



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 112912387 A

(43) 申请公布日 2021.06.04

(21) 申请号 201980070018.X

(22) 申请日 2019.08.21

(30) 优先权数据

62/721,439 2018.08.22 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2021.04.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2019/047550 2019.08.21

(87) PCT国际申请的公布数据

W02020/041501 EN 2020.02.27

(71) 申请人 弗雷德哈钦森癌症研究中心

地址 美国华盛顿州

(72) 发明人 J·维奇 S·R·里德尔

(74) 专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所
(普通合伙) 44240

代理人 金辉

(51) Int.Cl.

C07K 14/47 (2006.01)

C07K 16/30 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

权利要求书8页 说明书62页

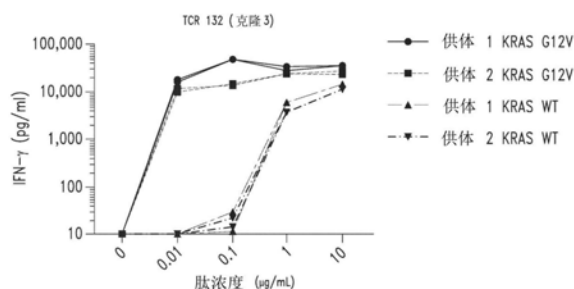
序列表37页 附图54页

(54) 发明名称

靶向KRAS或HER2抗原的免疫疗法

(57) 摘要

本文提供了对KRAS G12V或Her2-ITD新抗原具有特异性的结合蛋白和高亲和力重组T细胞受体(TCR)。还提供了编码和/或表达结合蛋白和/或高亲和力重组TCR的组合物和重组宿主细胞。所述组合物和重组宿主细胞可以用于治疗受试者,这些受试者患有非小细胞肺癌(NSCLC)、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、胆道癌、其中KRAS G12V新抗原是治疗靶标的适应症、或者其中Her2-ITD新抗原是治疗靶标的适应症。还提供了相关的疫苗、疫苗疗法和疫苗接种方案。



1. 一种结合蛋白, 包含:

T细胞受体 (TCR) α 链可变域 (V α), 其包含与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少约85%相同的CDR3氨基酸序列; 以及

TCR β 链可变结构域 (V β), 其包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少约85%相同的CDR3氨基酸序列,

其中所述结合蛋白能够结合MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:1): 人白细胞抗原 (HLA) 复合物和/或肽: HLA复合物, 其中所述肽包含或由SEQ ID NO:1的7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23或24个连续氨基酸组成。

2. 根据权利要求1所述的结合蛋白, 其中, 所述V α 包含SEQ ID NO:2的CDR3氨基酸序列, 并且所述V β 包含SEQ ID NO:3的CDR3氨基酸序列。

3. 根据权利要求1所述的结合蛋白, 其中, 所述V α 包含SEQ ID NO:12的CDR3氨基酸序列, 并且所述V β 包含SEQ ID NO:13的CDR3氨基酸序列。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的结合蛋白, 进一步包含:

(i) 根据SEQ ID NO:48或54的CDR1 α 氨基酸序列;

(ii) 根据SEQ ID NO:49或55的CDR2 α 氨基酸序列;

(iii) 根据SEQ ID NO:51或57的CDR1 β 氨基酸序列; 和/或

(iv) 根据SEQ ID NO:52或58的CDR2 β 氨基酸序列。

5. 根据权利要求4所述的结合蛋白, 包含分别如SEQ ID NOs: 48、49、2、51、52和3所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

6. 根据权利要求5所述的结合蛋白, 包含分别如SEQ ID NOs: 54、55、12、57、58和13所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述HLA包括DRB1-1101或DRB1-1104。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V α 包含或由与SEQ ID NOs: 6、16、66或70中任一项的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列组成。

9. 根据权利要求1至8中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V β 包含或由与SEQ ID NOs: 9、19、68或72中任一项的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列组成。

10. 根据权利要求1至9中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V α 和/或所述V β 的至少三个或四个互补决定区 (CDR) 不具有序列变化, 并且其中具有序列变化的CDR仅具有最多两个氨基酸取代、最多连续五个氨基酸缺失或其组合。

11. 根据权利要求1至10中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V α 包含与根据TRAV8-3或TRAV8-1的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列。

12. 根据权利要求1至11中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V β 包含与根据TRBV30或TRBV12-4的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列。

13. 根据权利要求1至12中任一项所述的结合蛋白, 进一步包含:

与根据TRAJ13或TRAJ38的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列; 以及

根据TCR β 链连接 (JB) 基因区段的氨基酸序列。

14. 根据权利要求13所述的结合蛋白, 包含与根据TRBJ2-4或TRBJ2-3的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V α 包含或由SEQ ID NO:6或66所示的氨基酸序列组成, 并且所述V β 包含或由SEQ ID NO:9或68所示的氨基酸序列组成。

16. 根据权利要求1至14中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V α 包含或由SEQ ID NO:16或70所示的氨基酸序列组成, 并且所述V β 包含或由SEQ ID NO:19或72所示的氨基酸序列组成。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的结合蛋白, 进一步包含TCR β 链恒定结构域(C β)、TCR α 链恒定结构域(C α)或两者。

18. 根据权利要求17所述的结合蛋白, 其中:

(i) 所述C α 与SEQ ID NO:67或71所示的氨基酸序列具有至少约85%的同一性、包含该氨基酸序列或由其组成; 和/或

(ii) 所述C β 与SEQ ID NO:69或73所示的氨基酸序列具有至少约85%的同一性、包含该氨基酸序列或由其组成。

19. 根据权利要求1至18中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述结合蛋白在细胞表面上能够独立地或在不存在CD4的情况下结合 (SEQ ID NO:1):HLA复合物和/或肽:HLA复合物, 其中该肽包含或由SEQ ID NO:1的大约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23或24个连续氨基酸组成。

20. 一种结合蛋白, 包含:

T细胞受体 (TCR) α 链可变 (V α) 结构域, 其包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少约85%相同的CDR3氨基酸序列; 以及

TCR β 链可变域 (V β), 其包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少约85%相同的CDR3氨基酸序列,

其中所述结合蛋白能够结合SPKANKEILDEAYVMAYVMAGVGSPYVSRLLG (SEQ ID NO:22):人白细胞抗原 (HLA) 复合物和/或肽:HLA复合物, 其中该肽包含或由SEQ ID NO:22的大约7、8、9、10、11、12、13、14、14、15、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成。

21. 根据权利要求20的所述结合蛋白, 其中, 所述V α 包含SEQ ID NO:23的CDR3氨基酸序列, 并且所述V β 包含SEQ ID NO:24的CDR3氨基酸序列。

22. 根据权利要求20或21中任一项所述的结合蛋白, 进一步包含根据SEQ ID NO:60的CDR1 α 、根据SEQ ID NO:61的CDR2 α 、根据SEQ ID NO:63的CDR1 β 和/或根据SEQ ID NO:64的CDR2 β 。

23. 根据权利要求22所述的结合蛋白, 包含分别如SEQ ID NO:60、61、23、63、64和24所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

24. 根据权利要求20至23中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述HLA包含DQB1-05:01或DQB1-05:02。

25. 根据权利要求20至24中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V α 包含或由与SEQ ID NO:27或74的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列组成。

26. 根据权利要求20至25中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V β 包含或由与SEQ ID NO:30或76的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列组成。

27. 根据权利要求20至26中任一项所述的结合蛋白,其中,至少三个或四个互补决定区(CDR)不具有序列变化,并且其中具有序列变化的CDR仅具有最多两个氨基酸取代、最多连续五个氨基酸缺失、或其组合。

28. 根据权利要求20至27中任一项所述的结合蛋白,其中,所述V α 包含与根据TRAV8-6的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列。

29. 根据权利要求20至28中任一项所述的结合蛋白,其中,所述V β 包含与根据TRBV20的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列。

30. 根据权利要求20至29中任一项所述的结合蛋白,进一步包含:

与根据TRAJ34的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列;和

根据TCRB链连接(J β)基因区段的氨基酸序列。

31. 根据权利要求30所述的结合蛋白,包含与根据TRBJ2-5的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列。

32. 根据权利要求1至31中任一项所述的结合蛋白,其中,所述V α 包含或由SEQ ID NO: 27或74所示的氨基酸序列组成,并且所述V β 包含或由SEQ ID NO: 30或76所示的氨基酸序列组成。

33. 根据权利要求20至32中任一项所述的结合蛋白,进一步包含TCRB链恒定结构域(C β)、TCR α 链恒定结构域(C α)或两者。

34. 根据权利要求33所述的结合蛋白,其中:

(i) C α 与SEQ ID NO: 75所示的氨基酸序列具有至少约85%的同一性、包含该氨基酸或由其组成;和/或

(ii) C β 与SEQ ID NO: 77所示的氨基酸序列具有至少约85%的同一性、包含该氨基酸或由其组成。

35. 根据权利要求20至34中任一项所述的结合蛋白,其中,所述结合蛋白在细胞表面上能够独立地或在不存在CD4的情况下结合(SEQ ID NO: 22):HLA复合物和/或肽:HLA复合物,其中该肽包含或由SEQ ID NO: 22的大约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成。

36. 根据权利要求1至35中任一项所述的结合蛋白,其中,所述结合蛋白是TCR、嵌合抗原受体或TCR的抗原结合片段。

37. 根据权利要求36所述的结合蛋白,其中,所述TCR、所述嵌合抗原受体或所述TCR的抗原结合片段是嵌合的、人源化的或人的。

38. 根据权利要求36或权利要求37所述的结合蛋白,其中,所述TCR的抗原结合片段包含单链TCR(scTCR)。

39. 一种组合物,包含权利要求1至38中任一项所述的结合蛋白和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

40. 一种编码权利要求1至39中任一项所述的结合蛋白的多核苷酸。

41. 根据权利要求40所述的多核苷酸,其中,所述多核苷酸是经密码子优化的。

42. 根据权利要求40或41所述的多核苷酸,其中,所述多核苷酸包含或由与SEQ ID NO: 4、5、7、8、10、14、15、17、18、20、25、26、28、29或31中任一项所述的核苷酸序列具有至少70%同一性的核苷酸序列组成。

43. 根据权利要求40至42中任一项所述的多核苷酸, 其中, 所述编码的结合蛋白包含TCR α 链和TCR β 链, 其中所述多核苷酸进一步包含位于所述 α 链-编码多核苷酸与所述 β 链-编码多核苷酸之间的编码自切割肽的多核苷酸。

44. 一种表达载体, 包含与表达控制序列可操作连接的根据权利要求40-43中任一项所述的多核苷酸。

45. 根据权利要求44的表达载体, 其中, 所述表达载体能够将所述多核苷酸递送至宿主细胞。

46. 根据权利要求45所述的表达载体, 其中, 所述宿主细胞是造血祖细胞或人免疫系统细胞。

47. 根据权利要求46所述的表达载体, 其中, 所述免疫系统细胞是CD4+T细胞、CD8+T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、天然杀伤细胞、树突状细胞或其任意组合。

48. 根据权利要求47所述的表达载体, 其中, 所述T细胞是幼稚T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞或其任意组合。

49. 根据权利要求44至48中任一项所述的表达载体, 其中, 所述表达载体是病毒载体。

50. 根据权利要求49所述的表达载体, 其中, 所述病毒载体是慢病毒载体或 γ -逆转录病毒载体。

51. 一种重组宿主细胞, 包含根据权利要求40-43中任一项所述的多核苷酸或根据权利要求44-50中任一项所述的表达载体, 其中所述重组宿主细胞能够在其细胞表面上表达所述编码的结合蛋白, 其中所述多核苷酸与所述宿主细胞异源。

52. 根据权利要求51所述的重组宿主细胞, 其中, 所述重组宿主细胞是造血祖细胞或免疫系统细胞, 该免疫系统细胞任选地是人免疫系统细胞。

53. 根据权利要求52所述的重组宿主细胞, 其中, 所述免疫系统细胞是CD4+T细胞、CD8+T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、天然杀伤细胞、树突状细胞或其任意组合。

54. 根据权利要求52或53所述的重组宿主细胞, 其中, 所述免疫系统细胞是T细胞。

55. 根据权利要求53或54所述的重组宿主细胞, 其中, 所述T细胞是幼稚T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞、干细胞记忆T细胞或其任意组合。

56. 根据权利要求52至55中任一项所述的重组宿主细胞, 其中, 与内源TCR相比, 所述结合蛋白能够更有效地与CD3蛋白缔合。

57. 根据权利要求52至55中任一项所述的重组宿主细胞, 其中, 与内源TCR相比, 所述结合蛋白具有更高的表面表达。

58. 根据权利要求52至57中任一项所述的重组宿主细胞, 其能够在存在肽抗原:HLA复合物的情况下产生IFN- γ , 但是在存在参考肽:HLA复合物的情况下产生较少量的IFN- γ 或产生无法检测到的IFN- γ ,

其中该肽抗原根据SEQ ID NO:1或22, 或其中该肽抗原分别包含或由SEQ ID NO:1或22的大约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成, 并且

其中参考肽分别根据SEQ ID NO:33或34。

59. 根据权利要求58所述的重组宿主细胞, 其能够在肽抗原以10、1、0.1或大约0.01 μ g/mL的浓度存在时产生IFN- γ 。

60. 根据权利要求58或59中任一项所述的重组宿主细胞,其能够在存在肽抗原:HLA复合物的情况下产生至少约1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000或10,000pg/mL的IFN- γ ,其中该肽抗原以0.01 μ g/mL至大约100 μ g/mL的浓度存在。

61. 根据权利要求58至60中任一项所述的重组宿主细胞,其能够在存在以下物质的情况下产生IFN γ :

(a) KRAS G12V肽:HLA复合物;以及

(b) (i) 抗HLA-DQ抗体或(b) (ii) 抗HLA-DR抗体。

62. 根据权利要求58至61中任一项所述的重组宿主细胞,其能够在存在(i) KRAS G12V肽抗原和/或KRAS G12V肽编码RNA和(ii) 表达HLA-DRB1-1101或HLA DRB1-1104的细胞的情况下产生IFN γ ,并能够将KRAS G12V抗原呈递给所述宿主免疫细胞。

63. 根据权利要求58至62中任一项所述的重组宿主细胞,其中:

(i) 其能够在存在肽抗原:HLA复合物的情况下产生至少约50pg/mL的IFN- γ ,其中该肽抗原是根据SEQ ID NO:22或者包含或由SEQ ID NO:22的大约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成,并且以大约0.01 μ g/mL或约0.05 μ g/mL存在;和/或

(ii) 其能够在存在肽抗原:HLA复合物的情况下产生至少约100、500、1000、5,000或10,000 μ g/mL IFN- γ ,其中肽抗原是根据SEQ ID NO:22或者包含或由SEQ ID NO:22的约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成,并且以约0.02、0.2、2或20 μ g/mL存在。

64. 根据权利要求58至63中任一项所述的重组宿主细胞,其在存在肽抗原:HLA复合物的情况下能够产生至少约10,000pg/mL的IFN- γ ,其中该肽抗原是根据SEQ ID NO:22或者包含或由SEQ ID NO:22的大约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成,并且以至少约0.01 μ g/mL存在。

65. 根据权利要求58至64的任一项的重组宿主细胞,其能够在存在肽抗原:HLA复合物和抗HLA-DR抗体和/或抗HLA I类抗体时产生IFN- γ ,其中该肽抗原是根据SEQ ID NO:22或者包含或由SEQ ID NO:22的大约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成。

66. 根据权利要求58至65中任一项所述的重组宿主细胞,其能够在存在以下物质的情况下产生IFN- γ : (i) 根据SEQ ID NO:22的或者包含或由SEQ ID NO:22的大约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成的Her2-ITD肽抗原和/或编码SEQ ID NO:22的多核苷酸或者包含或由SEQ ID NO:22的大约7、8、9、10、11、12、13、14、15、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成的肽以及(ii) 表达HLA-DQB1-0501或HLA-DQB1-0502并能够将Her2-ITD肽抗原呈递给宿主免疫细胞的细胞系。

67. 根据权利要求58至66中任一项所述的重组宿主细胞,其是免疫细胞并且包含内源免疫细胞蛋白的染色体基因敲除。

68. 根据权利要求67所述的重组宿主细胞,其包含PD-1、TIM3、LAG3、CTLA4、TIGIT、HLA成分、TCR成分或其任意组合的染色体基因敲除。

69. 一种治疗有需要的受试者的方法,包括:

将包含根据权利要求1至38中任一项所述的结合蛋白或根据权利要求58-68中任一项所述的重组宿主细胞的有效量的组合物施用于所述受试者,其中所述受试者患有非小细胞肺癌(NSCLC)、结直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、胆道癌、其中KRAS G12V新抗原为治疗靶标的适应症或其中Her2-ITD新抗原为治疗靶标的适应症。

70.根据权利要求69所述的方法,其中,所述组合物肠胃外或静脉内施用。

71.根据权利要求69或权利要求70所述的方法,其中,所述方法包括向所述受试者施用多个剂量的所述组合物。

72.根据权利要求71所述的方法,其中,所述多个剂量以约两周至约四周的施用间隔施用。

73.根据权利要求69至72中任一项所述的方法,其中,所述方法进一步包括向所述受试者施用细胞因子。

74.根据权利要求73所述的方法,其中,所述细胞因子包括IL-2、IL-15或IL-21。

75.根据权利要求69至74中任一项所述的方法,其中,所述受试者进一步接受免疫抑制治疗。

76.根据权利要求69至75中任一项所述的方法,其进一步包括向所述受试者施用免疫抑制剂抑制剂,该免疫抑制剂抑制剂任选地为PD-1抑制剂。

77.根据权利要求76所述的方法,其中,所述PD-1抑制剂包括尼武单抗(OPDIVO®);派姆单抗(KEYTRUDA®);伊匹木单抗+尼武单抗(YERVOY®+OPDIVO®);西米普利单抗;IBI-308;尼武单抗+relatlimab;BCD-100;卡米单抗;JS-001;斯巴达珠单抗;替雷利珠单抗;AGEN-2034;BGBA-333+替雷利珠单抗;CBT-501;dostarlimab;durvalumab+MEDI-0680;JNJ-3283;盐酸帕唑帕尼+派姆单抗;pidilizumab;REGN-1979+西米普利单抗;ABBV-181;ADUS-100+斯巴达珠单抗;AK-104;AK-105;AMP-224;BAT-1306;BI-754091;CC-90006;西米普利单抗+REGN-3767;CS-1003;GLS-010;LZM-009;MEDI-5752;MGD-013;PF-06801591;Sym-021;替雷利珠单抗+帕米帕尼;XmAb-20717;AK-112;ALPN-202;AM-0001;对抗PD-1的阿尔茨海默氏病抗体;BH-2922;BH-2941;BH-2950;BH-2954;对抗CTLA-4和PD-1的实体瘤生物制剂;针对肿瘤的靶向PD-1和LAG-3的双特异性单克隆抗体;BLSM-101;CB-201;CB-213;CBT-103;CBT-107;细胞免疫疗法+PD-1抑制剂;CX-188;HAB-21;他HEISCOIII-003;IKT-202;JTX-4014;MCLA-134;MD-402;mDX-400;MGD-019;拮抗PDCD1肿瘤的单克隆抗体;拮抗PD-1肿瘤的单克隆抗体;抑制PD-1肿瘤的溶瘤病毒;OT-2;PD-1拮抗剂+ropeginterferonalfa-2b;PEGMP-7;PRS-332;RXI-762;STIA-1110;TSR-075;靶向HER2和PD-1肿瘤的疫苗;针对PD-1的肿瘤和自身免疫性疾病的疫苗;XmAb-23104;抑制PD-1用于肿瘤学的反义寡核苷酸;AT-16201;抑制PD-1肿瘤学的双特异性单克隆抗体;IMM-1802;拮抗PD-1和CTLA-4用于实体瘤和血液学肿瘤的单克隆抗体;尼伏鲁单抗生物仿制药;用于拮抗CD278和CD28并拮抗PD-1用于肿瘤学的重组蛋白;用于激动PD-1的自身免疫疾病和炎性疾病的重组蛋白;SNA-01;SSI-361;YBL-006;AK-103;JY-034;AUR-012;BGB-108;抑制PD-1, Gal-9和TIM-3的实体瘤药物;ENUM-244C8;ENUM-388D4;MEDI-0680;拮抗PD-1转移性黑色素瘤和转移性肺癌的单克隆抗体;抑制PD-1肿瘤学的单克隆抗体;用于肿瘤的靶向CTLA-4和PD-1的单克隆抗体;拮抗PD-1对NSCLC的单克隆抗体;抑制PD-1和TIM-3肿瘤的单克隆抗体;抑制PD-1肿瘤学的单克隆抗体;抑制PD-1和VEGF-A用于血液系统恶性肿瘤和实体瘤的重组蛋白;用于对抗PD-1肿瘤的小分子;Sym-016;

inebilizumab+MEDI-0680;针对转移性黑色素瘤的针对PDL-1和IDO的疫苗;抗PD-1单克隆抗体+胶质母细胞瘤的细胞免疫疗法;拮抗PD-1用于肿瘤学的抗体;抑制PD-1/PD-L1的血液恶性肿瘤和细菌感染的单克隆抗体;抑制PD-1感染HIV的单克隆抗体;或抑制PD-1实体瘤的小分子。

78.根据权利要求69至77中任一项的方法,其中,所述组合物包含重组CD4+T细胞、重组CD8+T细胞或两者。

79.根据权利要求69至78中任一项所述的方法,其中,所述重组宿主细胞是同种异体、自体或同基因的。

80.根据权利要求1至38中任一项所述的结合蛋白、根据权利要求39所述的组合物、根据权利要求40至43中任一项所述的多核苷酸、根据权利要求44至50中任一项所述的表达载体或根据权利要求51至68中任一项所述的重组宿主细胞在治疗非小细胞肺癌(NSCLC)、大肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、胆道癌、其中KRAS G12V新抗原是治疗靶点的适应症、或其中Her2-ITD新抗原是治疗靶标的适应症中的用途。

81.根据权利要求51至68中任一项所述的重组宿主细胞在非小细胞肺癌(NSCLC)、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、胆道癌、其中KRAS G12V新抗原是治疗靶标的适应症、或其中Her2-ITD新抗原是治疗靶标的适应症的过继免疫疗法中的用途。

82.根据权利要求1至38中任一项所述的结合蛋白、根据权利要求39所述的组合物、根据权利要求40至43中任一项所述的多核苷酸、根据权利要求44至50中任一项所述的表达载体、或根据权利要求51至68中任一项所述的重组宿主细胞在制备用于治疗非小细胞肺癌(NSCLC)、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、胆道癌、其中KRAS G12V新抗原是治疗靶标的适应症的药物中的用途。

83.一种免疫原性组合物,包含:

(i)具有与MTE YKL VVVGAV GVG KSA LTI QLI Q(SEQ ID NO:1)或SPK ANK EIL DEA YVM AYV MAG VGS PYV SRL LG(SEQ ID NO:22)至少80%相同的氨基酸序列的肽;以及

(ii)非天然存在的药学上可接受的载体。

84.根据权利要求83所述的免疫原性组合物,其中,所述非天然存在的药学上可接受的载体包括乳膏、乳剂、凝胶、脂质体、纳米颗粒或软膏。

85.一种免疫原性组合物,包含:

(i)具有与MTE YKL VVVGAV GVG KSA LTI QLI Q(SEQ ID NO:1)或SPK ANK EIL DEA YVM AYV MAG VGS PYV SRL LG(SEQ ID NO:22)至少80%相同的氨基酸序列的肽;以及

(ii)免疫有效量的佐剂。

86.根据权利要求84所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包括聚-ICLC、CpG、GM-CSF或明矾。

87.一种治疗有需要的受试者或在该受试者中诱导免疫应答的方法,该方法包括向该受试者施用根据权利要求83至86中任一项所述的免疫原性组合物,

其中受试者患有或疑似患有非小细胞肺癌(NSCLC)、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、胆道癌、其中KRAS G12V新抗原是治疗靶点的适应症、或其中Her2-ITD新抗原是治疗靶标的适应症。

88.根据权利要求87所述的方法,其中,将所述免疫原性组合物施用于所述受试者两次

或更多次。

89. 根据权利要求87或权利要求88所述的方法, 进一步包括对所述受试者施用过继性细胞疗法。

90. 根据权利要求86至88中任一项所述的方法, 进一步包括向所述受试者施用佐剂或检查点抑制剂中的至少一种, 其中所述佐剂或检查点抑制剂任选地包含IL-2、PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂或CTLA-4抑制剂中的至少一种。

91. 一种能够引起对KRAS G12V的抗原特异性T细胞应答的分离的肽, 其包含具有不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8或7个氨基酸的多肽, 其中该多肽包含来自SEQ ID NO:1所示的KRAS G12V氨基酸序列的至少7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续氨基酸的序列。

92. 一种能够引起对Her2-ITD的抗原特异性T细胞应答的分离的肽, 其包含具有不超过32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、11、10、9、8或7个氨基酸的多肽, 其中该多肽包含来自SEQ ID NO:22所示的Her2-ITD氨基酸序列的至少7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31或32个连续氨基酸的序列。

93. 一种制备抗原刺激的抗原呈递细胞的方法, 该方法包括:

在足以通过抗原呈递细胞进行抗原加工和呈递的条件和时间下对以下物质进行体外接触, (i) 抗原呈递细胞群, 和 (ii) 根据权利要求40至43中任一项所述的多核苷酸或根据权利要求44至50中任一项所述的表达载体, 从而获得能够引起针对KRAS G12V或Her2-ITD的抗原特异性T细胞应答的抗原刺激性抗原呈递细胞。

94. 根据权利要求93所述的方法, 进一步包括在足以产生KRAS G12V-特异性T细胞或Her2-ITD-特异性T细胞的条件下, 使抗原刺激的抗原呈递细胞与一个或多个免疫相容性T细胞接触。

95. 一种方法, 包括在体外扩增根据权利要求93所述的KRAS G12V-特异性T细胞或Her2-ITD-特异性T细胞, 从而分别获得KRAS G12V-特异性T细胞或Her2-ITD-特异性T细胞的一个或多个克隆, 以及确定用于所述一个或多个克隆中一个或多个的T细胞受体多肽编码核酸序列。

96. 根据权利要求95所述的方法, 进一步包括用具有确定的T细胞受体多肽编码核酸序列的多核苷酸在体外转染或转导T细胞群, 从而获得工程化的KRAS G12V-特异性T细胞或工程化的Her2-ITD细胞群, 所述工程化的KRAS G12V-特异性T细胞或工程化的Her2-ITD细胞群的量足以过继转移抗原特异性T细胞应答。

靶向KRAS或HER2抗原的免疫疗法

关于序列表的声明

[0001] 与本申请相关联的序列表以文本格式代替纸质副本提供,并且据此通过引用结合到说明书中。包含序列表的文本文件的名称为360056_472WO_SEQUENCE_LISTING.txt。文本文件为61.6KB,创建于2019年8月21日,正在通过EFS-Web电子提交。

技术领域

[0002] 本公开涉及生物医学领域,具体地,涉及用于治疗以KRAS或HER2抗原为特征或与之相关的疾病例如癌症的组合物和方法。本公开的某些实施例涉及用于细胞免疫疗法的组合物和方法,细胞免疫疗法包括经修饰以编码和/或表达抗原特异性结合蛋白的免疫细胞。

背景技术

[0003] T细胞可通过识别衍生自未突变或突变蛋白加工并呈现与细胞表面主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的肽来消除癌细胞。在接受检查点阻断抗体(参见McGranahan N等,Science.2016;351(6280):1463-69)和过继T细胞转移(参见Lu Y-C等,Clinical Cancer Research.2014;20(13):3401-10)的患者中,对突变基因编码的新抗原特异的T细胞被认为是重要的抗肿瘤免疫介质。新抗原是T细胞的有吸引力的靶标,因为它们不受中央和外周耐受机制的限制,这些机制限制了对自身抗原具有特异性的T细胞的频率和功能(参见Schumacher TN等,Science.2015;348(6230):69-74)。实际上,存在于非小细胞肺癌(NSCLC)和其他癌症类型中的体细胞突变的负担与对免疫检查点抑制剂的反应相关(参见Rizvi NA等,Science.2015;348(6230):124-8以及Yatim N等,Science.2015;350(6258):328-34),提示内源性新抗原反应性T细胞的恢复活力有助于疗效。用肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)治疗的黑色素瘤和宫颈癌患者的临床反应也与TIL产品中新抗原反应性T细胞的存在有关(参见Lu Y-C等,Clinical Cancer Research.2014;20(13):3401-10)。大多数新抗原在肿瘤中是随机的、患者特异性的和/或异质表达的,这限制了它们作为工程化T细胞在多位患者中过继转移的靶标的用途(参见Schumacher TN等,Science.2015;348(6230):69-74),并且可以允许在NSCLC进展过程中丢失免疫原性新抗原的肿瘤细胞逃逸(参见Anagnostou V等人,Cancer discovery.2017;7(3):264-76)。相反,在许多患者的癌症中,复发性致癌驱动子突变在克隆中均质表达。不幸的是,已经描述了T细胞对极少数驱动突变的反应,这可能是基于人类白细胞抗原(HLA)基因型进行免疫选择的结果(参见Marty R等,Cell.2017)或不可逆性T细胞耗尽的发展排除了使用功能测定法将其分离(参见Philip M等,Nature.2017;545(7655):452)。

[0004] 由于其直接的细胞毒功能,鉴定T细胞识别的新抗原(包括由致癌突变产生的抗原)的努力主要集中在I类MHC到CD8⁺T细胞上的表位。尽管在许多肿瘤上缺乏II类MHC,但CD4⁺II类MHC限制的T细胞在人抗肿瘤免疫中的作用越来越受到赞赏。CD4⁺T细胞可以识别专业抗原呈递细胞呈递的肿瘤抗原,并支持CD8⁺T细胞在淋巴组织中的引发和扩增以及CD8⁺T细胞和先天免疫细胞在肿瘤微环境中的效应功能。小鼠模型的最新研究表明,肿瘤部位的

CD4⁺T细胞是免疫介导的肿瘤排斥的重要组成部分(参见Spitzer MH等,Cell.2017;168(3):487-502.e15),以及进行疫苗接种以将II类MHC限制的CD4⁺T细胞增加至新抗原可能具有有效的治疗作用(参见Kreiter S等,Nature.2015;520(7549):692-6)。此外,黑色素瘤患者常见CD4⁺T细胞对新抗原的反应(参见Linnemann C等,Nature medicine.2015;21(1):81),并且针对接种了旨在诱导CD8⁺T细胞反应的候选新抗原肽的黑色素瘤患者的近期研究相反导致其对60%的肽产生CD4⁺T细胞反应,具有抗肿瘤活性的迹象(参见Ott PA等,Nature.2017;547(7662):217)。肿瘤周围CD4⁺T细胞与NSCLC预后改善之间的关联(参见Al-Shibli KI等,Clinical cancer research.2008;14(16):5220-7;Hiraoka K等,British journal of cancer.2006;94(2):275;以及Wakabayashi O等,Cancer science.2003;94(11):1003-9)表明抗肿瘤CD4⁺T细胞应答可能具有临床意义。然而,CD4⁺新抗原特异性T细胞在人抗肿瘤免疫中的作用尚不清楚,很少有报道专门研究NSCLC中新抗原特异性CD4⁺T细胞应答。

附图说明

[0005] 结合附图,从以下描述和所附权利要求书中,本文公开的实施例将变得更加完全明显。

[0006] 图1A-1E示出了肺癌患者中CD4⁺新抗原反应性T细胞的检测和测试。(A)用于检测新抗原反应性T细胞的示意图。来自五名不同肺癌患者的外周血单核细胞(PBMC)用含有突变的肽库刺激(B)。与单个突变体或野生型肽孵育后,通过ELISpot在刺激的培养物中对IFN- γ 分泌细胞进行定量。所有实验都包括两个或三个技术重复。(C)与突变体SREK肽孵育后,来自患者1490的CD4⁺和CD8⁺T细胞的代表性IFN- γ 细胞内染色。(D)与ZNF292肽孵育的来自患者1347的CD4⁺和CD8⁺T细胞的代表性IFN- γ 细胞内染色。(E)作为患者1490和1347患者培养物中总T细胞的一部分的新抗原特异性CD4⁺或CD8⁺IFN- γ ⁺细胞的定量。

[0007] 图2A至2D示出了来自患者1490的肿瘤浸润淋巴细胞的新抗原特异性CD8⁺T细胞的检测和测试。将来自患者1490肿瘤切除的肿瘤浸润淋巴细胞与含有来自PWP2的突变或野生型序列的肽孵育,并通过干扰素捕获来测量IFN- γ 的分泌(A)。(B)在肿瘤浸润淋巴细胞培养后以及在IFN- γ 捕获TIL产物之后,在非相邻肺组织和肿瘤中PWP2-反应性CD8⁺TCRV β 克隆型频率。将含有PWP2特异性细胞的T细胞系与指示浓度的突变体(TERWDNLIYY (SEQ ID NO:39))或野生型(AERWDNLIYY (SEQ ID NO:40))肽孵育,并通过ELISA测定IFN- γ 的分泌(C、D)。

[0008] 图3A-3G示出了对与野生型肽有关的突变肽特异的CD4⁺T细胞系。通过IFN- γ 捕获富集了抗原特异性细胞的来自患者1347和1490的单克隆CD4⁺T细胞系在体外扩增,然后与自体B细胞和指示浓度的突变或野生型肽孵育。通过ELISA测量IFN- γ 的分泌。(A)来自患者1347的T细胞对MP3KP肽的反应性。(B-D)来自患者1490的T细胞对SREK1肽的反应性。(E、F)来自患者1490的T细胞对GUCY1A3肽的反应性。(G)来自患者1490的T细胞对AGO2肽的反应性。

[0009] 图4A-4K示出了对KRAS G12V肽具有特异性的CD4⁺T细胞的活性和测试。(A)在指示浓度的KRAS的N末端26个氨基酸存在的情况下,来自患者1139的三个CD4⁺T细胞克隆(克隆#3、5和9)与V12(突变)或G12(野生型)孵育,通过ELISA测量IFN- γ 的产生。(B)在存在指

示的II类HLA阻断抗体的情况下,将T细胞克隆与KRAS G12V肽孵育。(C)将T细胞克隆与B-LCL细胞系孵育,所述B-LCL细胞系用KRAS G12V肽或对照组进行脉冲,并表达与患者1139 (HLA DQB1-1104/1301DQB1 0301/0603)共有的单独的II类HLA等位基因。(D)将HLA DRB1-11:04+LCL与KRAS G12V肽孵育或用编码野生型或G12V KRAS序列的RNA转染。(E)将T细胞克隆与用KRAS G12V肽(1 μ g/mL)脉冲或用编码野生型或KRAS G12V序列的RNA转染的HLADRB1*11:04+LCL孵育,并通过ELISA测量IFN γ 的产生。(F)用来自T细胞克隆#3和#9的编码T细胞受体(TCR) V α 和V β 基因的慢病毒载体转导来自两个正常供体的CD4⁺ T细胞,然后孵育用KRAS G12V肽脉冲的HLA-DRB1-1104+LCL细胞。通过ELISA测量IFN- γ 的分泌。(G-K)用编码来自T细胞克隆#3 (aka TCR132)和#9 (aka TCR136)的T细胞受体V α 和V β 基因的慢病毒载体转导2个正常供体的CD4⁺ T细胞,同时进行内源性TCR α (J) 外显子1的CRISPR介导破坏,然后孵育经突变或野生型KRAS序列转染的KRASG12V肽 (G、H) 或B-LCL细胞脉冲的HLA-DRB1*1104+LCL细胞 (I),并通过ELISA测量IFN γ 的产生 (G-I、K)。

[0010] 图5A-5L示出了对Her2外显子20插入 (ERBB2 (Her2) 内部串联重复 (ITD); 在本文中也称为Her2-ITD) 具有特异性的CD4⁺ T细胞。(A、B) 在存在指示浓度的Her2-ITD (SPKANKEILDEAYVMAYVMAGVGSPYVSRLLG; SEQ ID NO: 22) 或相应的野生型肽 (SPKANKEILDEAYVMAGVGSPYVSRLLG; SEQ ID NO: 34) 的情况下,将来自患者1238 (50,000个细胞)的CD4⁺ T细胞系与自体B细胞 (100,000个细胞) 共培养,并且通过ELISA测量IFN- γ 的产生。(C、D) 在存在指示的II类MHC阻断抗体的情况下,将来自患者1238的CD4⁺ T细胞系与Her2-ITD肽孵育。(E、F) 将CD4⁺ T细胞系与用Her2-ITD肽脉冲或用编码野生型或Her2-ITD序列的RNA转染的自体B细胞孵育。(G) 将CD4⁺ T细胞系与表达与患者1238共享的个体II类HLA等位基因的Her2-ITD肽脉冲的B-LCL细胞系孵育 (HLA-DQB1-1202/1502DQB1 0301/0501)。(H-J) 用从Her2-ITD特异性T细胞获得的TCR序列转导来自两个正常供体的CD4⁺ T细胞,与用Her2-ITD肽 (H、I) 脉冲的B细胞或用野生型或突变的Her-2序列 (J) 转染的B-LCL细胞孵育,并在上清液中测量IFN- γ 的产生。(K) 通过CRISPR介导的内源TCR α 恒定区基因 (TRAC) 的删除,改善了通过用V β 2-特异性抗体染色所测量的转移的TCR的表达。(L) 对肿瘤和不相邻肺进行深层TCR V β 测序,并通过Fisher精确测试将Her2-ITD-特异性V β 定量为TCR V β 模板 (template) 的百分比 $p=0.004$,以用于与肺有关的肿瘤中富集。

[0011] 图6A和6B示出了多个示例性的Her2-ITD反应性T细胞系共享共同的TCR V β 克隆型。(A) 从PloS One 12.2 (2017): e0171225改编的Her2外显子20插入 (内部串联重复 (ITD)) 的示意图。(B) 通过TCR V β 深度测序分析了源自患者1238的十种不同的Her2-ITD反应性T细胞系,并且示出了每种T细胞系的TCR V β 模板 (y轴) 的百分比。

[0012] 图7A和7B示出了变体等位基因频率和mRNA表达与表达的突变的免疫原性不相关。(A) 比较来自该系列的五名患者中鉴定为具有免疫原性和非免疫原性的突变,用于TPM中的mRNA表达,该表达由肺癌腺癌的癌症基因组图谱数据库中的平均表达 (其对患者1139、1238、1490和511移除分布的顶部和底部的20%) 确定并由患者1347的患者异种移植物中的测得mRNA表达 (Mann-Whitney测试, $p=0.5$) 来确定。(B) 来自五名患者的免疫原性和非免疫原性筛选的突变的变体等位基因测序读段的一部分,通过Mann-Whitney测试得到 $p=0.78$ 。

[0013] 图8示出了来自健康HLA-DRB1-1104供体的血液的KRAS G12V-特异性CD4⁺ T细胞克隆型。

具体实施方式

[0014] 在一些方面,本公开提供针对KRAS G12V或Her2-ITD新抗原的结合蛋白和/或高亲和力重组TCR。还提供了包括(例如编码和/或表达)结合蛋白和/或高亲和力重组TCR的组合物和重组宿主细胞。根据本公开的组合物和重组宿主细胞可用于治疗患有非小细胞肺癌(NSCLC)、结肠直肠癌、胰腺癌、其中KRAS G12V新抗原是治疗靶标其他适应症(本文也称为疾病或病症)、以及其中Her2-ITD新抗原是治疗靶标的适应症的受试者。在一些实施例中,对KRAS G12V新抗原具有特异性的组合物和重组宿主细胞(例如,经修饰以编码和/或表达如本文公开的KRAS G12V-特异性结合蛋白或高亲和力重组TCR的免疫细胞,例如T细胞)可用于治疗患有胆道癌的受试者。在某些实施例中,对Her2-ITD新抗原具有特异性的组合物和重组宿主细胞(例如免疫细胞,如T细胞,经修饰以编码和/或表达如本文所公开的Her2-ITD-特异性结合蛋白或高亲和力重组TCR)可用于治疗患有与Her2-ITD新抗原相关的疾病或病症(例如卵巢癌或乳腺癌)的受试者。还提供了免疫原性组合物,例如疫苗,以及相关用途。

[0015] 容易理解的是,如本文一般描述的实施例是示例性的。各种实施例的以下描述无意于限制本公开的范围,而仅仅是各种实施例的代表。而且,在不脱离本公开的范围的情况下,本领域技术人员可以改变本文公开的某些方法的步骤或动作的顺序。换言之,除非实施例的正确操作需要特定的步骤或动作顺序,否则可以修改特定步骤或动作的顺序或使用。

[0016] 在更详细地阐述本公开之前,提供其用于本文的某些术语的定义可能有助于其理解。在整个本公开中阐述了附加的定义。

[0017] 除非另有明确定义,否则本文所用的技术术语具有其在本领域中所理解的正常含义。

[0018] 在本说明书中,任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应理解为包括所述范围内的任何整数的值、以及在适当时包括其分数的分数(例如整数的十分之一和十分之一),除非另有说明。同样,除非另有说明,否则本文所叙述的与任何物理特征,例如聚合物亚基、尺寸或厚度有关的任何数值范围应理解为包括所叙述的范围内的任何整数。

[0019] 如在本文中所使用的,在涉及可测量值时,“大约”意在涵盖与特定或指定的值、范围或结构的 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 或 $\pm 0.1\%$ 的变化,除非另有说明。

[0020] 应当理解,本文所用的术语“一个”和“一种”是指所列举的组分中的“一个或多个”。应将替代方案(例如“或”)的使用理解为是指替代方案之一,两者或两者的任意组合。如本文中所使用的,术语“包括”、“具有”和“包括”被同义地使用,这些术语及其变体旨在被解释为非限制性的。

[0021] “任选的”或“任选地”是指随后描述的元素、组件、事件或情况可能发生或可能不发生,并且该描述包括其中元素、组件、事件或情况发生的情况以及它们不发生的情况。

[0022] 另外,应该理解,本申请公开了衍生自本文所述的结构和亚基的各种组合的单个构建体或构建体组,其程度与单独设定每个构建体或构建体组的程度相同。因此,特定结构或特定亚单元的选择在本公开的范围內。

[0023] 术语“基本上由...组成”不等同于“包括”,并且指权利要求的指定材料或步骤或不实质上影响所要求保护的主题的基本特征的材料或步骤。例如,蛋白质结构域、区域或模块(例如,结合结构域、铰链区或接头)或蛋白质(其可以具有一个或多个结构域、区域或模

块)“基本上”由特定氨基酸组成,这时结构域、区域、模块或蛋白质的氨基酸序列包括延伸、缺失、突变或其组合(例如,氨基酸或羧基末端或结构域之间的氨基酸)组合时,最多贡献20%(例如,最多15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%或1%)的结构域、模块、区域或蛋白质的长度,并且基本上不会影响(即,不会将活性降低50%以上,例如不超过40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或1%)的结构域、区域、模块或蛋白质的活性(例如,结合蛋白的靶结合亲和力)。

[0024] 如本文所用,“氨基酸”是指天然存在的和合成的氨基酸,以及以类似于天然存在的氨基酸的方式起作用的氨基酸类似物和氨基酸模拟物。天然存在的氨基酸是由遗传密码编码的氨基酸,以及后来被修饰的氨基酸,例如羟脯氨酸,γ-羧基谷氨酸和O-磷酸丝氨酸。氨基酸类似物是指具有与天然氨基酸相同的基本化学结构的化合物,即与氢、羧基、氨基和R基团结合的α-碳,例如,高丝氨酸、正亮氨酸、蛋氨酸亚砷、蛋氨酸甲基砷。这样的类似物具有修饰的R基团(例如正亮氨酸)或修饰的肽主链,但是保留了与天然氨基酸相同的基本化学结构。氨基酸模拟物是指具有与氨基酸的一般化学结构不同的结构但以与天然氨基酸相似的方式起作用的化合物。

[0025] 如本文所用,“蛋白质”或“多肽”是指氨基酸残基的聚合物。蛋白质适用于天然存在的氨基酸聚合物,以及其中一个或多个氨基酸残基是相应的天然存在的氨基酸和非天然存在的氨基酸聚合物的人工化学模拟物的氨基酸聚合物。

[0026] 如本文所用,“融合蛋白”是指在单链中具有至少两个不同结构域的蛋白质,其中所述结构域不是天然一起存在于蛋白质中的。可以使用PCR、重组工程等来构建编码融合蛋白的多核苷酸,或者可以合成这样的融合蛋白。融合蛋白可进一步包含其他成分,例如标签、接头或转导标记。在某些实施例中,由宿主细胞(例如,T细胞)表达或产生的蛋白质位于细胞表面,其中融合蛋白锚定在细胞膜上(例如,通过跨膜结构域),并包含细胞外部分(例如,包含结合结构域)和细胞内部分(例如,包含信号传导结构域、效应子结构域、共刺激结构域或其组合)。

[0027] “连接氨基酸”或“连接氨基酸残基”是指在多肽的两个相邻基序、区域或结构域之间,例如在结合结构域和相邻恒定结构域之间或恒定结构域或TCR链与相邻的自我切割肽之间的一个或多个(例如,约2-10个)氨基酸残基。连接氨基酸可以由融合蛋白的构建体设计产生(例如,在编码融合蛋白的核酸分子的构建过程中,由于使用限制酶位点而产生的氨基酸残基)。

[0028] “核酸分子”或“多核苷酸”是指包括共价连接的核苷酸的聚合化合物,其可以由天然亚基(例如嘌呤或嘧啶碱基)或非天然亚基(例如吗啉环)组成。嘌呤碱基包括腺嘌呤、鸟嘌呤、次黄嘌呤和黄嘌呤、嘧啶碱基包括尿嘧啶、胸腺嘧啶和胞嘧啶。核酸分子包括聚核糖核酸(RNA)、聚脱氧核糖核酸(DNA),其可以是单链或双链的cDNA、基因组DNA和合成DNA。如果是单链,则核酸分子可以是编码链或非编码链(反义链)。编码氨基酸序列的核酸分子包括编码相同氨基酸序列的所有核苷酸序列。核苷酸序列的某些形式还可以包括内含子,以至于内含子将通过共转录或转录后机制被除去。换言之,由于遗传密码的冗余或简并或通过剪接,不同的核苷酸序列可编码相同的氨基酸序列。

[0029] 如本文所用,“突变”是指分别与参考或野生型核酸分子或多肽分子相比,核酸分子或多肽分子的序列变化。突变可导致几种不同类型的序列变化,包括核苷酸或氨基酸的

取代、插入或缺失。

[0030] “保守取代”是指不显著影响或改变特定蛋白质的结合特征的氨基酸取代。通常，保守取代是其中取代的氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基取代的取代。保守取代包括在以下组之一中发现的取代：第1组：丙氨酸 (Ala或A)、甘氨酸 (Gly或G)、丝氨酸 (Ser或S)、苏氨酸 (Thr或T)；第2组：天冬氨酸 (Asp或D)、谷氨酸 (Glu或Z)；第3组：天冬酰胺 (Asn或N)、谷氨酰胺 (Gln或Q)；第4组：精氨酸 (Arg或R)、赖氨酸 (Lys或K)、组氨酸 (His或H)；第5组：异亮氨酸 (Ile或I)、亮氨酸 (Leu或L)、蛋氨酸 (Met或M)、缬氨酸 (Val或V)；第6组：苯丙氨酸 (Phe或F)、酪氨酸 (Tyr或Y)、色氨酸 (Trp或W)。另外或可替代地，可以通过相似的功能、化学结构或组成 (例如，酸性、碱性、脂族、芳族或含硫) 将氨基酸分组为保守取代基。例如，出于取代的目的，脂族基团可包括Gly、Ala、Val、Leu和Ile。其他保守取代基包括：含硫的：Met和半胱氨酸 (Cys或C)；酸性的：Asp、Glu、Asn和Gln；小脂肪族，非极性或非极性残基：Ala、Ser、Thr、Pro和Gly；极性、带负电荷的残基及其酰胺：Asp、Asn、Glu和Gln；极性带正电荷的残基：His、Arg和Lys；大的脂肪族非极性残基：Met、Leu、Ile、Val和Cys；以及较大的芳香族残基：Phe、Tyr和Trp。其他信息可以在Creighton (1984) *Proteins*, W.H. Freeman and Company中找到。在某些实施例中，脯氨酸与具有脂族侧链的氨基酸 (例如，亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和丙氨酸) 具有某些特性。在某些情况下，可以认为谷氨酰胺替代谷氨酸或天冬酰胺替代天冬氨酸是相近取代，因为谷氨酰胺和天冬酰胺分别是谷氨酸和天冬氨酸的酰胺衍生物。在某些情况下，本发明的变体蛋白质、肽、多肽和氨基酸序列包括相对于参考氨基酸序列的一个或多个保守取代。

[0031] 如本领域中所理解的，两个多肽之间的“相似性”通过比较该多肽的氨基酸序列和保守的氨基酸替代物与第二个多肽的序列来确定 (例如，使用GENEWORKSTM、Align、ClustalTM、BLAST算法等)。

[0032] 还构想了本公开的多核苷酸和多肽的变体。变体核酸分子或多核苷酸与本文所述的定义的或参照的多核苷酸或多肽 (分别) 具有至少70%、75%、80%、85%、90%，并且优选为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.9%的同一性，或者对于多核苷酸而言，在在约65-68℃时使用0.015M氯化钠、0.0015M柠檬酸钠或在约42℃时使用0.015M氯化钠、0.0015M柠檬酸钠和50%甲酰胺的严格杂交条件下与多核苷酸杂交。核酸分子变体保留编码具有本文所述功能性 (例如特异性结合靶分子) 的融合蛋白或其结合结构域的能力。有关杂交反应的严格性的其他细节和解释，请参见Ausubel, F.M. (1995), *Current Protocols in Molecular Biology*. John Wiley&Sons, Inc. 此外，本领域技术人员可以遵循Boehringer Mannheim GmbH (1993) *The DIG System Users Guide for Filter Hybridization*, Boehringer Mannheim GmbH, Mannheim, Germany and in Liebl, W., Ehrmann, M., Ludwig, W., and Schleifer, K.H. (1991) *International Journal of Systematic Bacteriology* 41:255-260 on how to identify DNA sequences by means of hybridization手册中给出的说明。

[0033] 变体也可以指定义的或参考序列的片段 (例如，由截短、切割等产生的部分)，并且片段可以具有比定义的或参考序列的长度短的任何长度。

[0034] 如本文所用，“功能性部分”或“功能性片段”是指仅包含亲本或参考化合物的结构域、部分或片段的多肽或多核苷酸，并且该多肽或编码的多肽保留与之相关的至少50%的

活性。母体或参考化合物的结构域、部分或片段,优选至少55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%的亲本多肽活性水平,或提供生物学益处(例如,效应子功能)。当公开的多肽或编码的多肽的功能部分或片段与亲本或参照多肽相比在选定的测定法(例如用于测量结合亲和力或测量例如细胞因子释放的效应子功能的测定法)中表现出不大于50%(就亲和力而言,与亲本或参照相比,优选不大于20%或10%,或不超过对数差异)的性能降低时,本公开的多肽或编码的多肽的“功能部分”或“活性部分”或“功能片段”或“活性片段”具有“相似的结合”或“相似的活性”。在某些实施例中,功能部分是指效应分子、效应域、共刺激分子或共刺激域的“信号部分”。

[0035] 在某些实施例中,变体结合蛋白或其部分或片段(例如结合结构域)相对于亲本或参考结合蛋白或结构域可包含一个或多个氨基酸取代,其中一个或多个氨基酸取代去除、改变、或从亲本或参考结合结构域或蛋白质中减弱潜在的不良特征或特性(如果存在);例如,可能具有免疫原性的氨基酸序列,或可能提供不希望的糖基化位点、不希望的脱酰胺位点、不希望的氧化位点,不希望的异构化位点或热力学稳定性降低、或可能导致结合蛋白错误配对或错误折叠(例如,紧密配对的未配对半胱氨酸残基)的氨基酸序列。已知可以提供不期望的特征或特性的氨基酸序列、模式和基序(参见例如Seeliger等,mAbs 7(3):505-515(2015))。

[0036] 在某些实施例中,氨基酸取代包括去除体细胞突变的取代,例如,向种系编码氨基酸的回复。例如,在某些实施例中,参照CDR氨基酸序列或TCR可变结构域序列或TCR恒定区序列的变体包含取代,以去除或减弱潜在的不期望的特征或特性。应理解的是,选择这样的变体以不损害或基本上损害期望的功能(例如,对肽抗原:HLA复合物的结合特异性和/或亲和力)。

[0037] 如本文所用,“序列同一性”或“序列同一性百分比”是指如果需要的话在比对序列并引入缺口(例如可以将缺口引入第一和第二氨基酸或核酸序列中的一个或两个序列中以实现最佳比对)后,一个序列中与另一参考多肽序列中的氨基酸残基相同的氨基酸残基的百分比,以便在优选方法中获得最大的序列同一性百分比,并且不考虑将任何保守取代作为该序列的一部分序列同一性。此外,出于比较目的,可以忽略非同源序列。除非另外指出,否则本文所参考的序列同一性百分比是按参考序列的长度计算的。在本公开的上下文中,应理解的是,在使用序列分析软件进行分析的情况下,分析的结果基于所引用程序的“默认值”。“默认值”是指首次初始化时最初随软件加载的任何一组值或参数。例如,可以使用Altschul等,(1997)“Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs,”Nucleic Acids Res.25:3389-3402定义的NCBI BLAST 2.0软件生成序列同一性百分比值,并将参数设置为默认值。用于确定或计算序列比对和同一性百分比的其他程序包括例如BLASTP、BLASTN和BLASTX。

[0038] “功能变体”是指与本公开的亲本或参考化合物在结构上相似或基本在结构上相似但在组成上略有不同的多肽或多核苷酸(例如,一个碱基、原子或官能团是不同的、添加的或去除),使得该多肽或编码的多肽能够以亲本多肽活性水平的至少50%的效率,优选至少55%、60%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%的效率执行编码的亲本多肽的至少一种功能。换言之,当本发明的多肽或编码的多肽的功能变体在所选测定中与亲本或参照多肽相比表现出不超过50%的性能降低时,具有“相似的

结合”、“相似的亲和力”或“相似的活性”，所选测定例如是用于测定结合亲和性或亲和力的测定（例如，测定缔合（Ka）或解离（KD）常数的Biacore®或四聚体染色）；或测量免疫细胞蛋白（例如Lck、ZAP70、Fyn等）的磷酸化或激活或通过其进行的测定，包括本文所述的测定。本发明的多肽或编码的多肽（或其功能变体）启动、持续、参与、繁殖或扩增一个或多个细胞信号事件（例如响应抗原结合的T细胞信号事件）的能力可以通过检查变体多肽与直接与其作用（例如结合）的免疫细胞蛋白的活性、结构、化学状态（例如磷酸化）或相互作用来确定或者通过检查已知或认为参与细胞信号事件或受其影响的其他生物分子之间的活性、定位、结构、表达、分泌、化学状态（例如磷酸化）或相互作用来确定。本公开的多肽或编码的多肽（或其功能变体）启动、持续、参与、增殖或扩增细胞信号事件的能力也可以通过使用宿主细胞活性的功能测定来确定，包括本文所述的那些用于测量宿主细胞释放细胞因子、增殖、选择性杀死靶细胞或者治疗患有表达或以其他方式与本发明结合蛋白结合的抗原相关的疾病或病症的受试者的能力的功能测定。

[0039] 在某些实施例中，本公开的变体多肽可以包括化学修饰，例如同位素标记或共价修饰，例如糖基化、磷酸化、乙酰化、脱羧、瓜氨酸化、羟基化等。修饰多肽的方法是本领域已知的。修饰被设计为不消除或基本上不损害变体的所需生物学活性。

[0040] “改变的结构域”或“改变的蛋白质”是指基序、区域、结构域、肽、多肽或蛋白质，其与野生型基序、区域、结构域、肽、多肽或蛋白质（例如野生型TCR α 链、TCR β 链、TCR α 恒定域或TCR β 恒定域）具有至少85%（例如86%，87%，88%，89%，90%，91%，92%，93%，94%，95%，96%，97%，98%，99%，99.1%，99.2%，99.3%，99.4%，99.5%，99.6%，99.7%，99.8%或99.9%）的非相同序列的同一性。

[0041] 如本文所用，术语“内源的”或“天然的”是指通常存在于宿主细胞中的基因，蛋白质或活性。

[0042] 如本文所用，“异源的”、“非内源的”和“外源的”是指通过操纵（例如遗传操纵）引入的任何基因、蛋白质、化合物、分子或活性。在某些实施例中，异源，非内源性或外源性分子（例如受体、配体等）对于宿主细胞或受试者可能不是内源性的，而是可以通过如下方式将编码此类分子的核酸添加至宿主细胞中：缀合、转化、转染、转导、电穿孔等，其中添加的核酸分子可以整合到宿主细胞基因组中或可以作为染色体外遗传物质存在（例如，作为质粒或其他自复制载体）。术语“同源的”或“同源的”是指在宿主细胞，物种或菌株中发现或衍生自宿主细胞，物种或菌株的分子或活性。例如，异源、非内源或外源分子或编码该分子的基因可以分别与天然宿主或宿主细胞分子或编码该分子的基因同源，但是可以具有改变的结构、序列、表达水平、或其组合。非内源性分子可以来自相同物种、不同物种或其组合。

[0043] 如本文所用，术语“表达”是指基于核酸分子例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、翻译后修饰或其任意组合。表达的核酸分子通常可操作地连接至表达控制序列（例如启动子）。

[0044] 术语“可操作地连接”是指单个核酸片段上两个或更多个核酸分子的缔合，使得一个的功能受到另一个的影响。例如，当启动子能够影响该编码序列的表达时（即，该编码序列在该启动子的转录控制下），该启动子与该编码序列可操作地连接。“无关联的”是指彼此之间没有紧密联系的遗传成分，并且其中一个的功能不影响另一个。

[0045] 术语“构建体”是指含有重组核酸分子的任何多核苷酸。构建体可以存在于载体

(例如细菌载体或病毒载体)中或可以整合到基因组中。“载体”是能够转运另一个核酸分子的核酸分子。载体可以是,例如,质粒、粘粒、病毒、RNA载体或线性或环状DNA或RNA分子,其可以包括染色体、非染色体、半合成或合成核酸分子。示例性载体是能够自主复制的载体(附加载体)或表达与其连接的核酸分子的载体(表达载体)。

[0046] 如本文所用,“表达载体”是指包含核酸分子的DNA构建体,该核酸分子可操作地连接至能够影响核酸分子在合适宿主中表达的合适控制序列。此类控制序列包括实现转录的启动子、控制该转录的任选操纵子序列、编码合适的mRNA核糖体结合位点的序列以及控制转录和翻译终止的序列。载体可以是质粒、噬菌体颗粒、病毒或仅是潜在的基因组插入物。一旦转化成合适的宿主,载体就可以独立于宿主基因组复制和发挥作用,或者在某些情况下可以整合到基因组本身中。在本说明书中,“质粒”、“表达质粒”、“病毒”和“载体”经常互换使用。

[0047] 在将核酸分子插入细胞中的上下文中的术语“引入”是指“转染”、“转化”或“转导”,并且包括提及将核酸分子掺入到真核或原核细胞中,其中核酸分子可以被掺入细胞的基因组中(例如,染色体、质粒、质体或线粒体DNA),被转化成自主复制子,或被瞬时表达(例如,转染的mRNA)。如本文所用,术语“工程的”“重组的”或“非天然的”是指包括至少一种遗传改变或已通过引入外源核酸而被修饰的生物、微生物、细胞、核酸分子或载体,其中这样的改变或修饰是通过基因工程(例如人为干预)引入的。遗传改变包括例如修饰,这些修饰引入编码蛋白质、融合蛋白或酶的可表达核酸分子,或细胞遗传物质的其他核酸分子添加、缺失、取代或其他功能破坏。其他修饰包括例如非编码调节区,其中所述修饰改变多核苷酸、基因或操纵子的表达。

[0048] 如本文所述,可以将一种以上的异源、非内源性或外源性核酸分子作为分离的核酸分子、作为多个单独控制的基因、作为多顺反子核酸分子、作为编码融合蛋白的单个核酸分子或其任意组合引入宿主细胞。例如,可以修饰宿主细胞以表达两个或更多个编码对KRAS G12V或Her2-ITD新抗原肽(例如TCR α 和TCR β)具有特异性的期望TCR的异源、非内源或外源核酸分子。当将两个或更多个外源核酸分子引入宿主细胞时,应理解,两个或更多个外源核酸分子可作为单个核酸分子(例如在单个载体上)、在分开的载体上、整合在单个位点或多个位点或其任意组合中进入宿主染色体。所提及的异源核酸分子或蛋白质活性的数目是指编码核酸分子的数目或蛋白质活性的数目,而不是引入宿主细胞中的分开的核酸分子的数目。

[0049] 如本文所用,术语“宿主”或“宿主细胞”是指靶向异源或外源核酸分子进行遗传修饰以产生目的多肽(例如KRAS G12V-或Her2-ITD-特异性结合蛋白)的细胞(例如免疫系统细胞,例如T细胞)或微生物。在某些实施例中,宿主细胞可以任选地已经拥有或被修饰以包括其他遗传修饰(例如,包含可检测的标记;内源TCR缺失、改变或截短;共刺激因子表达增加等),所述其他遗传修饰赋予与异源或外源蛋白的生物合成相关或不相关的期望性质。本文进一步描述了示例性宿主细胞和适合用作宿主细胞的细胞类型。

[0050] “T细胞受体”(TCR)是指免疫球蛋白超家族成员(具有可变结合结构域、恒定结构域、跨膜区、短胞质尾;参见例如Janeway等,Immunobiology:The Immune System in Health and Disease,3rd Ed.,Current Biology Publications,p.4:33,1997),其能够特异性结合与MHC受体结合的抗原肽。TCR可以发现在细胞表面或呈可溶性形式,通常由具有 α

和 β 链(分别称为TCR α 和TCR β)或 γ 和 δ 链(也分别称为TCR γ 和TCR δ)的异二聚体组成。像其他免疫球蛋白一样,TCR链(例如 α 链和 β 链)的细胞外部分在N端包含两个免疫球蛋白结构域、可变域(例如 α 链可变域或V α 、 β 链可变域或V β ;通常基于Kabat编号的1至116位氨基酸(Kabat等,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,”US Dept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,5th ed.)),以及与细胞膜相邻的恒定域(例如,通常是基于Kabat的117至259位氨基酸的 α 链恒定域或C α 、通常是基于Kabat的117至295位氨基酸的 β 链恒定结构域或C β)。还像其他免疫球蛋白一样,可变结构域包含由框架区(FR)隔开的互补决定区(CDR)(参见,例如Jores等,Proc.Nat'l Acad.Sci.U.S.A.57:9138,1990;Chothia等,EMBO J.7:3745,1988;另参见Lefranc等,Dev.Comp.Immunol.27:55,2003)。在某些实施例中,TCR在T细胞(或T淋巴细胞)的表面上发现并与CD3复合物缔合。如本公开中所使用的TCR的来源可以来自各种动物物种,诸如人、小鼠、大鼠、猫、狗、山羊、马或其他哺乳动物。在某些实施例中,TCR复合物包含TCR或其功能部分;包含两个CD3 ζ 链或其功能部分或变体的二聚体;包含CD3 δ 链和CD ϵ 链或其功能部分或变体的二聚体;以及包含CD3 γ 链和CD ϵ 链或其功能部分或变体的二聚体,其中任何一个或多个对于T细胞可以是内源的或异源的。

[0051] “CD3”是包含六条链的多蛋白复合物(参见Borst J等,J Biol Chem,258(8):5135-41,1983以及Janeway等,p.172and 178,1999supra)。在哺乳动物中,复合物包括CD3 γ 链、CD3 δ 链、两条CD3 ϵ 链和CD3 ζ 链的同型二聚体。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链是包含单个免疫球蛋白结构域的免疫球蛋白超家族的相关细胞表面蛋白。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链的跨膜区域带负电荷,这被认为可以使这些链与TCR链带正电荷的区域缔合。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链的细胞内尾巴各包含单个保守的基序,称为基于免疫受体酪氨酸的活化基序或ITAM,而每个CD3 ζ 链均具有三个。不受理论的束缚,据信ITAM对于TCR复合体的信号传递能力是重要的。如本公开中使用的CD3可以来自各种动物物种,包括人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。

[0052] 如本文所用,“TCR复合物”是指通过CD3与TCR的缔合形成的复合物。例如,TCR复合物可以由CD3 γ 链、CD3 δ 链、两个CD3 ϵ 链、CD3 ζ 链的同型二聚体、TCR α 链和TCR β 链组成。或者,TCR复合物可以由CD3 γ 链、CD3 δ 链、两条CD3 ϵ 链、CD3 ζ 链的同型二聚体、TCR γ 链和TCR δ 链组成。如本文所用,“TCR复合物的组分”是指TCR链(例如TCR α 、TCR β 、TCR γ 或TCR δ)、CD3链(例如CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 ζ)、或由两条或更多条TCR链或CD3链形成的复合物(例如TCR α 和TCR β 的复合物、TCR γ 和TCR δ 的复合物、CD3 ϵ 和CD3 δ 的复合物、CD3 γ 和CD3 ϵ 的复合物,或TCR α 、TCR β 、CD3 γ 、CD3 δ 和两条CD3 ϵ 链的亚TCR复合体)。

[0053] “主要组织相容性复合物”(MHC)是指将肽抗原递送至细胞表面的糖蛋白。MHC I类分子是异质二聚体,具有 α 跨链的膜(具有三个 α 结构域)和非共价结合的 β 2微球蛋白。MHC II类分子由两个跨膜糖蛋白 α 和 β 组成,跨膜糖蛋白两者都跨膜。每个链都有两个域。MHC I类分子将起源于胞质溶胶的肽传递到细胞表面,其中肽:MHC复合物由CD8⁺T细胞识别。MHC II类分子将起源于囊泡系统的肽传递到细胞表面,在此处由CD4⁺T细胞识别。人MHC被称为人白细胞抗原(HLA)。

[0054] “CD4”是指协助TCR与抗原呈递细胞通讯的免疫球蛋白共受体糖蛋白(参见Campbell&Reece,Biology 909(Benjamin Cummings,Sixth Ed.,2002);Uni ProtKB P01730)。CD4存在于免疫细胞(如T辅助细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞)的表面,包

括四个在细胞表面表达的免疫球蛋白结构域(D1至D4)。在抗原呈递过程中,CD4与TCR复合物一起被募集以结合到MHCII分子的不同区域(CD4结合MHCII β 2,而TCR复合物结合MHCII α 1/ β 1)。

[0055] 如本文所用,术语“CD8共受体”或“CD8”是指细胞表面糖蛋白CD8,其为 α - α 同型二聚体或 α - β 异二聚体。CD8共受体辅助细胞毒性T细胞(CD8⁺)的功能,并通过其胞质酪氨酸磷酸化途径的信号传导发挥功能(Gao and Jakobsen, *Immunol. Today* 21:630-636, 2000; Cole and Gao, *Cell. Mol. Immunol.* 1:81-88, 2004)。在人类中,存在五(5)条不同的CD8 β 链(参见UniProtKB identifier P10966)和单条CD8 α 链(参见UniProtKB identifier P01732)。

[0056] “嵌合抗原受体”(CAR)是指一种融合蛋白,该融合蛋白经过改造后可包含两个或更多个天然存在的氨基酸序列,这些序列以一种在宿主细胞中非天然存在或非天然存在的方式连接在一起,该融合蛋白可作为存在于细胞表面时的受体。本公开的CAR包括细胞外部分,该细胞外部分包含与跨膜结构域连接的抗原结合结构域(例如从免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子获得或衍生的抗原结合结构域,例如衍生自对癌症抗原特异的抗体或TCR的scFv或scTCR,或从NK细胞的杀伤免疫受体衍生或获得的抗原结合结构域)和一个或多个细胞内信号传导域(可选地包含共刺激域)(参见例如Sadelain等, *Cancer Discov.*, 3(4):388 (2013);另参见Harris and Kranz, *Trends Pharmacol. Sci.*, 37(3):220 (2016); Stone等, *Cancer Immunol. Immunother.*, 63(11):1163 (2014))。在某些实施例中,结合蛋白包含含有抗原特异性TCR结合结构域的CAR(参见例如Walseng等, *Scientific Reports* 7:10713, 2017; TCR CAR构建体和方法通过引用整体并入本文)。

[0057] 术语“可变区”或“可变结构域”是指TCR α 链或 β 链(或对于 $\gamma\delta$ TCR为 γ 链和 δ 链)或抗体重链或轻链的结构域,即参与与抗原的结合。天然TCR的 α 链和 β 链的可变域(分别为V α 和V β)通常具有相似的结构,每个域包含四个通常保守的框架区(FR)和三个CDR。抗体重链(VH)和轻链(VL)的可变域也都通常包含四个通常保守的框架区(FR)和三个CDR。在一些情况下,TCR α 链或 β 链(或对于 $\gamma\delta$ TCR为 γ 链和 δ 链)或抗体重链或轻链的可变结构域都参与结合。在一些情况下,结合中涉及TCR α 链或 β 链之一的可变结构域(或对于 $\gamma\delta$ TCR为 γ 链和 δ 链)或抗体重链或轻链的可变结构域。

[0058] 术语“互补决定区”和“CDR”与“高变区”或“HVR”同义,并且在本领域中已知是指TCR或抗体可变区中的氨基酸序列,其赋予抗原特异性和/或结合亲和力,并且在一级序列中被框架氨基酸彼此分开。通常,在每个可变区中存在三个CDR(例如,在TCR α 链和 β 链可变区中的每个中具有三个CDR;在抗体重链和轻链可变区中的每个中具有3个CDR)。对于TCR的情况,CDR3被认为是负责识别加工抗原的主要CDR。通常,CDR1和CDR2主要或在某些情况下仅与MHC相互作用。可变域序列可以依照编号方案(例如, Kabat, EU, International Immunogenetics Information System (IMGT), Contact, and Aho),这可以允许对等价残基位置进行注释以及使用抗原受体编号和受体分类(ANARCI)软件工具进行不同分子间的比较(2016, *Bioinformatics* 15:298-300)。在本公开的某些实施例中,使用IMGT编号确定CDR。使用例如IMGT V-Quest (imgt.org/IMGTindex/V-QUEST.php),可以实现从TCR序列对CDR进行IMGT测定。应当理解,来自例如TCR V α 或V β 区或域的CDR可以具有根据特定编号方案的特定序列,并且可以根据不同编号方案而具有更短、更长或移位(例如,部分重叠)的序

列。

[0059] 如本文所用,“抗原”或“Ag”是指引起免疫应答的免疫原性分子。这种免疫应答可能涉及抗体的产生、特定免疫学上具有活性的细胞(例如,T细胞)的激活或两者。抗原(免疫原性分子)可以是例如肽、糖肽、多肽、糖多肽、多核苷酸、多糖、脂质等。显而易见,抗原可以合成、重组产生或衍生自生物学样品。可以包含一种或多种抗原的示例性生物样品包括组织样品、肿瘤样品、细胞、生物液或其组合。抗原可以由经过修饰或基因工程表达抗原的细胞产生。

[0060] 如本文所用,“新抗原”是指含有结构变化、改变或突变的宿主细胞产物,所述结构变化,改变或突变产生了先前未在受试者基因组(即在受试者的健康组织的样本中)中观察到的或被宿主的免疫系统“看见”或识别的新抗原或抗原表位,其(a)可以通过细胞的抗原加工和转运机制进行处理,并与MHC(例如HLA)分子结合存在于细胞表面;(b)可以引发免疫反应(例如细胞(T细胞)反应)。新抗原可以源自例如具有导致产品改变或突变的改变(取代、添加、缺失)的编码的多核苷酸、或源自外源核酸分子或蛋白质插入细胞中、或源自暴露于环境因素(例如化学、放射学)导致遗传改变。新抗原可以与肿瘤抗原分开产生,或者可以源自肿瘤抗原或与其相关。“肿瘤新抗原”(或“肿瘤特异性新抗原”)是指蛋白质,该蛋白质包含与肿瘤细胞或肿瘤内的多个细胞相关的、由其产生或在其内产生的新抗原决定簇。肿瘤新抗原决定簇存在于例如抗原性肿瘤蛋白或多肽上,这些蛋白或肽包含一种或多种由肿瘤细胞DNA编码的体细胞突变或染色体重排,以及来自与病毒相关肿瘤相关的病毒开放阅读框的蛋白或肽(例如子宫颈癌、一些头颈癌)。当涉及包含本文公开的突变(例如G12V)或HER2-ITD抗原的KRAS抗原时,术语“抗原”和“新抗原”在本文可互换使用。

[0061] 术语“表位”或“抗原表位”包括被关联结合分子识别并特异性结合的任何分子、结构、氨基酸序列或蛋白质决定簇,例如免疫球蛋白、T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体,或者其他结合分子、结构域或蛋白质。抗原决定簇通常包含分子的化学活性表面基团,例如氨基酸或糖侧链,并且可以具有特定的三维结构特征以及特定的电荷特征。表位可以包含连续的氨基酸(例如线性表位),也可以包含来自蛋白质不同部分的、通过蛋白质折叠而接近的氨基酸(例如,不连续或构象性表位),或者包含无论蛋白质折叠和/或细胞免疫系统是否加工都非常接近的不连续的氨基酸。

[0062] 如本文所用,“结合结构域”(也称为“结合区”或“结合部分”)是指具有与目标分子特异性和非特异性缔合、联合(unite)或结合的能力的分子,例如肽、寡肽、肽或蛋白质,所述目标分子例如为KRAS G12V肽(SEQ ID NO:1或者其包含或由SEQ ID NO:1的大约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23或24个连续氨基酸组成的免疫原性片段); KRAS G12V肽:MHC复合物,其中MHC等位基因可以是DRB1-1101或DRB1-1104;Her2-ITD(SEQ ID NO:22;或者其包含或由SEQ ID NO:22的7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸的免疫原性片段),或Her2-ITD肽:MHC复合物,其中MHC等位基因可以是DQB1-05:01或DQB1-05:02。结合结构域包括用于生物分子或其他目标靶标的任何天然存在的、合成的、半合成的或重组产生的结合伴侣。在一些实施例中,结合结构域是抗原结合结构域,例如抗体或TCR或其功能性结合结构域或抗原结合片段。示例性结合结构域包括单链抗体可变区(例如,单结构域抗体、sFv、scFv和Fab)、受体胞外域(例如TNF- α)、配体(例如细胞因子和趋化因子)、TCR的抗原结合区(例如单链TCR

(scTCR)、针对结合生物分子、适体或单结构域抗体(例如骆驼科动物或鱼类来源的单结构域抗体;参见例如Arbabi-Ghahroudi M(2017)Front.Immunol.8:1589)的特定能力而选择的合成多肽。

[0063] “接头”是指连接两个蛋白质、多肽、肽、结构域、区域或基序的氨基酸序列,并且可以提供与两个亚结合结构域的相互作用相容的间隔子功能,从而使得所得的多肽保持对靶分子的特异性结合(例如,scTCR)或保留信号传导活性(例如,TCR复合物)。在某些实施例中,接头包含约2至约35个氨基酸、约4至约20个氨基酸、约8至约15个氨基酸、约15至约25个氨基酸或其他合适数量的氨基酸。示例性的接头包括甘氨酸-丝氨酸接头,其中一个或多个连续的甘氨酸之后是丝氨酸,该序列可以重复两次、三次、四次或更多次。

[0064] 可以以单链形式工程改造本公开的任何结合结构域,使得第一结构域的C末端通过短肽序列连接至第二结构域的N末端,反之亦然(例如,对于scTCR,(N)V β (C)-接头-(N)V α (C)或(N)V α (C)-接头-(N)V β (C)。在某些实施例中,结合结构域是嵌合的、人的或人源化的。

[0065] 如本文所用,术语“KRAS G12V-特异性结合蛋白”是指与KRAS G12V新抗原特异性结合和/或对其具有特异性的蛋白或多肽。作为背景,KRAS(也称为CK-RAS、CFC2、K-RAS2A、K-RAS2B、K-RAS4A、K-RAS4B、KI-RAS、KRAS1、KRAS2、NS、NS3、RALD、RASK2、K-ras、KRAS原癌基因、GTPase和c-Ki-ras2)是一种p21 GTPase,其参与细胞增殖的信号转导。破坏负增长信号的KRAS突变可导致细胞持续增殖。据报道,在4%的非小细胞肺癌、10%的大肠癌、30%的胰腺癌和8%的卵巢癌中发现了KRAS G12V突变(参见Forbes S等,Current protocols in human genetics.2016:10.1.1-.1.37)。

[0066] 在一些实施例中,结合蛋白或多肽以例如或至少大约特定的亲和力结合于KRAS G12V肽,例如在细胞表面上与MHC或HLA分子复合的KRAS G12V。KRAS G12V-特异性结合蛋白可以结合KRAS G12V新抗原、其变体或其片段。例如,KRAS G12V-特异性结合蛋白可以结合根据SEQ ID NO:1的氨基酸序列,或与SEQ ID NO:1具有至少90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%或更高的序列同一性,其中与SEQ ID NO:1的残基12对应的残基是缬氨酸(V)。在某些实施例中,KRAS G12V-特异性结合蛋白以与本文提供的示例性KRAS G12V-特异性结合蛋白(例如本文提供的任何KRAS G12V-特异性TCR,例如,如通过相同的测定所测量的)所表现出的亲和力相比大约相同、至少大约相同或更大看到亲和力结合KRAS G12V衍生的肽:HLA复合物(或KRAS G12V-衍生的肽:MHC复合物)。可以测量 K_d 来评估KRAS G12V-特异性结合蛋白的亲和力。

[0067] 术语“Her2-ITD-特异性结合蛋白”是指与Her2-ITD新抗原特异性结合和/或特异的蛋白或多肽。在一些实施例中,当蛋白质或多肽与MHC或HLA分子(例如在细胞表面上以特定亲和力或至少大约特定亲和力)复合时,其结合至Her2-ITD抗原,例如Her2-ITD新抗原肽。Her2-ITD-特异性结合蛋白可以结合Her2-ITD新抗原、其变体或其片段。例如,Her2-ITD-特异性结合蛋白可以结合至SEQ ID NO:22的氨基酸序列,或结合至与SEQ ID NO:22具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更高的序列同一性的氨基酸序列。在某些实施例中,Her2-ITD-特异性结合蛋白以亲和力与Her2-ITD-衍生的肽:HLA复合物(或Her2-ITD-衍生的肽:MHC复合物)结合,该亲和力与由本文提供的示例性Her2-ITD-特异性结合蛋白(例如本文提供的任何Her2-ITD-特异性TCR)表现出的亲和力相比大约相同、至少大约相同、或更大,例如,通过相同的测定法测定可以测量 K_d 来评估Her2-

ITD-特异性结合蛋白的亲合力。

[0068] 用于评估亲和力或表观亲和力或相对亲和力的测定法是已知的。例如,TCR对抗原:HLA的表观亲和力可以通过评估与各种浓度的四聚体的结合来测量,例如通过使用标记的四聚体的流式细胞术进行。在一些实施例中,使用标记的四聚体在一定浓度范围内稀释2倍并且然后通过非线性回归确定结合曲线来测量TCR的表观 K_d ,表观 K_d 确定为产生半最大结合(half-maximal binding)的配体的浓度。在某些实施例中,KRAS G12V-或Her2-ITD-特异性结合蛋白分别包括KRAS G12V-或Her2-ITD-特异性免疫球蛋白超家族结合蛋白或其结合部分。

[0069] 如本文所用,“特异性结合”是指结合蛋白(例如,T细胞受体或嵌合抗原受体)或结合结构域(或其融合蛋白)以等于或大于 $10^5 M^{-1}$ 的亲和力或 K_a (即,与1/M单位的特定结合相互作用的平衡缔合常数)与靶分子缔合或结合,而与样品中的任何其他分子或组分没有显著缔合或结合。结合结构域(或其融合蛋白)可分类为“高亲和力”结合结构域(或其融合蛋白)或“低亲和力”结合结构域(或其融合蛋白)。“高亲和力”结合结构域是指 K_a 为至少 $10^7 M^{-1}$ 、至少 $10^8 M^{-1}$ 、至少 $10^9 M^{-1}$ 、至少 $10^{10} M^{-1}$ 、至少 $10^{11} M^{-1}$ 、至少 $10^{12} M^{-1}$ 或至少 $10^{13} M^{-1}$ 的那些结合结构域。“低亲和力”结合结构域是指 K_a 高达 $10^7 M^{-1}$ 、高达 $10^6 M^{-1}$ 或高达 $10^5 M^{-1}$ 的那些结合结构域。或者,亲和力可定义为与M单元(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)。在某些实施例中,结合结构域可以具有“增强的亲和力”,其是指与野生型(或亲本)结合结构域相比对靶抗原具有更强结合的选择或工程化的结合结构域。例如,增强的亲和力可能是由于对靶抗原的 K_a (平衡缔合常数)高于野生型结合结构域,或者是由于对靶抗原的 K_d 小于野生型结合结构域,或者是由于靶抗原的解离速率(K_{off})小于野生型结合结构域。已知多种测定法可用于鉴定与特定靶标特异性结合的本发明的结合结构域,以及测定结合结构域或融合蛋白的亲和力,例如western blot,ELISA和BIAcore® analysis(另参见例如Scatchard等,Ann.N.Y.Acad.Sci.57:660,1949;以及美国专利申请号5,283,173,5,468,614,or the equivalent)。

[0070] 如本文所述的KRAS G12V新抗原-或Her2-ITD-新抗原特异性结合蛋白、TCR或结构域及其变体,可以根据用于分析宿主细胞活性(包括确定宿主细胞结合、激活或诱导的检测,还包括确定抗原特异性宿主细胞的反应)的许多本领域公认的方法中的任何一种来进行功能表征。例子包括确定宿主细胞增殖、宿主细胞细胞因子释放、抗原特异性宿主细胞刺激、MHC限制性宿主细胞刺激、细胞毒性T淋巴细胞(CTL)活性(例如,通过检测从预载靶细胞释放 ^{51}Cr)、T细胞表型标记物表达以及T细胞功能的其他度量。例如,可以在Lefkovits (Immunology Methods Manual:The Comprehensive Sourcebook of Techniques,1998;另参见Current Protocols in Immunology;Weir,Handbook of Experimental Immunology,Blackwell Scientific,Boston,MA (1986);Mishell and Shigii (eds.) Selected Methods in Cellular Immunology,Freeman Publishing, San Francisco,CA (1979);以及Green and Reed,Science 281:1309 (1998))中找到进行这些和类似测定的程序。

[0071] 通过进一步的说明,在表达本公开的结合蛋白的宿主细胞的情况下,可以通过例如将宿主细胞暴露于肽或肽:HLA复合物(例如,以四聚体或其他多聚体形式组织)或者暴露于可选地在肽:HLA复合物中将抗原呈递给宿主细胞的抗原呈递细胞(APC)并且然后测量宿主的活性细胞(例如细胞因子(例如,IFN- γ ;TNF α)的产生或分泌;宿主细胞信号或激活成

分(例如CD137(4-1BB))的表达增加;宿主细胞的增殖;或杀死APC(例如,使用标记的铬释放测定法)来确定宿主细胞对抗原的亲合力。

[0072] “MHC-肽四聚体染色”是指用于检测表达包含TCR可变域或结合结构域的结合蛋白的抗原特异性细胞的测定法,该测定法包括MHC分子的四聚体,每个分子均包含(呈递)具有与至少一种新抗原(例如KRAS G12V或Her2-ITD)同源(例如相同或相关)的氨基酸序列,其中复合物能够与对同源新抗原特异的TCR缔合。每个MHC分子可以用生物素分子标记。生物素化的MHC/肽复合物可以通过添加链霉亲和素(其在一些实施例中可以被荧光标记)而被多聚化(例如四聚化)。可以通过荧光标记通过流式细胞术检测四聚体。在某些实施例中,MHC-肽四聚体测定法用于检测或选择本发明的结合蛋白或TCR。可以根据本文所述和本领域中实践的方法确定细胞因子的水平,所述方法包括例如ELISA、ELISpot、细胞内细胞因子染色和流式细胞术及其组合(例如,细胞内细胞因子染色和流式细胞术)。可以通过分离淋巴细胞(例如外周血细胞样品中的循环淋巴细胞或淋巴结细胞中的循环淋巴细胞)、用抗原刺激细胞并测量细胞因子的产生、细胞增殖和/或细胞活力(例如通过掺入氘化的胸苷或非放射性测定,例如MTT测定等)来确定由抗原特异性引发或刺激免疫应答引起的免疫细胞增殖和克隆扩增。可以例如通过确定Th1细胞因子(例如IFN- γ , IL-12, IL-2和TNF- β)和Type2细胞因子(例如IL-4, IL-5, IL-9, IL-10和IL-13)的水平来检查本文所述的免疫原对Th1免疫应答和Th2免疫应答之间的平衡的作用。

[0073] 与本公开的结合结构域特异性结合的靶分子可以位于感兴趣的细胞(“靶细胞”)上或与之结合。示例性靶细胞包括受试者或受试者样品中的表达本公开的抗原(KRAS G12V;HER2 ITD)的不需要的任何细胞、或用于研究目的的细胞,例如癌细胞、与自身免疫性疾病或病症或者炎症性疾病或病症相关的细胞、以及感染性生物或细胞(例如细菌、病毒或病毒感染的细胞)。传染性生物体的细胞,例如哺乳动物的寄生虫,也被认为是靶细胞。

[0074] 在某些实施例中,本公开的任何宿主细胞(例如,表达和/或编码如本文提供的异源结合蛋白的重组宿主细胞)可以是免疫系统细胞。如本文所用,术语“免疫系统细胞”和“免疫细胞”是指源自骨髓中造血干细胞的免疫系统的任何细胞,其产生两个主要谱系,即髓系祖细胞(产生髓样细胞(例如单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞、巨核细胞和粒细胞)和淋巴样祖细胞(产生淋巴样细胞,例如T细胞、B细胞和自然杀伤(NK)细胞)。示例性免疫系统细胞包括CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4-CD8⁻ 双阴性T细胞、干细胞记忆T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、调节性T细胞、天然杀伤细胞和树突状细胞。巨噬细胞和树突状细胞可以称为“抗原呈递细胞”或“APC”,它们是专门的细胞,其在与肽复合的APC表面的主要组织相容性复合体(MHC)受体与T细胞表面的TCR相互作用时可以激活T细胞。

[0075] “T细胞”是在胸腺中成熟并产生TCR的免疫系统细胞。T细胞可以是幼稚的(不暴露于抗原;与T_{CM}相比,CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127和CD45RA的表达增加,而CD45RO的表达减少)、记忆性T细胞(T_M) (经历过抗原并且长期-存活的细胞)和效应细胞(经历过抗原的具有细胞毒性的)。T_M可以进一步分为中央记忆T细胞(T_{CM},与原始T细胞相比,CD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45RO和CD95的表达增加,而CD54RA的表达减少)和效应记忆T细胞(T_{EM}与原始T细胞或T_{CM}相比,CD62L、CCR7、CD28、CD45RA的表达减少,而CD127的表达增加)的子集。效应T细胞(T_E)是指经历过抗原的CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞,与T_{CM}相比,其CD62L、CCR7、CD28的表达降低,并且对颗粒酶和穿孔素呈阳性。其他示例性T细胞包括调节性T细胞,例如CD4⁺CD25⁺

(Foxp3+) 调节性T细胞和Treg17细胞、以及Tr1、Th3、CD8+CD28- 和Qa-1限制性T细胞。

[0076] 在某些实施例中,宿主细胞是人造血祖细胞。“造血祖细胞”是来源于能够进一步分化为成熟细胞类型(例如T细胞谱系细胞)的造血干细胞(HSC)或胎儿组织。在某些实施例中,CD24^{lo} Lin⁻CD117⁺造血祖细胞是有用的。如本文所定义,造血祖细胞可包括能够进一步分化为T细胞谱系细胞的胚胎干细胞。造血祖细胞可以来自各种动物,包括人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。“胸腺细胞祖细胞”或“胸腺细胞”是存在于胸腺中的造血祖细胞。

[0077] “造血干细胞”或“HSC”是指未分化的造血细胞,其能够在体内自我更新、在体外基本上无限制地增殖、并且能够分化为其他细胞类型,包括T细胞谱系的细胞。HSC可以例如但不限于从胎儿肝脏、骨髓和脐带血中分离。

[0078] “胚胎干细胞”、“ES细胞”或“ESC”是指未分化的胚胎干细胞,具有整合到正在发育的胚胎的种系中并成为其一部分的能力。胚胎干细胞能够分化为造血祖细胞和任何组织或器官。适用于本文的胚胎干细胞包括来自J1 ES细胞系、129J ES细胞系、鼠类干细胞系D3(美国典型培养物保藏中心)、源自衍生自129/Sv小鼠的R1或E14K细胞系、衍生自Balb/c和C57B1/6小鼠的细胞系、以及人类胚胎干细胞(例如来自WICELL®Research Institute,WI; or ES cell International,Melbourne,Australia)的细胞。

[0079] “T细胞谱系的细胞”是指显示T细胞或其前体或祖细胞的至少一种表型特征的细胞,该特征将细胞与其他淋巴样细胞以及类红血球或髓样谱系的细胞区分开。这样的表型特征可以包括对T细胞特异的一种或多种蛋白质(例如,CD3⁺、CD4⁺和CD8⁺)的表达或对T细胞特异的生理、形态、功能或免疫学特征的表达。例如,T细胞谱系的细胞可以是定型为(committed to)T细胞谱系的祖细胞或前体细胞;CD25⁺未成熟和灭活的T细胞;已经历CD4或CD8线性定型的细胞;CD4⁺CD8⁺双阳性的胸腺细胞祖细胞;单阳性CD4⁺或CD8⁺;TCRαβ或TCRγδ;或成熟的功能性或活化的T细胞。

[0080] 术语“分离的”是指从其原始环境(例如,如果其天然存在则是指自然环境)中除去的物质。例如,存在于活体动物中的天然存在的核酸或多肽不是分离出,而与天然系统中的一些或全部共存物质分离的相同核酸或多肽是分离的。这样的核酸可以是载体的一部分和/或这样的核酸或多肽可以是组合物(例如细胞裂解物)的一部分,并且仍然是分离的,因为这样的载体或组合物对于核酸或多肽而言不是自然环境的一部分。术语“基因”是指参与产生多肽链的DNA片段。它包括编码区“前导区和尾区”之前和之后的区域、以及各个编码段(外显子)之间的插入序列(内含子)。

[0081] 如本文所用以描述细胞、微生物、核酸分子或载体,术语“重组”或“修饰的”或“工程化的”是指已经通过引入外源核酸分子(例如DNA、RNA)或蛋白质而修饰的细胞、微生物、核酸分子或载体,或指已被改变以使内源核酸分子或基因的表达受到控制、去调控或组成型改变的细胞或微生物,其中此类改变或修饰可以由基因工程引入。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,例如启动子)的修饰,或者其他核酸分子的添加、缺失、取代,或者细胞遗传物质的其他功能破坏或补充。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。

[0082] 在整个本公开中提供了附加的定义。

对KRAS G12V新抗体具有特异性的结合蛋白

[0083] 一方面,本公开提供了结合蛋白(例如,免疫球蛋白超家族结合蛋白或其一部分),

其包括TCR V α 结构域和V β 结构域,其中所述结合蛋白被配置为结合、能够结合和/或于特异于KRAS G12V新抗原。

[0084] 在某些实施例中,KRAS G12V-特异性结合蛋白被配置为结合、能够结合或特异于MTEYKLVWGA VGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:1):HLA复合物,或肽:HLA复合物,其中该肽包含或由SEQ ID NO:1的约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23或24个连续氨基酸组成。在一些实施例中,HLA包括DRB1-1101或DRB1-1104。

[0085] 在一些实施例中,TCR V α 结构域包含CDR3氨基酸序列,该CDR3氨基酸序列与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列至少约85% (即至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%) 相同。在某些实施例中,TCR V α 结构域CDR3氨基酸序列包含或由SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列组成。在某些实施例中,TCR V β 结构域包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%相同的CDR3氨基酸序列。在某些实施例中,TCR V α 结构域CDR3氨基酸序列包含或由SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列组成。

[0086] 在任何当前公开的实施例中,KRAS G12V-特异性结合蛋白包含与SEQ ID NO:48或54所示的氨基酸序列至少约85%相同的CDR1 α 氨基酸序列、与SEQ ID NO:49或55所示的氨基酸序列至少约85%相同的CDR2 α 氨基酸序列、与SEQ ID NO:51或57所示的氨基酸序列至少约85%相同的CDR1 β 氨基酸序列、和/或与SEQ ID NO:52或58所示的氨基酸序列至少约85%相同的CDR2 β 氨基酸序列。

[0087] 在进一步的实施例中,KRAS G12V-特异性结合蛋白包含分别如SEQ ID NO:48、49、51、52和53所示的或分别如SEQ ID NO:54、55、57、58和59所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

[0088] 在某些实施例中,KRAS G12V-特异性结合蛋白包含TCR V α 结构域,该TCR V α 结构域包含或由与SEQ ID NO:9或SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%相同的氨基酸序列组成。在某些实施例中,KRAS G12V-特异性结合蛋白包含TCR V β 结构域,该TCR V β 结构域包含或由与SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:16所示的氨基酸序列至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%相同的氨基酸序列组成。在进一步的实施例中,本文提供的 β 或 α CDR氨基酸序列中的任何一个或多个可以分别存在于V β 结构域和/或V α 结构域中。

[0089] 在某些实施例中,至少三个或四个互补决定区 (CDR) 可能不具有序列变化,并且确实具有序列变化的CDR可能仅具有最多两个氨基酸取代、最多连续五个氨基酸缺失、或它们的组合。

[0090] 在某些实施例中,KRAS G12V-特异性结合蛋白包含分别根据SEQ ID NOS:6和9或根据SEQ ID NO:16和19的TCR V α 结构域和TCR V β 结构域。

[0091] 在本文所述的任何实施例中,结合蛋白 (例如,本文讨论的KRAS G12V-特异性结合蛋白;HER2-ITD-特异性结合蛋白) 可包含“信号肽” (也称为前导序列、前导肽、或转运肽)。信号肽将新合成的多肽靶向其在细胞内或细胞外的适当位置。在定位或分泌完成期间或完成之后,可以从多肽中去除信号肽。具有信号肽的多肽在本文中被称作“前蛋白”,而其信号

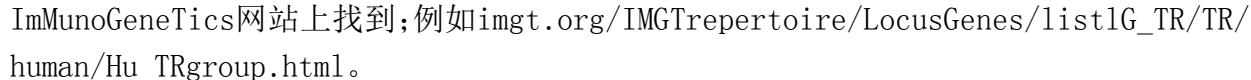
肽被去除的多肽在本文中被称为“成熟”蛋白或多肽。在某些实施例中，本公开的结合蛋白包含成熟的V β 结构域、成熟的V α 结构域或两者。在一些实施例中，本公开的结合蛋白包含成熟的TCR β 链、成熟的TCR α 链、或成熟的TCR β 链和成熟的TCR α 链。

[0092] 本公开的细胞表达的示例性结合蛋白和融合蛋白可以包括信号肽(例如,作为结合前蛋白),并且细胞可以去除信号肽以产生成熟的结合蛋白。在某些实施例中,结合蛋白包含两个组分,例如 α 链和 β 链,其可以在细胞表面上缔合以形成功能性结合蛋白。两种相关的组分可以包含成熟蛋白。

[0093] 在一些实施例中,信号肽或前导肽可以包含或由与所示的氨基酸序列SEQ ID NOs:50、53、56或59至少约85%(即85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%)相同的氨基酸序列。然而,应理解,目前公开的任何TCRV α 和TCRV β 结构域或包含它们的结合蛋白,可能缺少示例性信号或前导肽序列,或可以包含不同的信号或前导肽序列。

[0094] 因此,应理解,本发明涵盖了包含TCRV α 和/或TCRV β 结构域的KRAS G12V-特异性结合蛋白,其中,例如,包含在与SEQ ID NO:50、53、56或59对应的SEQ ID NO:6、9、16或19中的氨基酸序列可能不存在。

[0095] 在某些实施例中,KRAS G12V-特异性结合蛋白包含与SEQ ID NO:68或72中所示的氨基酸序列至少约85%(即85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%)相同、包含该氨基酸序列或由其组成的TCRV α 结构域,和/或包含与SEQ ID NO:66或70所示氨基酸序列至少约85%相同、包含该氨基酸序列或由其组成的TCRV β 结构域。

[0096] 在某些实施例中,结合蛋白包含TCR可变域,该TCR可变域包含由人TCRV、D和/或J等位基因编码的氨基酸序列。作为背景,在淋巴细胞发育过程中,V α 外显子由不同的可变和连接基因区段(V-J)组装而成,V β 外显子由不同的可变、多样性和连接基因区段(V-D-J)组装而成。TCR α 染色体基因座具有70-80个可变基因区段和61个连接基因区段。TCR β 染色体基因座具有52个可变基因片段,并且两个单独的簇包含单个的多样性基因片段、以及六个或七个连接基因段。功能性V α 和V β 基因外显子是由可变基因区段与V α 的连接基因区段的重组,以及可变基因区段与V β 的具有多样性基因区段和结合基因的区段的重组产生。根据各种等位基因的TCR基因区段的核苷酸和氨基酸序列是本领域已知的,并且可以在ImMunoGeneTics网站上找到;例如。

[0097] 应当理解,尽管编码结合蛋白的多核苷酸可以根据本文公开的TCR基因区段包含相同的核苷酸序列,但是可以使用编码参考的基因区段的氨基酸序列的任何核苷酸序列。

[0098] 在本文公开的任何实施例中,KRAS G12V-特异性结合蛋白的TCRV α 结构域包含根据TRAV8-3或TRAV8-1的氨基酸序列或与其至少85%相同的氨基酸序列(例如2、3、4、5、6、7、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、51、52、53、54、55、56、57、58、59或60个或更多个连续氨基酸)。在某些实施例中,KRAS G12V-特异性的TCRV β 结构域包含TRBV30或TRBV12-4的氨基酸序列。人T细胞受体可变区等位基因(例如TRAV、TRBV、TRAJ、TRBJ、TRBD)的核苷酸和氨基酸序列(包括本文提供的等位基因)是已知的,并且可以通过例

如IMGT (ImMunoGeneTics) InformationSystem[®]获得;例如, imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/alleles/list_alleles.php?species=Homo%20sapiens&group=TRAV; imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/alleles/list_alleles.php?species=Homo%20sapiens&group=TRBV; imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/alleles/list_alleles.php?species=Homo%20sapiens&group=TRAJ; imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/alleles/list_alleles.php?species=Homo%20sapiens&group=TRBJ;以及 imgt.org/IMGTrepertoire/Proteins/alleles/list_alleles.php?species=Homo%20sapiens&group=TRBD。

[0099] 在一些实施例中, KRAS G12V-特异性结合蛋白包含由TCR α 链连接(J α)结构域基因区段编码的氨基酸序列和由TCR β 链连接(J β)基因区段编码的氨基酸序列。TCR J α 结构域可包含根据TRAJ13或TRAJ38的氨基酸序列,或与其至少85%相同的氨基酸序列。TCR J β 结构域可包含根据TRBJ2-4或TRBJ2-3的氨基酸序列,或与其至少85%相同的氨基酸序列。

[0100] 这些人类T细胞受体可变域等位基因多核苷酸和氨基酸序列通过引用并入本文。

[0101] 在任何当前公开的实施例中(即KRAS G12V-特异性结合蛋白;Her2-ITD-特异性结合蛋白),结合蛋白可进一步包含TCR β 链恒定域(C β)、TCR α 链恒定域(C α)、或两者。人TCR C α 和C β 的示例性氨基酸序列可以在例如UniProtKb P01848(C α)和UniProtKb P01850和A0A5B9(C β)中找到。鼠TCR恒定区的示例性氨基酸序列可以在UniProtKb A0A0A6YWV4, A0A075B5J4和A0A075B5J3处找到。这些氨基酸序列通过引用并入本文。

[0102] 在任何当前公开的实施例中(即KRAS G12V-特异性结合蛋白;Her2-ITD-特异性结合蛋白),结合蛋白还包含C β 和C α ,其中V β 和C β 一起包含TCR β 链,其中V α 和C α 一起构成TCR α 链,并且其中TCR β 链和TCR α 链能够缔合形成二聚体。

[0103] 在进一步的实施例中,TCR C β 在氨基酸位置57处包含半胱氨酸氨基酸代替天然丝氨酸(例如, GV(S \rightarrow C)TD),并且TCR C α 在氨基酸位置48处包含半胱氨酸氨基酸代替天然苏氨酸(例如, DK(T \rightarrow C)VL;参见例如, Cohen等, Cancer Res. 67(8):3898-3903(2007))。

[0104] 在某些实施例中,TCR C α 具有与SEQ ID NO:67或71所示的氨基酸序列至少约85%(即85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%)的同一性、包含该氨基酸序列或由其组成。在某些实施例中,TCR C β 与SEQ ID NO:69或73所示的氨基酸序列具有至少约85%的同一性同一性、包含该氨基酸序列或由其组成。

[0105] 还构想了包含与分别包含在SEQ ID NO:11或21中的氨基酸序列具有至少85%同一性的TCR α 链和/或TCR β 链的结合蛋白,其中分别根据SEQ ID NO:50、53、56、59的氨基酸序列可能不存在。此类结合蛋白包含“成熟的”TCR α 和/或TCR β 链。

[0106] 在某些实施例中, KRAS G12V-特异性结合蛋白(或HER2-ITD特异性结合蛋白)可以是TCR、TCR的嵌合抗原受体或抗原结合片段。在某些实施例中,TCR、TCR的嵌合抗原受体或抗原结合片段可以是嵌合的、人源化的或人的。在其他实施例中,TCR的抗原结合片段包含或由单链TCR(scTCR)组成。

[0107] 本文还提供了高亲和力重组TCR,其被配置为结合、能够结合和/或对KRAS G12V新抗原具有特异性。高亲和力重组TCR可包含与SEQ ID NO:6、9、16或19的氨基酸序列至少约85%(即至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、

97%、98%、99%、99.5%或100%)相同V α 结构域。在一些实施例中,高亲和力重组TCR包含或由与SEQ ID NO:68或72所示氨基酸序列具有至少约85%的同一性的TCR V α 结构域组成,和/或包含或由与SEQ ID NO:66或70所示的氨基酸序列具有至少约85%的同一性的TCR V β 组成。

[0108] 在一些实施例中,TCR V α 结构域包含CDR3氨基酸序列,该CDR3氨基酸序列与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:12中列出的氨基酸序列至少约85% (即至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%)相同。在某些实施例中,TCR V α 结构域包含或由与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:12所示的氨基酸序列至少约85% (即85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%)相同的CDR3氨基酸序列组成。在某些实施例中,TCR V β 结构域包含或由与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%相同的CDR3氨基酸序列组成。在某些实施例中,TCR V α 结构域CDR3氨基酸序列包含或由SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:13所示的氨基酸序列组成。

[0109] 在某些实施例中,至少三个或四个互补决定区(CDR)可能不具有序列变化,并且确实具有序列变化的CDR可能仅具有最多两个氨基酸取代、最多连续五个氨基酸缺失、或它们的组合。

[0110] 在任何当前公开的实施例中,KRAS G12V-特异性高亲和力重组TCR包含根据SEQ ID NO:48或54的CDR1氨基酸序列、根据SEQ ID NO:49或55的CDR2 α 氨基酸序列、根据SEQ ID NO:51或57的CDR1 β 氨基酸序列和/或根据SEQ ID NO:52或58的CDR2 β 氨基酸序列。

[0111] 在进一步的实施例中,KRAS G12V-特异性高亲和力重组TCR包含分别如SEQ ID NOs:48、49、2、51、52,和3;或分别如SEQ ID NOs:54、55、12、57、58和13所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

[0112] 在任何当前公开的实施例中,KRAS G12V-特异性结合蛋白或高亲和力重组TCR能够结合MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:1):DRB1-1101或(SEQ ID NO:1):DRB1-1104复合物,或肽:DRB1-1101或DRB1-1104复合物,其中所述肽包含或由SEQ ID NO:1的约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23或24个连续氨基酸组成。

[0113] 在任何当前公开的实施例中,KRAS G12V-特异性结合蛋白或高亲和力重组TCR可以结合MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:1):DRB1-1101或(SEQ ID NO:1):DRB1-1104复合物,或肽:DRB1-1101或DRB1-1104复合物,其中该肽包含或由的SEQ ID NO:1的约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23或24个连续氨基酸组成,这些氨基酸在细胞表面上独立或在没有CD8和/或CD4的情况下存在。

对Her2-ITD新抗体具有特异性的结合蛋白

[0114] 本公开的另一方面涉及包含TCR V α 结构域和V β 结构域的结合蛋白,其中所述结合蛋白被配置为结合、能够结合和/或特异于Her2-ITD新抗原。

[0115] 在一些实施例中,Her2-ITD-特异性结合蛋白的TCR V α 结构域包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少约85% (即至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%)相同的CDR3氨基酸序列。在某些实施例中,TCR V β 结构域包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少约85%、86%、87%、88%、

89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%相同的CDR3氨基酸序列。在某些实施例中,TCR V α 结构域包含如SEQ ID NO:23所示的CDR3氨基酸序列,而TCR V β 结构域包含如SEQ ID NO:24所示的CDR3氨基酸序列。

[0116] 在某些实施例中,Her2-ITD-特异性结合蛋白包含根据SEQ ID NO:60的TCR V α CDR1、根据SEQ ID NO:61的TCR V α CDR2、根据SEQ ID NO:63的TCR V β CDR1、和根据SEQ ID NO:64的TCR V β CDR2。

[0117] 在某些实施例中,Her2-ITD-特异性结合蛋白分别包含根据SEQ ID NO:60、61、23、63、64和24的TCR V α CDR1-3和TCR V β CDR1-3。

[0118] 在任何当前公开的实施例中,Her-ITD特异性结合蛋白可以被配置为与SPKANKEILDEAYVMAYVMAGVGSPYVSRLLG (SEQ ID NO:22):HLA复合物或肽:HLA复合物结合、能够结合和/或对其具有特异性,其中肽包含或由SEQ ID NO:22的约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成。在某些实施例中,HLA包含QCB1-05:01或QCB1-05:02。在任何当前公开的实施例中,Her-ITD-特异性结合蛋白可结合SPKANKEILDEAYVMAYVMAGVGSPYVSRLLG (SEQ ID NO:22):HLA复合物、或结合肽:HLA复合物,其中该肽包含或由SEQ ID NO:22的约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成,这些氨基酸在细胞表面上独立或在不存在CD8和/或CD4的情况下存在。

[0119] 在任何当前公开的实施例中,Her2-ITD-特异性结合蛋白包含与SEQ ID NO:27的氨基酸序列至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%相同的TCR V α 结构域。在一些实施例中,结合蛋白包含与SEQ ID NO:30的氨基酸序列至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%相同的V β 结构域。在某些实施例中,结合蛋白的至少三个或四个CDR不包含序列变化,并且具有序列变化的CDR可以仅具有至多两个氨基酸取代、至多连续五个氨基酸缺失、或它们的组合。

[0120] 在某些实施例中,Her2-ITD-特异性结合蛋白包括包含或由与SEQ ID NO:74所示氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列组成的TCR V α 结构域,和/或包含或由与SEQ ID NO:76所示氨基酸序列具有至少85%同一性的氨基酸序列组成的TCR V β 结构域。

[0121] 在某些实施例中,结合蛋白的至少三个或四个CDR不包含序列变化,并且具有序列变化的CDR可以仅具有至多两个氨基酸取代、至多连续五个氨基酸缺失、或它们的组合。

[0122] 在某些实施例中,Her2-ITD-特异性结合蛋白的TCR V α 结构域包含根据TRAV8-6、或与其至少85%相同的氨基酸序列。在某些实施例中,Her2-ITD-特异性结合蛋白的TCR V β 结构域包含根据TRBV20的氨基酸序列。

[0123] 在某些实施例中,结合蛋白包含或进一步包含由TCR J α 结构域基因片段编码的氨基酸序列、或与其至少85%相同的氨基酸序列,以及由TCR J β 结构域基因片段编码的氨基酸序列、或与其至少85%相同的氨基酸序列。J α 结构域可包含根据TRAJ34的氨基酸序列。J β 结构域可包含根据TRBJ2-5的氨基酸序列或与其至少85%相同的序列。

[0124] 在某些实施例中,结合蛋白还包含与SEQ ID NO:75所示氨基酸序列具有至少85%同一性的C α 氨基酸序列,和/或与SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列具有至少85%同一性的C β 氨基酸序列。

[0125] 在某些实施例中,结合蛋白包含CB和Ca,其中VB和CB包含TCRB链,并且其中Va和Ca包含TCRa链,并且其中TCRB链和TCRa链能够缔合形成二聚体。

[0126] 在任何当前公开的实施例中,Her2-ITD-特异性结合蛋白可以是或包含TCR、TCR的嵌合抗原受体或抗原结合片段。在某些实施例中,TCR、TCR的嵌合抗原受体或抗原结合片段是嵌合的、人源化的或人的。在一些实施例中,TCR的抗原结合片段包含scTCR。

[0127] 本公开的另一方面涉及高亲和力重组TCR,其被配置为结合、能够结合或特异于Her2-ITD新抗原。在某些实施例中,高亲和力重组TCR包括包含Va结构域的α链,该Va结构域包含与SEQ ID NO:74的氨基酸序列具有至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸序列。此外,在任何当前公开的实施例中,TCR能够结合至SPKANKEILDEAYVMAYVMAGVGSPYVSRLLG (SEQ ID NO:22):DQB1-05:01或(SEQ ID NO:22):DQB1-05:02复合物,或肽:DQB1-05:01或肽:DQB1-05:02复合物,其中该肽包含或由SEQ ID NO:22的SEQ ID NO:22的约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成,这些氨基酸在细胞表面上独立或在不存在CD8和/或CD4的情况下存在。

[0128] 在某些实施例中,高亲和力重组TCR包括包含VB结构域的β链,VB结构域包含与SEQ ID NO:76的氨基酸序列具有至少约85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%同一性的氨基酸序列。在任何当前公开的实施例中,TCR能够结合至SPKANKEILDEAYVMAYVMAGVGSPYVSRLLG (SEQ ID NO:22):DQB1-05:01或DQB1-05:02复合物,或肽:DQB1-05:01或肽:DQB1-05:02复合物,其中该肽包含或由SEQ ID NO:22的8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成,这些氨基酸在细胞表面上独立或在不存在CD8和/或CD4的情况下存在。

[0129] 在某些实施例中,Her2-ITD-特异性高亲和力重组TCR包含根据本文阐述的示例性Her2-ITD CDR序列或与其具有至少85%的同一性的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和/或CDR3β。在某些实施例中,Her2-ITD-特异性TCR包含根据SEQ ID NO:60的TCR VaCDR1、根据SEQ ID NO:61的TCR VaCDR2、根据SEQ ID NO:63的TCR VβCDR1、和/或根据SEQ ID NO:64的TCR VβCDR2。

[0130] 在某些实施例中,Her2-ITD-特异性TCR分别包含根据SEQ ID NO:60、61、23、63、64和24的TCR VaCDR 1-3和TCR VβCDR 1-3。

[0131] 在任何目前公开的实施例中,可以可溶性形式提供KRAS G12V-特异性或Her2-ITD-特异性结合蛋白或高亲和力重组TCR(参见例如Walseng等,PLoS One doi:10.1371/journal.pone.0119559 (2015)),任选地与细胞毒剂和/或可检测剂缀合。举例来说,用于分离和纯化重组产生的可溶性TCR的方法可包括从将重组可溶性TCR分泌到培养基中的合适宿主细胞/载体系统获得上清液并且然后使用可商购的过滤器浓缩培养基。浓缩后,可将浓缩物施用于单一合适的纯化基质或一系列合适的基质,例如亲和基质或离子交换树脂。可以采用一个或多个反相HPLC步骤来进一步纯化重组多肽。从自然环境中分离免疫原时,也可以使用这些纯化方法。本文所述的一种或多种分离/重组可溶性TCR的大规模生产方法包括分批细胞培养,对其进行监测和控制以维持合适的培养条件。可溶性TCR的纯化可以根据本文所述和本领域已知的方法进行,并与国内外监管机构的法律和准则相符。

[0132] 本公开的另一方面涉及一种包含如上所述的结合蛋白或高亲和力重组TCR的组合物。如本文进一步所述,该组合物可以进一步包含药学上可接受的载体、稀释剂和/或赋形剂。

免疫原性成分

[0133] 本文还提供了免疫原性组合物(例如,用于疫苗中)。在某些实施例中,免疫原性组合物包含与MTEYKLVVV GAVGVGKSALTIQLIQ(SEQ ID NO:1)或SPKANKEIL DEAYVMAYVMAGVGS PYVSRLLG(SEQ ID NO:22)或其免疫原性片段具有至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.5%或100%的同一性的氨基酸序列的肽。

[0134] 在一些实施例中,免疫原性组合物包含分离的肽,其可以或能够引发对KRAS G12V的抗原特异性T细胞应答。分离的肽可包含或包含在不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8或7个氨基酸的多肽中。此外,多肽可以包含来自SEQ ID NO:1所示的KRAS G12V氨基酸序列的至少7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续氨基酸。

[0135] 在一些实施例中,免疫原性组合物包含分离的多肽,其可以或能够引发对Her2-ITD抗原的抗原特异性T细胞应答。分离的肽包含或包含在不超过32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、11、10、9、8或7个氨基酸中。此外,多肽可以包含SEQ ID NO:22所示的Her2-ITD氨基酸序列的至少7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31或32个连续氨基酸。

[0136] 在一些实施例中,免疫原性组合物还包含本文进一步讨论的药学上可接受的载体。药学上可接受的载体可以是非天然存在的药学上可接受的载体。在某些实施例中,非天然存在的药学上可接受的载体可以包括乳膏、乳剂、凝胶、脂质体、纳米颗粒或软膏。在其他实施例中,疫苗可以包含免疫有效量的佐剂,例如聚-ICLC、CpG、GM-CSF或明矾。

多核苷酸、载体和宿主细胞

[0137] 还提供了编码本文所述的结合蛋白、高亲和力重组TCR、免疫原性组合物或其功能片段或部分的多核苷酸。本领域普通技术人员将理解,由于遗传密码的简并性,存在许多编码如本文所述的结合蛋白、TCR或免疫原性组合物的核苷酸序列。一些这样的多核苷酸与天然、原始或鉴定的多核苷酸序列的核苷酸序列具有有限或最小的序列同一性。但是,本公开明确构想了由于密码子使用的差异而变化的多核苷酸。在某些实施例中,特别构想了为在哺乳动物宿主细胞中表达而进行了密码子优化的序列。密码子优化可以使用已知的技术和工具来执行,例如,使用GenScript®OptimumGene™工具。密码子优化的序列包括部分密码子优化的序列(例如,至少一种密码子被优化以在宿主细胞中表达)和完全密码子优化的序列。在某些免疫宿主细胞中表达的密码子优化公开在,例如,Scholten等, Clin.Immunol.119:135,2006中。

[0138] 在一些实施例中,单个多核苷酸编码如本文所述的结合蛋白,或者可替代地,结合蛋白可以由一个以上的多核苷酸编码。换言之,结合蛋白的成分或部分可以由两个或更多个多核苷酸编码,多核苷酸可以包含在单个核酸分子上或可以包含在两个或更多个核酸分子上。

[0139] 在某些实施例中,编码本公开的结合蛋白或TCR的两个或更多个组分或部分的多

核苷酸包含可操作地结合在单个开放阅读框(open reading frame)中的两个或更多个编码序列。这样的布置可以有利地允许协调所需基因产物的表达,例如TCR的 α 和 β 链的同时表达,使得它们以约1:1的比例产生。在某些实施例中,本公开的结合蛋白的两个或更多个取代基基因产物,例如TCR(例如 α 和 β 链),被表达为单独的分子并且在翻译后结合。在进一步的实施例中,本公开的结合蛋白的两个或更多个取代基基因产物表达为单个肽,其部分由可裂解或可去除的片段隔开。例如,可用于表达由单个多核苷酸或载体编码的可分离多肽的自切割肽在本领域中是已知的,包括例如猪破伤风病毒1 2A(P2A)肽、那亚瑟病毒2A(T2A)肽、马甲鼻炎病毒(ERAV) 2A(E2A)肽和口蹄疫病毒2A(F2A)肽。示例性的自我切割肽(也称为“核糖体跳跃元件”)包括包含或由SEQ ID NOs:35-38中任一项所示的氨基酸序列组成。

[0140] 因此,在某些实施例中,编码TCR α -链的异源多核苷酸和编码TCR β -链的异源多核苷酸包含在单个开放阅读框中,其中所述单个开放阅读框还包含编码位于所述编码 α 链多核苷酸与编码 β 链多核苷酸之间的自切割肽的多核苷酸。应理解的是,可以构想任一种取向(例如,编码 β 链多核苷酸-自切割肽- α 链编码多核苷酸;编码 α 链多核苷酸-自切割肽-编码 β 链的多核苷酸)。此类编码的结合蛋白的示例性氨基酸序列在SEQ ID NOs:11、20和32中提供。

[0141] 在某些实施例中,本公开的多核苷酸包含或由与SEQ ID NOs:4、5、7、8、10、14、15、17、18、20、25、26、28、29或31中任一项所示的核苷酸序列具有至少约70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.9%或100%同一性的多核苷酸组成。

[0142] 可以根据分子生物学或多肽纯化领域的各种方法和技术来生产和制备编码本文所述的对KRAS G12V或Her2-ITD具有特异性的结合蛋白或高亲和力重组TCR的分离或重组核酸分子。

[0143] 在进一步的实施例中,结合蛋白或TCR被表达为编码的转基因构建体的一部分,和/或宿主免疫细胞可以进一步编码:一种或多种另外的辅助蛋白,例如安全开关蛋白;标签、选择标记;CD8共受体 β 链;CD8共受体 α 链或两者;或其任意组合。在PCT申请PCT/US2017/053112中描述了可用于编码和表达结合蛋白和辅助成分(例如,安全开关蛋白、选择标记、CD8共受体 β 链或CD8共受体 α 链中的一个或多个)的多核苷酸和转基因构建体,其中的多核苷酸、转基因构建体和辅助组分(包括核苷酸和氨基酸序列)通过引用并入本文。应当理解,本公开的结合蛋白、安全开关蛋白、标签、选择标记、CD8共受体 β 链或CD8共受体 α 链中的任何或全部可以由单个核酸分子编码,或可由单独的核酸分子上或存在于单独的核酸分子上的多核苷酸序列编码。

[0144] 示例性的安全开关蛋白包括,例如截短的EGF受体多肽(huEGFRt),其缺乏细胞外N末端配体结合结构域和细胞内受体酪氨酸激酶活性,但保留其天然氨基酸序列,具有I型跨膜细胞表面定位,并具有用于药物级抗EGFR单克隆抗体西妥昔单抗(Erbix) tEGF受体(tEGFr;Wang等,Blood 118:1255-1263,2011);半胱天冬酶多肽(例如iCasp9;Straathof等,Blood 105:4247-4254,2005;Di Stasi等,N.Engl.J.Med.365:1673-1683,2011;Zhou and Brenner,Exp.Hematol.pii:S0301-472X(16)30513-6.doi:10.1016/j.exphem.2016.07.011),RQR8(Philip等,Blood 124:1277-1287,2014);源自于人c-myc蛋

白 (Myc) 的10个氨基酸的标签 (Kieback等, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105:623-628, 2008); 以及标记/安全开关多肽, 例如RQR (CD20+CD34; Philip等, 2014) 的构象完整的结合表位。

[0145] 可用于本公开修饰的免疫细胞的其他辅助成分包括标签或选择标记, 其允许对细胞进行鉴定、分类、分离、富集或追踪。例如, 可以从样品中未标记的细胞中分离出具有所需特性的标记的免疫细胞 (例如, 抗原特异性TCR和安全开关蛋白), 并更有效地活化和扩增以包含在所需纯度的产物中。

[0146] 如本文所用, 术语“选择标记”包含赋予细胞可识别改变的核酸构建体 (和编码的基因产物), 从而允许检测和阳性选择被包含选择标记的多核苷酸转导的免疫细胞。RQR是一种选择标记, 包括主要的CD20细胞外环和两个最小的CD34结合位点。在一些实施例中, 编码RQR的多核苷酸包含编码16个氨基酸的CD34最小表位的多核苷酸。在一些实施例中, 将CD34最小表位掺入CD8共受体茎结构域 (Q8) 的氨基末端位置。在进一步的实施例中, CD34最小结合位点序列可以与CD20的靶表位结合以形成T细胞的致密标记/自杀基因 (RQR8) (Philip等, 2014, 通过引用并入本文)。该构建体允许使用例如结合到磁珠 (Miltenyi) 上的CD34特异性抗体选择表达该构建体的免疫细胞, 并利用可以选择性删除表达转基因的工程化T细胞 (Philip等, 2014) 的临床接受的药物抗体利妥昔单抗。

[0147] 其他示例性选择标记还包括通常在T细胞上不表达的几种截短的I型跨膜蛋白: 截短的低亲和神经生长因子, 截短的CD19和截短的CD34 (参见例如Di Stasi等, N. Engl. J. Med. 365:1673-1683, 2011; Mavilio等, Blood 83:1988-1997, 1994; Fehse等, Mol. Ther. 1:448-456, 2000; 均整体并入本文)。CD19和CD34的有用功能是可以使用现成的Miltenyi CliniMACs™选择系统, 该系统可以将这些标记物用于临床级分选。然而, CD19和CD34是相对较大的表面蛋白, 可能会增加载体包装能力和整合载体的转录效率。也可以使用含有细胞外、非信号传导域的表面标记或各种蛋白质 (例如CD19、CD34、LNGFR)。任何选择标记均可以采用, 并且对于良好生产规范应该是可以接受的。在某些实施例中, 选择标记通过编码感兴趣的基因产物 (例如, 本公开的结合蛋白, 例如TCR或CAR) 的多核苷酸表达。选择标记的其他实例包括例如报道分子, 例如GFP、EGFP、 β -gal或氯霉素乙酰转移酶 (CAT)。在某些实施例中, 诸如CD34的选择标记由细胞表达, 并且CD34可用于选择富集或分离 (例如, 通过免疫磁选择) 在本文所述方法中使用的目的转导细胞。如本文所用, CD34标志物与抗CD34抗体或例如与CD34结合的scFv、TCR或其他抗原识别部分有所区别。

[0148] 在某些实施例中, 选择标记包括RQR多肽、截短的低亲和性神经生长因子 (tNGFR)、截短的CD19 (tCD19)、截短的CD34 (tCD34) 或其任意组合。

[0149] 还提供了包含根据本发明的多核苷酸的表达载体。可以使用任何合适的表达载体, 包括本文公开的示例性表达载体。此外, 表达载体可以被配置为或能够将多核苷酸递送至宿主细胞。

[0150] 典型的载体可以包括能够转运已经与其连接的另一核酸或能够在宿主生物中复制的核酸分子。如本文所述, 载体的一些实例包括质粒、病毒载体、粘粒和其他。一些载体可能能够在引入它们的宿主细胞中自主复制 (例如, 具有细菌复制起点的细菌载体和游离型哺乳动物载体), 而其他载体在导入宿主细胞的基因组后可能整合到宿主细胞的基因组中从而与宿主基因组一起复制。另外, 一些载体能够指导与其可操作连接的基因的表达 (这些载体可以称为“表达载体”)。根据相关实施例, 还应理解, 如果一种或多种试剂 (例如, 如本

文所述的编码免疫球蛋白超家族结合蛋白的多核苷酸或对KRAS G12V或Her2-ITD具有特异性的高亲和力重组TCR、或其变体)共同施用给受试者,每种试剂可以驻留在分开的或相同的载体中,并且可以将多种载体(每种包含不同的试剂或相同的试剂)引入细胞或细胞群体或施用给受试者。

[0151] 病毒载体包括逆转录病毒、腺病毒、细小病毒(例如腺相关病毒)、冠状病毒、负链RNA病毒(例如正粘病毒(例如流感病毒)、弹状病毒(例如狂犬病和水疱性口炎病毒)、副粘病毒(例如麻疹和仙台)、正链RNA病毒(例如小核糖核酸病毒和甲型病毒)以及双链DNA病毒、包括腺病毒、疱疹病毒(例如1型和2型单纯疱疹病毒和爱泼斯坦-巴尔病毒和巨细胞病毒)和痘病毒(例如牛痘、禽痘和金丝雀痘)。其他病毒包括但不限于诺沃克病毒、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、乳头瘤病毒、肝炎病毒和肝炎病毒。逆转录病毒的例子包括禽类白血病肉瘤、哺乳动物C型、B型病毒、D型病毒、HTLV-BLV组、慢病毒和泡沫病毒(Coffin, J.M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, Third Edition, B.N. Fields等, Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996)。

[0152] 在某些实施例中,载体包括质粒载体或病毒载体(例如选自慢病毒载体或 γ -逆转录病毒载体的载体)。病毒载体包括逆转录病毒、腺病毒、细小病毒(例如腺相关病毒)、冠状病毒、负链RNA病毒(例如正粘病毒(例如流感病毒)、弹状病毒(例如狂犬病和水疱性口炎病毒)、副粘病毒(例如麻疹和仙台)、正链RNA病毒(如小核糖核酸病毒和甲型病毒)、以及双链DNA病毒、包括腺病毒、疱疹病毒(例如1型和2型单纯疱疹病毒、EB病毒、巨细胞病毒)和痘病毒(例如痘苗病毒)、鸡痘和金丝雀痘)。例如,其他病毒包括诺沃克病毒、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、巴波病毒、肝炎病毒和肝炎病毒。逆转录病毒的例子包括禽白血病、肉瘤、哺乳动物C型、B型病毒、D型病毒、HTLV-BLV组、慢病毒和spumavirus(Coffin, J.M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, Third Edition, B.N. Fields等, Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996)。

[0153] “逆转录病毒”是具有RNA基因组的病毒,其使用逆转录酶被逆转录成DNA,然后将逆转录的DNA掺入宿主细胞基因组中。“ γ 逆转录病毒”是指逆转录病毒科的属。 γ 逆转录病毒的实例包括小鼠干细胞病毒、鼠白血病病毒、猫白血病病毒、猫肉瘤病毒和禽网状内皮病毒。如本文所用,“慢病毒载体”是指用于基因递送的基于HIV的慢病毒载体,其可以是整合的或非整合的、具有相对大的包装能力、并且可以转导多种不同的细胞类型。慢病毒载体通常是在瞬时转染三种病毒后产生的(包装、包膜和转移)或更多质粒进入生产细胞。像HIV一样,慢病毒载体通过病毒表面糖蛋白与细胞表面受体的相互作用进入靶细胞。进入时,病毒RNA经历逆转录,该逆转录由病毒逆转录酶复合体介导。逆转录产物是双链线性病毒DNA,它是病毒整合到感染细胞DNA中的底物。“慢病毒”是指能够感染分裂细胞和非分裂细胞的逆转录病毒属。慢病毒的几个例子包括HIV(人类免疫缺陷病毒:包括1型和2型HIV);马传染性贫血病毒;猫免疫缺陷病毒(FIV);牛免疫缺陷病毒(BIV);猿免疫缺陷病毒(SIV)和前卫维斯纳病毒(绵羊慢病毒)。

[0154] 使用逆转录病毒和慢病毒载体和包装细胞,用含有嵌合抗原受体转基因的病毒颗粒转导哺乳动物宿主细胞的方法是本领域已知的,并且先前已经描述于例如美国专利号8,119,772;Walchli等, *PLoS One* 6:327930, 2011;Zhao等, *J. Immunol.* 174:4415, 2005;Engels等, *Hum. Gene Ther.* 14:1155, 2003;Frecha等, *Mol. Ther.* 18:1748, 2010;以及

Verhoeyen等,Methods Mol.Biol.506:97,2009。逆转录病毒和慢病毒载体的构建体和表达系统也是可商购的。

[0155] 在某些实施例中,病毒载体可以是 γ 逆转录病毒,例如莫洛尼鼠白血病病毒(MLV)衍生的载体。在其他实施例中,病毒载体可以是更复杂的逆转录病毒来源的载体,例如慢病毒来源的载体。HIV-1衍生的载体属于这一类。其他例子包括源自HIV-2的慢病毒载体、FIV、马传染性贫血病毒、SIV和Maedi-Visna病毒(绵羊慢病毒)。使用逆转录病毒和慢病毒的病毒载体和包装细胞以含有TCR或CAR转基因的病毒颗粒转导哺乳动物宿主细胞的方法是本领域已知的,并且先前已在例如美国专利8,119,772;Walchli等,PLoS One 6:327930,2011;Zhao等,J.Immunol.174:4415,2005;Engels等,Hum.Gene Ther.14:1155,2003;Frecha等,Mol.Ther.75:1748,2010;以及Verhoeyen等,Methods Mol.Biol.506:91,2009。逆转录病毒和慢病毒载体的构建体和表达系统也是可商购的。其他病毒载体也可用于多核苷酸递送,包括DNA病毒载体,包括例如基于腺病毒的载体和基于腺伴随病毒(AAV)的载体;源自单纯疱疹病毒(HSV)的载体,包括扩增子载体、复制缺陷型HSV和减毒的HSV(Krisky等, Gene Ther.5:1517,1998)。

[0156] 为基因治疗用途而开发的其他载体也可以与本公开的组合物和方法一起使用。这样的载体包括衍生自杆状病毒和 α -病毒的载体(Jolly,D J.1999.Emerging Viral Vectors.pp 209-40in Friedmann T.ed.The Development of Human Gene Therapy.New York:Cold Spring Harbor Lab),或质粒载体(例如Sleeping Beauty或其他转座子载体)。

[0157] 当病毒载体基因组包含多个在宿主细胞中作为单独的转录物表达的多核苷酸时,病毒载体还可以在两个(或多个)转录物之间包含允许双顺反子或多顺反子表达的附加序列。在病毒载体中使用的此类序列的实例包括内部核糖体进入位点(IRES)、弗林蛋白酶切割位点、病毒2A肽或其任意组合。

[0158] 在某些实施例中,可以将编码对KRAS G12V或Her2-ITD新抗原特异的结合蛋白或高亲和力重组TCR的核酸可操作地连接至载体的一个或多个特定元件。例如,可以有效地连接实现它们所连接的编码序列的表达和加工所需的多核苷酸序列。表达控制序列可以包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA处理信号,例如剪接和聚腺苷酸化信号;稳定细胞质mRNA的序列;增强翻译效率的序列(即Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;以及可能增强蛋白质分泌的序列。如果表达控制序列与目的基因和以反式或远距离作用来控制目的基因表达控制序列邻接,则它们可操作地连接。在一些实施例中,病毒或质粒载体还包括转导标记(例如,绿色荧光蛋白、tEGFR、tCD19、tNGFR等)。

[0159] 在某些实施例中,载体能够将多核苷酸构建体递送至宿主细胞(例如,造血祖细胞或人免疫系统细胞)。在特定的实施例中,载体能够将构建体递送至人免疫系统细胞,例如CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁻ CD8⁻ 双阴性T细胞、 γ δ T细胞、天然杀伤细胞、树突状细胞或其任意组合。在其他实施例中,载体能够将构建体递送至幼稚T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞或其任意组合。在一些实施例中,编码本公开构建体的载体可以进一步包含编码核酸酶的多核苷酸,所述核酸酶可用于在宿主细胞中进行染色体敲除(例如,CRISPR-Cas核酸内切酶或本文公开的另一种核酸内切酶),或可用于在基因疗法替代或基因修复疗法中将治疗性转基因或其部分递送至宿主细胞的载体。或者,可将用于染色体敲除或基因替代或基因修复疗法的核酸酶递送至独立于编码本公开构建体的载体的宿主细胞。

[0160] 用于重组产生对KRAS G12V或Her2-ITD肽抗原具有特异性的结合蛋白或高亲和力重组TCR的表达载体的构建可以通过使用本领域已知的任何合适的分子生物学工程技术来完成,包括使用限制性核酸内切酶消化、连接、转化、质粒纯化和DNA测序,例如在Sambrook等(1989and 2001editions;Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY)以及Ausubel等(Current Protocols in Molecular Biology (2003))中描述的。为了获得有效的转录和翻译,每个重组表达构建体中的多核苷酸包括至少一个合适的表达控制序列(也称为调节序列),例如前导序列,特别是可操作地(即操作地)连接至编码目标蛋白质或肽的核苷酸序列的启动子。

[0161] 还提供了编码(例如包含编码的异源多核苷酸)和/或表达如本文所公开的结合蛋白或高亲和力重组TCR的宿主细胞。在一些实施例中,宿主细胞可以是如本文所公开的造血祖细胞或免疫系统细胞,例如人免疫系统细胞。在任何当前公开的实施例中,免疫系统细胞是CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、 γ δ T细胞、天然杀伤细胞、树突状细胞或其任意组合。另外,T细胞可以是幼稚T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞、干细胞记忆T细胞或其任意组合。在某些实施例中,使用本文公开的载体将宿主细胞修饰为包含或含有异源多核苷酸。

[0162] 重组宿主细胞可以是同种异体的、同基因的或自体的(例如对于接受该宿主细胞进行治疗的受试者而言)。在其中宿主细胞编码内源TCR的某些实施例中,与内源TCR相比,由T细胞表达的异源结合蛋白或高亲和力重组TCR能够更有效地与CD3蛋白缔合。在一些实施例中,由宿主T细胞表达的结合蛋白或高亲和力重组TCR能够与CD3复合物缔合并显示功能性表面表达和免疫活性,例如细胞因子的产生和/或表达抗原的靶细胞的杀死。在某些实施例中,与内源TCR相比,结合蛋白或高亲和力重组TCR可具有更高的细胞表面表达。

[0163] 在某些实施例中,表达和/或编码对KRAS V12G肽抗原特异的结合蛋白或高亲和力TCR的根据本发明的重组宿主免疫细胞(例如T细胞、NK细胞、NK-T细胞等)能够在存在肽抗原或编码该抗原的多核苷酸的情况下产生细胞因子,例如IFN- γ ,但在对照或参比物的存在下却很少或根本不产生分子(例如野生型肽或编码其的多核苷酸)。在某些实施例中,当肽抗原以10、1、0.1或约0.01 μ g/mL存在时(例如当将肽引入能够表达肽抗原的靶细胞中并且重组宿主免疫细胞存在于靶细胞中时),重组宿主免疫细胞能够产生IFN- γ 。在进一步的实施例中,重组宿主免疫细胞在存在以下物质时能够产生至少约100、200、1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000,或10,000pg/mL IFN- γ :(a)靶细胞(例如,重组宿主免疫细胞与靶细胞的比例为1:2)和(b)抗原,量为0.01 μ g/mL(或更小)至约100 μ g/mL。可以使用例如细胞因子ELISA试剂盒(例如来自eBioscience的人IFN- γ ELISA试剂盒或来自Mabtech的ELISpot-Pro试剂盒)来测量细胞因子的产生。

[0164] 在某些实施例中,重组宿主免疫细胞能够在KRAS G12V肽和抗HLA-DQ抗体、抗HLA-DR抗体或两者同时存在的情况下产生IFN γ 。

[0165] 在某些实施例中,重组宿主免疫细胞能够在存在以下物质的情况下产生IFN γ :(a)KRAS G12V肽抗原和/或KRAS G12V肽编码核酸(例如RNA)和(b)(i)表达HLA-DRB1-1101或HLA DRB1-1104,并且(ii)能够将KRAS G12V抗原呈递给宿主免疫细胞的细胞系。

[0166] 在某些实施例中,重组宿主免疫细胞编码(即包含编码的异源多核苷酸)和/或表达Her2-ITD-特异性结合蛋白或高亲和力重组TCR,并在存在Her2-ITD肽抗原或编码该抗原

的多核苷酸时能够产生细胞因子(例如IFN- γ),但在存在具有野生型序列(即由不包含内部串联重复的野生型多核苷酸编码的肽)或编码野生型Her2肽的参考多核苷酸时产生较低水平的细胞因子。

[0167] 在某些实施例中,重组宿主免疫细胞在靶标(抗原呈递细胞)以1个重组宿主免疫细胞:2个靶细胞的比例存在以及存在约0.01到约0.05 $\mu\text{g/mL}$ 的Her2-ITD肽抗原时,能够产生至少约50、60、70、80或更高的pg/mL IFN- γ ,和/或在存在(a)靶细胞和(b)肽抗原并且肽抗原分别以约0.02、0.2、2或20 $\mu\text{g/mL}$ 的量存在时能够产生至少约100、500、1000、5,000或10,000pg/mL IFN- γ 。

[0168] 在某些实施例中,当存在靶细胞、Her2-ITD肽抗原或编码该抗原的多核苷酸以及抗HLA-DR抗体和/或抗HLA-DR I类抗体时,宿主免疫细胞能够产生IFN- γ 。

[0169] 在某些实施例中,宿主免疫细胞能够在存在Her2-ITD肽抗原和/或编码Her2-ITD肽的RNA和表达HLA-DQB1-0501或HLA-DQB1-0502的细胞系的存在下产生IFN γ ,并且能够将Her2-ITD肽抗原呈递给宿主免疫细胞。

[0170] 在任何当前公开的实施例中,宿主细胞(例如宿主免疫细胞)可以包含内源性免疫细胞蛋白,例如PD-1、TIM3、LAG3、CTLA4、TIGIT、HLA成分或TCR成分或其任意组合。如本文所用,术语“染色体基因敲除”是指宿主细胞中的遗传改变或引入的抑制剂,其阻止(例如减少、延迟、抑制或消除)宿主细胞产生功能活性的内源性多肽产物。导致染色体基因敲除的改变可以包括,例如引入的无义突变(包括过早终止密码子的形成)、错义突变、基因缺失和链断裂、以及抑制内源性基因在宿主细胞中表达的抑制性核酸分子的异源表达。

[0171] 使用敲除程序或试剂后,可以通过宿主免疫细胞的DNA测序直接确认染色体基因敲除。染色体基因敲除还可以从敲除后不存在基因表达(例如,不存在由该基因编码的mRNA或多肽产物)中推断出来。

[0172] 在某些实施例中,染色体基因敲除或基因敲入通过宿主细胞的染色体编辑来进行。可以使用例如核酸内切酶进行染色体编辑。如本文所用,“核酸内切酶”是指能够催化多核苷酸链内的磷酸二酯键裂解的酶。在某些实施例中,核酸内切酶能够切割靶基因,从而使靶基因失活或“敲除”。核酸内切酶可以是天然存在的、重组的、基因修饰的或融合的核酸内切酶。由核酸内切酶引起的核酸链断裂通常通过同源重组或非同源末端连接(NHEJ)的不同机制来修复。在同源重组期间,供体核酸分子可用于供体基因“敲入”,用于靶基因“敲除”,并任选地通过供体基因敲入或靶基因敲除事件使靶基因失活。NHEJ是易于出错的修复过程,其通常会导致切割位点的DNA序列发生变化,例如,至少一个核苷酸的取代、缺失或添加。NHEJ可用于“敲除”靶基因。核酸内切酶的实例包括锌指核酸酶、TALE核酸酶、CRISPR-Cas核酸酶、大范围核酸酶和megaTAL。

[0173] 如本文所用,“锌指核酸酶”(ZFN)是指包含与非特异性DNA切割域融合的锌指DNA结合结构域的融合蛋白,例如FokI核酸内切酶。约30个氨基酸的每个锌指基序与约3个碱基对的DNA结合,某些残基上的氨基酸可以变化以改变三联体序列的特异性(参见例如Desjarlais等,Proc.Natl.Acad.Sci.90:2256-2260,1993;Wolfe等,J.Mol.Biol.285:1917-1934,1999)。多个锌指基序可以串联连接以产生对所需DNA序列的结合特异性,所述DNA序列例如具有约9至约18个碱基对的长度的区域。作为背景,ZFN通过催化基因组中位点特异性DNA双链断裂(DSB)的形成来介导基因组编辑,并且通过以下方式促进了转基因的靶

向整合:该转基因包含与DSB位置的基因组同源的侧翼序列同源性指导修复。或者,由ZFN产生的DSB可以通过非同源末端连接(NHEJ)的修复导致靶基因敲除,这是一个容易出错的细胞修复途径,会导致核苷酸在切割位点处插入或缺失。在某些实施例中,基因敲除包含使用ZFN分子进行的插入、缺失、突变或其组合。

[0174] 如本文所用,“转录激活物样效应子核酸酶”(TALEN)是指包含TALE DNA结合结构域和DNA切割结构域的融合蛋白,例如FokI核酸内切酶。“TALE DNA结合结构域”或“TALE”由一个或多个TALE重复结构域/单元组成,每个通常具有高度保守的33-35个氨基酸序列,其中第12和第13个氨基酸不同。TALE重复结构域参与TALE与靶DNA序列的结合。不同的氨基酸残基,称为重复可变残基(RVD),与特异性核苷酸识别相关。DNA的自然(规范)代码已经确定了对这些TALE的识别,使得在TALE的12和13位的HD(组氨酸-天冬氨酸)序列导致TALE与胞嘧啶(C)结合,NG(天冬酰胺-甘氨酸)与T核苷酸结合,NI(天冬酰胺-异亮氨酸)与A结合,NN(天冬酰胺-天冬酰胺)与G或A核苷酸结合,而NG(天冬酰胺-甘氨酸)与T核苷酸结合。非典型的(非典型)RVD也是已知的(参见例如美国专利公开号US 2011/0301073,该非典型的RVD通过引用整体并入本文)。TALEN可用于指导T细胞基因组中的位点特异性双链断裂(DSB)。非同源末端连接(NHEJ)从双链断裂的两侧连接DNA,在双链断裂中几乎没有或没有用于退火(annealing)的序列重叠,从而引入了敲除基因表达的错误。或者,如果转基因中存在同源侧翼序列,则同源性直接修复可将转基因引入DSB位点。在某些实施例中,基因敲除包括插入、缺失、突变或其组合,并使用TALEN分子制备。

[0175] 如本文所用,“聚簇的规则间隔的短回文重复序列/Cas”(CRISPR/Cas)核酸酶系统是指采用CRISPR RNA(crRNA)引导的Cas核酸酶来识别基因组内靶位点的系统(称为原型间隔子),具体通过碱基配对互补性并且然后如果短的、保守的与原型间隔子相关的基序(PAM)紧跟在互补靶序列的3'之后则进行DNA切割来进行识别。基于Cas核酸酶的序列和结构,CRISPR/Cas系统被分为三种类型(例如I型、II型和III型)。I型和III型的crRNA指导的监视复合体需要多个Cas亚基。研究最多的II型系统至少包括三个成分:RNA引导的Cas9核酸酶、crRNA和反式crRNA(tracrRNA)。tracrRNA包含双链体形成区。crRNA和tracrRNA形成双链体,该双链体能够与Cas9核酸酶相互作用,并通过crRNA上的间隔区与PAM上游的靶DNA上的原间隔区之间的Watson-Crick碱基配对将Cas9/crRNA:tracrRNA复合体引导至目标DNA的特定位点。Cas9核酸酶在crRNA间隔区定义的区域切割双链断裂。NHEJ修复导致插入和/或缺失,从而破坏了目标基因座的表达。或者,可以通过同源性指导的修复将具有同源侧翼序列的转基因引入DSB的位点。可以将crRNA和tracrRNA工程化成单个指导RNA(sgRNA或gRNA)(参见例如Jinek等,Science 337:816-21,2012)。此外,可以改变或编程与靶位点互补的指导RNA的区域以靶向所需序列(Xie等,PLoS One 9:e100448,2014;美国专利申请公开No.US 2014/0068797、No.US 2014/0186843;美国专利No.8,697,359、以及PCT公开No.WO 2015/071474;每个都以引用的方式并入)。在某些实施例中,基因敲除包括插入、缺失、突变或其组合,并使用CRISPR/Cas核酸酶系统制备。

[0176] 示例性的gRNA序列和使用该gRNA序列敲除编码免疫细胞蛋白的内源基因的方法包括Ren等,Clin.Cancer Res.23(9):2255-2266(2017)中描述的那些,其gRNA、CAS9 DNA、载体和基因敲除技术在此整体通过引用并入本文。

[0177] 如本文所用,“大范围核酸酶”,也称为“归巢内切核酸酶”,是指特征在于大识别位

点(约12至约40个碱基对的双链DNA序列)的内脱氧核糖核酸酶。基于序列和结构基序,大范围核酸酶可分为五个家族:LAGLIDADG (SEQ ID NO:159)、GIY-YIG (SEQ ID NO:160)、HNH、His-Cys盒和PD- (D/E) XK (SEQ ID NO:161)。示例性的大范围核酸酶包括I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII以及I-TevIII,其识别序列是已知的(参见例如美国专利号5,420,032和6,833,252; Belfort等, *Nucleic Acids Res.* 25:3379-3388, 1997; Dujon等, *Gene* 82:115-118, 1989; Perler等, *Nucleic Acids Res.* 22:1125-1127, 1994; Jasin, *Trends Genet.* 12:224-228, 1996; Gimble等, *J. Mol. Biol.* 263:163-180, 1996; Argast等, *J. Mol. Biol.* 280:345-353, 1998)。

[0178] 在某些实施例中,天然存在的大范围核酸酶可用于促进选自PD-1、LAG3、TIM3、CTLA4、TIGIT、HLA编码基因或TCR组分编码基因的靶的位点特异性基因组修饰。在其他实施例中,对靶基因具有新颖结合特异性的大范围核酸酶用于位点特异性基因组修饰(参见例如Porteus等, *Nat. Biotechnol.* 23:967-73, 2005; Sussman等, *J. Mol. Biol.* 342:31-41, 2004; Epinat等, *Nucleic Acids Res.* 31:2952-62, 2003; Chevalier等, *Molec. Cell* 10:895-905, 2002; Ashworth等, *Nature* 441:656-659, 2006; Paques等, *Curr. Gene Ther.* 7:49-66, 2007; 美国专利公开号Nos. US 2007/0117128; US 2006/0206949; US 2006/0153826; US 2006/0078552; 以及US 2004/0002092)。在进一步的实施例中,使用归巢核酸内切酶产生染色体基因敲除,所述归巢核酸内切酶已经被TALEN的模块化DNA结合结构域修饰以制备被称为MegaTAL的融合蛋白。当与编码目的多肽的外源供体模板结合使用时,MegaTAL不仅可用于敲除一个或多个靶基因,而且还可用于引入(敲除)异源或外源多核苷酸。

[0179] 在某些实施例中,染色体基因敲除包含被引入宿主细胞(例如免疫细胞)的抑制性核酸分子,所述宿主细胞包含编码与肿瘤相关抗原特异性结合的抗原特异性受体的异源多核苷酸,其中核酸分子编码靶标特异性抑制剂,并且其中编码的靶标特异性抑制剂抑制内源基因在宿主免疫细胞中的表达(即PD-1、TIM3、LAG3、CTLA4、TIGIT、HLA组分或TCR组分或其任意组合)。

[0180] 在某些实施例中,可以将目的结合蛋白或TCR敲入内源TCR基因座,从而敲除内源TCR并敲入目的蛋白。参见例如Eyquem等, *Nature* 543 (7643):113-117 (2017)。

[0181] 在某些实施例中,编码和/或表达本公开的结合蛋白或重组高亲和力TCR的宿主免疫细胞能够优先迁移到或活体存在于表达同源抗原(KRAS G12V或Her2-ITD)的靶组织(例如肿瘤)内,但在相同类型的非相邻组织中以统计上显著减少的量存在。通过说明的方式,宿主免疫细胞可以存在于肺肿瘤中(例如,如使用编码的结合蛋白的TCR V-区的深度测序所确定的那样),但是在与肿瘤不相邻的相同肺组织中以较低水平或根本不存在。在一些实施例中,非相邻组织包括或指从患病或恶性组织中去除至少3cm的组织。

[0182] 在某些实施例中,宿主细胞富含细胞组合物,例如可以施用于受试者。如本文所用,关于混合物中细胞类型的量的“富集”或“耗尽”是指在一个或多个富集或耗竭过程或步骤中产生的细胞混合物中的“富集”类型的数量增加,“贫化”细胞的数量减少或两者兼而有之。因此,取决于经历富集过程的原始细胞群的来源,混合物或组合物可包含30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%或更多(数量或数量的)“富集”细胞。经过耗竭过程的细胞可

能会导致混合物或组合物含有50%、45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%、9%、8%、7%、6%、5%、4%、3%、2%或1%或以下(数量或数量的)“耗尽”细胞。在某些实施例中,混合物中某种细胞类型的量将被富集,而另一种细胞类型的量将被耗尽,例如在消耗CD8⁺细胞的同时富集CD4⁺细胞,或在消耗CD62L⁻细胞时富集CD62L⁺细胞,或其组合。

[0183] 本文还提供了包含有效量的修饰的免疫细胞或包含修饰的免疫细胞的组合物的单位剂量。在某些实施例中,单位剂量以约1:1的比例包括(i)包含至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的修饰CD4⁺ T细胞的组合物,以及(ii)包含至少约30%、至少约40%、至少约50%组合、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的修饰CD8⁺ T细胞的组合物,其中单位剂量包含减少量的或基本不包含幼稚T细胞(即,与具有相当数量的PBMC的患者样品相比,具有的单位剂量中存在的天然T细胞群体的百分数小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约10%、小于约5或小于约1%)。

[0184] 在一些实施例中,单位剂量以约1:1的比例包括(i)包含至少约50%的修饰的CD4⁺ T细胞的组合物,以及(ii)包含至少约50%的修饰的CD8⁺ T细胞的组合物,其中单位剂量包含减少量的或基本不包含幼稚T细胞。在进一步的实施例中,单位剂量以约1:1的比例包括(i)包含至少约60%的修饰的CD4⁺ T细胞的组合物,以及(ii)包含至少约60%的修饰的CD8⁺ T细胞的组合物,其中单位剂量包含减少量的或基本不包含幼稚T细胞。在另外的实施例中,单位剂量以约1:1的比例包括(i)包含至少约70%的工程CD4⁺ T细胞的组合物,以及(ii)包含至少约70%的工程CD8⁺ T细胞的组合物,其中单位剂量包含减少量的或基本不包含幼稚T细胞。在一些实施例中,单位剂量以约1:1的比例包括(i)包含至少约80%的修饰的CD4⁺ T细胞的组合物,以及(ii)包含至少约80%的修饰的CD8⁺ T细胞的组合物,其中单位剂量包含减少量的或基本不包含幼稚T细胞。在一些实施例中,单位剂量以约1:1的比例包括(i)包含至少约85%的修饰的CD4⁺ T细胞的组合物,以及(ii)包含至少约85%的修饰的CD8⁺ T细胞的组合物,其中单位剂量包含减少量的或基本不包含幼稚T细胞。在一些实施例中,单位剂量以约1:1的比例包括(i)包含至少约90%的修饰的CD4⁺ T细胞的组合物,与(ii)包含至少约90%的修饰的CD8⁺ T细胞的组合物,其中单位剂量包含减少量的或基本不包含幼稚T细胞。

[0185] 应当理解,本公开的单位剂量可以包含如本文所述的结合蛋白、TCR或重组宿主细胞(即,表达对KRAS G12V或HER2-ITD抗原具有特异性的结合蛋白、以及修饰的表达对不同抗原(例如,不同的KRAS或HER2抗原、或来自不同蛋白质或靶标的抗原,例如BCMA、BRAF、CD3、CEACAM6、c-Met、EGFR、EGFRvIII、ErbB2、ErbB3、ErbB4、EphA2、IGF1R、GD2、O-乙酰GD2、O-乙酰GD3、GHRHR、GHR、FLT1、KDR、FLT4、CD44v6、CD151、CA125、CEA、CTLA-4、GITR、BTLA、TGFR2、TGFR1、IL6R、gp130、Lewis A、Lewis Y、TNFR1、TNFR2、PD1、PD-L1、PD-L2、HVEM、MAGE-A(例如包括MAGE-A1、MAGE-A3和MAGE-A4)、间皮素、NY-ESO-1、PSMA、RANK、ROR1、TNFRSF4、CD40、CD137、TWEAK-R、HLA、与HLA结合的肿瘤或病原体相关肽、与HLA结合的hTERT肽、与HLA结合的酪氨酸酶肽、LTβR、LIFRβ、LRP5、MUC1、OSMRβ、TCRα、TCRβ、CD19、CD20、CD22、CD25、CD28、CD30、CD33、CD52、CD56、CD79a、CD79b、CD80、CD81、CD86、CD123、CD171、CD276、B7H4、TLR7、TLR9、PTCH1、WT-1、HA1-H、Robo 1、甲胎蛋白(AFP)、Frizzled、OX40、PRAME和SSX-2等)。例如,单位剂量可包含表达特异性结合KRASG12V:HLA或HER2-ITD:HLA复合物的

结合蛋白的修饰CD4⁺T细胞以及表达特异性结合BRAFV600E抗原的结合蛋白(例如CAR)的修饰CD4⁺T细胞(和/或修饰CD8⁺T细胞)。

[0186] 在本文所述的任何实施例中,单位剂量包含相等或近似相等数量的工程化CD45RA⁻CD3⁺CD8⁺和修饰的CD45RA⁻CD3⁺CD4⁺TM细胞。

[0187] 在实施本公开的各种实施例中,标准技术可用于重组DNA、肽和寡核苷酸合成;免疫测定组织培养;以及转化(例如电穿孔和脂质转染)。酶促反应和纯化技术可根据制造商的说明书或本领域通常完成的或如本文所述的进行。这些以及相关的技术和过程通常可以根据常规方法进行,这些常规方法在本领域中是公知并且如本说明书全文中引用和讨论的、以及在微生物学、分子生物学、生物化学、分子遗传学、细胞生物学、病毒学和免疫学技术中的各种一般性和更具体的参考中描述(参见例如,Sambrook等,Molecular Cloning: A Laboratory Manual,3d ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.;Current Protocols in Molecular Biology(John Wiley and Sons, updated July 2008);Short Protocols in Molecular Biology:A Compendium of Methods from Current Protocols in Molecular Biology,Greenhouse Associates and Wiley-Interscience;Glover,DNA Cloning:A Practical Approach,vol.I&II (IRL Press,Oxford Univ.Press USA,1985);Current Protocols in Immunology(Edited by: John E.Coligan,Ada M.Kruisbeek,David H.Margulies,Ethan M.Shevach,Warren Strober 2001 John Wiley&Sons,NY,NY);Real-Time PCR:Current Technology and Applications,Edited by Julie Logan,Kirstin Edwards and Nick Saunders,2009, Caister Academic Press,Norfolk,UK;Anand,Techniques for the Analysis of Complex Genomes,(Academic Press,New York,1992);Guthrie and Fink,Guide to Yeast Genetics and Molecular Biology(Academic Press,New York,1991); Oligonucleotide Synthesis(N.Gait,Ed.,1984);Nucleic Acid Hybridization (B.Hames&S.Higgins,Eds.,1985);Transcription and Translation(B.Hames& S.Higgins,Eds.,1984);Animal Cell Culture(R.Freshney,Ed.,1986);Perbal,A Practical Guide to Molecular Cloning(1984);Next-Generation Genome Sequencing (Janitz,2008 Wiley-VCH);PCR Protocols(Methods in Molecular Biology) (Park,Ed., 3rd Edition,2010 Humana Press);Immobilized Cells And Enzymes(IRL Press,1986); the treatise,Methods In Enzymology(Academic Press,Inc.,N.Y.);Gene Transfer Vectors For Mammalian Cells(J.H.Miller and M.P.Calos eds.,1987,Cold Spring Harbor Laboratory);Harlow and Lane,Antibodies,(Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,1998);Immunochemical Methods In Cell And Molecular Biology(Mayer and Walker,eds.,Academic Press,London,1987);Handbook Of Experimental Immunology,Volumes I-IV(D.M.Weir and CC Blackwell,eds.,1986); Roitt,Essential Immunology,6th Edition,(Blackwell Scientific Publications, Oxford,1988);Embryonic Stem Cells:Methods and Protocols(Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen,Ed.,2002);Embryonic Stem Cell Protocols:Volume I: Isolation and Characterization(Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed.,2006);Embryonic Stem Cell Protocols:Volume II:Differentiation Models

(Methods in Molecular Biology) (Kurstad Turksen, Ed., 2006); Human Embryonic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kursad Turksen Ed., 2006); Mesenchymal Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Darwin J. Prockop, Donald G. Phinney, and Bruce A. Bunnell Eds., 2008); Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Medicine) (Christopher A. Klug, and Craig T. Jordan Eds., 2001) and Hematopoietic Stem Cell Protocols (Methods in Molecular Biology) (Kevin D. Bunting Ed., 2008); Neural Stem Cells: Methods and Protocols (Methods in Molecular Biology) (Leslie P. Weiner Ed., 2008))。

用途

[0188] 在另一方面, 本公开提供了通过向受试者施用有效量的本文所述的组合物(例如结合蛋白、TCR、重组宿主细胞、免疫原性组合物、多核苷酸、载体或相关组合物)来治疗有需要的受试者(例如患有或疑似患有与KRAS G12V抗原和/或Her2-ITD抗原相关的疾病或病症的方法)。此类疾病包括各种形式的增生性或过度增生性疾病, 例如实体癌和血液系统恶性肿瘤。

[0189] “治疗(treat)”、“治疗(treatment)”或“改善(ameliorate)”是指对受试者(例如人类或非人类哺乳动物, 例如灵长类、马、狗、小鼠或大鼠)的疾病、病症或病状的医学管理。通常, 适当的剂量或治疗方案包括宿主细胞和任选的佐剂以足以引起治疗或预防益处的量施用本发明公开的药物。治疗或预防/预防益处包括改善临床预后; 减轻或减轻与疾病有关的症状; 减少症状的发生; 改善生活质量; 更长的无病状态; 疾病程度的减少; 稳定疾病状态; 疾病进展延迟; 缓解; 生存延长生存期; 或其任意组合。

[0190] 本公开的组合物的“治疗有效量”或“有效量”(例如, 表达或编码其的结合蛋白或宿主细胞)是指以统计学上显著的方式足以减轻被治疗疾病的一种或多种症状的化合物或细胞的量。当提及单独给药的单个活性成分或表达单个活性成分的细胞时, 治疗有效剂量是指该成分或仅表达该成分的细胞的作用。当提及组合时, 治疗有效剂量是指活性成分或辅助活性成分与表达活性成分的细胞的组合量, 无论是连续施用还是同时施用, 都可产生治疗效果。组合也可以是表达一种以上活性成分的细胞, 例如特异性结合相同或不同抗原的两种不同结合蛋白。

[0191] 如本文中所使用的, “统计上显著”是指当使用学生的t检验(Student's t-test)计算得出的p值等于或小于0.050, 并且表示不太可能偶然出现被测量的特定事件或结果。

[0192] 如本文所用, 术语“过继免疫疗法(adoptive immune therapy)”或“过继免疫疗法(adoptive immunotherapy)”是指施用天然存在的或基因工程的疾病-抗原特异性免疫细胞(例如T细胞)。过继细胞免疫疗法可以是自体的(免疫细胞来自受体)、同种异体的(免疫细胞来自相同物种的供体)或同基因的(免疫细胞来自与受体遗传上相同的供体)。

[0193] 如本文所用, “过度增殖性疾病”是指与正常或未患病的细胞相比过度的生长或增殖。示例性的过度增殖性疾病包括肿瘤、癌症、肿瘤组织、癌、肉瘤、恶性细胞、恶性前细胞、以及非赘生性或非恶性过度增殖性疾病(例如腺瘤、纤维瘤、脂肪瘤、平滑肌瘤、血管瘤、纤维化、再狭窄以及自身免疫疾病、例如类风湿关节炎、骨关节炎、牛皮癣、炎症性肠病等)。某些涉及异常或过度生长的疾病发生得比缓慢增生性疾病更慢的疾病, 可以称为“增生性疾

病”，包括某些肿瘤、癌症、赘生性组织、癌、肉瘤、恶性细胞、恶性前细胞以及非肿瘤或非恶性疾病。

[0194] 在某些实施例中，方法包括向受试者施用有效量的组合物，所述组合物包含本文所述的结合蛋白、高亲和力重组TCR、宿主细胞、免疫原性组合物、多核苷酸或载体。在某些实施例中，受试者可以患有或疑似患有NSCLC、结肠直肠癌、胰腺癌、胆道癌、乳腺癌、卵巢癌、急性髓细胞性白血病 (AML) 和其中KRAS G12V新抗原是治疗靶标的 (其他) 适应症、或其中Her2-ITD新抗原是治疗靶标的其他适应症。在某些实施例中，受试者 (或受试者疾病) 表达KRAS G12V新抗原或Her2-ITD新抗原中的至少一种。

[0195] 通常，适当的剂量和治疗方案以足以提供益处的量提供活性分子或细胞。与未治疗的受试者相比，可以通过在治疗的受试者中建立改善的临床结果 (例如更频繁的缓解、完全或部分或更长的无病生存期) 来监测这种反应。预先存在的对肿瘤蛋白的免疫反应增加通常与改善的临床结果相关。通常可以使用常规的标准增殖、细胞毒性或细胞因子测定法评估此类免疫应答。

[0196] 为了预防性使用，剂量应足以预防、延迟与疾病或病症相关的疾病的发作或减轻其严重性。可以通过进行临床前 (包括体外和体内动物研究) 和临床研究，并分析通过适当的统计、生物学和临床方法及技术从中获得的数据，来确定根据本文所述方法施用的免疫原性组合物的预防益处，所有这些都可以由本领域技术人员容易地实践。

[0197] 还构想了药物组合物包含结合蛋白、高亲和力重组TCR、宿主 (即修饰的) 免疫细胞、免疫原性组合物、多核苷酸或本文所公开的载体的载体 (组合物) 以及药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。合适的赋形剂包括水、盐水、右旋糖、甘油等及其组合。在实施例中，包含本文公开的融合蛋白或宿主细胞的组合物还包含合适的输注介质。合适的输注介质可以是任何等渗介质，通常可以使用生理盐水、Normosol R (Abbott) 或Plasma-Lyte A (Baxter)、5%的葡萄糖水溶液、林格氏乳酸盐。输注介质可以补充人血清白蛋白或其他人血清成分。

[0198] 如医学领域技术人员所确定的，可以以适合于待治疗 (或预防) 的疾病或病状的方式施用药物组合物。所述组合物的合适剂量以及合适的持续时间和施用频率将由诸如患者的健康状况、患者的体型 (即体重、质量或身体面积)、类型和病情严重程度、活性成分的特定形式以及给药方法等因素来确定。通常，适当的剂量和治疗方案以足以提供治疗和/或预防益处的量提供组合物 (例如本文所述，包括改善的临床结果，例如更频繁的完全或部分缓解、或更长时间无疾病和/或总体生存率、或症状严重程度的减轻)。

[0199] 药物组合物的有效量是指在所需剂量和所需时间段内足以达到所需临床结果或有益治疗的量，如本文所述。有效量可以一次或多次给药方式递送。如果对已知或确认患有某种疾病或疾病状态的受试者给药，则术语“治疗量”可以用于治疗，而“预防有效量”可以用于描述向对作为预防性过程易感或有患疾病或疾病状态 (例如复发) 的风险的受试者给药的有效量。

[0200] 在过继性细胞疗法的情况下，治疗有效剂量是在过继转移中使用的编码和/或表达对KRAS G12V或Her2-ITD特异的结合蛋白或高亲和力重组TCR的宿主细胞的量，其能够治疗或治疗的人类或非人类哺乳动物中产生临床上理想的结果 (例如足以以统计学上显著的方式诱导或增强针对表达KRAS G12V或Her2-ITD的细胞的特异性T细胞免疫应答 (例如具有

细胞毒性T细胞反应)的量)。在各种实施例中,治疗有效剂量仅是CD4⁺ T细胞的量。在特定的实施例中,T细胞是幼稚T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞或其任意组合。

[0201] 组合物或单位剂量中的细胞数量为至少一个细胞(例如一个重组CD8⁺ T细胞亚群(例如可选地包含记忆和/或幼稚的CD8⁺ T细胞);一个重组CD4⁺ T细胞亚群(例如可选地包含记忆和/或幼稚的CD4⁺ T细胞))或更通常大于10²个细胞,例如多达10⁴个、多达10⁵个、多达10⁶个、多达10⁷个、多达10⁸个、多达10⁹个或10¹⁰个以上的细胞。在某些实施例中,以约10⁴至约10¹⁰细胞/m²的范围,优选以约10⁵至约10⁹细胞/m²的范围施用细胞。在一些实施例中,施用剂量包括多达约3.3×10⁵细胞/kg。在一些实施例中,施用剂量包括至多约1×10⁶细胞/kg。在一些实施例中,施用剂量包括多达约3.3×10⁶细胞/kg。在一些实施例中,施用剂量包括多达约1×10⁷细胞/kg。在某些实施例中,以包含多达约5×10⁴细胞/kg、5×10⁵细胞/kg、5×10⁶细胞/kg或多达约5×10⁷细胞/kg的剂量向受试者施用重组宿主细胞。在某些实施例中,以包含至少约5×10⁴细胞/kg、5×10⁵细胞/kg、5×10⁶细胞/kg或多达约5×10⁷细胞/kg的剂量向受试者施用重组宿主细胞。细胞的数量将取决于组合物所预期的最终用途以及其中所包括的细胞的类型。例如,经修饰以表达或编码结合蛋白的细胞将包含含有至少30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%或更多此类细胞的细胞群。对于本文提供的用途,电池的体积通常为一升或更少、500毫升或更少、250毫升或更少、或100毫升或更少。在实施例中,所需细胞的密度通常大于10⁴个细胞/ml,并且通常大于10⁷个细胞/ml,通常为10⁸个细胞/ml或更大。可以在一段时间内以单次输注或多次输注的形式施用细胞。在某些实施例中,可将临床上相关数量的细胞分配为多次输注,这些输注累计等于或超过10⁶、10⁷、10⁸、10⁹、10¹⁰或10¹¹个细胞。在某些实施例中,细胞的单位剂量可以是与来自同种异体供体的造血干细胞共同施用(例如同时或同期)。在一些实施例中,单位剂量中包含的一种或多种细胞对受试者是自体的。

[0202] 本文所述的药物组合物可以存在于单位剂量或多剂量容器中,例如密封的安瓿瓶或小瓶中。可以将这样的容器冷冻以保持制剂的稳定性,直到将其输注到患者体内为止。

[0203] 如本文所用,组合物的施用是指将其递送至受试者,而不论递送途径或方式如何,例如静脉内、口服阴道、直肠、皮下等。给药可以连续或间歇地和胃肠外进行。给药可以用于治疗已经被证实具有公认的病症、疾病或疾病状态的受试者,或者用于治疗易患或有风险患上这种病症、疾病或疾病状态的受试者。与辅助疗法的共同给药可能包括同时和/或以任何顺序依序和以任何给药方案递送多种药物(例如,具有一种或多种细胞因子的重组宿主细胞;免疫抑制疗法,例如钙调神经磷酸酶抑制剂、皮质类固醇、微管抑制剂、低剂量的麦考酚酸前药、或其任意组合)。

[0204] 如果本公开的组合物肠胃外给药,则该组合物还可包含无菌的水性或油性溶液或悬浮液。合适的无毒胃肠外可接受的稀释剂或溶剂包括水、林格氏溶液、等渗盐溶液、1,3-丁二醇、乙醇、丙二醇或聚乙二醇与水的混合物。水溶液或悬浮液可进一步包含一种或多种缓冲剂,例如乙酸钠、柠檬酸钠、硼酸钠或酒石酸钠。当然,用于制备任何剂量单位制剂的任何材料应该是药学上纯净的,并且就所使用的量而言基本上是无毒的。另外,可以将活性化合物掺入缓释制剂和制剂中。如本文所用,剂量单位形式是指适合于作为待治疗对象的单位剂量的物理上离散的单位;每个单位可包含预定量的重组细胞或活性化合物,所述重组细胞或活性化合物经计算可与合适的药物载体组合产生期望的治疗效果。

[0205] 在某些实施例中,向所述受试者施用多个剂量的本文所述的组合物(例如重组宿主细胞),其可以以约两周至约四周的施用间隔施用。

[0206] 本公开的治疗或预防方法可以作为治疗过程或方案的一部分施用于受试者,其可以包括在施予本公开单位剂量、细胞或组合物之前或之后的其他治疗。例如,在某些情况下在一些实施例中,接受单位剂量的受试者(例如重组宿主细胞)正在接受或已经接受过造血细胞移植(HCT;包括清髓性和非清髓性HCT)的。用于进行HCT的技术和方案在本领域中是已知的,并且可以包括移植任何合适的供体细胞,例如来自脐带血、骨髓或外周血的细胞,造血干细胞,激活(mobilized)的干细胞或羊水细胞。因此,在某些实施例中,本发明的重组宿主细胞可以在改良的HCT疗法中与造血干细胞一起施用或在造血干细胞之后不久施用。在一些实施例中,HCT包含供体造血细胞,其包含编码HLA成分的基因的染色体敲除、编码TCR成分的基因的染色体敲除、或两者兼而有之。

[0207] CTL免疫应答的水平可以通过本文所述和本领域常规实践的多种免疫学方法中的任何一种来确定。可以在施用本文所述的KRAS G12V或Her2-ITD特异性结合蛋白或TCR(或编码和/或表达它们的宿主细胞)或免疫原性的任何一种之前或之后确定CTL免疫应答的水平成分。可以使用本领域常规实践的几种技术和方法中的任何一种来进行用于确定CTL活性的细胞毒性测定(参见例如Henkart等,“Cytotoxic T-Lymphocytes” in Fundamental Immunology, Paul (ed.) (2003 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA), pages 1127-50以及其中引用的参考文献)。

[0208] 抗原特异性T细胞应答通常根据本文所述的任何T细胞功能参数(例如增殖、细胞因子释放、CTL活性、改变的细胞表面标志物表型等)通过观察到的T细胞应答的比较来确定,这种比较可以在适当情况下暴露于同源抗原(例如,当由免疫相容性抗原呈递细胞呈递时用于引发或激活T细胞的抗原)的T细胞与暴露于结构上不同或不相关的对照抗原的来自相同来源群体的T细胞之间进行。在统计学上显著大于对对照抗原的应答的对同源抗原的应答对于抗原特异性而言非常重要。

[0209] 可以从受试者获得生物样品以用于确定针对本文所述的针对KRAS G12V或Her2-ITD-衍生的新抗原肽的免疫应答的存在和水平。如本文所用,“生物样品”可以是血液样品(可以从其制备血清或血浆)、活检样品、体液(例如肺灌洗、腹水、粘膜洗涤液、滑液等)、骨髓、淋巴结、组织外植体、器官培养物或受试者或生物学来源的任何其他组织或细胞制剂。在接受任何免疫原性组合物之前,也可以从受试者获得生物样品,该生物样品可用作建立基线(例如免疫前)数据的对照。

[0210] 在一些实施例中,接受受试者组合物的受试者先前已经接受了淋巴清除化学疗法。在进一步的实施例中,所述淋巴清除化学疗法包括环磷酰胺、氟达拉滨、抗胸腺细胞球蛋白、奥沙利铂或其组合。

[0211] 根据本公开的方法可以进一步包括在组合疗法中施用一种或多种另外的药剂来治疗疾病或病症。例如,在某些实施例中,组合疗法包括将组合物(例如结合蛋白、高亲和力重组TCR、编码和/或表达相同的免疫原性组合物、多核苷酸、载体的修饰宿主细胞)(同期、同时、或依序)与免疫检查点抑制剂一起施用。在一些实施例中,组合疗法包括将本公开的组合物与刺激性免疫检查点剂的激动剂一起施用。在进一步的实施例中,组合疗法包括将本公开的组合物与第二种疗法(例如化学治疗剂、放射疗法、手术、抗体或其任意组合)一起

施用。

[0212] 如本文所用,术语“免疫抑制剂(immune suppression agent)”或“免疫抑制剂(immunosuppression agent)”是指提供抑制信号以帮助控制或抑制免疫应答的一种或多种细胞、蛋白质、分子、化合物或复合物。例如,免疫抑制剂包括分子,这些分子部分或全部地阻断免疫刺激;例如减少、预防或延迟免疫激活;或增加、激活或上调免疫抑制。靶向的示例性免疫抑制剂(例如,带有免疫检查点抑制剂)包括PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、CTLA4、B7-H3、B7-H4、CD244/2B4、HVEM、BTLA、CD160、TIM3、GAL9、KIR、PVR1 G(CD112R)、PVRL2、腺苷、A2aR、免疫抑制细胞因子(例如IL-10、IL-4、IL-1RA、IL-35)、IDO、精氨酸酶、VISTA、TIGIT、LAIR1、CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5、Treg细胞或其任意组合。

[0213] 免疫抑制剂抑制剂(immune suppression agent inhibitor)(也称为免疫检查点抑制剂)可以是化合物、抗体、抗体片段或融合多肽(例如Fc融合物,例如CTLA4-Fc或LAG3-Fc)、反义分子、核酶或RNAi分子、或低分子量有机分子。在本文公开的任何实施例中,方法可以单独或以任意组合包含具有以下免疫抑制组分中任一种的一种或多种抑制剂的本公开的组合物。

[0214] 因此,在某些实施例中,根据本发明的治疗方法可以进一步包括向受试者施用PD-1抑制剂。PD-1抑制剂可以包括尼伏鲁单抗(OPDIVO®);派姆单抗(KEYTRUDA®);伊匹木单抗+尼武单抗(YERVOY®+OPDIVO®);西米普利单抗IBI-308;尼武单抗+relatlimab;BCD-100;卡米单抗;JS-001;斯巴达珠单抗;替雷利珠单抗;AGEN-2034;BGBA-333+替雷利珠单抗;CBT-501;dostarlimab;durvalumab+MEDI-0680;JNJ-3283;盐酸帕唑帕尼+派姆单抗;pidilizumab;REGN-1979+西米普利单抗;ABBV-181;ADUS-100+斯巴达珠单抗;AK-104;AK-105;AMP-224;BAT-1306;BI-754091;CC-90006;西米普利单抗+REGN-3767;CS-1003;GLS-010;LZM-009;MEDI-5752;MGD-013;PF-06801591;Sym-021;替雷利珠单抗+帕米帕尼;XmAb-20717;AK-112;ALPN-202;AM-0001;对抗PD-1的阿尔茨海默氏病抗体;BH-2922;BH-2941;BH-2950;BH-2954;对抗CTLA-4和PD-1的实体瘤生物制剂;针对肿瘤的靶向PD-1和LAG-3的双特异性单克隆抗体;BLSM-101;CB-201;CB-213;CBT-103;CBT-107;细胞免疫疗法+PD-1抑制剂;CX-188;HAB-21;HEISCOIII-003;IKT-202;JTX-4014;MCLA-134;MD-402;mDX-400;MGD-019;拮抗PDCD1肿瘤的单克隆抗体;拮抗PD-1肿瘤的单克隆抗体;抑制PD-1肿瘤的溶瘤病毒;OT-2;PD-1拮抗剂+ropeginterferonalpha-2b;PEGMP-7;PRS-332;RXI-762;STIA-1110;TSR-075;靶向HER2和PD-1肿瘤的疫苗;靶向PD-1用于肿瘤学和自身免疫性疾病的疫苗;XmAb-23104;抑制PD-1用于肿瘤学的反义寡核苷酸;AT-16201;抑制PD-1用于肿瘤学的双特异性单克隆抗体;IMM-1802;拮抗PD-1和CTLA-4用于实体瘤和血液学肿瘤的单克隆抗体;尼伏鲁单抗生物仿制药;用于拮抗CD278和CD28并拮抗PD-1用于肿瘤学的重组蛋白;用于自身免疫性疾病和炎症疾病的重组蛋白激动PD-1;SNA-01;SSI-361;YBL-006;AK-103;JY-034;AUR-012;BGB-108;抑制PD-1,Gal-9和TIM-3的实体瘤药物;ENUM-244C8;ENUM-388D4;MEDI-0680;单克隆抗体、拮抗PD-1转移性黑色素瘤和转移性肺癌;抑制PD-1肿瘤学的单克隆抗体;针对肿瘤的靶向CTLA-4和PD-1的单克隆抗体;拮抗PD-1对NSCLC的单克隆抗体;抑制PD-1和TIM-3肿瘤的单克隆抗体;抑制PD-1肿瘤学的单克隆抗体;抑制PD-1和VEGF-A用于血液系统恶性肿瘤和实体瘤的重组蛋白;用于对抗PD-1肿瘤的小分子;Sym-016;inebilizumab+MEDI-0680;针对转移性黑色素瘤的针对PDL-1和IDO的疫苗;抗PD-1单克隆

抗体+胶质母细胞瘤的细胞免疫疗法;拮抗PD-1用于肿瘤学的抗体;抑制PD-1/PD-L1的血液恶性肿瘤和细菌感染的单克隆抗体;抑制PD-1感染HIV的单克隆抗体;和/或抑制PD-1的实体瘤的小分子。

[0215] 在某些实施例中,本公开的组合物与LAG3抑制剂组合使用,所述LAG3抑制剂例如为LAG525、IMP321、IMP701、9H12、BMS-986016或其任意组合。

[0216] 在某些实施例中,本公开的组合物与CTLA4的抑制剂组合使用。在特定的实施例中,组合物与CTLA4特异性抗体或其结合片段结合使用,所述抗体或其结合片段例如为易普利姆玛(ipilimumab)、曲美木单抗(tremelimumab)、CTLA4-Ig融合蛋白(例如阿巴西普、贝拉西普)或其任意组合。

[0217] 在某些实施例中,本公开的组合物与B7-H3特异性抗体或其结合片段(例如依诺妥珠单抗(MGA271)、376.96或两者)结合使用。B7-H4抗体结合片段可以是scFv或其融合蛋白,如例如在Dangaj等,Cancer Res.73:4820,2013以及在美国专利No.9,574,000和PCT专利公开号Nos.WO/201640724A1和WO 2013/025779A1中所描述的。

[0218] 在某些实施例中,本公开的组合物与CD244的抑制剂组合使用。

[0219] 在某些实施例中,本公开的组合物与BLTA、HVEM、CD160或其组合的抑制剂组合使用。抗CD-160抗体描述于例如PCT公开No.WO 2010/084158。

[0220] 在某些实施例中,本公开的组合物与TIM3的抑制剂组合使用。

[0221] 在某些实施例中,本公开的组合物与Gal9的抑制剂组合使用。

[0222] 在某些实施例中,本公开的组合物与腺苷信号传导抑制剂,例如诱饵腺苷受体结合使用。

[0223] 在某些实施例中,本公开的组合物与A2aR的抑制剂组合使用。

[0224] 在某些实施例中,本公开的组合物与KIR的抑制剂,例如利立单抗(BMS-986015)组合使用。

[0225] 在某些实施例中,本公开的组合物与抑制性细胞因子(通常是除TGFβ以外的细胞因子)或者Treg发育或活性的抑制剂组合使用。

[0226] 在某些实施例中,本公开的组合物与IDO抑制剂组合使用,所述抑制剂例如左1-甲基色氨酸、依帕卡司他(INCB024360;Liu等,Blood 115:3520-30,2010),依瑟仑(Terentis等,Biochem.49:591-600,2010)、吡啶昔莫德、NLG919(Mautino等,American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2013;Apr 6-10,2013)、1-甲基色氨酸(1-MT)-tira-pazamine或其任意组合。

[0227] 在某些实施例中,本公开的组合物与精氨酸酶抑制剂组合使用,所述抑制剂例如N(ω)-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)、N-ω-羟基-正-1-精氨酸(nor-NOHA)、L-NOHA、2(S)-氨基-6-硼代己酸(ABH)、S-(2-硼代乙基)-L-半胱氨酸(BEC)或其任意组合。

[0228] 在某些实施例中,本公开的组合物与VISTA的抑制剂组合使用,所述抑制剂例如CA-170(Curis,马萨诸塞州列克星敦)。

[0229] 在某些实施例中,本公开的组合物与TIGIT抑制剂组合使用,所述抑制剂例如COM902(Compugen,加拿大安大略省多伦多)、例如COM701(Compugen)的CD155抑制剂或两者。

[0230] 在某些实施例中,本公开的组合物与PVRIG、PVRL2或两者的抑制剂组合使用。抗

PVRIG抗体描述于例如PCT公开No.WO 2016/134333。抗PVRL2抗体描述于例如PCT公开No.WO 2017/021526。

[0231] 在某些实施例中,本公开的组合物与LAIR1抑制剂组合使用。

[0232] 在某些实施例中,本公开的组合物与CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5的抑制剂或其任意组合组合使用。

[0233] 在某些实施例中,本公开的组合物与增加刺激性免疫检查点分子的活性的试剂(即激动剂)组合使用。例如,组合物可以与CD137 (4-1BB) 激动剂(例如urelumab)、CD134 (OX-40) 激动剂(例如MEDI6469、MEDI6383或MEDI0562)、来那度胺、泊马利度胺、CD27激动剂(例如CDX-1127)、CD28激动剂(例如TGN1412、CD80或CD86)、CD40激动剂(例如CP-870,893、rhuCD40L或SGN-40)、CD122激动剂(例如IL-2)、GITR激动剂(例如PCT专利公开No.WO 2016/054638中所述的人源化单克隆抗体)、ICOS (CD278) (例如GSK3359609、mAb 88.2、JTX-2011、Icos 145-1、Icos 314-8或其任意组合)的激动剂组合使用。在本文公开的任何实施例中,方法可包括以单独或以任意组合的方式与刺激性免疫检查点分子的一种或多种激动剂(包括任何前述物质)一起施用本公开的组合物。

[0234] 在某些实施例中,组合疗法包括本公开的组合物和二次疗法,其包括以下一种或多种:对非炎性实体瘤表达的癌症抗原具有特异性的抗体或其抗原结合片段、放射治疗、手术、化学治疗剂、细胞因子、RNAi或其任意组合。

[0235] 在某些实施例中,组合疗法方法包括施用本公开的组合物,并进一步施用放射治疗或手术。放射疗法在本领域中是众所周知的,并且包括X射线疗法,例如 γ 射线照射和放射性药物疗法。适用于治疗受试者中给定癌症的手术和外科技术是本领域普通技术人员众所周知的。

[0236] 可用于促进免疫抗癌或抗肿瘤反应的细胞因子包括例如单独的或与本公开的组合物任意组合的IFN- α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-24和GM-CSF。在进一步的实施例中,如果在施用细胞因子之前至少向受试者施用抗HER2-ITD和/或抗KRAS G12V组合物至少三或四次,则依次施用细胞因子。在某些实施例中,将细胞因子皮下施用。在一些实施例中,受试者可以已经或正在接受免疫抑制疗法,例如钙调神经磷酸酶抑制剂、皮质类固醇、微管抑制剂、低剂量的霉酚酸前药或其任意组合。在另外的实施例中,被治疗的受试者已经接受了非清髓性或造血性细胞移植,其中可以在非清髓性的造血细胞移植后至少两至三个月给予治疗。

[0237] 在某些实施例中,组合疗法方法包括施用根据本发明的本公开的组合物和进一步施用化学治疗剂。化学治疗剂包括但不限于染色质功能抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、微管抑制药物、DNA损伤剂、抗代谢物(例如叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和糖修饰的类似物)、DNA合成抑制剂、DNA相互作用剂(例如嵌入剂)和DNA修复抑制剂。示例性化学治疗剂包括但不限于以下组:抗代谢物/抗癌剂,例如嘧啶类似物(5-氟尿嘧啶、氟尿苷、卡培他滨、吉西他滨和阿糖胞苷)和嘌呤类似物、叶酸拮抗剂和相关抑制剂(巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁和2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨));抗增殖/抗有丝分裂剂,包括例如长春花生物碱(长春碱、长春新碱和长春瑞滨)的天然产物、例如紫杉烷(紫杉醇,多西他赛)的微管干扰物、长春新碱、长春花碱、诺考达唑、埃博霉素和蔡维滨、表鬼臼苦苷、表鬼臼苦苷药剂(放线菌素、氨基地林、蒽环类药物、博来霉素、白消安、喜树碱、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、环磷酰胺、

放线菌素、柔红霉素、阿霉素、表柔比星、六甲基三聚氰胺草酸铂、异磷酰胺、美法仑、巯基乙胺、丝裂霉素、米托蒽醌、亚硝基脲、普卡霉素、丙卡巴嗪、紫杉醇、替莫唑胺、替尼泊苷、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷 (VP16)) ; 抗生素, 例如放线菌素 (放线菌素D)、柔红霉素、阿霉素 (阿霉素)、伊达比星、蒽环类、米托蒽醌、博来霉素、普卡霉素 (mithramycin) 和丝裂霉素; 酶 (L-天冬酰胺酶、全身性代谢L-天冬酰胺、使没有能力合成自己的天冬酰胺的细胞剥夺); 抗血小板药; 抗增殖/抗有丝分裂的烷化剂, 例如氮芥 (甲乙胺、环磷酰胺及其类似物、美法仑、苯丁酸氮芥)、亚乙基亚胺和甲基三聚氰胺 (六甲基三聚氰胺和噻替帕)、烷基磺酸盐-白硫丹、亚硝基脲 (卡莫司汀 (BCNU) 和类似物、链霉菌素)、曲康-达卡巴嗪 (DTIC) ; 抗增殖/抗有丝分裂抗代谢物, 例如叶酸类似物 (甲氨蝶呤) ; 铂配位配合物 (顺铂、卡铂)、丙卡巴嗪、羟基脲、米托坦、氨基谷氨酰胺; 激素、激素类似物 (雌激素、他莫昔芬、戈舍瑞林、比卡鲁胺、尼鲁米特) 和芳香酶抑制剂 (来曲唑、阿那曲唑) ; 抗凝剂 (肝素、合成肝素盐和其他凝血酶抑制剂) ; 纤维蛋白溶解剂 (例如组织纤溶酶原激活剂、链激酶和尿激酶)、阿司匹林、双嘧达莫、噻氯匹定、氯吡格雷、阿昔单抗; 抗迁移剂; 抗分泌剂 (breveldin) ; 免疫抑制剂 (环孢霉素、他克莫司 (FK-506)、西罗莫司 (雷帕霉素)、硫唑嘌呤、霉酚酸酯) ; 抗血管生成化合物 (TNP470、染料木黄酮) 和生长因子抑制剂 (血管内皮生长因子 (VEGF) 抑制剂、成纤维细胞生长因子 (FGF) 抑制剂) ; 血管紧张素受体阻滞剂; 一氧化氮供体; 反义寡核苷酸; 抗体 (曲妥单抗、利妥昔单抗) ; 嵌合抗原受体; 细胞周期抑制剂和分化诱导剂 (维甲酸) ; mTOR抑制剂、拓扑异构酶抑制剂 (阿霉素、阿霉素、喜树碱、柔红霉素、放线菌素、依尼泊苷、表柔比星、依托泊苷、伊达比星、伊立替康 (CPT-11) 和米托蒽醌、托泊替康、伊立替康)、皮质类固醇 (可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基prednisolone、泼尼松和prenisolone) ; 生长因子信号转导激酶抑制剂; 线粒体功能障碍的诱因、霍乱毒素、蓖麻毒蛋白、假单胞菌外毒素、百日咳博德特氏菌腺苷酸环化酶毒素或白喉毒素等毒素、以及胱天蛋白酶激活剂; 和染色质破坏剂。

[0238] 本公开的另一方面涉及如本文所述的组合物 (例如结合蛋白、TCR、宿主细胞、多核苷酸、载体、免疫原性组合物), 其用于治疗病症和/或用于制备用于治疗病症的药物和/或用于对病症进行过继免疫疗法, 所述病症为以下中的任何一种或多种: NSCLC、结直肠癌癌症、胰腺癌、AML、胆道癌、乳腺癌、卵巢癌、其中KRAS G12V新抗原是治疗靶点的其他适应症或Her2-ITD新抗原是治疗靶点的其他适应症。本文考虑的某些治疗或预防方法包括施用编码和/或表达本文公开的结合蛋白或TCR的宿主细胞 (可以是自体的、同种异体的或同基因的)。

[0239] 还提供了治疗有需要的受试者和/或在受试者中诱导免疫应答的方法, 其中所述方法包括向所述受试者施用有效量的本文所述的免疫原性组合物。该受试者可能患有或疑似患有NSCLC、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、胆道癌、AML、其中KRAS G12V新抗原是治疗靶点的其他适应症、其中Her2-ITD新抗原是治疗靶标。在一些实施例中, 可以将免疫原性组合物施用于受试者两次或更多次。

[0240] 在某些实施例中, 该方法可以进一步包括对受试者施用过继细胞疗法 (例如如本文所公开的)。在各种实施例中, 该方法可以进一步包括向受试者施用佐剂或检查点抑制剂中的至少一种, 其中该佐剂或检查点抑制剂包括IL-2、PD-1抑制剂、PD-L1、抑制剂或CTLA-4抑制剂、或本文公开的另一种抑制剂或组合物中的至少一种。

[0241] 在一些实施例中, 可以使用包含基于T细胞的新抗原疫苗的免疫原性组合物 (参见

例如PCT公开No.WO 2017/192924,其中的T细胞疫苗、免疫原性增强剂、转座子表达构建体和相关方法通过引用整体并入本文)。在某些实施例中,免疫原性组合物包含脂质体RNA制品(参见例如Kreiter等,Nature 520:692,2015,通过引用将其整体并入本文)。在某些在一些实施例中,免疫原性组合物用于制备肽脉冲的树突状细胞或其他抗原呈递细胞,其可以离体、体外或体内进行。

[0242] 本公开还提供了制备抗原脉冲的抗原呈递细胞的方法。在一些实施例中,所述方法包括在足以进行抗原呈递细胞进行抗原加工和呈递的条件和时间下体外接触(i)与受试者免疫相容的抗原呈递细胞群,和(ii)本文所述的多核苷酸、肽、免疫原性组合物和/或表达载体,从而获得能够引发对KRAS G12V或Her2-ITD的抗原特异性T细胞应答的抗原脉冲抗原呈递细胞。该方法可以进一步包括在足以产生KRAS G12V-特异性T细胞或Her2-ITD-特异性T细胞的条件下,使抗原刺激的抗原呈递细胞与一个或多个免疫相容性T细胞接触。

[0243] 还提供了包括在体外或离体扩增如本文以上公开的KRAS G12V-特异性免疫细胞或Her2-ITD-特异性免疫细胞以获得KRAS G12V-特异性免疫细胞或Her2-ITD-特异性免疫细胞的一种或多种克隆的方法。在某些实施例中,免疫细胞包括T细胞,并且该方法包括以足以进行T细胞受体结构表征的量扩增T细胞,并确定用于所述一种或多种克隆中的一种或多种的编码T细胞受体多肽的核酸序列。

[0244] 在某些实施例中,该方法进一步包括用包含如此确定的编码T细胞受体多肽的核酸序列的多核苷酸在体外或离体转染或转导免疫细胞群体,从而在向受试者给药时以有效地过继转移或赋予抗原特异性T细胞对KRAS G12V或Her2-ITD的应答的量获得工程化的KRAS G12V-特异性免疫细胞或工程化的Her2-ITD-特异性免疫细胞。

[0245] TCR测序的进展已经描述(例如Robins等,2009Blood 114:4099;Robins等,2010Sci.Translat.Med.2:47ra64,PMID:20811043;Robins等,2011(Sept.10)J.Imm.Meth.Epub ahead of print,PMID:21945395;以及Warren等,2011Genome Res.21:790),并且可以在实践根据本公开的实施例的过程中采用。类似地,使用期望的核酸转染/转导T细胞的方法已经描述(例如,US 2004/0087025),该方法具有使用具有期望的抗原特异性的T细胞的过继转移程序(例如,Schmitt等,Hum.Gen.20:1240,2009;Dossett等,Mol.Ther.77:742,2009;Till等,Blood 112:2261,2008;Wang等,Hum.Gene Ther.18:112,2007;Kuball等,Blood 109:2331,2007;US 2011/0243972;US 2011/0189141;以及Leen等,Ann.Rev.Immunol.25:243,2007),从而基于本文的教导,包括针对那些针对对与HLA受体复合的KRAS G12V(SEQ ID NO:1)或Her2-ITD(SEQ ID NO:22)新抗原具有特异性的增强亲和力TCR的方法,构想了将这些方法应用于当前公开的实施例。

[0246] 在一些实施例中,可以如Ho等所述制备免疫细胞系(参见2006J Immunol Methods 310(1-2):40-52))。例如,树突状细胞(DC)可以通过在补充了GM-CSF(800U/ml)和IL-4(1000U/ml)的DC培养基(CELLGENIX™)中培养两天(第-2至第0天)从PBMC的塑性粘附部分得到。在第-1天,可以添加成熟细胞因子TNFa(1100U/ml)、IL-1β(2000U/ml)、IL-6(1000U/ml)和PGE2(1μg/ml)。在第0天,可以在无血清DC培养基中在2到4个小时内收获DC、洗涤DC、以及使用肽(10μg/ml的单个肽或2μg/ml的肽库)脉冲处理DC。可以使用抗CD8微珠(MILTENYI BIOTEC™,奥本,加利福尼亚州)从PBMC中分离CD8 T细胞,并在存在IL-21(30ng/ml)的情况

下以1:5至1:10的效应靶(E:T)比率用DC刺激CD8⁺ T细胞。在第3天,可以添加IL-2 (12.5U/ml)、IL-7 (5ng/ml) 和IL-15 (5ng/ml)。在存在IL-21情况下经过肽脉冲2小时后,使用放射自体PBMC的塑性粘附部分作为抗原呈递细胞(APC),可以在第10天到第14天之间对细胞进行再刺激。再刺激后,可从第1天开始向细胞补充IL-2 (25U/ml)、IL-7 (5ng/ml) 和IL-15 (5ng/ml)。T细胞克隆可通过以有限的稀释度铺板细胞并用涂有OKT3 (ORTHO BIOTECH™, Bridgewater, N.J.) 的TM-LCL和同种异体PBMC作为饲养细胞(REP方案)扩增而产生(参见Ho等, 2006J Immunol Methods 310(1-2):40-52)。

实例

[0247] 以下实例说明了所公开的方法、用途和组合物。根据本公开,本领域技术人员将认识到,在有限试验内所公开的方法和组合物的这些实施例和其他实施例的变型是可能的。

实例1-NSCLC研究的临床方案

[0248] 在Fred Hutchinson Cancer Research Center,使用来自根据方案招募的四名患者(1347、1490、1238和1139)的知情同意后获得的NSCLC组织和非邻近的肺组织(尽可能远离恶性病变,至少3cm)进行单中心研究,其中包括接受机构审查委员会批准的针对I-III期NSCLC进行根治性手术的患者。来自淋巴结切除术的福尔马林固定的石蜡包埋组织是从一名接受机构审查委员会批准的单独方案中招募的患者(511)获得的。根据机构审查委员会批准的方案,从患者511、1139和1238获得外周血样本,从患者1347和1490获得白细胞分离术产品。所有研究均排除了有献血或白细胞分离术医学禁忌症的患者,并根据Belmont Report进行。

[0249] 病人511是一位73岁的女性前吸烟者,现年70岁,肺腺癌转移至淋巴结和骨骼。在接受献血的诊断后3年,她接受了卡铂和培美曲塞的治疗,然后进行了培美曲塞的单药治疗,并且处于长期疾病稳定期。

[0250] 患者1347是一位64岁的男性前吸烟者,他患有IIB期鳞状细胞癌,接受了外科切除手术,然后进行了卡铂和紫杉醇的辅助治疗。献血时,他受到监视且没有任何疾病的迹象。

[0251] 患者1490是一位62岁的女性前吸烟者,最初出现了pT2a肺腺癌,但已切除,但随后出现了肺门和纵隔局部复发。在开始用卡铂和紫杉醇进行确切的化学放射治疗后,她捐献了血液。

[0252] 患者1139是一位69岁的女性前吸烟者,最初切除了I期肺腺癌,随后进行了局部复发和脑转移,并通过立体定向放射外科手术进行了卡铂和培美曲塞的4周期治疗,然后进行了培美曲塞的维持治疗6周期。疾病出现了进展,她接受了尼古鲁单抗治疗,随后疾病进展。该患者在接受尼古鲁单抗治疗的同时献血。

[0253] 患者1238是一名68岁的非吸烟男性,最初表现为IIIA期肺腺癌,先行切除术,然后再辅以培美曲塞和顺铂,然后在1年后发展为转移性疾病。该患者先接受阿法替尼治疗,然后进行进展治疗,而接受派姆单抗(pembrolizumab)治疗,随后疾病进展。然后患者接受多西他赛和拉米单抗治疗,随后进行拉米单抗维持治疗,这是他在献血时正在接受的治疗。

[0254] 患者1490是一位62岁的女性前吸烟者,最初出现了pT2a肺腺癌,但已切除,但随后出现了肺门和纵隔局部复发。在开始用卡铂和紫杉醇进行确切的化学放射治疗后,她捐献了血液。

表格 1. 研究中患者的特征										
Pt #	献血 年 龄	诊 断	吸 烟 史	切 除 术 时 的 阶 段	献 血 时 的 阶 段	切 除 术 与 献 血 之 间 的 时 间	先 前 治 疗	献 血 时 的 治 疗	mS NVs	筛选 的 突 变
511	7 3	腺 瘤	是	IV- 淋 巴 结	IV	30 个 月	卡 铂 / 培 美 曲 塞	培 美 曲 塞	50 5	46
1490	6 2	腺 瘤	是	IB- 肺 肿 瘤	III	13 个 月	无	卡 铂 、 紫 杉 醇 、 放 射	13 0	46
1347	6 4	鳞 状 细 胞 癌	是	IIB - 肺 肿 瘤	没 有 疾 病 的 迹 象	10 个 月	卡 铂 / 紫 杉 醇	无	65	57
1139	6 9	腺 瘤	是	IV 期- 肺 肿 瘤	IV	27 个 月	卡 铂 / 培 美 曲 塞	尼 古 鲁 单 抗	38 8	48
1238	6 8	腺 瘤	否	IIIA- 肺 肿 瘤	IV	23 个 月	顺 铂 / 培 美 曲 塞 、 阿 法 替 尼 替 尼 派 姆 单 抗 、 多 西 他 赛 / 拉 米 单 抗	拉 米 单 抗	34 +Her2 ITD	20 +Her2 ITD
mSNV： 错义的单核苷酸变体。										

实例2-外来捕获的核酸制备和RNA测序

[0255] 从非相邻肺中分离出1490、1238和1139患者的非肿瘤DNA。血液被用作患者511和1347的非肿瘤DNA。使用QIAGEN™DNA/RNA ALLPREP™Micro试剂盒处理源自肿瘤、肺组织或血液中PBMC的单细胞悬液，以分离用于外显子组捕获的DNA，保留用于后续RNA-seq分析的RNA。除了从最初的肿瘤切除术中分离出的DNA之外，还从患者1347的肿瘤中建立了患者衍生的异种移植物 (PDX)，PDX肿瘤用于DNA和RNA的制备。基因组DNA浓度在INVITROGEN™QUBIT® 2.0 荧光计 (LIFE TECHNOLOGIES- INVITROGEN™, Carlsbad, CA, USA) 和TRINEAN™DROPSENSE96™分光光度计 (CALIPER™Life Sciences, Hopkinton, MA) 上进行定量。

实例3-全外来排序

[0256] 使用AGILENT™SURESELECTXT™试剂盒制备外显子组测序文库，并使用AGILENT™All Human Exon v6 (AGILENT™Technologies, Santa Clara, CA, USA) 分离了外显子靶标。使用LE220聚焦超声仪 (COVARIS®, Inc., Woburn, MA, USA) 将200ng基因组DNA片段

化,并在SCICLONE®NGSx Workstation (PERKINELMER®,Waltham,MA,USA)上制备并捕获文库。文库大小分布使用AGILENT™2200TAPESTATION™进行了验证。使用LIFE TECHNOLOGIES-INVITROGEN™QUBIT®2.0荧光计进行额外的库QC、合并索引库的混合以及聚类优化。

[0257] 所得文库使用配对末端100bp (PE100) 策略在ILLUMINA®HISEQ™2500上测序。使用ILLUMINA®'sReal Time Analysis v1.18软件执行图像分析和碱基检出,然后使用FASTQ files using ILLUMINA®'sbcl2fastq Conversion Software v1.8.4对索引读取进行“多路分解”并生成FASTQ文件(support_illumina_com/downloads/bcl2fastq_conversion_software_184_html)。

[0258] 保留通过标准ILLUMINA®质量过滤器的阅读对以进行进一步分析,在这里报告的样品中,平均产生了65.2M的肿瘤阅读对和64.4M的正常阅读对。使用BWA-MEM短读比对仪将配对的读段与人类基因组参考 (GRCh37/hg19) 进行比对 (参见Li H.arXiv preprint arXiv:13033997.2013以及Li H等,Bioinformatics.2009;25 (14) :1754-60)。得到的标准BAM格式的比对文件通过PiCard 2.0.1和GATK 3.5处理 (参见McKenna A等,Genome research.2010;20 (9) :1297-303) 以进行质量评分重新校准、插入缺失重新对齐,并根据建议的最佳做法进行重复删除 (参见Vander Auwera GA等,Current protocols in bioinformatics.2013;11.0.1-.0.33)。

[0259] 为了从准备分析的肿瘤和正常BAM文件中调用体细胞突变,使用了两个独立的软件包:MuTect 1.1.7 (参见Cibulskis K等,Nature biotechnology.2013;31 (3) :213), Strelka 1.0.14 (参见Saunders CT等,Bioinformatics.2012;28 (14) :1811-7),以及两种工具在VCF格式下的变体调用均通过Oncotator注释 (参见Ramos AH等,Human mutation.2015;36 (4))。如下将注释的错义体细胞变体合并为每个样品的单个摘要。首先,如果注释突变为“体细胞”且存在于dbSNP中但不存在于COSMIC中或其次要等位基因频率大于1% (根据UCSC Genome Browser snp150Common表),则将其删除。保留了两个变体调用者支持的变体,并且仅一个变体调用者支持的变体需要进行手动检查。

实例4-RNA-SEQ数据处理

[0260] 对于患者1347,使用来自PDX的肿瘤细胞直接测量候选突变的RNA表达。使用TRUSEQ™RNA Sample Prep v2 Kit (ILLUMINA®,Inc.,San Diego,CA,USA) 和SCICLONE®NGSx Workstation (PERKINELMER®,Waltham,MA,USA) 从总RNA中制备文库。使用AGILENT™2200TAPESTATION™ (AGILENT™Technologies,Santa Clara,CA,USA) 验证库的大小分布。使用LIFE TECHNOLOGIES-INVITROGEN™QUBIT®2.0Fluorometer进行额外的库QC、合并索引库的混合以及聚类优化。该文库在ILLUMINA®HISEQ™2500上测序,产生61M读段对 (每对两个50nt读段)。首先将读段与小鼠参考组件 (mm9) 对齐,以从小鼠而不是植入的肿瘤中除去读段。剩余的读物与具有RSEM 1.2.19的人RefSeq衍生的参考转录组对齐 (参见Li B等BMC bioinformatics.2011;12 (1) :323),从而得出以每百万转录单位 (TPM) 为单位的每个基因的丰度。

实例5-用于筛选的突变选择

[0261] 对于每位患者,通过与正常DNA样品比较确定单核苷酸变体 (SNV),并按变体等位基因频率和表达进行排序,以选择用于筛选的候选肽。对于患者511而言,称为MuTect

1.1.7的突变(Cibulskis K, Lawrence MS, Carter SL, Sivachenko A, Jaffe D, Sougnez C 等, Sensitive detection of somatic point mutations in impure and heterogeneous cancer samples. *Nat Biotechnol* 2013;31:213) 和 Strelka 1.0.14 (Saunders CT, Wong WS, Swamy S, Becq J, Murray LJ, Cheetham RK. Strelka: accurate somatic small-variant calling from sequenced tumor-normal sample pairs. *Bioinformatics* 2012; 28:1811-7), 其中根据肺腺癌的TCGA中的平均表达量对大于20%的变异等位基因频率进行排序, 并筛选前45个突变。

[0262] 对于患者1490, 由MuTect 1.1.7和Strelka 1.0.14识别的所有SNV具有10-40%的变异等位基因频率。根据肺腺癌的TCGA中的平均表达对这些进行排序, 并筛选出前46个突变。

[0263] 对于患者1139, 根据肺腺癌的TCGA中的平均表达对MuTect 1.1.7和Strelka 1.0.14调用的变异等位基因频率均大于20%的SNV进行排序, 并筛选前46个突变。对于患者1238, 检测到<50个突变, 因此根据肺腺癌的TCGA中的平均表达对由MuTect 1.1.7或Strelka 1.0.14调用的SNV进行排序, 并且筛选表达大于百万分之3转录物(TPM)的SNV。

[0264] 患者1347的体细胞变异显示大量(>10,000)的C>A/G>T转化, 其变异等位基因频率低。在相应的正常样品中也发现了类似数量的具有相似特性的变体, 这表明这些可能是由于DNA剪切过程中的氧化而造成的假象(Wakabayashi O, Yamazaki K, Oizumi S, Hommura F, Kinoshita I, Ogura S, 等, CD4⁺ T cells in cancer stroma, not CD8⁺ T cells in cancer cell nests, are associated with favorable prognosis in human nonsmall cell lung cancers. *Cancer Sci* 2003;94:1003-9)。为避免该特定样品出现此问题, 从相应的患者衍生异种移植物(PDX)中提取RNA-seq数据。将PDX RNA-seq与小鼠基因组(小鼠基因组的mm9释放)比对, 以抑制源自小鼠的读段。根据Broad Institute's GATK "Best Practices" RNA-seq变异调用工作流程执行了其余读段的变异调用, 包括两遍STAR对齐、拼接读段的拆分以及忽略软掩盖的基底的HaplotypeCaller的应用(McKenna A, Flanna M, Banks E, Sivachenko A, Cibulskis K, Kernytzsky A等, The Genome Analysis Toolkit: a MapReduce framework for analyzing next-generation DNA sequencing data. *Genome Res* 2010;20:1297-303) (软件.broadinstitute.org/gatk/documentation/article.php?id=3891)。HaplotypeCaller还用于在相应的正常血液外显子组样本中调用种系变体。保留了通过RNA-seq发现且未在种系外显子组捕获中观察到的变体。为了捕获其他候选变体, MuTect体细胞变体调用者也用于分析就绪的PDX RNA-seq BAM文件或PDX外显子组捕获BAM文件与正常血液外显子组BAM文件的比较。通过上述所有过程鉴定出的错义突变被合并为一组235个候选变体, 这些候选变体均使用Integrative Genomics Viewer (IGV) 手动检查(IGV) (McKenna等, (2010)), 以保留由切除的肿瘤外显子组和PDX所支持的但未在正常血液外显子组数据中观察到的那些突变。通过在每个位置支持替代等位基因的RNA-seq读段的数量对变体进行排序, 并选择前57个突变用于肽合成。与MuTect 1.1.7不同, Strelka变异调用者报告候选的体细胞插入和删除。报告的少于25个插入缺失标记被手动检查, 并经受与上述点突变相似的过滤标准, 包括变异等位基因频率和所含基因的预期表达(从TCGA LUAD汇总或直接从1347PDX测量)。也排除了可能导致所得蛋白质发生无义介导的衰变的移码。除了在患者1238中发现的Her2-ITD之外, 未鉴定到未预测将受无义介导衰变影响的蛋

白质编码插入缺失。诱导无意义介导衰变的标准是在转录本的末端外显子之前产生终止密码子。

实例6-T细胞培养

[0265] 从使用淋巴细胞分离培养基(Corning)通过密度梯度离心获得的患者和正常供者的血液中分离外周血单核细胞(PBMC),并用补充有EDTA(3.6mM)的PBS洗涤3次。

[0266] 用从ELIM BIOPHARM™获得的重叠的20-mer肽刺激患者的PBMC。跨越每个突变且在20个氨基酸序列的+7或+13位具有突变残基的两个肽用于刺激,其中多达100个包含50个突变的肽的库用于刺激。随后用>80%纯度的27-mer肽(突变氨基酸位于+13位)进行用于分析T细胞反应性的实验。

[0267] 将冷冻保存的PBMC解冻,并在含有L-谷氨酰胺和HEPES(GIBCO™)的RPMI培养基中静置过夜,该培养基补充有10%人血清(自产)、50μMβ-巯基乙醇、青霉素(100U/mL)和链霉素(100U/mL)、4mM L-谷氨酰胺(称为CTL培养基)和2ng/ml重组人IL-7(PEPROTECH®)。第二天早上洗涤PBMC,并将10⁷个细胞铺在5ml CTL培养基中6孔板的各个孔中,该培养基含有1μg/mL没有细胞因子的每种肽。在第3天,重组IL-2(PEPROTECH®)已添加至浓度为10U/ml的最终产物,并且在第3天、第6天和第9天用补充IL-2进行一半培养基更换。在第13天,收获来自各个孔的细胞,并通过ELISA和/或细胞因子染色测定法进行测定。

[0268] 在使用一种或几种(多达5个合并的)纯化突变肽和其他细胞因子(在初始刺激中及随后的限制稀释培养中提高生长效率)刺激PBMC之后,进行在初始测定中被鉴定为具有反应性的抗原特异性T细胞的富集。简而言之,首先在存在IL-21(30ng/ml)、IL-7(5ng/ml)、IL-15(1ng/ml)和IL-2 10U/ml的情况下,先用1μg/mL的27-mer突变肽刺激PBMC持续13天,然后用20μg/mL单个27-mer肽脉冲的自体B细胞对培养物再刺激5小时,然后对活细胞分泌IFN-γ的T细胞进行染色和分选(干扰素分泌试剂盒APC,Miltenii目录号no.130-090-762,包括捕获和检测试剂),以及使用FACSARIA™II(BD Biosciences)上的抗CD4-海水蓝(克隆RPA 14,Biolegend目录号300521)和抗CD8-FITC(克隆HIT8a,BD pharmigen目录号555634)。

[0269] 分选的T细胞包括抗原特异性细胞、以及非特异性产生纯度未知的IFN γ的细胞。为了分离具有抗原特异性的克隆或寡克隆细胞群,在存在1.0×10⁵辐照的异基因PBMC、2μg/mL、植物血凝素(SIGMA®)和IL-2(100U/ml)的情况下,在96孔板中以有限的稀释度扩增分选的细胞(每孔3或10个细胞)持续14到20天,并在第14天额外补充IL2。扩增后,将T细胞系(10,000-100,000个细胞)与突变肽(10μg/mL)脉冲的自体B细胞(100,000细胞)孵育,并通过ELISA测量IFN-γ的产生,以鉴定具有抗原特异性的T细胞。然后使用先前描述的快速扩展方案扩展反应性线,冷冻保存(参见Riddell SR等,Journal of immunological methods.1990;128(2):189-201)。将冷冻保存的细胞解冻,并在补充有10%DMSO和其他10%人血清的CTL培养基中静置过夜(最终浓度为20%人血清(Riddell SR,Greenberg PD.The use of anti-CD3 and anti-CD28 monoclonal antibodies to clone and expand human antigen-specific T cells.J Immunol Methods 1990;128:189-201)。将冷冻保存的细胞解冻,并在测定前在补充IL2(10U/mL)的CTL培养基中静置过夜。

[0270] 为了培养TIL,在存在IL2(6,000U/mL)的情况下,在T细胞培养基(RPMI 1640、10%胎牛血清、10mM HEPES、100U/mL链霉素、50μg/mL庆大霉素、50μMβ-巯基乙醇)的24孔板中培

养6-12个患者来源的肿瘤组织片段(2×2×2mm)持续35天。TIL在汇合时通过。35天扩展方案结束后,将细胞冷冻保存后再用于免疫测定。

实例7-抗原呈递细胞

[0271] 按照制造商的说明(MILTENYI BIOTEC™),使用涂有识别CD19的抗体包被的磁珠进行阳性选择,从PBMC中分离自体B细胞(MILTENYI BIOTEC™,目录号130-050-301)。在存在表达人CD40L的3T3细胞的情况下,B细胞在包含IMDM培养基(LIFE TECHNOLOGIES™)的B细胞培养基中培养7天,该培养基中补充了10%的人血清(内部)、100U/ml青霉素和100μg/mL链霉素(LIFE TECHNOLOGIES™)、2mM-谷氨酰胺(LIFE TECHNOLOGIES™)和200U/ml IL-4(PEPROTECH®),如所述(参见Tran E等,Science.2014;344(6184):641-5)。然后用表达人CD40L细胞的辐照过的(5000Gy)3T3对B细胞进行再刺激,并且每三天添加一次含有IL-4的新鲜培养基。在刺激后第3天,将B细胞用于测定。对于KRAS特异性T细胞,在某些实验中,使用B-LCL细胞系(CLC)(即HLA-DRB1-1104)作为抗原呈递细胞。HLA型LCL细胞系BM14、DEM、LUY、CB6B和DEU从Research Cell Bank(Seattle,WA)获得。LCL系的其余部分是Marie Bleakley,Fred Hutchinson Cancer Research Center的赠与。

实例8-mRNA表达和翻译

[0272] 使用Sahin组(Kreiter S,Selmi A,Diken M,Sebastian M,Osterloh P,Schild H等,Increased antigen presentation efficiency by coupling antigens to MHC class I trafficking signals.J Immunol 2008;180:309-18)描述的方法进行靶向内体的RNA表达,其中通过将抗原融合至I类MHC分类信号将抗原靶向内体。

[0273] mRNA表达构建体pJV57(Veatch JR, Lee SM, Fitzgibbon M, Chow IT, Jesernig B, Schmitt T等, Tumor infiltrating BRAFV600E-specific CD4 T cells correlated with complete clinical response in melanoma.J Clin Invest 2018;128:1563-8)是通过基因合成(Geneart, Life Sciences)构建的,其包含与人HLA-B基因N端25个氨基酸融合的T7启动子,然后是BamHI限制酶位点、增强的GFP编码序列、AgeI限制性位点、人HLA-B基因的C末端55个氨基酸,然后是人β-珠蛋白非翻译区,然后是30个核苷酸的poly-A尾巴,然后是poly-A尾巴中的SapI限制位点指导切割。

[0274] 通过将以下内容连接到经AgeI/BamHI消化的pJV57:退火的寡核苷酸(Ultramers, 集成DNA技术)编码的Her2氨基酸760-787(两侧为5'AgeI和3'BamHI位点)中来克隆pJV126。通过连接编码Her2氨基酸760-787(两侧为包含YVMA串联复制的5'AgeI和3'BamHI位点)的退火的寡核苷酸(Ultramers, Integrated DNA Technologies)制备pJV127。

[0275] 分别使用KRAS的前25个氨基酸或者使用G12V取代的KRAS的前25个氨基酸以相似的方式合成pJV128和pJV129。用SapI(Thermo Fisher)将pJV126和其他基于JV57的质粒线性化,并使用Highscribe T7 ARCA mRNA试剂盒(New England Biolabs)在体外转录mRNA,并根据制造商的说明通过锂沉淀法纯化。

[0276] 对于RNA转染,收获B细胞或B-LCL,用PBS洗涤1次,然后以 30×10^6 cells/mL的浓度悬浮在Opti-MEM(Life Technologies)中。将IVT RNA(10mg)等分到2mm间隙电穿孔比色皿的底部,然后将100mL APC直接添加到比色皿中。电穿孔中使用的最终RNA浓度为100mg/mL。使用BTX-830方波电穿孔仪进行电穿孔:150V、20ms和1个脉冲。然后在共培养之前将细胞转移至补充有IL4的B细胞培养基中持续16小时(Tran E, Turcotte S, Gros A, Robbins PF, Lu

YC, Dudley ME等, Cancer immunotherapy based on mutation-specific CD4^b T cells in a patient with epithelial cancer. Science 2014;344:641-5)。

实例9-细胞因子释放测定

[0277] 通过在96孔圆底板中将50,000个T细胞与100,000个自体B细胞或B-LCL细胞系孵育进行ELISA测定,这些B细胞或B-LCL细胞系在补充有5%热灭活的胎牛血清的RPMI (GIBCO™) 中用特定浓度的肽脉冲。将上清液中的IFN- γ 以1:1、1:10和1:100稀释并使用人IFN- γ ELISA试剂盒以技术上的一式两份或一式三份进行定量(EBIOSCIENCE™)。通过在添加肽的一小时之前将20 μ g/mL抗I类抗体(BIOLEGEN D®, 目录号311411) 抗HLA DR (BIOLEGEN D®克隆L243, 目录号307611) 或HLA-DQ (ABCAM™, 克隆spv-13, 目录号ab23632) 添加到抗原呈递细胞来进行HLA阻止试验。根据制造商的说明,通过使用IFN- γ ELISPOT-PRO™试剂盒(MABTECH™) 将20,000-100,000T细胞与200,000个自体B细胞(用20 μ g/mL每种肽脉冲处理) 在CTL培养基中孵育来进行ELISpot测定。对于细胞内IFN- γ 染色,在存在布雷菲德菌素A (GOLGIPLUG™, BD BIOSCIENCES™) 的情况下,将PBMC (100,000) 与用所示肽(20 μ g/mL) 脉冲的自体B细胞(100,000) 孵育,然后使用BD™细胞内染色试剂盒(BDBIOSCIENCES™) 固定和渗透,并使用FACSCANTO™II流式细胞仪进行分析。

实例10-TCR的标识和构造

[0278] 如实例11-12中所述,通过5' RACE从克隆T细胞群体获得TCR α 和 β 序列。合成了用于密码子优化序列的TCR序列,并将其克隆到通过翻译跳过序列连接的慢病毒载体中,如先前报道的那样(参见Veatch JR等, The Journal of clinical investigation. 2018;128(4) 1563-68)。使用IMMUNOSEQ™人TCRB试剂盒从ADAPTIVE BIOTECHNOLOGIES®获得样品中TCR V β 序列的频率,并在ADAPTIVE BIOTECHNOLOGIES®软件平台上进行分析。

实例11-TCR V β 和V α 测序

[0279] 根据制造商的说明,使用QIAGEN™DNEASY™或QIAMP™micro DNA试剂盒分离DNA。按照制造商的说明使用人类TCRB测序试剂盒(ADAPTIVE BIOTECHNOLOGIES®) 进行TCRB测序,并使用MiSeq (Fred Hutchinson Cancer Research Center Genomics中心) 进行测序,并使用ADAPTIVE BIOTECHNOLOGIES®软件进行数据分析。

实例12-TCR序列的鉴定

[0280] 用RNEASY™Plus Mini Kit (QIAGEN™) 从T细胞系中提取总RNA。根据制造商的规程,使用SMARTER®RACE 5' / 3' Kit (CLONTECH™) 从RNA中生成RACE就绪的cDNA。使用CLONEAMP™HiFi PCR Premix (CLONTECH™) 以扩增3' cDNA片段。基因特异性引物 (Human TCR C β 1 Reverse: 5' -CCA CTT CCA GGG CTG CCT TCA GAA ATC-3' SEQ ID NO:41; Human TCR C β 2 Reverse: 5' -TGG GAT GGT TTT GGA GCT AGC CTC TGG-3' SEQ ID NO:42; Human TCR C α Reverse: 5' -CAG CCG CAG CGT CAT GAG CAG ATT A-3' SEQ ID NO:43) 设计用于检测 α 和 β TCR带(1Kb)。3步触底PCR反应经历了95℃持续10秒、60℃持续15秒(每个循环降低0.2℃) 和72℃持续1分钟的35个循环。片段在1%琼脂糖凝胶上电泳并纯化(QIAQUICK™Gel Extraction Kit, QIAGEN™), 用于PENTR™Directional TOPO™克隆 (THERMO FISHER™)。对每个TCR α 和 β 从8-10个克隆中提取DNA (QIAPREP™Spin Miniprep Kit, QIAGEN™), 然后进行Sanger测序 (JV298: 5' -TCG CTT CTG TTC GCG CGC TT-3' SEQ ID NO:44; JV300: 5' -AAC AGG CAC ACG CTC TTG TC-3' SEQ ID NO:45)。

实例13-TCR载体的构造

[0281] TCR的构建在载体PRRL中(参见Jones S等,Human gene therapy.2009;20(6):630-40),其通过将六点突变引入如所述的土拨鼠肝炎病毒X蛋白的起始密码子和推定的启动子区域中进一步进行修饰(参见Lim CS等,RNA biology.2016;13(9):743-7),其中TCR β 基因位于TCR α 基因之前,由P2A翻译跳过序列分隔。如所述,引入半胱氨酸残基以促进引入的TCR链的配对(参见Kuball J等,Blood.2007;109(6):2331-8)。特定的可变区和CDR3序列示于表1。包含TRBV、CDR3和TRBJ序列之后是在残基57处由半胱氨酸取代的TCRB序列之后是P2A跳过序列以及TRAV和CDR3序列之后是TRAJ和TRAC序列的密码子优化的DNA片段合成为基因串(LIFE SCIENCESTM),然后使用NEBUILDER[®]克隆试剂盒(NEWENGLANDBIOLABS[®])将其克隆到用PstI和AscI(THERMO FISHERTM)线性化的慢病毒载体PRRL-SIN中,并验证序列。残基57处的半胱氨酸取代可以确保重组TCR的 α 链和 β 链配对,并且可以避免与内源TCR α 链和 β 链的错配。转导后一周,使用特异性抗体(表2)基于V β 表达对细胞进行分选,并如上所述进行扩增。T细胞用于测定或在扩增后第14天冷冻保存。

表2:抗原特异性TCR序列的特征

克隆	V-区域	CDR3	J- 区域	抗体
KRAS 克隆 3 β	TRBV30	CAWSALAGARDT QYF (SEQ ID NO:3)	TRBJ 2-3	V β 20-FITC (coulter IM1562)
KRAS 克隆 3 α	TRAV8-3	CAVGRSNSGGYQ KVTF (SEQ ID NO:2)	TRAJ 13	
KRAS 克隆 9 β	TRBV12-4	CASSLGLPGTDT QYF (SEQ ID NO:13)	TRBJ 2-3	V β 8-PE 克隆 JR.2 (biolegend cat 348104)
KRAS 克隆 9 α	TRAV8-1	CAVTVVNAGNNR KLIW (SEQ ID NO:12)	TRAJ 38	
Her2-ITD β	TRBV20	CSAPPLAGDETQ YF (SEQ ID NO:24)	TRBJ 2-5	V β 2-PE (milltenyicat 130-110-061)
Her2-ITD α	TRAV8-6	CAVSVNTDKLIF (SEQ ID NO:22)	TRAJ 34	

实例14-CRISPR-CAS9介导的基因缺失

[0221] 如先前所述 (Ren J,Liu X,Fang C,Jiang S,June CH,Zhao Y.Multiplex genome editing to generate universal CAR T cells resistant to PD1inhibition.Clin Cancer Res 2016;23:2255-66),通过在双重缓冲液 (IDT) 中将等体积的80 μ M TracrRNA (IDT) 与80 μ M gRNA AGAGTCTCTCAGCTGGTACA混合 (Kargl J,Busch SE,Yang GH,Kim KH,Hanke ML,Metz HE等,Neutrophils dominate the immune cell composition in non-small cell lung cancer.Nat Commun 2017;8:14381) 并且在加热块中加热至95 $^{\circ}$ C持续5分钟然后使其缓慢冷却来形成靶向TCR α 恒定域的第一外显子的CRISPR-Cas9 RNP。在电穿孔之前,将所得的40 μ M双链RNA与等体积的24 μ M Cas9蛋白 (IDT) 和1/20体积的400 μ M Cas9电穿孔增强剂 (IDT) 混合,并在室温下孵育15分钟。

[0283] 在第0天,使用EasySEP人类CD4 $^{+}$ 分离试剂盒 (StemCell) 通过阴性免疫选择从来自提供了IRB批准方案的知情同意的4名患者的冻存的健康人类供体PBMC中分离出CD4 $^{+}$ T细

胞,并在存在IL2 (50U/mL) 和IL7 (5ng/mL) 的情况下在CTL培养基中使用抗CD3/抗CD28微珠以3:1的珠:细胞比率 (Dynabeads, Invitrogen) 进行刺激持续2天。同样在第0天,用TCR载体以及psPAX2 (Addgene质粒No.12260) 和pMD2.G (Addgene质粒No.12259) 包装质粒瞬时转染Lenti-X细胞 (Clontech)。在第2天,除去磁珠,并利用程序EH-1 15使用Lonza 4D核转染器在20 μ l缓冲液P3中对 1×10^6 个细胞进行核转染。在慢病毒转导之前,使细胞在培养基中静置4小时。从Lenti-X细胞中收集慢病毒上清液,使用0.45- μ m聚醚砜 (PES) 注射器过滤器 (Millipore) 过滤,并在48孔组织培养板中将900 μ L加入50,000个活化T细胞中。加入聚乙烯 (Millipore) 至终浓度为4.4 μ g/mL,并在800xg和32°C下将细胞离心90分钟。16小时后,用补充有IL2 (50IU/mL) 和IL7 (5ng/mL) 的新鲜CTL替换病毒上清液。然后每48-72小时使用补充有IL2和IL7的CTL进行一次半培养基更换。在刺激的第+7或+8天,使用对转导的TCRV β 特异的抗体对转导的T细胞进行分选,并在进行免疫测定之前,使用上述快速扩增方案使所述转导的T细胞生长12-14天。

实例15-统计分析

[0284] 使用Graphpad Prism 7.0进行统计分析。通过单因素方差分析与Sidak校正分析Elispot数据,以进行多次比较。使用Fisher精确检验评估TCR V β 模板在肿瘤组织中的富集。

实例16-结果

[0285] 从4例肺腺癌患者和1例鳞状细胞癌患者中获得肿瘤标本 (表1)。进行了肿瘤和正常种系DNA的全外显子组测序。通过变体等位基因频率和mRNA表达对蛋白质编码变体进行排序。

[0286] 基于这些结果和可行性,每位患者选择20-57个突变用于T细胞反应分析 (表1;其他数据未显示)。通过用覆盖每个突变的重叠的20个氨基酸肽池刺激PBMC并通过IFN γ Elispot分析评估反应性来进行T细胞对候选人反应的初步筛选测定 (图1A)。然后针对与突变和野生型序列相对应的纯化的27-mer肽,重新测定对候选新抗原具有高于背景的反应性的T细胞培养物的IFN- γ 产生 (示例性数据如图1B所示)。总体上,检测到对238种新抗原中的21种 (8.8%) 的T细胞应答,并且与野生型肽应答相比显著升高 ($p < 0.05$)。观察到对KRAS和Her2-ITD突变的其他弱反应且它们不符合临界标准,但由于这些突变在肿瘤发生中的重要作用,因此被选择作进一步研究。

[0287] 对从患者1490和1347的血液中扩增出的潜在新抗原反应性T细胞进行了表征,这些患者的其他冷冻保存的样品是可获得的。这些患者的PBMC用纯化的27-mer肽刺激每个引起应答的突变体 (符合上述标准),并在再刺激后,通过有限稀释克隆对IFN- γ +细胞进行分类和扩增。分离了对突变GUCY1A3具有反应性的单个CD4+克隆,以及对来自患者1490的SREK1中的突变具有反应性的两个不同CD4+克隆。相对于野生型肽,这些克隆中的每一个都显示出对突变体的特异性 (图3B-图3F)。

[0288] 其他分离的T细胞克隆对突变SREK1肽具有反应性,但反应与SREK1野生型肽类似 (数据未显示),这可能解释了在筛选Elispot中观察到的与野生型肽的反应性 (图1B)。无法从患者1490和1347中分离出对其他新抗原具有特异性的T细胞系或克隆。在最初的肿瘤切除术中检测到两个具有不同TCRV β 序列的SREK1特异的克隆 (8/24095模板),并相对于同一切除术中的非相邻肺组织 (非相邻肺组织中的1/62424模板, $p = 0.0002$) 进行了富集。在肿

瘤切除样品或肺中未检测到GUCY1A3TCRV β 。

[0289] 这些观察结果表明,可以从血液中分离出对新抗原具有反应性的CD4⁺ T细胞,这些细胞可以定位于肿瘤组织。

[0290] 对于1490和1347患者,通过在大剂量IL2中培养肿瘤片段以从初始切除样品进行TIL培养(Kargl等(2017)),并通过之前描述的具有20-mer重叠肽的细胞内IFN- γ 和Elispot来测定TIL的新抗原反应性。没有发现对来自患者1347的筛选抗原的反应性,但是来自患者1490的TIL中的CD8⁺ T细胞对PWP2中的突变具有反应性(图2A)。

[0291] 鉴定了通过分选的PWP2反应性CD8⁺ T细胞表达的TCRV β ,并在初始肿瘤切除样品、非相邻肺和TIL培养后确定了PWP2反应性TCRV β 的频率。相对于不相邻的肺,TCRV β 序列在肿瘤切除中富集(0.2%、54/24095模板,相对于0.03%、18/62424模板, $p < 0.0001$),并且通过TIL培养进一步富集(4.8%的模板,图2B)。

[0292] 在IFN γ 捕获后从TILs扩增PWP2反应性T细胞系,并证实了其对突变体的反应性,但对野生型10-mer肽没有反应性(图2C和图2D)。在以TCRV β 模板的0.07%的频率(这对于IFN- γ Elispot分析而言可能太低了)刺激外周血后,TCRV β 测序鉴定出TCRV β 克隆型。因此,可能由于方法的不敏感性或因存在慢性抗原而导致功能受损的T细胞难以扩增,可以从培养的TIL产物和血液中分离出具有不同特异性的T细胞。

[0293] 在血液或肿瘤中通过这种分析鉴定出的大多数潜在的新抗原特异性T细胞都认可了私人的、患者特异性的突变,这与先前在其他癌症中的研究一致。血液中对患者1139中的复发性驱动程序突变KRASG12V和患者1238中的Her2-ITD的血液中相对较弱的T细胞反应未达到统计学显著性,但鉴于这些蛋白质对恶性表型的重要性,需要进一步努力表征特异性。用KRASG12V肽刺激来自患者1139的PBMC两次,然后鉴定并分选分泌IFN γ 筛选的CD4⁺ T细胞。T细胞在有限的稀释培养物中扩增。获得了四种T细胞培养物,它们特异性地响应于低浓度的KRASG12V肽而分泌IFN- γ ,但不会特异性响应于相应的野生型KRAS肽而分泌IFN- γ 。

[0294] TCRV β 测序显示,这些T细胞代表具有三种不同TCRV β 克隆型的单克隆群体,称为克隆3、5和9(图4A)。对KLAG12V产生的IFN- γ 部分被抗HLA-DR阻断,但未被抗HLA-DQ阻断,表明受到HLA-DR的限制(图4B)。患者的HLA基因型为HLA-DRB1*11:04/13:01、HLADQB1*03:01/06:03。所有三个T细胞克隆均显示对表达KLASG12V肽脉冲的HLA-DRB1*11:01或11:04的LCL细胞系的反应性,但在不存在HLA-DRB1*11的情况下对表达DQB1*03:01或DQB1*06:01的肽脉冲的LCL没有反应性,表明由于HLA-DRB1*11的HLA限制(图4C)。在切除标本或肿瘤的非相邻肺中未检测到KRASG12V特异性TCRV β 克隆型,每种克隆的测序深度为10,000个TCRV β 模板。

[0295] 在非常高的肽浓度下,观察到KRASG12V特异性T细胞克隆与野生型肽脉冲的APC的反应性。在内体中内源性加工后,抗原通常呈递给CD4⁺ T细胞(Kreiter等(2017))。因此,为了确定KRASG12V反应性T细胞克隆是否识别加工过的抗原,用编码具有内体靶向序列的KRASG12V或野生型KRAS的小基因构建体转染HLA匹配的B-LCL。这三个克隆中的每一个都特异性识别表达KRASG12V而非野生型KRAS序列的细胞(图4D和图4E),表明对内源性加工的新抗原具有特异性。通过5' RACE获得了来自T细胞克隆的KRASG12V特异性TCRV β 和V α 序列,构建了编码这些TCR的慢病毒载体。从两个正常供体将克隆3和9的TCR转化为CD4⁺ T细胞,赋予了用肽或表达KRASG12V而非野生型KRAS序列进行脉冲的靶细胞的特异性(图4F-图4I)。

[0296] 在这些试验中,在转基因TCR进行基因转移之前,供体T细胞经历了内源TCR α 恒定

区基因 (TRAC) 的外显子1的CRISPR-Cas9介导破坏(图4J), 以将异体抗原呈递细胞对这些细胞的背景激活降至最低(图4K)。用KRASG12V特异性TCR改造的T细胞表现出对靶细胞的识别, 这些靶细胞受到低浓度(比野生型KRAS肽低 $>2\log_{10}$)的突变体肽的脉冲。

[0297] 患者1238对复发性Her2外显子20插入表现出较弱的CD4⁺ T细胞反应, 该插入导致了氨基酸YVMA (Her2-ITD) 的读框内重复(图6A和图1B)。与上述分离KRASG12V-特异性T细胞相同的方法已成功用于分离的Her2-ITD-特异性CD4⁺ T细胞系。

[0294] 通过TCRV β 测序对多个T细胞系的分析显示出在所有十个T细胞系中均存在单一的复发性TCRV β 克隆型(图6B; 图8所示的KRAS克隆型数据), 其在一个T细胞系(#35)中几乎都是克隆的。该株系在低肽浓度下识别了突变的Her2-ITD肽, 但未识别相应的野生型Her2肽(图5A、图5B), 并且抗HLA-DQ而非抗HLA-DR或抗I类完全阻止了反应性(图5C、图5D)。与阻断数据一致, T细胞仅与表达HLA-DQB1*05:01和05:02的Her2-ITD肽脉冲的B-LCL系反应, 表明由于HLADQB1-05的限制(图5G)。这些T细胞还特异性识别了用靶向内体的突变体而非野生型Her2序列转染的II+类MHC细胞(图5E、图5F)。通过5'RACE获得了Her2-ITD特异性株系的TCRV β 和V α 序列。在通过CRISPR-Cas9介导的基因缺失的内源性TCR α 破坏之后, TCR序列的慢病毒基因转移对转染了突变型而非野生型Her2序列Her2-ITD肽和MHCII+类细胞赋予了特异性(图5H-图5J)。通过内源性TCR α 恒定区基因TRAC的CRISPR介导的TCR缺失而改善了通过用V β 2-特异性抗体染色来测量的转移的TCR的表达(图5K)。

[0298] 来自患者1238的初始肺切除样品的TCRV β 深度测序在肿瘤切除的20179模板中的3个模板中确定了Her2-ITD-特异性TCRV β 克隆型。尽管切除后不相邻肺组织的测序深度增加了五倍, 但未观察到Her2-ITD-特异性克隆型, 表明肿瘤中Her2-反应性CD4⁺ T细胞的富集(图5L, $p=0.004$ 用于富集)。肿瘤切除2年后血液中Her2-ITD-特异性CD4⁺ T细胞的存在与这些细胞是对肿瘤的持久性记忆T细胞反应的一部分相一致。

[0299] 本公开还提供以下示例性实施例:

[0300] 实施例1. 一种结合蛋白, 包含:

T细胞受体 (TCR) α 链可变域 (V α), 其包含与SEQ ID NO:2或SEQ ID NO:12的氨基酸序列至少约85%相同的CDR3氨基酸序列; 以及

TCR β 链可变结构域 (V β), 其包含与SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:13的氨基酸序列至少约85%相同的CDR3氨基酸序列,

其中所述结合蛋白能够结合MTEYKLVVV GAVGVGKSALTIQLIQ (SEQ ID NO:1): 人白细胞抗原 (HLA) 复合物和/或肽: HLA复合物, 其中所述肽包含或由SEQ ID NO:1的7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23或24个连续氨基酸组成。

[0301] 实施例2. 根据实施例1所述的结合蛋白, 其中, 所述V α 包含SEQ ID NO:2的CDR3氨基酸序列, 并且所述V β 包含SEQ ID NO:3的CDR3氨基酸序列。

[0302] 实施例3. 根据实施例1所述的结合蛋白, 其中, 所述V α 包含SEQ ID NO:12的CDR3氨基酸序列, 并且所述V β 包含SEQ ID NO:13的CDR3氨基酸序列。

[0303] 实施例4. 根据实施例1-3中任一项所述的结合蛋白, 进一步包含:

- (i) 根据SEQ ID NO:48或54的CDR1 α 氨基酸序列;
- (ii) 根据SEQ ID NO:49或55的CDR2 α 氨基酸序列;
- (iii) 根据SEQ ID NO:51或57的CDR1 β 氨基酸序列; 和/或

(iv) 根据SEQ ID NO:52或58的CDR2 β 氨基酸序列。

[0304] 实施例5. 根据实施例4所述的结合蛋白, 包含分别如SEQ ID NOs:48、49、2、51、52和3所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

[0305] 实施例6. 根据实施例5所述的结合蛋白, 包含分别如SEQ ID NOs:54、55、12、57、58和13所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

[0306] 实施例7. 根据实施例1至6中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述HLA包括DRB1-1101或DRB1-1104。

[0307] 实施例8. 根据实施例1至7中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V α 包含或由与SEQ ID NOs:6、16、66或70中任一项的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列组成。

[0308] 实施例9. 根据实施例1至8中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V β 包含或由与SEQ ID NOs:9、19、68或72中任一项的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列组成。

[0309] 实施例10. 根据实施例1-9中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V α 和/或所述V β 的至少三个或四个互补决定区(CDR)不具有序列变化, 并且其中具有序列变化的CDR仅具有最多两个氨基酸取代、最多连续五个氨基酸缺失或其组合。

[0310] 实施例11. 根据实施例1至10中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V α 包含与根据TRAV8-3或TRAV8-1的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列。

[0311] 实施例12. 根据实施例1至11中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V β 包含与根据TRBV30或TRBV12-4的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列。

[0312] 实施例13. 根据实施例1至12中任一项所述的结合蛋白, 进一步包含:

与根据TRAJ13或TRAJ38的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列; 以及
根据TCR β 链连接(J β)基因区段的氨基酸序列。

[0313] 实施例14. 根据实施例13所述的结合蛋白, 包含与根据TRBJ2-4或TRBJ2-3的氨基酸序列至少85%相同的氨基酸序列。

[0314] 实施例15. 根据实施例1至14中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V α 包含或由SEQ ID NO:6或66所示的氨基酸序列组成, 并且所述V β 包含或由SEQ ID NO:9或68所示的氨基酸序列组成。

[0315] 实施例16. 根据实施例1至14中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述V α 包含或由SEQ ID NO:16或70所示的氨基酸序列组成, 并且所述V β 包含或由SEQ ID NO:19或72所示的氨基酸序列组成。

[0316] 实施例17. 根据实施例1至16中任一项所述的结合蛋白, 进一步包含TCR β 链恒定结构域(C β)、TCR α 链恒定结构域(C α)或两者。

[0317] 实施例18. 根据实施例17所述的结合蛋白, 其中:

(i) 所述C α 与SEQ ID NO:67或71所示的氨基酸序列具有至少约85%的同一性、包含该氨基酸序列或由其组成; 和/或

(ii) 所述C β 与SEQ ID NO:69或73所示的氨基酸序列具有至少约85%的同一性、包含该氨基酸序列或由其组成。

[0318] 实施例19. 根据实施例1至18中任一项所述的结合蛋白, 其中, 所述结合蛋白在细胞表面上能够独立地或在不存在CD4的情况下结合(SEQ ID NO:1):HLA复合物和/或肽:HLA复合物, 其中该肽包含或由SEQ ID NO:1的大约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、

20、21、22、23或24个连续氨基酸组成。

[0319] 实施例20.一种结合蛋白,包含:

T细胞受体 (TCR) α 链可变 ($V\alpha$) 结构域,其包含与SEQ ID NO:23的氨基酸序列至少约85%相同的CDR3氨基酸序列;以及

TCR β 链可变域 ($V\beta$),其包含与SEQ ID NO:24的氨基酸序列至少约85%相同的CDR3氨基酸序列,

其中所述结合蛋白能够结合SPKANKEILDEAYVMAYVMAGVGSPYVSRLLG (SEQ ID NO: 22):人白细胞抗原 (HLA) 复合物和/或肽:HLA复合物,其中该肽包含或由SEQ ID NO:22的大约7、8、9、10、11、12、13、14、14、15、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成。

[0320] 实施例21.根据实施例20的所述结合蛋白,其中,所述 $V\alpha$ 包含SEQ ID NO:23的CDR3氨基酸序列,并且所述 $V\beta$ 包含SEQ ID NO:24的CDR3氨基酸序列。

[0321] 实施例22.根据实施例20或21中任一项所述的结合蛋白,进一步包含根据SEQ ID NO:60的CDR1 α 、根据SEQ ID NO:61的CDR2 α 、根据SEQ ID NO:63的CDR1 β 和/或根据SEQ ID NO:64的CDR2 β 。

[0322] 实施例23.根据实施例22所述的结合蛋白,包含分别如SEQ ID NO:60、61、23、63、64和24所示的CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 氨基酸序列。

[0323] 实施例24.根据实施例20至23中任一项所述的结合蛋白,其中,所述HLA包含DQB1-05:01或DQB1-05:02。

[0324] 实施例25.根据实施例20至24中任一项所述的结合蛋白,其中,所述 $V\alpha$ 包含或由与SEQ ID NO:27或74的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列组成。

[0325] 实施例26.根据实施例20至25中任一项所述的结合蛋白,其中,所述 $V\beta$ 包含或由与SEQ ID NO:30或76的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列组成。

[0326] 实施例27.根据实施例20至26中任一项所述的结合蛋白,其中,至少三个或四个互补决定区 (CDR) 不具有序列变化,并且其中具有序列变化的CDR仅具有最多两个氨基酸取代、最多连续五个氨基酸缺失、或其组合。

[0327] 实施例28.根据实施例20至27中任一项所述的结合蛋白,其中,所述 $V\alpha$ 包含与根据TRAV8-6的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列。

[0328] 实施例29.根据实施例20至28中任一项所述的结合蛋白,其中,所述 $V\beta$ 包含与根据TRBV20的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列。

[0329] 实施例30.根据实施例20至29中任一项所述的结合蛋白,进一步包含:

与根据TRAJ34的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列;和

根据TCR β 链连接 ($J\beta$) 基因区段的氨基酸序列。

[0330] 实施例31.根据实施例30所述的结合蛋白,包含与根据TRBJ2-5的氨基酸序列至少约85%相同的氨基酸序列。

[0331] 实施例32.根据实施例1至31中任一项所述的结合蛋白,其中,所述 $V\alpha$ 包含或由SEQ ID NO:27或74所示的氨基酸序列组成,并且所述 $V\beta$ 包含或由SEQ ID NO:30或76所示的氨基酸序列组成。

[0332] 实施例33.根据实施例20至32中任一项所述的结合蛋白,进一步包含TCR β 链恒定

结构域(C β)、TCR α 链恒定结构域(C α)或两者。

[0333] 实施例34.根据实施例33所述的结合蛋白,其中:

(i) C α 与SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列具有至少约85%的同一性、包含该氨基酸或由其组成;和/或

(ii) C β 与SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列具有至少约85%的同一性、包含该氨基酸或由其组成。

[0334] 实施例35.根据实施例20至34中任一项所述的结合蛋白,其中,所述结合蛋白在细胞表面上能够独立地或在不存在CD4的情况下结合(SEQ ID NO:22):HLA复合物和/或肽:HLA复合物,其中该肽包含或由SEQ ID NO:22的大约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成。

[0335] 实施例36.根据实施例1至35中任一项所述的结合蛋白,其中,所述结合蛋白是TCR、嵌合抗原受体或TCR的抗原结合片段。

[0336] 实施例37.根据实施例36所述的结合蛋白,其中,所述TCR、所述嵌合抗原受体或所述TCR的抗原结合片段是嵌合的、人源化的或人的。

[0337] 实施例38.根据实施例36或实施例37所述的结合蛋白,其中,所述TCR的抗原结合片段包含单链TCR(scTCR)。

[0338] 实施例39.一种组合物,包含实施例1至38中任一项所述的结合蛋白和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0339] 实施例40.一种编码实施例1至39中任一项所述的结合蛋白的多核苷酸。

[0340] 实施例41.根据实施例40所述的多核苷酸,其中,所述多核苷酸是经密码子优化的。

[0341] 实施例42.根据实施例40或41所述的多核苷酸,其中,所述多核苷酸包含或由与SEQ ID NOs:4、5、7、8、10、14、15、17、18、20、25、26、28、29或31中任一项所述的核苷酸序列具有至少70%同一性的核苷酸序列组成。

[0342] 实施例43.根据实施例40至42中任一项所述的多核苷酸,其中,所述编码的结合蛋白包含TCR α 链和TCR β 链,其中所述多核苷酸进一步包含位于所述 α 链-编码多核苷酸与所述 β 链-编码多核苷酸之间的编码自切割肽的多核苷酸。

[0343] 实施例44.一种表达载体,包含与表达控制序列可操作连接的根据实施例40-43中任一项所述的多核苷酸。

[0344] 实施例45.根据实施例44的表达载体,其中,所述表达载体能够将所述多核苷酸递送至宿主细胞。

[0345] 实施例46.根据实施例45所述的表达载体,其中,所述宿主细胞是造血祖细胞或人免疫系统细胞。

[0346] 实施例47.根据实施例46所述的表达载体,其中,所述免疫系统细胞是CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、天然杀伤细胞、树突状细胞或其任意组合。

[0347] 实施例48.根据实施例47所述的表达载体,其中,所述T细胞是幼稚T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞或其任意组合。

[0348] 实施例49.根据实施例44至48中任一项所述的表达载体,其中,所述表达载体是病

毒载体。

[0349] 实施例50. 根据实施例49所述的表达载体, 其中, 所述病毒载体是慢病毒载体或 γ -逆转录病毒载体。

[0350] 实施例51. 一种重组宿主细胞, 包含根据实施例40至43中任一项所述的多核苷酸或根据实施例44-50中任一项所述的表达载体, 其中所述重组宿主细胞能够在其细胞表面上表达所述编码的结合蛋白, 其中所述多核苷酸与所述宿主细胞异源。

[0351] 实施例52. 根据实施例51所述的重组宿主细胞, 其中, 所述重组宿主细胞是造血祖细胞或免疫系统细胞, 该免疫系统细胞任选地是人免疫系统细胞。

[0352] 实施例53. 根据实施例52所述的重组宿主细胞, 其中, 所述免疫系统细胞是CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、天然杀伤细胞、树突状细胞或其任意组合。

[0353] 实施例54. 根据实施例52或53所述的重组宿主细胞, 其中, 所述免疫系统细胞是T细胞。

[0354] 实施例55. 根据实施例53或54所述的重组宿主细胞, 其中, 所述T细胞是幼稚T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞、干细胞记忆T细胞或其任意组合。

[0355] 实施例56. 根据实施例52至55中任一项所述的重组宿主细胞, 其中, 与内源TCR相比, 所述结合蛋白能够更有效地与CD3蛋白缔合。

[0356] 实施例57. 根据实施例52至55中任一项所述的重组宿主细胞, 其中, 与内源TCR相比, 所述结合蛋白具有更高的表面表达。

[0357] 实施例58. 根据实施例52至57中任一项所述的重组宿主细胞, 其能够在存在肽抗原:HLA复合物的情况下产生IFN- γ , 但是在存在参考肽:HLA复合物的情况下产生较少量的IFN- γ 或产生无法检测到的IFN- γ ,

其中该肽抗原根据SEQ ID NO:1或22, 或其中该肽抗原分别包含或由SEQ ID NO:1或22的大约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成, 以及

其中参考肽分别根据SEQ ID NO:33或34。

[0358] 实施例59. 根据实施例58所述的重组宿主细胞, 其能够在肽抗原以10、1、0.1、或大约0.01 μ g/mL的浓度存在时产生IFN- γ 。

[0359] 实施例60. 根据实施例58或59中任一项所述的重组宿主细胞, 其能够在存在肽抗原:HLA复合物的情况下产生至少约1,000、2,000、3,000、4,000、5,000、6,000、7,000、8,000、9,000或10,000pg/mL的IFN- γ , 其中该肽抗原以0.01 μ g/mL至大约100 μ g/mL的浓度存在。

[0360] 实施例61. 根据实施例58至60中任一项所述的重组宿主细胞, 其能够在存在以下物质的情况下产生IFN γ :

(a) KRAS G12V肽:HLA复合物; 以及

(b) (i) 抗HLA-DQ抗体或 (b) (ii) 抗HLA-DR抗体。

[0361] 实施例62. 根据实施例58至61中任一项的重组宿主细胞, 其能够在存在 (i) KRAS G12V肽抗原和/或KRAS G12V肽编码RNA和 (ii) 表达HLA-DRB1-1101或HLA DRB1-1104的细胞的情况下产生IFN γ , 并能够将KRAS G12V抗原呈递给所述宿主免疫细胞。

[0362] 实施例63.根据实施例58至62中任一项所述的重组宿主细胞,其中:

(i) 其能够在存在肽抗原:HLA复合物的情况下产生至少约50pg/mL的IFN- γ ,其中该肽抗原是根据SEQ ID NO:22或者包含或由SEQ ID NO:22的大约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成,并且以大约0.01 μ g/mL或约0.05 μ g/mL存在;和/或

(ii) 其能够在存在肽抗原:HLA复合物的情况下产生至少约100、500、1000、5,000或10,000 μ g/mL IFN- γ ,其中肽抗原是根据SEQ ID NO:22或者包含或由SEQ ID NO:22的约7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、27、28、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30或31个连续氨基酸组成,并且以约0.02、0.2、2或20 μ g/mL存在。

[0363] 实施例64.根据实施例58至63中任一项所述的重组宿主细胞,其在存在肽抗原:HLA复合物的情况下能够产生至少约10,000pg/mL的IFN- γ ,其中该肽抗原是根据SEQ ID NO:22,并且以至少约0.01 μ g/mL存在。

[0364] 实施例65.根据实施例58至64的任一项的重组宿主细胞,其能够在存在肽抗原:HLA复合物和抗HLA-DR抗体和/或抗HLA I类抗体时产生IFN- γ ,其中该肽抗原是根据SEQ ID NO:22。

[0365] 实施例66.根据实施例58至65中任一项所述的重组宿主细胞,其能够在存在以下物质的情况下产生IFN- γ : (i) 根据SEQ ID NO:22的Her2-ITD肽抗原和/或编码SEQ ID NO:22的多核苷酸以及(ii) 表达HLA-DQB1-0501或HLA-DQB1-0502并能够将Her2-ITD肽抗原呈递给宿主免疫细胞的细胞系。

[0366] 实施例67.根据实施例58至66中任一项所述的重组宿主细胞,其是免疫细胞并且包含内源免疫细胞蛋白的染色体基因敲除。

[0367] 实施例68.根据实施例67所述的重组宿主细胞,其包含PD-1、TIM3、LAG3、CTLA4、TIGIT、HLA成分、TCR成分或其任意组合的染色体基因敲除。

[0368] 实施例69.一种治疗有需要的受试者的方法,包括:

将包含根据实施例1至38中任一项所述的结合蛋白或根据实施例58至68中任一项所述的重组宿主细胞的有效量的组合物施用于所述受试者,其中所述受试者患有非小细胞肺癌(NSCLC)、结直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、胆道癌、其中KRASG12V新抗原为治疗靶标的适应症、或其中Her2-ITD新抗原为治疗靶标的适应症。

[0369] 实施例70.根据实施例69所述的方法,其中,所述组合物肠胃外或静脉内施用。

[0370] 实施例71.根据实施例69或实施例70所述的方法,其中,所述方法包括向所述受试者施用多个剂量的所述组合物。

[0371] 实施例72.根据实施例71所述的方法,其中,所述多个剂量以约两周至约四周的施用间隔施用。

[0372] 实施例73.根据实施例69至72中任一项所述的方法,其中,所述方法进一步包括向所述受试者施用细胞因子。

[0373] 实施例74.根据实施例73所述的方法,其中,所述细胞因子包括IL-2、IL-15或IL-21。

[0374] 实施例75.根据实施例69至74中任一项所述的方法,其中,所述受试者进一步接受免疫抑制治疗。

[0375] 实施例76. 根据实施例69至75中任一项所述的方法, 其进一步包括向所述受试者施用免疫抑制剂抑制剂, 该免疫抑制剂抑制剂任选地为PD-1抑制剂。

[0376] 实施例77. 根据实施例76所述的方法, 其中, 所述PD-1抑制剂包括尼武单抗(OPDIVO®); 派姆单抗(KEYTRUDA®); 伊匹木单抗+尼武单抗(YERVOY®+OPDIVO®); 西米普利单抗; IBI-308; 尼武单抗+relatlimab; BCD-100; 卡米单抗; JS-001; 斯巴达珠单抗; 替雷利珠单抗; AGEN-2034; BGBA-333+替雷利珠单抗; CBT-501; dostarlimab; durvalumab+MEDI-0680; JNJ-3283; 盐酸帕唑帕尼+派姆单抗; pidilizumab; REGN-1979+西米普利单抗; ABBV-181; ADUS-100+斯巴达珠单抗; AK-104; AK-105; AMP-224; BAT-1306; BI-754091; CC-90006; 西米普利单抗+REGN-3767; CS-1003; GLS-010; LZM-009; MEDI-5752; MGD-013; PF-06801591; Sym-021; 替雷利珠单抗+帕米帕尼; XmAb-20717; AK-112; ALPN-202; AM-0001; 对抗PD-1的阿尔茨海默氏病抗体; BH-2922; BH-2941; BH-2950; BH-2954; 对抗CTLA-4和PD-1的实体瘤生物制剂; 针对肿瘤的靶向PD-1和LAG-3的双特异性单克隆抗体; BLSM-101; CB-201; CB-213; CBT-103; CBT-107; 细胞免疫疗法+PD-1抑制剂; CX-188; HAB-21; 他HEISCOIII-003; IKT-202; JTX-4014; MCLA-134; MD-402; mDX-400; MGD-019; 拮抗PDCD1肿瘤的单克隆抗体; 拮抗PD-1肿瘤的单克隆抗体; 抑制PD-1肿瘤的溶瘤病毒; OT-2; PD-1拮抗剂+ropeginterferon α -2b; PEGMP-7; PRS-332; RXI-762; STIA-1110; TSR-075; 靶向HER2和PD-1肿瘤的疫苗; 针对PD-1的肿瘤和自身免疫性疾病的疫苗; XmAb-23104; 抑制PD-1用于肿瘤学的反义寡核苷酸; AT-16201; 抑制PD-1肿瘤学的双特异性单克隆抗体; IMM-1802; 拮抗PD-1和CTLA-4用于实体瘤和血液学肿瘤的单克隆抗体; 尼伏鲁单抗生物仿制药; 用于拮抗CD278和CD28并拮抗PD-1用于肿瘤学的重组蛋白; 用于激动PD-1的自身免疫疾病和炎症疾病的重组蛋白; SNA-01; SSI-361; YBL-006; AK-103; JY-034; AUR-012; BGB-108; 抑制PD-1, Gal-9和TIM-3的实体瘤药物; ENUM-244C8; ENUM-388D4; MEDI-0680; 拮抗PD-1转移性黑色素瘤和转移性肺癌的单克隆抗体; 抑制PD-1肿瘤学的单克隆抗体; 用于肿瘤的靶向CTLA-4和PD-1的单克隆抗体; 拮抗PD-1对NSCLC的单克隆抗体; 抑制PD-1和TIM-3肿瘤的单克隆抗体; 抑制PD-1肿瘤学的单克隆抗体; 抑制PD-1和VEGF-A用于血液系统恶性肿瘤和实体瘤的重组蛋白; 用于对抗PD-1肿瘤的小分子; Sym-016; inebilizumab+MEDI-0680; 针对转移性黑色素瘤的针对PDL-1和IDO的疫苗; 抗PD-1单克隆抗体+胶质母细胞瘤的细胞免疫疗法; 拮抗PD-1用于肿瘤学的抗体; 抑制PD-1/PD-L1的血液恶性肿瘤和细菌感染的单克隆抗体; 抑制PD-1感染HIV的单克隆抗体; 或抑制PD-1实体瘤的小分子。

[0377] 实施例78. 根据实施例69至77中任一项的方法, 其中, 所述组合物包含重组CD4⁺ T细胞、重组CD8⁺ T细胞或两者。

[0378] 实施例79. 根据实施例69至78中任一项所述的方法, 其中, 所述重组宿主细胞是同种异体、自体或同基因的。

[0379] 实施例80. 根据实施例1至38中任一项所述的结合蛋白、根据实施例39所述的组合物、根据实施例40至43中任一项所述的多核苷酸、根据实施例44至50中任一项所述的表达载体或根据实施例51至68中任一项所述的重组宿主细胞在治疗非小细胞肺癌(NSCLC)、大肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、胆道癌、其中KRAS G12V新抗原是治疗靶点的适应症、或其中Her2-ITD新抗原是治疗靶标的适应症中的用途。

[0380] 实施例81. 根据实施例51至68中任一项所述的重组宿主细胞在非小细胞肺癌

(NSCLC)、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、胆道癌、其中KRAS G12V新抗原是治疗靶标的适应症、或其中Her2-ITD新抗原是治疗靶标的适应症的过继免疫疗法中的用途。

[0381] 实施例82.根据实施例1至38中任一项所述的结合蛋白、根据实施例39所述的组合物、根据实施例40至43中任一项所述的多核苷酸、根据实施例44至50中任一项所述的表达载体、或根据实施例51至68中任一项所述的重组宿主细胞在制备用于治疗非小细胞肺癌(NSCLC)、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、胆道癌、其中KRAS G12V新抗原是治疗靶标的适应症的药物中的用途。

[0382] 实施例83.一种免疫原性组合物,包含:

(i) 具有与MTE YKL VVV GAV GVG KSA LTI QLI Q (SEQ ID NO:1) 或SPK ANK EIL DEA YVM AYV MAG VGS PYV SRL LG (SEQ ID NO:22) 至少80%相同的氨基酸序列的肽;以及
(ii) 非天然存在的药学上可接受的载体。

[0383] 实施例84.根据实施例83所述的免疫原性组合物,其中,所述非天然存在的药学上可接受的载体包括乳膏、乳剂、凝胶、脂质体、纳米颗粒或软膏。

[0384] 实施例85.一种免疫原性组合物,包含:

(i) 具有与MTE YKL VVV GAV GVG KSA LTI QLI Q (SEQ ID NO:1) 或SPK ANK EIL DEA YVM AYV MAG VGS PYV SRL LG (SEQ ID NO:22) 至少80%相同的氨基酸序列的肽;以及
(ii) 免疫有效量的佐剂。

[0385] 实施例86.根据实施例84所述的免疫原性组合物,其中所述佐剂包括聚-ICLC、CpG、GM-CSF或明矾。

[0386] 实施例87.一种治疗有需要的受试者或在该受试者中诱导免疫应答的方法,该方法包括向该受试者施用根据实施例83至86中任一项所述的免疫原性组合物,

其中受试者患有或疑似患有非小细胞肺癌(NSCLC)、结肠直肠癌、胰腺癌、卵巢癌、乳腺癌、胆道癌、其中KRAS G12V新抗原是治疗靶点的适应症、或其中Her2-ITD新抗原是治疗靶标的适应症。

[0387] 实施例88.根据实施例87所述的方法,其中,将所述免疫原性组合物施用于所述受试者两次或更多次。

[0388] 实施例89.根据实施例87或实施例88所述的方法,进一步包括对所述受试者施用过继性细胞疗法。

[0389] 实施例90.根据实施例86至88中任一项所述的方法,进一步包括向所述受试者施用佐剂或检查点抑制剂中的至少一种,其中所述佐剂或检查点抑制剂任选地包含IL-2、PD-1抑制剂、PD-L1抑制剂或CTLA-4抑制剂中的至少一种。

[0390] 实施例91.一种能够引起对KRAS G12V的抗原特异性T细胞应答的分离的肽,其包含具有不超过25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、12、11、10、9、8或7个氨基酸的多肽,其中该多肽包含来自SEQ ID NO:1所示的KRAS G12V氨基酸序列的至少7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25个连续氨基酸的序列。

[0391] 实施例92.一种能够引起对Her2-ITD的抗原特异性T细胞应答的分离的肽,其包含具有不超过32、31、30、29、28、27、26、25、24、23、22、21、20、19、18、17、16、15、14、13、11、10、9、8或7个氨基酸的多肽,其中该多肽包含来自SEQ ID NO:22所示的Her2-ITD氨基酸序列的至少7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31或

32个连续氨基酸的序列。

[0392] 实施例93.一种制备抗原刺激的抗原呈递细胞的方法,该方法包括:

在足以通过抗原呈递细胞进行抗原加工和呈递的条件和时间下对以下物质进行体外接触,(i) 抗原呈递细胞群,和(ii) 根据实施例40-43中任一项所述的多核苷酸或根据实施例44至50中任一项所述的表达载体,从而获得能够引起针对KRAS G12V或Her2-ITD的抗原特异性T细胞应答的抗原刺激性抗原呈递细胞。

[0393] 实施例94.根据实施例93所述的方法,进一步包括在足以产生KRAS G12V-特异性T细胞或Her2-ITD-特异性T细胞的条件下,使抗原刺激的抗原呈递细胞与一个或多个免疫相容性T细胞接触。

[0394] 实施例95.一种方法,包括在体外扩增根据实施例93所述的KRAS G12V-特异性T细胞或Her2-ITD-特异性T细胞,从而分别获得KRAS G12V-特异性T细胞或Her2-ITD-特异性T细胞的一个或多个克隆,以及确定用于所述一个或多个克隆中一个或多个的T细胞受体多肽编码核酸序列。

[0395] 实施例96.根据实施例95所述的方法,进一步包括用具有确定的T细胞受体多肽编码核酸序列的多核苷酸在体外转染或转导T细胞群,从而获得工程化的KRAS G12V-特异性T细胞或工程化的Her2-ITD细胞群,所述工程化的KRAS G12V-特异性T细胞或工程化的Her2-ITD细胞群的量足以过继转移抗原特异性T细胞应答。

[0396] 可以将上述各种实施例组合以提供其他实施例。所有美国专利、美国专利公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和本说明书中提及和/或列于应用数据表中的非专利出版物(包括2018年8月22日提交的申请号为62/721,439美国临时专利)的全部内容通过引用并入本文。如果需要采用各种专利、申请和出版物的概念来提供其他实施例,则可以修改实施例的各方面。

[0397] 可以根据以上详细描述对实施例进行这些和其他改变。通常,在权利要求书中,所使用的术语不应解释为将权利要求限制为说明书和权利要求书中公开的特定实施例,而应解释为包括所有可能的实施例以及等同物的全部范围。索赔是有权的。因此,权利要求不受公开内容的限制。

序列表

<110> 弗雷德哈钦森癌症研究中心

Veatch, Joshua

Riddell, Stanley R.

<120> 靶向KRAS或HER2抗原的免疫疗法

<130> 360056.472W0

<140> PCT

<141> 2019-08-21

<150> US 62/721,439

<151> 2018-08-22

<160> 77

<170>用于Windows Version 4.0的FastSEQ

<210> 1

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - KRAS G12V 免疫原性肽

<400> 1

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

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

20 25

<210> 2

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 α

<400> 2

Cys Ala Val Gly Arg Ser Asn Ser Gly Gly Tyr Gln Lys Val Thr Phe

1 5 10 15

<210> 3

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 β

<400> 3

Cys Ala Trp Ser Ala Leu Ala Gly Ala Arg Asp Thr Gln Tyr Phe
1 5 10 15

<210> 4

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 天然核酸

<400> 4

tgtgctgtgg gccgatcgaa ttctgggggt taccagaaag ttaccttt 48

<210> 5

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 α 密码子优化核酸

<400> 5

tgcgccgtgg gcagatctaa tagcggcggc taccagaaag tgaccttt 48

<210> 6

<211> 310

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - V β 氨基酸

<400> 6

Met Leu Cys Ser Leu Leu Ala Leu Leu Leu Gly Thr Phe Phe Gly Val
1 5 10 15

Arg Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val
20 25 30

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro
35 40 45

Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu
50 55 60

Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn
65 70 75 80

Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys
85 90 95

Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Ala

100	105	110
Leu Ala Gly Ala Arg Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu		
115	120	125
Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val		
130	135	140
Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu		
145	150	155
Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp		
165	170	175
Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln		
180	185	190
Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser		
195	200	205
Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His		
210	215	220
Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp		
225	230	235
Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala		
245	250	255
Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly		
260	265	270
Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr		
275	280	285
Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys		
290	295	300
Arg Lys Asp Ser Arg Gly		
305	310	

<210> 7

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 β 天然核酸

<400> 7

tgtgcctgga gtgcgttggc gggagctaga gatacgcagt atttt 45

<210> 8

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 β 密码子优化核酸

<400> 8

tgtgcttgga gtgctctggc aggcgccaga gataccagat atttt 45

<210> 9

<211> 276

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - Va氨基酸

<400> 9

Met	Leu	Leu	Glu	Leu	Ile	Pro	Leu	Leu	Gly	Ile	His	Phe	Val	Leu	Arg
1				5					10					15	
Thr	Ala	Arg	Ala	Gln	Ser	Val	Thr	Gln	Pro	Asp	Ile	His	Ile	Thr	Val
			20					25					30		
Ser	Glu	Gly	Ala	Ser	Leu	Glu	Leu	Arg	Cys	Asn	Tyr	Ser	Tyr	Gly	Ala
			35				40					45			
Thr	Pro	Tyr	Leu	Phe	Trp	Tyr	Val	Gln	Ser	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Gln
			50				55				60				
Leu	Leu	Leu	Lys	Tyr	Phe	Ser	Gly	Asp	Thr	Leu	Val	Gln	Gly	Ile	Lys
65				70				75						80	
Gly	Phe	Glu	Ala	Glu	Phe	Lys	Arg	Ser	Gln	Ser	Ser	Phe	Asn	Leu	Arg
			85					90					95		
Lys	Pro	Ser	Val	His	Trp	Ser	Asp	Ala	Ala	Glu	Tyr	Phe	Cys	Ala	Val
			100					105					110		
Gly	Arg	Ser	Asn	Ser	Gly	Gly	Tyr	Gln	Lys	Val	Thr	Phe	Gly	Ile	Gly
			115					120					125		
Thr	Lys	Leu	Gln	Val	Ile	Pro	Asn	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val
			130				135				140				
Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser	Lys	Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe
145				150						155				160	
Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr	Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp
			165							170				175	
Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Cys	Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe
			180					185					190		
Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val	Ala	Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys
			195					200					205		
Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn	Ser	Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro
			210				215						220		

Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu
 225 230 235 240
 Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg
 245 250 255
 Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg
 260 265 270
 Leu Trp Ser Ser
 275

<210> 10

<211> 1827

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - 整个TCR转基因(核酸密码子优化)

<400> 10

```

atgctttgtt ctttgctggc tctgctgctg ggcaccttct ttggcgtcag aagccagacc 60
atccaccagt ggcttgctac actggtgcag cctgttggaa gccctctgag cctggaatgt 120
accgtggaag gcaccagcaa tcccaacctg tactggtaca gacaggccgc tggaagagga 180
ctgcagctgc tgtttttacag cgtcggcatc ggccagatca gcagcgaggt tccacagaat 240
ctgagcgcca gcagacccca ggacagacag tttatcctga gcagcaagaa gctgctgctg 300
agcgacagcg gcttctacct gtgtgcttgg agtgctctgg caggcgccag agataccag 360
tatttttgcc ctggcaccag actgaccgtg ctggaagatc tgaagaacgt gttcccacct 420
gaggtggccg tgttcgagcc ttctgaggcc gagatcagcc acacacagaa agccacactc 480
gtgtgtcttg ccaccggctt ttaccccgat cacgtggaac tgtcttggtg ggtcaacggc 540
aaagagggtc acagcggcgt ctgcacagat cccagcctc tgaaagaaca gcccgtctctg 600
aacgacagcc ggtactgcct gtctagcaga ctgagagtgt ccgccacctt ctggcagaac 660
cccagaaacc acttcagatg ccaggtgcag ttctacggcc tgagcgagaa cgatgagtgg 720
acccaggata gagccaagcc tgtgacacag atcgtgtctg ccgaagcctg gggcagagcc 780
gattgtggct ttaccagcga gagctaccag cagggcgctg tgtctgccac aatcctgtac 840
gagatcctgc tgggaaaagc cactctgtac gccgtgctgg tgtctgccct ggtgctgatg 900
gccatggtca agcggaaagga tagcagaggc ggaagcggcg ccacaaactt cagcctgctt 960
aaacaggccg gcgacgtgga agagaacccc ggacctatgc tgctggaact gatccctctg 1020
ctggggattc acttcgtgct gagaaccgct agagcccaga gcgtgaccca gcctgatatc 1080
cacatcaccg tgtctgaggg cgctctctct gaactgcggt gcaattacag ctacggcgcc 1140
actccttacc tgttttggtg cgtgcagagc ccaggccagg gactgcaact cctgctgaag 1200
tacttttagcg gcgacaccct ggtgcagggc atcaagggat tcgaggccga gttcaagaga 1260
agccagtcca gcttcaacct gcggaagcct tccgtgcatt ggagtgatgc cgccgagtac 1320
ttttgcgccg tgggcagatc taatagcggc ggctaccaga aagtgcctt tggcatcggc 1380
accaagctgc aagtgatccc caacattcag aaccccgatc ctgcagtgtg ccagctgcgg 1440

```

gacagcaaga gcagcgacaa gagcgtgtgc ctgttcaccg acttcgacag ccagaccaac 1500
 gtgtcccaga gcaaggacag cgacgtgtac atcaccgata agtgcgtgct ggacatgcgg 1560
 agcatggact tcaagagcaa cagcgccgtg gcctgggtcca acaagagcga cttcgctgc 1620
 gccaacgcct tcaacaacag cattatcccc gaggacacat tcttcccaag ccccgagagc 1680
 agctgcgacg tgaagctggt ggaaaagagc ttcgagacag acaccaacct gaacttcag 1740
 aacctcagcg tgatcggctt ccggatcctg ctgctgaagg tggccggctt caacctgctg 1800
 atgacctgc ggctgtggtc cagctga 1827

<210> 11

<211> 608

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - 整个TCR转基因AA (β , P2A, α)

<400> 11

Met	Leu	Cys	Ser	Leu	Leu	Ala	Leu	Leu	Leu	Gly	Thr	Phe	Phe	Gly	Val
1				5						10					15
Arg	Ser	Gln	Thr	Ile	His	Gln	Trp	Pro	Ala	Thr	Leu	Val	Gln	Pro	Val
				20						25					30
Gly	Ser	Pro	Leu	Ser	Leu	Glu	Cys	Thr	Val	Glu	Gly	Thr	Ser	Asn	Pro
				35						40					45
Asn	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Ala	Gly	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Leu
				50						55					60
Phe	Tyr	Ser	Val	Gly	Ile	Gly	Gln	Ile	Ser	Ser	Glu	Val	Pro	Gln	Asn
65				70						75					80
Leu	Ser	Ala	Ser	Arg	Pro	Gln	Asp	Arg	Gln	Phe	Ile	Leu	Ser	Ser	Lys
				85						90					95
Lys	Leu	Leu	Leu	Ser	Asp	Ser	Gly	Phe	Tyr	Leu	Cys	Ala	Trp	Ser	Ala
				100						105					110
Leu	Ala	Gly	Ala	Arg	Asp	Thr	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg	Leu
				115						120					125
Thr	Val	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val
				130						135					140
Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu
145				150						155					160
Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp
				165						170					175
Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln
				180						185					190
Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser

195	200	205
Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His		
210	215	220
Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp		
225	230	235
Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala		240
245	250	255
Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly		
260	265	270
Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr		
275	280	285
Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys		
290	295	300
Arg Lys Asp Ser Arg Gly Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu		
305	310	315
Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Glu		
325	330	335
Leu Ile Pro Leu Leu Gly Ile His Phe Val Leu Arg Thr Ala Arg Ala		
340	345	350
Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ile His Ile Thr Val Ser Glu Gly Ala		
355	360	365
Ser Leu Glu Leu Arg Cys Asn Tyr Ser Tyr Gly Ala Thr Pro Tyr Leu		
370	375	380
Phe Trp Tyr Val Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Gln Leu Leu Lys		
385	390	395
Tyr Phe Ser Gly Asp Thr Leu Val Gln Gly Ile Lys Gly Phe Glu Ala		
405	410	415
Glu Phe Lys Arg Ser Gln Ser Ser Phe Asn Leu Arg Lys Pro Ser Val		
420	425	430
His Trp Ser Asp Ala Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val Gly Arg Ser Asn		
435	440	445
Ser Gly Gly Tyr Gln Lys Val Thr Phe Gly Ile Gly Thr Lys Leu Gln		
450	455	460
Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg		
465	470	475
Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp		
485	490	495
Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr		
500	505	510

Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
515 520 525
Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
530 535 540
Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
545 550 555 560
Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
565 570 575
Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu
580 585 590
Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
595 600 605

<210> 12

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 α

<400> 12

Cys Ala Val Thr Val Val Asn Ala Gly Asn Asn Arg Lys Leu Ile Trp
1 5 10 15

<210> 13

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 β

<400> 13

Cys Ala Ser Ser Leu Gly Leu Pro Gly Thr Asp Thr Gln Tyr Phe
1 5 10 15

<210> 14

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 α 天然核酸

<400> 14

tgtgccgtga cgggtggtaa tgctggcaac aaccgtaagc tgatttgg 48

<210> 15

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 α 密码子优化核酸

<400> 15

tgcgccgtga ccgtgggtcaa cgccggcaac aacagaaagc tgatctgg 48

<210> 16

<211> 313

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - V β 氨基酸

<400> 16

Met	Gly	Ser	Trp	Thr	Leu	Cys	Cys	Val	Ser	Leu	Cys	Ile	Leu	Val	Ala
1				5				10					15		
Lys	His	Thr	Asp	Ala	Gly	Val	Ile	Gln	Ser	Pro	Arg	His	Glu	Val	Thr
			20					25					30		
Glu	Met	Gly	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Arg	Cys	Lys	Pro	Ile	Ser	Gly	His
			35					40					45		
Asp	Tyr	Leu	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr	Met	Met	Arg	Gly	Leu	Glu	Leu
			50				55				60				
Leu	Ile	Tyr	Phe	Asn	Asn	Asn	Val	Pro	Ile	Asp	Asp	Ser	Gly	Met	Pro
65				70					75					80	
Glu	Asp	Arg	Phe	Ser	Ala	Lys	Met	Pro	Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Thr	Leu
			85						90					95	
Lys	Ile	Gln	Pro	Ser	Glu	Pro	Arg	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala
			100					105					110		
Ser	Ser	Leu	Gly	Leu	Pro	Gly	Thr	Asp	Thr	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly
			115				120					125			
Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu
			130				135				140				
Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys
145				150					155					160	
Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu
			165						170					175	
Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr
			180					185					190		
Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr

195	200	205
Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro		
210	215	220
Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn		
225	230	235
Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser		
245	250	255
Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr		
260	265	270
Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly		
275	280	285
Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala		
290	295	300
Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly		
305	310	
<210> 17		
<211> 45		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列 - CDR3 β 天然核酸		
<400> 17		
tgtgccagca gtttagggct accagggaca gatacgcagt atttt 45		
<210> 18		
<211> 45		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列 - CDR3 β 密码子优化核酸		
<400> 18		
tgtgccagca gcctgggact gcccggcacc gatacacagt atttt 45		
<210> 19		
<211> 276		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列 - Va氨基酸		
<400> 19		
Met Leu Leu Leu Leu Ile Pro Val Leu Gly Met Ile Phe Ala Leu Arg		

[illegible]

<220>

<223> 合成序列 - 整个TCR转基因(核酸密码子优化)

<400> 20

```
atgggatcctt ggacactgtg ttgcgtgtcc ctgtgcatcc tgggtggccaa gcacacagat 60
gccggcgtga tccagtctcc tagacacgaa gtgaccgaga tgggccaaga agtgaccctg 120
cgctgcaagc ctatcagcgg ccacgattac ctgttctggt acagacagac catgatgaga 180
ggcctggaac tgctgatcta cttcaacaac aacgtgcccc tcgacgacag cggcatgccc 240
gaggatagat tcagcgccaa gatgccccaa gccagcttca gcaccctgaa gatccagcct 300
agcgagccca gagatagcgc cgtgtacttt tgtgccagca gcctgggact gcccggcacc 360
gatacacagt attttggccc tggcaccaga ctgaccgtgc tggaagatct gaagaacgtg 420
ttcccacctg aggtggccgt gttcgagcct tctgaggcgg agatcagcca cacacagaaa 480
gccacactcg tgtgtctggc caccggttc tateccgatc acgtggaact gtcttggtgg 540
gtcaacggca aagagggtga cagcggcgtc tgtaccgatc ctcagcctct gaaagagcag 600
cccgtcttga acgacagcag atactgcctg agcagcagac tgagagtgtc cgccaccttc 660
tggcagaacc ccagaaacca cttcagatgc caggtgcagt tctacggcct gagcgagaac 720
gatgagtgga cccaggatag agccaagcct gtgacacaga tcgtgtctgc cgaagcctgg 780
ggcagagccg attgtggctt taccagcgag agctaccagc agggcgtgct gtctgccaca 840
atcctgtacg agatcctgct gggcaaagcc actctgtacg ccgtgctggt gtctgccctg 900
gtgctgatgg ccatggtcaa gcggaaggat agcagaggcg gaagcggcgc cacaaacttc 960
tactgtctga aacaggccgg cgacgtggaa gagaaccctg gacctatgct gctcctgctg 1020
atccctgtgc tgggcatgat cttcgccctg agagatgcta gagcccagtc cgtgtctcag 1080
cacaaccacc atgtgatcct gagcgaagcc gcctctctgg aactgggctg caattacagc 1140
tacggcggca ccgtgaatct gttttggtac gtgcagtacc ccggccagca tctccagctg 1200
ctgctgaagt actttagcgg cgaccctctg gtcaagggca tcaagggatt cgaggccgag 1260
ttcatcaaga gcaagttcag cttcaacctg cggaagccca gcgtgcagtg gagcgataca 1320
gccgagtatt tctgcgccgt gaccgtggtc aacgccggca acaacagaaa gctgatctgg 1380
ggcctgggca ccagcctggc tgtgaacccc aatattcaga accccgatcc tgcagtgtac 1440
cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag agcgtgtgcc tgttcaccga cttcgacagc 1500
cagaccaacg tgtcccagag caaggacagc gacgtgtaca tcaccgataa gtgcgtgctg 1560
gacatgcgga gcatggactt caagagcaac agcgccgtgg cctgggtccaa caagagcgac 1620
ttcgctgcg ccaacgcctt caacaacagc attatccccg aggacacatt cttcccaagc 1680
cccagagca gctgcgacgt gaagctggtg gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg 1740
aacttccaga acctcagcgt gatcggttc cggatcctgc tgctgaaggt ggccggcttc 1800
aacctgctga tgaccctgcg gctgtggtcc agctga 1836
```

<210> 21

<211> 611

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - 整个TCR转基因AA(β , P2A, α)

<400> 21

Met	Gly	Ser	Trp	Thr	Leu	Cys	Cys	Val	Ser	Leu	Cys	Ile	Leu	Val	Ala
1				5					10					15	
Lys	His	Thr	Asp	Ala	Gly	Val	Ile	Gln	Ser	Pro	Arg	His	Glu	Val	Thr
			20					25					30		
Glu	Met	Gly	Gln	Glu	Val	Thr	Leu	Arg	Cys	Lys	Pro	Ile	Ser	Gly	His
		35					40					45			
Asp	Tyr	Leu	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr	Met	Met	Arg	Gly	Leu	Glu	Leu
	50					55					60				
Leu	Ile	Tyr	Phe	Asn	Asn	Asn	Val	Pro	Ile	Asp	Asp	Ser	Gly	Met	Pro
65				70					75					80	
Glu	Asp	Arg	Phe	Ser	Ala	Lys	Met	Pro	Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Thr	Leu
			85					90					95		
Lys	Ile	Gln	Pro	Ser	Glu	Pro	Arg	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala
			100					105					110		
Ser	Ser	Leu	Gly	Leu	Pro	Gly	Thr	Asp	Thr	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly
		115					120					125			
Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu
	130					135					140				
Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys
145				150					155					160	
Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu
			165					170					175		
Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr
		180					185					190			
Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr
	195					200					205				
Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro
	210					215					220				
Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn
225				230					235					240	
Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser
			245					250					255		
Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr
		260					265					270			
Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly
	275						280					285			
Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala

290	295	300
Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe		
305	310	315
Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met		320
	325	330
Leu Leu Leu Leu Ile Pro Val Leu Gly Met Ile Phe Ala Leu Arg Asp		335
	340	345
Ala Arg Ala Gln Ser Val Ser Gln His Asn His His Val Ile Leu Ser		350
	355	360
Glu Ala Ala Ser Leu Glu Leu Gly Cys Asn Tyr Ser Tyr Gly Gly Thr		365
370	375	380
Val Asn Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Gly Gln His Leu Gln Leu		
385	390	395
Leu Leu Lys Tyr Phe Ser Gly Asp Pro Leu Val Lys Gly Ile Lys Gly		400
	405	410
Phe Glu Ala Glu Phe Ile Lys Ser Lys Phe Ser Phe Asn Leu Arg Lys		415
	420	425
Pro Ser Val Gln Trp Ser Asp Thr Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val Thr		430
	435	440
Val Val Asn Ala Gly Asn Asn Arg Lys Leu Ile Trp Gly Leu Gly Thr		445
450	455	460
Ser Leu Ala Val Asn Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr		
465	470	475
Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr		480
	485	490
Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val		495
	500	505
Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys		510
	515	520
Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala		525
	530	535
Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser		540
545	550	555
Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr		560
	565	570
Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile		575
	580	585
Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu		590
595	600	605

Trp Ser Ser

610

<210> 22

<211> 32

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - HER2 ITD免疫原性肽

<400> 22

Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala

1 5 10 15

Tyr Val Met Ala Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly

20 25 30

<210> 23

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 α

<400> 23

Cys Ala Val Ser Val Asn Thr Asp Lys Leu Ile Phe

1 5 10

<210> 24

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 β

<400> 24

Cys Ser Ala Pro Pro Leu Ala Gly Asp Glu Thr Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 25

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 α 天然核酸

<400> 25

tgtgctgtga gtgtgaacac cgacaagctc atcttt 36

<210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 α 密码子优化核酸

<400> 26

tgcgccgtgt ctgtgaacac cgacaagctg atcttc 36

<210> 27

<211> 272

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - V α 氨基酸

<400> 27

Met Leu Leu Leu Leu Val Pro Ala Phe Gln Val Ile Phe Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gly Thr Arg Ala Gln Ser Val Thr Gln Leu Asp Ser Gln Val Pro Val

20 25 30

Phe Glu Glu Ala Pro Val Glu Leu Arg Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Val

35 40 45

Ser Val Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Asn Gln Gly Leu Gln

50 55 60

Leu Leu Leu Lys Tyr Leu Ser Gly Ser Thr Leu Val Glu Ser Ile Asn

65 70 75 80

Gly Phe Glu Ala Glu Phe Asn Lys Ser Gln Thr Ser Phe His Leu Arg

85 90 95

Lys Pro Ser Val His Ile Ser Asp Thr Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val

100 105 110

Ser Val Asn Thr Asp Lys Leu Ile Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu Gln

115 120 125

Val Phe Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg

130 135 140

Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp

145 150 155 160

Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr

165 170 175

Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser

180 185 190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe		
195	200	205
Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser		
210	215	220
Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn		
225	230	235
Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu		
	245	250
Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
260	265	270

<210> 28

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 β 天然核酸

<400> 28

tgcagtgctc ctcccctagc gggagatgag acccagtact tc 42

<210> 29

<211> 42

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - CDR3 β 核酸 - 密码子优化

<400> 29

tgtagcgccc ctccactggc cggcgacgag acacaatatt tt 42

<210> 30

<211> 308

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - V β 氨基酸

<400> 30

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Gly Ser Gly Leu Gly Ala		
1	5	10
Val Val Ser Gln His Pro Ser Trp Val Ile Cys Lys Ser Gly Thr Ser		
20	25	30
Val Lys Ile Glu Cys Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr Met Phe		
35	40	45

Trp	Tyr	Arg	Gln	Phe	Pro	Lys	Gln	Ser	Leu	Met	Leu	Met	Ala	Thr	Ser
50						55				60					
Asn	Glu	Gly	Ser	Lys	Ala	Thr	Tyr	Glu	Gln	Gly	Val	Glu	Lys	Asp	Lys
65					70					75					80
Phe	Leu	Ile	Asn	His	Ala	Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Val	Thr
				85					90					95	
Ser	Ala	His	Pro	Glu	Asp	Ser	Ser	Phe	Tyr	Ile	Cys	Ser	Ala	Pro	Pro
			100					105					110		
Leu	Ala	Gly	Asp	Glu	Thr	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg	Leu	Leu
			115					120				125			
Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu
			130				135					140			
Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys
145					150					155					160
Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val
				165					170					175	
Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu
			180					185					190		
Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg
			195					200				205			
Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg
			210				215				220				
Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln
225					230					235					240
Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly
				245					250					255	
Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	Leu
			260					265					270		
Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr
			275				280					285			
Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg	Lys
			290				295				300				

Asp Ser Arg Gly

305

<210> 31

<211> 1809

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - 整个核酸TCR转基因

<400> 31

```

atgttgcttt tgttgctgct cctcggacct ggctctggac tgggagctgt ggtttctcag 60
caccctcttt gggctcatctg caagagcggc accagcgtga agatcgagtg cagaagcctg 120
gacttccagg ccaccacaat gttctggtac agacagttcc ccaagcagag cctgatgctg 180
atggccacct ctaacgaggg cagcaaggcc acatatgagc agggcgtcga gaaggacaag 240
ttcctgatca accacgccag cctgacactg agcacctga cagtgacaag cgcccatcct 300
gaggacagca gcttctacat ctgtagcgcc cctccactgg ccggcgacga gacacaatat 360
tttggccctg gcaccagact gctggtgctg gacctgaaga acgtgttccc acctgaggtg 420
gccgtgttcg agccttctga ggccgagatc agccacacac agaaagccac actcgtgtgt 480
ctggccaccg gcttctatcc cgatcacgtc gaactgtctt ggtgggtcaa cggcaaagag 540
gtgcacagcg gcgtctgtac cgatcctcag cctctgaaag agcagcccg cctgaacgac 600
agcagatact gcctgagcag cagactgaga gtgtccgcca cttcttgga gaacccaga 660
aaccacttca gatgccaggt gcagttctac ggctgagcg agaacgatga gtggaccag 720
gatagagcca agcctgtgac acagatcgtg tctgccgaag cctggggcag agccgattgt 780
ggctttacca gcgagagcta ccagcaaggc gtgctgtctg ccaccatcct gtacgagatc 840
ctgctgggca aagccactct gtacgccgtg ctggtgtctg ccctggtcct gatggctatg 900
gtcaagcgga aggatagcag aggcggaagc ggcgccaaa acttctcact gctgaaacag 960
gcaggcgacg tgaagagaa ccccgacct atgctgtgc ttctggtgcc tgccttcaa 1020
gtgatcttta ccctcggcgg cacaagagcc cagagcgtga cacagctgga tagccaggtg 1080
ccagtgttcg aagaggcccc tgtggaactg cggtgcaact acagcagcag cgtgtccgtg 1140
tacctgtttt ggtacgtgca gtacccaac caggcctgc agctgctcct gaagtatctg 1200
agcggcagca ccctggtgga atccatcaat ggcttcgagg ccgaattcaa caagagccag 1260
accagcttcc acctgagaaa gccagcgtg cacatcagcg ataccgccga gtacttctgc 1320
gccgtgtctg tgaacaccga caagctgatc ttccgaccg gcacaaggct ccaggtgttc 1380
cccaacattc agaacccga tcctgcagtg taccagctgc gggacagcaa gagcagcgac 1440
aagagcgtgt gcctgttcac cgacttcgac agccagacca acgtgtccca gagcaaggac 1500
agcgacgtgt acatcaccga taagtgcgtg ctggacatgc ggagcatgga cttcaagagc 1560
aacagcgccg tggcctggtc caacaagagc gacttcgcct gcgccaacgc cttcaacaac 1620
agcattatcc ccgaggacac attcttccca agccccgaga gcagctgcga cgtgaagctg 1680
gtggaaaaga gtttcgagac agacaccaac ctgaacttcc agaacctcag cgtgatcggc 1740
ttccggatcc tgctgctgaa ggtggccggc ttcaacctgc tgatgacct gcggctgtgg 1800
tccagctga 1809

```

<210> 32

<211> 602

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - 整个TCR氨基酸序列

<400> 32

Met	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Gly	Pro	Gly	Ser	Gly	Leu	Gly	Ala
1				5					10					15	
Val	Val	Ser	Gln	His	Pro	Ser	Trp	Val	Ile	Cys	Lys	Ser	Gly	Thr	Ser
			20					25					30		
Val	Lys	Ile	Glu	Cys	Arg	Ser	Leu	Asp	Phe	Gln	Ala	Thr	Thr	Met	Phe
		35					40					45			
Trp	Tyr	Arg	Gln	Phe	Pro	Lys	Gln	Ser	Leu	Met	Leu	Met	Ala	Thr	Ser
	50					55					60				
Asn	Glu	Gly	Ser	Lys	Ala	Thr	Tyr	Glu	Gln	Gly	Val	Glu	Lys	Asp	Lys
65					70				75					80	
Phe	Leu	Ile	Asn	His	Ala	Ser	Leu	Thr	Leu	Ser	Thr	Leu	Thr	Val	Thr
			85					90						95	
Ser	Ala	His	Pro	Glu	Asp	Ser	Ser	Phe	Tyr	Ile	Cys	Ser	Ala	Pro	Pro
			100					105					110		
Leu	Ala	Gly	Asp	Glu	Thr	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg	Leu	Leu
		115					120					125			
Val	Leu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu
	130					135						140			
Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys
145					150					155				160	
Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val
			165					170					175		
Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu
			180					185					190		
Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg
	195						200					205			
Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg
	210					215					220				
Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln
225					230					235				240	
Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly
			245					250					255		
Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	Leu
		260						265					270		
Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr
		275					280					285			
Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg	Lys
	290					295					300				

Asp Ser Arg Gly Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln			
305	310	315	320
Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Leu Leu Leu Leu Val			
	325	330	335
Pro Ala Phe Gln Val Ile Phe Thr Leu Gly Gly Thr Arg Ala Gln Ser			
	340	345	350
Val Thr Gln Leu Asp Ser Gln Val Pro Val Phe Glu Glu Ala Pro Val			
	355	360	365
Glu Leu Arg Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Val Ser Val Tyr Leu Phe Trp			
	370	375	380
Tyr Val Gln Tyr Pro Asn Gln Gly Leu Gln Leu Leu Lys Tyr Leu			
385	390	395	400
Ser Gly Ser Thr Leu Val Glu Ser Ile Asn Gly Phe Glu Ala Glu Phe			
	405	410	415
Asn Lys Ser Gln Thr Ser Phe His Leu Arg Lys Pro Ser Val His Ile			
	420	425	430
Ser Asp Thr Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val Ser Val Asn Thr Asp Lys			
	435	440	445
Leu Ile Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu Gln Val Phe Pro Asn Ile Gln			
	450	455	460
Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp			
465	470	475	480
Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser			
	485	490	495
Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp			
	500	505	510
Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn			
	515	520	525
Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro			
	530	535	540
Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu			
545	550	555	560
Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu			
	565	570	575
Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn			
	580	585	590
Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser			
	595	600	

<210> 33

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - KRAS WT肽

<400> 33

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

1 5 10 15

Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln

20 25

<210> 34

<211> 28

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - HER2 WT肽

<400> 34

Ser Pro Lys Ala Asn Lys Glu Ile Leu Asp Glu Ala Tyr Val Met Ala

1 5 10 15

Gly Val Gly Ser Pro Tyr Val Ser Arg Leu Leu Gly

20 25

<210> 35

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 -Thoseaassigna病毒2A(T2A) 肽

<400> 35

Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu

1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 36

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - Porcine tescho病毒-1 2A(P2A) 肽

<400> 36

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
1 5 10 15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20

<210> 37

<211> 23

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - 马鼻炎A病毒(ERAV) 2A (E2A)

<400> 37

Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
1 5 10 15

Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20

<210> 38

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - 口蹄疫病毒2A (F2A) 肽

<400> 38

Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20 25

<210> 39

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - 突变肽

<400> 39

Thr Glu Arg Trp Asp Asn Leu Ile Tyr Tyr
1 5 10

<210> 40

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - 突变肽

<400> 40

Ala Glu Arg Trp Asp Asn Leu Ile Tyr Tyr

1 5 10

<210> 41

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - 人 TCR CB1反向

<400> 41

ccacttccag ggctgccttc agaaatc 27

<210> 42

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - 人 TCR CB2反向

<400> 42

tgggatgggtt ttggagctag cctctgg 27

<210> 43

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - 人 TCR C α 反向

<400> 43

cagccgcagc gtcattgagca gatta 25

<210> 44

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - JV298引物

<400> 44

tcgcttctgt tcgcgcgctt 20

<210> 45

<211> 20

<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列 - JV300引物
<400> 45
aacaggcaca cgctcttgtc 20
<210> 46
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列 - 指导rna
<400> 46
agagtctctc agctggtaca 20
<210> 47
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列 - TCR β 指导rna
<400> 47
ggagaatgac gagtggaccc 20
<210> 48
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列 - KRAS G12V克隆3 CDR1 α
<400> 48
Tyr Gly Ala Thr Pro Tyr
1 5
<210> 49
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列 - KRAS G12V克隆3 CDR2 α
<400> 49
Tyr Phe Ser Gly Asp Thr Leu

1 5
 <210> 50
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列 - KRAS G12V克隆3 TCR α 信号肽
 <400> 50
 Met Leu Cys Ser Leu Leu Ala Leu Leu Leu Gly Thr Phe Phe Gly Val
 1 5 10 15
 Arg Ser Gln Thr
 20
 <210> 51
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列 - KRAS G12V克隆3 CDR1 β
 <400> 51
 Gly Thr Ser Asn Pro Asn
 1 5
 <210> 52
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列 - KRAS G12V克隆3 CDR2 β
 <400> 52
 Ser Val Gly Ile Gly
 1 5
 <210> 53
 <211> 18
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列 - KRAS G12V 克隆 3 TCR β 信号肽
 <400> 53
 Met Leu Leu Glu Leu Ile Pro Leu Leu Gly Ile His Phe Val Leu Arg
 1 5 10 15

Thr Ala

<210> 54

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - KRAS G12V 克隆 9 CDR2 α

<400> 54

Tyr Gly Gly Thr Val Asn

1 5

<210> 55

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - KRAS G12V克隆9 CDR2 α

<400> 55

Tyr Phe Ser Gly Asp Pro Leu

1 5

<210> 56

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - KRAS G12V克隆9 TCR α 信号肽

<400> 56

Met Gly Ser Trp Thr Leu Cys Cys Val Ser Leu Cys Ile Leu Val Ala

1 5 10 15

Lys His Thr Asp

20

<210> 57

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - KRAS G12V克隆9 CDR1 β

<400> 57

Ser Gly His Asp Tyr

1 5

<210> 58

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - KRAS G12V克隆9 CDR2B

<400> 58

Phe Asn Asn Asn Val Pro

1 5

<210> 59

<211> 21

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - KRAS G12V 克隆 9 TCRβ信号肽

<400> 59

Met Leu Leu Leu Leu Ile Pro Val Leu Gly Met Ile Phe Ala Leu Arg

1 5 10 15

Asp Ala Arg Ala Gln

20

<210> 60

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - Her2 ITD TCR CDR1α

<400> 60

Ser Ser Val Ser Val Tyr

1 5

<210> 61

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - Her2 ITD TCR CDR2α

<400> 61

Tyr Leu Ser Gly Ser Thr Leu

1 5

<210> 62

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - Her2 ITD TCR α 信号肽

<400> 62

Met Leu Leu Leu Leu Val Pro Ala Phe Gln Val Ile Phe Thr Leu Gly

1 5 10 15

Gly Thr Arg Ala

20

<210> 63

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - Her2 ITD TCR CDR1 β

<400> 63

Asp Phe Gln Ala Thr Thr

1 5

<210> 64

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - Her2 ITD TCR CDR2 β

<400> 64

Ser Asn Glu Gly Ser Lys Ala

1 5

<210> 65

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - Her2 ITD TCR β 信号肽

<400> 65

Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Gly Ser Gly Leu Gly

1 5 10 15

<210> 66

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - KRAS G12V 克隆 3 TCR V α (成熟)

<400> 66

```

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

```

<210> 67

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - KRAS G12V克隆3 TCR C α

<400> 67

```

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

```

				85					90					95					
Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln				
				100					105					110					
Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly				
				115				120						125					
Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser								
				130				135						140					

<210> 68

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - KRAS G12V 克隆3 TCR Vβ (成熟)

<400> 68

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

<210> 69

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - KRAS G12V克隆3 TCR Cβ

<400> 69

Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser				
1				5					10					15					
Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala				
				20				25					30						

Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly
35				40				45							
Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu
50				55				60							
Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg
65				70				75				80			
Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln
				85				90				95			
Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg
100				105				110							
Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala
115				120				125							
Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser	Ala
130				135				140							
Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val
145				150				155				160			
Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg	Lys	Asp	Ser
				165				170				175			

Arg Gly

<210> 70

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - KRAS G12V克隆9 TCR Va (成熟)

<400> 70

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

100	105	110
Asn Pro Asn		
115		
<210> 71		
<211> 140		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列 - KRAS G12V克隆9 TCR C α		
<400> 71		
Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser		
1 5 10 15		
Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn		
20 25 30		
Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val		
35 40 45		
Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp		
50 55 60		
Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile		
65 70 75 80		
Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val		
85 90 95		
Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln		
100 105 110		
Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly		
115 120 125		
Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
130 135 140		
<210> 72		
<211> 115		
<212> PRT		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 合成序列 - KRAS G12V克隆9 TCR V β (成熟)		
<400> 72		
Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr Glu Met Gly Gln		
1 5 10 15		
Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His Asp Tyr Leu Phe		
20 25 30		

Trp	Tyr	Arg	Gln	Thr	Met	Met	Arg	Gly	Leu	Glu	Leu	Leu	Ile	Tyr	Phe
	35						40					45			
Asn	Asn	Asn	Val	Pro	Ile	Asp	Asp	Ser	Gly	Met	Pro	Glu	Asp	Arg	Phe
	50					55				60					
Ser	Ala	Lys	Met	Pro	Asn	Ala	Ser	Phe	Ser	Thr	Leu	Lys	Ile	Gln	Pro
65					70				75					80	
Ser	Glu	Pro	Arg	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Ser	Ser	Leu	Gly
			85						90					95	
Leu	Pro	Gly	Thr	Asp	Thr	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr
			100					105					110		
Val	Leu	Glu													
	115														
<210>	73														
<211>	178														
<212>	PRT														
<213>	人工序列														
<220>															
<223>	合成序列 - KRAS G12V克隆9 TCR Cβ														
<400>	73														
Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser
1			5					10					15		
Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala
			20					25					30		
Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly
		35					40					45			
Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu
	50					55				60					
Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg
65					70				75					80	
Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln
				85					90					95	
Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg
			100					105					110		
Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala
			115					120					125		
Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser	Ala
	130						135				140				
Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val
145					150					155					160

Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser
 165 170 175

Arg Gly

<210> 74

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - HER2 ITD TCR V α (成熟)

<400> 74

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

Pro Val Glu Leu Arg Cys Asn Tyr Ser Ser Ser Val Ser Val Tyr Leu
 20 25 30

Phe Trp Tyr Val Gln Tyr Pro Asn Gln Gly Leu Gln Leu Leu Lys
 35 40 45

Tyr Leu Ser Gly Ser Thr Leu Val Glu Ser Ile Asn Gly Phe Glu Ala
 50 55 60

Glu Phe Asn Lys Ser Gln Thr Ser Phe His Leu Arg Lys Pro Ser Val
 65 70 75 80

His Ile Ser Asp Thr Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Val Ser Val Asn Thr
 85 90 95

Asp Lys Leu Ile Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu Gln Val Phe Pro Asn
 100 105 110

<210> 75

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - HER2 ITD TCR C α

<400> 75

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser
 1 5 10 15

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn
 20 25 30

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val
 35 40 45

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp
 50 55 60

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile
 65 70 75 80
 Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val
 85 90 95
 Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln
 100 105 110
 Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly
 115 120 125
 Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 130 135 140

<210> 76

<211> 115

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - HER2 ITD TCR V β (成熟)

<400> 76

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

<210> 77

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 - HER2 ITD TCR C β

<400> 77

Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser
1				5					10					15	
Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala
			20					25					30		
Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly
		35					40					45			
Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu
	50					55					60				
Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg
65				70					75					80	
Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln
			85					90				95			
Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg
		100					105					110			
Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala
	115					120					125				
Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser	Ala
	130					135					140				
Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val
145				150					155					160	
Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg	Lys	Asp	Ser
			165					170					175		
Arg	Gly														



图1A

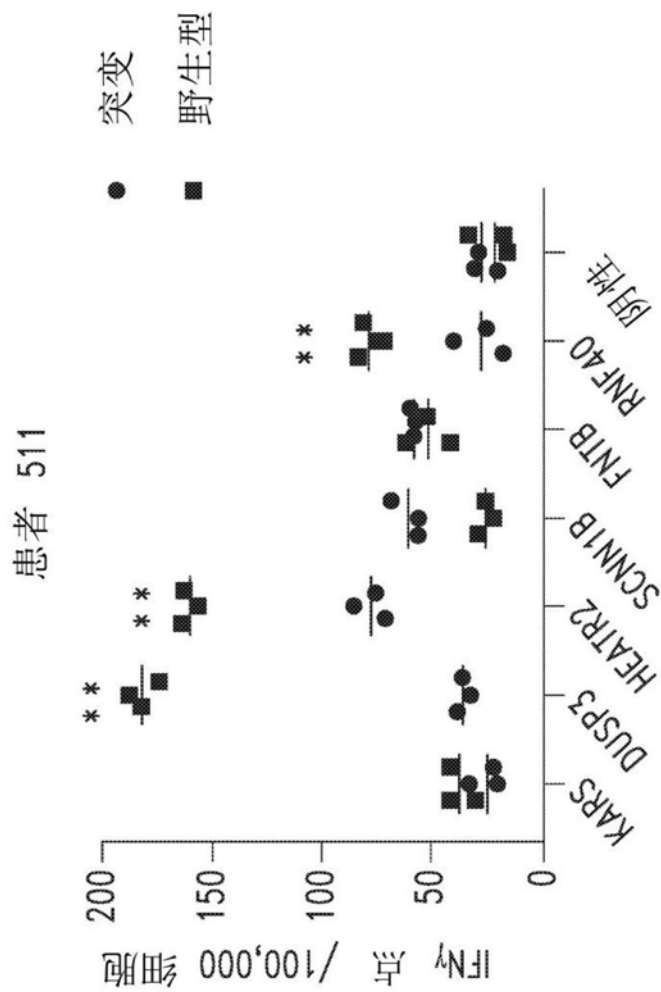


图1B

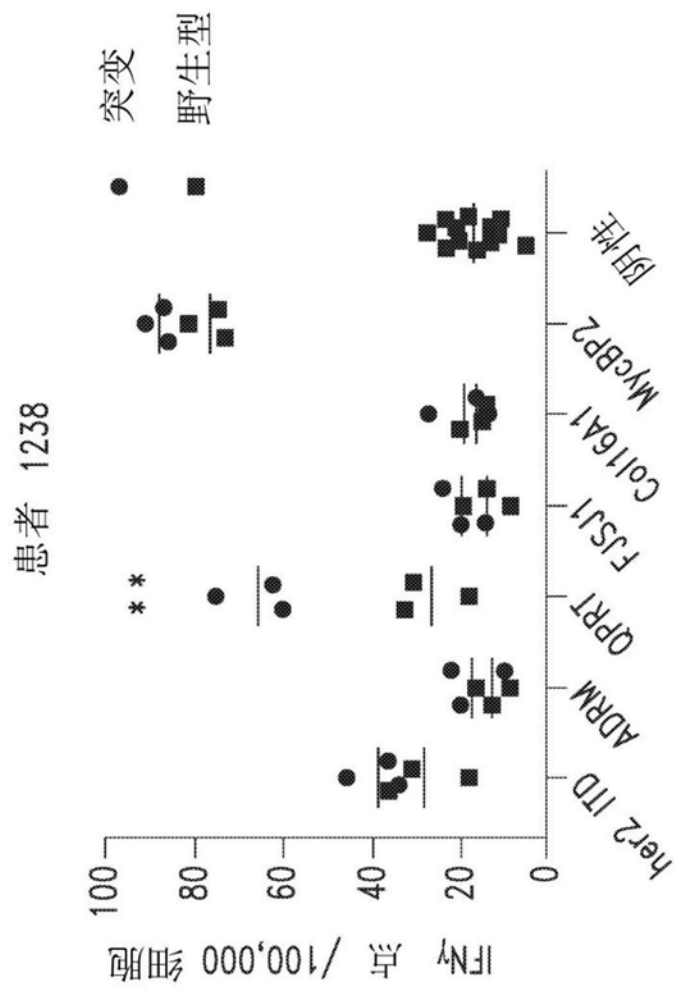


图1B(续图)

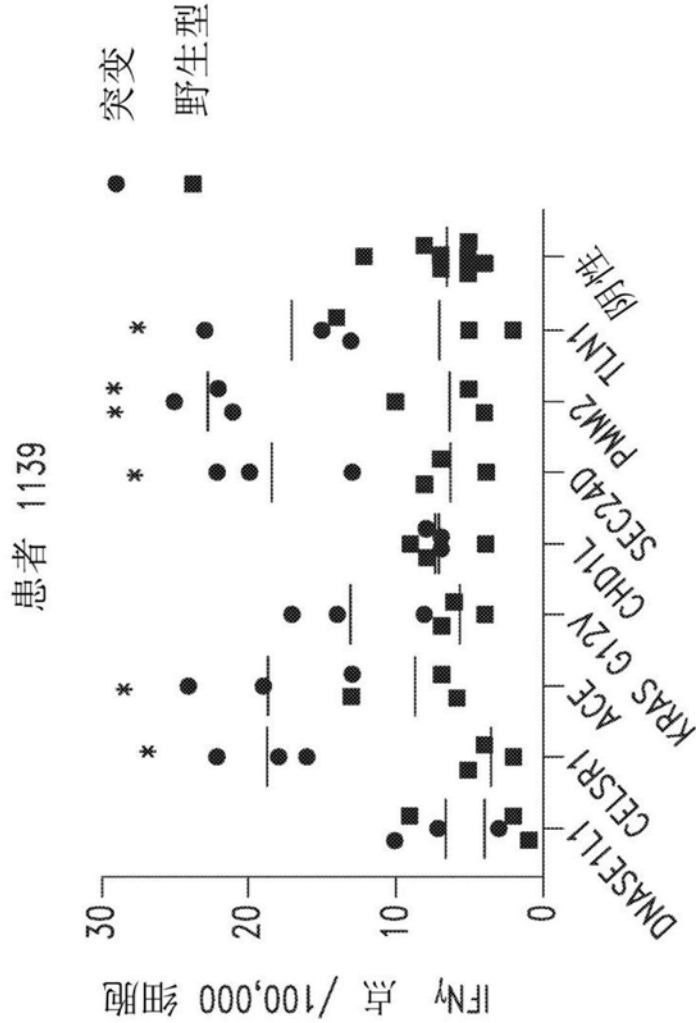


图1B(续图)

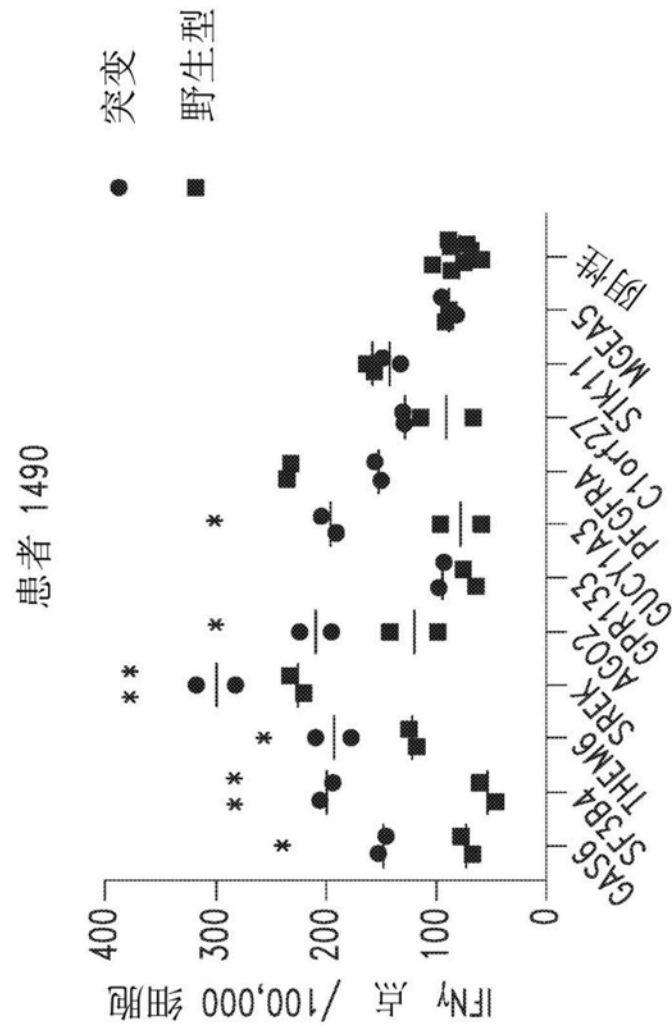


图1B(续图)

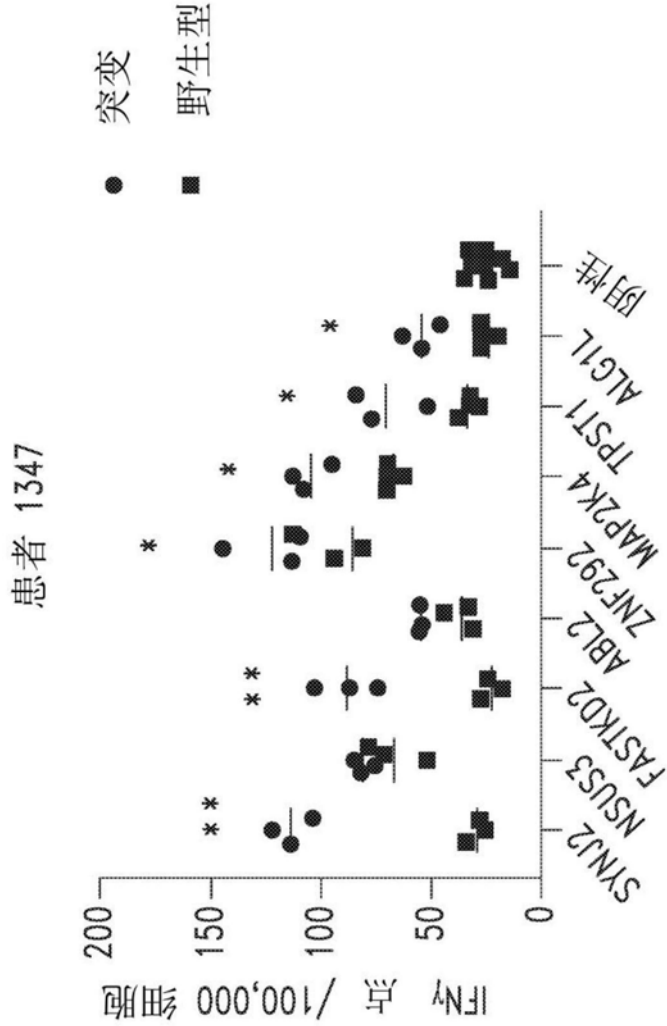


图1B(续图)

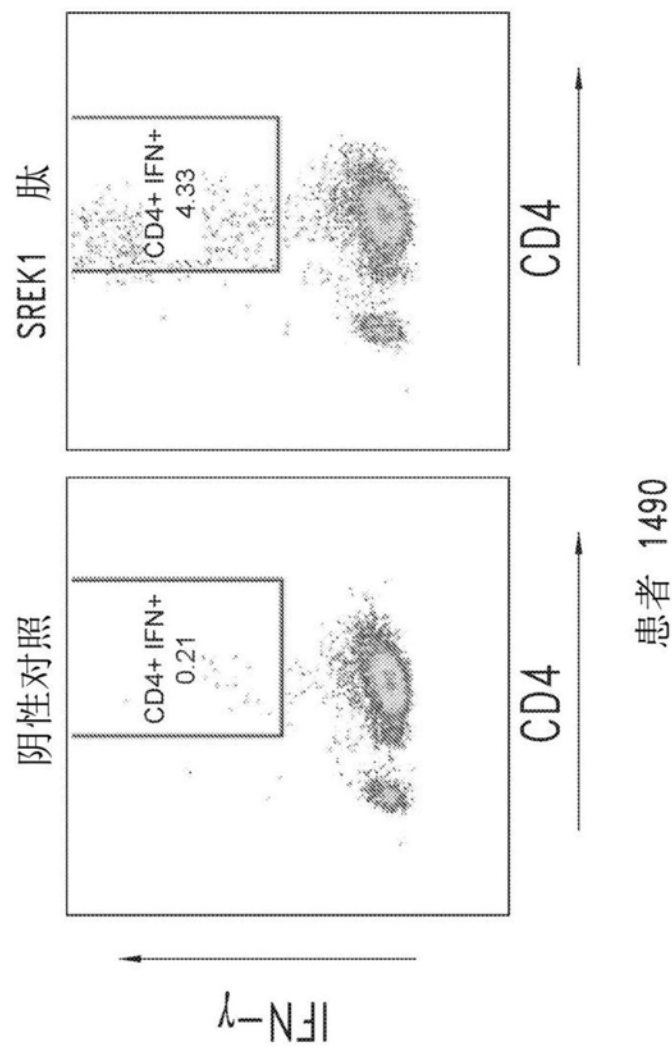


图1C

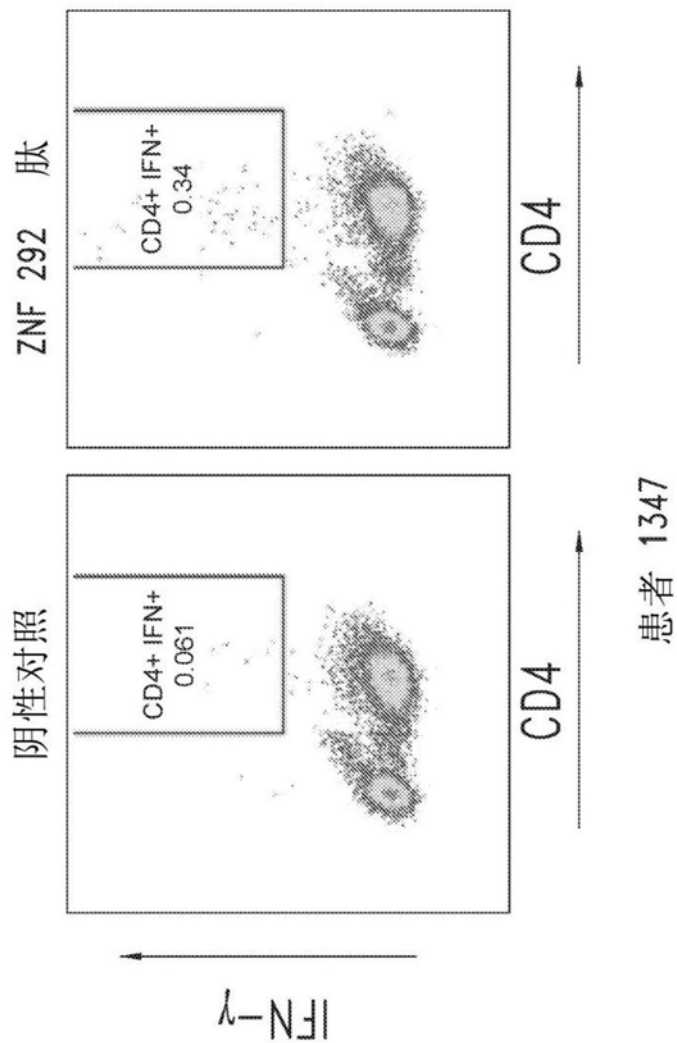


图1D

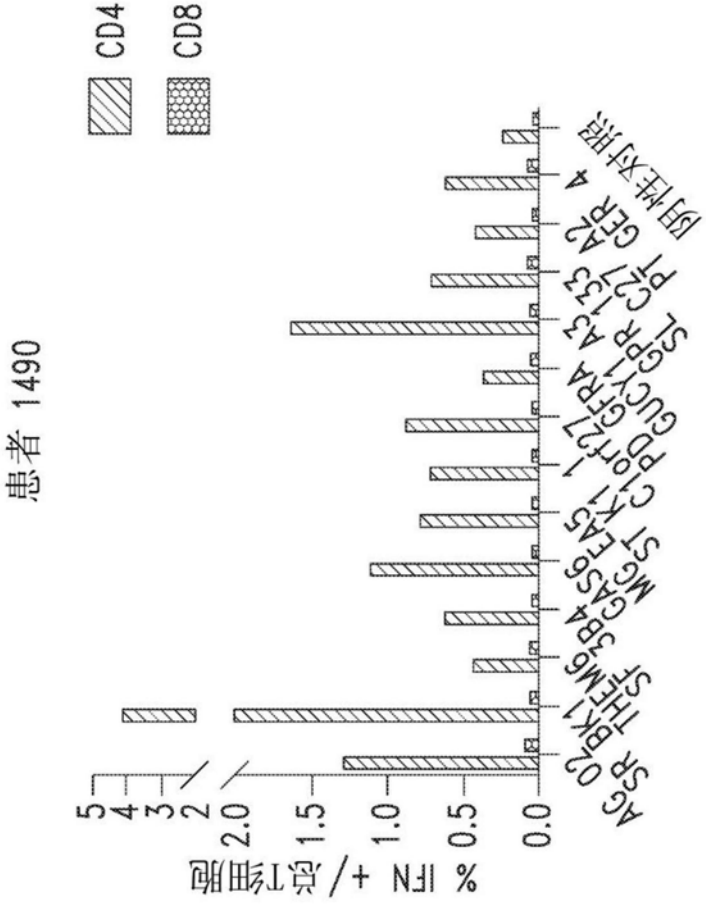


图1E

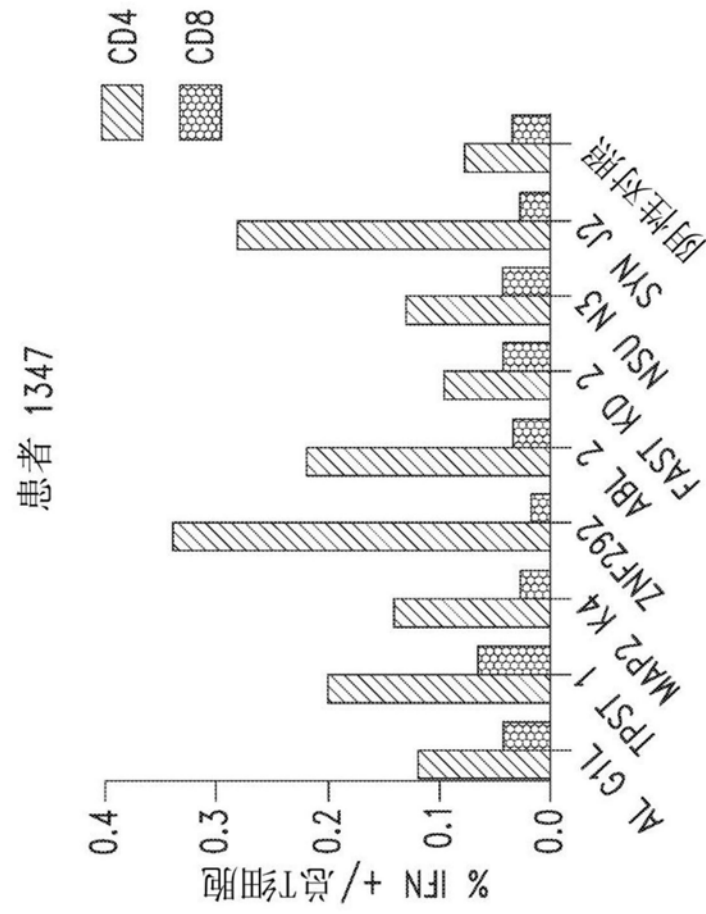


图1E (续图)

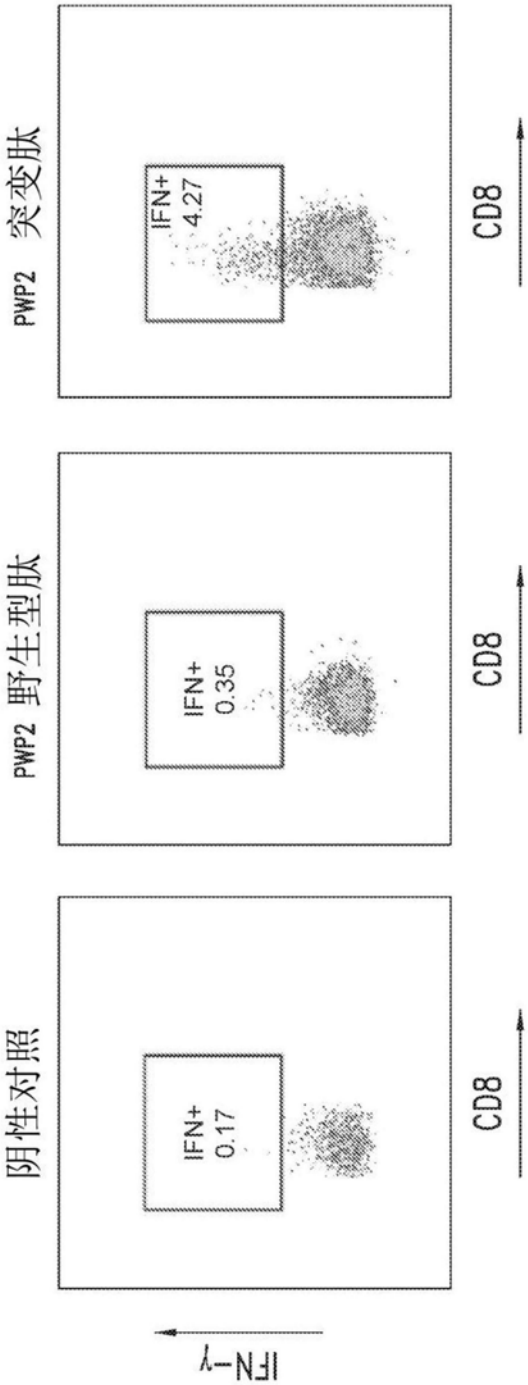


图2A

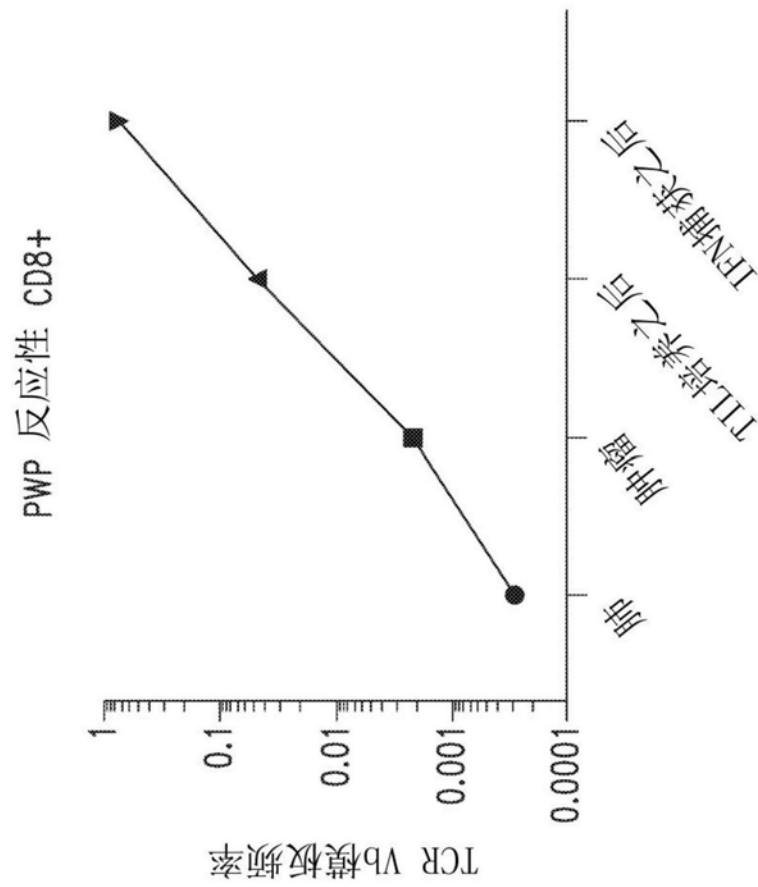


图2B

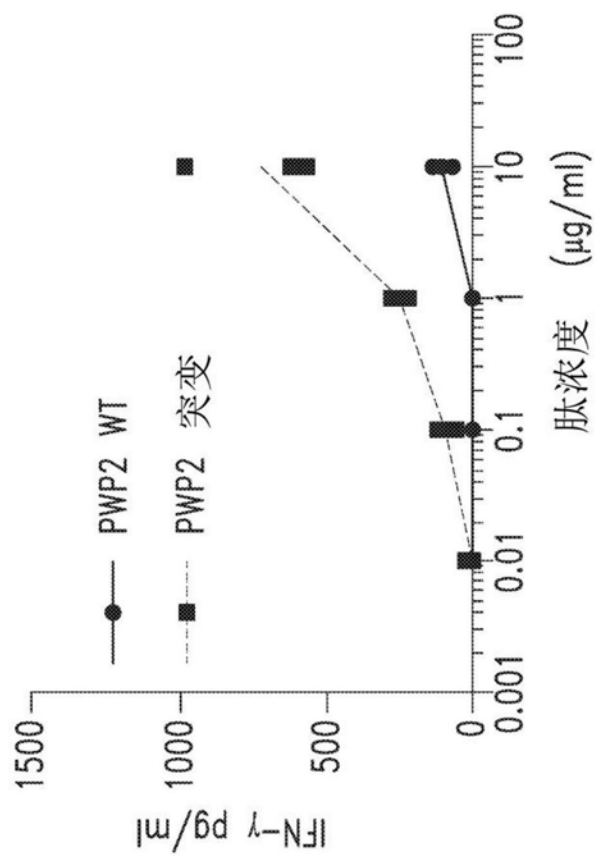


图2C

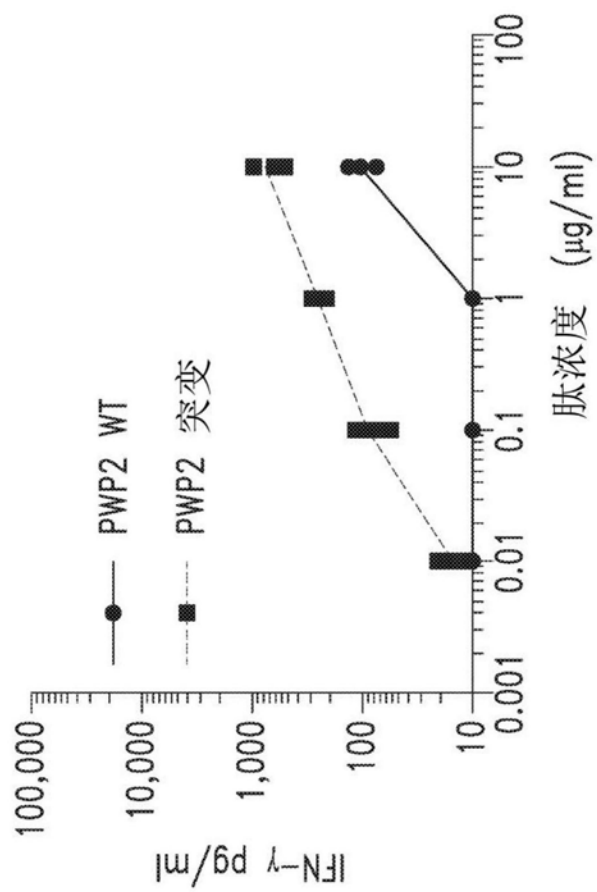


图2D

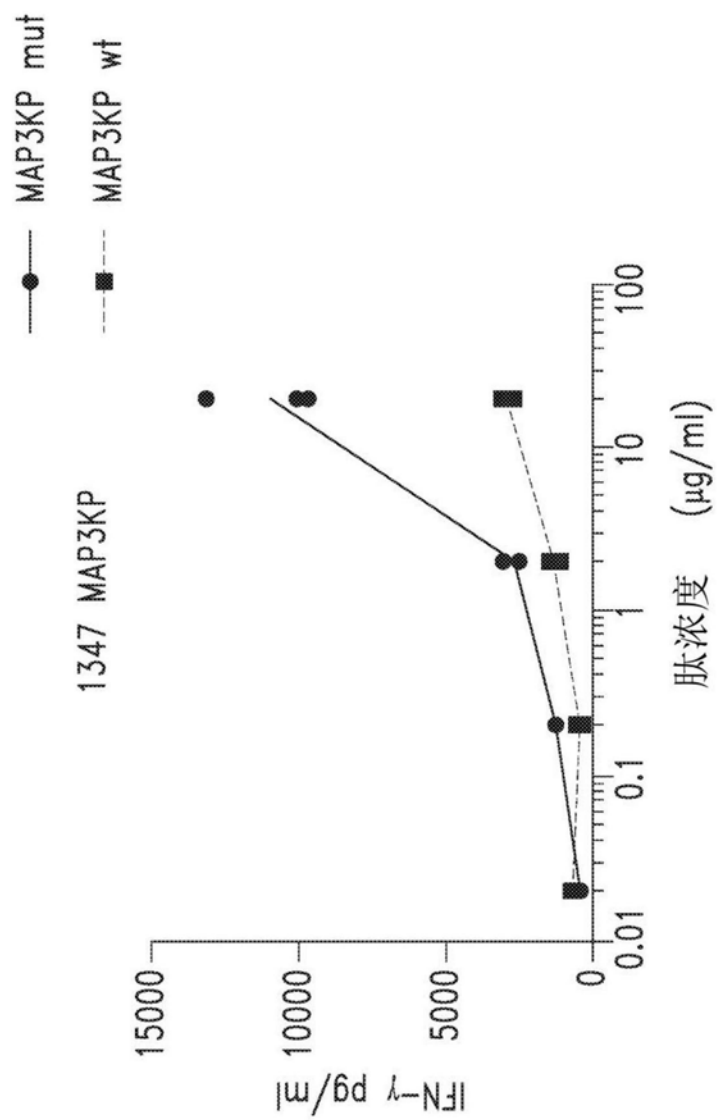


图3A

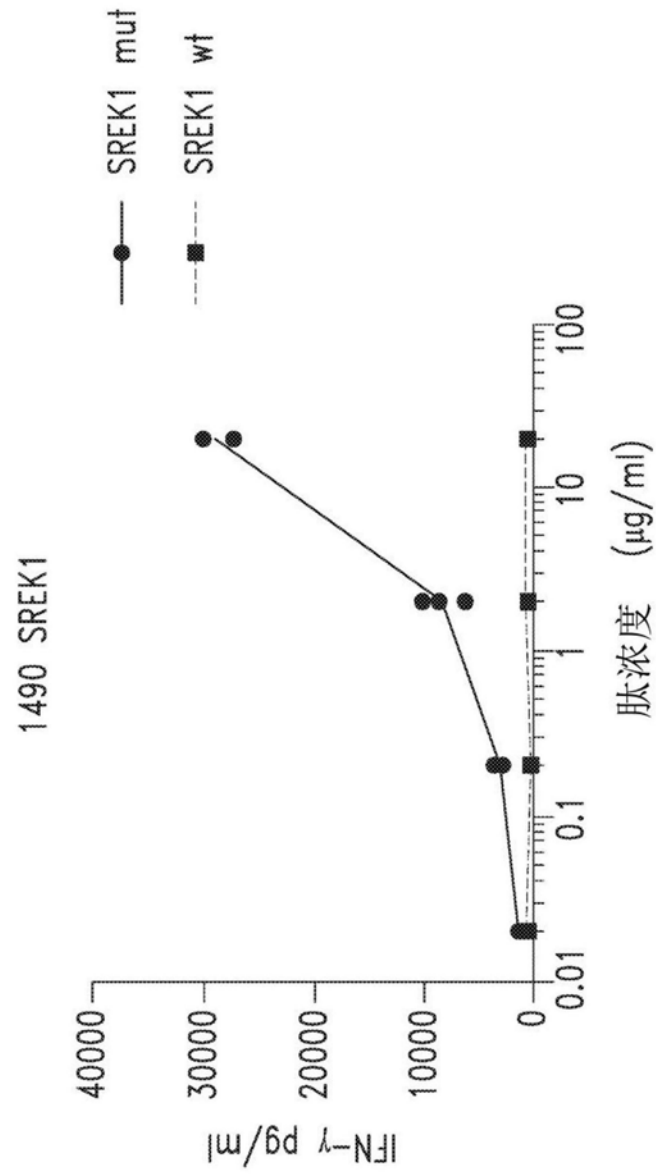


图3B

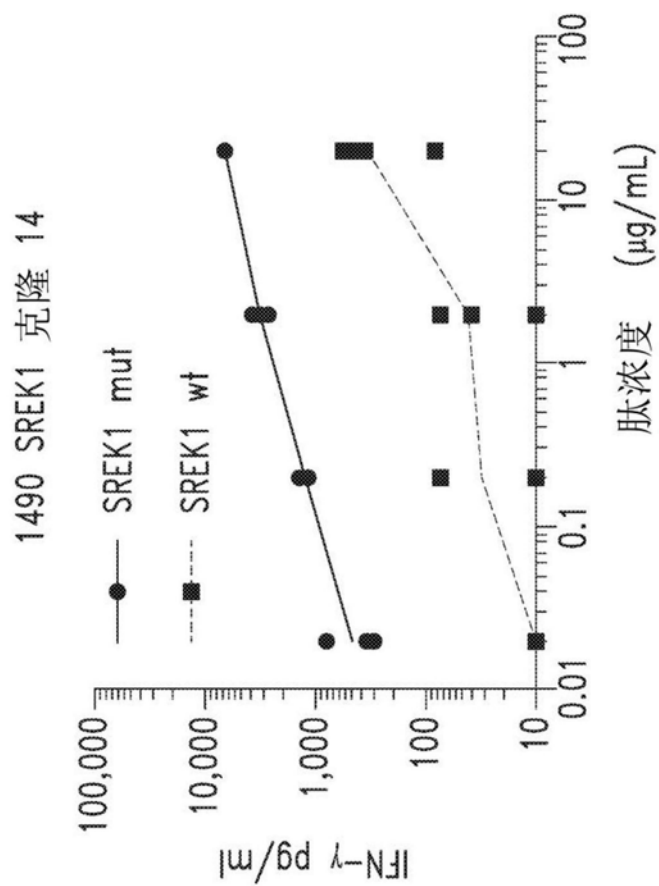


图3C

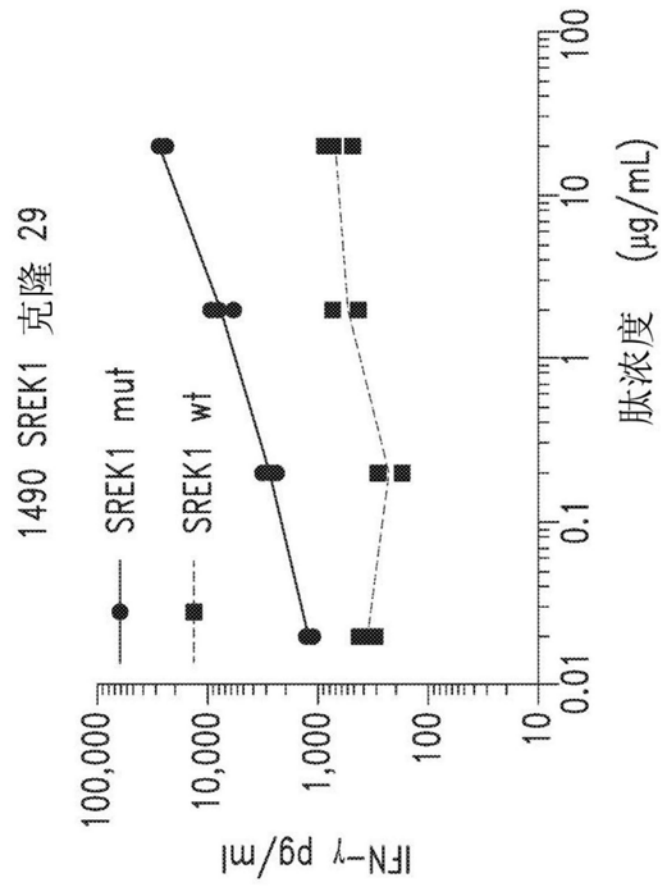


图3D

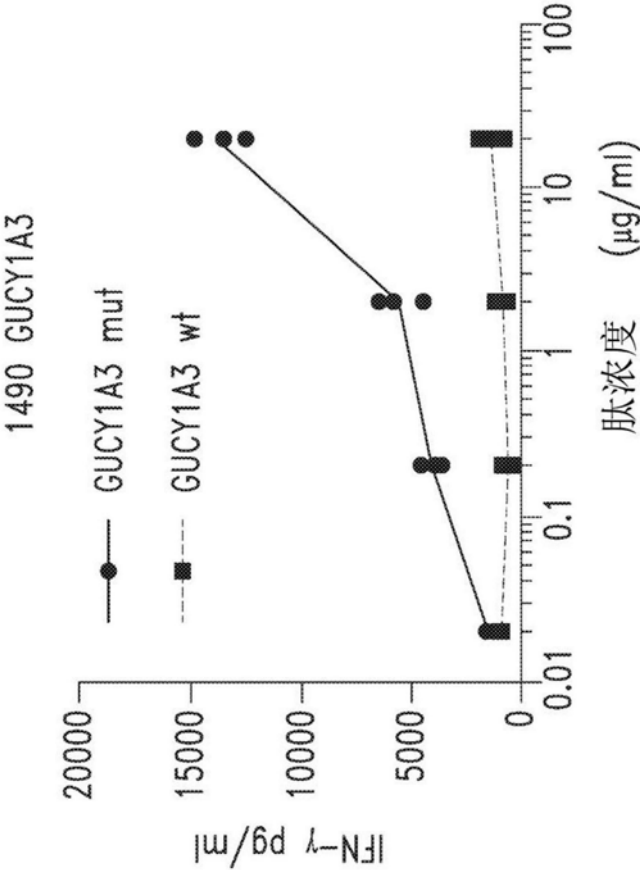


图3E

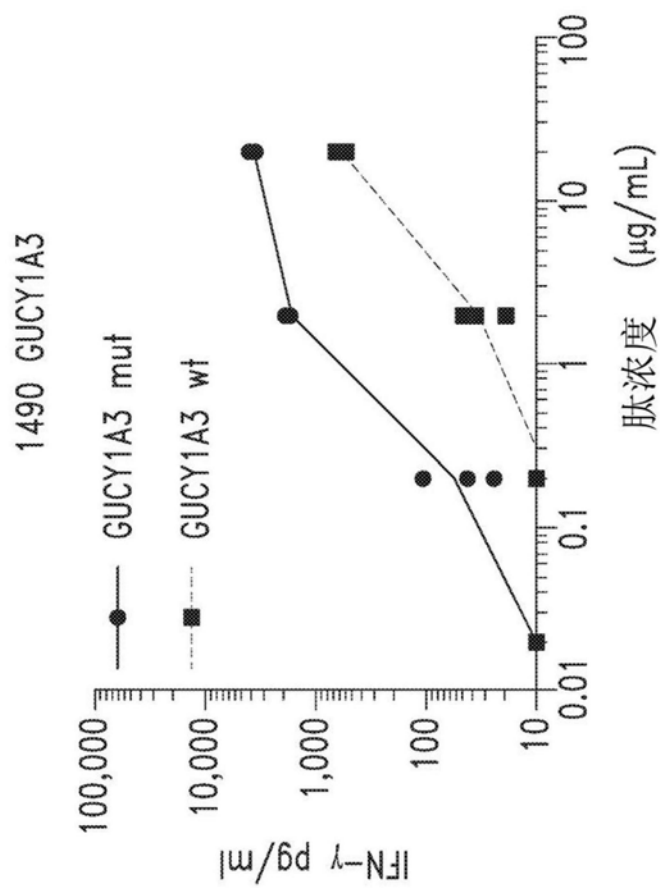


图3F

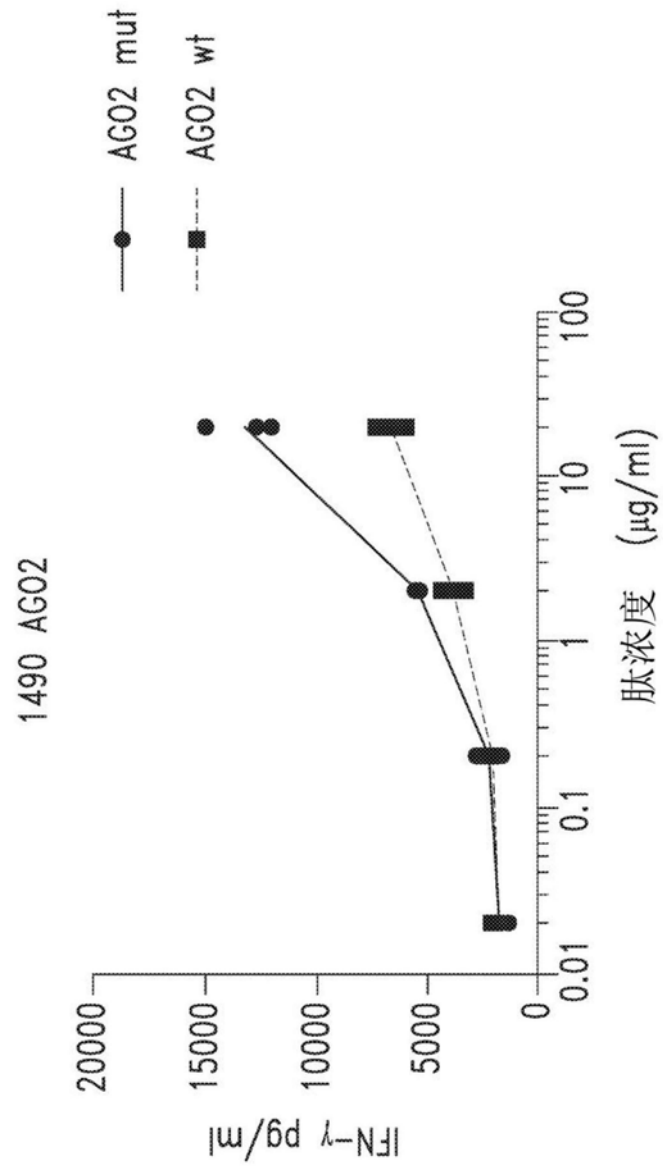


图3G

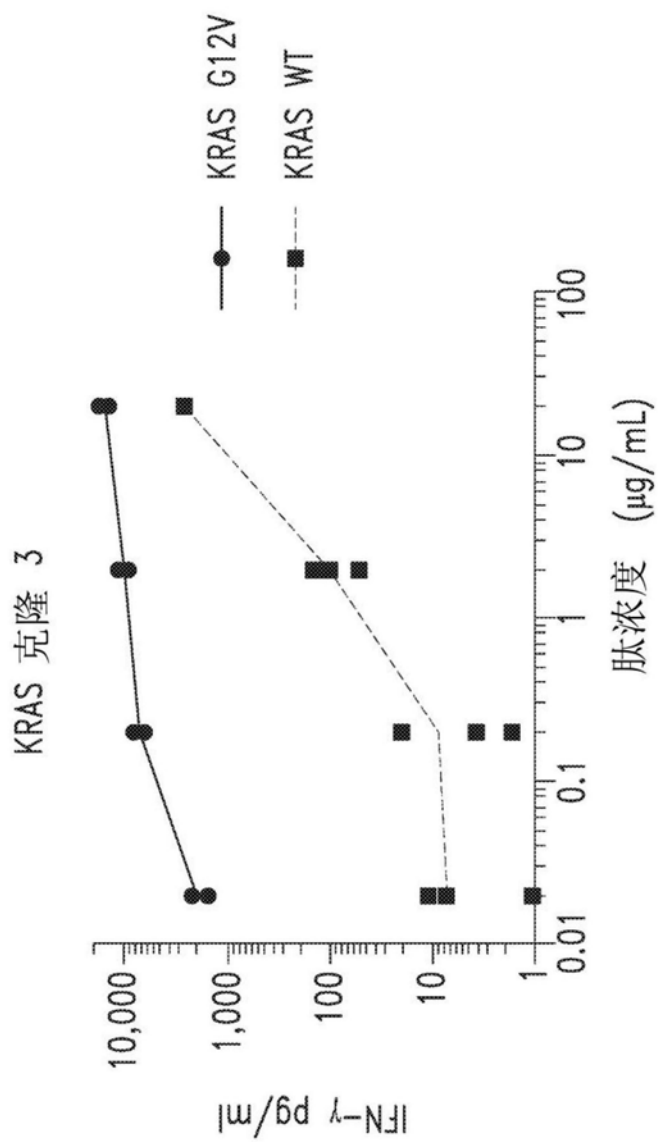


图4A

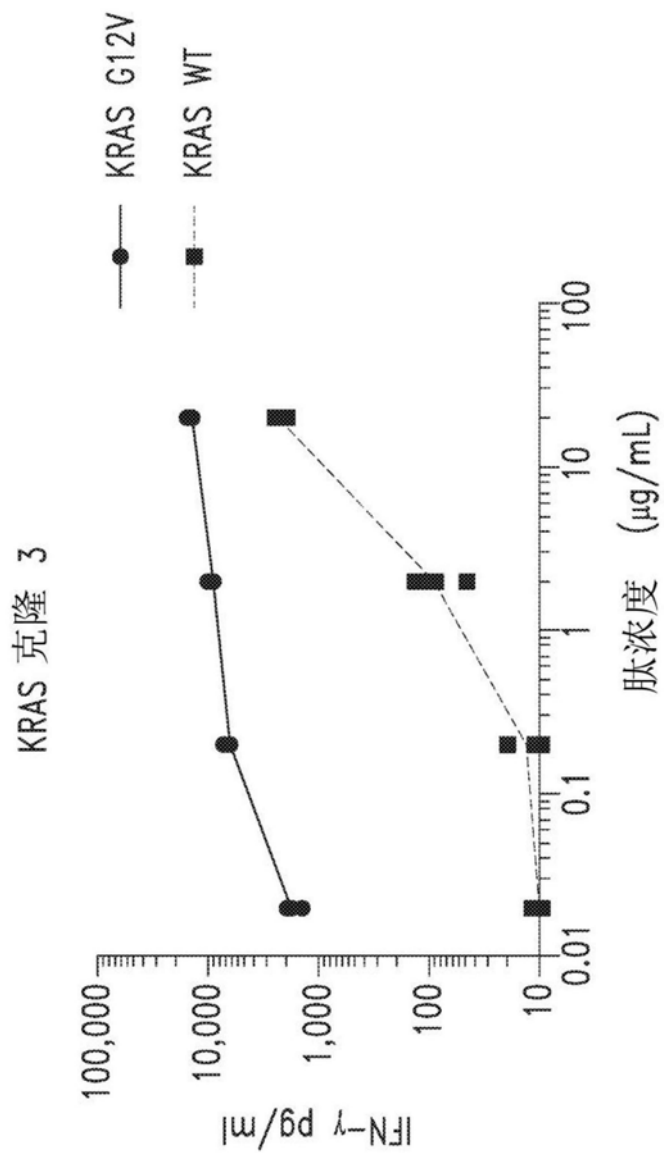


图4A (续图)

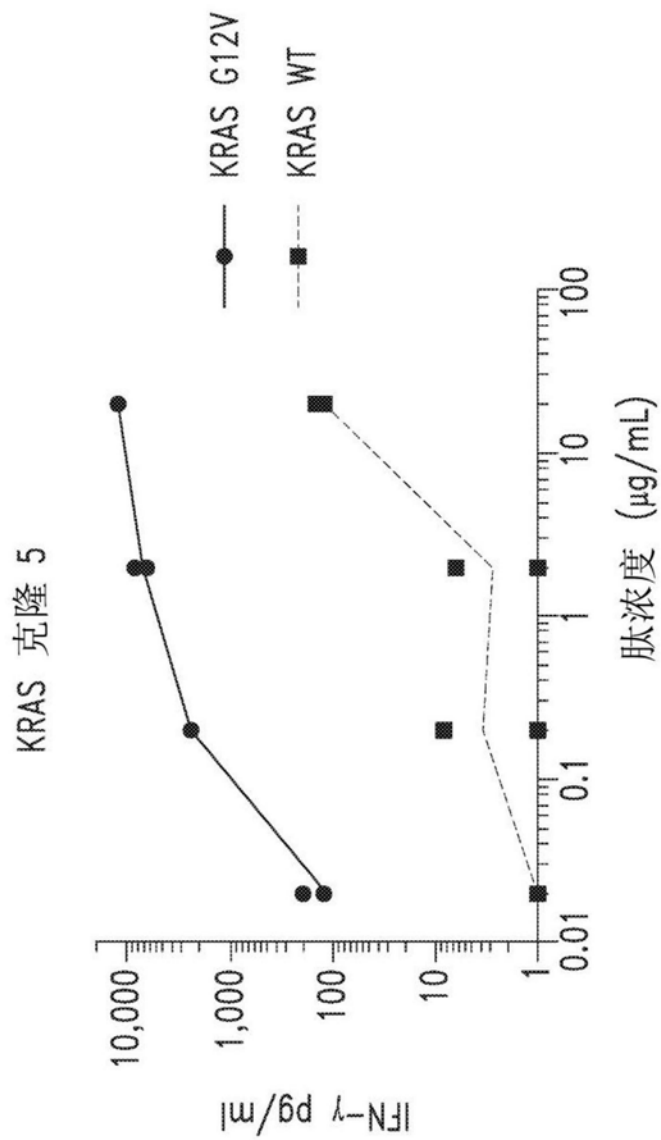


图4A (续图)

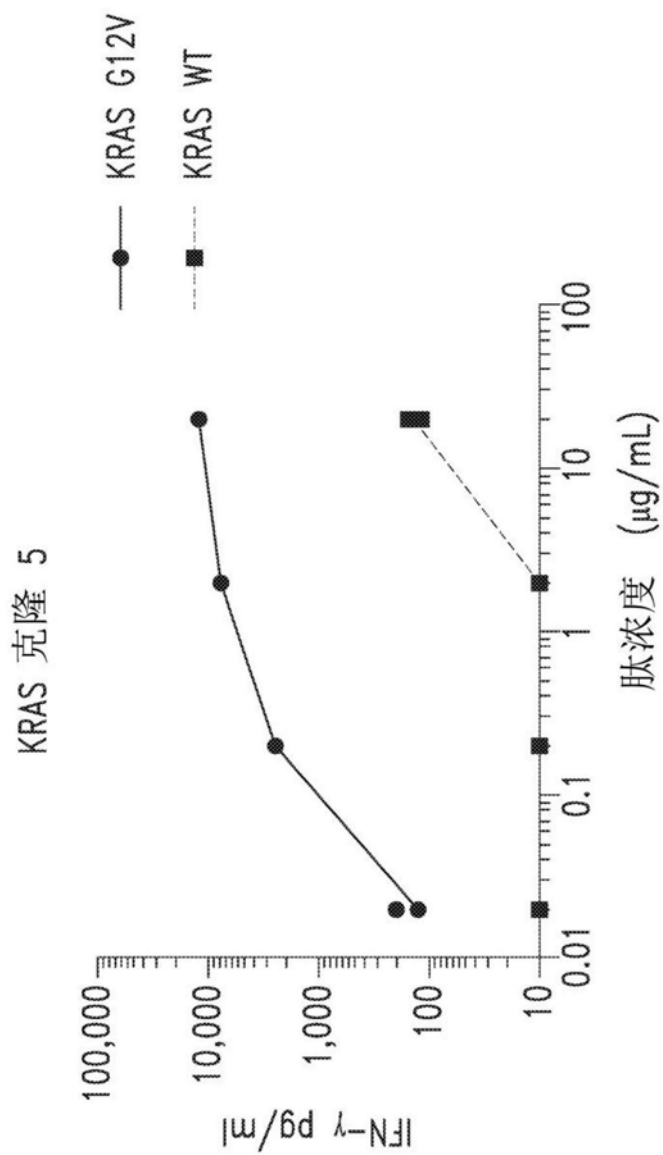


图4A(续图)

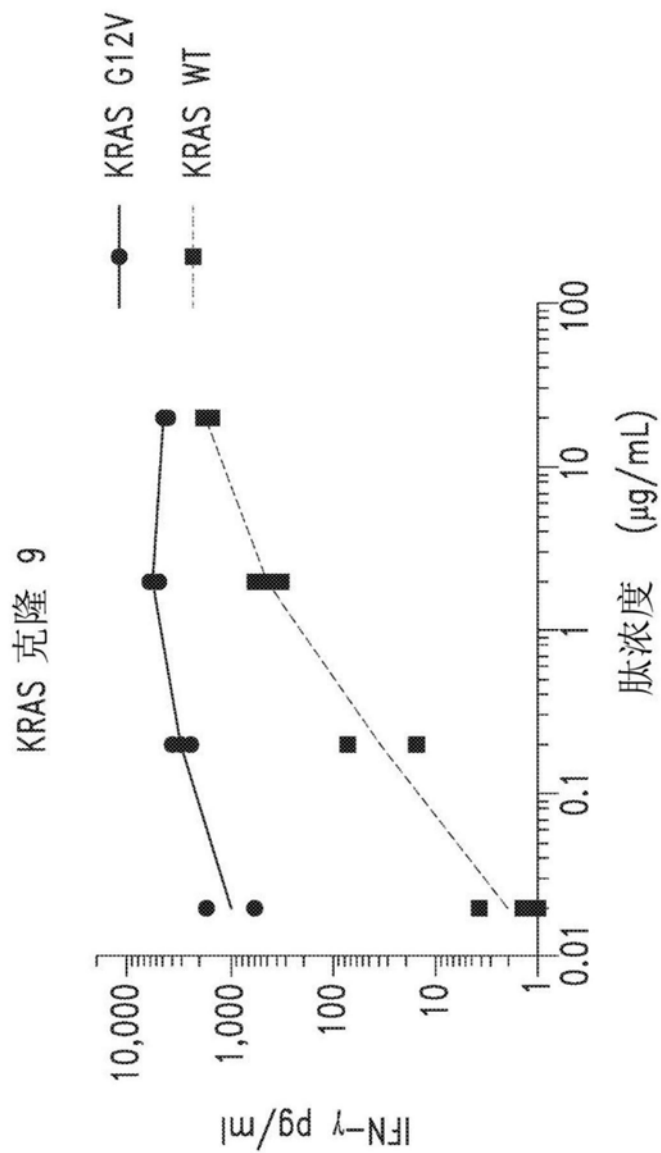


图4A(续图)

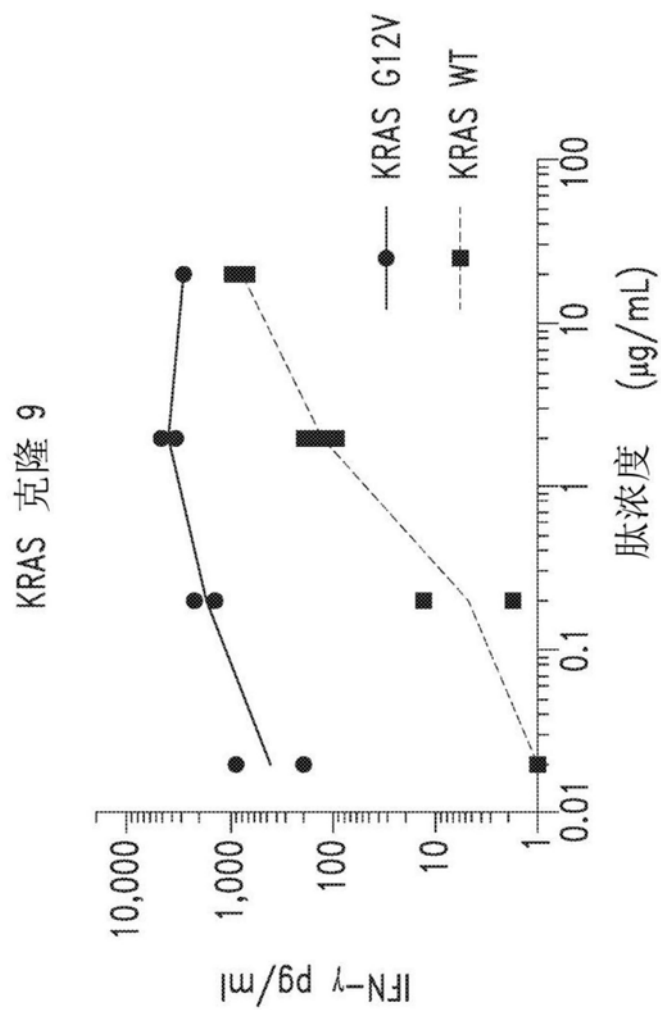


图4A(续图)

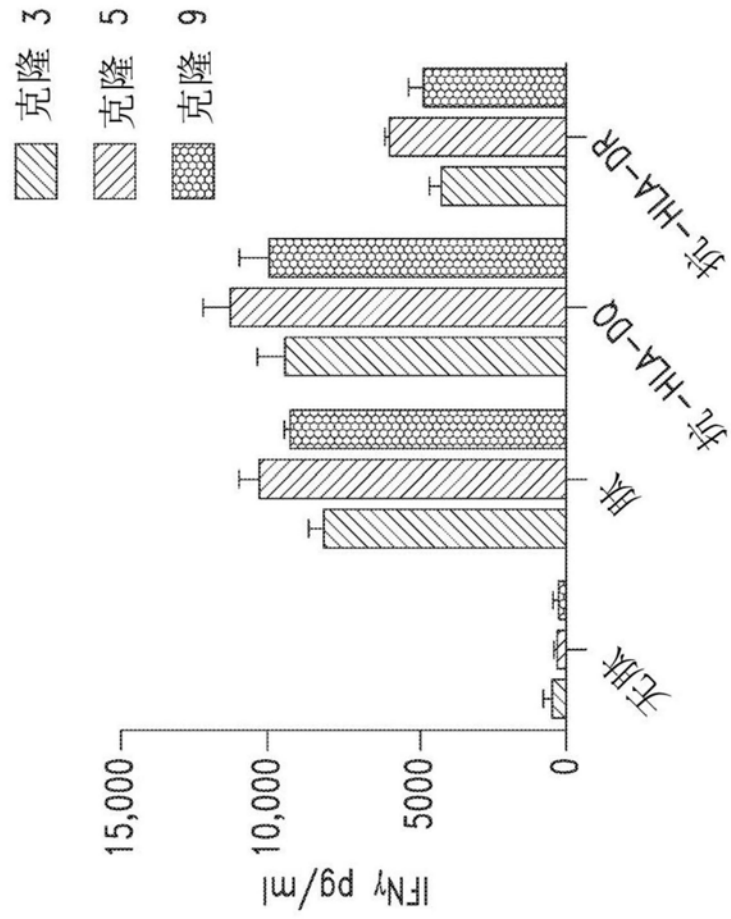


图4B

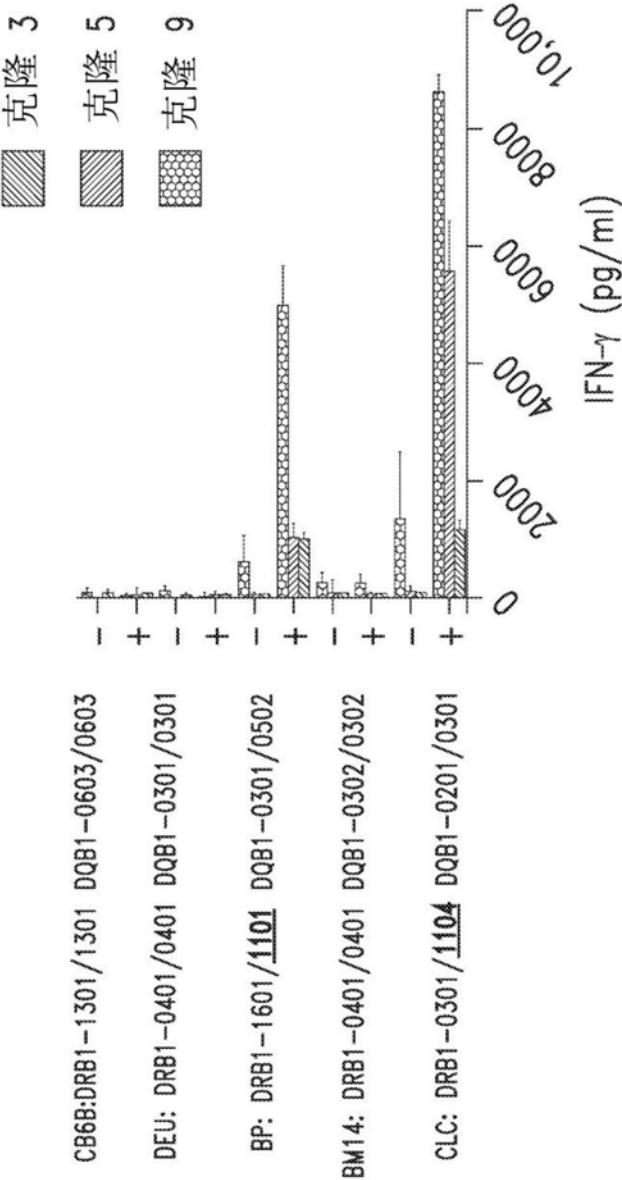


图4C

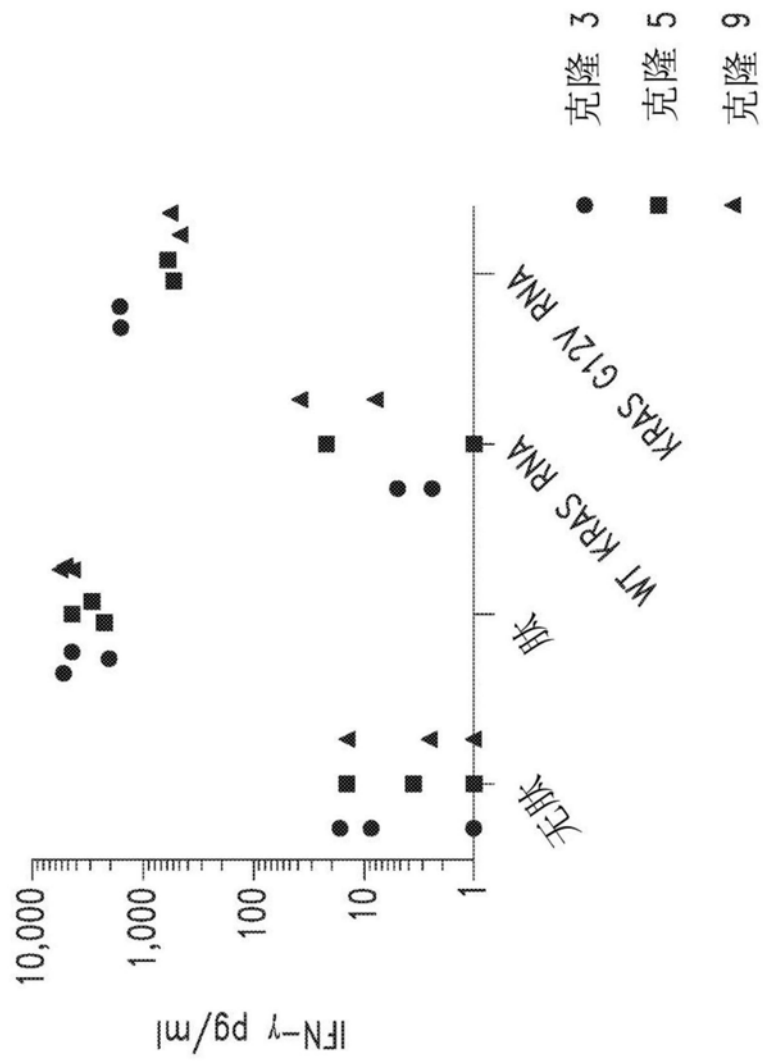


图4D

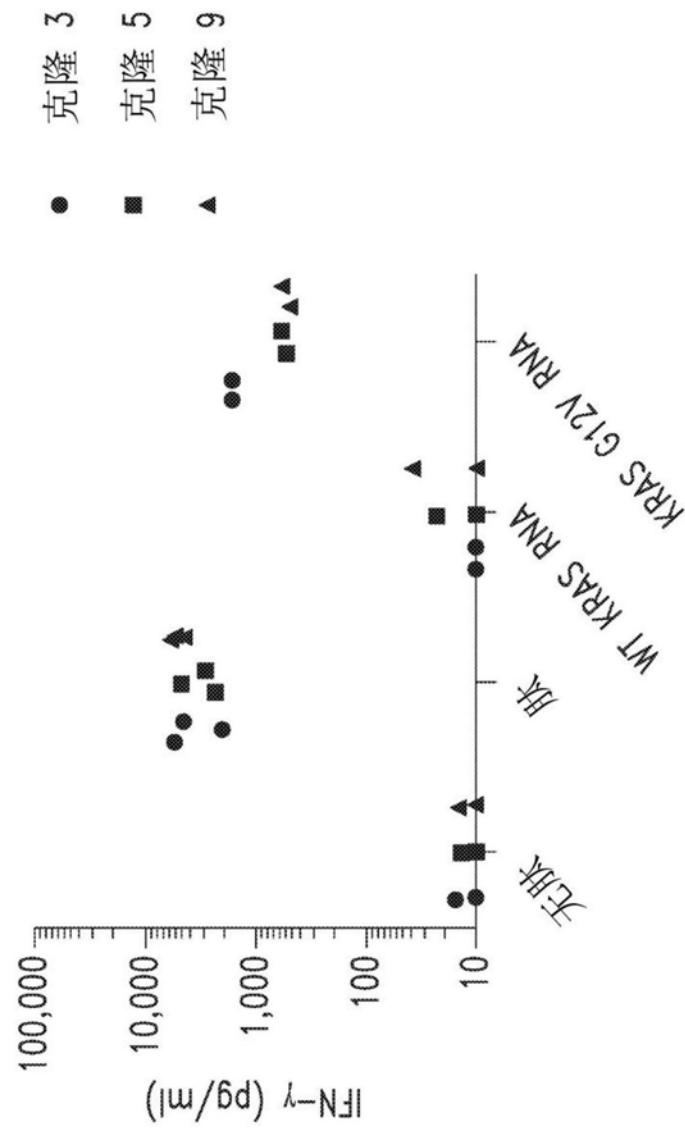


图4E

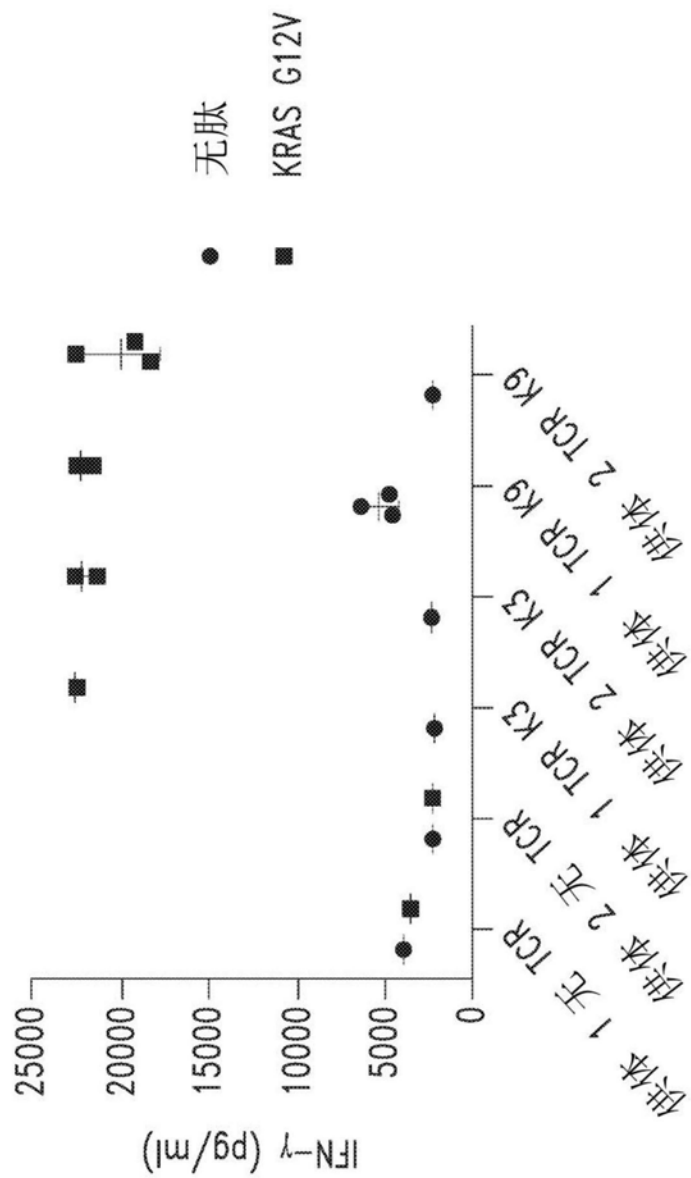


图4F

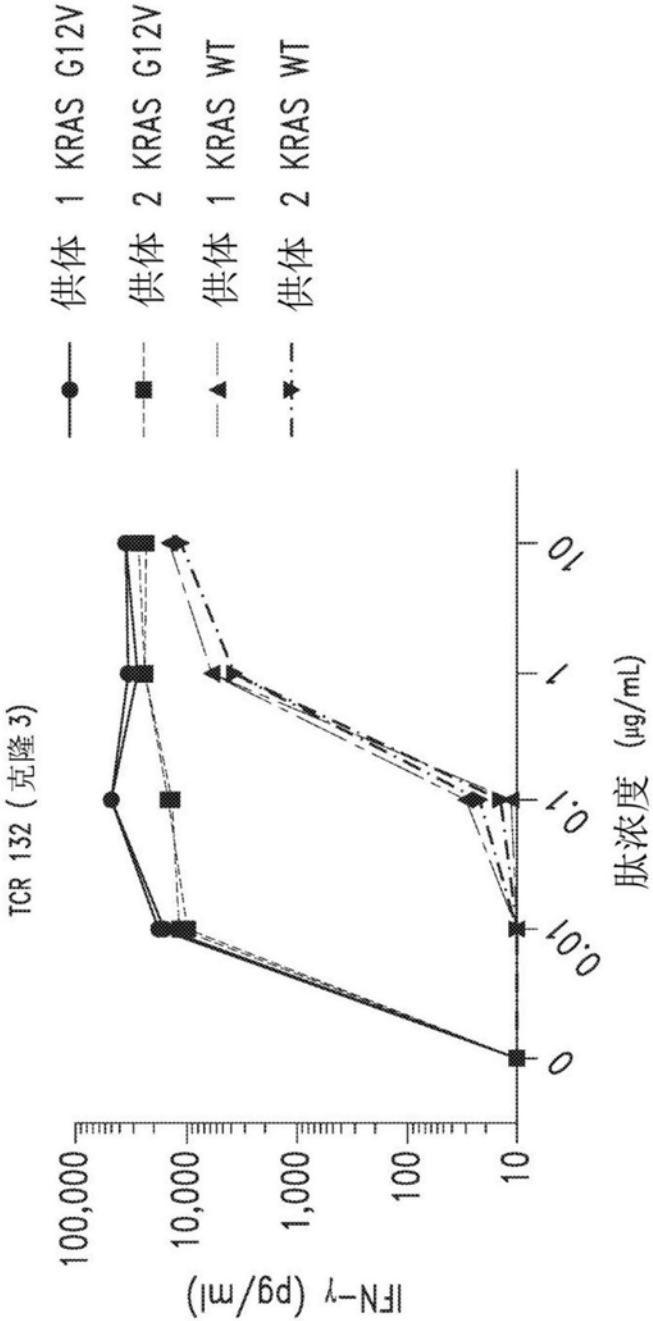


图4G

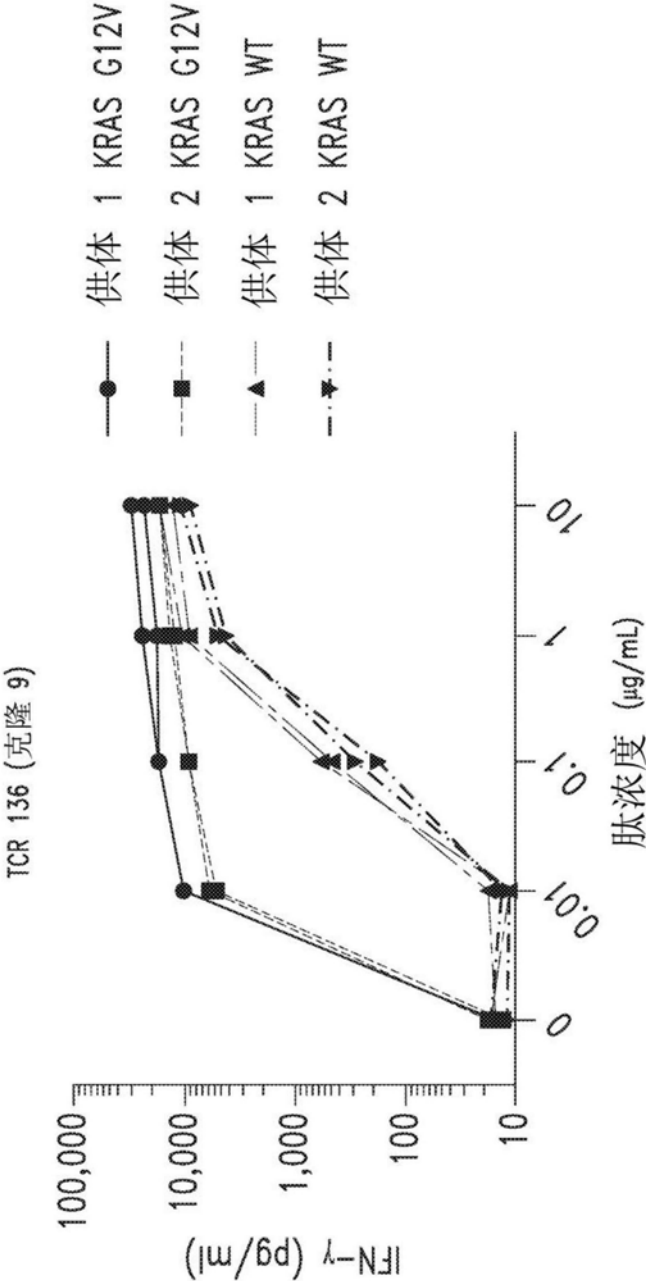


图4H

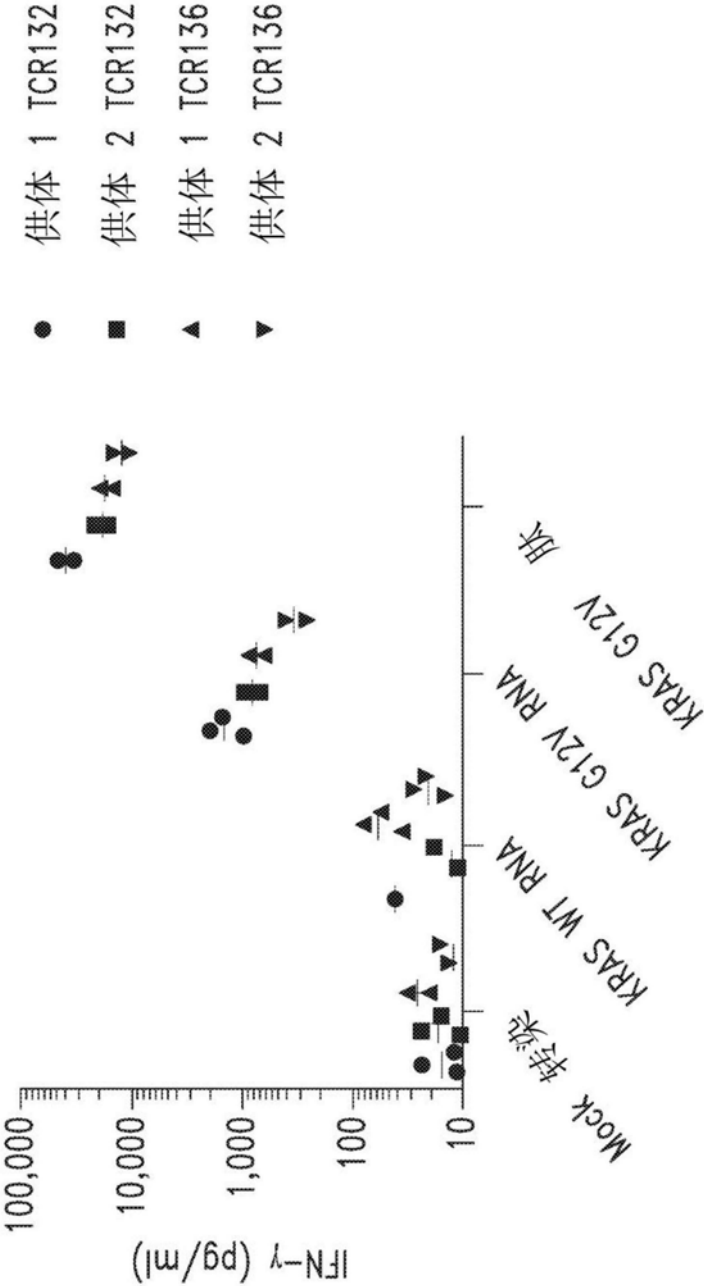


图4I

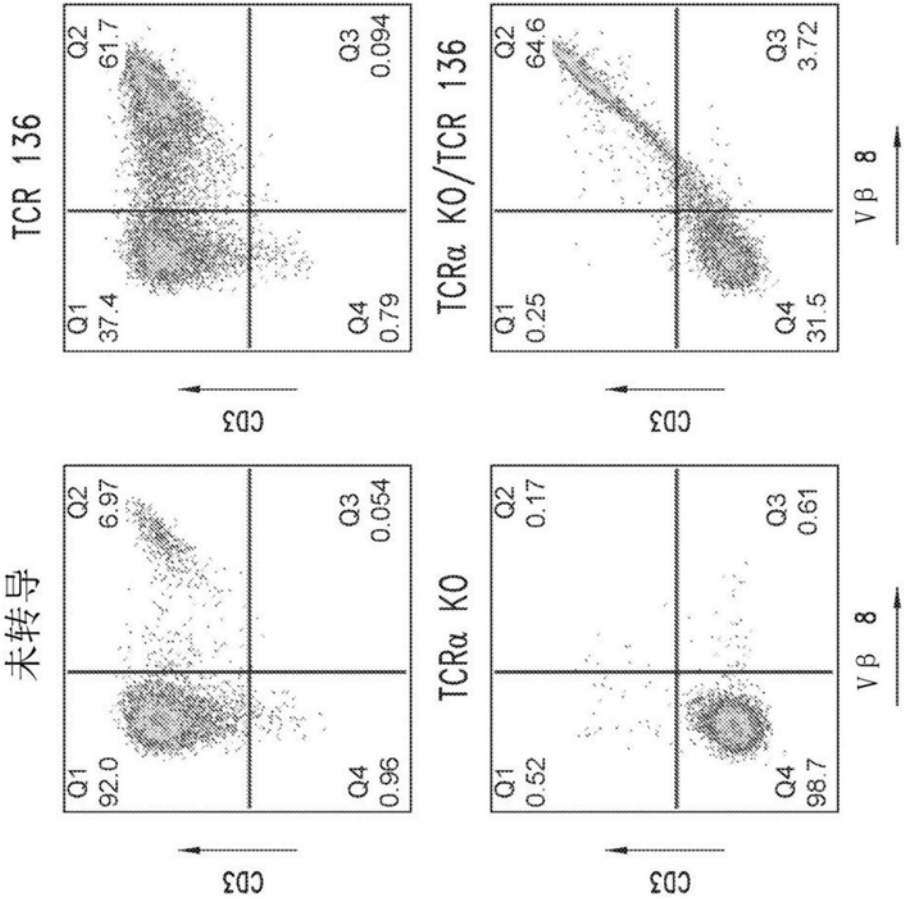


图4J

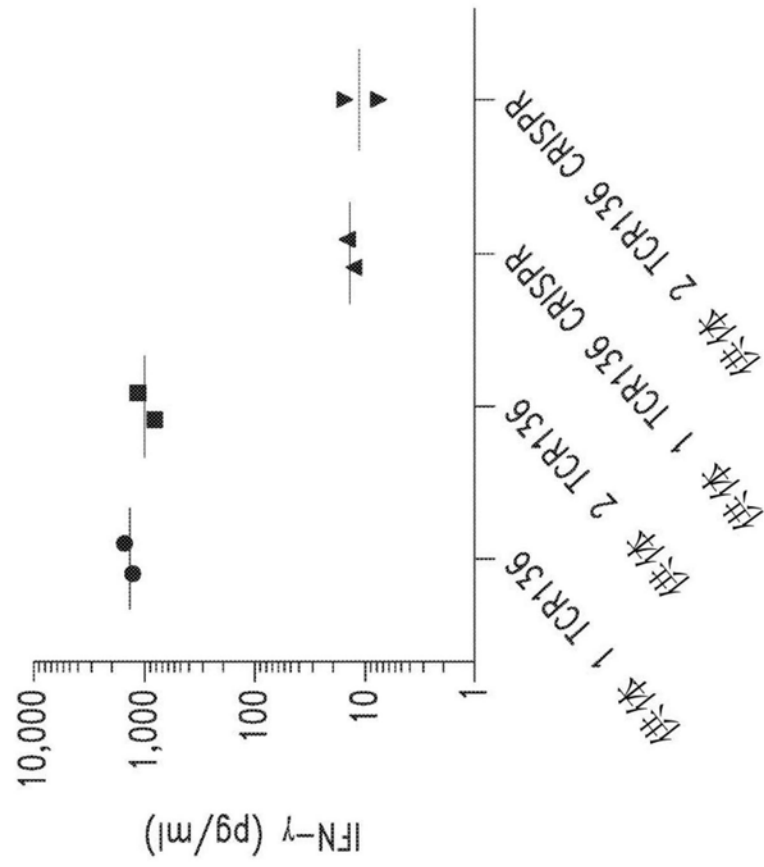


图4K

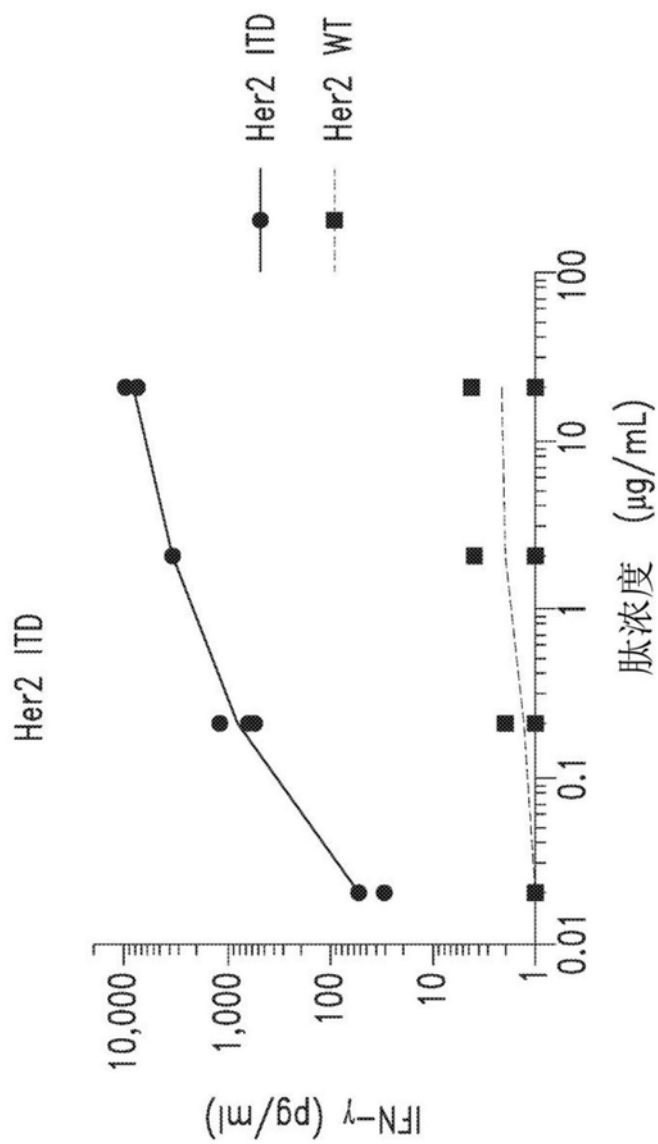


图5A

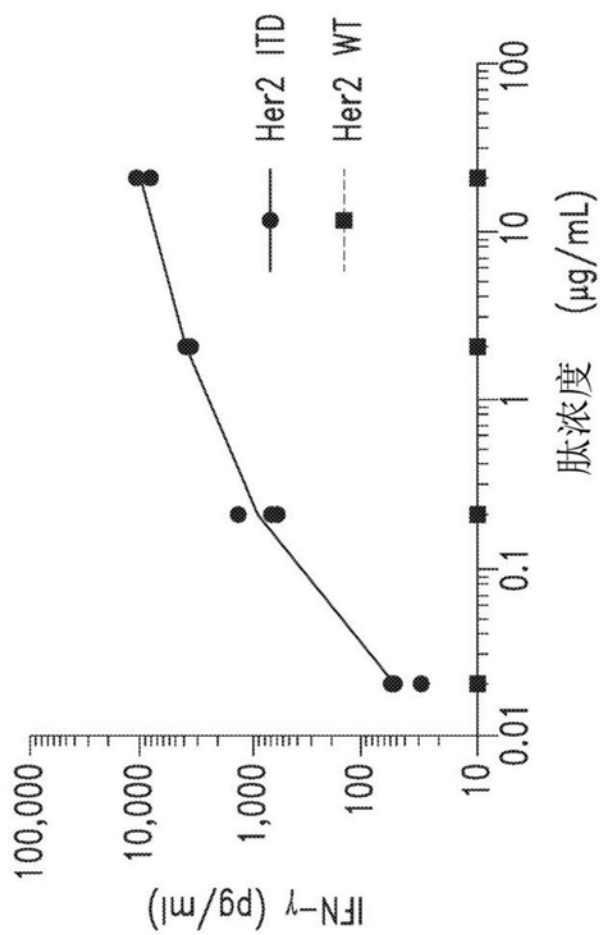


图5B

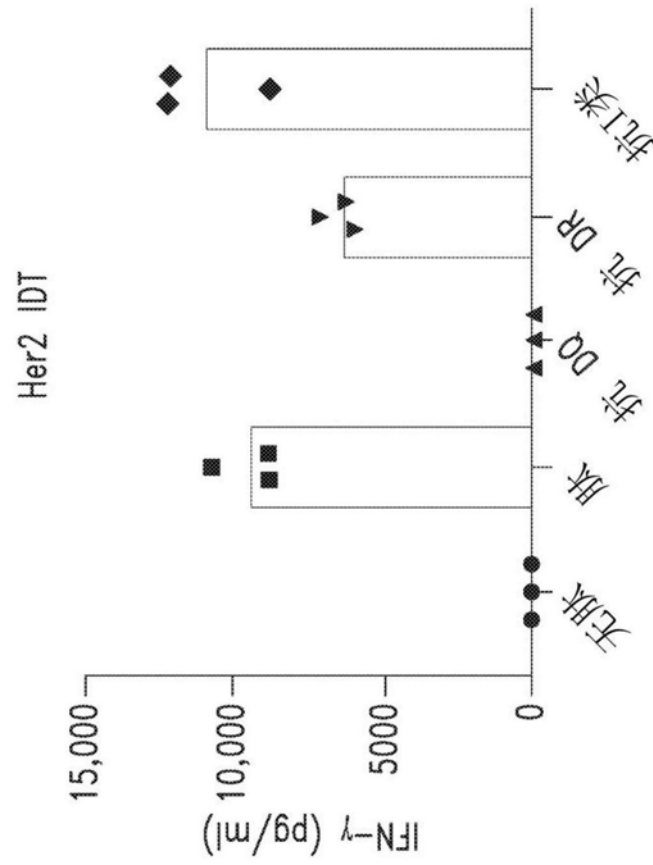


图5C

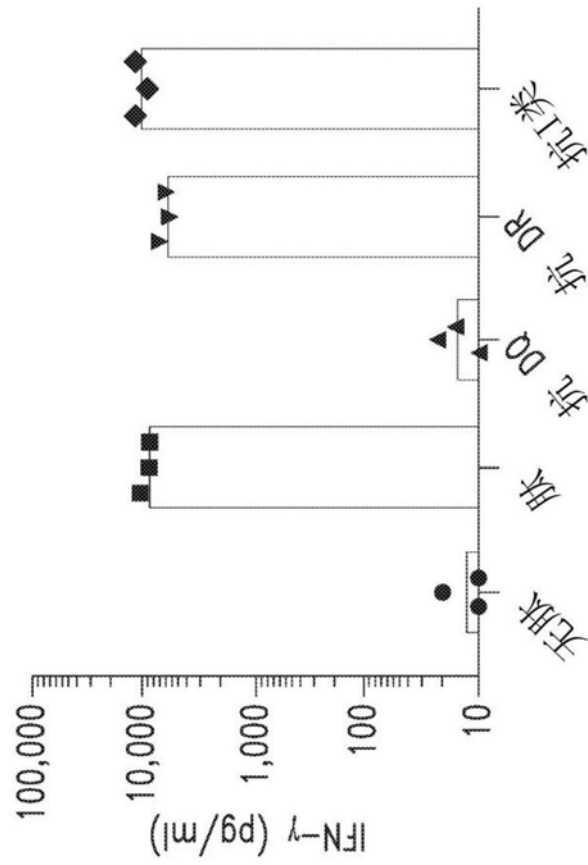


图5D

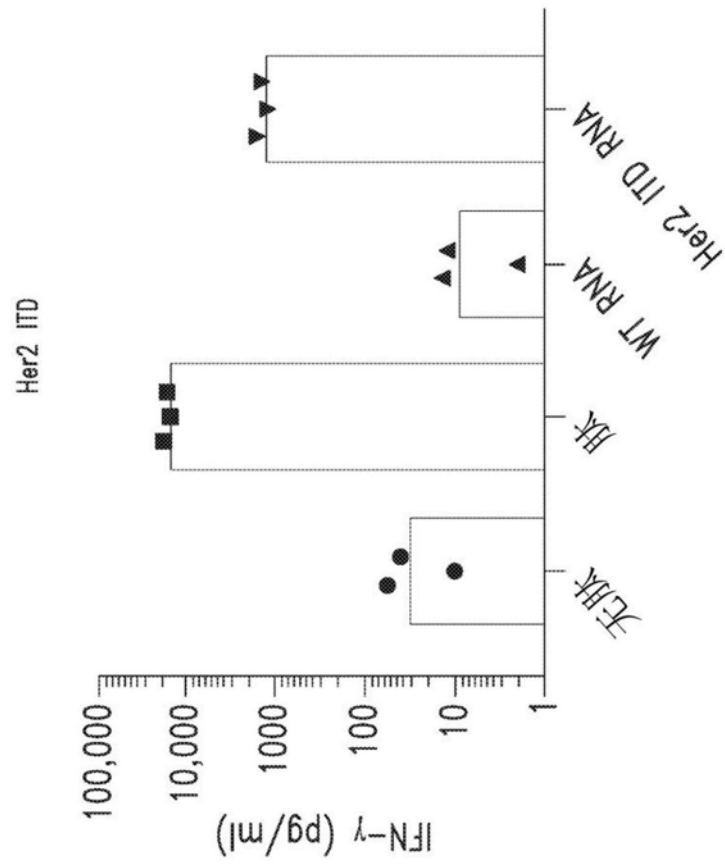


图5E

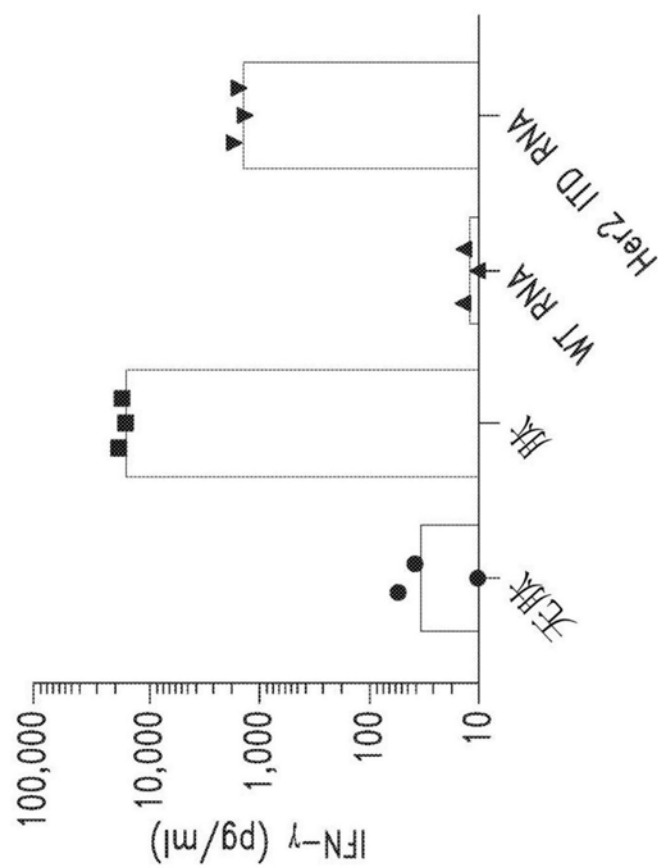


图5F

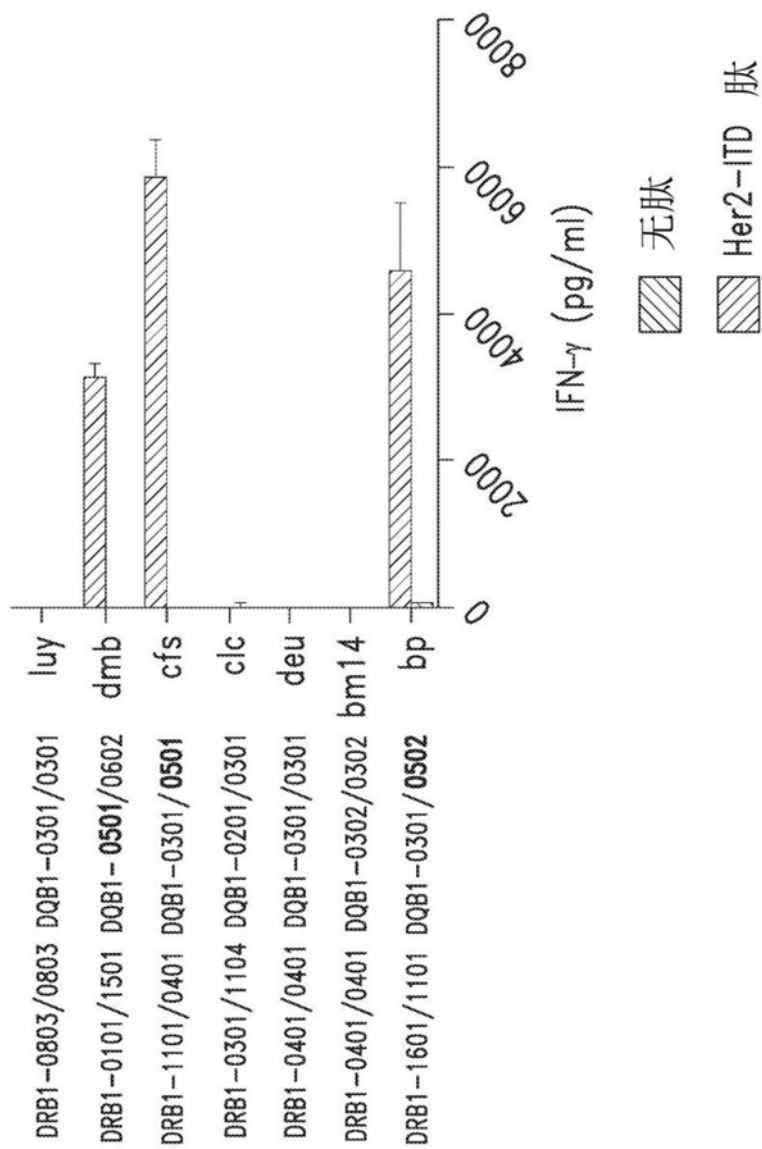


图5G

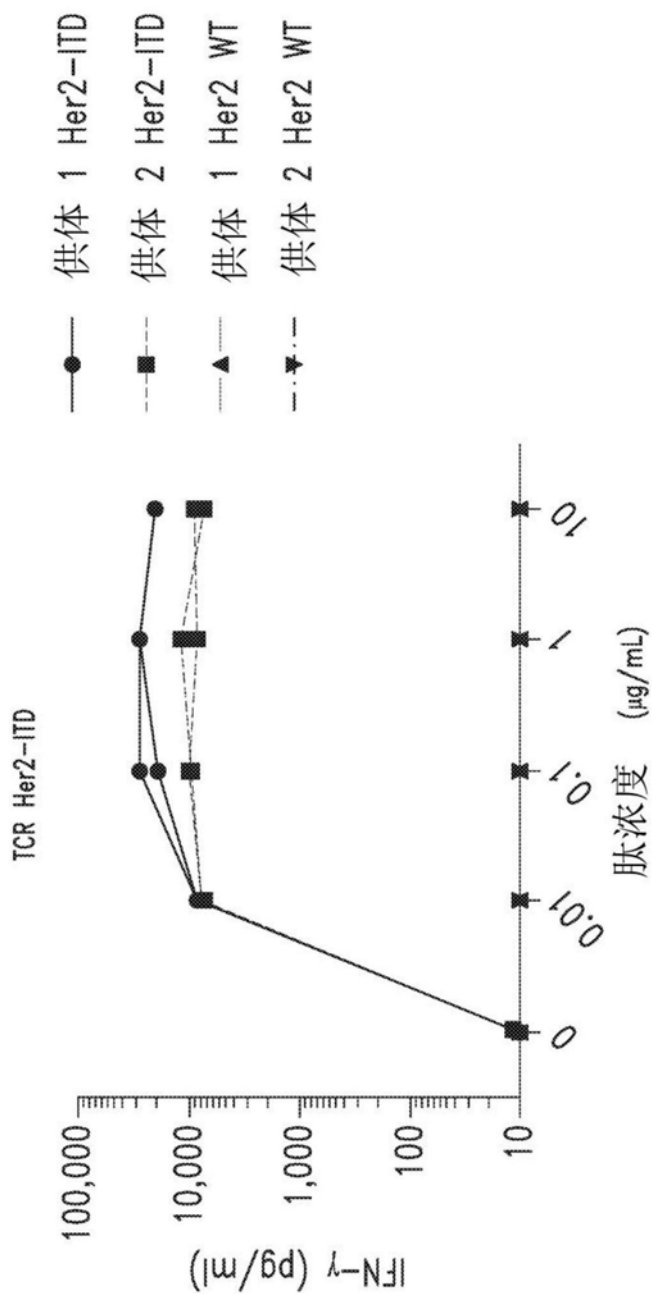


图5H

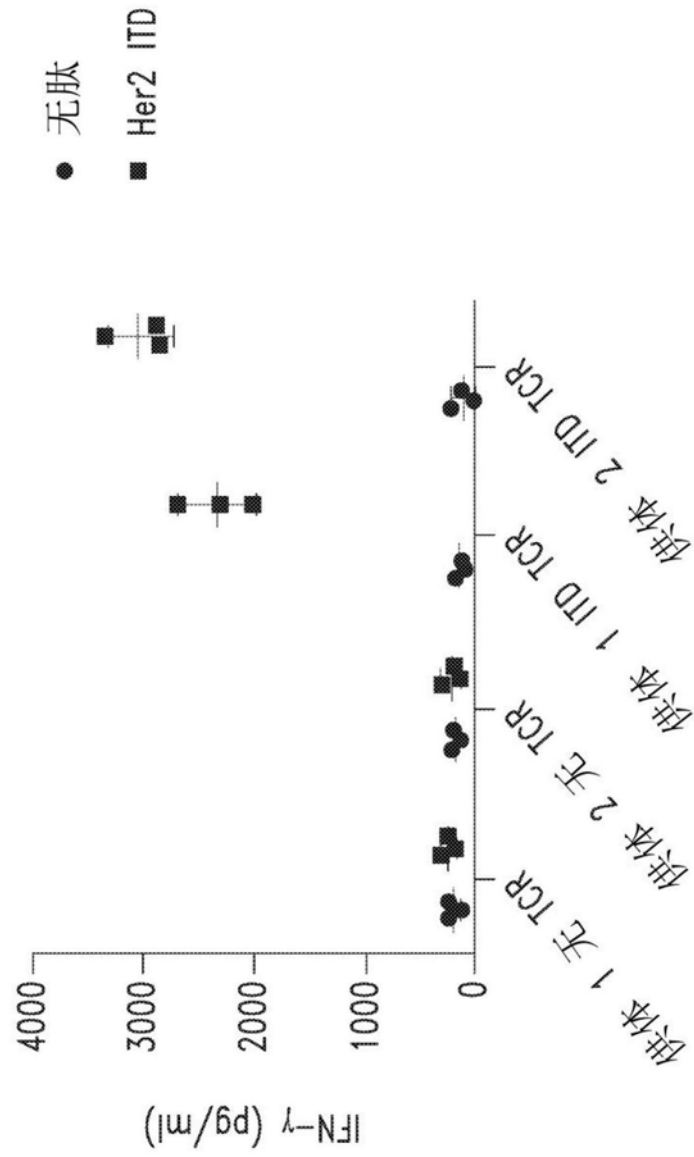


图5I

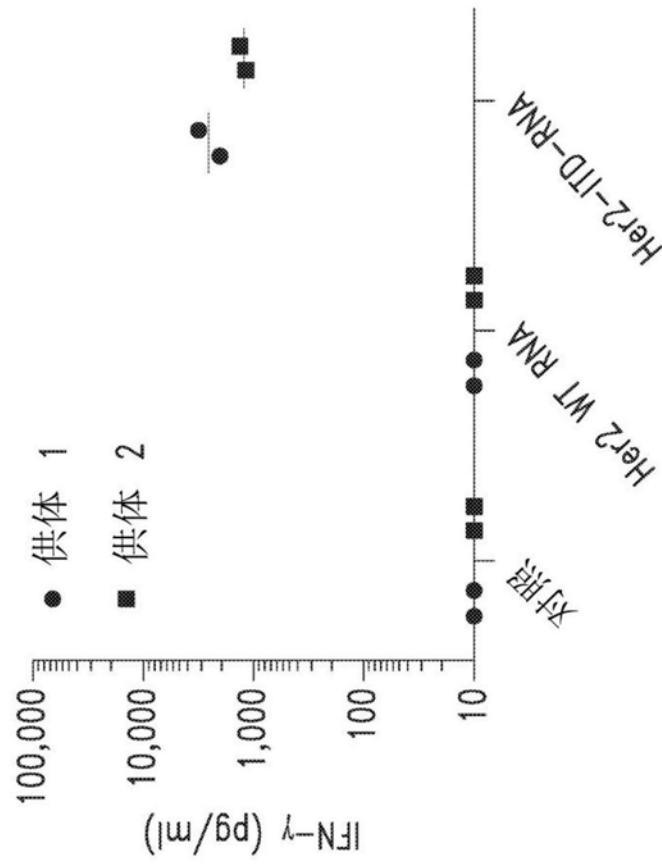


图5J

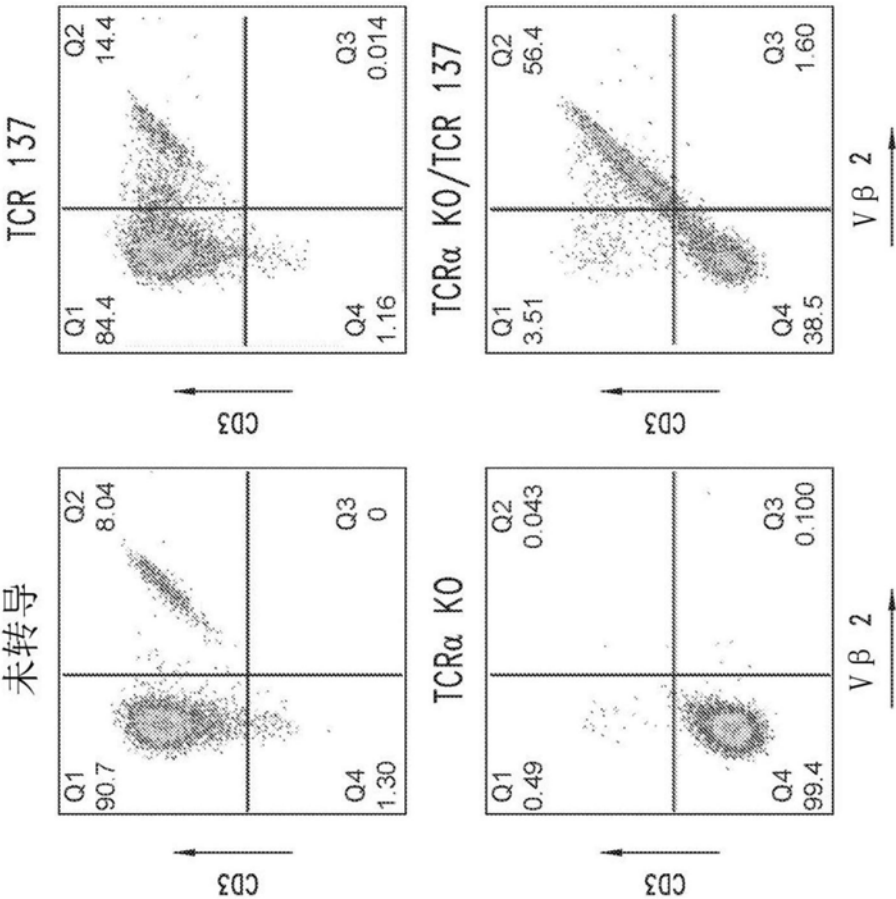


图5K

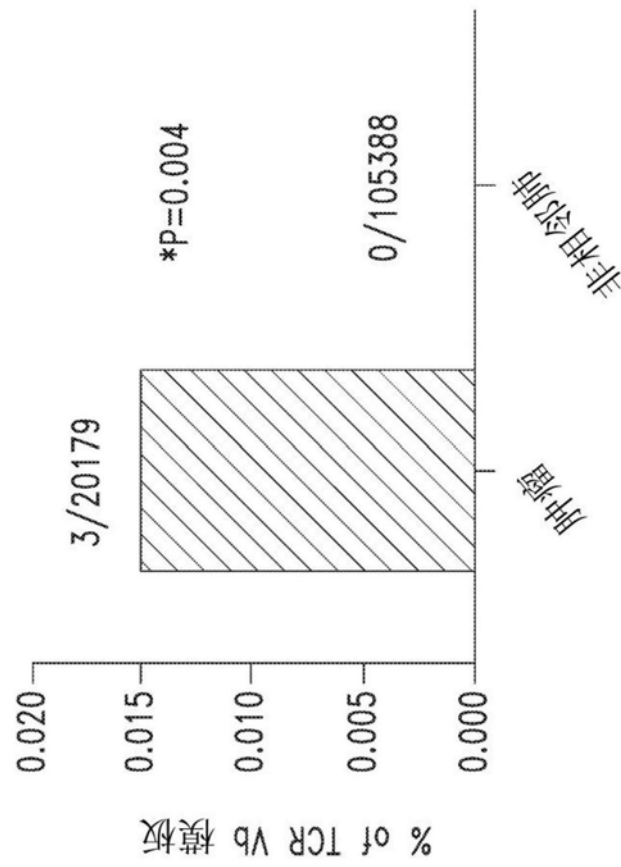


图5L

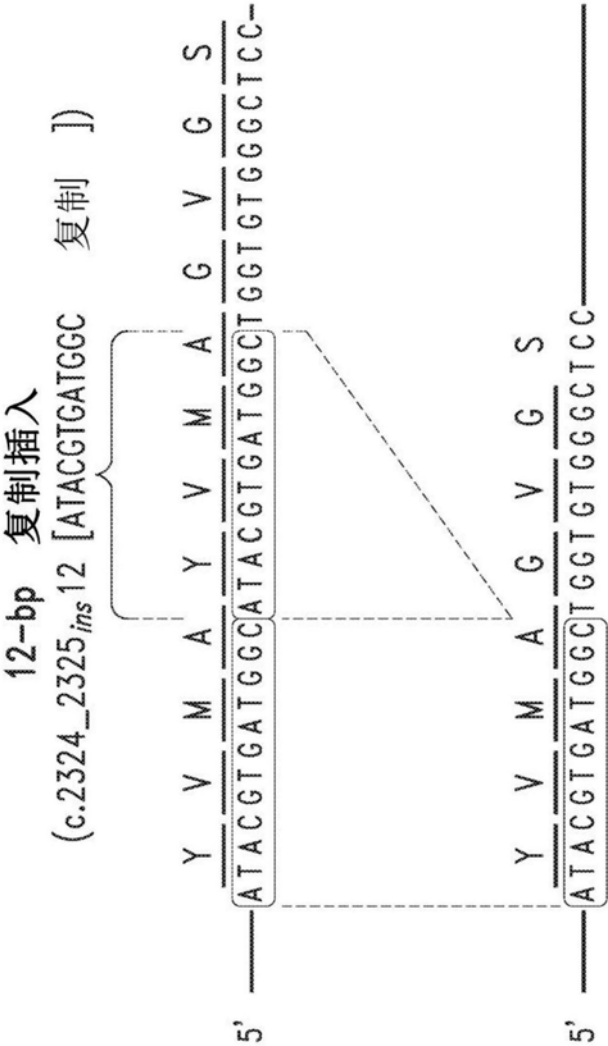


图6A

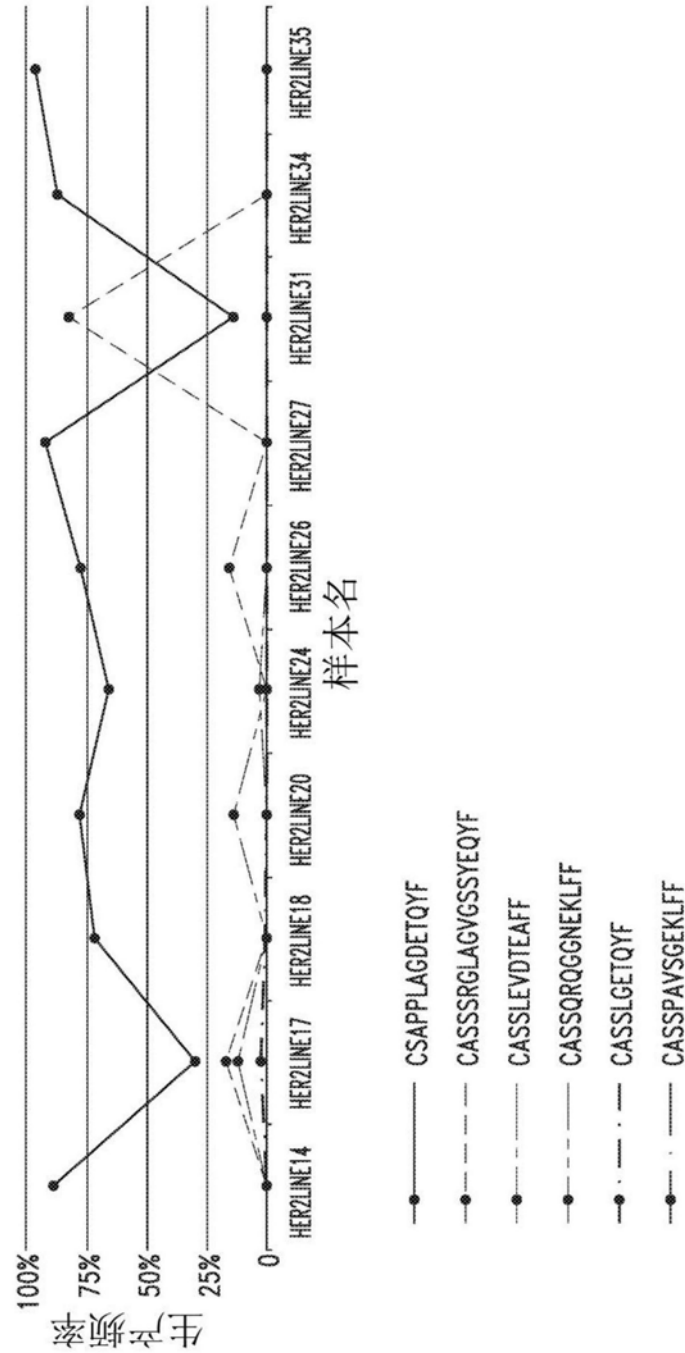


图6B

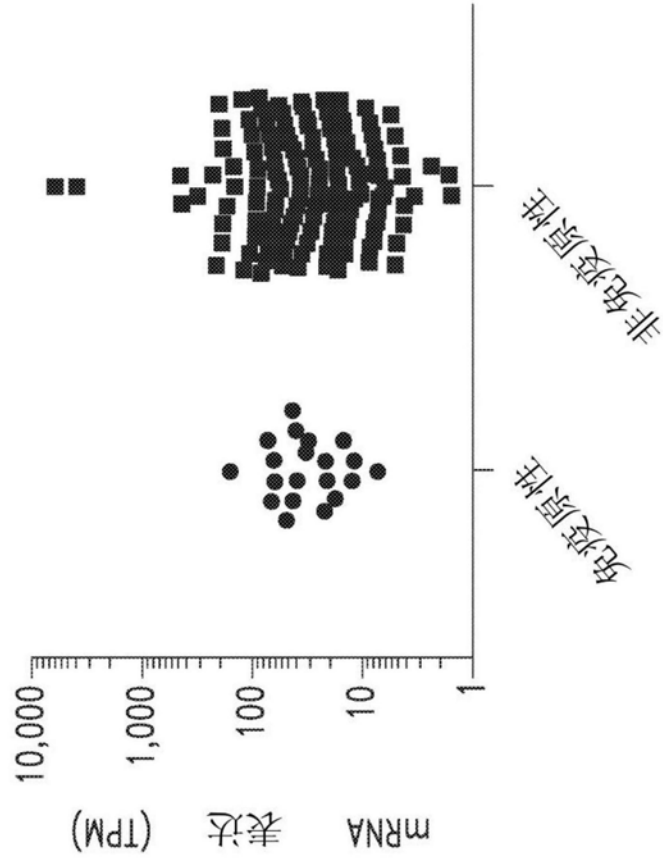


图7A

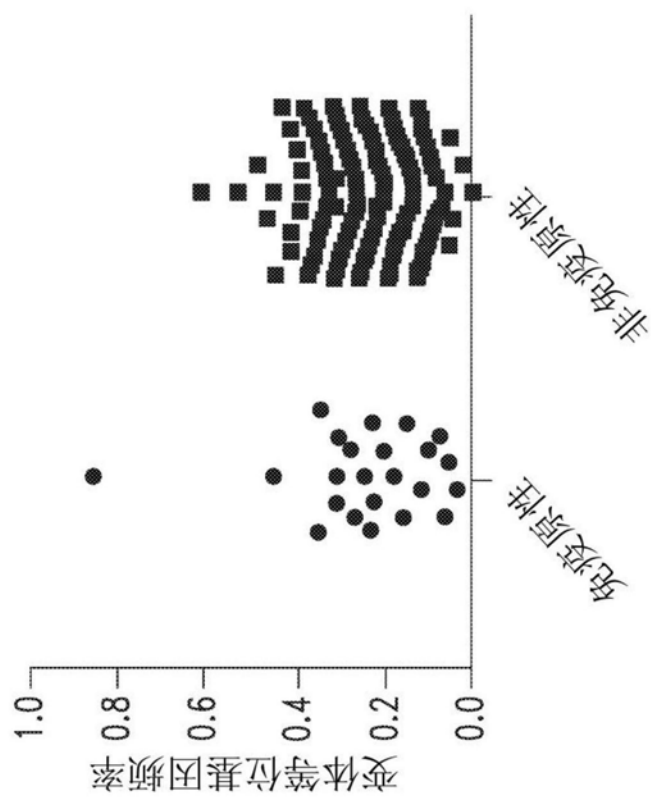


图7B

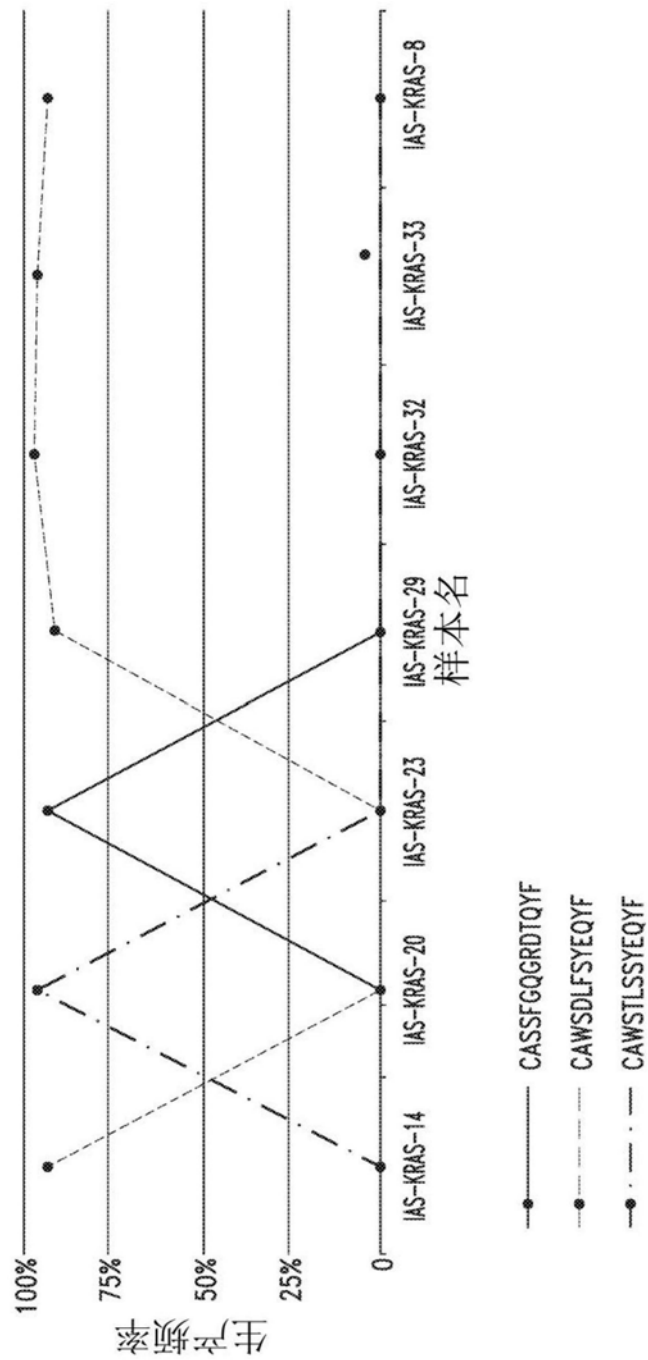


图8