



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 111212848 A

(43)申请公布日 2020.05.29

(21)申请号 201880066631.X

(22)申请日 2018.08.10

(30)优先权数据

62/544,695 2017.08.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2020.04.13

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/046350 2018.08.10

(87)PCT国际申请的公布数据

W02019/033057 EN 2019.02.14

(71)申请人 弗雷德哈钦森癌症研究中心

地址 美国华盛顿州

申请人 华盛顿大学

(72)发明人 J·维奇 S·R·里德尔 S·李

(74)专利代理机构 深圳市百瑞专利商标事务所

(普通合伙) 44240

代理人 金辉

(51)Int.Cl.

C07K 14/705(2006.01)

C07K 14/725(2006.01)

C07K 19/00(2006.01)

C12N 15/62(2006.01)

权利要求书7页 说明书43页

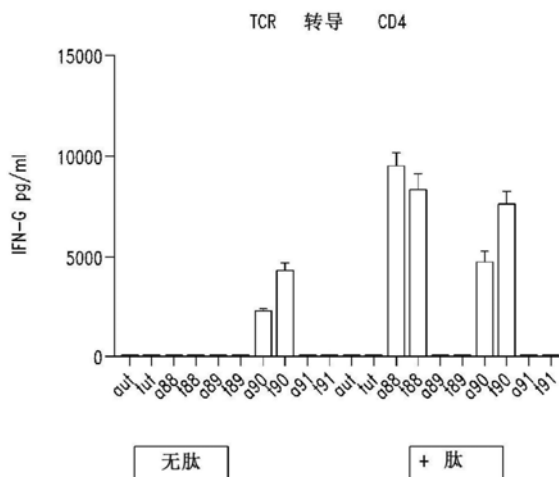
序列表73页 附图21页

(54)发明名称

BRAF特异性TCR及其用途

(57)摘要

本公开提供了结合蛋白,例如TCR,其特异性结合各种肿瘤相关抗原(包括人类BRAFV600E表位)、表达这种抗原特异结合蛋白的细胞、编码它们的核酸,以及用于治疗细胞表达BRAFV600E的疾病或病症(例如癌症)的组合物。



1. 一种结合蛋白,包括:

(a) T细胞受体 (TCR) α 链变量 ($V\alpha$) 结构域,该结构域具有SEQ ID NO:29-32中任一所示的CDR3氨基酸序列,或SEQ ID NO:29-32中任一所示的以多达五个氨基酸替代、插入和/或删除的CDR3氨基酸序列,以及TCR β 链变量 ($V\beta$) 结构域;

(b) $V\alpha$ 结构域,和 $V\beta$ 结构域,该 $V\beta$ 结构域具有SEQ ID NO:33-35中任一所示的CDR3氨基酸序列,或SEQ ID NO:33-35中任一所示的以多达五个氨基酸替代、插入和/或删除的CDR3氨基酸序列;或

(c) (a) 的 $V\alpha$ 结构域和 (b) 的 $V\beta$ 结构域,

其中,所述的结合蛋白能够与包括含BRAF^{V600E}突变的BRAF肽的细胞表面上的HLA复合物特异性结合,并且与包括不含BRAF^{V600E}突变的BRAF肽的细胞表面上的HLA复合物不结合。

2. 根据权利要求1所述的结合蛋白,其中:

(a) 所述 $V\alpha$ 结构域包括SEQ ID NO:29的CDR3氨基酸序列,所述 $V\beta$ 结构域包括SEQ ID NO:33的CDR3氨基酸序列;

(b) 所述 $V\alpha$ 结构域包括SEQ ID NO:30的CDR3氨基酸序列,所述 $V\beta$ 结构域包括SEQ ID NO:34的CDR3氨基酸序列;

(c) 所述 $V\alpha$ 结构域包括SEQ ID NO:31的CDR3氨基酸序列,所述 $V\beta$ 结构域包括SEQ ID NO:34的CDR3氨基酸序列;

(d) 所述 $V\alpha$ 结构域包括SEQ ID NO:32的CDR3氨基酸序列,所述 $V\beta$ 结构域包括SEQ ID NO:35的CDR3氨基酸序列;

(e) 所述 $V\alpha$ 结构域包括SEQ ID NO:29的CDR3氨基酸序列,所述 $V\beta$ 结构域包括SEQ ID NO:34的CDR3氨基酸序列;

(f) 所述 $V\alpha$ 结构域包括SEQ ID NO:29的CDR3氨基酸序列,所述 $V\beta$ 结构域包括SEQ ID NO:35的CDR3氨基酸序列;

(g) 所述 $V\alpha$ 结构域包括SEQ ID NO:30的CDR3氨基酸序列,所述 $V\beta$ 结构域包括SEQ ID NO:33的CDR3氨基酸序列;

(h) 所述 $V\alpha$ 结构域包括SEQ ID NO:30的CDR3氨基酸序列,所述 $V\beta$ 结构域包括SEQ ID NO:35的CDR3氨基酸序列;

(i) 所述 $V\alpha$ 结构域包括SEQ ID NO:31的CDR3氨基酸序列,所述 $V\beta$ 结构域包括SEQ ID NO:33的CDR3氨基酸序列;

(j) 所述 $V\alpha$ 结构域包括SEQ ID NO:31的CDR3氨基酸序列,所述 $V\beta$ 结构域包括SEQ ID NO:35的CDR3氨基酸序列;

(k) 所述 $V\alpha$ 结构域包括SEQ ID NO:32的CDR3氨基酸序列,所述 $V\beta$ 结构域包括SEQ ID NO:33的CDR3氨基酸序列;或

(l) 所述 $V\alpha$ 结构域包括SEQ ID NO:32的CDR3氨基酸序列,所述 $V\beta$ 结构域包括SEQ ID NO:34的CDR3氨基酸序列。

3. 根据权利要求1或2所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白包括 $V\alpha$ 结构域,所述 $V\alpha$ 结构域与SEQ ID NO:1-4中任一所示的氨基酸序列具有至少90%的一致性,并且包括 $V\beta$ 结构域,所述 $V\beta$ 结构域与SEQ ID NO:5-7中任一所示的氨基酸序列具有至少90%的一致性,前提是 (a) 至少三个或四个CDR没有突变,以及 (b) 有突变的CDR只有多达三个氨基酸替代、插

入和/或缺失。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的结合蛋白,其中V α 结构域包括或由SEQ ID NO:1-4中任一个所示的氨基酸序列组成。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的结合蛋白,其中V β 结构域包括或由SEQ ID NO:5-7中任一个所示的氨基酸序列组成。

6. 根据权利要求1-5中任一项所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白是TCR、TCR的抗原结合片段,或嵌合抗原受体。

7. 根据权利要求6所述的结合蛋白,其中所述TCR的抗原结合片段,包括单链TCR(scTCR)。

8. 根据权利要求6或7所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白是嵌合抗原受体。

9. 根据权利要求6-8中任一项所述的结合蛋白,其中TCR、TCR的抗原结合片段,或嵌合抗原受体是嵌合的、人类化的或人类的。

10. 根据权利要求6或9所述的结合蛋白,其中所述结合蛋白为TCR。

11. 根据权利要求10所述的结合蛋白,其中所述TCR包括 α 链恒定(C α)结构域,其具有至少90%与SEQ ID NO:25的氨基酸序列的序列一致性。

12. 根据权利要求11所述的结合蛋白,其中C α 结构域包括SEQ ID NO:25的氨基酸序列。

13. 根据权利要求10-12中任一项所述的结合蛋白,其中TCR包括 β 链(C β)恒定结构域,其与SEQ ID NO:26的氨基酸序列具有至少90%的一致性。

14. 根据权利要求13所述的结合蛋白,其中C β 结构域包括SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

15. 根据权利要求11-14中任一项所述的结合蛋白,其中TCR α 链包括SEQ ID NO:55-58中任一个所示的氨基酸序列。

16. 根据权利要求11-15中任一项所述的结合蛋白,其中TCR β 链包括SEQ ID NO:59-61中任一个所示的氨基酸序列。

17. 根据权利要求1-16中任一项所述的结合蛋白,其中所述BRAFV600E肽包括从约7至约27个氨基酸、从约10至约25个氨基酸、从约12至约20个氨基酸,或从约15至约19个氨基酸。

18. 根据权利要求1-17中任一项所述的结合蛋白,其中所述BRAFV600E肽包括SEQ ID NO:38或39中所述的氨基酸序列。

19. 根据权利要求1-18中任一项所述的结合蛋白,其中所述HLA复合物包括HLA-DQ。

20. 根据权利要求1-19中任一项所述的结合蛋白,其中所述HLA复合物包括HLA-DQB1*0301、*0302或*0303。

21. 根据权利要求20所述的结合蛋白,其中所述HLA复合物包括HLA-DQB1*0302。

22. 根据权利要求19-21中任一项所述的结合蛋白,其中所述HLA复合物包括HLA-DQA1*03。

23. 一种组合物,包括根据权利要求1-22中任一项所述的结合蛋白,和药物上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的组合物。

24. 根据权利要求1-22中任一项所述的编码结合蛋白的分离的多核苷酸。

25. 根据权利要求24所述的分离的多核苷酸,其中编码结合蛋白的多核苷酸是优化的密码子,用于在目的宿主细胞中表达。

26. 一种表达载体,其包括根据权利要求24或25所述的可操作地连接到表达控制序列的多核苷酸。

27. 根据权利要求26所述的表达载体,其中所述载体能够将所述多核苷酸递送至宿主细胞。

28. 根据权利要求27所述的表达载体,其中所述宿主细胞是造血祖细胞或人类免疫系统细胞。

29. 根据权利要求28所述的表达载体,其中所述免疫系统细胞为CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、 γ δ T细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞或其任何结合。

30. 根据权利要求29所述的表达载体,其中所述免疫系统细胞是CD4⁺T细胞。

31. 根据权利要求29或30所述的表达载体,其中所述T细胞为幼稚T细胞、中央记忆T细胞、干细胞记忆T细胞、效应记忆T细胞,或其任何结合。

32. 根据权利要求26-31中任一项所述的表达载体,其中所述载体是病毒载体。

33. 根据权利要求32所述的表达载体,其中所述病毒载体是慢病毒载体或 γ -逆转录病毒载体。

34. 宿主细胞,其包括根据权利要求24或25所述的异源多核苷酸,或根据权利要求26-33中任一项所述的表达载体,其中宿主细胞在其细胞表面表达由异源多核苷酸编码的结合蛋白。

35. 根据权利要求34所述的宿主细胞,其中:

(a) 编码V α 结构域的异源多核苷酸的部分,至少与SEQ ID NO:18-21中任一个所示的多核苷酸序列约80%是一致的;和/或

(b) 编码V β 结构域的异源多核苷酸的部分,至少与SEQ ID NO:22-24中任一个所示的多核苷酸序列约80%是一致的。

36. 根据权利要求34或35所述的宿主细胞,其中编码V α 结构域的异源多核苷酸的部分,包括或由SEQ ID NO:18-21中任一个所示的多核苷酸序列组成。

37. 根据权利要求34-36中任一项所述的宿主细胞,其中编码V β 结构域的异源多核苷酸的部分,包括或由SEQ ID NO:22-24中任一个所示的多核苷酸序列组成。

38. 根据权利要求34-37中任一项所述的宿主细胞,其中编码V α 结构域的异源多核苷酸的部分连接到编码TCR α 链恒定结构域的部分,其中编码 α 链常数结构域的部分包括或由至少约80%与SEQ ID NO:27一致的多核苷酸序列组成。

39. 根据权利要求34-38中任一项所述的宿主细胞,其中编码V β 结构域的异源多核苷酸部分连接到编码TCR β 链常数结构域的部分,其中编码 β 链常数结构域的部分,包括或由与SEQ ID NO:28的序列约80%一致的多核苷酸序列组成。

40. 根据权利要求34-39中任一项所述的宿主细胞,其中,编码V α 结构域的部分,包括或由SEQ ID NO:18的多核苷酸序列组成,而编码V β 结构域的部分,包括或由SEQ ID NO:22的多核苷酸序列组成。

41. 根据权利要求34-39中任一项所述的宿主细胞,其中编码V α 结构域的部分包括或由SEQ ID NO:19的多核苷酸序列组成,而编码V β 结构域的部分包括或由SEQ ID NO:23的多核苷酸序列组成。

42. 根据权利要求34-39中任一项所述的宿主细胞,其中编码V α 结构域的部分,包括或

由SEQ ID NO:20的多核苷酸序列组成,而编码V β 结构域的部分,包括或由SEQ ID NO:23的多核苷酸序列组成。

43.根据权利要求34-39中任一项所述的宿主细胞,其中编码V α 结构域的部分,包括或由SEQ ID NO:21的多核苷酸序列组成,而编码V β 结构域的部分,包括或由SEQ ID NO:24的多核苷酸序列组成。

44.根据权利要求34-43中任一项所述的宿主细胞,其中多核苷酸的一部分编码自裂肽,并且布置在TCR α 链编码部分和TCR β 链编码部分之间。

45.根据权利要求44所述的宿主细胞,其中编码自裂解肽的部分,包括或由SEQ ID NO:44-48中任一个所示的多核苷酸序列组成。

46.根据权利要求45所述的宿主细胞,其中所述编码的自裂解肽,包括或由SEQ ID NO:49-52中任一个所示的氨基酸序列组成。

47.根据权利要求34-46中任一项所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是造血祖细胞或人类免疫系统细胞。

48.根据权利要求47所述的宿主细胞,其中所述免疫系统细胞为CD4+T细胞、CD8+T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞或其任何组合。

49.根据权利要求47所述的宿主细胞,其中所述免疫系统细胞为T细胞。

50.根据权利要求47所述的宿主细胞,其中所述T细胞为幼稚T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞,或其任何结合。

51.根据权利要求48-50中任一项所述的宿主细胞,其中所述T细胞是CD4+T细胞。

52.根据权利要求50或51所述的宿主细胞,其中与内源性TCR相比,由T细胞表达的结合蛋白或TCR能够更有效地与CD3蛋白结合。

53.根据权利要求47-52中任一项所述的宿主细胞,包括PD-1基因的染色体基因敲除;LAG3基因;TIM3基因;CTLA4基因;HLA组成基因;TCR组成基因或其任何结合。

54.根据权利要求53所述的宿主细胞,其中,染色体基因敲除包括HLA组成基因的敲除,所述基因选自巨球蛋白基因、 α 2巨球蛋白基因、 α 3巨球蛋白基因、 β 1微球蛋白基因或 β 2微球蛋白基因。

55.根据权利要求53或54所述的宿主细胞,其中,染色体基因敲除包括TCR组成基因的敲除,所述基因选自TCR α 可变结构域基因、TCR β 可变结构域基因、TCR恒定结构域基因,或其结合。

56.根据权利要求48-55中任一项所述的宿主细胞,其中与内源的TCR相比,结合蛋白或TCR在T细胞上的表面表达更高。

57.一种组合物,其包括权利要求34-56中任一项所述的宿主细胞,和药学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂。

58.单位剂量,其包括有效量的(i)根据权利要求34-52中任一项所述的宿主细胞,或(ii)根据权利要求57所述的组合物,其中宿主细胞可选地处于约 10^7 个细胞/ m^2 到约 10^{11} 个细胞/ m^2 的剂量。

59.根据权利要求58所述单位剂量,其包括(i)包括至少约30%工程化的CD4+T细胞的组合物,与(ii)包括约30%工程化的CD8+T细胞的组合物,以比例约为1:1结合,其中所述单位剂量基本上不包括幼稚T细胞。

60. 一种治疗高增殖性疾病的方法,包括向有需要的人类受试者以(i)包括根据权利要求1-22中任一项所述的BRAF^{V600E}肽:HLA复合物的结合蛋白的组合物;(ii)根据权利要求34-56中任一项所述的宿主细胞;(iii)根据权利要求57所述的组合物;或(iv)根据权利要求58或59的单位剂量,进行给药。

61. 根据权利要求60所述的方法,其中所述高增殖性病症是癌症。

62. 根据权利要求61所述的方法,其中所述癌症选自毛细胞白血病、黑色素瘤、甲状腺癌,例如低分化甲状腺癌、非小细胞肺癌、结直肠癌、乳头状癌、非霍奇金淋巴瘤、胶质母细胞瘤和毛细胞星形细胞瘤。

63. 根据权利要求60-62中任一项所述的方法,其中所述组合物包括根据权利要求34-56中任一项所述的宿主细胞。

64. 一种用于治疗症状过继性免疫治疗方法,其特征为,BRAF^{V600E}在患有过度增殖性疾病的受试者的细胞中表达,包括以根据权利要求34-56中任一项所述宿主细胞,根据权利要求57所述的组合物,或根据权利要求58或59所述的单位剂量,对受试者进行给药。

65. 根据权利要求64所述的方法,其中宿主细胞在体外被修改。

66. 根据权利要求64或65所述的方法,其中宿主细胞是受试者的异基因细胞、同基因细胞或自体细胞。

67. 根据权利要求64-66中任一项所述的方法,其中所述宿主细胞是造血祖细胞或人类免疫系统细胞。

68. 根据权利要求67所述的方法,其中所述免疫系统细胞为CD4+T细胞、CD8+T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、 γ δ T细胞、自然杀伤细胞、自然杀伤T细胞、树突状细胞,或其任何结合。

69. 根据权利要求67或68所述的方法,其中所述免疫系统细胞为幼稚T细胞、中央记忆T细胞、干细胞记忆T细胞、效应记忆T细胞,或其任何结合。

70. 根据权利要求68或69所述的方法,其中所述细胞为CD4+T细胞。

71. 根据权利要求64-70中任一项所述的方法,其中所述高增殖性疾病是癌症。

72. 根据权利要求71所述的方法,其中所述癌症选自毛细胞白血病、黑色素瘤、甲状腺癌(例如甲状腺乳头状癌和低分化甲状腺癌)、非小细胞肺癌、结直肠癌、乳头状癌、非霍奇金淋巴瘤、胶质母细胞瘤,和毛细胞星形细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、郎格罕细胞组织细胞增殖症,或肉瘤(例如,纤维肉瘤(成纤维肉瘤)、皮肤纤维肉瘤突起(DFSP)、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、尤因肉瘤、胃肠道间质瘤、平滑肌肉瘤;血管肉瘤(血管肉瘤)、卡波西肉瘤、脂肪肉瘤、多形性肉瘤或滑膜肉瘤)。

73. 根据权利要求64-72中任一项所述的方法,其中宿主细胞经肠外给药。

74. 根据权利要求64-73中任一项所述的方法,其中所述方法包括向受试者以多剂量的宿主细胞进行给药。

75. 根据权利要求74所述的方法,其中所述多个剂量以大约二周到大约四周的给药间隔进行给药。

76. 根据权利要求64-75中任一项所述的方法,其中将重组宿主细胞以约 10^7 个细胞/ m^2 至约 10^{11} 个细胞/ m^2 的剂量对受试者进行给药。

77. 根据权利要求64-76中任一项所述的方法,其中所述方法进一步地包括以细胞因子

进行给药。

78. 根据权利要求77所述方法, 其中所述细胞因子为IL-2、IL-15、IL-21, 或其任何结合。

79. 根据权利要求78所述方法, 其中所述细胞因子为IL-2, 并且与宿主细胞同时地或顺序地进行给药。

80. 根据权利要求79所述方法, 其中所述细胞因子是按顺序给药的, 前提是受试者在用给药细胞因子之前, 至少给药于宿主细胞3或4次。

81. 根据权利要求78-80中任一项所述方法, 其中所述细胞因子为IL-2, 并且以皮下注射进行给药。

82. 根据权利要求64-81中任一项所述方法, 其中所述受试者进一步地接受免疫抑制治疗。

83. 根据权利要求82所述方法, 其中所述免疫抑制疗法选自钙调磷酸酶抑制剂、皮质类固醇、微管抑制剂、低剂量霉酚酸前药, 或其任何结合。

84. 根据权利要求64-83中任一项所述方法, 其中所述受试者接受了非清髓性或清髓性造血细胞移植。

85. 根据权利要求84所述方法, 其中所述受试者在非清髓性造血细胞移植后, 至少三个月以宿主细胞进行给药。

86. 根据权利要求85所述方法, 其中所述受试者在清髓性造血细胞移植后, 至少两个月以宿主细胞进行给药。

87. 根据权利要求64-86中任一项所述的方法, 进一步地包括向所述受试者以免疫抑制剂进行给药。

88. 根据权利要求87所述的方法, 其中所述免疫抑制剂的抑制剂, 抑制PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、CTLA4、B7-H3、B7-H4、CD244/2B4、HVEM、BTLA、CD160、TIM3、GAL9、腺苷、A2aR、免疫抑制细胞因子、IDO、精氨酸酶、VISTA、TIGIT、PVRIG、PVRL2、KIRs、LAIR1、CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5、CD160、Treg细胞, 或其任何结合。

89. 根据权利要求87或88所述的方法, 其中所述免疫抑制剂的抑制剂, 选自由抗体或其抗原结合片段、融合蛋白、小分子、RNAi分子、核酶、适体剂、反义寡核苷酸或其任何组合组成的组。

90. 根据权利要求89所述的方法, 其中所述免疫抑制剂的抑制剂, 包括匹利珠单抗、纳武单抗、派姆单抗、MEDI0680、AMP-224、BMS-936558、BMS-936559、杜瓦鲁单抗、阿替唑仑单抗、阿维鲁单抗、MPDL3280A、LAG525、IMP321、IMP701、9H12、BMS-986016、伊匹单抗、曲美目单抗、阿巴西普、贝拉西普、依诺妥珠单抗、376.96、抗B7-H4抗体或抗原结合片段、席夫仑单抗、左旋-1-甲基色氨酸、艾卡唑司他、依布硒啉、吡啶肟、NLG919、1-甲基-色氨酸(1-MT)-双氮氧化物、N(ω)-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)、N- ω -羟基-nor-1-精氨酸(nor-NOHA)、L-NOHA、2(S)-氨基-6-硼酸己酸(ABH)、S-(2-硼乙基)-L-半胱氨酸(BEC)、CA-170、COM902、COM701或其抗原结合片段, 或其任何结合。

91. 根据权利要求64-90中任一项所述的方法, 进一步地包括向受试者以治疗有效量的刺激性免疫检查点分子激动剂, 进行给药。

92. 根据权利要求91所述的方法, 其中所述激动剂选自脲醛单抗、MEDI6469、MEDI6383、

MEDI0562、利奈度胺、波马利多明、CDX-1127、TGN1412、CD80、CD86、CP-870893、rhuCD40L、SGN-40、IL-2、GSK3359609、mAb 88.2、JTX-2011、Icos 145-1、Icos 314-8,或其任何结合。

93. 根据权利要求64-92中任一项所述的方法,进一步地包括向受试者实施下列一种或多种:治疗性抗体、化疗、放射治疗、手术或其任何结合。

BRAF特异性TCR及其用途

[0001] 政府权益声明

[0002] 本发明是在国立卫生研究院授予的CA015704下,通过政府支持完成。政府对本发明享有一定的权利。

[0003] 关于序列表的声明

[0004] 与本申请相关联的序列表以文本格式提供,以代替纸质版,并在此通过引用方式并入说明书。含有序列表的文本文件名为360056_454W0序列号.txt。该文本文件为126KB,创建于2018年8月9日,并通过EFS-Web以电子方式提交。

背景技术

[0005] 肿瘤特异性T细胞的过继性转移是一种有吸引力的策略,它可以消除现存的肿瘤,并且需要在体内建立数量众多的抗原特异性T细胞,以消除现存的肿瘤并防止复发(Stromnes et al., Immunol. Rev. 257:145, 2014)。近年来,越来越多的证据表明,针对癌症突变产生的抗原的免疫应答可以被T细胞识别,并且这些T细胞可以介导对过继细胞疗法和免疫检查点抑制剂治疗的临床反应。由这种突变产生的抗原,是免疫治疗的特别吸引人的目标,因为相对于正常组织,它们对癌症是完全特异的,而且还因为它们缺乏可能限制T细胞对其他抗原类型的功能的中枢耐受机制。

[0006] 然而,尽管用自体或工程化转基因肿瘤特异性CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞(CTL)的给药,可以在所选患者中的直接介导抗肿瘤活度(Chapuis et al., Cancer Res. 72:LB-136, 2012; Chapuis et al., Sci. Transl. Med. 5:174ra127, 2013; Chapuis et al., Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 109:4592, 2012)²⁻⁴,但识别和分离具有所期望的特征的肿瘤反应性T细胞,是一项艰巨而复杂的工作(参见Stone and Kranz, Frontiers Immunol. 4:244, 2013; Chapuis et al., 2013; Schmitt et al., Hum. Gene Ther. 20:1240, 2009; Ho et al., J. Immunol. Methods 310:40, 2006)。此外,从每个患者或供体分离的CTL亲和力的可变性,限制了临床试验中的抗肿瘤疗效(Chapuis et al., 2013)。此外,大多数导致免疫应答的抗原特异性突变仅在个体的癌症中发现,而不是在多个患者中。

[0007] 存在明确的需求以采用替代的抗原特异性TCR免疫疗法对抗各种癌症,如毛细胞白血病、恶性黑色素瘤、甲状腺癌、肺癌和结肠癌。特别是,需要针对癌症特异性和广泛流行的抗原的TCR免疫疗法。此处公开的实施例满足了这些需求,并提供了其他相关的优点。

附图说明

[0008] 图1A-1I示出了对BRAF^{V600E}具有特异性的患者来源的CD4⁺ T细胞的识别和表征。(1A) 正电子发射断层扫描示出了在左髂区(左)和左大腿(右)处的复发的肿瘤。(1B-1D) BRAF^{V600E}-特异性T细胞的特异性和HLA限制性;(1B) 患者来源的T细胞系与野生型和突变型BRAF肽脉冲的自体B细胞孵化后,IFN- γ 的产生;(1C) 用突变BRAF肽脉冲,或用mRNA编码突变或野生型BRAF序列mRNA转染的自体B细胞的识别;(1D) 存在或不存在HLA阻断抗体时,经突变BRAF肽脉冲的自体B细胞的识别。(1E) 对在HLA-DQ处与患者匹配的B-LCL系1331的

BRAF^{V600E}-特异性CD4⁺ T细胞,以及用HLA-DRB1*0404 (DR4) 或HLA-DQB1*0302/DQA1*03 (DQ3) 转导之前和之后,HLA不匹配B-LCL的系VAVY的识别。(1F)通过患者来源的BRAF^{V600E}-特异性T细胞,与表达HLA DQB1*03等位基因并且经指定量的21-mer的BRAF^{V600E}肽脉冲的同种B-LCL细胞系一起孵化,释放的IFN- γ 。进行了三次技术上的重复。(1G)通过患者来源的BRAF^{V600E}-特异性T细胞,与经BRAF^{V600E}肽脉冲刺激的自体B细胞,或经过或未经过人IFN- γ 500U/ml预处理3天的所示的肿瘤细胞系一起孵化,释放的IFN- γ 。(1H,1I) HLA-DQ (1H) 和HLA-DR (1I) 在有或没有IFN- γ 预处理的肿瘤细胞系中的表达(平均荧光强度),通过流式细胞术相对于同种型对照进行定量。如图所示,所述实验进行两次或三次技术上的重复,并且代表两个独立的实验。

[0009] 图2A-20示出了过继性转移后,TIL(肿瘤浸润性淋巴细胞)中CD8⁺ T细胞的特异性,和血液中T细胞克隆型的TCR序列。(2A)通过将TIL,与自体CD40L-激活的B细胞一起孵化,IFN- γ 的产生。所述B细胞用13个肽库进行脉冲,所述肽库包含40个20-mer肽,所述肽通过elispot分析检测到包括患者黑素瘤中的20个非同义突变。分析中每个肽的最终浓度为10 μ g/ml。进行了三次技术上的重复。在存在布雷菲德菌素(brefeldin) A (2B-2E) 或与肿瘤相关的自身抗原(2F)脉冲作用下,(2B-2F)通过TIL与B细胞一起孵化,IFN- γ 的产生。所述B细胞经包含29个非同义突变的串联小基因,或经自身抗原酪氨酸酶,Mage A3,Mart1,SSX2和GP100编码的序列转导。分析中每个肽的最终浓度为10 μ g/ml。进行三次技术上重复。(2G)模拟刺激、BRAF^{V600E}肽刺激,或经BRAF^{V600E}肽再刺激后对IFN- γ 分泌细胞分选后,外周血单个核细胞TCR V β 序列频率。(2H)通过对治疗前血液、肿瘤单细胞悬液和注入患者的TIL产物的TCRB测序,对BRAF-特异性T细胞的TCR V β 克隆型进行定量。(2I)在TIL产品中的TCR V β 序列按患病率排序(图表的右侧)。(2J)排名前34的TIL TCR V β 克隆型的频率,来自(2I)在治疗前和治疗后10个月和24个月时获得的血液。(2K)在治疗前和治疗后血液中,针对特定抗原的CD4⁺BRAF^{V600E}和CD8⁺ T细胞TCR V β 克隆型的频率。(2L-2O)用自体B细胞和平铺肽孵化的TIL中的TIL和T细胞上的TCRB测序。平铺的肽跨过(2L)酪氨酸酶、(2M) Mart1、(2N) Mage A3和(2O) TRP2,并按IFN- γ 捕获进行分选。抗原特异性TCRB序列富集在分选的细胞中,用一盒标记。

[0010] 图3A-3C示出了用肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)治疗后BRAF-特异性T细胞的表型分析。(3A)用于从TIL中排除单核细胞(CD14⁺)、B细胞(CD19⁺)和死细胞(ViaProbe)的转储通道门控方案。作出存活的CD4⁺ T细胞-四聚体和CD45RA的图。(3B)作出四聚体阳性和阴性的CD45RA-记忆细胞(CD4⁺的88.1%)—所示的细胞表面标志物的图。数字表示门控区细胞的百分比,或每个标记的四聚体阳性细胞的百分比。(3C)活化(CD154⁺) BRAF-特异性T细胞的细胞内细胞因子染色。

[0011] 图4A-4B示出了从黑素瘤反应性患者TIL的主要V α 和V β 序列衍生的合成TCR,识别表达BRAF^{V600E}的细胞。(4A)在模拟刺激、BRAF^{V600E}刺激,或经BRAF^{V600E}肽再刺激后分选IFN- γ 分泌细胞后,外周血单个核细胞TCRBV α 的序列频率。(4B)通过来自两个正常供体的CD4⁺ T细胞,IFN- γ 的产生,所述供体经合成TCR结构物转导,并与经HLA-DQB1*0302B细胞系1331一起孵化,所述细胞系1331经BRAF^{V600E}肽脉冲,或经编码突变或野生型BRAF序列的mRNA转染。N=2或3次技术上的重复,如图所示。

[0012] 图5示出了通过使用在患者TIL中识别的TCRB和TCR α 基因,制成的四个TCR(pJV88-

pJV91)之一转导的CD4⁺ T细胞, IFN- γ 的产生。左边, 没有抗原肽。右边, 抗原肽。

[0013] 图6A和6B示出了CRISPR介导的内源性TCR序列敲除, 对主要人类CD4⁺ T细胞中异源BRAF^{V600E}-特异性TCR的表达的影响。(6A)用靶向TCRA和TCRB的Cas9-RNP转染受刺激T细胞, 并用编码BRAF^{V600E}-特异性TCR的DNA转导。通过Vbeta3.1测量BRAF-特异性TCR表达, 并用抗CD3测量TCR表达。顶部: 不具有(左)或具有(右)CRISPR-介导的TCR基因敲除的未修改的细胞。底部: 不具有(左)或具有(右)CRISPR-介导的TCR基因敲除的转导细胞。(6B)四聚体染色: 经BRAF^{V600E}-特异性TCR修改后的具有或不具有内源性TCR缺失的T细胞, 将其与未转导的细胞(最左侧的峰)和患者来源的抗原特异性T细胞克隆(最右侧的峰)进行比较, 以与四聚体结合。

具体实施方式

[0014] 在某些方面, 本公开提供了结合蛋白, 例如T细胞受体(TCR), 其能够特异性结合到BRAF^{V600E}肽抗原, 例如与主要组织相容性复合物(MHC)相关联的BRAF^{V600E}肽抗原(例如人类白细胞抗原, HLA)。本公开的结合蛋白可用于, 治疗过度增殖性疾病的疗法, 例如癌症, 其以BRAF^{V600E}表达为特征。

[0015] 从背景来看, 由癌症相关突变产生的抗原, 是治疗干预的有吸引力的目标, 但通常地, 是单个患者所独有的。因此, 由基本“驱动”突变的癌症引起的抗原, 引起了人们的兴趣, 因为它们对癌细胞都是特异性的, 并且在患者群体中发生的频率很高。BRAF蛋白涉及到细胞生长信号, 而突变BRAF与许多癌症有关(参见, 例如, Frasca et al., Endocrine-Related Cancer 15:191 (2008))。特别是, 所述替代突变V600E (BRAF^{V600E}), 其在BRAF基因第15个外显子中产生, 激活BRAF, 以驱动生长信号通路, 这是癌症发生的早期事件。这种突变在毛细胞白血病的病例、大约一半的恶性黑色素瘤病例、以及相当数量的晚期甲状腺癌、肺癌和结肠癌患者中, 都有发现。

[0016] 在某些实施例中, 本文描述的组合物和方法将具有治疗的实用性, 用于治疗与BRAF^{V600E}表达相关联的疾病和症状。这些疾病包括各种形式的高增殖性疾病, 如毛细胞白血病、黑色素瘤、甲状腺癌, 包括低分化甲状腺癌、非小细胞肺癌、结直肠癌、乳头状癌、非霍奇金(Hodgkin)淋巴瘤、胶质母细胞瘤和毛细胞星形细胞瘤、乳腺癌、卵巢癌、朗格汉斯(Langerhans)细胞组织细胞增殖和肉瘤(如纤维肉瘤(成纤维细胞肉瘤)、隆突性皮肤纤维肉瘤(DFSP)、骨肉瘤、横纹肌肉瘤、尤因(Ewing's)肉瘤、胃肠道间质瘤、平滑肌肉瘤、血管肉瘤(血管肉瘤)、卡波西(Kaposi's)肉瘤、脂肪肉瘤、多形性肉瘤和滑膜肉瘤)。本文描述了这些和相关用途的非限制性实施例, 包括BRAF^{V600E}抗原特异性T细胞应答的体外、离体和体内刺激, 例如通过使用重组T细胞, 其用于BRAF^{V600E}肽特异性TCR的表达。

[0017] 在更详细地阐述本公开之前, 提供本文中使用的某些术语的定义, 可能有助于理解本公开。贯穿本公开内容阐述了其他定义。

[0018] 在本说明书中, 除非另有说明, 否则任何浓度范围、百分比范围、比例范围或整数范围, 应理解为包括所列举范围内的任何整数的值, 并且在适当情况下, 包括其分数(例如整数的十分之一和百分之一)。此外, 除非另有说明, 否则本文引用的与任何物理特征有关的任何数字范围, 例如聚合物亚基、尺寸或厚度, 应理解为包括所列举范围内的任何整数。如本文所述, 除非另有说明, 术语“大约”是指指示的范围、值或结构的 $\pm 20\%$ 。应当理解的

是,本文中使用的术语“一(a)”和“一(an)”,指的是列举的成分中的“一个或多个”。所用替代的(如“或”),应当理解为两者中的任何一种,或替代的任何结合。如本文中所使用的,术语“包含”、“具有”和“包括”被同义地使用,其术语和变体旨在作为非限制性的来解释。

[0019] 此外,应当理解,本申请公开的,衍生自本文所述的结构和取代基的各种组合的单个化合物或化合物组,其程度与将每个化合物或化合物组单独列出的程度是相同的。因此,特定的结构或特定取代基的选择在本公开的范围內。

[0020] 术语“基本上由...组成”不等同于“包括”,指的是本发明所声称的指定的材料或步骤,或指那些不实质上影响本发明所声称的基本特征。例如,蛋白结构域、区域或模块(例如,结合域、铰链域、接头序列模块)或蛋白质(其可具有一个或多个结构域、区域或模块),当结构域,区域,模块或蛋白质的氨基酸序列包括延伸,缺失,突变或其组合时,“基本上由”特定氨基酸序列组成(例如,氨基或羧基末端或结构域之间的氨基酸),其结合对结构域、区域、模块或蛋白的长度贡献至多为20%(例如,至多15%、10%、8%、6%、5%、4%、3%、2%或1%),且不实质地影响(即,活度的降低不超过50%,例如不超过40%、30%、25%、20%、15%、10%、5%或1%)一个或多个结构域、一个或多个区域、一个或多个模块或蛋白的活度(例如,结合蛋白的靶结合亲和力)。

[0021] 如本文所用,“免疫系统细胞”是指在免疫系统中来源于骨髓造血干细胞的任何细胞,它产生了两个主要的谱系,骨髓祖细胞(其产生骨髓细胞,如单核细胞、巨噬细胞、树突状细胞,巨核细胞和粒细胞)和淋巴祖细胞(其产生淋巴细胞,如T细胞、B细胞和自然杀伤(NK)细胞,包括自然杀伤T(NK-T)细胞)。示例性的免疫系统细胞包括CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、调节性T细胞、自然杀伤性T细胞、自然杀伤T细胞和树突状细胞。巨噬细胞和树突状细胞可被称为“抗原递呈细胞”或“APC”,其是当APC表面的主要组织相容性复合物(MHC)受体与T细胞表面的TCR相互作用时,能够激活T细胞的特殊细胞。

[0022] “主要组织相容性复合物”(MHC)是指将肽抗原递送到细胞表面的糖蛋白。MHC的I类分子是具有跨膜 α 链(具有三个 α 结构域)和非共价结合的 β 2微球蛋白的异二聚体。MHC的II类分子由两种跨膜糖蛋白 α 和 β 组成,它们都跨越膜。每个链有两个结构域。MHC的I类分子将来源于胞浆的肽递送到细胞表面,其中肽:MHC复合物经CD8⁺ T细胞识别。MHC的II类分子将源于囊泡系统的肽递送到细胞表面,其中肽:MHC复合物经CD4⁺ T细胞识别。人类MHC被称为人类白细胞抗原(HLA)。HLA-II类型包括DP、DM、DOA、DOB、DQ和DR。许多编码不同HLA类型的亚单位的等位基因是已知的,例如,包括HLA-DQA1*03、HLA-DQB1*0301、HLA-DQB1*0302、HLA-DQB1*0303。在某些实施例中,根据本公开的结合蛋白能够识别与HLA-DQ复合的BRAF^{V600E}肽。在某些实施例中,所述HLA复合物包括HLA-DQB1*0301、*0302或*0303。在某些实施例中,所述HLA复合物包括HLA-DQB1*0302。在进一步的实施例中,所述HLA复合物包括HLA-DQA1*03。

[0023] “T细胞”或“T淋巴细胞”是在胸腺成熟,并产生T细胞受体(TCR)的免疫系统细胞。T细胞可以是幼稚的(不暴露于抗原;与T_{CM}相比,CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127和CD45RA的表达增加,而CD45RO的表达减少),记忆T细胞(T_M) (抗原经历和寿命长的),和效应细胞(有抗原经历的细胞毒性)。T_M可进一步地分为以下亚组:中央记忆T细胞(T_{CM},与幼稚T细胞相比,CD62L、CCR7、CD28、CD127和CD45RO的表达增加,而CD54RA的表达减少);效应记忆T细胞(T_{EM},

与幼稚T细胞或T_{CM}相比,CD62L、CCR7、CD28、CD45RA的表达减少,CD127的表达增加)。

[0024] 效应T细胞(T_E)是指抗原特异性CD8⁺细胞毒性T淋巴细胞,与T_{CM}相比,其具有CD62L、CCR7、CD28的表达减少,并且颗粒酶和穿孔素是阳性的。辅助性T细胞(T_H)是通过释放细胞因子,影响其他免疫细胞活度的CD4⁺细胞。CD4⁺T细胞可以激活和抑制一种适应性免疫应答,而这两种功能中的哪一种被诱导,将取决于其他细胞和信号的存在。可以使用已知技术收集T细胞,并且可以通过已知技术(例如通过与抗体的亲和力结合、流式细胞术或免疫磁性选择)富集或耗尽各种亚群或其结合。其他示例性的T细胞包括调节性T细胞,例如CD4⁺CD25⁺(Foxp3⁺)调节性T细胞和Treg17细胞,以及Tr1、Th3、CD8⁺CD28⁻和Qa-1限制性T细胞。

[0025] “T细胞受体”(TCR)是指免疫球蛋白超家族的成员(具有可变结合结构域、恒定结构域、跨膜区和短胞质尾;参见,例如,Janeway et al.,*Immunobiology: The Immune System in Health and Disease*, 3rd Ed., Current Biology Publications, p.4:33, 1997)能够与结合了MHC受体的抗原肽特异性结合。TCR可以在细胞表面或以可溶性形式存在,并且通常地由具有 α 和 β 链(也分别称为TCR α 和TCR β),或 γ 和 δ 链(也分别称为TCR γ 和TCR δ)的异二聚体组成。类似免疫球蛋白,TCR链的胞外部分(例如 α -链, β -链)包括两个免疫球蛋白结构域:一个可变结构域(例如 α -链可变结构域,或V α , β -链可变结构域或V β ;典型的基于在N-末端的基于Kabat编号的氨基酸1到116(Kabat et al., “Sequences of Proteins of Immunological Interest, US Dept. Health and Human Services, Public Health Service National Institutes of Health, 1991, 5th ed.));与细胞膜相邻的一个恒定结构域(例如, α -链恒定结构域或C α ,通常是基于Kabat的氨基酸117到259, β -链恒定结构域或C β ,通常是基于Kabat的氨基酸117到295)。此外,类似免疫球蛋白,可变结构域包括由框架区(FR)分隔的互补决定区(CDR)(参见,Jores et al., *Proc. Nat’l Acad. Sci. U.S.A.* 87: 9138, 1990; Chothia et al., *EMBO J.* 7: 3745, 1988; see also Lefranc et al., *Dev. Comp. Immunol.* 27: 55, 2003)。TCR可变结构域序列可与编号方案(例如,Kabat、EU、国际免疫遗传学信息系统(IMGIT)和Aho)对齐,所述编号方案可以使用抗原受体编号和受体分选(ANARCI)软件工具(2016, *Bioinformatics* 15: 298-300),对相同的残基位置进行注释,并对不同的分子进行比较。编号方案提供了TCR可变结构域中框架区域和CDR的标准化描述。

[0026] 在某些实施例中,在T细胞(或T淋巴细胞)表面发现TCR并与CD3复合物相关。本公开中使用的TCR的来源,可以来自各种动物物种,例如人类、小鼠、大鼠、兔子或其他哺乳动物。

[0027] “CD3”在本领域中被称为六链的多蛋白复合物(参见,Abbas and Lichtman, 2003; Janeway et al., p.172 and 178, 1999)。在哺乳动物中,复合物包括CD3 γ 链、CD3 δ 链、两个CD3 ϵ 链和CD3 ζ 链的同二聚体。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链是免疫球蛋白超家族的高度相关的细胞表面蛋白,所述超家族包含单细胞外免疫球蛋白结构域。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链的跨膜区带负电荷,这是允许这些链与带正电荷的T细胞受体链结合的特征。CD3 γ 、CD3 δ 和CD3 ϵ 链的胞内尾部各含有一个单一保守基序,称为基于免疫受体酪氨酸的激活基序,或ITAM,而每个CD3 ζ 链有三个ITAM。在不希望受到理论约束的情况下,人们认为ITAM对于TCR复合体的信令能力很重要。本公开中使用的CD3可以来自各种动物物种,包括人类、小鼠、大鼠或其他哺乳动物。

[0028] 如本文所用,“TCR复合物”指由CD3与TCR的结合所形成的复合物。例如,TCR复合物可以由CD3 γ 链、CD3 δ 链、两个CD3 ϵ 链、CD3 ζ 链的均聚体、TCR α 链和TCR β 链组成。可替代地,TCR复合物可以由CD3 γ 链、CD3 δ 链、两个CD3 ϵ 链、CD3 ζ 链的均聚体、TCR γ 链和TCR δ 链组成。

[0029] 本公开所用的“TCR复合物的组分”,是指TCR链(即TCR α 、TCR β 、TCR γ 或TCR δ)、CD3链(即CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 ζ),或由两个或多个TCR链或CD3链形成的复合物(例如,TCR α 和TCR β 的复合物、TCR γ 和TCR δ 的复合物、CD3 ϵ 和CD3 δ 的复合物、CD3 γ 和CD3 ϵ 的复合物,或TCR α 、TCR β 、CD3 γ 、CD3 δ ,和两个CD3 ϵ 链的亚TCR的复合物)。

[0030] “CD4”是指一种免疫球蛋白共受体糖蛋白,其协助TCR与抗原呈递细胞进行沟通(参见Campbell&Reece, *Biology* 909 (Benjamin Cummings, Sixth Ed., 2002); UniProtKB P01730)。CD4存在于免疫细胞表面,如T辅助细胞、单核细胞、巨噬细胞和树突状细胞,包括在细胞表面表达的四个免疫球蛋白结构域(D1到D4)。在抗原呈递过程中,CD4被吸收,并与TCR复合物结合到MHCII分子的不同区域(CD4结合MHCII β 2,而TCR复合物结合MHCII α 1/ β 1)。不希望被理论所束缚,人们相信接近TCR的复合物,允许CD4相关的激酶分子磷酸化在CD3胞质结构域上存在的免疫受体酪氨酸激活基序(ITAMs)。这种活动被认为是放大由激活的TCR产生的信号,以产生各种类型的T辅助细胞。

[0031] 如本文所用,术语“CD8共受体”或“CD8”是指细胞表面糖蛋白CD8,作为 α - α 同二聚体或 α - β 异二聚体。CD8共受体协助细胞毒性T细胞(CD8 $^+$)的功能,并由其胞质酪氨酸磷酸化途径(Gao and Jakobsen, *Immunol. Today* 21:630-636, 2000; Cole and Gao, *Cell. Mol. Immunol.* 1:81-88, 2004),通过信号传导发挥作用。在人类中,有五(5)条不同的CD8 β 链(参见UniProtKB identifier P10966)和一条CD8 α 链(参见UniProtKB identifier P01732)。

[0032] 术语“可变区”或“可变结构域”是指TCR α -链或 β -链(或用于 γ δ TCR的 γ -链和 δ -链)的域,其参与TCR与抗原的结合。天然TCR的 α -链和 β -链的可变结构域(分别为V α 和V β),通常地,具有相似的结构,每个结构域包括四个通常地保守的框架区(FR)和三个CDR。V α 结构域由两个独立的DNA片段编码,可变基因片段和连接基因片段(V-J);V β 结构域由三个独立的DNA片段编码,可变基因片段、多样性基因片段和连接基因片段(V-D-J)。单个V α 或V β 结构域可以足以赋予抗原结合的特异性。此外,结合特定抗原的TCR可使用V α 或V β 结构域,从结合抗原的TCR中分离,以筛选分别互补的V α 或V β 结构域的库。

[0033] 术语“互补决定区”和“CDR”是“高变区”或“HVR”的同义词,并且在本领域中,已知是指TCR可变区内的非邻接氨基酸序列,其赋予抗原特异性和/或结合亲和力。一般地,每个 α -链可变区(α CDR1、 α CDR2、 α CDR3)有三个CDR,每个 β -链可变区(β CDR1、 β CDR2、 β CDR3)有三个CDR。CDR3被认为是用于识别经处理的抗原的主要CDR。CDR1和CDR2主要与MHC相互作用。在某些实施例中,本公开的结合蛋白,包括如SEQ ID NO:1-4中的任一个所述的,V α 结构域的 α CDR1、 α CDR2和/或 α CDR3氨基酸序列。在某些实施例中,本公开的结合蛋白包括如SEQ ID NO:5-7中任一个所示的,V β 结构域的 β CDR1、 β CDR2和/或 β CDR3氨基酸序列。

[0034] 本文所用的“抗原”或“Ag”,是指激发免疫应答的免疫原性分子。这种免疫应答可能涉及抗体的产生、特异性免疫活性细胞(如T细胞)的激活,或两者兼而有之。抗原(免疫原性分子)可以是,例如肽、糖肽、多肽、糖肽、多核苷酸、多糖、脂质等。显而易见地,抗原可以合成、重组产生或从生物样品中衍生。示例性的生物样本可包括一种或多种抗原,所述抗原

包括组织样本、肿瘤样本、细胞、生物流体或其结合。抗原可以由经过修改或基因工程化,以表达抗原的细胞而产生。示例性的抗原包括BRAF^{V600E}。

[0035] 术语“表位”或“抗原表位”,包括由同源结合分子(例如免疫球蛋白、T细胞受体(TCR)、嵌合抗原受体或其他结合分子、结构域或蛋白质)识别和特异性地结合的任何分子、结构、氨基酸序列或蛋白质决定簇。通常地,表位决定簇包括分子的化学活度表面基团,如氨基酸或糖侧链,并且可以具有特定的三维结构特征,以及特定的电荷特征。

[0036] 如本文所使用的“结合结构域”(也称为“结合区”或“结合部分”),是指分子或其部分(例如肽、寡肽、多肽、蛋白质),其具有与目标(如BRAF^{V600E})特异性和非共价关联、联合或结合的能力。结合结构域包括用于生物分子、分子复合物(即包括两个或多个生物分子的复合物)或其他感兴趣的目标的任何自然地发生、合成、半合成或重组产生的结合配偶体。示例性的结合结构域包括单一链的免疫球蛋白可变区(例如,scTCR、scFv)、受体外结构域、配体(例如,细胞因子、趋化因子),或因特定的能力所选的合成多肽,以结合生物分子、分子复合物或其他感兴趣的目标。

[0037] 如本文所使用的,“特异性结合”或“特定于”是指结合蛋白(例如TCR受体),或结合结构域(或其融合蛋白),与目标分子的关联或结合,所述目标分子具有等于或大于 10^5M^{-1} (其等于该缔合反应的开速率 $[k_{\text{on}}]$ 与关速率 $[k_{\text{off}}]$ 之比)的亲和力或 K_a (一种与单元特定结合相互作用的平衡缔合常数,单位为 $1/\text{M}$),但不与样品中的任何其他分子或组分显著缔合或结合。结合蛋白或结合结构域(或其融合蛋白)可分为“高亲和力”结合蛋白或结合结构域(或其融合蛋白)或“低亲和力”结合蛋白或结合结构域(或其融合蛋白)。“高亲和力”结合蛋白或结合结构域,是指那些结合蛋白或结合结构域,其具有的 K_a 为至少 10^7M^{-1} 、至少 10^8M^{-1} 、至少 10^9M^{-1} 、至少 10^{10}M^{-1} 、至少 10^{11}M^{-1} 、至少 10^{12}M^{-1} 或至少 10^{13}M^{-1} 。“低亲和力”结合蛋白或结合结构域是指那些结合蛋白或结合结构域,其具有的 K_a 高达 10^7M^{-1} 、高达 10^6M^{-1} 、高达 10^5M^{-1} 。可替代地,亲和力可以定义为与单位 M (例如, 10^{-5}M 到 10^{-13}M)的特定结合作用的平衡离解常数(K_d)。

[0038] 在某些实施例中,受体或结合结构域可具有“增强的亲和力”,其指所选的或工程化的受体或结合结构域,其与目标抗原结合力强于野生型(或亲本)结合结构域。例如,增强的亲和力可能是由于目标抗原的 K_a (平衡缔合常数)高于野生型结合结构域,由于目标抗原的 K_d (离解常数)低于野生型结合结构域,由于目标抗原的失活率(k_{off})小于野生型结合结构域,或其结合。在某些实施例中,增强的亲和TCR可以是优化的密码子,以增强特定宿主细胞(例如T细胞)中的表达(Scholten et al., Clin. Immunol. 119:135, 2006)。

[0039] 已知有多种检测方法,用于识别本公开的特异性结合特定目标的结合结构域,以及确定结合结构域或融合蛋白亲和力,例如蛋白质印记(Western blot)、ELISA、分析性的超速离心法、光谱学和表面等离子共振(Biacore[®])分析(参见,例如,Scatchard et al., Ann. N.Y. Acad. Sci. 51:660, 1949; Wilson, Science 295:2103, 2002; Wolff et al., Cancer Res. 53:2560, 1993; and U.S. Patent Nos. 5,283,173, 5,468,614, 或等同物)。用于评估亲和力或表观亲和力或相对亲和力的分析也是已知的。在某些实例中,通过评估与不同浓度四聚体的结合,来测量TCR的表观亲和力,例如,使用标记的四聚体进行流式细胞术。在一些实施例中,TCR的表观 K_D 在浓度范围内,用标记的四聚体稀释2倍,然后通过非线性回归确定结合曲线,表观 K_D 被确定为产生半最大结合的配体的浓度。

[0040] 术语“BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白”是指特异性结合BRAF^{V600E}肽抗原或BRAF^{V600E}肽抗原:HLA复合物,例如,在细胞表面上,并且不结合细胞表面上的HLA复合物,其包括不含BRAF^{V600E}突变的BRAF肽。

[0041] 在某些实施例中,BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白结合含BRAF^{V600E}的肽:HLA复合物(或含BRAF^{V600E}的肽:MHC复合物),其具有的K_d小于约10⁻⁸M、小于约10⁻⁹M、小于约10⁻¹⁰M、小于约10⁻¹¹M、小于约10⁻¹²M或小于约10⁻¹³M,或具有与本文提供的示例性的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白所显示的亲和力大约相同、至少大约相同,或大于或大约等于的亲和力,如通过相同的分析测量的,例如本文提供的任何BRAF^{V600E}-特异性TCR。在某些实施例中,BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白,包括BRAF^{V600E}-特异性免疫球蛋白超家族结合蛋白,或其结合部分。

[0042] 术语“BRAF^{V600E}结合域”或“BRAF^{V600E}结合片段”是指负责特定BRAF^{V600E}结合的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白的结构域或部分。单独的BRAF^{V600E}-特异性结合结构域(即不含BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白的任何其他部分)是可以溶解的,并且可以与BRAF^{V600E}结合(例如,与MHC受体分子或其功能片段复合),其K_d小于约10⁻⁸M、小于约10⁻⁹M、小于约10⁻¹⁰M、小于约10⁻¹¹M、小于约10⁻¹²M,或小于约10⁻¹³M。示例性的BRAF^{V600E}-特异性结合域,如本文所述,包括BRAF^{V600E}-特异性scTCR(例如,单链αβTCR蛋白质,例如Vα-L-Vβ、Vβ-L-Vα、Vα-Cα-L-Vα或Vα-L-Vβ-Cβ,其中Vα和Vβ分别为TCRα和β可变结构域,Cα和Cβ分别为TCRα和β恒定结构域,L是连接子)和scFv片段,其可从抗BRAF^{V600E} TCR或抗体衍生。

[0043] 通过抗原呈递细胞(APC)(如树突状细胞、巨噬细胞、淋巴细胞或其他细胞类型)处理抗原的原理,以及APC将抗原呈递给T细胞的原理,包括免疫相容的APC和T细胞之间的主要组织相容性(例如,分享至少一种与抗原呈递相关的MHC基因的等位基因形式)复合物(MHC)的限制表达,已经被充分证实(参见,例如,Murphy, Janeway's Immunobiology (8th Ed.) 2011 Garland Science, NY; chapters 6, 9 and 16)。例如,源自胞浆的经处理抗原肽(例如肿瘤抗原、胞内病原体)的长度通常从大约7个氨基酸到大约11个氨基酸,并且将与I类MHC分子相关联,而在囊泡系统(例如细菌、病毒)中,经处理的肽的长度通常从大约10个氨基酸到大约25个氨基酸不等,并与II类MHC分子相关联。

[0044] “BRAF^{V600E}抗原”或“BRAF^{V600E}肽抗原”或“含BRAF^{V600E}肽抗原”是指BRAF蛋白质的自然地或合成地生产的部分,其长度范围从约7个氨基酸到约20个氨基酸,包括V600E替代突变(例如,来自BRAF⁵⁹⁷⁻⁶⁰³或BRAF⁵⁹⁰⁻⁶¹⁰的肽,其包括在对应于全长野生型BRAF的600位的残基处,取代缬氨酸的谷氨酸;参见,例如,Uniprot条目号P15056和NCBI参考标识符NP_004324.2),其可与MHC形成复合物(例如,HLA)分子,并且这种复合物可以与对BRAF^{V600E}肽:MHC(例如,HLA)复合物具有特异性的结合蛋白结合。示例性的BRAF^{V600E}肽抗原包括那些具有在SEQ ID NO:38或39中所述的氨基酸序列的抗原。

[0045] “连接子”是指连接两种蛋白质、多肽、肽、结构域、区域或基序的氨基酸序列,并可提供与两个子结合结构域的相互作用兼容的间隔功能,以便使所得到的多肽保持与目标分子的特异性结合亲和力(例如,scTCR),或保持信号活度(例如,TCR复合物)。在某些实施例中,连接子包括约二至约35个氨基酸,例如,或约四至约20个氨基酸,或约八至约15个氨基酸,或约15至约25个氨基酸。

[0046] “连接氨基酸”或“连接氨基酸残基”是指或多肽的两个相邻基序、区域或结构域之间(例如在结合结构域与相邻恒定结构域之间,或在TCR链与相邻自裂肽之间)的一个或多

个(例如,约2-10个)氨基酸残基。连接氨基酸可能来自融合蛋白的结构物设计(例如,在构建编码融合蛋白的核酸分子过程中,使用限制酶位点所产生的氨基酸残基)。

[0047] “改变的结构域”或“改变的蛋白质”是指具有非同源序列的基序、区域、结构域、肽、多肽或蛋白质,其与野生型的基序、区域、结构域、肽、多肽或蛋白质(例如野生型TCR α 链、TCR β 链、TCR α 恒定结构域、TCR β 恒定结构域)有至少85%(例如86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%、99.9%)的一致性。

[0048] 如本文所使用的,“核酸”或“核酸分子”指的是任何一种脱氧核糖核酸(DNA)、核糖核酸(RNA)、寡核苷酸,例如通过聚合酶链反应(PCR)或体外翻译产生的片段,和通过任何连接,分裂,核酸内切酶作用或核酸外切酶作用产生的片段。在某些实施例中,本公开的核酸通过PCR产生。核酸可以由天然产生的核苷酸的单体(例如脱氧核糖核苷酸和核糖核苷酸)、天然产生的核苷酸的类似物(如天然产生的核苷酸的 α -异构体形式),或两者的结合所组成。修改的核苷酸可以修改或替换糖部分,或嘧啶或嘌呤基部分。核酸单体可通过磷酸二酯键或此类键的类似物连接。磷酸二酯连接的类似物包括硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、亚磷酸酯、二硫代磷酸酯、苯硫基磷酸酯、苯胺基磷酸酯、氨基磷酸酯等。核酸分子可以是单链或双链。

[0049] 术语“分离的”是指材料从其原始环境中移除(例如,如果是天然产生的自然环境)。例如,存在于活动物中的天然产生的核酸或多肽不是分离的,但是从自然系统中某些或所有共存物质中分离出的相同核酸或多肽,是分离的。这种核酸可以是载体的一部分和/或这种核酸或多肽可以是组合物(例如,细胞裂解物)的一部分,并且在这种载体或组合物不是核酸或多肽的自然环境的一部分的情况下,仍然是分离的。术语“基因”是指参与产生多肽链的DNA片段;它包括编码区之前和之后的区域(“前导区和尾区”)以及各个编码片段(外显子)之间的插入序列(内含子)。

[0050] 如本文所使用的,术语“重组”是指通过人类干预进行基因工程化的细胞、微生物、核酸分子或载体,即通过引入异源核酸分子进行修改,或是指一个细胞或微生物被改变,从而使内源性核酸分子或基因的表达受到控制、解除管制、删除、减弱或构建。人类产生的基因改变可包括,例如,引入编码一种或多种蛋白质或酶的核酸分子(其可包括表达控制元件,例如启动子)的修改,或其他核酸分子的添加、删除、替代,或对细胞遗传物质的其他功能破坏或添加。示例性的修改包括那些来自参考或母体分子的异源或同源多肽的编码区,或其功能片段。

[0051] 如本文所使用的,“突变”是指与参考或野生型核酸分子或多肽分子相比,核酸分子或多肽分子的序列分别的变化。突变可以导致序列中的几种不同类型的改变,包括一个或多个核苷酸或一个或多个氨基酸的替代、插入或删除。在某些实施例中,突变是一个或多个密码子或氨基酸的替代、一个至约5个密码子或氨基酸的缺失,或其结合。

[0052] “保守的替代”,在本领域中被认为是一种氨基酸替代另一种具有类似性质的氨基酸。示例性的保守的替代在本领域是众所周知的(参见,例如,WO 97/09433,第10页;Lehninger,Biochemistry,2nd Edition;Worth Publishers,Inc.NY,NY,pp.71-77,1975;Lewin,Genes IV,Oxford University Press,NY and Cell Press,Cambridge,MA,p.8,1990)。

[0053] 术语“结构物”是指任何含有重组核酸分子的多核苷酸。结构物可以存在于载体(例如细菌载体、病毒载体)中,或者可以整合到基因组中。“载体”是能够运输另一个核酸分子的核酸分子。载体可以是,例如质粒、钴粒、病毒、RNA载体或线形或圆形的DNA或RNA分子,其可以包括染色体、非染色体、半合成或合成核酸分子。示例性的载体是那些能够自主复制(上位载体)或表达与其相连的核酸分子的载体(表达载体)。

[0054] 病毒载体包括逆转录病毒、腺病毒、细小病毒(例如腺相关病毒)、冠状病毒、负链RNA病毒,例如正粘病毒(如流感病毒)、横纹肌病毒(例如狂犬病和水泡性口炎病毒)、副粘病毒(例如麻疹和仙台病毒)、正链RNA病毒,例如小角病毒和 α 病毒、双链DNA病毒,包括腺病毒、疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒1类和2类、爱泼斯坦-巴尔(Epstein-Barr)病毒、巨细胞病毒),和痘病毒(例如痘苗、鸡痘和金丝雀痘)。其他病毒包括例如诺瓦克(Norwalk)病毒、披膜病毒、黄病毒、呼肠孤病毒、丘疹病毒、肝炎病毒(hepadnavirus)和肝炎病毒(hepatitis virus)。逆转录病毒的例子包括禽白血病肉瘤、哺乳动物C类、B类病毒、D类病毒、HTLV-BLV群、慢病毒、泡沫病毒(Coffin, J.M., *The viruses and their replication*, In *Fundamental Virology*, Third Edition, B.N. Fields et al., Eds., Lippincott-Raven Publishers, Philadelphia, 1996)。

[0055] 如本文所使用的,“慢病毒载体”,是指用于基因递送的基于HIV的慢病毒载体,其可以是整合的或非整合的,具有相对较大的包装容量,并且可以转导一系列不同的细胞类型。慢病毒载体通常是三个(包装、信封和传送)或更多质粒,瞬时转染到生产者细胞后产生的。类似HIV,慢病毒载体通过病毒表面糖蛋白与细胞表面受体的相互作用进入目标细胞。进入时,病毒RNA进行逆转录,其通过病毒逆转录酶复合物介导。逆转录产物是一种双链的线性病毒DNA,其是病毒整合到受感染细胞DNA的基质。

[0056] 术语“可操作地连接”指的是两个或多个核酸分子在单个核酸片段上的关联,从而使一个的功能受到另一个的影响。例如,当启动子能够影响编码序列的表达时(即,编码序列在启动子的转录控制下),启动子与编码序列可操作地连接。“未连接”是指相关的遗传因素彼此之间没有紧密的关联,一方的功能不会影响另一方。

[0057] 如本文所使用的,“表达载体”是指含有核酸分子的DNA结构物,其含有核酸分子,所述核酸分子可操作地连接至能够影响核酸分子在合适宿主中表达的合适控制序列。这种控制序列包括影响转录的启动子、控制这种转录的可选操作序列、编码合适的mRNA核糖体结合位点的序列,以及控制转录终止和翻译终止的序列。载体可以是质粒、噬菌体颗粒、病毒,或者仅仅是潜在的基因组插入。一旦转化为合适的宿主,载体可以独立于宿主基因组,进行复制和发挥作用,或者在某些情况下,可以整合到基因组本身中。在本说明书中,“钴粒”、“表达钴粒”、“病毒”和“载体”经常可以互换地使用。

[0058] 如本文所使用的,术语“表达”是指基于核酸分子(例如基因)的编码序列产生多肽的过程。该过程可包括转录、转录后控制、转录后修改、翻译、翻译后控制、翻译后修改,或其任何结合。

[0059] 术语“引入的”,在将核酸分子插入细胞的情况下,意味着“转染”,或“转化”,或“转导”,并且包括涉及将核酸分子并入真核或原核细胞中,其中核酸分子可并入细胞基因组(例如,染色体、质粒、质体或线粒体DNA),转化为自主复制子,或瞬时表达(例如,转染的mRNA)。

[0060] 如本文所使用的,“异源”核酸分子、结构物或序列,是指不是宿主细胞固有的、但可能与宿主细胞的核酸分子或核酸分子的一部分同源的核酸分子,或核酸分子的一部分。异源核酸分子、结构物或序列的来源可能来自不同的属或种。在某些实施中,异源核酸分子通过例如共轭、转化、转染、电穿孔等,添加(即,不是内生的或固有的)到宿主细胞或宿主基因组中,其中所添加的分子可以整合到宿主基因组中,或作为额外染色体遗传物质存在(例如,作为质粒或其他形式的自我复制载体),并且可能存在于多个副本中。此外,“异源”是指通过引入宿主细胞的异源多核苷酸编码的非天然酶、蛋白质或其他活度,即使是宿主细胞编码的同源蛋白质或活度。

[0061] 如本文所使用的,可以将一个以上异源核酸分子作为单独的核酸分子、作为多个单独控制的基因、作为多顺反子核酸分子、作为编码融合蛋白的单个核酸分子,或其任何结合,引入宿主细胞。例如,如本公开所揭示的,宿主细胞可被修改以表达两个或更多异源核酸分子,其编码对BRAF^{V600E}抗原肽(例如,TCR α 和TCR β)具有特异性的所期望的结合蛋白。当两个或多个异源核酸分子被引入宿主细胞时,应当理解的是,两个或多个异源核酸分子可作为单个核酸分子(例如,在单个载体上),被引入分离的载体上,在单个位点或多个位点,或其任何结合整合到宿主染色体中。参考的异源核酸分子或蛋白质活度的数目,是指编码核酸分子的数目或蛋白质活度的数目,而不是引入到宿主细胞的单独核酸分子的数目。

[0062] 如本文所使用的,术语“内源的”或“固有的”是指正常地存在于宿主细胞中的基因、蛋白质或活度。此外,与亲本基因、蛋白质或活度相比,发生突变、过度表达、改组、复制或其他方式改变的基因、蛋白质或活度,仍被认为是该特定宿主细胞的内源的或固有的。例如,来自第一基因的内源的控制序列(例如启动子、翻译衰减序列)可用于改变或调节第二固有的基因或核酸分子的表达,其中第二固有的基因或核酸分子的表达或调节,不同于亲本细胞中的正常表达或调节。

[0063] 术语“同源的”或“同源”是指在宿主细胞、物种或菌株中发现的,或从当中衍生出的分子或活度。例如,异源多核苷酸可以与固有的宿主细胞基因是同源的,并且可以可选地具有改变的表达水平、不同的序列、改变的活度,或其任何结合。

[0064] 如本文所使用的,“序列一致性”指的是一个序列中氨基酸残基的百分比,所述氨基酸残基与另一个参考多肽序列中的氨基酸残基,在对准序列并引入间隙之后相一致,如果需要的话,以达到最大百分比序列一致性,并且不考虑任何保守的替换作为序列标识的一部分。百分比序列一致值可以使用由Altschul et al. (1997)定义的NCBI BLAST2.0软件生成。“Gapped BLAST and PSI-BLAST: a new generation of protein database search programs”,Nucleic Acids Res.25:3389-3402,参数设置为默认值。

[0065] 如本文所使用的,“造血祖细胞”是一种可以从造血干细胞或胎儿组织中衍生的细胞,并且其能够进一步分化为成熟细胞类型(例如免疫系统细胞)。示例性的造血祖细胞包括那些具有CD24^{Lo}Lin-CD117⁺表型的细胞,或那些在胸腺中发现的细胞(称为祖细胞胸腺细胞)。

[0066] 如本文所使用的,术语“宿主”是指,靶向异源核酸分子进行遗传修改,以产生目标多肽(例如,抗BRAF^{V600E} TCR)的细胞(例如T细胞)或微生物。在某些实施例中,宿主细胞可以可选地经处理或被修改,以包括其他基因的修改,所述基因的修改,赋予与例如异源蛋白质的生物合成(例如,包括可检测标记;删除、改变或截断内源的TCR;或增加的共同刺激因子

表达),相关或无关的所期望的特性。在某些实施例中,宿主细胞是一种人类造血祖细胞,其是由编码对BRAF^{V600E}抗原肽具有特异性的TCR α 链的异源核酸分子转导的。

[0067] 如本文所使用的,“过度增殖性疾病”是指与正常或未分化细胞相比,过度的生长或增殖。示例性的过度增殖性疾病包括肿瘤、癌症、肿瘤组织、癌、肉瘤、恶性细胞、癌前细胞,以及非肿瘤或非恶性过度增殖性疾病(例如,腺瘤、纤维瘤、脂肪瘤、平滑肌瘤、血管瘤、纤维化、再狭窄,以及自身免疫性疾病,例如类风湿性关节炎、骨关节炎、银屑病、炎症性肠病等)。

[0068] BRAF^{V600E}肽特异性结合蛋白:HLA复合物

[0069] BRAF(又称B-RAF1、BRAF1、NS7、RAFBI、B-Raf、B-Raf原癌基因,以及丝氨酸/苏氨酸激酶),是指由BRAF基因编码的766-氨基酸蛋白。人类野生型BRAF的转录序列在NCBI参考标示符NM_004333.4(SEQ ID NO:78)中描述,蛋白质序列在NCBI参考标示符NP_004324.2(SEQ ID NO:36)中描述。BRAF是生长信号转导蛋白激酶Raf激酶家族的一员,在调节MAP激酶/ERK信号通路中发挥作用,其影响细胞的分裂、分化和分泌。在结构方面,BRAF由Raf激酶的三个保守的结构域特征组成:Ras-GTP结合的自我调节结构域;富含丝氨酸的铰链域;以及催化激酶结构域,其将蛋白质基质(分别为CR1、CR2和CR3)上的一致的序列磷酸化。活度的B-Raf形成二聚体。

[0070] BRAF激酶的突变形式包括V600E突变(BRAF^{V600E}),是多种肿瘤情况下的致癌因子,包括40%的黑色素瘤病例、10%的大肠癌病例,以及1%的非小细胞肺癌病例,并赋予促进肿瘤细胞生长和存活的结构信号。小分子BRAF抑制剂对黑色素瘤有一定的疗效,但通过补充替代信号途径,同时不丢失BRAF^{V600E}蛋白的表达,而产生耐药性。参见Shi et al.,Shi et al.,Cancer Disc.4(1):80(2014)。

[0071] 在某些方面,本公开提供一种结合蛋白,其包括:(a) T细胞受体(TCR) α 链可变(V α)结构域,其具有SEQ ID NO:29-32中任一个所示的CDR3氨基酸序列,或SEQ ID NO:29-32中任一个所示的CDR3氨基酸序列,其具有多达五个氨基酸替代、插入和/或缺失,以及TCR β 链可变区(V β)结构域;(b) V α 结构域和V β 结构域,其具有SEQ ID NO:33-35中任一个所示的CDR3氨基酸序列,或SEQ ID NO:33-35中任一个所示的CDR3氨基酸序列,其具有多达五个氨基酸替代、插入和/或缺失;或(c) (a)的V α 结构域和(b)的V β 结构域,其中结合蛋白能够与在细胞表面上的HLA复合物(所述HLA复合物包括含有BRAF^{V600E}突变的BRAF肽)特异性地结合,并且不与在细胞表面上的HLA复合物(所述HLA复合物包括不含BRAF^{V600E}突变的BRAF肽)结合。在某些实施例中,HLA复合物包括HLA-DQ。

[0072] 在某些实施例中,(a) V α 结构域包括SEQ ID NO:29的CDR3氨基酸序列,并且V β 结构域包括SEQ ID NO:33的CDR3氨基酸序列,(b) V α 结构域包括SEQ ID NO:30的CDR3氨基酸序列,并且V β 结构域包括SEQ ID NO:34的CDR3氨基酸序列,(c) V α 结构域包括SEQ ID NO:31的CDR3氨基酸序列,并且V β 结构域包括SEQ ID NO:34的CDR3氨基酸序列,(d) V α 结构域包括SEQ ID NO:32的CDR3氨基酸序列,并且V β 结构域包括SEQ ID NO:35的CDR3氨基酸序列,(e) V α 结构域包含SEQ ID NO:29的CDR3氨基酸序列,并且V β 结构域包含SEQ ID NO:34的CDR3氨基酸序列,(f) V α 结构域包含SEQ ID NO:29的CDR3氨基酸序列,并且V β 结构域包含SEQ ID NO:35的CDR3氨基酸序列,(g) V α 域包含SEQ ID NO:30的CDR3氨基酸序列,并且V β 域包含SEQ ID NO:33的CDR3氨基酸序列。(h) V α 结构域包含SEQ ID NO:30的CDR3氨基酸,并且V β 结构域

包含SEQ ID NO:35的CDR3氨基酸序列, (i) Va结构域包含SEQ ID NO:31的CDR3氨基酸, 并且Vβ结构域包含SEQ ID NO:33的CDR3氨基酸序列, (j) Va域包含SEQ ID NO:31的CDR3氨基酸序列, 并且Vβ结构域包含SEQ ID NO:35的CDR3氨基酸序列, (k) Va结构域包含SEQ ID NO:32的CDR3氨基酸序列, 并且Vβ结构域包含SEQ ID NO:33的CDR3氨基酸序列, 或(l) Va结构域包含SEQ ID NO:32的CDR3氨基酸序列, 而Vβ结构域包含SEQ ID NO:34的CDR3氨基酸序列。

[0073] 肽-MHC复合物, 如BRAF^{V600E}多肽:HLA复合物, 通过Va和Vβ结构域被TCR识别和结合。在淋巴细胞发育过程中, Va外显子是由不同的可变和连接基因片段(V-J) 组装而成, Vβ外显子是由不同的可变、多样性和连接基因片段(V-D-J) 组装而成。TCRα染色体位点有70-80个可变基因片段, 和61个连接基因片段。TCRβ染色体位点有52个可变的基因片段, 每个片段有两个独立的簇, 所述簇包括一个单一的多样性基因片段, 以及六个或七个连接的基因片段。功能性的Va和Vβ基因外显子是通过可变基因片段与用于Va的连接基因片段、以及具有多样性基因片段和用于Vβ的连接基因片段的可变基因片段的重组产生的。

[0074] Va和Vβ结构域各包括三个高变区, 也称为与肽-MHC复合物接触的互补决定区(CDR)。CDR1和CDR2在可变基因片段内编码, 而CDR3则通过跨越Va的可变和连接片段区域编码, 或跨越Vβ的可变、多样性和连接片段区域编码。与CDR1和CDR2相比, CDR3在重组过程中, 由于核苷酸的加入和丢失, 而具有更显著的多样性。

[0075] TCR可变结构域序列可与编号方案(Kabat、Chothia、Enhanced Chothia和Aho) 对齐, 允许对等效的残基位置进行注释, 并使用ANARCI软件工具对不同分子进行比较(2016, Bioinformatics 15:298-300)。编号方案提供了在TCR可变结构域中, 框架区域和CDR的标准化描述。

[0076] 因此, CDR1和CDR2序列可以从相应的可变基因片段(例如, TCRBV28-01、TCRAV21-01、TCRAV26-01、TCRAV12-02等位基因) 中推导出来。在某些实施例中, (a) VaCDR3氨基酸序列包括SEQ ID NO:29中所述的氨基酸序列, 并且Va结构域还包括通过SEQ ID NO:11中所述的多核苷酸序列编码的CDR1氨基酸序列和CDR2氨基酸序列, (b) VaCDR3氨基酸序列包括SEQ ID NO:30中所述的氨基酸序列, 并且Va结构域还包括通过SEQ ID NO:12中所述的多核苷酸序列编码的CDR1氨基酸序列和CDR2氨基酸序列, (c) VaCDR3氨基酸序列包括SEQ ID NO:31中所述的氨基酸序列, 并且Va结构域还包括通过SEQ ID NO:13中所述的多核苷酸序列编码的CDR1氨基酸序列和CDR2氨基酸序列, 或者(d) Va的CDR3氨基酸序列包括SEQ ID NO:32中所述的氨基酸序列, 并且Va结构域还包括通过SEQ ID NO:13中所述的多核苷酸序列编码的CDR1氨基酸序列和CDR2氨基酸序列。在某些实施例中, Vβ的CDR3氨基酸序列包括在SEQ ID NO:33-35中任一个所示的氨基酸序列, 并且Vβ结构域还包括通过SEQ ID NO:8中所述的多核苷酸序列编码的CDR1氨基酸序列和CDR2氨基酸序列。

[0077] 识别TCR Va和Vβ结构域结合对的例如方法包括以下公开内容中描述的那些方法: 例如公布号为WO 2016/161273PCT公布文件; Redmond et al., 2016, Genome Med. 8:80; Munson et al., 2016, Proc. Natl. Acad. Sci. 113:8272-7; Kim et al., 2012, PLoS ONE 7:e37338 (其中每一种方法的全部内容都通过引用并入本文)。因此, 本文所述的用于BRAF^{V600E}-特异性Vβ域的Va域(例如, 如序列SEQ ID NO:33-35中任一个所示的包括CDR3的Vβ结构域), 或者反之亦然, 是可以识别的。

[0078] 如本文所述的, BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白可具有相对于自然产生的结合蛋白(例

如TCR)的一个或多个氨基酸替代、缺失或插入。氨基酸的保守的替代是已知的,可以自然产生,也可以在结合蛋白或TCR重组产生时引入。氨基酸替代、缺失和插入可使用诱变方法引入蛋白质中(参见,例如Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,3d ed.,Cold Spring Harbor Laboratory Press,NY,2001)。寡核苷酸定向的位点特异性(或片段特异性)突变程序,可用于提供具有改变的多核苷酸,其具有根据所期望的替代,缺失或插入而改变的特定密码子。可替代地,随机或饱和的突变技术,例如丙氨酸扫描突变、易出错的聚合酶链反应突变,以及寡核苷酸定向突变,可用于制备免疫原多肽变体(参见,例如Sambrook et al.,同上)。

[0079] 本领域已知的各种标准,表明在肽或多肽中的特定位置被取代的氨基酸是否是保守的(或类似的)。例如,类似的氨基酸或保守的氨基酸替代,是将氨基酸残基替换为具有类似的侧链的氨基酸残基。类似的氨基酸可包括在以下类别中:具有碱性侧链的氨基酸(例如赖氨酸、精氨酸、组氨酸);具有酸性侧链的氨基酸(例如天冬氨酸、谷氨酸);具有不带电极性侧链的氨基酸(例如甘氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、酪氨酸、半胱氨酸、组氨酸);具有非极性侧链的氨基酸(例如丙氨酸、缬氨酸、亮氨酸、异亮氨酸、脯氨酸、苯丙氨酸、蛋氨酸、色氨酸);具有 β -支链的氨基酸(例如苏氨酸、缬氨酸、异亮氨酸),和具有芳香性的侧链的氨基酸(例如酪氨酸、苯丙氨酸、色氨酸)。脯氨酸被认为是较难分选的,与具有脂肪族侧链的氨基酸(例如亮氨酸、缬氨酸、异亮氨酸和丙氨酸)具有相同的性质。在某些情况下,谷氨酰胺替代谷氨酸,或天冬酰胺替代天冬氨酸,可视为类似的替代,因为谷氨酰胺和天冬酰胺分别是谷氨酸和天冬氨酸的酰胺衍生物。如本领域所理解的,两种多肽之间的“相似性”,是通过比较多肽与第二多肽的氨基酸序列,以及其保守的氨基酸替代物与第二个多肽的序列所确定的(例如,使用GENEWORKS、Align、BLAST算法,或本文所述并在本领域中实践的其他算法)。

[0080] 因此,在某些实施例中,本公开的结合蛋白包括V α 结构域,其与SEQ ID NO:1-4中任一个所示的氨基酸序列至少约90%(例如,至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%,或至少约99.9%)是一致的,且包括V β 结构域,其与SEQ ID NO:5-7中任一个所示的氨基酸序列至少约90%(例如,至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或至少约99.9%)是一致的,前提是(a)至少三个或四个CDR没有突变,(b)有突变的CDR确实只有至多三个氨基酸替代、插入、删除,或其结合。在某些实施例中,V α 结构域包括,或由SEQ ID NO:1-4中任一个所示的氨基酸序列组成。在某些实施例中,V β 结构域包括,或由SEQ ID NO:5-7中任一个所示的氨基酸序列组成。

[0081] 在特定实施例中,V α 结构域包括,或由SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列组成,V β 结构域包括,或由SEQ ID NO:5中所述的氨基酸序列组成。

[0082] 在其他实施例中,V α 结构域包括,或由SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列组成,V β 结构域包括,或由SEQ ID NO:6中所述的氨基酸序列组成。

[0083] 在其他实施例中,V α 结构域包括,或由SEQ ID NO:1中所述的氨基酸序列组成,V β 结构域包括,或由SEQ ID NO:7中所述的氨基酸序列组成。

[0084] 在特定实施例中,V α 结构域包括,或由SEQ ID NO:2中所述的氨基酸序列组成,V β

结构域包括,或由SEQ ID NO:5中所述的氨基酸序列组成。

[0085] 在其他实施例中,V α 结构域包括,或由SEQ ID NO:2中所述的氨基酸序列组成,V β 结构域包括,或由SEQ ID NO:6中所述的氨基酸序列组成。

[0086] 在其他实施例中,V α 结构域包括,或由SEQ ID NO:2中所述的氨基酸序列组成,V β 结构域包括,或由SEQ ID NO:7中所述的氨基酸序列组成。

[0087] 在特定实施例中,V α 结构域包括,或由SEQ ID NO:3中所述的氨基酸序列组成,V β 结构域包括,或由SEQ ID NO:5中所述的氨基酸序列组成。

[0088] 在其他实施例中,V α 结构域包括,或由SEQ ID NO:3中所述的氨基酸序列组成,V β 结构域包括,或由SEQ ID NO:6中所述的氨基酸序列组成。

[0089] 在其他实施例中,V α 结构域包括,或由SEQ ID NO:3中所述的氨基酸序列组成,V β 结构域包括,或由SEQ ID NO:7中所述的氨基酸序列组成。

[0090] 在特定实施例中,V α 结构域包括,或由SEQ ID NO:4中所述的氨基酸序列组成,V β 结构域包括,或由SEQ ID NO:5中所述的氨基酸序列组成。

[0091] 在其他实施例中,V α 结构域包括,或由SEQ ID NO:4中所述的氨基酸序列组成,V β 结构域包括,或由SEQ ID NO:6中所述的氨基酸序列组成。

[0092] 在其他实施例中,V α 结构域包括,或由SEQ ID NO:4中所述的氨基酸序列组成,V β 结构域包括,或由SEQ ID NO:7中所述的氨基酸序列组成。

[0093] 在进一步的实施例中,BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白是TCR、TCR的抗原结合片段或嵌合抗原受体。“嵌合抗原受体”(也称为CAR)是一种融合蛋白,包括抗原结合结构域(例如,从免疫球蛋白或类免疫球蛋白分子获得或衍生,例如scFv,来自癌症抗原特异性抗体或TCR,或从NK细胞的杀伤性免疫受体获得或衍生的抗原结合域)连接到跨膜结构域,以及一个或多个细胞内信号结构域(可选地包括一个或多个共刺激结构域)(参见,例如,Sadelain et al.,Cancer Discov.,3(4):388-398,2013;see also Harris and Kranz,Trends Pharmacol.Sci.,37(3):220-230,2016;Stone et al.,Cancer Immunol.Immunother.,63(11):1163-1176,2014)。在某些实施例中,结合蛋白包括CAR,其包括BRAF^{V600E}-特定的TCR结合域(参见,例如Walseng et al.,Scientific Reports 7:10713,2017;所述TCR CAR结构物和方法在此通过引用并入本文)。例如,在以下文献中描述制备CAR的方法:No.6,410,319美国专利;No.7,446,191美国专利;No.2010/065818美国专利申请公布文件;No.8,822,647美国专利;WO 2014/031687的PCT公布文件;No.7,514,537美国专利和Brentjens et al.,Clin.Cancer Res.13:5426,2007。

[0094] 在某些实施例中,TCR的抗原结合片段包括单链TCR(scTCR),其包括TCR V α 和V β 结构域TCR,但仅包括单个TCR恒定结构域(C α 或C β)。在某些实施例中,TCR的抗原结合片段,或嵌合抗原受体是嵌合的(例如,包括来自多于一个供体或物种的氨基酸残基或基序)、人类化的(例如,包括来自非人类生物体的残基,其经改变或替代,以降低人类免疫原性风险),或人类。根据本公开的结合蛋白,例如TCR,可进一步地包括TCR恒定结构域,例如,连接到V α 结构域、V β 结构域或两者兼有的C-末端。一个TCR β -链恒定结构域可由TRBC1基因或TRBC2基因编码,TCR α -链可由TRAC基因编码。在某些实施例中,TCR包括 α 链恒定(C α)结构域,其具有至少90%(例如,至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或至少约99.9%)与SEQ ID NO:25

中所述的氨基酸序列的序列一致性。在特定实施例中, C α 结构域包括SEQ ID NO:25中所述的氨基酸序列。在某些实施例中, TCR包括 β 链(C β)恒定结构域, 其具有至少90% (例如, 至少约90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或至少约99.9%) 与SEQ ID NO:26中所述氨基酸序列的序列一致性。在特定实施例中, C β 结构域包括SEQ ID NO:26中所述的氨基酸序列。

[0095] 在某些实施例中, 结合蛋白包括 α 链(包括V α 结构域和C α 结构域组成), 所述 α 链包括在SEQ ID NO:55-58中任一个所示的氨基酸序列。在某些实施例中, 结合蛋白包括 β 链(包括V β 结构域和C β 结构域组成), 所述 β -链包括SEQ ID NO:59-61中任一个所示的氨基酸序列。

[0096] 用于分离和纯化重组产生的可溶性结合蛋白(例如TCR)的方法, 以示例性的方式, 可以包括从合适的宿主细胞/载体系统中获得上清液, 所述上清液将重组可溶的TCR到培养基中, 然后使用市售的过滤器浓缩培养基。浓缩后, 浓缩物可应用于单个适宜的纯化基质, 或一系列适宜的基质, 例如亲和性的基质或离子交换树脂。一个或多个反相HPLC步骤, 可用于进一步纯化重组多肽。这些纯化方法也可用于从其自然环境中分离免疫原。本文所述的一种或多种分离/重组可溶的TCR的大规模生产方法, 包括批量细胞培养, 其被监测和控制, 以保持适当的培养条件。可溶的TCR的纯化, 可根据本文所述和本领域已知的、且符合国内外监管机构的法律和指南的方法进行。

[0097] 在某些实施例中, 编码对BRAF^{V600E}肽:HLA复合物具有特异性的(例如TCR)结合蛋白的核酸分子, 用于转染/转导宿主细胞(例如T细胞), 以用于过继性转移疗法。TCR测序的进展已被描述(例如, Robins et al., Blood 114:4099, 2009; Robins et al., Sci.Translat.Med.2:47ra64, 2010; Robins et al., (Sept.10) J.Imm.Meth.Epub ahead of print, 2011; Warren et al., Genome Res.21:790, 2011), 并在根据本公开的实施例的实践过程中可以采用。类似地, 用所期望的核酸转染/转导T细胞的方法(例如, 美国专利申请号US 2004/0087025)被描述为, 使用所期望的抗原特异性T细胞的过继性转移程序(例如, Schmitt et al., Hum.Gen.20:1240, 2009; Dossett et al., Mol.Ther.17:742, 2009; Till et al., Blood 112:2261, 2008; Wang et al., Hum.Gene Ther.18:712, 2007; Kuball et al., Blood 109:2331, 2007; US 2011/0243972; US 2011/0189141; Leen et al., Ann.Rev.Immunol.25:243, 2007), 基于本文的教导, 考虑将这些方法应用于当前公开的实施例, 包括针对那些与HLA受体复合的BRAF^{V600E}肽抗原具有特异性的TCR。

[0098] 如本文所述的, BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白或结构域, 可根据许多本领域公认的用于分析T细胞活度的方法, 进行功能表征, 包括T细胞结合的测定、活化或诱导, 还包括测定抗原特异性的T细胞应答。实施例包括测定T细胞增殖、T细胞因子释放、抗原特异性T细胞刺激、MHC限制性T细胞刺激、CTL活度(例如, 通过检测从预载目标细胞释放的⁵¹Cr)、T细胞表型标记表达的变化, 以及其他测定T细胞功能的方法。执行这些和类似分析的程序可以在例如在Lefkovits中找到(Immunology Methods Manual:The Comprehensive Sourcebook of Techniques, 1998)。也可以参见Current Protocols in Immunology; Weir, Handbook of Experimental Immunology, Blackwell Scientific, Boston, MA (1986); Mishell and Shigii (eds.) Selected Methods in Cellular Immunology, Freeman Publishing, San Francisco, CA (1979); Green and Reed, Science 281:1309 (1998), 及其引用文献。

[0099] “MHC-肽四聚体染色”是指用于检测抗原特异性T细胞的分析,其特征是MHC分子的四聚体,每个包括具有同源氨基酸序列的一致肽(例如,一致的或相关的)至少一个抗原(例如,BRAF^{V600E}),其中所述复合物能够结合对同源抗原具有特异性的T细胞受体。每一个MHC分子都可以标记一个生物素分子。生物素化的MHC/肽通过添加链霉亲和素进行四聚,所述链霉亲和素可以荧光标记。四聚体可通过荧光标记流式细胞术进行检测。在某些实施例中,MHC-肽四聚体分析,用于检测或选择即时公开的增强亲和性TCR。

[0100] 细胞因子的水平可根据本文所述和本领域实践的方法来确定,包括例如ELISA、ELISPOT、细胞内细胞因子染色、流式细胞术,及其结合(例如,细胞内细胞因子染色和流式细胞术)。对于抗原特异性引发或免疫应答的刺激导致的免疫细胞增殖和克隆扩增的测定,可通过分离淋巴细胞,例如外周血细胞或淋巴结中的细胞样本中的循环淋巴细胞,用抗原刺激细胞并测量细胞因子的产生,细胞增殖和/或细胞生存力,例如通过掺入氘标记的胸腺嘧啶或非放射性分析,例如MTT分析等。本文所述免疫原对Th1免疫应答和Th2免疫应答之间平衡的影响,可通过测定Th1细胞因子(如IFN- γ 、IL-12、IL-2和TNF- β)和2型细胞因子(例如IL-4、IL-5、IL-9、IL-10和IL-13)的水平来确定。

[0101] 在另一方面,本公开提供包括根据本公开的结合蛋白和医药上可接受的载体、稀释剂或赋形剂的组合物。药物上可接受的赋形剂是生物相容性载体,例如生理盐水,其适用于对人或其他非人哺乳动物受试者进行给药,在本文中更详细地描述。

[0102] 通过免疫细胞(如树突状细胞、吞噬细胞和B细胞)的抗原呈递在一定程度上取决于细胞上的HLA复合物。在不希望被理论束缚的情况下,人们认为由不同的HLA等位基因编码的HLA蛋白,在呈现特定抗原肽和与免疫细胞蛋白(如TCR)相互作用的能力上,可能有所不同。例如,给定的抗原肽可以通过HLA-DQ复合物呈现,而不是HLA-DR复合物,或反之亦然。在某些实施例中,根据本公开的结合蛋白,能够识别与HLA-DQ复合的BRAF^{V600E}肽。在某些实施例中,HLA复合物包括HLA-DQB1*0301、*0302或*0303。在某些实施例中,HLA复合物包括HLA-DQB1*0302。在进一步的实施例中,HLA复合物包括HLA-DQA1*03。

[0103] 根据本公开的结合蛋白靶向的肽抗原,也可以在尺寸上变化,这取决于,例如,呈现抗原的HLA分子的类型。一般地,HLA I类复合物呈现约8-10个氨基酸长度的肽,而HLA II类复合物呈现约15-24个氨基酸长度的肽,尽管这些肽可能短于或长于这些一般长度。因此,在某些实施例中,由本公开结合蛋白特异性结合的BRAF^{V600E}肽包括从约7至约27个氨基酸、从约10至约25个氨基酸、或从约12至约20个氨基酸,或从约15至约19个氨基酸。在特定实施例中,BRAF^{V600E}肽包括SEQ ID NO:38或39中所述的氨基酸序列。

[0104] 编码BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白的多核苷酸及其相关载体

[0105] 在另一方面中,提供了根据本公开的编码结合蛋白的分离多核苷酸和表达载体。通过使用本领域已知的任何合适的分子生物学工程技术,可以完成用于基因工程和产生用于目标的BRAF^{V600E}肽的结合蛋白或TCR的表达载体的构建。为了获得有效的转录和翻译,每个重组表达结构物中的多核苷酸,包括至少一个适当的表达控制序列(也称为调控序列),例如先导序列,特别是与编码免疫原的核苷酸序列可操作地(即,有效地)连接的启动子。

[0106] 某些实施例涉及编码本文提供的结合蛋白的多核苷酸,例如对BRAF^{V600E}肽:HLA复合物具有特异性的结合蛋白(例如TCR或CAR)。核酸可以是任何形式的单链或双链DNA、cDNA或RNA,并且可以包括彼此互补的核酸的正链和负链,包括反义DNA、cDNA和RNA。还包括

siRNA、微RNA、RNA-DNA杂合子、核酶和其他各种自然产生或合成的DNA或RNA形式。应当理解的是,与本公开公开的参考的多核苷酸序列相比,本公开的多核苷酸可以改变(即,包括不同的核苷酸序列),并且仍然编码相同的氨基酸或多肽,这是由于,例如遗传密码的简并。在某些实施例中,编码了,例如,结合蛋白或其部分、自裂肽、连接肽;或结合蛋白编码结构物的多核苷酸,可具有至少与SEQ ID NO:8-24;27;28;44-48;62-68和73-77中的任一个所述多核苷酸约80%(例如,至少约80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%、99.1%、99.2%、99.3%、99.4%、99.5%、99.6%、99.7%、99.8%或至少约99.9%)的一致性。

[0107] 在上述任意实施例中,编码本公开结合蛋白的多核苷酸是优化的密码子,其用于在目标宿主细胞中有效的表达。

[0108] 某些实施例包括含在载体中的本公开的多核苷酸。示例性的载体可包括多核苷酸,所述多核苷酸能够运输另一个多核苷酸至与其连接的多核苷酸,或能够在宿主生物体内复制。载体的一些例子包括质粒、病毒载体、钴粒和其他。一些载体可能能够在它们被引入的宿主细胞中自主复制(例如,具有复制细菌来源的细菌载体和上位哺乳动物载体),然而,其他载体可整合到宿主细胞的基因组中,或促进多核苷酸插入到宿主细胞的整合,从而与宿主基因一起复制(例如慢病毒载体、逆转录病毒载体)。此外,一些载体能够指导与其有效连接的基因的表达(这些载体可称为“表达载体”)。根据相关实施例,应该进一步理解,如果一种或多种试剂(例如,如本文所述,编码对BRAF^{V600E}具有特异性的结合蛋白或重组TCR的多核苷酸,或其变体)对受试者进行共同给药,则每种试剂可驻留在单独或相同的载体中,并且多个载体(每个包括不同的试剂或相同的试剂)可以引入到细胞或细胞群体中,或者对受试者进行给药。

[0109] 在某些实施例中,编码对BRAF^{V600E}肽:HLA复合物具有特异性的结合蛋白的多核苷酸,可能与载体的某些成分具有有效的联系。例如,影响与其连接的编码序列的表达和加工所需的多核苷酸序列,可以有效地连接。表达控制序列可以包括适当的转录起始、终止、启动子和增强子序列;有效的RNA处理信号,例如剪接和聚腺苷酸化信号;稳定细胞质mRNA的序列;提高翻译效率的序列(即Kozak一致的序列);增强蛋白质稳定性的序列;以及可能增强蛋白质分泌的序列。如果表达控制序列与目标基因相邻,并且表达控制序列在反式或远处起作用以控制目标基因,则可以有效地连接它们。在某些实施例中,编码本公开的结合蛋白的多核苷酸,包括于作为病毒载体的表达载体中,例如慢病毒载体或 γ -逆转录病毒载体。

[0110] 在某些实施例中,提供表达载体,其包括编码本公开结合蛋白的多核苷酸,其中多核苷酸有效地连接到表达控制序列(例如,启动子)。在某些实施例中,载体能够将多核苷酸递送至宿主细胞。在某些实施例中,宿主细胞是造血祖细胞或人类免疫系统细胞。在进一步实施例中,免疫系统细胞是CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4-CD8-双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞或其任何结合。在某些实施例中,免疫系统细胞是CD4⁺ T细胞。在某些实施例中,T细胞是幼稚T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞,或其任何结合。

[0111] 在本文的任何实施例中,所述载体是病毒载体。在某些实施例中,病毒载体是慢病毒载体或 γ -逆转录病毒载体。

[0112] 宿主细胞

[0113] 在更进一步的方面,提供宿主细胞,其包括根据本公开的异源多核苷酸,其中宿主细胞在其细胞表面,表达通过异源多核苷酸编码的结合蛋白(即,表达根据本公开的结合蛋白)。在特定实施例中,将表达载体递送至适当的细胞,例如T细胞或抗原呈递细胞,即在其细胞表面显示肽/MHC复合物的细胞(例如树突状细胞)。在某些实施例中,宿主细胞(例如,T细胞、NK细胞或NK-T细胞)缺乏CD8共受体或CD4共受体,并且编码的结合蛋白能够在缺乏CD4或CD8共受体的情况下,结合BRAF^{V600E}抗原:HLA复合物。在某些实施例中,宿主细胞是造血祖细胞或人类免疫系统细胞。例如,免疫系统细胞可以是CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤细胞、自然杀伤T细胞、树突状细胞或其任何结合。在一些实施例中,编码的结合蛋白,包括MHCII限制性TCR结合域,并且宿主细胞(例如CD8⁺ T细胞)包括编码异源CD4⁺共受体的多核苷酸。

[0114] 在某些实施例中,其中T细胞是宿主,T细胞可以是幼稚的、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞、干细胞记忆T细胞或其任何结合。在某些实施例中,T细胞是CD4⁺T细胞、CD8⁺ T细胞或两者兼有。导入宿主细胞的表达载体还可以包括,例如淋巴组织特异性转录调节元素(TRE),例如B淋巴细胞、T淋巴细胞,或树突状细胞特异性TRE。淋巴组织特异性TRE在本领域是已知的(参见,例如,Thompson et al.,Mol.Cell.Biol.12:1043,1992);Todd et al.,J.Exp.Med.177:1663,1993);Penix et al.,J.Exp.Med.178:1483,1993)。

[0115] 宿主细胞可以包括任何单个细胞或细胞培养物,其可接收载体,或核酸或表达蛋白的结合。这个术语还包括宿主细胞的后代,无论是遗传上的还是表型上的相同或不同。适合的宿主细胞可能取决于载体,并且可能包括哺乳动物细胞、动物细胞、人类细胞、猿猴细胞、昆虫细胞、酵母细胞和细菌细胞。可通过使用病毒载体、经磷酸钙沉淀转化、DEAE-葡聚糖、电穿孔、微量注射或其他方法,诱导这些细胞与载体或其他材料结合。参见,例如,Sambrook et al.,Molecular Cloning:A Laboratory Manual 2d ed.(Cold Spring Harbor Laboratory,1989)。

[0116] 因此,在一个方面中,提供一种宿主细胞,其包括根据本公开的异源多核苷酸或表达载体,其中宿主细胞在其细胞表面,表达通过异源多核苷酸编码的结合蛋白。在某些实施例中,编码V α 结构域的异源多核苷酸部分,至少与SEQ ID NO:18-21中任一个所示的多核苷酸序列有约80%是一致的。在某些实施例中,编码V β 结构域的异源多核苷酸部分,至少与SEQ ID NO:22-24中任一个所示的多核苷酸序列有约80%是一致的。

[0117] 在某些实施例中,编码V α 结构域的异源多核苷酸的部分,包括或由在SEQ ID NO:18-21中任一个所示的多核苷酸序列组成。在某些实施例中,编码V β 结构域的异源多核苷酸部分,包括或由SEQ ID NO:22-24中任一个所示的多核苷酸序列组成。

[0118] 在某些实施例中,编码V α 结构域的异源多核苷酸的部分,包括或由在SEQ ID NO:18-21中任一个所示的多核苷酸序列组成,并且编码V β 结构域的异源多核苷酸部分,包括或由SEQ ID NO:22-24中任一个所示的多核苷酸序列组成。

[0119] 在某些实施例中,编码V α 结构域的异源多核苷酸的部分,连接到编码TCR α -链恒定结构域的部分,其中编码 α -链恒定结构域的部分,包括或由与SEQ ID NO:27中所述的多核苷酸序列至少约80%是一致的序列组成。

[0120] 在某些实施例中,编码V β 结构域的异源多核苷酸的部分,连接到编码TCR β -链恒定域结构的部分,其中编码 β -链恒定结构域的部分,包括或由与SEQ ID NO:28中所述的多核

核苷酸序列至少约80%是一致的序列组成。

[0121] 在特定实施例中,编码V_α结构域的多核苷酸的部分,包括或由SEQ ID NO:18组成,编码V_β结构域的部分,包括或由SEQ ID NO:22组成。

[0122] 在其他实施例中,编码V_α结构域的多核苷酸的部分,包括或由SEQ ID NO:19组成,编码V_β结构域的部分,包括或由SEQ ID NO:23组成。

[0123] 在其他实施例中,编码V_α结构域的多核苷酸的部分,包括或由SEQ ID NO:20组成,编码V_β结构域的部分,包括或由SEQ ID NO:23组成。

[0124] 仍在其它实施例中,编码V_α结构域的多核苷酸的部分,包括或由SEQ ID NO:21组成,编码V_β结构域的部分,包括或由SEQ ID NO:24组成。

[0125] 在本文所述的任何实施例中,当与呈现或表达包括BRAF^{V600E}-抗原的抗原呈递细胞共同培养时,宿主细胞(例如,T细胞)表达本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白,能够产生干扰素。在某些实施例中,产生的干扰素包括干扰素-γ (IFN-γ)。在一些实施例中,目标细胞已被包括或由含BRAF^{V600E}-抗原组成的肽或多肽脉冲。在一些实施例中,目标细胞已被多核苷酸(例如,DNA、cDNA或mRNA)转染,所述多核苷酸编码包括或由含BRAF^{V600E}-抗原的组成的多肽或肽。在某些实施例中,本公开内容的宿主细胞与抗原呈递细胞一起培养时,会产生IFN-γ,所述抗原呈递细胞已被含BRAF^{V600E}的抗原脉冲,所述BRAF^{V600E}的抗原浓度为约0.005μg/mL至约10μg/mL。在进一步的实施例中,当与抗原呈递细胞一起培养时,宿主细胞产生至少约1,000pg/mL的IFN-γ,所述抗原呈递细胞,被含有浓度至少为约0.1μg/mL的BRAF^{V600E}的抗原脉冲。在一些实施例中,当与抗原呈递细胞一起培养时,宿主细胞产生至少约1,000pg/mL的IFN-γ,所述抗原呈递细胞用浓度至少约为0.1、0.2、0.3、0.4或0.5μg/mL抗原的含BRAF^{V600E}的抗原脉冲。在一些实施例中,当与抗原呈递细胞一起培养时,宿主细胞产生从约1,000pg/mL到10,000pg/mL的IFN-γ,所述抗原呈递细胞用浓度为约0.5μg/mL的抗原至10μg/mL的含BRAF^{V600E}的抗原脉冲。在一些实施例中,目标细胞包括B细胞。在进一步实施例中,B细胞表达HLA-DQ等位基因。仍在进一步的实施例中,B细胞是B-LCL系1331。

[0126] 在某些实施例中,多核苷酸的一部分编码自裂解肽,并布置在TCRα链-编码部分和TCRβ链-编码部分之间。通过单个载体,表达可分离多肽的自裂解肽是本领域已知的,其包括例如,猪破伤风病毒-1 2A (P2A) 肽、马蹄疫病毒2A (T2A) 肽、马甲鼻炎病毒 (ERAV) 2A (E2A) 肽,和口蹄疫病毒2A (F2A) 肽。因此,在某些实施例中,编码自裂肽的异源多核苷酸部分,包括或由在SEQ ID NO:44-48中任一个所示的多核苷酸序列组成。在进一步的实施例中,编码的自裂解肽包括或由在SEQ ID NO:49-52中任一个所示的氨基酸序列组成。

[0127] 在某些实施例中,宿主细胞是造血祖细胞或人类免疫系统细胞。在某些实施例中,免疫系统细胞是CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞、CD4⁻CD8⁻双阴性T细胞、γ δT细胞、自然杀伤细胞、树突状细胞,或其任何结合。在某些实施例中,免疫系统细胞是T细胞。在特定实施例中,T细胞是幼稚T细胞、中央记忆T细胞、效应记忆T细胞,或其任何结合。在进一步实施例中,T细胞是CD4⁺ T细胞。

[0128] 在某些实施例中,与内源性TCR相比,由T细胞表达的结合蛋白或TCR,能够更有效地与CD3蛋白、CD4蛋白或两者关联。在某些实施例中,相比于内源性TCR,结合蛋白或TCR在T细胞上的表面更高。

[0129] 在上述任意实施例中,包括编码BRAF^{V600E}-特异结合蛋白的异源多核苷酸的宿主细

胞,是经过修改的免疫细胞,其减少或消除了一种或多种内源性基因的表达,所述基因编码选自PD-1、LAG-3、CTLA4、TIM3、TIGIT、一种HLA分子、一种TCR分子或其任何成分或结合的多肽产物。在不希望受理论约束的情况下,某些内源性表达的免疫细胞蛋白,可能下调修改的免疫宿主细胞(例如PD-1、LAG-3、CTLA4、TIGIT)的免疫活度,或可能与本公开公开的异源结合蛋白竞争宿主细胞的表达,与TCR复合物成分(例如,CD3蛋白)相关联,或可能干扰本公开异源表达的结合蛋白(例如,结合非BRAF^{V600E}抗原或非BRAF^{V600E}抗原:HLA复合物,并干扰目前公开的结合蛋白与BRAF^{V600E}抗原结合的内源TCR)的结合活度,并干扰免疫宿主细胞结合表达BRAF^{V600E}抗原的目标细胞),或其任何结合。此外,用于细胞转移治疗的供体免疫细胞上表达的内源性蛋白质(例如,免疫宿主细胞蛋白质,例如HLA),可被同种异体受体识别为外来蛋白,这可能导致同种异体受体消除或抑制供体免疫细胞。

[0130] 因此,减少或消除这些内源性基因或蛋白质的表达或活度,可以提高宿主细胞在自体或异基因宿主环境中的活度、耐受性和持久性,并允许对于细胞的普遍给药(例如,对任何受体,不论HLA类型)。在某些实施例中,经修改的宿主免疫细胞是供体细胞(例如异基因)或自体细胞。在某些实施例中,本公开的修改的免疫宿主细胞包括一种或多种基因的染色体基因敲除,所述基因编码PD-1、LAG-3、CTLA4、TIM3、TIGIT、一种HLA成分(例如编码 α 1巨球蛋白、 α 2巨球蛋白、 α 3巨球蛋白、 β 1微球蛋白或 β 2微球蛋白的基因)、或一种TCR成分(例如,编码TCR可变结构区或TCR恒定结构区的基因)(参见,例如,Torikai et al., Nature Sci.Rep.6:21757 (2016); Torikai et al., Blood 119 (24):5697 (2012); and Torikai et al., Blood 122 (8):1341 (2013),所述基因编辑技术,组合物和过继性细胞疗法的全部内容通过引用并入本文。例如,SEQ ID NO:142-149)。如本文所使用的,术语“染色体基因敲除”是指宿主细胞中的基因的改变,其阻止宿主细胞产生功能活度的内源多肽产物。导致染色体基因敲除的改变可以包括,例如,引入的无意义突变(包括提前终止密码子的形成)、错义突变、基因缺失和链断裂,以及抑制核酸分子在宿主细胞中的内源性表达。

[0131] 在某些实施例中,染色体基因敲除或基因敲入,是通过对宿主细胞的染色体编辑来实现的。染色体编辑的执行,可以使用例如核酸内切酶。如本文所使用的“内切酶”是指能够催化多核苷酸链内磷酸二酯键断裂的酶。在某些实施例中,核酸内切酶能够切割目标基因,从而使目标基因失活或“敲除”。核酸内切酶可以是自然产生的、重组的、基因修改的,或融合的核酸内切酶。由核酸内切酶引起的核酸链断裂,通常通过同源重组或非同源末端连接(NHEJ)的独特的机制来修复。在同源重组过程中,供体核酸分子可用于供体基因“敲入”,用于目标基因“敲出”,并可选地,通过供体基因敲入或目标基因敲出事件,使目标基因失活。NHEJ是一个容易出错的修复过程,通常会导致切割部位DNA序列的改变,例如至少一个核苷酸的替代、删除或添加。NHEJ可以用来“敲除”一个目标基因。核酸内切酶的例子包括锌指核酸酶、TALE-核酸酶、CRISPR-Cas核酸酶、巨核酶和megaTAL。

[0132] 如本文所用,“锌指核酸酶”(ZFN)是指包括锌指DNA结合域的融合蛋白,其融合到非特定的DNA切割结构域,例如FokI核酸内切酶。约30个氨基酸的每个锌指基序与约3个碱基对的DNA结合,某些残基上的氨基酸可以改变,从而改变三重序列的特异性(参见,例如,Desjarlais et al., Proc.Natl.Acad.Sci.90:2256-2260,1993; Wolfe et al., J.Mol.Biol.285:1917-1934,1999)。多个锌指基序可以串联,以创建与所期望的DNA序列的结合特异性,例如具有范围从约9碱基对到约18碱基对的长度的区域。作为背景,ZFN通过催

化基因组中位点特异性DNA双链断裂 (DSB) 的形成,来介导基因组编辑,并且通过同源性定向修复,促进包括DSB位点与基因组同源的侧翼序列的转基因的靶向整合。可替代地,ZFN产生的DSB可通过非同源末端连接 (NHEJ) 修复,导致目标基因敲除,所述NHEJ是一种容易出错的细胞修复途径,可导致核苷酸在裂解位点的插入或缺失。在某些实施例中,基因敲除包括使用ZFN分子进行的插入、删除、突变或其结合。

[0133] 如本文所使用的,“转录激活物样效应子核酸酶”(TALEN),是指包括TALE DNA结合结构域和DNA切割结构域(例如FokI内切酶)的融合蛋白。“TALE DNA结合结构域”或“TALE”由一个或多个TALE重复结构域/单元组成,其每一个通常地具有高度保守的33-35个氨基酸序列,所述氨基酸序列具有不同的第12和第13个氨基酸。TALE重复结构域涉及了TALE与目标DNA序列的结合。发散氨基酸残基,称为重复变量保留(RVD),与特异性核苷酸识别相关。这些TALE的DNA识别的自然(标准)代码是已确定的,使得在TALE位置12和13处的HD(组氨酸-天冬氨酸)序列,导致TALE与胞嘧啶(C)结合,NG(天冬氨酸-甘氨酸)与T核苷酸结合,NI(天冬氨酸-异亮氨酸)与A结合,NN(天冬氨酸-天冬氨酸)与G或A核苷酸结合,以及NG(天冬酰胺甘氨酸)与T核苷酸结合。非标准的(非典型的)RVD也是已知的(参见,例如,美国专利公布文件US 2011/0301073,其中非典型RVD通过引用并入本文中)。TALEN可用于定向T细胞基因组中的位点特异性双链断裂(DSB)。非同源末端连接(NHEJ)从双链断裂的两侧连接DNA,其中几乎没有,或没有序列重叠用于退火,从而引入了敲除基因表达的错误。可替代地,同源定向修复可以在DSB的位置引入一个转基因,前提是该转基因中存在同源侧翼序列。在某些实施例中,基因敲除包括插入、缺失、突变或其结合,并使用TALEN分子制造。

[0134] 如本文所使用的,“规律间隔成簇短回文重复序列/Cas”(CRISPR/Cas)核酸酶系统,是指系统利用CRISPR-RNA(crRNA)引导的Cas核酸酶,通过碱基对互补性,识别基因组(称为原间隔序列)内的目标位点,然后在短时间内切割DNA,保守的原间隔基序的相关基序(PAM)紧跟在互补目标序列的3'之后。基于Cas核酸酶的序列和结构,CRISPR/Cas系统可分为三种类型(I型、II型和III型)。crRNA引导的I型和III型监测复合物,需要多个Cas亚单位。研究最多的II型系统至少包括三个组成部分:RNA引导的Cas9核酸酶、crRNA和反式作用的crRNA(tracrRNA)。所述tracrRNA包括双重形成区域。crRNA和tracrRNA形成一个双链,其能够与Cas9核酸酶相互作用并将Cas9/crRNA:tracrRNA复合物引导至目标DNA上的特定位置,这是通过crRNA上的间隔子与PAM上游目标DNA上的原间隔子之间的Watson-Crick碱基配对实现的。Cas9核酸酶在crRNA间隔区内切割双链断裂。NHEJ的修复导致插入和/或缺失,从而破坏目标位点的表达。可替代地,可以通过同源定向修复,将具有同源侧翼序列的转基因引入DSB位点。crRNA和tracrRNA可以被设计成单一引导RNA(sgRNA或gRNA)(参见,例如,Jinek et al.,Science 337:816-21,2012)。此外,可以改变或编程与目标位点互补的引导RNA的区域,以靶向所期望的序列(Xie et al.,PLOS One 9:e100448,2014;U.S.Pat.Appl.Pub.No.US 2014/0068797,U.S.Pat.Appl.Pub.No.US 2014/0186843;U.S.Pat.No.8,697,359,and PCT Publication No.WO 2015/071474;其中每个均通过引用并入)。在某些实施例中,基因敲除包括插入,缺失,突变或其结合,并使用CRISPR/Cas核酸酶系统制备。

[0135] 示例性的gRNA序列,和使用其来敲除编码免疫细胞蛋白的内源性基因的方法,包括那些在Ren et al.,Clin.Cancer Res.23(9):2255-2266(2017)中所描述,其中的gRNA、

CAS9DNA、载体和基因敲除技术,在此通过引用将其全部内容并入本文。

[0136] 在一些实施例中,基因敲除包括CRISPR介导的TCR α -链恒定结构域点(C α)、TCR β -链恒定结构域点(C β),或两者兼有。在某些实施例中,靶向TCR C α 位点的gRNA序列包括核苷酸序列AGAGTCTCTCAGCTGGTACA (SEQ ID NO:136)。在某些实施例中,靶向TCR C α 位点的gRNA序列包括核苷酸序列TGTGCTAGACATGAGGTCTA (SEQ ID NO:137)。在某些实施例中,靶向TCR C β 位点的gRNA序列包括核苷酸序列GCAGTATCTGGAGTCATTGA (SEQ ID NO:138)。在某些实施例中,靶向TCR C β 位点的gRNA序列包括核苷酸序列GGAGAATGACGAGTGGACCC (SEQ ID NO:139)。在一些实施例中,基因敲除包括CRISPR介导的人类 β 2M位点的基因敲除。在某些实施例中,靶向人类 β 2M的gRNA序列包括核苷酸序列CGCGAGCACAGCTAAGGCCA (SEQ ID NO:140)。在一些实施例中,基因敲除包括CRISPR介导的PD-1位点基因敲除。在某些实施例中,靶向PD-1的gRNA序列包括核苷酸序列GGCCAGGATGGTTCTTAGGT (SEQ ID NO:141)。

[0137] 如本文所使用的,“巨核酶”,也称为“归巢核酸内切酶”,是指具有大识别位点(约12到约40碱基对的双链DNA序列)的内脱氧核糖核酸酶。基于序列和结构基序,巨核酶可分为五个家族:LAGLIDADG、GIY-YIG、HNH、His-Cys-box和PD- (D/E) XK。示例性的巨核酶包括I-SceI、I-CeuI、PI-PspI、PI-Sce、I-SceIV、I-CsmI、I-PanI、I-SceII、I-PpoI、I-SceIII、I-CreI、I-TevI、I-TevII和I-TevIII,其识别序列是已知的(参见,例如,美国专利号5,420,032和6,833,252;Belfort et al.,Nucleic Acids Res.25:3379-3388,1997;Dujon et al.,Gene 82:115-118,1989;Perler et al.,Nucleic Acids Res.22:1125-1127,1994;Jasin,Trends Genet.12:224-228,1996;Gimble et al.,J.Mol.Biol.263:163-180,1996;Argast et al.,J.Mol.Biol.280:345-353,1998)。

[0138] 在某些实施例中,天然产生的大范围核酸酶可用于促进目标的位点特异性的基因组修改,所述目标选自PD-1、LAG3、TIM3、CTLA4、TIGIT、一种HLA编码基因,或一种TCR成分编码基因。在其它实施例中,对目标基因具有新的结合特异性的工程化巨核酶,被用于位点特异性基因组修改(参见,例如Porteus et al.,Nat.Biotechnol.23:967-73,2005;Sussman et al.,J.Mol.Biol.342:31-41,2004;Epinat et al.,Nucleic Acids Res.31:2952-62,2003;Chevalier et al.,Molec.Cell 10:895-905,2002;Ashworth et al.,Nature 441:656-659,2006;Paques et al.,Curr.Gene Ther.7:49-66,2007;美国专利公布文件:US 2007/0117128;US 2006/0206949;US 2006/0153826;US 2006/0078552;和US 2004/0002092)。在进一步的实施例中,使用归巢核酸内切酶来产生染色体基因敲除,所述归巢核酸内切酶经TALEN的模块化DNA结合结构域修改,以产生称为megaTAL的融合蛋白。当与编码目标多肽(例如TCR α 链,TCR β 或两者)的外源供体模板结合使用时,MegaTAL不仅可用于敲除一个或多个目标基因,还可用于引入(敲除)异源或外源的多核苷酸,其中由细胞产生的敲入的TCR对BRAF^{V600E}抗原或肽具有特异性。

[0139] 在某些实施例中,染色体基因敲除包括导入宿主细胞(例如免疫细胞)的抑制性核酸分子,其包括异源多核苷酸,所述异源多核苷酸编码与肿瘤相关抗原特异性结合的抗原特异性受体,其中,抑制性核酸分子编码目标特异性抑制剂,并且编码的目标特异性抑制剂,抑制宿主免疫细胞中的内源性的基因表达(即PD-1、TIM3、LAG3、CTLA4、TIGIT、一种HLA组分或一种TCR组分,或其任何结合)。

[0140] 使用敲除程序或试剂后,可以通过宿主免疫细胞的DNA测序直接确认染色体基因

敲除。染色体基因敲除也可以由敲除后基因表达的缺失(例如,通过基因编码的mRNA或多肽产物的缺失)来推断。

[0141] 治疗方法

[0142] 在一些方面,本公开的方法用于治疗高增殖性疾病,其中所述方法包括根据本公开向所需的人类受试者,用包括对人类BRAF^{V600E}或宿主细胞具有特异性的结合蛋白的组合物进行给药。

[0143] 在某些方面,本公开涉及一种治疗高增殖性疾病或症状的方法,其特征是,其通过向需要的人类受试者以组合物进行给药来表达BRAF^{V600E},所述组合物包括根据上述任何结合蛋白的BRAF^{V600E}肽:HLA复合物具有特异性的结合蛋白或宿主细胞。

[0144] 在受试者中存在高增殖性疾病或恶性症状,是指在受试者中存在异常增殖、癌和/或转化细胞,包括例如恶性肿瘤、肿瘤、非接触抑制或癌性转化细胞等(例如实体癌;血液癌包括淋巴瘤和白血病,例如急性髓细胞白血病、慢性髓细胞白血病等,例如肾癌、胃癌、卵巢癌和结直肠癌),其在本领域中是已知的,并且为其建立诊断和分选标准(例如,e.g., Hanahan and Weinberg,Cell 144:646,2011;Hanahan and Weinberg,Cell 100:57,2000; Cavallo et al.,Canc.Immunol.Immunother.60:319,2011;Kyrigideis et al., J.Carcinog.9:3,2010)。特别例如是,毛细胞白血病、黑色素瘤、非小细胞肺癌、结直肠癌、乳头状癌和甲状腺癌,这类低分化甲状腺癌。因此,在进一步实施例,提供了用于治疗与BRAF^{V600E}表达相关联的高增殖性疾病或其他症状的方法,包括毛细胞白血病、黑色素瘤、甲状腺癌(例如低分化甲状腺癌)、非小细胞肺癌、结直肠癌、乳头状癌,非霍奇金淋巴瘤,肺腺癌,脑肿瘤(包括胶质母细胞瘤和毛细胞星形细胞瘤)。

[0145] 如本文所使用的,术语“治疗(treat)”和“治疗(treatment)”是指对受试者(即患者、宿主,可能是人类或非人类动物)的疾病、病症或症状的医疗管理(参见,例如,Stedman's Medical Dictionary)。一般而言,适当的剂量和治疗方案,提供一种或多种结合蛋白或BRAF^{V600E}肽:HLA复合物,或表达该结合蛋白或BRAF^{V600E}肽的宿主细胞,以及可选地,足以提供治疗或预防益处的辅助治疗(例如,细胞因子,例如IL-2、IL-15、IL-21或其任何结合)。由于治疗性治疗或预防性或防御性方法,产生的治疗或预防性益处,包括,例如,改善的临床结果,其中目标是防止或延缓或以其他方式减少(例如,相对于未经治疗的对照,以统计学上显著的方式减少)不期望的生理变化或病症,或预防、延缓或除此之外(的方式)减少这种疾病或病症的扩大或严重程度。治疗受试者的有益或所期望的临床结果,包括减少、减轻或减缓由待治疗的疾病或病症引起的、或与之相关的症状;减少症状的发生;提高生活质量;延长无病状态(即,降低受试者将表现出的症状的可能性或倾向,基于此从而对疾病进行诊断);疾病范围的缩小;疾病状态的稳定(即不恶化);疾病进展的延迟或减缓;疾病状态的改善或缓解;和缓解(无论是部分或全部),无论是可检测或不可检测的;或总存活。

[0146] 如果受试者没有接受治疗,与预期的存活相比,“治疗”也意味着延长存活。需要本文所描述的方法和组合物的受试者,包括那些已经患有该疾病或病症的受试者,以及容易患有或有风险发展成该疾病或病症的受试者。本文所述的组合物(和包含该组合物的制剂)和方法所提供的临床益处,可通过设计和执行受试者体外分析,临床前研究和的临床研究来评估,所述受试者希望从给药的组合物受益,如实施例所述。

[0147] 如本文所述的,表达结合蛋白的细胞,是可在药物或生理学上可接受的,或适宜的

赋形剂或载体中对受试者进行给药。药物上可接受的赋形剂是生物相容性载体,例如生理盐水,其在本文中更详细地描述,适合于对人或其他非人哺乳动物受试者进行给药。

[0148] 在过继性细胞治疗的背景下,治疗有效剂量是在过继性转移中使用的宿主细胞的量(根据本公开表达结合蛋白),其能够在治疗人类或非人类动物中,产生临床期望结果(即,以统计学显著的方式,足以诱导或增强特异性T细胞对于细胞表达BRAF^{V600E}的免疫应答(例如,细胞毒性T细胞应答))。如医学界所知,任何一个病人的剂量取决于许多因素,包括病人的体型、体重、体表面积、年龄、给药的特定治疗、性别、给药时间和途径、大致健康状况,和其他同时给药的药物。剂量会有所不同,但宿主细胞给药的优选的剂量包括重组表达载体,如本文所述,约为 10^7 细胞/ m^2 、约 5×10^7 细胞/ m^2 、约 10^8 细胞/ m^2 、约 5×10^8 细胞/ m^2 、约 10^9 细胞/ m^2 、约 5×10^9 细胞/ m^2 、约 10^{10} 细胞/ m^2 、约 5×10^{10} 细胞/ m^2 或约 10^{11} 细胞/ m^2 。

[0149] 在任何本公开的实施例中,单位剂量可包括T细胞,例如CD4⁺ T细胞、CD8⁺ T细胞或两者兼有,其中T细胞可包括大块T细胞、幼稚T细胞、干细胞记忆T细胞、中央记忆T细胞或效应记忆T细胞。在某些实施例中,单位剂量包括BRAF^{V600E}-特异性CD4⁺ T细胞,而不包括CD8⁺ T细胞。在其他实施例中,单位剂量包括BRAF^{V600E}-特异性CD8⁺ T细胞,其可被设计成表达异源CD4⁺共受体,并且可选地,不包括CD4⁺ T细胞。在某些实施例中,单位剂量包括本公开的BRAF^{V600E}-特异性CD4⁺ T宿主细胞,进一步地包括经修改的CD4⁺ T细胞或CD8⁺ T细胞(例如,异基因或自体细胞修改的(例如,表达异源蛋白质,例如TCR、CAR、CD4共受体、CD8共受体,或其任何结合)或未经修改的),其对一种或多种其他抗原或抗原HLA复合物具有结合特异性,例如:BRAF^{V600E}抗原、不包括V600E突变的BRAF抗原;一种含有BRAF^{V600E}的抗原,其与单位剂量的当前公开的宿主细胞的结合蛋白不同的HLA相关联;或与高增殖性疾病或病症相关的不同抗原;例如、NY-ESO-1、SSX-2、酪氨酸酶、TMG1-4、GP100、MAGE-A3、MART1、ROR1、EGFR、EGFRvIII、EGP-2、EGP-40、GD2、GD3、HPV E6、HPV E7、Her2、L1-CAM、Lewis A、Lewis Y、MUC1、MUC16、PSCA、PSMA、CD19、CD20、CD22、CD56、CD23、CD24、CD30、CD33、CD37、CD44v7/8、CD38、CD56、CD123、CA125、c-MET、FcRH5、WT-1、叶酸受体 α 、VEGF- α 、VEGFR1、VEGFR2、IL-13R α 2、IL-11R α 、MAGE-A1、PSA、肝配蛋白A2、肝配蛋白B2、一个NKG2D、NY-ESO-1、TAG-72间皮素、NY-ESO-1、5T4、BCMA、FAP、碳酸酐酶9、ERBB2、或CEA、或其任何结合)。

[0150] 在某些实施例中,单位剂量包括(i)包括至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%或至少约95%的工程化CD4⁺ T细胞的组合物,以及(ii)包括至少约30%、至少约40%、至少约50%、至少约60%、至少约70%、至少约80%、至少约85%、至少约90%、或至少约95%的工程CD8⁺ T细胞的组合物,比例约为1:1,其中单位剂量包括减少量或基本上不含幼稚T细胞(即,与具有相当数量PBMCs的患者样本相比,具有小于约50%、小于约40%、小于约30%、小于约20%、小于约10%、小于约5%、或小于约1%以单位剂量存在的幼稚T细胞群)。

[0151] 在一些实施例中,单位剂量包括(i)包括至少约50%的工程化CD4⁺ T细胞的组合物,与(ii)包括至少约50%的工程化CD8⁺ T细胞的组合物结合,比例约为1:1,其中单位剂量包括减少的量,或基本上不含幼稚的T细胞。在进一步的实施例中,单位剂量包括(i)包括至少约60%的工程化CD4⁺ T细胞的组合物,与(ii)包括至少约60%的工程化CD8⁺ T细胞的组合物结合,比例约为1:1,其中单位剂量包括减少的量或基本上不含幼稚的T细胞。在更进一步的实施例中,单位剂量包括(i)包括至少约70%的工程化CD4⁺ T细胞的组合物,与(ii)

包括至少约70%的工程化CD8⁺ T细胞的组合物结合,比例约为1:1,其中单位剂量包括减少的量,或基本上没有幼稚T细胞。在一些实施例中,单位剂量包括(i)包括至少约80%的工程化CD4⁺ T细胞的成分,与(ii)包括约80%的工程化CD8⁺ T细胞的组合物结合,比例约为1:1,其中单位剂量包括减少的量或基本上不含幼稚的T细胞。在一些实施例中,单位剂量包括(i)包括至少约85%的工程化CD4⁺ T细胞的组合物,与(ii)包括至少约85%的工程化CD8⁺ T细胞的组合物结合,比例约为1:1,其中,单位剂量包括减少的量或基本上没有幼稚T细胞。在一些实施例中,单位剂量包括(i)包括至少约90%的工程化CD4⁺ T细胞的组合物,与(ii)包括约90%的工程化CD8⁺ T细胞的组合物结合,比例约为1:1,其中单位剂量包括减少的量或基本上不含幼稚的T细胞。

[0152] 在本文所述的任何实施例中,单位剂量包括相同,或大约相等数量的工程化CD45RA⁺CD3⁺CD8⁺和工程化CD45RA⁺CD3⁺CD4⁺的T_M细胞。

[0153] 药物组合物可以以适合于医学领域技术人员确定的待治疗(或预防)的疾病或症状的方式,进行给药。组合物适当的剂量、适当的持续时间和给药频率,将由患者的健康状况、患者的体型(即体重、质量或身体面积)、患者疾病的类型和严重程度、活性成分的特定形式,以及给药方法等因素决定。一般地,适当的剂量和治疗方案提供的一个或多个组合物,足以提供治疗和/或预防性的益处(如本文所述,包括改善的临床结果,例如更频繁的完全或部分缓解,或更长的无病和/或总存活期,或者减轻症状的严重性)。对于预防性使用,剂量应足以预防、延迟或减轻与疾病或症状相关的疾病的严重程度。根据本文所述方法,免疫原性组合物的预防效益,可以通过进行临床前(包括体外和体内动物研究)和临床研究,以及通过适当的统计、生物学和临床方法和技术分析从中获得的数据来确定给药,所有这些方法和技术本领域是技术人员易于实践的。

[0154] 与BRAF^{V600E}表达相关的条件,包括存在BRAF^{V600E}驱动力的细胞或分子事件的任何病症或症状,并且通常地表现为相对于正常细胞而言,病态细胞过度生长。与BRAF^{V600E}表达相关的一些症状,可能包括急性和慢性病症和疾病,例如使受试者易患特定疾病的病理条件。

[0155] 与BRAF^{V600E}表达相关的一些症状的例子,包括高增殖性疾病,其是指受试者中激活和/或增殖细胞(也可能是转录过度活跃)的状态,包括肿瘤、赘生物、癌症、恶性肿瘤等。除了激活或增殖细胞外,高增殖性疾病也可能包括细胞死亡过程的异常或失调,无论是坏死还是凋亡。这种细胞死亡过程的异常可能与多种病症有关,包括癌症(包括原发性、继发性恶性肿瘤以及转移),或其他症状。

[0156] 根据某些实施例,以BRAF^{V600E}表达为特征的癌症,可以通过使用本文公开的组合物和方法来治疗。此外,“癌症”可指任何加速的细胞增殖,包括实体瘤、腹水瘤、血液或淋巴或其他恶性肿瘤;结缔组织恶性肿瘤;转移性疾病;器官或干细胞移植后的微小残留疾病;多药耐药癌症、原发或继发恶性肿瘤,与恶性肿瘤或其他癌症有关的血管生成。在本公开的实施例中,还考虑了仅包括上述类型疾病中的一种的具体实施例,或者在可排除特定条件的情况下,无论其是否具有通过BRAF^{V600E}表达的特征。

[0157] 本文所设想的某些治疗或预防方法,包括对宿主细胞(可以是自体的、异基因的或同基因的)进行给药,其包括如本文所述的、稳定地整合到细胞染色体中的所期望的多核苷酸。例如,这种细胞组合物可以使用自体、异基因或同基因免疫系统细胞(例如,T细胞、抗原提呈细胞、自然杀伤细胞)在体外生成,以便将所需的、BRAF^{V600E}靶向的T细胞组合物,给药于

受试者,作为过继性免疫治疗。在某些实施例中,宿主细胞是造血祖细胞或人类免疫细胞。在某些实施例中,免疫系统细胞是 $CD4^+$ T细胞、 $CD8^+$ T细胞、 $CD4^-CD8^-$ 双阴性T细胞、 $\gamma\delta$ T细胞、自然杀伤细胞、自然杀伤T细胞、树突状细胞或其任何结合。在某些实施例中,免疫系统细胞是幼稚T细胞、中央记忆T细胞、干细胞记忆T细胞、效应记忆T细胞或其任何结合。在特定实施例中,该细胞是 $CD4^+$ T细胞。

[0158] 如本文所使用的,组合物的给药或治疗是指将其递送给受试者,而不论递送的路径或方式。给药可连续或间歇地进行,也可以是肠外地。给药可用于治疗已被证实具有确定的症状、疾病或疾病状态的受试者,或用于治疗易患或有风险发展层这种症状、疾病或疾病状态的受试者。与辅助治疗的联合给药可包括,以任何顺序和给药计划(例如,具有一种或多种细胞因子的 $BRAF^{V600E}$ 特异性重组(即工程化的)宿主细胞;免疫抑制疗法,如钙调磷酸酶抑制剂、皮质类固醇、微管抑制剂、小剂量霉酚酸前药,或其任何结合),同时和/或顺序将多种药剂递送至宿主细胞。

[0159] 在某些实施例中,向受试者以如本文所述的多剂量重组宿主细胞进行给药,其可在大约两周到大约四周之间的间隔进行给药。在进一步的实施例中,细胞因子(例如,IL-2、IL-15、IL-21)是按顺序给药的,前提是在进行细胞因子给药之前,受试者至少以重组宿主细胞进行3或4次的给药。在某些实施例中,细胞因子与宿主细胞同时进行给药。在某些实施例中,细胞因子以皮下注射进行给药。

[0160] 在更进一步的实施例中,被治疗的受试者正在进一步接受免疫抑制治疗,例如钙调神经磷酸酶抑制剂、皮质类固醇、微管抑制剂、低剂量霉酚酸前药,或其任何结合。在进一步的实施例中,经治疗的受试者已接受非清髓性或清髓性造血细胞移植,其中所述治疗,可在非清髓性造血细胞移植后至少两至至少三个月进行给药。

[0161] 治疗或药物组合物的有效量,是指在所需的剂量和时间段内,足以达到所期望的临床结果或有益治疗的量,如本文所述。有效量可以乙一次或多次给药进行递送。如果给药对象是已经已知的,或经证实已经患有疾病或疾病状态的受试者,则术语“预防治疗量”可用于描述对易感或有风险发展成疾病或疾病状态(如复发)的受试者,以有效量进行给药,作为预防疗程。

[0162] CTL免疫应答的水平,可通过本文所述和本领域常规实践的众多免疫方法中的任一种来确定。CTL免疫应答的水平,可以在给药前和给药后测定,所述 $BRAF^{V600E}$ -特异性结合蛋白,通过例如T细胞表达。用于测定CTL活度的细胞毒性分析,可以使用本领域常规实践的几种技术和方法中的任何一种来实施(参见,例如Henkart et al., "Cytotoxic T-Lymphocytes" in Fundamental Immunology, Paul (ed.) (2003 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA) (2003 Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA), 第1127-50页,以及其中引用的参考文献)。

[0163] 抗原特异性T细胞应答,通常是通过对所观察到的T细胞应答,与来自同一起来源群体的抗原T细胞比较所确定的。所述所观察到的T细胞应答,是根据本文所述的任何T细胞功能参数(例如,增殖,细胞因子释放,CTL活性,改变的细胞表面标志物表型等),其可以在暴露于适当抗原的同源抗原的T细胞之间进行(例如,当由免疫相容性抗原呈递细胞呈递时,用于引发或激活T细胞的抗原)。所述来自同一起来源群体的抗原T细胞暴露于结构上不同或不相关的对照抗原。具有统计学显著性的对同源抗原的应答,大于对对照抗原的应答,表示

抗原特异性。

[0164] 如本文所述,可从受试者处获得生物样品,以确定对含有BRAF^{V600E}抗原肽的免疫应答的呈现和水平。本文中使用的“生物样品”可以是血液样品(可从其中制备血清或血浆)、活检样品、体液(例如,肺灌洗液、腹水、粘膜冲洗液、滑液)、骨髓、淋巴结、组织外植体、器官培养物,或来自受试者或生物源的任何其他组织或细胞制剂。在接受任何免疫原性成分之前,也可从受试者处获得生物样品,其生物样本作为建立基线(即免疫前)数据的对照是有用的。

[0165] 本文所述的药物组合物可呈现于单位剂量或多剂量容器中,例如密封安瓿或小瓶。这些容器可以一直冷冻以保持制剂的稳定性。在某些实施例中,单位剂量包括如本文所述的重组宿主细胞,其剂量为约 10^7 细胞/ m^2 至约 10^{11} 细胞/ m^2 。开发合适的剂量和治疗方案,以用于在各种治疗方案中使用本文所述的特定组合物,包括例如,肠外或静脉给药或制剂。

[0166] 如果经肠外给药,则该组合物还可包括无菌水溶液,或油性溶液或悬浮液。合适的无毒肠外可接受稀释剂或溶剂,包括水、林格(Ringer's)溶液、等渗盐溶液、1,3-丁二醇、乙醇、丙二醇或聚二乙二醇与水混合。水溶液或悬浮液可进一步地包括一种或多种缓冲剂,例如乙酸钠、柠檬酸钠、硼酸钠或酒石酸钠。当然,用于制备任何剂量的单位制剂的任何材料,都应该是药学纯的,并且在所使用的量是基本无毒的。此外,所述活性化合物可以并入缓释制剂和配方中。如本文所使用的,剂量单位形式是指适合作为待治疗对象的单一剂量的物理离散单元;每个单元可包括预定数量的重组细胞或活性化合物,其经计算与适当的药物载体联合,产生期望的治疗效果。

[0167] 一般地,适当的剂量和治疗方案提供的活性分子或细胞数量,足以提供治疗的或预防的效益。与未经治疗的受试者相比,经治疗的受试者可通过建立改善的临床结果(例如更频繁的缓解、完全或部分、或更长的无病存活期),来监测这种反应。对肿瘤蛋白预先存在的免疫应答的增加,通常与改善的临床结果相关。通常地,可以使用标准增殖、细胞毒性或细胞因子测定,来评价这种免疫应答,这是本领域常规的,并且可以从治疗前后受试者处获得的样品来进行。

[0168] 在更进一步的方面,提供了根据本公开的包括宿主细胞的单位剂量形式。

[0169] 根据本公开的方法,可进一步地包括在组合疗法中用一种或多种附加药剂进行给药,来治疗该疾病或症状。例如,在某些实施例中,组合疗法包括用BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与(同时地、同步地或顺序地)免疫检查点抑制剂进行给药。在进一步的实施例中,组合疗法包括将本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该结合蛋白的工程化宿主细胞)与刺激性免疫检查点试剂的激动剂一起进行给药。在进一步的实施例中,组合疗法包括将本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该结合蛋白的工程化宿主细胞)与二次疗法(例如化学治疗剂、辐射疗法、手术、抗体或其任何结合)一起进行给药。

[0170] 如本文所使用的,术语“免疫抑制剂(immune suppression agent)”或“免疫抑制剂(immunosuppression agent)”是指提供抑制信号,以协助控制或抑制免疫应答的一个或多个细胞、蛋白质、分子、化合物或复合物。例如,免疫抑制剂包括部分或全部阻断免疫刺激的分子;减少、阻止或延迟免疫激活;或增加、激活或上调免疫抑制。对于目标的示例性的免疫抑制药物(例如,带有免疫检查点抑制剂)包括PD-1、PD-L1、PD-L2、LAG3、CTLA4、B7-H3、

B7-H4、CD244/2B4、HVEM、BTLA、CD160、TIM3、GAL9、KIR、PVR1G (CD112R)、PVRL2、腺苷、A2aR、免疫抑制细胞因子(例如,IL-10、IL-4、IL-1RA、IL-35)、IDO、精氨酸酶、VISTA、TIGIT、LAIR1、CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5、Treg细胞或其任何结合。

[0171] 免疫抑制剂(也称为免疫检查点抑制剂)可以是化合物、抗体、抗体片段或融合多肽(例如Fc融合,例如CTLA4-Fc或LAG3-Fc)、反义分子、核酶或RNAi分子,或低分子量有机分子。在本文公开的任何实施例中,方法可包括单独或以任何结合的方式,向本文公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该结合蛋白的工程化宿主细胞)以下任一免疫抑制成分的一种或多种抑制剂进行给药。

[0172] 在某些实施例中,BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白与PD-1抑制剂结合使用,例如PD-1特异性抗体或其结合片段,例如匹利珠单抗(pidilizumab)、纳武单抗(nivolumab)(可瑞达(Keytruda),前身为MDX-1106)、派姆单抗(pembrolizumab)(欧狄沃(Opdivo),前身为MK-3475)、MEDI0680(前身为AMP-514)、AMP-224、BMS-936558,或其任何结合。在进一步的实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与PD-L1特异性抗体或其结合片段结合使用,例如BMS-936559、杜瓦鲁单抗(durvalumab)(MEDI4736)、阿替唑仑单抗(atezolizumab)(RG7446)、阿维鲁单抗(avelumab)(MSB0010718C)、MPDL3280A,或其任何结合。

[0173] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与LAG3抑制剂(例如LAG525、IMP321、IMP701、9H12、BMS-986016,或其任何结合)结合使用。

[0174] 在某些实施例中,BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白与CTLA4抑制剂结合使用。在特定实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白与CTLA4特异性抗体或其结合片段(例如,伊匹单抗(ipilimumab)、曲美目单抗(tremelimumab)、CTLA4Ig融合蛋白(例如,阿巴西普(abatacept)、贝拉西普(belatacept),或其任何结合)结合使用。

[0175] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与B7-H3特异性抗体或其结合片段(例如依诺妥珠单抗(enoblituzumab)(MGA271)、376.96或两者兼有)结合使用。B7-H4抗体结合片段可以是scFv或其融合蛋白,例如在Dangaj et al., Cancer Res. 73:4820, 2013, 以及No. 9,574,000的美国专利和W0/201640724A1及公布号为W0 2013/025779A1的PCT专利公布文件中所述。

[0176] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与CD244抑制剂结合使用。

[0177] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与BTLA、HVEM、CD160或其任何组合的抑制剂结合使用。抗CD-160抗体例如在PCT公布文件W0 2010/084158中描述。

[0178] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与TIM3抑制剂结合使用。

[0179] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与Gal9抑制剂结合使用。

[0180] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与腺苷信号抑制剂(例如诱饵腺苷受体)结合使用。

[0181] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与A2aR抑制剂结合使用。

[0182] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与KIR抑制剂(如lirilumab(BMS-986015))结合使用。

[0183] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与抑制性细胞因子(通常地,TGFβ以外的细胞因子)或Treg发育或活度的抑制剂结合使用。

[0184] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与IDO抑制剂组合使用,例如左旋-1-甲基色氨酸、依帕腺苷(INCB024360;Liu et al.,Blood 115:3520-30,2010)、依布硒啉(ebselen)(Terentis et al.,Biochem.49:591-600,2010),吲哚脒(indoximod),NLG919(Mautino et al.,American Association for Cancer Research 104th Annual Meeting 2013;Apr 6-10,2013),1-甲基色氨酸(1-MT)-替拉-帕扎明,或它们的任何结合。

[0185] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与精氨酸酶抑制剂结合使用,例如N(ω)-硝基-L-精氨酸甲酯(L-NAME)、N-ω-羧基-N-精氨酸(nor-NOHA)、L-NOHA、2(S)-氨基-6-硼己酸(ABH),S-(2-硼乙基)-L-半胱氨酸(BEC)或其任何组合。

[0186] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与VISTA抑制剂(如CA-170(密歇根州列克星敦市的Curis)结合使用)。

[0187] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与TIGIT抑制剂(例如,COM902(加拿大安大略省多伦多市的Compugen,))、CD155抑制剂(例如,COM701(Compugen))或两者结合使用。

[0188] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与PVRIG、PVRL2或两者兼有的抑制剂结合使用。抗PVRIG抗体,如PCT公布文件W0 2016/134333中所述。抗PVRL2抗体如PCT公布文件W0 2017/021526所述。

[0189] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与LAIR1抑制剂结合使用。

[0190] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与CEACAM-1、CEACAM-3、CEACAM-5抑制剂,或其任何结合,结合使用。

[0191] 在某些实施例中,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)与增加刺激性免疫检查点分子活度(即,是激动剂)的试剂结合使用。例如,本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该结合蛋白的工程宿主细胞)可与CD137(4-1BB)激动剂(例如,脲醛单抗)、CD134(OX-40)激动剂(例如,MED6469、MED6383或MED0562)、来那度胺(lenalidomide)、汨马度胺(pomalidomide)、CD27激动剂(例如,CDX-1127)、CD28激动剂(例如,TGN1412、CD80或CD86)、CD40激动剂(例如,CP-870,893、rhuCD40L或SGN-40)、CD122激动剂(例如,IL-2)GITR激动剂(例如,PCT专利公布文件W0 2016/054638中描述的人源化单克隆抗体)、GITR激动剂ICOS(CD278)(例如,GSK3359609、mAb 88.2、JTX-2011、Icos 145-1、Icos 314-8或其任何结合)。在本文公开的任何实施例中,方法可包括单独地或以任何方式组合地,向本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该结合蛋白的工程化宿主细胞)以刺

激性免疫检查点分子的(包括前述任一种的)一种或多种激动剂进行给药。

[0192] 在某些实施例中,结合疗法包括本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程宿主细胞)和二级疗法,所述二级疗法包括一种抗体或抗原结合片段,其对非炎症实体肿瘤、放射治疗、外科手术、化学治疗剂、细胞因子、RNAi,或其任何结合所表达的癌症抗原,具有特异性。

[0193] 在某些实施例中,组合治疗方法包括用BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白进行给药,和进一步用放射治疗或手术进行给药。放射治疗在本领域中是众所周知的,包括X射线疗法,例如伽玛射线疗法和放射药物疗法。适合于治疗某一特定癌症或非炎症实体瘤的手术和外科技术是本领域普通技术人员所熟知的。

[0194] 在某些实施例中,结合治疗方法包括用本公开的BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白(或表达该蛋白的工程化宿主细胞)进行给药,和进一步用化学治疗剂进行给药。化学治疗剂包括,但不限于,染色质功能抑制剂、拓扑异构酶抑制剂、微管抑制药物、DNA损伤剂、抗代谢药(例如叶酸拮抗剂、嘧啶类似物、嘌呤类似物和糖修改类似物)、DNA合成抑制剂、DNA相互作用剂(如插层剂),和DNA修复抑制剂。说明性的化学治疗药物,包括但不限于以下组:抗代谢产物/抗癌药物,例如嘧啶类药物(5-氟尿嘧啶、氟尿苷、卡培他滨、吉西他滨和阿糖胞苷)和嘌呤类药物、叶酸拮抗剂和相关抑制剂(巯基嘌呤、硫代鸟嘌呤、喷妥司汀和2-氯脱氧腺苷(克拉屈滨));抗增殖/抗真菌药物,包括长春花生物碱(长春碱、长春新碱、长春瑞滨)等天然产物,微管干扰物,例如紫杉烷(紫杉醇、多西紫杉醇)、长春新碱、长春花碱、诺考达唑、埃博霉素和诺维本、表鬼臼毒素(依托泊苷,替尼泊苷)、DNA损伤剂(放线菌素、安萨克林、蒽环类、博来霉素、丁硫磷、喜树碱、卡铂、氯霉素、顺铂、环磷酰胺、细胞毒素、放线菌素、柔红霉素、阿霉素、表阿霉素、六甲基三聚氰胺草酸铂、异磷酰胺、马法兰、巯基乙胺、丝裂霉素、米托蒽醌、亚硝基脲、吡卡霉素、丙卡巴嗪、紫杉醇、泰索帝、替莫唑胺、替尼泊苷、三亚乙基硫代磷酰胺和依托泊苷(VP16);抗生素,如达克霉素(放线菌素D)、柔红霉素、阿霉素(阿霉素)、伊达比星、蒽环类药物、米托蒽醌、博来霉素、普卡霉素(丝光霉素)和丝裂霉素;酶(L-天冬酰胺酶,其系统地代谢L-天冬酰胺并剥夺没有能力合成自身天冬酰胺的细胞);抗血小板剂;抗增殖/抗有丝分裂烷基化剂,例如氮芥末(甲氯乙胺、环磷酰胺和类似物、马法兰、氯霉素)、亚乙基亚胺和甲基三聚氰胺(六甲基三聚氰胺和硫替帕)、烷基磺酸盐-丁磺酸盐、亚硝基脲(卡莫司汀(BCNU)及其类似物、链脲佐菌素)、酒石酸-达卡巴嗪(DTIC);抗增殖/抗有丝分裂的抗代谢药,如叶酸类似物(甲氨蝶呤);铂配位络合物(顺铂、卡铂)、异丙嗪,羟基脲、米诺坦、氨基谷氨酰胺;激素、激素类似物(雌激素、三苯氧胺、蛇床子素、比卡鲁胺、尼鲁米特)和芳香化酶抑制剂(来曲唑、阿那曲唑);抗凝血剂(例如组织纤溶酶原激活物、链激酶和尿激酶)、阿司匹林、双嘧达莫、噻氯匹定、氯吡格雷、阿昔单抗;抗感染药;抗分泌剂(布雷韦尔丁);免疫抑制剂(环孢素、他克莫司(FK-506),西罗莫司(雷帕霉素)、硫唑嘌呤、霉酚酸酯);抗血管生成化合物(TNP470,染料木素)和生长因子抑制剂(血管内皮生长因子(VEGF)抑制剂、成纤维细胞生长因子(FGF)抑制剂);血管紧张素受体阻断剂;一氧化氮供体;反义寡核苷酸;抗体(曲妥珠单抗,利妥昔单抗);嵌合抗原受体;细胞周期抑制剂和分化诱导剂(维甲酸);mTOR抑制剂,拓扑异构酶抑制剂(阿霉素(阿霉素)、氨茶碱、喜树碱、柔红霉素、放线菌素、依托泊苷、表柔比星、依托泊苷、伊达比星、伊立替康(CPT-11)和米托蒽醌、拓扑替康、伊立替康)、皮质类固醇(可的松、地塞米松、氢化可的松、甲基强的松龙、泼尼松和泼尼

松龙);生长因子信号转导激酶抑制剂;线粒体功能障碍诱导剂、毒素(例如霍乱毒素、蓖麻毒蛋白、假单胞菌外毒素、百日咳博德特氏菌腺苷酸环化酶毒素),或白喉毒素;以及染色质破坏剂。

[0195] 细胞因子越来越多地被用来调控宿主对抗癌活度的免疫应答。参见,例如, Floros&Tarhini, Semin.Oncol.42(4):539-548,2015。用于促进免疫抗癌或抗肿瘤应答的细胞因子包括,例如, IFN- α 、IL-2、IL-3、IL-4、IL-10、IL-12、IL-13、IL-15、IL-16、IL-17、IL-18、IL-21、IL-24和GM-CSF,单独地,或与本公开结合蛋白或细胞表达的相同对象结合。

[0196] 另一种癌症治疗方法涉及减少癌基因和癌细胞生长、维持、增殖和免疫逃避所需的其它基因的表达。RNA干扰,特别是microRNA(miRNA)和小抑制的RNA(siRNA)的使用,提供了一种降低癌症基因表达的途径(参见,例如,Larsson et al.,Cancer Treat.Rev.16(55):128-135,2017),其可与本公开结合蛋白或细胞表达的相同对象结合使用。

[0197] 在本文公开的任何实施例中,任何治疗剂(例如,BRAF^{V600E}-特异性结合蛋白或工程化宿主细胞、免疫抑制成分的抑制剂、刺激性免疫检查点分子的激动剂、抗肿瘤淋巴细胞、化学治疗剂、辐射疗法、手术、细胞因子或抑制性RNA),可在治疗过程中对受试者一次或多次进行给药,并且,以结合方式,可以以任何顺序或任何结合,对受试者进行给药。治疗药剂的适当的剂量、适当的持续时间和给药频率,将由以下因素决定:例如患者的症状;肿瘤或癌症的大小、类型、扩散、生长和严重程度;活性成分的特殊形式;以及给药方法。

[0198] 实例

[0199] 实例1

[0200] 黑色素瘤患者CD4⁺ BRAF^{V600E}-特异性T细胞的识别

[0201] 一位52岁男性病患,左脚患有IIIIC期BRAF^{V600E}-变异性黑色素瘤,接受了广泛切除、淋巴结清扫及辅助性伊匹单抗治疗。在完成一年的伊匹单抗治疗前不久,他要求切除左腿三个中途转移瘤,3个月后再切除一个中途转移瘤。随后他进展为,在左大腿处出现3cm长的左髂淋巴结转移,和软组织结节性FDG的剧烈损伤(图1A)。髂淋巴结被切除,以进行完整的外显子组测序和TIL的扩增,患者随后在接受淋巴结清扫化疗后,接受TIL输注。治疗27个月后,左大腿损伤恢复,患者保持无疾病。

[0202] 纯化的肿瘤细胞和正常组织的全外显子组和RNA测序,仅识别出20个非同义突变,如表1所示:(左2和3列);左4-6列:27-mer肽,其包括编码的非同义突变和在DNA或RNA序列中存在的突变(左4-6列);(左7和8列)构建了包括突变的20-mer肽;RNA序列表达以百万分之一转录产物(TPM)为单位。

[0203] 表1.源于黑色素瘤患者的纯化肿瘤细胞和正常组织中的非同义突变

[0204]

样品	亚.nt	亚.aa	27-mer aa 序列	DNA 中的突变	RNA 中的突变	20-me 肽 1	20-me 肽 2	RNA 中的 TPM
AP1M1	AP1M1.A>C	p.I295L	VIEKHSRSRI EYMLKAKSQ FKRRSTAN (SEQ ID NO: 79)	是	是	VIEKHSRS RIEYMLK AKSQF (SEQ ID NO: 80)	SRIEYML KAKSQFK RRSTAN (SEQ ID NO: 81)	61.33
BRAF	BRAF.A>T	p.V600E	DLTVKIGDF GLATEKSRW SGSHQFEQL (SEQ ID NO: 37)	是	是	DLTVKIG DFGLATE KSRWSG (SEQ ID NO: 38)	DFGLATE KSRWSGS HQFEQL (SEQ ID NO: 39)	10.83
DCAF6	DCAF6.G>A	p.A419T	EQFLQPSTSS TMSTQAHST SSPTESPH (SEQ ID NO: 82)	是	是	EQFLQPST SSTMSTQ AHSTS (SEQ ID NO: 83)	TSSTMST QAHSTSS PTESPH (SEQ ID NO: 84)	41.11
GTF2H4	GTF2H4.C>T	p.T319M	FIVVETNYRL YAYMESELQ IALIALFS (SEQ ID NO: 85)	是	是	FIVVETN YRLYAY MESELQI (SEQ ID NO: 86)	YRLYAY MESELQI ALIALFS (SEQ ID NO: 87)	49.95
NBPF12	NBPF12.A>G	p.E2471G	DSCQPYRSSF YALGEKHVG FSLDVGEI (SEQ ID NO: 88)	是	是	DSCQPYR SSFYALG EKHVG (SEQ ID NO: 89)	SSFYALG EKHVGFS LDVGEI (SEQ ID NO: 90)	12.5
ORC3	ORC3.A>C	p.I236L	ESFATKVLQ DFIILSSQHL HEFPLILI (SEQ ID NO: 91)	是	是	ESFATKV LQDFIILS SQHLH (SEQ ID NO: 92)	LQDFIILS SQHLHEF PLILI (SEQ ID NO: 93)	19.92
ROR1	ROR1.A>G	p.N53S	LVPTSSWNIS SELSKDSYLT LDEPMNN (SEQ ID NO: 94)	是	是	LVPTSSW NISSELSK DSYLT (SEQ ID NO: 95)	NISSELSK DSYLTLD EPMNN (SEQ ID NO: 96)	4.69
SF3B1	ZNF700.T>G	p.T358A	QMGGSTPVL TPGKAPIGTP AMNMATPT (SEQ ID NO: 97)	是	是	QMGGSTP VLTPGKA PIGTPA (SEQ ID NO: 98)	VLTPGKA PIGTPAM NMATPT (SEQ ID NO: 99)	105.2

[0205]

样品	亚.nt	亚.aa	27-mer aa 序列	DNA 中的突变	RNA 中的突变	20-me 肽 1	20-me 肽 2	RNA 中的 TPM
UNKL	UNKL.C>T	p.V154I	AHGPLDLRP PVC DIRELQ AQEALQNGQ (SEQ ID NO: 100)	是	是	AHGPLDL RPPVCDIR ELQAQ (SEQ ID NO: 101)	RPPVCDIR ELQAQEA LQNGQ (SEQ ID NO: 102)	6.72
ZNF700	ZNF700.T>G	p.F287L	GEKPYECSK CDKALHSSS SYHRHERSH (SEQ ID NO: 103)	是	是	GEKPYEC SKCDKAL HSSSSY (SEQ ID NO: 104)	SKCDKAL HSSSSYH RHERSH (SEQ ID NO: 105)	8.69
NVL	NVL.T>G	p.T370P	APCIIFIDEID AIPPKREVAS KDMERR (SEQ ID NO: 106)	是	是	APCIIFIDE IDAIPPKR EVA (SEQ ID NO: 107)	DEIDAIPP KREVAS DMERR (SEQ ID NO: 108)	18.42
MATN1	MATN1.T>G	p.T153P	SRSPDISKVV IVVPDGRPQ DSVQDVSA (SEQ ID NO: 109)	是	是	SRSPDISK VVIVVPD GRPQD (SEQ ID NO: 110)	KVVIVVP DGRPQDS VQDVSA (SEQ ID NO: 111)	0.14
CTNNA2	CTNNA2.A>C	p.N351H	VRQALQDLL SEYMHNTGR KEKGDPLNI (SEQ ID NO: 112)	是	否	VRQALQD LLSEYMH NTGRKE (SEQ ID NO: 113)	LLSEYMH NTGRKEK GDPLNI (SEQ ID NO: 114)	2.36
GET4	GET4.T>G	p.L65R	RYMSQSKHT EARERMYSG ALLFFSHGQ (SEQ ID NO: 115)	是	否	RYMSQSK HTEARER MYSGAL (SEQ ID NO: 116)	HTEARER MYSGALL FFSHGQ (SEQ ID NO: 117)	26.97
NTNG1	NTNG1.G>A	p.V271I	TVTDLRIRLL RPAIGEIVD ELHLARY (SEQ ID NO: 118)	是	是	TVTDLRIR LLRPAIGE IFVD (SEQ ID NO: 119)	RLLRPAIG EIFVDELH LARY (SEQ ID NO: 120)	0.73
SPTBN5	SPTBN5.G>A	p.T3127I	TLLDDAWLT TKAAIAESQ DYGDLEGV (SEQ ID NO: 121)	是	是	TLLDDAW LTTKAAI AESQDY (SEQ ID NO: 122)	LTTKAAI AESQDYG QDLEGV (SEQ ID NO: 123)	1.11
DPP6	DPP6.C>T	p.S113L	LLVILVICSLI VTLVILLTPA EDNSLS (SEQ ID NO: 124)	是	否	LLVILVIC SLIVTLVI LLTP (SEQ ID NO: 125)	CSLIVTLV ILLTPAED NSLS (SEQ ID NO: 126)	0.03
HIAT1	HIAT1.G>T	p.G93C	VKGILLSFLS APLICALSDV	是	否	VKGILLSF LSAPLICA	LSAPLICA LSDVWGR	46.71

样品	亚.nt	亚.aa	27-mer aa 序列	DNA 中的突变	RNA 中的突变	20-me 肽 1	20-me 肽 2	RNA 中的 TPM
[0206]			WGRKSFLL (SEQ ID NO: 127)			LSDVW (SEQ ID NO: 128)	KSFLL (SEQ ID NO: 129)	
	ITGA4	ITGA4.G>T	p.V359F	是	否	GSGAVM NAMETNL FGSDKYA (SEQ ID NO: 131)	AMETNLF GSDKYAA RFGESI (SEQ ID NO: 132)	4.59
	MYO1A	MYO1A.C>T	p.V1017I	是	否	SVRFKEN SVAVKVI QGPAGG (SEQ ID NO: 134)	SVAVKVI QGPAGGD NSKLRY (SEQ ID NO: 135)	0.05

[0207] 还测定了每个突变的染色体位置(使用GRCh37/hg19参考装配)和变异等位基因频率(VAF),但未在表1中示出。BRAF^{V600E}突变的VAF为35.4%。

[0208] T细胞对这些潜在的新抗原的应答,是通过用20个突变中的每一个侧接的肽库,刺激外周血单核细胞(PBMC)来评估的,所述外周血单核细胞从TIL治疗后的患者处获得。未检测到对候选的新抗原的CD8⁺ T细胞应答;然而,对包括BRAF^{V600E}的20-mer肽的CD4⁺ T细胞特异性应答进行了识别。BRAF^{V600E}-反应性T细胞,通过IFN- γ 捕获进行纯化,并显示其能够识别用突变而非野生型BRAF肽脉冲的自体B细胞,从而确认突变肽的特异性(图1B)。为了确定BRAF^{V600E}是否被II类MHC+APC处理和呈现,自体B细胞用mRNA进行转染,所述mRNA编码靶向胞内体的野生型或突变的BRAF序列。T细胞识别的B细胞表达突变,而非野生型BRAF(图1C)。

[0209] 识别被抗HLA-DQ而非抗I类或抗HLA-DR抗体阻断,识别HLA-DQ作为可能的限制性等位基因(图1D)。对已知基因型的多个B细胞系的分析表明,受HLA-DQA1*03与HLA-DQB1*03配对的限制,对DQB1*0301的识别较弱,而对DQB1*0302和DQB1*0303的识别更强(图1F和表2)。

[0210] 表2.在存在或不存在抗原的情况下,通过BRAF^{V600E}-特异性CD4⁺ T细胞,与表达不同的II类等位基因的同种异体B-LCL细胞系一起孵化后,产生IFN- γ 。

[0211]

Cell line	BRAF V600E 肽	平均 IFN-G pg/ml	HLA DRB1	HLA DQB1
1331	-	10	404	302
	+	41791		
CFS	-	10	0401, 0101	0301, 0501
	+	1547		
DEM	-	23	0401, 1602	0302, 0502
	+	29873		
DEU	-	6	401	301
	+	10359		
FAL	-	9	0403, 0801	03BG, 0402
	+	31620		
BM14	-	536	401	302
	+	42832		
DMB	-	38	0101, 1501	0501, 0602
	+	7		
DLM	-	26	0403, 0801	03BG, 0402
	+	39388		
AMM	-	6	0802, 1501	0402, 06WG
	+	9		
CLC	-	9	0301, 1104	02AB, 0301
	+	6		
BP	-	35	1601, 1101	0502, 0301
	+	36		
JWP	-	12	0701, 0701	02AB, 0303
	+	359		
DAH2	-	17	09, 1501	0303, 06W6
	+	49784		
VRM	-	6	0701, 10	0303, 0501
	+	188		

[0212] 完整的患者HLA分选如下:A*11:01:01/A*24:02:01;B*15:01:01/B*40:01:02;C*03:03:01/C*03:04:01;DPA1*01:03:01/DPA1*01:03:01;DPB1*04:01:01/DPB1*04:01:01;DQA1*03:01:01/DQA1*03:02;DQB1*03:02:01/DQB1*03:03:02;DRB1*04:03:01/DRB1*09:01:02;DRB4*01:03:01/DRB4*01:03:02。

[0213] 当用突变肽脉冲时,通过BRAF^{V600E}-特异性CD4⁺ T细胞识别了B-LCL,所述B-LCL用HLA-DQA1*03或DQB1*0302,但不是紧密连接的HLA-DRB1*04转染,确认了HLA的限制(图1E)。

[0214] 对三个具有HLA-DQB1*0302和BRAF^{V600E}基因型的黑色素瘤细胞系,进行了识别测验。一个表达最多HLA-DQ量的肿瘤细胞系,被BRAF^{V600E}-特异性CD4⁺ T细胞识别,证明了通过

肿瘤细胞可以直接表达表位(图1G-1I)。肿瘤特异性CD4⁺T细胞,可通过直接杀伤细胞和释放细胞因子,而具有抗肿瘤活性(参见,例如,Quezada et al., J.Exp.Med.207 (3):637-650 (2010); Manici et al., J.Exp.Med.189 (5):871-876 (1999)),但其主要作用是,通过许可APC和产生细胞因子来支持CD8⁺T细胞的发展和功能(参见,例如Sun and Bevan, Science 300 (5617):339-342 (2003); Williams et al., Nature 441 (7095):890-893 (2006))。尽管过继性转移的TIL含有BRAF^{V600E}-特异性CD4⁺ T细胞,但CD8⁺ T细胞是TIL的主要人群(表3)。简单地说,通过流式细胞仪分析注入患者体内的最终TIL产物的表型,并在PMA/离子霉素刺激后,在细胞内进行细胞因子染色。表3示出的百分比为CD45⁺细胞(顶部)或CD4或CD8细胞(底部)的百分比。

[0215] 表3. 最终TIL产物的表型

[0216]	寿命的%	CD45 的%					
	CD45	CD3 T	Γδ T	NKT	CD8T	CD4T	Treg
	99.9	99.7	0.04	0.014	93.9	3.4	0.52
	CD45 的%						
	CD8P1	CD8 TIM3	CD8 TM	CD8 幼稚	CD8 EMRA	CD8EM	
	51.6	93.4	0.002	0.003	36.5	58.6	
	CD8 或 CD4 的%						
	CD8 IFN-γ ⁺	CD4 IL17 ⁺	CD4 IL22	CD4 IFN-γ ⁺			
	99.3	3.6	0.42	98.8			

[0217] 此外,通过自体肿瘤刺激多个独立的TIL培养物,产生的大部分IFN-γ,其被HLA的I类阻断抗体阻断(表4)。

[0218] 表4. 初始TIL培养物的肿瘤特异性与I级阻断

[0219]

	库 T	库 R	库 B	库 A	库 S	库 1	库 2	库 3	库 4	库 5	库 6	碎片. 12
肿瘤	2179 .50	752. 12	2993. 64	4427. 63	2313. 73	3409. 99	7213. 00	3722. 50	3866. 23	2914. 58	3916 .23	2.44
肿瘤+ I 级阻断	94.3 2	11.95	67.49	38.78	67.88	75.74	394.6 8	258.8 8	86.28	369.3 2	513. 78	2.44
仅媒介	2.44	52.7 1	67.56	2.44	2.44	40.87	16.52	131.4 0	2.44	2.44	21.2 2	2.44
PMA/ Iono	2010 .14	360. 33	2563. 22	2929. 14	1203. 62	2038. 37	1565. 83	1454. 78	2757. 56	2012. 09	2155 .09	2.44
% 阻断	96%	98%	98%	99%	97%	98%	95%	93%	98%	87%	87%	0%

[0220] 当TIL与自体B细胞培养时,没有观察到IFN- γ 的产生,所述自体B细胞的肽库包含了由肿瘤外显子测序识别的所有20个非同义突变(图2A),但是IFN- γ 是在与B细胞共培养后产生的,所述B细胞用来自谱系限制性自身抗原(酪氨酸酶、Mart-1、TRP2)和癌睾丸抗原(Mage A3)脉冲,它们是黑色素瘤中T细胞的已知目标(参见,例如,Gros et al.Nat.Med.2016)(图2F),或用含有29个非同义突变,或酪氨酸酶、MAGE-A3、Mart1、SSX2和GP100编码序列的串联微基因(图2B-2E)进行转染。因此,患者TIL含有BRAF^{V600E}-特异性CD4⁺T细胞,和对自身抗原的不同CD8⁺T细胞应答。

[0221] 临床方案

[0222] 所述患者已经在FDA批准的IND下,以及弗雷德·哈钦森(Fred Hutchinson)癌症研究中心机构审查委员会批准的临床方案(FHCRC 2643;NCT01807182)下进行了登记用于TIL生成。患有IV期或III期黑色素瘤患者,不太可能通过手术治愈,其年龄>18岁,ECOG</=1,具有可以安全切除或活检的转移性疾病的部位,符合条件。TIL是从6,000IU/ml重组IL-2(Proleukin;Novartis)中的肿瘤片段中延伸出来的,使用的方法是国立癌症研究所外科分支机构开发的(例如,Dudley et al.,J.Immunother.24(4):363-373(2002))。TIL培养物是基于细胞生长和自体肿瘤细胞反应性来选择的,其是与自体肿瘤细胞共培养后,通过IFN- γ 分泌确定的。TIL冷冻保存至需要使用,然后解冻并使用快速膨胀方案,进行进一步膨胀,如先前所述(Riddell and Greenberg,J.Immunological Methods 128(2):189-201(1990))。按照环磷酸腺苷60mg/kg/天 $\times$ 2天,然后氟达拉滨25mg/m²/天 $\times$ 5天的淋巴清除化疗方案,将扩增的TIL对患者进行给药。在TIL输注后24小时内,所述患者每8小时接受600,000IU/kg的高剂量IL-2的IV,共9次。在主要提供者的判断下,在第6、12和24周,然后每3-6个月,使用RECIST版本1.1和CT和MRI评估肿瘤应答。

[0223] 用于外显子组捕获和RNA测序的核酸制备

[0224] 治疗后的血液用于分离非肿瘤DNA。一种来源于髓淋巴结肿瘤复发的单细胞悬液,被流式分选(碘化丙啶阴性和CD45阴性),以消耗大量浸润淋巴细胞,并富集肿瘤细胞。正常组织和已分选的肿瘤细胞用Qiagen-DNA/RNA-AllPrep Micro试剂盒处理,进行分离DNA,用于外显子组捕获,并保留RNA进行随后的RNA序列分析。基因组DNA浓度在Invitrogen

Qubit®2.0荧光计 (Life Technologies Invitrogen, 卡尔斯巴德, 加利福尼亚, 美国) 和 Trinean DropSense96分光光度计 (Caliper Life Sciences, 霍普金顿 (Hopkinton), 马赛诸塞 (MA)) 上定量。

[0225] 全外显子组序列测定

[0226] 使用Agilent SureSelectXT试剂盒制备外显子序列库, 并使用Agilent All Human Exon v6 (Agilent Technologies, 圣克拉拉, 加利福尼亚, 美国) 分离外显子目标。使用Covaris LE220聚焦超声仪 (Covaris, Inc., 沃本 (Woburn), 马赛诸塞, 美国) 和Sciclone NGSx工作站 (PerkinElmer, 沃尔瑟姆 (Waltham), 马赛诸塞, 美国) 制备并捕获的文库, 对200ng的基因组DNA进行片段化。使用Agilent 2200 TapeStation验证了库大小分布。使用Life Technologies' Invitrogen Qubit®2.0荧光计, 执行额外的库QC、合并索引库的混合, 和集群优化。

[0227] 在Illumina HiSeq 2500上使用成对末端100bp (PE100) 策略, 对结果库测序。使用Illumina's Real Time Analysis v1.18软件, 进行图像分析和基本调用, 接着使用Illumina的bcl2fastq转换软件V1.84 (http://support.illumina.com/downloads/bcl2fastq_conversion_software_184.html), 对索引读取和FASTQ文件的生成进行“多路分解”。保留通过标准Illumina质量过滤器的测序对 (read pairs), 以供进一步分析, 产生77M肿瘤测序对和89M个正常测序对。使用BWA-MEM短测序比对仪, 将测序对与人类基因组参考 (GRCh37/hg19) 对齐 (参见, 例如, arXiv preprint arXiv:1303.3997 (2013); Li and Rudin, Bioinformatics 25 (14):1754-1760)。以标准BAM格式生成的校准文件, 通过Picard 2.0.1和GATK3.5[37]处理, 根据推荐的最佳实践进行质量分数重新校准、索引重新校准, 和重复删除 (参见Current Protocols in Bioinformatics pp.11.10.1-11.10.33 (2013))。

[0228] 使用三个独立的软件包, 从已分析准备的肿瘤和正常的BAM文件中 (MuTect 1.1.7 [39]、Strelka 1.0.14[40]和VarScan.v2.4.1), 调用体细胞突变 (Koboldt et al., Genome Res. 22 (3):568-576 (2012))。使用Oncotator注释了所有工具, 以VCF格式进行的变体调用 (Ramos et al., Human Mutation 36 (4):E2423-E2429 (2015))。错义体细胞变异被结合并进一步注释, 包括野生型和变异肽序列, 以形成一个完整的摘要, 从其中选择候选肽进行合成。

[0229] RNA序列数据处理

[0230] 为了对通过观察到的表达水平, 对候选肽进行排名, 对来自同一单细胞悬液的流式分选的肿瘤细胞进行了RNA-seq。利用TruSeq RNA样品制备v2试剂盒 (美国加利福尼亚州圣地亚哥市的Illumina Inc.) 和Sciclone NGSx工作站 (美国马赛诸塞州沃尔瑟姆市的PerkinElmer), 从总RNA中制备RNA序列库。使用Agilent 2200 TapeStation (美国加利福尼亚州圣克拉拉市的Agilent Technologies) 验证了库的规模的分布。使用Life Technologies的Invitrogen Qubit®2.0荧光计 (美国加利福尼亚州卡尔斯巴德市的Life Technologies Invitrogen) 执行附加库QC、合并索引库d的混合和集群优化。在Illumina HiSeq 2500上对该库进行测序, 以产生133M 50nt的测序对 (PE50)。使用RSEM 1.2.19, 将读数与RefSeq衍生的参考转录组对齐 (参见Li and Dewar, BMC Bioinformatics 12 (1):323 (2011))。RSEM的基因水平表达值, 以TPM为单位, 添加到错义体细胞变异的总结中。

[0231] T细胞培养

[0232] 使用从Elim Biopharma获得的重叠的20-mer粗肽进行初始刺激,其中2个肽跨越每个突变,突变具有的突变残基位于20个氨基酸序列的+7或+13位。随后的实验在+11位置,用纯度大于80%的,具有V600(野生型)或E600(突变型)的21mer肽进行。冷冻保存的PBMC在CTL(含有L-谷氨酰胺和HEPES的RPMI培养基(Gibco))中解冻并放置过夜,并补充了10%的人类血清(内部生产)、50 μ M的 β -巯基乙醇、青霉素和链霉素、4mM的L-谷氨酰胺和2ng/ml的重组人类IL-7(Peprotech)。次日早上,洗涤PBMC,在6孔板的每孔5ml的CTL中,以10e6个细胞刺激,所述库中含1 μ g/ml的不含细胞因子的每种肽。在第+3天将重组IL-2(Peprotech)添加到最终浓度为10u/ml,并在第+3天、+6天和+9天,使用添加的IL-2进行一半介质的更换。在+13天,细胞被用于ELISA和细胞因子染色分析。

[0233] 按照制造商的说明,抗原特异性T细胞的富集,是通过使用IFN- γ 分泌试验APC(Miltenyi),对活细胞分泌的IFN- γ 进行染色,并使用自体B细胞作为抗原呈递细胞,用10 μ g/ml的21-mer BRAF突变肽进行脉冲,来进行的。CD4⁺IFN- γ 分泌细胞按FACS Aria2分选。将分选后的细胞在补充有10ng/ml人类IL-15的CTL中静置5天,然后使用前面描述的快速扩增方案进行扩增(Riddell和Greenberg,同上)。通过分选V β 3.1阳性进一步富集抗原特异性T细胞,通过抗V β 3.1(Thermo Scientific,型号.TCR2740)染色,CD4⁺细胞进行了扩增,并在扩增后第13天或第14天冷冻保存。在分析之前,将冷冻保存的细胞解冻,并在补充有10U/ml IL-2的CTL中过夜。

[0234] 抗原呈递细胞

[0235] 使用涂有识别CD19的抗体的磁珠(Miltenyi,型号130-050-301),和根据制造商的说明(Miltenyi,型号130-042)进行磁阳性选择,从新鲜或解冻的PBMC中分离自体B细胞。如前描述,原始B细胞与表达人类CD40L的NIH 3T3细胞,以1:1的比例,在B细胞培养基中孵化7天,并补充200U/ml的人类IL-4(Peprotech)(参见Tran et al.,Science 344(3184):641-645(2014))。随后每隔3天,采集B细胞并用3T3CD40L和新鲜介质重新刺激。B细胞用于刺激2或3天的+3天的分析。

[0236] 细胞因子释放分析

[0237] 在ELISA分析中,50000个效应T细胞在96孔圆形底板中孵化,所述底板上有100,000个B细胞或B-LCL系,RPMI(Gibco)中有10 μ g/ml或特定浓度的肽,并补充5%的热灭活的胎牛血清。上清液中的IFN- γ 用现有的人类IFN- γ 的ELISA试剂盒(ebiosciences)定量,技术上重复三次。用20 μ g/ml的抗I类抗体(Biolegend,型号311411)抗HLA-DR(克隆L243,型号307611)和HLA-DQ(Abcam,克隆spv-13,型号ab23632),在添加肽前1小时添加。在elispot分析中,50,000个肿瘤浸润淋巴细胞与200,000个自体B细胞一起孵化,用人类IFN- γ 的ELISpot-Pro试剂盒(Mabtech),在CTL介质中,以10 μ g/ml的每种肽的最终浓度脉冲肽库,并按照制造商的说明进行开发。

[0238] HLA识别

[0239] 利用LCL细胞系1331、DUCAF、VAVY、BM14、DEM和DEU。在共培养分析中,用10 μ g/ml的BRAF突变肽或DMSO对照,将LCL细胞系脉冲4小时,然后在ELISA分析前,用PBS洗涤3次。为了识别特定的II类等位基因,使用GenestringsTM(Life Sciences)合成了密码子优化线性DNA片段,所述DNA片段编码了HLA-DRB1 0404蛋白,或通过T2A跳跃序列与HLA-DQA1 0301蛋白相连的HLA-DQB1 0302蛋白,并克隆到载体MP71中(Engels et al.,Hum.Gene Ther.14

(12):1155-1168 (2003)), 所述载体MP71使用NEBuilder克隆试剂盒(新英格兰生物实验室)进行NotI和EcoRI (Thermo Fisher) 线性化, 并验证序列。如Sommermeyer等人(Leukemia, 2015)) 所述, 将逆转录病毒转导到HLA DRB1 0301、DQA1 0501和DQB1 0201 (研究细胞库) 同型结合的VAVY细胞系中。用抗体DRB1-PE (Biolegend, 型号362303) 在FACSAria2分选器上, 对DRB1 0404阳性的细胞进行分选。使用抗DQ抗体克隆HLADQ1-FITC (Biolegend, 型号318104), 对抗体DRB1-PE (Biolegend, 型号362303) 和DQB1 03DQA1 03阳性细胞进行分选。在对BRAF^{V600E}肽进行或不进行脉冲的情况下, 进行分析。ELISA实验按照指示, 技术上重复进行两次或三次, 分别代表两个独立的实验。

[0240] 实例2

[0241] 通过TIL识别TCR基因的使用

[0242] 深度测序用于识别BRAF^{V600E}-特异性T细胞和TIL中的其他T细胞的使用。三种TCR V β 克隆型, 在用BRAF^{V600E}肽刺激治疗PBMC后, 表现出明显的扩增, 这些序列在IFN- γ 捕获后进一步富集, 表明它们对突变肽具有特异性(图2G)。TIL输注前获得的肿瘤、TIL和PBMC的TCR V β 测序, 识别了肿瘤中的所有3个TCR V β 克隆, TIL中3个克隆中的2个。3个TCR V β 序列均低于治疗前PBMC的检测水平, 表明在肿瘤位点富集(图2H)。共有34个共同的V β 序列共同地构成了>50%的TIL产物(图2I)。在这34个克隆中, 只有5个在预处理血液中被检测到, 其中4个在非常低的频率下(图2J)。为了评估识别4种谱系特异性或C/T抗原各自的CD8⁺ T细胞的TCR基因使用情况, 用IFN- γ 捕获法对这些TIL细胞进行分选, 并评估TCR V β 的使用情况。在分选的细胞中识别出7种不同的V β 序列, 占TIL产物中T细胞的4.7% (图2L-2O)。在治疗后10个月和24个月采集的血液中, 检测到这7个克隆型和一个BRAF-特异性克隆(图2J和2K)。采用通过Kreiter et al. 所描述的方法, 进行针对胞内体的RNA表达(J. Immunol. 180 (1): 309-318 (2008)), 其中抗原通过将抗原与I类MHC分选信号融合而靶向胞内体。mRNA表达结构物pJV57, 是由基因合成(Geneart, Life Sciences) 构建, 其中包括一个T7启动子, 所述启动子与人类HLA-B基因的N端25个氨基酸融合, 然后接有BamHI限制位点、增强的GFP的编码序列、AgeI限制位点、人类HLA-B基因的C端55个氨基酸, 然后接有人类 β 珠蛋白未翻译区, 然后接有一条30核苷酸的聚 α 尾, 然后接有一个SapI限制性位点, 在聚 α 尾中定向切割。通过将以下片段连接到AgeI/BamHI消化的pJV57中, 来克隆结构物pJV84: 编码BRAF氨基酸575-624的退火寡核苷酸(超聚体, 集成DNA技术), 其两侧有包括E600取代基的5' AgeI和3' BamHI位点。结构物pJV85是通过连接编码BRAF氨基酸575-624的退火寡核苷酸(Ultramers, Integrated DNA Technologies) 制备的, 其两侧有包括野生型V600氨基酸的5' AgeI和3' BamHI位点。然后根据制造商的说明, 用SapI (Thermo Fisher) 将pJV84和pJV85线性化, 使用Highscribe T7ARCA mRNA试剂盒(新英格兰生物实验室) 在体外转录mRNA, 并通过锂沉淀纯化。如Tran et al. (同上) 所述, 在共培养实验前16小时, 将mRNA电穿孔到CD40L刺激的B细胞中。

[0243] 实例3

[0244] TIL产物的表型特征

[0245] TIL处理后对BRAF-特异性克隆进行表型分析(图3A-3C)。BRAF^{V600E}-特异性CD4⁺ T细胞显示出效应记忆表型(CD45RA⁻CCR7⁻CD27⁻KLRG1⁺), 并表达低水平的PD-1(图3A、3B)。大多数BRAF^{V600E}-特异性细胞表达CXCR3和CCR4。一部分细胞也表达归巢标记皮肤淋巴细胞相

关的抗原 (CLA)。BRAF^{V600E}肽激活的细胞产生 IFN- γ 、TNF- α 、IL-4 和 IL-21 (图 3C), 有时合并 (数据未显示)。综上所述, 这些数据表明, TIL 融合后循环 BRAF-特异性 CD4⁺ T 细胞, 具有混合的 Th1/Th2 表型, 这与已建立的针对黑色素瘤突变 BRAF 的记忆细胞免疫应答是一致的。

[0246] 实例4

[0247] BRAF^{V600E} TCR 的构造和测试

[0248] 仅自身抗原反应性 CD8⁺ T 细胞的过继性转移后, 黑色素瘤的持久缓解极为罕见 (参见, 例如, Johnson et al., Blood 114 (3):535-546 (2009); Yee et al., PNAS 99 (25):16168-16173 (2002); Dudley et al., J. Immunother. 24 (4):363-373 (2001))。在不希望被理论束缚的情况下, 人们相信 BRAF^{V600E}-特异性 CD4⁺ T 细胞, 提供直接的抗肿瘤效果, 并有助于自身抗原反应性 CD8⁺ T 细胞对抗含有少量新抗原的肿瘤的持久性和功能。在国际组织相容性工作组数据库中, 29% 的个人存在 BRAF^{V600E}-特异性 CD4⁺ T 细胞的 HLA-DQA1*03/DQB1*03 限制性等位基因 (Petersdorf, E., personal communication, International Histocompatibility Working Group in Hematopoietic Cell Transplantation. 2017), 并且从该患者身上分离 BRAF^{V600E}-特异性 TCR 基因, 能促进具有 TCR 工程化 T 细胞的 BRAF 突变肿瘤患者的过继性治疗。对具有不同 BRAF 活性克隆水平的样本进行 TCR V α 测序, 识别了四 (4) 个 TCR V α 序列, 其频率与三 (3) 个 TCR V β 序列相关 (图 2G)。

[0249] 从识别的三 (3) 个 TCRB 等位基因和四 (4) 个 TRCA 等位基因中, 构建了四 (4) 个 TCR, 并测试了抗原特异性应答 (图 4A, 4B 和 5)。患者的显性 TCR (pJV88) 在两个健康供体的 CD4⁺ T 细胞中表达, 并赋予表达 BRAF^{V600E} 而非野生型 BRAF 序列的细胞特异性 (图 2H)。TCR pJV90, 其由患者的第二主要 V β 克隆和一条可能的 α 链组成, 其显示出一定的活性, 但也可能具有非特异性的基线激活。

[0250] TCR V β 和 V α 测序

[0251] 根据制造商的说明, 使用 Qiagen DNeasy 或 Qiamp 微量 DNA 试剂盒, 从临床样本中分离 DNA。TCRB 测序是按照制造商的说明使用人类 TCRB 测序工具包 (Adaptive Biotechnology) 进行的, 然后使用 MiSeq (Fred Hutchinson 癌症研究中心基因学核心) 进行测序, 其数据分析通过适应性生物技术软件进行。TCRA 测序是使用人类 TCRA 测序服务 (适应性生物技术) 进行的。

[0252] T 细胞受体的构建

[0253] TCR 的构建是在载体 PRRL 中进行的 (Jones et al., Hum. Gene Ther. 20 (6):630-640 (2009)), 其用 β 链, 通过将六个点突变引入初始密码子, 和土拨鼠肝炎病毒 X 蛋白的推定启动子区域, 如 Lim and Brown, RNA Biology 13 (9):743-747 (2016)) 中所述, 随后通过 P2A 翻译跳过序列, 随后通过在 α 链中引入了半胱氨酸, 来促进配对, 从而对其进行了进一步修改 (参见 Kuball et al., Blood 109 (6):2331-2338 (2007))。合成了一个密码子优化的 DNA 片段, 所述片段包含 TRBV28 和 CDR3 和 TRBJ1-3 序列, 然后接有 TCRB1 序列, 其在残基 57 处取代了半胱氨酸, 然后接有 P2A 跳跃序列和 TRAV21 和 CDR3 序列, 然后接有 TRAJ43 和 TRAC 序列合成的基因串 (Life Sciences), 并使用 NEBuilder 克隆试剂盒 (新英格兰生物实验室) 将其克隆到载体 PRRL-SIN 中, 所述载体 PRRL-SIN 用 PstI 和 AscI (Thermo Fisher) 线性化, 并验证序列。转导后一周, 使用抗体克隆 8F10 (Thermo Scientific, 型号 TCR2740) 基于 Vbeta3.1 表达, 对细胞进行分选, 并如上所述通过快速扩增进行扩增。在快速扩增的第 14 天, 将 T 细胞用

于检测或冷冻保存。

[0254] 实例5

[0255] CRISPR介导的内源性TCR缺失导致转基因BRAF-特异性的TCR表达增加

[0256] 将合成的T细胞受体序列基因转移到T细胞后,转移的TCR α 和 β 链可能与内源性TCR亚基竞争,以表达和信号机制。为了研究内源性TCR的缺失是否增加了转移的TCR的表达,首先用CRISPR-Cas9核糖核蛋白转染受刺激的T细胞,其引导RNA序列导向内源性TCR α (引导rna:AGAGTCTCTCAGCTGGTACA;SEQ ID NO:136) 和TCR β (引导rna:GGAGAATGACGAGTGGACCC;SEQ ID NO:139) 恒定结构域基因(摘自Ren et al., Clin. Cancer Res. 23 (9):2255-2266 (2017))。组装了12uM Cas9蛋白(IDT) 和20uM带有电穿孔增强剂(IDT) 的引导RNA(IDT),并在核转染缓冲液P3 (Lonza) 中用抗CD3/抗CD28Dynabeads (Thermo-Fisher) 刺激2天后,将3u1加入2e6主要人类T细胞中,并使用AMAXA4D核转染电穿孔仪(Lonza) 进行核转染,使用程序EH-115。通过对TCR受体复合物的CD3成分进行染色测量,这种组合导致具有TCR表达的细胞减少>99% (图6A)。当内源TCR的基因缺失与BRAF^{V600E}-特异性TCR的基因转移相结合时,通过四聚体染色测量,观察到转移的T细胞受体在细胞表面的表达增加(图6B)。

[0257] 可以结合上述各种实施例,以提供进一步的实施例。本说明书中提及和/或申请数据表中列出的所有美国专利、美国专利申请公布文件、美国专利申请、外国专利、外国专利申请和非专利出版物,包括2017年8月11日提交的第62/544,695号美国临时专利申请,它们的全部内容均通过引用并入本文。如有必要,可以修改多方面的实施例,以利用各种专利、申请和出版物的概念来提供进一步的实施例。

[0258] 鉴于上述详细描述,可以对实施例进行这些和其他更改。一般地,在以下权利要求中,所使用的术语不应解释为将权利要求限定为说明书和权利要求书中公开的特定实施例,而应被解释为包括所有可能的实施例,以及这些权利要求有权享有的等同物的全部范围。因此,权利要求不受本公开的限制。

序列表

<110> 弗雷德哈钦森癌症研究中心

华盛顿大学

J·维奇

S·R·里德尔

S·李

<120> BRAF特异性TCR及其用途

<130> 360056.454W0

<140> PCT/US2018/046350

<141> 2018-08-10

<150> US 62/544,695

<151> 2017-08-11

<160> 149

<170> Windows版本4.0的FastSEQ

<210> 1

<211> 137

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR1 α 链可变结构域

<400> 1

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

Arg Gly Asn Asn Asp Met Arg Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Thr Val

115 120 125

Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro

130	135
<210> 2	
<211> 135	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成序列 TCR2-1 α 链可变结构域	
<400> 2	
Met Arg Leu Val Ala Arg Val Thr Val Phe Leu Thr Phe Gly Thr Ile	
1 5 10 15	
Ile Asp Ala Lys Thr Thr Gln Pro Thr Ser Met Asp Cys Ala Glu Gly	
20 25 30	
Arg Ala Ala Asn Leu Pro Cys Asn His Ser Thr Ile Ser Gly Asn Glu	
35 40 45	
Tyr Val Tyr Trp Tyr Arg Gln Ile His Ser Gln Gly Pro Gln Tyr Ile	
50 55 60	
Ile His Gly Leu Lys Asn Asn Glu Thr Asn Glu Met Ala Ser Leu Ile	
65 70 75 80	
Ile Thr Glu Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Ile Leu Pro His Ala Thr	
85 90 95	
Leu Arg Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ile Val Arg Ala Tyr Ser Gly	
100 105 110	
Tyr Ser Thr Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Met Leu Leu Val Ser Pro	
115 120 125	
Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro	
130 135	
<210> 3	
<211> 142	
<212> PRT	
<213> 人工序列	
<220>	
<223> 合成序列 TCR2-2 α 链可变结构域	
<400> 3	
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
Ile Thr Leu Asn Asn Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly		
	115	120 125
Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro Asp Pro		
130	135	140

<210> 4

<211> 138

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 TCR3 α 链可变结构域

<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
Thr Ser Asn Ala Gly Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr		
	115	120 125
Val Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro		
130	135	

<210> 5

<211> 132

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR1 β 链可变结构域

<400> 5

```

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

```

<210> 6

<211> 130

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR2 β 链可变结构域

<400> 6

```

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

```

65	70	75	80
Glu Gly Tyr Ser Val	Ser Arg Glu Lys Lys	Glu Arg Phe Ser	Leu Ile
	85	90	95
Leu Glu Ser Ala Ser	Thr Asn Gln Thr	Ser Met Tyr Leu	Cys Ala Ser
	100	105	110
Gly Ala Arg Gln Ile	Pro Tyr Thr Phe	Gly Ser Gly Thr	Arg Leu Thr
	115	120	125

Val Val

130

<210> 7

<211> 140

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 TCR3 β 链可变结构域

<400> 7

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

<210> 8

<211> 287

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCRBV28-01

<400> 8

gatgtgaaag taaccacagag ctcgagatat ctagtcaaaa ggacgggaga gaaagttttt 60
ctggaatgtg tccaggatat ggaccatgaa aatatgttct ggtatcgaca agaccaggt 120
ctggggctac ggctgatcta tttctcatat gatgttaaaa tgaaagaaaa aggagatatt 180
cctgaggggt acagtgtctc tagagagaag aaggagcgct tctccctgat tctggagtcc 240
gccagcacca accagacatc tatgtacctc tgtgccagca gtttatg 287

<210> 9

<211> 50

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCRBJ01-03

<400> 9

ctctggaaac accatatatt ttggagaggg aagttggctc actgtttag 50

<210> 10

<211> 48

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCRBJ01-02

<400> 10

ctaactatgg ctacaccttc ggttcgggga ccaggtaac cgtttag 48

<210> 11

<211> 279

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCRAV21-01

<400> 11

aaacaggagg tgacgcagat tcctgcagct ctgagtgtcc cagaaggaga aaacttggtt 60
ctcaactgca gtttactga tagcgtatt tacaacctcc agtggttag gcaggacct 120
gggaaaggtc tcacatctct gttgcttatt cagtcaagtc agagagagca aacaagtgga 180
agacttaatg cctcgctgga taaatcatca ggacgtagta ctttatacat tgcagcttct 240
cagcctggtg actcagccac ctacctctgt gctgtgagg 279

<210> 12

<211> 277

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCRAV26-01

<400> 12

gatgctaaga ccacccagcc cccctccatg gattgcgctg aaggaagagc tgcaaacctg 60
ccttgtaatc actctacat cagtggaaat gagtatgtgt attggtatcg acagattcac 120
tcccaggggc cacagtatat cattcatggt ctaaaaaaca atgaaaccaa tgaaatggcc 180
tctctgatca tcacagaaga cagaaagtcc agcaccttga tcctgccccca cgctacgctg 240
agagacactg ctgtgtacta ttgcatcgtc agagtcg 277

<210> 13

<211> 277

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCRAV12-02

<400> 13

cagaaggagg tggagcagaa ttctggaccc ctcagtgttc cagagggagc cattgcctct 60
ctcaactgca cttacagtga ccgaggttcc cagtccttct tctggtacag acaatattct 120
gggaaaagcc ctgagttgat aatgttcata tactccaatg gtgacaaaga agatggaagg 180
tttacagcac agctcaataa agccagccag tatgtttctc tgctcatcag agactcccag 240
cccagtgatt cagccaccta cctctgtgcc gtgaaca 277

<210> 14

<211> 54

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCRAJ43-01

<400> 14

acaataacaa tgacatgcgc tttggagcag ggaccagact gacagtaaaa ccaa 54

<210> 15

<211> 60

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCRAJ11-01

<400> 15

tgaattcagg atacagcacc ctcacctttg ggaaggggac tatgcttcta gtctctccag 60

<210> 16

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCRAJ39-01

<400> 16

tgaataataa tgcaggcaac atgctcacct ttggaggggg aacaagggtta atggtcaaac 60
ccc 63

<210> 17

<211> 59

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCRAJ27-01

<400> 17

taacaccaat gcaggcaaat caacctttgg ggatgggact acgctcactg tgaagccaa 59

<210> 18

<211> 409

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR1 α 链可变结构域

<400> 18

atggaaacac tgctgggcct gctgacctg ttgctgcaac tgcaatgggt gtccagcaag 60
caagaagtga ctgagatccc tgccgctctg tctgtgcctg agggcgaaaa cctggtcctg 120
aactgcagct tcaccgacag cgccatctac aacctgcagt ggttcaggca ggatccaggc 180
aagggcctga catccctgct gctgattcag agcagccaga gagagcagac cagcggcaga 240
ctgaatgcca gcctggataa gtcctccggc agaagcacc tgtatatcgc cgcttctcag 300
ccaggcgata gcgccacata tctgtgtgcc gtccggagag gcaacaacga catgagattc 360
ggagccggca ccagactgac cgtgaagccc aacattcaga accccgatc 409

<210> 19

<211> 403

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 TCR2-1 α 链可变结构域

<400> 19

atgagactgg tggccagagt gacagtgttc ctgaccttcg gcaccatcat cgacgccaaag 60
accacacagc ccaccagcat ggattgtgcc gagggcagag ctgccaacct gccttgtaat 120
cacagcacca tcagcggcaa cgagtacgtg tacttgtaca ggcagatcca ctctcagggc 180
cctcagtaca tcatccacgg cctgaagaac aacgagacaa acgagatggc ctctctgatc 240

atcaccgagg accgcaagag cagcaccctg attctgcctc acgccacact gagagacacc 300
gccgtgtact actgtatcgt gcgggcctac agcggctaca gcacactgac atttggcaag 360
ggcaccatgc tgctcgtgtc cccagacatt cagaaccccg atc 403

<210> 20

<211> 424

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 TCR2-2 α 链可变结构域

<400> 20

atgaagtccc tgagagtgct gctgggtcatc ctgtggctgc agctgtcttg ggtctggtcc 60
cagcagaaaag aggtggaaca gaacagcggc cctctgtctg ttctgaagg cgctatcgcc 120
tctctgaatt gcacctacag cgacagaggc agccagagct tcttctggta tcggcagtac 180
agcggcaaga gccccgagct gatcatgttc atctacagca acggcgacaa agaggacggc 240
cggtttacag cccagctgaa caaggccagc cagtacgtgt cactgctgat cagagacagc 300
cagcctagcg acagcgccac ctatctgtgt gccgtgatca ccctgaacaa caacgccggc 360
aacatgctga cctttggcgg cggaacacgg ctgatggtta agccccacat tcagaacccc 420
gatc 424

<210> 21

<211> 412

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR3 α 链可变结构域

<400> 21

atgaagtccc tgagagtgct gctgggtcatc ctgtggctgc agctgtcttg ggtctggtcc 60
cagcagaaaag aggtggaaca gaacagcggc cctctgtccg ttctgaagg cgccattgct 120
agcctgaatt gcacctacag cgaccggggc agccagagct tcttctggta taggcagtac 180
agcggcaaga gccccgagct gatcatgttc atctacagca acggcgacaa agaggacggc 240
cggtttacag cccagctgaa caaggccagc cagtacgtgt cactgctgat cagagacagc 300
cagcctagcg acagcgccac ctatctgtgt gccgtgacaa gcaatgccgg caagtccaca 360
tttggcgacg gcacaaccct gaccgtgaag cccaacattc agaaccccg tc 412

<210> 22

<211> 396

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR1 β 链可变结构域

<400> 22

atgggaatta gactgctgtg cagagtggcc ttctgcttcc tggctgttgg cctggtggac 60
 gtgaaagtga cccagagcag cagatacctg gtcaagagaa ccggcgagaa ggtgttcctg 120
 gaatgcgtgc aggacatgga ccacgagaat atgttctggt acagacagga ccccggcctg 180
 ggcctgagac tgatctactt cagctacgac gtgaagatga aggaaaagg cgacatcccc 240
 gagggctaca gcgtgtccag agagaagaaa gagcggttca gcctgaccc ggaaagcgcc 300
 agcaccaacc agaccagcat gtacctgtgc gccagcaacg agggcaatag cggcaacacc 360
 atctacttcg gcgaaggcag ctggctgacc gtggtg 396

<210> 23

<211> 390

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR2 β 链可变结构域

<400> 23

atgggaatta gactgctgtg cagagtggcc ttctgcttcc tggctgttgg cctggtggac 60
 gtgaaagtga cccagagcag cagatacctg gtcaagagaa ccggcgagaa ggtgttcctg 120
 gaatgcgtgc aggacatgga ccacgagaat atgttctggt acagacagga ccccggcctg 180
 ggcctgagac tgatctactt cagctacgac gtgaagatga aggaaaagg cgacatcccc 240
 gagggctaca gcgtgtccag agagaagaaa gagcggttca gcctgaccc ggaaagcgcc 300
 agcaccaacc agaccagcat gtacctgtgt gccagcggcg ccagacagat cccttacaca 360
 tttggctccg gcaccagact gaccgtggtg 390

<210> 24

<211> 420

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR3 β 链可变结构域

<400> 24

atgggaatta gactgctgtg cagagtggcc ttctgcttcc tggctgttgg cctggtggac 60
 gtgaaagtga cccagagcag cagatacctg gtcaagagaa ccggcgagaa ggtgttcctg 120
 gaatgcgtgc aggacatgga ccacgagaat atgttctggt acagacagga ccccggcctg 180
 ggcctgagac tgatctactt cagctacgac gtgaagatga aggaaaagg cgacatcccc 240
 gagggctaca gcgtgtccag agagaagaaa gagcggttca gcctgaccc ggaaagcgcc 300
 agcaccaacc agaccagcat gtacctgtgt gccagctctc tgtctgctgc cggcgaggcg 360
 tatggctaca ccttcaatta cggctacaca ttcggcagcg gcaccagact gaccgtggtg 420

<210> 25

<211> 134

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR α 链恒定结构域

<400> 25

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

<210> 26

<211> 177

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR β 链恒定结构域

<400> 26

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

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

Phe

<210> 27

<211> 407

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR α 恒定结构域

<400> 27

ctgcagtgtgta ccagctgcgg gacagcaaga gcagcgacaa gagcgtgtgc ctgttcaccg 60
 acttcgacag ccagaccaac gtgtcccaga gcaaggacag cgacgtgtac atcaccgata 120
 agtgcgtgct ggacatgcgg agcatggact tcaagagcaa cagcgccgtg gcctgggtcca 180
 acaagagcga cttgcctgc gccaacgcct tcaacaacag cattatcccc gaggacacat 240
 tcttcccaag ccccgagagc agctgcgacg tgaagctggg ggaaaagagc ttcgagacag 300
 acaccaacct gaacttccag aacctcagcg tgatcggcctt ccggtacctg ctgctgaagg 360
 tggccggcctt caacctgctg atgaccctgc ggctgtgggtc cagctga 407

<210> 28

<211> 454

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR β 恒定结构域

<400> 28

gaagatctga acaaagtgtt ccctccagag gtggccgtgt tcgagccttc tgaggccgag 60
 atcagccaca cacagaaagc cacactcgtg tgcttggtcca ccggcttttt tcccgatcac 120
 gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa gaggtgcaca gcggcgtctg taccgatcct 180
 cagcctctga aagagcagcc cgctctgaac gactccagat actgcctgag cagcaggctg 240
 agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc agaaaccact tcagatgcca ggtgcagttc 300
 tacggcctga gcgagaacga tgagtggacc caggatagag ccaagcctgt gacacagatc 360

gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat tgtggcttta cctccgtgtc ctatcagcag 420

ggcgtgctgt ctgccacat cctgtatgag atcc 454

<210> 29

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR1 α 链CDR3

<400> 29

Cys Ala Val Arg Arg Gly Asn Asn Asp Met Arg Phe

1 5 10

<210> 30

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR2-1 α 链CDR3

<400> 30

Cys Ile Val Arg Ala Tyr Ser Gly Tyr Ser Thr Leu Thr Phe

1 5 10

<210> 31

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR2-2 α 链CDR3

<400> 31

Cys Ala Val Ile Thr Leu Asn Asn Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe

1 5 10 15

<210> 32

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR3 α 链CDR3

<400> 32

Cys Ala Val Thr Ser Asn Ala Gly Lys Ser Thr Phe

1 5 10

<210> 33

<211> 14

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR1 β 链CDR3

<400> 33

Cys Ala Ser Asn Glu Gly Asn Ser Gly Asn Thr Ile Tyr Phe

1 5 10

<210> 34

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR2-1 β 链CDR3

<400> 34

Cys Ala Ser Gly Ala Arg Gln Ile Pro Tyr Thr Phe

1 5 10

<210> 35

<211> 16

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR3 β 链CDR3

<400> 35

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

1 5 10 15

<210> 36

<211> 766

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列人类BRAF

<400> 36

Met Ala Ala Leu Ser Gly Gly Gly Gly Gly Gly Ala Glu Pro Gly Gln

1 5 10 15

Ala Leu Phe Asn Gly Asp Met Glu Pro Glu Ala Gly Ala Gly Ala Gly

20 25 30

Ala Ala Ala Ser Ser Ala Ala Asp Pro Ala Ile Pro Glu Glu Val Trp

35 40 45

Asn	Ile	Lys	Gln	Met	Ile	Lys	Leu	Thr	Gln	Glu	His	Ile	Glu	Ala	Leu
50						55					60				
Leu	Asp	Lys	Phe	Gly	Gly	Glu	His	Asn	Pro	Pro	Ser	Ile	Tyr	Leu	Glu
65					70				75					80	
Ala	Tyr	Glu	Glu	Tyr	Thr	Ser	Lys	Leu	Asp	Ala	Leu	Gln	Gln	Arg	Glu
				85				90						95	
Gln	Gln	Leu	Leu	Glu	Ser	Leu	Gly	Asn	Gly	Thr	Asp	Phe	Ser	Val	Ser
				100				105						110	
Ser	Ser	Ala	Ser	Met	Asp	Thr	Val	Thr	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Ser	Leu
				115				120						125	
Ser	Val	Leu	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Val	Phe	Gln	Asn	Pro	Thr	Asp	Val
						135						140			
Ala	Arg	Ser	Asn	Pro	Lys	Ser	Pro	Gln	Lys	Pro	Ile	Val	Arg	Val	Phe
145					150					155					160
Leu	Pro	Asn	Lys	Gln	Arg	Thr	Val	Val	Pro	Ala	Arg	Cys	Gly	Val	Thr
				165					170					175	
Val	Arg	Asp	Ser	Leu	Lys	Lys	Ala	Leu	Met	Met	Arg	Gly	Leu	Ile	Pro
				180					185					190	
Glu	Cys	Cys	Ala	Val	Tyr	Arg	Ile	Gln	Asp	Gly	Glu	Lys	Lys	Pro	Ile
				195				200						205	
Gly	Trp	Asp	Thr	Asp	Ile	Ser	Trp	Leu	Thr	Gly	Glu	Glu	Leu	His	Val
						215								220	
Glu	Val	Leu	Glu	Asn	Val	Pro	Leu	Thr	Thr	His	Asn	Phe	Val	Arg	Lys
225					230					235					240
Thr	Phe	Phe	Thr	Leu	Ala	Phe	Cys	Asp	Phe	Cys	Arg	Lys	Leu	Leu	Phe
				245					250					255	
Gln	Gly	Phe	Arg	Cys	Gln	Thr	Cys	Gly	Tyr	Lys	Phe	His	Gln	Arg	Cys
				260				265						270	
Ser	Thr	Glu	Val	Pro	Leu	Met	Cys	Val	Asn	Tyr	Asp	Gln	Leu	Asp	Leu
				275				280						285	
Leu	Phe	Val	Ser	Lys	Phe	Phe	Glu	His	His	Pro	Ile	Pro	Gln	Glu	Glu
				290				295						300	
Ala	Ser	Leu	Ala	Glu	Thr	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Ser	Ser	Pro	Ser	Ala
305					310					315					320
Pro	Ala	Ser	Asp	Ser	Ile	Gly	Pro	Gln	Ile	Leu	Thr	Ser	Pro	Ser	Pro
				325					330					335	
Ser	Lys	Ser	Ile	Pro	Ile	Pro	Gln	Pro	Phe	Arg	Pro	Ala	Asp	Glu	Asp
				340					345					350	
His	Arg	Asn	Gln	Phe	Gly	Gln	Arg	Asp	Arg	Ser	Ser	Ser	Ala	Pro	Asn

355	360	365
Val His Ile Asn Thr Ile Glu Pro Val Asn Ile Asp Asp Leu Ile Arg		
370	375	380
Asp Gln Gly Phe Arg Gly Asp Gly Gly Ser Thr Thr Gly Leu Ser Ala		
385	390	395
Thr Pro Pro Ala Ser Leu Pro Gly Ser Leu Thr Asn Val Lys Ala Leu		400
405	410	415
Gln Lys Ser Pro Gly Pro Gln Arg Glu Arg Lys Ser Ser Ser Ser Ser		
420	425	430
Glu Asp Arg Asn Arg Met Lys Thr Leu Gly Arg Arg Asp Ser Ser Asp		
435	440	445
Asp Trp Glu Ile Pro Asp Gly Gln Ile Thr Val Gly Gln Arg Ile Gly		
450	455	460
Ser Gly Ser Phe Gly Thr Val Tyr Lys Gly Lys Trp His Gly Asp Val		
465	470	475
Ala Val Lys Met Leu Asn Val Thr Ala Pro Thr Pro Gln Gln Leu Gln		
485	490	495
Ala Phe Lys Asn Glu Val Gly Val Leu Arg Lys Thr Arg His Val Asn		
500	505	510
Ile Leu Leu Phe Met Gly Tyr Ser Thr Lys Pro Gln Leu Ala Ile Val		
515	520	525
Thr Gln Trp Cys Glu Gly Ser Ser Leu Tyr His His Leu His Ile Ile		
530	535	540
Glu Thr Lys Phe Glu Met Ile Lys Leu Ile Asp Ile Ala Arg Gln Thr		
545	550	555
Ala Gln Gly Met Asp Tyr Leu His Ala Lys Ser Ile Ile His Arg Asp		
565	570	575
Leu Lys Ser Asn Asn Ile Phe Leu His Glu Asp Leu Thr Val Lys Ile		
580	585	590
Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Val Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His		
595	600	605
Gln Phe Glu Gln Leu Ser Gly Ser Ile Leu Trp Met Ala Pro Glu Val		
610	615	620
Ile Arg Met Gln Asp Lys Asn Pro Tyr Ser Phe Gln Ser Asp Val Tyr		
625	630	635
Ala Phe Gly Ile Val Leu Tyr Glu Leu Met Thr Gly Gln Leu Pro Tyr		
645	650	655
Ser Asn Ile Asn Asn Arg Asp Gln Ile Ile Phe Met Val Gly Arg Gly		
660	665	670

Tyr Leu Ser Pro Asp Leu Ser Lys Val Arg Ser Asn Cys Pro Lys Ala
 675 680 685
 Met Lys Arg Leu Met Ala Glu Cys Leu Lys Lys Lys Arg Asp Glu Arg
 690 695 700
 Pro Leu Phe Pro Gln Ile Leu Ala Ser Ile Glu Leu Leu Ala Arg Ser
 705 710 715 720
 Leu Pro Lys Ile His Arg Ser Ala Ser Glu Pro Ser Leu Asn Arg Ala
 725 730 735
 Gly Phe Gln Thr Glu Asp Phe Ser Leu Tyr Ala Cys Ala Ser Pro Lys
 740 745 750
 Thr Pro Ile Gln Ala Gly Gly Tyr Gly Ala Phe Pro Val His
 755 760 765

<210> 37

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列27-mer BRAFV600E肽

<400> 37

Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Glu Lys Ser
 1 5 10 15
 Arg Trp Ser Gly Ser His Gln Phe Glu Gln Leu
 20 25

<210> 38

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列20-mer BRAFV600E肽

<400> 38

Asp Leu Thr Val Lys Ile Gly Asp Phe Gly Leu Ala Thr Glu Lys Ser
 1 5 10 15
 Arg Trp Ser Gly
 20

<210> 39

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列20-mer BRAFV600E肽

<400> 39

Asp Phe Gly Leu Ala Thr Glu Lys Ser Arg Trp Ser Gly Ser His Gln
 1 5 10 15
 Phe Glu Gln Leu
 20

<210> 40

<211> 266

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列HLADRB1

<400> 40

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

Val Thr Ser Pro Leu Thr Val Glu Trp Arg Ala Arg Ser Glu Ser Ala			
210	215	220	
Gln Ser Lys Met Leu Ser Gly Val Gly Gly Phe Val Leu Gly Leu Leu			
225	230	235	240
Phe Leu Gly Ala Gly Leu Phe Ile Tyr Phe Arg Asn Gln Lys Gly His			
	245	250	255
Ser Gly Leu Gln Pro Thr Gly Phe Leu Ser			
	260	265	
<210> 41			
<211> 261			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成序列HLADQB10302			
<400> 41			
Met Ser Trp Lys Lys Ala Leu Arg Ile Pro Gly Gly Leu Arg Val Ala			
1	5	10	15
Thr Val Thr Leu Met Leu Ala Met Leu Ser Thr Pro Val Ala Glu Gly			
	20	25	30
Arg Asp Ser Pro Glu Asp Phe Val Tyr Gln Phe Lys Gly Met Cys Tyr			
	35	40	45
Phe Thr Asn Gly Thr Glu Arg Val Arg Leu Val Thr Arg Tyr Ile Tyr			
	50	55	60
Asn Arg Glu Glu Tyr Ala Arg Phe Asp Ser Asp Val Gly Val Tyr Arg			
65	70	75	80
Ala Val Thr Pro Leu Gly Pro Pro Ala Ala Glu Tyr Trp Asn Ser Gln			
	85	90	95
Lys Glu Val Leu Glu Arg Thr Arg Ala Glu Leu Asp Thr Val Cys Arg			
	100	105	110
His Asn Tyr Gln Leu Glu Leu Arg Thr Thr Leu Gln Arg Arg Val Glu			
	115	120	125
Pro Thr Val Thr Ile Ser Pro Ser Arg Thr Glu Ala Leu Asn His His			
	130	135	140
Asn Leu Leu Val Cys Ser Val Thr Asp Phe Tyr Pro Ala Gln Ile Lys			
145	150	155	160
Val Arg Trp Phe Arg Asn Asp Gln Glu Glu Thr Thr Gly Val Val Ser			
	165	170	175
Thr Pro Leu Ile Arg Asn Gly Asp Trp Thr Phe Gln Ile Leu Val Met			
	180	185	190

Leu Glu Met Thr Pro Gln Arg Gly Asp Val Tyr Thr Cys His Val Glu
 195 200 205
 His Pro Ser Leu Gln Asn Pro Ile Ile Val Glu Trp Arg Ala Gln Ser
 210 215 220
 Glu Ser Ala Gln Ser Lys Met Leu Ser Gly Ile Gly Gly Phe Val Leu
 225 230 235 240
 Gly Leu Ile Phe Leu Gly Leu Gly Leu Ile Ile His His Arg Ser Gln
 245 250 255
 Lys Gly Leu Leu His
 260

<210> 42

<211> 255

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列HLADQA103

<400> 42

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

Leu Thr Phe Leu Pro Ser Ala Asp Glu Ile Tyr Asp Cys Lys Val Glu
 180 185 190
 His Trp Gly Leu Asp Glu Pro Leu Leu Lys His Trp Glu Pro Glu Ile
 195 200 205
 Pro Thr Pro Met Ser Glu Leu Thr Glu Thr Val Val Cys Ala Leu Gly
 210 215 220
 Leu Ser Val Gly Leu Val Gly Ile Val Val Gly Thr Val Leu Ile Ile
 225 230 235 240
 Arg Gly Leu Arg Ser Val Gly Ala Ser Arg His Gln Gly Pro Leu
 245 250 255

<210> 43

<211> 538

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列HLADQB10302-P2A-HLADQBA103

<400> 43

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

Thr	Pro	Leu	Ile	Arg	Asn	Gly	Asp	Trp	Thr	Phe	Gln	Ile	Leu	Val	Met
180				185				190							
Leu	Glu	Met	Thr	Pro	Gln	Arg	Gly	Asp	Val	Tyr	Thr	Cys	His	Val	Glu
195				200				205							
His	Pro	Ser	Leu	Gln	Asn	Pro	Ile	Ile	Val	Glu	Trp	Arg	Ala	Gln	Ser
210				215				220							
Glu	Ser	Ala	Gln	Ser	Lys	Met	Leu	Ser	Gly	Ile	Gly	Gly	Phe	Val	Leu
225				230				235				240			
Gly	Leu	Ile	Phe	Leu	Gly	Leu	Gly	Leu	Ile	Ile	His	His	Arg	Ser	Gln
245				250				255							
Lys	Gly	Leu	Leu	His	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys
260				265				270							
Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Met	Ile	Leu	Asn	Lys
275				280				285							
Ala	Leu	Met	Leu	Gly	Ala	Leu	Ala	Leu	Thr	Thr	Val	Met	Ser	Pro	Cys
290				295				300							
Gly	Gly	Glu	Asp	Ile	Val	Ala	Asp	His	Val	Ala	Ser	Tyr	Gly	Val	Asn
305				310				315				320			
Leu	Tyr	Gln	Ser	Tyr	Gly	Pro	Ser	Gly	Gln	Tyr	Ser	His	Glu	Phe	Asp
325				330				335							
Gly	Asp	Glu	Glu	Phe	Tyr	Val	Asp	Leu	Glu	Arg	Lys	Glu	Thr	Val	Trp
340				345				350							
Gln	Leu	Pro	Leu	Phe	Arg	Arg	Phe	Arg	Arg	Phe	Asp	Pro	Gln	Phe	Ala
355				360				365							
Leu	Thr	Asn	Ile	Ala	Val	Leu	Lys	His	Asn	Leu	Asn	Ile	Val	Ile	Lys
370				375				380							
Arg	Ser	Asn	Ser	Thr	Ala	Ala	Thr	Asn	Glu	Val	Pro	Glu	Val	Thr	Val
385				390				395				400			
Phe	Ser	Lys	Ser	Pro	Val	Thr	Leu	Gly	Gln	Pro	Asn	Thr	Leu	Ile	Cys
405				410				415							
Leu	Val	Asp	Asn	Ile	Phe	Pro	Pro	Val	Val	Asn	Ile	Thr	Trp	Leu	Ser
420				425				430							
Asn	Gly	His	Ser	Val	Thr	Glu	Gly	Val	Ser	Glu	Thr	Ser	Phe	Leu	Ser
435				440				445							
Lys	Ser	Asp	His	Ser	Phe	Phe	Lys	Ile	Ser	Tyr	Leu	Thr	Phe	Leu	Pro
450				455				460							
Ser	Ala	Asp	Glu	Ile	Tyr	Asp	Cys	Lys	Val	Glu	His	Trp	Gly	Leu	Asp
465				470				475				480			
Glu	Pro	Leu	Leu	Lys	His	Trp	Glu	Pro	Glu	Ile	Pro	Thr	Pro	Met	Ser

485	490	495
Glu Leu Thr Glu Thr Val Val Cys Ala Leu Gly Leu Ser Val Gly Leu		
500	505	510
Val Gly Ile Val Val Gly Thr Val Leu Ile Ile Arg Gly Leu Arg Ser		
515	520	525
Val Gly Ala Ser Arg His Gln Gly Pro Leu		
530	535	

<210> 44

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列猪破伤风病毒-1 2A (P2A) 肽

<400> 44

ggcagcggcg ccaccaactt tagcctgctg aaacaggctg gcgacgtgga agagaacccc 60
ggacct 66

<210> 45

<211> 66

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列猪破伤风病毒-1 2A (P2A) 肽

<400> 45

ggctctggcg ccaccaactt tagcctgctg aaacaggctg gcgacgtgga agagaacccc 60
ggacct 66

<210> 46

<211> 63

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列塔萨阿西尼亚病毒2A (T2A) 肽

<400> 46

ggaagcggag agggcagagg aagtctgcta acatgcggtg acgtcgagga gaatcctgga 60
cct 63

<210> 47

<211> 69

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列马甲鼻炎病毒(ERAV) 2A (E2A) 肽

<400> 47

ggaagcggac agtgtactaa ttatgctctc ttgaaattgg ctggagatgt tgagagcaac 60
cctggacct 69

<210> 48

<211> 75

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列口蹄疫病毒2A (F2A) 肽

<400> 48

ggaagcggag tgaaacagac tttgaatttt gaccttctca agttggcggg agacgtggag 60
tccaaccctg gacct 75

<210> 49

<211> 22

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列猪破伤风病毒-1 2A (P2A)

<400> 49

Gly	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val
1				5					10					15	
Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro										
				20											

<210> 50

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列塔萨阿西尼亚病毒2A (T2A) 肽

<400> 50

Leu	Glu	Gly	Gly	Gly	Glu	Gly	Arg	Gly	Ser	Leu	Leu	Thr	Cys	Gly	Asp
1				5					10					15	
Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly	Pro	Arg								
				20											

<210> 51

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列马甲鼻炎病毒 (ERAV) 2A (E2A) 肽

<400> 51

Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser

1 5 10 15

Asn Pro Gly Pro

20

<210> 52

<211> 25

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列口蹄疫病毒 2A (F2A) 肽

<400> 52

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

1 5 10 15

Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly Pro

20

25

<210> 53

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列甘氨酸-丝氨酸接头

<400> 53

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

1 5 10 15

<210> 54

<211> 18

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列甘氨酸-丝氨酸接头

<400> 54

Gly Ser Thr Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly

1 5 10 15

Ser Ser

<210> 55

<211> 271

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR1 α 链(全长度)

<400> 55

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	
Arg	Gly	Asn	Asn	Asp	Met	Arg	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	115	120	125	
Lys	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	Cys	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> 56

<211> 269

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR2-1 α 链(全长度)

<400> 56

```

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

```

Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
260 265

<210> 57

<211> 276

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR2-2α链(全长度)

<400> 57

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

Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg
 245 250 255
 Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg
 260 265 270
 Leu Trp Ser Ser
 275
 <210> 58
 <211> 272
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 合成序列TCR3 α 链(全长度)
 <400> 58
 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
 Thr Ser Asn Ala Gly Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr Thr Leu Thr
 115 120 125
 Val Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
 130 135 140
 Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
 145 150 155 160
 Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
 165 170 175
 Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
 180 185 190
 Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe
 195 200 205

Asn	Asn	Ser	Ile	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser
210						215					220				
Ser	Cys	Asp	Val	Lys	Leu	Val	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Thr	Asn
225					230					235					240
Leu	Asn	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu
				245					250					255	
Lys	Val	Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser
			260					265					270		

<210> 59

<211> 309

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR1TCR3α链(全长度)

<400> 59

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

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu
 195 200 205
 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
 225 230 235 240
 Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
 245 250 255
 Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln
 260 265 270
 Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala
 275 280 285
 Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val
 290 295 300

Lys Arg Lys Asp Phe

305

<210> 60

<211> 307

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR2-1和2-2TCR3β链(全长度)

<400> 60

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

Val	Val	Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe
130						135					140				
Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val
145					150					155					160
Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp
				165					170					175	
Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro
			180						185					190	
Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser
			195					200					205		
Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe
			210				215					220			
Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr
225				230						235					240
Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp
				245					250					255	
Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val
			260						265					270	
Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu
			275					280					285		
Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg
			290				295					300			

Lys Asp Phe

305

<210> 61

<211> 317

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR3β链(全长度)

<400> 61

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

Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro			
65	70	75	80
Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile			
	85	90	95
Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser			
	100	105	110
Ser Leu Ser Ala Ala Gly Gly Gly Tyr Gly Tyr Thr Phe Asn Tyr Gly			
	115	120	125
Tyr Thr Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Thr Val Val Glu Asp Leu Asn			
	130	135	140
Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu			
145	150	155	160
Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe			
	165	170	175
Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val			
	180	185	190
His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala			
	195	200	205
Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala			
	210	215	220
Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe			
225	230	235	240
Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro			
	245	250	255
Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly			
	260	265	270
Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu			
	275	280	285
Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser			
	290	295	300
Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe			
305	310	315	

<210> 62

<211> 816

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR1α链(全长度)

<400> 62

atggaaacac tgctgggcct gctgatacctg tggctgcaac tgcaatgggt gtccagcaag 60
 caagaagtga ctacagatccc tgccgctctg tctgtgcctg agggcgaaaa cctggtcctg 120
 aactgcagct tcaccgacag cgccatctac aacctgcagt ggttcaggca ggatccaggc 180
 aagggcctga catccctgct gctgattcag agcagccaga gagagcagac cagcggcaga 240
 ctgaatgcca gcctggataa gtcctccggc agaagcacc tgtatatcgc cgcttctcag 300
 ccaggcgata gcgccacata tctgtgtgcc gttcggagag gcaacaacga catgagattc 360
 ggagccggca ccagactgac cgtgaagccc aacattcaga accccgatcc tgcagtgtac 420
 cagctgcggg acagcaagag cagcgacaag agcgtgtgcc tgttcaccga cttcgacagc 480
 cagaccaacg tgccccagag caaggacagc gacgtgtaca tcaccgataa gtgcgtgctg 540
 gacatgcgga gcatggactt caagagcaac agcgccgtgg cctggtccaa caagagcgac 600
 ttgcctgcg ccaacgcctt caacaacagc attatcccc aggacacatt cttcccaagc 660
 cccgagagca gctgcgacgt gaagctggtg gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg 720
 aacttccaga acctcagcgt gatcggttc cggatcctgc tgctgaaggt ggccggcttc 780
 aacctgctga tgaccctgcg gctgtggtcc agctga 816

<210> 63

<211> 810

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR2-1 α 链(全长度)

<400> 63

atgagactgg tggccagagt gacagtgttc ctgaccttcg gcaccatcat cgacgccaaag 60
 accacacagc ccaccagcat ggattgtgcc gagggcagag ctgccaacct gccttghtaat 120
 cacagcacca tcagcggcaa cgagtacgtg tactggtaca ggcagatcca ctctcagggc 180
 cctcagtaca tcatccacgg cctgaagaac aacgagacaa acgagatggc ctctctgata 240
 atcaccgagg accgcaagag cagcaccttg attctgcctc acgccacact gagagacacc 300
 gccgtgtact actgtatcgt gcgggcctac agcggctaca gcacactgac atttggcaag 360
 ggcacatgct tgctcgtgtc cccagacatt cagaaccccg atcctgcagt gtaccagctg 420
 cgggacagca agagcagcga caagagcgtg tgctgttca ccgacttca cagccagacc 480
 aacgtgtccc agagcaagga cagcgacgtg tacatcacg ataagtgcgt gctggacatg 540
 cggagcatgg acttcaagag caacagcgcc gtggcctggt ccaacaagag cgacttcgcc 600
 tgcgccaacg cttcaacaa cagcattatc cccaggaca cattcttccc aagccccgag 660
 agcagctgct acgtgaagct ggtggaaaag agcttcgaga cagacaccaa cctgaacttc 720
 cagaacctca gcgtgatcgg cttccggatc ctgctgctga aggtggccgg cttcaacctg 780
 ctgatgacct tgcggctgtg gtccagctga 810

<210> 64

<211> 831

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR2-2α链(全长度)

<400> 64

```

atgaagtccc tgagagtgct gctgggtcatc ctgtgggtgc agctgtcttg ggtctggtcc 60
cagcagaaaag aggtggaaca gaacagcggc cctctgtctg ttcctgaagg cgctatcgcc 120
tctctgaatt gcacctacag cgacagaggc agccagagct tcttctggta tcggcagtac 180
agcggcaaga gccccgagct gatcatgttc atctacagca acggcgacaa agaggacggc 240
cggttttacag ccagctgaa caaggccagc cagtacgtgt cactgctgat cagagacagc 300
cagcctagcg acagcgccac ctatctgtgt gccgtgatca ccctgaacaa caacgccggc 360
aacatgctga cctttggcgg cggaacacgg ctgatggtta agccccacat tcagaacccc 420
gatcctgcag tgtaccagct gcgggacagc aagagcagcg acaagagcgt gtgcctgttc 480
accgacttcg acagccagac caacgtgtcc cagagcaagg acagcgacgt gtacatcacc 540
gataagtgcg tgctggacat gcggagcatg gacttcaaga gcaacagcgc cgtggcctgg 600
tccaacaaga gcgacttcgc ctgcgccaac gccttcaaca acagcattat ccccgaggac 660
acattcttcc caagccccga gagcagctgc gacgtgaagc tgggtgaaaa gagcttcgag 720
acagacacca acctgaactt ccagaacctc agcgtgatcg gcttcgggat cctgctgctg 780
aaggtggccg gcttcaacct gctgatgacc ctgcggctgt ggtccagctg a 831

```

<210> 65

<211> 819

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR3α链(全长度)

<400> 65

```

atgaagtccc tgagagtgct gctgggtcatc ctgtgggtgc agctgtcttg ggtctggtcc 60
cagcagaaaag aggtggaaca gaacagcggc cctctgtccg ttcctgaagg cgccattgct 120
agcctgaatt gcacctacag cgaccggggc agccagagct tcttctggta taggcagtac 180
agcggcaaga gccccgagct gatcatgttc atctacagca acggcgacaa agaggacggc 240
cggttttacag ccagctgaa caaggccagc cagtacgtgt cactgctgat cagagacagc 300
cagcctagcg acagcgccac ctatctgtgt gccgtgacaa gcaatgccgg caagtccaca 360
tttggcgacg gcacaaccct gaccgtgaag cccaacattc agaaccgccg tcctgcagtg 420
taccagctgc gggacagcaa gagcagcgac aagagcgtgt gcctgttcac cgacttcgac 480
agccagacca acgtgtccca gagcaaggac agcgacgtgt acatcaccga taagtgcgtg 540
ctggacatgc ggagcatgga cttcaagagc aacagcgccg tggcctggtc caacaagagc 600
gacttcgcct gcgccaacgc cttcaacaac agcattatcc ccgaggacac attcttccca 660
agccccgaga gcagctgcga cgtgaagctg gtggaaaaga gcttcgagac agacaccaac 720
ctgaacttcc agaacctcag cgtgatcggc ttccggatcc tgctgctgaa ggtggccggc 780
ttcaacctgc tgatgaccct gcggctgtgg tccagctga 819

```

<210> 66

<211> 927

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR1 β 链(全长度)

<400> 66

```

atgggaatta gactgctgtg cagagtggcc ttctgcttcc tggctgttgg cctggtggac 60
gtgaaagtga cccagagcag cagatacctg gtcaagagaa ccggcgagaa ggtgttcctg 120
gaatgcgtgc aggacatgga ccacgagaat atgttctggt acagacagga ccccggcctg 180
ggcctgagac tgatctactt cagctacgac gtgaagatga aggaaaaggg cgacatcccc 240
gagggctaca gcgtgtccag agagaagaaa gagcggttca gcctgatacct ggaaagcgcc 300
agcaccaacc agaccagcat gtacctgtgc gccagcaacg agggcaatag cggcaacacc 360
atctacttcg gcgaaggcag ctggctgacc gtggtggaag atctgaacaa agtgttcctt 420
ccagaggtgg ccgtgttcga gccttctgag gccgagatca gccacacaca gaaagccaca 480
ctcgtgtgcc tggccaccgg cttttttccc gatcacgtgg aactgtcttg gtgggtcaac 540
ggcaaagagg tgcacagcgg cgtctgtacc gatcctcagc ctctgaaaga gcagcccgtt 600
ctgaacgact ccagatactg cctgagcagc aggctgagag tgtccgccac cttctggcag 660
aaccccagaa accacttcag atgccaggtg cagttctacg gcctgagcga gaacgatgag 720
tggaccagag atagagccaa gcctgtgaca cagatcgtgt ctgccgaagc ctggggcaga 780
gccgattgtg gctttacctc cgtgtcctat cagcagggcg tgctgtctgc caccatcctg 840
tatgagatcc tgctgggcaa agccactctg tacgccgtgc tgggtgtctgc cctggtgctg 900
atggccatgg tcaagcggaa ggatttt 927

```

<210> 67

<211> 921

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR2-1和2-2 β 链(全长度)

<400> 67

```

atgggaatta gactgctgtg cagagtggcc ttctgcttcc tggctgttgg cctggtggac 60
gtgaaagtga cccagagcag cagatacctg gtcaagagaa ccggcgagaa ggtgttcctg 120
gaatgcgtgc aggacatgga ccacgagaat atgttctggt acagacagga ccccggcctg 180
ggcctgagac tgatctactt cagctacgac gtgaagatga aggaaaaggg cgacatcccc 240
gagggctaca gcgtgtccag agagaagaaa gagcggttca gcctgatacct ggaaagcgcc 300
agcaccaacc agaccagcat gtacctgtgt gccagcggcg ccagacagat cccttacaca 360
tttggtccg gcaccagact gaccgtggtg gaagatctga acaaagtgtt ccctccagag 420
gtggccgtgt tcgagccttc tgaggccgag atcagccaca cacagaaagc cacactcgtg 480
tgccctggcca ccggcttttt tcccgatcac gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa 540
gaggtgcaca gcggcgtctg taccgatcct cagcctctga aagagcagcc cgctctgaac 600

```

gactccagat actgcctgag cagcaggctg agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc 660
 agaaaccact tcagatgcca ggtgcagttc tacggcctga gcgagaacga tgagtggacc 720
 caggatagag ccaagcctgt gacacagatc gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat 780
 tgtggcttta cctccgtgtc ctatcagcag ggcgtgctgt ctgccacat cctgtatgag 840
 atcctgctgg gcaaagccac tctgtacgcc gtgctggtgt ctgccctggt gctgatggcc 900
 atgggtcaagc ggaaggattt t 921

<210> 68

<211> 951

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR3 β 链(全长度)

<400> 68

atgggaatta gactgctgtg cagagtggcc ttctgcttcc tggctgttgg cctggtggac 60
 gtgaaagtga cccagagcag cagatacctg gtcaagagaa ccggcgagaa ggtgttcctg 120
 gaatgcgtgc aggacatgga ccacgagaat atgttctggt acagacagga ccccggcctg 180
 ggcttgagac tgatctactt cagctacgac gtgaagatga aggaaaagg cgacatcccc 240
 gagggctaca gcgtgtccag agagaagaaa gagcggttca gcctgacatc ggaaagcgcc 300
 agcaccaacc agaccagcat gtacctgtgt gccagctctc tgtctgctgc cggcgagggc 360
 tatggctaca ccttcaatta cggctacaca ttccggcagc gcaccagact gaccgtggtg 420
 gaagatctga acaaagtgtt ccctccagag gtggccgtgt tcgagccttc tgaggccgag 480
 atcagccaca cacagaaagc cacactcgtg tgccctggcca ccggcttttt tcccgatcac 540
 gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa gaggtgcaca gcggcgtctg taccgatcct 600
 cagcctctga aagagcagcc cgctctgaac gactccagat actgcctgag cagcaggctg 660
 agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc agaaaccact tcagatgcca ggtgcagttc 720
 tacggcctga gcgagaacga tgagtggacc caggatagag ccaagcctgt gacacagatc 780
 gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat tgtggcttta cctccgtgtc ctatcagcag 840
 ggcgtgctgt ctgccacat cctgtatgag atcctgctgg gcaaagccac tctgtacgcc 900
 gtgctggtgt ctgccctggt gctgatggcc atgggtcaagc ggaaggattt t 951

<210> 69

<211> 602

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR1 (β -P2A- α)

<400> 69

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

1

5

10

15

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

89

Gly Leu Leu Ile Leu Trp Leu Gln Leu Gln Trp Val Ser Ser Lys Gln		
340	345	350
Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val Pro Glu Gly Glu Asn		
355	360	365
Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn Leu Gln		
370	375	380
Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu Leu Ile		
385	390	395
Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala Ser Leu		
405	410	415
Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Ala Ala Ser Gln Pro		
420	425	430
Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Arg Gly Asn Asn Asp		
435	440	445
Met Arg Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Thr Val Lys Pro Asn Ile Gln		
450	455	460
Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp		
465	470	475
Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser		
485	490	495
Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp		
500	505	510
Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn		
515	520	525
Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro		
530	535	540
Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu		
545	550	555
Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu		
565	570	575
Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn		
580	585	590
Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
595	600	

<210> 70

<211> 598

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR2-1 (β -P2A- α)

<400> 70

Met	Gly	Ile	Arg	Leu	Leu	Cys	Arg	Val	Ala	Phe	Cys	Phe	Leu	Ala	Val
1				5					10					15	
Gly	Leu	Val	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Gln	Ser	Ser	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys
			20					25					30		
Arg	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Phe	Leu	Glu	Cys	Val	Gln	Asp	Met	Asp	His
			35				40					45			
Glu	Asn	Met	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu
		50				55				60					
Ile	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Asp	Val	Lys	Met	Lys	Glu	Lys	Gly	Asp	Ile	Pro
65				70					75					80	
Glu	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Lys	Lys	Glu	Arg	Phe	Ser	Leu	Ile
			85					90					95		
Leu	Glu	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn	Gln	Thr	Ser	Met	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser
			100					105					110		
Gly	Ala	Arg	Gln	Ile	Pro	Tyr	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr
			115					120					125		
Val	Val	Glu	Asp	Leu	Asn	Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe
			130				135				140				
Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val
145				150					155					160	
Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp
			165					170					175		
Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro
			180					185					190		
Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser
			195				200					205			
Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe
			210				215				220				
Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp	Thr
225				230					235					240	
Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp
			245					250					255		
Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Val	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly	Val
			260				265						270		
Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu
			275				280					285			
Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys	Arg

290	295	300
Lys Asp Phe Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala		
305	310	315
Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Arg Leu Val Ala Arg Val		
325	330	335
Thr Val Phe Leu Thr Phe Gly Thr Ile Ile Asp Ala Lys Thr Thr Gln		
340	345	350
Pro Thr Ser Met Asp Cys Ala Glu Gly Arg Ala Ala Asn Leu Pro Cys		
355	360	365
Asn His Ser Thr Ile Ser Gly Asn Glu Tyr Val Tyr Trp Tyr Arg Gln		
370	375	380
Ile His Ser Gln Gly Pro Gln Tyr Ile Ile His Gly Leu Lys Asn Asn		
385	390	395
Glu Thr Asn Glu Met Ala Ser Leu Ile Ile Thr Glu Asp Arg Lys Ser		
405	410	415
Ser Thr Leu Ile Leu Pro His Ala Thr Leu Arg Asp Thr Ala Val Tyr		
420	425	430
Tyr Cys Ile Val Arg Ala Tyr Ser Gly Tyr Ser Thr Leu Thr Phe Gly		
435	440	445
Lys Gly Thr Met Leu Leu Val Ser Pro Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro		
450	455	460
Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys		
465	470	475
Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp		
485	490	495
Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met		
500	505	510
Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe		
515	520	525
Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe		
530	535	540
Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser		
545	550	555
Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly		
565	570	575
Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr		
580	585	590
Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
595		

<210> 71

<211> 605

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR2-2氨基酸(β -P2A- α)

<400> 71

```

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

```

Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val		
260	265	270
Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu		
275	280	285
Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg		
290	295	300
Lys Asp Phe Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala		
305	310	315
Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Lys Ser Leu Arg Val Leu		
325	330	335
Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys		
340	345	350
Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile		
355	360	365
Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe		
370	375	380
Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile		
385	390	395
Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn		
405	410	415
Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser		
420	425	430
Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Ile Thr Leu Asn Asn Asn Ala		
435	440	445
Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro		
450	455	460
His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys		
465	470	475
Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr		
485	490	495
Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys		
500	505	510
Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala		
515	520	525
Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser		
530	535	540
Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp		
545	550	555
Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe		

				565					570					575			
Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Ile	Gly	Phe	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala		
				580					585					590			
Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser					
				595				600						605			
<210> 72																	
<211> 476																	
<212> PRT																	
<213> 人工序列																	
<220>																	
<223> 合成序列TCR3 氨基酸(β-P2A-α)																	
<400> 72																	
Met	Gly	Ile	Arg	Leu	Leu	Cys	Arg	Val	Ala	Phe	Cys	Phe	Leu	Ala	Val		
1				5					10					15			
Gly	Leu	Val	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Gln	Ser	Ser	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys		
				20				25					30				
Arg	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Phe	Leu	Glu	Cys	Val	Gln	Asp	Met	Asp	His		
				35				40				45					
Glu	Asn	Met	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu		
				50			55				60						
Ile	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Asp	Val	Lys	Met	Lys	Glu	Lys	Gly	Asp	Ile	Pro		
65					70					75					80		
Glu	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Lys	Lys	Glu	Arg	Phe	Ser	Leu	Ile		
				85				90						95			
Leu	Glu	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn	Gln	Thr	Ser	Met	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser		
				100				105					110				
Ser	Leu	Ser	Ala	Ala	Gly	Gly	Gly	Tyr	Gly	Tyr	Thr	Phe	Asn	Tyr	Gly		
				115				120					125				
Tyr	Thr	Phe	Gly	Ser	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Val	Glu	Asp	Leu	Asn		
				130				135				140					
Lys	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu		
145					150				155					160			
Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe		
				165				170						175			
Phe	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val		
				180				185					190				
His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala		
				195				200					205				
Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala		

210	215	220
Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe		
225	230	235
Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro		240
245	250	255
Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly		
260	265	270
Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu		
275	280	285
Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser		
290	295	300
Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe Gly Ser Gly		
305	310	315
Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn		
325	330	335
Pro Gly Pro Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu		
340	345	350
Gln Leu Ser Trp Val Trp Ser Gln Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser		
355	360	365
Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr		
370	375	380
Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser		
385	390	395
Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys		
405	410	415
Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val		
420	425	430
Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu		
435	440	445
Cys Ala Val Thr Ser Asn Ala Gly Lys Ser Thr Phe Gly Asp Gly Thr		
450	455	460
Thr Leu Thr Val Lys Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp		
465	470	475

<210> 73

<211> 1809

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR1 (β-P2A-α)

<400> 73

atgggaatta gactgctgtg cagagtggcc ttctgcttcc tggctgttgg cctggtggac 60
 gtgaaagtga cccagagcag cagatacctg gtcaagagaa ccggcgagaa ggtgttcctg 120
 gaatgcgtgc aggacatgga ccacgagaat atgttctggt acagacagga ccccggcctg 180
 ggcctgagac tgatctactt cagctacgac gtgaagatga aggaaaagg cgacatcccc 240
 gagggtctaca gcggtgtccag agagaagaaa gagcggttca gcctgatacct ggaaagcgcc 300
 agcaccaacc agaccagcat gtacctgtgc gccagcaacg agggcaatag cggcaacacc 360
 atctacttctg gcgaaggcag ctggctgacc gtggtggaag atctgaacaa agtgttcctt 420
 ccagaggtgg ccgtgttcga gccttctgag gccagatca gccacacaca gaaagccaca 480
 ctcgtgtgcc tggccaccgg cttttttccc gatcacgtgg aactgtcttg gtgggtcaac 540
 ggcaaagagg tgcacagcgg cgtctgtacc gatectcagc ctctgaaaga gcagcccgt 600
 ctgaacgact ccagatactg cctgagcagc aggtgagag tgtccgccac cttctggcag 660
 aaccccagaa accacttcag atgccaggtg cagttctacg gcctgagcga gaacgatgag 720
 tggaccagg atagagccaa gcctgtgaca cagatcgtgt ctgccgaagc ctggggcaga 780
 gccgattgtg gctttacctc cgtgtcctat cagcaggcgg tgctgtctgc caccatcctg 840
 tatgagatcc tgctgggcaa agccactctg tacgccgtgc tgggtgtctgc cctggtgctg 900
 atggccatgg tcaagcggaa ggattttggc agcggcgcca ccaactttag cctgctgaaa 960
 caggctggcg acgtggaaga gaaccccga cctatggaaa cactgctggg cctgctgata 1020
 ctgtggctgc aactgcaatg ggtgtccagc aagcaagaag tgactcagat ccctgccgt 1080
 ctgtctgtgc ctgaggcgga aaacctggc ctgaactgca gttcaccga cagcgccatc 1140
 tacaacctgc agtggttcag gcaggatcca ggcaagggcc tgacatccct gctgctgatt 1200
 cagagcagcc agagagagca gaccagcggc agactgaatg ccagcctgga taagtccctc 1260
 ggcagaagca ccctgtatat cgccgcttct cagccaggcg atagcgccac atatctgtgt 1320
 gccgttcgga gaggcaacaa cgacatgaga ttccggagccg gcaccagact gaccgtgaag 1380
 cccaacattc agaaccccga tcctgcagtg taccagctgc gggacagcaa gagcagcgac 1440
 aagagcgtgt gcctgttcac cgacttcgac agccagacca acgtgtccca gagcaaggac 1500
 agcgacgtgt acatcaccga taagtgcgtg ctggacatgc ggagcatgga cttcaagagc 1560
 aacagcgccg tggcctggc caacaagagc gacttcgcct gcgccaacgc cttcaacaac 1620
 agcattatcc ccgaggacac attcttccca agccccgaga gcagctgcga cgtgaagctg 1680
 gtgaaaaaga gcttcgagac agacaccaac ctgaacttcc agaacctcag cgtgatcggc 1740
 ttccggatcc tgctgctgaa ggtggccggc ttcaacctgc tgatgaccct gcggctgtgg 1800
 tccagctga 1809

<210> 74

<211> 1797

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR2-1 (β -P2A- α)

<400> 74

atgggaatta gactgctgtg cagagtggcc ttctgcttcc tggctgttgg cctggtggac 60
 gtgaaagtga cccagagcag cagatacctg gtcaagagaa ccggcgagaa ggtgttcctg 120
 gaatgcgtgc aggacatgga ccacgagaat atgttctggt acagacagga ccccggcctg 180
 ggcttgagac tgatctactt cagctacgac gtgaagatga aggaaaagg cgacatcccc 240
 gagggctaca gcgtgtccag agagaagaaa gagcggttca gcctgaccc ggaaagcgcc 300
 agcaccaacc agaccagcat gtacctgtgt gccagcggcg ccagacagat cccttacaca 360
 tttggctccg gcaccagact gaccgtggtg gaagatctga acaaagtgtt ccctccagag 420
 gtggccgtgt tcgagccttc tgaggccgag atcagccaca cacagaaagc cacactcgtg 480
 tgcttgacca ccggcttttt tcccgatcac gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa 540
 gaggtgcaca gcggcgctctg taccgatcct cagcctctga aagagcagcc cgctctgaac 600
 gactccagat actgcctgag cagcaggtg agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc 660
 agaaaccact tcagatgcca ggtgcagttc tacggcctga gcgagaacga tgagtggacc 720
 caggatagag ccaagcctgt gacacagatc gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat 780
 tgtggcttta cctccgtgtc ctatcagcag ggcgtgctgt ctgccaccat cctgtatgag 840
 atcctgctgg gcaaagccac tctgtacgcc gtgctggtgt ctgccctggt gctgatggcc 900
 atggtcaagc ggaaggattt tggctctggc gccaccaact ttagcctgct gaaacaggct 960
 ggcgacgtgg aagagaaccc cggacctatg agactggtgg ccagagtgc agtggttcctg 1020
 accttcggca ccatcatcga cgccaagacc acacagccca ccagcatgga ttgtgccgag 1080
 ggagagctg ccaacctgcc ttgtaatcac agcaccatca gcggcaacga gtacgtgtac 1140
 tggtagaggc agatccactc tcagggccct cagtacatca tccacggcct gaagaacaac 1200
 gagacaaacg agatggcctc tctgatcatc accgaggacc gcaagagcag caccctgatt 1260
 ctgcctcacg ccacactgag agacaccgcc gtgtactact gtatcgtgcg ggcctacagc 1320
 ggctacagca cactgacatt tggcaagggc accatgctgc tcgtgtcccc agacattcag 1380
 aaccccgatc ctgcagtgtg ccagctgcgg gacagcaaga gcagcgacaa gagcgtgtgc 1440
 ctgttcaccg acttcgacag ccagaccaac gtgtcccaga gcaaggacag cgacgtgtac 1500
 atcaccgata agtgcgtgct ggacatgcgg agcatggact tcaagagcaa cagcgccgtg 1560
 gcctgggtcca acaagagcga cttcgctgc gccaacgcct tcaacaacag cattatcccc 1620
 gagacacat tcttcccaag ccccgagagc agctgcgacg tgaagctggt ggaaaagagc 1680
 ttcgagacag acaccaacct gaacttcag aacctcagcg tgatcggtt ccggtacctg 1740
 ctgctgaagg tggccggctt caacctgctg atgacctgc ggctgtggtc cagctga 1797

<210> 75

<211> 1818

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列 TCR2-2氨基酸(β -P2A- α)

<400> 75

atgggaatta gactgctgtg cagagtggcc ttctgcttcc tggctgttgg cctggtggac 60
 gtgaaagtga cccagagcag cagatacctg gtcaagagaa ccggcgagaa ggtgttcctg 120

gaatgcgtgc aggacatgga ccacgagaat atgttctggt acagacagga ccccggcctg 180
 ggcctgagac tgatctactt cagctacgac gtgaagatga aggaaaagg cgacatcccc 240
 gagggctaca gcgtgtccag agagaagaaa gagcggttca gcctgaccc ggaaagcgcc 300
 agcaccaacc agaccagcat gtacctgtgt gccagcggcg ccagacagat cccttacaca 360
 tttggctccg gcaccagact gaccgtgggt gaagatctga acaaagtgtt ccctccagag 420
 gtggccgtgt tcgagccttc tgaggccgag atcagccaca cacagaaagc cacactcgtg 480
 tgccctggcca ccggcttttt tcccgatcac gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa 540
 gaggtgcaca gcggcgctctg taccgatcct cagcctctga aagagcagcc cgctctgaac 600
 gactccagat actgcctgag cagcaggtg agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc 660
 agaaaccact tcagatgcca ggtgcagttc tacggcctga gcgagaacga tgagtggacc 720
 caggatagag ccaagcctgt gacacagatc gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat 780
 tgttgcttta cctccgtgtc ctatcagcag ggcgtgctgt ctgccaccat cctgtatgag 840
 atcctgctgg gcaaagccac tctgtacgcc gtgtggtgt ctgccctggt gctgatggcc 900
 atggtcaagc ggaaggattt tggtcttggc gccaccaact ttagcctgct gaaacaggct 960
 ggcgacgtgg aagagaaccc cggacctatg aagtcctga gagtgtgct ggtcatcctg 1020
 tggctgcagc tgtcttgggt ctggtcccag cagaaagagg tggaacagaa cagcggccct 1080
 ctgtctgttc ctgaaggcgc tatcgctct ctgaattgca cctacagcga cagaggcagc 1140
 cagagcttct tctggtatcg gcagtacagc ggcaagagcc ccgagctgat catgttcatc 1200
 tacagcaacg gcgacaaaga ggacggccgg ttacagccc agctgaacaa ggccagccag 1260
 tacgtgtcac tgctgatcag agacagccag cctagcgaca gcgccaccta tctgtgtgcc 1320
 gtgatcacc tgaacaacaa cgccggcaac atgctgacct ttggcggcgg aacacggctg 1380
 atggttaagc cccacattca gaacccgat cctgcagtgt accagctgcg ggacagcaag 1440
 agcagcgaca agagcgtgtg cctgttcacc gacttcgaca gccagaccaa cgtgtcccag 1500
 agcaaggaca gcgacgtgta catcaccgat aagtgcgtgc tggacatgcg gagcatggac 1560
 ttcaagagca acagcgccgt ggcctggtcc aacaagagcg acttcgcctg cgccaacgcc 1620
 ttcaacaaca gcattatccc cgaggacaca ttcttccaa gccccgagag cagctgcgac 1680
 gtgaagctgg tggaaaagag cttcgagaca gacaccaacc tgaacttcca gaacctcagc 1740
 gtgatcggct tccggatcct gctgctgaag gtggccggct tcaacctgct gatgaccctg 1800
 cggctgtggt ccagctga 1818

<210> 76

<211> 1429

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TCR3 氨基酸(β -P2A- α)

<400> 76

atgggaatta gactgctgtg cagagtggcc ttctgcttcc tggctgttgg cctggtggac 60
 gtgaaagtga cccagagcag cagatacctg gtcaagagaa ccggcgagaa ggtgttccctg 120
 gaatgcgtgc aggacatgga ccacgagaat atgttctggt acagacagga ccccggcctg 180

ggccctgagac tgatctactt cagctacgac gtgaagatga aggaaaaggg cgacatcccc 240
 gagggctaca gcgtgtccag agagaagaaa gagcggttca gcctgaccc gaaagcgcc 300
 agcaccaacc agaccagcat gtacctgtgt gccagctctc tgtctgctgc cggcggaggc 360
 tatggctaca ccttcaatta cggctacaca ttccggcagcg gcaccagact gaccgtggtg 420
 gaagatctga acaaagtgtt ccctccagag gtggccgtgt tcgagccttc tgaggccgag 480
 atcagccaca cacagaaagc cactctctgt tgcctggcca ccggcttttt tcccgatcac 540
 gtggaactgt cttggtgggt caacggcaaa gaggtgcaca gcggcgtctg taccgatcct 600
 cagcctctga aagagcagcc cgctctgaac gactccagat actgcctgag cagcaggctg 660
 agagtgtccg ccaccttctg gcagaacccc agaaaccact tcagatgcca ggtgcagtcc 720
 tacggcctga gcgagaacga tgagtggacc caggatagag ccaagcctgt gacacagatc 780
 gtgtctgccg aagcctgggg cagagccgat tgtggcttta cctccgtgtc ctatcagcag 840
 ggctgtctgt ctgccaccat cctgtatgag atcctgctgg gcaaagccac tctgtacgcc 900
 gtgtctggtgt ctgccctggt gctgatggcc atggtcaagc ggaaggattt tggcagcggc 960
 gccaccaact ttagcctgct gaaacaggct ggcgacgtgg aagagaaccc cggacctatg 1020
 aagtccctga gagtgctgct ggtcatcctg tggctgcagc tgtcttgggt ctggtccag 1080
 cagaaagagg tggaacagaa cagcggccct ctgtccgttc ctgaaggcgc cattgctagc 1140
 ctgaattgca cctacagcga ccggggcagc cagagcttct tctggtatag gcagtacagc 1200
 ggcaagagcc ccgagctgat catgttcac tacagcaacg gcgacaaaga ggacggccgg 1260
 ttacagccc agctgaacaa ggccagccag tacgtgtcac tgctgatcag agacagccag 1320
 cctagcgaca gcgccaccta tctgtgtgcc gtgacaagca atgccggcaa gtccacattt 1380
 ggccgacggca caacctgac cgtgaagccc aacattcaga accccgatc 1429

<210> 77

<211> 8298

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列pRRLSIN-P2A-aWPRE-PST1

<400> 77

tcgagggaat gaaagacccc acctgtaggt ttggcaagct agcttaagta acgccatttt 60
 gcaaggcatg gaaaatacat aactgagaat agagaagttc agatcaaggt taggaacaga 120
 gagacagcag aatatgggcc aaacaggata tctgtggtta gcagttcctg ccccggtcca 180
 gggccaagaa cagatggtcc ccagatgcgg tcccgccctc agcagtttct agagaacat 240
 cagatgtttc cagggtgccc caaggacctg aaaatgacct tgtgccttat ttgaactaac 300
 caatcagttc gcttctcgtt tctgttcgct cgcttctgct ccccgagctc aataaaagag 360
 cccacaaccc ctcaactcggc gcgccggcca ccatgagcaa ccaggtgctg tgctgcgtgg 420
 tgctgtgttt cctgggcgcc aacaccgtgg acggcggcat caccagagc cccaagtacc 480
 tggtccggaa agagggccag aacgtcacc tgagctgcga gcagaacctg aaccacgacg 540
 ccatgtactg gtacagacag gaccccgac agggcctgct gctgatctac tacagccaga 600
 tcgtgaacga cttccagaag ggagatatcg ccgagggcta cagcgtgtcc agagagaaga 660

```

aagagtcctt cccactgacc gtgaccagcg cccagaagaa cccaccgcc ttctacctgt 720
gcgccagctc tcctggcgcc ctgtacgagc agtacttcgg ccctggcacc cggctgacag 780
tgaccgagga cctgaagaac gtgttcccc cagaggtggc cgtgttcgag cctagcgagg 840
ccgagatcag ccacacccag aaagccacc tcgtgtgcct ggccaccggc ttttaccgcc 900
accacgtgga actgtcttgg tgggtcaacg gcaaagaggt gcacagcggc gtctgcaccg 960
acccccagcc cctgaaagag cagcccgcct tgaacgacag ccggtactgt ctgagcagca 1020
gactgagagt gtccgccacc ttctggcaga cccccggaa ccacttcaga tgccagggtgc 1080
agttctacgg cctgagcgag aacgacgagt ggaccagga ccgggccaag cccgtgacct 1140
agatcgtgtc tgctgaggcc tggggcagag ccgattgcgg cttcaccagc gagagctacc 1200
agcagggcgt gctgagcgcc accatcctgt acgagatcct gctgggcaag gccaccctgt 1260
acgccgtgct ggtgtccgcc ctggtgctga tggccatggt caagcggaag gacagccggg 1320
gcggttccgg agccacgaac ttctctctgt taaagcaagc aggagacgtg gaagaaaacc 1380
ccggtcccat gaccagcatc cgggccgtgt tcattctcct gtggctgcag ctggacctcg 1440
tcaacggcga gaacgtggaa cagcacccca gcacctgag cgtgcaggaa ggcgacagcg 1500
ccgtcatcaa gtgcacctac agcgactccg ccagcaacta cttcccctgg tacaagcagg 1560
aactgggcaa gcggccccag ctgatcatcg acatccggtc caacgtgggc gagaagaagg 1620
accagcggat cgccgtgacc ctgaacaaga ccgccaagca cttcagcctg cacatcaccg 1680
agacacagcc cgaggactcc gccgtgtact tctgtgccgc caccgaggac taccagctga 1740
tctggggagc cggcaccaag ctgatcatta agcccgacat ccagaacccc gacctgcag 1800
tgtaccagct gcgggacagc aagagcagcg acaagagcgt gtgcctgttc accgacttcg 1860
acagccagac caacgtgtcc cagagcaagg acagcgacgt gtacatcacc gataagtgcg 1920
tgctggacat gcggagcatg gacttcaaga gcaacagcgc cgtggcctgg tccaacaaga 1980
gcgacttcgc ctgcgccaac gccttcaaca acagcattat ccccgaggac acattcttcc 2040
caagccccga gagcagctgc gacgtgaagc tgggtggaaa gagcttcgag acagacacca 2100
acctgaactt ccagaacctc agcgtgatcg gcttcggat cctgctgctg aaggtggccg 2160
gcttcaacct gctgatgacc ctgcggctgt ggtccagctg agtcgacaat caacctctgg 2220
attacaaaat ttgtgaaaga ttgactggta ttcttaacta tgttgctcct tttacgctat 2280
gtggatacgc tgctttaatg cttttgtatc atgctattgc ttcccgtatg gctttcattt 2340
tctcctcctt gtataaatcc tggttgctgt ctctttatga ggagttgtgg cccgttgtca 2400
ggcaacgtgg cgtggtgtgc actgtgtttg ctgacgcaac cccactgggt tggggcattg 2460
ccaccacctg tcagctcctt tccgggactt tcgctttccc cctccctatt gccacggcgg 2520
aactcatcgc cgctgcctt gcccgctgct ggacaggggc tcggctgttg ggcactgaca 2580
attccgtggg gttgtcgggg aaatcatcgt ctttcccttg gctgctcgcc tgtgttgcca 2640
cctggattct gcgcgggacg tccttctgct acgtcccttc ggccctcaat ccagcggacc 2700
ttccttcccg cgccctgctg ccggtctgct ggctcttccc gcgtcttcgc cttegccttc 2760
agacgagtcg gatctccctt tgggccgcct ccccgctgg aattcgagct cggtaacctt 2820
aagaccaatg acttacaagg cagctgtaga tcttagccac tttttaaaag aaaagggggg 2880
actggaaggg ctaattcact cccaacgaag acaagatctg ctttttgctt gtactgggtc 2940
tctctggtta gaccagatct gagcctggga gctctctggc taactaggga acccactgct 3000

```

```

taagcctcaa taaagcttgc cttgagtgc tcaagtagtg tgtgcccgtc tgttgtgtga 3060
ctctggtaac tagagatccc tcagaccctt ttagtcagtg tggaaaatct ctagcagtag 3120
tagttcatgt catcttatta ttcagtatit ataacttgca aagaaatgaa tatcagagag 3180
tgagaggaac ttgtttattg cagcttataa tggttacaaa taaagcaata gcatcacaaa 3240
tttcacaaat aaagcatttt tttactgca ttctagttgt ggtttgtcca aactcatcaa 3300
tgtatcttat catgtctggc tctagctatc ccgcccctaa ctccgcccag ttccgcccag 3360
tctccgcccc atggctgact aatTTTTTTT atttatgcag aggccgaggc cgcctcggcc 3420
tctgagctat tccagaagta gtgaggaggc ttttttggag gcctaggctt ttgcgtcgag 3480
acgtacccaa ttcgccctat agtgagtcgt attacgcgcg ctactggcc gtcgttttac 3540
aacgtcgtga ctgggaaaaac cctggcgta cccaacttaa tcgccttgca gcacatcccc 3600
ctttcgccag ctggcgtaat agcgaagagg ccgcaccga tcgcccttcc caacagttgc 3660
gcagcctgaa tggcgaatgg cgcgacgcgc cctgtagcgg cgcattaagc gcggcgggtg 3720
tggtggttac gcgcagcgtg accgtacac ttgccagcgc cctagcgcgc gtccttttcg 3780
ctttcttccc ttcttttctc gccacgttcg ccggttttcc ccgtcaagct ctaaateggg 3840
ggctcccttt agggttccga tttagtgtt tacggcacct cgaccccaaa aaacttgatt 3900
agggtgatgg ttcacgtagt gggccatcgc cctgatagac ggtttttcgc cttttgacgt 3960
tgaggtccac gttctttaat agtggactct tgttccaaac tggaacaaca ctcaacccta 4020
tctcggctta ttcttttgat ttataaggga ttttgccgat ttcggcctat tggttaaaaa 4080
atgagctgat ttaacaaaaa tttacgcga attttaacaa aatattaacg tttacaattt 4140
cccaggtggc acttttcggg gaaatgtgcg cggaaccctt atttgtttat ttttctaat 4200
acattcaaat atgtatccgc tcatgagaca ataaccctga taaatgcttc aataatattg 4260
aaaaaggaag agtatgagta ttcaacattt ccgtgtcgc cttattccct tttttgcggc 4320
attttgcctt cctgtttttg ctacccaga aacgttggtg aaagtaaaag atgctgaaga 4380
tcagttgggt gcacgagtgg gttacatcga actggatctc aacagcggta agatccttga 4440
gagttttcgc cccgaagaac gttttccaat gatgagcact tttaaagttc tgctatgtgg 4500
cgcggtatta tcccgtattg acgccgggca agagcaactc gtcgccgca tacactattc 4560
tcagaatgac ttggttgagt actcaccagt cacagaaaag catcttacgg atggcatgac 4620
agtaagagaa ttatgcagtg ctgccataac catgagtgat aacactgcgg ccaacttact 4680
tctgacaacg atcggaggac cgaaggagct aaccgctttt ttgcacaaca tgggggatca 4740
tgtaactcgc cttgatcgtt gggaaccgga gctgaatgaa gccataccaa acgacgagcg 4800
tgacaccacg atgcctgtag caatggcaac aacgttgccg aaactattaa ctggcgaact 4860
acttactcta gcttcccggc aacaattaat agactggatg gaggcggata aagttgcagg 4920
accacttctg cgctcggccc ttccggttg ctggtttatt gctgataaat ctggagccgg 4980
tgagcgtggg tctcgcggta tcattgcagc actggggcca gatggttaagc cctcccgtat 5040
cgtagttatc tacacgacgg ggagtcaggc aactatggat gaacgaaata gacagatcgc 5100
tgagataggt gcctcactga ttaagcattg gtaactgtca gaccaagttt actcatatat 5160
acttttagatt gatttaaaac ttcattttta atttaaaagg atctagtgta agatcctttt 5220
tgataatctc atgacaaaaa tcccttaacg tgagtttttc ttccactgag cgtcagaccc 5280
cgtagaaaag atcaaaggat cttcttgaga tccttttttt ctgcgcgtaa tctgctgctt 5340

```

gcaaacaaaa aaaccaccgc taccagcggg ggtttgtttg ccgatcaag agctaccaac 5400
tctttttccg aaggtaactg gcttcagcag agcgcagata ccaaatactg tccttctagt 5460
gtagccgtag ttaggccacc acttcaagaa ctctgtagca ccgcctacat acctcgctct 5520
gctaatacctg ttaccagtgg ctgctgccag tggcgataag tcgtgtctta ccgggttgga 5580
ctcaagacga tagttaccgg ataaggcgca gcggtcgggc tgaacggggg gttcgtgcac 5640
acagcccagc ttggagcgaa cgacctacac cgaactgaga tacctacagc gtgagctatg 5700
agaaaagcgcc acgcttcccc aagggagaaa ggcgacagg tatccggtaa gcggcagggt 5760
cggaacagga gagcgcacga gggagcttcc agggggaaac gcctggatc tttatagtcc 5820
tgtcgggttt cgccacctct gacttgagcg tcgatttttg tgatgctcgt caggggggcg 5880
gagcctatgg aaaaacgcca gcaacgcggc ctttttacgg ttcttgccct tttgctggcc 5940
ttttgctcac atgttctttc ctgcgttata ccctgattct gtggataacc gtattaccgc 6000
ctttgagtga gctgataccg ctgcgcgag ccgaacgacc gagcgacgag agtcagttag 6060
cgaggaagcg gaagagcgcc caatacgcaa accgctctc ccgcgcggtt ggccgattca 6120
ttaatgcagc tggcacgaca ggtttcccga ctggaaagcg ggcagtgagc gcaacgcaat 6180
taatgtgagt tagctcactc attaggcacc ccaggcttta cactttatgc ttccggctcg 6240
tatgttgtgt ggaattgtga gcggataaca atttcacaca ggaaacagct atgaccatga 6300
ttacgccaaag cgcgcaatta accctcacta aagggaacaa aagctggagc tgcaagctta 6360
atgtagtctt atgcaatact cttgtagtct tgcaacatgg taacgatgag ttagcaacat 6420
gccttacaag gagagaaaaa gcaccgtgca tgccgattgg tggaagtaag gtggtacgat 6480
cgtgccttat taggaaggca acagacgggt ctgacatgga ttggacgaac cactgaattg 6540
ccgcattgca gagatatgtt atttaagtgc ctagctcgat acaataaacg ggtctctctg 6600
gtagaccag atctgagcct gggagctctc tggctaacta gggaaccac tgcttaagcc 6660
tcaataaagc ttgccttgag tgcttcaagt agtgtgtgcc cgtctgttgt gtgactctgg 6720
taactagaga tccctcagac ctttttagtc agtgtggaaa atctctagca gtggcgcccc 6780
aacagggacc tgaaagcgaa agggaaacca gagctctctc gacgcaggac tcggcttgct 6840
gaagcgcgca cggcaagagg cgagggcgcg cactgggtga gtacgcaaaa aattttgact 6900
agcggaggct agaaggagag agatgggtgc gagagcgtca gtattaagcg ggggagaatt 6960
agatcgcgat gggaaaaaat tcggttaagg ccagggggaa agaaaaata taaattaaaa 7020
catatagtat gggcaagcag ggagctagaa cgattcgag ttaatcctgg cctgttagaa 7080
acatcagaag gctgtagaca aatactggga cagctacaac catcccttca gacaggatca 7140
gaagaactta gatcattata taatacagta gcaacctct attgtgtgca tcaaaggata 7200
gagataaaaag acaccaagga agcttttagac aagatagagg aagagcaaaa caaaagtaag 7260
accaccgcac agcaagcggc cgtgatctt cagacctgga ggaggagata tgagggacaa 7320
ttggagaagt gaattatata aatataaagt agtaaaaatt gaaccattag gagtagcacc 7380
caccaaggca aagagaagag tgggtgcagag agaaaaaaga gcagtgggaa taggagcttt 7440
gttccttggg ttcttgggag cagcaggaag cactatgggc gcagcctcaa tgacgctgac 7500
ggtacaggcc agacaattat tgtctggtat agtgcagcag cagaacaatt tgctgagggc 7560
tattgaggcg caacagcatc tgttgcaact cacagtctgg ggcataagc agctccaggc 7620
aagaatcctg gctgtggaaa gatacctaaa ggatcaacag ctctggggga tttggggttg 7680

ctctggaaaa ctcatTTGca ccactgctgt gccttggaaT gctagttgga gtaataaatc 7740
 tctggaacag atttggaaTc acacgacctg gatggagtgG gacagagaaa ttaacaatta 7800
 cacaagctta atacactcct taattgaaga atcgcaaaac cagcaagaaa agaattgaaca 7860
 agaattattg gaattagata aatgggcaag tttgtggaaT tggtttaaca taacaaattg 7920
 gctgtggTat ataaaattat tcataatgat agtaggaggc ttggtaggtt taagaatagt 7980
 ttttgctgta ctttctatag tgaatagagt taggcaggga tattcaccat tatcgtttca 8040
 gacccacctc ccaaccccga ggggacccga caggcccgaa ggaatagaag aagaaggTgG 8100
 agagagagac agagacagat ccattcgatt agtgaacgga tctcgacggt atcggttaac 8160
 ttttaaaaga aaagggggga ttgggggggta cagtgcaggG gaaagaatag tagacataat 8220
 agcaacagac atacaaacta aagaattaca aaacaaatt acaaaaattc aaaattttat 8280
 cgatcacgag actagccg 8298

<210> 78

<211> 2949

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列人类BRAF

<400> 78

cgctccctt cccctcccc gcccgacagc ggccgctcgg gccccggctc tcggttataa 60
 gatggcgGcg ctgagcggtg gcggtggtgg cggcgcgagG ccgggccagg ctctgttcaa 120
 cggggacatg gagccccagg ccggcgccgg cgccggcgcc gcggcctctt cggctgcgga 180
 ccctgccatt ccggaggagg tgtggaatat caaacaaatg attaagtTga cacaggaaca 240
 tatagaggcc ctattggaca aatttggTgg ggagcataat ccaccatcaa tatatctgga 300
 ggcctatgaa gaatacacca gcaagctaga tgcactccaa caaagagaac aacagttatt 360
 ggaatctctg gggaacggaa ctgatttttc tgtttctagc tctgcatcaa tggataccgt 420
 tacatcttct tcctcttcta gcctttcagt gctaccttca tctctttcag tttttcaaaa 480
 tcccacagat gtggcacgga gcaaccccaa gtcaccacaa aaacctatcg ttagagtctt 540
 cctgcccac aaacagagga cagtggTacc tgcaaggTgt ggagttacag tccgagacag 600
 tctaaagaaa gcactgatga tgagaggTct aatcccagag tgctgtgctg tttacagaat 660
 tcaggatgga gagaagaaac caattggTtg ggacactgat atttcctggc ttactggaga 720
 agaattgcat gtggaagtgt tggagaatgt tccacttaca acacacaact ttgtacgaaa 780
 aacgtttttc accttagcat tttgtgactt ttgtcgaaag ctgcttttcc agggtttccg 840
 ctgtcaaaca tgtggttata aatttcacca gcgttgtagt acagaagTtc cactgatgtg 900
 tgTtaattat gaccaacttg atttgetgtt tgtctccaag ttctttgaac accaccaat 960
 accacaggaa gaggcgtcct tagcagagac tgccctaaca tctggatcat ccccttccgc 1020
 accgcctcg gactctattg ggccccaaat tctcaccagt ccgtctcctt caaaatccat 1080
 tccaattcca cagcccttcc gaccagcaga tgaagatcat cgaaatcaat ttgggcaacg 1140
 agaccgatcc tcatcagctc ccaatgtgca tataaacaca atagaacctg tcaatattga 1200
 tgacttgatt agagaccaag gatttcgtgg tgatggagga tcaaccacag gtttgtctgc 1260

tccccccct gcctcattac ctggctcact aactaacgtg aaagccttac agaaatctcc 1320
 aggacctcag cgagaaagga agtcatcttc atcctcagaa gacaggaatc gaatgaaaac 1380
 acttggtaga cgggactcga gtgatgattg ggagattcct gatgggcaga ttacagtggg 1440
 acaaagaatt ggatctggat catttggaac agtctacaag ggaaagtggc atgggtgatgt 1500
 ggcagtgaaa atgttgaatg tgacagcacc tacacctcag cagttacaag ccttcaaaaa 1560
 tgaagtagga gtactcagga aaacacgaca tgtgaatata ctactcttca tgggctattc 1620
 cacaaagcca caactggcta ttgttaccga gtgggtgtgag ggctccagct tgtatcacca 1680
 tctccatatac attgagacca aatttgagat gatcaaactt atagatattg cacgacagac 1740
 tgcacagggc atggattact tacacgcca gtcaatcacc cacagagacc tcaagagtaa 1800
 taatatatatt cttcatgaag acctcacagt aaaaataggt gattttgggc tagctacagt 1860
 gaaatctcga tggagtgggt cccatcagtt tgaacagttg tctggatcca ttttgtggat 1920
 ggcaccagaa gtcatcagaa tgcaagataa aaatccatac agctttcagt cagatgtata 1980
 tgcatttggga attgttctgt atgaattgat gactggacag ttaccttatt caaacatcaa 2040
 caacagggac cagataattt ttatgggtggg acgaggatac ctgtctccag atctcagtaa 2100
 ggtacggagt aactgtccaa aagccatgaa gagattaatg gcagagtgcc tcaaaaagaa 2160
 aagagatgag agaccactct tccccaaat tctcgctctt attgagctgc tggcccgctc 2220
 attgccaaaa attcaccgca gtgcatcaga acctccttg aatcgggctg gtttccaaac 2280
 agaggatttt agtctatatg cttgtgcttc tccaaaaaca cccatccagg cagggggata 2340
 tgggtgcgttt cctgtccact gaaacaaatg agtgagagag ttcaggagag tagcaacaaa 2400
 aggaaaataa atgaacatat gtttgcttat atgttaaatt gaataaaata ctctcttttt 2460
 ttttaagggtg aaccaaagaa cacttgtgtg gttaaagact agatataatt tttcccaaaa 2520
 ctaaaattta tacttaacat tggattttta acatccaagg gttaaatac atagacattg 2580
 ctaaaatttg gcagagcctc ttctagaggc tttactttct gttccgggtt tgtatcattc 2640
 acttggttat ttttaagtagt aaacttcagt ttctcatgca acttttggtg ccagctatca 2700
 catgtccact agggactcca gaagaagacc ctacctatgc ctgtgtttgc aggtgagaag 2760
 ttggcagtcg gttagcctgg gttagataag gcaaactgaa cagatctaatt ttaggaagtc 2820
 agtagaattt aataattcta ttattattct taataatttt tctataacta tttcttttta 2880
 taacaatttg gaaaatgtgg atgtctttta tttccttgaa gcaataaact aagtttcttt 2940
 ttataaaaa 2949

<210> 79

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列AP1M1

<400> 79

Val Ile Glu Lys His Ser His Ser Arg Ile Glu Tyr Met Leu Lys Ala

1

5

10

15

Lys Ser Gln Phe Lys Arg Arg Ser Thr Ala Asn

20 25

<210> 80
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列AP1M1
<400> 80
Val Ile Glu Lys His Ser His Ser Arg Ile Glu Tyr Met Leu Lys Ala
1 5 10 15
Lys Ser Gln Phe
20

<210> 81
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列AP1M1
<400> 81
Ser Arg Ile Glu Tyr Met Leu Lys Ala Lys Ser Gln Phe Lys Arg Arg
1 5 10 15
Ser Thr Ala Asn
20

<210> 82
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列DCAF6
<400> 82
Glu Gln Phe Leu Gln Pro Ser Thr Ser Ser Thr Met Ser Thr Gln Ala
1 5 10 15
His Ser Thr Ser Ser Pro Thr Glu Ser Pro His
20 25

<210> 83
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成序列DCAF6

<400> 83

Glu Gln Phe Leu Gln Pro Ser Thr Ser Ser Thr Met Ser Thr Gln Ala

1 5 10 15

His Ser Thr Ser

20

<210> 84

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列DCAF6

<400> 84

Thr Ser Ser Thr Met Ser Thr Gln Ala His Ser Thr Ser Ser Pro Thr

1 5 10 15

Glu Ser Pro His

20

<210> 85

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列GTF2H4

<400> 85

Phe Ile Val Val Glu Thr Asn Tyr Arg Leu Tyr Ala Tyr Met Glu Ser

1 5 10 15

Glu Leu Gln Ile Ala Leu Ile Ala Leu Phe Ser

20

25

<210> 86

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列GTF2H4

<400> 86

Phe Ile Val Val Glu Thr Asn Tyr Arg Leu Tyr Ala Tyr Met Glu Ser

1 5 10 15

Glu Leu Gln Ile

20

<210> 87

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列GTF2H4

<400> 87

Tyr Arg Leu Tyr Ala Tyr Met Glu Ser Glu Leu Gln Ile Ala Leu Ile

1 5 10 15

Ala Leu Phe Ser

20

<210> 88

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列NBPF12

<400> 88

Asp Ser Cys Gln Pro Tyr Arg Ser Ser Phe Tyr Ala Leu Gly Glu Lys

1 5 10 15

His Val Gly Phe Ser Leu Asp Val Gly Glu Ile

20

25

<210> 89

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列NBPF12

<400> 89

Asp Ser Cys Gln Pro Tyr Arg Ser Ser Phe Tyr Ala Leu Gly Glu Lys

1 5 10 15

His Val Gly Phe

20

<210> 90

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列NBPF12

<400> 90

Ser Ser Phe Tyr Ala Leu Gly Glu Lys His Val Gly Phe Ser Leu Asp

1 5 10 15

Val Gly Glu Ile

20

<210> 91

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列ORC3

<400> 91

Glu Ser Phe Ala Thr Lys Val Leu Gln Asp Phe Ile Ile Leu Ser Ser

1 5 10 15

Gln His Leu His Glu Phe Pro Leu Ile Leu Ile

20

25

<210> 92

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列ORC3

<400> 92

Glu Ser Phe Ala Thr Lys Val Leu Gln Asp Phe Ile Ile Leu Ser Ser

1 5 10 15

Gln His Leu His

20

<210> 93

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列ORC3

<400> 93

Leu Gln Asp Phe Ile Ile Leu Ser Ser Gln His Leu His Glu Phe Pro

1 5 10 15

Leu Ile Leu Ile

20

<210> 94

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列R0R1

<400> 94

Leu Val Pro Thr Ser Ser Trp Asn Ile Ser Ser Glu Leu Ser Lys Asp

1 5 10 15

Ser Tyr Leu Thr Leu Asp Glu Pro Met Asn Asn

20 25

<210> 95

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列R0R1

<400> 95

Leu Val Pro Thr Ser Ser Trp Asn Ile Ser Ser Glu Leu Ser Lys Asp

1 5 10 15

Ser Tyr Leu Thr

20

<210> 96

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列R0R1

<400> 96

Asn Ile Ser Ser Glu Leu Ser Lys Asp Ser Tyr Leu Thr Leu Asp Glu

1 5 10 15

Pro Met Asn Asn

20

<210> 97

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列SF3B1

<400> 97

Gln Met Gly Gly Ser Thr Pro Val Leu Thr Pro Gly Lys Ala Pro Ile
 1 5 10 15

Gly Thr Pro Ala Met Asn Met Ala Thr Pro Thr
 20 25

<210> 98

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列SF3B1

<400> 98

Gln Met Gly Gly Ser Thr Pro Val Leu Thr Pro Gly Lys Ala Pro Ile
 1 5 10 15

Gly Thr Pro Ala
 20

<210> 99

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列SF3B1

<400> 99

Val Leu Thr Pro Gly Lys Ala Pro Ile Gly Thr Pro Ala Met Asn Met
 1 5 10 15

Ala Thr Pro Thr
 20

<210> 100

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列UNKL

<400> 100

Ala His Gly Pro Leu Asp Leu Arg Pro Pro Val Cys Asp Ile Arg Glu
 1 5 10 15

Leu Gln Ala Gln Glu Ala Leu Gln Asn Gly Gln
 20 25

<210> 101

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列UNKL

<400> 101

Ala His Gly Pro Leu Asp Leu Arg Pro Pro Val Cys Asp Ile Arg Glu

1 5 10 15

Leu Gln Ala Gln

20

<210> 102

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列UNKL

<400> 102

Arg Pro Pro Val Cys Asp Ile Arg Glu Leu Gln Ala Gln Glu Ala Leu

1 5 10 15

Gln Asn Gly Gln

20

<210> 103

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列ZNF700

<400> 103

Gly Glu Lys Pro Tyr Glu Cys Ser Lys Cys Asp Lys Ala Leu His Ser

1 5 10 15

Ser Ser Ser Tyr His Arg His Glu Arg Ser His

20

25

<210> 104

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列ZNF700

<400> 104

Gly Glu Lys Pro Tyr Glu Cys Ser Lys Cys Asp Lys Ala Leu His Ser

1	5	10	15
Ser Ser Ser Tyr			
20			
<210> 105			
<211> 20			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成序列ZNF700			
<400> 105			
Ser Lys Cys Asp Lys Ala Leu His Ser Ser Ser Ser Tyr His Arg His			
1	5	10	15
Glu Arg Ser His			
20			
<210> 106			
<211> 27			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成序列NVL			
<400> 106			
Ala Pro Cys Ile Ile Phe Ile Asp Glu Ile Asp Ala Ile Pro Pro Lys			
1	5	10	15
Arg Glu Val Ala Ser Lys Asp Met Glu Arg Arg			
20	25		
<210> 107			
<211> 20			
<212> PRT			
<213> 人工序列			
<220>			
<223> 合成序列NVL			
<400> 107			
Ala Pro Cys Ile Ile Phe Ile Asp Glu Ile Asp Ala Ile Pro Pro Lys			
1	5	10	15
Arg Glu Val Ala			
20			
<210> 108			
<211> 20			
<212> PRT			

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列NVL

<400> 108

Asp Glu Ile Asp Ala Ile Pro Pro Lys Arg Glu Val Ala Ser Lys Asp

1 5 10 15

Met Glu Arg Arg

20

<210> 109

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列MATN1

<400> 109

Ser Arg Ser Pro Asp Ile Ser Lys Val Val Ile Val Val Pro Asp Gly

1 5 10 15

Arg Pro Gln Asp Ser Val Gln Asp Val Ser Ala

20

25

<210> 110

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列MATN1

<400> 110

Ser Arg Ser Pro Asp Ile Ser Lys Val Val Ile Val Val Pro Asp Gly

1 5 10 15

Arg Pro Gln Asp

20

<210> 111

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列MATN1

<400> 111

Lys Val Val Ile Val Val Pro Asp Gly Arg Pro Gln Asp Ser Val Gln

1 5 10 15

Asp Val Ser Ala

20

<210> 112

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列CTNNA2

<400> 112

Val Arg Gln Ala Leu Gln Asp Leu Leu Ser Glu Tyr Met His Asn Thr

1 5 10 15

Gly Arg Lys Glu Lys Gly Asp Pro Leu Asn Ile

20

25

<210> 113

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列CTNNA2

<400> 113

Val Arg Gln Ala Leu Gln Asp Leu Leu Ser Glu Tyr Met His Asn Thr

1 5 10 15

Gly Arg Lys Glu

20

<210> 114

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列CTNNA2

<400> 114

Leu Leu Ser Glu Tyr Met His Asn Thr Gly Arg Lys Glu Lys Gly Asp

1 5 10 15

Pro Leu Asn Ile

20

<210> 115

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列GET4

<400> 115

Arg Tyr Met Ser Gln Ser Lys His Thr Glu Ala Arg Glu Arg Met Tyr

1 5 10 15

Ser Gly Ala Leu Leu Phe Phe Ser His Gly Gln

20 25

<210> 116

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列GET4

<400> 116

Arg Tyr Met Ser Gln Ser Lys His Thr Glu Ala Arg Glu Arg Met Tyr

1 5 10 15

Ser Gly Ala Leu

20

<210> 117

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列GET4

<400> 117

His Thr Glu Ala Arg Glu Arg Met Tyr Ser Gly Ala Leu Leu Phe Phe

1 5 10 15

Ser His Gly Gln

20

<210> 118

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列NTNG1

<400> 118

Thr Val Thr Asp Leu Arg Ile Arg Leu Leu Arg Pro Ala Ile Gly Glu

1 5 10 15

Ile Phe Val Asp Glu Leu His Leu Ala Arg Tyr

20 25

<210> 119
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列NTNG1
<400> 119
Thr Val Thr Asp Leu Arg Ile Arg Leu Leu Arg Pro Ala Ile Gly Glu
1 5 10 15
Ile Phe Val Asp
20

<210> 120
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列NTNG1
<400> 120
Arg Leu Leu Arg Pro Ala Ile Gly Glu Ile Phe Val Asp Glu Leu His
1 5 10 15
Leu Ala Arg Tyr
20

<210> 121
<211> 27
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列SPTBN5
<400> 121
Thr Leu Leu Leu Asp Ala Trp Leu Thr Thr Lys Ala Ala Ile Ala Glu
1 5 10 15
Ser Gln Asp Tyr Gly Gln Asp Leu Glu Gly Val
20 25

<210> 122
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列
<220>

<223> 合成序列SPTBN5

<400> 122

Thr Leu Leu Leu Asp Ala Trp Leu Thr Thr Lys Ala Ala Ile Ala Glu

1 5 10 15

Ser Gln Asp Tyr

20

<210> 123

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列SPTBN5

<400> 123

Leu Thr Thr Lys Ala Ala Ile Ala Glu Ser Gln Asp Tyr Gly Gln Asp

1 5 10 15

Leu Glu Gly Val

20

<210> 124

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列DPP6

<400> 124

Leu Leu Val Ile Leu Val Ile Cys Ser Leu Ile Val Thr Leu Val Ile

1 5 10 15

Leu Leu Thr Pro Ala Glu Asp Asn Ser Leu Ser

20

25

<210> 125

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列DPP6

<400> 125

Leu Leu Val Ile Leu Val Ile Cys Ser Leu Ile Val Thr Leu Val Ile

1 5 10 15

Leu Leu Thr Pro

20

<210> 126

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列DPP6

<400> 126

Cys Ser Leu Ile Val Thr Leu Val Ile Leu Leu Thr Pro Ala Glu Asp

1 5 10 15

Asn Ser Leu Ser

20

<210> 127

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列HIAT1

<400> 127

Val Lys Gly Leu Leu Ser Phe Leu Ser Ala Pro Leu Ile Cys Ala Leu

1 5 10 15

Ser Asp Val Trp Gly Arg Lys Ser Phe Leu Leu

20 25

<210> 128

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列HIAT1

<400> 128

Val Lys Gly Leu Leu Ser Phe Leu Ser Ala Pro Leu Ile Cys Ala Leu

1 5 10 15

Ser Asp Val Trp

20

<210> 129

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列HIAT1

<400> 129

Leu Ser Ala Pro Leu Ile Cys Ala Leu Ser Asp Val Trp Gly Arg Lys

1 5 10 15

Ser Phe Leu Leu

20

<210> 130

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列ITGA4

<400> 130

Gly Ser Gly Ala Val Met Asn Ala Met Glu Thr Asn Leu Phe Gly Ser

1 5 10 15

Asp Lys Tyr Ala Ala Arg Phe Gly Glu Ser Ile

20

25

<210> 131

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列ITGA4

<400> 131

Gly Ser Gly Ala Val Met Asn Ala Met Glu Thr Asn Leu Phe Gly Ser

1 5 10 15

Asp Lys Tyr Ala

20

<210> 132

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列ITGA4

<400> 132

Ala Met Glu Thr Asn Leu Phe Gly Ser Asp Lys Tyr Ala Ala Arg Phe

1 5 10 15

Gly Glu Ser Ile

20

<210> 133

<211> 27

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列MY01A

<400> 133

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

1 5 10 15

Pro Ala Gly Gly Asp Asn Ser Lys Leu Arg Tyr

20 25

<210> 134

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列MY01A

<400> 134

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

1 5 10 15

Pro Ala Gly Gly

20

<210> 135

<211> 20

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列MY01A

<400> 135

Ser Val Ala Val Lys Val Ile Gln Gly Pro Ala Gly Gly Asp Asn Ser

1 5 10 15

Lys Leu Arg Tyr

20

<210> 136

<211> 20

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成序列TRAC-gRNA-1

<400> 136

agagtctctc agctggtaca 20
<210> 137
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列TRAC-gRNA-2
<400> 137
tgtgctagac atgaggtcta 20
<210> 138
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列TRBC-gRNA-1
<400> 138
gcagtatctg gagt cattga 20
<210> 139
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列TRBC-gRNA-2
<400> 139
ggagaatgac gagtggaccc 20
<210> 140
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列 B2M-gRNA
<400> 140
cgcgagcaca gctaaggcca 20
<210> 141
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列PD-1-gRNA

<400> 141
ggccaggatg gttcttaggt 20
<210> 142
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列 sgRNA正向 Oligo:
TRAC_sgRNA_pLenti_F1
<400> 142
caccggagaa tcaaaatcgg tgaat 25
<210> 143
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列sgRNA反向 Oligo:
TRAC_sgRNA_pLenti_R1
<400> 143
aaacattcac cgattttgat tctcc 25
<210> 144
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列PD1_sgRNA_F1
<400> 144
caccgcagtt gtgtgacacg gaag 24
<210> 145
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列 PD1_sgRNA_R1
<400> 145
aaaccttccg tgtcacacaa ctgc 24
<210> 146
<211> 25
<212> DNA

<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列 CTLA4_sgRNA_F1
<400> 146
caccggcaaa ggtgagtgag acttt 25
<210> 147
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列 CTLA4_sgRNA_R1
<400> 147
aaacaaagtc tcactcacct ttgcc 25
<210> 148
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列 LAG3_sgRNA_F1
<400> 148
caccggtttc tgcagccgct ttggg 25
<210> 149
<211> 25
<212> DNA
<213> 人工序列
<220>
<223> 合成序列 LAG3_sgRNA_R1
<400> 149
aaacccccaaa gcggctgcag aaacc 25

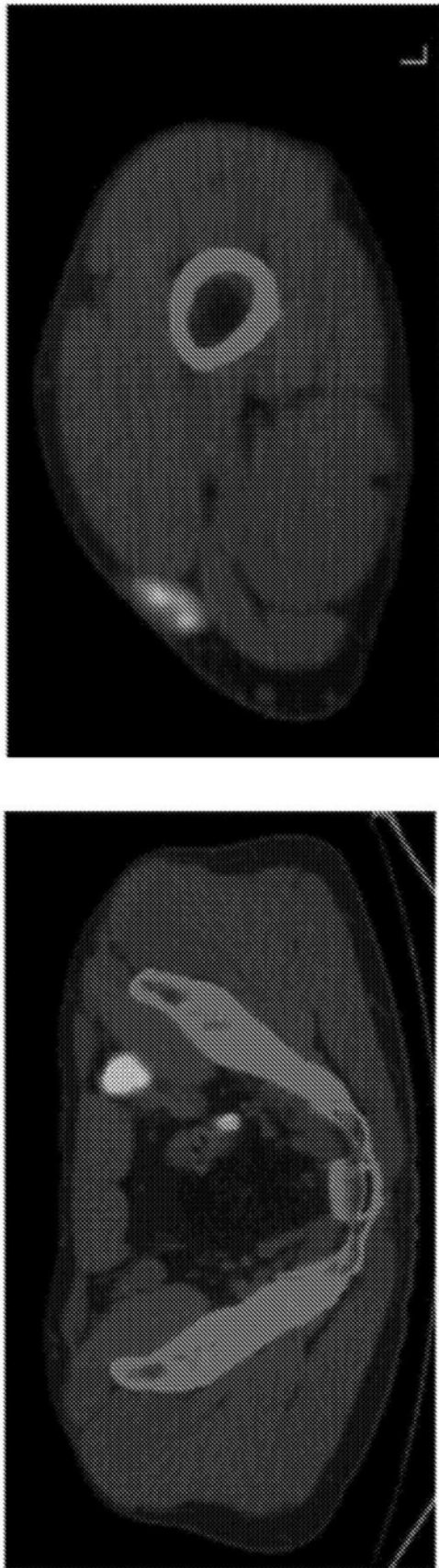


图1A

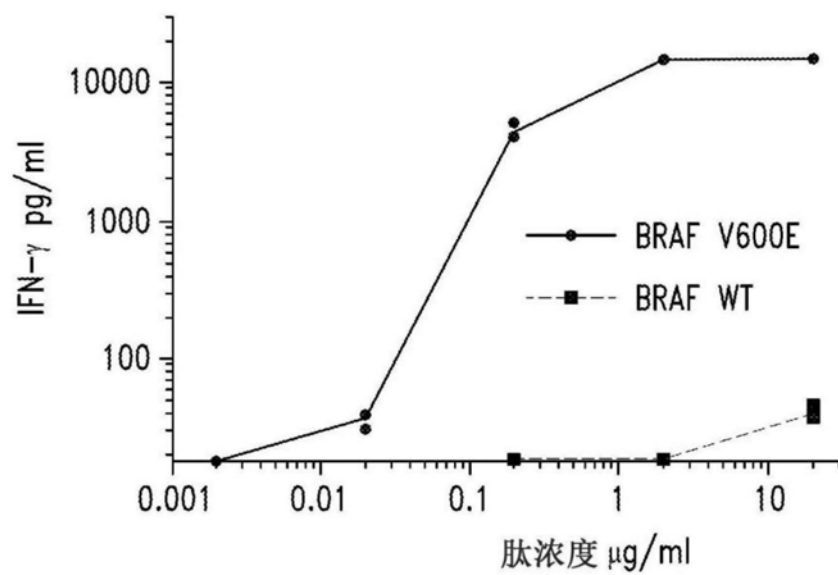


图1B

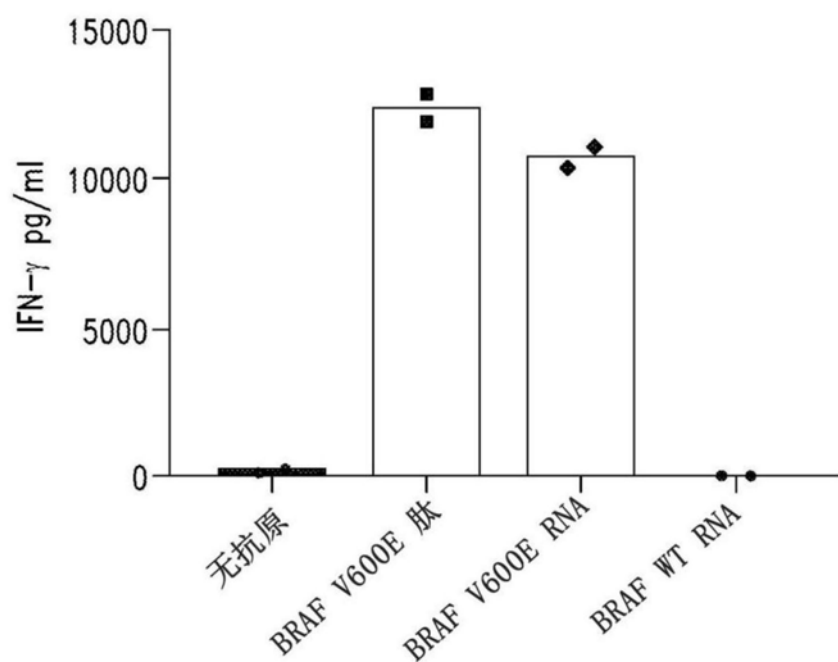


图1C

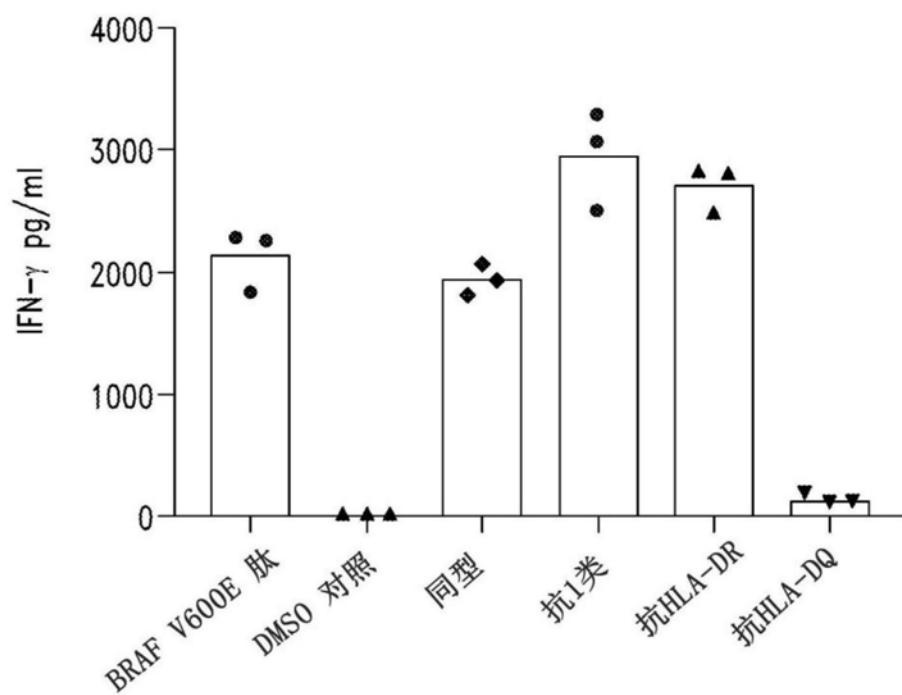


图1D

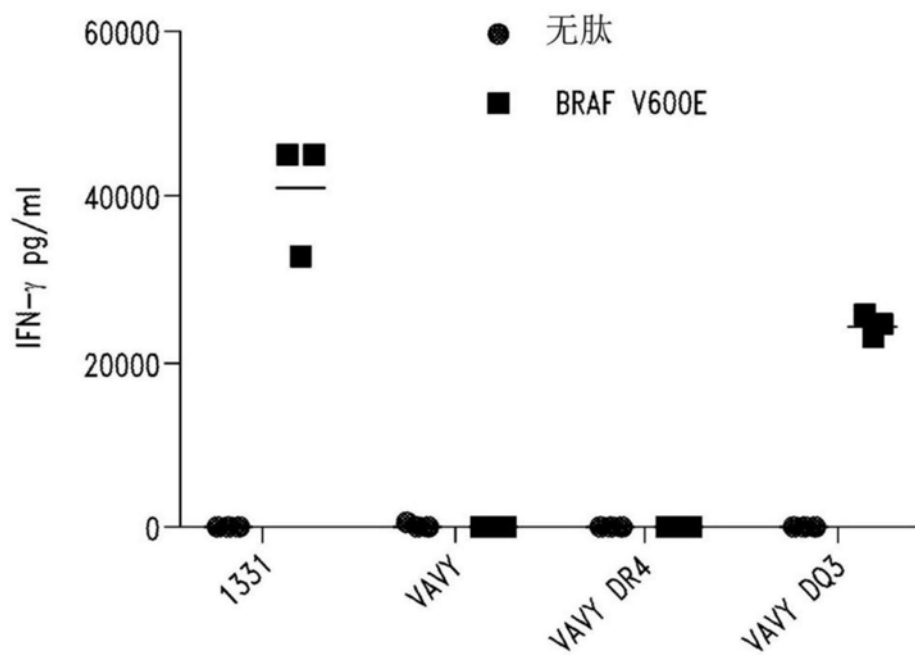


图1E

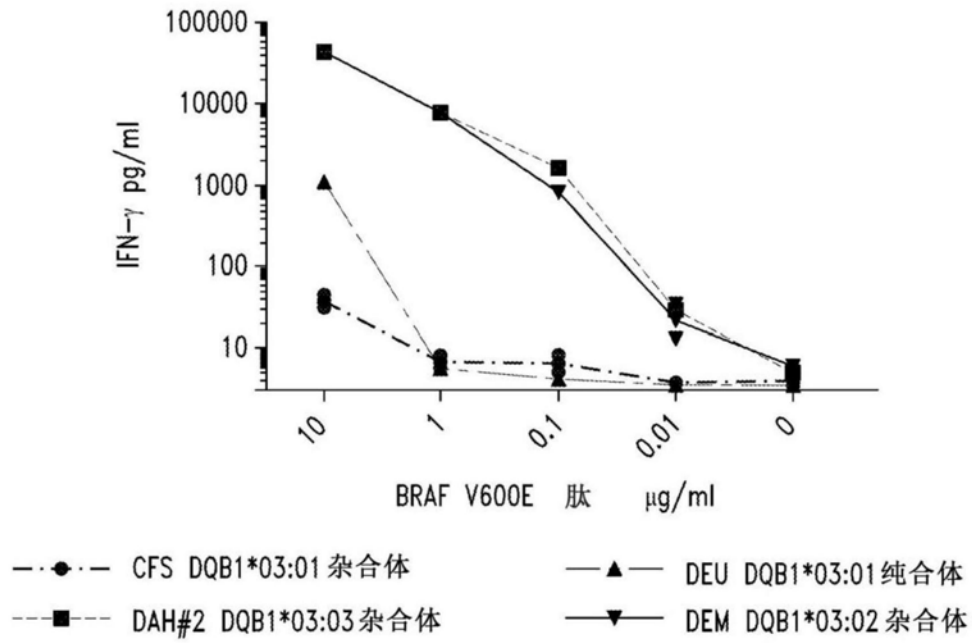


图1F

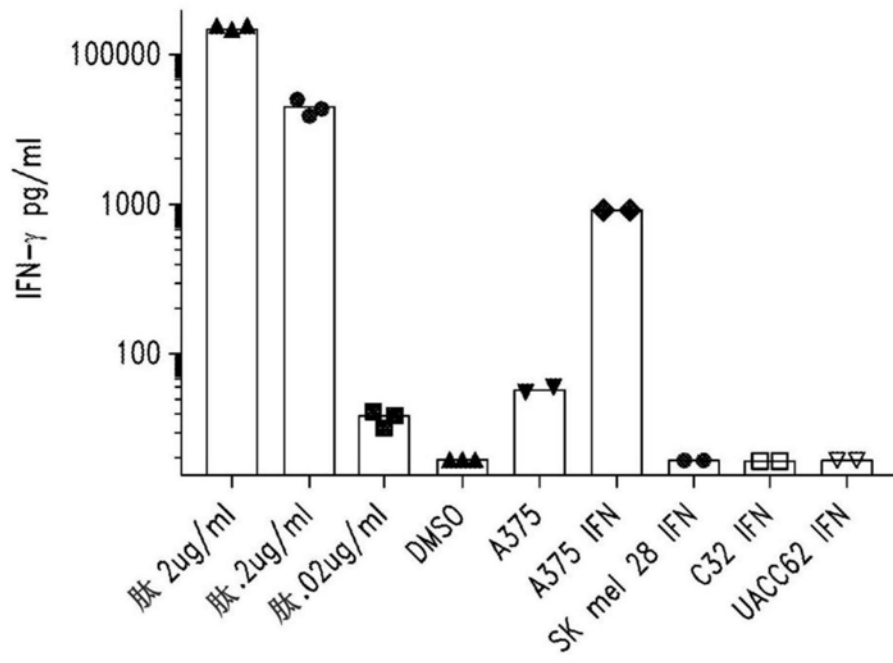


图1G

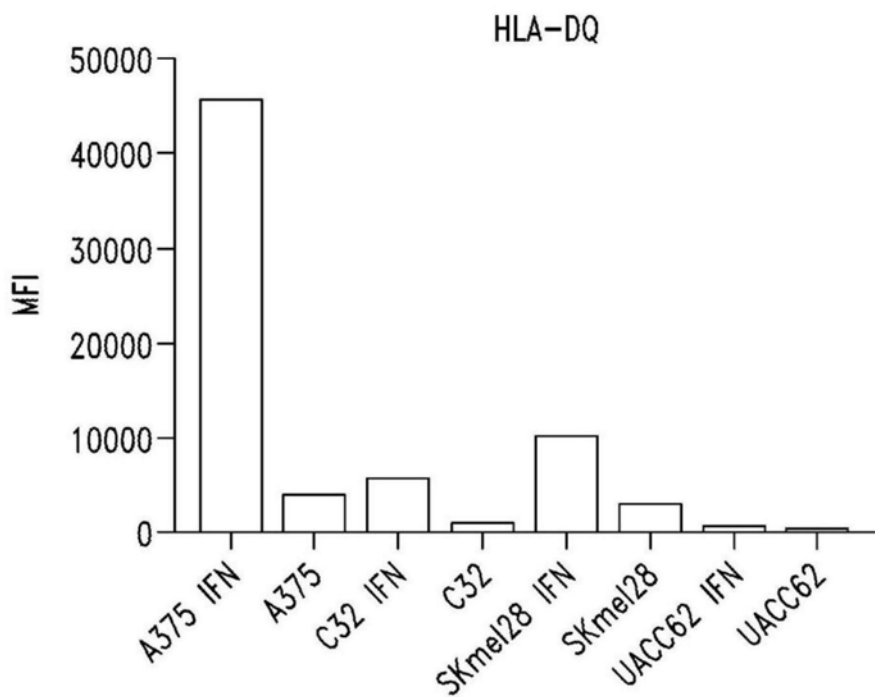


图1H

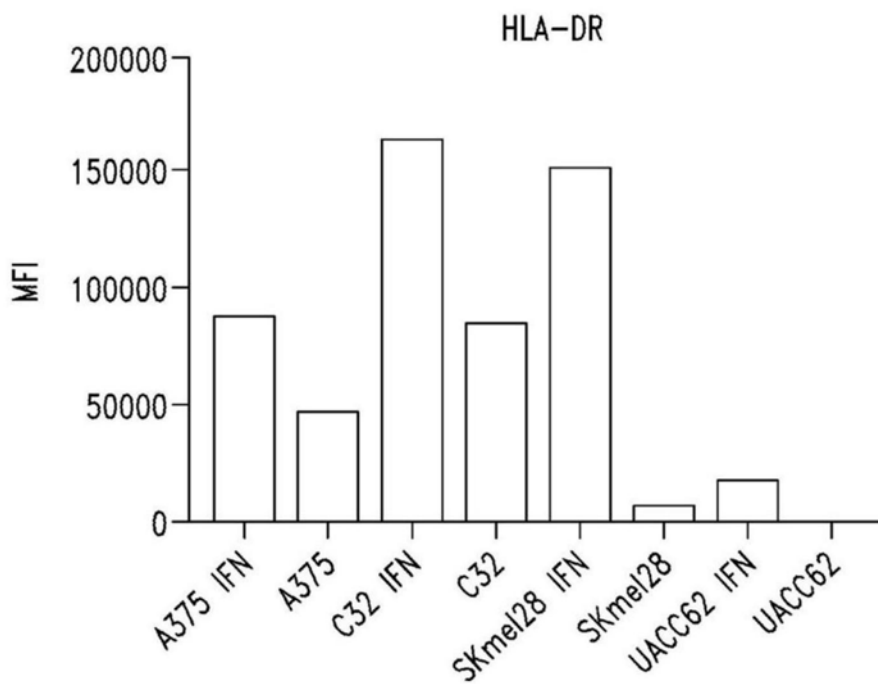


图1I

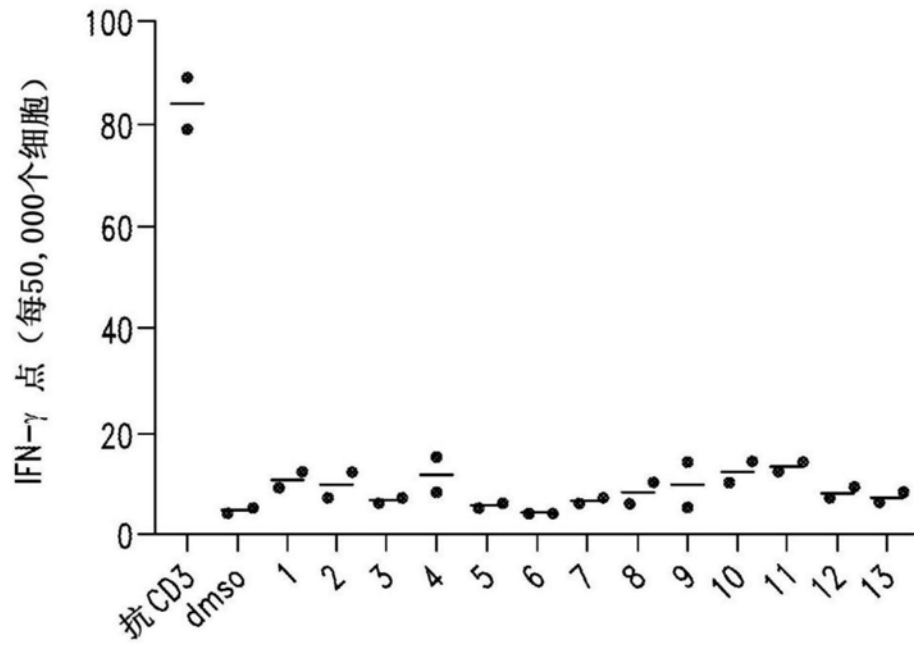


图2A

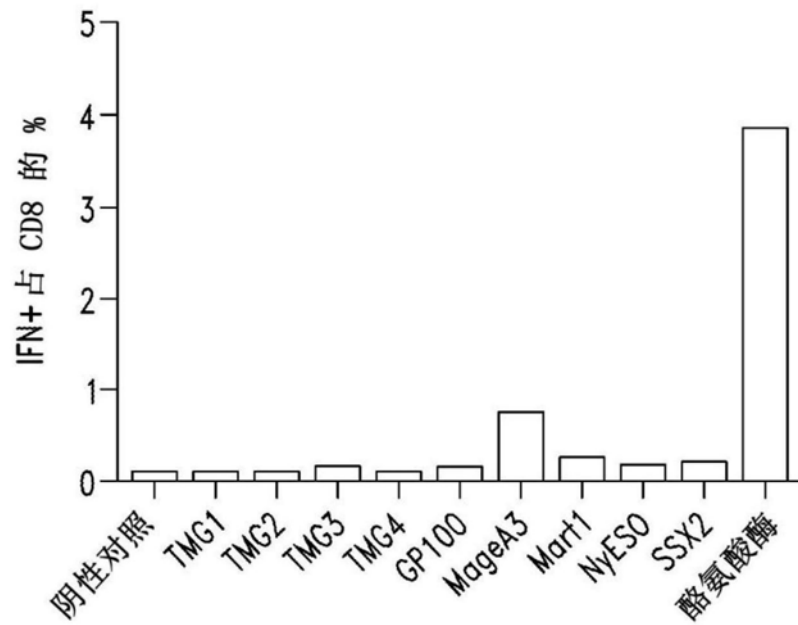


图2B

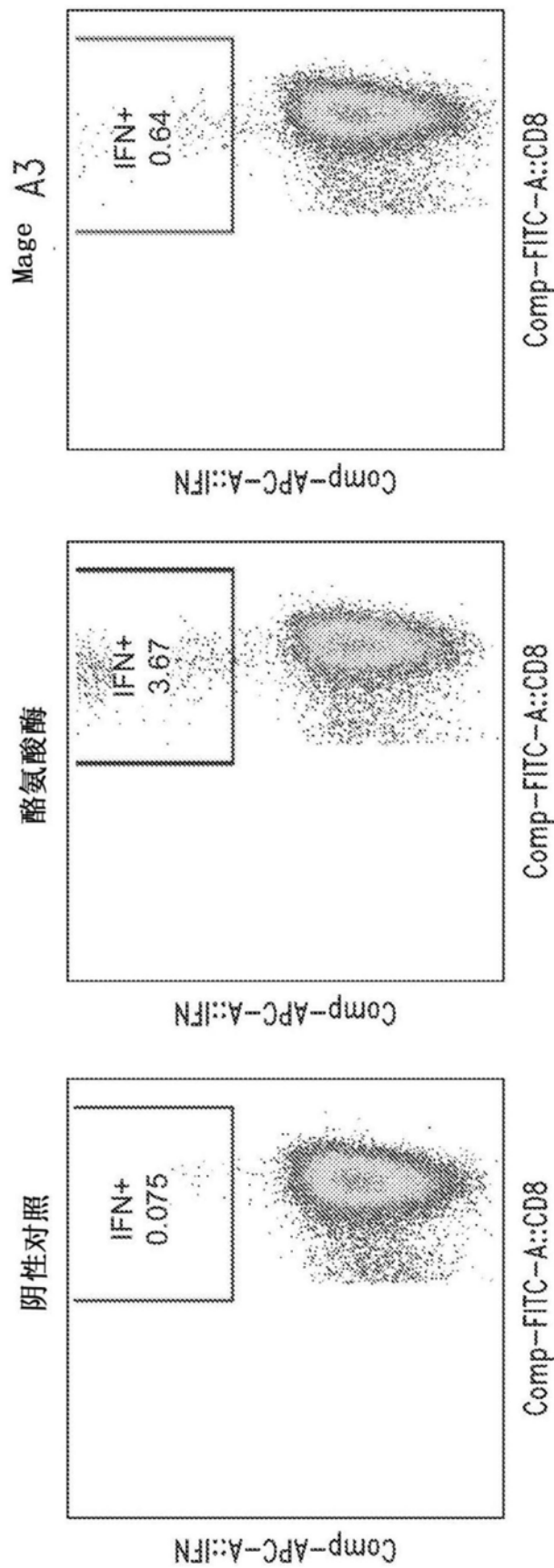


图2C

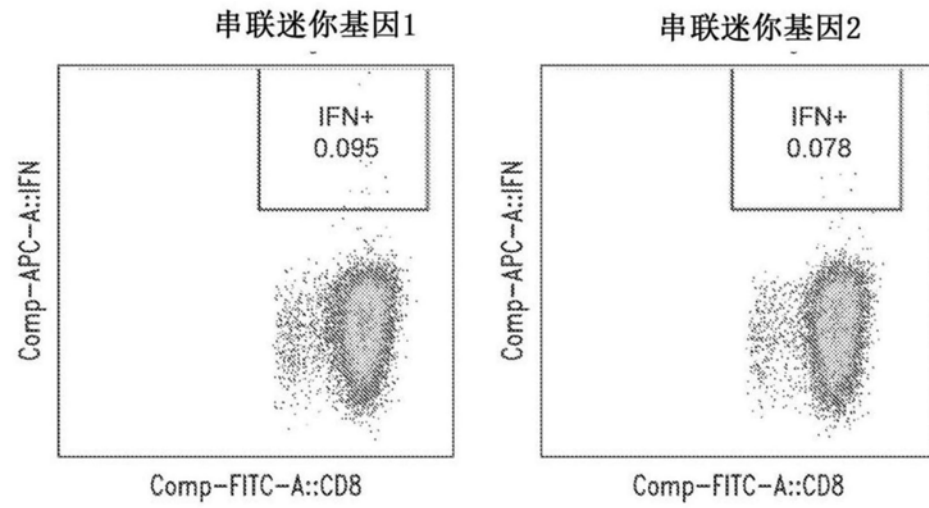


图2D

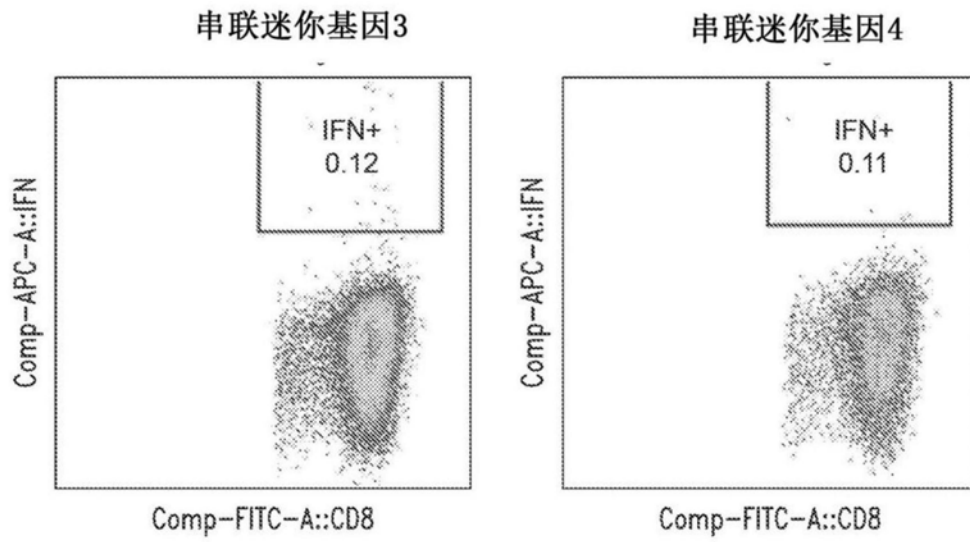


图2E

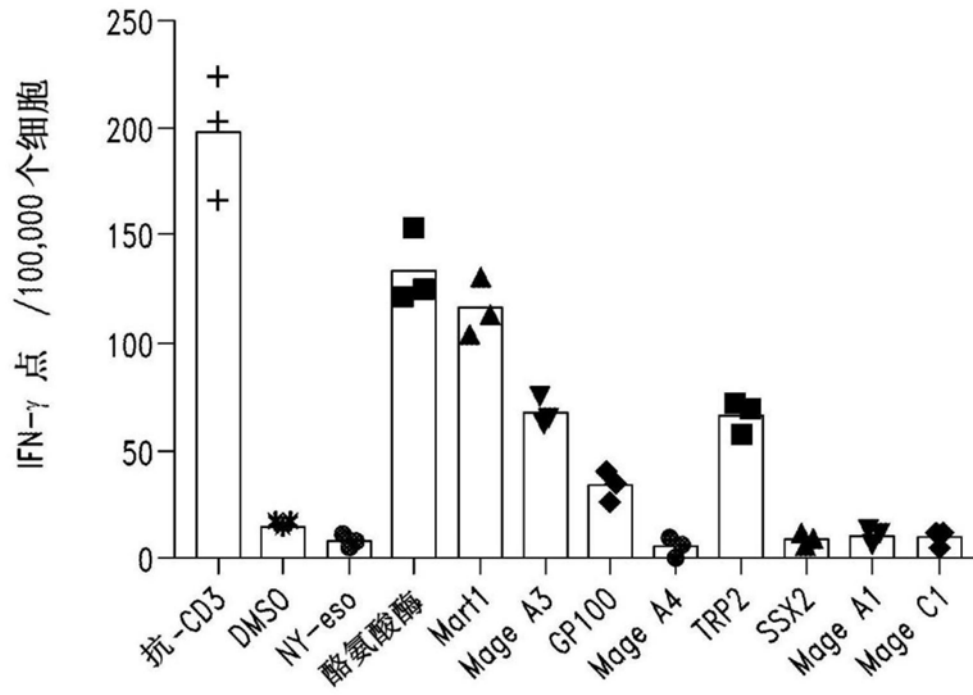


图2F

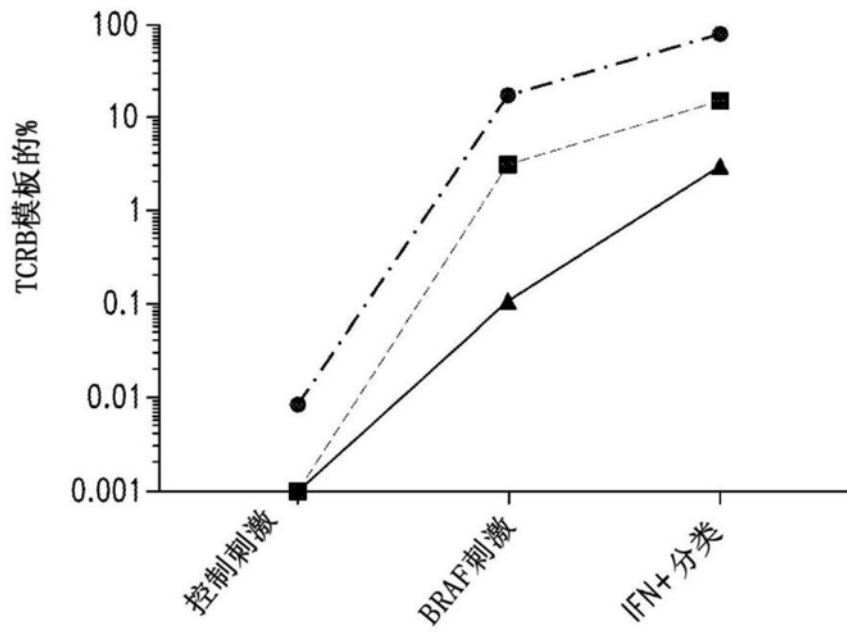


图2G

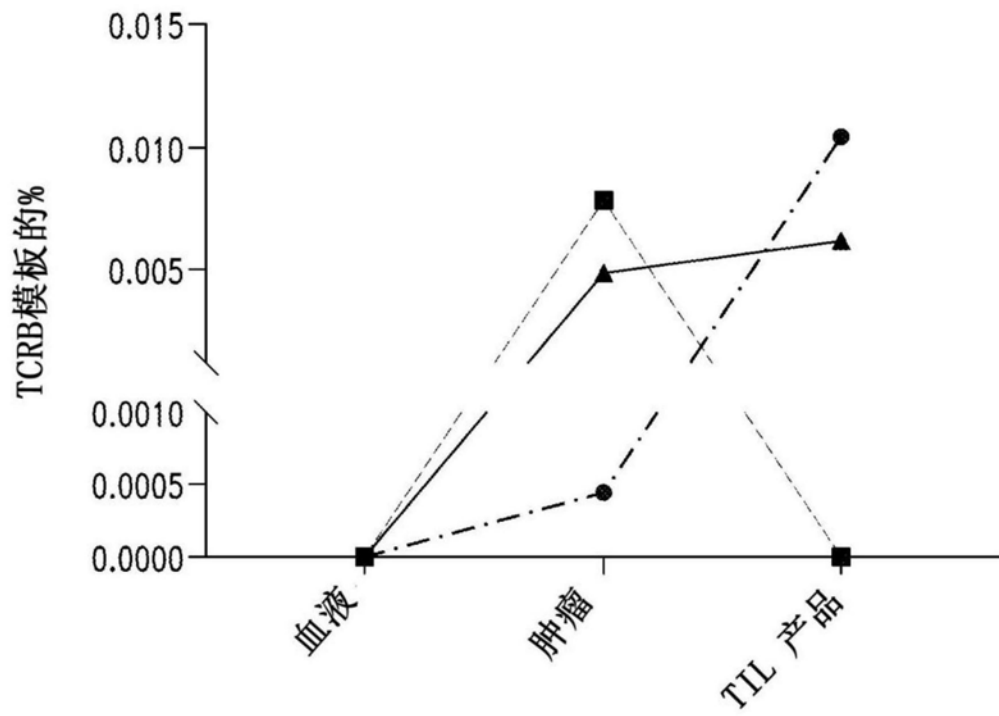


图2H

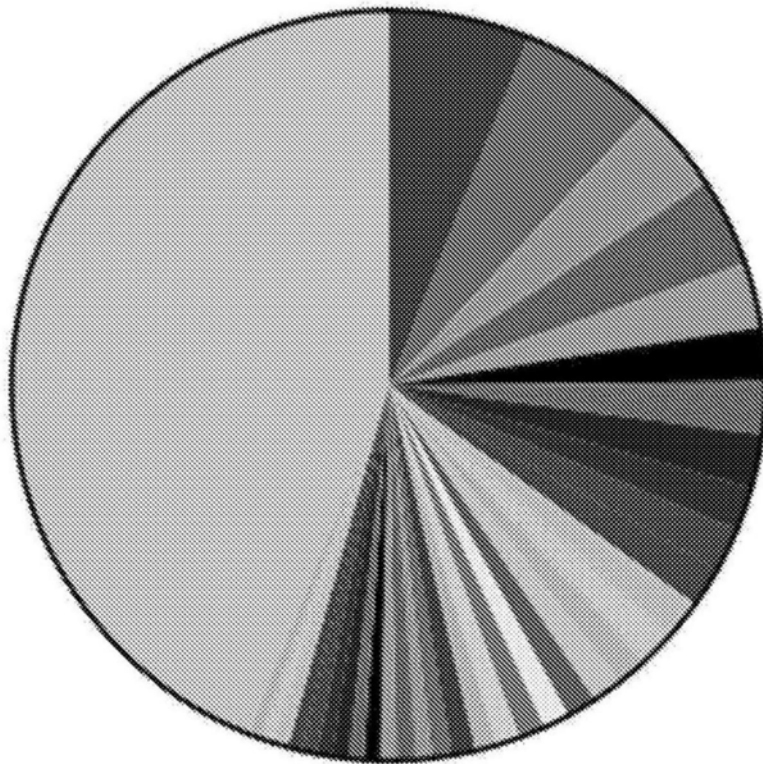


图2I

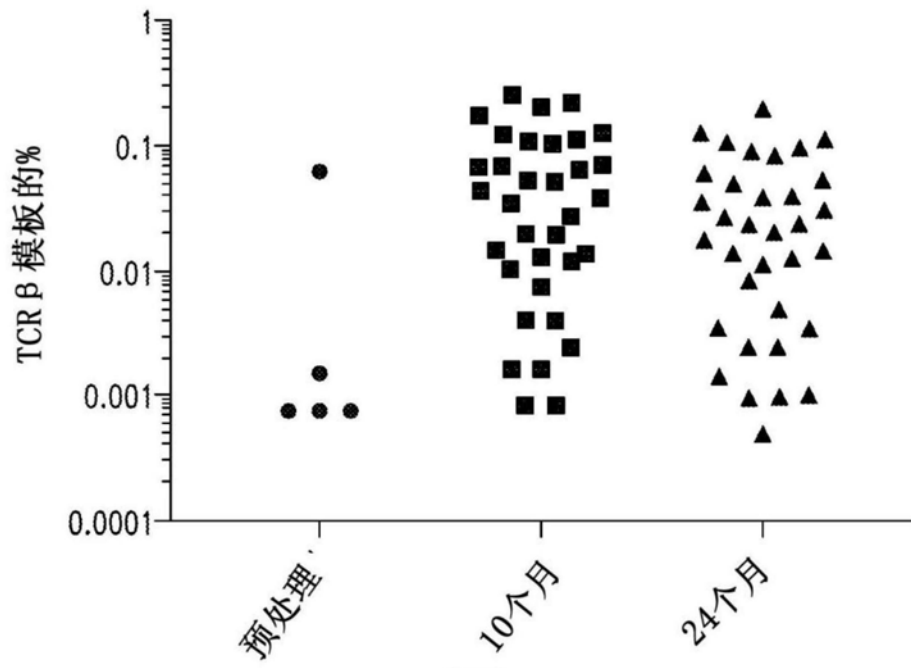


图2J

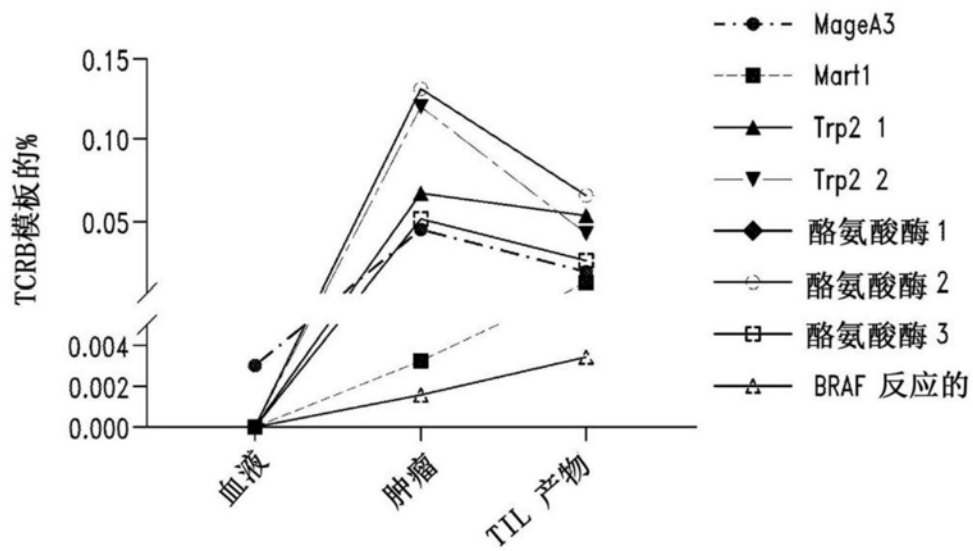


图2K

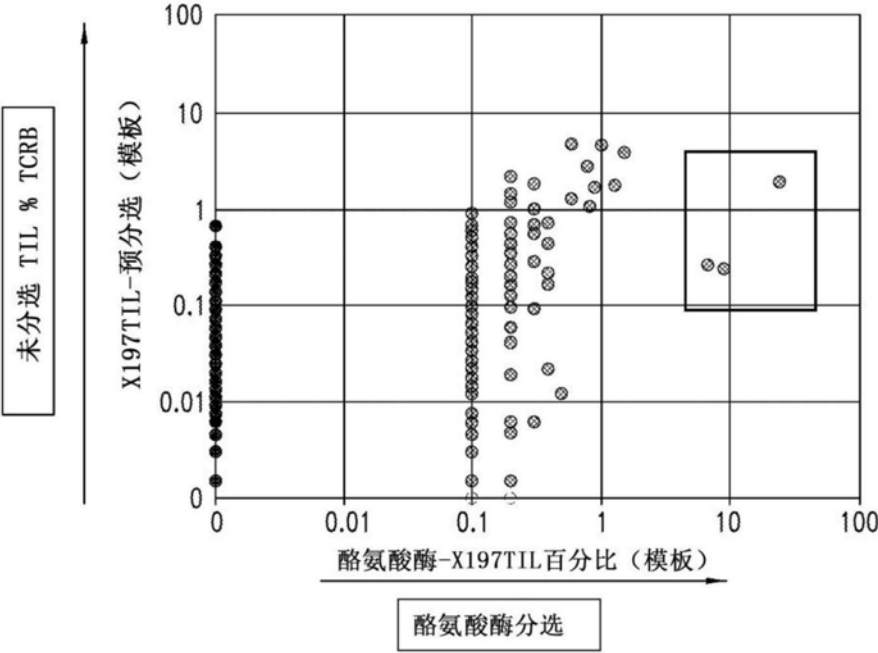


图2L

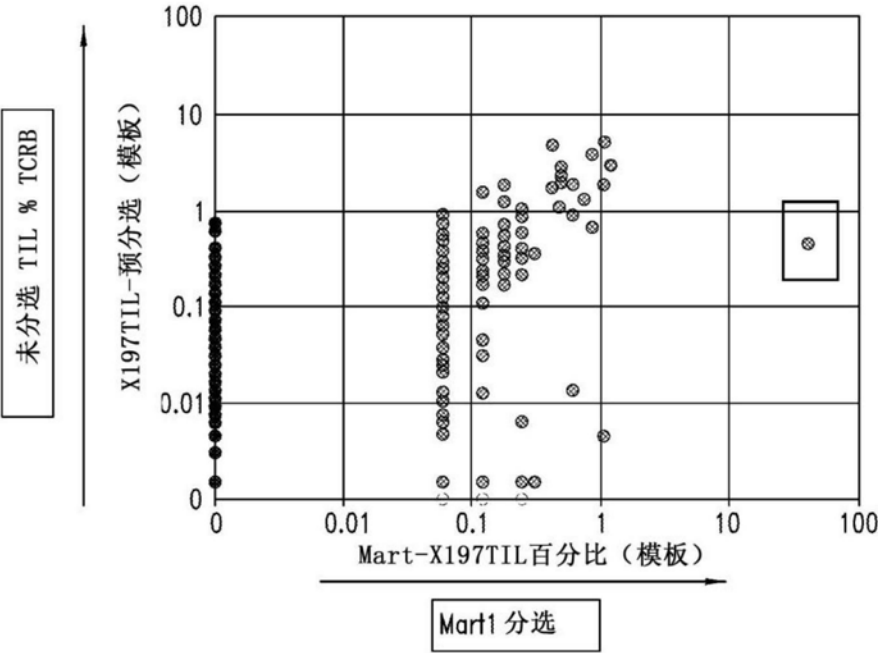


图2M

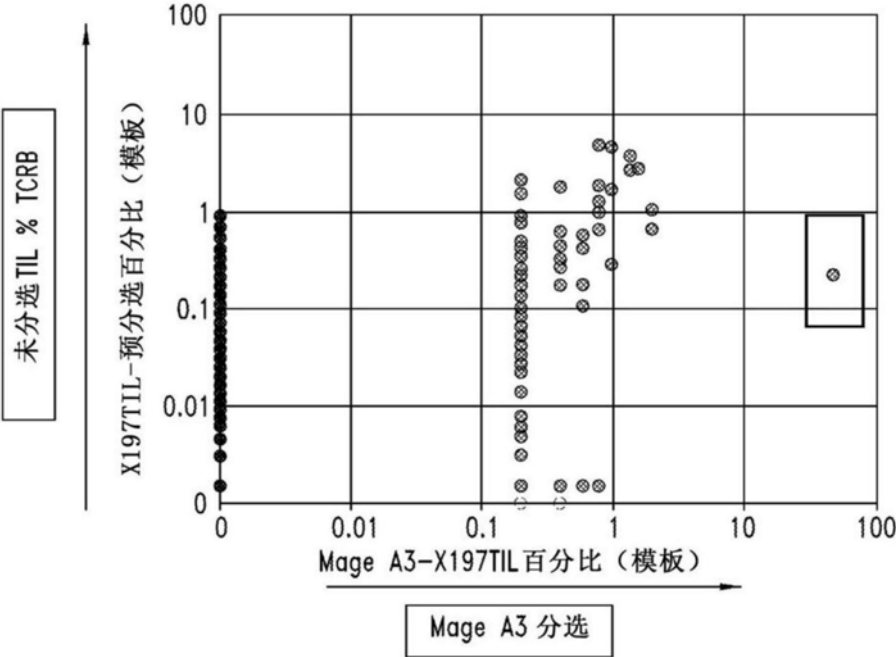


图2N

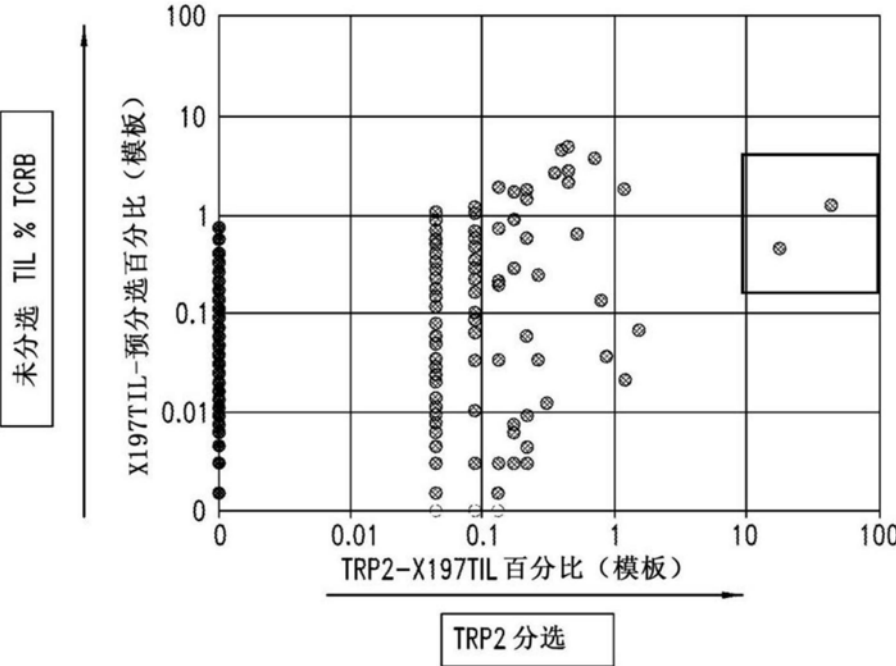


图20

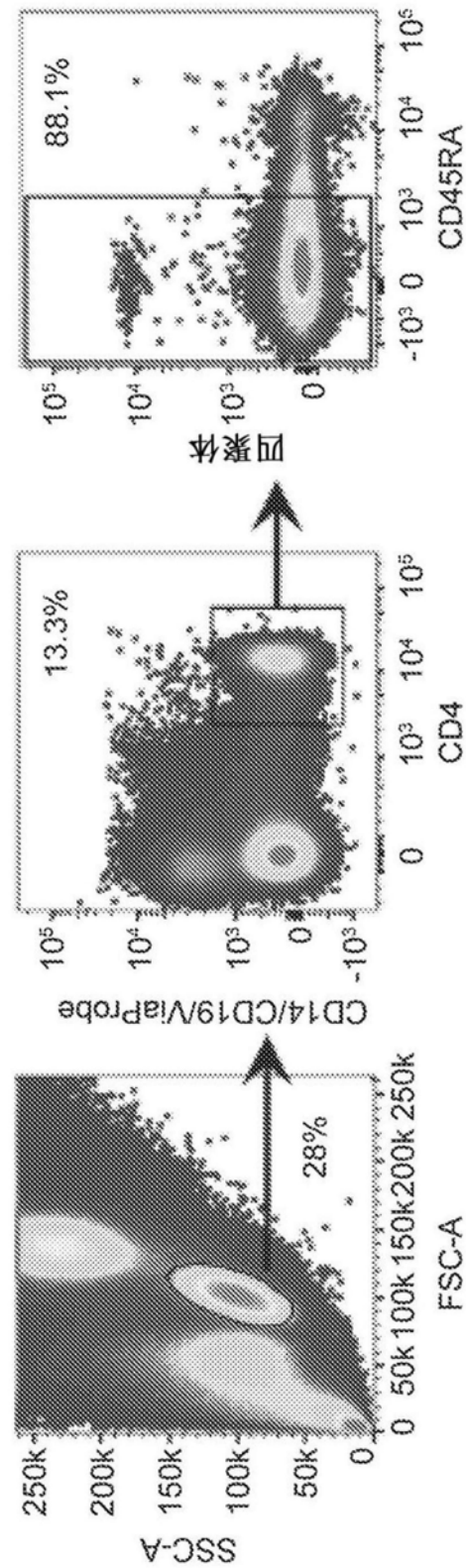


图3A

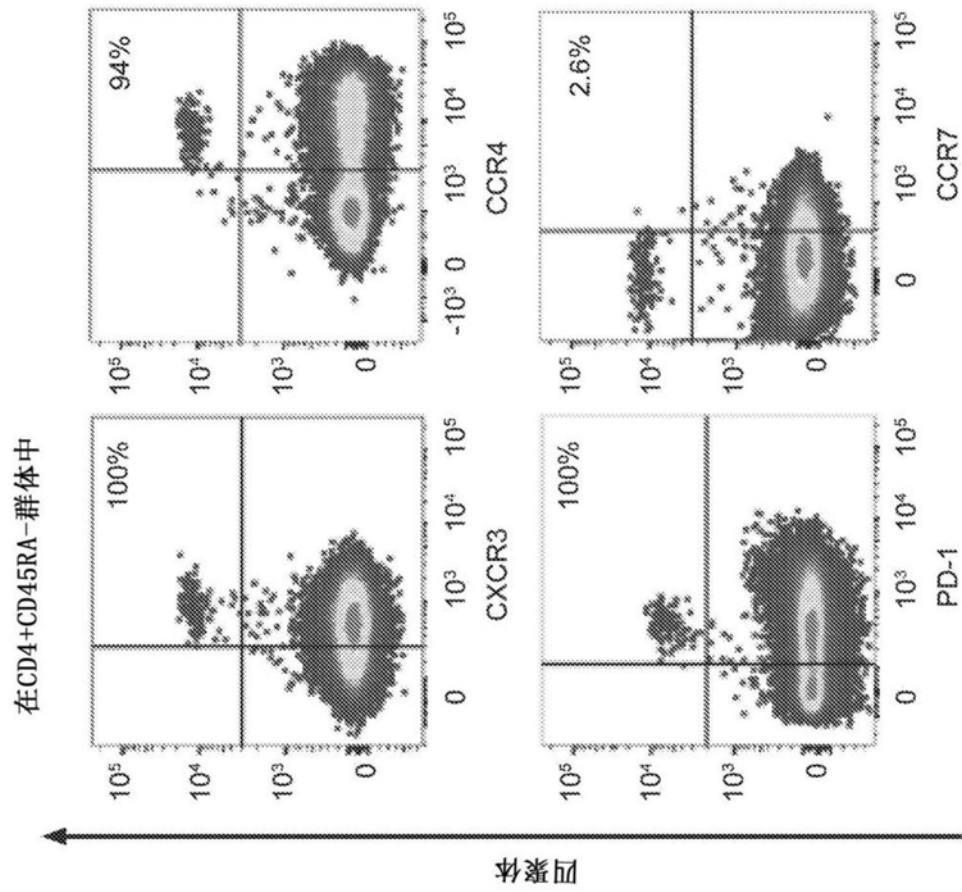


图3B

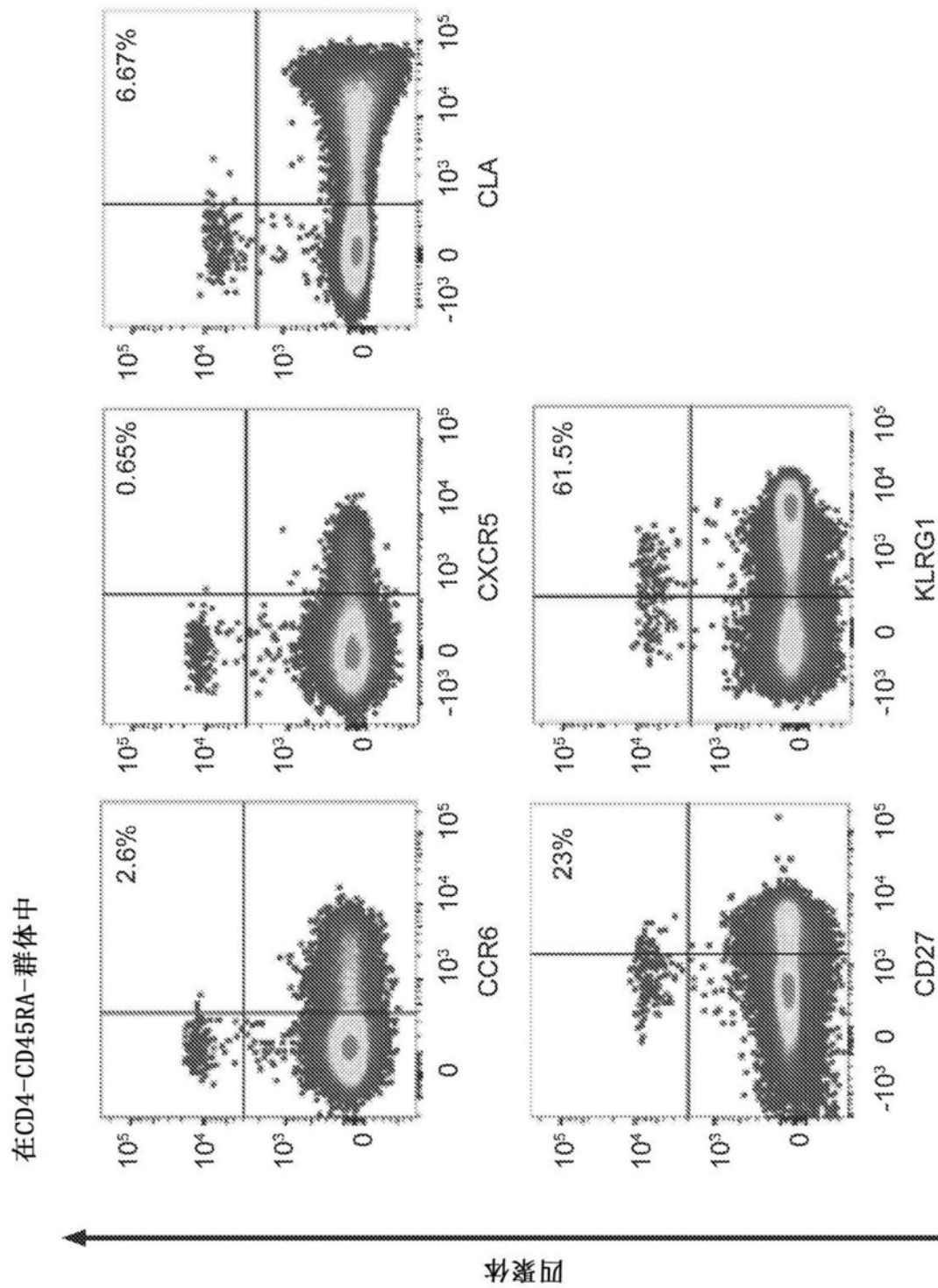


图3B续图

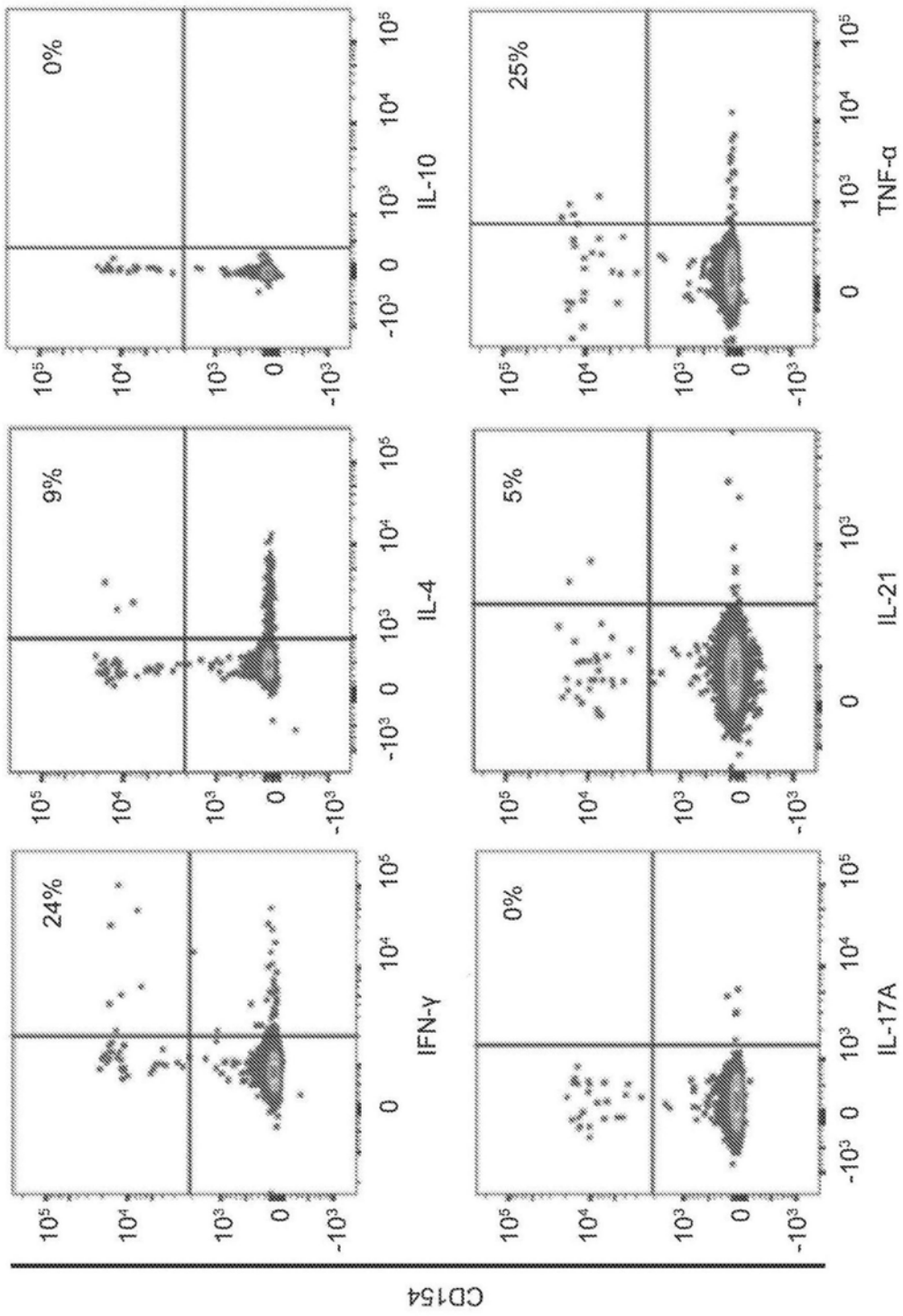


图3C

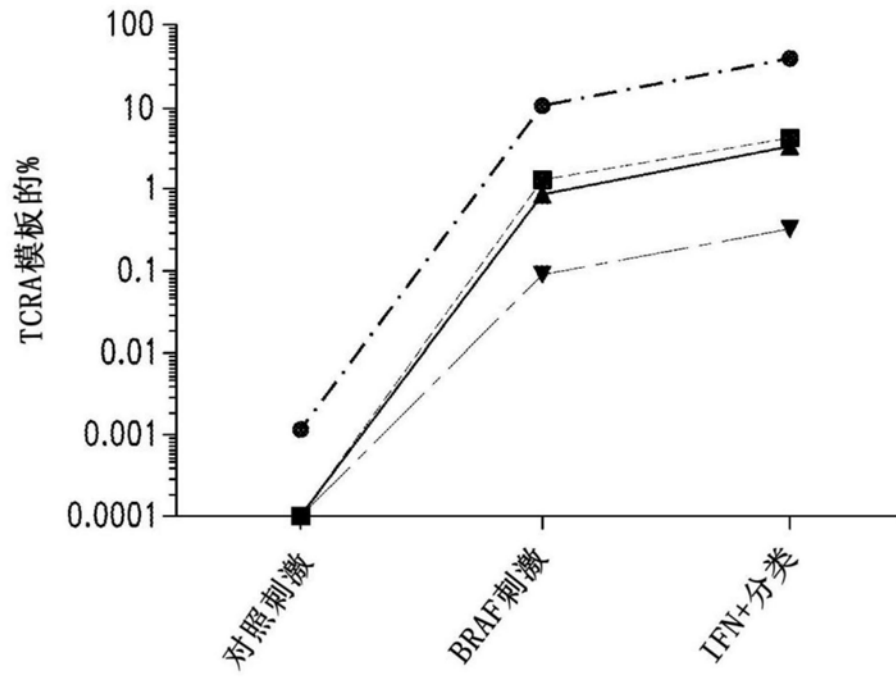


图4A

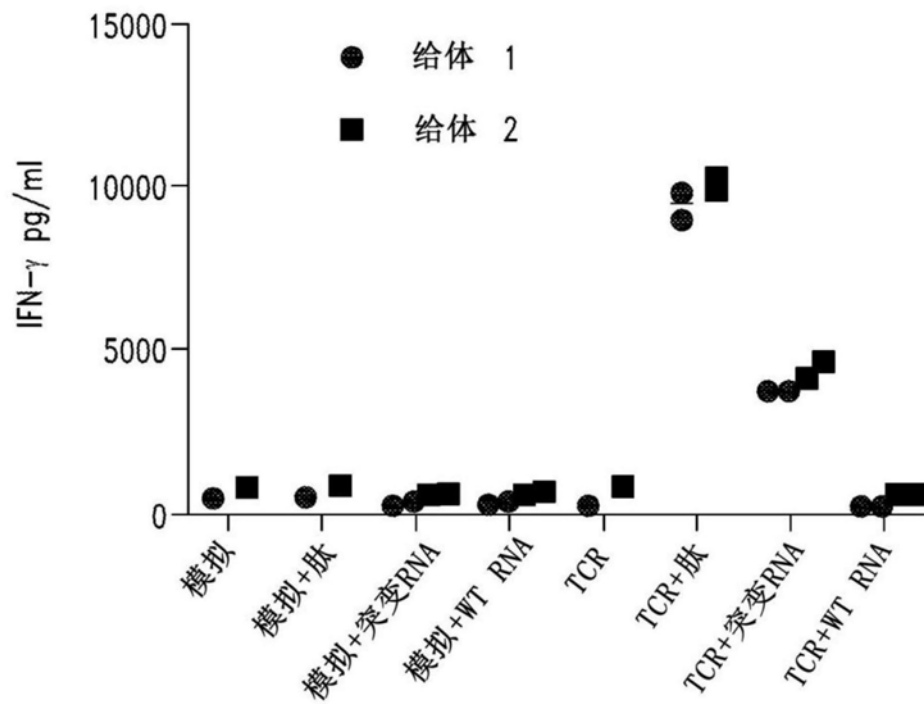


图4B

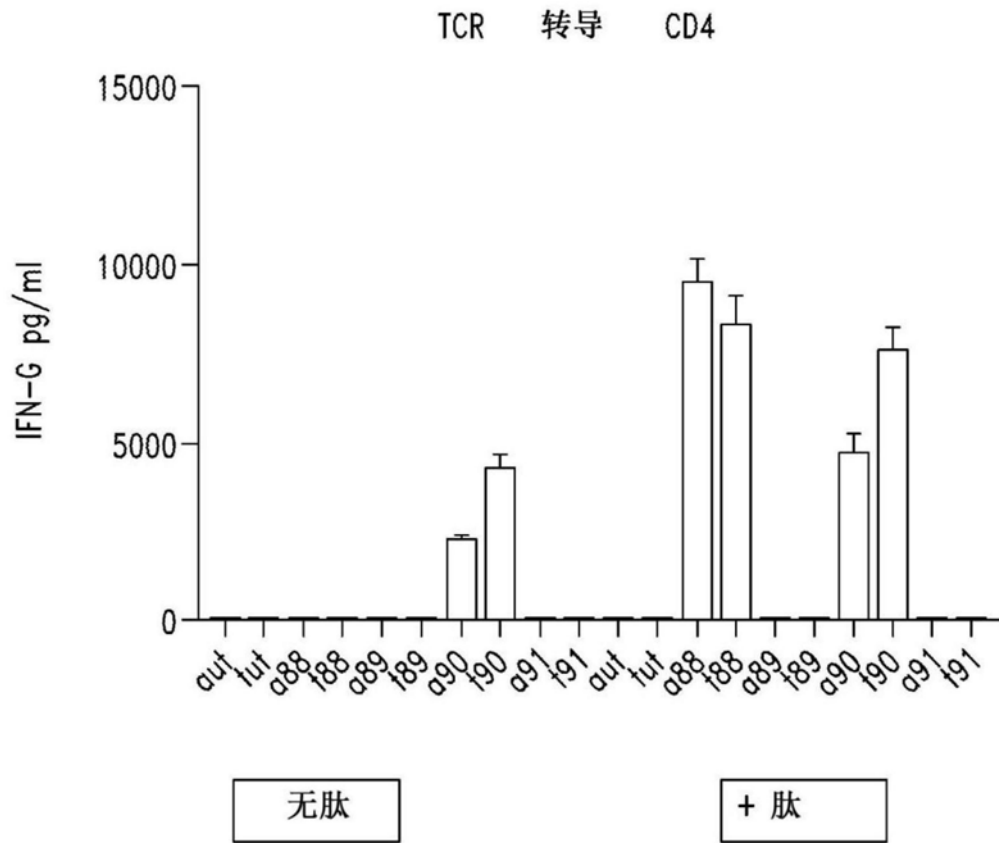


图5

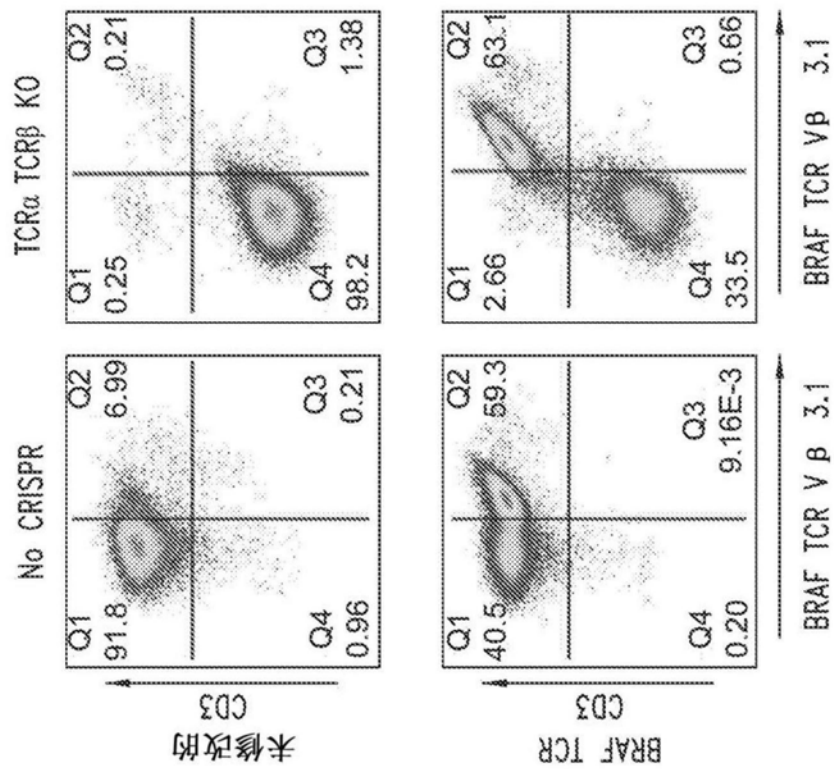


图6A

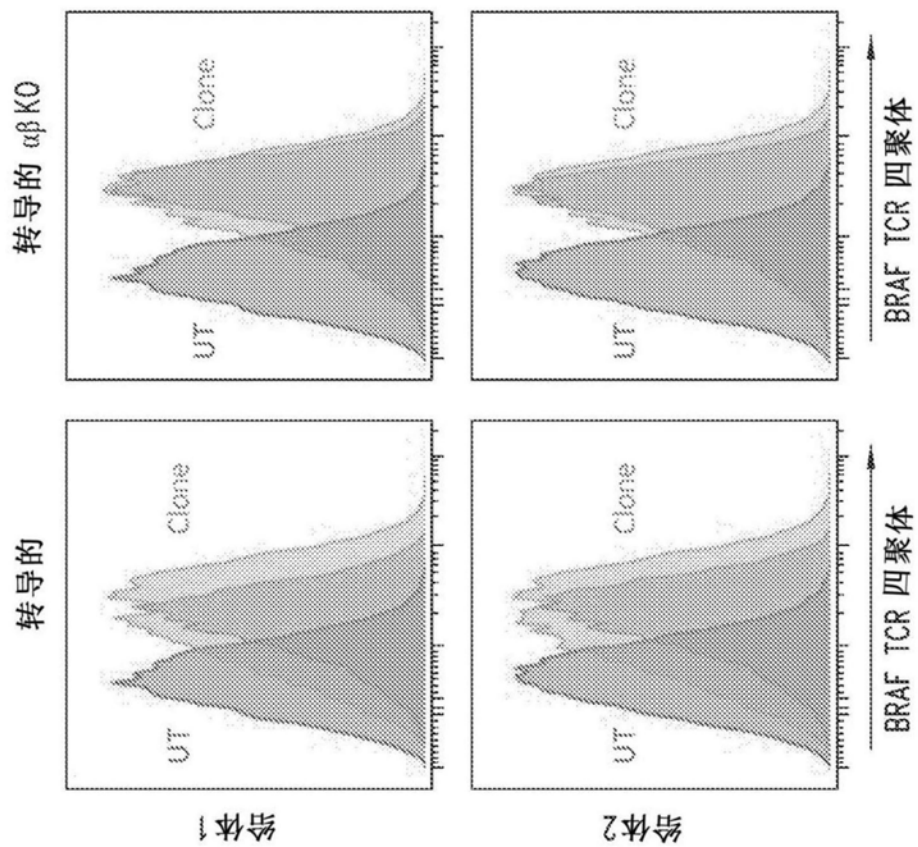


图6B