



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110582299 A

(43)申请公布日 2019.12.17

(21)申请号 201880026621.3

(22)申请日 2018.03.15

(30)优先权数据

62/471,956 2017.03.15 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.10.23

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/022759 2018.03.15

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/170338 EN 2018.09.20

(71)申请人 弗雷德哈钦森癌症研究中心

地址 美国华盛顿州

(72)发明人 奥德·沙皮伊 托马斯·施密特

梅甘·麦卡菲

(74)专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所
(普通合伙) 44240

代理人 金辉

(51)Int.Cl.

A61K 39/395(2006.01)

C07K 16/30(2006.01)

权利要求书8页 说明书31页

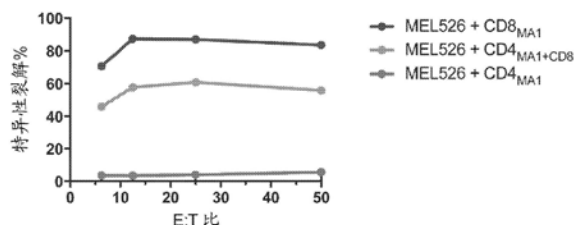
序列表54页 附图16页

(54)发明名称

高亲和力MAGE-A1特异性TCR及其用途

(57)摘要

本公开提供对各种肿瘤相关抗原(包括人类MAGE-A1表位)具有高亲和力或提高亲和力的TCR;表达这类高亲和力抗原-特异性TCR的T细胞;编码所述TCR的核酸;以及用于治疗其中细胞过表达这些抗原中的一种或多种的疾病或病症,诸如癌症的组合物。



1. 一种经修饰的细胞,其包含编码结合蛋白质的异源多核苷酸,其中所述经编码的结合蛋白质包括:

(a) T细胞受体 (TCR) α -链可变 ($V\alpha$) 域,其具有根据SEQ ID NO:26、32、38、44、50或51中任一个的CDR3氨基酸序列;和TCR β -链可变 ($V\beta$) 域;

(b) $V\beta$ 域,其具有根据SEQ ID NO:23、29、35、41或47中任一个的CDR3氨基酸序列;和 $V\alpha$ 域;或

(c) $V\alpha$ 域,其具有根据SEQ ID NO:26、32、38、44、50或51中任一个的CDR3氨基酸序列;和 $V\beta$ 域,其具有根据SEQ ID NO:23、29、35、41或47中任一个的CDR3氨基酸序列;并且

其中所述结合蛋白质能够独立于CD8或在CD8不存在下特异性结合于细胞表面上的MAGE-A1肽:HLA复合物。

2. 根据权利要求1所述的经修饰的细胞,其中所述经编码的结合蛋白质能够以小于或等于约10⁻⁸M的Kd特异性结合于KVLEYVIKV (SEQ ID NO.:123):人类白细胞抗原 (HLA) 复合物。

3. 根据权利要求1或2所述的经修饰的细胞,其中所述 (a) 的 $V\beta$ 域来源于TRBV30等位基因、TRBV29等位基因或TRBV9等位基因。

4. 根据权利要求1或2所述的经修饰的细胞,其中所述 (b) 的 $V\alpha$ 域来源于TRAV38-1等位基因、TRAV34等位基因、TRAV16等位基因或TRAV5等位基因。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的经修饰的细胞,其中经编码的 $V\alpha$ 域包含与根据SEQ ID NO.:3、7、11、15和19中任一个的氨基酸序列至少约90%同一的氨基酸序列,且经编码的 $V\beta$ 域包含与根据SEQ ID NO.:1、5、9、13、17中任一个的氨基酸序列至少约90%同一的氨基酸序列,条件是 (a) 至少三个或四个CDR不具有序列变化,其中不具有序列变化的CDR仅具有至多两个氨基酸取代、至多一个连续五氨基酸缺失,或它们的组合,且 (b) 所述经编码的结合蛋白质仍能够独立于CD8或在CD8不存在下特异性结合于MAGE-A1肽:HLA细胞表面复合物。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的经修饰的细胞,其中:

(a) 所述经编码的 $V\alpha$ 域包含 (i) 根据SEQ ID NO:24、30、36、42和48中任一个的CDR1氨基酸序列;和/或 (ii) 根据SEQ ID NO:25、31、37、43和49中任一个的CDR2氨基酸序列;和/或

(b) 所述经编码的 $V\beta$ 域包含 (iii) 根据SEQ ID NO:21、27、33、39和45中任一个的CDR1氨基酸序列;和/或 (iv) 根据SEQ ID NO:22、28、34、40和46中任一个的CDR2氨基酸序列。

7. 根据权利要求1-6中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经编码的结合蛋白质包含:

(a) 分别根据SEQ ID NO:24-26的 $V\alpha$ CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,和分别根据SEQ ID NO:21-23的 $V\beta$ CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列;

(b) 分别根据SEQ ID NO:30-32的 $V\alpha$ CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,和分别根据SEQ ID NO:27-29的 $V\beta$ CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列;

(c) 分别根据SEQ ID NO:36-38的 $V\alpha$ CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,和分别根据SEQ ID NO:33-35的 $V\beta$ CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列;

(d) 分别根据SEQ ID NO:42-44的 $V\alpha$ CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,和分别根据SEQ ID NO:39-41的 $V\beta$ CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列;或

(e) 分别根据SEQ ID NO:48-50的V α CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,和分别根据SEQ ID NO:45-47的V β CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经编码的结合蛋白质特异性结合于KVLEYVIKV (SEQ ID NO.:123):HLA-A*201复合物。

9. 根据权利要求1-8中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经编码的V α 域包含根据SEQ ID NO.:3、7、11、15或19的氨基酸序列或由其组成。

10. 根据权利要求1-9中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经编码的V β 域包含根据SEQ ID NO.:1、5、9、13或17的氨基酸序列或由其组成。

11. 根据权利要求1-10中任一项所述的经修饰的细胞,其还包含编码TCR α -链恒定(C α)域的异源多核苷酸,所述TCR α 链恒定(C α)域与根据SEQ ID NO.:4、8、12、16或20的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性。

12. 根据权利要求1-11中任一项所述的经修饰的细胞,其还包含编码TCR β -链恒定(C β)域的异源多核苷酸,所述TCR β 链恒定(C β)域包含与根据SEQ ID NO.:2、6、10、14或18的氨基酸序列具有至少90%的序列同一性的氨基酸序列。

13. 根据权利要求1-12中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经编码的结合蛋白质包括:包含SEQ ID NO.:3或由SEQ ID NO.:3组成的V α 域;包含SEQ ID NO.:1或由SEQ ID NO.:1组成的V β 域;包含SEQ ID NO.:4或由SEQ ID NO.:4组成的C α 域;和包含SEQ ID NO.:2或由SEQ ID NO.:2组成的C β 域。

14. 根据权利要求1-12中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经编码的结合蛋白质包括:包含SEQ ID NO.:7或由SEQ ID NO.:7组成的V α 域;包含SEQ ID NO.:5或由SEQ ID NO.:5组成的V β 域;包含SEQ ID NO.:8或由SEQ ID NO.:8组成的C α 域;和包含SEQ ID NO.:6或由SEQ ID NO.:6组成的C β 域。

15. 根据权利要求1-14中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经编码的结合蛋白质包括:包含SEQ ID NO.:11或由SEQ ID NO.:11组成的V α 域;包含SEQ ID NO.:9或由SEQ ID NO.:9组成的V β 域;包含SEQ ID NO.:12或由SEQ ID NO.:12组成的C α 域;和包含SEQ ID NO.:10或由SEQ ID NO.:10组成的C β 域。

16. 根据权利要求1-12中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经编码的结合蛋白质包括:包含SEQ ID NO.:15或由SEQ ID NO.:15组成的V α 域;包含SEQ ID NO.:13或由SEQ ID NO.:13组成的V β 域;包含SEQ ID NO.:16或由SEQ ID NO.:16组成的C α 域;和包含SEQ ID NO.:14或由SEQ ID NO.:14组成的C β 域。

17. 根据权利要求1-12中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经编码的结合蛋白质包括:包含SEQ ID NO.:19或由SEQ ID NO.:19组成的V α 域;包含SEQ ID NO.:17或由SEQ ID NO.:17组成的V β 域;包含SEQ ID NO.:20或由SEQ ID NO.:20组成的C α 域;和包含SEQ ID NO.:18或由SEQ ID NO.:18组成的C β 域。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述结合蛋白质为T细胞受体(TCR)、TCR的抗原结合片段,或嵌合抗原受体。

19. 根据权利要求18所述的经修饰的细胞,其中所述TCR、所述嵌合抗原受体或所述TCR的抗原结合片段是嵌合的、人源化的或人类的。

20. 根据权利要求18或19所述的经修饰的细胞,其中所述TCR的抗原结合片段包含单链

TCR (scTCR)。

21. 根据权利要求18-20中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述结合蛋白质为嵌合抗原受体,任选地为TCR-CAR。

22. 根据权利要求18-20中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述结合蛋白质为TCR。

23. 根据权利要求1-22中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经修饰的细胞为人类免疫细胞。

24. 根据权利要求23所述的经修饰的细胞,其中所述免疫细胞为T细胞、NK细胞或NK-T细胞。

25. 根据权利要求24所述的经修饰的细胞,其中所述免疫细胞为CD4+T细胞、CD8+T细胞或两者。

26. 根据权利要求23-25中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经修饰的细胞包含以下各者的染色体基因敲除:PD-1基因;LAG3基因;TIM3基因;CTLA4基因;HLA组分基因;TCR组分基因;或它们的组合。

27. 根据权利要求26所述的经修饰的细胞,其中所述染色体基因敲除包括选自以下各者的HLA组分基因的敲除: α 1巨球蛋白基因、 α 2巨球蛋白基因、 α 3巨球蛋白基因、 β 1微球蛋白基因或 β 2微球蛋白基因。

28. 根据权利要求26所述的经修饰的细胞,其中所述染色体基因敲除包括选自以下各者的TCR组分基因的敲除:TCR α 可变区基因、TCR β 可变区基因、TCR恒定区基因,或它们的组合。

29. 根据权利要求25-28中任一项所述的经修饰的细胞,其中所述经修饰的细胞为CD4+T细胞且进一步包含编码CD8共受体的至少一个胞外部分的异源多核苷酸。

30. 根据权利要求29所述的经修饰的细胞,其中编码所述结合蛋白质的所述多核苷酸和/或编码CD8共受体的至少一个胞外部分的所述多核苷酸经密码子优化以由所述经修饰的细胞表达。

31. 一种组合物,其包含根据权利要求1-30中任一项所述的经修饰的细胞和药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。

32. 一种单位剂量,其包含有效量的(i) 根据权利要求1-30中任一项所述的经修饰的细胞或(ii) 根据权利要求31所述的组合物。

33. 根据权利要求32所述的单位剂量,其包含呈约1:1比率的至少约30%经修饰的CD4+T细胞与(ii) 包含至少约30%经修饰的CD8+T细胞的组合物的组合。

34. 根据权利要求33所述的单位剂量,其中所述单位剂量基本上不含原始T细胞。

35. 一种经分离的多核苷酸,其编码具有TCR V α 域和TCR V β 域的结合蛋白质,其中所述经编码的结合蛋白质能够独立于CD8或在CD8不存在下特异性结合于细胞表面上的MAGE-A1肽:HLA复合物,所述经分离的多核苷酸包含:

(a) 根据SEQ ID NO:97、103、109、115或121的V α CDR3编码多核苷酸,和V β 编码多核苷酸;

(b) 根据SEQ ID NO:94、100、106、112或118的V β CDR3编码多核苷酸,和V α 编码多核苷酸;或

(c) 根据SEQ ID NO:97、103、109、115或121的V α CDR3编码多核苷酸,和根据SEQ ID NO:

94、100、106、112或118的V β CDR3编码多核苷酸。

36. 根据权利要求35所述的经分离的多核苷酸,其中所述(a)的V β 编码多核苷酸来源于TRBV30等位基因、TRBV29等位基因或TRBV9等位基因。

37. 根据权利要求35所述的经分离的多核苷酸,其中所述(b)的V α 编码多核苷酸来源于TRAV38-1等位基因、TRAV34等位基因、TRAV16等位基因或TRAV5等位基因。

38. 根据权利要求35-37中任一项所述的经分离的多核苷酸,其包含:

(a) 根据SEQ ID NO:97的V α CDR3编码多核苷酸,和根据SEQ ID NO:94的V β CDR3编码多核苷酸;

(b) 根据SEQ ID NO:103的V α CDR3编码多核苷酸,和根据SEQ ID NO:100的V β CDR3编码多核苷酸;

(c) 根据SEQ ID NO:109的V α CDR3编码多核苷酸,和根据SEQ ID NO:106的V β CDR3编码多核苷酸;

(d) 根据SEQ ID NO:115的V α CDR3编码多核苷酸,和根据SEQ ID NO:112的V β CDR3编码多核苷酸;或

(e) 根据SEQ ID NO:121的V α CDR3编码多核苷酸,和根据SEQ ID NO:118的V β CDR3编码多核苷酸。

39. 根据权利要求35-38中任一项所述的经分离的多核苷酸,其还包含:

(a) 根据SEQ ID NO:95、101、107、113或119的V α CDR1编码多核苷酸;

(b) 根据SEQ ID NO:96、102、108、114或120的V α CDR2编码多核苷酸;

(c) 根据SEQ ID NO:92、98、104、110或116的V β CDR1编码多核苷酸;和/或

(d) 根据SEQ ID NO:93、99、105、111或117的V β CDR2编码多核苷酸。

40. 根据权利要求35-39中任一项所述的经分离的多核苷酸,其包含:

(a) 根据SEQ ID NO:95的V α CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:96的V α CDR2编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:97的V α CDR3编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:92的V β CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:93的V β CDR2编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:94的V β CDR3编码多核苷酸;

(b) 根据SEQ ID NO:101的V α CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:102的V α CDR2编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:103的V α CDR3编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:98的V β CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:99的V β CDR2编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:100的V β CDR3编码多核苷酸;

(c) 根据SEQ ID NO:107的V α CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:108的V α CDR2编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:109的V α CDR3编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:104的V β CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:105的V β CDR2编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:106的V β CDR3编码多核苷酸;

(d) 根据SEQ ID NO:113的V α CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:114的V α CDR2编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:115的V α CDR3编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:110的V β CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:111的V β CDR2编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:112的V β CDR3编码多核苷酸;或

(e) 根据SEQ ID NO:119的V α CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:120的V α CDR2编码多

核苷酸;根据SEQ ID NO:121的VaCDR3编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:116的VBCDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:117的VBCDR2编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:118的VBCDR3编码多核苷酸。

41. 根据权利要求35-40中任一项所述的经分离的多核苷酸,其中所述Va编码多核苷酸包括与SEQ ID NO:58、66、74、82或90具有至少80%同一性的核苷酸序列,且所述Vβ编码多核苷酸包括与SEQ ID NO:56、64、72、80或88具有至少80%同一性的核苷酸序列]

42. 根据权利要求35-41中任一项所述的经分离的多核苷酸,其中:

(a) 所述Va编码多核苷酸包括与SEQ ID NO:58具有至少80%同一性的核苷酸序列,且所述Vβ编码多核苷酸包括与SEQ ID NO:56具有至少80%同一性的核苷酸序列;

(b) 所述Va编码多核苷酸包括与SEQ ID NO:66具有至少80%同一性的核苷酸序列,且所述Vβ编码多核苷酸包括与SEQ ID NO:64具有至少80%同一性的核苷酸序列;

(c) 所述Va编码多核苷酸包括与SEQ ID NO:74具有至少80%同一性的核苷酸序列,且所述Vβ编码多核苷酸包括与SEQ ID NO:72具有至少80%同一性的核苷酸序列;

(d) 所述Va编码多核苷酸包括与SEQ ID NO:82具有至少80%同一性的核苷酸序列,且所述Vβ编码多核苷酸包括与SEQ ID NO:80具有至少80%同一性的核苷酸序列;或

(e) 所述Va编码多核苷酸包括与SEQ ID NO:90具有至少80%同一性的核苷酸序列,且所述Vβ编码多核苷酸包括与SEQ ID NO:88具有至少80%同一性的核苷酸序列。

43. 根据权利要求42所述的经分离的多核苷酸,其中:

(a) 所述Va编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:58的核苷酸序列或由其组成,且所述Vβ编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:56的核苷酸序列或由其组成;

(b) 所述Va编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:66的核苷酸序列或由其组成,且所述Vβ编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:64的核苷酸序列或由其组成;

(c) 所述Va编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:74的核苷酸序列或由其组成,且所述Vβ编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:72的核苷酸序列或由其组成;

(d) 所述Va编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:82的核苷酸序列或由其组成,且所述Vβ编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:80的核苷酸序列或由其组成;或

(e) 所述Va编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:90的核苷酸序列或由其组成,且所述Vβ编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:88的核苷酸序列或由其组成。

44. 根据权利要求35-43中任一项所述的经分离的多核苷酸,其还包括:

(a) 与SEQ ID NO:59、67、75、83或91具有至少80%同一性的Ca域编码多核苷酸;和/或

(b) 与SEQ ID NO:57、65、73、81或89具有至少80%同一性的CB域编码多核苷酸。

45. 根据权利要求44所述的经分离的多核苷酸,其中所述Ca域编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:59、67、75、83或91的核苷酸序列或由其组成,且所述CB域编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:57、65、73、81或89的核苷酸序列或由其组成。

46. 根据权利要求45所述的经分离的多核苷酸,其包括:

(a) 根据SEQ ID NO:58的Va编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:56的Vβ编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:59的Ca域编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:57的CB域编码多核苷酸;

(b) 根据SEQ ID NO:66的Va编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:64的Vβ编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:67的Ca域编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:65的CB域编码多核苷酸;

(c) 根据SEQ ID NO:74的V α 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:72的V β 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:75的C α 域编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:73的C β 域编码多核苷酸;

(d) 根据SEQ ID NO:82的V α 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:80的V β 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:83的C α 域编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:81的C β 域编码多核苷酸;或

(e) 根据SEQ ID NO:90的V α 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:88的V β 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:91的C α 域编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:89的C β 域编码多核苷酸。

47. 根据权利要求44-46中任一项所述的经分离的多核苷酸,其还包括编码自裂解肽的多核苷酸,所述自裂解肽设置在TCR α -链编码多核苷酸和TCR β -链编码多核苷酸之间。

48. 根据权利要求47所述的经分离的多核苷酸,其中所述编码自裂解肽的多核苷酸包括根据SEQ ID NO.:128-132中任一个的核苷酸序列或由其组成。

49. 根据权利要求47所述的经分离的多核苷酸,其中所述多核苷酸编码自裂解肽,所述自裂解肽包含根据SEQ ID NO.:124-127中任一个的氨基酸序列或由其组成。

50. 一种表达载体,其包括可操作地连接于表达控制序列的根据权利要求35-49中任一项所述的多核苷酸。

51. 根据权利要求50所述的表达载体,其中所述载体能够将所述多核苷酸递送至宿主细胞。

52. 根据权利要求51所述的表达载体,其中所述宿主细胞是造血祖细胞或人类免疫系统细胞。

53. 根据权利要求52所述的表达载体,其中所述人类免疫系统细胞是CD4+T细胞、CD8+T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、 γ δ T细胞、自然杀伤细胞、树突细胞或它们的任何组合。

54. 根据权利要求53所述的表达载体,其中所述T细胞是原始T细胞、中央记忆性T细胞、效应记忆T细胞或它们的任何组合。

55. 根据权利要求50-54中任一项所述的表达载体,其中所述载体是病毒载体。

56. 根据权利要求55所述的表达载体,其中所述病毒载体是慢病毒载体或 γ 逆转录病毒载体。

57. 一种用于治疗与MAGE-A1表达相关的过度增殖性病症的方法,其包括向有需要的人类受试者施用根据权利要求1-30中任一项所述的经修饰的细胞、根据权利要求31所述的组合物,或根据权利要求3-34中任一项权利要求所述的单位剂量。

58. 根据权利要求57所述的方法,其中所述过度增殖性病症是血液恶性肿瘤或实体癌。

59. 根据权利要求60所述的方法,其中所述血液恶性肿瘤选自急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病(AML)、慢性髓性白血病(CML)、慢性嗜酸性粒细胞白血病(CEL)、骨髓增生异常综合征(MDS)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)或多发性骨髓瘤(MM)。

60. 根据权利要求58所述的方法,其中所述实体癌选自非小细胞肺癌(NSCLC)、三阴性乳腺癌(TNBC)、卵巢癌、恶性黑色素瘤、结肠癌、结直肠癌、胆管癌、膀胱癌、骨和软组织癌、脑肿瘤、乳癌、宫颈癌、硬纤维瘤、胚胎癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、胃腺癌、多形性胶质母细胞瘤、妇科肿瘤、头颈鳞状细胞癌、肝癌、肺癌、间皮瘤、骨肉瘤、胰腺癌、胰腺导管腺癌、原发性星形细胞肿瘤、原发性甲状腺癌、前列腺癌、肾癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、睾丸生殖细胞肿瘤、尿路上皮癌、子宫肉瘤或子宫癌。

61. 根据权利要求57-60中任一项所述的方法,其中所述经修饰的细胞能够以I类HLA限

制性方式促进对MAGE-A1的抗原特异性T细胞应答。

62. 根据权利要求61所述的方法, 其中所述I类HLA限制性应答与抗原加工相关转运体(TAP) 无关。

63. 根据权利要求61或62所述的方法, 其中所述抗原特异性T细胞应答包括CD4+辅助性T淋巴细胞(Th) 应答和CD8+细胞毒性T淋巴细胞(CTL) 应答中的至少一种。

64. 根据权利要求63所述的方法, 其中所述CTL应答针对具有异常MAGE-A1表达的细胞。

65. 根据权利要求57-64中任一项所述的方法, 其中所述经修饰的细胞被离体修饰。

66. 根据权利要求65所述的经修饰的细胞, 其中所述经修饰的细胞是同种异体细胞、同基因细胞或自体细胞。

67. 根据权利要求57-66中任一项权利要求所述的表达载体, 其中所述经修饰的细胞是经修饰的人类免疫细胞, 其中所述免疫细胞选自CD4+T细胞、CD8+T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤细胞、树突细胞或它们的任何组合。

68. 根据权利要求67所述的方法, 其中所述T细胞是原始T细胞、中央记忆性T细胞、效应记忆T细胞或它们的任何组合。

69. 根据权利要求67或68所述的方法, 其中所述T细胞是CD4+T细胞。

70. 根据权利要求69所述的方法, 其中所述CD4+T细胞还包含编码CD8共受体的至少一个胞外部分的异源多核苷酸。

71. 根据权利要求69或70所述的方法, 其还包括向所述受试者施用CD8+T细胞, 所述CD8+T细胞能够特异性结合于细胞表面上的MAGE-A1肽:HLA复合物。

72. 根据权利要求71所述的方法, 其中所述CD8+T细胞包括根据权利要求1-30中任一项所述的经修饰的细胞。

73. 根据权利要求57-72中任一项所述的方法, 其中所述经修饰的细胞肠胃外施用。

74. 根据权利要求57-73中任一项所述的方法, 其中所述方法包括向所述受试者施用多个剂量的所述经修饰的细胞。

75. 根据权利要求74所述的方法, 其中所述多个剂量以约两周至约四周的施用之间的间隔施用。

76. 根据权利要求57-75中任一项所述的方法, 其中将所述经修饰的细胞以约10⁷个细胞/m²至约10¹¹个细胞/m²的剂量施用于所述受试者。

77. 根据权利要求57-76中任一项所述的方法, 其中所述方法还包括施用细胞因子。

78. 根据权利要求77所述的方法, 其中所述细胞因子是IL-2、IL-15、IL-21或它们的任何组合。

79. 根据权利要求78所述的方法, 其中所述细胞因子是IL-2, 并与所述经修饰细胞同时或依序施用。

80. 根据权利要求79所述的方法, 其中所述细胞因子依序施用, 条件是在细胞因子施用前向所述受试者施用所述经修饰的细胞至少三次或四次。

81. 根据权利要求78-80中任一项所述的方法, 其中所述细胞因子为IL-2并皮下施用。

82. 根据权利要求57-81中任一项所述的方法, 其中所述受试者还接受免疫抑制疗法。

83. 根据权利要求82所述的方法, 其中所述免疫抑制疗法选自钙调磷酸酶抑制剂、皮质类固醇、微管抑制剂、低剂量的霉酚酸前药、免疫检查点抑制剂或它们的任何组合。

84. 根据权利要求57-83中任一项所述的方法, 其中向所述受试者进一步施用有效量的刺激性免疫检查点分子。

85. 根据权利要求57-84中任一项所述的方法, 其中所述受试者已接受非清髓性或清髓性造血细胞移植。

86. 根据权利要求85所述的方法, 其中在所述非清髓性造血细胞移植后至少三个月向所述受试者施用所述经修饰的细胞。

87. 根据权利要求86所述的方法, 其中在所述清髓性造血细胞移植后至少两个月向所述受试者施用所述经修饰的细胞。

88. 根据权利要求57-87中任一项所述的方法, 其中已经向所述受试者施用DNA低甲基化剂和HDAC抑制剂中的一种或多种。

89. 一种经修饰的CD4+T细胞, 其包含编码来自CD8+T细胞的能够特异性结合于肽抗原的TCR的异源多核苷酸。

90. 根据权利要求89所述的经修饰的CD4+T细胞, 其中所述TCR是高亲和力TCR。

91. 根据权利要求89或90所述的经修饰的CD4+T细胞, 其中所述TCR能够独立于CD8或在CD8不存在下特异性结合于细胞表面上的肽: 抗原HLA复合物。

92. 根据权利要求89-91中任一项所述的经修饰的CD4+T细胞, 其还包含编码CD8共受体分子的至少一个胞外部分的异源多核苷酸。

93. 根据权利要求92所述的经修饰的CD4+T细胞, 其中所述异源多核苷酸编码来自所述CD8+T细胞的CD8 α 和CD8 β 。

94. 根据权利要求92或93所述的经修饰的CD4+T细胞, 其中所述经修饰的CD4+T细胞能够在结合于所述肽: 抗原HLA复合物时引发CTL应答。

95. 根据权利要求89-94中任一项所述的经修饰的CD4+T细胞, 其中所述肽抗原来自MAGE-A1。

96. 一种用于制备经修饰的CD4+T细胞的方法, 其包括用编码来自CD8+T细胞的能够特异性结合肽抗原的TCR的异源多核苷酸转导CD4+T细胞。

97. 根据权利要求96所述的方法, 其中所述TCR是天然存在的TCR。

98. 根据权利要求96或权利要求97所述的方法, 其还包括用编码CD8共受体的至少一个胞外部分的异源多核苷酸转导所述CD4+T细胞。

99. 根据权利要求98所述的方法, 其中所述CD8共受体包含来自所述CD8+T细胞的CD8 α 和CD8 β 。

高亲和力MAGE-A1特异性TCR及其用途

[0001] 关于序列表的声明

[0002] 与本申请相关的序列表以文本格式代替纸质副本提供,并且据此以引用方式并入到本说明书中。含有序列表的文本文件的名称是360056_446WO_SEQUENCE_LISTING.txt。文本文件为86.3KB,创建于2018年3月14日,并通过EFS-Web以电子方式提交。

背景技术

[0003] 过继转移肿瘤特异性T细胞是消除现有肿瘤的有吸引力的策略,并需要在体内建立一个稳健的抗原特异性T细胞群,以消除现有肿瘤并防止复发(Stromnes等人, Immunol.Rev.257:145,2014)。尽管肿瘤特异性CD8+细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的转移是安全的并且可以在选择的患者中介导直接的抗肿瘤活性(Chapuis等人,Cancer Res.72:LB-136,2012;Chapuis等人,Sci.Transl.Med.5:174ra127,2013;Chapuis等人,Proc.Nat'l.Acad.Sci.U.S.A.109:4592,2012)2-4,但从每名患者或供体分离的CTL的亲合力的变化在临床试验中限制了抗肿瘤功效(Chapuis等人,2013)。因为TCR亲和力是CTL亲合力的重要决定因素(Zoete等人,Frontiers Immunol.4:268,2013),因此已经使用分离自对肿瘤特异性抗原具有特异性的充分表征的T细胞克隆的高亲和力TCR α/β 基因开发了重定向供体或患者T细胞的抗原特异性的策略(Stromnes等人,Immunol.Rev.257:145,2014;Robbins等人,J.Clin.Oncol.29:917,2011)。这类高亲和力自身/肿瘤反应性T细胞是罕见的,因为表达自身/肿瘤反应性TCR的T细胞经受中枢和外周耐受(Stone和Kranz,Frontiers Immunol.4:244,2013),其中供体之间相对TCR亲和力变化广泛。因此,必须筛选许多匹配的供体以鉴定可以产生TCR α/β 基因疗法构建体的足够高亲和力的肿瘤特异性T细胞克隆。例如,分离对单一HLA等位基因具有高功能性亲合力的天然引发的维尔姆斯瘤抗原1(WT1)特异性TCR需要筛选数百个WT特异性T细胞系,这代表来自超过75名正常供体的外周库的数千个单独T细胞克隆,这是一个非常耗费时间和劳动力的过程(Chapuis等人,2013;Schmitt等人,Hum.Gene Ther.20:1240,2009;Ho等人,J.Immunol.Methods 310:40,2006)。

[0004] 需要针对各种癌症(诸如白血病和肿瘤)的替代性抗原特异性TCR免疫疗法。本发明公开的实施方案解决了这些需求并提供其他相关优点。

附图说明

[0005] 图1A和1B显示了代表性数据,其说明相比在极低频率(B)下发现的对自身抗原的高亲和力T细胞,在更高的频率(A)下发现对病毒抗原的高亲和力T细胞。

[0006] 图2A和2B分别显示(A)由本公开的发明人进行的T细胞富集测定的示意图,(B)来自用于富集抗原特异性CD8+ T细胞的一系列分选实验的流式细胞术数据。

[0007] 图3显示了使用MAGE-A1:HLA四聚体的来自本公开的TCR β CDR3富集方案的示例性数据。

[0008] 图4A和4B分别显示(A)使用本公开的方法鉴定的MAGE-A1:HLA四聚体与TCR的特异性结合和(B)MAGE-A1特异性TCR的富集。

[0009] 图5A-5C分别提供(A)流式细胞术数据,其显示本公开的MAGE-A1特异性CD8⁺ T细胞结合MAGE-A1:HLA四聚体,(B)在抗原表达U266骨髓瘤细胞存在(左)或不存在下(右),MAGE-A1特异性CD8⁺ T细胞的细胞因子产生,和(C)特异性溶解数据,其显示本公开的高亲和力MAGE-A1 TCR转导的CD8⁺ T细胞结合抗原:MHC四聚体并杀灭呈递MAGE-A1:MHC(A*0201)的细胞。(C)中的数据来自标准的Cr51释放测定,其中使CD8⁺ T细胞与单独的U266细胞、与外源性干扰素- γ (IFN γ) 或与外源性MAGE-A1肽共同培养。

[0010] 图6A说明了根据本公开的免疫疗法方法,其中转导CD4⁺ T细胞以表达均来自对肽抗原具有特异性的CD8⁺ T细胞的TCR和CD8共受体。激活经转导的CD4⁺ T细胞可以增强或改善CD8⁺ T细胞(诸如免疫疗法环境中输注的CTL)的抗原应答。图6B显示了本公开的发明人所进行实验的设计,其中转导CD4⁺ T细胞以表达非CD8依赖性MHC I类限制性TCR,但不表达CD8共受体。

[0011] 图7A显示来自实验的流式细胞术数据,其中测定表达高亲和力CD8抗MAGE-A1 TCR的T细胞(CD8⁺和CD4⁺)与MAGE-A1:MHC四聚体的结合。图7B显示MAGE-A1特异性T细胞与MAGE-A1:MHC四聚体的特异性结合。图7C显示表达本公开的MAGE-A1特异性TCR的CD8⁺ T细胞的靶细胞裂解(Cr51释放)和相当的CD4⁺ T细胞杀灭的缺乏。

[0012] 图8A显示本公开的发明人所进行实验的示意图,其中转导CD4⁺ T细胞以表达高亲和力MAGE A1 I类TCR加CD8 $\alpha\beta$ 共受体,并检测在表达肽:MHC的细胞存在下的功能性。图8B显示与仅表达MAGE-A1 TCR的CD4⁺ T细胞相比,更高比例的用MAGE-A1 TCR和CD8共受体转导的CD4⁺ T细胞产生细胞因子。图8C显示所指定T细胞对抗原呈递MEL526黑素瘤靶细胞的特异性溶解。图8D显示用抗原刺激后两组经转导的CD4⁺ T细胞的扩增。

具体实施方式

[0013] 在某些方面,本公开提供组合物,其包含对与主要组织相容性复合物(MHC)(例如,人类白细胞抗原,HLA)相关的MAGE-A1肽抗原具有特异性的结合蛋白质,该组合物可用于例如治疗与MAGE-A1表达相关的疾病或病症(例如,癌症)或过继性免疫疗法以治疗癌症。在某些实施方案中,本公开提供编码这类MAGE-A1特异性结合蛋白质的多核苷酸,以及经修饰以表达MAGE-A1特异性结合蛋白质(例如TCR)的宿主细胞。

[0014] 在其他方面,本公开提供经修饰的CD4⁺ T细胞,其包含编码来自能够特异性结合于肽抗原(例如,MAGE-A1)的CD8⁺ T细胞的TCR的异源多核苷酸,并且任选地包含编码CD8共受体分子的至少一个胞外部分的异源多核苷酸。

[0015] 作为背景,因为肿瘤产生于先前正常的组织,所以基于T细胞的免疫疗法的大多数肿瘤靶是自身抗原。例如,这类肿瘤相关抗原(TAA)可以在癌细胞中以高水平表达,但在其他细胞中可以不表达或可以最低限度地表达。在胸腺中的T细胞发育期间,与自身抗原弱结合的T细胞得以在胸腺中存活,并且可以经历进一步发育和成熟,而与自身抗原强结合的T细胞被免疫系统消除,因为这些细胞会产生不期望的自身免疫应答。因此,通过T细胞与抗原结合的相对能力对其进行分类,以制备对外来入侵者响应(即,识别非自身抗原),同时防止自身免疫应答(即,识别自身抗原)的免疫系统。这种耐受机制限制了能够以高亲和力识别肿瘤(自身)抗原的天然存在的T细胞,并因此消除了能够有效消除肿瘤细胞的T细胞。因此,难以分离具有对肿瘤抗原具有特异性的高亲和力TCR的T细胞,因为大多数此类细胞基

本上被免疫系统消除。

[0016] 本公开提供对MAGE-A1 (也称为MAGE-1, MAGE家族成员A1, CT1.1和黑素瘤抗原基因1) 肽具有特异性的TCR, 诸如对MAGE-A1肽具有特异性的高亲和力TCR, 其中表达这类TCR的细胞能够独立于CD8结合于MAGE-A1:HLA复合物。此外, 与内源性TCR相比, 此类TCR可任选地能够更有效地与CD3蛋白缔合。

[0017] 开发出一种方法, 以便在短时间(约6-8周)内快速并同时筛选和分类来自一个大型HLA匹配供体组的T细胞克隆型(基于亲和力)。在某些实施方案中, 本公开提供通过在受试者的免疫细胞(例如, PBMC)存在下使用有限浓度的抗原特异性pMHC多聚体来富集具有高亲和力TCR的细胞的方法。使用TCRB库和频率分析与生物信息学的结合准确鉴定TCR α 链和 β 链对。这些方法的一个优点是相对于克隆单个TCR, 它们允许快速比较来自多个供体的数千个克隆的TCR亲和力。

[0018] 本文所述的组合物和方法将在某些实施方案中具有治疗效用, 以用于治疗与MAGE-A1表达相关的疾病和病症。这类疾病包括各种形式的过度增殖性病症, 诸如血液恶性肿瘤和实体癌。这些和相关用途的非限制性实例在本文进行了描述, 并包括体外、离体和体内刺激MAGE-A1抗原特异性T细胞应答, 诸如通过使用表达对MAGE-A1肽具有特异性的增强或高亲和力TCR的重组T细胞。

[0019] 在更详细地阐述本公开之前, 理解本公开可能有助于提供本文中使用的某些术语的定义。另外的定义在本公开通篇中阐述。

[0020] 在本说明书中, 除非另有说明, 否则任何浓度范围、百分比范围、比率范围或整数范围应理解为包括所述范围内的任何整数的值, 并且在适当时包括其分数(诸如, 整数的十分之一和百分之一)。此外, 除非另有说明, 否则本文所述的与任何物理特征(诸如聚合物亚单元、尺寸或厚度)相关的任何数字范围应理解为包括所述范围内的任何整数。除非另有说明, 否则如本文所用的术语“约”是指所指示范围、值或结构的 $\pm 20\%$ 。应理解, 如本文所用的术语“一/一个(a/an)”是指所列举组分中的“一个(种)或多个(种)”。替代方案的使用(例如, “或”)应理解为意指替代方案中的一个、两个或它们的任何组合。如本文所用, 术语“包括”、“具有”和“包含”同义使用, 所述术语和变体旨在解释为非限制性的。

[0021] 此外, 应理解, 本申请公开了来源于本文所述的结构和取代基的各种组合的单独化合物或化合物群组, 直至如同每种化合物或化合物群组单独阐述的程度。因此, 特定结构或特定取代基的选择在本公开的范围之内。

[0022] 术语“基本上由……组成”不等同于“包含”, 并且指代权利要求的指定材料或步骤, 或指代不实质上影响所要求保护的主题的基本特征的那些。例如, 蛋白质域、区域或模块(例如, 结合域、铰链区、连接子模块)或蛋白质(可具有一个或多个域、区域或模块)“基本上由”特定氨基酸序列“组成”, 当域、区域、模块或蛋白质的氨基酸序列包括延伸、缺失、突变或它们的组合(例如, 氨基或羧基末端或域之间的氨基酸)时, 所述延伸、缺失、突变或它们的组合呈组合促进域、区域、模块或蛋白质长度的至多20%(例如, 至多15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%或1%)并且基本上不会影响(即, 不会将活性减少超过50%, 诸如不超过40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或1%)域、区域、模块或蛋白质的活性(例如, 结合蛋白质的靶结合亲和力)。

[0023] 如本文所用, “免疫系统细胞”是指免疫系统的任何细胞, 其源自骨髓中的造血干

细胞,产生两个主要谱系,即骨髓祖细胞(其产生骨髓细胞,诸如单核细胞、巨噬细胞、树突细胞、巨核细胞和粒细胞)和淋巴祖细胞(其产生淋巴样细胞,诸如T细胞、B细胞和自然杀伤细胞(NK))。示例性免疫系统细胞包括CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、调节性T细胞、自然杀伤细胞和树突细胞。巨噬细胞和树突细胞可以称为“抗原呈递细胞”或“APC”,其为在与肽复合的APC表面上的主要组织相容性复合物(MHC)受体与T细胞表面上的TCR相互作用时,可以活化T细胞的特定细胞。

[0024] “主要组织相容性复合物”(MHC)是指将肽抗原递送至细胞表面的糖蛋白。MHC I类分子是异二聚体,其具有跨越 α 链(具有三个 α 域)的膜和非共价缔合的 β 2微球蛋白。MHC II类分子由两种跨膜糖蛋白 α 和 β (两者都跨越膜)构成。每个链具有两个域。MHC I类分子将源自胞质溶胶的肽递送至细胞表面,其中肽:MHC复合物被CD8⁺ T细胞识别。MHC II类分子将源自囊泡系统的肽递送至细胞表面,其中所述肽被CD4⁺ T细胞识别。人类MHC称为人类白细胞抗原(HLA)。

[0025] “T细胞”是在胸腺中成熟并产生T细胞受体(TCR)的免疫系统细胞。T细胞可以是原始的(不暴露于抗原;与TCM相比,CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127和CD45RA的表达增加,且CD45RO的表达降低)、记忆性T细胞(TM)(经历抗原且长寿命)和效应细胞(经历抗原,具有细胞毒性)。TM可进一步分为中央记忆性T细胞(TCM,与原始T细胞相比,CD62L、CCR7、CD28、CD127、CD45RO和CD95的表达增加,且CD54RA的表达降低)和效应记忆T细胞(TEM,与原始T细胞或TCM相比,CD62L、CCR7、CD28、CD45RA的表达降低,且CD127的表达增加)的亚群。效应T细胞(TE)是指经历抗原的CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞,其相比TCM具有降低的CD62L、CCR7、CD28表达,并且对颗粒酶和穿孔素呈阳性。其他示例性T细胞包括调节性T细胞,诸如CD4⁺ CD25⁺ (Foxp3⁺) 调节性T细胞和Treg17细胞,以及Tr1、Th3、CD8⁺CD28⁻和Qa-1限制性T细胞。

[0026] “T细胞受体”(TCR)是指能够特异性结合与MHC受体结合的抗原肽的免疫球蛋白超家族成员(具有可变结合域、恒定域、跨膜区和短胞质尾区;参见例如Janeway等人,Immunobiology:The Immune System in Health and Disease,第3版,Current Biology Publications,第4:33页,1997)。TCR可以在细胞表面上或呈可溶形式发现,且通常由具有 α 和 β 链(也分别称为TCR α 和TCR β)或 γ 和 δ 链(也分别称为TCR γ 和TCR δ)的异二聚体构成。如同免疫球蛋白,TCR链(例如, α 链、 β 链)的胞外部分含有两个免疫球蛋白域、在N端处的一个可变域(例如, α 链可变域或V α , β 链可变域或V β ;基于Kabat编号通常为氨基酸1至116,Kabat等人,“Sequences of Proteins of Immunological Interest,US Dept.Health and Human Services,Public Health Service National Institutes of Health,1991,第5版),和与细胞膜相邻的一个恒定域(例如, α 链恒定域或C α ,基于Kabat通常为氨基酸117至259, β 链恒定域或C β ,基于Kabat通常为氨基酸117至295)。还如同免疫球蛋白,可变域含有由框架区(FR)分隔的互补决定区(CDR)(参见例如Jores等人,Proc.Nat'l Acad.Sci.U.S.A.87:9138,1990;Chothia等人,EMBO J.7:3745,1988;还参见Lefranc等人,Dev.Comp.Immunol.27:55,2003)。原始TCR的V α 和V β 一般具有相似的结构,每个可变域包含四个保守FR和三个CDR。V α 域由两个独立的DNA区段编码,即可变基因区段和连接基因区段(V-J);V β 域由三个独立的DNA区段编码,即可变基因区段、多样性基因区段和连接基因区段(V-D-J)。单一V α 或V β 域可足以赋予抗原结合特异性。此外,可以使用来自TCR的V α 或V β 域分离结合特定抗原的TCR,所述TCR结合抗原以分别筛选互补的V α 或V β 域的文库。在某些实施

方案中,TCR在T细胞(或T淋巴细胞)的表面上发现并与CD3复合物缔合。本公开中使用的TCR来源可以来自各种动物物种,诸如人类、小鼠、大鼠、兔或其他哺乳动物。

[0027] 如本文所用,术语“CD8共受体”或“CD8”意指细胞表面糖蛋白CD8,呈 α - α 同二聚体或 α - β 异二聚体形式。CD8共受体有助于细胞毒性T细胞(CD8⁺)的功能,并通过其细胞质酪氨酸磷酸化途径进行信号传导起作用(Gao和Jakobsen, *Immunol. Today* 21:630-636, 2000; Cole和Gao, *Cell. Mol. Immunol.* 1:81-88, 2004)。存在五(5)种不同的CD8 β 链(参见UniProtKB标识符P10966)和单一CD8 α 链(参见UniProtKB标识符P01732)。CD8通常结合pMHC I类复合物。

[0028] “CD4共受体”或“CD4”是指协助TCR与抗原呈递细胞连通的免疫球蛋白共受体糖蛋白(参见Campbell&Reece, *Biology* 909 (Benjamin Cummings, 第六版, 2002))。CD4在免疫细胞(诸如T辅助细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突细胞)的表面上发现,并且包括四种在细胞表面表达的免疫球蛋白域(D1至D4)。在抗原呈递期间,募集CD4以及TCR复合物以与MHCII分子的不同区域结合(CD4结合MHCII β 2,而TCR复合物结合MHCII α 1/ β 1)。不希望受理论束缚,据信紧密靠近TCR复合物允许CD4相关激酶分子磷酸化CD3的细胞质域上存在的免疫受体酪氨酸激活基序(ITAM)。认为该活性放大由活化的TCR产生的信号,以产生各种类型的T辅助细胞。CD4通常结合pMHC II类复合物。

[0029] “CD3”是六链的多蛋白复合物(参见Abbas和Lichtman, 2003; Janeway等人, 第172和178页, 1999)。在哺乳动物中,该复合物包含CD3 γ 链、CD3 δ 链、两条CD3 ϵ 链和CD3 ζ 链的同二聚体。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链是含有单一细胞外免疫球蛋白域的免疫球蛋白超家族的高度相关的细胞表面蛋白。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链的跨膜区带负电荷,该特征允许这些链与带正电荷的T细胞受体链缔合。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链的细胞内尾部各自含有称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序或ITAM的单个保守基序,而每个CD3 ζ 链具有三个。不希望受理论束缚,据信ITAM对于TCR复合物的信号传导能力是重要的。如本公开中所用的CD3可以来自各种动物物种,包括人类、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。

[0030] 如本文所用,“TCR复合物”是指通过CD3与TCR缔合形成的复合物。例如,TCR复合物可以由CD3 γ 链、CD3 δ 链、两条CD3 ϵ 链、CD3 ζ 链的同二聚体、TCR α 链和TCR β 链构成。例如,TCR复合物可以由CD3 γ 链、CD3 δ 链、两条CD3 ϵ 链、CD3 ζ 链的同二聚体、TCR γ 链和TCR δ 链构成。

[0031] 如本文所用,“TCR复合物的组分”是指TCR链(即TCR α 、TCR β 、TCR γ 或TCR δ)、CD3链(即CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 ζ)、或由两条或更多条TCR链或CD3链形成的复合物(例如,TCR α 和TCR β 的复合物、TCR γ 和TCR δ 的复合物、CD3 ϵ 和CD3 δ 的复合物、CD3 γ 和CD3 ϵ 的复合物,或TCR α 、TCR β 、CD3 γ 、CD3 δ 和两条CD3 ϵ 链的亚TCR复合物)。

[0032] 如本文所用,“结合域”(也称为“结合区”或“结合部分”)是指能够特异性和非共价缔合、联合或组合标靶(例如,MAGE-A1、MAGE-A1肽:MHC复合物)的分子或其部分(例如,肽、寡肽、多肽、蛋白质)。结合域包括生物分子、分子复合物(即,包含两种或更多种生物分子的复合物)或其他所关注标靶的任何天然存在的、合成的、半合成的或以重组方式产生的结合配偶体。示例性结合域包含单链免疫球蛋白可变区(例如scTCR、scFv)、受体胞外域、配体(例如,细胞因子、趋化因子),或因其结合生物分子、分子复合物或其他所关注标靶的特异性能力而选择的合成多肽。

[0033] 如本文所用,“特异性结合”或“对……具有特异性”是指结合蛋白质(例如,TCR受

体)或结合域(或其融合蛋白)以等于或大于 10^5M^{-1} (等于该缔合反应的结合速率 $[k_{\text{on}}]$ 与解离速率 $[k_{\text{off}}]$ 的比率)的亲和力或 K_a (即,特定结合相互作用的平衡缔合常数,单位为 $1/\text{M}$)与靶分子缔合或联合,而不会与样品中任何其他分子或组分显著缔合或联合。结合蛋白质或结合域(或其融合蛋白)可以分为“高亲和力”结合蛋白质或结合域(或其融合蛋白)或“低亲和力”结合蛋白质或结合域(或其融合蛋白)。“高亲和力”结合蛋白质或结合域是指 K_a 为至少 10^7M^{-1} 、至少 10^8M^{-1} 、至少 10^9M^{-1} 、至少 10^{10}M^{-1} 、至少 10^{11}M^{-1} 、至少 10^{12}M^{-1} 或至少 10^{13}M^{-1} 的那些结合蛋白质或结合域。“低亲和力”结合蛋白质或结合域是指 K_a 为至多 10^7M^{-1} 、至多 10^6M^{-1} 、至多 10^5M^{-1} 的那些结合蛋白质或结合域。或者,亲和力可以定义为特定结合相互作用的平衡解离常数(K_d),单位为 M (例如, 10^{-5}M 至 10^{-13}M)。

[0034] 在某些实施方案中,受体或结合域可具有“增强的亲和力”,这是指经选择或工程化的受体或结合域与靶抗原的结合比野生型(或亲本)结合域更强。例如,增强的亲和力可能归因于靶抗原的 K_a (平衡缔合常数)高于野生型结合域,归因于靶抗原的 K_d (解离常数)小于野生型结合域的 K_d (解离常数),归因于靶抗原的解离速率(k_{off})小于野生型结合域的解离速率(k_{off})或它们的组合。在某些实施方案中,可以对增强亲和力的TCR进行密码子优化以增强特定宿主细胞(诸如T细胞)中的表达(Scholten等人, Clin. Immunol. 119:135, 2006)。

[0035] 已知多种测定用于鉴定特异性结合特定标靶的本公开的结合域,以及测定结合域或融合蛋白亲和力,诸如免疫印迹、ELISA、分析型超速离心、光谱学和表面等离子体共振(Biacore®)分析(参见例如Scatchard等人, Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949; Wilson, Science 295:2103, 2002; Wolff等人, Cancer Res. 53:2560, 1993; 和美国专利号5,283,173、5,468,614或等效者)。

[0036] 术语“MAGE-A1特异性结合蛋白”是指特异性结合于MAGE-A1或其肽或其片段的蛋白质或多肽。在一些实施方案中,MAGE-A1特异性结合蛋白或多肽以至少、或至少约特定亲和力与(例如细胞表面上的)MAGE-A1或其肽,诸如与MHC或HLA分子复合的MAGE-A1结合。在某些实施方案中,MAGE-A1特异性结合蛋白以小于约 10^{-8}M 、小于约 10^{-9}M 、小于约 10^{-10}M 、小于约 10^{-11}M 、小于约 10^{-12}M 或小于约 10^{-13}M 的 K_d ,或以大约与本文提供的示例性MAGE-A1特异性结合蛋白(诸如本文提供的MAGE-A1特异性TCR中的任一种)所展现的亲和力相同、至少大约与该亲和力相同、或比该亲和力更大或大约为该亲和力的亲和力结合MAGE-A1源性肽:HLA复合物(或MAGE-A1源性肽:MHC复合物),例如如通过相同测定所测量。在某些实施方案中,MAGE-A1特异性结合蛋白包含MAGE-A1特异性免疫球蛋白超家族结合蛋白或其结合部分。

[0037] 用于评估亲和力或表观亲和力或相对亲和力的测定包括(例如)通过评估与各种浓度的四聚体的结合(例如通过使用标记的四聚体的流式细胞术)测量对TCR(或对包含衍生自TCR的结合域的结合蛋白质)的表观亲和力。在一些实例中,TCR的表观 K_D 使用标记四聚体的2倍稀释液在一系列浓度下测量,然后通过非线性回归确定结合曲线,表观 K_D 确定为产生半最大结合的配体浓度。

[0038] 术语“MAGE-A1结合域”或“MAGE-A1结合片段”是指负责特异性MAGE-A1结合的MAGE-A1特异性结合蛋白的域或部分。单独的MAGE-A1特异性结合域(即,没有MAGE-A1特异性结合蛋白的任何其他部分)可以是可溶的并且可以小于约 10^{-8}M 、小于约 10^{-9}M 、小于约

10-10M、小于约10-11M、小于约10-12M或小于约10-13M的Kd结合于MAGE-A1。示例性MAGE-A1特异性结合域包括如本文所述的MAGE-A1特异性scTCR(例如,单链 α TCR蛋白,诸如Va-L-V β -V β -L-V α -Va-C α -L-V α 或Va-L-V β -C β ,其中Va和V β 分别是TCR α 和 β 可变域,C α 和C β 分别是TCR α 和 β 恒定域,且L是连接子)和scFv片段,其可以衍生自抗MAGE-A1 TCR或抗体。

[0039] 已经充分建立抗原呈递细胞(APC)(诸如树突细胞、巨噬细胞、淋巴细胞或其他细胞类型)的抗原加工原理,以及APC对T细胞的抗原呈递原理,包括免疫相容性(例如,共享与抗原呈递相关的MHC基因至少一种等位基因形式)APC和T细胞之间的主要组织相容性复合物(MHC)限制性呈递(参见例如Murphy, Janeway's Immunobiology(第8版)2011Garland Science, NY;第6、9和16章)。例如,源自胞质溶胶(例如,肿瘤抗原、细胞内病原体)的经加工抗原肽通常为约7个氨基酸至约11个氨基酸长,并且将与I类MHC分子缔合,而在囊泡系统中加工的肽(例如,细菌、病毒)的长度在约10个氨基酸至约25个氨基酸之间变化,并与II类MHC分子缔合。

[0040] “MAGE-A1抗原”或“MAGE-A1肽抗原”是指天然或合成产生的MAGE-A1蛋白质部分,长度为约7个氨基酸至约15个氨基酸,其可与MHC(例如HLA)分子形成复合物且这类复合物可以与对MAGE-A1肽:MHC(例如,HLA)复合物具有特异性的TCR结合。

[0041] “连接子”是指连接两种蛋白质、多肽、肽、域、区域或基序的氨基酸序列,并且可以提供与两个亚结合域的相互作用相容的间隔功能,使得所得多肽保持对靶分子的特异性结合亲和力(例如,scTCR)或保留信号传导活性(例如,TCR复合物)。在某些实施方案中,连接子由约2个至约35个氨基酸,例如,或约4个至约20个氨基酸或约8个至约15个氨基酸或约15个至约25个氨基酸构成。

[0042] “连接氨基酸”或“连接氨基酸残基”是指多肽的两个相邻基序、区域或域之间,诸如结合域和相邻恒定域之间或TCR链和相邻的自裂解肽之间的一个或多个(例如,约2-10个)氨基酸残基。连接氨基酸可以由融合蛋白的构建体设计产生(例如,在构建编码融合蛋白的核酸分子期间使用限制酶位点产生的氨基酸残基)。

[0043] “改变的域”或“改变的蛋白质”是指与野生型基序、区域、域、肽、多肽或蛋白质(例如,野生型TCR α 链、TCR β 链、TCR α 恒定域、TCR β 恒定域)具有至少85%(例如,86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%)的不同序列同一性的基序、区域、域、肽、多肽或蛋白质。

[0044] 如本文所用,“核酸”或“核酸分子”或“多核苷酸”是指任何脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、寡核苷酸,例如通过聚合酶链式反应(PCR),或通过体外翻译产生的片段,以及由任何连接、断裂、核酸内切酶作用或核酸外切酶作用产生的片段。在某些实施方案中,通过PCR产生本公开的核酸。核酸可以由作为天然存在的核苷酸(诸如脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸)的单体、天然存在的核苷酸的类似物(例如天然存在的核苷酸的 α -对映体形式)或两者的组合构成。经修饰的核苷酸可以具有糖部分或嘧啶或嘌呤碱基部分的修饰或置换。核酸单体可以通过磷酸二酯键或这类键的类似物连接。磷酸二酯键的类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯胺基硫代磷酸酯、苯胺磷酸酯、氨基磷酸酯等。核酸分子可以是单链或双链。

[0045] 术语“分离”意指将物质从其原始环境(例如如果它是天然存在的,就是自然环境)

中移出。例如,不分离存在于活体动物中的天然存在的核酸或多肽,但分离与天然系统中的一些或所有共存材料分离的相同核酸或多肽。这类核酸可以是载体的一部分和/或这类核酸或多肽可以是组合物的一部分(例如,细胞裂解物),并且仍然是分离的,因为这类载体或组合物并非核酸或多肽的天然环境的一部分。术语“基因”意指参与产生多肽链的DNA区段;它包括在编码区之前和之后的区域“前导序列和尾随序列”,以及各个编码区段(外显子)之间的间插序列(内含子)。

[0046] 如本文所用,术语“经修饰的”、“经工程化”或“重组”是指细胞、微生物、核酸分子或载体通过人为干预进行遗传工程化-即通过引入外源或异源核酸分子来修饰,或指代细胞或微生物被改变成使得内源核酸分子或基因的表达受到控制、被解除控制或为组成型的。人类产生的遗传改变可包括例如引入编码一种或多种蛋白质或酶的核酸分子(其可包括表达控制元件,诸如启动子)的修饰,或其他核酸分子添加、缺失、取代,或细胞遗传物质的其他功能性破坏或添加。示例性修饰包括对来自参考或母体分子的异源或同源多肽的编码区或其功能片段的修饰。

[0047] 如本文所用,“突变”是指分别与参考或野生型核酸分子或多肽分子相比,核酸分子或多肽分子的序列变化。突变可导致几种不同类型的序列变化,包括核苷酸或氨基酸的取代、插入或缺失。在某些实施方案中,突变是一个或三个密码子或氨基酸的取代、一个至约5个密码子或氨基酸的缺失,或它们的组合。

[0048] “保守取代”在本领域中被认为是一种氨基酸取代具有相似特性的另一种氨基酸。示例性保守取代描述于例如:WO 97/09433第10页;Lehninger,Biochemistry,第2版;Worth Publishers,Inc.NY,NY,第71-77页,1975;以及Lewin,Genes IV,Oxford University Press,NY and Cell Press,Cambridge,MA,第8页,1990。氨基酸的保守取代可以天然存在,或者可以在重组产生结合蛋白质或TCR时引入。可以使用本领域已知的诱变方法将氨基酸取代、缺失和添加引入蛋白质中(参见例如Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第3版,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY,2001)。可以使用寡核苷酸定点的位点特异性(或区段特异性)诱变程序来提供改变的多核苷酸,该多核苷酸具有根据所需的取代、缺失或插入而改变的特定密码子。或者,可以使用随机或饱和诱变技术,诸如丙氨酸扫描诱变、易错聚合酶链式反应诱变和寡核苷酸定点诱变来制备免疫原多肽变体(参见例如,Sambrook等,见上文)。

[0049] 术语“构建体”是指含有重组核酸分子的任何多核苷酸。构建体可以存在于载体(例如,细菌载体、病毒载体)中或可以整合到基因组中。

[0050] “载体”是能够转运另一种核酸分子的核酸分子。载体可以是例如质粒、黏粒、病毒、RNA载体或线性或环状DNA或RNA分子,其可包括染色体、非染色体、半合成或合成的核酸分子。示例性载体是能够自主复制(附加型载体)或表达与它们连接的核酸分子的载体(表达载体)。

[0051] 术语“可操作地连接(operably linked/operatively-linked)”是指单个核酸分子或片段上两个或更多个核酸分子的缔合,使得一个核酸分子或片段的功能受另一个核酸分子或片段的影响。例如,当启动子能够影响编码序列的表达(即,编码序列在启动子的转录控制下)时,启动子与该编码序列可操作地连接。“未连接”意指相关的遗传元件彼此不紧密缔合,并且一个的功能不会影响另一个。

[0052] 如本文所使用,“表达载体”是指含有与合适的控制序列可操作连接的核酸序列的DNA构建体,其能够在合适的宿主中实现核酸分子的表达。这类控制序列包括用于实现转录的启动子、用于控制这类转录的任选的操纵子序列、编码合适的mRNA核糖体结合位点的序列,以及控制转录和翻译终止的序列。载体可以是质粒、噬菌体颗粒、病毒或简单地潜在的基因组插入物。一旦转换到合适的宿主中,载体可以独立于宿主基因组复制和起作用,或者在一些情况下可以整合到基因组本身中。在本说明书中,“质粒”、“表达质粒”、“病毒”和“载体”通常可互换使用。

[0053] 如本文所用,术语“表达”是指基于核酸分子(例如基因)的编码序列产生多肽的过程。该过程可包括转录、转录后控制、转录后修饰、翻译、翻译后控制、翻译后修饰或它们的任何组合。

[0054] 在将核酸分子插入细胞的背景下,术语“引入”意指“转染”、或“转化”或“转导”,并且包括参考将核酸分子并入真核或原核细胞中,其中核酸分子可以并入细胞的基因组(例如,染色体、质粒、质体或线粒体DNA),转化成自主复制子,或瞬时表达(例如,转染的mRNA)。

[0055] 如本文所用,“异源”或“外源”核酸分子、构建体或序列是指多核苷酸或多核苷酸的一部分,其并非来源于宿主细胞,但可以与来自宿主细胞的多核苷酸或多核苷酸的一部分同源。异源或外源多核苷酸、构建体或序列的来源可以来自不同的属或物种。在某些实施方案中,通过例如接合、转化、转染、电穿孔等将异源或外源多核苷酸添加(即,不是内源或天然的)至宿主细胞或宿主基因组,其中所添加的分子可以整合到宿主基因组中或作为染色体外遗传物质(例如,作为质粒或其他形式的自我复制载体)存在,并且可以以多个拷贝存在。另外,“异源”是指由引入宿主细胞的外源多核苷酸编码的非天然酶、蛋白质或其他活性物,即使宿主细胞编码同源蛋白质或活性物。

[0056] 如本文所述,可以将多于一种异源或外源核酸分子作为单独的多核苷酸、作为多个单独受控基因、作为多顺反子多核苷酸、作为编码融合蛋白的单个核酸分子,或它们的任何组合引入宿主细胞中。例如,如本文所公开,可修饰宿主细胞以表达编码对MAGE-A1抗原肽具有特异性的所需TCR(例如TCR α 和TCR β)的两种或更多种异源或外源多核苷酸。当将两种或更多种外源核酸分子引入宿主细胞时,应理解两种或更多种外源核酸分子可作为单个多核苷酸引入(例如,在单个载体上)到分开的载体上,整合到宿主染色体中的单个位点或多个位点,或它们的任何组合。参考的异源核酸分子或蛋白质活性物的数量是指编码核酸分子或蛋白质活性物的数量,而不是引入宿主细胞的单独多核苷酸的数量。

[0057] 如本文所用,术语“内源”或“天然”是指基因、蛋白质或活性物正常存在于宿主细胞中。此外,与亲本基因、蛋白质或活性物相比,突变、过表达、改组、复制或以其他方式改变的基因、蛋白质或活性物仍然被认为对于该特定宿主细胞为内源或天然的。例如,来自第一基因的内源控制序列(例如,启动子、翻译衰减序列)可用于改变或调节第二天然基因或核酸分子的表达,其中第二天然基因或核酸分子的表达或调节不同于亲代细胞中的正常表达或调节。

[0058] 术语“同源的(homologous)”或“同源物(homolog)”是指分子或活性物发现于或衍生于宿主细胞、物种或菌株中。例如,异源或外源核酸分子可以与天然宿主细胞基因同源,并且可以任选地具有改变的表达量、不同的序列、改变的活性或它们的任何组合。

[0059] 如本文所用,“序列同一性”是指在比对序列并引入(如果需要)用以实现最大序列

同一性百分比,并且不考虑任何保守取代作为序列同一性的一部分后,一个序列中的氨基酸残基与另一参考多肽序列中的氨基酸残基相同的百分比。序列同一性百分比值可以使用如Altschul等人(1997)“Gapped BLAST and PSI-BLAST:a new generation of protein database search programs”,*Nucleic Acids Res.*25:3389-3402所定义的NCBI BLAST2.0软件生成,参数设定为默认值。

[0060] 如本文所用,“造血祖细胞”是可以衍生自造血干细胞或胎儿组织并且能够进一步分化成成熟细胞类型(例如免疫系统细胞)的细胞。示例性造血祖细胞包括具有CD24Lo Lin-CD117+表型的那些或在胸腺中发现的那些(称为祖细胞胸腺细胞)。

[0061] 如本文所用,术语“宿主”是指旨在用异源或外源核酸分子进行遗传修饰,以产生所关注多肽(例如,高亲和力或增强亲和力抗MAGE-A1 TCR)的细胞(例如T细胞)或微生物。在某些实施方案中,宿主细胞可任选地已经拥有或经修饰以包括赋予与异源或外源蛋白质的生物合成相关或不相关的所需特性的其他遗传修饰(例如,包含可检测标记;缺失、改变或截短的内源性TCR;增加的共刺激因子表达)。在某些实施方案中,宿主细胞是用异源或外源核酸分子转导的人类造血祖细胞,该核酸分子编码对MAGE-A1抗原肽具有特异性的TCR α 链。

[0062] 如本文所用,“过度增殖性病症”是指与正常或未患病细胞相比过度生长或增殖。示例性过度增殖性病症包括肿瘤、癌症、肿瘤组织、癌、肉瘤、恶性细胞、癌变前细胞,以及非肿瘤或非恶性过度增殖性病症(例如腺瘤、纤维瘤、脂肪瘤、平滑肌瘤、血管瘤、纤维化、再狭窄,以及自身免疫疾病,诸如类风湿性关节炎、骨关节炎、牛皮癣、炎性肠病等)。

[0063] 对MAGE-A1抗原肽具有特异性的结合蛋白

[0064] 在某些方面,本公开提供一种经修饰的细胞,其包含异源多核苷酸,该异源多核苷酸编码特异性结合于MAGE-A1或MAGE-A1肽抗原(诸如与HLA分子复合的MAGE-A1肽)的结合蛋白质(例如,TCR、单链TCR(scTCR)或CAR)。

[0065] 作为背景,免疫疗法的理想标靶是在恶性组织中具有高表达并且在正常组织中具有有限至不存在表达的免疫原性蛋白质。一组独特的蛋白质(称为癌症/睾丸抗原(CTA))由于它们在各种恶性组织中表达但在健康成人组织中除了睾丸的生殖细胞外低水平表达而被鉴定为有希望的免疫治疗标靶(Ademuyiwa等人*PLoS One*,7(6):e38783(2012);Badovinac Crnjevic等人,*Med Oncol.*,29(3):1586-91(2012);Curigliano,G.等人,*Ann.Oncol.*,22(1):98-103(2011))。此外,CTA尤其在较高级别的病变和侵袭性恶性肿瘤中表达,并且与较差的临床结果相关(Barrow等人,*Clin Cancer Res.*,12(3Pt 1):764-71(2006);Gure等人*Clin Cancer Res.*,11(22):8055-62(2005);Velazquez等人,*Cancer Immun.*,7:11(2007))。MAGE家族蛋白是在许多肿瘤类型(例如黑素瘤、肺癌、卵巢癌、多发性骨髓瘤以及TNBC)中广泛表达的CTA.Simpson,A.J.等人,*Cancer/testis antigens, gametogenesis and cancer*,*Nat.Rev.Cancer*,2005.5(8):615-25;Weon,J.L.和P.R.Potts,*Curr Opin Cell Biol*,2015.37:1-8;Park,T.S.等人,*J Immunother*,2016.39(1):1-7;Li,X.,S.C.Hughes和R.Wevrick,*Cancer Genet*,2015.208(1-2):25-34;Kerkar,S.P.等人,*J Immunother*,2016.39(4):181-7。具体来说,MAGE-A1在69.1%的TNBC病例总计(n=81)和85.7%的III级病例中表达.Mrklic,I.等人,*Acta Histochem*,2014.116(5):740-6。另外,来自黑素瘤细胞系的证据表明MAGE-A1直接驱动肿瘤发生.Wang,D.等人,

Biochem Biophys Res Commun, 2016. 473 (4) : 959-65。

[0066] 在某些实施方案中,本公开的结合蛋白质包含 (a) 具有根据SEQ ID NO:26、32、38、44、50或51中任一个的CDR3氨基酸序列的T细胞受体 (TCR) α 链可变 (V α) 域,和TCR β 链可变 (V β) 域; (b) 具有根据SEQ ID NO:23、29、35、41或47中任一个的CDR3氨基酸序列的V β 域和V α 域;或 (c) 具有根据SEQ ID NO:26、32、38、44、50或51中任一个的CDR3氨基酸序列的V α 域,和具有根据SEQ ID NO:23、29、35、41或47中任一个的CDR3氨基酸序列的V β 域。

[0067] 肽-MHC复合物,诸如MAGE-A1肽:MHC复合物由TCR V α 和TCR V β 域识别并结合。在淋巴细胞发育期间,V α 外显子由不同的可变和连接基因区段 (V-J) 组装而成,且V β 外显子由不同的可变、多样性和连接基因区段 (V-D-J) 组装而成。TCR α 染色体基因座具有70-80个可变基因区段和61个连接基因区段。TCR β 染色体基因座具有52个可变基因区段,且每一者的两个独立簇含有单个多样性基因区段,以及六个或七个连接基因区段。功能性V α 和V β 基因外显子对于V α 通过使可变基因区段与连接基因区段重组产生且对于V β 使可变基因区段与多样性基因区段和连接基因区段产生。

[0068] TCR V α 和V β 域各自包含三个高变环,也称为接触肽-MHC复合物的互补决定区 (CDR)。CDR1和CDR2在可变基因区段内编码,而CDR3由对于V α 跨越可变区段和连接区段的区域编码,或对于V β 跨越可变区段、多样性区段和连接区段的区域编码。因此,如果已知V α 或V β 的可变基因区段的同一性 (例如,通过已知的TRAV或TRVB等位基因),则可推导出它们相应的CDR1和CDR2的序列。此外,某些本发明公开的对MAGE-A1具有特异性的高亲和力TCR可变区 (例如,具有高亲和力CDR3序列所鉴别的那些) 由选择的TCR α 等位基因或TCR β 等位基因编码。在某些实施方案中,经编码的结合域包含来源于TRBV30等位基因、TRBV29等位基因或TRBV9等位基因的V β 域。在一些实施方案中,经编码的结合域包含来源于TRAV38-1等位基因、TRAV34等位基因、TRAV16等位基因或TRAV5等位基因的V α 域。

[0069] TCR可变域序列可以相对于编号方案 (国际免疫遗传信息系统 (IMGT) 和Aho) 比对,从而允许使用抗原受体编号和受体分类 (ANARCI) 软件工具 (2016, Bioinformatics 15: 298-300) 对等位的残基位置进行注释并比较不同的分子。编号方案提供TCR可变域中框架区和CDR的标准化描绘。

[0070] 在某些实施方案中,与本文公开的参考氨基酸序列相比,结合蛋白质包含功能性变体氨基酸序列,其中与包含参考氨基酸序列的结合蛋白质相比,经编码的结合蛋白质保留结合特征。例如,在一些实施方案中,经编码V α 域包含与根据SEQ ID No.:3、7、11、15和19中任一个的氨基酸序列至少约90%同一 (例如,至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%同一) 的氨基酸序列,且经编码V β 域包含与根据SEQ ID NO.:1、5、9、13、17中任一个的氨基酸序列至少约90%同一的氨基酸序列,条件是 (a) 至少三个或四个CDR不具有序列变化,其中所述不具有序列变化的CDR仅具有至多两个氨基酸取代、至多一个连续五氨基酸缺失,或它们的组合,且 (b) 所述经编码的结合蛋白质仍能够独立于CD8或在CD8不存在下特异性结合于MAGE-A1肽:HLA细胞表面复合物。

[0071] 在特定实施方案中, (a) V α 域包含 (i) 根据SEQ ID NO:24、30、36、42和48中任一个的CDR1氨基酸序列,和/或 (ii) 根据SEQ ID NO:25、31、37、43和49中任一个的CDR2氨基酸序列;和/或 (b) 经编码的V β 域包含 (iii) 根据SEQ ID NO:21、27、33、39和45中任一个的CDR1氨

氨基酸序列,和/或(iv)根据SEQ ID NO:22、28、34、40和46中任一个的CDR2氨基酸序列。在另一个实施方案中,经编码的结合蛋白质包括:(a)分别根据SEQ ID NO:24-26的V α CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,和分别根据SEQ ID NO:21-23的V β CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列;(b)分别根据SEQ ID NO:30-32的V α CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,和分别根据SEQ ID NO:27-29的V β CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列;(c)分别根据SEQ ID NO:36-38的V α CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,和分别根据SEQ ID NO:33-35的V β CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列;(d)分别根据SEQ ID NO:42-44的V α CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,和分别根据SEQ ID NO:39-41的V β CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列;或(e)分别根据SEQ ID NO:48-50的V α CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列,和分别根据SEQ ID NO:45-47的V β CDR1、CDR2和CDR3氨基酸序列。

[0072] 在某些实施方案中,V α 域包含根据SEQ ID NO.:3、7、11、15或19的氨基酸序列或由其组成。在其他实施方案中,经编码的V β 域包含根据SEQ ID NO.:1、5、9、13或17的氨基酸序列或由其组成。

[0073] 在一些实施方案中,结合蛋白质包含TCR α 链恒定域、TCR β 链恒定域或两者。在某些实施方案中,TCR α 链恒定(C α)域具有与SEQ ID NO:4、8、12、16或20中任一个的氨基酸序列至少90%的序列同一性。在其他实施方案中,TCR β 链恒定(C β)域具有与SEQ ID NO:2、6、10、14或18中任一个的氨基酸序列至少90%的序列同一性。

[0074] 因此,在一些实施方案中,本公开的结合包括V α 域、V β 域、C α 域和C β 域。在其他实施方案中,结合蛋白质包括:包含SEQ ID NO.:3或由其组成的V α 域;包含SEQ ID NO.:1或由其组成的V β 域;包含SEQ ID NO.:4或由其组成的C α 域;和包含SEQ ID NO.:2或由其组成的C β 域。在其他实施方案中,结合蛋白质包括:包含SEQ ID NO.:7或由其组成的V α 域;包含SEQ ID NO.:5或由其组成的V β 域;包含SEQ ID NO.:8或由其组成的C α 域;和包含SEQ ID NO.:6或由其组成的C β 。在另外其他实施方案中,结合蛋白质包括:包含SEQ ID NO.:11或由其组成的V α 域;包含SEQ ID NO.:9或由其组成的V β 域;包含SEQ ID NO.:12或由其组成的C α 域;和包含SEQ ID NO.:10或由其组成的C β 域。在其他实施方案中,结合蛋白质包括:包含SEQ ID NO.:15或由其组成的V α 域;包含SEQ ID NO.:13或由其组成的V β 域;包含SEQ ID NO.:16或由其组成的C α ;和包含SEQ ID NO.:14或由其组成的C β 域。在又其他实施方案中,结合蛋白质包括:包含SEQ ID NO.:19或由其组成的V α 域;包含SEQ ID NO.:17或由其组成的V β 域;包含SEQ ID NO.:20或由其组成的C α 域;和包含SEQ ID NO.:18或由其组成的C β 域。

[0075] 在本文公开的实施方案中的任一个中,结合蛋白质(例如,呈可溶形式或在本公开的经修饰的细胞的细胞表面上表达)能够独立于CD8或在CD8不存在下结合于细胞表面上的MAGE-A1:HLA-A*201复合物(例如,KVLEYVIKV(SEQ ID NO.:123):HLA-A*201复合物)。

[0076] 在某些实施方案中,上述MAGE-A1特异性结合蛋白中的任一种各自为T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体或TCR的抗原结合片段,其中任何一种都可以是嵌合的、人源化的或人类的。在其他实施方案中,TCR的抗原结合片段包含单链TCR(scTCR)或嵌合抗原受体(CAR)。在某些实施方案中,MAGE-A1特异性结合蛋白是TCR,任选地是scTCR。用于制备经工程化的TCR的方法描述于例如Bowerman等人,Mol.Immunol.,46(15):3000(2009)中,其技术以引用方式并入本文。在某些实施方案中,MAGE-A1特异性结合域是包含MAGE-A1特异性TCR结合域的CAR(参见例如,Walseng等,Scientific Reports 7:10713(2017),其TCR CAR构建体以全文引用方式并入本文)。用于制备CAR的方法也描述于例如美国专利号6,410,319;美国专利

号7,446,191;美国专利公开号2010/065818;美国专利号8,822,647;PCT公开号WO 2014/031687;美国专利号7,514,537;以及Brentjens等人,2007,Clin.Cancer Res.13:5426,其技术以引用方式并入本文。

[0077] 可用于分离和纯化重组产生的可溶性TCR的方法例如可包括从合适的宿主细胞/载体系统获得上清液,所述宿主细胞/载体系统将重组可溶性TCR分泌到培养基中,并且然后使用市售过滤器浓缩培养基。在浓缩后,可将浓缩物施用于单一合适的纯化基质或一系列合适的基质,例如亲和基质或离子交换树脂。可以使用一个或多个反相HPLC步骤来进一步纯化重组多肽。在将免疫原从其天然环境中分离时,也可以使用这些纯化方法。用于大规模生产本文所述的一种或多种分离的/重组可溶性TCR的方法包括分批细胞培养,监测和控制分批细胞培养以维持适当的培养条件。可溶性TCR的纯化可以根据本文所述和本领域已知,并且符合国内和国外管理机构的法律和指导的方法进行。

[0078] 在某些实施方案中,使用编码对MAGE-A1具有特异性的结合蛋白质或高亲和力TCR的核酸分子转染/转导宿主细胞(例如T细胞)以用于过继转移疗法。TCR测序的进展已经有所描述(例如Robins等人,Blood 114:4099,2009;Robins等人,Sci.Translat.Med.2:47ra64,2010;Robins等人,(9月10日)J.Imm.Meth.Epub ahead of print,2011;Warren等人,Genome Res.21:790,2011)并且可以在实施根据本公开的实施方案的过程中使用。类似地,用所需核酸转染/转导T细胞的方法已经描述(例如美国专利申请公开号US 2004/0087025)为具有使用具有所需抗原特异性的T细胞的过继转移方法(例如Schmitt等人,Hum.Gen.20:1240,2009;Dossett等人,Mol.Ther.17:742,2009;Till等人,Blood 112:2261,2008;Wang等人,Hum.Gene Ther.18:712,2007;Kuball等人,Blood 109:2331,2007;US 2011/0243972;US 2011/0189141;Leen等人,Ann.Rev.Immunol.25:243,2007),使得基于本文的教导,考虑了这些方法适应于本发明公开的实施方案,包括涉及对与HLA受体复合的MAGE-A1肽抗原具有特异性的高亲和力TCR的那些。

[0079] 如本文所述的MAGE-A1特异性结合蛋白或域可以根据用于测定T细胞活性的大量本领域公认方法中的任何一种进行功能表征,所述方法包括测定T细胞结合、活化或诱导,并且还包括测定具有抗原特异性的T细胞应答。实例包括测定T细胞增殖、T细胞细胞因子释放、抗原特异性T细胞刺激、MHC限制性T细胞刺激、CTL活性(例如,通过检测从预先加载的靶细胞的⁵¹Cr释放)、T细胞表型标记物表达的变化,以及T细胞功能的其他测量。用于进行这些和类似测定的程序可例如见于Lefkovits(Immunology Methods Manual:The Comprehensive Sourcebook of Techniques,1998)。还参见Current Protocols in Immunology;Weir,Handbook of Experimental Immunology,Blackwell Scientific,Boston,MA(1986);Mishell和Shigii(编)Selected Methods in Cellular Immunology,Freeman Publishing,San Francisco,CA(1979);Green和Reed,Science 281:1309(1998)以及其中引用的参考文献。

[0080] “MHC-肽四聚体染色”是指用于检测抗原特异性T细胞的测定,其特征不在于MHC分子的四聚体,每一个包含具有与至少一种抗原(例如,MAGE-A1)同源(例如,相同或相关)的氨基酸序列的相同肽,其中所述复合物能够结合对同源抗原具有特异性的T细胞受体。每一个MHC分子可以用生物素分子标记。通过添加链霉抗生物素蛋白使生物素化的MHC/肽四聚化,所述链霉抗生物素蛋白可以被荧光标记。可以通过流式细胞术经由荧光标记检测四聚体。

在某些实施方案中,使用MHC-肽四聚体测定检测或选择本公开的增强亲和力TCR。

[0081] 细胞因子的含量可根据本文所述和本领域实施的方法测定,所述方法包括例如ELISA、ELISPOT、细胞内细胞因子染色和流式细胞术以及它们的组合(例如,细胞内细胞因子染色和流式细胞术)。由对免疫应答的抗原特异性诱导或刺激引起的免疫细胞增殖和克隆扩增可以通过以下测定:分离淋巴细胞,诸如外周血细胞样品中的循环淋巴细胞或来自淋巴结的细胞;用抗原刺激细胞;以及测量细胞因子产生、细胞增殖和/或细胞活力,诸如通过掺入氘标记的胸苷或非放射性测定,诸如MTT测定等。可以例如通过测定Th1细胞因子,诸如IFN- γ 、IL-12、IL-2和TNF- β 以及2型细胞因子,诸如IL-4、IL-5、IL-9、IL-10和IL-13的含量检测本文所述的免疫原对Th1免疫应答和Th2免疫应答之间的平衡的影响。

[0082] 多核苷酸和载体

[0083] 在另一方面,本文提供分离或重组多核苷酸,其中多核苷酸编码对5T4具有特异性的本公开的结合蛋白(例如,免疫球蛋白超家族结合蛋白,诸如TCR、scTCR或CAR),并且其中多核苷酸经密码子优化以便在宿主细胞(例如,本公开的免疫细胞)中表达。还提供包含本公开的多核苷酸的载体(例如,表达载体),其中所述多核苷酸与表达控制序列(例如,启动子)可操作地缔合或可操作地连接。构建表达载体以制备对本公开的MAGE-A1肽具有特异性的结合蛋白质可以使用限制性核酸内切酶消化、连接、转化、质粒纯化、DNA测序或它们的组合来进行,例如,如Sambrook等人(1989和2001版;Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY)和Ausubel等人(Current Protocols in Molecular Biology,2003)中所描述。为了有效转录和翻译,表达构建体中含有的多核苷酸包括至少一个合适的表达控制序列(也称为调节序列),诸如前导序列,以及特别是可操作地(operably)(即,可操作地(operatively))连接于编码本公开的结合蛋白质的核苷酸序列的启动子。

[0084] 核酸可以是呈任何形式的单链或双链DNA、cDNA或RNA,并且可以包括彼此互补的核酸的正链和负链,包括反义DNA、cDNA和RNA。还包括siRNA、微RNA、RNA-DNA杂合体、核酶和其他各种天然存在的或合成形式的DNA或RNA。

[0085] 可以根据分子生物学或多肽纯化技术的各种方法和技术生产和制备分离或重组核酸分子,其编码如本文所述的对MAGE-A1具有特异性的结合蛋白质(例如,免疫球蛋白超家族结合蛋白)或高亲和力重组T细胞受体(TCR)。

[0086] 在某些实施方案中,提供一种经分离的多核苷酸,其编码具有TCR V α 域和TCR V β 域的结合蛋白质,其中所述经编码结合蛋白质能够独立于CD8或在CD8不存在下特异性结合于细胞表面上的MAGE-A1肽:HLA复合物,所述经分离的多核苷酸包含:(a)根据SEQ ID NO:97、103、109、115或121的V α CDR3编码多核苷酸,和V β 编码多核苷酸;(b)根据SEQ ID NO:94、100、106、112或118的V β CDR3编码多核苷酸,和V α 编码多核苷酸;或(c)根据SEQ ID NO:97、103、109、115或121的V α CDR3编码多核苷酸,和根据SEQ ID NO:94、100、106、112或118的V β CDR3编码多核苷酸。在其他实施方案中,V β 编码多核苷酸来源于TRBV30等位基因、TRBV29等位基因或TRBV9等位基因。在一些实施方案中,V α 编码多核苷酸来源于TRAV38-1等位基因、TRAV34等位基因、TRAV16等位基因或TRAV5等位基因。

[0087] 本发明公开的编码结合蛋白质的多核苷酸可以在一些实施方案中包括:(a)根据SEQ ID NO:97的V α CDR3编码多核苷酸,和根据SEQ ID NO:94的V β CDR3编码多核苷酸;(b)根

据SEQ ID NO:103的V α CDR3编码多核苷酸,和根据SEQ ID NO:100的V β CDR3编码多核苷酸;(c)根据SEQ ID NO:109的V α CDR3编码多核苷酸,和根据SEQ ID NO:106的V β CDR3编码多核苷酸;(d)根据SEQ ID NO:115的V α CDR3编码多核苷酸,和根据SEQ ID NO:112的V β CDR3编码多核苷酸;或(e)根据SEQ ID NO:121的V α CDR3编码多核苷酸,和根据SEQ ID NO:118的V β CDR3编码多核苷酸。在某些实施方案中,编码结合蛋白质的经分离的多核苷酸进一步包含(a)根据SEQ ID NO:95、101、107、113或119的V α CDR1编码多核苷酸;(b)根据SEQ ID NO:96、102、108、114或120的V α CDR2编码多核苷酸;(c)根据SEQ ID NO:92、98、104、110或116的V β CDR1编码多核苷酸;和/或(d)根据SEQ ID NO:93、99、105、111或117的V β CDR2编码多核苷酸。

[0088] 在特定实施方案中,编码本公开的结合蛋白质的经分离的多核苷酸包括(a)根据SEQ ID NO:95的V α CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:96的V α CDR2编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:97的V α CDR3编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:92的V β CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:93的V β CDR2编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:94的V β CDR3编码多核苷酸;(b)根据SEQ ID NO:101的V α CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:102的V α CDR2编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:103的V α CDR3编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:98的V β CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:99的V β CDR2编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:100的V β CDR3编码多核苷酸;(c)根据SEQ ID NO:107的V α CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:108的V α CDR2编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:109的V α CDR3编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:104的V β CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:105的V β CDR2编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:106的V β CDR3编码多核苷酸;(d)根据SEQ ID NO:113的V α CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:114的V α CDR2编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:115的V α CDR3编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:110的V β CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:111的V β CDR2编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:112的V β CDR3编码多核苷酸;或(e)根据SEQ ID NO:119的V α CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:120的V α CDR2编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:121的V α CDR3编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:116的V β CDR1编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:117的V β CDR2编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:118的V β CDR3编码多核苷酸。

[0089] 在一些实施方案中,本公开提供一种编码结合蛋白质的多核苷酸,其中V α 编码多核苷酸包含具有与SEQ ID NO:58、66、74、82或90至少80%同一性(例如,至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%或100%的核苷酸序列,且V β 编码多核苷酸包含具有与SEQ ID NO:56、64、72、80或88至少80%同一性的核苷酸序列。在其他实施方案中:(a) V α 编码多核苷酸包括具有与SEQ ID NO:58至少80%同一性的核苷酸序列,且V β 编码多核苷酸包括具有与SEQ ID NO:56至少80%同一性的核苷酸序列;(b) V α 编码多核苷酸包括具有与SEQ ID NO:66至少80%同一性的核苷酸序列,且V β 编码多核苷酸包括具有与SEQ ID NO:64至少80%同一性的核苷酸序列;(c) V α 编码多核苷酸包括具有与SEQ ID NO:74至少80%同一性的核苷酸序列,且V β 编码多核苷酸包括具有与SEQ ID NO:72至少80%同一性的核苷酸序列;(d) V α 编码多核苷酸包括具有与SEQ ID NO:82至少80%同一性的核苷酸序列,且V β 编码多核苷酸包括具有与SEQ ID NO:80至少80%同一性的核苷酸序列;或(e) V α 编码多核苷酸包括具有与SEQ ID NO:90至少80%

同一性的核苷酸序列,且V β 编码多核苷酸包括具有与SEQ ID NO:88至少80%同一性的核苷酸序列。

[0090] 在特定实施方案中,(a)V α 编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:58的核苷酸序列或由其组成,且V β 编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:56的核苷酸序列或由其组成;(b)V α 编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:66的核苷酸序列或由其组成,且V β 编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:64的核苷酸序列或由其组成;(c)V α 编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:74的核苷酸序列或由其组成,且V β 编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:72的核苷酸序列或由其组成;(d)V α 编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:82的核苷酸序列或由其组成,且V β 编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:80的核苷酸序列或由其组成;或(e)V α 编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:90的核苷酸序列或由其组成,且V β 编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:88的核苷酸序列或由其组成。

[0091] 本公开的结合蛋白质编码多核苷酸在某些实施方案中可进一步包含编码TCR α 链恒定域的多核苷酸,编码TCR β 链恒定域的多核苷酸或两者。在一些实施方案中,编码本公开的结合蛋白质的经分离的多核苷酸进一步包括:(a)具有与SEQ ID NO:59、67、75、83或91至少80%同一性的C α 域编码多核苷酸;和/或(b)具有与SEQ ID NO:57、65、73、81或89至少80%同一性的C β 域编码多核苷酸。在其他实施方案中,C α 域编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:59、67、75、83或91的核苷酸序列或由其组成,且C β 域编码多核苷酸包括根据SEQ ID NO:57、65、73、81或89的核苷酸序列或由其组成。

[0092] 在特定实施方案中,编码本公开的结合蛋白质的经分离的多核苷酸包括:(a)根据SEQ ID NO:58的V α 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:56的V β 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:59的C α 域编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:57的C β 域编码多核苷酸;(b)根据SEQ ID NO:66的V α 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:64的V β 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:67的C α 域编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:65的C β 域编码多核苷酸;(c)根据SEQ ID NO:74的V α 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:72的V β 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:75的C α 域编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:73的C β 域编码多核苷酸;(d)根据SEQ ID NO:82的V α 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:80的V β 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:83的C α 域编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:81的C β 域编码多核苷酸;或(e)根据SEQ ID NO:90的V α 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:88的V β 编码多核苷酸;根据SEQ ID NO:91的C α 域编码多核苷酸;和根据SEQ ID NO:89的C β 域编码多核苷酸。

[0093] 在其他实施方案中,本公开的结合蛋白质的两种或更多种取代基因产物表达为单一肽,其中部分由可裂解或可移除区段分隔开。例如,可用于表达由单一多核苷酸或载体编码的可分离多肽的自裂解肽是本领域已知的,并且包括例如猪捷申病毒-1 2A (P2A) 肽,诸如由具有示于SEQ ID NO:128或129中任一者的核苷酸序列的多核苷酸编码的肽;明脉扁刺蛾 β 四体病毒2A (T2A) 肽,诸如由具有示于SEQ ID NO:132中的核苷酸序列的多核苷酸编码的肽;马甲型鼻炎病毒 (ERAV) 2A (E2A) 肽,诸如由具有示于SEQ ID NO:131中的核苷酸序列的多核苷酸编码的肽;和口蹄疫病毒2A (F2A) 肽,诸如由具有示于SEQ ID NO:130中的核苷酸序列的多核苷酸编码的肽。

[0094] 因此,在某些实施方案中,编码本公开的结合蛋白质的经分离的多核苷酸进一步包含编码自裂解肽的多核苷酸,所述自裂解肽设置在编码TCR α 链的多核苷酸和编码TCR β 链

的多核苷酸之间,或设置在编码TCR VB域的多核苷酸和编码TCR Va的多核苷酸之间,或设置在编码TCR可变域的多核苷酸和编码TCR恒定域的多核苷酸之间或它们的任何组合之间。在特定实施方案中,编码自裂解肽的多核苷酸包含根据SEQ ID NO.:128-132中任一个的核苷酸序列或由其组成。在其他实施方案中,多核苷酸编码自裂解肽,所述自裂解肽包含根据SEQ ID NO.:124-127中任一个的氨基酸序列或由其组成。

[0095] 本文还提供了含有本公开的多核苷酸的载体。构建用于重组产生对所关注MAGE-A1肽具有特异性的结合蛋白质或高亲和力工程化的TCR的表达载体可以通过使用任何合适的分子生物学工程化技术来完成,所述技术包括使用限制性核酸内切酶消化、连接、转化、质粒纯化和DNA测序,如例如Sambrook等人(1989和2001版;Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY)和Ausubel等人(Current Protocols in Molecular Biology,2003)中所描述。为了获得有效的转录和翻译,每个重组表达构建体中的多核苷酸包括至少一个合适的表达控制序列,诸如可操作地(operably)(即,可操作地(operatively))连接到编码结合蛋白质的核苷酸序列的启动子。另外,编码本公开的结合蛋白质的多核苷酸还可以包括编码结合蛋白质的氨基末端处的前导序列的序列(也称为前结合蛋白),该前导序列可以由细胞移除以产生成熟的结合蛋白质。

[0096] 示例性载体可包含能够转运与其连接的另一核酸分子的核酸分子,或能够在宿主生物中复制的核酸分子。载体的一些实例包括质粒、病毒载体、黏粒等。一些载体能够在引入它们的宿主细胞中自主复制(例如具有细菌复制起点和附加型哺乳动物载体的细菌载体),而其他载体可以整合到宿主细胞的基因组中或在引入宿主细胞后促进多核苷酸插入物的整合并由此与宿主基因组(例如,慢病毒载体)一起复制。另外,一些载体能够引导与它们可操作地连接的基因的表达(这些载体可以称为“表达载体”)。根据相关实施方案,应进一步理解,如果将一种或多种药剂(例如,编码对MAGE-A1具有特异性的结合蛋白质或高亲和力重组TCR的多核苷酸或其变体,如本文所述)共同施用于受试者,每种药剂可以存在于单独或相同的载体中,并且可以将多个载体(各自含有不同的药剂,相同的药剂)引入细胞或细胞群或施用于受试者。

[0097] 在某些实施方案中,编码对MAGE-A1具有特异性的结合蛋白质或高亲和力重组TCR的多核苷酸可以与载体的某些元件可操作地连接。例如,实现与它们连接的编码序列的表达和加工所需的多核苷酸序列可以可操作地连接。表达控制序列可包括合适的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA加工信号,诸如剪接和多腺苷酸化信号;稳定细胞质mRNA的序列;提高翻译效率的序列(即Kozak共有序列);增强蛋白质稳定性的序列;以及可能增强蛋白质分泌的序列。如果表达控制序列与所关注基因和表达控制序列邻接,则它们可以可操作地连接,所述表达控制序列反式或远距离地起作用以控制所关注基因。在某些实施方案中,编码本公开的结合蛋白质的多核苷酸含在表达载体中,所述表达载体是病毒载体,诸如慢病毒载体或 γ -逆转录病毒载体。

[0098] 病毒载体包括逆转录病毒;腺病毒;细小病毒(例如腺病毒相关病毒);冠状病毒;负链RNA病毒,诸如正粘病毒(例如流感病毒)、弹状病毒(例如狂犬病和水疱性口炎病毒)、副粘病毒(例如,麻疹和仙台);正链RNA病毒,诸如小核糖核酸病毒和甲病毒;以及双链DNA病毒,包括腺病毒、疱疹病毒(如1型和2型单纯疱疹病毒、EB病毒、巨细胞病毒)和痘病毒(例

如牛痘、鸡痘和金丝雀痘)。其他病毒包括例如诺沃克病毒(Norwalk virus)、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、乳多空病毒、嗜肝DNA病毒和肝炎病毒。逆转录病毒的实例包括禽白血病-肉瘤、哺乳动物C型、B型病毒、D型病毒、HTLV-BLV组、慢病毒、泡沫病毒(Coffin, J.M., *Retroviridae: The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, 第三版, B.N. Fields等人编, Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996)。

[0099] 如本文所用,“慢病毒载体”意指用于基因递送的基于HIV的慢病毒载体,其可以是整合的或非整合的,具有相对较大的包装能力,并且可以转导一系列不同的细胞类型。慢病毒载体通常在将三种(包装、包膜和转移)或更多种质粒瞬时转染到生产细胞中后产生。与HIV一样,慢病毒载体通过病毒表面糖蛋白与细胞表面上受体的相互作用进入靶细胞。进入时,病毒RNA经历逆转录,该逆转录由病毒逆转录酶复合物介导。逆转录产物是双链线性病毒DNA,它是病毒整合到感染细胞DNA中的底物。

[0100] 在特定实施方案中,将重组或经工程化的表达载体递送至合适的细胞(即,能够将编码结合蛋白质的多核苷酸递送至宿主细胞),例如T细胞或抗原呈递细胞,即在其细胞表面上显示肽/MHC复合物(例如,树突细胞)并且缺乏CD8的细胞。在某些实施方案中,宿主细胞是造血祖细胞或人类免疫系统细胞。例如,免疫系统细胞可以是CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤细胞、树突细胞,或它们的任何组合。在某些实施方案中,其中T细胞是宿主,T细胞可以是原始细胞、中央记忆性T细胞、效应记忆T细胞或它们的任何组合。本公开的重组表达载体因此还可以包括例如淋巴组织特异性转录调节元件(TRE),诸如B淋巴细胞、T淋巴细胞或树突细胞特异性TRE。淋巴组织特异性TRE在本领域中是已知的(参见例如Thompson等人, *Mol. Cell. Biol.* 12:1043, 1992); Todd等人, *J. Exp. Med.* 177:1663, 1993); Penix等人, *J. Exp. Med.* 178:1483, 1993)。

[0101] 除了载体之外,某些实施方案涉及宿主细胞,所述宿主细胞包含本发明公开的载体。本领域技术人员容易理解,许多合适的宿主细胞可用于本领域。宿主细胞可包括任何可接受载体或核酸和/或蛋白质掺入的单独细胞或细胞培养物,以及任何子代细胞。该术语还涵盖宿主细胞的子代,无论是遗传上还是表型上相同或不同。合适的宿主细胞取决于载体并可包括哺乳动物细胞、动物细胞、人类细胞、类人猿细胞、昆虫细胞、酵母细胞和细菌细胞。可以通过使用病毒载体、经由磷酸钙沉淀转化、DEAE-葡聚糖、电穿孔、显微注射或其他方法诱导这些细胞以掺入载体或其他材料。参见例如Sambrook等人, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 第2版(Cold Spring Harbor Laboratory, 1989)。

[0102] 宿主细胞

[0103] 还提供了宿主细胞(即,经修饰的细胞),其包括编码本公开的结合蛋白质的异源多核苷酸。在某些实施方案中,宿主细胞包括人类免疫细胞,诸如T细胞、NK细胞或NK-T细胞。在一些实施方案中,宿主细胞包括CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞或两者。用所需核酸转染/转导T细胞的方法已经描述(例如美国专利申请公开号US 2004/0087025)为具有使用具有所需靶特异性的T细胞的过继转移方法(例如Schmitt等人, *Hum. Gen.* 20:1240, 2009; Dossett等人, *Mol. Ther.* 17:742, 2009; Till等人, *Blood* 112:2261, 2008; Wang等人, *Hum. Gene Ther.* 18:712, 2007; Kuball等人, *Blood* 109:2331, 2007; US 2011/0243972; US 2011/0189141; Leen等人, *Ann. Rev. Immunol.* 25:243, 2007),使得基于本文的教导,考虑了这些方法适应于本发明公开的实施方案。

[0104] 在某些实施方案中,经修饰的细胞包含编码结合蛋白质的异源多核苷酸,其中所述经编码的结合蛋白质包括:(a) T细胞受体 (TCR) α -链可变 ($V\alpha$) 域,其具有根据SEQ ID NO: 26、32、38、44、50或51中任一个的CDR3氨基酸序列;以及TCR β -链可变 ($V\beta$) 域; (b) $V\beta$ 域,其具有根据SEQ ID NO: 23、29、35、41或47中任一个的CDR3氨基酸序列;以及 $V\alpha$ 域;或(c) $V\alpha$ 域,其具有根据SEQ ID NO: 26、32、38、44、50或51中任一个的CDR3氨基酸序列;以及 $V\beta$ 域,其具有根据SEQ ID NO: 23、29、35、41或47中任一个的CDR3氨基酸序列;并且其中结合蛋白质能够独立于CD8或在CD8不存在下特异性结合于细胞表面上的MAGE-A1肽:HLA复合物。在一些实施方案中,经编码的结合蛋白质能够以小于或等于约10-8M的Kd特异性结合于KVLEYVIKV (SEQ ID NO.:123):人类白细胞抗原 (HLA) 复合物。

[0105] 可使用任何合适的方法转染或转导细胞(例如T细胞),或施用本发明方法的多核苷酸或组合物。用于将多核苷酸递送至宿主细胞的已知方法包括例如使用阳离子聚合物、脂质样分子和某些商业产品,诸如IN-VIVO-JET PEI。其他方法包括离体转导、注射、电穿孔、DEAE-葡聚糖、超声处理加载、脂质体介导的转染、受体介导的转导、微粒轰击、转位子介导的转移等。转染或转导宿主细胞的另外其他方法采用载体,本文进一步详细描述。

[0106] 在任何前述实施方案中,宿主细胞(例如,免疫细胞)可以是“通用供体”细胞,其被修饰以减少或消除编码参与免疫信号传导或其他相关活动的多肽的一种或多种内源性基因的表达。示例性基因敲除包括编码PD-1、LAG-3、CTLA4、TIM3、HLA分子、TCR分子等的那些。不希望受理论束缚,某些内源表达的免疫细胞蛋白可被接受宿主免疫细胞的同种异体宿主识别为外源,这可导致宿主免疫细胞(例如,HLA等位基因)的消除,或可下调经修饰的细胞(例如,PD-1、LAG-3、CTLA4)的免疫活性,或可能干扰本公开的异源表达的结合蛋白的结合活性(例如,内源性TCR,其结合非MAGE-A1抗原并因此干扰经修饰的细胞结合表达MAGE-A1抗原的细胞)。因此,减少或消除此类内源性基因或蛋白质的表达或活性可以改善同种异体宿主内经修饰的细胞的活性、耐受性和持久性,并允许施用通用的“现成”细胞(例如,无论HLA类型如何向任何接收者施用)。

[0107] 在某些实施方案中,本公开的宿主细胞(例如,经修饰的免疫细胞)包含一种或多种编码PD-1、LAG-3、CTLA4、TIM3、HLA组分(例如,编码 α 1巨球蛋白、 α 2巨球蛋白、 α 3巨球蛋白、 β 1微球蛋白或 β 2微球蛋白的基因),或TCR组分(例如,编码TCR可变区或TCR恒定区的基因)的基因的染色体基因敲除(参见例如Torikai等人,Nature Sci.Rep.6:21757 (2016); Torikai等人,Blood 119 (24):5697 (2012);和Torikai等人,Blood 122 (8):1341 (2013),其基因编辑技术和组合物以全文引用的方式并入本文中)。如本文所用,术语“染色体基因敲除”是指经修饰的细胞中的遗传改变,其防止经修饰的细胞产生功能活性内源性多肽产物。导致染色体基因敲除的改变可包括例如引入的无义突变(包括提前终止密码子的形成)、错义突变、基因缺失和链断裂,以及抑制经修饰的细胞中内源性基因表达的抑制性核酸分子的异源表达。

[0108] 可以通过免疫细胞的染色体编辑引入染色体基因敲除。在某些实施方案中,通过免疫细胞的染色体编辑来进行染色体基因敲除。可以使用例如核酸内切酶进行染色体编辑。如本文所用,“核酸内切酶”是指能够催化裂解多核苷酸链内磷酸二酯键的酶。在某些实施方案中,核酸内切酶能够裂解靶基因,从而使靶基因失活或“敲除”该靶基因。核酸内切酶可以是天然存在的、重组的、遗传修饰的或融合核酸内切酶。核酸内切酶所引起的核酸链断

裂通常通过同源重组或非同源性末端接合 (NHEJ) 的不同机制修复。在同源重组期间, 供体核酸分子可用于基因“敲入”以使靶基因失活。NHEJ 是易错修复过程, 经常导致裂解位点处 DNA 序列的改变, 例如, 至少一个核苷酸的取代、缺失或添加。NHEJ 可用于“基因敲除”靶基因。使用核酸内切酶破坏或敲除免疫细胞中的基因或基因表达的方法是本领域已知的, 并描述于例如 PCT 公开号 WO 2015/066262; WO2013/074916; 和 WO 2014/059173; 其中每一者的方法都以引用方式并入。核酸内切酶的实例包括锌指核酸酶、TALE-核酸酶、CRISPR-Cas 核酸酶和大范围核酸酶。

[0109] 如本文所用, “锌指核酸酶” (ZFN) 是指融合蛋白, 其包含与非特异性 DNA 裂解域融合的锌指 DNA 结合域, 诸如 FokI 核酸内切酶。每个具有约 30 个氨基酸的锌指基序结合约 3 个 DNA 的碱基对, 并且可以改变某些残基处的氨基酸以改变三联体序列特异性 (参见例如 Desjarlais 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci.* 90: 2256-2260, 1993; Wolfe 等人, *J. Mol. Biol.* 285: 1917-1934, 1999)。可以串联连接多个锌指基序以产生对所需 DNA 序列 (诸如长度在约 9 个到约 18 个碱基对的区域) 的结合特异性。作为背景, ZFN 通过催化基因组中位点特异性 DNA 双链断裂 (DSB) 的形成来介导基因组编辑, 并且通过同源定向修复来促进转基因的靶向整合, 该转基因包含与 DSB 位点处的基因组同源的旁侧序列。或者, ZFN 生成的 DSB 可以经由非同源末端接合 (NHEJ) 的修复导致靶基因敲除, 这是一种易错的细胞修复途径, 导致在裂解位点处核苷酸的插入或缺失。在某些实施方案中, 基因敲除包括使用 ZFN 分子制备的插入、缺失、突变或它们的组合。

[0110] 如本文所用, “转录激活子样效应因子核酸酶” (TALEN) 是指融合蛋白, 其包含 TALE DNA 结合域和 DNA 裂解域, 诸如 FokI 核酸内切酶。“TALE DNA 结合域”或“TALE”由一个或多个 TALE 重复域/单元构成, 每个通常具有高度保守的 33-35 个氨基酸序列, 具有不同的第 12 和第 13 氨基酸。TALE 重复域参与 TALE 与靶 DNA 序列的结合。所述不同的氨基酸残基称为重复可变双残基 (RVD), 与特异性核苷酸识别相关。已确定用于这些 TALE 的 DNA 识别的天然 (规范) 编码, 使得位置 12 和 13 处的 HD 序列导致与胞嘧啶 (C) 结合, NG 与 T 结合, NI 与 A 结合, NN 与 G 或 A 结合, 以及 NG 与 T 结合并且非规范 (非典型) RVD 也是已知的 (参见例如, 美国专利公开号 US2011/0301073, 其中非典型 RVD 以全文引用的方式并入本文)。TALEN 可用于引导 T 细胞基因组中的位点特异性双链断裂 (DSB)。非同源末端接合 (NHEJ) 接合来自双链断裂两侧的 DNA, 其中退火有极少或没有序列重叠, 从而引入敲除基因表达的错误。或者, 同源定向修复可以在 DSB 位点引入转基因, 提供转基因中存在的同源旁侧序列。在某些实施方案中, 基因敲除包括插入、缺失、突变或它们的组合, 并使用 TALEN 分子制备。

[0111] 如本文所用, “规律间隔成簇短回文重复序列/Cas” (CRISPR/Cas) 核酸酶系统是指以下系统: 其使用 CRISPR RNA (crRNA) 引导的 Cas 核酸酶经由碱基配对互补识别基因组内的靶位点 (称为前间区序列), 且然后在保守的短前间区序列相关基序 (PAM) 紧跟在互补靶序列的 3' 之后时裂解 DNA。CRISPR/Cas 系统基于 Cas 核酸酶的序列和结构分成三种类型 (即 I 型、II 型和 III 型)。I 型和 III 型中 crRNA 引导的监测复合物需要多个 Cas 亚单元。研究最多的 II 型系统包含至少三种组分: RNA 引导的 Cas9 核酸酶、crRNA 和反式作用 crRNA (tracrRNA)。tracrRNA 包含双链体形成区。crRNA 和 tracrRNA 形成双链体, 该双链体能够与 Cas9 核酸酶相互作用并经由 crRNA 上的间隔序列与 PAM 上游靶 DNA 上的前间区序列之间的 Watson-Crick 碱基配对将 Cas9/crRNA:tracrRNA 复合物引导至靶 DNA 上的特异性位点。Cas9 核酸酶在 crRNA

间隔序列限定的区域内裂解双链断裂。NHEJ的修复导致破坏靶向基因座的表达的插入和/或缺失。或者,可以经由同源定向修复将具有同源旁侧序列的转基因引入DSB位点。可以将crRNA和tracrRNA工程化成单导向RNA(sgRNA或gRNA)(参见例如Jinek等人,Science 337:816-21,2012)。此外,可以改变或编程与靶位点互补的指导RNA区域以靶向所需序列(Xie等人,PLoS One 9:e100448,2014;美国专利申请公开号US 2014/0068797、美国专利申请公开号US 2014/0186843;美国专利号8,697,359和PCT公开号WO 2015/071474;其中每一者的技术和组合物以引用方式并入)。在某些实施方案中,基因敲除包括插入、缺失、突变或它们的组合,并使用CRISPR/Cas核酸酶系统制备。

[0112] 如本文所用,“大范围核酸酶”也称为“归巢核酸内切酶”,指代以大识别位点(约12至约40个碱基对的双链DNA序列)为特征的脱氧核糖核酸内切酶。大范围核酸酶可基于序列和结构基序分为五个家族:LAGLIDADG、GIY-YIG、HNH、His-Cys盒和PD-(D/E)XK。示例性大范围核酸酶包括I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII,其识别序列是已知的(参见例如美国专利号5,420,032和6,833,252;Belfort等人,Nucleic Acids Res.25:3379-3388,1997;Dujon等人,Gene 82:115-118,1989;Perler等人,Nucleic Acids Res.22:1125-1127,1994;Jasin,Trends Genet.12:224-228,1996;Gimble等人,J.Mol.Biol.263:163-180,1996;Argast等人,J.Mol.Biol.280:345-353,1998)。

[0113] 在某些实施方案中,天然存在的大范围核酸酶可用于促进选自PD-1、LAG3、TIM3、CTLA4、HLA编码基因或TCR组分编码基因的标靶的位点特异性基因组修饰。在其他实施方案中,对靶基因具有新结合特异性的经工程化的大范围核酸酶用于位点特异性基因组修饰(参见例如Porteus等人,Nat.Biotechnol.23:967-73,2005;Sussman等人,J.Mol.Biol.342:31-41,2004;Epinat等人,Nucleic Acids Res.31:2952-62,2003;Chevalier等人,Molec.Cell 10:895-905,2002;Ashworth等人,Nature 441:656-659,2006;Paques等人,Curr.Gene Ther.7:49-66,2007;美国专利公开号US 2007/0117128;US 2006/0206949;US 2006/0153826;US 2006/0078552;和US 2004/0002092)。

[0114] 在某些实施方案中,染色体基因敲除包含引入经修饰的细胞的抑制性核酸分子,所述经修饰的细胞包含异源多核苷酸,该异源多核苷酸编码特异性结合于肿瘤相关抗原的抗原特异性受体,其中所述抑制性核酸分子编码标靶特异性抑制剂并且其中经编码的标靶特异性抑制剂抑制经修饰的细胞中的内源性基因表达(即PD-1、TIM3、LAG3、CTLA4、HLA组分、TCR组分或它们的任何组合的内源性基因表达)。

[0115] 在使用敲除程序或试剂后,可以通过经修饰的细胞的DNA测序直接证实染色体基因敲除。染色体基因敲除也可以从敲除后基因表达的缺失(例如,基因所编码的mRNA或多肽产物的缺失)推断出来。

[0116] 在一些实施方案中,经修饰的细胞是CD4⁺ T细胞,其包含编码本公开的结合蛋白质的异源多核苷酸(例如,来自CD8⁺ T细胞的能够特异性结合于肽抗原的MAGE-A1特异性TCR)。在一些实施方案中,经修饰的CD4⁺ T细胞的异源编码的TCR是高亲和力TCR。在特定实施方案中,经修饰的CD4⁺ T细胞的异源编码的TCR能够独立于CD8或在CD8不存在下特异性结合于细胞表面上的肽:抗原HLA复合物。

[0117] 在其他实施方案中,经修饰的CD4⁺ T细胞进一步包含编码CD8共受体的至少一个

胞外部分的异源多核苷酸。如实例中所示,CD4⁺ T细胞对本公开的MAGE-A1特异性结合蛋白和CD8共受体的至少一个胞外部分的共表达可以赋予CD4⁺ T细胞新的或改善的功能性(例如改善的细胞因子释放,与表达MAGE-A1:HLA的靶细胞结合时的CTL应答)。CD8共受体 α 链的氨基酸序列提供于SEQ ID NO:143中。CD8共受体 β 链的五种不同同工型的氨基酸序列分别提供于SEQ ID NO:144-148中。在一些实施方案中,本公开的经修饰的CD4⁺ T细胞进一步包含编码全长CD8共受体 β 链的异源多核苷酸,编码全长CD8共受体 α 链的异源多核苷酸,或两者。CD8编码多核苷酸在一些实施方案中可为

[0118] 本文还提供用于制备经修饰的CD4⁺ T细胞的方法,其中所述方法包括用编码来自CD8⁺ T细胞的能够特异性结合肽抗原的TCR的异源多核苷酸转导CD4⁺ T细胞。在某些实施方案中,用于修饰CD4⁺ T细胞的TCR编码多核苷酸来自天然存在的CD8⁺ T细胞(即,TCR是天然存在的TCR)。所述方法的其他实施方案可包括用编码CD8共受体的至少一个胞外部分的异源多核苷酸转导CD4⁺ T细胞,该CD4⁺ T细胞在一些实施方案中可包含来自CD8⁺ T细胞的CD8 α 和CD8 β 。

[0119] 组合物

[0120] 本文还提供了组合物(例如,医药组合物),其包含本文公开的经修饰的细胞和药学上可接受的载剂、稀释剂或赋形剂。合适的赋形剂包括水、盐水、右旋糖、甘油等及它们的组合。在实施方案中,包含如本文公开的融合蛋白或宿主细胞的组合物还包含合适的输注培养基。合适的输注培养基可以是任何等渗培养基配制物,通常可以使用生理盐水、Normosol R (Abbott) 或Plasma-Lyte A (Baxter)、5%葡萄糖水溶液、林格氏乳酸盐(Ringer's lactate)。输注培养基可以补充有人类血清白蛋白或其他人类血清组分。本文所述的组合物可以存在于单位剂量或多剂量容器中,诸如密封安瓿或小瓶中。可以冷冻此类容器以保持配制物的稳定性直至输注到患者体内。

[0121] 组合物的“有效量”是指在必需剂量下并且持续必需的时间足以实现所需治疗结果或有益治疗的量,如本文所述。有效量可以在一次或多次施用中递送。如果向已知或确认患有疾病或疾病状态的受试者施用,则术语“治疗量”可对于治疗使用,而“预防有效量”可用于将向易罹患或处于罹患疾病或疾病状态(例如复发)风险下的受试者施用有效量描述为预防过程。

[0122] 如医学领域的技术人员所确定,组合物可以以适合于待治疗(或预防)的疾病或病症的方式施用。组合物的合适剂量以及合适的持续时间和频率将通过诸如以下的因素确定:患者的健康状况、患者的体型(即体重、质量或体重)、患者病状的类型和严重程度、活性成分的特定形式和施用方法。通常,适当的剂量和治疗方案以足以提供治疗和/或预防益处(例如本文所述,包括改善的临床结果,诸如更频繁的完全或部分缓解,或更长时间的无疾病和/或总体生存,或症状严重程度减轻)的量提供组合物。对于预防用途,剂量应足以预防、延迟疾病或病症相关疾病的发作或减轻其严重性。根据本文所述方法施用的组合物的预防益处可通过进行临床前(包括体外和体内研究)和临床研究并通过适当的统计学、生物学以及临床方法和技术分析从中获得的数据来确定。

[0123] 治疗有效剂量是用于过继转移的宿主细胞(表达对人类MAGE-A1具有特异性的结合蛋白质或高亲和力重组TCR)的量,其能够在经治疗人类或非人类哺乳动物中产生临床期望的结果(即,足以以统计学上显著的方式诱导或增强针对过表达MAGE-A1的细胞的特异性

T细胞免疫应答(例如,细胞毒性T细胞应答)。任何一名患者的剂量取决于许多因素,包括患者体型、体重、体表面积、年龄、待施用的具体疗法、性别、施用时间和途径、一般健康状况和同时施用的其他药物。剂量将有差别,但用于施用包含如本文所述的重组表达载体的宿主细胞的优选剂量为约107个细胞/m²、约5x 10⁷个细胞/m²、约108个细胞/m²、约5x 10⁸个细胞/m²、约109个细胞/m²、约5x 10⁹个细胞/m²、约1010个细胞/m²、约5x 10¹⁰个细胞/m²或约1011个细胞/m²。在某些实施方案中,单位剂量包含如本文所述的经修饰的细胞,剂量为约107个细胞/m²至约1011个细胞/m²。

[0124] 在某些实施方案中,单位剂量包含呈约1:1比率的(i)包含至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、或至少约95%经工程化的CD4⁺ T细胞的组合物,与(ii)包含至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、或至少约95%经工程化的CD8⁺ T细胞的组合物的组合。在其他实施方案中,单位剂量含有减少量或基本上不含原始T细胞(即,与具有相当数量的PBMC的患者样品相比,具有少于约50%、少于约40%、少于约30%、少于约20%、少于约10%、少于约5%、或少于约1%存在于单位剂量中的原始T细胞群)。

[0125] 在一些实施方案中,单位剂量包含呈约1:1比率的(i)包含至少约50%经工程化的CD4⁺ T细胞的组合物,与(ii)包含至少约50%经工程化的CD8⁺ T细胞的组合物的组合,其中单位剂量含有减少量或基本上不含原始T细胞。在其他实施方案中,单位剂量包含呈约1:1比率的(i)包含至少约60%经修饰的CD4⁺ T细胞的组合物,与(ii)包含至少约60%经修饰的CD8⁺ T细胞的组合物的组合,其中单位剂量含有减少量或基本上不含原始T细胞。在另外其他实施方案中,单位剂量包含呈约1:1比率的(i)包含至少约70%经修饰的CD4⁺ T细胞的组合物,与(ii)包含至少约70%经修饰的CD8⁺ T细胞的组合物的组合,其中单位剂量含有减少量或基本上不含原始T细胞。在一些实施方案中,单位剂量包含呈约1:1比率的(i)包含至少约80%经修饰的CD4⁺ T细胞的组合物,与(ii)包含至少约80%经修饰的CD8⁺ T细胞的组合物的组合,其中单位剂量含有减少量或基本上不含原始T细胞。在一些实施方案中,单位剂量包含呈约1:1比率的(i)包含至少约85%经修饰的CD4⁺ T细胞的组合物,与(ii)包含至少约85%经修饰的CD8⁺ T细胞的组合物的组合,其中单位剂量含有减少量或基本上不含原始T细胞。在一些实施方案中,单位剂量包含呈约1:1比率的(i)包含至少约90%经修饰的CD4⁺ T细胞的组合物,与(ii)包含至少约90%经修饰的CD8⁺ T细胞的组合物的组合,其中单位剂量含有减少量或基本上不含原始T细胞。

[0126] 在本文所述的任何实施方案中,单位剂量包含相等或近似相等数量的经修饰的CD45RA-CD3⁺ CD8⁺和经修饰的CD45RA-CD3⁺ CD4⁺ TM细胞。

[0127] 开发合适的给药和治疗方案,用于在多种治疗方案中使用本文所述的特定组合物,所述治疗方案包括例如肠胃外或静脉内施用或配制。如果本发明组合物经肠胃外施用,则该组合物还可包括无菌水性或油性溶液或悬浮液。合适的无毒肠胃外可接受的稀释剂或溶剂包括水、林格氏溶液(Ringer's solution)、等渗盐溶液、1,3-丁二醇、乙醇、丙二醇或聚乙二醇与水的混合物。水溶液或悬浮液可进一步包含一种或多种缓冲剂,诸如乙酸钠、柠檬酸钠、硼酸钠或酒石酸钠。当然,用于制备任何剂量单位配制物的任何材料应是药学上纯的并且在采用的量下是基本上无毒的。此外,活性化合物可以掺入到缓释制剂和配制物中。

如本文使用,剂量单位形式是指适合作为用于待治疗的受试者的单一剂量的物理上离散单位;每个单位可含有预先确定量的经修饰的细胞或活性化合物,其经计算可与合适药物载体结合产生所需治疗效果。

[0128] 如本文所用,组合物的施用是指将其递送至受试者,而不论递送的途径或模式如何。给药可以连续或间歇地进行,并且可以肠胃外进行。施用可以用于治疗已经确认患有公认的病状、疾病或疾病状态的受试者,或用于治疗易患或处于罹患这类病状、疾病或疾病状态的受试者。与辅助疗法共同施用可包括按任何顺序并根据任何给药计划表同时和/或依序递送多种药剂(例如,具有一种或多种细胞因子的经修饰的细胞;免疫抑制疗法,诸如钙调磷酸酶抑制剂、皮质类固醇、微管抑制剂、低剂量霉酚酸前药、HDAC抑制剂、DNA低甲基化药剂,或它们的任何组合)。

[0129] 在某些实施方案中,向受试者施用多个剂量的本文所述的经修饰的细胞,其可以在约两周至约四周的施用之间间隔施用。

[0130] 治疗方法

[0131] 在某些方面,本公开涉及通过向有需要的人类受试者施用如本文公开的经修饰的细胞、组合物或单位剂量(或它们的任何组合)来治疗过度增殖性病症或以MAGE-A1表达(例如,异常的MAGE-A1表达)为特征的病状的方法。

[0132] 与MAGE-A1表达相关的病状包括存在MAGE-A1细胞或分子事件的活动缺乏、过度活动或不适当活动的任何病症或病症,并且可能是相对于正常细胞,在受累细胞(例如,骨髓瘤细胞)中异常高(具有统计显著性)的MAGE-A1表达或不适当(即,在给定细胞类型的健康细胞中不存在)的表达的结果。患有这类病症或病状的受试者将受益于用本发明描述的实施方案的组合物或方法的治疗。与异常MAGE-A1表达相关的一些病状因此可包括急性以及慢性病症和疾病,诸如使受试者易患特定病症的那些病理病状。

[0133] 与MAGE-A1表达相关的病状的一些实例包括增殖性病症或过度增殖性病症,其指代受试者中的活化和/或增殖细胞的状态(其也可以是转录过度活跃的),包括肿瘤、赘生物、癌症、恶性肿瘤等。除活化或增殖细胞外,过度增殖性病症还可包括细胞死亡过程的异常或失调,无论是通过坏死还是细胞凋亡。这类细胞死亡过程的异常可能与多种病状有关,包括癌症(包括原发性、继发性恶性肿瘤以及转移)或其他病状。

[0134] 在受试者中存在过度增殖性病症或恶性病症是指受试者中存在发育异常、癌性和/或转化细胞,包括例如赘生物、肿瘤、非接触抑制或致癌转化细胞等(例如,实体癌;血液癌,包括淋巴瘤和白血病,诸如急性髓性白血病、慢性髓性白血病等),其是本领域已知的并且建立了其诊断和分类的标准(例如,Hanahan和Weinberg,Cell 144:646,2011;Hanahan和Weinberg,Cell 100:57,2000;Cavallo等人,Canc.Immunol.Immunother.60:319,2011;Kyrigideis等人,J.Carcinog.9:3,2010)。在某些实施方案中,此类癌细胞可以是急性髓性白血病、B细胞淋巴细胞白血病、T细胞淋巴母细胞白血病或骨髓瘤的细胞,包括能够引发和连续移植这些癌症类型中的任一种的癌症干细胞(参见例如Park等人,Molec.Therap.17:219,2009)。

[0135] 在某些实施方案中,提供了用于治疗过度增殖性病症(诸如血液恶性肿瘤或实体癌)的方法,其中所述方法包括向有需要的人类受试者施用本公开的经修饰的细胞、组合物或单位剂量。示例性血液恶性肿瘤包括急性淋巴母细胞性白血病(ALL)、急性髓性白血病

(AML)、慢性髓性白血病(CML)、慢性嗜酸性粒细胞白血病(CEL)、骨髓增生异常综合征(MDS)、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)或多发性骨髓瘤(MM)。

[0136] 在其他实施方案中,提供了用于治疗过度增殖性病症的方法,诸如实体癌选自非小细胞肺癌(NSCLC)、三阴性乳腺癌(TNBC)、卵巢癌、恶性黑色素瘤、结肠癌、结直肠腺癌、结直肠癌、胆管癌、膀胱癌、骨和软组织癌、脑肿瘤、乳癌、宫颈癌、硬纤维瘤、胚胎癌、子宫内膜癌、食道癌、胃癌、胃腺癌、多形性胶质母细胞瘤、妇科肿瘤、头颈鳞状细胞癌、肝癌、肺癌、间皮瘤、骨肉瘤、胰腺癌、胰腺导管腺癌、原发性星形细胞肿瘤、原发性甲状腺癌、前列腺癌、肾癌、肾细胞癌、横纹肌肉瘤、皮肤癌、软组织肉瘤、睾丸生殖细胞肿瘤、尿路上皮癌、子宫肉瘤或子宫癌。

[0137] 如医学领域的技术人员所理解,术语“治疗(treat/treatment)”是指受试者(即,患者、宿主,可以是人类或者非人类动物)的疾病、病症或病状的医学管理(参见例如,Stedman's Medical Dictionary)。通常,适当的剂量和治疗方案以足以提供治疗或预防益处,量提供一种或多种对人类MAGE-A1具有特异性的结合蛋白质或高亲和力重组TCR或表达它的宿主细胞,以及任选的辅助疗法(例如,细胞因子,诸如IL-2、IL-15、IL-21或它们的任何组合)。治疗性治疗或预防性或防止性方法产生的治疗或预防益处包括例如改善的临床结果,其中目的是防止或延缓或以其他方式减少(例如,相对于未治疗的对照以统计学上显著的方式减少)不期望的生理变化或病症,或防止、延缓或以其他方式减少这类疾病或病症的发展或严重程度。治疗受试者的有益或期望的临床结果包括减少、减轻或缓解由以下各者引起或与以下各者相关的症状:待治疗的疾病或病症;症状发生率下降;生存质量提高;更长时间的无病状态(即,降低受试者呈现症状的可能性或倾向,根据该症状进行疾病诊断);降低疾病程度;稳定(即没有恶化)的疾病状态;延迟或减缓疾病进展;改善或缓解疾病状态;和缓解(无论是部分还是全部),无论是可检测的还是不可检测的;或总体生存。

[0138] “治疗”还可意指与受试者不接受治疗时的预期存活期相比延长存活期。需要本文所述方法和组合物的受试者包括已经患有疾病或病症的受试者,以及易患或处于罹患该疾病或病症风险下的受试者。需要预防性治疗的受试者包括要预防疾病、病状或病症(即,降低疾病或病症发生或复发的可能性)的受试者。本文所述的组合物(和包含组合物的制剂)和方法所提供的临床益处可以通过设计和执行对预期受益于组合物的受试者的体外测定、临床前研究和临床研究来评估,如在实例中描述。

[0139] 在本发明公开方法的某些实施方案中,经修饰的细胞能够以I类HLA限制性方式促进对MAGE-A1的抗原特异性T细胞应答。在一些实施方案中,I类HLA限制性应答与抗原加工相关转运体(TAP)无关。在一些实施方案中,由根据本发明公开的方法施用的经修饰的细胞促进的抗原特异性T细胞应答包括CD4+辅助性T淋巴细胞(Th)应答和CD8+细胞毒性T淋巴细胞(CTL)应答中的至少一种。在特定实施方案中,根据本发明公开的方法引发的CTL应答针对具有异常MAGE-A1表达的细胞(例如,MAGE-A1+肿瘤细胞)。CTL免疫应答的水平可以通过本文所述和本领域常规实施的大量免疫学方法中的任何一种来测定。可以在施用本文描述的由例如T细胞表达的MAGE-A1特异性结合蛋白中的任何一种之前和之后测定CTL免疫应答的水平。用于测定CTL活性的细胞毒性测定可以使用本领域常规实践的几种技术和方法中的任何一种进行(参见例如Henkart等人,“Cytotoxic T-Lymphocytes”in Fundamental Immunology,Paul(编)(2003 Lippincott Williams&Wilkins,Philadelphia,PA),第1127-

50页,以及其中引用的参考文献)。

[0140] 抗原特异性T细胞应答通常通过比较根据本文描述的任一个T细胞功能参数(例如,增殖、细胞因子释放、CTL活性、改变的细胞表面标记物表型等)观察到的T细胞应答来确定,所述参数于在适当的环境中暴露于同源抗原(例如,当由免疫相容的抗原呈递细胞呈递时,用于引发或激活T细胞的抗原)的T细胞与来自相同来源群体,取代暴露于结构上不同或不相关对照抗原的T细胞之间获得。对同源抗原的响应比对照抗原的响应更强,具有统计显著性,表示抗原特异性。

[0141] 可以从受试者获得生物样品,以用于确定如本文所述的对MAGE-A1衍生的抗原肽的免疫应答的存在和水平。如本文所用的“生物样品”可以是血液样品(可以由其制备血清或血浆)、活检样本、体液(例如,肺灌洗液、腹水、粘膜洗液、滑液)、骨髓、淋巴结、组织外植体、器官培养物或来自受试者或生物来源的其他组织或细胞制剂。也可以从接受任何免疫原性组合物之前的受试者获得生物样品,该生物样品可作用于建立基线(即免疫前)数据的对照。

[0142] 本公开的经修饰的细胞在某些实施方案中可用于过继细胞疗法中。例如,在一些实施方案中,将经修饰的细胞离体修饰(例如,用本公开的重组表达载体或多核苷酸转导),然后施用于有需要的受试者。在某些实施方案中,经修饰的细胞是同种异体细胞、同基因细胞或自体细胞(即,相对于施用经修饰的细胞的受试者)。在本发明公开的方法的任一种中,经修饰的细胞包括选自以下的经修饰的人类免疫细胞:CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤细胞、树突细胞,或它们的任何组合。在某些实施方案中,经修饰的细胞是T细胞,例如原始T细胞、中央记忆性T细胞、效应记忆T细胞或它们的任何组合。

[0143] 在特定实施方案中,用于本发明公开的方法中的经修饰的细胞是CD4⁺ T细胞。在一些这类实施方案中,经修饰的CD4⁺ T细胞还包含编码CD8共受体的至少一个胞外部分的异源多核苷酸,并任选地编码完整的CD8 α 链、完整的CD8 β 链或两者。这类方法在某些实施方案中进一步包括向受试者施用CD8⁺ T细胞,所述CD8⁺ T细胞能够特异性结合于细胞表面上的MAGE-A1肽:HLA复合物,诸如根据本公开的CD8⁺经修饰的T细胞。

[0144] 本发明公开的治疗或预防方法可包括施用或给药经修饰的细胞或组合疗法的任何合适的方法。例如,在某些实施方案中,向受试者施用多个剂量的如本文所述的经修饰的细胞,其可以在约两周至约四周的施用之间间隔施用。此外,本公开的治疗或预防方法可以作为治疗过程或方案的一部分施用于受试者,所述治疗过程或方案可以包括在施用本发明公开的单位剂量、细胞或组合物之前或之后的额外治疗。在其他实施方案中,依序施用细胞因子,条件是在细胞因子施用前向受试者施用至少三次或四次经修饰的细胞。在某些实施方案中,皮下施用细胞因子(例如IL-2、IL-15、IL-21)。在另外其他实施方案中,所治疗的受试者进一步接受免疫抑制疗法,诸如钙调磷酸酶抑制剂、皮质类固醇、微管抑制剂、低剂量的霉酚酸前药或它们的任何组合。在又其他实施方案中,所治疗的受试者已接受非清髓性或清髓性造血细胞移植,其中所述治疗可在非清髓性造血细胞移植后至少2个月至至少3个月施用。在一些实施方案中,给受试者施用DNA低甲基化剂和HDAC抑制剂中的一种或多种,其中一种或两种可以增强MAGE-A1表达(参见Weon, J.L.和P.R.Potts, Curr Opin Cell Biol, 2015.37:p.1-8),从而增强靶向MAGE-A1的过继性细胞疗法。

[0145] 根据本公开的方法可以在某些实施方案中进一步包括以组合疗法施用一种或多种另外的药剂以治疗疾病或病症。例如,在某些实施方案中,组合疗法包括施用经修饰的细胞(同时(concurrently)、同时(simultaneously)或依序)与免疫检查点抑制剂。在一些实施方案中,组合疗法包括施用经修饰的细胞与刺激性免疫检查点药剂的激动剂。在其他实施方案中,组合疗法包括施用经修饰的细胞和二次疗法,诸如化学治疗剂、放射疗法、手术、抗体或它们的任何组合。

[0146] 如本文所用,术语“免疫抑制剂(immune suppression agent/immunosuppression agent)”是指提供抑制信号以帮助控制或抑制免疫应答的一种或多种细胞、蛋白质、分子、化合物或复合物。例如,免疫抑制剂包括部分或完全阻断免疫刺激;减少、防止或延迟免疫激活;或增加、激活或上调免疫抑制的那些分子。标靶(例如,用免疫检查点抑制剂)的示例性免疫抑制剂包括PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、CTLA4、B7-H3、B7-H4、CD244/2B4、HVEM、BTLA、CD160、TIM3、GAL9、KIR、PVR1G(CD112R)、PVRL2、腺苷、A2aR、免疫抑制细胞因子(例如,IL-10、IL-4、IL-1RA、IL-35)、IDO、精氨酸酶、VISTA、TIGIT、LAIR1、CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5、Treg细胞或它们的任何组合。

[0147] 免疫抑制剂抑制剂(也称为免疫检查点抑制剂)可以是化合物、抗体、抗体片段或融合多肽(例如,Fc融合物,诸如CTLA4-Fc或LAG3-Fc)、反义分子、核酶或RNAi分子,或低分子量有机分子。在本文公开的任何实施方案中,方法可包括单独或呈任何组合的经修饰的细胞以及一种或多种以下免疫抑制组分的抑制剂。

[0148] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与以下组合使用:PD-1抑制剂,例如PD-1特异性抗体或其结合片段,诸如匹地利珠抗(pidilizumab)、尼沃鲁单抗(nivolumab)、兰洛利珠单抗(pembrolizumab)、MEDI0680(以前称为AMP-514)、AMP-224、BMS-936558或它们的任何组合。在其他实施方案中,本公开的经修饰的细胞与以下组合使用:PD-L1特异性抗体或其结合片段,诸如BMS-936559、度伐鲁单抗(durvalumab)(MEDI4736)、阿特利珠单抗(atezolizumab)(RG7446)、阿维鲁单抗(avelumab)(MSB0010718C)、MPDL3280A,或它们的任何组合。

[0149] 在某些实施方案中,本公开的经修饰的细胞与以下组合使用:LAG3抑制剂,诸如LAG525、IMP321、IMP701、9H12、BMS-986016或它们的组合。

[0150] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与CTLA4的抑制剂组合使用。在特定实施方案中,经修饰的细胞与以下组合使用:CTLA4特异性抗体或其结合片段,诸如艾匹利木单抗(ipilimumab)、曲美利木单抗(tremelimumab)、CTLA4-Ig融合蛋白(例如阿他西普(abatacept)、贝他西普(belatacept)),或它们的任何组合。

[0151] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与以下组合使用:B7-H3特异性抗体或其结合片段,诸如依诺妥珠单抗(enoblituzumab)(MGA271)、376.96或两者。B7-H4抗体结合片段可为scFv或其融合蛋白,如例如Dangaj等人,Cancer Res.73:4820,2013中描述,以及美国专利号9,574,000和PCT专利公开号WO/201640724A1和WO 2013/025779A1中描述的那些。

[0152] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与CD244的抑制剂组合使用。

[0153] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与BLTA、HVEM、CD160的抑制剂或它们的组合使用。抗CD-160抗体描述于例如PCT公开号WO 2010/084158。

[0154] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与TIM3的抑制剂组合使用。

[0155] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与Gal9的抑制剂组合使用。

[0156] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与腺苷信号传导的抑制剂,诸如诱饵腺苷受体组合使用。

[0157] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与A2aR的抑制剂组合使用。

[0158] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与KIR的抑制剂,诸如利瑞鲁单抗(BMS-986015)组合使用。

[0159] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与抑制性细胞因子(通常,除TGF β 之外的细胞因子)或Treg发育或活性的抑制剂组合使用。

[0160] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与以下组合使用:IDO抑制剂,诸如左旋-1-甲基色氨酸、依多司他(epacadostat)(INCB024360;Liu等人,Blood 115:3520-30,2010)、依布硒啉(ebselen)(Terentis等人,Biochem.49:591-600,2010)、英多莫德(indoximod)、NLG919(Mautino等人,American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2013;Apr 6-10,2013)、1-甲基-色氨酸(1-MT)-替拉扎明或它们的组合。

[0161] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与以下组合使用:精氨酸酶抑制剂,诸如N(ω)-硝基-L-精氨酸甲基酯(L-NAME)、N- ω -羟基-去甲-1-精氨酸(去甲-NOHA)、L-NOHA、2(S)-氨基-6-硼基己酸(ABH)、S-(2-硼基乙基)-L-精氨酸(BEC)或它们的组合。

[0162] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与VISTA的抑制剂,诸如CA-170(Curis, Lexington, Mass.)组合使用。

[0163] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与以下组合使用:TIGIT的抑制剂,诸如COM902(Compugen, Toronto, Ontario Canada);CD155的抑制剂,诸如COM701(Compugen)或两者。

[0164] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与PVRIG、PVRL2或两者的抑制剂组合使用。抗PVRIG抗体描述于例如PCT公开号WO 2016/134333。抗PVRL2抗体描述于例如PCT公开号WO 2017/021526。

[0165] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与LAIR1抑制剂组合使用。

[0166] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5的抑制剂或它们的组合使用。

[0167] 在某些实施方案中,经修饰的细胞与提高刺激性免疫检查点分子活性的试剂(即,激动剂)组合使用。例如,经修饰的细胞可以与以下各者组合使用:CD137(4-1BB)激动剂(诸如,乌瑞鲁单抗(urelumab))、CD134(OX-40)激动剂(诸如,MEDI6469、MEDI6383或MEDI0562)、来那度胺(lenalidomide)、泊马度胺(pomalidomide)、CD27激动剂(诸如,CDX-1127)、CD28激动剂(诸如,TGN1412、CD80或CD86)、CD40激动剂(诸如,CP-870,893、rhuCD40L或SGN-40)、CD122激动剂(诸如,IL-2)、GITR的激动剂(诸如,PCT专利公开号WO 2016/054638中描述的人源化单克隆抗体)、ICOS的激动剂(CD278)(诸如,GSK3359609、mAb 88.2、JTX-2011、Icos 145-1、Icos 314-8,或它们的任何组合)。在本文公开的任何实施方案中,方法可包括单独或呈任何组合施用经修饰的细胞与一种或多种刺激性免疫检查点分子的激动剂。

[0168] 在某些实施方案中,组合疗法包括经修饰的细胞和包括以下中的一种或多种的二次疗法:对非发炎性实体瘤所表达的癌抗原具有特异性的抗体或其抗原结合片段、放射治疗、手术、化学治疗剂、细胞因子、RNAi或它们的任何组合。

[0169] 在某些实施方案中,组合疗法方法包括施用经修饰的细胞并进一步施用放射治疗或手术。放射疗法在本领域中是众所周知的,并且包括X射线疗法,诸如 γ 辐照和放射性药物疗法。适合于治疗受试者中的给定癌症的手术和外科技术是本领域普通技术人员所熟知的。

[0170] 在某些实施方案中,组合疗法方法包括施用经修饰的细胞并进一步施用化学治疗剂。化学治疗剂包括但不限于染色质功能抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、微管抑制药物、DNA损伤剂、抗代谢物(诸如叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和糖修饰类似物)、DNA合成抑制剂、DNA相互作用剂(诸如嵌合剂)和DNA修复抑制剂。示例性化学治疗剂包括但不限于以下群组:抗代谢物/抗癌剂,诸如嘧啶类似物(5-氟尿嘧啶、氟尿苷、卡培他滨(capecitabine)、吉西他滨(gemcitabine)和阿糖胞苷)和嘌呤类似物、叶酸拮抗剂和相关抑制剂(巯基嘌呤、硫鸟嘌呤、喷司他丁(pentostatin)和2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨(cladribine))) ;抗增殖剂/抗有丝分裂剂,包括天然产物,诸如长春花生物碱(长春碱、长春新碱和长春瑞滨(vinorelbine)) ;微管破坏剂,诸如紫杉烷(紫杉醇、多西他赛(docetaxel))、长春花新碱、长春花碱、诺考达唑(nocodazole)、埃博霉素和长春瑞滨、表鬼臼毒素(依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide)) ;DNA损伤剂(放线菌素、安吡啶、蒽环类抗生素、博来霉素、白消安(busulfan)、喜树碱、卡铂、苯丁酸氮芥、顺铂、环磷酰胺(cyclophosphamide)、环磷酰胺(Cytosan)、放线菌素D、柔红霉素、多柔比星、表柔比星(epirubicin)、六甲基三聚氰胺奥沙利铂、异环磷酰胺、美法仑(melphalan)、氮芥、丝裂霉素、米托蒽醌(mitoxantrone)、亚硝基脲、普卡霉素、甲苄肼、紫杉醇、泰索帝(taxotere)、替莫唑胺、替尼泊苷(teniposide)、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷(etoposide) (VP 16)) ;抗生素,诸如放线菌素D(dactinomycin) (放线菌素D(actinomycin D))、柔红霉素、多柔比星(阿霉素)、伊达比星(idarubicin)、蒽环类抗生素、米托蒽醌、博来霉素、普卡霉素(光神霉素)和丝裂霉素;酶(L-天冬酰胺酶,其系统地代谢L-天冬酰胺并剥夺不具有合成自身天冬酰胺能力的细胞) ;抗血小板药;抗增殖/抗有丝分裂烷化剂,诸如氮芥(nitrogen mustard) (二氯甲基二乙胺(mechlorethamine)、环磷酰胺和类似物、美法仑、苯丁酸氮芥)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺(六甲基三聚氰胺和噻替派)、烷基磺酸盐-白消安、亚硝基脲(卡莫司汀(BCNU)和类似物、链脲佐菌素)、三嗪-达卡巴嗪(DTIC) ;抗增殖/抗有丝分裂抗代谢物,诸如叶酸类似物(甲氨蝶呤) ;铂配位复合物(顺铂、卡铂)、甲苄肼、羟基脲、米托坦(mitotane)、氨基苯乙吡啶酮;激素、激素类似物(雌激素、他莫昔芬(tamoxifen)、戈舍瑞林(goserelin)、比卡鲁胺(bicalutamide)、尼鲁米特(nilutamide))和芳香酶抑制剂(来曲唑(letrozole)、阿那曲唑(anastrozole)) ;抗凝血剂(肝素、合成肝素盐和其他凝血酶抑制剂) ;纤维蛋白溶解剂(诸如组织纤维蛋白溶酶原激活剂、链激酶和尿激酶)、阿司匹林、双嘧达莫、噻氯匹定、氯吡格雷、阿昔单抗(abciximab) ;抗迁移剂;抗分泌剂(布雷菲德菌素(breveldin)) ;免疫抑制剂(环孢菌素、他克莫司(FK-506)、西罗莫司(sirolimus) (雷帕霉素)、硫唑嘌呤、霉酚酸酯) ;抗血管生成化合物(TNP470、染料木黄酮)和生长因子抑制剂(血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂、成纤维细胞生长因子(FGF)抑制剂) ;血管紧张素受体阻滞剂;一氧化氮供体;反义寡核苷酸;抗体(曲妥珠单抗(trastuzumab)、利妥昔单抗(rituximab)) ;嵌合抗原受体;细胞周期抑制剂和分化诱导剂(维甲酸) ;mTOR抑制剂、拓扑异构酶抑制剂(多柔比星(阿霉素)、安吡啶、喜树碱、柔红霉素、放线菌素D、替尼泊苷、表柔比星、依托泊苷、伊达比星、伊立替康

(irinotecan) (CPT-11) 和米托蒽醌、托泊替康 (topotecan)、伊立替康 (irinotecan)、皮质类固醇 (可的松 (cortisone)、地塞米松 (dexamethasone)、氢化可的松、甲基泼尼松龙、泼尼松 (prednisone) 和泼尼松龙); 生长因子信号转导激酶抑制剂; 线粒体功能障碍诱导剂、毒素 (诸如霍乱毒素、蓖麻毒素、假单胞菌外毒素、百日咳博德特氏菌腺苷酸环化酶毒素或白喉毒素), 以及半胱天冬酶激活剂; 和染色质干扰物。

[0171] 细胞因子越来越多地用于操纵宿主对抗癌活性的免疫应答。参见例如 Floros & Tarhini, Semin. Oncol. 42 (4): 539-548, 2015。用于促进免疫抗癌或抗肿瘤应答的细胞因子包括例如 IFN- α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-24 和 GM-CSF, 其单独或与本公开的经修饰的细胞任意组合。

[0172] 实施例

[0173] 实施例1

[0174] 生成对癌症表位具有特异性的高亲和力 TCR

[0175] 由于胸腺选择而难以生成用于过继性细胞疗法的高亲和力 TCR, 其中对自身抗原 (例如, MART1 和 MAGE-A1) 具有高亲和力的 TCR 被去除, 并因此与对外来抗原具有特异性的 TCR 相比相对稀少 (参见例如图 1A 和 1B)。如图 2A 和 2B 所示, 开发了新的筛选和富集方法以鉴定对 MAGE-A1 具有特异性的高亲和力 TCR。简单来说, 在 IL-2、IL-7、IL-15 和 IL-21 存在下, 用肽脉冲的自体 DC 刺激一次来自 12 个健康供体的外周血单核细胞 (PBMC) 的 CD8⁺ T 细胞, 并用肽脉冲的自体 PBMC 刺激两次, 以获得多克隆 MAGE-A1 特异性 CD8⁺ T 细胞系。汇集来自所有供体的受刺激的细胞系并使用有限浓度的 MAGE-A1 肽:MHC 多聚体分选几次, 这会产生富集的高亲和力 T 细胞克隆群。相对于来自汇集和单独 pMHC 分类中的 TCR 频率对来自所述群体的 TCR β 基因测序。

[0176] 图 3 展示来自一系列 pMHC 分类的示例性数据, 所述 pMHC 分类富集表达对 MAGE-A1 抗原具有特异性的 TCRBCDR3 的 T 细胞。从汇集物中鉴定的高亲和力克隆强烈结合 MAGE-A1:MHC, 与较低的 EC₅₀ 相关 (图 4A、4B)。

[0177] 实施例2

[0178] MAGE-A1 特异性 TCR 的体外功能性

[0179] 选择使用实施例 1 的方法产生的高亲和力 MAGE-A1 特异性 CD8⁺ T 细胞克隆 “MA2” (图 5A) 以供进一步测试。如图 5B 所示, 当与表达 MAGE-A1 的 HAL-A*0201+U266 多发性骨髓瘤细胞共同培养 (效/靶 (E:T) 比为 10:1, 4 小时) 时, MA2+CD8⁺ T 细胞选择性地产生细胞因子。在标准的 4 小时 Cr51 释放测定中, MA2⁺ T 细胞能够在存在或不存在外源 IFN- γ 和 MAGE-A1 肽的情况下杀死靶细胞 (图 5C)。

[0180] 实施例3

[0181] MAGE-A1 特异性 CD8 TCR 独立于 CD8 结合四聚体

[0182] CD8⁺ TCR 识别 I 类 HLA 分子呈递的抗原, 而 CD4⁺ TCR 识别在 II 类 HLA 背景下呈递的抗原。为了测试高亲和力 MA2 TCR 是否可以独立于 CD8 结合 MAGE-A1:HLA I, 用 MA2 TCR 转导 CD4⁺ T 细胞 (参见例如图 6A 和 6B 的示意图)。如图 7A 和 7B 所示, 用 MA2 TCR 转导的 CD4⁺ T 细胞以与 MA2 CD8⁺ T 细胞相当 (B_{max} 相差约 5 倍) 的亲和力结合 MAGE-A1:HLA 四聚体。然而, 如图 7C 所示, 转化的 CD4⁺ T 细胞在体外未杀死靶细胞。

[0183] 实施例4

[0184] 经工程化的CD4⁺ T细胞表达的功能测试

[0185] MAGE-A1特异性CD8 TCR和CD8共受体

[0186] 接着,研究CD8⁺共受体改善表达高亲和力CD8-TCR的CD4⁺ T细胞功能的能力(参见例如图6A)。如图8A的图示所示,用高亲和力I类限制性MAGE-A1特异性TCR和CD8共受体转导CD4⁺ T细胞。图8B显示,与仅用外源CD8 TCR转导的CD4⁺ T细胞相比,更高比例的用外源CD8 TCR和CD8共受体转导的CD4⁺ T细胞响应于抗原产生细胞因子。图8C显示,双重转导的CD4⁺ T细胞令人惊讶地表现出针对MEL526靶细胞的细胞裂解活性,其速率与表达相同高亲和力TCR的CD8⁺ T细胞相当。如图8D所示,与不含CD8的MA2⁺ CD4⁺细胞相比,在用抗原刺激后,双重转导的CD4⁺ T细胞的增殖也更稳健。

[0187] 这些数据表明,本公开的高亲和力MAGE-A1特异性TCR和表达它们的CD8⁺和CD4⁺ T细胞可用于靶向和杀死表达MAGE-A1的癌细胞,并且可用于针对表达MAGE-A1的疾病的细胞免疫疗法。

[0188] 上述不同的实施方案可以组合以提供另外的实施方案。在本说明书中引用和/或在申请数据表中列举的所有美国专利、美国专利申请公开、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利公开(如果有的话,包括2017年3月15日提交的美国临时专利申请号62/471,956)以全文引用的方式并入本文。如果必要的话,可以修改实施方案的方面,以采用不同专利、申请和公开的概念以提供又另外的实施方案。

[0189] 根据上文详细说明,可以对实施方案作出这些和其他改变。总体上,在以下权利要求书中,所使用的术语不应解读为将权利要求书限制为说明书和权利要求书中公开的具体实施方案,而应解读为包括所有可能的实施方案连同这些权利要求所享有的等效权利的全部范围。因此,权利要求书不受本公开文本的限制。

<110> 弗雷德哈钦森癌症研究中心 (Fred Hutchinson Cancer Research Center)
 奥德·沙皮伊 (Chapuis, Aude)
 托马斯·施密特 (Schmitt, Thomas)
 梅甘·麦卡菲 (McAfee, Megan)
 <120> 高亲和力MAGE-A1特异性TCR及其用途
 <130> 360056.446W0
 <140> PCT
 <141> 2018-03-15
 <150> US 62/471,956
 <151> 2017-03-15
 <160> 148
 <170> FastSEQ for Windows Version 4.0
 <210> 1
 <211> 133
 <212> PRT
 <213> 人工序列 (Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成序列β链可变域 (氨基酸)
 <400> 1
 Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val
 1 5 10 15
 Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys
 20 25 30
 Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His
 35 40 45
 Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu
 50 55 60
 Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro
 65 70 75 80
 Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile
 85 90 95
 Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser
 100 105 110
 Asn Asn Arg Asp Ser Tyr Asn Ser Pro Leu His Phe Gly Asn Gly Thr
 115 120 125
 Arg Leu Thr Val Thr
 130

<210> 2

<211> 177

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列 β 链恒定域(氨基酸)

<400> 2

```

Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
1           5           10           15
Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
          20           25           30
Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
          35           40           45
Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
          50           55           60
Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
65           70           75           80
Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
          85           90           95
Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
          100          105          110
Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
          115          120          125
Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
          130          135          140
Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
145          150          155          160
Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
          165          170          175
Phe

```

<210> 3

<211> 128

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列 α 链可变域(氨基酸)

<400> 3

```

Met Lys Pro Thr Leu Ile Ser Val Leu Val Ile Ile Phe Ile Leu Arg
1           5           10           15

```

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

<210> 4

<211> 141

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列 α 链恒定域(氨基酸)

<400> 4

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
 20 25 30
 Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys
 35 40 45
 Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
 50 55 60
 Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
 65 70 75 80
 Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
 85 90 95
 Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe
 100 105 110
 Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
 115 120 125
 Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 130 135 140

<210> 5

<211> 130

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列β链可变域(氨基酸)

<400> 5

```

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

```

<210> 6

<211> 177

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列β链恒定域(氨基酸)

<400> 6

```

Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
1           5           10           15
Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
           20           25           30
Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
           35           40           45
Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys

```

50	55	60
Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu		
65	70	75
Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys		80
	85	90
Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp		95
	100	105
Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg		110
	115	120
Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser		125
	130	135
Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala		140
145	150	155
Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp		160
	165	170
		175

Phe

<210> 7

<211> 130

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列 α 链可变域(氨基酸)

<400> 7

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

Lys Pro

130

<210> 8

<211> 141

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列 α 链恒定域(氨基酸)

<400> 8

Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys

1 5 10 15

Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr

20 25 30

Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys

35 40 45

Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala

50 55 60

Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser

65 70 75 80

Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp

85 90 95

Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe

100 105 110

Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala

115 120 125

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

130 135 140

<210> 9

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列 β 链可变域(氨基酸)

<400> 9

Met Leu Cys Ser Leu Leu Ala Leu Leu Leu Gly Thr Phe Phe Gly Val

1 5 10 15

Arg Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val

20 25 30

Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro

	35				40				45								
Asn	Leu	Tyr	Trp	Tyr	Arg	Gln	Ala	Ala	Gly	Arg	Gly	Leu	Gln	Leu	Leu		
	50				55				60								
Phe	Tyr	Ser	Val	Gly	Ile	Gly	Gln	Ile	Ser	Ser	Glu	Val	Pro	Gln	Asn		
65					70					75						80	
Leu	Ser	Ala	Ser	Arg	Pro	Gln	Asp	Arg	Gln	Phe	Ile	Leu	Ser	Ser	Lys		
				85					90					95			
Lys	Leu	Leu	Leu	Ser	Asp	Ser	Gly	Phe	Tyr	Leu	Cys	Ala	Leu	Ser	Thr		
	100					105					110						
Ser	Tyr	Glu	Gln	Tyr	Phe	Gly	Pro	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Thr			
	115					120					125						
<210> 10																	
<211> 178																	
<212> PRT																	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)																	
<220>																	
<223> 合成序列β链恒定域(氨基酸)																	
<400> 10																	
Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser		
1				5				10					15				
Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala		
			20					25					30				
Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly		
	35					40					45						
Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu		
	50					55					60						
Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg		
65				70					75						80		
Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln		
				85					90					95			
Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg		
	100					105					110						
Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala		
	115					120					125						
Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser	Ala		
	130					135					140						
Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val		
145				150					155						160		
Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg	Lys	Asp	Ser		

165	170	175
Arg Gly		
<210> 11		
<211> 133		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成序列α链可变域(氨基酸)		
<400> 11		
Met Thr Arg Val Ser Leu Leu Trp Ala Val Val Val Ser Thr Cys Leu		
1 5 10 15		
Glu Ser Gly Met Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser		
20 25 30		
Val Gln Glu Ala Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser		
35 40 45		
Glu Asn Asn Tyr Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln		
50 55 60		
Met Ile Leu Val Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr		
65 70 75 80		
Glu Asn Arg Phe Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser		
85 90 95		
Leu Lys Ile Ser Asp Ser Gln Leu Gly Asp Thr Ala Met Tyr Phe Cys		
100 105 110		
Ala Phe Met Lys Ser His Ser Gly Tyr Ile Phe Gly Thr Gly Thr Arg		
115 120 125		
Leu Lys Val Leu Ala		
130		
<210> 12		
<211> 141		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成序列α链恒定域(氨基酸)		
<400> 12		
Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys		
1 5 10 15		
Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr		
20 25 30		
Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys		

35	40	45
Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala		
50	55	60
Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser		
65	70	75
Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp		80
85	90	95
Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe		
100	105	110
Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala		
115	120	125
Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
130	135	140
<210> 13		
<211> 129		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成序列β链可变域(氨基酸)		
<400> 13		
Met Leu Cys Ser Leu Leu Ala Leu Leu Leu Gly Thr Phe Phe Gly Val		
1	5	10
Arg Ser Gln Thr Ile His Gln Trp Pro Ala Thr Leu Val Gln Pro Val		15
20	25	30
Gly Ser Pro Leu Ser Leu Glu Cys Thr Val Glu Gly Thr Ser Asn Pro		
35	40	45
Asn Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Ala Gly Arg Gly Leu Gln Leu Leu		
50	55	60
Phe Tyr Ser Val Gly Ile Gly Gln Ile Ser Ser Glu Val Pro Gln Asn		
65	70	75
Leu Ser Ala Ser Arg Pro Gln Asp Arg Gln Phe Ile Leu Ser Ser Lys		80
85	90	95
Lys Leu Leu Leu Ser Asp Ser Gly Phe Tyr Leu Cys Ala Trp Ser Val		
100	105	110
Ala Val Asn Thr Glu Ala Phe Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Thr Val		
115	120	125
Val		
<210> 14		
<211> 177		

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列 β 链恒定域(氨基酸)

<400> 14

Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro
1				5					10					15	
Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu
			20					25					30		
Ala	Thr	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn
			35				40					45			
Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys
			50				55					60			
Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu
65					70				75					80	
Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys
					85				90					95	
Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp
					100				105					110	
Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg
					115				120					125	
Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser
							135					140			
Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala
145						150				155				160	
Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg	Lys	Asp
					165				170					175	

Phe

<210> 15

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列 α 链可变域(氨基酸)

<400> 15

Met	Thr	Arg	Val	Ser	Leu	Leu	Trp	Ala	Val	Val	Val	Ser	Thr	Cys	Leu
1				5				10						15	
Glu	Ser	Gly	Met	Ala	Gln	Thr	Val	Thr	Gln	Ser	Gln	Pro	Glu	Met	Ser
				20				25					30		

Val	Gln	Glu	Ala	Glu	Thr	Val	Thr	Leu	Ser	Cys	Thr	Tyr	Asp	Thr	Ser
35				40				45							
Glu	Asn	Asn	Tyr	Tyr	Leu	Phe	Trp	Tyr	Lys	Gln	Pro	Pro	Ser	Arg	Gln
50				55				60							
Met	Ile	Leu	Val	Ile	Arg	Gln	Glu	Ala	Tyr	Lys	Gln	Gln	Asn	Ala	Thr
65				70				75				80			
Glu	Asn	Arg	Phe	Ser	Val	Asn	Phe	Gln	Lys	Ala	Ala	Lys	Ser	Phe	Ser
				85				90				95			
Leu	Lys	Ile	Ser	Asp	Ser	Gln	Leu	Gly	Asp	Thr	Ala	Met	Tyr	Phe	Cys
100				105				110							
Ala	Phe	Gly	Glu	Gly	Ala	Arg	Leu	Met	Phe	Gly	Asp	Gly	Thr	Gln	Leu
115				120				125							
Val	Val	Lys	Pro												
130															
<210> 16															
<211> 141															
<212> PRT															
<213> 人工序列(Artificial Sequence)															
<220>															
<223> 合成序列α链恒定域(氨基酸)															
<400> 16															
Asp	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser	Lys
1				5				10				15			
Ser	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr
20				25				30							
Asn	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Cys
35				40				45							
Val	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val	Ala
50				55				60							
Trp	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn	Ser
65				70				75				80			
Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys	Asp
				85				90				95			
Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn	Leu	Asn	Phe
100				105				110							
Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala
115				120				125							
Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser			
130				135				140							

<210> 17

<211> 129

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列 β 链可变域(氨基酸)

<400> 17

```

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

```

Leu

<210> 18

<211> 178

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列 β 链恒定域(氨基酸)

<400> 18

```

Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser
1           5           10           15
Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala
           20           25           30
Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly
           35           40           45
Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu
           50           55           60

```

Thr Lys Leu Ser Val Lys Pro

130 135
 <210> 20
 <211> 141
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成序列 α 链恒定域(氨基酸)
 <400> 20
 Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
 20 25 30
 Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys
 35 40 45
 Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
 50 55 60
 Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
 65 70 75 80
 Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
 85 90 95
 Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe
 100 105 110
 Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
 115 120 125
 Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 130 135 140
 <210> 21
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)
 <220>
 <223> 合成序列1388.1 β 链CDR1域(氨基酸)
 <400> 21
 Met Asp His Glu Asn
 1 5
 <210> 22
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.1 β 链CDR2域(氨基酸)

<400> 22

Ser Tyr Asp Val Lys Met

1 5

<210> 23

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.1 β 链CDR3域(氨基酸)

<400> 23

Cys Ala Ser Asn Asn Arg Asp Ser Tyr Asn Ser Pro Leu His Phe

1 5 10 15

<210> 24

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.1 α 链CDR1域(氨基酸)

<400> 24

Tyr Ser Gly Ser Pro Glu

1 5

<210> 25

<211> 4

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.1 α 链CDR2域(氨基酸)

<400> 25

His Ile Ser Arg

1

<210> 26

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.1 α 链CDR3域(氨基酸)

<400> 26

Cys Ala Leu Arg Ser Gly Gly Tyr Gln Lys Val Thr Phe

1 5 10

<210> 27

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.2b β 链CDR1域(氨基酸)

<400> 27

Ser Gly Asp Leu Ser

1 5

<210> 28

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.2b β 链CDR2域(氨基酸)

<400> 28

Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu

1 5

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.2b β 链CDR3域(氨基酸)

<400> 29

Cys Ala Ser Ser Gln Gly Asp Glu Lys Leu Phe Phe

1 5 10

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.2b α 链CDR1域(氨基酸)

<400> 30

Asp Ser Ser Ser Thr Tyr

1 5

<210> 31

<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列1388.2b α 链CDR2域(氨基酸)
<400> 31
Ile Phe Ser Asn Met Asp Met
1 5
<210> 32
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列1388.2b α 链CDR3域(氨基酸)
<400> 32
Cys Ala Glu Ser Ile Asp Ala Arg Leu Met Phe
1 5 10
<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列1388.3 β 链CDR1域(氨基酸)
<400> 33
Gly Thr Ser Asn Pro Asn
1 5
<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列1388.3 β 链CDR2域(氨基酸)
<400> 34
Ser Val Gly Ile Gly
1 5
<210> 35
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.3 β 链CDR3域(氨基酸)

<400> 35

Cys Ala Leu Ser Thr Ser Tyr Glu Gln Tyr Phe

1 5 10

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.3 α 链CDR1域(氨基酸)

<400> 36

Thr Ser Glu Asn Asn Tyr Tyr

1 5

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.3 α 链CDR2域(氨基酸)

<400> 37

Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn

1 5

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.3 α 链CDR3域(氨基酸)

<400> 38

Cys Ala Phe Met Lys Ser His Ser Gly Tyr Ile Phe

1 5 10

<210> 39

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.1b β 链CDR1域(氨基酸)

<400> 39

Gly Thr Ser Asn Pro Asn

1 5

<210> 40

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.1b β 链CDR2域(氨基酸)

<400> 40

Ser Val Gly Ile Gly

1 5

<210> 41

<211> 13

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.1b β 链CDR3域(氨基酸)

<400> 41

Cys Ala Trp Ser Val Ala Val Asn Thr Glu Ala Phe Phe

1 5 10

<210> 42

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.1b α 链CDR1域(氨基酸)

<400> 42

Thr Ser Glu Asn Asn Tyr Tyr

1 5

<210> 43

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.1b α 链CDR2域(氨基酸)

<400> 43

Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn

1 5

<210> 44

<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列17804.1b α 链CDR3域(氨基酸)
<400> 44
Cys Ala Phe Gly Glu Gly Ala Arg Leu Met Phe
1 5 10
<210> 45
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列17804.2 β 链CDR1域(氨基酸)
<400> 45
Gly Thr Ser Asn Pro Asn
1 5
<210> 46
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列17804.2 β 链CDR2域(氨基酸)
<400> 46
Ser Ile Gly Ile Asp
1 5
<210> 47
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)
<220>
<223> 合成序列17804.2 β 链CDR3域(氨基酸)
<400> 47
Cys Ala Trp Ser Val Thr Arg His Asn Glu Gln Phe Phe
1 5 10
<210> 48
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.2 α 链CDR1域(氨基酸)

<400> 48

Lys Thr Leu Tyr Gly

1 5

<210> 49

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.2 α 链CDR2域(氨基酸)

<400> 49

Leu Gln Lys Gly Gly Glu Glu

1 5

<210> 50

<211> 19

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.2 α 链CDR3域(氨基酸)

<400> 50

Cys Gly Ala Ala Pro Thr Tyr Ser Asn Tyr Gly Gly Ser Gln Gly Asn

1 5 10 15

Leu Ile Phe

<210> 51

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列18648.2 α 链CDR3域(氨基酸)

<400> 51

Cys Ala Leu Arg Gly Leu Asn Tyr Gly Gln Asn Phe Val Phe

1 5 10

<210> 52

<211> 399

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.1 β 链可变域

<400> 52

atgggaatca ggctcctctg tcgtgtggcc ttttgtttcc tggctgtagg cctcgtagat	60
gtgaaagtaa cccagagctc gagatatcta gtcaaaagga cgggagagaa agtttttctg	120
gaatgtgtcc aggatatgga ccatgaaaat atgttctggt atcgacaaga cccaggtctg	180
gggctacggc tgatctatct ctcatatgat gttaaaatga aagaaaaagg agatattcct	240
gaggggtaca gtgtctctag agagaagaag gagcgcttct ccctgattct ggagtcgcc	300
agcaccaacc agacatctat gtacctctgc gccagcaaca acagagacag ctacaacagc	360
cccctccact ttgggaacgg gaccaggctc actgtgacg	399

<210> 53

<211> 531

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.1 β 链恒定域(天然NA)

<400> 53

gaggacctga acaaagtgtt cccccagag gtggccgtgt tcgagccttc tgaggccgag	60
atcagccaca cccagaaaagc caccctcgtg tgccctggcca ccggcttttt ccccgaccac	120
gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa gaggtgcact ccggcgtgtg caccgatccc	180
cagcctctga aagaacagcc cgccctgaac gacagccgtt actgcctgtc cagcagactg	240
agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc cggaaccact tcagatgcca ggtgcagttc	300
tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggacagag ccaagcccgt gacacagatc	360
gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat tgcggcttta cctccgtgtc ctatcagcag	420
ggcgtgctga gcgccaccat cctgtacgag atcctgctgg gcaaggccac actgtacgcc	480
gtgctggtgt ctgccctggt gctgatggcc atggtcaagc ggaaggactt c	531

<210> 54

<211> 384

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.1 α 链可变域(天然NA)

<400> 54

atgaagccca ccctcatctc agtgcctgtg ataatattha tactcagagg aacaagagcc	60
cagagagtga ctcagcccga gaagtcctc tctgtcttta aaggggcccc agtggagctg	120
aagtgcact attcctatct tgggagtcct gaactcttct ggtatgtcca gtactccaga	180
caacgcctcc agttactctt gagacacatc tctagagaga gcatcaaagg cttcactgct	240
gaccttaaca aaggcgagac atctttccac ctgaagaaac catttgctca agaggaagac	300
tcagccatgt attactgcgc cctgagaagc ggcggctacc agaaggtgac ctttggaact	360
ggaacaaagc tccaagtcac ccca	384

<210> 55

<211>	426	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成序列1388.1 α 链恒定域(天然NA)	
<400>	55	
gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag		60
tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaaatg tgtcacaaag taaggattct		120
gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac		180
agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc		240
attattccag aagacacett cttccccagc ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc		300
gagaaaagct ttgaaacaga tacgaaceta aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc		360
cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgtgcg gctgtggtcc		420
agctga		426
<210>	56	
<211>	399	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成序列1388.1 β 链可变域 (密码子优化的NA)	
<400>	56	
atgggaatta gactgctgtg ccgggtggcc ttctgcttcc tggctgtggg actggtggac		60
gtgaaagtga ccagagcag cagatactc gtgaagcgga ccggcgagaa ggtgttcctg		120
gaatgcgtgc aggacatgga ccacgagaat atgttctggt acagacagga ccccggcctg		180
ggcctgcggc tgatctactt cagctacgac gtgaagatga aggaaaagg cgacatcccc		240
gagggctaca gcgtgtccag agagaagaaa gagcggttca gcctgaccc ggaaagcgcc		300
agcaccaacc agaccagcat gtacctgtgc gcctccaaca accgggacag ctacaacagc		360
cccctgcact tcggcaacgg caccagactg accgtgacc		399
<210>	57	
<211>	531	
<212>	DNA	
<213>	人工序列(Artificial Sequence)	
<220>		
<223>	合成序列1388.1 β 链恒定域 (密码子优化的NA)	
<400>	57	
gaggacctga acaaagtgtt cccccagag gtggccgtgt tcgagccttc tgaggccgag		60
atcagccaca ccagaaaagc caccctcgtg tgcttgcca ccggcttttt ccccgaccac		120
gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa gaggtgcact ccggcgtgtg caccgatccc		180
cagcctctga aagaacagcc cgccctgaac gacagccgt actgcctgtc cagcagactg		240

agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc cggaaccact tcagatgcca ggtgcagttc 300
 tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggacagag ccaagcccgt gacacagatc 360
 gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat tgcggcttta cctccgtgtc ctatcagcag 420
 ggctgtctga gcgccaccat cctgtacgag atcctgctgg gcaaggccac actgtacgcc 480
 gtgctgggtg ctgccctggt gctgatggcc atggtaagc ggaaggactt c 531

<210> 58

<211> 390

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.2b α 链可变域(天然NA)

<400> 58

atgaagacat ttgctggatt ttcgttctg tttttgtggc tgcagctgga ctgtatgagt 60
 agaggagagg atgtggagca gagtcttttc ctgagtgtcc gagaggaga cagctccgtt 120
 ataaactgca cttacacaga cagctcctcc acctacttat actggtataa gcaagaacct 180
 ggagcaggtc tccagttgct gacgtatatt ttttcaaata tggacatgaa acaagaccaa 240
 agactcactg ttctattgaa taaaaaggat aaacatctgt ctctgcgcac tgcagacacc 300
 cagactgggg actcagctat ctacttctgt gcagagagta tcgatgccag actcatgttt 360
 ggagatggaa ctcagctggt ggtgaagccc 390

<210> 59

<211> 426

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.1 α 链恒定域(密码子优化的NA)

<400> 59

gacatccaga accccgaccc tgcagtgtac cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag 60
 agcgtgtgcc tgttcaccga cttcgacagc cagaccaacg tgtcccagag caaggacagc 120
 gacgtgtaca tcaccgataa gtgcgtgctg gacatgcgga gcatggactt caagagcaac 180
 agcgccgtgg cctgggtccaa caagagcgac ttcgcctgcg ccaacgcctt caacaacagc 240
 attatccccg aggacacatt cttcccaagc cccgagagca gctgcgacgt gaagctgggtg 300
 gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg aacttcaga acctcagcgt gatcggttc 360
 cggatcctgc tgctgaaggt ggccggcttc aacctgctga tgaccctgcg gctgtggtcc 420
 agctga 426

<210> 60

<211> 390

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.2b β 链可变域(天然NA)

<400> 60

atgggcttca ggctcctctg ctgtgtggcc ttttgtctcc tgggagcagg cccagtggat	60
tctggagtca cacaaacccc aaagcacctg atcacagcaa ctggacagcg agtgacgctg	120
agatgctccc ctaggtctgg agacctctct gtgtactggg accaacagag cctggaccag	180
ggcctccagt tcctcattca gtattataat ggagaagaga gagcaaaagg aaacattctt	240
gaacgattct ccgcacaaca gttccctgac ttgcactctg aactaaacct gagctctctg	300
gagctggggg actcagcttt gtatttctgt gccagcagcc agggggatga aaaactgttt	360
tttggcagtg gaacccagct ctctgtcttg	390

<210> 61

<211> 531

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.2b β 链恒定域(天然NA)

<400> 61

gaggacctga acaaagtgtt cccccagag gtggccgtgt tcgagccttc tgaggccgag	60
atcagccaca cccagaaagc caccctcgtg tgcctggcca ccggcttttt ccccgaccac	120
gtggaactgt cttgggtggg caacggcaaa gaggtgcact ccggcgtgtg caccgatccc	180
cagcctctga aagaacagcc cgccctgaac gacagccgtt actgcctgtc cagcagactg	240
agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc cggaaccact tcagatgcca ggtgcagttc	300
tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggacagag ccaagcccgt gacacagatc	360
gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat tgcggcttta cctccgtgtc ctatcagcag	420
ggcgtgctga gcgccacat cctgtacgag atcctgctgg gcaaggccac actgtacgcc	480
gtgctggtgt ctgccctggt gctgatggcc atggtcaagc ggaaggactt c	531

<210> 62

<211> 390

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.2b α 链可变域(天然NA)

<400> 62

atgaagacat ttgctggatt ttcgttctctg tttttgtggc tgcagctgga ctgtatgagt	60
agaggagagg atgtggagca gagtcttttc ctgagtgtcc gagaggaga cagctccgtt	120
ataaactgca ctacacaga cagctcctcc acctacttat actggtataa gcaagaacct	180
ggagcaggtc tccagttgct gacgtatatt ttttcaaata tggacatgaa acaagaccaa	240
agactcactg ttctattgaa taaaaaggat aaacatctgt ctctgcgcac tgcagacacc	300
cagactgggg actcagctat ctacttctgt gcagagagta tcgatgccag actcatgttt	360
ggagatggaa ctcagctggt ggtgaagccc	390

<210> 63	
<211> 426	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.2b α 链恒定域(天然NA)	
<400> 63	
gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag	60
tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaatg tgtcacaag taaggattct	120
gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac	180
agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac ttgtcatgtg caaacgcctt caacaacagc	240
attattccag aagacacett cttccccagc ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc	300
gagaaaagct ttgaaacaga tacgaacctt aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc	360
cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgtgcg gctgtggtcc	420
agctga	426
<210> 64	
<211> 390	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.2b β 链可变域(密码子优化的NA)	
<400> 64	
atgggcttca gactgctgtg ctgcgtggcc ttctgtctgc tgggagccgg ccctgtggat	60
agcggcgtga cacagacacc caagcacctg atcacgccca ccggccagcg cgtgacactg	120
agatgtagcc ctagaagcgg cgacctgagc gtgtactggt atcagcagag cctggaccag	180
ggcctgcagt tcctgatcca gtactacaac ggcgaggaaac gggccaaggg caacatcctg	240
gaacggttca gcgcccagca gttccccgat ctgcacagcg agctgaacct gagcagcctg	300
gaactgggcg acagcgccct gtactttctgt gccagttctc agggcgacga gaagctgttc	360
ttcggcagcg gcacacagct gagcgtgctg	390
<210> 65	
<211> 531	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.2b β 链恒定域(密码子优化的NA)	
<400> 65	
gaagatctga acaaggtgtt cccccagag gtggccgtgt tcgagccttc tgaggccgag	60
atcagccaca ccagaaaagc caccctcgtg tgccctggcca ccggcttttt ccccgaccac	120
gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa gaggtgcact ccggcgtgtg caccgatccc	180

cagcctctga aagaacagcc cgccctgaac gacagccggt actgcctgtc cagcagactg	240
agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc cggaaccact tcagatgcca ggtgcagttc	300
tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggacagag ccaagcccgt gaccagatc	360
gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat tgcggcttta ccagcgtgtc ctatcagcag	420
ggcgtgtctga gcgccaccat cctgtacgag atcctgctgg gcaaggccac cctgtacgcc	480
gtgctggtgt ctgccctggt gctgatggcc atgggtcaagc ggaaggactt c	531

<210> 66

<211> 390

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.2b α 链可变域 (密码子优化的NA)

<400> 66

atgaagacct tcgccggtt cagcttctg ttctgtggc tgcagctgga ctgcatgagc	60
agaggcgagg acgtggaaca gagcctgttt ctgtccgtgc gcgaggcgca ctccagcgtg	120
atcaattgca cctacaccga cagcagcagc acctacctgt attggtacaa gcaggaaccc	180
ggcgtggcc tgcagctgct gacctacatc ttcagcaaca tggacatgaa gcaggaccag	240
cggctgaccg tgctgtgtaa caagaaggat aagcacctgt ccctgcgat cgccgatacc	300
cagacaggcg actccgcat ctacttttgc gccgagagca tcgacgcccg gctgatgttt	360
ggagatggca cccagctggt cgtgaagccc	390

<210> 67

<211> 426

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.2b α 链恒定域 (密码子优化的NA)

<400> 67

gacatccaga accccgaccc tgcagtgtac cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag	60
agcgtgtgcc tgttcaccga cttcgacagc cagaccaacg tgtcccagag caaggacagc	120
gacgtgtaca tcaccgataa gtgcgtgctg gacatgcgga gcatggactt caagagcaac	180
agcgccgtgg cctgggtccaa caagagcgac ttgcctgcg ccaacgcctt caacaacagc	240
attatccccg aggacacatt cttcccaagc cccgagagca gctgcgacgt gaagctggtg	300
gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg aacttcaga acctcagcgt gatcggttc	360
cggatcctgc tgctgaaggt ggccggttc aacctgctga tgaccctgcg gctgtggtcc	420
agctga	426

<210> 68

<211> 381

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.3 β 链可变域(天然NA)

<400> 68

atgctctgct ctctccttgc ccttctcctg ggcactttct ttggggtcag atctcagact	60
attcatcaat ggccagcgac cctgggtgcag cctgtgggca gcccgtcttc tctggagtgc	120
actgtggagg gaacatcaaa ccccaacctt tactgggtacc gacaggctgc aggcaggggc	180
ctccagctgc tcttctactc cgttgggtatt ggccagatca gctctgaggt gccccagaat	240
ctctcagcct ccagacccca ggaccggcag ttcattctga gttctaagaa gctccttctc	300
agtgactctg gcttctatct ctgcgcctg agcaccagct acgagcagta cttcgggccc	360
ggcaccaggc tcacggtcac a	381

<210> 69

<211> 537

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.3 β 链恒定域(天然NA)

<400> 69

gacctgaaaa acgtgttccc acccgaggtc gctgtgtttg agccatcaga agcagagatc	60
tccacacccc aaaaggccac actgggtgtgc ctggccacag gcttctaccc cgaccacgtg	120
gagctgagct ggtgggtgaa tgggaaggag gtgcacagtg gggctctgcac agaccgcag	180
cccctcaagg agcagcccg cctcaatgac tccagatact gcctgagcag ccgcctgagg	240
gtctcggcca ccttctggca gaacccccgc aaccacttcc gctgtcaagt ccagttctac	300
gggctctcgg agaattgacga gtggaccacg gatagggcca aacctgtcac ccagatcgtc	360
agcgcgcagg cctggggtag agcagactgt ggcttcacct ccgagtctta ccagcaaggg	420
gtcctgtctg ccaccatcct ctatgagatc ttgctaggga aggccacctt gtatgccgtg	480
ctgggtcagtg ccctcgtgct gatggccatg gtcaagagaa aggattccag aggctag	537

<210> 70

<211> 399

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.3 α 链可变域(天然NA)

<400> 70

atgacacgag ttagcttgcgt gtgggcagtc gtgggtctcca cctgtcttga atccggcatg	60
gcccagacag tcaactcagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gactgtgacc	120
ctgagttgca catatgacac cagtgagaat aattattatt tgttctggta caagcagcct	180
cccagcaggc agatgattct cgttattcgc caagaagctt ataagcaaca gaatgcaacg	240
gagaatcggt tctctgtgaa cttccagaaa gcagccaaat ccttcagtct caagatctca	300
gactcacagc tgggggacac tgcgatgtat ttctgtgctt tcatgaagtc ccactccgga	360

tacatctttg gaacaggcac caggctgaag gttttagca	399
<210> 71	
<211> 426	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.3 α 链恒定域(天然NA)	
<400> 71	
gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag	60
tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaatg tgtcacaag taaggattct	120
gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac	180
agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc	240
attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc	300
gagaaaagct ttgaaacaga tacgaacctt aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc	360
cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgtgcg gctgtggtcc	420
agctga	426
<210> 72	
<211> 381	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.3 β 链可变域(密码子优化的NA)	
<400> 72	
atgctgtgtt ctctgctggc cctgctgctg ggcaccttct ttggagtgcg gagccagacc	60
atccaccagt ggctgctac actggtgcag cctgtgggca gccctctgag cctggaatgt	120
accgtggaag gcaccagcaa cccaacctg tactggtaca gacaggccgc tggcagaggc	180
ctgcagctgc tgttttacag cgtgggcata ggccagatca gcagcgaggt gccccagaat	240
ctgagcgcca gcagacccca ggaccggcag tttatcctga gcagcaagaa gctgctgctg	300
agcgacagcg gcttctacct gtgtgccctg agcaccagct acgagcagta cttcggccca	360
ggcaccagac tgaccgtgac c	381
<210> 73	
<211> 534	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.3 β 链恒定域(密码子优化的NA)	
<400> 73	
gacctgaaga acgtgttccc cccagaggtg gccgtgttcg agccttctga ggccgagatc	60
agccacaccc agaaagccac cctcgtgtgt ctggccaccg gctttttacc cgaccacgtg	120

gaactgtcctt ggtgggtcaa cggcaaagag gtgcactccg gcggtgtgcac cgatccccag	180
cctctgaaag aacagccccg cctgaacgac agccggtact gcctgtccag cagactgaga	240
gtgtccgcca ccttctggca gaacccccgg aaccacttca gatgccaggt gcagttctac	300
ggcctgagcg agaacgacga gtggaccag gacagagcca agcccgtgac ccagatcgtg	360
tctgccgaag cctggggcag agccgattgc ggctttacca gcgagagcta ccagcagggc	420
gtgctgtctg ccaccatcct gtacgagatc ctgctgggaa aggccaccct gtacgccgtg	480
ctgggtgtctg ccctggtgct gatggccatg gtcaagcgga aggacagcag aggc	534

<210> 74

<211> 399

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.3 α 链可变域 (密码子优化的NA)

<400> 74

atgaccgagg tgctactgct gtgggctgtg gtggtgtcca cctgtctgga aagcgcatg	60
gcccagaccg tgacacagtc ccagcctgag atgagcgtgc aggaagccga gacagtgacc	120
ctgagctgca cctacgacac ctccgagaac aactactacc tgttttggtg caagcagccc	180
cccagccggc agatgatcct cgtgatcaga caggaagcct ataagcagca gaacgccacc	240
gagaacagat tcagcgtgaa cttccagaag gccgccaaga gcttttagcct gaagatcagc	300
gacagccagc tgggcgacac cgccatgtac ttttgcgcct ttatgaagtc ccacagcggc	360
tacatcttcg gcaccggcac acggctgaaa gtgctggct	399

<210> 75

<211> 426

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列1388.3 α 链恒定域 (密码子优化的NA)

<400> 75

gacatccaga accccgaccc tgcagtgtac cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag	60
agcgtgtgcc tgttcaccga cttcgacagc cagaccaacg tgtcccagag caaggacagc	120
gacgtgtaca tcaccgataa gtgcgtgctg gacatgcgga gcatggactt caagagcaac	180
agcgccgtgg cctgggtcaa caagagcgac ttcgcctgcg ccaacgcctt caacaacagc	240
attatccccg aggacacatt cttcccaagc cccgagagca gctgcgacgt gaagctggtg	300
gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg aacttcaga acctcagcgt gatcggttc	360
cggatcctgc tgctgaaggt ggccggcttc aacctgctga tgaccctgcg gctgtggtcc	420
agctga	426

<210> 76

<211> 387

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.1b β 链可变域(天然NA)

<400> 76

atgctctgct ctctccttgc ctttctcctg ggcactttct ttggggtcag atctcagact	60
attcatcaat ggccagcgac cctggtgcag cctgtgggca gcccgccttc tctggagtgc	120
actgtggagg gaacatcaaa ccccaaccta tactggtacc gacaggctgc aggcaggggc	180
ctccagctgc tcttctactc cgttggtatt ggccagatca gctctgaggt gccccagaat	240
ctctcagcct ccagacccca ggaccggcag ttcctcctga gttctaagaa gctccttctc	300
agtgactctg gcttctatct ctgtgcctgg agtggtgcgg tgaacactga agctttcttt	360
ggacaaggca ccagactcac agttgta	387

<210> 77

<211> 531

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.1b β 链恒定域(天然NA)

<400> 77

gaggacctga acaaagtgtt cccccagag gtggccgtgt tcgagccttc tgaggccgag	60
atcagccaca cccagaaagc caccctcgtg tgcctggcca ccggcttttt ccccgaccac	120
gtggaactgt cttgggtgggt caacggcaaa gaggtgcact ccggcgtgtg caccgatccc	180
cagcctctga aagaacagcc cgccctgaac gacagccgtt actgcctgtc cagcagactg	240
agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc cggaaccact tcagatgcca ggtgcagttc	300
tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggacagag ccaagcccgt gacacagatc	360
gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat tgcggcttta cctccgtgtc ctatcagcag	420
ggcgtgctga gcgccaccat cctgtacgag atcctgctgg gcaaggccac actgtacgcc	480
gtgctggtgt ctgccctggt gctgatggcc atgggtcaagc ggaaggactt c	531

<210> 78

<211> 396

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.1b α 链可变域(天然NA)

<400> 78

atgacacgag ttagcttgct gtgggcagtc gtggtctcca cctgtcttga atccggcatg	60
gccagacag tcaactcagtc tcaaccagag atgtctgtgc aggaggcaga gactgtgacc	120
ctgagttgca catatgacac cagtgagaat aattattatt tgttctggta caagcagcct	180
cccagcaggc agatgattct cgttattcgc caagaagctt ataagcaaca gaatgcaacg	240
gagaatcggt tctctgtgaa cttccagaaa gcagccaaat ccttcagtct caagatctca	300

gactcacagc tgggggacac tgcgatgtat ttctgcgcct tcggcgaggg cgccagactc	360
atgttttgag atggaactca gctggtggtg aagccc	396
<210> 79	
<211> 426	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列17804.1b α 链恒定域(天然NA)	
<400> 79	
gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag	60
tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaatg tgtcacaag taaggattct	120
gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac	180
agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac ttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc	240
attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc	300
gagaaaagct ttgaaacaga tacgaacctt aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc	360
cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgtgcg gctgtggtcc	420
agctga	426
<210> 80	
<211> 387	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列17804.1b β 链可变域(密码子优化的NA)	
<400> 80	
atgctgtgtt ctctgctggc cctgctgctg ggcaccttct ttggagtgcg gagccagacc	60
atccaccagt ggccgtgtac actggtgcag cctgtgggca gccctctgag cctggaatgt	120
accgtggaag gcaccagcaa cccaacctg tactggtaca gacaggccgc tggcagaggc	180
ctgcagctgc tgttttacag cgtgggcac ggccagatca gcagcgaggt gccccagaat	240
ctgagcgcca gcagaccca ggaccggcag tttatcctga gcagcaagaa gctgctgctg	300
agcgacagcg gcttctacct gtgcgcttgg agcgtggccg tgaacaccga ggcattcttt	360
gggcagggca cccggctgac cgtggtg	387
<210> 81	
<211> 531	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列17804.1b β 链恒定域(密码子优化的NA)	
<400> 81	
gaagatctga acaaggtgtt cccccagag gtggccgtgt tcgagccttc tgaggccgag	60

atcagccaca cccagaaagc caccctcgtg tgcctggcca cgggcttttt ccccgaccac	120
gtggaactgt cttgggtgggt caacggcaaa gaggtgcact cgggcgtgtg caccgatccc	180
cagcctctga aagaacagcc cgccctgaac gacagccggt actgcctgtc cagcagactg	240
agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc cggaaccact tcagatgcca ggtgcagttc	300
tacggcctga gcgagaacga cgagtggacc caggacagag ccaagcccgt gaccagatc	360
gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat tgcggcttta ccagcgtgtc ctatcagcag	420
ggcgtgctgt ctgccacat cctgtacgag atcctgctgg gaaaggccac cctgtacgcc	480
gtgctggtgt ctgccctggt gctgatggcc atggtcaagc ggaaggactt c	531

<210> 82

<211> 396

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.1b α 链可变域 (密码子优化的NA)

<400> 82

atgaccagag tgtctctgct gtgggctgtg gtggtgtcca cctgtctgga aagcggcatg	60
gccagaccg tgacacagtc ccagcctgag atgagcgtgc aggaagccga gacagtgacc	120
ctgagctgca cctacgacac cagcgagaac aactactacc tgttttggtg caagcagccc	180
cccagccggc agatgatcct cgtgatcaga caggaagcct ataagcagca gaacgccacc	240
gagaacagat tcagcgtgaa cttccagaag gccgccaaga gcttcagcct gaagatcagc	300
gacagccagc tgggcgacac cgccatgtac ttttgcgcct ttggcgaggg cgccagactg	360
atgtttggcg acggaacca gctggtcgtg aagccc	396

<210> 83

<211> 426

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.1b α 链恒定域 (密码子优化的NA)

<400> 83

gacatccaga accccgaccc tgcagtgtac cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag	60
agcgtgtgcc tgttcaccga cttcgacagc cagaccaacg tgtcccagag caaggacagc	120
gacgtgtaca tcaccgataa gtgcgtgctg gacatgcgga gcatggactt caagagcaac	180
agcgccgtgg cctgggtccaa caagagcgac ttcgcctgcg ccaacgcctt caacaacagc	240
attatccccg aggacacatt cttcccaagc ccgagagca gctgcgacgt gaagctggtg	300
gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg aacttccaga acctcagcgt gatcggttc	360
cggatcctgc tgctgaaggt ggccggcttc aacctgctga tgaccctgcg gctgtggtcc	420
agctga	426

<210> 84

<211> 387

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.2 β 链可变域(天然NA)

<400> 84

atgctctgct ctctccttgc ctttctcctg ggcactttct ttggggtcag atctcagact	60
attcatcaat ggccagcgac cctgggtgcag cctgtgggca gcccgtcttc tctggagtgc	120
actgtggagg gaacatcaaa cccaaccta tactgggtacc gacaggctgc aggcaggggc	180
ctccagctgc tcttctactc cattgggtatt gaccagatca gctctgaggt gccccagaat	240
ctctcagcct ccagacccca ggaccggcag ttcattctga gttctaagaa gctcctcctc	300
agtgactctg gcttctatct ctgtgcctgg agtgtaacca ggcacaatga gcagttcttc	360
gggccaggga cacggctcac cgtgcta	387

<210> 85

<211> 537

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.2 β 链恒定域(天然NA)

<400> 85

gacctgaaaa acgtgttccc acccgaggtc gctgtgtttg agccatcaga agcagagatc	60
tcccacaccc aaaaggccac actgggtgtgc ctggccacag gcttctaccc cgaccacgtg	120
gagctgagct ggtgggtgaa tgggaaggag gtgcacagtg gggctctgcac agaccgcag	180
cccctcaagg agcagcccg cctcaatgac tccagatact gcctgagcag ccgcctgagg	240
gtctcggcca ccttctggca gaacccccgc aaccacttcc gctgtcaagt ccagttctac	300
gggctctcgg agaatgacga gtggaccag gatagggcca aacctgtcac ccagatcgtc	360
agcgcagagg cctggggtag agcagactgt ggcttcacct ccgagtctta ccagcaaggg	420
gtcctgtctg ccaccatcct ctatgagatc ttgctagga aggccacctt gtatgccgtg	480
ctggtcagtg ccctcgtgct gatggccatg gtcaagagaa aggattccag aggctag	537

<210> 86

<211> 405

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.2 α 链可变域(天然NA)

<400> 86

atgctgtgca gcctgctggc cctgctgctg ggcaccttct tcgagcccag aaccagccaa	60
gaactggagc agagtcctca gtccttgatc gtccaagagg gaaagaatct caccataaac	120
tgcacgtcat caaagacgtt atatggctta tactgggtata agcaaaagta tggtgaaggt	180
cttatcttct tgatgatgct acagaaaagg ggggaagaga aaagtcatga aaagataact	240

gccaagttgg atgagaaaaa gcagcaaagt tccctgcata tcacagcctc ccagcccagc	300
catgcaggca tctacctctg tggagcagcc cctacatact cgaattatgg aggaagccaa	360
ggaaatctca tctttggaaa aggcactaaa ctctctgtta aacca	405
<210> 87	
<211> 426	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列17804.2 α 链恒定域(天然NA)	
<400> 87	
gatatccaga accctgaccc tgccgtgtac cagctgagag actctaaatc cagtgacaag	60
tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct caaacaatg tgtcacaag taaggattct	120
gatgtgtata tcacagacaa atgtgtgcta gacatgaggt ctatggactt caagagcaac	180
agtgtgtgg cctggagcaa caaatctgac tttgcatgtg caaacgcctt caacaacagc	240
attattccag aagacacctt cttccccagc ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc	300
gagaaaagct ttgaaacaga tacgaaccta aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc	360
cgaatcctcc tcctgaaagt ggccgggttt aatctgctca tgacgtgcg gctgtggtcc	420
agctga	426
<210> 88	
<211> 387	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列17804.2 β 链可变域(密码子优化的NA)	
<400> 88	
atgctgtgtt ctctgctggc tctgctgctg ggcaccttct ttggagtgcg gagccagacc	60
atccaccagt ggcctgctac actggtgcag cctgtgggca gccctctgag cctggaatgt	120
accgtggaag gcaccagcaa cccaacctg tactggtaca gacaggccgc tggcagaggc	180
ctgcagctgc tgttttacag catcggcatc gaccagatca gcagcgaggt gccccagAAC	240
ctgagcgcca gcagacccca ggaccggcag tttatcctga gcagcaagaa gctgctgctg	300
agcgacagcg gcttctacct gtgcgcttgg agcgtgaccc ggcacaacga gcagttcttt	360
ggccctggca cccggctgac cgtgctg	387
<210> 89	
<211> 534	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列17804.2 β 链恒定域(密码子优化的NA)	
<400> 89	

gacctgaaga acgtgttccc cccagaggtg gccgtgttcg agccttctga ggccgagatc	60
agccacaccc agaaagccac cctcgtgtgt ctggccaccg gcttttaccg cgaccacgtg	120
gaactgtctt ggtgggtcaa cggcaaagag gtgcactccg gcgtgtgcac cgatccccag	180
cctctgaaag aacagcccgc cctgaacgac agccggtact gcctgtccag cagactgaga	240
gtgtccgcca ccttctggca gaacccccgg aaccacttca gatgccaggt gcagttctac	300
ggcctgagcg agaacgacga gtggaccag gacagagcca agcccgtgac ccagatcgtg	360
tctgccgaag cctggggcag agccgattgc ggctttacca gcgagagcta ccagcagggc	420
gtgctgtctg ccaccatcct gtacgagatc ctgctgggaa aggccaccct gtacgccgtg	480
ctgggtgtctg ccctgggtgt gatggccatg gtcaagcgga aggacagcag aggc	534

<210> 90

<211> 405

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.2 α 链可变域 (密码子优化的NA)

<400> 90

atgctgtgca gcctgctggc cctgctgtgt ggaacatttt tcgagccccg gaccagccag	60
gaactggaac agagcccaca gaggctgac gtgcaggaag gcaagaacct gaccatcaac	120
tgcaccagct ccaagacact gtacggcctg tatttggtata agcagaagta cggcgagggc	180
ctgatcttcc tgatgatgct gcagaagggc ggcgaggaaa agagccacga gaagatcacc	240
gccaaagctgg acgagaagaa gcagcagtc agcctgcaca tcaccgcctc ccagccttct	300
cacgccggca tctatctgtg tggcgccgct cccacctaca gcaactatgg cggcagccag	360
ggcaatctga tcttcggcaa gggcaccaag ctgagcgtga agccc	405

<210> 91

<211> 426

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17804.2 α 链恒定域 (密码子优化的NA)

<400> 91

gacatccaga accccgaccc tgcagtgtac cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag	60
agcgtgtgcc tgttcaccga cttcgacagc cagaccaacg tgtcccagag caaggacagc	120
gacgtgtaca tcaccgataa gtgcgtgtgt gacatgcgga gcatggactt caagagcaac	180
agcgccgtgg cctgggtccaa caagagcgac ttcgcctgcg ccaacgcctt caacaacagc	240
attatccccg aggacacatt cttcccaagc cccgagagca gctgcgacgt gaagctggtg	300
gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg aacttcaga acctcagcgt gatecgcttc	360
cggatcctgc tgctgaaggt ggccggcttc aacctgctga tgaccctgcg gctgtgtgtcc	420
agctga	426

<210> 92

<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.1 β 链CDR1域(密码子优化的NA)	
<400> 92	
atggaccacg agaat	15
<210> 93	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.1 β 链CDR2域(密码子优化的NA)	
<400> 93	
agctacgacg tgaagatg	18
<210> 94	
<211> 45	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.1 β 链CDR3域(密码子优化的NA)	
<400> 94	
tgcgcctcca acaaccggga cagctacaac agccccctgc acttc	45
<210> 95	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.1 α 链CDR1域(密码子优化的NA)	
<400> 95	
tacagcggca gccccgag	18
<210> 96	
<211> 12	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.1 α 链CDR2域(密码子优化的NA)	
<400> 96	
cacatcagca ga	12

<210> 97	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.1 α 链CDR3域(密码子优化的NA)	
<400> 97	
tgcgccctga gatccggcgg ctaccagaaa gtgacattt	39
<210> 98	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.2b β 链CDR1域(密码子优化的NA)	
<400> 98	
agcggcgacc tgagc	15
<210> 99	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.2b β 链CDR2域(密码子优化的NA)	
<400> 99	
tactacaacg gcgaggaa	18
<210> 100	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.2b β 链CDR3域(密码子优化的NA)	
<400> 100	
tactacaacg gcgaggaa	18
<210> 101	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.2b α 链CDR1域(密码子优化的NA)	
<400> 101	

gacagcagca gcacctac	18
<210> 102	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.2b α 链CDR2域(密码子优化的NA)	
<400> 102	
atcttcagca acatggacat g	21
<210> 103	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.2b α 链CDR3域(密码子优化的NA)	
<400> 103	
tgcgccgaga gcatcgacgc ccggctgatg ttt	33
<210> 104	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.3 β 链CDR1域(密码子优化的NA)	
<400> 104	
ggcaccagca accccaac	18
<210> 105	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.3 β 链CDR2域(密码子优化的NA)	
<400> 105	
agcgtgggca tcggc	15
<210> 106	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.3 β 链CDR3域(密码子优化的NA)	

<400> 106	
tgtgccctga gcaccagcta cgagcagtac ttc	33
<210> 107	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.3 α 链CDR1域(密码子优化的NA)	
<400> 107	
acctccgaga acaactacta c	21
<210> 108	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.3 α 链CDR2域(密码子优化的NA)	
<400> 108	
caggaagcct ataagcagca gaac	24
<210> 109	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列1388.3 α 链CDR3域(密码子优化的NA)	
<400> 109	
tgcgccttta tgaagtccca cagcggctac atcttcggc	39
<210> 110	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列17084.1b β 链CDR1域(密码子优化的NA)	
<400> 110	
ggcaccagca accccaac	18
<210> 111	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	

<223> 合成序列17084.1b β 链CDR2域(密码子优化的NA)	
<400> 111	
agcgtgggca tcggc	15
<210> 112	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列17084.1b β 链CDR3域(密码子优化的NA)	
<400> 112	
tgcgcttgga gcgtggccgt gaacaccgag gcattcttt	39
<210> 113	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列17084.1b α 链CDR1域(密码子优化的NA)	
<400> 113	
accagcgaga acaactacta c	21
<210> 114	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列17084.1b α 链CDR2域(密码子优化的NA)	
<400> 114	
caggaagcct ataagcagca gaac	24
<210> 115	
<211> 33	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列17084.1b α 链CDR3域(密码子优化的NA)	
<400> 115	
tgcgcctttg gcgaggcg cagactgatg ttt	33
<210> 116	
<211> 18	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	

<220>	
<223> 合成序列17084.2 β 链CDR1域(密码子优化的NA)	
<400> 116	
ggcaccagca accccaac	18
<210> 117	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列17084.2 β 链CDR2域(密码子优化的NA)	
<400> 117	
agcatcggca tcgac	15
<210> 118	
<211> 39	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列17084.2 β 链CDR3域(密码子优化的NA)	
<400> 118	
tgcgcttgga gcgtgacccg gcacaacgag cagttcttt	39
<210> 119	
<211> 15	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列17084.2 α 链CDR1域(密码子优化的NA)	
<400> 119	
aagacactgt acggc	15
<210> 120	
<211> 21	
<212> DNA	
<213> 人工序列(Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列17084.2 α 链CDR2域(密码子优化的NA)	
<400> 120	
ctgcagaagg gcggcgagga a	21
<210> 121	
<211> 57	
<212> DNA	

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列17084.2 α 链CDR3域 (密码子优化的NA)

<400> 121

tgtggcgccg ctccaccta cagcaactat ggcggcagcc agggcaatct gatcttc

57

<210> 122

<211> 309

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人类MAGE-A1(氨基酸)

<400> 122

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

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

305

<210> 123

<211> 9

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列人类MAGE-A1 278-286

<400> 123

Lys Val Leu Glu Tyr Val Ile Lys Val

1

5

<210> 124

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列猪捷申病毒-1 2A(P2A) 肽

<400> 124

Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val

1

5

10

15

Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20

<210> 125

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列口蹄疫病毒2A(F2A) 肽

<400> 125

Gly Ser Gly Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala
 1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro
 20 25

<210> 126

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列马甲型鼻炎病毒 (ERAV) 2A (E2A) 肽

<400> 126

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
 1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro
 20

<210> 127

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列明脉扁刺蛾病毒2A (T2A) 肽

<400> 127

Leu Glu Gly Gly Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp
 1 5 10 15

Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Arg
 20

<210> 128

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列猪捷申病毒-1 2A (P2A) 肽 (NA)

<400> 128

ggaagcggag ctactaactt cagcctgctg aagcaggctg gagacgtgga ggagaaccct 60
 ggacct 66

<210> 129

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列猪捷申病毒-1 2A (P2A) 肽 (CO-NA)	
<400> 129	
ggttccggag ccacgaactt ctctctgtta aagcaagcag gagacgtgga agaaaacccc	60
ggtccc	66
<210> 130	
<211> 75	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列口蹄疫病毒2A (F2A) 肽 (NA)	
<400> 130	
ggaagcggag tgaaacagac ttggaatttt gaccttctca agttggcggg agacgtggag	60
tccaaccctg gacct	75
<210> 131	
<211> 69	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列马甲型鼻炎病毒 (ERAV) 2A (E2A) 肽 (NA)	
<400> 131	
ggaagcggac agtgtactaa ttatgctctc ttgaaattgg ctggagatgt tgagagcaac	60
cctggacct	69
<210> 132	
<211> 63	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列明脉扁刺蛾病毒2A (T2A) 肽 (NA)	
<400> 132	
ggaagcggag agggcagagg aagtctgcta acatgcggtg acgtcgagga gaatcctgga	60
cct	63
<210> 133	
<211> 15	
<212> PRT	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列甘氨酸-丝氨酸连接子	

<400> 133

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 134

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列甘氨酸-丝氨酸连接子

<400> 134

Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly
1 5 10 15

Ser Ser

<210> 135

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列sgRNA正向寡聚物:

TRAC_sgRNA_pLenti_F1

<400> 135

caccggagaa tcaaaatcgg tgaat

25

<210> 136

<211> 25

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列sgRNA反向寡聚物:

TRAC_sgRNA_pLenti_R1

<400> 136

aaacattcac cgattttgat tctcc

25

<210> 137

<211> 24

<212> DNA

<213> 人工序列 (Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列sgRNA正向寡聚物:

PD1_sgRNA_F1

<400> 137

caccgcagtt gtgtgacacg gaag	24
<210> 138	
<211> 24	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列sgRNA反向寡聚物:	
PD1_sgRNA_R1	
<400> 138	
aaaccttccg tgtcacacaa ctgc	24
<210> 139	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列sgRNA正向寡聚物:	
CTLA4_sgRNA_F1	
<400> 139	
caccggcaaa ggtgagtgag acttt	25
<210> 140	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列sgRNA反向寡聚物:	
CTLA4_sgRNA_R1	
<400> 140	
aaacaaagtc tcactcacct ttgcc	25
<210> 141	
<211> 25	
<212> DNA	
<213> 人工序列 (Artificial Sequence)	
<220>	
<223> 合成序列sgRNA正向寡聚物:	
LAG3_sgRNA_F1	
<400> 141	
caccggtttc tgcagccgct ttggg	25
<210> 142	
<211> 25	

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列sgRNA反向寡聚物:

LAG3_sgRNA_R2

<400> 142

aaacccccaaa gcggtgcag aaacc

25

<210> 143

<211> 214

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列CD8共受体 α 链

<400> 143

Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu Gly Glu

1 5 10 15

Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly

20 25 30

Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Phe

35 40 45

Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp

50 55 60

Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val Leu Thr

65 70 75 80

Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala

85 90 95

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu

100 105 110

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala

115 120 125

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg

130 135 140

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys

145 150 155 160

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu

165 170 175

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg

180 185 190

Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser Gly Asp Lys Pro Ser

195	200	205
Leu Ser Ala Arg Tyr Val		
210		
<210> 144		
<211> 189		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 合成序列"CD8共受体β链同工型1		
<400> 144		
Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val		
1 5 10 15		
Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr		
20 25 30		
Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp Ser His His Glu Phe		
35 40 45		
Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val		
50 55 60		
Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala Ser Arg Phe Ile Leu		
65 70 75 80		
Asn Leu Thr Ser Val Lys Pro Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Phe Cys Met		
85 90 95		
Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Gln Leu Ser		
100 105 110		
Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala Gln Pro Thr Lys Lys Ser Thr		
115 120 125		
Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly		
130 135 140		
Pro Leu Cys Ser Pro Ile Thr Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly Val Leu		
145 150 155 160		
Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Val Ala Ile His Leu Cys Cys Arg Arg		
165 170 175		
Arg Arg Ala Arg Leu Arg Phe Met Lys Gln Phe Tyr Lys		
180 185		
<210> 145		
<211> 200		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		

<223> 合成序列CD8共受体β链同工型2

<400> 145

```

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

```

<210> 146

<211> 225

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列CD8共受体β链同工型3

<400> 146

```

Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val
1           5           10           15
Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr
           20           25           30

```

Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp Ser His His Glu Phe
 35 40 45
 Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val
 50 55 60
 Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala Ser Arg Phe Ile Leu
 65 70 75 80
 Asn Leu Thr Ser Val Lys Pro Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Phe Cys Met
 85 90 95
 Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Gln Leu Ser
 100 105 110
 Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala Gln Pro Thr Lys Lys Ser Thr
 115 120 125
 Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly
 130 135 140
 Pro Leu Cys Ser Pro Ile Thr Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly Val Leu
 145 150 155 160
 Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Val Ala Ile His Leu Cys Cys Arg Arg
 165 170 175
 Arg Arg Ala Arg Leu Arg Phe Met Lys Gln Lys Phe Asn Ile Val Cys
 180 185 190
 Leu Lys Ile Ser Gly Phe Thr Thr Cys Cys Cys Phe Gln Ile Leu Gln
 195 200 205
 Ile Ser Arg Glu Tyr Gly Phe Gly Val Leu Leu Gln Lys Asp Ile Gly
 210 215 220

Gln

225

<210> 147

<211> 225

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列CD8共受体β链同工型4

<400> 147

Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val
 1 5 10 15
 Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr
 20 25 30
 Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp Ser His His Glu Phe
 35 40 45

Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val
 50 55 60
 Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala Ser Arg Phe Ile Leu
 65 70 75 80
 Asn Leu Thr Ser Val Lys Pro Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Phe Cys Met
 85 90 95
 Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Gln Leu Ser
 100 105 110
 Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala Gln Pro Thr Lys Lys Ser Thr
 115 120 125
 Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly
 130 135 140
 Pro Leu Cys Ser Pro Ile Thr Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly Val Leu
 145 150 155 160
 Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Val Ala Ile His Leu Cys Cys Arg Arg
 165 170 175
 Arg Arg Ala Arg Leu Arg Phe Met Lys Gln Lys Phe Asn Ile Val Cys
 180 185 190
 Leu Lys Ile Ser Gly Phe Thr Thr Cys Cys Cys Phe Gln Ile Leu Gln
 195 200 205
 Ile Ser Arg Glu Tyr Gly Phe Gly Val Leu Leu Gln Lys Asp Ile Gly
 210 215 220

Gln

225

<210> 148

<211> 222

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 合成序列CD8共受体β链同工型5

<400> 148

Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val
 1 5 10 15
 Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr
 20 25 30
 Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp Ser His His Glu Phe
 35 40 45
 Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val
 50 55 60

Glu	Gln	Glu	Lys	Ile	Ala	Val	Phe	Arg	Asp	Ala	Ser	Arg	Phe	Ile	Leu
65					70					75					80
Asn	Leu	Thr	Ser	Val	Lys	Pro	Glu	Asp	Ser	Gly	Ile	Tyr	Phe	Cys	Met
				85						90					95
Ile	Val	Gly	Ser	Pro	Glu	Leu	Thr	Phe	Gly	Lys	Gly	Thr	Gln	Leu	Ser
				100						105					110
Val	Val	Asp	Phe	Leu	Pro	Thr	Thr	Ala	Gln	Pro	Thr	Lys	Lys	Ser	Thr
				115						120					125
Leu	Lys	Lys	Arg	Val	Cys	Arg	Leu	Pro	Arg	Pro	Glu	Thr	Gln	Lys	Gly
				130						135					140
Pro	Leu	Cys	Ser	Pro	Ile	Thr	Leu	Gly	Leu	Leu	Val	Ala	Gly	Val	Leu
145					150					155					160
Val	Leu	Leu	Val	Ser	Leu	Gly	Val	Ala	Ile	His	Leu	Cys	Cys	Arg	Arg
				165						170					175
Arg	Arg	Ala	Arg	Leu	Arg	Phe	Met	Lys	Gln	Pro	Gln	Gly	Glu	Gly	Ile
				180						185					190
Ser	Gly	Thr	Phe	Val	Pro	Gln	Cys	Leu	His	Gly	Tyr	Tyr	Ser	Asn	Thr
				195						200					205
Thr	Thr	Ser	Gln	Lys	Leu	Leu	Asn	Pro	Trp	Ile	Leu	Lys	Thr		
				210						215					220

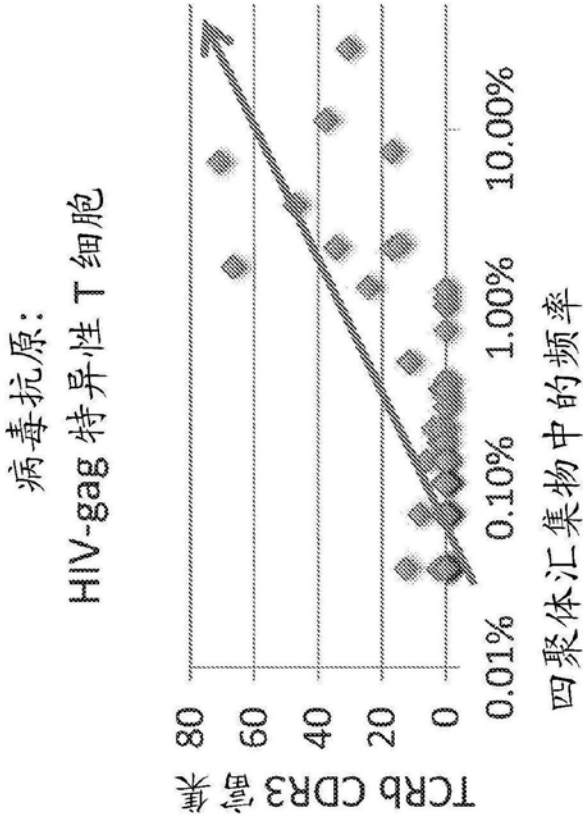


图1A

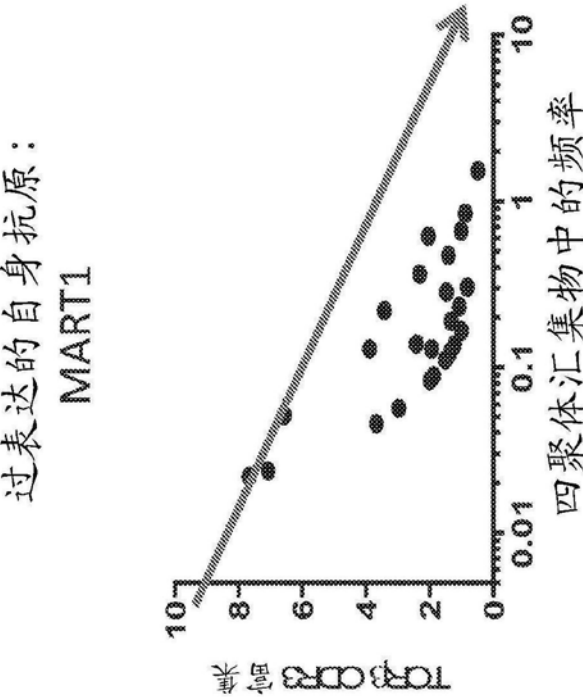


图1B

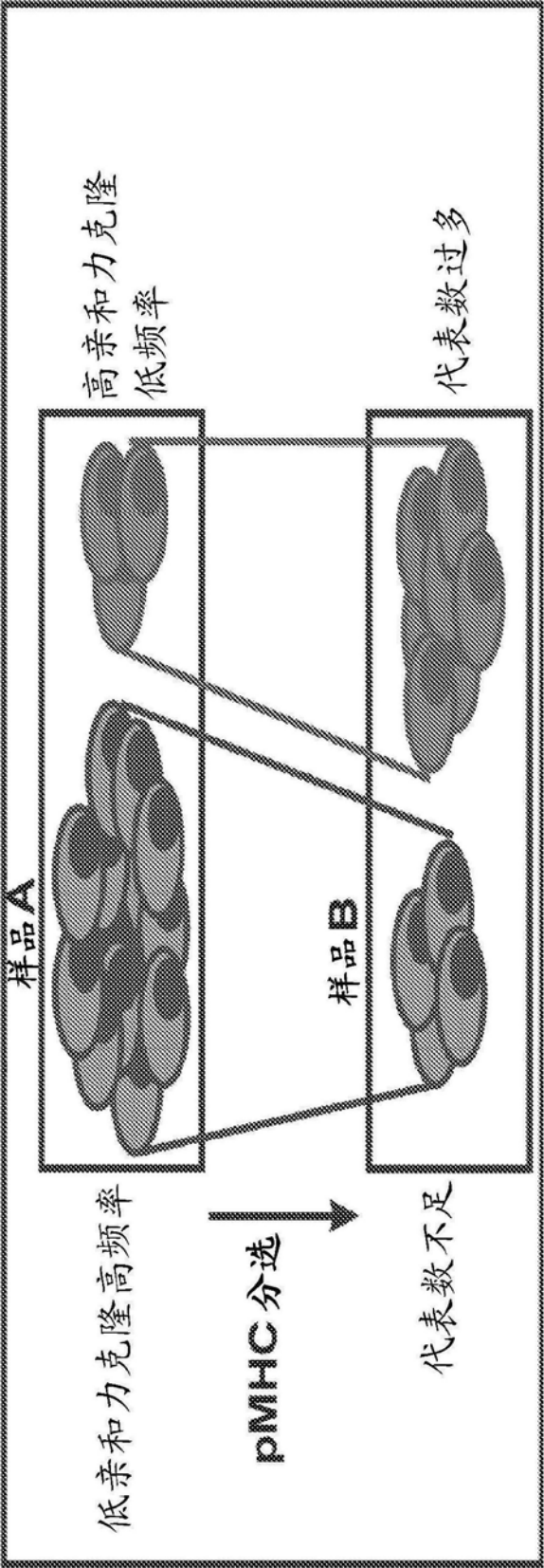


图2A

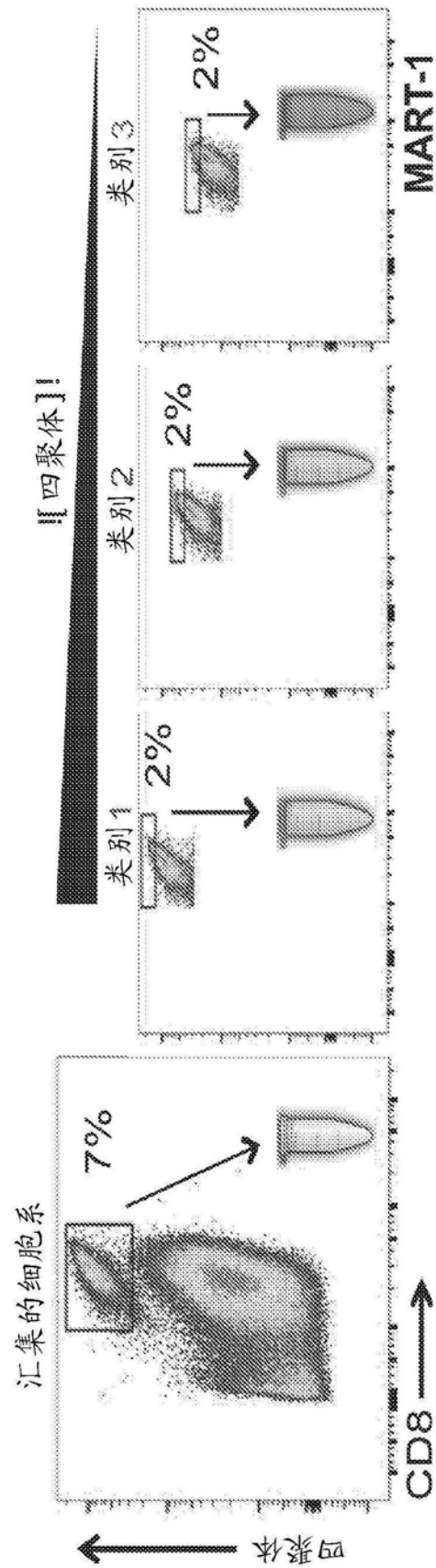


图2B

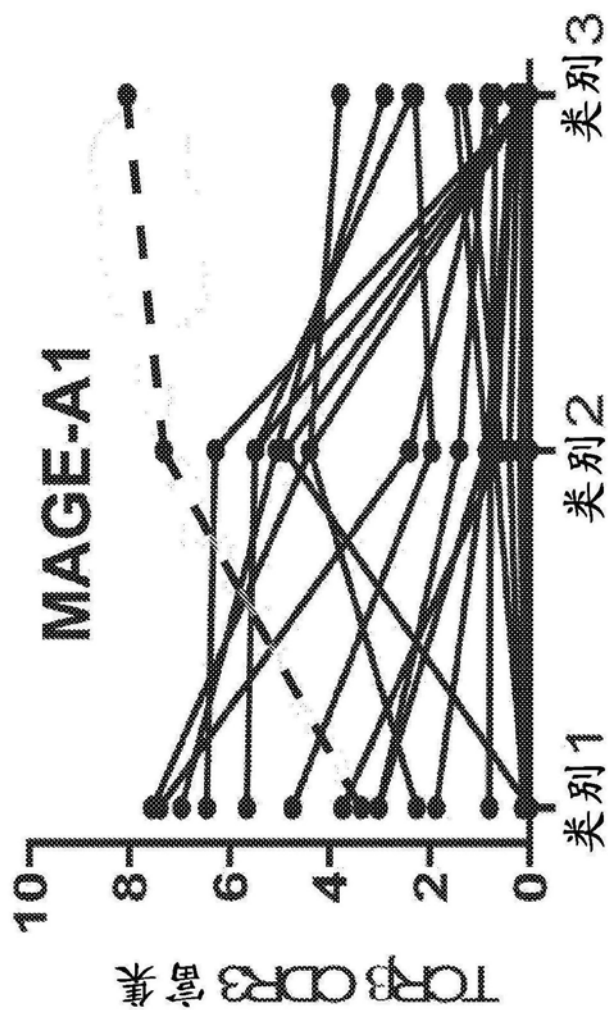


图3

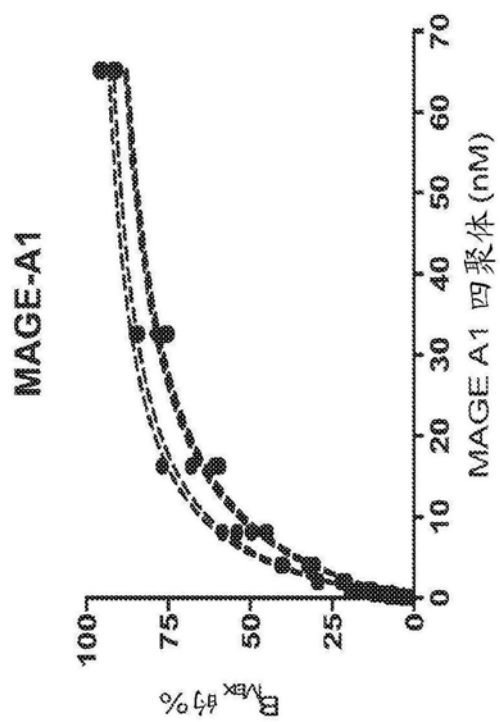


图4A

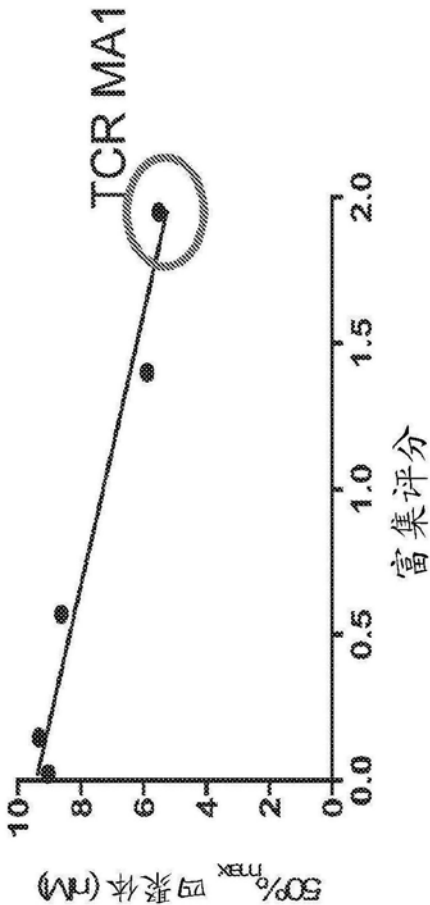


图4B

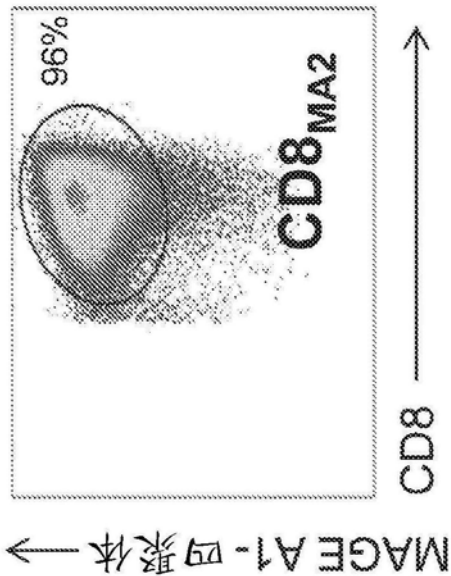


图5A

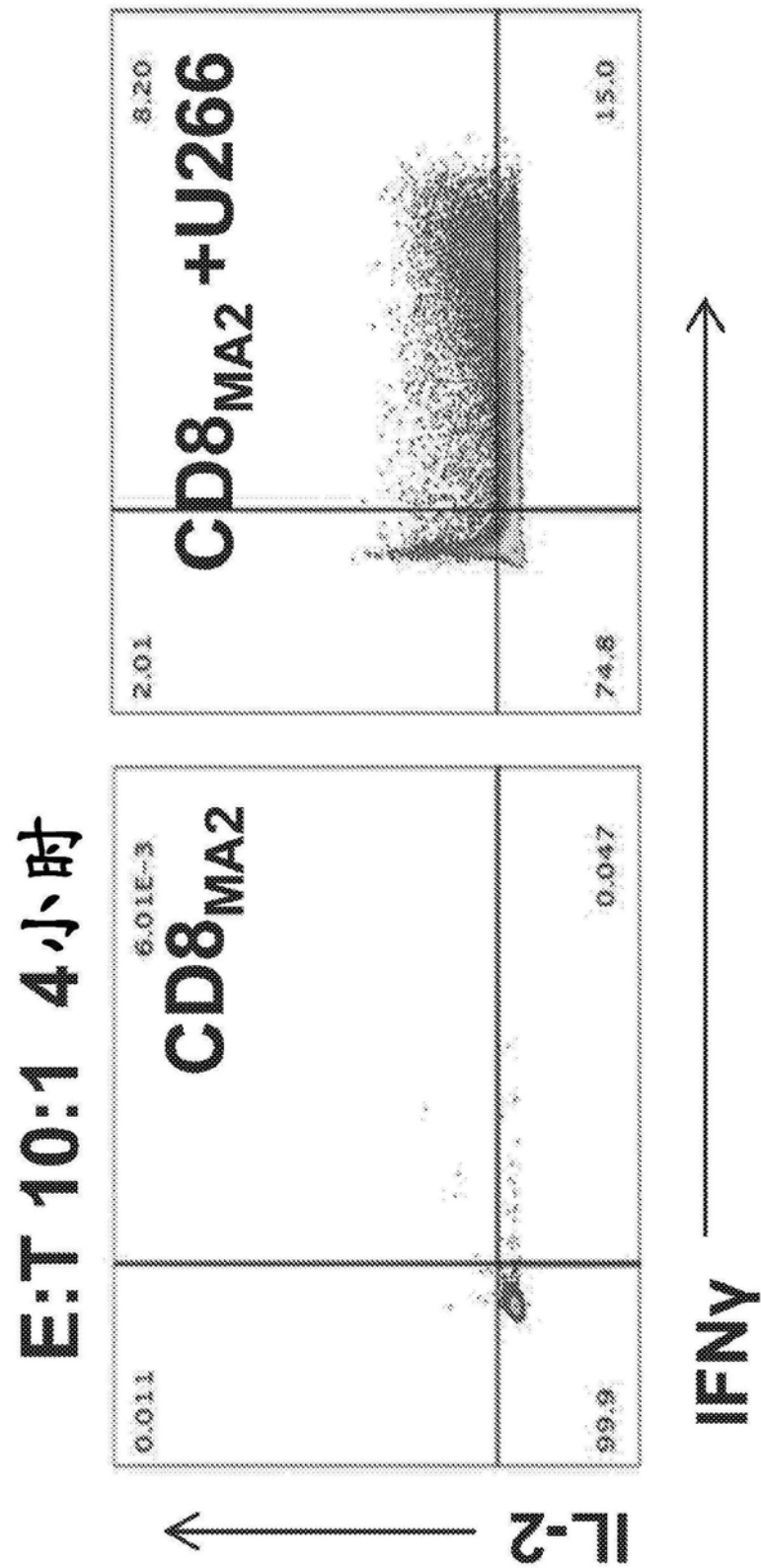


图5B

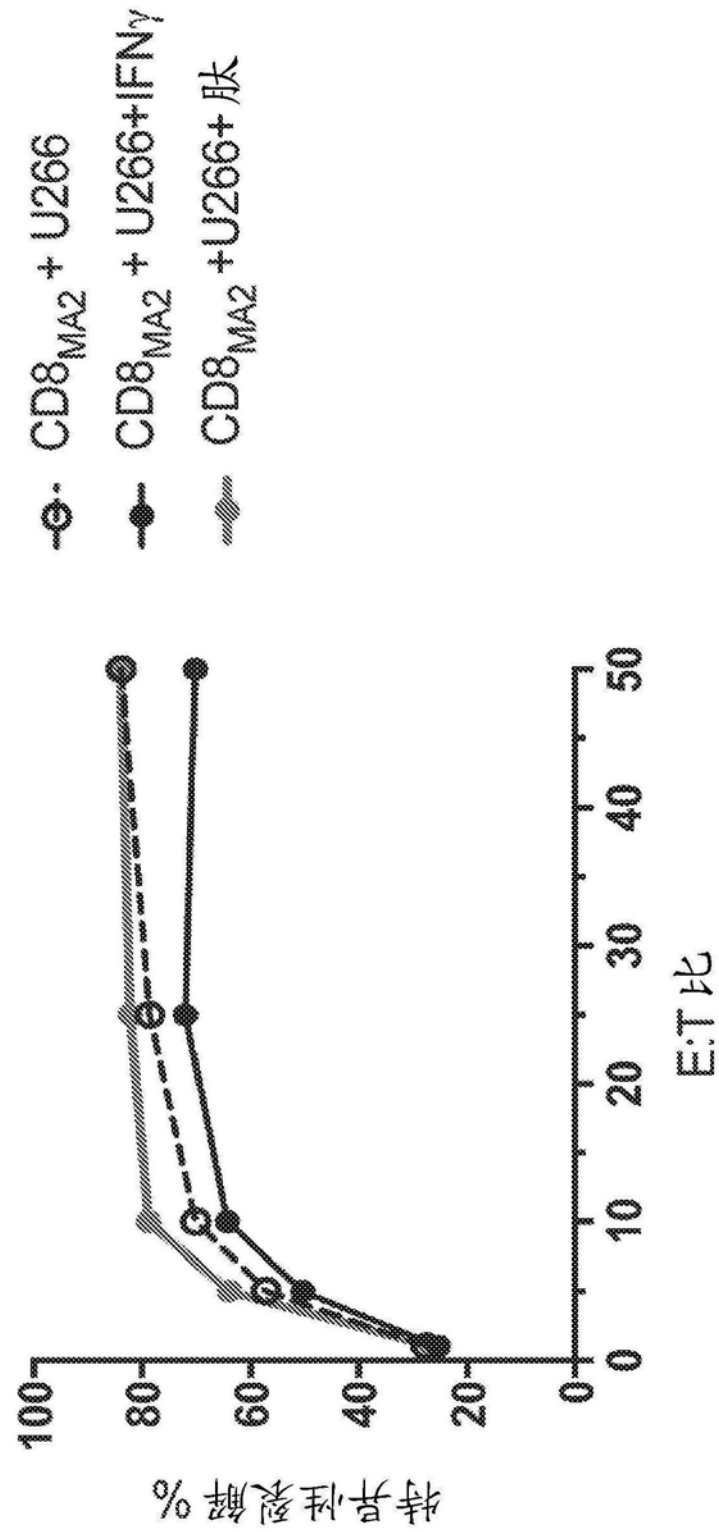


图5C

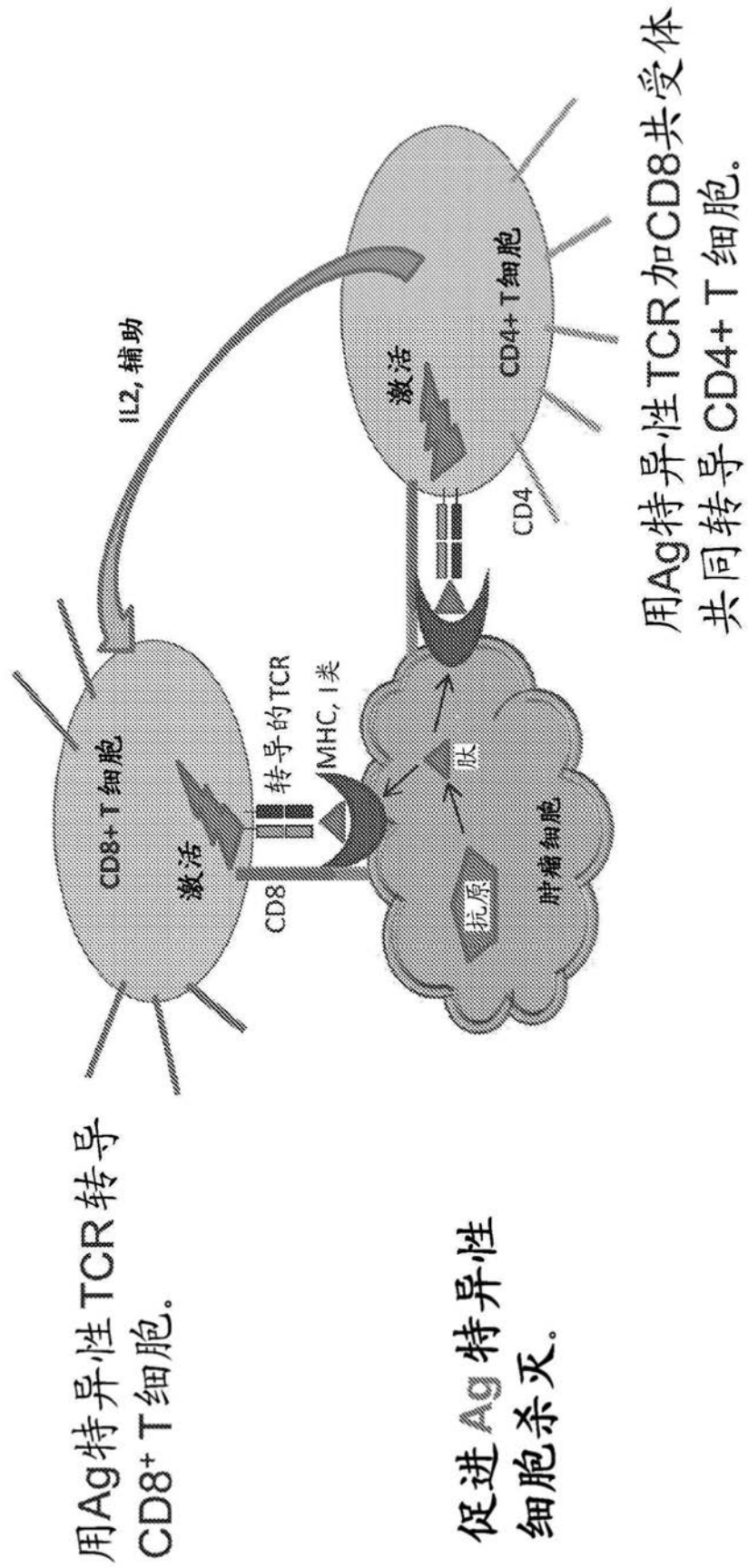


图6A

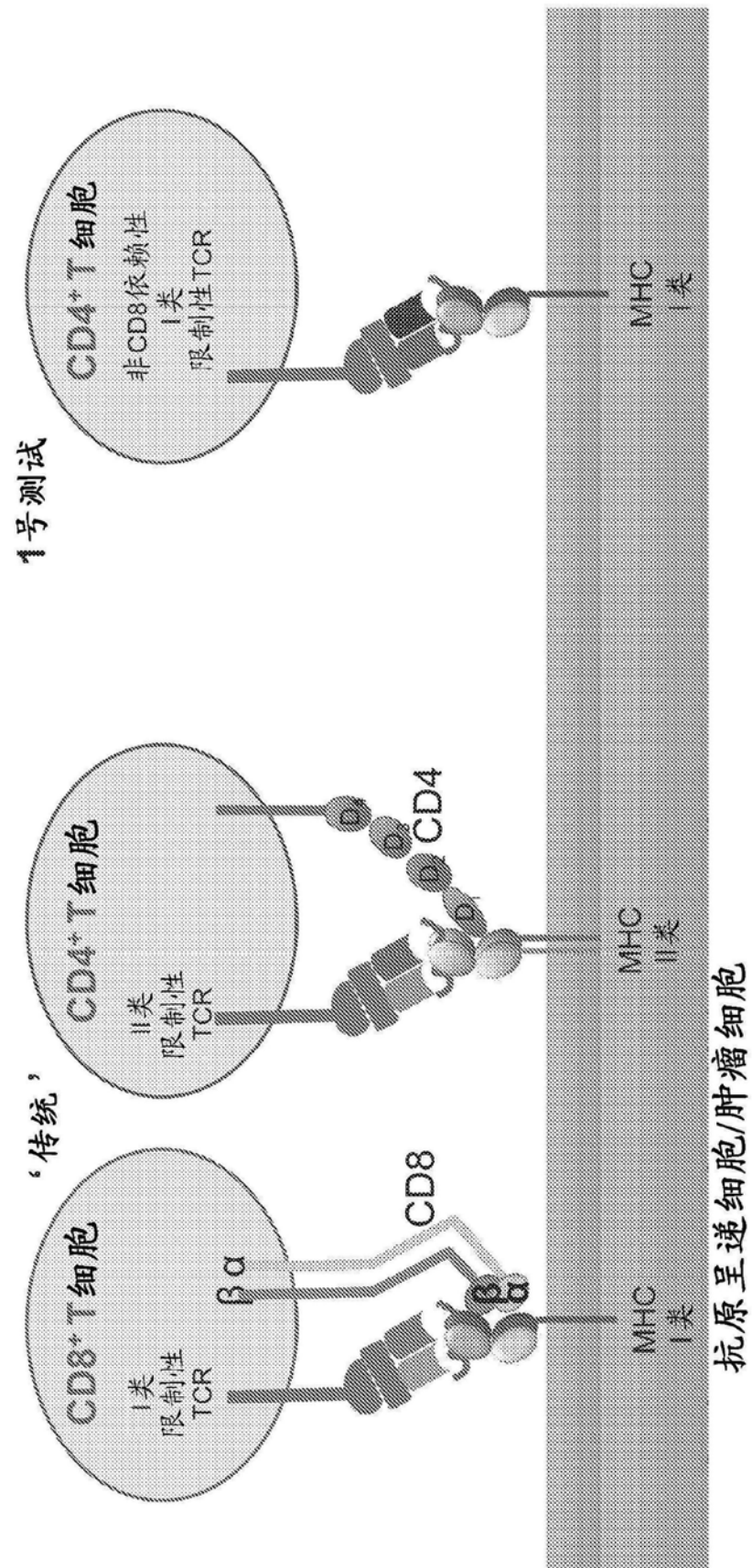


图6B

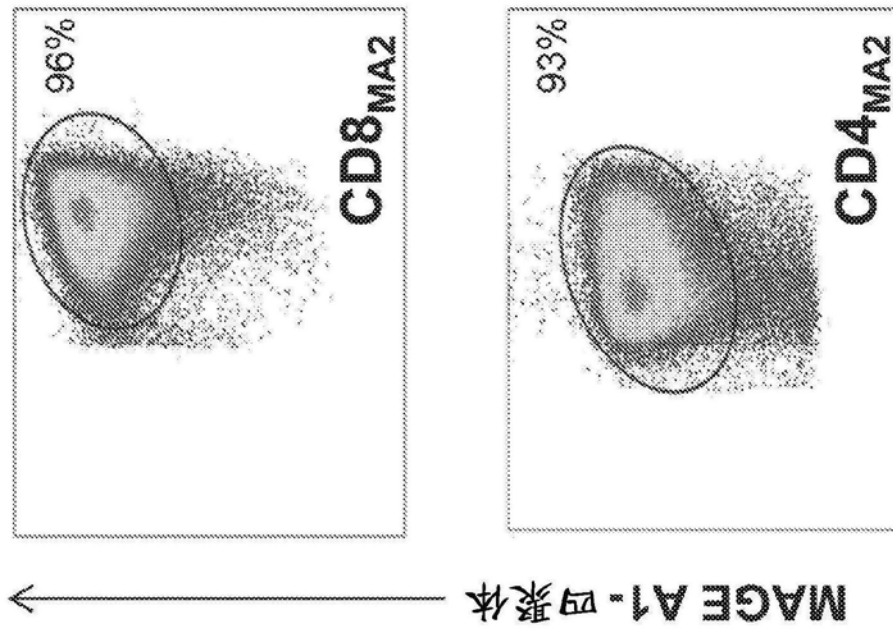


图7A

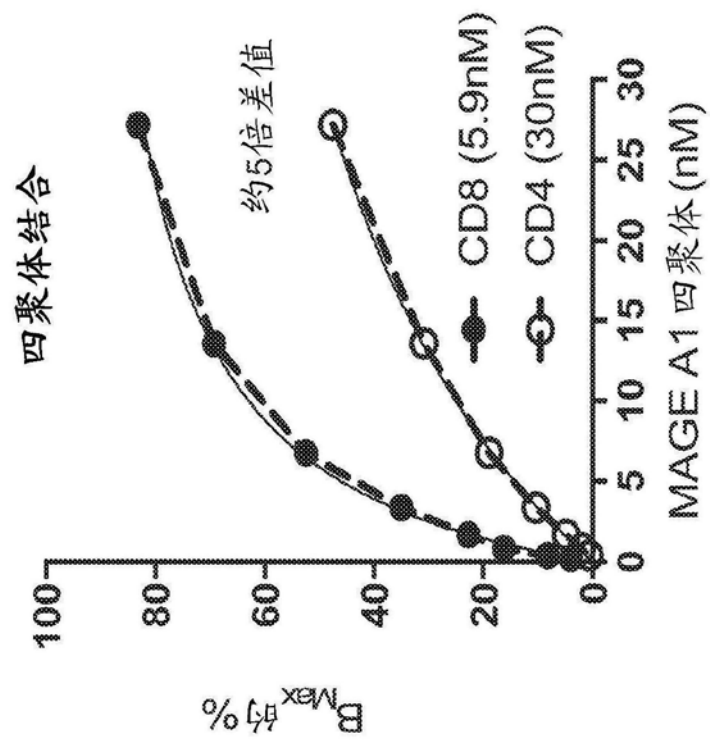


图7B

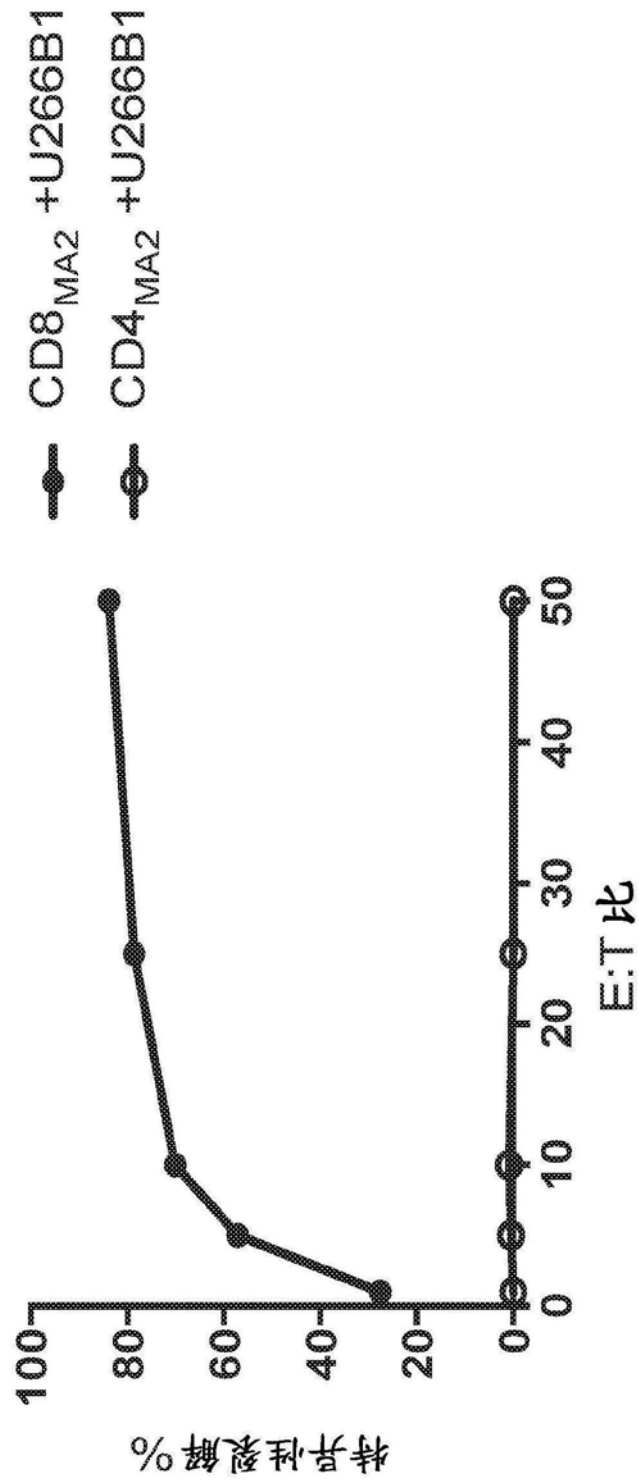


图7C

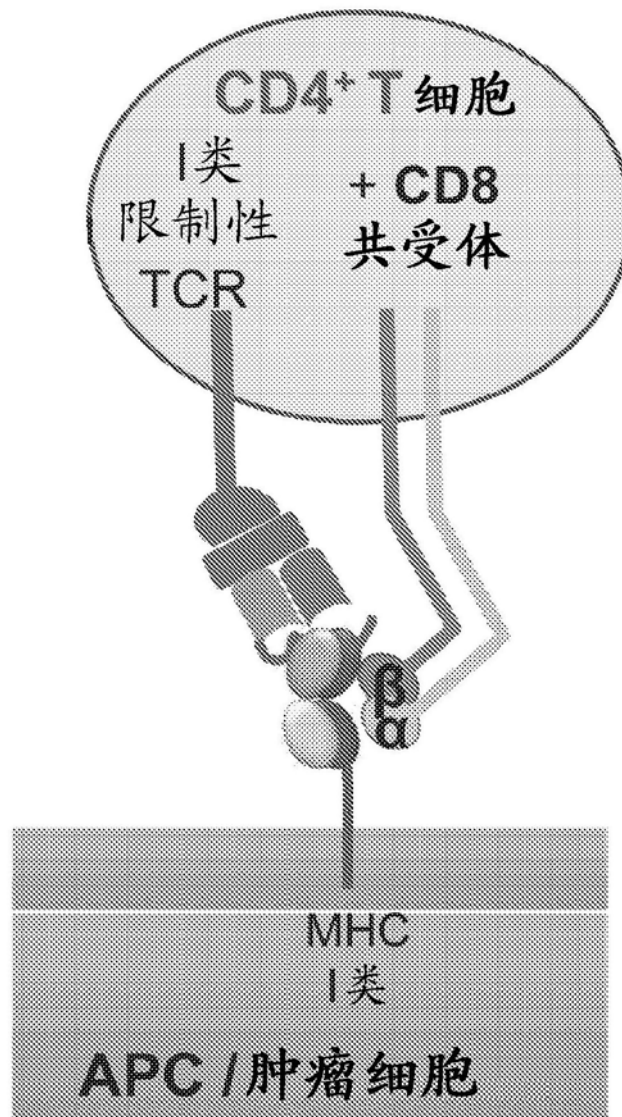


图8A

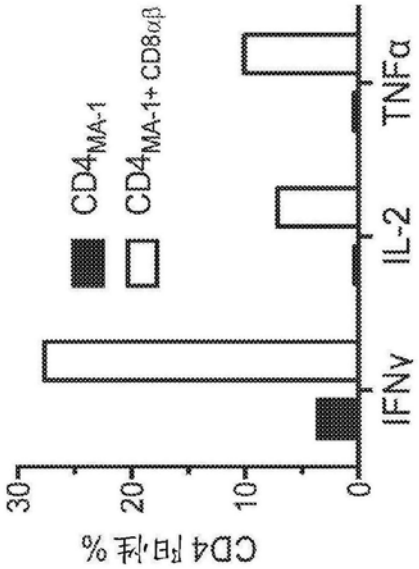


图8B

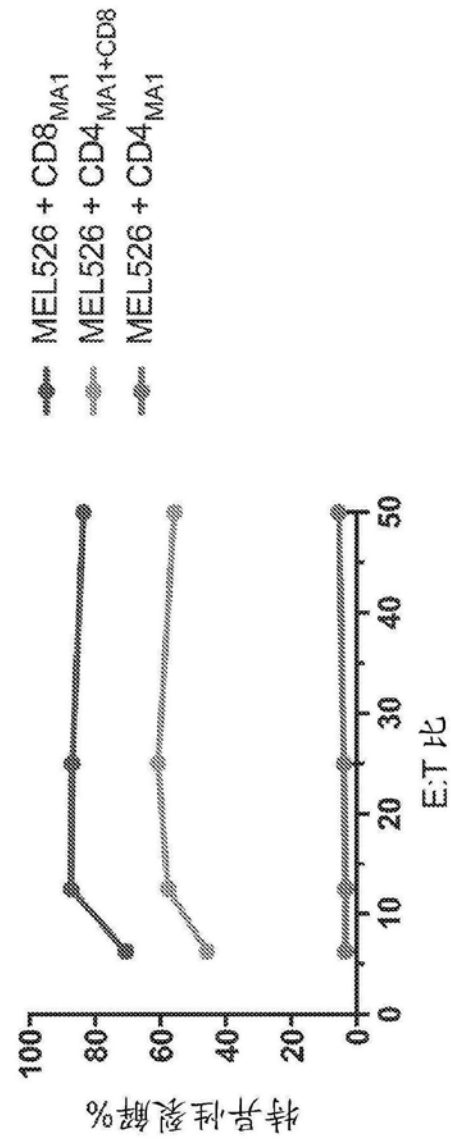


图8C

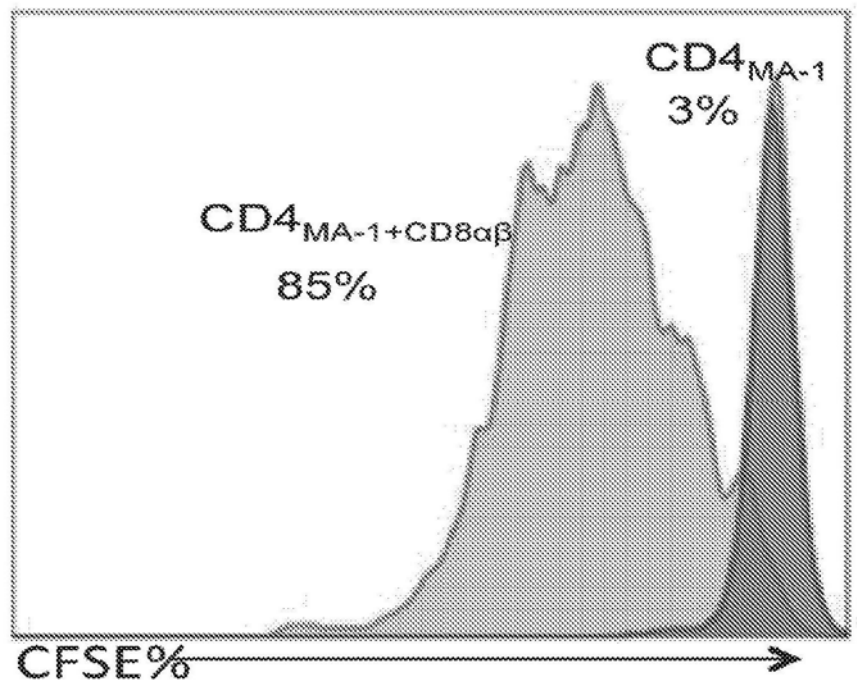


图8D