



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111406068 A

(43)申请公布日 2020.07.10

(21)申请号 201880047554.3

埃米莉·汉-忠·薛 王青

(22)申请日 2018.05.16

(74)专利代理机构 北京安信方达知识产权代理有限公司 11262

(30)优先权数据

62/506,674 2017.05.16 US

代理人 李敏春 郑霞

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.01.16

(51)Int.Cl.

C07K 16/18(2006.01)

C07K 14/71(2006.01)

C07K 14/82(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C07K 14/47(2006.01)

C07K 16/28(2006.01)

C07K 16/32(2006.01)

C07K 16/40(2006.01)

C07K 7/00(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/032996 2018.05.16

(87)PCT国际申请的公布数据

WO2018/213467 EN 2018.11.22

(71)申请人 约翰霍普金斯大学

地址 美国马里兰州

(72)发明人 B·沃戈尔斯滕 K·W·金泽勒

周士彬 杰奎琳·道格拉斯

迈克尔·S·黄 N·派帕多普勒斯

权利要求书3页 说明书58页 附图10页

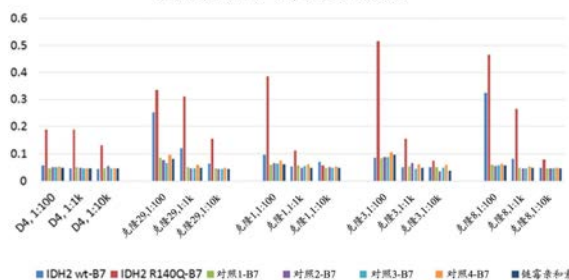
(54)发明名称

MANAbody及使用方法

(57)摘要

本文件提供了用于评价患有或疑似患有癌症的哺乳动物和/或用于治疗患有癌症的哺乳动物的方法和材料。例如,提供了包含可以与修饰的肽(例如,肿瘤抗原)结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,单链可变片段(scFv))的分子以及使用这样的分子的方法。

评价噬菌体克隆与一组单体的结合的ELISA



1. 一种分子,所述分子包含能够与肽-HLA- β -2微球蛋白复合物结合的抗原结合结构域,其中所述肽包含修饰的肽,其中所述HLA是I类HLA,并且其中所述抗原结合结构域不与包含所述修饰的肽的野生型形式的复合物结合。

2. 如权利要求1中任一项所述的分子,其中所述修饰的肽包含7个氨基酸至15个氨基酸。

3. 如权利要求2所述的分子,其中所述修饰的肽包含10个氨基酸。

4. 如权利要求1至权利要求3中任一项所述的分子,其中所述修饰的肽来源于修饰的IDH2多肽、修饰的EGFR多肽、修饰的p53多肽、修饰的KRAS多肽、修饰的HRAS多肽、修饰的NRAS多肽或修饰的CTNNB多肽。

5. 如权利要求1至权利要求4中任一项所述的分子,其中所述修饰的肽包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32。

6. 如权利要求5所述的分子,其中所述修饰的肽包含SEQ ID NO:1,其中所述I类HLA是HLA-B7,并且其中所述抗原结合片段包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8。

7. 如权利要求5所述的分子,其中所述修饰的肽包含SEQ ID NO:11,其中所述I类HLA是HLA-B7,并且其中所述抗原结合片段包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:380、SEQ ID NO:390、SEQ ID NO:391、SEQ ID NO:392和SEQ ID NO:393。

8. 如权利要求5所述的分子,其中所述修饰的肽包含SEQ ID NO:13,其中所述I类HLA是HLA-A2,并且其中所述抗原结合片段包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:324、SEQ ID NO:325、SEQ ID NO:326、SEQ ID NO:327、SEQ ID NO:328、SEQ ID NO:329和SEQ ID NO:330。

9. 如权利要求5所述的分子,其中所述修饰的肽包含SEQ ID NO:15,其中所述I类HLA是HLA-A2,并且其中所述抗原结合片段包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:331、SEQ ID NO:333、SEQ ID NO:336和SEQ ID NO:337。

10. 如权利要求5所述的分子,其中所述修饰的肽包含SEQ ID NO:16,其中所述I类HLA是HLA-A2,并且其中所述抗原结合片段包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:332、SEQ ID NO:334、SEQ ID NO:335、SEQ ID NO:336和SEQ ID NO:337。

11. 如权利要求5所述的分子,其中所述修饰的肽包含SEQ ID NO:18,其中所述I类HLA是HLA-A2,并且其中所述抗原结合片段包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:338、SEQ ID NO:339和SEQ ID NO:340。

12. 如权利要求5所述的分子,其中所述修饰的肽包含SEQ ID NO:20,其中所述I类HLA是HLA-A3,并且其中所述抗原结合片段包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:341、SEQ ID NO:342和SEQ ID NO:343。

13. 如权利要求5所述的分子,其中所述修饰的肽包含SEQ ID NO:21,其中所述I类HLA是HLA-A3,并且其中所述抗原结合片段包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:342、SEQ ID NO:343、SEQ ID NO:349、SEQ ID NO:350、SEQ ID NO:351、SEQ ID NO:352、SEQ ID NO:353、SEQ ID NO:354、SEQ ID NO:355、SEQ ID NO:356和SEQ ID NO:357。

14. 如权利要求5所述的分子,其中所述修饰的肽包含SEQ ID NO:22,其中所述I类HLA是HLA-A3,并且其中所述抗原结合片段包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:338、SEQ ID NO:339、SEQ ID NO:340、SEQ ID NO:341、SEQ ID NO:342、SEQ ID NO:343、SEQ ID NO:344、SEQ ID NO:345、SEQ ID NO:346、SEQ ID NO:347、SEQ ID NO:348、SEQ ID NO:369、SEQ ID NO:370、SEQ ID NO:371、SEQ ID NO:372、SEQ ID NO:373和SEQ ID NO:374。

15. 如权利要求5所述的分子,其中所述修饰的肽包含SEQ ID NO:24,其中所述I类HLA是HLA-A11,并且其中所述抗原结合片段包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:358、SEQ ID NO:359、SEQ ID NO:360、SEQ ID NO:361、SEQ ID NO:362、SEQ ID NO:363、SEQ ID NO:364、SEQ ID NO:365、SEQ ID NO:366、SEQ ID NO:367和SEQ ID NO:368。

16. 如权利要求5所述的分子,其中所述修饰的肽包含SEQ ID NO:26,其中所述I类HLA是HLA-A3,并且其中所述抗原结合片段包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:375、SEQ ID NO:376、SEQ ID NO:377、SEQ ID NO:378和SEQ ID NO:379。

17. 如权利要求5所述的分子,其中所述修饰的肽包含SEQ ID NO:28,其中所述I类HLA是HLA-A1,并且其中所述抗原结合片段包含SEQ ID NO:394的氨基酸序列。

18. 如权利要求5所述的分子,其中所述修饰的肽包含SEQ ID NO:30,其中所述I类HLA是HLA-A1,并且其中所述抗原结合片段包含SEQ ID NO:395的氨基酸序列。

19. 如权利要求5所述的分子,其中所述修饰的肽包含SEQ ID NO:31,其中所述I类HLA是HLA-A1,并且其中所述抗原结合片段包含SEQ ID NO:396的氨基酸序列。

20. 如权利要求5所述的分子,其中所述修饰的肽包含SEQ ID NO:32,其中所述I类HLA是HLA-A1,并且其中所述抗原结合片段包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:397、SEQ ID NO:398、SEQ ID NO:399、SEQ ID NO:400和SEQ ID NO:401。

21. 如权利要求1至权利要求20中任一项所述的分子,其中所述分子选自由以下组成的组:抗体、抗体片段、单链可变片段(scFv)、嵌合抗原受体(CAR)、T细胞受体(TCR)、TCR模拟物、串联scFv、双特异性T细胞衔接器、双抗体、单链双抗体、scFv-Fc、双特异性抗体和双亲和力和重靶向抗体(DART)。

22. 如权利要求1至权利要求21中任一项所述的分子,其中所述分子是单链双抗体。

23. 如权利要求1至权利要求22中任一项所述的分子,其中所述分子还包含能够与选自由以下组成的组的效应细胞受体结合的抗原结合结构域:CD3、CD28、CD4、CD8、CD16a、NKG2D、PD-1、CTLA-4、4-1BB、OX40、ICOS和CD27。

24. 如权利要求23所述的分子,其中能够与效应细胞结合的所述抗原结合结构域能够与CD3结合,其中所述抗原结合结构域包含选自由以下组成的组的氨基酸序列:SEQ ID NO:404、SEQ ID NO:405、SEQ ID NO:406、SEQ ID NO:407、SEQ ID NO:408、SEQ ID NO:409、SEQ ID NO:410、SEQ ID NO:411、SEQ ID NO:412、SEQ ID NO:413、SEQ ID NO:414、SEQ ID NO:415、SEQ ID NO:416和SEQ ID NO:417。

25. 如权利要求23所述的分子,其中能够与效应细胞结合的所述抗原结合结构域能够与CD16a结合。

26. 如权利要求23所述的分子,其中能够与效应细胞结合的所述抗原结合结构域能够与NKG2D结合。

27. 一种嵌合抗原受体 (CAR), 所述CAR包含:
细胞外结构域, 所述细胞外结构域包含权利要求1至权利要求26中任一项所述的抗原结合结构域;
跨膜结构域; 以及
细胞内结构域。
28. 如权利要求27所述的CAR, 其中所述跨膜结构域包括CD4、CD8或CD28的跨膜结构域。
29. 如权利要求27或权利要求28所述的CAR, 其中所述细胞内结构域包括来自CD28、DAP10、ICOS、OX40和/或4-1BB的一个或多个共刺激结构域。
30. 如权利要求27至权利要求29中任一项所述的CAR, 其中所述细胞内结构域包含来自CD3- ζ 的信号传导结构域。
31. 一种T细胞, 所述T细胞表达权利要求27至权利要求30中任一项所述的CAR。
32. 一种用于治疗患有癌症的哺乳动物的方法, 所述方法包括:
向所述哺乳动物施用权利要求1至权利要求26中任一项所述的分子, 其中所述癌症包含表达所述修饰的肽的癌细胞。
33. 一种用于治疗患有癌症的哺乳动物的方法, 所述方法包括:
向所述哺乳动物施用表达权利要求27至权利要求30中任一项所述的CAR的T细胞, 其中所述癌症包含表达所述修饰的肽的癌细胞。
34. 如权利要求32或权利要求33所述的方法, 其中所述哺乳动物是人类。
35. 如权利要求32至权利要求34中任一项所述的方法, 其中所述癌症选自由以下组成的组: 霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、急性髓性白血病、肺癌、胰腺癌、胃癌、结肠直肠癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胆道癌、肝癌、骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、食管癌、胃癌、肾癌、骨癌、软组织癌、头颈癌、多形性成胶质细胞瘤和星形细胞瘤。

MANAbody及使用方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请要求于2017年5月16日提交的美国专利申请序列号62/506,674的权益。在先申请的公开内容被认为是本申请的公开内容的一部分(并且通过引用并入)。

[0003] 关于联邦资助的声明

[0004] 本发明根据来自美国国立卫生研究院(the National Institutes of Health)的资助号CA62924在美国政府支持下进行。美国政府在本发明中具有某些权利。

[0005] 背景

1. 技术领域

[0006] 本文件涉及用于评价患有或疑似患有癌症的哺乳动物和/或用于治疗患有癌症的哺乳动物的方法和材料。例如,本文件提供了用于使用包含可以与修饰的肽(例如,肿瘤抗原)结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,单链可变片段(scFv))的分子来治疗患有癌症的哺乳动物的方法和材料。

[0007] 2. 背景信息

[0008] 癌症中的体细胞突变是癌症疗法的理想靶,因为它们仅在肿瘤细胞而非正常细胞中被独特地表达。特别地,靶向驱动基因蛋白(大致细分为致癌基因蛋白和肿瘤抑制蛋白)具有另外的益处。首先,肿瘤对它们赋予致癌能力的依赖使耐受不太可能。其次,这些突变通常在肿瘤发展期间早期发生,因此基本上所有子代癌细胞都将包含突变。最后,驱动基因蛋白倾向于在许多患者中共有热点突变,因此靶向单一突变的疗法可以被应用于广泛的患者群体。

[0009] 大多数突变体蛋白(包括大多数突变体驱动基因蛋白)是细胞内的。虽然小分子可以靶向细胞内蛋白,但是对于大多数这样的驱动基因蛋白,开发可以特异性地抑制突变体驱动基因而不是其野生型(wt)对应物的活性的小分子仍然遥不可及。可以具有区分单个氨基酸突变的能力的抗体通常可以仅靶向细胞外表位。

[0010] 免疫系统通过抗原加工和呈递对细胞的细胞内内容物进行采样。在蛋白水解之后,所得到的肽的一部分被加载到人类白细胞抗原(HLA)上,并且被送至细胞表面,在该处它们经其T细胞受体(TCR)充当T细胞区分自身肽与非自身肽的途径。例如,病毒感染的细胞将在其HLA中呈递病毒肽,触发T细胞以杀死该细胞。类似地,在癌症中,突变体肽可以被呈递到癌细胞表面上的HLA中,这被称为突变相关新抗原(Mutation-Associated Neo-Antigen)MANA。在一些情况下,并且在不同程度上,患者可以对这些突变体肽-HLA新抗原产生抗癌T细胞应答,并且检查点阻断抗体可以进一步增强该应答。然而,许多患者,特别是具有低的突变负担的那些患者,不能够产生足够的抗癌T细胞应答。因此,特异性地靶向MANA的疗法或诊断可以提供真正的诊断或治疗癌症的肿瘤特异性方法。

[0011] HLA I类蛋白存在于所有有核细胞上。存在三种经典的HLA I类基因A、B和C,其中每一种都是高度多态的。每个HLA等位基因具有特定的肽结合基序,并且因此,仅某些肽将与某些HLA等位基因结合。

[0012] 在本领域中对开发诊断、监测和有效地治疗癌症的新方法存在持续需求。

[0013] 概述

[0014] 本文件提供了用于治疗患有癌症的哺乳动物的方法和材料。例如,本文件提供了用于使用包含可以与修饰的肽(例如,存在于肽-HLA-b2M复合物中的修饰的肽)结合的一个或更多个抗原结合结构域(例如,scFv)的一种或更多种分子来治疗患有癌症(例如,表达修饰的肽的癌症)的哺乳动物的方法和材料。在一些情况下,包含可以与修饰的肽(例如,存在于肽-HLA-b2M复合物中的修饰的肽)结合的一个或更多个抗原结合结构域(例如,scFv)的一种或更多种分子可以被施用至患有癌症(例如,表达修饰的肽的癌症)的哺乳动物,以治疗哺乳动物。

[0015] 如本文中显示的,在许多急性髓性白血病(AML)病例中,scFv被鉴定为靶向(例如,结合)存在于肽-HLA-b2M复合物中的许多突变相关新抗原(MANA)。还如本文中显示的,scFv被用于设计嵌合抗原受体(CAR)T细胞(CART;也被缩写为CAR T或CAR-T)和能够识别并杀死表达MANA的细胞的双特异性抗体两者。特异性地靶向MANA的能力提供诊断和/或治疗癌症的肿瘤特异性方法。例如,特异性地靶向MANA的scFv可以用于全长抗体或其片段、抗体药物缀合物(ADC)、抗体放射性核素缀合物、CART或双特异性抗体,以诊断和/或治疗患有癌症的哺乳动物。

[0016] 一般来说,本文件的一个方面是一种分子,所述分子包含可以与肽-HLA-β-2微球蛋白复合物结合的抗原结合结构域,其中肽包含修饰的肽,其中HLA是I类HLA,并且其中抗原结合结构域不与包含修饰的肽的野生型形式的复合物结合。修饰的肽可以包含7个氨基酸至15个氨基酸(例如,10个氨基酸)。修饰的肽可以来源于修饰的IDH2多肽、修饰的EGFR多肽、修饰的p53多肽、修饰的KRAS多肽、修饰的HRAS多肽、修饰的NRAS多肽或修饰的CTNNB多肽。修饰的肽可以包含以下中列出的氨基酸序列:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:32。当修饰的肽包含SEQ ID NO:1时,I类HLA可以是HLA-B7,并且抗原结合片段可以包含以下中列出的氨基酸序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6、或SEQ ID NO:8。当修饰的肽包含SEQ ID NO:11时,I类HLA可以是HLA-B7,并且抗原结合片段可以包含以下中列出的氨基酸序列:SEQ ID NO:380、SEQ ID NO:390、SEQ ID NO:391、SEQ ID NO:392或SEQ ID NO:393。当修饰的肽包含SEQ ID NO:13时,I类HLA可以是HLA-A2,并且抗原结合片段可以包含以下中列出的氨基酸序列:SEQ ID NO:324、SEQ ID NO:325、SEQ ID NO:326、SEQ ID NO:327、SEQ ID NO:328、SEQ ID NO:329或SEQ ID NO:330。当修饰的肽包含SEQ ID NO:15时,I类HLA可以是HLA-A2,并且抗原结合片段可以包含以下中列出的氨基酸序列:SEQ ID NO:331、SEQ ID NO:333、SEQ ID NO:336或SEQ ID NO:337。当修饰的肽包含SEQ ID NO:16时,I类HLA可以是HLA-A2,并且抗原结合片段可以包含以下中列出的氨基酸序列:SEQ ID NO:332、SEQ ID NO:334、SEQ ID NO:335、SEQ ID NO:336、或SEQ ID NO:337。当修饰的肽包含SEQ ID NO:18时,I类HLA可以是HLA-A2,并且抗原结合片段可以包含以下中列出的氨基酸序列:SEQ ID NO:338、SEQ ID NO:339或SEQ ID NO:340。当修饰的肽包含SEQ ID NO:20时,I类HLA可以是HLA-A3,并且抗原结合片段可以包含以下中列出的氨基酸序列:SEQ ID NO:341、SEQ ID NO:342或SEQ ID NO:343。当修饰的肽包含SEQ ID NO:

21时,I类HLA可以是HLA-A3,并且抗原结合片段可以包含以下中列出的氨基酸序列:SEQ ID NO:342、SEQ ID NO:343、SEQ ID NO:349、SEQ ID NO:350、SEQ ID NO:351、SEQ ID NO:352、SEQ ID NO:353、SEQ ID NO:354、SEQ ID NO:355、SEQ ID NO:356或SEQ ID NO:357。当修饰的肽包含SEQ ID NO:22时,I类HLA可以是HLA-A3,并且抗原结合片段可以包含以下中列出的氨基酸序列:SEQ ID NO:338、SEQ ID NO:339、SEQ ID NO:340、SEQ ID NO:341、SEQ ID NO:342、SEQ ID NO:343、SEQ ID NO:344、SEQ ID NO:345、SEQ ID NO:346、SEQ ID NO:347、SEQ ID NO:348、SEQ ID NO:369、SEQ ID NO:370、SEQ ID NO:371、SEQ ID NO:372、SEQ ID NO:373或SEQ ID NO:374。当修饰的肽包含SEQ ID NO:24时,I类HLA可以是HLA-A11,并且抗原结合片段可以包含以下中列出的氨基酸序列:SEQ ID NO:358、SEQ ID NO:359、SEQ ID NO:360、SEQ ID NO:361、SEQ ID NO:362、SEQ ID NO:363、SEQ ID NO:364、SEQ ID NO:365、SEQ ID NO:366、SEQ ID NO:367或SEQ ID NO:368。当修饰的肽包含SEQ ID NO:26时,I类HLA可以是HLA-A3,并且抗原结合片段可以包含以下中列出的氨基酸序列:SEQ ID NO:375、SEQ ID NO:376、SEQ ID NO:377、SEQ ID NO:378或SEQ ID NO:379。当修饰的肽包含SEQ ID NO:28时,I类HLA可以是HLA-A1,并且抗原结合片段可以包含SEQ ID NO:394中列出的氨基酸序列。当修饰的肽包含SEQ ID NO:30时,I类HLA可以是HLA-A1,并且抗原结合片段可以包含SEQ ID NO:395中列出的氨基酸序列。当修饰的肽包含SEQ ID NO:31时,I类HLA可以是HLA-A1,并且抗原结合片段可以包含SEQ ID NO:396中列出的氨基酸序列。当修饰的肽包含SEQ ID NO:32时,I类HLA可以是HLA-A1,并且抗原结合片段可以包含以下中列出的氨基酸序列:SEQ ID NO:397、SEQ ID NO:398、SEQ ID NO:399、SEQ ID NO:400或SEQ ID NO:401。分子可以是抗体、抗体片段、scFv、CAR、TCR、TCR模拟物、串联scFv、双特异性T细胞衔接器、双抗体、单链双抗体、scFv-Fc、双特异性抗体、或双亲和力重靶向抗体(DART)。例如,分子可以是单链双抗体。分子还可以包含可以与效应细胞受体(例如CD3、CD28、CD4、CD8、CD16a、NKG2D、PD-1、CTLA-4、4-1BB、OX40、ICOS或CD27)结合的抗原结合结构域。当可以与效应细胞结合的抗原结合结构域可以与CD3结合时,抗原结合结构域可以包含以下中列出的氨基酸序列:SEQ ID NO:404、SEQ ID NO:405、SEQ ID NO:406、SEQ ID NO:407、SEQ ID NO:408、SEQ ID NO:409、SEQ ID NO:410、SEQ ID NO:411、SEQ ID NO:412、SEQ ID NO:413、SEQ ID NO:414、SEQ ID NO:415、SEQ ID NO:416或SEQ ID NO:417。

[0017] 在另一个方面中,本文件的特征在于CAR。CAR可以包含细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域,该细胞外结构域包含本文所描述的任何抗原结合结构域(例如,可以与肽-HLA- β -2微球蛋白复合物结合的抗原结合结构域,其中肽包含修饰的肽,其中HLA是I类HLA,并且其中抗原结合结构域不与包含修饰的肽的野生型形式的复合物结合)。跨膜结构域可以包括CD4、CD8或CD28的跨膜结构域。细胞胞内结构域可以包括来自CD28、DAP10、ICOS、OX40和/或4-1BB的一个或更多个共刺激结构域。细胞内结构域可以包括来自CD3- ζ 的信号传导结构域。

[0018] 在另一个方面中,本文件的特征在于表达本文描述的任何CAR(例如,包含细胞外结构域、跨膜结构域和胞内结构域的CAR,该细胞外结构域包含本文描述的任何抗原结合结构域)的T细胞。T细胞可以表达包含细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域的CAR,该细胞外结构域包含可以与肽-HLA- β -2微球蛋白复合物结合的抗原结合结构域,其中肽包含修饰的肽,其中HLA是I类HLA,并且其中抗原结合结构域不与包含修饰的肽的野生型形式的复

合物结合。

[0019] 在另一个方面中,本文件的特征在于用于治疗患有癌症的哺乳动物的方法。方法可以包括以下或基本上由以下组成:向哺乳动物施用一种或更多种分子,所述分子包含本文描述的任何抗原结合结构域(例如,可以与肽-HLA- β -2微球蛋白复合物结合的抗原结合结构域,其中肽包含修饰的肽,其中HLA是I类HLA,并且其中抗原结合结构域不与包含修饰的肽的野生型形式的复合物结合),其中癌症包含表达修饰的肽的癌细胞。哺乳动物可以是人类。癌症可以是霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、AML、肺癌、胰腺癌、胃癌(gastric cancer)、结肠直肠癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胆道癌、肝癌、骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、食管癌、胃癌(stomach cancer)、肾癌、骨癌、软组织癌、头颈癌、多形性成胶质细胞瘤和星形细胞瘤。

[0020] 在另一个方面中,本文件的特征在于用于治疗患有癌症的哺乳动物的方法。方法可以包括以下或基本上由以下组成:向哺乳动物施用一个或更多个T细胞,所述T细胞表达本文描述的CAR中的任一种(例如,包含细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域的CAR,该细胞外结构域包含本文描述的任何抗原结合结构域),其中癌症包含表达修饰的肽的癌细胞。哺乳动物可以是人类。癌症可以是霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、AML、肺癌、胰腺癌、胃癌、结肠直肠癌、卵巢癌、子宫内膜癌、胆道癌、肝癌、骨髓瘤、乳腺癌、前列腺癌、食管癌、胃癌、肾癌、骨癌、软组织癌、头颈癌、多形性成胶质细胞瘤和星形细胞瘤。

[0021] 除非另有定义,否则本文使用的所有技术和科学术语具有与由本发明所属技术领域的普通技术人员之一通常理解的相同的含义。尽管与本文描述的那些相似或等同的方法和材料可以用于实践本发明,但下文描述了合适的方法和材料。在本文中提及的所有出版物、专利申请、专利及其他参考文献均通过引用以其整体并入。在冲突的情况下,将以本说明书(包括定义)为准。此外,材料、方法和实例仅是说明性的而并不意图限制。

[0022] 在附图和下文的描述中阐述了本发明的一个或更多个实施方案的细节。本发明的其他特征、目的和优点根据说明书和附图以及根据权利要求将是明显的。

[0023] 附图描述

[0024] 图1包含显示IDH2 R140Q HLA-B7 scFv的特异性的ELISA结果。肽-HLA生物素化单体被涂覆在链霉亲和素板上,该肽-HLA生物素化单体包括野生型(wt)形式的IDH2肽(SPNGTIRNIL;SEQ ID NO:2)、包含R140Q突变的IDH2肽(SPNGTIQNIL;SEQ ID NO:1)以及包含以下对照肽的四种对照HLA-B7单体:对照1肽是SPGAANKRPI(人工序列;SEQ ID NO:418)、对照2肽是RPIPIKYKAM(来自突变体MyD88 L265P;SEQ ID NO:9)、对照3肽是KPITIGRHAH(来自与wt IDH2不同的肽;SEQ ID NO:10)和对照4肽是AVGVGKSAL(来自突变体KRAS G12V;SEQ ID NO:11)。在淘选(panning)中鉴定的五个克隆在孔中以指定的稀释度,随后是兔抗噬菌体抗体,然后是抗兔-HRP抗体进行孵育。

[0025] 图2包含显示对肽脉冲的A2+细胞的流式细胞术的图。将T2细胞在无血清培养基中在37°C用以下肽脉冲过夜:仅 β -2微球蛋白(b2M)蛋白、或具有EGFR T790M(789-797)肽(IMQLMPFGC;SEQ ID NO:13)的b2M。EGFR wt(789-797)肽(ITQLMPFGC;SEQ ID NO:14)不与HLA-A2结合。将细胞用每100 μ L细胞10 μ L沉淀的噬菌体进行沾染(stain),洗涤并且用兔抗M13抗体进行沾染,然后洗涤并且用抗兔-PE抗体进行沾染。将细胞用存活/死亡近红外(Near-IR)染料染色,洗涤,并且通过LSRII流式细胞仪来分析。

[0026] 图3包含显示对肽脉冲的B7+细胞的流式细胞术的图。将RPMI-6666细胞在无血清培养基中在37℃用以下肽脉冲过夜:仅b2M蛋白、具有IDH2突变体R140Q肽 (SPNGTIQNIL;SEQ ID NO:1)的b2M蛋白、或具有IDH2wt肽 (SPNGTIRNIL;SEQ ID NO:2)的b2M。将细胞用每100μL细胞10μL沉淀的噬菌体进行沾染,洗涤并且用兔抗M13抗体进行沾染,然后洗涤并且用抗兔-PE抗体进行沾染。将细胞用存活/死亡近红外染料染色,洗涤,并且通过LSRII流式细胞仪来分析。

[0027] 图4包含显示对肽脉冲的A2+细胞的流式细胞术的图。将T2细胞在无血清培养基中在37℃用以下肽脉冲过夜:仅b2M、具有p53突变体R248Q (245-254)肽 (GMNQRPIILTI;SEQ ID NO:15)的b2M、具有p53突变体R248W (245-254)肽 (GMNWRPIILTI;SEQ ID NO:16)的b2M、具有p53wt (245-254)肽 (GMNRRPIILTI;SEQ ID NO:17)的b2M、或具有HLA-A2对照肽HLA (ELAGIGILTV;SEQ ID NO:403)的b2M。将细胞用每100μL细胞10μL沉淀的噬菌体进行沾染,洗涤并且用兔抗M13抗体进行沾染,然后洗涤并且用抗兔-PE抗体进行沾染。将细胞用存活/死亡近红外染料染色,洗涤,并且通过LSRII流式细胞仪来分析。

[0028] 图5包含显示对肽脉冲的A2+细胞的流式细胞术的图。将T2细胞在无血清培养基中在37℃用以下肽脉冲过夜:仅b2M、具有KRAS突变体G12V (6-14)肽 (LVVVGAVGV;SEQ ID NO:18)的b2M、或具有KRAS wt (6-14)肽 (LVVVGAGGV;SEQ ID NO:19)的b2M。将细胞用每100μL细胞10μL沉淀的噬菌体进行沾染,洗涤并且用兔抗M13抗体进行沾染,然后洗涤并且用抗兔-PE抗体进行沾染。将细胞用存活/死亡近红外染料染色,洗涤,并且通过LSRII流式细胞仪来分析。

[0029] 图6包含显示出对肽脉冲的A3+细胞的流式细胞术的图。将T2A3细胞在无血清培养基中在37℃用以下肽脉冲过夜:仅b2M、具有KRAS突变体G12C (8-16)肽 (VVGACVGVK;SEQ ID NO:419)的b2M、具有KRAS突变体G12D (8-16)肽 (VVGADGVGVK;SEQ ID NO:420)的b2M、具有KRAS突变体G12V (8-16)肽 (VVGAVGVGVK;SEQ ID NO:22)的b2M、具有KRAS突变体G12C (7-16)肽 (VVGACVGVK;SEQ ID NO:20)的b2M、具有KRAS突变体G12D (7-16)肽 (VVGADGVGVK;SEQ ID NO:21)的b2M、具有KRAS突变体G12V (7-16)肽 (VVGAVGVGVK;SEQ ID NO:22)的b2M、具有KRAS wt (8-16)肽 (VVGAGGVGVK;SEQ ID NO:25)的b2M、具有KRAS wt (7-16)肽 (VVGAGGVGVK;SEQ ID NO:23)的b2M、或CTNNB S45F (41-49)肽 (TTAPFLSGK;SEQ ID NO:26)的b2M。将细胞用每100μL细胞10μL沉淀的噬菌体进行染,洗涤并且用兔抗M13抗体进行沾染,然后洗涤并且用抗兔-PE抗体进行沾染。将细胞用存活/死亡近红外染料染色,洗涤,并且通过LSRII流式细胞仪来分析。

[0030] 图7包含显示对肽脉冲的A3+细胞的流式细胞术的图。将T2A3细胞在无血清培养基中在37℃用以下肽脉冲过夜:仅b2M、具有KRAS突变体G12V (7-16)肽 (VVGAVGVGVK;SEQ ID NO:22)的b2M、或具有KRAS wt (7-16)肽 (VVGAGGVGVK;SEQ ID NO:23)的b2M。将细胞用每100μL细胞10μL沉淀的噬菌体进行沾染,并且洗涤并且用兔抗M13抗体进行沾染,然后洗涤并且用抗兔-PE抗体进行沾染。将细胞用存活/死亡近红外染料染色,洗涤,并且通过LSRII流式细胞仪来分析。

[0031] 图8包含显示出对肽脉冲的A3+细胞的流式细胞术的图。将T2A3细胞在无血清培养基中在37℃用以下肽脉冲过夜:仅b2M、具有KRAS突变体G12C (7-16)肽 (VVGACVGVK;SEQ ID NO:20)的b2M、具有KRAS突变体G12D (7-16)肽 (VVGADGVGVK;SEQ ID NO:21)的b2M、具有KRAS

突变体G12V (7-16) 肽 (VVVGAVGVGK; SEQ ID NO:22) 的b2M、或具有KRAS wt (7-16) 肽 (VVVGAGGVGK; SEQ ID NO:23) 的b2M。将细胞用每100 μ L细胞10 μ L沉淀的噬菌体进行沾染, 洗涤并且用兔抗M13抗体进行沾染, 然后洗涤并且用抗兔-PE抗体进行沾染。将细胞用存活/死亡近红外染料染色, 洗涤, 并且通过LSRII流式细胞仪来分析。

[0032] 图9包含显示对肽脉冲的A11+细胞的流式细胞术的图。将Hs611.T细胞在无血清培养基中在37 $^{\circ}$ C用以下肽脉冲过夜: 仅b2M、具有KRAS突变体G12C (7-16) 肽 (VVVGACGVGK; SEQ ID NO:20) 的b2M、具有KRAS突变体G12D (7-16) 肽 (VVVGADGVGK; SEQ ID NO:21) 的b2M、具有KRAS突变体G12V (7-16) 肽 (VVVGAVGVGK; SEQ ID NO:22) 的b2M、或具有KRAS wt (7-16) 肽 (VVVGAGGVGK; SEQ ID NO:23) 的b2M。将细胞用每100 μ L细胞10 μ L沉淀的噬菌体进行沾染, 洗涤并且用兔抗M13抗体进行沾染, 然后洗涤并且用抗兔-PE抗体进行沾染。将细胞用存活/死亡近红外染料染色, 洗涤, 并且通过LSRII流式细胞仪来分析。

[0033] 图10包含显示对肽脉冲的A11+细胞的流式细胞术的图。将MINO细胞在无血清培养基中在37 $^{\circ}$ C用以下肽脉冲过夜: 仅b2M、具有KRAS突变体G12D (8-16) 肽 (VVGADGVGK; SEQ ID NO:24) 的b2M、或具有KRAS wt (8-16) 肽 (VVGAGGVGK; SEQ ID NO:25) 的b2M。将细胞用每100 μ L细胞10 μ L沉淀的噬菌体进行沾染, 洗涤并且用兔抗M13抗体进行沾染, 然后洗涤并且用抗兔-PE抗体进行沾染。将细胞用存活/死亡近红外染料染色, 洗涤, 并且通过LSRII流式细胞仪来分析。

[0034] 图11包含显示对肽脉冲的A11+细胞的流式细胞术的图。将Hs611.T细胞在无血清培养基中在37 $^{\circ}$ C用以下肽脉冲过夜: 仅b2M、具有KRAS突变体G12C (7-16) 肽 (VVVGACGVGK; SEQ ID NO:20) 的b2M、具有KRAS突变体G12D (7-16) 肽 (VVVGADGVGK; SEQ ID NO:21) 的b2M、具有KRAS G12V (7-16) 肽 (VVVGAVGVGK; SEQ ID NO:22) 的b2M、或具有KRAS wt (7-16) 肽 (VVVGAGGVGK; SEQ ID NO:23) 的b2M。将细胞用每100 μ L细胞10 μ L沉淀的噬菌体进行沾染, 洗涤并且用兔抗M13抗体进行沾染, 然后洗涤并且用抗兔-PE抗体进行沾染。将细胞用存活/死亡近红外染料染色, 洗涤, 并且通过LSRII流式细胞仪来分析。

[0035] 图12包含显示对肽脉冲的A3+细胞的流式细胞术的图。将T2A3细胞在无血清培养基中在37 $^{\circ}$ C用以下肽脉冲过夜: 仅b2M、具有CTNNB突变体S45F (41-49) 肽 (TTAPFLSGK; SEQ ID NO:26) 的b2M、或具有CTNNB wt (41-49) 肽 (TTAPSLSGK; SEQ ID NO:27) 的b2M。将细胞用每100 μ L细胞10 μ L沉淀的噬菌体进行沾染, 洗涤并且用兔抗M13抗体进行沾染, 然后洗涤并且用抗兔-PE抗体进行沾染。将细胞用存活/死亡近红外染料染色, 洗涤, 并且通过LSRII流式细胞仪来分析。

[0036] 图13包含显示对肽脉冲的B7+细胞的流式细胞术的图。将RPMI-6666细胞在无血清培养基中在37 $^{\circ}$ C肽脉冲过夜, 显示出用以下来脉冲的细胞: 仅b2M、具有KRAS突变体G12V (11-19) 肽 (AVGVGKSAL; SEQ ID NO:11) 的b2M。KRAS wt (11-19) 肽 (AGGVGKSAL; SEQ ID NO:12) 不与HLA-B7结合。将细胞用每100 μ L细胞10 μ L沉淀的噬菌体进行沾染, 洗涤并且用兔抗M13抗体进行沾染, 然后洗涤并且用抗兔-PE抗体进行沾染。将细胞用存活/死亡近红外染料染色, 洗涤, 并且通过LSRII流式细胞仪来分析。

[0037] 图14包含显示出对肽脉冲的A1+细胞的流式细胞术的图。将SigM5细胞在无血清培养基中在37 $^{\circ}$ C肽脉冲过夜, 显示出用以下来脉冲的细胞: 仅b2M、具有H/K/N RAS突变体Q61H (55-64) 肽 (ILDTAGHEEY; SEQ ID NO:28) 的b2M、具有H/K/N RAS突变体Q61K (55-64) 肽

(ILDTAGKEEY;SEQ ID NO:30)的b2M、具有H/K/N RAS突变体Q61L (55-64) 肽 (ILDTAGLEEY; SEQ ID NO:31)的b2M、具有H/K/N RAS突变体Q61R (55-64) 肽 (ILDTAGREEY;SEQ ID NO:32)的b2M、或具有H/K/N RAS wt (55-64) 肽 (ILDTAGQEEY;SEQ ID NO:29)的b2M。将细胞用每100 μ L细胞10 μ L沉淀的噬菌体进行沾染,洗涤并且用兔抗M13抗体进行沾染,然后洗涤并且用抗兔-PE抗体进行沾染。将细胞用存活/死亡近红外染料染色,洗涤,并且通过LSRII流式细胞仪来分析。

[0038] 图15A-15B示出了MANAbody克隆可以被转化到CAR-T细胞中。图15A:将IDH2 R140Q (134-143)-B7 c1.1MANA-CAR-T细胞与COS-7细胞在37 $^{\circ}$ C共培养4小时,该COS-7细胞被用编码HLA-B7、IDH2 (WT) 和IDH2 (R140Q) 的多种组合的质粒共转染。在共培养之后,收集条件培养基并且通过ELISA对分泌的IFN γ 进行测定。图15B:将KRAS G12V (7-16)-A3c1.2MANA-CAR-T细胞与COS-7细胞在37 $^{\circ}$ C共培养4小时,该COS-7细胞被用编码HLA-A3、KRAS (WT) 和KRAS (G12V) 的多种组合的质粒共转染。在共培养之后,收集条件培养基并且通过ELISA对分泌的IFN γ 进行测定。

[0039] 图16A-16B示出了MANAbody可以被转化到单链双抗体 (scDb) 中。图16A:将包含抗CD3克隆mUCHT1或hUCHT1v9的IDH2R140Q (134-143)-B7 c1.29scDb、IDH2 R140Q (134-143)-B7 c1.1scDb和IDH2R140Q (134-143)-B7 c1.3scDb以指定的浓度与T细胞和COS-7细胞在37 $^{\circ}$ C孵育24小时,该COS-7细胞用被编码HLA-B7、IDH2 (WT)、IDH2 (R140Q) 和GFP的多种组合的质粒共转染。在共培养之后,将板快速冷冻,并且收集条件培养基并通过ELISA对分泌的IFN γ 进行测定。图16B:将KRAS G12V (7-16)-A3 c1.2mUCHT1 scDb以指定的浓度在以下情况下在37 $^{\circ}$ C孵育24小时:具有或没有T细胞,并且1) 无靶细胞、2) 具有用编码HLA-A3和KRAS (WT) 或HLA-A3和KRAS (G12V) 的质粒共转染的COS-7细胞或3) 具有NCI-H441亲本细胞或HLA-A3敲除细胞。在共培养之后,将板快速冷冻,并且收集条件培养基并通过ELISA对分泌的IFN γ 进行测定。

[0040] 图17示出了被转化到scDb中的MANAbody克隆可以杀死靶细胞。将KRAS G12V (7-16)-A3 c1.2mUCHT1 scDb和pan-HLA-A3 scDb以0ng/mL或50ng/mL在以下情况下在37 $^{\circ}$ C孵育24小时:具有或没有T细胞,并且具有NCI-H441亲本细胞或HLA-A3敲除细胞。在共培养之后,使用CellTiter-Glo来测定每个孔中的存活细胞。靶细胞存活百分比通过减去来自仅T细胞的孔的值并且针对来自仅靶细胞的孔的值归一化来计算。

[0041] 详细描述

[0042] 本文件提供了用于评价患有癌症或疑似患有癌症的哺乳动物和/或治疗患有癌症的哺乳动物的方法和材料。例如,一种或更多种分子可以用于评价患有癌症或疑似患有癌症的哺乳动物和/或治疗患有癌症(例如,表达一个或更多个修饰的肽的癌症)的哺乳动物,所述一种或更多种分子包含可以靶向(例如,结合)一个或更多个修饰的肽(例如,存在于肽-HLA复合物诸如肽-HLA-b2M复合物中的肽)的一个或更多个抗原结合结构域(例如,scFv)。在一些情况下,包含可以与修饰的肽结合的一个或更多个抗原结合结构域的一种或更多种分子可以用于检测从患有癌症或疑似患有癌症的哺乳动物获得的样品中一个或更多个修饰的肽的存在或不存在。在一些情况下,可以将包含可以与修饰的肽结合的一个或更多个抗原结合结构域的一种或更多种分子施用至患有癌症(例如,表达修饰的肽的癌症)的哺乳动物,以治疗哺乳动物。

[0043] 如本文中使用的,修饰的肽是来源于修饰的多肽的肽。修饰的多肽可以是任何适当的修饰的多肽(例如,具有引起疾病的突变诸如致癌突变的的多肽)。修饰的肽可以相对于野生型(wt)肽(例如,来源于修饰的多肽所来自的wt多肽的肽)具有一个或多个氨基酸修饰(例如,取代)。修饰的肽也可以被称为突变体肽。在一些情况下,修饰的肽可以是肿瘤抗原。肿瘤抗原的实例包括但不限于突变相关新抗原(MANA)、肿瘤相关抗原和肿瘤特异性抗原。修饰的肽可以是任何适当的长度。在一些情况下,修饰的肽的长度可以是约7个氨基酸至约15个氨基酸(例如,约8个氨基酸至约15个氨基酸、约9个氨基酸至约15个氨基酸、约10个氨基酸至约15个氨基酸、约11个氨基酸至约15个氨基酸、约12个氨基酸至约15个氨基酸、约13个氨基酸至约15个氨基酸、约7个氨基酸至约14个氨基酸、约7个氨基酸至约13个氨基酸、约7个氨基酸至约12个氨基酸、约7个氨基酸至约11个氨基酸、约7个氨基酸至约10个氨基酸、约7个氨基酸至约9个氨基酸、或约9个氨基酸至约10个氨基酸)。例如,修饰的肽的长度可以是约9个氨基酸。例如,修饰的肽的长度可以是约10个氨基酸。修饰的肽可以来源于任何修饰的(例如致癌的)多肽。本文描述的修饰的肽可以来源自的修饰的多肽的实例包括但不限于表皮生长因子受体(EGFR)、异柠檬酸脱氢酶2(IDH2)、p53、RAS(例如,KRAS、HRAS和NRAS)和CTNNB。修饰的肽可以包含任何适当的修饰。在一些情况下,本文描述的修饰的肽可以包含表1中示出的一个或多个修饰(例如,突变)。

[0044] 表1. 修饰的肽。

来源蛋白	突变	突变体肽	SEQ ID NO:	WT 肽	SEQ ID NO:	肽密码子	HLA Allele	
EGFR	T790M	IMQLMPFGC	13	ITQLMPFGC	14	789-797	A2	
IDH2	R140Q	SPNGTIQNIL	1	SPNGTIRNIL	2	134-143	B7	
p53	R248Q,	GMNQRPILTI,	15	GMNRRPILTI	17	245-254	A2	
	R248W	GMNWRPILTI	16					
KRAS	G12V	LVVVGAVGV	18	LVVVGAGGV	19	6-14	A2	
KRAS	G12C, G12D, G12V	VVVGACGVGK,	20	VVVGAGGVGK	23	7-16	A3	
		VVVGADGVGK,	21					
		VVVGAVGVGK	22					
[0045]	KRAS	G12V	VVVGAVGVGK	22	VVVGAGGVGK	23	7-16	A3
	KRAS	G12D	VVVGADGVGK	21	VVVGAGGVGK	23	7-16	A3
	KRAS	G12D	VVVGADGVGK	21	VVVGAGGVGK	23	7-16	A11
	KRAS	G12D	VVVGADGVGK	24	VVVGAGGVGK	25	8-16	A11
	KRAS	G12V	VVVGAVGVGK	22	VVVGAGGVGK	23	7-16	A11
	CTNNB	S45F	TTAPFLSGK	26	TTAPSLSGK	27	41-49	A3
	KRAS	G12V	AVGVGKSAL	11	AGGVGKSAL	12	11-19	B7
	H/K/N RAS	Q61H	ILDTAGHEEY	28	ILDTAGQEEY	29	55-64	A1
	H/K/N RAS	Q61K	ILDTAGKEEY	30	ILDTAGQEEY	29	55-64	A1
	H/K/N RAS	Q61L	ILDTAGLEEY	31	ILDTAGQEEY	29	55-64	A1
H/K/N RAS	Q61R	ILDTAGREEY	32	ILDTAGQEEY	29	55-64	A1	

[0046] 本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)可以与任何适当的HLA复合。HLA可以是任何适当的HLA等位基因。在一些情况下,HLA可以是I类HLA(例如,HLA-A、HLA-B和HLA-C)

等位基因。本文描述的修饰的肽可以与其复合的HLA等位基因的实例包括但不限于HLA-A1、HLA-A2、HLA-A3、HLA-11和HLA-B7。表1中示出了用于特定修饰的肽的示例性HLA等位基因。例如,来源于修饰的EGFR多肽的修饰的肽(例如,IMQLMPFGC(SEQ ID NO:13))可以与HLA-A2和b2M复合。例如,来源于修饰的IDH2多肽的修饰的肽(例如,SPNGTIQNIL(SEQ ID NO:1))可以与HLA-B7和b2M复合。例如,来源于修饰的p53多肽的修饰的肽(例如,GMNQRPIITI(SEQ ID NO:15)或GMNWRPIITI(SEQ ID NO:16))可以与HLA-A2和b2M复合。例如,来源于修饰的KRAS多肽的修饰的肽(例如,LVVVGAVGV(SEQ ID NO:18)、VVVGACGVGK(SEQ ID NO:20)、VVVGADGVGK(SEQ ID NO:21)、VVVGAVGVGK(SEQ ID NO:22)和VVGADGVGK(SEQ ID NO:24))可以与HLA-A2、HLA-A3和/或HLA-A11以及b2M复合。例如,来源于修饰的CTNNB多肽的修饰的肽(例如,TTAPFLSGK(SEQ ID NO:26))可以与HLA-A3和b2M复合。例如,来源于修饰的KRAS多肽的修饰的肽(例如,AVGVGKSAL(SEQ ID NO:11))可以与HLA-B7和b2M复合。例如,来源于修饰的H/K/N RAS多肽的修饰的肽(例如,ILDTAGHEEY(SEQ ID NO:28)、ILDTAGKEEY(SEQ ID NO:30)、ILDTAGLEEY(SEQ ID NO:31)、ILDTAGREEY(SEQ ID NO:32))可以与HLA-A1和b2M复合。

[0047] 本文件提供了分子,所述分子包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)。在一些情况下,包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,不结合)不存在于复合物(例如,肽-HLA-b2M复合物)中的本文描述的修饰的肽。在一些情况下,包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,不结合)wt肽(例如,来源于修饰的多肽来源于的wt多肽的肽)。

[0048] 包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)的分子可以是任何适当类型的分子。在一些情况下,分子可以是单价分子(例如,包含单个抗原结合结构域)。在一些情况下,分子可以是多价分子(例如,包含两个或更多个抗原结合结构域并且同时地靶向两个或更多个抗原)。例如,双特异性分子可以包含两个抗原结合结构域,三特异性分子可以包含三个抗原结合结构域,四特异性分子可以包含四个抗原结合结构域等。包含抗原结合结构域的分子的实例包括但不限于抗体、抗体片段、scFv、CAR、T细胞受体(TCR)、TCR模拟物、串联scFv、双特异性T细胞衔接器、双抗体、scDb、scFv-Fc、双特异性抗体、双亲和重靶向抗体(DART)、以及包含至少一个可变重链(VH)和至少一个可变轻链(VL)的任何其他分子。这些分子中的任一个可以根据本文描述的材料和方法来使用。在一些情况下,抗原结合结构域可以是scFv。例如,包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,一个或多个scFv)的分子可以是CAR。例如,包含可以与本文描述的修饰的肽结合的两个scFv的分子可以是单链双抗体(scDb)。

[0049] 在一些情况下,当包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,一个或多个scFv)的分子是CAR时,所述CAR可以

是任何适当的CAR。本文提供的CAR可以包含细胞外结构域、跨膜结构域和细胞内结构域(例如,细胞内信号传导结构域诸如共刺激结构域),该细胞外结构域具有至少一个可以与本文描述的修饰的肽结合的抗原结合结构域。CAR可以包含任何适当的细胞外结构域。例如,CAR可以包含具有抗原结合结构域分子(例如,scFv),该抗原结合结构域可以与包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽结合:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32。CAR可以包含任何适当的跨膜结构域。跨膜结构域可以来源于任何适当的多肽。可以被用于本文描述的CAR的跨膜结构域的实例包括但不限于CD4、CD8(例如,CD8- α 和CD8- β)、CD28、CD3 ϵ 、CD5、CD6、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD45、CD64、CD80、CD86、CD134、4-1BB和CD154的跨膜结构域。在一些情况下,本文描述的CAR可以包含CD28跨膜结构域。CAR可以包含任何适当的细胞内结构域。细胞内结构域可以来源于任何适当的多肽。细胞内结构域可以包括共刺激结构域(例如,单个共刺激结构域或多个共刺激结构域)。在其中CAR包含多个共刺激结构域的情况下,所述CAR可以包含相同类型的多个共刺激结构域或不同类型的多个共刺激结构域。细胞内结构域可以包括信号传导结构域。可以被用于本文描述的CAR的细胞内结构域的实例包括但不限于CD3(例如,CD3- ζ)、CD28、DAP10、诱导型T细胞共刺激物(ICOS)、OX40、4-1BB、CD2、CD4、CD8、CD5、CD22、DAP-12、CD22和CD79的细胞内结构域。CAR可以使用任何适当的方法制备。在一些情况下,CAR还可以包含铰链序列(例如,被定位在细胞外结构域和跨膜结构域之间)。在一些情况下,CAR可以如在别处描述制备(参见,Curran等人,2012J. Gene Med 14:405-415;Kershaw等人,2005Nature Reviews Immunol.5(12):928-940;Eshhar等人,1993Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.90(2):720-724;Sadelain等人,2009Curr. Opin. Immunol.21(2):215-223;WO 2015/142675;WO 2015/150526;和WO 2014/134165)。本文还提供了表达一个或更多个CAR的CART,该CAR可以靶向(例如,结合)本文描述的一个或更多个修饰的肽(例如,具有两个或更多个抗原结合结构域的CAR)。本文还提供了表达一个或更多个CAR的CART,该CAR可以靶向(例如,结合)本文描述的一个或更多个修饰的肽。

[0050] 在一些情况下,当包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或更多个抗原结合结构域(例如,scFv)的分子是多价分子(例如,双特异性分子)时,第一抗原结合结构域可以与本文描述的修饰的肽结合,并且第二抗原结合结构域可以与效应细胞(例如,呈递在效应细胞上的抗原)结合。效应细胞的实例包括但不限于,T细胞、自然杀伤(NK)细胞、自然杀伤T(NKT)细胞、B细胞、浆细胞、巨噬细胞、单核细胞、小胶质细胞、树突细胞、中性粒细胞、成纤维细胞和肥大细胞。呈递在效应细胞上的抗原的实例包括但不限于CD3、CD4、CD8、CD28、CD16a、NKG2D、PD-1、CTLA-4、4-1BB、OX40、ICOS、CD27、以及任何其他效应细胞表面受体。在一些情况下,本文描述的分子可以包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域可以与本文描述的修饰的肽结合,所述第二抗原结合结构域可以与呈递在T细胞上的抗原(例如,CD3)结合。在一些情况下,可以与CD3结

合的序列(例如,scFv序列)可以是如表4中所示出的。在一些情况下,可以与CD3结合的序列(例如,scFv序列)可以是如在别处描述的(参见,例如,Rodrigues等人,1992Int J Cancer Suppl.7:45-50;Shalaby等人,1992J Exp Med.175:217-25;Brischwein等人,2006Mol Immunol.43:1129-43;Li等人,2005Immunology.116:487-98;W02012162067;US20070065437;US20070065437;US20070065437;US20070065437;US20070065437;和US20070065437)。在一些情况下,本文描述的分子可以包含第一抗原结合结构域和第二抗原结合结构域,所述第一抗原结合结构域可以与本文描述的修饰的肽结合,所述第二抗原结合结构域可以与呈递在NK细胞上的抗原(例如,CD16a或NKG2D)结合。通过结合修饰的肽和效应细胞两者,多价分子可以使表达修饰的肽(例如,作为HLA复合物的一部分)的细胞接近效应细胞,允许效应细胞作用于表达修饰的肽的细胞。

[0051] 在一些情况下,当包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或更多个抗原结合结构域(例如,scFv)的分子是多价分子(例如,双特异性分子)时,分子可以呈包含至少一个VH和至少一个VL的任何适当的形式。例如,VH和VL可以处于任何适当的取向。在一些情况下,VH可以是VL的N-末端。在一些情况下,VH可以是VL的C-末端。在一些情况下,接头氨基酸序列可以被定位在VH和VL之间。

[0052] 在一些情况下,当双特异性分子是串联scFv时,所述串联scFv可以处于任何适当的取向。包含scFv-A和scFv-B的串联scFv取向的实例包括但不限于VLA-LL-VHA-SL-VLB-LL-VHB、VLA-LL-VHA-SL-VHB-LL-VLB、VHA-LL-VLA-SL-VLB-LL-VHB、VHA-LL-VLA-SL-VHB-LL-VLB、VLB-LL-VHB-SL-VLA-LL-VHA、VLB-LL-VHB-SL-VHA-LL-VLA、VHB-LL-VLB-SL-VLA-LL-VHA和VHB-LL-VLB-SL-VHA-LL-VLA,其中SL是短接头,并且LL是长接头。短接头的长度可以从约3个氨基酸至约10个氨基酸。短接头可以包含任何适当的组合的任何适当的氨基酸(例如,甘氨酸和丝氨酸)。长接头的长度可以从约10个氨基酸至约25个氨基酸。长接头可以包括任何适当的组合的任何适当的氨基酸(例如,甘氨酸和丝氨酸)。

[0053] 在一些情况下,当双特异性分子是双抗体时,所述双抗体可以处于任何适当的取向。包含scFv-A和scFv-B的双抗体取向的实例包括但不限于VLA-SL-VHB和VLB-SL-VHA、VLA-SL-VLB和VHB-SL-VHA、VHA-SL-VLB和VHB-SL-VLA、VLB-SL-VHA和VLA-SL-VHB、VLB-SL-VLA和VHA-SL-VHB,以及VHB-SL-VLA和VHA-SL-VLB,其中SL是短接头。短接头的长度可以从约3个氨基酸至约10个氨基酸。短接头可以包含任何适当的组合的任何适当的氨基酸(例如,甘氨酸和丝氨酸)。

[0054] 在一些情况下,当双特异性分子是scDb时,所述scDb可以处于任何适当的取向。包含scFv-A和scFv-B的scDb取向的实例包括但不限于VLA-SL-VHB-LL-VLB-SL-VHA、VHA-SL-VLB-LL-VHB-SL-VLA、VLA-SL-VLB-LL-VHB-SL-VHA、VHA-SL-VHB-LL-VLB-SL-VLA、VLB-SL-VHA-LL-VLA-SL-VHB、VHB-SL-VLA-LL-VHA-SL-VLB、VLB-SL-VLA-LL-VHA-SL-VHB,以及VHB-SL-VHA-LL-VLA-SL-VLB,其中SL是短接头,并且LL是长接头。短接头的长度可以从约3个氨基酸至约10个氨基酸。短接头可以包含任何适当的组合的任何适当的氨基酸(例如,甘氨酸和丝氨酸)。长接头的长度可以从约10个氨基酸至约25个氨基酸。长接头可以包含任何

适当的组合的任何适当的氨基酸(例如,甘氨酸和丝氨酸)。

[0055] 在一些情况下,当双特异性分子是scFv-Fc时,所述scFv-Fc可以处于任何适当的取向。包含scFv-Fc-A、scFv-Fc-B和Fc结构域的scFv-Fc取向的实例包括但不限于VLA-LL-VHA-铰链-Fc和VLB-LL-VHB-铰链-Fc、VHA-LL-VLA-铰链-Fc和VHB-LL-VLB-铰链-Fc、VLA-LL-VHA-铰链-Fc和VHB-LL-VLB-铰链-Fc、VHA-LL-VLA-铰链-Fc和VLB-LL-VHB-铰链-Fc,其中LL是长接头。长接头的长度可以是约10个氨基酸至约25个氨基酸。长接头可以包含任何适当的组合的任何适当的氨基酸(例如,甘氨酸和丝氨酸)。在一些情况下,scFv-Fc中的Fc结构域可以包含一个或更多个修饰,以增加scFv-Fc的异二聚体化和/或减少scFv-Fc的同二聚体化。在一些情况下,scFv-Fc中的Fc结构域可以不包含铰链结构域。在一些情况下,scFv-Fc中的Fc结构域可以处于scFv的N-末端。

[0056] 包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或更多个抗原结合结构域(例如,scFv)的分子可以包含任何适当的互补决定区(CDR)。例如,包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或更多个抗原结合结构域的分子可以包含可变重链(VH)和可变轻链(VL),所述可变重链(VH)具有三个VH互补决定区(CDR-VH),所述可变轻链(VL)具有三个VL CDR(CDR-VL)。例如,可以与来源于修饰的EGFR多肽的修饰的肽(例如,IMQLMPFGC(SEQ ID NO:13))结合的分子可以包含下文列出的每个CDR中的一个:

CDR-VL1: QDVNTA (SEQ ID NO:33);

CDR-VL2: SAS;

CDR-VL3: QQYDYAPIT (SEQ ID NO:34), QQSPYYYLPIT (SEQ ID NO:35), QQYYYSPT (SEQ ID NO:36), QQHYGNPFT (SEQ ID NO:37), QQSYYSPPT (SEQ ID NO:38), QQYYSYPPT (SEQ ID NO:39), QQYYYYPPT (SEQ ID NO:40);

[0057]

CDR-VH1: GFNISWYQ (SEQ ID NO:41), GFNVSWSY (SEQ ID NO:42), GFNISWNQ (SEQ ID NO:43), GFNVGYG (SEQ ID NO:44), GFNITSSY (SEQ ID NO:45), GFNINSSY (SEQ ID NO:46), GFNISTSY (SEQ ID NO:47);

CDR-VH2: VTPYSGYT (SEQ ID NO:48), IYGDSGYT (SEQ ID NO:49), VSPYSGYT (SEQ ID NO:50), VSGMEGYT (SEQ ID NO:51), ISPADGYN (SEQ ID NO:52), ISPTDGYY (SEQ ID NO:53), IDPNDGYS (SEQ ID NO:54);以及

CDR-VH3: SRSYTDGFDY (SEQ ID NO:55), SRGQWEASYAMDY (SEQ ID NO:56), SRSDYYAMDY (SEQ ID NO:57), SRDIYGYAMDV (SEQ ID NO:58), SRTDSTAYTAMDV (SEQ ID NO:59), SRTSDTSYAAMDV (SEQ ID NO:60), SRTNNTAADAMDV (SEQ ID NO:61)。

[0058]

[0059] 例如,可以与来源于修饰的IDH2多肽的修饰的肽(例如,SPNGTIQNIL (SEQ ID NO:1))结合的分子可以包含下文列出的每个CDR中的一个:

CDR-VL1: QDVNTA (SEQ ID NO:33);

CDR-VL2: SAS;

CDR-VL3: QQYSYSPPT (SEQ ID NO:62), QQGKAYWPAT (SEQ ID NO:63),
QQVYSSPFT (SEQ ID NO:64), QQYSLYSPMT (SEQ ID NO:65), QQSYYMPFT (SEQ ID
[0060] NO:66);

CDR-VH1: GFNISDTY (SEQ ID NO:67), GFNVGHYR (SEQ ID NO:68),
GFNVKYYM (SEQ ID NO:69), GFNSFLS (SEQ ID NO:70), GFNIFRGY (SEQ ID
NO:71);

CDR-VH2: ISPRTGYN (SEQ ID NO:72), VSPNGYYT (SEQ ID NO:73),
ISPGYDYT (SEQ ID NO:74), IFPSSDYT (SEQ ID NO:75), ISPHSDYT (SEQ ID NO:76);

[0061] 以及

CDR-VH3: SRAYYSYAYAMDV (SEQ ID NO:77), SRGYSSYAFDY (SEQ ID
[0062] NO:78), SRSYWRYSVDV (SEQ ID NO:79), SRGKHSSDSNYMDY (SEQ ID NO:80),
SRSYGWAAFDY (SEQ ID NO:81)

[0063] 例如,可以与来源于修饰的p53多肽的修饰的肽(例如,GMNQRPILTI (SEQ ID NO:
15)和GMNWRPILTI (SEQ ID NO:16))结合的分子可以包含下文列出的每个CDR中的一个:

CDR-VL1: QDVNTA (SEQ ID NO:33);

CDR-VL2: SAS;

CDR-VL3: QQSGYAPIT (SEQ ID NO:82), QQYSYAPIT (SEQ ID NO:83),
QQSLYGPFT (SEQ ID NO:84), QQYSYSPIT (SEQ ID NO:85), QQSGYQPDT (SEQ ID
[0064] NO:86), QQYLYQPWT (SEQ ID NO:87);

CDR-VH1: GFNISYYS (SEQ ID NO:89), GFNIGYYT (SEQ ID NO:90),
GFNIAEY (SEQ ID NO:91), GFNLFGYG (SEQ ID NO:92), GFNISWYA (SEQ ID
NO:93), GFNIDYYG (SEQ ID NO:94);

CDR-VH2: VDPDSDYT (SEQ ID NO:96), VSPWSYST (SEQ ID NO:97),
IGPDSGYT (SEQ ID NO:98), IGPYYYYT (SEQ ID NO:99), IWPDSDWT (SEQ ID

NO:100), LYGGSDST (SEQ ID NO:101);以及

CDR-VH3: SRSWIHMFSMDY (SEQ ID NO:103), SRDHWDEAFDV (SEQ ID
[0065] NO:104), SRVWYYSTYGMDY (SEQ ID NO:105), SRENYDMAMDY (SEQ ID NO:106),
SRYYSsafdv (SEQ ID NO:107), SRQYSAYFDY (SEQ ID NO:108)。

[0066] 例如,可以与来源于修饰的KRAS多肽的修饰的肽(例如,LVVVGAVGV (SEQ ID NO:
18)、VVVGACGVGK (SEQ ID NO:20)、VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)、VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:
22)和VVGADGVGK (SEQ ID NO:24))结合的分子可以包含下文列出的每个CDR中的一个:

[0067] CDR-VL1:QDVNTA (SEQ ID NO:33) ;

[0068] CDR-VL2:SAS和SAY;

[0069]

CDR-VL3: QQWYSSPVT (SEQ ID NO:110),QQYYSRPVT(SEQ ID NO:111),
QQSYGSGSPWT(SEQ ID NO:121), QQTYYSPWT(SEQ ID NO:122), QQYYYPIT(SEQ
ID NO:123), QQSYYYFRPIT(SEQ ID NO:132), QQASYYYPLT(SEQ ID NO:133),
QQKSEYSPWT(SEQ ID NO:134), QQSGYIPFT(SEQ ID NO:135), QQGAYYRPFT(SEQ
ID NO:136), QQYMYSPVT(SEQ ID NO:152), QQSSSSPIT(SEQ ID NO:153),
QQSSASPLT(SEQ ID NO:154), QQYAYSPLT(SEQ ID NO:155), QQYSYYPIT(SEQ ID
NO:168), QQYSYTPVT(SEQ ID NO:169), QQYSYEPVT(SEQ ID NO:170),
QQYAYYSPVT(SEQ ID NO:171), QQYEYYPMT(SEQ ID NO:172), QQYSFYPT(SEQ
ID NO:188), QQYSYSPIT(SEQ ID NO:85), QQYSAYYQPIT(SEQ ID NO:189),
QQYSYYPIT(SEQ ID NO:168), QQYEYVPHT(SEQ ID NO:190), QQYSYMPIT(SEQ ID
NO:191), QQYAYYPVT(SEQ ID NO:192), QQYSYMPIT(SEQ ID NO:191),
QQYDYRPVT(SEQ ID NO:193), QQYDFTPMT(SEQ ID NO:194), QQYSSSSPVT(SEQ
ID NO:195), QQSSYTPIT(SEQ ID NO:229), QQYAYYPIT (SEQ ID NO:230),
QQYEYYPIT (SEQ ID NO:231), QQYTYYPIT (SEQ ID NO:232), QQYSYYPIT (SEQ ID
NO:168), QQSSVEPWT (SEQ ID NO:233);

CDR-VH1: GFNINWAN (SEQ ID NO:112), GFNIYLHD (SEQ ID NO:113),
GFNIYWSH (SEQ ID NO:114), GFNIVGGG (SEQ ID NO:124), GFNIRSYA (SEQ ID
NO:125), GFNVSHTG (SEQ ID NO:126), GFNLSYSD (SEQ ID NO:137), GFNISASG
(SEQ ID NO:138), GFNIYRYG (SEQ ID NO:139), GFNIYGTM (SEQ ID NO:140),
GFNISYSY (SEQ ID NO:141), GFNVSAYW (SEQ ID NO:156), GFNISGYG (SEQ ID
NO:157), GFNVSSVG (SEQ ID NO:158), GFNVSSYG (SEQ ID NO:159), GFNFSYGY
(SEQ ID NO:173), GFNVWGPG (SEQ ID NO:174), GFNVSGSQ (SEQ ID NO:175),
GFNIYGQM (SEQ ID NO:176), GFNVMYST (SEQ ID NO:177), GFNFGSY (SEQ ID
NO:196), GFNISDSY (SEQ ID NO:197), GFNIFSDQ (SEQ ID NO:198), GFNLSYSY

(SEQ ID NO:199), GFNISYGY (SEQ ID NO:200), GFNISYQH (SEQ ID NO:201), GFNLSGYY (SEQ ID NO:202), GFNVSGQY (SEQ ID NO:203), GFNVSTSG (SEQ ID NO:204), GFNISYAK (SEQ ID NO:205), GFNFSSYV (SEQ ID NO:206), GFNISQGG (SEQ ID NO:234), GFNISSTG (SEQ ID NO:235), GFNFFSTV (SEQ ID NO:236), GFNLHGYL (SEQ ID NO:237), GFNLSTHV (SEQ ID NO:238), GFNVSYYS (SEQ ID NO:239);

[0070] **CDR-VH2:** ISPPYDYT (SEQ ID NO:115), IIPAIDYT (SEQ ID NO:116), ISSFEGYT (SEQ ID NO:117), IYPQGDYT (SEQ ID NO:127), VGPGKGYT (SEQ ID NO:128), VGPGKGYT (SEQ ID NO:128), VMPDSGHT (SEQ ID NO:142), IHPLKPYT (SEQ ID NO:143), LYPYGYST (SEQ ID NO:144), FKPDSYNT (SEQ ID NO:145), LLPYDGNT (SEQ ID NO:146), IYGGSGYT (SEQ ID NO:160), LYGGSDYT (SEQ ID NO:161), IYGTSDYT (SEQ ID NO:162), IAPRRDYT (SEQ ID NO:163), ISGYTGNT (SEQ ID NO:178), IHPFSGNT (SEQ ID NO:179), IPGWSGYT (SEQ ID NO:180), LSPFSGNT (SEQ ID NO:181), IYSWSDYT (SEQ ID NO:182), ISGYSGNT (SEQ ID NO:207), FSPYSSNT (SEQ ID NO:208), FMPYDSYTT (SEQ ID NO:209), ISGFSGNT (SEQ ID NO:210), FHYGSGNT (SEQ ID NO:211), FMPYQGST (SEQ ID NO:212), FSPYSGYT (SEQ ID NO:213), ISPVSGNT (SEQ ID NO:214), IYGAYSGT (SEQ ID NO:215), LTYWGGYT (SEQ ID NO:216), VYPDSGGT (SEQ ID NO:217), VYPGGGQT (SEQ ID NO:240), LLGGSGNT (SEQ ID NO:241), IYPWSGST (SEQ ID NO:242), IYPPNGYT (SEQ ID NO:243), FYPYVGYT (SEQ ID NO:244), IYPWNDYT (SEQ ID NO:245); 以及

[0071] **CDR-VH3:** SRSYSYYFDY (SEQ ID NO:118), SRRDGYFFDY (SEQ ID NO:119), SRSYSYYMDY (SEQ ID NO:120), SRDSSYLAFDY (SEQ ID NO:129), SRNFQSTSHAFDY (SEQ ID NO:130), SRKTYAFDY (SEQ ID NO:131), SRATNIPVYAFDY (SEQ ID NO:147), SRYSSMYYYFDY (SEQ ID NO:148), SRSYAYGYFAY (SEQ ID NO:149), SRGEVYHYAFDY (SEQ ID NO:150), SRAAYSSMDV (SEQ ID NO:151), SRTHSYWSAFDY (SEQ ID NO:164), SRTVRYAFDY (SEQ ID NO:165), SRSSRYSDY (SEQ ID NO:166), SRKSSYYFDY (SEQ ID NO:167), SRAASLSSSYSAFDV (SEQ ID NO:183), SRGYSYSAMDY (SEQ ID NO:184), SRGYSYFAMDY (SEQ ID NO:185), SRNISYEQSSAFDY (SEQ ID NO:186), SRGYAHNSFDY (SEQ ID NO:187), SRSNQSAYSMDY (SEQ ID NO:218),

[0072] SRSQFTFYQYFDY (SEQ ID NO:219), SRMSVRNAFDY (SEQ ID NO:220),
SRSDSYTTAMDY (SEQ ID NO:221), SRSNYYYLDY (SEQ ID NO:222),
SRANIYSSHSFFDY (SEQ ID NO:223), SRTHSSIIYHSFDY (SEQ ID NO:224),
SRPMKTSYYGAFDY (SEQ ID NO:225), SRSQSYTYWSAMDY (SEQ ID NO:226),
SRGEYGTMDY (SEQ ID NO:227), SRTSSYYAFDY (SEQ ID NO:228),
SRGYDYSAFDY (SEQ ID NO:246), SRGLQYSAMDY (SEQ ID NO:247),
SRSRSSNYYFDV (SEQ ID NO:248), SRGVDYAYLDY (SEQ ID NO:249),
SRGYRYQYMDV (SEQ ID NO:250), SRGSYYSFYD (SEQ ID NO:251)。

[0073] 例如,可以与来源于修饰的CTNNB多肽的修饰的肽(例如,TTAPFLSGK (SEQ ID NO:26))结合的分子可以包含下文列出的每个CDR中的一个:

[0074] CDR-VL1:QDVNTA (SEQ ID NO:33);

[0075] CDR-VL2:SAS和SAY;

CDR-VL3: QQSYSPPT (SEQ ID NO:38), QQIYTSPIT (SEQ ID NO:252),
QQRAYFPIT (SEQ ID NO:253), QQYAYTPIT (SEQ ID NO:254), QQIHYKPLT (SEQ ID
NO:255);

[0076] **CDR-VH1:** GFNINNTY (SEQ ID NO:256), GFNFITG (SEQ ID NO:257),
GFNFSDYG (SEQ ID NO:258), GFNVWSYG (SEQ ID NO:259), GFNVAWYS (SEQ ID
NO:260);

CDR-VH2: IYPTDGYT (SEQ ID NO:260), IGPGSDYT (SEQ ID NO:261),
LIPASGYT (SEQ ID NO:262), VTPDGSYT (SEQ ID NO:263), VYGGSSYT (SEQ ID
NO:264);以及

[0077] **CDR-VH3:** SRTYYSYYSAMDV (SEQ ID NO:265), SRYYYASALDY (SEQ ID
NO:266), SRGWSYMDY (SEQ ID NO:267), SRSYGWAMDY (SEQ ID NO:268),
SRDFYSSGMDY (SEQ ID NO:269)。

[0078] 例如,可以与来源于修饰的KRAS多肽的修饰的肽(例如,AVGVGKSAL (SEQ ID NO:11))结合的分子可以包含下文列出的每个CDR中的一个:

CDR-VL1: QDVNTA (SEQ ID NO:33);

CDR-VL2: SAS;

CDR-VL3: QQEWRLPIT (SEQ ID NO:270), QQGTSTPFT (SEQ ID NO:271),
QQSWRYPMT (SEQ ID NO:272), QQSYSYPVT (SEQ ID NO:273), QQGWLYSPFT (SEQ
ID NO:274);

[0079] **CDR-VH1:** GFNVYGNQ, (SEQ ID NO:275), GFNLSYYG (SEQ ID NO:402),
GFNISRYG (SEQ ID NO:276), GFNIYSSW (SEQ ID NO:277), GFNISGYG (SEQ ID
NO:157);

CDR-VH2: IYPYSGST (SEQ ID NO:278), IYPDSGYT (SEQ ID NO:279),
FYPPSSYT (SEQ ID NO:280), FQPYSGYT (SEQ ID NO:281), VYGGSGYT (SEQ ID

NO:282); 以及

CDR-VH3: SRSAYVAYSYFDY (SEQ ID NO:283), SRAYLYYYLAY (SEQ ID NO:284), SRKY YEAMDY (SEQ ID NO:285), SREYTY YFDY (SEQ ID NO:286), SRAHSSYYVDY (SEQ ID NO:287)。

[0081] 例如,可以与来源于修饰的H/K/N RAS多肽的修饰的肽(例如, ILDTAGHEEY (SEQ ID NO:28)、ILDTAGKEEY (SEQ ID NO:30)、ILDTAGLEEY (SEQ ID NO:31)、ILDTAGREEY (SEQ ID NO:32))结合的分子可以包含下文列出的每个CDR中的一个:

CDR-VL1: QDVNTA (SEQ ID NO:33);

CDR-VL2: SAS;

CDR-VL3: QQHY YSPVT (SEQ ID NO:292), QQYAYAPFT (SEQ ID NO:296), QQAHMIPIT (SEQ ID NO:300), QQSVYDPIT (SEQ ID NO:301), QQSYTSPLT (SEQ ID NO:302), QQGQYSPFT (SEQ ID NO:303), QQYWYLPTT (SEQ ID NO:320);

[0082] **CDR-VH1:** GFNIGYYG (SEQ ID NO:289), GFNIFYQD (SEQ ID NO:293), GFNVSYSM (SEQ ID NO:297), GFNFSFPG (SEQ ID NO:305), GFNISGSW (SEQ ID NO:306), GFNIYYGV, (SEQ ID NO:307), GFNVSYEY (SEQ ID NO:308), GFNISWYD (SEQ ID NO:321);

CDR-VH2: VYPGGGYT (SEQ ID NO:290), IYPDYDYT (SEQ ID NO:294), VWGDGGVT (SEQ ID NO:298), FVG YDGYT (SEQ ID NO:310), LYPDSDYT (SEQ ID NO:311), IYPDSSWT (SEQ ID NO:312), IYGGSDNT (SEQ ID NO:313), IEPSVGYT (SEQ ID NO:322); 以及

[0083] **CDR-VH3:** SRYYYYGFDY (SEQ ID NO:291), SRTYSVYMDY (SEQ ID NO:295), SRGSYAFDY (SEQ ID NO:299), SRDYYSFSMDY (SEQ ID NO:316), SRAHTYAFDY (SEQ ID NO:317), SRDQDFHYMNYLSYALDY (SEQ ID NO:318), SRPLGSYFDY (SEQ ID NO:319), SRSYPYYYFDY (SEQ ID NO:323)

[0084] 可以与特定修饰的肽结合的CDR(例如, CDR-VL1、CDR-VL2、CDR-VL3、CDR-VH1、CDR-VH2和CDR-VH3的特定组合)的实例在表2中示出。在一些情况下,包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或多个抗原结合结构域(例如, scFv)的分子可以包含任何适当的CDR序列集(例如,本文描述的任何CDR序列集)。

[0085] 包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或多个抗原结合结构域(例如, scFv)的分子可以包含任何适当的序列。例如,可以与来源于修饰的

EGFR多肽的修饰的肽(例如,IMQLMPFGC(SEQ ID NO:13))结合的分子可以包含但不限于以下中的任一个中列出的scFv序列:SEQ ID NO:324、SEQ ID NO:325、SEQ ID NO:326、SEQ ID NO:327、SEQ ID NO:328、SEQ ID NO:329和SEQ ID NO:330。例如,可以与来源于修饰的IDH2多肽的修饰的肽(例如,SPNGTIQNIL(SEQ ID NO:1))结合的分子可以包含但不限于以下中的任一个中列出的scFv序列:SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:4、SEQ ID NO:5、SEQ ID NO:6和SEQ ID NO:8。例如,可以与来源于修饰的p53多肽的修饰的肽(例如,GMNQRPIILTI(SEQ ID NO:15)和GMNWRPIILTI(SEQ ID NO:16))结合的分子可以包含但不限于以下中的任一个中列出的scFv序列:SEQ ID NO:331、SEQ ID NO:332、SEQ ID NO:333、SEQ ID NO:334、SEQ ID NO:335、SEQ ID NO:336和SEQ ID NO:337。例如,可以与来源于修饰的KRAS多肽的修饰的肽(例如,LVVVGAVGV(SEQ ID NO:18)、VVVGACGVGK(SEQ ID NO:20)、VVVGADGVGK(SEQ ID NO:21)、VVVGAVGVGK(SEQ ID NO:22)和VVVGADGVGK(SEQ ID NO:24))结合的分子可以包含但不限于以下中的任一个中列出的scFv序列:SEQ ID NO:338、SEQ ID NO:339、SEQ ID NO:340、SEQ ID NO:341、SEQ ID NO:342、SEQ ID NO:343、SEQ ID NO:344、SEQ ID NO:345、SEQ ID NO:346、SEQ ID NO:347、SEQ ID NO:348、SEQ ID NO:349、SEQ ID NO:350、SEQ ID NO:351、SEQ ID NO:352、SEQ ID NO:353、SEQ ID NO:354、SEQ ID NO:355、SEQ ID NO:356、SEQ ID NO:357、SEQ ID NO:358、SEQ ID NO:359、SEQ ID NO:360、SEQ ID NO:361、SEQ ID NO:362、SEQ ID NO:363、SEQ ID NO:364、SEQ ID NO:365、SEQ ID NO:366、SEQ ID NO:367、SEQ ID NO:368、SEQ ID NO:369、SEQ ID NO:370、SEQ ID NO:371、SEQ ID NO:372、SEQ ID NO:373和SEQ ID NO:374。例如,可以与来源于修饰的CTNNB多肽的修饰的肽(例如,TTAPFLSGK(SEQ ID NO:26))结合的分子可以包含但不限于以下中的任一个中列出的scFv序列:SEQ ID NO:375、SEQ ID NO:376、SEQ ID NO:377、SEQ ID NO:378、SEQ ID NO:379。例如,可以与来源于修饰的KRAS多肽的修饰的肽(例如,AVGVGKSAL(SEQ ID NO:11))结合的分子可以包含但不限于以下中的任一个中列出的scFv序列:SEQ ID NO:380、SEQ ID NO:390、SEQ ID NO:391、SEQ ID NO:392和SEQ ID NO:393。例如,可以与来源于修饰的H/K/N RAS多肽的修饰的肽(例如,ILDAGHEEY(SEQ ID NO:28)、ILDAGKEEY(SEQ ID NO:30)、ILDAGLEEY(SEQ ID NO:31)、ILDAGREEY(SEQ ID NO:32))结合的分子可以包含但不限于以下中的任一个中列出的scFv序列:SEQ ID NO:394、SEQ ID NO:395、SEQ ID NO:396、SEQ ID NO:397、SEQ ID NO:398、SEQ ID NO:399和SEQ ID NO:400。可以与特定修饰的肽结合的序列(例如,scFv序列)的实例在表3中示出。在一些情况下,包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或更多个抗原结合结构域(例如,scFv)的分子可以具有与表3中示出的序列有偏差的序列,有时被称为变体序列。例如,包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或更多个抗原结合结构域的分子可以与表3中示出的任何序列具有至少75%的序列同一性(例如,至少80%的序列同一性、至少85%的序列同一性、至少90%的序列同一性、至少95%的序列同一性、至少96%的序列同一性、至少97%的序列同一性、至少98%的序列同一性、至少99%的序列同一性或更多),条件是变体序列维持与本文描述的修饰的肽结合的能力。在一些情况下,包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或更多个抗原结合结构域的分子可

以包含本文描述的任何适当的CDR序列集,并且与表3中示出的序列有偏差的任何序列可以处于支架序列中。

[0086] 包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)的分子可以被附接(例如,共价地或非共价地附接)至标记物(例如,可检测的标记物)。可检测的标记物可以是任何适当的标记物。在一些情况下,标记物可以用于帮助检测本文描述的一个或多个修饰的肽的存在或不存在。例如,被标记的本文描述的分子可以在体外用于检测从哺乳动物获得的样品中的癌细胞(例如,表达本文描述的修饰的肽的癌细胞)。在一些情况下,标记物(例如,可检测的标记物)可以用于帮助确定本文描述的一个或多个修饰的肽的位置。例如,被标记的本文描述的分子可以在体内用于监测抗肿瘤疗法和/或检测哺乳动物中的癌细胞(例如,表达本文描述的修饰的肽的癌细胞)。可以被附接至本文描述的分子的标记物的实例包括但不限于放射性核素、发色团、酶和荧光分子(例如,绿色荧光蛋白)。

[0087] 包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)的分子可以被附接(例如,共价地或非共价地附接)至治疗剂。治疗剂可以是任何治疗剂。在一些情况下,治疗剂可以是抗癌剂。可以被附接至本文描述的分子的治疗剂的实例包括但不限于抗癌剂,诸如单甲基奥瑞他汀E(MMAE)、单甲基奥瑞他汀F(MMAF)、美登素、mertansine/emtansine(DM1)、ravtansine/soravtansine(DM4)、SN-38、加利车霉素(calicheamicin)、D6.5、二聚吡咯并苯二氮卓类(PBD)、蓖麻毒蛋白、假单胞菌外毒素A、白喉毒素和白树毒素。

[0088] 本文件还提供了用于使用一种或更多种分子的方法,所述一种或更多种分子包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID No:32)结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)。例如,包含可以靶向(例如,结合)一个或多个修饰的肽的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)的一种或更多种分子可以用于评价患有癌症或疑似患有癌症的哺乳动物和/或治疗患有癌症(例如,表达一个或多个修饰的肽的癌症)的哺乳动物。在一些情况下,包含可以与修饰的肽结合的一个或多个抗原结合结构域的一种或更多种分子可以用于检测从患有癌症或疑似患有癌症的哺乳动物获得的样品中一个或多个修饰的肽的存在或不存在。在一些情况下,可以将包含可以与修饰的肽结合的一个或多个抗原结合结构域的一种或更多种分子施用至患有癌症(例如,表达修饰的肽的癌症)的哺乳动物,以治疗哺乳动物。向患有癌症的哺乳动物(例如,人类)施用包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或多个抗原结合结构域的一种或更多种分子可以有效地治疗哺乳动物。

[0089] 任何类型的哺乳动物可以如本文描述评价和/或治疗。可以如本文描述评价和/或治疗的哺乳动物的实例包括但不限于灵长类动物(例如,人类和非人类灵长类动物诸如黑猩猩、狒狒或猴)、犬、猫、猪、绵羊、兔、小鼠和大鼠。在一些情况下,哺乳动物可以是人类。

[0090] 可以评价和/或治疗哺乳动物的任何适当的癌症。在一些情况下,癌症可以表达本文描述的一个或多个修饰的肽(例如,一个或多个MANA)。癌症可以是原发性癌症。癌症可以是转移性癌症。癌症可以包括一个或多个实体瘤。癌症可以包括一个或多个非实体瘤。可以如本文描述(例如,至少部分地基于本文描述的一个或多个修饰的肽的存在)评价和/或如本文描述(例如,通过施用包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)的一种或更多种分子)治疗的癌症的实例包括但不限于淋巴瘤(例如,霍奇金氏淋巴瘤、非霍奇金氏淋巴瘤、白血病诸如急性髓性白血病(AML),和骨髓瘤)、肺癌、胰腺癌、胃癌、结肠癌(例如,结肠直肠癌)、卵巢癌、子宫内膜癌、胆道癌、肝癌、骨和软组织癌、乳腺癌、前列腺癌、食管癌、胃癌、肾癌、头颈癌和脑癌(例如,多形性成胶质细胞瘤和星形细胞瘤)。

[0091] 当评价患有癌症或疑似患有癌症的哺乳动物时,一种或更多种分子可以用于评价本文描述的一种或更多种修饰的肽的存在或不存在,所述一种或更多种分子包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或多个抗原结合结构域(scFv)。例如,从人类获得的样品中本文描述的一种或更多种修饰的肽的存在、不存在或水平可以用于确定该人类是否患有癌症。在一些情况下,从哺乳动物获得的样品中本文描述的一种或更多种修饰的肽的存在可以用于将该哺乳动物鉴定为患有癌症。例如,当从哺乳动物获得的样品具有本文描述的一种或更多种修饰的肽时,可以将该哺乳动物鉴定为患有癌症。

[0092] 可以评价从哺乳动物获得的任何适当的样品以确定本文描述的一种或更多种修饰的肽的存在、不存在或水平。例如,可以从哺乳动物获得生物样品诸如组织样品(例如,乳房组织)和流体样品(例如,血液、血清、血浆或尿液),并且进行评价以确定本文描述的一种或更多种修饰的肽的存在、不存在或水平。任何适当的方法可以用于检测本文描述的一种或更多种修饰肽的存在、不存在或水平。例如,测序技术(包括但不限于Sanger测序、化学测序、纳米孔测序、连接测序(SOLiD测序)和质谱测序)可以用于确定从哺乳动物获得的样品中本文描述的一种或更多种修饰的肽的存在、不存在或水平。

[0093] 当治疗患有癌症的哺乳动物时,可以将一种或更多种分子施用至患有癌症的哺乳动物,以治疗该哺乳动物,所述一种或更多种分子包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID No:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或多个抗原结合结构域(scFv)。在一些情况下,哺乳动物可以患有表达本文描述的一种或更多种修饰的肽的癌症。例如,可以将包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或多个抗原结合结构域的一种或更多种分子施用至患有表达该修饰的肽的癌症的哺乳动物,以治疗该哺乳动物。例如,可以将包含可以与本文描述的修饰的

肽结合的一个或多个scFv的一种或更多种分子(例如,一种或更多种CAR和/或一种或更多种scDb)施用至患有表达该修饰的肽的癌症的哺乳动物,以治疗该哺乳动物。

[0094] 在一些情况下,可以将一种或更多种分子在范围从数天至数周的时间段内一次或多次施用至哺乳动物(例如,患有癌症的哺乳动物),所述一种或更多种分子包含可以与本文描述修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)。在一些情况下,包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)的一种或更多种分子可以被配制成用于向哺乳动物施用的药学上可接受的组合物。例如,有效量的包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)的一种或更多种分子可以与一种或更多种药学上可接受的载体(添加剂)和/或稀释剂一起配制。药物组合物可以被配制成用于以固体形式或液体形式(包括但不限于无菌溶液、悬浮液、持续释放制剂、片剂、胶囊、丸剂、粉末和颗粒)施用。可以在本文描述的组合物中使用的药学上可接受的载体、填充剂和媒介物包括但不限于离子交换剂、氧化铝、硬脂酸铝、卵磷脂、血清蛋白(诸如人血清白蛋白)、缓冲物质(诸如磷酸盐)、甘氨酸、山梨酸、山梨酸钾、饱和植物脂肪酸的偏甘油酯混合物、水、盐或电解质(诸如硫酸鱼精蛋白、磷酸氢二钠、磷酸氢钾、氯化钠、锌盐)、胶体硅、三硅酸镁、聚乙烯吡咯烷酮、基于纤维素的物质、聚乙二醇、羧甲基纤维素钠、聚丙烯酸酯、蜡、聚乙烯-聚氧丙烯嵌段聚合物、聚乙二醇和羊毛脂。

[0095] 包含一种或更多种分子的组合物可以被设计成用于口服施用、肠胃外(包括皮下、肌内、静脉内和皮内)施用或瘤内施用,所述一种或更多种分子包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)。适合于肠胃外施用的组合物包括水性和非水性的无菌注射溶液,该水性和非水性的无菌注射溶液可以包含抗氧化剂、缓冲剂、抑菌剂和致使制剂与意图的接受者的血液等渗的溶质。制剂可以呈现于单位剂量容器或多剂量容器例如密封的安瓿瓶和小瓶中,并且可以储存在冷冻干燥(冻干)条件中,仅需要在临使用之前添加无菌液体载体例如注射用水。即时注射溶液和悬浮液可以由无菌粉末、颗粒和片剂制备。

[0096] 包含一种或更多种分子的组合物可以使用任何适当的技术施用并且被施用至任何适当的位置,所述一种或更多种分子包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)。包含含有可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)的一种或更多种分子的组合物可以被局部地(例如,瘤内)或全身地施用。例如,本文提供的组合物可以通过瘤内施用(例如,

注射到肿瘤中)或通过施用到由肿瘤浸润的生物空间(例如,脊柱内施用、小脑内施用、腹膜内施用和/或胸膜施用)来局部地施用。例如,本文提供的组合物可以通过口服施用或通过静脉内施用(例如,注射或输注)来全身地施用至哺乳动物(例如,人类)。

[0097] 有效剂量可以根据癌症的风险和/或严重程度、施用的途径、受试者的年龄和一般健康状况、赋形剂使用、与其他治疗性治疗共使用(co-usage)(诸如使用其他剂)的可能性、以及治疗医师的判断而变化。包含一种或更多种分子的组合物的有效量可以是治疗存在于受试者内的癌症而不对受试者产生显著的毒性的任何量,所述一种或更多种分子包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或更多个抗原结合结构域(例如,scFv)。如果特定受试者未能对特定量做出响应,则可以增加包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或更多个抗原结合结构域(例如,scFv)的一种或更多种分子的量(例如,两倍、三倍、四倍或更多)。在接受该较高的量之后,可以监测哺乳动物对治疗的响应性和毒性症状两者,并且做出相应地调整。有效量可以保持恒定,或者可以根据受试者对治疗的响应被调整为浮动比例(sliding scale)或可变剂量。各种因素都可以影响被用于特定应用的实际有效量。例如,施用频率、治疗的持续时间、多种治疗剂的使用、施用的途径和状况(例如,癌症)的严重程度可能需要增加或减少所施用的实际有效量。

[0098] 一种或更多种分子的施用频率可以有效地治疗患有癌症的哺乳动物而不对哺乳动物产生显著的毒性的任何频率,所述一种或更多种分子包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或更多个抗原结合结构域(例如,scFv)。例如,包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或更多个抗原结合结构域(例如,scFv)的一种或更多种分子的施用频率可以从一周约两次至约三次至一年约两次至约三次。在一些情况下,患有癌症的受试者可以接受本文描述的一种或更多种抗体的单次施用。包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或更多个抗原结合结构域(例如,scFv)的一种或更多种分子的施用频率可以在治疗的持续时间期间保持恒定或者可以是可变的。用包含含有可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或更多个抗原结合结构域(例如,scFv)的一种或更多种分子的组合物的治疗的过程可以包括休息期。例如,包含含有可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或更多个抗原结合结构域(例如,scFv)的一种或更多种分子的组合物可以在两年时间段内每隔一个月被施用,随后是在六个月的休息期,并且这样的方案可以被重复多次。与有效量一样,各种因素可以影响被用于特定应用的实际施用频率。例如,有效量、治疗的持续时间、多种治疗剂的使用、施用途径和状况(例如,癌症)的严重程度可能需要增加或减少施用频率。

[0099] 用于施用包含一种或更多种分子的组合物的有效持续时间可以有效地治疗存在于哺乳动物内的癌症而不对哺乳动物产生显著的毒性的任何持续时间,所述一种或更多种分子分子包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸

序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)。在一些情况下,有效持续时间可以从数月至数年不等。一般来说,用于治疗患有癌症的哺乳动物的有效持续时间范围可以在从约一个月或两个月至五年或更多年的持续时间内。多种因素可以影响被用于特定治疗的实际有效持续时间。例如,有效持续时间可以随着施用频率、有效量、多种治疗剂的使用、施用途径和所治疗的状况的严重程度而变化。

[0100] 在某些情况下,可以监测哺乳动物内的癌症,以评价癌症治疗的有效性。可以使用任何适当的方法确定患有癌症的哺乳动物是否被治疗。例如,可以使用成像技术或实验室测定评价存在于哺乳动物内的癌细胞的数目和/或肿瘤的尺寸。例如,可以使用成像技术或实验室测定评价存在于哺乳动物内的癌细胞和/或肿瘤的位置。

[0101] 在一些情况下,一种或更多种分子可以作为与一种或更多种另外的癌症治疗(例如,抗癌剂)的组合疗法被施用至患有癌症的哺乳动物,所述一种或更多种分子包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32)结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)。癌症治疗可以包括任何适当的癌症治疗。在一些情况下,癌症治疗可以包括手术。在一些情况下,癌症治疗可以包括放射疗法。在一些情况下,癌症治疗可以包括施用一种或更多种治疗剂(例如,一种或更多种抗癌剂)。抗癌剂的实例包括但不限于铂化合物(例如,顺铂或卡铂)、紫杉烷类(taxanes)(例如,紫杉醇、多西他赛(docetaxel)或白蛋白结合型紫杉醇诸如 nab-紫杉醇(nab-paclitaxel))、六甲蜜胺(alretamine)、卡培他滨(capecitabine)、环磷酰胺、依托泊苷(etoposide)(vp-16)、吉西他滨(gemcitabine)、异环磷酰胺(ifosfamide)、伊立替康(irinotecan)(cpt-11)、多柔比星脂质体、美法仑(melphalan)、培美曲塞(pemetrexed)、拓扑替康(topotecan)、长春瑞滨(vinorelbine)、促黄体生成激素-释放激素(LHRH)激动剂(例如,戈舍瑞林(goserelin)和亮丙瑞林(leuprolide))、抗雌激素类(例如,他莫昔芬(tamoxifen))、芳香酶抑制剂(例如,来曲唑(letrozole)、阿那曲唑(anastrozole)和依西美坦(exemestane))、血管生成抑制剂(例如,贝伐单抗(bevacizumab))、聚(ADP)-核糖聚合酶(PARP)抑制剂(例如,奥拉帕尼(olaparib)、卢卡帕尼(rucaparib)和尼拉帕尼(niraparib))、放射性磷、抗CTLA-4抗体、抗PD-1抗体、抗PD-L1抗体、IL-2和其他细胞因子、以及它们的任何组合。在其中包含可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)的一种或更多种分子与一种或更多种另外的癌症治疗组合使用的情况下,所述一种或更多种另外的癌症治疗可以同时或独立地被施用。例如,可以首先施用包含含有可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)的一种或更多种分子的组合物,并且其次施用一种或更多种另外的癌症治疗,反之亦然。

[0102] 本文还提供了试剂盒,该试剂盒包括一种或更多种分子,所述一种或更多种分子包含可以与本文描述的修饰的肽(例如,包含以下中的任一个中列出的氨基酸序列的修饰

的肽:SEQ ID NO:1、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:20、SEQ ID NO:21、SEQ ID NO:22、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:30、SEQ ID NO:31和SEQ ID NO:32) 结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)。例如,试剂盒可以包括包含含有可以与本文描述的修饰的肽结合的一个或多个抗原结合结构域(例如,scFv)的一种或更多种分子的组合物(例如,药学上可接受的组合物)。在一些情况下,试剂盒可以包括用于进行本文描述的任何方法的说明。在一些情况下,试剂盒可以包括至少一个剂量的本文描述的任何组合物(例如,药物组合物)。在一些情况下,试剂盒可以提供用于施用本文描述的任何组合物(例如,药物组合物)的手段(例如,注射器)。

[0103] 在以下实施例中进一步描述本发明,该实施例不限制权利要求书中描述的本发明的范围。

实施例

[0104] 实施例1:鉴定另外的MANAbody克隆并将MANAbody克隆转化成基于T细胞的治疗形式

[0105] 在该研究中,设计并构建了两个噬菌体展示文库,这两个文库在噬菌体表面上展示了单链可变片段(scFv)。存在于两个文库中的scFv基于人源化4D5(曲妥珠单抗)框架,其中在scFv的互补决定区(CDR)的关键位置处引入氨基酸可变性。

[0106] 使用噬菌体展示文库鉴定这样的scFv,该scFv特异性识别被折叠成与重组HLA等位基因 α 链和 β -2微球蛋白(b2M)形成复合物的含突变的肽。这些复合物在本文中也称为单体,模拟癌细胞表面上的天然肽/HLA复合物。

[0107] 肽-HLA靶可以包括表1中示出的突变体肽(例如,突变相关新抗原(MANA))。在表2中示出了可以与表1中的肽-HLA靶特异性地结合的互补决定区(CDR)。在表3中示出了可以与表1中的肽-HLA靶特异性地结合的scFv。这些scFv还可以因其与突变相关新抗原结合的能力被称为MANAbody。

[0108]

表2. 轻(L)链和重(H)链的MANAbody互补决定区(CDR)序列。

靶肽	靶HLA等位基因	CDR L1	CDR L2	CDR L3	CDR H1	CDR H2	CDR H3
1) EGFR T790M(789-797)-A2							
IMQLMPFGC (SEQ ID NO:13)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQDYAPIT (SEQ ID NO:34)	GFNISWYQ (SEQ ID NO:41)	VTPYSGYT (SEQ ID NO:48)	SRSYTDGFDY (SEQ ID NO:55)
IMQLMPFGC (SEQ ID NO:13)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSPYYLPIT (SEQ ID NO:35)	GFNVSWSY (SEQ ID NO:42)	IYGDSGYT (SEQ ID NO:49)	SRQWEASYAM DY (SEQ ID NO:56)
IMQLMPFGC (SEQ ID NO:13)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYYSPVT (SEQ ID NO:36)	GFNISWNQ (SEQ ID NO:43)	VSPYSGYT (SEQ ID NO:50)	SRSYYAMDY (SEQ ID NO:57)
IMQLMPFGC (SEQ ID NO:13)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQHYGNPFT (SEQ ID NO:37)	GFNVGYYG (SEQ ID NO:44)	VSGMEGYT (SEQ ID NO:51)	SRDIYGYAMDV (SEQ ID NO:58)
IMQLMPFGC (SEQ ID NO:13)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSYSPPT (SEQ ID NO:38)	GFNITSSY (SEQ ID NO:45)	ISPADGYN (SEQ ID NO:52)	SRTDSTAYTAMD V (SEQ ID NO:59)
IMQLMPFGC (SEQ ID NO:13)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYYSYPT (SEQ ID NO:39)	GFNINSSY (SEQ ID NO:46)	ISPTDGY (SEQ ID NO:53)	SRTSDTSY AAMDV (SEQ ID NO:60)
IMQLMPFGC (SEQ ID NO:13)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYYSYPT (SEQ ID NO:40)	GFNISTSY (SEQ ID NO:47)	IDPNDGYS (SEQ ID NO:54)	SRTNNTAADAMD V (SEQ ID NO:61)
2) IDH2 R140Q(134-143)-B7							

[0109]

SPNGTIQNIL (SEQ ID NO:1)	HLA-B7	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYSYSPPT (SEQ ID NO:62)	GFNISDTY (SEQ ID NO:67)	ISPRITGYN (SEQ ID NO:72)	SRAYYSYAYAMD V (SEQ ID NO:77)
SPNGTIQNIL (SEQ ID NO:1)	HLA-B7	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQGKAYWPAT (SEQ ID NO:63)	GFNVGHYR (SEQ ID NO:68)	VSPNGYYT (SEQ ID NO:73)	SRGYSSYAFDY (SEQ ID NO:78)
SPNGTIQNIL (SEQ ID NO:1)	HLA-B7	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQVYSSPFT (SEQ ID NO:64)	GFNVKYYM (SEQ ID NO:69)	ISPGYDYT (SEQ ID NO:74)	SRSYWRYSVDV (SEQ ID NO:79)
SPNGTIQNIL (SEQ ID NO:1)	HLA-B7	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYSLYSPMT (SEQ ID NO:65)	GFNSFLS (SEQ ID NO:70)	IFPSSDYT (SEQ ID NO:75)	SRGKHSSDSNYY MDY (SEQ ID NO:80)
SPNGTIQNIL (SEQ ID NO:1)	HLA-B7	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSYMPFT (SEQ ID NO:66)	GFNIFRGY (SEQ ID NO:71)	ISPHSDYT (SEQ ID NO:76)	SRSYGWAAFDY (SEQ ID NO:81)
3) p53 R248Q/W(245-254)-A2							
GMNQRPILTI (SEQ ID NO:15)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSGYAPIT (SEQ ID NO:82)	GFNISYYS (SEQ ID NO:89)	VDPDSDYT (SEQ ID NO:96)	SRSWIHMFSMDY (SEQ ID NO:103)
GMNWRPILTI (SEQ ID NO:16)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYSYAPIT (SEQ ID NO:83)	GFNIGYYT (SEQ ID NO:90)	VSPWSYST (SEQ ID NO:97)	SRDHWDEAFDV (SEQ ID NO:104)
GMNQRPILTI (SEQ ID NO:15)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSLYGPFT (SEQ ID NO:84)	GFNIAIYIY (SEQ ID NO:91)	IGPDSGYT (SEQ ID NO:98)	SRVWYYSTYGMID Y (SEQ ID NO:105)
GMNWRPILTI (SEQ ID NO:16)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYSYSPIT (SEQ ID NO:85)	GFNLFYGY (SEQ ID NO:92)	IGPYYYT (SEQ ID NO:99)	SRENYDMAMDY (SEQ ID NO:106)
GMNWRPILTI (SEQ ID NO:16)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSGYQPDT (SEQ ID NO:86)	GFNISWYA (SEQ ID NO:93)	IWPDSDWT (SEQ ID NO:100)	SRYYSASFVDV (SEQ ID NO:107)

[0110]

GMNQRPILTI (SEQ ID NO:15), GMNWRPILTI (SEQ ID NO:16)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYLYQPWT (SEQ ID NO:87)	GFNIDYYG (SEQ ID NO:94)	LYGGSDST (SEQ ID NO:101)	SRQYSAYFDY (SEQ ID NO:108)
GMNQRPILTI (SEQ ID NO:15), GMNWRPILTI (SEQ ID NO:16)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQGLYYPWT (SEQ ID NO:88)	GFNVSYSS (SEQ ID NO:95)	IWPDSGQT (SEQ ID NO:102)	SRSYFDAMDY (SEQ ID NO:109)
4) KRAS G12V(6-14)-A2							
LVVVGAVGV (SEQ ID NO:18)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQWYSSPVT (SEQ ID NO:110)	GFNINWAN (SEQ ID NO:112)	ISPPYDYT (SEQ ID NO:115)	SRSYSYFDY (SEQ ID NO:118)
LVVVGAVGV (SEQ ID NO:18)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYYSRPVT (SEQ ID NO:111)	GFNLYLHD (SEQ ID NO:113)	IIPADYD (SEQ ID NO:116)	SRRDGYFDY (SEQ ID NO:119)
LVVVGAVGV (SEQ ID NO:18)	HLA-A2	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQWYSSPVT (SEQ ID NO:110)	GFNIYWSH (SEQ ID NO:114)	ISSFEGYT (SEQ ID NO:117)	SRSYSYMDY (SEQ ID NO:120)
5) KRAS G12C/D/V(7-16)-A3							
VVVGACGVGK (SEQ ID NO:20), VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSYGSGSPWT (SEQ ID NO:121)	GFNIVGGG (SEQ ID NO:124)	IYPQGDYT (SEQ ID NO:127)	SRDSSYLAFDY (SEQ ID NO:129)
VVVGACGVGK (SEQ ID NO:20), VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21), VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQTYYPSPWT (SEQ ID NO:122)	GFNIRSYA (SEQ ID NO:125)	VGPGKGYT (SEQ ID NO:128)	SRNFQSTSHAFDY (SEQ ID NO:130)

[0111]

VVVGACGVGK (SEQ ID NO:20), VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21), VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYYYPFIT (SEQ ID NO:123)	GFNVSHTG (SEQ ID NO:126)	VGPGKGYT (SEQ ID NO:128)	SRKTYAFDY (SEQ ID NO:131)
6) KRAS G12V(7-16)-A3							
VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSYYYFRPIT (SEQ ID NO:132)	GFNLSYSD (SEQ ID NO:137)	VMPDSGHT (SEQ ID NO:142)	SRAATNIPVYAFDY (SEQ ID NO:147)
VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQASYYYPLT (SEQ ID NO:133)	GFNISASG (SEQ ID NO:138)	IHPLKPYT (SEQ ID NO:143)	SRYSSMYYYFD Y (SEQ ID NO:148)
VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQKSEYSPWT (SEQ ID NO:134)	GFNIYRYG (SEQ ID NO:139)	LYPYGYST (SEQ ID NO:144)	SRSYAYGYFAY (SEQ ID NO:149)
VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSGYIPFT (SEQ ID NO:135)	GFNIYGTM (SEQ ID NO:140)	FKPDSYNT (SEQ ID NO:145)	SRGEVYHYAFD Y (SEQ ID NO:150)
VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQGAYYRPFT (SEQ ID NO:136)	GFNISYSY (SEQ ID NO:141)	LLPYDGNT (SEQ ID NO:146)	SRAAYSSMDV (SEQ ID NO:151)
7) KRAS G12D(7-16)-A3							
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYMYSPVT (SEQ ID NO:152)	GFNVSAYW (SEQ ID NO:156)	IYGGSGYT (SEQ ID NO:160)	SRTHSYWSAFDY (SEQ ID NO:164)

[0112]

VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSSSPIT (SEQ ID NO:153)	GFNISGYG (SEQ ID NO:157)	LYGGSDYT (SEQ ID NO:161)	SRTVRYAFDY (SEQ ID NO:165)
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSSASPLT (SEQ ID NO:154)	GFNVSSVG (SEQ ID NO:158)	IYGTSDYT (SEQ ID NO:162)	SRSSRYSM DY (SEQ ID NO:166)
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYAYSPLT (SEQ ID NO:155)	GFNVSSYG (SEQ ID NO:159)	IAPRRDYT (SEQ ID NO:163)	SRKSSYFDY (SEQ ID NO:167)
8) KRAS G12D(7-16)-A11							
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYSYPIT (SEQ ID NO:168)	GFNFSYGY (SEQ ID NO:173)	ISGYTGNT (SEQ ID NO:178)	SRAASLSSYSYSAF DV (SEQ ID NO:183)
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYSYTPVT (SEQ ID NO:169)	GFNVWGPQ (SEQ ID NO:174)	IHPFSGNT (SEQ ID NO:179)	SRGYSYSAMDY (SEQ ID NO:184)
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYSYEPVT (SEQ ID NO:170)	GFNVSGSQ (SEQ ID NO:175)	IPGWSGYT (SEQ ID NO:180)	SRGYSYFAMDY (SEQ ID NO:185)
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYAYYSPVT (SEQ ID NO:171)	GFNIYQQM (SEQ ID NO:176)	LSPFSGNT (SEQ ID NO:181)	SRNISYEQSSAFDY (SEQ ID NO:186)
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYEYYPMT (SEQ ID NO:172)	GFNVMYST (SEQ ID NO:177)	IYSWSDYT (SEQ ID NO:182)	SRGYAHNSFDY (SEQ ID NO:187)
9) KRAS G12D(8-16)-A11							
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYSFYPT (SEQ ID NO:188)	GFNFGSY (SEQ ID NO:196)	ISGYSGNT (SEQ ID NO:207)	SRSNQSAYSMD Y (SEQ ID NO:218)

[0113]

VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYSYSPIT (SEQ ID NO:85)	GFNISDSY (SEQ ID NO:197)	FSPYSSNT (SEQ ID NO:208)	SRSQFTFYQYFDY (SEQ ID NO:219)
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAY	QQYSAYYQPIT (SEQ ID NO:189)	GFNIFSDQ (SEQ ID NO:198)	FMPYDSYYT (SEQ ID NO:209)	SRMSVRNAFDY (SEQ ID NO:220)
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYSYYPIT (SEQ ID NO:168)	GFNLSYSY (SEQ ID NO:199)	ISFGSGNT (SEQ ID NO:210)	SRSDSYYTAMDY (SEQ ID NO:221)
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYEYVPHT (SEQ ID NO:190)	GFNISYGY (SEQ ID NO:200)	FHYGSGNT (SEQ ID NO:211)	SRSNYYYLDY (SEQ ID NO:222)
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYSYMPIT (SEQ ID NO:191)	GFNISYQH (SEQ ID NO:201)	FMPYQGST (SEQ ID NO:212)	SRANIYSSHFFDY (SEQ ID NO:223)
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYAYYPVT (SEQ ID NO:192)	GFNLSGY (SEQ ID NO:202)	FSPYSGYT (SEQ ID NO:213)	SRTHSSYHSFDY (SEQ ID NO:224)
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYSYMPIT (SEQ ID NO:191)	GFNVSGQY (SEQ ID NO:203)	ISPVSGNT (SEQ ID NO:214)	SRPMKTSYYGAFD (SEQ ID NO:225)
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYDYRPVT (SEQ ID NO:193)	GFNVSTSG (SEQ ID NO:204)	IYGAYSGT (SEQ ID NO:215)	SRSQSYTYWSAM (SEQ ID NO:226)
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYDFTPMT (SEQ ID NO:194)	GFNISYAK (SEQ ID NO:205)	LTYWGGYT (SEQ ID NO:216)	SRGEYGTYMDY (SEQ ID NO:227)
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYSSSSPVT (SEQ ID NO:195)	GFNFSYV (SEQ ID NO:206)	VYPDSGGT (SEQ ID NO:217)	SRTSSYAFDY (SEQ ID NO:228)
10) KRAS G12V(7-16)-A11							
VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSSYTPIT (SEQ ID NO:229)	GFNISQGG (SEQ ID NO:234)	VYPGGGQT (SEQ ID NO:240)	SRGYDYSAFDY (SEQ ID NO:246)

[0114]

VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYAYYPIT (SEQ ID NO:230)	GFNISSTG (SEQ ID NO:235)	LLGGSGNT (SEQ ID NO:241)	SRGLQYSAMDY (SEQ ID NO:247)
VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A11	QDVNTA	SAS	QQYEYYPIT (SEQ ID NO:231)	GFNFFSTV (SEQ ID NO:236)	IYPWVGST (SEQ ID NO:242)	SRSRSSNYFDV (SEQ ID NO:248)
VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYTYYPIT (SEQ ID NO:232)	GFNLHGYL (SEQ ID NO:237)	IYPPNGYT (SEQ ID NO:243)	SRGVDYAYLDY (SEQ ID NO:249)
VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYSYYPIT (SEQ ID NO:168)	GFNLSTHV (SEQ ID NO:238)	FYPYVGYT (SEQ ID NO:244)	SRGYRYQYMDV (SEQ ID NO:250)
VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A11	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSSVEPWT (SEQ ID NO:233)	GFNVSYYS (SEQ ID NO:239)	IYPWNDY T (SEQ ID NO:245)	SRGSYYSFDY (SEQ ID NO:251)
11) CTNNB S45F(41-49)-A3							
TTAPFLSGK (SEQ ID NO:26)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSYSPPT (SEQ ID NO:38)	GFNINNTY (SEQ ID NO:256)	IYPTDGYT (SEQ ID NO:260)	SRTYYSYYSAMD V (SEQ ID NO:265)
TTAPFLSGK (SEQ ID NO:26)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAY	QQIYTSPIT (SEQ ID NO:252)	GFNFITG (SEQ ID NO:257)	IGPGSDYT (SEQ ID NO:261)	SRYYYASALDY (SEQ ID NO:266)
TTAPFLSGK (SEQ ID NO:26)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQRAYFPIT (SEQ ID NO:253)	GFNFSDYG (SEQ ID NO:258)	LIPASGYT (SEQ ID NO:262)	SRGWSY YMDY (SEQ ID NO:267)
TTAPFLSGK (SEQ ID NO:26)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQQAYTPIT (SEQ ID NO:254)	GFNVWSYG (SEQ ID NO:259)	VTPDGSYT (SEQ ID NO:263)	SRSYGWAMDY (SEQ ID NO:268)
TTAPFLSGK (SEQ ID NO:26)	HLA-A3	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAY	QQIHYKPLT (SEQ ID NO:255)	GFNVAWYS (SEQ ID NO:260)	VYGGSSYT (SEQ ID NO:264)	SRDFYSSGMDY (SEQ ID NO:269)
12) KRAS G12V(11-19)-B7							

[0115]

AVGVGKSAL (SEQ ID NO:11)	HLA-B7	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQEWRLPIT (SEQ ID NO:270)	GFNVYGNQ (SEQ ID NO:275)	IYPYSGST (SEQ ID NO:278)	SRSAYVAYSFDY (SEQ ID NO:283)
AVGVGKSAL (SEQ ID NO:11)	HLA-B7	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQGTSTPFT (SEQ ID NO:271)	GFNLSYYG (SEQ ID NO:402)	IYPDSGYT (SEQ ID NO:279)	SRAYLYYLAY (SEQ ID NO:284)
AVGVGKSAL (SEQ ID NO:11)	HLA-B7	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSWRYPMT (SEQ ID NO:272)	GFNISRYG (SEQ ID NO:276)	FYPSSSYT (SEQ ID NO:280)	SRKYEAMDY (SEQ ID NO:285)
AVGVGKSAL (SEQ ID NO:11)	HLA-B7	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSYSPVT (SEQ ID NO:273)	GFNIYSSW (SEQ ID NO:277)	FQPYSGYT (SEQ ID NO:281)	SREYTYFDY (SEQ ID NO:286)
AVGVGKSAL (SEQ ID NO:11)	HLA-B7	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQGWLYSPFT (SEQ ID NO:274)	GFNISGYG (SEQ ID NO:157)	VYGGSGYT (SEQ ID NO:282)	SRAHSSYYVDY (SEQ ID NO:287)
13) H/K/N RAS Q61H(55-64)-A1							
ILDTAGHEEY (SEQ ID NO:28)	HLA-A1	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQGYFYYPNT (SEQ ID NO:288)	GFNIGYYG (SEQ ID NO:289)	VYPGGGYT (SEQ ID NO:290)	SRYYYYGFDY (SEQ ID NO:291)
14) H/K/N RAS Q61K(55-64)-A1							
ILDTAGKEEY (SEQ ID NO:30)	HLA-A1	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQHYSPVT (SEQ ID NO:292)	GFNIFYQD (SEQ ID NO:293)	IYPDYDYT (SEQ ID NO:294)	SRTYSVYMDY (SEQ ID NO:295)
15) H/K/N RAS Q61L(55-64)-A1							
ILDTAGLEEY (SEQ ID NO:31)	HLA-A1	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYAYAPFT (SEQ ID NO:296)	GFNVYSM (SEQ ID NO:297)	VWGDGGVT (SEQ ID NO:298)	SRGSYYAFDY (SEQ ID NO:299)
16) H/K/N RAS Q61R(55-64)-A1							

[0116]

ILDTAGREY (SEQ ID NO:32)	HLA-A1	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQAHMIPIT (SEQ ID NO:300)	GFNFSPG (SEQ ID NO:305)	FVGYDGYT (SEQ ID NO:310)	SRDYYSFSMDY (SEQ ID NO:316)
ILDTAGREY (SEQ ID NO:32)	HLA-A1	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSVYDPIT (SEQ ID NO:301)	GFNIGSW (SEQ ID NO:306)	LYPDSDYT (SEQ ID NO:311)	SRAHTYAFDY (SEQ ID NO:317)
ILDTAGREY (SEQ ID NO:32)	HLA-A1	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQSYTSPLT (SEQ ID NO:302)	GFNIYGV (SEQ ID NO:307)	IYPDSSWT (SEQ ID NO:312)	SRDQDFHYMNY LSYALDY (SEQ ID NO:318)
ILDTAGREY (SEQ ID NO:32)	HLA-A1	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQQYSPFT (SEQ ID NO:303)	GFNVSYEY (SEQ ID NO:308)	IYGGSDNT (SEQ ID NO:313)	SRPLGSYFDY (SEQ ID NO:319)
ILDTAGREY (SEQ ID NO:32)	HLA-A1	QDVNTA (SEQ ID NO:33)	SAS	QQYWYLPIT (SEQ ID NO:320)	GFNISWYD (SEQ ID NO:321)	IEPSVGYT (SEQ ID NO:322)	SRSYPYYFDY (SEQ ID NO:323)

表3. MANAbody scFv序列

靶肽	靶HLA 等位基因	scFv克隆名称	scFv序列	SEQ ID NO:
1) EGFR T790M(789-797)-A2				
IMQLMPFGC (SEQ ID NO:13)	HLA-A2	EGFR_T790M_A2_c11	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYYCQQ YDYAPITFGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRSLSCAASGFNISWYQMHWRVQAPGKLEWVALVTP YSGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRSYTDGFDYWGQGLVTVSS	324

[0117]

IMQLMPFGC (SEQ ID NO:13)	HLA-A2	EGFR_T790M_A2_c15	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQS PYYYLPIITFGQGTKVEIKRTGGSGGGGGASEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNVSWSYMHWRQAPGKGLEWVANIY GDSGYTHYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRQWEASYAMDYWGQGLVTVSS	325
IMQLMPFGC (SEQ ID NO:13)	HLA-A2	EGFR_T790M_A2_c118	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ YYSPVTFGQGTKVEIKRTGGSGGGGGASEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNVSWSYMHWRQAPGKGLEWVALVSP YSGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRSDIYAMDYWGQGLVTVSS	326
IMQLMPFGC (SEQ ID NO:13)	HLA-A2	EGFR_T790M_A2_c123	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ HYGNPFTFGQGTKVEIKRTGGSGGGGGASEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNVSWSYMHWRQAPGKGLEWVAFVS GMEGYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRDIYGYAMDVWVGQGLVTVSS	327
IMQLMPFGC (SEQ ID NO:13)	HLA-A2	EGFR_T790M_A2_D2D6	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQS YYSPPTFGQGTKVEIKRTGGSGGGGGASEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFNITSSYIHWVVRQAPGKGLEWVAIYSPADG YNYRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR DSTAYTAMDVWVGQGLVTVSS	328
IMQLMPFGC (SEQ ID NO:13)	HLA-A2	EGFR_T790M_A2_D2D8	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVTTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ YYSPPTFGQGTKVEIKRTGGSGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNINSSYIHWVVRQAPGKGLEWVAIYSP GYRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR TSDTSYAAMDVWVGQGLVTVSS	329

[0118]

IMQLMPFGC (SEQ ID NO:13)	HLA-A2	EGFR_T790M_A2_D3E6	DIQMTQSPSSLSASVGDTRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLISASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSLQPEDFATYCCQQ YVYYPPTFGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFINISTYIHWRVRAQPGKGLEWVAIDPN DGYRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RTNNTAADAMDVWGQGLVTVSS	330
2) IDH2 R140Q(134-143)-B7				
SPNGTIQNIL (SEQ ID NO:1)	HLA-B7	IDH2_R140Q_B7_D4	DIQMTQSPSSLSASVGDTRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLISASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSLQPEDFATYCCQQ YSYSPPTFGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFINISDITYIHWRVRAQPGKGLEWVASISPRTG YNRYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRA YYSYAYAMDVWGQGLVTVSS	3
SPNGTIQNIL (SEQ ID NO:1)	HLA-B7	IDH2_R140Q_B7_c129	DIQMTQSPSSLSASVGDTRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLISASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSLQPEDFATYCCQQ GKAYWPATFGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNVGHYRMHWVRAQPGKLEWVAM VSPNGYYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAV YYCSRGSYSSYAFDYWGQGLVTVSS	4
SPNGTIQNIL (SEQ ID NO:1)	HLA-B7	IDH2_R140Q_B7_c11	DIQMTQSPSSLSASVGDTRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLISASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSLQPEDFATYCCQQ VYSSPPTFGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNVKYYMMHWVRAQPGKLEWVAISP GYDYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRSYWRYSDVDVWGQGLVTVSS	5

[0119]

SPNGTIQNIL (SEQ ID NO:1)	HLA-B7	IDH2_R140Q_B7_c13	DIQMTQSPSSLSASVGDRLVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSLQPEDFATYCCQQ YSLYSPMTFGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGG GLVQPGGSLRLSCAASGFSFLSIHWVVRQAPGKGLEWVAHIFPSS DYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR GKHSDSNYMDYWGQGLVTVSS	6
SPNGTIQNIL (SEQ ID NO:1)	HLA-B7	IDH2_R140Q_B7_c18	DIQMTQSPSSLSASVGDRLVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSLQPEDFATYCCQS YYMPFTFGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNIFRGYMHWVVRQAPGKGLEWVAMISPH SDYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR SYGWAADFYWGQGLVTVSS	8
3) p53 R248Q/W(245-254)-A2				
GMNQRPILTI (SEQ ID NO:15)	HLA-A2	p53_R248Q_A2_c10	DIQMTQSPSSLSASVGDRLVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSLQPEDFATYCCQS GYAPITFGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFNISYYSMHWVVRQAPGKGLEWVADVPDS DYTEYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSRS WIHFMSMDYWGQGLVTVSS	331
GMNWRPILTI (SEQ ID NO:16)	HLA-A2	p53_R248W_A2_c12	DIQMTQSPSSLSASVGDRLVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSLQPEDFATYCCQQ YSYAPITFGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNIGYYTMHWVVRQAPGKGLEWVAEVS WSYSTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RDHWDEAFDVGQGLVTVSS	332

[0120]

GMNQRPI.TI (SEQ ID NO: 15)	HLA-A2	p53_R248Q_A2_c14	DIQMTQSPSSLSASVGVDRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQS LYGPFITFGQGTKEIKRTGGSGGGGSEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFINIYEMHWVRQAPGKGLEWVALIGPDS GYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR VWYYSTYGMDYWGQGLVTVSS	333
GMNWRPIL.TI (SEQ ID NO: 16)	HLA-A2	p53_R248W_A2_c18	DIQMTQSPSSLSASVGVDRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ YSYSPITFGQGTKEIKRTGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNIFGYGMHWVRQAPGKGLEWVAEIGPY YYTYSADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RENYDMAMDYWGQGLVTVSS	334
GMNWRPIL.TI (SEQ ID NO: 16)	HLA-A2	p53_R248W_A2_c11	DIQMTQSPSSLSASVGVDRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQS GYQDITFGQGTKEIKRTGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNISWYAMHWVRQAPGKGLEWVAEIWP DSDWTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRYYYSSAFDVGQGLVTVSS	335
GMNQRPI.TI (SEQ ID NO: 15), GMNWRPIL.TI (SEQ ID NO: 16)	HLA-A2	p53_R248QW_A2_c114	DIQMTQSPSSLSASVGVDRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ YLYQPWTFGQGTKEIKRTGGSGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNIDYYGMHWVRQAPGKGLEWVASLY GGSDTDYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRQYSAYFDYWGQGLVTVSS	336
GMNQRPI.TI (SEQ ID NO: 15), GMNWRPIL.TI (SEQ ID NO: 16)	HLA-A2	p53_R248QW_A2_c117	DIQMTQSPSSLSASVGVDRVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ GLYYPWTFGQGTKEIKRTGGSGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNYSYSSIHWRQAPGKGLEWVAEIWPD SGQWTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RSSYFDAMDYWGQGLVTVSS	337

[0121]

4) KRAS G12V(6-14)-A2				
LVVVGAVGV (SEQ ID NO:18)	HLA-A2	KRAS_G12V_A2_A1	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTLSLQPEDFATYCCQQ WYSSPVTFGQGTKVEIKRTGGGGGGGASEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNINWANMHWVRQAPGKGLEWVAQISP PYDYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRSYSYFDYWGQGTLVTVSS	338
LVVVGAVGV (SEQ ID NO:18)	HLA-A2	KRAS_G12V_A2_C1	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTLSLQPEDFATYCCQQ YYSRPVTFGQGTKVEIKRTGGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNIIYLDHMHVVRQAPGKGLEWVAQIIPAI DYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR RDGYFDYWGQGTLVTVSS	339
LVVVGAVGV (SEQ ID NO:18)	HLA-A2	KRAS_G12V_A2_A5	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTLSLQPEDFATYCCQQ WYSSPVTFGQGTKVEIKRTGGGGGGGASEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNIYWSHMHWVRQAPGKGLEWVAIISF EGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RSYSYMDYWGQGTLVTVSS	340
5) KRAS G12C/D/V(7-16)-A3				
VVVGACGVGK (SEQ ID NO:20), VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	KRAS_G12CV_A3_c15	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVITTCRASQDVNTAVAWYQQKPKGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTLSLQPEDFATYCCQS YGGSPWTFGQGTKVEIKRTGGGGGGGASEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNIVGGIHWVRQAPGKGLEWVAKIYP QGDYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRDSSYLAFDYWGQGTLVTVSS	341

[0122]

VVVGACGVGK (SEQ ID NO:20), VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21), VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	KRAS_G12CDV_A3_c19	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLISASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTLSLQPEDFATYCCQQ TYYSPTFGQGTKEIKRTGGSGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNIRSYAMHWVVRQAPGKGLEWVAQVGP GKGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRNFQSTSHAFDYWGQGTLVTVSS	342
VVVGACGVGK (SEQ ID NO:20), VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21), VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	KRAS_G12CDV_A3_c118	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLISASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTLSLQPEDFATYCCQQ YYYPITFGQGTKEIKRTGGSGGGGSEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNVSHVTGMHWVVRQAPGKGLEWVAVVG GKGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRKTYAFDYWGQGTLVTVSS	343
6) KRAS G12V(7-16)-A3				
VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	KRAS_G12V_A3_c12	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLISASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTLSLQPEDFATYCCQS YYFRPITFGQGTKEIKRTGGSGGGGSEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNLSYSDIHWVVRQAPGKGLEWVAVVM DSGHTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRATNIPVYAFDYWGQGTLVTVSS	344
VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	KRAS_G12V_A3_V12	DIQMTQSPSSLSASVGDRTVITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLISASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTLSLQPEDFATYCCQQ ASYYYPLTFGQGTKEIKRTGGSGGGGSEVQLVESGGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNISAGMHWVVRQAPGKGLEWVA DIH PLKPYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRYSSMYYYFDYWGQGTLVTVSS	345

[0123]

VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	KRAS_G12V_A3_c120	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVTITCRASQDQVNTAVAWYQQKPKGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQ KSEYSPWTFGGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFINRYGIHWVRQAPGKGLEWVAFLY PYGYSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRSYAYGYFAYWGQGLVTVSS	346
VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	KRAS_G12V_A3_c121	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVTITCRASQDQVNTAVAWYQQKPKGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQS GYPFTFGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFINYGTMMHWVRQAPGKGLEWVAQFKPDS YNTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR GEVYHYAFDYWGQGLVTVSS	347
VVVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A3	KRAS_G12V_A3_c122	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVTITCRASQDQVNTAVAWYQQKPKGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQ GAYYRPFYGGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFINISYIMHWVRQAPGKGLEWVAFLY PYDGNITYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRAAYSSMDVWGQGLVTVSS	348
7) KRAS G12D(7-16)-A3				
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A3	KRAS_G12D_A3_c111	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVTITCRASQDQVNTAVAWYQQKPKGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISSLQPEDFATYYCQQ YMYSPVTFGGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFINVSAYWMHWVRQAPGKGLEWVAQIY GGSGYTMVADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRTHSYWSAFDYWGQGLVTVSS	349

[0124]

VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A3	KRAS_G12D_A3_D12	DIQMTQPSSLSASVGDRTTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISSLQPEDFATYCCQQS SSSPITFGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFNISGYGMHWVRQAPGKGLEWVAYLYGGS DYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR TVRYAFDYWGQGTLVTVSS	350
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A3	KRAS_G12D_A3_D15	DIQMTQPSSLSASVGDRTTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISSLQPEDFATYCCQQS SASPLTFGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFNVSSVGMHWVRQAPGKGLEWVAYIYGTS DYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR SSRYSMIDYWGQGTLVTVSS	351
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A3	KRAS_G12D_A3_D26	DIQMTQPSSLSASVGDRTTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISSLQPEDFATYCCQQ YAYSPLTFGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNVSSYGMHWVRQAPGKLEWVAFIAPR RDYTSYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR KSSYYFDYWGQGTLVTVSS	352
8) KRAS G12D(7-16)-A11				
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_D3	DIQMTQPSSLSASVGDRTTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISSLQPEDFATYCCQQ YSYYPIITFGQGTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNFYSYGMHWVRQAPGKLEWVAWISG YTGNTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRAASLSSYYSAFDVWGQGTLVTVSS	353

[0125]

VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_D14	DIQMTQSPSSLSASVGDTRVTTICRASQDQVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYQCQQ YSYTPVTFGGQGTKVEIKRTGGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNVWPGMHWVRQAPGKGLEWVARIHP FSGNTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RGYSYAMDYWGQGLVTVSS	354
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_D18	DIQMTQSPSSLSASVGDTRVTTICRASQDQVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYQCQQ YSYEPVTFGGQGTKVEIKRTGGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNVSGSQMHWVRQAPGKGLEWVARIPG WSGYTTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRGYSYFAMDYWGQGLVTVSS	355
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_D21	DIQMTQSPSSLSASVGDTRVTTICRASQDQVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYQCQQ YAYYSPVTFGGQGTKVEIKRTGGGGGGGASEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNIYGQMMHWVRQAPGKGLEWVAFLL SPFSGNTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRNIYEQSSAFDYWGQGLVTVSS	356
VVVGADGVGK (SEQ ID NO:21)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_D22	DIQMTQSPSSLSASVGDTRVTTICRASQDQVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYQCQQ YEYYPMTFGQGTKVEIKRTGGGGGGGASEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNVMYSTMHWVRQAPGKGLEWVASIYS WSDYTTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRGYAHNSFDYWGQGLVTVSS	357
9) KRAS G12D(8-16)-A11				

[0126]

VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_cl4	DIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ YSFYPTFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNFGSYIHWRQAPGKGLEWVAIISGYSG NTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCSRS NQSAYSYMDYWGQGTLVTVSS	358
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_cl6	DIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ YSYSPITFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNIDSYMHWVRQAPGKGLEWVATFSPY SSNTWYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCS RSQFTFYQYFDYWGQGTLVTVSS	359
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_cl7	DIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLYSAYFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ YSAYYQPIITFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFNIFSDQMHWVRQAPGKGLEWVAGFM PYDSYTYNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCSRMSVRFNFDYWGQGTLVTVSS	360
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_cl9	DIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ YSYYPITFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNLSYIMHWVRQAPGKGLEWVAVISGF SGNTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCS RSDSYTAMDYWGQGTLVTVSS	361
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_cl10	DIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ YEYVPHITFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNISYIMHWVRQAPGKGLEWVAKFHY GSGNTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVVYCS SRSNYYLDYWGQGTLVTVSS	362

[0127]

VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_c112	DIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ YSYMPITFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNISYQHIHWVRQAPGKGLEWVAIFMPY QGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RANYSSSHFFDYWGQGLVTVSS	363
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_c114	DIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ YAYYPVTFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNLSGYMHWVRQAPGKGLEWVAWFS PYSGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYY CSRTHSSIYHSFDYWGGGLVTVSS	364
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_c115	DIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ YSYMPITFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNVSQYMHWVRQAPGKGLEWVAISPV SGNTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RPMKTSYYGAFDYWGQGLVTVSS	365
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_c117	DIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ YDYRPVTFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNVSTSGMHWVRQAPGKGLEWVAFIYG AYSGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRSQSYTYWSAMDYWGQGLVTVSS	366
VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_c118	DIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ YDFTPMTFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNISYAKMHWVRQAPGKGLEWVAYLTY WGGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRGEYGTMDYWGQGLVTVSS	367

[0128]

VVGADGVGK (SEQ ID NO:24)	HLA-A11	KRAS_G12D_A11_c119	DIQMTQSPSSLSASVGDTRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSLQPEDFATYCCQQ YSSSPVTFGGQTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGTFNFSYVMHWVRQAPGKGLEWVAIVY PDSGGTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRRAEDTAVYY CSRTSSYAFDYWGQGLVTVSS	368
10) KRAS G12V(7-16)-A11				
VVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A11	KRAS_G12V_A11_V3	DIQMTQSPSSLSASVGDTRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSLQPEDFATYCCQS SYTPITFGQTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGTFNFSYVMHWVRQAPGKGLEWVAIVYVY GQNTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRRAEDTAVYYCSR GYDYSAFDYWGQGLVTVSS	369
VVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A11	KRAS_G12V_A11_V9	DIQMTQSPSSLSASVGDTRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSLQPEDFATYCCQQ YAYYPITFGQTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGTFNFSYVMHWVRQAPGKGLEWVAELLGG SGNTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRRAEDTAVYYCS RGLQYSAMDYWGQGLVTVSS	370
VVGAVGVGK (SEQ ID NO:22)	HLA-A11	KRAS_G12V_A11_V10	DIQMTQSPSSLSASVGDTRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSLQPEDFATYCCQQ YEYYPITFGQTKVEIKRTGGGGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGTFNFSYVMHWVRQAPGKGLEWVAEIVPWS GSTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRRAEDTAVYYCSRS RSSNYFDVWGQGLVTVSS	371

[0130]

TTAPFLSGK (SEQ ID NO:26)	HLA-A3	CTNNB_S45F_A3_c13	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLISAYFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYCCQI YTSPIFGQGTKEIKRTGGSGGGGASEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFNFIITGMHWVVRQAPGKGLEWVARIGP YTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCSRY YYASALDYWGQGLVTVSS	376
TTAPFLSGK (SEQ ID NO:26)	HLA-A3	CTNNB_S45F_A3_c14	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLISASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYCCQ RAYFPITFGQGTKEIKRTGGSGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNFDYGMHWVVRQAPGKGLEWVAMLIPA SGYTNYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCS RGWSSYMDYWGQGLVTVSS	377
TTAPFLSGK (SEQ ID NO:26)	HLA-A3	CTNNB_S45F_A3_c17	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLISASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYCCQ QYAYTPIFGQGTKEIKRTGGSGGGGASEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNVDVYGIHWVVRQAPGKGLEWVAVTP DGSYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCS SRSYGWAMDYWGQGLVTVSS	378
TTAPFLSGK (SEQ ID NO:26)	HLA-A3	CTNNB_S45F_A3_c19	DIQMTQSPSSLSASVGDRAVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLISAYFLYSGVPSRFSRSGTDFLTISLQPEDFATYCCQI HYKPLTFGQGTKEIKRTGGSGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNVAWYSIHWVVRQAPGKGLEWVAQVY GSSYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYCS RDFYSSGMIDYWGQGLVTVSS	379
12) KRAS G12V(11-19)-B7				

[0131]

AVGVGKSAL (SEQ ID NO: 11)	HLA-B7	KRAS_G12V_B7_c11	DIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ EWRLPITFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFINVYGNQIHWRQAPGKGLEWVARIYPI SGSTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR SAYVAYSYFDYWGGQGLVTVSS	380
AVGVGKSAL (SEQ ID NO: 11)	HLA-B7	KRAS_G12V_B7_c12	DIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ GTSTPFTFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFINLSYGMHWVVRQAPGKGLEWVATIYPD SGYTKYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RAYLYYLYAYWGGQGLVTVSS	390
AVGVGKSAL (SEQ ID NO: 11)	HLA-B7	KRAS_G12V_B7_c13	DIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQS WRYPMFTFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFINISRYGMHWVVRQAPGKGLEWVAVFYPS SSYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR KYYEAMDYWGGQGLVTVSS	391
AVGVGKSAL (SEQ ID NO: 11)	HLA-B7	KRAS_G12V_B7_c15	DIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQS YSYPVTFHGHTKVEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFINISYSSWVHWVVRQAPGKGLEWVAYFPY SGYTKYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS REYTYFDYWGGQGLVTVSS	392
AVGVGKSAL (SEQ ID NO: 11)	HLA-B7	KRAS_G12V_B7_c16	DIQMTQSPSSLSASVGDVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ GWLYSPFTFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGG GLVQPGGSLRLSCAASGFINISYGMHWVVRQAPGKGLEWVAVR YGGSGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVY YCSRAHSSYVVDYWGGQGLVTVSS	393

[0133]

ILDTAGREYY (SEQ ID NO:32)	HLA-A1	H/R/N RAS Q61R_A1_c116	DIQMTQSPSSLSASVGVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ AHMIPITFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNFSFPMHWVRQAPGKGLEWVAWFVG YDGYTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRDYYSFSDYWGQGLVTVSS	397
ILDTAGREYY (SEQ ID NO:32)	HLA-A1	H/R/N RAS Q61R_A1_c117	DIQMTQSPSSLSASVGVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQS VYDPITFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFNISGSWIHWVRQAPGKGLEWVAWLYPDS DYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR AHTYAFDYWGQGLVTVSS	398
ILDTAGREYY (SEQ ID NO:32)	HLA-A1	H/R/N RAS Q61R_A1_c118	DIQMTQSPSSLSASVGVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQS YTSPLTFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGGLV QPGGSLRLSCAASGFNIYYGVMHWRQAPGKGLEWVAMIYPDS SWTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR DQDFHYMNYLALDYWGQGLVTVSS	399
ILDTAGREYY (SEQ ID NO:32)	HLA-A1	H/R/N RAS Q61R_A1_c119	DIQMTQSPSSLSASVGVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ GQYSPFTFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGGL VQPGGSLRLSCAASGFNVSYEYMHWRQAPGKGLEWVAEYIG GSDNTYYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC SRPLGSYFDYWGQGLVTVSS	400
ILDTAGREYY (SEQ ID NO:32)	HLA-A1	H/R/N RAS Q61R_A1_c122	DIQMTQSPSSLSASVGVDRVTITCRASQDVNTAVAWYQQKPGKAP KLLIYSASFLYSGVPSRFSRSGTDFLTITSSLQPEDFATYYCQQ YWYLPFTFGQGTKEIKRTGGSGGGGGGASEVQLVESGGG LVQPGGSLRLSCAASGFNISWYDIHWVRQAPGKGLEWVADIEPS VGYTYADSVKGRFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS RSYPYYFDYWGQGLVTVSS	401

[0134] 在图1中示出了特异性地识别与HLA-B7 (SPNGTIQNIL;SEQ ID NO:1)复合的包含R140Q突变的IDH2肽的scFv的代表性ELISA数据。所述scFv不识别与相同的HLA等位基因复合的感兴趣的肽的wt形式。当测试与单体包被的ELISA板的结合时,所述scFv不识别与HLA等位基因复合的其他对照肽。

[0135] 使用的另外的流式细胞术显示出,当这些细胞用突变体肽而不是wt肽或其他对照肽脉冲时,MANAbody scFv克隆特异性地沾染HLA等位基因-匹配的细胞系(图2-图14)。

[0136] 为了证明MANAbody克隆可以被用作治疗模式,选择的MANAbody克隆被工程化到CAR-T细胞中。设计了这样的嵌合抗原受体(CAR) T细胞(CART),该嵌合抗原受体(CAR) T细胞(CART)能够经由其内源性加工和呈递机制识别和杀死表达在HLA分子的情况下含致癌突变的肽的细胞。具体地,设计了靶向在HLA-A3的情况下呈递的突变体KRAS G12V肽的CART,并且设计了靶向在HLA-B7的情况下呈递的突变体IDH2 R140Q肽的CART。将靶向任一突变体肽的MANAbody scFv移植到第三代CAR构建体中,并且CAR受体通过mRNA电穿孔在CD3⁺ T细胞中表达。随后,将CAR-T细胞与COS-7细胞共培养,该COS-7细胞被用编码KRAS/IDH2突变体和wt蛋白与它们各自的HLA组合的质粒。由于T细胞(包括CAR-T细胞)在被靶细胞上的同源抗原(cognate antigen)活化之后产生细胞因子,因此通过ELISA测量共培养培养基上清液中IFN γ 的释放。仅当COS-7细胞被用突变体和同源HLA质粒共转染时,IFN γ 相对于背景存在显著释放(图15)。与用wt和同源HLA共转染的COS-7细胞共培养的CAR-T细胞仅释放背景水平的IFN γ 。总之,这些发现表明,表达MANAbody克隆的CAR-T细胞可以靶向表达在HLA分子的情况下呈递的MANA的肿瘤细胞。

[0137] 为了证明MANAbody克隆可以被用作治疗模式,选择的MANAbody克隆被工程化为双特异性抗体。设计了具有与靶癌细胞结合的一个抗体片段和具有与T细胞表面上的CD3蛋白结合的一个抗体片段的双特异性抗体。存在许多不同的靶向人类CD3 ϵ 分子、人类CD3 δ 分子和/或人类CD3 γ 分子的抗CD3 scFv克隆。在表4中列出了这样的克隆的实例。

[0138] 设计了具有与在HLA-A3的情况下呈递的突变体KRAS G12V肽结合的一个抗体片段和具有与T细胞表面上的CD3蛋白结合的一个抗体片段的双特异性抗体。具体地,设计了靶向在HLA-A3和CD3的情况下呈递的突变体KRAS G12V肽的双特异性抗体,并且设计了靶向在HLA-B7和CD3的情况下呈递的突变体IDH2 R140Q肽的双特异性抗体。

[0139]

表4. 抗人类CD3 scFv序列

克隆名称	克隆scFv序列	SEQ ID NO:
人源化UCHT1 (hUCHT1v9)	DIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIRNLYNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRFSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNLPTWTFGQGTKVEIKGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSTFTYTMNWVRQAPGKGLEWVVALINPYKGVSTYINQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNLSRAEDTAVYYCARSGYYGDSWYFEDVWGQGTLLVTVSS	404
鼠UCHT1 (mUCHT1)	DIQMTQTSSLSASLGDRVTISCRASQDIRNLYNWYQQKPDGTVKLLIYYTSRLLHSGVPSKFSGSGTDYSLTISNLEQEDIATYFCQQGNLPTWTFAGGKLEIKGGGGGGGGGGSEVQLQQSGPELVKPGASMKISCKASGYSTFTYTMNWVKQSHGKNLEWMGLINPYKGVSTYINQKFKDKATLTVDKSSSTAYMELLSLTSED SAVYYCARSGYYGDSWYFEDVWGAGTTVTVSS	405
diL2K	DIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSYMNWYQQKPKGKAPKRWIYDTSKVASGVPARFSGSGTDYSLTINSLEAEADAATYYCQQWSSNPLTFGGGTKVEIKGGGGGGGGGGSDVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTRYTMHWVRQAPGQGLEWIGYINPSRGYTNVADSVKGRFTITTDKSTSTAYMELSSLRSEDTATYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLLVTVSS	406
hXR32	QAVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCRSSTGAVTTSNYANWVQQKPGQAPRGLIGGINKRAPWTPARFSGSLLG GKAAALTTTGAQAEDAADYYCALWYSNLWVFGGGLTKLVGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTYAMNWVRQAPGKGLEWVARIKSYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNSLYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYVSWFAYWGQGTLLVTVSS	407
L2K-07	DIQLTQSPAIMSASPGEKVTMTCRASSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKVASGVPIRFSGSGTYSYSLTISMEAEADAATYYCQQWSSNPLTFGAGTKLELKGKGGGGGGGGGGSDIKLQQSGAELARPGASVKMSCKTSGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNVADSVKDRFTISRDDSKNSLYL SAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLLVTVSS	408
OKT3	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSVSYMNWYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPAHFRSGSGTYSYSLTISGMEAEADAATYYCQQWSSNPLTFGSGTKLEINGGGGGGGGGGGSDVQLQQSGAELARPGASVKMSCKASGYTFTRYTMHWVKQRPQGLEWIGYINPSRGYTNVADSVKDRFTISRDDSKNSLYL SAVYYCARYYDDHYCLDYWGQGTLLVTVSS	409
PSMA-CD3	QTVVTQEPSTLTVSPGGTVTLTCGSSTGAVTSGNYPNWVQQKPGQAPRGLIGGINKRAPWTPARFSGSLLG GKAAALTLGSGVQPEDEAEYYCVLWYSNRWVFGGGLTKLVGGGGGGGGGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNKYAMNWVRQAPGKGLEWVARIKSYNNYATYYADSVKDRFTISRDDSKNTAYLQMNSLKTEDTAVYYCVRHGNFGNSYISYWAYWGQGTLLVTVSS	410

[0140]

28F11	EIVLTQSPA.TLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGKVEIKGGGGGGGGGGVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CAASGKFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWYDGSKKYYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCARQMGYWHFDLWGRGTLVTVSS	411
27H5-VL1	EIVLTQSPRTL.SLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPDRFSGSGGTDFTL TISRLDPEDFAVYYCQYGSPIITFGQTRLEIKGGGGGGGGGGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSC AASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWYDGSKKNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDT AVYYCARGTGYNWFDPWGQGLVTVSS	412
27H5-VL2	DILMTQSPSSLSASVGDRTVITTCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYASSLQSGVPSRFSGSGGTDYTL TISSLQPEDFATYYCQYYSTLTFGGGKVEIKGGGGGGGGGGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCA ASGFTFRSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWYDGSKKNYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCARGTGYNWFDPWGQGLVTVSS	413
23F10	EIVLTQSPA.TLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGKVEIKGGGGGGGGGGVQLVESGGGVVQSGRSLRLS CAASGKFSGYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWYDGSKKYYVDSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRGE DTAVYYCARQMGYWHFDLWGRGTLVTVSS	414
15C3-VL1	EIVLTQSPA.TLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRAATGIPARFSGSGGTDFTL TISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGKVEIKGGGGGGGGGGVQLVESGGGVVQPGRSLRLS CVASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWYNGRQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAE DTAVYYCTRGTGYNWFDPWGQGLVTVSS	415
15C3-VL2	AIQLTQSPSSLASVGDRTVITTCRASQGISSALAWYQQKPGKAPKLLIYDASSLESVPSRFSGSGGTDFTLT ISSLQPEDFATYYCQYFNSTPITFGQTRLEIKGGGGGGGGGGVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCV ASGFTFSSYGMHWVRQAPGKGLEWVAWIWYNGRQDYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLRAEDTA VYYCTRGTGYNWFDPWGQGLVTVSS	416
hu12F6	QIVLSQSPAILSAPGEEKVTMTCRASSVSYMHWYQQKPGSSPKPWYATSNLASGVPARFSGSGGTSYSL TISRVEAEDAATYYCQYQWSSNPITFGGKLETKRGGGGGGGGGGVQLQSQGAELARPGASVK MSCKASGYTFTSYTMHWVKQRPGQGLEWIGYINPSSGYTKYNQKFKDKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSE DSAVYYCARWQDYDYFDYWGQGLTVTVSS	417

[0141] 在图16A中示出了三个IDH2 R140Q HLA-B7 MANAbody scFv克隆与两个不同的抗CD3 scFv克隆组合的代表性scDb共培养结果。在指定浓度的scDb的存在下,将T细胞与用编

码HLA-B7、全长IDH2变体和/或GFP的质粒共转染的COS-7细胞共培养。作为通过靶细胞上的同源抗原的T细胞活化的读出,通过ELISA测量共培养培养基上清液中IFN γ 的释放。仅当COS-7细胞被用HLA-B7和突变体IDH2 R140Q质粒共转染时,IFN γ 相对于背景存在显著的T细胞释放,IFN γ 的水平依赖于被包含在孔中的scDb的浓度。与被用HLA-B7和wt IDH2共转染的COS-7细胞共培养的T细胞仅释放背景水平的IFN γ 。在图16B中示出了KRAS G12V HLA-A3MANAbody scFv克隆与抗CD3克隆组合成单链双抗体的代表性scDb共培养结果。在该共培养中,单链双抗体以0ng/mL、50ng/mL和100ng/mL的浓度进行测试。仅当COS-7细胞被用HLA-A3和突变体KRAS G12V质粒共转染时,IFN γ 相对于背景存在显著的T细胞释放。与被用HLA-A3和wt KRAS共转染的COS-7细胞共培养的T细胞仅释放背景水平的IFN γ ,类似于在无T细胞、无靶细胞和无scDb孔中观察到的IFN γ 的水平。内源性KRAS G12V HLA-A3阳性细胞系NCI-H441作为靶细胞系且其等基因HLA-A3敲除作为对照。仅针对亲本NCI-H441细胞系而非HLA-A3敲除的NCI-H441观察到IFN γ 释放。总之,这些发现表明,包含MANAbody克隆的双特异性抗体靶向表达在HLA分子的情况下呈递的MANA的肿瘤细胞。

[0142] 为了评价使用MANAbody克隆作为治疗模式的功效,使用Promega的CellTiter-Glo试剂测定KRAS G12V HLA-A3单链双抗体的靶细胞存活力(图17)。CellTiter-Glo测量孔中ATP浓度,ATP浓度与存活细胞的数目成比例。靶细胞存活力百分比通过减去来自仅T细胞的孔的CellTiter-Glo值并且针对来自仅靶细胞的孔的CellTiter-Glo值归一化来测量。仅当NCI-H441亲本细胞与T细胞在KRAS G12V-A3 scDb或pan-HLA-A3 scDb阳性对照的存在下孵育时,存在显著的靶细胞死亡。在没有scDb的情况下或在NCI-H441 HLA-A3敲除的孔中没有观察到靶细胞死亡

[0143] 总之,这些发现证明,MANAbody可以用于将T细胞重定向并活化,以杀死表达特定突变蛋白和HLA等位基因对(例如,IDH2 R140Q与HLA-B7和KRAS G12V与HLA-A3)的肿瘤细胞。

[0144] 材料和方法

[0145] 细胞和细胞系.

[0146] RPMI-6666细胞(ATCC,Manassas,VA)在具有20%FBS(GE Hyclone,Logan,Utah,USA)和1%青霉素链霉素(Life Technologies)的RPMI-1640(ATCC)中培养。T2细胞(ATCC)和MINO细胞(ATCC)在具有10%FBS(GE Hyclone)和1%青霉素链霉素(Thermo Fisher)的RPMI-1640(ATCC)中培养。T2A3细胞(来自Eric Lutz博士的惠赠)在具有10%FBS(GE Hyclone)、1%青霉素链霉素(Thermo Fisher)、0.1mM MEM非必需氨基酸(NEAA,Thermo Fisher)和500 μ g/mL遗传霉素(Thermo Fisher)的RPMI-1640(ATCC)中培养。SigM5细胞(DSMZ,Brunswick,Germany)在具有20%FBS(GE Hyclone)和1%青霉素链霉素(Thermo Fisher)的Iscove MDM(ATCC)中培养。Hs611.T细胞(ATCC)在具有10%FBS(GE Hyclone)和1%青霉素链霉素(Thermo Fisher)的Dulbecco改良的Eagle培养基(ATCC)中培养。NCI-H441细胞(ATCC)和COS-7细胞(ATCC)在具有10%FBS(GE Hyclone)和1%青霉素链霉素(Thermo Fisher)的McCoy 5A(改良的)培养基(Thermo Fisher)中培养。COS-7细胞(ATCC,CRL-1651TM) 在具有10%FBS(GE Hyclone)和1%青霉素-链霉素(Thermo Fisher)的DMEM(高葡萄糖、丙酮酸;Thermo Fisher)中培养。293FT细胞(Thermo Fisher)在具有10%FBS(GE Hyclone)、0.1mM MEM非必需氨基酸(NEAA,Thermo Fisher)、6mM L-谷氨酰胺(Thermo

Fisher)、1mM MEM丙酮酸钠(Thermo Fisher)、500 μ g/ml遗传霉素(Thermo Fisher)和1%青霉素-链霉素(Thermo Fisher)的高葡萄糖D-MEM(Thermo Fisher)中培养。将所有细胞系在5%CO₂下在37°C维持。

[0147] 通过来自健康志愿者供体的全血的Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare) 梯度离心获得PBMC。用CD3微珠(Miltenyi Biotec)从PBMC阳性选择CD3⁺细胞,并且用DynaBeads®人类T-活化剂CD3/CD28(Life Technologies)活化和扩增。除非另有说明,否则原代CD3⁺T细胞在具有10%FBS(GE Hyclone)、1%青霉素-链霉素(Life Technologies)和100IU/mL重组人类白细胞介素-2(Proleukin®)的RPMI-1640(ATCC)中在5%CO₂下在37°C培养。

[0148] 噬菌体展示文库构建。

[0149] 对于第一代噬菌体文库,使用混合分裂池(mixed and split pool)简并寡核苷酸合成在DNA 2.0(Menlo Park,CA)合成寡核苷酸。对于第二代噬菌体文库,使用三核苷酸诱变(TRIM)技术在GeneArt(Thermo Fisher,Halethorpe,MD)合成寡核苷酸。对于这两个文库,寡核苷酸被掺入到pADL-10b噬菌粒(Antibody Design Labs,San Diego,CA)。该噬菌粒包含F1起点、限制未诱导的表达的转录阻遏物、lac操纵子和lac阻遏物。合成具有pe1B周质分泌信号的scFv,并且将其亚克隆在lac操作子的下游。对于第一代文库,myc表位标签随后是TEV蛋白酶裂解识别序列紧邻可变重链的下游放置,而在第二代文库中,scFv随后是FLAG标签。在scFv、标签和裂解位点之后,是全长、符合读框的(in-frame)M13 pIII外壳蛋白序列。

[0150] 为了将噬菌粒DNA转化到细菌中,将10-20ng连接产物与10 μ L电感受态SS320细胞(Lucigen,Middleton,WI)和14 μ L双蒸水在冰上混合。将该混合物使用基因脉冲电穿孔系统(Bio-Rad,Hercules,CA)电穿孔,并且允许在恢复培养基(Lucigen)中在37°C恢复60min。将用60ng连接产物转化的细胞汇集,并且铺板在包含补充有羧苄青霉素(100 μ g/mL)和2%葡萄糖的2xYT培养基的24-cm \times 24-cm板上。将细胞在37°C生长6小时,并且在4°C放置过夜。为了确定每一系列电穿孔的转化效率,取出等分试样并且通过系列稀释来滴定。将生长在板上的细胞刮到850mL具有羧苄青霉素(100 μ g/mL)加2%葡萄糖的2xYT培养基中,最终OD₆₀₀为5-15。取出850mL培养物中的2mL并且以 \sim 1:200稀释,以达到最终OD₆₀₀为0.05-0.07。在快速冷冻之前,向剩余的培养物中添加150mL的无菌甘油,以产生甘油储备液。使稀释的细菌生长到OD₆₀₀为0.2-0.4,用M13K07辅助噬菌体(Antibody Design Labs,San Diego,CA)感染,并且允许在37°C振荡1小时。将培养物离心,并且将细胞重悬于具有羧苄青霉素(100 μ g/mL)和卡那霉素(50 μ g/mL)的2xYT培养基中,并在30°C生长过夜用于噬菌体产生。第二天早上,将细菌培养物等分到50mL Falcon管中,并且以高速沉淀两次以获得澄清的上清液。将装载噬菌体的上清液按照PEG/NaCl比上清液为4:1的比率用20%PEG-8000/2.5M NaCl溶液在冰上沉淀40min。在沉淀之后,将噬菌体以12,000g离心40分钟,并且重悬于1mL体积1X TBS,2mM EDTA中。将来自多个管的噬菌体汇集,再沉淀,并且重悬至 1×10^{13} cfu/mL的平均滴度。对于第一代文库,所获得的转化体的总数目为 5.5×10^9 。对于第二代文库,所获得的转化体的总数目为 3.6×10^{10} 。将每个文库等分并且在-80°C储存在15%甘油中。

[0151] 完整噬菌体文库的下一代测序。

[0152] 使用位于CDR-H3区侧翼的引物扩增来自文库的DNA。在这些引物的5'-末端处的序列掺入了分子条形码,以便于不同的噬菌体序列的明确计数。Kinde等人描述了用于PCR-扩增和测序的方案。使用自定义SQL数据库处理和翻译序列,并且使用Microsoft Excel分析核苷酸序列和氨基酸翻译两者。

[0153] 肽和HLA-单体。

[0154] 使用NetMHC版本4.0预测突变体肽、wt肽和对照肽(列于表1中)与HLA等位基因结合。通过Peptide 2.0(Chantilly,VA)以>90%的纯度合成所有肽。将肽以10mg/mL重悬于DMSO或DMF中,并且在-20℃储存。通过将重组HLA与肽和β-2微球蛋白重折叠合成HLA单体,通过凝胶过滤纯化,并且生物素化(Fred Hutchinson Immune Monitoring Lab,Seattle,WA)。通过使用W6/32抗体(BioLegend,San Diego,CA)进行ELISA,确认单体在选择之前被折叠。

[0155] 与突变体肽-HLA单体结合的噬菌体的选择。

[0156] 将包含蛋白HLA和β-2-微球蛋白的生物素化的单体与MyOne T1链霉亲和素磁珠(Life Technologies,Carlsbad,CA)缀合。生物素化的单体与30μLMyOne T1珠(每1μg的单体)在封闭缓冲液(PBS、0.5%BSA、0.1%叠氮化钠)中在室温孵育1小时。在初始孵育之后,将复合物用1ml封闭缓冲液洗涤3次,并且重悬于1ml封闭缓冲液中。

[0157] 富集阶段。

[0158] 在选择富集阶段(第1轮)中,将代表文库的1000倍覆盖度的噬菌体与裸的、洗涤过的MyOne T1珠和热变性的、珠缀合的HLA单体在旋转器上在40℃孵育过夜。该步骤对于去除识别链霉亲和素或变性的单体的任何噬菌体是必需的,该识别链霉亲和素或变性的单体的噬菌体在生物素化的单体的每次制备在很小程度上存在。在阴性选择之后,将珠用DynaMag-2磁体(Life Technologies)分离,并且将包含未结合的噬菌体的上清液转移,用于针对1μg与MyOne T1链霉亲和素磁珠缀合的突变体肽-HLA单体的阳性选择。在洗脱之前,将珠使用磁体用包含0.5%Triton-20的1ml,1X TBS洗涤10次。通过将珠重悬于1mL 0.2M甘氨酸(pH 2.2)中洗脱噬菌体。在孵育10分钟之后,通过添加150μL 1M Tris,pH 9.0中和溶液。使用中和的噬菌体感染10ml中对数噬菌体SS320s培养物,并添加M13K07辅助噬菌体(MOI为4)和2%葡萄糖。在37℃振荡1小时之后,将细菌重悬于具有羧苄青霉素(100μg/mL)、卡那霉素(50μg/mL)和50uM IPTG的2xYT培养基中,并且在30℃生长过夜用于噬菌体产生。第二天早上如先前所描述的用PEG/NaCl沉淀噬菌体。

[0159] 最终选择阶段。

[0160] 对由富集阶段得到的噬菌体进行三轮至五轮的最终选择。对于每一轮的最终选择,使用10-0.1%的沉淀的噬菌体针对缺乏感兴趣的突变的蛋白的HLA等位基因匹配细胞进行第一阴性选择。然后,针对天然wt肽-HLA单体和不相关的HLA-等位基因匹配单体阴性选择未结合的噬菌体。在阴性选择之后,如对于上文的富集阶段所描述的,将珠用Dynamag 2磁体(Life Technologies)分离,并且将包含未结合的噬菌体的上清液转移用于用250ng至1μg突变肽-HLA单体的阳性选择。

[0161] ELISA。

[0162] 将链霉亲和素包被的96孔板(R&D Systems,Minneapolis,MN)在40℃用在封闭缓

冲液(具有0.5%BSA、2mM EDTA和0.1%叠氮化钠的PBS)中的50ng(以50uL)的生物素化突变体或wt肽-HLA单体包被过夜。将板用1X TBST(TBS+0.05%Trition-X 100)短暂洗涤。将噬菌体在封闭缓冲液中连续稀释至指定的浓度,并且向每个孔中添加50uL。将噬菌体在室温(RT)孵育2小时,随后是使用ELISA板洗涤器(BioTek,Winooski,VT)洗涤(用1X TBS-0.05% Trition-20(TBST)洗涤6次)。将结合的噬菌体与在1X TBST中以1:3000稀释的50uL兔抗-M13抗体(Pierce,Rockford,IL)在室温孵育1小时,随后是再洗涤6X次,并且与在1X TBST中以1:10,000稀释的50uL抗兔HRP(Thermo Fisher)在室温孵育1小时。在用1X TBST洗涤最后6次之后,将50uL TMB底物(BioLegend,San Diego,CA)添加至孔中,并且将反应用1N硫酸猝灭。用协同H1多模式读取器(BioTek,Winooski,VT)测量450nm处的吸光度。

[0163] 通过选择用从最终选择中获得的噬菌体的有限稀释物转化的SS320细胞的单独菌落进行单克隆噬菌体ELISA。将单独菌落接种到包含100μg/mL羧苄青霉素和2%葡萄糖的200μl 2xYT培养基中,并且在37°C生长3小时。然后,将细胞用 1.6×10^7 M13K07辅助噬菌体(Antibody Design Labs,San Diego,CA)感染,并且在37°C伴随振荡孵育。将细胞沉淀,重悬于包含羧苄青霉素(100μg/mL)、卡那霉素(50μg/mL)和50uM IPTG的300μL 2xYT培养基中,并且在30°C生长过夜。将细胞沉淀,并且如上文所描述的,将装载噬菌体的上清液被用于ELISA。

[0164] 肽脉冲和流式细胞术。

[0165] 对于肽脉冲,将HLA-匹配细胞用PBS洗涤一次并且用无血清RPMI-1640洗涤一次,然后在包含50μg/mL肽和10μg/mL人类β-2微球蛋白(ProSpec,East Brunswick,NJ)的无血清RPMI-1640中以 10^6 个细胞/mL在37°C孵育过夜。将脉冲的细胞沉淀,在冷沾染缓冲液(包含0.5%BSA、2mM EDTA和0.1%叠氮化钠的PBS)中洗涤一次,并且重悬于100μL的沾染缓冲液中。噬菌体沾染用10uL(大约 1×10^9)噬菌体以100uL总体积在冰上进行1小时,随后是在冷沾染缓冲液中的一次4mL洗涤。然后,将细胞用1uL兔抗-M13抗体(Pierce,Rockford,IL)以100uL总体积在冰上沾染1小时,并且用4mL冷沾染缓冲液洗涤一次。将细胞用抗兔-PE(Biolegend)以100uL总体积在冰上沾染1小时,随后是根据制造商的说明与存活/死亡可固定的近红外死细胞染色剂(Thermo Fisher)在室温孵育10min。将细胞在4mL沾染缓冲液中洗涤一次,随后是重悬于300uL沾染缓冲液中,然后分析。使LSRII流式细胞仪(Becton Dickinson,Mansfield,MA)分析染色的细胞。

[0166] CAR构建和生成。

[0167] 合成第三代嵌合抗原受体(CAR)构建体(包含MANAbody scFv、CD28跨膜结构域、以及4-1BB和CD3ζ细胞内结构域)(GeneArt®),并且将其克隆到哺乳动物表达载体pCI(Promega)中。根据制造商的说明用T7mScript™标准mRNA生产系统试剂盒(CellScript™)合成mRNA。将CAR mRNA用BTX ECM 2001Electro Cell Manipulator(Harvard Apparatus)电穿孔到原代CD3+ T细胞中,以生成CAR-T细胞。

[0168] CAR-T活化共培养测定。

[0169] 根据制造商的说明以96孔板形式用编码HLA-A3、HLA-B7、IDH2(WT)、IDH2(R140Q)、KRAS(WT)和KRAS(G12V)的pcDNA3.1(Life Technologies)质粒与Lipofectamine 3000(Life Technologies)的各种组合转染COS-7细胞。将100,000个电穿孔的CAR-T细胞覆盖在转染的COS-7细胞上,并且允许共培养物在5%CO₂下在37°C孵育4小时。在共培养之后,收集

条件培养基并且通过ELISA (Quantikine® , R&D Systems) 对分泌的IFN γ 进行测定。

[0170] 双特异性抗体产生.

[0171] 编码双特异性抗体的gBLOCK从IDT (Skokie, Illinois) 订购。遵循制造商的方案, 将gBLOCK被topo克隆 (topo-cloned) 到pcDNA3.4质粒 (Thermo Fisher) 中。根据制造商的说明在T75烧瓶中使用Lipofectamine 3000 (Life Technologies) 用双特异性抗体pcDNA3.4质粒转染293FT细胞 (Thermo Fisher)。在孵育5-7天之后, 收获培养基, 并且以3,000g在4°C离心10min。根据制造商的说明使用Clontech Capture™ His-加标签的纯化小量提取试剂盒 (Takara, Mountain View, CA) 纯化双特异性抗体蛋白。根据制造商的说明使用Zeba spin 7k MWC0脱盐柱将双特异性抗体蛋白脱盐到PBS中。使用Mini-PROTEAN® TGX Stain-Free™ 预制凝胶 (Biorad, Hercules, California) 使用已知浓度的蛋白的标准曲线定量双特异性抗体浓度。使用ChemiDoc XRS+成像仪 (Biorad) 对Stain-free凝胶进行成像。

[0172] 双特异性抗体共培养测定.

[0173] 根据制造商的说明在T75烧瓶中用编码HLA-A3、HLA-B7、IDH2 (WT)、IDH2 (R140Q)、KRAS (WT) 和KRAS (G12V) 的pcDNA3.1 (Life Technologies) 质粒与Lipofectamine 3000 (Life Technologies) 的各种组合转染COS-7细胞。将50,000个T细胞与转染的30,000个COS-7细胞或10,000个NCI-H441细胞以及指定浓度的双特异性抗体在96孔板中混合, 并且允许共培养物在5%CO₂下在37°C孵育24小时。在共培养之后, 将96孔板快速冷冻, 并且收集条件培养基裂解物, 并通过ELISA (Quantikine® , R&D Systems) 对分泌的IFN γ 进行测定。可选择地, 在共培养之后, 靶细胞存活力使用CellTiter-Glo (Promega) 来测量。

[0174] 其他实施方案

[0175] 应当理解, 虽然本发明已经结合其详细的描述被描述, 前述的描述意图说明而非限制本发明的范围, 本发明的范围由所附权利要求书的范围限定。其他方面、优势和修改在以下权利要求书的范围内。

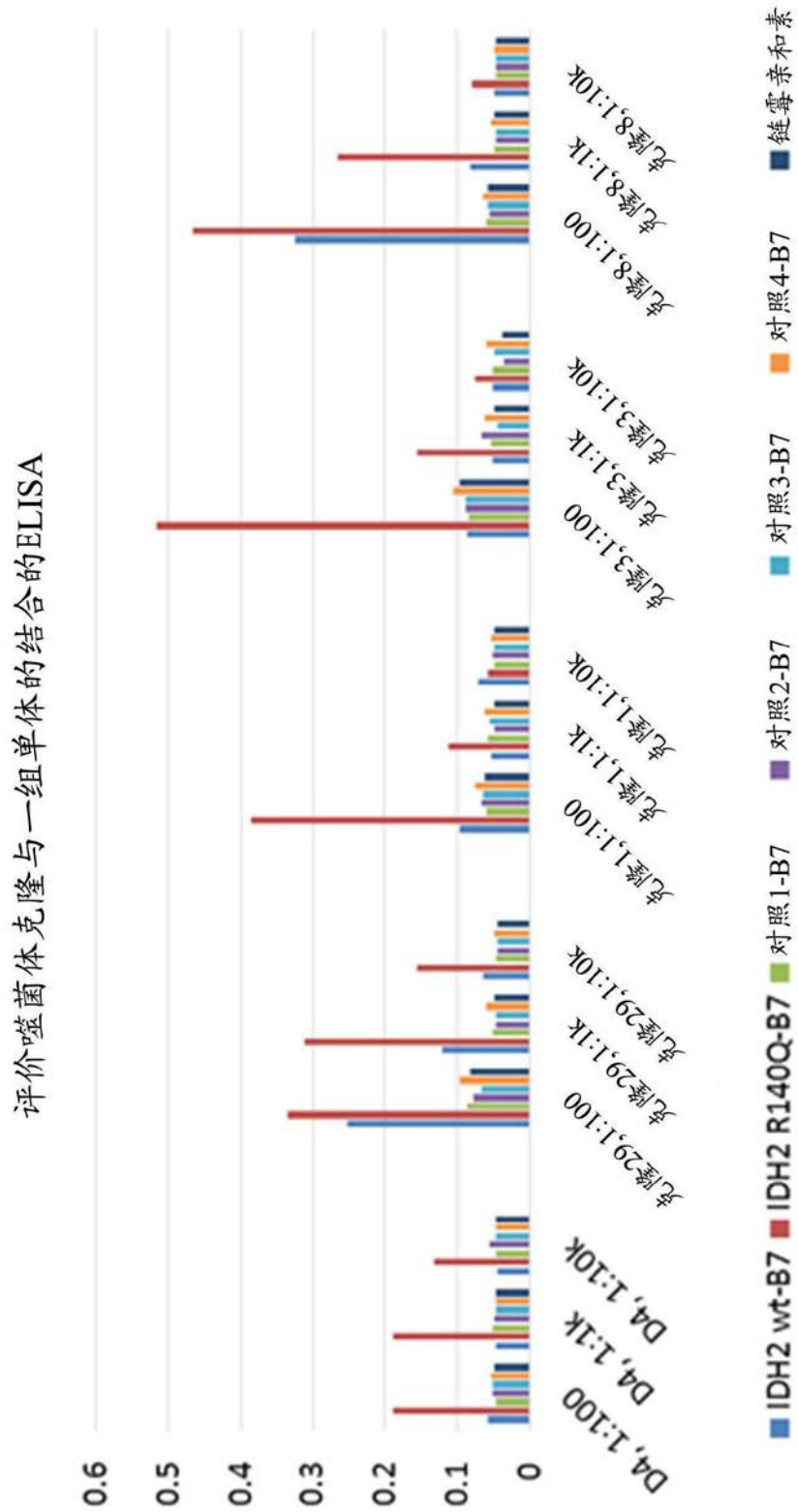


图1

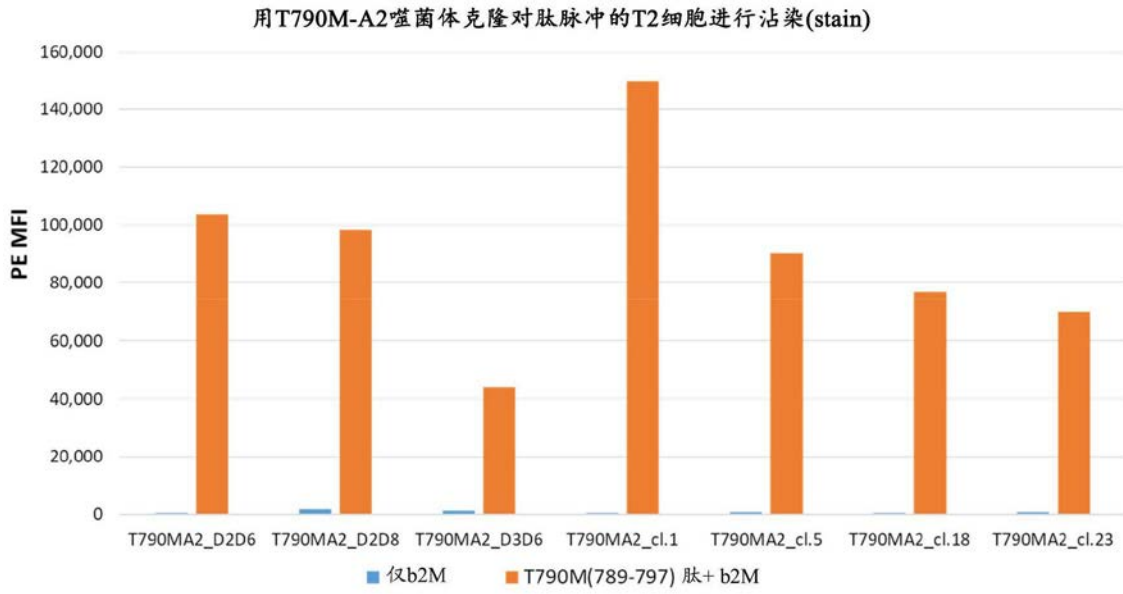


图2

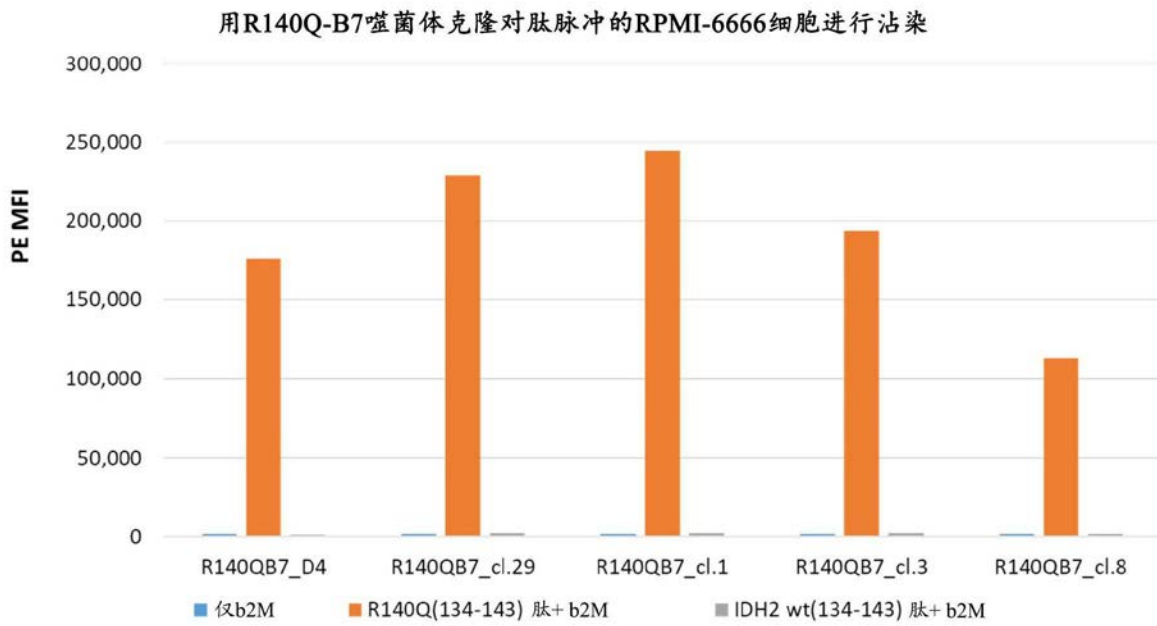


图3

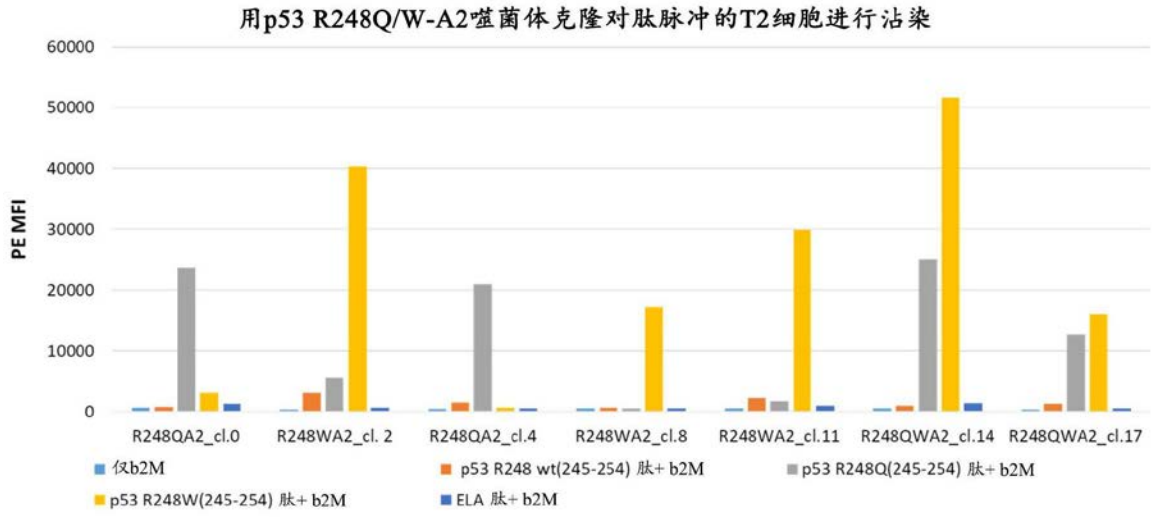


图4

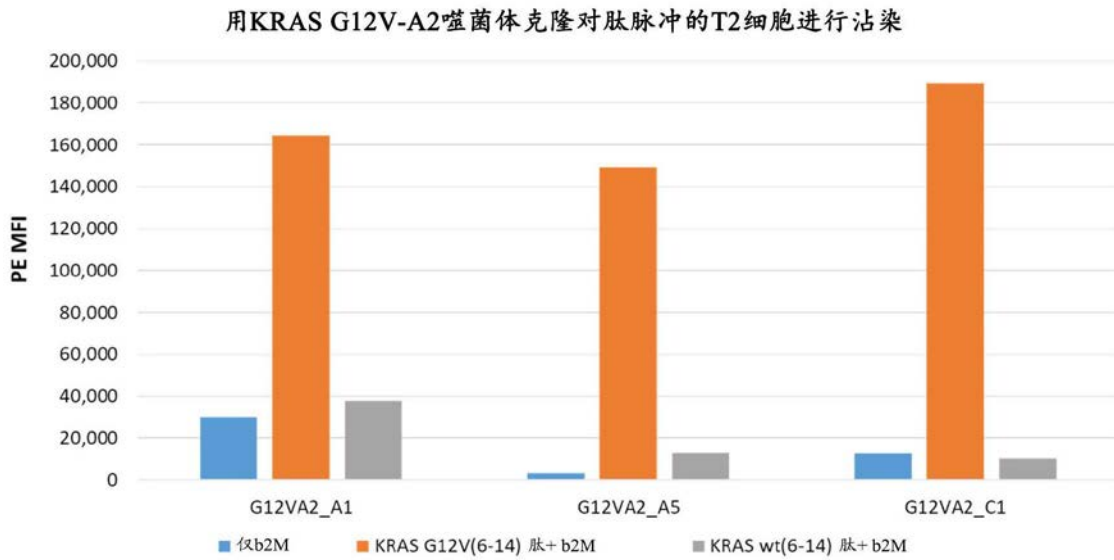


图5

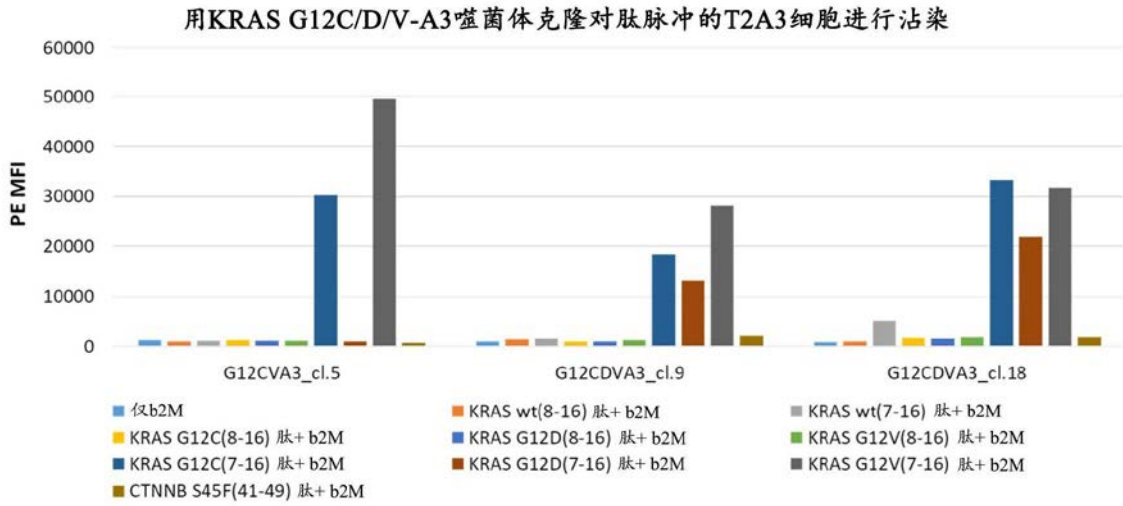


图6

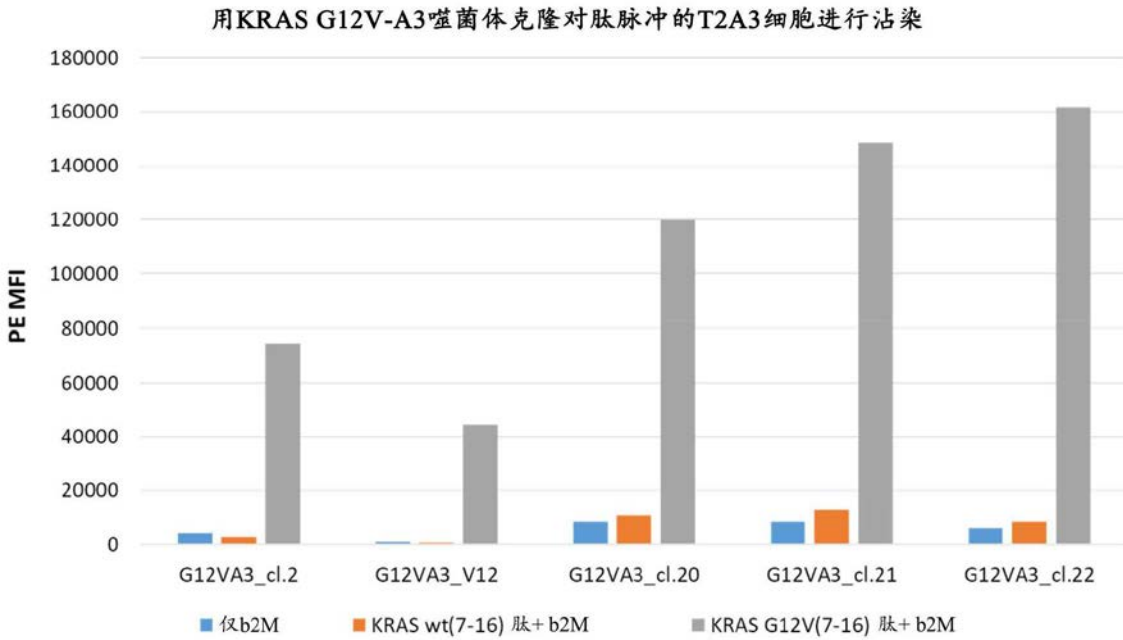


图7

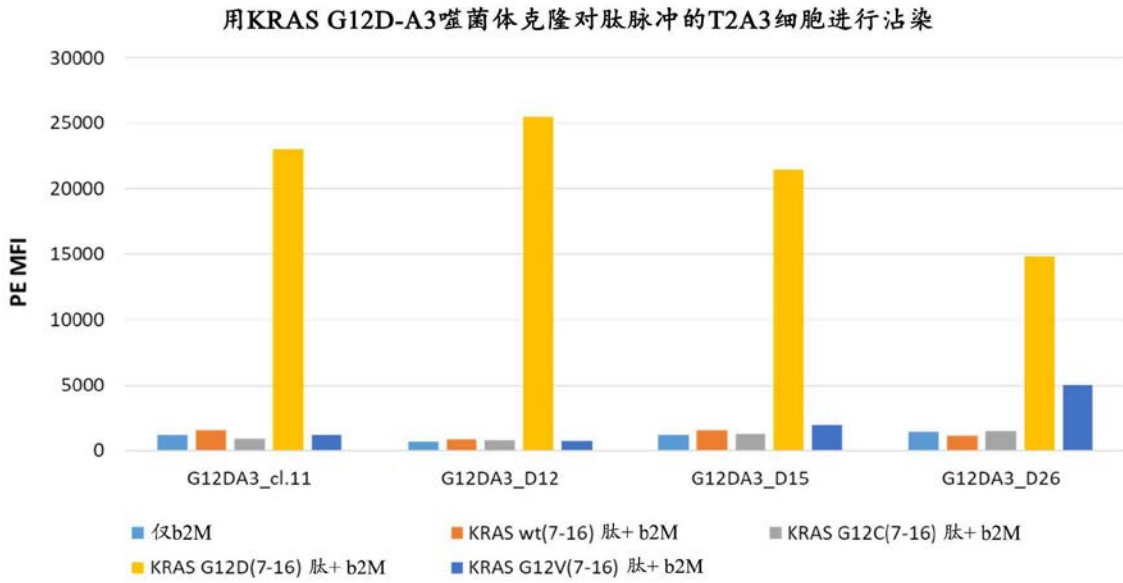


图8

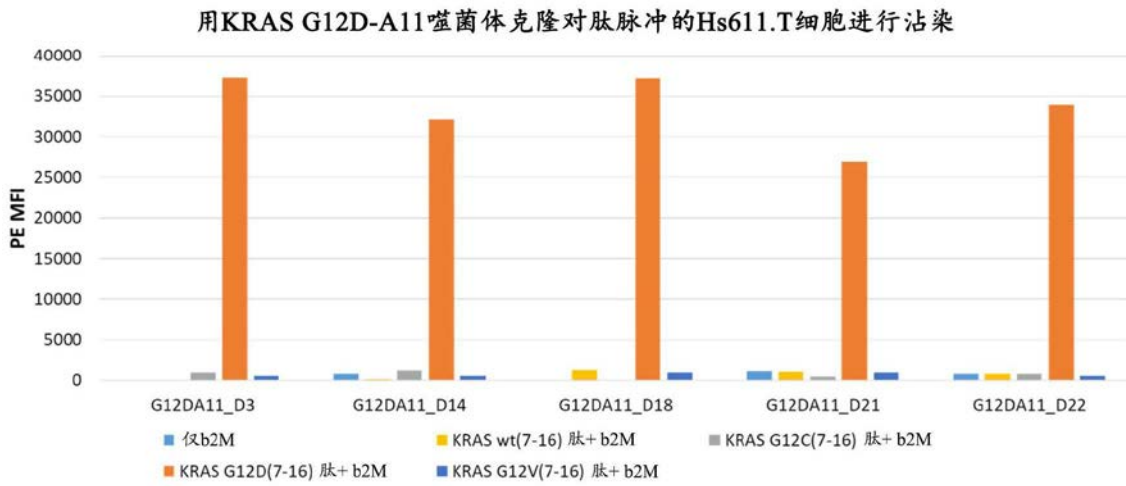


图9

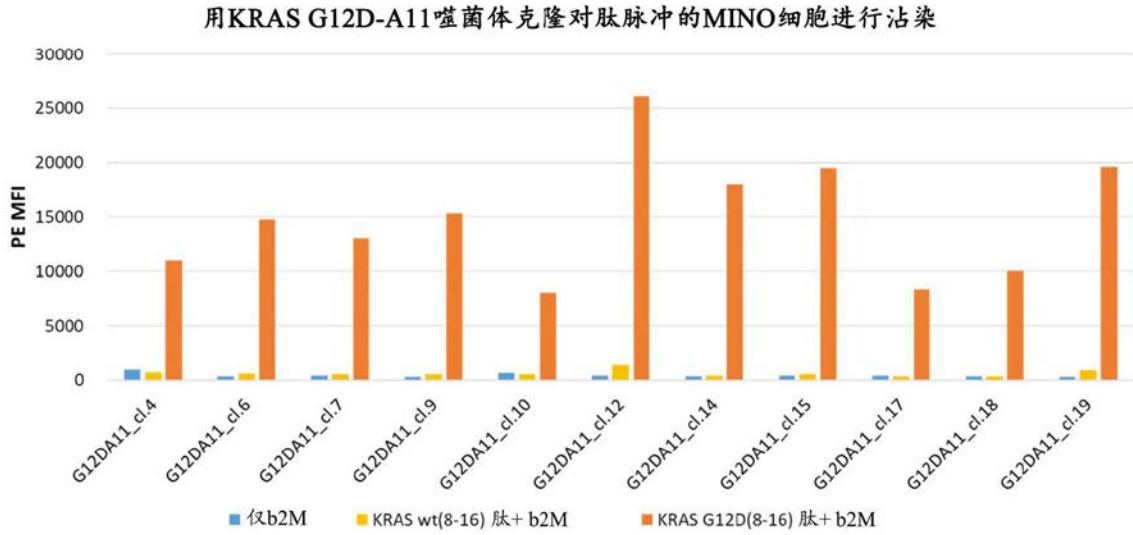


图10

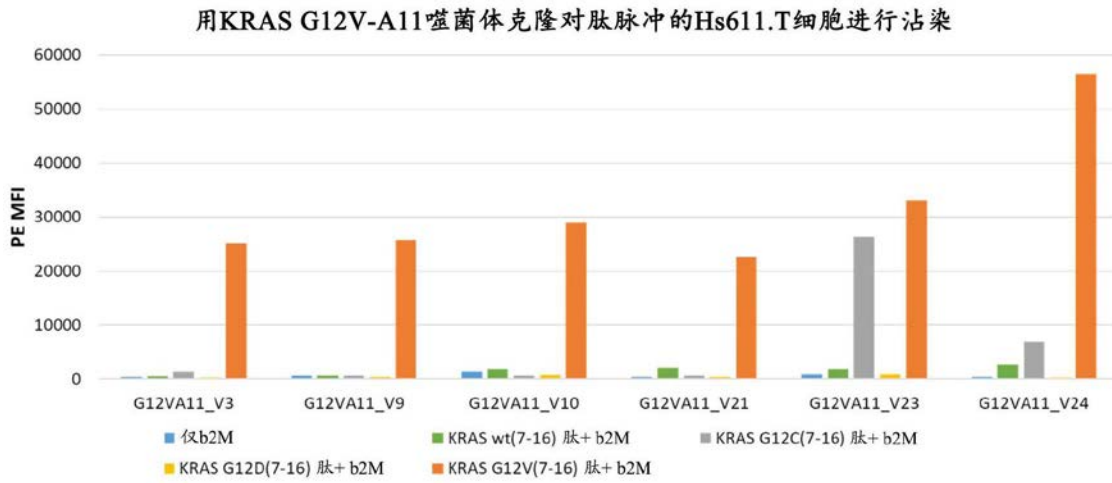


图11

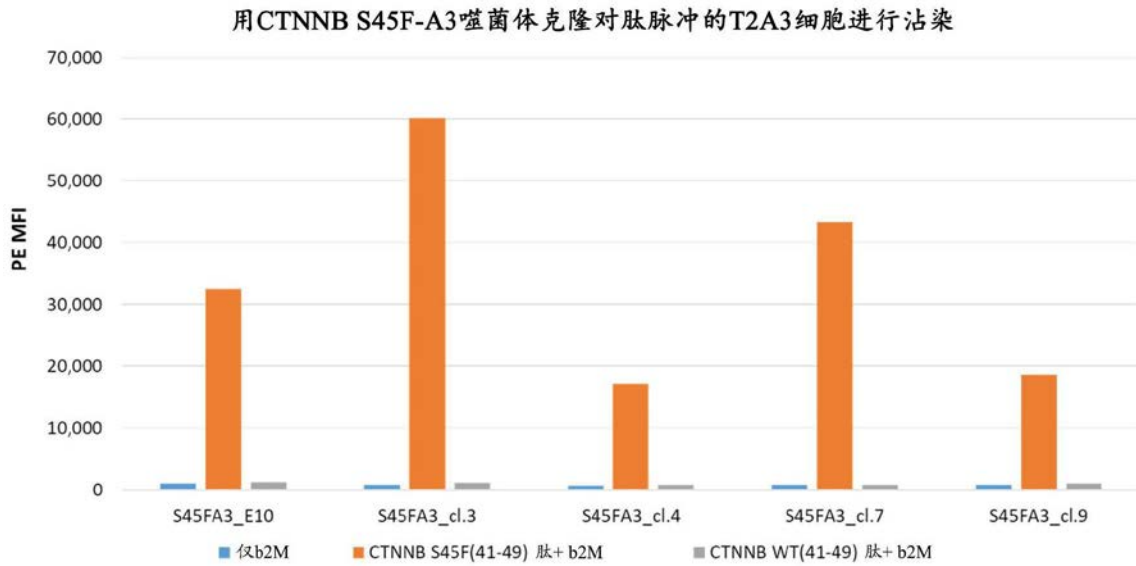


图12

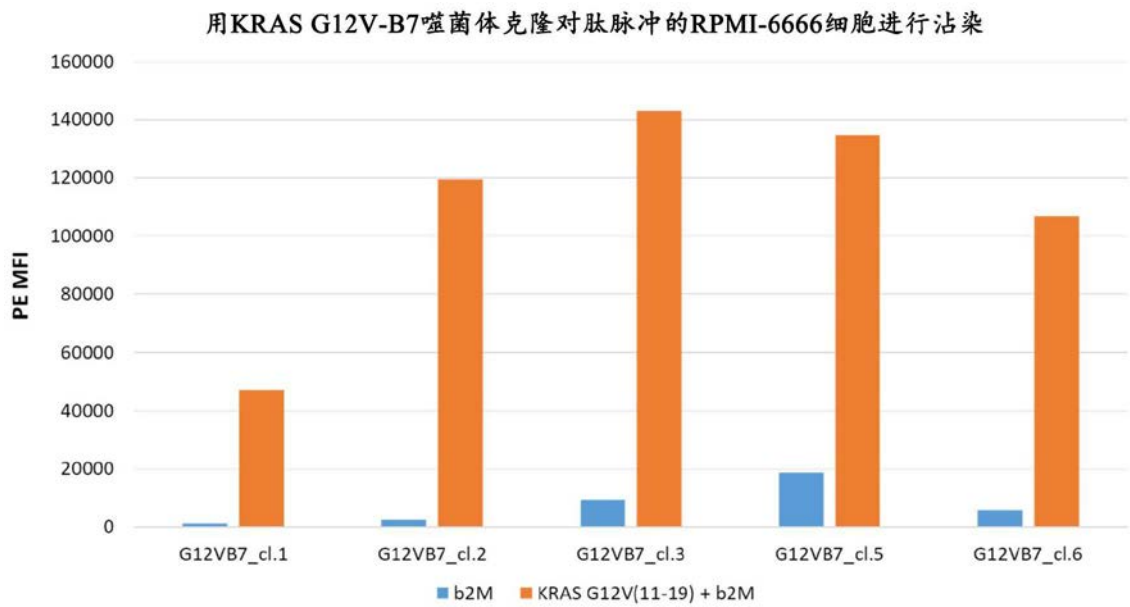


图13

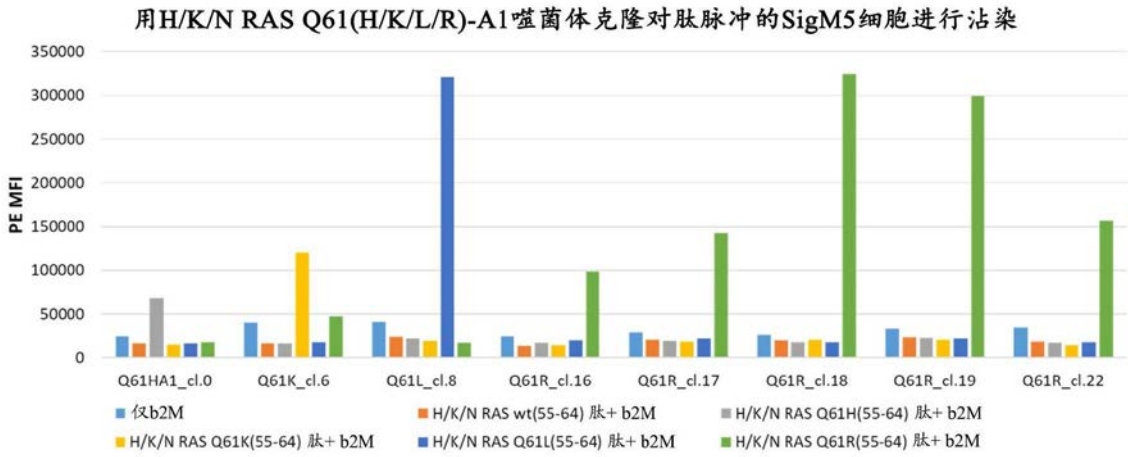


图14

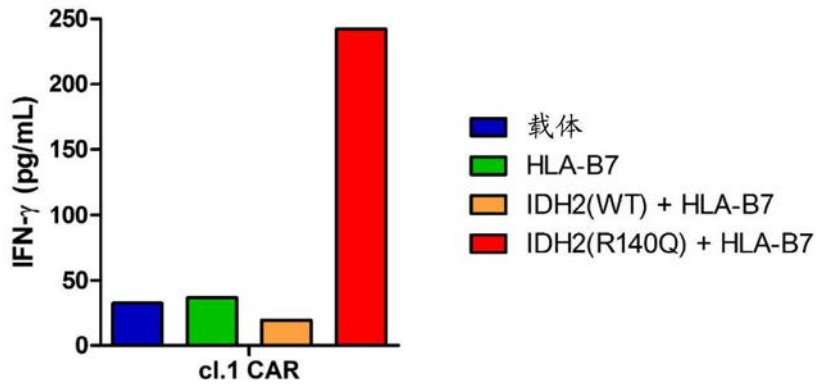


图15A

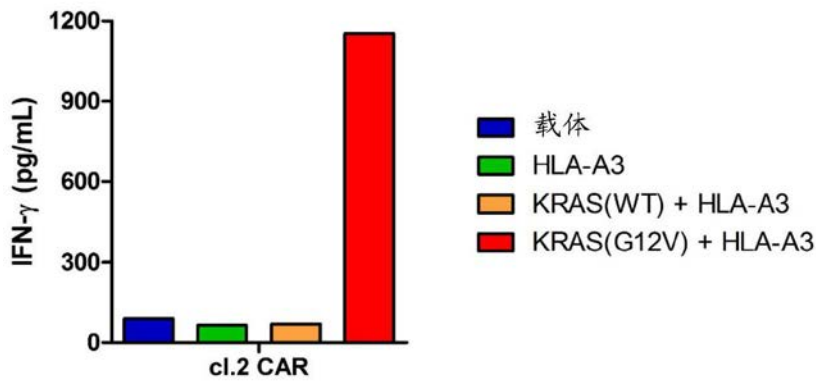


图15B

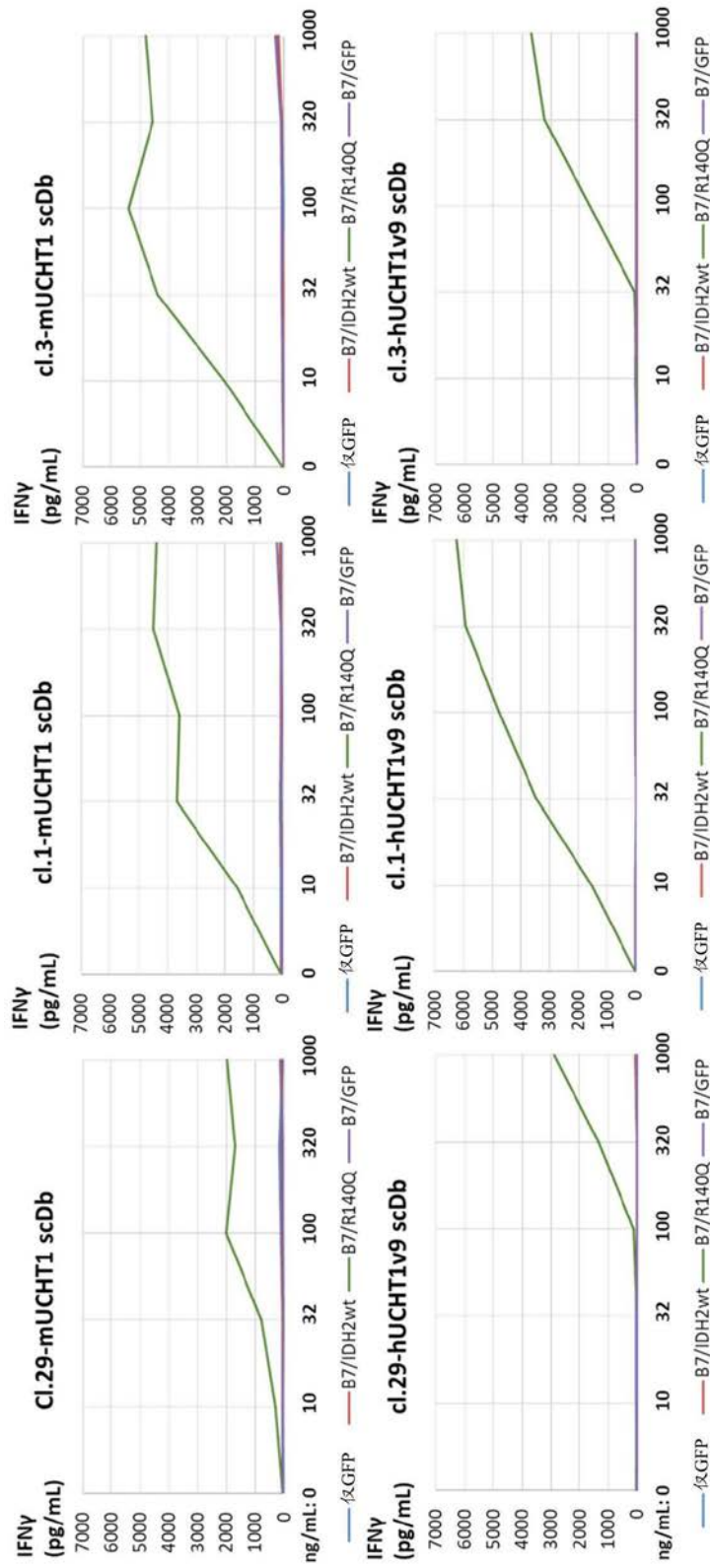


图16A

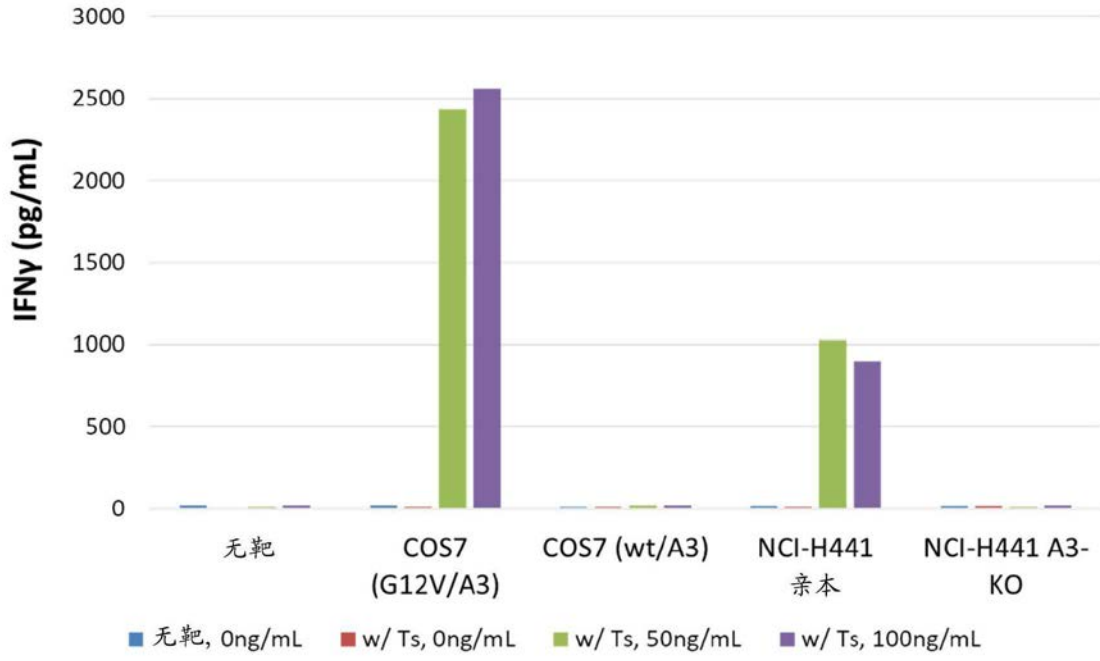


图16B

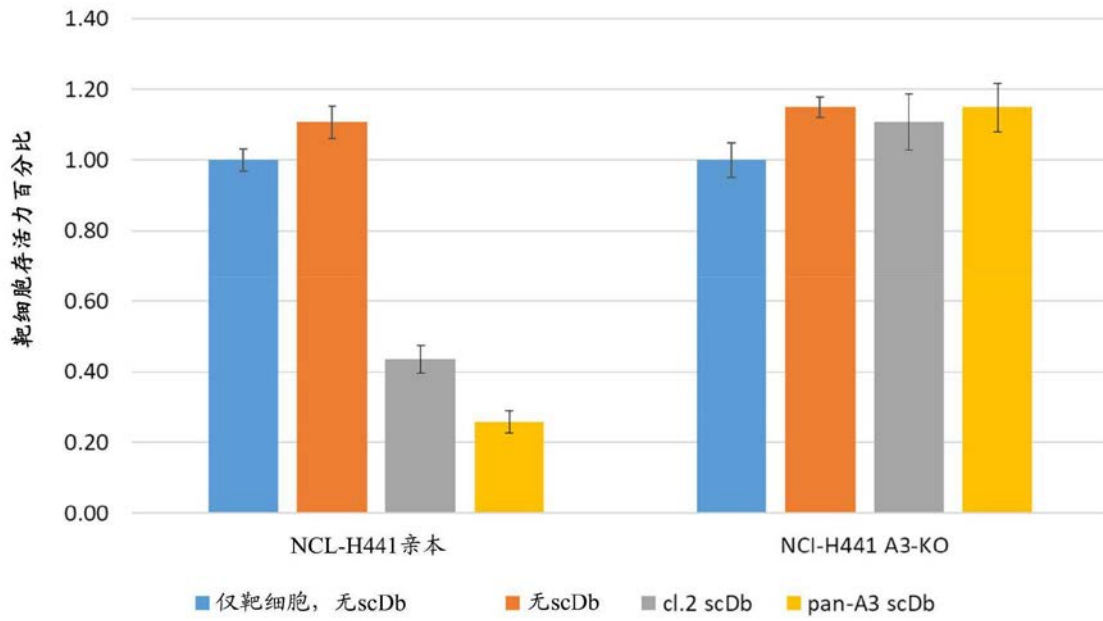


图17