



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 111836638 B

(45) 授权公告日 2024. 10. 29

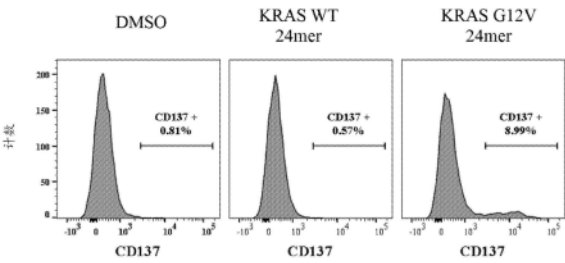
(21) 申请号 201880087270.7	(72) 发明人 拉米·约瑟夫 卢勇成 盖尔·卡弗里 史蒂文·A·罗森伯格
(22) 申请日 2018.12.03	
(65) 同一申请的已公布的文献号 申请公布号 CN 111836638 A	(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理 有限责任公司 11204 专利代理师 王达佐 洪欣
(43) 申请公布日 2020.10.27	
(30) 优先权数据 62/594,244 2017.12.04 US	(51) Int.Cl. A61K 39/00 (2006.01) C07K 14/47 (2006.01) A61K 38/17 (2006.01) C07K 14/725 (2006.01)
(85) PCT国际申请进入国家阶段日 2020.07.21	
(86) PCT国际申请的申请数据 PCT/US2018/063581 2018.12.03	(56) 对比文件 CN 107223134 A, 2017.09.29
(87) PCT国际申请的公布数据 W02019/112941 EN 2019.06.13	审查员 陈皓
(73) 专利权人 美国卫生和人力服务部 地址 美国马里兰州	权利要求书7页 说明书25页 序列表20页 附图6页

(54) 发明名称

针对突变的RAS的HLA I类限制性T细胞受体

(57) 摘要

本申请公开了分离的或纯化的T细胞受体 (TCR), 其中所述TCR对人白细胞抗原 (HLA) I类分子呈递的突变的RAS氨基酸序列具有抗原特异性。还提供了相关的多肽和蛋白质, 以及相关的核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群和药物组合物。还公开了检测哺乳动物中癌症的存在的方法以及治疗或预防哺乳动物中的癌症的方法。



1. 分离的或纯化的T细胞受体 (TCR), 其包含:

(i) 氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的 α 链互补决定区 (CDR) 1, 氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的 α 链CDR2, 以及氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的 α 链CDR3, 和

(ii) 氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示的 β 链CDR1, 氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的 β 链CDR2, 以及氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示的 β 链CDR3,

其中所述TCR对由人白细胞抗原 (HLA) I类分子呈递的突变的人RAS氨基酸序列具有抗原特异性。

2. 如权利要求1所述的TCR, 其包含人可变区。

3. 如权利要求1或2所述的TCR, 其包含:

(i) 与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列;

(ii) 与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列;

(iii) 与SEQ ID NO:7的氨基酸22-137至少99%相同的氨基酸序列;

(iv) 与SEQ ID NO:8的氨基酸22-133至少99%相同的氨基酸序列; 或者

(v) (i) 和 (ii) 两者; (i) 和 (iv) 两者; (ii) 和 (iii) 两者; 或者 (iii) 和 (iv) 两者。

4. 如权利要求1-3任一项所述的TCR, 其包含:

(i) SEQ ID NO:7的氨基酸序列;

(ii) SEQ ID NO:8的氨基酸序列;

(iii) SEQ ID NO:7的氨基酸22-137;

(iv) SEQ ID NO:8的氨基酸22-133; 或者

(v) (i) 和 (ii) 两者; (i) 和 (iv) 两者; (ii) 和 (iii) 两者; 或者 (iii) 和 (iv) 两者。

5. 如权利要求1-4任一项所述的TCR, 其还包含:

(a) α 链恒定区, 所述 α 链恒定区包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列, 其中:

(i) SEQ ID NO:17的第48位的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:17的第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:17的第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 以及

(iv) SEQ ID NO:17的第115位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) β 链恒定区, 所述 β 链恒定区包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列, 其中SEQ ID NO:18的第57位的X是Ser或Cys; 或者

(c) (a) 和 (b) 两者。

6. 如权利要求1-5任一项所述的TCR, 其还包含:

(a) α 链恒定区, 所述 α 链恒定区包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列, 其中:

(i) SEQ ID NO:17的第48位的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:17的第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:17的第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 以及

(iv) SEQ ID NO:17的第115位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) β 链恒定区, 所述 β 链恒定区包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列的, 其中SEQ ID NO:18的第57位的X是Ser或Cys; 或者

(c) (a) 和 (b) 两者。

7. 如权利要求1-6任一项所述的分离的或纯化的TCR,其包含:

(a) α 链,所述 α 链包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:21的第185位的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:21的第249位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:21的第251位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及

(iv) SEQ ID NO:21的第252位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) β 链,所述 β 链包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22的第190位的X是Ser或Cys;

(c) α 链,所述 α 链包含与SEQ ID NO:21的氨基酸22-274至少99%相同的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:21的第185位的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:21的第249位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:21的第251位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及

(iv) SEQ ID NO:21的第252位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(d) β 链,所述 β 链包含与SEQ ID NO:22的氨基酸22-306至少99%相同的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22的第190位的X是Ser或Cys;或者

(e) (a) 和 (b) 两者; (a) 和 (d) 两者; (b) 和 (c) 两者;或者 (c) 和 (d) 两者。

8. 如权利要求1-7任一项所述的分离的或纯化的TCR,其包含:

(a) α 链,所述 α 链包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:21的第185位的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:21的第249位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:21的第251位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及

(iv) SEQ ID NO:21的第252位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) β 链,所述 β 链包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22的第190位的X是Ser或Cys;

(c) α 链,所述 α 链包含SEQ ID NO:21的氨基酸22-274,其中:

(i) SEQ ID NO:21的第185位的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:21的第249位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:21的第251位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及

(iv) SEQ ID NO:21的第252位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(d) β 链,所述 β 链包含SEQ ID NO:22的氨基酸22-306,其中SEQ ID NO:22的第190位的X是Ser或Cys;或者

(e) (a) 和 (b) 两者; (a) 和 (d) 两者; (b) 和 (c) 两者;或者 (c) 和 (d) 两者。

9. 分离的或纯化的多肽,其包含权利要求1-8中任一项所述的TCR的功能部分,其中所述功能部分包含:

(i) 氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的 α 链CDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的 α 链CDR2,以及氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的 α 链CDR3,和

(ii) 氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示的 β 链CDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的 β 链

CDR2,以及氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示的β链CDR3,

其中所述功能部分对由HLA I类分子呈递的突变的人RAS氨基酸序列具有抗原特异性。

10. 如权利要求9所述的分离的或纯化的多肽,其中所述功能部分包含:

- (i) 与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列;
- (ii) 与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列;
- (iii) 与SEQ ID NO:7的氨基酸22-137至少99%相同的氨基酸序列;
- (iv) 与SEQ ID NO:8的氨基酸22-133至少99%相同的氨基酸序列;或
- (v) (i) 和(ii) 两者; (i) 和(iv) 两者; (ii) 和(iii) 两者;或者(iii) 和(iv) 两者。

11. 如权利要求9或10所述的分离的或纯化的多肽,其中所述功能部分包含:

- (i) SEQ ID NO:7的氨基酸序列;
- (ii) SEQ ID NO:8的氨基酸序列;
- (iii) SEQ ID NO:7的氨基酸22-137;
- (iv) SEQ ID NO:8的氨基酸22-133;或者
- (v) (i) 和(ii) 两者; (i) 和(iv) 两者; (ii) 和(iii) 两者;或者(iii) 和(iv) 两者。

12. 如权利要求9-11任一项所述的分离的或纯化的多肽,其中所述功能部分包含:

- (a) 与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列,其中:
 - (i) SEQ ID NO:17的第48位的X是Thr或Cys;
 - (ii) SEQ ID NO:17的第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
 - (iii) SEQ ID NO:17的第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及
 - (iv) SEQ ID NO:17的第115位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (b) 与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:18的第57位的X是Ser或Cys;或者
- (c) (a) 和(b) 两者。

13. 如权利要求9-12任一项所述的分离的或纯化的多肽,其中所述功能部分包含:

- (a) SEQ ID NO:17的氨基酸序列,其中:
 - (i) SEQ ID NO:17的第48位的X是Thr或Cys;
 - (ii) SEQ ID NO:17的第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
 - (iii) SEQ ID NO:17的第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及
 - (iv) SEQ ID NO:17的第115位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (b) SEQ ID NO:18的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:18的第57位的X是Ser或Cys;或者
- (c) (a) 和(b) 两者。

14. 如权利要求9-13任一项所述的分离的或纯化的多肽,其包含:

- (a) 与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列,其中:
 - (i) SEQ ID NO:21的第185位的X是Thr或Cys;
 - (ii) SEQ ID NO:21的第249位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
 - (iii) SEQ ID NO:21的第251位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及
 - (iv) SEQ ID NO:21的第252位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (b) 与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22的第190位的X是Ser或Cys;

(c) 与SEQ ID NO:21的氨基酸22-274至少99%相同的氨基酸序列,其中:
(i) SEQ ID NO:21的第185位的X是Thr或Cys;
(ii) SEQ ID NO:21的第249位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
(iii) SEQ ID NO:21的第251位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及
(iv) SEQ ID NO:21的第252位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
(d) 与SEQ ID NO:22的氨基酸22-306至少99%相同的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22的第190位的X是Ser或Cys;或者

(e) (a) 和 (b) 两者; (a) 和 (d) 两者; (b) 和 (c) 两者; 或者 (c) 和 (d) 两者。

15. 如权利要求9-14任一项所述的分离的或纯化的多肽,其包含:

(a) SEQ ID NO:21的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:21的第185位的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:21的第249位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:21的第251位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及

(iv) SEQ ID NO:21的第252位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) SEQ ID NO:22的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22的第190位的X是Ser或Cys;

(c) SEQ ID NO:21的氨基酸22-274,其中:

(i) SEQ ID NO:21的第185位的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:21的第249位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:21的第251位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及

(iv) SEQ ID NO:21的第252位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(d) SEQ ID NO:22的氨基酸22-306,其中SEQ ID NO:22的第190位的X是Ser或Cys;或者

(e) (a) 和 (b) 两者; (a) 和 (d) 两者; (b) 和 (c) 两者; 或者 (c) 和 (d) 两者。

16. 分离的或纯化的蛋白,其包含:

(i) 包含以下的第一多肽链:氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示的 α 链CDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO:2所示的 α 链CDR2,以及氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示的 α 链CDR3;和

(ii) 包含以下的第二多肽链:氨基酸序列如SEQ ID NO:4所示的 β 链CDR1,氨基酸序列如SEQ ID NO:5所示的 β 链CDR2,以及氨基酸序列如SEQ ID NO:6所示的 β 链CDR3,

其中所述蛋白对由人白细胞抗原 (HLA) I类分子呈递的突变的人RAS氨基酸序列具有抗原特异性。

17. 如权利要求16所述的分离的或纯化的蛋白,其中:

(i) 所述第一多肽链含有与SEQ ID NO:7的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列;

(ii) 所述第二多肽链含有与SEQ ID NO:8的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列;

(iii) 所述第一多肽链含有与SEQ ID NO:7的氨基酸22-137至少99%相同的氨基酸序列;

(iv) 所述第二多肽链含有与SEQ ID NO:8的氨基酸22-133至少99%相同的氨基酸序列;或者

(v) (i) 和 (ii) 两者; (i) 和 (iv) 两者; (ii) 和 (iii) 两者; 或 (iii) 和 (iv) 两者。

18. 如权利要求16或17所述的分离的或纯化的蛋白,其中:

(i) 所述第一多肽链含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列;

- (ii) 所述第二多肽链含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列;
- (iii) 所述第一多肽链含有SEQ ID NO:7的氨基酸22-137;
- (iv) 所述第二多肽链含有SEQ ID NO:8的氨基酸22-133;或者
- (v) (i) 和(ii) 两者; (i) 和(iv) 两者; (ii) 和(iii) 两者; 或(iii) 和(iv) 两者。

19. 如权利要求16-18任一项所述的分离或纯化的蛋白, 其中:

(a) 所述第一多肽链包含与SEQ ID NO:17的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列, 其中:

- (i) SEQ ID NO:17的第48位的X是Thr或Cys;
- (ii) SEQ ID NO:17的第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (iii) SEQ ID NO:17的第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 以及
- (iv) SEQ ID NO:17的第115位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) 所述第二多肽链包含与SEQ ID NO:18的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列, 其中SEQ ID NO:18的第57位的X是Ser或Cys; 或者

(c) (a) 和(b) 两者。

20. 如权利要求16-19任一项所述的分离或纯化的蛋白, 其中:

(a) 所述第一多肽链包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列, 其中:

- (i) SEQ ID NO:17的第48位的X是Thr或Cys;
- (ii) SEQ ID NO:17的第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (iii) SEQ ID NO:17的第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 以及
- (iv) SEQ ID NO:17的第115位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) 所述第二多肽链包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列, 其中SEQ ID NO:18的第57位的X是Ser或Cys; 或者

(c) (a) 和(b) 两者。

21. 如权利要求16-20任一项所述的分离的或纯化的蛋白, 其中:

(a) 所述第一多肽链包含与SEQ ID NO:21的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列, 其中:

- (i) SEQ ID NO:21的第185位的X是Thr或Cys;
- (ii) SEQ ID NO:21的第249位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (iii) SEQ ID NO:21的第251位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 以及
- (iv) SEQ ID NO:21的第252位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) 所述第二多肽链包含与SEQ ID NO:22的氨基酸序列至少99%相同的氨基酸序列, 其中SEQ ID NO:22的第190位的X是Ser或Cys;

(c) 所述第一多肽链包含与SEQ ID NO:21的氨基酸22-274至少99%相同的氨基酸序列, 其中:

- (i) SEQ ID NO:21的第185位的X是Thr或Cys;
- (ii) SEQ ID NO:21的第249位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (iii) SEQ ID NO:21的第251位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 以及
- (iv) SEQ ID NO:21的第252位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (d) 所述第二多肽链包含与SEQ ID NO:22的氨基酸22-306至少99%相同的氨基酸序

列,其中SEQ ID NO:22的第190位的X是Ser或Cys;或者

(e) (a) 和 (b) 两者; (a) 和 (d) 两者; (b) 和 (c) 两者;或者 (c) 和 (d) 两者。

22. 如权利要求16-21任一项所述的分离的或纯化的蛋白,其中:

(a) 所述第一多肽链包含SEQ ID NO:21的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:21的第185位的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:21的第249位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:21的第251位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及

(iv) SEQ ID NO:21的第252位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) 所述第二多肽链包含SEQ ID NO:22的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22的第190位的X是Ser或Cys;

(c) 所述第一多肽链包含SEQ ID NO:21的氨基酸22-274,其中:

(i) SEQ ID NO:21的第185位的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:21的第249位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:21的第251位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及

(iv) SEQ ID NO:21的第252位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(d) 所述第二多肽链包含SEQ ID NO:22的氨基酸22-306,其中SEQ ID NO:22的第190位的X是Ser或Cys;或者

(e) (a) 和 (b) 两者; (a) 和 (d) 两者; (b) 和 (c) 两者;或者 (c) 和 (d) 两者。

23. 如权利要求1-22任一项所述的TCR、分离的或纯化的多肽、或分离的或纯化的蛋白,其中所述突变的人RAS氨基酸序列是突变的人Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(KRAS)、突变的人Harvey大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(HRAS)或突变的人神经母细胞瘤大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(NRAS)氨基酸序列。

24. 如权利要求23所述的TCR、分离的或纯化的多肽、或分离的或纯化的蛋白,其中所述突变的人RAS氨基酸序列的氨基酸序列包含SEQ ID NO:29或30,或者由SEQ ID NO:29或30组成。

25. 如权利要求1-24任一项所述的TCR、分离的或纯化的多肽、或分离的或纯化的蛋白,其中所述HLA I类分子是HLA-A分子。

26. 如权利要求1-24任一项所述的TCR、分离的或纯化的多肽、或分离的或纯化的蛋白,其中所述HLAI类分子是HLA-A11分子。

27. 如权利要求1-24任一项所述的TCR、分离的或纯化的多肽、或分离的或纯化的蛋白,其中所述HLAI类分子是HLA-A*11:01分子。

28. 如权利要求1-24任一项所述的TCR、分离的或纯化的多肽、或分离的或纯化的蛋白,其中所述突变的人RAS氨基酸序列包括在第12位的甘氨酸被取代的野生型人KRAS、野生型人HRAS或野生型人NRAS氨基酸序列,其中第12位是通过分别参照野生型人KRAS、野生型人HRAS或野生型人NRAS蛋白来定义的。

29. 如权利要求28所述的TCR、分离的或纯化的多肽、或分离的或纯化的蛋白,其中所述取代是第12位的甘氨酸被缬氨酸取代。

30. 分离的或纯化的核酸,其包含编码权利要求1-8中任一项所述的TCR、权利要求9-15中任一项所述的多肽或权利要求16-22中任一项所述的蛋白的核苷酸序列。

31. 重组表达载体,其包含权利要求30所述的核酸。

32. 分离的或纯化的宿主细胞,其包含权利要求31所述的重组表达载体。

33. 分离的或纯化的细胞群,其包含权利要求32所述的宿主细胞。

34. 药物组合物,其包含 (a) 权利要求1-8中任一项所述的TCR、权利要求9-15中任一项所述的多肽、权利要求16-22中任一项所述的蛋白、权利要求30所述的核酸、权利要求31所述的重组表达载体、权利要求32所述的宿主细胞或权利要求33所述的细胞群;以及 (b) 药学上可接受的载体。

35. 权利要求1-8中任一项所述的TCR、权利要求9-15中任一项所述的多肽、权利要求16-22中任一项所述的蛋白、权利要求30所述的核酸、权利要求31所述的重组表达载体、权利要求32所述的宿主细胞、或权利要求33所述的细胞群或权利要求34所述的药物组合物在制备用于检测、治疗或预防哺乳动物的癌症的药物中的用途。

36. 如权利要求35所述的用途,其中所述癌症表达突变的人RAS氨基酸序列,其中所述突变的人RAS氨基酸序列是突变的人KRAS氨基酸序列、突变的人HRAS氨基酸序列或突变的人NRAS氨基酸序列。

37. 如权利要求36所述的用途,其中所述突变的人RAS氨基酸序列包括第12位的甘氨酸被取代的野生型人KRAS、野生型人HRAS或野生型人NRAS氨基酸序列,其中第12位是通过分别参照所述野生型人KRAS氨基酸序列、野生型人HRAS氨基酸序列或野生型人NRAS氨基酸序列来定义的。

38. 如权利要求37所述的用途,其中所述取代是用缬氨酸取代第12位的甘氨酸。

39. 如权利要求36-38中任一项所述的用途,其中所述突变的人RAS氨基酸序列是突变的人Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (KRAS) 氨基酸序列。

40. 如权利要求36-38中任一项所述的用途,其中所述突变的人RAS氨基酸序列是突变的人神经母细胞瘤大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (NRAS) 氨基酸序列。

41. 如权利要求36-38中任一项所述的用途,其中所述突变的人RAS氨基酸序列是突变的人Harvey大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (HRAS) 氨基酸序列。

42. 如权利要求36-38中任一项所述的用途,其中所述癌症是胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌或前列腺癌。

针对突变的RAS的HLA I类限制性T细胞受体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2017年12月4日提交的美国临时专利申请第62/594,244号的权益,该美国临时专利申请在本文中通过引用以其整体并入。

[0003] 关于联邦政府资助的研究和开发的声明

[0004] 本发明是在政府支持下由国立卫生研究院的国家癌症研究所完成,项目编号为BC010985。政府享有本发明的某些权利。以电子方式提交的材料通过引用并入

[0005] 通过引用整体并入本文的是随本文同时提交的并且如下确定的计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表:名称为“741039_ST25.txt”,日期为2018年12月3日的一份37,098字节ASCII(文本)文件。

[0006] 发明背景

[0007] 一些癌症可具有十分有限的治疗选择,尤其在癌症变为转移性及不可切除时。尽管诸如例如手术、化学疗法及放射疗法的治疗已经取得进展,但许多癌症(诸如例如胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌和前列腺癌)的预后可能较差。因此,存在对癌症的另外治疗的未满足的需求。

[0008] 发明简述

[0009] 本发明的实施方案提供了分离的或纯化的T细胞受体(TCR),其包含(i) SEQ ID NO:1-3、(ii) SEQ ID NO:4-6或(iii) SEQ ID NO:1-6的氨基酸序列,其中所述TCR对由人白细胞抗原(HLA) I类分子呈递的突变的人RAS氨基酸序列具有抗原特异性,并且其中所述突变的人RAS氨基酸序列是突变的人Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(KRAS)氨基酸序列、突变的人Harvey大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(HRAS)氨基酸序列或突变的人神经母细胞瘤大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(NRAS)氨基酸序列。

[0010] 本发明的另一实施方案提供了分离的或纯化的多肽,其包含本发明TCR的功能部分,其中所述功能部分包含以下氨基酸序列:(a) 全部SEQ ID NO:1-3, (b) 全部SEQ ID NO:4-6,或(c) 全部SEQ ID NO:1-6。

[0011] 本发明的另一实施方案提供了包含至少一种本发明多肽的分离的或纯化的蛋白。

[0012] 本发明的其它实施方案提供了与本发明的TCR、多肽及蛋白相关的核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群体和药物组合物。

[0013] 本发明的实施方案还提供了检测哺乳动物中癌症的存在的方法以及治疗或预防哺乳动物中癌症的方法。

[0014] 附图中几个视图的简要说明

[0015] 图1A描述了示例在与二甲基亚砜(DMSO)或者用KRAS WT24-mer肽或KRAS G12V 24-mer肽脉冲的自体DC共培养后,外周血CD8⁺T细胞的CD137表达的图。方框中的数字表示在每种共培养条件下表达CD137的T细胞的百分比。

[0016] 图1B是显示在T细胞与用DMSO、KRAS WT 24-mer肽或KRAS G12V 24-mer肽脉冲的自体DC共培养后,每 2×10^4 个细胞的IFN- γ 斑点数目的图。用PMA:离子霉素培养的T细胞以及用DMSO脉冲的DC培养的T细胞作为对照。

[0017] 图2显示了描述实验数据的图(点图),示例了已经用结合KRAS G12V四聚体-别藻蓝素(APC)或KRAS G12V四聚体-藻红蛋白(PE)的KRAS G12V 24-mer肽进行IVS的CD8+外周血细胞的百分比(右图)。左图显示了已被修饰以表达TCR的T细胞,该TCR在HLA-A*11:01的背景下识别KRAS G12D 10-mer,其与KRAS G12V四聚体-APC或KRAS G12V四聚体-PE结合。

[0018] 图3描述了显示用实施例2的TCR转导的来自第一供体和第二供体(分别为左图和右图)的同种异体T细胞表面上TCR表达的图,如通过流式细胞术通过对鼠TCR β 链恒定区(mTCR β)染色所测量的。方框中的数字表示mTCR β 表达阳性的细胞的百分比。

[0019] 图4的图显示了与表达不同KRAS^{G12}突变的癌细胞系共培养过夜后,用实施例2的TCR转导的来自两个不同供体(供体1和供体2)的T细胞的IFN- γ 产生(如通过ELISPOT测定法测量的(IFN- γ 斑点/2E4个细胞)以及4-1BB表达(%mTCR β +CD137+)。每个靶癌细胞系未转导或用HLA-A*11:01转导。“>”表示大于500个斑点。

[0020] 图5A是显示在将用实施例2的TCR转导的T细胞与用指示浓度(ng/mL)的KRAS G12V 9-mer肽(实心圆)或KRAS WT 9-mer肽(空心圆)脉冲的靶细胞共培养后分泌的IFN- γ 的浓度(pg/mL)的图。

[0021] 图5B是显示在将用实施例2的TCR转导的T细胞与用指示浓度(ng/mL)的KRAS G12V 10-mer肽(实心圆)或KRAS WT 10-mer肽(空心圆)脉冲的靶细胞共培养后分泌的IFN- γ 的浓度(pg/mL)的图。

[0022] 发明详述

[0023] RAS家族蛋白属于小GTPase的大家族。不受特定理论或机制的束缚,认为在突变时,RAS蛋白可参与许多人类癌症的瘤形成早期的信号转导。单个氨基酸取代可活化蛋白质。突变的RAS蛋白产物可组成型活化。突变的RAS蛋白可在多种人类癌症(诸如例如胰腺癌(例如胰腺癌)、结肠直肠癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫内膜癌、卵巢癌(例如上皮卵巢癌)和前列腺癌)中的任一种中表达。人RAS家族蛋白包括Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(KRAS)、Harvey大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(HRAS)和神经母细胞瘤大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(NRAS)。

[0024] KRAS也被称为GTPase KRas、V-Ki-Ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因或KRAS2。存在KRAS的两种转录物变体:KRAS变体A和KRAS变体B。野生型(WT)KRAS变体A具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列。野生型(WT)KRAS变体B具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列。在下文中,除非另外指定,否则提及“KRAS”(突变的或未突变的(WT))是指变体A和变体B。在活化时,突变的KRAS结合鸟苷-5'-三磷酸(GTP)并将GTP转化成鸟苷-5'-二磷酸(GDP)。

[0025] HRAS是RAS蛋白家族的另一成员。HRAS也被称为Harvey大鼠肉瘤病毒癌蛋白、V-Ha-Ras Harvey大鼠肉瘤病毒癌基因同源物或Ras家族小GTP结合蛋白H-Ras。WT HRAS具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列。

[0026] NRAS是RAS蛋白家族的再一成员。NRAS也被称为GTPase NRas、V-Ras神经母细胞瘤RAS病毒癌基因同源物或NRAS1。WT NRAS具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列。

[0027] 本发明的实施方案提供了分离的或纯化的TCR,其对由人白细胞抗原(HLA) I类分子呈递的突变的人RAS氨基酸序列(在下文称“突变的RAS”)具有抗原特异性,其中突变的人RAS氨基酸序列是突变的人KRAS、突变的人HRAS或突变的人NRAS氨基酸序列。在下文中,除非另外指定,否则所提及的“TCR”也是指TCR的功能部分和功能变体。

[0028] 本发明的TCR可对任何突变的人RAS蛋白、多肽或肽氨基酸序列具有抗原特异性。在本发明的实施方案中,突变的人RAS氨基酸序列是突变的人KRAS氨基酸序列、突变的人HRAS氨基酸序列或突变的人NRAS氨基酸序列。WT人KRAS、NRAS和HRAS蛋白的氨基酸序列各自具有188-189个氨基酸残基的长度且彼此具有高度同一性。例如,WT人NRAS蛋白的氨基酸序列与WT人KRAS蛋白的氨基酸序列是86.8%相同的。WT人NRAS蛋白与WT人KRAS蛋白的氨基酸残基1-86是100%相同的。WT人HRAS蛋白的氨基酸序列与WT人KRAS蛋白的氨基酸序列是86.3%相同的。WT人HRAS蛋白与WT人KRAS蛋白的氨基酸残基1-94是100%相同的。在下文中,除非另外指定,否则所提及的“RAS”(突变的或未突变的(WT))统称为KRAS、HRAS和NRAS。

[0029] 在本发明的实施方案中,突变的人RAS氨基酸序列包括在第12位的甘氨酸被取代的WT RAS氨基酸序列,其中第12位是通过分别参照WT RAS蛋白来限定的。WT RAS蛋白可以是WT KRAS蛋白(SEQ ID NO:9或10)、WT HRAS蛋白(SEQ ID NO:11)或WT NRAS蛋白(SEQ ID NO:12)中的任一种,这是因为如上文所阐释的,WT人NRAS蛋白和WT人KRAS蛋白的氨基酸残基1-86是100%相同的,且WT人HRAS蛋白和WT人KRAS蛋白的氨基酸残基1-94是100%相同的。因此,WT KRAS、WT HRAS及WT NRAS蛋白中每一种的第12位的氨基酸残基是相同的,也就是甘氨酸。

[0030] WT RAS氨基酸序列的第12位的甘氨酸可以用除甘氨酸外的任意氨基酸残基取代。在本发明的实施方案中,所述取代是用缬氨酸取代WT RAS氨基酸序列的第12位的甘氨酸。在这方面,本发明的实施方案提供了对具有G12V突变的任何WT RAS蛋白、多肽或肽氨基酸序列具有抗原特异性的TCR。

[0031] 在本文中,通过参照WT RAS蛋白的氨基酸序列来限定RAS的突变和取代。因此,在本文中,通过参照存在于WT RAS蛋白中特定位置的氨基酸残基,随后是位置编号,随后是以所述特定突变或取代中代替该残基的氨基酸残基来描述RAS的突变和取代。RAS氨基酸序列(例如RAS肽)可以包含少于全长WT RAS蛋白的所有氨基酸残基的氨基酸残基。因此,在理解相应残基在RAS氨基酸序列的特定实例中的实际位置可以是不同的情况下,在本文中,通过参照WT全长RAS蛋白(即SEQ ID NO:9-12中的任一个)来限定第12位。在位置是如通过SEQ ID NO:9-12中任一个所限定时,术语“G12”是指通常存在于SEQ ID NO:9-12中任一个的第12位的甘氨酸,并且“G12V”指示通常存在于SEQ ID NO:9-12中任一个的第12位的甘氨酸由缬氨酸代替。例如,在RAS氨基酸序列的特定实例是例如TEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLI(SEQ ID NO:28)(对应于SEQ ID NO:9的连续氨基酸残基2至24的示例性WT KRAS肽)时,“G12V”是指SEQ ID NO:28中加下划线的甘氨酸被缬氨酸取代,即使SEQ ID NO:28中加下划线的甘氨酸的实际位置为11。

[0032] 具有G12V突变的全长RAS蛋白的实例示于以下表1中。

[0033] 表1

[0034]	突变的全长RAS蛋白	SEQ ID NO:
	G12V KRAS变体A	13
	G12V KRAS变体B	14
	G12V HRAS	15
	G12V NRAS	16

[0035] 在本发明的实施方案中,TCR对具有上述G12V突变的RAS肽具有抗原特异性,其中

突变的RAS肽具有任意长度。在本发明的实施方案中,突变的RAS肽具有适合于结合本文所述的任何HLA I类分子的任何长度。例如,TCR可以对具有G12V突变的RAS肽具有抗原特异性,所述RAS肽具有约9个至约10个氨基酸残基的长度。突变的RAS肽可以包含包括G12V突变的突变的RAS蛋白的任何连续的氨基酸残基。在本发明的实施方案中,TCR可以对具有G12V突变的RAS肽具有抗原特异性,所述突变的RAS肽具有约9个氨基酸残基或约10个氨基酸残基的长度。可以被本发明的G12V TCR识别的各自具有G12V突变的特定肽的实例是9-mer VVGAVGVGK (SEQ ID NO:29) 和10-mer VVGAVGVGK。

[0036] 在本发明的实施方案中,本发明的TCR能够识别由HLA I类分子呈递的突变的RAS。在这方面,TCR可以在HLA I类分子的背景下结合突变的RAS时引发免疫应答。除突变的RAS外,本发明的TCR还可以结合HLA I类分子。

[0037] 在本发明的实施方案中,HLA I类分子是HLA-A分子。HLA-A分子是 α 链和 β 2微球蛋白的异二聚体。HLA-A α 链可以由HLA-A基因编码。 β 2微球蛋白非共价地结合 α 链的 α 1、 α 2和 α 3结构域,以构建HLA-A复合物。HLA-A分子可以是任何HLA-A分子。在本发明的实施方案中,HLA I类分子是HLA-A11分子。HLA-A11分子可以是任何HLA-A11分子。HLA-A11分子的实例可包括但不限于HLA-A*11:01、HLA-A*11:02、HLA-A*11:03或HLA-A*11:04。优选地,HLA I类分子是HLA-A*11:01分子。

[0038] 本发明的TCR可以提供多种优点中的任何一种或多种,包括在由细胞表达时用于过继性细胞转移。突变的RAS由癌细胞表达且不由正常非瘤性细胞表达。不受特定理论或机制的束缚,认为本发明的TCR有利地靶向癌细胞的破坏,同时最小化或消除正常非瘤性细胞的破坏,从而减小(例如最小化或消除)毒性。此外,本发明的TCR可以有利地、成功地治疗或预防对其他类型的治疗(诸如例如化学疗法、手术或放射)无反应的突变的RAS阳性的癌症。RAS^{G12}突变是在许多癌症类型中发现的最常见的热点突变之一。例如,KRAS G12V突变分别在约27%和约9%的胰腺癌和结肠直肠癌患者中表达。而且,RAS家族成员在不同癌症类型(例如黑色素瘤中的NRAS)中共用G12热点突变。另外,本发明的TCR可以提供对突变的RAS的高度亲合识别,这可以提供识别未经处理的肿瘤细胞(例如未用干扰素(IFN)- γ 处理的、未用编码突变的RAS和HLA-A*11:01中的一个或两个的载体转染的、未用具有G12V突变的RAS肽脉冲的或其组合处理的肿瘤细胞)的能力。此外,HLA-A*11:01等位基因分别在约14%和约9%的白种人和西班牙裔种族中表达。在美国,HLA-A*11:01等位基因由多达约45%的亚洲种族表达。因此,本发明的TCR可以增加符合免疫疗法条件的癌症患者的数量以包括表达HLA-A*11:01等位基因的那些患者,其可能不适用于使用识别由其它MHC分子所呈递的RAS的TCR的免疫疗法。此外,本发明的TCR、多肽和蛋白质包含人氨基酸序列,与例如包含小鼠氨基酸序列的TCR、多肽和蛋白质相比,其可以降低人免疫系统排斥的风险。

[0039] 本文所用的短语“抗原特异性”意指TCR能够以高亲合力特异性结合且免疫性识别突变的RAS。例如,如果在与(a)用低浓度突变的RAS肽(例如约0.05ng/mL至约10ng/mL、1ng/mL、2ng/mL、5ng/mL、8ng/mL、10ng/mL或通过前述值中的任两个限定的范围)脉冲的抗原阴性、HLA I类分子阳性靶细胞或(b)已引入编码突变的RAS的核苷酸序列以便靶细胞表达突变的RAS的抗原阴性、HLA I类分子阳性靶细胞一起共培养时,约 1×10^4 至约 1×10^5 个表达TCR的T细胞分泌至少约200pg/mL或更多(例如200pg/mL或更多、300pg/mL或更多、400pg/mL或更多、500pg/mL或更多、600pg/mL或更多、700pg/mL或更多、1000pg/mL或更多、5,000pg/

mL或更多、7,000pg/mL或更多、10,000pg/mL或更多、20,000pg/mL或更多或者通过前述值中的任两个限定的范围)的IFN- γ ,则TCR可以被认为对突变的RAS具有“抗原特异性”。表达本发明TCR的细胞也可以在与用较高浓度的突变的RAS肽脉冲的抗原阴性、HLA I类分子阳性靶细胞共培养时分泌IFN- γ 。HLA I类分子可以是本文所述的任何HLA I类分子(例如HLA-A*11:01分子)。

[0040] 可选地或另外地,如果在与(a)用低浓度突变的RAS肽脉冲的抗原阴性、HLA I类分子阳性靶细胞或(b)已引入编码突变的RAS的核苷酸序列以便靶细胞表达突变的RAS的抗原阴性、HLA I类分子阳性靶细胞共培养时,表达TCR的T细胞分泌的IFN- γ 是通过阴性对照表达的IFN- γ 的量的至少两倍,则TCR可以被认为对突变的RAS具有“抗原特异性”。阴性对照可以是(例如)(i)与以下细胞共培养的表达式TCR的T细胞:(a)用相同浓度的不相关肽(例如具有来自突变的RAS肽的不同序列的一些其他肽)脉冲的抗原阴性、HLA I类分子阳性靶细胞,或(b)已引入编码不相关肽的核苷酸序列以便靶细胞表达不相关肽的抗原阴性、HLA I类分子阳性靶细胞;或(ii)与以下细胞共培养的未转导的T细胞(例如衍生自不表达TCR的PBMC):(a)用相同浓度的突变的RAS肽脉冲的抗原阴性、HLA I类分子阳性靶细胞,或(b)已引入编码突变的RAS的核苷酸序列以便靶细胞表达突变的RAS的抗原阴性、HLA I类分子阳性靶细胞。由阴性对照的靶细胞表达的HLA I类分子与由与所测试T细胞共培养的靶细胞表达的HLA I类分子相同。HLA I类分子可以是本文所述的任何HLA I类分子(例如HLA-A*11:01分子)。可以通过本领域已知的方法,诸如例如酶联免疫吸附测定(ELISA)测量IFN- γ 分泌。

[0041] 可选地或另外地,如果在与(a)用低浓度的突变的RAS肽脉冲的抗原阴性、HLA I类分子阳性靶细胞或(b)已引入编码突变的RAS的核苷酸序列以便靶细胞表达突变的RAS的抗原阴性、HLA I类分子阳性靶细胞共培养时,与分泌IFN- γ 的阴性对照T细胞的数量相比,至少两倍数量的表达式TCR的T细胞分泌IFN- γ ,则TCR可以被认为对突变的RAS具有“抗原特异性”。HLA I类分子、肽浓度和阴性对照可以如本文针对本发明的其它方面所述。可以通过本领域已知的方法,诸如例如ELISPOT测量分泌IFN- γ 的细胞的数量。

[0042] 可选地或另外地,如果表达式TCR的T细胞上调一种或多种T细胞活化标志物的表达(如在使用表达突变的RAS的靶细胞刺激后通过例如流式细胞术所测量的),则TCR可以被认为对突变的RAS具有“抗原特异性”。T细胞活化标志物的实例包括4-1BB、OX40、CD107a、CD69和在抗原刺激时上调的细胞因子(例如肿瘤坏死因子(TNF)、白介素(IL)-2等)。

[0043] 本发明的实施方案提供了TCR,其包含两个多肽(即多肽链),如TCR的 α 链、TCR的 β 链、TCR的 γ 链、TCR的 δ 链或其组合。本发明TCR的多肽可以包含任何氨基酸序列,条件是该TCR对突变的RAS具有抗原特异性。

[0044] 在本发明的实施方案中,TCR包含两条多肽链,其各自包含含有TCR的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3的可变区。在本发明的实施方案中,TCR包含第一多肽链和第二多肽链,第一多肽链包含含有SEQ ID NO:1氨基酸序列的CDR1(α 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:2氨基酸序列的CDR2(α 链的CDR2)和含有SEQ ID NO:3氨基酸序列的CDR3(α 链的CDR3),第二多肽链包含含有SEQ ID NO:4氨基酸序列的CDR1(β 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:5氨基酸序列的CDR2(β 链的CDR2)和含有SEQ ID NO:6氨基酸序列的CDR3(β 链的CDR3)。在这方面,本发明的TCR可以包含选自SEQ ID NO:1-6的氨基酸序列中的任何一个或多个。在本发明的实施方案

中,TCR包含以下氨基酸序列:(a)全部SEQ ID NO:1-3,(b)全部SEQ ID NO:4-6,或(c)全部SEQ ID NO:1-6。在特别优选的实施方案中,TCR包含全部SEQ ID NO:1-6的氨基酸序列。

[0045] 在本发明的实施方案中,TCR包含含有以上示出的CDR的TCR的可变区的氨基酸序列。TCR可以包含人可变区,例如人 α 链可变区和人 β 链可变区。在这方面,TCR可以包含以下氨基酸序列:SEQ ID NO:7(α 链的可变区);SEQ ID NO:8(β 链的可变区);或SEQ ID NO:7和8二者。优选地,TCR包含SEQ ID NO:7和8二者的氨基酸序列。

[0046] 本发明的TCR还可以包含 α 链恒定区及 β 链恒定区。恒定区可以衍生自任何合适的物种(诸如例如人或小鼠)。在本发明的实施方案中,TCR还包含鼠 α 链和 β 链恒定区或人 α 链和 β 链恒定区。如本文所用,在提及TCR或本文所述的TCR的任何组分(例如互补决定区(CDR)、可变区、恒定区、 α 链和/或 β 链)时,术语“鼠”或“人”意指TCR(或其组分)分别衍生自小鼠或人,即,TCR(或其组分)分别源自小鼠T细胞或人T细胞或由其一次性表达。

[0047] 本发明的实施方案提供了包含人可变区和鼠恒定区的嵌合TCR,其中该TCR对由HLA I类分子呈递的突变的人RAS氨基酸序列具有抗原特异性。鼠恒定区可提供任何一种或多种优点。例如,鼠恒定区可以减少本发明TCR与引入本发明TCR的宿主细胞的内源性TCR的错配。可选地或另外地,与具有人恒定区的相同TCR相比,鼠恒定区可以增加本发明TCR的表达。嵌合TCR可以包含SEQ ID NO:19(野生型(WT)鼠 α 链恒定区)、SEQ ID NO:20(WT鼠 β 链恒定区)或SEQ ID NO:19和20二者的氨基酸序列。优选地,本发明的TCR包含SEQ ID NO:19和20二者的氨基酸序列。嵌合TCR可以包含与本文针对本发明的其它方面所述的任何CDR区组合的本文所述的任何鼠恒定区。在这方面,TCR可以包含以下氨基酸序列:(a)全部SEQ ID NO:1-3和19;(b)全部SEQ ID NO:4-6和20;或(c)全部SEQ ID NO:1-6和19-20。在本发明的另一实施方案中,嵌合TCR可以包含与本文针对本发明的其它方面所述的任何可变区组合的本文所述的任何鼠恒定区。在这方面,TCR可以包含以下氨基酸序列:(i)SEQ ID NO:7和19二者;(ii)SEQ ID NO:8和20二者;或(vi)全部SEQ ID NO:7-8及19-20。

[0048] 在本发明的另一实施方案中,TCR包含以下氨基酸序列:SEQ ID NO:23(具有WT鼠恒定区的 α 链)、SEQ ID NO:24(具有WT鼠恒定区的 β 链)或SEQ ID NO:23-24二者。

[0049] 在本发明的实施方案中,TCR包含取代的恒定区。在这方面,TCR可以包含本文所述的任何TCR在 α 链和 β 链之一或二者的恒定区中具有一个、两个、三个或四个氨基酸取代的氨基酸序列。优选地,TCR包含鼠恒定区,其在 α 链和 β 链之一或两者的鼠恒定区中具有一个、两个、三个或四个氨基酸取代。在特别优选的实施方案中,TCR包含鼠恒定区,其在 α 链的鼠恒定区中具有一个、两个、三个或四个氨基酸取代且在 β 链的鼠恒定区中具有一个氨基酸取代。在一些实施方案中,与包含未取代(野生型)恒定区的亲代TCR相比,包含取代的恒定区的TCR有利地提供以下的一种或多种:增加突变的RAS⁺靶标的识别、增加宿主细胞的表达、减少与内源性TCR的错配和增加抗肿瘤活性。一般而言,TCR α 链和 β 链的鼠恒定区的取代的氨基酸序列SEQ ID NO:17和18分别对应于未取代的鼠恒定区氨基酸序列SEQ ID NO:19和20的全部或一部分,其中SEQ ID NO:17与SEQ ID NO:19相比具有一个、两个、三个或四个氨基酸取代,且SEQ ID NO:18与SEQ ID NO:20相比具有一个氨基酸取代。在这方面,本发明的实施方案提供了包含以下氨基酸序列的TCR:(a)SEQ ID NO:17(α 链的恒定区),其中(i)第48位的X是Thr或Cys,(ii)第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp,(iii)第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp以及(iv)第115位的X是Gly、Ala、Val、

Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp; (b) SEQ ID NO:18 (β 链的恒定区), 其中第57位的X是Ser或Cys; 或(c) SEQ ID NO:17和18二者。在本发明的实施方案中, 包含SEQ ID NO:17的TCR不包含SEQ ID NO:19 (α 链的未取代的鼠恒定区)。在本发明的实施方案中, 包含SEQ ID NO:18的TCR不包含SEQ ID NO:20 (β 链的未取代的鼠恒定区)。

[0050] 在本发明的实施方案中, TCR包含含有可变区和恒定区的 α 链以及含有可变区和恒定区的 β 链。在这方面, TCR可以包含(a) 含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的 α 链, 其中: (i) SEQ ID NO:21的第185位的X是Thr或Cys, (ii) SEQ ID NO:21的第249位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp, (iii) SEQ ID NO:21的第251位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp, 以及(iv) SEQ ID NO:21的第252位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp; (b) 含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的 β 链, 其中SEQ ID NO:22的第190位的X是Ser或Cys; 或(c) (a) 和(b) 两者。在本发明的实施方案中, 包含SEQ ID NO:21的TCR不包含SEQ ID NO:23 (未取代的 α 链)。在本发明的实施方案中, 包含SEQ ID NO:22的TCR不包含SEQ ID NO:24 (未取代的 β 链)。

[0051] 在本发明的实施方案中, 取代的恒定区包含 α 链和 β 链之一或两者的恒定区中的半胱氨酸取代以提供半胱氨酸取代的TCR。 α 链及 β 链中的相对半胱氨酸提供二硫键, 该二硫键使取代的TCR的 α 链及 β 链的恒定区彼此连接且并不存在于包含未取代鼠恒定区的TCR中。在这方面, TCR可以是半胱氨酸取代的TCR, 其中SEQ ID NO:19的第48位的天然Thr (Thr48) 和SEQ ID NO:20的第57位的天然Ser (Ser57) 中的一个或两个可以被Cys取代。优选地, SEQ ID NO:19的天然Thr48和SEQ ID NO:20的天然Ser57均被Cys取代。半胱氨酸取代的TCR恒定区序列的实例示于表2中。在本发明的实施方案中, 半胱氨酸取代的TCR包含(i) SEQ ID NO:17、(ii) SEQ ID NO:18或(iii) SEQ ID NO:17和18二者, 其中SEQ ID NO:17和18均如表2中所定义。除本文所述的任何CDR或可变区外, 本发明的半胱氨酸取代的TCR可以包含取代的恒定区。

[0052] 在本发明的实施方案中, 半胱氨酸取代的嵌合TCR包含全长 α 链和全长 β 链。半胱氨酸取代的嵌合TCR α 链和 β 链序列的实例示于表2中。在本发明的实施方案中, TCR包含(i) SEQ ID NO:21、(ii) SEQ ID NO:22、或(iii) SEQ ID NO:21和22二者, 其中SEQ ID NO:21-22如表2中所定义。

[0053] 表2

[0054]

SEQ ID NO:	“X”的定义
SEQ ID NO:17 (恒定区 α 链)	第 48 位的 X 是 Cys, 第 112 位的 X 是 Ser, 第 114 位的 X 是 Met, 以及 第 115 位的 X 是 Gly。
SEQ ID NO:18 (恒定区 β 链)	第 57 位的 X 是 Cys
SEQ ID NO:21 (α 链)	第 185 位的 X 是 Cys, 第 249 位的 X 是 Ser, 第 251 位的 X 是 Met, 以及 第 252 位的 X 是 Gly。
SEQ ID NO:22 (β 链)	第 190 位的 X 是 Cys

[0055] 在本发明的实施方案中,取代的氨基酸序列包含具有疏水性氨基酸的 α 链和 β 链之一或两者的恒定区的跨膜(TM)结构域中的一个、两个或三个氨基酸的取代,以提供疏水性氨基酸取代的TCR(也在本文中被成为“LVL修饰的TCR”)。与在TM结构域中缺乏疏水性氨基酸取代的TCR相比,TCR的TM结构域中的疏水性氨基酸取代可以增加TCR的TM结构域的疏水性。在这方面,TCR是LVL修饰的TCR,其中SEQ ID NO:19的天然Ser112、Met114和Gly115中的一个、两个或三个可以独立地被Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp取代;优选地被Leu、Ile或Val取代。优选地,SEQ ID NO:19的天然Ser112、Met114和Gly115中的所有三个可以独立地被Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp取代;优选地被Leu、Ile或Val取代。在本发明的实施方案中,LVL修饰的TCR包含(i) SEQ ID NO:17、(ii) SEQ ID NO:18或(iii) SEQ ID NO:17和18二者,其中SEQ ID NO:17和18均如表3中所定义。除本文所述的任何CDR或可变区外,本发明的LVL修饰的TCR可以包含取代的恒定区。

[0056] 在本发明的实施方案中,LVL修饰的TCR包含全长 α 链和全长 β 链。LVL修饰的TCR α 链和 β 链序列的实例示于表3中。在本发明的实施方案中,LVL修饰的TCR包含(i) SEQ ID NO:21、(ii) SEQ ID NO:22或(iii) SEQ ID NO:21和22二者,其中SEQ ID NO:21-22如表3中所定义。

[0057] 表3

[0058]

SEQ ID NO:	“X”的定义
SEQ ID NO:17 (恒定区 α 链)	第 48 位的 X 是 Thr; 第 112 位的 X 是 Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met 或 Trp; 优选地, 其中第 112 位的 X 是 Leu、Ile 或 Val; 特别优选地, 其中第 112 位的 X 是 Leu; 第 114 位的 X 是 Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe 或 Trp; 优选地, 其中第 114 位的 X 是 Leu、Ile 或 Val; 特别优选地, 其中第 114 位的 X 是 Ile; 以及 第 115 位的 X 是 Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met 或 Trp; 优选地其中第 115 位的 X 是 Leu、Ile 或 Val; 特别优选地, 其中第 115 位的 X 是 Val; 其中 SEQ ID NO:17 不包含 SEQ ID NO:19 (α 链的未取代的恒定区)
SEQ ID NO:18 (恒定区 β 链)	第 57 位的 X 是 Ser
SEQ ID NO:21 (α 链)	第 185 位的 X 是 Thr; 第 249 位的 X 是 Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、

SEQ ID NO:	“X”的定义
[0059]	Met 或 Trp; 优选地, 其中第 243 位的 X 是 Leu、Ile 或 Val; 特别优选地, 其中第 243 位的 X 是 Leu; 第 251 位的 X 是 Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe 或 Trp; 优选地, 其中第 245 位的 X 是 Leu、Ile 或 Val; 特别优选地, 其中第 245 位的 X 是 Ile; 以及 第 252 位的 X 是 Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met 或 Trp; 优选地, 其中第 246 位的 X 是 Leu、Ile 或 Val; 特别优选地, 其中第 246 位的 X 是 Val, 其中 SEQ ID NO:21 不包含 SEQ ID NO:23 (未取代的 α 链)
SEQ ID NO:22 (β 链)	第 190 位的 X 是 Ser

[0060] 在本发明的实施方案中, 取代的氨基酸序列包括与具有疏水性氨基酸的 α 链及 β 链之一或两者的恒定区的跨膜(TM)结构域中的一个、两个或三个氨基酸的取代组合的 α 链和 β 链之一或两者的恒定区中的半胱氨酸取代(也在本文中被称作“半胱氨酸取代的LVL修饰的TCR”)。在这方面, TCR是半胱氨酸取代的LVL修饰的嵌合TCR, 其中SEQ ID NO:19的天然Thr48被Cys取代; SEQ ID NO:19的天然Ser112、Met114和Gly115中的一个、两个或三个独立地被Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp取代; 优选地被Leu、Ile或Val取代; 且SEQ ID NO:20的天然Ser57被Cys取代。优选地, SEQ ID NO:19的天然Ser112、Met114和Gly115中的所有三个都可以独立地被Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp取代; 优选地被Leu、Ile或Val取代。在本发明的实施方案中, 半胱氨酸取代的LVL修饰的TCR包含(i) SEQ ID NO:17、(ii) SEQ ID NO:18或(iii) SEQ ID NO:17和18二者, 其中SEQ ID NO:17和18均如表4中所定义。除本文所述的任何CDR或可变区外, 本发明的半胱氨酸取代的LVL修饰的TCR还可以包含取代的恒定区。

[0061] 在实施方案中, 半胱氨酸取代的LVL修饰的TCR包含全长 α 链和全长 β 链。在本发明的实施方案中, 半胱氨酸取代的LVL修饰的TCR包含(i) SEQ ID NO:21、(ii) SEQ ID NO:22、或(iii) SEQ ID NO:21和22二者, 其中SEQ ID NO:21和22如表4中所定义。

[0062] 表4

[0063]

SEQ ID NO:	“X”的定义
SEQ ID NO:17 (恒定区 α 链)	第 48 位的 X 是 Cys; 第 112 位的 X 是 Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met 或 Trp; 优选地, 其中第 112 位的 X 是 Leu、Ile 或 Val; 特别优选地, 其中第 112 位的 X 是 Leu; 第 114 位的 X 是 Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe 或 Trp; 优选地, 其中第 114 位的 X 是 Leu、Ile 或 Val; 特别优选地, 其中第 114 位的 X 是 Ile; 以及 第 115 位的 X 是 Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met 或 Trp; 优选地, 其中第 115 位的 X 是 Leu、Ile 或 Val; 以及特别优选地, 其中第 115 位的 X 是 Val, 其中 SEQ ID NO:17 不同时包含第 112 位的 Ser、第 114 位的 Met 和第 115 位的 Gly 的全部。
SEQ ID NO:18 (恒定区 β 链)	第 57 位的 X 是 Cys
SEQ ID NO:21 (α 链)	第 185 位的 X 是 Cys; 第 249 位的 X 是 Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met 或 Trp; 优选地, 其中第 243 位的 X 是 Leu、Ile 或 Val;

SEQ ID NO:	“X”的定义
[0064]	<p>特别优选地, 其中第 243 位的 X 是 Leu; 第 251 位的 X 是 Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe 或 Trp; 优选地, 其中第 245 位的 X 是 Leu、Ile 或 Val; 特别优选地, 其中第 245 位的 X 是 Ile; 以及 第 252 位的 X 是 Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met 或 Trp; 优选地, 其中第 246 位的 X 是 Leu、Ile 或 Val; 以及 特别优选地, 其中第 246 位的 X 是 Val, 其中 SEQ ID NO:21 不同时包含第 249 位的 Ser、第 251 位的 Met 和第 252 位的 Gly 的全部。</p>
SEQ ID NO:22 (β 链)	第 190 位的 X 是 Cys

[0065] 本发明的实施方案还提供了包含本文所述的任何TCR的功能部分的多肽。本文所用的术语“多肽”包含寡肽且是指由一个或多个肽键连接的氨基酸的单链。

[0066] 对于本发明的多肽, 功能部分可以是包含为TCR一部分的TCR的连续氨基酸的任何部分, 条件是该功能部分能特异性结合突变的RAS。在提及TCR使用时, 术语“功能部分”是指本发明TCR的任何部分或片段, 该部分或片段保留产生该部分的TCR(亲代TCR)的生物活性。功能部分涵盖例如TCR中保留特异性结合突变的RAS(例如在HLA-A*11:01分子的背景内)或者以与亲代TCR类似的程度、相同的程度或较高的程度检测、治疗或预防癌症的能力的那些部分。提及亲代TCR时, 功能性部分可以包括例如亲代TCR的约10%、约25%、约30%、约50%、约70%、约80%、约90%、约95%或更多。

[0067] 功能部分可以在该部分的氨基或羧基末端处或者在两个末端处包括另外的氨基酸, 所述另外的氨基酸并未发现于亲代TCR的氨基酸序列中。理想地, 另外的氨基酸并不干扰功能部分的生物功能, 例如特异性结合突变的RAS和/或具有检测癌症、治疗或预防癌症的能力等。更理想地, 与亲代TCR的生物活性相比, 另外的氨基酸增强了生物活性。

[0068] 多肽可以包含本发明TCR的 α 链和 β 链中的任一个或两个的功能性部分, 如包含本发明TCR的 α 链和/或 β 链中可变区的CDR1、CDR2和CDR3中的一个或多个的功能性部分。在本发明的实施方案中, 多肽可以包含SEQ ID NO:1(α 链的CDR1)、SEQ ID NO:2(α 链的CDR2)、SEQ ID NO:3(α 链的CDR3)、SEQ ID NO:4(β 链的CDR1)、SEQ ID NO:5(β 链的CDR2)、SEQ ID NO:6(β 链的CDR3)或其组合的氨基酸序列。

[0069] 在这方面, 本发明的多肽可以包含选自SEQ ID NO:1-6的氨基酸序列中的任何一个或多个。在本发明的实施方案中, TCR包含以下氨基酸序列: (a) 全部SEQ ID NO:1-3, (b) 全部SEQ ID NO:4-6, 或 (c) 全部SEQ ID NO:1-6。在优选的实施方案中, 多肽包含全部SEQ ID NO:1-6的氨基酸序列。

[0070] 在本发明的实施方案中,本发明的多肽可以包含例如本发明TCR的可变区,其包含上文示出的CDR区的组合。在这方面,多肽可以包含以下氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:7(α 链的可变区),(ii) SEQ ID NO:8(β 链的可变区),或(iii) SEQ ID NO:7和8二者。优选地,多肽包含SEQ ID NO:7和8二者的氨基酸序列。

[0071] 在本发明的实施方案中,本发明的多肽还可以包含上文示出的本发明TCR的恒定区。在这方面,多肽还可以包含以下氨基酸序列:SEQ ID NO:19(α 链的WT鼠恒定区)、SEQ ID NO:20(β 链的WT鼠恒定区)、SEQ ID NO:17(α 链的取代的鼠恒定区)、SEQ ID NO:18(β 链的取代的鼠恒定区)、SEQ ID NOs:19和20二者、或SEQ ID NOs:17和18二者。优选地,多肽还包含与本文针对本发明其它方面所述的任何CDR区或可变区组合的SEQ ID NOs:19和20两者或SEQ ID NOs:17和18两者的氨基酸序列。

[0072] 在本发明的实施方案中,所述多肽包含:(a) SEQ ID NO:17的氨基酸序列,其中(i) SEQ ID NO:17的第48位的X是Thr或Cys,(ii) SEQ ID NO:17的第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp,(iii) SEQ ID NO:17的第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp,和(iv) SEQ ID NO:17的第115位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(b) SEQ ID NO:18的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:18的第57位的X是Ser或Cys;或者(c):(a)和(b)两者。在本发明的实施方案中,多肽的SEQ ID NO:17和18中的一个或两个如表2-4中任一个所定义。

[0073] 在本发明的实施方案中,本发明的多肽可以包含本文所述的TCR的 α 或 β 链的整个长度。在这方面,本发明的多肽可以包含SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NOs:21和22两者、或SEQ ID NOs:23和24两者的氨基酸序列。优选地,多肽包含SEQ ID NOs:21和22两者的氨基酸序列或SEQ ID NOs:23和24两者的氨基酸序列。

[0074] 在本发明的实施方案中,多肽包含:(a) SEQ ID NO:21的氨基酸序列,其中:(i) SEQ ID NO:21的第185位的X是Thr或Cys,(ii) SEQ ID NO:21的第249位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp,(iii) SEQ ID NO:21的第251位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp,以及(iv) SEQ ID NO:21的第252位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(b) SEQ ID NO:22的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:22的第190位的X是Ser或Cys;或者(c):(a)和(b)两者。在本发明的实施方案中,多肽的SEQ ID NO:21-22中的任何一个或多个如表2-4中的任一个所定义。

[0075] 本发明的实施方案还提供了包含本文所述的至少一种多肽的蛋白质。“蛋白质”意指包含一条或多条多肽链的分子。

[0076] 在实施方案中,本发明的蛋白质可以包含含有SEQ ID NO:1-3的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:4-6的氨基酸序列的第二多肽链。

[0077] 在本发明的另一个实施方案中,蛋白质可以包含含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的第二多肽链。

[0078] 本发明的蛋白质还可以包含本文针对本发明其它方面所述的任何恒定区。在这方面,在本发明的实施方案中,第一多肽链还可以包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列并且第二多肽链还可以包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在本发明的实施方案中,第一多肽链还可以包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列并且第二多肽链还可以包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0079] 在本发明的实施方案中,蛋白质包含:(a)含有SEQ ID NO:17的氨基酸序列的第一多肽链,其中:(i)SEQ ID NO:17的第48位的X是Thr或Cys,(ii)SEQ ID NO:17的第112位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp,(iii)SEQ ID NO:17的第114位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp,以及(iv)SEQ ID NO:17的第115位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(b)含有SEQ ID NO:18的氨基酸序列的第二条多肽链,其中SEQ ID NO:18的第57位的X是Ser或Cys;或(c):(a)和(b)两者。在本发明的实施方案中,该蛋白质的SEQ ID NO:17和18中的一个或两个如表2-4中任一个所定义。

[0080] 可选地或另外地,本发明实施方案的蛋白质可以包含(a)含有SEQ ID NO:21的氨基酸序列的第一多肽链,其中:(i)SEQ ID NO:21的第185位的X是Thr或Cys,(ii)SEQ ID NO:21的第249位的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp,(iii)SEQ ID NO:21的第251位的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp,以及(iv)SEQ ID NO:21的第252位的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(b)含有SEQ ID NO:22的氨基酸序列的第二多肽链,其中SEQ ID NO:22的第190位的X是Ser或Cys;或者(c):(a)和(b)二者。在本发明的实施方案中,蛋白质可以包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列的第一多肽链和含有SEQ ID NO:24的氨基酸序列的第二多肽链。在本发明的实施方案中,SEQ ID NO:21-22中的一个或两个如表2-4中的任一个所定义。

[0081] 本发明的蛋白质可以是TCR。可选地,例如,如果蛋白质包含含有SEQ ID NO:21和22二者、SEQ ID NO:23和24二者的氨基酸序列的单一多肽链,或如果蛋白质的第一和/或第二多肽链还包含其它氨基酸序列(例如编码免疫球蛋白或其部分的氨基酸序列),则本发明的蛋白质可以是融合蛋白。在这方面,本发明的实施方案还提供包含本文所述的至少一种本发明多肽以及至少一种其它多肽的融合蛋白。其它多肽可以作为融合蛋白的单独多肽存在,或可以作为与本文所述的一种本发明多肽同框(串联)表达的多肽存在。其它多肽可以编码任何肽类或蛋白质分子或者其部分,包括但不限于:免疫球蛋白、CD3、CD4、CD8、MHC分子、CD1分子(例如CD1a、CD1b、CD1c、CD1d)等。

[0082] 融合蛋白可以包含一个或多个拷贝的本发明多肽和/或一个或多个拷贝的其它多肽。例如,融合蛋白可以包含1、2、3、4、5或更多个拷贝的本发明多肽和/或其它多肽。制备融合蛋白的合适方法是本领域已知的且包括例如重组方法。

[0083] 在本发明的一些实施方案中,本发明的TCR、多肽和蛋白质可以表达为包含连接 α 链和 β 链的接头肽的单一蛋白。在这方面,本发明的TCR、多肽和蛋白质还可以包含接头肽。接头肽可以有利地促进重组TCR、多肽和/或蛋白质在宿主细胞中的表达。接头肽可以包含任何合适的氨基酸序列。例如,接头肽可以是包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的弗林蛋白酶-SGSG-P2A接头。在包含接头肽的构建体由宿主细胞表达时,接头肽可以被切割,从而产生分离的 α 链和 β 链。在本发明的实施方案中,TCR、多肽或蛋白质可以包含含有全长 α 链、全长 β 链和定位在 α 链与 β 链之间的接头肽的氨基酸序列。

[0084] 本发明的蛋白质可以是包含本文所述的至少一种本发明多肽的重组抗体或其抗原结合部分。如本文所用,“重组抗体”是指包含本发明的多肽和抗体或其抗原结合部分的多肽链中的至少一种的重组(例如基因改造的)蛋白。抗体或其抗原结合部分的多肽可以是抗体的重链、轻链、重链或轻链的可变区或恒定区、单链可变片段(scFv)或者Fc、Fab或F(ab)₂’片段等。抗体或其抗原结合部分的多肽链可以作为重组抗体的单独多肽存在。可选

地,抗体或其抗原结合部分的多肽链可以作为与本发明的多肽同框(串联)表达的多肽存在。抗体或其抗原结合部分的多肽可以是任何抗体或任何抗体片段(包含本文所述的任何抗体和抗体片段)的多肽。

[0085] 本发明的范围包含本文所述的本发明TCR、多肽或蛋白质的功能变体。本文所用的术语“功能变体”是指与亲代TCR、多肽或蛋白质具有实质或显著的序列同一性或类似性的TCR、多肽或蛋白质,该功能变体保留产生该变体的TCR、多肽或蛋白质的生物活性。功能变体涵盖例如本文所述的TCR、多肽或蛋白质(亲代TCR、多肽或蛋白质)的那些变体,其保留以与亲代TCR、多肽或蛋白质类似的程度、相同的程度或较高的程度特异性结合突变的RAS(亲代TCR对其具有抗原特异性,或亲代多肽或蛋白质与其特异性结合)的能力。关于亲代TCR、多肽或蛋白质,功能变体可以分别与亲代TCR、多肽或蛋白质具有例如至少约30%、约50%、约75%、约80%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更高的氨基酸序列同一性。

[0086] 功能变体可以例如包含具有至少一个保守氨基酸取代的亲代TCR、多肽或蛋白质的氨基酸序列。保守氨基酸取代为本领域已知的,且包含其中一个具有某些物理和/或化学性质的氨基酸交换为另一具有相同化学或物理性质的氨基酸的氨基酸取代。例如,保守氨基酸取代可以是酸性氨基酸取代另一酸性氨基酸(例如Asp或Glu)、具有非极性侧链的氨基酸取代具有非极性侧链的另一氨基酸(例如Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val等)、碱性氨基酸取代另一碱性氨基酸(Lys、Arg等)、具有极性侧链的氨基酸取代具有极性侧链的另一氨基酸(Asn、Cys、Gln、Ser、Thr、Tyr等)等。

[0087] 可选地或另外地,功能变体可以包含具有至少一个非保守氨基酸取代的亲代TCR、多肽或蛋白质的氨基酸序列。在这种情况下,优选地,非保守氨基酸取代并不干扰或抑制功能变体的生物活性。优选地,非保守氨基酸取代增强了功能变体的生物活性,使得与亲代TCR、多肽或蛋白质相比,功能变体的生物活性增加。

[0088] TCR、多肽或蛋白质可以基本上由指定氨基酸序列或本文所述的序列组成,使得TCR、多肽或蛋白质的其它组分(例如其它氨基酸)并不实质上改变TCR、多肽或蛋白质的生物活性。在这方面,本发明的TCR、多肽或蛋白质可以例如基本上由SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:23、SEQ ID NO:24、SEQ ID NOs:21-22二者或SEQ ID NOs:23-24二者的氨基酸序列组成。另外,例如,本发明的TCR、多肽或蛋白质可以基本上由(i) SEQ ID NO:7、(ii) SEQ ID NO:8、或(iii) SEQ ID NOs:7和8二者的氨基酸序列组成。此外,本发明的TCR、多肽或蛋白质可以基本上由以下氨基酸序列组成:(a) SEQ ID NO:1-6中的任何一个或多个;(b) SEQ ID NO:1-3全部;(c) SEQ ID NO:4-6全部;或(d) SEQ ID NO:1-6全部。

[0089] 本发明的TCR、多肽和蛋白质可以具有任何长度,即可以包含任何数目的氨基酸,条件是TCR、多肽或蛋白质保留其生物活性,例如特异性结合突变的RAS的能力;检测哺乳动物中的癌症;或者治疗或预防哺乳动物中的癌症等。例如,多肽的长度范围可以为约50至约5000个氨基酸,如长度为约50、约70、约75、约100、约125、约150、约175、约200、约300、约400、约500、约600、约700、约800、约900、约1000或更多个氨基酸。在这方面,本发明的多肽也包含寡肽。

[0090] 本发明的TCR、多肽和蛋白质可以包含替代一种或多种天然存在的氨基酸的合成氨基酸。此类合成氨基酸是本领域已知的,包含例如氨基环己烷甲酸、正亮氨酸、 α -氨基正

癸酸、高丝氨酸、S-乙酰基氨基甲基-半胱氨酸、反式-3-羟基脯氨酸及反式-4-羟基脯氨酸、4-氨基苯基丙氨酸、4-硝基苯基丙氨酸、4-氯苯基丙氨酸、4-羧基苯基丙氨酸、 β -苯基丝氨酸- β -羟基苯基丙氨酸、苯基甘氨酸、 α -萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、二氢吡啶-2-甲酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸、氨基丙二酸、氨基丙二酸单酰胺、N'-苄基-N'-甲基-赖氨酸、N',N'-二苄基-赖氨酸、6-羟基赖氨酸、鸟氨酸、 α -氨基环戊烷甲酸、 α -氨基环己烷甲酸、 α -氨基环庚烷甲酸、 α -(2-氨基-2-降莰烷)-甲酸、 α , γ -二氨基丁酸、 α , β -二氨基丙酸、高苯基丙氨酸及 α -叔丁基甘氨酸。

[0091] 本发明的TCR、多肽和蛋白质可以经由例如二硫键发生糖基化、酰胺化、羧基化、磷酸化、酯化、N-酰化、环化,或转化成酸加成盐和/或任选地二聚化或聚合或缀合的。

[0092] 可以通过本领域已知的方法,诸如例如从头合成来获得本发明的TCR、多肽和/或蛋白质。另外,可以使用标准重组方法使用本文所述的核酸重组产生多肽和蛋白质。参见,例如Green和Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第4版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)。可选地,本文所述的TCR、多肽和/或蛋白质可以由公司,如Synpep (Dublin, CA)、Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) 和 Multiple Peptide Systems (San Diego, CA) 商业合成。在这方面,本发明的TCR、多肽和蛋白质可以是合成的、重组的、分离的和/或纯化的。

[0093] 本发明范围包括包含任何本发明TCR、多肽或蛋白质(包含其任何功能部分或变体)、核酸、重组表达载体、宿主细胞、宿主细胞群体或者抗体或其抗原结合部分的缀合物,例如生物缀合物。本领域已知缀合物以及合成缀合物的一般方法。

[0094] 本发明的实施方案提供了包括编码本文所述的任何TCR、多肽或蛋白质的核苷酸序列的核酸。本文所用的“核酸”包含“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”且通常意指DNA或RNA的聚合物,其可以是单链或双链的,其可以含有天然、非天然或改变的核苷酸,且其可以含有天然、非天然或改变的核苷酸间键联(如磷酸酯键联或硫代磷酸酯键联)来代替存在于未修饰寡核苷酸的核苷酸之间的磷酸二酯。在实施方案中,核酸包含互补DNA (cDNA)。通常优选地,核酸不包含任何插入、缺失、倒置和/或取代。然而,在一些情况下,如本文所论述,核酸可以适于包含一个或多个插入、缺失、倒置和/或取代。

[0095] 优选地,本发明的核酸是重组的。如本文所用,术语“重组体”是指(i)通过将天然或合成的核酸区段连接至可以在活细胞中复制的核酸分子而在活细胞外构建的分子,或(ii)来自以上(i)中所述的那些复制的分子。出于本文目的,复制可以是体外复制或体内复制。

[0096] 可以基于化学合成和/或酶促连接反应使用本领域已知的程序来构建核酸。参见例如Green和Sambrook等人,见上文。例如,可以使用天然存在的核苷酸或以各种方式修饰的核苷酸以化学方式来合成核酸,该修饰的核苷酸经设计以增加分子的生物稳定性或增加在杂交时形成的双链体(例如硫代磷酸酯衍生物和吡啶取代的核苷酸)的物理稳定性。可以用于生成核酸的修饰核苷酸的实例包括但不限于:5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰基胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫基尿苷、5-羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-半乳糖基腺苷、肌苷、N⁶-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、N⁶取代的腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧

啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫基尿嘧啶、 β -D-甘露糖基腺苷、5'-甲氧基羧基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基硫基-N⁶-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、怀丁氧苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、腺苷(queosine)、2-硫基胞嘧啶、5-甲基-2-硫基尿嘧啶、2-硫基尿嘧啶、4-硫基尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、3-(3-氨基-3-N-2-羧基丙基)尿嘧啶和2,6-二氨基嘌呤。可选地,本发明的一种或多种核酸可以购自诸如Macromolecular Resources(Fort Collins,CO)和Synthegen(Houston,TX)的公司。

[0097] 核酸可以包含编码本文所述的任何TCR、多肽或蛋白质的任何核苷酸序列。在本发明的实施方案中,核酸可以包含SEQ ID NO:31-32中任一个的核苷酸序列(表5)。在本发明的实施方案中,核酸包含SEQ ID NOs:31-32二者的核苷酸序列。

[0098] 表5

TCR ID	TCR 链	核苷酸序列
[0099] RAS ^{G12V} - HLA-A* 11:01	α (TRAV 14/DV4* 02)	SEQ ID NO: 31 atgcattctgagctccctgctgaagggtggtgacagccagcctgtggctggga ccaggaatcgacagaagatcacccagacacagcccgcatgtttgtgca ggagaaggaggccgtgaccctggattgcacctacgacacatctgatccag ctacggcctgttctgtgataagcagccttctagcggcgagatgatctttctgat ctaccagggcagctatgaccagcagaacgccaccgagggcagatactctc tgaatttcagaaggccaggaagagcgccaacctggtcatcagcgcctccc agctgggcgattccgccatgtatttctgtgccatgagagggcctcacaggg cggctctgagaagctggtgtttggcaagggcaccaagctgacagtgaaccc taatattcagaatccc
	β (TRBV 5-1*01)	SEQ ID NO:32 atggcgctcccgactgctgtgctgggtcctgctgtgcctgctgggggctggg cctgtcaaagctggcgctcactcagactccacgatacctgatcaagaccagg ggccagcaggtgacactgtcttgcagcccaatctccggccaccgctccgtg tcttggtaccagcagaccctggccagggcctccagttctgtttgagtatttc tctgagacacagcggacaagggaatttccccggccggtttagcggcag acagtttagcaactccaggtctgagatgaatgtgagcaccctggagctggg cgactccgcctgtacctgtgcgccagctccctgacttctggcgggtttgatg agcagttctttgggctggcactcggctgaccgtcctg

[0100] 在本发明的实施方案中,核酸包含编码本文所述的任何TCR、多肽或蛋白质的密码子优化的核苷酸序列。不受任何特定理论或机制的束缚,认为核苷酸序列的密码子优化增加mRNA转录物的翻译效率。核苷酸序列的密码子优化可以涉及将天然密码子替换为另一密码子,该另一密码子编码相同氨基酸,但可以通过在细胞内更易于获得的tRNA来翻译,由此增加翻译效率。核苷酸序列的优化也可以减少干扰翻译的二级mRNA结构,由此增加翻译效率。

[0101] 本发明还提供了核酸,其包含与本文所述的任何核酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列或在严格条件下与本文所述的任何核酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列。

[0102] 在严格条件下杂交的核苷酸序列优选地在高严格条件下杂交。“高严格条件”意指核苷酸序列以可检测地强于非特异性杂交的量与靶序列(本文所述的任何核酸的核苷酸序列)特异性杂交。高严格条件包括将具有准确互补序列的多核苷酸或者仅含有一些分散错配的多核苷酸与恰巧具有匹配核苷酸序列的一些小的区域(例如3-10个碱基)的随机序列区分开的条件。此类小的互补区域比14-17个或者更多个碱基的全长互补物更易熔化,且高严格杂交使其易于区分。相对高的严格条件将包括例如低盐和/或高温条件,如由约0.02-0.1M NaCl或等效物在约50-70°C的温度所提供的。此类高严格条件容忍核苷酸序列与模板或靶标链之间很少的错配(如果存在的话),并且特别适合于检测任何本发明的TCR的表达。通常认为通过添加增加量的甲酰胺可以导致更严格的条件。

[0103] 本发明还提供了核酸,其包含与本文所述的任何核酸至少约70%或更高,例如约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%相同的核苷酸序列。在这方面,核酸可以基本上由本文所述的任何核苷酸序列组成。

[0104] 本发明的核酸可以掺入重组表达载体中。在这方面,本发明提供了包含本发明的任何核酸的重组表达载体。在本发明的实施方案中,重组表达载体包含编码 α 链、 β 链和接头肽的核苷酸序列。

[0105] 出于本文的目的,术语“重组表达载体”意指基因修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,在该构建体包含编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列且使该载体与细胞在足以使mRNA、蛋白质、多肽或肽在细胞内表达的条件下接触时,允许宿主细胞表达mRNA、蛋白质、多肽或肽。本发明的载体并非是整体天然存在的。然而,载体的一部分可以是天然存在的。本发明的重组表达载体可以包含任何类型的核苷酸,包括但不限于:DNA及RNA,其可以是单链或双链的,合成的或部分自天然来源获得的,且可以含有天然、非天然或改变的核苷酸。重组表达载体可以包含天然存在的、非天然存在的核苷酸间键联,或两种类型的键联。优选地,非天然存在的或改变的核苷酸或核苷酸间键联不阻碍载体的转录或复制。

[0106] 本发明的重组表达载体可以是任何合适的重组表达载体,且可以用于转化或转染任何合适的宿主细胞。合适的载体包括经设计用于繁殖和扩增或用于表达或用于上述二者的那些载体,如质体和病毒。载体可以选自:pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene,LaJolla,CA)、pET系列(Novagen,Madison,WI)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,Uppsala,Sweden)和pEX系列(Clontech,Palo Alto,CA)。也可以使用噬菌体载体,如 λ GT10、 λ GT11、 λ ZapII(Stratagene)、 λ EMBL4和 λ NM1149。植物表达载体的实例包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。优选地,重组表达载体是病毒载体,例如逆转录病毒载体。在特别优选的实施方案中,重组表达载体是MSGV1载体。

[0107] 可以使用描述于例如Green和Sambrook等人(见上文)的标准重组DNA技术来制备本发明的重组表达载体。可以制备环形或线性的表达载体的构建体以含有在原核或真核宿主细胞中起作用的复制系统。复制系统可以衍生自例如ColE1,2 μ 质体, λ ,SV40,牛乳头瘤病毒等。

[0108] 理想地,重组表达载体包含调控序列,如转录和翻译起始密码子和终止密码子,其

对要引入载体的宿主细胞类型(例如细菌、真菌、植物或动物)为特异的,这视情况而定并且考虑载体是否基于DNA或RNA。

[0109] 重组表达载体可以包含一种或多种标志物基因,其允许选择转化或转染的宿主细胞。标志物基因包括杀生物剂抗性(例如对抗生素、重金属等的抗性)、营养缺陷型宿主细胞中的互补性以提供原营养等。用于本发明表达载体的合适标志物基因包括例如新霉素(neomycin)/G418抗性基因、潮霉素(hygromycin)抗性基因、组氨醇抗性基因、四环素(tetracycline)抗性基因和氨苄青霉素(ampicillin)抗性基因。

[0110] 重组表达载体可以包括天然或非天然启动子,该启动子可操作地连接至编码TCR、多肽或蛋白质的核苷酸序列或者连接至与编码TCR、多肽或蛋白质的核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列。启动子的选择,例如强、弱、可诱导的、组织特异的和发育特异的,在本领域普通技术人员的能力内。类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在技术人员的能力内。启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,例如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子和存在于鼠干细胞病毒的长末端重复中的启动子。

[0111] 本发明的重组表达载体可以经设计用于瞬时表达、稳定表达或用于二者。另外,重组表达载体可以经制备以用于组成型表达或用于可诱导表达。

[0112] 另外,重组表达载体可以经制备以包含自杀基因。如本文所用,术语“自杀基因”是指使得表达自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可以是赋予基因在其中表达的细胞针对试剂(例如药物)的敏感性的基因,并且当细胞与所述试剂接触或者暴露于所述试剂时引起细胞死亡。自杀基因为本领域已知的并且包括例如单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶脱氨酶、嘌呤核苷磷酸化酶、硝基还原酶和可诱导半胱天冬酶(caspase)9基因系统。

[0113] 本发明的另一实施方案还提供了包含本文所述的任何重组表达载体的宿主细胞。如本文所用,术语“宿主细胞”是指可以含有本发明重组表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可以是真核细胞(例如植物、动物、真菌或藻类),或者可以是原核细胞(例如细菌或原生动物)。宿主细胞可以是培养出的细胞,或原代细胞,即直接分离自如人的有机体的细胞。宿主细胞可以是贴壁细胞,或悬浮细胞,即在悬浮液中生长的细胞。合适的宿主细胞为本领域已知的,并且包括例如DH5 α 大肠杆菌(E.coli)细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴VERO细胞、COS细胞、HEK293细胞等。出于扩增或复制重组表达载体的目的,宿主细胞优选是原核细胞,例如DH5 α 细胞。出于产生重组TCR、多肽或蛋白质的目的,宿主细胞优选是哺乳动物细胞。最优选地,宿主细胞是人类细胞。尽管宿主细胞可以是任何细胞类型,可以源自任何类型组织,且可以处于任何发育阶段,但宿主细胞优选是外周血淋巴细胞(PBL)或外周血单核细胞(PBMC)。更优选地,宿主细胞是T细胞。

[0114] 出于本文的目的,T细胞可以是任何T细胞,如培养的T细胞,例如原代T细胞,或来自培养的T细胞系(例如Jurkat、SupT1等)的T细胞,或获自哺乳动物的T细胞。如果获自哺乳动物,则T细胞可获自多种来源,包括但不限于:血液、骨髓、淋巴结、胸腺或者其它组织或流体。T细胞也可以是富集的或纯化的。优选地,T细胞是人T细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞且可以处于任何发育阶段,包括但不限于:CD4⁺/CD8⁺双阳性T细胞、CD4⁺辅助T细胞(例如Th₁和Th₂细胞)、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞(例如细胞毒性T细胞)、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、记忆T细胞(例如中心记忆T细胞和效应记忆T细胞)、初始T细胞等。

[0115] 本发明还提供了包含本文所述的至少一种宿主细胞的细胞群体。细胞群体可以是

除了至少一种其它细胞外还包含含有所述任何重组表达载体的宿主细胞的异质群体,所述其它细胞例如不包含任何重组表达载体的宿主细胞(例如T细胞)或者除了T细胞之外的细胞,例如B细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、红细胞、肝细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌细胞、脑细胞等。可选地,细胞群体可以是基本同质的群体,其中所述群体主要包含含有重组表达载体的宿主细胞(例如基本由含其组成)。群体也可以是克隆的细胞群体,其中群体的所有细胞均为含有重组表达载体的单个宿主细胞的克隆,以使群体的所有细胞均包含重组表达载体。在本发明的一个实施方案中,细胞群体是包含含有如本文所述的重组表达载体的宿主细胞的克隆群体。

[0116] 在本发明的实施方案中,群体中的细胞数目可以快速扩增。T细胞数目的扩增可以通过例如,美国专利8,034,334;美国专利8,383,099;美国专利申请公开号2012/0244133;Dudley等人,J.Immunother.,26:332-42(2003);以及Riddell等人,J.Immunol.Methods,128:189-201(1990)中所述的本领域已知的许多方法的任一种来实现。在实施方案中,通过将T细胞与OKT3抗体、IL-2和饲养PBMC(例如辐照的同种异体PBMC)一起培养来进行T细胞数目的扩增。

[0117] 本发明的TCR、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体和宿主细胞(包含其群体)可以是分离的和/或纯化的。本文所用的术语“分离的”意指自其天然环境取出。本文所用的术语“纯化的”意指具有增加的纯度,其中“纯度”是相对术语,且无需解释为绝对纯度。例如,纯度可以是至少约50%,可以大于约60%、约70%、约80%、约90%、约95%,或可以是约100%。

[0118] 本发明的TCR、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体和宿主细胞(包含其群体)(所有这些在下文中通称为“本发明TCR材料”)可以配制成组合物,如药物组合物。在这方面,本发明提供了药物组合物,其包含本文所述的TCR、多肽、蛋白质、核酸、表达载体和宿主细胞(包含其群体)中的任一种及药学上可接受的载体。含有任何本发明TCR材料的本发明药物组合物可以包含一种以上的本发明TCR材料(例如多肽及核酸)或者两种或更多种不同的TCR。可选地,药物组合物可以包含与另一药物活性剂或药物组合的本发明TCR材料,该另一药物活性剂或药物是例如化学治疗剂,例如天冬酰胺酶、白消安(busulfan)、卡铂(carboplatin)、顺铂(cisplatin)、柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、氟尿嘧啶、吉西他滨(gemcitabine)、羟基脲(hydroxyurea)、甲氨喋呤(methotrexate)、紫杉醇(paclitaxel)、利妥昔单抗(rituximab)、长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)等。

[0119] 优选地,载体是药学上可接受的载体。对于药物组合物,载体可以是常规用于所考虑的具体的本发明TCR材料的那些载体中的任一种。制备可施用的组合物的方法是本领域技术人员已知的或对于本领域技术人员是显而易见的且更详细地描述于,例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy,第22版,Pharmaceutical Press(2012)中。优选地,药学上可接受的载体是在使用条件下无有害副作用或毒性的载体。

[0120] 载体的选择部分地取决于具体的本发明TCR材料以及用于施用本发明TCR材料的具体方法。因此,存在本发明的药物组合物的多种合适制剂。合适的制剂可以包含用于肠胃外、皮下、静脉内、肌内、动脉内、鞘内、肿瘤内或腹膜内施用的那些制剂中的任一种。可以使用一种以上的途径来施用本发明的TCR材料,并且在某些情况下,特定途径可以提供比另一

途径更直接且更有效的反应。

[0121] 优选地,通过注射,例如静脉施用本发明TCR材料。在本发明TCR材料是表达本发明TCR的宿主细胞(或其群体)时,用于注射用细胞的药学上可接受的载体可以包含任何等渗载体,诸如,例如生理盐水(溶于水中的约0.90%w/v NaCl、溶于水中的约300mOsm/L NaCl或约9.0g NaCl/升水)、NORMOSOL R电解质溶液(Abbott,Chicago,IL)、PLASMA-LYTE A (Baxter,Deerfield,IL)、溶于水中的约5%右旋糖或林格氏乳酸盐(Ringer's lactate)。在实施方案中,药学上可接受的载体补充有人血清白蛋白。

[0122] 出于本发明的目的,所施用的本发明TCR材料的量或剂量(例如当本发明TCR材料是一种或多种细胞时的细胞数目)应足以在合理的时间范围内引起个体或动物中的例如治疗或预防反应。例如,本发明TCR材料的剂量应足以在自施用时开始约2小时或更长(例如12至24或更多小时)的时段内结合癌症抗原(例如突变的RAS)或者检测、治疗或预防癌症。在某些实施方案中,该时间段甚至可能更长。剂量将由特定的本发明TCR材料的功效和动物(例如人)的状况以及待治疗的动物(例如人)的体重来确定。

[0123] 用于确定施用剂量的许多测定法是本领域已知的。出于本发明的目的,可以使用如下的测定法来确定待施用于哺乳动物的起始剂量,所述测定法包括在一组各自给予不同剂量的T细胞的哺乳动物中,在向哺乳动物施用给定剂量的表达本发明TCR、多肽或蛋白质的T细胞时,比较靶细胞裂解或此类T细胞分泌IFN- γ 的程度。可以通过本领域已知的方法来测定在施用某一剂量时靶细胞裂解或IFN- γ 分泌的程度。

[0124] 本发明TCR材料的剂量还取决于可伴随施用特定本发明TCR材料的任何不良副作用的存在、性质和程度。通常,主治医师将考虑多种因素来决定用以治疗每一个体患者的本发明TCR材料的剂量,所述因素例如是年龄、体重、一般健康状况、饮食、性别、待施用的本发明TCR材料、施用途径和所治疗癌症的严重程度。在本发明TCR材料是细胞群体的实施方案中,每次输注所施用的细胞数目可有所变化,例如约 1×10^6 至约 1×10^{12} 个细胞或更多。在某些实施方案中,可以施用少于 1×10^6 个细胞。

[0125] 本领域普通技术人员会容易理解,可以以多种方式来修饰本发明的TCR材料,使得通过修饰来增加本发明TCR材料的治疗或预防功效。例如,本发明TCR材料可直接或通过桥联(bridge)间接缀合至化学治疗剂。本领域已知使化合物缀合至化学治疗剂的实践。本领域普通技术人员会认识到,本发明TCR材料上并非本发明TCR材料的功能所需的位点是用于连接桥联和/或化学治疗剂的合适位点,条件是该桥联和/或化学治疗剂在连接至本发明TCR材料后并不干扰本发明TCR材料的功能,即结合突变的RAS或者检测、治疗或预防癌症的能力。

[0126] 预期本发明的药物组合物、TCR、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体、宿主细胞和细胞群体可以用于治疗或预防癌症的方法中。不受特定理论的束缚,认为本发明TCR能特异性结合突变的RAS,使得TCR(或相关的本发明多肽或蛋白质)在由细胞表达时能够介导针对表达突变的RAS的靶细胞的免疫应答。在这方面,本发明提供了治疗或预防哺乳动物中的癌症的方法,其包括以有效治疗或预防哺乳动物中的癌症的量向哺乳动物施用以下物质中的任一种:本文所述的任何药物组合物、TCR、多肽或蛋白质;包含编码本文所述的任何TCR、多肽、蛋白质的核苷酸序列的任何核酸或重组表达载体;或者包含编码本文所述的任何TCR、多肽或蛋白质的重组载体的任何宿主细胞或细胞群体。

[0127] 本发明的实施方案提供了本文所述的任何药物组合物、TCR、多肽或蛋白质；包含编码本文所述的任何TCR、多肽、蛋白质的核苷酸序列的任何核酸或重组表达载体；或者包含编码本文所述的任何TCR、多肽或蛋白质的重组载体的任何宿主细胞或细胞群体，其用于治疗或预防哺乳动物中的癌症。

[0128] 本文所用的术语“治疗”和“预防”以及源于其的词语不一定意指100%或完全的治疗或预防。相反，存在不同程度的治疗或预防，其被本领域普通技术人员认为具有潜在的益处或治疗效果。在这方面，本发明的方法可以提供任何量任何水平的哺乳动物中癌症的治疗或预防。此外，由本发明方法提供的治疗或预防可以包括被治疗或预防的癌症的一种或多种病况或症状的治疗或预防。例如，治疗或预防可以包括促进肿瘤消退。另外，出于本文目的，“预防”可以涵盖延迟癌症或其症状或病况的发作。可选地或另外地，“预防”可以涵盖预防或延迟癌症或其症状或病况的复发。

[0129] 还提供了检测哺乳动物中癌症存在的方法。该方法包括：(i) 使包含来自哺乳动物的一个或多个细胞的样品与本文所述的本发明TCR、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群体或药物组合物中的任一种接触，从而形成复合物；以及(ii) 检测复合物，其中检测到复合物指示哺乳动物存在癌症。

[0130] 关于检测哺乳动物中的癌症的本发明方法，细胞样品可以是包含全细胞、其裂解物或全细胞裂解物部分（例如细胞核或细胞质部分、全蛋白部分或核酸部分）的样品。

[0131] 出于检测癌症的本发明方法的目的，接触可以发生于哺乳动物的体外或体内。优选地，接触是在体外。

[0132] 另外，可以通过本领域已知的多种方式来检测复合物。例如，本文所述的本发明TCR、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体、宿主细胞或细胞群体可以用可检测的标记物进行标记，所述可检测标记物是例如放射性同位素、荧光团（例如异硫氰酸荧光素（FITC）、藻红素（PE））、酶（例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶）和元素颗粒（例如金颗粒）。

[0133] 出于其中施用宿主细胞或细胞群体的本发明方法的目的，细胞可以是哺乳动物同种异体的或自体的细胞。优选地，细胞是哺乳动物自体的。

[0134] 对于本发明方法，癌症可以是任何癌症，包括以下的任一种：急性淋巴细胞性癌症、急性骨髓样白血病、肺泡横纹肌肉瘤、骨癌、脑癌、乳癌、肛门癌、肛管癌或直肠肛门癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、阴道癌、外阴癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓样癌症、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、宫颈癌、胃肠道类癌肿瘤、胶质瘤、霍奇金淋巴瘤（Hodgkin lymphoma）、下咽癌、肾脏癌症、喉癌、肝癌、肺癌、恶性间皮瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤（non-Hodgkin lymphoma）、口咽癌、卵巢癌、阴茎癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌及肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、输尿管癌和膀胱癌。优选的癌症是胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌或前列腺癌。优选地，肺癌是肺腺癌，卵巢癌是上皮卵巢癌，且胰腺癌症是胰腺腺癌。在本发明的实施方案中，癌症表达突变的人RAS氨基酸序列，其中突变的人RAS氨基酸序列是突变的人KRAS、突变的人HRAS或突变的人NRAS氨基酸序列。由癌症表达的突变的人KRAS、突变的人HRAS和突变的人NRAS可以如本文针对本发明其它方面所述。

[0135] 本发明方法中所提及的哺乳动物可以是任何哺乳动物。如本文所用，术语“哺乳动

物”是指任何哺乳动物,包括但不限于:啮齿目(Rodentia)哺乳动物(例如小鼠及仓鼠)和兔形目(Logomorpha)哺乳动物(例如兔)。优选地,哺乳动物来自食肉目(Carnivora),包含猫类(猫)和犬类(狗)。更优选地,哺乳动物来自偶蹄目(Artiodactyla)(包含牛类(牛)及猪类(猪))或奇蹄目(Perssodactyla)(包含马类(马))。最优选地,哺乳动物是灵长目(Primate)、猿目(Ceboid)或猴目(Simoid)(猴)或类人猿目(人类及猿)。特别优选的哺乳动物是人。

[0136] 以下实施例进一步阐释本发明,但当然不应理解为以任何方式限制本发明范围。

[0137] 实施例1

[0138] 本实施例显示了对具有G12V突变的人KRAS具有抗原特异性的TCR的分离,其中突变的KRAS由HLA-A*11:01分子呈递。

[0139] 在体外致敏(IVS)后,从子宫内膜癌患者的外周血中鉴定并分离出TCR。发现该患者的癌细胞表达KRAS G12V突变。简言之,将自体的DC用突变肽(MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLI)(SEQ ID NO:26)脉冲,并与从患者外周血中分选出的CD8 T细胞共培养10天。

[0140] 然后,测试T细胞针对用包含KRAS G12V突变的24-mer肽(MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLI)(SEQ ID NO:26)或相应的WT肽(MTEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLI)(SEQ ID NO:27)脉冲的自体DC的反应性。将肽重悬于DMSO中。将与用DMSO脉冲的DC一起培养的T细胞用作阴性对照。基于CD137表达和IFN- γ 产生(如通过ELISPOT测定法测量的)来测量T细胞反应性。然后基于CD137表达对反应性T细胞进行分选,扩增分选的T细胞数目,并如本实施例所述再次测试分选的扩增数目的细胞。结果显示在图1A和1B中。如图1A和1B所示,仅在与用KRAS G12V肽脉冲的DC共培养后,T细胞才上调CD137表达(图1A)并增加IFN- γ 的产生(图1B)。

[0141] 由于患者是HLA-A*11:01阳性的,因此预测KRAS G12V 9-mer和10-mer肽以高亲和力与该等位基因结合。因此,在HLA-A*11:01的情况下,利用四聚体染色技术来测试T细胞是否对KRAS^{G12V}有反应性。用四聚体(9-mer VVGAVGVGK(SEQ ID NO:29)或10-mer VVGAVGVGK(SEQ ID NO:30))对已经用KRAS G12V 24-mer肽进行IVS的外周血CD8+T细胞进行染色。PE和APC均是荧光团。将四聚体缀合至这些荧光团的一种或另一种。用两种四聚体对细胞染色增加了特异性的置信度。结果如图2所示(右图)。被修饰以表达TCR的T细胞被用作阴性对照,所述TCR在HLA-A*11:01的背景下识别KRAS G12D 10-mer。阴性对照的结果显示在图2中(左图)。如图2所示,已经用KRAS G12V 24-mer肽进行IVS的CD8 T细胞被KRAS^{G12V}-HLA-A*11:01四聚体染色,而阴性对照T细胞则未染色。

[0142] 使用单细胞测序方法对四聚体分选的细胞进行测序显示出一条 β 链和一条 α 链(表6)。TCR α 链和 β 链可变区的核苷酸序列分别为SEQ ID NO:31和32。

[0143] 表6

TCR ID	TCR 链	氨基酸序列(互补决定区加下划线)
[0144] KRAS ^{G12V} - HLA-A*11:01	α (TRAV14 /DV4*02)	MSLSLLKVV ^T ASLWLGP ^G IAQKITQTQPGMF VQEKEAVTL ^D CTYDTSDPSYGLFWYKQPSSGE MIFLIYQGSYDQQNATEGRYSLNFKARKSAN LVISASQLGDSAMYFCAMRGASQGGSEKLVFG KGTKLTVNP(SEQ ID NO:7)
	β (TRBV5- 1*01)	MGSRLLCWVLLCLLGAGPVKAGVTQTTPRYLIK TRGQQVTLSCSPISGHR ^S VSWYQQTPGQGLQF LFEYFSETQRNKGNFPGRFSGRQFSNSRSEM ^N VSTLELGDSALYLCASSLTSGGFDEQFFGPGTR LTVL(SEQ ID NO:8)

[0145] 实施例2

[0146] 本实施例显示了编码具有半胱氨酸取代的、LVL修饰的鼠恒定区的实施例1的TCR的表达盒的制备,并将该表达盒克隆到逆转录病毒载体中。

[0147] 将实施例1的TCR克隆到MSGV1-逆转录病毒载体中。将编码实施例1的分离的G12V反应性TCR(包含SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32的核苷酸序列)并包含半胱氨酸取代的、LVL修饰的鼠恒定区的核苷酸序列克隆到逆转录病毒载体中。 α 链鼠恒定区包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列,其中第48位的X是Cys,第112位的X是Leu,第114位的X是Ile,并且第115位的X是Val。 β 链恒定区包含SEQ ID NO:18的氨基酸序列,其中第57位的X是Cys。包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列的P2A接头(Wargo等人,Cancer Immunol.Immunother.,58(3):383-94(2009))位于 α 链恒定区和 β 链可变区之间。从5'端到3'端,逆转录病毒载体包含以下核苷酸序列,其编码TCR β 链可变区,随后是修饰的 β 链鼠恒定区,随后是P2A接头序列,随后是TCR α 链可变区,随后是修饰的 α 链鼠恒定区。

[0148] 实施例3

[0149] 本实施例显示了用实施例2的TCR转导的外周血同种异体T细胞特异性识别具有G12V突变的人KRAS,其中突变的KRAS由HLA-A*11:01分子呈递。

[0150] 制备了编码实施例2的TCR的逆转录病毒,并将其用于转导来自两个供体的外周血同种异体T细胞(方法如Tran等人,N.Engl.J.Med.,375:2255-2262(2016)中所述)。通过流式细胞术测量TCR在细胞表面上的表达。结果显示在图3中。如图3所示,在细胞表面检测到鼠TCR β 链恒定区(mTCR β)表达。

[0151] 测试用实施例2的TCR转导的同种异体细胞对表达KRAS G12D/KRAS G12C或KRAS G12V的靶癌细胞系的反应性。如图4所示,靶癌细胞系对HLA-A11表达呈阳性或阴性。通过IFN- γ 产生(ELISPOT)和CD137上调(流式细胞术)测量反应性。结果显示在图4中。如图4所示,发现转导的细胞对表达KRAS^{G12V}和HLA-A*11:01的癌细胞具有特异性反应。

[0152] 实施例4

[0153] 本实施例显示了实施例2的TCR特异性识别KRAS G12V 9-mer肽VVGAVGVGK(SEQ ID NO:29)和KRAS G12V 10-mer肽KRAS G12V 10-mer肽VVVGAVGVGK(SEQ ID NO:30)中的每一

种。

[0154] 如实施例3中所述,用实施例2的TCR转导同种异体T细胞。用多种浓度的KRAS G12V 9-mer肽VVGAVGVGK (SEQ ID NO:29)、KRAS G12V 10-mer肽VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:30)、KRAS WT9-mer肽VVGAGGVGK (SEQ ID NO:33)或KRAS WT 10-mer肽VVVGAGGVGK (SEQ ID NO:34)脉冲COS7/A11靶细胞。将转导的T细胞与脉冲的靶细胞共培养。测量IFN- γ 的分泌。结果显示在图5A(9-mer)和图5B(10-mer)中。如图5A-5B所示,TCR特异性识别KRAS G12V 9-mer肽和KRAS G12V 10-mer肽中的每一种。

[0155] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利在此通过引用并入,其程度如同每份参考文献单独地和具体地表示为通过引用并入并且在本文以其整体示出。

[0156] 在描述本发明的上下文中使用的术语“一个/一种”和“所述”和“至少一种/一个”以及类似的指示物(特别是在以下权利要求的上下文中)应被解释为涵盖单数和复数两者,除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。术语“至少一种/一个”之后一项或多项列举(例如,“A和B中的至少一种/一个”)的使用应被解释为意指选自列出的项中的一项(A或B)或者两个或更多个列出的项的任意组合(A和B),除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应被解释为开放式的术语(即意指“包括,但不限于”),除非另外指明。本文数值的范围的描述仅旨在用作分别提及属于范围内的每个单独数值的速记法,除非本文另外指出,并且将每个单独数值并入说明书,如同其在本文中被独立描述一样。本文描述的所有方法可以任何合适的顺序进行,除非本文另外指出或与上下文明显矛盾。本文提供的任何和所有的实例或示例性语言(如“诸如”)的使用仅仅旨在更好地阐明本发明,不会对本发明的范围构成限制,除非以另外方式进行保护。不应将本说明书中的语言解释为表明任何未要求保护的组分对实施本发明是必要的。

[0157] 本发明的优选实施方案在本文中描述,包括发明人已知的实施该发明的最佳模式。对本领域的普通技术人员来说,阅读上述说明书后这些优选的实施方案的变型可以是显而易见的。发明人期望本领域技术人员酌情利用这些变型,并且发明人有意以不同于本文具体描述的方式实施该发明。因此,在适用法律允许的情况下,本发明包括在所附的权利要求中所述主题的所有变化和等同物。而且,在其所有可能的变型中上述要素的任何组合包括于本发明中,除非本文另外说明或与上下文明显矛盾。

[0001] 序列表

[0002] <110> 美国卫生和人力服务部 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE

[0003] SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES)

[0004] <120> 针对突变的RAS的HLA I类限制性T细胞受体

[0005] <130> 741039

[0006] <150> US 62/594,244

[0007] <151> 2017-12-04

[0008] <160> 34

[0009] <170> PatentIn version 3.5

[0010] <210> 1

[0011] <211> 7

[0012] <212> PRT

[0013] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0014] <400> 1

[0015] Thr Ser Asp Pro Ser Tyr Gly

[0016] 1 5

[0017] <210> 2

[0018] <211> 8

[0019] <212> PRT

[0020] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0021] <400> 2

[0022] Gln Gly Ser Tyr Asp Gln Gln Asn

[0023] 1 5

[0024] <210> 3

[0025] <211> 16

[0026] <212> PRT

[0027] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0028] <400> 3

[0029] Cys Ala Met Arg Gly Ala Ser Gln Gly Gly Ser Glu Lys Leu Val Phe

[0030] 1 5 10 15

[0031] <210> 4

[0032] <211> 5

[0033] <212> PRT

[0034] <213> 智人 (Homo sapiens)

[0035] <400> 4

[0036] Ser Gly His Arg Ser

[0037] 1 5

[0038]	<210>	5
[0039]	<211>	6
[0040]	<212>	PRT
[0041]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0042]	<400>	5
[0043]	Tyr Phe Ser Glu Thr Gln	
[0044]	1	5
[0045]	<210>	6
[0046]	<211>	15
[0047]	<212>	PRT
[0048]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0049]	<400>	6
[0050]	Cys Ala Ser Ser Leu Thr Ser Gly Gly Phe Asp Glu Gln Phe Phe	
[0051]	1	5 10 15
[0052]	<210>	7
[0053]	<211>	137
[0054]	<212>	PRT
[0055]	<213>	智人(Homo sapiens)
[0056]	<400>	7
[0057]	Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu	
[0058]	1	5 10 15
[0059]	Gly Pro Gly Ile Ala Gln Lys Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe	
[0060]		20 25 30
[0061]	Val Gln Glu Lys Glu Ala Val Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser	
[0062]		35 40 45
[0063]	Asp Pro Ser Tyr Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu	
[0064]		50 55 60
[0065]	Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Gln Gln Asn Ala Thr	
[0066]	65	70 75 80
[0067]	Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn	
[0068]		85 90 95
[0069]	Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys	
[0070]		100 105 110
[0071]	Ala Met Arg Gly Ala Ser Gln Gly Gly Ser Glu Lys Leu Val Phe Gly	
[0072]		115 120 125
[0073]	Lys Gly Thr Lys Leu Thr Val Asn Pro	
[0074]		130 135
[0075]	<210>	8
[0076]	<211>	133

[0077]	<212> PRT															
[0078]	<213> 智人 (Homo sapiens)															
[0079]	<400> 8															
[0080]	Met	Gly	Ser	Arg	Leu	Leu	Cys	Trp	Val	Leu	Leu	Cys	Leu	Leu	Gly	Ala
[0081]	1				5					10					15	
[0082]	Gly	Pro	Val	Lys	Ala	Gly	Val	Thr	Gln	Thr	Pro	Arg	Tyr	Leu	Ile	Lys
[0083]					20					25					30	
[0084]	Thr	Arg	Gly	Gln	Gln	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Ser	Pro	Ile	Ser	Gly	His
[0085]					35					40					45	
[0086]	Arg	Ser	Val	Ser	Trp	Tyr	Gln	Gln	Thr	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Gln	Phe
[0087]					50					55					60	
[0088]	Leu	Phe	Glu	Tyr	Phe	Ser	Glu	Thr	Gln	Arg	Asn	Lys	Gly	Asn	Phe	Pro
[0089]	65						70					75				80
[0090]	Gly	Arg	Phe	Ser	Gly	Arg	Gln	Phe	Ser	Asn	Ser	Arg	Ser	Glu	Met	Asn
[0091]							85					90				95
[0092]	Val	Ser	Thr	Leu	Glu	Leu	Gly	Asp	Ser	Ala	Leu	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser
[0093]							100					105			110	
[0094]	Ser	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Phe	Asp	Glu	Gln	Phe	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr
[0095]							115					120			125	
[0096]	Arg	Leu	Thr	Val	Leu											
[0097]							130									
[0098]	<210> 9															
[0099]	<211> 189															
[0100]	<212> PRT															
[0101]	<213> 智人 (Homo sapiens)															
[0102]	<400> 9															
[0103]	Met	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Val	Val	Val	Gly	Ala	Gly	Gly	Val	Gly	Lys
[0104]	1					5					10					15
[0105]	Ser	Ala	Leu	Thr	Ile	Gln	Leu	Ile	Gln	Asn	His	Phe	Val	Asp	Glu	Tyr
[0106]						20					25				30	
[0107]	Asp	Pro	Thr	Ile	Glu	Asp	Ser	Tyr	Arg	Lys	Gln	Val	Val	Ile	Asp	Gly
[0108]						35					40				45	
[0109]	Glu	Thr	Cys	Leu	Leu	Asp	Ile	Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Gln	Glu	Glu	Tyr
[0110]							50					55			60	
[0111]	Ser	Ala	Met	Arg	Asp	Gln	Tyr	Met	Arg	Thr	Gly	Glu	Gly	Phe	Leu	Cys
[0112]	65						70					75				80
[0113]	Val	Phe	Ala	Ile	Asn	Asn	Thr	Lys	Ser	Phe	Glu	Asp	Ile	His	His	Tyr
[0114]							85					90				95
[0115]	Arg	Glu	Gln	Ile	Lys	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Glu	Asp	Val	Pro	Met	Val

[0116]	100	105	110
[0117]	Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys		
[0118]	115	120	125
[0119]	Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr		
[0120]	130	135	140
[0121]	Ser Ala Lys Thr Arg Gln Arg Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val		
[0122]	145	150	155
[0123]	Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Ile Ser Lys Glu Glu Lys		
[0124]	165	170	175
[0125]	Thr Pro Gly Cys Val Lys Ile Lys Lys Cys Ile Ile Met		
[0126]	180	185	
[0127]	<210> 10		
[0128]	<211> 188		
[0129]	<212> PRT		
[0130]	<213> 智人(Homo sapiens)		
[0131]	<400> 10		
[0132]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys		
[0133]	1	5	10
[0134]	Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr		
[0135]	20	25	30
[0136]	Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly		
[0137]	35	40	45
[0138]	Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr		
[0139]	50	55	60
[0140]	Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys		
[0141]	65	70	75
[0142]	Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr		
[0143]	85	90	95
[0144]	Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val		
[0145]	100	105	110
[0146]	Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys		
[0147]	115	120	125
[0148]	Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr		
[0149]	130	135	140
[0150]	Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val		
[0151]	145	150	155
[0152]	Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys		
[0153]	165	170	175
[0154]	Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met		

[0155]		180		185
[0156]	<210>	11		
[0157]	<211>	189		
[0158]	<212>	PRT		
[0159]	<213>	智人 (Homo sapiens)		
[0160]	<400>	11		
[0161]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys			
[0162]	1	5	10	15
[0163]	Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr			
[0164]		20	25	30
[0165]	Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly			
[0166]		35	40	45
[0167]	Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr			
[0168]		50	55	60
[0169]	Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys			
[0170]	65	70	75	80
[0171]	Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His Gln Tyr			
[0172]		85	90	95
[0173]	Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val			
[0174]		100	105	110
[0175]	Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Ala Ala Arg Thr Val Glu Ser Arg			
[0176]		115	120	125
[0177]	Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Tyr Ile Glu Thr			
[0178]		130	135	140
[0179]	Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val			
[0180]	145	150	155	160
[0181]	Arg Glu Ile Arg Gln His Lys Leu Arg Lys Leu Asn Pro Pro Asp Glu			
[0182]		165	170	175
[0183]	Ser Gly Pro Gly Cys Met Ser Cys Lys Cys Val Leu Ser			
[0184]		180	185	
[0185]	<210>	12		
[0186]	<211>	189		
[0187]	<212>	PRT		
[0188]	<213>	智人 (Homo sapiens)		
[0189]	<400>	12		
[0190]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys			
[0191]	1	5	10	15
[0192]	Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr			
[0193]		20	25	30

[0194]	Asp	Pro	Thr	Ile	Glu	Asp	Ser	Tyr	Arg	Lys	Gln	Val	Val	Ile	Asp	Gly
[0195]				35					40					45		
[0196]	Glu	Thr	Cys	Leu	Leu	Asp	Ile	Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Gln	Glu	Glu	Tyr
[0197]			50					55					60			
[0198]	Ser	Ala	Met	Arg	Asp	Gln	Tyr	Met	Arg	Thr	Gly	Glu	Gly	Phe	Leu	Cys
[0199]	65					70					75					80
[0200]	Val	Phe	Ala	Ile	Asn	Asn	Ser	Lys	Ser	Phe	Ala	Asp	Ile	Asn	Leu	Tyr
[0201]					85					90					95	
[0202]	Arg	Glu	Gln	Ile	Lys	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Asp	Asp	Val	Pro	Met	Val
[0203]				100					105					110		
[0204]	Leu	Val	Gly	Asn	Lys	Cys	Asp	Leu	Pro	Thr	Arg	Thr	Val	Asp	Thr	Lys
[0205]			115					120					125			
[0206]	Gln	Ala	His	Glu	Leu	Ala	Lys	Ser	Tyr	Gly	Ile	Pro	Phe	Ile	Glu	Thr
[0207]			130					135					140			
[0208]	Ser	Ala	Lys	Thr	Arg	Gln	Gly	Val	Glu	Asp	Ala	Phe	Tyr	Thr	Leu	Val
[0209]	145					150					155					160
[0210]	Arg	Glu	Ile	Arg	Gln	Tyr	Arg	Met	Lys	Lys	Leu	Asn	Ser	Ser	Asp	Asp
[0211]					165					170					175	
[0212]	Gly	Thr	Gln	Gly	Cys	Met	Gly	Leu	Pro	Cys	Val	Val	Met			
[0213]				180						185						
[0214]	<210> 13															
[0215]	<211> 189															
[0216]	<212> PRT															
[0217]	<213> 智人(Homo sapiens)															
[0218]	<400> 13															
[0219]	Met	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Val	Val	Val	Gly	Ala	Val	Gly	Val	Gly	Lys
[0220]	1				5					10					15	
[0221]	Ser	Ala	Leu	Thr	Ile	Gln	Leu	Ile	Gln	Asn	His	Phe	Val	Asp	Glu	Tyr
[0222]				20					25					30		
[0223]	Asp	Pro	Thr	Ile	Glu	Asp	Ser	Tyr	Arg	Lys	Gln	Val	Val	Ile	Asp	Gly
[0224]			35						40					45		
[0225]	Glu	Thr	Cys	Leu	Leu	Asp	Ile	Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Gln	Glu	Glu	Tyr
[0226]			50					55					60			
[0227]	Ser	Ala	Met	Arg	Asp	Gln	Tyr	Met	Arg	Thr	Gly	Glu	Gly	Phe	Leu	Cys
[0228]	65					70					75					80
[0229]	Val	Phe	Ala	Ile	Asn	Asn	Thr	Lys	Ser	Phe	Glu	Asp	Ile	His	His	Tyr
[0230]					85					90					95	
[0231]	Arg	Glu	Gln	Ile	Lys	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Glu	Asp	Val	Pro	Met	Val
[0232]				100					105					110		

[0233]	Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
[0234]	115 120 125
[0235]	Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
[0236]	130 135 140
[0237]	Ser Ala Lys Thr Arg Gln Arg Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
[0238]	145 150 155 160
[0239]	Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Ile Ser Lys Glu Glu Lys
[0240]	165 170 175
[0241]	Thr Pro Gly Cys Val Lys Ile Lys Lys Cys Ile Ile Met
[0242]	180 185
[0243]	<210> 14
[0244]	<211> 188
[0245]	<212> PRT
[0246]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0247]	<400> 14
[0248]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys
[0249]	1 5 10 15
[0250]	Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
[0251]	20 25 30
[0252]	Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
[0253]	35 40 45
[0254]	Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
[0255]	50 55 60
[0256]	Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
[0257]	65 70 75 80
[0258]	Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
[0259]	85 90 95
[0260]	Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
[0261]	100 105 110
[0262]	Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
[0263]	115 120 125
[0264]	Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
[0265]	130 135 140
[0266]	Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
[0267]	145 150 155 160
[0268]	Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys
[0269]	165 170 175
[0270]	Lys Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met
[0271]	180 185

41

[0311]	35	40	45
[0312]	Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr		
[0313]	50	55	60
[0314]	Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys		
[0315]	65	70	75
[0316]	Val Phe Ala Ile Asn Asn Ser Lys Ser Phe Ala Asp Ile Asn Leu Tyr		
[0317]	85	90	95
[0318]	Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Asp Asp Val Pro Met Val		
[0319]	100	105	110
[0320]	Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Thr Arg Thr Val Asp Thr Lys		
[0321]	115	120	125
[0322]	Gln Ala His Glu Leu Ala Lys Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr		
[0323]	130	135	140
[0324]	Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val		
[0325]	145	150	155
[0326]	Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Met Lys Lys Leu Asn Ser Ser Asp Asp		
[0327]	165	170	175
[0328]	Gly Thr Gln Gly Cys Met Gly Leu Pro Cys Val Val Met		
[0329]	180	185	
[0330]	<210> 17		
[0331]	<211> 137		
[0332]	<212> PRT		
[0333]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0334]	<220>		
[0335]	<223> 合成的		
[0336]	<220>		
[0337]	<221> MISC_FEATURE		
[0338]	<222> (48) .. (48)		
[0339]	<223> X是Thr或Cys		
[0340]	<220>		
[0341]	<221> MISC_FEATURE		
[0342]	<222> (112) .. (112)		
[0343]	<223> X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp		
[0344]	<220>		
[0345]	<221> MISC_FEATURE		
[0346]	<222> (114) .. (114)		
[0347]	<223> X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp		
[0348]	<220>		
[0349]	<221> MISC_FEATURE		

[0350] <222> (115) .. (115)
 [0351] <223> X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp
 [0352] <400> 17
 [0353] Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg
 [0354] 1 5 10 15
 [0355] Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile
 [0356] 20 25 30
 [0357] Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Xaa
 [0358] 35 40 45
 [0359] Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala
 [0360] 50 55 60
 [0361] Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr
 [0362] 65 70 75 80
 [0363] Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr
 [0364] 85 90 95
 [0365] Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Xaa
 [0366] 100 105 110
 [0367] Val Xaa Xaa Leu Arg Ile Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu
 [0368] 115 120 125
 [0369] Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 [0370] 130 135
 [0371] <210> 18
 [0372] <211> 173
 [0373] <212> PRT
 [0374] <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 [0375] <220>
 [0376] <223> 合成的
 [0377] <220>
 [0378] <221> MISC_FEATURE
 [0379] <222> (57) .. (57)
 [0380] <223> X是Ser或Cys
 [0381] <400> 18
 [0382] Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
 [0383] 1 5 10 15
 [0384] Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 [0385] 20 25 30
 [0386] Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 [0387] 35 40 45
 [0388] Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Xaa Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys

[0389]	50	55	60
[0390]	Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala		
[0391]	65	70	75
[0392]	Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe		
[0393]	85	90	95
[0394]	His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro		
[0395]	100	105	110
[0396]	Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly		
[0397]	115	120	125
[0398]	Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu		
[0399]	130	135	140
[0400]	Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser		
[0401]	145	150	155
[0402]	Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser		
[0403]	165	170	
[0404]	<210> 19		
[0405]	<211> 137		
[0406]	<212> PRT		
[0407]	<213> 小家鼠 (Mus musculus)		
[0408]	<400> 19		
[0409]	Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg		
[0410]	1	5	10
[0411]	Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile		
[0412]	20	25	30
[0413]	Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr		
[0414]	35	40	45
[0415]	Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala		
[0416]	50	55	60
[0417]	Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr		
[0418]	65	70	75
[0419]	Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr		
[0420]	85	90	95
[0421]	Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser		
[0422]	100	105	110
[0423]	Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu		
[0424]	115	120	125
[0425]	Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0426]	130	135	
[0427]	<210> 20		

[0428] <211> 173
 [0429] <212> PRT
 [0430] <213> 小家鼠 (Mus musculus)
 [0431] <400> 20
 [0432] Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
 [0433] 1 5 10 15
 [0434] Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 [0435] 20 25 30
 [0436] Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 [0437] 35 40 45
 [0438] Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys
 [0439] 50 55 60
 [0440] Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
 [0441] 65 70 75 80
 [0442] Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
 [0443] 85 90 95
 [0444] His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
 [0445] 100 105 110
 [0446] Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
 [0447] 115 120 125
 [0448] Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu
 [0449] 130 135 140
 [0450] Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser
 [0451] 145 150 155 160
 [0452] Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
 [0453] 165 170
 [0454] <210> 21
 [0455] <211> 274
 [0456] <212> PRT
 [0457] <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 [0458] <220>
 [0459] <223> 合成的
 [0460] <220>
 [0461] <221> MISC_FEATURE
 [0462] <222> (185) .. (185)
 [0463] <223> X是Thr或Cys
 [0464] <220>
 [0465] <221> MISC_FEATURE
 [0466] <222> (249) .. (249)

[0467] <223> X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp
 [0468] <220>
 [0469] <221> MISC_FEATURE
 [0470] <222> (251) .. (251)
 [0471] <223> X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp
 [0472] <220>
 [0473] <221> MISC_FEATURE
 [0474] <222> (252) .. (252)
 [0475] <223> X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp
 [0476] <400> 21
 [0477] Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu
 [0478] 1 5 10 15
 [0479] Gly Pro Gly Ile Ala Gln Lys Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe
 [0480] 20 25 30
 [0481] Val Gln Glu Lys Glu Ala Val Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser
 [0482] 35 40 45
 [0483] Asp Pro Ser Tyr Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu
 [0484] 50 55 60
 [0485] Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Gln Gln Asn Ala Thr
 [0486] 65 70 75 80
 [0487] Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn
 [0488] 85 90 95
 [0489] Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
 [0490] 100 105 110
 [0491] Ala Met Arg Gly Ala Ser Gln Gly Gly Ser Glu Lys Leu Val Phe Gly
 [0492] 115 120 125
 [0493] Lys Gly Thr Lys Leu Thr Val Asn Pro Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro
 [0494] 130 135 140
 [0495] Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys
 [0496] 145 150 155 160
 [0497] Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu
 [0498] 165 170 175
 [0499] Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Xaa Val Leu Asp Met Lys Ala Met
 [0500] 180 185 190
 [0501] Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe
 [0502] 195 200 205
 [0503] Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser
 [0504] 210 215 220
 [0505] Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp

[0506]	225	230	235	240
[0507]	Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Xaa Val Xaa Xaa Leu Arg Ile Leu			
[0508]		245	250	255
[0509]	Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp			
[0510]		260	265	270
[0511]	Ser Ser			
[0512]	<210> 22			
[0513]	<211> 306			
[0514]	<212> PRT			
[0515]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0516]	<220>			
[0517]	<223> 合成的			
[0518]	<220>			
[0519]	<221> MISC_FEATURE			
[0520]	<222> (190) .. (190)			
[0521]	<223> X是Ser或Cys			
[0522]	<400> 22			
[0523]	Met Gly Ser Arg Leu Leu Cys Trp Val Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala			
[0524]	1	5	10	15
[0525]	Gly Pro Val Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Ile Lys			
[0526]		20	25	30
[0527]	Thr Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Ser Cys Ser Pro Ile Ser Gly His			
[0528]		35	40	45
[0529]	Arg Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Gln Phe			
[0530]		50	55	60
[0531]	Leu Phe Glu Tyr Phe Ser Glu Thr Gln Arg Asn Lys Gly Asn Phe Pro			
[0532]	65	70	75	80
[0533]	Gly Arg Phe Ser Gly Arg Gln Phe Ser Asn Ser Arg Ser Glu Met Asn			
[0534]		85	90	95
[0535]	Val Ser Thr Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser			
[0536]		100	105	110
[0537]	Ser Leu Thr Ser Gly Gly Phe Asp Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr			
[0538]		115	120	125
[0539]	Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val			
[0540]		130	135	140
[0541]	Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala			
[0542]	145	150	155	160
[0543]	Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu			
[0544]		165	170	175

[0545]	Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Xaa Thr Asp
[0546]	180 185 190
[0547]	Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg
[0548]	195 200 205
[0549]	Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg
[0550]	210 215 220
[0551]	Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu
[0552]	225 230 235 240
[0553]	Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly
[0554]	245 250 255
[0555]	Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu
[0556]	260 265 270
[0557]	Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr
[0558]	275 280 285
[0559]	Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys
[0560]	290 295 300
[0561]	Asn Ser
[0562]	305
[0563]	<210> 23
[0564]	<211> 274
[0565]	<212> PRT
[0566]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0567]	<220>
[0568]	<223> 合成的
[0569]	<400> 23
[0570]	Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu
[0571]	1 5 10 15
[0572]	Gly Pro Gly Ile Ala Gln Lys Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe
[0573]	20 25 30
[0574]	Val Gln Glu Lys Glu Ala Val Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser
[0575]	35 40 45
[0576]	Asp Pro Ser Tyr Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu
[0577]	50 55 60
[0578]	Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Gln Gln Asn Ala Thr
[0579]	65 70 75 80
[0580]	Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn
[0581]	85 90 95
[0582]	Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
[0583]	100 105 110

[0584]	Ala Met Arg Gly Ala Ser Gln Gly Gly Ser Glu Lys Leu Val Phe Gly
[0585]	115 120 125
[0586]	Lys Gly Thr Lys Leu Thr Val Asn Pro Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro
[0587]	130 135 140
[0588]	Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys
[0589]	145 150 155 160
[0590]	Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu
[0591]	165 170 175
[0592]	Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met
[0593]	180 185 190
[0594]	Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe
[0595]	195 200 205
[0596]	Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser
[0597]	210 215 220
[0598]	Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
[0599]	225 230 235 240
[0600]	Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu
[0601]	245 250 255
[0602]	Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp
[0603]	260 265 270
[0604]	Ser Ser
[0605]	<210> 24
[0606]	<211> 306
[0607]	<212> PRT
[0608]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)
[0609]	<220>
[0610]	<223> 合成的
[0611]	<400> 24
[0612]	Met Gly Ser Arg Leu Leu Cys Trp Val Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala
[0613]	1 5 10 15
[0614]	Gly Pro Val Lys Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Ile Lys
[0615]	20 25 30
[0616]	Thr Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Ser Cys Ser Pro Ile Ser Gly His
[0617]	35 40 45
[0618]	Arg Ser Val Ser Trp Tyr Gln Gln Thr Pro Gly Gln Gly Leu Gln Phe
[0619]	50 55 60
[0620]	Leu Phe Glu Tyr Phe Ser Glu Thr Gln Arg Asn Lys Gly Asn Phe Pro
[0621]	65 70 75 80
[0622]	Gly Arg Phe Ser Gly Arg Gln Phe Ser Asn Ser Arg Ser Glu Met Asn

[0623]		85		90		95	
[0624]	Val Ser Thr Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser						
[0625]		100		105		110	
[0626]	Ser Leu Thr Ser Gly Gly Phe Asp Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr						
[0627]		115		120		125	
[0628]	Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val						
[0629]		130		135		140	
[0630]	Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala						
[0631]	145		150		155		160
[0632]	Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu						
[0633]		165		170		175	
[0634]	Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp						
[0635]		180		185		190	
[0636]	Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg						
[0637]		195		200		205	
[0638]	Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg						
[0639]		210		215		220	
[0640]	Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu						
[0641]	225		230		235		240
[0642]	Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly						
[0643]		245		250		255	
[0644]	Arg Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu						
[0645]		260		265		270	
[0646]	Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr						
[0647]		275		280		285	
[0648]	Ala Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys						
[0649]		290		295		300	
[0650]	Asn Ser						
[0651]	305						
[0652]	<210> 25						
[0653]	<211> 27						
[0654]	<212> PRT						
[0655]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)						
[0656]	<220>						
[0657]	<223> 合成的						
[0658]	<400> 25						
[0659]	Arg Ala Lys Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys						
[0660]	1	5		10		15	
[0661]	Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro						

[0662]	20	25
[0663]	<210> 26	
[0664]	<211> 24	
[0665]	<212> PRT	
[0666]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[0667]	<400> 26	
[0668]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys	
[0669]	1 5 10 15	
[0670]	Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile	
[0671]	20	
[0672]	<210> 27	
[0673]	<211> 24	
[0674]	<212> PRT	
[0675]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[0676]	<400> 27	
[0677]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys	
[0678]	1 5 10 15	
[0679]	Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile	
[0680]	20	
[0681]	<210> 28	
[0682]	<211> 23	
[0683]	<212> PRT	
[0684]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[0685]	<400> 28	
[0686]	Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys Ser	
[0687]	1 5 10 15	
[0688]	Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile	
[0689]	20	
[0690]	<210> 29	
[0691]	<211> 9	
[0692]	<212> PRT	
[0693]	<213> 智人 (Homo sapiens)	
[0694]	<400> 29	
[0695]	Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys	
[0696]	1 5	
[0697]	<210> 30	
[0698]	<211> 10	
[0699]	<212> PRT	
[0700]	<213> 智人 (Homo sapiens)	

[0701]	<400> 30
[0702]	Val Val Val Gly Ala Val Gly Val Gly Lys
[0703]	1 5 10
[0704]	<210> 31
[0705]	<211> 426
[0706]	<212> DNA
[0707]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0708]	<400> 31
[0709]	atgcatctga gctccctgct gaaggtggtg acagccagcc tgtggctggg accaggaatc 60
[0710]	gcacagaaga tcacccagac acagcccggc atgtttgtgc aggagaagga ggccgtgacc 120
[0711]	ctggattgca cctacgacac atctgatccc agctacggcc tgttctggta taagcagcct 180
[0712]	tctagcggcg agatgatctt tctgatctac cagggcagct atgaccagca gaacgccacc 240
[0713]	gagggcagat actctctgaa tttccagaag gccaggaaga gcgccaacct ggcatcagc 300
[0714]	gcctcccagc tgggcgattc cgccatgtat ttctgtgcca tgagaggcgc ctcacagggc 360
[0715]	ggctctgaga agctggtgtt tggcaagggc accaagctga cagtgaacct taatattcag 420
[0716]	aatccc 426
[0717]	<210> 32
[0718]	<211> 399
[0719]	<212> DNA
[0720]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0721]	<400> 32
[0722]	atggcgtccc gactgctgtg ctgggtcctg ctgtgcctgc tgggggctgg gcctgtcaaa 60
[0723]	gctggcgctca ctcagactcc acgatacctg atcaagacca ggggccagca ggtgacactg 120
[0724]	tcttgcagcc caatctccgg ccaccgctcc gtgtcttggg accagcagac ccctggccag 180
[0725]	ggcctccagt tcctgtttga gtatttctct gagacacagc ggaacaaggg caattttccc 240
[0726]	ggccggttta gcggcagaca gtttagcaac tccaggtctg agatgaatgt gagcaccctg 300
[0727]	gagctgggcg actccgccct gtacctgtgc gccagctccc tgacttctgg cgggtttgat 360
[0728]	gagcagttct ttgggcctgg cactcggctg accgtcctg 399
[0729]	<210> 33
[0730]	<211> 9
[0731]	<212> PRT
[0732]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0733]	<400> 33
[0734]	Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys
[0735]	1 5
[0736]	<210> 34
[0737]	<211> 10
[0738]	<212> PRT
[0739]	<213> 智人(Homo sapiens)

[0740]	<400> 34									
[0741]	Val	Val	Val	Gly	Ala	Gly	Gly	Val	Gly	Lys
[0742]	1				5					10

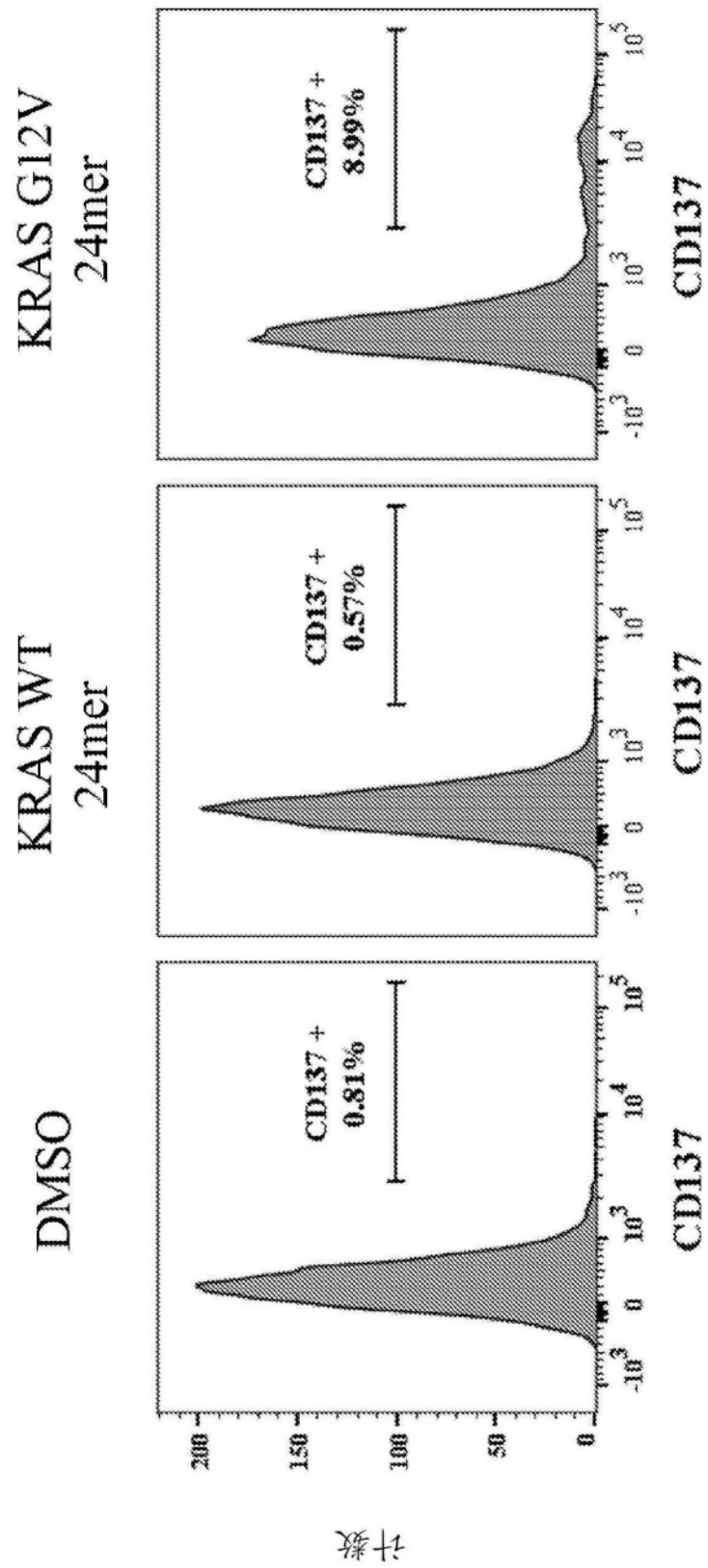


图1A

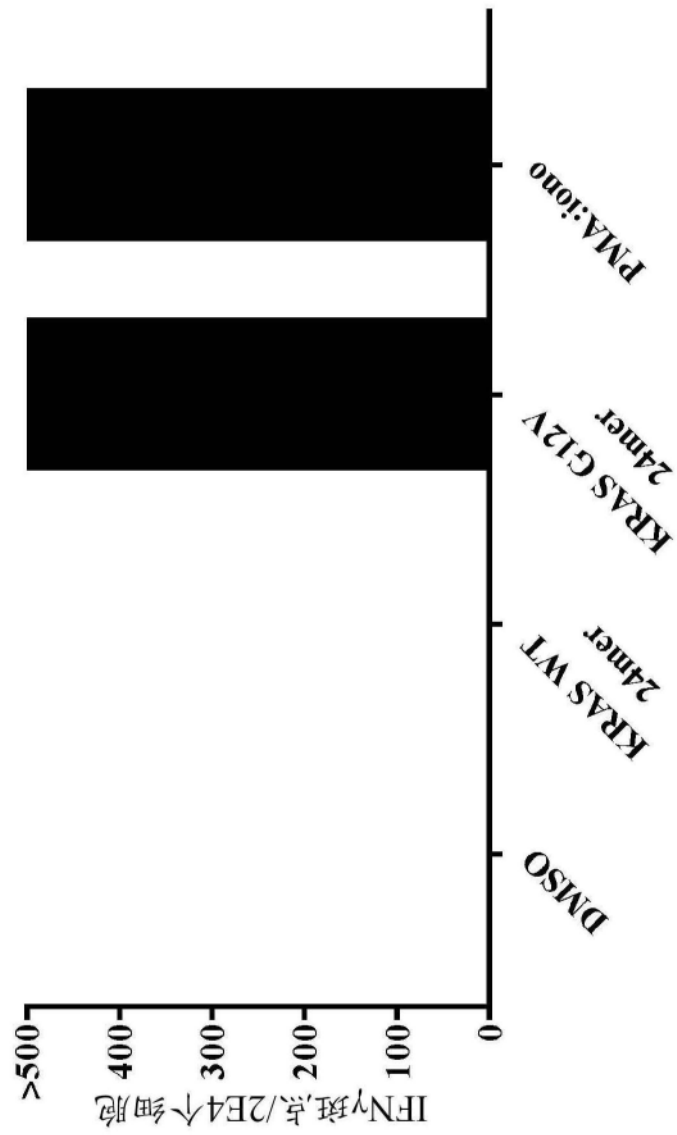


图1B

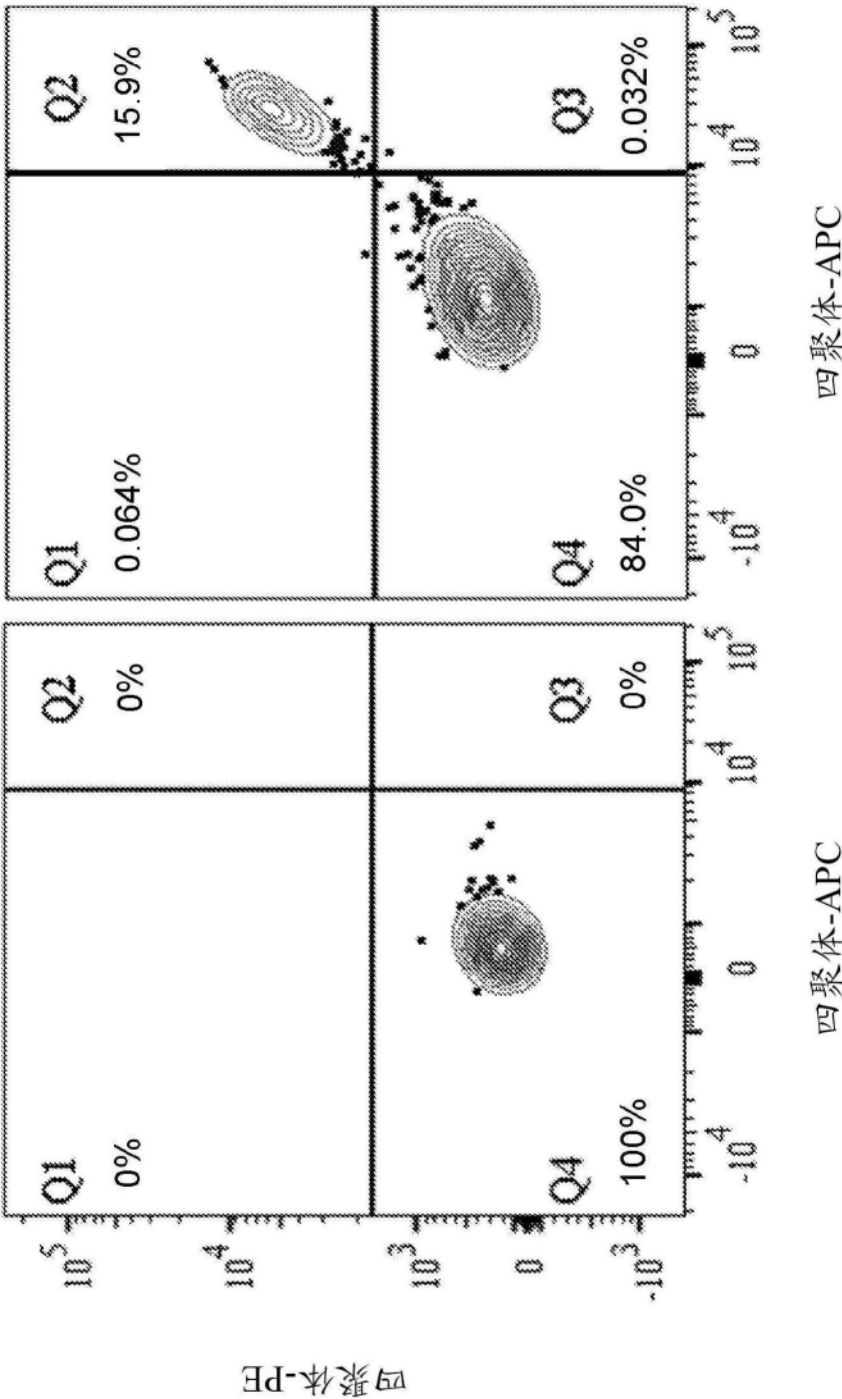


图2

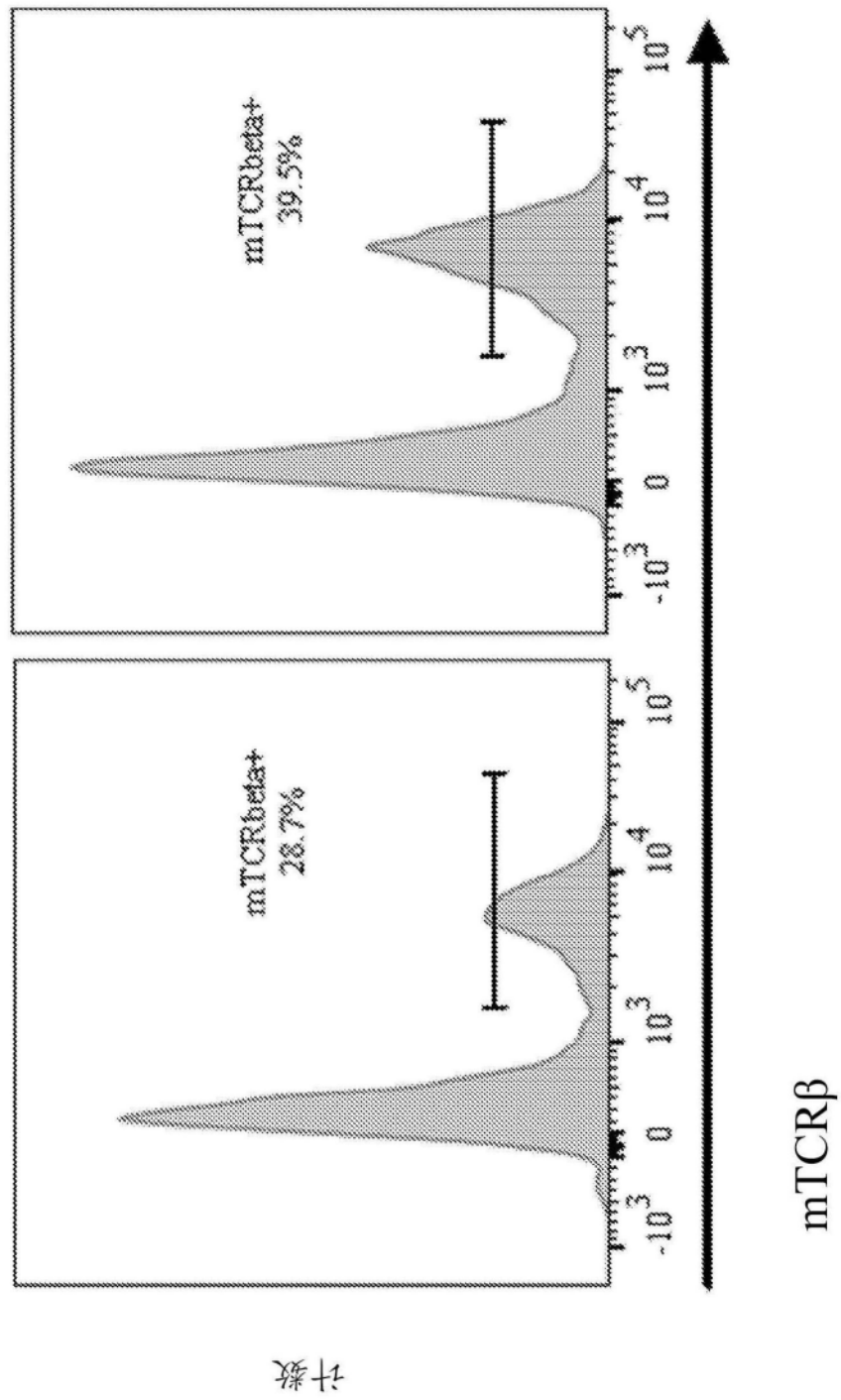


图3

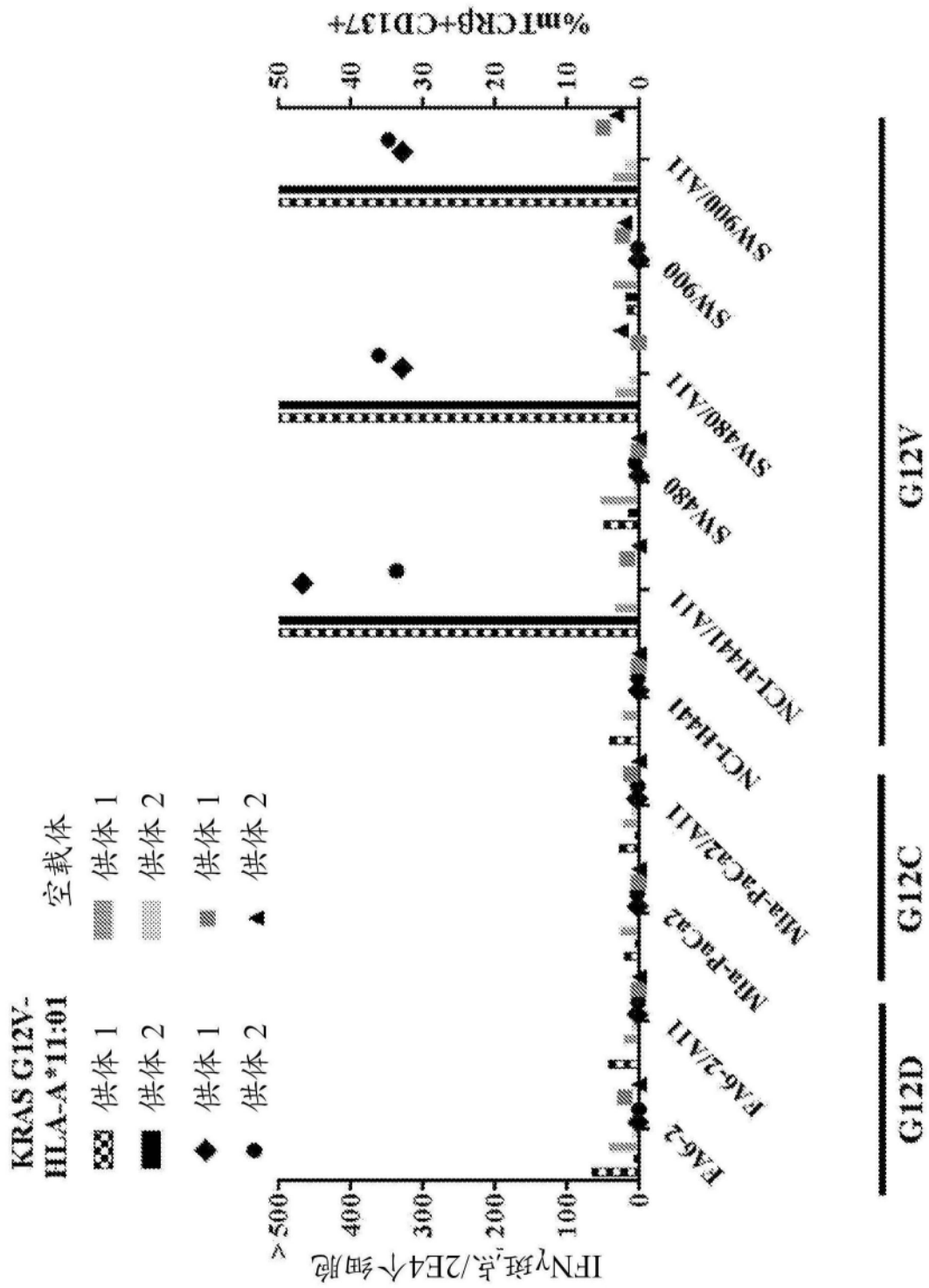


图4

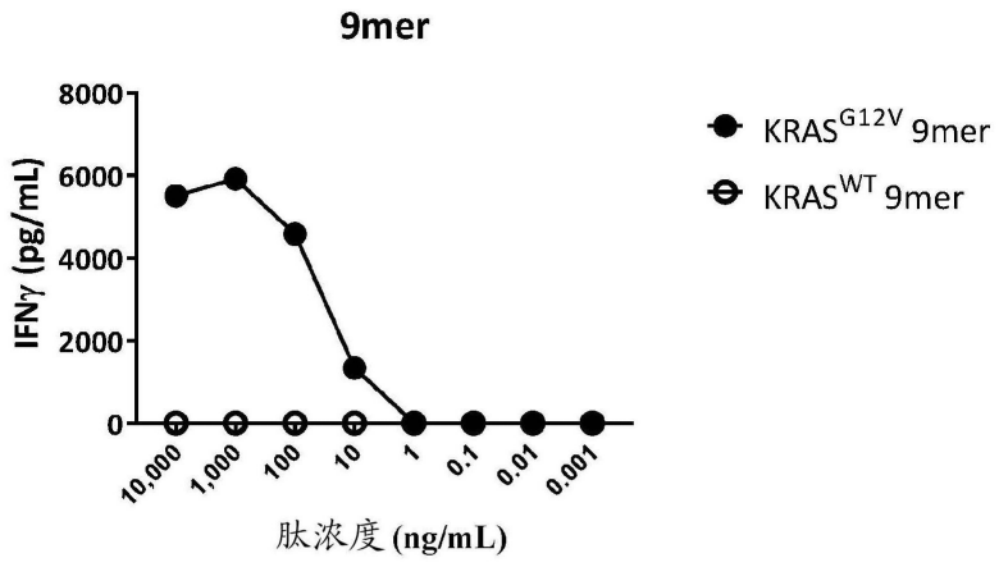


图5A

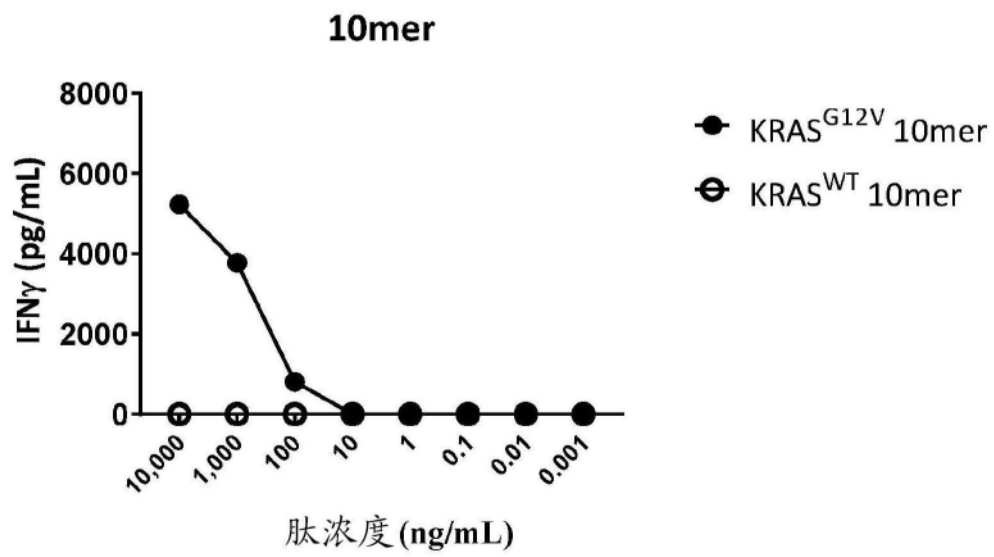


图5B