



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 101389652 B

(45) 授权公告日 2013.05.29

(21) 申请号 200680018255.4

W0 2003/020763 A3, 2003.03.13, 全文.

(22) 申请日 2006.05.19

Yi Li, et al..Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display. 《NATURE BIOTECHNOLOGY》.2005, 第23卷(第3期), 349-354.

(30) 优先权数据

PCT/GB2005/002078 2005.05.25 GB
0524477.7 2005.11.30 GB

(85) PCT申请进入国家阶段日
2007.11.26

Junko Arai, et al..Identification of human telomerase reverse transcriptase - derived peptides that induce HLA-A24 - restricted antileukemia cytotoxic T lymphocytes. 《BLOOD》.2001, 第97卷(第9期), 2903-2907.

(86) PCT申请的申请数据
PCT/GB2006/001857 2006.05.19

(87) PCT申请的公布数据
W02006/125962 EN 2006.11.30

审查员 廖文勇

(73) 专利权人 英美诺科有限公司
地址 英国牛津郡

(72) 发明人 B·K·雅各布森 李懿

(74) 专利代理机构 上海专利商标事务所有限公
司 31100

代理人 张宜红

(51) Int. Cl.
C07K 14/725(2006.01)
A61K 38/17(2006.01)
C12N 15/12(2006.01)

(56) 对比文件
W0 2004044004 A2, 2004.05.27,

权利要求书2页 说明书16页 附图12页

(54) 发明名称
特异性结合 VYGFVRACL-HLA-A24 的 T 细胞受体

(57) 摘要

本发明提供具有特异性结合 VYGFVRACL-HLA-A24 肽-MHC 特性的 T 细胞受体 (TCR)。这种 TCR 可单用或与治疗剂联用来靶向呈递该复合物的癌细胞。

1. 一种分离的 T 细胞受体 (TCR), 其具有特异性结合 VYGFVRACL-HLA-A24 的特性, 其特征在于, 所述 TCR 的 α 链可变区是 SEQ ID NO:2 或 SEQ ID NO:19, 所述 TCR 的 β 链可变区是 SEQ ID NO:3。

2. 如权利要求 1 所述的 T 细胞受体 (TCR), 其具有特异性结合 VYGFVRACL-HLA-A*2402 的特性。

3. 如权利要求 1 所述的 TCR, 其特征在于, 所述 TCR 含有 α 链 SEQ ID NO:15 和 β 链 SEQ ID NO:16。

4. 如权利要求 1 所述的 TCR, 其特征在于, 所述 TCR 含有 α 链 SEQ ID NO:20 和 β 链 SEQ ID NO:16。

5. 如权利要求 1 所述的 TCR, 其特征在于, 所述 TCR 与治疗剂或可检测部分相连。

6. 如权利要求 5 所述的 TCR, 其特征在于, 所述 TCR 与治疗剂或可检测部分共价连接。

7. 一种多价 TCR 复合物, 其含有至少两个如权利要求 1 所述的 TCR。

8. 一种多价 TCR 复合物, 其含有至少两个如权利要求 2 所述的 TCR。

9. 一种多价 TCR 复合物, 其含有至少两个如权利要求 3 所述的 TCR。

10. 一种多价 TCR 复合物, 其含有至少两个如权利要求 4 所述的 TCR。

11. 一种多价 TCR 复合物, 其含有至少两个如权利要求 5 所述的 TCR。

12. 一种多价 TCR 复合物, 其含有至少两个如权利要求 6 所述的 TCR。

13. 一种细胞, 其呈递如权利要求 1 所述的 TCR。

14. 一种细胞, 其呈递如权利要求 2 所述的 TCR。

15. 一种细胞, 其呈递如权利要求 3 所述的 TCR。

16. 一种细胞, 其呈递如权利要求 4 所述的 TCR。

17. 一种细胞, 其呈递如权利要求 5 所述的 TCR。

18. 一种细胞, 其呈递如权利要求 6 所述的 TCR。

19. 一种细胞, 其经转染以呈递如权利要求 1 所述的 TCR。

20. 一种细胞, 其经转染以呈递如权利要求 2 所述的 TCR。

21. 一种细胞, 其经转染以呈递如权利要求 3 所述的 TCR。

22. 一种细胞, 其经转染以呈递如权利要求 4 所述的 TCR。

23. 一种细胞, 其经转染以呈递如权利要求 5 所述的 TCR。

24. 一种细胞, 其经转染以呈递如权利要求 6 所述的 TCR。

25. 如权利要求 13 所述的细胞, 其特征在于, 所述细胞是人 T 细胞或人造血干细胞。

26. 如权利要求 14 所述的细胞, 其特征在于, 所述细胞是人 T 细胞或人造血干细胞。

27. 如权利要求 15 所述的细胞, 其特征在于, 所述细胞是人 T 细胞或人造血干细胞。

28. 如权利要求 16 所述的细胞, 其特征在于, 所述细胞是人 T 细胞或人造血干细胞。

29. 如权利要求 17 所述的细胞, 其特征在于, 所述细胞是人 T 细胞或人造血干细胞。

30. 如权利要求 18 所述的细胞, 其特征在于, 所述细胞是人 T 细胞或人造血干细胞。

31. 如权利要求 19 所述的细胞, 其特征在于, 所述细胞是人 T 细胞或人造血干细胞。

32. 如权利要求 20 所述的细胞, 其特征在于, 所述细胞是人 T 细胞或人造血干细胞。

33. 如权利要求 21 所述的细胞, 其特征在于, 所述细胞是人 T 细胞或人造血干细胞。

34. 如权利要求 22 所述的细胞, 其特征在于, 所述细胞是人 T 细胞或人造血干细胞。

35. 如权利要求 23 所述的细胞,其特征在于,所述细胞是人 T 细胞或人造血干细胞。
36. 如权利要求 24 所述的细胞,其特征在于,所述细胞是人 T 细胞或人造血干细胞。
37. 一种或多种核酸,其编码如权利要求 1 所述的 TCR。
38. 一种或多种核酸,其编码如权利要求 2 所述的 TCR。
39. 一种或多种核酸,其编码如权利要求 3 所述的 TCR。
40. 一种或多种核酸,其编码如权利要求 4 所述的 TCR。
41. 一种或多种核酸,其编码如权利要求 5 所述的 TCR。
42. 一种或多种核酸,其编码如权利要求 6 所述的 TCR。
43. 一种药物组合物,其含有如权利要求 1 所述的 TCR 以及药学上可接受的载体。
44. 一种药物组合物,其含有如权利要求 2 所述的 TCR 以及药学上可接受的载体。
45. 一种药物组合物,其含有如权利要求 3 所述的 TCR 以及药学上可接受的载体。
46. 一种药物组合物,其含有如权利要求 4 所述的 TCR 以及药学上可接受的载体。
47. 一种药物组合物,其含有如权利要求 5 所述的 TCR 以及药学上可接受的载体。
48. 一种药物组合物,其含有如权利要求 6 所述的 TCR 以及药学上可接受的载体。
49. 一种药物组合物,其含有如权利要求 25 所述的细胞以及药学上可接受的载体。
50. 一种药物组合物,其含有如权利要求 26 所述的细胞以及药学上可接受的载体。
51. 一种药物组合物,其含有如权利要求 27 所述的细胞以及药学上可接受的载体。
52. 一种药物组合物,其含有如权利要求 28 所述的细胞以及药学上可接受的载体。
53. 一种药物组合物,其含有如权利要求 29 所述的细胞以及药学上可接受的载体。
54. 一种药物组合物,其含有如权利要求 30 所述的细胞以及药学上可接受的载体。
55. 一种药物组合物,其含有如权利要求 31 所述的细胞以及药学上可接受的载体。
56. 一种药物组合物,其含有如权利要求 32 所述的细胞以及药学上可接受的载体。
57. 一种药物组合物,其含有如权利要求 33 所述的细胞以及药学上可接受的载体。
58. 一种药物组合物,其含有如权利要求 34 所述的细胞以及药学上可接受的载体。
59. 一种药物组合物,其含有如权利要求 35 所述的细胞以及药学上可接受的载体。
60. 一种药物组合物,其含有如权利要求 36 所述的细胞以及药学上可接受的载体。

特异性结合 VYGFVRACL-HLA-A24 的 T 细胞受体

[0001] 本发明涉及具有特异性结合 VYGFVRACL-HLA-A24 特性的分离的 T 细胞受体 (TCR)。

[0002] 发明背景

[0003] VYGFVRACL 肽衍生自端粒酶蛋白的催化亚单位。(参见 Meyerson 等, (1997)Cell 90:785-795 和 Nakamura 等, (1997)Science 277:955-9)。这些研究描述了从数据库序列中几乎同时发现了端粒酶催化亚单位的 DNA 和推导的氨基酸序列。两项研究均注意到端粒酶催化亚单位活性与人癌症有关。这些癌细胞的 I 类 HLA 分子呈递该蛋白质的肽中包括 VYGFVRACL。该肽由 HLA-A24 呈递 (Arai 等, (2001)Blood 97(9):2903-2907, 和 Tajima 等, Int. J. Cancer (2004) 110:403-412)。因此, VYGFVRACL-HLA-A24 复合物提供了本发明 TCR 可靶向的一种癌症标记,例如将细胞毒性药物递送至癌细胞。

[0004] 发明简述

[0005] 本发明首次利用了具有特异性结合 VYGFVRACL-HLA-A24 特性的分离的 T 细胞受体 (TCR)。这种 TCR 可单用或与治疗剂联用来靶向呈递该复合物的癌细胞。

[0006] 发明详述

[0007] 本发明提供具有特异性结合 VYGFVRACL-HLA-A24 特性的分离的 TCR。VYGFVRACL (SEQ ID NO:1) 肽优选由 HLA-A*2402 呈递。

[0008] 具有特异性结合 VYGFVRACL-HLA-A24 特性的 TCR 在本文称为 VYG-A24TCR。“亲本”VYG-A24 TCR 定义为含有如图 1a 所示 α 链可变区 (SEQ ID NO:2) 和如图 1b 所示 β 链可变区 (SEQ ID NO:3) 的那些 TCR。例如,二硫键连接的可溶性形式的亲本 VYG-A24 TCR 由如图 5a 所示 TCR α 链 (SEQ ID NO:15) 和如图 5b 所示 TCR β 链 (SEQ ID NO:16) 构成。

[0009] 本发明的一个实施方式提供了具有特异性结合 VYGFVRACL-HLA-A24 特性的非天然 TCR。即,本发明的这种 TCR 由自然界中未发现的序列构成。

[0010] 另一实施方式提供的本发明 TCR 的特征在于所述 TCR 对所述 VYGFVRACL-HLA-A*2402 复合物的 KD 为 $5\mu\text{M}$ 或更低。本文的实施例 4 提供了适用于测定可溶性 TCR 与 pMHC 分子之间相互作用的 KD 的 Biacore 方法的细节。

[0011] 另一方面提供了本发明的分离 TCR,其含有如图 10b (SEQ ID NO:20) 和 / 或图 3b (SEQ ID No:12) 所示的互补决定区 (CDR)。在相应的附图中这些 TCR 链的 CDR 以下划线标出。

[0012] VYGFVRACL-HLA-A24 复合物的特异性亲本 VYG-A24 TCR 使用以下 V α 链和 V β 链:

[0013] α 链:TRAV22

[0014] β 链:TRBV 6.5

[0015] VYG-A24 TCR 可用作制备本发明其它 TCR 的模板。因此,与亲本 VYG-A24TCR α 链可变区 (参见图 1a 和 SEQ ID No:2) 和 / 或 β 链可变区 (参见图 1b 和 SEQ ID No:3) 相比,本发明的一个实施方式包括在至少一个互补决定区 (CDR) 和 / 或其可变区框架区中含有突变的 TCR。在一相关的实施方式中,本发明也包括相对于 VYG-A24 TCR α 链可变区 (参见图 10a 和 SEQ ID No:19) 和在至少一个互补决定区 (CDR) 和 / 或其可变区框架区中含有突变的 TCR。

[0016] 也考虑可突变本发明 TCR 可变区中的其它超变区,例如超变 4(HV4) 区,从而产生能保留了特异性结合 VYGFVRACL-HLA-A24 特性的高亲和力突变型 TCR。

[0017] 噬菌体展示提供了一种制备 TCR 变体文库的方法。(Li 等,(2005)NatureBiotech 23(3):349-354) 和 WO 2004/04404 详述了适用于噬菌体展示和随后筛选各含有非天然链间二硫键的 TCR 变体文库的方法。

[0018] 天然 TCR 存在异质二聚体 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ 形式。然而,以前的报道显示一条 TCR α 链或 TCR β 链构成的重组 TCR 能与肽 MHC 分子结合。此外,以前的报道显示 $\alpha\alpha$ 或 $\beta\beta$ 同质二聚体构成的重组 TCR 能与肽 MHC 分子结合。因此,本发明的其它实施方式提供了 TCR $\alpha\alpha$ 或 TCR $\beta\beta$ 同质二聚体。

[0019] 在一个实施方式中,本发明 TCR 包含 α 链可变区和 TCR β 链可变区。

[0020] 除非有相反表述,本文的 TCR 氨基酸序列一般含有 N-末端甲硫氨酸(Met 或 M) 残基。本领域技术人员可知该残基在重组蛋白的产生过程中可以除去。本领域技术人员显然还知道,可将其 C-末端和/或 N-末端的序列截短 1、2、3、4、5 或更多个残基,而基本上不影响该 TCR 结合 pMHC 的性能,本发明包括所有这些变化细微的变体。

[0021] 本文所用的术语“分离的 TCR”表示自然界中发现的以外形式的 TCR,例如可溶性 TCR 或非天然转染了编码所述 TCR 遗传物质的细胞上的 TCR。

[0022] 本文所用的术语“可变区”应理解为包括某给定 TCR 中包含的除 TCR α 链的 TRAC 基因或 TCR β 链的 TRBC1 或 TRBC2(基因) 所编码的恒定区以外的所有氨基酸。(T cell receptor Factsbook(《T 细胞受体手册》),(2001),LeFranc 和 LeFranc,Academic Press, ISBN 0-12-441352-8)。

[0023] 优选实施方式提供的本发明 TCR 含有:

[0024] 图 1a(SEQ ID NO:2) 所示 α 链可变区和图 1b(SEQ ID NO:3) 所示 β 链可变区或其表型沉默变体。例如,含有 SEQ ID NO:15(图 5a) 和 SEQ ID NO:16(图 5b) 所示氨基酸序列的 TCR。该 TCR α 链是已知的 ILAKFLHWL-HLA-A*0201 复合物特异性 TCR 的 α 链。该 TCR α 链的 DNA 和氨基酸序列首次公布于 WO 2005/116075 中。

[0025] 其它优选的实施方式提供的本发明 TCR 含有:

[0026] 图 10a(SEQ ID NO:19) 所示 α 链可变区和图 1b(SEQ ID NO:3) 所示的 β 链可变区或其表型沉默变体。例如,含有 SEQ ID NO:20(图 10b) 和 SEQ ID NO:16(图 5b) 所示氨基酸序列的 TCR。

[0027] 在一相关实施方式中,本发明的这种 TCR 还可包含图 6a 所示截短的 α 链恒定区氨基酸序列(SEQ ID NO:4) 和图 6b 和 6c 所示截短的 β 链恒定区序列之一(SEQ IDNO:5 和 6) 或其表型沉默变体。

[0028] 本文所用的术语“表型沉默变体”应理解为指保留了与由 HLA-A24 呈递的端粒酶衍生 VYGFVRACL 肽结合特性的那些 TCR。例如,本领域技术人员已知可能产生在其恒定区和/或可变区中掺入了微小变化但不改变与 VYGFVRACL-HLA-A24 复合物相互作用亲和力和/或解离速率的 TCR。本发明范围包括这类变化细微的变体。其中含有一个或多个保守取代的那些 TCR 也构成本发明的一部分。

[0029] 就广义而言,本发明 TCR 可以分别是 WO 04/033685 和 WO 03/020763 所述的 单链 TCR(scTCR) 形式或二聚体 TCR(dTCR) 形式。

[0030] 合适的 scTCR 形式包括：由对应于 TCR α 链可变区的氨基酸序列构成的第一区段，由对应于 TCR β 链可变区序列并与对应于 TCR β 链恒定区胞外序列的氨基酸序列的 N 末端相融合的氨基酸序列构成的第二区段，和连接该第一区段 C 末端与该第二区段 N 末端的接头序列。

[0031] 或者，所述第一区段可由对应于 TCR β 链可变区的氨基酸序列构成，所述第二区段可由对应于 TCR α 链可变区序列并与对应于 TCR α 链恒定区胞外序列的氨基酸序列的 N 末端相融合的氨基酸序列构成。

[0032] 以上 scTCR 在第一和第二链之间还含有二硫键，所述二硫键在天然 $\alpha\beta$ T 细胞受体中没有等价物，其中该接头序列的长度和该二硫键的位置应使第一和第二区段的可变区序列的相互取向基本上与天然 $\alpha\beta$ T 细胞受体中的相同。

[0033] 更具体地说，第一区段可由对应于 TCR α 链可变区序列并与对应于 TCR α 链恒定区胞外序列的氨基酸序列的 N 末端相融合的氨基酸序列构成，第二区段可由对应于 TCR β 链可变区序列并与对应于 TCR β 链恒定区胞外序列的氨基酸序列的 N 末端相融合的氨基酸序列构成，和在第一和第二链之间可以存在天然 $\alpha\beta$ T 细胞受体中没有等价物的二硫键。

[0034] 在以上 scTCR 形式中，接头基团可连接第一区段 C 末端和第二区段 N 末端，其可如式 $-PGGG-(SGGGG)_n-P-$ 所示，其中 n 是 5 或 6，P 是脯氨酸，G 是甘氨酸，S 是丝氨酸：

[0035] $-PGGG-SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG-P$ (SEQ ID NO :7)

[0036] $-PGGG-SGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGSGGGG-P$ (SEQ ID NO :8)

[0037] 本发明 TCR 的合适 dTCR 形式含有第一多肽，其中对应于 TCR α 链可变区序列的序列与对应于 TCR α 链恒定区胞外序列的序列的 N 末端相融合；和第二多肽，其中对应于 TCR β 链可变区序列的序列与对应于 TCR β 链恒定区胞外序列的序列的 N 末端相融合，该第一和第二多肽通过在天然 $\alpha\beta$ T 细胞受体中没有等价物的二硫键相连。

[0038] 所述第一多肽可含有与对应于 TCR α 链恒定区胞外序列的序列的 N 末端相融合的 TCR α 链可变区序列，而第二多肽中的序列对应于 TCR β 链可变区序列并与对应于 TCR β 链恒定区胞外序列的序列的 N 末端相融合，该第一和第二多肽通过取代 TRAC*01 外显子 1 的 Thr 48 和取代 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser57 的半胱氨酸残基之间的二硫键或其非人等价键相连。（“TRAC”等在本文中根据 T cell receptor Factsbook (《T 细胞受体手册》)，(2001)，LeFranc 和 LeFranc, Academic Press, ISBN 0-12-441352-8 命名)。

[0039] 本发明 TCR 的 dTCR 或 scTCR 形式可具有对应于人 $\alpha\beta$ TCR 胞外恒定和可变区序列的氨基酸序列，和在天然 TCR 中没有等价物的二硫键可连接所述恒定区序列的氨基酸残基。与天然 TCR 中其 β 碳原子距离小于 0.6nm 的氨基酸残基相对应的半胱氨酸残基之间存在二硫键，例如在取代 TRAC*01 外显子 1 的 Thr 48 和取代 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser 57 的半胱氨酸残基之间或其非人等同残基之间。就 TCR α 链而言，可引入半胱氨酸形成二硫键的其它位点是 TRAC*01 外显子 1 中的以下残基，就 TCR β 链而言，是 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 中的以下残基：

[0040]

TCR α 链		TCR β 链		天然 β 碳距离 (nm)	
Thr45	Tyr10	Thr45	Ser17	0.533	0.560
			Asp59	0.359	0.59
			Glu15		

[0041] 除了以上提及的非天然二硫键以外,本发明 TCR 的 dTCR 或 scTCR 形式可在对应于天然 TCR 中通过二硫键连接的那些残基的残基之间含有二硫键。

[0042] 本发明 TCR 优选不含有对应于跨膜序列的序列。

[0043] 本发明 TCR 优选不含有对应于天然 TCR 胞质序列的序列。

[0044] 本发明 TCR 的 dTCR 或 scTCR 形式可含有第一多肽,其中对应于 TCR α 链可变区序列的序列与对应于 TCR α 链恒定区胞外序列的序列的 N 末端相融合,和

[0045] 第二多肽,其中对应于 TCR β 链可变区序列的序列与对应于 TCR β 链恒定区胞外序列的序列的 N 末端相融合,

[0046] 该第一和第二多肽通过取代 TRAC*01 外显子 1 的 Thr 48 和取代 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser 57 的半胱氨酸残基之间的二硫键或其非人等价键相连。

[0047] 目前优选的一个本发明实施方式提供含有 SEQ ID NO:15 所示 α 链氨基酸序列和 SEQ ID NO:16 所示 β 链氨基酸序列的 TCR。目前优选的另一个本发明实施方式提供含有 SEQ ID NO:20 所示 α 链氨基酸序列和 SEQ ID NO:16 所示 β 链氨基酸序列的 TCR。

[0048] 也提供了编码本发明 TCR 的一种或多种核酸。提供的所述一种或多种核酸可以是经改造适合在原核或真核宿主细胞中表达的形式。合适的宿主细胞包括但不限于:细菌、酵母菌、哺乳动物或昆虫细胞。例如,宿主细胞可以是人 T 细胞或人造血干细胞。

[0049] 使这种经改造的一种或多种核酸是经突变而反映为其中引入了宿主细胞偏爱的密码子。引入的突变是不影响所编码的一种或多种多肽氨基酸序列的沉默突变。GeneArt (Regensburg, 德国) 提供合适的核酸优化服务 (GeneOptimizer™)。GeneArt 拥有的 WO 2004/059556 进一步提供了该优化方法的细节。

[0050] 目前优选的本发明其它实施方式提供了由全长 TCR α 链 DNA 序列和全长 TCR β 链 DNA 序列构成的核酸。与上述核酸互补的核酸或相应的 RNA 序列也构成本发明的部分。此外,本领域技术人员明显知道编码本发明 TCR 的所述一种或多种核酸也可含有非编码(内含子)序列。

[0051] 本领域技术人员明显知道这种全长 TCR 链 DNA 序列编码以下序列:

[0052] 前导序列和胞外、跨膜和胞质 TCR 序列。

[0053] PEG 化的 TCR 单体

[0054] 在个具体实施方式中,本发明 TCR 与至少一条聚亚烷基二醇链结合。本领域技术人员已知有许多方法可产生这种结合。在一优选实施方式中,一条或多条所述聚亚烷基二醇链与 TCR 共价相连。在另一实施方式中,本发明该方面的聚乙二醇链含有至少两个聚乙烯重复单位。

[0055] 多价 TCR 复合物

[0056] 本发明一方面提供含有至少两个本发明 TCR 的多价 TCR 复合物。在该方面的一个实施方式中,至少两个 TCR 分子经接头部分相连形成多价复合物。这些复合物优选为水溶性的,所以应照此选择接头部分。此外,接头部分优选能与 TCR 分子上确定的位置相连,从而尽可能降低所形成复合物的结构多样性。该方面的一个实施方式所提供的本发明 TCR 复合物中聚合物链或肽接头序列延伸于各 TCR 中不位于该 TCR 可变区序列中的氨基酸残基之间。

[0057] 由于本发明复合物可用作药物,接头部分的选择应考虑它们的药学适用性,例如它们的免疫原性。

[0058] 本领域已知能满足以上所需标准的接头部分的例子,例如连接抗体片段的技术。

[0059] 两类接头优选用于产生本发明的多价 TCR 分子。这些接头是非肽聚合物链或肽接

头序列。其中的 TCR 通过聚亚烷基二醇链相连的本发明 TCR 复合物提供了该方面的一个实施方式。

[0060] 第一类是亲水性聚合物,例如聚亚烷基二醇。此类中最常用的是聚乙二醇或 PEG,其结构如下式所示。

[0061] $\text{HOCH}_2\text{CH}_2\text{O}(\text{CH}_2\text{CH}_2\text{O})_n\text{-CH}_2\text{CH}_2\text{OH}$

[0062] 其中 n 大于 2。然而,其它聚合物可以是基于其它合适的、任选取代的聚亚烷基二醇,包括聚丙二醇,和乙二醇与丙二醇的共聚物。

[0063] 这种聚合物可用于处理或偶联治疗剂,特别是多肽或蛋白质治疗剂来有益地改变该治疗剂的 PK 分布,例如降低肾廓清率、提高血浆半衰期、降低免疫原性和提高溶解性。据信,一个或多个 PEG 分子围绕治疗剂周围形成的“外壳”能在立体上阻碍此治疗剂与免疫系统反应并降低蛋白酶降解,从而改善 PEG- 治疗剂偶联物的 PK 分布。(Casey 等, (2000), Tumor Targetting, 4 235-244)。所用亲水性聚合物的大小可根据 TCR 复合物预定的治疗应用来具体选择。因此,例如当要该产品离开循环(系统)渗入组织时,如用于治疗肿瘤时,宜使用 5 KDa 级的低分子量聚合物。已有许多综述文章和书籍详细描述了 PEG 和类似分子在药物制剂中的应用。例如,参见 Harris, (1992), Polyethylene Glycol Chemistry-Biotechnical and Biomedical Applications(《聚乙二醇化学-生物技术和生物医药应用》), Plenum, 纽约, 纽约州或 Harris 和 Zalipsky, (1997), Chemistry and Biological Applications of Polyethylene Glycol ACS Books(《聚乙二醇化学和生物学应用 ACS 手册》), 华盛顿, 哥伦比亚特区。

[0064] 所用的聚合物可具有线形或分支构型。可通过加入分支部分,包括甘油和甘油寡聚物、季戊四醇、山梨醇和赖氨酸来诱生分支 PEG 分子或其衍生物。

[0065] 该聚合物一般在其结构中,例如在其一端或两端,和 / 或骨架的支链处具有化学反应活性基团,从而使该聚合物能与 TCR 中的靶位点相连。如下所示,这种化学反应活性基团可与亲水性聚合物直接相连,或者在亲水性聚合物和反应活性化学(基团)之间可以具有间隔基团 / 部分:

[0066] 反应活性化学(基团)-亲水性聚合物-反应活性化学(基团)

[0067] 反应活性化学(基团)-间隔基团-亲水性聚合物-间隔基团-反应活性化学(基团)

[0068] 用于形成以上所概述类型的构建物的间隔基团可以是无反应活性、化学稳定的、链状的任何有机部分。这种间隔基团包括但不限于以下基团:

[0069] $-(\text{CH}_2)_n-$, 其中 $n = 2$ 到 5

[0070] $-(\text{CH}_2)_3\text{NHC}(\text{CH}_2)_2$

[0071] 其中二价亚烷基间隔基团位于聚亚烷基二醇链和其与该复合物的 TCR 连接点之间的本发明 TCR 复合物是该方面的另一种实施方式。

[0072] 其中聚亚烷基二醇链含有至少两个聚乙二醇重复单位的本发明 TCR 复合物是该方面的另一实施方式。

[0073] 本发明可用的直接或经间隔基团与反应活性化学(基团)相连的亲水性聚合物有许多商业供应商。这些供应商包括 Nektar Therapeutics(加利福尼亚州,美国)、NOF Corporation(日本)、Sunbio(韩国)和 Enzon Pharmaceuticals(新泽西州,美国)。

[0074] 本发明所用直接或经间隔基团与反应活性化学（基团）相连的可商品化购得的亲水性聚合物包括但不限于以下聚合物：

[0075]

PEG 接头描述	PEG 来源	目录号
TCR 单体连接		
5K 线形（马来酰亚胺）	Nektar	2D2MOH01
20K 线形（马来酰亚胺）	Nektar	2D2MOP01
20K 线形（马来酰亚胺）	NOF Corporation	SUNBRIGHT ME-200MA
20K 支链（马来酰亚胺）	NOF Corporation	SUNBRIGHT GL2-200MA
30K 线形（马来酰亚胺）	NOF Corporation	SUNBRIGHT ME-300MA
40K 支链 PEG（马来酰亚胺）	Nektar	2D3XOT01
5K-NP 线形（用于 Lys 连接）	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-50H
10K-NP 线形（用于 Lys 连接）	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-10T
20K-NP 线形（用于 Lys 连接）	NOF Corporation	SUNBRIGHT MENP-20T
TCR 二聚体接头		
3.4K 线形（马来酰亚胺）	Nektar	2D2DOF02
5K 分叉的（马来酰亚胺）	Nektar	2D2DOH0F
10K 线形（用正吡啶基 ds- 接头取代马来酰亚胺）	Sunbio	
20K 分叉的（马来酰亚胺）	Nektar	2D2DOP0F
20K 线形（马来酰亚胺）	NOF Corporation	
40K 分叉的（马来酰亚胺）	Nektar	2D3XOT0F
高级 TCR 多聚体		
15K, 3 臂, Mal ₃ （用于三聚体）	Nektar	0J00N03
20K, 4 臂, Mal ₄ （用于四聚体）	Nektar	0J00P04
40K, 8 臂, Mal ₈ （用于八聚体）	Nektar	0J00T08

[0076] 可利用各种偶联化学（基团）将聚合物分子偶联于蛋白质和肽剂。选择最合适的偶联化学（基团）在很大程度上取决于所需的偶联部位。例如，以下偶联化学（基团）已用于连接 PEG 分子（来源：Nektar 分子工程目录 2003 (Nektar Molecular Engineering Catalogue 2003)）的一个或多个末端：

[0077] N-马来酰亚胺

[0078] 乙烯基砜

[0079] 苯并三唑碳酸酯

[0080] 琥珀酰亚胺丙酸酯 (Succinimidyl propionate)

[0081] 琥珀酰亚胺丁酸酯 (Succinimidyl butanoate)

[0082] 硫代酯

[0083] 乙醛

[0084] 丙烯酸酯

[0085] 生物素

[0086] 伯胺

[0087] 如上所述，非 PEG 聚合物也可为本发明 TCR 的多聚化提供合适的接头。例如，可用含有通过脂肪链相连的马来酰亚胺末端的部分，例如 BMH 和 BMOE (Pierce, 产品号 22330 和 22323)。

[0088] 肽接头是另一类 TCR 接头。这些接头由氨基酸链组成，其作用是在要连接的 TCR 分子上产生简单的接头或多聚化结构域。曾采用生物素 / 链霉亲和素系统来产生体外结合

研究用的 TCR 四聚体（参见 WO/99/60119）。然而，链霉亲和素是微生物来源的多肽，因此用于治疗剂中并不理想。

[0089] 其中的 TCR 通过源自人多聚化结构域的肽接头连接的本发明 TCR 复合物提供了该方面的另一种实施方式。

[0090] 有许多含多聚化结构域的人蛋白质可用于产生多价 TCR 复合物。例如，p53 四聚化结构域已用于产生 scFv 抗体片段四聚体，该四聚体与单体 scFv 片段相比，显示血清存留期增加和解离速率明显降低。（Willuda 等，(2001) J. Biol. Chem. 276 (17) 14385-14392）。血红蛋白的四聚化结构域也可能用于该类应用。

[0091] 含有至少两个 TCR 的本发明多价 TCR 复合物提供了该方面的最后一个实施方式，其中至少一个所述 TCR 与治疗剂结合。

[0092] 一方面，本发明 TCR（或其多价复合物）或者还可在其 α 或 β 链的 C-末端或 N-末端包含反应活性半胱氨酸。

[0093] 诊断和治疗应用

[0094] 一方面，本发明 TCR 可以与治疗剂或可检测部分结合。例如，所述治疗剂或可检测部分可与 TCR 共价相连。

[0095] 在本发明的一个实施方式中，所述治疗剂或可检测部分与一条或两条 TCR 链的 C-末端共价相连。

[0096] 一方面，可用可检测部分，例如适用于诊断目的的标记物来标记本发明 TCR 的 scTCR 或一条或两条 dTCR 链。这种标记的 TCR 可用于检测 VYGFVRACL-HLA-A*0201 复合物的方法中，该方法包括使 TCR 配体与该 TCR 配体的特异性 TCR（或多聚高亲和力 TCR 复合物）接触；和检测与该 TCR 配体的结合情况。在例如利用生物素化的异质二聚体形成的四聚体 TCR 复合物中，可利用荧光链霉亲和素提供可检测标记。这种荧光标记的 TCR 四聚体适用于 FACS 分析，例如检测携带这些 TCR 的特异性 VYGFVRACL-HLA-A*0201 复合物的抗原呈递细胞。

[0097] 可检测本发明可溶性 TCR 的另一种方法是利用 TCR 特异性抗体（例如，抗-CD3 抗体），特别是单克隆抗体。有许多可商品化购得的抗-T 细胞抗体，例如 α F1 和 β F1 可分别识别 α 和 β 链的恒定区。

[0098] 在其它方面，本发明 TCR（或其多价复合物）或者还可与治疗剂结合（例如，共价或其他方式相连），所述治疗剂可以是，例如用于杀伤细胞的毒性部分，或免疫效应分子，如白介素或细胞因子。与非多聚野生型或本发明的 T 细胞受体异质二聚体相比，本发明多价 TCR 复合物对 TCR 配体的结合能力提高。因此，本发明多价 TCR 复合物特别可用于在体外或体内追踪或靶向呈递特定抗原的细胞，也可用作中间体来产生具有这种用途的其它多价 TCR 复合物。因此，这些 TCR 或多价 TCR 复合物可以体内应用的药学上可接受的制剂提供。

[0099] 本发明也提供将治疗剂递送至靶细胞的方法，该方法包括在允许潜在的靶细胞与本发明 TCR 或多价 TCR 复合物结合的条件下使二者接触，所述 TCR 或多价 TCR 复合物对 VYGFVRACL-HLA-A24 复合物具有特异性并结合有治疗剂。

[0100] 具体地说，本发明的可溶性 TCR 或多价 TCR 复合物可用于将治疗剂递送至呈递特定抗原的细胞部位。这可用于许多情况，特别是对付肿瘤。递送的治疗剂应可在局部施加其作用而不只对与其结合的细胞起作用。因此，一种具体方案设想可将抗肿瘤分子与肿瘤

抗原特异性的本发明 TCR 或多价 TCR 复合物相连。

[0101] 为此应用,可利用许多治疗剂,例如放射性化合物,酶(例如,穿孔素)或化疗药物(例如,顺铂)。为保证只在所需部位发挥毒性作用,可将毒素包裹在与链霉亲和素相连的脂质体内从而缓慢释放该化合物。这防止了毒素在体内转运期间的破坏作用并且保证了 TCR 与相关的抗原呈递细胞结合后毒素具有最大作用。

[0102] 其它合适的治疗剂包括:

[0103] • 小分子细胞毒性药物,即分子量小于 700 道尔顿,能杀伤哺乳动物细胞的化合物。这种化合物也可包含具有细胞毒性作用的毒性金属。此外,应该理解这些小分子细胞毒性药物也包括药物前体,即能在生理条件下分解或转变从而释放细胞毒性药物的化合物。这种药物的例子包括顺铂、美登素衍生物、拉奇霉素(rachelmycin)、刺胞霉素、多西他赛、鬼臼亚乙苷、吉西他滨、异环磷酰胺、依利替康、苯丙氨酸氮芥、米托蒽醌、sorfimer 卟啉钠 II(sorfimer sodium photofrin II)、替莫唑胺、拓扑替康、葡萄糖醛酸曲美沙特(trimetrate glucuronate)、奥利斯他汀 E(auristatin E)、长春新碱和阿霉素;

[0104] • 肽类细胞毒素,即能杀伤哺乳动物细胞的蛋白质或其片段。包括但不限于:蓖麻毒素、白喉毒素、假单胞菌细菌外毒素 A 及其变体(例如 PE38)、DNA 酶和 RNA 酶;

[0105] • 放射性核素,即一些元素的不稳定同位素,其衰减时发射一种或多种 α 或 β 粒子,或 γ 射线。包括但不限于:碘 131、铯 137、钬 166、铟 111、铊 201、铋 213 和 214、钷 147 和 177、镅 241 和 243、钷 147 和 177、镅 241 和 243;也可利用螯合剂来促进这些放射性核素与 TCR 或其多聚体结合;

[0106] • 药物前体,包括但不限于:抗体定向的酶药物前体;

[0107] • 免疫刺激剂,即能激活免疫应答的部分。包括但不限于:细胞因子,例如 IL-2 和 IFN- γ ;超抗原及其突变体;pHLA 复合物和趋化因子,例如 IL-8、血小板因子 4、黑色素瘤生长刺激蛋白等;抗体或其片段;补体激活剂;异种蛋白结构域;同种蛋白结构域;病毒/细菌蛋白结构域;病毒/细菌肽和抗 T 细胞决定簇抗体(例如,抗-CD3 或抗-CD28)。

[0108] 功能性抗体片段和变体

[0109] 适用于本文所述组合物和方法的抗体片段和变体/类似物包括但不限于以下。

[0110] 抗体片段

[0111] 本领域技术人员已知可能产生基本上保留了亲代抗体相同结合特性的某给定抗体的片段。下文提供了这种片段的细节:

[0112] 微型抗体(minibody)-这些构建物由具有截短的 Fc 部分的抗体组成。同样,它们保留了其所衍生自抗体的完整结合结构域。

[0113] Fab 片段-这些(构建物)包含与免疫球蛋白重链的一部分共价相连的一条免疫球蛋白轻链。因此,Fab 片段包含一个抗原结合位点。Fab 片段定义为用木瓜蛋白酶处理 IgG 而释放的那部分。这种片段一般可用重组 DNA 技术生产。(Reeves 等,(2000),Lecture Notes on Immunology(《免疫学讲稿》),(第四版),Blackwell Science 出版)。

[0114] F(ab')₂ 片段-这些(构建物)同时包含一种抗体的抗原结合位点和绞链区。F(ab')₂ 片段定义为用胃蛋白酶处理 IgG 而释放的那部分。这种片段一般可用重组 DNA 技术生产。(Reeves 等,(2000),Lecture Notes on Immunology(《免疫学讲稿》),(第四版),Blackwell Science 出版)。

[0115] Fv 片段-这些(构建物)包含与免疫球蛋白轻(链)可变区共价相连的免疫球蛋

白重（链）可变区。已作出了许多 Fv 设计。这些（构建物）包括通过引入二硫键来增强两结构域之间缔合的 dsFv。或者，可利用肽接头将两个结构域结合到一起成为一条多肽来形成 scFv。还产生了含有免疫球蛋白重链或轻链的可变区，与相应的免疫球蛋白重链或轻链的可变或恒定区相结合的 Fv 构建物。Fv 也可多聚化形成双抗体或三抗体（Maynard 等，（2000），Annu Rev Biomed Eng, 2 339-376）。

[0116] Nanobodies™- 由 Ablynx（比利时）投入市场的这些构建物包含衍生自骆驼（camelid）（例如，骆驼或美洲驼）抗体的一个合成的免疫球蛋白重（链）可变区。

[0117] 结构域抗体 - 由 Domantis（比利时）投入市场的这些构建物包含亲和力成熟的一个免疫球蛋白重（链）可变区或免疫球蛋白轻（链）可变区。

[0118] 抗体变体和类似物

[0119] 本发明抗体的明确功能特性是它们能特异性结合靶配体。本领域技术人员已知可能将这种结合特性工程改造加入到许多其它蛋白质中。适用于本发明组合物和方法的抗体变体和类似物的例子包括但不限于以下。

[0120] 基于蛋白质支架的结合多肽 - 该结合构建物家族包括含天然结合环的蛋白质的突变类似物。例子包括由 Affibody（瑞典）投入市场的 Affibodies，其是基于衍生自金黄色葡萄球菌（*Staphylococcus aureus*）蛋白 A 的一个 IgG 结合结构域的三螺旋基序。另一例子是由 EvoGenix（澳大利亚）投入市场的 Evibodies，其是基于在 CTLA-4 胞外结构域中移植了类似于抗体结合环的结构域。最后一个例子是由 Regeneron Pharmaceuticals（US）投入市场的 Cytokine Traps，其将细胞因子受体结构域移植入抗体支架中。（Nygren 等，（2000）Current Opinion in Structural biology, 7 463-469）是利用支架来工程改造蛋白质中新结合位点的综述。该综述提及以下蛋白质作为支架来源：CP1 锌指（结构）、淀粉酶抑制肽（Tendamistat）、Z 结构域（蛋白 A 同类物）、PST1、卷曲螺旋、LACI-D1 和细胞色素 b₅₆₂。其它蛋白质支架研究报道采用纤连蛋白、绿色荧光蛋白（GFP）和锚蛋白重复（单位）。

[0121] 本领域技术人员已知可以产生能与某给定蛋白配体不同部分结合的抗体或其片段，变体或类似物。例如，可产生针对形成该复合物（CD3）的任一多肽链（即， γ 、 δ 、 ϵ 、 ξ 和 η CD3 链）的抗 -CD3 抗体。能与 ϵ CD3 链结合的抗体是本发明组合物和方法所用的优选抗 -CD3 抗体。

[0122] 本发明的可溶性 TCR 或多价 TCR 复合物可与能将药物前体转化为药物的酶相连。这可使药物前体只在所需部位转变为药物（即，通过 sTCR 靶向）。

[0123] 预计本文披露的 VYGFVRACL（SEQ ID NO：1）-HLA-A24 特异性 TCR 可用于癌症的诊断和治疗方法。

[0124] 对于癌症治疗，将毒素或免疫刺激剂定位在肿瘤或转移（性肿瘤）附近可提高其效力。对于疫苗递送，将疫苗抗原定位在抗原呈递细胞附近可提高该抗原的效力。该方法也可应用于成像目的。

[0125] 一个实施方式提供了呈递本发明 TCR 的细胞。另一相关实施方式提供了经转染而能呈递本发明 TCR 的细胞。呈递或经转染而能呈递本发明 TCR 的细胞优选人 T 细胞或人造血干细胞。呈递本发明 TCR 的细胞可通过过继疗法（adoptive therapy methods）用于治疗癌症。这些方法提供了在患者体内将细胞，例如 T 细胞导向靶细胞群的手段，所述方法包括

给予癌症对象多个呈递本发明 TCR 的细胞,所述 TCR 对靶细胞群上的 VYGFVRACL-HLA-A24 配体具有特异性。

[0126] 本发明的其它实施方式提供了含有以下组分的药物组合物:

[0127] 本发明的 TCR 或多价 TCR 复合物(任选与治疗剂结合),或多个呈递至少一种本发明 TCR 的细胞,或编码本发明 TCR 的一种或多种核酸及药学上可接受的载体。

[0128] 本发明也提供一种癌症治疗方法,包括给予患这种癌症的对象有效量的本发明 TCR 或多价 TCR 复合物(任选与治疗剂结合),或能呈递至少一种本发明 TCR 的多个细胞,或编码本发明 TCR 的一种或多种核酸。在一相关实施方式中,本发明提供本发明的 TCR 或多价 TCR 复合物(任选与治疗剂结合),或能呈递至少一种本发明 TCR 的多个细胞,或编码本发明 TCR 的一种或多种核酸在制备治疗癌症组合物中的应用。

[0129] 本发明的治疗性或成像 TCR 一般可作为通常含有药学上可接受的载体的无菌药物组合物的一部分提供。该药物组合物可采用任何合适的形式(取决于给予患者的所需方法)。该药物组合物可以单位剂型提供,一般装在密封容器中或作为试剂盒的一部分提供。这种试剂盒通常(虽然不一定)装有使用说明书。该试剂盒可装有多个所述单位剂型。

[0130] 该药物组合物适于用任何合适的途径给药,例如胃肠外、透皮或通过吸入给药,优选经胃肠外途径(包括皮下、肌肉内或最优选静脉内给药)。可用药学领域中已知的任何方法制备该组合物,例如在无菌条件下混合活性成分与载体或赋形剂。

[0131] 本发明物质的剂量可根据待治疗的疾病或病症、待治疗个体的年龄和状况等而在较大范围内变动,医师可最终确定所用的合适剂量。

[0132] 其它方面

[0133] 本发明的 scTCR 或 dTCR(优选由对应于人序列的恒定区或可变区序列构成)可以是基本纯形式、或作为纯化或分离的制品提供。例如,可以基本上不含其它蛋白质的形式提供。

[0134] 可通过以下方法鉴定具有特异性结合 VYGFVRACL-HLA-A*2402 特性的高亲和力 TCR,该 TCR(i) 含有至少一个 TCR α 链可变区和/或至少一个 TCR β 链可变区和(ii) 对所述 VYGFVRACL-HLA-A*2402 复合物的 K_D 小于或等于 $1 \mu M$:

[0135] (a) 制备各含有亲本 VYG-A24 TCR 的 α 和 β 链可变区的多个 TCR,其中 α 和 β 链可变区的一个或两个含有突变;

[0136] (b) 在适合于 TCR 与 VYGFVRACL-HLA-A*2402 结合的条件下使所述突变的 TCR 与 VYGFVRACL-HLA-A*2402 接触;和

[0137] (c) 测定该相互作用的 K_D ,选出具有所需 K_D 的 TCR。

[0138] 本发明各方面的优选特征与已作了必要修正的其它各方面的一样。本文提及的现有技术文件按照法律所允许的最大程度纳入。

[0139] 实施例

[0140] 以下实施例进一步描述了本发明,但不以任何方式限制本发明的范围。

[0141] 下文参考了附图,其中:

[0142] 图 1a 和 1b 分别提供了亲本 VYG-A24 TCR 的 α 链可变区氨基酸序列和 β 链可变区氨基酸序列。

[0143] 图 2a 和 2b 分别提供了可溶形式的亲本 VYG-A24 TCR α 链和 β 链的 DNA 序列。

下划线标出了 NdeI 和 HindIII 限制性内切酶识别位点。

[0144] 图 3a 和 3b 分别提供了从图 2a 和 2b 所示 DNA 序列产生的可溶形式亲本 VYG-A24TCR α 和 β 链的氨基酸序列。下划线标出了这些可溶性 TCR 链中的 CDR 序列。

[0145] 图 4a 和 4b 分别提供了可溶形式的亲本 VYG-A24 TCR α 链和 β 链的 DNA 序列, 其经突变而包含了额外的半胱氨酸残基从而形成非天然二硫键。阴影表示引入各链的半胱氨酸密码子。下划线标出了 NdeI 和 HindIII 限制性内切酶识别位点。

[0146] 图 5a 和 5b 分别显示了从图 4a 和 4b 的 DNA 序列产生的可溶形式的亲本 VYG-A24 TCR α 和 β 链的氨基酸序列。阴影表示引入各链的半胱氨酸。

[0147] 图 6a 提供了截短形式 TRAC 的氨基酸序列。

[0148] 图 6b 提供了截短形式 TRBC1 的氨基酸序列。

[0149] 图 6c 提供了截短形式 TRBC2 的氨基酸序列。

[0150] 图 7a 提供述了 pGMT7 质粒的质粒图谱。

[0151] 图 7b 提供述了 pGMT7 质粒的 DNA 序列。

[0152] 图 8 详细描述了二硫键连接形式的可溶性亲本 VYG-A24 TCR 的 β 链氨基酸序列, 其采用了经肽接头与野生型人 IL-2 融合的 TRBC2 编码的恒定区。接头和 IL-2 序列以斜体字表示。

[0153] 图 9 提供了二硫键连接形式的可溶性亲本 VYG-A24 TCR 与 HLA-VYGFVRACL-HLA-A*2402 相互作用产生的 Biacore 响应曲线。

[0154] 图 10a 提供了 (c8)VYG-A24 TCR α 链可变区的氨基酸序列。

[0155] 图 10b 提供了掺入了非天然半胱氨酸的可溶形式 (c8)VYG-A24 TCR 的 α 链氨基酸序列。引入的半胱氨酸加亮表示, 该 TCR 链的 CDR 内的氨基酸以下划线标出。

[0156] 实施例 1- 制备包含亲本 VYG-A24 可变区的二硫键连接的可性 TCR

[0157] 图 4a 和 4b 提供了对 VYGFVRACL-HLA-A*2402 复合物具有特异性的二硫键连接形式的可溶性亲本 VYG-A24 TCR 的 α 和 β 链 DNA 序列。通过以下实施例 6 所述的方法从噬菌体文库中鉴定 β 链序列。 α 链是已知 [LAKFLHWL-HLA-A*0201 复合物特异性 TCR 的 α 链。该 α 链的 DNA 序列和氨基酸序列在 W02005/116075 中首次披露。可由多个承包研究公司 (contractresearch company), 例如 GeneArt (德国) 从头合成这些 DNA 序列。还可在这 DNA 序列中加入限制性内切酶识别位点, 从而使得这些 DNA 序列易于连接入 pGMT7 表达质粒, 该质粒含有能在大肠杆菌 BL21-DE3 (pLysS) 中高水平表达的 T7 启动子 (Pan 等, Biotechniques (2000) 29 (6) :1234-8)。

[0158] 将用 NdeI 和 HindIII 切割的编码各 TCR 链的 DNA 序列连接入也用 NdeI 和 HindIII 切割的不同 pGMT7 载体 (pGMT7 的质粒图谱见图 7a, 该载体的 DNA 序列见图 7b (SEQ ID NO : 17))。

[0159] 在编码可溶性亲本 VYG-A24 TCR 链的 DNA 中导入限制性内切酶识别位点

[0160] NdeI-CATATG

[0161] HindIII-AAGCTT

[0162] 连接

[0163] 将连接的质粒转化入感受态大肠杆菌菌株 XL1- 蓝细胞, 接种于含 100mg/ml 氨苄西林的 LB/ 琼脂平板。37°C 培育过夜后, 挑取单菌落, 用含 100mg/ml 氨苄西林的 10ml LB

于 37°C 摇动培养过夜。用 Miniprep 试剂盒 (Qiagen) 纯化克隆的质粒,用自动化 DNA 测序仪 (Lark Technologies) 测序插入的片段。

[0164] 图 5a 和 5b 分别显示了由图 4a 和 4b 所示 DNA 序列产生的二硫键连接的可溶性亲本 VYG-A24 TCR α 和 β 链胞外氨基酸序列。

[0165] 实施例 2- 制备二硫键连接的可溶性 VYG-A24 TCR 的高亲和力变体

[0166] 可将如实施例 1 所述制备的二硫键连接的可溶性亲本 VYG-A24 TCR 用作模板,从该模板制备对 VYGFVRACL (SEQ ID NO:43)-HLA-A*0201 复合物的亲和力提高的本发明 TCR。

[0167] 本领域技术人员已知可通过定点诱变将制备这些突变链所需的必需密码子变化导入编码这些链的 DNA 中 (QuickChange™, Stratagene 的定点诱变试剂盒)。

[0168] 简言之,可通过用能掺入所需一个或多个密码子变化的引物以及含相关亲本 VYG-A24 TCR 链 DNA 的 pGMT7 质粒作为诱变模板来实现:

[0169] 采用以下条件进行诱变:50 ng 质粒模板、1 μ l 的 10mM dNTP、由厂商提供的 5 μ l 的 10 $\times$ Pfu DNA 聚合酶缓冲液、25pmol 的正向引物、25pmol 的反向引物、1 μ l 的 pfu DNA 聚合酶,总体积为 50 μ l。95°C 进行 2 分钟的初始变性后,进行 25 轮如下反应:变性 (95°C, 10 秒)、退火 (55°C, 10 秒) 和延伸 (72°C, 8 分钟)。用 DpnI 限制性内切酶消化所得产物以去除模板质粒,并转化入大肠杆菌 XL1- 蓝菌株中。采用测序验证诱变。

[0170] 实施例 3- 可溶性 TCR 的表达、重折叠和纯化

[0171] 将实施例 1 制备的含有亲本 VYG-A24 TCR α 链和亲本 VYG-A24 TCR β 链的 pGMT7 表达质粒分别转化入大肠杆菌菌株 BL21pLysS, 37°C 用 TYP 培养基 (含 100 μ g/ml 氨苄西林) 培养具有氨苄西林抗性的单菌落至 OD₆₀₀ 为 0.4, 然后用 0.5mM IPTG 诱导蛋白质表达。诱导后 3 小时用 Beckman J-6B 以 4000rpm 离心 30 分钟收集细胞。将细胞沉淀物重悬在含有 50mM Tris-HCl、25% (w/v) 蔗糖、1mM NaEDTA、0.1% (w/v) 叠氮钠、10mM DTT, pH 8.0 的缓冲液中。冻融过夜后,在 Milsonix XL2020 超声波仪中用标准的 12mm 直径探头超声破碎重悬的细胞 1 分钟,总共超声约 10 分钟。用 Beckman J2-21 离心机以 13000rpm 离心 30 分钟回收包涵体沉淀物。然后用洗涤剂洗涤三次以去除细胞碎片和膜组分。每次用 Triton 缓冲液 (50mM Tris-HCl、0.5% Triton-X100、200mM NaCl、10mM NaEDTA、0.1% (w/v) 叠氮钠、2mM DTT, pH 8.0) 匀浆包涵体沉淀物,然后用 Beckman J2-21 以 13000rpm 离心 15 分钟使其沉淀。然后用如下缓冲液进行类似洗涤以去除洗涤剂和盐:50mM Tris-HCl、1mM NaEDTA、0.1% (w/v) 叠氮钠、2mM DTT, pH 8.0。最后,将包涵体分成 30mg 等分, -70°C 冷冻。用 6M 盐酸胍溶解并通过 Bradford 染料结合测试 (PerBio) 定量测定包涵体蛋白产量。

[0172] 融化含有约 30mg TCR β 链和 60mg TCR α 链的包涵体的冷冻储备物,然后混合样品,用 15ml 胍溶液 (6M 盐酸胍、10mM 醋酸钠、10mM EDTA) 稀释该混合物以确保链完全变性。然后将含有完全还原并变性的 TCR 链的胍溶液注入 1 升以下重折叠缓冲液中:100mM Tris pH 8.5、400mM L-精氨酸、2mMEDTA、5mM 还原谷胱甘肽、0.5mM 氧化谷胱甘肽、5M 尿素、0.2mM PMSF。加入氧化还原对 (2- 巯乙胺和胱胺 (其终浓度分别为 6.6mM 和 3.7mM), 约 5 分钟后加入变性的 TCR 链。溶液静置 5 小时 $\pm$ 15 分钟。5°C $\pm$ 3°C, 在 Spectrapor 1 膜 (Spectrum; 产品编号:132670) 中用 10L 10mM Tris pH 8.1 透析重折叠的 TCR18-20 小时。然后将透析缓冲液换为新鲜的 10mM Tris pH 8.1 (10L), 在 5°C $\pm$ 3°C 下再透析 20-22 小时。

[0173] 将透析的重折叠物加样于 POROS 50HQ 阴离子交换柱上,用 Akta 纯化仪

(Pharmacia) 以 50 倍以上柱体积的 0-500mM NaCl 梯度液洗脱结合的蛋白质从而将 sTCR 与降解产物和杂质分开。将诸峰组分保存于 4℃, 用考马斯染色 SDS-PAGE 分析, 然后合并与浓缩。最后, 用 HBS-EP 缓冲液 (10mM HEPES pH7.4, 150mM NaCl, 3.5mM EDTA, 0.05% 乙基苯基聚乙二醇 (nonidet p40)) 预平衡的 Superdex 200HR 凝胶过滤柱纯化和表征 sTCR。合并与浓缩相对分子量约 50kDa 的洗脱峰后通过 Biacore 表面等离子共振分析来表征。

[0174] 实施例 4-Biacore 表面等离子共振表征结合于特异性 pMHC 的 sTCR

[0175] 用表面等离子共振生物传感器 (Biacore 3000™) 分析亲本 VYG-A24 TCR 与 VYGFVRACL-HLA-A*2402 的结合情况。制备以半定向方式固定在链霉亲和素包被结合表面上的单种 VYGFVRACL-HLA-A*2402 复合物 (描述于下文) 有助于该项分析, 从而能同时有效测试可溶性 T- 细胞受体与多达 4 种不同 pMHC (固定在不同的流动小室上) 的结合情况。手动注入 HLA 复合物易于操控固定的 I 类分子的精确水平。

[0176] 体外重折叠含有亚单位蛋白组分和合成肽的细菌表达的包涵体中生物素化 I 类 HLA-A*2402 分子, 然后纯化并在体外进行酶促生物素化 (O' Callaghan 等 (1999) Anal. Biochem. 266 :9-15)。所表达的 HLA-A*2402- 重链的 C 末端具有生物素化标签, 其以合适的结构替代了该蛋白质的跨膜区和胞质结构域。获得的包涵体表达水平约 75mg/ 升细菌培养物。还在大肠杆菌中从合适构建物表达了作为包涵体的 MHC 轻链或 β 2- 微球蛋白, 其水平约为 500mg/ 升细菌培养物。

[0177] 裂解大肠杆菌细胞, 纯化包涵体至约 80% 纯度。用 6M 盐酸胍、50mM Tris pH 8.1、100mM NaCl、10mM DTT、10mM EDTA 使包涵体蛋白质变性, 通过在低于 5℃ 将变性蛋白一次脉冲加入重折叠缓冲液: 0.4M L- 精氨酸-HCl、100mM Tris pH 8.1、3.7mM 脲胺、6.6mM β - 半胱胺, 负载于 HLA-A*0201 分子所需的 4mg/ml SLYNTVATL 肽, 重折叠成 30mg/ 升重链、30mg/ 升 β 2m 的浓度。重折叠在 4℃ 进行至少 1 小时方能完成。

[0178] 用 10 倍体积的 10mM Tris pH 8.1 透析更换缓冲液。为充分降低溶液的离子强度, 缓冲液需更换两次。然后将蛋白质溶液通过 1.5 μ m 乙酸纤维素滤膜过滤, 加样于 POROS 50HQ 阴离子交换柱上 (床体积 8ml)。用 0-500mM NaCl 线性梯度液洗脱蛋白。HLA-A*0201- 肽复合物大约在 250mM NaCl 处洗脱, 收集诸峰细分, 加入蛋白酶抑制剂混合物 (Calbiochem), 各组分冷藏于冰上。

[0179] 用以相同缓冲液平衡的 Pharmacia 快速脱盐柱将含生物素化标记的 pMHC 分子的缓冲液更换为 10mM Tris pH 8.1、5mM NaCl。洗脱后立即将含有蛋白质的组分冷藏于冰上, 加入蛋白酶抑制剂混合物 (Calbiochem)。然后加入生物素化试剂: 1mM 生物素、5mM ATP (缓冲至 pH 8)、7.5mM MgCl₂ 和 5 μ g/ml BirA 酶 (按照 O' Callaghan 等, (1999), Anal. Biochem. 266 :9-15 纯化)。然后室温培育混合物过夜。

[0180] 采用凝胶过滤层析纯化生物素化的 pHLA-A*2402 分子。用已过滤的 PBS 预平衡 Pharmacia Superdex 75 HR 10/30 柱, 加载 1ml 生物素化反应混合物, 用 PBS 以 0.5ml/ 分钟过柱。生物素化 pHLA-A*0201 分子在约 15ml 时作为单峰洗脱。合并含有蛋白质的组分, 在冰上冷藏, 加入蛋白酶抑制剂混合物。采用考马斯结合试验 (PerBio) 测定蛋白质浓度, 将生物素化 VYGFVRACL-HLA-A*2402 分子等份试样冷冻保存在 -20℃。采用标准的胺基偶联方法 (amine coupling method) 固定链霉亲和素。

[0181] 这种固定的复合物能结合 T- 细胞受体和辅助受体 CD8 α α , 可将二者注射入溶液

相。即使在低浓度（至少 $40 \mu\text{g/ml}$ ）也能获得 TCR 的特异性结合，提示该 TCR 较稳定。如果采用溶液相或固定相的 sTCR，观察到 sTCR 的 pMHC 结合特性在质量和数量上相似。这对控制可溶性（TCR）部分活性至关重要，也提示生物素化的 pMHC 复合物与非生物素化的复合物生物活性相同。

[0182] 在 Biacore 3000TM 表面等离子共振（SPR）生物传感器上分析含有新的链间键的可溶性亲本 VYG-A24 TCR 与其同源 pMHC 或无关的 pMHC 混合物（制备方法如上所述）之间的相互作用。在一流动小室中，SPR 检测到传感器表面附近以响应单位（RU）表示的折光率发生变化，该原理可用于检测受体配体相互作用和分析它们的亲和力以及动力学参数。所述探针流动小室如下制备：通过交联到 $\beta 2m$ 上的生物素与已化学交联到流动小室的活化表面上的链霉亲和素之间的结合，将各 HLA-肽复合物固定在不同的流动小室中。然后使 sTCR 以恒定流速通过不同流动小室的表面，并测定该情况下的 SPR 响应以进行测试。

[0183] 检测平衡结合常数

[0184] 制备亲本 VYG-A24 TCR 的一系列稀释液，以 $5 \mu\text{l/分钟}$ 的恒定流速注入两个不同的流动小室；一个流动小室用约 1000RU 的特异性 VYGFVRACL-HLA-A*2402 复合物包被，第二个用约 1000RU 的非特异性 HLA-A24-肽复合物包被。用对照小室的测定值对各浓度的响应进行标准化。制作标准化数据响应与 TCR 样品浓度相关图，拟合成双曲线（hyperbola）以计算平衡结合常数， K_D 。（Price&Dwek, Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists (2nd Edition), 《生物化学家的物理化学原理和问题》第二版, 1979, Clarendon Press, 牛津）。

[0185] 检测动力学参数

[0186] 通过试验检测解离速率常数 K_d 和结合速率常数 K_a 来确定高亲和力 TCR 的 K_D 。平衡常数 K_D 计算为 k_d/k_a 。注射 TCR 流过两个不同小室，一个用约 300RU 的特异性 HLA-A*2402-VYGFVRACL 复合物包被，第二个用约 300 RU 的非特异性肽-HLA 复合物包被。流速设置为 $50 \mu\text{l/分钟}$ 。通常注入约 $3 \mu\text{M}$ 浓度的 $250 \mu\text{l}$ TCR。然后使缓冲液流过直到响应回复到基线。用 Biaevaluation 软件计算动力学参数。也将解离相拟合为单指数衰变方程式从而能计算半衰期。

[0187] 结果

[0188] 采用上述方法分析二硫键连接的可溶性亲本 VYG-A24 TCR（由 SEQ ID NO:15 和 16 分别详述的二硫键连接的可溶性 α 和 β TCR 链组成）与 VYGFVRACL-HLA-A*2402 复合物之间的相互作用，显示 K_D 为 $4 \mu\text{M}$ 。（Biacore 响应曲线见图 9）。

[0189] 实施例 5- 制备可溶性 VYG-A24 TCR-野生型人 IL-2 融合蛋白

[0190] 可用基本上如实施例 1-3 中所述的方法制备可溶性 VYG-A24 TCR-野生型（WT）人 IL-2 融合蛋白。简言之，将编码所需接头和 WT 人 IL-2 的 DNA 加到二硫键连接的可溶性 VYG-A24 TCR β 链 DNA 序列的 3' 端。图 8 提供了融合蛋白的氨基酸序列，该融合蛋白包含通过接头序列（SEQ ID NO:18）融合到 WT 人 IL-2 的二硫键连接的亲本 VYG-A24 TCR β 链。该融合蛋白的接头和 IL-2 部分用斜体表示，TCR β 中引入的半胱氨酸残基以阴影表示。然后可将编码该构建物的 DNA 连接入 pGMT7。然后可采用基本上如实施例 3 所述的方法，使该 β 链融合蛋白与图 5a 详述的二硫键连接的可溶性亲本 VYG-A24 TCR α 链（SEQ ID NO:15）相结合，从而表达此可溶性亲本 VYG-A24 TCR-IL-2 融合蛋白。

[0191] 实施例 6- 从 A6 TCR 起源的噬菌体展示文库分离与 HLA-A24-VYGFVRA CL 结合的 TCR

[0192] 采用 WO 2004/044004 所述的方法制备噬菌体展示的 TCR 文库。简言之,该文库基于对 HLA-A2-LLFGYPVYV 具有特异性的二硫键连接的可溶性 A6 TCR。利用能在所展示的 A6 TCR 的 CDR3 区域中引入突变的诱变引物产生 A6 TCR 文库的多样性。为展示 A6 TCR 文库,将噬菌粒载体构建为能表达含有异质二聚体 A6TCR(含有非天然链间二硫键)与 gIII 噬菌体包衣蛋白的融合蛋白。利用含有噬菌粒的大肠杆菌 XL-1- 蓝细胞表达此噬菌体展示的 TCR,所述噬菌粒能编码与噬菌体 gIII 蛋白融合的可溶性 A6TCR α 链和 A6TCR β 链。采用噬菌体 ELISA 方法检测噬菌体颗粒上是否存在展示的能结合 VYGFVRACL-HLA-A*2402 的功能性 TCR。然后利用编码噬菌体展示的经 ELISA 选择的 TCR 的 DNA 构建二硫键连接的可溶性 TCR。然后采用本文实施例 4 所述的 Biacore 方法评估这些可溶性 TCR 与 HLA-A24-VYGFVRACL 的结合情况。利用从该文库分离得到的 TCR β 链 (SEQ ID NO :16) 构建二硫键连接的可溶性亲代 VYG-A24TCR,该 β 链与能结合 ILAKFLHWL-HLA-A*0201 的“野生型”TCR α 链 (SEQ ID NO :15) 的二硫键连接的可溶性类似物结合。也从该文库分离得到图 10b 所示的 TCR α 链 (SEQ ID NO :20),其与图 5b 所示的 TCR β 链 (SEQ ID NO 16) 一起展示为对 VYGFVRACL-HLA-A*2402 复合物具有特异性的 $\alpha \beta$ TCR。

10 20
* *
M K N Q V E Q S P P D L I L Q E G A N S T L R C N F S D S

30 40 50
* * *
V N N L Q W F H Q N P W G Q L I N L F Y I P S G T K Q N G

60 70 80
* * *
R L S A T T V A T E R Y S L L Y I S S S Q T T D S G V Y F

90 100 110
* * *
C A V D S A T S G T Y K Y I F G T G T R L K V L A N
(SEQ ID No: 2)

图 1a

10 20
* *
M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N
30 40 50
* * *
H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q
60 70 80
* * *
G E V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T
90 100 110
* * *
S V Y F C A A E P S A E G K V Y F G P G T R L T V T
(SEQ ID No: 3)

图 1b

tatacatatgaaaaaccaagtggagcagagtcctccagacctgattctccaggagggagccaattccacgctgcggtgcaa
ttttctgactctgtgaacaatttgagtggttcatcaaaccttggggacagctcatcaacctgtttacattccctcagggac
aaaacagaatggaagattaagcgccacgactgtcgctacggaacgctacagcttattgtacatttccttcccagaccacag
actcaggcggtttatttctgtgctgtggactctgctacctcaggaacctacaatacatctttggaacaggcaccaggctgaagg
tttagcaaatatccagaacctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaagtcgagtgacaagtctgtctgcctattca
ccgattttgattctcaacaaatgtgtcacaagtaaggattctgatgttatatcacagacaaaactgtgctagacatgaggtc
tatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcatta
ttcagaagacaccttcttccccagcccagaaagttcc
(SEQ ID No: 9)

图 2a

tatacatatgaatgctggtgtaactcaaacacccaaaattccaggtcctgaagacaggacagagcatgacactgcagtgtgcc
caggatatgaacctgaatacatgtcctggtatcgacaagaccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgc
tggtatcactgaccaaggagaagtcccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggatttcccgctcaggctgctg
tcggctgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgccgtgagccttctgcggagggggaaggttacttcgggccgggcac
caggctcacggtcacagaggacctgaaaaacgtgttccaccagggtcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatctc
ccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccaccggttctacccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatg
ggaaggaggtgcacagtggggtcagcacagaccgcagccctcaaggagcagcccgccctcaatgactccagatacg
ctctgagcagccgcctgagggtctcggccaccttctggcaggacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagttctacg
ggctctcggagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaaccgctacccagatcgtcagcgccgaggcctggggta
gagcagactaagcttgaattc
(SEQ ID No: 10)

图 2b

M K N Q V E Q S P P D L I L Q E G A N S T L R C N F S D S
V N N L Q W F H Q N P W G Q L I N L F Y I P S G T K Q N G
 R L S A T T V A T E R Y S L L Y I S S S Q T T D S G V Y F
 C A V D S A T S G T Y K Y I F G T G T R L K V L A N I Q N
 P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N
 V S Q S K D S D V Y I T D K T V L D M R S M D F K S N S A
 V A W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P
 E S S
 (SEQ ID No: 11)

图 3a

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N
H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q
 G E V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T
 S V Y F C A A E P S A E G K V Y F G P G T R L T V T E D L
 K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L
 A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V S T D P Q
 P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q D P
 R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V T Q
 I V S A E A W G R A D
 (SEQ ID No: 12)

图 3b

tatacatatgaaaaaccaagtggagcagagtcctccagacctgattctccaggaggagccaattccacgctgcggtgcaa
ttttctgactctgtgaacaatttcagtggttcataaaacccttggggacagctcatcaacctgtttacattccctcaggac
aaaacagaatggaagattaagcgccacgactgtcgctacggaacgctacagcttattgtacatttcctcttcccagaccacag
actcaggcgtttatttctgtgctgtggactctgctacctcaggaacctacaatacatctttggaacaggcaccaggctgaagg
tttagcaaatatccagaacctgacctgccgtgtaccagctgagagactctaagtcgagtgacaagtctgtctgcctattca
ccgattttgattctcaacaaatgtgtcacaaagtaaggattctgatgttatatcacagacaaatgtgtgctagacatgaggtc
tatggacttcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctgactttgatgtgcaaacgccttcaacaacagcatta
ttcagaagacaccttcttcccagcccagaaagtcc

(SEQ ID No: 13)

图 4a

tatacatatgaatgctggtgtaactcaaacacaaaaattccaggtcctgaagacaggacagagcatgacactgcagtggtcc
caggatatgaacctgaatacatgtcctggtatcgacaagaccaggcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgc
tggtatcactgaccaaggagaagtcaccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggattcccgtcaggctgtg
tcggctgctccctcccagacatctgtgtacttctgtgccgtgagccttctgcggagggggaaggttacttcgggccgggcac
caggctcacggctcacagaggacctgaaaaacgtgttccaccagggtcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatctc
ccacacccaaaaggccacactggtgtgcctggccaccggtttctacccgaccacgtggagctgagctggtgggtgaatg
ggaaggaggtgcacagtggggctgtgcacagaccgcagccctcaaggagcagccgccctcaatgactccagatacg
ctctgagcagccgctgagggtctcgccaccttctggcaggacccccgaaccacttccgtgtcaagtcagttctacg
ggctctcggagaatgacgagtggaaccaggatagggccaaaccgctacccagatcgtcagcgccgaggcctggggta
gagcagactaagcttgaattc

(SEQ ID No: 14)

图 4b

M K N Q V E Q S P P D L I L Q E G A N S T L R C N F S D S
V N N L Q W F H Q N P W G Q L I N L F Y I P S G T K Q N G
R L S A T T V A T E R Y S L L Y I S S S Q T T D S G V Y F
C A V D S A T S G T Y K Y I F G T G T R L K V L A N I Q N
P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N
V S Q S K D S D V Y I T D K C V L D M R S M D F K S N S A
V A W S N K S D F A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P
E S S
(SEQ ID No: 15)

图 5a

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N
H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q
G E V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T
S V Y F C A A E P S A E G K V Y F G P G T R L T V T E D L
K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L
A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V C T D P Q
P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q D P
R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V T Q
I V S A E A W G R A D
(SEQ ID No: 16)

图 5b

I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T
D F D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K
(SEQ ID No: 4)

图 6a

E D L N K V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T
L V C L A T G F F P D H V E L S W W V N G K E V H S G V
(SEQ ID No: 5)

图 6b

E D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T
L V C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V
(SEQ ID No: 6)

图 6c

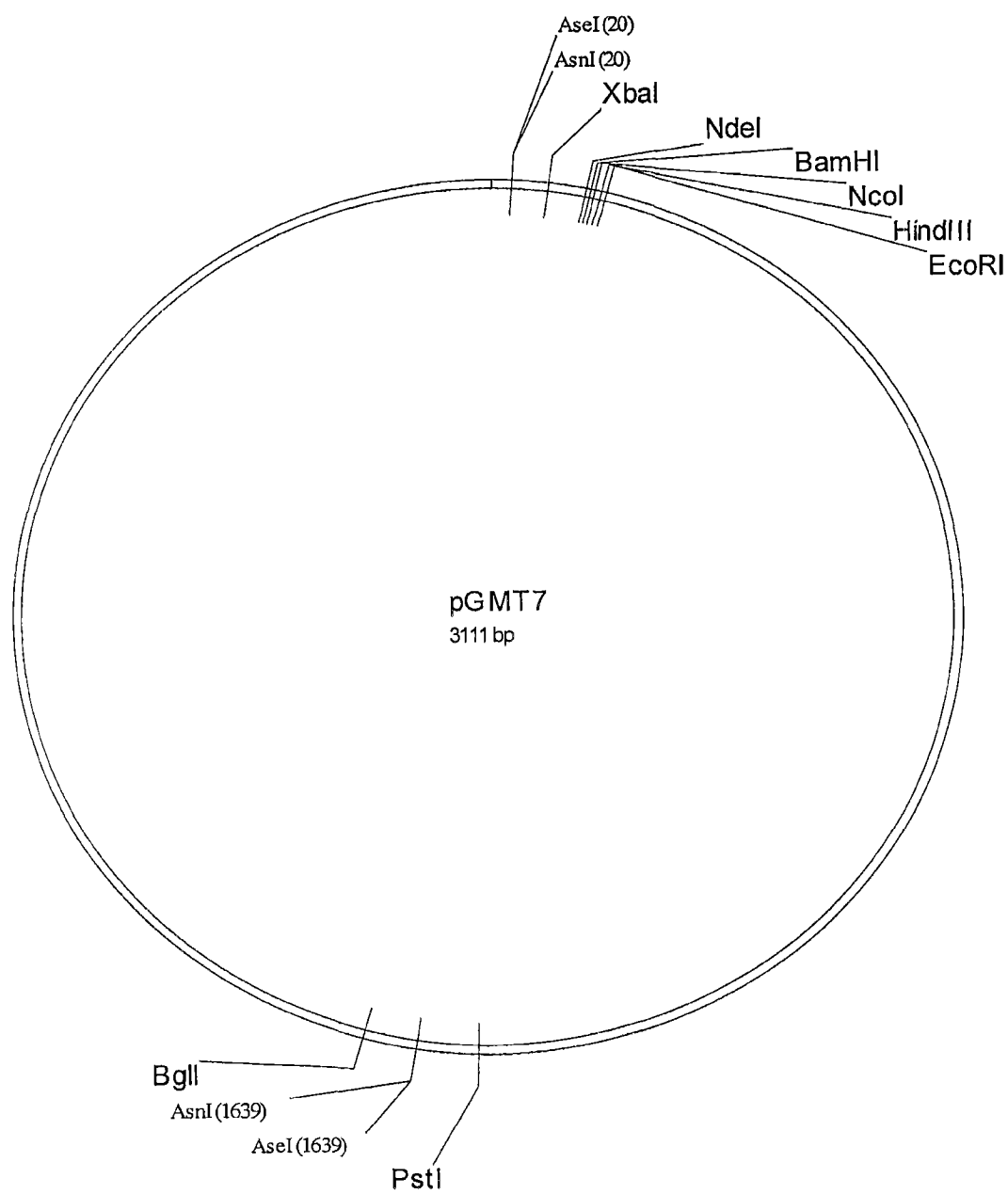


图 7a

```

1   GATCTCGATC CCGCGAAATT AATACGACTC ACTATAGGGA GACCACAACG
51  GTTTCCCTCT AGAAATAATT TTGTTTAACT TTAAGAAGGA GATATACATA
101 TGGGATCCAT GGTAAGCTTG AATTCCGATC CGGCTGCTAA CAAAGCCCGA
151 AAGGAAGCTG AGTTGGCTGC TGCCACCGCT GAGCAATAAC TAGCATAACC
201 CCTTGGGGCC TCTAAACGGG TCTTGAGGGG TTTTTTGCTG AAAGGAGGAA
251 CTATATCCGG ATAATTCTTG AAGACGAAAG GGCCTCGTGA TACGCCATT
301 TTTATAGGTT AATGTCATGA TAATAATGGT TTCTTAGACG TCAGGTGGCA
351 CTTTTCGGGG AAATGTGCGC GGAACCCCTA TTTGTTTATT TTTCTAAATA
401 CATTCAAATA TGTATCCGCT CATGAGACAA TAACCCTGAT AAATGCTTCA
451 ATAATATTTT GTTAAAATTC GCGTTAAATT TTTGTTAAAT CAGCTCATTT
501 TTTAACCAAT AGGCCGAAAT CGGCAAAATC CCTTATAAAT CAAAAGAATA
551 GACCGAGATA GGGTTGAGTG TTGTTCCAGT TTGGAACAAG AGTCCACTAT
601 TAAAGAACGT GGACTCCAAC GTCAAAGGGC GAAAAACCGT CTATCAGGGC
651 GATGGCCAC TACGTGAACC ATCACCCCTA TCAAGTTTTT TGGGGTCGAG
701 GTGCCGTAAA GCACTAAATC GGAACCCCTA AGGGAGCCCC CGATTTAGAG
751 CTTGACGGGG AAAGCCGGCG AACGTGGCGA GAAAGGAAGG GAAGAAAGCG
801 AAAGGAGCGG GCGCTAGGGC GCTGGCAAGT GTAGCGGTCA CGCTGCGCGT
851 AACCACCACA CCCGCCGCGC TTAATGCGCC GCTACAGGGC GCGTCAGGTG
901 GCACTTTTCG GGGAAATGTG CGCGGAACCC CTATTTGTTT ATTTTTCTAA
951 ATACATTCAA ATATGTATCC GCTCATGAGA CAATAACCCT GATAAATGCT
1001 TCAATAATAT TGAAAAAGGA AGAGTATGAG TATTCAACAT TTCCGTGTCG
1051 CCCTTATTCC CTTTTTTGCG GCATTTTGCC TTCCTGTTTT TGCTCACCCA
1101 GAAACGCTGG TGAAAGTAAA AGATGCTGAA GATCAGTTGG GTGCACGAGT
1151 GGGTTACATC GAACTGGATC TCAACAGCGG TAAGATCCTT GAGAGTTTTT
1201 GCCCCGAAGA ACGTTTTCCA ATGATGAGCA CTTTTAAAGT TCTGCTATGT
1251 GGCGCGGTAT TATCCCGTGT TGACGCCGGG CAAGAGCAAC TCGGTCGCCG
1301 CATACTAT TCTCAGAATG ACTTGGTGA GTACTACCA GTCACAGAAA
1351 AGCATCTTAC GGATGGCATG ACAGTAAGAG AATTATGCAG TGCTGCCATA
1401 ACCATGAGTG ATAACACTGC GGCCAACCTA CTTCTGACAA CGATCGGAGG
1451 ACCGAAGGAG CTAACCGCTT TTTTGCACAA CATGGGGGAT CATGTAACCTC
1501 GCCTTGATCG TTGGGAACCG GAGCTGAATG AAGCCATACC AAACGACGAG
1551 CGTGACACCA CGATGCCTGC AGCAATGGCA ACAACGTTGC GCAAACCTATT
1601 AACTGGCGAA CTACTTACTC TAGCTTCCCG GCAACAATTA ATAGACTGGA
1651 TGGAGGCGGA TAAAGTTGCA GGACCACTTC TGCGCTCGGC CCTTCCGGCT
1701 GGCTGGTTTA TTGCTGATAA ATCTGGAGCC GGTGAGCGTG GGTCTCGCGG
1751 TATCATTGCA GCACTGGGGC CAGATGGTAA GCCCTCCCGT ATCGTAGTTA
1801 TCTACACGAC GGGGAGTCAG GCAACTATGG ATGAACGAAA TAGACAGATC
1851 GCTGAGATAG GTGCCTCACT GATTAAGCAT TGGTAACTGT CAGACCAAGT
1901 TTAATCATAT ATACTTTAGA TTGATTTAAA ACTTCATTTT TAATTTAAAA
1951 GGATCTAGGT GAAGATCCTT TTTGATAATC TCATGACCAA AATCCCTTAA
2001 CGTGAGTTTT CGTTCCACTG AGCGTCAGAC CCCGTAGAAA AGATCAAAGG
2051 ATCTTCTTGA GATCCTTTTT TTCTGCGCGT AATCTGCTGC TTGCAAACAA

```

图 7b

```
2101 AAAAACCACC GCTACCAGCG GTGGTTTGTG TGCCGGATCA AGAGCTACCA
2151 ACTCTTTTTC CGAAGGTAAC TGGCTTCAGC AGAGCGCAGA TACCAAATAC
2201 TGTCCCTTCTA GTGTAGCCGT AGTTAGGCCA CCACTTCAAG AACTCTGTAG
2251 CACCGCCTAC ATACCTCGCT CTGCTAATCC TGTTACCAGT GGCTGCTGCC
2301 AGTGGCGATA AGTCGTGTCT TACCGGGTTG GACTCAAGAC GATAGTTACC
2351 GGATAAGGCG CAGCGGTCGG GCTGAACGGG GGGTTCGTGC ACACAGCCCA
2401 GCTTGGAGCG AACGACCTAC ACCGAACTGA GATACCTACA GCGTGAGCTA
2451 TGAGAAAGCG CCACGCTTCC CGAAGGGAGA AAGGCGGACA GGTATCCGGT
2501 AAGCGGCAGG GTCGGAACAG GAGAGCGCAC GAGGGAGCTT CCAGGGGGAA
2551 ACGCCTGGTA TCTTTATAGT CCTGTCGGGT TTCGCCACCT CTGACTTGAG
2601 CGTCGATTTT TGTGATGCTC GTCAGGGGGG CGGAGCCTAT GGAAAAACGC
2651 CAGCAACGCG GCCTTTTTTAC GGTTCTTGGC CTTTGTGCTGG CCTTTTGCTC
2701 ACATGTTCTT TCCTGCGTTA TCCCCTGATT CTGTGGATAA CCGTATTACC
2751 GCCTTTGAGT GAGCTGATAC CGCTCGCCGC AGCCGAACGA CCGAGCGCAG
2801 CGAGTCAGTG AGCGAGGAAG CGGAAGAGCG CCTGATGCGG TATTTTCTCC
2851 TTACGCATCT GTGCGGTATT TCACACCGCA ATGGTGCACT CTCAGTACAA
2901 TCTGCTCTGA TGCCGCATAG TTAAGCCAGT ATAACTCCG CTATCGCTAC
2951 GTGACTGGGT CATGGCTGCG CCCCAGACACC CGCCAACACC CGCTGACGCG
3001 CCCTGACGGG CTTGTCTGCT CCCGGCATCC GCTTACAGAC AAGCTGTGAC
3051 CGTCTCCGGG AGCTGCATGT GTCAGAGGTT TTCACCGTCA TCACCGAAAC
3101 GCGCGAGGCA G
(SEQ ID NO: 17)
```

图 7b 续

M N A G V T Q T P K F Q V L K T G Q S M T L Q C A Q D M N
 H E Y M S W Y R Q D P G M G L R L I H Y S V G A G I T D Q
 G E V P N G Y N V S R S T T E D F P L R L L S A A P S Q T
 S V Y F C A A E P S A E G K V Y F G P G T R L T V T E D L
 K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L
 A T G F Y P D H V E L S W W V N G K E V H S G V Q T D P Q
 P L K E Q P A L N D S R Y A L S S R L R V S A T F W Q D P
 R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W T Q D R A K P V T Q
 I V S A E A W G R A D P G A P T S S S T K K T Q L Q L E H
 L L L D L Q M I L N G I N N Y K N P K L T R M L T F K F Y
 M P K K A T E L K H L Q C L E E E L K P L E E V L N L A Q
 S K N F H L R P R D L I S N I N V I V L E L K G S E T T F
 M C E Y A D E T A T I V E F L N R W I T F C Q S I I S T L
 T
 (SEQ ID NO: 18)

图 8

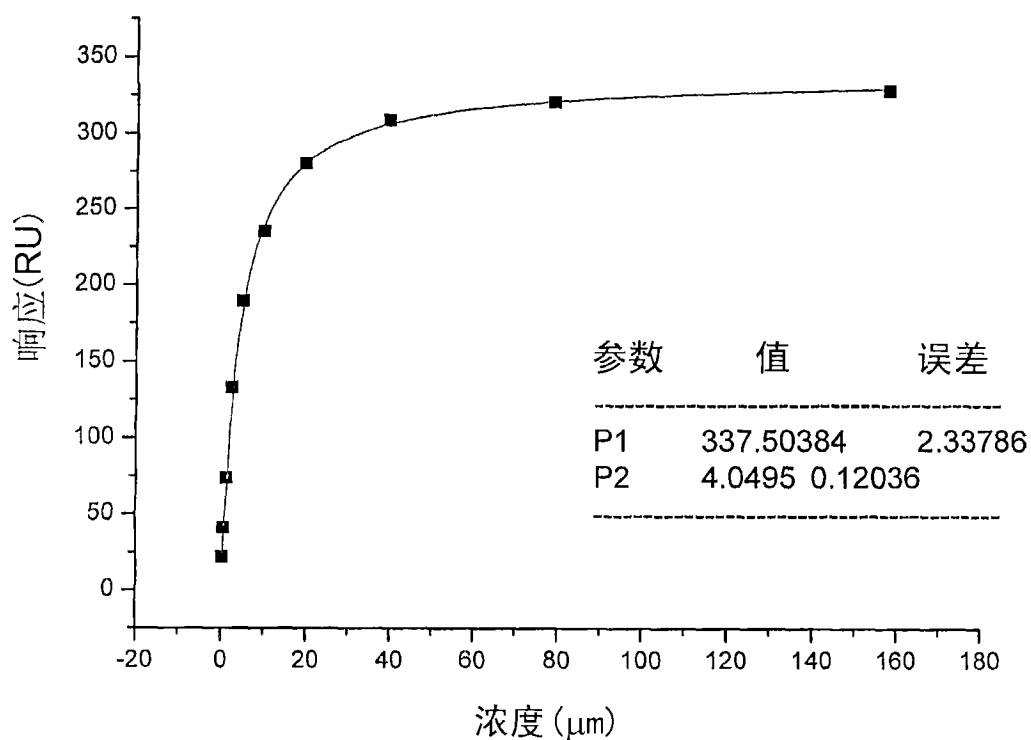


图 9

MQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSSQFFWYRQYSGKSPELIMSIYSN
GDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLTRDSQPSDSATYLCAQSQCTENQFGAGTQV
VVTPD
(SEQ ID NO: 19)

图 10a

MQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSSQFFWYRQYSGKSPELIMSIYSN
GDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLTRDSQPSDSATYLCAQSQCTENQFGAGTQV
VVTPDIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKQV
LDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSI IPEDTFFPSPSS
(SEQ ID NO: 20)

图 10b