



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 103974974 A

(43) 申请公布日 2014. 08. 06

(21) 申请号 201280055972. X

代理人 张莹

(22) 申请日 2012. 09. 11

(51) Int. Cl.

(30) 优先权数据

61/535, 086 2011. 09. 15 US

C07K 14/705 (2006. 01)

C07K 16/28 (2006. 01)

G01N 33/50 (2006. 01)

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2014. 05. 14

C07K 14/47 (2006. 01)

C12N 5/0783 (2006. 01)

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/US2012/054623 2012. 09. 11

(87) PCT国际申请的公布数据

W02013/039889 EN 2013. 03. 21

(71) 申请人 美国卫生和人力服务部

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 保罗·F·罗宾斯

史蒂文·A·罗森堡 朱恃贵

史蒂文·A·费尔德曼

理查德·A·摩根

(74) 专利代理机构 中科专利商标代理有限责任

公司 11021

权利要求书2页 说明书27页

序列表26页 附图9页

(54) 发明名称

识别 HLA-A1- 或 HLA-CW7- 限制的 MAGE 的 T 细胞受体

(57) 摘要

本发明提供分离的或纯化的 T 细胞受体 (TCR), 其具有对 a) 在 HLA-A1 情况下的黑色素瘤抗原家族 A (MAGE A)-3 或 b) HLA-Cw7 情况下的 MAGE-A12 的抗原特异性。本发明进一步提供相关多肽和蛋白, 以及相关核酸, 重组表达载体, 宿主细胞, 和细胞群。由本发明进一步提供的是抗体, 或其抗原结合部分, 和与本发明的 TCR 有关的药物组合物。由本发明进一步提供检测在宿主中癌症的存在的方法和在宿主中治疗或预防癌症的方法。

1. 一种分离的或纯化的 T 细胞受体 (TCR), 其具有对 a) 在 HLA-A1 情况下的黑色素瘤抗原家族 A (MAGE A)-3 或 b) 在 HLA-Cw7 情况下的 MAGE-A12 的抗原特异性。

2. 权利要求 1 的分离的或纯化的 TCR, 其具有对 a) 包含 EVDPIGHLY (SEQ ID NO:2) 的 MAGE-A3 表位或 b) 包含 VRIGHLYIL (SEQ ID NO:4) 的 MAGE-A12 表位的抗原特异性。

3. 权利要求 2 的分离的或纯化的 TCR, 其包含 SEQ ID NO:5-10, 16-21, 26-31 或 36-41 的氨基酸序列。

4. 权利要求 3 的分离的或纯化的 TCR, 其包含 SEQ ID NO:11-12, 22-23, 32-33 或 42-43 的氨基酸序列。

5. 权利要求 4 的分离的或纯化的 TCR, 其包含 SEQ ID NO:13-14, 24-25, 34-35 或 44-45 的氨基酸序列。

6. 一种分离的或纯化的多肽, 其包含权利要求 1 到 5 任一项的 TCR 的功能部分, 其中所述功能部分包含 SEQ ID NO:5-10, 16-21, 26-31 或 36-41 的氨基酸序列。

7. 权利要求 6 的分离的或纯化的多肽, 其中所述部分包含 SEQ ID NO:11-12, 22-23, 32-33 或 42-43 的氨基酸序列。

8. 权利要求 7 的分离的或纯化的多肽, 其中所述部分包含 SEQ ID NO:13-14, 24-25, 34-35 或 44-45 的氨基酸序列。

9. 一种分离的或纯化的蛋白, 其包含至少一个权利要求 6-8 任一项的所述多肽。

10. 权利要求 9 的分离的或纯化的蛋白, 其包含:

第一多肽链, 所述第一多肽链包含 SEQ ID NO:5-7, 16-18, 26-28 或 36-38 的氨基酸序列; 和

第二多肽链, 所述第二多肽链包含 SEQ ID NO:8-10, 19-21, 29-31 或 39-41 的氨基酸序列。

11. 权利要求 10 的分离的或纯化的蛋白, 其包含:

第一多肽链, 所述第一多肽链包含 SEQ ID NO:11, 22, 32 或 42 的氨基酸序列; 和

第二多肽链, 所述第二多肽链包含 SEQ ID NO:12, 23, 33 或 43 的氨基酸序列。

12. 权利要求 11 的分离的或纯化的蛋白, 其包含:

第一多肽链, 所述第一多肽链包含 SEQ ID NO:13, 24, 34 或 44 的氨基酸序列; 和

第二多肽链, 所述第二多肽链包含 SEQ ID NO:14, 25, 35 或 45 的氨基酸序列。

13. 权利要求 9-12 任一项的蛋白, 其中所述蛋白是融合蛋白。

14. 权利要求 9-13 任一项的蛋白, 其中所述蛋白是重组抗体。

15. 一种分离的或纯化的核酸, 其包含编码权利要求 1-5 任一项的 TCR、权利要求 6-8 任一项的多肽、或权利要求 9-14 任一项的蛋白的核苷酸序列。

16. 权利要求 15 的核酸, 其包含包含 SEQ ID NO:46-49 的任一个的核苷酸序列。

17. 一种分离的或纯化的核酸, 其包含与权利要求 16 所述核酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列。

18. 一种分离的或纯化的核酸, 其包含与权利要求 15-17 任一项的核酸的核苷酸序列在严格条件下杂交的核苷酸序列。

19. 一种重组表达载体, 其包含权利要求 15-18 任一项的核酸。

20. 一种分离的宿主细胞, 其包含权利要求 19 的重组表达载体。

21. 如权利要求 20 的分离的宿主细胞,其中所述细胞是外周血淋巴细胞(PBL)。
22. 如权利要求 21 的分离的宿主细胞,其中所述 PBL 是 T 细胞。
23. 如权利要求 20 的分离的宿主细胞,其中所述细胞是肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。
24. 一种细胞群,其包含至少一个权利要求 20-23 任一项的宿主细胞。
25. 一种抗体,或其抗原结合部分,其特异结合权利要求 1 到 5 任一项的 TCR 的功能部分,其中所述功能部分包含 SEQ ID NO :5-10,16-21,26-31 或 36-41 的氨基酸序列。
26. 一种药物组合物,其包含权利要求 1 到 5 任一项的 TCR,权利要求 6 到 8 任一项的多肽,权利要求 9 到 14 任一项蛋白,权利要求 15 到 18 任一项的核酸,权利要求 19 的重组表达载体,权利要求 20 到 23 任一项的宿主细胞,权利要求 24 的细胞群,权利要求 25 的抗体或其抗原结合部分,和药学可接受的载体。
27. 一种检测在宿主中癌症的存在的方法,包含:
 - (i) 将包含癌症细胞的样品与权利要求 1 到 5 任一项的 TCR,权利要求 6 到 8 任一项的多肽,权利要求 9 到 14 任一项的蛋白,权利要求 15 到 18 任一项的核酸,权利要求 19 的重组表达载体,权利要求 20 到 23 任一项的宿主细胞,权利要求 24 的细胞群,权利要求 25 的抗体或其抗原结合部分接触,从而形成复合物,和
 - (ii) 检测所述复合物,其中所述复合物的检出指示所述宿主中癌症的存在。
28. 一种治疗或预防宿主中癌症的方法,包含以治疗或预防所述宿主中癌症的有效量向宿主施用权利要求 1 到 5 任一项的 TCR,权利要求 6 到 8 任一项的多肽,权利要求 9 到 14 任一项的蛋白,权利要求 15 到 18 任一项的核酸,权利要求 19 的重组表达载体,权利要求 20 到 23 任一项的宿主细胞,权利要求 24 的细胞群,权利要求 25 的抗体或其抗原结合部分,或权利要求 26 的药物组合物。
29. 权利要求 27 或 28 的方法,其中所述癌症是黑色素瘤,乳腺癌,白血病,甲状腺癌,胃癌,胰腺癌,肝癌,肺癌,卵巢癌,多发性骨髓瘤,食道癌,肾癌,头部癌症,颈部癌症,前列腺癌,或泌尿道上皮癌。
30. 权利要求 27-29 任一项的方法,其中所述宿主细胞是宿主自体的细胞。
31. 权利要求 27-29 任一项的方法,其中所述群的细胞是宿主自体的细胞。
32. 权利要求 1 到 5 任一项的 TCR,权利要求 6 到 8 任一项的多肽,权利要求 9 到 14 任一项的蛋白,权利要求 15 到 18 任一项的核酸,权利要求 19 的重组表达载体,权利要求 20 到 23 任一项的宿主细胞,权利要求 24 的细胞群,权利要求 25 的抗体或其抗原结合部分,或权利要求 26 的药物组合物,用于治疗或预防癌症。
33. 权利要求 32 的 TCR,多肽,蛋白,核酸,重组表达载体,宿主细胞,细胞群,抗体或其抗原结合部分,或药物组合物,其中所述癌症是黑色素瘤,乳腺癌,白血病,甲状腺癌,胃癌,胰腺癌,肝癌,肺癌,卵巢癌,多发性骨髓瘤,食道癌,肾癌,头部癌症,颈部癌症,前列腺癌,或泌尿道上皮癌。
34. 权利要求 32 或 33 的宿主细胞,其中所述宿主细胞是宿主自体的细胞。
35. 权利要求 32-34 任一项的细胞群,其中所述群的细胞是宿主自体的细胞。

识别 HLA-A1- 或 HLA-CW7- 限制的 MAGE 的 T 细胞受体

[0001] 对相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于 2011 年 9 月 15 日申请的美国专利申请号 61/535,086 的优先权,其通过参考以其整体引入。

[0003] 电子提交的材料的通过参考引入

[0004] 在此以其整体通过参考引入的是与此同时提交的计算机可读的核苷酸 / 氨基酸序列表,识别为如下:日期为 2012 年 8 月 22 日,名为 " 710922ST25.TXT, " 的一个 52,162 字节 ASCII (文本) 文件。

[0005] 发明背景

[0006] 过继性细胞治疗 (ACT) 包括转移反应性 T 细胞到患者内,包括转移肿瘤 - 反应性 T 细胞到癌症患者内。使用靶向人白细胞抗原 (HLA)-A2 限制的 T 细胞表位的 T 细胞的过继性细胞治疗在一些患者中引起肿瘤的消退方面已是成功的。然而,缺少 HLA-A2 表达的患者不能用靶向 HLA-A2 限制的 T 细胞表位的 T 细胞治疗。此种限制产生对过继性细胞治疗的普遍应用产生障碍。因此,存在对改善的用于治疗癌症的免疫组合物和方法的需求。

[0007] 发明的简单概要

[0008] 本发明提供分离的或纯化的 T 细胞受体 (TCR),其具有对 a)HLA-A1 情况下的黑色素瘤抗原家族 A (MAGE A)-3 或 b)HLA-Cw7 情况下的 MAGE-A12 的抗原特异性。本发明进一步提供相关的多肽和蛋白,以及相关的核酸,重组表达载体,宿主细胞,和细胞群。由本发明进一步提供的是抗体,或其抗原结合部分,和与本发明的 TCR 相关的药物组合物。

[0009] 由本发明进一步提供检测宿主中癌症的存在的方法和/或治疗或预防宿主中癌症的方法。所述检测宿主中癌症的存在的方法包含 (i) 将包含癌症细胞的样品与在此描述的发明的 TCR,多肽,蛋白,核酸,重组表达载体,宿主细胞,宿主细胞群,或抗体,或其抗原结合部分的任一个接触,从而形成复合物,和 (ii) 检测所述复合物,其中所述复合物的检出表征所述宿主中癌症的存在。

[0010] 所述治疗或预防宿主中癌症的方法包含以治疗或预防宿主中癌症的有效量向所述宿主施用在此描述的所述 TCR,多肽,或蛋白的任一个,任何包含编码在此描述的所述 TCR,多肽,蛋白的任一个的核苷酸序列核酸或重组表达载体,或任何包含编码在此描述的所述 TCR,多肽,或蛋白的任一个的重组载体的宿主细胞或宿主细胞群。

[0011] 附图的一些视图的简述

[0012] 图 1A 为显示响应与不同肿瘤细胞系共培养的未转导的 (UT) 细胞 (黑色线条) 或转导有抗 MAGE-A3TCR A10 (SEQ ID NO :46) (无阴影线条) 或抗 MAGE-A3TCR13-18 (SEQ ID NO :48) (灰色线条) 的细胞的干扰素 (IFN)- γ 分泌 (pg/ml) 的线条图。

[0013] 图 1B 为显示响应与 HLA-A1+/MAGE-A3+ 新鲜肿瘤 FrTu2767 (黑色线条), FrTu3178 (灰色线条), FrTu2823 (无阴影线条) 或 FrTu3068 (对角线线条) 或 HLA-A*0201+/MART-1+ 新鲜肿瘤 FrTu2851 (水平线线条) 或 FrTu3242 (竖直线线条) 共培养的 UT 细胞或转导有抗 MAGE-A3TCR A10 (SEQ ID NO :46) 或抗 MART-1TCR DMF5 的细胞的 IFN- γ 分泌 (pg/ml) 的线条图。方格线条表示不与肿瘤细胞共培养的细胞。

[0014] 图 2A 和 2B 为显示响应与不同肿瘤细胞系共培养的,源自转导有编码截短的人低亲和力和神经生长因子受体 (NGFR) 的对照构建体 (黑色线条),抗 MAGE-A12TCR502 (SEQ ID NO :47) (无阴影线条),或抗 MAGE-A12TCR FM8 (SEQ ID NO :49) (灰色线条) 的第一 (图 2A) 和第二 (图 2B) 供体的细胞的 IFN- γ 分泌 (pg/ml) 的线条图。

[0015] 图 3A 说明表达 HLA-A1 (线条的无阴影部分),HLA-A2 (线条的灰色部分),和 / 或 HLA-Cw7 (线条的黑色部分) 的正常高加索人群体的累积百分数的线条图。

[0016] 图 3B 和 3C 说明将预计表达 HLA-A2 和 NY-ESO-1 (线条的对角线部分);HLA-A1 和 MAGE-A3 (线条的无阴影部分);HLA-A2, MAGE-A3, 和 MAGE-A12 (线条的灰色部分);和 / 或 HLA-Cw7 和 MAGE-A12 (线条的黑色部分) 的人黑色素瘤 (图 3B) 和滑膜细胞肉瘤 (图 3C) 患者群体的累积百分数的线条图。

[0017] 图 4 为显示响应与由源自 MAGE-A12 (VRIGHLYIL;SEQ ID NO :4), MAGE-A2 (VPISHLYIL;SEQ ID NO :50), MAGE-A3 (DPIGHLYIF;SEQ ID NO :51), MAGE-A6 (DPIGHVYIF;SEQ ID NO :52), 或对照肽 (EDGCPAAEK;SEQ ID NO :53) 的肽刺激的 HLA-Cw*0701 和 HLA-Cw*0702 靶细胞共培养的转导有 NGFR (黑色线条),抗 MAGE-A12TCR502 (SEQ ID NO :47) (无阴影线条),或抗 MAGE-A12TCR FM8 (SEQ ID NO :49) (灰色线条) 的细胞的 IFN- γ 分泌 (pg/ml) 的线条图。

[0018] 图 5A-5D 显示在指定的效应物对靶 (E:T) 的比率下,由未转导的 (闭合圆形) 或转导有抗 MAGE-A12TCR502 (SEQ ID NO :47) (▼),抗 MAGE-A12TCR FM8 (SEQ ID NO :49) (菱形),抗 MAGE-A3TCR A10 (SEQ ID NO :46) (正方形),抗 MAGE-A3TCR13-18 (SEQ ID NO :48) (▲),或抗 MAGE-A3TCR112-120 (开放圆形) 的 PBMC 导致的 397mel (A),624mel (B),2984mel (C),和 2661RCC (D) 细胞的溶解百分数的线状图。提供源自两个独立实验中的一个的代表性结果。

[0019] 图 6A 为显示响应与不同肿瘤细胞系共培养的未转导的 (对照) 细胞 (条纹线条) 或转导有抗 MAGE-A3TCR A10 (SEQ ID NO :46) (阴影线条) 或抗 MAGE-A3TCR13-18 (SEQ ID NO :48) (方格线条) 的细胞的 IFN- γ 分泌 (pg/ml) 的线条图。提供源自三个独立的评估转导有这些 TCR 的 T 细胞的响应的实验中的两个的代表性结果。

[0020] 图 6B 为显示对转导有抗 MAGE-A3TCR A10 (SEQ ID NO :46), 抗 MAGE-A3TCR13-18 (SEQ ID NO :48), 抗 MAGE-A12TCR502 (SEQ ID NO :47), 或抗 MAGE-A12TCR FM8 (SEQ ID NO :49) 的细胞测量的载体 DNA 的估计的相对拷贝的线条图。

[0021] 图 6C 为显示响应与同不同浓度的 MAGE-A3168-176 肽孵育的靶细胞的共培养转导有抗 MAGE-A3TCR A10 (SEQ ID NO :46) (圆形) 或抗 MAGE-A3TCR13-18 (SEQ ID NO :48) (正方形) 的细胞分泌的 IFN- γ 的量的线状图。

[0022] 图 6D 为显示响应与不同肿瘤细胞系共培养的转导有抗 MAGE-A12TCR502 (SEQ ID NO :47) (阴影线条) 或抗 MAGE-A12TCR FM8 (SEQ ID NO :49) (方格线条) 的细胞的 IFN- γ 分泌 (pg/ml) 的线条图。提供源自三个独立的评估转导有这些 TCR 的 T 细胞的响应的实验中的两个的代表性结果。

[0023] 图 6E 为显示由响应与同不同浓度的 MAGE-A12 :170-178 肽孵育的靶细胞的共培养转导有抗 MAGE-A12TCR502 (SEQ ID NO :47) (圆形) 或抗 MAGE-A12TCR FM8 (SEQ ID NO :49) (正方形) 的细胞分泌的 IFN- γ 的量的线状图。

[0024] 图 6F 为显示响应与不同肿瘤细胞系共培养的未转导的(对照)(条纹线条)或转导有抗 MAGE-A12TCR502(SEQ ID NO:47)(阴影线条)或抗 MAGE-A12TCR FM8(SEQ ID NO:49)(方格线条)的细胞的 IFN- γ 分泌(pg/ml)的线条图。提供源自三个独立的评估转导有这些 TCR 的 T 细胞的响应的实验中的两个的代表性结果。

[0025] 图 7A 为显示响应与不同新鲜未培养的肿瘤共培养的未转导的细胞(对照)(条纹线条)或转导有抗 MAGE-A3TCR A10(SEQ ID NO:46)(阴影线条)或抗 MAGE-A3TCR13-18(方格线条)的细胞的 IFN- γ 分泌(pg/ml)的线条图。提供源自三个独立的评估转导有这些 TCR 的 T 细胞的响应的实验中的一个的代表性结果。

[0026] 图 7B 为显示响应与不同新鲜未培养肿瘤共培养的未转导的细胞(对照)(条纹线条)或转导有抗 MAGE-A12TCR502(SEQ ID NO:47)(阴影线条)或抗 MAGE-A12TCR FM8(SEQ ID NO:49)(方格线条)的细胞的 IFN- γ 分泌(pg/ml)的线条图。提供源自三个独立的评估转导有这些 TCR 的 T 细胞的响应的实验中的一个的代表性结果。

[0027] 图 8A 为显示与用 HLA-A*01 加上 MAGE-A3, A1, A2, A4, A6, A9, A10 或 A12 之一转染的靶细胞共培养过夜的未转导的细胞(对照)(条纹线条)或转导有抗 MAGE-A3TCR A10(SEQ ID NO:46)(阴影线条)或抗 MAGE-A3TCR13-18(方格线条)细胞的 IFN- γ 分泌(pg/ml)的线条图。

[0028] 图 8B 为显示与用 HLA-C*07:02 加上 MAGE-A3, A1, A2, A4, A6, A9, A10 或 A12 之一转染的靶细胞共培养过夜的未转导的细胞(对照)(条纹线条)或转导有抗 MAGE-A12TCR502(SEQ ID NO:47)(阴影线条)或抗 MAGE-A12TCR FM8(SEQ ID NO:49)(方格线条)的细胞的 IFN- γ 分泌(pg/ml)的线条图。

[0029] 图 8C 为显示与用 HLA-C*07:01 加上 MAGE-A3, A1, A2, A4, A6, A9, A10 或 A12 之一转染的靶细胞共培养过夜的未转导的细胞(对照)(条纹线条)或转导有抗 MAGE-A12TCR502(SEQ ID NO:47)(阴影线条)或抗 MAGE-A12TCR FM8(SEQ ID NO:49)(方格线条)的细胞的 IFN- γ 分泌(pg/ml)的线条图。

[0030] 图 9A 和 9B 为显示与不同肿瘤靶共培养的为未转导的(对照)(条纹线条)或转导有抗 MAGE-A3TCR A10(SEQ ID NO:46)(阴影线条)或抗 MAGE-A3TCR13-18(方格线条)的 CD8+(图 9A)或 CD4+ 细胞(图 9B)的 IFN- γ 分泌的线条图。提供源自两个独立实验中的一个的代表性结果。

[0031] 图 9C 为显示与不同肿瘤靶共培养的为未转导的(对照)(条纹线条)或转导有抗 MAGE-A12TCR502(SEQ ID NO:47)(阴影线条)或抗 MAGE-A12TCR FM8(SEQ ID NO:49)(方格线条)的 CD8+ 细胞的 IFN- γ 分泌的线条图。提供源自两个独立实验中的一个的代表性结果。

[0032] 发明详述

[0033] 本发明的一个实施方案提供 T 细胞受体(TCR),所述 TCR 具有对 a)HLA-A1 情况下的黑色素瘤抗原家族 A(MAGE-A)-3(还称为 MAGE-3)或 b)HLA-Cw7 情况下的 MAGE-A12(还称为 MAGE-12)的抗原特异性。

[0034] MAGE-A3 和 MAGE-A12 是 12 种同源蛋白的 MAGE-A 家族成员,所述家族还包括 MAGE-A1, MAGE-A2, MAGE-A4, MAGE-A5, MAGE-A6, MAGE-A7, MAGE-A8, MAGE-A9, MAGE-A10, 和 MAGE-A11。所述 MAGE-A 蛋白是癌睾丸抗原(CTA),所述 CTA 仅表达在肿瘤细胞和睾丸和胎

盘的无 MHC 表达生殖细胞中。MAGE-A 蛋白表达在多种人癌症中,所述人癌症包括,但不限于,黑色素瘤,乳腺癌,白血病,甲状腺癌,胃癌,胰腺癌,肝癌(举例来说,肝细胞癌),肺癌(举例来说,非小细胞肺癌),卵巢癌,多发性骨髓瘤,食道癌,肾癌,头部癌症(举例来说,鳞状细胞癌),颈部癌症(举例来说,鳞状细胞癌),前列腺癌,和泌尿道上皮癌。

[0035] 本发明的 TCR 提供很多优点,包括当用于过继性细胞转移时。例如,通过靶向 a) HLA-A1 情况下提呈的 MAGE-A3 或 b) HLA-Cw7 情况下提呈的 MAGE-A12,发明的 TCR 有可能治疗患者,其不能使用靶向其它 HLA 分子(举例来说,HLA-A2) 情况下提呈的 MAGE 抗原的 TCR 治疗。因为 HLA-A1 和 HLA-Cw7 是高度常见等位基因,发明的 TCR 有利地大大扩展了可以被治疗的患者群体。此外,不受特别的理论限制,人们相信因为 MAGE-A3 和 / 或 MAGE-A12 由多种癌症类型的细胞表达,发明的 TCR 有利地提供破坏多种类型的癌症的细胞的能力并且,因此,治疗或预防多种类型的癌症。此外,不受特别的理论限制,人们相信因为所述 MAGE-A 蛋白是癌睾丸抗原,其仅表达在肿瘤细胞和睾丸和胎盘的无 MHC 表达的生殖细胞中,发明的 TCR 有利地靶向癌症细胞的破坏,同时最小化或消除对正常,非癌细胞的破坏,从而例如,通过最小化或消除,减少毒性。

[0036] 如在此使用的短语“抗原特异性”意为所述 TCR 可以以高亲和力特异结合和免疫识别 MAGE-A3 或 MAGE-A12。例如,如果当分别与分别用低浓度的 MAGE-A3 肽或 MAGE-A12 肽(举例来说,约 0.05ng/ml 到约 5ng/ml,0.05ng/ml,0.1ng/ml,0.5ng/ml,1ng/ml,或 5ng/ml) 刺激的抗原-阴性的 HLA-A1+ 靶细胞或 HLA-Cw7+ 靶细胞共培养时,表达所述 TCR 的 T 细胞分泌至少约 200pg/ml 或更多(举例来说,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) 的 IFN- γ , TCR 可以被认为是具有对 MAGE-A3 或 MAGE-A12 的“抗原特异性”。备选地或此外,如果当与用低浓度的 MAGE-A3 肽或 MAGE-A12 肽分别刺激的抗原-阴性的 HLA-A1+ 靶细胞或 HLA-Cw7+ 靶细胞分别共培养时,表达所述 TCR 的 T 细胞分泌至少如未转导的 PBL 背景水平的 IFN- γ 的两倍 IFN- γ 量,TCR 可以被认为是具有对 MAGE-A3 或 MAGE-A12 的“抗原特异性”。当与用较高浓度的 MAGE-A3 肽或 MAGE-A12 肽分别刺激的抗原-阴性的 HLA-A1+ 靶细胞或 HLA-Cw7+ 靶细胞共培养时,发明的 TCR 也可以分泌 IFN- γ 。

[0037] 本发明的一个实施方案提供具有对于任何 MAGE-A3 蛋白,多肽或肽的抗原特异性的 TCR。发明的 TCR 可以具有对于 MAGE-A3 蛋白的抗原特异性,所述 MAGE-A3 蛋白包含 SEQ ID NO:1,由 SEQ ID NO:1 组成,或主要由 SEQ ID NO:1 组成。在本发明的一个优选的实施方案中,所述 TCR 具有对 MAGE-A3168-176 肽的抗原特异性,所述肽包含 EVDPIGHLY (SEQ ID NO:2),由 EVDPIGHLY (SEQ ID NO:2) 组成,或主要由 EVDPIGHLY (SEQ ID NO:2) 组成。

[0038] 发明的 TCR 可以以人白细胞抗原 (HLA)-A1- 依赖的方式识别 MAGE-A3。由如在此使用的“HLA-A1- 依赖的方式”意为所述 TCR 在结合于 HLA-A1 分子的情况下的 MAGE-A3 癌症抗原时诱导免疫反应。发明的 TCR 可以识别由 HLA-A1 分子呈递的 MAGE-A3 并可以结合除 MAGE-A3 外的 HLA-A1 分子。典型的 HLA-A1 分子,在其情况下发明的 TCR 识别 MAGE-A3,包括由 HLA-A*0101,HLA-A*0102,和 / 或 HLA-A*0103 等位基因编码的那些。

[0039] 本发明的一个实施方案提供具有对任何 MAGE-A12 蛋白,多肽或肽的抗原特异性的 TCR。发明的 TCR 可以具有对 MAGE-A12 蛋白的抗原特异性,所述 MAGE-A12 蛋白包含 SEQ

ID NO :3, 由 SEQ ID NO :3 组成, 或主要由 SEQ ID NO :3 组成。在本发明的一个优选的实施方案中, 所述 TCR 具有对 MAGE-A12170-178 肽的抗原特异性, 所述肽包含 VRIGHLYIL (SEQ ID NO :4), 由 VRIGHLYIL (SEQ ID NO :4) 组成, 或主要由 VRIGHLYIL (SEQ ID NO :4) 组成。

[0040] 发明的 TCR 可以以 HLA-Cw7- 依赖的方式识别 MAGE-A12。由如在此使用的“HLA-Cw7- 依赖的方式”意为所述 TCR 在结合于 HLA-Cw7 分子情况下的 MAGE-A12 癌症抗原时诱导免疫反应。发明的 TCR 可以识别由 HLA-Cw7 分子呈递的 MAGE-A12 并可以结合除 MAGE-A12 之外的 HLA-Cw7 分子。典型的 HLA-Cw7 分子, 在其情况下发明的 TCR 识别 MAGE-A12, 包括由 HLA-Cw*0701 和 / 或 HLA-Cw*0702 等位基因编码的那些。

[0041] 本发明提供包含两条多肽 (即, 多肽链) 的 TCR, 所述多肽如 TCR 的 α 链, TCR 的 β 链, TCR 的 γ 链, TCR 的 δ 链, 或其组合。TCR 的此种多肽链在本领域已知。发明的 TCR 的所述多肽可以包含任何氨基酸序列, 条件是所述 TCR 具有对 a) HLA-A1 情况下的 MAGE-A3 或 b) HLA-Cw7 情况下的 MAGE-A12 的抗原特异性。

[0042] 在本发明的一个实施方案中, 所述 TCR 包含两条多肽链, 其中每个包含可变区, 所述可变区包含 TCR 的互补决定区 (CDR) 1, CDR2, 和 CDR3。在本发明的一个实施方案中, 所述 TCR 具有对 MAGE-A3168-176 的抗原特异性并且包含第一多肽链, 所述第一多肽链包含 CDR1 (包含 SEQ ID NO :5 或 16 (α 链的 CDR1) 的氨基酸序列), CDR2 (包含 SEQ ID NO :6 或 17 (α 链的 CDR2) 的氨基酸序列, 和 CDR3 (包含 SEQ ID NO :7 或 18 (α 链的 CDR3) 的氨基酸序列, 和第二多肽链, 所述第二多肽链包含 CDR1 (包含 SEQ ID NO :8 或 19 (β 链的 CDR1) 的氨基酸序列), CDR2 (包含 SEQ ID NO :9 或 20 (β 链的 CDR2) 的氨基酸序列), 和 CDR3 (包含 SEQ ID NO :10 或 21 (β 链的 CDR3) 的氨基酸序列)。在本发明的另一个实施方案中, 所述 TCR 具有对 MAGE-A12170-178 的抗原特异性, 并且包含第一多肽链, 所述第一多肽链包含 CDR1 (包含 SEQ ID NO :26 或 36 (α 链的 CDR1) 的氨基酸序列), CDR2 (包含 SEQ ID NO :27 或 37 (α 链的 CDR2) 的氨基酸序列), 和 CDR3 (包含 SEQ ID NO :28 或 38 (α 链的 CDR3) 的氨基酸序列), 和第二多肽链, 所述第二多肽链包含 CDR1 (包含 SEQ ID NO :29 或 39 (β 链的 CDR1) 的氨基酸序列), CDR2 (包含 SEQ ID NO :30 或 40 (β 链的 CDR2) 的氨基酸序列), 和 CDR3 (包含 SEQ ID NO :31 或 41 (β 链的 CDR3) 的氨基酸序列)。在这点上, 发明的 TCR 可以包含选自 SEQ ID NO :5-7, 8-10, 16-18, 19-21, 26-28, 29-31, 36-38, 和 39-41 的任一个或更多组成的组的任一个或更多的氨基酸序列。优选地, 所述 TCR 包含 SEQ ID NO :5-10, 16-21, 26-31, 或 36-41 的氨基酸序列。更优选地, 所述 TCR 包含 SEQ ID NO :5-10 或 26-31 的氨基酸序列。

[0043] 备选地或此外, 所述 TCR 可以包含包含以上列出的 CDR 的 TCR 的可变区的氨基酸序列。在这点上, 所述具有对 MAGE-A3168-176 的抗原特异性的 TCR 可以包含 SEQ ID NO :11 或 22 (α 链的可变区) 或 12 或 23 (β 链的可变区), SEQ ID NO :11 和 12 二者或 SEQ ID NO :22 和 23 二者的氨基酸序列。在本发明的另一个实施方案中, 所述 TCR 具有对 MAGE-A12170-178 的抗原特异性并且包含 SEQ ID NO :32 或 42 (α 链的可变区) 或 33 或 43 (β 链可变区), SEQ ID NO :32 和 33 二者, 或 SEQ ID NO :42 和 43 二者的氨基酸序列。优选地, 发明的 TCR 包含 SEQ ID NO :11 和 12 二者或 SEQ ID NO :32 和 33 二者的氨基酸序列。

[0044] 备选地或此外, 所述 TCR 可以包含 TCR 的 α 链和 TCR 的 β 链。发明的 TCR 的 α

链和 β 链的每个可以独立地包含任何氨基酸序列。优选地,所述 α 链包含如以上列出的 α 链的可变区。在这点上,发明的具有对 MAGE-A3168-176 的抗原特异性的 TCR 可以包含 SEQ ID NO:13 或 24 的氨基酸序列并且发明的具有对 MAGE-A12170-178 的抗原特异性的 TCR 可以包含 SEQ ID NO:34 或 44 的氨基酸序列。发明的此种类型的 TCR 可以与任何 TCR 的 β 链配对。优选地,发明的 TCR 的 β 链包含如以上列出的 β 链的可变区。在这点上,发明的具有对 MAGE-A3168-176 的抗原特异性的 TCR 可以包含 SEQ ID NO:14 或 25 的氨基酸序列并且发明的具有对 MAGE-A12170-178 的抗原特异性的 TCR 可以包含 SEQ ID NO:35 或 45 的氨基酸序列。发明的 TCR,因此,可以包含 SEQ ID NO:13,14,24,25,34,35,44,或 45,SEQ ID NO:13 和 14 二者,SEQ ID NO:24 和 25 二者,SEQ ID NO:34 和 35 二者,或 SEQ ID NO:44 和 45 二者的氨基酸序列。优选地,发明的 TCR 包含 SEQ ID NO:13 和 14 二者或 SEQ ID NO:34 和 35 二者的氨基酸序列。

[0045] 本发明还提供的是包含在此描述的任何所述 TCR 的功能部分的多肽。如在此使用的术语“多肽”包括寡肽并且指由一个或更多肽键连接的氨基酸单链。

[0046] 至于发明的多肽,所述功能部分可以是包含所述 TCR 的连续的氨基酸的任何部分,其是 TCR 的部分,条件是所述功能部分特异结合 MAGE-A3 或 MAGE-A12。当关于 TCR 时所使用的术语“功能部分”指本发明的所述 TCR 的任何部分或片段,所述部分或片段保留所述 TCR 的生物学活性,其是 TCR 的部分,(母体 TCR)。功能部分包括,例如,保留特异结合 MAGE-A3(举例来说,以 HLA-A1- 依赖的方式)或 MAGE-A12(举例来说,以 HLA-Cw7- 依赖的方式)的能力,或以如母体 TCR 类似的程度,同样的程度,或更高的程度检测,治疗,或预防癌症的那些 TCR 的部分。关于所述母体 TCR,所述功能部分可以包含,例如,所述母体 TCR 的约 10%,25%,30%,50%,68%,80%,90%,95%,或更多。

[0047] 功能部分可以在所述部分的氨基或羧基末端,或在二者末端包含另外的氨基酸,所述另外的氨基酸在所述母体 TCR 的氨基酸序列中未发现。理想地,所述另外的氨基酸不干扰所述功能部分的生物学功能,举例来说,特异结合于 MAGE-A3 或 MAGE-A12;和/或具有检测癌症,治疗或预防癌症的功能,等。更理想地,当与所述母体 TCR 的生物学活性比较时,所述另外的氨基酸增强生物学活性。

[0048] 所述多肽可以包含本发明所述 TCR 的 α 和 β 链之一或二者的功能部分,如包含本发明的 TCR 的 α 链和/或 β 链的可变区的 CDR1,CDR2,和 CDR3 的一个或更多的功能部分。在这点上,所述多肽可以包含包含 SEQ ID NO:5,16,26,或 36(α 链的 CDR1),6,17,27,或 37(α 链的 CDR2),7,18,28,或 38(α 链的 CDR3),8,19,29,或 39(β 链的 CDR1),9,20,30,或 40(β 链的 CDR2),10,21,31,或 41(β 链的 CDR3),或其组合的氨基酸序列的功能部分。优选地,发明的多肽包含包含 SEQ ID NO:5-7;8-10;16-18;19-21;26-28;29-31;36-38;39-41;SEQ ID NO:5-10 中全体;SEQ ID NO:16-21 中全体;SEQ ID NO:26-31 中全体;或 SEQ ID NO:36-41 中全体的功能部分。更优选地,所述多肽包含包含 SEQ ID NO:5-10 中全体或 SEQ ID NO:26-31 中全体的氨基酸序列的功能部分。

[0049] 备选地或此外,发明的多肽可以包含,例如,包含以上列出的 CDR 区的组合发明的 TCR 的可变区。在这点上,所述多肽可以包含 SEQ ID NO:11,22,32,或 42(α 链的可变区),SEQ ID NO:12,23,33,或 43(β 链的可变区),SEQ ID NO:11 和 12 二者,SEQ ID NO:22 和 23,SEQ ID NO:32 和 33 二者,或 SEQ ID NO:42 和 43 二者的氨基酸序列。优选地,所述多

肽包含 SEQ ID NO :11 和 12 二者或 SEQ ID NO :32 和 33 二者的氨基酸序列。

[0050] 备选地或此外,发明的多肽可以包含在此描述的所述 TCR 的一个的 α 或 β 链的全长。在这点上,发明的多肽可以包含 SEQ ID NO :13,14,24,25,34,35,44,或 45 的氨基酸序列。备选地,本发明的所述多肽可以包含在此描述的所述 TCR 的 α 和 β 链。例如,发明的多肽可以包含 SEQ ID NO :13 和 14 二者;SEQ ID NO :24 和 25 二者;SEQ ID NO :34 和 35 二者;或 SEQ ID NO :44 和 45 二者的氨基酸序列。优选地,所述多肽包含 SEQ ID NO :13 和 14 二者或 SEQ ID NO :34 和 35 二者的氨基酸序列。

[0051] 本发明进一步提供包含在此描述的所述多肽的至少一个的蛋白。由“蛋白”意为包含一个或更多多肽链的分子。

[0052] 在一个实施方案中,本发明的所述蛋白可以包含包含 SEQ ID NO :5-7;SEQ ID NO :16-18;SEQ ID NO :26-28;或 SEQ ID NO :36-38 的氨基酸序列的第一多肽链和包含 SEQ ID NO :8-10;SEQ ID NO :19-21;SEQ ID NO :29-31;或 SEQ ID NO :39-41 氨基酸序列第二多肽链。备选地或此外,本发明的所述蛋白可以包含包含 SEQ ID NO :11,22,32,或 42 的氨基酸序列的第一多肽链和包含 SEQ ID NO :12,23,33,或 43 的氨基酸序列的第二多肽链。本发明的所述蛋白可以,例如,包含包含 SEQ ID NO :13,24,34,或 44 的氨基酸序列的第一多肽链和包含 SEQ ID NO :14,25,35,或 45 的氨基酸序列的第二多肽链。在这种情况下,本发明的所述蛋白可以是 TCR。备选地,如果,例如,所述蛋白包含包含 SEQ ID NO :13,24,34,或 44 和 SEQ ID NO :14,25,35,或 45 的单一多肽链,或如果所述蛋白的第一和 / 或第二多肽链进一步包含其它氨基酸序列,举例来说,编码免疫球蛋白或其部分的氨基酸序列,那么发明的蛋白可以是融合蛋白。在这点上,本发明还提供融合蛋白,所述融合蛋白包含与至少一种其它多肽一起的在此描述的发明的多肽的至少一种。其它多肽可以作为融合蛋白的分离的多肽存在,或可以作为与在此描述的发明的多肽的一种在框中(一前一后地)表达的多肽存在。其它多肽可以编码任何肽或蛋白分子,或其部分,包括,但不限于免疫球蛋白,CD3,CD4,CD8,MHC 分子,CD1 分子,举例来说,CD1a,CD1b,CD1c,CD1d,等。

[0053] 所述融合蛋白可以包含发明的多肽的一个或更多拷贝和 / 或其它多肽的一个或更多拷贝。例如,所述融合蛋白可以包含发明的多肽和 / 或所述其它多肽的 1,2,3,4,5,或更多个拷贝。制备融合蛋白的合适方法在本领域中已知,并且包括,例如,重组方法。参见,例如,Choi 等, *Mol. Biotechnol.* 31 :193-202 (2005)。

[0054] 在本发明的一些实施方案中,本发明的所述 TCR,多肽,和蛋白可以表达为包含连接所述 α 链和所述 β 链的接头肽单个蛋白。在这点上,包含 SEQ ID NO :13,24,34,或 44 和 SEQ ID NO :14,25,35,或 45 的本发明的所述 TCR,多肽,和蛋白可以进一步包含包含 SEQ ID NO :15 或 54 的接头肽。所述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的表达。当由宿主细胞表达包括所述接头肽的构建体时,所述接头肽可以切除,产生分离的 α 和 β 链。

[0055] 本发明的蛋白可以是包含在此描述的发明的多肽的至少一种的重组抗体。如在此使用的,“重组抗体”指包含本发明的所述多肽和抗体的多肽链或其部分的至少一种的重组(举例来说,遗传改造的)蛋白。抗体的所述多肽或其部分可以是重链,轻链,重或轻链的可变或恒定区,单链可变片段(scFv),或抗体的 Fc,Fab,或 F(ab)₂' 片段,等。抗体的所述多肽链或其部分,可以作为重组抗体的分离的多肽存在。备选地,抗体的所述多肽链,或

其部分,可以作为与本发明的所述多肽在框中(一前一后地)表达的多肽存在。抗体的所述多肽,或其部分,可以是任何抗体的多肽或任何抗体片段,包括任何在此描述的抗体和抗体片段。

[0056] 包括在本发明范围内的是在此描述的发明的 TCR,多肽,和蛋白的功能变体。如在此使用的术语“功能变体”指与母体 TCR,多肽,或蛋白具有基本上或显著的序列同一性或相似性的 TCR,多肽,或蛋白,所述功能变体保留所述 TCR,多肽,或蛋白的生物学活性,其是所述 TCR,多肽,或蛋白的变体。功能变体包括,例如,在此描述的所述 TCR,多肽,或蛋白(所述母体 TCR,多肽,或蛋白)的那些变体,所述变体保留特异结合 MAGE-A3 或 MAGE-A12 的能力,所述母体 TCR 对所述 MAGE-A3 或 MAGE-A12 具有抗原特异性或母体多肽或蛋白特异以如所述母体 TCR,多肽,或蛋白相似的程度,相同的程度,或更高的程度结合于所述 MAGE-A3 或 MAGE-A12。关于所述母体 TCR,多肽,或蛋白,所述功能变体可以,例如,是与所述母体 TCR,多肽,或蛋白在氨基酸序列方面至少约 30%,50%,75%,80%,90%,95%,96%,97%,98%,99%或更多相同。

[0057] 所述功能变体可以,例如,包含具有至少一种保守氨基酸取代的所述母体 TCR,多肽,或蛋白的氨基酸序列。保守氨基酸取代是本领域已知的,并且包括氨基酸取代,其中一个具有一定的物理和/或化学性质的氨基酸以另一个具有相同化学或物理性质的氨基酸交换。例如,所述保守氨基酸取代可以是酸性氨基酸代替另一个酸性氨基酸(举例来说,Asp 或 Glu),带有非极性侧链的氨基酸代替另一个带有非极性侧链的氨基酸(举例来说,Ala, Gly, Val, Ile, Leu, Met, Phe, Pro, Trp, Val, 等),碱性氨基酸代替另一个碱性氨基酸(Lys, Arg, 等),带有极性侧链的氨基酸代替另一个带有极性侧链的氨基酸(Asn, Cys, Gln, Ser, Thr, Tyr, 等),等。

[0058] 备选地或此外,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所述母体 TCR,多肽,或蛋白的氨基酸序列。在该情况下,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学活性。优选地,所述非保守氨基酸取代增强所述功能变体的生物学活性,这样以至于当与所述母体 TCR,多肽,或蛋白比较时,所述功能变体的生物学活性增加。

[0059] 所述 TCR,多肽,或蛋白可以基本由在此描述的一个或多个特定氨基酸序列组成,这样以至于所述功能变体的其它组分,举例来说,其它氨基酸,不本质改变所述功能变体的生物学活性。在这点上,发明的 TCR,多肽,或蛋白可以,例如,基本上由 SEQ ID NO:13,14,24,25,34,35,44,或 45,SEQ ID NO:13 和 14 二者,SEQ ID NO:24 和 25 二者,SEQ ID NO:34 和 35 二者,或 SEQ ID NO:44 和 45 二者的氨基酸序列组成。同样,例如,发明的 TCR,多肽,或蛋白可以基本上由 SEQ ID NO:11,12,22,23,32,33,42,或 43,SEQ ID NO:11 和 12 二者,SEQ ID NO:22 和 23 二者,SEQ ID NO:32 和 33 二者,或 SEQ ID NO:42 和 43 二者氨基酸序列组成。此外,发明的 TCR,多肽,或蛋白可以基本上由 SEQ ID NO:5,16,26,或 36(α 链的 CDR1,SEQ ID NO:6,17,27,或 37(α 链的 CDR2),SEQ ID NO:7,18,28,或 38(α 链的 CDR3),SEQ ID NO:8,19,29,或 39(β 链的 CDR1,SEQ ID NO:9,20,30,或 40(β 链的 CDR2),SEQ ID NO:10,21,31,或 41(β 链的 CDR3),或任何其组合,举例来说,SEQ ID NO:5-7;8-10;5-10;16-18;19-21;16-21;26-28;29-31;26-31;36-38;39-41;或 36-41 的氨基酸序列组成。

[0060] 本发明的所述 TCR,多肽,蛋白(包括功能部分和功能变体)可以是任何长度,即,可以包含任何数量的氨基酸,条件是所述 TCR,多肽,或蛋白(或其功能部分或功能变体)

保留其生物学活性,举例来说,特异结合 MAGE-A3 或 MAGE-A12 ;检测宿主中癌症 ;或治疗或预防宿主中癌症的能力,等。例如,所述多肽可以使在约 50 到约 5000 氨基酸长度,如 50, 70, 75, 100, 125, 150, 175, 200, 300, 400, 500, 600, 700, 800, 900, 1000 或更多氨基酸长度范围内。在这点上,本发明的所述多肽还包括寡肽。

[0061] 本发明的所述 TCR,多肽,和蛋白(包括功能部分和功能变体)可以包含合成的氨基酸替代一个或更多天然存在的氨基酸。此种合成的氨基酸是本领域已知的,并且包括,例如,氨基环己烷羧酸,正亮氨酸, α -氨基 n- 癸酸,高丝氨酸, S- 乙酰氨基甲基-半胱氨酸,反式-3-和反式-4-羟脯氨酸,4-氨基苯丙氨酸,4-硝基苯丙氨酸,4-氯代苯丙氨酸,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-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'- 苄甲基-N'- 甲基-赖氨酸, N', N'- 二苄基-赖氨酸,6-羟基赖氨酸,鸟氨酸, α -氨基环戊烷羧酸, α -氨基环己烷羧酸, α -氨基环庚烷羧酸, α -(2-氨基-2-降冰片烷)-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。

[0062] 本发明的所述 TCR,多肽,和蛋白(包括功能部分和功能变体)可以通过,举例来说,二硫桥键,或转变为酸式加成盐和 / 或任选的二聚化或多聚化,或偶联而被糖基化的,酰胺化的,羧化的,磷酸化的,酯化的, N- 酰化的,环化的。

[0063] 当本发明的所述 TCR,多肽,和蛋白(包括功能部分和功能变体)是以盐的形式时,优选地,所述多肽是以药学可接受的盐的形式。合适的药学可接受的酸式加成盐包括源自无机酸,如盐酸的,氢溴酸的,磷酸的,偏磷酸的,硝酸的,和硫酸,和有机酸,如酒石酸的,醋酸的,柠檬酸的,苹果酸的,乳酸的,富马酸的,苯甲酸的,乙醇酸的,葡糖酸的,琥珀酸的和芳基磺酸,例如, p- 甲苯磺酸的那些。

[0064] 本发明的所述 TCR,多肽,和 / 或蛋白(包括其功能部分和功能变体)可以通过本领域已知的方法获得。从头合成多肽和蛋白的合适的方法在参考文献中描述,如 Chan 等, Fmoc Solid Phase Peptide Synthesis, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2005 ;Peptide and Protein Drug Analysis, 编辑 Reid, R., Marcel Dekker, Inc., 2000 ;Epitope Mapping, 编辑 Westwood 等, Oxford University Press, Oxford, United Kingdom, 2000 ;和美国专利号 5,449,752。并且,多肽和蛋白可以使用在此描述的核酸使用标准重组方法重组生产。参见,例如, Sambrook 等, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第三次编辑, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY 2001 ;和 Ausubel 等, Current Protocols in Molecular Biology, Greene Publishing Associates and John Wiley & Sons, NY, 1994。进一步的,本发明的所述 TCR,多肽,和蛋白中的一些(包括其功能部分和功能变体)可以从来源如植物,细菌,昆虫,哺乳动物,举例来说,大鼠,人,等分离和 / 或纯化。分离和纯化的方法是本领域公知的。备选地,在此描述的所述 TCR,多肽,和 / 或蛋白(包括其功能部分和功能变体)可以通过公司,如 Synpep (Dublin, CA), Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD), 和 Multiple Peptide Systems (San Diego, CA) 商业合成。在这方面,发明的 TCR,多肽,和蛋白可以是合成的,重组的,分离的,和 / 或纯化的。

[0065] 包括在本发明的范围内的是偶联物,举例来说,生物偶联物,包含任何发明的 TCR,多肽,或蛋白(包括其任何所述功能部分或变体),核酸,重组表达载体,宿主细胞,宿主

细胞群,或抗体,或其抗原结合部分。通常偶联物,和合成偶联物的方法,是本领域已知的(参见,例如,Hudecz, F., Method Mol.Biol. 298:209-223(2005)和Kirin等, Inorg Chem. 44(15):5405-5415(2005))。

[0066] 由如在此使用的“核酸”包括“多核苷酸,”“寡核苷酸,”和“核酸分子,”并且通常意为DNA或RNA的聚合物,所述DNA或RNA可以是单链的或双链的,合成的或从天然来源获得的(举例来说,分离的和/或纯化的),其可以包含天然的,非天然的或改变的核苷酸,并且其可以包含天然的,非天然的或改变的核苷酸间连接,如氨基磷酸酯连接或硫代磷酸酯连接替代在未修饰的寡核苷酸之间建立的磷酸二酯。通常优选所述核酸不包含任何插入,缺失,倒位和/或取代。然而,如在此讨论的,在一些情况下,对于核酸其可以是合适的以包含一个或更多插入,缺失,倒位和/或取代。

[0067] 优选地,本发明的核酸是重组的。如在此使用的,术语“重组”指(i)在活细胞外通过连接天然的或合成的核酸片段与可以在活细胞中复制的核酸分子来构建的分子,或(ii)由描述于以上(i)中的那些复制产生的分子。为了在此的目的,所述复制可以是体外复制或体内复制。

[0068] 所述核酸可以基于化学合成和/或酶连接反应使用本领域已知的工艺构建。参见,例如,Sambrook等,在前,和Ausubel等,在前。例如,核酸可以使用天然存在的核苷酸或设计以增加分子的生物稳定性或以增加杂交时形成的双链的物理稳定性的不同修饰的核苷酸(举例来说,硫代磷酸酯衍生物和吡啶代核苷酸)来化学合成。可以用于产生核酸的修饰的核苷酸的例子包括,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-硫尿嘧啶,5-羧甲基氨基甲基尿嘧啶,二氢尿嘧啶, β -D-半乳糖基 queosine,肌苷, N^6 -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, N^6 -替代腺嘌呤,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 queosine,5'-甲氧基羧甲基尿嘧啶,5-甲氧基尿嘧啶,2-甲基硫代- N^6 -异戊烯基腺嘌呤,尿嘧啶-5-羧乙酸(v),wybutoxosine,假尿嘧啶,queosine,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-羧乙酸甲基酯,3-(3-氨基-3-N-2-羧基丙基)尿嘧啶,和2,6-二氨基嘌呤。备选地,本发明的一种或更多核酸可以从公司购买,如Macromolecular Resources(Fort Collins, CO)和Synthegen(Houston, TX)。

[0069] 所述核酸可以包含编码在此描述的任何所述TCR,多肽,或蛋白,或其功能部分或功能变体的任何核苷酸序列。例如,所述核酸可以包含核苷酸序列SEQ ID NO:46-49的任何一个或更多,由核苷酸序列SEQ ID NO:46-49的任何一个或更多组成,或基本上由核苷酸序列SEQ ID NO:46-49的任何一个或更多组成。

[0070] 本发明还提供包含与在此描述的任何所述核酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列或与在此描述的任何所述核酸的核苷酸序列在严格条件下杂交的核苷酸序列的核酸。

[0071] 所述在严格条件下杂交的核苷酸序列优选在高度严格条件下杂交。由“高度严格条件”意为所述核苷酸序列以强于非特异杂交的可检测的量特异杂交于靶序列(在此描述的任何所述核酸的核苷酸序列)。高度严格条件包括将多核苷酸与正好互补序列区分,或将仅包含一些分散的错配的序列与偶尔具有一些匹配核苷酸序列的小的区域(举例来说,

3-10 个碱基)的随机序列区分的条件。此种小的互补区域比 14-17 或更多碱基的全长互补更易于融入,且高度严格条件使它们易于区别。相对地,高度严格条件将包括,例如,低盐和/或高温条件,如在约 50-70°C 的温度下,由约 0.02-0.1MNaCl 或相当的量提供的。即便有,此种高度严格条件允许所述核苷酸序列和模板或靶链之间很小的错配,并且尤其适于检测任何发明的 TCR 的表达。通常理解所述条件可以通过加入增加的甲酰胺的量使变得更严格。

[0072] 本发明还提供包含与在此描述的任何所述核酸为至少约 70%或更多,举例来说,约 80%,约 90%,约 91%,约 92%,约 93%,约 94%,约 95%,约 96%,约 97%,约 98%,或约 99%相同的核苷酸序列的核酸。

[0073] 本发明的所述核酸可以整合入重组表达载体。在这点上,本发明提供包含本发明的任何所述核酸的重组表达载体。为了在此的目的,术语“重组表达载体”意为遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,当包含编码所述 mRNA,蛋白,多肽,或肽,和载体的核苷酸序列的构建体在足以使得所述 mRNA,蛋白,多肽,或肽在细胞中表达的条件下与所述细胞接触时,其允许通过宿主细胞表达 mRNA,蛋白,多肽,或肽。本发明的载体总体上不是天然存在的。然而,载体的部分可以是天然存在的。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,其可以是单链的或双链的,合成的或部分获自天然来源且,其可以包含天然的,非天然的或改变的核苷酸。所述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接,或两种类型的连接。优选地,所述非天然存在的或改变的核苷酸或核苷酸间连接不妨碍载体的转录或复制。

[0074] 本发明的重组表达载体可以是任何合适的重组表达载体,并可以用于转化或转染任何合适的宿主。合适的载体包括为增殖和扩增或为表达或二者设计的那些,如质粒和病毒。所述载体可以选自由以下组成的组:pUC 系列 β (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。植物表达载体的例子包括 pBI01, pBI101.2, pBI101.3, pBI121 和 pBIN19 (Clontech)。动物表达载体的例子包括 pEUK-C1, pMAM 和 pMAMneo (Clontech)。优选地,所述重组表达载体是病毒载体,举例来说,逆转录病毒载体。

[0075] 本发明的重组表达载体可以使用描述于例如, Sambrook 等,在前,和 Ausubel 等,在前中的标准重组 DNA 技术制备。可以制备环形或线形表达载体的构建体以包含在原核或真核宿主细胞中行使功能的复制系统。复制系统可以源自,举例来说,ColE1, 2 μ 质粒, λ , SV40, 牛乳头瘤病毒等。

[0076] 理想地,所述重组表达载体包含调控序列,如转录和翻译起始和终止密码子,所述调控序列是宿主类型(举例来说,细菌,真菌,植物,或动物)特异的,酌情并考虑载体是否是基于 DNA 或 RNA 将所述载体整合入所述宿主中。

[0077] 所述重组表达载体可以包括允许用于筛选转化或转染的宿主的一种或更多标志物基因。标志物基因包括生物杀灭剂抗性,举例来说,对抗生素,重金属的抗性,等,在营养缺陷型宿主中补充以提供原养型等。用于发明的表达载体的合适的标志物基因包括,例如,新霉素/G418 抗性基因,潮霉素抗性基因,组胺醇抗性基因,四环素抗性基因,和氨苄青霉

素抗性基因。

[0078] 所述重组表达载体可以包含天然或非天然启动子,所述启动子可操作连接于编码所述 TCR,多肽,或蛋白(包括其功能部分和功能变体)的核苷酸序列,或与编码所述 TCR,多肽,或蛋白核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列。启动子的选择,举例来说,强,弱,可诱导,组织特异的和发育特异的,在技术人员的普通技术内。类似的,核苷酸序列与启动子的组合也在技术人员的普通技术内。所述启动子可以是非病毒启动子或病毒启动子,举例来说,巨细胞病毒(CMV)启动子,SV40启动子,RSV启动子,和发现于鼠干细胞病毒的长末端重复中的启动子。

[0079] 发明的重组表达载体可以为瞬时表达,稳定表达之一,或二者设计。同样,所述重组表达载体可以为构成型表达或诱导型表达制备。进一步的,所述重组表达载体可以制备以包括自杀基因。

[0080] 如在此使用的,术语“自杀基因”指引起表达所述自杀基因的细胞死亡的基因。所述自杀基因可以是使表达该基因的细胞具有对试剂(举例来说,药物)的敏感性,并当细胞与所述试剂接触或暴露于所述试剂时导致细胞死亡的基因。自杀基因是本领域已知的(参见,例如, Suicide Gene Therapy :Methods and Reviews, Springer, Caroline J. (Cancer Research UK Centre for Cancer Therapeutics at the Institute of Cancer Research, Sutton, Surrey, UK), Humana Press, 2004) 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,和硝基还原酶。

[0081] 本发明的另一个实施方案进一步提供包含任何在此描述的重组表达载体的宿主细胞。如在此使用的,术语“宿主细胞”指可以包含发明的重组表达载体的任何类型的细胞。所述宿主细胞可以是真核细胞,举例来说,植物,动物,真菌,或藻类,或可以是原核细胞,举例来说,细菌或原生动物。所述宿主细胞可以是培养的细胞或原代细胞,即,直接分离自生物体,举例来说,人。所述宿主细胞可以是粘着细胞或悬浮细胞,即,在悬浮液中生长的细胞。合适的宿主细胞是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。为了扩增或复制所述重组表达载体,所述宿主细胞优选地为原核细胞,举例来说, DH5 α 细胞。为了生产重组 TCR,多肽,或蛋白,所述宿主细胞优选地为哺乳动物细胞。最优选地,所述宿主细胞为人细胞。同时宿主细胞可以是任何细胞类型的,可以源自任何类型的组织,并且可以是任何发育阶段的,宿主细胞优选地为外周血淋巴细胞(PBL)或外周血单核细胞(PBMC)。更优选地,所述宿主细胞为 T 细胞。

[0082] 为了在此的目的,所述 T 细胞可以是任何 T 细胞,如培养的 T 细胞,举例来说,原代 T 细胞,或源自培养的 T 细胞系的 T 细胞,举例来说, Jurkat, SupT1, 等,或获自哺乳动物的 T 细胞。如果获自哺乳动物,所述 T 细胞可以获自许多来源,包括但不限于血液,骨髓,淋巴结,胸腺,或其它组织或液体。T 细胞还可以是富集的或纯化的。优选地,所述 T 细胞是人 T 细胞。更优选地,所述 T 细胞是分离自人的 T 细胞。所述 T 细胞可以是任何类型的 T 细胞且可以为任何发育阶段的,包括但不限于, CD4⁺/CD8⁺ 双阳性 T 细胞, CD4⁺ 辅助 T 细胞, 举例来说, Th₁ 和 Th₂ 细胞, CD8⁺ T 细胞(举例来说,细胞毒性 T 细胞),肿瘤浸润淋巴细胞(TIL),记忆 T 细胞(举例来说,中央记忆 T 细胞和效应记忆 T 细胞),天然 T 细胞等。优选地,所述 T 细胞为 CD8⁺ T 细胞或 CD4⁺ T 细胞。

[0083] 由本发明还提供的是包含至少一个在此描述的宿主细胞的细胞群。所述细胞群可

以是包含除了至少一个其它细胞（举例来说，不包含任何重组表达载体的宿主细胞（举例来说，T 细胞），或除了 T 细胞之外的细胞，举例来说，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）之外的包含任何描述的重组表达载体的所述宿主细胞的异质群体。备选地，所述细胞群可以是基本上同质群体，其中，所述群体主要包含包含所述重组表达载体的宿主细胞（举例来说，基本由其组成）。所述群体还可以是克隆细胞群，其中所述群体的所有细胞是单个包含重组表达载体的宿主细胞的克隆，这样以至于所述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，所述细胞群是包含包含如在此描述的重组表达载体的宿主细胞的克隆群体。

[0084] 本发明进一步提供抗体，或其抗原结合部分，其特异结合任何在此描述的所述 TCR 的功能部分。优选地，所述功能部分特异结合所述癌症抗原，举例来说，所述功能部分包含氨基酸序列 SEQ ID NO :5, 16, 26, 或 36 (α 链的 CDR1), 6, 17, 27, 或 37 (α 链的 CDR2), 7, 18, 28, 或 38 (α 链的 CDR3), 8, 19, 29, 或 39 (β 链的 CDR1), 9, 20, 30, 或 40 (β 链的 CDR2), 10, 21, 31, 或 41 (β 链的 CDR3), SEQ ID NO :11, 22, 32, 或 42 (α 链的可变区), SEQ ID NO :12, 23, 33, 或 43 (β 链的可变区), 或其组合，举例来说，5-7 ; 8-10 ; 5-10 ; 16-18, 19-21 ; 16-21 ; 26-28 ; 29-31 ; 26-31 ; 36-38 ; 39-41 ; 或 36-41。更优选地，所述功能部分包含 SEQ ID NO : 5-10 或 SEQ ID NO :26-31 的氨基酸序列。在一个优选的实施方案中，所述抗体，或其抗原结合部分，结合由所有 6 个 CDR (α 链的 CDR1-3 和 β 链的 CDR1-3) 组成的表位。所述抗体可以是本领域已知的任何类型的免疫球蛋白。例如，所述抗体可以是任何同种型的，举例来说，IgA, IgD, IgE, IgG, IgM, 等。所述抗体可以是单克隆的或多克隆的。所述抗体可以是天然存在的抗体，举例来说，分离和 / 或纯化自哺乳动物（举例来说，小鼠，兔，山羊，马，鸡，仓鼠，人，等）的抗体。备选地，所述抗体可以是遗传改造的抗体，举例来说，人源化抗体或嵌合抗体。所述抗体可以是以单体的或多聚体的形式。同样，所述抗体可以对发明的 TCR 的所述功能部分具有任何水平的亲和力 (affinity) 或亲和力 (avidity)。理想地，所述抗体是对发明的 TCR 的所述功能部分特异的，这样以至于与其它肽或蛋白存在最小的交叉反应。

[0085] 检测抗体结合发明的 TCR 的任何功能部分的能力的方法是本领域已知的并且包括任何抗体 - 抗原结合测定法，如，例如，放射性免疫测定 (RLA), ELISA, 蛋白质印迹，免疫沉淀，和竞争抑制测定（参见，举例来说，Janeway 等，在下文，和美国专利申请公开号 2002/0197266A1）。

[0086] 制备抗体的合适的方法是本领域已知的。例如，标准的杂交瘤方法描述于，举例来说，**Köhler** 和 Milstein, Eur. J. Immunol., 5, 511-519 (1976), Harlow 和 Lane (eds.), Antibodies: A Laboratory Manual, CSH Press (1988), 和 C. A. Janeway 等 (eds.), Immunobiology, 第五次编辑, Garland Publishing, New York, NY (2001)。备选地，其它方法，如 EBV- 杂交瘤方法 (Haskard 和 Archer, J. Immunol. Methods, 74 (2), 361-67 (1984), 和 Roder 等, Methods Enzymol., 121, 140-67 (1986)), 和噬菌体载体表达系统（参见，举例来说，Huse 等, Science, 246, 1275-81 (1989)）是本领域已知的。进一步地，在非人动物中生产抗体的方法描述于，举例来说，美国专利 5, 545, 806, 5, 569, 825, 和 5, 714, 352, 和美国专利申请公开号 2002/0197266A1。

[0087] 噬菌体展示此外可以用于产生本发明的抗体。在这点上，编码抗体的抗原 - 结合可变 (V) 结构域的噬菌体文库可以使用标准的分子生物学和重组 DNA 技术（参见，举例来

说, Sambrook 等 (eds.), MolecularCloning, A Laboratory Manual, 第三版, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York (2001)) 产生。选择特异结合于需要的抗原的编码具有需要的特异性的可变区的噬菌体, 并且重组完全或部分抗体为包含选择的可变结构域。编码重组抗体的核酸序列引入合适的细胞系, 如用于杂交瘤生产的骨髓瘤细胞, 这样以至于具有单克隆抗体的特征的抗体由所述细胞分泌的 (参见, 举例来说, Janeway 等, 在前, Huse 等, 在前, 和美国专利 6,265,150)。

[0088] 抗体可以由转基因小鼠生产, 所述转基因小鼠对特定重和轻链免疫球蛋白基因是转基因的。此种方法是本领域已知的并描述于, 例如美国专利 5,545,806 和 5,569,825, 和 Janeway 等, 在前。

[0089] 用于产生人源化抗体的方法是本领域公知的并详细描述于, 例如, Janeway 等, 在前, 美国专利 5,225,539, 5,585,089 和 5,693,761, 欧洲专利号 0239400B1, 和英国专利号 2188638。人源化的抗体还可以使用描述于例如, 美国专利 5,639,641 和 Pedersen 等, J. Mol. Biol., 235,959-973 (1994) 中的抗体表面重建技术产生。

[0090] 本发明还提供任何在此描述的抗体的抗原结合部分。所述抗原结合部分可以是具有至少一个抗原结合位点 (如 Fab, F(ab')₂, dsFv, sFv; 二体 (diabodies), 和三体 (triabodies)) 的任何部分。

[0091] 单链可变区片段 (sFv) 抗体片段可以使用常规重组 DNA 工艺技术产生 (参见, 举例来说, Janeway 等, 在前), 所述 sFv 由包含通过合成的肽连接于轻抗体链的 V 结构域的抗体重链的可变 (V) 结构域的截短的 Fab 片段组成。类似的, 二硫键稳定的可变区片段 (dsFv) 可以通过重组 DNA 技术制备 (参见, 举例来说, Reiter 等, Protein Engineering, 7, 697-704 (1994))。然而, 本发明的抗体片段不限于这些典型类型的抗体片段。

[0092] 并且, 所述抗体, 或其抗原结合部分, 可以修饰以包含可检测标签, 如, 例如, 放射性同位素, 荧光团 (举例来说, 异硫氰酸荧光素 (FITC), 藻红蛋白 (PE)), 酶 (举例来说, 碱性磷酸酶, 辣根过氧化物酶), 和元素颗粒 (举例来说, 金颗粒)。

[0093] 发明的 TCR, 多肽, 蛋白, (包括其功能部分和功能变体), 核酸, 重组表达载体, 宿主细胞 (包括其群体), 和抗体 (包括其抗原结合部分), 可以是分离的和 / 或纯化的。如在此使用的术语 " 分离的 " 意为已从其天然环境中移除。如在此使用的术语 " 纯化的 " 意为已在纯度方面增加, 其中 " 纯度 " 是相对的术语, 并不必然理解为绝对的纯度。例如, 所述纯度可以是至少约 50%, 可以是大于 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, 或可以是 100%。

[0094] 发明的 TCR, 多肽, 蛋白 (包括其功能部分和变体), 核酸, 重组表达载体, 宿主细胞 (包括其群体), 和抗体 (包括其抗原结合部分), 其全体在下文中共同指为 " 发明的 TCR 材料 ", 可以配制为组合物, 如药物组合物。在这点上, 本发明提供包含任何所述 TCR, 多肽, 蛋白, 功能部分, 功能变体, 核酸, 表达载体, 宿主细胞 (包括其群体), 和抗体 (包括其抗原结合部分), 和药学可接受的载体的药物组合物。包含任何发明的 TCR 材料的发明的药物组合物可以包含多于一种发明的 TCR 材料, 举例来说, 多肽和核酸, 或两种或更多不同的 TCR。备选地, 所述药物组合物可以包含与其它药学活性试剂或药物组合的发明的 TCR 材料, 所述其它其它药学活性试剂或药物如化学疗法试剂, 举例来说, 天门冬氨酰胺, 白消胺, 卡铂, 顺铂, 正定霉素, 阿霉素, 氟尿嘧啶, 吉西他宾, 羟基脲, 氨甲喋呤, 紫杉醇, 利妥昔单抗, 长春碱, 长春新碱, 等。

[0095] 优选地,所述载体是药学可接受的载体。至于药物组合物,所述载体可以是任何那些方便使用且仅由化学-物理的考虑(如溶解性和缺少与活性化合物的反应性)和由给药方式限制的载体。在此描述的所述药学可接受的载体,例如,载体(vehicles),佐剂,赋形剂,和稀释剂是本领域技术人员公知的且对于公众容易获得。优选所述药学可接受的载体为化学插入活性试剂的载体和在使用条件下不具有有害副作用或毒性的载体。

[0096] 载体的选择将部分由特定的发明的 TCR 材料和由用于施用发明的 TCR 材料的特定的方法决定。因此,存在多种本发明的药物组合物的合适的制剂。以下用于口服,气溶胶,肠胃外,皮下,静脉内,肌肉内,动脉内,鞘内和腹膜间的制剂是典型的且决没限制。可以使用多于一种途径以施用发明的 TCR 材料,在一些实例中,特定的途径可以比其它途径提供更直接和更有效的反应。

[0097] 局部制剂对于本领域技术人员是公知的。此种制剂在本发明的范围内尤其适于施用于皮肤。

[0098] 适于口腔给药的制剂可以由以下组成,(a) 液体溶液,所述液体溶液如溶于稀释剂的有效量的发明的 TCR 材料,所述稀释剂如水,盐水,或橙汁;(b) 胶囊剂,袋剂,片剂,糖锭(lozenges),和锭剂(troches),每个包含以固体或料粒形式的预定量的活性成分;(c) 粉末;(d) 在合适液体中的悬液;和(e) 合适的乳状液。液体制剂可以包括稀释剂,如水和酒精,例如,乙醇,苯甲醇,和聚乙烯醇,加入或不加入药学可接受的表面活性剂。胶囊剂形式可以是普通的硬或软壳凝胶型,其包含,例如,表面活性剂,润滑剂,和惰性填料,如乳糖,蔗糖,磷酸钙,和玉米淀粉。片剂形式可以包括乳糖,蔗糖,甘露糖,玉米淀粉,马铃薯淀粉,海藻酸,微晶纤维素,阿拉伯胶,明胶,瓜尔胶,胶体二氧化硅,交联羧甲基纤维素钠,滑石,硬脂酸镁,硬脂酸钙,硬脂酸锌,硬脂酸和其它赋形剂,着色剂,稀释剂,缓冲剂,崩解剂,湿润剂,防腐剂,调味剂和其它药学可容的赋性剂的一种或更多。糖锭(Lozenge)形式可以在香料中包含发明的 TCR 材料,所述香料通常为蔗糖,和阿拉伯胶或黄芪胶,且锭剂(pastilles)在惰性基质中包含发明的 TCR 材料,所述惰性基质如明胶和甘油,或蔗糖和阿拉伯胶,乳状液,胶和包含作为本领域已知的此种赋形剂外的类似物。

[0099] 发明的 TCR 材料,单独或与其他合适的组分组合,可以制备为气溶胶制剂以通过吸入给药。这些气溶胶制剂可以置于加压可接受的推进器中,如二氯二氟甲烷,丙烷,氮等。其还可以配制为用于常压制备的药物,如在喷雾器(nebulizer)或喷雾器(atomizer)中。此种喷雾制剂还用于用于喷射粘液。

[0100] 适于肠胃外给药的制剂包括水性的或非水性的等渗无菌注射溶液,其可以包含抗氧化剂,缓冲剂,抑菌剂,和使制剂与目标受体的血液等渗的溶质,和可以包括悬浮剂,增溶剂,增稠剂,稳定剂和防腐剂的水性的和非水性的无菌悬液。发明的 TCR 材料可以以药学载体中的生理学可接受的稀释剂施用,所述稀释剂如无菌液体或液体的混合物,包括水,盐水,含水葡萄糖,和相关的糖溶液,酒精,如乙醇或十六烷基醇,乙二醇,如丙二醇或聚乙烯醇,二甲基亚砷,甘油,缩酮如 2,2-二甲基-1,3-二氧戊烷-4-甲醇,醚,聚(乙烯醇)400,油,脂肪酸,脂肪酸酯或甘油酯,或加或不加药学可接受的表面活性剂的乙酰化脂肪酸甘油酯,所述表面活性剂,如脂肪酸盐或去污剂,悬浮剂,如果胶,卡波姆,甲基纤维素,羟丙基甲基纤维素,或羧甲基纤维素,或乳化剂和其它药学佐剂。

[0101] 可以用在肠胃外制剂中的油包括石油,动物、植物、或合成的油。油特别的例子包

括花生,大豆,芝麻,棉籽,玉米,橄榄,石蜡油和矿物油。用于用在肠胃外制剂中的合适的脂肪酸包括油酸,硬脂酸和异硬脂酸。油酸乙酯和豆蔻酸异丙酯是合适的脂肪酸酯的实例。

[0102] 供在肠胃外制剂中使用的合适的脂肪酸盐包括脂肪碱金属,铵,和三乙醇铵盐,且合适的去污剂包括 (a) 阳离子去污剂如,例如,二甲基二烷基卤化铵,和卤代烷基吡啶, (b) 阴离子去污剂如,例如,烷基、芳基、和烯磺酸盐,烷基、烯、醚、和单酸甘油酯硫酸盐,和磺基丁二酸酯, (c) 非离子去污剂如,例如,氧化脂肪胺,脂肪酸链烷醇酰胺,和聚氧乙烯聚丙烯共聚物, (d) 两性去污剂如,例如,烷基- β -氨基丙酸酯,和 2-烷基-咪唑啉季铵盐,和 (e) 其混合物。

[0103] 典型地,肠胃外制剂以发明的 TCR 材料在溶液中的重量计将包含从约 0.5% 到约 25%,或更多。可以使用防腐剂和缓冲剂。为了最小化或消除在注射位点的刺激,此种组合物可以包含一种或更多非离子型表面活性剂,所述表面活性剂具有亲油亲酯平衡 (HLB) 为从约 12 到约 17。在此种制剂中表面活性剂的质量以重量计典型地在约 5% 到约 15% 范围内。合适的表面活性剂包括聚乙二醇脱水山梨糖醇脂肪酸酯,如脱水山梨糖醇单油酸酯和通过环氧丙烷与丙二醇的缩合形成的环氧乙烷与疏水性基质的高分子量加合物。所述肠胃外制剂可以以单位剂量或多剂量密封的容器(如安瓿和小瓶)提供,并且可以储藏在冷冻干燥(冻干)的条件,所述条件仅需要在使用前直接加入无菌液体赋形剂,例如,用于注射的水。可以从之前描述种类的无菌粉末,料粒和片剂制备临时的注射溶液和悬液。

[0104] 可注射制剂与本发明一致。对于可注射组合物的有效药理学载体的需求是本领域普通技术人员公知的(参见,举例来说,Pharmaceutics and Pharmacy Practice, J. B. Lippincott Company, Philadelphia, PA, Banker and Chalmers, eds., 第 238-250 页 (1982),和 ASHP Handbook on Injectable Drugs, Toissel, 第四版,第 622-630 页 (1986))。优选地,当施用细胞,举例来说, T 细胞时,所述细胞通过注射施用。

[0105] 本领域技术人员将理解,除了以上描述的药物组合物之外,本发明的发明的 TCR 材料可以配置为包含复合物,如环糊精包含复合物,或脂质体。

[0106] 为了本发明,施用的发明的 TCR 材料的量或剂量应当是足以产生效果的,举例来说,在受试者或动物中在合适的时间范围内的治疗或预防反应。例如,发明的 TCR 材料的剂量应当足以结合癌症抗原,或在从给药时间开始从约 2 小时或更长,举例来说,12 到 24 或更多小时的时期内检测,治疗或预防癌症。在一些实施方案中,所述时期可以甚至更长。剂量将由特定的发明的 TCR 材料的功效和动物(举例来说,人)的状况,以及被治疗动物(举例来说,人)的体重决定。

[0107] 很多用于确定给药剂量的测定法是本领域已知的。为了本发明,可以使用测定法确定施用于哺乳动物的起始剂量,所述测定法包含在向一组哺乳动物(其中每个给予不同剂量的 T 细胞)中的哺乳动物施用给定剂量的此种 T 细胞时,比较靶细胞溶解的程度或由表达发明的 TCR,多肽,或蛋白的 T 细胞分泌 IFN- γ 的程度。当施用一定剂量时,靶细胞溶解和/或分泌 IFN- γ 的程度可以由在本领域中已知的方法测试。

[0108] 发明的 TCR 材料的剂量还将由任何可能伴随施用特定的发明的 TCR 材料的有害的副作用的存在,性质和程度决定。典型地,主治医生将考虑多种因素(如年龄,体重,基本健康状况,饮食,性别,施用的发明的 TCR 材料,给药途径和被治疗病状的严重度)决定用于治疗个体患者的发明的 TCR 材料的剂量。例如且不意在限制本发明,发明的 TCR 材料的剂量

可以为约 0.001 到约 1000mg/kg 被治疗受试者的体重 / 天或更多,从约 0.01 到约 10mg/kg 体重 / 天或更多,或约 0.01mg 到约 1mg/kg 体重 / 天或更多。在一个实施方案中,其中发明的 TCR 材料为细胞群,施用的细胞的数量可以改变,举例来说,从约 1×10^6 到约 1×10^{11} 细胞或更多。

[0109] 本领域普通技术人员将容易理解,本发明的发明的 TCR 材料可以以许多方式修饰,这样以至于通过修饰增加发明的 TCR 材料的治疗或预防功效。例如,发明的 TCR 材料可以直接或间接通过桥偶联于靶向部分。偶联化合物(举例来说,发明的 TCR 材料对靶向部分)的实施是本领域已知的。参见,例如, Wadwa 等, J. Drug Targeting 3:111(1995) 和美国专利 5,087,616。如在此使用的术语“靶向部分”,指特异识别和结合细胞表面受体,以至于所述靶向部分引导发明的 TCR 材料向表面表达受体的细胞群递送的任何分子或试剂。靶向部分包括,但不限于,结合细胞表面受体(举例来说,上皮生长因子受体(EGFR), T 细胞受体(TCR), B 细胞受体(BCR), CD28, 血小板源性生长因子受体(PDGF), 烟碱乙酰胆碱受体(nAChR), 等)的抗体,或其片段,肽,激素,生长因子,细胞因子,和任何其它天然或非天然的配体。如在此使用的术语“桥”,指连接发明的 TCR 材料到靶向部分的任何试剂或分子。本领域普通技术人员公认发明的 TCR 材料上的对发明的 TCR 材料的功能是不必需的位点,是用于附加桥和 / 或靶向部分理想的位点,条件是桥和 / 或靶向部分附于发明的 TCR 材料时,不影响发明的 TCR 材料的功能,即,结合 MAGE-A3 或 MAGE-A12 ;或检测,治疗,或预防癌症的能力。

[0110] 备选地,发明的 TCR 材料可以修饰为储藏形式,这样以至于发明的 TCR 材料释放于其所施用的体内的方式相对于体内的时间和位置是可控的(参见,例如,美国专利 4,450,150)。发明的 TCR 材料的储藏形式可以是,例如,包含本发明的 TCR 材料和多孔的或非多孔的材料(例如聚合物)的可植入组合物,其中本发明的 TCR 材料由材料形成胶囊或分散于整个材料和 / 或非多孔材料的降解物。储存物随后移植于身体内需要的部位,且本发明的 TCR 材料以预定的速率从所述移植物中释放。

[0111] 预期发明的药物组合物, 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方法中。不受特别的理论限制, 相信发明的 TCR 特异结合于 MAGE-A3, MAGE-A12, 这样以至于所述 TCR(或相关的发明的多肽或蛋白)当由细胞表达时能够介导针对表达 MAGE-A3 或 MAGE-A12 的靶细胞的免疫反应。在这点上, 本发明提供在宿主中治疗或预防癌症的方法, 包含以在宿主中的治疗或预防癌症的有效量向宿主施用在此描述的任何的药物组合物, TCR, 多肽, 或蛋白, 包含编码在此描述的任何所述 TCR, 多肽, 蛋白的核苷酸序列的任何核酸或重组表达载体, 或包含编码在此描述的任何所述 TCR, 多肽, 或蛋白的重组载体的任何宿主细胞或细胞群。

[0112] 如在此使用的术语“治疗,”和“预防”以及从其衍生的词不一定意为 100% 或完全的治疗或预防。反而, 存在变化的治疗或预防程度, 所述程度为本领域普通技术人员公认具有潜在的好处或治疗效果。在这方面, 发明的方法可以提供宿主中癌症的任何水平的治疗或预防的量。此外, 由发明的方法提供的治疗或预防可以包括疾病(例如, 治疗或预防的癌症)的一个或更多病状或症状的治疗或预防。并且, 为了在此的目的, “预防”可以包括延迟疾病或其症状或病状的开始。

[0113] 还提供的是在宿主中检测癌症的存在的方法。所述方法包含 (i) 包含癌症细胞的

样品与在此描述的任何发明的 TCR, 多肽, 蛋白, 核酸, 重组表达载体, 宿主细胞, 细胞群, 或抗体或其抗原结合部分接触, 从而形成复合物, 并检测所述复合物, 其中复合物的检出指征宿主中癌症的存在。

[0114] 关于宿主中发明的检测癌症的方法, 癌症细胞的样品可以是包含完整细胞, 其溶胞产物, 或全细胞溶胞产物的部分 (例如, 核的或细胞质部分, 全部蛋白部分, 或核酸部分) 的样品。

[0115] 为了发明的检测方法, 所述接触可以发生在相对于宿主的体外或体内。优选的, 所述接触是体外的。

[0116] 此外, 复合物检测可以通过在本领域中已知的很多方式发生。例如, 在此描述的本发明的 TCR, 多肽, 蛋白, 核酸, 重组表达载体, 宿主细胞, 细胞群, 或抗体或其抗原结合部分可以用可检测标签标记, 所述标签如, 例如, 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)。

[0117] 为了发明的方法, 其中施用宿主细胞或细胞群体, 所述细胞可以是与宿主异源或自体同源的细胞。优选地, 所述细胞与宿主自体同源。

[0118] 至于发明的方法, 所述癌症可以是任何癌症, 包括肉瘤 (举例来说, 滑膜肉瘤, 骨源性肉瘤, 子宫平滑肌肉瘤, 和腺泡状横纹肌肉瘤), 淋巴瘤 (举例来说, 霍奇金淋巴瘤和非霍奇金淋巴瘤), 肝细胞癌, 神经胶质瘤, 头部癌症 (举例来说, 鳞状细胞癌), 颈部癌症 (举例来说, 鳞状细胞癌), 急性淋巴癌, 白血病 (举例来说, 急性髓细胞样白血病和慢性淋巴细胞白血病), 骨癌, 脑癌, 乳腺癌, 肛门、肛门管或肛门直管的癌症, 眼部的癌症, 肝内胆管的癌症, 关节的癌症, 颈部、胆囊或胸膜的癌症, 鼻、鼻腔或中耳的癌症, 口腔的癌症, 阴户的癌症, 慢性髓样癌, 结肠癌 (举例来说, 结肠恶性肿瘤), 食道癌, 宫颈癌, 胃癌, 胃与肠的类癌瘤, 下咽癌, 喉癌, 肝癌 (举例来说, 肝细胞癌), 肺癌 (举例来说, 非小细胞肺癌), 恶性间皮瘤, 黑色素瘤, 多发性骨髓瘤, 鼻咽癌, 卵巢癌, 胰腺癌, 腹膜癌, 网膜和肠系膜癌, 咽癌, 前列腺癌, 直肠癌, 肾癌 (举例来说, 肾细胞癌), 小肠癌, 软组织癌, 胃癌, 睾丸癌, 甲状腺癌, 和泌尿道上皮癌 (举例来说, 输尿管癌症和膀胱癌) 的任一种。

[0119] 发明的方法中宿主指代的可以是任何宿主。优选地, 宿主是哺乳动物。如在此使用的, 术语“哺乳动物”指任何哺乳动物, 包括, 但不限于, 但不限于, 啮齿目的哺乳动物, 例如小鼠和仓鼠, 和兔形目的哺乳动物, 例如兔。优选的, 所述哺乳动物源自食肉目, 包括猫科的 (猫) 和犬科的 (狗)。更优选的, 所述哺乳动物源自偶蹄目, 包括牛科的 (母牛) 和猪科的 (猪) 或奇蹄目的, 包括马科的 (马)。最优选的, 所述哺乳动物是灵长类的, Ceboids, 或 Simoids (猴) 或类人目的 (人和猿)。特别优选的哺乳动物为人。

[0120] 以下实施例进一步说明本发明, 但当然不应理解为以任何方式限制其范围。

[0121] 实施例 1

[0122] 该实施例表明源自 T 细胞克隆的 TCR 基因的克隆和 TCR 构建体的产生。

[0123] 最初, 四个 T 细胞克隆鉴别为识别在显性 I 类 (class I) 等位基因 HLA-A*01 和 C*07 情况下的 MAGE-A 基因家族的表位。约 30% 的黑色素瘤患者群体表达 HLA-A*01, 且多于 95% 的 HLA-A*01⁺ 个体表达 HLA-A*0101 亚型, 同时多于 50% 黑色素瘤的患者表达两种显性 HLA-C*07 亚型, C*07 :01 和 C*07 :02 的一种。

[0124] 表达的 TCR α 和 β 链分离自两个克隆, A10 和 13-18, 其识别在 HLA-A*01 情况下的蛋白 MAGE-A3 的 168-176 残基 (MAGE-A3 :168-176)。此外, 识别对应于 MAGE-A12 蛋白的 170-178 残基 (MAGE-A12 :170-178) 的肽的 HLA-C*07 限制的 TCR 分离自克隆 502 和 FM8。

[0125] 编码功能性 TCR 的 α 和 β 链分离自两个 MAGE-A12 反应性, HLA-C*07 反应性 T 细胞克隆, PHIN LB831-501D/19, 表示为“502” (Heidecker 等, J. Immunol., 164 : 6041-6045 (2000)) 和“FM8” (Panelli 等, J. Immunol., 164 : 4382-4392 (2000)), 以及两个 MAGE-A3 反应性, HLA-A*01 限制的 T 细胞克隆, LAU147CTL1 或 810/A10, 表示为“A10” (Parmentier 等, Nat. Immunol., 11 : 449-454 (2010)) 和 NW1000AVP-113-18, 表示为“13-18”。简要地, 使用 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒 (Clontech, Mountain View, CA) 使用 oligo-dT 反转录分离自 T 细胞克隆的 RNA 为 cDNA。由所述 T 细胞克隆表达的所述 TCR α 和 β 链通过进行 5' -RACE 反应鉴定, 所述 5' -RACE 反应使用互补于所述 TCR α 链恒定区的引物 5' -CACTGTTGCTCTTGAA GTCC-3' (SEQ ID NO :55) 和互补于所述 TCR β 链恒定区的 5' -CAGGCAGTAT CTGGAGTCATTGAG-3' (SEQ ID NO :56) 与源自 SMART RNA 合成试剂盒的接头引物组合。测序 5' -RACE 产物之后, 全长的基因产物使用设计以扩增合适的全长 TCR α 和 β 链的特定的引物扩增。A10TCR 表达 AV12-1/BV24-1, 13-18 表达 AV12-3/BV15, 502TCR 表达 AV13-1/BV25-1, 且 FM8 表达 AV38-2/BV4-3。

[0126] 编码对四个 T 细胞克隆的每个的配对的 α 和 β 链的转录本插入 MSGV1 逆转录病毒表达载体。

[0127] 实施例 2

[0128] 该实施例表明表达抗 MAGE-A3TCR-A10 (SEQ ID NO :13 和 14) 和抗 MAGE-A3TCR13-18 (SEQ ID NO :24 和 25) 的细胞响应 HLA-A1+/MAGE-A3+ 细胞的反应性。

[0129] 评估抗 CD3 刺激的转导有 TCR-A10 (SEQ ID NO :46) 和 TCR13-18 (SEQ ID NO :48) 的 T 细胞识别一组表达 MAGE-A3 的 HLA-A*01+ 黑色素瘤细胞系的能力。未转导的 (UT) 和转导的细胞与不同肿瘤细胞系共培养过夜 (表 1A, 1B 和图 6A), 并测量干扰素- γ (IFN- γ) (pg/ml)。

[0130] 表 1A

[0131]

肿瘤	HLA-A*01	拷贝数 MAGE-A3
1860mel	+	12,100
397mel	+	32,700
SK23mel	+	18,400
2984mel	+	14,900
2951mel	+	12-300
A375mel	+	3,670

537mel	+	4,270
1300-A1mel	+	7,280
1300mel	-	13,600
2661RCC	+	< 1,000

[0132] 表 1B

[0133]

肿瘤	HLA-A*01	MAGE-A3
2984mel	+	+
397mel	+	+
2630mel	+	+
2556mel	+	+
526mel	-	+
624mel	-	+
2359mel	-	+
2661RCC	+	-

[0134]

[0135] 结果显示评估的八种 HLA-A*01+/MAGE-A3+ 黑色素瘤细胞系中的六种从 TCR A10 比从 TCR13-18- 转导的 T 细胞刺激更高的 IFN- γ 释放水平 (图 1A)。在 TCR- 转导的 T 细胞与两株表达相对低水平的 MAGE-A3, A375mel 和 537mel 的 HLA-A1+ 黑色素瘤细胞系共培养之后, 释放较低水平 IFN- γ , 而 TCRA10- 转导的 T 细胞响应这些靶细胞比 TCR13-18 转导的 T 细胞释放更高水平的 IFN- γ 。这些反应由 HLA-A1 限制, 因为缺乏 HLA-A1 表达的 1300mel, 未能刺激从 TCRA10 和 TCR13-18- 转导的细胞中 IFN- γ 释放, 然而通过用 HLA-A*01 转染亲本 1300mel 细胞系产生的细胞系 (指定为 1300-A1) 刺激从 TCR A10 和 TCR13-18 转导的 T 细胞中的 IFN- γ 释放。缺乏 MAGE-A3 表达的 HLA-A*01+ 肾癌细胞系, 2661RCC, 未能刺激从 TCR A10 和 TCR13-18 转导的 T 细胞中显著的 IFN- γ 释放。这些结果表明当与 MAGE-A3⁺/HLA-A1⁺ 靶细胞共培养时, 表达 TCRA10 的细胞比表达 TCR-13-18 的细胞释放更高水平的 IFN- γ 。这些结果还表明 TCR A10 和 TCR-13-18 在 MAGE-A3+/HLA-A1+ 靶细胞存在的情况下是刺激的。

[0136] 用转导的 PBMC 进行的共培养测定的结果表明 TCRA10- 转导的 T 细胞响应 HLA-A*01+/MAGE-A3+ 肿瘤细胞系 397mel, 2984mel, 和 2556mel, 产生高水平的 IFN- γ 。细胞因子水平介于产生自 TCR13-18 转导的 T 细胞的那些的五倍到十倍之间 (图 6A)。MAGE-A3+

但 HLA-A*01 阴性的细胞系 562,624 和 2359mel, 以及 MAGE-A3 阴性但 HLA-A*01+ 的肾癌细胞系 2661RCC 未能刺激从 TCR A10 或 13-18 转导的 T 细胞之一中的显著的细胞因子的水平 (图 6A)。

[0137] 使用定量 PCR 测定评估所述 TCR 的转导水平, 所述定量 PCR 测定使用基因组 DNA 与设计以特异检测 MSGV1 逆转录病毒 LTR 但不是人内源性逆转录病毒序列的正向 (SEQ ID NO:58) 和反向 (SEQ ID NO:59) 引物和探针 (SEQ ID NO:60) 进行。扩增产物的水平标准化于 PBMC 的正对照样品, 所述 PBMC 转导有针对 NY-ESO-1:157-165 表位的 TCR, 所述表位通过用 NY-ESO-1 四聚物染色估计为包含约 80% 转导的 T 细胞。

[0138] 在转导有 A10 或 13-18TCR 的 T 细胞的活性方面的差异似乎不是由于用两种 TCR 转导的频率方面的不同, 因为它们似乎是相当的 (图 6B)。此外, 转导有 A10TCR 的 T 细胞识别与最小浓度为 0.5nM 的 MAGE-A3168-176 肽孵育的靶细胞, 所述浓度比用于由转导有 13-18TCR 的细胞识别所需要的浓度低 10 倍 (图 6C), 表明 A10TCR 具有比 13-18TCR 更高的功能性亲和力。

[0139] 评估新鲜的, 未培养的肿瘤细胞刺激转导有 TCR A10 (SEQ ID NO:46) 或 DMF5 (针对 HLA-A*0201/MART-1:27-35T 细胞表位的 TCR) 之一的 T 细胞的能力。未转导的 (UT) 和转导的细胞与不同的新鲜肿瘤共培养, 并测量 IFN- γ (pg/ml)。

[0140] 结果表明 TCR A10 转导的 T 细胞识别四株测试的 HLA-A*01+/MAGE-A3+ 新鲜肿瘤 (FrTu2767, FrTu3178, FrTu2823 和 FrTu3068) 中的四株, 且 DMF5- 转导的 T 细胞识别测试的 HLA-A*0201+/MART-1+ 新鲜肿瘤细胞 (FrTu2851 和 FrTu3242) 二者 (图 1B)。所述 TCRA10 转导的 T 细胞未能识别 HLA-A*0201+ 新鲜肿瘤, 而 DMF5 转导的 T 细胞未能识别 HLA-A*01+ 新鲜肿瘤, 表明由 TCR A10 导致的 IFN- γ 分泌是 HLA-A1+/MAGE-A3+- 特异的反应。

[0141] 转导有 TCR A10 和 13-18 的 T 细胞识别六株 MAGE-A3+ 和 HLA-A*01+ 新鲜肿瘤 (FrTu), FrTu3178, 2767, 2823, 2830 和 3068 中的五株, 但不识别或者 FrTu2685 (缺乏 MAGE-A3 表达的 HLA-A*01+ 新鲜肿瘤) 或者三株缺乏 HLA-A*01 表达的 MAGE-A3+ 新鲜肿瘤, FrTu2181, 3242 和 2803 (图 7A; 表 1C)。

[0142] 表 1C

[0143]

新鲜肿瘤	HLA-A*01	MAGE-A3
3178	+	+
2767	+	+
2823	+	+
2830	+	+
3068	+	+
2268	+	+

2685	+	-
2181	-	+
3242	-	+
2803	-	+

[0144]

[0145] 实施例 3

[0146] 该实施例表明表达抗 MAGE-A12TCR502 (SEQ ID NO :34 和 35) 或抗 MAGE-A12TCR FM8 (SEQ ID NO :44 和 45) 的细胞响应与 HLA-Cw*07+/MAGE-A12+ 细胞的共培养的反应性。

[0147] 分离自两个患者 PBMC 样品的抗 CD3 刺激的 CD8⁺T 细胞用编码截短的人低亲和力神经生长因子受体 (NGFR) 的对照构建体转导, 评估 TCR502 (SEQ ID NO :47), 或 TCR FM8 (SEQ ID NO :49) 识别一组表达 MAGE-A12 的 Cw*07+ 黑色素瘤细胞系的能力。

[0148] MAGE-A12 基因产物的表达通过 Q-PCR 评估, 所述 Q-PCR 使用两条设计以特异扩增 MAGE-A12 基因产物而不是 MAGE-A 基因家族的其它成员的引物 (SEQ ID NO :61 和 62) 以及 MAGE-A12 特异的探针 (SEQ ID NO :63)。使用质粒对照作为用以评估拷贝数的标准和使用甘油醛 3- 磷酸脱氢酶 (GAPDH) 以标准化来确定抗原表达。表达大于 1,000 拷贝的 MAGE-A12 每 10⁶ 拷贝的 GAPDH 的肿瘤细胞系和新鲜肿瘤表示为对于 MAGE-A12 表达是阳性。

[0149] 转导的细胞与不同肿瘤细胞系 (表 2A ; 图 6D 和 6F) 共培养过夜, 并测量 IFN- γ (pg/ml)。

[0150] 表 2A

[0151]

刺激物	HLA-C 等位基因	MAGE-A12
1910mel	0701, 0303	+
586mel	0701	+
2359mel	0701, 16	+
F002mel	0701, 1203	+
1300mel	0702	+
624mel	0702, 0802	+
SK23mel	0701, 0702	+
1909mel	0701, 0702	+
1011mel	0702	-

397mel	0701	+
526mel	-	+
2556mel	-	+
2984mel	-	+
2630mel	0701	-

[0152]

[0153] 结果表明转导有 TCR502 的 T 细胞识别测试的八株表达 HLA-Cw*0701 或 0702 之一的 MAGE-A12⁺ 黑色素瘤细胞系中的八株,然而仅转导有 TCR FM8 的 T 细胞识别表达 HLA-Cw*0702 的黑色素瘤细胞系(图 2A 和 2B;还参见图 6F)。此外,当与 TCR FM8 转导的 T 细胞比较时,TCR502 转导的 T 细胞响应 HLA-Cw*0702⁺ 靶 SK23mel, 1300mel 和 624mel 释放更高水平的 IFN- γ (Figs. 6D 和 6F)。1011mel 细胞(其表达 HLA-Cw*0702 但缺乏 MAGE-A12 的表达)不刺激从转导有 TCR502 或 TCR FM8 的细胞中的显著的细胞因子释放。转导有编码 NGFR 的对照构建体的 T 细胞未能显著响应于测试的靶的任一个。这些结果表明当与 MAGE-A12⁺/HLA-Cw7 靶细胞共培养时,表达 TCR 的 502 细胞比表达 TCR FM8 的细胞释放更高水平的 IFN- γ , 并且 TCR502 识别 HLA-Cw0701 或 HLA-Cw, 0702 之一情况下的 MAGE-A12。这些结果还表明在存在 MAGE-A12⁺ 细胞的情况下,TCR A502 和 TCR FM8 被刺激。

[0154] 所述 TCR502 转导的 T 细胞识别 HLA-C*0702⁺, MAGE-A12⁺ 肿瘤 624mel 以及两株 HLA-C*07 :01⁺, MAGE-A12⁺ 肿瘤, 397 和 2359mel, 然而 FM8 转导的 T 细胞识别 HLA-C*07 :02⁺ 肿瘤细胞系 624mel 但未能识别 397 和 2359mel (图 6D)。转导的 T 细胞群体中没有一个识别 526, 2556, 或 2984mel (缺乏 HLA-C*07 表达的 MAGE-A3⁺ 黑色素瘤细胞系), 或 2630mel (缺乏 MAGE-A12 表达的 HLA-C*07 :01⁺ 肿瘤细胞系) (图 6D)。这些差异似乎不是由于两个 TCR 的转导频率方面的差异(如在实施例 2 中描述的测量), 其在转导有任一 TCR 的细胞中是相似的(图 6B)。此外,转导有 502TCR 的细胞识别与最低浓度为 2.5nM MAGE-A12 :170-178 孵育的靶细胞,所述浓度是对于由转导有 FM8TCR 的细胞的识别所需要的浓度低 100 倍的浓度(图 6E),指示 502TCR 比 FM8TCR 具有更高的功能性亲和力。

[0155] 随后评估转导有 MAGE-A12 反应性 TCR 的 T 细胞对新鲜,未培养的肿瘤细胞的酶消化的反应。转导有 TCR502 的 T 细胞识别四种表达 HLA-C*0701 的 MAGE-A12⁺ 新鲜肿瘤中的一种, FrTu3068, 且 TCR502 以及 FM8 转导的 T 细胞识别两种表达 HLA-C*07 :02 的 MAGE-A12⁺ 肿瘤中的一种, FrTu2181 (图 7B;表 2B)。TCR 转导的 T 细胞群体中没有一种识别 HLA-C*07 :01⁻ 和 07 :02⁻ 新鲜肿瘤 2767 或 2823, 或缺乏 MAGE-A12 表达的 MAGE-A12⁻ 肿瘤 2685, 3242 和 2803。

[0156] 表 2B

[0157]

新鲜肿瘤	HLA-C*07	MAGE-A12
3068	01	+
2181	02	+
3178	01	+
2830	01	+
2268	01,02	+
2767	-	+
2823	-	+
2685	01	-
3242	01	-
2803	02	-

[0158] 实施例 4

[0159] 该实施例表明可以使用发明的 TCR 治疗的群体。

[0160] 约 28% 的患者群体表达 HLA-A*01, 和约 54% 的患者群体表达 HLA-Cw*07。由约 27% 和约 31% 的患者群体分别表达 HLA-Cw*07, Cw*0701 和 Cw*0702 中的两种优势亚型。图 3A 说明预期为通过使用由 HLA-A1, HLA-A2, 和 / 或 HLA-Cw7 限制的 TCR 可治疗的群体的累积百分数 (基于在普通高加索人群中这些等位基因的百分数)。

[0161] 因为约 30% 的患者表达高水平的 MAGE-A3 和 MAGE-A12, 发明的 TCR 的使用将让显著更高百分率的患者适合于基于 TCR 过继性免疫疗法。图 3B 和 3C 说明预期是使用 TCR 可治疗的人黑色素瘤 (图 3B) 和滑膜细胞肉瘤 (图 3C) 患者群体的累积百分数, 所述 TCR 识别 HLA-A2 情况下的 NY-ESO-1; HLA-A1 情况下的 MAGE-A3; HLA-A2 情况下的 MAGE-A3 和 MAGE-A12; 和 / 或 HLA-Cw7 情况下的 MAGE-A12。

[0162] 实施例 5

[0163] 该实施例表明表达 TCR502 或 TCR FM8 的细胞响应与用源自 MAGE 家族的不同蛋白的肽刺激的表达 HLA-Cw*0701 或 HLA-Cw*0702 的靶细胞的共培养的反应性。

[0164] 转导有 NGFR, TCR502 (SEQ ID NO:47), 或 TCR FM8 (SEQ ID NO:49) 的细胞与表达 HLA-Cw*0701 或 HLA-Cw*0702 的细胞共培养。测量 IFN- γ (pg/ml) 分泌。

[0165] 结果表明当用 MAGE-A12 (VRIGHLYIL; SEQ ID NO:4) 刺激时, 转导有 TCR502 的细胞识别表达 HLA-Cw*0701 或 HLA-Cw*0702 细胞, 并且当用 MAGE-A12 (VRIGHLYIL; SEQ ID NO:4) 刺激时, 转导有 TCR FM8 的细胞识别表达 HLA-Cw*0702 的细胞 (图 4)。转导有 NGFR 的细胞不显示显著的反应性。

[0166] 实施例 6

[0167] 该实施例表明抗 MAGE-A3 和抗 MAGE-A12TCR 的特异性。

[0168] 在用抗 CD3 抗体刺激后,源自单个供体的 PMBC 用未转导的或转导有抗 MAGE-A12TCR502(SEQ ID NO:47),抗 MAGE-A12TCR FM8(SEQ ID NO:49),抗 MAGE-A3TCR A10(SEQ ID NO:46),抗 MAGE-A3TCR13-18(SEQ ID NO:48),或抗 MAGE-A3TCR112-120 的 PMBC 转导。在刺激后十三天,在标准的 4 小时 ^{51}Cr 释放测试中,转导的 T 细胞与列于表 3 中的肿瘤靶孵育。

[0169] 表 3

[0170]

	MAGE-A3	MAGE-A12	HLA-A	HLA-C
397mel	+	+	01/02	0401/0701
624mel	+	+	02/03	0702/0802
2984mel	+	+	01/02	06
2661RCC	-	-	01/02	07

[0171] 如在图 5(A)-5(D) 中显示的,抗 MAGE-A12TCR502 特异溶解表达的 MAGE-A12 和 HLA-Cw7 的肿瘤细胞且不溶解缺乏 MAGE-A12 或 HLA-Cw7 表达的肿瘤细胞。抗 MAGE-A3TCR A10 特异溶解表达 MAGE-A3 和 HLA-A1 的肿瘤细胞且不溶解缺乏 MAGE-A3 或 HLA-A1 表达的肿瘤细胞。

[0172] 实施例 7

[0173] 该实施例表明抗 MAGE-A3 和抗 MAGE-A12TCR 的特异性。

[0174] 猴肾细胞系 COS-7 用 HLA-A*01, C*07:01 或 C*07:02 之一加上 MAGE-A3, A1, A2, A4, A6, A9, A10 或 A12 之一瞬时转染过夜。次日加入 T 细胞,或者转导有 TCR A10, 13-18 或者未转导的对照细胞或者 TCR502, FM8 或者未转导的对照细胞,并在过夜共培养之后通过 ELISA 评估可溶 IFN- γ 的释放。

[0175] 转导有 MAGE-A3- 反应性 TCR A10 的 T 细胞识别转染有 MAGE-A3 的 HLA-A1⁺ 靶细胞,但未能识别转染有 MAGE-A1, A2, A4, A6, A9, A10 或 A12 构建体的靶标(图 8A),所述构建体编码与 MAGE-A3:170-178 表位介于 1-3 个位点之间不同的肽。转导有 TCR502 或 FM8 之一的 T 细胞识别转染有 MAGE-A12 的 HLA-C*07:02⁺ 靶标但不识别 MAGE-A3, A1, A2, A4, A6, A9, A10(图 8B),而转导有 TCR502 而不是 FM8 的 T 细胞识别转染有 MAGE-A12 的 HLA-C*07:01⁺ 靶标,而不识别测试的另外的 MAGE-A 家族成员(图 8C)。

[0176] 实施例 8

[0177] 该实施例表明转导的 T 细胞的反应性。

[0178] 纯化的 CD8⁺ 和 CD4⁺T 细胞通过使用 CD8 和 CD4T 淋巴细胞富集试剂盒(Becton/Dickinson, Franklin Lakes, N.J.) 阴性筛选,继之以使用 CD8 和 CD4 磁珠(Becton/Dickinson) 的阳性筛选分离。通过荧光激活细胞筛选术(FACS) 分析评估分离的 CD8⁺ 和 CD4⁺ 细胞,以分别包含小于 1% 的污染 CD4⁺ 和 CD8⁺T 细胞。

[0179] 随后评价转导有 TCR 的分离的 CD8⁺ 和 CD4⁺T 细胞群体对肿瘤细胞靶标的反应。高度纯化的转导有 TCR A10 的包含少于 1% 污染 CD8⁺T 细胞的 CD4⁺T 细胞响应稳定转染有 HLA-A*01 的 MAGE-A3⁺ 肿瘤细胞系 397mel 以及 MAGE-A3⁺ 肿瘤细胞系 1300A1 mel, 释放低但显著水平的 IFN- γ (表 4A ;图 9B)。转导有 TCR A10 的 CD8⁺T 细胞响应 397mel 或 1300-A1mel 释放干扰素 - γ (表 4A ;图 9A)。转导有 TCR502 或 TCR FM8 的 CD8⁺T 细胞响应 624mel 释放干扰素 - γ , 且 TCR502 响应 397mel 释放干扰素 - γ (图 9C 和表 4B)。

[0180] 表 4A

[0181]

细胞系	HLA-A*01	MAGE-A3
397mel	+	+
1300mel	+	+
1300-A1mel	+	+
624mel	-	+
2359mel	-	+
2661RCC	+	-

[0182] 表 4B

[0183]

细胞系	HLA-C*07	MAGE-A12
397mel	01	+
624mel	02	+
2359mel	01	+
526mel	-	+
2661RCC	-	-

[0184]

[0185] 在此引用的所有参考文献, 包括出版物, 专利申请, 和专利, 像每个参考文献单独和特异地指出以作为参考引入一样, 以相同的程度作为参考引入, 且在此以其整体列出。

[0186] 在描述本发明的上下文中 (尤其在以下的权利要求的上下文中), 术语“一个 (种) (a)”和“一个 (种) (an)”和“所述 (the)”和“至少一种 (个)”和类似的指示物的使用将理解为覆盖单数和复数二者, 除非在此另有陈述或与上下文明显抵触。术语“至少一个 (种)”继之以一系列一个或更多项 (例如, “A 和 B 中的至少一个”) 将理解为意味着选自列出的项 (A 或 B) 的一项或列出的项 (A 和 B) 的两个或更多的组合, 除非在此另有陈述或

与上下文明显抵触。术语“包含 (comprising),” “具有 (having),” “包括 (including),” 和“包含 (containing)”将理解为开放的术语 (即,意为“包括,但不限于,”),除非另有说明。在此,值的范围的叙述仅意在用作单独指在范围内的每个分离的值的简写方法,除非在此另有陈述,且每个分离的值像其在此单独陈述一样引入说明书。所有在此描述的方法可以以任何合适的顺序进行,除非在此另有陈述或与上下文明显抵触。在此提供的任何或所有实施例,或典型术语 (例如,“例如 (such as)”) 的使用,仅意在更好阐明本发明且不造成对本发明范围的限制,除非另有要求。说明书中没有术语应该理解为指示任何非要求的作为对本发明的实践必要的成分。

[0187] 本发明优选的实施方案在此描述,包括对于发明人来说用于实现本发明的最好的方式。在阅读上文描述时,那些优选的实施方案的改变可以成为对于本领域技术人员来讲显而易见的。发明人预期熟练技术人员酌情使用此种改变,且发明人意在除了如在此详细描述之外,使本发明付诸实践。因此,本发明包括在如由适用的法律允许的附于此的权利要求中陈述的主题的所有改变和相等物。此外,以上描述的成分的以其所有可能的改变形式的任何组合由本发明包括,除非在此另有陈述或与上下文明显抵触。

[0001]

序列表

<110> 美国卫生和人力服务部
 <120> HLA-A1-或HLA-CW7-限制的MAGE的T细胞受体
 <130> 710922
 <150> US 61/535,086
 <151> 2011-09-15
 <160> 63
 <170> PatentIn version 3.5
 <210> 1
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 1
 Met Pro Leu Glu Gln Arg Ser Gln His Cys Lys Pro Glu Glu Gly Leu
 1 5 10 15
 Glu Ala Arg Gly Glu Ala Leu Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala Pro Ala
 20 25 30
 Thr Glu Glu Gln Glu Ala Ala Ser Ser Ser Thr Leu Val Glu Val
 35 40 45
 Thr Leu Gly Glu Val Pro Ala Ala Glu Ser Pro Asp Pro Pro Gln Ser
 50 55 60
 Pro Gln Gly Ala Ser Ser Leu Pro Thr Thr Met Asn Tyr Pro Leu Trp
 65 70 75 80
 Ser Gln Ser Tyr Glu Asp Ser Ser Asn Gln Glu Glu Gly Pro Ser
 85 90 95
 Thr Phe Pro Asp Leu Glu Ser Glu Phe Gln Ala Ala Leu Ser Arg Lys
 100 105 110
 Val Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu
 115 120 125
 Pro Val Thr Lys Ala Glu Met Leu Gly Ser Val Val Gly Asn Trp Gln
 130 135 140
 Tyr Phe Phe Pro Val Ile Phe Ser Lys Ala Ser Ser Ser Leu Gln Leu
 145 150 155 160
 Val Phe Gly Ile Glu Leu Met Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr
 165 170 175
 Ile Phe Ala Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly Asp
 180 185 190
 Asn Gln Ile Met Pro Lys Ala Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile
 195 200 205
 Ile Ala Arg Glu Gly Asp Cys Ala Pro Glu Glu Lys Ile Trp Glu Glu

[0002]

210	215	220
Leu Ser Val Leu Glu Val Phe Glu Gly Arg Glu Asp Ser Ile Leu Gly 225 230 235 240		
Asp Pro Lys Lys Leu Leu Thr Gln His Phe Val Gln Glu Asn Tyr Leu 245 250 255		
Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Cys Tyr Glu Phe Leu 260 265 270		
Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu His 275 280 285		
His Met Val Lys Ile Ser Gly Gly Pro His Ile Ser Tyr Pro Pro Leu 290 295 300		
His Glu Trp Val Leu Arg Glu Gly Glu Glu 305 310		
<210> 2		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 人		
<400> 2		
Glu Val Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr 1 5		
<210> 3		
<211> 314		
<212> PRT		
<213> 人		
<400> 3		
Met Pro Leu Glu Gln Arg Ser Gln His Cys Lys Pro Glu Glu Gly Leu 1 5 10 15		
Glu Ala Gln Gly Glu Ala Leu Gly Leu Val Gly Ala Gln Ala Pro Ala 20 25 30		
Thr Glu Glu Gln Glu Thr Ala Ser Ser Ser Ser Thr Leu Val Glu Val 35 40 45		
Thr Leu Arg Glu Val Pro Ala Ala Glu Ser Pro Ser Pro Pro His Ser 50 55 60		
Pro Gln Gly Ala Ser Thr Leu Pro Thr Thr Ile Asn Tyr Thr Leu Trp 65 70 75 80		
Ser Gln Ser Asp Glu Gly Ser Ser Asn Glu Glu Gln Glu Gly Pro Ser 85 90 95		
Thr Phe Pro Asp Leu Glu Thr Ser Phe Gln Val Ala Leu Ser Arg Lys 100 105 110		
Met Ala Glu Leu Val His Phe Leu Leu Leu Lys Tyr Arg Ala Arg Glu 115 120 125		

[0003]

Pro Phe Thr Lys Ala Glu Met Leu Gly Ser Val Ile Arg Asn Phe Gln
 130 135 140
 Asp Phe Phe Pro Val Ile Phe Ser Lys Ala Ser Glu Tyr Leu Gln Leu
 145 150 155 160
 Val Phe Gly Ile Glu Val Val Glu Val Val Arg Ile Gly His Leu Tyr
 165 170 175
 Ile Leu Val Thr Cys Leu Gly Leu Ser Tyr Asp Gly Leu Leu Gly Asp
 180 185 190
 Asn Gln Ile Val Pro Lys Thr Gly Leu Leu Ile Ile Val Leu Ala Ile
 195 200 205
 Ile Ala Lys Glu Gly Asp Cys Ala Pro Glu Glu Lys Ile Trp Glu Glu
 210 215 220
 Leu Ser Val Leu Glu Ala Ser Asp Gly Arg Glu Asp Ser Val Phe Ala
 225 230 235 240
 His Pro Arg Lys Leu Leu Thr Gln Asp Leu Val Gln Glu Asn Tyr Leu
 245 250 255
 Glu Tyr Arg Gln Val Pro Gly Ser Asp Pro Ala Cys Tyr Glu Phe Leu
 260 265 270
 Trp Gly Pro Arg Ala Leu Val Glu Thr Ser Tyr Val Lys Val Leu His
 275 280 285
 His Leu Leu Lys Ile Ser Gly Gly Pro His Ile Ser Tyr Pro Pro Leu
 290 295 300
 His Glu Trp Ala Phe Arg Glu Gly Glu Glu
 305 310

<210> 4
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 4

Val Arg Ile Gly His Leu Tyr Ile Leu
 1 5

<210> 5
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 5

Asn Ser Ala Ser Gln Ser
 1 5

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT

[0004]

<213> 人

<400> 6

Val Tyr Ser Ser Gly Asn
1 5

<210> 7

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 7

Val Val Asn Arg Asp Asn Asp Met Arg
1 5

<210> 8

<211> 5

<212> PRT

<213> 人

<400> 8

Lys Gly His Asp Arg
1 5

<210> 9

<211> 6

<212> PRT

<213> 人

<400> 9

Ser Phe Asp Val Lys Asp
1 5

<210> 10

<211> 12

<212> PRT

<213> 人

<400> 10

Ala Thr Ser Glu Gly Gly Pro Pro Tyr Glu Gln Tyr
1 5 10

<210> 11

<211> 129

<212> PRT

<213> 人

<400> 11

Met Ile Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser
1 5 10 15

Trp Val Trp Ser Gln Arg Lys Glu Val Glu Gln Asp Pro Gly Pro Phe
20 25 30

Asn Val Pro Glu Gly Ala Thr Val Ala Phe Asn Cys Thr Tyr Ser Asn
35 40 45

Ser Ala Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Cys Arg Lys Glu
50 55 60

[0005]

Pro Lys Leu Leu Met Ser Val Tyr Ser Ser Gly Asn Glu Asp Gly Arg
 65 70 75 80
 Phe Thr Ala Gln Leu Asn Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Leu Leu Ile
 85 90 95
 Arg Asp Ser Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Val Val Asn
 100 105 110
 Arg Asp Asn Asp Met Arg Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Thr Val Lys
 115 120 125
 Pro
 <210> 12
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 12
 Met Ala Ser Leu Leu Phe Phe Cys Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Gly Thr
 1 5 10 15
 Gly Ser Met Asp Ala Asp Val Thr Gln Thr Pro Arg Asn Arg Ile Thr
 20 25 30
 Lys Thr Gly Lys Arg Ile Met Leu Glu Cys Ser Gln Thr Lys Gly His
 35 40 45
 Asp Arg Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu
 50 55 60
 Ile Tyr Tyr Ser Phe Asp Val Lys Asp Ile Asn Lys Gly Glu Ile Ser
 65 70 75 80
 Asp Gly Tyr Ser Val Ser Arg Gln Ala Gln Ala Lys Phe Ser Leu Ser
 85 90 95
 Leu Glu Ser Ala Ile Pro Asn Gln Thr Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Thr
 100 105 110
 Ser Glu Gly Gly Pro Pro Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
 115 120 125
 Leu Thr Val Thr
 130
 <210> 13
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 13
 Met Ile Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser
 1 5 10 15
 Trp Val Trp Ser Gln Arg Lys Glu Val Glu Gln Asp Pro Gly Pro Phe

[0006]

	20	25	30
Asn Val Pro Glu Gly Ala Thr	Val Ala Phe Asn Cys Thr Tyr Ser Asn		
35	40	45	
Ser Ala Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Cys Arg Lys Glu			
50	55	60	
Pro Lys Leu Leu Met Ser Val Tyr Ser Ser Gly Asn Glu Asp Gly Arg			
65	70	75	80
Phe Thr Ala Gln Leu Asn Arg Ala Ser Gln Tyr Ile Ser Leu Leu Ile			
85	90	95	
Arg Asp Ser Lys Leu Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Val Val Asn			
100	105	110	
Arg Asp Asn Asp Met Arg Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Thr Val Lys			
115	120	125	
Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser			
130	135	140	
Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Ile Asp Ser Gln			
145	150	155	160
Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys			
165	170	175	
Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val			
180	185	190	
Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn			
195	200	205	
Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys			
210	215	220	
Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn			
225	230	235	240
Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val			
245	250	255	
Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser			
260	265	270	
<210> 14			
<211> 311			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 14			
Met Ala Ser Leu Leu Phe Phe Cys Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Gly Thr			
1	5	10	15
Gly Ser Met Asp Ala Asp Val Thr Gln Thr Pro Arg Asn Arg Ile Thr			

[0007]

20					25					30					
Lys	Thr	Gly	Lys	Arg	Ile	Met	Leu	Glu	Cys	Ser	Gln	Thr	Lys	Gly	His
		35					40					45			
Asp	Arg	Met	Tyr	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu
	50					55					60				
Ile	Tyr	Tyr	Ser	Phe	Asp	Val	Lys	Asp	Ile	Asn	Lys	Gly	Glu	Ile	Ser
	65					70					75				80
Asp	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Arg	Gln	Ala	Gln	Ala	Lys	Phe	Ser	Leu	Ser
				85					90					95	
Leu	Glu	Ser	Ala	Ile	Pro	Asn	Gln	Thr	Ala	Leu	Tyr	Phe	Cys	Ala	Thr
			100					105					110		
Ser	Glu	Gly	Gly	Pro	Pro	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg
		115					120					125			
Leu	Thr	Val	Thr	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala
		130					135					140			
Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr
		145				150					155				160
Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser
			165						170					175	
Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro
		180						185					190		
Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu
		195					200					205			
Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn
		210					215					220			
His	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu
		225				230					235				240
Trp	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu
			245						250					255	
Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln
			260					265					270		
Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala
		275					280					285			
Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val
		290					295					300			
Lys	Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly									
		305				310									

[0008]

<210> 15
<211> 27
<212> PRT
<213> 人

<400> 15

Arg Ala Lys Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys
1 5 10 15

Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20 25

<210> 16
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 16

Asn Ser Ala Phe Gln Tyr
1 5

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 17

Thr Tyr Ser Ser Gly Asn
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> 人

<400> 18

Ala Met Arg Gly Ala Gln Lys Leu Val
1 5

<210> 19
<211> 5
<212> PRT
<213> 人

<400> 19

Leu Asn His Asn Val
1 5

<210> 20
<211> 6
<212> PRT
<213> 人

<400> 20

Tyr Tyr Asp Lys Asp Phe
1 5

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> 人

[0009]

<400> 21

Ala Thr Ser Trp Asp Arg Gly Tyr Glu Gln Tyr
1 5 10

<210> 22

<211> 131

<212> PRT

<213> 人

<400> 22

Met Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu
1 5 10 15

Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asp Pro Gly Pro
20 25 30

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

Asn Ser Ala Phe Gln Tyr Phe Met Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Arg Lys
50 55 60

Gly Pro Glu Leu Leu Met Tyr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Lys Glu Asp
65 70 75 80

Gly Arg Phe Thr Ala Gln Val Asp Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ser Leu
85 90 95

Phe Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala
100 105 110

Met Arg Gly Ala Gln Lys Leu Val Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Thr
115 120 125

Ile Asn Pro
130

<210> 23

<211> 131

<212> PRT

<213> 人

<400> 23

Met Gly Pro Gly Leu Leu His Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Thr
1 5 10 15

Gly His Gly Asp Ala Met Val Ile Gln Asn Pro Arg Tyr Gln Val Thr
20 25 30

Gln Phe Gly Lys Pro Val Thr Leu Ser Cys Ser Gln Thr Leu Asn His
35 40 45

Asn Val Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Gln Ala Pro Lys Leu
50 55 60

Leu Phe His Tyr Tyr Asp Lys Asp Phe Asn Asn Glu Ala Asp Thr Pro
65 70 75 80

[0010]

Asp Asn Phe Gln Ser Arg Arg Pro Asn Thr Ser Phe Cys Phe Leu Asp
 85 90 95
 Ile Arg Ser Pro Gly Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Leu Cys Ala Thr
 100 105 110
 Ser Trp Asp Arg Gly Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
 115 120 125
 Thr Val Thr
 130
 <210> 24
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 24
 Met Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu
 1 5 10 15
 Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asp Pro Gly Pro
 20 25 30
 Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Val Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser
 35 40 45
 Asn Ser Ala Phe Gln Tyr Phe Met Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Arg Lys
 50 55 60
 Gly Pro Glu Leu Leu Met Tyr Thr Tyr Ser Ser Gly Asn Lys Glu Asp
 65 70 75 80
 Gly Arg Phe Thr Ala Gln Val Asp Lys Ser Ser Lys Tyr Ile Ser Leu
 85 90 95
 Phe Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala
 100 105 110
 Met Arg Gly Ala Gln Lys Leu Val Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Thr
 115 120 125
 Ile Asn Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
 130 135 140
 Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
 145 150 155 160
 Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
 165 170 175
 Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
 180 185 190
 Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
 195 200 205

[0011]

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
 210 215 220
 Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
 225 230 235 240
 Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu
 245 250 255
 Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Arg
 260 265 270
 <210> 25
 <211> 310
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 25
 Met Gly Pro Gly Leu Leu His Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Thr
 1 5 10 15
 Gly His Gly Asp Ala Met Val Ile Gln Asn Pro Arg Tyr Gln Val Thr
 20 25 30
 Gln Phe Gly Lys Pro Val Thr Leu Ser Cys Ser Gln Thr Leu Asn His
 35 40 45
 Asn Val Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Gln Ala Pro Lys Leu
 50 55 60
 Leu Phe His Tyr Tyr Asp Lys Asp Phe Asn Asn Glu Ala Asp Thr Pro
 65 70 75 80
 Asp Asn Phe Gln Ser Arg Arg Pro Asn Thr Ser Phe Cys Phe Leu Asp
 85 90 95
 Ile Arg Ser Pro Gly Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Leu Cys Ala Thr
 100 105 110
 Ser Trp Asp Arg Gly Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
 115 120 125
 Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
 130 135 140
 Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
 145 150 155 160
 Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
 165 170 175
 Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln
 180 185 190
 Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
 195 200 205

[0012]

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
 210 215 220
 Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
 225 230 235 240
 Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
 245 250 255
 Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly
 260 265 270
 Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr
 275 280 285
 Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys
 290 295 300
 Arg Lys Asp Ser Arg Gly
 305 310

<210> 26
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 26

Asp Ser Ala Ser Asn Tyr
 1 5

<210> 27
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 27

Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu
 1 5

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 28

Ala Ala Ser Gly Ala Thr Asp Lys Leu Ile
 1 5 10

<210> 29
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 29

Met Gly His Asp Lys
 1 5

<210> 30
 <211> 6

[0013]

<212> PRT

<213> 人

<400> 30

Ser Tyr Gly Val Asn Ser
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> 人

<400> 31

Ala Ser Ser Gly Gly His Glu Gln Tyr
1 5

<210> 32

<211> 130

<212> PRT

<213> 人

<400> 32

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

<210> 33

<211> 129

<212> PRT

<213> 人

<400> 33

Met Thr Ile Arg Leu Leu Cys Tyr Met Gly Phe Tyr Phe Leu Gly Ala
1 5 10 15

Gly Leu Met Glu Ala Asp Ile Tyr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Ile

[0014]

20	25	30
Gly Thr Gly Lys Lys Ile Thr	Leu Glu Cys Ser Gln Thr	Met Gly His
35	40	45
Asp Lys Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Asp Pro Gly Met Glu Leu His Leu		
50	55	60
Ile His Tyr Ser Tyr Gly Val Asn Ser Thr Glu Lys Gly Asp Leu Ser		
65	70	75
Ser Glu Ser Thr Val Ser Arg Ile Arg Thr Glu His Phe Pro Leu Thr		
85	90	95
Leu Glu Ser Ala Arg Pro Ser His Thr Ser Gln Tyr Leu Cys Ala Ser		
100	105	110
Ser Gly Gly His Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val		
115	120	125
Thr		
<210> 34		
<211> 271		
<212> PRT		
<213> 人		
<400> 34		
Met Thr Ser Ile Arg Ala Val Phe Ile Phe Leu Trp Leu Gln Leu Asp		
1	5	10
Leu Val Asn Gly Glu Asn Val Glu Gln His Pro Ser Thr Leu Ser Val		
20	25	30
Gln Glu Gly Asp Ser Ala Val Ile Lys Cys Thr Tyr Ser Asp Ser Ala		
35	40	45
Ser Asn Tyr Phe Pro Trp Tyr Lys Gln Glu Leu Gly Lys Arg Pro Gln		
50	55	60
Leu Ile Ile Asp Ile Arg Ser Asn Val Gly Glu Lys Lys Asp Gln Arg		
65	70	75
Ile Ala Val Thr Leu Asn Lys Thr Ala Lys His Phe Ser Leu His Ile		
85	90	95
Thr Glu Thr Gln Pro Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Ser		
100	105	110
Gly Ala Thr Asp Lys Leu Ile Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu Gln Val		
115	120	125
Phe Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp		
130	135	140
Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser		

[0015]

145	150	155	160
Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp	165	170	175
Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala	180	185	190
Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn	195	200	205
Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser	210	215	220
Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu	225	230	235
Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys	245	250	255
Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser	260	265	270
<210> 35			
<211> 308			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 35			
Met Thr Ile Arg Leu Leu Cys Tyr Met Gly Phe Tyr Phe Leu Gly Ala	1	5	10
Gly Leu Met Glu Ala Asp Ile Tyr Gln Thr Pro Arg Tyr Leu Val Ile	20	25	30
Gly Thr Gly Lys Lys Ile Thr Leu Glu Cys Ser Gln Thr Met Gly His	35	40	45
Asp Lys Met Tyr Trp Tyr Gln Gln Asp Pro Gly Met Glu Leu His Leu	50	55	60
Ile His Tyr Ser Tyr Gly Val Asn Ser Thr Glu Lys Gly Asp Leu Ser	65	70	75
Ser Glu Ser Thr Val Ser Arg Ile Arg Thr Glu His Phe Pro Leu Thr	85	90	95
Leu Glu Ser Ala Arg Pro Ser His Thr Ser Gln Tyr Leu Cys Ala Ser	100	105	110
Ser Gly Gly His Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val	115	120	125
Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu	130	135	140
Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys			

[0016]

145	150	155	160
Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val	165	170	175
Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu	180	185	190
Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg	195	200	205
Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg	210	215	220
Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln	225	230	235
Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly	245	250	255
Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu	260	265	270
Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr	275	280	285
Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys	290	295	300
Asp Ser Arg Gly	305		
<210> 36			
<211> 7			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 36			
Thr Ser Glu Ser Asp Tyr Tyr	1	5	
<210> 37			
<211> 8			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 37			
Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn	1	5	
<210> 38			
<211> 13			
<212> PRT			
<213> 人			
<400> 38			
Ala Tyr Arg Ser Ala Gln Gly Gly Ser Glu Lys Leu Val	1	5	10

[0017]

<210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 39

Leu Gly His Asn Ala
 1 5

<210> 40
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 40

Tyr Ser Leu Glu Glu Arg
 1 5

<210> 41
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 41

Ala Ser Ser Gln Thr Thr Tyr Tyr Asn Glu Gln Phe
 1 5 10

<210> 42
 <211> 137
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 42

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

Glu Phe Ser Met Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser
 20 25 30

Val Gln Glu Ala Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser
 35 40 45

Glu Ser Asp Tyr Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln
 50 55 60

Met Ile Leu Val Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr
 65 70 75 80

Glu Asn Arg Phe Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser
 85 90 95

Leu Lys Ile Ser Asp Ser Gln Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys
 100 105 110

Ala Tyr Arg Ser Ala Gln Gly Gly Ser Glu Lys Leu Val Phe Gly Lys
 115 120 125

Gly Thr Lys Leu Thr Val Asn Pro Tyr
 130 135

[0018]

<210> 43
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 43
 Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Val Pro Met Glu Thr Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg His Leu Val Met
 20 25 30
 Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Leu Gly His
 35 40 45
 Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Lys Lys Pro Leu Glu Leu
 50 55 60
 Met Phe Val Tyr Ser Leu Glu Glu Arg Val Glu Asn Asn Ser Val Pro
 65 70 75 80
 Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser His Leu Phe Leu His
 85 90 95
 Leu His Thr Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
 100 105 110
 Ser Gln Thr Thr Tyr Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg
 115 120 125
 Leu Thr Val Leu
 130
 <210> 44
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 44
 Met Ala Cys Pro Gly Phe Leu Trp Ala Leu Val Ile Ser Thr Cys Leu
 1 5 10 15
 Glu Phe Ser Met Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser
 20 25 30
 Val Gln Glu Ala Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser
 35 40 45
 Glu Ser Asp Tyr Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln
 50 55 60
 Met Ile Leu Val Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr
 65 70 75 80
 Glu Asn Arg Phe Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser
 85 90 95

[0019]

Leu Lys Ile Ser Asp Ser Gln Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Ala Tyr Arg Ser Ala Gln Gly Gly Ser Glu Lys Leu Val Phe Gly Lys
 115 120 125
 Gly Thr Lys Leu Thr Val Asn Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala
 130 135 140
 Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu
 145 150 155 160
 Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp
 180 185 190
 Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala
 195 200 205
 Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe
 210 215 220
 Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe
 225 230 235 240
 Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe
 245 250 255
 Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu
 260 265 270
 Arg Leu Trp Ser Ser
 275
 <210> 45
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> 人
 <400> 45
 Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15
 Val Pro Met Glu Thr Gly Val Thr Gln Thr Pro Arg His Leu Val Met
 20 25 30
 Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Leu Gly His
 35 40 45
 Asn Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Ser Ala Lys Lys Pro Leu Glu Leu
 50 55 60
 Met Phe Val Tyr Ser Leu Glu Glu Arg Val Glu Asn Asn Ser Val Pro
 65 70 75 80

[0020]

Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser His Leu Phe Leu His
 85 90 95
 Leu His Thr Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser
 100 105 110
 Ser Gln Thr Thr Tyr Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg
 115 120 125
 Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala
 130 135 140
 Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
 145 150 155 160
 Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
 165 170 175
 Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro
 180 185 190
 Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu
 195 200 205
 Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn
 210 215 220
 His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
 225 230 235 240
 Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
 245 250 255
 Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln
 260 265 270
 Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala
 275 280 285
 Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val
 290 295 300
 Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
 305 310

<210> 46

<211> 1827

<212> DNA

<213> 人

<400> 46

atgatatacct tgagagtttt actggtgatac ctgtggettc agttaagctg ggtttggagc 60
 caacggaagg aggtggagca ggatactgga cccttcaatg ttccagaggg agccactgtc 120
 gctttcaact gtacttacag caacagtget tctcagtctt tcttctggta cagacaggat 180
 tgcaggaaaag aacctaaagt getgatgtcc gtatactcca gtgtaataga agatggaagg 240

[0021]

tttacagcac agctcaatag agccagccag tatatttccc tgctcatcag agactccaag	300
ctcagtgatt cagccaceta cctctgtgtg gtgaaccggg acaatgacat ggcctttgga	360
gcagggaaca gactgacagt aaaaacaaat atccagaacc ctgaacctgc cgtgtaccag	420
ctgagagact cttaattccag tgacaagtct gtctgcttat tcaccgatat tgattctcaa	480
acaaatgtgt cacaagtaa ggattctgat gtgtatatca cagacaaaac tgtgttagac	540
atgaggctcta tggacttcaa gagcaacagt gctgtggcct ggagcaacaa atctgacttt	600
gcattgtcaa acgccttcaa caacagcatt attcagaag acactttctt cccagccca	660
gaaagtctct gtgatgtcaa gctggctgag aaaagcttgg aaacagatac gaacctaaac	720
tttcaaaacc tgtcagtcat tgggttccga atctctctcc tgaaagtggc egggtttaat	780
ctgtctatga cgtcgggt gtgtccagc cgggccaagc ggtccggatc cggagccacc	840
aacttcagcc tgcagaaga ggccggcgac gtggaggaga acccggccc catggcctcc	900
ctgtcttctt tctgtggggt cttttatctc ctgggaacag ggtccatgga tctgtatgtt	960
accagacccc caaggaatag gatcacaag acaggaaaga ggattatgct ggaatgttct	1020
cagactaagg gtcattatag aatgtactgg tatcgacaag acccaggact gggcctacgg	1080
ttgatctatt actccttga tgtcaaagat ataaacaaag gagagatctc tgatggatac	1140
agtgtctctc gacaggcaca ggctaaatc tccctgtccc tagagtctgc catccccaac	1200
cagacagctc ttactttctg tgccaccagt gagggagggt cgcctacga gcagtacttc	1260
gggcccggca ccaggctcac ggtcacagag gacctgaaa acgtgttccc accgaggtc	1320
gctgtgtttg agccatcaga agcagagatc tcccacccc aaaaggccac actggtgtgc	1380
ctggccacag gcttctaccc cgaccacgtg gactgagct ggtgggtgaa tgggaaggag	1440
gtgcacagtg ggttcagcac agaccgcag cccctcaagg agcagccgc cctcaatgac	1500
tccagatact gctgagcag ccgctgagg gtctcgcca cttcttgcca gaacccccc	1560
aaccacttcc gctgtcaagt ccagttctac ggctctctgg agaatacga gtggaccacg	1620
gatagggcca aacctgtcac ccagatctc agcgcgagg cctggggtag agcagaactgt	1680
ggttctacct ccagatttta ccagcaagg gtctgtctg ccaccatct ctatgagatc	1740
ttgttaggga aggcacact gtatgcgtg ctggtcagt cctctgtgt gatggcyatg	1800
gtcaagagaa aggattccag aggttag	1827

<210> 47

<211> 1821

<212> DNA

<213> 人

<400> 47

atgacatcca ttgagctgt atttatatc ctgtgctgc agctggactt ggtgaatgga	60
gagaatgttg agcagcatcc ttcaacctg agtgtccagg agggagacag cgtgtttatc	120
aagtgtactt attcagacag tgcctcaaac taattccctt ggtataagea agaacttga	180
aaaagacctc agcttattat agacattcgt tcaaatgtgg gggaaaagaa agaccaacga	240
attgtgttta cattgaacaa gacagccaaa catttctccc tgcaatcac agagacccaa	300
cctgaagact cggtgtcta cttctgtgca gcaagtgggg ccaccgacaa gctcatcttt	360
gggactggga ccagattaca agtctttcca aatatccaga acctgaccc tgcctgtac	420

[0022]

cagctgagag acctctaaatc cagtgacaag tetgtctgce taitcaccga ttttgattct	480
caaacaatg tgtcacaaag taaggattct gatgtgtata tcacagacaa aactgtgcta	540
gacatgaggt ctatggactt caagagcaac agtgetgtgg cctggagcaa caaatctgac	600
tttgcattgt caaacgcctt caacaacagc attattccag aagacacctt ctccccage	660
ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggte gagaaaagct ttgaaacaga taogaacctt	720
aaatttcaaa acctgtcagt gattgggttc cgaatctctc tctgaaagt ggcgggttt	780
aatctgtctc tgacctgctg gctgtggttc agccgggcca agcggctcgg atccggagcc	840
accaacttca gccctgtgaa gcaggccggc gacgtggagg agaaccctcg ccccatgact	900
atcaggtctc tetgtacat gggtttttat tttctggggg caggctctat ggaagtgcac	960
atctaccaga ccccaagata ccttggtata gggacaggaa agaagatcac tctggaatgt	1020
tctcaaacca tgggcatga caaatgtac tggatcaac aagatccagg aatggaacta	1080
cacctcatcc actattctta tggagttaat tcacagaga agggagatct ttctctcgag	1140
tcaacagtct ccagaataag gacggagcat ttctccctga ccttggagtc tgcaggccc	1200
tcacatact ctacgtacct ctgtgccagc agtggcgggc acgagcagta ctctgggccc	1260
ggcaccaggc tcacgtcac agaggacctg aaaaacgtgt tcccaccga ggtcgtgtg	1320
tttgagccat cagaagcaga gatctccac acccaaaagg ccacactggt gtgcctggcc	1380
acaggtctct tccctgacca cgtggagctg agctggtggg tgaatgggaa ggaggtgcac	1440
agtggggctc gcacggacct gcagccctc aaggagcagc ccgcccctaa tgactccaga	1500
tactgcctga gcagccgctt gagggtctcg gccacctctt ggcagaacce ccgaaccac	1560
ttcctgtctc aagtcagtt ctacgggctc tcggagaatg acgagtggac ccaggatagg	1620
gccaaccctg tcaccagat cgtcagcgcc gaggcctggg gtagagcaga ctgtggttt	1680
acctgggtgt cctaccagca aggggtctct tetgcccaca tctctatga gatctgcta	1740
gggaaggcca cctgtatgc tgtctgtgtc agcgccttg tttgatggtc tatggtcaag	1800
agaaaggatt ccagaggeta g	1821

<210> 48

<211> 1830

<212> DNA

<213> 人

<400> 48

atgatgaaat ccttgagagt tttactgggt atcctgtgce ttcagttaag ctgggtttgg	60
agccaacaga aggaggtgga gcaggatctt ggaccactca gtgttccaga gggagccatt	120
gtttctctca actgcactta cagcaacagt gcttttcaat acttcattgt gtacagacag	180
tattccagaa aagccctga gttgtgatg tacacatact ccagtggtaa caaagaagat	240
ggaaggttta cagcacaggt cgataaatcc agcaagtata tctccttggt catcagagac	300
tcacagecca gtgatteagc caactacctc tgtgcaatgc ggggagccca gaagctggta	360
tttgcccaag gaaccaggt gactatacac ccaaatatcc agaacctga cctgcccgtg	420
taccagtga gagaetctaa atccagtgc aagtctgtct gectattcac cgatittgat	480
tctcaacaa atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atateacaga caaaactgtg	540
ctagacatga ggtctatgga ctccaagagc aacagtgtgt tgccctggag caacaaatct	600

[0023]

```

gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattatc cagaagacac cttcttcccc 660
agcccagaaa gtctctgtga tgtcaagctg gtgagaaaaa gctttgaaac agatacgaac 720
ctaaacttcc aaaacctgtc agtgattggg ttcgaatcc tcctctgaa agtggccggg 780
tttaattctc tcatgaacct geggtctgg tccagacggg ccaagcggtc cggatccgga 840
gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc tgcagctgg aggagaaccc cggccccatg 900
ggctctgggc ttctccactg gatggccctt tgtctcttg gaacaggtea tggggatgcc 960
atggtcctcc agaaccacag ataccaggtt acccagttg gaaagccagt gacctgagt 1020
tgttctcaga ctttgaacca taactctatg tactggtacc agcagaagtc aagtcaggcc 1080
ccaaagctgc tgttccacta ctatgacaaa gatitaaaca atgaagcaga cccccctgat 1140
aacttccaat ccaggaggcc gaacacttct ttctgcttcc ttgacatccg ctcaccaggc 1200
ctgggggaag cagccatgta cctgtgtgcc acctctggg accgagggtc cgagcagtae 1260
ttcgggcagg gcaccaggt caccgtcaca gaggacctga aaaacgtgtt cccaccagag 1320
gtcgtctgtt ttgagccatc agaagcagag atctccca cccaaaagcc cacactggtg 1380
tgcttgcca cagcttctc ccccgaccac gtggagctga gctggtgggt gaatgggaag 1440
gaggtgcaca gtggggctcag cacagaccgc cagccccca aggagcagcc cgcctcaat 1500
gactccagat actgcctgag cagccgcctg agggctctcg ccactctctg gcagaacccc 1560
cgcaaccact tccgtgtcga agtcagttc tacgggtctt cggagaatga cagtggtacc 1620
caggataggc ccaaacctgt caccagatc gtcagcgcg aggcctgggg tagagcagac 1680
tgttgcttca cctccagatc ttaccagcaa ggggtctctg ctgccaccat cctctatgag 1740
atcttctag ggaagccac cttgtatgcc gtctgtgta gtgcctctgt gctgatggct 1800
atggtcaaga gaaaggattc cagaggttag 1830

```

<210> 49
<211> 1848
<212> DNA
<213> 人

```

<400> 49
atggcatgcc ctggttctct gtgggcactt gtgatctcca cctgtcttga atttagcatg 60
gtcagacag tcaactagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggagcaga gacctgacc 120
ctgagctgca catatgacac cagtgagagt gattattatt tattctggtc caagcagcct 180
cccagcagcc agatgattct cgttattctc caagaagctt ataagcaaca gaatgcaaca 240
gagaatctgt tctctgtgaa cttccagaaa gcagccaaat ccttcagtct caagatctca 300
gactcacagc tgggggatgc cgcgatgtat ttctgtgctt ataggagcgc tcaggcgcca 360
tetgaaaagc tggctcttgg aaagggaacg aaactgacag taaaccata tatccagAAC 420
cctgacctgt ccgtgtacca gctgagagac tctaaatcca gtgacaagtc tgtctgccta 480
ttcaccgatt ttgattctca aacaaatgtg tcacaaagta aggattctga tgtgtatata 540
acagacaaaa ctgtgtctga catgaggtct atggacttca agagcaacag tctgttgccc 600
tggagcaaca aatctgactt tgcattgtga aacgccttca acaacagcat tattccagaa 660
gacaccttct tccccagccc agaaagtctc tgtgatgta agctggctga gaaaagcttt 720
gaaacagata cgaacctaaa cttcaaaaac ctgtcagtga ttgggttccg aatctctctc 780

```

[0024]

```

ctgaaagtgg cegggtttaa tctgtcatg acgtgcggc tgtggtccag cggggccaag      840
cggteccgat ceggagccac caacttcagc ctgtgaagc aggcgggga cgtggaggag      900
aaceceggcc ccatgggctg caggtgtctc tctgtgcgg ttctctgtct cctgggagcg      960
gtcccatgg aaacgggagt tacgcagaca ccaagacacc tggtcatggg aatgacaaat     1020
aagaagtctt tgaatgtga acaacatctg gtcataacg ctatgtattg gtacaagcaa     1080
agtgcataga agccactgga gctcatgttt gtctacagtc ttgaagaacg ggtigaaaac     1140
aacagtgtgc caagtctctt ctacacggaa tgcaccaaca gctctcactt attccttcac     1200
ctacacaccc tgcagccaga agactcggcc ctgtatctct gcgcacagcag ccaaactact     1260
tactacaatg agcagttctt cgggccaggg acacggctca ccgtgtatga ggacctgaaa     1320
aacgtgttcc cacccgaggt cgtgtgttt gagccatcag aageagagat ctcccacacc     1380
caaaaggcca cactggtgtg cctggccaca ggtctctacc cgcaccactg ggagctgagc     1440
tgggtgggtg atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca cagacccgca gccctcaag     1500
gagcagcccg cctcaatga ctccagatac tgcctgagca gccgctgag ggtctcgccc     1560
acctcttggc agaacccecg caaccacttc cgtgtcgaag tccagttcta cgggctctcg     1620
gagaatgacg agtggacca ggatagggcc aaaccgctca ccagatcgt cagcgccgag     1680
gcctggggta gacgagactg tggttcacc tccagttctt accagcaagg ggtctgtct     1740
gccaccatcc tctatgagat ctgttaggg aagccacct tgtatgcctg gctggtcagt     1800
gccctctgtc tgatggccat ggtaagaga aaggattcca gaggtctag      1848

```

<210> 50
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 50

Val Pro Ile Ser His Leu Tyr Ile Leu
1 5

<210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 51

Asp Pro Ile Gly His Leu Tyr Ile Phe
1 5

<210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人

<400> 52

Asp Pro Ile Gly His Val Tyr Ile Phe
1 5

<210> 53
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人

[0025]

<400> 53

Glu Asp Gly Cys Pro Ala Ala Glu Lys
1 5

<210> 54

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 54

Arg Ala Lys Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys
1 5 10 15

Gln Ala Cys Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
20 25

<210> 55

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 55

cactgttget cttgaagtec

20

<210> 56

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 56

caggcagtat ctggagtcac tgag

24

<210> 57

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 57

Ser Gly Ser Gly
1

<210> 58

<211> 27

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成的

<400> 58

tgcaaggcat ggaaaataca taactga

27

<210> 59

[0026]

<211>	25	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	59	
	cacagatattc ctgtttggee catat	25
<210>	60	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	60	
	tctctctgtt cctaaccttg	20
<210>	61	
<211>	20	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	61	
	tccgtgagga ggcaaggttc	20
<210>	62	
<211>	19	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	62	
	gagcctgcgc acccaccaa	19
<210>	63	
<211>	28	
<212>	DNA	
<213>	人工序列	
<220>		
<223>	合成的	
<400>	63	
	agtgtgggca ggagctagtg ctgctcgg	28

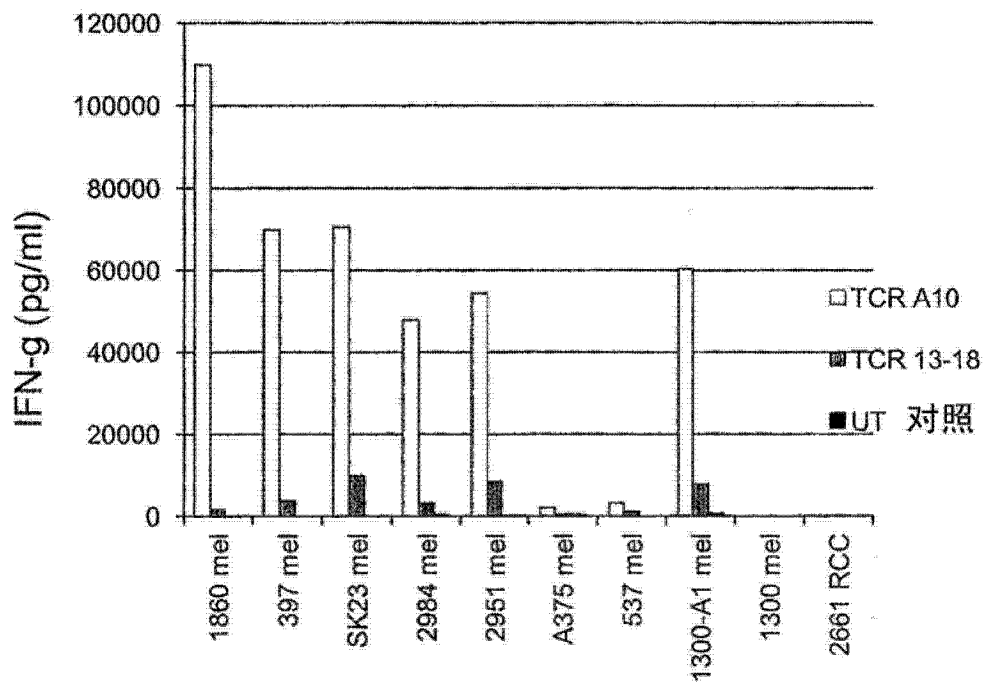


图 1A

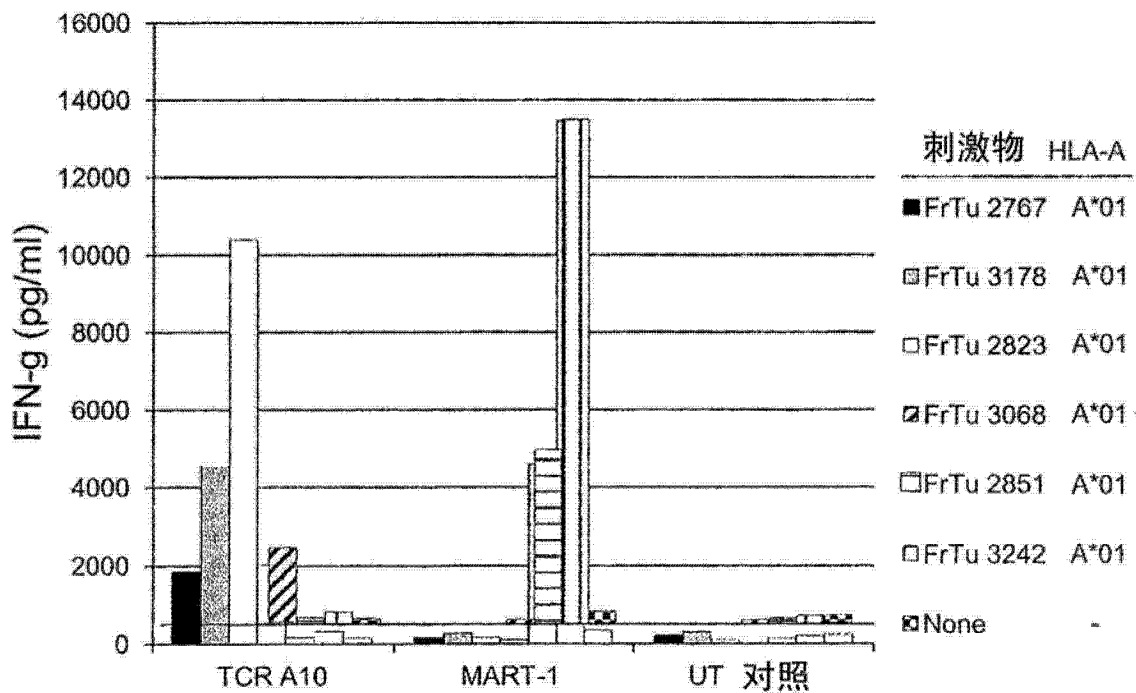


图 1B

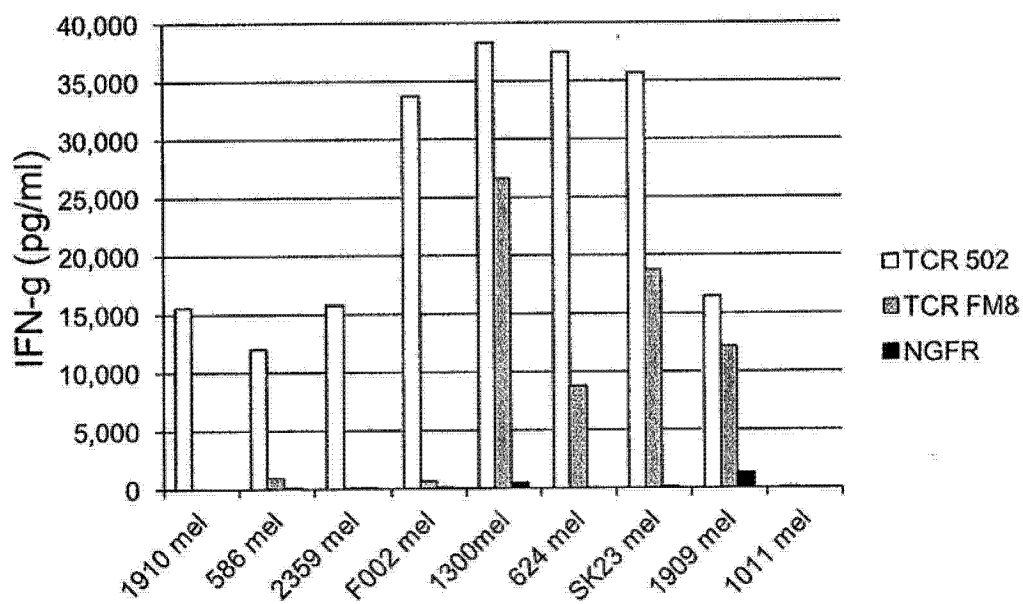


图 2A

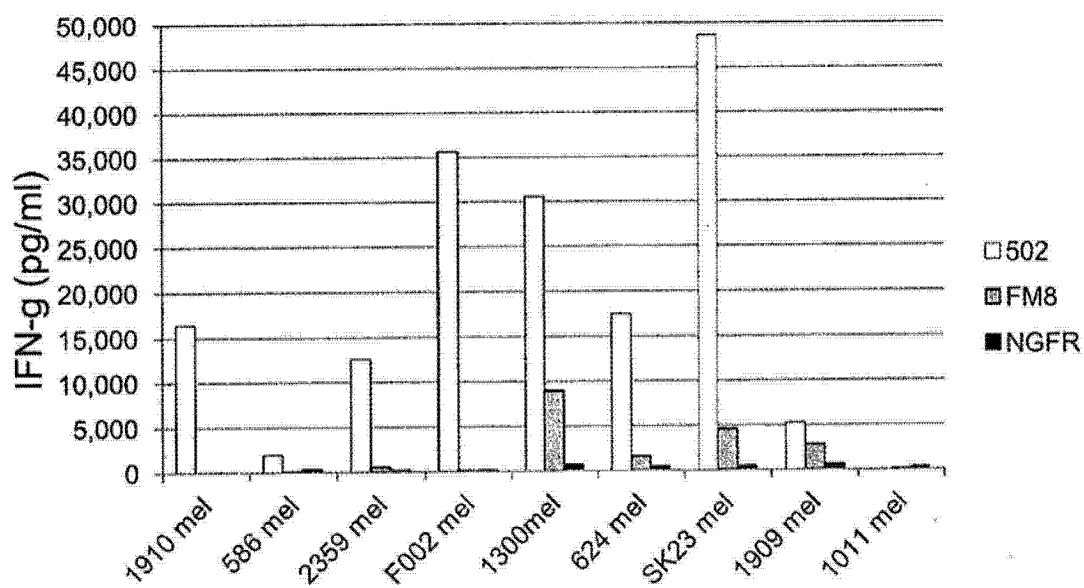


图 2B

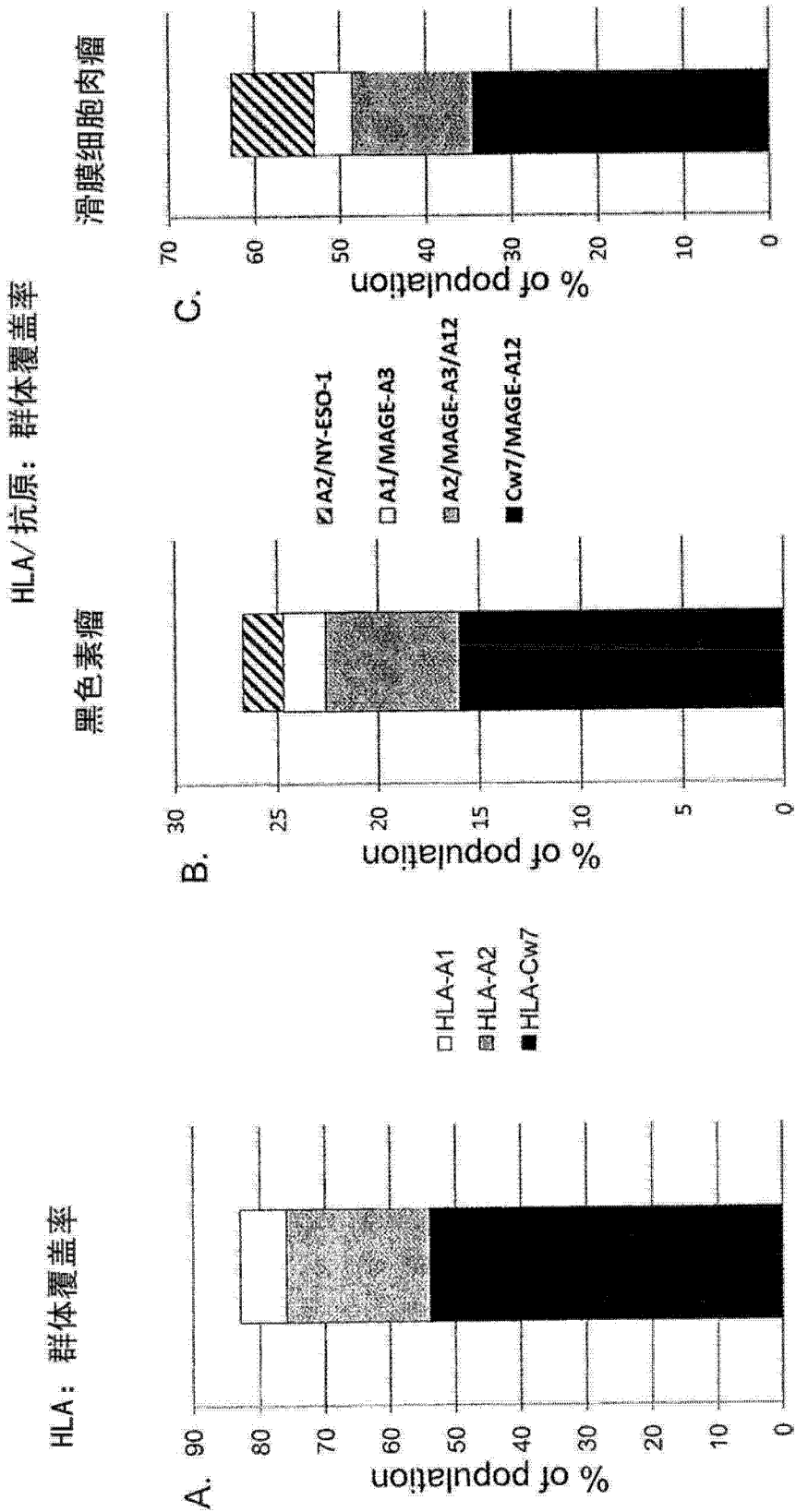


图 3

EBV B

Cw*0701*

Cw*0702*

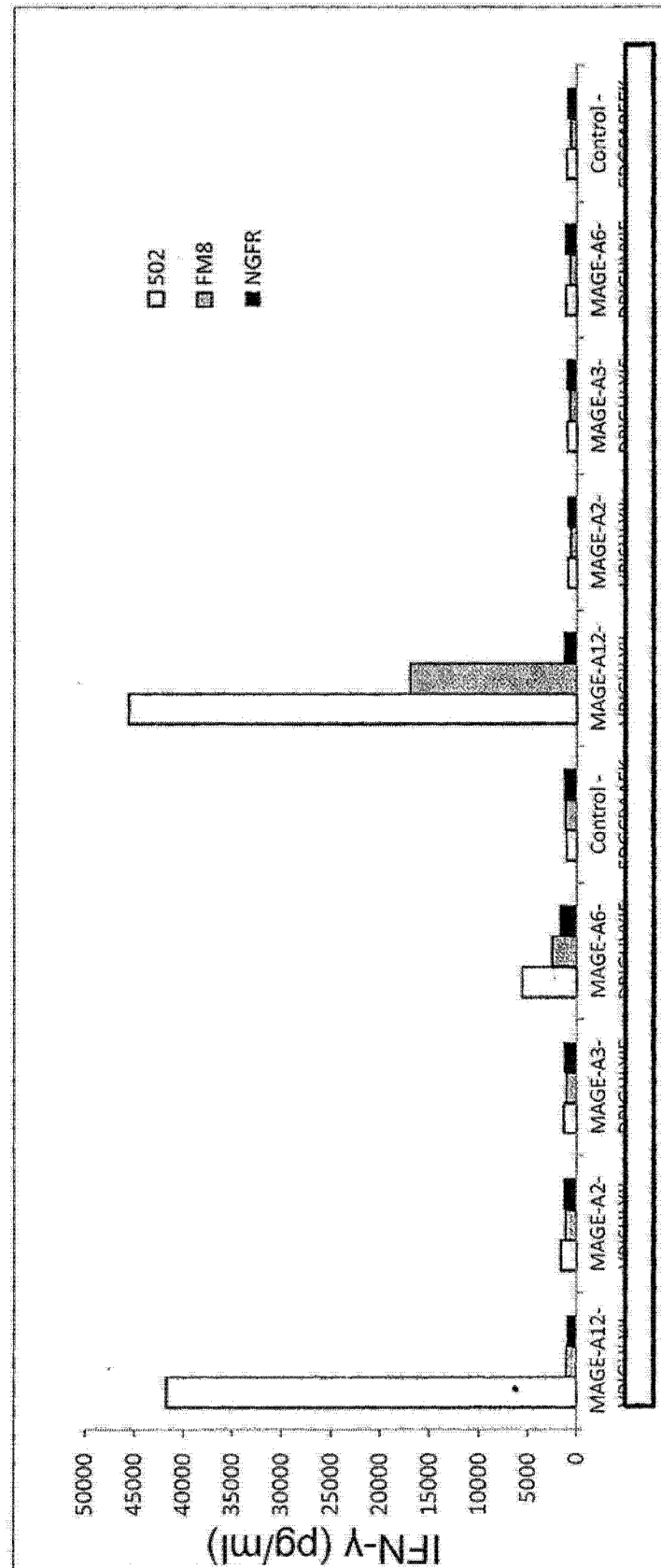


图 4

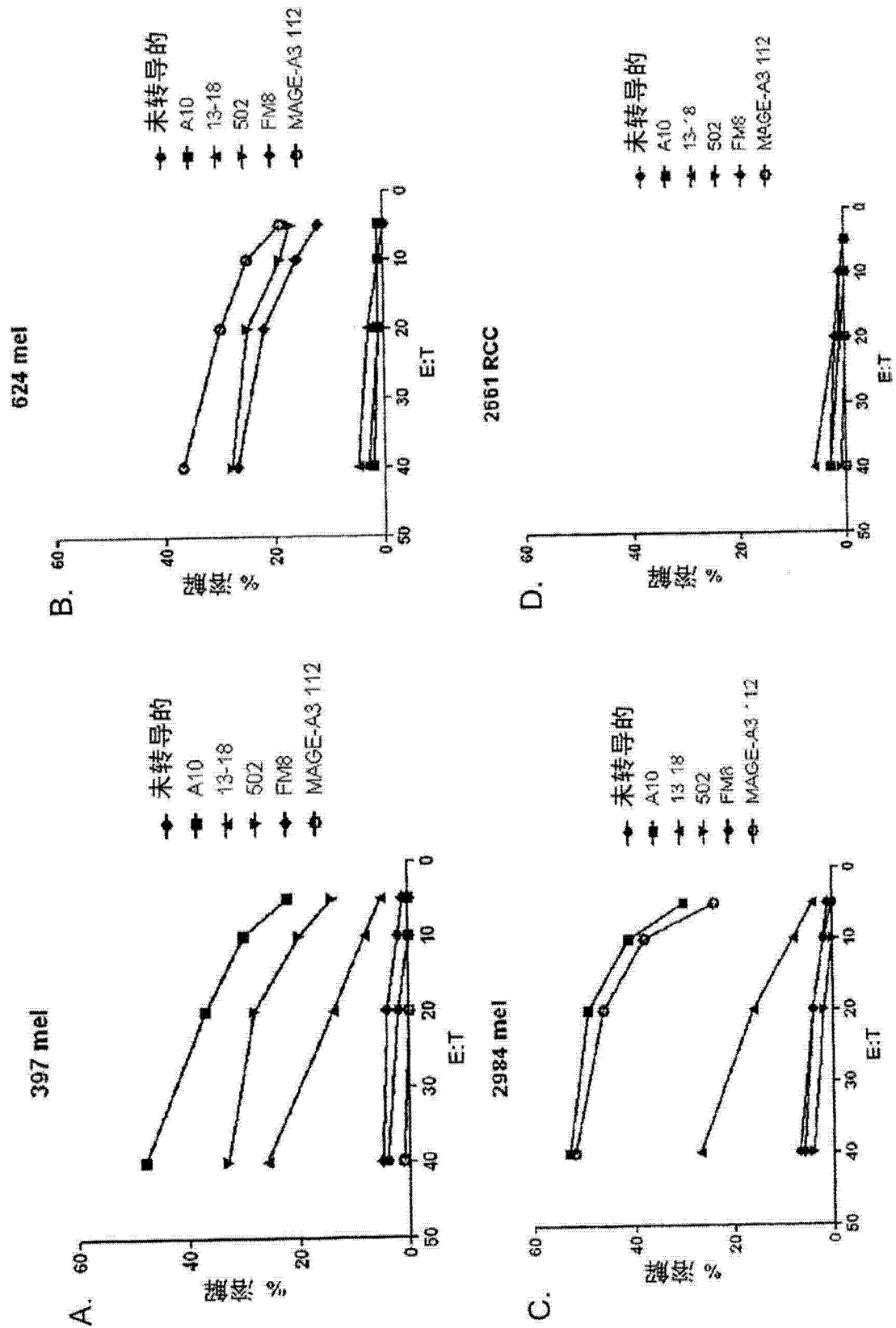


图 5

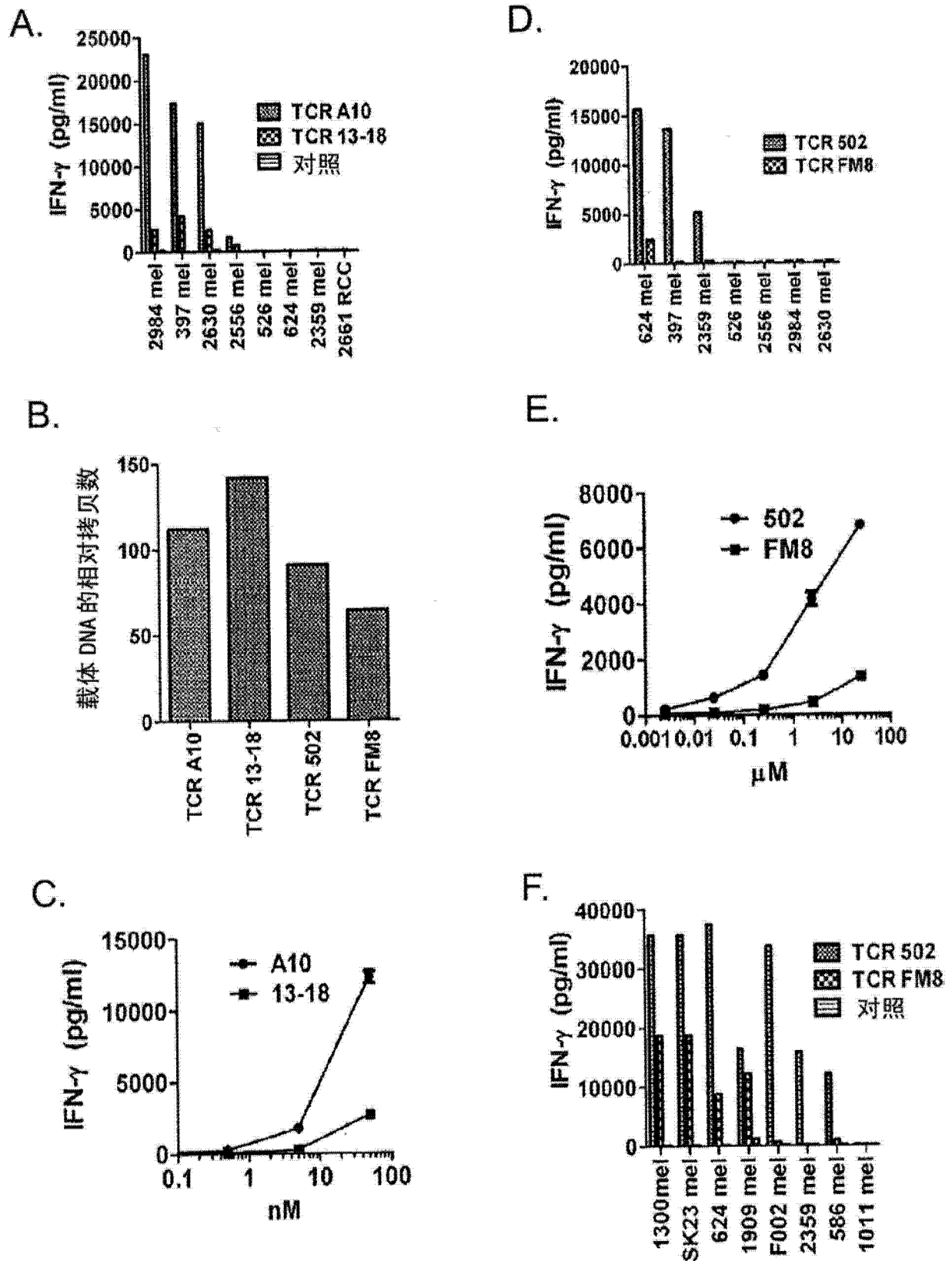


图 6

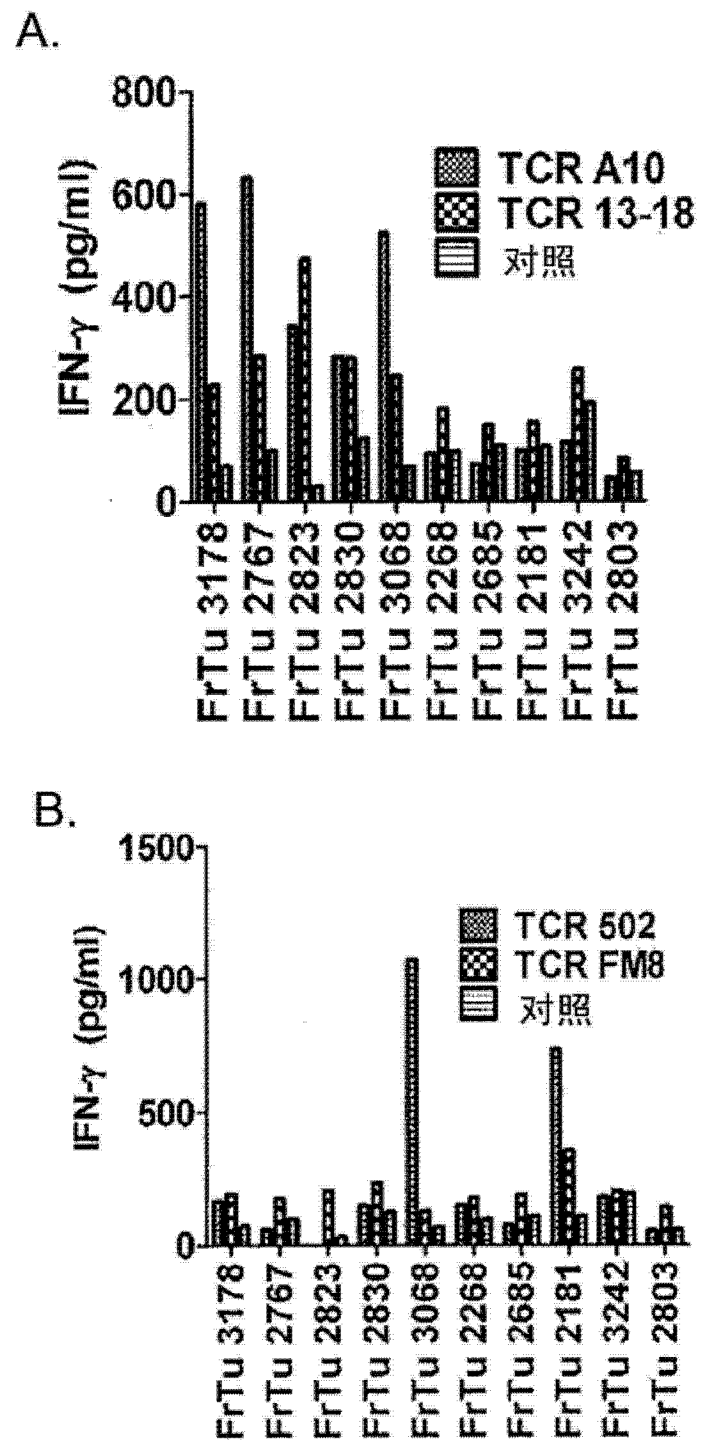


图 7

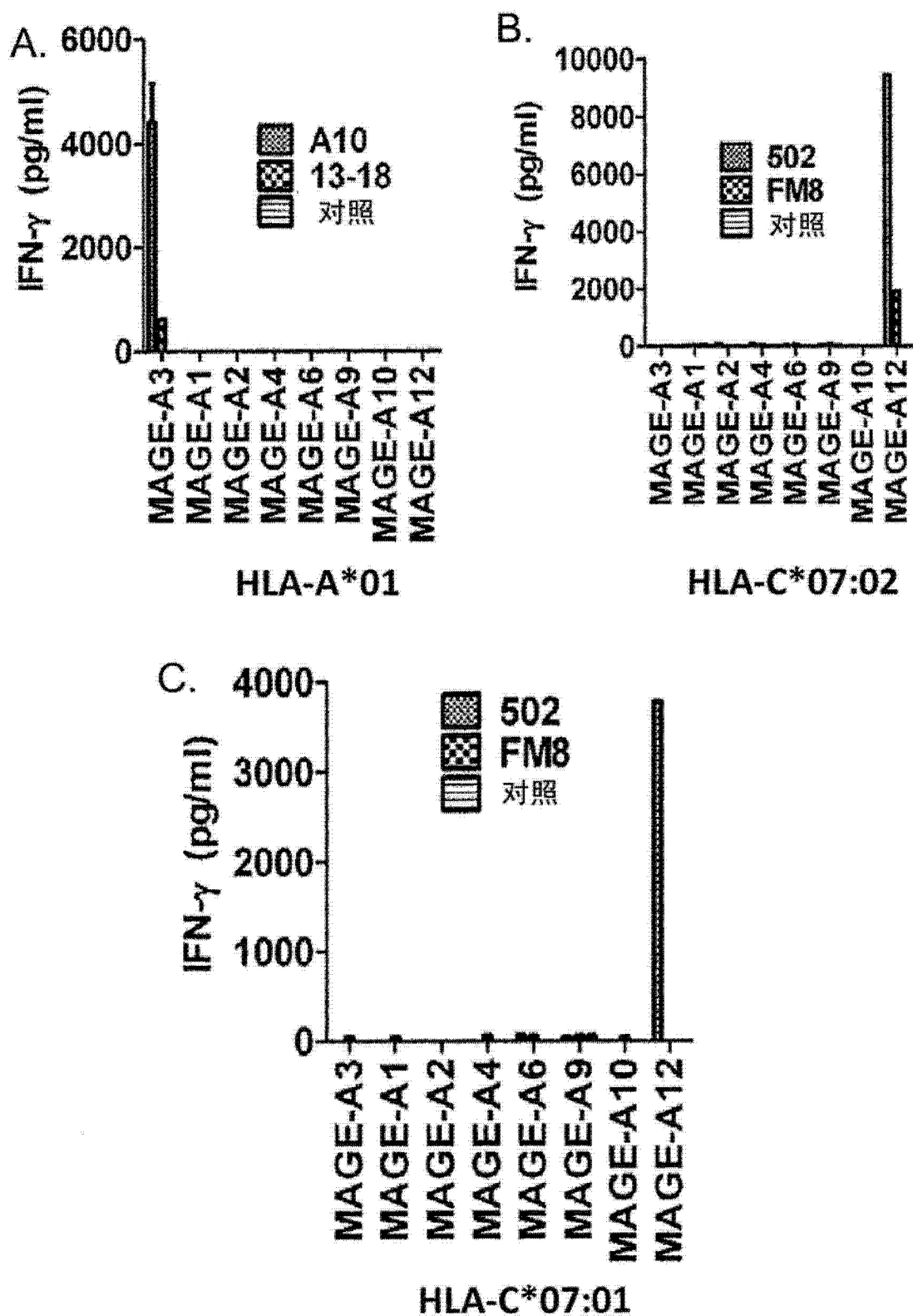


图 8

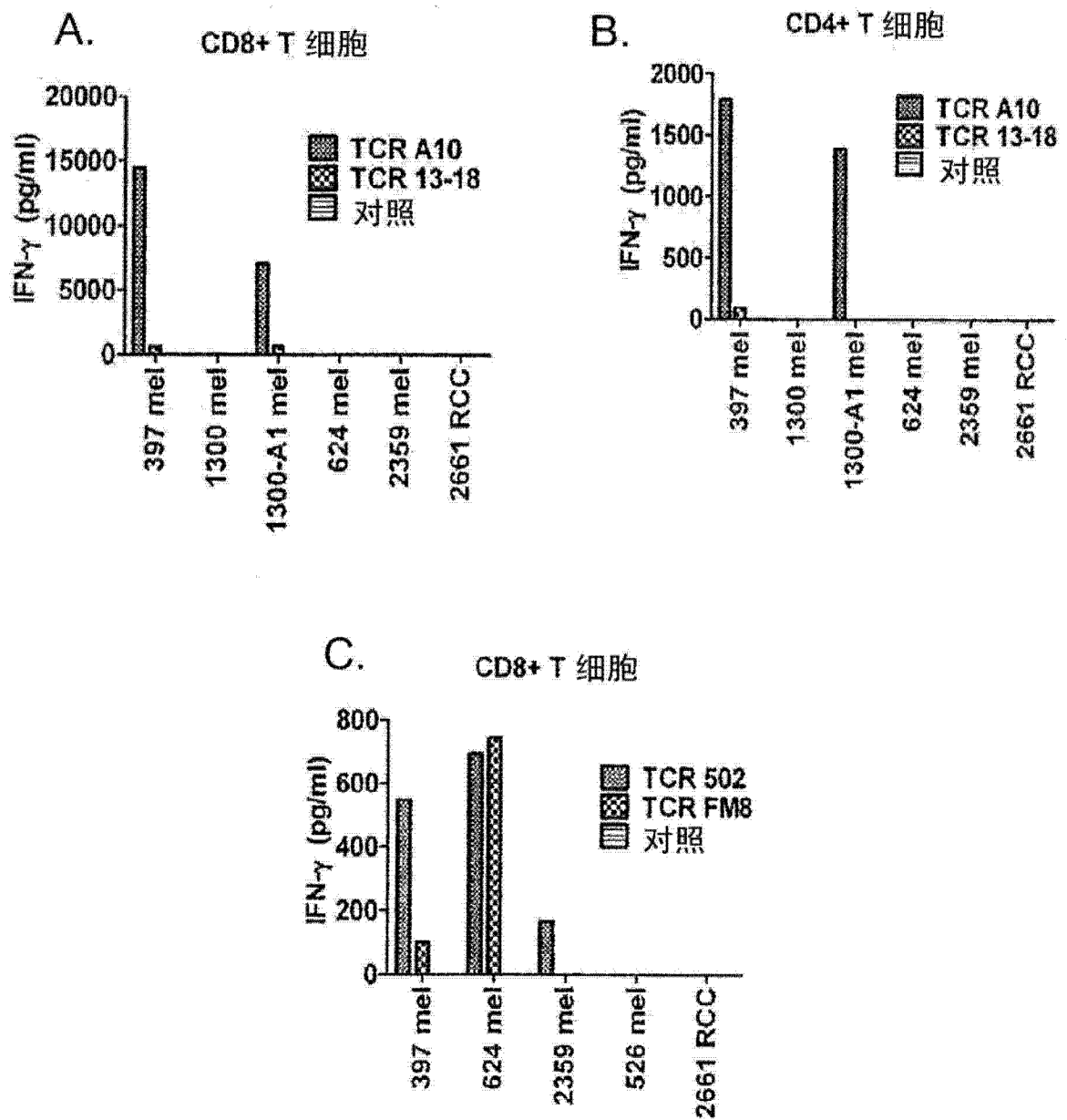


图 9