(19)国家知识产权局

(12)发明专利

(10)授权公告号 CN 109476725 B
(45)授权公告日 2023.04.04

(21)申请号 201780031710.2
(22)申请日 2017.04.10
(65)同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109476725 A
(43)申请公布日 2019.03.15
(30)优先权数据
1606177.2 2016.04.08 GB
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.11.22
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/058580 2017.04.10
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/174824 EN 2017.10.12
(73)专利权人 艾达普特免疫有限公司
地址 英国牛津郡
(72)发明人 N·特里布尔 W·劳伦斯 E·巴格
(74)专利代理机构 北京戈程知识产权代理有限公司 11314
专利代理师 程伟 程云
(51)Int.Cl.
C07K 14/725(2006.01)
C07K 14/47(2006.01)
(56)对比文件
CN 104144700 A,2014.11.12
CN 101287831 A,2008.10.15
US 7666604 B2,2010.02.23
高晓明.TCR.《医学免疫学基础》.北京医科大学出版社,2001,113-114.
审查员 陈中伟
权利要求书2页 说明书18页
序列表16页

(54)发明名称

T细胞受体

(57)摘要

本发明涉及T细胞受体(TCR),其结合衍生自MAGE-A4蛋白的HLA-A*0201限制性的肽GVYDGREHTV(SEQ ID NO:1)。本发明的TCR显示了对于该MAGE表位的优异的特异性谱。还提供了编码TCR的核酸、工程化以提呈TCR的细胞、携带编码TCR的表达载体的细胞以及包含本发明的TCR、核酸或细胞的药物组合物。

CN 109476725 B

1.一种T细胞受体(TCR),其具有结合与HLA-A*0201复合的SEQ ID No:1的特性,当可溶形式的TCR在25℃和pH为7.1-7.5使用表面等离子体共振测量时,具有0.05μM至20.0μM的解离常数,并且所述T细胞受体对与HLA-A*0201复合的SEQ ID No:1结合的选择性为与HLA-A*0201复合的SEQ ID No 2结合的至少10倍,其中所述TCR包含TCRα链可变结构域和TCRβ链可变结构域,并且其中所述TCR可变结构域至少与SEQ ID No:1的残基V2、Y3和D4构成接触;

其中,所述α链可变结构域包含:

VSPFSN所示的αCDR1;

LTILTF所示的αCDR2;

CVVSGGTDSWGKLQF所示的αCDR3;

以及,所述β链可变结构域包含:

KGHDR所示的βCDR1;

SFDVK所示的βCDR2;

CATSGQGAYEEQFF所示的βCDR3。

2.根据权利要求1所述的TCR,其是α-β异二聚体,具有α链TRAV10+TRAC恒定结构域序列和β链TRBV24-1+TRBC-2恒定结构域序列。

3.根据权利要求1所述的TCR,其是类型Vα-L-Vβ、Vβ-L-Vα、Vα-Cα-L-Vβ或Vα-L-Vβ-Cβ的单链形式,其中Vα和Vβ分别是TCRα和TCRβ可变区,Cα和Cβ分别是TCRα和TCRβ恒定区,L是接头序列。

4.根据权利要求1至3中任一项所述的TCR,其与可检测标记、治疗剂结合、或其是PEG化的。

5.根据权利要求1所述的TCR,其中α链可变结构域包含于SEQ ID No:8的氨基酸序列。

6.根据权利要求1所述的TCR,其中α链可变结构域包含于序列,其中:

(i)其氨基酸残基1-27具有(a)与SEQ ID No:3的氨基酸残基1-27的序列至少90%的同一性,或(b)相对于(a)的序列,一个、两个或三个氨基酸的插入、缺失或取代;

(ii)氨基酸残基28-33是VSPFSN所示;

(iii)其氨基酸残基34-47具有(a)与SEQ ID No:3的氨基酸残基34-47的序列至少90%的同一性,或(b)相对于(a)的序列,一个、两个或三个氨基酸的插入、缺失或取代;

(iv)氨基酸残基48-53是LTILTF所示;

(v)其氨基酸残基54-90(a)与SEQ ID No:3的氨基酸残基54-90的序列具有至少90%的同一性,或者(b)相对于(a)的序列一个、两个或三个氨基酸的插入、缺失或取代;

(vi)氨基酸残基91-105是CVVSGGTDSWGKLQF所示。

7.根据权利要求1所述的TCR,其中β链可变结构域包含于SEQ ID No:9的氨基酸序列。

8.根据权利要求1所述的TCR,其中在β链可变结构域包含于序列,其中:

(i)其氨基酸残基1-45具有(a)与SEQ ID No:4的残基1-45的氨基酸序列至少90%的同一性,或(b)相对于(a)的序列,一个、两个或三个氨基酸的插入、缺失或取代;

(ii)氨基酸残基46-50是KGHDR所示;

(iii)其氨基酸残基51-67具有(a)与SEQ ID No:4的氨基酸残基51-67的序列至少90%的同一性,或(b)相对于(a)的序列,一个、两个或三个氨基酸的插入、缺失或取代;

(iv)氨基酸残基68-72是SFDVK所示;

(v)其氨基酸残基73-109具有(a)与SEQ ID No:4的氨基酸残基73-109的序列至少90％的同一性,或(b)相对于(a)的序列,一个、两个或三个氨基酸的插入、缺失或取代;

(vi)氨基酸残基110-123是CATSGQGAYEEQFF所示。

9.一种核酸,其编码权利要求1至8中任一项所述的TCR。

10.一种分离的或非天然存在的T细胞,其提呈权利要求1至8中任一项所述的TCR。

11.一种细胞,其携带

(a)TCR表达载体,所述TCR表达载体包含权利要求9所述的核酸,所述核酸在单个开放阅读框中,或者在两个不同的开放阅读框中分别编码α链和β链;或者

(b)第一表达载体和第二表达载体,所述第一表达载体包含编码权利要求1至8中任一项中所述的TCR的α链的核酸,所述第二表达载体包含编码权利要求1至8中任一项中所述的TCR的β链的核酸。

12.一种药物组合物,其包含权利要求1至8中任一项所述的TCR,权利要求9所述的核酸或权利要求10或11所述的细胞,以及一种或多种药学上可接受的载体或赋形剂。

13.权利要求1至8中任一项所述的TCR、权利要求9所述的核酸或权利要求10或11所述的细胞在制备药物中的用途,所述药物用于治疗癌症。

T细胞受体

技术领域

[0001] 本发明涉及T细胞受体(TCR),其结合衍生自黑素瘤相关抗原(MAGE)A4蛋白(氨基酸230-239)的HLA-A*0201限制性的十肽GVYDGREHTV。本发明的TCR显示了对于该MAGE表位的优异的特异性谱。

背景技术

[0002] 癌症睾丸抗原(CTA)是由约140个基因编码的肿瘤相关抗原(TAA)的亚类。这些抗原的表达限制于免疫豁免部位,如睾丸、胎盘和胎儿卵巢;它们通常不在其它组织中表达。已经在恶性肿瘤中观察到这些基因的表达。CTA的免疫原性导致在许多实体瘤中靶向这些抗原的癌症疫苗的广泛开发。在这一大类TAA中,黑素瘤相关抗原(MAGE)已成为癌症免疫疗法的有希望的候选物。

[0003] 作为多基因家族的成员,已经报道了超过30种癌症睾丸(CT)基因,其被组织入染色体X上的基因簇(CT-X抗原)。CT基因簇位于Xq24和Xq28之间,并且包括基因家族如MAGE和NY-ESO-1。I型MAGE基因簇是被最广泛表征的,包括MAGE-A、MAGE-B和MAGE-C家族。MAGE-A蛋白由12种不同的MAGE-A基因家族成员(MAGE-A1至MAGE-A12)编码,并由保守的165-171个氨基酸碱基定义,其被称为MAGE同源结构域(MHD)。MHD对应于所有MAGE-A家族成员共有氨基酸的唯一区域。

[0004] T细胞识别以及与细胞表面分子和肽的复合物相互作用,所述细胞表面分子称为人白细胞抗原(“HLA”),或主要组织相容性复合物(“MHC”)。肽衍生自较大的分子,其由还提呈HLA/MHC分子的细胞加工。T细胞和HLA/肽复合物的相互作用受到限制,需要T细胞对HLA分子和肽的特定组合具有特异性。如果不存在特异性的T细胞,即使其伴侣复合体存在,也没有T细胞响应。类似地,如果不存在特异性复合物但存在T细胞,则没有响应。该机制参与免疫系统对感染、自身免疫疾病的响应以及对异常(如肿瘤)的响应。

[0005] 一些MAGE基因家族蛋白(MAGE-A至MAGE-C家族)仅在生殖细胞和癌症中表达。其它(MAGE-D至MAGE-H)在正常组织中广泛表达。所有这些MAGE蛋白家族具有与其它MAGE蛋白的序列紧密匹配的同源区,并且包含在免疫识别中展示为HLA/肽复合物的肽。因此,重要的是选择针对期望的MAGE肽/HLA-A2抗原高度特异性的TCR临床候选物。

[0006] MAGE A4是MAGE A基因家族的CTA成员。虽然认为它可能在胚胎发育中起作用,但功能未知。在肿瘤发病机理中,它似乎参与肿瘤转化或肿瘤进展的方面。MAGE A4涉及大量肿瘤,包括精原细胞瘤、先天性角化不良、黑素瘤、肝细胞癌、肾细胞癌、胰腺癌、肺癌、结直肠癌和乳癌。肽GVYDGREHTV(SEQ ID No:1)对应于已知的MAGE-A4蛋白的氨基酸残基数230-239。

[0007] MAGE B2是MAGE B基因家族的CTA。MAGE B2在睾丸和胎盘中以及在不同组织学类型的肿瘤的显著部分中表达。肽GVYDGEEHSV(SEQ ID No:2)显示与MAGE A4的交叉反应性,使得某些TCR能够结合展示两种肽的HLA分子。

发明内容

[0008] 我们开发了一种TCR,其与展示MAGE A4肽GVYDGREHTV的HLA分子结合,优于MAGE B2。在第一方面,本发明提供了一种T细胞受体(TCR),其具有结合与HLA-A*0201复合的GVYDGREHTV(SEQ ID No:1)的特性,当使用可溶形式的TCR在25℃和pH为7.1-7.5的表面等离子体共振测量时,具有约0.05μM至约20.0μM的解离常数,其中所述TCR包含TCRα链可变结构域和TCRβ链可变结构域,并且其中TCR可变结构域至少与GVYDGREHTV(SEQ ID No:1)的残基V2、Y3和D4构成接触。

[0009] 在实施方案中,根据本发明的TCR具有结合与HLA-A*0201复合的GVYDGEEHSV(SEQ ID No:2)的特性,使用可溶形式的TCR在25℃和pH为7.1至7.5的表面等离子体共振测量时,具有约20μM至约50μM的解离常数,其中所述TCR包含TCRα链可变结构域和TCRβ链可变结构域。在一些实施方案中,解离常数高于50微摩尔(microM),如100μM、200μM、500μM或更高。

[0010] 因此,根据本发明的TCR能够有效地结合展示GVYDGREHTV的HLA,但不能结合展示GVYDGEEHSV的HLA。

[0011] 在一些实施方案中,TCR的α链可变结构域包含与SEQ ID No:3的氨基酸残基1-111的序列(α链)具有至少80%同一性的氨基酸序列,和/或β链可变结构域包含与SEQ ID No:4的氨基酸残基1-111的序列(β链)具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[0012] 在另一方面,本发明提供了一种T细胞受体(TCR),其具有结合与HLA-A*0201复合的GVYDGREHTV(SEQ ID No:1)的特性,并且包含TCRα链可变结构域和TCRβ链可变结构域,

[0013] 所述α链可变结构域包含与SEQ ID No:3的氨基酸残基1-111的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,和/或

[0014] 所述β链可变结构域包含与SEQ ID No:4的氨基酸残基1-111的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列。

[0015] GVYDGREHTVHLA-A2复合物提供了本发明的TCR可靶向的癌症标志物。本发明提供了这样的TCR,其用于将细胞毒性或免疫效应剂递送至癌细胞和/或用于过继治疗(adoptive therapy)用途的目的。

[0016] 使用国际免疫遗传学(IMGT)TCR命名法描述TCR,并且链接到TCR序列的IMGT公共数据库。天然α-β异二聚体TCR具有α链和β链。广泛地,每条链包含可变区、连接区和恒定区,β链通常还在可变区和连接区之间含有短的多变区,但是该多变区通常被认为是连接区的一部分。每个可变区包含嵌入框架序列中的三个CDR(互补决定区),一个是名为CDR3的高变区。有几种类型的α链可变(Vα)区和几种类型的β链可变(Vβ)区,其区别在于它们的框架、CDR1和CDR2序列以及部分限定的CDR3序列。在IMGT命名法中,Vα类型通过唯一的TRAV编号来指代。因此,“TRAV21”定义具有独特框架和CDR1和CDR2序列的TCR Vα区,以及部分由TCR到TCR间保守的氨基酸序列限定的CDR3序列,但所述CDR3序列还包含TCR到TCR间变化的氨基酸序列。以相同的方式,“TRBV5-1”定义具有独特框架和CDR1和CDR2序列的TCR Vβ区,但仅部分限定CDR3序列。

[0017] 类似地,TCR的连接区由独特的IMGT TRAJ和TRBJ命名法定义,而恒定区由IMGT TRAC和TRBC命名法定义。

[0018] β链多变区在IMGT命名法中通过缩写TRBD指代,并且如所提及的,串联的TRBD/TRBJ区通常一起被认为是连接区。

[0019] αβTCR的α和β链一般被认为各自具有两个“结构域”,即可变结构域和恒定结构域。可变结构域由可变区和连接区的连接组成。在本说明书和权利要求书中,术语“TCRα可变结构域”因此是指TRAV和TRAJ区的串联,术语TCRα恒定结构域指细胞外TRAC区或C-末端截短的TRAC序列。同样,术语“TCRβ可变结构域”是指TRBV和TRBD/TRBJ区的串联,术语TCRβ恒定结构域指细胞外TRBC区或C末端截短的TRBC序列。

[0020] 由IMGT命名法定义的独特序列是众所周知的,并且对于在TCR领域工作的人员是可得到的。例如,它们可以在IMGT公共数据库中找到。“T cell Receptor Factsbook”,(2001)LeFranc和LeFranc,Academic出版社,ISBN 0-12-441352-8也公开了由IMGT命名法定义的序列,但由于其公开日期和随后的时滞,其中的信息有时需要通过参考IMGT数据库来确认。

[0021] 根据本发明的一种TCR包含SEQ ID No:3所示的α链细胞外结构域(TRAV10+TRAC)和SEQ ID No:4所示的β链细胞外结构域(TRBV24-1+TRBC-2)。术语“亲本TCR”、“亲本MAGE-A4 TCR”在本文中同义使用,用以指包含分别为SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的细胞外α和β链的该TCR。期望提供相对于亲本TCR而言突变或修饰的TCR,其与亲本TCR相比对肽-HLA复合物具有更高的亲和力和/或更慢的解离速率。

[0022] 为了提供了一种所述突变或修饰的TCR的结合谱可以与其进行比较的参照TCR,使用根据本发明的可溶的TCR是方便的,所述可溶的TCR具有SEQ ID No:3中给出的亲本MAGE-A4 TCRα链的细胞外序列和SEQ ID No:4中给出的亲本MAGE-A4 TCRβ链的细胞外序列。该TCR在本文中称为“参照TCR”或“参照MAGE-A4 TCR”。注意,SEQ ID No:5包含SEQ ID No:3的亲本α链细胞外序列,并且C162已经取代T162(即TRAC的T48)。同样,SEQ ID No:6是SEQ ID No:4的亲本β链细胞外序列,并且C169已经取代S169(即TRBC2的S57),A187已经取代C187并且D201已经取代N201。相对于亲本α和β链细胞外序列的这些半胱氨酸取代使得能够形成链间二硫键,其稳定重折叠的可溶TCR,即通过重折叠细胞外α和β链形成的TCR。使用稳定的二硫键连接的可溶TCR作为参照TCR使得能够更方便地评估结合亲和力和结合半衰期。本发明的TCR可以包含上述突变。

[0023] 本发明的TCR可以是非天然存在的和/或纯化的和/或工程化的。相对于亲本TCR,本发明的TCR可以具有在α链可变结构域和/或β链可变结构域中存在的多于一个突变。“工程化TCR”和“突变TCR”在本文中同义使用,并且一般是指相对于亲本TCR,具有引入的一个或多个突变的TCR,尤其是在其α链可变结构域和/或β链可变结构域。这些突变可以改善针对与HLA-A*020101复合的GVYDGREHTV(SEQ ID No:1)的结合亲和力。在某些实施方案中,在α链可变结构域中存在1、2、3、4、5、6、7或8个突变,例如4个或8个突变,和/或在β链可变结构域中1、2、3、4或5个突变,例如5个突变。在一些实施方案中,本发明的TCR的α链可变结构域可以包含这样的氨基酸序列,其与SEQ ID No:3的氨基酸残基1-11的序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性。在一些实施方案中,本发明的TCR的β链可变结构域可以包含这样的氨基酸序列,其与SEQ ID No:4的氨基酸残基1-111的序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%的同一性。

[0024] 本发明的TCR的α链可变结构域可以具有以下突变:

[0025]

M4	V或L

[0026] 参考SEQ ID No:3中所示的编号,和/或

[0027] β链可变结构域可以具有以下突变中的至少一种:

[0028]

N10	E

[0029] 参考SEQ ID No:4中所示的编号。

[0030] 本发明的TCR的α链可变结构域可以包含SEQ ID NO:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7-8的氨基酸残基1-105的氨基酸序列,

[0031] 或者包含氨基酸序列,其中其氨基酸残基1-27、34-47和54-90分别与SEQ ID No:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7-8的氨基酸残基1-27、34-47和54-90的序列具有至少90%或95%的同一性,以及其中氨基酸残基28-33、48-53和91-105分别与SEQ ID No:3、SEQ ID NO:5或SEQ ID NO:7-8的氨基酸残基28-33、48-53和91-105的序列具有至少90%或95%的同一性。

[0032] 在α链可变结构域中,序列为

[0033] (i)其氨基酸残基1-26可以具有(a)与SEQ ID No:3的氨基酸残基1-26的序列至少90%的同一性,或(b)相对于(a)的序列,可以具有一个、两个或三个氨基酸残基的插入或缺失;

[0034] (ii)氨基酸残基28-33是VSPFSN(SEQ ID No:17);

[0035] (iii)其氨基酸残基33-49可以具有(a)与SEQ ID NO:3的氨基酸残基34-47的序列至少90%的同一性,或(b)相对于(a)的序列,可具有一个、两个或三个氨基酸残基的插入或缺失;

[0036] (iv)氨基酸残基48-53可以是LTIMTF(SEQ ID No:18)或LTRMTF(SEQ ID No:19)或LTIVTF(SEQ ID No:20)或LTILTF(SEQ ID No:21);

[0037] (v)其氨基酸残基55-89可具有与SEQ ID No:3的氨基酸残基54-90的序列至少90%的同一性,或者可以相对于前者具有一个、两个或三个插入、缺失或取代;

[0038] (vi)氨基酸90-93可以是CVVSGGTDSWGKLQF(SEQ ID No:22)。

[0039] 本发明的TCR的β链可变结构域可以包含SEQ ID No:4、或SEQ ID No:6或SEQ ID No:9的氨基酸序列,

[0040] 或者包含氨基酸序列,其中其氨基酸残基1-45、51-67、74-109分别与SEQ ID No:4、或SEQ ID No:9的氨基酸残基1-45、51-67、74-109的序列具有至少90%或95%的同一性,以及其中氨基酸残基46-50、68-73和109-123分别与SEQ ID No:4、或SEQ ID No:9的氨基酸残基46-50、68-73和109-123的序列具有至少90%或95%的同一性。

[0041] 在β链可变结构域中,序列为

[0042] (i)其氨基酸残基1-45可具有(a)与SEQ ID No:4的残基1-45的氨基酸序列至少90%的同一性,或(b)相对于(a)的序列,可具有一个、两个或三个氨基酸残基插入或缺失;

[0043] (ii)氨基酸残基46-50可以是KGHDR(SEQ ID No:23);

[0044] (iii)其氨基酸残基51-67可具有(a)与SEQ ID NO:4的氨基酸残基51-67的序列至少90%的同一性,或(b)相对于(a)的序列,可具有一个、两个或三个氨基酸残基插入或缺失;

[0045] (iv)氨基酸残基68-73可以是SVFDK(SEQ ID No:24);

[0046] (v)其氨基酸残基54-90可具有(a)与SEQ ID NO:4的氨基酸残基54-90的序列至少

90％的同一性，或(b)相对于(a)的序列，可具有一个、两个或三个氨基酸残基的插入或缺失；

[0047] (vi)氨基酸109-123是CATSGQGAYNEQFF(SEQ ID No:25)或CATSGQGAYREQFF(SEQ ID No:26)；

[0048] 本发明的TCR可以具有α和β链可变结构域的以下组合之一：

[0049]

α链SEQ ID No	β链SEQ ID No
3	4
3	6
3	9
5	4
5	6
5	9
7	4
7	6
7	9
8	4
8	6
8	9

[0050] 在本发明的范围内的是本文公开的本发明的任何TCR的表型沉默变体。如本文所用，术语“表型沉默变体”应理解为指除了上述那些之外还包含一个或多个另外的氨基酸改变的TCR，其中TCR具有与没有所述改变的相应TCR相似的表型。为了本申请的目的，TCR表型包含抗原结合特异性(K_D和/或结合半衰期)和抗原特异性。当在相同条件下(例如在25℃和在相同的SPR芯片上)测量时，表型沉默变体对GVYDGREHTV(SEQ ID No:1)HLA-A*0201复合物所具有的K_D和/或结合半衰期是不含所述改变的相应TCR所测量的K_D和/或结合半衰期的10％以内。合适的条件在实施例3中进一步定义。抗原特异性以下进一步定义。如本领域技术人员已知的，可以产生与上文详述的那些TCR相比在恒定结构域和/或可变结构域中引入有改变的TCR，而不改变与GVYDGREHTV(SEQ ID No:1)HLA-A*0201复合物的相互作用的亲和力。尤其是，这种沉默突变可以引入已知不直接参与抗原结合的序列部分内(例如在CDR外)。这些简单的(trivial)变体包括在本发明的范围内。已经进行了一个或多个保守取代的那些TCR也形成本发明的一部分。

[0051] 可以使用任何合适的方法进行突变，包括但不限于基于聚合酶链反应(PCR)、基于限制性酶的克隆或不依赖连接的克隆(LIC)规程的那些。这些方法在许多标准分子生物学文本中详述。关于聚合酶链反应(PCR)和基于限制酶的克隆的更多细节，参见Sambrook& Russell，(2001)Molecular Cloning-A Laboratory Manual(第三版)CSHL出版社。关于不依赖连接的克隆(LIC)规程的进一步信息可以在Rashtchian，(1995)Curr Opin Biotechnol 6(1):30-6中找到。

[0052] 本发明的TCR具有结合MAGE-A4肽，GVYDGREHTV(SEQ ID No:1)HLA-A2复合物的特性。已发现相对于其它不相关表位，本发明的TCR对那些MAGE表位是高度特异性的，因此尤其适合作为用于将治疗剂或可检测标记递送至展示那些表位的细胞和组织的靶向载体。在

本发明TCR的上下文中特异性涉及它们识别肽GVYDGREHTV阳性的HLA-A*0201靶细胞的能力,同时具有最小的识别肽阴性的HLA-A*0201靶细胞或者展示MAGE B2肽GVYDGEEHSV的HLA细胞的能力。为了测试特异性,TCR可以是可溶形式和/或可以在T细胞的表面上表达。可以通过测量在TCR和靶细胞存在下的T细胞活化水平来确定识别。在这种情况下,肽阴性或MAGE B2靶细胞的最小识别被定义为:当在相同条件下测量时,T细胞活化水平小于肽阳性靶细胞存在下产生的T细胞活化水平的10%,优选小于5%,更优选小于1%。对于本发明的可溶的TCR,可以在治疗相关的TCR浓度确定特异性。治疗相关浓度可以定义为10^{-9}M或更低的TCR浓度,和/或比相应EC 50值高达100倍、优选高达1000倍高的浓度。肽阳性细胞可通过肽脉冲(peptide-pulsing)获得,或更优选地,它们可以天然地提呈所述肽。优选地,肽阳性和肽阴性细胞都是人细胞。

[0053] 已经发现本发明的某些TCR非常适合用于过继治疗。这样的TCR对于复合物可以具有小于200μM的K_D,例如约0.05μM至约20μM或约100μM,和/或对于复合物具有约0.5秒至约12分钟的结合半衰期($T_{1/2}$)。在一些实施方案中,本发明的TCR对复合物可以具有约0.05μM至约20μM、约0.1μM至约5μM或约0.1μM至约2μM的K_D。不希望受理论束缚,对于在过继细胞治疗中具有治疗用途的TCR,似乎存在最佳的亲和力窗口。天然存在的TCR识别来自肿瘤抗原的表位,其一般具有太低的亲和力(20μM至50μM),并且非常高的亲和力TCR(在纳摩尔范围或更高)具有交叉反应性问题(Robbins等人(2008)J.Immunol.180 6116-6131;Zhao等人(2007)J.Immunol.179 5845-5854;Scmid等人(2010)J.Immunol 1844936-4946)。

[0054] 本发明的TCR可以是αβ异二聚体或者可以是单链形式。单链形式包括Vα-L-Vβ、Vβ-L-Vα、Vα-Cα-L-Vβ或Vα-L-Vβ-Cβ类型的αβTCR多肽,其中Vα和Vβ分别是TCRα和TCRβ可变区,Cα和Cβ分别是TCRα和TCRβ恒定区,L是接头序列。为了用作将治疗剂递送到抗原提呈细胞的靶向剂,TCR可以是可溶形式(即不具有跨膜或细胞质结构域)。为了稳定性,可溶的αβ异二聚体TCR优选在各个恒定结构域的残基之间具有引入的二硫键,例如WO 03/020763中所述的。存在于本发明的αβ异二聚体中的一个或两个恒定结构域可以在C末端(C terminus)或C端(C termini)截短,例如高达15个、或高达10个或高达8个或更少的氨基酸。对于在过继治疗中使用,αβ异二聚体TCR可以例如以具有细胞质和跨膜结构域的全长链转染。用于过继治疗的TCR可含有对应于天然存在于各自α恒定结构域和β恒定结构域之间的二硫键,另外地或可替代地,可存在非天然二硫键。

[0055] 对于本领域技术人员显而易见的是,可以在序列的C末端和/或N末端处提供截短序列,截短1、2、3、4、5或更多个残基,而实质上不影响TCR的结合表征。所有这些简单的变体都包括在本发明中。

[0056] 本发明的α-β异二聚体TCR通常包含α链TRAC恒定结构域序列和β链TRBC1或TRBC2恒定结构域序列。α链和β链恒定结构域序列可以通过截短或取代来修饰,用以缺失TRAC外显子2的Cys4和TRBC1或TRBC2外显子2的Cys2之间的天然二硫键。α链和β链恒定结构域序列也可以通过半胱氨酸残基取代TRAC的Thr 48和TRBC1或TRBC2的Ser 57来修饰,所述半胱氨酸在TCR的α和β恒定结构域之间形成二硫键。

[0057] 本发明的一些TCR对于GVYDGREHTV-HLA-A2复合物具有实质上高于参照MAGE-A4 TCR的结合亲和力和/或结合半衰期。增加天然TCR的结合亲和力通常降低TCR对其肽-MHC配体的特异性,这在Zhao Yangbing等人,The Journal of Immunology,The American

Association of Immunologists,US,vol.179,No.9,2007年11月1日,5845-5854中证实。然而,衍生自亲本TCR的本发明的TCR保持对GVYDGREHTV-HLA-A2复合物特异性,尽管具有比亲本TCR实质上更高的结合亲和力。此外,与亲本TCR相比,它们对MAGE-A4的选择性显著高于MAGE-B2(例如至少10倍)。

[0058] 使用本文实施例3的表面等离子体共振(BIAcore)方法可以确定结合亲和力(与平衡常数K_D成反比)和结合半衰期(表示为$T^{1/2}$)。测量可以在25℃和pH7.1至7.5使用可溶形式的TCR进行。应当理解,使TCR的亲和力加倍导致K_D减半。T1/2通过ln2除以解离速率(k_{off})计算。因此,T1/2的加倍导致k_{off}减半。通常针对TCR的可溶形式,即截短以去除疏水性跨膜结构域残基的那些形式,测量TCR的K_D和k_{off}值。因此,应当理解,如果TCR的可溶形式满足这样的要求,即其对GVYDGREHTV-HLA-A2复合物具有结合亲和力和/或结合半衰期,则给定的TCR满足该要求。优选地,使用相同的测定方案测量给定TCR的结合亲和力或结合半衰期数次,例如3次或更多次,并且取结果的平均值。参照MAGE-A4 TCR具有通过该方法测量的约65μM的K_D,以及其k_{off}约为$0.73s^{-1}$,(即,$T^{1/2}$约为0.95s)。

[0059] 在另一方面,本发明提供了编码本发明的TCR的核酸。在一些实施方案中,核酸是cDNA。在一些实施方案中,本发明提供了包含编码本发明的TCR的α链可变结构域的序列的核酸。在一些实施方案中,本发明提供了包含编码本发明TCR的β链可变结构域的序列的核酸。核酸可以是非天然存在的和/或纯化的和/或工程化的。

[0060] 在另一方面,本发明提供了包含本发明的核酸的载体。优选地,载体是TCR表达载体。

[0061] 本发明还提供了携带本发明载体、优选TCR表达载体的细胞。载体包含在单个开放阅读框中、或者在两个不同的开放阅读框中分别编码α链和β链的本发明核酸。另一方面提供了携带第一表达载体和第二表达载体的细胞,所述第一表达载体包含编码本发明TCR的α链的核酸,所述第二表达载体包含编码本发明TCR的β链的核酸。这样的细胞在过继治疗中是尤其有用的。本发明的细胞可以是分离的和/或重组的和/或非天然存在的和/或工程化的。

[0062] 因为本发明的TCR在过继治疗中具有效用,本发明包括提呈本发明TCR的非天然存在和/或纯化和/或工程化的细胞,特别是T细胞。本发明还提供了提呈本发明TCR的扩充的T细胞群。存在一些适合于用编码本发明TCR的核酸(比如DNA、cDNA或RNA)转染T细胞的方法(参见例如Robbins等人,(2008)J Immunol.180:6116-6131)。表达本发明TCR的T细胞将适合用于基于过继治疗的癌症治疗。如本领域技术人员已知的,存在一些可以进行过继治疗的合适的方法(参见例如Rosenberg等人,(2008)Nat Rev Cancer 8(4):299-308)。

[0063] 本发明的可溶的TCR可用于将可检测标记或治疗剂递送至抗原提呈细胞和含有抗原提呈细胞的组织。因此它们可以与可检测标记(用于诊断目的,其中TCR用于检测提呈GVYDGREHTV-HLA-A2复合物的细胞的存在)、与治疗剂、或与PK修饰部分(例如通过PEG化)结合(共价或其它)。

[0064] 用于诊断目的的可检测标记包括例如荧光标记、放射性标记、酶、核酸探针和造影剂。

[0065] 可以与本发明的TCR结合的治疗剂包括免疫调节剂、放射性化合物、酶(例如穿孔素)或化疗剂(例如顺铂)。为了确保在期望的位置发挥毒性作用,毒素可以在脂质体内与

TCR连接，使得化合物缓慢释放。这将防止在体内转运过程中的损伤作用，并确保毒素在TCR与相关抗原提呈细胞结合后具有最大作用。

[0066] 其它合适的治疗剂包括：

[0067] • 小分子细胞毒性剂，即分子量小于700道尔顿，具有杀死哺乳动物细胞能力的化合物。这种化合物还可以含有能够具有细胞毒性作用的有毒金属。此外，应当理解，这些小分子细胞毒性剂还包括前药，即在生理条件下衰减或转化以释放细胞毒性剂的化合物。这种试剂的实例包括顺铂、美登素衍生物、雷查霉素(rachelmycin)、卡里奇霉素(calicheamicin)、多西他赛(docetaxel)、依托泊苷、吉西他滨、异环磷酰胺、伊立替康、美法仑、米托蒽醌、sorfimer卟吩姆钠(sodiumphotofrin)II、替莫唑胺、拓扑替康，葡萄糖醛酸三甲曲沙(trimetreate glucuronate)，澳瑞他汀E、长春新碱和多柔比星；

[0068] • 肽细胞毒素，即具有杀死哺乳动物细胞能力的蛋白或其片段。例如，蓖麻毒素、白喉毒素、假单胞菌细菌外毒素A、DNA酶(DNase)和RNA酶(RNase)；

[0069] • 放射性核素，即同时伴随着一种或多种α粒子或β粒子或γ射线的发射而衰减的元素的不稳定同位素。例如，碘131、铼186、铟111、钇90、铋210和铋213、锕225和砹213；螯合剂可以用于促进这些放射性核素与高亲和力TCR或其多聚体的结合；

[0070] • 免疫刺激剂，即刺激免疫响应的免疫效应分子。例如，细胞因子比如IL-2和IFN-γ；

[0071] • 超抗原及其突变体；

[0072] • TCR-HLA融合；

[0073] • 趋化因子，比如IL-8、血小板因子4、黑素瘤生长刺激蛋白等；

[0074] • 抗体或其片段，包括抗T细胞或抗NK细胞决定簇抗体(例如抗CD3、抗CD28或抗CD16)；

[0075] • 具有抗体样结合表征的替代蛋白支架；

[0076] • 补体活化剂；

[0077] • 异种蛋白结构域、同种异体蛋白结构域、病毒/细菌蛋白结构域、病毒/细菌肽。

[0078] 一个优选的实施方案，提供了本发明的TCR，所述TCR与抗CD3抗体或所述抗CD3抗体的功能片段或变体结合(通常通过融合至α或β链的N或C末端)。适合用于本文所述的组合物和方法的抗体片段和变体/类似物包括微型抗体(minibodies)、Fab片段、$F(ab')_2$片段、dsFv和scFv片段、Nanobodies™(这些构建体，由Ablynx(比利时)销售，包含衍生自骆驼科(例如骆驼或美洲驼)抗体的合成的单免疫球蛋白可变重链结构域)，和结构域抗体(Domantis(比利时)，其包含亲和力成熟的单一免疫球蛋白可变重链结构域或免疫球蛋白可变轻链结构域)，或者替代蛋白支架，其显示抗体样结合表征，比如Affibodies(Affibody(瑞典)，其包含工程化的蛋白A支架)，或者Anticalins(Pieris(德国)，其包含工程化的anticalins)，这仅仅是列举的一小部分。

[0079] 对于一些目的，本发明的TCR可以聚集成包含几种TCR的复合物以形成多价TCR复合物。有一些人类蛋白含有可用于产生多价TCR复合物的多聚化结构域。例如，已经用于产生scFv抗体片段的四聚体的p53的四聚化结构域，与单体scFv片段相比，其显示出增加的血清持续性和显著降低的解离速率。(Willuda等人(2001)J.Biol.Chem.276(17)14385-14392)。血红蛋白也具有可能用于这种应用的四聚化结构域。与本发明的非多聚野生型或T

细胞受体异二聚体相比，本发明的多价TCR复合物可以具有增强的对GVYDGREHTV HLA-A2复合物的结合能力。因此，本发明的TCR的多价复合物也包括在本发明内。根据本发明的这种多价TCR复合物尤其可用于跟踪或靶向在体外或体内提呈特定抗原的细胞，并且还可用作产生具有此类用途的其它多价TCR复合物的中间体。

[0080] 如本领域众所周知的，TCR可以经历翻译后修饰。糖基化是一种这样的修饰，其包含寡糖部分与TCR链中限定的氨基酸的共价附着。例如，天冬酰胺残基或丝氨酸/苏氨酸残基是寡糖附着的公知位置。特定蛋白的糖基化状态取决于一些因素，包括蛋白序列、蛋白构象和某些酶的可用性。此外，糖基化状态(即寡糖类型、共价连接和附着的总数)可以影响蛋白功能。因此，当生产重组蛋白时，通常需要控制糖基化。已经使用控制的糖基化来改善基于抗体的治疗剂(Jefferis R.,Nat Rev Drug Discov.2009Mar;8(3):226-34.)。对于本发明的可溶的TCR，可以通过例如在体内使用特定细胞系或通过体外化学修饰控制糖基化。这种修饰是期望的，因为糖基化可以改善药代动力学，降低免疫原性并更接近地模拟天然人蛋白(Sinclair AM和Elliott S.,Pharm Sci.2005Aug;94(8):1626-35)。

[0081] 为了施用至患者，本发明的TCR、核酸和/或细胞(通常与可检测标记或治疗剂结合)可以与药学上可接受的载体或赋形剂一起以药物组合物提供。根据本发明的治疗或成像TCR通常作为无菌药物组合物的一部分提供，其通常包括药学上可接受的载体。该药物组合物可以是任何合适的形式(取决于将其施用至患者所期望的方法)。其可以以单位剂型提供，一般在密闭容器中提供，并且可以作为试剂盒的一部分提供。这样的试剂盒通常(尽管不一定)包括使用说明书。其可以包括多个所述单位剂型。

[0082] 药物组合物可适于通过任何合适的途径施用，优选肠胃外(包括皮下、肌内或优选静脉内)途径。这样的组合物可以通过药学领域中已知的任何方法制备，例如通过在无菌条件下将活性成分与载体或赋形剂混合。

[0083] 本发明的物质的剂量可以在宽限度之间变化，这取决于待治疗的疾病或病症、待治疗个体的年龄和状况等，并且医生将最终确定要使用的合适剂量。

[0084] 本发明的TCR、药物组合物、载体、核酸和细胞可以以实质上纯的形式提供，例如至少80％、至少85％、至少90％、至少91％、至少92％、至少93％、至少94％、至少95％、至少96％、至少97％、至少98％、至少99％或100％纯度。

[0085] 本发明还提供：

[0086] • 一种本发明的TCR、核酸或细胞，其用于药物，优选用于治疗癌症比如实体瘤(例如肺、肝和胃转移)和/或鳞状细胞癌的方法。

[0087] • 本发明的TCR、核酸或细胞在制备用于治疗癌症的药物中的用途。

[0088] • 一种治疗患者中癌症的方法，包括向患者施用本发明的TCR、核酸或细胞。

[0089] 本发明的每个方面的优选特征是对于其它方面中的每一个加以必要的修改。在本文提及的现有技术文件在法律允许的最大范围内并入。

[0090] 在以下非限制性实施例中进一步描述本发明。

[0091] 参考所附序列，其中：

[0092] SEQ ID No:1是MAGE A4肽

[0093] SEQ ID No:2是MAGE B2肽

[0094] SEQ ID No:3是亲本MAGE-A4特异性TCR的α链的细胞外部分的氨基酸序列，SEQ ID

No:4显示亲本MAGE-A4特异性TCRβ链氨基酸序列的β链的细胞外部分的氨基酸序列。

[0095] SEQ ID No:5显示天然Lenti TCR(本文称为“参照TCR”)的α链的氨基酸序列。除了半胱氨酸取代T162(即TRAC恒定区的T48)之外,序列与亲本TCR的序列相同。SEQ ID No:6是天然Lenti TCR(本文称为“参照TCR”)的β链。除了半胱氨酸取代S169(即TRBC2恒定区的S57)并且A187取代C187和D201取代N201外,序列与亲本TCR的序列相同。

[0096] SEQ ID No:7和8显示可存在于本发明的TCR中的α链的序列。形成CDR区或CDR区主要部分的子序列用下划线表示。

[0097] SEQ ID No:9显示可存在于本发明的TCR中的β链的序列。形成CDR区或CDR区主要部分的子序列加下划线。

[0098] SEQ ID NO:10-15显示了TCR A、B和C的可溶α和β链的序列。根据本发明,这些TCR中没有一种可以被开发成功能性TCR。

具体实施方式

[0099] 实施例

[0100] 实施例1-将参照MAGE-A4 TCRα链和β链可变区序列克隆到基于pGMT7的表达质粒

[0101] 通过在(Molecular Cloning a Laboratory Manual第三版,Sambrook和Russell)中描述的标准方法,分别将SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4的亲本MAGE-A4 TCR可变α和TCR可变β结构域克隆到含有Cα或Cβ的基于pGMT7的表达质粒中。使用Applied Biosystems 3730xl DNA分析仪对质粒进行测序。以相同的方式,克隆分别为SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:5的参照MAGE-A4 TCR可变α和TCR可变β结构域。

[0102] 将编码TCRα链可变区的DNA序列连接到用限制酶切割的pEX956中。将编码TCRβ链可变区的DNA序列连接到pEXb21中,其也用限制酶切割。

[0103] 将连接的质粒转化到感受态(competent)大肠杆菌(E.coli)菌株XL1-blue细胞中,并铺在含有100μg/mL氨苄青霉素的LB/琼脂板上。在37℃孵育过夜后,挑取单个克隆,并在37℃下振荡,在含有100μg/mL氨苄青霉素的5mL LB中生长过夜。使用Miniprep试剂盒(Qiagen)纯化克隆的质粒,并使用Applied Biosystems 3730x1 DNA分析仪对质粒进行测序。

[0104] 实施例2-可溶的参照MAGE-A4 TCR的表达、重折叠和纯化

[0105] 将实施例1中制备的分别含有参照TCRα-链和β-链的表达质粒分别地转化到大肠杆菌菌株BL21pLysS中,并将单个氨苄青霉素抗性克隆在37℃下在TYP(氨苄青霉素100μg/ml)介质中生长至OD $_{600}$为约0.6-0.8,然后用0.5mM IPTG诱导蛋白表达。诱导后3小时通过在Beckman J-6B中以4000rpm离心30分钟收获细胞。在$MgCl_2$和DNaseI存在下,用25ml Bug Buster(NovaGen)裂解细胞沉淀。通过在Beckman J2-21离心机中以13000rpm离心30分钟回收包涵体沉淀。然后进行三次洗涤剂洗涤以去除细胞碎片和膜成分。每次包涵体沉淀在Triton缓冲液(50mM Tris-HCl pH 8.0,0.5%Triton-X100,200mM NaCl,10mM NaEDTA)中匀浆化(homogenised),然后通过在Beckman J2-21中以13000rpm离心15分钟沉淀。然后通过在以下缓冲液中的类似洗涤去除洗涤剂和盐:50mM Tris-HCl pH 8.0,1mM NaEDTA。最后,将包涵体分成30mg的等份,并在-70℃冷冻。通过用6M胍-HCl溶解定量包涵体蛋白产量,OD测量在Hitachi U-2001分光光度计上进行。然后使用消光系数计算蛋白浓度。

[0106] 从冷冻储存中解冻约15mg的TCRα链和15mg的TCRβ链可溶的包涵体，并稀释到10ml的胍溶液(6M盐酸胍，50mM Tris HCl pH 8.1，100mM NaCl，10mM EDTA，10mM DTT)，以确保完全链变性。然后将含有完全还原和变性的TCR链的胍溶液注入到0.5升的以下重折叠缓冲液中：100mM Tris pH 8.1，400mM L-精氨酸，2mM EDTA，5M尿素。在加入变性的TCR链约5分钟之前，加入氧化还原对(盐酸半胱胺和胱氨二盐酸)至终浓度分别为6.6mM和3.7mM。将溶液放置约30分钟。将重折叠的TCR针对10L H_2O在Spectrapor 1膜(Spectrum；产品编号132670)中透析18-20小时。此后，将透析缓冲液换为新鲜的10mM Tris pH8.1(10L)两次，并在5℃±3℃下继续透析约8小时。

[0107] 通过将透析的重折叠物装载到POROS 50HQ阴离子交换柱上，并使用Akta纯化器(GE Healthcare)，经50柱体积的10mM Tris pH 8.1中的0-500mM NaCl梯度洗脱结合的蛋白，将可溶的TCR同降解产物和杂质分离。汇合峰级分，并加入蛋白酶抑制剂的混合物(Calbiochem)。然后将混合的级分储存在4℃，并通过考马斯染色的SDS-PAGE分析，然后汇合并浓缩。最后，使用在PBS缓冲液(Sigma)中预平衡的GE Healthcare Superdex 75HR凝胶过滤柱纯化和表征可溶的TCR。在相对分子量约50kDa洗脱的峰汇合并浓缩，然后通过BIAcore表面等离子体共振分析进行表征。

[0108] 实施例3-结合表征

[0109] BIAcore分析

[0110] 表面等离子体共振生物传感器(BIAcore 3000™)可用于分析可溶的TCR与其肽-MHC配体的结合。这通过产生可被固定到链霉亲和素包被的结合表面(传感器芯片)的可溶的生物素化肽-HLA(“pHLA”)复合物而促进。传感器芯片包含四个单独的流动池，其能够同时测量T细胞受体与四种不同pHLA复合物的结合。手动注入pHLA复合物允许容易地操作固定的I类分子的精确水平。

[0111] 在体外从含有组成型亚基蛋白(constituent subunit proteins)和合成肽的细菌表达的包涵体，进行生物素化的I类HLA-A*0201分子的重折叠，随后纯化和在体外酶生物素化(O'Callaghan等人(1999)Anal.Biochem.266:9-15)。HLA-A*0201-重链与C-末端生物素标签表达，所述C-末端生物素标签在合适的构建体中替代蛋白的跨膜结构域和细胞质结构域。获得约75mg/升细菌培养物的包涵体表达水平。MHC轻链或β2-微球蛋白也在约500mg/升细菌培养物的水平从合适的构建体在大肠杆菌中表达为包涵体。

[0112] 裂解大肠杆菌细胞，并将包涵体纯化至约80％纯度。来自包涵体的蛋白在6M胍-HCl，50mM Tris pH 8.1，100mM NaCl，10mM DTT，10mM EDTA中变性，并以浓度30mg/升的重链，30mg/升的β2m，加入0.4M L-精氨酸、100mM Tris pH 8.1、3.7mM胱氨二盐酸、6.6mM盐酸半胱胺、4mg/L需要由HLA-A*02分子负载的MAGE-A4 GVYDGREHTV或MAGE-B2 GVYDGEEHSV肽中，通过在<5℃加入单一的变性蛋白脉冲进入重折叠缓冲液中进行重折叠。重折叠在4℃时进行至少1小时方能完成。

[0113] 通过在10体积的10mM Tris pH 8.1中透析来交换缓冲液。需要两次更换缓冲液以充分降低溶液的离子强度。然后将蛋白溶液通过1.5μm的乙酸纤维素过滤器过滤，并加载到POROS 50HQ阴离子交换柱(8ml柱床体积)上。使用Akta纯化器(GE Healthcare)，用在10mM Tris pH 8.1中的线性0-500mM NaCl梯度洗脱蛋白。在约250mM NaCl时，洗脱HLA-A*0201-肽复合物，收集峰级分，加入蛋白酶抑制剂的混合物(Calbiochem)，并将级分在冰上冷却。

[0114] 使用在相同缓冲液中平衡的GE Healthcare快速脱盐柱将生物素标记的pHLA分子缓冲液交换到10mM Tris pH 8.1,5mM NaCl中。在洗脱后立即将含蛋白的级分在冰上冷却并加入蛋白酶抑制剂混合物(Calbiochem)。然后加入生物素化试剂:1mM生物素,5mM ATP(缓冲至pH 8),7.5mM $MgCl_2$和5μg/ml BirA酶(根据O'Callaghan等人(1999)Anal.Biochem.266:9-15纯化)。然后将混合物在室温下孵育过夜。

[0115] 使用凝胶过滤色谱纯化生物素化的pHLA-A*0201分子。用过滤的PBS预平衡GE Healthcare Superdex 75HR 10/30柱,并加载1ml生物素化反应混合物,并使用Akta纯化器(GE Healthcare)以0.5ml/min用PBS处理(developed)柱。生物素化的pHLA-A*0201分子在约15ml时以单峰洗脱。汇合含有蛋白的级分,在冰上冷却,加入蛋白酶抑制剂混合物。使用考马斯结合测定(PerBio)确定蛋白浓度,将生物素化的pHLA-A*01分子的等份在-20℃冷冻储存。

[0116] 这种固定化的复合物能够结合T细胞受体和共同受体CD8αα,二者都可以注入可溶相中。如果TCR在可溶或固定相中使用,观察到可溶TCR的pHLA结合特性在定性和定量上相似。这是对可溶物质部分活性的重要控制,并且还表明生物素化的pHLA复合物在生物学上与非生物素化的复合物一样有活性。

[0117] 在BIAcore 3000™表面等离子体共振(SPR)生物传感器上测量在小流动池内的传感器表面附近以响应单位(RU)表示的折射率的变化,该原理可用于检测受体配体相互作用并分析它们的亲和力和动力学参数。BIAcore实验在25℃的温度下,使用PBS缓冲液(Sigma,pH 7.1-7.5)作为运行缓冲液,和在制备的蛋白样本的稀释液中进行。链霉亲和素通过标准胺偶联方法固定到流动池。pHLA复合物通过生物素标签固定。然后使可溶的TCR以恒定的流速通过不同流动池的表面,测量该情况下的SPR响应以进行测定。

[0118] 平衡结合常数

[0119] 上述BIAcore分析方法用于确定平衡结合常数。制备参照MAGE-A4 TCR的二硫连接的可溶异二聚体形式的系列稀释液,并以5μl/分钟的恒定流速在两种不同的流动池中注入;一个用约1000RU的特异性GVYDGREHTV HLA-A*0201复合物包被,第二个用约1000RU的非特异性复合物包被。使用来自对照池的测量值对每种浓度的响应进行标准化。将标准化的数据响应对TCR样本的浓度作图,并拟合到非线性曲线拟合模型,以计算平衡结合常数K_D。(Price&Dwek,Principles and Problems in Physical Chemistry for Biochemists(第二版)1979,Clarendon出版社,牛津)。参照MAGE-A4 TCR的二硫连接的可溶形式(实施例2)显示出约2.00μM的K_D。来自于相同的BIAcore数据,T1/2约为0.95s。

[0120] 动力学参数

[0121] 上述BIAcore分析方法也用于确定平衡结合常数和解离速率。

[0122] 对于高亲和力TCR(参见下文实施例4),通过实验测量解离速率常数k_{off}和结合速率常数k_{on}来确定K_D。平衡常数K_D计算为k_{off}/k_{on}。

[0123] TCR注入在两个不同的池上,其中一个包被有约1000RU的特异性GVYDGREHTV HLA-A*0201复合物,第二个包被有约1000RU的非特异性复合物。流速设定为50μl/min。通常注入250μl浓度为约1μM的TCR。然后使缓冲液流过,直到响应回到基线或>2小时之后。使用BIAevaluation软件计算动力学参数。将解离相拟合为能够计算半衰期的单对数衰减方程。

[0124] 实施例4-本发明高亲和力TCR的制备

[0125] 如实施例1中那样制备分别含有TCRα-链和β-链的表达质粒：

[0126]

TCR ID	α链SEQ ID No	β链SEQ ID No
TCR1(亲本)	3	4
TCR2	3	9
TCR3	7	9
TCR4	8	9

[0127] 将质粒分别转化到大肠杆菌菌株BL21pLysS中，并将单个氨苄青霉素抗性克隆，在37℃下在TYP(氨苄青霉素100μg/ml)介质中生长至OD_{600}为约0.6-0.8，然后用0.5mM IPTG诱导蛋白表达。诱导后3小时通过在Beckman J-6B中以4000rpm离心30分钟收获细胞。在$MgCl_2$和DNaseI的存在下，用25ml Bug Buster(Novagen)裂解细胞沉淀。通过在Beckman J2-21离心机中以13000rpm离心30分钟回收包涵体沉淀。然后进行三次洗涤剂洗涤以去除细胞碎片和膜成分。每次包涵体沉淀在Triton缓冲液(50mM Tris-HCl pH 8.0,0.5％Triton-X100，200mM NaCl,10mM NaEDTA)中匀浆化，然后通过在Beckman J2-21中以13000rpm离心15分钟沉淀。然后通过在以下缓冲液中的类似洗涤去除洗涤剂和盐:50mM Tris-HCl pH 8.0,1mM NaEDTA。最后，将包涵体分成30mg的等份，并在-70℃冷冻。通过用6M胍-HCl溶解定量包涵体蛋白产量，OD测量在Hitachi U-2001分光光度计上进行。然后使用消光系数计算蛋白浓度。

[0128] 将本发明每种TCR的约10mg TCRα链和10mg TCRβ链的可溶包涵体稀释到10ml的胍溶液(6M盐酸胍,50mM Tris HCl pH 8.1,100mM NaCl,10mM EDTA,10mM DTT)中，以确保完全的链变性。然后将含有完全还原和变性的TCR链的胍溶液注入到0.5升的以下重折叠缓冲液中:100mM Tris pH 8.1,400mM L-精氨酸,2mM EDTA,5M尿素。在加入变性的TCR链约5分钟之前，加入氧化还原对(盐酸半胱胺和胱氨二盐酸)至终浓度分别为6.6mM和3.7mM。将溶液放置约30分钟。将重折叠的TCR在10L H_2O中在Spectrapor 1膜(Spectrum;产品编号132670)中透析18-20小时。此后，将透析缓冲液换为新鲜的10mM Tris pH8.1(10L)两次，并在5℃±3℃下继续透析约8小时。

[0129] 通过将透析的重折叠物装载到POROS 50HQ阴离子交换柱上，并使用Akta纯化器(GE Healthcare)，用10mM Tris pH 8.1中的0-500mM NaCl梯度经15柱体积洗脱结合的蛋白，将可溶的TCR同降解产物和杂质分离。然后将汇合的级分储存在4℃，并通过考马斯染色的SDS-PAGE分析，然后汇合并浓缩。最后，使用在PBS缓冲液(Sigma)中预平衡的GE Healthcare Superdex 75HR凝胶过滤柱纯化和表征可溶的TCR。在相对分子量约50kDa洗脱的峰汇合并浓缩，然后通过BIAcore表面等离子体共振分析进行表征。

[0130] 使用实施例3的方法评估由此制备的TCR对MAGE-A4表位或MAGE-B2表位的亲和力谱，并与参照TCR进行比较。结果列于下表中：

[0131]

	MAGE A4 K_D(μM)	MAGE-B2 K_D(μM)
参照(TCR1)	65.1	17
TCR2	17.2	197.5
TCR3	2.6	27.6
TCR4	5.1	52.6

[0132] 还尝试基于SEQ ID No:10/11、12/13、14/15的组合制备高亲和力TCR。

[0133] 在TCR A的情况下，其组合了SEQ ID No:10的α链和SEQ ID No:11的β链，注意到

MAGE-A1、MAGE-A10和PRAME之间的交叉反应性。通过突变和选择不可能去除这种交叉反应性。

[0134] TCR B组合了SEQ ID No:12的α链和SEQ ID No:13的β链。TCR B不能折叠形成可溶的TCR,因此不可能具有结合表征。

[0135] TCR C组合了SEQ ID NO:14的α链和SEQ ID No:15的β链。该TCR在表达时是可溶的并且可以结合抗原。然而,当在T细胞中表达时,TCR C显示无活性。

[0136] 实施例5-用亲本和变体MAGE-A4 TCR转染T细胞

[0137] (a)通过Express-In介导瞬时转染293T细胞的慢病毒载体制备

[0138] 第三代慢病毒包装系统用于包装含有编码期望的TCR的基因的慢病毒载体。使用Express-In介导的转染(Open Biosystems),将4种质粒(一种含有实施例5c(下文)中所述的TCRα链-P2A-TCRβ链单ORF基因的慢病毒载体和3个含有构建感染性但非复制性慢病毒颗粒所必需的其它成分的质粒)转染293T细胞。

[0139] 对于转染,取一个T150瓶对数生长期的293T细胞,细胞均匀分布在板上,略高于50%汇合。将Express-In等份升至室温。将3ml无血清介质(RPMI 1640+10mM HEPES)置于无菌的15ml锥形管中。将174μl的Express-In试剂直接加入无血清介质中(这提供了试剂与DNA重量比为3.6:1)。通过颠倒管3-4次彻底混合,并在室温下孵育5-20分钟。

[0140] 在单独的1.5ml微管中加入15μg质粒DNA到预混合的包装混合物等份(含有18μg pRSV.REV(Rev表达质粒)、18μg pMDLg/p.RRE(Gag/Pol表达质粒)、7μg pVSV-G(VSV糖蛋白表达质粒),通常约22μl,向上和向下移液以确保DNA混合物的均一性。向DNA混合物中滴加约1mL Express-In/无血清介质,然后轻轻地上下移液,然后转移回Express-In/无血清介质的其余部分。将管颠倒3-4次,并在室温下孵育15-30分钟。从细胞瓶中去除旧的培养介质。将Express-In/介质/DNA(3mL)复合物直接加入到293T细胞的直立瓶的底部。缓慢地将瓶平放以覆盖细胞,并非常轻轻地摇动以确保均匀分布。1分钟后,加入22ml新鲜的培养介质(R10+HEPES:RPMI 1640、10%热灭活的FBS、1%Pen/Strep/L-谷氨酰胺,10mM HEPES),小心地将瓶送回培养箱。将其在37℃/5%CO2下孵育过夜。24小时后,收获含有包装的慢病毒载体的介质。

[0141] 为了收获包装的慢病毒载体,将细胞培养上清液通过0.45微米尼龙注射器过滤器进行过滤,将培养介质在10,000g下离心18小时(或112,000g,2小时),去除大部分上清液(小心不要干扰沉淀),并将沉淀重悬在剩余的几毫升上清液中(通常为来自每管31ml起始体积的约2ml)。将其以1ml的等份在干冰上快速冷冻,并储存在-80℃。

[0142] (b)用含有感兴趣基因的包装的慢病毒载体转导T细胞

[0143] 在用包装的慢病毒载体转导之前,从健康志愿者的血液中分离人T细胞(依据需要,CD8或CD4或两者)。将这些细胞计数,并在48孔板中以1×10^6个细胞/ml(0.5mL/孔),在含有50U/mL IL-2的R10孵育过夜,所述48孔板以每个细胞3个珠的比例含有预洗涤的抗CD3/CD28抗体包被的微珠(Dynabeads®T cell expander,Invitrogen)。

[0144] 在过夜刺激后,将0.5ml净(neat)包装的慢病毒载体加入到期望的细胞中。将其在37℃/5%CO2下孵育3天。转导后3天,计数细胞,并稀释至0.5×10^6个细胞/ml。根据需要加入含有IL-2的新鲜介质。转导后5-7天去除珠。计数细胞,并每隔两天替换或添加含有IL-2的新鲜介质。将细胞保持在0.5×10^6至1×10^6个细胞/mL。从第3天通过流式细胞术分析细

胞，并从第5天用于功能测定(例如用于IFNγ释放的ELISpot，参见实施例6)。从第10天开始，或当细胞减慢分裂和尺寸减小时，将细胞以至少4×10^6个细胞/瓶的等份(在90％FBS/10％DMSO中以1×10^7细胞/ml)冷冻储存。

[0145] 实施例6-MAGE A4 TCR工程化T细胞的活化

[0146] 进行以下测定以证实对肿瘤细胞系响应的TCR转导的细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的活化。使用ELISPOT测定测量的IFN-γ生产被用作细胞毒性T淋巴细胞(CTL)活化的读出。

[0147] ELISPOT

[0148] 试剂

[0149] 测定介质：10％FCS(Gibco，Cat#2011-09)，88％RPMI 1640(Gibco，Cat#42401)，1％谷氨酰胺(Gibco Cat#25030)和1％青霉素/链霉素(Gibco Cat#15070-063)。

[0150] 洗涤缓冲液：0.01M PBS/0.05％吐温20(Tween 20)

[0151] PBS(Gibco Cat#10010)

[0152] 人IFNγELISPOT试剂盒(BD Bioscience；Cat#551849)，其含有捕获和检测抗体和人IFN-γPVDF ELISPOT 96孔板，以及相关AEC底物组(BD Bioscience，Cat#551951)。

[0153] 方法

[0154] 靶细胞制备

[0155] 该方法中使用的靶细胞是天然表位提呈细胞：A375人黑素瘤细胞，其为HLA-$A2^+$ MAGE $A10^+$。使用HLA-$A2^+$MAGE $A10^-$的HCT116人结肠癌作为阴性对照。通过在Megafuge®1.0(Heraeus)中以1200rpm离心10分钟共3次，洗涤足够的靶细胞(50,000个细胞/孔)。然后将细胞以10^6个细胞/ml重悬于测定介质中。

[0156] 效应细胞制备

[0157] 在该方法中使用的效应细胞(T细胞)是外周血淋巴细胞(PBL)，其通过使用CD14和CD25微珠试剂盒(分别为Miltenyi Biotech Cat#130-050-201和130-092-983)通过阴性选择从健康志愿者静脉血新鲜分离的外周血单核细胞(PBMC)中获得。使用抗CD3/CD28包被的珠(Dynabeads®T cell expander，Invitrogen)刺激细胞，用携带编码感兴趣的全αβTCR的基因的慢病毒(基于实施例5中描述的构建体)转导，并在含有50U/mL IL-2的测定介质中扩增，直到转导后10至13天。然后将这些细胞置于测定介质中，然后通过在Megafuge®1.0(Heraeus)中以1200rpm离心10分钟进行洗涤。然后将细胞以最终所需浓度的4倍重悬于测定介质中。

[0158] 如下制备板：将100μL抗IFN-γ捕获抗体稀释在每板10ml的无菌PBS中。然后将100μL稀释的捕获抗体分配到每个孔中。然后将板在4℃孵育过夜。孵育后，洗涤板(程序1，板类型2，Ultrawash Plus 96孔板洗涤器；Dynex)以去除捕获抗体。然后通过向每个孔中加入200μL测定介质，在室温下孵育2小时封闭板。然后从板洗涤测定介质(程序1，板类型2，Ultrawash Plus 96孔板洗涤器，Dynex)，并通过甩掉和在纸巾上拍打ELISPOT板去除任何剩余的介质。

[0159] 然后将测定的成分以下列顺序加入ELISPOT板中：

[0160] 50μL的靶细胞，10^6个细胞/ml(给予总共50,000个靶细胞/孔)

[0161] 50μL介质(测定介质)

[0162] 50μL效应细胞(20,000个TCR转导的PBL细胞/孔)

[0163] 然后将板孵育过夜(37℃/5％CO_2)。第二天,将板用洗涤缓冲液洗涤三次(程序1,板类型2,Ultrawash Plus 96孔板洗涤器,Dynex),并在纸巾上拍打干燥以去除过量的洗涤缓冲液。然后向每个孔中加入100μl第一检测抗体。使用制造商说明书中指定的稀释度将第一检测抗体稀释到10mL的稀释缓冲液(单板所需的体积)中。然后将板在室温下孵育至少2小时,然后用洗涤缓冲液洗涤三次(程序1,板类型2,Ultrawash Plus 96孔板洗涤器,Dynex);通过在纸巾上拍打板来去除过量的洗涤缓冲液。

[0164] 通过向每孔中加入100μL稀释的链霉亲和素-HRP,并在室温下孵育板1小时,进行第二检测。使用制造商说明书中指定的稀释度将链霉亲和素-HRP稀释到10mL稀释缓冲液中(单板所需的体积)。然后将板用洗涤缓冲液洗涤三次(程序1,板类型2,Ultrawash Plus 96孔板洗涤器,Dynex),并在纸巾上拍打以去除过量的洗涤缓冲液。然后通过向每个孔中加入200μL PBS将板洗涤两次,将缓冲液甩掉并在纸巾上拍打以去除过量的缓冲液。在使用前不超过15分钟,向每1ml的AEC底物中加入一滴(20μL)的AEC发色体并混合。每个板制备10ml该溶液;每孔加入100μL。然后使用箔保护板免受光照,并常规监测斑点显色,通常在5-20分钟内发生。将板在自来水中洗涤以终止显色反应,并在其拆卸成三个组成部分之前摇动干燥。然后使板在室温下干燥至少2小时,然后使用Immunospot®酶标仪(Plate reader)(CTL;Cellular Technology Limited)计数斑点。

[0165] 实施例7-通过用所有替代氨基酸取代来鉴定结合基序

[0166] 获得天然MAGE-A4肽的变体,其中每个位置的氨基酸残基被所有19种替代天然存在的氨基酸依次替换,使得总共制备了171种肽。将天然和氨基酸取代的肽脉冲到抗原提呈细胞上,并且用ELISpot测定法所测量的干扰素γ(IFNγ)产生用作TCR4转导的T细胞活化的读出。通过相对于天然肽在T细胞活性中大于50％的减少来定义必需位置。

[0167] 如实施例6所述进行ELISpot测定。

[0168] 肽的每个位置处的耐受残基如下所示。下划线的氨基酸代表肽中相应位置的天然残基。

[0169]

位置	耐受残基
1	G̲H
2	V̲IL
3	Y̲VF
4	D̲N
5	G̲N
6	KAR̲GSCHTQMFVNLYI
7	S̲HQMEILWPYFATCNDGRKV
8	DSHQME̲ILWPYFATCNGRKV
9	SH̲QMEILWPYFATCNDGRKV
10	V̲FMAILT

[0170] 因此,显而易见的是,当在抗原提呈细胞的表面上与HLA-A*0201复合时,MAGE A4 TCR4至少与肽(SEQ ID NO:1)的V2、Y3和D4接触。

[0171] SEQ ID No:1MAGE A4表位

[0172] GVYDGREHTV

[0173] SEQ ID No:2MAGE B2表位

[0174] GVYDGEEHSV

[0175] SEQ ID No:3α可变链

[0176] MKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIMTFSENTKS NGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSWGKLQF

[0177] SEQ ID No:4β可变链

[0178] MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDP GLGLRLIYYSFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSLESAIPNQTALYFCATSGQGAYN EQFF

[0179] SEQ ID No:5α链可溶形式

[0180] MKKHLTTFLVILWLYFYRGNGKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQD TGRGPVSLTIMTFSENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSW GKLQFGAGTQVVVTPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYI TDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

[0181] SEQ ID No:6β链可溶形式

[0182] MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDP GLGLRLIYYSFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSLESAIPNQTALYFCATSGQGAYN EQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWV NGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSE NDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD

[0183] SEQ ID No:7突变α可变链

[0184] MKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTIVTFSENTKSN GRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSWGKLQF

[0185] SEQ ID No:8突变α可变链

[0186] MKNQVEQSPQSLIILEGKNCTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSN GRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVSGGTDSWGKLQF

[0187] SEQ ID No:9突变β可变链

[0188] MASLLFFCGAFYLLGTGSMDADVTQTPRNRITKTGKRIMLECSQTKGHDRMYWYRQDP GLGLRLIYYSFDVKDINKGEISDGYSVSRQAQAKFSLSLESAIPNQTALYFCATSGQGAYE EQFF

[0189] SEQ ID No:10α链可溶形式

[0190] METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPG KGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVGGYSTLTFG KGTVLLVSPDNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVL DMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTN LNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

[0191] SEQ ID No:11β链可溶形式

[0192] MSISLLCCAAFPLLWAGPVNAGVTQTPKFRILKIGQSMTLQCAQDMNHNYMYWYRQDP GMGLKLIYYSVGAGITDKGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLELAAPSQTSVYFCASSYSRW SPLHFGNGTRLTVTEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKRKDF

[0193] SEQ ID No:12α链可溶形式

[0194] MQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKED GRFTAQLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCAVKMANQAGTALIFGKGTTLSVSSNIQNP DPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVA WSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

[0195] SEQ ID No:13β链可溶形式

[0196] MQDGGITQSPKFQVLRTGQSMTLLCAQDMNHEYMYWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGITD QGEVPNGYNVSRLNKREFSLRLESAAPSQTSVYFCASLGGLADEQFFGPGTRLTVLEDL KNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQP LKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQI VSAEAWGRAD

[0197] SEQ ID No:14α链可溶形式

[0198] MKTFAGFSFLFLWLQLDCMSRGEDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQE PGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAERNSGAGS YQLTFGKGTKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYIT DKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSF ETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

[0199] SEQ ID No:15β链可溶形式

[0200] MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQNPRHKITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQTL GQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSLFS GVNTEAFFGQGTRLTVVEDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVEL SWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYA VLVSALVLMAMVKRKDF

[0001] 序列表

[0002] <110> 艾达普特免疫有限公司

[0003] <120> T细胞受体

[0004] <130> P5486PC00

[0005] <140> PCT/EP2017/058580

[0006] <141> 2017-04-10

[0007] <150> GB 1606177.2

[0008] <151> 2016-04-08

[0009] <160> 28

[0010] <170> PatentIn version 3.5

[0011] <210> 1

[0012] <211> 10

[0013] <212> PRT

[0014] <213> 人类

[0015] <400> 1

[0016] Gly Val Tyr Asp Gly Arg Glu His Thr Val

[0017] 1 5 10

[0018] <210> 2

[0019] <211> 10

[0020] <212> PRT

[0021] <213> 人类

[0022] <400> 2

[0023] Gly Val Tyr Asp Gly Glu Glu His Ser Val

[0024] 1 5 10

[0025] <210> 3

[0026] <211> 105

[0027] <212> PRT

[0028] <213> 人工序列

[0029] <220>

[0030] <221> 来源

[0031] <223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

[0032] <400> 3

[0033] Met Lys Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu

[0034] 1 5 10 15

[0035] Gly Lys Asn Cys Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser

[0036] 20 25 30

[0037] Asn Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu

[0038] 35 40 45

[0039] Thr Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr
[0040] 50 55 60
[0041] Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala
[0042] 65 70 75 80
[0043] Ser Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Ser Gly Gly
[0044] 85 90 95
[0045] Thr Asp Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe
[0046] 100 105
[0047] <210> 4
[0048] <211> 123
[0049] <212> PRT
[0050] <213> 人工序列
[0051] <220>
[0052] <221> 来源
[0053] <223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"
[0054] <400> 4
[0055] Met Ala Ser Leu Leu Phe Phe Cys Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Gly Thr
[0056] 1 5 10 15
[0057] Gly Ser Met Asp Ala Asp Val Thr Gln Thr Pro Arg Asn Arg Ile Thr
[0058] 20 25 30
[0059] Lys Thr Gly Lys Arg Ile Met Leu Glu Cys Ser Gln Thr Lys Gly His
[0060] 35 40 45
[0061] Asp Arg Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu
[0062] 50 55 60
[0063] Ile Tyr Tyr Ser Phe Asp Val Lys Asp Ile Asn Lys Gly Glu Ile Ser
[0064] 65 70 75 80
[0065] Asp Gly Tyr Ser Val Ser Arg Gln Ala Gln Ala Lys Phe Ser Leu Ser
[0066] 85 90 95
[0067] Leu Glu Ser Ala Ile Pro Asn Gln Thr Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Thr
[0068] 100 105 110
[0069] Ser Gly Gln Gly Ala Tyr Asn Glu Gln Phe Phe
[0070] 115 120
[0071] <210> 5
[0072] <211> 229
[0073] <212> PRT
[0074] <213> 人工序列
[0075] <220>
[0076] <221> 来源
[0077] <223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

[0078] <400> 5

[0079] Met Lys Lys His Leu Thr Thr Phe Leu Val Ile Leu Trp Leu Tyr Phe

[0080] 1 5 10 15

[0081] Tyr Arg Gly Asn Gly Lys Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu

[0082] 20 25 30

[0083] Ile Ile Leu Glu Gly Lys Asn Cys Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val

[0084] 35 40 45

[0085] Ser Pro Phe Ser Asn Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly

[0086] 50 55 60

[0087] Pro Val Ser Leu Thr Ile Met Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn

[0088] 65 70 75 80

[0089] Gly Arg Tyr Thr Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu

[0090] 85 90 95

[0091] His Ile Thr Ala Ser Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val

[0092] 100 105 110

[0093] Val Ser Gly Gly Thr Asp Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe Gly Ala Gly

[0094] 115 120 125

[0095] Thr Gln Val Val Val Thr Pro Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val

[0096] 130 135 140

[0097] Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe

[0098] 145 150 155 160

[0099] Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp

[0100] 165 170 175

[0101] Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe

[0102] 180 185 190

[0103] Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys

[0104] 195 200 205

[0105] Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro

[0106] 210 215 220

[0107] Ser Pro Glu Ser Ser

[0108] 225

[0109] <210> 6

[0110] <211> 262

[0111] <212> PRT

[0112] <213> 人工序列

[0113] <220>

[0114] <221> 来源

[0115] <223> /注="人工序列的描述：合成多肽"

[0116] <400> 6

[0117] Met Ala Ser Leu Leu Phe Phe Cys Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Gly Thr
[0118] 1 5 10 15
[0119] Gly Ser Met Asp Ala Asp Val Thr Gln Thr Pro Arg Asn Arg Ile Thr
[0120] 20 25 30
[0121] Lys Thr Gly Lys Arg Ile Met Leu Glu Cys Ser Gln Thr Lys Gly His
[0122] 35 40 45
[0123] Asp Arg Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu
[0124] 50 55 60
[0125] Ile Tyr Tyr Ser Phe Asp Val Lys Asp Ile Asn Lys Gly Glu Ile Ser
[0126] 65 70 75 80
[0127] Asp Gly Tyr Ser Val Ser Arg Gln Ala Gln Ala Lys Phe Ser Leu Ser
[0128] 85 90 95
[0129] Leu Glu Ser Ala Ile Pro Asn Gln Thr Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Thr
[0130] 100 105 110
[0131] Ser Gly Gln Gly Ala Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg
[0132] 115 120 125
[0133] Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala
[0134] 130 135 140
[0135] Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
[0136] 145 150 155 160
[0137] Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
[0138] 165 170 175
[0139] Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro
[0140] 180 185 190
[0141] Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu
[0142] 195 200 205
[0143] Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn
[0144] 210 215 220
[0145] His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
[0146] 225 230 235 240
[0147] Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
[0148] 245 250 255
[0149] Ala Trp Gly Arg Ala Asp
[0150] 260
[0151] <210> 7
[0152] <211> 105
[0153] <212> PRT
[0154] <213> 人工序列
[0155] <220>

[0156] <221> 来源

[0157] <223> /注="人工序列的描述：合成多肽"

[0158] <400> 7

[0159] Met Lys Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu

[0160] 1 5 10 15

[0161] Gly Lys Asn Cys Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser

[0162] 20 25 30

[0163] Asn Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu

[0164] 35 40 45

[0165] Thr Ile Val Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr

[0166] 50 55 60

[0167] Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala

[0168] 65 70 75 80

[0169] Ser Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Ser Gly Gly

[0170] 85 90 95

[0171] Thr Asp Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe

[0172] 100 105

[0173] <210> 8

[0174] <211> 105

[0175] <212> PRT

[0176] <213> 人工序列

[0177] <220>

[0178] <221> 来源

[0179] <223> /注="人工序列的描述：合成多肽"

[0180] <400> 8

[0181] Met Lys Asn Gln Val Glu Gln Ser Pro Gln Ser Leu Ile Ile Leu Glu

[0182] 1 5 10 15

[0183] Gly Lys Asn Cys Thr Leu Gln Cys Asn Tyr Thr Val Ser Pro Phe Ser

[0184] 20 25 30

[0185] Asn Leu Arg Trp Tyr Lys Gln Asp Thr Gly Arg Gly Pro Val Ser Leu

[0186] 35 40 45

[0187] Thr Ile Leu Thr Phe Ser Glu Asn Thr Lys Ser Asn Gly Arg Tyr Thr

[0188] 50 55 60

[0189] Ala Thr Leu Asp Ala Asp Thr Lys Gln Ser Ser Leu His Ile Thr Ala

[0190] 65 70 75 80

[0191] Ser Gln Leu Ser Asp Ser Ala Ser Tyr Ile Cys Val Val Ser Gly Gly

[0192] 85 90 95

[0193] Thr Asp Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe

[0194] 100 105

[0195] <210> 9

[0196] <211> 123

[0197] <212> PRT

[0198] <213> 人工序列

[0199] <220>

[0200] <221> 来源

[0201] <223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

[0202] <400> 9

[0203] Met Ala Ser Leu Leu Phe Phe Cys Gly Ala Phe Tyr Leu Leu Gly Thr

[0204] 1 5 10 15

[0205] Gly Ser Met Asp Ala Asp Val Thr Gln Thr Pro Arg Asn Arg Ile Thr

[0206] 20 25 30

[0207] Lys Thr Gly Lys Arg Ile Met Leu Glu Cys Ser Gln Thr Lys Gly His

[0208] 35 40 45

[0209] Asp Arg Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu

[0210] 50 55 60

[0211] Ile Tyr Tyr Ser Phe Asp Val Lys Asp Ile Asn Lys Gly Glu Ile Ser

[0212] 65 70 75 80

[0213] Asp Gly Tyr Ser Val Ser Arg Gln Ala Gln Ala Lys Phe Ser Leu Ser

[0214] 85 90 95

[0215] Leu Glu Ser Ala Ile Pro Asn Gln Thr Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Thr

[0216] 100 105 110

[0217] Ser Gly Gln Gly Ala Tyr Glu Glu Gln Phe Phe

[0218] 115 120

[0219] <210> 10

[0220] <211> 271

[0221] <212> PRT

[0222] <213> 人工序列

[0223] <220>

[0224] <221> 来源

[0225] <223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

[0226] <400> 10

[0227] Met Glu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Ile Leu Trp Leu Gln Leu Gln Trp

[0228] 1 5 10 15

[0229] Val Ser Ser Lys Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val

[0230] 20 25 30

[0231] Pro Glu Gly Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala

[0232] 35 40 45

[0233] Ile Tyr Asn Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr

[0234] 50 55 60

[0235] Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg

[0236] 65 70 75 80

[0237] Leu Asn Ala Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile

[0238] 85 90 95

[0239] Ala Ala Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Gly

[0240] 100 105 110

[0241] Gly Tyr Ser Thr Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Val Leu Leu Val Ser

[0242] 115 120 125

[0243] Pro Asp Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp

[0244] 130 135 140

[0245] Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser

[0246] 145 150 155 160

[0247] Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp

[0248] 165 170 175

[0249] Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala

[0250] 180 185 190

[0251] Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn

[0252] 195 200 205

[0253] Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser

[0254] 210 215 220

[0255] Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu

[0256] 225 230 235 240

[0257] Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys

[0258] 245 250 255

[0259] Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

[0260] 260 265 270

[0261] <210> 11

[0262] <211> 308

[0263] <212> PRT

[0264] <213> 人工序列

[0265] <220>

[0266] <221> 来源

[0267] <223> /注="人工序列的描述: 合成多肽"

[0268] <400> 11

[0269] Met Ser Ile Ser Leu Leu Cys Cys Ala Ala Phe Pro Leu Leu Trp Ala

[0270] 1 5 10 15

[0271] Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Arg Ile Leu

[0272] 20 25 30

[0273] Lys Ile Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His
[0274] 35 40 45
[0275] Asn Tyr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Lys Leu
[0276] 50 55 60
[0277] Ile Tyr Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Lys Gly Glu Val Pro
[0278] 65 70 75 80
[0279] Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg
[0280] 85 90 95
[0281] Leu Glu Leu Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser
[0282] 100 105 110
[0283] Ser Tyr Ser Arg Trp Ser Pro Leu His Phe Gly Asn Gly Thr Arg Leu
[0284] 115 120 125
[0285] Thr Val Thr Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
[0286] 130 135 140
[0287] Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
[0288] 145 150 155 160
[0289] Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
[0290] 165 170 175
[0291] Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln
[0292] 180 185 190
[0293] Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
[0294] 195 200 205
[0295] Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
[0296] 210 215 220
[0297] Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
[0298] 225 230 235 240
[0299] Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
[0300] 245 250 255
[0301] Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly
[0302] 260 265 270
[0303] Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr
[0304] 275 280 285
[0305] Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys
[0306] 290 295 300
[0307] Arg Lys Asp Phe
[0308] 305
[0309] <210> 12
[0310] <211> 208
[0311] <212> PRT

[0312] <213> 人工序列

[0313] <220>

[0314] <221> 来源

[0315] <223> /注="人工序列的描述：合成多肽"

[0316] <400> 12

[0317] Met Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu

[0318] 1 5 10 15

[0319] Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln

[0320] 20 25 30

[0321] Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile

[0322] 35 40 45

[0323] Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala

[0324] 50 55 60

[0325] Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser

[0326] 65 70 75 80

[0327] Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Lys Met Ala Asn

[0328] 85 90 95

[0329] Gln Ala Gly Thr Ala Leu Ile Phe Gly Lys Gly Thr Thr Leu Ser Val

[0330] 100 105 110

[0331] Ser Ser Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp

[0332] 115 120 125

[0333] Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser

[0334] 130 135 140

[0335] Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp

[0336] 145 150 155 160

[0337] Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala

[0338] 165 170 175

[0339] Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn

[0340] 180 185 190

[0341] Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser

[0342] 195 200 205

[0343] <210> 13

[0344] <211> 244

[0345] <212> PRT

[0346] <213> 人工序列

[0347] <220>

[0348] <221> 来源

[0349] <223> /注="人工序列的描述：合成多肽"

[0350] <400> 13

[0351] Met Gln Asp Gly Gly Ile Thr Gln Ser Pro Lys Phe Gln Val Leu Arg
[0352] 1 5 10 15
[0353] Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Leu Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu
[0354] 20 25 30
[0355] Tyr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile
[0356] 35 40 45
[0357] His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn
[0358] 50 55 60
[0359] Gly Tyr Asn Val Ser Arg Leu Asn Lys Arg Glu Phe Ser Leu Arg Leu
[0360] 65 70 75 80
[0361] Glu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Leu
[0362] 85 90 95
[0363] Gly Gly Leu Ala Asp Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr
[0364] 100 105 110
[0365] Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe
[0366] 115 120 125
[0367] Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val
[0368] 130 135 140
[0369] Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp
[0370] 145 150 155 160
[0371] Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro
[0372] 165 170 175
[0373] Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser Ser
[0374] 180 185 190
[0375] Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His Phe
[0376] 195 200 205
[0377] Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr
[0378] 210 215 220
[0379] Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp
[0380] 225 230 235 240
[0381] Gly Arg Ala Asp
[0382] <210> 14
[0383] <211> 275
[0384] <212> PRT
[0385] <213> 人工序列
[0386] <220>
[0387] <221> 来源
[0388] <223> /注="人工序列的描述：合成多肽"
[0389] <400> 14

[0390] Met Lys Thr Phe Ala Gly Phe Ser Phe Leu Phe Leu Trp Leu Gln Leu
[0391] 1 5 10 15
[0392] Asp Cys Met Ser Arg Gly Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser
[0393] 20 25 30
[0394] Val Arg Glu Gly Asp Ser Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser
[0395] 35 40 45
[0396] Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu
[0397] 50 55 60
[0398] Gln Leu Leu Thr Tyr Ile Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln
[0399] 65 70 75 80
[0400] Arg Leu Thr Val Leu Leu Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg
[0401] 85 90 95
[0402] Ile Ala Asp Thr Gln Thr Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu
[0403] 100 105 110
[0404] Arg Asn Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr
[0405] 115 120 125
[0406] Lys Leu Ser Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr
[0407] 130 135 140
[0408] Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr
[0409] 145 150 155 160
[0410] Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val
[0411] 165 170 175
[0412] Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys
[0413] 180 185 190
[0414] Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala
[0415] 195 200 205
[0416] Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser
[0417] 210 215 220
[0418] Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr
[0419] 225 230 235 240
[0420] Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile
[0421] 245 250 255
[0422] Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu
[0423] 260 265 270
[0424] Trp Ser Ser
[0425] 275
[0426] <210> 15
[0427] <211> 311
[0428] <212> PRT

[0429] <213> 人工序列

[0430] <220>

[0431] <221> 来源

[0432] <223> /注="人工序列的描述：合成多肽"

[0433] <400> 15

[0434] Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala

[0435] 1 5 10 15

[0436] Asp His Ala Asp Thr Gly Val Ser Gln Asn Pro Arg His Lys Ile Thr

[0437] 20 25 30

[0438] Lys Arg Gly Gln Asn Val Thr Phe Arg Cys Asp Pro Ile Ser Glu His

[0439] 35 40 45

[0440] Asn Arg Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Thr Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe

[0441] 50 55 60

[0442] Leu Thr Tyr Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Glu Lys Ser Arg Leu Leu

[0443] 65 70 75 80

[0444] Ser Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Pro Lys Gly Ser Phe Ser Thr Leu

[0445] 85 90 95

[0446] Glu Ile Gln Arg Thr Glu Gln Gly Asp Ser Ala Met Tyr Leu Cys Ala

[0447] 100 105 110

[0448] Ser Ser Leu Phe Ser Gly Val Asn Thr Glu Ala Phe Phe Gly Gln Gly

[0449] 115 120 125

[0450] Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu

[0451] 130 135 140

[0452] Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys

[0453] 145 150 155 160

[0454] Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu

[0455] 165 170 175

[0456] Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr

[0457] 180 185 190

[0458] Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr

[0459] 195 200 205

[0460] Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro

[0461] 210 215 220

[0462] Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn

[0463] 225 230 235 240

[0464] Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser

[0465] 245 250 255

[0466] Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr

[0467] 260 265 270

[0468] Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly

[0469] 275 280 285

[0470] Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala

[0471] 290 295 300

[0472] Met Val Lys Arg Lys Asp Phe

[0473] 305 310

[0474] <210> 16

[0475] <211> 10

[0476] <212> PRT

[0477] <213> 人类

[0478] <400> 16

[0479] Gly Val Tyr Asp Gly Ala Tyr Val Ser Val

[0480] 1 5 10

[0481] <210> 17

[0482] <211> 6

[0483] <212> PRT

[0484] <213> 人工序列

[0485] <220>

[0486] <221> 来源

[0487] <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

[0488] <400> 17

[0489] Val Ser Pro Phe Ser Asn

[0490] 1 5

[0491] <210> 18

[0492] <211> 6

[0493] <212> PRT

[0494] <213> 人工序列

[0495] <220>

[0496] <221> 来源

[0497] <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

[0498] <400> 18

[0499] Leu Thr Ile Met Thr Phe

[0500] 1 5

[0501] <210> 19

[0502] <211> 6

[0503] <212> PRT

[0504] <213> 人工序列

[0505] <220>

[0506] <221> 来源

[0507] <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

[0508] <400> 19

[0509] Leu Thr Arg Met Thr Phe

[0510] 1 5

[0511] <210> 20

[0512] <211> 6

[0513] <212> PRT

[0514] <213> 人工序列

[0515] <220>

[0516] <221> 来源

[0517] <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

[0518] <400> 20

[0519] Leu Thr Ile Val Thr Phe

[0520] 1 5

[0521] <210> 21

[0522] <211> 6

[0523] <212> PRT

[0524] <213> 人工序列

[0525] <220>

[0526] <221> 来源

[0527] <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

[0528] <400> 21

[0529] Leu Thr Ile Leu Thr Phe

[0530] 1 5

[0531] <210> 22

[0532] <211> 15

[0533] <212> PRT

[0534] <213> 人工序列

[0535] <220>

[0536] <221> 来源

[0537] <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

[0538] <400> 22

[0539] Cys Val Val Ser Gly Gly Thr Asp Ser Trp Gly Lys Leu Gln Phe

[0540] 1 5 10 15

[0541] <210> 23

[0542] <211> 5

[0543] <212> PRT

[0544] <213> 人工序列

[0545] <220>

[0546] <221> 来源

[0547] <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

[0548] <400> 23

[0549] Lys Gly His Asp Arg

[0550] 1 5

[0551] <210> 24

[0552] <211> 5

[0553] <212> PRT

[0554] <213> 人工序列

[0555] <220>

[0556] <221> 来源

[0557] <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

[0558] <400> 24

[0559] Ser Val Phe Asp Lys

[0560] 1 5

[0561] <210> 25

[0562] <211> 14

[0563] <212> PRT

[0564] <213> 人工序列

[0565] <220>

[0566] <221> 来源

[0567] <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

[0568] <400> 25

[0569] Cys Ala Thr Ser Gly Gln Gly Ala Tyr Asn Glu Gln Phe Phe

[0570] 1 5 10

[0571] <210> 26

[0572] <211> 14

[0573] <212> PRT

[0574] <213> 人工序列

[0575] <220>

[0576] <221> 来源

[0577] <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

[0578] <400> 26

[0579] Cys Ala Thr Ser Gly Gln Gly Ala Tyr Arg Glu Gln Phe Phe

[0580] 1 5 10

[0581] <210> 27

[0582] <211> 9

[0583] <212> PRT

[0584] <213> 人类

[0585] <400> 27

[0586] Gly Val Asp Gly Lys Ser Asp Ser Val

[0587] 1 5

[0588] <210> 28

[0589] <211> 5

[0590] <212> PRT

[0591] <213> 人工序列

[0592] <220>

[0593] <221> 来源

[0594] <223> /注="人工序列的描述: 合成肽"

[0595] <400> 28

[0596] Ser Phe Asp Val Lys

[0597] 1 5