表面上作为Aga2-融合物表达(Boder和Wittrup(1997)*Nat. Biotech.*, 15, 553-557; Boder和Wittrup(2000)*Methods Enzymol*, 328, 430-44)。在该酵母展示系统中,该TCR能以V β -接头-V α 或V α -接头-V β 形式展示为稳定的单链蛋白(Aggen等人(2011)*Protein Engineering, Design, & Selection*, 24, 361-72; Holler等人(2000)*Proc Natl Acad Sci USA*, 97, 5387-92; Kiecke等人(1999)*Proc Natl Acad Sci USA*, 96, 5651-6; Richman等人(2009)*Mol Immunol*, 46, 902-16; Weber等人(2005)*Proc Natl Acad Sci USA*, 102, 19033-8)或展示为双链异二聚体(Aggen等人(2011)*Protein Engineering, Design, & Selection*, 24, 361-72; Richman等人(2009)*Mol Immunol*, 46, 902-16)。在一些实施方案中,可以通过利用称为V α 2的人V α 区的稳定性来开发人TCR单链V α V β 片段(称为scTv或scTCR)(Aggen等人(2011)*Protein Engineering, Design, & Selection*, 24, 361-72)。在一些实施方案中,呈单链形式的体外工程化的高亲和力T细胞受体可以用于分离人稳定的scTv片段(V β -接头-V α),其可以表达为稳定的蛋白质,在酵母的表面上以及从大肠杆菌以可溶形式。

[0381] 在一些实施方案中,用于筛选的抗体或TCR文库可以通过将它们与在细胞的表面上表达的蛋白质融合而在细胞(包括细菌大肠杆菌、酵母酿酒酵母和哺乳动物细胞)的表面上表达。在一些实施方案中,细胞展示可以用于筛选抗体或TCR文库,其中不需要固定靶抗原。在其他实施方案中,诸如荧光激活细胞分选(FACS)等技术可以用于鉴定所需抗体。通常,FACS允许在细胞通过激光束时基于它们的光散射特性分离细胞亚群。参见例如公开的专利申请号US 2003/0100023和US 2003/0036092。单链抗体或TCR可以通过将其与先前显示将异源蛋白导向细菌表面的蛋白质融合而在大肠杆菌的外表面上表达(Francisco等人,

(1993)Proc.Natl.Acad.ScL,USA,90:10444-10448)。单链和Fab抗体以及单链TCR可以展示在酵母细胞的表面上,并且可以利用酵母中的同源重组来产生转化体的文库(参见例如Kieke等人,(1997)Prot.Eng.,10:1303-1310;Weaver-Feldhaus等人,(2004)FEBS Lett.,564:24-34;和Swers等人,(2004)Nucleic Acids Res.,32:e36)。在一些实施方案中,可以利用哺乳动物细胞展示筛选scFv文库以及IgG(Ho等人,(2005)J.Biol.Chem.,280:07-617)。

[0382] 在一些实施方案中,哺乳动物细胞展示用于TCR的工程化(Chervin等人(2008)J Immunol Methods,339,175-84;Kessels等人(2000)Proc Natl Acad Sci USA,97,14578-83)。在一些情况下,此系统使用逆转录病毒载体将TCR α 和 β -链引入TCR阴性T细胞杂交瘤中。在该哺乳动物细胞展示系统中,引入的TCR能以其天然构象在表面上表达,与CD3亚基复合,在一些方面中允许完全功能性的T细胞(信号传导能力)。在一些实施方案中,可以使用此方法工程化其天然宿主中的全长异二聚体TCR。

[0383] c. 无细胞展示

[0384] 在一些实施方案中,该文库是无细胞展示文库。因此,在一些实施方案中,结合分子附着于核糖体或核酸(例如,DNA或RNA)而展示。在一些实施方案中,可以通过利用无细胞展示文库产生潜在地与MHC-肽复合物结合的结合分子,例如抗体或其抗原结合部分。无细胞展示是一种广泛使用的用于筛选潜在结合分子的文库的与特定抗原结合的能力的方法。无细胞展示是这样一种无细胞方法,其中蛋白质或肽单独附着于核糖体或核酸(例如,DNA或RNA)而表达。通过特异性结合反应实现结合分子的选择,该特异性结合反应涉及识别该蛋白质或肽,使得能够分离特定结合分子,并且回收和繁殖或表达该蛋白质或肽。在一些实施方案中,用目标靶抗原(如可溶性抗原、固定化抗原或细胞表达的抗原)淘选无细胞展示文库。

[0385] 可以利用本领域已知的文库产生方法来产生适用于与本文描述的方法一起所述的文库。用于文库产生的一些方法描述于美国专利号6,258,558和6,261,804;Szostak等人的W0989/31700;Roberts和Szostak(1997)94:12297-12302;美国专利号6,385,581,W0 00/32823;美国专利号6,361,943;7,416,847;6,258,558;6,214,553;6,281,344;6,518,018;6,416,950;7,195,880;6,429,300;9,134,304;和美国专利公开号US 20140113831中,将其通过引用并入本文。

[0386] 在一些实施方案中,该展示文库是核糖体展示文库。在一些实施方案中,使用核糖体展示允许体外构建结合分子,例如抗体文库。可替代地,在一些方面中,核糖体展示可以涉及在核糖体的表面上展示新生形式的蛋白质或肽,使得形成与编码mRNA的稳定复合物;可以用该蛋白质或肽的配体选择该复合物,并且通过逆转录分离的mRNA获得遗传信息(参见例如美国专利号US 5,643,768和US 5,658,754)。在一些方面中,选择技术类似于噬菌体展示的选择技术,其中用固定的抗原淘选核糖体展示文库。

[0387] 在一些实施方案中,可以利用生物素-链霉亲和素相互作用。在一些方面中,例如共价DNA展示,与抗体片段遗传融合的噬菌体P2蛋白可以与其自身的DNA序列结合(Reiersen等人(2005)Nucl.Acids Res.33:e10)。可替代地,可以将该DNA和肽区室化,如在水包油乳液中。在一些实施方案中,选择技术类似于噬菌体展示的选择技术,其中用固定的抗原淘选DNA展示文库。参见例如国际专利公开号W0 98/037186。

[0388] 在一些实施方案中,使用肽-核酸融合文库。肽-核酸文库可以包括DNA展示和mRNA展示文库。

[0389] 在一些方面中,在利用DNA展示的情况下,编码该肽的DNA与该肽连接。在一些实施方案中,可以利用非共价DNA展示,其中通过识别细菌RepA蛋白以及整合到模板DNA中的其自身的复制起点序列来促进DNA-蛋白质连接(Odegrip等人(2004) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 101:2806-2810)。

[0390] 在一些实施方案中,如美国专利号9,134,304或US20140113831中所述产生和/或筛选该文库。在一些实施方案中,可以通过mRNA的体外翻译产生多肽-核酸融合物,该mRNA包括共价附接的嘌呤霉素基团,例如如Roberts和Szostak(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 94:12297-12302和美国专利号6,207,446中所述。在一些实施方案中,该mRNA然后可以逆转录成DNA并与该多肽交联。

[0391] 在一些实施方案中,该文库的核酸构建体含有T7启动子。在一些方面中,可以通过本领域已知的任何方法操纵该文库中的核酸,以添加适当的启动子、增强子、间隔子或标签,其可用于核酸或其翻译产物的产生、选择或纯化。例如,在一些实施方案中,该文库中的序列可以包括TMV增强子、编码FLAG标签的序列、链霉亲和素展开序列或多腺苷酸化序列或信号。在一些实施方案中,该核酸文库序列还可以包括独特的来源标签以鉴定该RNA或DNA序列的来源。在一些实施方案中,该核酸文库序列可以包括库标签。库标签可以用于鉴定在特定轮选择期间选择的那些序列。在一些方面中,这可以允许例如来自多个选择轮次的序列在单次运行中合并和测序,而不会丢失它们源自哪个选择轮次的跟踪。

[0392] 在一些实施方案中,使用核酸展示文库(如mRNA展示文库)允许体外构建候选结合分子的文库,包括抗体文库。在一些方面中,mRNA展示允许展示蛋白质或肽,其中使新生蛋白质通过嘌呤霉素连接与其mRNA共价结合(Roberts等人(1997) *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 64:12297-12302)。嘌呤霉素通常充当氨酰基tRNA的模拟物,进入核糖体A位点,并且新生蛋白质通过核糖体的肽基转移酶活性与其共价结合。在一些实施方案中,在核糖体解离后对这些蛋白质-mRNA融合物进行选择。在一些方面中,选择技术类似于噬菌体展示的选择技术,其中用固定的抗原淘选mRNA展示文库。

[0393] 在一些实施方案中,该双链DNA文库在体外转录并与肽受体(如嘌呤霉素)缔合。在一个实施方案中,然后使与高亲和力配体(例如生物素)连接的接头(例如生物素结合接头)退火。在一些实施方案中,该接头与该mRNA光交联。在具体实施方案中,然后加载配体受体(例如,链霉亲和素)。在另外的实施方案中,与肽受体附接的第二高亲和力配体与该链霉亲和素结合。在一些实施方案中,该第二高亲和力配体/肽受体是生物素-嘌呤霉素接头,例如BPP。

[0394] 在一些实施方案中,可以进行体外翻译,其中该肽受体与该新生翻译产物反应。

[0395] 在一些实施方案中,纯化后的结果是肽-核酸复合物的文库。在一些实施方案中,此类复合物然后可以在纯化后经历逆转录。可以通过本领域已知的任何方法(例如通过亲和层析、柱层析、密度梯度离心、亲和标签捕获等)纯化该复合物。在一个实施方案中,利用寡-dT纤维素纯化,其中该复合物被设计为包括具有聚-A尾的mRNA。在这样的实施方案中,寡-dT与柱或纯化装置中的纤维素共价结合。在一些实施方案中,寡-dT参与和该复合物中mRNA的聚-A尾的互补碱基配对,从而阻碍其通过纯化装置的进展。在一些方面中,可以用水

或缓冲液洗脱该复合物。

[0396] 在一些实施方案中,逆转录产生cDNA/RNA杂合体,其在一些方面中通过与接头、高亲和力配体、配体受体、肽受体(可能与第二高亲和力配体连接)或其一些可操作的组合缔合而非共价连接至转录肽。

[0397] 在一些实施方案中,然后可以用RNA酶处理所得的纯化的复合物以降解剩余的mRNA,然后进行第二链DNA合成以产生完整的cDNA。在一些实施方案中,NA接头中的核酸可以用作逆转录的引物。因此,在一些方面中,该cDNA仍与该高亲和力配体和该复合物的一部分衔接。

[0398] 在一些实施方案中,可以进一步纯化该复合物,例如如果该复合物被工程化以含有标签的话。可以使用本领域已知的任何标签来纯化该复合物。例如,可以使用FLAG标签、myc标签、组氨酸标签(His标签)或HA标签等。在一些实施方案中,将编码FLAG标签的序列工程化到原始DNA序列中,使得最终转录的蛋白质含有该FLAG标签。

[0399] 在一些实施方案中,然后通过使用本领域已知的任何选择方法选择所得复合物。在一些实施方案中,使用亲和选择。例如,可以将所需的结合靶标或抗原(例如MHC-肽复合物)固定在固体支持物上以用于在亲和柱中使用。可用于亲和层析的方法的例子描述于美国专利号4,431,546、4,431,544、4,385,991、4,213,860、4,175,182、3,983,001、5,043,062中,将其全部通过引用以其整体并入本文。可以通过标准免疫测定和/或亲和层析评估结合活性。可以使用如描述于例如美国专利号5,798,208中的标准血红蛋白噬斑测定来完成筛选复合物的催化功能(例如,蛋白水解功能)。可以使用例如Biacore仪器在体外测定候选结合分子(例如,抗体或TCR或其抗原结合部分)的评估结合,该仪器测量抗体与给定靶标或抗原的结合速率。在一些实施方案中,该靶标或抗原(例如MHC-肽复合物)在细胞表面上表达,并且评估候选结合分子的展示复合物与细胞表面的结合。在一些实施方案中,首先针对不表达该靶标或抗原(例如MHC-肽复合物)的细胞筛选或选择该展示复合物,如以去除结合该细胞但不结合目标靶标的展示分子;然后针对确实表达目标靶标(例如MHC-肽复合物)的细胞选择候选结合分子的剩余展示复合物,例如以鉴定特异性结合物。

[0400] 在一些实施方案中,可以通过该DNA组分的测序来鉴定所选择的复合物。可以利用本领域已知的任何测序技术,例如454测序、Sanger测序、合成测序或美国专利号5,547,835、5,171,534、5,622,824、5,674,743、4,811,218、5,846,727、5,075,216、5,405,746、5,858,671、5,374,527、5,409,811、5,707,804、5,821,058、6,087,095、5,876,934、6,258,533、5,149,625中所述的方法,将其全部通过引用以其整体并入本文。

[0401] 在一些实施方案中,可以多次进行选择以鉴定更高亲和力的结合物,并且可以进一步用竞争性结合物或更严格的洗涤条件实施。本领域技术人员将理解,可以利用本文描述的程序的变体。

[0402] 2. 迭代方法

[0403] 在一些实施方案中,可以筛选候选肽结合分子的文库(包括抗体或抗原结合部分的文库或TCR或抗原结合部分的文库),以根据所提供的方法鉴定与特定肽表位(如MHC-肽复合物)结合的结合分子。在相关的实施方案中,通过此类方法鉴定或选择的特定结合分子(例如抗体或TCR或其抗原结合部分)可以通过亲和力成熟或诱变进一步改变,从而产生相关结合分子的文库。在一些实施方案中,可以筛选结合分子的该另外的或相关的文库与相

同或相似的肽表位(如MHC-肽复合物)的结合,以鉴定以较高的结合亲和力与该靶标(例如MHC-肽复合物)结合的潜在结合分子。可以使用本领域已知的或本文描述的用于文库产生和靶标选择的任何方法。

[0404] 在一些方面中,能以迭代方式利用该方法。例如,通过本文描述的方法之一选择的核酸或蛋白质可以作为用于产生新文库的基础,从该文库可以再次开始该过程。这种方案的一个例子可以包括其中一轮选择的产物用于再生新文库。

[0405] 在一些实施方案中,以迭代模式使用展示文库技术。第一展示文库用于鉴定靶标的一种或多种配体。然后使用诱变方法改变这些鉴定的配体以形成第二展示文库。然后从该第二文库中选择更高亲和力的配体,例如通过使用更高严格性或更具竞争性的结合和洗涤条件。

[0406] 在一些实施方案中,该诱变针对已知或可能在结合界面处的区域。在一些实施方案中,诱变可以针对抗体的重链或轻链或者TCR的 α 或 β 链的CDR区。此外,诱变可以针对CDR附近或邻近的框架区。在一些情况下,诱变可以针对一个或几个CDR,例如以进行精确的逐步改进。

[0407] 一些示例性诱变技术包括:易错PCR(Leung等人(1989)Technique 1:11-15)、使用随机切割的DNA改组(Stemmer(1994)Nature 389:391;称为“核酸改组”)、RACHITT(MCoco等人(2001)Nature Biotech.19:354)、定点诱变(Zoller等人(1987)Nucl Acids Res 10:6487-6504)、盒式诱变(Reidhaar-Olson(1991)Methods Enzymol.208:564-586)和简并寡核苷酸的掺入(Griffiths等人(1994)EMBO J.13:3245)。

[0408] 在迭代选择的一个例子中,本文描述的方法用于首先从展示文库中鉴定以对该配体至少必需的活性或结合特异性结合MHC-肽复合物的结合分子,其然后可以用随后的迭代改善。在一些实施方案中,编码初始鉴定的结合分子的核酸序列然后可以用作用于引入变异的模板核酸,例如以鉴定相对于初始结合分子具有增强的特性(例如,结合亲和力、动力学或稳定性)的第二蛋白质配体。

[0409] C. 杂交瘤选择

[0410] 在一些实施方案中,杂交瘤技术可以用于产生与MHC-肽复合物结合(如特异性结合)的抗体。在一些实施方案中,可以利用转基因小鼠,其含有人免疫球蛋白库,允许体内亲和力成熟,并且在一些情况下,允许通过杂交瘤技术产生人抗体。

[0411] 在一些实施方案中,通过用有效量的含有特定MHC-肽复合物的免疫原免疫宿主(例如,小鼠)可以产生与MHC-肽复合物潜在地结合的抗体或其抗原结合部分。在一些情况下,该MHC-肽复合物的肽能够由MHC分子呈递。在一些实施方案中,然后向宿主给予有效量的免疫原以用于引发免疫应答,其中该免疫原保持其三维形式持续一段足以引发针对该肽在该MHC分子的结合沟中的三维呈递的免疫应答的时间。在一些情况下,可以从该宿主收集血清,并且然后可以测定血清,以确定是否产生了识别该肽在该MHC分子的结合沟中的三维呈递的所需抗体。在一些实施方案中,可以评估所产生的抗体以确认该抗体可以区分该MHC-肽复合物与单独的MHC分子、单独的肽以及MHC和无关肽的复合物。然后可以分离所需的抗体。

[0412] 在一些实施方案中,用该MHC-肽复合物免疫动物(例如,啮齿动物),该MHC-肽复合物包括特定肽(如使用所提供的方法鉴定的肽)。在一些实施方案中,用在其表面上呈递与

该MHC结合的特定肽的细胞(如已经根据所提供的方法引入了编码异源抗原的CMV载体的细胞)免疫动物(例如,啮齿动物)。该细胞可以具有该MHC蛋白的特定等位基因。任选地用该抗原(例如MHC-肽复合物)加强该动物以进一步刺激应答。在一些方面中,从该动物分离脾细胞,并且扩增和克隆编码VH和/或VL结构域的核酸,如以用于在文库中表达。

[0413] 在一些实施方案中,通过用相关抗原免疫实验室小鼠或任何其他啮齿动物并分离脾细胞(包括产生抗体的B细胞)来产生抗体或抗原结合片段,然后将其通过与骨髓瘤细胞融合来永生化以产生B细胞杂交瘤(Harlow和Lane,1988)。通常,杂交瘤保留B细胞合成抗原特异性抗体的能力,并且可以获得大量产物。在一些实施方案中,这产生高亲和力抗体,其在分离B细胞之前在免疫应答过程中通过亲和力成熟过程在体内产生和选择。在一些实施方案中,可以产生携带相当大的部分的人免疫球蛋白重链和轻链基因座的转基因小鼠品系,从而允许产生分泌全人mAb的鼠B细胞杂交瘤(综述于Bruggemann和Neuberger,1996)。

[0414] III. 重组受体和遗传工程化的细胞

[0415] 提供了重组受体(如抗原受体),其包括或含有通过所提供的方法鉴定的结合分子。此类结合分子可以包括TCR、TCR样抗体或其抗原结合片段以及含有所提供的结合分子或其抗原结合片段的其他重组受体。例如,此类重组受体包括含有所提供的TCR样抗体或其抗原结合片段的嵌合受体,包括功能性非TCR抗原受体,如嵌合抗原受体(CAR)。在一些实施方案中,该方法包括细胞的遗传工程化,如向该细胞中引入用于表达重组受体或转基因抗原受体(包括转基因TCR和嵌合抗原受体)的重组基因。

[0416] 还提供了表达该重组抗原受体的细胞(例如CD4+和/或CD8+ T细胞)及其在过继细胞疗法(如与该抗原相关的疾病和障碍的治疗)中的用途。

[0417] A. 重组受体和嵌合抗原受体

[0418] 该工程化通常包括引入用于表达遗传工程化的抗原受体的一个或多个基因。此类重组受体包括遗传工程化的TCR及其组分以及该抗体或其抗原结合部分作为重组受体的一部分在细胞上表达的抗原受体。该抗原受体包括功能性非TCR抗原受体,如嵌合抗原受体(CAR)。通常,含有针对肽-MHC复合物表现出TCR样特异性的抗体或抗原结合片段的CAR也可以称为TCR样CAR。

[0419] 示例性抗原受体(包括CAR)以及用于将此类受体工程化并引入细胞中的方法包括例如国际专利申请公开号W0200014257、W02013126726、W02012/129514、W02014031687、W02013/166321、W02013/071154、W02013/123061,美国专利申请公开号US2002131960、US2013287748、US20130149337,美国专利号6,451,995、7,446,190、8,252,592、8,339,645、8,398,282、7,446,179、6,410,319、7,070,995、7,265,209、7,354,762、7,446,191、8,324,353和8,479,118,以及欧洲专利申请号EP2537416中所述的那些,和/或由Sadelain等人,Cancer Discov.2013年4月;3(4):388-398;Davila等人(2013)PLoS ONE 8(4):e61338;Turtle等人,Curr.Opin.Immunol.,2012年10月;24(5):633-39;Wu等人,Cancer,2012年3月18(2):160-75所述的那些。在一些方面中,该抗原受体包括CAR,如美国专利号7,446,190中所述的,以及国际专利申请公开号W0/2014055668 A1中所述的那些。示例性CAR包括任何上述出版物(如W02014031687、US 8,339,645、US 7,446,179、US 2013/0149337、美国专利号7,446,190、美国专利号8,389,282)中公开的CAR,例如并且其中该抗原结合部分(例如,scFv)被抗体(例如,如本文提供的)替换。

[0420] 在一些实施方案中,该CAR通常包括TCR样抗体(包括作为对MHC-肽复合物具特异性的抗体或其抗原结合片段)的细胞外抗原(或配体)结合结构域,其与一种或多种细胞内信号传导组分连接,在一些方面中经由接头和/或跨膜结构域。在一些实施方案中,此类分子通常可以通过天然抗原受体(如TCR)模拟或接近信号,并且任选地通过这种受体与共刺激受体组合模拟或接近信号。

[0421] 在一些实施方案中,该CAR通常在其细胞外部分中包括一种或多种抗原结合分子,如一个或多个抗原结合片段、结构域或部分,或者通过所提供的方法鉴定的TCR样抗体的一个或多个抗体可变结构域和/或抗体分子。在一些实施方案中,该CAR包括抗体分子的一个或多个抗原结合部分,如衍生自单克隆抗体(mAb)的可变重链(VH)和可变轻链(VL)的单链抗体片段(scFv)。

[0422] 在一些实施方案中,该CAR的抗原结合分子可以进一步包括间隔子,其可以是或包括免疫球蛋白恒定区或其变体或修饰形式的至少一部分,如铰链区(例如,IgG4铰链区)和/或CH1/CL和/或Fc区。在一些实施方案中,该恒定区或部分属于人IgG,如IgG4或IgG1。在一些方面中,该恒定区的部分用作抗原识别组分(例如,scFv)与跨膜结构域之间的间隔子区。与不存在该间隔子的情况下相比,该间隔子的长度可以提供抗原结合后该细胞的增强的反应性。在一些例子中,该间隔子的长度为或约12个氨基酸或者长度不超过12个氨基酸。示例性间隔子包括具有至少约10至229个氨基酸、约10至200个氨基酸、约10至175个氨基酸、约10至150个氨基酸、约10至125个氨基酸、约10至100个氨基酸、约10至75个氨基酸、约10至50个氨基酸、约10至40个氨基酸、约10至30个氨基酸、约10至20个氨基酸或约10至15个氨基酸(并且包括任何列出的范围的端点之间的任何整数)的那些。在一些实施方案中,间隔子区具有约12个或更少的氨基酸、约119个或更少的氨基酸或约229个或更少的氨基酸。示例性间隔子包括单独的IgG4铰链、与CH2和CH3结构域连接的IgG4铰链或与CH3结构域连接的IgG4铰链。示例性间隔子包括但不限于Hudecek等人(2013)Clin.Cancer Res.,19:3153或国际专利申请公开号W02014031687、美国专利号8,822,647或公开的申请号US2014/0271635中所述的那些。

[0423] 在一些实施方案中,该恒定区或部分属于人IgG,如IgG4或IgG1。在一些实施方案中,该间隔子具有序列ESKYGPPCPPCP(在SEQ ID NO:40中列出),并且由SEQ ID NO:41中列出的序列编码。在一些实施方案中,该间隔子具有SEQ ID NO:42中列出的序列。在一些实施方案中,该间隔子具有SEQ ID NO:43中列出的序列。在一些实施方案中,该恒定区或部分属于IgD。在一些实施方案中,该间隔子具有SEQ ID NO:44中列出的序列。在一些实施方案中,该间隔子具有与SEQ ID NO:40、42、43或44中的任一个表现出至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的氨基酸序列。

[0424] 该抗原识别结构域通常与一种或多种细胞内信号传导组分(如通过抗原受体复合物(如TCR复合物)(在CAR的情况下)模拟激活和/或经由另一种细胞表面受体模拟信号的信号传导组分)连接。因此,在一些实施方案中,该抗原结合分子(例如,TCR样抗体或抗原结合片段)与一个或多个跨膜和细胞内信号传导结构域连接。在一些实施方案中,该跨膜结构域与细胞外结构域融合。在一个实施方案中,使用天然与该受体(例如,CAR)中的一个结构域缔合的跨膜结构域。在一些情形中,通过氨基酸取代选择或修饰该跨膜结构域以避免此类

结构域与相同或不同表面膜蛋白的跨膜结构域结合,以最小化与该受体复合物的其他成员的相互作用。

[0425] 在一些实施方案中,该跨膜结构域衍生自天然或合成来源。当来源是天然的时,在一些方面中,该结构域可以衍生自任何膜结合蛋白或跨膜蛋白。跨膜区包括衍生自以下的那些(即至少包含以下的跨膜区):T细胞受体的 α 、 β 或 ζ 链,CD28,CD3 ϵ ,CD45,CD4,CD5,CDS,CD9,CD16,CD22,CD33,CD37,CD64,CD80,CD86,CD134,CD137,CD154。可替代地,在一些实施方案中,该跨膜结构域是合成的。在一些方面中,该合成跨膜结构域主要包含疏水残基,如亮氨酸和缬氨酸。在一些方面中,将在合成跨膜结构域的每个末端发现苯丙氨酸、色氨酸和缬氨酸的三联体。在一些实施方案中,该连接是通过接头、间隔子和/或跨膜结构域。

[0426] 在一些实施方案中,短的寡肽或多肽接头(例如,长度在2与10个之间的氨基酸的接头,如含有甘氨酸和丝氨酸的接头,例如甘氨酸-丝氨酸双联体)存在并形成该CAR的跨膜结构域与胞质信号传导结构域之间的连接。

[0427] 该CAR通常包括至少一种或多种细胞内信号传导组分。该细胞内信号传导结构域包括通过天然抗原受体模拟或接近信号、通过这种受体与共刺激受体组合模拟或接近信号和/或仅通过共刺激受体模拟或接近信号的那些。在一些实施方案中,该CAR包括该TCR复合物的细胞内组分,如介导T细胞激活和细胞毒性的TCR CD3+链,例如CD3 ζ 链。因此,在一些方面中,该抗原结合分子与一个或多个细胞信号传导模块连接。在一些实施方案中,细胞信号传导模块包括CD3跨膜结构域、CD3细胞内信号传导结构域和/或其他CD跨膜结构域。在一些实施方案中,该CAR还包括一种或多种另外的分子(如Fc受体 γ 、CD8、CD4、CD25或CD16)的一部分。例如,在一些方面中,该CAR包括CD3-zeta (CD3- ζ)或Fc受体 γ 与CD8、CD4、CD25或CD16之间的嵌合分子。

[0428] 在一些实施方案中,在连接该CAR后,该CAR的胞质结构域或细胞内信号传导结构域激活免疫细胞(例如,工程化以表达该细胞的T细胞)的正常效应子功能或应答中的至少一种。例如,在一些情境下,该CAR诱导T细胞的功能,如细胞溶解活性或T辅助活性,如细胞因子或其他因子的分泌。在一些实施方案中,使用抗原受体组分或共刺激分子的细胞内信号传导结构域的截短部分代替完整的免疫刺激链,例如如果其转导效应子功能信号的话。在一些实施方案中,该一个或多个细胞内信号传导结构域包括T细胞受体(TCR)的胞质序列,并且在一些方面中还包括共受体(其在天然背景下与这种受体并行起作用以在抗原受体接合后启动信号转导)和/或此类分子的任何衍生物或变体的那些,和/或具有相同功能能力的任何合成序列。

[0429] 在天然TCR的背景下,完全激活通常不仅需要通过TCR进行信号传导,还需要共刺激信号。因此,在一些实施方案中,为了促进完全激活,用于生成次级或共刺激信号的组分也被包括在该CAR中。在其他实施方案中,该CAR不包括用于生成共刺激信号的组分。在一些方面中,另外的CAR在同一细胞中表达,并且提供用于生成次级或共刺激信号的组分。在一些方面中,该细胞包含第一CAR和第二CAR,该第一CAR含有用于诱导初级信号的信号传导结构域,并且该第二CAR与第二抗原结合并含有用于生成共刺激信号的组分。例如,第一CAR可以是激活性CAR,并且该第二CAR可以是共刺激CAR。在一些方面中,必须连接两种CAR以在该细胞中诱导特定的效应子功能,这可以为被靶向的细胞类型提供特异性和选择性。

[0430] 在一些方面中,T细胞激活被描述为由两类胞质信号传导序列介导:通过TCR启动

抗原依赖性初级激活的那些(初级胞质信号传导序列)以及以抗原非依赖性方式起作用以提供次级或共刺激信号的那些(次级胞质信号传导序列)。在一些方面中,该CAR包括此类信号传导组分中的一种或两种。

[0431] 在一些方面中,该CAR包括调节该TCR复合物的初级激活的初级胞质信号传导序列。以刺激方式起作用的初级胞质信号传导序列可以含有信号传导基序(其被称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM)。含有初级胞质信号传导序列的ITAM的例子包括衍生自TCR ζ (CD3 ζ)、FcR γ 、CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 的那些。在一些实施方案中,该CAR中的胞质信号传导分子含有衍生自CD3 ζ 的胞质信号传导结构域、其部分或序列。

[0432] 在一些实施方案中,该CAR包括共刺激受体(如CD28、4-1BB、OX40、DAP10和ICOS)的信号传导结构域和/或跨膜部分。在一些方面中,同一CAR包括激活和共刺激组分;在其他方面中,该激活结构域由一种CAR提供,而该共刺激组分由识别另一种抗原的另一种CAR提供。

[0433] 在一些实施方案中,该激活结构域被包括在一种CAR内,而该共刺激组分由识别另一种抗原的另一种CAR提供。在一些实施方案中,该CAR包括在同一细胞上表达的激活或刺激CAR和共刺激CAR(参见W02014/055668)。在一些方面中,该TCR样CAR是刺激性或激活性CAR;在其他方面中,它是共刺激性CAR。在一些实施方案中,该细胞还包括抑制性CAR(iCAR,参见Fedorov等人,Sci.Transl.Medicine,5(215)(2013年12月)),如识别不同于由该TCR样抗体识别的特定MHC-肽复合物的抗原的CAR,由此通过该TCR样CAR递送的激活信号通过该抑制性CAR与其配体的结合而减少或抑制,例如以减少脱靶效应。

[0434] 在某些实施方案中,该细胞内信号传导结构域包含与CD3(例如,CD3- ζ)细胞内结构域连接的CD28跨膜和信号传导结构域。在一些实施方案中,该细胞内信号传导结构域包含与CD3 ζ 细胞内结构域连接的嵌合CD28和CD137(4-1BB,TNFRSF9)共刺激结构域。

[0435] 在一些实施方案中,该TCR样CAR包含两个或更多个共刺激结构域,其与胞质部分中的激活结构域(例如,初级激活结构域)组合。一个例子是包括CD3- ζ 、CD28和4-1BB的细胞内组分的受体。

[0436] 在一些实施方案中,该CAR或其他抗原受体还包括标记,其可以用于确认该细胞被转导或工程化以表达该受体。在一些实施方案中,该标记是非天然发现于T细胞上或非天然发现于T细胞的表面上的分子(例如,细胞表面蛋白)或其部分。在一些实施方案中,该分子是非自身分子(例如,非自身蛋白),即没有被细胞过继转移到其中的宿主的免疫系统识别为“自身”的分子。在一些实施方案中,该标记不起任何治疗功能和/或除了用作遗传工程化(例如,用于选择成功工程化的细胞)的标记之外不产生任何作用。在其他实施方案中,该标记可以是治疗性分子或另外发挥一些所需作用的分子,如在体内细胞将遇到的配体,如共刺激性或免疫检查点分子,以在过继转移和遇到配体时增强和/或减弱该细胞的应答。

[0437] 在一些方面中,该标记包括CD34、NGFR或表皮生长因子受体(例如,tEGFR)的全部或部分(例如,截短形式)。在一些实施方案中,该标记是细胞表面受体的截短形式,如截短的EGFR,即tEGFR。截短的EGFR(例如tEGFR)的示例性多肽包含SEQ ID NO:45或61中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:45或61表现出至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,编码该标记的核酸与编码接头序列(如可切割的接头序列,例如T2A)的多核苷酸可操作地连接。例如,标记和任选地接头序列可以是公开的专利申请号W02014031687中

披露的任何标记和接头序列。例如,该标记可以是截短的EGFR (tEGFR),其任选地与接头序列(如T2A可切割的接头序列)连接。示例性T2A接头序列包含SEQ ID NO:46或56中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:46或56表现出至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的氨基酸序列。

[0438] 在一些情况下,CAR被称为第一代、第二代和/或第三代CAR。在一些方面中,第一代CAR是在抗原结合时单独提供CD3链诱导的信号信号的CAR;在一些方面中,第二代CAR是提供这种信号和共刺激信号的CAR,例如包括来自共刺激受体(如CD28或CD137)的细胞内信号传导结构域的CAR;在一些方面中,第三代CAR在一些方面中是包括不同共刺激受体的多个共刺激结构域的CAR。

[0439] 在一些实施方案中,该嵌合抗原受体包括细胞外部分和细胞内信号传导结构域,该细胞外部分含有在所提供的方法中鉴定的TCR样抗体或片段。在一些实施方案中,该抗体或片段包括scFv,并且该细胞内结构域含有ITAM。在一些方面中,该细胞内信号传导结构域包括CD3-zeta (CD3 ζ) 链的 ζ 链的信号传导结构域。在一些实施方案中,该嵌合抗原受体包括连接该细胞外结构域和该细胞内信号传导结构域的跨膜结构域。在一些方面中,该跨膜结构域含有CD28的跨膜部分。该细胞外结构域和跨膜可以直接或间接连接。在一些实施方案中,该细胞外结构域和跨膜通过间隔子(如本文描述的任何间隔子)连接。在一些实施方案中,该嵌合抗原受体含有T细胞共刺激分子的细胞内结构域,如在该跨膜结构域和细胞内信号传导结构域之间。在一些方面中,该T细胞共刺激分子是CD28或41BB。

[0440] 例如,在一些实施方案中,该CAR含有如本文所提供的TCR样抗体(例如,抗体片段)、作为或含有CD28的跨膜部分的跨膜结构域或其功能变体以及含有CD28的信号传导部分或其功能变体和CD3 ζ 的信号传导部分或其功能变体的细胞内信号传导结构域。在一些实施方案中,该CAR含有如本文所提供的TCR样抗体(例如,抗体片段)、作为或含有CD28的跨膜部分的跨膜结构域或其功能变体以及含有4-1BB的信号传导部分或其功能变体和CD3 ζ 的信号传导部分或其功能变体的细胞内信号传导结构域。在一些这样的实施方案中,该受体还包括含有Ig分子(如人Ig分子)的一部分(如Ig铰链,如IgG4铰链)的间隔子,如仅铰链间隔子。

[0441] 在一些实施方案中,该受体(例如,该TCR样CAR)的跨膜结构域是人CD28(例如登录号P01747.1)或其变体的跨膜结构域,如包含SEQ ID NO:47中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:47表现出至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的氨基酸序列的跨膜结构域。在一些实施方案中,含有该重组受体的部分的跨膜结构域包含SEQ ID NO:48中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:48具有至少或至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的氨基酸序列。

[0442] 在一些实施方案中,该重组受体(例如该TCR样CAR)的细胞内信号传导组分含有人CD28的细胞内共刺激信号传导结构域或其功能变体或部分,如在天然CD28蛋白的位置186-187处具有LL到GG取代的结构域。例如,该细胞内信号传导结构域可以包含SEQ ID NO:49或50中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:49或50表现出至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的氨基酸序列。在一些实施方案中,该细胞内结构域包含4-1BB的细胞内共刺激信号传导结构域(例如

登录号Q07011.1)或其功能变体或部分,如SEQ ID NO:51中列出的氨基酸序列或与SEQ ID NO:51表现出至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的氨基酸序列。

[0443] 在一些实施方案中,该重组受体(例如该CAR)的细胞内信号传导结构域包含人CD3 ζ 刺激信号传导结构域或其功能变体,如人CD3 ζ (登录号:P20963.2)的同种型3的112AA胞质结构域或如美国专利号7,446,190或美国专利号8,911,993中所述的CD3 ζ 信号传导结构域。例如,在一些实施方案中,该细胞内信号传导结构域包含SEQ ID NO:52、53或54的氨基酸序列或与SEQ ID NO:52、53或54表现出至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的氨基酸序列。

[0444] 在一些方面中,该间隔子仅含有IgG的铰链区,如仅IgG4或IgG1的铰链,如SEQ ID NO:40中列出的仅铰链间隔子。在其他实施方案中,该间隔子是或含有任选地与CH2和/或CH3结构域连接的Ig铰链,如IgG4衍生的铰链。在一些实施方案中,该间隔子是与CH2和CH3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4铰链,如SEQ ID NO:43中所列出。在一些实施方案中,该间隔子是仅与CH3结构域连接的Ig铰链,例如IgG4铰链,如SEQ ID NO:42中所列出。在一些实施方案中,该间隔子是或包含富甘氨酸-丝氨酸序列或其他柔性接头,如已知的柔性接头。

[0445] 例如,在一些实施方案中,该TCR样CAR包括TCR样抗体或片段(如本文所提供的方法中鉴定的任何TCR样抗体或片段,包括scFv)、间隔子(如含Ig铰链的任何间隔子)、CD28跨膜结构域、CD28细胞内信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方案中,该TCR样CAR包括TCR样抗体或片段(如本文所提供的方法中鉴定的任何TCR样抗体或片段,包括scFv)、间隔子(如含Ig铰链的任何间隔子)、CD28跨膜结构域、CD28细胞内信号传导结构域和CD3 ζ 信号传导结构域。在一些实施方案中,此类TCR样CAR构建体还包括T2A核糖体跳跃元件和/或tEGFR序列,例如在该CAR的下游。

[0446] 在一些实施方案中,此类CAR构建体还包括T2A核糖体跳跃元件和/或tEGFR序列,例如在该CAR的下游,如SEQ ID NO:46或61(对于tEGFR)和45或56(对于T2A)中所列出,或与SEQ ID NO:46或61(对于tEGFR)或45或56(对于T2A)表现出至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的序列同一性的列氨基酸序列。

[0447] B. 工程化的细胞

[0448] 还提供了细胞,例如被工程化以含有转基因抗原受体的工程化的细胞,该转基因抗原受体含有用于特异性识别在MHC分子的背景下的肽表位(即MHC-肽复合物)的结合分子。此类细胞包括用转基因TCR或TCR样CAR工程化的细胞。在一些实施方案中,该肽表位是抗原的MHC限制性表位,该抗原包括细胞内抗原,如与恶性肿瘤或细胞转化(例如癌症)、自身免疫或炎性疾病相关的任何MHC限制性抗原、或来源于感染性疾病(例如病毒病原体或细菌病原体)的抗原。还提供了此类细胞的群体以及含有该细胞或细胞群的组合物。该组合物包括用于给予(如以用于过继细胞疗法)的药物组合物和制剂。还提供了用于向受试者(例如,患者)给予该细胞和组合物的治疗方法。

[0449] 该细胞通常是真核细胞,如哺乳动物细胞,并且通常是人细胞。在一些实施方案中,该细胞衍生自血液、骨髓、淋巴或淋巴器官,是免疫系统的细胞,如先天或适应性免疫的细胞,例如骨髓或淋巴细胞,包括淋巴细胞,通常为T细胞和/或NK细胞。其他示例性细胞包

括干细胞,如多潜能干细胞和多能干细胞,包括诱导多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,该细胞是单核细胞或粒细胞,例如骨髓细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、树突细胞、肥大细胞、嗜酸性粒细胞和/或嗜碱性粒细胞。该细胞通常是原代细胞,如直接从受试者分离和/或从受试者分离并冷冻的那些。就待治疗的受试者而论,该细胞可以是同种异体的和/或自体的。该方法包括现成的方法。在一些方面中,对于现成的技术,该细胞是多能的和/或多潜能的,如干细胞,如诱导多能干细胞(iPSC)。在一些实施方案中,该方法包括从该受试者中分离细胞,如本文所述制备、加工、培养和/或工程化它们,并且在冷冻保存之前或之后将它们重新引入同一患者体内。

[0450] 在一些实施方案中,该细胞包括T细胞或其他细胞类型的一个或多个子集,如整个T细胞群、CD4⁺细胞、CD8⁺细胞及其亚群,如由功能、激活状态、成熟度、分化、扩增、再循环、定位和/或持续能力的潜力、抗原特异性、抗原受体类型、在特定器官或区室中的存在、标记或细胞因子分泌谱和/或分化程度定义的那些。T细胞和/或CD4⁺和/或CD8⁺ T细胞的亚型和亚群包括原初T(T_N)细胞、效应T细胞(T_{EFP})、记忆T细胞及其亚型(如干细胞记忆T(T_{SCM})、中枢记忆T(T_{CM})、效应记忆T(T_{EM})或终末分化的效应记忆T细胞)、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、未成熟T细胞、成熟T细胞、辅助T细胞、细胞毒性T细胞、黏膜相关恒定T(MAIT)细胞、天然存在和适应性调节性T(Treg)细胞、辅助T细胞(如TH1细胞、TH2细胞、TH3细胞、TH17细胞、TH9细胞、TH22细胞、滤泡性辅助T细胞)、 α/β T细胞以及 δ/γ T细胞。

[0451] 在一些实施方案中,该细胞是CD8⁺ T细胞,并且用抗原受体(例如TCR或TCR样CAR)工程化此类细胞,该抗原受体与在MHC I类分子的背景下的肽表位特异性结合。在一些情况下,该MHC I类分子是经典MHC I类分子或非经典MHC I类分子。在一些实施方案中,该MHC I类分子是MHC-E。在一些实施方案中,提供了用于将CD8⁺细胞工程化以表达工程化的抗原受体的方法,该方法是通过向此类细胞中引入一种或多种核酸分子来进行,该一种或多种核酸分子编码对在MHC I类分子(例如MHC Ia类分子和/或MHC-E分子)的背景下的肽表位具特异性的TCR或TCR样CAR。

[0452] 在一些实施方案中,该细胞是CD8⁺ T细胞,并且用抗原受体(例如TCR或TCR样CAR)工程化此类细胞,该抗原受体与在MHC II类分子的背景下的肽表位特异性结合。在一些实施方案中,提供了用于将CD8⁺细胞工程化以表达工程化的抗原受体的方法,该方法是通过向此类细胞中引入一种或多种核酸分子来进行,该一种或多种核酸分子编码对在MHC II类分子的背景下的肽表位具特异性的TCR或TCR样CAR。

[0453] 在一些实施方案中,该细胞是CD4⁺ T细胞,并且用抗原受体(例如TCR或TCR样CAR)工程化此类细胞,该抗原受体特异性结合在MHC II类分子的背景下的肽表位。在一些实施方案中,提供了用于将CD4⁺细胞工程化以表达工程化的抗原受体的方法,该方法是通过向此类细胞中引入一种或多种核酸分子来进行,该一种或多种核酸分子编码对在MHC II类分子的背景下的肽表位具特异性的TCR或TCR样CAR。

[0454] 在一些实施方案中,提供了用抗原受体(例如TCR或TCR样CAR)工程化的CD4⁺细胞和CD8⁺细胞,该抗原受体与在MHC II类分子的背景下的肽表位特异性结合。在一些实施方案中,在CD4⁺细胞和CD8⁺细胞上表达的抗原受体是相同的。在一些实施方案中,在CD4⁺细胞上表达的抗原受体不同于在CD8⁺细胞上表达的抗原受体,但是两种表达的抗原受体都与在MHC II类分子的背景下的肽表位特异性结合。在一些实施方案中,提供了用于将CD4⁺和/或

CD8+细胞群工程化以表达工程化的抗原受体的方法,该方法是通过向此类细胞中引入一种或多种核酸分子来进行,该一种或多种核酸分子编码对在MHC II类分子的背景下的肽表位具特异性的TCR或TCR样CAR。

[0455] 在一些实施方案中,该工程化的抗原受体(例如TCR或TCR样抗体或其抗原结合片段)的结合分子是通过所提供的方法鉴定的结合分子。

[0456] 1. 用于工程化的细胞

[0457] 在一些实施方案中,该工程化的细胞的制备包括一个或多个培养和/或制备步骤。用于引入该抗原受体(例如,TCR或TCR样CAR)的细胞可以从样品(如生物样品,例如从受试者获得或来源于受试者的样品)中分离。在一些实施方案中,该细胞从其中分离的受试者是患有疾病或病症或需要细胞疗法或将被给予细胞疗法的受试者。在一些实施方案中,该受试者是需要特定治疗性干预(如过继细胞疗法,其中细胞被分离、加工和/或工程化)的人。

[0458] 因此,在一些实施方案中,该细胞是原代细胞,例如原代人细胞。该样品包括直接取自该受试者的组织、流体和其他样品,以及来自一个或多个加工步骤(如分离、离心、遗传工程化(例如用病毒载体转导)、洗涤和/或孵育)的样品。该生物样品可以是直接从生物来源获得的样品或经过加工的样品。生物样品包括但不限于体液(如血液、血浆、血清、脑脊液、滑液、尿液和汗液)、组织和器官样品,包括由其衍生的加工样品。

[0459] 在一些方面中,该细胞从其中衍生或分离的样品是血液或血液衍生的样品,或者是或衍生自单采术或白细胞分离术产物。示例性样品包括全血、外周血单核细胞(PBMC)、白细胞、骨髓、胸腺、组织活检、肿瘤、白血病、淋巴瘤、淋巴结、肠相关淋巴组织、黏膜相关淋巴组织、脾、其他淋巴组织、肝、肺、胃、肠、结肠、肾、胰腺、乳房、骨、前列腺、子宫颈、睾丸、卵巢、扁桃体或其他器官和/或由其衍生的细胞。在细胞疗法(例如,过继细胞疗法)的背景下,样品包括来自自体 and 同种异体来源的样品。

[0460] 在一些实施方案中,该细胞衍生自细胞系,例如T细胞系。在一些实施方案中,该细胞获得自异种来源,例如获得自小鼠、大鼠、非人灵长类动物和猪。

[0461] 在一些实施方案中,该细胞的分离包括一个或多个制备和/或基于非亲和力的细胞分离步骤。在一些例子中,将细胞在一种或多种试剂的存在下洗涤、离心和/或孵育,例如以去除不需要的组分、针对所需组分进行富集、裂解或去除对特定试剂敏感的细胞。在一些例子中,基于一种或多种特性(如密度、黏附特性、尺寸、对特定组分的敏感性和/或抗性)分离细胞。

[0462] 在一些例子中,来自受试者的循环血液的细胞例如通过单采术或白细胞分离术获得。在一些方面中,该样品含有淋巴细胞,包括T细胞、单核细胞、粒细胞、B细胞、其他有核白细胞、红细胞和/或血小板,并且在一些方面中含有除红细胞和血小板之外的细胞。

[0463] 在一些实施方案中,洗涤从该受试者收集的血细胞,例如以去除血浆级分并将该细胞置于适当的缓冲液或介质中以用于随后的加工步骤。在一些实施方案中,用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤该细胞。在一些实施方案中,该洗涤溶液缺乏钙和/或镁和/或许多或所有二价阳离子。在一些方面中,根据制造商的说明书,通过半自动“流通”离心机(例如,Cobe 2991细胞加工器,Baxter)完成洗涤步骤。在一些方面中,根据制造商的说明书,通过切向流过滤(TFF)完成洗涤步骤。在一些实施方案中,洗涤后将该细胞重悬于多种生物相容性缓冲液(例如像不含 $\text{Ca}^{++}/\text{Mg}^{++}$ 的PBS)中。在某些实施方案中,去除血细胞样品的组分并将该细胞

直接重悬于培养基中。

[0464] 在一些实施方案中,该方法包括基于密度的细胞分离方法,如通过裂解红细胞并通过Percoll或Ficoll梯度离心而从外周血制备白细胞。

[0465] 在一些实施方案中,该分离方法包括基于该细胞中一种或多种特定分子(如表面标记,例如表面蛋白、细胞内标记或核酸)的表达或存在来分离不同细胞类型。在一些实施方案中,可以使用任何已知的基于此类标记的用于分离的方法。在一些实施方案中,该分离是基于亲和力或免疫亲和力的分离。例如,在一些方面中,该分离包括基于该细胞的一种或多种标记(通常为细胞表面标记)的表达或表达水平来分离细胞和细胞群,例如通过和与此类标记特异性结合的抗体或结合配偶体一起孵育,然后通常是洗涤步骤和从那些未与该抗体或结合配偶体结合的细胞中分离已结合该抗体或结合配偶体的细胞。

[0466] 此类分离步骤可以基于阳性选择(其中保留已经结合该试剂的细胞以供进一步使用)和/或阴性选择(其中保留未与该抗体或结合配偶体结合的细胞)。在一些例子中,保留两种级分以供进一步使用。在一些方面中,在没有可用于特异性鉴定异质群体中的细胞类型的抗体的情况下,阴性选择可能特别有用,使得最好基于由除所需群体之外的细胞表达的标记进行分离。

[0467] 该分离不需要导致100%富集或去除特定细胞群或表达特定标记的细胞。例如,针对特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阳性选择或富集是指增加此类细胞的数量或百分比,但不需要导致不表达该标记的细胞的完全不存在。同样地,特定类型的细胞(如表达标记的那些)的阴性选择、去除或耗竭是指减少此类细胞的数量或百分比,但不需要导致所有此类细胞的完全去除。

[0468] 在一些例子中,进行多轮分离步骤,其中来自一个步骤的阳性或阴性选择的级分经受另一个分离步骤,如随后的阳性或阴性选择。在一些例子中,单个分离步骤可以同时耗竭表达多种标记的细胞,如通过将细胞与多种抗体或结合配偶体(每种抗体或结合配偶体对被靶向用于阴性选择的标记具特异性)一起孵育。同样地,通过将细胞与在各种细胞类型上表达的多种抗体或结合配偶体一起孵育,可以同时阳性选择多种细胞类型。

[0469] 例如,在一些方面中,T细胞的特定亚群,如对一种或多种表面标记呈阳性或高水平表达的细胞(例如CD28⁺、CD62L⁺、CCR7⁺、CD27⁺、CD127⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺和/或CD45RO⁺T细胞)通过阳性或阴性选择技术来分离。

[0470] 例如,可以使用抗CD3/抗CD28缀合的磁珠(例如,DYNABEADS®M-450 CD3/CD28T Cell Expander)阳性选择CD3⁺,CD28⁺T细胞。

[0471] 在一些实施方案中,通过阳性选择针对特定细胞群富集或者通过阴性选择针对特定细胞群消耗来进行分离。在一些实施方案中,通过将细胞与一种或多种抗体或其他结合剂一起孵育来完成阳性或阴性选择,该一种或多种抗体或其他结合剂与分别在阳性或阴性选择的细胞上表达或以相对较高水平(标记^高) (标记⁺)的一种或多种表面标记特异性结合。

[0472] 在一些实施方案中,通过阴性选择非T细胞(如B细胞、单核细胞或其他白细胞,如CD14)上表达的标记,将T细胞与PBMC样品分离。在一些方面中,CD4⁺或CD8⁺选择步骤用于分离CD4⁺辅助T细胞和CD8⁺细胞毒性T细胞。通过对在一种或多种原初、记忆和/或效应T细胞亚群上表达或以相对较高程度表达的标记的阳性或阴性选择,可以将此类CD4⁺和CD8⁺群体进一步分类成亚群。

[0473] 在一些实施方案中,CD8⁺细胞针对原初细胞、中枢记忆细胞、效应记忆细胞和/或中枢记忆干细胞进行进一步富集或耗竭,如通过基于与相应亚群相关的表面抗原的阳性或阴性选择。在一些实施方案中,针对中枢记忆T(T_{CM})细胞进行富集以增加功效,如以改善给予后的长期存活、扩增和/或移植,这在一些方面中在此类亚群中特别稳健。参见Terakura等人(2012)Blood.1:72-82;Wang等人(2012)J Immunother.35(9):689-701。在一些实施方案中,组合针对T_{CM}富集的CD8⁺T细胞和CD4⁺T细胞进一步增强功效。

[0474] 在实施方案中,记忆T细胞存在于CD8⁺外周血淋巴细胞的CD62L⁺和CD62L⁻两个子集中。PBMC可以针对CD62L⁻CD8⁺和/或CD62L⁺CD8⁺级分进行富集或耗竭,如使用抗CD8和抗CD62L抗体。

[0475] 在一些实施方案中,针对中枢记忆T(T_{CM})细胞的富集是基于CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3和/或CD127的阳性或高表面表达;在一些方面中,它是基于对表达或高度表达CD45RA和/或颗粒酶B的细胞的阴性选择。在一些方面中,通过表达CD4、CD14、CD45RA的细胞的耗竭以及针对表达CD62L的细胞的阳性选择或富集,来分离针对T_{CM}细胞富集的CD8⁺群体。在一个方面中,针对中枢记忆T(T_{CM})细胞的富集从基于CD4表达选择的细胞的阴性级分开始进行,其经受基于CD14和CD45RA的表达的阴性选择和基于CD62L的阳性选择。此类选择在一些方面中是同时进行的,并且在其他方面中以任何顺序依次进行。在一些方面中,用于制备CD8⁺细胞群或亚群的相同的基于CD4表达的选择步骤也用于产生CD4⁺细胞群或亚群,使得来自基于CD4的分离的阳性和阴性两种级分被保留并用于该方法的后续步骤中,任选地在—个或多个另外的阳性或阴性选择步骤之后。

[0476] 在一个特定例子中,PBMC样品或其他白细胞样品经受CD4⁺细胞的选择,其中保留了阴性和阳性两种级分。然后使该阴性级分经受基于CD14和CD45RA或CD19的表达的阴性选择和基于中枢记忆T细胞特有的标记(如CD62L或CCR7)的阳性选择,其中阳性和阴性选择以任一顺序进行。

[0477] 通过鉴定具有细胞表面抗原的细胞群,将CD4⁺T辅助细胞分类为原初细胞、中枢记忆细胞和效应细胞。CD4⁺淋巴细胞可以通过标准方法获得。在一些实施方案中,原初CD4⁺T淋巴细胞是CD45RO⁻,CD45RA⁺,CD62L⁺,CD4⁺T细胞。在一些实施方案中,中枢记忆CD4⁺细胞是CD62L⁺且CD45RO⁺。在一些实施方案中,效应CD4⁺细胞是CD62L⁻且CD45RO⁻。

[0478] 在一个例子中,为了通过阴性选择来针对CD4⁺细胞进行富集,单克隆抗体混合物通常包括CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。在一些实施方案中,该抗体或结合配偶体与固体支持物或基质(如磁珠或顺磁珠)结合,以允许细胞分离以用于阳性和/或阴性选择。例如,在一些实施方案中,使用免疫磁性(或亲和磁性)分开技术来分开或分离细胞和细胞群(综述于Methods in Molecular Medicine,第58卷:Metastasis Research Protocols,第2卷:Cell Behavior In Vitro and In Vivo,第17-25页S.A.Brooks和U.Schumacher编辑©Humana Press Inc.,新泽西州托托瓦)。

[0479] 在一些方面中,将待分离的细胞的样品或组合物与小的可磁化或磁响应材料(如磁响应颗粒或微粒,如顺磁珠(例如像Dynalbeads或MACS珠))一起孵育。该磁响应材料(例如,颗粒)通常直接或间接地附着于结合配偶体(例如,抗体),该结合配偶体与希望分离(例如,希望阴性地或阳性地选择)的一个细胞、多个细胞或细胞群上存在的分子(例如,表面标记)特异性结合。

[0480] 在一些实施方案中,该磁性颗粒或珠包含与特异性结合成员(如抗体或其他结合配偶体)结合的磁响应材料。有许多在磁分离方法中使用的熟知的磁响应材料。合适的磁性颗粒包括在Molday的美国专利号4,452,773和欧洲专利说明书EP 452342 B中所述的那些,将其通过引用特此并入。胶体大小的颗粒(如Owen的美国专利号4,795,698和Liberti等人的美国专利号5,200,084中所述的那些)是其他例子。

[0481] 该孵育通常在这样的条件下进行,由此该抗体或结合配偶体或者与附着于磁性颗粒或珠的此类抗体或结合配偶体特异性结合的分子(如二抗或其他试剂)与细胞表面分子特异性结合,如果存在于该样品内的细胞上的话。

[0482] 在一些方面中,将该样品置于磁场中,并且具有附着于其上的磁响应或可磁化颗粒的那些细胞将被吸引到磁体并与未标记的细胞分离。对于阳性选择,保留被磁铁吸引的细胞;对于阴性选择,保留未被吸引的细胞(未标记的细胞)。在一些方面中,在同一选择步骤期间进行阳性和阴性选择的组合,其中保留阳性和阴性级分并进一步加工或经受另外的分离步骤。

[0483] 在某些实施方案中,该磁响应颗粒被包被在一抗或其他结合伴侣、二抗、凝集素、酶或链霉亲和素中。在某些实施方案中,该磁性颗粒通过对一种或多种标记具特异性的一抗的包被而附着于细胞。在某些实施方案中,用一抗或结合配偶体标记该细胞而不是珠,并且然后添加细胞类型特异性二抗或其他结合配偶体(例如链霉亲和素)包被的磁性颗粒。在某些实施方案中,将链霉亲和素包被的磁性颗粒与生物素化的一抗或二抗结合使用。

[0484] 在一些实施方案中,该磁响应颗粒保持附着于该细胞,该细胞随后被孵育,培养和/或工程化;在一些方面中,该颗粒保持附着于该细胞以用于给予患者。在一些实施方案中,从该细胞中去除可磁化或磁响应颗粒。用于从细胞中去除可磁化颗粒的方法是已知的,并且包括例如使用竞争性非标记抗体、可磁化颗粒或与可切割接头缀合的抗体等。在一些实施方案中,该可磁化颗粒是可生物降解的。

[0485] 在一些实施方案中,基于亲和力的选择是经由磁激活细胞分选(MACS)(Miltenyi Biotec,加利福尼亚州奥本)。磁激活细胞分选(MACS)系统能够高纯度选择附着有磁化颗粒的细胞。在某些实施方案中,MACS以这样的模式操作,其中在施加外部磁场之后依次洗脱非靶标和靶标种类。也就是说,附着于磁化颗粒的细胞保持在适当的位置,而未附着的种类被洗脱。然后,在完成第一次洗脱步骤之后,以某种方式释放被捕获在磁场中并被阻止洗脱的种类,使得它们可以被洗脱和回收。在某些实施方案中,该非靶细胞被标记并从异质细胞群中耗竭。

[0486] 在某些实施方案中,使用这样的系统、装置或设备进行分离或分开,该系统、装置或设备进行该方法的分离、细胞制备、分开、加工、孵育、培养和/或制备步骤中的一种或多种。在一些方面中,该系统用于在封闭或无菌环境中进行这些步骤中的每一个,例如以最小化错误、用户操作和/或污染。在一个例子中,该系统是如国际专利申请公开号W02009/072003或US 20110003380 A1中所述的系统。

[0487] 在一些实施方案中,该系统或设备在集成或独立系统中和/或以自动或可编程方式进行分离、加工、工程化和配制步骤中的一个或多个(例如,全部)。在一些方面中,该系统或设备包括与该系统或设备通信的计算机和/或计算机程序,其允许用户对加工、分离、工程化和配制步骤的各个方面进行编程、控制、评估其结果和/或调整。

[0488] 在一些方面中,使用CliniMACS系统(Miltenyi Biotec)进行该分离和/或其他步骤,例如以用于在封闭和无菌系统中在临床规模水平上自动分离细胞。组件可以包括集成微计算机、磁分离单元、蠕动泵和各种夹管阀。在一些方面中,该集成计算机控制该仪器的所有组件并指示该系统以标准化顺序执行重复程序。在一些方面中,该磁分离单元包括可移动的永磁体和用于选择柱的支架。该蠕动泵控制整个管组的流速,并与夹管阀一起确保缓冲液通过该系统的受控流动和细胞的连续悬浮。

[0489] 在一些方面中,该CliniMACS系统使用抗体偶联的可磁化颗粒,其在无菌,无热原的溶液中提供。在一些实施方案中,在用磁性颗粒标记细胞后,洗涤该细胞以去除过量的颗粒。然后将细胞制备袋连接到管组,该管组又连接到含有缓冲液的袋和细胞收集袋。该管组由预装配的无菌管(包括预柱和分离柱)组成,并且仅供一次性使用。在启动分离程序后,该系统自动将细胞样品施加到分离柱。标记的细胞保留在柱内,而未标记的细胞通过一系列洗涤步骤去除。在一些实施方案中,用于与本文描述的方法一起使用的细胞群是未标记的并且不保留在柱中。在一些实施方案中,用于与本文描述的方法一起使用的细胞群被标记并保留在柱中。在一些实施方案中,用于与本文描述的方法一起使用的细胞群在去除磁场后从柱中洗脱,并且收集在细胞收集袋内。

[0490] 在某些实施方案中,使用CliniMACS Prodigy系统(Miltenyi Biotec)进行分离和/或其他步骤。在一些方面中,该CliniMACS Prodigy系统配备有细胞处理单元,其允许自动洗涤和通过离心分离细胞。该CliniMACS Prodigy系统还可以包括机载相机和图像识别软件,其通过辨别源细胞产品的宏观层来确定最佳细胞分级终点。例如,将外周血自动分离成红细胞、白细胞和血浆层。该CliniMACS Prodigy系统还可以包括集成的细胞培养室,其实现细胞培养方案,例如像细胞分化和扩增、抗原加载和长期细胞培养。输入端口可以允许无菌移除和补充培养基,并且可以使用集成显微镜监测细胞。参见例如,Klebanoff等人(2012) *J Immunother.* 35(9):651-660, Terakura等人(2012) *Blood.* 1:72-82, 和Wang等人(2012) *J Immunother.* 35(9):689-701。

[0491] 在一些实施方案中,通过流式细胞术收集和富集(或耗竭)本文描述的细胞群,其中针对多种细胞表面标记染色的细胞在流体流中载携。在一些实施方案中,通过制备规模(FACS)分类收集和富集(或耗竭)本文描述的细胞群。在某些实施方案中,通过使用微机电系统(MEMS)芯片结合基于FACS的检测系统来收集和富集(或耗竭)本文描述的细胞群(参见例如,WO 2010/033140, Cho等人(2010) *Lab Chip* 10, 1567-1573; 和Godin等人(2008) *J Biophoton.* 1(5):355-376)。在两种情况下,细胞可以用多种标记来标记,允许以高纯度分离明确定义的T细胞子集。

[0492] 在一些实施方案中,用一种或多种可检测标记来标记该抗体或结合配偶体,以促进阳性和/或阴性选择的分离。例如,分离可以基于与荧光标记的抗体的结合。在一些例子中,基于对一种或多种细胞表面标记具特异性的抗体或其他结合配偶体的结合来分离细胞在流体流中载携,如通过荧光激活细胞分选(FACS),包括制备规模(FACS)和/或微机电系统(MEMS)芯片,例如与流式细胞检测系统组合。此类方法允许基于多种标记同时进行阳性和阴性选择。

[0493] 在一些实施方案中,该制备方法包括在分离、孵育和/或工程化之前或之后冷冻(例如,冷冻保存)该细胞的步骤。在一些实施方案中,该冷冻和后续解冻步骤去除该细胞群

中的粒细胞,并且在一定程度上去除单核细胞。在一些实施方案中,例如在洗涤步骤之后将该细胞悬浮在冷冻溶液中以去除血浆和血小板。在一些方面中,可以使用多种已知的冷冻溶液和参数中的任何一种。一个例子涉及使用含有20% DMSO和8%人血清白蛋白(HSA)的PBS,或其他合适的细胞冷冻培养基。然后将其用培养基1:1稀释,使得DMSO和HSA的最终浓度分别为10%和4%。然后将该细胞以1°/分钟的速率冷冻至-80℃并储存在液氮储罐的气相中。

[0494] 2. 细胞的制备、载体和工程化方法

[0495] 在一些实施方案中,该遗传工程化通常涉及向该细胞中引入编码该重组或工程化组分的核酸,如通过逆转录病毒转导、转染或转化。在一些实施方案中,通过以下方式完成基因转移:首先刺激该细胞,如通过将其与诱导反应(如增殖、存活和/或激活)的刺激进行组合,例如如通过细胞因子或激活标记的表达所测量的,然后转导激活的细胞,并且在培养物中扩增至足以用于临床应用的数目。

[0496] 在一些实施方案中,在遗传工程化之前或与其相连地孵育和/或培养该细胞。该孵育步骤可以包括培养、培育、刺激、激活和/或繁殖。在一些实施方案中,在刺激条件或刺激剂的存在下孵育该组合物或细胞。此类条件包括设计用于在群体中诱导细胞的增殖、扩增、激活和/或存活以模拟抗原暴露和/或引发细胞用于遗传工程化(如用于引入重组抗原受体)的那些。孵育和/或工程化可以在培养容器中进行,该培养容器是如单元、室、孔、柱、管、管组、阀、小瓶、培养皿、袋或其他用于培养或培育细胞的容器。

[0497] 该条件可以包括以下中的一种或多种:特定培养基、温度、氧含量、二氧化碳含量、时间、试剂(例如,营养素、氨基酸、抗生素、离子和/或刺激因子(如细胞因子、趋化因子、抗原、结合配偶体、融合蛋白、重组可溶性受体和任何其他旨在激活细胞的试剂))。

[0498] 在一些实施方案中,该刺激条件或刺激剂包括能够激活TCR复合物的细胞内信号传导结构域的一种或多种试剂(例如,配体)。在一些方面中,该试剂在T细胞中开启或启动TCR/CD3细胞内信号传导级联。此类试剂可以包括抗体,如对TCR具特异性的那些,例如抗CD3。在一些实施方案中,该刺激条件包括能够刺激共刺激受体的一种或多种试剂(例如配体),例如抗CD28。在一些实施方案中,此类试剂和/或配体可以与固体支持物(如珠)和/或一种或多种细胞因子结合。任选地,该扩增方法还可以包括向培养基中(例如,以至少约0.5ng/ml的浓度)添加抗CD3和/或抗CD28抗体的步骤。在一些实施方案中,该刺激剂包括IL-2、IL-15和/或IL-7。在一些方面中,IL-2浓度为至少约10单位/mL。

[0499] 在一些方面中,孵育根据诸如Riddell等人的美国专利号6,040,177,Klebanoff等人(2012)J Immunother.35(9):651-660,Terakura等人(2012)Blood.1:72-82和/或Wang等人(2012)J Immunother.35(9):689-701中所述的那些等技术进行。

[0500] 在一些实施方案中,通过以下方式来扩增该T细胞:向该组合物中添加饲养细胞(如非分裂外周血单核细胞(PBMC))(例如,使得针对待扩增的初始群体中每个T淋巴细胞,所得细胞群含有至少约5、10、20或40个或更多的PBMC饲养细胞);并且孵育该培养物(例如持续足以扩增T细胞数量的时间)。在一些方面中,该非分裂饲养细胞可以包含 γ 照射的PBMC饲养细胞。在一些实施方案中,用在约3000至3600拉德范围内的 γ 射线来照射该PBMC以防止细胞分裂。在一些方面中,在添加该T细胞群之前将该饲养细胞添加到培养基中。

[0501] 在一些实施方案中,该刺激条件包括适合于人T淋巴细胞生长的温度,例如至少约

25摄氏度,通常为至少约30摄氏度,并且通常在或约在37摄氏度。任选地,该孵育还可以包括添加非分裂EBV转化的类淋巴母细胞(LCL)作为饲养细胞。可以用在约6000至10,000拉德范围内的 γ 射线照射LCL。在一些方面中,该LCL饲养细胞以任何合适的量(如LCL饲养细胞与初始T淋巴细胞的比率为至少约10:1)提供。

[0502] 在一些方面中,进一步工程化该细胞以促进细胞因子或其他因子的表达。

[0503] 在一些情境下,刺激因子(例如,淋巴因子或细胞因子)的过表达可能对受试者有毒。因此,在一些情境下,经工程化的细胞包括导致该细胞在体内(如在过继免疫疗法中给予时)对阴性选择易感的基因区段。例如,在一些方面中,工程化该细胞,使得它们可以由于给予它们的患者的体内状况的改变而被消除。该阴性选择性表型可以由赋予对所给予的试剂(例如,化合物)的敏感性的基因的插入而产生。阴性选择性基因包括单纯疱疹病毒I型胸苷激酶(HSV-I TK)基因(Wigler等人,Cell 2:223,1977),其赋予更昔洛韦敏感性;细胞次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)基因;细胞腺嘌呤磷酸核糖基转移酶(APRT)基因;细菌胞嘧啶脱氨酶(Mullen等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA.89:33(1992))。

[0504] 用于引入遗传工程化的组分(例如,抗原受体,例如CAR)的各种方法是熟知的,并且可以与所提供的方法和组合物一起使用。示例性方法包括用于转移编码该受体的核酸的那些,包括经由病毒(例如,逆转录病毒或慢病毒)转导、转座子和电穿孔。

[0505] 在一些实施方案中,使用重组感染性病毒颗粒(例如像,衍生自猿猴病毒40(SV40)、腺病毒、腺相关病毒(AAV)的载体)将重组核酸转移到细胞中。在一些实施方案中,使用重组慢病毒载体或逆转录病毒载体(如 γ -逆转录病毒载体)将重组核酸转移到T细胞中(参见例如,Koste等人(2014)Gene Therapy 2014年4月3日.doi:10.1038/gt.2014.25; Carlens等人(2000)Exp Hematol 28(10):1137-46;Alonso-Camino等人(2013)Mol Ther Nucl Acids 2,e93;Park等人,Trends Biotechnol.2011年11月29日(11):550-557)。

[0506] 在一些实施方案中,该逆转录病毒载体具有长末端重复序列(LTR),例如衍生自莫洛尼鼠白血病病毒(MoMLV)、骨髓增生性肉瘤病毒(MPSV)、鼠胚胎干细胞病毒(MESV)、鼠干细胞病毒(MSCV)、脾病灶形成病毒(SFFV)或腺相关病毒(AAV)的逆转录病毒载体。大多数逆转录病毒载体衍生自鼠逆转录病毒。在一些实施方案中,该逆转录病毒包括来源于任何禽类或哺乳动物细胞来源的那些。该逆转录病毒通常是双嗜性的,这意味着它们能够感染包括人在内的若干种物种的宿主细胞。在一个实施方案中,待表达的基因替代逆转录病毒gag、pol和/或env序列。已经描述了许多说明性逆转录病毒系统(例如,美国专利号5,219,740;6,207,453;5,219,740;Miller和Rosman(1989)BioTechniques 7:980-990;Miller, A.D.(1990)Human Gene Therapy 1:5-14;Scarpa等人(1991)Virology 180:849-852;Burns等人(1993)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 90:8033-8037;以及Boris-Lawrie和Temin(1993)Cur.Opin.Genet.Develop.3:102-109)。

[0507] 慢病毒转导的方法是已知的。示例性方法描述于例如Wang等人(2012)J.Immunother.35(9):689-701;Cooper等人(2003)Blood.101:1637-1644;Verhoeven等人(2009)Methods Mol Biol.506:97-114;以及Cavalieri等人(2003)Blood.102(2):497-505中。

[0508] 在一些实施方案中,经由电穿孔将重组核酸转移到T细胞中(参见例如,Chicaybam等人,(2013)PLoS ONE 8(3):e60298和Van Tedeloo等人(2000)Gene Therapy 7(16):

1431-1437)。在一些实施方案中,经由转座将重组核酸转移到T细胞中(参见例如,Manuri等人(2010)Hum Gene Ther 21(4):427-437;Sharma等人(2013)Molec Ther Nucl Acids 2,e74;和Huang等人(2009)Methods Mol Biol 506:115-126)。在免疫细胞中引入和表达遗传材料的其他方法包括磷酸钙转染(例如,如Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley&Sons,纽约州纽约中所述)、原生质体融合、阳离子脂质体介导的转染、钨颗粒促进的微粒轰击(Johnston,Nature,346:776-777(1990))和磷酸锆DNA共沉淀(Brash等人,Mol.Cell Biol.,7:2031-2034(1987))。

[0509] 用于转移编码该重组产物的核酸的其他方法和载体是例如在国际专利申请公开号W02014055668和美国专利号7,446,190中所述的那些。

[0510] 另外的核酸(例如,用于引入的基因)包括用于改善治疗功效的那些,如通过促进转移细胞的活力和/或功能;用于提供选择和/或评估细胞的遗传标记的基因,如以评估体内存活或定位;改善安全性的基因,例如通过使细胞在体内对阴性选择易感,如Lupton S.D.等人,Mol.and Cell Biol.,11:6(1991)和Riddell等人,Human Gene Therapy 3:319-338(1992)所述;还参见Lupton等人的PCT/US91/08442和PCT/US94/05601的出版物,其描述了使用由将显性阳性选择性标记与阴性选择性标记融合而得到的双功能选择性融合基因。参见例如,Riddell等人,美国专利号6,040,177,第14-17栏。

[0511] IV.组合物、制剂和给予方法

[0512] 还提供了含有该TCR、TCR样抗体结合分子或其抗原片段、嵌合受体(例如CAR)的组合物以及含有经工程化的细胞的组合物,包括药物组合物和制剂。还提供了使用该分子和组合物的方法以及该分子和组合物的用途,如在表达该抗原的疾病、病症和障碍的治疗中,或在检测、诊断和预后方法中。

[0513] A.药物组合物和制剂

[0514] 提供了包括TCR或TCR样结合分子或抗原结合片段(包括嵌合受体(例如CAR))和/或表达该分子或抗原受体的工程化的细胞的药物制剂。例如,在一些实施方案中,提供了包括工程化的CD4⁺和/或CD8⁺ T细胞的药物组合物和制剂,该细胞表达靶向MHC限制性表位(如MHC-Ia类、MHC-E或MHC II类限制性表位)的抗原受体或嵌合抗原受体(如TCR或TCR样CAR)。此类药物组合物和制剂的例子包括包含CD4⁺和CD8⁺细胞的药物组合物和制剂,该细胞被工程化以表达靶向相同的MHC II类限制性表位的抗原受体,例如TCR或TCR样CAR。

[0515] 术语“药物制剂”是指这样的制剂,其处于使得其中所含活性成分的生物活性有效的形式,并且不含对给予制剂的受试者具有不可接受的毒性的另外的组分。

[0516] “药学上可接受的载体”是指药物制剂中除活性成分外的成分,其对受试者无毒。药学上可接受的载体包括但不限于缓冲剂、赋形剂、稳定剂或防腐剂。

[0517] 在一些方面中,载体的选择部分地由特定细胞、结合分子和/或抗体和/或由给予方法决定。因此,存在多种合适的制剂。例如,该药物组合物可以含有防腐剂。合适的防腐剂可以包括例如对羟基苯甲酸甲酯、对羟基苯甲酸丙酯、苯甲酸钠和苯扎氯铵。在一些方面中,使用两种或更多种防腐剂的混合物。该防腐剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.0001%至约2%的量存在。载体描述于例如Remington's Pharmaceutical Sciences第16版,Osol,A.编辑(1980)中。药学上可接受的载体在所用的剂量和浓度下通常对接受者无毒,并且包括但不限于:缓冲剂,如磷酸盐、柠檬酸盐和其他有机酸;抗氧化剂,包括抗坏血

酸和甲硫氨酸;防腐剂(如十八烷基二甲基苄基氯化铵;六甲氯铵;苯扎氯铵;苄索氯铵;苯酚、丁醇或苄醇;烷基对羟基苯甲酸酯,如对羟基苯甲酸甲酯或对羟基苯甲酸丙酯;儿茶酚;间苯二酚;环己醇;3-戊醇;和间甲酚);低分子量(少于约10个残基)多肽;蛋白质,如血清白蛋白、明胶或免疫球蛋白;亲水性聚合物,如聚乙烯吡咯烷酮;氨基酸,如甘氨酸、谷氨酰胺、天冬酰胺、组氨酸、精氨酸或赖氨酸;单糖、二糖和其他碳水化合物,包括葡萄糖、甘露糖或糊精;螯合剂,如EDTA;糖类,如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇;成盐抗衡离子,如钠;金属络合物(例如锌-蛋白质络合物);和/或非离子表面活性剂,如聚乙二醇(PEG)。

[0518] 在一些方面中,缓冲剂被包括在该组合物中。合适的缓冲剂包括例如柠檬酸、柠檬酸钠、磷酸、磷酸钾和各种其他酸和盐。在一些方面中,使用两种或更多种缓冲剂的混合物。该缓冲剂或其混合物通常以按总组合物的重量计约0.001%至约4%的量存在。用于制备可给予的药物组合物的方法是已知的。示例性方法在例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams&Wilkins;第21版(2005年5月1日)中更详细地描述。

[0519] 该抗体的制剂可以包括冻干制剂和水溶液。

[0520] 该制剂或组合物还可以含有可用于用该结合分子或细胞治疗的特定适应症、疾病或病症的多于一种的活性成分,优选地具有与该结合分子或细胞互补的活性的那些,其中各活性不会相互产生不利影响。此类活性成分合适地以对预期目的有效的量组合地存在。因此,在一些实施方案中,该药物组合物还包括其他药学活性剂或药物,如化学治疗剂,例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春花碱、长春新碱等。在一些实施方案中,将该细胞或抗体以盐(例如,药学上可接受的盐)的形式给予。合适的药学上可接受的酸加成盐包括衍生自无机酸的那些,该无机酸是如盐酸、氢溴酸、磷酸、偏磷酸、硝酸和硫酸,以及衍生自有机酸的那些,该有机酸是如酒石酸、乙酸、柠檬酸、苹果酸、乳酸、富马酸、苯甲酸、乙醇酸、葡萄糖酸、琥珀酸和芳基磺酸(例如,对甲苯磺酸)。

[0521] 可以将活性成分包埋在微胶囊、胶体药物递送系统(例如,脂质体、白蛋白微球、微乳液、纳米颗粒和纳米胶囊)或粗乳液中。在某些实施方案中,将该药物组合物配制为包合物(如环糊精包合物)或配制成脂质体。脂质体可以用于将该宿主细胞(例如,T细胞或NK细胞)靶向特定组织。许多方法可用于制备脂质体,如在例如Szoka等人, Ann.Rev.Biophys.Bioeng., 9:467 (1980)以及美国专利4,235,871、4,501,728、4,837,028和5,019,369中所述的那些。

[0522] 在一些方面中,该药物组合物可以利用时间释放、延迟释放和持续释放递送系统,使得该组合物的递送发生在待治疗部位的致敏之前并且有足够的时间引起致敏。许多类型的释放递送系统是可行的并且是已知的。此类系统可以避免重复给予该组合物,从而增加对受试者和医师的便利性。

[0523] 在一些实施方案中,该药物组合物含有有效治疗或预防该疾病或病症的量(如治疗有效量或预防有效量)的结合分子和/或细胞。在一些实施方案中,通过定期评估所治疗的受试者来监测治疗或预防功效。对于数天或更长时间的重复给予,取决于病症,重复该治疗直至出现所需疾病症状的抑制。然而,其他剂量方案可能是有用的并且可以确定。所需剂量可以通过单次推注给予该组合物、通过多次推注给予该组合物或通过连续输注给予该组

合物来递送。

[0524] 可以使用标准给予技术、制剂和/或装置来给予该细胞。提供了用于储存和给予该组合物的制剂和装置(如注射器和小瓶)。该细胞的给予可以是自体的或异源的。例如,免疫应答细胞或祖细胞可以从一名受试者获得,并且给予同一受试者或不同的相容受试者。外周血衍生的免疫应答细胞或其后代(例如,体内、离体或体外衍生的)可以经由局部注射(包括导管给予)、全身注射、局部注射、静脉内注射或肠胃外给予来给予。当给予治疗组合物(例如,含有遗传修饰的免疫应答细胞的药物组合物)时,通常将其配制成单位剂量可注射形式(溶液、悬浮液、乳液)。

[0525] 制剂包括用于口服、静脉内、腹膜内、皮下、经肺、透皮、肌内、鼻内、经颊、舌下或栓剂给予的那些。在一些实施方案中,肠胃外给予该细胞群。如本文所用的术语“肠胃外”包括静脉内、肌内、皮下、直肠、阴道和腹膜内给予。在一些实施方案中,使用通过静脉内、腹膜内或皮下注射的外周全身递送将该细胞群给予受试者。

[0526] 在一些实施方案中,组合物作为无菌液体制剂(例如,等渗水溶液、悬浮液、乳液、分散体或黏性组合物,其在一些方面中可以缓冲至所选pH)提供。液体制剂一般比凝胶、其他黏性组合物和固体组合物制备起来更容易。另外地,液体组合物稍微更方便给予,特别是通过注射。在另一方面,黏性组合物可以配制在适当的黏度范围内,以提供与特定组织的更长的接触时间。液体或黏性组合物可以包含载体,其可以是溶剂或分散介质,其含有例如水、盐水、磷酸盐缓冲盐水、多元醇(例如,甘油、丙二醇、液体聚乙二醇)及其合适的混合物。

[0527] 无菌可注射溶液可以通过将该结合分子掺入溶剂中来制备,例如与合适的载体、稀释剂或赋形剂(如无菌水、生理盐水、葡萄糖、右旋糖等)混合。该组合物也可以是冻干的。该组合物可以含有辅助物质,如润湿剂、分散剂或乳化剂(例如,甲基纤维素)、pH缓冲剂、胶凝或黏度增强添加剂、防腐剂、调味剂、颜料等,这取决于所需的给予和制备的途径。在一些方面中,可以参考标准文本来制备合适的制剂。

[0528] 可以添加各种增强该组合物的稳定性和无菌性的添加剂,包括抗微生物防腐剂、抗氧化剂、螯合剂和缓冲剂。防止微生物的作用可以通过不同的抗细菌和抗真菌剂(例如,对羟基苯甲酸酯、三氯叔丁醇、苯酚、抗坏血酸等)来确保。通过使用延迟吸收的试剂(例如单硬脂酸铝和明胶)可以实现可注射药物形式的延长吸收。

[0529] 可以制备持续释放制剂。持续释放制剂的合适实例包括含有该抗体的固体疏水聚合物的半透性基质,该基质呈成型制品(例如薄膜或微胶囊)的形式。

[0530] 用于体内给予的制剂通常是无菌的。例如,通过无菌过滤膜过滤可以容易地实现无菌。

[0531] B. 给予方法和细胞在过继细胞疗法中的用途

[0532] 还提供了用于使用该TCR或TCR样结合分子或抗原结合片段(包括嵌合受体(例如CAR))和/或表达该分子或抗原受体的工程化的细胞的方法以及该TCR或TCR样结合分子或抗原结合片段(包括嵌合受体(例如CAR))和/或表达该分子或抗原受体的工程化的细胞的用途。此类方法和用途包括治疗方法和用途,例如涉及向受试者给予该分子、细胞或含有其的组合物,用于靶向与疾病、病症或障碍相关的抗原的MHC限制性肽表位,该抗原包括参与恶性肿瘤或细胞转化(例如癌症)、自身免疫或炎症疾病的抗原或衍生自病毒病原体或细菌病原体的抗原。

[0533] 在一些实施方案中,以实现该疾病或障碍的治疗的有效量给予该分子、细胞和/或组合物。用途包括该分子或细胞在此类方法和治疗中以及在制备药物以实施此类治疗方法中的用途。在一些实施方案中,通过向患有或怀疑患有该疾病或病症的受试者给予该分子或细胞或包含其的组合物来进行。在一些实施方案中,该方法由此治疗该受试者的该疾病或病症或障碍。

[0534] 如本文所用的,“治疗(treatment)”(及其语法变体,如“治疗(treat或treating)”)是指疾病或病症或障碍,或与其相关的症状、不良反应或结果、或表型的完全或部分减轻或减少。所希望的治疗效果包括但不限于预防疾病的发生或复发、症状的缓和、疾病的任何直接或间接病理后果的减少、预防转移、降低疾病进展的速度、减轻或减缓疾病状态以及缓解或改善预后。该术语并不暗示完全治愈疾病或完全消除任何症状或对所有症状或结果的影响。

[0535] 如本文所用的,“延迟疾病的发展”意指推迟、阻碍、减慢、延缓、稳定、抑制和/或延期疾病(如癌症)的发展。此延迟可以具有不同的时间长度,这取决于病史和/或所治疗的个体。对于本领域技术人员显而易见的是,足够或显著的延迟实际上可以涵盖预防,因为个体不会患上疾病。例如,可能延迟晚期癌症,如转移的发展。

[0536] 如本文所用的,“预防”包括提供关于受试者的疾病的发生或复发的预防,该受试者可能易患该疾病但尚未被诊断患有该疾病。在一些实施方案中,所提供的分子和组合物用于延迟疾病的发展或减慢疾病的进展。

[0537] 如本文所用的,“抑制”功能或活性是当与除了目标条件或参数之外在其他方面相同的条件相比时,或者可替代地,与另一种情况相比时,减少功能或活性。例如,与不存在抗体或组合物或细胞的情况下的肿瘤生长速率相比,抑制肿瘤生长的该抗体或组合物或细胞降低肿瘤的生长速率。

[0538] 在给予的背景下,药剂(例如,药物制剂、结合分子、抗体或细胞或组合物)的“有效量”是指以剂量/量计并且持续所需的时间段有效实现所需结果(如治疗或预防结果)的量。

[0539] 药剂(例如,药物制剂、抗体或细胞)的“治疗有效量”是指以剂量计并且持续所需的时间段有效实现所需治疗结果(如用于治疗疾病、病症或障碍,和/或治疗的药代动力学或药效动力学作用)的量。该治疗有效量可以根据诸如疾病状态、受试者的年龄、性别和体重以及给予的细胞群等因素而变化。在一些实施方案中,所提供的方法涉及以有效量(例如,治疗有效量)给予该分子、细胞和/或组合物。

[0540] “预防有效量”是指以剂量计并且持续所需的时间段有效实现所需预防结果的量。通常但不是必须的,因为预防剂量是在疾病之前或早期在受试者体内使用的,所以预防有效量将小于治疗有效量。

[0541] 所治疗的疾病或病症可以是任何疾病或病症,其中抗原的表达与疾病状况或障碍的病因学相关和/或参与其中,例如导致、加剧这种疾病、病症或障碍或以其他方式参与其中。示例性疾病和病症可以包括与恶性肿瘤或细胞转化(例如癌症)、自身免疫或炎性疾病或例如由细菌、病毒或其他病原体引起的感染性疾病相关的疾病或病症。上文描述了示例性抗原,其包括与可以治疗的各种疾病和病症相关的抗原。在具体实施方案中,该嵌合抗原受体或转基因TCR与和该疾病或病症相关的抗原特异性结合。

[0542] 在一些实施方案中,该方法包括过继细胞疗法,由此将表达所提供的靶向MHC限制

性表位的分子遗传工程化的细胞(例如,表达TCR或TCR样CAR的细胞)给予受试者。这种给予能以抗原靶向的方式促进细胞激活(例如,T细胞激活),使得该疾病或障碍的细胞被靶向用于破坏。

[0543] 因此,所提供的方法和用途包括用于过继细胞疗法的方法和用途。在一些实施方案中,该方法包括将该细胞或含有该细胞的组合物给予受试者、组织或细胞,如患有、有风险患上或怀疑患有该疾病、病症或障碍的受试者、组织或细胞。在一些实施方案中,将该细胞、群体和组合物给予患有待治疗的特定疾病或病症的受试者,例如经由过继细胞疗法,如过继T细胞疗法。在一些实施方案中,将该细胞或组合物给予该受试者,如患有或有风险患上该疾病或病症的受试者。在一些方面中,该方法由此治疗(例如,减轻)该疾病或病症的一种或多种症状。

[0544] 用于过继细胞疗法的细胞的给予方法是已知的,并且可以与所提供的方法和组合物一起使用。例如,过继T细胞疗法方法描述于例如Gruenberg等人的美国专利申请公开号2003/0170238;Rosenberg的美国专利号4,690,915;Rosenberg(2011)Nat Rev Clin Oncol.8(10):577-85)中。参见例如,Themeli等人(2013)Nat Biotechnol.31(10):928-933;Tsukahara等人(2013)Biochem Biophys Res Commun 438(1):84-9;Davila等人(2013)PLoS ONE 8(4):e61338。

[0545] 在一些实施方案中,该细胞疗法(例如过继细胞疗法,例如过继T细胞疗法)通过自体转移进行,其中从接受该细胞疗法的受试者或从衍生自这种受试者的样品中分离和/或以其他方式制备该细胞。因此,在一些方面中,该细胞来源于需要治疗的受试者(例如,患者),并且在分离和加工后将该细胞给予同一受试者。

[0546] 在一些实施方案中,该细胞疗法(例如过继细胞疗法,例如过继T细胞疗法)通过同种异体转移进行,其中从将要接受或最终接受该细胞疗法的受试者以外的受试者(例如,第一受试者)分离和/或以其他方式制备该细胞。在这样的实施方案中,然后将该细胞给予相同物种的不同受试者,例如第二受试者。在一些实施方案中,该第一和第二受试者在遗传上是相同的。在一些实施方案中,该第一和第二受试者在遗传上是相似的。在一些实施方案中,该第二受试者与该第一受试者表达相同的HLA类别或超类型。

[0547] 在一些实施方案中,给予该细胞、细胞群或组合物的受试者是灵长类动物,如人。在一些实施方案中,该灵长类动物是猴或猿。该受试者可以是雄性或雌性,并且可以处于任何合适的年龄,包括婴儿、幼年、青春期、成年和老年受试者。在一些实施方案中,该受试者是非灵长类哺乳动物,如啮齿动物。在一些例子中,该患者或受试者是用于疾病、过继细胞疗法和/或用于评估毒性结果(如细胞因子释放综合征(CRS))的经验证的动物模型。

[0548] 该结合分子(如TCR、TCR样抗体)和含有TCR样抗体的嵌合受体(例如CAR)以及表达其的细胞可以通过任何合适的方式给予,例如通过注射,例如静脉内或皮下注射、眼内注射、眼周注射、视网膜下注射、玻璃体内注射、经中隔注射、巩膜下注射、脉络膜内注射、前房内注射、结膜下注射(subconjunctival injection,subconjunctival injection)、眼球筋膜下(sub-Tenon)注射、眼球后注射、眼球周注射或后近巩膜(posterior juxtasclearal)递送。在一些实施方案中,它们通过肠胃外、肺内和鼻内给予,并且如果需要局部治疗,则通过病灶内给予。肠胃外输注包括肌内、静脉内、动脉内、腹膜内或皮下给予。给药和给予可以部分取决于给予是短暂的还是长期的。各种给药方案包括但不限于在不同时间点的单次或多

次给予、推注给予和脉冲输注。

[0549] 为了预防或治疗疾病,该结合分子或细胞的适当剂量可以取决于待治疗的疾病类型、结合分子的类型、疾病的严重程度和病程、给予该结合分子用于预防还是治疗目的、之前疗法、患者的临床病史和对该结合分子的反应以及主治医师的判断。在一些实施方案中,该组合物和分子和细胞合适地一次或在一系列治疗中给予该患者。

[0550] 取决于疾病的类型和严重程度,结合分子(例如TCR或TCR样抗体)的剂量可以包括约1 μ g/kg至15mg/kg(例如0.1mg/kg-10mg/kg)、约1 μ g/kg至100mg/kg或更多、约0.05mg/kg至约10mg/kg、0.5mg/kg、2.0mg/kg、4.0mg/kg或10mg/kg。可以间歇地给予多个剂量,例如每周或每三周一次。可以给予初始较高负荷剂量,然后给予一个或多个较低剂量。

[0551] 在某些实施方案中,该细胞或细胞亚型的个体群体以约100万至约1000亿个细胞和/或该细胞量每公斤体重(像例如100万至约500亿个细胞(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400亿个细胞或由前述值中的任两个所限定的范围),如约1000万至约1000亿个细胞(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900亿个细胞或由前述值中的任两个所限定的范围),并且在一些情况下约1亿个细胞至约500亿个细胞(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450亿个细胞或在这些范围之间的任何值)和/或每公斤体重的范围给予受试者。剂量可以根据疾病或障碍和/或患者和/或其他治疗特有的属性而变化。

[0552] 在一些实施方案中,例如,在该受试者是人的情况下,该剂量包括少于约 1×10^8 个总重组受体(例如,CAR)表达细胞、T细胞或外周血单核细胞(PBMC),例如范围为约 1×10^6 至 1×10^8 个此类细胞,如 2×10^6 、 5×10^6 、 1×10^7 、 5×10^7 或 1×10^8 个或总的此类细胞或前述值中的任两个之间的范围。

[0553] 在一些实施方案中,将该细胞或结合分子(例如TCR或TCR样抗体)作为组合治疗的一部分与另一种治疗性干预(如另一种抗体或工程化的细胞或受体或药剂,如细胞毒性剂或治疗剂)例如同时或以任何顺序依次给予。

[0554] 在一些实施方案中,将该细胞或结合分子(例如TCR或TCR样抗体)与一种或多种另外的治疗剂或与另一种治疗性干预同时或以任何顺序依次共同给予。在一些情境下,将该细胞与另一种疗法在时间上足够接近地共同给予,使得该细胞群增强一种或多种另外的治疗剂的效果,或反之亦然。在一些实施方案中,在该一种或多种另外的治疗剂之前给予该细胞或结合分子(例如TCR或TCR样抗体)。在一些实施方案中,在该一种或多种另外的治疗剂之后给予该细胞或结合分子(例如TCR或TCR样抗体)。

[0555] 一旦将该细胞给予哺乳动物(例如,人),在一些方面中,便通过许多已知方法中的任何一种来测量该工程化的细胞群和/或结合分子(例如TCR或TCR样抗体)的生物活性。要评估的参数包括工程化或天然T细胞或其他免疫细胞与抗原的体内(例如通过成像)或离体(例如通过ELISA或流式细胞术)的特异性结合。在某些实施方案中,可以使用本领域已知的任何合适的方法(如描述于例如Kochenderfer等人,J.Immunotherapy,32(7):689-702(2009)和Herman等人J.Immunological Methods,285(1):25-40(2004)中的细胞毒性测定)

测量该工程化的细胞破坏靶细胞的能力。在某些实施方案中,还可以通过测定某些细胞因子(如CD107a、IFN γ 、IL-2和TNF)的表达和/或分泌来测量该细胞的生物活性。在一些方面中,通过评估临床结果(如肿瘤负担或负荷的减少)来测量生物活性。

[0556] 在某些实施方案中,工程化的细胞以任何数量的方式进行修饰,使得其治疗或预防功效增加。例如,由该群体表达的工程化的CAR或TCR可以直接或通过接头间接缀合至靶向部分。将化合物(例如,CAR或TCR)与靶向部分缀合的实践在本领域是已知的。参见例如,Wadwa等人,J Drug Targeting 3:111(1995)和美国专利5,087,616。

[0557] V. 定义

[0558] 如本文所用的,单数形式“一种/个(a/an)”和“该(the)”包括复数种/个指示物,除非上下文另外明确说明。例如,“一种/个(a或an)”意指“至少一种/个”或“一种/个或多种/个”。应理解,本文描述的方面和变化包括“由方面和变化组成”和/或“基本上由方面和变化组成”。

[0559] 贯穿本公开文本,所要求保护的主题的各个方面以范围形式呈现。应理解的是,范围形式的描述仅仅是为了方便和简洁,并且不应该被解释为对所要求保护的主题的范围的不能转变的限制。因此,应该认为范围的描述具体公开了所有可能的子范围以及该范围内的单个数值。例如,在提供了值的范围的情况下,应理解,在该范围的上限和下限之间的每个中间值以及在所陈述范围内的任何其他所述或中间值涵盖在所要求保护的主题内。这些较小范围的上限和下限可以独立地被包括在该较小范围内,并且也涵盖在所要求保护的主题内,受制于在所陈述范围内任何确切排除的限制。在所陈述范围包括限制中的一者或两者的情况下,排除了那些包括的限制中的任一者或两者的范围也包括在所要求保护的主题内。无论范围的广度如何,这都适用。

[0560] 如本文所用的术语“约”是指本技术领域的技术人员容易知道的相应值的通常误差范围。本文对“约”某一值或参数的提及包括(并描述)针对该值或参数本身的实施方案。例如,涉及“约X”的描述包括“X”的描述。

[0561] 如本文所用的,就肽、蛋白质或多肽而论,“分离的”或“纯化的”是指基本上不含所有其他多肽、污染物、起始试剂或其他材料,或当化学合成时基本上不含化学前体或其他化学品的分子。如果如通过本领域技术人员用于评估这种纯度的诸如高效液相层析(HPLC)、薄层层析(TLC)或毛细管电泳(CE)等标准分析方法确定的,制剂看起来不含容易检测到的杂质,或者足够纯使得进一步的纯化不会可检测地改变该物质的物理和化学性质的话,可以确定它们基本上是游离的。

[0562] 如本文所用的,术语“重组”是指通过引入外源(如异源)核酸分子而被修饰的细胞、微生物、核酸分子或载体,或者是指已经被改变使得内源核酸分子或基因的表达受到控制、去调节或是组成型的细胞或微生物,其中此类改变或修饰可以通过遗传工程引入。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)的修饰或其他核酸分子添加、缺失、取代或对细胞遗传材料的其他功能性破坏或添加。示例性修饰包括来自参考或亲本分子的异源或同源多肽的编码区或其功能片段中的修饰。

[0563] 如本文所用的,组合物是指两种或更多种产物、物质或化合物(包括细胞)的任何混合物。其可以是溶液、悬浮液、液体、粉末、糊剂、水性、非水性或其任何组合。

[0564] 如本文所用的,细胞或细胞群对特定标记呈“阳性”的陈述是指特定标记(通常为表面标记)在细胞上或细胞中的可检测的存在。当提及表面标记时,该术语是指如通过流式细胞术检测到的,表面表达的存在,例如通过用与该标记特异性结合的抗体进行染色并检测所述抗体,其中该染色通过流式细胞术以如下水平是可检测的,该水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色,和/或该水平基本上与已知对该标记呈阳性的细胞的水平相似,和/或该水平基本上高于已知对该标记呈阴性的细胞的水平。

[0565] 如本文所用的,细胞或细胞群对特定标记呈“阴性”的陈述是指特定标记(通常为表面标记)在细胞上或细胞中不存在实质上可检测的存在。当提及表面标记时,该术语是指如通过流式细胞术检测到的,表面表达的不存在,例如通过用与该标记特异性结合的抗体进行染色并检测所述抗体,其中该染色通过流式细胞术以如下水平没有检测到,该水平基本上高于在其他方面相同的条件下用同种型匹配对照进行相同程序检测到的染色,和/或该水平基本上低于已知对该标记呈阳性的细胞的水平,和/或该水平与已知对该标记呈阴性的细胞的水平相比是基本上相似的。

[0566] 如本文所用的,术语“载体”是指能够繁殖与其连接的另一种核酸的核酸分子。该术语包括作为自我复制核酸结构的载体以及掺入已引入其的宿主细胞基因组中的载体。某些载体能够指导它们可操作地连接的核酸的表达。此类载体在本文中称为“表达载体”。该载体包括病毒载体(如CMV载体),括具有携带另一种核酸的基因组并能够插入宿主基因组中以进行繁殖的那些。

[0567] 如本文所用的,“可操作地连接”是指组分(如编码序列(例如异源核酸)和核酸控制序列(例如调节序列))以当它们以在将该编码序列的表达或转录和/或翻译置于该核酸控制序列的影响或控制下的方式共价连接时允许基因表达的方式的关联。因此,这意味着所描述的组分处于允许它们以其预期方式起作用的关系。

[0568] 如本文所用的,术语“表达”是指借此基于核酸分子(如基因)的编码序列产生多肽的过程。该过程可以包括转录、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。

[0569] 在向细胞中插入核酸分子的背景下的术语“引入”意指“转染”或“转化”或“转导”,并且包括对将核酸分子掺入真核或原核细胞中的提及,其中该核酸分子可以掺入细胞的基因组(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,转染的mRNA)。

[0570] 如本文所用的,“受试者”是哺乳动物,如人或其他动物,并且通常是人。

[0571] 如本文所用的,对照是指除了没有用测试参数处理外与测试样品基本上相同的样品,或者如果是血浆样品,它可以来自不受目标条件影响的正常志愿者。对照也可以是内部对照。

[0572] 除非另外定义,否则本文使用的所有领域术语、符号和其他技术和科学术语或命名旨在具有与所要求保护的主体所属领域的普通技术人员通常理解的含义相同的含义。在一些情况下,为了清楚和/或为了便于参考而在本文中定义具有通常理解的含义的术语,并且本文中包含的此类定义不应被解释为表示与本领域通常理解的实质性差异。

[0573] 本申请中提及的所有出版物(包括专利文献、科学文章和数据库)出于所有目的通

过引用以其整体并入,在程度上如同每个单独的出版物通过引用单独并入。如果本文所述的定义与通过引用并入本文的专利、申请、公开的申请和其他出版物中所述的定义相反或在其他方面不一致,则本文所述的定义优先于通过引用并入本文的定义。

[0574] 本文使用的章节标题只是出于组织的目的,而不应解释为限制所描述的主题。

[0575] VI. 示例性实施方案

[0576] 本文所提供的实施方案包括:

[0577] 1. 一种鉴定肽表位的方法,其包括:

[0578] a) 向细胞中引入包含编码靶抗原的异源核酸的重组巨细胞病毒 (CMV) 载体颗粒;
并且

[0579] b) 检测或鉴定在该细胞的表面上的在MHC分子的背景下的一种或多种肽,其中在MHC分子的背景下的该一种或多种肽包含该靶抗原的肽表位。

[0580] 2. 实施方案1的方法,其还包括在该细胞上鉴定与在MHC分子的背景下的该一种或多种肽中的至少一种结合的肽结合分子或其抗原结合片段。

[0581] 3. 一种鉴定与肽表位结合的肽结合分子或其抗原结合片段的方法,其包括:

[0582] a) 向细胞中引入包含编码靶抗原的异源核酸的重组巨细胞病毒 (CMV) 载体颗粒;
并且

[0583] b) 在该细胞上鉴定与在MHC分子的背景下的至少一种肽结合的肽结合分子或其抗原结合片段。

[0584] 4. 实施方案3的方法,其包括在步骤b) 之前或之后,通过检测或鉴定在该细胞的表面上的在MHC分子的背景下的一种或多种肽来鉴定该肽表位。

[0585] 5. 实施方案1-4中任一项的方法,其中该CMV载体颗粒不表达活性UL128和/或UL130蛋白或其直系同源物。

[0586] 6. 实施方案1-5中任一项的方法,其中该CMV载体颗粒在编码UL128和/或UL130的开放阅读框或编码UL128和/或UL130的直系同源物的开放阅读框中被改变。

[0587] 7. 实施方案1-6中任一项的方法,其中:

[0588] 该CMV载体颗粒不表达活性UL128和UL130蛋白或UL128和UL130蛋白的直系同源物;或者

[0589] 该CMV载体颗粒在编码UL128和UL130的开放阅读框或编码UL128和UL130的直系同源物的开放阅读框中被改变。

[0590] 8. 实施方案1-7中任一项的方法,其中该CMV载体颗粒在编码UL128和/或UL130或其直系同源物的开放阅读框中包含点突变、移码突变或缺失。

[0591] 9. 实施方案1-8中任一项的方法,其中该CMV载体颗粒是哺乳动物CMV载体颗粒。

[0592] 10. 实施方案1-9中任一项的方法,其中该CMV载体颗粒是灵长类动物或人CMV载体颗粒。

[0593] 11. 实施方案1-10中任一项的方法,其中该CMV载体颗粒是恒河猴CMV载体颗粒。

[0594] 12. 实施方案11的方法,其中该CMV载体颗粒是RhCMV 68-1。

[0595] 13. 实施方案1-10中任一项的方法,其中该CMV载体颗粒是人CMV载体颗粒。

[0596] 14. 实施方案1-13中任一项的方法,其中该CMV载体颗粒包含与亲本CMV基因组相比在编码UL128和/或UL130的开放阅读框中已经被修饰的基因组。

- [0597] 15. 实施方案14的方法, 其中与亲本CMV基因组相比, 编码UL128和/或UL130的开放阅读框的全部或功能活性部分被缺失。
- [0598] 16. 实施方案14或实施方案15的方法, 其中该亲本CMV基因组是选自AD169、Davis、Toledo、Towne或Merlin、其感染性细菌人工染色体(BAC)或临床分离株的人CMV基因组。
- [0599] 17. 实施方案1-16中任一项的方法, 其中该CMV载体颗粒还不表达活性UL11蛋白或UL11蛋白的直系同源物, 或者在编码UL11或UL11的直系同源物的开放阅读框中被改变。
- [0600] 18. 实施方案1-17中任一项的方法, 其中该MHC分子是MHC Ia类、MHC II类或MHC-E分子。
- [0601] 19. 实施方案1-18中任一项的方法, 其中该细胞是原代细胞或是细胞系。
- [0602] 20. 实施方案1-19中任一项的方法, 其中该细胞能够被该CMV载体颗粒感染。
- [0603] 21. 实施方案1-20中任一项的方法, 其中该细胞选自成纤维细胞、内皮细胞、B细胞、树突细胞、巨噬细胞和人工抗原呈递细胞。
- [0604] 22. 实施方案1-21中任一项的方法, 其中该细胞是成纤维细胞。
- [0605] 23. 实施方案22的方法, 其中该成纤维细胞是细胞系或原代成纤维细胞。
- [0606] 24. 实施方案1-23中任一项的方法, 其中该细胞是人细胞。
- [0607] 25. 实施方案1-24中任一项的方法, 其中该MHC分子是人的。
- [0608] 26. 实施方案1-25中任一项的方法, 其中该MHC分子是选自HLA-A2、HLA-A1、HLA-A3、HLA-A24、HLA-A28、HLA-A31、HLA-A33、HLA-A34、HLA-B7、HLA-B45和HLA-Cw8的MHC Ia类分子。
- [0609] 27. 实施方案1-26中任一项的方法, 其中该MHC分子是MHC Ia类分子, 其为HLA-A*24、HLA-A*02或HLA-A*01。
- [0610] 28. 实施方案1-25中任一项的方法, 其中该MHC分子是选自HLA-DR1、HLA-DR3、HLA-DR4、HLA-DR7、HLA-DR52、HLA-DQ1、HLA-DQ2、HLA-DQ4、HLA-DQ8和HLA-DP1的MHC II类分子。
- [0611] 29. 实施方案1-25中任一项的方法, 其中该MHC分子是MHC-E分子, 其为HLAE*01:01或HLAE*0103。
- [0612] 30. 实施方案1-29中任一项的方法, 其中该细胞被遗传地或重组地工程化以表达该MHC分子。
- [0613] 31. 实施方案1-30中任一项的方法, 其中:
- [0614] (1) 在向该细胞中引入该CMV载体颗粒之前或与此同时, 已经将或将该细胞与激活剂或刺激剂一起孵育; 或者
- [0615] (2) 该方法还包括在向该细胞中引入该CMV载体颗粒之前或与此同时, 将该细胞与激活剂或刺激剂一起孵育。
- [0616] 32. 实施方案31的方法, 其中与不存在所述激活或刺激的情况下该细胞的表面上该MHC分子的存在相比, 与该激活或刺激条件一起孵育增加该细胞的表面上该MHC分子的存在。
- [0617] 33. 实施方案31或实施方案32的方法, 其中表达增加至少1.2倍、1.5倍、2倍、3倍、4倍、5倍、6倍、7倍、8倍、9倍或10倍。
- [0618] 34. 实施方案31-33中任一项的方法, 其中该激活或刺激在干扰素 γ 的存在下实现。

[0619] 35. 实施方案1-25和28-34中任一项的方法, 其中该细胞在编码该细胞中的MHC Ia类分子的基因中被阻遏和/或被破坏和/或该细胞不表达MHC Ia类分子。

[0620] 36. 实施方案35的方法, 其中编码该MHC Ia类分子的基因是HLA-A、HLA-B或HLA-C基因。

[0621] 37. 实施方案35或实施方案36的方法, 其中该阻遏由抑制性核酸分子实现。

[0622] 38. 实施方案37的方法, 其中该抑制性核酸分子包含RNA干扰剂。

[0623] 39. 实施方案37或实施方案38的方法, 其中该抑制性核酸分子是或包含或编码小干扰RNA(siRNA)、微小RNA改造的shRNA、短发夹RNA(shRNA)、发夹siRNA、微小RNA(miRNA前体)或微小RNA(miRNA)。

[0624] 40. 实施方案35或实施方案36的方法, 其中该基因的破坏由基因编辑核酸酶、锌指核酸酶(ZFN)、成簇的规则间隔短回文核酸(CRISPR)/Cas9和/或TAL效应核酸酶(TALEN)介导。

[0625] 41. 实施方案35-40中任一项的方法, 其中与不存在所述破坏的情况下该细胞中的表达相比, 该MHC Ia类分子在该细胞中的表达降低至少50%、60%、70%、80%、90%或95%。

[0626] 42. 实施方案1-41中任一项的方法, 其中该靶抗原是蛋白质或多肽。

[0627] 43. 实施方案1-42中任一项的方法, 其中该靶抗原是肿瘤抗原、自身免疫抗原、炎性抗原或病原性抗原。

[0628] 44. 实施方案43的方法, 其中该病原性抗原是细菌抗原或病毒抗原。

[0629] 45. 实施方案1-44中任一项的方法, 其中该靶抗原是已知或预先确定的。

[0630] 46. 实施方案1-43中任一项的方法, 其中该靶抗原是肿瘤抗原, 并且该肿瘤抗原选自神经胶质瘤相关抗原、 β -人绒毛膜促性腺激素、甲胎蛋白(AFP)、凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN--CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、黑色素-A/MART-1、WT-1、S-100、MBP、CD63、MUC1(例如MUC1-8)、p53、Ras、细胞周期蛋白B1、HER-2/neu、癌胚抗原(CEA)、gp100、MAGE-A1、MAGE-A2、MAGE-A3、MAGE-A4、MAGE-A5、MAGE-A6、MAGE-A7、MAGE-A8、MAGE-A9、MAGE-A10、MAGE-A11、MAGE-A11、MAGE-B1、MAGE-B2、MAGE-B3、MAGE-B4、MAGE-C1、BAGE、GAGE-1、GAGE-2、p15、酪氨酸酶(例如酪氨酸酶相关蛋白1(TRP-1)或酪氨酸酶相关蛋白2(TRP-2))、 β -连环蛋白、NY-ESO-1、LAGE-1a、PP1、MDM2、MDM4、EGVfVIII、Tax、SSX2、端粒酶、TARP、pp65、CDK4、波形蛋白、S100、eIF-4A1、IFN诱导型p78、和黑素转铁蛋白(p97)、尿路斑块蛋白II、前列腺特异性抗原(PSA)、人激肽释放酶(huK2)、前列腺特异性膜抗原(PSM)、和前列腺酸性磷酸酶(PAP)、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白B2、BA-46、Bcr-abl、E2A-PRL、H4-RET、IGH-IGK、MYL-RAR、半胱天冬酶8、FRa、CD24、CD44、CD133、CD166、epCAM、CA-125、HE4、Oval、雌激素受体、孕酮受体、uPA、PAI-1、CD19、CD20、CD22、ROR1、CD33/IL3Ra、c-Met、PSMA、糖脂F77、GD-2、胰岛素生长因子(IGF)-I、IGF-II、IGF-I受体和间皮素。

[0631] 47. 实施方案1-44中任一项的方法, 其中该靶抗原是选自甲型肝炎病毒、乙型肝炎病毒、丙型肝炎病毒(HCV)、人乳头瘤病毒(HPV)、肝炎病毒感染、爱泼斯坦-巴尔病毒(EBV)、人疱疹病毒8(HHV-8)、人T细胞白血病病毒-1(HTLV-1)、人T细胞白血病病毒-2(HTLV-2)和巨细胞病毒(CMV)的病毒抗原。

[0632] 48. 实施方案47的方法, 其中该病毒抗原是选自HPV-16、HPV-18、HPV-31、HPV-33和HPV-35的HPV抗原。

[0633] 49. 实施方案47的方法, 其中该病毒抗原是选自爱泼斯坦-巴尔核抗原(EBNA)-1、EBNA-2、EBNA-3A、EBNA-3B、EBNA-3C、EBNA-前导蛋白(EBNA-LP), 潜伏膜蛋白LMP-1、LMP-2A和LMP-2B, EBV-EA、EBV-MA和EBV-VCA的EBV抗原。

[0634] 50. 实施方案47的方法, 其中该病毒抗原是HTLV抗原, 其为TAX。

[0635] 51. 实施方案47的方法, 其中该病毒抗原是HBV抗原, 其为乙型肝炎核心抗原或乙型肝炎包膜抗原。

[0636] 52. 实施方案1-2和4-51中任一项的方法, 其中检测或鉴定在MHC分子的背景下的一种或多种肽包括从该细胞的裂解物中提取肽或从细胞表面洗脱肽。

[0637] 53. 实施方案1-2和4-51中任一项的方法, 其中检测或鉴定在MHC分子的背景下的一种或多种肽包括从该细胞中分离该一种或多种MHC分子并且从该MHC分子洗脱该一种或多种相关肽。

[0638] 54. 实施方案53的方法, 其中分离该一种或多种MHC分子包括溶解该细胞并且通过免疫沉淀或免疫亲和层析选择该MHC分子。

[0639] 55. 实施方案52-54中任一项的方法, 其中该一种或多种肽在弱酸或稀酸的存在下从该细胞的裂解物中提取或从细胞表面或MHC分子洗脱。

[0640] 56. 实施方案52-55中任一项的方法, 其包括分级、分离或纯化该一种或多种肽。

[0641] 57. 实施方案56的方法, 其包括对该一种或多种肽测序。

[0642] 58. 实施方案1-2和4-57中任一项的方法, 其包括确定在MHC分子的背景下鉴定的肽表位是否引发抗原特异性免疫应答。

[0643] 59. 实施方案58的方法, 其中该抗原特异性免疫应答是细胞毒性T细胞应答或体液T细胞应答。

[0644] 60. 实施方案59的方法, 其中该T细胞是原代T细胞或T细胞克隆。

[0645] 61. 实施方案60的方法, 其中该T细胞来源于健康或正常受试者或者携带病原体或携带肿瘤的受试者。

[0646] 62. 实施方案61的方法, 其中该携带病原体或携带肿瘤的受试者已经或可能已经暴露于该靶抗原。

[0647] 63. 实施方案61或实施方案62的方法, 其中该受试者是携带肿瘤的受试者, 并且该肿瘤是黑色素瘤、肉瘤、乳腺癌、肾癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、结肠直肠癌、胰腺癌、头颈部鳞状肿瘤或肺鳞癌。

[0648] 64. 实施方案63的方法, 其中该T细胞来源于正常或健康受试者, 并且该T细胞在体外用所鉴定的肽表位引发。

[0649] 65. 实施方案1-64中任一项的方法, 其包括:

[0650] 检测或鉴定在对照细胞的表面上形成的在MHC分子的背景下的一种或多种肽, 所述对照细胞未引入该CMV载体颗粒或引入了缺乏编码该靶抗原的异源核酸的CMV载体颗粒; 并且

[0651] 鉴定与该对照细胞相比引入了含有该异源核酸的CMV载体颗粒的细胞特有的在MHC分子的背景下的一种或多种肽, 从而鉴定该肽靶抗原的该一种或多种肽表位。

- [0652] 66. 实施方案1-65中任一项的方法, 其中该肽表位是非典型肽表位。
- [0653] 67. 实施方案1-66中任一项的方法, 其中该肽表位具有8至50个氨基酸、8至13个氨基酸、9至22个氨基酸或11至42个氨基酸的长度。
- [0654] 68. 实施方案1-67中任一项的方法, 其中该肽表位对所结合的MHC具有IC₅₀大于200nM、300nM、400nM、500nM、600nM、700nM、800nM、900nM、1000nM或更大的结合亲和力。
- [0655] 69. 实施方案1-68中任一项的方法, 其中该肽表位对所结合的MHC具有IC₅₀小于500nm、400nM、300nM、200nM、100nM、50nM或更小的结合亲和力。
- [0656] 70. 实施方案1-69中任一项的方法, 其中该肽表位能够在受试者体内诱导CD4+和/或CD8+免疫应答。
- [0657] 71. 实施方案1-70中任一项的方法, 其中该肽表位能够在该受试者体内诱导CD8+免疫应答。
- [0658] 72. 实施方案1-71中任一项的方法, 其中该肽表位是通用肽表位和/或超表位。
- [0659] 73. 实施方案1-72中任一项的方法, 其中该肽表位与相同类型或超类型的至少两种、至少三种、至少四种、至少五种或更多种MHC分子结合。
- [0660] 74. 实施方案70-73中任一项的方法, 其中该免疫应答在群体中的在MHC基因座处遗传上不同的大多数受试者中引发。
- [0661] 75. 实施方案74的方法, 其中该免疫应答在群体中大于50%、60%、70%、80%、90%或更多的受试者中引发。
- [0662] 76. 实施方案74或实施方案75的方法, 其中该受试者群体是人类。
- [0663] 77. 实施方案72-76中任一项的方法, 其中该通用肽表位或超表位能够结合MHC II类分子。
- [0664] 78. 实施方案77的方法, 其中该通用肽表位或超表位能够诱导CD8+ T细胞应答和/或CD4+ T细胞应答。
- [0665] 79. 实施方案77或实施方案78的方法, 其中该通用肽表位或超表位能够诱导CD8+ T细胞应答。
- [0666] 80. 实施方案72-76中任一项的方法, 其中该通用肽表位或超表位能够结合MHC E类分子。
- [0667] 81. 实施方案1-80中任一项的方法, 其在体外进行。
- [0668] 82. 一种通过实施方案1-2、4-81和138-140中任一项的方法鉴定的肽表位。
- [0669] 83. 实施方案82的肽表位, 其能够结合MHC Ia类分子。
- [0670] 84. 实施方案82的肽表位, 其能够结合MHC II类分子。
- [0671] 85. 实施方案82的肽表位, 其能够结合MHC E分子。
- [0672] 86. 一种稳定的MHC-肽复合物, 其包含在MHC分子的背景下的实施方案82-85中任一项的肽表位。
- [0673] 87. 实施方案86的稳定的MHC-肽复合物, 其存在于细胞表面上。
- [0674] 88. 实施方案2-81和138-140中任一项的方法, 其中该肽结合分子或其抗原结合片段的鉴定包括:
- [0675] i) 在该细胞上评估多种候选肽结合分子或其抗原结合片段与在MHC分子的背景下的该至少一种肽的结合; 并且

[0676] ii) 从该多种中鉴定与在MHC分子的背景下的该至少一种肽结合的一种或多种肽结合分子。

[0677] 89. 一种鉴定结合MHC-肽复合物的肽结合分子或其抗原结合片段的方法, 其包括:

[0678] a) 评估多种候选肽结合分子或其抗原结合片段与实施方案86或实施方案87的MHC-肽复合物的结合; 并且

[0679] b) 从该多种中鉴定与该复合物结合的一种或多种肽结合分子。

[0680] 90. 一种鉴定结合MHC-肽复合物的肽结合分子或其抗原结合片段的方法, 其包括:

[0681] a) 通过实施方案1-2、4-81和138-140中任一项的方法鉴定靶抗原的肽表位;

[0682] b) 评估多种候选肽结合分子或其抗原结合片段与包含该肽表位的稳定的MHC-肽复合物的结合; 并且

[0683] c) 从该多种中鉴定与该MHC-肽复合物结合的一种或多种肽结合分子或其抗原结合片段。

[0684] 91. 实施方案88-90中任一项的方法, 其中该多种候选肽结合分子包含一种或多种T细胞受体(TCR)、TCR的一个或多个抗原结合片段或者一种或多种抗体或其抗原结合片段。

[0685] 92. 实施方案89-91中任一项的方法, 其中该多种候选肽结合分子包含至少2、5、10、100、 10^3 、 10^4 、 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 种或更多的不同分子。

[0686] 93. 实施方案88-92中任一项的方法, 其中:

[0687] 该多种候选肽结合分子包含从来自受试者或受试者群体的样品获得的一种或多种候选肽结合分子; 或者

[0688] 该多种候选肽结合分子包含在从来自受试者的样品获得的亲本支架肽结合分子中包含突变的一种或多种候选肽结合分子。

[0689] 94. 实施方案93的方法, 其中该受试者或受试者群体是正常或健康受试者或者是患病受试者。

[0690] 95. 实施方案94的方法, 其中该患病受试者是携带肿瘤的受试者。

[0691] 96. 实施方案93-95中任一项的方法, 其中该候选肽结合分子包含TCR或其抗原结合片段, 并且该受试者已经用该靶抗原的肽表位接种。

[0692] 97. 实施方案93-96中任一项的方法, 其中该受试者是人或啮齿动物。

[0693] 98. 实施方案93-97的方法, 其中该受试者是HLA转基因小鼠和/或是人TCR转基因小鼠。

[0694] 99. 实施方案93-98中任一项的方法, 其中该候选肽结合分子包含TCR或其抗原结合片段, 并且该样品包含T细胞。

[0695] 100. 实施方案99的方法, 其中该样品包含外周血单核细胞(PBMC)或肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)。

[0696] 101. 实施方案91-100中任一项的方法, 其中TCR的该抗原结合片段是单链TCR(scTCR)。

[0697] 102. 实施方案93-97中任一项的方法, 其中该多种候选肽结合分子包含抗体或其抗原结合片段, 并且该样品包含B细胞。

[0698] 103. 实施方案102的方法, 其中该样品选自血液、骨髓和脾和/或该样品包含PBMC、脾细胞或骨髓细胞。

- [0699] 104. 实施方案102或实施方案103的方法, 其中该抗体或其抗原结合片段是IgM衍生的抗体或抗原结合片段。
- [0700] 105. 实施方案88-100和102-104中任一项的方法, 其中该候选肽结合分子存在于天然抗体文库中。
- [0701] 106. 实施方案88-100和102-105中任一项的方法, 其中该候选肽结合分子是单链可变片段(scFv)。
- [0702] 107. 实施方案88-106中任一项的方法, 其中与亲本肽结合分子相比, 该候选肽结合分子包含一个或多个氨基酸突变。
- [0703] 108. 实施方案107的方法, 其中该一个或多个氨基酸突变包含该分子的一个或多个互补决定区(CDR)中的突变。
- [0704] 109. 实施方案88-108中任一项的方法, 其中该候选肽结合分子存在于展示文库中。
- [0705] 110. 实施方案109的方法, 其中该展示文库选自细胞表面展示文库、噬菌体展示文库、核糖体展示文库、mRNA展示文库和dsDNA展示文库。
- [0706] 111. 实施方案88-92中任一项的方法, 其中在评估该多种候选肽结合分子或其抗原结合片段与该MHC-肽复合物的结合之前, 该方法包括:
- [0707] 用包含该MHC-肽复合物的免疫原免疫宿主; 并且
- [0708] 从该宿主收集样品, 其中该样品包含该候选肽结合分子。
- [0709] 112. 实施方案111的方法, 其中该宿主是人或啮齿动物。
- [0710] 113. 实施方案112的方法, 其中该样品是血液、血清或血浆。
- [0711] 114. 实施方案88-113中任一项的方法, 其中:
- [0712] 所鉴定的肽结合分子或其抗原结合片段对该MHC-肽复合物表现出解离常数(K_D)从或从约 10^{-5} M至 10^{-13} M、 10^{-5} M至 10^{-9} 或 10^{-7} M至 10^{-12} M的结合亲和力; 或者
- [0713] 所鉴定的肽结合分子对该MHC-肽复合物表现出 K_D 小于或小于约 10^{-5} M、 10^{-6} M、 10^{-7} M、 10^{-8} M、 10^{-9} M、 10^{-10} M、 10^{-11} M或更小的结合亲和力。
- [0714] 115. 一种通过实施方案88-114中任一项的方法鉴定的肽结合分子或其抗原结合片段。
- [0715] 116. 实施方案115的肽结合分子或其抗原结合片段, 其是TCR或其抗原结合片段。
- [0716] 117. 实施方案116的肽结合分子或其抗原结合片段, 其是抗体或其抗原结合片段。
- [0717] 118. 一种重组抗原受体, 其包含实施方案115-117中任一项的肽结合分子或其抗原结合片段。
- [0718] 119. 实施方案118的重组抗原受体, 其是嵌合抗原受体(CAR)。
- [0719] 120. 一种遗传工程化的细胞, 其表达实施方案116-118中任一项的肽结合分子或其抗原结合片段或者实施方案118或实施方案119的重组抗原受体。
- [0720] 121. 实施方案120的遗传工程化的细胞, 其是T细胞。
- [0721] 122. 实施方案121的遗传工程化的细胞, 其中该T细胞是CD4+或CD8+ T细胞。
- [0722] 123. 一种CD8+遗传工程化的细胞, 其表达肽结合分子或其抗原结合片段或者包含肽结合分子或其抗原结合片段的重组抗原受体, 其中该肽结合分子或其抗原结合片段特异性结合在MHC II类分子的背景下呈递的肽表位。

[0723] 124. 实施方案123的CD8+遗传工程化的细胞,其中该肽结合分子是抗体或其抗原结合片段。

[0724] 125. 实施方案124的CD8+遗传工程化的细胞,其中该重组抗原受体是T细胞受体(TCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

[0725] 126. 实施方案123-125中任一项的CD8+遗传工程化的细胞,其中该CD8+T细胞还表达第二肽结合分子或其抗原结合片段或者包含第二肽结合分子或其抗原结合片段的重组抗原受体,其中该第二肽结合分子或其抗原结合片段特异性结合在MHC Ia类分子或MHC-E分子的背景下呈递的肽表位。

[0726] 127. 一种组合物,其包含实施方案115-117中任一项的肽结合分子或其抗原结合片段、实施方案118或实施方案119的重组抗原受体或实施方案120-126中任一项的遗传工程化的细胞。

[0727] 128. 一种组合物,其包含CD4+和CD8+ T细胞,每个细胞被工程化以表达包含肽结合分子或其抗原结合片段的重组抗原受体,该肽结合分子或其抗原结合片段结合在MHC II类分子的背景下呈递的肽表位。

[0728] 129. 实施方案128的组合物,其中该CD4+和CD8+细胞表达相同的肽结合分子或其抗原结合片段。

[0729] 130. 实施方案128或实施方案129的组合物,其中该肽结合分子或其抗原结合片段是T细胞受体(TCR)、TCR的抗原结合片段、抗体或抗体的抗原结合片段。

[0730] 131. 实施例128-130中任一项的组合物,其中该重组抗原受体是嵌合抗原受体(CAR)。

[0731] 132. 实施方案128-131中任一项的组合物,其中该组合物中的CD8+ T细胞用包含第二肽结合分子或其抗原结合片段的重组抗原受体进一步工程化,该第二肽结合分子或其抗原结合片段与在MHC Ia类分子或MHC-E分子的背景下呈递的肽表位特异性结合。

[0732] 133. 实施方案128-132中任一项的组合物,其中该组合物中CD4+与CD8+细胞的比例在5:1或约5:1与1:5或约1:5之间、在1:3或约1:3与3:1或约3:1之间、在2:1或约2:1与1:5或约1:5之间或者在2:1或约2:1与1:5或约1:5之间。

[0733] 134. 实施方案127-133中任一项的组合物,其包含药学上可接受的载体。

[0734] 135. 一种治疗疾病或病症的方法,其包括向受试者给予实施方案127-134中任一项的组合物。

[0735] 136. 实施方案135的方法,其中该重组抗原受体和与该疾病或病症相关的抗原结合。

[0736] 137. 实施方案135或实施方案136的方法,其中该疾病或病症是癌症。

[0737] 138. 实施方案1-81中任一项的方法,其中该CMV载体颗粒编码UL40和US28。

[0738] 139. 实施方案1-81和138中任一项的方法,其中该CMV载体颗粒表达一种或多种活性UL40蛋白和/或活性US28蛋白。

[0739] 140. 实施方案1-81、138和139中任一项的方法,其中将含有编码活性UL40的一个或多个开放阅读框和/或编码活性US28的一个或多个开放阅读框的异源核酸插入该CMV载体颗粒中。

[0740] 141. 实施方案127-134中任一项的药物组合物,用于在治疗疾病或病症中使用。

[0741] 142.用于实施方案141使用的药物组合物,其中该重组抗原受体和与该疾病或病症相关的抗原结合。

[0742] 143.用于实施方案141或权利要求142使用的药物组合物,其中该疾病或病症是癌症。

[0743] 序列表

[0744]

SEQ ID NO.		序列
1	蛋白质 主要组织相容性复合 物, I类, E, E*0101 智人 (Homo sapiens) GenBank号AAH02578.1 或UniProt号P13747.3	MVDGTL L L L L L S E A L A L T Q T W A G S H S L K Y F H T S V S R P G R G E P R F I S V G Y V D D T Q F V R F D N D A A S P R M V P R A P W M E Q E G S E Y W D R E T R S A R D T A Q I F R V N L R T L R G Y Y N Q S E A G S H T L Q W M H G C E L G P D R R F L R G Y E Q F A Y D G K D Y L T L N E D L R S W T A V D T A A Q I S E Q K S N D A S E A E H Q R A Y L E D T C V E W L H K Y L E K G K E T L L H L E P P K T H V T H H P I S D H E A T L R C W A L G F Y P A E I T L T W Q D G E G H T Q D T E L V E T R P A G D G T F Q K W A A V V V P S G E E Q R Y T C H V Q H E G L P E P V T L R W K P A S Q P T I P V G I I A G L V L L G S V V S G A V V A A V I W R K K S S G G K G G S Y S K A E W S D S A Q G S E S H S L
2	DNA 主要组织相容性复合 物, I类, E 智人 GenBank号BC002578 编码DNA序列 (CDS) 15-1091	C A G A G G C T G G G A T C A T G G T A G A T G G A A C C C T C C T T T T A C T C C T C T C G G A G G C C C T G G C C C T T A C C C A G A C C T G G G C G G G C T C C C A C T C C T T G A A G T A T T T C C A C A C T T C C G T G T C C C G G C C G G C C G C G G G A G C C C C G C T T C A T C T C T G T G G G C T A C G T G G A C G A C A C C C A G T T C G T G C G C T T C G A C A A C G A C G C C G C G A G T C C G A G G A T G G T G C C G C G G G C G C C G T G G A T G G A G C A G G A G G G G T C A G A G T A T T G G G A C C G G G A G A C A C G G A G C G C C A G G G A C A C C G C A C A G A T T T T C C G A G T G A A C C T G C G G A C G C T G C G C G G C T A C T A C A A T C A G A G C G A G G C C G G G T C T C A C A C C C T G C A G T G G A T G C A T G G C T G C G A G C T G G G G C C C G A C A G G C G C T T C C T C C G C G G G T A T G A A C A G T T C G C C T A C G A C G G C A A G G A T T A T C T C A C C C T G A A T G A G G A C C T G C G C T C C T G G A C C G C G T G G A C A C G G C G G C T C A G A T C T C C G A G C A A A A G T C A A A T G A T G C C T C T G A G G C G G A G C A C C A G A G A G C C T A C C T G G A A G A C A C A T G C G T G G A G T G G C T C C A C A A A T A C C T G G A G A A G G G G A A G G A G A C G C T G C T T C A C C T G G A G C C C C C A A A G A C A C A C G T G A C T C A C C A C C C C A T C T C T G A C C A T G A G G C C A C C C T G A G G T G C T G G G C C C T G G G C T T C T A C C T G C G G A G A T C A C A C T G A C C T G G C A G C A G G A T G G G G A G G G C C A T A C C C A G G A C A C G G A G C T C G T G G A G A C C A G G C C T G C A G G G G A T G G A A C C T T C C A G A A G T G G G C A G C T G T G G T G G T G C C T T C T G G A G A G G A G C A G A G A T A C A C G T G C C A T G T G C A G C A T G A G G G G C T A C C C G A G C C C G T C A C C C T G A G A T G G A A G C C G G C T T C C C A G C C C A C C A T C C C C A T C G T G G G C A T C A T T G C T G G C C T G G T T C T C C T T G G A T C T G T G G T C T C T G G A G C T G T G G T T G C T G C T G T G A T A T G G A G G A A G A A G A G C T C A G G T G G A A A A G G A G G G A G C T A C T C T A A G G C T G A G T G G A G C G A C A G T G C C C A G G G G T C T G A G T C T C A C A G C T T G T A A A G C C T G A G A C A G C T G C C T T G T G T G C G A C T G A G A T G C A C A G C T G C C T T G T G T G C G A C T G A G A T G C A G G A T T T C C T C A C G C C T C C C C T A T G T G T C T T A G G G G A C T C T G G C T T C T C T T T T T G C A A G G G C C T C T G A A T C T G T C T G T G T C C C T G T T A G C A C A A T G T G A G G A G G T A G A G A A A C A G T C C A C C T C T G T G T C T A C C A T G A C C C C C T T C C T C A C A C T G A C C T G T G T T C C T T C C C T G T T C T T T T C T A T T A A A A A T A A G A A C C T G G G C A G A G T G C G G C A G C T C A T G C C T G T A A T C C C A G C A C T T A G G G A G G C C G A G G A G G G C A G A T C A C G A G G T C A G G A G A T C G A A A C C A T C C T G G C T A A C A C G G T G A A A C C C C G T C T C T A C T A A A A A A T A C A A A A A A T T A G C T G G G C G C A G A G G C A C G G G C C T G T A G T C C C A G C T A C T C A G G A G G C G G A G G C A G G A G A A T G G C G T C A A C C C G G G A G G C G G A G G T T G C A G T G A G C C A G G A T T G T G C G A C T G C A C T C C A G C C T G G G T G A C A G G G T G A A A C G C C A T C T C A A A A A A T A A A A A T T A A A A A A A A A A A A A A A A A A A
3	蛋白质	MVDGTL L L L L L S E A L A L T Q T W A G S H S L K Y F H T S V S R P G R G E P R F

[0745]

	主要组织相容性复合 物, I类, E, E*0103 智人 GenBank号NP_005507	ISVGYVDDTQFVRFDNDAASPRMVPRAPWMEQEGSEYWDRET RSARDTAQIFRVNLRTRLRGYYNQSEAGSHTLQWMHGCELGPD GRFLRGYEQFAYDGDYLTNEDLRSWTAVDTAQISEQKSN DASEAEHQRAYLEDTCVEWLHKYLEKGKETLLHLEPPKTHVT HHPISDHEATLRCWALGFYPAEITLTWQQDGEGHTQDTEL VET RPAGDGTGFKWAAVVVPSGEEQRYTCHVQHEGLPEPVTLRW KPASQPTIPIVGIIAGLVLLGSVVSGAVVAAVIWRKKSSGGKGG SYSKAEWSDSAQGSSESHL
4	DNA 主要组织相容性复合 物, I类, E, E*0103 智人 GenBank NM_005516.5 CDS 127-1203	GCAGACTCAGTTCTCATTCCCAATGGGTGTCGGGTTTCTAGA GAAGCCAATCAGCGTCGCCACGACTCCCGACTATAAAGTCC CCATCCGGACTCAAGAAGTTCTCAGGACTCAGAGGCTGGGA TCATGGTAGATGGAACCCCTCTTTTACTCCTCTCGGAGGCCC TGGCCCTTACCCAGACCTGGGCGGGCTCCCACTCCTTGAAGT ATTTCCACACTTCCGTGTCCCGGCCCGGCCGCGGAGCCCC GCTTCATCTCTGTGGGCTACGTGGACGACACCCAGTTCGTGC GCTTCGACAACGACGCCGCGAGTCCGAGGATGGTGCCGCGG GCGCCGTGGATGGAGCAGGAGGGGTCAGAGTATTGGGACC GGGAGACACGGAGCGCCAGGGACACCGCACAGATTTTCCGA GTGAATCTGCGGACGCTGCGCGGCTACTACAATCAGAGCGA GGCCGGGTCTCACACCCTGCAGTGGATGCATGGCTGCGAGC TGGGGCCCCGACGGGCGCTTCTCCGCGGGTATGAACAGTTC GCCTACGACGGCAAGGATTATCTCACCTGAATGAGGACCT GCGCTCCTGGACCGCGGTGGACACGGCGGCTCAGATCTCCG AGCAAAAGTCA AATGATGCCTCTGAGGCGGAGCACCAGAGAGCCTACCTGGA AGACACATGCGTGGAGTGGCTCCACAAATACCTGGAGAAGG GGAAGGAGACGCTGCTTCACCTGGAGCCCCCAAAGACACAC GTGACTCACCACCCATCTCTGACCATGAGGCCACCCTGAG GTGCTGGGCCCTGGGCTTCTACCCTGCGGAGATCACACTGA CCTGGCAGCAGGATGGGGAGGGCCATACCCAGGACACGGA GCTCGTGGAGACCAGGCCTGCAGGGGATGGAACCTTCCAGA AGTGGGACAGCTGTGGTGGTGCCTTCTGGAGAGGAGCAGAGA TACACGTGCCATGTGCAGCATGAGGGGCTACCCGAGCCCCGT CACCTTGAGATGGAAGCCGGCTTCCCAGCCCACCATCCCCA TCGTGGGCATCATTGCTGGCCTGGTTCTCCTTGGATCTGTGG TCTCTGGAGCTGTGGTTGCTGCTGTGATATGGAGGAAGAAG AGTCTAGGTGGAAGAGGAGGGAGCTACTTAAGGCTGAGTG GAGCGACAGTGCCAGGGGTCTGAGTCTCACAGCTTGTAAG GCCTGAGACAGCTGCCTTGTGTGCGACTGAGATGCACAGCT GCCTTGTGTGCGACT GAGATGCAGGATTTCTCACGCCTCCCCTATGTGTCTTAGGG GACTCTGGCTTCTCTTTTGTGAAGGGCCTCTGAATCTGTCTG TGTCCCTGTTAGCACAATGTGAGGAGGTAGAGAAAACGTCC ACCTCTGTGTCTACCATGACCCCTTCTCACACTGACCTGT GTTCTTCCCTGTTCTTTTCTATTAAAAATAAGAACCTGG GCAGAGTGCGGCAGCTCATGCCTGTAATCCCAGCACTTAGG GAGGCCGAGGAGGGCAGATCACGAGGTCAGGAGATCGAAA CCATCCTGGCTAACACGGTGAAACCCCGTCTCTACTAAAAA ATACAAAAAATTAGCTGGGCGCAGAGGCAGGGCCTGTAGT CCAGCTACTCAGGAGGCGGAGGCAGGAGAAATGGCGTCAA CCCGGGAGGCGGAGGTTGCAGTGAGCCAGGATTGTGCGACT GCACTCCAGCCTGGGTGACAGGGTGAAACGCCATCTCAAAA AATAAAAAATTGAAAAATAAAAAAAGAACCTGGATCTCAATT TAATTTTTCATATTCTTGCAATGAAATGGACTTGAGGAAGCT AAGATCATAGCTAGAAATACAGATAATTCCACAGCACATCT CTAGCAAATTTA GCCTATTCTATTCTCTAGCCTATTCTTACCACCTGTAATCT TGACCATATACCTTGGAGTTGAATATTGTTTTCTACTGCTG

[0746]

		TGGTTTGAATGTTCCCTCCAACACTCATGTTGAGACTTAATC CCTAATGTGGCAATACTGAAAGGTGGGGCCTTTGAGATGTG ATTGGATCGTAAGGCTGTGCCTTCATTCATGGGTAAATGGAT TAATGGGTTATCACAGGAATGGGACTGGTGGCTTTATAAGA AGAGGAAAAGAGAACTGAGCTAGCATGCCAGCCACAGA GAGCCTCCACTAGAGTGATGCTAAGTGGAATGTGAGGTGC AGCTGCCACAGAGGGCCCCACCAGGGAAATGTCTAGTGTC TAGTGGATCCAGGCCACAGGAGAGAGTGCCTTGTGGAGCGC TGGGAGCAGGACCTGACCACCAGGACCCAGAAGTGTG GAGTCAGTGGCAGCATGCAGCGCCCCCTTGGGAAAGCTTTA GGCACCAGCCTGCAACCCATTTCGAGCAGCCACGTAGGCTGC ACCCAGCAAAGCCACAGGCACGGGGCTACCTGAGGCCTTGG GGGCCCCAATCCCTGCTCCAGTGTGTCCGTGAGGCAGCACAC GAAGTCAAAAG AGATTATTCTCTTCCCACAGATACCTTTTCTCTCCCATGACCC TTTAACAGCATCTGCTTCATTCCCCTCACCTTCCCAGGCTGA TCTGAGGTAACTTTGAAGTAAAATAAAAGCTGTGTTTGAG CATCATTTGTATTTCAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAAA
5	A*0101前导序列 和 A*0301 和 A*3601 和 Cw*1502的残基3-11 / VL9肽	VMAPRTLIL
6	A*0201 和 A*0211 和 A*2403 和 A*2501的残基3-11 / VL9肽	VMAPRTLVL
7	A*0702 和 B*06501 和 A*0801的残基3-11 / VL9肽	VMAPRTVLL
8	G的残基3-11 / VL9肽	VMAPRTLFL
9	Cw*0401的残基3-11 / VL9肽	VMAPRTLIL
10	HLA-C CRISPR 指导 RNA 1	AGCGACGCCGCGAGTCCGAG
11	HLA-C CRISPR 指导 RNA 2	GGTCGCAGCCAGACATCCTC

[0747]

12	HLA-C CRISPR 指导 RNA 3	GACACAGAAGTACAAGCGCC
13	HLA-C CRISPR 指导 RNA 4	TCACCGCTATGATGTGTAGG
14	HLA-C CRISPR 指导 RNA 5	CTCTCAGCTGCTCCGCCGCA
15	HLA-C CRISPR 指导 RNA 6	CTTCCTCCTACACATCATAG
16	HLA-A CRISPR 指导 RNA 1	CGTCCTGCCGGTACCCGCGG
17	HLA-A CRISPR 指导 RNA 2	TACCGGCAGGACGCCTACGA
18	HLA-A CRISPR 指导 RNA 3	ACAGCGACGCCGCGAGCCAG
19	HLA-A CRISPR 指导 RNA 4	CCAGTCACAGACTGACCGAG
20	HLA-A CRISPR 指导 RNA 5	TCCCTCCTTACCCCATCTCA
21	HLA-A CRISPR 指导 RNA 6	CCACCCCATCTCTGACCATG
22	HLA-B CRISPR 指导 RNA 1	CGTCGCAGCCGTACATGCTC
23	HLA-B CRISPR 指导 RNA 2	CGCTGTGGAACCTCACGAAC
24	HLA-B CRISPR 指导 RNA 3	GGATGGCGAGGACCAAATC
25	HLA-B CRISPR 指导 RNA 4	CCTGGCTGTCCTAGCAGTTG
26	HLA-B CRISPR 指导 RNA 5	CGTACTGGTCATGCCC GCGG
27	HLA-B CRISPR 指导 RNA 6	CTCCGATGACCACAAC TGCT
28	A2-1 siRNA	GGATTACATCGCCCTGAAAG
29	A2-2 siRNA	GCAGGAGGGTCCGGAGTATT
30	A2-3 siRNA	GGACGGGGAGACACGGAAG
31	A2-4 siRNA	GAAAGTGAAGGCCCACTCA
32	ABC-1 siRNA	GATACCTGGAGAACGGGAAG
33	ABC-2 siRNA	GCTGTGGTGGTGCCTTCTGG
34	ABC-3 siRNA	GCTACTACAACCAGAGCGAG
35	ABC-4 siRNA	GTGGCTCCGCAGATACCTG
36	HLA-A特异性shRNA	CACCUGCCAUGUGCAUGAUUUUGUGUAGUCAUGCUGCACAU GGCAGGUGUUUUUU
37	HLA ABC 特异性 shRNA	GGAGAUCACACUGACCUGGCAUUUGUGUAGUGCCAGGUCA GUGUGAUCUCCUUUUUU
38	接头1	-PGGG-(SGGGG)5-P-, 其中P是脯氨酸, G是甘氨酸并且S是丝氨酸

[0748]

39	接头2	GSADDAKKDAAKKDGKS
40	间隔子(IgG4铰链)(aa) 智人	ESKYGPPCPPCP
41	间隔子(IgG4铰链)(nt) 智人	GAATCTAAGTACGGACCGCCCTGCCCCCTTGCCCT
42	铰链-CH3间隔子 智人	ESKYGPPCPPCPGQPREPVYTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGF YPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSR WQEGNVFSCSVMEALHNHYTQKSLSLGK
43	铰链-CH2-CH3间隔子 智人	ESKYGPPCPPCPAPEFLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVV VDVSDQEDPEVFQFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQFNSTYRVVSV LTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKGLPSSIEKTISKAKGQPREPV YTLPPSQEEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTTPVLDSDGSFFLYSRLTVDKSRWQEGNVFSCSVMEALHN HYTQKSLSLGK
44	IGD-铰链-Fc 智人	RWPESPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATTRNTGRGEE KKKEKEKEEQEERETKTPECPSHTQPLGVYLLTPAVQDLWLRD KATFTCFVVGSDLKDAHLTWEVAGKVPTGGVEEGLLERHNG SQSQHSRLTLPRSL WNAGTSVTCTLNHPSLPPQRLMALREPAAPVKLSLNLASS DPPEAASWLLCEVSGFSPNILLMWLEDQREVNTSGFAPARPPP QPGSTTFWAWSVLRVPAPPSPQATYTCVVSHEDSRTLLNASR SLEVSIVTDH
45	tEGFR 人工	MLLLVTSLLLCELHPAFLIPRKVCNGIGIGEFKDSL SINATNIK HFKNCTSIGDLHILPVAFRGDSFTHTPLDPQELDILKTVKEIT GFLLIQAWPENRTDLHAFENLEIIRGR TKQHGFSLAVVSLNITS LGLRSLKEISDGDVVISGNKLCYANTINWKKLFGTSGQKTKIIS NRGENSCKATGQVCHALCSPEGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRE CVDKCNLLEGEPRFVENSECIQCHPECLPQAMNITCTGRGPDN CIQCAHYIDGPHCVKTCPAGVMGENNTLVWKYADAGHVCHL CHPNCTYTGCTGPGLEGCP TNGPKIPSIATGMV GALLLLLVVAL GIGLFM
46	T2A 人工	LEGGGEGRGSLLTCGDVEENPGPR
47	CD28 (登录号P10747 的氨基酸153-179) 智人	FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV
48	CD28 (登录号P10747 的氨基酸114-179) 智人	IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPFPGPSKP FWVLVVVGGLACYSLLVTVAFIIFWV
49	CD28 (P10747的氨基酸 180-220)	RSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS

[0749]

	智人	
50	CD28 (LL到GG)	RSKRSRGGHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDFAAYRS
	智人	
51	4-1BB(Q07011.1的氨基酸214-255)	KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEGGCEL
	智人	
52	CD3 ζ	RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR
	智人	
53	CD3 ζ	RVKFSRSAEPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR
	智人	
54	CD3 ζ	RVKFSRSADAPAYKQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRD PEMGGKPRRKNPQEGLYN ELQKDKMAEA YSEIGMKGER RRGKGHDGLY QGLSTATKDTYDALHMQALP PR
	智人	
55	接头	-PGGG-(SGGGG) ₆ -P-, 其中P是脯氨酸, G是甘氨酸并且S是丝氨酸
56	T2A	EGRGSLLTCG DVEENPGP
57	P2A	GSGATNFSLL KQAGDVEENP GP
58	P2A	ATNFSLLKQA GDVEENPGP
59	E2A	QCTNYALLKL AGDVESNPGP
60	F2A	VKQTLNFDLL KLAGDVESNP GP
61	iEGFR	RKVCNGIGIGEFKDSLSINATNIKHFKNCTSSISGDLHILPVAFRG DSFTHTPPLDPQELDILKTVKEITGFLLIQAWPENRTDLHAFENL EIIRGR TKQHGGFSLAVVSLNITSLGLRSLKEISDGDVVISGNKNL CYANTINWKKLFGTSGQKTKIISNRGENSCKATGQVCHALCSP EGCWGPEPRDCVSCRNVSRGRECVDKCNLLEGEPRFVENSEC IQCHPECLPQAMNITCTGRGPDNCIQCAHYIDGPHCVKTCPAG VMGENNTLVWKYADAGHVCHLCHPNCTYGTGPGLEGCPNTN GPKIPSIATGMVGALLLLVVALGIGLFM
62	VL9肽	VMAPRALLL
63	VL9肽	SQAPLPCVL

[0001]	序列表
[0002]	<110> Juno Therapeutics, Inc.
[0003]	Tareen, Semih U.
[0004]	Sissons, James
[0005]	Frohlich, Mark
[0006]	<120> 鉴定肽表位的方法、结合此类表位的分子和相关用途
[0007]	<130> 735042002140
[0008]	<140> 尚未分配
[0009]	<141> 与此同时
[0010]	<150> US 62/355,211
[0011]	<151> 2016-06-27
[0012]	<160> 63
[0013]	<170> PatentIn 版本3.5
[0014]	<210> 1
[0015]	<211> 358
[0016]	<212> PRT
[0017]	<213> 智人
[0018]	<220>
[0019]	<221> 尚未归类的特征
[0020]	<223> 主要组织相容性复合物, I类, E, E*0101
[0021]	<400> 1
[0022]	Met Val Asp Gly Thr Leu Leu Leu Leu Ser Glu Ala Leu Ala Leu
[0023]	1 5 10 15
[0024]	Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Leu Lys Tyr Phe His Thr Ser
[0025]	20 25 30
[0026]	Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser Val Gly Tyr
[0027]	35 40 45
[0028]	Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Asn Asp Ala Ala Ser Pro
[0029]	50 55 60
[0030]	Arg Met Val Pro Arg Ala Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Ser Glu Tyr
[0031]	65 70 75 80
[0032]	Trp Asp Arg Glu Thr Arg Ser Ala Arg Asp Thr Ala Gln Ile Phe Arg
[0033]	85 90 95
[0034]	Val Asn Leu Arg Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly
[0035]	100 105 110
[0036]	Ser His Thr Leu Gln Trp Met His Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Arg
[0037]	115 120 125
[0038]	Arg Phe Leu Arg Gly Tyr Glu Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr
[0039]	130 135 140
[0040]	Leu Thr Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Val Asp Thr Ala
[0041]	145 150 155 160

[0042]	Ala Gln Ile Ser Glu Gln Lys Ser Asn Asp Ala Ser Glu Ala Glu His		
[0043]		165	170
[0044]	Gln Arg Ala Tyr Leu Glu Asp Thr Cys Val Glu Trp Leu His Lys Tyr		175
[0045]		180	185
[0046]	Leu Glu Lys Gly Lys Glu Thr Leu Leu His Leu Glu Pro Pro Lys Thr		190
[0047]		195	200
[0048]	His Val Thr His His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys		205
[0049]		210	215
[0050]	Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Gln		220
[0051]		225	230
[0052]	Asp Gly Glu Gly His Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro		235
[0053]		245	250
[0054]	Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser		255
[0055]		260	265
[0056]	Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro		270
[0057]		275	280
[0058]	Glu Pro Val Thr Leu Arg Trp Lys Pro Ala Ser Gln Pro Thr Ile Pro		285
[0059]		290	295
[0060]	Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Leu Gly Ser Val Val Ser		300
[0061]		305	310
[0062]	Gly Ala Val Val Ala Ala Val Ile Trp Arg Lys Lys Ser Ser Gly Gly		315
[0063]		325	330
[0064]	Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Lys Ala Glu Trp Ser Asp Ser Ala Gln Gly		335
[0065]		340	345
[0066]	Ser Glu Ser His Ser Leu		350
[0067]		355	
[0068]	<210> 2		
[0069]	<211> 1670		
[0070]	<212> DNA		
[0071]	<213> 智人		
[0072]	<220>		
[0073]	<221> 尚未归类的特征		
[0074]	<223> 主要组织相容性复合物, I类, E (氨基酸15-1091的CDS)		
[0075]	<400> 2		
[0076]	cagaggtg gatcatggta gatggaaccc tccttttact cctctcggag gccctggccc	60	
[0077]	ttaccagac ctgggcgggc tccactcct tgaagtattt ccacacttcc gtgtcccggc	120	
[0078]	ccggccgcgg ggagccccgc ttcatctctg tgggctacgt ggacgacacc cagttcgtgc	180	
[0079]	gtttcgacaa cgacgccgcg agtccgagga tgggtccgcg ggcgccgtgg atggagcagg	240	
[0080]	agggtcaga gtattgggac cgggagacac ggagcggcag ggacaccgca cagattttcc	300	
[0081]	gagtgaacct gcggacgtg cgcggtact acaatcagag cgaggccggg tctcacacc	360	
[0082]	tgcagtggat gcatggctgc gagctggggc cgcacaggcg cttcctccgc gggtatgaac	420	
[0083]	agttcgcta cgacggcaag gattatctca ccctgaatga ggacctgcgc tcctggaccg	480	

[0084]	cgggtggacac ggcggtctcag atctccgagc aaaagtcaaa tgatgcctct gaggcggagc	540
[0085]	accagagagc ctacctggaa gacacatgcg tggagtggct ccacaaatac ctggagaagg	600
[0086]	ggaaggagac gctgcttcac ctggagcccc caaagacaca cgtgactcac caccatctct	660
[0087]	ctgaccatga ggccaccctg aggtgctggg ccctgggctt ctaccctgcg gagatcacac	720
[0088]	tgacctggca gcaggatggg gagggccata cccaggacac ggagctcgtg gagaccaggc	780
[0089]	ctgcagggga tggaaccttc cagaagtggg cagctgtggt ggtgccttct ggagaggagc	840
[0090]	agagatacac gtgccatgtg cagcatgagg ggctaccgca gcccgtcacc ctgagatgga	900
[0091]	agccggtctc ccagcccacc atccccatcg tgggcatcat tgctggcctg gttctccttg	960
[0092]	gatctgtggt ctctggagct gtggttctg ctgtgatatg gaggaagaag agctcagggtg	1020
[0093]	gaaaaggagg gagctactct aaggctgagt ggagcgacag tgcccagggg tctgagtctc	1080
[0094]	acagcttgta aagcctgaga cagctgcctt gtgtgcgact gagatgcaca gctgccttgt	1140
[0095]	gtgcgactga gatgcaggat ttctctacgc ctccccatg tgtcttaggg gactctggct	1200
[0096]	tctctttttg caagggcctc tgaatctgtc tgtgtccctg ttagcacaat gtgaggaggt	1260
[0097]	agagaaacag tccacctctg tgtctaccat gaccccttc ctacactga cctgtgttcc	1320
[0098]	ttccctgttc tcttttctat taaaaataag aacctgggca gagtgcggca gctcatgcct	1380
[0099]	gtaatcccag cacttaggga ggccgaggag ggcagatcac gaggtcagga gatcgaaacc	1440
[0100]	atcctggcta acacggtgaa accccgtctc tactaaaaaa taaaaaaat tagctgggcg	1500
[0101]	cagaggcacg ggcctgtagt cccagctact caggaggcgg aggcaggaga atggcgtaa	1560
[0102]	ccccggaggc ggaggttgca gtgagccagg attgtgcgac tgcactccag cctgggtgac	1620
[0103]	agggtgaaac gccatctcaa aaaataaaaa ttaaaaaaaa aaaaaaaaaa	1670
[0104]	<210>	3
[0105]	<211>	358
[0106]	<212>	PRT
[0107]	<213>	智人
[0108]	<220>	
[0109]	<221>	尚未归类的特征
[0110]	<223>	主要组织相容性复合物, I类, E, E*0103
[0111]	<400>	3
[0112]	Met Val Asp Gly Thr Leu Leu Leu Leu Leu Ser Glu Ala Leu Ala Leu	
[0113]	1 5 10 15	
[0114]	Thr Gln Thr Trp Ala Gly Ser His Ser Leu Lys Tyr Phe His Thr Ser	
[0115]	20 25 30	
[0116]	Val Ser Arg Pro Gly Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ser Val Gly Tyr	
[0117]	35 40 45	
[0118]	Val Asp Asp Thr Gln Phe Val Arg Phe Asp Asn Asp Ala Ala Ser Pro	
[0119]	50 55 60	
[0120]	Arg Met Val Pro Arg Ala Pro Trp Met Glu Gln Glu Gly Ser Glu Tyr	
[0121]	65 70 75 80	
[0122]	Trp Asp Arg Glu Thr Arg Ser Ala Arg Asp Thr Ala Gln Ile Phe Arg	
[0123]	85 90 95	
[0124]	Val Asn Leu Arg Thr Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly	
[0125]	100 105 110	

[0126]	Ser His Thr Leu Gln Trp Met His Gly Cys Glu Leu Gly Pro Asp Gly
[0127]	115 120 125
[0128]	Arg Phe Leu Arg Gly Tyr Glu Gln Phe Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr
[0129]	130 135 140
[0130]	Leu Thr Leu Asn Glu Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Val Asp Thr Ala
[0131]	145 150 155 160
[0132]	Ala Gln Ile Ser Glu Gln Lys Ser Asn Asp Ala Ser Glu Ala Glu His
[0133]	165 170 175
[0134]	Gln Arg Ala Tyr Leu Glu Asp Thr Cys Val Glu Trp Leu His Lys Tyr
[0135]	180 185 190
[0136]	Leu Glu Lys Gly Lys Glu Thr Leu Leu His Leu Glu Pro Pro Lys Thr
[0137]	195 200 205
[0138]	His Val Thr His His Pro Ile Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys
[0139]	210 215 220
[0140]	Trp Ala Leu Gly Phe Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Gln
[0141]	225 230 235 240
[0142]	Asp Gly Glu Gly His Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro
[0143]	245 250 255
[0144]	Ala Gly Asp Gly Thr Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser
[0145]	260 265 270
[0146]	Gly Glu Glu Gln Arg Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro
[0147]	275 280 285
[0148]	Glu Pro Val Thr Leu Arg Trp Lys Pro Ala Ser Gln Pro Thr Ile Pro
[0149]	290 295 300
[0150]	Ile Val Gly Ile Ile Ala Gly Leu Val Leu Leu Gly Ser Val Val Ser
[0151]	305 310 315 320
[0152]	Gly Ala Val Val Ala Ala Val Ile Trp Arg Lys Lys Ser Ser Gly Gly
[0153]	325 330 335
[0154]	Lys Gly Gly Ser Tyr Ser Lys Ala Glu Trp Ser Asp Ser Ala Gln Gly
[0155]	340 345 350
[0156]	Ser Glu Ser His Ser Leu
[0157]	355
[0158]	<210> 4
[0159]	<211> 2679
[0160]	<212> DNA
[0161]	<213> 智人
[0162]	<220>
[0163]	<221> 尚未归类的特征
[0164]	<223> 主要组织相容性复合物, I类, E, E*0103 (氨基酸127-1203的CDS)
[0165]	<400> 4
[0166]	gcgactcag ttctcattcc caatgggtgt cgggtttcta gagaagccaa tcagcgtcgc 60
[0167]	cacgactccc gactataaag tccccatccg gactcaagaa gttctcagga ctcagagget 120

[0168]	gggatcatgg tagatggaac cctcctttta ctctctcgg aggccctggc ccttaccag	180
[0169]	acctgggcgg gctcccactc cttgaagtat ttccacactt ccgtgtcccg gcccgccgc	240
[0170]	ggggagcccc gcttcactc tgtgggctac gtggacgaca ccagttcgt gcgcttcgac	300
[0171]	aacgacgccg cgagtccgag gatggtgccg cgggcgccgt ggatggagca ggagggtca	360
[0172]	gagtattggg accgggagac acggagcgcc agggacaccg cacagatttt ccgagtgaat	420
[0173]	ctgcggacgc tgcgcggcta ctacaatcag agcgaggccg ggtctcacac cctgcagtgg	480
[0174]	atgcatggct gcgagctggg gcccagcggg cgcttctctc gcgggtatga acagtctgcc	540
[0175]	tacgacggca aggattatct caccctgaat gaggacctgc gctcctggac cgcggtggac	600
[0176]	acggcggctc agatctccga gcaaaagtca aatgatgcct ctgaggcgga gcaccagaga	660
[0177]	gcctacctgg aagacacatg cgtggagtgg ctccacaaat acctggagaa ggggaaggag	720
[0178]	acgtgcttc acctggagcc cccaaagaca cacgtgactc accaccccat ctctgacct	780
[0179]	gaggccacc ttaggtgctg ggccctgggc ttctaccctg cggagatcac actgacctgg	840
[0180]	cagcaggatg gggaggcca taccaggac acggagctcg tggagaccag gcctgcaggg	900
[0181]	gatggaacct tccagaagtg ggcagctgtg gtggtgcctt ctggagagga gcagagatac	960
[0182]	acgtgcatg tgcagcatga ggggctaccc gagcccgta ccctgagatg gaagccggct	1020
[0183]	tcccagccca ccatcccat cgtgggcatc attgctggcc tggttctctt tggatctgtg	1080
[0184]	gtctctggag ctgtggtgc tgcgtgata tggaggaaga agagctcagg tggaaaagga	1140
[0185]	gggagctact ctaaggctga gtggagcgac agtggccagg ggtctgagtc tcacagcttg	1200
[0186]	taaagcctga gacagctgcc ttgtgtcga ctgagatgca cagctgcctt gtgtgcgact	1260
[0187]	gagatgcagg atttctcac gcctccccta tgtgtcttag gggactctgg cttctctttt	1320
[0188]	tgcaagggcc tctgaatctg tctgtgtccc tgttagcaca atgtgaggag gtagagaaac	1380
[0189]	agtccacctc tgtgtctacc atgacccct tctcacact gacctgtgtt ctttcctgt	1440
[0190]	tctcttttct attaaaaata agaacctggg cagagtgcgg cagctcatgc ctgtaatcc	1500
[0191]	agcacttagg gaggccgagg agggcagatc acgaggtcag gagatcgaac ccatcctggc	1560
[0192]	taacacggtg aaacccgctc tctactaaaa aatacaaaaa attagctggg cgcagaggca	1620
[0193]	cgggcctgta gtcccagcta ctcaggagc ggaggcagga gaatggcgtc aacccgggag	1680
[0194]	gcggaggttg cagttagcca ggattgtgcg actgcactcc agcctgggtg acagggtgaa	1740
[0195]	acgccatctc aaaaaataaa aattgaaaaa taaaaaaaga acctggatct caatttaatt	1800
[0196]	tttcatattc ttgcaatgaa atggacttga ggaagctaag atcatagcta gaaatacaga	1860
[0197]	taattccaca gcacatctct agcaaattta gcctattcct attctctagc ctattcctta	1920
[0198]	ccacctgtaa tcttgacct ataccttga gttgaatatt gttttcatac tgctgtggtt	1980
[0199]	tgaatgttcc ctccaacact catgttgaga cttaatccct aatgtggcaa tactgaaagg	2040
[0200]	tggggccttt gagatgtgat tggatcgtaa ggctgtgcct tcattcatgg gttaatggat	2100
[0201]	taatgggtta tcacaggaat gggactggtg gctttataag aagaggaaaa gagaactgag	2160
[0202]	ctagcatgcc cagcccacag agagcctcca ctagagtgat gctaagtga aatgtgaggt	2220
[0203]	gcagctgcca cagaggcccc ccaccaggga aatgtctagt gtctagtga tccaggccac	2280
[0204]	aggagagagt gccttgtgga gcgctgggag caggacctga ccaccaccag gacccagaa	2340
[0205]	ctgtggagtc agtggcagca tgcagcggc ccttgggaaa gctttaggca ccagcctgca	2400
[0206]	accattcga gcagccacgt aggtgcacc cagcaaagcc acaggcacgg ggctacctga	2460
[0207]	ggccttgggg gcccaatccc tgctccagtg tgtccgtgag gcagcacacg aagtcaaaag	2520
[0208]	agattattct cttcccacag atacctttt tctcccatga ccctttaaca gcatctgctt	2580
[0209]	cattcccctc acctcccag gctgatctga ggtaaacttt gaagtaaaat aaaagctgtg	2640

[0210]	tttgagcatc atttgatattt caaaaaaaaa aaaaaaaaa 2679
[0211]	<210> 5
[0212]	<211> 9
[0213]	<212> PRT
[0214]	<213> 人工序列
[0215]	<220>
[0216]	<223> 前导序列 (A0101、A0301、A3601和
[0217]	Cw1502的残基3-11) / VL9肽
[0218]	<400> 5
[0219]	Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Leu Leu
[0220]	1 5
[0221]	<210> 6
[0222]	<211> 9
[0223]	<212> PRT
[0224]	<213> 人工序列
[0225]	<220>
[0226]	<223> 前导序列 (A0201、A0211、A2403和
[0227]	A2501的残基3-11) / VL9肽
[0228]	<400> 6
[0229]	Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Val Leu
[0230]	1 5
[0231]	<210> 7
[0232]	<211> 9
[0233]	<212> PRT
[0234]	<213> 人工序列
[0235]	<220>
[0236]	<223> 前导序列 (A0702、B06501和A0801的残基3-11) / VL9
[0237]	肽
[0238]	<400> 7
[0239]	Val Met Ala Pro Arg Thr Val Leu Leu
[0240]	1 5
[0241]	<210> 8
[0242]	<211> 9
[0243]	<212> PRT
[0244]	<213> 人工序列
[0245]	<220>
[0246]	<223> 前导序列 (G的残基3-11) / VL9肽
[0247]	<400> 8
[0248]	Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Phe Leu
[0249]	1 5
[0250]	<210> 9
[0251]	<211> 9

[0252]	<212> PRT
[0253]	<213> 人工序列
[0254]	<220>
[0255]	<223> 前导序列 (Cw0401的残基3-11) / VL9肽
[0256]	<400> 9
[0257]	Val Met Ala Pro Arg Thr Leu Ile Leu
[0258]	1 5
[0259]	<210> 10
[0260]	<211> 20
[0261]	<212> DNA
[0262]	<213> 人工序列
[0263]	<220>
[0264]	<223> HLA-C CRISPR指导RNA 1
[0265]	<400> 10
[0266]	agcgacgccg cgagtccgag 20
[0267]	<210> 11
[0268]	<211> 20
[0269]	<212> DNA
[0270]	<213> 人工序列
[0271]	<220>
[0272]	<223> HLA-C CRISPR指导RNA 2
[0273]	<400> 11
[0274]	ggtcgcagcc agacatcctc 20
[0275]	<210> 12
[0276]	<211> 20
[0277]	<212> DNA
[0278]	<213> 人工序列
[0279]	<220>
[0280]	<223> HLA-C CRISPR指导RNA 3
[0281]	<400> 12
[0282]	gacacagaag tacaagcgcc 20
[0283]	<210> 13
[0284]	<211> 20
[0285]	<212> DNA
[0286]	<213> 人工序列
[0287]	<220>
[0288]	<223> HLA-C CRISPR指导RNA 4
[0289]	<400> 13
[0290]	tcaccgctat gatgtgtagg 20
[0291]	<210> 14
[0292]	<211> 20
[0293]	<212> DNA

[0294] <213> 人工序列
[0295] <220>
[0296] <223> HLA-C CRISPR指导RNA 5
[0297] <400> 14
[0298] ctctcagctg ctccgccgca 20
[0299] <210> 15
[0300] <211> 20
[0301] <212> DNA
[0302] <213> 人工序列
[0303] <220>
[0304] <223> HLA-C CRISPR指导RNA 6
[0305] <400> 15
[0306] cttcctccta cacatcatag 20
[0307] <210> 16
[0308] <211> 20
[0309] <212> DNA
[0310] <213> 人工序列
[0311] <220>
[0312] <223> HLA-A CRISPR指导RNA 1
[0313] <400> 16
[0314] cgtcctgccg gtacccgcgg 20
[0315] <210> 17
[0316] <211> 20
[0317] <212> DNA
[0318] <213> 人工序列
[0319] <220>
[0320] <223> HLA-A CRISPR指导RNA 2
[0321] <400> 17
[0322] taccggcagg acgcctacga 20
[0323] <210> 18
[0324] <211> 20
[0325] <212> DNA
[0326] <213> 人工序列
[0327] <220>
[0328] <223> HLA-A CRISPR指导RNA 3
[0329] <400> 18
[0330] acagcgacgc cgcgagccag 20
[0331] <210> 19
[0332] <211> 20
[0333] <212> DNA
[0334] <213> 人工序列
[0335] <220>

[0336] <223> HLA-A CRISPR指导RNA 4
[0337] <400> 19
[0338] ccagtcacag actgaccgag 20
[0339] <210> 20
[0340] <211> 20
[0341] <212> DNA
[0342] <213> 人工序列
[0343] <220>
[0344] <223> HLA-A CRISPR指导RNA 5
[0345] <400> 20
[0346] tccctcctta ccccatctca 20
[0347] <210> 21
[0348] <211> 20
[0349] <212> DNA
[0350] <213> 人工序列
[0351] <220>
[0352] <223> HLA-A CRISPR指导RNA 6
[0353] <400> 21
[0354] ccaccccatc tctgaccatg 20
[0355] <210> 22
[0356] <211> 20
[0357] <212> DNA
[0358] <213> 人工序列
[0359] <220>
[0360] <223> HLA-B CRISPR指导RNA 1
[0361] <400> 22
[0362] cgtcgcagcc gtacatgctc 20
[0363] <210> 23
[0364] <211> 20
[0365] <212> DNA
[0366] <213> 人工序列
[0367] <220>
[0368] <223> HLA-B CRISPR指导RNA 2
[0369] <400> 23
[0370] cgctgtcgaa cctcacgaac 20
[0371] <210> 24
[0372] <211> 20
[0373] <212> DNA
[0374] <213> 人工序列
[0375] <220>
[0376] <223> HLA-B CRISPR指导RNA 3
[0377] <400> 24

[0378] ggatggcgag gaccaaactc 20
[0379] <210> 25
[0380] <211> 20
[0381] <212> DNA
[0382] <213> 人工序列
[0383] <220>
[0384] <223> HLA-B CRISPR指导RNA 4
[0385] <400> 25
[0386] cctggctgtc ctagcagttg 20
[0387] <210> 26
[0388] <211> 20
[0389] <212> DNA
[0390] <213> 人工序列
[0391] <220>
[0392] <223> HLA-B CRISPR指导RNA 5
[0393] <400> 26
[0394] cgtactggtc atgcccgcgg 20
[0395] <210> 27
[0396] <211> 20
[0397] <212> DNA
[0398] <213> 人工序列
[0399] <220>
[0400] <223> HLA-B CRISPR指导RNA 6
[0401] <400> 27
[0402] ctccgatgac cacaactget 20
[0403] <210> 28
[0404] <211> 20
[0405] <212> DNA
[0406] <213> 人工序列
[0407] <220>
[0408] <223> A2-1 siRNA
[0409] <400> 28
[0410] ggattacatc gccctgaaag 20
[0411] <210> 29
[0412] <211> 20
[0413] <212> DNA
[0414] <213> 人工序列
[0415] <220>
[0416] <223> A2-2 siRNA
[0417] <400> 29
[0418] gcaggagggt ccggagtatt 20
[0419] <210> 30

[0420]	<211> 20
[0421]	<212> DNA
[0422]	<213> 人工序列
[0423]	<220>
[0424]	<223> A2-3 siRNA
[0425]	<400> 30
[0426]	ggacggggag acacggaaag 20
[0427]	<210> 31
[0428]	<211> 19
[0429]	<212> DNA
[0430]	<213> 人工序列
[0431]	<220>
[0432]	<223> A2-4 siRNA
[0433]	<400> 31
[0434]	gaaagtgaag gccactca 19
[0435]	<210> 32
[0436]	<211> 20
[0437]	<212> DNA
[0438]	<213> 人工序列
[0439]	<220>
[0440]	<223> ABC-1 siRNA
[0441]	<400> 32
[0442]	gatacctgga gaacgggaag 20
[0443]	<210> 33
[0444]	<211> 20
[0445]	<212> DNA
[0446]	<213> 人工序列
[0447]	<220>
[0448]	<223> ABC-2 siRNA
[0449]	<400> 33
[0450]	gctgtggtgg tgccttctgg 20
[0451]	<210> 34
[0452]	<211> 20
[0453]	<212> DNA
[0454]	<213> 人工序列
[0455]	<220>
[0456]	<223> ABC-3 siRNA
[0457]	<400> 34
[0458]	gctactacaa ccagagcgag 20
[0459]	<210> 35
[0460]	<211> 19
[0461]	<212> DNA

- [0462] <213> 人工序列
- [0463] <220>
- [0464] <223> ABC-4 siRNA
- [0465] <400> 35
- [0466] gtggctccgc agatacctg 19
- [0467] <210> 36
- [0468] <211> 54
- [0469] <212> RNA
- [0470] <213> 人工序列
- [0471] <220>
- [0472] <223> HLA-A特异性shRNA
- [0473] <400> 36
- [0474] caccugccau gugcaugauu uguguaguca ugcugcacau ggcagguguu uuuu 54
- [0475] <210> 37
- [0476] <211> 57
- [0477] <212> RNA
- [0478] <213> 人工序列
- [0479] <220>
- [0480] <223> HLA ABC特异性shRNA
- [0481] <400> 37
- [0482] ggagaucaca cugaccuggc auuuguguag ugccagguca gugugaucuc cuuuuuu 57
- [0483] <210> 38
- [0484] <211> 30
- [0485] <212> PRT
- [0486] <213> 人工序列
- [0487] <220>
- [0488] <223> 接头1
- [0489] <400> 38
- [0490] Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
- [0491] 1 5 10 15
- [0492] Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Pro
- [0493] 20 25 30
- [0494] <210> 39
- [0495] <211> 17
- [0496] <212> PRT
- [0497] <213> 人工序列
- [0498] <220>
- [0499] <223> 接头2
- [0500] <400> 39
- [0501] Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys
- [0502] 1 5 10 15
- [0503] Ser

[0504]	<210> 40
[0505]	<211> 12
[0506]	<212> PRT
[0507]	<213> 人工序列
[0508]	<220>
[0509]	<223> 间隔子 (人IgG4铰链) (aa)
[0510]	<400> 40
[0511]	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro
[0512]	1 5 10
[0513]	<210> 41
[0514]	<211> 36
[0515]	<212> DNA
[0516]	<213> 人工序列
[0517]	<220>
[0518]	<223> 间隔子 (人IgG4铰链) (nt)
[0519]	<400> 41
[0520]	gaatctaagt acggaccgcc ctgccccct tgcct 36
[0521]	<210> 42
[0522]	<211> 119
[0523]	<212> PRT
[0524]	<213> 人工序列
[0525]	<220>
[0526]	<223> 铰链-CH3 间隔子 (智人)
[0527]	<400> 42
[0528]	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Gly Gln Pro Arg
[0529]	1 5 10 15
[0530]	Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys
[0531]	20 25 30
[0532]	Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp
[0533]	35 40 45
[0534]	Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys
[0535]	50 55 60
[0536]	Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser
[0537]	65 70 75 80
[0538]	Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser
[0539]	85 90 95
[0540]	Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
[0541]	100 105 110
[0542]	Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
[0543]	115
[0544]	<210> 43
[0545]	<211> 229

[0546]	<212>	PRT
[0547]	<213>	人工序列
[0548]	<220>	
[0549]	<223>	铰链-CH2-CH3 间隔子 (智人)
[0550]	<400>	43
[0551]	Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Phe	
[0552]	1	5 10 15
[0553]	Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr	
[0554]	20	25 30
[0555]	Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val	
[0556]	35	40 45
[0557]	Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val	
[0558]	50	55 60
[0559]	Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe Asn Ser	
[0560]	65	70 75 80
[0561]	Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu	
[0562]	85	90 95
[0563]	Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu Pro Ser	
[0564]	100	105 110
[0565]	Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro	
[0566]	115	120 125
[0567]	Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln	
[0568]	130	135 140
[0569]	Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala	
[0570]	145	150 155 160
[0571]	Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr	
[0572]	165	170 175
[0573]	Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Arg Leu	
[0574]	180	185 190
[0575]	Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser	
[0576]	195	200 205
[0577]	Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser	
[0578]	210	215 220
[0579]	Leu Ser Leu Gly Lys	
[0580]	225	
[0581]	<210>	44
[0582]	<211>	282
[0583]	<212>	PRT
[0584]	<213>	人工序列
[0585]	<220>	
[0586]	<223>	IgD-铰链-Fc (智人)
[0587]	<400>	44

[0588]	Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro Thr Ala
[0589]	1 5 10 15
[0590]	Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala Pro Ala
[0591]	20 25 30
[0592]	Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys Glu Lys
[0593]	35 40 45
[0594]	Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro Glu Cys Pro
[0595]	50 55 60
[0596]	Ser His Thr Gln Pro Leu Gly Val Tyr Leu Leu Thr Pro Ala Val Gln
[0597]	65 70 75 80
[0598]	Asp Leu Trp Leu Arg Asp Lys Ala Thr Phe Thr Cys Phe Val Val Gly
[0599]	85 90 95
[0600]	Ser Asp Leu Lys Asp Ala His Leu Thr Trp Glu Val Ala Gly Lys Val
[0601]	100 105 110
[0602]	Pro Thr Gly Gly Val Glu Glu Gly Leu Leu Glu Arg His Ser Asn Gly
[0603]	115 120 125
[0604]	Ser Gln Ser Gln His Ser Arg Leu Thr Leu Pro Arg Ser Leu Trp Asn
[0605]	130 135 140
[0606]	Ala Gly Thr Ser Val Thr Cys Thr Leu Asn His Pro Ser Leu Pro Pro
[0607]	145 150 155 160
[0608]	Gln Arg Leu Met Ala Leu Arg Glu Pro Ala Ala Gln Ala Pro Val Lys
[0609]	165 170 175
[0610]	Leu Ser Leu Asn Leu Leu Ala Ser Ser Asp Pro Pro Glu Ala Ala Ser
[0611]	180 185 190
[0612]	Trp Leu Leu Cys Glu Val Ser Gly Phe Ser Pro Pro Asn Ile Leu Leu
[0613]	195 200 205
[0614]	Met Trp Leu Glu Asp Gln Arg Glu Val Asn Thr Ser Gly Phe Ala Pro
[0615]	210 215 220
[0616]	Ala Arg Pro Pro Pro Gln Pro Gly Ser Thr Thr Phe Trp Ala Trp Ser
[0617]	225 230 235 240
[0618]	Val Leu Arg Val Pro Ala Pro Pro Ser Pro Gln Pro Ala Thr Tyr Thr
[0619]	245 250 255
[0620]	Cys Val Val Ser His Glu Asp Ser Arg Thr Leu Leu Asn Ala Ser Arg
[0621]	260 265 270
[0622]	Ser Leu Glu Val Ser Tyr Val Thr Asp His
[0623]	275 280
[0624]	<210> 45
[0625]	<211> 357
[0626]	<212> PRT
[0627]	<213> 人工序列
[0628]	<220>
[0629]	<223> tEGFR

[0630]	<400> 45
[0631]	Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro
[0632]	1 5 10 15
[0633]	Ala Phe Leu Leu Ile Pro Arg Lys Val Cys Asn Gly Ile Gly Ile Gly
[0634]	20 25 30
[0635]	Glu Phe Lys Asp Ser Leu Ser Ile Asn Ala Thr Asn Ile Lys His Phe
[0636]	35 40 45
[0637]	Lys Asn Cys Thr Ser Ile Ser Gly Asp Leu His Ile Leu Pro Val Ala
[0638]	50 55 60
[0639]	Phe Arg Gly Asp Ser Phe Thr His Thr Pro Pro Leu Asp Pro Gln Glu
[0640]	65 70 75 80
[0641]	Leu Asp Ile Leu Lys Thr Val Lys Glu Ile Thr Gly Phe Leu Leu Ile
[0642]	85 90 95
[0643]	Gln Ala Trp Pro Glu Asn Arg Thr Asp Leu His Ala Phe Glu Asn Leu
[0644]	100 105 110
[0645]	Glu Ile Ile Arg Gly Arg Thr Lys Gln His Gly Gln Phe Ser Leu Ala
[0646]	115 120 125
[0647]	Val Val Ser Leu Asn Ile Thr Ser Leu Gly Leu Arg Ser Leu Lys Glu
[0648]	130 135 140
[0649]	Ile Ser Asp Gly Asp Val Ile Ile Ser Gly Asn Lys Asn Leu Cys Tyr
[0650]	145 150 155 160
[0651]	Ala Asn Thr Ile Asn Trp Lys Lys Leu Phe Gly Thr Ser Gly Gln Lys
[0652]	165 170 175
[0653]	Thr Lys Ile Ile Ser Asn Arg Gly Glu Asn Ser Cys Lys Ala Thr Gly
[0654]	180 185 190
[0655]	Gln Val Cys His Ala Leu Cys Ser Pro Glu Gly Cys Trp Gly Pro Glu
[0656]	195 200 205
[0657]	Pro Arg Asp Cys Val Ser Cys Arg Asn Val Ser Arg Gly Arg Glu Cys
[0658]	210 215 220
[0659]	Val Asp Lys Cys Asn Leu Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu
[0660]	225 230 235 240
[0661]	Asn Ser Glu Cys Ile Gln Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met
[0662]	245 250 255
[0663]	Asn Ile Thr Cys Thr Gly Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala
[0664]	260 265 270
[0665]	His Tyr Ile Asp Gly Pro His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val
[0666]	275 280 285
[0667]	Met Gly Glu Asn Asn Thr Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His
[0668]	290 295 300
[0669]	Val Cys His Leu Cys His Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro
[0670]	305 310 315 320
[0671]	Gly Leu Glu Gly Cys Pro Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala

[0672]	325	330	335
[0673]	Thr Gly Met Val Gly Ala Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly		
[0674]	340	345	350
[0675]	Ile Gly Leu Phe Met		
[0676]	355		
[0677]	<210> 46		
[0678]	<211> 24		
[0679]	<212> PRT		
[0680]	<213> 人工序列		
[0681]	<220>		
[0682]	<223> T2A		
[0683]	<400> 46		
[0684]	Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp		
[0685]	1 5 10 15		
[0686]	Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg		
[0687]	20		
[0688]	<210> 47		
[0689]	<211> 27		
[0690]	<212> PRT		
[0691]	<213> 智人		
[0692]	<220>		
[0693]	<221> 尚未归类的特征		
[0694]	<223> CD28 (登录号 P10747的氨基酸153-179)		
[0695]	<400> 47		
[0696]	Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu		
[0697]	1 5 10 15		
[0698]	Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val		
[0699]	20 25		
[0700]	<210> 48		
[0701]	<211> 66		
[0702]	<212> PRT		
[0703]	<213> 智人		
[0704]	<220>		
[0705]	<221> 尚未归类的特征		
[0706]	<223> CD28 (登录号P10747的氨基酸114-179)		
[0707]	<400> 48		
[0708]	Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn		
[0709]	1 5 10 15		
[0710]	Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu		
[0711]	20 25 30		
[0712]	Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly		
[0713]	35 40 45		

[0714]	Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
[0715]	50 55 60
[0716]	Trp Val
[0717]	65
[0718]	<210> 49
[0719]	<211> 41
[0720]	<212> PRT
[0721]	<213> 智人
[0722]	<220>
[0723]	<221> 尚未归类的特征
[0724]	<223> CD28 (P10747的氨基酸180-220)
[0725]	<400> 49
[0726]	Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
[0727]	1 5 10 15
[0728]	Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
[0729]	20 25 30
[0730]	Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
[0731]	35 40
[0732]	<210> 50
[0733]	<211> 41
[0734]	<212> PRT
[0735]	<213> 智人
[0736]	<220>
[0737]	<221> 尚未归类的特征
[0738]	<223> CD28 (LL到GG)
[0739]	<400> 50
[0740]	Arg Ser Lys Arg Ser Arg Gly Gly His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr
[0741]	1 5 10 15
[0742]	Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro
[0743]	20 25 30
[0744]	Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
[0745]	35 40
[0746]	<210> 51
[0747]	<211> 42
[0748]	<212> PRT
[0749]	<213> 智人
[0750]	<220>
[0751]	<221> 尚未归类的特征
[0752]	<223> 4-1BB (Q07011.1的氨基酸214-255)
[0753]	<400> 51
[0754]	Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met
[0755]	1 5 10 15

[0756]	Arg	Pro	Val	Gln	Thr	Thr	Gln	Glu	Glu	Asp	Gly	Cys	Ser	Cys	Arg	Phe
[0757]				20				25						30		
[0758]	Pro	Glu	Glu	Glu	Glu	Gly	Gly	Cys	Glu	Leu						
[0759]				35				40								
[0760]	<210> 52															
[0761]	<211> 112															
[0762]	<212> PRT															
[0763]	<213> 智人															
[0764]	<220>															
[0765]	<221> 尚未归类的特征															
[0766]	<223> CD3ζ															
[0767]	<400> 52															
[0768]	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Asp	Ala	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly
[0769]	1				5					10					15	
[0770]	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr
[0771]				20				25						30		
[0772]	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys
[0773]			35					40					45			
[0774]	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys
[0775]		50					55					60				
[0776]	Asp	Lys	Met	Ala	Glu	Ala	Tyr	Ser	Glu	Ile	Gly	Met	Lys	Gly	Glu	Arg
[0777]	65				70					75					80	
[0778]	Arg	Arg	Gly	Lys	Gly	His	Asp	Gly	Leu	Tyr	Gln	Gly	Leu	Ser	Thr	Ala
[0779]				85				90						95		
[0780]	Thr	Lys	Asp	Thr	Tyr	Asp	Ala	Leu	His	Met	Gln	Ala	Leu	Pro	Pro	Arg
[0781]				100				105						110		
[0782]	<210> 53															
[0783]	<211> 112															
[0784]	<212> PRT															
[0785]	<213> 智人															
[0786]	<220>															
[0787]	<221> 尚未归类的特征															
[0788]	<223> CD3ζ															
[0789]	<400> 53															
[0790]	Arg	Val	Lys	Phe	Ser	Arg	Ser	Ala	Glu	Pro	Pro	Ala	Tyr	Gln	Gln	Gly
[0791]	1				5					10					15	
[0792]	Gln	Asn	Gln	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Asn	Leu	Gly	Arg	Arg	Glu	Glu	Tyr
[0793]				20				25						30		
[0794]	Asp	Val	Leu	Asp	Lys	Arg	Arg	Gly	Arg	Asp	Pro	Glu	Met	Gly	Gly	Lys
[0795]			35					40					45			
[0796]	Pro	Arg	Arg	Lys	Asn	Pro	Gln	Glu	Gly	Leu	Tyr	Asn	Glu	Leu	Gln	Lys
[0797]		50					55					60				

[0798]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
[0799]	65 70 75 80
[0800]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
[0801]	85 90 95
[0802]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0803]	100 105 110
[0804]	<210> 54
[0805]	<211> 112
[0806]	<212> PRT
[0807]	<213> 智人
[0808]	<220>
[0809]	<221> 尚未归类的特征
[0810]	<223> CD3ζ
[0811]	<400> 54
[0812]	Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Lys Gln Gly
[0813]	1 5 10 15
[0814]	Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
[0815]	20 25 30
[0816]	Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
[0817]	35 40 45
[0818]	Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
[0819]	50 55 60
[0820]	Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
[0821]	65 70 75 80
[0822]	Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
[0823]	85 90 95
[0824]	Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
[0825]	100 105 110
[0826]	<210> 55
[0827]	<211> 35
[0828]	<212> PRT
[0829]	<213> 人工序列
[0830]	<220>
[0831]	<223> 接头
[0832]	<400> 55
[0833]	Pro Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
[0834]	1 5 10 15
[0835]	Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly
[0836]	20 25 30
[0837]	Gly Gly Pro
[0838]	35
[0839]	<210> 56

[0840]	<211> 18
[0841]	<212> PRT
[0842]	<213> 人工序列
[0843]	<220>
[0844]	<223> T2A
[0845]	<400> 56
[0846]	Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
[0847]	1 5 10 15
[0848]	Gly Pro
[0849]	<210> 57
[0850]	<211> 22
[0851]	<212> PRT
[0852]	<213> 人工序列
[0853]	<220>
[0854]	<223> P2A
[0855]	<400> 57
[0856]	Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
[0857]	1 5 10 15
[0858]	Glu Glu Asn Pro Gly Pro
[0859]	20
[0860]	<210> 58
[0861]	<211> 19
[0862]	<212> PRT
[0863]	<213> 人工序列
[0864]	<220>
[0865]	<223> P2A
[0866]	<400> 58
[0867]	Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
[0868]	1 5 10 15
[0869]	Pro Gly Pro
[0870]	<210> 59
[0871]	<211> 20
[0872]	<212> PRT
[0873]	<213> 人工序列
[0874]	<220>
[0875]	<223> E2A
[0876]	<400> 59
[0877]	Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
[0878]	1 5 10 15
[0879]	Asn Pro Gly Pro
[0880]	20
[0881]	<210> 60

[0882]	<211> 22															
[0883]	<212> PRT															
[0884]	<213> 人工序列															
[0885]	<220>															
[0886]	<223> F2A															
[0887]	<400> 60															
[0888]	Val	Lys	Gln	Thr	Leu	Asn	Phe	Asp	Leu	Leu	Lys	Leu	Ala	Gly	Asp	Val
[0889]	1				5					10					15	
[0890]	Glu	Ser	Asn	Pro	Gly	Pro										
[0891]				20												
[0892]	<210> 61															
[0893]	<211> 335															
[0894]	<212> PRT															
[0895]	<213> 人工序列															
[0896]	<220>															
[0897]	<223> tEGFR															
[0898]	<400> 61															
[0899]	Arg	Lys	Val	Cys	Asn	Gly	Ile	Gly	Ile	Gly	Glu	Phe	Lys	Asp	Ser	Leu
[0900]	1			5					10						15	
[0901]	Ser	Ile	Asn	Ala	Thr	Asn	Ile	Lys	His	Phe	Lys	Asn	Cys	Thr	Ser	Ile
[0902]				20				25						30		
[0903]	Ser	Gly	Asp	Leu	His	Ile	Leu	Pro	Val	Ala	Phe	Arg	Gly	Asp	Ser	Phe
[0904]			35				40					45				
[0905]	Thr	His	Thr	Pro	Pro	Leu	Asp	Pro	Gln	Glu	Leu	Asp	Ile	Leu	Lys	Thr
[0906]		50				55					60					
[0907]	Val	Lys	Glu	Ile	Thr	Gly	Phe	Leu	Leu	Ile	Gln	Ala	Trp	Pro	Glu	Asn
[0908]	65					70				75					80	
[0909]	Arg	Thr	Asp	Leu	His	Ala	Phe	Glu	Asn	Leu	Glu	Ile	Ile	Arg	Gly	Arg
[0910]				85				90						95		
[0911]	Thr	Lys	Gln	His	Gly	Gln	Phe	Ser	Leu	Ala	Val	Val	Ser	Leu	Asn	Ile
[0912]				100				105						110		
[0913]	Thr	Ser	Leu	Gly	Leu	Arg	Ser	Leu	Lys	Glu	Ile	Ser	Asp	Gly	Asp	Val
[0914]			115				120					125				
[0915]	Ile	Ile	Ser	Gly	Asn	Lys	Asn	Leu	Cys	Tyr	Ala	Asn	Thr	Ile	Asn	Trp
[0916]		130				135					140					
[0917]	Lys	Lys	Leu	Phe	Gly	Thr	Ser	Gly	Gln	Lys	Thr	Lys	Ile	Ile	Ser	Asn
[0918]	145				150				155						160	
[0919]	Arg	Gly	Glu	Asn	Ser	Cys	Lys	Ala	Thr	Gly	Gln	Val	Cys	His	Ala	Leu
[0920]				165				170						175		
[0921]	Cys	Ser	Pro	Glu	Gly	Cys	Trp	Gly	Pro	Glu	Pro	Arg	Asp	Cys	Val	Ser
[0922]				180				185						190		
[0923]	Cys	Arg	Asn	Val	Ser	Arg	Gly	Arg	Glu	Cys	Val	Asp	Lys	Cys	Asn	Leu

[0924]	195	200	205
[0925]	Leu Glu Gly Glu Pro Arg Glu Phe Val Glu Asn Ser Glu Cys Ile Gln		
[0926]	210	215	220
[0927]	Cys His Pro Glu Cys Leu Pro Gln Ala Met Asn Ile Thr Cys Thr Gly		
[0928]	225	230	235
[0929]	Arg Gly Pro Asp Asn Cys Ile Gln Cys Ala His Tyr Ile Asp Gly Pro		
[0930]	245	250	255
[0931]	His Cys Val Lys Thr Cys Pro Ala Gly Val Met Gly Glu Asn Asn Thr		
[0932]	260	265	270
[0933]	Leu Val Trp Lys Tyr Ala Asp Ala Gly His Val Cys His Leu Cys His		
[0934]	275	280	285
[0935]	Pro Asn Cys Thr Tyr Gly Cys Thr Gly Pro Gly Leu Glu Gly Cys Pro		
[0936]	290	295	300
[0937]	Thr Asn Gly Pro Lys Ile Pro Ser Ile Ala Thr Gly Met Val Gly Ala		
[0938]	305	310	315
[0939]	Leu Leu Leu Leu Leu Val Val Ala Leu Gly Ile Gly Leu Phe Met		
[0940]	325	330	335
[0941]	<210> 62		
[0942]	<211> 9		
[0943]	<212> PRT		
[0944]	<213> 人工序列		
[0945]	<220>		
[0946]	<223> VL9肽		
[0947]	<400> 62		
[0948]	Val Met Ala Pro Arg Ala Leu Leu Leu		
[0949]	1	5	
[0950]	<210> 63		
[0951]	<211> 9		
[0952]	<212> PRT		
[0953]	<213> 人工序列		
[0954]	<220>		
[0955]	<223> VL9肽		
[0956]	<400> 63		
[0957]	Ser Gln Ala Pro Leu Pro Cys Val Leu		
[0958]	1	5	