



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 109563149 A

(43)申请公布日 2019.04.02

(21)申请号 201780049787.2

斯特芬·沃尔特

(22)申请日 2017.07.04

塞巴斯蒂安·邦克

(30)优先权数据

102016115246.3 2016.08.17 DE

62/376,059 2016.08.17 US

62/376,632 2016.08.18 US

(74)专利代理机构 上海麦其知识产权代理事务所(普通合伙) 31257

代理人 董红曼

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.02.14

(51)Int.Cl.

G07K 14/725(2006.01)

G07K 14/78(2006.01)

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/EP2017/066630 2017.07.04

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/033291 EN 2018.02.22

(71)申请人 伊玛提克斯生物技术有限公司

地址 德国蒂宾根

权利要求书2页 说明书25页

(72)发明人 莉奥妮·阿尔滕 多米尼克·莫勒

序列表28页 附图12页

(54)发明名称

T细胞受体及使用该T细胞受体的免疫治疗

(57)摘要

本发明涉及针对COL6A3抗原的抗原识别构建体。本发明特别提出了对肿瘤表达抗原COL6A3选择性和特异性的新型T细胞受体(TCR)类分子。本发明的TCR及其衍生COL6A3抗原结合片段可用于诊断、治疗和预防表达COL6A3的癌性疾病。还提出了编码本发明抗原识别构建体的核酸、包含这些核酸的载体、表达抗原识别构建体的重组细胞以及包含本发明化合物的药物组合物。

1. 一种抗原识别构建体,其包含至少一个与选自SEQ ID No.:3、9、15、21、27和33的氨基酸序列至少具有50%序列同一性的互补决定区(CDR)3。

2. 根据权利要求1所述的抗原识别构建体,其中所述抗原识别构建体能够特异性地和/或选择性地与COL6A3抗原肽结合。

3. 根据权利要求1或2所述的抗原识别构建体,其中所述抗原识别构建体为抗体或其衍生物或片段、或T细胞受体(TCR)或其衍生物或片段。

4. 根据权利要求1至3中任一项所述的抗原识别构建体,其包含TCR α 或 γ 链,和/或TCR β 或 δ 链,其中所述TCR α 或 γ 链包含与选自SEQ ID No.:3、15和27的氨基酸序列具有至少50%序列同一性的CDR3,和/或其中所述TCR β 或 δ 链包含与选自SEQ ID No.:9、21和33的氨基酸序列具有至少50%序列同一性的CDR3。

5. 根据权利要求4所述的抗原识别构建体,其中所述TCR α 或 γ 链还包含与选自SEQ ID No.:1、13和25的氨基酸序列具有至少50%序列同一性的CDR1,和/或与选自SEQ ID No.:2、14和26的氨基酸序列具有至少50%序列同一性的CDR2。

6. 根据权利要求4或5所述的抗原识别构建体,其中所述TCR β 或 δ 链还包含与选自SEQ ID No.:7、19和31的氨基酸序列具有至少50%序列同一性的CDR1,和/或与选自SEQ ID No.:8、20和32的氨基酸序列具有至少50%序列同一性的CDR2。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的抗原识别构建体,其包含与选自SEQ ID No.:4、10、16、22、28和34的氨基酸序列具有至少50%序列同一性的TCR可变链区。

8. 根据权利要求1至7中任一项所述的抗原识别构建体,其包含TCR的结合片段,其中所述结合片段包含CDR1至CDR3,CDR1至CDR3任选地选自具有SEQ ID No.:1、2、3或7、8、9或13、14、15或19、20、21或25、26、27或31、32、33的氨基酸序列的CDR1至CDR3序列。

9. 一种核酸,其编码权利要求1至8中任一项所述的抗原识别构建体。

10. 一种载体,其包含权利要求9所述的核酸。

11. 一种宿主细胞,其包含权利要求1至8中任一项所述的抗原识别构建体、或权利要求9所述的核酸、或权利要求10所述的载体,可选地,宿主细胞为淋巴细胞,优选为T淋巴细胞或T淋巴细胞祖细胞,更优选为CD4或CD8阳性T细胞。。

12. 一种药物组合物,其包含权利要求1至8中任一项所述的抗原识别构建体、或权利要求9所述的核酸、或权利要求10所述的载体、或权利要求11所述的宿主细胞,以及药学上可接受的载体、稳定剂和/或赋形剂。

13. 权利要求1至8中任一项所述的抗原识别构建体、或权利要求9所述的核酸、或权利要求10所述的载体、或权利要求11所述的宿主细胞、或权利要求12的药物组合物在药物中的用途,可选地在诊断、预防和/或治疗增殖性疾病中的用途。

14. 一种制备表达COL6A3特异性抗原识别构建体的细胞系的方法,包括

- a. 提供合适的宿主细胞,
- b. 提供基因构建体,其包含编码权利要求1至8中任一项所述的抗原识别构建体的编码序列,
- c. 将所述基因构建体引入所述合适的宿主细胞,
- d. 由所述合适的宿主细胞表达所述基因构建体。

15. 根据权利要求14所述的方法,还包括从所述合适的宿主细胞中分离和纯化所述抗

原识别构建体,以及任选地在T细胞中重构所述抗原识别构建体。

T细胞受体及使用该T细胞受体的免疫治疗

技术领域

[0001] 本发明涉及针对COL6A3抗原的抗原识别构建体。本发明特别提出了对肿瘤表达抗原COL6A3选择性和特异性的新型T细胞受体 (TCR) 类分子。本发明的TCR及其衍生COL6A3抗原结合片段可用于诊断、治疗和预防表达COL6A3的癌性疾病。还提出了编码本发明抗原识别构建体的核酸、包含这些核酸的载体、表达抗原识别构建体的重组细胞、以及包含本发明化合物的药物组合物。

背景技术

[0002] 胶原蛋白是一种蛋白质超家族,在维持各种组织完整性方面发挥作用。胶原蛋白为细胞外基质蛋白,并具有三螺旋结构域作为其共同的结构元素。胶原蛋白VI是微纤维的主要结构成分。胶原蛋白VI的基本结构单元为 $\alpha 1$ (VI)、 $\alpha 2$ (VI) 和 $\alpha 3$ (VI) 胶原链的异源三聚体。 $\alpha 1$ (VI) 和 $\alpha 2$ (VI) 链分别由COL6A1和COL6A2基因编码。由COL6A3基因编码的蛋白质为VI型胶原蛋白($\alpha 3$ (VI) 胶原链)的 $\alpha 3$ 亚基(Bertini et al.,2002 Eur.J.Paediatr.Neurol 6:193-8)。COL6A3基因表达之前被证明与乳腺癌进展相关,并在结肠癌中升高(Smith MJ,et al.“Analysis of differential gene expression in colorectal cancer and stroma using fluorescence-activated cell sorting purification.”British Journal of Cancer.2009;100:1452-1464;Tilman G et al.“Human periostin gene expression in normal tissues,tumors and melanoma:evidences for periostin production by both stromal and melanoma cells.”Mol Cancer.2007;6:80)并作为结直肠癌的预后指标(Qiao J et al.“Stroma derived COL6A3 is a potential prognosis marker of colorectal carcinoma revealed by quantitative proteomics.”Oncotarget.2015,Oct 6;6(30):29929-29946)。COL6A3基因位于人基因组中2q37的位置,包含44个外显子。COL6A3蛋白有3177个氨基酸,包含12个血管性假血友病因子A型(vWA)结构域,一个纤连蛋白3型结构域和一个BPTI/Kunitz丝氨酸蛋白酶抑制剂家族(KU)结构域。

[0003] 基于T细胞的免疫治疗靶标代表作用于主要组织相容性复合体(MHC)分子提呈的来源于肿瘤相关蛋白或肿瘤特异性蛋白的肽表位。这些肿瘤相关抗原(TAA)可以是源自所有蛋白类型的肽,如酶、受体、转录因数等,他们在相应肿瘤的细胞中被表达,并且与同源未变的细胞相比,其表达通常上调。

[0004] 细胞免疫反应的特定元素能特异性地识别和破坏肿瘤细胞。从肿瘤浸润细胞群或外周血中分离出的T细胞表明,这些细胞在癌症的天然免疫防御中发挥了重要作用。特别是CD8阳性T细胞在这种反应中发挥重要作用,TC δ 8+能识别通常8至10个源自蛋白或位于细胞质的缺损核糖体产物(DRiP)的氨基酸残基的主要组织相容性复合体(MHC)所载的肽中所含的I类分子。人MHC分子也称为人白细胞-抗原(HLA)。

[0005] TCR是免疫球蛋白超家族的异二聚体细胞表面蛋白,其与参与介导信号转导的CD3复合体的不变蛋白质相关。TCR以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在,其结构相似,但解剖位置非常不同,也可能功能也非常不同。天然异二聚体 $\alpha\beta$ TCR的细胞外部分由两个多肽组成,每个多肽都有一

个膜近端恒定结构域和一个膜远端可变结构域。每个恒定和可变结构域都包括一个链内二硫键。可变结构域包含与抗体互补决定区 (CDR) 类似的高度多态性环。使用TCR基因疗法可克服目前的一些障碍。他可让患者自己的T细胞在短时间内具有所需的特异性并产生足够数量的T细胞,从而避免其耗尽。TCR将被转导至中央记忆T细胞或具有干细胞特征的T细胞中,这可确保转移时产生更好的持久性和功能。TCR工程化T细胞将通过化学疗法或照射被注入淋巴细胞减少的癌症患者,从而获得有效的植入,但抑制免疫抑制。

[0006] 虽然在开发用于癌症治疗的分子靶向药物方面取得了进展,但是,本领域仍然需要开发专门靶向作用于癌细胞高度特异性分子的抗癌新药。本发明说明书通过提出新型COL6A3TCR、各自的重组TCR构建体、核酸、载体和与COL6A3表位特异性结合的公开宿主细胞来满足此需求;以及使用这些分子治疗癌症的方法。

发明内容

[0007] 在第一方面,本发明的目的通过抗原识别构建体来解决,所述抗原识别构建体包含至少一个互补决定区 (CDR) 3,其与选自SEQ ID N03、9、15、21、27和33的氨基酸序列至少具有50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或优选为100%序列同一性。

[0008] 在另一个附加或替代实施方案中,抗原识别构建体还可包含CDR1和/或CDR2结构域序列。在可变结构域内,CDR1和CDR2位于多肽链的可变(V)区域,CDR3包括一部分V区域、全部多样性(D)区域和连接(J)区域。CDR3是最可变的,是负责特异性和选择性识别抗原的主要CDR。CDR1和CDR2序列可以选自人可变链等位基因的CDR序列。

[0009] 天然 α - β 异二聚体TCR具有 α 链和 β 链。每个链都包括可变、连接和恒定区域, β 链通常还包括可变区和连接区之间的短多样性区域,但是该多样性区域常被视为连接区域的一部分。每个可变区都包括嵌入在框架序列中的三个CDR(互补决定区),其中一个称为CDR3的高度可变区。存在几种类型的 α 链可变(V α)区和几种类型的 β 链可变(V β)区,由其框架、CDR1和CDR2序列及部分定义的CDR3序列区分。V α 类型通过唯一的TRAV号在IMGT命名中提及,V β 类型通过唯一的TRBV号被提及。

[0010] 因此,在一个附加或替代实施方案中,本发明的抗原识别构建体包含如下文表1中所述的CDR1、CDR2和CDR3序列组合,该表格还连同CDR3序列的各可变链等位基因。因此,优选的是本发明的抗原识别构建体,其包含至少一个、优选为全部三个CDR序列CDR1、CDR2和CDR3。优选情况是,本发明的抗原识别构建体包含本文公开的本发明的单个TCR可变区的各CDR1至CDR3。

[0011] 本文所用术语“特异性”或“抗原特异性”或“特异性针对”给定抗原系指当所述抗原为HLA,优选为HLAA2时,抗原识别构建体可与所述抗原特异性结合,优选为COL6A3抗原,更优选为具有高亲合力的抗原。例如,作为抗原识别构建体的TCR可视为对COL6A3抗原具有“抗原特异性”,如果T细胞表达TCR并与呈递HLA的COL6A3接触的T细胞分泌至少约200pg/ml或以上(例如,250pg/ml或以上、300pg/ml或以上、400pg/ml或以上、500pg/ml或以上、600pg/ml或以上、700pg/ml或以上、1000pg/ml或以上、2,000pg/ml或以上、2,500pg/ml或以上、5,000pg/ml或以上)的干扰素 γ (IFN- γ),条件是在与低浓度COL6A3抗原脉冲处理的靶细胞共培养时,例如下文提出的COL6A3表位和抗原(例如,约 10^{-11} mol/l, 10^{-10} mol/l, 10^{-9} mol/l, 10^{-8} mol/l, 10^{-7} mol/l, 10^{-6} mol/l, 10^{-5} mol/l)。替代或附加情况下,在COL6A3抗原

与脉冲处理的靶细胞共培养时,表达TCR的T细胞分泌的IFN- γ 至少两倍于未转染背景水平IFN- γ ,则TCR可视为对COL6A3具有“抗原特异性”。如上所述的这种“特异性”可用ELISA进行分析。

[0012] 在本发明的一个替代或附加实施方案中,抗原识别构建体选择性地与COL6A3抗原结合;优选其中COL6A3抗原为具有SEQ ID NO:58至67所示氨基酸序列的蛋白质表位或肽,最优选为SEQ ID NO:58或其变体,其中所述变体氨基酸缺失、添加、插入或取代不超过三个、优选为两个、最优选为不超过一个氨基酸位置。

[0013] 术语“选择性”或“选择性识别/结合”被理解是指抗原识别构建体(如TCR或抗体)的性质,选择性地识别或结合至优选仅一个特异性表位,优选为与另一个表位没有或基本上没有交叉反应。优选情况为,术语“选择性”或“选择性识别/结合”是指抗原识别构建体(例如TCR)选择性地识别或结合优选仅一个特异性表位,且优选为与另一个表位没有或基本上没有交叉反应,其中所述表位对于一种蛋白质是独特的,使得抗原识别构建体对另一种表位和另一种蛋白质没有或基本上没有交叉反应性。

[0014] 根据本发明的抗原识别构建体优选为选自抗体或其衍生物或片段、或T细胞受体(TCR)或其衍生物或片段。本发明的抗体或TCR的衍生物或片段应优选为可保留母体分子的抗原结合/识别能力,特别是其如上所述的特异性和/或选择性。此类结合功能可以通过如本文所定义的CDR3区的存在来保留。

[0015] 在本发明的一实施方案中,本发明的TCR能够以主要组织相容性复合体(MHC) I类依赖性方式识别COL6A3抗原。本文使用的“MHC I类依赖性方式”系指在MHC I类分子的背景中在结合COL6A3抗原时TCR引起免疫应答。MHC I类分子可以是本领域已知的任何MHC I类分子,例如HLA-A分子。在本发明的一项优先实施方案中,MHC I类分子为HLA-A2分子。

[0016] 本发明提供单链抗原识别构建体和双链识别构建体。

[0017] 本发明特别提出一种作为抗原识别构建体或其片段或衍生物的TCR。TCR优选为人TCR,其被理解为由人TCR基因座产生,因此包含人TCR序列。此外,本发明TCR的特征在于它源自人,并且特异性地识别COL6A3抗原。

[0018] 本发明的另一项实施方案另外提供上述抗原识别构建体,其诱导免疫应答,优选为其中免疫应答的特征在于干扰素(IFN) γ 水平增加。

[0019] 本发明的TCR可以为单链 α 或 β ,或 γ 和 δ 分子,或为由 α 和 β 链或 γ 和 δ 链两者组成的双链构建体。

[0020] 本发明的抗原识别构建体可以包含TCR α 或 γ 链;和/或TCR β 或 δ 链;其中所述TCR α 或 γ 链包含与选自SEQ ID No.3、15和27的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的CDR3,和/或其中所述TCR β 或 δ 链包含与选自SEQ ID No.9、21和33的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的CDR3。

[0021] 最优选地,在一些其他实施方案中,其中本公开指包含本文公开的TCR链的任何一个、两个或全部CDR1至CDR3区的抗原识别构建体(参见表1),此类抗原识别构建体可以为优选的,其包含相应的CDR序列,其具有三个、两个、优选为仅一个修饰的氨基酸残基。修饰的氨基酸残基可以选自氨基酸插入、缺失或取代基。最为优先的情况是三个、两个、优选为一个修饰的氨基酸残基为相应CDR序列的第一个或最后一个氨基酸残基。如果修饰是取代,则

在一些实施方案中优选取代为保守的氨基酸取代。

[0022] 如果本发明的抗原识别构建体由至少两个氨基酸链(如双链TCR或其抗原结合片段)组成,则抗原识别构建体可以包含根据SEQ ID NO:3的第一个多肽链氨基酸序列和根据SEQ ID NO:9的第二个多肽链氨基酸序列;或根据SEQ ID NO:15的第一个多肽链氨基酸序列和根据SEQ ID NO:21的第二个多肽链氨基酸序列;或根据SEQ ID NO:27的第一个多肽链氨基酸序列和根据SEQ ID NO:33的第二个多肽链氨基酸序列。上述任一双链TCR或其抗原结合片段均是本发明的优选TCR。在一些实施方案中,本发明双链TCR的CDR3可以突变。如上所述的SEQ ID NO:9至28的CDR3序列突变优选包括取代、缺失、添加或插入不超过3个、优选为2个、最优选为不超过1个氨基酸残基。在一些实施方案中,第一多肽链可以是TCR α 或 γ 链,第二多肽链可以是TCR β 或 δ 链。优选为 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ TCR的组合。

[0023] 在一些实施方案中,TCR或其抗原结合片段由TCR α 与TCR β 链、或 γ 与 δ 链组成。此类双链TCR包括在每个链可变区内,并且各可变区包含一个CDR1、一个CDR2和一个CDR3序列。TCR包含SEQ ID NO:4和SEQ ID NO:10(R4P1D10)或SEQ ID NO:16和SEQ ID NO:22(R4P3F9)或SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:34(R4P3H3)的可变链氨基酸序列中所包含的CDR1至CDR3序列。

[0024] 本发明的一些实施方案涉及由TCR α 和TCR β 链组成的TCR或其片段,其中所述TCR包含与选自分别根据SEQ ID NO:4和10或16和22或28和34的 α 和 β 链的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、90%、95%、98%、99%或优选为100%序列同一性的可变区序列。

[0025] 本发明的TCR可以进一步包含源自任何合适物种的恒定区,如任何哺乳动物,例如:人、大鼠、猴、兔、驴或小鼠。在本发明的一项实施方案中,本发明的TCR进一步包含人恒定区。在一些优选实施方案中,本发明TCR的恒定区可例如通过引入异源序列、优选为小鼠序列来稍加修饰,这可能可以增加TCR的表达和稳定性。

[0026] 本发明的一些实施方案涉及由TCR α 和TCR β 链组成的TCR或其片段,其中所述TCR包含与选自分别根据SEQ ID NO:5和11或17和23或29和35的 α 和 β 链的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、90%、95%、98%、99%或优选为100%序列同一性的恒定区。

[0027] 本发明的TCR α 或 γ 链还可以包含与选自SEQ ID No.1、13和25的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的CDR1和/或与选自SEQ ID No.2、14和26的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的CDR2。

[0028] 根据本发明,TCR β 或 γ 链还可以包含与选自SEQ ID No.7、19和31的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的CDR1和/或与选自SEQ ID No.8、20和32的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的CDR2。

[0029] 在一个其他实施方案中,抗原识别构建体可以包含TCR的结合片段,并且其中所述结合片段包含CDR1至CDR3,其或可选自具有SEQ ID No.1、2、3或7、8、9或13、14、15或19、20、21或25、26、27或31、32、33的氨基酸序列的CDR1至CDR3序列。

[0030] 在本发明的其他实施方案中,前文所述的抗原识别构建体是由至少一个TCR α 和一个TCR β 链序列组成的TCR或其片段,其中所述TCR α 链序列包含具有SEQ ID NO:1至3的氨基

酸序列的CDR1至CDR3序列,所述TCR β 链序列包含具有SEQ ID NO:7至9的氨基酸序列的CDR1至CDR3序列;或其中所述TCR α 链序列包含具有SEQ ID NO:13至15的氨基酸序列的CDR1至CDR3序列,所述TCR β 链序列包含具有SEQ ID NO:19至21的氨基酸序列的CDR1至CDR3序列;或其中所述TCR α 链序列包含具有SEQ ID NO:25至27的氨基酸序列的CDR1至CDR3序列,所述TCR β 链序列包含具有SEQ ID NO:31至33的氨基酸序列的CDR1至CDR3序列。

[0031] 在本发明的进一步实施方案中,前文所述的抗原识别构建体是由至少一个TCR α 和一个TCR β 链序列组成的TCR或其片段,其中所述TCR α 链序列包含具有SEQ ID No.4的氨基酸序列的可变区序列,并且其中所述TCR β 链序列包含具有SEQ ID NO:10的氨基酸序列的可变区序列;或其中所述TCR α 链序列包含具有SEQ ID No.16的氨基酸序列的可变区序列,并且其中所述TCR β 链序列包含具有SEQ ID No.22的氨基酸序列的可变区序列;或其中所述TCR α 链序列包含具有SEQ ID No.28的氨基酸序列的可变区序列,并且其中所述TCR β 链序列包含具有SEQ ID No.34的氨基酸序列的可变区序列。

[0032] 在本发明的进一步实施方案中,前文所述的抗原识别构建体是TCR或其片段,其还包含与选自SEQ ID No.5、11、17、23、29和35的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的TCR恒定区;优选地,其中TCR由至少一个TCR α 和一个TCR β 链序列组成,其中TCR α 链序列包含与SEQ ID No.5、17和29的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的恒定区。

[0033] 此外,所披露的是前文所述的抗原识别构建体,其包含与SEQ ID No.6的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的第一个TCR链,以及与SEQ ID No.12的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的第二个TCR链。本发明还提出的TCR包含与SEQ ID No.18的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的第一个TCR链,以及与SEQ ID No.24的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的第二个TCR链。在进一步的实施方案中,本发明提出的抗原识别构建体为TCR并且包含与SEQ ID No.30的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的第一个TCR链,以及与SEQ ID No.36的氨基酸序列具有至少50%、60%、70%、80%、90%、95%、98%、99%或100%序列同一性的第二个TCR链。

附图说明

[0034] 图1:在分别与载有COL6A3-002肽(SEQ ID NO:58)、(SEQ ID NO:59-67)的1-9位置处丙氨酸或甘氨酸取代的多种COL6A3-002变体或NYESO1-001对照肽(SEQ ID NO:68)的K562-A2靶细胞(参见Hirano N.et al.;Blood.2006 Feb 15;107(4):1528-36一文)共同培养后,一个供体的用TCR R4P1D10的 α 和 β 链RNA(表1)电穿孔的人原代CD8⁺ T细胞的IFN γ 释放(左轴)和HLA-A*02/COL6A3-002四聚体染色(右轴)。

[0035] 图2:分别与载有COL6A3-002肽(SEQ ID NO:58)、同源但不相关的肽AGRN-001、CLASP-001、COL6A1-001、COL6A2-001、COL6A3-006、COL6A3-008、COL6A3-014、VWA2-001、VWF-001(SEQ ID NO:49-57)或NYESO1-001对照肽(SEQ ID NO:68)的K562-A2靶细胞进行共同培养后,一个供体的用TCR R4P1D10的 α 和 β 链RNA(表1)电穿孔的人原代CD8⁺ T细胞的IFN

γ 释放(左轴)和HLA-A*02/COL6A3-002四聚体染色(右轴)。仅电穿孔的CD8+T细胞(仅E)作为对照。

[0036] 图3:分别用TCR R4P1D10或NYES01-001特异性对照TCR 1G4的 α 和 β 链RNA(表1)电穿孔的J.RT3-T3.5细胞的HLA-A*02/COL6A3-002四聚体和HLA-A*02/NYES01-001四聚体染色。电穿孔对照的J.RT3-T3.5细胞作为对照。

[0037] 图4:分别用TCR R4P1D10或NYES01-001特异性对照TCR 1G4的 α 和 β 链RNA(表1)电穿孔的SUP-T1细胞的HLA-A*02/COL6A3-002四聚体和HLA-A*02/NYES01-001四聚体染色。电穿孔对照的SUP-T1细胞作为对照。

[0038] 图5:一个供体的分别用TCR R4P1D10或NYES01-001特异性对照TCR 1G4的 α 和 β 链RNA(表1)电穿孔的人原代CD8+ T细胞的HLA-A*02/COL6A3-002四聚体和HLA-A*02/NYES01-001四聚体染色。电穿孔对照的CD8+T细胞作为对照。

[0039] 图6:分别与载有COL6A3-002肽(SEQ ID NO:58)、(SEQ ID NO:59-67)的1-9位置处丙氨酸或甘氨酸取代的多种COL6A3-002变体或NYES01-001对照肽(SEQ ID NO:68)的K562-A2靶细胞进行共同培养后,一个供体的用TCR R4P3F9的 α 和 β 链RNA(表1)电穿孔的人原代CD8+ T细胞的IFN γ 释放。

[0040] 图7:分别与载有COL6A3-002肽(SEQ ID NO:58)、同源但不相关的肽AGRN-001、CLASP-001、COL6A1-001、COL6A2-001、COL6A3-006、COL6A3-008、COL6A3-014、VWA2-001、VWF-001(SEQ ID NO:49-57)或NYES01-001对照肽(SEQ ID NO:68)的K562-A2靶细胞进行共同培养后,一个供体的用TCR R4P3F9的 α 和 β 链RNA(表1)电穿孔的人原代CD8+ T细胞的IFN γ 释放。电穿孔对照的CD8+ T细胞(仅E)作为对照。

[0041] 图8:分别用TCR R4P3F9或NYES01-001特异性对照TCR 1G4的 α 和 β 链RNA(表1)电穿孔的J.RT3-T3.5细胞的HLA-A*02/COL6A3-002四聚体和HLA-A*02/NYES01-001四聚体染色。电穿孔对照的J.RT3-T3.5细胞作为对照。

[0042] 图9:分别用TCR R4P3F9或NYES01-001特异性对照TCR 1G4的 α 和 β 链RNA(表1)电穿孔的SUP-T1细胞的HLA-A*02/COL6A3-002四聚体和HLA-A*02/NYES01-001四聚体染色。电穿孔对照的SUP-T1细胞作为对照。

[0043] 图10:分别用与载有COL6A3-002肽(SEQ ID NO:58)、(SEQ ID NO:59-67)的1-9位置处丙氨酸或甘氨酸取代的多种COL6A3-002变体或NYES01-001对照肽(SEQ ID NO:68)的K562-A2靶细胞进行共同培养后,一个供体的用TCR R4P3H3的 α 和 β 链RNA(表1)电穿孔的人原代CD8+ T细胞的IFN γ 释放。

[0044] 图11:分别与载有COL6A3-002肽(SEQ ID NO:58)、同源但不相关的肽AGRN-001、CLASP-001、COL6A1-001、COL6A2-001、COL6A3-006、COL6A3-008、COL6A3-014、VWA2-001、VWF-001(SEQ ID NO:49-57)或NYES01-001对照肽(SEQ ID NO:68)的K562-A2靶细胞进行共同培养后,一个供体的用TCR R4P3H3的 α 和 β 链RNA(表1)电穿孔的人原代CD8+ T细胞的IFN γ 释放。电穿孔对照的CD8+ T细胞(仅E)作为对照。

[0045] 图12:分别用TCR R4P3H3或NYES01-001特异性对照TCR 1G4的 α 和 β 链RNA(表1)电穿孔的SUP-T1细胞的HLA-A*02/COL6A3-002四聚体和HLA-A*02/NYES01-001四聚体染色。电穿孔对照的SUP-T1细胞作为对照。

具体实施方式

[0046] 本文所用的术语“鼠”或“人”在提及抗原识别构建体或TCR时,或本文所述的TCR的任何组分(例如,互补性决定区(CDR)、可变区、恒定区, α 链和/或 β 链)是指分别源自小鼠或人未经排列的TCR基因座的TCR(或其组分)。

[0047] 在本发明的一项实施方案中,提供了嵌合TCR,其中所述TCR链包含来自多物种的序列。优选情况为,本发明的TCR可包含 α 链,其包含 α 链的人可变区和例如鼠TCR α 链的鼠恒定区。

[0048] 在—项实施方案中,本发明的TCR是由根据上述实施方案的人可变区和人恒定区组成的人TCR。

[0049] 本发明的TCR可以为单链TCR(scTCR)。scTCR可包含第一TCR链(例如, α 链)的可变区的多肽和整个(全长)第二TCR链(例如, β 链)的多肽,反之亦然。此外,scTCR可以任选地包含一个或多个将两个或多个多肽连接在一起的接头。例如,接头可以是肽,其将两个单链连接在一起,如本文所述。还提供了本发明的scTCR,其与人细胞因数如IL-2、IL-7或IL-15融合。

[0050] 本发明的抗原识别构建体还可以以包含至少两个scTCR分子的多聚复合体形式提供,其中所述scTCR分子各自与至少一种生物素部分融合,并且其中所述scTCR通过生物素-链霉亲和素相互作用相互连接,以形成所述多聚体复合体。用于产生多聚体TCR的类似方法也是可行的并且包括在本披露资料中。还提出了更高级的多聚体复合体,其包含本发明两种以上的scTCR。

[0051] 为了本发明的目的,TCR是具有至少一个TCR α 或 γ 和/或TCR β 或 δ 可变结构域的部分。通常它们包括TCR α 可变结构域和TCR β 可变结构域。它们可以为 $\alpha\beta$ 异源二聚体,也可以为单链形式。为了用于过继疗法, $\alpha\beta$ 异二聚体TCR可以,例如,被转染为具有细胞质和跨膜结构域的全长链。如果需要,相应恒定结构域残基之间可以存在引入的二硫键。

[0052] 在—项优选的实施方案中,抗原识别构建体为人TCR或其片段或衍生物。人TCR或其片段或衍生物是一种TCR,其包含超过50%的相应人TCR序列。优选情况为,只有少部分TCR序列为人工来源或源自其他物种。然而,众所周知,例如,人源的嵌合TCR在恒定结构域含有鼠源序列是有利的。因此,特别优选的是根据本发明的TCR,其在其恒定结构域的细胞外部分含有鼠序列。

[0053] 因此,又为优选的是本发明的抗原识别构建体能够以人白细胞抗原(HLA)依赖性方式、优选以HLA-A02依赖性方式识别其抗原。在本发明的上下文中,术语“HLA依赖性方式”系指抗原识别构建体仅在抗原肽由所述HLA提呈的情况下才与抗原结合。

[0054] 在—项实施方案中,根据本发明的抗原识别构建体优选为诱导免疫应答,优选为其中免疫应答的特征在于干扰素(IFN) γ 水平增加。

[0055] 本发明还提出了包含本文所述的任何TCR(或其功能变体)的功能部分的多肽,例如,选自实施例部分和表1中所述R4P1D10、R4P3F9和R4P3H3中的任何一种TCR。本文所用的术语“多肽”包括寡肽,并且系指通过一个或多个肽键连接的氨基酸的单链。关于本发明的多肽,功能部分可以是包含TCR(或其功能变体)连续氨基酸的任何部分,其中部分条件是功能部分与COL6A3抗原特异性结合,优选为如表2中所公开的,以及肽A1至A9(SEQ ID NO:59-67)。当使用与TCR(或其功能变体)相关时,术语“功能部分”系指本发明TCR(或其功能变体)

的任何部分或片段,其中该部分或片段保留TCR(或其功能变体)的生物活性,其为母体TCR或其亲代功能变体的一部分。功能部分包括,例如,保留与COL6A3抗原特异性结合的能力(以HLA依赖性方式)或以与母体TCR(或其功能变体)相似程度、相同程度或更高程度检测、治疗或预防癌症的TCR(或其功能变体)的那些部分。关于母体TCR(或其功能变体),功能部分可以包括,例如,约10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%或更多母体TCR可变序列(或其功能变体)。

[0056] 功能部分可以在该部分的氨基或羧基末端或两个末端包含额外的氨基酸,其中在母体TCR或其功能变体的氨基酸序列中未发现额外的氨基酸。理想的情况是,额外的氨基酸不干扰功能部分的生物学功能,例如,特异性结合COL6A3抗原;和/或具有检测癌症、治疗或预防癌症等能力。更理想的是,与母体TCR或其功能变体的生物学活性相比,额外的氨基酸增强了生物学活性。

[0057] 多肽可包含本发明TCR的 α 和 β 链的一个或两个功能部分或其功能变体,例如包含本发明TCR的 α 和/或 β 链可变区的CDR1、CDR2和(优选)CDR3之一或其功能变体的功能部分。在本发明的一项实施方案中,多肽可包含功能部分,其包含SEQ ID NO:3、9、15、21、27和33的氨基酸序列(本发明TCR可变区的CDR3)或其组合。在本发明的一项实施方案中,本发明的多肽可包括例如本发明TCR的可变区或其功能变体,其包含上述CDR区的组合。在这一点来说,多肽可包含SEQ ID NO:4、10、16、22、28和34中的任一个氨基酸序列(本发明TCR的 α 或 β 链的可变区)。

[0058] 在一些情况下,本发明的构建体可以包含一个或两个多肽链,其包含根据SEQ ID NO:1至36(CDR序列,恒定和可变区和全长序列)中任一项的一个序列或其功能片段,并且进一步包含其他氨基酸序列,例如,编码免疫球蛋白或其部分的氨基酸序列,则本发明的蛋白质可以是融合蛋白。就此而言,本发明还提供了包含本文所述的至少一种本发明的多肽与至少一种其他多肽的融合蛋白。其他的多肽可以作为融合蛋白的单独多肽存在,或者可以作为与本文所述的本发明多肽之一框架(串联)表达的多肽存在。其他多肽可包括任何肽或蛋白质分子或其部分,包括但不限于免疫球蛋白、CD3、CD4、CD8、MHC分子、CD1分子(例如,CD1a、CD1b、CD1c、CD1d等)。

[0059] 融合蛋白可以包含本发明多肽的一个或多个拷贝和/或另一个多肽的一个或多个拷贝。例如,融合蛋白可包含本发明多肽和/或另一多肽的1、2、3、4、5个或更多个拷贝。制备融合蛋白的合适方法是本领域已知的,并且包括例如重组方法。在本发明的一些实施方案中,本发明的TCR(及其功能部分和功能变体)、多肽和蛋白质可以表达为单一蛋白,其包含连接 α 链和 β 链和连接 γ 链和 δ 链的连接肽。就此而言,本发明的TCR(及其功能变体和功能部分)、多肽和蛋白质包含本发明TCR可变区的氨基酸序列,并且可以进一步包含接头肽。接头肽可以有利地促进宿主细胞中重组TCR(包括其功能部分和功能变体)、多肽和/或蛋白质的表达。接头肽可包含任何合适的氨基酸序列。单链TCR构建体的接头序列是本领域公知的。此类单链构建体可进一步包含一个或两个恒定结构域序列。在通过宿主细胞表达包括接头肽的构建体后,接头肽也可能被裂解,引起 α 和 β 链以及 γ 和 δ 链分离。

[0060] 如上所述,本发明TCR的结合功能可以在抗体框架中。本文中使用了各种语法形式的术语“抗体”,系指免疫球蛋白分子和免疫球蛋白分子的免疫活性部分,即含有抗原结合位点或互补位的分子。此类分子也被称为免疫球蛋白分子的“抗原结合片段”。本发明还提

出了与本文所述的抗原特异性结合的抗体或其抗原结合部分。抗体可以是本领域已知的任何类型的免疫球蛋白。例如，抗体可以是任何同种型免疫球蛋白，例如IgA、IgD、IgE、IgG、IgM等。抗体可以是单克隆或多克隆抗体。抗体可以是天然存在的抗体，例如从哺乳动物（例如，小鼠、兔、山羊、马、鸡、仓鼠、人等）中分离和/或纯化的抗体。或者，抗体可以是基因工程化抗体，例如人源化抗体或嵌合抗体。抗体可以是单体或聚合体形式。

[0061] 本发明还提出了本文所述任何抗体的抗原结合部分。抗原结合部分可以是具有至少一个抗原结合位点的任何部分，例如Fab、F(ab')₂、dsFv、sFv、双抗体和三抗体。由包含通过合成肽连接到轻链抗体的可变(V)结构域的抗体重链的V结构域的截短Fab片段所组成的单链可变区片段(sFv)抗体片段可使用常规重组DNA技术方法产生。类似地，二硫键稳定的可变区片段(dsFv)可以通过重组DNA技术制备，但本发明的抗体片段不限于这些示例性类型的抗体片段。此外，抗体或其抗原结合部分可以被修饰为包括可检测的标记，例如放射性同位素、荧光团（例如，异硫氰酸荧光素(FITC)，藻红蛋白(PE)）、酶（例如，碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶）和元素颗粒（例如，金颗粒）。在某些情况下，与SEQ ID No:3、9、15、21、27和33中提供的CDR3序列相比，TCR CDR3序列可以略加修饰，但优选不超过3个氨基酸残基，优选为仅两个，最优选为仅一个氨基酸位置。优选地，抗体包含该CDR3，优选为该组合中所有的CDR1至CDR3区，如表1中本发明的TCR所示。

[0062] 制备抗体的合适方法是本领域已知的。例如，标准杂交瘤方法描述于例如，Kohler and Milstein, *Eur. J. Immunol.*, 5, 511-519 (1976), Harlow and Lane (eds.), *Antibodies: A Laboratory Manual*, CSH Press (1988), and C. A. Janeway et al. (eds.), *Immunobiology*, 8Ed., Garland Publishing, New York, NY (2011) 一文中。或者，其他方法，例如EBV杂交瘤方法(Haskard and Archer, *J. Immunol. Methods*, 74 (2), 361-67 (1984))，和Roder et al. *Methods Enzymol.*, 121, 140-67 (1986)) 和噬菌体载体表达系统(参见例如，Huse et al., *Science*, 246, 1275-81 (1989)) 都是本领域已知的。此外，在非人动物中产生抗体的方法描述于例如美国专利5,545,806、5,569,825和5,714,352以及美国专利申请公开号2002/0197266中。

[0063] 本发明的一些实施方案也涉及作为可溶性TCR的TCR或其功能片段和多肽。用于本文时，术语可溶性“T细胞受体”系指天然TCR的异二聚体截短变体，其包含TCR α 链和 β 链的细胞外部分，通过二硫键连接，但是其缺乏天然蛋白质的跨膜和胞质结构域。术语可溶性“T细胞受体 α 链和可溶性T细胞受体 β 链序列”系指缺乏跨膜和胞质结构域的TCR α 链和 β 链序列。可溶性TCR α 链和 β 链的序列(氨基酸或核酸)可以与天然TCR中的相应序列相同，或者与相应的天然TCR序列相比，可以包含变体可溶性TCR α 链和 β 链序列。本文所用的术语可溶性“T细胞受体”包括具有变体或非变体可溶性TCR α 链和 β 链序列的可溶性TCR。这些变异可以在可溶性TCR α 链和 β 链序列的可变区或恒定区中，并且可以包括但不限于氨基酸缺失、插入、取代突变以及不改变氨基酸序列的核酸序列改变。在任何情况下本发明的可溶性TCR都保留其母体分子的结合功能。

[0064] 上述问题通过编码本发明抗原识别构建体的核酸或任何上述蛋白质或多肽构建体得以进一步解决。核酸优选为(a)具有编码根据本发明的抗原识别构建体的链；(b)具有与(a)中的链互补的链；或(c)具有在严格条件下与如(a)或(b)所述的分子杂交的链。严格条件是本领域技术人员已知的，具体来自Sambrook等人的“Molecular Cloning”一文。除此

之外,核酸任选具有进一步的序列,其是表达对应于蛋白质的核酸序列所必需的,特别是用于在哺乳动物/人细胞中表达。使用的核酸可包含于适于允许在细胞中表达对应于该肽的核酸序列的载体中。然而,核酸也可用于转化抗原呈递细胞,其可以不限于经典的抗原呈递细胞,例如树突状细胞,这样,使得他们本身在其细胞表面上产生相应的蛋白质。

[0065] 本文所用的“核酸”包括“多核苷酸”、“寡核苷酸”和“核酸分子”,通常是指可以为单链或双链、合成或从自然资源中获得(例如,分离和/或纯化)的DNA或RNA聚合物,其可含有天然、非天然的或改变的核苷酸,并且可含有天然、非天然的或改变的核苷酸间连接子,例如氨基磷酸酯连接子或磷硫代磷酸酯连接子,而非未修饰寡核苷酸的核苷酸之间的磷酸二酯。

[0066] 优选地,本发明的核酸为重组核酸。本文所用的术语“重组”系指(i)通过将天然或合成核酸区段连接到可在活细胞中复制的核酸分子而构建在活细胞外部的分子,或(ii)从复制上述(i)中所述内容而产生的分子。为了本文的目的,复制可以是体外复制,也可以是体内复制。核酸可包含编码本文所述的任何TCR、多肽或蛋白质或功能部分或其功能变体的任何核苷酸序列。

[0067] 此外,本发明提出了包含如上所述的本发明核酸的载体。理想情况是,载体为表达载体或重组表达载体。术语“重组表达载体”在本发明背景下系指允许在合适宿主细胞中表达mRNA、蛋白质或多肽的核酸构建体。本发明的重组表达载体可以是任何合适的重组表达载体,并可用于转化或转染任何合适的宿主。合适的载体包括设计用于繁殖和扩增或用于表达或两者兼有的载体,例如质粒和病毒。动物表达载体的实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo。优选地,重组表达载体为病毒载体,例如,逆转录病毒载体。重组表达载体包括调节序列,例如转录和翻译起始和终止密码子,其特异于宿主细胞(例如,细菌、真菌、植物或动物)的类型,其中载体将被引入其中并且在其中可以进行本发明核酸的表达。此外,本发明的载体可以包括一个或多个标志物基因,其允许选择转化或转染的宿主。重组表达载体可包含与编码本发明构建体的核苷酸序列或者与编码本发明构建体的核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列在操作上可连接的天然或规范性启动子。启动子的选择包括例如强、弱、诱导型、组织特异性和开发特异性启动子。启动子可以是非病毒启动子,也可以是病毒启动子。本发明的重组表达载体可以被设计用于暂态表达、稳定表达或两者的表达。此外,重组表达载体可以用于组成型表达或诱导型表达。

[0068] 本发明还涉及包含根据本发明的抗原识别构建体的宿主细胞。具体地,本发明的宿主细胞包含如上所述的核酸或载体。宿主细胞可以是真核细胞,例如植物、动物、真菌或藻类,也可以是原核细胞,例如细菌或原生动物。宿主细胞可以是培养细胞或原代细胞,即直接从生物体(例如人)分离。宿主细胞可以是贴壁细胞或悬浮细胞(即,在悬浮液中生长的细胞)。为了产生重组TCR、多肽或蛋白质的目的,宿主细胞优选为哺乳动物细胞。最优选地,宿主细胞为人细胞。虽然宿主细胞可以是任何细胞类型,可以来自任何类型的组织,可以是任何发育阶段的细胞,但是宿主细胞优选为外周血白细胞(PBL)或外周血单核细胞(PBMC)。更优选地,宿主细胞为T细胞。T细胞可以是任何T细胞,诸如培养的T细胞,例如,原代T细胞或来自培养T细胞系的T细胞,例如Jurkat、SupT1等,或获得自哺乳动物的T细胞,优选为来自人类患者的T细胞或T细胞前体。如果获得自哺乳动物,T细胞可从许多来源获得,包括但不限于血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其他组织或液体。T细胞还可以是富集或纯化的。优选地,

T细胞为人T细胞。更优选地，T细胞是分离自人的T细胞。T细胞可以是任何类型的T细胞并且可以是任何发育阶段的，包括但不限于CD4阳性和/或CD8阳性、CD4阳性辅助T细胞，例如，Th1和Th2细胞、CD8-阳性T细胞（例如，细胞毒性T细胞）、肿瘤浸润细胞（TIL）、记忆T细胞、幼稚T细胞等。优选地，T细胞为CD8阳性T细胞或CD4阳性T细胞。

[0069] 优选地，本发明的宿主细胞为淋巴细胞，优选为T淋巴细胞，例如CD4阳性或CD8阳性T细胞。宿主细胞更优选为对表达COL6A3的肿瘤细胞特异性的肿瘤反应性T细胞。

[0070] 本发明的另一方面涉及本文公开的用于药物中的抗原识别构建体、核酸、载体、药物组合物和/或宿主细胞。在一项优选实施方案中在药物中的用途包括在诊断、预防和/或治疗诸如恶性或良性肿瘤疾病等肿瘤疾病中的用途。肿瘤疾病为，例如，在所述肿瘤疾病的癌细胞或肿瘤细胞中以表达COL6A3为特征的肿瘤疾病。

[0071] 关于抗原识别构建体及其衍生其他材料的上述医疗用途，待治疗和/或诊断的癌症可以为任何癌症，包括以下癌症中任一种：急性淋巴细胞癌、急性骨髓性白血病、腺泡状横纹肌肉瘤、骨癌、脑癌、乳腺癌、肛门癌、肛管癌或肛门直肠癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、阴道癌、外阴癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞癌、结肠癌、食管癌、宫颈癌、胃肠类癌、神经胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌、恶性间皮瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、口咽癌、卵巢癌、阴茎癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌、肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、输尿管癌和膀胱癌。优选的癌症为宫颈癌、口咽癌、肛门癌、肛管癌、肛门直肠癌、阴道癌、外阴癌或阴茎癌。特别优选的癌症为COL6A3阳性癌症，包括胃肠癌和胃癌。

[0072] 本发明的构建体、蛋白质、TCR抗体、多肽和核酸特别用于免疫治疗，优选用于过继性T细胞治疗。本发明化合物的给药可以，例如，涉及将本发明的T细胞输入到所述患者体内。优选地，此类T细胞为患者的自体T细胞，并且用本发明的核酸或抗原识别构建体在体外转导。

[0073] W02016/011210公开了用于过继疗法的工程细胞，包括NK细胞和T细胞以及含有所述细胞的组合物及其受试者给药方法。所述细胞可以含有特异性结合抗原的基因工程化抗原受体，例如，嵌合抗原受体（CAR）和共刺激受体。

[0074] 本发明的目的还通过制备表达细胞系的COL6A3特异性抗原识别构建体的方法来解决，包括

[0075] a. 提出合适的宿主细胞，

[0076] b. 提供一种基因构建体，其包含编码根据本发明公开的抗原识别构建体的编码序列，

[0077] c. 引入所述合适的宿主细胞、所述基因构建体，和

[0078] d. 由所述合适的宿主细胞表达所述基因构建体。

[0079] 所述方法可以进一步包括在所述合适宿主细胞上进行细胞表面呈递所述抗原识别构建体的步骤。

[0080] 在其他优选的实施方案中，所述基因构建体是包含与所述编码序列可操作地连接的启动子序列的表达构建体。

[0081] 优选地，所述抗原识别构建体来源于哺乳动物，优选来源于人。用于本发明方法的

优选合适宿主细胞为哺乳动物细胞,诸如人细胞,特别是人T淋巴细胞。用于本发明的T细胞在上文中进行了详细描述。

[0082] 本发明还包括实施方案,其中所述抗原识别构建体为修饰的TCR,其中所述修饰是加入功能结构域,诸如标记物或治疗活性物质。此外,包括具有可选结构域的TCR,诸如可选膜锚定结构域而不是内源性跨膜区。

[0083] 理想情况是,用于将基因构建体引入所述合适宿主细胞的转染系统为逆转录病毒载体系统。此类系统是本领域技术人员所熟知的。

[0084] 本发明还包括在一项实施方案中,从细胞中分离和纯化抗原识别构建体的另外的方法步骤,以及任选地在T细胞中重构经翻译的抗原识别构建体片段。

[0085] 本发明的另一方面提出了通过产生T细胞受体(TCR)的方法获得的或可获得的T细胞,其中T细胞受体(TCR)对于肿瘤细胞具有特异性并且具有如上所述的高亲合力。此类T细胞取决于本发明方法中使用的宿主细胞,例如人或非人T细胞,优选为人TCR。

[0086] 本发明的TCR、多肽、蛋白质(包括其功能变体)、核酸、重组表达载体、宿主细胞(包括其群体)和抗体(包括其抗原结合部分)可以进行分离和/或纯化。本文所用的术语“分离”系指已经从其自然环境中去除。本文所用的术语“纯化”系指纯度增加,其中“纯度”为一个相对术语,并不一定要解释为绝对纯度。例如,纯度可以为至少约50%,可以大于60%、70%、80%、90%、95%,也可以为100%。

[0087] 本发明的抗原识别构建体、TCR、多肽、蛋白质(包括其功能变体)、核酸、重组表达载体、宿主细胞(包括其群体)和抗体(包括其抗原结合部分)以下统称为“本发明的TCR材料”,可以配制成组合物,诸如药物组合物。就此而言,本发明提出了一种药物组合物,其包含本文所述的任意抗原识别构建体、TCR、多肽、蛋白质、功能部分、功能变体、核酸、表达载体、宿主细胞(包括其群体)和抗体(包括其抗原结合部分)以及药用载体、赋形剂和/或稳定剂。含有任何本发明TCR材料的本发明药物组合物可包含多于一种本发明的TCR材料,例如,多肽和核酸,或两种或更多种不同的TCR(包括功能部分及其功能变体)。或者,药物组合物可包含与另一种药物活性剂或药物组合的本发明TCR材料,诸如,化学治疗剂,例如,天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、柔红霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春花碱、长春新碱等。优选地,载体为药用载体。关于药物组合物,载体可以是常规用于所考虑的本发明的特定TCR材料的任意载体。这些药用载体是本领域技术人员所熟知的,并且是公众容易获得的。优选情况是,药用载体是在使用条件下无有害副作用或毒性的一种载体。

[0088] 因此,本还提出了一种药物组合物,其包含本文所述的本发明的任何产品和本发明的任何TCR材料,特别是任何蛋白质、核酸或宿主细胞。在一项优选的实施方案中,药物组合物用于免疫治疗,优选为继代细胞治疗。

[0089] 优选地,本发明的TCR材料通过注射施用,如,静脉内施用。当本发明的TCR材料为表达本发明TCR(或其功能变体)的宿主细胞时,用于注射的细胞药用载体可以包括任何等渗载体,例如,生理盐水(水中含有约0.90%w/v的NaCl、水中含有约300mOsm/L NaCl、或每升水中含有约9.0g NaCl)、NORMOSOL R电解质溶液(Abbott,Chicago,IL)、PLASMA-LYTE A(Baxter,Deerfield,IL)、水中含约5%葡萄糖或林格氏乳酸盐。在一项实施方案中,药用载体用人血清白蛋白补充。

[0090] 为了本发明的目的,施用本发明TCR材料的数量或剂量(例如,当本发明TCR材料为一个或多个细胞时的细胞数量)可以在合理时间框架内在受试者或动物中足以影响治疗或预防反应。例如,本发明TCR材料的剂量应该自施用起约2个小时或更长时间(例如,12至24小时)或更多小时的期间内与癌症抗原结合或检测、治疗或预防癌症。在某些实施方案中,时间可能更长。剂量将由本发明特定TCR材料的疗效和动物(例如,人)的状况以及待治疗动物(例如,人)的体重决定。

[0091] 预期本发明的药物组合物、TCR(包括其功能变体)、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体、宿主细胞或细胞群可用于癌症或COL6A3阳性癌前病变的治疗或预防方法。本发明的TCR(及其功能变体)被认为可与COL6A3抗原特异性结合,使得TCR(或本发明相关多肽或蛋白质及其功能变体)由细胞表达时能够介导针对表达本发明COL6A3抗原的靶细胞。就此而言,本发明提出了哺乳动物中病症(特别是癌症)的治疗或预防方法,包括向哺乳动物施用任何药物组合物、抗原识别构建体,特别是TCR(及其功能变体)、多肽或本文所述的蛋白质、任何核酸或重组表达载体,其包含编码本文所述的任何TCR(及其功能变体)、多肽、蛋白质的核苷酸序列或包含重组载体的任何宿主细胞或细胞群,该重组载体编码本文所述的本发明的任何构建体(及其功能变体)、多肽或蛋白质,用量为有效治疗或预防哺乳动物中病症的量,其中所述病症为癌症,优选为COL6A3阳性癌症。

[0092] 可用于本发明的药用载体或稀释剂的实例包括诸如SPGA、碳水化合物(例如,山梨糖醇、甘露糖醇、淀粉、蔗糖、葡萄糖、葡聚糖)等稳定剂,诸如白蛋白或酪蛋白等蛋白质,诸如牛血清或脱脂牛奶和缓冲液(例如,磷酸盐缓冲液)等含蛋白制剂。

[0093] 本文中所述的术语“治疗”和“预防”以及源自这些术语的词语并不一定意味着100%或完全治疗或预防。相反,存在不同程度的治疗或预防,而本领域普通技术人员认识到具有潜在的益处或治疗效果。就此而言,本发明的方法可为哺乳动物的病症提供任何治疗或预防水平的任意量。此外,本发明方法提出的治疗或预防可包括待治疗或预防疾病(例如,癌症)的一种或多种病症或症状的治疗或预防。例如,治疗或预防可以包括促进肿瘤消退。此外,就本文之目的而言,“预防”可以包括推迟疾病或其症状或病症的发作。

[0094] 本发明还涉及一种治疗癌症的方法,其包括与至少一种化学治疗剂和/或放射治疗组合施用本说明书的TCR、核酸或宿主细胞。

[0095] 还提出了一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,包括:

[0096] a) 从所述受试者中分离细胞;

[0097] b) 用编码本发明的抗原识别构建体的至少一种载体转化细胞以产生转化的细胞;

[0098] c) 扩增转化细胞以产生多个转化细胞;和

[0099] d) 将所述多个转化细胞施用于所述受试者。

[0100] 还提出了一种在有需要的受试者中治疗癌症的方法,包括:

[0101] a) 从健康供体中分离细胞;

[0102] b) 用编码本发明的抗原识别构建体的一种载体转化细胞以产生转化的细胞;

[0103] c) 扩增转化细胞以产生多个转化细胞;和

[0104] d) 将所述多个转化细胞施用于所述受试者。

[0105] 还提出了一种检测生物样本中癌症的方法,包括:

[0106] a) 使生物样本与本说明书的抗原识别构建体接触;

[0107] b) 检测抗原识别构建体与生物样本的结合情况。

[0108] 在一些实施方案中,检测癌症的方法在体外、体内或原位进行。

[0109] 还提出了检测哺乳动物中是否有病症的方法。该方法包括(i)将包含哺乳动物一种或多种细胞的样本接触本发明的任何TCR(及其功能变体)、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群、抗体或其抗原结合部分或本文所述的药物组合物,从而形成复合体,并包括检测复合体,其中所述复合体的检测提示哺乳动物中是否存在病症,其中所述病症为癌症,诸如COL6A3阳性恶性疾病。

[0110] 关于检测哺乳动物疾病的本发明方法,细胞样本可以是包含全细胞、其裂解物或全部细胞裂解物的一部分的样本,例如核或细胞质级分、全蛋白质级分或核酸级分。

[0111] 就本发明检测方法的的目的而言,所述接触可以在哺乳动物体外或体内进行。优选情况是,接触在体外进行。

[0112] 此外,复合体的检测可以通过本领域已知的任何方式进行。例如,本文所述的本发明抗原识别构建体(及其功能变体)、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群或抗体或TCR或其抗原结合部分可以用检测到的标记(诸如,放射性同位素、荧光团(例如,异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红蛋白(PE))、酶(例如,碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶)和元素颗粒(例如,金颗粒)进行标记。

[0113] 为了本发明方法之目的,其中施用宿主细胞或细胞群,所述细胞可以是与哺乳动物同种异体或自体的细胞。优选情况是,细胞为哺乳动物自体细胞。

[0114] 关于本发明TCR材料的上述医疗用途,待治疗和/或诊断的癌症可以为任何癌症,包括以下癌症中任一种:急性淋巴细胞癌、急性骨髓性白血病、腺泡状横纹肌肉瘤、骨癌、脑癌、乳腺癌、肛门癌、肛管癌或肛门直肠癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、阴道癌、外阴癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性髓细胞癌、结肠癌、食管癌、宫颈癌、胃肠类癌、神经胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌、恶性间皮瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、口咽癌、卵巢癌、阴茎癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌、肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、输尿管癌和膀胱癌。优选的癌症为宫颈癌、口咽癌、肛门癌、肛管癌、肛门直肠癌、阴道癌、外阴癌或阴茎癌。特别优选的癌症为COL6A3阳性癌症,诸如,胃肠癌和胃癌。

[0115] 总体上,本发明提出了患有肿瘤或肿瘤疾病的受试者的治疗方法,其包括施用本发明公开的抗原识别构建体、核酸、载体、药物组合物和/或宿主细胞。优选地,所述受试者为需要这种治疗的受试者。优选实施方案中的受试者为患有COL6A3阳性的肿瘤或肿瘤疾病的哺乳动物受试者,优选为人类患者。

[0116] 在以下实施例中将对本发明进一步进行说明,参照随附图表和序列,但是不仅限于此。为了本发明的目的,本文中引用的所有参考文献通过引用的方式并入。

[0117] 表1:本发明的TCR序列

[0118]

SEQ ID NO:	TCR	链	区域	序列
1	R4P1D10	α	CDR1	DRGSQS
2	R4P1D10	α	CDR2	IY
3	R4P1D10	α	CDR3	CAVNFHDKIIF
4	R4P1D10	α	可变结构域	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKE VEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRG SQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQ PSDSATYLCAVN
5	R4P1D10	α	恒定结构域	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEK SFETDTNLFQNLVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS
6	R4P1D10	α	全长	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKE VEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRG SQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQ PSDSATYLCAVNFHDKIIFGKGTRLH ILPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVC LFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKT VLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKL VEKSFETDTNLFQNLVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS
7	R4P1D10	β	CDR1	SGDLS
8	R4P1D10	β	CDR2	YYNGEE
9	R4P1D10	β	CDR3	CASSVASAYGYTF
10	R4P1D10	β	可变结构域	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQ

[0119]

				TPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSV YWYQQSLDQGLQFLIHYYNGEERA KGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLE LGDSALYFCASSV
11	R4P1D10	β	恒定结构域	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC LSSRLRVSAATFWQNPRNHFRCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYE ILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKR KDF
12	R4P1D10	β	全长	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQ TPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSV YWYQQSLDQGLQFLIHYYNGEERA KGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLE LGDSALYFCASSVASAYGYTFGSGT RLTVVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEI SHTQKATLVCLATGFFPDHVELSW WVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL NDSRYCLSSRLRVSAATFWQNPRNH RCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVT QIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGV SATILYEILLGKATLYAVLVSALVLM AMVKRKDF
13	R4P3F9	α	CDR1	DRGSQS
14	R4P3F9	α	CDR2	IY
15	R4P3F9	α	CDR3	CAAYSGAGSYQLTF
16	R4P3F9	α	可变结构域	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKE VEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRG SQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQ PSDSATYLCA
17	R4P3F9	α	恒定结构域	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKLVEK SFETDTNLFQNLVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS
18	R4P3F9	α	全长	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKE VEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRG SQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQ PSDSATYLCAAYSGAGSYQLTFGKG TKLSVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSD KSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYIT DKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSD FACANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCD VKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRI

[0120]

				LLKLVAGFNLLMTLRLWSS
19	R4P3F9	β	CDR1	SGDLS
20	R4P3F9	β	CDR2	YYNGEE
21	R4P3F9	β	CDR3	CASSVESSYGYTF
22	R4P3F9	β	可变结构域	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQ TPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSV YWYQQSLDQGLQFLIHYYNGEERA KGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLE LGDSALYFCASSV
23	R4P3F9	β	恒定结构域	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFFPDHVELSWVWNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC LSSRLRVSAATFWQNPRNHFRQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYE ILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKR KDF
24	R4P3F9	β	全长	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQ TPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSV YWYQQSLDQGLQFLIQYYNGEERA KGNILERFSAQQFPDLHSELNLSLE LGDSALYFCASSVESSYGYTFGSGTR LTVVEDLNKVPPEVAVFEPSEAEIS HTQKATLVCLATGFFPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALND SRYCLSSRLRVSAATFWQNPRNHFRQ VQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIV SAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSA TILYEILLGKATLYAVLVSALVLM MVKRKDF
25	R4P3H3	α	CDR1	DRGSQS
26	R4P3H3	α	CDR2	IY
27	R4P3H3	α	CDR3	CAVKAGNQFYF
28	R4P3H3	α	可变结构域	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKE VEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRG SQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQ PSDSATYLCAV
29	R4P3H3	α	恒定结构域	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSVDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEK SFETDTNLFQNLVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS
30	R4P3H3	α	全长	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKE VEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRG SQSFFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGD KEDGRFTAQLNKASQYVSLLRDSQ

[0121]

				PSDSATYLCAVKAGNQFYFGTGTSL TVIPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKT VLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKL VEKSFETDTNLFQNLVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS
31	R4P3H3	β	CDR1	SGHVS
32	R4P3H3	β	CDR2	FQNEAQ
33	R4P3H3	β	CDR3	CASSLLTSGGDNEQFF
34	R4P3H3	β	可变结构域	MGTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVS QSPRYKVAKRGQDVALRCDPISGHV SLFWYQQALGQGPEFLTYFQNEAQL DKSGLPSDRFFAERPEGSVSTLKIQR TQQEDSAVYLCASSL
35	R4P3H3	β	恒定结构域	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC LSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEA WGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEI LLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRK DSRG
36	R4P3H3	β	全长	MGTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVS QSPRYKVAKRGQDVALRCDPISGHV SLFWYQQALGQGPEFLTYFQNEAQL DKSGLPSDRFFAERPEGSVSTLKIQR TQQEDSAVYLCASSLLTSGGDNEQF FGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEP SEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVE LSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ PALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAK PVTQIVSAEA WGRADCGFTSESYQQ GVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAL VLMAMVKRKDSRG
37	1G4	α	CDR1	DSAIYN
38	1G4	α	CDR2	IQS
39	1G4	α	CDR3	CAVRPTSGGSYIPTF
40	1G4	α	可变结构域	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTV IPAALSVPEGENLVNCSFTDSAIYN LQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQT SGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGD SATYLC AVR
41	1G4	α	恒定结构域	YIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFT DFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLD MRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACAN AFNNSIIPEDTFFPSPESCDVKLVEK

[0122]

				SFETDTNLFQNLQSVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS
42	1G4	α	全长	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTV IPAALSVPEGENLVNCSFTDSAIYN LQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQT SGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGD SATYLCAVRPTSGGSYIPTFGRGTSLI VHPYIQNPDPVYQLRDSKSSDKSV CLFTDFDSQTNVSQSKSDVYITDKT VLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFA CANAFNNSIIPEDTFFPSPSSCDVKL VEKSFETDTNLFQNLQSVIGFRILL KVAGFNLLMTLRLWSS
43	1G4	β	CDR1	MNHEY
44	1G4	β	CDR2	SVGAGI
45	1G4	β	CDR3	CASSYVGNTGELFF
46	1G4	β	可变结构域	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQ TPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHE YMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGI TDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLS AAPSQTSVYFCASSY
47	1G4	β	恒定结构域	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK ATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGK EVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC LSSRLRVSATFWQNPVNHFRQVQF YGLSENDEWTQDRAKPVITQIVSAEA WGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEI LLGKATLYAVLVSAVLVLMAMVKRKR DSRG
48	1G4	β	全长	MSIGLLCCAALSLLWAGPVNAGVTQ TPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHE YMSWYRQDPGMGLRLIHYSVGAGI TDQGEVPNGYNVSRSTTEDFPLRLS AAPSQTSVYFCASSYVGNTGELFFG EGSRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELS WVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPA LNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPVNH FRQVQFYGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGV LSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLV MAMVKRKRDSRG

[0123] 表2:本发明的肽序列

[0124]

肽代码	序列	SEQ ID NO:
AGRN-001	ALLDGRVQL	49

[0125]	CLASP1-001	RLLDGAFKL	50
	COL6A1-001	ILLDGSASV	51
	COL6A2-001	FLLDGSERL	52
	COL6A3-006	FLFDGSANLV	53
	COL6A3-008	FLFDGSANL	54
	COL6A3-014	FLLDGSEGV	55
	VWA2-001	FLLDGSNSV	56
	VWF-001	FLLDGSSRL	57
	COL6A3-002	FLLDGSANV	58
	A1	ALLDGSANV	59
	A2	FALDGSANV	60
	A3	FLADGSANV	61
	A4	FLLAGSANV	62
	A5	FLLDASANV	63
	A6	FLLDGAANV	64
	A7	FLLDGSGNV	65
	A8	FLLDGSAAV	66
	A9	FLLDGSANA	67
	NYESO1-001	SLLMWITQV	68

[0126] 实施例

[0127] 一方面,当与来自自体(即患者)的T细胞相比时,异体反应性环境用于规避自身耐受性并产生具有更高亲合力的T细胞。此类环境的实例包括体外产生异体HLA反应性肽特异性T细胞(Sadovnikova et al.1998;Savage et al.2004;Wilde et al.2012)和针对人-MHC或人TCR的转基因小鼠进行免疫(Stanislawski et al.2001;Li et al.2010),两者的内容通过引用整体并入本文。

[0128] 为了从同种异体反应性环境中分离高亲和力T细胞,获得知情同意后,使用来自HLA-A*02阴性健康供体的PBMC。从MBLI(Woburn,MA)中获得含有COL6A3-002的重组生物素化HLA-A*02 I类单体和A2荧光四聚体。将PBMC使用磷酸盐缓冲盐水(PBS)稀释的抗CD20SA室温下孵育1小时,洗涤,并使用生物素化的HLA-A*02/COL6A3-002单体室温下温育30分钟,洗涤并在具有10%人AB血清的RPMI中用24孔板以 3×10^6 个细胞/孔进行铺板。第1天以10ng/mL加入白细胞介素7(IL-7;R&D Systems,Minneapolis,MN),第4天以10U/mL加入IL-2(Chiron,Harefield,United Kingdom)。在5周的期间,每周用新鲜的PBMC对细胞进行再刺激,用1:1的比例与应答细胞混合,并在24孔板中以 3×10^6 /孔进行铺板。

[0129] 为了获得高亲合力T细胞,将大约 10^6 个含有HLA-A*02/COL6A3-002四聚体-藻红蛋白(PE)(获得自MBLI)的PBMC4°C下孵育30分钟,随后用抗CD8-异硫氰酸荧光素(FITC)/别藻蓝蛋白(APC)在4°C下孵育20分钟,然后进行荧光启动细胞分选。分选的四聚体阳性细胞在24孔板中扩增,方法为每孔 2×10^5 个分选细胞、 2×10^6 个经照射的A2阴性PBMC作为进料、

2×10^4 CD3/CD28珠/mL (Dyna1, Oslo Norway) 和 IL-2 (1000U/mL)。然后使用如此获得的高亲合力T细胞,采用本领域已知的技术鉴定和分离TCR,例如单细胞5'RACE (cDNA末端快速扩增)。然后分析非冗余TCR DNA进行氨基酸/DNA序列测定并克隆到表达载体中。

[0130] 从健康供体的T细胞中分离和扩增三种COL6A3-002特异性TCR (R4P1D10、R4P3F9和R4P3H3,参见表2),每种编码肿瘤特异性TCR- α 和TCR- β 链。根据之前描述的方法 (Walter et al., 2003 J Immunol., Nov15;171 (10):4974-8) 对健康供体的细胞进行体外刺激。如先前所述进行COL6A3肽提呈 (Hirano N. et al.; Blood. 2006 Feb 15; 107 (4):1528-36)。靶细胞用HLA-A*02多聚体进行单细胞分选,然后用于随后的TCR分离。例如根据Green和Sambrook所著的分子克隆实验室手册第四版所述的标准方法通过5'RACE分离TCR序列。对TCR R4P1D10、R4P3F9和R4P3H3的 α 和 β 可变区进行测序并克隆以进行进一步的功能表征。R4P1D10和R4P3H3来自HLA-A*02阳性供体, R4P3F9来自HLA-A*02阴性供体 (同种反应性环境)。

[0131] 表3:COL6A3-002和NYESO1-001 TCR的SPR亲和力

[0132]

TCR	HLA-A02/COL6A3-002 复合体的平衡解离常数 (K_D), 单位 μ M	HLA-A02 /NYESO1-001 复合体的平衡解离常数 (K_D), 单位 μ M
R4P1D10	16	无结合
R4P3F9	62	无结合
R4P3H3	102	无结合
1G4	无结合	7

[0133] 实施例1:T细胞受体R4P1D10

[0134] TCR R4P1D10 α 和 β 链按前述方法进行克隆,例如,如美国专利8,519,100所述,其内容通过引用并入本文用于所述方法。TCR R4P1D10限于HLA-A2-提呈的COL6A3-002 (见上表3)。

[0135] 表4:R4P1D10 α 链的特征:

[0136]

起始	终止	描述	序列
1	21	L 片段 (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQ (SEQ ID NO:69)
1	113	V 链 (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQ NSGPLSVPEGAIASLNCTYSRGRSQSFFW

[0137]

			YRQYSGKSPPELIMFIYSNGDKEDGRFTA QLNKASQYVSVLLIRDSQPSDSATYLCAV N
48	53	CDR1	DRGSQS
71	72	CDR2	IY
110	120	CDR3	CAVNFHDKIIF
116	130	J 片段 (TRAJ30)	DKIIFGKGTRLHILP
131	272	恒定区 (TRAC)	NIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDF DSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSM DFKNSNAVAWSNKSDFACANAFNNSIIP EDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLF QNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

[0138] 表5:R4P1D10 β 链的特征:

[0139]

起始	终止	描述	序列
1	19	L 片段 (TRBV9)	MGFRLCCVAFCLLGAGPV (SEQ ID NO:70)
1	114	V 链 (TRBV9)	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLIT ATGQRVTLRCSRSGDLSVYWYQQSLDQGLQ FLIHYYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSEL NLSSLELGDSALYFCASSV
46	50	CDR1	SGDLS
68	73	CDR2	YYNGEE
110	122	CDR3	CASSVASAYGYTF
118	131	J 链 (TRBJ1-2)	YGYTFGSGTRLTVV
132	308	恒定区 (TRBC1)	EDLNKVPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCL ATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPL KEQPALNDSRYCLSSRLRVSAATFWQNPRNHF RCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEA WGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKAT LYAVLVSALVLMAMVVRKDF

[0140] R4P1D10特异性识别COL6A3-002,与HLA-A*02+靶细胞共同培养并与分别载有COL6A3-002肽或COL6A3-002的丙氨酸和甘氨酸取代变体(图1)或与COL6A3-002具有高度序列相似性的不同肽(图2)的HLA-A*02四聚体结合时,再表达该TCR的人原代CD8⁺ T细胞释放IFN γ 。NYES01-001肽用作阴性对照。

[0141] R4P1D10的再表达引起J.RT3-T3.5 Jurka T细胞(图3)、SUP-T1细胞(图4)和人原代CD8⁺ T细胞(图5)中HLA-A*02/COL6A3-002四聚体的特异性结合,而不是HLA-A*02/NYES01-001四聚体的特异性结合。对于每种细胞类型,NYES01-001特异性TCR 1G4的再表达和空白表达作为对照。

[0142] 根据先前描述的方法 (Willcox BE et al., 1999 Protein Sci., Nov; 8(11): 2418-23) 对表达为可溶性TCR的R4P1D10与HLA-A*02/COI6A3-002复合体的SPR (表面等离子体共振) 结合力分析显示亲和力为 $K_D = 16 \mu\text{M}$ (表3)。1G4 TCR和HLA-A*02/NYES01-001的SPR结合资料用作对照。

[0143] 实施例2: T细胞受体R4P3F9

[0144] TCR R4P3F9 α 和 β 链按前述方法进行克隆, 例如, 如美国专利8,519,100所述, 其通过引用并入本文用于所述方法。TCR R4P3F9限于HLA-A2-提呈的COI6A3-002 (见上表3)。

[0145] 表6: R4P3F9 α 链的特征

[0146]

起始	终止	描述	序列
1	21	L 片段 (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQ (SEQ ID NO:71)
1	111	V 链 (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSG PLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSG KSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVS LLIRDSQPSSDASYLCA
48	53	CDR1	DRGSQS
71	72	CDR2	IY
110	123	CDR3	CAAYSGAGSYQLTF
113	133	J 片段 (TRAJ28)	YSGAGSYQLTFGKGTKLSVIP
134	274	恒定区 (TRAC)	NIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKNSAV AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCD VKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS

[0147] 表7: R4P3F9 β 链的特征

[0148]

起始	终止	描述	序列
1	19	L 片段 (TRBV9)	MGFRLCCVAFCLLGAGPV (SEQ ID NO:72)
1	114	V 链 (TRBV9)	MGFRLCCVAFCLLGAGPVDSGVTQTPKHLITA TGQRVTLRCSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLI HYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSELNLSSL ELGDSALYFCASSV
46	50	CDR1	SGDLS
68	73	CDR2	YYNGEE
110	122	CDR3	CASSVESSYGYTF

[0149]

118	131	J 链 (TRBJ1-2)	YGYTFGSGTRLTVV
132	308	恒定区 (TRBC1)	EDLNKVFPPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLAT GFFPDHVELSWVWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQ PALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQ FYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADC GFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSA LVLMAMVKRKDF

[0150] R4P3F9特异性识别COL6A3-002,与分别载有COL6A3-002肽或COL6A3-002的丙氨酸和甘氨酸取代变体(图6)或与COL6A3-002具有高度序列相似性的不同肽(图7)的HLA-A*02+靶细胞共同培养时,再表达该TCR的人原代CD8+ T细胞释放IFN γ 。NYES01-001肽用作阴性对照。

[0151] R4P3F9的再表达引起J.RT3-T3.5 Jurka T细胞(图8)和SUP-T1细胞(图9)中HLA-A*02/COL6A3-002四聚体的特异性结合,而不是HLA-A*02/NYES01-001四聚体的特异性结合。对于每种细胞类型,NYES01-001特异性TCR 1G4的再表达和空白表达作为对照。

[0152] 根据先前描述的方法(Willcox BE et al.,1999 Protein Sci.,Nov;8(11):2418-23)对表达为可溶性TCR的R4P3F9与HLA-A*02/COL6A3-002复合体的SPR结合力分析显示亲和力为 $K_D=62\mu\text{M}$ (表3)。1G4 TCR和HLA-A*02/NYES01-001的SPR结合资料用作对照。

[0153] 实施例3:T细胞受体R4P3H3

[0154] TCR R4P3H3 α 和 β 链按前述方法进行克隆,例如,如美国专利8,519,100所述,其通过引用并入本文。TCR R4P3H3限于HLA-A2-提呈的COL6A3-002(见上表3)。

[0155] 表8:R4P3H3 α 链的特征

[0156]

起始	终止	描述	序列
1	21	L 片段 (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQ (SEQ ID NO:73)
1	112	V 链 (TRAV12-2)	MKSLRVLLVILWLQLSWVWSQQKEVEQNSG PLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSG KSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVS LLIRDSQPDSATYLCAV
48	53	CDR1	DRGSQS
71	72	CDR2	IY
110	120	CDR3	CAVKAGNQFYF
115	130	J 片段 (TRAJ49)	GNQFYFGTGTSLTVIP
131	271	恒定区 (TRAC)	NIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQT NVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAV

[0157]

			AWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCD VKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKVA GFNLLMTLRLWSS
--	--	--	---

[0158] 表9:R4P3H3β链的特征

[0159]

起始	终止	描述	序列
1	19	L 片段 (TRBV7-8)	MGTRLLCWVVLGFLGTDHT (SEQ ID NO:74)
1	115	V 链 (TRBV7-8)	MGTRLLCWVVLGFLGTDHTGAGVVSQSPRYKV AKRGQDVALRCDPISGHVSLFWYQQALGQGP EFLTYFQNEAQLDKSGLPSDRFFAERPEGSVST LKIQRQQEDSAVYLCASSL
46	50	CDR1	SGHVS
68	73	CDR2	FQNEAQ
111	126	CDR3	CASSLLTSGGDNEQFF
122	135	J 链 (TRBJ2-1)	NEQFFGPGTRLTVL
136	314	恒定区 (TRBC2)	EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLA TGFYPDHVELSWVWVNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFC QVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWG RADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYA VLVSALVLMAMVKRKDSRG

[0160] R4P3H3特异性识别COL6A3-002,与分别载有COL6A3-002肽或COL6A3-002的丙氨酸和甘氨酸取代变体(图10)或与COL6A3-002具有高度序列相似性的不同肽(图11)的HLA-A*02+靶细胞共同培养时,再表达该TCR的人原代CD8⁺ T细胞释放IFN γ 。NYES01-001肽用作阴性对照。

[0161] R4P3H3的再表达引起SUP-T1细胞(图12)中HLA-A*02/COL6A3-002四聚体的特异性结合,而不是HLA-A*02/NYES01-001四聚体的特异性结合。NYES01-001特异性TCR 1G4的再表达和空白表达作为对照。

[0162] 根据先前描述的方法(Willcox BE et al.,1999 Protein Sci.,Nov;8(11):2418-23)对表达为可溶性TCR的R4P3H3与HLA-A*02/COL6A3-002复合体的SPR结合力分析显示亲和力为 $K_D=102\mu\text{M}$ (表3)。1G4 TCR和HLA-A*02/NYES01-001的SPR结合资料用作对照。

序列表

<110> 伊玛提克斯生物技术有限公司
<120> T细胞受体及使用该T细胞受体的免疫治疗
<130> I32978W0
<150> DE 102016115246.3
<151> 2016-08-17
<150> US 62/376,059
<151> 2016-08-17
<150> US 62/376,632
<151> 2016-08-18
<160> 74
<170> PatentIn版本3.5
<210> 1
<211> 6
<212> PRT
<213> 智人(Homo sapiens)
<400> 1
Asp Arg Gly Ser Gln Ser
1 5
<210> 2
<211> 2
<212> PRT
<213> 智人
<400> 2
Ile Tyr
1
<210> 3
<211> 11
<212> PRT
<213> 智人
<400> 3
Cys Ala Val Asn Phe His Asp Lys Ile Ile Phe
1 5 10
<210> 4
<211> 113
<212> PRT
<213> 智人
<400> 4

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

Asn

<210> 5

<211> 141

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Asn 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 Thr
 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> 6

<211> 271
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 6
 Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser
 1 5 10 15
 Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu
 20 25 30
 Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp
 35 40 45
 Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser
 50 55 60
 Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly
 65 70 75 80
 Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu
 85 90 95
 Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val
 100 105 110
 Asn Phe His Asp Lys Ile Ile Phe Gly Lys Gly Thr Arg Leu His Ile
 115 120 125
 Leu Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp
 130 135 140
 Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser
 145 150 155 160
 Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp
 165 170 175
 Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala
 180 185 190
 Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn
 195 200 205
 Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser
 210 215 220
 Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu
 225 230 235 240
 Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys
 245 250 255
 Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
 260 265 270
 <210> 7

<211> 5
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 7
 Ser Gly Asp Leu Ser
 1 5
 <210> 8
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 8
 Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu
 1 5
 <210> 9
 <211> 13
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 9
 Cys Ala Ser Ser Val Ala Ser Ala Tyr Gly Tyr Thr Phe
 1 5 10
 <210> 10
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 10
 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 His 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 Val
 <210> 11
 <211> 177
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 11
 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 Ser 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> 12
 <211> 308
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 12
 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 His Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu		
65	70	75
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 Val Ala Ser Ala Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu		
115	120	125
Thr Val Val Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val		
130	135	140
Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu		
145	150	155
Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp		
165	170	175
Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln		
180	185	190
Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser		
195	200	205
Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His		
210	215	220
Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp		
225	230	235
Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala		
245	250	255
Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly		
260	265	270
Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr		
275	280	285
Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys		
290	295	300
Arg Lys Asp Phe		
305		
<210> 13		
<211> 6		
<212> PRT		
<213> 智人		

<400> 13

Asp Arg Gly Ser Gln Ser

1 5

<210> 14

<211> 2

<212> PRT

<213> 智人

<400> 14

Ile Tyr

1

<210> 15

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人

<400> 15

Cys Ala Ala Tyr Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe

1 5 10

<210> 16

<211> 111

<212> PRT

<213> 智人

<400> 16

Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser

1 5 10 15

Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu

20 25 30

Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp

35 40 45

Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser

50 55 60

Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly

65 70 75 80

Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu

85 90 95

Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala

100 105 110

<210> 17

<211> 141

<212> PRT

<213> 智人

<400> 17

Asn	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	Thr
			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> 18

<211> 274

<212> PRT

<213> 智人

<400> 18

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

Tyr Ser Gly Ala Gly Ser Tyr Gln Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Lys
 115 120 125
 Leu Ser Val Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln
 130 135 140
 Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
 145 150 155 160
 Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
 165 170 175
 Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
 180 185 190
 Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
 195 200 205
 Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro
 210 215 220
 Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
 225 230 235 240
 Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu
 245 250 255
 Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp
 260 265 270

Ser Ser

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 19

Ser Gly Asp Leu Ser

1 5

<210> 20

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 20

Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu

1 5

<210> 21

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人

<400> 21

Cys Ala Ser Ser Val Glu Ser Ser Tyr Gly Tyr Thr Phe
1 5 10

<210> 22

<211> 114

<212> PRT

<213> 智人

<400> 22

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 His 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 Val

<210> 23

<211> 177

<212> PRT

<213> 智人

<400> 23

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 Ser 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> 24																	
<211> 308																	
<212> PRT																	
<213> 智人																	
<400> 24																	
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	Val	Glu	Ser	Ser	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Leu		
				115					120					125			
Thr	Val	Val	Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val		
				130					135					140			
Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu		
				145					150					155			160
Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp		
				165					170					175			

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln
 180 185 190
 Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
 195 200 205
 Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
 210 215 220
 Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
 225 230 235 240
 Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
 245 250 255
 Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly
 260 265 270
 Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr
 275 280 285
 Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys
 290 295 300
 Arg Lys Asp Phe
 305
 <210> 25
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 25
 Asp Arg Gly Ser Gln Ser
 1 5
 <210> 26
 <211> 2
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 26
 Ile Tyr
 1
 <210> 27
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 27
 Cys Ala Val Lys Ala Gly Asn Gln Phe Tyr Phe
 1 5 10

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> 智人

<400> 28

```

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

```

<210> 29

<211> 141

<212> PRT

<213> 智人

<400> 29

```

Asn 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 Thr
           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> 30					
<211> 271					
<212> PRT					
<213> 智人					
<400> 30					
Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser					
1	5		10		15
Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu					
	20		25		30
Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp					
	35		40		45
Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser					
	50		55		60
Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly					
65	70		75		80
Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu					
	85		90		95
Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val					
	100		105		110
Lys Ala Gly Asn Gln Phe Tyr Phe Gly Thr Gly Thr Ser Leu Thr Val					
	115		120		125
Ile Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp					
	130		135		140
Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser					
145	150		155		160
Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp					
	165		170		175
Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala					
	180		185		190
Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn					
	195		200		205
Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser					
	210		215		220
Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu					
225	230		235		240
Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys					

	245		250		255
Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser					
	260		265		270
<210> 31					
<211> 5					
<212> PRT					
<213> 智人					
<400> 31					
Ser Gly His Val Ser					
1		5			
<210> 32					
<211> 6					
<212> PRT					
<213> 智人					
<400> 32					
Phe Gln Asn Glu Ala Gln					
1		5			
<210> 33					
<211> 16					
<212> PRT					
<213> 智人					
<400> 33					
Cys Ala Ser Ser Leu Leu Thr Ser Gly Gly Asp Asn Glu Gln Phe Phe					
1		5		10	15
<210> 34					
<211> 115					
<212> PRT					
<213> 智人					
<400> 34					
Met Gly Thr Arg Leu Leu Cys Trp Val Val Leu Gly Phe Leu Gly Thr					
1		5		10	15
Asp His Thr Gly Ala Gly Val Ser Gln Ser Pro Arg Tyr Lys Val Ala					
		20		25	30
Lys Arg Gly Gln Asp Val Ala Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His					
		35		40	45
Val Ser Leu Phe Trp Tyr Gln Gln Ala Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe					
		50		55	60
Leu Thr Tyr Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Asp Lys Ser Gly Leu Pro					
65		70		75	80

Ser Asp Arg Phe Phe Ala Glu Arg Pro Glu Gly Ser Val Ser Thr Leu
 85 90 95
 Lys Ile Gln Arg Thr Gln Gln Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala
 100 105 110
 Ser Ser Leu
 115
 <210> 35
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 35
 Glu Asp Leu Lys Asn 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 Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 35 40 45
 Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser 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 Glu 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
 Ser Arg Gly
 <210> 36
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 36

Met	Gly	Thr	Arg	Leu	Leu	Cys	Trp	Val	Val	Leu	Gly	Phe	Leu	Gly	Thr
1				5					10					15	
Asp	His	Thr	Gly	Ala	Gly	Val	Ser	Gln	Ser	Pro	Arg	Tyr	Lys	Val	Ala
			20					25					30		
Lys	Arg	Gly	Gln	Asp	Val	Ala	Leu	Arg	Cys	Asp	Pro	Ile	Ser	Gly	His
		35					40					45			
Val	Ser	Leu	Phe	Trp	Tyr	Gln	Gln	Ala	Leu	Gly	Gln	Gly	Pro	Glu	Phe
		50				55					60				
Leu	Thr	Tyr	Phe	Gln	Asn	Glu	Ala	Gln	Leu	Asp	Lys	Ser	Gly	Leu	Pro
65				70						75				80	
Ser	Asp	Arg	Phe	Phe	Ala	Glu	Arg	Pro	Glu	Gly	Ser	Val	Ser	Thr	Leu
				85					90					95	
Lys	Ile	Gln	Arg	Thr	Gln	Gln	Glu	Asp	Ser	Ala	Val	Tyr	Leu	Cys	Ala
			100					105					110		
Ser	Ser	Leu	Leu	Thr	Ser	Gly	Gly	Asp	Asn	Glu	Gln	Phe	Phe	Gly	Pro
		115					120					125			
Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro
						135						140			
Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln
145					150					155					160
Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val
				165					170					175	
Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser
			180					185					190		
Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg
		195						200					205		
Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn
		210				215					220				
Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu
225					230					235					240
Asn	Asp	Glu	Trp	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val
				245					250					255	
Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser
			260					265					270		
Tyr	Gln	Gln	Gly	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu
			275					280				285			
Gly	Lys	Ala	Thr	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met
			290				295				300				
Ala	Met	Val	Lys	Arg	Lys	Asp	Ser	Arg	Gly						

305 310
 <210> 37
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 37
 Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
 1 5
 <210> 38
 <211> 3
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 38
 Ile Gln Ser
 1
 <210> 39
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 39
 Cys Ala Val Arg Pro Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe
 1 5 10 15
 <210> 40
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 40
 Met Glu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Ile Leu Trp Leu Gln Leu Gln Trp
 1 5 10 15
 Val Ser Ser Lys Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val
 20 25 30
 Pro Glu Gly Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala
 35 40 45
 Ile Tyr Asn Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr
 50 55 60
 Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg
 65 70 75 80
 Leu Asn Ala Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile
 85 90 95

Ala Ala Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg
 100 105 110

<210> 41

<211> 141

<212> PRT

<213> 智人

<400> 41

Tyr 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 Thr
 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> 42

<211> 274

<212> PRT

<213> 智人

<400> 42

Met Glu Thr Leu Leu Gly Leu Leu Ile Leu Trp Leu Gln Leu Gln Trp
 1 5 10 15

Val Ser Ser Lys Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val
 20 25 30

Pro Glu Gly Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala
 35 40 45

Ile Tyr Asn Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr
 50 55 60

Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg

65	70	75	80
Leu Asn Ala Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile			
	85	90	95
Ala Ala Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg			
	100	105	110
Pro Thr Ser Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser			
	115	120	125
Leu Ile Val His Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln			
	130	135	140
Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp			
145	150	155	160
Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr			
	165	170	175
Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser			
	180	185	190
Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn			
	195	200	205
Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro			
	210	215	220
Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp			
225	230	235	240
Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu			
	245	250	255
Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp			
	260	265	270
Ser Ser			
<210> 43			
<211> 5			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 43			
Met Asn His Glu Tyr			
1	5		
<210> 44			
<211> 6			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 44			
Ser Val Gly Ala Gly Ile			

1 5
 <210> 45
 <211> 14
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 45
 Cys Ala Ser Ser Tyr Val Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe
 1 5 10
 <210> 46
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 46
 Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala
 1 5 10 15
 Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu
 20 25 30
 Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His
 35 40 45
 Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu
 50 55 60
 Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro
 65 70 75 80
 Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg
 85 90 95
 Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser
 100 105 110
 Ser Tyr
 <210> 47
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 47
 Glu Asp Leu Lys Asn 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 Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser 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 Glu 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
 Ser Arg Gly
 <210> 48
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 48
 Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala
 1 5 10 15
 Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu
 20 25 30
 Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His
 35 40 45
 Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu
 50 55 60
 Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro
 65 70 75 80
 Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg
 85 90 95
 Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser
 100 105 110
 Ser Tyr Val Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg
 115 120 125
 Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala

130	135	140
Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr		
145	150	155
Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser		
	165	170
Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro		
	180	185
Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu		
	195	200
Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn		
210	215	220
His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu		
225	230	235
Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu		
	245	250
Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln		
	260	270
Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala		
	275	280
Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val		
290	295	300
Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly		
305	310	
<210> 49		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 49		
Ala Leu Leu Asp Gly Arg Val Gln Leu		
1	5	
<210> 50		
<211> 9		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 50		
Arg Leu Leu Asp Gly Ala Phe Lys Leu		
1	5	
<210> 51		
<211> 9		

<212> PRT
 <213> 智人
 <400> 51
 Ile Leu Leu Asp Gly Ser Ala Ser Val
 1 5
 <210> 52
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 52
 Phe Leu Leu Asp Gly Ser Glu Arg Leu
 1 5
 <210> 53
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 53
 Phe Leu Phe Asp Gly Ser Ala Asn Leu Val
 1 5 10
 <210> 54
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 54
 Phe Leu Phe Asp Gly Ser Ala Asn Leu
 1 5
 <210> 55
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 55
 Phe Leu Leu Asp Gly Ser Glu Gly Val
 1 5
 <210> 56
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 56
 Phe Leu Leu Asp Gly Ser Asn Ser Val

1 5
<210> 57
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 57
Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ser Arg Leu
1 5
<210> 58
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 58
Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val
1 5
<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 59
Ala Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val
1 5
<210> 60
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 60
Phe Ala Leu Asp Gly Ser Ala Asn Val
1 5
<210> 61
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 61
Phe Leu Ala Asp Gly Ser Ala Asn Val
1 5
<210> 62
<211> 9
<212> PRT

<213> 智人
<400> 62
Phe Leu Leu Ala Gly Ser Ala Asn Val
1 5
<210> 63
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 63
Phe Leu Leu Asp Ala Ser Ala Asn Val
1 5
<210> 64
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 64
Phe Leu Leu Asp Gly Ala Ala Asn Val
1 5
<210> 65
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 65
Phe Leu Leu Asp Gly Ser Gly Asn Val
1 5
<210> 66
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 66
Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Ala Val
1 5
<210> 67
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人
<400> 67
Phe Leu Leu Asp Gly Ser Ala Asn Ala
1 5

<210> 68

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 68

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Val

1 5

<210> 69

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 69

Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser

1 5 10 15

Trp Val Trp Ser Gln

20

<210> 70

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

<400> 70

Met Gly Phe Arg Leu Leu Cys Cys Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala

1 5 10 15

Gly Pro Val

<210> 71

<211> 21

<212> PRT

<213> 智人

<400> 71

Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser

1 5 10 15

Trp Val Trp Ser Gln

20

<210> 72

<211> 19

<212> PRT

<213> 智人

<400> 72

Met Gly Phe Arg Leu Leu Cys Cys Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala

1	5	10	15
Gly Pro Val			
<210> 73			
<211> 21			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 73			
Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser			
1	5	10	15
Trp Val Trp Ser Gln			
20			
<210> 74			
<211> 19			
<212> PRT			
<213> 智人			
<400> 74			
Met Gly Thr Arg Leu Leu Cys Trp Val Val Leu Gly Phe Leu Gly Thr			
1	5	10	15
Asp His Thr			

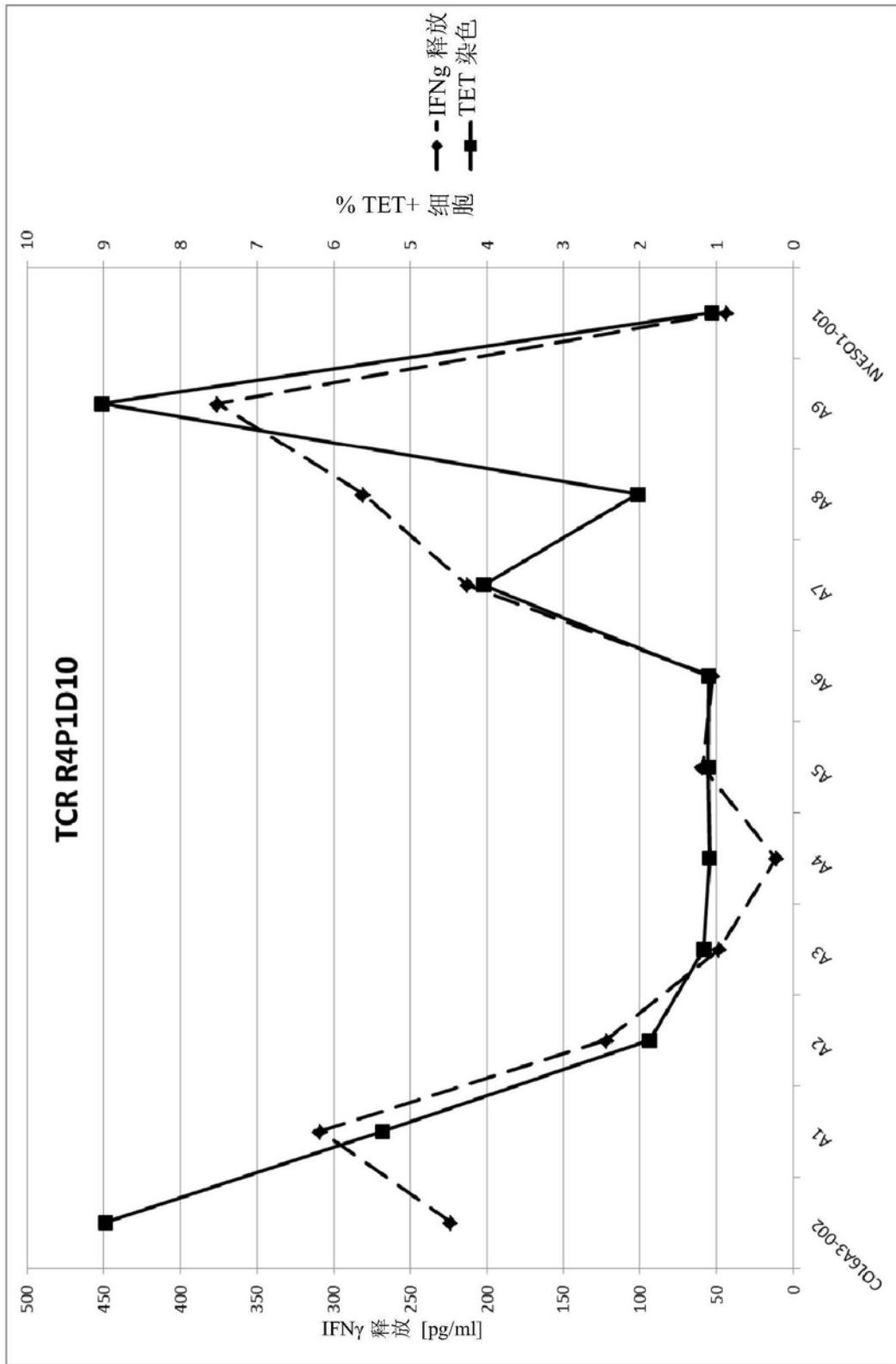


图1

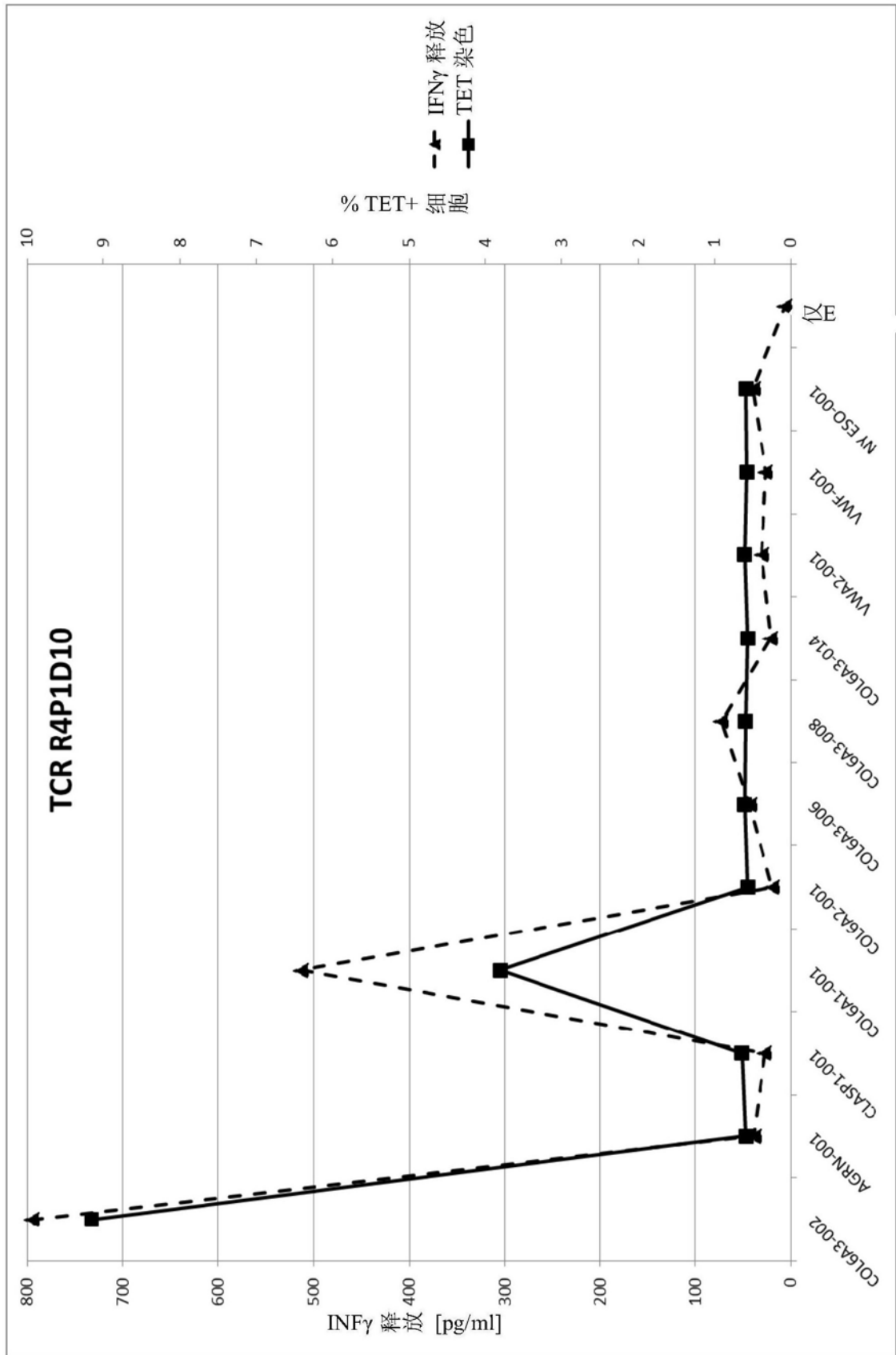


图2

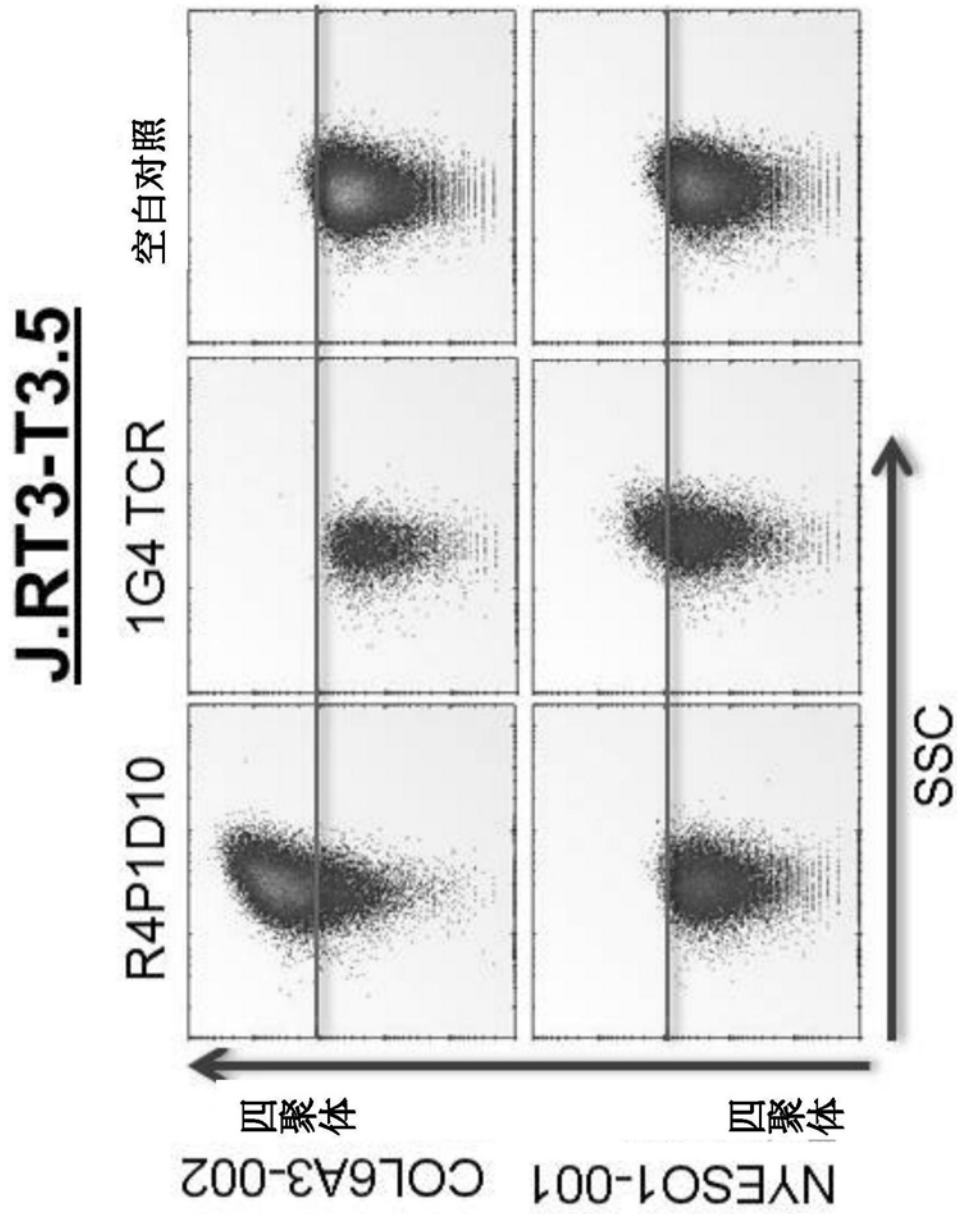


图3

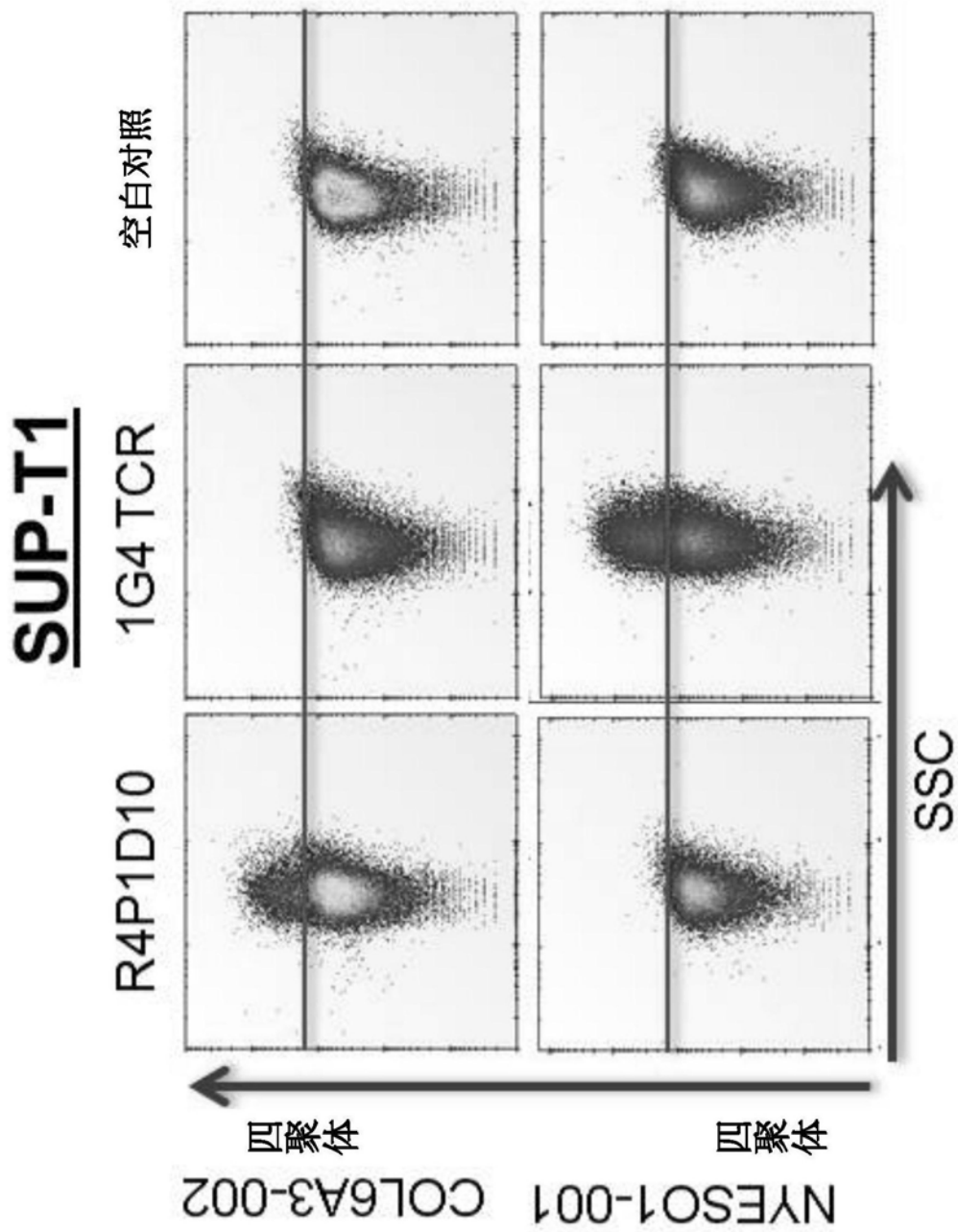


图4

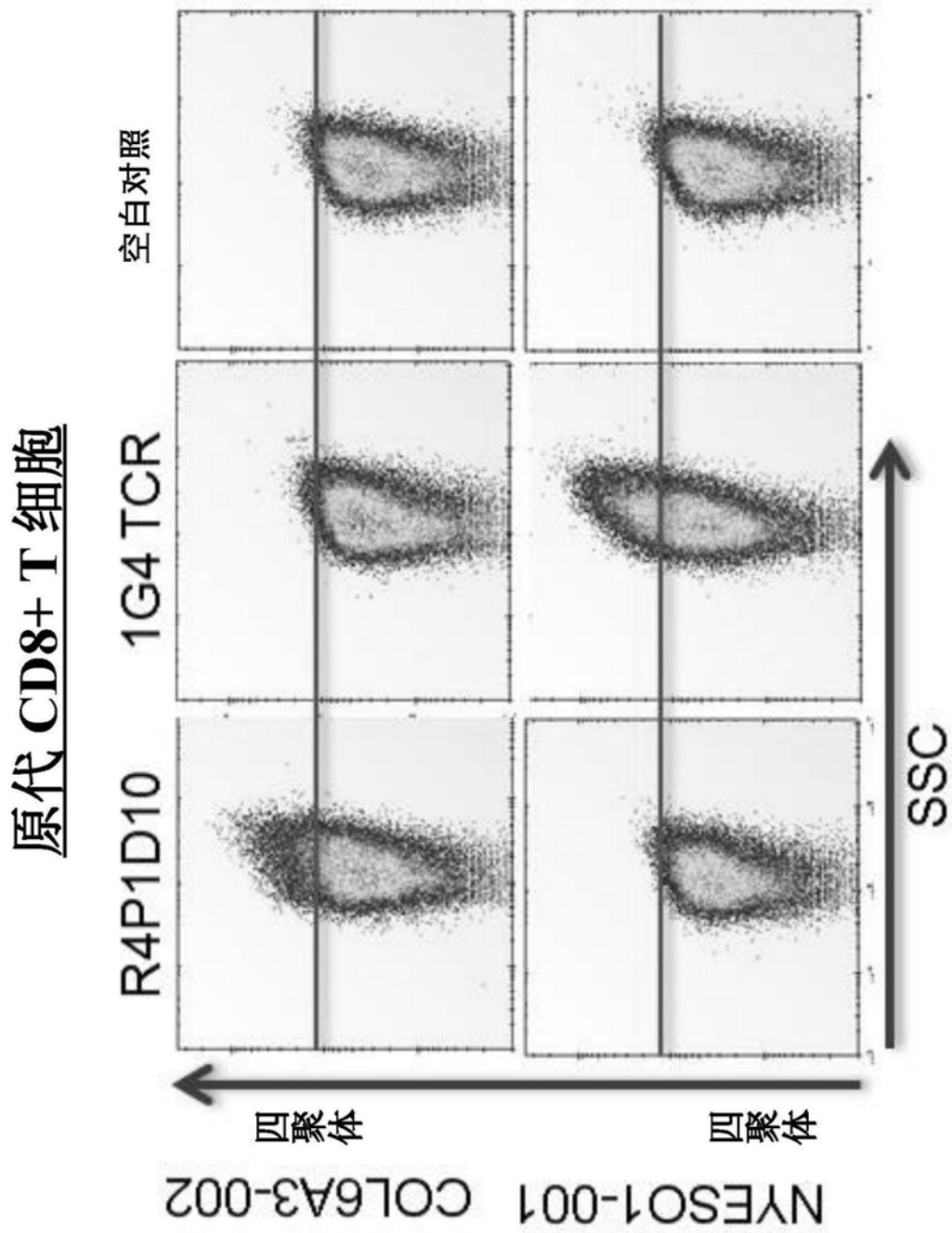


图5

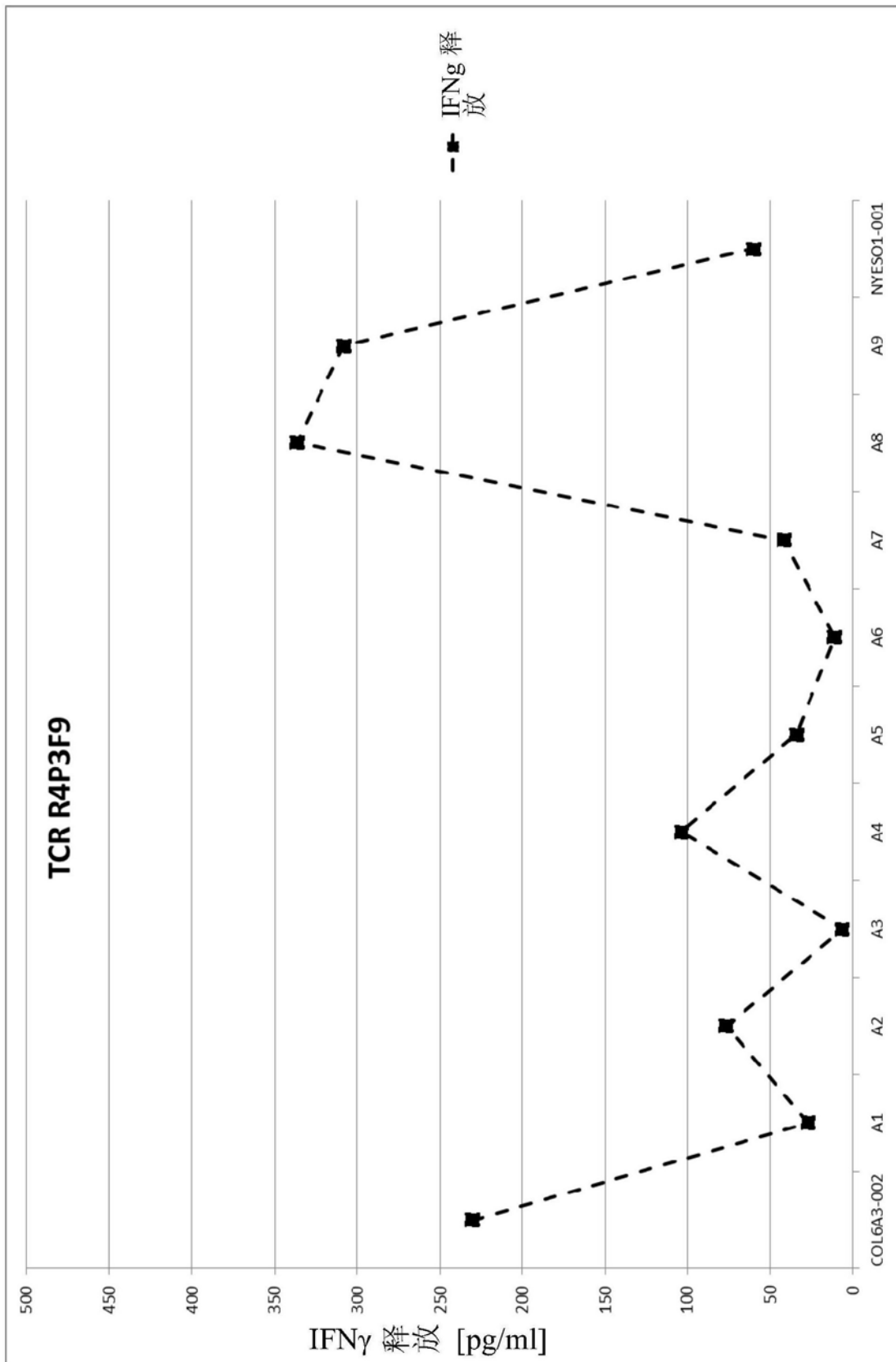


图6

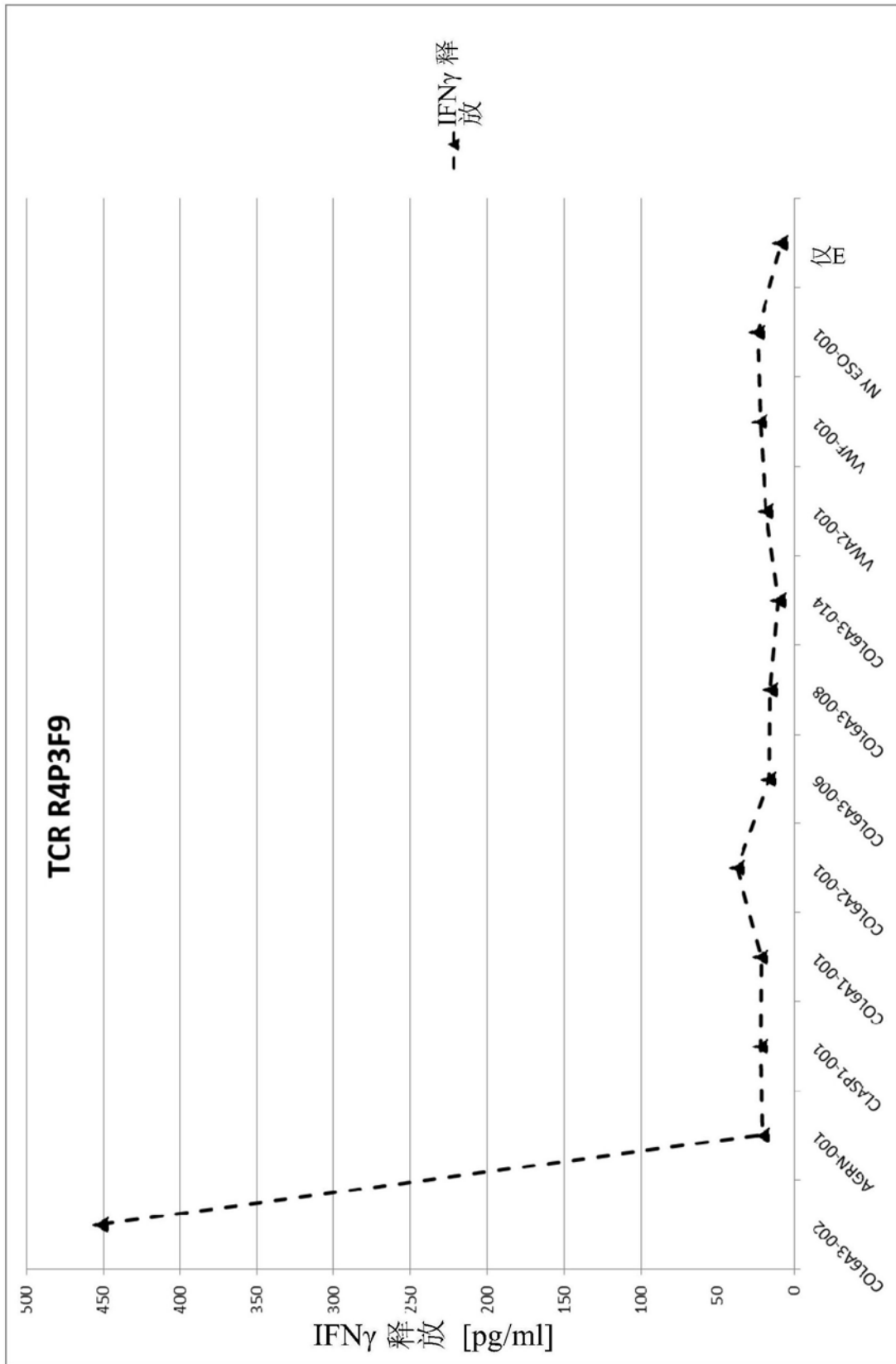


图7

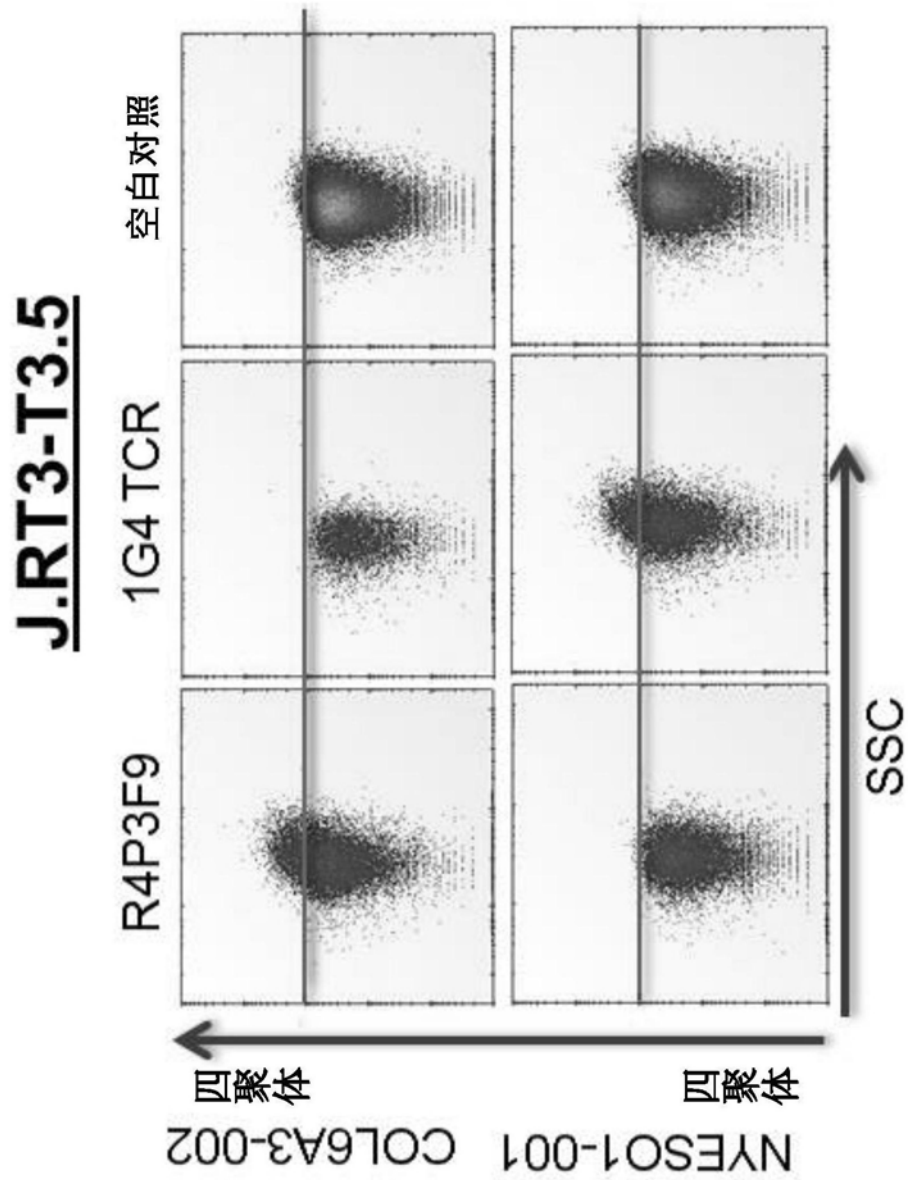


图8

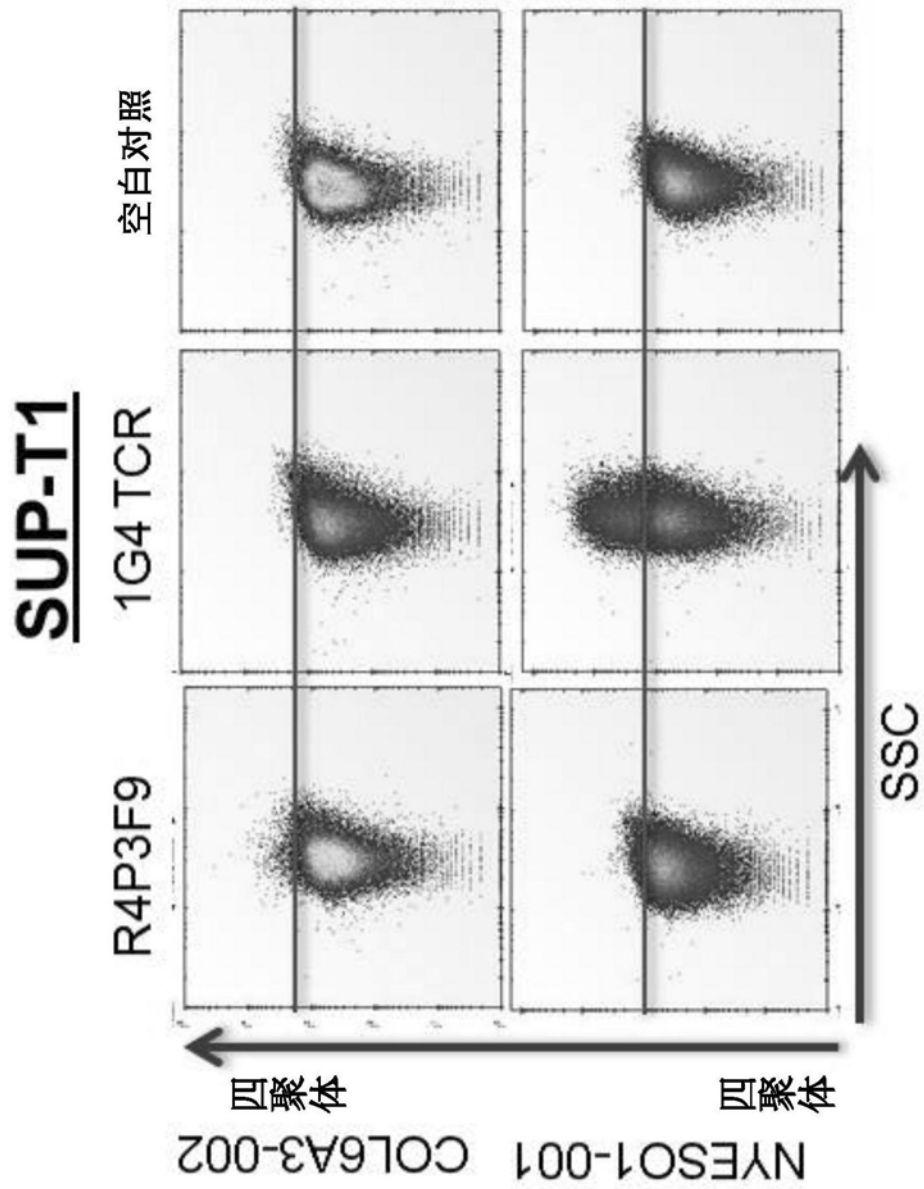


图9

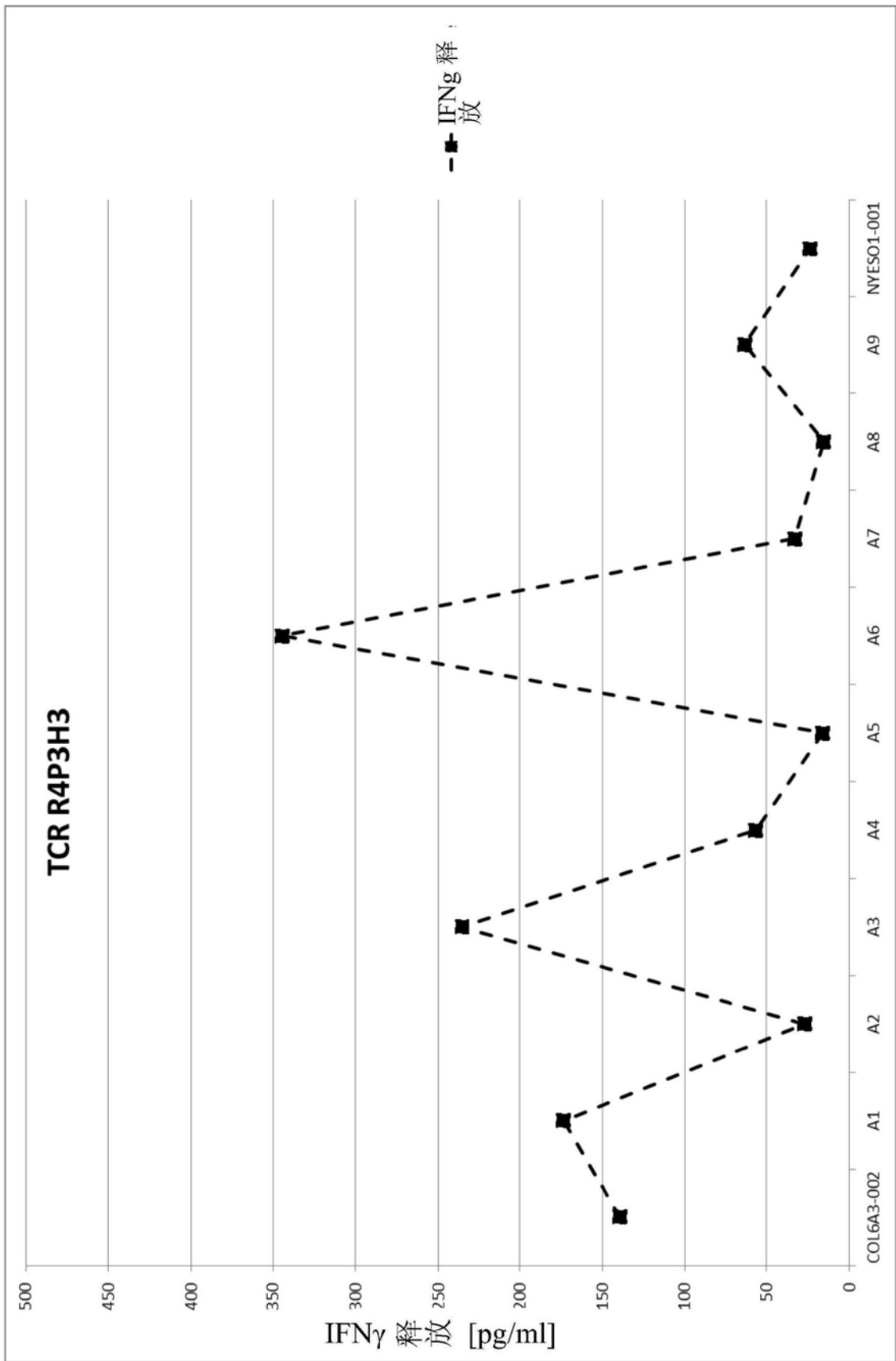


图10

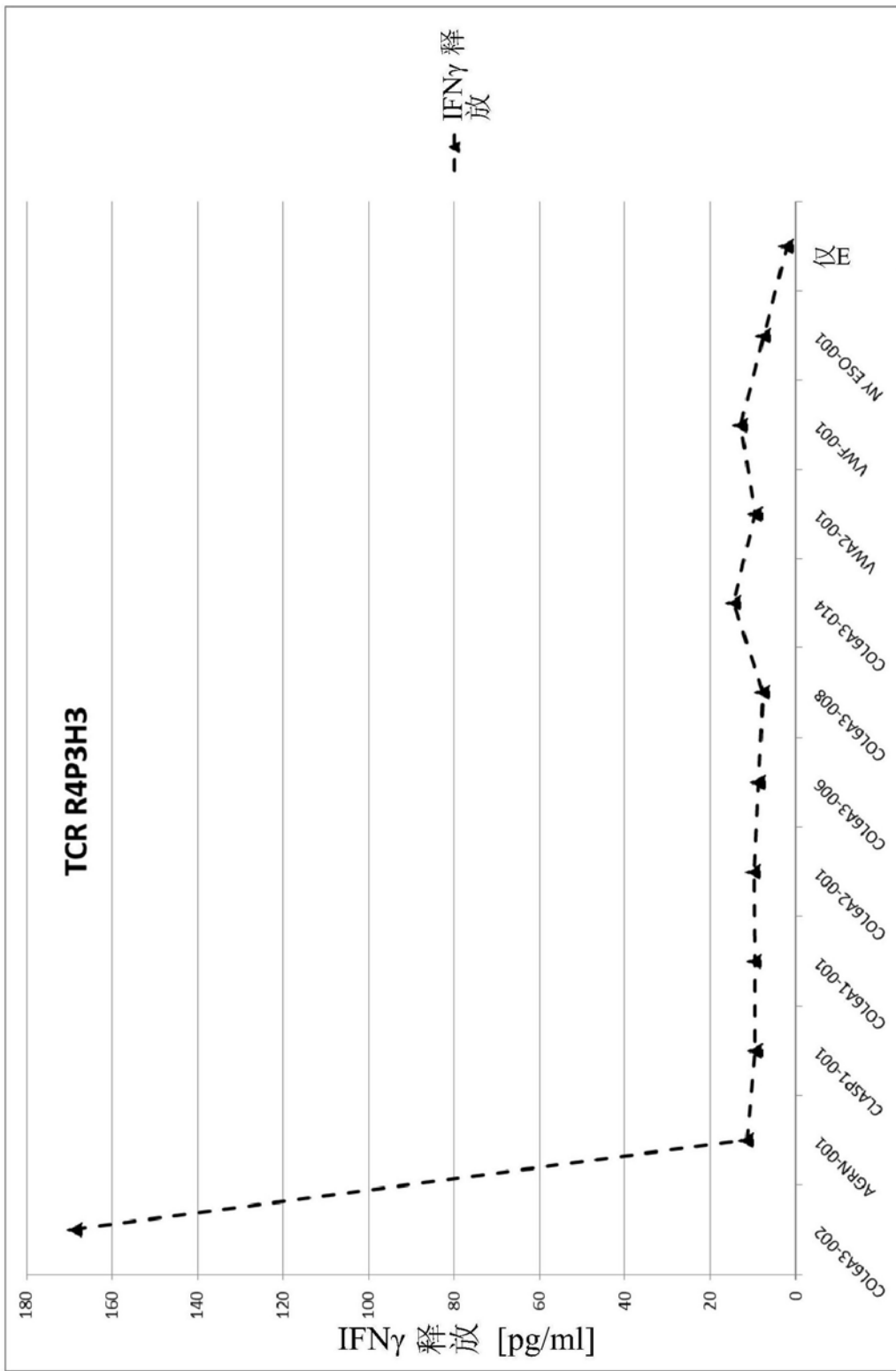


图11

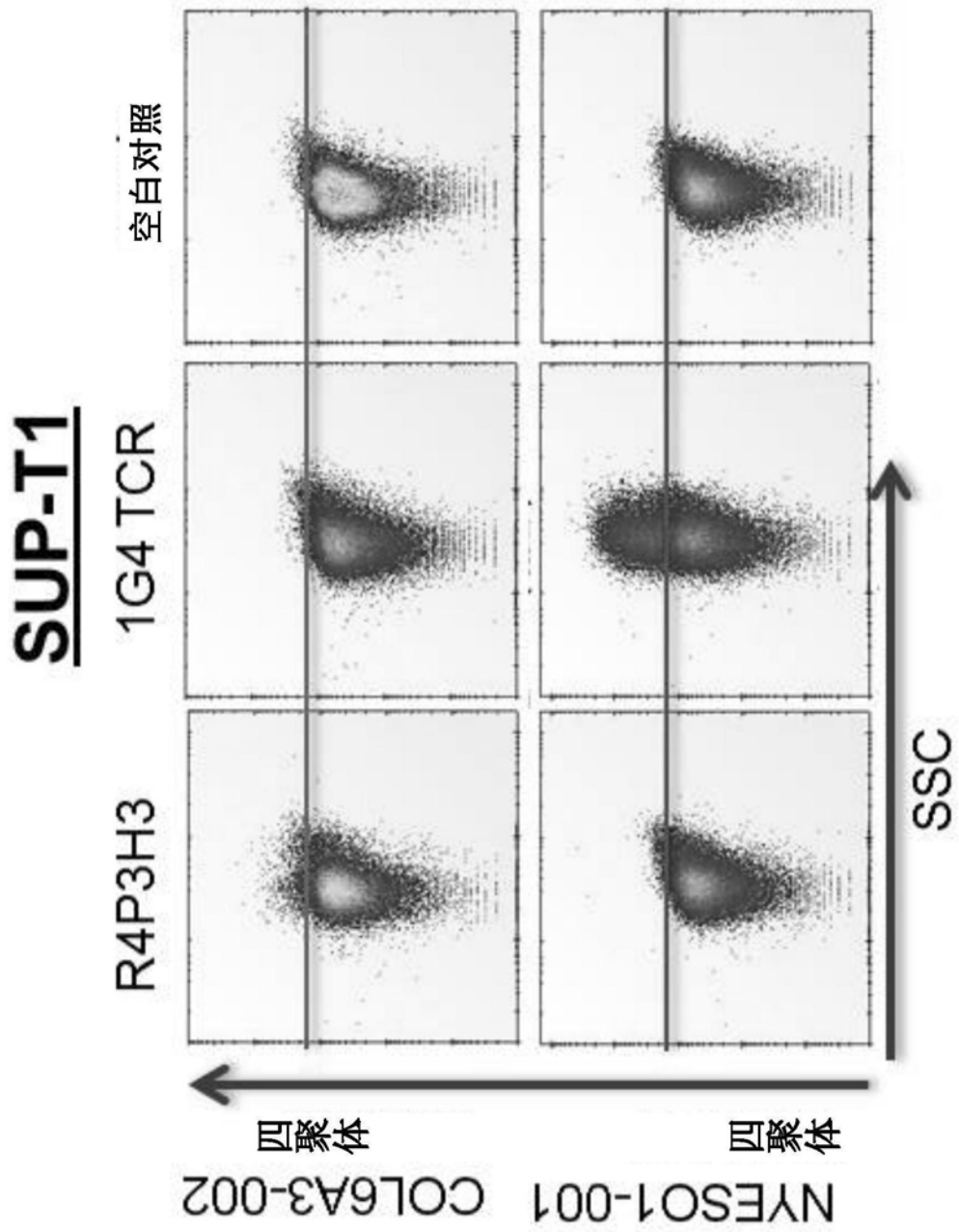


图12