



(10) 授权公告号 CN 112166324 B

(45) 授权公告日 2025.02.28

(21) 申请号 201980035785.7

(22) 申请日 2019.04.12

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 112166324 A

(43) 申请公布日 2021.01.01

(30) 优先权数据
18167050.6 2018.04.12 EP

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2020.11.27

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2019/059563 2019.04.12

(87) PCT国际申请的公布数据
W02019/197671 EN 2019.10.17

(73) 专利权人 苏黎世联邦理工学院
地址 瑞士苏黎世

(72) 发明人 简·基斯洛
弗朗茨·约瑟夫·奥伯迈尔
曼弗雷德·科普夫

(74) 专利代理机构 北京东方亿思知识产权代理
有限责任公司 11258

专利代理师 肖善强

(51) Int.Cl.
G01N 33/569 (2006.01)
G01N 33/68 (2006.01)

(56) 对比文件
US 2006099218 A1, 2006.05.11
W0 2016097334 A1, 2016.06.23
Fei Wen 等.Rapid identification of
CD4+ T-cell epitopes using yeast
displaying pathogen-derived peptide
library.J Immunol Methods . .2008,第336卷
(第1期),摘要.

Fei Wen 等.Rapid identification of
CD4+ T-cell epitopes using yeast
displaying pathogen-derived peptide
library.J Immunol Methods . .2008,第336卷
(第1期),摘要、第3.3节.

审查员 周钰芳

权利要求书2页 说明书17页 附图9页

(54) 发明名称

作为疫苗设计的表位选择工具的哺乳动物
MHC肽展示

(57) 摘要

本发明涉及一种用于鉴定由主要组织相容性复合物(MHC)呈递的候选肽的方法,用于疫苗接种、诱导免疫耐受、阻断TCR、MHC介导的毒素递送和用CAR重定向T细胞,用于免疫原性测试和其他体外T细胞反应性测试。本发明进一步涉及用于确定候选肽的MHC结合亲和力的方法。

1. 一种用于鉴定由主要组织相容性复合物 (MHC) 呈递的候选肽的方法, 所述方法包括如下步骤:

a) 在报告细胞系中表达重组MHC-肽复合物, 其中所述重组MHC-肽复合物是肽-MHC-TCR嵌合体, 在所述嵌合体中所述候选肽共价结合至所述MHC, 并且其中所述报告细胞系是哺乳动物细胞系,

b) 检测和分离显示MHC-肽复合物的表面表达的报告细胞, 其中所述报告细胞的检测和分离包含使所述报告细胞与针对所述重组MHC-肽复合物的抗体接触的步骤, 和

c) 确定在步骤 (b) 中分离的报告细胞的细胞表面呈递的候选肽的氨基酸序列。

2. 根据权利要求1所述的方法, 所述方法还包括如下步骤:

(i) 产生包含候选肽的库, 所述候选肽克隆在重组MHC β 链和/或 α 链上游并与其同框; 以及

(ii) 将所述库与相应的MHC α 链和/或 β 链一起转导到所述报告细胞系中。

3. 根据权利要求1或2所述的方法, 所述方法还包括确定MHC-肽复合物的表面表达的水平或候选肽对MHC的结合亲和力的步骤。

4. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述MHC是II类MHC分子, 其包含细胞外MHC II类 α 链和跨膜结构域, 以及细胞外MHC II类 β 链和跨膜结构域。

5. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述MHC是I类MHC分子, 其包含细胞外MHC I类 α 链和跨膜结构域以及 β -2微球蛋白。

6. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述MHC-肽复合物是包含候选肽、 β -2巨球蛋白、细胞外MHC I类 α 链和跨膜结构域的融合蛋白。

7. 根据权利要求5所述的方法, 其中所述MHC I类 α 链携带Y84A突变。

8. 根据权利要求6所述的方法, 其中所述MHC I类 α 链携带Y84A突变。

9. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述MHC的各链包含跨膜结构域。

10. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述跨膜结构域是天然MHC跨膜结构域。

11. 根据权利要求4所述的方法, 其中所述跨膜结构域是异源分子的跨膜结构域。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中所述异源分子是TCR α/β 、TCR γ/δ 、CD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ 、CD4或CD8 α/β 。

13. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述报告细胞系是缺乏MHC II类肽负载机构的细胞系。

14. 根据权利要求13所述的方法, 其中所述报告细胞系是T细胞杂交瘤。

15. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述报告细胞系是缺乏功能性TAP1、TAP2和/或 β -2-微球蛋白基因的细胞系。

16. 根据权利要求15所述的方法, 其中所述报告细胞系是具有缺陷或缺失的TAP1、TAP2和/或 β -2-微球蛋白基因的T细胞杂交瘤。

17. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述候选肽是携带个体肿瘤衍生的突变的肿瘤特异性肽。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述突变是SNV。

19. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述候选肽是引起免疫反应的抗原。

20. 根据权利要求1或2所述的方法, 其中所述候选肽是进行免疫原性测试的化合物。

21. 根据权利要求1所述的方法,其中所述候选肽在MHC-肽复合物库中编码。
22. 根据权利要求21所述的方法,其中所述MHC-肽复合物库包含克隆在重组MHC β 链和/或 α 链上游并与其同框的候选肽。
23. 根据权利要求22所述的方法,其中所述MHC-肽复合物库包含:
 - a) 天然肽的突变体形式;或
 - b) 通过随机转向或消化衍生自感兴趣的细胞或病原体的cDNA或DNA而产生的肽。
24. 根据权利要求21至23中任一项所述的方法,其中所述MHC-肽复合物库编码至少10个候选肽。
25. 根据权利要求24所述的方法,其中所述MHC-肽复合物库编码至少50个候选肽。
26. 根据权利要求24所述的方法,其中所述MHC-肽复合物库编码至少200个候选肽。
27. 根据权利要求24所述的方法,其中所述MHC-肽复合物库编码至少1000个候选肽。
28. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述抗体针对MHC-I或MHC-II,或其中所述抗体针对CD3 γ 、CD3 δ 或CD3 ϵ 。
29. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在其表面上有效表达MHC的报告细胞通过基于FACS或基于MACS的细胞分选来富集。
30. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在细胞表面呈递的候选肽的序列通过PCR和测序确定。
31. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述候选肽用作疫苗。
32. 根据权利要求31所述的方法,其中所述疫苗是基于肿瘤特异性抗原(TSA)的癌症疫苗。
33. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述候选肽用于诱导对其包含的至少一个表位的免疫耐受。
34. 根据权利要求1或2所述的方法,其中在MHC分子的情况下所述候选肽用于阻断TCR。
35. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述候选肽用于将MHC介导的毒素递送到细胞。
36. 根据权利要求35所述的方法,其中所述细胞是T细胞。
37. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述候选肽用于用MHC-CAR重定向T细胞。
38. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述候选肽用于免疫原性测试。
39. 根据权利要求1或2所述的方法,其中所述候选肽用于T细胞反应性测试。

作为疫苗设计的表位选择工具的哺乳动物MHC肽展示

[0001] 本发明涉及一种用于鉴定由主要组织相容性复合物(MHC)呈递的候选肽的方法,用于体内和/或体外干预,包括疫苗接种、诱导免疫耐受、阻断TCR和MHC介导的毒素递送,用于免疫原性测试和其他体外T细胞反应性测试。

[0002] T细胞在免疫系统中起着核心作用。T细胞的功能主要取决于由抗原呈递细胞(APC)呈递的肽中包含的表位的识别。APC几乎可以是任何有核细胞类型,但是专业的APC例如树突状细胞(DC)在呈递中特别有效。存在具有不同功能的不同T细胞集合,特别是分别识别由专业APC呈递的MHCII结合表位或由大多数细胞类型呈递的MHCI结合表位的CD4+T细胞或CD8+T细胞。MHC分子在以短线性肽形式向T细胞呈递细胞抗原或表位方面起着重要作用。

[0003] MHC由 α 链和 β 链以及结合在由这些链形成的凹槽中的肽组成。该复合物的稳定性高度依赖于肽结合,因此空的MHC分子从细胞表面被下调并降解。然而,空的MHC分子存在于细胞表面,且可以结合细胞外肽并将其呈递到T细胞。此外,有人描述了空的MHC的两种不同的异构体(Rabunowitz等人, *Immunity*, 9, 699-709 (1998)):较不稳定的活性异构体和较稳定的非活性异构体。个体的MHC目录(MHC repertoire)是多基因的而MHC基因是高度多态的。因此,个体可以表达的MHC的集合很可能与另一个随机个体的集合非常不同。

[0004] 携带MHC的肽与在T细胞表面的T细胞受体(TCR)相互作用,从而导致T细胞活化。APC,例如树突状细胞或巨噬细胞,可以通过吞噬作用或受体介导的内吞作用使抗原内在化。

[0005] 为了控制T细胞的活性,重要的是确定它们的特异性肽配体并控制或调节MHC-肽复合物与TCR间的相互作用。因此,重要的是确定肽与MHC的结合亲和力。合适的肽或MHC-肽复合物可用于多种应用。它们可用于例如鉴定或富集反应性T细胞或用于体外免疫原性测试。它们也可用于阻断TCR,体内递送毒素到T细胞或用含MHC的嵌合抗原受体MHC-CAR重定向T细胞(Jyothi等人, *Nat. Biotech*, 20, 1215-1220 (2002)),以诱导对表位的免疫耐受(否则所述表位将活化对该表位具有特异性的T细胞)。疫苗,特别是活化T细胞以消除癌细胞的基于肿瘤特异性抗原(TSA)的癌症疫苗的开发是现代医学的主要目标之一。肿瘤特异性肽,即所谓的新抗原(neoantigen),仅存在于肿瘤细胞中,而在正常组织中完全不存在。此类肿瘤特异性肽由导致形成新蛋白质序列的肿瘤特异性DNA改变产生。由于不同肿瘤内和不同肿瘤间的细胞的遗传异源性,即使它们起源于同一器官,存在于患者的肿瘤中的一组新抗原在很大程度上也对该患者具有特异性。在MHC的背景下,肿瘤特异性肽被展示(display)在肿瘤细胞和所谓的抗原呈递细胞(APC)的表面上。一旦肿瘤特异性肽在细胞表面呈递,它们就可以被免疫系统识别和破坏。因此,含有肿瘤特异性肽的疫苗可以刺激免疫系统以检测和破坏在其表面呈递这些分子的癌细胞。

[0006] 最近,已经有人证明由肿瘤中积累的体细胞突变引起的TSA经常被肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)识别(Linnemann等人, *Nat Med* 1-7 (2014))。肿瘤DNA的外显子组测序以及与来自健康组织的DNA比较可以发现对患者的肿瘤细胞特异的此类体细胞突变。然而,通常会检测到许多突变(Vormehr等人, *Curr Opin Immunol* 39, 14-22 (2016)),但由于技术问题,同时也是为了使自身免疫的风险最小化,一种疫苗中仅应混合少量TSA(即肿瘤特异性肽)。这

些TSA的选择至关重要,因为抗原呈递细胞(APC)不会在其MHC分子上呈递所有可能的肽,而是呈递适合对患者特异的特定MHC等位基因的子集。对于许多涉及T细胞的应用,选择可以由APC有效呈递的肽,特别是肿瘤特异性肽是至关重要的且对于肿瘤疫苗设计仍然是瓶颈。为了解决这个问题,候选肽通常根据其MHC结合亲和力进行排名,这些亲和力是借助于生物信息学分析预测的(Sahin等人,Nature 1-19(2017);Ott等人,Nature 547,217-221(2017))。然而,最近的数据表明,对于肽呈递的生物信息学预测效果相当差,特别是对于MHC II类表位(Sofron等人,Eur J Immunol 46,319-328(2015))。已经有人公开了使用抗原呈递报告细胞系测量T细胞与MHC-肽复合物(经由其TCR)的结合的“湿实验室”方法;WO2016097334 A1。该报告细胞系表达包含MHC-肽复合物的嵌合抗原受体,该MHC-肽复合物在与T细胞的TCR结合后活化报告细胞系中的报告基因。间接地,也用该方法测量MHC-肽复合物的稳定性,因为只有足够稳定的MHC-肽复合物会出现在报告细胞系的表面,与T细胞相互作用并最终活化报告子。然而,该方法不允许具体测量MHC-肽复合物的稳定性,因为报告基因的活化还取决于TCR对肽表位的亲和力和其他免疫调节因子。

[0007] 因此,需要提供可靠地确定由APC有效呈递的肽,特别是TSA的装置和方法。

[0008] 现在,本发明满足了这种需求,因为它提供了在权利要求书和本发明的以下实施方式中更具体地定义的这样的装置和方法。

[0009] 在其主要方面,本发明涉及:

[0010] 1.一种用于鉴定由主要组织相容性复合物(MHC)呈递的候选肽的方法,所述方法包括在报告细胞系中表达包含共价结合的候选肽的重组MHC-肽复合物,检测显示MHC-肽复合物的表面表达的报告细胞,和确定在细胞表面呈递的候选肽的序列。

[0011] 2.根据方面1所述的方法,所述方法包括

[0012] (i)产生包含候选肽的库,所述候选肽克隆在重组MHC β 链和/或 α 链上游并与其同框(in-frame);

[0013] (ii)将这种库与相应的MHC α 链和/或 β 链一起转导到合适的报告细胞系中;

[0014] (iii)检测和分离在细胞表面上表达一种或多种MHC-肽复合物的细胞;

[0015] (iv)从在其细胞表面上呈递一种或多种MHC-肽复合物的细胞中分离DNA;

[0016] (v)确定由整合在从在细胞表面上呈递MHC-肽复合物的细胞分离的所述DNA中的载体编码的候选肽的序列。

[0017] 3.一种用于鉴定由主要组织相容性复合物(MHC)呈递的候选肽的方法,所述方法包括在报告细胞系中表达包含共价结合的候选肽的重组MHC-肽复合物,检测显示MHC-肽复合物的表面表达的报告细胞,和确定MHC-肽复合物的表面表达的水平,以及在细胞表面呈递的候选肽的序列。

[0018] 4.根据方面3所述的方法,所述方法包括

[0019] (i)产生包含候选肽的库,所述候选肽克隆在重组MHC β 链和/或 α 链上游并与其同框;

[0020] (ii)将这种库与相应的MHC α 链和/或 β 链一起转导到合适的报告细胞系中;

[0021] (iii)检测和分离在细胞表面上表达一种或多种MHC-肽复合物的细胞;

[0022] (iv)确定所述一种或多种MHC-肽复合物的细胞表面表达的水平;

[0023] (v)从在其细胞表面上呈递一种或多种MHC-肽复合物的细胞中分离DNA;

- [0024] (vi) 确定由整合在从在细胞表面上呈递MHC-肽复合物的细胞分离的所述DNA中的载体编码的候选肽的序列。
- [0025] 5. 根据方面1至4中任一项所述的方法,其中所述MHC分子是MHC II类分子,其包含细胞外MHC II类 α 链和跨膜结构域,以及细胞外MHC II类 β 链和跨膜结构域。
- [0026] 6. 根据方面1至4中任一项所述的方法,其中所述MHC分子是MHC I类分子,其包含细胞外MHC I类 α 链和跨膜结构域以及 β -2微球蛋白。
- [0027] 7. 根据方面1至4中任一项所述的方法,其中所述MHC-肽复合物是融合蛋白,其包含候选肽, β -2巨球蛋白,细胞外MHC I类 α 链和跨膜结构域。
- [0028] 8. 根据方面6或7所述的方法,其中所述MHC α 链携带Y84A突变。
- [0029] 9. 根据方面1至8中任一项所述的方法,其中MHC分子的每个链包含跨膜结构域。
- [0030] 10. 根据方面1至9中任一项所述的方法,其中所述跨膜结构域是MHC分子的天然跨膜结构域。
- [0031] 11. 根据方面1至9中任一项所述的方法,其中所述跨膜结构域是异源分子例如TCR α/β 、TCR γ/δ 、CD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ 、CD4或CD8 α/β 的跨膜结构域。
- [0032] 12. 根据方面1至11中任一项所述的方法,其中所述报告细胞系是哺乳动物细胞系。
- [0033] 13. 根据方面1至12中任一项所述的方法,其中所述报告细胞系是缺乏所述MHC II类肽装载机构的细胞系。
- [0034] 14. 根据方面13所述的方法,其中所述报告细胞系是T细胞杂交瘤。
- [0035] 15. 根据方面1至14中任一项所述的方法,其中所述报告细胞系是缺乏功能性TAP1、TAP2和/或 β -2-微球蛋白基因的细胞系。
- [0036] 16. 根据方面15所述的方法,其中所述报告细胞系是具有缺陷或缺失的TAP1、TAP2和/或 β -2-微球蛋白基因的T细胞杂交瘤。
- [0037] 17. 根据前述方面中任一项所述的方法,其中所述候选肽是携带个体肿瘤衍生的突变的肿瘤特异性肽。
- [0038] 18. 根据方面17所述的方法,其中所述突变是SNV。
- [0039] 19. 根据方面1至16所述的方法,其中所述候选肽是引起免疫反应的抗原。
- [0040] 20. 根据方面1至16所述的方法,其中所述候选肽是进行免疫原性测试的化合物。
- [0041] 21. 根据前述方面中任一项所述的方法,其中在其表面上有效表达MHC的报告细胞通过基于FACS或基于MACS的细胞分选来富集。
- [0042] 22. 根据前述方面中任一项所述的方法,其中在细胞表面呈递的候选肽的序列通过PCR和测序确定。
- [0043] 23. 根据方面1至22中任一项所述的方法,其中所述候选肽用作疫苗。
- [0044] 24. 根据方面23所述的方法,其中所述疫苗是基于肿瘤特异性抗原(TSA)的癌症疫苗。
- [0045] 25. 根据方面1至22中任一项所述的方法,其中所述候选肽用于诱导针对其包含的至少一个表位的免疫耐受。
- [0046] 26. 根据方面1至22或25中任一项所述的方法,其中在MHC分子的情况下所述候选肽用于阻断TCR。

[0047] 27. 根据方面1至22或25中任一项所述的方法,其中所述候选肽用于将MHC介导的毒素递送到细胞,特别是T细胞。

[0048] 28. 根据方面1至22或25中任一项所述的方法,其中所述候选肽用于用MHC-CAR重定向T细胞。

[0049] 29. 根据方面1至22中任一项所述的方法,其中所述候选肽用于免疫原性测试。

[0050] 30. 根据方面1至22或29中任一项所述的方法,其中所述候选肽用于T细胞反应性测试。

[0051] 31. 一种用于确定候选肽的MHC结合亲和力的方法,所述方法包括在报告细胞系中表达包含共价结合的候选肽的重组MHC-肽复合物,检测在报告细胞的表面上呈递MHC-肽复合物的报告细胞,和确定这种呈递/表达的水平。

[0052] 32. 根据方面31所述的方法,所述方法包括

[0053] (i) 产生包含候选肽的库,所述候选肽克隆在连接到至少一个跨膜区的重组MHC α 结构域或 β 结构域上游;

[0054] (ii) 将这种库与相应的MHC α 结构域或 β 结构域一起转导到合适的报告细胞系中;

[0055] (iii) 检测在其细胞表面上呈递一种或多种MHC-肽复合物的细胞;

[0056] (iv) 确定这种呈递/表达的水平。

[0057] 本发明提供了用于鉴定由主要组织相容性复合物(MHC)呈递的候选肽的方法,所述方法包括在报告细胞系中表达包含共价结合的候选肽的重组MHC-肽复合物,检测显示MHC-肽复合物的表面表达的报告细胞,和确定在细胞表面呈递的候选肽的序列。

[0058] 本发明至少部分基于出人意料的发现,即可以直接定量地测量哺乳动物细胞系中重组肽-MHC复合物的表面表达水平。进一步出人意料的是,通过基于抗体染色和流式细胞术的标准实验室技术,并且在不具有涉及T细胞的复杂共培养系统和/或复杂的报告系统的情况下,肽-MHC复合物的这种直接测量是可行的。尽管本领域技术人员可能知道基于生物信息学方法的预测并不总是很准确,但是现有技术的生物信息学方法完全无法预测通过本文公开的方法确定的肽与特定MHC变体的结合仍然是令人惊讶的。进一步出人意料的是,无论待分析的特定肽和/或MHC变体如何,都可以用CD3e抗体检测重组MCR(WO2016097334A1中公开的肽-MHC-TCR嵌合体)中包含的MHC。不受理论的束缚,本文公开的方法允许主要测量由MHC引起的肽呈递的生物学可变性,而不需要引入当使用不同抗体检测不同MHC变体时可能的技术可变性。

[0059] 肽可以共价结合到MHC分子以克服对肽加工机构/装载机构的需求。该方法已被用于在各种MHC展示方法中(Crawford等人,PLoS Biol 2,e90(2004);Wen等人,Protein Eng Des Sel 24,701-709(2011))生产稳定的MHC-四聚体(Crawford等人,Immunity 8,675-682(1998)),以产生在其APC上表达单肽的小鼠(Ignatowicz等人,Cell 84,521-529(1996))或在CAR中设计成重定向T细胞到其他T细胞(Jyothi等人,Nat Biotechnol 20,1215-1220(2002))。通常,必须使MHC分子突变以使其在酵母细胞或昆虫细胞的表面上表达(Wen等人,Protein Eng Des Sel 24,701-709(2011)),并且在一些研究中通过结合额外的二硫桥采取一些措施来稳定在MHC的槽中的肽(Truscott等人,J. Immunol. 178,6280-6289(2007))。

[0060] 然而,在本发明的上下文中显示,在无法装载MHC肽的细胞中,即使过度表达,不具有束缚肽的重组MHC分子在细胞表面上仍不可检测或不稳定(在低水平可检测)(图4)。

[0061] 因此,即使存在,被Rabunowitz (Rabunowitz等人, *Immunity*, 9, 699-709 (1998)) 描述的空MHC的相对稳定的异构体也不会非专业抗原呈递细胞的表面上持续很长时间。重要的是,在本发明的上下文中显示,并非所有束缚到重组MHC的肽都会导致MHC复合物的有效细胞表面表达。实际上,有些阻止在表面上的表达(图2a和图2b)。因此,与未感染的报告细胞和/或不具有共价结合的肽或不稳定的MHC-肽复合物的MHC转导的报告细胞相比,具有束缚的候选肽的重组MHC分子在合适的报告细胞系表面上的高表达可以用作被MHC有效肽呈递的指标。换句话说,显示重组MHC-肽复合物的表面表达的报告细胞可以通过将所述MHC-肽复合物的表面表达与未感染的报告细胞或与不具有共价结合肽或不稳定的MHC肽复合物的MHC转导的报告细胞的背景信号比较来检测。此外,测量这种呈递/表达的水平(图2a和图7) 允许根据其MHC结合能力对肽进行分级。通过MHC呈递的肽的检测和/或分级可在必要时包含一个或多个归一化步骤,例如通过不具有与候选肽或随机肽共价结合或施加不稳定相互作用的候选肽或随机肽的相应MHC变体的背景信号归一化。必要时,可以使用本领域熟知的归一化和/或标准化方法,基于所测得的重组MHC-肽复合物的表面表达,确定候选肽与MHC的结合亲和力。

[0062] 在某些实施方式中,候选肽的分级和/或候选肽与MHC的结合亲和力的确定可以与重组MHC-肽复合物的表面表达直接相关,而重组MHC-肽复合物的表面表达是通过使用抗-CD3e、抗-CD3δ或抗-CD3 γ 抗体的CD3染色确定的。优选地,为了与所述CD3染色的所述相关性,MHC包含在MCR中。

[0063] 本文首次证明适当设计的MHC II类肽复合物可用于鉴定由APC有效呈递的候选肽。

[0064] 此外,发现在本发明的范围内,当使用由连接到与TCR的跨膜单元融合的MHC的天然细胞外结构域的肽组成的MHC-TCR融合蛋白(MCR)时,并非所有的MHC-II类肽组合都在细胞表面上有效表达。例如,当测试不同的MHC-肽组合时,观察到流感基质蛋白1(MP1)-衍生的肽的表面差异表达。重要的是,肽结合的预测分析并未表明MHC肽结合亲和力的类似模式。

[0065] 在各种实施方式中,本发明涉及根据如本文所述的前述实施方式的用于鉴定候选肽的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0066] (i) 产生包含候选肽的库,特别是包含克隆在重组MHCβ链和/或α链上游并与其同框的候选肽的库;

[0067] (ii) 将这种库与相应的MHCα链和/或β链一起转导到合适的报告细胞系中;

[0068] (iii) 检测在其细胞表面上呈递一种或多种MHC-肽复合物的细胞;

[0069] (iv) 从在其细胞表面上呈递一种或多种MHC-肽复合物的细胞中分离DNA;

[0070] (v) 确定在细胞表面呈递上的MHC-肽复合物内的候选肽的序列。

[0071] 如本文所用,术语“主要组织相容性复合物(MHC)”是指MHC I类和MHC II类基因以及由其编码的蛋白质。术语MHC-I、MHC-II、MHC-1和MHC-2在本文中被不同地使用以指示这些种类分子。

[0072] 在某些实施方式中,本发明涉及一种用于鉴定由主要组织相容性复合物(MHC)呈递的候选肽的方法,所述方法包括在报告细胞系中表达包含共价结合的候选肽的重组MHC-肽复合物,检测显示MHC-肽复合物的表面表达的报告细胞,和确定MHC-肽复合物的表面表

达的水平,以及在细胞表面呈递的候选肽的序列。

[0073] 在各种实施方式中,本发明涉及根据如本文所述的前述实施方式的用于鉴定候选肽的方法,其中所述方法包括以下步骤:

[0074] (i) 产生库,所述库包含克隆在重组MHC β 链和/或 α 链上游并与其同框的候选肽;

[0075] (ii) 将这种库与相应的MHC α 链和/或 β 链一起转导到合适的报告细胞系中;

[0076] (iii) 检测和分离在细胞表面上表达一种或多种MHC-肽复合物的细胞;

[0077] (iv) 确定所述一种或多种MHC-肽复合物的细胞表面表达的水平;

[0078] (v) 从在其细胞表面上呈递一种或多种MHC-肽复合物的细胞中分离DNA;

[0079] (vi) 确定由整合在从在细胞表面上呈递MHC-肽复合物的细胞分离的所述DNA中的载体编码的候选肽的序列。

[0080] 在哺乳动物中,存在称为I类和II类的两种类型的MHC分子。MHC I类分子存在于体内几乎所有有核细胞中并被CD8⁺细胞识别。MHC II类分子主要在免疫系统的专业APC上表达并被CD4⁺细胞识别。所述分子进一步被抗原亚型细分。人MHC I类分子,也称为人白细胞抗原(HLA),被分为HLA-A、-B和-C。人MHC II类分子被分为HLA-DR、-DQ和-DP。

[0081] MHC I类分子在人体的几乎每个细胞中都有发现。MHC I类分子是异源二聚体,其由与约12kDa的单态性(人中)非MHC编码的轻(β)链蛋白(称为 β_2 微球蛋白(β_2m))非共价缀合的多态性重链(α)构成。重 α 链是约45kDa的多态性跨膜糖蛋白,由3个细胞外结构域组成,每个细胞外结构域包含约90个氨基酸(在N端的 α_1 、 α_2 和 α_3)、约40个氨基酸的跨膜区域和约30个氨基酸的细胞质尾。 α_1 和 α_2 结构域,即膜远端结构域,形成肽结合槽或裂口,其大小足以结合8-10个氨基酸的肽,而 α_3 结构域靠近质膜。呈递的肽由肽结合槽在 α_1 和 α_2 结构域的中心区域中固定。

[0082] MHC II类分子仅在几种特殊类型的细胞,特别是抗原呈递细胞(APC),例如巨噬细胞、树突状细胞和B细胞中被发现。MHC II类分子包含两个不同的多肽链,一个33kDa α 链和一个28kDa β 链,它们通过非共价相互作用缀合。类似于MHC I类分子,MHC II类分子是包含细胞外结构域、跨膜片段和细胞质尾的膜结合的糖蛋白。这些非共价异源二聚体复合物中的每个链包含两个细胞外结构域、跨膜结构域和细胞质尾。细胞外结构域是分别用于 α 链和 β 链的 α_1 和 α_2 结构域以及 β_1 和 β_2 结构域。II类分子的膜远端结构域由 α_1 和 β_1 结构域组成并形成具有足够大小以结合肽的肽结合槽或裂口,被结合的肽大小通常为13-18个氨基酸,或者10-18个氨基酸或更长。II类的膜近端对, α_2 和 β_2 ,具有与Ig恒定(C)结构域的结构类似性。人中存在三对II类 α 和 β 链基因,称为HLA-DR、HLA-DP和HLA-DQ。针对HLA-DR记录了最高水平的多态性。

[0083] 如本文所用,候选肽是指在长度上具有8-18个氨基酸或至多50个氨基酸的肽。与MHC I类结合的候选肽的优选长度是8、9或10个氨基酸。与MHC II类结合的候选肽的优选长度是10、11、12、13、14、15、16、17或18个氨基酸。特别地,候选肽被包含在由重组核酸编码的MHC-肽复合物中。

[0084] 在各种实施方式中,本发明涉及根据如本文所述的前述实施方式中任一项的方法,其中所述MHC分子是包含细胞外MHC II类 α 链和跨膜结构域以及细胞外MHC II类 β 链和跨膜结构域的MHC II类分子。

[0085] 在其他实施方式中,MHC分子是MHC I类分子,其包含细胞外MHC I类 α 链和跨膜结

构域以及 β -2微球蛋白。

[0086] 在另一个实施方式中,MHC-肽复合物是融合蛋白,其包含候选肽、 β -2巨球蛋白、细胞外MHC I类 α 链和跨膜结构域。

[0087] 对于MHC I类分子,已经显示 α 链中的Y84A突变打开肽结合袋,使得能够更好地容纳所连接的肽(Mitaksov,V.等人Chem Biol 14,909-922(2007))。

[0088] 因此,在一个具体的实施方式中,MHC I类分子的MHC α 链携带Y84A突变。例如,可以通过定点诱变引入Y84A突变。

[0089] 在一些实施方式中,本发明涉及根据如本文所述的前述实施方式中任一项的方法,其中所述MHC分子包含一个或两个跨膜结构域。

[0090] 在各种实施方式中,本发明涉及根据如本文所述的前述实施方式中任一项的方法,其中上述跨膜结构域是MHC分子的自然跨膜结构域。

[0091] 如本文所用,术语“天然跨膜结构域”是指在其天然状态下维持MHC分子的跨膜部分的结构性质的MHC跨膜结构域。

[0092] 在具体的实施方式中,跨膜结构域是异源分子的跨膜结构域,其包括但不限于TCR α/β 、TCR γ/δ 、CD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ 、CD4或CD8 α/β 。

[0093] 用于实施本发明的方法的报告细胞系(reporter cell line)可以是可用于生物学应用的任何细胞系或细胞系的衍生物。合适的细胞系或其衍生物是例如但不限于人、小鼠、大鼠、猴子、仓鼠、鱼、青蛙或昆虫来源或酵母,例如但不限于HEK、CHO、3T3、杂交瘤、HeLa、Sf9、Schneider 2细胞、Jurkat、HUVEC、HL-60、MCF-7、Saos-2细胞、IMR-90、Raw 264.7、PC3、Vero、Cos、GH3、PC12、狗MDCK、非洲爪蟾A6或斑马鱼AB9。

[0094] 在一个具体的实施方式中,所述报告细胞系是哺乳动物细胞系。合适的哺乳动物细胞系例如但不限于T细胞杂交瘤、T细胞克隆、Jurkat、BW5147 α - β -融合配偶体、骨髓瘤、HEK、CHO、3T3。

[0095] 特别地,适用于本发明的报告细胞系,优选哺乳动物细胞系,是缺乏展示最初存在于细胞中的内源性蛋白质衍生肽的能力的细胞系。因此,细胞应仅呈递携带衍生自感兴趣的肽库的候选肽的MHC肽复合物。肽的加工及其在用于展示的MHC分子上的负载是多步骤过程,涉及构成加工和呈递机构的多种分子。MHC I类分子经由称为TAP的转运蛋白(与抗原加工相关的转运蛋白)来装载肽,该转运蛋白将肽转运到ER中,在那里它们结合MHC I类分子。MHC II类分子的装载通过吞噬作用或自噬发生;MHC II类分子在它们转移到细胞表面前被递送到吞噬溶酶体并将肽装载。用于MHC II类分子的肽加工/装载机构仅存在于APC中。

[0096] 根据上文,在一个实施方式中,适合于实施本发明的方法的报告细胞系是缺乏MHC II类肽装载机构的细胞系。优选地,缺乏MHC II类肽装载机构的报告细胞系是哺乳动物细胞系。

[0097] 在一个具体的实施方式中,报告细胞系是T细胞杂交瘤。

[0098] 在另一个实施方式中,适合于实施本发明的方法的报告细胞系是缺乏功能性TAP1、TAP2和/或 β -2-微球蛋白基因的细胞系。

[0099] 在一个具体的实施方式中,报告细胞系是具有缺陷或缺失的TAP1、TAP2和/或 β -2-微球蛋白基因的T细胞杂交瘤。具有缺陷或缺失的TAP1、TAP2和/或 β -2-微球蛋白基因的细胞系的其他实例包括但不限于T细胞和B细胞克隆或杂交瘤、HEK细胞或3T3细胞。

[0100] 外显子组测序可用于鉴定肿瘤中独特存在的TSA。例如,可以通过对源自患者的肿瘤DNA测序并将其与源自健康受试者的DNA比较来鉴定TSA。通过对每个患者的肿瘤和正常DNA测序,也可以为单个患者鉴定TSA。基于该分析,可将各自携带肿瘤衍生的突变的多个候选肽用于产生MHC-肽复合物。因此,在本发明的一个实施方式中,使用肽库。这些肽可携带肿瘤衍生的突变或是天然肽。

[0101] 因此,在各个实施方式中,本发明涉及根据如本文所述的前述实施方式中任一项的方法,其中所述候选肽是携带个体肿瘤衍生的突变的肿瘤特异性肽。

[0102] 如本文所用,术语“肿瘤衍生的突变”是指核酸序列中对肿瘤特异且在来自健康组织的DNA中不存在的突变。

[0103] 在一个具体的实施方式中,肿瘤衍生的突变是单核苷酸变异(SNV)。SNV包括但不限于p53、KRAS和BRAF的各种突变。

[0104] 在另一个实施方式中,候选肽是引起免疫反应的抗原。例如,肽可以源自病原体。

[0105] 在另一个实施方式中,候选肽是进行免疫原性测试的化合物。

[0106] 在一个实施方式中,本发明涉及一种使用候选肽库的方法,其中所述库包含天然肽的突变体形式。例如,天然肽可能已知不可以被给定的MHC分子有效地呈递。因此,为了筛选由给定的MHC分子更有效地呈递的肽突变体,可以使用包含突变体肽的库。

[0107] 在另一个实施方式中,本发明涉及使用候选肽库的方法,其中所述库包含通过随机转向或消化衍生自感兴趣的细胞或病原体的cDNA或DNA而产生的肽。这样的库将覆盖存在于此类细胞中的所有肽。例如,从癌症组织或经受自身免疫攻击的组织产生MHC展示库,将允许定义可能被给定MHC呈递的所有组织肽。因此,将来将不需要测试并且可以在表中查询特定的肽是否被给定MHC有效地呈递。

[0108] 在一个实施方式中,使用重组表达载体产生MHC-肽复合物库。重组表达载体是可复制的DNA构建体,包含以下的组件:(1)在基因表达中具有调节作用的一种或多种试剂,例如启动子、操纵子或增强子,可操作地连接到(2)转录成mRNA并翻译成蛋白质的编码所需蛋白质(例如MHC-肽复合物)的核苷酸序列,以及(3)适当的转录和翻译起始和终止序列。启动子和其他调节元件的选择通常根据预期的报告细胞系而变化。表达载体通常是“质粒”的形式,其是指以其载体形式不与染色体结合的环状双链DNA环。合适的原核生物表达载体包括来自大肠杆菌,例如Col E1、pCR1、pBR322、pMB9及其衍生物的质粒,较宽的宿主范围质粒,例如RP4,噬菌体DNA,例如噬菌体 λ 及其各种衍生物,M13等。另外的大肠杆菌载体例如在Maniatis等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,NY (1982)和Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,NY (1989)中描述。然而,本发明旨在包括具有等同功能并在此后将在本领域中已知的表达载体的其他形式。游离复制(replicating episomally)的真核表达载体,例如pCEP4或BKV,或衍生自病毒的其他载体,例如逆转录病毒例如pMY、pMX、pSIR,腺病毒例如pAd等也可以使用。在表达载体中,控制转录或翻译的调节元件通常可衍生自哺乳动物、微生物、病毒或昆虫基因。可以另外掺入通常由复制起点赋予的复制能力和有助于识别转化体的选择基因。含有来自真核病毒的调节元件的表达载体通常用于真核表达载体,例如SV40载体、乳头瘤病毒载体和衍生自爱泼斯坦-巴尔病毒的载体。其他示例性真核载体包括pMSG、pAV009/A+、pMT010/A+、pMAMneo-5、杆状病毒pDSVE,以及允许在CMV启动子、SV40早期启动

子、SV40晚期启动子、金属硫蛋白启动子、鼠类乳腺肿瘤病毒启动子、劳斯肉瘤病毒启动子、多角体蛋白启动子或对在真核细胞中表达显示有效的其他启动子的指导下表达蛋白质的任何其他载体。

[0109] “启动子”定义为指导核酸转录的核酸控制序列的阵列。如本文所用,启动子包括靠近转录起始位点的必需核酸序列,例如在聚合酶II型启动子,即TATA元件的情况下。启动子还任选地包括远端增强子或阻遏子元件,其可位于距转录起始位点多达数千个碱基对。用于真核宿主细胞的启动子是本领域技术人员已知的。此类启动子的说明性实例包括但不限于来自猿猴病毒40 (SV40) 的启动子、小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV) 启动子、人免疫缺陷病毒 (HIV) 启动子,例如HIV长末端重复 (LTR) 启动子、莫洛尼病毒启动子、ALV启动子、巨细胞病毒 (CMV) 启动子,例如CMV立即早期启动子、爱泼斯坦巴尔病毒 (EBV) 启动子、劳斯肉瘤病毒 (RSV) 启动子以及来自人基因例如人肌动蛋白、人肌球蛋白、人血红蛋白、人肌肉肌酸和人金属硫蛋白的启动子。合适的启动子的其他实例包括CAG启动子(包含CMV增强子、鸡 β -肌动蛋白启动子和兔 β -球蛋白剪接受体以及聚(A)序列的杂合启动子)。

[0110] 术语“可操作地连接”是指核酸表达控制序列(例如转录因子结合位点的阵列或启动子)和第二核酸序列之间的功能性连接,其中表达控制序列指导对应于第二序列的核酸的转录。

[0111] 通过使用本领域已知的标准技术将表达载体转导到宿主细胞中,从而将MHC-肽库引入合适的报告细胞系。合适的方法例如在Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor, NY (1989) 中描述。为了产生用于转导的伪逆转录病毒,用含有由LTR、包装信号和感兴趣的基因组组成的病毒基因组的构建体(在这种情况下,携带MHC链的肽)瞬时转染不断表达反转录病毒蛋白GAG、POL和ENV的包装细胞系(例如Phoenix细胞系)。或者,用分别编码反转录病毒蛋白GAG、POL和ENV以及由LTR、包装信号和感兴趣的基因组组成的病毒基因组的载体混合物瞬时转染合适的细胞系,如HEK、3T3或其他。这些常用策略可确保产生有缺陷的伪逆转录病毒,该伪逆转录病毒能够感染靶细胞并将感兴趣的基因引入其基因组DNA中。然而,感染的靶细胞不能产生反转录病毒,因为伪逆转录病毒在其基因组中不携带gag、pol和env基因。或者,可以通过用基于脂质、磷酸钙、阳离子聚合物或DEAE-葡聚糖的试剂转染或通过电穿孔将MHC-肽库引入合适的报告细胞系。

[0112] 报告细胞系的术语“感染”和“转导”在本文中可互换使用。

[0113] 用于检测呈递细胞表面暴露的MHC-肽复合物的细胞的方法是本领域已知的。合适的方法包括细胞分选技术,例如流式细胞术、荧光活化细胞分选 (FACS) 和磁性细胞分选 (MACS)。

[0114] 因此,在各种实施方式中,本发明涉及根据如本文所述的前述实施方式中任一项的方法,其中通过荧光活化细胞分选 (FACS) 富集在其表面上有效表达MHC的报告细胞。

[0115] FACS是指一种基于由细胞表达的一种或多种特异性多肽的存在、不存在或存在的水平将细胞群体分成一个或多个亚群体的方法。FACS依赖于单个细胞的光学性质,包括荧光,以便将细胞分类为亚群。适用于实施本文所述方法的细胞分选仪是本领域众所周知的并且可商购。示例性细胞分选仪包括MoFlo分选仪 (DakoCytomation, Fori Collins, Colo.)、FACS AriaTM、FACS ArrayTM、FACS VantageTM、BDTM LSR II和FACS CaiiburTM (BD Biosciences, San Jose, Calif.) 和由其他商业供应商例如Sony, BioRad和Beckman

Coulter生产的其他等效细胞分选仪。

[0116] 在另一个实施方式中,本发明涉及根据如本文所述的前述实施方式中任一项的方法,其中通过基于MACS的细胞分选来富集在其表面上有效表达MHC的报告细胞。

[0117] “MACS”是指基于由细胞表达的一种或多种MACS可选择多肽的存在、不存在或存在的水平将细胞群体分成一个或多个亚群的方法。MACS依赖于标记的单个细胞的磁化率性质,以便将细胞分类为亚群体。对于MACS,可以将磁珠(例如可从Miltenyi Biotec Bergisch Gladbach, Germany; 130-048-402获得的磁珠)用作标记。适用于实施本文所述方法的MACS细胞分选仪是本领域众所周知的并且可商购。示例性MACS细胞分选仪包括autoMACS Pro Separator(Miltenyi Biotec)。

[0118] 在各种实施方式中,可使细胞与对MHC-I或MHC-II特异的抗体或与用于检测与杂种相关的蛋白质的抗体接触。例如,如果MHC细胞外结构域与TCR跨膜区融合,可以使用检测CD3 γ 、CD3 δ 或CD3 ϵ 的抗体。抗体可以直接缀合到可检测标记。或者,可使与可检测标记缀合且对第一抗体特异的第二抗体与细胞接触。适合使用的可检测标记包括可通过光谱、光化学、生物化学、免疫化学、电、光学或化学手段检测的任何化合物。本发明中有用的标记包括生物素,磁珠(例如DynabeadsTM),荧光标记(例如荧光素,得克萨斯红,若丹明,绿色荧光蛋白,丹磺酰氯,伞形酮,PE,APC,CY5,Cy7,PerCP,Alexa染料等),放射性标记(例如³H,¹²⁵I,³⁵S,¹C或³²P),酶(例如辣根过氧化物酶,碱性磷酸酶等)和色母标记(colorimetric label),例如胶体金或有色玻璃或塑料(例如聚苯乙烯,聚丙烯,乳胶等)珠。在例如《分子探针手册:荧光探针和标记技术指南》(The Molecular Probes Handbook:A Guide to Fluorescent Probes and Labeling Technologies)(第11版)中进一步描述了各种合适的荧光标记。

[0119] 取决于使用了多少个荧光标记,该分类产生非荧光细胞群体和至少一个荧光细胞群体。至少一种携带荧光细胞的细胞群体的存在表明至少一种候选肽被APC有效呈递。因此,FACS能够分选细胞群体以产生富含包含表面暴露的MHC-I或MHC-II的细胞的细胞群体。

[0120] 本发明的实施方式采用本领域技术人员已知的DNA分离方法。通常,目的是将存在于细胞核中的DNA与其他细胞组分分开。DNA的分离通常从细胞的裂解或分解开始。该过程对于破坏蛋白质结构是必不可少的并允许核酸从细胞核中释放。裂解在盐溶液中进行,盐溶液含有去污剂以使蛋白质或蛋白酶(消化蛋白质的酶)例如蛋白酶K变性,或在某些情况下二者都被变性。这导致细胞破裂和膜溶解。DNA分离的方法包括但不限于苯酚:氯仿提取、高盐沉淀、碱变性、离子交换柱色谱、树脂结合和顺磁珠结合。

[0121] 本发明的实施方式采用本领域技术人员已知的cDNA产生方法。通常,目的是将细胞中存在的分离的RNA转化为DNA,称为拷贝DNA,以便将其用作聚合酶链反应(PCR)的模板。RNA的分离通常从细胞的裂解或分解开始。该过程对于破坏蛋白质结构是必不可少的并允许从其中释放核酸。裂解通常在含苯酚的溶液中进行(例如TRIzolTM)。这导致细胞分解和膜溶解并使RNA与其他细胞组分分离。然后将分离的RNA通过逆转录酶(例如SuperscriptTM, GoscriptTM)转化成cDNA。

[0122] 然后通过PCR扩增在细胞表面呈递的MHC-肽复合物内的候选肽的序列并且可以通过本领域已知的任何方法进行测序。

[0123] 在各种实施方式中,本发明涉及根据如本文所述的前述实施方式中任一项的方法,其中所述候选肽的序列通过PCR和测序确定。

[0124] 在一个实施方式中,候选肽的序列通过数字PCR确定。数字聚合酶链反应(数字PCR, DigitalPCR, dPCR或dePCR)是可用于直接定量和克隆扩增核酸(包括DNA、cDNA或RNA)的传统聚合酶链反应方法的改进。

[0125] 测序也可以使用微流体进行。微流体技术涉及处理少量流体的微型设备。由于微流体可以准确并可重复地控制和分配小流体体积,特别是小于 $1\mu\text{l}$ 的流体,应用微流体提供显著的成本节省。微流体技术的使用减少周期时间,缩短获得结果的时间并提高通量。此外,微流控技术的引入增强系统集成和自动化。微流体反应通常在微滴中进行。

[0126] 在一些实施方式中,使用第二代测序(或下一代或Next-Gen)、第三代(或下一代)或第四代(或N3-Gen)测序技术来进行测序,包括但不限于焦磷酸测序,连接测序,单分子测序,合成序列(sequence-by-synthesis, SBS),大规模并行克隆,大规模并行单分子SBS,实时大规模并行单分子,实时大规模并行单分子纳米孔技术。Morozova和Marra在*Genomics*, 92:255 (2008)中对某些此类技术进行综述。

[0127] 在一些实施方式中,在测序之前、之后或同时,扩增核酸。核酸扩增技术的说明性非限制性实例包括但不限于聚合酶链反应(PCR),逆转录聚合酶链反应(RT-PCR),转录介导的扩增(TMA),连接酶链反应(LCR),链置换扩增(SDA)和基于核酸序列的扩增(NASBA)。本领域普通技术人员将认识到某些扩增技术(例如PCR)要求在扩增(例如RT-PCR)之前将RNA逆转录成DNA,而其他扩增技术直接扩增RNA(例如TMA和NASBA)。

[0128] 在一个实施方式中,本发明涉及根据如本文所述的前述实施方式中任一项的方法,其中所述候选肽用作疫苗。

[0129] 在一个具体的实施方式中,疫苗是基于肿瘤特异性抗原(TSA)的癌症疫苗。

[0130] 术语“疫苗接种”或等同物在本领域中是众所周知的。例如,术语疫苗接种可以理解为增加受试者对抗原的免疫反应并因此增加抵抗或克服疾病的能力的过程。“疫苗”应理解为是指用于产生用于预防和/或治疗疾病(例如癌症)的免疫力的组合物。因此,疫苗是包含抗原的药物且旨在用于人或动物中以通过疫苗接种产生特异性防御和保护性物质。术语“基于TSA的癌症疫苗”是指包含肿瘤特异性抗原的汇集样品的疫苗,例如,包含至少一种、至少两种、至少三种、至少四种、至少五种或更多种肿瘤特异性肽。为了使疫苗有效,包含抗原或表位的短线性肽必须在APC的表面上被MHC呈递。不同个体之间表达的MHC变体集差异非常大。

[0131] 复发性肿瘤衍生的突变可作为公共肿瘤特异性抗原,从而能够开发发适用于更广泛患者群体的基于TSA的癌症疫苗。因此,本发明的方法可用于鉴定含有某些MHC变体的患者并将这些常见/公共TSA有效地呈递到免疫系统。然而,许多肿瘤衍生的突变似乎衍生自患者特异性改变且任何那些改变都可能影响TSA肽与MHC的结合。因此,本发明的方法也可以用于鉴定个性化疫苗的患者特异性候选肽。

[0132] 此外,患者的肿瘤通常包含许多TSA,每个TSA仅可包含在肿瘤细胞的子集中。因此,在一些实施方式中,候选TSA的集合可以由衍生自不同肿瘤细胞集合的TSA组成。因此,开发癌症疫苗的重要步骤是从包含在患者肿瘤细胞中并优选在患者肿瘤细胞中良好表达的TSA候选物中选择与该患者中表达的MHC具有高亲和力的那些。为了最佳的免疫反应,疫苗中包含的一组TSA应进一步活化分别识别MHCII或MHCI-肽复合物的CD4+和CD8+T细胞两者。因此,本发明的方法可以用于鉴定与患者的特定MHCII和MHCI变体结合的TSA。

[0133] 在一个实施方式中,候选肽用于诱导对其包含的至少一个表位的免疫耐受。如本文所用,“免疫耐受性”是指宿主对一种或多种特定抗原的免疫反应性降低。抗原包含免疫决定簇/表位,在没有耐受性的情况下,它们会引起不想要的免疫反应。可以诱导免疫耐受以预防或改善移植排斥、自身免疫、过敏反应或其他不良免疫反应。不受理论的束缚,可以通过产生充当免疫反应的负调节剂的调节性T细胞来实现免疫耐受。不同类型的T细胞的平衡也可能取决于TCR和MHC肽复合物的相互作用。因此,本发明的方法可以用于选择适合于产生对该肽的免疫耐受性的MHC-肽复合物。实现免疫耐受的其他可能机制包括阻断特定T细胞的TCR和/或杀死特定T细胞。

[0134] 因此,在一个实施方式中,候选肽用于在MHC分子的背景下阻断TCR。“TCR的阻断”是指包括阻断天然TCR-MHC相互作用的肽-MHC复合物的任何试剂。为了预测MHC肽复合物的TCR阻断功效,该复合物的稳定性很重要。

[0135] 在另一个实施方式中,候选肽用于到细胞,特别是T细胞的MHC介导的毒素递送。

[0136] “MHC介导的毒素递送”是指将毒性剂(蛋白质或其他)与肽-MHC四聚体或其他MHC多聚体共价连接以将所述毒素递送到细胞,特别是T细胞,导致细胞死亡。本文公开的方法允许测量特定的MHC-肽对的稳定性并且因此可以用于开发用于阻断特异性TCR或杀死特异性T细胞,特别是用于体内施加的MHC-肽复合物。

[0137] 在又一个实施方式中,候选肽用于经由MHC-CAR将T细胞重定向到其他肽-MHC特异性T细胞。

[0138] 用由与CD247 (CD3zeta) 的胞内链连接的抗体组成的CAR将T细胞重定向到其他细胞已经被普遍使用并且已经在临床中使用。配备有由连接到CD247 (CD3zeta) 的胞内链的肽-MHC组成的CAR的T细胞,特别是细胞毒性T细胞或配备有MCR的T细胞可以使用这些受体以识别对这些肽-MHC复合物特异的T细胞并杀死它们(Jyothi等人,Nat. Biotech, 20, 1215-1220 (2002))。本文公开的方法允许测量特定的MHC-肽对 (MHC-peptide pair) 的稳定性,并且因此可以用于开发用在CAR或MCR中以重定向杀伤特定的T细胞的MHC-肽复合物,特别是用于体内施加的MHC-肽复合物。

[0139] 对于调节免疫反应的许多疗法,需要鉴定参与该免疫反应的TCR。存在本领域众所周知的不同方式,其允许鉴定那些TCR并依赖于TCR与MHC-肽复合物中包含的表位的相互作用。一个关键的先决条件是有关MHC-肽复合物在APC表面的呈递的信息。如果表位未被在体外实验测定中使用的APC的MHC呈递,可能无法鉴定与该表位结合的合适TCR。此外,如果在这样的测定中被APC呈递的MHC肽复合物或库中,肽中的一种优先呈递,这可能导致选择次优TCR。因此,对于优化的TCR识别和选择过程,重要的是克服与MHC-肽复合物呈递相关的不确定性。因此,本发明的方法可用于提供关于特定肽对特定MHC的亲力的定量信息并选择用于体外测定用于鉴定识别表位的TCR或用于富集表达这种TCR的T细胞的合适的复合物。

[0140] 在一个实施方式中,候选肽用于T细胞反应性测试。

[0141] 本文所用的术语“T细胞反应性”是指物质引起T细胞活化的能力。更具体地说,“T细胞反应性”是指肽诱导T细胞增殖、分化和/或细胞因子产生的能力。T细胞反应性测定是本领域众所周知的并且通常包括呈递MHC-肽复合物的APC和T细胞的共培养。那些测定可用于扩增用于细胞疗法的T细胞或用于鉴定与特定表位结合的TCR,例如用于适应性T细胞疗法或嵌合抗原受体 (CAR) T细胞疗法。T细胞反应性测试可进一步用于免疫原性测试。

[0142] 在某些实施方式中,候选肽用于免疫原性测试。如本文所用,术语“免疫原性测试”是指测量对生物治疗剂的潜在免疫反应。生物疗法可以引起可能影响其安全性和有效性的免疫反应。免疫原性测试用于监测和评估临床研究和临床前研究期间的体液(抗体)或细胞(T细胞)反应。通常,测试生物治疗剂的免疫原性涉及测量针对生物治疗剂特异性产生的抗体。用本发明的方法,可以鉴定由MHC分子,特别是对个体特异性的MHC有效地呈递的肽,并因此在体外程序中可能引起T细胞介导的免疫反应。这可以帮助提供化合物的总体免疫原性特征的更完整和准确的描述,且同时可以减轻患者或临床试验参与者的负担。

[0143] 在另一个实施方式中,本发明提供了一种MHC-肽复合物,其包含共价结合到MHC分子的 α 结构域或 β 结构域的细胞外部分的候选肽、MHC β 结构域的细胞外部分和异源分子的至少一个跨膜结构域。

[0144] 在一个实施方式中,本发明提供了根据前述实施方式的MHC-肽复合物,其中所述跨膜结构域是异源分子例如TCR α/β 、TCR γ/δ 、CD3 $\gamma/\delta/\epsilon/\zeta$ 、CD4或CD8 α/β 的跨膜结构域。

[0145] 在一个实施方式中,MHC分子是包含细胞外MHC II类 α 链、细胞外MHC II类 β 链和至少两个跨膜结构域的MHC II类分子。

[0146] 在另一个实施方式中,MHC分子是包含细胞外MHC I类 α 链、 β -2巨球蛋白和至少一个跨膜结构域的MHC I类分子。

[0147] 在又一个实施方式中,MHC分子是包含肽、 β -2-微球蛋白和细胞外MHC I类 α 链和至少一个跨膜结构域的融合体的MHC杂合分子。

[0148] 在一个具体的实施方式中,MHC I类分子的MHC α 链携带Y84A突变。

[0149] 在各种实施方式中,本发明提供了MHC-肽复合物,其中所述候选肽是携带个体肿瘤衍生的突变的肿瘤特异性肽。

[0150] 在一个具体的实施方式中,肿瘤衍生的突变是单核苷酸变异(SNV)。

[0151] 在另一个实施方式中,本发明提供了包含编码如前述实施方式中任一项所定义的MHC-肽复合物的核苷酸序列的重组构建体。

[0152] 在又一个实施方式中,本发明提供了包含与前述实施方式的重组构建体连接的启动子序列的表达盒。

[0153] 在另一个实施方式中,本发明提供了包含前述实施方式的表达盒的载体。

[0154] 在另一个实施方式中,本发明提供了包含本发明的MHC-肽复合物的细胞。

[0155] 在一个实施方式中,本发明涉及包含MHC II类肽复合物的根据前述实施方式的细胞,其中所述细胞是缺乏MHC II类肽负载机构的哺乳动物细胞。

[0156] 在另一个实施方式中,所述细胞包含MHC I类肽复合物,其中所述细胞是缺乏功能性TAP1、TAP2和/或 β -2-微球蛋白基因的哺乳动物细胞。

[0157] 在又一个实施方式中,所述细胞包含MHC I类肽复合物,其中所述细胞是具有缺陷或缺失的TAP1、TAP2和/或 β -2-微球蛋白基因的T细胞杂交瘤。

[0158] 本发明还包括用于确定候选肽的MHC结合亲和力的方法,所述方法包括在报告细胞系中表达包含共价结合的候选肽的重组MHC-肽复合物,和检测在报告细胞的表面上呈递MHC-肽复合物的报告细胞,包括对这种呈递/表达水平的测量。报告细胞系可以是哺乳动物细胞系。在一个实施方式中,所使用的哺乳动物细胞系相对于天然细胞系显示改变的性质,例如它携带酶缺失、酶和/或MHC分子的突变和/或过表达。

[0159] 在一个实施方式中,本发明涉及根据前述实施方式的方法,所述方法包括:

[0160] (i) 产生包含候选肽的库,所述候选肽克隆在连接到跨膜区的重组MHC α 结构域或 β 结构域上游;

[0161] (ii) 将这种库与相应的MHC α 结构域或 β 结构域一起转导到合适的报告细胞系中;

[0162] (iii) 检测在其细胞表面上呈递一种或多种MHC-肽复合物的细胞;

[0163] (iv) 确定这种呈递/表达的水平。

[0164] 本发明的方法也可以应用于高通量筛选。高通量筛选 (HTS) 技术通常用于定义大规模的细胞快速处理。在某些实施方式中,可以用不同的候选肽库并行运行多个筛选。高通量筛选系统是可商购的且通常自动化整个程序,包括所有样品和试剂移液,液体分配,定时孵育以及适合于测定的检测器中的微孔板的最终读数。这些可配置的系统提供高通量和快速启动以及高度的灵活性和定制化。

[0165] 本文所用的术语“肽”是指至少两个共价连接的氨基酸。通常,MHC I类肽在长度上为8或9个氨基酸,但长度可变化为7至10个氨基酸。MHC II类肽在长度上可以为从15个到24个氨基酸不等。任选地,它们在长度上可以为从10个氨基酸到30个氨基酸不等或更多个氨基酸。

[0166] 如本文所用,肽与MHC的结合或“结合亲和力”或肽与MHC的相互作用是指在肽结合槽或裂口中发生的肽-MHC相互作用。这种结合或相互作用也可以自然发生。

[0167] 如本文所用,肽与MHC的“共价结合”或“束缚”是指重组MHC-肽复合物,其中所述共价键通过基因工程产生。

[0168] 如本文所用,MHC-肽复合物是指其中肽与MHC结合的复合物。这种结合可以经由肽结合槽或裂口和/或通过肽与MHC的共价结合发生。

[0169] 在如本文所用的重组MHC-肽复合物中,候选肽总是与MHC共价结合,但是该肽可以有效结合到MHC裂口或不结合到MHC裂口。

[0170] MHC-肽复合物的稳定性是指在肽结合槽中发生的肽-MHC相互作用的稳定性,它与所述MHC-肽复合物的表面表达相关。它不是指共价肽-MHC键的稳定性。

[0171] 如本文所用,术语“抗原”是指能够引发对其自身或其部分的免疫反应的肽或蛋白质的全部或部分。这种免疫反应可能涉及抗体的产生,或特定免疫学上活性的细胞的活化,或两者都涉及。

[0172] 如本文所用,术语“肽装载机构”是指用肽装载MHC分子所需的所有需要的组分。例如,MHC I类肽装载机构几乎存在于所有细胞中且其中包括TAP转运蛋白、胰蛋白酶和钙网蛋白。MHC II类肽装载机构仅在APC中持续存在,但可能在其他细胞(如T细胞)中被诱导。

[0173] 如本文所用,术语“跨膜结构域”定义为能够跨越细胞膜的主要疏水的氨基酸序列。术语“跨膜区”在本文中用作“跨膜结构域”的同义词。

[0174] 如本文所用,术语“库”或等同物是指多个分子。在MHC-肽复合物的情况下,库提供了结构上足够多样的肽群体以实现概率上足够范围的细胞反应,以提供一个或多个表现出所需反应的细胞。在一个优选的实施方式中,在本发明的方法中同时分析至少10个,优选至少50个,更优选至少200个且最优选至少1000个肽。可以设计库以最大程度地扩大库的大小和多样性。

[0175] 当涉及例如细胞或核酸、蛋白质或载体时,术语“重组”表示该细胞、核酸、蛋白质

或载体已通过引入异源核酸或蛋白质或天然核酸或蛋白质的改变被修饰,或该细胞衍生自如此修饰的细胞。因此,例如,重组细胞表达在细胞的天然(非重组)形式内未发现的基因或表达否则将以异常方式表达、表达不足或根本不表达的天然基因。通常,重组核酸最初例如使用聚合酶和核酸内切酶,以自然中通常未发现的形式,通过操纵核酸在体外形成。以这种方式,实现不同序列的可操作连接。因此,出于本发明的目的,线性形式的分离的核酸或通过连接通常不连接的DNA分子体外形成的表达载体都被认为是重组的。应当理解,一旦制备重组核酸并将其重新引入宿主细胞或生物体中,它将非重组地复制,即使用宿主细胞的体内细胞机构而不是体外操作;然而,这种核酸一旦被重组产生,尽管随后非重组地复制,就本发明的目的而言仍被认为是重组的。类似地,重组蛋白,例如本发明的MHC-肽复合物,是使用重组技术(即通过如上所述表达重组核酸)制备的蛋白质。

[0176] 当参考核酸的部分使用时,术语“异源的”表示该核酸包含两个或更多个在自然中通常彼此之间没有相同关系的亚序列。例如,所述核酸通常是重组产生的,具有例如来自不相关基因的两个或更多个序列,所述不相关基因被排列以制备新的功能核酸,例如来自一个来源的启动子和来自另一个来源的编码区。类似地,异源蛋白通常是指在自然中彼此之间没有相同关系的两个或更多个子序列(例如,融合蛋白)。

[0177] 如本文所用,术语“癌”被定义为特征在于异常细胞的快速且不受控制地生长的疾病。癌细胞可以局部扩散或通过血液和淋巴系统扩散到身体的其他部位。各种癌症的实例包括但不限于乳腺癌、前列腺癌、卵巢癌、子宫颈癌、皮肤癌、胰腺癌、结直肠癌、肾癌、肝癌、脑癌、淋巴瘤、白血病、肺癌等。

[0178] 此外,在权利要求中,词语“包括”不排除其他元件或步骤,并且除非上下文另外明确指出,否则不定冠词(“a”、“an”)和定冠词(“该”)包括复数对象。

[0179] 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本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。尽管与本文描述的那些类似或等同的方法和材料可以用于本发明的实践或测试中,下面描述了合适的方法和材料。在有冲突的情况下,以包括定义的本说明书为准。另外,材料、方法和实施例仅是说明性的,并不意图是限制性的。

[0180] 通过以下实施例进一步说明本发明的具体实施方式。然而,应当理解,本发明不限于这些实施例的具体细节。以下实施例用以说明本发明的优选实施方式。本领域技术人员应该理解,以下实施例中公开的技术代表了本发明中用于在本发明的实践中很好地起作用的技术,且因此可以认为构成其实施的优选方式。然而,根据本公开,本领域技术人员应当理解,可以在所公开的具体实施方式中进行许多改变,并且在不脱离本发明的精神和范围的情况下仍可获得相似或类似的结果。

[0181] 图1示出MHC-TCR融合分子(MCR2)和天然MHC II类的结构。

[0182] 图2制备编码携带人MHC分子(HLA-DRB1_4, DRB1_15和DRB5_1)的 α 和 β 链的MCR的构建体,所述人MHC分子具有共价连接的流感基质蛋白1肽MP1₁₀₃₋₁₂₀ (a)、MP1₆₂₋₇₂ (b)或流感cDNA衍生的肽库(c)。在转导MHC II类缺陷细胞系后,使用抗-HLA-DR APC抗体通过FACS测量MCR表面表达。图表显示含有HLA-DRB1_4-MP1₁₀₃₋₁₂₀复合物的MCR的有效表面表达,而含有DRB1_15-MP1₁₀₃₋₁₂₀ (a)的MCR仅在很低的水平被检测到。我们几乎没有检测到包含DRB5_1-MP1₁₀₃₋₁₂₀ (a)的MCR,但确实检测到包含DRB5_1-MP1₆₂₋₇₂ (b)的MCR的有效表达。重要的是,当将流感cDNA衍生的肽库束缚到HLA DRB 1_4或HLA DRB 1_15时,观察到类似水平的MCR表面

表达(c)。“UI”是指未感染的细胞。

[0183] 图3显示被抗-HLA-DR和抗-CD3e染色的用含有携带不同肽(pep1, pep2和pep3)的各种HLA β 链的MCR转导的细胞的示例分析。双阳性染色表明两种抗体在检测MCR表面表达方面都同样有效,群体的对角线形状表明MCR与CD3链的有效缀合方。

[0184] 图4显示不具有共价连接的肽的MHC和MCR分子的低表面表达。用HLA-DRB1.4(左)或MCR2-DRB1.4构建体(右)转导的细胞用 α HLA-DR(顶部)或 α CD3(底部)染色。

[0185] 图5显示使用免疫表位数据库(IEDB)分析资源的MP1₁₀₃₋₁₂₀的肽结合预测。

[0186] 图6显示用含有各种HLA-DRB链的MCR转导的细胞的FACS分析,这些HLA-DRB链携带包含核心表位MP1₁₀₇₋₁₁₇的不同肽。抗-CD3e或抗-HLA-DR PE抗体用于测量MCR表面表达。该图表显示核心MP1₁₀₇₋₁₁₇肽只能在HLA-DRB1_4上有效地呈递,而不能被HLA-DRB1_15和HLA-DRB5_1呈递,并且侧翼肽区域不发挥主要作用。通过PCR和测序证实所有样品中MCR的存在(未显示)。

[0187] 图7将束缚到小鼠MCR的 α 链的随机肽库转导到报告细胞,分选在表面表达MCR的单个细胞,并确定示例克隆的序列。该图代表携带这样的肽的MCR的示例性克隆的FACS分析,所述克隆用抗小鼠MHC II类和相应的肽序列染色。

[0188] 实施例1-含有流感基质蛋白1肽的MCR的表面差异表达

[0189] 发明人构建了由与MHC的天然细胞外结构域连接的肽组成的MHC-TCR融合蛋白(MCR),所述MHC的天然细胞外结构域与TCR的跨膜单元融合(图1;也参见WO 2016/097334 A1)。具体地,已经产生编码携带人MHC分子(HLA-DRB1_4, DRB1_15和DRB5_1)的 α 和 β 链的MCR的构建体,其中 β 链携带共价连接的流感基质蛋白1肽(MP1₁₀₃₋₁₂₀)、MP1₆₂₋₇₂或流感cDNA衍生的肽的库。含有逆转录病毒的上清液根据标准方案在亲嗜性(ecotropic)Phoenix包装细胞系中产生并用于感染报告细胞系和分选的细胞。在转导MHC II类缺陷细胞系(T细胞杂交瘤)后,抗-HLA-DR APC抗体被用于通过FACS测量MCR表面表达(图2)。包含束缚到HLA DRB 1_4的氨基酸103-120的MP1衍生的肽可导致MCR在哺乳动物报告细胞系表面上有效表达。束缚到HLA DRB 1_15的同一肽导致极低的MCR表达并且在HLA DRB 5_1的情况下完全不表达(图2a)。然而,另一种包含氨基酸62-72的MP1衍生的肽可导致含有HLA DRB 5-1的MCR的有效表达,但其他测试的HLA不行(图2b)。重要的是,在将流感cDNA衍生的肽库束缚到HLA DRB 1_4或HLA DRB 1_15时,观察到类似的表面表达水平,表明HLA 1_4和HLA 1_15均可作为MCR的部分在细胞表面上高效表达(图2c)。从公开的研究(Schmid等人,Immunity 2007)已知包含氨基酸103-117和107-121的MP1肽被HLA DRB 1-4有效呈递,这表明只有共价连接的肽有效地结合到MHC肽结合槽,MHC复合物对于可以通过抗体染色来检测的表面表达足够稳定。图6进一步显示不管侧翼肽区域,核心MP1₁₀₇₋₁₁₇肽仅可以在HLA-DRB1_4上有效地呈递。

[0190] 实施例2-用不同抗体检测MCR表面表达

[0191] 使用抗-HLA-DR和抗-CD3e进行抗体染色,检测含有携带不同肽(pep1, pep2和pep3)的各种HLA β 链的MCR的表面表达,并在BDFortessa流式细胞计上分析(图3)。双阳性染色表明两种抗体均可有效检测MCR表面表达并且抗-CD3e染色可普遍用于检测携带不同HLA等位基因的MCR。群体的对角线形状进一步表明MCR与CD3链的有效缀合。

[0192] 实施例3-MP1₁₀₃₋₁₂₀的MHC结合亲和力预测

[0193] 使用免疫表位数据库(IEDB)分析资源来预测对MP1₁₀₃₋₁₂₀的MHC结合亲和力(Wang,

P.等人A Systematic Assessment of MHC Class II Peptide Binding Predictions and Evaluation of a Consensus Approach. *PLoS Comput Biol* 4, e1000048 (2008); Wang, P. 等人 Peptide binding predictions for HLA DR, DP and DQ molecules. *BMC Bioinformatics* 11, 568 (2010)。对于MP1₁₀₃₋₁₂₁, 本发明的方法表明HLA DRB 4_1最佳结合并导致HLA的高表面表达, HLA DRB 1_15适度结合并导致低的表面表达, 且HLA DRB 5_1完全不结合。然而, 使用IEDB分析资源, 肽结合预测分析表明HLA DRB 5_1是最佳的MP1₁₀₃₋₁₂₀结合剂(图5)。

[0194] 实施例4-检测含有与 α 链融合的肽的MCR的表面表达

[0195] 发明人构建了携带束缚到 α 链的随机肽的小鼠MCR的库。在转导MHC II类缺陷细胞系(T细胞杂交瘤)后, 抗MHC抗体被用于通过FACS测量MCR表面表达(图7)。检测到携带许多不同肽的MCR的有效表达, 这表明与MCR的 α 链连接的肽也可以稳定MHC复合物, 足以进行表面表达。

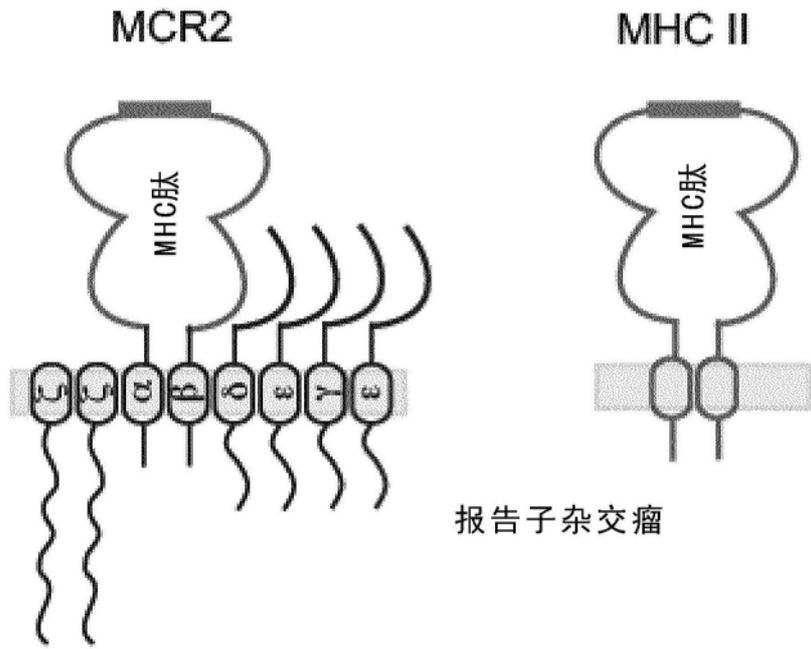


图1

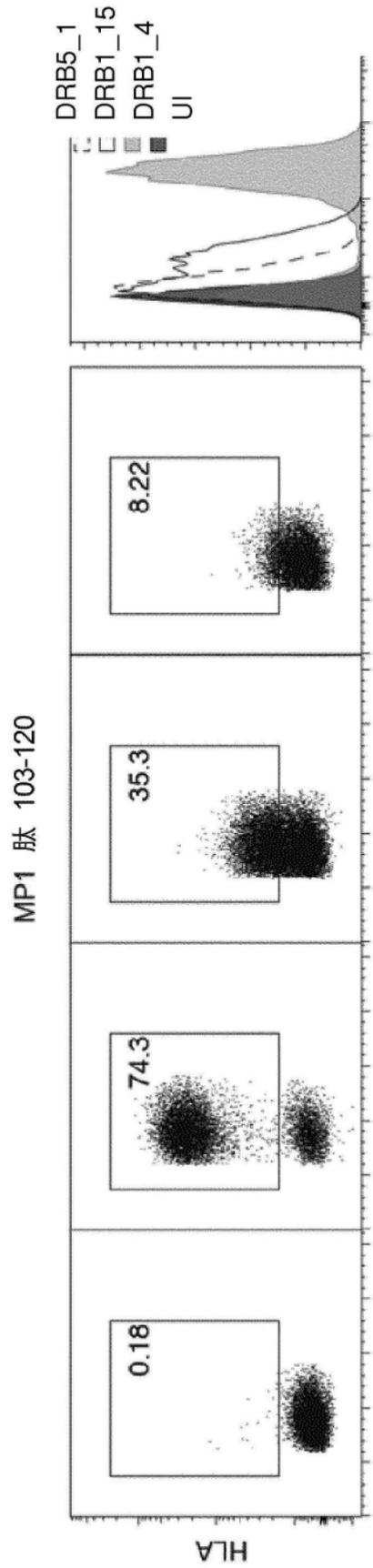


图2a

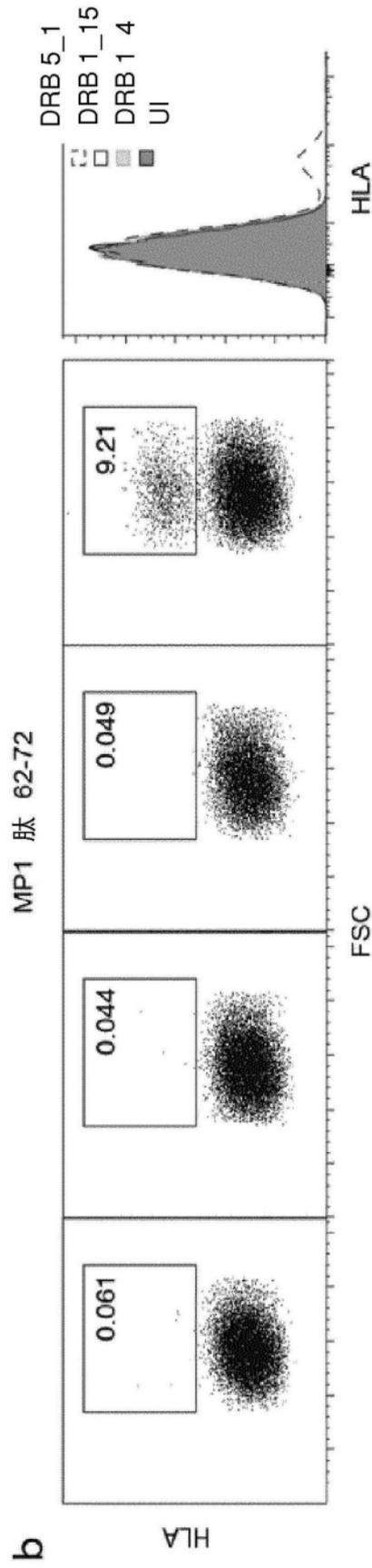


图2b

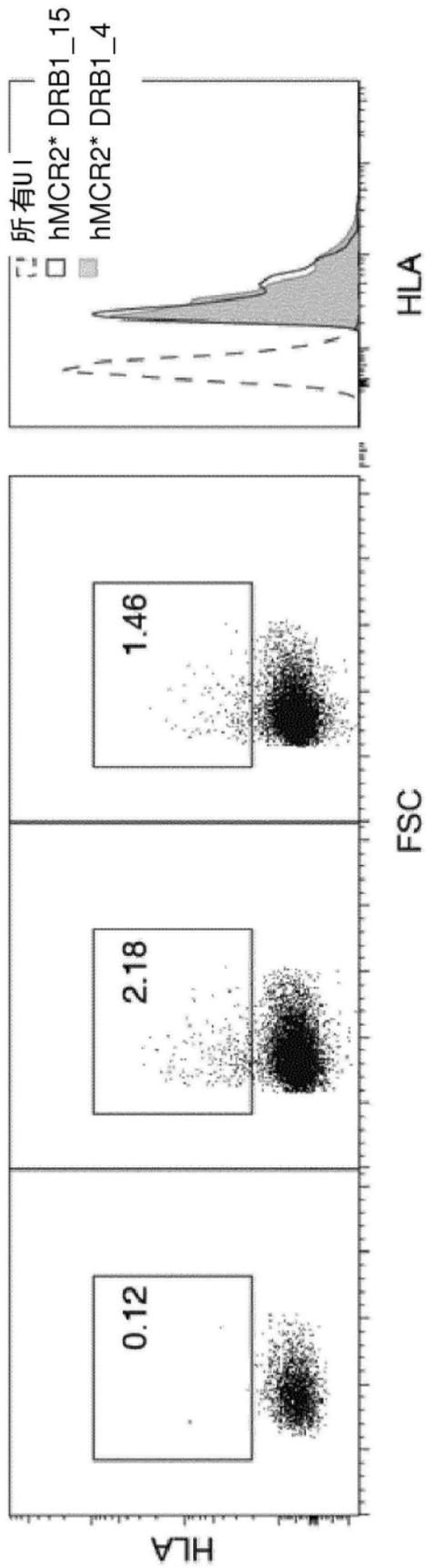


图2c

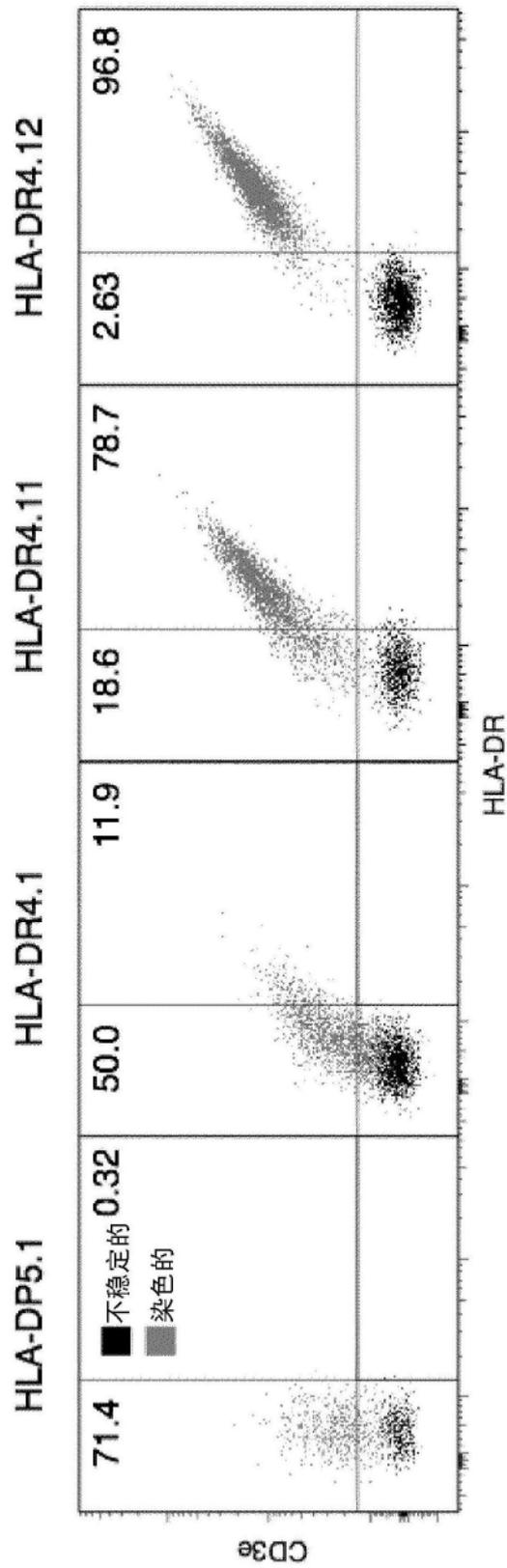


图3

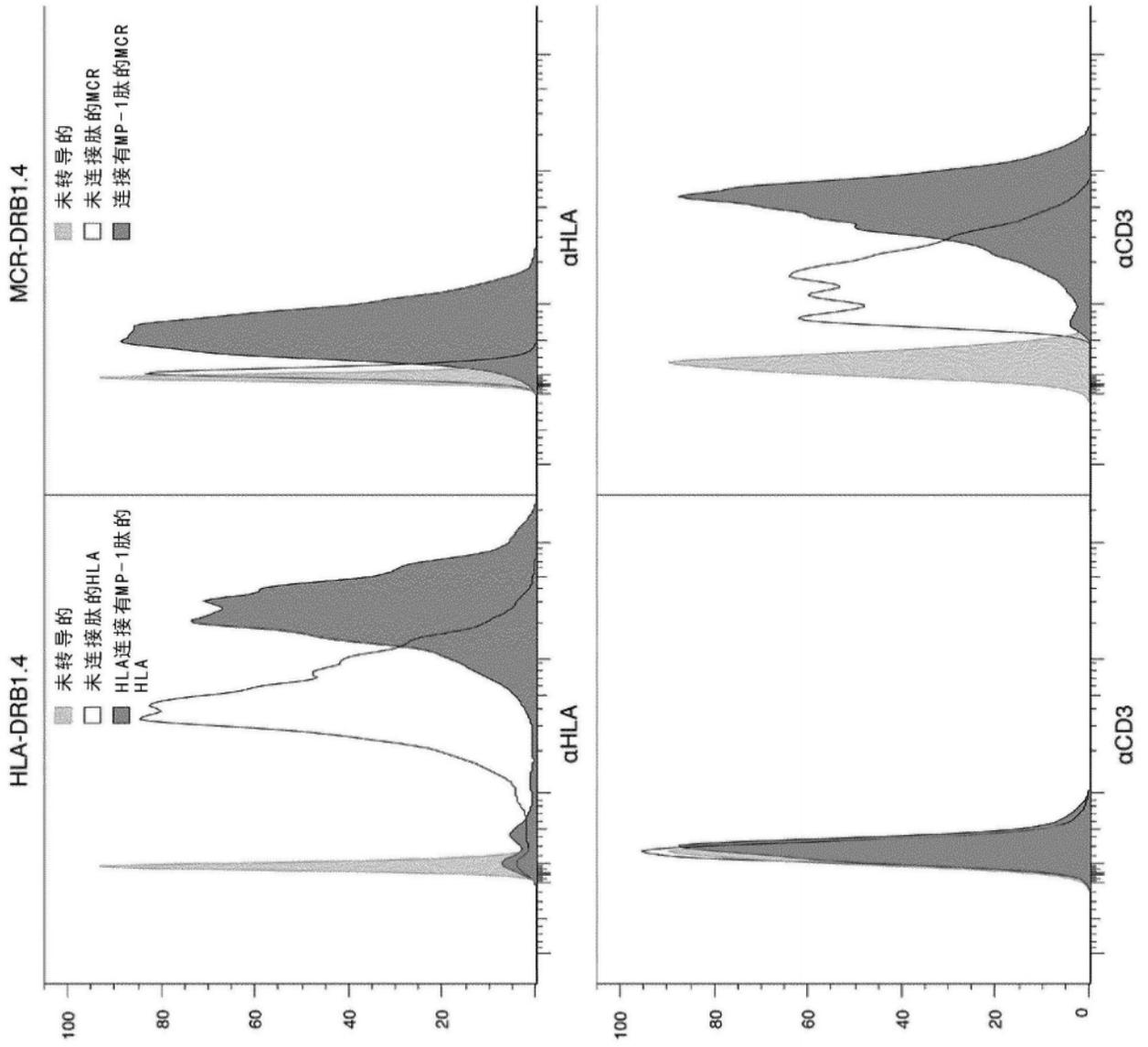


图4

MHC-I I 结合预测结果

输入序列

#	名称	序列
1	IEDB表位229773	LKREITFHGAKEISLSYS

预测方法：IEDB推荐的 | 低百分比等级= 好的结合剂

引证
选中来扩展结果：

等位基因	#	起始	结束	肽	所用方法	百分比等级
HLA-DRB5*01:01	1	1	15	LKREITFHGAKEISL	共有序列 (smmm/nn/sturniolo)	5.79
HLA-DRB5*01:01	1	2	16	KREITFHGAKEISLS	共有序列 (smmm/nn/sturniolo)	5.79
HLA-DRB5*01:01	1	3	17	REITFHGAKEISLSY	共有序列 (smmm/nn/sturniolo)	5.79
HLA-DRB5*01:01	1	4	18	EITFHGAKEISLSYS	共有序列 (smmm/nn/sturniolo)	5.79
HLA-DRB1*04:01	1	1	15	LKREITFHGAKEISL	共有序列 (smmm/nn/sturniolo)	7.69
HLA-DRB1*04:01	1	4	18	EITFHGAKEISLSYS	共有序列 (smmm/nn/sturniolo)	10.18
HLA-DRB1*04:01	1	3	17	REITFHGAKEISLSY	共有序列 (smmm/nn/sturniolo)	10.30
HLA-DRB1*04:01	1	2	16	KREITFHGAKEISLS	共有序列 (smmm/nn/sturniolo)	10.96
HLA-DRB1*15:01	1	1	15	LKREITFHGAKEISL	共有序列 (smmm/nn/sturniolo)	15.89
HLA-DRB1*15:01	1	2	16	KREITFHGAKEISLS	共有序列 (smmm/nn/sturniolo)	19.31
HLA-DRB1*15:01	1	3	17	REITFHGAKEISLSY	共有序列 (smmm/nn/sturniolo)	20.74
HLA-DRB1*15:01	1	4	18	EITFHGAKEISLSYS	共有序列 (smmm/nn/sturniolo)	27.88

图5

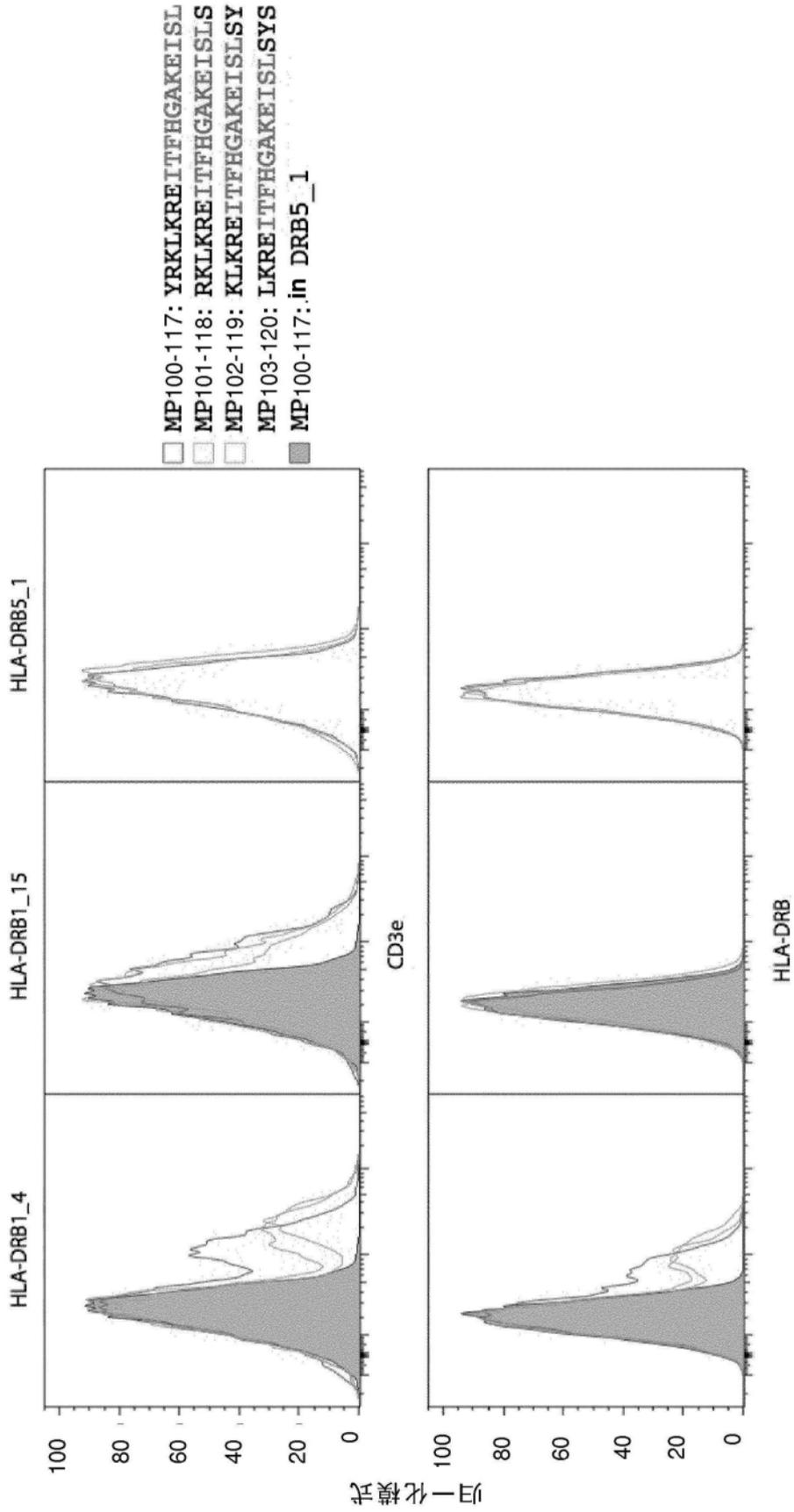


图6

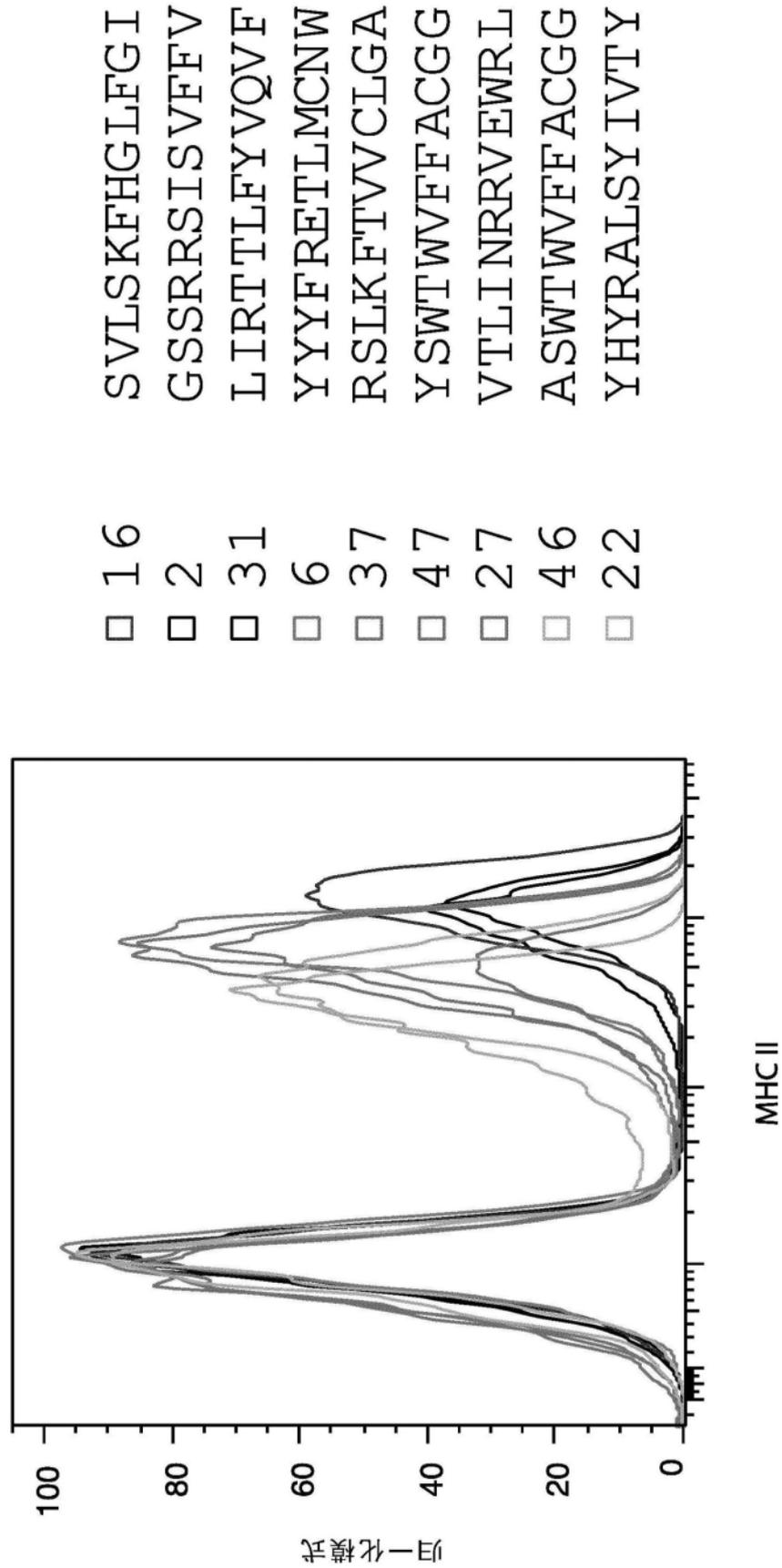


图7