(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 114555790 B
(45)授权公告日 2025.02.25

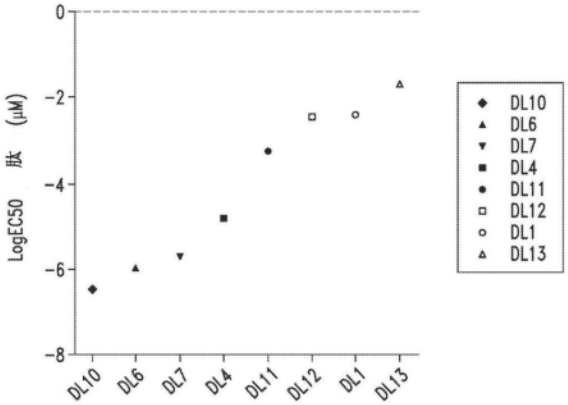
(21)申请号 202080071763.9
(22)申请日 2020.08.19
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 114555790 A
(43)申请公布日 2022.05.27
(30)优先权数据
62/889,519 2019.08.20 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2022.04.13
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2020/047071 2020.08.19
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2021/034976 EN 2021.02.25
(73)专利权人 弗雷德哈钦森癌症中心
地址 美国华盛顿州
(72)发明人 T·M·施米特 A·G·沙皮伊
P·D·格林伯格
(74)专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所(普通合伙) 44240
专利代理师 金辉
(51)Int.Cl.
C12N 5/10(2006.01)
C07K 14/725(2006.01)
C07K 14/47(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)
C12N 15/867(2006.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61K 38/20(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
A61K 45/06(2006.01)
A61K 9/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)
(56)对比文件
CN 107074970 A,2017.08.18
WO 2005056595 A2,2005.06.23
WO 2015077615 A1,2015.05.28
审查员 张丽玮
权利要求书8页 说明书69页
序列表59页 附图9页

(54)发明名称

WT-1特异性T细胞免疫疗法

(57)摘要

本公开提供了对人肾母细胞瘤蛋白1(WT-1)表位具有特异性的结合蛋白、以及表达该结合蛋白的宿主细胞。还提供了编码结合蛋白的多核苷酸和包含多核苷酸的载体。提供了当前公开的组合物的相关方法和用途,用于治疗与WT-1表达相关的疾病或病症,例如各种癌症。



CN 114555790 B

1.一种修饰的免疫细胞,包含编码结合蛋白的异源多核苷酸,其中编码的结合蛋白包含:

T细胞受体TCRα链可变Vα结构域,其包含分别根据SEQ ID NO.:26、27和28所示的互补决定区CDR1α、CDR2α和CDR3α氨基酸序列;和

TCRβ链可变Vβ结构域,其包含分别根据SEQ ID NO.:38、39和40所示的CDR1β、CDR2β和CDR3β氨基酸序列,

其中,编码的结合蛋白能够结合SEQ ID NO.:94所示的RMFPNAPYL:人白细胞抗原HLA-A*0201复合物。

2.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白能够结合SEQ ID NO.:94所示的RMFPNAPYL:HLA-A*0201复合物,产生pEC_{50}为4.0或更高的IFNγ。

3.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白能够结合SEQ ID NO.:94所示的RMFPNAPYL:HLA-A*0201复合物,产生pEC_{50}为5.0或更高的IFNγ。

4.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白能够结合SEQ ID NO.:94所示的RMFPNAPYL:HLA-A*0201复合物,产生pEC_{50}为6.0或更高的IFNγ。

5.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白能够结合SEQ ID NO.:94所示的RMFPNAPYL:HLA-A*0201复合物,产生pEC_{50}为6.5或更高的IFNγ。

6.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,当修饰的免疫细胞的群与抗原呈递细胞共培养4小时时,在共培养物中用包含或由SEQ ID NO.:94所示的氨基酸序列RMFPNAPYL组成的肽以10^{-4}μM、10^{-5}μM或10^{-6}μM的肽浓度脉冲的条件下,所述群中的修饰的免疫细胞的50%或更多产生IFN-γ。

7.根据权利要求6所述的修饰的免疫细胞,其中抗原呈递细胞包含T2细胞。

8.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,当修饰的免疫细胞的群与抗原呈递细胞共培养时,在共培养物中用包含或由SEQ ID NO.:94所示的氨基酸序列RMFPNAPYL组成的肽以10^{-2}μM的肽浓度脉冲的条件下,所述群中的修饰的免疫细胞中的10%或更多为$Nur77^{+}$。

9.根据权利要求8所述的修饰的免疫细胞,其中抗原呈递细胞包含T2细胞、Jurkat细胞或两者。

10.根据权利要求8所述的修饰的免疫细胞,其中,当修饰的免疫细胞的群与抗原呈递细胞共培养时,在共培养物中用包含或由SEQ ID NO.:94所示的氨基酸序列RMFPNAPYL组成的肽以10^{-2}μM的肽浓度脉冲的条件下,所述群中的修饰的免疫细胞中的20%或更多为$Nur77^{+}$。

11.根据权利要求8所述的修饰的免疫细胞,其中,当修饰的免疫细胞的群与抗原呈递细胞共培养时,在共培养物中用包含或由SEQ ID NO.:94所示的氨基酸序列RMFPNAPYL组成的肽以10^{-2}μM的肽浓度脉冲的条件下,所述群中的修饰的免疫细胞中的40%或更多为$Nur77^{+}$。

12.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,当修饰的免疫细胞的群与抗原呈递细胞共培养时,在共培养物中用包含或由SEQ ID NO.:94所示的氨基酸序列RMFPNAPYL组成的肽以10^{-3}μM的肽浓度脉冲的条件下,所述群中的修饰的免疫细胞中的10%或更多为$Nur77^{+}$。

13.根据权利要求12所述的修饰的免疫细胞,其中,当修饰的免疫细胞的群与抗原呈递

细胞共培养时,在共培养物中用包含或由SEQ ID NO.:94所示的氨基酸序列RMFPNAPYL组成的肽以10^{-3}μM的肽浓度脉冲的条件下,所述群中的修饰的免疫细胞中的20%或更多为Nur77^{+}。

14.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和MDA-MB-468细胞以30:1的比例存在于样品中时,所述修饰的免疫细胞能够杀死样品中11%或更多的HLA-A*0201^{+}MDA-MB-468细胞。

15.根据权利要求14所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和MDA-MB-468细胞以30:1的比例存在于样品中时,修饰的免疫细胞能够杀死样品中15%或更多的HLA-A*0201^{+}MDA-MB-468细胞。

16.根据权利要求14所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和MDA-MB-468细胞以30:1的比例存在于样品中时,修饰的免疫细胞能够杀死样品中20%或更多的HLA-A*0201^{+}MDA-MB-468细胞。

17.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和MDA-MB-468细胞以1:1的比例存在于样品中时,修饰的免疫细胞能够杀死样品中5%或更多的HLA-A*0201^{+}MDA-MB-468细胞。

18.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和Panc1细胞以30:1的比例存在时,所述修饰的免疫细胞能够杀死样品中21%或更多的Panc1细胞。

19.根据权利要求18所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和所述Panc1细胞以30:1的比例存在时,所述修饰的免疫细胞能够杀死样品中23%或更多的Panc1细胞。

20.根据权利要求18所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和所述Panc1细胞以30:1的比例存在时,所述修饰的免疫细胞能够杀死样品中25%或更多的Panc1细胞。

21.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,与包含编码T细胞受体的多核苷酸的参考免疫细胞相比,所述修饰的免疫细胞在4小时的共培养中对HLA-A*0201^{+}MDA-MB-468细胞和/或对Panc1细胞具有增加的杀伤活性,所述T细胞受体包含具有SEQ ID NO.:82所示氨基酸序列的TCRα链和具有SEQ ID NO.:83所示氨基酸序列的TCRβ链。

22.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白能够独立于CD8或在不存在CD8的情况下与细胞表面上的SEQ ID NO.:94所示的RMFPNAPYL:HLA-A*0201复合物结合。

23.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中:

(i)编码的Vβ结构域包含或由与SEQ ID NO.:16和8中任一项的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列组成;和/或

(ii)编码的Vα结构域包含或由与SEQ ID NO.:12和4中任一项的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列组成。

24.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的TCR Vβ结构域包含根据TRBJ02-03基因区段的氨基酸序列。

25.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的TCR Vα结构域包含根据TRAJ43基因区段的氨基酸序列。

26.根据权利要求25所述的修饰的免疫细胞,其中:

(i)所述编码的TCR Vβ结构域包含根据TRBJ02-03基因区段的氨基酸序列;并且

(ii)所述编码的TCR Vα结构域包含根据TRAJ43基因片段的氨基酸序列。

27.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中:

所述编码的Vβ结构域包含或由SEQ ID NO.:16或8所示的氨基酸序列组成,并且编码的Vα结构域包含或由SEQ ID NO.:12或4所示的氨基酸序列组成。

28.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中编码的Vβ结构域包含SEQ IDNO.:16所示的氨基酸序列,编码的Vα结构域包含SEQ ID NO.:12所示的氨基酸序列。

29.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中编码的Vβ结构域由SEQ IDNO.:16所示的氨基酸序列组成,编码的Vα结构域由SEQ ID NO.:12所示的氨基酸序列组成。

30.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白进一步包含:

(i)TCRα链恒定结构域Cα或其片段;和/或

(ii)TCRβ链恒定结构域Cβ或其片段。

31.根据权利要求30所述的修饰的免疫细胞,其中,编码的Cα包含或由与SEQID NO.:41-44中的任一项具有至少90%同一性的氨基酸序列组成。

32.根据权利要求30所述的修饰的免疫细胞,其中,编码的Cβ包含或由与SEQID NO.:45具有至少90%同一性的氨基酸序列组成。

33.根据权利要求30所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白包含TCRβ链,所述TCRβ链与SEQ ID NO.:61或57所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、或者包括或由SEQ ID NO.:61或57所示的氨基酸序列组成;以及TCRα链,所述TCRα链与SEQ ID NO.:53或49所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、或者包括或由SEQ ID NO.:53或49所示的氨基酸序列组成。

34.根据权利要求30所述的修饰的免疫细胞,其中编码的结合蛋白包含TCRβ链和TCRα链,所述TCRβ链包含SEQ ID NO.:61所示的氨基酸序列,所述TCRα链包含SEQ ID NO.:53所示的氨基酸序列。

35.根据权利要求30所述的修饰的免疫细胞,其中编码的结合蛋白包含TCRβ链和TCRα链,所述TCRβ链由SEQ ID NO.:61所示的氨基酸序列组成,所述TCRα链由SEQ ID NO.:53所示的氨基酸序列组成。

36.根据权利要求1-29和31-34中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白是TCR、嵌合抗原受体CAR或单链TCR。

37.根据权利要求36所述的修饰的免疫细胞,其中编码的结合蛋白是TCR。

38.根据权利要求36所述的修饰的免疫细胞,其中所述免疫细胞是人类T细胞。

39.根据权利要求38所述的修饰的免疫细胞,其中所述免疫细胞是人类CD8+T细胞。

40.根据权利要求38所述的修饰的免疫细胞,其中所述免疫细胞是人类CD4+T细胞。

41.根据权利要求37所述的修饰的免疫细胞,其中所述免疫细胞是人类T细胞。

42.根据权利要求41所述的修饰的免疫细胞,其中所述免疫细胞是人类CD8+T细胞。

43.根据权利要求41所述的修饰的免疫细胞,其中所述免疫细胞是人类CD4+T细胞。

44.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,所述免疫细胞是人免疫系统细胞。

45.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,所述免疫细胞为T细胞。

46.根据权利要求45所述的修饰的免疫细胞,其中所述T细胞为$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、$CD4^-CD8^-$双阴性T细胞、或者γδT细胞、自然杀伤细胞、NK-T细胞、树突细胞或其任意组合。

47.根据权利要求46所述的修饰的免疫细胞,其中所述T细胞是$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞或两者。

48.根据权利要求45所述的修饰的免疫细胞,其中,所述T细胞是幼稚T细胞、中枢记忆T细胞、效应记忆T细胞、干细胞记忆T细胞或其任意组合。

49.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,编码所述结合蛋白的所述多核苷酸经密码子优化以用于在所述免疫细胞中的表达。

50.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,编码所述结合蛋白的所述多核苷酸包含与SEQ ID NO.:65、69、73和77中任一项所示的多核苷酸序列具有至少75%同一性的多核苷酸。

51.根据权利要求50所述的修饰的免疫细胞,其中,编码所述结合蛋白的所述多核苷酸包含:

与SEQ ID NO.:77所示多核苷酸序列具有至少75%同一性的多核苷酸,和与SEQ ID NO.:69所示多核苷酸序列具有至少75%同一性的多核苷酸。

52.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,其中,编码所述结合蛋白的所述多核苷酸进一步包含编码位于编码Vβ的多核苷酸与编码Vα的多核苷酸之间的自切割肽的多核苷酸。

53.根据权利要求52所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的自切割肽包含或由与SEQ ID NO.:84-88中任一项所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列组成。

54.根据权利要求52所述的修饰的免疫细胞,其中,编码自切割肽的多核苷酸包含或由与SEQ ID NO.:89-93中任一项所示的多核苷酸序列具有至少75%同一性的多核苷酸序列组成。

55.根据权利要求52所述的修饰的免疫细胞,其中,编码所述结合蛋白的所述多核苷酸具有从5'-末端到3'-末端的以下结构:编码TCRβ链的多核苷酸-编码自切割肽的多核苷酸-编码TCRα链的多核苷酸。

56.根据权利要求55所述的修饰的免疫细胞,其中,编码所述结合蛋白的所述多核苷酸包含与SEQ ID NO.:81所示的多核苷酸序列具有至少75%同一性的多核苷酸。

57.根据权利要求56所述的修饰的免疫细胞,其中,编码所述结合蛋白的所述多核苷酸包含多核苷酸,该多核苷酸包含或由SEQ ID NO.:81所示的多核苷酸序列组成。

58.根据权利要求1所述的修饰的免疫细胞,进一步包含:

(i)异源多核苷酸,其编码包含CD8共受体α链的细胞外部分的多肽;

(ii)异源多核苷酸,其编码包含CD8共受体β链的细胞外部分的多肽;或者

(iii)(i)的多核苷酸和(ii)的多核苷酸。

59.根据权利要求58所述的修饰的免疫细胞,包含:

(a)异源多核苷酸,其编码包含CD8共受体α链的细胞外部分的多肽;

(b)异源多核苷酸,其编码包含CD8共受体β链的细胞外部分的多肽;和

(c)编码位于(a)的多核苷酸与(b)的多核苷酸之间的自切割肽的多核苷酸。

60.根据权利要求58所述的修饰的免疫细胞,其中:

(i)包含CD8共受体α链的细胞外部分的编码的多肽是或包含CD8共受体α链;和/或

(ii)包含CD8共受体β链的细胞外部分的编码的多肽是或包含CD8共受体β链。

61.根据权利要求58所述的修饰的免疫细胞,其中宿主细胞包含CD4+T细胞。

62.一种编码结合蛋白的分离的多核苷酸,其中,编码的结合蛋白包含TCR Vα结构域和TCR Vβ结构域,并且能够与SEQ ID NO.:94所示的RMFPNAPYL:HLA-A*0201复合物结合,其中:

(i)编码的Vα结构域包含SEQ ID NO.:28所示的CDR3氨基酸序列;

(ii)编码的Vβ结构域包含SEQ ID NO.:40所示的CDR3氨基酸序列;

(iii)编码的Vα结构域包含SEQ ID NO.:26所示的CDR1氨基酸序列;

(iv)编码的Vβ结构域包含SEQ ID NO.:38所示的CDR1氨基酸序列;

(v)编码的Vα结构域包含SEQ ID NO.:27所示的CDR2氨基酸序列;和

(vi)编码的Vβ结构域包含SEQ ID NO.:39所示的CDR2氨基酸序列。

63.根据权利要求62所述的分离的多核苷酸,其中:

(i)编码的Vα结构域包含或由与SEQ ID NO.:4或12所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列组成;和

(ii)编码的Vβ结构域包含或由与SEQ ID NO.:8或16所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列或组成。

64.根据权利要求62所述的分离的多核苷酸,其中:

(i)编码的TCR Vα包含在TCRα链中,其中所述TCRα链包含或由与SEQ IDNO.:53或49所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列组成;和

(ii)编码的TCR Vβ包含在TCRβ链中,其中所述TCRβ链包含或由与SEQ IDNO.:61或57所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列组成。

65.根据权利要求62所述的分离的多核苷酸,其中,所述多核苷酸经密码子优化以用于在宿主细胞中的表达。

66.根据权利要求62所述的分离的多核苷酸,其中宿主细胞是人类T细胞、NK细胞或NK-T细胞。

67.根据权利要求66所述的分离的多核苷酸,其中宿主细胞是人类T细胞。

68.根据权利要求62所述的分离的多核苷酸,其中,所述多核苷酸包含与SEQ IDNO:65、69、73和77中任一项所示的多核苷酸序列具有至少75%同一性的多核苷酸。

69.根据权利要求62所述的分离的多核苷酸,其中编码的结合蛋白是TCR。

70.根据权利要求63所述的分离的多核苷酸,其中编码的结合蛋白是TCR。

71.根据权利要求64所述的分离的多核苷酸,其中编码的TCR Vα包含在TCRα链中,其中TCRα链包含或由SEQ ID NO.:53所示的氨基酸序列组成;以及编码的TCR Vβ包含在TCRβ链中,其中TCRβ链包含或由SEQ ID NO.:61所示的氨基酸序列组成。

72.一种载体,包含权利要求62所述的多核苷酸。

73.根据权利要求72所述的载体,其中,所述载体是慢病毒载体或逆转录病毒载体。

74.一种载体,包含权利要求63-71中任一项所述的多核苷酸。

75.一种宿主细胞,包含权利要求63-71中任一项的多核苷酸或根据权利要求72或73所述的载体并且能够表达所编码的结合蛋白。

76.一种宿主细胞,包含权利要求62所述的多核苷酸。

77.一种组合物,包括:

(i)根据权利要求1-61中任一项所述的修饰的免疫细胞;

(ii)根据权利要求62-71中任一项所述的多核苷酸;

(iii)根据权利要求72或73所述的载体;和/或

(iv)根据权利要求76所述的宿主细胞;

以及药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

78.权利要求1-61中任一项所述的修饰的免疫细胞、权利要求62-71中任一项所述的多核苷酸、权利要求72或73所述的载体,和/或权利要求76所述的宿主细胞在制备用于治疗HLA-A*0201阳性的人类受试者中与WT-1表达相关的疾病或病症的药物中的用途,其中所述疾病或病症选自乳腺癌、胰腺癌和急性髓细胞白血病,并且其中所述修饰的免疫细胞是人类T细胞。

79.根据权利要求78所述的用途,其中,所述疾病或病症是乳腺癌。

80.根据权利要求78所述的用途,其中,所述疾病或病症是胰腺癌。

81.根据权利要求78所述的用途,其中,所述疾病或病症是急性髓细胞白血病。

82.根据权利要求78所述的用途,其中,所述修饰的免疫细胞被离体修饰以包含所述异源多核苷酸。

83.根据权利要求78所述的用途,其中,所述修饰的免疫细胞对于所述受试者是同种异体的、同系的或自体的。

84.根据权利要求78所述的用途,其中,所述T细胞是$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、$CD4^-CD8^-$双阴性T细胞、γδT细胞、或其任意组合。

85.根据权利要求78所述的用途,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。

86.根据权利要求78所述的用途,其中,所述药物用于以多个剂量施用给受试者。

87.根据权利要求86所述的用途,其中,所述多个剂量以2至4周的施用间隔施用。

88.根据权利要求78所述的用途,其中,将所述药物以10^4个修饰的免疫细胞/kg至10^{11}个修饰的免疫细胞/kg的剂量施用于受试者。

89.根据权利要求78所述的用途,其中,所述药物用于与细胞因子一起施用给受试者。

90.根据权利要求89所述的用途,其中,所述细胞因子是IL-2、IL-15、IL-21或其任意组合。

91.根据权利要求90所述的用途,其中,所述细胞因子是IL-2并且用于与药物同时或依序施用。

92.根据权利要求91所述的用途,其中,所述细胞因子用于依序施用,条件是所述受试者在施用细胞因子之前施用所述药物至少三或四次。

93.根据权利要求89所述的用途,其中,所述细胞因子是IL-2并且用于皮下施用。

94.根据权利要求78所述的用途,其中,所述受试者进一步接受免疫抑制疗法。

95.根据权利要求94所述的用途,其中,所述免疫抑制疗法选自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以及其任意组合。

96.根据权利要求78所述的用途,其中,所述受试者已经接受了非清髓性或清髓性造血细胞移植。

97.根据权利要求96所述的用途,其中所述药物用于在所述非清髓性造血细胞移植后至少三个月施用给受试者。

98.根据权利要求97所述的用途,其中所述药物用于在所述清髓性造血细胞移植后至少两个月施用给受试者。

99.根据权利要求78所述的用途,其中,所述受试者先前已经接受过针对急性髓细胞白血病的治疗。

100.权利要求77所述的组合物在制备用于治疗HLA-A*0201阳性的人类受试者中与WT-1表达相关的疾病或病症的药物中的用途,其中所述疾病或病症选自乳腺癌、胰腺癌和急性髓细胞白血病,并且其中所述修饰的免疫细胞是人类T细胞。

101.根据权利要求100所述的用途,其中修饰的免疫细胞选自CD8+T细胞和CD4+T细胞。

102.一种结合蛋白,包含T细胞受体TCRα链可变Vα结构域和TCRβ链可变Vβ结构域,其中:

Vα结构域包含:

(i)SEQ ID NO.:28的CDR3氨基酸序列CDR3α;

(ii)SEQ ID NO.:26的CDR1氨基酸序列CDR1α;

(iii)SEQ ID NO.:27的CDR2氨基酸序列CDR2α;并且

Vβ结构域包含:

(iv)SEQ ID NO:40的CDR3氨基酸序列CDR3β;

(v)SEQ ID NO.:38的CDR1氨基酸序列CDR1β;

(vi)SEQ ID NO.:39的CDR2氨基酸序列CDR2β,

其中所述结合蛋白能够结合SEQ ID NO:94所示的RMFPNAPYL:HLA-A*0201复合物。

103.根据权利要求102所述的结合蛋白,其中:

(i)Vα结构域包含与SEQ ID NO.:4或12所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列;和

(ii)Vβ结构域包含与SEQ ID NO.:8或16所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列。

104.根据权利要求102所述的结合蛋白,其中Vα结构域包含SEQ ID NO.:12所示的氨基酸序列,并且Vβ结构域包含SEQ ID NO.:16所示的氨基酸序列。

105.根据权利要求102所述的结合蛋白,其中Vα结构域由SEQ ID NO.:12所示的氨基酸序列组成,并且Vβ结构域由SEQ ID NO.:16所示的氨基酸序列组成。

106.根据权利要求102所述的结合蛋白,进一步包含:

(1)TCRα链恒定结构域Cα或其片段;和/或

(2)TCRβ链恒定结构域Cβ或其片段。

107.根据权利要求106所述的结合蛋白,其中,Cα包含或由SEQ ID NO.:41-44中任一项的氨基酸序列组成。

108.根据权利要求106所述的结合蛋白,其中,Cβ包含或由SEQ ID NO.:45的氨基酸序列组成。

109.根据权利要求106所述的结合蛋白,其中结合蛋白包含TCRβ链和TCRα链,所述TCRβ链与SEQ ID NO.:61或57所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、包含或由SEQ ID NO.:61

或57所示的氨基酸序列组成,所述TCRα链与SEQ ID NO.:53或49所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、包含或由SEQ ID NO.:53或49所示的氨基酸序列组成。

110.根据权利要求106所述的结合蛋白,其中结合蛋白包含TCRβ链和TCRα链,所述TCRβ链包含SEQ ID NO.:61所示的氨基酸序列,所述TCRα链包含SEQID NO.:53所示的氨基酸序列。

111.根据权利要求106所述的结合蛋白,其中结合蛋白包含TCRβ链和TCRα链,所述TCRβ链由SEQ ID NO.:61所示的氨基酸序列组成,所述TCRα链由SEQID NO.:53所示的氨基酸序列组成。

112.制备根据权利要求1-61中任一项所述的修饰的免疫细胞的方法,包含使用根据权利要求62-71中任一项所述的多核苷酸或者根据权利要求72或73所述的载体转染或转导免疫细胞。

113.根据权利要求102-111中任一项所述的结合蛋白在制备用于治疗HLA-A*0201阳性受试者中与WT-1表达相关的疾病或病症的药物中的用途,其中所述疾病或病症选自乳腺癌、胰腺癌和急性髓细胞白血病。

114.根据权利要求113所述的用途,其中疾病或病症是乳腺癌。

115.根据权利要求113所述的用途,其中所述疾病或病症是胰腺癌。

116.根据权利要求113所述的用途,其中所述疾病或病症是急性髓细胞白血病。

WT-1特异性T细胞免疫疗法

[0001] 关于序列表的声明

[0002] 与本申请相关的序列表以文本格式代替纸质副本提供,并在此通过引用并入本说明书中。包含序列表的文本文件的名称是360056_473WO_SEQUENCE_LISTING.txt。文本文件为109KB,创建于2020年8月17日,并通过EFS-Web以电子方式提交。

背景技术

[0003] T细胞受体(TCR)基因治疗是一种新兴的治疗方法,旨在克服与传统T细胞过继性免疫治疗相关的障碍,例如分离、表征和扩增肿瘤抗原特异性T细胞所需的大量时间和劳动力(Schmitt等人,Hum.GeneTher.20:1240,2009)。另一个障碍是,大多数可被T细胞免疫疗法靶向的已鉴定肿瘤抗原是过度表达的自身蛋白,因此对这些抗原特异的高亲和力T细胞通常在胸腺选择过程中被消除,并且在外周成分中很少或不存在。

[0004] 已经考虑了增强用于TCR基因治疗的TCR的亲和力的策略(例如Udyavar等人,J.Immunol.182:4439,2009;Zhao等人,J.Immunol.179:5845,2007;Richman和Kranz,Biomol.Eng.24:361,2007)。

[0005] 靶向T细胞治疗实现最大临床效果并伴有最小免疫毒性的前提条件包括识别在例如恶性细胞区室中具有高表达和呈递但在正常组织中没有显著表达的疾病相关抗原。例如,已经描述了几种急性髓性白血病(AML)相关抗原,并且已显示肾母细胞瘤蛋白1(WT-1)在大多数AML患者的白血病干细胞(LSC)区室中表达水平显著高于生理造血干细胞(HSC)。WT-1已在过继性T细胞转移和肽疫苗接种的临床试验中作为目标(参见例如美国专利号7,342,092;7,608,685;7,622,119)。此外,据报道WT-1表达是微小残留病的标志物,因为AML患者在形态学缓解中升高的转录水平预示着明显的临床复发(Inoue等人,Blood 84:3071,1994;Ogawa等人,Blood 101:1698,2003)。

[0006] 由于WT-1是一种细胞内(通常是细胞核)蛋白,因此针对WT-1的免疫疗法已使用旨在产生WT-1特异性$CD8^+$细胞毒性T淋巴细胞(CTL)反应的细胞方法,该反应识别通过MHC类呈现在细胞表面上的肽。为了诱导CTL反应,细胞内蛋白质通常被蛋白酶体或内切/溶酶体降解,产生的肽片段与MHC I类或II类分子结合。这些肽-MHC复合物展示在细胞表面,它们在细胞表面通过肽-MHC-TCR相互作用与T细胞结合。源自WT-1蛋白的肽理论上可用于人类疫苗中以诱导能够杀死肿瘤细胞的人类白细胞抗原(HLA)-限制性细胞毒性$CD8^+$T细胞。然而,由于WT-1是一种自身蛋白,因此免疫可能仅引起具有低亲和力TCR的T细胞的反应。此外,在患有造血系统恶性肿瘤和实体瘤的患者中可检测到针对WT-1的抗体,这表明WT-1可能是高度免疫原性抗原(Gaiger等人,Clin.Cancer Res.7(Suppl.3):761,2001)。

[0007] 显然,需要替代基因疗法用作针对各种癌症(例如白血病和肿瘤)的高度特异性的WT-1靶向免疫疗法。本公开的实施例解决了这种需要并提供了其他相关优点。

发明内容

[0008] 根据某些实施例,本公开提供了能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO:94):人白细胞抗

原(HLA)复合物的结合蛋白,其中,所述结合蛋白包含:(a)T细胞受体(TCR)α链可变区(Vα)结构域,其包含根据SEQ ID NO.:19、22、25或28中任一项的CDR3氨基酸序列(CDR3α)或其变体;以及TCRβ链可变区(Vβ)结构域,其中Vβ任选地包含或由与SEQ ID NO.:5-8或13-16中任一项所示的氨基酸序列具有至少90％(例如,90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多)同一性的氨基酸序列组成;(b)TCR Vβ结构域,其包含根据SEQ ID NO.:31、34、37或40中任一项的CDR3氨基酸序列(CDR3β)或其变体;以及TCR Vα结构域,其中Vα任选地包含或由与SEQ ID NO.:1-4或9-12中任一项所示的氨基酸序列具有至少90％同一性的氨基酸序列组成;或者(c)(a)的TCR Vα结构域和(b)的TCR Vβ结构域。

[0009] 在某些实施例中,结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):人白细胞抗原(HLA)复合物,产生pEC_{50}为4.0、4.5、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5或更高的IFNγ(例如,包括结合蛋白的免疫细胞(例如,T细胞、NK-T细胞或NK细胞)具有pEC_{50}为4.0、4.5、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5或更高的SEQ ID NO.:94:HLA IFNγ产生)。

[0010] 在某些实施例中,HLA包括HLA-A*0201。

[0011] 在某些实施例中,结合蛋白是人的、人源化的或嵌合的。

[0012] 在本文公开的任何实施例中,结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):人白细胞抗原(HLA)复合物,其中结合蛋白包含TCR Vβ结构域和TCR Vα结构域,其中:(i)Vβ结构域包含或由与SEQ ID NO.:5-8或13-16中任一项的氨基酸序列具有至少90％(例如,90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或更多)同一性的氨基酸序列组成;和/或(ii)Vα结构域包含或由与SEQ ID NO.:1-4或9-12中任一项的氨基酸序列具有至少90％同一性的氨基酸序列组成。

[0013] 在某些实施例中,编码的结合蛋白是TCR、CAR或scTCR。

[0014] 本文还提供了修饰的免疫细胞,其包含编码本文公开的结合蛋白的异源多核苷酸。在某些实施例中,免疫细胞包括T细胞、NK细胞、NK-T细胞或其任意组合。在某些实施例中,编码如本文公开的结合蛋白的免疫细胞在根据SEQ ID NO.:94的肽(例如包含在肽:HLA复合物中)的存在下被激活。在某些实施例中,编码如本文公开的结合蛋白的免疫细胞能够杀死表达SEQ ID NO:94:HLA复合物的靶细胞。

[0015] 还提供了编码根据本公开的结合蛋白的分离的多核苷酸。在某些实施例中,编码的结合蛋白包含:(i)SEQ ID NO.:19、22、25、28、31、34、37或40中任一项所示的氨基酸序列;(ii)SEQ ID NO.:17、20、23、26、29、32、35或38中任一项所示的氨基酸序列;(iii)SEQ ID NO.:18、21、24、27、30、33、36或39中任一项所示的氨基酸序列;(iv)一种氨基酸序列,其包含、或由SEQ ID NO:1-4或9-12中任一项所示的氨基酸序列组成、或者与该氨基酸序列具有至少90％(例如,90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一性;(v)一种氨基酸序列,其包含、或由SEQ ID NO:5-8或13-16中任一项所示的氨基酸序列组成、或者与该氨基酸序列具有至少90％同一性;(vi)一种氨基酸序列,其包含、或由SEQ ID NO.:46-53中任一项所示的氨基酸序列组成、或者与该氨基酸序列具有至少90％同一性;(vii)一种氨基酸序列,其包含、或由SEQ ID NO.:54-61中任一项所示的氨基酸序列组成、或者与该氨基酸序列具有至少90％同一性;或(viii)(i)-(vii)的任何组合。

[0016] 在某些实施例中,多核苷酸包含或由与SEQ ID NO.:62-81中任一项所示的核苷酸

序列具有至少75％(例如75％、80％、85％、90％、91％、92％、93％、94％、95％、96％、97％、98％、99％或100％)同一性的多核苷酸组成。在某些实施例中,多核苷酸经密码子优化以用于在宿主细胞,如免疫细胞(例如人T细胞)中表达。

[0017] 还提供了包含如本文所述的多核苷酸的载体,以及包含本公开的修饰细胞、结合蛋白、多核苷酸和/或载体的组合物。

[0018] 还提供了用于治疗患有与WT-1表达或活性相关的疾病或病症的受试者的方法,其中,所述方法包括向受试者施用有效量的如本文公开的经修饰的免疫细胞、结合蛋白、多核苷酸或载体。

[0019] 在某些实施例中,疾病或病症是血液恶性肿瘤或实体癌。例如,待治疗的血液恶性肿瘤可以是急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性髓细胞白血病(AML,包括难治性和复发性AML,并且包括急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性粒单核细胞白血病(例如,伴有或不伴有嗜酸性粒细胞增多症)、急性单核细胞白血病、急性红细胞白血病和急性巨核细胞白血病)、慢性粒细胞白血病(CML)、慢性粒细胞白血病、慢性嗜酸性粒细胞白血病(CEL)、骨髓增生异常综合征(MDS)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或多发性骨髓瘤(MM,包括难治性和复发性MM)。待治疗的示例性实体癌可以是胆管癌、膀胱癌、骨和软组织癌、脑瘤、乳腺癌(breast cancer)、乳腺癌(breast carcinoma)、宫颈癌、结肠癌、结直肠腺癌、结直肠癌、硬纤维瘤、胚胎癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、胃腺癌、多形性胶质母细胞瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、弥漫性腹膜间皮瘤、恶性胸膜间皮瘤、神经胶质瘤、星形细胞瘤、妇科肿瘤、头颈部鳞状细胞癌、肝癌、肝细胞癌、肺癌、非小细胞癌、恶性黑色素瘤、骨肉瘤、卵巢癌(例如,上皮性卵巢癌、卵巢癌)、输卵管癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胰腺导管腺癌、原发性星形细胞瘤、原发性甲状腺癌、前列腺癌、肾癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、成骨肉瘤、睾丸生殖细胞肿瘤、尿路上皮癌、子宫肉瘤、子宫癌肉瘤或子宫癌。

[0020] 通过参考以下详细描述和附图将进一步理解本公开的这些和其他方面和实施例。在本说明书中提及和/或在申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利公开均通过引用整体并入本文,如同每个都单独并入一样。如果需要,可以修改本公开的方面和实施例,以采用各种专利、申请和出版物的概念来提供其他实施例。

附图说明

[0021] 图1示出了WT-1特异性T细胞系的鉴定。简而言之,从4名健康供体获得的WT-1特异性多克隆T细胞系(CD8+)与肽脉冲的自体树突细胞一起培养,用CD8-非依赖性(CD8i)WT-1肽/HLA-A四聚体染色,并分选高四聚体染色细胞。鉴定了二十四(24)个WT-1特异性克隆型。通过测序进行TCR库分析。示出了分类与未分类群体中每个克隆型的倍数富集(y轴)和每个克隆型的CD3表面表达(x轴)。

[0022] 图2A-2C示出了示例性WT-1特异性结合蛋白在转导的宿主细胞中表达。来自图1所示24种克隆型的十(10)个WT-1特异性TCR用于转导TCRα/TCRβ缺陷型J76 Jurkat T细胞。将转导细胞(以浅灰色示出)的WT-1:HLA-A四聚体结合和CD3表达与用参考WT-1特异性TCR转导的细胞(以深灰色示出)进行比较,参考WT-1特异性TCR具有根据SEQ ID NO.:82的α链和

根据SEQ ID NO.:83的β链并由Schmitt等人(Nat.Biotechnol.35:1188,2017)描述。

[0023] 图3A和3B示出了本公开的结合蛋白在转导的宿主细胞中是有功能的。(A)用WT-1特异性TCR转导表达Nur77-dt Tomato报告基因(报告人类T细胞中的抗原特异性信号传导;参见Ahsouri和Weiss,J Immunol 198(2):657-668(2017))的Jurkat细胞,并且与装载有指定浓度的WT-1肽的APC一起孵育24小时。(B)所示TCR的Nur77激活肽EC_{50}值。

[0024] 图4A-4C示出了本公开的示例性结合蛋白的进一步功能表征。(A)肽/MHC四聚体与CD8+T细胞结合,这些细胞被转导以表达WT-1特异性TCR,如图所示。(B)通过将扩增的抗原特异性CD8+T细胞与T2靶细胞共培养4小时产生IFNγ(通过流式细胞术测定),T2靶细胞用滴定浓度的肽脉冲。示出的是IFN-γ+T细胞的百分比。(C)通过线性回归将产生IFNγ的细胞的百分比拟合到剂量反应曲线来确定每个TCR的IFNγ肽EC_{50}。

[0025] 图5A和5B示出了与表达参考TCR(根据SEQ ID NO.:82的α链;根据SEQ ID NO.:83的β链)的T细胞的裂解相比,表达本公开的示例性结合蛋白(TCR DL6或DL10)的T细胞裂解肿瘤细胞。(A)HLA-A2转导的肿瘤细胞系MDA-MB-468细胞的裂解。(B)天然HLA-A2+肿瘤系Panc-1细胞的裂解。(A)和(B)均示出4小时测定的结果,其中靶细胞负载^{51}Cr,通过测量响应于效应T细胞剂量相对于肿瘤的减少的Cr释放来计算TCR转导的T细胞介导的杀伤(E:T;x轴)。

[0026] 图6示出了与参考TCR(根据SEQ ID NO.:82的α链;根据SEQ ID NO.:83的β链)相比,本公开的示例性TCR DL10在用肽脉冲的T2靶细胞存在的情况下产生的IFN-γ。

[0027] 图7示出与单独的肿瘤细胞相比在表达本公开的示例性TCR DL10的T细胞存在的情况下或者在表达参考TCR(根据SEQ ID NO.:82的α链;根据SEQ ID NO.:83的β链)的T细胞存在的情况下,Panc-1肿瘤细胞生长减少。在IncuCyte测定中监测细胞增殖/存活超过7天。误差线表示平均值的标准误差。

具体实施方式

[0028] 在某些方面,本公开提供了对与主要组织相容性复合物(MHC)(例如,人白细胞抗原(HLA))相关的WT-1肽抗原具有特异性的结合蛋白(例如,TCR、CAR、scTCR)、编码结合蛋白的多核苷酸、载体、编码和/或表达结合蛋白的修饰免疫细胞和相关组合物。本公开的WT-1特异性组合物可用于例如过继免疫疗法以治疗癌症。作为背景,基于T细胞的免疫疗法的大多数肿瘤靶标都是自身抗原,因为肿瘤起源于以前的正常组织。例如,此类肿瘤相关抗原(TAA)可能在癌细胞中以高水平表达,但在其他细胞中可能不表达或可能最低表达。在胸腺中的T细胞发育过程中,与自身抗原弱结合的T细胞被允许在胸腺中存活,胸腺可以进一步发育以增加对外来入侵者的特异性,而与自身抗原强结合的T细胞则被消除免疫系统,因为这些细胞会产生不良的自身免疫反应。因此,T细胞按其与抗原结合的相对能力进行分类,以使免疫系统准备好应对外来入侵者(即识别非自身抗原),同时防止自身免疫反应(即识别自身抗原)。这种耐受机制限制了天然存在的能够以高亲和力识别肿瘤(自身)抗原的T细胞,因此消除了能够有效消除肿瘤细胞的T细胞。因此,分离具有对肿瘤抗原特异的高亲和力TCR的T细胞是困难的,因为这些细胞基本上被免疫系统消除。

[0029] 本公开内容的一个优点是提供对WT-1肽具有特异性的结合蛋白,其中该结合蛋白能够结合WT-1(SEQ ID NO.:94):HLA(例如,HLA-A*0201)复合物。在某些实施例中,结合蛋

白能够独立于或在不存在CD8的情况下与WT-1结合,与内源性TCR相比能够更有效地与CD3蛋白结合,能够向宿主发出信号表达结合蛋白以产生细胞因子的细胞,或其任意组合。在某些实施例中,结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):HLA复合物,产生pEC_{50}为4.0、4.5、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5或更高的IFNγ;和/或其中与包含SEQ ID NO:82的α链氨基酸序列和SEQ ID NO:83的β链氨基酸序列的TCR相比,结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):HLA复合物,产生具有更高pEC_{50}的IFNγ。

[0030] 在某些实施例中,本文描述的组合物和方法将具有治疗效用,用于治疗与WT-1表达(例如,与在正常或无病细胞中可检测到的WT-1表达相比,以统计学显著的方式在量级上大于该水平的可检测的WT-1表达)相关的疾病和状况。此类疾病包括各种疾病和病症,例如血液恶性肿瘤和实体癌。本文描述了这些和相关用途的非限制性实例,这些实例包括WT-1抗原特异性T细胞应答的体外、离体和体内刺激,例如通过使用重组免疫细胞(例如T细胞),编码和/或表达对WT-1肽特异的异源结合蛋白(例如,RMPFNAPYL,SEQ ID NO.:94)。

[0031] 在更详细地阐述本公开之前,提供将在本文中使用的某些术语的定义可能有助于对其的理解。在本公开全文中阐述了另外的定义。

[0032] 在本说明书中,任何浓度范围、百分比范围、比例范围或整数范围应被理解为包括所述范围内的任何整数的值,并且在适当时,包括其分数(例如整数的十分之一和百分之一),除非另有说明。此外,本文所述的与任何物理特征(例如聚合物亚单元、尺寸或厚度)相关的任何数字范围应理解为包括所述范围内的任何整数,除非另有说明。如本文所用,除非另有说明,否则术语"约"是指所示范围、值或结构的±20%。应当理解,本文使用的术语"一个(a)"和"一个(an)"是指"一个或多个"所列举的组件。备选方案(例如,"或")的使用应理解为表示备选方案中的一个、两者或其任意组合。如本文所用,术语"包括"、"具有"和"包含"同义使用,这些术语及其变体旨在被解释为非限制性的。

[0033] 此外,应当理解,衍生自本文所述的结构和取代基的各种组合的单个化合物或化合物组,由本申请公开到与设定每个化合物或化合物组相同的程度分别出。因此,特定结构或特定取代基的选择在本公开的范围内。

[0034] 术语"基本上由……组成"不等同于"包括",而是指特定的材料或步骤,或者指那些对要求保护的发明的基本特征没有实质性影响的材料或步骤。例如,当结构域、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,氨基末端或羧基末端或结构域之间的氨基酸)时,这些延伸、缺失、突变或其组合组合起来贡献了结构域、区域、模块或蛋白质的长度的至多20%(例如,至多15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%或1%)并且不显著影响(即,不降低活性超过50%,例如不超过40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或1%)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),蛋白质结构域、区域或模块(例如,结合结构域、铰链区、接头模块)或蛋白质(可能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"。

[0035] 如本文所用,术语"宿主"是指用异源或外源核酸分子靶向遗传修饰以产生目的多肽(例如,增强的亲和力抗-WT-1TCR)的细胞(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赋予与异源或外源蛋白质的生物合成相关或不相关的期望特性的其他遗传修饰(例如,包含可检测标记;缺失、改变或截短的内源TCR;增

加的共刺激因子表达)。在某些实施例中,宿主细胞是用编码对WT-1抗原肽特异的TCRα链的异源或外源核酸分子转导的人造血祖细胞。

[0036] 如本文所用,“免疫系统细胞”是指源自骨髓中的造血干细胞的免疫系统的任何细胞,其产生两个主要谱系,骨髓祖细胞(其产生骨髓细胞,例如单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、巨核细胞和粒细胞)和淋巴祖细胞(其产生淋巴样细胞,如T细胞、B细胞和自然杀伤(NK)细胞)。示例性免疫系统细胞包括$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、$CD4^-CD8^-$双阴性T细胞、γδT细胞、自然杀伤细胞和树突细胞。巨噬细胞和树突状细胞可称为“抗原呈递细胞”或“APC”,它们是当APC表面上的主要组织相容性复合体(MHC)受体与表面上的TCR相互作用时可以激活T细胞的特化细胞。在某些实施例中,免疫系统细胞是人免疫系统细胞。

[0037] 如本文所用,“造血祖细胞”是可以衍生自造血干细胞或胎儿组织并且能够进一步分化成成熟细胞类型(例如免疫系统细胞)的细胞。示例性造血祖细胞包括具有$CD24^{Lo}Lin^-CD117^+$表型的那些或在胸腺中发现的那些(称为祖胸腺细胞)。

[0038] “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类分子是具有跨膜α链(具有三个α结构域)和非共价结合的β2微球蛋白的异二聚体。MHC II类分子由两种跨膜糖蛋白α和β组成,它们都跨越膜。每个链都有两个域。MHC I类分子将源自胞质溶胶的肽递送至细胞表面,其中肽:MHC复合物被$CD8^+$T细胞识别。MHC II类分子将源自囊泡系统的肽传递到细胞表面,在那里它们被$CD4^+$T细胞识别。人类MHC被称为人类白细胞抗原(HLA)。

[0039] “T细胞”是在胸腺中成熟并产生T细胞受体(TCR)的免疫系统细胞。T细胞可以是幼稚的(未暴露于抗原;与T_{CM}相比,CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127和CD45RA的表达增加,和CD45RO的表达减少)、记忆T细胞(T_M)(经历过抗原且长寿的)和效应细胞(经历过抗原且具有细胞毒性的)。T_M可进一步分为中枢记忆T细胞亚群(T_{CM},与幼稚T细胞相比,CD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45RO和CD95的表达增加,和CD54RA的表达减少)、干细胞记忆T细胞和效应记忆T细胞(T_{EM},与幼稚T细胞或T_{CM}相比,CD62L、CCR7、CD28、CD45RA的表达减少,和CD127的表达增加)。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,CD62L、CCR7、CD28的表达减少,并且颗粒酶和穿孔素呈阳性。

[0040] “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、恒定域、跨膜区和短胞质尾;参见例如Janeway等人,Immunobiology:The Immune System in Health and Disease,3^{rd} 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可以在细胞表面发现或以可溶形式存在,通常由具有α和β链(也分别称为TCRα和TCRβ),或γ和δ链(也分别称为TCRγ和TCRδ)的异二聚体组成。与其他免疫球蛋白(例如,抗体)一样,TCR链(例如,α-链、β-链)的胞外部分包含两个免疫球蛋白结构域:位于N末端的可变结构域(例如,α-链可变结构域或Vα、β-链可变结构域或Vβ;通常为基于Kabat编号(Kabat等人,"Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,5^{th} ed.)的氨基酸1到116;以及与细胞膜相邻的一个恒定结构域(例如,α-链恒定结构域或C_α,通常为基于Kabat的氨基酸117至259;β链恒定结构域或C_β,通常为基于Kabat的氨基酸117至295)。与其他免疫球蛋白一样,可变结构域包含由框架区(FR)分隔的互补决定区(CDR)(参见例如Jores等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.USA 87:9138,1990;

Chothia等人,EMBO J.7:3745,1988;另见Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.27:55,2003)。在某些实施例中,TCR存在于T细胞(或T淋巴细胞)的表面上并与CD3复合物结合。如在本公开中使用的,TCR的来源可以来自各种动物物种,例如人、小鼠、大鼠、兔或其他哺乳动物。

[0041] 术语"可变区"或"可变结构域"是指免疫球蛋白超家族结合蛋白(例如,TCRα-链或β-链(或用于γδTCR的γ链和δ链))的结构域,其参与免疫球蛋白超家族结合蛋白(例如,TCR)与抗原的结合。在TCR的情况下,α链和β链的可变结构域(分别为Vα和Vβ)通常具有相似的结构,每个结构域包含四个保守框架区(FR)和三个CDR。Vα结构域由两个独立的DNA片段编码,可变基因片段和连接基因片段(V-J);Vβ结构域由三个独立的DNA片段编码,可变基因片段、多样性基因片段和连接基因片段(V-D-J)。单个Vα或Vβ结构域或其功能片段或部分可能足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用Vα或Vβ结构域从结合抗原的TCR中分离出结合特定抗原的TCR,以分别筛选互补Vα或Vβ结构域的库。

[0042] 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免疫球蛋白(例如,TCR)可变区内的氨基酸序列,其赋予抗原特异性和/或结合亲和力,并且通过框架区彼此分开。一般来说,每个TCRα-链可变区有3个CDR(αCDR1、αCDR2、αCDR3),每个TCRβ-链可变区有3个CDR(βCDR1、βCDR2、βCDR3)。在TCR中,CDR3被认为是负责识别加工抗原的主要CDR。通常,CDR1和CDR2主要与MHC相互作用。

[0043] CDR1和CDR2在TCR可变区编码序列的可变基因区段内编码,而CDR3由跨越Vα的可变和连接区段的区域编码,或由跨越Vβ的可变、多样性和连接区段的区域编码。因此,如果已知Vα或Vβ的可变基因片段的身份(identity),则可以推断出它们对应的CDR1和CDR2的序列。与CDR1和CDR2相比,由于在重组过程中核苷酸的添加和丢失,CDR3通常显著更加多样化。

[0044] TCR可变结构域序列可以与编号方案(例如,IMGT、Kabat、Chothia、Enhanced Chothia、Contact和Aho)进行比对,允许注释等效残基位置并使用例如ANARCI软件比较不同的分子(2016,生物信息学15:298-300)。编号方案提供了TCR可变域中框架区和CDR的标准化描述。因此,应当理解来自TCR Vα或Vβ区域或结构域的CDR可以具有根据特定编号方案的特定序列,并且可以具有根据特定编号方案的稍微更短、更长或移位(例如,部分重叠)的序列到不同的编号方案。在某些本公开实施例中,CDR是使用IMGT编号方案确定的;例如,使用IMGT V-Quest(imgt.org/IMGTindex/V-QUEST.php)。

[0045] "CD3"在本领域中已知为六链的多蛋白复合物(参见,Abbas和Lichtman,2003;Janeway等人,p172和178,1999)。在哺乳动物中,该复合物包含一个CD3γ链、一个CD3δ链、两个CD3ε链、和一个CD3ζ链的同源二聚体。CD3γ、CD3δ和CD3ε链是高度相关的免疫球蛋白超家族包含单个免疫球蛋白结构域。CD3γ、CD3δ和CD3ε链的跨膜区域带负电荷,这一特性被认为允许这些链与T细胞受体链的带正电荷区域结合。CD3γ、CD3δ和CD3ε链的细胞内尾部各包含一个保守基序,称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM,而每个CD3ζ链具有三个。不希望受理论束缚,据信ITAM对于TCR复合物的信号传导能力很重要。本公开中使用的CD3可以来自各种动物物种,包括人、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。

[0046] 如本文所用,"TCR复合物"是指由CD3与TCR结合形成的复合物。例如,TCR复合物可以由链CD3γ链、CD3δ链、两条CD3ε链、CD3ζ链的同源二聚体、TCRα链和TCRβ链组成。或者,TCR复合物可以由CD3γ链、CD3δ链、两条CD3ε链、CD3ζ链的同源二聚体、TCRγ链和TCRδ链组

成。

[0047] 如本文所用,“TCR复合物的组分”是指TCR链(即,TCRα、TCRβ、TCRγ或TCRδ)、CD3链(即CD3γ、CD3δ、CD3ε或CD3ζ),或通过两个或更多个TCR链或CD3链(例如,TCRα和TCRβ的复合物,TCRγ和TCRδ的复合物,CD3ε和CD3δ的复合物,CD3γ和CD3ε的复合物,或TCRα、TCRβ的亚TCR复合物、CD3γ、CD3δ和两条CD3ε链)形成的复合物。

[0048] 如本文所用,术语“CD8共受体”或“CD8”是指细胞表面糖蛋白CD8,其可由T细胞表达为包含两条CD8α链的同源二聚体,或包含α链和β链的异源二聚体。CD8共受体被认为有助于细胞毒性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作用(Gao和Jakobsen,Immunol.Today 21:630-636,2000;Cole和Gao,Cell.Mol.Immunol.1:81-88,2004)。特别地,并且不希望受理论束缚,据信CD8共受体结合在抗原表达细胞表面上表达的MHC-I蛋白复合物,并且在TCR:抗原-MHC结合背景下的这种结合启动或协助产生针对抗原表达细胞的免疫应答(例如,细胞因子的转录和表达、钙分泌、溶细胞活性等)的T细胞信号通路。在人类中,已知八(8)种不同的CD8β链同工型(“M1”-“M8”;参见UniProtKB标识符P10966-1、2、3、4、6、7、8和9);其中,异构体1、2、4和5被认为与自然界的细胞膜相关,而异构体3、6、7和8被认为与细胞外区域相关或被分泌。同样在人类中,已知三种CD8α链异构体(参见UniProtKB标识符P01732-1、2和3)。

[0049] “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);UniProtKB P01730)。CD4存在于T辅助细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞等免疫细胞表面,通常包括在细胞表面表达的四个免疫球蛋白结构域(D1(包含Ig样V型结构域)、D2、D3和D4(分别包含Ig样C2型结构域1、2和3))。在抗原呈递过程中,CD4与TCR复合物一起被募集以结合MHCII分子的不同区域(CD4结合MHCIIβ2,而TCR复合物结合MHCIIα1/β1)。不希望受理论束缚,据信与TCR复合物的紧密接近允许CD4相关激酶分子磷酸化存在于CD3的细胞质结构域上的免疫受体酪氨酸活化基序(ITAM)。这种活动被认为放大了由激活的TCR产生的信号,以产生各种类型的T辅助细胞。

[0050] 如本文所用,“结合结构域”(也称为“结合区”或“结合部分”)是指具有与目标特异性和非共价缔合(associate)、联合(unite)、或结合(combine)的能力的肽、寡肽、多肽或蛋白质(例如,WT-1或WT-1肽:MHC复合物)。结合结构域包括用于生物分子、分子复合物(即,包含两个或更多个生物分子的复合物)或其他感兴趣靶标的任何天然存在的、合成的、半合成的或重组产生的结合配偶体。示例性的结合结构域包括单链免疫球蛋白可变区(例如,scTCR、scFv)、受体胞外结构域、配体(例如,细胞因子、趋化因子),或选择用于结合生物分子、分子复合物或其他感兴趣靶标的特异性能力的合成多肽。

[0051] 如本文所用,“特异性结合”或“特异性针对”是指结合蛋白(例如,TCR受体)或结合结构域(或其融合蛋白)以等于或大于10^5M^{-1}(对于该缔合反应等于开启率[k_{on}]与关闭率[k_{off}]的比例)的亲和力或K_a(即,与1/M单位的特定结合反应的平衡缔合常数)与目标分子的缔合或联合,而与样品中的任何其他分子或成分没有显著缔合或联合。结合蛋白或结合结构域(或其融合蛋白)可以分类为“高亲和力”结合蛋白或结合结构域(或其融合蛋白)或“低亲和力”结合蛋白或结合结构域(或其融合蛋白)。“高亲和力”结合蛋白或结合结构域是指至少10^7M^{-1}、至少10^8M^{-1}、至少10^9M^{-1}、至少$10^{10}M^{-1}$、至少$10^{11}M^{-1}$、至少$10^{12}M^{-1}$、或至少$10^{13}M^{-1}$

的那些结合蛋白或结合结构域。“低亲和力”结合蛋白或结合结构域是指K_a最高为10^7M^{-1}、高达10^6M^{-1}、高达10^5M^{-1}的那些结合蛋白或结合结构域。或者,亲和力可以定义为与M单位(例如,10^{-5}M至10^{-13}M)的特定结合相互作用的平衡解离常数(K_d)。

[0052] 在某些实施例中,受体或结合结构域可具有“增强的亲和力”,其是指选择的或工程化的受体或结合结构域与靶抗原的结合比野生型(或亲本)结合结构域更强。例如,增强的亲和力可能是由于靶抗原的K_a(平衡缔合常数)高于野生型结合结构域,这是由于靶抗原的K_d(解离常数)小于野生型结合结构域的野生型结合结构域、由于靶抗原的解离率(k_{off})小于野生型结合结构域、或其组合。在某些实施例中,可对增强的亲和力TCR进行密码子优化以增强特定宿主细胞如T细胞中的表达(Scholten等人,Clin.Immunol.119:135,2006)。

[0053] 术语“功能亲合力”是指体外免疫细胞(例如,T细胞、NK细胞、NK-T细胞)对给定浓度的配体的反应的生物学测量或激活阈值,其中生物学测量可以包括细胞因子产生(例如,IFNγ产生、IL-2产生等)、细胞毒活性、活化和增殖。例如,在体外通过产生细胞因子、具有细胞毒性、表达激活标记物或增殖来对低抗原剂量作出生物学(免疫学)反应的T细胞被认为具有高功能亲合力,而具有较低功能亲合力的T细胞在引发类似于高亲和力T细胞的免疫反应之前需要更高量的抗原。可以理解,功能亲合力不同于亲和力(affinity)和亲合力(avidity)。亲和力是指结合蛋白与其抗原/配体之间任何给定键的强度。一些结合蛋白是多价的并与多种抗原结合——在这种情况下,整体连接的强度就是亲合力。

[0054] 功能亲合力和免疫反应的有效性之间存在许多相关性。一些离体研究表明,不同的T细胞功能(例如增殖、细胞因子产生等)可以在不同的阈值下触发(参见例如Betts等人,J.Immunol.172:6407,2004;Langenkamp等人,Eur.J.Immunol.32:2046,2002)。影响功能亲合力的因素包括(a)TCR对pMHC复合物的亲和力,即TCR和pMHC之间相互作用的强度(Cawthon等人,J.Immunol.167:2577,2001),(b)TCR和CD4或CD8共受体的表达水平,以及(c)信号分子的分布和组成(Viola and Lanzavecchia,Science 273:104,1996),以及减弱T细胞功能和TCR信号传导的分子的表达水平。

[0055] 在特定暴露时间后诱导基线和最大反应之间的半最大反应所需的抗原浓度称为“半最大有效浓度”或“EC_{50}”。EC_{50}值通常表示为摩尔(摩尔/升)量,但它通常转换为如下的对数值-$\log_{10}(EC_{50})$(例如,参见图4(C))。例如,如果EC_{50}等于1μM(10^{-6}M),则$\log_{10}(EC_{50})$值为-6。使用的另一个值是pEC_{50},它被定义为EC_{50}的负对数(-$\log_{10}(EC_{50})$)。在上述实例中,等于1μM的EC_{50}具有6的pEC50值。在某些实施例中,本公开的结合蛋白的功能亲合力将是其促进免疫细胞(例如,T细胞、NK-T细胞、NK细胞)产生IFNγ的能力,其可以使用本领域已知和/或本文所述的测定法测量。“高功能亲合力”TCR或其结合结构域是指具有至少10^{-4}M、至少约10^{-5}M或至少约10^{-6}M的EC_{50}的那些TCR或其结合结构域。

[0056] 在一些实施例中,pEC_{50}用于描述50%的免疫细胞表达激活标记Nur77所需的肽抗原量。

[0057] 已知多种测定法用于鉴定特异性结合特定靶标的本公开内容的结合结构域,以及确定结合结构域或融合蛋白亲和力,例如蛋白质印迹、ELISA、分析超速离心、光谱学和表面等离子共振(Biacore®)分析(参见例如,Scatchard等人,Ann.NY Acad.Sci.51:660,1949;Wilson,Science 295:2103,2002;Wolff等人,Cancer Res.53:2560,1993;和US专利号5,283,173、5,468,614或等同物)以及肽:MHC四聚体染色。

[0058] 术语“WT-1-特异性免疫球蛋白超家族结合蛋白”或“WT-1-特异性结合蛋白”在某些实施例中是指特异性结合WT-1或其肽的本公开的蛋白质或多肽或者任选地与HLA分子复合的肽。术语“WT-1结合结构域”或“WT-1结合片段”是指WT-1特异性结合蛋白中负责特异性WT-1结合的结构域或部分。单独的WT-1特异性结合结构域(即,没有WT-1特异性结合蛋白的任何其他部分)可以是可溶的。示例性的WT-1特异性结合结构域包括来自WT-1特异性TCR的那些,例如可以在TCR或scTCR中发现的那些(例如,单链αTCR蛋白,例如Vα-L-Vβ、Vβ-L-Vα、Vα-Cα-L-Vα或Vα-L-Vβ-Cβ,其中Vα和Vβ分别是TCRα和β可变结构域,Cα和Cβ分别是TCRα和β恒定结构域,并且L是接头)和如本文所述的scFv片段,其可以衍生自抗WT-1TCR或抗体。

[0059] “WT-1抗原”或“WT-1肽抗原”是指WT-1蛋白的天然或合成产生的部分,长度范围为约7个氨基酸至约15个氨基酸,其可与MHC(例如,HLA)分子形成复合物,并且这种复合物可以与对WT-1肽:MHC(例如,HLA)复合物特异的TCR结合。已经很好地建立(参见例如Murphy,Janeway’s Immunobiology(8th Ed.)2011 Garland Science,NY;第6、9和16章)抗原呈递细胞(APC)(如树突状细胞、巨噬细胞、淋巴细胞或其他细胞类型)处理抗原的原理、以及APC向T细胞呈递抗原的原理,包括免疫相容性(例如,共享至少一种与抗原呈递相关的MHC基因的等位基因形式)APC与T细胞之间的主要组织相容性复合物(MHC)-限制呈递。例如,源自胞质溶胶(例如,肿瘤抗原、细胞内病原体)的加工抗原肽的长度通常为约7个氨基酸至约11个氨基酸,并与I类MHC分子缔合,而在囊泡系统(例如,细菌、病毒)中加工的肽的长度从约10个氨基酸到约25个氨基酸不等,并与II类MHC分子缔合。由于WT-1是一种内部宿主蛋白,因此WT-1抗原肽将在I类MHC的背景下呈递。在特定实施例中,WT-1肽是RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94),已知其与人I类HLA相关(并且更具体地,与等位基因HLA-A*201相关)。

[0060] “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功能,从而使所得多肽保持特异性结合对靶分子的亲和力(例如,scTCR)或保留信号活性(例如,TCR复合物)。在某些实施例中,接头由例如约2至约35个氨基酸或约4至约20个氨基酸或约8至约15个氨基酸或约15至约25个氨基酸组成。

[0061] 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或基序的蛋白质,其中这些结构域或基序不是天然地一起存在于蛋白质中。可以使用PCR、重组工程等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。融合蛋白还可以包含其他成分,例如标签、接头或转导标记。在某些实施例中,由宿主细胞(例如免疫细胞,例如T细胞)表达或产生的融合蛋白位于细胞表面,其中融合蛋白锚定在细胞膜(例如,通过跨膜组分或结构域)并且包含胞外组分(例如,能够与MHC分子结合)和胞内组分(例如,包含信号传导结构域、效应结构域、共刺激结构域或其部分或组合)。

[0062] “连接氨基酸”或“连接氨基酸残基”是指多肽的两个相邻基序、区域或结构域之间(例如结合结构域与相邻的恒定域之间或TCR链与相邻的自切割肽之间)的一个或多个(例如约2-10个)氨基酸残基。连接氨基酸可由融合蛋白的构建体设计产生(例如,在构建编码融合蛋白的核酸分子期间使用限制性酶位点产生的氨基酸残基)。

[0063] “改变的结构域”或“改变的蛋白质”是指与野生型基序、区域、结构域、肽、多肽或蛋白质(例如野生型类型TCRα链、TCRβ链、TCRα恒定结构域、TCRβ恒定结构域)具有至少85%(例如,85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、

99％或99.5％)序列同一性的基序、区域、结构域、肽、多肽或蛋白质。

[0064] 如本文所用,“核酸”或“核酸分子”或“多核苷酸”是指脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、寡核苷酸、例如通过聚合酶链式反应(PCR)或通过体外翻译产生的片段中的任何一种,以及通过连接、断裂、核酸内切酶作用或核酸外切酶作用中的任何一种方式产生的片段。在某些实施例中,本公开的多核苷酸通过PCR产生。多核苷酸可以由天然存在的核苷酸单体(例如脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸)、天然存在的核苷酸的类似物(例如天然存在的核苷酸的α-对映异构形式)或两者的组合组成。修饰的核苷酸可以在糖部分或嘧啶或嘌呤碱基部分中进行修饰或替换。核酸单体可以通过磷酸二酯键或这种键的类似物连接。磷酸二酯键的类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒酸磷酸酯、二硒酸磷酸酯、苯胺硫代磷酸酯、苯胺磷酸酯、氨基磷酸酯等。多核苷酸可以是单链的或双链的。

[0065] 术语“分离的”是指材料从其原始环境(例如,如果它是天然存在的,则为自然环境)移除。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的,但与天然系统中的一些或所有共存材料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并非自然环境的一部分。术语“基因”是指参与产生多肽链的DNA片段;它包括编码区“前导和尾随”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)。

[0066] 本公开的任何宿主细胞、结合蛋白、多核苷酸或载体可以是“分离的”。

[0067] 如本文所用,术语“重组的”、“工程化的”和“修饰的”是指已经通过引入外源核酸分子而被修饰的细胞、微生物、核酸分子或载体,或者是指细胞或已经改变以致内源核酸分子或基因的表达受到控制、失调或组成型的微生物,其中可通过基因工程引入此类改变或修饰。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,或其他核酸分子的添加、缺失、取代或者对细胞的遗传物质的其他功能破坏或添加。示例性修饰包括来自参考或亲本分子的异源或同源多肽的编码区或其功能片段中的修饰。

[0068] 如本文所用,“突变”是指分别与参照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发生变化。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替换、插入或缺失。在某些实施例中,突变是1个或3个密码子或氨基酸的取代、1至约5个密码子或氨基酸的缺失、或其组合。

[0069] “保守取代”在本领域中被认为是一种氨基酸取代另一种具有相似性质的氨基酸。示例性的保守取代是本领域众所周知的(参见例如WO 97/09433第10页;Lehninger,Biochemistry,2nd Edition;Worth Publishers,Inc.NY,NY,pp.71-77,1975;Lewin,Genes IV,Oxford University Press,NY and Cell Press,Cambridge,MA,p.8,1990)。本领域技术人员已知的多种标准表明在肽或多肽的特定位置被取代的氨基酸是否是保守的(或相似的)。例如,相似氨基酸或保守氨基酸替换是其中氨基酸残基被具有相似侧链的氨基酸残基替换的替换。类似的氨基酸可包括在以下类别中:具有碱性侧链的氨基酸(例如,赖氨酸、精氨酸、组氨酸);具有酸性侧链的氨基酸(例如,天冬氨酸、谷氨酸);具有不带电荷的极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、组氨酸);具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、

蛋氨酸、色氨酸);具有β-支链侧链的氨基酸(例如,苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸)和具有芳香侧链的氨基酸(例如,酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸)。脯氨酸被认为更难分类,它与具有脂肪族侧链的氨基酸(例如亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和丙氨酸)具有相同的特性。在某些情况下,用谷氨酰胺代替谷氨酸或用天冬酰胺代替天冬氨酸可以被认为是类似的代替,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。如本领域所理解的,两条多肽之间的"相似性"通过将多肽的氨基酸序列和其保守的氨基酸取代物与第二多肽的序列进行比较来确定(例如,使用GENEWORKS、Align、BLAST算法或本文描述并在本领域中实践其他算法)。

[0070] 在某些实施例中,根据本公开的蛋白质(例如,结合蛋白)包含与参考序列相比的变体序列(例如,与本文公开的参考TCR CDR相比的变体TCR CDR)。在某些实施例中,本公开的变体蛋白质、肽、多肽和氨基酸序列可以包含相对于参考氨基酸序列的一个或多个保守取代。还考虑了本公开的多核苷酸和多肽的变体。变体核酸分子或多肽与本文所述的定义或参考多核苷酸或多肽(分别)具有至少70%、75%、80%、85%、90%,优选为至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或99.9%同一性,或者对于多核苷酸,在约65-68℃,0.015M氯化钠、0.0015M柠檬酸钠或在约42℃,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参考多核苷酸杂交。核酸分子变体保留编码结合蛋白或其结合结构域的能力,所述结合蛋白具有本文所述的功能,例如特异性结合靶分子。有关杂交反应严格性的更多细节和解释,请参见Ausubel,FM(1995),Current Protocols in Molecular Biology.John Wiley&Sons,Inc.。此外,关于如何通过杂交鉴定DNA序列,本领域技术人员可以遵循手册Boehringer Mannheim GmbH(1993)The DIG System Users Guide for Filter Hybridization,Boehringer Mannheim GmbH,Mannheim,Germany和Liebl,W.,Ehrmann,M.,Ludwig,W.和Schleifer,KH(1991)International Journal of Systematic Bacteriology 41:255-260。

[0071] 变体还可以指定义或参考序列的片段(例如,由截短、切割等产生的部分),并且片段可以具有比定义或参考序列的长度短的任何长度。如本文所用,"功能部分"或"功能片段"是指仅包含亲本或参考化合物的结构域、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母体或参考化合物的结构域、部分或片段缔合的至少50%、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,效应器功能)。当功能部分或片段在所选测定中表现出不超过50%的性能降低时,本公开的多肽或编码的多肽的"功能部分"或"功能片段"具有"相似的结合"或"相似的活性",如与亲本或参考多肽相比(优选与亲本或参考相比在亲和力方面不超过20%或10%,或不超过对数差异),例如用于测量结合亲和力或测量效应器功能的测定(例如,细胞因子释放)。在某些实施例中,功能部分是指效应分子、效应结构域、共刺激分子或共刺激结构域的"信号传导部分"。

[0072] 在某些实施例中,变体结合蛋白或其一部分(例如,结合结构域)或片段可以包含相对于亲本或参考结合蛋白或域的一个或多个氨基酸取代,其中如果存在于亲本或参考结合结构域或蛋白质中,所述一个或多个氨基酸取代去除、改变或减弱潜在的不希望的特征或特性;例如,具有潜在免疫原性的氨基酸序列,或者可能提供不需要的糖基化位点、不需要的脱酰胺位点、不需要的氧化位点、不需要的异构化位点或热力学稳定性降低、或可能导

致在结合蛋白中的错误配对或错误折叠(例如,非常接近的未配对半胱氨酸残基)的氨基酸序列。可能提供不希望的特征或特性的氨基酸序列、模式和基序是已知的(参见例如Seeliger等人,mAbs 7(3):505-515(2015))。

[0073] 在某些实施例中,氨基酸取代包括去除体细胞突变(例如回复到种系编码的氨基酸)的取代。例如,在某些实施例中,参考CDR氨基酸序列或TCR可变域序列或TCR恒定区序列的变体包含取代以去除或减弱潜在的不希望的特征或特征。应理解选择此类变体以不损害或不实质上损害所需功能(例如,对WT-1抗原:HLA复合物的结合特异性和/或亲和力)。

[0074] 术语"构建体"是指包含重组核酸的任何多核苷酸。构建体可以存在于载体(例如,细菌载体、病毒载体)中或者可以整合到基因组中。"载体"是能够转运另一种核酸的核酸分子。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,其可包括染色体、非染色体、半合成或合成核酸。示例性载体是那些能够自主复制(游离型载体)或表达它们所连接的核酸(表达载体)的载体。

[0075] 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病毒)、以及双链DNA病毒,双链DNA病毒包括腺病毒、疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒1型和2型、爱泼斯坦-巴尔病毒、巨细胞病毒)、和痘病毒(例如牛痘、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、乳多空病毒、嗜肝DNA病毒和肝炎病毒。逆转录病毒的实例包括禽类白血病肉瘤、哺乳动物C型、B型病毒、D型病毒、HTLV-BLV组、慢病毒、泡沫病毒(Coffin,J.M.,Retroviridae:The viruses and their replication,In Fundamental Virology,Third Edition,B.N.Fields等人,Eds.,Lippincott-Raven Publishers,Philadelphia,1996)。

[0076] 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,并且可以转导一系列不同的细胞类型。慢病毒载体通常是在三个(包装、包膜和转移)或更多质粒瞬时转染到生产细胞后产生的。与HIV类似,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进行逆转录,这是由病毒逆转录酶复合物介导的。逆转录产物是双链线性病毒DNA,是病毒整合到感染细胞DNA中的底物。

[0077] 术语"可操作地连接"是指两个或更多个核酸分子在单个核酸片段上的结合,使得一个核酸分子的功能受到另一个核酸分子的影响。例如,当启动子能够影响编码序列的表达时(即,编码序列在启动子的转录控制下),启动子与编码序列可操作地连接。"未关联"是指相关的遗传元件彼此之间没有密切关联,并且其中一个的功能不影响另一个。

[0078] 如本文所用,"表达载体"是指含有核酸分子的DNA构建体,该核酸分子可操作地连接到能够影响核酸分子在合适宿主中表达的合适控制序列。此类控制序列包括影响转录的启动子、控制此类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、病毒或简单的潜在基因组插入物。一旦转化到合适的宿主中,载体就可以独立于宿主基因组进行复制和发挥作用,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。

[0079] 如本文所用,术语“表达”是指基于基因的核酸序列产生多肽的过程。该过程包括转录和翻译。

[0080] 在将核酸序列插入细胞的上下文中,术语“引入”是指“转染(transfection)”或“转化(transformation)”或“转导(transduction)”,并且包括指将核酸序列掺入真核或原核细胞中,其中核酸分子可以掺入细胞的基因组中(例如染色体、质粒、质体或线粒体DNA)、转化为自主复制子、或瞬时表达(例如,转染的mRNA)。

[0081] 如本文所用,“异源”或“外源”核酸分子、构建体或序列是指不是宿主细胞天然的但可以与来自宿主的核酸分子或核酸分子的一部分同源的核酸分子或核酸分子的一部分。异源或外源核酸分子、构建体或序列的来源可以来自不同的属或种。在某些实施例中,通过例如缀合、转化、转染、电穿孔等将异源或外源核酸分子(即,非内源或天然的)添加至宿主细胞或宿主基因组,其中添加的分子可以整合到宿主基因组中或作为染色体外遗传物质存在(例如,作为质粒或其他形式的自我复制载体),并且可以以多个拷贝存在。此外,“异源”是指由引入宿主细胞的外源核酸分子编码的非天然酶、蛋白质或其他活性,即使宿主细胞编码同源蛋白质或活性。此外,包含“修饰”或“异源”多核苷酸或结合蛋白的细胞包括该细胞的子代,无论子代本身是否被转导、转染或以其他方式操作或改变。

[0082] 如本文所述,可以将一种以上的异源或外源核酸分子作为单独的核酸分子、作为多个单独控制的基因、作为多顺反子核酸分子、作为编码融合物的单个核酸分子、或其任意组合的方式引入宿主细胞蛋白质。例如,如本文所公开的,宿主细胞可以被修饰以表达两种或更多种异源或外源核酸分子,这些异源或外源核酸分子编码对WT-1抗原肽特异的所需TCR(例如,TCRα和TCRβ)。当将两种或更多种外源核酸分子引入宿主细胞时,应理解这两种或更多种外源核酸分子可以作为单个核酸分子(例如,在单个载体上)、在单独的载体上、在单个位点或多个位点整合进入宿主染色体。提及的异源核酸分子或蛋白质活性的数量是指编码核酸分子的数量或蛋白质活性的数量,而不是引入宿主细胞中的单独核酸分子的数量。外源核酸分子(例如,编码本公开的结合蛋白或CD8共受体)也可以通过基因编辑技术(例如使用CRISPR-Cas系统、大范围核酸酶等)引入宿主细胞的基因组。

[0083] 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。此外,与亲本基因、蛋白质或活性相比,突变、过表达、改组、复制或以其他方式改变的基因、蛋白质或活性仍被认为是该特定宿主细胞的内源性或天然的。例如,来自第一基因的内源控制序列(例如,启动子、翻译衰减序列)可用于改变或调节第二天然基因或核酸分子的表达,其中第二天然基因或核酸分子的表达或调节核酸分子不同于亲代细胞中的正常表达或调节。

[0084] 术语“同源的”或“同系物”是指在宿主细胞、物种或菌株中发现或衍生的分子或活性。例如,异源或外源核酸分子可以与天然宿主细胞基因同源,并且可以任选地具有改变的表达水平、不同的序列、改变的活性或其任意组合。

[0085] 如本文所用,“序列同一性”是指一个序列中的氨基酸残基与另一参考多肽序列中的氨基酸残基在比对序列并在必要时引入空位以实现最大百分比序列之后的百分比同一性,并且不考虑将任何保守替换作为序列同一性的一部分。可以使用Altschul等人(1997)″Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs″,Nucleic Acids Res.25:3389-3402定义的NCBI BLAST2.0软件(其中参数设置

为默认值)生成百分比序列同一性值。

[0086] 如本领域所理解的,两条多肽之间的“相似性”通过将多肽的氨基酸序列和其保守的氨基酸替代物与第二多肽的序列进行比较来确定(例如,使用GENEWORKS™、Align、ClustalTM、BLAST算法等)。

[0087] 如本文所用,“过度增殖性疾病”是指与正常或未患病细胞相比过度生长或增殖。示例性过度增殖性疾病包括肿瘤、癌症、肿瘤组织、癌、恶性癌前细胞,以及非肿瘤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、再狭窄以及自身免疫性疾病(例如类风湿性关节炎、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,其发生速度比过度增殖性疾病的情况慢,可称为“增殖性疾病”,包括某些肿瘤、癌症、肿瘤组织、癌、肉瘤、恶性细胞、恶性癌前细胞,以及非肿瘤性或非恶性疾病。

[0088] WT-1抗原肽特异性结合蛋白

[0089] 在某些实施例中,本公开提供了一种结合蛋白,其包含(a)包含根据SEQ ID NO:19、22、25或28中任一项的CDR3氨基酸序列(CDR3α)或其变体的T细胞受体(TCR)α链可变区(Vα)结构域,和TCR Vβ结构域;(b)包含根据SEQ ID NO:31、34、37或40中任一项的CDR3氨基酸序列(CDR3β)或其变体的TCR Vβ结构域,和TCR Vα结构域;或(c)(a)的TCR Vα结构域和(b)的TCR Vβ结构域,其中结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):人白细胞抗原(HLA)复合物,其中任选地,HLA包括HLA-A*0201。

[0090] 在某些实施例中,结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):HLA复合物,其产生pEC_{50}为4.0、4.5、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5或更高的IFNγ。

[0091] 在某些实施例中,(a)、(b)或(c)的Vβ结构域包含或由与SEQ ID NO:5-8或13-16中任一项所示的氨基酸序列具有至少90%(例如90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%)同一性的氨基酸序列组成,和/或(a)、(b)或(c)的Vα结构域包含或由与SEQ ID NO:1-4或9-12中任一项所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的任何氨基酸序列组成。

[0092] 在某些实施例中,CDR3β包含或由SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列组成,并且CDR3α包含或由SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列组成。在某些实施例中,CDR3β包含或由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列组成,并且CDR3α包含或由SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列组成。在某些实施例中,CDR3β包含氨基酸序列组或由SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列组成,并且CDR3α包含或由SEQ ID NO:25中所示的氨基酸序列组成。在某些实施例中,CDR3β包含或由SEQ ID NO:40中所示的氨基酸序列组成,并且CDR3a包含或由SEQ ID NO:28所示的氨基酸序列组成。

[0093] 在某些实施例中,结合蛋白包括包含CDR1α、CDR2α和CDR3α的Vα结构域以及包含CDR1β、CDR2β和CDR3β的Vβ结构域。

[0094] 在某些实施例中,Vβ结构域包含SEQ ID NO:29、32、35或38中任一项所示的CDR1β氨基酸序列或其变体,和/或SEQ ID NO:30、33、36或39中任一项所示的CDR2β氨基酸序列或其变体。在某些实施例中,Vα结构域包含SEQ ID NO:17、20、23或26中任一项的CDR1α氨基酸序列或其变体,和/或SEQ ID NO:18、21、24或27任一项所示的CDR2α氨基酸序列或其变体。

[0095] 在特定实施例中,TCR Vα和Vβ结构域分别包含CDR1α、CDR2α、CDR3α和CDR1β、CDR2

β、CDR3β以及以下氨基酸序列:(i)分别为SEQ ID NO.:26-28和38-40;(ii)分别为SEQ ID NO.:23、27、28和38-40;(iii)分别为SEQ ID NO.:17-19和29-31;(iv)分别为SEQ ID NO.:20-22和32-34;(v)分别为SEQ ID NO.:23-25和35-37。

[0096] 在任何本公开实施例中,结合蛋白结合WT-1肽:HLA-A*201复合物。在任何本公开实施例中,在不依赖于CD8或在不存在CD8的情况下,结合蛋白能够与细胞表面上的WT-1肽:HLA复合物结合。

[0097] 在某些实施例中,如本文所述的结合蛋白包括变体多肽种类,其相对于如本文呈现的SEQ ID NO:1-61的序列在氨基酸序列中具有一个或多个氨基酸取代、插入或缺失。在某些实施例中,取代是或包括保守取代。氨基酸的保守取代是众所周知的并且可以自然发生或者可以在重组产生结合蛋白时引入。可以使用本领域已知的诱变方法将氨基酸取代、缺失和添加引入蛋白质中(参见例如,Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3d ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY,2001)。寡核苷酸定向的位点特异性(或片段特异性)诱变程序可用于提供改变的多核苷酸,其具有根据所需的取代、缺失或插入而改变的特定密码子。或者,随机或饱和诱变技术(例如丙氨酸扫描诱变、易错聚合酶链式反应诱变和寡核苷酸定向诱变)可用于制备免疫原多肽变体(参见例如Sambrook等人,同上)。

[0098] 在某些实施例中,对WT-1特异的特定结合蛋白的种类(或变体)可包括与本文公开的任何示例性氨基酸序列(例如,SEQ ID NO.:1-61)具有至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%同一性的氨基酸序列。

[0099] 在某些实施例中,提供了包含与SEQ ID NO.:1-4或9-12中任一项所示的氨基酸序列的具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%,或100%)序列同一性的Vβ结构域,和/或与SEQ ID NO.:5-8或13-16中任一项所示的氨基酸序列具有至少90%序列同一性的Vα结构域,其中,所述结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO:94):HLA复合物。在其他实施例中,本文提供的任何一种或多种β或αCDR氨基酸序列可以分别存在于Vβ结构域和/或Vα结构域中。

[0100] 在某些实施例中,结合蛋白包括包含或由与SEQ ID NO.:5-8或13-16中的任一项具有至少90%同一性的氨基酸序列组成的Vβ结构域,和/或包含或由与SEQ ID NO.:1-4或9-12中的任一项具有至少90%同一性的氨基酸序列组成的Vα结构域,前提是(a)至少三个或四个CDR没有突变,(b)确实具有突变的CDR仅具有最多两个氨基酸取代、最多五个连续氨基酸缺失或其组合,并且(c)结合蛋白保留其与RMFPNAPYL(SEQ ID NO:94):HLA复合物结合的能力,可选地产生pEC_{50}为4.0、4.5、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5或更高的IFNγ。

[0101] 在某些实施例中,结合蛋白包括包含由人TCR V、D和/或J等位基因编码的氨基酸序列的TCR可变域。作为背景,在淋巴细胞发育过程中,Vα外显子由不同的可变和连接基因片段(V-J)组装而成,而Vβ外显子由不同的可变、多样性和连接基因片段(V-D-J)组装而成。TCRα染色体位点具有70-80个可变基因片段和61个连接基因片段。TCRβ染色体位点具有52个可变基因片段以及两个独立的簇,每个簇包含一个多样性基因片段、以及六个或七个连接基因片段。功能性Vα和Vβ基因外显子是通过可变基因片段与Vα连接基因片段的重组以及可变基因片段与多样性基因片段和Vβ连接基因片段的重组而产生的。根据各种等位基因的

TCR基因片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,在imgt.org/IMGTrepertoire/LocusGenes/listIG_TR/TR/human/Hu_TRgroup.html。

[0102] 应当理解,虽然编码结合蛋白的多核苷酸可以包含与本文公开的根据TCR基因片段相同的核苷酸序列,但是在本公开的上下文中可以使用编码基因片段的氨基酸序列的任何核苷酸序列。

[0103] 在某些实施例中,结合蛋白包含Vβ结构域,其包含(i)根据TRBJ02-03基因区段的氨基酸序列;和/或(ii)根据TRBV06-05基因片段的氨基酸序列、根据TRBV07-09基因片段的氨基酸序列或根据TRBV20-01基因片段的氨基酸序列。在某些实施例中,结合蛋白包含Vα结构域,其包含(i)根据TRAJ43基因区段的氨基酸序列;和/或(ii)根据TRAV20-02基因区段的氨基酸序列;由TRAV38DV08基因片段编码的氨基酸序列;或根据TRAV38-01基因片段的氨基酸序列。在相关实施例中,Vβ结构域包含根据TRBJ02-03基因区段的氨基酸序列,并且Vα结构域包含根据TRAJ43基因区段的氨基酸序列;Vβ结构域包含根据TRBV06-05基因片段的氨基酸序列,并且Vα结构域包含根据TRAV20-02基因片段的氨基酸序列;Vβ结构域包含根据TRBV07-09基因片段的氨基酸序列,并且Vα结构域包含根据TRAV38DV08基因片段的氨基酸序列;或者Vβ结构域包含根据TRBV20-01基因片段的氨基酸序列,并且Vα结构域包含根据TRAV38-01基因片段的氨基酸序列。

[0104] 在前述实施例中,根据TRA或TRB基因区段的氨基酸序列长度为5、6、7、8、9、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145或150个氨基酸,包括这些示例性长度之间的任何长度的氨基酸(例如11、12、13、14个氨基酸等)。

[0105] 在某些实施例中,提供了能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94:HLA复合物的结合蛋白,其中,所述结合蛋白包含TCR Vα结构域和TCR Vβ结构域。在某些实施例中,Vα结构域包含或由SEQ ID NO.:1或9所示的氨基酸序列组成,并且Vβ结构域包含或由SEQ ID NO.:5或13所示的氨基酸序列组成。在某些实施例中,Vα结构域包含或由SEQ ID NO.:2或10所示的氨基酸序列组成,并且Vβ结构域包含或由SEQ ID NO.:6或14所示的氨基酸序列组成。在某些实施例中,Vα结构域包含或由SEQ ID NO.:3或11所示的氨基酸序列组成,并且Vβ结构域包含或由SEQ ID NO.:7或15所示的氨基酸序列组成。在某些实施例中,Vα结构域包含或由SEQ ID NO.:4或12所示的氨基酸序列组成,并且Vβ结构域包含或由SEQ ID NO.:8或16所示的氨基酸序列组成。

[0106] 在任何本公开实施例中,结合蛋白可以包含α链恒定结构域(Cα)或其片段和/或β链恒定结构域(Cβ)或其片段或部分。在某些实施例中,Cα包含或由与SEQ ID NO.:41-44中任一项具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)序列同一性的氨基酸序列组成。在某些实施例中,Cβ包含或由与SEQ ID NO:45具有至少90%序列同一性的氨基酸序列组成。

[0107] 在其他实施例中,TCR Cβ包含半胱氨酸氨基酸代替氨基酸位置57处的天然丝氨酸(例如,GV(S→C)TD),并且TCR Cα包含半胱氨酸氨基酸代替氨基酸位置48处的天然苏氨酸(例如,DK(T→C)VL;参见例如,Cohen等人,Cancer Res.67(8):3898-3903(2007))。

[0108] 在某些实施例中,结合蛋白是T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体或TCR的抗原结合片

段,其中任一种可以是嵌合的、人源化的或人的。在其他实施例中,TCR的抗原结合片段包含单链TCR(scTCR)或嵌合抗原受体(CAR)。

[0109] “嵌合抗原受体”(CAR)是指一种融合蛋白,其被设计成包含两个或更多个天然存在的氨基酸序列,这些氨基酸序列以非天然存在或在宿主细胞中非天然存在的方式连接在一起,该融合蛋白可以当存在于细胞表面时起受体的作用。CAR可以包括细胞外部分,其包含抗原结合结构域(例如,衍生自或从免疫球蛋白或免疫球蛋白样分子获得,例如衍生自或从对癌症抗原特异的TCR获得的TCR结合结构域、衍生自或从抗体获得的scFv、或衍生自或从NK细胞的杀伤免疫受体获得的抗原结合结构域),该抗原结合结构域连接到跨膜结构域以及一个或多个细胞内信号转导结构域(任选包含共刺激结构域)(参见例如,Sadelain等人,Cancer Discov.,3(4):388(2013);另见Harris和Kranz,Trends Pharmacol.Sci.,37(3):220(2016),Stone等人,Cancer Immunol.Immunother.,63(11):1163(2014)和Walseng等人,Scientific Reports 7:10713(2017),其中CAR构建体及其制造方法通过引用并入本文)。与WT-1抗原特异性结合(例如,在肽:HLA复合物的情况下)的本公开的CAR包含TCR Vα结构域和Vβ结构域或其功能片段或部分。

[0110] 在某些实施例中,WT-1特异性结合蛋白是TCR。在相关实施例中,结合蛋白(a)包含TCRα链,该TCRα链与SEQ ID NO:50或46中所示的氨基酸序列具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性或者包含所述氨基酸序列或由其组成;以及TCRβ链,该TCRβ链与SEQ ID NO:58或54所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、包含所述氨基酸序列或由其组成;(b)包含TCRα链,该TCRα链与SEQ ID NO:51或47中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、包含所述氨基酸序列或由其组成;以及TCRβ链,该TCRβ链与SEQ ID NO:59或55所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、包含所述氨基酸序列或由其组成;(c)包含TCRα链,该TCRα链与SEQ ID NO:52或48中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、包含所述氨基酸序列或由其组成;以及TCRβ链,该TCRβ链与SEQ ID NO:60或56所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、包含所述氨基酸序列或由其组成;或者(d)包含TCRα链,该TCRα链与SEQ ID NO:53或49中所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、包含所述氨基酸序列或由其组成;以及TCRβ链,该TCRβ链与SEQ ID NO:61或57所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、包含所述氨基酸序列或由其组成。

[0111] 在某些实施例中,结合蛋白包含融合蛋白,该融合蛋白包含(i)包含结合结构域的胞外成分,该结合结构域包含T细胞受体(TCR)α链可变(Vα)结构域和T细胞受体(TCR)β链可变(Vβ)结构域,其中Vα结构域包含根据SEQ ID NO:19、22、25或28中任一项所示的CDR3氨基酸序列(CDR3α)或其变体,并且TCR Vβ结构域包含根据SEQ ID NO:31、34、37或40中任一项所示的CDR3氨基酸序列(CDR3β)或其变体;(ii)细胞内成分;以及(iii)位于胞外成分和胞内成分之间的跨膜成分。在某些实施例中,融合蛋白是CAR。

[0112] 在某些实施例中,结合蛋白包含融合蛋白,该融合蛋白包含(i)包含特异性结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO:94)肽:HLA复合物的结合结构域的胞外成分,其中该结合结构域包含T细胞受体(TCR)α链可变(Vα)结构域和T细胞受体(TCR)β链可变(Vβ)结构域,其中,所述Vα结构域包含或由与SEQ ID NO:1、2、3、4、9、10、11或12中任一项或其变体具有至少90%同一性的氨基酸序列组成,并且Vβ结构域包含或由与SEQ ID NO:5、6、7、8、13、14、15或16中任一项或其变体具有至少90%同一性的氨基酸序列组成,任选地前提是:(a)至少三个或四个

CDR没有突变,(b)确实有突变的CDR仅至多两个氨基酸取代,至多连续五个氨基酸缺失,或其组合;以及(c)融合蛋白保留其结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO:94):HLA复合物的能力;(ii)细胞内成分;以及(iii)位于胞外成分和胞内成分之间的跨膜成分。

[0113] 应当理解,任何当前公开的结合结构域,包括示例性CDR和可变结构域序列及其变体,都可以包含在根据本公开内容的融合蛋白中。

[0114] 在本文所述的任何实施例中,本公开的编码多肽可以包含"信号肽"(也称为前导序列、前导肽或转运肽)。信号肽将新合成的多肽靶向细胞内外的适当位置。包含信号肽的本公开的示例性蛋白质或多肽的氨基酸序列在例如SEQ ID NO.:1-8、46-49和54-57中提供。在定位或分泌完成期间或一旦完成,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为"前蛋白",并且其信号肽被去除的多肽在本文中被称为"成熟"蛋白或多肽。在本文公开的任何实施例中,结合蛋白或融合蛋白包含或是成熟蛋白,或者是或包含前蛋白。本公开的示例性成熟蛋白质或多肽的氨基酸序列在SEQ ID NO.:9-16、50-53和58-61中提供。

[0115] 在某些实施例中,本公开的结合蛋白包含一个或多个连接氨基酸。

[0116] 在某些实施例中,结合蛋白包含接头。在某些实施例中,接头由例如约2至约35个氨基酸、或约4至约20个氨基酸、或约8至约15个氨基酸、或约15至约25个氨基酸组成。示例性接头包括甘氨酸-丝氨酸接头(例如,SEQ ID NO.:95和96)。

[0117] 在某些实施例中,提供了包含根据前述实施例中任一项的WT特异性结合蛋白和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的组合物。

[0118] 在某些实施例中,WT-1特异性结合蛋白以可溶形式提供(参见例如Walseng等人,PLoS One doi:10.1371/journal.pone.0119559(2015)),并且可以任选地缀合至细胞毒剂和/或可检测剂。例如,用于分离和纯化重组产生的可溶性TCR的方法可以包括从将重组可溶性TCR分泌到培养基中的合适的宿主细胞/载体系统获得上清液,然后使用市售过滤器浓缩培养基。浓缩后,可将浓缩物应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。当从其自然环境中分离免疫原时,也可以使用这些纯化方法。用于大规模生产一种或多种本文所述的分离的/重组的可溶性TCR的方法包括分批细胞培养,其被监测和控制以维持适当的培养条件。可溶性TCR的纯化可以根据本文描述的和本领域已知的并且符合国内和国外监管机构的法律和指南的方法进行。

[0119] 在某些实施例中,编码对WT-1特异的结合蛋白的核酸分子用于转染/转导宿主细胞(例如,T细胞)以用于过继转移疗法。已经描述了TCR测序的进展(例如,Robins等人,2009 Blood 114:4099;Robins等人,2010 Sci.Translat.Med.2:47ra64,PMID:20811043;Robins等人,2011(Sept.10)J.Imm.Meth.Epub ahead of print,PMID:21945395;Warren等人,2011 Genome Res.21:790),并且可以在实施根据本公开实施例的过程中使用。类似地,已经描述了用期望的核酸转染/转导T细胞的方法(例如,US 2004/0087025)以及使用期望抗原特异性的T细胞的过继转移程序(例如,Schmitt等人,Hum.Gen.20:1240,2009;Dossett等人,Mol.Ther.17:742,2009;Till等人,Blood 112:2261,2008;Wang等人,Hum.Gene Ther.18:712,2007;Kuball等人,Blood 109:2331,2007;US 2011/0243972;US2011/0189141;Leen等人,Ann.Rev.Immunol.25:243,2007),从而基于本文的教导,包括针对与

HLA复合的WT-1肽抗原RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94)特异的增强亲和力TCR的教导,预期这些方法学适用于本公开的实施例。

[0120] 在某些实施例中,如本文所述的WT-1特异性结合蛋白或结构域可以由宿主T细胞表达,并且可以根据用于测定T细胞活性的本领域公认的大量方法学(包括测定T细胞的结合、激活或诱导,还包括确定抗原特异性的T细胞反应)中的任何一种在功能上表征。在某些实施例中,结合蛋白能够以I类HLA限制的方式促进针对人WT-1的抗原特异性T细胞应答。在其他实施例中,I类HLA限制性反应是与抗原加工(TAP)无关的转运蛋白相关的。在某些实施例中,抗原特异性T细胞应答包括$CD4^+$辅助T淋巴细胞(Th)应答和$CD8^+$细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答中的至少一种。在相关实施例中,CTL反应针对WT-1过表达细胞。用于测定T细胞活性的方法的其他实例包括确定T细胞增殖、T细胞细胞因子释放、抗原特异性T细胞刺激、MHC限制性T细胞刺激、CTL活性(例如,通过检测从预加载靶标释放的^{51}Cr细胞)、T细胞表型标志物表达的变化以及T细胞功能的其他测量值。可以在例如Lefkovits(Immunology Methods Manual:The Comprehensive Sourcebook of Techniques,1998)中找到进行这些和类似测定的程序。也可以参考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);Green and Reed,Science 281:1309(1998)以及其中引用的参考文献。

[0121] "MHC-肽四聚体染色"是指用于检测抗原特异性T细胞的测定法,其特征是MHC分子的四聚体,每个分子包含相同的肽,该肽具有与至少一种抗原(例如,WT-1)同源(例如,相同或相关)的氨基酸序列,其中复合物能够结合对同源抗原特异的T细胞受体。每个MHC分子都可以用生物素分子标记。生物素化的MHC/肽通过添加链霉亲和素进行四聚化,可以进行荧光标记。四聚体可以通过荧光标记通过流式细胞术检测。在某些实施例中,MHC-肽四聚体测定用于检测或选择本公开的增强亲和力TCR。

[0122] 细胞因子水平可根据本文所述和本领域实践的方法确定,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)。由抗原特异性引发或刺激免疫反应引起的免疫细胞增殖和克隆扩增可以通过分离淋巴细胞来确定,例如外周血细胞样品中的循环淋巴细胞或来自淋巴结的细胞,用抗原刺激细胞并测量细胞因子产生、细胞增殖和/或细胞活力,例如通过掺入氚化胸苷或非放射性测定,例如MTT测定等。可以检查本文所述的免疫原对Th1免疫反应和Th2免疫反应之间平衡的影响,例如通过测定Th1细胞因子(如IFN-γ、IL-12、IL-2和TNF-β)和2型细胞因子(例如IL-4、IL-5、IL-9、IL-10和IL-13)的水平。

[0123] 多核苷酸和载体

[0124] 还提供了编码根据本公开的结合蛋白或其片段或部分的多核苷酸(例如,分离的多核苷酸)。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如本文所述的编码对WT-1特异的结合蛋白的分离的或重组的多核苷酸。

[0125] 在某些实施例中,对多核苷酸进行密码子优化以在靶宿主细胞中有效表达。密码子优化可以使用已知的技术和工具进行,例如使用GenScript® OptimumGene™工具;GeneArt®GeneOptimizer™(Sigma)等。密码子优化的序列包括部分密码子优化(即,至少一

个密码子优化用于在宿主细胞中表达)的序列和完全密码子优化的序列。用于在某些免疫宿主细胞中表达的密码子优化公开于,例如,Scholten等人,Clin.Immunol.119:135,2006。

[0126] 如本领域技术人员将认识到的,多核苷酸可以指任何形式的单链或双链DNA、cDNA或RNA,并且可以包括相互互补的核酸的正链和负链,包括反义DNA、cDNA和RNA。还包括siRNA、microRNA、RNA-DNA杂合体、核酶和其他各种天然或合成形式的DNA或RNA。

[0127] 在一些实施例中,编码本公开的结合蛋白的多核苷酸包含与SEQ ID NO:62-81中任一项所示的多核苷酸序列具有至少75%同一性(例如,75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)的多核苷酸。

[0128] 在某些实施例中,编码结合蛋白的多核苷酸包含(i)与SEQ ID NO:74所示的多核苷酸序列具有至少75%同一性的TCRβ链编码多核苷酸,以及与SEQ ID NO:66所示多核苷酸序列具有至少75%同一性的TCRα链编码多核苷酸;(ii)与SEQ ID NO:75所示的多核苷酸序列具有至少75%同一性的TCRβ链编码多核苷酸,以及与SEQ ID NO:67所示多核苷酸序列具有至少75%同一性的TCRα链编码多核苷酸;(iii)与SEQ ID NO:76所示的多核苷酸序列具有至少75%同一性的TCRβ链编码多核苷酸,以及与SEQ ID NO:68所示多核苷酸序列具有至少75%同一性的TCRα链编码多核苷酸;或(iv)与SEQ ID NO:77所示的多核苷酸序列具有至少75%同一性的TCRβ链编码多核苷酸,以及与SEQ ID NO:69所示多核苷酸序列具有至少75%同一性的TCRα链编码多核苷酸。

[0129] 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,或者可替换地,结合蛋白可以由多于一种多核苷酸编码。换言之,结合蛋白的组分或部分可以由两个或更多个多核苷酸编码,其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。

[0130] 在某些实施例中,编码本公开的结合蛋白的两个或更多个组分或部分的多核苷酸包含在单个开放阅读框中可操作地连接的两个或更多个编码序列。这种排列可以有利地允许所需基因产物的协调表达,例如同时表达TCR的α链和β链,使得它们以大约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链和β链)或CAR,被表达为单独的分子并且在翻译后缔合。在其他实施例中,本公开的结合蛋白的两个或更多个取代基基因产物被表达为单个多肽,其中部分由可切割或可去除的区段隔开。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是本领域已知的,并且包括例如Porcine teschovirus-1 2A(P2A-1)肽、Porcine teschovirus-2 2A(P2A-2)肽、Thoesa asigna病毒2A(T2A)肽、Equine rhinitis A病毒(ERAV)2A(E2A)肽和口蹄疫病毒2A(F2A)肽。自切割肽的示例性核苷酸和氨基酸序列在SEQ ID NO:84-93中提供。在某些实施例中,编码自切割肽的多核苷酸包含或由与SEQ ID NO:89-93中任一项所示的多核苷酸序列具有至少75%同一性的多核苷酸序列组成。在某些实施例中,编码的自切割肽包含或由与SEQ ID NO:84-88中任一项所示氨基酸序列的具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性氨基酸序列组成。

[0131] 应当理解,构想了编码通过自切割肽(例如,编码β-链的多核苷酸-自切割肽-编码α-链的多核苷酸;编码α-链的多核苷酸-自切割肽-编码β-链的多核苷酸)分离的两个感兴趣多肽的各种多核苷酸布置。

[0132] 相应地,在一些实施例中,编码结合蛋白的多核苷酸具有这样的结构,该结构包含

或具有(编码TCRβ结构域(例如链)的多核苷酸)-(编码自切割肽的多核苷酸)-(编码TCRβ结构域(例如链)的多核苷酸)的5'-末端至3'-末端。

[0133] 在某些实施例中,编码结合蛋白的多核苷酸包含或由与SEQ ID NO:78-81中任一项所示的多核苷酸序列具有至少75%(例如,75%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或更多)同一性的多核苷酸序列。在某些实施例中,多核苷酸包含多核苷酸序列,该多核苷酸序列包含或由SEQ ID NO:78-81中任一项所示的多核苷酸序列组成。

[0134] 其他方面,提供了编码结合蛋白的分离的多核苷酸,其中编码的结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):HLA复合物并且包含TCR Vα结构域和TCR Vβ结构域,其包含:(i)SEQ ID NO:19、22、25、28、31、34、37或40中任一项所示的氨基酸序列;(ii)SEQ ID NO:17、20、23、26、29、32、35或38中任一项所示的氨基酸序列;(iii)SEQ ID NO:18、21、24、27、30、33、36或39中任一项所示的氨基酸序列;(iv)氨基酸序列,其与SEQ ID NO:1-4或9-12中任一项所示的氨基酸序列具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性或者包含或由所述氨基酸序列组成;(v)氨基酸序列,其与SEQ ID NO:5-8或13-16中任一项所示的氨基酸序列具有至少90%同一性或者包含或由所述氨基酸序列组成;(vi)氨基酸序列,其与SEQ ID NO:46-53中任一项所示的氨基酸序列具有至少90%同一性或者包含或由所述氨基酸序列组成;(vii)氨基酸序列,其与SEQ ID NO:54-61中任一项所示的氨基酸序列具有至少90%同一性或者包含或由所述氨基酸序列组成;或(viii)(i)-(vii)的任何组合。

[0135] 在其他实施例中,编码的结合蛋白表达为转基因构建体的一部分,其编码和/或修饰的免疫细胞可以编码:一种或多种额外的辅助蛋白,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公开WO 2018/058002中描述了可用于编码和表达结合蛋白和辅助组分(例如,安全开关蛋白、选择标记、CD8共受体β-链或CD8共受体α-链中的一种或多种)的多核苷酸和转基因构建体,多核苷酸、转基因构建体和辅助组分(包括其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链中的任何一个或所有可以由多核苷酸序列编码或者,所述多核苷酸序列是单独的核酸分子或存在于单独的核酸分子上。

[0136] 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,并且具有用于药物级抗EGFR单克隆抗体、西妥昔单抗(Erbitux)tEGF受体(tEGFr;Wang等人,Blood 118:1255-1263,2011)的构象完整结合表位;半胱天冬酶多肽(例如,iCasp9;Straathof等人,Blood 105:4247-4254,2005;Di Stasi等人,N.Engl.J.Med.365:1673-1683,2011;Zhou和Brenner,Exp.Hematol.pii:S0301-472X(16)30513-6.doi:10.1016/j.exphem.2016.07.011)、RQR8(Philip等人,Blood 124:1277-1287,2014);源自人c-myc蛋白(Myc)的10-氨基酸标签(Kieback等人,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等人,2014)。

[0137] 可用于本公开的修饰的免疫细胞的其他辅助成分包括标签或选择标记,其允许细

胞被识别、分选、分离、富集或跟踪。例如,具有所需特性的标记免疫细胞(例如,抗原特异性TCR和安全开关蛋白)可以从样品中的未标记细胞中分拣出来,并更有效地激活和扩增以包含在所需纯度的产品中。

[0138] 如本文所用,术语"选择标记"包括核酸构建体(和编码的基因产物),其赋予细胞可识别的变化,从而允许检测和阳性选择用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,包含一个主要的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CD34最小表位的多核苷酸。在一些实施例中,CD34最小表位掺入CD8共受体茎结构域(Q8)的氨基末端位置。在其他实施例中,CD34最小结合位点序列可以与CD20的靶表位组合以形成T细胞的紧凑标记/自杀基因(RQR8)(Philip等人,2014,通过引用并入本文)。该构建体允许选择表达该构建体的免疫细胞,例如,使用与磁珠(Miltenyi)结合的CD34特异性抗体,并利用临床上接受的药物抗体利妥昔单抗,其允许选择性删除表达转基因的工程化T细胞(Philip等人,2014)。

[0139] 其他示例性选择标记还包括几种通常不在T细胞上表达的截短的I型跨膜蛋白:截短的低亲和力神经生长因子、截短的CD19和截短的CD34(参见例如,Di Stasi等人,N.Engl.J.Med.365:1673-1683,2011;Mavilio等人,Blood 83:1988-1997,1994;Fehse等人,Mol.Ther.1:448-456,2000;每篇文献均以其整体并入本文)。CD19和CD34的有用特性是现成的MiltenyiCliniMACs™选择系统的可用性,该系统可以针对这些标记物进行临床级分类。然而,CD19和CD34是相对较大的表面蛋白,可能会影响整合载体的载体包装能力和转录效率。也可以使用包含细胞外、非信号结构域或各种蛋白质(例如,CD19、CD34、LNGFR)的表面标记。可以使用任何选择标记,并且应该是良好生产规范可接受的。在某些实施例中,使用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。选择标记的其他实例包括例如报告基因,例如GFP、EGFP、β-gal或氯霉素乙酰转移酶(CAT)。在某些实施例中,例如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,通过免疫磁性选择)用于在本文描述的方法中使用的转导的感兴趣细胞。如本文所用,CD34标记区别于抗CD34抗体或者例如scFv、TCR或其他结合CD34的抗原识别部分。

[0140] 在某些实施例中,选择标记包含RQR多肽、截短的低亲和力神经生长因子(tNGFR)、截短的CD19(tCD19)、截短的CD34(tCD34)或其任意组合。

[0141] 作为背景,在免疫治疗细胞产物中包含$CD4^+$T细胞可以提供抗原诱导的IL-2分泌,并增强引入的细胞毒性$CD8^+$T细胞的持久性和功能(参见例如Kennedy等人,Immunol.Rev.222:129(2008);Nakanishi等人,Nature 462(7272):510(2009))。在某些情况下,$CD4^+$T细胞中的I类限制性TCR可能需要CD8共受体的转移以增强TCR对I类HLA肽复合物的敏感性。CD4共受体在结构上与CD8不同,并且已被证明是CD8共受体的无效替代物(参见例如Stone&Kranz,Front.Immunol.4:244(2013);也参见Cole等人,Immunology 137(2):139(2012)。因此,用于本公开的组合物和方法的另一种辅助蛋白包含CD8共受体或其组分。

[0142] 在某些实施例中,包含编码本公开的结合蛋白的异源多核苷酸的工程化免疫细胞可以进一步包含编码CD8共受体蛋白或其β链或α链组分的异源多核苷酸。

[0143] 在一些实施例中,编码的CD8共受体包括α链或其片段或变体。人CD8共受体α链前体的氨基酸序列是已知的,并提供于例如UniProtKB-P30433(也参见UniProtKB-P31783;-P10732;和-P10731)。

[0144] 在一些实施例中,编码的CD8共受体包括β链或其片段或变体。人CD8共受体β链前体的氨基酸序列是已知的,并提供于例如UniProtKB-P10966(也参见UniProtKB-Q9UQ56;-E9PD41;Q8TD28;和-P30434;和-P05541)。

[0145] 不希望受理论束缚,据信距宿主细胞表面的距离对于RQR多肽作为选择标记/安全开关的作用是重要的(Philip等人,2010(同上))。在一些实施例中,编码的RQR多肽包含在编码的CD8共受体的β链、α链或两者中,或者其中之一或两者的片段或变体中。在具体实施例中,修饰的免疫细胞包含编码iCasp9的异源多核苷酸和编码重组CD8共受体蛋白的异源多核苷酸,所述重组CD8共受体蛋白包含含有RQR多肽的β链并且进一步包含CD8α链。

[0146] 本公开的分离的多核苷酸可进一步包含编码如本文公开的安全开关蛋白、选择标记、CD8共受体β链或CD8共受体α链的多核苷酸,或可包含编码其任意组合的多核苷酸。

[0147] 在某些实施例中,本公开的修饰的免疫细胞进一步包含:(i)编码包含CD8共受体α链的胞外部分的多肽的异源多核苷酸,其中任选地,编码的多肽是或包含CD8共受体α链;(ii)编码包含CD8共受体β链的胞外部分的多肽的异源多核苷酸,其中任选地,编码的多肽是或包含CD8共受体β链;或(iii)(i)的多核苷酸和(ii)的多核苷酸,其中任选地,宿主细胞包含CD4+T细胞、CD8+T细胞或两者。

[0148] 在其他实施例中,修饰的免疫细胞包含:(a)编码包含CD8共受体α链的胞外部分的多肽的异源多核苷酸,其中任选地,编码的多肽是或包含CD8共受体α链;(b)编码包含CD8共受体β链的胞外部分的多肽的异源多核苷酸,其中任选地,编码的多肽是或包含CD8共受体β链;(c)编码位于(a)的多核苷酸和(b)的多核苷酸之间的自切割肽的多核苷酸。

[0149] 在一些实施例中,编码结合蛋白的多核苷酸进一步包含编码选择标记的多核苷酸。

[0150] 标准技术可用于重组DNA、肽和寡核苷酸合成、免疫测定和组织培养和转化(例如电穿孔、脂质转染)。酶促反应和纯化技术可以根据制造商的说明书或如本领域中通常完成的或如本文所述的那样进行。这些和相关的技术和程序通常可以根据本领域公知的常规方法进行,并且如在整个本说明书中引用和讨论的微生物学、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和更具体的参考文献中所述。参见例如Sambrook等人,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,Greene Pub.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 andCC 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);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)。

[0151] 某些实施例包括包含在载体中的多核苷酸。本领域技术人员可以容易地确定与本文公开的某些实施例一起使用的合适载体。典型的载体可以包含能够转运与其连接的另一种核酸或能够在宿主生物体中复制的多核苷酸。载体的一些实例包括质粒、病毒载体、粘粒等。一些载体可能能够在它们被引入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),而其他载体可以在引入宿主细胞后整合到宿主细胞的基因组中,从而与宿主基因组一起复制。此外,一些载体能够指导与其有效连接的基因的表达。根据相关实施例,应当进一步理解,如果将一种或多种药剂(例如,编码对WT-1特异的结合蛋白的多核苷酸、或其变体,如本文所述)共同施用给受试者,则每种药剂可存在于单独的或相同的载体中,可以将多个载体(每个载体包含不同的试剂或相同的试剂)引入细胞或细胞群或施用于受试者。

[0152] 在某些实施例中,本公开的多核苷酸可以与载体的某些元件可操作地连接。例如,可以可操作地连接多核苷酸序列,这些多核苷酸序列需要实现与其连接的编码序列的表达和加工。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;高效的RNA处理信号,如剪接和多聚腺苷酸化信号;稳定细胞质mRNA的序列;提高翻译效率的序列(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感兴趣的基因和以反式或远距离作用以控制感兴趣的基因的表达控制序列邻接,则它们可以可操作地连接。

[0153] 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、爱泼斯坦-巴尔病毒、巨细胞病毒)和痘病毒(例如、牛痘、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、乳多空病毒、嗜肝DNA病毒和肝炎病毒。逆转录病毒的实例包括禽白血病肉瘤、哺乳动物C型、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 et al.,Eds.,Lippincott-Raven Publishers,Philadelphia,1996)。

[0154] “逆转录病毒”是具有RNA基因组的病毒,RNA基因组使用逆转录酶逆转录成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(Gammaretrovirus)”是指逆转录病毒科的一个属。γ逆转录病毒的实例包括小鼠干细胞病毒、鼠白血病病毒、猫白血病病毒、猫肉瘤病毒和禽网状内皮细胞增多症病毒。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,并且可以转导一系列不同的细胞类型。慢病毒载体通常是在三个(包装、包膜和转移)或更多质粒瞬时转染到生产细胞后产生的。与HIV类似,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进行逆转录,这是由病毒逆转录酶复合物介导的。逆转录产物是双链线性病毒DNA,是病毒整合到感染细胞DNA中的底物。

[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衍生载体,例如慢病毒衍生载体。HIV-1衍生的载体属于这一类。其他实例包括源自HIV-2、FIV、马传染性贫血病毒、SIV和Maedi-Visna病毒(羊慢病毒)的慢病毒载体。使用逆转录病毒和慢病毒载体和包装细胞以用含有TCR或CAR转基因的病毒颗粒转导哺乳动物宿主细胞的方法在本领域中是已知的并且之前已经描述于例如:美国专利8,119,772;Walchli等人,PLoS One 6:327930,2011;Zhao等人,J.Immunol.174:4415,2005;Engels等人,Hum.Gene Ther.14:1155,2003;Frecha等人,Mol.Ther.18:1748,2010;以及Verhoeyen等人,Methods Mol.Biol.506:97,2009。逆转录病毒和慢病毒载体构建体和表达系统也可商购获得。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相关病毒(AAV)的载体;来源于单纯疱疹病毒(HSV)的载体,包括扩增子载体、复制缺陷型HSV和减毒HSV(Krisky等人,Gene Ther.5:1517,1998)。

[0156] 开发用于基因治疗用途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-病毒的那些(Jolly,D J.1999.Emerging Viral Vectors.pp 209-40 in Friedmann T.ed.The Development of Human Gene Therapy.New York:Cold Spring Harbor Lab),或质粒载体(如睡美人(Sleeping Beauty)或其他转座子

载体)。

[0157] 当病毒载体基因组包含多个要在宿主细胞中作为单独转录物表达的多核苷酸时,病毒载体还可以在两个(或更多)转录物之间包含允许双顺反子或多顺反子表达的额外序列。用于病毒载体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,载体能够将多核苷酸或转基因构建体递送至宿主细胞(例如,造血祖细胞或人免疫系统细胞)。在具体实施例中,载体能够将多核苷酸或转基因构建体递送至人免疫系统细胞,例如CD4+T细胞、CD8+T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、干细胞记忆T细胞、γδT细胞、自然杀伤细胞、树突细胞或其任意组合。在其他实施例中,载体能够将转基因构建体递送至幼稚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,编码本公开的多核苷酸或转基因构建体的载体可以进一步包含编码核酸酶的多核苷酸,所述核酸酶可用于在宿主细胞中执行染色体敲除(例如,CRISPR-Cas核酸内切酶或另一种核酸内切酶),或者可用于在基因疗法替代或基因修复疗法中将治疗性多核苷酸或转基因或其部分递送至宿主细胞。或者,用于染色体敲除或基因置换或基因修复治疗的核酸酶可以独立于编码本公开内容的多核苷酸或转基因构建体的载体递送至宿主细胞。

[0159] 宿主细胞

[0160] 本文还提供了宿主细胞,其包含本公开的异源多核苷酸(例如,编码任何本公开的结合蛋白或融合蛋白并且任选地编码一种或多种另外的蛋白质,例如选择标记、自切割肽、CD8共受体多肽或其任意组合)和/或表达本文公开的任何结合蛋白。这样的宿主细胞可以通过例如用本公开的载体转染或转导,和/或通过基因编辑来产生。

[0161] 在一些实施例中,宿主细胞包括免疫系统细胞,其可以是任何人类免疫系统细胞,例如本文所述的那些示例性免疫系统细胞。在某些实施例中,宿主细胞包括T细胞、NK细胞、NK-T细胞或其任意组合。在其他实施例中,T细胞包括$CD8^+$T细胞、$CD4^+$T细胞或两者。

[0162] 因此,在特定实施例中,修饰的免疫细胞包含编码根据本公开内容的结合蛋白的异源多核苷酸,其中所编码的结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):人白细胞抗原(HLA)复合体。

[0163] 在某些实施例中,编码的结合蛋白能够与SEQ ID NO.:94:HLA复合物结合,产生pEC_{50}为4.0、4.5、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、4.0、4.5、5.0、5.1、5.2、5.3、5.4、5.5、5.6、5.7、5.8、5.9、6.0、6.1、6.2、6.3、6.4、6.5或更高的IFNγ。

[0164] 在某些实施例中,肽:HLA复合物包含肽:HLA-A*201复合物。

[0165] 在任何本公开实施例中,当修饰的免疫细胞群体与抗原呈递细胞(例如表达HLA(如HLA-A*0201)的T2细胞、Jurkat细胞、树突细胞)共培养4小时时,在共培养物中用包含或由氨基酸序列RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94)组成的肽以10^{-4}μM或10^{-5}μM或10^{-6}μM的肽浓度脉冲的条件下,群体中50%或更多的修饰的免疫细胞产生干扰素-γ(IFN-γ)。在某些实施例中,当修饰的免疫细胞群与抗原呈递细胞(在某些情况下也称为"靶细胞")共培养时,在共培养物中用包含或由氨基酸序列RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94)组成的肽以约10^{-2}μM的肽浓度脉冲的条件下,群体中10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%或更多的修饰免疫细胞是$Nur77^+$(即表达Nur77),其中抗原呈递细胞任选地表达包括T2细胞、Jurkat细胞或两者,并且任选地是HLA-A*0201+。

[0166] 在一些实施例中,当修饰的免疫细胞群与抗原呈递细胞共培养时,在共培养物中用包含或由氨基酸序列RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94)组成的肽以10^{-3}μM的肽浓度脉冲的条件下,群体中10%、15%、20%或更多的修饰的免疫细胞是$Nur77^{+}$。

[0167] 在一些实施例中,结合蛋白具有pEC50为1.0、1.1、1.2、1.3、1.4、1.4、1.5、1.6、1.7、1.8、1.9、2.0、2.1、2.2、2.3、2.4、2.5、2.6或更高的Nur77表达(SEQ ID NO.:94:HLA,例如HLA-A*0201)。

[0168] 在任何本公开实施例中,当样品中修饰的免疫细胞和MDA-MB-468细胞以30:1的比例存在时,经修饰的免疫细胞能够杀死至少11%、12%、13%、14%、15%、20%、25%或更多的$HLA\text{-}A*0201^{+}$MDA-MB-468细胞。在某些实施例中,当样品中修饰的免疫细胞和MDA-MB-468细胞以10:1的比例存在时,经修饰的免疫细胞能够杀死至少10%或更多的$HLA\text{-}A*0201^{+}$MDA-MB-468细胞。在某些实施例中,当样品中修饰的免疫细胞和MDA-MB-468细胞以1:1的比例存在时,经修饰的免疫细胞能够杀死至少5%或更多的$HLA\text{-}A*0201^{+}$MDA-MB-468细胞。

[0169] 在任何本公开实施例中,如本文所述,可以使用4小时共培养测定杀伤力,任选使用标记的铬(例如,^{51}Cr)。

[0170] 在某些实施例中,当修饰的免疫细胞和Panc1细胞以30:1的比例存在时,修饰的免疫细胞能够杀死样品中21%、22%、23%、24%、25%或更多的Panc1细胞。在其他实施例中,当修饰的免疫细胞和Panc1细胞以10:1的比例存在时,修饰的免疫细胞能够杀死样品中10%、15%或更多的Panc1细胞。在其他实施例中,当修饰的免疫细胞和Panc1细胞以9:1、8:1、7:1、6:1或5:1的比例存在时,修饰的免疫细胞能够杀死样品中10%、15%或更多的Panc1细胞。

[0171] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞:在4小时共培养中具有针对$HLA\text{-}A*0201^{+}$MDA-MB-468细胞和/或针对Panc1细胞的增加的杀伤活性,和/或在与肽脉冲的靶细胞共培养4小时具有改善的IFN-γ产生,和/或与包含编码T细胞受体(包含具有SEQ ID NO:82所示氨基酸序列的TCRα链和具有SEQ ID NO:83所示氨基酸序列的TCRβ链)的多核苷酸的参考免疫细胞相比,进一步减少Panc-1癌细胞的增殖(例如,超过60、75、100、125、150或更多小时,如使用IncuCyte分析所测量的)。

[0172] 在一些实施例中,本公开的经修饰的免疫细胞在超过50、100、150或更多小时内阻止或基本上阻止Panc-1癌细胞的生长和/或增殖,其中任选地,经修饰的免疫细胞和Panc-1癌细胞以8:1的效应物:靶细胞比例存在。

[0173] 在任何本公开实施例中,如本文所述,可以使用4小时共培养测定杀伤力,任选地使用标记的铬(例如^{51}Cr)。

[0174] 应当理解,除了编码的结合蛋白之外,“参考”免疫细胞是相同的免疫细胞类型并且在表型上与受试者修饰的免疫细胞相同或基本相同。例如,对于修饰的CD8+人T细胞,参考免疫细胞是CD8+人T细胞,并且可以例如来自与修饰的免疫细胞相同的来源或供体。

[0175] 在任何上述实施例中,编码的结合蛋白可以是TCR、CAR或scTCR。在任何上述实施例中,编码的结合蛋白能够在不依赖CD8或在不存在CD8的情况下与细胞表面上的WT-1肽(SEQ ID NO.:94):HLA复合物结合。

[0176] 在任何本公开实施例中,由修饰的免疫细胞表达的结合蛋白可以包含TCR、单链TCR(scTCR)、嵌合抗原受体(CAR)或其任意组合。

[0177] 可以修饰任何合适的免疫细胞以包括编码本公开的结合蛋白的异源多核苷酸,包括例如T细胞、NK细胞、NK-T细胞、巨噬细胞、单核细胞或树突细胞。在一些实施例中,修饰的免疫细胞包括$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞或两者。在一些实施例中,修饰的免疫细胞包含CD4-CD8-双阴性T细胞或γδT细胞。在一些实施例中,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。用所需核酸转染/转导T细胞的方法已经被描述(例如,美国专利申请公开US 2004/0087025)为具有使用所需靶标特异性的T细胞的过继转移程序(例如,Schmitt等人,Hum.Gen.20:1240,2009;Dossett等人,Mol.Ther.17:742,2009;Till等人,Blood 112:2261,2008;Wang等人,Hum.Gene Ther.18:712,2007;Kuball等人,Blood 109:2331,2007;US 2011/0243972;US 2011/0189141;Leen等人,Ann.Rev.Immunol.25:243,2007),从而基于本文教导而构想将这些方法适用于本公开实施例。

[0178] 可以使用任何合适的方法来转染或转导细胞,例如T细胞,或施用本方法的多核苷酸或组合物。用于将多核苷酸递送至宿主细胞的已知方法包括,例如,使用阳离子聚合物、类脂分子和某些商业产品,例如IN-VIVO-JET PEI。其他方法包括离体转导、注射、电穿孔、DEAE-葡聚糖、超声加载、脂质体介导的转染、受体介导的转导、微粒轰击、转座子介导的转移等。转染或转导宿主细胞的更进一步的方法使用本文进一步详细描述的载体。在某些实施例中,宿主细胞被基因编辑以在其基因组中包含编码如本文提供的结合蛋白(或其他蛋白质或多肽)的多核苷酸。

[0179] 在任何前述实施例中,修饰的免疫细胞可以修饰以减少或消除编码参与免疫信号传导或其他相关活性的多肽的一个或多个内源基因的表达(例如,通过如本文所述的染色体基因敲除),和/或以包含如本文提供的异源多核苷酸。示例性基因敲除包括编码PD-1、LAG-3、CTLA4、TIM3、HLA分子、TCR分子等的基因敲除。不希望受理论束缚,某些内源性表达的免疫细胞蛋白可能被接受修饰的免疫细胞的同种异体宿主识别为外来的,这可能导致修饰的免疫细胞(例如,HLA等位基因)的消除,或可能下调修饰的免疫细胞(例如,PD-1、LAG-3、CTLA4)的免疫活性,或可能干扰本公开的异源表达的结合蛋白(例如,修饰的T细胞的内源性TCR,其结合非WT-1抗原并可能干扰修饰的免疫细胞结合表达WT-1抗原的细胞),或可能与异源结合蛋白竞争表达。

[0180] 因此,降低或消除此类内源基因或蛋白质的表达或活性可以提高结合蛋白的活性、耐受性、表达或修饰的免疫细胞在自体或异体宿主环境中的持久性,并且可以允许细胞的普遍施用(例如给任何接受者,无论HLA类型如何)。在某些实施例中,修饰的免疫细胞是供体细胞(例如,同种异体)或自体细胞。在某些实施例中,本公开的修饰的免疫细胞包含这样的一个或多个基因的染色体基因敲除,所述基因编码PD-1、LAG-3、CTLA4、TIM3、TIGIT、HLA组分(例如,编码α1巨球蛋白、α2巨球蛋白、α3巨球蛋白、β1微球蛋白或β2微球蛋白)或TCR组分(例如,编码TCR可变区或TCR恒定区的基因)(参见例如Torikai等人,Nature Sci.Rep.6:21757(2016);Torikai等人,Blood 119(24):5697(2012);和Torikai等人,Blood 122(8):1341(2013),其中的基因编辑技术、组合物和过继细胞疗法的全部内容以引用的方式并入本文)。

[0181] 如本文所用,术语"染色体基因敲除"是指阻止(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的宿主细胞中的基因遗传改变或引入抑制剂。导致染色体基因敲除的改变可以包括,例如,引入的无义突变(包括过早终止密码子的形成)、错

义突变、基因缺失和链断裂,以及抑制宿主细胞中的内源性基因表达的的抑制性核酸分子的异源表达。

[0182] 在某些实施例中,染色体基因敲除或基因敲入是通过宿主细胞的染色体编辑实现的。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,从而灭活或“敲除”靶基因。核酸内切酶可以是天然存在的、重组的、遗传修饰的或融合的核酸内切酶。由内切核酸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)的不同机制进行修复。在同源重组过程中,供体核酸分子可用于供体基因“敲入”、靶基因“敲除”,并可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是容易出错的修复过程,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替换、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megaTALs。

[0183] 如本文所用,“锌指核酸酶”(ZFN)是指包含与非特异性DNA切割结构域(如Fok1核酸内切酶)融合的锌指DNA结合结构域的融合蛋白。大约30个氨基酸的每个锌指基序与大约3个DNA碱基对结合,并且可以改变某些残基上的氨基酸以改变三联体序列特异性(参见例如Desjarlais等人,Proc.Natl.Acad.Sci.90:2256-2260,1993;Wolfe等人,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(例如长度范围为约9至约18个碱基对的区域)的结合特异性。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,并且在DSB位点促进包含与基因组同源的侧翼序列的转基因的靶向整合同源定向修复。或者,由ZFN产生的DSB可以通过非同源末端连接(NHEJ)修复来敲除靶基因,这是一种容易出错的细胞修复途径,导致切割位点处核苷酸的插入或缺失。在某些实施例中,基因敲除包括使用ZFN分子进行的插入、缺失、突变或其组合。

[0184] 如本文所用,“转录激活因子样效应核酸酶”(TALEN)是指包含TALE DNA结合结构域和DNA切割结构域(例如FokI核酸内切酶)的融合蛋白。“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,具有不同的第12和13个氨基酸。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),与特定的核苷酸识别相关。已经确定了这些TALE的DNA识别的自然(规范)密码,使得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核苷酸结合,NN(天冬酰胺-天冬酰胺)与G或A核苷酸结合,和NG(天冬酰胺-甘氨酸)与T核苷酸结合。非经典(非典型)RVD也是已知的(参见例如美国专利公开US 2011/0301073,该非典型RVD通过引用以其整体并入本文)。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)连接来自双链断裂两侧的DNA,其中很少或没有用于退火的序列重叠,从而引入敲除基因表达的错误。或者,同源定向修复可以在DSB位点引入转基因,前提是转基因中存在同源侧翼序列。在某些实施例中,基因敲除包括插入、缺失、突变或其组合,并且使用TALEN分子进行。

[0185] 如本文所用,“成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核酸酶通过碱基配对互补性来识别基因组内的靶

位点的系统(称为原型间隔子),然后如果短的、保守的原型间隔区相关基序(PAM)紧跟互补靶序列的3',则切割DNA。基于Cas核酸酶的序列和结构,CRISPR/Cas系统分为三种类型(即I型、II型和III型)。I型和III型中CrRNA引导的监测复合物需要多个Cas亚基。研究最多的II型系统至少包含三个组成部分:RNA引导的Cas9核酸酶、crRNA和反式作用CrRNA(tracrRNA)。TracrRNA包含双链体形成区。CrRNA和TracrRNA形成双链体,其能够与Cas9核酸酶相互作用,并通过crRNA上的间隔区与PAM上游的目标DNA上的原型间隔区之间的Watson-Crick碱基配对将Cas9/crRNA:tracrRNA复合物引导至目标DNA上的特定位点。Cas9核酸酶在crRNA间隔区定义的区域内切割双链断裂。NHEJ的修复导致插入和/或缺失破坏目标基因座的表达。或者,可以通过同源定向修复将具有同源侧翼序列的转基因引入DSB位点。CrRNA和TracrRNA可以工程化为单一的向导RNA(sgRNA或gRNA)(参见例如,Jinek等人,Science 337:816-21,2012)。此外,可以改变或编程与靶位点互补的引导RNA区域以靶向所需序列(Xie等人,PLOS One 9:e100448,2014;美国专利申请号US 2014/0068797,美国专利申请号US 2014/0186843;美国专利号8,697,359,以及PCT申请号WO 2015/071474;每一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,并且使用CRISPR/Cas核酸酶系统进行。

[0186] 示例性gRNA序列和使用其敲除编码免疫细胞蛋白的内源基因的方法包括Ren等人,Clin.Cancer Res.23(9):2255-2266(2017)中描述的那些,其中的gRNAs、Cas9 DNAs、载体和基因敲除技术通过引用整体并入本文。

[0187] 可以使用替代的Cas核酸酶,包括但不限于Cas 12、Cas 13和Cas 14核酸酶及其变体。例如,可以使用WO 2019/178427中公开的Cas核酸酶,其通过引用整体并入本文(包括其中公开的Cas核酸酶、CRISPR-Cas系统和相关方法)。

[0188] 如本文所用,"大范围核酸酶"也称为"归巢核酸内切酶",是指以大识别位点(约12至约40个碱基对的双链DNA序列)为特征的内切脱氧核糖核酸酶。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:97)、GIY-YIG(SEQ ID NO:98)、HNH、His-Cys box和PD-(D/E)XK(SEQ ID NO:99)。示例性大范围核酸酶包括I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII,其识别序列是已知的(参见例如美国专利号5,420,032和6,833,252;Belfort等人,Nucleic Acids Res.25:3379-3388,1997;Dujon等人,Gene 82:115-118,1989;Perler等人,Nucleic Acids Res.22:1125-1127,1994;Jasin,Trends Genet.12:224-228,1996;Gimble等人,J.Mol.Biol.263:163-180,1996;Argast等人,J.Mol.Biol.280:345-353,1998)。

[0189] 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组分编码基因的靶标的位点特异性基因组修饰。在其他实施例中,对靶基因具有新的结合特异性的工程化大范围核酸酶用于位点特异性基因组修饰(参见例如Porteus等人,Nat.Biotechnol.23:967-73,2005;Sussman等人,J.Mol.Biol.342:31-41,2004;Epinat等人,Nucleic Acids Res.31:2952-62,2003;Chevalier等人,Molec.Cell 10:895-905,2002;Ashworth等人,Nature 441:656-659,2006;Paques等人,Curr.GeneTher.7:49-66,2007;美国专利公开号US 2007/0117128;US 2006/0206949;US 2006/0153826;US 2006/0078552;和US 2004/0002092)。在其他实施例

中,使用已经用TALEN的模块化DNA结合结构域修饰的归巢核酸内切酶产生染色体基因敲除,以制造称为megaTAL的融合蛋白。MegaTAL不仅可用于敲除一个或多个靶基因,而且当与编码目标多肽的外源供体模板组合使用时,还可用于引入(敲入)异源或外源多核苷酸。

[0190] 在某些实施例中,染色体基因敲除包含引入宿主细胞(例如免疫细胞)中的抑制性核酸分子,该宿主细胞包含编码特异性结合肿瘤相关抗原的抗原特异性受体的异源多核苷酸,其中抑制性核酸分子编码靶特异性抑制剂,并且其中编码的靶特异性抑制剂抑制宿主免疫细胞中的内源性基因表达(即,PD-1、TIM3、LAG3、CTLA4、TIGIT、HLA组分或TCR组分或其任意组合)。

[0191] 在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。染色体基因敲除也可以从敲除后基因表达的缺失(例如,基因编码的mRNA或多肽产物的缺失)推断出来。

[0192] 任何前述基因编辑技术可用于将本公开的多核苷酸(例如,编码结合蛋白和/或CD8共受体多肽)引入宿主细胞基因组。在一些实施例中,将异源多核苷酸引入编码内源性TCR组分、HLA组分、PD-1、LAG-3、CTLA4、TIM3或TIGIT的基因座,或安全港基因座(例如Rosa26、AAVS1、CCR5等)。在某些实施例中,将编码结合蛋白和/或编码CD8共受体多肽的异源多核苷酸引入宿主细胞TRAC基因座中。在其他实施例中,引入了宿主细胞TRBC基因座的染色体敲除。

[0193] 因此,在某些实施例中,提供了宿主细胞(例如,修饰的免疫细胞),其在内源性TRAC基因座中包含编码本公开的结合蛋白的异源多核苷酸、本公开的CD8共受体、或两者。在其他实施例中,宿主细胞包含内源性TRBC基因座的染色体敲除。

[0194] 在另一个方面,本文提供了组合物,其包含本公开的修饰的免疫细胞(和/或多核苷酸、载体或结合蛋白)和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

[0195] 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的比例包含(i)组合物,该组合物包含至少约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%修饰的CD4+T细胞,和(ii)组合物,该组合物包含至少约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CD8+T细胞,其中单位剂量含有减少量的或基本上不含幼稚T细胞(即,与具有相当数量的PBMC的患者样品相比,单位剂量中存在的幼稚T细胞群体的百分比少于约50%、少于约40%、少于约30%、少于约20%、少于约10%、少于约5%或小于约1%)。

[0196] 在一些实施例中,单位剂量以约1:1的比例包含(i)包含至少约50%修饰的CD4+T细胞的组合物,和(ii)包含至少约50%修饰的CD8+T细胞的组合物,其中单位剂量含有减少量的或基本上不含幼稚T细胞。在其他实施例中,单位剂量以约1:1的比例包含(i)包含至少约60%修饰的CD4+T细胞的组合物,与(ii)包含至少约60%的修饰的CD8+T细胞的组合物,其中单位剂量含有减少量的或基本上不含幼稚T细胞。在其他实施例中,单位剂量以约1:1的比例包含(i)包含至少约70%修饰的CD4+T细胞的组合物,与(ii)包含至少约70%修饰的CD8+T细胞的组合物,其中单位剂量含有减少量的或基本上不含幼稚T细胞。在一些实施例中,单位剂量以约1:1的比例包含(i)包含至少约80%修饰的CD4+T细胞的组合物,与(ii)包含至少约80%修饰的CD8+T细胞的组合物,其中单位剂量含有减少量的或基本上不含幼稚T

细胞。在一些实施例中,单位剂量以约1:1的比例包含(i)包含至少约85%修饰的CD4+T细胞的组合物,与(ii)包含至少约85%修饰的CD8+T细胞的组合物,其中单位剂量含有减少量的或基本上不含幼稚T细胞。在一些实施例中,单位剂量以约1:1的比例包含(i)包含至少约90%修饰的CD4+T细胞的组合物,与(ii)包含至少约90%修饰的CD8+T细胞的组合物,其中单位剂量含有减少量的或基本上不含幼稚T细胞。

[0197] 应当理解,本公开的单位剂量可以包含如本文所述的修饰的免疫细胞(即,表达对根据SEQ ID NO:94的WT-1抗原特异的结合蛋白)和表达对不同抗原(例如,不同的WT-1抗原(例如,包含SEQ ID NO.:100))特异或对来自不同蛋白质或靶标的抗原特异的修饰的免疫细胞,不同蛋白质或靶标例如为BCMA、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、TGFBR2、TGFBR1、IL6R、gp130、Lewis A、Lewis Y、TNFR1、TNFR2、PD1、PD-L1、PD-L2、HVEM、MAGE-A(例如,包括MAGE-A1、MAGE-A3和MAGE-A4)、间皮素、NY-ESO-1、PSMA、RANK、ROR1、TNFRSF4、CD40、CD137、TWEAK-R、HLA、与HLA结合的肿瘤或病原体相关肽、与HLA结合的hTERT肽,与HLA结合的酪氨酸酶肽、与HLA结合的KRAS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、HA1-H、Robo1、甲胎蛋白(AFP)、Frizzled、OX40、PRAME、BRAF、核心结合因子、MR-1(Crowther等人,Nature Immunol.21:175-185(2020))和SSX-2等)。例如,单位剂量可以包含表达特异性结合WT-1:HLA复合物的结合蛋白的修饰的$CD8^+$T细胞和表达特异性结合CD19抗原的结合蛋白(例如,CAR)的修饰的$CD4^+$T细胞(和/或修饰的CD8+T细胞)。

[0198] 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。

[0199] 在一些实施例中,提供了组合物,其包含(i)如本文所公开的经修饰的免疫细胞,并且进一步包含(ii)包含编码结合蛋白的多核苷酸的免疫细胞,所述结合蛋白包含TCR Vα和TCR Vβ并且能够特异性结合VLDFAPPGA(SEQ ID NO.:100):HLA复合物,其中任选地,HLA包括HLA-A*0201,并且其中任选地,(i)的经修饰的免疫细胞和(ii)的免疫细胞各自独立地选自T细胞、NK细胞和NK-T细胞。

[0200] 在某些其他实施例中,(ii)中的免疫细胞的结合蛋白分别包含:(a)SEQ ID NO.:101-103和105-107的CDR1a、CDR2a、CDR3a、CDR1β、CDR2β和CDR3β氨基酸序列,并且其中任选地,(1)Vα与SEQ ID NO.:104中所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由所述氨基酸序列组成,和/或(2)Vβ与SEQ ID NO.:108所示氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由所述氨基酸序列组成;(b)SEQ ID NO.:109-110和113-115的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β氨基酸序列,并且其中任选地,(1)Vα与SEQ ID NO.:112中所示的氨基酸序列具有至少90%(例如,90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%)同一性、包含或由所述氨基酸序列组成,和/或(2)Vβ与SEQ ID NO.:116所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由所述氨基酸序列组成;(c)SEQ ID NO.:117-119和121-123的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β氨基酸序列,并且其中任选地,(1)Vα与SEQ ID NO.:120所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由所述氨基酸序列组成和/或(2)Vβ与SEQ ID NO.:124所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由所述

氨基酸序列组成。

[0201] 用途

[0202] 在某些方面,本公开内容涉及用于治疗与WT-1表达相关的疾病或病症的方法,该方法通过向有需要的人类受试者施用有效量的根据本公开任一实施例的结合蛋白、多核苷酸、载体、细胞或组合物来进行。

[0203] “治疗(treat)”或“治疗(treatment)”或“改善”是指对受试者(例如,人类或非人类哺乳动物,例如灵长类动物、马、猫、狗、山羊、小鼠、大鼠)的疾病、病症或状况的医学管理。治疗或预防/防备益处包括改善临床结果;减少或减轻与疾病相关的症状;减少症状的发生;改善生活质量;延长无病状态;减轻疾病程度,稳定疾病状态;延迟疾病进展;缓解;存活;延长存活;或其任意组合。

[0204] 如本文所用,“治疗有效量”或“有效量”是指足以产生治疗效果,包括改善的临床结果的修饰免疫细胞的量;减轻或减轻与疾病相关的症状;减少症状的发生;提高生活质量;更长的无病状态;减轻疾病程度,稳定疾病状态;延缓疾病进展;缓解;生存;或以统计学上显著的方式延长生存期。

[0205] 如本文所用,“统计显著”是指当使用学生T检验计算时,p值为0.050或更小,并且表明所测量的特定事件或结果不太可能是偶然出现的。

[0206] 可以根据本公开的方法治疗的受试者通常是人类和其他灵长类动物受试者,例如用于兽医学和/或研究目的的猴子和猿。小鼠或大鼠也可用于研究目的。在任何上述实施例中,受试者可以是人类受试者。受试者可以是男性或女性并且可以是任何合适的年龄,包括婴儿、少年、青少年、成人和老年受试者。根据本公开的细胞可以按照医学领域技术人员确定的适合待治疗的疾病、状况或病症的方式施用。在任何上述实施例中,如本文所述的修饰的免疫细胞或单位剂量通过静脉内、腹膜内、肿瘤内、进入骨髓、进入淋巴结或进入脑脊液给药,以便遇到靶细胞(例如,白血病细胞)。组合物的合适剂量、合适持续时间和给药频率将由多个因素决定,诸如患者状况;疾病、状况或病症的大小、类型和严重程度;活性成分的具体形式;和给药方法等。

[0207] 当提及单独施用的单个活性成分或表达单一活性成分的细胞时,治疗有效量是指该成分或单独表达该成分的细胞的效果。当提及组合时,治疗有效量是指活性成分或组合的辅助活性成分与表达导致治疗效果的活性成分的细胞的组合量,无论是连续给药还是同时给药。组合也可以是表达多于一种活性成分的细胞。

[0208] 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或抗原特异性免疫细胞(例如T细胞)。过继性细胞免疫疗法可以是自体的(免疫细胞来自受体)、同种异体的(免疫细胞来自同一物种的供体)或同基因的(免疫细胞来自与受体遗传相同的供体)。

[0209] 与WT-1表达相关的病症包括其中存在WT-1细胞或分子事件的低活性、过度活性或不适当活性的任何紊乱或病症,并且通常由患病细胞(例如,白血病细胞)中WT-1表达相对于正常细胞异常高(具有统计学意义)水平引起。患有此类病症或状况的受试者将受益于用目前描述的实施例的组合物或方法进行的治疗。因此,与WT-1过表达相关的一些病症可能包括急性和慢性病症和疾病,例如使受试者易患特定病症的那些病理病症。

[0210] 与WT-1表达相关的疾病和病症包括受试者中存在发育异常、癌性和/或转化细胞,

包括例如赘生性细胞、肿瘤、非接触抑制或致癌转化细胞等(例如实体癌;血液系统癌症,包括淋巴瘤和白血病,例如急性髓细胞白血病、慢性髓细胞白血病等),它们是本领域已知的并且已建立诊断和分类标准(例如,Hanahan和Weinberg,2011Cell 144:646;Hanahan和Weinberg 2000 Cell 100:57;Cavallo等人,2011Canc.Immunol.Immunother.60:319;Kyrigideis等人,2010 J.Carcinog.9:3)。在某些实施例中,此类癌细胞可以是急性髓性白血病、B细胞成淋巴细胞白血病、T细胞成淋巴细胞白血病或骨髓瘤的细胞,包括能够引发和连续移植任何这些类型的癌症的癌症干细胞(参见例如,参见Park等人2009 Molec.Therap.17:219)。根据某些实施例,几乎任何类型的以WT-1过表达为特征的癌症都可以通过使用本文公开的组合物和方法来治疗,包括血液学癌症(例如,白血病,包括急性髓性白血病(AML)、T或B细胞淋巴瘤、骨髓瘤等)。此外,“癌症”可以指任何加速增殖的细胞,包括实体瘤、腹水瘤、血液或淋巴或其他恶性肿瘤;结缔组织恶性肿瘤;转移性疾病;器官或干细胞移植后的最小残留疾病;多重耐药性癌症、原发性或继发性恶性肿瘤、与恶性肿瘤相关的血管生成或其他形式的癌症。在本公开实施例中还考虑了特定实施例,其中仅包括上述类型的疾病中的一种,或者可以排除特定病症而不管它们是否以WT-1过表达为特征。

[0211] 与WT-1过表达相关的病症的一些实例包括受试者中的过度增殖性疾病和增殖性疾病,包括肿瘤、赘生物、癌症、恶性肿瘤等。除了活化或增殖细胞之外,过度增殖性或增殖性疾病还可以包括细胞死亡过程的异常或失调,无论是通过坏死还是凋亡实现的。这种细胞死亡过程的异常可能与多种病症有关,包括癌症(包括原发性、继发性恶性肿瘤以及转移瘤)或其他病症。

[0212] 在某些实施例中,目前的方法可用于治疗血液恶性肿瘤或实体癌。示例性的血液恶性肿瘤包括急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性髓细胞白血病(AML,包括难治性和复发性AML,并且包括急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性粒单核细胞白血病(例如,伴有或不伴有嗜酸性粒细胞增多症)、急性单核细胞白血病、急性红细胞白血病和急性巨核细胞白血病)、慢性粒细胞白血病(CML)、慢性粒细胞白血病、慢性嗜酸性粒细胞白血病(CEL)、骨髓增生异常综合征(MDS)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或多发性骨髓瘤(MM,包括难治性和复发性MM)。

[0213] 在某些实施例中,本公开的方法可用于治疗实体癌,例如胆管癌、膀胱癌、骨和软组织癌、脑瘤、乳腺癌(breast cancer)、乳腺癌(breast carcinoma)、宫颈癌、结肠癌、结直肠腺癌、结直肠癌、硬纤维瘤、胚胎癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、胃腺癌、多形性胶质母细胞瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、弥漫性腹膜间皮瘤、恶性胸膜间皮瘤、神经胶质瘤、星形细胞瘤、妇科肿瘤、头颈部鳞状细胞癌、肝癌、肝细胞癌、肺癌、非小细胞肺癌、恶性黑色素瘤、骨肉瘤、卵巢癌(如上皮性卵巢癌、卵巢癌)、输卵管癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胰腺导管腺癌、原发性星形细胞瘤、原发性甲状腺癌、前列腺癌、肾癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、成骨肉瘤、睾丸生殖细胞瘤、尿路上皮癌、子宫肉瘤、子宫癌肉瘤或子宫癌。

[0214] 还提供了药物组合物,其包含用于根据本文所述的任何方法使用的结合蛋白、多核苷酸、载体、宿主细胞和/或修饰的免疫细胞(任选地与编码能够结合SEQ ID NO.:100:HLA复合物的结合蛋白的免疫细胞组合)。如医学领域的技术人员所确定的,药物组合物可以以适合待治疗(或预防)的疾病或病症的方式施用。组合物的合适剂量和合适的持续时间和给药频率将由以下因素决定:患者的健康状况、患者的体型(即体重、质量或身体面积)、

患者症状的类型和严重程度、活性成分的具体形式和给药方法。一般而言,适当的剂量和治疗方案以足以提供治疗和/或预防益处(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,或更长时间的无病期和/或总生存期,或症状严重程度的减轻)的量提供组合物。

[0215] 如本文所述,药物组合物的有效量是指在剂量和所需时间段内足以实现所需临床结果或有益治疗的量。可以在一次或多次给药中递送有效量。如果施用给已知或确认患有疾病或疾病状态的受试者,则术语"治疗量"可用于提及治疗,而"预防有效量"可用于描述作为预防性过程向受试者施用有效量,该受试者容易或有患上疾病或疾病状态(例如,复发)的风险。

[0216] 在某些实施例中,方法包括向已经接受、正在接受或将接受包含编码结合蛋白的多核苷酸的免疫细胞施用如本文提供的经修饰的免疫细胞,所述结合蛋白包含TCR Vα和TCR Vβ并且能够特异性结合VLDFAPPGA(SEQ ID NO.:100):HLA复合物,其中任选地,HLA包括HLA-A*0201,并且其中任选地,修饰的免疫细胞和免疫细胞各自独立地选自T细胞、NK细胞和NK-T细胞。在某些实施例中,能够特异性结合VLDFAPPGA(SEQ ID NO.:100):HLA复合物的结合蛋白分别包含:(a)SEQ ID NO.:101-103和105-107的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β氨基酸序列,并且其中任选地,(1)Vα与SEQ ID NO.:104中所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由所述氨基酸序列组成和/或(2)Vβ与SEQ ID NO.:108所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由所述氨基酸序列组成;

[0217] (b)SEQ ID NO:109-110和113-115的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β氨基酸序列,并且其中,任选地,(1)Vα与SEQ ID NO.:112中所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由所述氨基酸序列组成,和/或(2)Vβ与SEQ ID NO.:116中所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由所述氨基酸序列组成;或者(c)SEQ ID NO.:117-119和121-123的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β氨基酸序列,并且其中任选地,(1)Vα与SEQ ID NO.:120所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、包含或由所述氨基酸序列组成,和/或(2)Vβ与SEQ ID NO.:124所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由所述氨基酸序列组成。

[0218] 一般而言,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。对肿瘤蛋白的预先存在的免疫反应的增加通常与改善的临床结果相关。这种免疫反应通常可以使用标准增殖、细胞毒性或细胞因子测定来评估,这些测定在本领域中是常规的并且可以使用在治疗之前和之后从受试者获得的样品进行。

[0219] 对于预防性使用,剂量应足以预防、延缓与疾病或病症相关的疾病的发作或减轻其严重性。根据本文所述的方法施用的组合物的预防益处可以通过进行临床前(包括体外和体内动物研究)和临床研究并通过适当的统计学、生物学和临床方法和技术分析从中获得的数据来确定,所有这些都可以由本领域技术人员容易地实践。

[0220] 本文考虑的某些治疗或预防方法包括施用宿主细胞(其可以是自体的、同种异体的或同系的),该宿主细胞包含如本文所述的稳定整合到细胞染色体中或作为染色体外核酸存在的所需核酸分子酸分子。例如,可以使用自体、同种异体或同源免疫系统细胞(例如,

T细胞、抗原呈递细胞、自然杀伤细胞)离体产生这样的细胞组合物,以施用所需的靶向WT-1的T细胞组合物作为过继免疫疗法。在某些实施例中,免疫细胞是$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、$CD4^-CD8^-$双阴性T细胞、γδT细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞或其任意组合。在其他实施例中,免疫细胞是幼稚T细胞、中枢记忆T细胞、效应记忆T细胞或其任意组合。

[0221] 组合物或单位剂量中的细胞量是至少一种细胞(例如,一种修饰的$CD8^+$T细胞亚群(例如,任选地包含记忆和/或幼稚$CD8^+$T细胞);一种修饰的$CD4^+$T细胞亚群(例如,任选地包含记忆和/或幼稚$CD4^+$T细胞))或更典型地大于10^2个细胞,例如,多达10^4个、多达10^5个、多达10^6个、多达10^7个、多达10^8个、多达10^9个、多达10^{10}个或多达10^{11}个细胞。在某些实施例中,细胞以约10^4至约10^{11}个细胞/m^2的范围施用,优选在约10^5至约10^9个细胞/m^2的范围内。在一些实施例中,施用的剂量包括至多约$3.3x10^5$个细胞/kg。在一些实施例中,给药剂量包括至多约1×10^6个细胞/kg。在一些实施例中,给药剂量包括至多约3.3×10^6个细胞/kg。在一些实施例中,给药剂量包括至多约1×10^7个细胞/kg。在某些实施例中,将修饰的免疫细胞以包含至多约$5x10^4$个细胞/kg、$5x10^5$个细胞/kg、$5x10^6$个细胞/kg或至多约$5x10^7$个细胞/kg。在某些实施例中,以包括至少约5×10^4个细胞/kg、5×10^5个细胞/kg、5×10^6个细胞/kg或至多约5×10^7个细胞/kg的剂量向受试者施用修饰的免疫细胞。细胞的数量将取决于组合物的最终用途以及其中包含的细胞类型。例如,经修饰以含有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%或更多这样的细胞。对于本文提供的用途,细胞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10^4个细胞/ml并且通常大于10^7个细胞/ml,通常为10^8个细胞/ml或更大。细胞可以作为单次输注或在一定时间范围内以多次输注的形式施用。临床相关数量的免疫细胞可以分配到多个输注中,这些输注累积等于或超过10^6、10^7、10^8、10^9、10^{10}或10^{11}个细胞。在某些实施例中,单位剂量的修饰免疫细胞可以与来自同种异体供体的造血干细胞共同施用(例如,同时(simultaneously)或同时(contemporaneously))。在一些实施例中,包含在单位剂量中的一种或多种修饰的免疫细胞对于受试者是自体的。

[0222] 本文所述的药物组合物可存在于单位剂量或多剂量容器中,例如密封安瓿或小瓶。此类容器可冷冻以保持制剂在使用前的稳定性。在某些实施例中,单位剂量包含如本文所述的重组宿主细胞,其剂量为约10^4个细胞/m^2至约10^{11}个细胞/m^2。开发用于在各种治疗方案中使用本文所述的特定组合物的合适的给药和治疗方案,包括例如肠胃外或静脉内给药或制剂。

[0223] 在某些实施例中,包含如本文公开的修饰的免疫细胞的药物组合物还包含药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。术语“药学上可接受的赋形剂或载体”或“生理学上可接受的赋形剂或载体”是指生物相容性赋形剂,例如生理盐水,其在本文中更详细地描述,其适用于给予人或其他非人哺乳动物受试者并且通常被认为是安全的或不会引起严重的不良事件。

[0224] 合适的赋形剂包括水、盐水、葡萄糖、甘油等以及它们的组合。在实施例中,包含如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制剂,通常是生理盐水、Normosol R(Abbott)或Plasma-Lyte A(Baxter)、5%葡萄糖水溶液,可以使用乳酸林格氏液。输注培养基可以补充人血清白蛋白或其他人血清

成分。

[0225] 如果主题组合物是肠胃外施用的,则该组合物还可以包括无菌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、林格溶液、等渗盐溶液、1,3-丁二醇、乙醇、丙二醇或与水混合的聚乙二醇。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纯的并且在所使用的量中基本上是无毒的。此外,活性化合物可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作为待治疗对象的单位剂量的物理离散单位;每个单元可包含预定量的重组细胞或活性化合物,经计算可与适当的药物载体联合产生所需的治疗效果。

[0226] 如本文所用,组合物或疗法的施用是指将其递送至受试者,而与递送途径或方式无关。给药可以连续地或间歇地和非肠道地进行。给药可以用于治疗已经确认患有公认病症、疾病或疾病状态的受试者,或用于治疗易患或有风险发展这种病症、疾病或疾病状态的受试者。与辅助治疗的共同给药可以包括以任何顺序和任何给药方案同时和/或连续递送多种药剂(例如,使用一种或多种细胞因子修饰的免疫细胞;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、低剂量的霉酚酸前药或其任意组合)。

[0227] 在某些实施例中,将多剂如本文所述的修饰的免疫细胞或结合蛋白施用于受试者,其可以在约2至约4周的之间的施用间隔施用。在其他实施例中,连续施用细胞因子,条件是在施用细胞因子之前向受试者施用修饰的免疫细胞至少三或四次。在某些实施例中,皮下施用细胞因子(例如,IL-2、IL-15、IL-21)。在其他实施例中,被治疗的受试者正在进一步接受免疫抑制疗法,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。

[0228] 本公开的治疗或预防方法可作为治疗过程或方案的一部分施用于受试者,其可包括在施用即时公开的单位剂量、细胞或组合物之前或之后的额外治疗。例如,在某些实施例中,接受单位剂量的经修饰免疫细胞的受试者正在接受或以前接受过造血细胞移植(HCT;包括清髓性和非清髓性HCT)。在一些实施例中,可在非清髓性造血细胞移植后至少两到至少三个月施用修饰的免疫细胞。用于进行HCT的技术和方案是本领域已知的,并且可以包括移植任何合适的供体细胞,例如源自脐带血、骨髓或外周血的细胞、造血干细胞、动员干细胞或来自羊水的细胞。因此,在某些实施例中,本公开的经修饰的免疫细胞可以在经修饰的HCT疗法中与造血干细胞一起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组分的基因的染色体敲除、编码TCR组分的基因的染色体敲除或两者。

[0229] 在一些实施例中,接受修饰的免疫细胞或结合蛋白的受试者先前已经接受了淋巴清除化疗。在其他实施例中,淋巴细胞清除化学疗法包括环磷酰胺、氟达拉滨、抗胸腺细胞球蛋白或其组合。

[0230] 在某些实施例中,受试者先前已经接受过针对AML的治疗,或者处于发展或进展AML的风险中。

[0231] 根据本公开的方法可以进一步包括施用一种或多种另外的药剂以在联合疗法中治疗疾病或病症。在一些实施例中,该方法还包括将修饰的免疫细胞或结合蛋白与免疫检查点抑制剂(并行、同时或依次)给药。在一些实施例中,该方法包括施用具有刺激性免疫检

查点试剂的激动剂的经修饰的免疫细胞。在其他实施例中,联合疗法包括将修饰的免疫细胞与二级疗法一起施用,例如化学治疗剂、放射疗法、手术、抗体或其任意组合。

[0232] 如本文所用,术语“免疫抑制剂”或“免疫抑制制剂”是指提供抑制信号以帮助控制或抑制免疫反应的一种或多种细胞、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:部分或完全地阻断免疫刺激;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(例如,使用免疫检查点抑制剂)的示例性免疫抑制剂包括PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、CTLA4、B7-H3、B7-H4、CD244/2B4、HVEM、BTLA、CD160、TIM3、GAL9、KIR、PVR1G(CD112R)、PVRL2、腺苷、A2aR、免疫抑制细胞因子(例如IL-10,IL-4,IL-1RA,IL-35)、IDO、精氨酸酶、VISTA、TIGIT、LAIR1、CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5、Treg细胞或其任意组合。

[0233] 免疫抑制剂抑制剂(也称为免疫检查点抑制剂)可以是化合物、抗体、抗体片段或融合多肽(例如,Fc融合物,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,方法可以包括使用以下免疫抑制组分中的任何一种的一种或多种抑制剂(单独或以任何组合)修饰的免疫细胞或结合蛋白。

[0234] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与PD-1抑制剂组合使用,例如PD-1特异性抗体或其结合片段,例如匹地利珠单抗、纳武单抗、帕博利珠单抗、MEDI0680(以前称为AMP-514)、AMP-224、BMS-936558或其任意组合。在其他实施例中,本公开的修饰的免疫细胞或结合蛋白与PD-L1特异性抗体或其结合片段组合使用,例如BMS-936559、德瓦鲁单抗(MEDI4736)、阿特朱单抗(RG7446)、阿维鲁单抗(MSB0010718C))、MPDL3280A或其任意组合。

[0235] 在某些实施例中,本公开的修饰的免疫细胞或结合蛋白与LAG3抑制剂组合使用,LAG3抑制剂例如为LAG525、IMP321、IMP701、9H12、BMS-986016或其任意组合。

[0236] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与CTLA4抑制剂组合使用。在特定实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与CTLA4特异性抗体或其结合片段(例如易普利姆玛、曲美木单抗、CTLA4-Ig融合蛋白(例如阿巴西普、贝拉西普)或其任意组合)组合使用。

[0237] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与B7-H3特异性抗体或其结合片段(例如依诺珠单抗(MGA271)、376.96或两者)组合使用。B7-H4抗体结合片段可以是scFv或其融合蛋白,如在例如Dangaj等人,Cancer Res.73:4820,2013以及美国专利号9,574,000和PCT专利公开号WO/201640724A1和WO2013/025779A1中描述的那些。

[0238] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与CD244抑制剂组合使用。

[0239] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与BLTA、HVEM、CD160或其任意组合的抑制剂组合使用。抗CD-160抗体描述于例如PCT公开号WO 2010/084158中。

[0240] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与TIM3抑制剂组合使用。

[0241] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与Gal9抑制剂组合使用。

[0242] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与腺苷信号传导抑制剂如诱饵腺苷受体组合使用。

[0243] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与A2aR抑制剂组合使用。

[0244] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与KIR抑制剂如lirilumab(BMS-986015)组合使用。

[0245] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞与抑制性细胞因子(通常是除TGFβ以外的细胞因子)或Treg发育或活性的抑制剂组合使用。

[0246] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与IDO抑制剂联合使用,IDO抑制剂例如为左旋-1-甲基色氨酸、epacadostat(INCB024360;Liu等人,Blood 115:3520-30,2010)、依布硒啉(Terentis等人,Biochem.49:591-600,2010)、indoximod、NLG919(Mautino等人,American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2013;Apr 6-10,2013)、1-methyl-tryptophan(1-MT)-tira-pazamine、或其任意组合。

[0247] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与精氨酸酶抑制剂联合使用,例如N(Ω)-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)、N-ω-羟基-nor-1-精氨酸(nor-NOHA)、L-NOHA、2(S)-amino-6-boronohexanoic acid(ABH)、S-(2-boronoethyl)-L-cysteine(BEC)或其任意组合。

[0248] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与VISTA抑制剂如CA-170(Curis,Lexington,Mass)组合使用。

[0249] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞与TIGIT抑制剂例如COM902(Compugen,Toronto,Ontario Canada)、CD155抑制剂例如COM701(Compugen)或两者。

[0250] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与PVRIG、PVRL2或两者的抑制剂组合使用。抗PVRIG抗体描述于例如PCT公开号WO 2016/134333中。抗PVRL2抗体描述于例如PCT公开号WO 2017/021526中。

[0251] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与LAIR1抑制剂组合使用。

[0252] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5或其任意组合的抑制剂组合使用。

[0253] 在某些实施例中,修饰的免疫细胞或结合蛋白与增加刺激性免疫检查点分子的活性(即激动剂)的试剂组合使用。例如,修饰的免疫细胞或结合蛋白可以与CD137(4-1BB)激动剂(例如,乌瑞芦单抗)、CD134(OX-40)激动剂(例如,MEDI6469、MEDI6383或MEDI0562)、来那度胺、泊马度胺、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的激动剂(例如,PCT专利公开号WO 2016/054638)、ICOS(CD278)的激动剂(例如,GSK3359609、mAb 88.2、JTX-2011、Icos 145-1、Icos 314-8或其任意组合)组合使用。在本文公开的任何实施例中,方法可以包括与包括上述任何一种的刺激性免疫检查点分子的一种或多种激动剂(单独或以任何组合)一起施用修饰的免疫细胞或结合蛋白。

[0254] 在某些实施例中,联合治疗包括修饰的免疫细胞或结合蛋白和辅助治疗,辅助治疗包含以下一种或多种:非发炎实体瘤表达的癌抗原特异的抗体或其抗原结合片段,放射治疗、手术、化疗剂、细胞因子、RNAi或其任意组合。

[0255] 在某些实施例中,联合治疗方法包括施用修饰的免疫细胞或结合蛋白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-照射,和放射性药物疗法。适合于治疗受试者中给定癌症的手术和手术技术是本领域普通技术人员熟知的。

[0256] 在某些实施例中,联合治疗方法包括施用修饰的免疫细胞或结合蛋白并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/抗有丝分裂剂包括天然产物,如长春花生物碱(长春碱、长春新碱和长春瑞滨)、微管破坏剂,如紫杉烷(紫杉醇、多西他赛)、长春新碱、长春花素、诺考达唑、埃坡霉素和萘维滨、表鬼臼毒素(依托泊苷、替尼泊苷)、DNA损伤药物(放线菌素、安吖啶、蒽环类、博来霉素、白消安、喜树碱、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺、环磷酰胺、放线菌素、柔红霉素、多柔比星、表柔比星、六甲基三聚氰胺奥沙利铂、异磷酰胺、美法仑、甲基氯卡他明、丝裂霉素、米托蒽醌、普罗霉素、硝基脲紫杉醇、泰索帝、替莫唑胺、替尼泊苷、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷(VP 16));抗生素如更生霉素(放线菌素D)、柔红霉素、多柔比星(阿霉素)、伊达比星、蒽环类、米托蒽醌、博来霉素、普卡霉素(光神霉素)和丝裂霉素;酶(L-天冬酰胺酶,它系统地代谢L-天冬酰胺并剥夺没有能力合成自己的天冬酰胺的细胞);抗血小板药物;抗增殖/抗有丝分裂烷化剂,例如氮芥(甲氯乙胺、环磷酰胺和类似物、美法仑、苯丁酸氮芥)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(六甲基三聚氰胺和噻替哌)、烷基磺酸盐-白消安、亚硝基脲(卡莫司汀(BCNU)和类似物、链脲佐菌素)、三氮杂萘-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);铂配位络合物(顺铂、卡铂)、丙卡巴肼、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(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(曲妥珠单抗、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(多柔比星(阿霉素)、安吖啶、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、拓扑替康、伊立替康)、皮质类固醇(可的松、地塞米松、氢化可的松、甲泼尼龙、泼尼松和泼尼松龙);生长因子信号转导激酶抑制剂;线粒体功能障碍诱导剂、毒素如霍乱毒素、蓖麻毒素、假单胞菌外毒素、百日咳博德特氏菌腺苷酸环化酶毒素或白喉毒素,以及半胱天冬酶激活剂;和染色质破坏物。

[0257] 细胞因子可用于操纵宿主对抗癌活性的免疫反应。参见例如Floros&Tarhini,Semin.Oncol.42(4):539-548,2015。可用于促进免疫抗癌或抗肿瘤反应的细胞因子包括例如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,其可单独或与本公开的经修饰免疫细胞或结合蛋白任意组合使用。

[0258] 在其他方面,提供了用于制造本公开的组合物的方法。在某些实施例中,所述方法包括将(i)用本公开的载体转导的宿主细胞的等分试样与(ii)药学上可接受的载体组合。在某些实施例中,本公开的载体用于转染/转导宿主细胞(例如,T细胞)以用于过继转移疗法(例如,靶向癌症抗原)。

[0259] 在一些实施例中,该方法进一步包括,在等分之前,培养转导的宿主细胞并选择已掺入(即表达)载体的转导细胞。在其他实施例中,该方法包括在培养和选择之后和等分之

前,扩增转导的宿主细胞。在本方法的任何实施例中,制造的组合物或单位剂量可以冷冻以备后用。任何合适的宿主细胞可用于根据本方法制备组合物或单位剂量,包括例如造血干细胞、T细胞、原代T细胞、T细胞系、NK细胞或NK-T细胞。在具体实施例中,所述方法包括宿主细胞,其是CD8+T细胞、CD4+T细胞或两者。

[0260] 本公开还包括以下示例性实施例。

[0261] 实施例1.一种修饰的免疫细胞,包含编码结合蛋白的异源多核苷酸,其中编码的结合蛋白包含:(a)包含根据SEQ ID NO:28、19、22或25中任一项的CDR3氨基酸序列(CDR3α)或其变体的T细胞受体(TCR)α链可变区(Vα)结构域,以及TCRβ链可变(Vβ)结构域;或者(b)包含根据SEQ ID NO.:40、31、34或37中任一项的CDR3氨基酸序列(CDR3β)或其变体的TCR Vβ结构域,以及TCR Vα结构域;或者(c)(a)的TCR Vα结构域以及(b)的TCR Vβ结构域,其中,所述编码的结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):人白细胞抗原(HLA)复合物,其中,HLA任选地包含HLA-A*0201。

[0262] 实施例2.根据实施例1所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):HLA复合物,产生pEC_{50}为4.0或更高、或4.5或更高的IFNγ。

[0263] 实施例3.根据实施例1或2所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):HLA复合物,产生pEC_{50}为5.0或更高的IFNγ。

[0264] 实施例4.根据实施例1-3中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):HLA复合物,产生pEC_{50}为5.5或更高的IFNγ。

[0265] 实施例5.根据实施例1-4中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):HLA复合物,产生pEC_{50}为6.0或更高的IFNγ。

[0266] 实施例6.根据实施例1-5中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):HLA复合物,产生pEC_{50}为6.5或更高的IFNγ。

[0267] 实施例7.根据实施例1-6中任一项的修饰的免疫细胞,其中,所述HLA包括HLA-A*201。

[0268] 实施例8.根据实施例1-7中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞的群与抗原呈递细胞(如HLA-A*0201+)共培养4小时时,所述群中50%或更多的所述修饰的免疫细胞产生IFN-γ,在共培养物中用包含或由氨基酸序列RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94)组成的肽以10^{-4}μM或10^{-5}μM或10^{-6}μM的肽浓度脉冲的条件下,其中,所述抗原呈递细胞任选地包含T2细胞。

[0269] 实施例9.根据实施例1-8中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞的群与抗原呈递细胞共培养(如约24小时)时,在共培养物中用包含或由氨基酸序列RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94)组成的肽以10^{-2}μM的肽浓度脉冲的条件下,所述群中的修饰的免疫细胞中的10%或更多为$Nur77^{+}$,其中,所述抗原呈递细胞任选地包含T2细胞、Jurkat细胞或两者。

[0270] 实施例10.根据实施例9所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞的群与抗原呈递细胞共培养(如约24小时)时,在共培养物中用包含或由氨基酸序列RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94)组成的肽以10^{-2}μM的肽浓度脉冲的条件下,所述群中的修饰的免疫细胞中的15%或更多为$Nur77^{+}$。

[0271] 实施例11.根据实施例9或10所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细

胞的群与抗原呈递细胞共培养(如约24小时)时,在共培养物中用包含或由氨基酸序列RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94)组成的肽以10^{-2}μM的肽浓度脉冲的条件下,所述群中的修饰的免疫细胞中的20%或更多为$Nur77^{+}$。

[0272] 实施例12.根据实施例9-11中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞的群与抗原呈递细胞共培养(如约24小时)时,在共培养物中用包含或由氨基酸序列RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94)组成的肽以10^{-2}μM的肽浓度脉冲的条件下,所述群中的修饰的免疫细胞中的40%或更多为$Nur77^{+}$。

[0273] 实施例13.根据实施例9-12中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞的群与抗原呈递细胞共培养(如约24小时)时,在共培养物中用包含或由氨基酸序列RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94)组成的肽以10^{-2}μM的肽浓度脉冲的条件下,所述群中的修饰的免疫细胞中的50%或更多为$Nur77^{+}$。

[0274] 实施例14.根据实施例1-13中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞的群与抗原呈递细胞共培养(如约24小时)时,在共培养物中用包含或由氨基酸序列RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94)组成的肽以10^{-3}μM的肽浓度脉冲的条件下,所述群中的修饰的免疫细胞中的10%或更多为$Nur77^{+}$。

[0275] 实施例15.根据实施例14所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞的群与抗原呈递细胞共培养(如约24小时)时,在共培养物中用包含或由氨基酸序列RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94)组成的肽以10^{-3}μM的肽浓度脉冲的条件下,所述群中的修饰的免疫细胞中的15%或更多为$Nur77^{+}$。

[0276] 实施例16.根据实施例14或15所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞的群与抗原呈递细胞共培养(如约24小时)时,在共培养物中用包含或由氨基酸序列RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94)组成的肽以10^{-3}μM的肽浓度脉冲的条件下,所述群中的修饰的免疫细胞中的20%或更多为$Nur77^{+}$。

[0277] 实施例17.根据实施例1-16中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和MDA-MB-468细胞以30:1的比例存在于样品中时,所述修饰的免疫细胞能够杀死样品中11%或更多的$HLA\text{-}A*0201^{+}$MDA-MB-468细胞。

[0278] 实施例18.根据实施例17所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和MDA-MB-468细胞以30:1的比例存在于样品中时,所述修饰的免疫细胞能够杀死样品中12%或更多的$HLA\text{-}A*0201^{+}$MDA-MB-468细胞。

[0279] 实施例19.根据实施例17或18所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和MDA-MB-468细胞以30:1的比例存在于样品中时,所述修饰的免疫细胞能够杀死样品中14%或更多的$HLA\text{-}A*0201^{+}$MDA-MB-468细胞。

[0280] 实施例20.根据实施例17-19中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和MDA-MB-468细胞以30:1的比例存在于样品中时,修饰的免疫细胞能够杀死样品中15%或更多的$HLA\text{-}A*0201^{+}$MDA-MB-468细胞。

[0281] 实施例21.根据实施例17-20中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和MDA-MB-468细胞以30:1的比例存在于样品中时,修饰的免疫细胞能够杀死样品中20%或更多的$HLA\text{-}A*0201^{+}$MDA-MB-468细胞。

[0282] 实施例22.根据实施例17-21中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰

的免疫细胞和MDA-MB-468细胞以30:1的比例存在于样品中时,修饰的免疫细胞能够杀死样品中25%或更多的HLA-A*0201^{+}MDA-MB-468细胞。

[0283] 实施例23.根据实施例1-22中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和MDA-MB-468细胞以10:1的比例存在于样品中时,修饰的免疫细胞能够杀死样品中10%或更多的HLA-A*0201^{+}MDA-MB-468细胞。

[0284] 实施例24.根据实施例1-23中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和MDA-MB-468细胞以1:1的比例存在于样品中时,修饰的免疫细胞能够杀死样品中5%或更多的HLA-A*0201^{+}MDA-MB-468细胞。

[0285] 实施例25.根据实施例1-24中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和所述Panc1细胞以30:1的比例存在时,所述修饰的免疫细胞能够杀死样品中21%或更多的Panc1细胞。

[0286] 实施例26.根据实施例25所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和所述Panc1细胞以30:1的比例存在时,所述修饰的免疫细胞能够杀死样品中22%或更多的Panc1细胞。

[0287] 实施例27.根据实施例25或26所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和所述Panc1细胞以30:1的比例存在时,所述修饰的免疫细胞能够杀死样品中23%或更多的Panc1细胞。

[0288] 实施例28.根据实施例25-27中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和所述Panc1细胞以30:1的比例存在时,所述修饰的免疫细胞能够杀死样品中24%或更多的Panc1细胞。

[0289] 实施例29.根据实施例25-28中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,当所述修饰的免疫细胞和所述Panc1细胞以30:1的比例存在时,所述修饰的免疫细胞能够杀死样品中25%或更多的Panc1细胞。

[0290] 实施例30.根据实施例1-29中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,与包含编码T细胞受体的多核苷酸的参考免疫细胞相比,所述修饰的免疫细胞在4小时的共培养中对HLA-A*0201^{+}MDA-MB-468细胞和/或对Panc1细胞具有增加的杀伤活性,所述T细胞受体包含具有SEQ ID NO.:82所示氨基酸序列的TCRα链和具有SEQ ID NO.:83所示氨基酸序列的TCRβ链。

[0291] 实施例31.根据实施例1-30中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白能够独立于CD8或在不存在CD8的情况下与细胞表面上的WT-1肽:HLA复合物结合。

[0292] 实施例32.根据实施例1-31中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中:(i)编码的Vβ结构域包含或由与SEQ ID NO.:16、5、6、7、8、13、14或15中任一项的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列组成;和/或(ii)编码的Vα结构域包含或由与SEQ ID NO.:12、1、2、3、4、9、10、11中任一项的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列组成。

[0293] 实施例33.根据实施例1-32中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的Vβ结构域包含或由与SEQ ID NO.:16、5、6、7、8、13、14或15中的任一项具有至少90%同一性的氨基酸序列组成,和/或所述编码的Vα结构域包含或由与SEQ ID NO.:12、1、2、3、4、9、10或11中的任一项具有至少90%同一性的氨基酸序列组成,前提是:(i)至少三个或四个CDR没有突变;(ii)确实具有突变的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;以及(iii)编码的结合蛋白保留其结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):HLA复合物的能力,任选地产生pEC50为4.0或更高的干扰素-γ(IFNγ)。

[0294] 实施例34.根据实施例1-33中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中:(i)编码的CDR3β包含或由SEQ ID NO.:40所示的氨基酸序列组成,并且编码的CDR3α包含或由SEQ ID NO.:28所示的氨基酸序列组成;(ii)编码的CDR3β包含或由SEQ ID NO:31所示的氨基酸序列组成,并且编码的CDR3α包含或由SEQ ID NO:19所示的氨基酸序列组成;(iii)编码的CDR3β包含或由SEQ ID NO:34所示的氨基酸序列组成,并且编码的CDR3α包含或由SEQ ID NO:22所示的氨基酸序列组成;或者(iv)编码的CDR3β包含或由SEQ ID NO:37所示的氨基酸序列组成,并且编码的CDR3α包含或由SEQ ID NO:25所示的氨基酸序列组成。

[0295] 实施例35.根据实施例1-34中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中:(i)编码的Vβ结构域包含SEQ ID NO.:38、29、32或35中任一项的CDR1β氨基酸序列和/或SEQ ID NO.:39、30、33或36中任一项的CDR2β氨基酸序列;和/或(ii)编码的Vα结构域包含SEQ ID NO.:26、17、20或23中任一项的CDR1α氨基酸序列,和/或SEQ ID NO.:27、18、21或24中任一项的CDR2α氨基酸序列。

[0296] 实施例36.根据实施例1-35中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的TCR Vα和Vβ结构域包含分别为以下的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β氨基酸序列:(i)分别为SEQ ID NO.:26-28和38-40;(ii)分别为SEQ ID NO.:23、27、28和38-40;(iii)分别为SEQ ID NO.:17-19和29-31;(iv)分别为SEQ ID NO.:20-22和32-34;或者(v)分别为SEQ ID NO.:23-25和35-37。

[0297] 实施例37.根据实施例1-36中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的TCR Vβ结构域包含:(i)根据TRBJ02-03基因区段的氨基酸序列;和/或(ii)根据TRBV06-05基因片段的氨基酸序列、根据TRBV07-09基因片段的氨基酸序列或根据TRBV20-01基因片段的氨基酸序列。

[0298] 实施例38.根据实施例1-37中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的TCR Vα结构域包含:(i)根据TRAJ43基因区段的氨基酸序列;和/或(ii)根据TRAV20-02基因区段的氨基酸序列;根据TRAV38DV08基因片段的氨基酸序列;或根据TRAV38-01基因片段的氨基酸序列。

[0299] 实施例39.根据实施例38所述的修饰的免疫细胞,其中:(i)所述编码的TCR Vβ结构域包含根据TRBJ02-03基因区段的氨基酸序列;并且(ii)所述编码的TCR Vα结构域包含根据TRAJ43基因片段的氨基酸序列。

[0300] 实施例40.根据实施例38所述的修饰的免疫细胞,其中:(i)所述编码的TCR Vβ结构域包含根据TRBV06-05基因区段的氨基酸序列;并且(ii)所述编码的TCR Vα结构域包含根据TRAV20基因区段的氨基酸序列。

[0301] 实施例41.根据实施例38所述的修饰的免疫细胞,其中:(i)所述编码的TCR Vβ结构域包含根据TRBV07-09基因区段的氨基酸序列;并且(ii)所述编码的TCR Vα结构域包含根据TRAV38DV08基因片段的氨基酸序列。

[0302] 实施例42.根据实施例38所述的修饰的免疫细胞,其中:(i)所述编码的TCR Vβ结构域包含根据TRBV20-01基因区段的氨基酸序列;并且(ii)所述编码的TCR Vα结构域包含根据TRAV38-01基因片段的氨基酸序列。

[0303] 实施例43.根据实施例1-42中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中:(i)所述编码的Vβ结构域包含或由SEQ ID NO.:16或8所示的氨基酸序列组成,并且编码的Vα结构域包含或由SEQ ID NO.:12或4所示的氨基酸序列组成;(ii)所述编码的Vβ结构域包含或由SEQ ID NO.:13或5所示的氨基酸序列组成,并且编码的Vα结构域包含或由SEQ ID NO.:9或1所示的氨基酸序列组成;(iii)所述编码的Vβ结构域包含或由SEQ ID NO.:14或6所示的氨基酸序列组成,并且编码的Vα结构域包含或由SEQ ID NO.:10或2所示的氨基酸序列组成;或者(iv)所述编码的Vβ结构域包含或由SEQ ID NO.:15或7所示的氨基酸序列组成,并且编码的Vα结构域包含或由SEQ ID NO.:11或3所示的氨基酸序列组成。

[0304] 实施例44.根据实施例1-43中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白进一步包含:(i)TCRα链恒定结构域(Cα)或其片段;和/或(ii)TCRβ链恒定结构域(Cβ)或其片段。

[0305] 实施例45.根据实施例44所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的Cα包含或由与SEQ ID NO.:41-44中的任一项具有至少90%同一性的氨基酸序列组成。

[0306] 实施例46.根据实施例44或45所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的Cβ包含或由与SEQ ID NO.:45具有至少90%同一性的氨基酸序列组成。

[0307] 实施例47.根据实施例44-46中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白包含:(i)TCRβ链,该TCRβ链与SEQ ID NO.:61或57所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、或者包括或由该氨基酸序列组成;以及TCRα链,该TCRα链与SEQ ID NO.:53或49所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、或者包括或由该氨基酸序列组成;(ii)TCRβ链,该TCRβ链与SEQ ID NO.:58或54所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、或者包括或由该氨基酸序列组成;以及TCRα链,该TCRα链与SEQ ID NO.:50或46所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、或者包括或由该氨基酸序列组成;(iii)TCRβ链,该TCRβ链与SEQ ID NO.:59或55所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、或者包括或由该氨基酸序列组成;以及TCRα链,该TCRα链与SEQ ID NO.:51或52所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、或者包括或由该氨基酸序列组成;或者(iv)TCRβ链,该TCRβ链与SEQ ID NO.:60或56所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、或者包括或由该氨基酸序列组成;以及TCRα链,该TCRα链与SEQ ID NO.:52或48所示的氨基酸序列具有至少90%同一性、或者包括或由该氨基酸序列组成。

[0308] 实施例48.根据实施例1-47中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的结合蛋白是TCR、嵌合抗原受体(CAR)或单链TCR(scTCR)。

[0309] 实施例49.根据实施例1-48中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,所述免疫细胞是人免疫系统细胞。

[0310] 实施例50.根据实施例1-49中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,所述免疫细胞为T细胞,任选地为$CD4^+$T细胞、$CD8^+$T细胞、$CD4^-CD8^-$双阴性T细胞、或者γδT细胞、自然杀伤细胞、NK-T细胞、树突细胞或其任意组合。

[0311] 实施例51.根据实施例50所述的修饰的免疫细胞,其中,所述T细胞是幼稚T细胞、中枢记忆T细胞、效应记忆T细胞、干细胞记忆T细胞或其任意组合。

[0312] 实施例52.根据实施例1-51中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,编码所述结合蛋白的所述多核苷酸经密码子优化以用于在所述免疫细胞中的表达。

[0313] 实施例53.根据实施例1-52中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,编码所述结合

蛋白的所述多核苷酸包含与SEQ ID NO.:62-77中任一项所示的多核苷酸序列具有至少75％同一性的多核苷酸。

[0314] 实施例54.根据实施例53所述的修饰的免疫细胞,其中,编码所述结合蛋白的所述多核苷酸包含:(i)与SEQ ID NO.:77所示多核苷酸序列具有至少75％同一性的多核苷酸,和与SEQ ID NO.:69所示多核苷酸序列具有至少75％同一性的多核苷酸;(ii)与SEQ ID NO.:74所示多核苷酸序列具有至少75％同一性的多核苷酸,和与SEQ ID NO.:66所示多核苷酸序列具有至少75％同一性的多核苷酸;(iii)与SEQ ID NO.:75所示多核苷酸序列具有至少75％同一性的多核苷酸,和与SEQ ID NO.:67所示多核苷酸序列具有至少75％同一性的多核苷酸;或者(iv)与SEQ ID NO.:76所示多核苷酸序列具有至少75％同一性的多核苷酸,和与SEQ ID NO.:68所示多核苷酸序列具有至少75％同一性的多核苷酸。

[0315] 实施例55.根据实施例1-54中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,编码所述结合蛋白的所述多核苷酸进一步包含编码位于编码Vβ的多核苷酸与编码Vα的多核苷酸之间的自切割肽的多核苷酸。

[0316] 实施例56.根据实施例55所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码的自切割肽包含或由与SEQ ID NO.:84-88中任一项所示的氨基酸序列具有至少90％同一性的氨基酸序列组成。

[0317] 实施例57.根据实施例55或56所述的修饰的免疫细胞,其中,所述编码自切割肽的多核苷酸包含或由与SEQ ID NO.:89-93中任一项所示的多核苷酸序列具有至少75％同一性的多核苷酸序列组成。

[0318] 实施例58.根据实施例55-57中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,编码所述结合蛋白的所述多核苷酸具有从5'-末端到3'-末端为(编码TCRβ链的多核苷酸)-(编码自切割肽的多核苷酸)-(编码TCRα链的多核苷酸)的结构。

[0319] 实施例59.根据实施例55-58中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,编码所述结合蛋白的所述多核苷酸包含与SEQ ID NO.:78-81中任一项所示的多核苷酸序列具有至少75％同一性的多核苷酸。

[0320] 实施例60.根据实施例53所述的修饰的免疫细胞,其中,编码所述结合蛋白的所述多核苷酸包含多核苷酸,该多核苷酸包含或由SEQ ID NO.:78-81中任一项所示的多核苷酸序列组成。

[0321] 实施例61.根据实施例1-60中任一项所述的修饰的免疫细胞,进一步包含:(i)异源多核苷酸,其编码包含CD8共受体α链的胞外部分的多肽,其中任选地,编码的多肽是或包含CD8共受体α链;(ii)异源多核苷酸,其编码包含CD8共受体β链的胞外部分的多肽,其中任选地,编码的多肽是或包含CD8共受体β链;或者(iii)(i)的多核苷酸和(ii)的多核苷酸,其中任选地,所述宿主细胞包含CD4+T细胞。

[0322] 实施例62.根据实施例61所述的宿主细胞,包含:(a)异源多核苷酸,其编码包含CD8共受体α链的细胞外部分的多肽,其中任选地,编码的多肽是或包含CD8共受体α链;(b)异源多核苷酸,其编码包含CD8共受体β链的细胞外部分的多肽,其中,任选地,编码的多肽是或包含CD8共受体β链;和(c)编码位于(a)的多核苷酸与(b)的多核苷酸之间的自切割肽的多核苷酸。

[0323] 实施例63.根据实施例1-62中任一项所述的修饰的免疫细胞,其中,所述免疫细胞

包含以下的染色体基因敲除:PD-1基因;LAG3基因;TIM3基因;CTLA4基因;HLA成分基因;TCR成分基因;或其任意组合。

[0324] 实施例64.根据实施例63所述的修饰的免疫细胞,其中,所述染色体基因敲除包括HLA成分基因的敲除,该HLA成分基因选自:α1巨球蛋白基因;α2巨球蛋白基因;α3巨球蛋白基因;β1微球蛋白基因;或β2微球蛋白基因;或其任意组合。

[0325] 实施例65.根据实施例63或64所述的修饰的免疫细胞,其中,所述染色体基因敲除包括TCR成分基因的敲除,该TCR成分基因选自:TCRα可变区基因;TCRβ可变区基因;TCR恒定区基因;或其任意组合。

[0326] 实施例66.一种编码结合蛋白的分离的多核苷酸,其中,编码的结合蛋白包含TCR Vα结构域和TCR Vβ结构域,并且能够与RMFPNAPYL(SEQ ID NO.:94):HLA复合物结合,其中:(i)编码的Vα结构域包含SEQ ID NO.:28、19、22或25中任一项所示的CDR3氨基酸序列;(ii)编码的Vβ结构域包含SEQ ID NO.:40、31、34或37中任一项所示的CDR3氨基酸序列;(iii)编码的Vα结构域包含SEQ ID NO.:26、17、20或23中任一项所示的CDR1氨基酸序列;(iv)编码的Vβ结构域包含SEQ ID NO.:38、32或35中任一项所示的CDR1氨基酸序列;(v)编码的Vα结构域包含SEQ ID NO.:27、18、21或24中任一项所示的CDR2氨基酸序列;(vi)编码的Vβ结构域包含SEQ ID NO.:39、30、33或36中任一项所示的CDR2氨基酸序列;(vii)所编码的Vα结构域包含或由与SEQ ID NO.:4、1-3、12或9-11中任一项所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列组成;(viii)所编码的Vβ结构域包含或由与SEQ ID NO.:8、5-7、16或13-15中任一项所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列组成;(ix)编码的TCR Vα包含在TCRα链中,其中该TCRα链包含或由与SEQ ID NO.:53和46-52中任一项所示的氨基酸序列具有至少90%同一性的氨基酸序列组成;(x)编码的TCR Vβ包含在TCRβ链中,其中该TCRβ链包含或由与SEQ ID NO.:61和54-60中任一项所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性氨基酸序列组成;或者(xi)(i)-(x)的任何组合。

[0327] 实施例67.根据实施例66所述的分离的多核苷酸,其中,所述多核苷酸经密码子优化以用于在宿主细胞中的表达,其中任选地,所述宿主细胞是人T细胞、NK细胞或NK-T细胞。

[0328] 实施例68.根据实施例66或67所述的分离的多核苷酸,其中,所述多核苷酸包含与SEQ ID NO:62-81中任一项所示的多核苷酸序列具有至少75%同一性的多核苷酸。

[0329] 实施例69.一种载体,包含实施例66-68中任一项的多核苷酸。

[0330] 实施例70.根据实施例69所述的载体,其中,所述载体是慢病毒载体或逆转录病毒载体。

[0331] 实施例71.一种宿主细胞,包含实施例66-68中任一项的多核苷酸并且能够表达所编码的结合蛋白。

[0332] 实施例72.一种组合物,包括:(i)实施例1-65中任一项的修饰的免疫细胞;(ii)实施例66-68中任一项的多核苷酸;(iii)实施例69或70的载体;和/或(iv)实施例71的宿主细胞;以及药学上可接受的载体、赋形剂或稀释剂。

[0333] 实施例73.根据实施例72所述的组合物,包括:(i)实施例1-65中任一项的修饰的免疫细胞;和(ii)包含编码结合蛋白的多核苷酸的免疫细胞,该结合蛋白包含TCR Vα和TCR Vβ并且能够特异性结合VLDFAPPGA(SEQ ID NO.:100):HLA复合物,其中任选地,HLA包括HLA-A*0201,并且其中任选地,(i)的修饰的免疫细胞和(ii)的免疫细胞各自独立地选自T

细胞、NK细胞和NK-T细胞。

[0334] 实施例74.根据实施例73所述的组合物,其中(ii)中的免疫细胞结合蛋白包括:(a)SEQ ID NO.:101-103和105-107的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β氨基酸序列,并且其中任选地,(1)Vα与SEQ ID NO.:104所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由该氨基酸序列组成,和/或(2)Vβ与SEQ ID NO.:108所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由该氨基酸序列组成;(b)SEQ ID NO.:109-110和113-115的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β氨基酸序列,并且其中任选地,(1)Vα与SEQ ID NO.:112所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由该氨基酸序列组成,和/或(2)Vβ与SEQ ID NO.:116所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由该氨基酸序列组成;或者(c)SEQ ID NO.:117-119和121-123的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β氨基酸序列,并且其中任选地,(1)Vα与SEQ ID NO.:120所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由该氨基酸序列组成,和/或(2)Vβ与SEQ ID NO.:124所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、包含或由该氨基酸序列组成。

[0335] 实施例75.一种治疗患有与WT-1表达相关的疾病或病症的受试者的方法,包括向受试者施用有效量的:(i)实施例1-65中任一项的修饰的免疫细胞;(ii)实施例66-68中任一项的多核苷酸;(iii)实施例69或70的载体;(iv)实施例71的宿主细胞;和/或(v)实施例72-74中任一项的组合物。

[0336] 实施例76.实施例75的方法,包括将实施例1-65中任一项的修饰的免疫细胞施用于已经接受、正在接受或将接受包含编码结合蛋白的多核苷酸的免疫细胞的受试者,该结合蛋白包含TCR Vα和TCR Vβ并且能够特异性结合VLDFAPPGA(SEQ ID NO.:100):HLA复合物,其中任选地,HLA包括HLA-A*0201,并且其中任选地,所述修饰的免疫细胞和所述免疫细胞各自独立地选自T细胞、NK细胞和NK-T细胞。

[0337] 实施例77.根据实施例76所述的方法,其中,能够特异性结合所述VLDFAPPGA(SEQ ID NO.:100):HLA复合物的所述结合蛋白包含:(a)SEQ ID NO.:101-103和105-107的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β氨基酸序列,并且其中任选地,(1)Vα与SEQ ID NO.:104所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、或者包含或由该氨基酸序列组成,和/或(2)Vβ与SEQ ID NO.:108所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、或者包含或由该氨基酸序列组成;(b)SEQ ID NO.:109-110和113-115的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β氨基酸序列,并且其中任选地,(1)Vα与SEQ ID NO.:112所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、或者包含或由该氨基酸序列组成,和/或(2)Vβ与SEQ ID NO.:116所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、或者包含或由该氨基酸序列组成;或者(c)SEQ ID NO.:117-119和121-123的CDR1α、CDR2α、CDR3α、CDR1β、CDR2β和CDR3β氨基酸序列,并且其中任选地,(1)Vα与SEQ ID NO.:120所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、或者包含或由该氨基酸序列组成,和/或(2)Vβ与SEQ ID NO.:124所示的氨基酸序列具有至少90%的同一性、或者包含或由该氨基酸序列组成。

[0338] 实施例78.根据实施例75-77中任一项所述的方法,其中,所述疾病或病症是血液恶性肿瘤或实体癌。

[0339] 实施例79.根据实施例78所述的方法,其中,所述血液恶性肿瘤选自急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性髓细胞白血病(AML,包括难治

性和复发性AML,并且包括急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性粒单核细胞白血病(例如,伴有或不伴有嗜酸性粒细胞增多症)、急性单核细胞白血病、急性红细胞白血病和急性巨核细胞白血病)、慢性粒细胞白血病(CML)、慢性粒细胞白血病、慢性嗜酸性粒细胞白血病(CEL)、骨髓增生异常综合征(MDS)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或多发性骨髓瘤(MM,包括难治性和复发性MM)。

[0340] 实施例80.根据实施例78所述的方法,其中,所述实体癌选自胆管癌、膀胱癌、骨和软组织癌、脑瘤、乳腺癌(breast cancer)、乳腺癌(breast carcinoma)、宫颈癌、结肠癌、结直肠腺癌、结直肠癌、硬纤维瘤、胚胎癌、子宫内膜癌、食管癌、胃癌、胃腺癌、多形性胶质母细胞瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、弥漫性腹膜间皮瘤、恶性胸膜间皮瘤、神经胶质瘤、星形细胞瘤、妇科肿瘤、头颈部鳞状细胞癌、肝癌、肝细胞癌、肺癌、非小细胞肺癌、恶性黑色素瘤、骨肉瘤、卵巢癌(如上皮性卵巢癌、卵巢癌)、输卵管癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胰腺导管腺癌、原发性星形细胞瘤、原发性甲状腺癌、前列腺癌、肾癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、成骨肉瘤、睾丸生殖细胞肿瘤、尿路上皮癌、子宫肉瘤、子宫癌肉瘤或子宫癌。

[0341] 实施例81.根据实施例75-80中任一项所述的方法,其中,所述修饰的免疫细胞被离体修饰以包含所述异源多核苷酸。

[0342] 实施例82.根据实施例75-81中任一项所述的方法,其中,所述修饰的免疫细胞对于所述受试者是同种异体的、同系的或自体的。

[0343] 实施例83.根据实施例75-82中任一项所述的方法,其中,所述修饰的免疫细胞是造血祖细胞或人免疫系统细胞。

[0344] 实施例84.根据实施例83所述的方法,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、γδT细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞、或其任意组合。

[0345] 实施例85.根据实施例84所述的方法,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。

[0346] 实施例86.根据实施例75-85中任一项所述的方法,其中,所述方法包括向所述受试者施用多个剂量的所述修饰的免疫细胞。

[0347] 实施例87.根据实施例86所述的方法,其中,所述多个剂量以约2至约4周的施用间隔施用。

[0348] 实施例88.根据实施例75-87中任一项所述的方法,其中,将所述修饰的免疫细胞以约10^4细胞/kg至约10^{11}细胞/kg的剂量施用于受试者。

[0349] 实施例89.根据实施例75-88中任一项所述的方法,其中,所述方法还包括向所述受试者施用细胞因子。

[0350] 实施例90.根据实施例89所述的方法,其中,所述细胞因子是IL-2、IL-15、IL-21或其任意组合。

[0351] 实施例91.根据实施例90所述的方法,其中,所述细胞因子是IL-2并且与所述修饰的免疫细胞同时或依序施用。

[0352] 实施例92.根据实施例91所述的方法,其中,所述细胞因子是依序施用的,条件是所述受试者在施用细胞因子之前施用所述修饰的免疫细胞至少三或四次。

[0353] 实施例93.根据实施例89-92中任一项所述的方法,其中,所述细胞因子是IL-2并且皮下施用。

[0354] 实施例94.根据实施例75-93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疗法。

[0355] 实施例95.根据实施例94所述的方法,其中,所述免疫抑制疗法选自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。

[0356] 实施例96.根据实施例75-95中任一项所述的方法,其中,所述受试者已经接受了非清髓性或清髓性造血细胞移植。

[0357] 实施例97.根据实施例96所述的方法,其中在所述非清髓性造血细胞移植后至少三个月向所述受试者施用所述修饰的免疫细胞。

[0358] 实施例98.根据实施例97所述的方法,其中在所述清髓性造血细胞移植后至少两个月向所述受试者施用所述修饰的免疫细胞。

[0359] 实施例99.根据实施例75-98中任一项所述的方法,其中,所述受试者先前已经接受过针对AML的治疗。

[0360] 实施例100.一种组合物,包括:(i)实施例1-65中任一项的修饰的免疫细胞;(ii)实施例66-68中任一项的多核苷酸;(iii)实施例69或70的载体;和/或(iv)实施例71的宿主细胞,用于治疗与WT-1表达相关的疾病或病症。

[0361] 实施例101.一种组合物,包括:(i)实施例1-65中任一项的修饰的免疫细胞;(ii)实施例66-68中任一项的多核苷酸;(iii)实施例69或70的载体;和/或(iv)实施例71的宿主细胞,用于制造用于治疗与WT-1表达相关的疾病或病症的药物。

[0362] 实施例102.根据实施例100或101使用的组合物,其中,所述疾病或病症是血液恶性肿瘤或实体癌。

[0363] 实施例103.根据实施例102所述使用的组合物,其中,所述血液恶性肿瘤选自急性淋巴细胞白血病(ALL)、急性淋巴细胞白血病、急性髓细胞白血病、急性髓细胞白血病(AML,包括难治性和复发性AML,并且包括急性髓细胞白血病、急性早幼粒细胞白血病、急性粒细胞白血病、急性粒单核细胞白血病(例如,伴有或不伴有嗜酸性粒细胞增多症)、急性单核细胞白血病、急性红细胞白血病和急性巨核细胞白血病)、慢性粒细胞白血病(CML)、慢性粒细胞白血病、慢性嗜酸性粒细胞白血病(CEL)、骨髓增生异常综合征(MDS)、非霍奇金淋巴瘤(NHL)或多发性骨髓瘤(MM,包括难治性和复发性MM)。

[0364] 实施例104.根据实施例102使用的组合物,其中,所述实体癌选自胆管癌、膀胱癌、骨和软组织癌、脑瘤、乳腺癌(breast cancer)、乳腺癌(breast carcinoma)、宫颈癌、结肠癌、结直肠腺癌、结直肠癌、硬纤维瘤、胚胎癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、胃腺癌、多形性胶质母细胞瘤、胶质母细胞瘤、黑色素瘤、弥漫性腹膜间皮瘤、恶性胸膜间皮瘤、神经胶质瘤、星形细胞瘤、妇科肿瘤、头颈部鳞状细胞癌、肝癌、肝细胞癌、肺癌、非小细胞肺癌、恶性黑色素瘤、骨肉瘤、卵巢癌(如上皮性卵巢癌、卵巢癌)、输卵管癌、子宫内膜癌、胰腺癌、胰腺导管腺癌、原发性星形细胞瘤、原发性甲状腺癌、前列腺癌、肾癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、成骨肉瘤、睾丸生殖细胞肿瘤、尿路上皮癌、子宫肉瘤、子宫癌肉瘤或子宫癌中。

[0365] 实施例105.一种结合蛋白,包含T细胞受体(TCR)α链可变(Vα)结构域和TCRβ链可变(Vβ)结构域,其中:所述Vα结构域包含:(i)SEQ ID NO.:28、19、22或25或28中任一项的CDR3氨基酸序列(CDR3α)或其变体;(ii)SEQ ID NO.:26、17、20或23中任一项的CDR1氨基酸

序列(CDR1α);(iii)SEQ ID NO.:27、18、21或24中任一项的CDR2氨基酸序列(CDR2a);(iv)与SEQ ID NO:1-4或9-12中任一项的氨基酸序列具有至少90％同一性的氨基酸序列;或者(v)(i)-(iv)的任意组合;并且所述Vβ结构域包含:(vi)SEQ ID NO:40、31、34或37中任一项的CDR3氨基酸序列(CDR3β)或其变体;(vii)SEQ ID NO.:38、29、32或35中任一项的CDR1氨基酸序列(CDR1β);(viii)SEQ ID NO.:39、30、33或36中任一项的CDR2氨基酸序列(CDR2β);(ix)与SEQ ID NO:5-8或13-16中任一项所示的氨基酸序列具有至少90％同一性的氨基酸序列;或者(x)(vi)-(x)的任意组合,其中所述结合蛋白能够结合RMFPNAPYL(SEQ ID NO:94):HLA复合物,其中任选地,HLA包括HLA-A*0201。

[0366] 实施例106.根据实施例105所述的结合蛋白,进一步包含:(1)TCRα链恒定结构域(Cα)或其片段;和/或(2)TCRβ链恒定结构域(Cβ)或其片段。

[0367] 实施例107.根据实施例106所述的结合蛋白,其中,所述Cα包含或由SEQ ID NO.:41-44中任一项的氨基酸序列组成。

[0368] 实施例108.根据实施例106或107所述的结合蛋白,其中,所述Cβ包含或由SEQ ID NO.:45的氨基酸序列组成。

[0369] 实施例109.一种分离的多核苷酸,其编码实施例105-108中任一项的结合蛋白。

[0370] 实施例110.根据实施例109所述的多核苷酸,其经密码子优化以用于宿主细胞中的表达。

[0371] 实施例111.一种修饰的免疫细胞,包含实施例109-110中任一项的多核苷酸,其中,所述多核苷酸对于所述免疫细胞是异源的。

[0372] 序列

[0373] SEQ ID NO:1(#4具有前导序列的α链可变结构域)

[0374] MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCAVNIGNHDMRFGAGTRLTVKPN

[0375] SEQ ID NO:2(#6具有前导序列的α链可变结构域)

[0376] MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEALRLQEGESSSLNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGEEKEKERLKATLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCAVQTMDGNQFYFGTGTSLTVIPN

[0377] SEQ ID NO:3(#7具有前导序列的α链可变结构域)

[0378] MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCASPGTYKYIFGTGTRLKVLAN

[0379] SEQ ID NO:4(#10具有前导序列的α链可变结构域)

[0380] MTRVSLWAVVVSTCLESGMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESNYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFCAFNPWENYGQNFVFGPGTRLSVLPY

[0381] SEQ ID NO:5(#4具有前导序列的β链可变结构域)

[0382] MGCRLLCCAVLCLLGAVPIDTEVTQTPKHLVMGMTNKKSLKCEQHMGHRAMYWYKQKAKKPPELMFVYSYEKLSINESVPSRFSPECPNSSLLNLHLHALQPEDSALYLCASSQGTSGADTQYFGPGTRLTVLE

[0383] SEQ ID NO:6(#6具有前导序列的β链可变结构域)

[0384] MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYSLWDLQETQYFPGTRLLVLE

[0385] SEQ ID NO:7(#7具有前导序列的β链可变结构域)

[0386] MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQDPRHKITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQTLGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSFSDGGATDTQYFGPGTRLTVLE

[0387] SEQ ID NO:8(#10具有前导序列的β链可变结构域)

[0388] MLLLLLLLGPAGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSARPHSLTDTQYFGPGTRLTVLE

[0389] SEQ ID NO:9(#4去除前导序列的α链可变结构域)

[0390] QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCAVNIGNHDMRFGAGTRLTVKPN

[0391] SEQ ID NO:10(#6去除前导序列的α链可变结构域)

[0392] EDQVTQSPEALRLQEGESSSLNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGEEKERLKATLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCAVQTMDGNQFYFGTGTSLTVIPN

[0393] SEQ ID NO:11(#7去除前导序列的α链可变结构域)

[0394] AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFASSPGTYKYIFGTGTRLKVLAN

[0395] SEQ ID NO:12(#10去除前导序列的α链可变结构域)

[0396] AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESNYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFCAFNPWENYGQNFVFGPGTRLSVLPY

[0397] SEQ ID NO:13(#4去除前导序列的β链可变结构域)

[0398] DTEVTQTPKHLVMGMTNKKSLKCEQHMGHRAMYWYKQKAKKPPELMFVYSYEKLSINESVPSRFSPECPNSSLLNLHLHALQPEDSALYLCASSQGTSGADTQYFGPGTRLTVLE

[0399] SEQ ID NO:14(#6去除前导序列的β链可变结构域)

[0400] NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYSLWDLQETQYFPGTRLLVLE

[0401] SEQ ID NO:15(#7去除前导序列的β链可变结构域)

[0402] DTGVSQDPRHKITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQTLGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSFSDGGATDTQYFGPGTRLTVLE

[0403] SEQ ID NO:16(#10去除前导序列的β链可变结构域)

[0404] GAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSARPHSLTDTQYFGPGTRLTVLE

[0405] SEQ ID NO:17(#4 CDR1α)

[0406] DRGSQS

[0407] SEQ ID NO:18(#4 CDR2α)

[0408] IYSNGD

[0409] SEQ ID NO:19(#4 CDR3α)

[0410] CAVNIGNHDMRF

[0411] SEQ ID NO:20(#6 CDR1α)

[0412] VSGLRG

[0413] SEQ ID NO:21(#6 CDR2α)

[0414] LYSAGEE

[0415] SEQ ID NO:22(#6 CDR3α)

[0416] CAVQTMDGNQFYF

[0417] SEQ ID NO:23(#7 CDR1α)

[0418] TSESDYY

[0419] SEQ ID NO:24(#7 CDR2α)

[0420] QEAYKQQN

[0421] SEQ ID NO:25(#7 CDR3α)

[0422] CASSPGTYKYIF

[0423] SEQ ID NO:26(#10 CDR1α)

[0424] TSESNYY

[0425] SEQ ID NO:27(#10 CDR2α)

[0426] QEAYKQQN

[0427] SEQ ID NO:28(#10 CDR3α)

[0428] CAFNPWENYGQNFVF

[0429] SEQ ID NO:29(#4 CDR1β)

[0430] MGHRA

[0431] SEQ ID NO:30(#4 CDR2β)

[0432] YSYEKL

[0433] SEQ ID NO:31(#4 CDR3β)

[0434] CASQGTSGADTQYF

[0435] SEQ ID NO:32(#6 CDR1β)

[0436] MNHEY

[0437] SEQ ID NO:33(#6 CDR2β)

[0438] VGAGI

[0439] SEQ ID NO:34(#6 CDR3β)

[0440] CASSYSLWDLQETQYF

[0441] SEQ ID NO:35(#7 CDR1β)

[0442] SEHNR

[0443] SEQ ID NO:36(#7 CDR2β)

[0444] FQNEAQ

[0445] SEQ ID NO:37(#7 CDR3β)

[0446] CASSFSDGGATDTQYF

[0447] SEQ ID NO:38(#10 CDR1β)

[0448] DFQATT

[0449] SEQ ID NO:39(#10 CDR2β)

[0450] SNEGSKA

[0451] SEQ ID NO:40(#10 CDR3β)

[0452] CSARPHLTDTQYF

[0453] SEQ ID NO:41(#4 TCRα恒定结构域)

[0454] IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

[0455] SEQ ID NO:42(#6 TCRα恒定结构域)

[0456] IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

[0457] SEQ ID NO:43(#7 TCRα恒定结构域)

[0458] IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

[0459] SEQ ID NO:44(#10 TCRα恒定结构域)

[0460] IQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

[0461] SEQ ID NO:45(TCRβ恒定结构域)

[0462] DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALN DSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATI LYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

[0463] SEQ ID NO:46(#4具有前导序列的α链)

[0464] MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIM FIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCAVNIGNHDMRFGAGTRLTVKPNIQNPDPAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPE SSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

[0465] SEQ ID NO:47(#6具有前导序列的α链)

[0466] MEKMLECAFIVLWLQLGWLSGEDQVTQSPEALRLQEGESSSLNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLF TLYSAGEEKEKERLKATLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCAVQTMDGNQFYFGTGTSLTVIPNIQNPDPAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPE SSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

[0467] SEQ ID NO:48(#7具有前导序列的α链)

[0468] MACSPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILV IRQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCASSPGTYKYIFGTGTRLKVLANIQNPDPAVYQL RDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFQW SPESSCDVLLKVAKSDFNLLMFRFQ

[0469] SEQ ID NO:49(#10具有前导序列的α链)

[0470] MTRVSLLWAVVVSTCLESGMAQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESNYYLFWYKQPPSRQMILVI RQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFCAFNPWENYGQNFVFGPGTRLSVLPYIQNPDPAVY QLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTF FPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

[0471] SEQ ID NO:50(#4去除前导序列的α链)

[0472] QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKAS QYVSLLIRDSQPSDSATYLCAVNIGNHDMRFGAGTRLTVKPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ SKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFTLRLWSPESSCDVLLVEKSFETDTNL

NFQNLSVLGFRIL

[0473] SEQ ID NO:51(#6去除前导序列的α链)

[0474] EDQVTQSPEALRLQEGESSSLNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGEEKERLKATLTKKES FLHITAPKPEDSATYLCAVQTMDGNQFYFGTGTSLTVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSK DSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVLLVEKSFETDTNLNFQNL NSSFR

[0475] SEQ ID NO:52(#7去除前导序列的α链)

[0476] AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQ KAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCASSPGTYKYIFGTGTRLKVLANIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTN VSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSRLWSSVIGFRILL

[0477] SEQ ID NO:53(#10去除前导序列的α链)

[0478] AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESNYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQ KAAKSFSLKISDSQLGDTAMYFCAFNPWENYGQNFVFGPGTRLSVLPYIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTLNFKSPESSCDVKLVEKSGFD TNLNFQWSVSLVA

[0479] SEQ ID NO:54(#4具有前导序列的β链)

[0480] MGCRLLCCAVLCLLGAVPIDTEVTQTPKHLVMGMTNKKSLKCEQHMGHRAMYWYKQKAKKPPELMFVYS YEKLSINESVPSRFSPECPNSSLLNLHLHALQPEDSALYLCASSQGTSGADTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAV FEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALV LMAMVKRKDSRG

[0481] SEQ ID NO:55(#6具有前导序列的β链)

[0482] MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSV GAGITDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYSLWDLQETQYFGPGTRLLVLEDLKNVFPPEVA VFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQN PRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAL VLMAMVKRKDSRG

[0483] SEQ ID NO:56(#7具有前导序列的β链)

[0484] MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQDPRHKITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQTLGQGPEFLTYFQ NEAQLEKSRLLSDRFSAERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSFSDGGATDTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEV AVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQ NPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSA LVLMAMVKRKDSRG

[0485] SEQ ID NO:57(#10具有前导序列的β链)

[0486] MLLLLLLLGPAGSGLGAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGS KATYEQGVEKDKFLINHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSARPHSLTDTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFE PSEAEISHTQKATLVCL

[0487] ATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFY GLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSR

G

[0488] SEQ ID NO:58(#4去除前导序列的β链)

[0489] DTEVTQTPKHLVMGMTNKKSLKCEQHMGHRAMYWYKQKAKKPPELMFVYSYEKLSINESVPSRFSPECP NSSLLNLHLHALQPEDSALYLCASSQGTSGADTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL ATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEW TQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

[0490] SEQ ID NO:59(#6去除前导序列的β链)

[0491] NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHEYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITDQGEVPNGYNVSRS TTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYSLWDLQETQYFGPGTRLLVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVC LATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDE WTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

[0492] SEQ ID NO:60(#7去除前导序列的β链)

[0493] DTGVSQDPRHKITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQTLGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAER PKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSFSDGGATDTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSEND EWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

[0494] SEQ ID NO:61(#10去除前导序列的β链)

[0495] GAVVSQHPSWVICKSGTSVKIECRSLDFQATTMFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVEKDKFLI NHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSARPHSLTDTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV CLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSEND EWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

[0496] SEQ ID NO:62(#4α基因片段)

[0497] ATGAAATCCTTGAGAGTTTTACTAGTGATCCTGTGGCTTCAGTTGAGCTGGGTTTGGAGCCAACAGAAG GAGGTGGAGCAGAATTCTGGACCCCTCAGTGTTCCAGAGGGAGCCATTGCCTCTCTCAACTGCACTTACAGTGACCG AGGTTCCCAGTCCTTCTTCTGGTACAGACAATATTCTGGGAAAAGCCCTGAGTTGATAATGTTCATATACTCCAATG GTGACAAAGAAGATGGAAGGTTTACAGCACAGCTCAATAAAGCCAGCCAGTATGTTTCTCTGCTCATCAGAGACTCC CAGCCCAGTGATTCAGCCACCTACCTCTGTGCCGTGAACATAGGAAACCATGACATGCGCTTTGGAGCAGGGACCAG ACTGACAGTAAAACCAAATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGT CTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGAC AAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGC ATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGAAAGTTCCTGTGATGTCA AGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCTAAACTTTCAAAACCTGTCAGTGATTGGGTTCCGAATCCTC CTCCTGAAAGTGGCCGGGTTTAATCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0498] SEQ ID NO:63(#6α基因片段)

[0499] ATGGAGAAAATGTTGGAGTGTGCATTCATAGTCTTGTGGCTTCAGCTTGGCTGGTTGAGTGGAGAAGAC CAGGTGACGCAGAGTCCCGAGGCCCTGAGACTCCAGGAGGGAGAGAGTAGCAGTCTCAACTGCAGTTACACAGTCAG CGGTTTAAGAGGGCTGTTCTGGTATAGGCAAGATCCTGGGAAAGGCCCTGAATTCCTCTTCACCCTGTATTCAGCTG GGGAAGAAAAGGAGAAAGAAAGGCTAAAAGCCACATTAACAAAGAAGGAAAGCTTTCTGCACATCACAGCCCCTAAA CCTGAAGACTCAGCCACTTATCTCTGTGCTGTGCAGACCATGGACGGTAACCAGTTCTATTTTGGGACAGGGACAAG

TTTGACGGTCATTCCAAATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGT
CTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGAC
AAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGC
ATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGAAAGTTCCTGTGATGTCA
AGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCTAAACTTTCAAAACCTGTCAGTGATTGGGTTCCGAATCCTC
CTCCTGAAAGTGGCCGGGTTTAATCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0500] SEQ ID NO:64(#7α基因片段)

[0501] ATGGCATGCCCTGGCTTCCTGTGGGCACTTGTGATCTCCACCTGTCTTGAATTTAGCATGGCTCAGACA
GTCACTCAGTCTCAACCAGAGATGTCTGTGCAGGAGGCAGAGACCGTGACCCTGAGCTGCACATATGACACCAGTGA
GAGTGATTATTATTTATTCTGGTACAAGCAGCCTCCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTTATTCGCCAAGAAGCTTATA
AGCAACAGAATGCAACAGAGAATCGTTTCTCTGTGAACTTCCAGAAAGCAGCCAAATCCTTCAGTCTCAAGATCTCA
GACTCACAGCTGGGGGATGCCGCGATGTATTTCTGTGCTTCCAGTCCAGGAACCTACAAATACATCTTTGGAACAGG
CACCAGGCTGAAGGTTTTAGCAAATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTG
ACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATC
ACAGACAAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGA
CTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGAAAGTTCCTGTG
ATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCTAAACTTTCAAAACCTGTCAGTGATTGGGTTCCGA
ATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGGTTTAATCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0502] SEQ ID NO:65(#10α基因片段)

[0503] ATGACACGAGTTAGCTTGCTGTGGGCAGTCGTGGTCTCCACCTGTCTTGAATCCGGCATGGCCCAGACA
GTCACTCAGTCTCAACCAGAGATGTCTGTGCAGGAGGCAGAGACTGTGACCCTGAGTTGCACATATGACACCAGTGA
GAGTAATTATTATTTGTTCTGGTACAAACAGCCTCCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTTATTCGCCAAGAAGCTTATA
AGCAACAGAATGCAACGGAGAATCGTTTCTCTGTGAACTTCCAGAAAGCAGCCAAATCCTTCAGTCTCAAGATCTCA
GACTCACA

[0504] GCTGGGGGACACTGCGATGTATTTCTGTGCTTTCAACCCTTGGGAGAACTATGGTCAGAATTTTGTCTT
TGGTCCCGGAACCAGATTGTCCGTGCTGCCCTATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTA
AATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGTAAGGATTCTGAT
GTGTATATCACAGACAAAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAA
CAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGAAA
GTTCCTGTGATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCTAAACTTTCAAAACCTGTCAGTGATT
GGGTTCCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGGTTTAATCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0505] SEQ ID NO:66(#4α基因片段,密码子优化)

[0506] ATGAAGAGCCTGAGAGTCCTGCTGGTGATTTTGTGGCTGCAGCTGTCTTGGGTTTGGTCTCAGCAGAAA
GAAGTGGAGCAGAATAGCGGCCCTCTGTCTGTTCCTGAAGGCGCTATTGCTAGCCTGAATTGCACATACAGCGATAG
AGGATCTCAGAGCTTCTTCTGGTACCGGCAGTACAGCGGCAAGAGCCCAGAACTGATCATGTTCATCTACAGCAATG
GCGACAAGGAGGATGGCAGGTTTACAGCCCAGCTGAACAAGGCCAGCCAGTATGTTTCTCTGCTGATCAGAGATAGC
CAGCCTAGCGATTCTGCCACCTACCTGTGTGCCGTGAACATCGGAAATCACGACATGAGATTTGGAGCCGGCACAAG
ACTGACCGTGAAGCCCAATATCCAGAACCCTGATCCTGCTGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGAGCAGCGACAAGA
GCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGAT

AAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGC
CTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGCAGCTGCGACGTGA
AGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTCAGCGTGATCGGCTTCCGGATCCTG
CTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0507] SEQ ID NO:67(#6α基因片段,密码子优化)

[0508] ATGGAGAAGATGCTGGAGTGTGCGTTCATCGTTCTGTGGCTGCAACTTGGATGGCTGTCTGGAGAGGAT
CAGGTTACACAGTCTCCTGAAGCCCTGAGACTGCAAGAAGGAGAAAGCTCTAGCCTGAACTGCAGCTACACAGTGTC
TGGACTGAGAGGCCTGTTCTGGTACAGACAGGATCCTGGAAAAGGCCCAGAGTTCCTGTTTACCCTGTATTCTGCCG
GCGAGGAGAAGGAGAAAGAGAGACTGAAAGCTACCCTGACCAAGAAGGAGAGCTTCCTGCACATTACCGCCCCCAAA
CCTGAGGATTCTGCCACATATCTGTGTGCTGTGCAGACCATGGATGGCAACCAGTTCTACTTCGGCACAGGCACATC
TCTGACCGTTATCCCCAATATCCAGAACCCTGATCCTGCCGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGAGCAGCGACAAGA
GCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGAT
AAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCGC
CTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGCAGCTGCGACGTGA
AGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTCAGCGTGATCGGCTTCCGGATCCTG
CTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0509] SEQ ID NO:68(#7α基因片段,密码子优化)

[0510] ATGGCTTGTCCTGGATTCTTATGGGCTCTGGTGATCAGCACCTGTCTGGAGTTCTCTATGGCCCAGACA
GTGACACAGTCTCAGCCTGAAATGTCTGTGCAGGAAGCCGAAACCGTGACACTGTCTTGCACCTACGATACAAGCGA
GAGCGACTACTACCTGTTCTGGTACAAGCAGCCTCCCTCTAGGCAGATGATCCTGGTGATTAGACAGGAGGCCTACA
AACAGCAGAATGCCACCGAGAACCGGTTTAGCGTGAACTTCCAGAAAGCCGCCAAGAGCTTCAGCCTGAAAATCTCT
GACAGCCAGCTGGGAGATGCTGCCATGTACTTTTGTGCCAGCTCTCCAGGCACCTACAAGTACATTTTTGGCACCGG
CACCAGACTGAAGGTGCTGGCCAATATCCAGAATCCCGATCCTGCCGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGAGCAGCG
ACAAGAGCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATC
ACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGA
CTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGCAGCTGCG
ACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTCAGCGTGATCGGCTTCCGG
ATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0511] SEQ ID NO:69(#10α基因片段,密码子优化)

[0512] ATGACCAGAGTTAGCCTGTTATGGGCTGTGGTGGTGAGCACATGTCTGGAATCTGGAATGGCCCAGACA
GTGACACAGTCTCAGCCTGAAATGTCTGTGCAGGAAGCCGAAACCGTTACACTGAGCTGCACCTACGATACAAGCGA
GAGCAACTACTACCTGTTCTGGTACAAGCAGCCCCCTTCTAGGCAGATGATCCTGGTGATCAGACAGGAGGCCTATA
AACAGCAGAATGCCACCGAGAACCGGTTTAGCGTGAACTTCCAGAAAGCCGCCAAGAGCTTCAGCCTGAAAATCTCT
GACAGCCAGCTGGGCGATACAGCCATGTACTTTTGTGCCTTCAACCCCTGGGAGAACTATGGCCAGAATTTCGTGTT
CGGCCCTGGCACCAGACTGTCTGTTCTGCCTTATATCCAGAACCCCGATCCTGCTGTGTACCAGCTGCGGGACAGCA
AGAGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGAC
GTGTACATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAA
CAAGAGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGA
GCAGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTCAGCGTGATC

GGCTTCCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0513] SEQ ID NO:70(#4β基因片段)

[0514] ATGGGCTGCAGGCTGCTCTGCTGTGCGGTTCTCTGTCTCCTGGGAGCAGTTCCCATAGACACTGAAGTT
ACCCAGACACCAAAACACCTGGTCATGGGAATGACAAATAAGAAGTCTTTGAAATGTGAACAACATATGGGGCACAG
GGCTATGTATTGGTACAAGCAGAAAGCTAAGAAGCCACCGGAGCTCATGTTTGTCTACAGCTATGAGAAACTCTCTA
TAAATGAAAGTGTGCCAAGTCGCTTCTCACCTGAATGCCCCAACAGCTCTCTCTTAAACCTTCACCTACACGCCCTG
CAGCCAGAAGACTCAGCCCTGTATCTCTGCGCCAGCAGCCAAGGGACTAGCGGGGCAGATACGCAGTATTTTGGCCC
AGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAG
CAGAGATCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTACCCC

[0515] GACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCGCAG
CCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG
GCAGAACCCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATA
GGGCCAAACCTGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGGGTAGAGCAGACTGTGGCTTCACCTCCGAGTCTTAC
CAGCAAGGGGTCCTGTCTGCCACCATCCTCTATGAGATCTTGCTAGGGAAGGCCACCTTGTATGCCGTGCTGGTCAG
TGCCCTCGTGCTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGCTAG

[0516] SEQ ID NO:71(#6β基因片段)

[0517] ATGAGCATCGGCCTCCTGTGCTGTGCAGCCTTGTCTCTCCTGTGGGCAGGTCCAGTGAATGCTGGTGTC
ACTCAGACCCCAAAATTCCAGGTCCTGAAGACAGGACAGAGCATGACACTGCAGTGTGCCCAGGATATGAACCATGA
ATACATGTCCTGGTATCGACAAGACCCAGGCATGGGGCTGAGGCTGATTCATTACTCAGTTGGTGCTGGTATCACTG
ACCAAGGAGAAGTCCCCAATGGCTACAATGTCTCCAGATCAACCACAGAGGATTTCCCGCTCAGGCTGCTGTCGGCT
GCTCCCTCCCAGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGTTACTCTCTTTGGGACCTTCAAGAGACCCAGTACTTCGG
GCCAGGCACGCGGCTCCTGGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAG
AAGCAGAGATCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTG
AGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCT
CAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGCAACCACTTCC
GCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTCACCCAGATC
GTCAGCGCCGAGGCCTGGGGTAGAGCAGACTGTGGCTTCACCTCCGAGTCTTACCAGCAAGGGGTCCTGTCTGCCAC
CATCCTCTATGAGATCTTGCTAGGGAAGGCCACCTTGTATGCCGTGCTGGTCAGTGCCCTCGTGCTGATGGCCATGG
TCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGCTAG

[0518] SEQ ID NO:72(#7β基因片段)

[0519] ATGGGCACCAGCCTCCTCTGCTGGATGGCCCTGTGTCTCCTGGGGGCAGATCACGCAGATACTGGAGTC
TCCCAGGACCCCAGACACAAGATCACAAAGAGGGGACAGAATGTAACTTTCAGGTGTGATCCAATTTCTGAACACAA
CCGCCTTTATTGGTACCGACAGACCCTGGGGCAGGGCCCAGAGTTTCTGACTTACTTCCAGAATGAAGCTCAACTAG
AAAAATCAAGGCTGCTCAGTGATCGGTTCTCTGCAGAGAGGCCTAAGGGATCTTTCTCCACCTTGGAGATCCAGCGC
ACAGAGCAGGGGGACTCGGCCATGTATCTCTGTGCCAGCAGCTTTTCAGACGGGGGGGCTACAGATACGCAGTATTT
TGGCCCAGGCACCCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCAT
CAGAAGCAGAGATCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAG
CTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCCGC
CCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGCAACCACT

TCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTCACCCAG
ATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGGGTAGAGCAGACTGTGGCTTCACCTCCGAGTCTTACCAGCAAGGGGTCCTGTCTGC
CACCATCCTCTATGAGATCTTGCTAGGGAAG

[0520] GCCACCTTGTATGCCGTGCTGGTCAGTGCCCTCGTGCTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGA
GGCTAG

[0521] SEQ ID NO:73(#10β基因片段)

[0522] ATGCTGCTGCTTCTGCTGCTTCTGGGGCCAGCAGGCTCCGGGCTTGGTGCTGTCGTCTCTCAACATCCG
AGCTGGGTTATCTGTAAGAGTGGAACCTCTGTGAAGATCGAGTGCCGTTCCCTGGACTTTCAGGCCACAACTATGTT
TTGGTATCGTCAGTTCCCGAAACAGAGTCTCATGCTGATGGCAACTTCCAATGAGGGCTCCAAGGCCACATACGAGC
AAGGCGTCGAGAAGGACAAGTTTCTCATCAACCATGCAAGCCTGACCTTGTCCACTCTGACAGTGACCAGTGCCCAT
CCTGAAGACAGCAGCTTCTACATCTGCAGTGCTAGACCCCATTCTCTCACAGATACGCAGTATTTTGGCCCAGGCAC
CCGGCTGACAGTGCTCGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGA
TCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGG
GTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTC
CAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAG
TCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTCACCCAGATCGTCAGCGCC
GAGGCCTGGGGTAGAGCAGACTGTGGCTTCACCTCCGAGTCTTACCAGCAAGGGGTCCTGTCTGCCACCATCCTCTA
TGAGATCTTGCTAGGGAAGGCCACCTTGTATGCCGTGCTGGTCAGTGCCCTCGTGCTGATGGCCATGGTCAAGAGAA
AGGATTCCAGAGGCTAG

[0523] SEQ ID NO:74(#4β基因片段,密码子优化)

[0524] ATGGGCTGTAGACTGTTGTGTTGTGCTGTGCTGTGTCTGTTGGGAGCTGTGCCTATCGATACAGAGGTG
ACCCAGACCCCTAAACATCTGGTTATGGGCATGACCAACAAGAAGAGCCTGAAGTGCGAGCAGCACATGGGCCATAG
GGCCATGTATTGGTATAAGCAGAAGGCCAAGAAACCTCCTGAGCTGATGTTCGTGTACAGCTACGAGAAGCTGAGCA
TCAACGAGAGCGTGCCCAGCAGATTTTCTCCTGAGTGCCCTAATTCTAGCCTGCTGAATCTGCACCTGCATGCTCTG
CAGCCTGAGGATTCTGCTCTGTACCTGTGTGCTTCTTCTCAGGGCACATCTGGAGCTGATACACAGTACTTCGGACC
TGGCACAAGACTGACAGTGCTGGAAGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTAGCGAGG
CCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTACCCCGACCACGTGGAACTGTCT
TGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGCCCTGAA
CGACAGCCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCAGAT
GCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTG
TCTGCTGAGGCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACCAT
CCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTGGTGCTGATGGCCATGGTCA
AGCGGAAGGACAGCCGGGGC

[0525] SEQ ID NO:75(#6β基因片段,密码子优化)

[0526] ATGTCTATCGGTCTGCTGTGCTGTGCTGCTCTTTCTCTGCTTTGGGCTGGACCTGTGAATGCTGGAGTT
ACACAAACCCCCAAGTTCCAAGTGCTGAAGACAGGACAGAGCATGACCCTGCAGTGTGCTCAGGACATGAATCACGA
GTACATGAGCTGGTACAGACAGGATCCTGGAATGGGCCTGAGGCTGATCCACTACTCTGTTGGAGCCGGAATTACAG
ATCAGGGAGAAGTGCCAAATGGCTACAACGTGAGCAGGAGCACAACCGAGGACTTCCCCTTAAGACTGTTGTCTGCT
GCTCCATCTCAGACAAGCGTGTACTTTTGCGCCAGCTCCTACTCTCTGTGGGATCTGCAGGAAACCCAGTACTTTGG

ACCAGGCACAAGACTGTTAGTGCTGGAGGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTAGCG
AGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTACCCCGACCACGTGGAACTG
TCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGCCCT
GAACGACAGCCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCA
GATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAGATC
GTGTCTGCTGAGGCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCAC
CATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTGGTGCTGATGGCCATGG
TCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGC

[0527] SEQ ID NO:76(#7β基因片段,密码子优化)

[0528] ATGGGCACATCTCTTCTCTGCTGGATGGCTCTTTGTCTGCTTGGAGCCGATCATGCCGATACAGGAGTT
AGCCAGGATCCTAGACACAAGATCACCAAGAGAGGCCAGAATGTGACCTTCCGGTGCGATCCTATCTCTGAGCACAA
CAGGCTGTACTGGTACAGACAAACACTGGGACAAGGACCTGAGTTCCTGACCTACTTCCAGAACGAAGCCCAGCTGG
AGAAGTCTAGACTTCTGAGCGACAGATTTAGCGCCGAGAGACCTAAAGGCAGCTTTAGCACCCTGGAGATCCAGAGA
ACAGAACAGGGCGATTCTGCCATGTACCTGTGTGCTAGCAGCTTTTCTGATGGAGGCGCCACCGATACACAGTATTT
CGGACCTGGCACAAGACTGACAGTGCTGGAGGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTA
GCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTACCCCGACCACGTGGAA
CTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGC
CCTGAACGACAGCCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACT
TCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAG
ATCGTGTCTGCTGAGGCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGC
CACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTGGTGCTGATGGCCA
TGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGC

[0529] SEQ ID NO:77(#10β基因片段,密码子优化)

[0530] ATGCTGCTTCTTCTCCTCCTTCTCGGACCTGCTGGATCTGGATTAGGAGCTGTTGTGTCTCAGCACCCT
TCTTGGGTGATCTGTAAAAGCGGCACAAGCGTGAAGATCGAGTGCAGAAGCCTGGACTTTCAGGCCACAACCATGTT
CTGGTATAGGCAGTTCCCCAAGCAGTCTCTGATGCTGATGGCCACCTCTAATGAGGGCTCTAAGGCCACATATGAAC
AGGGAGTGGAGAAGGACAAGTTCCTGATCAACCACGCCTCTCTGACCCTGTCTACCCTGACAGTTACATCTGCCCAC
CCTGAGGATAGCAGCTTTTACATCTGTAGCGCCAGACCTCACAGCCTGACCGATACACAGTACTTTGGCCCTGGCAC
AAGACTGACAGTGTTAGAAGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTAGCGAGGCCGAGA
TCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTACCCCGACCAC

[0531] GTGGAACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTG
AAAGAGCAGCCCGCCCTGAACGACAGCCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAA
CCCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGGGCCA
AGCCCGTGACCCAGATCGTGTCTGCTGAGGCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAG
GGCGTGCTGAGCGCCACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCT
GGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGC

[0532] SEQ ID NO:78(#4β-P2A-#4α,密码子优化)

[0533] ATGGGCTGTAGACTGTTGTGTTGTGCTGTGCTGTGTCTGTTGGGAGCTGTGCCTATCGATACAGAGGTG
ACCCAGACCCCTAAACATCTGGTTATGGGCATGACCAACAAGAAGAGCCTGAAGTGCGAGCAGCACATGGGCCATAG

GGCCATGTATTGGTATAAGCAGAAGGCCAAGAAACCTCCTGAGCTGATGTTCGTGTACAGCTACGAGAAGCTGAGCA
TCAACGAGAGCGTGCCCAGCAGATTTTCTCCTGAGTGCCCTAATTCTAGCCTGCTGAATCTGCACCTGCATGCTCTG
CAGCCTGAGGATTCTGCTCTGTACCTGTGTGCTTCTTCTCAGGGCACATCTGGAGCTGATACACAGTACTTCGGACC
TGGCACAAGACTGACAGTGCTGGAAGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTAGCGAGG
CCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTACCCCGACCACGTGGAACTGTCT
TGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGCCCTGAA
CGACAGCCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCAGAT
GCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTG
TCTGCTGAGGCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACCAT
CCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTGGTGCTGATGGCCATGGTCA
AGCGGAAGGACAGCCGGGGCGGTTCCGGAGCCACGAACTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAAC
CCCGGTCCCATGAAGAGCCTGAGAGTCCTGCTGGTGATTTTGTGGCTGCAGCTGTCTTGGGTTTGGTCTCAGCAGAA
AGAAGTGGAGCAGAATAGCGGCCCTCTGTCTGTTCCTGAAGGCGCTATTGCTAGCCTGAATTGCACATACAGCGATA
GAGGATCTCAGAGCTTCTTCTGGTACCGGCAGTACAGCGGCAAGAGCCCAGAACTGATCATGTTCATCTACAGCAAT
GGCGACAAGGAGGATGGCAGGTTTACAGCCCAGCTGAACAAGGCCAGCCAGTATGTTTCTCTGCTGATCAGAGATAG
CCAGCCTAGCGATTCTGCCACCTACCTGTGTGCCGTGAACATCGGAAATCACGACATGAGATTTGGAGCCGGCACAA
GACTGACCGTGAAGCCCAATATCCAGAACCCTGATCCTGCTGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGAGCAGCGACAAG
AGCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCACCGA
TAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACTTCG
CCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGCAGCTGCGACGTG
AAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTCAGCGTGATCGGCTTCCGGATCCT
GCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0534] SEQ ID NO:79(#6β-P2A-#6α,密码子优化)

[0535] ATGTCTATCGGTCTGCTGTGCTGTGCTGCTCTTTCTCTGCTTTGGGCTGGACCTGTGAATGCTGGAGTT
ACACAAACCCCCAAGTTCCAAGTGCTGAAGACAGGACAGAGCATGACCCTGCAGTGTGCTCAGGACATGAATCACGA
GTACATGAGCTGGTACAGACAGGATCCTGGAATGGGCCTGAGGCTGATCCACTACTCTGTTGGAGCCGGAATTACAG
ATCAGGGAGAAGTGCCAAATGGCTACAACGTGAGCAGGAGCACAACCGAGGACTTCCCCTTAAGACTGTTGTCTGCT
GCTCCATCTCAGACAAGCGTGTACTTTTGCGCCAGCTCCTACTCTCTGTGGGATCTGCAGGAAACCCAGTACTTTGG
ACCAGGCACAAGACTGTTAGTGCTGGAGGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTAGCG
AGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTACCCCGACCACGTGGAACTG
TCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGCCCT
GAACGACAGCCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCA
GATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAGATC
GTGTCTGCTGAGGCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCAC
CATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTGGTGCTGATGGCCATGG
TCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGCGGTTCCGGAGCCACGAACTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAA
AACCCCGGTCCCATGGAGAAGATGCTGGAGTGTGCGTTCATCGTTCTGTGGCTGCAACTTGGATGGCTGTCTGGAGA
GGATCAGGTTACACAGTCTCCTGAAGCCCTGAGACTGCAAGAAGGAGAAAGCTCTAGCCTGAACTGCAGCTACACAG
TGTCTGGACTGAGAGGCCTGTTCTGGTACAGACAGGATCCTGGAAAAGGCCCAGAGTTCCTGTTTACCCTGTATTCT

GCCGGCGAGGAGAAGGAGAAAGAGAGACTGAAAGCTACCCTGACCAAGAAGGAGAGCTTCCTGCACATTACCGCCCC
CAAACCTGAGGATTCTGCCACATATCTGTGTGCTGTGCAGACCATGGATGGCAACCAGTTCTACTTCGGCACAGGCA
CATCTCTGACCGTTATCCCCAATATCCAGAACCCTGATCCTGCCGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGAGCAGCGAC
AAGAGCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTACATCAC
CGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGAGCGACT
TCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGCAGCTGCGAC
GTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTCAGCGTGATCGGCTTCCGGAT
CCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0536] SEQ ID NO:80(#7β-P2A-#7α,密码子优化)

[0537] ATGGGCACATCTCTTCTCTGCTGGATGGCTCTTTGTCTGCTTGGAGCCGATCATGCCGATACAGGAGTT
AGCCAGGATCCTAGACACAAGATCACCAAGAGAGGCCAGAATGTGACCTTCCGGTGCGATCCTATCTCTGAGCACAA
CAGGCTGTACTGGTACAGACAAACACTGGGACAAGGACCTGAGTTCCTGACCTACTTCCAGAACGAAGCCCAGCTGG
AGAAGTCTAGACTTCTGAGCGACAGATTTAGCGCCGAGAGACCTAAAGGCAGCTTTAGCACCCTGGAGATCCAGAGA
ACAGAACAGGGCGATTCTGCCATGTACCTGTGTGCTAGCAGCTTTTCTGATGGAGGCGCCACCGATACACAGTATTT
CGGACCTGGCACAAGACTGACAGTGCTGGAGGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTA
GCGAGGCCGAGATCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTACCCCGACCACGTGGAA
CTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGC
CCTGAACGACAGCCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACT
TCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAG
ATCGTGTCTGCTGAGGCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGC
CACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTGGTGCTGATGGCCA
TGGTCAAGCGGAAGGACAGCCGGGGCGGTTCCGGAGCCACGAACTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAA
GAAAACCCCGGTCCCATGGCTTGTCCTGGATTCTTATGGGCTCTGGTGATCAGCACCTGTCTGGAGTTCTCTATGGC
CCAGACAGTGACACAGTCTCAGCCTGAAATGTCTGTGCAGGAAGCCGAAACCGTGACACTGTCTTGCACCTACGATA
CAAGCGAGAGCGACTACTACCTGTTCTGGTACAAGCAGCCTCCCTCTAGGCAGATGATCCTGGTGATTAGACAGGAG
GCCTACAAACAGCAGAATGCCACCGAGAACCGGTTTAGCGTGAACTTCCAGAAAGCCGCCAAGAGCTTCAGCCTGAA
AATCTCTGACAGCCAGCTGGGAGATGCTGCCATGTACTTTTGTGCCAGCTCTCCAGGCACCTACAAGTACATTTTTG
GCACCGGCACCAGACTGAAGGTGCTGGCCAATATCCAGAATCCCGATCCTGCCGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAG
AGCAGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACGT
GTACATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACA
AGAGCGACTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGC
AGCTGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTCAGCGTGATCGG
CTTCCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0538] SEQ ID NO:81(#10β-P2A-#10α,密码子优化)

[0539] ATGCTGCTTCTTCTCCTCCTTCTCGGACCTGCTGGATCTGGATTAGGAGCTGTTGTGTCTCAGCACCCT
TCTTGGGTGATCTGTAAAAGCGGCACAAGCGTGAAGATCGAGTGCAGAAGCCTGGACTTTCAGGCCACAACCATGTT
CTGGTATAGGCAGTTCCCCAAGCAGTCTCTGATGCTGATGGCCACCTCTAATGAGGGCTCTAAGGCCACATATGAAC
AGGGAGTGGAGAAGGACAAGTTCCTGATCAACCACGCCTCTCTGACCCTGTCTACCCTGACAGTTACATCTGCCCAC
CCTGAGGATAGCAGCTTTTACATCTGTAGCGCCAGACCTCACAGCCTGACCGATACACAGTACTTTGGCCCTGGCAC

AAGACTGACAGTGTTAGAAGACCTGAAGAACGTGTTCCCCCCAGAGGTGGCCGTGTTCGAGCCTAGCGAGGCCGAGA
TCAGCCACACCCAGAAAGCCACCCTCGTGTGCCTGGCCACCGGCTTTTACCCCGACCACGTGGAACTGTCTTGGTGG
GTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCTGCACCGACCCCCAGCCCCTGAAAGAGCAGCCCGCCCTGAACGACAG
CCGGTACTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGGAACCACTTCAGATGCCAGG
TGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGACGAGTGGACCCAGGACCGGGCCAAGCCCGTGACCCAGATCGTGTCTGCT
GAGGCCTGGGGCAGAGCCGATTGCGGCTTCACCAGCGAGAGCTACCAGCAGGGCGTGCTGAGCGCCACCATCCTGTA
CGAGATCCTGCTGGGCAAGGCCACCCTGTACGCCGTGCTGGTGTCCGCCCTGGTGCTGATGGCCATGGTCAAGCGGA
AGGACAGCCGGGGCGGTTCCGGAGCCACGAACTTCTCTCTGTTAAAGCAAGCAGGAGACGTGGAAGAAAACCCCGGT
CCCATGACCAGAGTTAGCCTGTTATGGGCTGTGGTGGTGAGCACATGTCTGGAATCTGGAATGGCCCAGACAGTGAC
ACAGTCTCAGCCTGAAATGTCTGTGCAGGAAGCCGAAACCGTTACACTGAGCTGCACCTACGATACAAGCGAGAGCA
ACTACTACCTGTTCTGGTACAAGCAGCCCCCTTCTAGGCAGATGATCCTGGTGATCAGACAGGAGGCCTATAAACAG
CAGAATGCCACCGAGAACCGGTTTAGCGTGAACTTCCAGAAAGCCGCCAAGAGCTTCAGCCTGAAAATCTCTGACAG
CCAGCTGGGCGATACAGCCATGTACTTTTGTGCCTTCAACCCCTGGGAGAACTATGGCCAGAATTTCGTGTTCGGCC
CTGGCACCAGACTGTCTGTTCTGCCTTATATCCAGAACCCCGATCCTGCTGTGTACCAGCTGCGGGACAGCAAGAGC
AGCGACAAGAGCGTGTGCCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACAGCGACGTGTA
CATCACCGATAAGTGCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAACAAGA
GCGACTTCGCCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCCGAGGACACATTCTTCCCAAGCCCCGAGAGCAGC
TGCGACGTGAAGCTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTCAGCGTGATCGGCTT
CCGGATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGCGGCTGTGGTCCAGCTGA

[0540] SEQ ID NO:82(参考TCRα链)

[0541] MTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPSTLSVQEGDSAVIKCTYSDSASNYFPWYKQELGKRPQLIIDI
RSNVGEKKDQRIAVTLNKTAKHFSLHITETQPEDSAVYFCAATEDYQLIWGAGTKLIIKPDIQNPDPAVYQLRDSKS
SDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS
CDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

[0542] SEQ ID NO:83(参考TCRβ链)

[0543] MSNQVLCCVVLCFLGANTVDGGITQSPKYLFRKEGQNVTLSCEQNLNHDAMYWYRQDPGQGLRLIYYSQ
IVNDFQKGDIAEGYSVSREKKESFPLTVTSAQKNPTAFYLCASSPGALYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFE
PSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRN
HFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLM
AMVKRKDSRG

[0544] SEQ ID NO:84(猪捷申病毒-1 2A(P2A-1)肽)

[0545] GSGATNFSLLKQAGDVEENPGP

[0546] SEQ ID NO:85(猪捷申病毒-2 2A(P2A-2)肽)

[0547] SGATNFSLKQAGDVEENPGP

[0548] SEQ ID NO:86(Thosea asigna病毒2A(T2A)肽)

[0549] GSGEGRGSLLTCGDVEENPGP

[0550] SEQ ID NO:87(A型马鼻炎病毒(ERAV)2A(E2A)肽)

[0551] GSGQCTNYALLKLAGDVESNPGP

[0552] SEQ ID NO:88(口蹄疫病毒2A(F2A)肽)

[0553] GSGVKQTLNFDLLKLAGDVESNPGP

[0554] SEQ ID NO:89(猪捷申病毒-1 2A(P2A-1)肽-nt序列)

[0555] GGAAGTGGAGCTACGAATTTTTTTTTATTAAAACAAGCAGGAGATGTTGAGGAGAATCCCGGTCCA

[0556] SEQ ID NO:90(猪捷申病毒-2 2A(P2A-2)肽-nt序列)

[0557] AGCGGCGCCACCAACTTCAGCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGGAAGAGAACCCTGGCCCT

[0558] SEQ ID NO:91(Thosea asigna病毒2A(T2A)肽-nt序列)

[0559] GGAAGCGGAGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCCTGGACCT

[0560] SEQ ID NO:92(A型马鼻炎病毒(ERAV)2A(E2A)肽-nt序列)

[0561] GGAAGCGGACAGTGTACTAATTATGCTCTCTTGAAATTGGCTGGAGATGTTGAGAGCAACCCTGGACCT

[0562] SEQ ID NO:93(口蹄疫病毒2A(F2A)肽-nt序列)

[0563] GGAAGCGGAGTGAAACAGACTTTGAATTTTGACCTTCTCAAGTTGGCGGGAGACGTGGAGTCCAACCCT GGACCT

[0564] SEQ ID NO:94(WT-1肽抗原)

[0565] RMFPNAPYL

[0566] SEQ ID NO:95(G-S接头)

[0567] GGGS

[0568] SEQ ID NO:96

[0569] GlyxSery,其中X和Y各自独立地为非零整数

[0570] SEQ ID NO:97-大范围核酸酶识别位点

[0571] 拉格利达格

[0572] SEQ ID NO:98-大范围核酸酶识别位点

[0573] GIY-YIG

[0574] SEQ ID NO:99-大范围核酸酶识别位点

[0575] PD-(D/E)XK

[0576] SEQ ID NO.:100(WT-1 aa 37-45)

[0577] VLDFAPPGA

[0578] SEQ ID NO.:101(TCR 10.1CDR1α)

[0579] DSAIYN

[0580] SEQ ID NO.:102(TCR 10.1CDR2α)

[0581] IQSSQRE

[0582] SEQ ID NO.:103(TCR 10.1CDR3α)

[0583] CAVKETSGSRLTF

[0584] SEQ ID NO.:104(TCR 10.1 Vα)

[0585] KQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKS SGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVKETSGSRLTFGEGTQLTVNP

[0586] SEQ ID NO.:105(TCR 10.1 CDR1β)

[0587] SGHVS

[0588] SEQ ID NO.:106(TCR 10.1 CDR2β)

[0589] FNYEAQ

[0590] SEQ ID NO.:107(TCR 10.1 CDR3β)

[0591] CASSLTGSYEQYF

[0592] SEQ ID NO.:108(TCR 10.1 Vβ)

[0593] GAGVSQSPRYKVTKRGQDVALRCDPISGHVSLYWYRQALGQGPEFLTYFNYEAQQDKSGLPNDRFSAERPEGSISTLTIQRTEQRDSAMYRCASSLTGSYEQYFGPGTRLTVTE

[0594] SEQ ID NO.:109(TCR 13.1 CDR1α)

[0595] NSMFDY

[0596] SEQ ID NO.:110(TCR 13.1 CDR2α)

[0597] ISSIKDK

[0598] SEQ ID NO.:111(TCR 13.1 CDR3α)

[0599] CAASGIGDYKLSF

[0600] SEQ ID NO.:112(TCR 13.1 Vα)

[0601] DQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISISSIKDKNEDGRFTVFLNKSAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAASGIGDYKLSFGAGTTVTVRAN

[0602] SEQ ID NO.:113(TCR 13.1 CDR1β)

[0603] PRHDT

[0604] SEQ ID NO.:114(TCR 13.1 CDR2β)

[0605] FYEKMQ

[0606] SEQ ID NO.:115(TCR 13.1 CDR3β)

[0607] CASSLRLGRETQYF

[0608] SEQ ID NO.:116(TCR 13.1 Vβ)

[0609] AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQFSDYHSELNMSSLELGDSALYFCASLRLGRETQYFGPGTRLLVLE

[0610] SEQ ID NO.:117(TCR 16.1 CDR1α)

[0611] VSGLRG

[0612] SEQ ID NO.:118(TCR 16.1 CDR2α)

[0613] LYSAGEE

[0614] SEQ ID NO.:119(TCR 16.1 CDR3α)

[0615] CAVITGFQKLVF

[0616] SEQ ID NO.:120(TCR 16.1 Vα)

[0617] EDQVTQSPEALRLQEGESSSLNCSYTVSGLRGLFWYRQDPGKGPEFLFTLYSAGEEKERLKATLTKKESFLHITAPKPEDSATYLCAVITGFQKLVFGTGTRLLVSPN

[0618] SEQ ID NO.:121(TCR 16.1 CDR1β)

[0619] MNHEY

[0620] SEQ ID NO.:122(TCR 16.1 CDR2β)

[0621] SMNVEV

[0622] SEQ ID NO.:123(TCR 16.1 CDR3β)

[0623] CASSFSGGTYEQYF

[0624] SEQ ID NO.:124(TCR 16.1 Vβ)

[0625] EAQVTQNPRYLITVTGKKLTVTCSQNMNHEYMSWYRQDPGLGLRQIYYSMNVEVTDKGDVPEGYKVSRKEKRNFPLILESPSPNQTSLYFCASFSGGTYEQYFGPGTRLTVTE

[0626] 实例

[0627] 实例1

[0628] WT-1肽特异性TCR的鉴定和表征

[0629] $CD8^+$T细胞与用WT-1肽RMFPNAPYL(SEQ ID NO:94)(Ho,Greenberg等人,2006)脉冲的自体树突细胞(DC)一起培养。将T细胞系合并,用CD8非依赖性(CD8i)WT-1肽:HLA四聚体染色并分选高四聚体染色细胞。共鉴定了40个具有高四聚体染色的多克隆T细胞系。分选的T细胞样品和总未分选样品的一部分均通过TCR库分析(Adaptive Biotechnologies)进行分析,以量化每个TCR克隆型。还通过单细胞RNA测序和TCR配对(10X基因组学)分析了一部分高四聚体染色细胞。通过比较分类与未分类群体中每个克隆型的倍数富集以及每个克隆型的CD3表面表达,将24个TCR克隆型鉴定为WT-1特异性(图1)。其中,选择了10个进行合成。转导TCRα/TCRβ缺陷型J76 Jurkat T细胞,以表达候选TCR。与作为总转基因TCR表面表达标志物的CD3表达相比,通过测量相对WT-1肽:HLA四聚体染色来评估每个候选物对WT-1的亲和力。将结果与表达WT-1肽:HLA-特异性TCR的细胞的结果进行比较,该WT-1肽:HLA-特异性TCR具有根据SEQ ID NO:82的α链和根据SEQ ID NO:83的β链。数据如图2A-2C所示。

[0630] 对表达Nur77-番茄激活标记的TCR转导的Jurkat细胞在肽存在下的激活进行了评估。数据如图3A所示。

[0631] 从供体PMBC中分离的CD8+T细胞被转导以表达选择用于进一步研究的八种TCR之一。一周后,对转导细胞进行WT-1肽:HLA四聚体染色和CD8表达分类(图4A)。扩增四聚体$^+$ $CD8^+$T细胞并测定FN γ 的产生。用滴定浓度的WT-1肽脉冲的T2靶细胞培养扩增的抗原特异性细胞4小时,并通过流式细胞术测定IFN γ 的产生(图4B)。通过非线性回归将产生IFN γ 的细胞的百分比拟合到剂量反应曲线,以计算每个TCR的肽EC_{50}(图4C)。

[0632] 针对诱导肿瘤细胞裂解的能力,将表达具有最低EC_{50}值的两种TCR的T细胞与表达参考WT-1特异性TCR的T细胞比较。将被转导表达HLA-A2的肿瘤细胞系MDA-MB-468和天然HLA_A2^+肿瘤细胞系Panc-1装载^{51}Cr。通过测量响应于相对于肿瘤细胞靶标的效应T细胞剂量减少的Cr释放,计算TCR转导的T细胞介导的杀伤(图5A和5B)。

[0633] 进一步研究了表达示例性TCR DL10的T细胞的IFN- γ 产生(图6)和减少肿瘤细胞系细胞生长的能力(图7)。对于IFN- γ 的产生,用参考TCR或TCRDL10转导原代CD8+T细胞,并用肽脉冲的T2靶细胞培养,如图6所示。4小时后,通过细胞内流式细胞术评估IFN γ 的产生,并且通过Graphpad Prism中的非线性回归将百分比IFN γ 阳性拟合到剂量反应曲线。为了评估控制肿瘤生长的能力,用参考TCR(包括具有SEQ ID NO:82所示氨基酸序列的TCRα链和具有SEQ ID NO:83所示氨基酸序列的TCRβ链)或用TCRDL10转导原代CD8+T细胞,并在IncuCyte测定中与HLA-A2+WT-1+胰腺肿瘤细胞系Panc-1(转导以表达红色荧光蛋白)以8:1的比例一式三份培养,并且在7天内监测细胞增殖/存活率。误差线表示平均值的标准误差。

[0634] 可以组合上述各种实施例以提供其他实施例。本说明书中提及和/或在申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请出版物、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物(包括于2019年8月20日提交的美国专利申请号62/889,519)以引用方式整体并入本文。如果需要,可以修改实施例的方面以采用各种专利、申请和出版物的概念来提

供其他实施例。

[0635] 可以根据以上详细描述对实施例进行这些和其他改变。一般而言,在以下权利要求中,所使用的术语不应被解释为将权利要求限制为在说明书和权利要求中公开的具体实施例,而应被解释为包括所有可能的实施例以及权利要求等同物的全部范围。因此,权利要求不受本公开的限制。

[0001] 序列表

[0002] <110> 弗雷德哈钦森癌症研究中心

[0003] T•M•施米特

[0004] A•G•沙皮伊

[0005] P•D•格林伯格

[0006] <120> 360056.473WO

[0007] <130> WT-1特异性T细胞免疫疗法

[0008] <140> PCT

[0009] <141> 2020-08-19

[0010] <150> US 62/889,519

[0011] <151> 2019-08-20

[0012] <160> 124

[0013] <170> FastSEQ for Windows Version 4.0

[0014] <210> 1

[0015] <211> 132

[0016] <212> PRT

[0017] <213> 人工序列

[0018] <220>

[0019] <223> 具有前导序列的合成序列 No. 4 α 链可变结构域

[0020] <400> 1

[0021] Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser

[0022] 1 5 10 15

[0023] Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu

[0024] 20 25 30

[0025] Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp

[0026] 35 40 45

[0027] Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser

[0028] 50 55 60

[0029] Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly

[0030] 65 70 75 80

[0031] Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu

[0032] 85 90 95

[0033] Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val

[0034] 100 105 110

[0035] Asn Ile Gly Asn His Asp Met Arg Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Thr

[0036] 115 120 125

[0037] Val Lys Pro Asn

[0038] 130

[0039] <210> 2

[0040] <211> 132

[0041] <212> PRT

[0042] <213> 人工序列

[0043] <220>

[0044] <223> 具有前导序列的合成序列 No. 6 α 链可变结构域

[0045] <400> 2

[0046] Met Glu Lys Met Leu Glu Cys Ala Phe Ile Val Leu Trp Leu Gln Leu

[0047] 1 5 10 15

[0048] Gly Trp Leu Ser Gly Glu Asp Gln Val Thr Gln Ser Pro Glu Ala Leu

[0049] 20 25 30

[0050] Arg Leu Gln Glu Gly Glu Ser Ser Ser Leu Asn Cys Ser Tyr Thr Val

[0051] 35 40 45

[0052] Ser Gly Leu Arg Gly Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly

[0053] 50 55 60

[0054] Pro Glu Phe Leu Phe Thr Leu Tyr Ser Ala Gly Glu Glu Lys Glu Lys

[0055] 65 70 75 80

[0056] Glu Arg Leu Lys Ala Thr Leu Thr Lys Lys Glu Ser Phe Leu His Ile

[0057] 85 90 95

[0058] Thr Ala Pro Lys Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Gln

[0059] 100 105 110

[0060] Thr Met Asp Gly Asn Gln Phe Tyr Phe Gly Thr Gly Thr Ser Leu Thr

[0061] 115 120 125

[0062] Val Ile Pro Asn

[0063] 130

[0064] <210> 3

[0065] <211> 134

[0066] <212> PRT

[0067] <213> 人工序列

[0068] <220>

[0069] <223> 具有前导序列的合成序列 No. 7 α 链可变结构域

[0070] <400> 3

[0071] Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu

[0072] 1 5 10 15

[0073] Glu Phe Ser Met Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser

[0074] 20 25 30

[0075] Val Gln Glu Ala Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser

[0076] 35 40 45

[0077] Glu Ser Asp Tyr Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln

[0078] 50 55 60

[0079] Met Ile Leu Val Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr

[0080] 65 70 75 80

[0081] Glu Asn Arg Phe Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser

[0082] 85 90 95

[0083] Leu Lys Ile Ser Asp Ser Gln Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys

[0084] 100 105 110

[0085] Ala Ser Ser Pro Gly Thr Tyr Lys Tyr Ile Phe Gly Thr Gly Thr Arg

[0086] 115 120 125

[0087] Leu Lys Val Leu Ala Asn

[0088] 130

[0089] <210> 4

[0090] <211> 137

[0091] <212> PRT

[0092] <213> 人工序列

[0093] <220>

[0094] <223> 具有前导序列的合成序列 No. 10 α 链可变结构域

[0095] <400> 4

[0096] Met Thr Arg Val Ser Leu Leu Trp Ala Val Val Val Ser Thr Cys Leu

[0097] 1 5 10 15

[0098] Glu Ser Gly Met Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser

[0099] 20 25 30

[0100] Val Gln Glu Ala Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser

[0101] 35 40 45

[0102] Glu Ser Asn Tyr Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln

[0103] 50 55 60

[0104] Met Ile Leu Val Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr

[0105] 65 70 75 80

[0106] Glu Asn Arg Phe Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser

[0107] 85 90 95

[0108] Leu Lys Ile Ser Asp Ser Gln Leu Gly Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys

[0109] 100 105 110

[0110] Ala Phe Asn Pro Trp Glu Asn Tyr Gly Gln Asn Phe Val Phe Gly Pro

[0111] 115 120 125

[0112] Gly Thr Arg Leu Ser Val Leu Pro Tyr

[0113] 130 135

[0114] <210> 5

[0115] <211> 134

[0116] <212> PRT

[0117] <213> 人工序列

[0118] <220>

[0119] <223> 具有前导序列的合成序列 No. 4 α 链可变结构域

[0120] <400> 5

[0121] Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala

[0122] 1 5 10 15

[0123] Val Pro Ile Asp Thr Glu Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Val Met

[0124] 20 25 30

[0125] Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Met Gly His

[0126] 35 40 45

[0127] Arg Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Lys Ala Lys Lys Pro Pro Glu Leu

[0128] 50 55 60

[0129] Met Phe Val Tyr Ser Tyr Glu Lys Leu Ser Ile Asn Glu Ser Val Pro

[0130] 65 70 75 80

[0131] Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser Leu Leu Asn Leu His

[0132] 85 90 95

[0133] Leu His Ala Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser

[0134] 100 105 110

[0135] Ser Gln Gly Thr Ser Gly Ala Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr

[0136] 115 120 125

[0137] Arg Leu Thr Val Leu Glu

[0138] 130

[0139] <210> 6

[0140] <211> 135

[0141] <212> PRT

[0142] <213> 人工序列

[0143] <220>

[0144] <223> 具有前导序列的合成序列 No. 6 β 链可变结构域

[0145] <400> 6

[0146] Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala

[0147] 1 5 10 15

[0148] Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu

[0149] 20 25 30

[0150] Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His

[0151] 35 40 45

[0152] Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu

[0153] 50 55 60

[0154] Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro

[0155] 65 70 75 80

[0156] Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg

[0157] 85 90 95

[0158] Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser

[0159] 100 105 110

[0160] Ser Tyr Ser Leu Trp Asp Leu Gln Glu Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly

[0161] 115 120 125

[0162] Thr Arg Leu Leu Val Leu Glu

[0163] 130 135

[0164] <210> 7

[0165] <211> 136

[0166] <212> PRT

[0167] <213> 人工序列

[0168] <220>

[0169] <223> 具有前导序列的合成序列 No.7 β 链可变结构域

[0170] <400> 7

[0171] Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala

[0172] 1 5 10 15

[0173] Asp His Ala Asp Thr Gly Val Ser Gln Asp Pro Arg His Lys Ile Thr

[0174] 20 25 30

[0175] Lys Arg Gly Gln Asn Val Thr Phe Arg Cys Asp Pro Ile Ser Glu His

[0176] 35 40 45

[0177] Asn Arg Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Thr Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe

[0178] 50 55 60

[0179] Leu Thr Tyr Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Glu Lys Ser Arg Leu Leu

[0180] 65 70 75 80

[0181] Ser Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Pro Lys Gly Ser Phe Ser Thr Leu

[0182] 85 90 95

[0183] Glu Ile Gln Arg Thr Glu Gln Gly Asp Ser Ala Met Tyr Leu Cys Ala

[0184] 100 105 110

[0185] Ser Ser Phe Ser Asp Gly Gly Ala Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro

[0186] 115 120 125

[0187] Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu

[0188] 130 135

[0189] <210> 8

[0190] <211> 132

[0191] <212> PRT

[0192] <213> 人工序列

[0193] <220>

[0194] <223> 具有前导序列的合成序列 No. 10 β 链可变结构域

[0195] <400> 8

[0196] Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Ala Gly Ser Gly Leu Gly

[0197] 1 5 10 15

[0198] Ala Val Val Ser Gln His Pro Ser Trp Val Ile Cys Lys Ser Gly Thr

[0199] 20 25 30

[0200] Ser Val Lys Ile Glu Cys Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr Met

[0201] 35 40 45

[0202] Phe Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Lys Gln Ser Leu Met Leu Met Ala Thr

[0203] 50 55 60

[0204] Ser Asn Glu Gly Ser Lys Ala Thr Tyr Glu Gln Gly Val Glu Lys Asp

[0205] 65 70 75 80

[0206] Lys Phe Leu Ile Asn His Ala Ser Leu Thr Leu Ser Thr Leu Thr Val

[0207] 85 90 95

[0208] Thr Ser Ala His Pro Glu Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Cys Ser Ala Arg

[0209] 100 105 110

[0210] Pro His Ser Leu Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
[0211] 115 120 125
[0212] Thr Val Leu Glu
[0213] 130
[0214] <210> 9
[0215] <211> 111
[0216] <212> PRT
[0217] <213> 人工序列
[0218] <220>
[0219] <223> 去除前导序列的合成序列 No. 4 α 链可变结构域
[0220] <400> 9
[0221] Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly
[0222] 1 5 10 15
[0223] Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser
[0224] 20 25 30
[0225] Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met
[0226] 35 40 45
[0227] Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln
[0228] 50 55 60
[0229] Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
[0230] 65 70 75 80
[0231] Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Ile Gly Asn His
[0232] 85 90 95
[0233] Asp Met Arg Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Thr Val Lys Pro Asn
[0234] 100 105 110
[0235] <210> 10
[0236] <211> 111
[0237] <212> PRT
[0238] <213> 人工序列
[0239] <220>
[0240] <223> 去除前导序列的合成序列 No. 6 α 链可变结构域
[0241] <400> 10
[0242] Glu Asp Gln Val Thr Gln Ser Pro Glu Ala Leu Arg Leu Gln Glu Gly
[0243] 1 5 10 15
[0244] Glu Ser Ser Ser Leu Asn Cys Ser Tyr Thr Val Ser Gly Leu Arg Gly
[0245] 20 25 30
[0246] Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Pro Glu Phe Leu Phe
[0247] 35 40 45
[0248] Thr Leu Tyr Ser Ala Gly Glu Glu Lys Glu Lys Glu Arg Leu Lys Ala
[0249] 50 55 60
[0250] Thr Leu Thr Lys Lys Glu Ser Phe Leu His Ile Thr Ala Pro Lys Pro
[0251] 65 70 75 80

[0252] Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Gln Thr Met Asp Gly Asn
[0253] 85 90 95
[0254] Gln Phe Tyr Phe Gly Thr Gly Thr Ser Leu Thr Val Ile Pro Asn
[0255] 100 105 110
[0256] <210> 11
[0257] <211> 114
[0258] <212> PRT
[0259] <213> 人工序列
[0260] <220>
[0261] <223> 去除前导序列的合成序列 No. 7 α 链可变结构域
[0262] <400> 11
[0263] Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser Val Gln Glu Ala
[0264] 1 5 10 15
[0265] Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Glu Ser Asp Tyr
[0266] 20 25 30
[0267] Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln Met Ile Leu Val
[0268] 35 40 45
[0269] Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr Glu Asn Arg Phe
[0270] 50 55 60
[0271] Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser Leu Lys Ile Ser
[0272] 65 70 75 80
[0273] Asp Ser Gln Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Pro
[0274] 85 90 95
[0275] Gly Thr Tyr Lys Tyr Ile Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu Lys Val Leu
[0276] 100 105 110
[0277] Ala Asn
[0278] <210> 12
[0279] <211> 117
[0280] <212> PRT
[0281] <213> 人工序列
[0282] <220>
[0283] <223> 去除前导序列的合成序列 No. 10 α 链可变结构域
[0284] <400> 12
[0285] Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser Val Gln Glu Ala
[0286] 1 5 10 15
[0287] Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Glu Ser Asn Tyr
[0288] 20 25 30
[0289] Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln Met Ile Leu Val
[0290] 35 40 45
[0291] Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr Glu Asn Arg Phe
[0292] 50 55 60
[0293] Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser Leu Lys Ile Ser

[0294] 65 70 75 80
[0295] Asp Ser Gln Leu Gly Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Ala Phe Asn Pro
[0296] 85 90 95
[0297] Trp Glu Asn Tyr Gly Gln Asn Phe Val Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
[0298] 100 105 110
[0299] Ser Val Leu Pro Tyr
[0300] 115
[0301] <210> 13
[0302] <211> 115
[0303] <212> PRT
[0304] <213> 人工序列
[0305] <220>
[0306] <223> 去除前导序列的合成序列 No. 4 β 链可变结构域
[0307] <400> 13
[0308] Asp Thr Glu Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Val Met Gly Met Thr
[0309] 1 5 10 15
[0310] Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Met Gly His Arg Ala Met
[0311] 20 25 30
[0312] Tyr Trp Tyr Lys Gln Lys Ala Lys Lys Pro Pro Glu Leu Met Phe Val
[0313] 35 40 45
[0314] Tyr Ser Tyr Glu Lys Leu Ser Ile Asn Glu Ser Val Pro Ser Arg Phe
[0315] 50 55 60
[0316] Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser Leu Leu Asn Leu His Leu His Ala
[0317] 65 70 75 80
[0318] Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Gln Gly
[0319] 85 90 95
[0320] Thr Ser Gly Ala Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr
[0321] 100 105 110
[0322] Val Leu Glu
[0323] 115
[0324] <210> 14
[0325] <211> 116
[0326] <212> PRT
[0327] <213> 人工序列
[0328] <220>
[0329] <223> 去除前导序列的合成序列 No. 6β 链可变结构域
[0330] <400> 14
[0331] Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly
[0332] 1 5 10 15
[0333] Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
[0334] 20 25 30
[0335] Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr

[0336] 35 40 45

[0337] Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr

[0338] 50 55 60

[0339] Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser

[0340] 65 70 75 80

[0341] Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr Ser

[0342] 85 90 95

[0343] Leu Trp Asp Leu Gln Glu Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

[0344] 100 105 110

[0345] Leu Val Leu Glu

[0346] 115

[0347] <210> 15

[0348] <211> 117

[0349] <212> PRT

[0350] <213> 人工序列

[0351] <220>

[0352] <223> 去除前导序列的合成序列 No. 7 β 链可变结构域

[0353] <400> 15

[0354] Asp Thr Gly Val Ser Gln Asp Pro Arg His Lys Ile Thr Lys Arg Gly

[0355] 1 5 10 15

[0356] Gln Asn Val Thr Phe Arg Cys Asp Pro Ile Ser Glu His Asn Arg Leu

[0357] 20 25 30

[0358] Tyr Trp Tyr Arg Gln Thr Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe Leu Thr Tyr

[0359] 35 40 45

[0360] Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Glu Lys Ser Arg Leu Leu Ser Asp Arg

[0361] 50 55 60

[0362] Phe Ser Ala Glu Arg Pro Lys Gly Ser Phe Ser Thr Leu Glu Ile Gln

[0363] 65 70 75 80

[0364] Arg Thr Glu Gln Gly Asp Ser Ala Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Phe

[0365] 85 90 95

[0366] Ser Asp Gly Gly Ala Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

[0367] 100 105 110

[0368] Leu Thr Val Leu Glu

[0369] 115

[0370] <210> 16

[0371] <211> 117

[0372] <212> PRT

[0373] <213> 人工序列

[0374] <220>

[0375] <223> 去除前导序列的合成序列 No. 10 β 链可变结构域

[0376] <400> 16

[0377] Gly Ala Val Val Ser Gln His Pro Ser Trp Val Ile Cys Lys Ser Gly

[0378] 1 5 10 15

[0379] Thr Ser Val Lys Ile Glu Cys Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr

[0380] 20 25 30

[0381] Met Phe Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Lys Gln Ser Leu Met Leu Met Ala

[0382] 35 40 45

[0383] Thr Ser Asn Glu Gly Ser Lys Ala Thr Tyr Glu Gln Gly Val Glu Lys

[0384] 50 55 60

[0385] Asp Lys Phe Leu Ile Asn His Ala Ser Leu Thr Leu Ser Thr Leu Thr

[0386] 65 70 75 80

[0387] Val Thr Ser Ala His Pro Glu Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Cys Ser Ala

[0388] 85 90 95

[0389] Arg Pro His Ser Leu Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

[0390] 100 105 110

[0391] Leu Thr Val Leu Glu

[0392] 115

[0393] <210> 17

[0394] <211> 6

[0395] <212> PRT

[0396] <213> 人工序列

[0397] <220>

[0398] <223> 合成序列 No. 4 CDR1α

[0399] <400> 17

[0400] Asp Arg Gly Ser Gln Ser

[0401] 1 5

[0402] <210> 18

[0403] <211> 6

[0404] <212> PRT

[0405] <213> 人工序列

[0406] <220>

[0407] <223> 合成序列 No. 4 CDR2α

[0408] <400> 18

[0409] Ile Tyr Ser Asn Gly Asp

[0410] 1 5

[0411] <210> 19

[0412] <211> 12

[0413] <212> PRT

[0414] <213> 人工序列

[0415] <220>

[0416] <223> 合成序列 No. 4 CDR3α

[0417] <400> 19

[0418] Cys Ala Val Asn Ile Gly Asn His Asp Met Arg Phe

[0419] 1 5 10

[0420] <210> 20
[0421] <211> 6
[0422] <212> PRT
[0423] <213> 人工序列
[0424] <220>
[0425] <223> 合成序列 No. 6 CDR1α
[0426] <400> 20
[0427] Val Ser Gly Leu Arg Gly
[0428] 1 5
[0429] <210> 21
[0430] <211> 7
[0431] <212> PRT
[0432] <213> 人工序列
[0433] <220>
[0434] <223> 合成序列 No. 6 CDR2α
[0435] <400> 21
[0436] Leu Tyr Ser Ala Gly Glu Glu
[0437] 1 5
[0438] <210> 22
[0439] <211> 13
[0440] <212> PRT
[0441] <213> 人工序列
[0442] <220>
[0443] <223> 合成序列 No. 6 CDR3α
[0444] <400> 22
[0445] Cys Ala Val Gln Thr Met Asp Gly Asn Gln Phe Tyr Phe
[0446] 1 5 10
[0447] <210> 23
[0448] <211> 7
[0449] <212> PRT
[0450] <213> 人工序列
[0451] <220>
[0452] <223> 合成序列 No. 7 CDR1α
[0453] <400> 23
[0454] Thr Ser Glu Ser Asp Tyr Tyr
[0455] 1 5
[0456] <210> 24
[0457] <211> 8
[0458] <212> PRT
[0459] <213> 人工序列
[0460] <220>
[0461] <223> 合成序列 No. 7 CDR2α

[0462] <400> 24

[0463] Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn

[0464] 1 5

[0465] <210> 25

[0466] <211> 12

[0467] <212> PRT

[0468] <213> 人工序列

[0469] <220>

[0470] <223> 合成序列 No. 7 CDR3α

[0471] <400> 25

[0472] Cys Ala Ser Ser Pro Gly Thr Tyr Lys Tyr Ile Phe

[0473] 1 5 10

[0474] <210> 26

[0475] <211> 7

[0476] <212> PRT

[0477] <213> 人工序列

[0478] <220>

[0479] <223> 合成序列 No. 10 CDR1α

[0480] <400> 26

[0481] Thr Ser Glu Ser Asn Tyr Tyr

[0482] 1 5

[0483] <210> 27

[0484] <211> 8

[0485] <212> PRT

[0486] <213> 人工序列

[0487] <220>

[0488] <223> 合成序列 No. 10 CDR2α

[0489] <400> 27

[0490] Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn

[0491] 1 5

[0492] <210> 28

[0493] <211> 15

[0494] <212> PRT

[0495] <213> 人工序列

[0496] <220>

[0497] <223> 合成序列 No. 10 CDR3α

[0498] <400> 28

[0499] Cys Ala Phe Asn Pro Trp Glu Asn Tyr Gly Gln Asn Phe Val Phe

[0500] 1 5 10 15

[0501] <210> 29

[0502] <211> 5

[0503] <212> PRT

[0504] <213> 人工序列
[0505] <220>
[0506] <223> 合成序列 No. 4 CDR1β
[0507] <400> 29
[0508] Met Gly His Arg Ala
[0509] 1 5
[0510] <210> 30
[0511] <211> 6
[0512] <212> PRT
[0513] <213> 人工序列
[0514] <220>
[0515] <223> 合成序列 No. 4 CDR2β
[0516] <400> 30
[0517] Tyr Ser Tyr Glu Lys Leu
[0518] 1 5
[0519] <210> 31
[0520] <211> 15
[0521] <212> PRT
[0522] <213> 人工序列
[0523] <220>
[0524] <223> 合成序列 No. 4 CDR3β
[0525] <400> 31
[0526] Cys Ala Ser Ser Gln Gly Thr Ser Gly Ala Asp Thr Gln Tyr Phe
[0527] 1 5 10 15
[0528] <210> 32
[0529] <211> 5
[0530] <212> PRT
[0531] <213> 人工序列
[0532] <220>
[0533] <223> 合成序列 No. 6 CDR1β
[0534] <400> 32
[0535] Met Asn His Glu Tyr
[0536] 1 5
[0537] <210> 33
[0538] <211> 6
[0539] <212> PRT
[0540] <213> 人工序列
[0541] <220>
[0542] <223> 合成序列 No. 6 CDR2β
[0543] <400> 33
[0544] Ser Val Gly Ala Gly Ile
[0545] 1 5

[0546] <210> 34
[0547] <211> 16
[0548] <212> PRT
[0549] <213> 人工序列
[0550] <220>
[0551] <223> 合成序列 No. 6 CDR3β
[0552] <400> 34
[0553] Cys Ala Ser Ser Tyr Ser Leu Trp Asp Leu Gln Glu Thr Gln Tyr Phe
[0554] 1 5 10 15
[0555] <210> 35
[0556] <211> 5
[0557] <212> PRT
[0558] <213> 人工序列
[0559] <220>
[0560] <223> 合成序列 No. 7 CDR1β
[0561] <400> 35
[0562] Ser Glu His Asn Arg
[0563] 1 5
[0564] <210> 36
[0565] <211> 6
[0566] <212> PRT
[0567] <213> 人工序列
[0568] <220>
[0569] <223> 合成序列 No. 7 CDR2β
[0570] <400> 36
[0571] Phe Gln Asn Glu Ala Gln
[0572] 1 5
[0573] <210> 37
[0574] <211> 16
[0575] <212> PRT
[0576] <213> 人工序列
[0577] <220>
[0578] <223> 合成序列 No. 7 CDR3β
[0579] <400> 37
[0580] Cys Ala Ser Ser Phe Ser Asp Gly Gly Ala Thr Asp Thr Gln Tyr Phe
[0581] 1 5 10 15
[0582] <210> 38
[0583] <211> 6
[0584] <212> PRT
[0585] <213> 人工序列
[0586] <220>
[0587] <223> 合成序列 No. 10 CDR1β

[0588] <400> 38

[0589] Asp Phe Gln Ala Thr Thr

[0590] 1 5

[0591] <210> 39

[0592] <211> 7

[0593] <212> PRT

[0594] <213> 人工序列

[0595] <220>

[0596] <223> 合成序列 No. 10 CDR2β

[0597] <400> 39

[0598] Ser Asn Glu Gly Ser Lys Ala

[0599] 1 5

[0600] <210> 40

[0601] <211> 14

[0602] <212> PRT

[0603] <213> 人工序列

[0604] <220>

[0605] <223> 合成序列 No. 10 CDR3β

[0606] <400> 40

[0607] Cys Ser Ala Arg Pro His Ser Leu Thr Asp Thr Gln Tyr Phe

[0608] 1 5 10

[0609] <210> 41

[0610] <211> 140

[0611] <212> PRT

[0612] <213> 人工序列

[0613] <220>

[0614] <223> 合成序列 No. 4 TCR α恒定结构域

[0615] <400> 41

[0616] Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser

[0617] 1 5 10 15

[0618] Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn

[0619] 20 25 30

[0620] Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val

[0621] 35 40 45

[0622] Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp

[0623] 50 55 60

[0624] Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile

[0625] 65 70 75 80

[0626] Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val

[0627] 85 90 95

[0628] Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln

[0629] 100 105 110

[0630] Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly
[0631] 115 120 125
[0632] Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0633] 130 135 140
[0634] <210> 42
[0635] <211> 140
[0636] <212> PRT
[0637] <213> 人工序列
[0638] <220>
[0639] <223> 合成序列 No. 6 TCR α恒定结构域
[0640] <400> 42
[0641] Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser
[0642] 1 5 10 15
[0643] Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn
[0644] 20 25 30
[0645] Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val
[0646] 35 40 45
[0647] Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp
[0648] 50 55 60
[0649] Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile
[0650] 65 70 75 80
[0651] Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val
[0652] 85 90 95
[0653] Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln
[0654] 100 105 110
[0655] Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly
[0656] 115 120 125
[0657] Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0658] 130 135 140
[0659] <210> 43
[0660] <211> 140
[0661] <212> PRT
[0662] <213> 人工序列
[0663] <220>
[0664] <223> 合成序列 No. 7 TCR α恒定结构域
[0665] <400> 43
[0666] Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser
[0667] 1 5 10 15
[0668] Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn
[0669] 20 25 30
[0670] Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val
[0671] 35 40 45

[0672] Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp
[0673] 50 55 60
[0674] Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile
[0675] 65 70 75 80
[0676] Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val
[0677] 85 90 95
[0678] Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln
[0679] 100 105 110
[0680] Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly
[0681] 115 120 125
[0682] Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0683] 130 135 140
[0684] <210> 44
[0685] <211> 140
[0686] <212> PRT
[0687] <213> 人工序列
[0688] <220>
[0689] <223> 合成序列 No. 10 TCR α恒定结构域
[0690] <400> 44
[0691] Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser
[0692] 1 5 10 15
[0693] Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn
[0694] 20 25 30
[0695] Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val
[0696] 35 40 45
[0697] Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp
[0698] 50 55 60
[0699] Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile
[0700] 65 70 75 80
[0701] Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val
[0702] 85 90 95
[0703] Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln
[0704] 100 105 110
[0705] Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly
[0706] 115 120 125
[0707] Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0708] 130 135 140
[0709] <210> 45
[0710] <211> 178
[0711] <212> PRT
[0712] <213> 人工序列
[0713] <220>

[0714] <223> 合成序列 TCR β恒定结构域

[0715] <400> 45

[0716] Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser

[0717] 1 5 10 15

[0718] Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala

[0719] 20 25 30

[0720] Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly

[0721] 35 40 45

[0722] Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu

[0723] 50 55 60

[0724] Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg

[0725] 65 70 75 80

[0726] Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln

[0727] 85 90 95

[0728] Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg

[0729] 100 105 110

[0730] Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala

[0731] 115 120 125

[0732] Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala

[0733] 130 135 140

[0734] Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val

[0735] 145 150 155 160

[0736] Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser

[0737] 165 170 175

[0738] Arg Gly

[0739] <210> 46

[0740] <211> 272

[0741] <212> PRT

[0742] <213> 人工序列

[0743] <220>

[0744] <223> 合成序列 No. 4 具有前导序列的α链

[0745] <400> 46

[0746] Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser

[0747] 1 5 10 15

[0748] Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu

[0749] 20 25 30

[0750] Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp

[0751] 35 40 45

[0752] Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser

[0753] 50 55 60

[0754] Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly

[0755] 65 70 75 80

[0756] Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu
[0757] 85 90 95
[0758] Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val
[0759] 100 105 110
[0760] Asn Ile Gly Asn His Asp Met Arg Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Thr
[0761] 115 120 125
[0762] Val Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
[0763] 130 135 140
[0764] Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
[0765] 145 150 155 160
[0766] Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
[0767] 165 170 175
[0768] Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
[0769] 180 185 190
[0770] Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
[0771] 195 200 205
[0772] Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
[0773] 210 215 220
[0774] Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
[0775] 225 230 235 240
[0776] Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu
[0777] 245 250 255
[0778] Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0779] 260 265 270
[0780] <210> 47
[0781] <211> 272
[0782] <212> PRT
[0783] <213> 人工序列
[0784] <220>
[0785] <223> 合成序列 No. 6 具有前导序列的α链
[0786] <400> 47
[0787] Met Glu Lys Met Leu Glu Cys Ala Phe Ile Val Leu Trp Leu Gln Leu
[0788] 1 5 10 15
[0789] Gly Trp Leu Ser Gly Glu Asp Gln Val Thr Gln Ser Pro Glu Ala Leu
[0790] 20 25 30
[0791] Arg Leu Gln Glu Gly Glu Ser Ser Ser Leu Asn Cys Ser Tyr Thr Val
[0792] 35 40 45
[0793] Ser Gly Leu Arg Gly Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly
[0794] 50 55 60
[0795] Pro Glu Phe Leu Phe Thr Leu Tyr Ser Ala Gly Glu Glu Lys Glu Lys
[0796] 65 70 75 80
[0797] Glu Arg Leu Lys Ala Thr Leu Thr Lys Lys Glu Ser Phe Leu His Ile

[0798] 85 90 95

[0799] Thr Ala Pro Lys Pro Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Gln

[0800] 100 105 110

[0801] Thr Met Asp Gly Asn Gln Phe Tyr Phe Gly Thr Gly Thr Ser Leu Thr

[0802] 115 120 125

[0803] Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg

[0804] 130 135 140

[0805] Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp

[0806] 145 150 155 160

[0807] Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr

[0808] 165 170 175

[0809] Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser

[0810] 180 185 190

[0811] Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe

[0812] 195 200 205

[0813] Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser

[0814] 210 215 220

[0815] Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn

[0816] 225 230 235 240

[0817] Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu

[0818] 245 250 255

[0819] Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

[0820] 260 265 270

[0821] <210> 48

[0822] <211> 274

[0823] <212> PRT

[0824] <213> 人工序列

[0825] <220>

[0826] <223> 合成序列 No. 7 具有前导序列的α链

[0827] <400> 48

[0828] Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu

[0829] 1 5 10 15

[0830] Glu Phe Ser Met Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser

[0831] 20 25 30

[0832] Val Gln Glu Ala Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser

[0833] 35 40 45

[0834] Glu Ser Asp Tyr Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln

[0835] 50 55 60

[0836] Met Ile Leu Val Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr

[0837] 65 70 75 80

[0838] Glu Asn Arg Phe Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser

[0839] 85 90 95

[0840] Leu Lys Ile Ser Asp Ser Gln Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys
[0841] 100 105 110
[0842] Ala Ser Ser Pro Gly Thr Tyr Lys Tyr Ile Phe Gly Thr Gly Thr Arg
[0843] 115 120 125
[0844] Leu Lys Val Leu Ala Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln
[0845] 130 135 140
[0846] Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
[0847] 145 150 155 160
[0848] Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
[0849] 165 170 175
[0850] Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
[0851] 180 185 190
[0852] Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
[0853] 195 200 205
[0854] Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro
[0855] 210 215 220
[0856] Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
[0857] 225 230 235 240
[0858] Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu
[0859] 245 250 255
[0860] Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp
[0861] 260 265 270
[0862] Ser Ser
[0863] <210> 49
[0864] <211> 277
[0865] <212> PRT
[0866] <213> 人工序列
[0867] <220>
[0868] <223> 合成序列 No. 10 具有前导序列的α链
[0869] <400> 49
[0870] Met Thr Arg Val Ser Leu Leu Trp Ala Val Val Val Ser Thr Cys Leu
[0871] 1 5 10 15
[0872] Glu Ser Gly Met Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser
[0873] 20 25 30
[0874] Val Gln Glu Ala Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser
[0875] 35 40 45
[0876] Glu Ser Asn Tyr Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln
[0877] 50 55 60
[0878] Met Ile Leu Val Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr
[0879] 65 70 75 80
[0880] Glu Asn Arg Phe Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser
[0881] 85 90 95

[0882] Leu Lys Ile Ser Asp Ser Gln Leu Gly Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys
[0883] 100 105 110
[0884] Ala Phe Asn Pro Trp Glu Asn Tyr Gly Gln Asn Phe Val Phe Gly Pro
[0885] 115 120 125
[0886] Gly Thr Arg Leu Ser Val Leu Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala
[0887] 130 135 140
[0888] Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu
[0889] 145 150 155 160
[0890] Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser
[0891] 165 170 175
[0892] Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp
[0893] 180 185 190
[0894] Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala
[0895] 195 200 205
[0896] Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe
[0897] 210 215 220
[0898] Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe
[0899] 225 230 235 240
[0900] Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe
[0901] 245 250 255
[0902] Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu
[0903] 260 265 270
[0904] Arg Leu Trp Ser Ser
[0905] 275
[0906] <210> 50
[0907] <211> 251
[0908] <212> PRT
[0909] <213> 人工序列
[0910] <220>
[0911] <223> 合成序列 No. 4 去除前导序列的α链
[0912] <400> 50
[0913] Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly
[0914] 1 5 10 15
[0915] Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser
[0916] 20 25 30
[0917] Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met
[0918] 35 40 45
[0919] Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln
[0920] 50 55 60
[0921] Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
[0922] 65 70 75 80
[0923] Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Ile Gly Asn His

[0924] 85 90 95
[0925] Asp Met Arg Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Thr Val Lys Pro Asn Ile
[0926] 100 105 110
[0927] Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser
[0928] 115 120 125
[0929] Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val
[0930] 130 135 140
[0931] Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu
[0932] 145 150 155 160
[0933] Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser
[0934] 165 170 175
[0935] Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile
[0936] 180 185 190
[0937] Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys
[0938] 195 200 205
[0939] Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn
[0940] 210 215 220
[0941] Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe
[0942] 225 230 235 240
[0943] Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0944] 245 250
[0945] <210> 51
[0946] <211> 251
[0947] <212> PRT
[0948] <213> 人工序列
[0949] <220>
[0950] <223> 合成序列 No. 6 去除前导序列的α链
[0951] <400> 51
[0952] Glu Asp Gln Val Thr Gln Ser Pro Glu Ala Leu Arg Leu Gln Glu Gly
[0953] 1 5 10 15
[0954] Glu Ser Ser Ser Leu Asn Cys Ser Tyr Thr Val Ser Gly Leu Arg Gly
[0955] 20 25 30
[0956] Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Pro Glu Phe Leu Phe
[0957] 35 40 45
[0958] Thr Leu Tyr Ser Ala Gly Glu Glu Lys Glu Lys Glu Arg Leu Lys Ala
[0959] 50 55 60
[0960] Thr Leu Thr Lys Lys Glu Ser Phe Leu His Ile Thr Ala Pro Lys Pro
[0961] 65 70 75 80
[0962] Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Gln Thr Met Asp Gly Asn
[0963] 85 90 95
[0964] Gln Phe Tyr Phe Gly Thr Gly Thr Ser Leu Thr Val Ile Pro Asn Ile
[0965] 100 105 110

[0966] Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser
[0967] 115 120 125
[0968] Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val
[0969] 130 135 140
[0970] Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu
[0971] 145 150 155 160
[0972] Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser
[0973] 165 170 175
[0974] Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile
[0975] 180 185 190
[0976] Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys
[0977] 195 200 205
[0978] Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn
[0979] 210 215 220
[0980] Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe
[0981] 225 230 235 240
[0982] Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0983] 245 250
[0984] <210> 52
[0985] <211> 254
[0986] <212> PRT
[0987] <213> 人工序列
[0988] <220>
[0989] <223> 合成序列 No. 7 去除前导序列的α链
[0990] <400> 52
[0991] Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser Val Gln Glu Ala
[0992] 1 5 10 15
[0993] Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Glu Ser Asp Tyr
[0994] 20 25 30
[0995] Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln Met Ile Leu Val
[0996] 35 40 45
[0997] Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr Glu Asn Arg Phe
[0998] 50 55 60
[0999] Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser Leu Lys Ile Ser
[1000] 65 70 75 80
[1001] Asp Ser Gln Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Pro
[1002] 85 90 95
[1003] Gly Thr Tyr Lys Tyr Ile Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu Lys Val Leu
[1004] 100 105 110
[1005] Ala Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser
[1006] 115 120 125
[1007] Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln

[1008] 130 135 140
[1009] Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
[1010] 145 150 155 160
[1011] Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val
[1012] 165 170 175
[1013] Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn
[1014] 180 185 190
[1015] Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys
[1016] 195 200 205
[1017] Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn
[1018] 210 215 220
[1019] Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val
[1020] 225 230 235 240
[1021] Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[1022] 245 250
[1023] <210> 53
[1024] <211> 257
[1025] <212> PRT
[1026] <213> 人工序列
[1027] <220>
[1028] <223> 合成序列 No. 10 去除前导序列的α链
[1029] <400> 53
[1030] Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser Val Gln Glu Ala
[1031] 1 5 10 15
[1032] Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Glu Ser Asn Tyr
[1033] 20 25 30
[1034] Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln Met Ile Leu Val
[1035] 35 40 45
[1036] Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr Glu Asn Arg Phe
[1037] 50 55 60
[1038] Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser Leu Lys Ile Ser
[1039] 65 70 75 80
[1040] Asp Ser Gln Leu Gly Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys Ala Phe Asn Pro
[1041] 85 90 95
[1042] Trp Glu Asn Tyr Gly Gln Asn Phe Val Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
[1043] 100 105 110
[1044] Ser Val Leu Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu
[1045] 115 120 125
[1046] Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe
[1047] 130 135 140
[1048] Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile
[1049] 145 150 155 160

[1050] Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn
[1051] 165 170 175
[1052] Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala
[1053] 180 185 190
[1054] Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu
[1055] 195 200 205
[1056] Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr
[1057] 210 215 220
[1058] Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu
[1059] 225 230 235 240
[1060] Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser
[1061] 245 250 255
[1062] Ser
[1063] <210> 54
[1064] <211> 312
[1065] <212> PRT
[1066] <213> 人工序列
[1067] <220>
[1068] <223> 合成序列 No. 4 具有前导序列的β链
[1069] <400> 54
[1070] Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala
[1071] 1 5 10 15
[1072] Val Pro Ile Asp Thr Glu Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Val Met
[1073] 20 25 30
[1074] Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Met Gly His
[1075] 35 40 45
[1076] Arg Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Lys Ala Lys Lys Pro Pro Glu Leu
[1077] 50 55 60
[1078] Met Phe Val Tyr Ser Tyr Glu Lys Leu Ser Ile Asn Glu Ser Val Pro
[1079] 65 70 75 80
[1080] Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser Leu Leu Asn Leu His
[1081] 85 90 95
[1082] Leu His Ala Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
[1083] 100 105 110
[1084] Ser Gln Gly Thr Ser Gly Ala Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr
[1085] 115 120 125
[1086] Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val
[1087] 130 135 140
[1088] Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala
[1089] 145 150 155 160
[1090] Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu
[1091] 165 170 175

[1092] Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp
[1093] 180 185 190
[1094] Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys
[1095] 195 200 205
[1096] Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg
[1097] 210 215 220
[1098] Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp
[1099] 225 230 235 240
[1100] Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala
[1101] 245 250 255
[1102] Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln
[1103] 260 265 270
[1104] Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys
[1105] 275 280 285
[1106] Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met
[1107] 290 295 300
[1108] Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
[1109] 305 310
[1110] <210> 55
[1111] <211> 313
[1112] <212> PRT
[1113] <213> 人工序列
[1114] <220>
[1115] <223> 合成序列 No. 6 具有前导序列的β链
[1116] <400> 55
[1117] Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala
[1118] 1 5 10 15
[1119] Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu
[1120] 20 25 30
[1121] Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His
[1122] 35 40 45
[1123] Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu
[1124] 50 55 60
[1125] Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro
[1126] 65 70 75 80
[1127] Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg
[1128] 85 90 95
[1129] Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser
[1130] 100 105 110
[1131] Ser Tyr Ser Leu Trp Asp Leu Gln Glu Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly
[1132] 115 120 125
[1133] Thr Arg Leu Leu Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu

[1134] 130 135 140
[1135] Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys
[1136] 145 150 155 160
[1137] Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu
[1138] 165 170 175
[1139] Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr
[1140] 180 185 190
[1141] Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr
[1142] 195 200 205
[1143] Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro
[1144] 210 215 220
[1145] Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn
[1146] 225 230 235 240
[1147] Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser
[1148] 245 250 255
[1149] Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr
[1150] 260 265 270
[1151] Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly
[1152] 275 280 285
[1153] Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala
[1154] 290 295 300
[1155] Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
[1156] 305 310
[1157] <210> 56
[1158] <211> 314
[1159] <212> PRT
[1160] <213> 人工序列
[1161] <220>
[1162] <223> 合成序列 No. 7 具有前导序列的β链
[1163] <400> 56
[1164] Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
[1165] 1 5 10 15
[1166] Asp His Ala Asp Thr Gly Val Ser Gln Asp Pro Arg His Lys Ile Thr
[1167] 20 25 30
[1168] Lys Arg Gly Gln Asn Val Thr Phe Arg Cys Asp Pro Ile Ser Glu His
[1169] 35 40 45
[1170] Asn Arg Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Thr Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe
[1171] 50 55 60
[1172] Leu Thr Tyr Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Glu Lys Ser Arg Leu Leu
[1173] 65 70 75 80
[1174] Ser Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Pro Lys Gly Ser Phe Ser Thr Leu
[1175] 85 90 95

[1176] Glu Ile Gln Arg Thr Glu Gln Gly Asp Ser Ala Met Tyr Leu Cys Ala
[1177] 100 105 110
[1178] Ser Ser Phe Ser Asp Gly Gly Ala Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro
[1179] 115 120 125
[1180] Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro
[1181] 130 135 140
[1182] Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln
[1183] 145 150 155 160
[1184] Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val
[1185] 165 170 175
[1186] Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys
[1187] 180 185 190
[1188] Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg
[1189] 195 200 205
[1190] Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn
[1191] 210 215 220
[1192] Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu
[1193] 225 230 235 240
[1194] Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val
[1195] 245 250 255
[1196] Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser
[1197] 260 265 270
[1198] Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu
[1199] 275 280 285
[1200] Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met
[1201] 290 295 300
[1202] Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
[1203] 305 310
[1204] <210> 57
[1205] <211> 310
[1206] <212> PRT
[1207] <213> 人工序列
[1208] <220>
[1209] <223> 合成序列 No. 10 具有前导序列的β链
[1210] <400> 57
[1211] Met Leu Leu Leu Leu Leu Leu Leu Gly Pro Ala Gly Ser Gly Leu Gly
[1212] 1 5 10 15
[1213] Ala Val Val Ser Gln His Pro Ser Trp Val Ile Cys Lys Ser Gly Thr
[1214] 20 25 30
[1215] Ser Val Lys Ile Glu Cys Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr Met
[1216] 35 40 45
[1217] Phe Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Lys Gln Ser Leu Met Leu Met Ala Thr

[1218] 50 55 60
[1219] Ser Asn Glu Gly Ser Lys Ala Thr Tyr Glu Gln Gly Val Glu Lys Asp
[1220] 65 70 75 80
[1221] Lys Phe Leu Ile Asn His Ala Ser Leu Thr Leu Ser Thr Leu Thr Val
[1222] 85 90 95
[1223] Thr Ser Ala His Pro Glu Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Cys Ser Ala Arg
[1224] 100 105 110
[1225] Pro His Ser Leu Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
[1226] 115 120 125
[1227] Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
[1228] 130 135 140
[1229] Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
[1230] 145 150 155 160
[1231] Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
[1232] 165 170 175
[1233] Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln
[1234] 180 185 190
[1235] Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
[1236] 195 200 205
[1237] Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
[1238] 210 215 220
[1239] Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
[1240] 225 230 235 240
[1241] Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
[1242] 245 250 255
[1243] Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly
[1244] 260 265 270
[1245] Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr
[1246] 275 280 285
[1247] Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys
[1248] 290 295 300
[1249] Arg Lys Asp Ser Arg Gly
[1250] 305 310
[1251] <210> 58
[1252] <211> 293
[1253] <212> PRT
[1254] <213> 人工序列
[1255] <220>
[1256] <223> 合成序列 No. 4 去除前导序列的β链
[1257] <400> 58
[1258] Asp Thr Glu Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Val Met Gly Met Thr
[1259] 1 5 10 15

[1260] Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Met Gly His Arg Ala Met
[1261] 20 25 30
[1262] Tyr Trp Tyr Lys Gln Lys Ala Lys Lys Pro Pro Glu Leu Met Phe Val
[1263] 35 40 45
[1264] Tyr Ser Tyr Glu Lys Leu Ser Ile Asn Glu Ser Val Pro Ser Arg Phe
[1265] 50 55 60
[1266] Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser Leu Leu Asn Leu His Leu His Ala
[1267] 65 70 75 80
[1268] Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Gln Gly
[1269] 85 90 95
[1270] Thr Ser Gly Ala Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr
[1271] 100 105 110
[1272] Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe
[1273] 115 120 125
[1274] Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val
[1275] 130 135 140
[1276] Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp
[1277] 145 150 155 160
[1278] Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro
[1279] 165 170 175
[1280] Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser
[1281] 180 185 190
[1282] Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe
[1283] 195 200 205
[1284] Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr
[1285] 210 215 220
[1286] Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp
[1287] 225 230 235 240
[1288] Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val
[1289] 245 250 255
[1290] Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu
[1291] 260 265 270
[1292] Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg
[1293] 275 280 285
[1294] Lys Asp Ser Arg Gly
[1295] 290
[1296] <210> 59
[1297] <211> 294
[1298] <212> PRT
[1299] <213> 人工序列
[1300] <220>
[1301] <223> 合成序列 No. 6 去除前导序列的β链

[1302] <400> 59

[1303] Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly
[1304] 1 5 10 15
[1305] Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
[1306] 20 25 30
[1307] Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
[1308] 35 40 45
[1309] Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr
[1310] 50 55 60
[1311] Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser
[1312] 65 70 75 80
[1313] Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr Ser
[1314] 85 90 95
[1315] Leu Trp Asp Leu Gln Glu Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
[1316] 100 105 110
[1317] Leu Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
[1318] 115 120 125
[1319] Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
[1320] 130 135 140
[1321] Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
[1322] 145 150 155 160
[1323] Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln
[1324] 165 170 175
[1325] Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
[1326] 180 185 190
[1327] Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
[1328] 195 200 205
[1329] Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
[1330] 210 215 220
[1331] Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
[1332] 225 230 235 240
[1333] Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly
[1334] 245 250 255
[1335] Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr
[1336] 260 265 270
[1337] Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys
[1338] 275 280 285
[1339] Arg Lys Asp Ser Arg Gly
[1340] 290
[1341] <210> 60
[1342] <211> 295
[1343] <212> PRT

[1344] <213> 人工序列

[1345] <220>

[1346] <223> 合成序列 No. 7 去除前导序列的β链

[1347] <400> 60

[1348] Asp Thr Gly Val Ser Gln Asp Pro Arg His Lys Ile Thr Lys Arg Gly

[1349] 1 5 10 15

[1350] Gln Asn Val Thr Phe Arg Cys Asp Pro Ile Ser Glu His Asn Arg Leu

[1351] 20 25 30

[1352] Tyr Trp Tyr Arg Gln Thr Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe Leu Thr Tyr

[1353] 35 40 45

[1354] Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Glu Lys Ser Arg Leu Leu Ser Asp Arg

[1355] 50 55 60

[1356] Phe Ser Ala Glu Arg Pro Lys Gly Ser Phe Ser Thr Leu Glu Ile Gln

[1357] 65 70 75 80

[1358] Arg Thr Glu Gln Gly Asp Ser Ala Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Phe

[1359] 85 90 95

[1360] Ser Asp Gly Gly Ala Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

[1361] 100 105 110

[1362] Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala

[1363] 115 120 125

[1364] Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr

[1365] 130 135 140

[1366] Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser

[1367] 145 150 155 160

[1368] Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro

[1369] 165 170 175

[1370] Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu

[1371] 180 185 190

[1372] Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn

[1373] 195 200 205

[1374] His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu

[1375] 210 215 220

[1376] Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu

[1377] 225 230 235 240

[1378] Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln

[1379] 245 250 255

[1380] Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala

[1381] 260 265 270

[1382] Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val

[1383] 275 280 285

[1384] Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly

[1385] 290 295

[1386] <210> 61

[1387] <211> 295

[1388] <212> PRT

[1389] <213> 人工序列

[1390] <220>

[1391] <223> 合成序列 No. 10 去除前导序列的β链

[1392] <400> 61

[1393] Gly Ala Val Val Ser Gln His Pro Ser Trp Val Ile Cys Lys Ser Gly

[1394] 1 5 10 15

[1395] Thr Ser Val Lys Ile Glu Cys Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr

[1396] 20 25 30

[1397] Met Phe Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Lys Gln Ser Leu Met Leu Met Ala

[1398] 35 40 45

[1399] Thr Ser Asn Glu Gly Ser Lys Ala Thr Tyr Glu Gln Gly Val Glu Lys

[1400] 50 55 60

[1401] Asp Lys Phe Leu Ile Asn His Ala Ser Leu Thr Leu Ser Thr Leu Thr

[1402] 65 70 75 80

[1403] Val Thr Ser Ala His Pro Glu Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Cys Ser Ala

[1404] 85 90 95

[1405] Arg Pro His Ser Leu Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

[1406] 100 105 110

[1407] Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala

[1408] 115 120 125

[1409] Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr

[1410] 130 135 140

[1411] Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser

[1412] 145 150 155 160

[1413] Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro

[1414] 165 170 175

[1415] Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu

[1416] 180 185 190

[1417] Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn

[1418] 195 200 205

[1419] His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu

[1420] 210 215 220

[1421] Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu

[1422] 225 230 235 240

[1423] Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln

[1424] 245 250 255

[1425] Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala

[1426] 260 265 270

[1427] Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val

[1428] 275 280 285

[1429] Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly

[1430] 290 295

[1431] <210> 62

[1432] <211> 819

[1433] <212> DNA

[1434] <213> 人工序列

[1435] <220>

[1436] <223> 合成序列 No. 4 α基因片段

[1437] <400> 62

[1438] atgaaatcct tgagagtttt actagtgatc ctgtggcttc agttgagctg ggtttggagc 60

[1439] caacagaagg aggtggagca gaattctgga cccctcagtg ttccagaggg agccattgcc 120

[1440] tctctcaact gcacttacag tgaccgaggt tcccagtcct tcttctggta cagacaatat 180

[1441] tctgggaaaa gccctgagtt gataatgttc atatactcca atggtgacaa agaagatgga 240

[1442] aggtttacag cacagctcaa taaagccagc cagtatgttt ctctgctcat cagagactcc 300

[1443] cagcccagtg attcagccac ctacctctgt gccgtgaaca taggaaacca tgacatgcgc 360

[1444] tttggagcag ggaccagact gacagtaaaa ccaaatatcc agaaccctga ccctgccgtg 420

[1445] taccagctga gagactctaa atccagtgac aagtctgtct gcctattcac cgattttgat 480

[1446] tctcaaacaa atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg 540

[1447] ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgctg tggcctggag caacaaatct 600

[1448] gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc 660

[1449] agcccagaaa gttcctgtga tgtcaagctg gtcgagaaaa gctttgaaac agatacgaac 720

[1450] ctaaactttc aaaacctgtc agtgattggg ttccgaatcc tcctcctgaa agtggccggg 780

[1451] tttaatctgc tcatgacgct gcggctgtgg tccagctga 819

[1452] <210> 63

[1453] <211> 819

[1454] <212> DNA

[1455] <213> 人工序列

[1456] <220>

[1457] <223> 合成序列 No. 6 α基因片段

[1458] <400> 63

[1459] atggagaaaa tgttggagtg tgcattcata gtcttgtggc ttcagcttgg ctggttgagt 60

[1460] ggagaagacc aggtgacgca gagtcccgag gccctgagac tccaggaggg agagagtagc 120

[1461] agtctcaact gcagttacac agtcagcggt ttaagagggc tgttctggta taggcaagat 180

[1462] cctgggaaag gccctgaatt cctcttcacc ctgtattcag ctggggaaga aaaggagaaa 240

[1463] gaaaggctaa aagccacatt aacaaagaag gaaagctttc tgcacatcac agcccctaaa 300

[1464] cctgaagact cagccactta tctctgtgct gtgcagacca tggacggtaa ccagttctat 360

[1465] tttgggacag ggacaagttt gacggtcatt ccaaatatcc agaaccctga ccctgccgtg 420

[1466] taccagctga gagactctaa atccagtgac aagtctgtct gcctattcac cgattttgat 480

[1467] tctcaaacaa atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg 540

[1468] ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgctg tggcctggag caacaaatct 600

[1469] gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc 660

[1470] agcccagaaa gttcctgtga tgtcaagctg gtcgagaaaa gctttgaaac agatacgaac 720
[1471] ctaaactttc aaaacctgtc agtgattggg ttccgaatcc tcctcctgaa agtggccggg 780
[1472] tttaatctgc tcatgacgct gcggctgtgg tccagctga 819
[1473] <210> 64
[1474] <211> 825
[1475] <212> DNA
[1476] <213> 人工序列
[1477] <220>
[1478] <223> 合成序列 No. 7 α基因片段
[1479] <400> 64
[1480] atggcatgcc ctggcttcct gtgggcactt gtgatctcca cctgtcttga atttagcatg 60
[1481] gctcagacag tcactcagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gaccgtgacc 120
[1482] ctgagctgca catatgacac cagtgagagt gattattatt tattctggta caagcagcct 180
[1483] cccagcaggc agatgattct cgttattcgc caagaagctt ataagcaaca gaatgcaaca 240
[1484] gagaatcgtt tctctgtgaa cttccagaaa gcagccaaat ccttcagtct caagatctca 300
[1485] gactcacagc tgggggatgc cgcgatgtat ttctgtgctt ccagtccagg aacctacaaa 360
[1486] tacatctttg gaacaggcac caggctgaag gttttagcaa atatccagaa ccctgaccct 420
[1487] gccgtgtacc agctgagaga ctctaaatcc agtgacaagt ctgtctgcct attcaccgat 480
[1488] tttgattctc aaacaaatgt gtcacaaagt aaggattctg atgtgtatat cacagacaaa 540
[1489] actgtgctag acatgaggtc tatggacttc aagagcaaca gtgctgtggc ctggagcaac 600
[1490] aaatctgact ttgcatgtgc aaacgccttc aacaacagca ttattccaga agacaccttc 660
[1491] ttccccagcc cagaaagttc ctgtgatgtc aagctggtcg agaaaagctt tgaaacagat 720
[1492] acgaacctaa actttcaaaa cctgtcagtg attgggttcc gaatcctcct cctgaaagtg 780
[1493] gccgggttta atctgctcat gacgctgcgg ctgtggtcca gctga 825
[1494] <210> 65
[1495] <211> 834
[1496] <212> DNA
[1497] <213> 人工序列
[1498] <220>
[1499] <223> 合成序列 No. 10 α基因片段
[1500] <400> 65
[1501] atgacacgag ttagcttgct gtgggcagtc gtggtctcca cctgtcttga atccggcatg 60
[1502] gcccagacag tcactcagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gactgtgacc 120
[1503] ctgagttgca catatgacac cagtgagagt aattattatt tgttctggta caaacagcct 180
[1504] cccagcaggc agatgattct cgttattcgc caagaagctt ataagcaaca gaatgcaacg 240
[1505] gagaatcgtt tctctgtgaa cttccagaaa gcagccaaat ccttcagtct caagatctca 300
[1506] gactcacagc tgggggacac tgcgatgtat ttctgtgctt tcaacccttg ggagaactat 360
[1507] ggtcagaatt ttgtctttgg tcccggaacc agattgtccg tgctgcccta tatccagaac 420
[1508] cctgaccctg ccgtgtacca gctgagagac tctaaatcca gtgacaagtc tgtctgccta 480
[1509] ttcaccgatt ttgattctca aacaaatgtg tcacaaagta aggattctga tgtgtatatc 540
[1510] acagacaaaa ctgtgctaga catgaggtct atggacttca agagcaacag tgctgtggcc 600
[1511] tggagcaaca aatctgactt tgcatgtgca aacgccttca acaacagcat tattccagaa 660

[1512] gacaccttct tccccagccc agaaagttcc tgtgatgtca agctggtcga gaaaagcttt 720
[1513] gaaacagata cgaacctaaa ctttcaaaac ctgtcagtga ttgggttccg aatcctcctc 780
[1514] ctgaaagtgg ccgggtttaa tctgctcatg acgctgcggc tgtggtccag ctga 834
[1515] <210> 66
[1516] <211> 819
[1517] <212> DNA
[1518] <213> 人工序列
[1519] <220>
[1520] <223> 合成序列 No. 4 α基因片段,密码子优化
[1521] <400> 66
[1522] atgaagagcc tgagagtcct gctggtgatt ttgtggctgc agctgtcttg ggtttggtct 60
[1523] cagcagaaag aagtggagca gaatagcggc cctctgtctg ttcctgaagg cgctattgct 120
[1524] agcctgaatt gcacatacag cgatagagga tctcagagct tcttctggta ccggcagtac 180
[1525] agcggcaaga gcccagaact gatcatgttc atctacagca atggcgacaa ggaggatggc 240
[1526] aggtttacag cccagctgaa caaggccagc cagtatgttt ctctgctgat cagagatagc 300
[1527] cagcctagcg attctgccac ctacctgtgt gccgtgaaca tcggaaatca cgacatgaga 360
[1528] tttggagccg gcacaagact gaccgtgaag cccaatatcc agaaccctga tcctgctgtg 420
[1529] taccagctgc gggacagcaa gagcagcgac aagagcgtgt gcctgttcac cgacttcgac 480
[1530] agccagacca acgtgtccca gagcaaggac agcgacgtgt acatcaccga taagtgcgtg 540
[1531] ctggacatgc ggagcatgga cttcaagagc aacagcgccg tggcctggtc caacaagagc 600
[1532] gacttcgcct gcgccaacgc cttcaacaac agcattatcc ccgaggacac attcttccca 660
[1533] agccccgaga gcagctgcga cgtgaagctg gtggaaaaga gcttcgagac agacaccaac 720
[1534] ctgaacttcc agaacctcag cgtgatcggc ttccggatcc tgctgctgaa ggtggccggc 780
[1535] ttcaacctgc tgatgaccct gcggctgtgg tccagctga 819
[1536] <210> 67
[1537] <211> 819
[1538] <212> DNA
[1539] <213> 人工序列
[1540] <220>
[1541] <223> 合成序列 No. 6 α基因片段,密码子优化
[1542] <400> 67
[1543] atggagaaga tgctggagtg tgcgttcatc gttctgtggc tgcaacttgg atggctgtct 60
[1544] ggagaggatc aggttacaca gtctcctgaa gccctgagac tgcaagaagg agaaagctct 120
[1545] agcctgaact gcagctacac agtgtctgga ctgagaggcc tgttctggta cagacaggat 180
[1546] cctggaaaag gcccagagtt cctgtttacc ctgtattctg ccggcgagga gaaggagaaa 240
[1547] gagagactga aagctaccct gaccaagaag gagagcttcc tgcacattac cgcccccaaa 300
[1548] cctgaggatt ctgccacata tctgtgtgct gtgcagacca tggatggcaa ccagttctac 360
[1549] ttcggcacag gcacatctct gaccgttatc cccaatatcc agaaccctga tcctgccgtg 420
[1550] taccagctgc gggacagcaa gagcagcgac aagagcgtgt gcctgttcac cgacttcgac 480
[1551] agccagacca acgtgtccca gagcaaggac agcgacgtgt acatcaccga taagtgcgtg 540
[1552] ctggacatgc ggagcatgga cttcaagagc aacagcgccg tggcctggtc caacaagagc 600
[1553] gacttcgcct gcgccaacgc cttcaacaac agcattatcc ccgaggacac attcttccca 660

[1554] agccccgaga gcagctgcga cgtgaagctg gtggaaaaga gcttcgagac agacaccaac 720
[1555] ctgaacttcc agaacctcag cgtgatcggc ttccggatcc tgctgctgaa ggtggccggc 780
[1556] ttcaacctgc tgatgaccct gcggctgtgg tccagctga 819
[1557] <210> 68
[1558] <211> 825
[1559] <212> DNA
[1560] <213> 人工序列
[1561] <220>
[1562] <223> 合成序列 No. 7 α基因片段,密码子优化
[1563] <400> 68
[1564] atggcttgtc ctggattctt atgggctctg gtgatcagca cctgtctgga gttctctatg 60
[1565] gcccagacag tgacacagtc tcagcctgaa atgtctgtgc aggaagccga aaccgtgaca 120
[1566] ctgtcttgca cctacgatac aagcgagagc gactactacc tgttctggta caagcagcct 180
[1567] ccctctaggc agatgatcct ggtgattaga caggaggcct acaaacagca gaatgccacc 240
[1568] gagaaccggt ttagcgtgaa cttccagaaa gccgccaaga gcttcagcct gaaaatctct 300
[1569] gacagccagc tgggagatgc tgccatgtac ttttgtgcca gctctccagg cacctacaag 360
[1570] tacatttttg gcaccggcac cagactgaag gtgctggcca atatccagaa tcccgatcct 420
[1571] gccgtgtacc agctgcggga cagcaagagc agcgacaaga gcgtgtgcct gttcaccgac 480
[1572] ttcgacagcc agaccaacgt gtcccagagc aaggacagcg acgtgtacat caccgataag 540
[1573] tgcgtgctgg acatgcggag catggacttc aagagcaaca gcgccgtggc ctggtccaac 600
[1574] aagagcgact tcgcctgcgc caacgccttc aacaacagca ttatccccga ggacacattc 660
[1575] ttcccaagcc ccgagagcag ctgcgacgtg aagctggtgg aaaagagctt cgagacagac 720
[1576] accaacctga acttccagaa cctcagcgtg atcggcttcc ggatcctgct gctgaaggtg 780
[1577] gccggcttca acctgctgat gaccctgcgg ctgtggtcca gctga 825
[1578] <210> 69
[1579] <211> 834
[1580] <212> DNA
[1581] <213> 人工序列
[1582] <220>
[1583] <223> 合成序列 No. 10 α基因片段,密码子优化
[1584] <400> 69
[1585] atgaccagag ttagcctgtt atgggctgtg gtggtgagca catgtctgga atctggaatg 60
[1586] gcccagacag tgacacagtc tcagcctgaa atgtctgtgc aggaagccga aaccgttaca 120
[1587] ctgagctgca cctacgatac aagcgagagc aactactacc tgttctggta caagcagccc 180
[1588] ccttctaggc agatgatcct ggtgatcaga caggaggcct ataaacagca gaatgccacc 240
[1589] gagaaccggt ttagcgtgaa cttccagaaa gccgccaaga gcttcagcct gaaaatctct 300
[1590] gacagccagc tgggcgatac agccatgtac ttttgtgcct tcaacccctg ggagaactat 360
[1591] ggccagaatt tcgtgttcgg ccctggcacc agactgtctg ttctgcctta tatccagaac 420
[1592] cccgatcctg ctgtgtacca gctgcgggac agcaagagca gcgacaagag cgtgtgcctg 480
[1593] ttcaccgact tcgacagcca gaccaacgtg tcccagagca aggacagcga cgtgtacatc 540
[1594] accgataagt gcgtgctgga catgcggagc atggacttca agagcaacag cgccgtggcc 600
[1595] tggtccaaca agagcgactt cgcctgcgcc aacgccttca acaacagcat tatccccgag 660

[1596] gacacattct tcccaagccc cgagagcagc tgcgacgtga agctggtgga aaagagcttc 720
[1597] gagacagaca ccaacctgaa cttccagaac ctcagcgtga tcggcttccg gatcctgctg 780
[1598] ctgaaggtgg ccggcttcaa cctgctgatg accctgcggc tgtggtccag ctga 834
[1599] <210> 70
[1600] <211> 939
[1601] <212> DNA
[1602] <213> 人工序列
[1603] <220>
[1604] <223> 合成序列 No. 4 β基因片段
[1605] <400> 70
[1606] atgggctgca ggctgctctg ctgtgcggtt ctctgtctcc tgggagcagt tcccatagac 60
[1607] actgaagtta cccagacacc aaaacacctg gtcatgggaa tgacaaataa gaagtctttg 120
[1608] aaatgtgaac aacatatggg gcacagggct atgtattggt acaagcagaa agctaagaag 180
[1609] ccaccggagc tcatgtttgt ctacagctat gagaaactct ctataaatga aagtgtgcca 240
[1610] agtcgcttct cacctgaatg ccccaacagc tctctcttaa accttcacct acacgccctg 300
[1611] cagccagaag actcagccct gtatctctgc gccagcagcc aagggactag cggggcagat 360
[1612] acgcagtatt ttggcccagg cacccggctg acagtgctcg aggacctgaa aaacgtgttc 420
[1613] ccacccgagg tcgctgtgtt tgagccatca gaagcagaga tctcccacac ccaaaaggcc 480
[1614] acactggtgt gcctggccac aggcttctac cccgaccacg tggagctgag ctggtgggtg 540
[1615] aatgggaagg aggtgcacag tggggtcagc acagacccgc agcccctcaa ggagcagccc 600
[1616] gccctcaatg actccagata ctgcctgagc agccgcctga gggtctcggc caccttctgg 660
[1617] cagaaccccc gcaaccactt ccgctgtcaa gtccagttct acgggctctc ggagaatgac 720
[1618] gagtggaccc aggatagggc caaacctgtc acccagatcg tcagcgccga ggcctggggt 780
[1619] agagcagact gtggcttcac ctccgagtct taccagcaag gggtcctgtc tgccaccatc 840
[1620] ctctatgaga tcttgctagg gaaggccacc ttgtatgccg tgctggtcag tgccctcgtg 900
[1621] ctgatggcca tggtcaagag aaaggattcc agaggctag 939
[1622] <210> 71
[1623] <211> 942
[1624] <212> DNA
[1625] <213> 人工序列
[1626] <220>
[1627] <223> 合成序列 No. 6 β基因片段
[1628] <400> 71
[1629] atgagcatcg gcctcctgtg ctgtgcagcc ttgtctctcc tgtgggcagg tccagtgaat 60
[1630] gctggtgtca ctcagacccc aaaattccag gtcctgaaga caggacagag catgacactg 120
[1631] cagtgtgccc aggatatgaa ccatgaatac atgtcctggt atcgacaaga cccaggcatg 180
[1632] gggctgaggc tgattcatta ctcagttggt gctggtatca ctgaccaagg agaagtcccc 240
[1633] aatggctaca atgtctccag atcaaccaca gaggatttcc cgctcaggct gctgtcggct 300
[1634] gctccctccc agacatctgt gtacttctgt gccagcagtt actctctttg ggaccttcaa 360
[1635] gagacccagt acttcgggcc aggcacgcgg ctcctggtgc tcgaggacct gaaaaacgtg 420
[1636] ttcccacccg aggtcgctgt gtttgagcca tcagaagcag agatctccca cacccaaaag 480
[1637] gccacactgg tgtgcctggc cacaggcttc taccccgacc acgtggagct gagctggtgg 540

[1638] gtgaatggga aggaggtgca cagtggggtc agcacagacc cgcagcccct caaggagcag 600
[1639] cccgccctca atgactccag atactgcctg agcagccgcc tgagggtctc ggccaccttc 660
[1640] tggcagaacc cccgcaacca cttccgctgt caagtccagt tctacgggct ctcggagaat 720
[1641] gacgagtgga cccaggatag ggccaaacct gtcacccaga tcgtcagcgc cgaggcctgg 780
[1642] ggtagagcag actgtggctt cacctccgag tcttaccagc aaggggtcct gtctgccacc 840
[1643] atcctctatg agatcttgct agggaaggcc accttgtatg ccgtgctggt cagtgccctc 900
[1644] gtgctgatgg ccatggtcaa gagaaaggat tccagaggct ag 942
[1645] <210> 72
[1646] <211> 945
[1647] <212> DNA
[1648] <213> 人工序列
[1649] <220>
[1650] <223> 合成序列 No. 7 β基因片段
[1651] <400> 72
[1652] atgggcacca gcctcctctg ctggatggcc ctgtgtctcc tgggggcaga tcacgcagat 60
[1653] actggagtct cccaggaccc cagacacaag atcacaaaga ggggacagaa tgtaactttc 120
[1654] aggtgtgatc caatttctga acacaaccgc ctttattggt accgacagac cctggggcag 180
[1655] ggcccagagt ttctgactta cttccagaat gaagctcaac tagaaaaatc aaggctgctc 240
[1656] agtgatcggt tctctgcaga gaggcctaag ggatctttct ccaccttgga gatccagcgc 300
[1657] acagagcagg gggactcggc catgtatctc tgtgccagca gcttttcaga cgggggggct 360
[1658] acagatacgc agtattttgg cccaggcacc cggctgacag tgctcgagga cctgaaaaac 420
[1659] gtgttcccac ccgaggtcgc tgtgtttgag ccatcagaag cagagatctc ccacacccaa 480
[1660] aaggccacac tggtgtgcct ggccacaggc ttctaccccg accacgtgga gctgagctgg 540
[1661] tgggtgaatg ggaaggaggt gcacagtggg gtcagcacag acccgcagcc cctcaaggag 600
[1662] cagcccgccc tcaatgactc cagatactgc ctgagcagcc gcctgagggt ctcggccacc 660
[1663] ttctggcaga acccccgcaa ccacttccgc tgtcaagtcc agttctacgg gctctcggag 720
[1664] aatgacgagt ggacccagga tagggccaaa cctgtcaccc agatcgtcag cgccgaggcc 780
[1665] tggggtagag cagactgtgg cttcacctcc gagtcttacc agcaaggggt cctgtctgcc 840
[1666] accatcctct atgagatctt gctagggaag gccaccttgt atgccgtgct ggtcagtgcc 900
[1667] ctcgtgctga tggccatggt caagagaaag gattccagag gctag 945
[1668] <210> 73
[1669] <211> 933
[1670] <212> DNA
[1671] <213> 人工序列
[1672] <220>
[1673] <223> 合成序列 No. 10 β基因片段
[1674] <400> 73
[1675] atgctgctgc ttctgctgct tctggggcca gcaggctccg ggcttggtgc tgtcgtctct 60
[1676] caacatccga gctgggttat ctgtaagagt ggaacctctg tgaagatcga gtgccgttcc 120
[1677] ctggactttc aggccacaac tatgttttgg tatcgtcagt tcccgaaaca gagtctcatg 180
[1678] ctgatggcaa cttccaatga gggctccaag gccacatacg agcaaggcgt cgagaaggac 240
[1679] aagtttctca tcaaccatgc aagcctgacc ttgtccactc tgacagtgac cagtgcccat 300

[1680] cctgaagaca gcagcttcta catctgcagt gctagacccc attctctcac agatacgcag 360
[1681] tattttggcc caggcacccg gctgacagtg ctcgaggacc tgaaaaacgt gttcccaccc 420
[1682] gaggtcgctg tgtttgagcc atcagaagca gagatctccc acacccaaaa ggccacactg 480
[1683] gtgtgcctgg ccacaggctt ctaccccgac cacgtggagc tgagctggtg ggtgaatggg 540
[1684] aaggaggtgc acagtggggt cagcacagac ccgcagcccc tcaaggagca gcccgccctc 600
[1685] aatgactcca gatactgcct gagcagccgc ctgagggtct cggccacctt ctggcagaac 660
[1686] ccccgcaacc acttccgctg tcaagtccag ttctacgggc tctcggagaa tgacgagtgg 720
[1687] acccaggata gggccaaacc tgtcacccag atcgtcagcg ccgaggcctg gggtagagca 780
[1688] gactgtggct tcacctccga gtcttaccag caaggggtcc tgtctgccac catcctctat 840
[1689] gagatcttgc tagggaaggc caccttgtat gccgtgctgg tcagtgccct cgtgctgatg 900
[1690] gccatggtca agagaaagga ttccagaggc tag 933
[1691] <210> 74
[1692] <211> 936
[1693] <212> DNA
[1694] <213> 人工序列
[1695] <220>
[1696] <223> 合成序列 No. 4 β基因片段,密码子优化
[1697] <400> 74
[1698] atgggctgta gactgttgtg ttgtgctgtg ctgtgtctgt tgggagctgt gcctatcgat 60
[1699] acagaggtga cccagacccc taaacatctg gttatgggca tgaccaacaa gaagagcctg 120
[1700] aagtgcgagc agcacatggg ccatagggcc atgtattggt ataagcagaa ggccaagaaa 180
[1701] cctcctgagc tgatgttcgt gtacagctac gagaagctga gcatcaacga gagcgtgccc 240
[1702] agcagatttt ctcctgagtg ccctaattct agcctgctga atctgcacct gcatgctctg 300
[1703] cagcctgagg attctgctct gtacctgtgt gcttcttctc agggcacatc tggagctgat 360
[1704] acacagtact tcggacctgg cacaagactg acagtgctgg aagacctgaa gaacgtgttc 420
[1705] cccccagagg tggccgtgtt cgagcctagc gaggccgaga tcagccacac ccagaaagcc 480
[1706] accctcgtgt gcctggccac cggcttttac cccgaccacg tggaactgtc ttggtgggtc 540
[1707] aacggcaaag aggtgcacag cggcgtctgc accgaccccc agcccctgaa agagcagccc 600
[1708] gccctgaacg acagccggta ctgtctgagc agcagactga gagtgtccgc caccttctgg 660
[1709] cagaaccccc ggaaccactt cagatgccag gtgcagttct acggcctgag cgagaacgac 720
[1710] gagtggaccc aggaccgggc caagcccgtg acccagatcg tgtctgctga ggcctggggc 780
[1711] agagccgatt gcggcttcac cagcgagagc taccagcagg gcgtgctgag cgccaccatc 840
[1712] ctgtacgaga tcctgctggg caaggccacc ctgtacgccg tgctggtgtc cgccctggtg 900
[1713] ctgatggcca tggtcaagcg gaaggacagc cggggc 936
[1714] <210> 75
[1715] <211> 939
[1716] <212> DNA
[1717] <213> 人工序列
[1718] <220>
[1719] <223> 合成序列 No. 6 β基因片段,密码子优化
[1720] <400> 75
[1721] atgtctatcg gtctgctgtg ctgtgctgct ctttctctgc tttgggctgg acctgtgaat 60

[1722] gctggagtta cacaaacccc caagttccaa gtgctgaaga caggacagag catgaccctg 120
[1723] cagtgtgctc aggacatgaa tcacgagtac atgagctggt acagacagga tcctggaatg 180
[1724] ggcctgaggc tgatccacta ctctgttgga gccggaatta cagatcaggg agaagtgcca 240
[1725] aatggctaca acgtgagcag gagcacaacc gaggacttcc ccttaagact gttgtctgct 300
[1726] gctccatctc agacaagcgt gtacttttgc gccagctcct actctctgtg ggatctgcag 360
[1727] gaaacccagt actttggacc aggcacaaga ctgttagtgc tggaggacct gaagaacgtg 420
[1728] ttccccccag aggtggccgt gttcgagcct agcgaggccg agatcagcca cacccagaaa 480
[1729] gccaccctcg tgtgcctggc caccggcttt taccccgacc acgtggaact gtcttggtgg 540
[1730] gtcaacggca aagaggtgca cagcggcgtc tgcaccgacc cccagcccct gaaagagcag 600
[1731] cccgccctga acgacagccg gtactgtctg agcagcagac tgagagtgtc cgccaccttc 660
[1732] tggcagaacc cccggaacca cttcagatgc caggtgcagt tctacggcct gagcgagaac 720
[1733] gacgagtgga cccaggaccg ggccaagccc gtgacccaga tcgtgtctgc tgaggcctgg 780
[1734] ggcagagccg attgcggctt caccagcgag agctaccagc agggcgtgct gagcgccacc 840
[1735] atcctgtacg agatcctgct gggcaaggcc accctgtacg ccgtgctggt gtccgccctg 900
[1736] gtgctgatgg ccatggtcaa gcggaaggac agccggggc 939
[1737] <210> 76
[1738] <211> 942
[1739] <212> DNA
[1740] <213> 人工序列
[1741] <220>
[1742] <223> 合成序列 No. 7 β基因片段,密码子优化
[1743] <400> 76
[1744] atgggcacat ctcttctctg ctggatggct ctttgtctgc ttggagccga tcatgccgat 60
[1745] acaggagtta gccaggatcc tagacacaag atcaccaaga gaggccagaa tgtgaccttc 120
[1746] cggtgcgatc ctatctctga gcacaacagg ctgtactggt acagacaaac actgggacaa 180
[1747] ggacctgagt tcctgaccta cttccagaac gaagcccagc tggagaagtc tagacttctg 240
[1748] agcgacagat ttagcgccga gagacctaaa ggcagcttta gcaccctgga gatccagaga 300
[1749] acagaacagg gcgattctgc catgtacctg tgtgctagca gcttttctga tggaggcgcc 360
[1750] accgatacac agtatttcgg acctggcaca agactgacag tgctggagga cctgaagaac 420
[1751] gtgttccccc cagaggtggc cgtgttcgag cctagcgagg ccgagatcag ccacacccag 480
[1752] aaagccaccc tcgtgtgcct ggccaccggc ttttaccccg accacgtgga actgtcttgg 540
[1753] tgggtcaacg gcaaagaggt gcacagcggc gtctgcaccg acccccagcc cctgaaagag 600
[1754] cagcccgccc tgaacgacag ccggtactgt ctgagcagca gactgagagt gtccgccacc 660
[1755] ttctggcaga acccccggaa ccacttcaga tgccaggtgc agttctacgg cctgagcgag 720
[1756] aacgacgagt ggacccagga ccgggccaag cccgtgaccc agatcgtgtc tgctgaggcc 780
[1757] tggggcagag ccgattgcgg cttcaccagc gagagctacc agcagggcgt gctgagcgcc 840
[1758] accatcctgt acgagatcct gctgggcaag gccaccctgt acgccgtgct ggtgtccgcc 900
[1759] ctggtgctga tggccatggt caagcggaag gacagccggg gc 942
[1760] <210> 77
[1761] <211> 930
[1762] <212> DNA
[1763] <213> 人工序列

[1764] <220>

[1765] <223> 合成序列 No. 10 β基因片段,密码子优化

[1766] <400> 77

[1767] atgctgcttc ttctcctcct tctcggacct gctggatctg gattaggagc tgttgtgtct 60

[1768] cagcaccctt cttgggtgat ctgtaaaagc ggcacaagcg tgaagatcga gtgcagaagc 120

[1769] ctggactttc aggccacaac catgttctgg tataggcagt tccccaagca gtctctgatg 180

[1770] ctgatggcca cctctaatga gggctctaag gccacatatg aacagggagt ggagaaggac 240

[1771] aagttcctga tcaaccacgc ctctctgacc ctgtctaccc tgacagttac atctgcccac 300

[1772] cctgaggata gcagctttta catctgtagc gccagacctc acagcctgac cgatacacag 360

[1773] tactttggcc ctggcacaag actgacagtg ttagaagacc tgaagaacgt gttcccccca 420

[1774] gaggtggccg tgttcgagcc tagcgaggcc gagatcagcc acacccagaa agccaccctc 480

[1775] gtgtgcctgg ccaccggctt ttaccccgac cacgtggaac tgtcttggtg ggtcaacggc 540

[1776] aaagaggtgc acagcggcgt ctgcaccgac ccccagcccc tgaaagagca gcccgccctg 600

[1777] aacgacagcc ggtactgtct gagcagcaga ctgagagtgt ccgccacctt ctggcagaac 660

[1778] ccccggaacc acttcagatg ccaggtgcag ttctacggcc tgagcgagaa cgacgagtgg 720

[1779] acccaggacc gggccaagcc cgtgacccag atcgtgtctg ctgaggcctg gggcagagcc 780

[1780] gattgcggct tcaccagcga gagctaccag cagggcgtgc tgagcgccac catcctgtac 840

[1781] gagatcctgc tgggcaaggc caccctgtac gccgtgctgg tgtccgccct ggtgctgatg 900

[1782] gccatggtca agcggaagga cagccggggc 930

[1783] <210> 78

[1784] <211> 1821

[1785] <212> DNA

[1786] <213> 人工序列

[1787] <220>

[1788] <223> 合成序列 No. 4 β-P2A-No. 4 α,密码子优化

[1789] <400> 78

[1790] atgggctgta gactgttgtg ttgtgctgtg ctgtgtctgt tgggagctgt gcctatcgat 60

[1791] acagaggtga cccagacccc taaacatctg gttatgggca tgaccaacaa gaagagcctg 120

[1792] aagtgcgagc agcacatggg ccatagggcc atgtattggt ataagcagaa ggccaagaaa 180

[1793] cctcctgagc tgatgttcgt gtacagctac gagaagctga gcatcaacga gagcgtgccc 240

[1794] agcagatttt ctcctgagtg ccctaattct agcctgctga atctgcacct gcatgctctg 300

[1795] cagcctgagg attctgctct gtacctgtgt gcttcttctc agggcacatc tggagctgat 360

[1796] acacagtact tcggacctgg cacaagactg acagtgctgg aagacctgaa gaacgtgttc 420

[1797] cccccagagg tggccgtgtt cgagcctagc gaggccgaga tcagccacac ccagaaagcc 480

[1798] accctcgtgt gcctggccac cggcttttac cccgaccacg tggaactgtc ttggtgggtc 540

[1799] aacggcaaag aggtgcacag cggcgtctgc accgaccccc agcccctgaa agagcagccc 600

[1800] gccctgaacg acagccggta ctgtctgagc agcagactga gagtgtccgc caccttctgg 660

[1801] cagaaccccc ggaaccactt cagatgccag gtgcagttct acggcctgag cgagaacgac 720

[1802] gagtggaccc aggaccgggc caagcccgtg acccagatcg tgtctgctga ggcctggggc 780

[1803] agagccgatt gcggcttcac cagcgagagc taccagcagg gcgtgctgag cgccaccatc 840

[1804] ctgtacgaga tcctgctggg caaggccacc ctgtacgccg tgctggtgtc cgccctggtg 900

[1805] ctgatggcca tggtcaagcg gaaggacagc cggggcggtt ccggagccac gaacttctct 960

[1806] ctgttaaagc aagcaggaga cgtggaagaa aaccccggtc ccatgaagag cctgagagtc 1020
[1807] ctgctggtga ttttgtggct gcagctgtct tgggtttggt ctcagcagaa agaagtggag 1080
[1808] cagaatagcg gccctctgtc tgttcctgaa ggcgctattg ctagcctgaa ttgcacatac 1140
[1809] agcgatagag gatctcagag cttcttctgg taccggcagt acagcggcaa gagcccagaa 1200
[1810] ctgatcatgt tcatctacag caatggcgac aaggaggatg gcaggtttac agcccagctg 1260
[1811] aacaaggcca gccagtatgt ttctctgctg atcagagata gccagcctag cgattctgcc 1320
[1812] acctacctgt gtgccgtgaa catcggaaat cacgacatga gatttggagc cggcacaaga 1380
[1813] ctgaccgtga agcccaatat ccagaaccct gatcctgctg tgtaccagct gcgggacagc 1440
[1814] aagagcagcg acaagagcgt gtgcctgttc accgacttcg acagccagac caacgtgtcc 1500
[1815] cagagcaagg acagcgacgt gtacatcacc gataagtgcg tgctggacat gcggagcatg 1560
[1816] gacttcaaga gcaacagcgc cgtggcctgg tccaacaaga gcgacttcgc ctgcgccaac 1620
[1817] gccttcaaca acagcattat ccccgaggac acattcttcc caagccccga gagcagctgc 1680
[1818] gacgtgaagc tggtggaaaa gagcttcgag acagacacca acctgaactt ccagaacctc 1740
[1819] agcgtgatcg gcttccggat cctgctgctg aaggtggccg gcttcaacct gctgatgacc 1800
[1820] ctgcggctgt ggtccagctg a 1821
[1821] <210> 79
[1822] <211> 1824
[1823] <212> DNA
[1824] <213> 人工序列
[1825] <220>
[1826] <223> 合成序列 No. 6 β-P2A-No. 6 α,密码子优化
[1827] <400> 79
[1828] atgtctatcg gtctgctgtg ctgtgctgct ctttctctgc tttgggctgg acctgtgaat 60
[1829] gctggagtta cacaaacccc caagttccaa gtgctgaaga caggacagag catgaccctg 120
[1830] cagtgtgctc aggacatgaa tcacgagtac atgagctggt acagacagga tcctggaatg 180
[1831] ggcctgaggc tgatccacta ctctgttgga gccggaatta cagatcaggg agaagtgcca 240
[1832] aatggctaca acgtgagcag gagcacaacc gaggacttcc ccttaagact gttgtctgct 300
[1833] gctccatctc agacaagcgt gtacttttgc gccagctcct actctctgtg ggatctgcag 360
[1834] gaaacccagt actttggacc aggcacaaga ctgttagtgc tggaggacct gaagaacgtg 420
[1835] ttccccccag aggtggccgt gttcgagcct agcgaggccg agatcagcca cacccagaaa 480
[1836] gccaccctcg tgtgcctggc caccggcttt taccccgacc acgtggaact gtcttggtgg 540
[1837] gtcaacggca aagaggtgca cagcggcgtc tgcaccgacc cccagcccct gaaagagcag 600
[1838] cccgccctga acgacagccg gtactgtctg agcagcagac tgagagtgtc cgccaccttc 660
[1839] tggcagaacc cccggaacca cttcagatgc caggtgcagt tctacggcct gagcgagaac 720
[1840] gacgagtgga cccaggaccg ggccaagccc gtgacccaga tcgtgtctgc tgaggcctgg 780
[1841] ggcagagccg attgcggctt caccagcgag agctaccagc agggcgtgct gagcgccacc 840
[1842] atcctgtacg agatcctgct gggcaaggcc accctgtacg ccgtgctggt gtccgccctg 900
[1843] gtgctgatgg ccatggtcaa gcggaaggac agccggggcg gttccggagc cacgaacttc 960
[1844] tctctgttaa agcaagcagg agacgtggaa gaaaaccccg gtcccatgga gaagatgctg 1020
[1845] gagtgtgcgt tcatcgttct gtggctgcaa cttggatggc tgtctggaga ggatcaggtt 1080
[1846] acacagtctc ctgaagccct gagactgcaa gaaggagaaa gctctagcct gaactgcagc 1140
[1847] tacacagtgt ctggactgag aggcctgttc tggtacagac aggatcctgg aaaaggccca 1200

[1848] gagttcctgt ttaccctgta ttctgccggc gaggagaagg agaaagagag actgaaagct 1260
[1849] accctgacca agaaggagag cttcctgcac attaccgccc ccaaacctga ggattctgcc 1320
[1850] acatatctgt gtgctgtgca gaccatggat ggcaaccagt tctacttcgg cacaggcaca 1380
[1851] tctctgaccg ttatccccaa tatccagaac cctgatcctg ccgtgtacca gctgcgggac 1440
[1852] agcaagagca gcgacaagag cgtgtgcctg ttcaccgact tcgacagcca gaccaacgtg 1500
[1853] tcccagagca aggacagcga cgtgtacatc accgataagt gcgtgctgga catgcggagc 1560
[1854] atggacttca agagcaacag cgccgtggcc tggtccaaca agagcgactt cgcctgcgcc 1620
[1855] aacgccttca acaacagcat tatccccgag gacacattct tcccaagccc cgagagcagc 1680
[1856] tgcgacgtga agctggtgga aaagagcttc gagacagaca ccaacctgaa cttccagaac 1740
[1857] ctcagcgtga tcggcttccg gatcctgctg ctgaaggtgg ccggcttcaa cctgctgatg 1800
[1858] accctgcggc tgtggtccag ctga 1824
[1859] <210> 80
[1860] <400> 80
[1861] 000
[1862] <210> 81
[1863] <211> 1830
[1864] <212> DNA
[1865] <213> 人工序列
[1866] <220>
[1867] <223> 合成序列 No. 10 β-P2A-No. 10 α,密码子优化
[1868] <400> 81
[1869] atgctgcttc ttctcctcct tctcggacct gctggatctg gattaggagc tgttgtgtct 60
[1870] cagcaccctt cttgggtgat ctgtaaaagc ggcacaagcg tgaagatcga gtgcagaagc 120
[1871] ctggactttc aggccacaac catgttctgg tataggcagt tccccaagca gtctctgatg 180
[1872] ctgatggcca cctctaatga gggctctaag gccacatatg aacagggagt ggagaaggac 240
[1873] aagttcctga tcaaccacgc ctctctgacc ctgtctaccc tgacagttac atctgcccac 300
[1874] cctgaggata gcagctttta catctgtagc gccagacctc acagcctgac cgatacacag 360
[1875] tactttggcc ctggcacaag actgacagtg ttagaagacc tgaagaacgt gttcccccca 420
[1876] gaggtggccg tgttcgagcc tagcgaggcc gagatcagcc acacccagaa agccaccctc 480
[1877] gtgtgcctgg ccaccggctt ttaccccgac cacgtggaac tgtcttggtg ggtcaacggc 540
[1878] aaagaggtgc acagcggcgt ctgcaccgac ccccagcccc tgaaagagca gcccgccctg 600
[1879] aacgacagcc ggtactgtct gagcagcaga ctgagagtgt ccgccacctt ctggcagaac 660
[1880] ccccggaacc acttcagatg ccaggtgcag ttctacggcc tgagcgagaa cgacgagtgg 720
[1881] acccaggacc gggccaagcc cgtgacccag atcgtgtctg ctgaggcctg gggcagagcc 780
[1882] gattgcggct tcaccagcga gagctaccag cagggcgtgc tgagcgccac catcctgtac 840
[1883] gagatcctgc tgggcaaggc caccctgtac gccgtgctgg tgtccgccct ggtgctgatg 900
[1884] gccatggtca agcggaagga cagccggggc ggttccggag ccacgaactt ctctctgtta 960
[1885] aagcaagcag gagacgtgga agaaaacccc ggtcccatga ccagagttag cctgttatgg 1020
[1886] gctgtggtgg tgagcacatg tctggaatct ggaatggccc agacagtgac acagtctcag 1080
[1887] cctgaaatgt ctgtgcagga agccgaaacc gttacactga gctgcaccta cgatacaagc 1140
[1888] gagagcaact actacctgtt ctggtacaag cagccccctt ctaggcagat gatcctggtg 1200
[1889] atcagacagg aggcctataa acagcagaat gccaccgaga accggtttag cgtgaacttc 1260

[1890] cagaaagccg ccaagagctt cagcctgaaa atctctgaca gccagctggg cgatacagcc 1320
[1891] atgtactttt gtgccttcaa cccctgggag aactatggcc agaatttcgt gttcggccct 1380
[1892] ggcaccagac tgtctgttct gccttatatc cagaaccccg atcctgctgt gtaccagctg 1440
[1893] cgggacagca agagcagcga caagagcgtg tgcctgttca ccgacttcga cagccagacc 1500
[1894] aacgtgtccc agagcaagga cagcgacgtg tacatcaccg ataagtgcgt gctggacatg 1560
[1895] cggagcatgg acttcaagag caacagcgcc gtggcctggt ccaacaagag cgacttcgcc 1620
[1896] tgcgccaacg ccttcaacaa cagcattatc cccgaggaca cattcttccc aagccccgag 1680
[1897] agcagctgcg acgtgaagct ggtggaaaag agcttcgaga cagacaccaa cctgaacttc 1740
[1898] cagaacctca gcgtgatcgg cttccggatc ctgctgctga aggtggccgg cttcaacctg 1800
[1899] ctgatgaccc tgcggctgtg gtccagctga 1830
[1900] <210> 82
[1901] <211> 270
[1902] <212> PRT
[1903] <213> 人工序列
[1904] <220>
[1905] <223> 合成序列 参考TCR α链
[1906] <400> 82
[1907] Met Thr Ser Ile Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp
[1908] 1 5 10 15
[1909] Leu Val Asn Gly Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val
[1910] 20 25 30
[1911] Gln Glu Gly Asp Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala
[1912] 35 40 45
[1913] Ser Asn Tyr Phe Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln
[1914] 50 55 60
[1915] Leu Ile Ile Asp Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg
[1916] 65 70 75 80
[1917] Ile Ala Val Thr Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile
[1918] 85 90 95
[1919] Thr Glu Thr Gln Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Thr
[1920] 100 105 110
[1921] Glu Asp Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ile Ile Lys
[1922] 115 120 125
[1923] Pro Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser
[1924] 130 135 140
[1925] Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
[1926] 145 150 155 160
[1927] Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
[1928] 165 170 175
[1929] Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val
[1930] 180 185 190
[1931] Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn

[1932] 195 200 205
[1933] Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys
[1934] 210 215 220
[1935] Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn
[1936] 225 230 235 240
[1937] Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val
[1938] 245 250 255
[1939] Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[1940] 260 265 270
[1941] <210> 83
[1942] <211> 310
[1943] <212> PRT
[1944] <213> 人工序列
[1945] <220>
[1946] <223> 合成序列 参考TCR β链
[1947] <400> 83
[1948] Met Ser Asn Gln Val Leu Cys Cys Val Val Leu Cys Phe Leu Gly Ala
[1949] 1 5 10 15
[1950] Asn Thr Val Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Tyr Leu Phe Arg
[1951] 20 25 30
[1952] Lys Glu Gly Gln Asn Val Thr Leu Ser Cys Glu Gln Asn Leu Asn His
[1953] 35 40 45
[1954] Asp Ala Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Gln Gly Leu Arg Leu
[1955] 50 55 60
[1956] Ile Tyr Tyr Ser Gln Ile Val Asn Asp Phe Gln Lys Gly Asp Ile Ala
[1957] 65 70 75 80
[1958] Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Ser Phe Pro Leu Thr
[1959] 85 90 95
[1960] Val Thr Ser Ala Gln Lys Asn Pro Thr Ala Phe Tyr Leu Cys Ala Ser
[1961] 100 105 110
[1962] Ser Pro Gly Ala Leu Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
[1963] 115 120 125
[1964] Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
[1965] 130 135 140
[1966] Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
[1967] 145 150 155 160
[1968] Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
[1969] 165 170 175
[1970] Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln
[1971] 180 185 190
[1972] Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
[1973] 195 200 205

[1974] Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
[1975] 210 215 220
[1976] Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
[1977] 225 230 235 240
[1978] Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
[1979] 245 250 255
[1980] Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly
[1981] 260 265 270
[1982] Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr
[1983] 275 280 285
[1984] Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys
[1985] 290 295 300
[1986] Arg Lys Asp Ser Arg Gly
[1987] 305 310
[1988] <210> 84
[1989] <211> 22
[1990] <212> PRT
[1991] <213> 人工序列
[1992] <220>
[1993] <223> 合成序列 猪捷申病毒-1 2A(P2A-1)肽
[1994] <400> 84
[1995] Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val
[1996] 1 5 10 15
[1997] Glu Glu Asn Pro Gly Pro
[1998] 20
[1999] <210> 85
[2000] <211> 21
[2001] <212> PRT
[2002] <213> 人工序列
[2003] <220>
[2004] <223> 合成序列 猪捷申病毒-2 2A(P2A-2)肽
[2005] <400> 85
[2006] Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu
[2007] 1 5 10 15
[2008] Glu Asn Pro Gly Pro
[2009] 20
[2010] <210> 86
[2011] <211> 21
[2012] <212> PRT
[2013] <213> 人工序列
[2014] <220>
[2015] <223> 合成序列 Thosea asigna 病毒 2A(T2A)肽

[2016] <400> 86
[2017] Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu
[2018] 1 5 10 15
[2019] Glu Asn Pro Gly Pro
[2020] 20
[2021] <210> 87
[2022] <211> 23
[2023] <212> PRT
[2024] <213> 人工序列
[2025] <220>
[2026] <223> 合成序列 A型马鼻炎病毒(ERAV)2A(E2A)肽
[2027] <400> 87
[2028] Gly Ser Gly Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp
[2029] 1 5 10 15
[2030] Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[2031] 20
[2032] <210> 88
[2033] <211> 25
[2034] <212> PRT
[2035] <213> 人工序列
[2036] <220>
[2037] <223> 合成序列 口蹄疫病毒2A(F2A)肽
[2038] <400> 88
[2039] Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
[2040] 1 5 10 15
[2041] Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
[2042] 20 25
[2043] <210> 89
[2044] <211> 66
[2045] <212> DNA
[2046] <213> 人工序列
[2047] <220>
[2048] <223> 合成序列 猪捷申病毒-1 2A(P2A-1)肽-nt序列
[2049] <400> 89
[2050] ggaagtggag ctacgaattt ttctttatta aaacaagcag gagatgttga ggagaatccc 60
[2051] ggtcca 66
[2052] <210> 90
[2053] <211> 63
[2054] <212> DNA
[2055] <213> 人工序列
[2056] <220>
[2057] <223> 合成序列 猪捷申病毒-2 2A(P2A-2)肽-nt序列

[2058] <400> 90
[2059] agcggcgcca ccaacttcag cctgctgaaa caggccggcg acgtggaaga gaaccctggc 60
[2060] cct 63
[2061] <210> 91
[2062] <211> 63
[2063] <212> DNA
[2064] <213> 人工序列
[2065] <220>
[2066] <223> 合成序列 Thosea asigna 病毒 2A(T2A)肽-nt序列
[2067] <400> 91
[2068] ggaagcggag agggcagagg aagtctgcta acatgcggtg acgtcgagga gaatcctgga 60
[2069] cct 63
[2070] <210> 92
[2071] <211> 69
[2072] <212> DNA
[2073] <213> 人工序列
[2074] <220>
[2075] <223> 合成序列 A型马鼻炎病毒(ERAV)2A(E2A)肽-nt序列
[2076] <400> 92
[2077] ggaagcggac agtgtactaa ttatgctctc ttgaaattgg ctggagatgt tgagagcaac 60
[2078] cctggacct 69
[2079] <210> 93
[2080] <211> 75
[2081] <212> DNA
[2082] <213> 人工序列
[2083] <220>
[2084] <223> 合成序列 口蹄疫病毒 2A(F2A)肽-nt序列
[2085] <400> 93
[2086] ggaagcggag tgaaacagac tttgaatttt gaccttctca agttggcggg agacgtggag 60
[2087] tccaaccctg gacct 75
[2088] <210> 94
[2089] <211> 9
[2090] <212> PRT
[2091] <213> 人工序列
[2092] <220>
[2093] <223> 合成序列 WT-1 肽抗原
[2094] <400> 94
[2095] Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
[2096] 1 5
[2097] <210> 95
[2098] <211> 5
[2099] <212> PRT

[2100] <213> 人工序列
[2101] <220>
[2102] <223> 合成序列 G-S 接头
[2103] <400> 95
[2104] Gly Gly Gly Gly Ser
[2105] 1 5
[2106] <210> 96
[2107] <211> 20
[2108] <212> PRT
[2109] <213> 人工序列
[2110] <220>
[2111] <223> 合成序列 G-S 接头
[2112] <400> 96
[2113] Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ser Ser Ser Ser Ser Ser
[2114] 1 5 10 15
[2115] Ser Ser Ser Ser
[2116] 20
[2117] <210> 97
[2118] <211> 9
[2119] <212> PRT
[2120] <213> 人工序列
[2121] <220>
[2122] <223> 合成序列 大范围核酸酶识别位点
[2123] <400> 97
[2124] Leu Ala Gly Leu Ile Asp Ala Asp Gly
[2125] 1 5
[2126] <210> 98
[2127] <211> 6
[2128] <212> PRT
[2129] <213> 人工序列
[2130] <220>
[2131] <223> 合成序列 大范围核酸酶识别位点
[2132] <400> 98
[2133] Gly Ile Tyr Tyr Ile Gly
[2134] 1 5
[2135] <210> 99
[2136] <211> 5
[2137] <212> PRT
[2138] <213> 人工序列
[2139] <220>
[2140] <223> 合成序列 大范围核酸酶识别位点
[2141] <220>

[2142] <221> VARIANT
[2143] <222> 3
[2144] <223> Xaa = Asp or Glu
[2145] <220>
[2146] <221> VARIANT
[2147] <222> 4
[2148] <223> Xaa = any amino acid
[2149] <400> 99
[2150] Pro Asp Xaa Xaa Lys
[2151] 1 5
[2152] <210> 100
[2153] <211> 9
[2154] <212> PRT
[2155] <213> 人工序列
[2156] <220>
[2157] <223> 合成序列 WT-1 aa 37-45
[2158] <400> 100
[2159] Val Leu Asp Phe Ala Pro Pro Gly Ala
[2160] 1 5
[2161] <210> 101
[2162] <211> 6
[2163] <212> PRT
[2164] <213> 人工序列
[2165] <220>
[2166] <223> 合成序列 TCR 10.1 CDR1α
[2167] <400> 101
[2168] Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
[2169] 1 5
[2170] <210> 102
[2171] <211> 7
[2172] <212> PRT
[2173] <213> 人工序列
[2174] <220>
[2175] <223> 合成序列 TTCR 10.1 CDR2α
[2176] <400> 102
[2177] Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu
[2178] 1 5
[2179] <210> 103
[2180] <211> 13
[2181] <212> PRT
[2182] <213> 人工序列
[2183] <220>

[2184] <223> 合成序列 TCR 10.1 CDR3α
[2185] <400> 103
[2186] Cys Ala Val Lys Glu Thr Ser Gly Ser Arg Leu Thr Phe
[2187] 1 5 10
[2188] <210> 104
[2189] <211> 112
[2190] <212> PRT
[2191] <213> 人工序列
[2192] <220>
[2193] <223> 合成序列 TCR 10.1 Vα
[2194] <400> 104
[2195] Lys Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val Pro Glu Gly
[2196] 1 5 10 15
[2197] Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
[2198] 20 25 30
[2199] Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu
[2200] 35 40 45
[2201] Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala
[2202] 50 55 60
[2203] Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Ala Ala Ser
[2204] 65 70 75 80
[2205] Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Lys Glu Thr Ser
[2206] 85 90 95
[2207] Gly Ser Arg Leu Thr Phe Gly Glu Gly Thr Gln Leu Thr Val Asn Pro
[2208] 100 105 110
[2209] <210> 105
[2210] <211> 5
[2211] <212> PRT
[2212] <213> 人工序列
[2213] <220>
[2214] <223> 合成序列 TCR 10.1 CDR1β
[2215] <400> 105
[2216] Ser Gly His Val Ser
[2217] 1 5
[2218] <210> 106
[2219] <211> 6
[2220] <212> PRT
[2221] <213> 人工序列
[2222] <220>
[2223] <223> 合成序列 TCR 10.1 CDR2β
[2224] <400> 106
[2225] Phe Asn Tyr Glu Ala Gln

[2226] 1 5
[2227] <210> 107
[2228] <211> 13
[2229] <212> PRT
[2230] <213> 人工序列
[2231] <220>
[2232] <223> 合成序列 TCR 10.1 CDR3β
[2233] <400> 107
[2234] Cys Ala Ser Ser Leu Thr Gly Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe
[2235] 1 5 10
[2236] <210> 108
[2237] <211> 114
[2238] <212> PRT
[2239] <213> 人工序列
[2240] <220>
[2241] <223> 合成序列 TCR 10.1 Vβ
[2242] <400> 108
[2243] Gly Ala Gly Val Ser Gln Ser Pro Arg Tyr Lys Val Thr Lys Arg Gly
[2244] 1 5 10 15
[2245] Gln Asp Val Ala Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His Val Ser Leu
[2246] 20 25 30
[2247] Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe Leu Thr Tyr
[2248] 35 40 45
[2249] Phe Asn Tyr Glu Ala Gln Gln Asp Lys Ser Gly Leu Pro Asn Asp Arg
[2250] 50 55 60
[2251] Phe Ser Ala Glu Arg Pro Glu Gly Ser Ile Ser Thr Leu Thr Ile Gln
[2252] 65 70 75 80
[2253] Arg Thr Glu Gln Arg Asp Ser Ala Met Tyr Arg Cys Ala Ser Ser Leu
[2254] 85 90 95
[2255] Thr Gly Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val
[2256] 100 105 110
[2257] Thr Glu
[2258] <210> 109
[2259] <211> 6
[2260] <212> PRT
[2261] <213> 人工序列
[2262] <220>
[2263] <223> 合成序列 TCR 13.1 CDR1α
[2264] <400> 109
[2265] Asn Ser Met Phe Asp Tyr
[2266] 1 5
[2267] <210> 110

[2268] <211> 7
[2269] <212> PRT
[2270] <213> 人工序列
[2271] <220>
[2272] <223> 合成序列 TCR 13.1 CDR2α
[2273] <400> 110
[2274] Ile Ser Ser Ile Lys Asp Lys
[2275] 1 5
[2276] <210> 111
[2277] <211> 13
[2278] <212> PRT
[2279] <213> 人工序列
[2280] <220>
[2281] <223> 合成序列 TCR 13.1 CDR3α
[2282] <400> 111
[2283] Cys Ala Ala Ser Gly Ile Gly Asp Tyr Lys Leu Ser Phe
[2284] 1 5 10
[2285] <210> 112
[2286] <211> 113
[2287] <212> PRT
[2288] <213> 人工序列
[2289] <220>
[2290] <223> 合成序列 TCR 13.1 Vα
[2291] <400> 112
[2292] Asp Gln Gln Val Lys Gln Asn Ser Pro Ser Leu Ser Val Gln Glu Gly
[2293] 1 5 10 15
[2294] Arg Ile Ser Ile Leu Asn Cys Asp Tyr Thr Asn Ser Met Phe Asp Tyr
[2295] 20 25 30
[2296] Phe Leu Trp Tyr Lys Lys Tyr Pro Ala Glu Gly Pro Thr Phe Leu Ile
[2297] 35 40 45
[2298] Ser Ile Ser Ser Ile Lys Asp Lys Asn Glu Asp Gly Arg Phe Thr Val
[2299] 50 55 60
[2300] Phe Leu Asn Lys Ser Ala Lys His Leu Ser Leu His Ile Val Pro Ser
[2301] 65 70 75 80
[2302] Gln Pro Gly Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Ser Gly Ile Gly
[2303] 85 90 95
[2304] Asp Tyr Lys Leu Ser Phe Gly Ala Gly Thr Thr Val Thr Val Arg Ala
[2305] 100 105 110
[2306] Asn
[2307] <210> 113
[2308] <211> 5
[2309] <212> PRT

[2310] <213> 人工序列
[2311] <220>
[2312] <223> 合成序列 TCR 13.1 CDR1β
[2313] <400> 113
[2314] Pro Arg His Asp Thr
[2315] 1 5
[2316] <210> 114
[2317] <211> 6
[2318] <212> PRT
[2319] <213> 人工序列
[2320] <220>
[2321] <223> 合成序列 TCR 13.1 CDR2β
[2322] <400> 114
[2323] Phe Tyr Glu Lys Met Gln
[2324] 1 5
[2325] <210> 115
[2326] <211> 14
[2327] <212> PRT
[2328] <213> 人工序列
[2329] <220>
[2330] <223> 合成序列 TCR 13.1 CDR3β
[2331] <400> 115
[2332] Cys Ala Ser Ser Leu Arg Leu Gly Arg Glu Thr Gln Tyr Phe
[2333] 1 5 10
[2334] <210> 116
[2335] <211> 114
[2336] <212> PRT
[2337] <213> 人工序列
[2338] <220>
[2339] <223> 合成序列 TCR 13.1 Vβ
[2340] <400> 116
[2341] Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg
[2342] 1 5 10 15
[2343] Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val
[2344] 20 25 30
[2345] Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser
[2346] 35 40 45
[2347] Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe
[2348] 50 55 60
[2349] Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser
[2350] 65 70 75 80
[2351] Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Arg

[2352] 85 90 95

[2353] Leu Gly Arg Glu Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Leu Val

[2354] 100 105 110

[2355] Leu Glu

[2356] <210> 117

[2357] <211> 6

[2358] <212> PRT

[2359] <213> 人工序列

[2360] <220>

[2361] <223> 合成序列 TCR 16.1 CDR1α

[2362] <400> 117

[2363] Val Ser Gly Leu Arg Gly

[2364] 1 5

[2365] <210> 118

[2366] <211> 7

[2367] <212> PRT

[2368] <213> 人工序列

[2369] <220>

[2370] <223> 合成序列 TCR 16.1 CDR2α

[2371] <400> 118

[2372] Leu Tyr Ser Ala Gly Glu Glu

[2373] 1 5

[2374] <210> 119

[2375] <211> 12

[2376] <212> PRT

[2377] <213> 人工序列

[2378] <220>

[2379] <223> 合成序列 TCR 16.1 CDR3α

[2380] <400> 119

[2381] Cys Ala Val Ile Thr Gly Phe Gln Lys Leu Val Phe

[2382] 1 5 10

[2383] <210> 120

[2384] <211> 110

[2385] <212> PRT

[2386] <213> 人工序列

[2387] <220>

[2388] <223> 合成序列 TCR 16.1 Vα

[2389] <400> 120

[2390] Glu Asp Gln Val Thr Gln Ser Pro Glu Ala Leu Arg Leu Gln Glu Gly

[2391] 1 5 10 15

[2392] Glu Ser Ser Ser Leu Asn Cys Ser Tyr Thr Val Ser Gly Leu Arg Gly

[2393] 20 25 30

[2394] Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Pro Glu Phe Leu Phe
[2395] 35 40 45
[2396] Thr Leu Tyr Ser Ala Gly Glu Glu Lys Glu Lys Glu Arg Leu Lys Ala
[2397] 50 55 60
[2398] Thr Leu Thr Lys Lys Glu Ser Phe Leu His Ile Thr Ala Pro Lys Pro
[2399] 65 70 75 80
[2400] Glu Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Ile Thr Gly Phe Gln Lys
[2401] 85 90 95
[2402] Leu Val Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu Leu Val Ser Pro Asn
[2403] 100 105 110
[2404] <210> 121
[2405] <211> 5
[2406] <212> PRT
[2407] <213> 人工序列
[2408] <220>
[2409] <223> 合成序列 TCR 16.1 CDR1β
[2410] <400> 121
[2411] Met Asn His Glu Tyr
[2412] 1 5
[2413] <210> 122
[2414] <211> 6
[2415] <212> PRT
[2416] <213> 人工序列
[2417] <220>
[2418] <223> 合成序列 TCR 16.1 CDR2β
[2419] <400> 122
[2420] Ser Met Asn Val Glu Val
[2421] 1 5
[2422] <210> 123
[2423] <211> 14
[2424] <212> PRT
[2425] <213> 人工序列
[2426] <220>
[2427] <223> 合成序列 TCR 16.1 CDR3β
[2428] <400> 123
[2429] Cys Ala Ser Ser Phe Ser Gly Gly Thr Tyr Glu Gln Tyr Phe
[2430] 1 5 10
[2431] <210> 124
[2432] <211> 114
[2433] <212> PRT
[2434] <213> 人工序列
[2435] <220>

[2436] <223> 合成序列 TCR 16.1 Vβ

[2437] <400> 124

[2438] Glu Ala Gln Val Thr Gln Asn Pro Arg Tyr Leu Ile Thr Val Thr Gly

[2439] 1 5 10 15

[2440] Lys Lys Leu Thr Val Thr Cys Ser Gln Asn Met Asn His Glu Tyr Met

[2441] 20 25 30

[2442] Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Gln Ile Tyr Tyr

[2443] 35 40 45

[2444] Ser Met Asn Val Glu Val Thr Asp Lys Gly Asp Val Pro Glu Gly Tyr

[2445] 50 55 60

[2446] Lys Val Ser Arg Lys Glu Lys Arg Asn Phe Pro Leu Ile Leu Glu Ser

[2447] 65 70 75 80

[2448] Pro Ser Pro Asn Gln Thr Ser Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Phe Ser

[2449] 85 90 95

[2450] Gly Gly Thr Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val

[2451] 100 105 110

[2452] Thr Glu

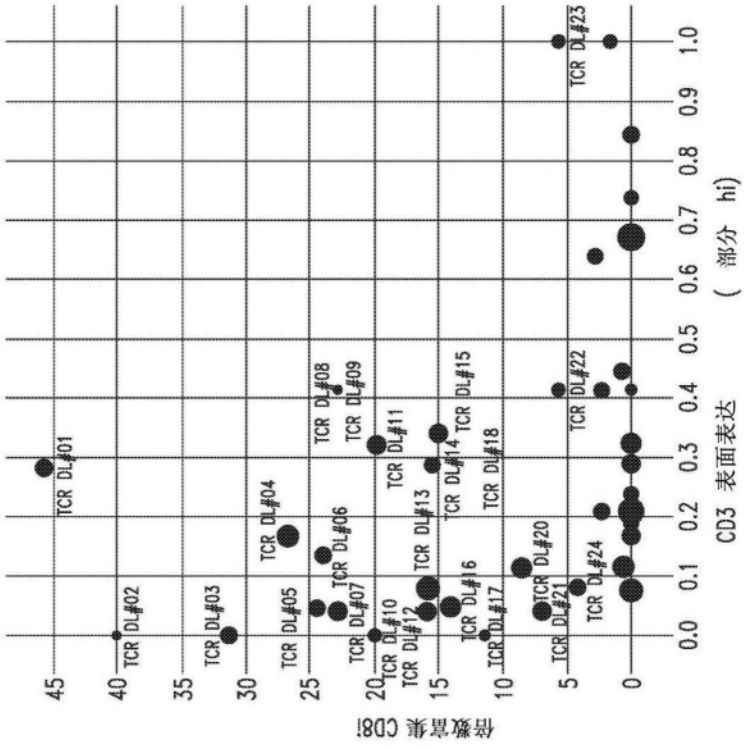

倍数富集 CD8i
CD3 表面表达 (部分 hi)
0.0
0.1
0.2
0.3
0.4
0.5
0.6
0.7
0.8
0.9
1.0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
45
TCR DL#01
TCR DL#02
TCR DL#03
TCR DL#04
TCR DL#05
TCR DL#06
TCR DL#07
TCR DL#08
TCR DL#09
TCR DL#10
TCR DL#11
TCR DL#12
TCR DL#13
TCR DL#14
TCR DL#15
TCR DL#16
TCR DL#17
TCR DL#18
TCR DL#20
TCR DL#21
TCR DL#22
TCR DL#23
TCR DL#24

图1

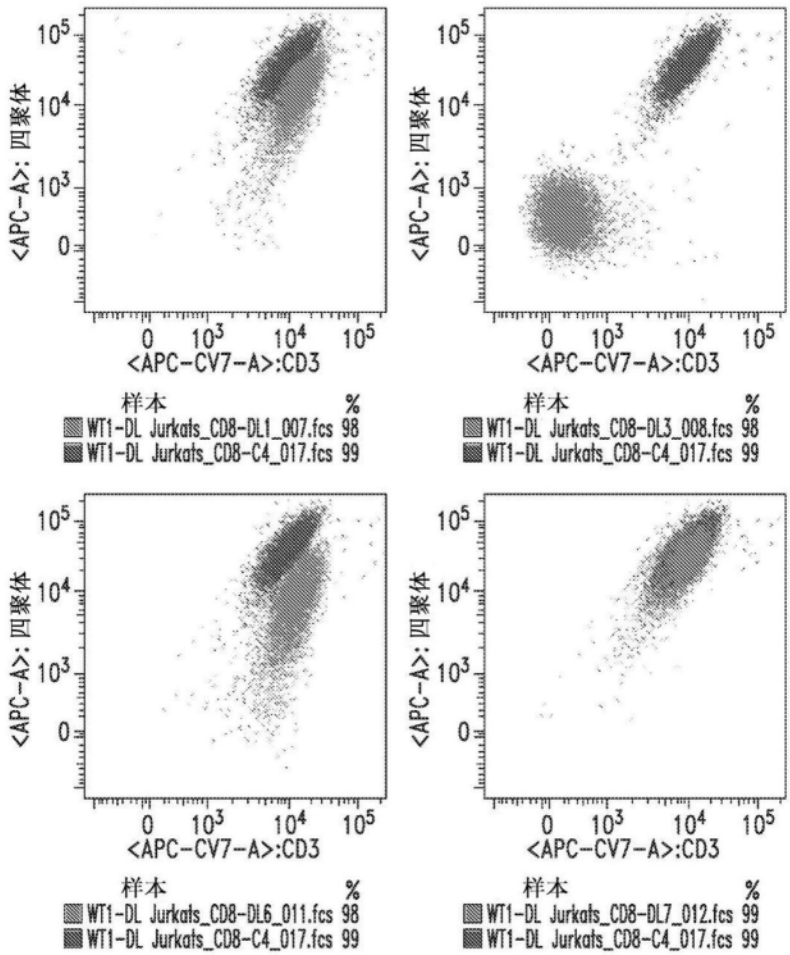

<APC-A>:四聚体
<APC-CV7-A>:CD3
样本 %
WT1-DL Jurkats_CD8-DL1_007.fcs 98
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-DL3_008.fcs 98
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-DL6_011.fcs 98
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-DL7_012.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99

图2A

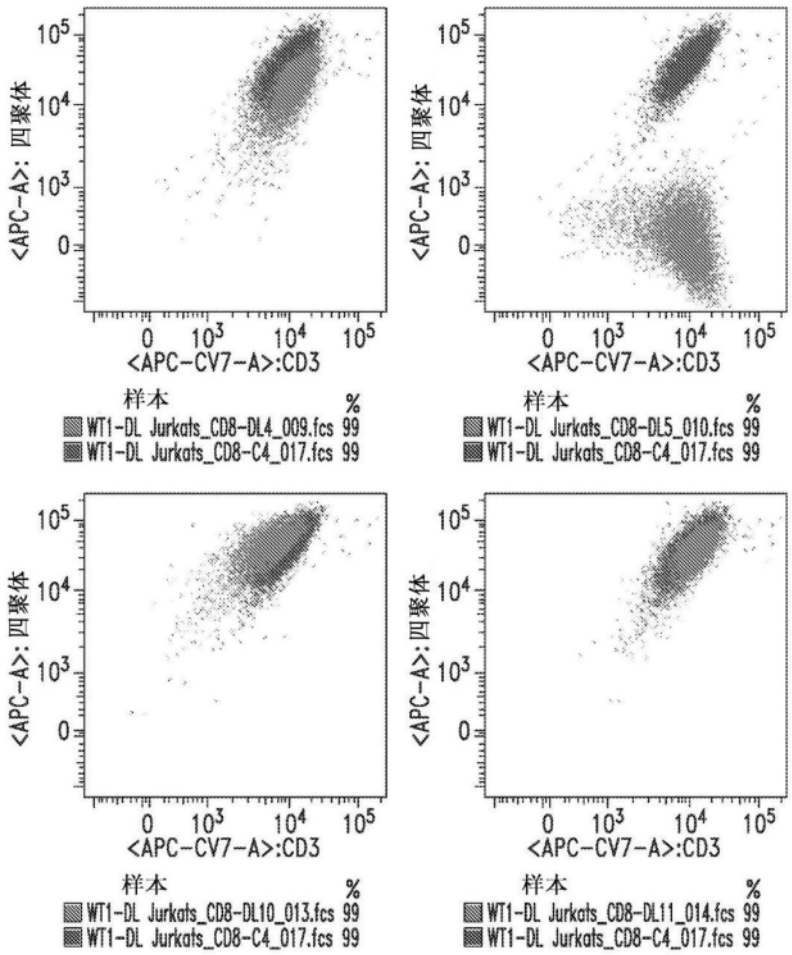

<APC-A>: 四聚体
<APC-CV7-A>:CD3
样本 %
WT1-DL Jurkats_CD8-DL4_009.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-DL5_010.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-DL10_013.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-DL11_014.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99

图2B

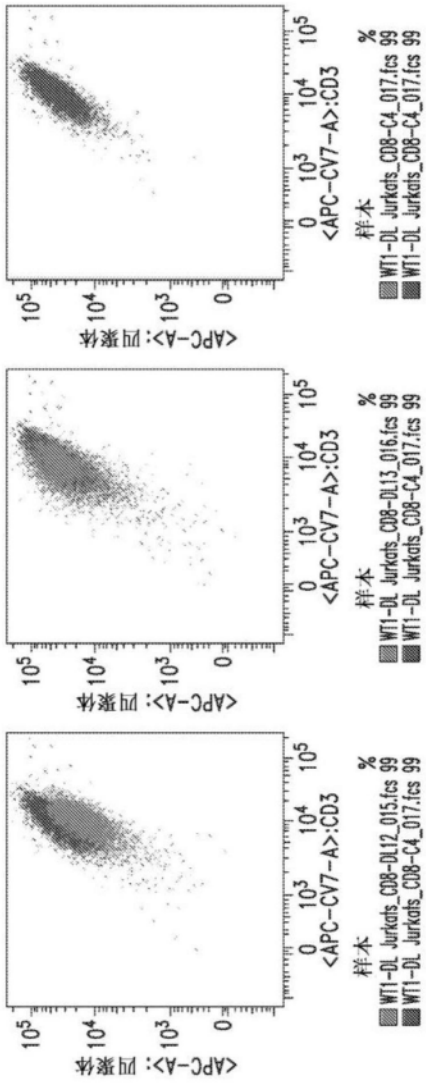

<APC-A>:四聚体
<APC-CV7-A>:CD3
样本
WT1-DL Jurkats_CD8-DL12_015.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-DL13_016.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99
WT1-DL Jurkats_CD8-C4_017.fcs 99

图2C

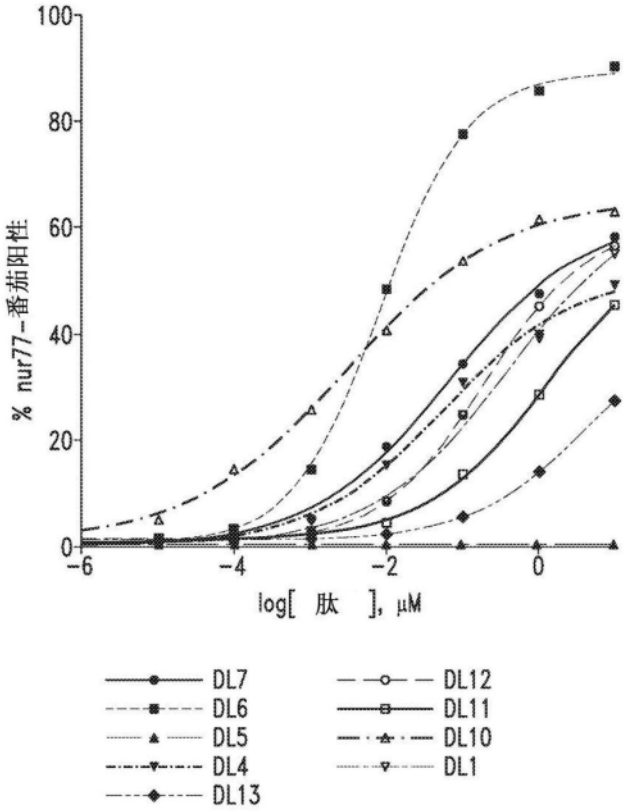

100
80
60
40
20
0
% nur77-番茄阳性
-6
-4
-2
0
log[肽], μM
DL7
DL6
DL5
DL4
DL13
DL12
DL11
DL10
DL1

图3A

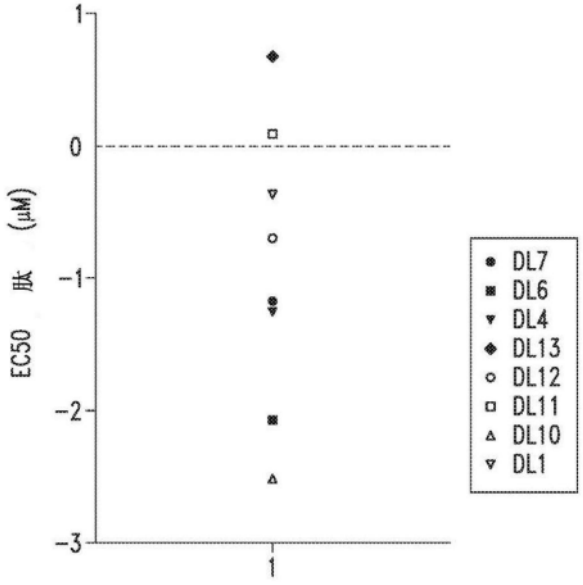

1
0
-1
-2
-3
EC50 肽 (μM)
1
DL7
DL6
DL4
DL13
DL12
DL11
DL10
DL1

图3B

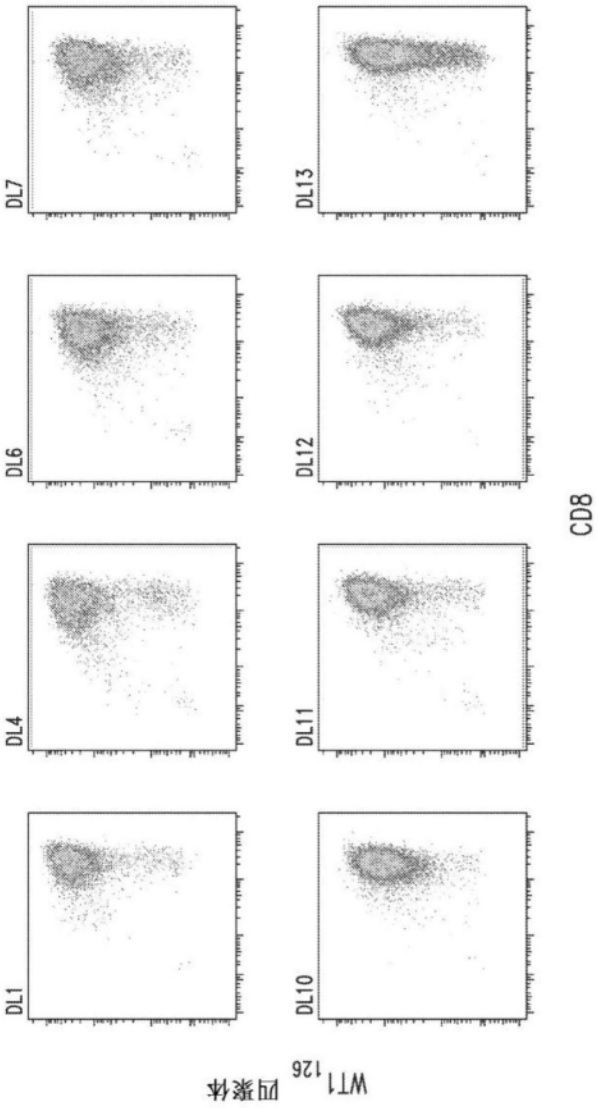


图4A

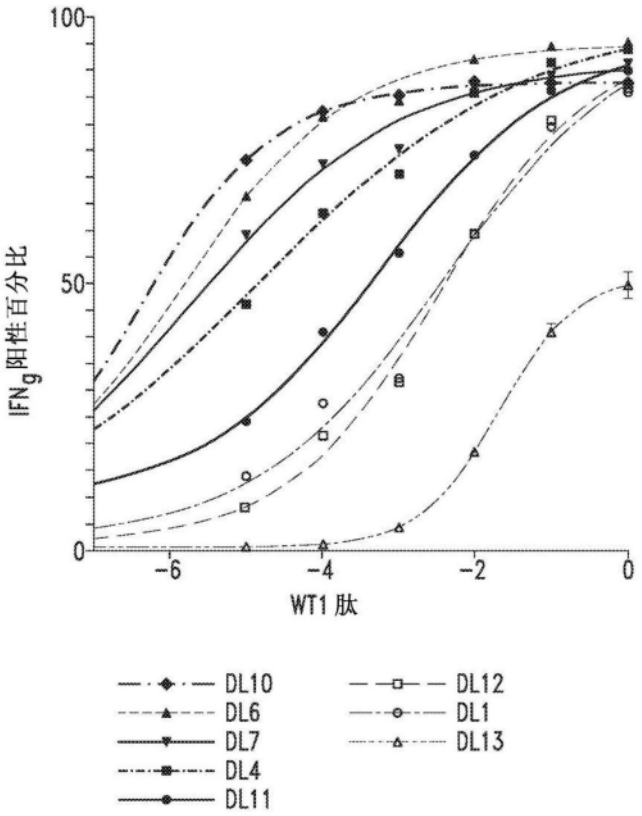

100
50
0
IFNg阳性百分比
-6
-4
-2
0
WT1肽
DL10
DL6
DL7
DL4
DL11
DL12
DL1
DL13

图4B

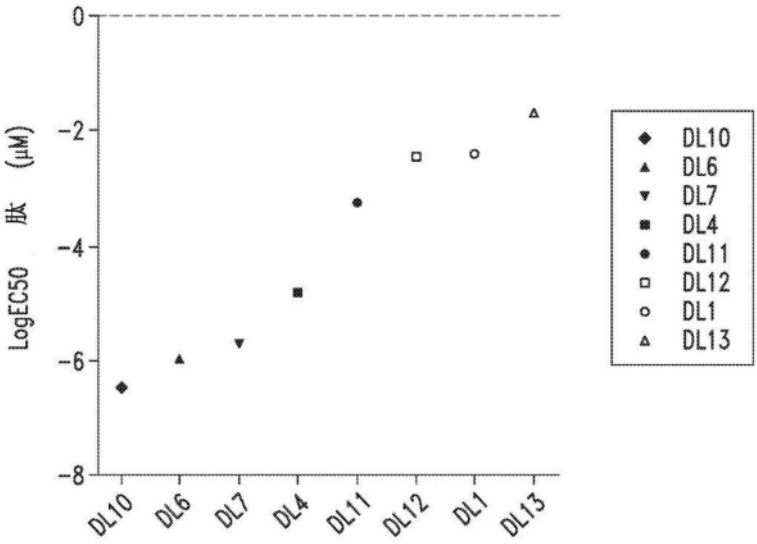

0
-2
-4
-6
-8
LogEC50 肽 (μM)
DL10
DL6
DL7
DL4
DL11
DL12
DL1
DL13

图4C

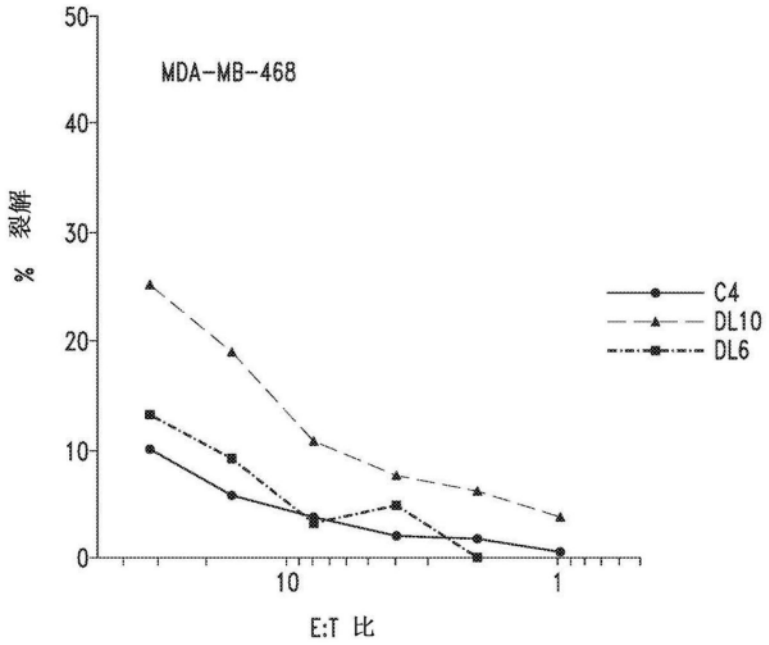

MDA-MB-468
% 裂解
50
40
30
20
10
0
10
1
E:T 比
C4
DL10
DL6

图5A

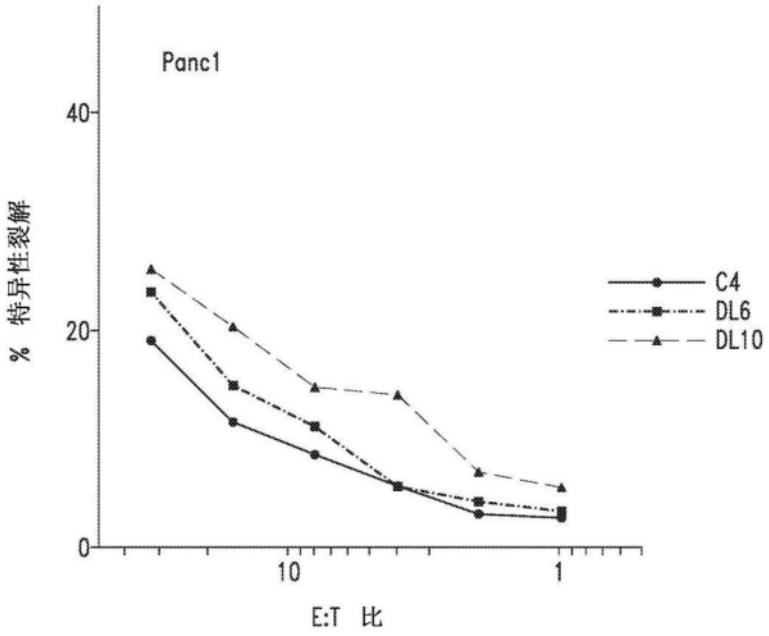

Panc1
% 特异性裂解
40
20
0
10
1
E:T 比
C4
DL6
DL10

图5B

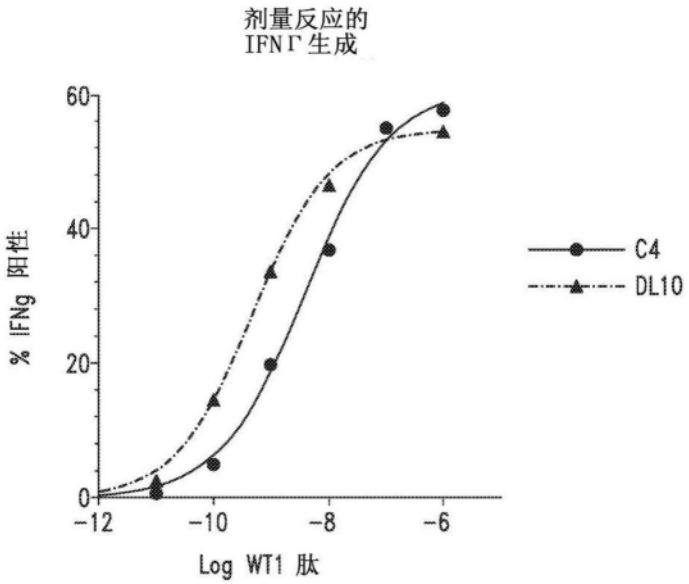

剂量反应的
IFNΓ生成
% IFNg 阳性
60
40
20
0
-12
-10
-8
-6
Log WT1 肽
C4
DL10

图6

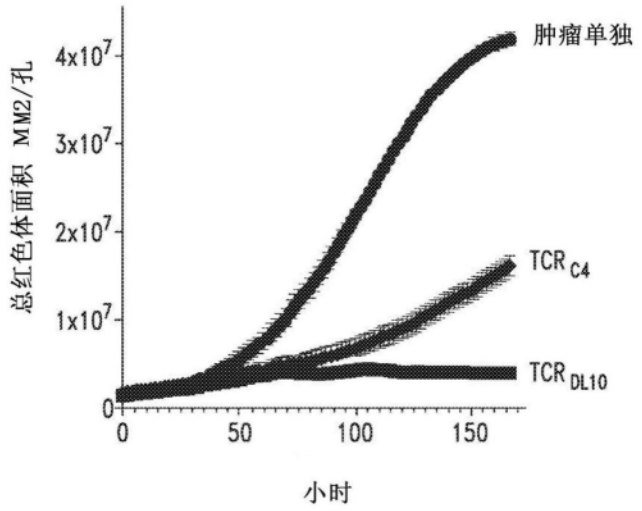

总红色体面积 MM2/孔
4x10^7
3x10^7
2x10^7
1x10^7
0
0
50
100
150
小时
肿瘤单独
TCR C4
TCR DL10

图7