



(12) 发明专利

(10) 授权公告号 CN 108350059 B

(45) 授权公告日 2021.10.08

(21) 申请号 201680058891.3

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

(22) 申请日 2016.09.09

有限责任公司 11204

(65) 同一申请的已公布的文献号

代理人 王达佐 洪欣

申请公布号 CN 108350059 A

(51) Int.CI.

C07K 14/725 (2006.01)

(43) 申请公布日 2018.07.31

C07K 14/82 (2006.01)

(30) 优先权数据

A61K 45/06 (2006.01)

62/218,688 2015.09.15 US

A61K 38/00 (2006.01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

(56) 对比文件

2018.04.03

CN 103974974 A, 2014.08.06

(86) PCT国际申请的申请数据

CN 103249430 A, 2013.08.14

PCT/US2016/050875 2016.09.09

Frederick D. Tsai等.K-Ras4A splice variant is widely expressed in cancer and uses a hybrid membrane-targeting motif. 《PNAS》.2015, 第112卷(第3期), 第779-784页.

(87) PCT国际申请的公布数据

审查员 王慧

W02017/048593 EN 2017.03.23

(73) 专利权人 美国卫生和人力资源部

权利要求书6页 说明书27页

地址 美国马里兰州

序列表18页 附图1页

(72) 发明人 埃里克·特兰 卢勇成

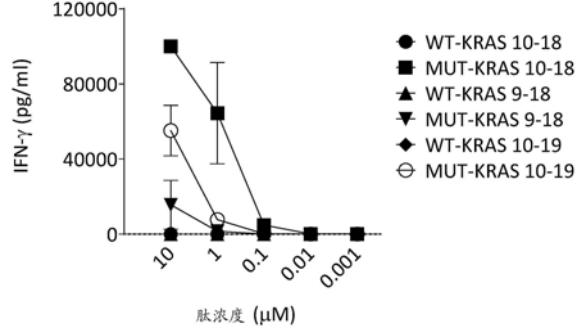
史蒂文·A·罗森伯格

(54) 发明名称

识别HLA-CW8限制性突变KRAS的T细胞受体

(57) 摘要

公开了分离的或纯化的T细胞受体(TCR),其对在HLA-Cw*0802分子背景下呈递的突变的Kirsten大鼠肉瘤病毒致癌基因同源物(KRAS)具有抗原特异性。还提供了相关的多肽和蛋白,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) 含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的α链互补决定区 (CDR) 1, 含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的α链CDR2, 以及含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的α链CDR3; 和

(II) 含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的β链CDR1, 含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的β链CDR2, 以及含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的β链CDR3。

2. 如权利要求1所述的分离的或纯化的TCR, 其中所述TCR对由人白细胞抗原 (HLA) -Cw8分子呈递的突变的KRAS氨基酸序列GADGVGKSA (SEQ ID NO:18) 具有抗原特异性。

3. 如权利要求2所述的分离的或纯化的TCR, 其中所述HLA-Cw8分子为HLA-Cw*0802。

4. 如权利要求1或2所述的分离的或纯化的TCR, 其包含:

(I) 含有与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列的α链可变区;

(II) 含有与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列的β链可变区;

(III) 含有与SEQ ID NO:9的氨基酸20-129具有至少99%同一性的氨基酸序列的α链可变区;

(IV) 含有与SEQ ID NO:10的氨基酸22-132具有至少99%同一性的氨基酸序列的β链可变区; 或

(V) (I) 和 (II), (I) 和 (IV), (II) 和 (III), 或者 (III) 和 (IV)。

5. 如权利要求1或2所述的分离的或纯化的TCR, 其包含:

(I) 含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的α链可变区;

(II) 含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的β链可变区;

(III) 含有SEQ ID NO:9的氨基酸20-129的α链可变区;

(IV) 含有SEQ ID NO:10的氨基酸22-132的β链可变区; 或

(V) (I) 和 (II), (I) 和 (IV), (II) 和 (III), 或者 (III) 和 (IV)。

6. 如权利要求1或2所述的分离的或纯化的TCR, 其还包含:

(a) 含有与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列的α链恒定区, 其中:

(i) SEQ ID NO:11的第48位的X为Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:11的第112位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:11的第114位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 以及

(iv) SEQ ID NO:11的第115位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) 含有与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列的β链恒定区, 其中SEQ ID NO:12的第57位的X为Ser或Cys; 或

(c) (a) 和 (b)。

7. 如权利要求1或2所述的分离的或纯化的TCR, 其还包含:

(a) 含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的α链恒定区, 其中:

(i) SEQ ID NO:11的第48位的X为Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:11的第112位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:11的第114位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 以及

(iv) SEQ ID NO:11的第115位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；

(b) 含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的β链恒定区，其中SEQ ID NO:12的第57位的X为Ser或Cys；或

(c) (a) 和 (b)。

8. 如权利要求1或2所述的分离的或纯化的TCR，其包含：

(a) 含有与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列的α链，其中：

(i) SEQ ID NO:13的第177位的X为Thr或Cys；

(ii) SEQ ID NO:13的第241位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；

(iii) SEQ ID NO:13的第243位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp；以及

(iv) SEQ ID NO:13的第244位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；

(b) 含有与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列的β链，其中SEQ ID NO:14的第189位的X为Ser或Cys；

(c) 含有与SEQ ID NO:13的氨基酸20-266具有至少99%同一性的氨基酸序列的α链，其中：

(i) SEQ ID NO:13的第177位的X为Thr或Cys；

(ii) SEQ ID NO:13的第241位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；

(iii) SEQ ID NO:13的第243位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp；以及

(iv) SEQ ID NO:13的第244位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；

(d) 含有与SEQ ID NO:14的氨基酸22-305具有至少99%同一性的氨基酸序列的β链，其中SEQ ID NO:14的第189位的X为Ser或Cys；或

(e) (a) 和 (b) , (a) 和 (d) , (b) 和 (c) , 或者 (c) 和 (d)。

9. 如权利要求1或2所述的分离的或纯化的TCR，其包含：

(a) 含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的α链，其中：

(i) SEQ ID NO:13的第177位的X为Thr或Cys；

(ii) SEQ ID NO:13的第241位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；

(iii) SEQ ID NO:13的第243位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp；以及

(iv) SEQ ID NO:13的第244位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；

(b) 含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的β链，其中SEQ ID NO:14的第189位的X为Ser或Cys；

(c) 含有SEQ ID NO:13的氨基酸20-266的α链，其中：

(i) SEQ ID NO:13的第177位的X为Thr或Cys；

(ii) SEQ ID NO:13的第241位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；

(iii) SEQ ID NO:13的第243位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp；以及

(iv) SEQ ID NO:13的第244位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；

(d) 含有SEQ ID NO:14的氨基酸22-305的β链，其中SEQ ID NO:14的第189位的X为Ser或Cys；或

(e) (a) 和 (b) , (a) 和 (d) , (b) 和 (c) , 或者 (c) 和 (d)。

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

述功能部分包含SEQ ID N0s:3-8的氨基酸序列。

11. 如权利要求10所述的分离的或纯化的多肽,其中所述功能部分包含以下的氨基酸序列:

- (I) 与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少99%的同一性;
- (II) 与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少99%的同一性;
- (III) 与SEQ ID NO:9的氨基酸20-129具有至少99%的同一性;
- (IV) 与SEQ ID NO:10的氨基酸22-132具有至少99%的同一性;或
- (V) (I) 和 (II), (I) 和 (IV), (II) 和 (III), 或者 (III) 和 (IV)。

12. 如权利要求10所述的分离的或纯化的多肽,其中所述功能部分包含以下的氨基酸序列:(I) SEQ ID NO:9; (II) SEQ ID NO:10; (III) SEQ ID NO:9的氨基酸20-129; (IV) SEQ ID NO:10的氨基酸22-132;或者(V) (I) 和 (II), (I) 和 (IV), (II) 和 (III), 或者 (III) 和 (IV)。

13. 如权利要求10-12中任一项所述的分离的或纯化的多肽,其还包含:

- (a) 与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列,其中:
 - (i) SEQ ID NO:11的第48位的X为Thr或Cys;
 - (ii) SEQ ID NO:11的第112位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
 - (iii) SEQ ID NO:11的第114位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及
 - (iv) SEQ ID NO:11的第115位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (b) 与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:12的第57位的X为Ser或Cys;或
- (c) (a) 和 (b)。

14. 如权利要求10-12中任一项所述的分离的或纯化的多肽,其还包含:

- (a) SEQ ID NO:11的氨基酸序列,其中:
 - (i) SEQ ID NO:11的第48位的X为Thr或Cys;
 - (ii) SEQ ID NO:11的第112位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
 - (iii) SEQ ID NO:11的第114位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及
 - (iv) SEQ ID NO:11的第115位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (b) SEQ ID NO:12的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:12的第57位的X为Ser或Cys;或
- (c) (a) 和 (b)。

15. 如权利要求10-12中任一项所述的分离的或纯化的多肽,其包含:

- (a) 与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列,其中:
 - (i) SEQ ID NO:13的第177位的X为Thr或Cys;
 - (ii) SEQ ID NO:13的第241位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
 - (iii) SEQ ID NO:13的第243位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及
 - (iv) SEQ ID NO:13的第244位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (b) 与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:14的第189位的X为Ser或Cys;
- (c) 与SEQ ID NO:13的氨基酸20-266具有至少99%同一性的氨基酸序列,其中:
 - (i) SEQ ID NO:13的第177位的X为Thr或Cys;

- (ii) SEQ ID NO:13的第241位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；
- (iii) SEQ ID NO:13的第243位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp；以及
- (iv) SEQ ID NO:13的第244位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；
- (d) 与SEQ ID NO:14的氨基酸22-305具有至少99%同一性的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:14的第189位的X为Ser或Cys；或
- (e) (a) 和 (b) , (a) 和 (d) , (b) 和 (c) , 或者 (c) 和 (d) 。

16. 如权利要求10-12中任一项所述的分离的或纯化的多肽，其包含：

(a) SEQ ID NO:13的氨基酸序列，其中：

- (i) SEQ ID NO:13的第177位的X为Thr或Cys；
- (ii) SEQ ID NO:13的第241位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；
- (iii) SEQ ID NO:13的第243位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp；以及
- (iv) SEQ ID NO:13的第244位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；
- (b) SEQ ID NO:14的氨基酸序列，其中SEQ ID NO:14的第189位的X为Ser或Cys；
- (c) SEQ ID NO:13的氨基酸20-266，其中：
 - (i) SEQ ID NO:13的第177位的X为Thr或Cys；
 - (ii) SEQ ID NO:13的第241位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；
 - (iii) SEQ ID NO:13的第243位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp；以及
 - (iv) SEQ ID NO:13的第244位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；
- (d) SEQ ID NO:14的氨基酸22-305，其中SEQ ID NO:14的第189位的X为Ser或Cys；或
- (e) (a) 和 (b) , (a) 和 (d) , (b) 和 (c) , 或者 (c) 和 (d) 。

17. 分离的或纯化的蛋白，其包含权利要求1-9中任一项所述的TCR的功能部分，其中所述功能部分包含SEQ ID NO:3-8的氨基酸序列，并且其中所述蛋白包含：含有SEQ ID NO:3-5的氨基酸序列的第一多肽链；以及含有SEQ ID NO:6-8的氨基酸序列的第二多肽链。

18. 如权利要求17所述的分离的或纯化的蛋白，其包含：

- (I) 含有与SEQ ID NO:9的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列的第一多肽链；
- (II) 含有与SEQ ID NO:10的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列的第二多肽链；
- (III) 含有与SEQ ID NO:9的氨基酸20-129具有至少99%同一性的氨基酸序列的第一多肽链；
- (IV) 含有与SEQ ID NO:10的氨基酸22-132具有至少99%同一性的氨基酸序列的第二多肽链；或
- (V) (I) 和 (II) , (I) 和 (IV) , (II) 和 (III) , 或 (III) 和 (IV) 。

19. 如权利要求17所述的分离的或纯化的蛋白，其包含：

- (I) 含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的第一多肽链；
- (II) 含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的第二多肽链；
- (III) 含有SEQ ID NO:9的氨基酸20-129的第一多肽链；
- (IV) 含有SEQ ID NO:10的氨基酸22-132的第二多肽链；或
- (V) (I) 和 (II) , (I) 和 (IV) , (II) 和 (III) , 或 (III) 和 (IV) 。

20. 如权利要求17-19任一项所述的分离的或纯化的蛋白,其包含:

(a) 含有与SEQ ID NO:11的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列的第一多肽链,其中:

- (i) SEQ ID NO:11的第48位的X为Thr或Cys;
- (ii) SEQ ID NO:11的第112位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (iii) SEQ ID NO:11的第114位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及
- (iv) SEQ ID NO:11的第115位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) 含有与SEQ ID NO:12的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列的第二多肽链,其中SEQ ID NO:12的第57位的X为Ser或Cys;或

- (c) (a) 和 (b)。

21. 如权利要求17-19任一项所述的分离的或纯化的蛋白,其包含:

(a) 含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的第一多肽链,其中:

- (i) SEQ ID NO:11的第48位的X为Thr或Cys;
- (ii) SEQ ID NO:11的第112位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (iii) SEQ ID NO:11的第114位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及
- (iv) SEQ ID NO:11的第115位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) 含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的第二多肽链,其中SEQ ID NO:12的第57位的X为Ser或Cys;或

- (c) (a) 和 (b)。

22. 如权利要求17-19任一项所述的分离的或纯化的蛋白,其包含:

(a) 含有与SEQ ID NO:13的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列的第一多肽链,其中:

- (i) SEQ ID NO:13的第177位的X为Thr或Cys;
- (ii) SEQ ID NO:13的第241位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (iii) SEQ ID NO:13的第243位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及
- (iv) SEQ ID NO:13的第244位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) 含有与SEQ ID NO:14的氨基酸序列具有至少99%同一性的氨基酸序列的第二多肽链,其中SEQ ID NO:14的第189位的X为Ser或Cys;

(c) 含有与SEQ ID NO:13的氨基酸20-266具有至少99%同一性的氨基酸序列的第一多肽链,其中:

- (i) SEQ ID NO:13的第177位的X为Thr或Cys;
- (ii) SEQ ID NO:13的第241位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (iii) SEQ ID NO:13的第243位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及
- (iv) SEQ ID NO:13的第244位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(d) 含有与SEQ ID NO:14的氨基酸22-305具有至少99%同一性的氨基酸序列的第二多肽链,其中SEQ ID NO:14的第189位的X为Ser或Cys;或

- (e) (a) 和 (b) , (a) 和 (d) , (b) 和 (c) ,或者 (c) 和 (d)。

23. 如权利要求17-19任一项所述的分离的或纯化的蛋白,其包含:

(a) 含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的第一多肽链,其中:

- (i) SEQ ID NO:13的第177位的X为Thr或Cys；
- (ii) SEQ ID NO:13的第241位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；
- (iii) SEQ ID NO:13的第243位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp；以及
- (iv) SEQ ID NO:13的第244位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；
- (b) 含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的第二多肽链，其中SEQ ID NO:14的第189位的X为Ser或Cys；
- (c) 含有SEQ ID NO:13的氨基酸20-266的第一多肽链，其中：
 - (i) SEQ ID NO:13的第177位的X为Thr或Cys；
 - (ii) SEQ ID NO:13的第241位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；
 - (iii) SEQ ID NO:13的第243位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp；以及
 - (iv) SEQ ID NO:13的第244位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp；
- (d) 含有SEQ ID NO:14的氨基酸22-305的的第二多肽链，其中SEQ ID NO:14的第189位的X为Ser或Cys；或
- (e) (a) 和 (b) , (a) 和 (d) , (b) 和 (c) ,或者 (c) 和 (d) 。

24. 分离的或纯化的核酸，其编码权利要求1-9中任一项所述的TCR、权利要求10-16中任一项所述的多肽、或权利要求17-23中任一项所述的蛋白。

25. 重组表达载体，其包含权利要求24所述的核酸。

26. 分离的或纯化的宿主细胞，其包含权利要求25所述的重组表达载体。

27. 细胞群，其包含至少两种权利要求26所述的分离的或纯化的宿主细胞。

28. 药物组合物，其包含权利要求1-9中任一项所述的TCR、权利要求10-16中任一项所述的多肽、权利要求17-23中任一项所述的蛋白、权利要求24所述的核酸、权利要求25所述的重组表达载体、权利要求26所述的宿主细胞、权利要求27所述的宿主细胞群、或权利要求28所述的药物组合物在制备用于检测哺乳动物中癌症存在的方法的试剂盒中的用途。

30. 权利要求1-9中任一项所述的TCR、权利要求10-16中任一项所述的多肽、权利要求17-23中任一项所述的蛋白、权利要求24所述的核酸、权利要求25所述的重组表达载体、权利要求26所述的宿主细胞、权利要求27所述的宿主细胞群、或权利要求28所述的药物组合物在制备用于治疗或预防哺乳动物中的癌症的药物中的用途。

31. 如权利要求29或30所述的用途，其中所述癌症为胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌或前列腺癌。

识别HLA-CW8限制性突变KRAS的T细胞受体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求于2015年9月15日提交的美国临时专利申请第62/218,688号的权益,通过引用将其整体并入本文。

[0003] 通过引用并入电子提交的材料

[0004] 通过引用整体并入本文的是,随本文同时提交并且按如下确定的计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表:名称为“26288_ST25.txt”,日期为2016年9月9日的30,753字节ASCII(文本)文件。

[0005] 关于联邦政府资助的研发的声明

[0006] 本发明是在编号Z01 ZIABC010984的项目的政府支持下,由美国国立卫生研究院、国家癌症研究所完成的。政府在本发明中享有一定的权利。

[0007] 发明背景

[0008] 一些癌症可能具有非常有限的治疗选择,特别是当癌症成为转移性的且不可切除时。尽管在例如手术、化学疗法和放射疗法的治疗方面取得进展,但许多癌症如胰腺癌、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,对癌症的其它治疗需求尚未满足。

[0009] 发明概述

[0010] 本发明的实施方案提供了分离的或纯化的T细胞受体(TCR),其对在人白细胞抗原(HLA)-Cw8分子背景下呈递的突变的Kirsten大鼠肉瘤病毒致癌基因同源物(KRAS)具有抗原特异性。

[0011] 本发明还提供了相关的多肽和蛋白,以及相关的核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群和与本发明的TCR有关的药物组合物。

[0012] 本发明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的癌症的方法。

附图说明

[0013] 图1图示了在与用不同浓度的(μ M)突变的KRAS₁₀₋₁₈GADGVGKSA(SEQ ID NO:18)(正方形)、突变的KRAS₉₋₁₈VGADGVGKSA(SEQ ID NO:31)(▼)、突变的KRAS₁₀₋₁₉GADGVGKSAL(SEQ ID NO:30)(空心圆)、野生型(WT)KRAS₁₀₋₁₈GAGGVVGKSA(SEQ ID NO:17)(实心圆)、WT KRAS₉₋₁₈VGAGGVVGKSA(SEQ ID NO:32)(▲)、或WT KRAS₁₀₋₁₉GAGGVGKSAL(SEQ ID NO:33)(菱形)脉冲的靶标树突状细胞(DC)共培养后,由用编码包含SEQ ID NO:9的 α 链可变区和SEQ ID NO:10的 β 链可变区的抗突变的KRAS TCR的核苷酸序列转导的效应T细胞分泌的干扰素(IFN)- γ (pg/ml)的量。

[0014] 发明详述

[0015] Kirsten大鼠肉瘤病毒致癌基因同源物(KRAS)也称为GTP酶KRas, V-Ki-Ras2Kirsten大鼠肉瘤病毒致癌基因或KRAS2,是小GTP酶超家族的成员。KRAS有两种转录本变体:KRAS变体A和KRAS变体B。除非另有说明,下文提及“KRAS”(突变的或未突变的)是指变

体A和变体B两者。不受特定理论或机制的束缚,认为当突变时,KRAS可能参与多种人类癌症的肿瘤发生早期的信号转导。单个氨基酸取代可能激活该突变。当激活时,突变的KRAS与鸟苷-5'-三磷酸(GTP)结合,并将GTP转变为鸟苷5'-二磷酸(GDP)。突变的KRAS蛋白产物可被组成型激活。突变的KRAS蛋白可在众多人类癌症的任何一种中表达,例如,胰腺癌症(pancreatic cancer)(例如,胰腺癌(pancreatic carcinoma))、结肠直肠癌、肺癌(例如,肺腺癌)、子宫内膜癌、卵巢癌(例如,上皮性卵巢癌)和前列腺癌。

[0016] 本发明的实施方案提供了分离的或纯化的TCR,其对突变的人KRAS(下文称“突变的KRAS”)具有抗原特异性。除非另有说明,下文提及“TCR”也指TCR的功能部分和功能变体。本发明的TCR可以对具有G12D突变的任何KRAS(蛋白、多肽或肽)具有抗原特异性。在本发明的实施方案中,TCR对具有G12D突变的KRAS蛋白具有抗原特异性,所述KRAS蛋白包含SEQ ID NO:15或16的氨基酸序列或由其组成。SEQ ID NO:15的突变的KRAS变体A蛋白氨基酸序列大体对应于SEQ ID NO:1的未突变的、野生型(WT)KRAS蛋白变体A氨基酸序列的第1-189位,不同之处在于:在SEQ ID NO:15中第12位的甘氨酸被天冬氨酸取代。SEQ ID NO:16的突变的KRAS变体B蛋白氨基酸序列大体对应于SEQ ID NO:2的未突变的、WT KRAS蛋白变体B氨基酸序列的第1-188位,不同之处在于:在SEQ ID NO:16中第12位的甘氨酸被天冬氨酸取代。在本发明的实施方案中,TCR对上文所述的具有G12D突变的KRAS肽具有抗原特异性,所述KRAS肽具有任意长度。例如,TCR可以对具有G12D突变的KRAS肽具有抗原特异性,所述KRAS肽具有约8至约24个氨基酸残基,优选约9至约11个氨基酸残基的长度。在本发明的实施方案中,TCR可以对具有G12D突变的KRAS肽具有抗原特异性,所述KRAS肽具有约8个氨基酸残基、约9个氨基酸残基、约10个氨基酸残基、约11个氨基酸残基、约12个氨基酸残基、或约24个氨基酸残基的长度。例如,TCR可以对具有G12D突变的KRAS₁₀₋₁₈肽具有抗原特异性,所述肽包含GADGVGKSA(SEQ ID NO:18)的氨基酸序列或由其组成。具有G12D突变的SEQ ID NO:18的突变的KRAS肽氨基酸序列大体对应于SEQ ID NO:17的未突变的、WT KRAS₁₀₋₁₈肽氨基酸序列的第1-9位,不同之处在于:在SEQ ID NO:18中第3位的甘氨酸被天冬氨酸取代。在本发明的又一实施方案中,TCR可以对具有G12D突变的KRAS肽具有抗原特异性,突变的KRAS肽包含以下氨基酸序列或由其组成:MTEYKLVVVGADGVGKSLTIQLI(SEQ ID NO:20);GADGVGKSA(突变的KRAS₁₀₋₁₈;SEQ ID NO:18);VGADGVGKSA(突变的KRAS₉₋₁₈;SEQ ID NO:31);或GADGVGKSAL(突变的KRAS₁₀₋₁₉;SEQ ID NO:30)。在示例性实施方案中,TCR对突变的KRAS表位具有抗原特异性,所述突变的KRAS表位包含以下氨基酸序列或由其组成:MTEYKLVVVGADGVGKSLTIQLI(SEQ ID NO:20);GADGVGKSA(突变的KRAS₁₀₋₁₈;SEQ ID NO:18);VGADGVGKSA(突变的KRAS₉₋₁₈;SEQ ID NO:31);或GADGVGKSAL(突变的KRAS₁₀₋₁₉;SEQ ID NO:30)。

[0017] 在本发明的实施方案中,本发明的TCR能够以HLA-Cw8-依赖性方式识别突变的KRAS。如本文所用,“HLA-Cw8-依赖性方式”意指TCR在结合HLA-Cw8分子背景内的突变的KRAS时引发免疫应答。本发明的TCR能够识别由HLA-Cw8分子呈递的突变的KRAS,并且可以结合除突变的KRAS之外的HLA-Cw8分子。示例性的HLA-Cw8分子(在该背景中本发明的TCR识别突变的KRAS)包括由以下等位基因编,码的那些:HLA-Cw*0801、HLA-Cw*0802、HLA-Cw*0803、HLA-Cw*0804、HLA-Cw*0805、HLA-Cw*0806、HLA-Cw*0807、HLA-Cw*0808和HLA-Cw*0809。在优选实施方案中,TCR识别在HLA-Cw*0802分子背景内的突变的KRAS。

[0018] 本发明的TCR提供许多优势,包括当由用于过继性细胞转移的细胞表达时。突变的

KRAS由癌细胞表达,而不由正常的非癌性细胞表达。不受特定理论或机制的束缚,认为本发明的TCR有利地靶向破坏癌细胞,同时最小化或消除对正常的非癌性细胞的破坏,从而例如通过最小化或消除来降低毒性。而且,本发明的TCR可有利地成功治疗或预防突变的KRAS-阳性癌症,所述癌症不响应于诸如化学疗法、手术或放射的其它类型治疗。此外,本发明的TCR可以提供对突变的KRAS的高度亲合识别,其可以提供识别未经处理的肿瘤细胞(例如,没有用干扰素(IFN)- γ 处理、用编码突变的KRAS和HLA-Cw*0802之一或两者的载体转染、用具有G12D突变的KRAS肽脉冲、或以上的组合的肿瘤细胞)的能力。此外,HLA-Cw*0802等位基因分别在高达约8%和约11%的美国白种人和非裔美国人种族中表达。因此,本发明的TCR可以增加适合免疫治疗的癌症患者数量,以包括表达HLA-Cw*0802等位基因的那些患者,那些患者可能不适合使用识别在其它MHC分子背景中的抗原的TCR进行免疫治疗。

[0019] 如本文所用,短语“抗原特异性”意指TCR能以高亲合力特异性结合并免疫识别突变的KRAS。例如,当与以下细胞共培养时:(a)用低浓度的突变的KRAS肽(例如,约0.05ng/mL至约5ng/mL、0.05ng/mL、0.1ng/mL、0.5ng/mL、1ng/mL、5ng/mL,或由上述数值中任意两个所限定的范围)脉冲的抗原阴性的HLA-Cw*0802⁺靶细胞,或者(b)已向其中引入编码突变的KRAS的核苷酸序列以使靶细胞表达突变的KRAS的抗原阴性的HLA-Cw*0802⁺靶细胞,如果表达TCR的约1x 10⁴至约1x 10⁵个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、或由上述数值中任意两个所限定的范围)的IFN- γ ,则该TCR可以被认为对突变的KRAS具有“抗原特异性”。当与用较高浓度的突变的KRAS肽脉冲的抗原阴性的HLA-Cw*0802⁺靶细胞共培养时,表达本发明的TCR的细胞也可分泌IFN- γ 。

[0020] 可选地或此外,当与以下细胞共培养时:(a)用低浓度的突变的KRAS肽脉冲的抗原阴性的HLA-Cw*0802⁺靶细胞,或者(b)已向其中引入编码突变的KRAS的核苷酸序列以使靶细胞表达突变的KRAS的抗原阴性的HLA-Cw*0802⁺靶细胞,如果相比阴性对照所表达的IFN- γ 的量,表达TCR的T细胞分泌至少两倍的IFN- γ ,则该TCR可以被认为对突变的KRAS具有“抗原特异性”。阴性对照可以为例如,(i)与以下细胞共培养的表达TCR的T细胞:(a)用相同浓度的不相关肽(例如,具有与突变的KRAS肽不同的序列的一些其它肽)脉冲的抗原阴性的HLA-Cw*0802⁺靶细胞,或(b)已向其中引入编码不相关肽的核苷酸序列以使靶细胞表达该不相关肽的抗原阴性的HLA-Cw*0802⁺靶细胞;或者(ii)与以下细胞共培养的未转导的T细胞(例如源自不表达TCR的PBMC):(a)用相同浓度的突变的KRAS肽脉冲的抗原阴性的HLA-Cw*0802⁺靶细胞,或(b)已向其中引入编码突变的KRAS的核苷酸序列以使靶细胞表达突变的KRAS的抗原阴性的HLA-Cw*0802⁺靶细胞。可以通过本领域熟知的方法例如,酶联免疫吸附测定(ELISA)来测量IFN- γ 的分泌。

[0021] 可选地或此外,当与以下细胞共培养时:(a)用低浓度的突变的KRAS肽脉冲的抗原阴性的HLA-Cw*0802⁺靶细胞,或者(b)已向其中引入编码突变的KRAS的核苷酸序列以使靶细胞表达突变的KRAS的抗原阴性的HLA-Cw*0802⁺靶细胞,如果相比分泌IFN- γ 的阴性对照T细胞的数量,至少两倍数量的表达TCR的T细胞分泌IFN- γ ,则所述TCR可以被认为对突变的KRAS具有“抗原特异性”。肽和所述阴性对照的浓度可以如针对本发明其它方面所描述的。可以通过本领域已知的方法例如ELISPOT来测量分泌IFN- γ 的细胞数量。

[0022] 可选地或此外,如果表达TCR的T细胞上调4-1BB和OX40之一或两者的表达,则TCR可以被认为对突变的KRAS具有“抗原特异性”,如在用表达突变的KRAS的靶细胞刺激后通过例如流式细胞术所测量的。

[0023] 本发明提供了包含两种多肽(即多肽链)的TCR,所述多肽为如TCR的 α 链、TCR的 β 链、TCR的 γ 链、TCR的 δ 链或它们的组合。本发明TCR的多肽可以包含任何氨基酸序列,条件是所述TCR对突变的KRAS具有抗原特异性。

[0024] 在本发明的实施方案中,TCR包含两条多肽链,其各自包含可变区,所述可变区包含TCR的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3。在本发明的实施方案中,TCR包含第一多肽链,其包含含有SEQ ID NO:3的氨基酸序列的CDR1(α 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:4的氨基酸序列的CDR2(α 链的CDR2)和含有SEQ ID NO:5的氨基酸序列的CDR3(α 链的CDR3);以及第二多肽链,其包含含有SEQ ID NO:6的氨基酸序列的CDR1(β 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:7的氨基酸序列的CDR2(β 链的CDR2)和含有SEQ ID NO:8的氨基酸序列的CDR3(β 链的CDR3)。在这方面,本发明的TCR可以包含选自SEQ ID NO:3-8的氨基酸序列的任何一个或多个。优选地,TCR包含SEQ ID NO:3-5或SEQ ID NO:6-8的氨基酸序列。在特别优选的实施方案中,TCR包含SEQ ID NO:3-8的全部氨基酸序列。

[0025] 在本发明的实施方案中,所述TCR包含含有上文示出的CDR的TCR的可变区的氨基酸序列。在这方面,TCR可以包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:9(α 链的可变区);SEQ ID NO:10(β 链的可变区);或SEQ ID NO:9和10两者。优选地,本发明的TCR包含SEQ ID NO:9和10两者的氨基酸序列。

[0026] 本发明的TCR还可以包含恒定区。恒定区可以来源于任何合适的物种,例如,人或小鼠。在本发明的实施方案中,TCR还包含鼠恒定区。如本文所用,术语“鼠”或“人”,在涉及本文所述的TCR或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,意指分别来源于小鼠或人的TCR(或其组分),即分别源自或同时由小鼠T细胞或人T细胞表达的TCR(或其组分)。

[0027] 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,其中所述TCR对在HLA-Cw8分子背景中呈递的突变的KRAS具有抗原特异性。嵌合TCR可以包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:24(野生型(WT)鼠 α 链恒定区)、SEQ ID NO:25(WT鼠 β 链恒定区)、或SEQ ID NO:24和25两者。优选地,本发明的TCR包含SEQ ID NO:24和25两者的氨基酸序列。嵌合TCR可以包含如本文关于本发明的其它方面所述的任何CDR区。在本发明的另一实施方案中,嵌合TCR可以包含本文关于本发明的其它方面所述的任何可变区。在这方面,嵌合TCR可以包含以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:3-5和24;(ii) SEQ ID NO:6-8和25;(iii) SEQ ID NO:3-8和24-25;(iv) SEQ ID NO:9和24;(v) SEQ ID NO:10和25;或(vi) SEQ ID NO:9-10和24-25。优选地,嵌合TCR包含以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:3-8和24-25;或(ii) SEQ ID NO:9-10和24-25。

[0028] 在本发明的实施方案中,本发明的TCR可以包含TCR的 α 链和TCR的 β 链。本发明的TCR的 α 链和 β 链中的每一个可以独立地包含任何氨基酸序列。在这方面,本发明的嵌合TCR的 α 链可以包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。这种类型的 α 链可以与TCR的任何 β 链配对。在这方面,本发明的TCR的 β 链可以包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列。因此,本发明的TCR可以包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、或SEQ ID NO:26和27两者。优选地,

本发明的TCR包含SEQ ID NO:26和27两者的氨基酸序列。

[0029] 在本发明的实施方案中,TCR包含取代的恒定区。在这方面,TCR可以包含在 α 和 β 链的一个或两个的恒定区中具有一个、两个、三个或四个氨基酸取代的任一本文所述TCR的氨基酸序列。在一些实施方案中,与包含未取代的(野生型)恒定区的亲本TCR相比,包含取代的恒定区的TCR有利地提供以下的一个或多个:增加的突变的KRAS⁺靶标的识别、增加的宿主细胞的表达和增加的抗肿瘤活性。通常,TCRa和 β 链的鼠恒定区(分别为SEQ ID NO:11和12)的取代的氨基酸序列分别对应于SEQ ID NO:24和25的未取代的鼠恒定区氨基酸序列的全部或部分,其中当与SEQ ID NO:24相比时SEQ ID NO:11具有一个、两个、三个或四个氨基酸取代,以及当与SEQ ID NO:25相比时SEQ ID NO:12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:11(α 链的恒定区),其中(i)第48位的X为Thr或Cys;(ii)第112位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(iii)第114位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;和(iv)第115位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;以及(b) SEQ ID NO:12(β 链的恒定区),其中第57位的X为Ser或Cys。在本发明的实施方案中,包含SEQ ID NO:11的TCR不包含SEQ ID NO:24(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:12的TCR不包含SEQ ID NO:25(β 链的未取代的鼠恒定区)。

[0030] 在本发明的实施方案中,取代的恒定区包括在 α 和 β 链的一个或两个的恒定区中的半胱氨酸取代,以提供半胱氨酸-取代的TCR。 α 和 β 链中相对的半胱氨酸提供二硫键,其将取代的TCR的 α 和 β 链的恒定区彼此连接,并且其不存在于包含未取代的鼠恒定区的TCR中。在这方面,TCR可以为半胱氨酸取代的嵌合TCR,其中SEQ ID NO:24的天然Thr48和SEQ ID NO:25的天然Ser57中的一个或两个可以被Cys取代。优选地,SEQ ID NO:24的天然Thr48和SEQ ID NO:25的天然Ser57均被Cys取代。在一个实施方案中,半胱氨酸取代的嵌合TCR包含:含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的 α 链恒定区,其中第48位的X为Cys,第112位的X为天然Ser,第114位的X为天然Met,和第115位的X为天然Gly;以及含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的 β 链恒定区,其中第57位的X为Cys。除了本文所述的任何CDR和/或可变区之外,本发明的半胱氨酸取代的嵌合TCR可以包含取代的恒定区。在这方面,半胱氨酸取代的嵌合TCR可以包含以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:3-8和11-12;(ii) SEQ ID NO:9-12;(iii) SEQ ID NO:3-5和11;(iv) SEQ ID NO:6-8和12;(v) SEQ ID NO:9和11;或(vi) SEQ ID NO:10和12。优选地,半胱氨酸取代的嵌合TCR包含以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:3-8和11-12,或(ii) SEQ ID NO:9-12。

[0031] 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。在这方面,TCR可以为半胱氨酸取代的嵌合TCR,其中SEQ ID NO:26的天然Thr177和SEQ ID NO:27的天然Ser189中的一个或两个可以被Cys取代。优选地,SEQ ID NO:26的天然Thr177和SEQ ID NO:27的天然Ser189均被Cys取代。在一个实施方案中,半胱氨酸取代的嵌合TCR包含:含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的 α 链,其中第177位的X为Cys,第241位的X为天然Ser,第243位的x为天然Met,和第244位的X为天然Gly;以及含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的 β 链恒定区,其中第189位的X为Cys。在这方面,半胱氨酸取代的嵌合TCR可以包含以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:13,(ii) SEQ ID NO:14,或(iii) SEQ ID NO:13-14两者。优选地,半胱氨酸取代的嵌合TCR包含:含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的全长 α 链,以及含有SEQ ID NO:

14的氨基酸序列的全长 β 链。

[0032] 在本发明的实施方案中,取代的氨基酸序列包括 α 和 β 链中的一个或两个的恒定区的跨膜(TM)结构域中的一个、两个或三个氨基酸被取代为疏水性氨基酸,以提供疏水性氨基酸取代的TCR(在本文中也被称为“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为LVL修饰的嵌合TCR,其中SEQ ID NO:24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;优选被Leu、Ile或Val取代。优选地,SEQ ID NO:24的天然Ser112、Met114和Gly115中的全部三个可以独立地被Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp取代;优选被Leu、Ile或Val取代。在一个实施方案中,LVL修饰的嵌合TCR包含:含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的 α 链恒定区,其中第48位的X为天然Thr,第112位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp,第114位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp,和第115位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;以及含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的 β 链恒定区,其中包含SEQ ID NO:11的LVL修饰的嵌合TCR不包含SEQ ID NO:24(α 链的未取代的鼠恒定区)。在优选实施方案中,LVL修饰的嵌合TCR包含:含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的 α 链恒定区,其中第48位的X为天然Thr,第112位的X为Leu,第114位的X为Ile,和第115位的X为Val;以及含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的 β 链恒定区。优选地,LVL修饰的嵌合TCR包含:含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的 α 链恒定区,以及含有SEQ ID NO:25的氨基酸序列的 β 链恒定区。除了本文所述的任何CDR和/或可变区之外,本发明的LVL修饰的嵌合TCR可以包含取代的恒定区。在这方面,LVL修饰的嵌合TCR可以包含以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:3-5和11;(ii) SEQ ID NO:6-8和25;(iii) SEQ ID NO:3-8、11和25;(iv) SEQ ID NO:9和11;(v) SEQ ID NO:10和25;或(vi) SEQ ID NO:9-11和25。优选地,LVL修饰的嵌合TCR包含以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:3-8、11和25,或(ii) SEQ ID NO:9-11和25。

[0033] 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。在这方面,TCR可以为LVL修饰的嵌合TCR,其中SEQ ID NO:26的天然Ser241、Met243和Gly244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;优选被Leu、Ile或Val取代。优选地,SEQ ID NO:26的天然Ser241、Met243和Gly244的全部三个可以独立地被Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp取代;优选被Leu、Ile或Val取代。在一个实施方案中,LVL修饰的嵌合TCR包含:含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的 α 链,其中第177位的X为天然Thr,第241位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp,第243位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp,和第244位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;以及含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的 β 链,其中包含SEQ ID NO:13的LVL修饰的嵌合TCR不包含SEQ ID NO:26(未取代的鼠 α 链)。在优选实施方案中,LVL修饰的嵌合TCR包含:含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的 α 链,其中第177位的X为天然Thr,第241位的X为Leu,第243位的X为Ile,和第244位的X为Val;以及含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的 β 链,其中包含SEQ ID NO:13的LVL修饰的嵌合TCR不包含SEQ ID NO:26(未取代的鼠 α 链)。优选地,LVL修饰的嵌合TCR包含:含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的 α 链,以及含有SEQ ID NO:27的氨基酸序列的 β 链恒定区。

[0034] 在本发明的一个实施方案中,取代的氨基酸序列包括 α 和 β 链中的一个或两个的恒

定区中的半胱氨酸取代联合 α 和 β 链中的一个或两个的恒定区的跨膜(TM)结构域中的一个、两个或三个氨基酸被取代为疏水性氨基酸(在本文中也被称为“半胱氨酸取代的LVL修饰的TCR”)。在这方面,TCR为半胱氨酸取代的LVL修饰的嵌合TCR,其中SEQ ID NO:24的天然Thr48被Cys取代;SEQ ID NO:24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;优选被Leu、Ile或Val取代;以及SEQ ID NO:25的天然Ser57被Cys取代。优选地,SEQ ID NO:24的天然Ser112、Met114和Gly115的全部三个可以独立地被Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp取代;优选被Leu、Ile或Val取代。在一个实施方案中,半胱氨酸取代的LVL修饰的嵌合TCR包含:含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的 α 链,其中第48位的X为Cys,第112位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp,第114位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp,和第115位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;以及含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的 β 链,其中第57位的X为Cys,其中SEQ ID NO:11不包含SEQ ID NO:24(未取代的 α 链),以及SEQ ID NO:12不包含SEQ ID NO:25(未取代的 β 链)。优选地,半胱氨酸取代的LVL修饰的嵌合TCR包含:含有SEQ ID NO:11的氨基酸序列的 α 链,其中第48位的X为Cys,第112位的X为Leu,第114位的X为Ile,第115位的X为Val;以及含有SEQ ID NO:12的氨基酸序列的 β 链,其中第57位的X为Cys。除了本文所述的任何CDR和/或可变区之外,本发明的半胱氨酸取代的LVL修饰的嵌合TCR可以包含取代的恒定区。在这方面,半胱氨酸取代的LVL修饰的嵌合TCR可以包含:(i) SEQ ID NO:3-5和11;(ii) SEQ ID NO:9和11;(iii) SEQ ID NO:6-8和12;(iv) SEQ ID NO:10和12;(v) SEQ ID NO:3-8和11-12;或(vi) SEQ ID NO:9-12。优选地,半胱氨酸取代的LVL修饰的嵌合TCR包含以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:3-8和11-12,或(ii) SEQ ID NO:9-12。

[0035] 在一个实施方案中,半胱氨酸取代的LVL修饰的嵌合TCR包含全长 α 链和全长 β 链。在这方面,TCR可以为半胱氨酸取代的LVL修饰的嵌合TCR,其中SEQ ID NO:26的天然Thr177被Cys取代,以及SEQ ID NO:26的天然Ser241、Met243和Gly244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;优选被Leu、Ile或Val取代。优选地,SEQ ID NO:26的天然Ser241、Met243和Gly244的全部三个可以独立地被Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp取代;优选被Leu、Ile或Val取代。在一个实施方案中,半胱氨酸取代的LVL修饰的嵌合TCR包含:含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的 α 链,其中第177位的X为Cys,第241位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp,第243位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp,和第244位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;以及含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的 β 链,其中第189位的X为Cys,其中包含SEQ ID NO:13的半胱氨酸取代的LVL修饰的嵌合物不包含SEQ ID NO:26(未取代的鼠 α 链)。在优选实施方案中,半胱氨酸取代的LVL修饰的嵌合TCR包含:含有SEQ ID NO:13的氨基酸序列的 α 链,其中第177位的X为Cys,第241位的X为Leu,第243位的X为Ile,和第244位的X为Val;以及含有SEQ ID NO:14的氨基酸序列的 β 链,其中第189位的X为Cys。

[0036] 本发明的范围包括本文所述的本发明TCR的功能变体。如本文所用,术语“功能变体”是指与亲本TCR、多肽或蛋白具有大量或显著序列同一性或相似性的TCR、多肽或蛋白,所述功能变体保留了该变体所来源的TCR、多肽或蛋白的生物活性。功能变体涵盖例如,本文所述的TCR、多肽或蛋白(亲本TCR、多肽或蛋白)的那些变体,所述变体保留了以与亲本TCR、多肽或蛋白类似程度、相同程度或比亲本TCR、多肽或蛋白更高程度的特异性结合突变

的KRAS的能力,所述亲本TCR对所述突变的KRAS具有抗原特异性或者所述亲本多肽或蛋白能特异性结合突变的KRAS。关于亲本TCR、多肽或蛋白,所述功能变体可分别与亲本TCR、多肽或蛋白的氨基酸序列例如具有至少约30%、50%、75%、80%、90%、95%、96%、97%、98%、99%或更多的同一性。

[0037] 所述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本TCR、多肽或蛋白的氨基酸序列。保守氨基酸取代为本领域已知的,且包括这样的氨基酸取代,其中具有某些物理和/或化学特性的一个氨基酸被替换为具有相同物理或化学特性的另一个氨基酸。例如,保守氨基酸取代可以为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。

[0038] 可选地或此外,所述功能变体可以包含具有至少一个非保守氨基酸取代的亲本TCR、多肽或蛋白的氨基酸序列。在此情况下,优选非保守氨基酸取代不干扰或抑制所述功能变体的生物活性。优选地,非保守氨基酸取代增强所述功能变体的生物活性,使得与亲本TCR、多肽或蛋白相比,所述功能变体的生物活性增加。

[0039] TCR、多肽或蛋白可基本上由本文所述的指定的一个或多个氨基酸序列组成,使得所述TCR、多肽或蛋白的其它组分例如其它氨基酸,不会实质上改变所述TCR、多肽或蛋白的生物活性。在这方面,本发明的TCR、多肽或蛋白可以例如基本上由于以下的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:26和27两者、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:13-14、或SEQ ID NO:13和27两者,其中SEQ ID NO:13和14被取代,如本文关于本发明的其它方面所述的。另外,例如,本发明的TCR、多肽或蛋白可以基本上由以下的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、或SEQ ID NO:9和10两者。此外,本发明的TCR、多肽或蛋白可以基本上由以下的氨基酸序列组成:SEQ ID NO:3(α 链的CDR1)、SEQ ID NO:4(α 链的CDR2)、SEQ ID NO:5(α 链的CDR3)、SEQ ID NO:6(β 链的CDR1)、SEQ ID NO:7(β 链的CDR2)、SEQ ID NO:8(β 链的CDR3)、或它们的任意组合,例如,SEQ ID NO:3-5;6-8;或3-8。

[0040] 本发明还提供了包含本文所述的任何TCR的功能部分的多肽。如本文所用,术语“多肽”包括寡肽并且是指由一个或肽键连接的氨基酸的单链。

[0041] 对于本发明的多肽,所述功能部分可以为包含其作为部分的TCR的连续氨基酸的任何部分,条件是功能部分能特异性结合突变的KRAS。术语“功能部分”当提及TCR使用时,是指本发明的TCR的任何部分或片段,所述部分或片段保留了所述部分或片段所来源的TCR(亲本TCR)的生物活性。功能部分涵盖,例如TCR的那些部分,其保留了以与亲本TCR类似程度、相同程度或比亲本TCR更高程度的特异性结合突变的KRAS(例如,以HLA-Cw*0802-依赖性方式)、或检测、治疗或预防癌症的能力。关于亲本TCR,所述功能部分可以包含例如亲本TCR的约10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%或更多。

[0042] 功能部分可以在该部分的氨基端、或羧基端、或两端包含另外的氨基酸,另外的氨基酸不存在于亲本TCR的氨基酸序列中。可取的是,另外的氨基酸不干扰功能部分的生物功能,例如,特异性结合突变的KRAS;和/或具有检测癌症、治疗或预防癌症的能力等。更可取的是,与亲本TCR的生物活性相比,另外的氨基酸增强了生物活性。

[0043] 多肽可以包含本发明的TCR的 α 和 β 链中任一个或两个的功能部分,如包含本发明

TCR的 α 链和/或 β 链可变区的CDR1、CDR2和CDR3中一个或多个的功能部分。在本发明的一个实施方案中,多肽可包含含有以下的氨基酸序列的功能部分:SEQ ID NO:3 (α 链的DR1)、SEQ ID NO:4 (α 链的CDR2)、SEQ ID NO:5 (α 链的CDR3)、SEQ ID NO:6 (β 链的CDR1)、SEQ ID NO:7 (β 链的CDR2)、SEQ ID NO:8 (β 链的CDR3)、或它们的组合。优选地,本发明的多肽包含:含有SEQ ID NO:3-5;6-8;或全部SEQ ID NO:3-8的氨基酸序列的功能部分。更优选地,多肽包含含有全部SEQ ID NO:3-8的氨基酸序列的功能部分。

[0044] 在本发明的一个实施方案中,本发明的多肽可以包含例如本发明的TCR的可变区,其包含上文所示的CDR区的组合。在这方面,多肽可以包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:9 (α 链的可变区)、SEQ ID NO:10 (β 链的可变区)、或SEQ ID NO:9和10两者。优选地,多肽包含SEQ ID NO:9和10两者的氨基酸序列。

[0045] 在本发明的一个实施方案中,本发明的多肽还可以包含上文示出的本发明的TCR的恒定区。在这方面,多肽可以包含以下的氨基酸序列:SEQ ID NO:24 (α 链的WT鼠恒定区)、SEQ ID NO:25 (β 链的WT鼠恒定区)、SEQ ID NO:11 (α 链的鼠恒定区)、SEQ ID NO:12 (β 链的鼠恒定区)、SEQ ID NO:11和25两者、SEQ ID NO:11和12两者、或SEQ ID NO:24和25两者,其中SEQ ID NO:11和12被取代,如本文关于本发明的其它方面所述的。优选地,多肽包含以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:11和12两者,(ii) SEQ ID NO:24和25两者,或(iii) SEQ ID NO:11和25两者,其中SEQ ID NO:11和12被取代,如本文关于本发明的其它方面所述的。

[0046] 在本发明的一个实施方案中,本发明的多肽可以包含本发明的TCR的可变区和恒定区的组合。在这方面,多肽可以包含以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:9 (α 链的可变区)和SEQ ID NO:24 (α 链的恒定区)两者,(ii) SEQ ID NO:10 (β 链的可变区)和SEQ ID NO:25 (β 链的恒定区)两者,(iii) SEQ ID NO:9、10、24和25的全部,(iv) SEQ ID NO:9和11两者,(v) SEQ ID NO:10和12两者,(vi) SEQ ID NO:9-12的全部,或(vii) SEQ ID NO:9-11和25,其中SEQ ID NO:11和12被取代,如本文关于本发明的其它方面所述的。优选地,多肽包含以下的氨基酸序列:(i) 全部SEQ ID NO:9、10、24和25,(ii) SEQ ID NO:9-12的全部,其中SEQ ID NO:11和12,或(iii) SEQ ID NO:9-11和25的全部,其中SEQ ID NO:11-12被取代,如本文关于本发明的其它方面所述的。

[0047] 在本发明的一个实施方案中,本发明的多肽可以包含本文所述的任何CDR区和本发明的TCR的恒定区的组合。在这方面,多肽可以包含以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:3-5和24的全部,(ii) SEQ ID NO:6-8和25的全部,(iii) SEQ ID NO:3-8和24-25的全部;(iv) SEQ ID NO:3-5和11的全部;(v) SEQ ID NO:6-8和12的全部;(vi) SEQ ID NO:3-8和11-12的全部;或(vii) SEQ ID NO:3-5、11和25的全部,其中SEQ ID NO:11和12被取代,如本文关于本发明的其它方面所述的。优选地,多肽包含以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:3-8和24-25的全部,(ii) SEQ ID NO:3-8和11-12的全部,或(iii) SEQ ID NO:3-5、11和25的全部,其中SEQ ID NO:11和12被取代,如本文关于本发明的其它方面所述的。

[0048] 在本发明的一个实施方案中,本发明的多肽可以包含本文所述的TCR的 α 或 β 链全长。在这方面,本发明的多肽可以包含以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:26,(ii) SEQ ID NO:27,(iii) SEQ ID NO:26和27两者,(iv) SEQ ID NO:13,(v) SEQ ID NO:14,(vi) SEQ ID NO:13和14两者,(vii) SEQ ID NO:13和27两者,其中SEQ ID NO:13和14被取代,如本文关于本发明的其它方面所述的。优选地,多肽包含以下的氨基酸序列:(i) SEQ ID NO:26和27两

者,(ii) SEQ ID NO:13和14两者,(iii) SEQ ID NO:13和27两者,其中SEQ ID NO:13和14被取代,如本文关于本发明的其它方面所述的。

[0049] 本发明还提供了包含至少一条本文所述的多肽的蛋白。“蛋白”意指包含一条或多条多肽链的分子。

[0050] 在一个实施方案中,本发明的蛋白可以包含:(I)含有SEQ ID NO:3-5的氨基酸序列的第一多肽链;(II)含有SEQ ID NO:6-8的氨基酸序列的第二多肽链;或(III)(I)和(II)两者。可选地或此外,本发明的蛋白可以包含:(I)含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列的第一多肽链;(II)含有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的第二多肽链;或(III)(I)和(II)两者。所述蛋白可以例如包含:含有以下的氨基酸序列的第一多肽链:(i) SEQ ID NO:9和24两者,(ii) SEQ ID NO:9和11两者,(iii) SEQ ID NO:3-5和24的全部,或(iv) SEQ ID NO:3-5和11的全部;以及含有以下的氨基酸序列的第二多肽链:(i) SEQ ID NO:10和25两者,(ii) SEQ ID NO:10和12,(iii) SEQ ID NO:6-8和25的全部,或(iv) SEQ ID NO:6-8和12,其中SEQ ID NO:11和12被取代,如本文关于本发明的其它方面所述的。可选地或此外,本发明的蛋白可以包含:含有SEQ ID NO:26或13的氨基酸序列的第一多肽链,以及含有SEQ ID NO:27或14的氨基酸序列的第二多肽链,其中SEQ ID NO:13和14被取代,如本文关于本发明的其它方面所述的。在此情况下,本发明的蛋白可以为TCR。可选地,如果例如蛋白包含含有SEQ ID NO:26和27两者、或SEQ ID NO:13和14两者的氨基酸序列的单条多肽链,或如果蛋白的第一和/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,则本发明的蛋白可以为融合蛋白。在这方面,本发明还提供了包含至少一种本文所述的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,或可以以这样的多肽存在:其与本文所述的本发明多肽之一在框内(串联)表达。其它多肽可以编码任何肽分子或蛋白分子或其部分,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。

[0051] 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或更多拷贝的本发明的多肽和/或其它多肽。制备融合蛋白的合适方法为本领域已知的,并且包括例如重组方法。

[0052] 在本发明的一些实施方案中,本发明的TCR、多肽和蛋白可以被表达为包含连接 α 链和 β 链的接头肽的单个蛋白。在这方面,本发明的TCR、多肽和蛋白还可以包含接头肽。接头肽可以有利地促进重组TCR、多肽和/或蛋白在宿主细胞中表达。接头肽可以包含任何合适的氨基酸序列。例如,接头肽可以包含SEQ ID NO:23。当由宿主细胞来表达包含接头肽的构建体时,所述接头肽可以被切割而产生分离的 α 和 β 链。在本发明的一个实施方案中,TCR、多肽或蛋白可以包含这样的氨基酸序列,其包含全长 α 链、全长 β 链和位于 α 和 β 链之间的接头肽。

[0053] 本发明的蛋白可以为包含至少一种本文所述的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”是指包含至少一种本发明的多肽和抗体或其抗原结合部分的多肽链的重组(例如,基因工程改造的)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)、或抗体的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,可以以这样的多肽存在:其与本发明的多肽在框

内(串联)表达。抗体或其抗原结合部分的多肽,可以为任何抗体或任何抗体片段(包括本文所述的任何抗体和抗体片段)的多肽。

[0054] 本发明的TCR、多肽和蛋白可以为任何长度,即可以包含任何数目的氨基酸,前提是所述TCR、多肽或蛋白保留它们的生物活性,例如,特异性结合突变的KRAS、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的能力。例如,多肽可以为约50至约5000个氨基酸的长度,如50、70、75、100、125、150、175、200、300、400、500、600、700、800、900、1000或更多个氨基酸的长度。在这方面,本发明的多肽也包括寡肽。

[0055] 本发明的TCR、多肽和蛋白可以包含代替一个或多个天然存在的氨基酸的合成氨基酸。此类合成氨基酸为本领域已知的,并且包括例如:氨基环己烷羧酸、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-羟脯氨酸和反式-4-羟脯氨酸、4-氨基苯丙氨酸、4-硝基苯丙氨酸、4-氯苯丙氨酸、4-羧基苯丙氨酸、 β -苯基丝氨酸、 β -羟基苯丙氨酸、苯甘氨酸、 α -萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、二氢吲哚-2-羧酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-羧酸、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-羟赖氨酸、鸟氨酸、 α -氨基环戊烷羧酸、 α -氨基环己烷羧酸、 α -氨基环庚烷羧酸、 α -(2-氨基-2-降莰烷)-羧酸、 α , γ -二氨基丁酸、 α , β -二氨基丙酸、高苯丙氨酸和 α -叔丁基甘氨酸。

[0056] 本发明的TCR、多肽和蛋白可以被糖基化、酰胺化、羧化、磷酸化、酯化、N-酰化、经由例如二硫桥而环化、或被转化成酸加成盐和/或任选地二聚化或聚合或缀合。

[0057] 本发明的TCR、多肽和/或蛋白可以通过本领域已知的方法获得,例如,从头合成。另外,多肽和蛋白可以使用本文所述的核酸利用标准的重组方法重组产生。参见,例如,Green and Sambrook, *Molecular Cloning:A Laboratory Manual*, 4th ed., Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)。可选地,本文所述的TCR、多肽和/或蛋白可以通过诸如Synpep (Dublin, CA)、Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) 和 Multiple Peptide Systems (San Diego, CA) 的公司商业合成。在这方面,本发明的TCR、多肽和蛋白可以为合成的、重组的、分离的和/或纯化的。

[0058] 本发明的实施方案提供了包含编码本文所述的TCR、多肽或蛋白中任一种的核苷酸序列的核酸。如本文所用,“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”,并且通常意指DNA或RNA的聚合物,其可以为单链或双链的,其可以含有天然的、非天然的、或改变的核苷酸,且其可以含有天然的、非天然的、或改变的核苷酸间连键,如氨基磷酸酯键或硫代磷酸酯键,替代未修饰的寡核苷酸的核苷酸之间存在的磷酸二酯。在一个实施方案中,所述核酸包括互补的DNA (cDNA)。通常优选的是不包含任何插入、缺失、倒置和/或取代的核酸。然而,在一些情况下,如本文所论述的,包含一个或多个插入、缺失、倒置和/或取代的核酸可能是合适的。

[0059] 优选地,本发明的核酸为重组体。如本文所用,术语“重组体”是指:(i)通过将天然或合成的核酸片段与可以在活细胞中复制的核酸分子连接而在活细胞外构建的分子,或(ii)由上述(i)中所述的那些分子进行复制所产生的分子。为了本文的目的,所述复制可以为体外复制或体内复制。

[0060] 可以使用本领域已知的程序,基于化学合成和/或酶促连接反应构建所述核酸。参见,例如,Green and Sambrook et al., 同上。例如,核酸可以使用天然存在的核苷酸,或设

计为增加分子的生物稳定性或增加杂交后形成的双链体的物理稳定性的不同修饰的核苷酸(如,硫代磷酸酯衍生物和吖啶取代的核苷酸),进行化学合成。可以用于生成核酸的修饰的核苷酸的实例,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-乙酰胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧甲基氨基甲基-2-硫尿苷、5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-半乳糖基辫苷(queosine)、肌苷、N6-异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-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-硫尿嘧啶、 β -D-甘露糖基辫苷、5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基硫基-N⁶-异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氨基乙酸(v)、怀丁昔(wybutoxosine)、假尿嘧啶、辫苷、2-硫胞嘧啶、5-甲基-2-硫尿嘧啶、2-硫尿嘧啶、4-硫尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氨基乙酸甲酯、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。

[0061] 核酸可以包含编码本文所述的TCR、多肽或蛋白中任一种的任何核苷酸序列。在本发明的一个实施方案中,核酸可以包含SEQ ID NO:28 (α 链的可变区) 和SEQ ID NO:29 (β 链的可变区) 的核苷酸序列。

[0062] 在本发明的一个实施方案中,核酸包含编码本文所述的TCR、多肽或蛋白中任一种的密码子优化的核苷酸序列。不受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转录本的翻译效率。核苷酸序列的密码子优化可以涉及用天然密码子取代另一密码子,该密码子编码相同氨基酸,但可以被细胞内更容易获得的tRNA翻译,从而增加翻译效率。核苷酸序列的优化还可以减少会干扰翻译的二级mRNA结构,从而增加翻译效率。

[0063] 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,或包含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。

[0064] 在严格条件下杂交的核苷酸序列优选在高严格条件下杂交。“高严格条件”意指核苷酸序列以在可检测方面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。高严格条件包括这样的条件:其可以将具有精确互补序列的多核苷酸,或仅含有少数分散错配的多核苷酸与碰巧具有匹配该核苷酸序列的一些小区域(例如,3-10个碱基)的随机序列区分开来。相比14-17个或更多个碱基的全长互补物,此类小的互补区域更容易解链,并且高严格杂交使得它们易于被区分。相对高的严格条件将包括,例如,低盐和/或高温条件,如约50-70°C温度下通过约0.02-0.1M NaCl或等同物提供的条件。此类高严格条件容许该核苷酸序列与模板或靶链之间很少(如果有的话)的错配,并且特别适于检测任何本发明TCR的表达。通常认为,可以通过加入增加量的甲酰胺使条件更严格。

[0065] 本发明还提供包含与本文所述的任何核酸具有至少约70%或更多,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%同一性的核苷酸序列的核酸。在这方面,所述核酸可以基本上由本文所述的任何核苷酸序列组成。

[0066] 本发明的核酸可以掺入至重组表达载体中。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。在本发明的一个实施方案中,重组表达载体包含编码 α 链、 β 链和接头肽的核苷酸序列。

[0067] 为了本文的目的,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,当该构建体包含编码mRNA、蛋白、多肽或肽的核苷酸序列,并且在足以使得在宿主细胞内表达mRNA、蛋白、多肽或肽的条件下将载体与宿主细胞接触时,所述构建体允许该宿主细胞表达mRNA、蛋白、多肽或肽。本发明的载体并非整个是天然存在的。然而,载体的部分可以为天然存在的。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和RNA,其可以为单链或双链的、合成的或部分由天然来源获得,并且可以含有天然的、非天然的或改变的核苷酸。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连键,或这两种类型的连键。优选地,所述非天然存在的或改变的核苷酸或核苷酸间连键不会阻碍载体的转录或复制。

[0068] 本发明的重组表达载体可以为任何合适的重组表达载体,并且可以被用于转化或转染任何合适的宿主细胞。合适的载体包括设计用于繁殖和扩增、或用于表达、或这两者的那些载体,如质粒和病毒。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,所述重组表达载体为病毒载体,例如,逆转录病毒载体。在特别优选的实施方案中,所述重组表达载体为MSGV1载体。

[0069] 本发明的重组表达载体可以使用在例如Green and Sambrook et al. (同上)中描述的标准重组DNA技术进行制备。可以将表达载体的构建体(其为环状或线性的)制备成含有在原核或真核宿主细胞中有功能的复制系统。复制系统可以来源于,例如ColE1、2 μ 质粒、 λ 、SV40、牛乳头瘤病毒等。

[0070] 可取的是,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,该调控序列对待引入该载体的宿主细胞类型(例如细菌、真菌、植物或动物)具有特异性,视情况而定考虑该载体是基于DNA还是RNA的。

[0071] 重组表达载体可以包含一个或多个标记基因,所述标记基因允许对转化或转染的宿主细胞进行选择。标记基因包括杀菌剂抗性,例如对抗生素、重金属等的抗性,与营养缺陷型宿主细胞互补以提供原养型等。本发明表达载体的合适标记基因包括,例如新霉素/G418抗性基因、潮霉素抗性基因、组氨醇抗性基因、四环素抗性基因和氨基青霉素抗性基因。

[0072] 重组表达载体可以包含天然或非天然的启动子,该启动子可操作地连接至编码TCR、多肽或蛋白的核苷酸序列,或可操作地连接至与编码TCR、多肽或蛋白的核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列。对启动子的选择,例如强、弱、可诱导的、组织特异性的和发育特异性的,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本领域技术人员的能力内。启动子可以为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启动子或存在于鼠干细胞病毒的长末端重复序列中的启动子。

[0073] 本发明的重组表达载体可以被设计用于瞬时表达、用于稳定表达、或用于这两者。另外,可以制备用于组成型表达或用于诱导型表达的重组表达载体。

[0074] 此外,可以制备包含自杀基因的重组表达载体。如本文所用,术语“自杀基因”是指导致表达自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可以为赋予表达该基因的细胞对药剂如药

物的敏感性，并且当该细胞与所述药剂接触或暴露于所述药剂时引起该细胞死亡的基因。自杀基因为本领域已知的，并且包括例如，单纯性疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶脱氨酶基因、嘌呤核苷磷酸化酶基因和硝基还原酶基因。

[0075] 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的重组表达载体的任何类型的细胞。所述宿主细胞可以为真核细胞，例如，植物、动物、真菌或藻类，或可以为原核细胞，例如，细菌或原生动物。宿主细胞可以为培养的细胞或原代细胞，即从生物体如人直接分离的细胞。宿主细胞可以为贴壁细胞或悬浮细胞，即悬浮生长的细胞。合适的宿主细胞为本领域已知的并且包括，例如，DH5 α 大肠杆菌细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴VERO细胞、COS细胞、HEK293细胞等。为了扩增或复制重组表达载体的目的，所述宿主细胞优选为原核细胞，例如，DH5 α 细胞。为了产生重组的TCR、多肽或蛋白的目的，所述宿主细胞优选为哺乳动物细胞。最优先地，所述宿主细胞为人细胞。虽然所述宿主细胞可以为任何细胞类型的细胞，可以源于任何类型的组织，并且可以为任何发育阶段的细胞，但宿主细胞优选为外周血淋巴细胞(PBL)或外周血单核细胞(PBMC)。更优先地，所述宿主细胞为T细胞。

[0076] 为了本文的目的，T细胞可以为任何T细胞，如培养的T细胞，例如原代T细胞，或来自培养的T细胞系如Jurkat、SupT1等的T细胞，或从哺乳动物获得的T细胞。如果从哺乳动物获得，则T细胞可以从许多来源获得，包括但不限于：血液、骨髓、淋巴结、胸腺、或其它组织或液体。T细胞也可以被富集或纯化。优先地，T细胞为人T细胞。T细胞可以为任何类型的T细胞，并且可以为任何发育阶段的T细胞，包括但不限于：CD4 $^+$ /CD8 $^+$ 双阳性T细胞、CD4 $^+$ 辅助性T细胞如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)、记忆性T细胞(例如，中心记忆性T细胞和效应记忆性T细胞)、初始T细胞等。

[0077] 本发明还提供了包含至少一种本文所述的宿主细胞的细胞群。所述细胞群可以为异质群体，其除了包含至少一种不包含任何重组表达载体的其它细胞例如宿主细胞(例如T细胞)，或T细胞之外的细胞例如B细胞、巨噬细胞、中性粒细胞、红细胞、肝细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌肉细胞、脑细胞等之外，还包含含有所述的任何重组表达载体的宿主细胞。可选地，所述细胞群可以为大体上同质的群体，其中所述群体主要包含含有所述重组表达载体的宿主细胞(例如，基本上由其组成)。所述群体也可以为克隆细胞群，其中该群体的所有细胞为包含重组表达载体的单个宿主细胞的克隆，以使得群体的所有细胞包含所述重组表达载体。在本发明的一个实施方案中，所述细胞群为包含含有本文所述重组表达载体的宿主细胞的克隆群体。

[0078] 在本发明的一个实施方案中，所述群体中细胞的数目可以快速地扩增。T细胞数目的扩增可以通过以下文献中所述的本领域已知的许多方法中的任一种来实现，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 et al., J. Immunother., 26:332-42 (2003)；以及Riddell et al., J. Immunol. Methods, 128:189-201 (1990)。在一个实施方案中，通过将T细胞与OKT3抗体、IL-2和饲养层PBMC(例如，经辐照的同种异体PBMC)培养，来进行T细胞数目的扩增。

[0079] 本发明的TCR、多肽、蛋白、核酸、重组表达载体和宿主细胞(包括其群体)可以是分离的和/或纯化的。如本文所用，术语“分离的”意指已经脱离其天然环境。如本文所用，术语“纯化的”意指纯度已经增加，其中“纯度”为相对术语，并且不一定解释为绝对纯度。例如，

纯度可以为至少约50%，可以大于60%、70%、80%、90%、95%或可以为100%。

[0080] 本发明的TCR、多肽、蛋白、核酸、重组表达载体和宿主细胞(包括其群体)，在下文中全部被统称为“本发明的TCR物质”，其可以被配制成组合物，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、核酸、表达载体和宿主细胞(包括其群体)中的任一种以及药学可接受的载体。含有任何本发明的TCR物质的本发明的药物组合物，可以包含多于一种本发明的TCR物质，例如多肽和核酸，或两种或更多种不同的TCR。可选地，所述药物组合物可以包含本发明的TCR物质并组合有另一药物活性剂或药物，如化学治疗剂，例如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、阿霉素、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗(rituximab)、长春碱、长春新碱等。

[0081] 优选地，所述载体为药学可接受的载体。关于药物组合物，载体可以为那些常规地用于考虑中的本发明具体TCR物质中的任何一种。对本领域技术人员来说，用于制备可施用的组合物的方法为已知的或显而易见的，且更详细地描述于，例如，Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 22nd Ed., Pharmaceutical Press (2012)。优选的是，药学可接受的载体为在使用条件下无有害副作用或毒性的载体。

[0082] 载体的选择将部分由本发明的具体TCR物质以及用于施用本发明TCR物质的具体方法来确定。因此，存在本发明的药物组合物的多种合适的制剂。合适的制剂可以包括任何用于肠胃外、皮下、静脉内、肌内、动脉内、鞘内、瘤内或腹膜内施用的那些制剂。可以使用多于一种途径来施用本发明的TCR物质，并且在某些情况下，特定的途径可以提供比另一途径更直接且更有效的应答。

[0083] 优选地，本发明的TCR物质通过注射例如静脉内注射施用。当本发明的TCR物质为表达本发明的TCR的宿主细胞时，用于注射的所述细胞的药学可接受的载体可以包括任何等渗载体，例如生理盐水(约0.90% w/v的NaCl水溶液、约300m0sm/L的NaCl水溶液、或约9.0g NaCl/L水)、NORMOSOL R电解质溶液(Abbott, Chicago, IL)、PLASMA-LYTE A(Baxter, Deerfield, IL)、约5%葡萄糖水溶液或乳酸林格氏液。在一个实施方案中，药学可接受的载体补充有人血清白蛋白。

[0084] 为了本发明的目的，施用的本发明TCR物质的量或剂量(例如，本发明的TCR物质为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使对象或动物产生例如治疗性或预防性应答。例如，本发明的TCR物质的剂量，应在从施用时起约2小时或更久，例如12-24小时或更久的时段内，足以结合癌症抗原(例如，突变的KRAS)、或检测、治疗或预防癌症。在某些实施方案中，时间段甚至可以更久。所述剂量将由本发明具体TCR物质的功效和动物(例如人)的状况以及待治疗的动物(例如人)的体重来确定。

[0085] 用于确定施用剂量的许多测定为本领域已知的。为了本发明的目的，测定可以用于确定待施用于哺乳动物的起始剂量，所述测定包括：将给定剂量的表达本发明TCR、多肽或蛋白的T细胞施用于一组哺乳动物(其中各自被给予不同剂量的T细胞)中的哺乳动物后，比较靶细胞裂解或由此类T细胞所分泌的IFN-γ的程度。可以通过本领域已知的方法测定在施用某剂量后，靶细胞裂解或IFN-γ分泌的程度。

[0086] 本发明TCR物质的剂量，也通过可能伴随本发明具体TCR物质施用的任何不利副作用的存在、性质和程度来确定。通常，主治医师会考虑多种因素如年龄、体重、总体健康、饮食、性别、待施用的本发明TCR物质、施用途径以及被治疗的癌症的严重程度，来决定用于治

疗每个个体患者的本发明TCR物质的剂量。在本发明的TCR物质为细胞群的一个实施方案中,每次输注施用的细胞数目可以例如从约 1×10^6 至约 1×10^{12} 个细胞或更多进行变化。在某些实施方案中,可以施用少于 1×10^6 个细胞。

[0087] 本领域普通技术人员将容易理解,本发明的TCR物质可用许多方式进行修饰,以通过修饰使得本发明TCR物质的治疗性或预防性功效增加。例如,本发明的TCR物质可以直接地或通过桥间接地缀合于化学治疗剂。将化合物缀合于化学治疗剂的实践为本领域已知的。本领域普通技术人员认识到,在本发明TCR物质上对本发明TCR物质的功能并非必需的位点,是附接桥和/或化学治疗剂的理想位点,条件是:一旦所述桥和/或化学治疗剂被附接到本发明的TCR物质上,不会干扰本发明TCR物质的功能,即结合突变的KRAS或检测、治疗或预防癌症的能力。

[0088] 预期本发明的药物组合物、TCR、多肽、蛋白、核酸、重组表达载体、宿主细胞或细胞群,可以用于治疗或预防癌症的方法中。不受特定理论的束缚,认为本发明的TCR能特异性结合突变的KRAS,以使得当由细胞表达时,TCR(或相关的本发明多肽或蛋白)能够介导针对表达突变的KRAS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癌症的方法,其包括:以有效治疗或预防哺乳动物中癌症的量,向哺乳动物施用本文所述的药物组合物、TCR、多肽或蛋白中的任一种,包含编码本文所述的TCR、多肽、蛋白中的任一种的核苷酸序列的任何核酸或重组表达载体,或包含编码本文所述的TCR、多肽或蛋白中的任一种的重组载体的任何宿主细胞或细胞群。

[0089] 本发明的一个实施方案提供了本文所述的药物组合物、TCR、多肽或蛋白中的任一种,包含编码本文所述的TCR、多肽、蛋白中的任一种的核苷酸序列的任何核酸或重组表达载体,或包含编码本文所述的TCR、多肽或蛋白中的任一种的重组载体的任何宿主细胞或细胞群,用于治疗或预防哺乳动物中癌症的用途。

[0090] 如本文所用,术语“治疗”和“预防”以及源自于此的词汇,不一定意味着100%或完全治疗或预防。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,本发明方法可以提供任何水平的任何量的对哺乳动物癌症的治疗或预防。此外,本发明方法提供的治疗或预防可以包括对正在治疗或预防的癌症中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的消退。另外,为了本文的目的,“预防”可以涵盖延迟癌症或其症状或病况的发作。可选地或此外,“预防”可以涵盖预防或延迟癌症或其症状或病况的复发。

[0091] 还提供了检测哺乳动物中癌症存在的方法。所述方法包括:(i)使包含来自哺乳动物的一种或多种细胞的样品与本文所述的本发明TCR、多肽、蛋白、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群或药物组合物中的任一种接触,从而形成复合物,以及检测所述复合物,其中检测到复合物指示哺乳动物中癌症的存在。

[0092] 关于本发明的检测哺乳动物中癌症的方法,细胞的样品可以为包含全细胞、其裂解物、或全细胞裂解物的一部分,例如细胞核或细胞质部分、全蛋白部分、或核酸部分的样品。

[0093] 为了本发明检测方法的目的,所述接触可以在相对于哺乳动物的体外或体内发生。优选地,所述接触为体外的。

[0094] 另外,复合物的检测可以通过本领域已知的多种方法进行。例如,本文所述的本发

明TCR、多肽、蛋白、核酸、重组表达载体、宿主细胞或细胞群可以用可检测标记,如放射性同位素、荧光团(例如异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(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)进行标记。

[0095] 为了本发明方法的目的,其中当施用宿主细胞或细胞群时,所述细胞可以为与哺乳动物同种异体或哺乳动物自体的细胞。优选地,所述细胞为哺乳动物自体的。

[0096] 关于本发明的方法,所述癌症可以为任何癌症,包括以下的任一种:急性淋巴细胞性癌症、急性骨髓性白血病、腺泡状横纹肌肉瘤、骨癌、脑癌、乳腺癌、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、慢性淋巴细胞白血病、慢性骨髓性癌症、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、下咽癌、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌、恶性间皮瘤、黑素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、口咽癌、卵巢癌、阴茎癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌和肠系膜癌、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。优选的癌症为胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌或前列腺癌。优选地,所述肺癌是肺部腺癌,所述卵巢癌是上皮性卵巢癌,以及所述胰腺癌症是胰腺癌。在另一优选实施方案中,所述癌症是表达具有G12D突变的突变的KRAS氨基酸序列的癌症。

[0097] 本发明方法提及的哺乳动物可以为任何哺乳动物。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:啮齿目的哺乳动物如小鼠和仓鼠,以及兔形目的哺乳动物如兔。优选所述哺乳动物来自食肉目,包括猫科动物(猫)和犬科动物(犬)。更优选所述哺乳动物来自偶蹄目包括牛科动物(牛)和猪科动物(猪),或来自奇蹄目包括马科动物(马)。最优选所述哺乳动物来自灵长目、猿(Cebooids)目或猴(Simoids)目(猴),或来自类人猿亚目(人和类人猿)。特别优选是哺乳动物为人。

[0098] 以下实施例进一步阐述了本发明,但当然不应视为以任何方式限制本发明的范围。

实施例

[0099] 以下材料和方法用于实施例1-5中所述的实验。

[0100] 患者样品

[0101] 样品来源于纳入由美国国家癌症研究所(NCI)的机构审查委员会(IRB)批准的临床方案(NCT01174121)的患者。

[0102] 下一代测序

[0103] 对于除患者3971之外的所有患者,通过先前所述的个人基因组诊断(Personal Genome Diagnostics)(PGDx,Baltimore,MD)(Jones et al.,Science,330:228-231(2010)),在低温保存的肿瘤组织(包埋在最佳切割温度(OCT)培养基中)和正常外周血细胞上进行全外显子组测序(WES)。PGDx将数据与基因组构建hg18进行比对。对于患者3971,使用Illumina HiSeq 2000测序系统进行全基因组测序(WGS),其中正常样品的平均深度为39.19,肿瘤样品的平均深度为46.53。

[0104] 如下文所述,还利用国立卫生研究院(Bethesda,MD)的Biowulf Linux集群(biowulf.nih.gov)的高性能计算能力对WES数据进行再分析。

[0105] 比对、处理和变异调用

[0106] 使用来自Novocraft (novocraft.com) 的Novoalign MPI进行人基因组构建hg19的比对。使用Picard's MarkDuplicates工具标记重复项。根据GATK最佳实践流程 (broadinstitute.org/gatk) 进行Indel重新比对和基准重新校准。数据清除后, 使用Samtools Mpileup软件 (samtools.sourceforge.net) 创建pileup文件, 以及使用VarScan2软件 (varscan.sourceforge.net) 调用体细胞变异。然后, 使用Annovar软件 (annovar.openbioinformatics.org) 对这些变异进行注释。

[0107] 对于大多数WES样品, 对由PGDx生成的数据进行再分析, 并使用串联小基因 (TMG) 和肽方法降低突变- 调用阈值以产生用于评价的低信度假定突变。在变异调用之后, 使用以下过滤值产生用于评价的假定突变: 对于患者3812、3948、3995、4007和4032, 使用肿瘤中 $\geq 10\%$ 的变异频率和 ≥ 2 的变异读取的截止值。对于患者4069, 使用肿瘤中 $\geq 8\%$ 的变异频率和 ≥ 3 的变异读取的截止值。对于患者3978和3942, 突变调用阈值没有降低。对于患者3971(全基因组测序), 使用肿瘤中 $\geq 20\%$ 的变异频率且正常中 $\leq 10\%$ 变异频率的截止值, 以确定突变数目和TMG构建体的产生。

[0108] 注意, 如果突变调用阈值没有降低, 则不会检测到一种免疫原性突变(患者4069, ZFYVE27的突变)。当使用先前的方法来调用上文提及的突变时, 剩余的免疫原性突变存在于突变列表中。

[0109] 肿瘤浸润性淋巴细胞 (TIL) 的产生

[0110] 如先前所述 (Jin et al., J. Immunother., 35:283-292 (2012)), 产生TIL。简而言之, 将手术切除的肿瘤切成大约1-2mm碎片, 并单独置于包含含有高剂量IL-2 (6000IU/ml, Chiron, Emeryville, CA) 的2ml完全培养基 (CM) 的24孔板的孔中。CM由补充有10%内部用的人血清、2mM L-谷氨酰胺、25mM HEPES和10 μ g/ml庆大霉素的罗斯维尔公园纪念研究所 (Roswell Park Memorial Institute (RPMI)) 培养基组成。在一些情况下, 在TIL最初生长之后 (2-4周), 在补充有5%人AB血清、3000IU/ml IL-2和30ng/ml OKT3抗体 (Miltenyi Biotec, Bergisch Gladbach, Germany) 的400ml 50/50培养基中, 以1:100的比率使用经辐射的PBMC在透气的G-Rex100烧瓶中迅速扩增选定的培养物。50/50培养基由CM与AIM-V培养基的1:1混合物组成。将所有细胞在37°C和5%CO₂下培养。

[0111] 对于除患者3971和4069之外的所有患者, 下一代测序和TIL生成来源于相同的转移性结节。对于患者3971, 由肺病变成TIL, 并且在肝病上进行全基因组测序。对于患者4069, 由肝病变成TIL, 并且在原发性胰腺肿瘤上进行全外显子组测序。

[0112] 串联小基因 (TMG) 构建体和体外转录的 (IVT) RNA的产生

[0113] 串联小基因 (TMG) 构建体的一般描述, 描述于Lu et al., Clin. Cancer Res., 20: 3401-3410 (2014) 和Tran et al., Science, 344:641-645 (2014) 中。简而言之, 对于通过下一代测序鉴定的每个非同义取代突变, 制备编码侧翼连接有野生型蛋白序列的12个氨基酸的对应氨基酸变化的“小基因”构建体。将多个小基因串在一起以产生TMG构建体。对于插入/缺失 (indels), 通过翻译框移码的序列直至下一个终止密码子来制备小基因。这些小基因构建体为密码子优化的、合成的, 并使用EcoRI和BamHI进行框内克隆 (Gene Oracle, Mountain View, CA) 至修饰的pcDNA3.1载体中。除了含有poly-A尾以增强mRNA稳定性之外, 这种修饰的载体还含有信号序列和DC-LAMP运输序列以增强加工和呈递 (Bonehill et

al., J. Immunol., 172:6649-6657 (2004)。通过标准Sanger测序(Gene Oracle),验证所有TMG的核苷酸序列。用限制酶Nsi I使编码TMG的质粒线性化。用Not I使编码绿色荧光蛋白(GFP)的对照pcDNA3.1/V5-His-TOPO载体(没有信号序列和DC-LAMP运输序列)线性化。用乙二胺四乙酸(EDTA)、乙酸钠和乙醇来沉淀线性化的DNA。通过标准的琼脂糖凝胶电泳来验证DNA线性化。根据制造商的指导,使用MESSAGE MMACHINE T7U1tra试剂盒(Life Technologies,Carlsbad,CA),将大约1 μ g线性化质粒用于产生IVT RNA。使用LiCl₂方法沉淀RNA,并使用NanoDrop分光光度计评估RNA纯度和浓度。然后,将RNA等分到微管中,并储存在-80°C直至使用。

[0114] 自体抗原递呈细胞(APC)的产生

[0115] 使用塑料附着方法产生单核细胞来源的未成熟的树突状细胞(DC)。简而言之,将单采样品解冻、洗涤、用纯AIM-V培养基(Life Technologies)设定为5-10x 10⁶个细胞/ml,然后在适当大小的组织培养瓶中以大约1x 10⁶个细胞/cm²孵育,并在37°C、5%CO₂下孵育。在90分钟(min)之后,收集非贴壁细胞,用AIM-V培养基剧烈洗涤烧瓶,然后用AIM-V培养基再孵育60min。然后,用AIM-V培养基再次剧烈洗涤烧瓶,然后用DC培养基孵育贴壁细胞。DC培养基包括含有5%人血清、100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素、2mM L-谷氨酰胺、800IU/ml粒细胞-巨噬细胞集落刺激因子(GM-CSF)(Leukine(沙格司亭))和200U/ml IL-4(Peprotech,Rocky Hill,NJ)的RPMI。在第2-3天,将新鲜的DC培养基添加至培养物中。在培养开始之后第4-6天,将新鲜的或冷冻/解冻的DC用于实验中。

[0116] 使用CD40L和IL-4刺激方法产生抗原递呈B细胞。简而言之,使用人CD19-微珠(Miltenyi Biotec)从自体单采样品中正向选择B细胞。然后,将CD19+细胞与稳定表达CD40L的经辐射的(6000rad)3T3细胞(3T3-CD40L),在B细胞培养基中以大约1:1的比率进行培养。B细胞培养基包括补充有10%人血清、100U/ml青霉素和100 μ g/ml链霉素、10 μ g/ml庆大霉素、2mM L-谷氨酰胺和200U/ml IL-4(Peprotech)的伊斯科夫改良达尔伯克氏培养基(Iscove's Modified Dulbecco's Media,IMDM)(Life Technologies)培养基。在第3天开始添加新鲜的B细胞培养基,此后每2-3天添加或更换培养基。根据需要,每5-8天使用另外的经辐射的3T3-CD40L饲养细胞来再刺激B细胞。通常在用3T3-CD40L细胞进行最后一次刺激之后5-8天,在实验中使用新鲜的或冷冻/解冻的B细胞。

[0117] RNA转染

[0118] 收获APC(DC或B细胞),用PBS洗涤1次,然后以10-30x 10⁶个细胞/ml重悬浮于Opti-MEM培养基(Life Technologies)中。将IVTRNA(4 μ g或8 μ g)等分至2mm间隙电穿孔小池的底部,并将50 μ l或100 μ l APC直接添加至小池中。因此,电穿孔中使用的最终RNA浓度为80 μ g/ml。使用BTX-830方波电转化仪进行电穿孔。用150V,10ms和1个脉冲,对DC进行电穿孔,以及用150V,20ms和1个脉冲对B细胞进行电穿孔。使用这些设置的转染效率通常为70-90%,如用GFP RNA所评估的。所有步骤在室温进行。在电穿孔之后,将细胞立即转移至含有补充有适当细胞因子的DC-或B-细胞培养基的聚丙烯管中。将转染的细胞在37°C、5%CO₂下孵育过夜(12-14h)。在用于共培养测定之前,将细胞用磷酸盐缓冲盐水(PBS)洗涤1次。在共培养测定中,不相关的TMG RNA对照是来自不同患者的TMG。

[0119] 脉脉冲

[0120] 收获DC或B细胞,然后用含有适当细胞因子的DC或B细胞培养基以0.5x 10⁶个细

胞/ml (DC) 或 1×10^6 个细胞/ml (B细胞) 重悬浮。用二甲基亚砜 (DMSO) 溶解长肽 (通常为25-mers, Genscript, Piscataway, NJ), 以 $\sim 10\mu\text{g}/\text{ml}$ (或用于滴定的指定浓度) 脉冲至APC上, 并在 37°C 和5% CO_2 下孵育过夜。第二天 (通常在肽脉冲之后12-16小时 (h)), 在与T细胞共培养之前将APC洗涤1次。对于短的/预测的最小肽, 将APC在 37°C 用 ~ 0.1 至 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 肽脉冲 ~ 2 小时 (除非另有说明), 并在与T细胞共培养之前洗涤1次。

[0121] T细胞分选、扩增和克隆

[0122] 将BD FACS Aria IIu细胞分选仪和BD FACS Jazz细胞分选仪, 用于需要细胞分选的所有实验中。在指定实验中, 在含有 $30\text{ng}/\text{ml}$ 抗-CD3抗体 (OKT3) 和 $3000\text{IU}/\text{ml}$ IL-2的50/50培养基中, 使用过量的经辐射的 (4000rad) 同种异体饲养细胞 (三种不同供体白细胞单采样品的汇集物) 来扩增分选的T细胞。通常将细胞用于最初刺激之后2-3周的测定中。

[0123] 在一些情况下, 为了研究T细胞的突变反应性, 基于PD-1表达对来自新鲜肿瘤消化物的CD4和CD8T细胞进行分选和扩增, 因为已经证明黑色素瘤患者中的 $\text{PD-1}^+\text{CD8}^+$ T细胞富集在肿瘤反应性T细胞中 (Gros et al., J.Clin.Invest., 124:2246-2259 (2014))。基于流动的细胞分选也用于富集突变反应性T细胞, 如下文“突变反应性TCR的鉴定和构建”中所述。

[0124] 共培养测定: 针对细胞表面活化标志物的IFN- γ ELISPOT、ELISA和流式细胞术

[0125] 当DC用作APC时, 96孔板的每孔使用大约 3.5×10^4 至 7×10^4 个DC。当B细胞用作APC时, 96孔板的每孔使用大约 2×10^5 个细胞。在酶联免疫斑点 (ELISPOT) 测定中, 每孔使用 1×10^4 至 4×10^4 个效应T细胞。在处理ELISPOT板之前, 从板收获细胞并对其进行处理, 以用于下文所述的流式细胞术分析。在共培养之前, 通常将T细胞解冻并静置在含有IL-2 ($3000\text{IU}/\text{ml}$ IL-2) 的50/50培养基中至少两天。所有共培养在不存在外源添加的细胞因子的情况下进行。对于所有的IFN- γ ELISPOT和流式细胞术测定, 使用板结合的OKT3 ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) 作为阳性对照。为了与COS-7和胰腺细胞系共培养, 将 1×10^5 个T细胞与 1×10^5 个靶细胞共培养过夜。收集上清液并使用IFN- γ ELISA评估IFN- γ 。

[0126] 对于IFN- γ ELISPOT测定, 简而言之, 用每孔 $50\mu\text{l}$ 70%乙醇预处理ELISpot PVDF (ELIIP) 板 (Millipore, Billerica, MA (MAIPSU)) 2min, 用PBS洗涤3次, 然后用 $50\mu\text{l}$ 的 $10\mu\text{g}/\text{ml}$ IFN- γ 捕获抗体 (Mabtech, Cincinnati, OH) (克隆: 1-D1K) 包被, 并在冰箱中孵育过夜。对于OKT3对照, 用IFN- γ 捕获抗体 ($10\mu\text{g}/\text{ml}$) 和OKT3 ($1\mu\text{g}/\text{ml}$) 的混合物包被孔。在共培养之前, 将板用PBS洗涤三次, 随后用50/50培养基在室温 (RT) 封闭至少1h。在20-22h共培养之后, 将细胞从ELISPOT板收获至标准96孔圆底板中, 然后用PBS+0.05%吐温-20洗涤剂 (PBS-T) 将ELISPOT板洗涤6次, 然后用 $100\mu\text{l}/\text{孔}$ 的 $0.22\mu\text{m}$ 过滤的 $1\mu\text{g}/\text{ml}$ 生物素化抗-人IFN- γ 检测抗体溶液 (Mabtech, 克隆: 7-B6-1) 在室温孵育2h。然后, 用PBS-T将板洗涤3次, 随后用 $100\mu\text{l}/\text{孔}$ 的链霉亲和素-ALP (Mabtech, 1:3000稀释) 孵育1h。然后用PBS将板洗涤5次, 随后用 $100\mu\text{l}/\text{孔}$ 的 $0.45\mu\text{m}$ 过滤的BCIP/NBT底物溶液 (KPL, Inc., Gaithersburg, MD) 显影。通过用冷的自来水彻底漂洗来终止反应。使用 ImmunoSpot 读板仪和相关软件 (Cellular Technologies, Ltd., Shaker Heights, OH) 对ELISPOT板进行扫描和计数。

[0127] 在刺激之后大约22-24h, 通过流式细胞术评估T细胞活化标志物OX40和4-1BB的表达。简而言之, 将从ELISPOT板收获的细胞沉淀, 用荧光激活细胞分选 (FACS) 缓冲液 (补充有1%FBS和2mM EDTA的1X PBS) 洗涤, 然后用适当的抗体在黑暗中于 4°C 染色大约30分钟。在BD FACSCanto II流式细胞仪上采集前, 用FACS缓冲液洗涤细胞至少一次。所有数据都针对

活的(PI阴性)单细胞设门。收集的活T细胞事件的数目通常在 2×10^3 - 8×10^3 。

[0128] 流式细胞术抗体

[0129] 以下滴定的抗-人抗体用于细胞表面染色:CD3-AF700(克隆:UCHT1)、CD4-APC-Cy7(克隆:SK3)、CD8-PE-Cy7(克隆:SK1)、OX40-FITC(克隆:Ber-ACT35)和4-1BB-APC(克隆:4B4-1)。除CD8-PE-Cy7和OX40-FITC(BD Bioscience, Franklin Lakes, NJ)之外,所有抗体来自BioLegend(San Diego, CA)。使用IOMark B Mark TCRV试剂盒(Beckman Coulter, Schaumburg, IL)来评估指定T细胞群的TCR-V β 库。使用荧光染料缀合的抗-小鼠TCR β 恒定区抗体(克隆:H57-597,eBioscience, San Diego, CA)来评估TCR转导效率。

[0130] TCR-V β 深度测序

[0131] 使用DNeasy血液和组织试剂盒(Qiagen, Venlo, Netherlands),针对分离自外周血、T细胞和冷冻肿瘤组织的基因组DNA,通过immunoSEQ测定(Adaptive Biotechnologies, Seattle, WA)进行TCR-V β 深度测序。在TCR频率的计算中仅使用生产性TCR重排。

[0132] 突变反应性TCR的鉴定和构建

[0133] 使用几种方法来鉴定突变反应性TCR序列。首先,将与突变的TMG或肽共培养时上调活化标志物(4-1BB或OX40)的T细胞进行FACS纯化,然后直接测序或进一步扩增,如下文所述。其次,在存在与占优势的TCR-V β 克隆型相关的优势反应性的情况下(如使用IOMARK BETA MARK TCR V试剂盒所测定的),将表达占优势的TCR-V β 的T细胞进行FACS纯化,然后直接测序或进一步扩增后测序。

[0134] 在大多数情况下,在扩增之后,使富集的突变反应性细胞沉淀,并分离总RNA(RNEASY Mini试剂盒,Qiagen)。然后按照制造商的指导(SMARTer RACE cDNA扩增试剂盒, Clontech, Mountain View, CA),使用TCR- α 和- β 链恒定引物,对总RNA进行5'RACE。将试剂盒的程序1用于PCR,修改了延伸时间(2分钟而不是3分钟)。 α 和 β 链恒定引物的序列为:TCR- α , SEQ ID NO:21;TCR- β , SEQ ID NO:22。然后通过标准琼脂糖凝胶电泳和凝胶提取(Clontech)来分离TCR PCR产物。然后将产物直接测序,或TOPO-TA克隆后对单个集落进行测序(Macrogen, Seoul, Korea)。在其它情况下,对富集的突变反应性细胞(Adaptive Biotechnologies, Seattle, WA)进行TCR-V β 深度测序,其通常产生高度占优势的TCR-V β 序列。使用富集的突变反应性T细胞群和/或TCR-转导的T细胞进行共培养测定,以验证所述细胞群事实上对所鉴定的突变具有反应性。

[0135] 通过将TCR- α V-J区与小鼠TCR- α 恒定链,以及将TCR- β -V-D-J区与小鼠TCR- β 恒定链融合,来完成突变反应性TCR的构建。小鼠TCR- α 恒定链具有SEQ ID NO:24的氨基酸序列,并且小鼠TCR- β 恒定链具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列。 α 和 β 链通过弗林蛋白酶SGSG P2A接头(SEQ ID NO:23)隔开。小鼠TCR恒定区的使用促进引入的TCR的配对,并且也促进使用对小鼠TCR- β 链特异的抗体(eBioscience),通过流式细胞术来鉴定阳性转导的T细胞。在有两个假定的TCR α 链与一个 β 链配对的情况下,两种TCR都被构建并评估其反应性。合成TCR构建体,并将其克隆至MSGV1逆转录病毒载体(Gene Oracle)中。

[0136] 细胞系转染和转导

[0137] 用KRAS野生型或G12D cDNA(各200ng),联合来自患者3995的HLA-B和-C等位基因cDNA(各50ng)之一(表1)转染COS-7细胞。仅测试了HLA-B和HLA-C等位基因,因为初步实验排除了HLA-A作为KRAS G12D反应性的限制元件。在96孔板中进行转染。除了KRASG12D-阴性

细胞系BxPC-3 (KRAS wt)、A818.8 (KRASG12R)、SK-PC3 (KRASG12V) 和MIA PaCa-2 (KRASG12C)之外,均表达KRASG12D的人胰腺癌细胞系ASPC-1、MDA-Panc48、PK-45p、FA6-2和HPAC-1,未转导有任何物质或转导有编码HLA-Cw*08:02的逆转录病毒。

[0138] 表1

[0139]	患者 ID	HLA-I					
		A	A	B	B	C	C
[0140]	3995	30:02	32:01	14:01	18:01	05:01	08:02

[0141] 外周血T细胞的TCR转导

[0142] 将自体单采样品解冻,并在T细胞培养基中设置为 2×10^6 个细胞/ml,所述T细胞培养基由补充有5%内部用人血清、10μg/ml庆大霉素、100U/ml青霉素和100μg/ml链霉素、1.25μg/ml FUNGIZONE两性霉素B和2mM L-谷氨酰胺的RPMI和AIM-V培养基的50/50混合物组成。用50ng/ml可溶性OKT3 (Miltenyi Biotech) 和300IU/ml rhu IL-2 (Chiron) 在24孔板中刺激 2×10^6 个细胞(1ml)2天,然后进行逆转录病毒转导。为了产生瞬时逆转录病毒上清液,使用LIPOFECTAMINE 2000试剂(Life Technologies),将编码突变反应性TCR的逆转录病毒载体MSGV1 (1.5μg/孔) 和编码质粒RD114的包膜(0.75μg/孔),共转染到逆转录病毒包装细胞系293GP中(6孔聚-D-赖氨酸包被的板中每孔有 1×10^6 个细胞,在转染前一天铺板)。在转染之后42-48h收集逆转录病毒上清液,用DMEM培养基以1:1稀释,然后在32°C以2,000g保持2h离心到RETRONECTIN试剂包被的(10μg/ml,Takara,Shiga,Japan)非组织培养物处理的6孔板上。然后将活化的T细胞(2×10^6 个/孔,在含有IL-2的T细胞培养基中以 0.5×10^6 个细胞/ml)在300g下保持10min旋转到逆转录病毒板上。将活化的T细胞转导过夜,从板中移出,并进一步在含有IL-2的T细胞培养基中培养。转导实验中包括GFP和模拟转导对照。通常在逆转录病毒转导后10-14天测定细胞。

[0143] 实施例1

[0144] 该实施例显示对转移性肿瘤中存在的体细胞突变的鉴定。

[0145] 使用全外显子组或全基因组测序来鉴定来自患有源于结肠、直肠、食管、胆管或胰腺的癌症的9名患者的转移性肿瘤中存在的体细胞突变(表2)。当使用先前方法调用突变时(Tran et al., Science, 344:641-645 (2014)),突变的数目为10至155(表2)。然而,为了评价任何低覆盖率和低置信度突变,放宽了大多数样品的突变调用标准,因此评价了38-264个假定突变(表2)。

表 2 患者年龄 / 肿瘤类型 突变数目^{**} 评估的突变数目^{***} 评估的突变数目^{**} 具有突变的 TIL 培养物数目[†] 具有突变的 TIL 培养物数目[†]

ID	患者年龄 / 肿瘤类型	突变数目 ^{**}	评估的突变数目 ^{***}	评估的突变数目 ^{**}	具有突变的 TIL 培养物数目 [†]	识别的突变基因	氨基酸变化	T 细胞类型	肿瘤反应该突性的频率(%)	肿瘤反应该突性的频率(%)	肿瘤中突变的频率(%)	肿瘤中突变的频率(%)	TCR 反应的频率(%)	TCR 反应的频率(%)	TCR 变异的频率(%)	TCR 变异的频率(%)	
3737*	45/F 胆管	26	25	5	5	ERBB2IP	E805G E805G	CD4 CD4	0.009 0.375	2718 10	5	1143 862	-----	-----	-----	-----	
3812	44/M 胆管	48	179	5	0	-----	-----	-----	-----	-----	NE	NE NE	NE	NE	NE	NE	
3942	46/F 直肠	155	144	6	2	NUP98 KARS GPD2	A359D D356H E426K	CD8 CD8 CD4	0.67 0.020 0.037	5	1143 862	-----	-----	-----	-----		
3948	48/M 食管	84	211	5	2	PLEC XPO7 AKAP2	E1179K P274S Q418K	CD4 CD4 CD4	NE NE NE	NE	NE	NE NE NE	NE	NE	NE		
3971	49/M 结肠	118	118	23	11	CASP8	F67V	CD8	1.25	3	3	NE	NE	NE	NE	NE	
3978	46/F 胆管	39	38	9 [‡]	1 [§]	ITGB4	S1002I	CD4	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	NE	
3995	50/M 结肠	58	154	19 [‡]	2 [§]	TUBGCP2 RNF213 KRAS	P293L N1702S G12D	CD8 CD8 CD8	0.023 0.60 0.055	1056 15 527	1056 15 527	121 887 4	121 887 4	NE	NE	NE	NE
4007	52/M 结肠	134	264	25 [‡]	4	SKIV2L	R653H R653H A48T E527K S3707T H3709Q T3710A	CD8 CD8 CD4 CD4	0.090 0.014 1.19 NE NE	121 887 4	121 887 4	NE	NE	NE	NE		
4032	46/M 结肠	101	222	24	12	API5	R243Q	CD8	0.083	126	126	126	126	126	126	126	

患者 ID	年龄 / 性别	肿瘤类型	突变数目**	评估的突变数***	TIL 培养物数目	评估的 TIL 应养物数目†	具有突变反义基因的培养物数目‡	识别的突变基因化	T 细胞类型	肿瘤中突变 TCR 的频率 (%)	肿瘤中突变 TCR 反应的排名
4069	57/M	胰腺	10	97	15	1	ZFYVE27	R6H	CD8	0.059	187

*先前在 Tran et al., *Science*, 344: 641-645 (2014) 中报道的患者 3737。

**如来自全外显子组测序的 Personal Genome Diagnostics (PGDx) 所确定的。

***如突变调用标准放宽时所确定的。对于患者 3737、3942 和 3978，未放宽突变调用标准。

†通过 IFN-γ ELISPOT 或流式细胞术测定的与突变 TMG 或肽共培养时 4-1BB 或 OX40 上调的反应性。

‡指定的 TIL 培养物的数目包括基于 PD-1 表达从肿瘤消化物分选和扩增的 T 细胞群。

§由 FACS 纯化的 TIL 群鉴定的。

NE = 未评价。

[0147]

[0148] 实施例2

[0149] 该实施例显示从结肠直肠癌患者 (患者 No. 3995) 中分离出识别 KRAS G12D 的 T 细

胞。

[0150] 从表2中显示的每名患者的转移性病变产生多个TIL培养物。为了测试来自每名患者的所有TIL培养物是否识别他们自己的肿瘤突变,如先前所述使用串联小基因(TMG)方法(Lu et al., Clin.Cancer Res., 20:3401-3410 (2014); Tran et al., Science, 344:641-645 (2014))。简而言之,这些TMG包含一系列小基因,所述小基因是基因构建体,其编码由来自亲本蛋白的12个野生型氨基酸侧接于每侧的鉴定的突变,除在翻译cDNA直至下一个终止密码子的移码突变的情况之外。在体外转录之后,然后将TMG RNA分别转染到自体抗原递呈细胞(APC)中,允许患者的各MHC I类和II类分子对所有突变的表位进行潜在加工和呈递,随后与不同的TIL培养物共培养。

[0151] 对于患者3995,将19种不同的TIL培养物与自体DC共培养,所述自体DC转染有不相关的串联小基因(TMG)RNA或总共编码通过实施例1中所述的全外显子组测序来鉴定的154个小基因的10种不同TMG构建体(TM-1至TMG-10)之一。

[0152] 如通过IFN- γ ELISPOT所确定的,鉴定出对TMG-2和TMG-5具有反应性的TIL培养物。为了鉴定TMG-2和TMG-5中哪些突变的抗原被识别,将TMG-2和TMG-5反应性细胞与自体DC共培养,所述自体DC用分别由TMG-2或TMG-5编码的突变的肽单独脉冲。鉴定出针对RNF213^{N1702S}和TUBGCP2^{P293L}的患者-独特的突变-特异性CD8+T细胞。

[0153] 另外,观察到针对KRAS^{G12D}热点突变的低水平CD8+TIL反应性。该TIL培养物针对TMG-3具有反应性,如通过IFN- γ ELISPOT所确定的。TMG-3编码13个突变的小基因,包括KRAS G12D热点突变。将TMG-3反应性细胞与用野生型(wt)(SEQ ID NO:19)或突变的KRASG12D长(SEQ ID NO:20)(24-mer)肽脉冲的自体DC共培养。对于与wt KRAS肽共培养的TIL,每3x 10⁴个TIL计数的点的数目为0;以及对于与突变的KRAS G12D肽共培养的TIL,每3x 10⁴个TIL计数的点的数目为59。因此,KRAS G12D被鉴定为由TMG-3-反应性TIL识别的突变。显然地,由所述细胞识别的突变的KRAS长肽SEQ ID NO:20涵盖最小的T细胞表位GADGVGKSAL(SEQ ID NO:18),预测其在由患者表达的结合MHC-I分子C08:02的肽中排名前2%。

[0154] 将在KRAS G12D刺激后上调4-1BB的CD8+T细胞进行FACS纯化并扩增。对于与用wt或KRAS G12D长肽脉冲的DC或用全长wt或KRAS G12D RNA转染的DC共培养过夜的KRAS G12D富集的CD8+T细胞,进行4-1BB表达的IFN- γ ELISPOT测定和流式细胞术分析。

[0155] 通过4-1BB表达的IFN- γ ELISPOT测定和流式细胞术分析证实了,富集群:(i)在用突变的KRAS^{G12D}肽脉冲或用全长KRAS^{G12D} RNA转染时特异性识别APC,以及(ii)在用WT KRAS肽脉冲或用全长WT KRAS RNA转染时不特异性识别APC。

[0156] 将KRAS^{G12D}-反应性TIL的富集群与未用任何物质(模拟)或用HLA-C*08:02等位基因转导的胰腺癌细胞系MDA-Panc48(KRAS^{G12D})、HPAC(KRAS^{G12D})或MIA PaCa-2(KRAS^{G12C})共培养6小时。使用流式细胞术评估CD107a表达,以及通过细胞内细胞因子染色评估TNF产生。将用wt或KRAS^{G12D} 24-AA-长肽脉冲过夜的自体APC(外周血单核细胞)用作对照靶T细胞。数据针对表达KRAS^{G12D}反应性TCR VB5.2的CD8+T细胞设门。

[0157] 结果显示,KRAS-突变反应性TIL特异性产生肿瘤坏死因子(TNF),并针对表达HLA-C*08:02和KRAS^{G12D}的胰腺癌细胞系显示细胞溶解潜能。

[0158] 实施例3

[0159] 该实施例显示,从实施例2的KRAS^{G12D}-特异性T细胞分离出抗KRAS G12D TCR。该实施例还显示,用所分离的TCR对自体开放库T细胞进行基因工程改造,提供了转染有KRAS^{G12D}的COS-7细胞的HLA-Cw*08:02-限制性识别。

[0160] 从T细胞中分离编码实施例2中所分离的KRAS G12D-反应性细胞的TCR的α和β链可变区的核苷酸序列。将编码分别与小鼠TCRα恒定链(SEQ ID NO:24)和小鼠β恒定链(SEQ ID NO:25)融合的α链可变区(SEQ ID NO:9)和β链可变区(SEQ ID NO:10)的核苷酸序列克隆至表达载体中。对自体开放库T细胞进行基因工程改造,以表达抗-KRAS G12D TCR。

[0161] 将基因工程改造的细胞与用以下物质共转染的COS-7细胞共培养:(i)无物或编码WT KRAS或KRAS G12D的核苷酸序列,以及(ii)没有HLA分子或患者(B*14:01、B*18:01、Cw*05:01或Cw*08:02)表达的单独的HLA-B和-C等位基因。通过IFN-γ ELISA测定测量IFN-γ分泌。结果显示,用分离自KRAS^{G12D}特异性T细胞的TCR对T细胞进行基因工程改造,重定向了对转染有KRAS^{G12D}的COS-7细胞的HLA-Cw*08:02-限制性反应性。结果还显示,经基因工程改造的T细胞不识别用WT KRAS、无KRAS、或无HLA分子转染的COS-7细胞中的任一种。经基因工程改造的T细胞也不识别用(i)KRAS G12D和(ii)B*14:01,B*18:01或Cw*05:01分子共转染的COS-7细胞。

[0162] 实施例4

[0163] 该实施例显示,用实施例3中所分离的TCR对自体开放库T细胞进行基因工程改造,提供了表达KRAS^{G12D}的胰腺癌细胞系的HLA-Cw*08:02-限制性识别。

[0164] 对自体开放库T细胞进行基因工程改造,以表达实施例3的抗-KRAS G12D TCR。将经基因工程改造的T细胞与未用任何物质(模拟)或用HLA-Cw*08:02等位基因转导的各种胰腺癌细胞系共培养。胰腺细胞系如下:ASPC-1 (KRAS G12D+) ;MDA-Panc48 (KRAS G12D+) ;PK-45p (KRAS G12D+) ;FA6-2 (KRAS G12D+) ;HPAC (KRAS G12D+) ;BxPC-3 (KRAS wt) ;A818.8 (KRAS^{G12R}) ;SK-PC3 (KRAS^{G12V}) ;和MIA PaCa-2 (KRAS^{G12C}) 。通过ELISA测量IFN-γ 分泌。

[0165] 结果显示,用分离自KRAS^{G12D}-特异性T细胞的TCR对自体开放库T细胞进行基因工程改造,重定向了对表达KRAS^{G12D}的胰腺癌细胞系的HLA-Cw*08:02-限制性反应性。结果还显示,经基因工程改造的细胞不识别BxPC-3 (KRAS wt) ;A818.8 (KRAS^{G12R}) ;SK-PC3 (KRAS^{G12V}) ;或MIA PaCa-2 (KRAS^{G12C}) 细胞系。在不存在HLA-Cw*08:02的情况下,未观察到胰腺细胞系的识别。

[0166] 实施例5

[0167] 该实施例显示,浸润表2中所示患者的转移性病变的突变反应性T细胞的频率。

[0168] 为了确定浸润转移性病变的突变反应性T细胞的内源性频率,对低温保存的转移性肿瘤病变进行TCR-Vβ深度测序。如表2中所示,鉴定的浸润转移性病变的突变反应性T细胞的频率是可变的,范围为给定肿瘤内所有T细胞的0.009-1.25%。在17个鉴定的突变反应性TCR中,有4个排名在肿瘤中前10个最频繁的TCR中(排名范围:3-2718,表2)。值得注意的是,通常只有少数来源于相同转移性病变的TIL培养物具有可检测水平的产生IFN-γ 的突变反应性T细胞,此外,针对对不同突变具有反应性的T细胞,富集不同的TIL培养物(表2)。不受特定理论或机制的束缚,在新表位T细胞反应性中的这种异质性,可能是人癌症中观察到的瘤内基因组异质性的函数。

[0169] 实施例6

[0170] 该实施例显示,用编码实施例3的抗-突变的KRAS TCR的核苷酸序列转导的T细胞,识别了用突变的KRAS肽脉冲的自体树突状细胞。

[0171] 用编码实施例3的抗-突变的KRAS TCR的核苷酸序列转导T细胞。将转导的细胞与用表3中所示肽之一脉冲的自体树突状细胞在不同浓度下共培养。通过ELISA测量IFN- γ 。结果显示于图1中。

[0172] 表3

突变的 KRAS 肽		WT KRAS 肽	
[0173] 突变的 KRAS ₁₀₋₁₈	GADGVGKSA (SEQ ID NO: 18)	WT KRAS ₁₀₋₁₈	GAGGVGKSA (SEQ ID NO: 17)
[0174] 突变的 KRAS ₉₋₁₈	VGADGVGKSA (SEQ ID NO: 31)	WT KRAS ₉₋₁₈	VGAGGVGKSA (SEQ ID NO: 32)
[0174] 突变的 KRAS ₁₀₋₁₉	GADGVGKSAL (SEQ ID NO: 30)	WT KRAS ₁₀₋₁₉	GAGGVGKSAL (SEQ ID NO: 33)

[0175] 如图1中所示,用编码实施例3的抗-突变的KRAS TCR的核苷酸序列转导的T细胞,识别了每个突变的KRAS肽,并且不识别任何WT KRAS肽。

[0176] 在此将本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利通过引用并入,其程度如同将各参考文献单独且明确指明通过引用并入并且在本文整体陈述一样。

[0177] 术语“一个/一种(a/an)”和“所述(the)”以及类似的指代物,在描述本发明的上下文中(特别是在下述权利要求的上下文中)的使用被解释为既涵盖单数又涵盖复数,除非本文另外指明或者上下文明显矛盾。在术语“至少一种/一个”之后的一项或多项的列表(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所列出的项中一项(A或B)或两个或更多个列出的项的组合(A和B)。术语“包含(comprising)”,“具有(having)”,“包括(including)”以及“含有(containing)”被解释为开放式术语(即,意为“包括但不限于”),除非另外标注。本文数值范围的叙述仅意图作为单独指落入范围内的各独立数值的速记法,除非本文另外指明,并且各独立的数值并入说明书如同本文单独对其进行叙述一样。可以以任何合适的顺序实施本文所述的所有方法,除非本文另外指明或者在其它方面与上下文明显矛盾。本文提供的任何或所有实施例或者示例性语言(例如“如”的使用,仅意图更好地阐明本发明并且不对本发明的范围构成限制,除非另外声明。说明书中的语言均不应被解释为指示任何未要求保护的元素对于本发明的实践是必要的。

[0178] 本文描述了本发明的优选实施方案,包括发明人已知的实施本发明的最佳方式。经阅读前述描述,那些优选实施方案的变型对于本领域普通技术人员而言可以变得显而易见。发明人期望本领域技术人员视情况应用此类变型,并且发明人意图以与本文具体所述的不同方式实践本发明。因此,如适用的法律所允许的,本发明包括本文所附权利要求中所述主题的所有改型和等同物。此外,本发明涵盖以上所述元素的所有可能的变型的任何组合,除非本文另外指明或者在其它方面与上下文明显矛盾。

[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> 识别HLA-CW8限制性突变KRAS的T细胞受体

[0005] <130> 18C80529CN

[0006] <150> US 62/218,688

[0007] <151> 2015-09-15

[0008] <160> 33

[0009] <170> SIPOSequenceListing 1.0

[0010] <210> 1

[0011] <211> 189

[0012] <212> PRT

[0013] <213> 智人(Homo sapiens)

[0014] <400> 1

[0015] Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys

[0016]	1	5	10	15
--------	---	---	----	----

[0017] Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr

[0018]	20	25	30
--------	----	----	----

[0019] Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly

[0020]	35	40	45
--------	----	----	----

[0021] Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr

[0022]	50	55	60
--------	----	----	----

[0023] Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys

[0024]	65	70	75	80
--------	----	----	----	----

[0025] Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr

[0026]	85	90	95
--------	----	----	----

[0027] Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val

[0028]	100	105	110
--------	-----	-----	-----

[0029] Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys

[0030]	115	120	125
--------	-----	-----	-----

[0031] Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr

[0032]	130	135	140
--------	-----	-----	-----

[0033] Ser Ala Lys Thr Arg Gln Arg Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val

[0034]	145	150	155	160
--------	-----	-----	-----	-----

[0035] Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Ile Ser Lys Glu Glu Lys

[0036]	165	170	175
--------	-----	-----	-----

[0037] Thr Pro Gly Cys Val Lys Ile Lys Lys Cys Ile Ile Met

[0038]		180		185												
[0039]	<210>	2														
[0040]	<211>	188														
[0041]	<212>	PRT														
[0042]	<213>	智人(Homo sapiens)														
[0043]	<400>	2														
[0044]	Met	Thr	Glu	Tyr	Lys	Leu	Val	Val	Val	Gly	Ala	Gly	Gly	Val	Gly	Lys
[0045]	1				5					10						15
[0046]	Ser	Ala	Leu	Thr	Ile	Gln	Leu	Ile	Gln	Asn	His	Phe	Val	Asp	Glu	Tyr
[0047]					20					25						30
[0048]	Asp	Pro	Thr	Ile	Glu	Asp	Ser	Tyr	Arg	Lys	Gln	Val	Val	Ile	Asp	Gly
[0049]					35					40						45
[0050]	Glu	Thr	Cys	Leu	Leu	Asp	Ile	Leu	Asp	Thr	Ala	Gly	Gln	Glu	Glu	Tyr
[0051]					50					55						60
[0052]	Ser	Ala	Met	Arg	Asp	Gln	Tyr	Met	Arg	Thr	Gly	Glu	Gly	Phe	Leu	Cys
[0053]					65					70						80
[0054]	Val	Phe	Ala	Ile	Asn	Asn	Thr	Lys	Ser	Phe	Glu	Asp	Ile	His	His	Tyr
[0055]					85					90						95
[0056]	Arg	Glu	Gln	Ile	Lys	Arg	Val	Lys	Asp	Ser	Glu	Asp	Val	Pro	Met	Val
[0057]					100					105						110
[0058]	Leu	Val	Gly	Asn	Lys	Cys	Asp	Leu	Pro	Ser	Arg	Thr	Val	Asp	Thr	Lys
[0059]					115					120						125
[0060]	Gln	Ala	Gln	Asp	Leu	Ala	Arg	Ser	Tyr	Gly	Ile	Pro	Phe	Ile	Glu	Thr
[0061]					130					135						140
[0062]	Ser	Ala	Lys	Thr	Arg	Gln	Gly	Val	Asp	Asp	Ala	Phe	Tyr	Thr	Leu	Val
[0063]					145					150						160
[0064]	Arg	Glu	Ile	Arg	Lys	His	Lys	Glu	Lys	Met	Ser	Lys	Asp	Gly	Lys	Lys
[0065]					165					170						175
[0066]	Lys	Lys	Lys	Lys	Ser	Lys	Thr	Lys	Cys	Val	Ile	Met				
[0067]					180					185						
[0068]	<210>	3														
[0069]	<211>	7														
[0070]	<212>	PRT														
[0071]	<213>	智人(Homo sapiens)														
[0072]	<400>	3														
[0073]	Asn	Ile	Ala	Thr	Asn	Asp	Tyr									
[0074]	1			5												
[0075]	<210>	4														
[0076]	<211>	5														

- [0077] <212> PRT
[0078] <213> 智人(Homo sapiens)
[0079] <400> 4
[0080] Gly Tyr Lys Thr Lys
[0081] 1 5
[0082] <210> 5
[0083] <211> 13
[0084] <212> PRT
[0085] <213> 智人(Homo sapiens)
[0086] <400> 5
[0087] Leu Val Gly Asp Met Asp Gln Ala Gly Thr Ala Leu Ile
[0088] 1 5 10
[0089] <210> 6
[0090] <211> 5
[0091] <212> PRT
[0092] <213> 智人(Homo sapiens)
[0093] <400> 6
[0094] Ser Gly His Asp Thr
[0095] 1 5
[0096] <210> 7
[0097] <211> 6
[0098] <212> PRT
[0099] <213> 智人(Homo sapiens)
[0100] <400> 7
[0101] Tyr Tyr Glu Glu Glu Glu
[0102] 1 5
[0103] <210> 8
[0104] <211> 12
[0105] <212> PRT
[0106] <213> 智人(Homo sapiens)
[0107] <400> 8
[0108] Ala Ser Ser Leu Gly Gln Thr Asn Tyr Gly Tyr Thr
[0109] 1 5 10
[0110] <210> 9
[0111] <211> 129
[0112] <212> PRT
[0113] <213> 智人(Homo sapiens)
[0114] <400> 9
[0115] Met Arg Gln Val Ala Arg Val Ile Val Phe Leu Thr Leu Ser Thr Leu

[0116]	1	5	10	15
[0117]	Ser Leu Ala Lys Thr Thr Gln Pro Ile Ser Met Asp Ser Tyr Glu Gly			
[0118]		20	25	30
[0119]	Gln Glu Val Asn Ile Thr Cys Ser His Asn Asn Ile Ala Thr Asn Asp			
[0120]		35	40	45
[0121]	Tyr Ile Thr Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Ser Gln Gly Pro Arg Phe Ile			
[0122]		50	55	60
[0123]	Ile Gln Gly Tyr Lys Thr Lys Val Thr Asn Glu Val Ala Ser Leu Phe			
[0124]		65	70	75
[0125]	Ile Pro Ala Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Ser Leu Pro Arg Val Ser			
[0126]		85	90	95
[0127]	Leu Ser Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Val Gly Asp Met Asp Gln			
[0128]		100	105	110
[0129]	Ala Gly Thr Ala Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Thr Leu Ser Val Ser			
[0130]		115	120	125
[0131]	Ser			
[0132]	<210> 10			
[0133]	<211> 132			
[0134]	<212> PRT			
[0135]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[0136]	<400> 10			
[0137]	Met Gly Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala			
[0138]		1	5	10
[0139]				15
[0140]	Gly Leu Val Asp Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys			
[0141]		20	25	30
[0142]	Thr Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Lys Ser Gly His			
[0143]		35	40	45
[0144]	Asp Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe			
[0145]		50	55	60
[0146]	Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro			
[0147]		65	70	75
[0148]	Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn			
[0149]		85	90	95
[0150]	Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser			
[0151]		100	105	110
[0152]	Ser Leu Gly Gln Thr Asn Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg			
[0153]		115	120	125
[0154]	Leu Thr Val Val			
		130		

[0155]	<210>	11			
[0156]	<211>	137			
[0157]	<212>	PRT			
[0158]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)			
[0159]	<220>				
[0160]	<221>	SITE			
[0161]	<222>	(()..()			
[0162]	<223>	合成的			
[0163]	<220>				
[0164]	<221>	SITE			
[0165]	<222>	(48) .. (48)			
[0166]	<223>	第48位的X为Thr或Cys			
[0167]	<220>				
[0168]	<221>	SITE			
[0169]	<222>	(112) .. (112)			
[0170]	<223>	第112位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp			
[0171]	<220>				
[0172]	<221>	SITE			
[0173]	<222>	(114) .. (114)			
[0174]	<223>	第114位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp			
[0175]	<220>				
[0176]	<221>	SITE			
[0177]	<222>	(115) .. (115)			
[0178]	<223>	第115位的X为G1、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp			
[0179]	<400>	11			
[0180]	Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg				
[0181]	1	5	10	15	
[0182]	Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile				
[0183]		20	25	30	
[0184]	Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Xaa				
[0185]		35	40	45	
[0186]	Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala				
[0187]		50	55	60	
[0188]	Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr				
[0189]		65	70	75	80
[0190]	Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr				
[0191]		85	90	95	
[0192]	Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Xaa				
[0193]		100	105	110	

[0194]	Val Xaa Xaa Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu			
[0195]	115	120		125
[0196]	Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser			
[0197]	130	135		
[0198]	<210> 12			
[0199]	<211> 173			
[0200]	<212> PRT			
[0201]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0202]	<220>			
[0203]	<221> SITE			
[0204]	<222> () .. ()			
[0205]	<223> 合成的			
[0206]	<220>			
[0207]	<221> SITE			
[0208]	<222> (57) .. (57)			
[0209]	<223> 第57位的X为Ser或Cys			
[0210]	<400> 12			
[0211]	Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro			
[0212]	1 5 10			15
[0213]	Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu			
[0214]	20 25			30
[0215]	Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn			
[0216]	35 40			45
[0217]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Xaa Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys			
[0218]	50 55			60
[0219]	Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala			
[0220]	65 70 75			80
[0221]	Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe			
[0222]	85 90			95
[0223]	His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro			
[0224]	100 105			110
[0225]	Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly			
[0226]	115 120			125
[0227]	Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu			
[0228]	130 135			140
[0229]	Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser			
[0230]	145 150			155 160
[0231]	Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser			
[0232]	165	170		

[0233]	<210>	13			
[0234]	<211>	266			
[0235]	<212>	PRT			
[0236]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)			
[0237]	<220>				
[0238]	<221>	SITE			
[0239]	<222>	(())..()			
[0240]	<223>	合成的			
[0241]	<220>				
[0242]	<221>	SITE			
[0243]	<222>	(177)..(177)			
[0244]	<223>	第117位的X为Thr或Cys			
[0245]	<220>				
[0246]	<221>	SITE			
[0247]	<222>	(241)..(241)			
[0248]	<223>	第241位的X为Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp			
[0249]	<220>				
[0250]	<221>	SITE			
[0251]	<222>	(243)..(243)			
[0252]	<223>	第243位的X为Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp			
[0253]	<220>				
[0254]	<221>	SITE			
[0255]	<222>	(244)..(244)			
[0256]	<223>	第244位的X为Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp			
[0257]	<400>	13			
[0258]	Met Arg Gln Val Ala Arg Val Ile Val Phe Leu Thr Leu Ser Thr Leu				
[0259]	1	5	10	15	
[0260]	Ser Leu Ala Lys Thr Thr Gln Pro Ile Ser Met Asp Ser Tyr Glu Gly				
[0261]		20	25	30	
[0262]	Gln Glu Val Asn Ile Thr Cys Ser His Asn Asn Ile Ala Thr Asn Asp				
[0263]		35	40	45	
[0264]	Tyr Ile Thr Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Ser Gln Gly Pro Arg Phe Ile				
[0265]		50	55	60	
[0266]	Ile Gln Gly Tyr Lys Thr Lys Val Thr Asn Glu Val Ala Ser Leu Phe				
[0267]		65	70	75	80
[0268]	Ile Pro Ala Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Ser Leu Pro Arg Val Ser				
[0269]		85	90	95	
[0270]	Leu Ser Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Val Gly Asp Met Asp Gln				
[0271]		100	105	110	

[0272]	Ala Gly Thr Ala Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Thr Leu Ser Val Ser			
[0273]	115	120	125	
[0274]	Ser Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro			
[0275]	130	135	140	
[0276]	Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln			
[0277]	145	150	155	160
[0278]	Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys			
[0279]	165	170	175	
[0280]	Xaa Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile			
[0281]	180	185	190	
[0282]	Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu			
[0283]	195	200	205	
[0284]	Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu			
[0285]	210	215	220	
[0286]	Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu			
[0287]	225	230	235	240
[0288]	Xaa Val Xaa Xaa Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn			
[0289]	245	250	255	
[0290]	Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser			
[0291]	260	265		
[0292]	<210> 14			
[0293]	<211> 305			
[0294]	<212> PRT			
[0295]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0296]	<220>			
[0297]	<221> SITE			
[0298]	<222> ()..()			
[0299]	<223> 合成的			
[0300]	<220>			
[0301]	<221> SITE			
[0302]	<222> (189)..(189)			
[0303]	<223> 第189位的X为Ser或Cys			
[0304]	<400> 14			
[0305]	Met Gly Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala			
[0306]	1	5	10	15
[0307]	Gly Leu Val Asp Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys			
[0308]	20	25	30	
[0309]	Thr Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Lys Ser Gly His			
[0310]	35	40	45	

[0311]	Asp Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe			
[0312]	50	55	60	
[0313]	Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro			
[0314]	65	70	75	80
[0315]	Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn			
[0316]	85	90	95	
[0317]	Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser			
[0318]	100	105	110	
[0319]	Ser Leu Gly Gln Thr Asn Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg			
[0320]	115	120	125	
[0321]	Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser			
[0322]	130	135	140	
[0323]	Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr			
[0324]	145	150	155	160
[0325]	Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser			
[0326]	165	170	175	
[0327]	Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Xaa Thr Asp Pro			
[0328]	180	185	190	
[0329]	Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu			
[0330]	195	200	205	
[0331]	Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys			
[0332]	210	215	220	
[0333]	Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly			
[0334]	225	230	235	240
[0335]	Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg			
[0336]	245	250	255	
[0337]	Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser			
[0338]	260	265	270	
[0339]	Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala			
[0340]	275	280	285	
[0341]	Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn			
[0342]	290	295	300	
[0343]	Ser			
[0344]	305			
[0345]	<210> 15			
[0346]	<211> 189			
[0347]	<212> PRT			
[0348]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[0349]	<400> 15			

[0350]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys
[0351]	1 5 10 15
[0352]	Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
[0353]	20 25 30
[0354]	Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
[0355]	35 40 45
[0356]	Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
[0357]	50 55 60
[0358]	Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
[0359]	65 70 75 80
[0360]	Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr
[0361]	85 90 95
[0362]	Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val
[0363]	100 105 110
[0364]	Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys
[0365]	115 120 125
[0366]	Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr
[0367]	130 135 140
[0368]	Ser Ala Lys Thr Arg Gln Arg Val Glu Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val
[0369]	145 150 155 160
[0370]	Arg Glu Ile Arg Gln Tyr Arg Leu Lys Lys Ile Ser Lys Glu Glu Lys
[0371]	165 170 175
[0372]	Thr Pro Gly Cys Val Lys Ile Lys Lys Cys Ile Ile Met
[0373]	180 185
[0374]	<210> 16
[0375]	<211> 188
[0376]	<212> PRT
[0377]	<213> 智人(Homo sapiens)
[0378]	<400> 16
[0379]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys
[0380]	1 5 10 15
[0381]	Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile Gln Asn His Phe Val Asp Glu Tyr
[0382]	20 25 30
[0383]	Asp Pro Thr Ile Glu Asp Ser Tyr Arg Lys Gln Val Val Ile Asp Gly
[0384]	35 40 45
[0385]	Glu Thr Cys Leu Leu Asp Ile Leu Asp Thr Ala Gly Gln Glu Glu Tyr
[0386]	50 55 60
[0387]	Ser Ala Met Arg Asp Gln Tyr Met Arg Thr Gly Glu Gly Phe Leu Cys
[0388]	65 70 75 80

[0389]	Val Phe Ala Ile Asn Asn Thr Lys Ser Phe Glu Asp Ile His His Tyr			
[0390]		85	90	95
[0391]	Arg Glu Gln Ile Lys Arg Val Lys Asp Ser Glu Asp Val Pro Met Val			
[0392]		100	105	110
[0393]	Leu Val Gly Asn Lys Cys Asp Leu Pro Ser Arg Thr Val Asp Thr Lys			
[0394]		115	120	125
[0395]	Gln Ala Gln Asp Leu Ala Arg Ser Tyr Gly Ile Pro Phe Ile Glu Thr			
[0396]		130	135	140
[0397]	Ser Ala Lys Thr Arg Gln Gly Val Asp Asp Ala Phe Tyr Thr Leu Val			
[0398]		145	150	155
[0399]	Arg Glu Ile Arg Lys His Lys Glu Lys Met Ser Lys Asp Gly Lys Lys			
[0400]		165	170	175
[0401]	Lys Lys Lys Ser Lys Thr Lys Cys Val Ile Met			
[0402]		180	185	
[0403]	<210> 17			
[0404]	<211> 9			
[0405]	<212> PRT			
[0406]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[0407]	<400> 17			
[0408]	Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys Ser Ala			
[0409]		1	5	
[0410]	<210> 18			
[0411]	<211> 9			
[0412]	<212> PRT			
[0413]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[0414]	<400> 18			
[0415]	Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala			
[0416]		1	5	
[0417]	<210> 19			
[0418]	<211> 24			
[0419]	<212> PRT			
[0420]	<213> 智人(Homo sapiens)			
[0421]	<400> 19			
[0422]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys			
[0423]		1	5	10
[0424]	Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile			15
[0425]		20		
[0426]	<210> 20			
[0427]	<211> 24			

[0428]	<212>	PRT		
[0429]	<213>	智人(Homo sapiens)		
[0430]	<400>	20		
[0431]	Met Thr Glu Tyr Lys Leu Val Val Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys			
[0432]	1	5	10	15
[0433]	Ser Ala Leu Thr Ile Gln Leu Ile			
[0434]		20		
[0435]	<210>	21		
[0436]	<211>	26		
[0437]	<212>	DNA		
[0438]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0439]	<220>			
[0440]	<221>			
[0441]	<222>			
[0442]	<223>	合成的		
[0443]	<400>	21		
[0444]	gccacagcac tgtgcttttg aagtcc			26
[0445]	<210>	22		
[0446]	<211>	24		
[0447]	<212>	DNA		
[0448]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0449]	<220>			
[0450]	<221>			
[0451]	<222>			
[0452]	<223>	合成的		
[0453]	<400>	22		
[0454]	caggcagtat ctggagtcat tgag			24
[0455]	<210>	23		
[0456]	<211>	27		
[0457]	<212>	PRT		
[0458]	<213>	人工序列(Artificial Sequence)		
[0459]	<220>			
[0460]	<221>	SITE		
[0461]	<222>	() .. ()		
[0462]	<223>	合成的		
[0463]	<400>	23		
[0464]	Arg Ala Lys Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys			
[0465]	1	5	10	15
[0466]	Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro			

[0467]	20	25		
[0468]	<210>	24		
[0469]	<211>	137		
[0470]	<212>	PRT		
[0471]	<213>	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)		
[0472]	<400>	24		
[0473]	Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg			
[0474]	1	5	10	15
[0475]	Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile			
[0476]	20	25	30	
[0477]	Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr			
[0478]	35	40	45	
[0479]	Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala			
[0480]	50	55	60	
[0481]	Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr			
[0482]	65	70	75	80
[0483]	Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr			
[0484]	85	90	95	
[0485]	Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser			
[0486]	100	105	110	
[0487]	Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu			
[0488]	115	120	125	
[0489]	Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser			
[0490]	130	135		
[0491]	<210>	25		
[0492]	<211>	173		
[0493]	<212>	PRT		
[0494]	<213>	小家鼠 (<i>Mus musculus</i>)		
[0495]	<400>	25		
[0496]	Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro			
[0497]	1	5	10	15
[0498]	Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu			
[0499]	20	25	30	
[0500]	Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn			
[0501]	35	40	45	
[0502]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys			
[0503]	50	55	60	
[0504]	Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala			
[0505]	65	70	75	80

[0506]	Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe			
[0507]		85	90	95
[0508]	His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro			
[0509]		100	105	110
[0510]	Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly			
[0511]		115	120	125
[0512]	Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu			
[0513]		130	135	140
[0514]	Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser			
[0515]		145	150	155
[0516]	Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser			
[0517]		165	170	
[0518]	<210> 26			
[0519]	<211> 266			
[0520]	<212> PRT			
[0521]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0522]	<220>			
[0523]	<221> SITE			
[0524]	<222> ()..()			
[0525]	<223> 合成的			
[0526]	<400> 26			
[0527]	Met Arg Gln Val Ala Arg Val Ile Val Phe Leu Thr Leu Ser Thr Leu			
[0528]		1	5	10
[0529]	Ser Leu Ala Lys Thr Thr Gln Pro Ile Ser Met Asp Ser Tyr Glu Gly			
[0530]		20	25	30
[0531]	Gln Glu Val Asn Ile Thr Cys Ser His Asn Asn Ile Ala Thr Asn Asp			
[0532]		35	40	45
[0533]	Tyr Ile Thr Trp Tyr Gln Gln Phe Pro Ser Gln Gly Pro Arg Phe Ile			
[0534]		50	55	60
[0535]	Ile Gln Gly Tyr Lys Thr Lys Val Thr Asn Glu Val Ala Ser Leu Phe			
[0536]		65	70	75
[0537]	Ile Pro Ala Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Ser Leu Pro Arg Val Ser			
[0538]		85	90	95
[0539]	Leu Ser Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Leu Val Gly Asp Met Asp Gln			
[0540]		100	105	110
[0541]	Ala Gly Thr Ala Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Thr Leu Ser Val Ser			
[0542]		115	120	125
[0543]	Ser Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro			
[0544]		130	135	140

[0545]	Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln			
[0546]	145	150	155	160
[0547]	Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys			
[0548]	165	170	175	
[0549]	Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile			
[0550]	180	185	190	
[0551]	Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu			
[0552]	195	200	205	
[0553]	Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu			
[0554]	210	215	220	
[0555]	Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu			
[0556]	225	230	235	240
[0557]	Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn			
[0558]	245	250	255	
[0559]	Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser			
[0560]	260	265		
[0561]	<210> 27			
[0562]	<211> 305			
[0563]	<212> PRT			
[0564]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
[0565]	<220>			
[0566]	<221> SITE			
[0567]	<222> ()..()			
[0568]	<223> 合成的			
[0569]	<400> 27			
[0570]	Met Gly Pro Gly Leu Leu Cys Trp Ala Leu Leu Cys Leu Leu Gly Ala			
[0571]	1	5	10	15
[0572]	Gly Leu Val Asp Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Thr His Leu Ile Lys			
[0573]	20	25	30	
[0574]	Thr Arg Gly Gln Gln Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Lys Ser Gly His			
[0575]	35	40	45	
[0576]	Asp Thr Val Ser Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Gln Phe			
[0577]	50	55	60	
[0578]	Ile Phe Gln Tyr Tyr Glu Glu Glu Arg Gln Arg Gly Asn Phe Pro			
[0579]	65	70	75	80
[0580]	Asp Arg Phe Ser Gly His Gln Phe Pro Asn Tyr Ser Ser Glu Leu Asn			
[0581]	85	90	95	
[0582]	Val Asn Ala Leu Leu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser			
[0583]	100	105	110	

[0584]	Ser Leu Gly Gln Thr Asn Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg		
[0585]	115	120	125
[0586]	Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser		
[0587]	130	135	140
[0588]	Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr		
[0589]	145	150	155
[0590]	Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser		
[0591]	165	170	175
[0592]	Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro		
[0593]	180	185	190
[0594]	Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu		
[0595]	195	200	205
[0596]	Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys		
[0597]	210	215	220
[0598]	Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly		
[0599]	225	230	235
[0600]	Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg		
[0601]	245	250	255
[0602]	Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser		
[0603]	260	265	270
[0604]	Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala		
[0605]	275	280	285
[0606]	Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn		
[0607]	290	295	300
[0608]	Ser		
[0609]	305		
[0610]	<210> 28		
[0611]	<211> 387		
[0612]	<212> DNA		
[0613]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
[0614]	<220>		
[0615]	<221>		
[0616]	<222>		
[0617]	<223> 合成的		
[0618]	<400> 28		
[0619]	atgaggcaag tggcgagagt gatcggttc ctgaccctga gtacttttag ccttgctaag	60	
[0620]	accacccagc ccatctccat ggactcatat gaaggacaag aagtgaacat aacctgttagc	120	
[0621]	cacaacaaca ttgctacaaa tgattatatc acgtggtacc aacagttcc cagccaagga	180	
[0622]	ccacgattta ttattcaagg atacaagaca aaagttacaa acgaagtggc ctccctgttt	240	

[0623]	atccctgccg acagaaaagtc cagcactctg agcctgcccc gggttccct gagcgacact	300
[0624]	gctgtgtact actgcctcgt gggtgacatg gaccaggcag gaactgctct gatctttggg	360
[0625]	aagggaacca ctttatcagt gagttcc	387
[0626]	<210> 29	
[0627]	<211> 396	
[0628]	<212> DNA	
[0629]	<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
[0630]	<220>	
[0631]	<221> misc_feature	
[0632]	<222> ()..()	
[0633]	<223> 合成的	
[0634]	<220>	
[0635]	<221> misc_feature	
[0636]	<222> (385) .. (385)	
[0637]	<223> n为a、c、g或t	
[0638]	<400> 29	
[0639]	atggcccccgg ggcctcctcg ctgggcactg ctttgtctcc tgggagcagg ctttagtggac	60
[0640]	gctggagtca cccaaagtcc cacacacctg atcaaaacga gaggacagca agtgaactctg	120
[0641]	agatgctctc ctaagtctgg gcatgacact gtgtcctggt accaacaggc cctgggtcag	180
[0642]	gggccccagt ttatcttca gtattatgag gaggaagaga gacagagagg caacttccct	240
[0643]	gatcgattct caggtcacca gttccctaactatactctg agctgaatgt gaacgccttg	300
[0644]	ttgctggggg actcggccct ctatctctgt gccagcagct tgggacagac caactatggc	360
[0645]	tacaccttgc gttcgggac caggntaacc gttgt	396
[0646]	<210> 30	
[0647]	<211> 10	
[0648]	<212> PRT	
[0649]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0650]	<400> 30	
[0651]	Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu	
[0652]	1 5 10	
[0653]	<210> 31	
[0654]	<211> 10	
[0655]	<212> PRT	
[0656]	<213> 智人(Homo sapiens)	
[0657]	<400> 31	
[0658]	Val Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala	
[0659]	1 5 10	
[0660]	<210> 32	
[0661]	<211> 10	

- [0662] <212> PRT
[0663] <213> 智人(Homo sapiens)
[0664] <400> 32
[0665] Val Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys Ser Ala
[0666] 1 5 10
[0667] <210> 33
[0668] <211> 10
[0669] <212> PRT
[0670] <213> 智人(Homo sapiens)
[0671] <400> 33
[0672] Gly Ala Gly Gly Val Gly Lys Ser Ala Leu
[0673] 1 5 10

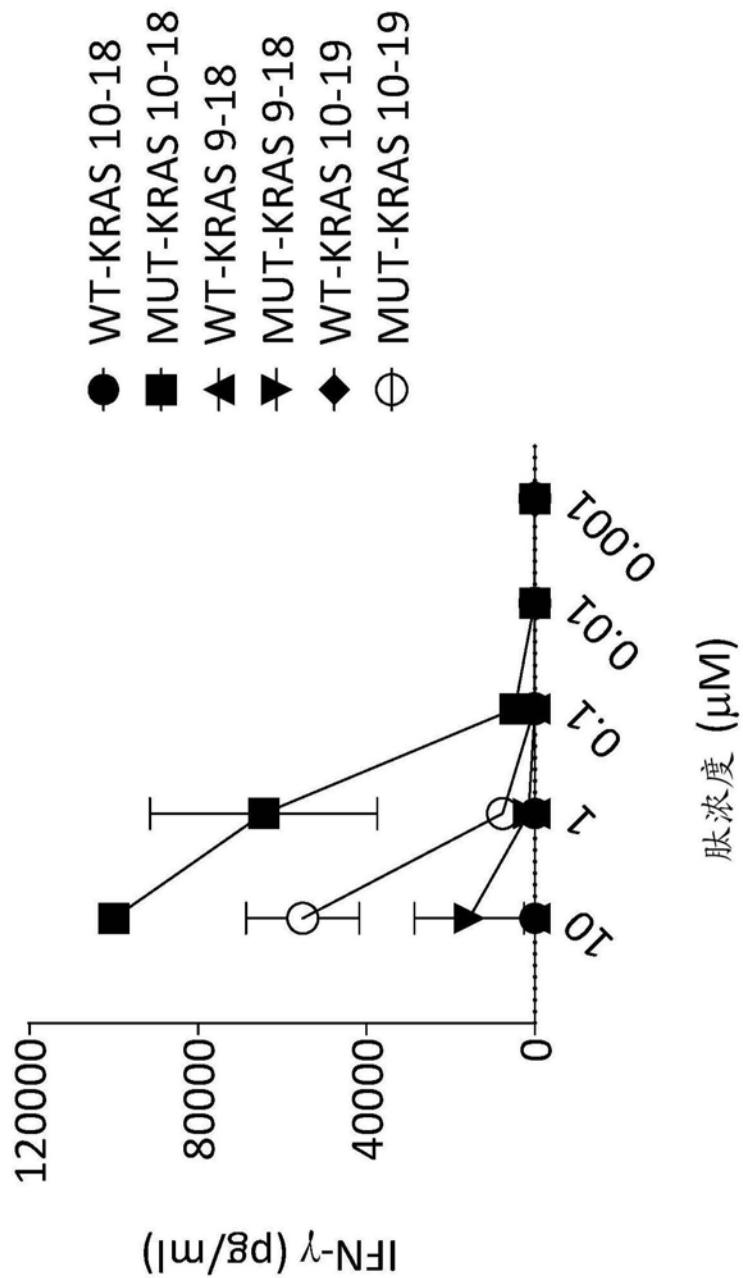


图1