



(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 105899530 B

(45)授权公告日 2020.05.08

(21)申请号 201480071635.9

菲利普·D·格林伯格

(22)申请日 2014.11.21

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 105899530 A

有限责任公司 11204

(43)申请公布日 2016.08.24

代理人 王达佐 洪欣

(30)优先权数据

(51)Int.Cl.

61/907,887 2013.11.22 US

C07K 14/725(2006.01)

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2016.06.29

A61K 38/17(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

A61P 35/00(2006.01)

PCT/US2014/066903 2014.11.21

(56)对比文件

(87)PCT国际申请的公布数据

US 2007191496 A1,2007.08.16,

W02015/077615 EN 2015.05.28

US 2007191496 A1,2007.08.16,

(73)专利权人 伊利诺伊州大学理事会

CN 101389652 B,2013.05.29,

地址 美国伊利诺伊州

CN 101389652 A,2009.03.18,

专利权人 弗雷德哈钦森癌症研究中心

CN 103249430 A,2013.08.14,

(72)发明人 希娜·N·史密斯

Helmut W H G Kessels et al.《Changing
T cell specificity by retroviral T cell
receptor display》.《PNAS》.2000,第96卷(第26
期),第14578-14583页.

丹尼尔·T·哈里斯

审查员 黄炎

大卫·M·克兰泽

权利要求书1页 说明书39页

托马斯·M·施密特

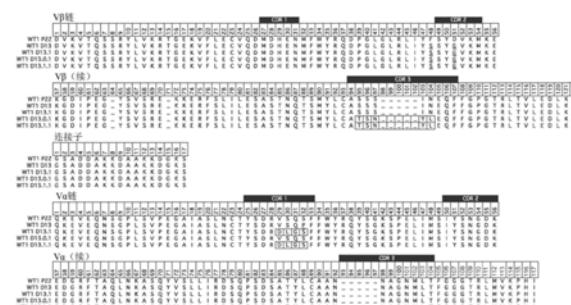
序列表13页 附图13页

(54)发明名称

工程化的高亲和力人类T细胞受体

(57)摘要

提供了对于WT1抗原具有特异性的T细胞受体(TCR)。所述TCR包括如下更高亲和力的TCR,其通过产生单链形式的突变TCR库、接着针对酵母表面上提高的稳定性和亲和力进行选择(即定向进化)而工程化。在实施例中,所述TCR可以按可溶形式用于体内靶向递送,或在过继T细胞环境下以基因形式引入T细胞中。



1. 一种经修饰的T细胞受体或其抗原结合片段, 其包含V α 和V β , 其中所述V α 和V β 分别包含SEQ ID NO: 4和3所示的氨基酸序列, 或所述V α 和V β 分别包含SEQ ID NO: 2和3所示的氨基酸序列, 或所述V α 和V β 分别包含SEQ ID NO: 4和21所示的氨基酸序列, 或所述V α 和V β 分别包含SEQ ID NO: 22和21所示的氨基酸序列。
2. 根据权利要求1所述的经修饰的T细胞受体, 其中所述经修饰的T细胞受体包含具有SEQ ID NO:5所示的氨基酸序列的单链T细胞受体。
3. 根据权利要求1所述的经修饰的T细胞受体, 其以纳摩尔或更高亲和力结合到肽WT1与HLA-A2分子的复合物, 其中所述经修饰的T细胞受体以小于或等于 10^{-6} M的K_D值结合所述复合物。
4. 根据权利要求1所述的经修饰的T细胞受体, 其呈可溶形式。
5. 一种靶向表达WT1抗原的癌细胞的治疗剂, 其中所述治疗剂包含根据权利要求3所述的经修饰的T细胞受体。
6. 一种靶向表达WT1抗原的癌细胞的治疗剂, 其中所述治疗剂包含表达根据权利要求1所述的经修饰的T细胞受体的人类T细胞。
7. 权利要求5所述的治疗剂在制备用于治疗患有表达WT1抗原的癌症的受试者的药物中的用途。
8. 权利要求6所述的治疗剂在制备用于治疗患有表达WT1抗原的癌症的受试者的药物中的用途。

工程化的高亲和力人类T细胞受体

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本申请根据35U.S.C. §119 (e) 要求2013年11月22日提交的美国临时专利申请第61/907,887号的权益,并且此临时申请以全文引用的方式并入本文中。

[0003] 关于联邦资助的研究或开发的声明

[0004] 本发明在美国政府支持下在由国家卫生研究院 (National Institutes of Health) 授予的拨款号R01GM55767和T32GM070421下作出。美国政府拥有本发明的某些权利。

[0005] 关于序列表的声明

[0006] 与本申请相关的序列表以文本格式代替纸本拷贝提供,并且在此以引用的方式并入本说明书中。含有序列表的文本文件的名称是IMMU_003_02W0_ST25.txt。文本文件18KB, 创建于2014年11月21日,并且以电子方式经由EFS-Web提交。

技术领域

[0007] 本发明涉及针对维尔姆斯氏肿瘤 (Wilms' tumor) 抗原 (WT1) 的T细胞受体 (TCR), 包括通过体外技术工程化的高亲和力TCR; 以及制备经修饰的TCR和单链TCR的方法; 和所述TCR用于治疗、诊断和成像方法的相应用途。

背景技术

[0008] T细胞受体 (TCR) 和抗体是已经进化以识别不同类别的抗原 (配位体) 的分子 ((Murphy (2012) , xix, 第868页))。TCR是负责识别在抗原呈递细胞 (APC) 或任何有核细胞 (例如, 体内的除红细胞外的所有人类细胞) 的表面上的主要组织相容性复合物 (MHC) 的产物情境下呈递的抗原肽的抗原特异性分子。相比之下, 抗体典型地识别可溶或细胞表面抗原, 并且不需要通过MHC呈递抗原。此系统经由其TCR赋予T细胞以识别由细胞 (包括病毒蛋白质) 表达的细胞内抗原的整个阵列的潜在能力, 所述细胞内抗原在细胞内加工为短肽, 结合到细胞内MHC分子并且以肽-MHC复合物 (pepMHC) 形式递送到表面。此系统允许几乎任何外源蛋白质 (例如, 突变癌症抗原或病毒蛋白质) 或异常表达蛋白质提供T细胞的靶标 (综述于 (Davis和Bjorkman (1988) 《自然 (Nature) 》, 334, 395-402; Davis等人 (1998) 《免疫学年鉴 (Annu Rev Immunol) 》, 16, 523-544; Murphy (2012) , xix, 第868页) 中)。

[0009] TCR与pepMHC的相互作用可以驱动T细胞成为各种活化状态, 取决于结合的亲和力 (或解离速率)。TCR识别过程通过提供多样TCR谱系而允许T细胞在正常健康细胞与例如已经由病毒或恶性肿瘤变得转化的细胞之间进行区别, 其中一种或多种TCR针对结合到MHC分子的外源肽以高于用于刺激T细胞活性的阈值的结合亲和力存在的概率很高 (Manning和Kranz (1999) 《今日免疫学 (Immunology Today) 》, 20, 417-422)。

[0010] 迄今为止, 从通过体外培养鉴别人类或小鼠T细胞克隆分离的野生型TCR已经显示具有相对低结合亲和力 ($K_d=1-300\mu M$) ((Davis等人 (1998) 《免疫学年鉴》, 16, 523-544)。对此的部分解释似乎是, 胸腺中出现的T细胞在自身-pepMHC配位体上被负选择 (耐受性诱

导),使得缺失具有过高亲和力的T细胞(Starr等人(2003)《免疫学年鉴》,21,139-76)。为了补偿这些相对低亲和力,T细胞已经进化共同受体系统,其中细胞表面分子CD4和CD8结合到MHC分子(分别II类和I类)并且与TCR在介导信号传导活性方面协同作用。CD8在此过程中特别有效,使得具有极低亲和力(例如, $K_d=300\mu M$)的TCR介导有效抗原特异性活性。

[0011] 在体外,定向进化已经用以产生对于特定pepMHC具有较高亲和力的TCR。三种已经使用的不同呈现方法是酵母呈现(Holler等人(2003)《自然·免疫学(Nat Immunol)》,4,55-62;Holler等人(2000)《美国国家科学院院刊(Proc Natl Acad Sci U S A)》,97,5387-92)、噬菌体呈现(Li等人(2005)《自然·生物技术(Nat Biotechnol)》,23,349-54)和T细胞呈现(Chervin等人(2008)《免疫学方法杂志(J Immunol Methods)》,339,175-84)。在所有三种方法中,过程包括使展现野生型TCR的正常低亲和力的TCR工程化或修饰其,使得TCR的突变体的亲和力对于同源pepMHC(T细胞特异性针对的初始抗原)具有增加的亲和力。因此,野生型TCR被用作制备一个或多个CDR中的诱变库的模板,并且具有较高亲和力的突变体通过结合到同源肽-MHC抗原而被选择。

[0012] 在本发明中,公开了通过酵母呈现而工程化的对维尔姆斯氏肿瘤-1(WT1)具有特异性的野生型T细胞受体和高亲和力T细胞受体。WT1是已经被描述为充当肿瘤抑制因子和致癌基因两者的转录因子。WT1以高水平表达于白血病以及多种实体肿瘤中(Sugiyama等人(2010)《日本临床肿瘤学杂志(Japanese Journal of Clinical Oncology)》40(5)377-387)。其已经成为疫苗工作,和使用具有野生型T细胞受体的T细胞的各种过继T细胞方法的靶标。

[0013] WT1在由国家癌症研究所(National Cancer Institute)所列的前75种癌症抗原的优先排序清单中排名第1(Cheever等人(2009)《临床癌症研究(Clin Cancer Res)》,15,5323-5337)。因此,需要鉴别特异性靶向此癌症抗原的药剂,例如,治疗剂。本发明提供了体外工程化的较高亲和力TCR,其可以例如以可溶形式用于体内靶向递送或在过继T细胞环境下以基因形式引入T细胞中。

发明内容

[0014] 本发明涉及一种针对WT1抗原的野生型T细胞受体,和以提高的亲和力结合到所述WT1抗原的体外工程化T细胞受体(TCR)。更确切地说,本发明涉及所述野生型T细胞受体的序列以及通过酵母、噬菌体或哺乳动物细胞的表面上的库的呈现而选择的那些稳定化和亲和力突变;选自这些库的用于以增加的亲和力结合到抗原的TCR蛋白质;和体外选择的TCR衍生物用于治疗、诊断或成像应用的用途。

[0015] 本发明的一个方面涉及一种T细胞受体或其抗原结合片段,其包含来源于T细胞克隆的V α 和V β ,其中所述T细胞受体结合到肽WT1与HLA-A2分子的复合物,并且其中所述T细胞受体包含SEQ ID NO:1中阐述的V β 氨基酸序列和SEQ ID NO:2中阐述的V α 氨基酸序列。在一个实施例中,一种宿主细胞,其表达所述T细胞受体。在另一实施例中,所述宿主细胞是人类T细胞。

[0016] 本发明的一个方面涉及一种经修饰的T细胞受体或其抗原结合片段,其包含来源于野生型T细胞受体的V α 和V β ,其中所述V α 、所述V β 或这两者相对于所述野生型T细胞受体包含一个或多个互补决定区(CDR)中的突变,其中所述经修饰的T细胞受体结合到称为WT1/

HLA-A2的肽/MHC抗原(结合到被称为HLA-A2的MHC产物的WT1肽RMFPNAPYL (SEQ ID NO:6))。

[0017] 在一个实施例中,所述T细胞受体包括包含与SEQ ID NO:1中阐述的V β 氨基酸序列具有至少80%一致性的氨基酸序列的V β ,其中所述T细胞受体通过结合到WT1/HLA-A2介导活性。

[0018] 在另一实施例中,所述经修饰的T细胞受体包括包含与SEQ ID NO:3中阐述的V β 氨基酸序列具有至少80%一致性的氨基酸序列的经修饰的V β ,其中所述经修饰的T细胞受体以10⁶M更高的亲和力(K_A值)结合到WT1/HLA-A2。

[0019] 在另一实施例中,所述T细胞受体包括包含与SEQ ID NO:2中阐述的V α 氨基酸序列具有至少80%一致性的氨基酸序列的V α ,其中所述T细胞受体通过结合到WT1/HLA-A2介导活性。

[0020] 在另一实施例中,所述经修饰的T细胞受体包括包含与SEQ ID NO:4中阐述的V α 氨基酸序列具有至少80%一致性的氨基酸序列的经修饰的V α ,其中所述经修饰的T细胞受体以10⁶M更高的亲和力(K_A值)结合到WT1/HLA-A2。

[0021] 在一个实施例中,所述T细胞受体是包含SEQ ID NO:5中阐述的氨基酸序列的单链T细胞受体。

[0022] 在一个实施例中,所述T细胞受体含有选自SEQ ID NO:3中阐述的氨基酸序列的S95T、S97N、I103Y、N104L的至少一个CDR3 β 突变。

[0023] 在另一实施例中,所述T细胞受体含有选自SEQ ID NO:4中阐述的氨基酸序列的V29D、S30L和Q31G的至少一个CDR1 α 突变。

[0024] 在一个实施例中,所述经修饰的T细胞受体提供体外选择突变T细胞受体的酵母呈现库而产生。

[0025] 在另一实施例中,所述经修饰的T细胞受体表达为结合到其靶抗原的可溶蛋白质。

[0026] 在另一实施例中,所述野生型或所述经修饰的T细胞受体表达于用于过继T细胞疗法的T细胞中。

[0027] 本发明的一个方面提供了一种靶向表达WT1抗原的癌细胞的治疗剂,其中所述治疗剂包含本文所述的经修饰的T细胞受体。在一个实施例中,一种靶向表达WT1抗原的癌细胞的治疗剂,其中所述治疗剂包含表达本文所述的经修饰的T细胞受体的人类T细胞。一个实施例提供了一种治疗患有表达WT1抗原的癌症的受试者的方法,其包含投与本文所述的治疗剂。

附图说明

[0028] 图1展示了来自本发明研究的各种WT1/HLA-A2特异性T细胞受体的经比对的氨基酸序列。WT1P22表示从通过WT1/HLA-A2刺激的人类T细胞克隆分离的野生型序列。其它TCR序列通过酵母呈现方法分离以获得更大表面水平和更高亲和力。CDR3 β 和CDR1 α 内的在矩形内突出显示的氨基酸残基是通过酵母呈现而分离以获得更高亲和力的TCR中的突变。关于V β 链展示的序列从上到下对应于SEQ ID NO:1、21、21、3和3。所描绘的连接序列是SEQ ID NO:8。关于V α 链展示的序列从上到下对应于SEQ ID NO:2、22、4、2和4。

[0029] 图2A是展示TCR:pepMHC复合物(A6;PDB:1A07)的侧视图的3维图。指示 α 链和 β 链的

可变(V)和恒定(C)区。所展示的结构不包括TCR的C α 区。HLA-A2(α1、α2、α3和β2m)以灰色展示，并且Tax肽(LLFGYPVYV, SEQ ID NO:7)以黑色展示。在本发明中检查的A6TCR和WT1TCR都使用V α 2片段(基于IMGT命名法，也称为TRAV12)。

[0030] 图2B是展示肽-MHC(Tax/HLA-A2)上的TCR(CDR)足迹的俯视图的3维图。尽管关于本发明中使用的WT1TCR未描述晶体结构，但迄今为止已经在几乎所有复合物中观察到V α 区定位于α2MHC螺旋和肽的N末端上并且V β 区定位于α1MHC螺旋和肽的C末端上的此对角线对接定向。

[0031] 图3是展示一种使单链TCR工程化以获得针对肽:HLA.A2的提高的亲和力的方法的图。展示了用以使高亲和力TCR工程化的通用方法。

[0032] 图4是用于使单链T细胞受体片段(V α -连接子-V β 或V β -连接子-V α)工程化的酵母呈现系统的示意图。

[0033] 图5A和5B展示了在用识别V β 3上的构象表位的两种抗体分选之后WT1单链TCR易错库的流式细胞术直方图。将WT1易错库依序用1:10稀释的Therma hVb3.1FITC IgG和BC hVb3.2FITC IgM抗体两者，AlexaFluor 647山羊抗小鼠IgG和山羊抗小鼠IgM APC分选，总共3次分选。然后将每次分选之后的酵母细胞的等分试样与1:10稀释的Therma hVb3.1FITC IgG，AlexaFluor 647山羊抗小鼠IgG一起培育。灰色指示仅用二级抗体染色的酵母细胞(图5A)。将在第3次分选之后分离的稳定克隆WT1D13用1:10稀释的Therma hVb3.1FITC IgG，AlexaFluor 647山羊抗小鼠IgG染色(图5B)。

[0034] 图6A和6B展示了在用WT1:HLA.A2分选之后WT1单链TCR D13CDR1 α 库的流式细胞术直方图。将WT1D13CDR1 α 库依序用100-200nM WT1:HLA-A2二聚体(DimerX；获自BD Pharmingen)、APC结合的山羊抗小鼠二级抗体分选，总共五次分选。然后将在每次分选之后的酵母细胞的等分试样相继与100nM WT1:HLA-A2二聚体(DimerX；获自BD Pharmingen)和APC结合的山羊抗小鼠二级抗体一起培育。灰色指示仅用二级抗体染色的酵母细胞(图6A)。将在第5次分选之后分离的克隆WT1D13.1相继用100nM WT1:HLA-A2二聚体(DimerX；获自BD Pharmingen)和APC结合的山羊抗小鼠二级抗体染色(图6B)。

[0035] 图7A和7B展示了在用WT1:HLA.A2分选之后WT1单链TCR D13.1组合CDR3库的流式细胞术直方图。将WT1D13.1组合CDR3库依序用10-100nM WT1:HLA-A2二聚体(DimerX；获自BD Pharmingen)、APC结合的山羊抗小鼠二级抗体分选，总共三次分选。然后将在每次分选之后的酵母细胞的等分试样相继与100nM WT1:HLA-A2二聚体(DimerX；获自BD Pharmingen)和APC结合的山羊抗小鼠二级抗体一起培育。灰色指示仅用二级抗体染色的酵母细胞(图7A)。将在第3次分选之后分离的改善结合的克隆WT1D13.1.1相继用100nM WT1:HLA-A2二聚体(DimerX；获自BD Pharmingen)和APC结合的山羊抗小鼠二级抗体染色(图7B)。

[0036] 图8A-8D展示了高亲和力TCR，WT1D13.1.1对于WT1:HLA-A2二聚体和单体的结合性质。图8A展示了相继用各种浓度的WT1:HLA-A2Ig二聚体以及荧光标记的抗Ig抗体(作为二级抗体)染色的高亲和力scTCR WT1D13.1.1的流式细胞术直方图。图8B展示了相继用各种浓度的生物素化的WT1:HLA-A2单体以及SA-PE(1:100)二级抗体染色的高亲和力scTCR WT1D13.1.1的流式细胞术直方图。图8C是展示图7A中绘制的直方图的平均荧光强度(MFI)值相较于WT1:HLA-A2二聚体浓度的线图。图8D是展示图8B中绘制的直方图的平均荧光强度

(MFI) 值相较于WT1:HLA-A2单体浓度的线图。

[0037] 图9A-E展示了表达于大肠杆菌 (E.coli) 中的可溶高亲和力TCR WT1D13.1.1的结合。图9A-D是展示首先在无肽 (图9A) 情况下、与阴性对照肽Tax (图9B) 一起、与阴性对照肽 MART-1 (图9C) 一起或与肽WT1 (图9D) 一起培育、接着与生物素标记的WT1-D13.1.1TCR一起培育的人类T2 (HLA-A2+) 细胞的流式细胞术分析的一系列直方图。图9E是描绘滴定的图，所述滴定显示WT1-D13.1.1TCR具有至少260nM的最低亲和力 (K_D 值) (因为在流式细胞术中洗涤细胞导致低估此范围中的亲和力)。

[0038] 图10A和10B展示了小鼠T细胞中的野生型P22、D13.1、D13.0.1和D13.1.1TCR的活性。将经分离的小鼠CD8 (图10A) 和CD4 (图10B) T细胞用P22、D13.1、D13.0.1和D13.1.1TCR转导 (经修饰的TCR不含有V β 区中的D13“稳定化”突变: F48S和D51G)。然后将经转导的T细胞与 HLA-A2+APC和各种浓度的WT1肽一起培育。在24小时培育之后，使用标准ELISA测量IFN- γ 浓度。

[0039] 图11显示，CD8T细胞中的高亲和力TCR WT1D13.1.1针对一组WT1结构类似人类肽不展示活性。通过检索人类蛋白质组中在WT1肽 (SEQ ID NO:6) 的9个残基中的每一个处具有保守突变的肽，确定WT1结构类似肽。然后合成预计以最高亲和力结合到HLA-A2的这10种肽。肽编号1-10分别对应于SEQ ID NO:25-34。将小鼠CD8T细胞分离，并且用D13.1.1TCR (不含有V β 区中的D13稳定化突变F48S和D51G) 转导，并且与相应肽和HLA-A2+APC一起培育24小时。

[0040] 图12A和12B是说明WT1特异性TCR的例示性治疗应用的图。图12A描绘了适用作可溶治疗产品的TCR形式的五种实例: 1) 呈V α -V β 定向或V β -V α 定向的单链TCR (突变的高亲和力V域用星号展示)；2) 在框内与抗体的恒定区结构域融合的单链TCR；3) 与轻链或重链的恒定区的框内免疫球蛋白融合体；4) 直接偶合到药物的单链TCR (或2和3中展示的免疫球蛋白融合体)；和5) 在框内与单链Fv (VL-连接子-VH) 连接以产生双特异性药剂的单链TCR。图12B描绘了将使用通过酵母呈现分离的高亲和力可变域 (V) 的基于细胞的疗法的两种实例，或野生型TCR V域也可以用于过继T细胞疗法 (在人类T细胞情况下)。将TCR克隆到哺乳动物细胞载体中，以便在过继T细胞疗法中按以下形式通过T细胞表达: 1) 嵌合抗原受体 (CAR) 中的单链受体和2) 全长 α 和 β TCR。

[0041] 序列的简要说明

[0042] SEQ ID NO:1是结合到WT1/HLA-A2的TCR (P22) 的野生型V β 区的氨基酸序列。

[0043] SEQ ID NO:2是结合到WT1/HLA-A2的TCR (P22) 的野生型V α 区的氨基酸序列。

[0044] SEQ ID NO:3是以高亲和力结合到WT1/HLA-A2的TCR (D13.1.1) 的经修饰的V β 区的氨基酸序列。

[0045] SEQ ID NO:4是以高亲和力结合到WT1/HLA-A2的TCR (D13.1.1) 的经修饰的V α 区的氨基酸序列。

[0046] SEQ ID NO:5是以高亲和力结合到WT1/HLA-A2的单链TCR (WT1-D13.1.1) 的氨基酸序列。

[0047] SEQ ID NO:6是WT-1抗原的氨基酸序列。

[0048] SEQ ID NO:7是Tax抗原的氨基酸序列。

[0049] SEQ ID NO:8是连接子的氨基酸序列。

- [0050] SEQ ID NO:9是引物剪接4L的多核苷酸序列。
- [0051] SEQ ID NO:10是用以产生WT1-D13CDR1 α 库PreSOE 1号的反向引物的多核苷酸序列。
- [0052] SEQ ID NO:11是用以产生WT1-D13CDR1 α 库PreSOE 2号的正向引物的多核苷酸序列。
- [0053] SEQ ID NO:12是引物T7的多核苷酸序列。
- [0054] SEQ ID NO:13是用以产生WT1-D13.1CDR3 β 1库的PreSOE 1号的反向引物的多核苷酸序列。
- [0055] SEQ ID NO:14是用以产生WT1-D13.1CDR3 β 1库的PreSOE 2号的正向引物的多核苷酸序列。
- [0056] SEQ ID NO:15是用以产生WT1-D13.1CDR3 β 2库的PreSOE 1号的反向引物的多核苷酸序列。
- [0057] SEQ ID NO:16是用以产生WT1-D13.1CDR3 β 2库的PreSOE 2号的正向引物的多核苷酸序列。
- [0058] SEQ ID NO:17是用以产生WT1-D13.1CDR3 α 1库的PreSOE 1号的反向引物的多核苷酸序列。
- [0059] SEQ ID NO:18是用以产生WT1-D13.1CDR3 α 1库的PreSOE 2号的正向引物的多核苷酸序列。
- [0060] SEQ ID NO:19是用以产生WT1-D13.1CDR3 α 2库的PreSOE 1号的反向引物的多核苷酸序列。
- [0061] SEQ ID NO:20是用以产生WT1-D13.1CDR3 α 2库的PreSOE 2号的正向引物的多核苷酸序列。
- [0062] SEQ ID NO:21是以高亲和力结合到WT1/HLA-A2的TCR (D13) 的经修饰的V β 区的氨基酸序列。
- [0063] SEQ ID NO:22是以高亲和力结合到WT1/HLA-A2的TCR (D13) 的经修饰的V α 区的氨基酸序列。
- [0064] SEQ ID NO:23是A型流感肽的氨基酸序列。
- [0065] SEQ ID NO:24是变异A型流感肽的氨基酸序列。
- [0066] SEQ ID NO:25-34是十种WT1变异肽的氨基酸序列。

具体实施方式

- [0067] 以下描述希望促进对本发明的理解但并不希望具限制性。
- [0068] 一般来说,本文所用的术语和短语具有其领域公认的含义,其可以参考标准文本、杂志参考文献和本领域的技术人员已知的情境找到。以下定义经提供以阐明其在本发明的情境下的特定用途。
- [0069] 如本文所用,“连接”是指两个基团之间的缔合,其可以是共价或非共价缔合。基团可以使用可变长度肽链、非氨基酸化学基团或如本领域中已知的其它手段连接。连接子区可以是可操作地连接蛋白质或肽的两个功能或结构域的氨基酸序列。
- [0070] 如本文所用,术语“化学治疗剂”是指能够减少或预防一种癌细胞、一群癌细胞、肿

瘤或其它恶性组织生长、增殖或扩散的任何物质。所述术语预期还涵盖任何抗肿瘤剂或抗癌剂。

[0071] 如本文所用,术语“有效量”预期涵盖例如医药有效量或治疗有效量的情境。举例来说,在某些实施例中,有效量能够实现筛选分析中的有益状态、有益结果、功能活性或改善临床病况。

[0072] 如本文所用,术语“癌细胞”预期涵盖如本领域中广泛理解的定义。在一个实施例中,所述术语是指可能会促进人类或动物的癌症的临床病况的异常调节细胞。在一个实施例中,所述术语可以指人体或动物体内或来源于人体或动物体的经培养的细胞系或细胞。癌细胞可以是如本领域中理解的多种多样的分化细胞、组织或器官类型。癌细胞的特定实例包括乳癌、结肠癌、皮肤癌、卵巢癌、白血病、肺癌、肝癌、睾丸癌、食道癌和其它类型的癌症。

[0073] 如本文所用,“治疗 (treating/treatment)”是指用于获得有益或所要结果、包括并且优选临床结果的方法。治疗可以指改善疾病或病况的症状或延迟疾病或病况的进展。

[0074] 如本文所用,“预防 (prevention/preventing)”是指用于预防、抑制或减少疾病或病况的可能性、疾病或病况的发作或复发的方法。其还指预防、抑制或减少疾病或病况的症状的可能性、疾病或病况的症状的出现或再现,并且其还包括在疾病或病况发作或复发之前减少疾病或病况的强度、作用、症状和/或负担。

[0075] 如本文所用,“抑制细胞生长”或“抑制细胞增殖”是指降低或中断细胞的生长速率。举例来说,通过抑制肿瘤细胞的生长,肿瘤的大小的增加速率可能减慢。在其它实施例中,肿瘤可以保持相同大小;或大小减小,即,消退。在特定实施例中,细胞生长或细胞增殖的速率被抑制至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%或至少90%。

[0076] 术语“野生型”和“wt”在本文中可互换地使用并且关于具有编码从天然存在或未经修饰的TCR (例如,初始或母体T细胞克隆) 分离的可变区的氨基酸序列或多核苷酸、对于抗原具有特异性的TCR使用。

[0077] 在呈现氨基酸序列的图和表中,野生型有时指示为“wt”。在顶部序列下方呈现的序列中,破折号指示氨基酸与比对的wt或顶部序列中呈现的氨基酸相同。字母指示已经在所述位置从顶部序列进行取代。

[0078] 如本文所用,术语“经修饰的”、“变异的”、“突变性”、“突变的”和“衍生的”T细胞受体是指具有与初始或野生型T细胞克隆相比具有一个或多个突变的可变区的TCR序列。经修饰的TCR的实例包括较高亲和力TCR。

[0079] 编码序列是编码蛋白质的氨基酸序列或功能RNA (例如tRNA或rRNA) 的基因或cDNA的一部分。

[0080] 补体或互补序列意指根据沃森-克里克 (Watson-Crick) 碱基配对规则与核苷酸的另一序列形成氢键结的双螺旋体的核苷酸的一序列。

[0081] 下游是指DNA或RNA中的相对位置并且是朝链的3'末端的区。

[0082] 表达是指将基因转录到结构RNA (rRNA、tRNA) 或信使RNA (mRNA) 中并且随后将mRNA转译到蛋白质中。

[0083] 如果两个核酸序列来源于单独生物体,无论此类生物体是否是不同物种,只要所

述序列不一起以相同排列天然存在于同一生物体中,那么所述序列与彼此是异源的。

[0084] 同源性是指两个核苷酸或氨基酸序列之间的一致性的程度。

[0085] 功能上等效于具体例示的TCR序列的氨基酸序列是已经通过单或多氨基酸取代、通过添加和/或缺失氨基酸而修饰或其中一个或多个氨基酸已经被化学修饰,但尽管如此仍保持本发明的细胞结合或可溶TCR蛋白质的结合特异性和高亲和力结合活性的氨基酸序列。功能上等效的核苷酸序列是编码具有与具体例示的细胞结合或可溶TCR蛋白质实质上相同的生物活性的多肽的核苷酸序列。在本发明的情境下,可溶TCR蛋白质不具有天然细胞结合TCR的部分并且在溶液中稳定(即,当如本文所述并且在用于蛋白质溶液的标准条件下处置时,其在溶液中通常不凝集)。

[0086] 术语“经分离的”是指通过人力从天然状态改变的组合物、化合物、物质或分子。举例来说,如果天然存在的组合物或物质已经从其初始环境有所改变或从其初始环境移出或这两种情况都有,那么其是经分离的。举例来说,在所述术语用于本文中时,天然存在于活动物中的多核苷酸或多肽不是经分离的,但与其天然状态的共存物质分离的相同多核苷酸或多肽是经分离的。

[0087] 核酸构筑体是从天然存在的基因分离或已经被修饰以含有核酸的以否则将不天然存在的方式组合和并列的片段的核酸分子。

[0088] 核酸分子意指含有通过3'-5'磷酸二酯键连接的脱氧核糖核苷酸或核糖核苷酸的单或双链线性多核苷酸。

[0089] 如果连接的性质不干扰两个DNA序列相对于彼此影响其正常功能的能力,那么所述序列可操作地连接。举例来说,如果启动子能够实现编码序列的转录,那么启动子区将可操作地连接于编码序列。

[0090] 多肽是通过肽键连接的氨基酸的线性聚合物。

[0091] 术语“启动子”是指通常80-120个碱基对长并且位于基因的起始位点上游的顺式作用DNA序列,RNA聚合酶可以结合到其并且起始正确转录。可以存在提供转录的开/关调节和/或增强(增加)下游编码序列的表达的相关额外转录调节序列。

[0092] 重组核酸分子(例如重组DNA分子)是在体外通过两个或更多个非同源DNA分子的连接形成的新颖核酸序列(例如含有克隆到至少一个克隆位点中的外源DNA的一个或多个插入片段的重组质体)。

[0093] 术语“转化”和“转染”是指通过外部应用来自另一不同基因型细胞的经纯化的重组DNA定向修饰细胞的基因组,导致其吸收并且整合到受试细胞的基因组中。在细菌中,重组DNA典型地不整合到细菌染色体中,而是自主地复制为质体。术语“经转化的”和“经转染的”在本文中可互换地使用。举例来说,T细胞可以在过继T细胞处理之前用编码本文所述的经修饰的或高亲和力的TCR的DNA序列转染。

[0094] 上游意指在DNA或RNA中的任何位点的5'侧上。

[0095] 载体是能够在宿主细胞中自主地复制并且可以接受外源DNA的核酸分子。载体携有其自身的复制起点;一个或多个可以用于插入外源DNA的限制性核酸内切酶的独特识别位点;以及通常可选标记,例如编码抗生素抗性的基因,和通常用于表达插入的DNA的识别序列(例如,启动子)。常见载体包括质体载体和噬菌体载体。

[0096] 高亲和力T细胞受体(TCR)是比野生型TCR更强地结合到标靶配位体的工程化TCR。

高亲和力的一些实例包括对于标靶配位体在约 10^{-6} M与 10^{-12} M之间以及为其中的所有个别值和范围的平衡结合常数。此范围涵盖据报道为野生型亲和力(10^{-4} 到 10^{-6} M)的亲和力与已经通过定向进化分离的亲和力(约 10^{-12} M)之间的亲和力。

[0097] 细胞因子是通过影响其它细胞的细胞制备的蛋白质、肽或糖蛋白。

[0098] 哺乳动物包括人类和非人类哺乳动物。

[0099] 本领域的技术人员应了解,由于遗传密码的简并,众多功能上等效的核苷酸序列编码相同氨基酸序列。

[0100] T细胞受体

[0101] T细胞受体 (TCR) 由在T细胞表面上配对以形成异源二聚受体的两条链($\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$)组成。 $\alpha\beta$ TCR表达于体内的大多数T细胞上并且已知参与识别MHC限制抗原。 $\alpha\beta$ TCR的分子遗传学、结构和生物化学现在已经得到透彻的研究。每条 α 和 β 链由两种结构域组成:锚定细胞膜中的蛋白质并且与CD3信号传导装置的恒定亚单位缔合的恒定域(C),和通过六个环(称为互补决定区(CDR))赋予抗原识别的可变域(V)。每一个V域具有三个CDR。这些CDR与结合到由主要组织相容性复合物编码的蛋白质的抗原肽之间的复合物(pepMHC)相互作用(Davis和Bjorkman (1988)《自然》,334,395-402;Davis等人(1998)《免疫学年鉴》,16,523-544;Murphy (2012),xix,第868页)。

[0102] TCR的分子遗传学已经展现了组合以形成V域的编码区的多种基因之间的遗传重组的过程。所述过程类似于抗体发育,其中重和轻链基因重排以产生由B细胞衍生的抗体展现的巨大多样性(Tonegawa (1988)《体外细胞发育生物学(*In Vitro Cell Dev Biol*)》,24,253-65)。在T细胞的情况下, α 链V域通过将一个V区(在人类中约75之中)与一个连接(J)基因片段(在人类中约61之中)重排而形成(图5.8,Janeway,第8版)。 β 链V域通过将一个V区(在人类中约52之中)与一个多样性(D)基因(在人类中2之中)与一个连接(J)基因片段(在人类中13之中)重排而形成(图5.8,(Murphy (2012),xix,第868页))。 $V\alpha J\alpha$ 与 $V\beta D\beta J\beta$ 基因重排的连接点编码每条链的CDR3环,并且其促进 $\alpha\beta$ TCR的巨大多样性,理论极限是超过 10^{15} 个不同TCR(Davis和Bjorkman (1988)《自然》,334,395-402),远高于人类中可实现的多样性,因为总计仅存在约1011个T细胞(Mason (1998)《今日免疫学》,19,395-404)。每条链的可能CDR1和CDR2多样性通过V基因的数目表示,因为这些环编码于V基因内,并且TCR不经历体内细胞突变。尽管CDR1和CDR2环的多样性与CDR3环相比相对有限,但已经有多个实例显示其中基于肽抗原和/或MHC产物对于特定V区已经存在选择。

[0103] I类MHC产物结合到8到10个氨基酸长度的肽并且其表达于体内的所有有核细胞上(由(Rock和Goldberg (1999)《免疫学年鉴》,17,739-79)综述)。尽管抗体-抗原相互作用的全部结合能都集中于外源抗原上,但TCR-肽:MHC的相当大部分的结合能引导于自身-MHC分子处(Manning和Kranz (1999)《今日免疫学》,20,417-422)。实际上,更为新近的研究已经提出,CDR1和/或CDR2环的特定残基已经进化以与MHC螺旋上的特定残基相互作用,因此提供对于MHC的基础亲和力,解释MHC限制的过程(Garcia等人(2009)《自然·免疫学》,10,143-7;Marrack等人(2008)《免疫学年鉴》,26,171-203)。

[0104] 已经关注了使用对于肽-MHC抗原(I类)具有高于正常范围的亲和力的TCR(所谓的较高亲和力TCR),以便:1)驱动CD4辅助T细胞(其不具有CD8共同受体)的活性;或2)使可以用于直接靶向细胞的可溶TCR发育,通过连接“效应子”分子(例如,抗体Fc区、毒性药物或抗

体scFv,例如抗CD3抗体,以形成双特异性蛋白质) ((Ashfield和Jakobsen (2006) *Drugs*, 9, 554-9; Foote和Eisen (2000)《美国国家科学院院刊》, 97, 10679-81; Holler等人 (2000)《美国国家科学院院刊》, 97, 5387-92; Molloy等人 (2005)《药理学当前观点 (Curr Opin Pharmacol)》, 5, 438-43; Richman和Kranz (2007)《生物分子工程 (Biomol Eng)》, 24, 361-73)。此方法还可以克服一些癌症患者面临的问题,由此其T细胞对于潜在肿瘤抗原不以充足特异性和结合亲和力表达TCR (部分由于耐受性的胸腺和周边过程)。举例来说,现在已经鉴别了超过300种MHC限制的T细胞界定的肿瘤抗原 (cancerimmunity.org/peptide/) (Boon 和 Old (1997)《免疫学当前观点 (Curr Opin Immunol)》, 9, 681-3; Cheever等人 (2009)《临床癌症研究》, 15, 5323-37)。这些肿瘤抗原包括突变肽、分化抗原和过度表达的抗原,其都可以充当疗法的靶标。因为迄今为止描述的大多数癌症抗原来源于在MHC分子的情境下仅可以在细胞表面处靶向的细胞内蛋白质,所以TCR在其已经进化以识别此类别的抗原时成为治疗剂的理想候选物。

[0105] 类似地,TCR可以检测已经于感染细胞中天然加工并且由MHC分子呈现于细胞表面上的来源于病毒蛋白质的肽。在过去25年中已经鉴别出多种病毒抗原靶标,包括来源于HIV和HTLV中的病毒基因组的肽(例如,Addo等人 (2007)《公共科学图书馆 • 综合 (PLoS ONE)》, 2, e321; Tsomides等人 (1994)《实验医学杂志 (J Exp Med)》, 180, 1283-93; Utz等人 (1996)《病毒学杂志 (J Virol)》, 70, 843-51)。然而,患有这些疾病的患者可能不具有对于感染细胞的结合和摧毁最优的TCR。最终,有可能TCR可以用作自体免疫靶标的受体拮抗剂;或在高度特异性的过程中用作免疫抑制局部免疫细胞反应,因此避免一般性免疫抑制的递送药剂 ((Molloy等人 (2005)《药理学当前观点》, 5, 438-43; Stone等人 (2012)《蛋白质工程 (Protein Engineering)》))。

[0106] 经修饰的T细胞受体

[0107] 定向进化已经用以产生对于特定pepMHC具有较高亲和力的TCR。三种已经使用的不同呈现方法是酵母呈现 (Holler等人 (2003)《自然 • 免疫学》, 4, 55-62; Holler等人 (2000)《美国国家科学院院刊》, 97, 5387-92)、噬菌体呈现 (Li等人 (2005)《自然 • 生物技术》, 23, 349-54) 和T细胞呈现 (Chervin等人 (2008)《免疫学方法杂志》, 339, 175-84)。在所有三种方法中,过程包括使展现野生型TCR的正常低亲和力的TCR工程化,以便TCR的突变体对于特定pepMHC (即,对于T细胞特异性针对的初始抗原) 具有增加的亲和力。因此,野生型TCR被用作制备一个或多个CDR中的诱变库的模板,接着通过结合到同源肽-MHC抗原选择具有较高亲和力的突变体。本领域中众所周知,为了使亲和力工程化以便高于野生型亲和力超过仅几倍,此类体外定向进化是必需的。

[0108] 酵母呈现允许相关蛋白质以Aga2融合体形式表达于表面上 (Boder和Wittrup (1997)《自然 • 生物技术》, 15, 553-557; Boder和Wittrup (2000)《酶学方法 (Methods Enzymol)》, 328, 430-44)。此系统已经成功地用于使较高亲和力TCR、单链抗体、纤连蛋白和其它蛋白质工程化。在酵母呈现系统中,TCR已经呈现为呈V β -连接子-V α 或V α -连接子-V β 形式的稳定化单链蛋白质 (Aggen等人 (2011)《蛋白质工程、设计与选择 (Protein Engineering, Design, & Selection)》, 24, 361-72; Holler等人 (2000)《美国国家科学院院刊》, 97, 5387-92; Kieke等人 (1999)《美国国家科学院院刊》, 96, 5651-6; Richman等人 (2009)《分子免疫学 (Mol Immunol)》, 46, 902-16; Weber等人 (2005)《美国国家科学院院刊》, 92, 5387-92)。

刊》,102,19033-8),或二链异源二聚体(Aggen等人(2011)《蛋白质工程、设计与选择》,24,361-72;Richman等人(2009)《分子免疫学》,46,902-16)。两种小鼠TCR已经使用此系统工程化以获得更高亲和力:2C(I类MHC限制)和3.L2(II类MHC限制)(Holler等人(2000)《美国国家科学院院刊》,97,5387-92;Weber等人(2005)《美国国家科学院院刊》,102,19033-8)。人类TCR单链V α V β 片段(称为scTv或scTCR)最近也已经通过利用人类V α 区(称为V α 2,通过IMGT命名法也称为TCRA12)的优越稳定性而开发(Aggen等人(2011)《蛋白质工程、设计与选择》,24,361-72)。在此情况下,呈单链形式的体外工程化的高亲和力T细胞受体用以分离人类稳定化scTv片段(V β -连接子-V α),其可以在酵母表面上和从大肠杆菌以可溶形式表达为稳定蛋白质。TCR包括两种稳定化人类scTv片段,A6scTv,其对来源于人类T细胞淋巴病毒Tax蛋白质的肽具有特异性;和868scTv,其对来源于人类免疫缺陷病毒Gag蛋白质的肽(肽:SL977-85)具有特异性。这两种TCR都使用V α 2基因(IMGT:TRAV12家族),但其具有来源于初始T细胞克隆的CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 残基,TCR从所述初始T细胞克隆分离。因此,这些scTCR的较高亲和力突变体各自针对其同源肽-MHC抗原来源于其初始(亲本)TCR。

[0109] 在第二系统(噬菌体呈现)中,相关蛋白质与病毒外壳蛋白的N末端融合(Scott和Smith(1990)《科学(Science)》,249,386-90)。各种TCR,包括称为A6、868和1G4的那些(I类MHC限制)已经使用此方法工程化以获得更高亲和力(Li等人(2005)《自然·生物技术》,23,349-54;Sami等人(2007)《蛋白质工程、设计与选择》,20,397-403;Varela-Rohena等人(2008)《自然·医学(Nat Med)》,14,1390-5)。这些TCR的噬菌体呈现通过在两个C域之间引入非天然二硫键以便促进 α 和 β 链的配对而实现。此系统因此使用来源于初始T细胞克隆的全长(V α C α /V β C β)异源二聚蛋白质以便针对其同源肽-MHC工程化。

[0110] 已经报道用于使TCR工程化的第三系统是哺乳动物细胞呈现(Chervin等人(2008)《免疫学方法杂志》,339,175-84;Kessels等人(2000)《美国国家科学院院刊》,97,14578-83)。此系统使用反转录病毒载体将TCR α 和 β 链引入TCR阴性T细胞杂交瘤中。在一个研究(Kessels等人(2000)《美国国家科学院院刊》,97,14578-83)中,所选突变TCR显示为结合到结构上极类似于同源肽的肽(ASNENMDAM相较于ASNENMETM;分别是SEQ ID NO:23和24)。在其它研究中,突变TCR的亲和力显示为对于同源pepMHC增加(Chervin等人(2008)《免疫学方法杂志》,339,175-84)。在许多研究中已经显示,此类较高亲和力TCR针对同源肽的结构类似变异数也展现更高亲和力(例如,Holler等人(2003)《自然·免疫学》,4,55-62)。在哺乳动物细胞呈现系统中,引入的TCR以其天然构象表达于表面上,与CD3亚单位复合,允许完全功能性T细胞(信号传导感受态)。其天然宿主中的全长异源二聚TCR因此使用此方法工程化。

[0111] 结合到WT1/HLA-A2的高亲和力TCR

[0112] 本发明提供了针对熟知的癌症抗原WT1/HLA-A2的一种野生型TCR和各种高亲和力TCR。在某些实施例中,工程化的TCR可以按可溶形式用于体内靶向递送,或在过继转移方法或治疗中由T细胞重组表达。在一个特定实施例中,单链V α V β 形式的TCR(scTCR)架构可以有效载荷制备和使用,例如细胞因子、毒素、放射性同位素、化学治疗剂或药物(类似于抗体-药物结合物),以将效应分子递送到TCR结合的位置(例如,肿瘤)。TCR还可以用于细胞疗法,例如CD4+T细胞、CD8+T细胞和/或自然杀手(NK)细胞的过继转移,以介导针对表达WT1的癌细胞的反应。本文所提供的scTCR架构还可以用于经由通过共价连接(例如通过TCR的胺

反应性或巯基反应性氨基酸侧链)到可检测基团(例如放射性同位素或荧光部分)鉴别例如赘生性或病毒相关的细胞表面抗原,来诊断例如恶性或病毒感染的细胞。

[0113] 在一个实施例中,本文所述的scTCR蛋白质可呈现于酵母、噬菌体或哺乳动物细胞的表面上,并且可以用以使TCR工程化以对于WT1抗原具有甚至更高亲和力。在一个实施例中,本文所述的scTCR蛋白质可以表达于例如以下各者中:原核细胞,例如大肠杆菌、黑曲霉(*Aspergillus niger*)、无花果曲霉(*Aspergillus ficuum*)、泡盛曲霉(*Aspergillus awamori*)、米曲霉(*Aspergillus oryzae*)、里氏木霉(*Trichoderma reesei*)、米黑毛霉(*Mucor miehei*)、乳酸克鲁维酵母(*Kluyveromyces lactis*)、巴斯德毕赤酵母(*Pichia pastoris*)、酿酒酵母(*Saccharomyces cerevisiae*)、枯草芽孢杆菌(*Bacillus subtilis*)或地衣芽孢杆菌(*Bacillus licheniformis*);昆虫细胞(例如,黑腹果蝇(*Drosophila melanogaster*));哺乳动物细胞,包括细胞系,例如中国仓鼠卵巢细胞系(CHO);或植物物种(例如,芥花、大豆、玉米、土豆、大麦、黑麦、小麦),或其它本领域已知的蛋白质表达来源,并且大量产生。举例来说并且仅作为实例,TCR还可以用以检测细胞表面上的特定肽/MHC。在一个实施例中,所公开的scTCR基因可以通过使用编码于DNA构筑体内的适合肽序列连接到用于信号传导域的基因,并且引入可能会消除标靶细胞的T细胞中。这些构筑体已经被称为嵌合抗原受体(CAR),其现在普遍地用于包括使用含有scTCR的CAR的领域中。

[0114] 在所提供的单链V α V β TCR蛋白质中,可变 α 和可变 β 链使用任何适合肽连接子连接,所述肽连接子包括本领域中已知的那些,例如抗体单链Fv键(Bird等人(1988)《科学》,242,423-426;Holliger等人(1993)《美国国家科学院院刊》,90,6444-8;Hoogenboom(2005)《自然·生物技术》,23,1105-16;Turner等人(1997)《免疫学方法杂志》,205,43-54)。在一个实施例中,提供了一种具有以下结构的可溶人类单链TCR:V α -L-V β 或V β -L-V α ,其中L是将V β 与V α 连接的连接子肽,V β 是TCR可变 β 区,并且V α 是TCR可变 α 区。

[0115] 在一个实施例中,V β V α TCR被称为WT1D13.1.1,其中V β 是第3组的TCR可变 β 区,并且V α 是第2组的TCR可变 α 区(Utz,U.等人,1996)(Aggen,D.A.等人,2011)。

[0116] 在一个实施例中,连接子肽含有超过5个赖氨酸残基。在一个实施例中,连接子肽含有5与30个之间的氨基酸。在一个实施例中,连接子肽具有GSADDAAKKDAAKKDGS(SEQ ID NO:8)的氨基酸序列。在一个实施例中,所提供的sc V β V α TCR不含有恒定区。当术语sc V β V α TCR用于本文中时,应理解,sc V β V α TCR也包括为本领域中理解和使用的术语。因此,V β 和V α 链可以通过连接子以任何构形彼此连接。

[0117] 在本发明的一个方面,本发明的V β V α TCR以约10⁻⁶M与10⁻¹²M之间的平衡结合常数K_D特异性结合到配位体。在本发明的此方面的一个实施例中,配位体是肽/MHC配位体。在一个实施例中,与正常野生型TCR的亲和力相比,本发明的V β V α TCR对于配位体具有增强的亲和力。

[0118] 生物活性基团

[0119] 还提供了包括生物活性基团的如本文所述的V β V α TCR蛋白质。如本文所用,“生物活性基团”是在生物系统中导致可测量或可检测的作用的基团。在一个实施例中,生物活性基团选自:抗肿瘤剂,例如(但不限于)血管生成抑制剂、酶抑制剂、微管抑制剂、DNA嵌入剂或交联剂、DNA合成抑制剂;细胞因子,例如(但不限于)IL-2、IL-15、GM-CSF、IL-12、TNF- α 、IFN- γ 或LT- α (Schrama等人(2006)《自然评论药物发现(Nat Rev Drug Discov)》,5,147-

59; Wong等人(2011)《蛋白质工程、设计与选择》,24,373-83);抗炎基团,例如(但不限于)TGF- β 、IL-37、IL-10(Nold等人(2010)《自然·免疫学》,11,1014-22;Stone等人(2012)《蛋白质工程》);放射性同位素,例如(但不限于) ^{90}Y 或 ^{131}I (Reichert和Valge-Archer(2007)《自然评论药物发现》,6,349-56);毒素,例如(但不限于)假单胞菌(*Pseudomonas*)外毒素A、白喉毒素或一连串的蓖麻毒素(Pastan等人(2006)《自然评论:癌症(Nat Rev Cancer)》,6,559-65;Schrama等人(2006)《自然评论药物发现》,5,147-59);药物;或抗体,例如单链Fv。

[0120] 在本发明的此方面的一个实施例中,生物活性基团是细胞毒性分子,有时称为药物(例如,在术语“抗体药物结合物”中)。如本文所用,“细胞毒性”意指对细胞有毒性。细胞毒性分子的实例包括(但不限于)多柔比星(doxorubicin)、甲氨蝶呤(methotrexate)、丝裂霉素(mitomycin)、5-氟尿嘧啶、倍癌霉素(duocarmycin)、奥瑞他汀(auristatins)、美登素(maytansines)、卡奇霉素(calicheamicins)和以上分子的类似物(Jarvis(2012)《化学与工程新闻(Chemical and Engineering News)》,90,12-18;Litvak-Greenfeld和Benhar(2012)《先进药物输送评论(Adv Drug Deliv Rev)》;Ricart和Tolcher(2007)《自然·临床实践肿瘤学(Nat Clin Pract Oncol)》,4,245-55)。细胞毒性分子不需要导致完全细胞死亡,而是导致生长的可测量或可检测的抑制或细胞活性的降低。

[0121] 在一个实施例中,本文所述的TCR连接到能够将前药转化为药物的酶。这例如通过使得药物的活性形式在由TCR靶向的位置处(例如,在肿瘤位点处)产生而是适用的。

[0122] 在一个实施例中,生物活性基团通过连接子结合到单链TCR,这可以通过例如与TCR的游离胺基或巯基的标准化学反应来实现。

[0123] 在另一实施例中,TCR连接到单链抗体片段(scFv)以产生双特异性药剂。含有一个针对肿瘤抗原的scFv和一个针对T细胞的CD3分子的scFv的双特异性抗体现在已经成功地用于临床(Bargou等人(2008)《科学》,321,974-7)。另外,还已经报道了含有TCR和针对CD3的scFv的双特异性药剂(Liddy等人(2012)《自然·医学》,18,980-7)。

[0124] 还提供了一种包括可检测基团的如本文所述的单链V β V α TCR。在一个实施例中,可检测基团是可以通过光谱学或基于酶的方法检测到的基团。在一个实施例中,可检测基团是荧光基团,例如(但不限于)荧光素、R-藻红蛋白(PE)、PE-Cy5、PE-Cy7、德克萨斯红(Texas red)或别藻蓝蛋白(APC);经放射性标记的基团,例如(但不限于)125I、32P、99mTc;吸收基团;或具有产生可检测产物的性质的酶,例如(但不限于)辣根过氧化物酶或碱性磷酸酶。

[0125] 如本领域中已知,生物活性基团、可检测基团或连接到TCR的其它基团可以使用柔性肽连接子或通过化学结合连接,并且可以共价或非共价连接到TCR。

[0126] 本文还提供了一种人类TCR,其用于治疗或预防哺乳动物的癌症的方法,所述方法包含向哺乳动物投与有效量的连接到治疗有效分子的经修饰的TCR。在一个特定实施例中,哺乳动物是人类。在另一实施例中,哺乳动物是伴侣动物(例如,狗、猫、兔、啮齿动物、马)或牲畜动物(例如,奶牛、马、猪)。

[0127] 还提供了一种如本文所述的经分离的单链TCR(scTCR),和一种在大肠杆菌中制备单链TCR的方法。还提供了一种医药组合物,其包含如本文所述的scTCR和医药学上可接受的载剂。

[0128] 还提供了已经连接到信号传导域的本文所述的sc V α V β TCR,其在T细胞的表面上产生活性TCR。在一个实施例中,此scTCR可以用于治疗哺乳动物的癌症的方法,所述方法包

含:将TCR克隆到载体中,将载体引入患者的T细胞中,和将T细胞过继转移回患者中。

[0129] 经修饰的TCR多肽和多核苷酸

[0130] 本发明涵盖一种DNA载体,其包括至少一个编码单链T细胞受体(scTCR)的DNA片段。

[0131] 通过标准诱变技术,结合本文所述的分析,本领域的技术人员可以获得改变的TCR序列并且针对特定结合亲和力和/或特异性测试其。本领域中已知的适用诱变技术包括(但不限于)从头基因合成、寡核苷酸定向诱变、区域特异性诱变、连接子扫描诱变和通过PCR的定点诱变(参看例如Sambrook等人(1989)和Ausubel等人(1999))。

[0132] 在获得经修饰的TCR编码序列时,本领域的普通技术人员将认识到,TCR衍生的蛋白质可以通过某些氨基酸取代、添加、缺失和转译后修饰,在不损失或降低生物活性的情况下修饰。具体来说,众所周知,保守氨基酸取代(即,用一种氨基酸取代具有类似大小、电荷、极性和构象的另一氨基酸)不大可能显著改变蛋白质功能。为蛋白质的成分的20种标准氨基酸可以广泛分类为如下四组保守氨基酸:非极性(疏水性)组包括丙氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、色氨酸和缬氨酸;极性(不带电、中性)组包括天冬酰胺、半胱氨酸、谷氨酰胺、甘氨酸、丝氨酸、苏氨酸和酪氨酸;带正电(碱性)组含有精氨酸、组氨酸和赖氨酸;并且带负电(酸性)组含有天冬氨酸和谷氨酸。蛋白质中用一种氨基酸取代同一组内的另一氨基酸不大可能对蛋白质的生物活性具有不良影响。

[0133] 在一个实施例中,本发明的scTCR可以在产生稳定化蛋白质的可变域的任何区域中含有额外突变。在一个实施例中,一个或多个额外突变在CDR1、CDR2、HV4、CDR3、FR2和FR3中的一者或多者中。用于诱变的区域可以通过定向进化确定,其中晶体结构或分子模型用以产生TCR的与所关注的配位体(例如抗原)相互作用的区域。在其它实例中,可变区可以通过添加或缺失氨基酸以使scTCR与配位体之间的所要相互作用工程化而再成形。

[0134] 本发明的多肽包括经修饰的TCR和其抗原结合片段(例如,scTCR)和嵌合抗原受体(CAR)。术语“多肽”、“蛋白质”和“肽”和“糖蛋白”可互换地使用,并且意指不限于任何特定长度的氨基酸聚合物。所述术语不排除例如肉豆蔻酰化、硫酸化、糖基化、磷酸化以及信号序列的添加或缺失的修饰。术语“多肽”或“蛋白质”意指一条或多条氨基酸链,其中每条链包含通过肽键共价连接的氨基酸,并且其中所述多肽或蛋白质可以包含多条通过肽键非共价和/或共价连接在一起的链,所述链具有天然蛋白质(即,通过天然存在的并且具体地说非重组细胞产生的蛋白质)或遗传工程化或重组细胞的序列;并且包含具有天然蛋白质的氨基酸序列的分子,或具有对一个或多个天然序列氨基酸进行的缺失、添加和/或取代的分子。术语“多肽”和“蛋白质”具体地说涵盖本发明的经修饰的TCR或其抗原结合片段,或具有对经修饰的TCR或其抗原结合片段的一个或多个氨基酸进行的缺失、添加和/或取代的序列。因此,“多肽”或“蛋白质”可以包含一条(被称为“单体”)或多条(被称为“多聚体”)氨基酸链。

[0135] 本文中提及的术语“经分离的蛋白质”意指如下受试蛋白质:(1)不含至少一些其它蛋白质,其将与所述其它蛋白质一起典型地在自然界中找到,(2)基本上不含来自相同来源(例如,来自相同物种)的其它蛋白质,(3)由来自不同物种的细胞表达,(4)已经从至少约50%的多核苷酸、脂质、碳水化合物或其它物质分离,其与所述物质在自然界中结合,(5)与蛋白质部分不结合(通过共价或非共价相互作用),“经分离的蛋白质”与所述蛋白质部分在

自然界中缔合, (6) 与多肽可操作地缔合(通过共价或非共价相互作用), 其与所述多肽在自然界中并不缔合, 或(7) 不存在于自然界中。此类经分离的蛋白质可以由基因组DNA、cDNA、mRNA或其它RNA编码, 可以是合成来源, 或其任何组合。在某些实施例中, 经分离的蛋白质实质上不含见于其天然环境中并且将干扰其用途(治疗、诊断、预防、研究或其它)的蛋白质或多肽或其它污染物。

[0136] 在特定实施例中, 受试经修饰的TCR可以具有:a) 具有与本文所述的经修饰的TCR的 α 链可变区至少80%一致、至少85%一致、至少90%、至少95%或至少98%或99%一致的氨基酸序列的TCR α 链可变区; 和b) 具有与本文所述的经修饰的TCR的 β 链可变区至少80%一致、至少85%、至少90%、至少95%或至少98%或99%一致的氨基酸序列的 β 链可变区。

[0137] 在特定实施例中, 经修饰的TCR可以包含:a) 包含以下各者的TCR α 链可变区:i. 氨基酸序列与本文所述的所选TCR的 α 链CDR1区一致的CDR1区; ii. 氨基酸序列与所选TCR的 α 链CDR2区一致的CDR2区; 和 iii. 氨基酸序列与所选TCR的 α 链CDR3区一致的CDR3区; 以及b) 包含以下各者的 β 链可变区:i. 氨基酸序列与所选TCR的 β 链CDR1区一致的CDR1区; ii. 氨基酸序列与所选TCR的 β 链CDR2区一致的CDR2区; 和 iii. 氨基酸序列与所选TCR的 β 链CDR3区一致的CDR3区; 其中TCR特异性结合WT1抗原。在另一实施例中, 经修饰的TCR或其抗原结合片段是变异的经修饰的TCR, 其中除了V α 和V β 区的CDR区中的多达8、9、10、11、12、13、14、15个或更多个氨基酸取代以外, 变异体包含与所选经修饰的TCR一致的 α 链和 β 链。就此来说, 所选变异的经修饰的TCR的CDR区中可以存在1、2、3、4、5、6、7、8个、或在某些实施例中9、10、11、12、13、14、15个更多个氨基酸取代。取代可以在CDR中V α 和/或V β 区中。(参看例如Muller, 1998,《结构(Structure)》6:1153-1167)。

[0138] 在一个实施例中, 提供了一种多核苷酸, 其编码经修饰的TCR或其抗原结合片段。在其它相关实施例中, 多核苷酸可以是编码经修饰的TCR的多核苷酸的变异体。多核苷酸变异体与编码本文所述的经修饰的TCR的多核苷酸序列可以具有实质一致性。举例来说, 多核苷酸可以是使用本文所述的方法(例如, 使用标准参数的BLAST分析, 如下文所描述), 与参考多核苷酸序列(例如编码本文所述的TCR的序列)相比包含至少70%序列一致性、优选至少75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或更高序列一致性的多核苷酸。本领域的技术人员将认识到, 这些值可以适当地调整, 以便通过考虑密码简并、氨基酸类似性、阅读框架定位等, 确定由两个核苷酸序列编码的蛋白质的相应一致性。

[0139] 典型地, 多核苷酸变异体将含有一个或多个取代、添加、缺失和/或插入, 优选使得由变异的多核苷酸编码的TCR的结合亲和力相对于由本文具体阐述的多核苷酸序列编码的TCR并不实质上降低。

[0140] 当比较多核苷酸序列时, 如果如下文所描述, 两个序列中的核苷酸的序列当经比对以获得最大对应性时相同, 那么两个序列被称为“一致的”。两个序列之间的比较典型地通过在比较窗口比较序列以鉴别和比较局部区的序列类似性来进行。如本文所用, “比较窗口”是指至少约20个、通常30到约75个、40到约50个邻接位置的片段, 其中在两个序列经最优化对之后, 序列可以与具有相同数目的邻接位置的参考序列相比较。

[0141] 用于比较的序列的最优化对可以使用默认参数, 使用生物信息学软件的Lasergene套件中的Megaalign程序(DNASTAR公司, 威斯康星州麦迪逊(Madison, WI))来执行。此程序体现了以下参考文献中描述的若干比对方案:Dayhoff, M.O. (1978) 用于检测远

缘关系的蛋白质-基质的进化变化的模型 (A model of evolutionary change in proteins-Matrices for detecting distant relationships) . Dayhoff, M.O. (编) 蛋白质序列和结构地图集 (Atlas of Protein Sequence and Structure) , 国家生物医学研究基金会 (National Biomedical Research Foundation) , 华盛顿哥伦比亚特区 (Washington DC) 第5卷, 增刊3, 第345-358页; Hein J. , 比对和系统发育的通用方法 (Unified Approach to Alignment and Phylogenies) , 第626-645页 (1990) ; 《酶学方法》第183卷, 学术出版公司 (Academic Press, Inc.) , 加利福尼亚州圣地亚哥 (San Diego, CA) ; Higgins, D.G. 和 Sharp, P.M. , CABIOS 5:151-153 (1989) ; Myers, E.W. 和 Muller W. , CABIOS 4:11-17 (1988) ; Robinson, E.D. , 《组合疗法 (Comb.Theor) 》11:105 (1971) ; Santou, N. Nes, M. , 《分子生物学与进化 (Mol.Biol.Evol.) 》4:406-425 (1987) ; Sneath, P.H.A. 和 Sokal, R.R. , 《数值分类法-数值分类法的原理与实践 (Numerical Taxonomy-the Principles and Practice of Numerical Taxonomy) 》, 弗里曼出版社 (Freeman Press) , 加利福尼亚州旧金山 (San Francisco, CA) (1973) ; Wilbur, W.J. 和 Lipman, D.J. , 《美国国家科学院院刊》80:726-730 (1983) 。

[0142] 或者, 用于比较的序列的最优比对可以通过 Smith 和 Waterman, Add. APL. Math 2: 482 (1981) 的局部一致性算法、通过 Needleman 和 Wunsch, 《分子生物学杂志 (J. Mol. Biol.) 》48:443 (1970) 的一致性比对算法、通过 Pearson 和 Lipman, 《美国国家科学院院刊》85:2444 (1988) 的类似性方法检索、通过这些算法的计算机化实施方案 (威斯康星遗传学软件包, 遗传学计算机组 (Genetics Computer Group, GCG) , 575 Science Dr., 威斯康星州麦迪逊中的 GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA 和 TFASTA) 或通过检查来执行。

[0143] 适用于确定序列一致性百分比和序列类似性的算法的一个优选实例是 BLAST 和 BLAST 2.0 算法, 其分别描述于 Altschul 等人, 《核酸研究 (Nucl. Acids Res.) 》25:3389-3402 (1977) 和 Altschul 等人, 《分子生物学杂志》215:403-410 (1990) 中。BLAST 和 BLAST 2.0 可以例如以本文所述的参数使用以确定两种或更多种多核苷酸之中的序列一致性百分比。用于进行 BLAST 分析的软件通过美国国家生物技术信息中心 (National Center for Biotechnology Information) 公开可用。在一个说明性实例中, 对于核苷酸序列, 累积得分可以使用参数 M (一对匹配残基的奖励得分; 始终 > 0) 和 N (错配残基的惩罚得分; 始终 < 0) 计算。当累积比对得分从其达到的最大值降低量 X; 累积得分因一次或多次负分残基比对的累积而变成 0 或低于 0; 或到达任一序列的末端时, 中断字命中点在各方向上的延伸。BLAST 算法参数 W、T 和 X 确定比对的灵敏度和速度。BLASTN 程序 (对于核苷酸序列) 使用如下默认参数: 字长 (W) 是 11, 并且期望值 (E) 是 10, 并且 BLOSUM62 计分矩阵 (参看 Henikoff 和 Henikoff, 《美国国家科学院院刊》89:10915 (1989)) 比对 (B) 是 50, 预期值 (E) 是 10, M=5, N=-4, 并且比较两条链。

[0144] 在某些实施例中, “序列一致性百分比”通过在至少 20 个位置的比较窗口比较两个最优比对序列确定, 其中比较窗口中的多核苷酸序列部分与用于两个序列的最优比对的参考序列 (其不包含添加或缺失) 相比可以包含 20% 或更少、通常 5 到 15% 或 10 到 12% 的添加或缺失 (即, 间隙)。百分比通过以下方式计算: 确定两个序列中存在的一致核酸碱基的位置数得到匹配位置数, 将匹配位置数除以参考序列中的总位置数 (即, 窗口大小), 并且将结果乘以 100 得到序列一致性百分比。

[0145] 本领域的普通技术人员应了解,作为遗传密码简并的结果,存在许多编码如本文所述的TCR的核苷酸序列。这些多核苷酸中的一些与编码结合到例如相同抗原的经修饰的TCR的天然或初始多核苷酸序列的核苷酸序列具有最小序列一致性。尽管如此,本发明明确地涵盖由于密码子使用差异而改变的多核苷酸。在某些实施例中,具体涵盖已经经过密码子优化以用于哺乳动物表达的序列。

[0146] 用于克隆、DNA分离、扩增和纯化;用于涉及DNA连接酶、DNA聚合酶、限制核酸内切酶等的酶促反应的标准技术;和各种分离技术是本领域的技术人员已知并且通常利用的技术。多种标准技术描述于Sambrook等人(1989)《分子克隆(Molecular Cloning)》,第二版,冷泉港实验室(Cold Spring Harbor Laboratory),纽约普莱恩维尤(Plainview, New York);Maniatis等人(1982)《分子克隆》,冷泉港实验室,纽约普莱恩维尤;Wu(编)(1993)《酶学方法》218,第I部分;Wu(编)(1979)《酶学方法》68;Wu等人(编)(1983)《酶学方法》100和101;Grossman和Moldave(编)《酶学方法》65;Miller(编)(1972)《分子遗传学实验(Experiments in Molecular Genetics)》,冷泉港实验室,纽约冷泉港(Cold Spring Harbor, New York);Old和Primrose(1981)《基因操纵原理(Principles of Gene Manipulation)》,加利福尼亚大学出版社(University of California Press),伯克利(Berkeley);Schleif和Wensink(1982)《分子生物学实用方法(Practical Methods in Molecular Biology)》;Glover(编)(1985)《DNA克隆(DNA Cloning)》第I和II卷,IRL出版社,英国牛津(Oxford, UK);Hames和Higgins(编)(1985)《核酸杂交(Nucleic Acid Hybridization)》,IRL出版社,英国牛津;以及Setlow和Hollaender(1979)《基因工程:原理和方法(Genetic Engineering: Principles and Methods)》,第1-4卷,普雷纳姆出版社(Plenum Press),纽约(New York)中。缩写和命名在使用时被视为本领域中标准的并且常用于专业杂志(例如本文引用的那些)中。

[0147] 核苷酸序列之间的同源性可以通过DNA杂交分析确定,其中双链DNA杂交体的稳定性与出现的碱基配对程度相关。高温和/或低盐含量的条件降低杂交体的稳定性,并且可以改变以防止具有低于所选同源性程度的序列退火。举例来说,对于具有约55%G-C含量的序列,40-50°C、6×SSC(氯化钠/柠檬酸钠缓冲液)和0.1%SDS(十二烷基硫酸钠)的杂交和洗涤条件指示约60-70%同源性,50-65°C、1×SSC和0.1%SDS的杂交和洗涤条件指示约82-97%同源性,并且52°C、0.1×SSC和0.1%SDS的杂交和洗涤条件指示约99-100%同源性。广泛范围的用于比较核苷酸和氨基酸序列(并且测量同源性程度)的计算机程序也是可用的,并且提供市售和自由软件的来源的清单见于Ausubel等人(1999)中。容易获得的序列比较和多序列比对算法分别是局部比对检索基本工具(Basic Local Alignment Search Tool, BLAST)(Altschul等人, 1997)和ClustalW程序。BLAST在因特网上在ncbi.nlm.nih.gov可用并且ClustalW的版本在www2.ebi.ac.uk可用。

[0148] 工业微生物菌株(例如,黑曲霉、无花果曲霉、泡盛曲霉、米曲霉、里氏木霉、米黑毛霉、乳酸克鲁维酵母、巴斯德毕赤酵母、酿酒酵母、大肠杆菌、枯草芽孢杆菌或地衣芽孢杆菌)、昆虫(果蝇)、哺乳动物(例如,中国仓鼠卵巢细胞系,CHO)或植物物种(例如,芥花、大豆、玉米、土豆、大麦、黑麦、小麦)可以用作用于重组产生TCR蛋白质的宿主细胞。在某些实施例中,高亲和力TCR蛋白质或可溶蛋白质的异源表达中的第一步骤,表达构筑体被组装以包括TCR或可溶TCR编码序列和控制序列,例如启动子、增强子和终止子。还可以包括其它序

列,例如信号序列和可选标记。为了实现TCR的细胞外表达,表达构筑体可以包括分泌信号序列。在实施例中,如果需要细胞质表达,那么信号序列不包括于表达构筑体上。在实施例中,启动子和信号序列在宿主细胞中起作用并且提供TCR或可溶TCR蛋白质的表达和分泌。可以包括转录终止子以确保高效转录。增强表达或蛋白质纯化的辅助序列也可以包括于表达构筑体中。

[0149] 根据本发明可以使用各种启动子(转录起始调节区)。适当启动子的选择可以取决于所提议的表达宿主。来自异源来源的启动子只要其在所选宿主中起作用就可以使用。

[0150] 启动子选择还取决于肽或蛋白质产生的所要效率和水平。诱导型启动子(例如tac)通常用以显著增加大肠杆菌中的蛋白质表达水平。蛋白质的过度表达可能对宿主细胞有害。因此,宿主细胞生长可能受限。诱导型启动子系统的使用使得宿主细胞可在诱导基因表达之前培养到可接受密度,因此促进更高产物产率。

[0151] 根据本发明可以使用各种信号序列。可以使用与TCR编码序列同源的信号序列。或者,还可以使用已经被选择或设计用于在表达宿主中高效分泌和加工的信号序列。举例来说,适合信号序列/宿主细胞对包括用于在枯草芽孢杆菌中分泌的枯草芽孢杆菌sacB信号序列,和用于巴斯德毕赤酵母分泌的酿酒酵母 α -交配因子或巴斯德毕赤酵母酸性磷酸酶phoI信号序列。信号序列可以通过编码信号肽酶裂解位点的序列直接连接到蛋白质编码序列,或通过由通常少于十个密码子组成的短核苷酸桥连接,其中桥确保下游TCR序列的正确阅读框架。

[0152] 已经针对真核蛋白质表达系统鉴别了用于增强转录和转译的元件。举例来说,将花椰菜花叶病毒(CaMV)启动子1000bp定位于异源启动子的任一侧上可以使植物细胞中的转录水平提高10到400倍。表达构筑体还应该包括适当转译起始序列。修饰表达构筑体以包括Kozak共有序列用于恰当转译起始可以使转译水平提高10倍。

[0153] 通常利用选择性标记,其可以是表达构筑体的一部分或从其分离(例如,由表达载体携载),使得标记可以整合于不同于相关基因的位点处。实例包括赋予抗生素抗性的标记(例如,对于大肠杆菌宿主细胞赋予氨苄西林抗性的bla、赋予多种多样的原核和真核细胞以卡那霉素抗性的nptII)或允许宿主生长于基本培养基上的标记(例如,HIS4使得巴斯德毕赤酵母或His-酿酒酵母能够在不存在组氨酸的情况下生长)。可选标记具有其自身的转录和转译起始和终止调节区以使得标记可独立表达。如果抗生素抗性用作标记,那么用于选择的抗生素的浓度将取决于抗生素而变化,通常范围介于10到600 μ g抗生素/mL培养基。

[0154] 表达构筑体通过利用已知重组DNA技术(Sambrook等人,1989;Ausubel等人,1999)组装。限制酶消化和连接是以连接DNA的两个片段的基本步骤。DNA片段的末端可能需要在连接之前修饰,并且这可以通过填充突出端、用核酸酶(例如,ExoIII)使片段的末端部分缺失、定点诱变或通过PCR添加新碱基对来实现。多连接子和衔接子可以用以促进所选片段的连接。表达构筑体典型地在利用大肠杆菌的多轮限制、连接和转化的各阶段中组装。众多适用于构筑表达构筑体的克隆载体在本领域中已知(λ ZAP和pBLUESCRIPT SK-1,Stratagene,加利福尼亚州拉荷亚(LaJolla,CA);pET,Novagen Inc.,威斯康星州麦迪逊-引用于Ausubel等人,1999中)并且特定选择对于本发明并不重要。克隆载体的选择将受经选择用于将表达构筑体引入宿主细胞中的基因转移系统影响。在每一阶段结束时,所得构筑体可以通过限制、DNA序列、杂交和PCR分析来分析。

[0155] 表达构筑体可以转化到宿主中作为线性或环状的克隆载体构筑体,或可以从克隆载体移出并且按原样使用或引入到递送载体上。递送载体促进所选宿主细胞类型中表达构筑体的引入和维持。表达构筑体通过多种已知基因转移系统中的任一种(例如,天然感受态、化学介导的转化、原生质体转化、电穿孔、生物弹射击转化、转染或结合)引入宿主细胞中(Ausubel等人,1999;Sambrook等人,1989)。基因转移系统取决于所用的宿主细胞和载体系统而选择。

[0156] 举例来说,表达构筑体可以通过原生质体转化或电穿孔而引入酿酒酵母细胞中。酿酒酵母的电穿孔容易实现,并且产生与原生质球转化相当的转化效率。

[0157] 在除配位体结合部位以外的位点处与TCR蛋白质特异性地反应的单克隆或多克隆、优选单克隆抗体可以通过本领域中已知的方法制备,并且许多是市售的。参看例如Harlow和Lane(1988)《抗体:实验室手册(Antibodies:A Laboratory Manual)》,冷泉港实验室;Goding(1986)《单克隆抗体:原理和实践(Monoclonal Antibodies:Principles and Practice)》,第2版,学术出版社(Academic Press),纽约;和Ausubel等人(1999)《最新分子生物学实验方法汇编(Current Protocols in Molecular Biology)》,约翰·威利父子公司(John Wiley&Sons, Inc.),纽约。

[0158] 对特定靶配位体具有特异性的呈细胞结合或可溶形式的TCR适用作例如用于筛选生物样品(例如细胞、组织样品、活检物质、体液等)或用于检测测试样品中靶配位体的存在的诊断探针。TCR时常通过共价或非共价连接提供可检测信号的物质而标记。适合标记包括(但不限于)放射性核素、酶、底物、辅因子、抑制剂、荧光剂、化学发光剂、磁性粒子等。另外,TCR可以偶合到针对第二结合分子的配位体:举例来说,TCR可以经生物素化。结合到靶细胞或分子的TCR的检测然后可以通过结合可检测抗生蛋白链菌素(荧光、放射性、化学发光或其它可检测分子连接的抗生蛋白链菌素,或其中存在发色底物的酶可用于的抗生蛋白链菌素)来实现。描述待共价结合到scTCR的此类标记和/或毒性化合物的使用的美国专利包括(但不限于)第3,817,837号、第3,850,752号、第3,927,193号、第3,939,350号、第3,996,345号、第4,277,437号、第4,275,149号、第4,331,647号、第4,348,376号、第4,361,544号、第4,468,457号、第4,444,744号、第4,640,561号、第4,366,241号、第RE 35,500号、第5,299,253号、第5,101,827号、第5,059,413号。

[0159] 经标记的TCR可以使用对于所使用的标记适当的监测装置或方法检测。可以使用荧光显微术或荧光激活细胞分选术,其中标记是荧光部分,并且在标记是放射性核素时,可以使用例如 γ 计数、放射自显影或液体闪烁计数,限制条件为所述方法对于要分析的样品和所用的放射性核素是适当的。另外,可以利用二级检测分子或粒子,其中存在识别TCR的部分的可检测分子或粒子,所述部分在不存在如本文提到的MHC组分的情况下不是靶配位体的结合位点的一部分。本领域知晓适用于原位诊断成像的化合物;参看例如美国专利第5,101,827号、第5,059,413号。适用于体内疗法和/或成像的放射性核素包括¹¹¹铟、⁹⁷铷、¹²⁵碘、¹³¹碘、¹²³碘、⁶⁷镓、⁹⁹锝。毒素包括尤其白喉毒素、蓖麻毒素和蓖麻子毒素,限制条件为在TCR-毒素复合物结合到细胞后,毒性部分内化,使得其可以发挥其细胞毒性作用。免疫毒素技术为本领域所熟知,并且适合毒性分子包括(但不限于)化学治疗药物,例如长春地辛(vindesine)、抗叶酸剂(例如甲氨蝶呤)、顺铂(cisplatin)、丝裂霉素、蒽环霉素(anthracycline)(例如道诺霉素(daunomycin)、道诺比星(daunorubicin)或阿霉素

(adriamycin))；和细胞毒性蛋白质,例如核糖体失活蛋白质,例如,白喉毒素、美洲商陆抗病毒蛋白质、相思豆毒素、蓖麻毒素、假单胞菌外毒素A或其重组衍生物。一般来说,参看例如Olssnes和Pihl(1982)《药物疗法(Pharmac. Ther.)》25:355-381;和《用于癌症检测和疗法的单克隆抗体(Monoclonal Antibodies for Cancer Detection and Therapy)》,Baldwin和Byers编,第159-179页,学术出版社,1985。

[0160] 已经公开了TCR分子的通式结构以及制备和使用(包括结合到肽:主要组织相容性复合物)方法。参看例如PCT/US98/04274、PCT/US98/20263、W099/60120。

[0161] 医药组合物和治疗剂

[0162] 对特定靶配位体具有特异性的TCR适用于治疗被认为罹患与特定抗原相关的疾病(例如,赘生性疾病或病症,例如癌症)的动物和哺乳动物,包括人类。可以根据本文所述的方法治疗的癌症的类型的实例包括(但不限于)维尔姆斯氏肿瘤、膀胱癌、乳癌、结肠癌、结肠直肠癌、食道癌、胃癌、肝细胞癌、肾癌、白血病、肝癌、肺癌、淋巴瘤、黑素瘤、成神经细胞瘤、非小细胞肺癌、口腔癌、骨肉瘤、卵巢癌、胰腺癌、前列腺癌、肾癌、皮肤癌、小细胞肺癌和睾丸癌。

[0163] 治疗产品可以使用本文展示的物质制备。治疗产品的有效量是在受试者中产生可测量效果的最小剂量。治疗产品容易由本领域的普通技术人员制备。在一个实施例中,本发明的scTCR直接投与到患者。在一个实施例中,本发明的scTCR连接到PEG或免疫球蛋白恒定区,如本领域中已知。此实施例延长了血清清除。在一个实施例中,scTCR连接到化学治疗剂或药物以便将药物递送到靶细胞,例如癌细胞。在一个实施例中,scTCR连接到生物效应分子,例如细胞因子(Tayal和Kalra(2008)《欧洲药理学杂志(Eur J Pharmacol.)》,579,1-12)。在一个实施例中,scTCR以抗肿瘤活性连接到细胞因子,例如IL-2、IL-12或TNF α (Wong等人(2011)《蛋白质工程、设计与选择》,24,373-83)。在一个实施例中,scTCR连接到免疫抑制性细胞因子,例如IL-10或IL-13(Stone等人(2012)《蛋白质工程》)。在一个实施例中,scTCR连接到另一抗原结合分子以形成双特异性药剂(Miller等人(2010)《蛋白质工程、设计与选择》,23,549-57;Thakur和Lum(2010)《分子治疗学当前观点(Curr Opin Mol Ther.)》,12,340-9)。在一个实施例中,双特异性分子由scTCR连接到单链Fv(例如抗CD3)组成(Bargou等人(2008)《科学》,321,974-7;Liddy等人(2012)《自然·医学》,18,980-7),以交联T细胞和病变细胞。在一个实施例中,scTCR连接到TCR信号传导域(例如CD3)以形成嵌合抗原受体(Porter等人(2011)《新英格兰医学杂志(N Engl J Med)》,365,725-33;Sadelain等人(2009)《免疫学当前观点》,21,215-23;Stroncek等人(2012)《转化医学杂志(J Transl Med)》,10,48)。投药的这些方法和其它方法(例如静脉内)在本领域中已知。适用剂量可以由本领域的普通技术人员确定。

[0164] scTCR组合物可以通过本领域中已知的任何方式调配。其典型地可以制备为可注射剂,尤其用于静脉内、腹膜内或滑膜投药(途径由特定疾病决定);或调配物,用于鼻内或口服投药,呈液体溶液或悬浮液形式。还可以制备适用于在注射或其它投药之前溶解或悬浮于液体中的固体形式。制剂还可以例如经乳化,或蛋白质/肽封装于脂质体中。

[0165] 活性成分通常与任选的医药添加剂(例如赋形剂或载剂)混合,所述医药添加剂是医药学上可接受的并且与活性成分相容。适合赋形剂包括(但不限于)水、生理盐水、葡萄糖、甘油、乙醇等和其组合。scTCR于可注射剂、气雾剂或经鼻调配物中的浓度通常在0.05到

5mg/ml范围内。特定有效剂量的选择是已知的并且由本领域的普通技术人员在无过度实验的情况下进行。类似剂量可以投与到其它粘膜表面。

[0166] 另外,必要时,可以包括scTCR的疫苗可以含有微量的医药添加剂,例如辅助物质,例如润湿或乳化剂、pH缓冲剂和/或增强疫苗有效性的佐剂。可能有效的佐剂的实例包括(但不限于):氢氧化铝;N-乙酰基-胞壁酰基-L-苏氨酰基-D异谷氨酰胺(thr-MDP);N-乙酰基-正-胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺(CGP 11637,称为nor-MDP);N-乙酰基胞壁酰基-L-丙氨酰基-D-异谷氨酰胺酰基-L-丙氨酸-2-(1'-2'-二棕榈酰基-sn-甘油-3羟基磷酰氧基)-乙胺(CGP 19835A,称为MTP-PE);和RIBI,其在2%角鲨烯/Tween®80乳液中含有三种从细菌提取的组分:单磷酰脂质A、二霉菌酸海藻糖和细胞壁骨架(MPL+TDM+CWS)。还可以使用如本领域中已知的此类额外调配物和投药模式。

[0167] 本发明的scTCR和/或具有与TCR可变区类似(大于90%一致性)的一级结构并且维持对于标靶配位体的高亲和力的结合片段可以调配成中性或盐形式的疫苗。医药学上可接受的盐包括(但不限于)用无机酸(例如,盐酸或磷酸)和有机酸(例如,乙酸、草酸、酒石酸或马来酸)形成的酸加成盐(用肽的游离氨基形成)。用游离羧基形成的盐也可以来源于无机碱,例如,钠、钾、铵、钙或铁氢氧化物;和有机碱,例如,异丙胺、三甲胺、2-乙基氨基-乙醇、组氨酸和普鲁卡因(procaine)。

[0168] 用于治疗用途的scTCR以与剂量调配物相容的方式投与,并且根据本领域已知的内容,其量和方式例如是预防和/或治疗有效的。待投与的量,其通常在每剂量约100到20,000 μ g蛋白质范围内,更通常在每剂量约1000到10,000 μ g蛋白质范围内。类似组合物可以使用经标记的scTCR以类似方式投与以用于成像,以便例如检测标靶配位体所结合的细胞。所需投与的活性成分的确切量可以取决于医生或兽医的判断,并且可以为每个个体所特有,但此类确定在此类执业医生的技能范围内。

[0169] TCR产物可以在单一剂量中;在二剂量时程(例如间隔二到八周)中;或在多剂量时程中给出。多剂量时程是其中主要治疗过程可以包括1到10个或更多个单独剂量、接着是视需要在后续时间间隔投与以维持和/或加强反应的其它剂量的时程。

[0170] 除非另外陈述,否则所描述或示例的组分的每种调配物或组合可以用以实践本发明。物质的具体名称预期是示例性的,因为已知本领域的普通技术人员可以按不同方式命名相同物质。当在本文中描述化合物,方式为例如在化学式或化学名称中不规定化合物的特定异构体或对映异构体时,所述描述预期包括个别或以任何组合描述的化合物的每种异构体和对映异构体。本领域的普通技术人员将了解,除具体示例的那些以外的方法、标靶配位体、生物活性基团、起始物质和合成方法可以用于不借助于过度实验而实践本发明。任何此类方法、标靶配位体、生物活性基团、起始物质和合成方法的所有本领域已知的功能等效物预期包括于本发明中。每当在说明书中给出范围(例如温度范围、时间范围或组成范围)时,所有中间范围和子范围以及所给出范围内所包括的所有个别值预期都包括于本发明中。

[0171] 确切配方、投药途径和剂量可以由个别医生鉴于患者的病况选择(参看例如Fingl等人,《治疗学的药理学基础(The Pharmacological Basis of Therapeutics)》,1975,第1章第1页)。

[0172] 应注意,主治医生会了解如何和何时因毒性或器官功能障碍而终止、中断或调整

投药。反之,主治医生还会了解在临床反应不充足(排除毒性)时将治疗调整到更高水平。处理所关注病症时的投与剂量的量值将随待治疗的病况的严重程度和投药途径而变化。病况的严重程度可以例如部分通过标准预后评估方法评估。此外,剂量和可能剂量频率也将根据个别患者的年龄、体重和反应而变化。兽医学中也可以使用与上文论述的程序相当的程序。

[0173] 取决于所治疗的特定病况和所选的靶向方法,此类药剂可以经调配和全身或局部地投与。调配和投药的技术可以见于Alfonso和Gennaro (1995) 中。适合途径可以包括例如口服、直肠、经皮、阴道、经粘膜或肠道投药;肠胃外递送,包括肌肉内、皮下或髓内注射,以及鞘内、静脉内或腹膜内注射。

[0174] 对于注射,本发明的药剂可以于水溶液中,优选于生理学相容的缓冲液(例如汉克溶液(Hanks's solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)或生理盐水缓冲液)中调配。对于经粘膜投药,在调配物中使用适于待渗透的屏障的渗透剂。此类渗透剂通常是本领域中已知的。

[0175] 医药学上可接受的载剂用以将本文公开用于实践本发明的化合物调配成适用于全身性投药的剂量的用途属于本发明的范围内。通过恰当选择载剂和适合制造实践,本发明的组合物、尤其调配成溶液的组合物可以在肠胃外,例如通过静脉内注射而投与。适当化合物可以容易使用本领域中熟知的医药学上可接受的载剂调配成适用于口服投药的剂量。此类载剂使本发明的化合物能调配成片剂、丸剂、胶囊、液体、凝胶、糖浆、浆液、悬浮液等,用于由待治疗的患者口服摄取。

[0176] 预期细胞内投与的药剂可以使用本领域的普通技术人员熟知的技术投与。举例来说,此类药剂可以封装到脂质体中,并且然后如上文所述投与。脂质体是具有水性内部的球形脂质双层。在脂质体形成时存在于水溶液中的所有分子都并入水性内部中。脂质体内含物受外部微环境保护,并且因为脂质体与细胞膜融合,所以被高效递送到细胞的细胞质中。另外,由于其疏水性,因此小有机分子可以直接细胞内投与。

[0177] 适用于本发明中的医药组合物包括其中活性成分以有效实现预期目的量包含在内的组合物。有效量的确定完全在本领域的技术人员的能力范围内,尤其根据本文所提供的详细公开内容。

[0178] 除了活性成分之外,这些医药组合物可以含有有助于将活性化合物加工成可以在医药学上使用的制剂的适合医药学上可接受的载剂,包含赋形剂和助剂。经调配用于口服投药的制剂可以呈片剂、糖衣药丸、胶囊或溶液形式,包括经调配用于延迟释放或仅在药物到达小肠或大肠时释放的制剂。

[0179] 本发明的医药组合物可以按本身已知的方式制造,例如,借助于常规混合、溶解、粒化、糖衣药丸制备、悬浮、乳化、封装、包覆或冻干工艺。

[0180] 用于肠胃外投药的医药调配物包括水溶性形式的活性化合物的水溶液。另外,活性化合物的悬浮液可以制备成适当的油性注射悬浮液。适合的亲脂性溶剂或媒剂包括脂肪油,例如芝麻油;或合成脂肪酸酯,例如油酸乙酯或甘油三酯;或脂质体。水性注射悬浮液可以含有增加悬浮液粘度的物质,例如羧甲基纤维素钠、山梨糖醇或葡聚糖。任选地,悬浮液还可以含有适合的稳定剂或提高化合物的溶解度以允许制备高度浓缩溶液的试剂。

[0181] 用于口服用途的医药制剂可以通过以下方式获得:将活性化合物与固体赋形剂组

合,任选地研磨所得混合物,和在必要时添加适合助剂之后,加工颗粒的混合物,获得片剂或糖衣药丸芯。具体来说,适合的赋形剂是填充剂,例如糖,包括乳糖、蔗糖、甘露糖醇或山梨糖醇;纤维素制剂,例如玉米淀粉、小麦淀粉、水稻淀粉、土豆淀粉、明胶、黄蓍胶、甲基纤维素、羟丙基甲基纤维素、羧甲基纤维素钠和/或聚乙烯吡咯烷酮(PVP)。必要时,可以添加崩解剂,例如交联聚乙烯吡咯烷酮、琼脂或海藻酸或其盐(例如海藻酸钠)。

[0182] 糖衣药丸芯具有适合包衣。出于此目的,可以使用浓缩糖溶液,其可以任选地含有阿拉伯胶、滑石、聚乙烯吡咯烷酮、卡波莫凝胶(carbopol gel)、聚乙二醇和/或二氧化钛、漆溶液和适合的有机溶剂或溶剂混合物。染料或颜料可以添加到片剂或糖衣药丸包衣中以鉴别或表征活性化合物剂量的不同组合。

[0183] 可以经口使用的医药制剂包括由明胶制成的推入配合胶囊(push-fit capsule)以及由明胶和例如甘油或山梨糖醇的塑化剂制成的软密封胶囊。配合插入胶囊可以含有活性成分与例如乳糖的填充剂、例如淀粉的粘合剂和/或例如滑石或硬脂酸镁的润滑剂以及任选的稳定剂的混杂物。在软胶囊中,活性化合物可以溶解或悬浮于适合液体(例如脂肪油、液体石蜡或液体聚乙二醇)中。另外,可以添加稳定剂。

[0184] 治疗方法

[0185] 高亲和力TCR和包含高亲和力TCR的医药组合物可以用以例如治疗患有癌症、肿瘤、恶性肿瘤或赘生性疾病或病症的患者。在一个实施例中,治疗患有癌症的患者的方法包含投与本文所述的高亲和力TCR。在一个实施例中,高亲和力TCR对WT1具有特异性。在一个实施例中,TCR包括包含SEQ ID NO:3中阐述的氨基酸序列的V β 。在另一实施例中,TCR包括包含SEQ ID NO:4中阐述的氨基酸序列的V α 。在一个实施例中,高亲和力TCR是包含SEQ ID NO:5中阐述的氨基酸序列的单链TCR。在另一实施例中,高亲和力TCR与治疗剂(例如,化学治疗剂)组合投与。在又一实施例中,高亲和力TCR结合到生物活性基团。

[0186] 本发明的另一方面提供了一种用于将T细胞过继转移到有需要的患者的方法,其包含投与表达本文所述的野生型TCR或高亲和力TCR的T细胞。在一个实施例中,T细胞已经用编码对WT1具有特异性的TCR的多核苷酸转染。在一个实施例中,TCR包括包含SEQ ID NO:3中阐述的氨基酸序列的V β 。在另一实施例中,TCR包括包含SEQ ID NO:4中阐述的氨基酸序列的V α 。在一个实施例中,高亲和力TCR是包含SEQ ID NO:5中阐述的氨基酸序列的单链TCR。

[0187] 实例

[0188] 以下实例进一步描述了本发明的非限制性实例。

[0189] 实例1

[0190] 经工程化以获得对肽/HLA-A2抗原的更高亲和力的TCR

[0191] 用以发现或产生单链TCR以获得提高的亲和力和稳定性的通用策略展示于图3中。所述方法包括六个步骤,如所说明:

[0192] 1) 将来自T细胞克隆(例如P22)(图1中展示的序列,以及包含SEQ ID NO:1中阐述的氨基酸序列的V β 和包含SEQ ID NO:2中阐述的氨基酸序列的V α)的V α 和V β TCR基因克隆为单链TCR形式以用于呈现。V区识别与HLA-A2复合的HLA-A2限制抗原肽WT1(SEQ ID NO:6)。在本发明中,将来自克隆P22(例如Dossett等人(2009)《分子治疗学(Mol Ther)》,17(4),742)的TCR V区基因克隆为单链形式(V β -连接子-V α),并且引入酵母呈现载体中用于表达

于酵母表面上(图4)。

[0193] 2) 针对具有抗V β 抗体的稳定化变异体,产生易错库和进行FACs或磁珠选择。因为单链V α 和V β TCR通常由于稳定化恒定区的失去而不稳定,所以产生易错诱变库以针对使得可稳定表达于酵母表面上的稳定化突变选择,但可以使用其它呈现形式,包括(但不限于)噬菌体和哺乳动物呈现。噬菌体呈现载体和克隆产生了10¹¹的库大小,而酵母呈现载体和同源重组步骤产生了10¹⁰的库大小(Benatuil等人(2010)《蛋白质工程、设计与选择》,23,155-9)。各种方法已经用于选择变异体,包括与固定化配位体的基于亲和力的结合(噬菌体呈现)或抗原情况下的磁粒选择(酵母呈现),或经标记的肽-MHC抗原情况下的荧光激活细胞分选术(酵母呈现)。在本实例中,利用针对识别折叠表位的TCR V β 的抗体,荧光激活细胞分选术(FACS)或磁珠选择用以分离具有改进的抗体结合的变异体。

[0194] 3) 评估从易错库的选择中分离的scTCR克隆的热稳定性,并且针对亲和力成熟的模板,选择稳定化变异体,并且进行测序。典型地,鉴别促进增加的酵母表面水平和更大溶液稳定性的单一位点突变。

[0195] 4) 将稳定化scTCR序列用作用于通常在CDR1 α 、CDR3 α 、CDR3 β 中产生CDR库的模板,但还可以使用其它区,包括(但不限于)CDR1 β 、CDR2 α 、CDR2 β 和HV4。在本发明中,通过使用磁珠选择和/或荧光激活细胞分选术(FACS),针对改进的与肽:MHC的结合从CDR库选择酵母呈现变异体,但可以使用利用其它方法的选择,包括(但不限于)噬菌体呈现情况下的淘选或哺乳动物呈现情况下的磁性选择或FACS。

[0196] 5) 评估从CDR库的选择中分离的scTCR克隆的与肽:MHC的特异性结合,所述scTCR克隆针对所述肽:MHC工程化。从酵母克隆拯救质体,并且对其测序。

[0197] 6) 如果需要进一步的亲和力提高,那么步骤5中所选择的scTCR克隆可以用作用于在不选择突变的其它环或区(例如CDR1 α 、CDR3 α 、CDR3 β)中产生额外库的模板,但还可以使用其它区,包括(但不限于)CDR1 β 、CDR2 α 、CDR2 β 和HV4。这些步骤中的每一个的实例进一步描述于下文中。

[0198] 实例2

[0199] 人类TCR A6的分析,其使用V α 2,与Tax:HLA.A2复合

[0200] TCR都采用类似Ig折叠和对接角,并且pepMHC的TCR识别完全由CDR环上的特定残基介导(Garcia等人(2009)《自然·免疫学》,10,143-7;Marrack等人(2008)《免疫学年鉴》,26,171-203;Rudolph等人(2006)《免疫学年鉴》,24,419-66)。尽管WT1TCR的晶体结构在本发明提出时不可用,但展示了使用WT1P22TCR的相同V α 2域的A6:Tax肽:HLA-A2复合物(PDB:1A07)(Garboczi等人(1996)《自然》,384,134-141)。复合物的侧视图显示,含有六个CDR的可变域的末端对接到Tax:HLA.A2分子上,结合位点的中心区定位于肽Tax上(图2A)。晶体结构不包括恒定区 α ,但恒定区有助于使全长构筑体稳定化。上文所述的在步骤2中选择的稳定化突变通常在框架区中选择,例如V α /V β 界面或C α /V α 或C β /V β 界面的接合点在全长TCR中的存在处。

[0201] 展示了除了六个CDR环以外,TCR“被去除”的Tax:HLA-A2复合物的俯视图(图2B)。此图显示,TCR在肽-MHC上采用对角线位置,这是现在对于所有TCR:肽-MHC结构都观察到的发现。在此方向上,两个CDR3环定位于肽上,而来自CDR1和CDR2环的各种残基主要与MHC分子的螺旋相互作用。出于步骤4和6中的亲和力成熟的目的,这些环通常被靶向用于产生亲

和力成熟库,但可以使用其它区。

[0202] 实例3

[0203] WT1TCR的酵母呈现

[0204] 为了针对提高的稳定性(步骤2)或提高的亲和力(步骤5)进行选择,有必要使用如下呈现系统,其中可以分别针对与识别构象表位的抗体或肽:MHC配位体的结合,筛选TCR突变体的库。三种呈现系统已经用于使TCR工程化以获得更高亲和力,并且可以用于此过程:酵母呈现、噬菌体呈现和T细胞(哺乳动物细胞)呈现。替代性呈现方法(例如核糖体、RNA、DNA和CIS呈现)也可能适用于此过程。在所有这些情况下,将对于抗原具有低亲和力的野生型TCR克隆到系统中,并且用作用于使TCR工程化以针对肽:MHC配位体具有增强的稳定性和亲和力的模板。这些系统中的任一种可以应用于此处描述的方法,其中单一TCR被用作具有增强的结合性质的TCR的库和选择的模板。

[0205] 在本实例中,酵母呈现被用作平台(图4)。WT1TCR被用作用于经由易错诱变使突变稳定化的模板,并且从选择中分离的稳定化克隆被用作亲和力成熟的模板。

[0206] 实例4

[0207] 稳定化WT1TCR,WT1-D13的易错库构筑和选择

[0208] 如先前所描述(Richman等人(2009)《分子生物学方法(Methods Mol Biol)》504,323-350)利用WT1反应性细胞系(称为P22)作为模板,产生WT1易错库。因此通过组合经线性化的pCT302载体、WT1易错PCR产物和感受态EBY100酵母细胞,将人类WT1易错scTCR库引入酵母呈现载体中。所得库含有约 2.3×10^7 个独立克隆,通过在电穿孔之后接种限制稀释等分试样的酵母判断。针对与两种识别人类hV β 3的抗体的结合,经由FACS根据表1选择库,所述抗体是抗hV β 3.1 FITC IgG(赛默科技(Thermo Scientific))和抗hV β 3 FITC IgM(贝克曼库尔特(Beckman Coulter))。

[0209] 表1.分选条件

分选	条件
[0210]	赛默科技 hV β 3.1 FITC (1:10); AlexaFluor® 647 山羊抗小鼠 IgG (1:100) 和 贝克曼库尔特 hV β 3 FITC IgM (1:10); 山羊抗小鼠 IgM APC (1:4)
	赛默科技 hV β 3.1 FITC (1:10); AlexaFluor 647®山羊抗小鼠 IgG (1:100) 和 贝克曼库尔特 hV β 3 FITC IgM (1:10); 山羊抗小鼠 IgM APC (1:4)
	赛默科技 hV β 3.1 FITC (1:10); AlexaFluor® 647 山羊抗小鼠 IgG (1:100) 和 贝克曼库尔特 hV β 3 FITC IgM (1:10); 山羊抗小鼠 IgM APC (1:4)

[0211] 使用热变性研究,我们已经鉴别了这些抗体识别V β 3上的折叠表位(数据未展示)。使用AlexaFluor®647山羊抗小鼠IgG(生命技术(Life Technologies))和山羊抗小鼠IgM APC(英杰(Invitrogen))二级抗体扩增信号。在3次迭代分选期间,V β 3阳性染色群体出现(图5A)。在第3次分选之后,分离被称为WT1-D13的克隆,其具有改进的V β 3荧光(图5B)并且当被加热到80°C时展示热稳定性(数据未展示)。WT1-D13克隆被用作亲和力成熟的模板。

[0212] 实例5

[0213] 具有增强的与WT1:HLA.A2,WT1.1的结合的WT1TCR的CDR1 α 库构筑和选择

[0214] 从易错PCR库的选择中分离的稳定化WT1-D13克隆被用作用于经由重叠延伸剪接(SOE)产生跨越4个相邻残基的CDR1 α 库的模板(Horton等人(1990)《生物技术(Biotechniques)》,8,528-535)。因此通过组合经线性化的pCT302载体、WT1-D13CDR1 α 库PCR产物和感受态EBY100酵母细胞,将人类WT1-D13CDR1 α scTCR库引入酵母呈现载体中。所得库含有约 3.1×10^6 个独立克隆,通过在电穿孔之后接种限制稀释等分试样的酵母判断。根据表2针对与WT1(RMFPNAPYL,SEQ ID NO:6)/HLA.A2/Ig二聚体(BD DimerX)的结合,对WT1-D13CDR1 α 库进行FACS分选。

[0215] 表2.分选条件

分选	条件
1	100 nM WT1:HLA.A2 二聚体 APC 结合的山羊抗小鼠二级抗体 (1:100)
2	100 nM WT1:HLA.A2 二聚体 APC 结合的山羊抗小鼠二级抗体 (1:100)
3	
4	
5	
	200 nM WT1:HLA.A2 二聚体 APC 结合的山羊抗小鼠二级抗体 (1:100)

[0216] [0217] 在用WT1(RMFPNAPYL,SEQ ID NO:6)/HLA-A2/Ig二聚体的五轮FACS选择之后,适中阳性染色群体开始出现(图6A)。在第5次分选之后分离的克隆WT1-D13.1展示与WT1(RMFPNAPYL,SEQ ID NO:6)/HLA.A2的结合的适度改善,并且被用作进一步亲和力成熟的模板(图6B)。

[0218] 实例6

[0219] 具有进一步增强的与WT1:HLA.A2,WT1.1.1的结合的WT1TCR的CDR3库构筑和选择

[0220] 为了进一步提高WT1scTCR的亲和力,使用从WT1-D13CDR1 α 库分离的WT1-D13.1克隆作为模板,产生CDR3库。通过重叠延伸剪接(SOE)PCR,制备在每个CDR3中一次跨越5个相邻密码子的简并密码子,来产生WT1-D13.1CDR3库(2个库在CDR3 β 环中;2个库在CDR3 α 环中)。因此通过组合经线性化的pCT302载体、WT1-D13.1CDR3PCR产物(即CDR3 α 1、CDR3 α 2、CDR3 β 1或CDR3 β 2库)和感受态EBY100酵母细胞,将每个WT1-D13.1CDR3库引入酵母呈现载体中。将四个所得库汇集,并且所得组合库含有约 3.5×10^6 个独立克隆,如通过在电穿孔之后接种限制稀释等分试样的酵母确定。根据表3中的图表针对与WT1(RMFPNAPYL,SEQ ID NO:6)/HLA.A2/Ig二聚体(BD DimerX)的结合,对WT1-D13CDR3组合库进行FACS分选。

[0221] 表3.分选条件

分选	条件
1	100 nM WT1:HLA.A2 二聚体 APC 结合的山羊抗小鼠二级抗体 (1:100)

[0223]	2	100 nM WT1:HLA.A2 二聚体 APC 结合的山羊抗小鼠二级抗体 (1:100)
	3	10 nM WT1:HLA.A2 二聚体 APC 结合的山羊抗小鼠二级抗体 (1:100)

[0224] 在用WT1 (RMFPNAPYL, SEQ ID N0:8) /HLA-A2/Ig二聚体的三轮FACS选择之后, 阳性染色群体开始出现(图7A)。在第3次分选之后分离的克隆WT1-D13.1.1展示增加的与WT1 (RMFPNAPYL, SEQ ID N0:8) /HLA.A2的结合(图7B)。

[0225] 实例7

[0226] 高亲和力WT1TCR,WT1-D13.1.1的结合分析

[0227] 为了评估从CDR3库的选择中分离的WT1-D13.1.1克隆的结合, 将呈现WT1-D13.1.1的酵母用从大肠杆菌表达和纯化的WT1 (RMFPNAPYL, SEQ ID N0:6) /HLA.A2二聚体 (HLA-A2-Ig) 和单体滴定。在160pM到500nM下分析WT1/A2二聚体(图8A), 并且在6.4nM到4μM下分析单体(图8B)。然后洗涤酵母细胞并且通过流式细胞术进行分析。绘制平均荧光强度(MFI) 相较于WT1/HLA-A2复合物的浓度的每个直方图。使用非线性回归分析将各值标准化, 并且分别确定二聚体和单体的25nM和240nM的 $K_{D,app}$ 值(图8C和8D)。因此, WT1-D13.1.1展现纳摩尔亲和力。

[0228] 实例8

[0229] 可溶高亲和力WT1TCR,WT1-D13.1.1的结合分析

[0230] 为了进一步展示WT1-D13.1.1scTv以高亲和力特异性地结合WT1/HLA-A2, 使可溶形式的WT1-D13.1.1scTv从大肠杆菌包涵体表达并且再折叠, 并且经由C末端BirA标签生物素化(Aggen等人(2011)《蛋白质工程、设计与选择》, 24, 361-72; Zhang等人(2007)《实验医学杂志》, 204, 49-55)。将人类细胞系T2 (HLA-A2+) 与1μM Tax、MART-1或WT1肽一起培育, 并且洗涤。将生物素化WT1-D13.1.1scTv于不预负载有肽(图9A)、或预负载有阴性肽Tax (4nM 到1μM) (图9B)、无用肽MART-1 (4nM 到1μM) (图9C)、WT1 (4nM 到1μM) (图9D) 的T2细胞上滴定。将细胞洗涤, 并且与SA-PE一起培育, 并且通过流式细胞术进行分析。仅负载有WT1肽的细胞由WT1-D13.1.1TCR结合(图9A-D), 表明可溶TCR对WT1具有特异性。MFI相较于WT1滴定的TCR浓度的曲线图的非线性回归显示, 可溶TCR展现260nM的最低 K_D 值(图9E)。

[0231] 实例9

[0232] 经分离以获得针对WT1抗原的提高的亲和力的TCR的序列分析

[0233] 从经分离的质体确定WT1特异性 (P22、D13、D13.1、D13.0.1和D13.1.1) 单链TCR的序列, 并且将其展示于图1中。P22、D13、D13.1、D13.0.1和D13.1.1的VB链的氨基酸序列分别阐述于SEQ ID N0:1、21、21、3和3中, 并且P22、D13、D13.1、D13.0.1和D13.1.1的Va链的氨基酸序列分别阐述于SEQ ID N0:2、22、4、2和4中。注意, 通过从最终亲和力成熟的scTCR D13.1.1 (SEQ ID N0:5) 去除CDR1α突变来构筑D13.0.1。图1中的加下划线的氨基酸位置指示起因于针对稳定化突变的易错库选择的突变。框中的氨基酸位置展示选自CDR库的亲和力增强性突变。

[0234] 实例10

[0235] CD8和CD4T细胞中的WT1-P22、WT1-D13.1、WT1-D13.0.1和WT1-D13.1.1TCR的体外活性

[0236] 为了评估T细胞中的不同WT1特异性TCR的活性,将CD8(图10A)和CD4(图10B)T细胞从AAD转基因小鼠(这些是如下的小鼠:其具有由HLA-A2的 α_1 和 α_2 域和小鼠D b 的 α_3 域组成的杂交I类基因;这些AAD小鼠可获自杰克逊实验室(Jackson Laboratories))中分离。将细胞用与抗CD3和抗CD28抗体偶合的珠子活化,并且然后用WT1-P22、WT1-D13.1、WT1-D13.0.1和WT1-D13.1.1TCR(序列不含有D13稳定化突变,V β F48S和D51G)转导,如Chervin等人,(2013)《基因疗法(Gene Ther)》.20 (6):634-44中所描述。将T细胞与不同浓度的肽WT1和通过对来自AAD小鼠的脾细胞进行伴刀豆球蛋白A(Concanavilin A)刺激而制备的AAD母细胞一起培育。在24小时培育之后,使用ELISA分析上清液的IFN- γ 浓度。CD8T细胞在D13.0.1和D13.1.1TCR的情况下展示最大活性(图10A)。CD4T细胞仅经D13.1.1TCR活化,表明D13.1.1可以独立于CD8介导活性(图10B)。在其它HLA-A2结合肽(例如MART1)的情况下未观察到反应性。

[0237] 实例11

[0238] CD8T细胞中的WT1-D13.1.1TCR与结构上类似于WT1的人类肽无反应性

[0239] 为了进一步确定高亲和力WT1-D13.1.1TCR的特异性,评估结构上类似于WT1肽的肽的体外活性。基于WT1的9个残基处的保守突变,针对结构上类似于WT1肽的肽,执行蛋白质组搜索。然后经由预测算法获取存在于人类蛋白质组中的肽与HLA-A2的结合能力。合成预计以最高亲和力结合HLA-A2的十种肽(图11),并且测试使经高亲和力WT1-D13.1.1TCR转导的CD8T细胞活化的能力。这些肽中无一者呈现活性,表明此TCR当与这10种结构类似肽一起呈递时维持特异性。

[0240] 实例12

[0241] WT1、WT1-D13.1和WT1-D13.1.1TCR的治疗形式

[0242] 现在众所周知,较高亲和力TCR可以按各种形式用于靶向表达相应抗原的细胞。因此,显而易见的是,由上文展示的工程化策略产生的TCR可以按可溶形式使用或按TCR基因疗法形式用于过继T细胞疗法,如图12中所说明。

[0243] 材料和方法

[0244] 抗体、肽:HLA-A2、MACS和流式细胞术试剂

[0245] 用以检测酵母表面表达的抗体包括:抗HA表位标签(克隆HA.11;科文斯(Covance))、抗hV β 3FITC抗体(克隆CH92;贝克曼-库尔特(Beckman-Coulter))、抗hV β 3.1FITC抗体(克隆8F10;赛默科技)、抗hV β 20抗体(克隆ELL1.4;贝克曼-库尔特)、产生于我们的实验室的抗Va2单克隆抗体(数据未展示)、山羊抗小鼠IgM APC(生命技术)、山羊抗小鼠IgG F(ab') $_2$ AlexaFluor $^{\text{®}}$ 647二级抗体(英杰)、抗生蛋白链菌素-藻红蛋白(SA:PE,BD Pharmingen)和MACS微珠(Miltenyl Biotec)。

[0246] 在宾州州立大学医学院(Penn State University College of Medicine)(美国宾夕法尼亚州赫胥(Hershey,PA,USA))的大分子核心设施(Macromolecular Core Facility),通过标准F-moc(N-(9-芴基)甲氧羰基)化学,合成结合到HLA-A2[WT1₁₂₆₋₁₃₄:RMFPNAPYL(SEQ ID NO:6)]的肽。对于FACS和流式细胞术分析,使用重组可溶二聚HLA-A2:Ig融合蛋白(BDTM DimerX)。另外,将通过在UV光存在下将UV可裂解肽换成另一HLA.A2限制肽产生的单体HLA.A2-生物素试剂用于流式细胞术和MACS选择(Rodenko等人(2006)《自然实验手册(Nat Protoc)》,1,1120-1132;Toebes等人(2006)《自然·医学》,12,246-251)。

[0247] scTv于酵母呈现载体中的克隆和表达

[0248] 使TCR可变区片段 (scTv) 表达于酵母呈现质体pCT302 (V β -L-V α) 中 (Boder和Wittrup (2000)《酶学方法》,328,430-444), 所述质体含有允许生长于Trp培养基中的半乳糖诱导性AGA2融合体。scTv基因的诱导包括使经转化的EBY100酵母细胞在选择培养基中生长到生长停滞期, 接着转移到含半乳糖的培养基。由金斯瑞 (Genscript) (美国新泽西州皮斯卡塔威 (Piscataway, NJ, USA)) 合成模板WT1单链TCR基因, 其在构筑体的V α 2域中具有F49S突变 (Aggen等人 (2011)《蛋白质工程、设计与选择》,24,361-372)。

[0249] 将WT1特异性TCR基因从CTL克隆 (针对WT1的TCR基因, 来自Phillip Greenberg; 例如Dossett等人 (2009)《分子治疗学》,17 (4), 742) 中分离, 并且由金斯瑞合成基因, 克隆为单链形式 (V β -连接子-V α), 引入酵母呈现载体中用于表达于酵母表面上。scTv由可变组成含有通过连接子区GSADDAKKDAAKKDGS (SEQ ID NO:8) 连接 (Hoo等人 (1992)《美国国家科学院院刊》,89,4759-4763; Weber等人 (2005)《美国国家科学院院刊》,102,19033-19038; Aggen等人 (2011)《蛋白质工程、设计与选择》,24,361-372)。将scTv引入pCT302的NheI和XhoI限制位点中。

[0250] 突变scTv酵母呈现库的产生、呈现和选择

[0251] 易错PCR用以产生随机突变, 如先前所描述 (Richman等人 (2009)《分子免疫学》, 46, 902-916)。使用重叠延伸剪接 (SOE) PCR产生一次跨越4-5个相邻密码子的CDR1和3库 (Horton等人 (1990)《生物技术》,8,528-535)。

[0252] 对于WT1-D13CDR1 α 库, 利用以下引物对产生PreSOE PCR产物: 5'-GGC AGC CCC ATA AAC ACA CAG TAT-3' (剪接4L) (SEQ ID NO:9) 和5'-ACG ATC GCT ATA GGT GCA GTT CAA TGA TGC AAT AGC ACC TTC CGG GAC ACT TAA TGG GCC GCT-3' (SEQ ID NO:10), 以及5'-ATT GCA TCA TTG AAC TGC ACC TAT AGC GAT CGT NNS NNS NNS NNS TTC TTT TGG TAT AGA CAG TAC AGT GGC AAA TCC CCG-3' (SEQ ID NO:11) 和5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3' (T7) (SEQ ID NO:12)。对每个相应PreSOE与T7和剪接4L一起进行SOE PCR。

[0253] 对于WT1-D13.1CDR3库, 针对四个库中的每一个, 利用以下引物对产生PreSOE PCR产物: β 1: 5'-GGC AGC CCC ATA AAC ACA CAG TAT-3' (剪接4L) (SEQ ID NO:9) 和5'-TGC ACA CAG GTA CAT GGA AGT TTG ATT GGT ACT AGC GCT TTC CAG AAT CAA ACT GAA ACG TTC TTT-3' (SEQ ID NO:13), 以及5'-AGT ACC AAT CAA ACT TCC ATG TAC CTG TGT GCA NNS NNS NNS NNS GAA CAG TTT TTC GGC CCA GGT ACA AGA TTA ACG GTG-3' (SEQ ID NO:14) 和5'-TAA TAC GAC TCA CTA TAG GG-3' (T7) (SEQ ID NO:12); β 2: 剪接4L (SEQ ID NO:9) 和5'-TGC ACA CAG GTA CAT GGA AGT TTG ATT GGT ACT AGC GCT TTC CAG AAT CAA ACT GAA ACG TTC TTT-3' (SEQ ID NO:15), 以及5'-AGT ACC AAT CAA ACT TCC ATG TAC CTG TGT GCA AGC AGT TCC ATC NNS NNS NNS NNS GGC CCA GGT ACA AGA TTA ACG GTG-3' (SEQ ID NO:16) 和T7 (SEQ ID NO:12); α 1: 剪接4L (SEQ ID NO:9) 和5'-GGC GCA CAG GTA AGT GGC GCT ATC TGA CGG TTG GCT ATC ACG GAT TAA CAG AGA GAC ATA CTG GGA-3' (SEQ ID NO:17), 以及5'-CAA CCG TCA GAT AGC GCC ACT TAC CTG TGC GGC NNS NNS NNS NNS AAT ATG CTG ACC TTC GGT GGC GGT ACT CGC TTA ATG-3' (SEQ ID NO:18) 和T7 (SEQ ID NO:12); α 2: 剪接4L (SEQ ID NO:9) 和5'-GGC GCA CAG GTA AGT GGC GCT ATC TGA CGG TTG GCT ATC ACG GAT TAA CAG AGA GAC ATA CTG GGA-3' (SEQ ID NO:19), 以及

5'-CAA CCG TCA GAT AGC GCC ACT TAC CTG TGC GCC GCG AAT AAC GCG NNS NNS NNS
NNS NNS TTC GGT GGC GGT ACT CGC TTA ATG-3' (SEQ ID NO:20) 和 T7 (SEQ ID NO:12)。

[0254] 通过将易错或SOE PCR产物与NheI和XhoI消化pCT302一起电穿孔,通过在EBY100酵母中同源重组来制备酵母库(Horton等人(1990)《生物技术》,8,528-535)。将库于含半乳糖的培养基(SG-CAA)中诱导48小时,用1mL 1% PBS/BSA洗涤,并且用抗体或肽:MHC试剂以图4A、5A、6A、8A和9A中指示的浓度染色。洗涤(1ml, 1% PBS/BSA)细胞,并且使用FACS Aria(碧迪生物科学(BD Bioscience))高速分选仪或经由MACS LS柱在QuadroMACSTM分离器(Miltenyl Biotec)上选择大多数荧光细胞。为了测试经分离的克隆的热稳定性,在染色方案之前将酵母在高温下培育30分钟(数据未展示)。

[0255] 高亲和力克隆的分离和染色

[0256] 在选择之后,通过接种限制稀释液分离库克隆。使群落扩增并且于含半乳糖的培养基(SG-CAA)中诱导48小时,用1mL 1% PBS/BSA洗涤,并且用各种浓度的肽/HLA.A2DimerX、山羊抗小鼠IgG F(ab')₂AlexaFluor[®]647二级抗体或各种浓度的UV交换肽/HLA.A2、SA-PE染色。将细胞洗涤(1ml, 1% PBS/BSA),并且在Accuri C6流式细胞仪上进行分析。

[0257] 使用ZymoprepTM酵母质体Miniprep II (Zymo Research)回收质体,并且经由热休克转化到亚克隆EfficiencyTMDH5^aTM感受态细胞(英杰)中而将其引回大肠杆菌中。使大肠杆菌细胞扩增,并且使用QIAprep Spin Miniprep试剂盒(凯杰(Qiagen))分离质体。通过桑格测序(Sanger sequencing)对个别克隆的序列进行测定。

[0258] 关于以引用的方式并入和变化形式的声明

[0259] 本文引用的所有参考文献,例如包括已颁发或授予的专利或等效物的专利文件;专利申请案公开;和非专利文献文件或其它原始材料,特此以全文引用的方式并入本文中,如同个别地以引用的方式并入一般,其程度使得每个参考文献至少部分不会与本申请中的公开内容不一致(例如,将部分不一致的参考文献除了参考文献的部分不一致部分以外以引用的方式并入)。

[0260] 本说明书中提及的所有专利和公开都指示本发明所属领域的技术人员的技能水平。本文引用的参考文献以全文引用的方式并入本文中,用以指示在一些情况下到其提交日为止的现有技术水平,并且预期在需要时此信息可以在本文中用以排除(例如,放弃)现有技术中的特定实施例或者使用现有技术水平中的方法或材料而不具体包括本文公开内容中的方法或材料。举例来说,当要求化合物时,应理解,现有技术中已知的化合物,包括本文所公开的参考文献(尤其参考的专利文件)中公开的某些化合物,并不打算包括于权利要求中。

[0261] 当在本文中使用马库什(Markush)群组或其它分组时,所述群组的所有个别成员以及所述群组的所有可能组合和子组合预期个别地包括于本发明中。

[0262] 在本文中使用术语“包含(comprise/comprises/comprised/comprising)”时,其欲解释为规定所提及的所陈述特征、整数、步骤或组分的存在,但不排除一个或多个其它特征、整数、步骤、组分或其群组的存在或添加。还预期涵盖如下的本发明的单独实施例,其中术语“包含(comprising/comprise(s)/comprised)”任选地替换成文法上类似的术语,例如“由……组成”或“基本上由……组成”,以便因此描述未必共同延伸的其它实施例。为清楚

起见,如本文所用,“包含”与“具有”、“包括”、“含有”或“特征为”同义,并且是包括性或开放性的并且不排除额外未列出的要素或方法步骤。如本文所用,“由……组成”排除权利要求要素中未规定的任何要素、步骤、组分或成分。如本文所用,“基本上由……组成”不排除不会实质上影响权利要求的基本和新颖特征(例如,不影响活性成分)的材料或步骤。在本文中各情况下,术语“包含”、“基本上由……组成”和“由……组成”中任一者可以替换成其它两个术语中的任一者。可以适合地在不存在本文未具体公开的任何要素、限制的情况下实践本文说明性地描述的公开内容。

[0263] 已经参考各种特定和优选实施例与技术来描述本发明。然而,应理解,在保持在本发明的精神和范围内的同时,可以进行许多变化和修改。本领域的普通技术人员将了解,除本文具体描述的那些以外的组合物、方法、装置、装置元件、材料、任选特征、程序和技术可以用于不借助于过度实验而实践如本文广泛公开的本发明。预期本发明涵盖本文所述的组合物、方法、装置、装置元件、材料、程序和技术的所有本领域已知的功能等效物;和其部分。每当公开范围时,预期涵盖所有子范围和个别值。本发明不受所公开的实施例限制,所述实施例包括图中展示或说明书中例示的任何实施例,其作为实例或说明给出并且不具限制性。本文提供的一些参考文献以引用的方式并入本文中,用以提供关于本发明的额外起始物质、额外合成方法和额外分析方法和额外用途的细节。

[0264] 本领域的技术人员将容易了解,本发明非常适于实施所提及的目标和获得所述目的和优势以及其中固有的那些。本文所述的如目前代表优选实施例的组合物以及方法和辅助方法是例示性的并且预期不为对本发明的范围的限制。本领域的技术人员将想到其中的变化和其它用途,所述变化和用途涵盖于本发明的精神内。

[0265] 参考文献

[0266] 1. Addo M.M., Draenert R., Rathod A., Verrill C.L., Davis B.T., Gandhi R.T., Robbins G.K., Basgoz N.O., Stone D.R., Cohen D.E., Johnston M.N., Flynn T., Wurcel A.G., Rosenberg E.S., Altfeld M. 和 Walker B.D. (2007) 完全分化的HIV-1特异性CD8+T效应细胞在受控制中比在进行性HIV-1感染中更频繁地检测到 (Fully Differentiated HIV-1 Specific CD8+T Effector Cells Are More Frequently Detectable in Controlled than in Progressive HIV-1 Infection). 《公共科学图书馆·综合 (PLOS ONE)》2, e321。

[0267] 2. Aggen D.H., Chervin A.S., Insaidoo F.K., Piepenbrink K., H., Baker B.M. 和 Kranz D.M. (2011) 允许表达稳定单链T细胞受体的人类可变区的鉴别和工程化 (Identification and engineering of human variable regions that allow expression of stable single-chain T cell receptors). 《蛋白质工程、设计与选择 (Protein Engineering, Design, & Selection)》24, 361-72。

[0268] 3. Anikeeva N., Mareeva T., Liu W. 和 Sykulev Y. (2009) 寡聚T细胞受体能否用作检测受感染细胞上的病毒肽表位的工具 (Can oligomeric T-cell receptor be used as a tool to detect viral peptide epitopes on infected cells)? 《临床免疫学 (Clin Immunol)》130, 98-109。

[0269] 4. Armstrong K.M., Piepenbrink K.H. 和 Baker B.M. (2008) 肽-MHC复合物的构象变化和T细胞受体识别灵活性 (Conformational changes and flexibility in T-cell

receptor recognition of peptide-MHC complexes).《生物化学杂志(Biochem J)》415, 183-96。

[0270] 5.Ashfield R.和Jakobsen B.K. (2006) 制备高亲和力T细胞受体:一类新靶向治疗剂(Making high-affinity T-cell receptors:a new class of targeted therapeutics).IDrugs 9,554-9。

[0271] 6.Bargou R.,Leo E.,Zugmaier G.,Klinger M.,Goebeler M.,Knop S.,Noppeney R.,Viardot A.,Hess G.,Schuler M.,Einsele H.,Brandl C.,Wolf A.,Kirchinger P.,Klappers P.,Schmidt M.,Riethmuller G.,Reinhardt C.,Baeuerle P.A.和Kufer P. (2008) 癌症患者的通过极低剂量的T细胞接合抗体的肿瘤消退(Tumor regression in cancer patients by very low doses of a T cell-engaging antibody).《科学(Science)》321,974-7。

[0272] 7.Benatuil L.,Perez J.M.,Belk J.和Hsieh C.M. (2010) 一种改进的用于产生极大人类抗体库的酵母转化方法(An improved yeast transformation method for the generation of very large human antibody libraries).《蛋白质工程、设计与选择》23, 155-9。

[0273] 8.Bird R.E.,Hardman K.D.,Jacobson J.W.,Johnson S.,Kaufman B.M.,Lee S.M.,Lee T.,Pope S.H.,Riordan G.S.和Whitlow M. (1988) 单链抗原结合蛋白质(Single-chain antigen-binding proteins).《科学》242,423-426。

[0274] 9.Boder E.T.和Wittrup K.D. (1997) 用于筛选组合多肽库的酵母表面呈现(Yeast surface display for screening combinatorial polypeptide libraries).《自然·生物技术(Nat Biotechnol)》15,553-557。

[0275] 10.Boder E.T.和Wittrup K.D. (2000) 用于蛋白质表达、亲和力和稳定性的定向进化的酵母表面呈现(Yeast surface display for directed evolution of protein expression,affinity, and stability).《酶学方法(Methods Enzymol)》328,430-44。

[0276] 11.Boon T.和Old L.J. (1997) 癌症肿瘤抗原(Cancer tumor antigens).《免疫学当前观点(Curr Opin Immunol)》9,681-3。

[0277] 12.Borbulevych O.Y.,Santhanagopalan S.M.,Hossain M.和Baker B.M. (2011) 癌症基因疗法中所用的TCR经由不同机理与MART-1/Melan-A肿瘤抗原交叉反应(TCRs used in cancer gene therapy cross-react with MART-1/Melan-A tumor antigens via distinct mechanisms).《免疫学杂志(J Immunol)》187,2453-63。

[0278] 13.Brower V. (1997) Enbrel的III期加强了在RA中的展望[新闻](Enbrel's phase III reinforces prospects in RA[news]).《自然·生物技术》15,1240。

[0279] 14.Bulek A.M.,Cole D.K.,Skowera A.,Dolton G.,Gras S.,Madura F.,Fuller A.,Miles J.J.,Gostick E.,Price D.A.,Drijfhout J.W.,Knight R.R.,Huang G.C.,Lissin N.,Molloy P.E.,Wooldridge L.,Jakobsen B.K.,Rossjohn J.,Peakman M.,Rizkallah P.J.和Sewell A.K. (2012) 在1型糖尿病中通过CD8(+) T细胞杀死人类β细胞的结构基础(Structural basis for the killing of human beta cells by CD8(+) T cells in type 1 diabetes).《自然·免疫学(Nat Immunol)》13,283-9。

[0280] 15.Cheever M.A.,Allison J.P.,Ferris A.S.,Finn O.J.,Hastings B.M.,

Hecht T.T., Mellman I., Prindiville S.A., Viner J.L., Weiner L.M. 和 Matrisian L.M. (2009) 癌症抗原的优先排序: 用于加速转译研究的国家癌症研究所样板工程 (The prioritization of cancer antigens: a national cancer institute pilot project for the acceleration of translational research). 《临床癌症研究 (Clin Cancer Res)》15, 5323-37。

[0281] 16. Chervin A.S., Aggen D.H., Raseman J.M. 和 Kranz D.M. (2008) 使用T细胞呈现系统使较高亲和力T细胞受体工程化 (Engineering higher affinity T cell receptors using a T cell display system). 《免疫学方法杂志 (J Immunol Methods)》339, 175-84。

[0282] 17. Chervin AS, Stone JD, Soto CM, Engels B, Schreiber H, Roy EJ 和 Kranz DM. (2013) 用以检查过继T细胞反应的具有多样结合性质的T细胞受体库的设计 (Design of T-cell receptor libraries with diverse binding properties to examine adoptive T-cell responses). 《基因疗法 (Gene Ther.)》20 (6): 634-44。

[0283] 18. Colby D.W., Kellogg B.A., Graff C.P., Yeung Y.A., Swers J.S. 和 Wittrup K.D. (2004) 通过酵母表面呈现使抗体亲和力工程化 (Engineering antibody affinity by yeast surface display). 《酶学方法》388, 348-58。

[0284] 19. Davis M.M. 和 Bjorkman P.J. (1988) T细胞抗原受体基因和T细胞识别 (T-cell antigen receptor genes and T-cell recognition). 《自然》334, 395-402。

[0285] 20. Davis M.M., Boniface J.J., Reich Z., Lyons D., Hampl J., Arden B. 和 Chien Y. (1998) 通过 $\alpha\beta$ T细胞受体的配位体识别 (Ligand recognition by alpha beta T cell receptors). 《免疫学年鉴 (Annu Rev Immunol)》16, 523-544。

[0286] 21. Ding Y.H., Baker B.M., Garboczi D.N., Biddison W.E. 和 Wiley D.C. (1999) 产生极不同的T细胞信号的四种A6-TCR/肽/HLA-A2结构几乎相同 (Four A6-TCR/peptide/HLA-A2 structures that generate very different T cell signals are nearly identical). 《免疫学 (Immunity)》11, 45-56。

[0287] 22. Foote J. 和 Eisen H.N. (2000) 打破抗体和T细胞受体的亲和力上限 (Breaking the affinity ceiling for antibodies and T cell receptors). 《美国国家科学院院刊 (Proc Natl Acad Sci U S A)》97, 10679-81。

[0288] 23. Garboczi D.N., Ghosh P., Utz U., Fan Q.R., Biddison W.E. 和 Wiley D.C. (1996) 人类T细胞受体、病毒肽和HLA-A2之间的复合物的结构 (Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2). 《自然》384, 134-141。

[0289] 24. Garcia K.C., Adams J.J., Feng D. 和 Ely L.K. (2009) MHC的TCR生殖系偏向的分子基础意外地简单 (The molecular basis of TCR germline bias for MHC is surprisingly simple). 《自然·免疫学》10, 143-7。

[0290] 25. Haidar J.N., Pierce B., Yu Y., Tong W., Li M. 和 Weng Z. (2009) T细胞受体的基于结构的设计导致对于pepMHC的结合亲和力有接近100倍提高 (Structure-based design of a T-cell receptor leads to nearly 100-fold improvement in binding affinity for pepMHC). 《蛋白质 (Proteins)》74, 948-60。

[0291] 26. Harkiolaki M., Holmes S.L., Svendsen P., Gregersen J.W., Jensen L.T.,

McMahon R., Friese M.A., van Boxel G., Etzensperger R., Tzartos J.S., Kranc K., Sainsbury S., Harlos K., Mellins E.D., Palace J., Esiri M.M., van der Merwe P.A., Jones E.Y. 和 Fugger L. (2009) T细胞由于与常见微生物肽的低亲和力交叉反应性而介导自体免疫疾病 (T cell-mediated autoimmune disease due to low-affinity crossreactivity to common microbial peptides). 《免疫学》30, 348-57。

[0292] 27. Hawse W.F., Champion M.M., Joyce M.V., Hellman L.M., Hossain M., Ryan V., Pierce B.G., Weng Z. 和 Baker B.M. (2012) 最前沿: 动态驱动的T细胞信号传导机理的证据 (Cutting edge: evidence for a dynamically driven T cell signaling mechanism). 《免疫学杂志》188, 5819-23。

[0293] 28. Holler P.D., Chlewicki L.K. 和 Kranz D.M. (2003) 对于外源pMHC具有高亲和力的TCR展示自身反应性 (TCRs with high affinity for foreign pMHC show self-reactivity). 《自然·免疫学》4, 55-62。

[0294] 29. Holler P.D., Holman P.O., Shusta E.V., O'Herrin S., Wittrup K.D. 和 Kranz D.M. (2000) 对于肽/MHC具有高亲和力的T细胞受体的体外进化 (In vitro evolution of a T cell receptor with high affinity for peptide/MHC). 《美国国家科学院院刊》97, 5387-92。

[0295] 30. Holliger P., Prospero T. 和 Winter G. (1993) “双功能抗体”: 小的二价并且双特异性的抗体片段 (“Diabodies”: small bivalent and bispecific antibody fragments). 《美国国家科学院院刊》90, 6444-8。

[0296] 31. Hoogenboom H.R. (2005) 选择和筛选重组抗体库 (Selecting and screening recombinant antibody libraries). 《自然·生物技术》23, 1105-16。

[0297] 32. Jarvis L.M. (2012) 再考虑抗体-药物结合物 (Rethinking Antibody-Drug Conjugates). 《化学与工程新闻 (Chemical and Engineering News)》90, 12-18。

[0298] 33. Kessels H.W., van Den Boom M.D., Spits H., Hooijberg E. 和 Schumacher T.N. (2000) 通过反转录病毒T细胞受体呈现改变T细胞特异性 (Changing T cell specificity by retroviral T cell receptor display). 《美国国家科学院院刊》97, 14578-83。

[0299] 34. Kieke M.C., Shusta E.V., Boder E.T., Teyton L., Wittrup K.D. 和 Kranz D.M. (1999) 从酵母表面呈现库选择功能T细胞受体突变体 (Selection of functional T cell receptor mutants from a yeast surface-display library). 《美国国家科学院院刊》96, 5651-6。

[0300] 35. Lauck F., Smith C.A., Friedland G.F., Humphris E.L. 和 Kortemme T. (2010) RosettaBackrub--用于柔性骨架蛋白质结构模型化和设计的网络服务器 (RosettaBackrub--a web server for flexible backbone protein structure modeling and design). 《核酸研究 (Nucleic Acids Res)》38, W569-75。

[0301] 36. Li Y., Moysey R., Molloy P.E., Vuidepot A.L., Mahon T., Baston E., Dunn S., Liddy N., Jacob J., Jakobsen B.K. 和 Boulter J.M. (2005) 具有皮摩尔亲和力的人类T细胞受体通过噬菌体呈现的定向进化 (Directed evolution of human T-cell receptors with picomolar affinities by phage display). 《自然·生物技术》23, 349-54。

- [0302] 37. Liddy N., Bossi G., Adams K.J., Lissina A., Mahon T.M., Hassan N.J., Gavarret J., Bianchi F.C., Pumphrey N.J., Ladell K., Gostick E., Sewell A.K., Lissin N.M., Harwood N.E., Molloy P.E., Li Y., Cameron B.J., Sami M., Baston E.E., Todorov P.T., Paston S.J., Dennis R.E., Harper J.V., Dunn S.M., Ashfield R., Johnson A., McGrath Y., Plesa G., June C.H., Kalos M., Price D.A., Vuidepot A., Williams D.D., Sutton D.H. 和 Jakobsen B.K. (2012) 单克隆TCR重定向肿瘤细胞杀死 (Monoclonal TCR-redirected tumor cell killing). 《自然·医学 (Nat Med)》。
- [0303] 38. Litvak-Greenfeld D. 和 Benhar I. (2012) 基于抗体的免疫结合物的风险和不良毒性 (Risks and untoward toxicities of antibody-based immunoconjugates). 《先进药物输送评论 (Adv Drug Deliv Rev)》。
- [0304] 39. Manning T.C. 和 Kranz D.M. (1999) T细胞受体的结合能量学:与免疫后果的相关性 (Binding energetics of T-cell receptors: correlation with immunological consequences). 《今日免疫学 (Immunology Today)》20, 417-422。
- [0305] 40. Marrack P., Scott-Browne J.P., Dai S., Gapin L. 和 Kappler J.W. (2008) 控制TCR-MHC相互作用的进化上保守的氨基酸 (Evolutionarily conserved amino acids that control TCR-MHC interaction). 《免疫学年鉴》26, 171-203。
- [0306] 41. Marsh S.G.E., Parham P. 和 Barber L.D. (2000) 《HLA事实书籍 (The HLA Facts Book)》. 学术出版社 (Academic Press), 伦敦 (London)。
- [0307] 42. Mason D. (1998) 极高交叉反应性水平是T细胞受体的必需特征 (A very high level of crossreactivity is an essential feature of the T-cell receptor). 《今日免疫学》19, 395-404。
- [0308] 43. Miller B.R., Demarest S.J., Lugovskoy A., Huang F., Wu X., Snyder W.B., Croner L.J., Wang N., Amatucci A., Michaelson J.S. 和 Glaser S.M. (2010) 使scFv稳定性工程化以用于开发双特异性和多价抗体 (Stability engineering of scFvs for the development of bispecific and multivalent antibodies). 《蛋白质工程、设计与选择》23, 549-57。
- [0309] 44. Molloy P.E., Sewell A.K. 和 Jakobsen B.K. (2005) 可溶T细胞受体:新颖免疫疗法 (Soluble T cell receptors:novel immunotherapies). 《药理学当前观点 (Curr Opin Pharmacol)》5, 438-43。
- [0310] 45. Murphy K. (2012) 《詹韦的免疫生物学 (Janeway's immunobiology)》. 加兰科学 (Garland Science), 纽约 (New York)。
- [0311] 46. Nold M.F., Nold-Petry C.A., Zepp J.A., Palmer B.E., Bufler P. 和 Dinarello C.A. (2010) IL-37的先天免疫的重要抑制剂 (IL-37 is a fundamental inhibitor of innate immunity). 《自然·免疫学》11, 1014-22。
- [0312] 47. Pastan I., Hassan R., Fitzgerald D.J. 和 Kreitman R.J. (2006) 癌症的免疫毒素疗法 (Immunotoxin therapy of cancer). 《自然评论:癌症 (Nat Rev Cancer)》6, 559-65。
- [0313] 48. Pierce B.G., Haidar J.N., Yu Y. 和 Weng Z. (2010) T细胞受体中的亲和力增强性突变的组合在互补决定区和链内和之间展现高度非累加作用 (Combinations of

affinity-enhancing mutations in a T cell receptor reveal highly nonadditive effects within and between complementarity determining regions and chains). 《生物化学(Biochemistry)》49,7050-9。

[0314] 49. Porter D.L., Levine B.L., Kalos M., Bagg A. 和 June C.H. (2011) 慢性淋巴性白血病中的嵌合抗原受体修饰的T细胞 (Chimeric antigen receptor-modified T cells in chronic lymphoid leukemia). 《新英格兰医学杂志(N Engl J Med)》365,725-33。

[0315] 50. Reichert J.M. 和 Valge-Archer V.E. (2007) 单克隆抗体癌症治疗剂的发展趋势 (Development trends for monoclonal antibody cancer therapeutics). 《自然评论药物发现(Nat Rev Drug Discov)》6,349-56。

[0316] 51. Ricart A.D. 和 Tolcher A.W. (2007) 技术洞察: 用于癌症疗法的细胞毒性药物免疫结合物 (Technology insight: cytotoxic drug immunoconjugates for cancer therapy). 《自然·临床实践肿瘤学(Nat Clin Pract Oncol)》4,245-55。

[0317] 52. Richman S.A., Aggen D.H., Dossett M.L., Donermeyer D.L., Allen P.M., Greenberg P.D. 和 Kranz D.M. (2009) 增强结构域稳定性并且实现以单链VaV β 片段形式表达的T细胞受体可变区的结构特征 (Structural features of T cell receptor variable regions that enhance domain stability and enable expression as single-chain ValphaVbeta fragments). 《分子免疫学(Mol Immunol)》46,902-16。

[0318] 53. Richman S.A. 和 Kranz D.M. (2007) 抗原特异性T细胞受体的呈现、工程化和应用 (Display, engineering, and applications of antigen-specific T cell receptors). 《生物分子工程(Biomol Eng)》24,361-73。

[0319] 54. Rock K.L. 和 Goldberg A.L. (1999) 细胞蛋白质的降解和I类MHC呈递肽的产生 (Degradation of cell proteins and the generation of MHC class I-presented peptides). 《免疫学年鉴》17,739-79。

[0320] 55. Rudolph M.G., Stanfield R.L. 和 Wilson I.A. (2006) TCR如何结合MHC、肽和共同受体 (How TCRs bind MHCs, peptides, and coreceptors). 《免疫学年鉴》24,419-66。

[0321] 56. Sadelain M., Brentjens R. 和 Riviere I. (2009) 嵌合抗原受体的前景和潜在缺陷 (The promise and potential pitfalls of chimeric antigen receptors). 《免疫学当前观点》21,215-23。

[0322] 57. Sami M., Rizkallah P.J., Dunn S., Molloy P., Moysey R., Vuidepot A., Baston E., Todorov P., Li Y., Gao F., Boulter J.M. 和 Jakobsen B.K. (2007) 结合到肽主要组织相容性复合物的高亲和力人类T细胞受体的晶体结构展现天然对角线结合几何构型 (Crystal structures of high affinity human T-cell receptors bound to peptide major histocompatibility complex reveal native diagonal binding geometry). 《蛋白质工程、设计与选择》20,397-403。

[0323] 58. Schrama D., Reisfeld R.A. 和 Becker J.C. (2006) 作为癌症治疗剂的抗体靶向药物 (Antibody targeted drugs as cancer therapeutics). 《自然评论药物发现》5, 147-59。

[0324] 59. Scott J.K. 和 Smith G.P. (1990) 用表位库搜寻肽配位体 (Searching for

- peptide ligands with an epitope library).《科学》249,386-90。
- [0325] 60. Skowera A., Ellis R.J., Varela-Calvino R., Arif S., Huang G.C., Van-Krinks C., Zaremba A., Rackham C., Allen J.S., Tree T.I., Zhao M., Dayan C.M., Sewell A.K., Unger W.W., Drijfhout J.W., Ossendorp F., Roep B.O. 和 Peakman M. (2008) CTL通过识别葡萄糖调节的前胰岛素原表位靶向用以杀死患有1型糖尿病的患者中的 β 细胞 (CTLs are targeted to kill beta cells in patients with type 1 diabetes through recognition of a glucose-regulated preproinsulin epitope).《临床研究杂志 (J Clin Invest)》118,3390-402。
- [0326] 61. Smith C.A. 和 Kortemme T. (2008) Backrub样骨架模拟重现了天然蛋白质构象变异性并且改进了突变侧链预测 (Backrub-like backbone simulation recapitulates natural protein conformational variability and improves mutant side-chain prediction).《分子生物学杂志 (J Mol Biol)》380,742-56。
- [0327] 62. Soo Hoo W.F., Lacy M.J., Denzin L.K., Voss E.W.J., Hardman K.D. 和 Kranz D.M. (1992) 表达于大肠杆菌中的单链T细胞受体的表征 (Characterization of a single-chain T cell receptor expressed in E.Coli).《国家科学院院刊》89,4759-4763。
- [0328] 63. Starr T.K., Jameson S.C. 和 Hogquist K.A. (2003) T细胞的正和负选择 (Positive and negative selection of T cells).《免疫学年鉴》21,139-76。
- [0329] 64. Starwalt S.E., Masteller E.L., Bluestone J.A. 和 Kranz D.M. (2003) 单链II类MHC产物通过酵母呈现的定向进化 (Directed evolution of a single-chain class II MHC product by yeast display).《蛋白质工程 (Protein Eng)》16,147-56。
- [0330] 65. Stone J.D., Chervin A.S., Aggen D.H. 和 Kranz D.M. (2012) T细胞受体工程化 (T cell receptor engineering).《酶学方法》503,189-222。
- [0331] 66. Stone J.D., Yin Y., Mo M., Weber K.S., Donermeyer D.L., Allen P.M., Mariuzza R.A. 和 Kranz D.M. (2012) 使高亲和力T细胞受体/细胞因子融合体工程化以用于治疗靶向 (Engineering High-Affinity T Cell Receptor/Cytokine Fusions for Therapeutic Targeting).《蛋白质工程》(Kaumaya P.编). InTech。
- [0332] 67. Stroncek D.F., Berger C., Cheever M.A., Childs R.W., Dudley M.E., Flynn P., Gattinoni L., Heath J.R., Kalos M., Marincola F.M., Miller J.S., Mostoslavsky G., Powell D.J., Jr., Rao M., Restifo N.P., Rosenberg S.A., O'Shea J. 和 Melief C.J. (2012) 癌症的细胞疗法的新方向:癌症的细胞疗法的最高水平的概述 (New directions in cellular therapy of cancer:a summary of the summit on cellular therapy for cancer).《转化医学杂志 (J Transl Med)》10,48。
- [0333] 68. Swers J.S., Kellogg B.A. 和 Wittrup K.D. (2004) 通过体内同源重组和酵母表面呈现产生的改组抗体库 (Shuffled antibody libraries created by in vivo homologous recombination and yeast surface display).《核酸研究》32,e36。
- [0334] 69. Tayal V. 和 Kalra B.S. (2008) 细胞因子和抗细胞因子作为治疗剂--最新情况 (Cytokines and anti-cytokines as therapeutics--an update).《欧洲药理学杂志 (Eur J Pharmacol)》579,1-12。
- [0335] 70. Thakur A. 和 Lum L.G. (2010) 用双特异性抗体的癌症疗法:临床经验 (Cancer

therapy with bispecific antibodies:Clinical experience).《分子治疗学当前观点(Curr Opin Mol Ther)》12,340-9。

[0336] 71.Tonegawa S. (1988) 诺贝尔生理学或医学演讲(Nobel lecture in physiology or medicine)--1987.免疫多样性的体细胞产生(Somatic generation of immune diversity).《体外细胞发育生物学(In Vitro Cell Dev Biol)》24,253-65。

[0337] 72.Tsomides T.J.,Aldovini A.,Johnson R.P.,Walker B.D.,Young R.A.和Eisen H.N. (1994) 受1型人类免疫缺陷病毒慢性感染的细胞上由细胞毒性T淋巴细胞识别的天然加工的病毒肽(Naturally processed viral peptides recognized by cytotoxic T lymphocytes on cells chronically infected by human immunodeficiency virus type 1).《实验医学杂志(J Exp Med)》180,1283-93。

[0338] 73.Turner D.J.,Ritter M.A.和George A.J. (1997) 连接子于单链Fv抗体片段的表达中的重要性:肽序列使用噬菌体呈现技术的优化(Importance of the linker in expression of single-chain Fv antibody fragments:optimisation of peptide sequence using phage display technology).《免疫学方法杂志》205,43-54。

[0339] 74.Utz U.,Banks D.,Jacobson S.和Biddison W.E. (1996) 来自患有HTLV-1相关疾病的患者的1型人类T细胞白血病病毒(HTLV-1) Tax特异性CD8+细胞毒性T淋巴细胞的T细胞受体谱系的分析:寡克隆增殖的证据(Analysis of the T-cell receptor repertoire of human T-cell leukemia virus type 1(HTLV-1) Tax-specific CD8+cytotoxic T lymphocytes from patients with HTLV-1-associated disease:evidence for oligoclonal expansion).《病毒学杂志(J Virol)》70,843-51。

[0340] 75.Varela-Rohena A.,Molloy P.E.,Dunn S.M.,Li Y.,Suhoski M.M.,Carroll R.G.,Milicic A.,Mahon T.,Sutton D.H.,Laugel B.,Moysey R.,Cameron B.J.,Vuidepot A.,Purbhoo M.A.,Cole D.K.,Phillips R.E.,June C.H.,Jakobsen B.K.,Sewell A.K.和Riley J.L. (2008) 通过CD8T细胞表达增强的T细胞受体控制HIV-1免疫逃避(Control of HIV-1immune escape by CD8T cells expressing enhanced T-cell receptor).《自然·医学》14,1390-5。

[0341] 76.Weber K.S.,Donermeyer D.L.,Allen P.M.和Kranz D.M. (2005) 经体外工程化以实现更高亲和力的II类限制T细胞受体保持肽特异性和功能(Class II-restricted T cell receptor engineered in vitro for higher affinity retains peptide specificity and function).《美国国家科学院院刊》102,19033-8。

[0342] 77.Wong R.L.,Liu B.,Zhu X.,You L.,Kong L.,Han K.P.,Lee H.I.,Chavaillaz P.A.,Jin M.,Wang Y.,Rhode P.R.和Wong H.C. (2011) 用于产生多价靶向免疫分子的白细胞介素-15:白细胞介素-15受体α架构(Interleukin-15:Interleukin-15receptor alpha scaffold for creation of multivalent targeted immune molecules).《蛋白质工程、设计与选择》24,373-83。

[0343] 美国专利

[0344] 7,569,357;2004年2月20日提交;2009年8月4日颁发;伊利诺伊州大学董事会(Board of Trustees University of Illinois);高亲和力TCR蛋白质和方法(High affinity TCR proteins and methods)。

[0345] 7,465,787;2003年12月16日提交;2008年12月16日颁发;伊利诺伊州大学董事会;蛋白质的酵母细胞表面呈现和其用途(Yeast cell surface display of proteins and uses therof)。

[0346] 6,759,243;2000年12月6日提交;2004年7月6日颁发;伊利诺伊州大学董事会;高亲和力TCR蛋白质和方法。

[0347] 6,699,658;1998年1月20日提交;2004年3月2日颁发;伊利诺伊州大学董事会;蛋白质的酵母细胞表面呈现和其用途。

[0348] 6,696,251;2000年11月28日提交;2004年2月24日颁发;伊利诺伊州大学董事会;蛋白质的酵母细胞表面呈现和其用途。

[0349] 6,423,538;2000年11月28日提交;2002年7月23日颁发;伊利诺伊州大学董事会;蛋白质的酵母细胞表面呈现和其用途。

[0350] 6,300,065;1998年8月26日提交;2001年10月9日颁发;伊利诺伊州大学董事会;蛋白质的酵母细胞表面呈现和其用途。

[0351] 8,143,376;2005年5月18日提交;2012年3月27日颁发;Immunocore有限公司;高亲和力NY-ESO T细胞受体(High affinity NY-ESO T cell receptor)。

[0352] 8,088,379;2007年9月26日提交;2012年1月3日颁发;Immunocore有限公司;经修饰的T细胞受体以及相关材料和方法(Modified T cell receptors and related materials and methods)。

[0353] 8,017,730;2006年5月19日提交;2011年9月13日颁发;Immunocore有限公司;结合到VYGFVRACL-HLA-A24的T细胞受体(T cell receptors which bind to VYGFVRACL-HLA-A24)。

[0354] 7,763,718;2007年10月29日提交;2010年7月27日颁发;Immunocore有限公司;可溶T细胞受体(Soluble T cell receptors)。

[0355] 7,666,604;2003年7月9日提交;2010年2月23日颁发;Immunocore有限公司;经修饰的可溶T细胞受体(Modified soluble T cell receptor)。

[0356] 7,608,410;2008年10月7日提交;2009年10月27日颁发;Immunocore有限公司;改进T细胞受体的方法(Method of improving T cell receptors)。

[0357] 7,569,664;2003年10月3日提交;2009年8月4日颁发;Immunocore有限公司;单链重组T细胞受体(Single chain recombinant T cell receptors)。

[0358] 8,105,830;2002年11月5日提交;2012年1月31日颁发;Altior Bioscience公司;多特异性结合分子和其用途(Polyspecific binding molecules and uses therof)。

[0359] 6,534,633;1999年10月21日提交;2003年3月18日颁发;Altior Bioscience公司;多特异性结合分子和其用途。

序列表

<110> 伊利诺伊州大学理事会
弗雷德哈钦森癌症研究中心
希娜·N·史密斯;
丹尼尔·T·哈里斯;
大卫·M·克兰泽;
托马斯·M·施密特;
菲利普·D·格林伯格

<120> 工程化的高亲和力人类T细胞受体

<130> IMMU-003/02WO

<150> US 61/907,887

<151> 2013-11-22

<160> 34

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 115

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly
1 5 10 15

[0001] Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met
20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe
35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr
50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser
65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Ile
85 90 95

Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp
100 105 110

Leu Lys Asn
115

<210> 2
<211> 112
<212> PRT
<213> 智人

<400> 2

Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly
1 5 10 15

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Val Ser Gln Ser
20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met
35 40 45

Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln
50 55 60

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Asn Asn Ala Gly Asn
85 90 95

Met Leu Thr Phe Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile
100 105 110

<210> 3

<211> 115

[0002] <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对于WT1/HLA-A2具有高亲和力的TCR的经修饰的可变β区

<400> 3

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met
20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Ser
35 40 45

Ser Tyr Gly Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr
50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser
65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Thr Ser Asn Tyr
85 90 95

Leu Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp

100

105

110

Leu Lys Asn
115

<210> 4
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 对于WT1/HLA-A2具有高亲和力的TCR的经修饰的可变 α 区

<400> 4

Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly
1 5 10 15

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Asp Leu Gly Ser
20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met
35 40 45

Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln
50 55 60

[0003]

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Asn Asn Ala Gly Asn
85 90 95

Met Leu Thr Phe Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile
100 105 110

<210> 5
<211> 244
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 以高亲和力结合到WT1/HLA-A2的单链TCR

<400> 5

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met
20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Ser
35 40 45

Ser Tyr Gly Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr
 50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser
 65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Thr Ser Asn Tyr
 85 90 95

Leu Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp
 100 105 110

Leu Lys Asn Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys
 115 120 125

Asp Gly Lys Ser Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser
 130 135 140

Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg
 145 150 155 160

Asp Leu Gly Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro
 165 170 175

[0004]

Glu Leu Ile Met Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg
 180 185 190

Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile
 195 200 205

Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Asn
 210 215 220

Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val
 225 230 235 240

Lys Pro His Ile

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 6

Arg Met Phe Pro Asn Ala Pro Tyr Leu
 1 5

<210> 7
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 人类T细胞淋巴病毒

<400> 7

Leu Leu Phe Gly Tyr Pro Val Tyr Val
 1 5

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 氨基酸连接序列

<400> 8

Gly Ser Ala Asp Asp Ala Lys Lys Asp Ala Ala Lys Lys Asp Gly Lys
 1 5 10 15

Ser

[0005] <210> 9
 <211> 24
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 引物剪接4L

<400> 9
 ggcagccca taaacacaca gtat

24

<210> 10
 <211> 63
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用以产生WT1-D13 CDR1 α 库的反向引物

<400> 10
 acgatcgcta tagtgtcagt tcaatgatgc aatagcacct tccggacac ttaatggcc

60

gct

63

<210> 11
 <211> 81
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用以产生WT1-D13 CDR1 α 库的正向引物

<220>

<221> misc_feature		
<222> (34)..(35)		
<223> n =任何碱基		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (37)..(38)		
<223> n =任何碱基		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (40)..(41)		
<223> n =任何碱基		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (43)..(44)		
<223> n =任何碱基		
<400> 11		
attgcatcat tgaactgcac ctatagcgat cgttnsnnsn nsnnsttctt ttggataga		60
cagtacagtg gcaaataccc g		81
<210> 12		
<211> 20		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
[0006] <223> 引物T7		
<400> 12		
taatacgact cactataggg		20
<210> 13		
<211> 66		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 用以产生WT1-D13.1 CDR3 β 1库的反向引物		
<400> 13		
tgcacacagg tacatggaag tttgattgg actagcgctt tccagaatca aactgaaacg		60
ttcttt		66
<210> 14		
<211> 84		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 用以产生WT1-D13.1 CDR3 β 1库的正向引物		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (34)..(35)		
<223> n =任何碱基		

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (37)..(38)
 <223> n =任何碱基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (40)..(41)
 <223> n =任何碱基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (43)..(44)
 <223> n =任何碱基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(47)
 <223> n是a、c、g或t

<400> 14
 agtaccaatc aaacttccat gtacctgtgt gcannsnnsn nsnnnsnnsga acagttttc 60
 gccccaggta caagattAAC ggtg 84

<210> 15
 <211> 66
 <212> DNA
 <213> 人工序列

[0007] <220>
 <223> 用以产生WT1-D13.1 CDR3 β 2库的反向引物

<400> 15
 tgcacacagg tacatggaag tttgatttgt actagcgctt tccagaatca aactgaaacg 60
 ttcttt 66

<210> 16
 <211> 84
 <212> DNA
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 用以产生WT1-D13.1 CDR3 β 2库的正向引物

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (46)..(47)
 <223> n =任何碱基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (49)..(50)
 <223> n =任何碱基

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (52)..(53)
 <223> n =任何碱基

<220>

<221> misc_feature		
<222> (55)..(56)		
<223> n =任何碱基		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (58)..(59)		
<223> n是a、c、g或t		
<400> 16		
agtaccaatc aaacttccat gtacctgtgt gcaaggcgtt ccatcnnnn snnsnnnn		60
ggcccaggta caagatataac ggtg		84
<210> 17		
<211> 66		
<212> DNA		
<213> 人工序列		
<220>		
<223> 用以产生WT1-D13.1 CDR3 α 1库的反向引物		
<400> 17		
ggcgcacagg taagtggcgc tatctgacgg ttggctatca cggatataaca gagagacata		60
ctggga		66
<210> 18		
<211> 84		
<212> DNA		
[0008] <213> 人工序列		
<220>		
<223> 用以产生WT1-D13.1 CDR3 α 1库的正向引物		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (34)..(35)		
<223> n =任何碱基		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (37)..(38)		
<223> n =任何碱基		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (40)..(41)		
<223> n =任何碱基		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (43)..(44)		
<223> n =任何碱基		
<220>		
<221> misc_feature		
<222> (46)..(47)		
<223> n是a、c、g或t		
<400> 18		
caaccgtcag atagcgccac ttacctgtgc gcnnnnnn nnnnnnnn tatgtgacc		60

ttcgggtggcg gtactcgctt aatg	84
<210> 19	
<211> 66	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用以产生WT1-D13.1 CDR3 α 2库的反向引物	
<400> 19	
ggcgacagg taagtggcgc tatctgacgg ttggctatca cggattaaca gagagacata	60
ctggga	66
<210> 20	
<211> 84	
<212> DNA	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 用以产生WT1-D13.1 CDR3 α 2库的正向引物	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (46)..(47)	
<223> n =任何碱基	
[0009]	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (49)..(50)	
<223> n =任何碱基	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (52)..(53)	
<223> n =任何碱基	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (55)..(56)	
<223> n =任何碱基	
<220>	
<221> misc_feature	
<222> (58)..(59)	
<223> n是a、c、g或t	
<400> 20	
caaccgtcag atagcgccac ttacctgtgc gccgagaata acgcgnnsnn snnsnnnsnn	60
ttcgggtggcg gtactcgctt aatg	84
<210> 21	
<211> 115	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 对于WT1/HLA-A2具有高亲和力的TCR的经修饰的可变β区	

<400> 21

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met
20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Ser
35 40 45

Ser Tyr Gly Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr
50 55 60

Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser
65 70 75 80

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Ile
85 90 95

Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp
100 105 110

[0010] Leu Lys Asn
115

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 对于WT1/HLA-A2具有高亲和力的TCR的经修饰的可变α区

<400> 22

Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly
1 5 10 15

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Val Ser Gln Pro
20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met
35 40 45

Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln
50 55 60

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Ala Asn Asn Ala Gly Asn
85 90 95

Met Leu Thr Phe Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile
100 105 110

<210> 23

<211> 9

<212> PRT

<213> A型流感

<400> 23

Ala Ser Asn Glu Asn Met Asp Ala Met
1 5

<210> 24

<211> 9

<212> PRT

<213> A型流感

<400> 24

Ala Ser Asn Glu Asn Met Glu Thr Met
1 5

<210> 25

<211> 9

[0011] <212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> WT1结构类似人类肽

<400> 25

Lys Leu Phe Ser Gln Leu Ser Tyr Leu
1 5

<210> 26

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> WT1结构类似人类肽

<400> 26

Lys Leu Phe Ser Thr Ala Met Phe Leu
1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> WT1结构类似人类肽

<400> 27

His Met Trp Gly Gln Ser Leu Tyr Ile
1 5

<210> 28

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> WT1结构类似人类肽

<400> 28

Lys Ile Phe Gly Ser Leu Ala Phe Leu
1 5

<210> 29

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> WT1结构类似人类肽

<400> 29

Lys Ile Phe Pro Ser Cys Leu Phe Val
1 5

[0012] <210> 30

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> WT1结构类似人类肽

<400> 30

Lys Leu Trp Pro Ser Val Ala Phe Ala
1 5

<210> 31

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> WT1结构类似人类肽

<400> 31

His Leu Trp Gly Gln Ser Leu Tyr Ile
1 5

<210> 32

<211> 9

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> WT1结构类似人类肽

<400> 32

Arg Ile Trp Leu Ser Val Val Phe Val
1 5

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

[0013] <220>
<223> WT1结构类似人类肽

<400> 33

His Leu Phe Ser Ser Leu Pro Phe Ala
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> WT1结构类似人类肽

<400> 34

Arg Ile Phe Ser Thr Ala Leu Phe Val
1 5

V β 链 (续)

VB (续)

连接子

Vg
鎌

Va (km)

VB _链	COR 1	COR 2
1	—	—
2	—	—
3	—	—
4	—	—
5	—	—
6	—	—
7	—	—
8	—	—
9	—	—
10	—	—
11	—	—
12	—	—
13	—	—
14	—	—
15	—	—
16	—	—
17	—	—
18	—	—
19	—	—
20	—	—
21	—	—
22	—	—
23	—	—
24	—	—
25	—	—
26	—	—
27	—	—
28	—	—
29	—	—
30	—	—
31	—	—
32	—	—
33	—	—
34	—	—
35	—	—
36	—	—
37	—	—
38	—	—
39	—	—
40	—	—
41	—	—
42	—	—
43	—	—
44	—	—
45	—	—
46	—	—
47	—	—
48	—	—
49	—	—
50	—	—
51	—	—
52	—	—
53	—	—
54	—	—
55	—	—

Va (续)	CDR 3	
	WT	WT
57	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
58	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
59	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
60	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
61	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
62	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
63	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
64	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
65	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
66	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
67	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
68	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
69	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
70	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
71	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
72	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
73	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
74	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
75	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
76	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
77	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
78	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
79	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
80	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
81	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
82	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
83	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
84	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
85	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
86	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
87	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
88	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
89	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
90	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
91	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
92	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
93	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
94	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
95	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
96	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
97	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
98	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
99	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
100	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
101	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
102	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
103	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
104	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
105	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
106	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
107	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
108	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
109	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
110	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
111	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
112	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
113	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
114	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
115	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
116	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L
117	EDG R F	TAQ L N K A S Q Y V S L L

图1

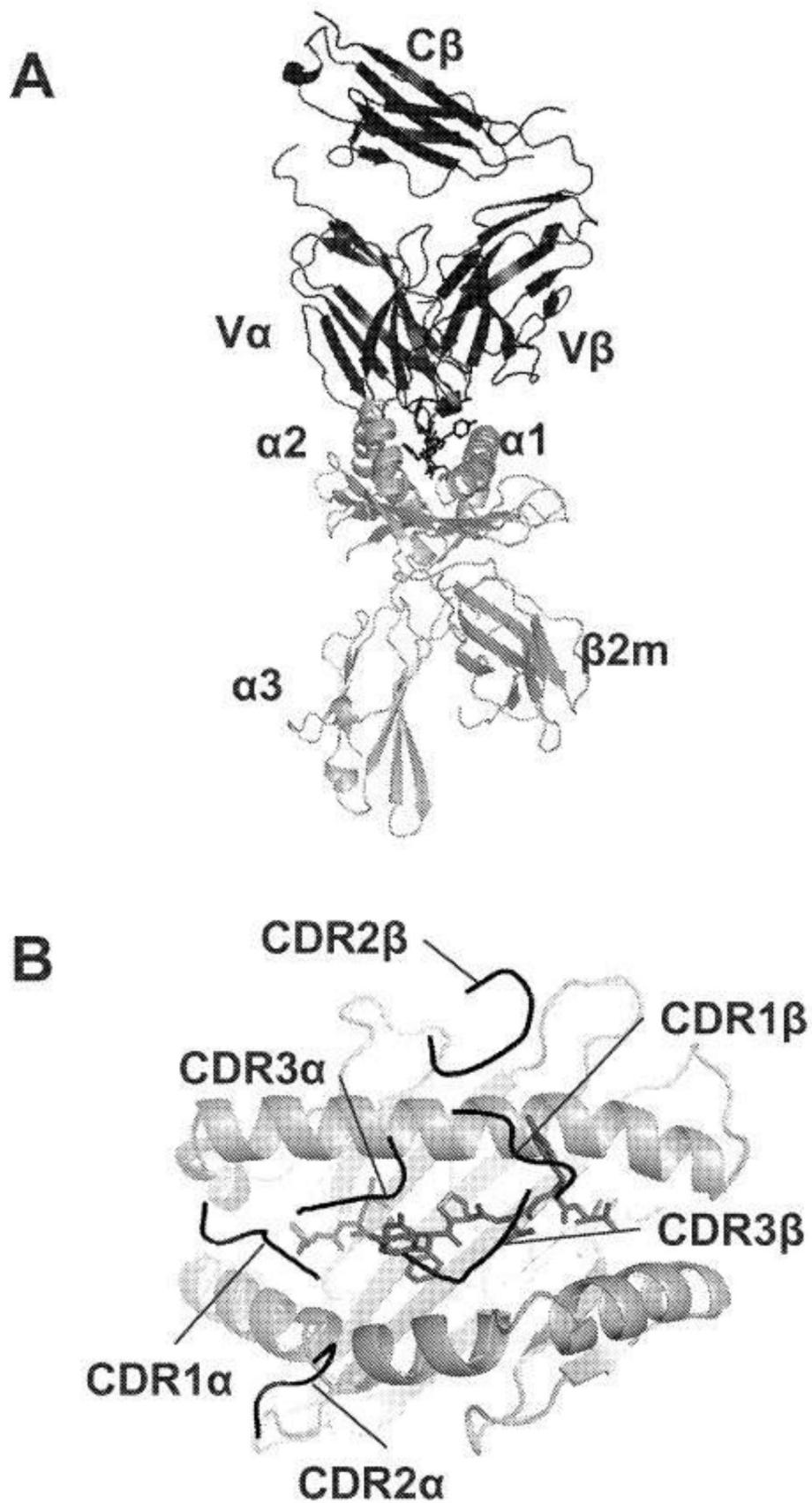


图2

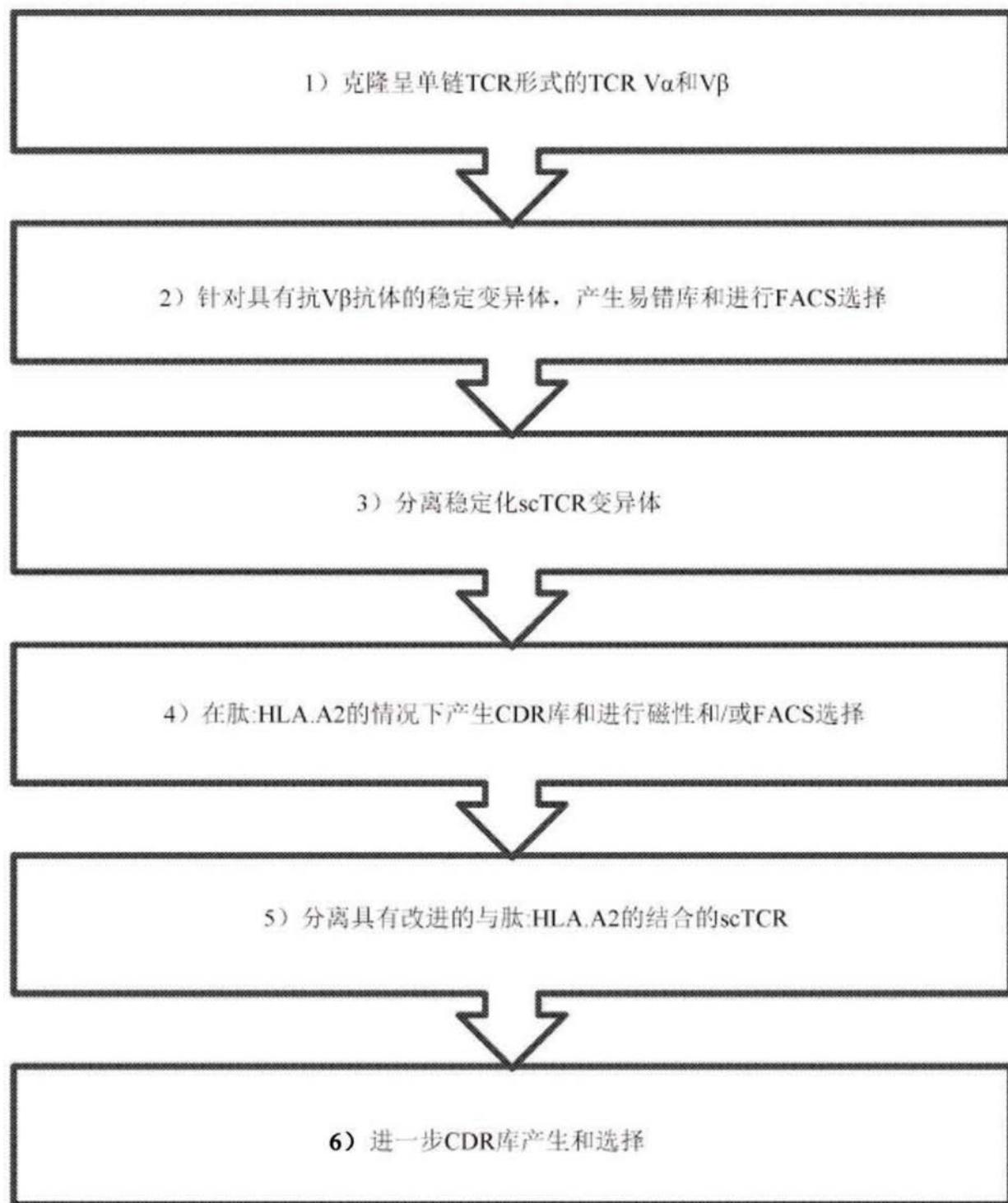


图3

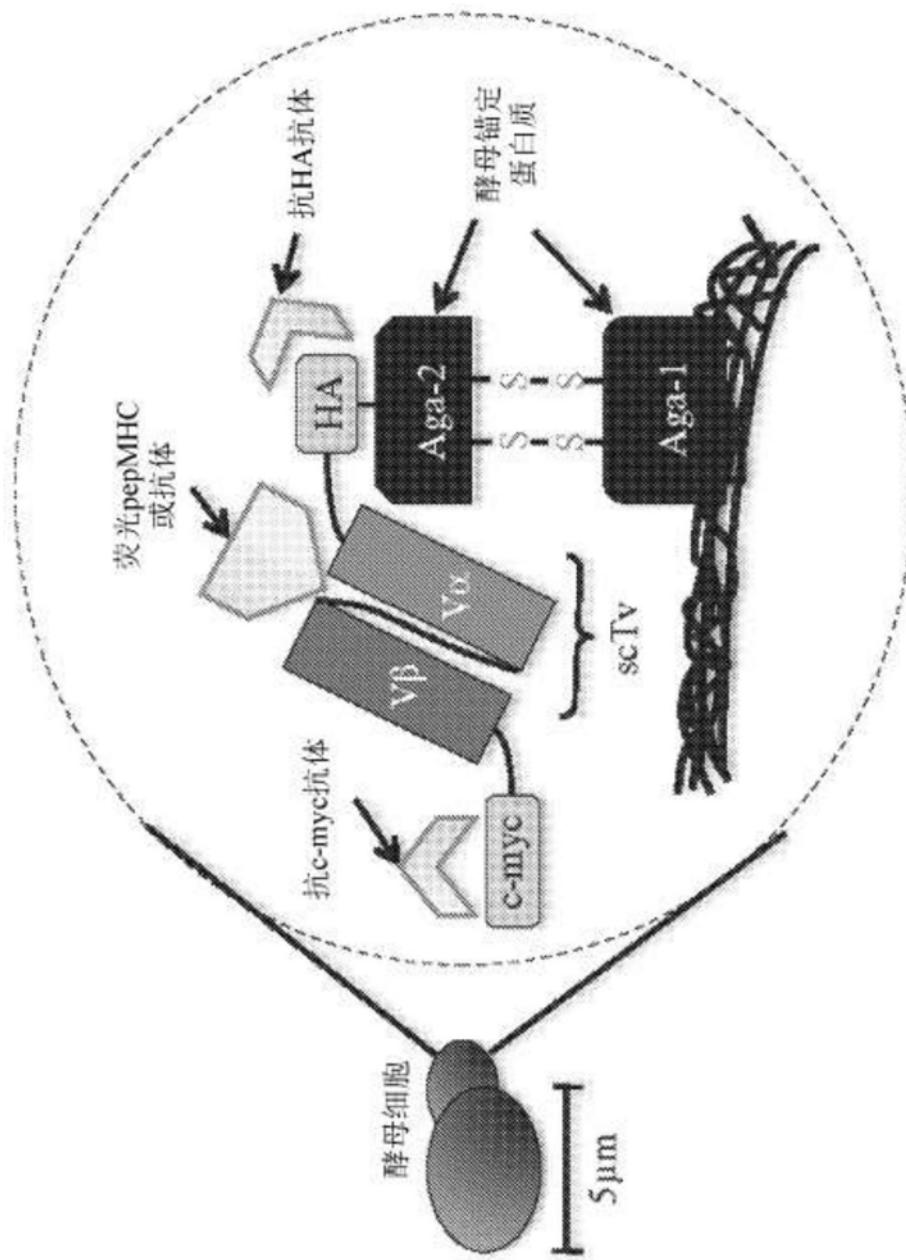


图4

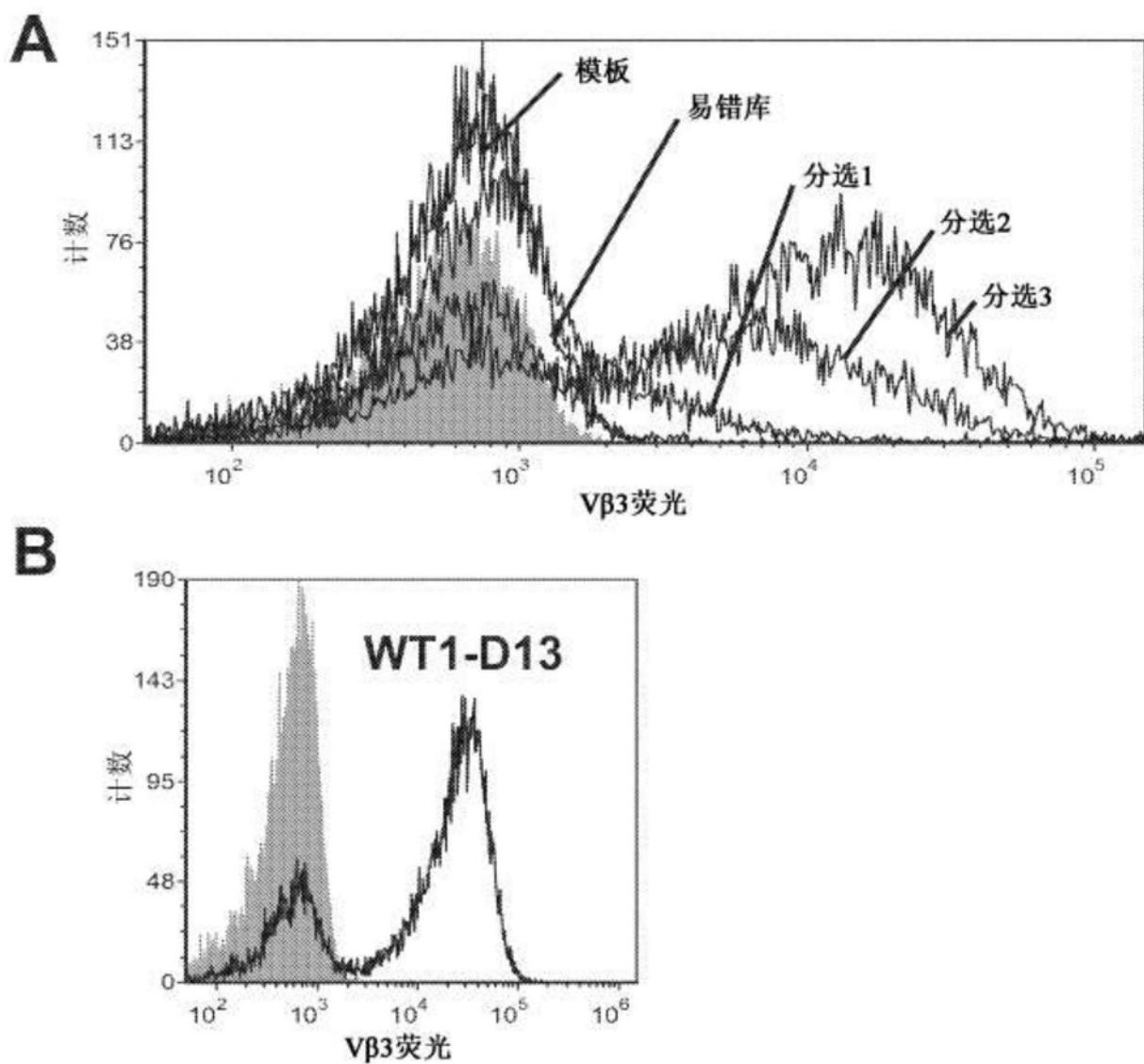


图5

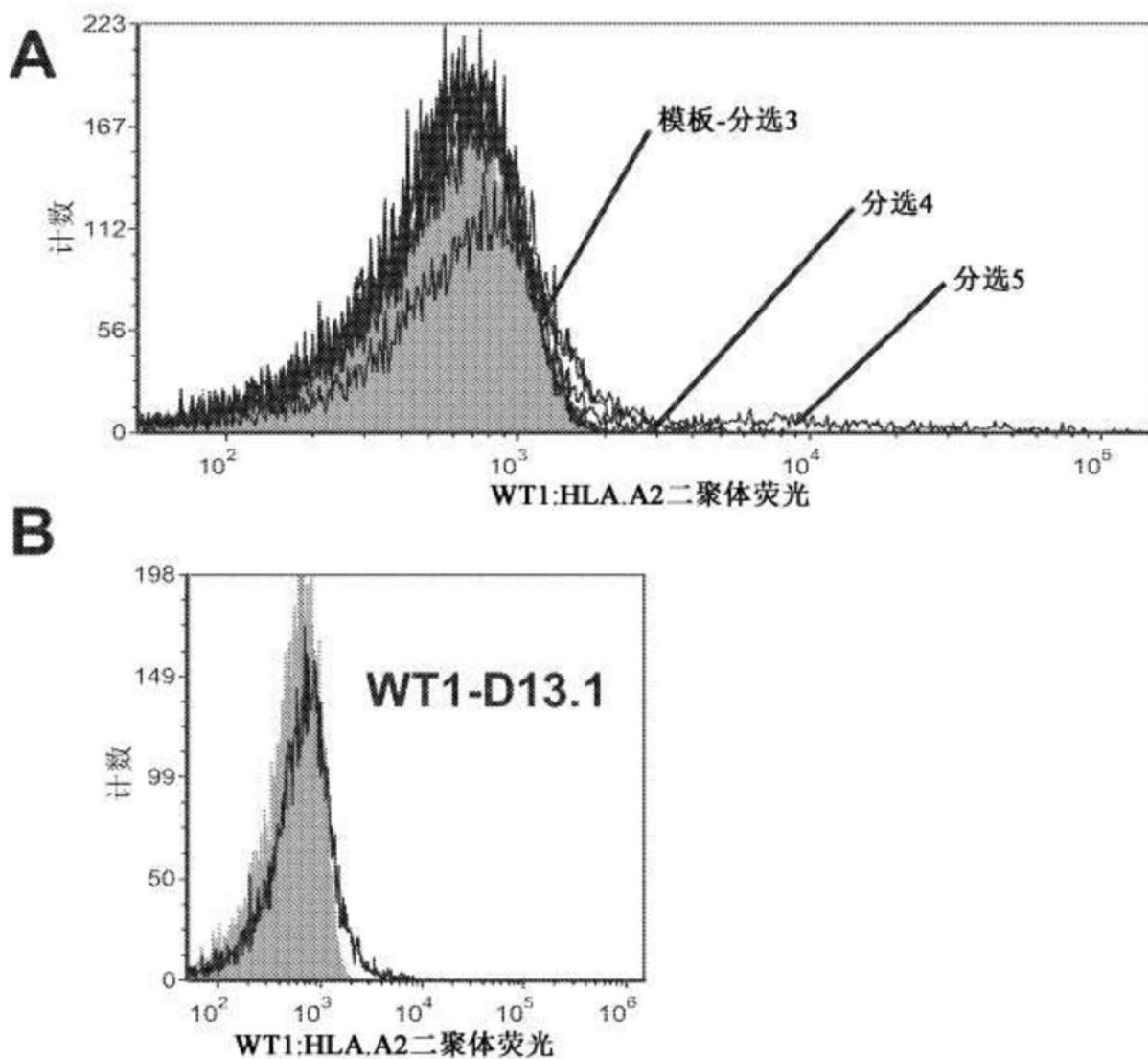


图6

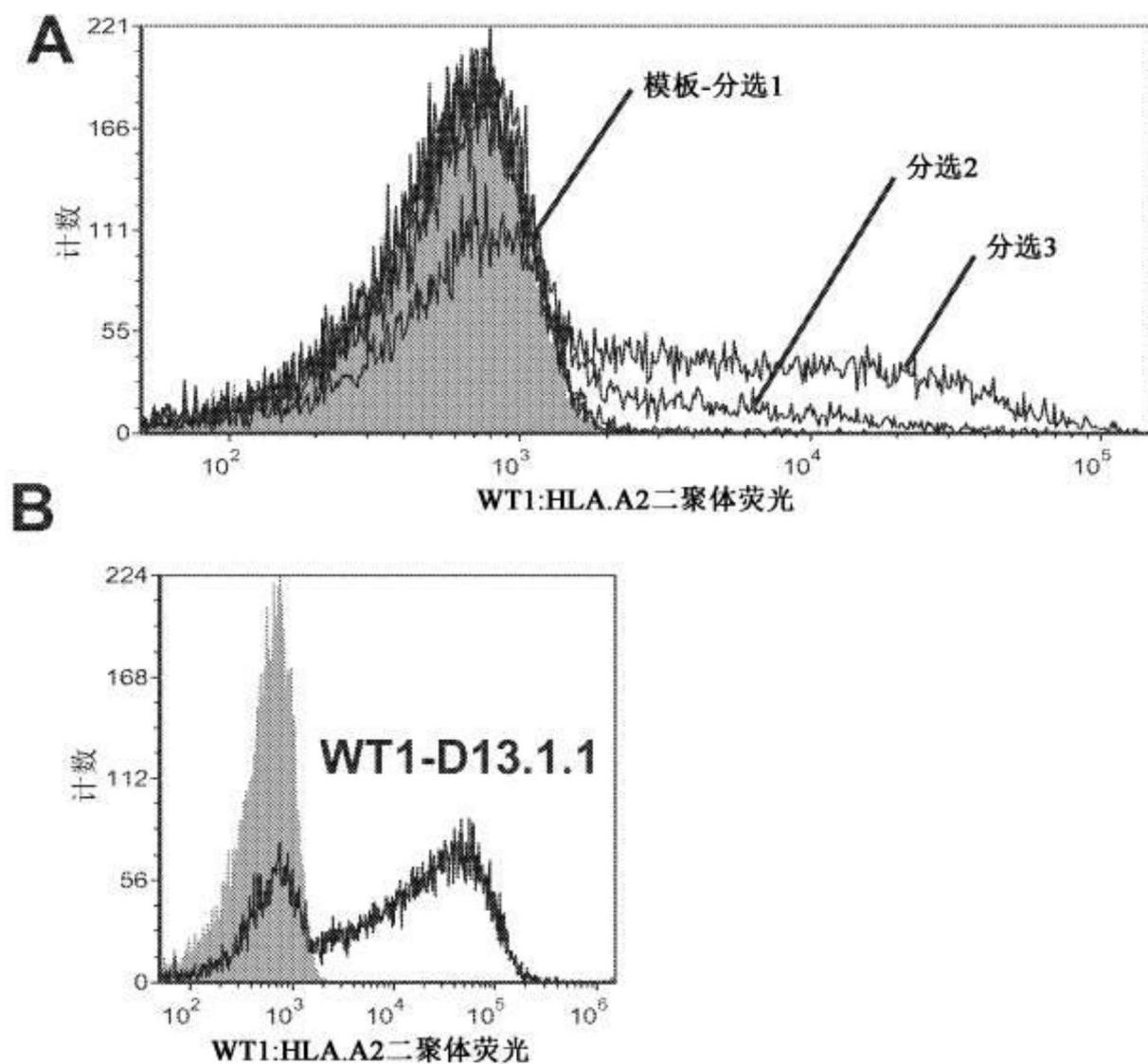


图7

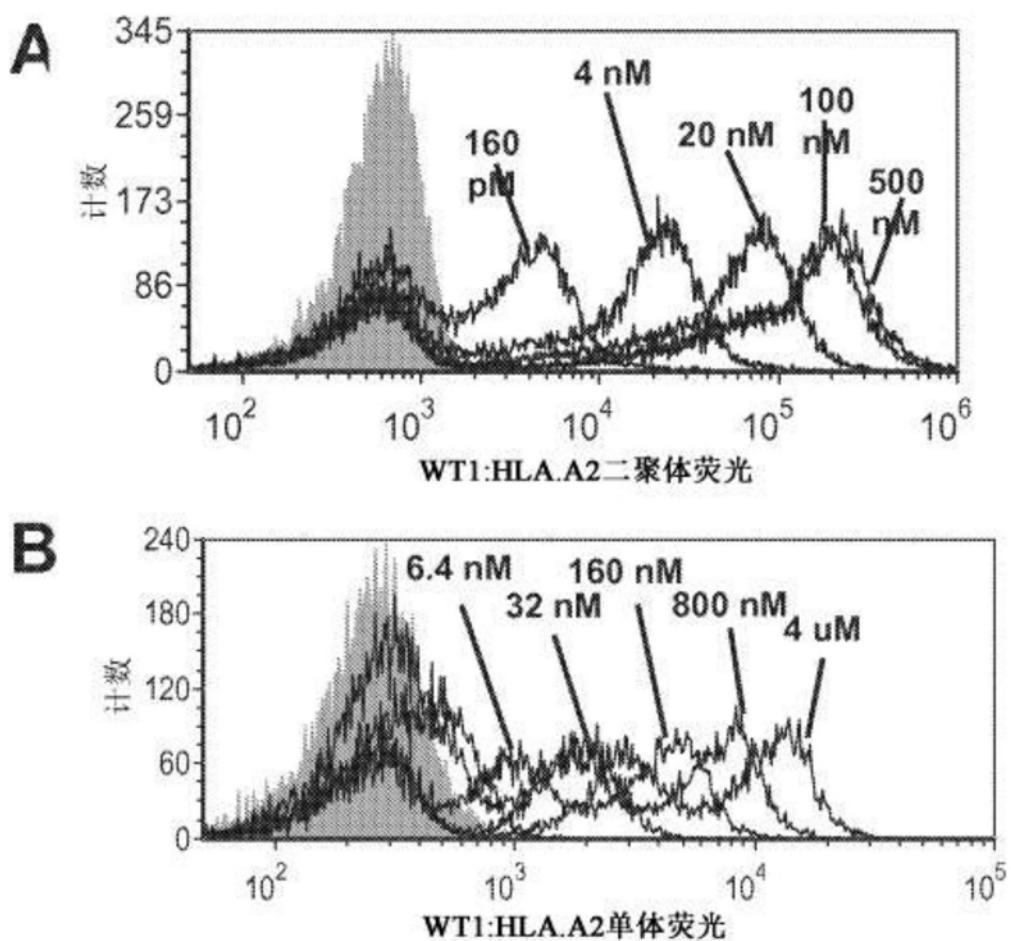


图8

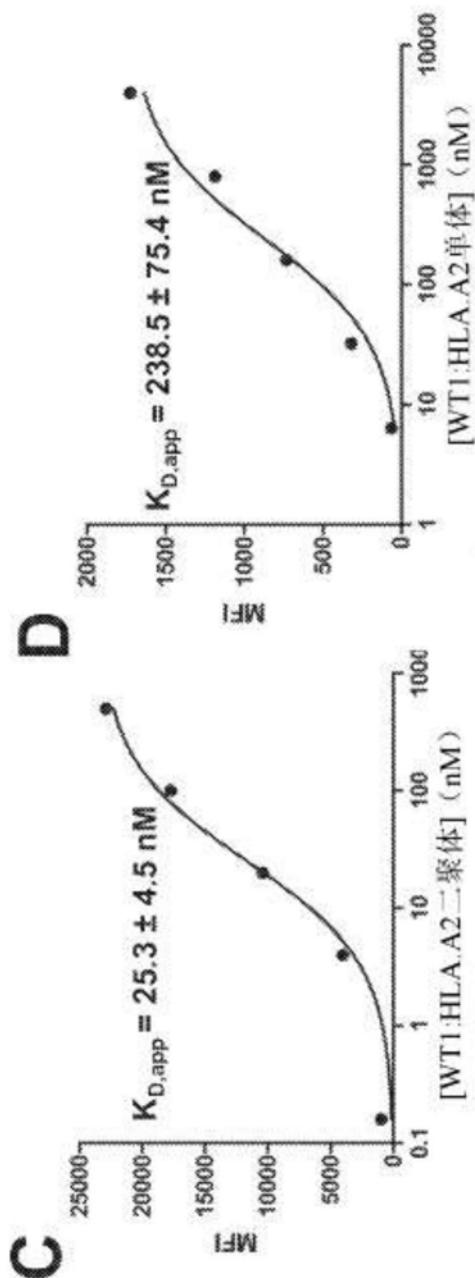


图8 (续)

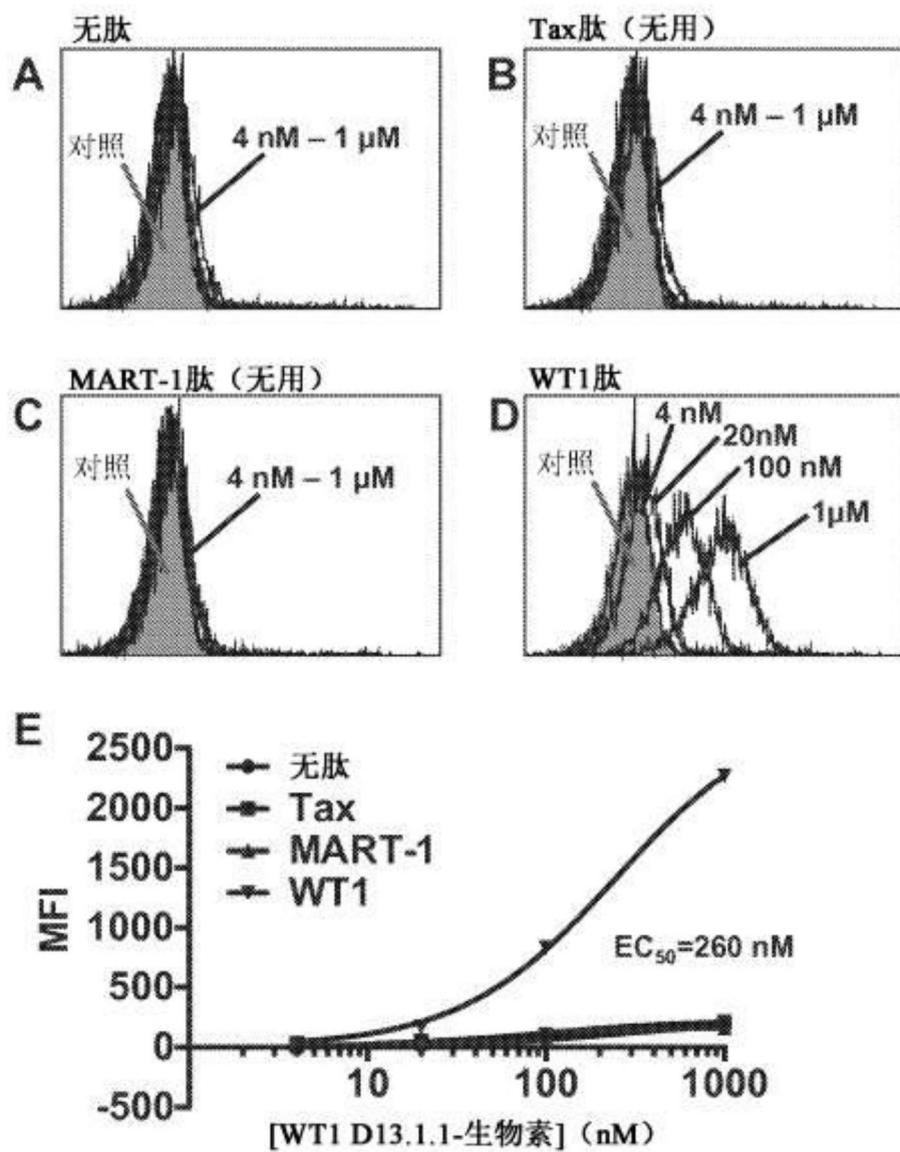


图9

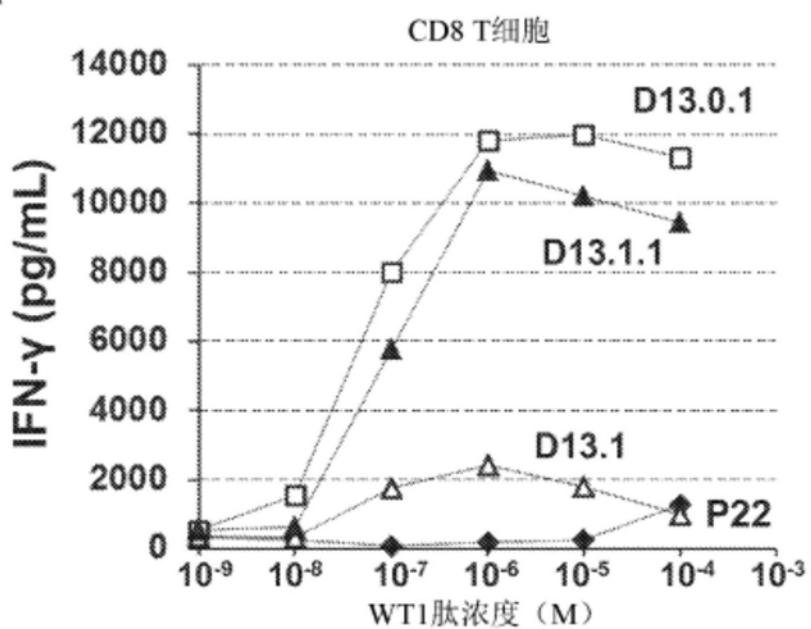
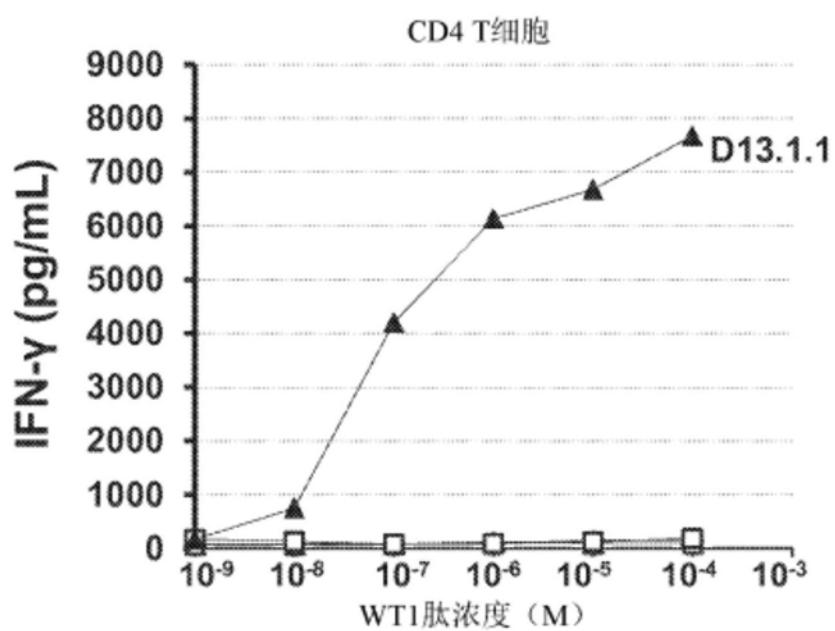
A**B**

图10

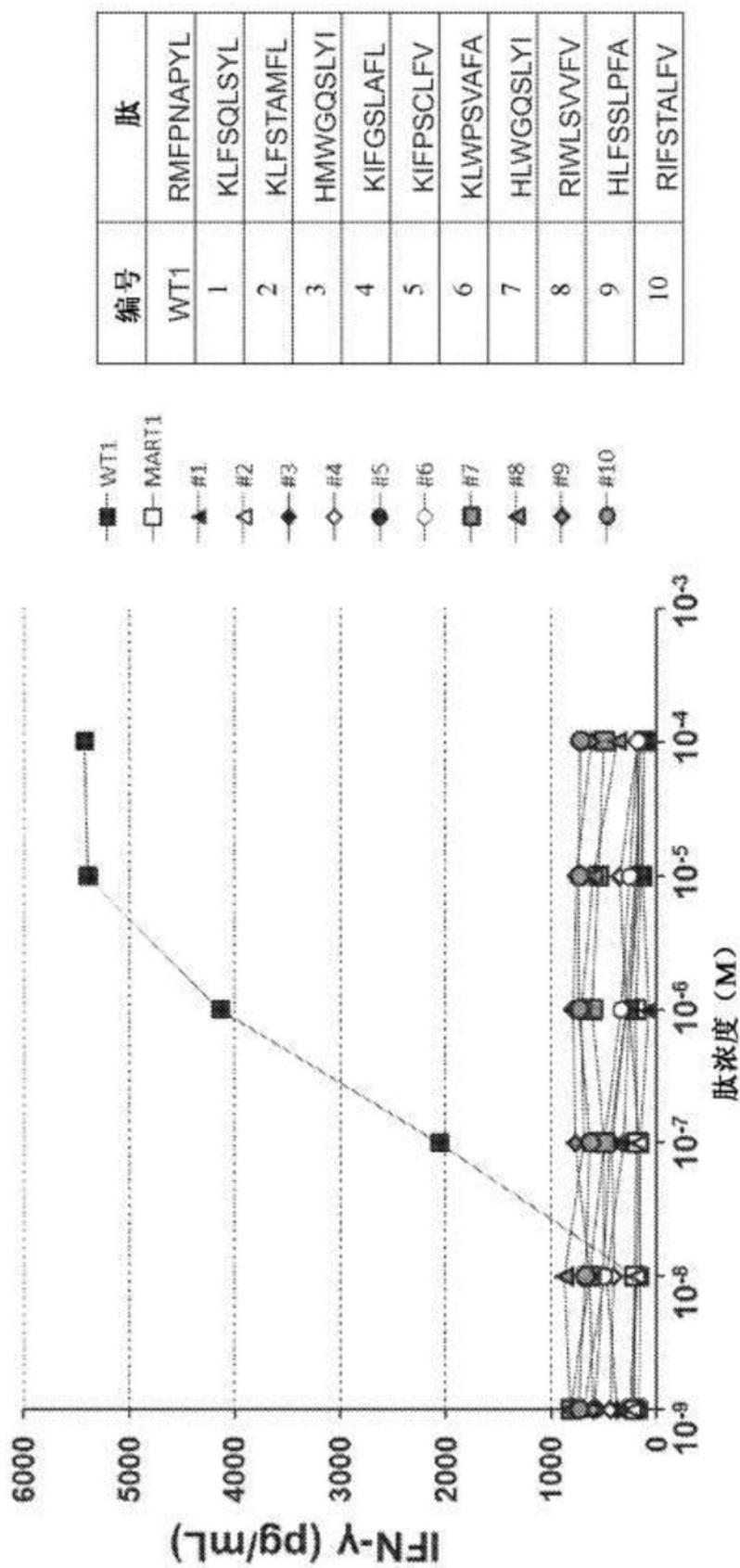
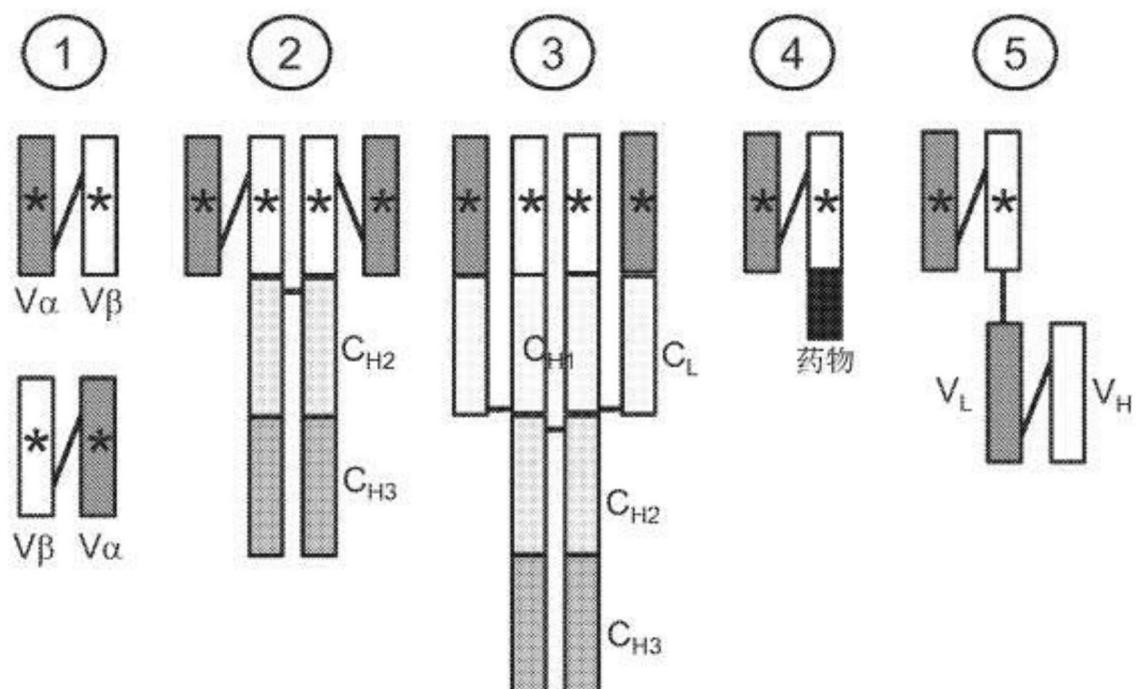


图11

A



B

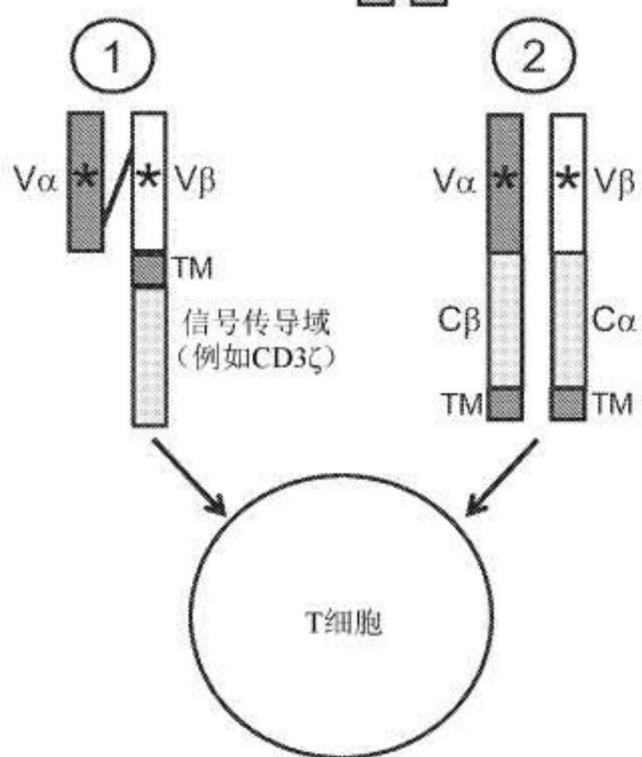


图12