(19)国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 117425665 A
(43)申请公布日 2024.01.19

(21)申请号 202280035973.1
(22)申请日 2022.04.18
(30)优先权数据
63/176,477 2021.04.19 US
(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2023.11.17
(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2022/025223 2022.04.18
(87)PCT国际申请的公布数据
WO2022/225852 EN 2022.10.27
(71)申请人 得克萨斯州大学系统董事会
地址 美国得克萨斯州
(72)发明人 余嘉诚 潘科 赵玉伦
(74)专利代理机构 北京集佳知识产权代理有限公司 11227
专利代理师 张珊珊 韩晓帆
(51)Int.Cl.
C07K 7/06(2006.01)
C07K 19/00(2006.01)
C12N 15/62(2006.01)
C12N 5/10(2006.01)
A61K 38/08(2019.01)
A61K 39/00(2006.01)
A61P 35/00(2006.01)
A61P 35/02(2006.01)

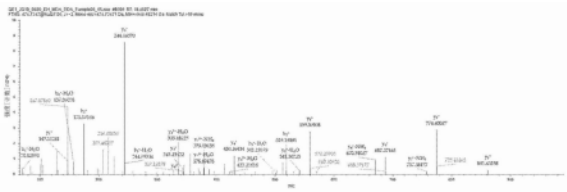
权利要求书12页 说明书61页 附图20页

(54)发明名称

包含MHC I类肽的方法和组合物

(57)摘要

本公开内容通过提供用于对个体进行治疗和疫苗接种以对抗癌症的方法和组合物而满足了本领域的需求。因此,本公开内容的一些方面涉及包含与SEQ ID NO:1或2的肽具有至少70%序列同一性的分离肽。在一些实施方案中,该肽包含SEQ ID NO:1或2的肽的至少6个连续氨基酸。另一些方面涉及包含分离肽的药物组合物、编码该肽的核酸以及包含本公开内容的核酸的表达载体和宿主细胞。还提供了包含本公开内容的肽、核酸或表达载体的体外分离的树突细胞。



CN 117425665 A

1.肽,其与IYNGKLFDL(SEQ ID NO:1)或SSSQESVPK(SEQ ID NO:2)的肽具有至少70％序列同一性。

2.权利要求1所述的肽,其中所述肽包含SEQ ID NO:1或2。

3.权利要求1或2所述的肽,其中所述肽包含SEQ ID NO:1或2的至少6个连续氨基酸。

4.权利要求1或3所述的肽,其中所述肽的长度为13个氨基酸或更少。

5.权利要求4所述的肽,其中所述肽由9个氨基酸组成。

6.权利要求1至5中任一项所述的肽,其中所述肽是免疫原性的。

7.权利要求1至6中任一项所述的肽,其中所述肽是经修饰的。

8.权利要求7所述的肽,其中所述修饰包含与分子缀合。

9.权利要求7或8所述的肽,其中所述分子包含抗体、脂质、佐剂或检测部分。

10.权利要求1至9中任一项所述的肽,其中所述肽相对于SEQ ID NO:1或2的肽具有1、2或3个替换。

11.分子复合物,其包含权利要求1至10中任一项所述的肽以及MHC多肽。

12.药物组合物,其包含权利要求1至10中任一项所述的分离肽或权利要求11所述的分子复合物以及药物载体。

13.权利要求12所述的药物组合物,其中所述药物组合物被配制成用于肠胃外施用、静脉内注射、肌内注射、吸入或皮下注射。

14.权利要求12或13所述的药物组合物,其中所述肽包含在脂质体、含脂质的纳米粒或基于脂质的载体中。

15.权利要求14所述的药物组合物,其中药物制剂被配制成用于注射或作为鼻喷剂吸入。

16.权利要求12至15中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物被配制为疫苗。

17.权利要求12至16中任一项所述的药物组合物,其中所述组合物还包含佐剂。

18.核酸,其编码权利要求1至10中任一项所述的肽。

19.表达载体,其包含权利要求18所述的核酸。

20.宿主细胞,其包含权利要求18所述的核酸或权利要求19所述的表达载体。

21.体外分离的树突细胞,其包含权利要求1至10中任一项所述的肽、权利要求18所述的核酸或权利要求19所述的表达载体。

22.权利要求21所述的树突细胞,其中所述树突细胞是成熟树突细胞。

23.权利要求21或22所述的树突细胞,其中所述细胞是HLA-A型的细胞。

24.肽特异性结合分子,其中所述分子与权利要求1至10中任一项所述的肽或权利要求11所述的分子复合物特异性结合。

25.权利要求24所述的结合分子,其中所述分子是双特异性的。

26.权利要求24或25所述的结合分子,其中所述结合分子是抗体、TCR模拟抗体、scFV、骆驼科抗体、适配体或DARPIN。

27.制备细胞的方法,其包括将权利要求18所述的核酸或权利要求19所述的表达载体转移到所述细胞中。

28.权利要求27所述的方法,其中所述方法还包括分离所表达的肽或多肽。

29.产生癌症特异性免疫效应细胞的方法,其包括:

(a)获得起始免疫效应细胞群;以及

(b)使所述起始免疫效应细胞群与权利要求1至10中任一项所述的肽或权利要求11所述的分子复合物接触,从而产生肽特异性免疫效应细胞。

30.权利要求29所述的方法,其中接触进一步限定为将所述起始免疫效应细胞群与抗原呈递细胞(APC)、人工抗原呈递细胞(aAPC)或人工抗原呈递表面(aAPS)共培养;其中所述APC、aAPC或aAPS在其表面上呈递所述肽。

31.权利要求30所述的方法,其中所述APC是树突细胞。

32.权利要求29至31中任一项所述的方法,其中所述免疫效应细胞是T细胞、外周血淋巴细胞、NK细胞、恒定NK细胞、NKT细胞。

33.权利要求29至32中任一项所述的方法,其中所述免疫效应细胞分化自间充质干细胞(MSC)或诱导多能干(iPS)细胞。

34.权利要求32所述的方法,其中所述T细胞是$CD8^+$T细胞、$CD4^+$T细胞、$CD4^+$Treg细胞或γδT细胞。

35.权利要求32所述的方法,其中所述T细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。

36.权利要求29至35中任一项所述的方法,其中获得包括从外周血单个核细胞(PBMC)中分离所述起始免疫效应细胞群。

37.权利要求29至36中任一项所述的方法,其中所述起始免疫效应细胞群获自对象。

38.权利要求37所述的方法,其中所述对象是人。

39.权利要求37或38所述的方法,其中所述对象患有癌症。

40.权利要求39所述的方法,其中所述癌症包含对于所述肽的表达呈阳性的肿瘤细胞。

41.权利要求1至40中任一项所述的方法,其中所述癌症包含白血病、肺癌或皮肤癌。

42.权利要求29至41中任一项所述的方法,其中所述癌症包含实体瘤。

43.权利要求29至42中任一项所述的方法,其中所述癌症包含肺癌。

44.权利要求43所述的方法,其中所述肺癌包含腺癌或鳞状细胞癌。

45.权利要求31至41中任一项所述的方法,其中所述方法还包括在所述共培养之前将所述肽或编码所述肽的核酸引入到所述树突细胞中。

46.权利要求45所述的方法,其中所述肽或编码所述肽的核酸通过电穿孔引入。

47.权利要求45所述的方法,其中所述肽或编码所述肽的核酸通过将所述肽或编码所述肽的核酸添加至树突细胞培养基中来引入。

48.权利要求45所述的方法,其中所述免疫效应细胞与已引入所述肽或编码所述肽的核酸的第二树突细胞群共培养。

49.权利要求45所述的方法,其中在所述共培养之后,从所述免疫效应细胞纯化CD8或CD4阳性和肽MHC四聚体阳性T细胞群。

50.权利要求49所述的方法,其中通过限制或连续稀释,随后是通过快速扩增方案扩增单个克隆来产生肽特异性免疫效应细胞的克隆群。

51.权利要求50所述的方法,其中所述方法还包括从所述肽特异性免疫效应细胞的克隆群克隆T细胞受体(TCR)。

52.权利要求51所述的方法,其中克隆所述TCR是克隆TCRα链和TCRβ链。

53.权利要求51或权利要求52所述的方法,其中所述TCR是使用5'-cDNA末端快速扩增

(RACE)方法来克隆的。

54.权利要求53所述的方法,其中所克隆的TCR被亚克隆至表达载体中。

55.权利要求54所述的方法,其中所述表达载体是逆转录病毒载体或慢病毒载体。

56.权利要求55所述的方法,其中用所述表达载体转导宿主细胞以产生表达所述TCR的经改造细胞。

57.权利要求56所述的方法,其中所述宿主细胞是免疫细胞。

58.权利要求31至57中任一项所述的方法,其中所述免疫细胞是T细胞并且所述经改造细胞是经改造T细胞。

59.权利要求58所述的方法,其中所述T细胞是$CD8^+$T细胞、CD4+T细胞、$CD4^+$Treg细胞或γδT细胞并且所述经改造细胞是经改造T细胞。

60.权利要求59所述的方法,其中所述起始免疫效应细胞群获自患有癌症的对象并且所述宿主细胞与所述对象是同种异体的或自体的。

61.权利要求60所述的方法,其中所述癌症对于所述肽的表达呈阳性。

62.权利要求58或59所述的方法,其中从经转导的宿主细胞纯化CD8或CD4阳性和肽MHC四聚体阳性的经改造T细胞群。

63.权利要求49所述的方法,其中通过限制或连续稀释,随后是通过快速扩增方案扩增单个克隆来产生肽特异性的经改造T细胞的克隆群。

64.肽特异性的经改造T细胞,其根据权利要求29至63中任一项所述的方法来产生。

65.多肽,其包含抗原结合可变区,所述抗原结合可变区包含含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3。

66.权利要求65所述的多肽,其中所述可变区包含CDR1、CDR2和/或CDR3。

67.权利要求66所述的多肽,其中所述可变区包含分别具有SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的氨基酸序列或分别与SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性的CDR1和/或CDR2。

68.权利要求65至67中任一项所述的多肽,其中所述可变区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5具有至少70%序列同一性的氨基酸序列。

69.权利要求65至68中任一项所述的多肽,其中所述多肽包含T细胞受体α(TCR-a)可变区。

70.权利要求69所述的多肽,其中所述多肽包含TCR-a可变区和恒定区。

71.权利要求65至70中任一项所述的多肽,其中所述多肽还包含信号肽。

72.权利要求71所述的多肽,其中所述信号肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的氨基酸序列。

73.多肽,其包含抗原结合可变区,所述抗原结合可变区包含含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列或与SEQ ID NO:16具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3。

74.权利要求73所述的多肽,其中所述可变区包含CDR1、CDR2和/或CDR3。

75.权利要求74所述的多肽,其中所述可变区包含分别具有SEQ ID NO:14和15的氨基酸序列或分别与SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR1和/或CDR2。

76.权利要求73至75中任一项所述的多肽,其中所述可变区包含SEQ ID NO:12的氨基

酸序列或与SEQ ID NO:12具有至少70％序列同一性的氨基酸序列。

77.权利要求73至76中任一项所述的多肽,其中所述多肽包含T细胞受体β(TCR-b)可变区。

78.权利要求77所述的多肽,其中所述多肽包含TCR-b可变区和恒定区。

79.权利要求73至78中任一项所述的多肽,其中所述多肽还包含信号肽。

80.权利要求79所述的多肽,其中所述信号肽包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列或与SEQ ID NO:13具有至少80％同一性的氨基酸序列。

81.权利要求65至80中任一项所述的多肽,其中所述多肽包含TCR-a和TCR-b可变区。

82.权利要求65至81中任一项所述的多肽,其中所述多肽是重组的。

83.多肽,其包含抗原结合可变区,所述抗原结合可变区包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列或与SEQ ID NO:23具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR3。

84.权利要求83所述的多肽,其中所述可变区包含CDR1、CDR2和/或CDR3。

85.权利要求84所述的多肽,其中所述可变区包含分别具有SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22的氨基酸序列或分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22具有至少80％序列同一性的CDR1和/或CDR2。

86.权利要求83至85中任一项所述的多肽,其中所述可变区包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或与SEQ ID NO:19具有至少70％序列同一性的氨基酸序列。

87.权利要求83至86中任一项所述的多肽,其中所述多肽包含T细胞受体α(TCR-a)可变区。

88.权利要求87所述的多肽,其中所述多肽包含TCR-a可变区和恒定区。

89.权利要求83至88中任一项所述的多肽,其中所述多肽还包含信号肽。

90.权利要求89所述的多肽,其中所述信号肽包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列或与SEQ ID NO:20具有至少80％同一性的氨基酸序列。

91.多肽,其包含抗原结合可变区,所述抗原结合可变区包含含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列或与SEQ ID NO:30具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR3。

92.权利要求91所述的多肽,其中所述可变区包含CDR1、CDR2和/或CDR3。

93.权利要求92所述的多肽,其中所述可变区包含分别具有SEQ ID NO:28和29的氨基酸序列或分别与SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR1和/或CDR2。

94.权利要求91至93中任一项所述的多肽,其中所述可变区包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列或与SEQ ID NO:26具有至少70％序列同一性的氨基酸序列。

95.权利要求91至94中任一项所述的多肽,其中所述多肽包含T细胞受体β(TCR-b)可变区。

96.权利要求95所述的多肽,其中所述多肽包含TCR-b可变区和恒定区。

97.权利要求91至96中任一项所述的多肽,其中所述多肽还包含信号肽。

98.权利要求83至97中任一项所述的多肽,其中所述多肽包含TCR-a和TCR-b可变区。

99.权利要求83至98中任一项所述的多肽,其中所述多肽是重组的。

100.权利要求97所述的多肽,其中所述信号肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列或与SEQ ID NO:27具有至少80％同一性的氨基酸序列。

101.核酸,其编码权利要求65至100中任一项所述的多肽。

102.权利要求101所述的核酸,其中所述核酸是cDNA。

103.经改造T细胞受体(TCR),其包含TCR-a区和TCR-b区,其中所述TCR-a区包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3,并且所述TCR-b区包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列或与SEQ ID NO:16具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3。

104.权利要求103所述的TCR,其中所述TCR包含TCR-a区和TCR-b区,所述TCR-a区包含含有CDR1、CDR2和CDR3的可变区,所述TCR-b区包含含有CDR1、CDR2和CDR3的可变区。

105.权利要求104所述的TCR,其中所述TCR-a区包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:7具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR1,和/或所述TCR-b区包含具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:14具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR1。

106.权利要求104或105所述的TCR,其中所述TCR-a区包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR2,和/或所述TCR-b区包含具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:15具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR2。

107.权利要求103至106中任一项所述的TCR,其中所述TCR-a区的CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:7、8和9的氨基酸序列,并且其中所述TCR-b区的CDR1、CDR3和CDR3分别包含SEQ ID NO:14、15和16的氨基酸序列。

108.权利要求103至107中任一项所述的TCR,其中所述TCR-a区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5具有至少70%序列同一性的氨基酸序列,并且所述TCR-b区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12具有至少70%序列同一性的氨基酸序列。

109.经改造T细胞受体(TCR),其包含TCR-a区和TCR-b区,其中所述TCR-a区包含具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列或与SEQ ID NO:23具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3,并且所述TCR-b区包含具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列或与SEQ ID NO:30具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3。

110.权利要求109所述的TCR,其中所述TCR包含TCR-a区和TCR-b区,所述TCR-a区包含含有CDR1、CDR2和CDR3的可变区,所述TCR-b区包含含有CDR1、CDR2和CDR3的可变区。

111.权利要求110所述的TCR,其中所述TCR-a区包含具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:21具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR1,和/或所述TCR-b区包含具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:28具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR1。

112.权利要求110或111所述的TCR,其中所述TCR-a区包含具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:22具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR2,和/或所述TCR-b区包含具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:29具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR2。

113.权利要求109至112中任一项所述的TCR,其中所述TCR-a区的CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:21、22和23的氨基酸序列,并且其中所述TCR-b区的CDR1、CDR3和CDR3分别包含SEQ ID NO:28、29和30的氨基酸序列。

114.权利要求109至113中任一项所述的TCR,其中所述TCR-a区包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或与SEQ ID NO:19具有至少70%序列同一性的氨基酸序列,并且所述TCR-b区包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列或与SEQ ID NO:26具有至少70%序列同一性的氨基酸序列。

115.权利要求103至114中任一项所述的TCR,其中所述TCR是单链TCR。

116.权利要求103至114中任一项所述的TCR,其中所述TCR-a区和所述TCR-b区在不同的多肽上。

117.权利要求103至114中任一项所述的TCR,其中所述TCR-a区和所述TCR-b区在同一多肽上。

118.多肽,其包含权利要求103至117中任一项所述的TCR,其中所述多肽是双特异性的。

119.融合蛋白,其包含权利要求103至118中任一项所述的TCR以及CD3结合区。

120.权利要求119所述的融合蛋白,其中所述CD3结合区包含CD3特异性抗原结合片段(Fab)、单链可变片段(scFv)、单结构域抗体或单链抗体。

121.核酸,其编码TCR-a多肽和/或TCR-b多肽,其中所述TCR-a多肽包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3,并且所述TCR-b多肽包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列或与SEQ ID NO:16具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3。

122.权利要求121所述的核酸,其中所述核酸编码包含CDR1、CDR2和CDR3的TCR-a多肽和/或包含CDR1、CDR2和CDR3的TCR-b多肽。

123.权利要求122所述的核酸,其中所述核酸编码:TCR-a多肽,其包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:7具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR1;和/或TCR-b多肽,其包含具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:14具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR1。

124.权利要求122或123所述的核酸,其中所述核酸编码:TCR-a多肽,其包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR2;和/或TCR-b多肽,其具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:15具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR2。

125.权利要求109至124中任一项所述的核酸,其中所述核酸编码:具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的TCR-a可变区,和/或具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的TCR-b可变区。

126.权利要求125所述的核酸,其中所述核酸编码:具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的TCR-a多肽,和/或具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列或与SEQ ID NO:11具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的TCR-b多肽链。

127.权利要求126所述的核酸,其中所述核酸包含SEQ ID NO:3、10,和/或其片段。

128.核酸,所述核酸编码:TCR-a多肽,其包含具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列或与SEQ ID NO:23具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3;和/或TCR-b多肽,其包含具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列或与SEQ ID NO:30具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3。

129.权利要求128所述的核酸,其中所述核酸编码包含CDR1、CDR2和CDR3的TCR-a多肽和/或包含CDR1、CDR2和CDR3的TCR-b多肽。

130.权利要求129所述的核酸,其中所述核酸编码:TCR-a,其包含具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:21具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR1;和/或TCR-b多肽,其包含具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:28具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR1。

131.权利要求129或130的核酸,其中所述核酸编码:TCR-a多肽,其包含具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:22具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR2;和/或TCR-b多肽,其包含具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:29具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR2。

132.权利要求128至131中任一项所述的核酸,其中所述核酸编码:具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列或与SEQ ID NO:19具有至少70％序列同一性的氨基酸序列的TCR-a可变区,和/或具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列或与SEQ ID NO:26具有至少70％序列同一性的氨基酸序列的TCR-b可变区。

133.权利要求132所述的核酸,其中所述核酸编码:具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列或与SEQ ID NO:18具有至少70％序列同一性的氨基酸序列的TCR-a多肽链,和/或具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列或与SEQ ID NO:25具有至少70％序列同一性的氨基酸序列的TCR-b多肽链。

134.权利要求133所述的核酸,其中所述核酸包含SEQ ID NO:17、24,和/或其片段。

135.权利要求121至134中任一项所述的核酸,其中所述核酸在同一核酸上包含至少一个TCR-a(TRA)基因和至少一个TCR-b(TRB)基因。

136.权利要求121至135中任一项所述的核酸,其中所述核酸是多顺反子的。

137.权利要求136所述的核酸,其中所述核酸包含内部核糖体进入位点(IRES)或2A可切割接头。

138.权利要求121至137中任一项所述的核酸,其中所述核酸包含编码所述TCR-a和/或TCR-b基因的cDNA。

139.权利要求121至138中任一项所述的核酸,其中所述核酸还编码包含CD3结合区的多肽。

140.权利要求139所述的核酸,其中所述CD3结合区包含CD3特异性抗原结合片段(Fab)、单链可变片段(scFv)、单结构域抗体或单链抗体。

141.权利要求121至140中任一项所述的核酸,其中所述核酸是cDNA。

142.核酸载体,其包含权利要求101、102或121至141中任一项所述的核酸。

143.权利要求142所述的载体,其中所述载体包含指导所述核酸的表达的启动子。

144.权利要求143所述的载体,其中所述启动子包含鼠干细胞病毒(MSCV)启动子。

145.权利要求142至144中任一项所述的载体,其中所述载体包含TCR-a和TCR-b基因。

146.细胞,其包含权利要求65至100中任一项所述的多肽、权利要求103至114中任一项所述的TCR、权利要求115或118中任一项所述的融合蛋白、权利要求101、102或121至141中任一项所述的核酸或者权利要求142至145中任一项所述的载体。

147.权利要求146所述的细胞,其中所述细胞包含干细胞、祖细胞、免疫细胞或自然杀

伤(NK)细胞。

148.权利要求147所述的细胞,其中所述细胞包含造血干细胞或祖细胞、T细胞、从间充质干细胞(MSC)或诱导多能干细胞(iPSC)分化的细胞。

149.权利要求146或147所述的细胞,其中所述细胞分离自或来源于外周血单个核细胞(PBMC)。

150.权利要求148或149所述的细胞,其中所述T细胞包含细胞毒性T淋巴细胞(CTL)、$CD8^+$T细胞、$CD4^+$T细胞、恒定NK T(iNKT)细胞、γ-δT细胞、NKT细胞、调节性T细胞或$CD4^+$调节性细胞。

151.权利要求146至150中任一项所述的细胞,其中所述细胞分离自癌症患者。

152.组合物,其包含权利要求64所述的肽特异性T细胞、权利要求65至100或118中任一项所述的多肽、权利要求103至115中任一项所述的TCR、权利要求119或120所述的融合蛋白、权利要求101、102或121至141中任一项所述的核酸或者权利要求142至145中任一项所述的载体。

153.权利要求152所述的组合物,其中所述组合物已被确定为无血清、无支原体、无内毒素和/或无菌的。

154.制备经改造细胞的方法,其包括将权利要求101、102或121至141中任一项所述的核酸或者权利要求142至145中任一项所述的载体转移到细胞中。

155.权利要求154所述的方法,其中所述方法还包括在培养基中培养所述细胞、在允许所述细胞分裂的条件下孵育所述细胞、筛选所述细胞和/或冷冻所述细胞。

156.在对象中治疗或预防癌症的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的权利要求1至10中任一项所述的肽或者权利要求11所述的分子复合物、权利要求12至17或152至155中任一项所述的药物组合物、权利要求18、19或142至145中任一项所述的核酸或表达载体、权利要求21至23中任一项所述的树突细胞或者权利要求64所述的肽特异性T细胞、权利要求65至100或118中任一项所述的多肽、权利要求103至115中任一项所述的TCR、权利要求119或120所述的融合蛋白。

157.在对象中刺激免疫应答的方法,所述方法包括向所述对象施用有效量的权利要求1至10中任一项所述的肽或者权利要求11所述的分子复合物、权利要求12至17或152至155中任一项所述的药物组合物、权利要求18、19或142至145中任一项所述的核酸或表达载体、权利要求21至23中任一项所述的树突细胞或者权利要求64所述的肽特异性T细胞、权利要求65至100或118中任一项所述的多肽、权利要求103至115中任一项所述的TCR、权利要求119或120所述的融合蛋白。

158.权利要求156或157所述的方法,其中所述对象是人。

159.权利要求156至158中任一项所述的方法,其中所述肽特异性T细胞是自体的或同种异体的。

160.权利要求156至159中任一项所述的方法,其还包括施用至少第二治疗剂。

161.权利要求160所述的方法,其中所述第二治疗剂是抗癌剂。

162.权利要求156至161中任一项所述的方法,其中所述对象已被诊断出患有癌症。

163.权利要求162所述的方法,其中所述癌症包含对于所述肽的表达呈阳性的癌症。

164.权利要求156至163中任一项所述的方法,其中所述癌症包含白血病、肺癌或皮肤

癌。

165.权利要求156至164中任一项所述的方法,其中所述癌症包含实体瘤。

166.权利要求156至165中任一项所述的方法,其中所述癌症包含肺癌。

167.权利要求166所述的方法,其中所述肺癌包含腺癌或鳞状细胞癌。

168.权利要求156至167中任一项所述的方法,其中治疗包括以下中的一种或更多种:降低肿瘤尺寸;提高总存活率;降低癌症复发的风险;降低进展的风险;和/或提高无进展存活、无再发存活和/或无复发存活的机会。

169.克隆肽特异性T细胞受体(TCR)的方法,所述方法包括:

(a)获得起始免疫效应细胞群;

(b)使所述起始免疫效应细胞群与权利要求1至10中任一项所述的肽接触,从而产生肽特异性免疫效应细胞;

(c)纯化对所述肽具有特异性的免疫效应细胞,以及

(d)从所纯化的免疫效应细胞中分离TCR序列。

170.权利要求169所述的方法,其中接触进一步限定为将所述起始免疫效应细胞群与抗原呈递细胞(APC)、人工抗原呈递细胞(aAPC)或人工抗原呈递表面(aAPS)共培养;其中所述APC、aAPC或aAPS在其表面上呈递所述肽。

171.权利要求170所述的方法,其中所述APC是树突细胞。

172.权利要求169所述的方法,其中所述免疫效应细胞是T细胞、外周血淋巴细胞、NK细胞、恒定NK细胞、NKT细胞。

173.权利要求169所述的方法,其中所述免疫效应细胞分化自间充质干细胞(MSC)或诱导多能干(iPS)细胞。

174.权利要求172所述的方法,其中所述T细胞是$CD8^+$T细胞、$CD4^+$T细胞、$CD4^+$Treg细胞或γδT细胞。

175.权利要求172所述的方法,其中所述T细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。

176.权利要求169至176中任一项所述的方法,其中获得包括从外周血单个核细胞(PBMC)中分离所述起始免疫效应细胞群。

177.权利要求169至176中任一项所述的方法,其中所述起始免疫效应细胞群获自对象。

178.权利要求177所述的方法,其中所述对象是人。

179.权利要求178所述的方法,其中所述对象患有癌症。

180.权利要求169至179中任一项所述的方法,其中所述癌症包含白血病、肺癌或皮肤癌。

181.权利要求169至180中任一项所述的方法,其中所述癌症包含实体瘤。

182.权利要求169至181中任一项所述的方法,其中所述癌症包含肺癌。

183.权利要求182所述的方法,其中所述肺癌包含腺癌或鳞状细胞癌。

184.权利要求171至182中任一项所述的方法,其中所述方法还包括在所述共培养之前将所述肽或编码所述肽的核酸引入到所述树突细胞中。

185.权利要求184所述的方法,其中所述肽或编码所述肽的核酸通过电穿孔引入。

186.权利要求184所述的方法,其中所述肽或编码所述肽的核酸通过将所述肽或编码

所述肽的核酸添加至所述树突细胞的培养基中来引入。

187.权利要求184所述的方法,其中所述免疫效应细胞与已引入所述肽或编码所述肽的核酸的第二树突细胞群共培养。

188.权利要求184所述的方法,其中纯化限定为在所述共培养后从所述免疫效应细胞中纯化CD4或CD8阳性和肽MHC四聚体阳性T细胞群。

189.权利要求188所述的方法,其中所述CD4或CD8阳性和肽MHC四聚体阳性T细胞群通过荧光激活细胞分选(FACS)来纯化。

190.权利要求189所述的方法,其中纯化还包括通过限制或连续稀释分选的细胞,随后是通过快速扩增方案扩增单个克隆来产生肽特异性免疫效应细胞的克隆群。

191.权利要求190所述的方法,其中分离限定为从所述肽特异性免疫效应细胞的克隆群中克隆T细胞受体(TCR)。

192.权利要求169至191中任一项所述的方法,其中所述方法还包括对TCRα基因和/或TCRβ基因进行测序和/或通过互补位热点(GLIPH)分析对淋巴细胞相互作用进行分组。

193.权利要求191或192所述的方法,其中克隆所述TCR是克隆TCRα链和TCRβ链。

194.权利要求193所述的方法,其中所述TCRα链和TCRβ链是使用5'-cDNA末端快速扩增(RACE)方法来克隆的。

195.权利要求194所述的方法,其中所克隆的TCR被亚克隆至表达载体中。

196.权利要求195所述的方法,其中所述表达载体包含TCRα序列与TCRβ序列之间的接头结构域。

197.权利要求196所述的方法,其中所述接头结构域包含编码一个或更多个肽切割位点的序列。

198.权利要求197所述的方法,其中所述一个或更多个切割位点是弗林蛋白酶切割位点和/或P2A切割位点。

199.权利要求198所述的方法,其中所述TCRα序列和TCRβ序列通过IRES序列连接。

200.权利要求195至199中任一项所述的方法,其中所述表达载体是逆转录病毒载体或慢病毒载体。

201.权利要求200所述的方法,其中用所述表达载体转导宿主细胞以产生表达所述TCRα链和TCRβ链的经改造细胞。

202.权利要求201所述的方法,其中所述宿主细胞是免疫细胞。

203.TCR,其通过权利要求169至202中任一项所述的方法产生。

204.融合蛋白,其包含与T细胞结合区融合的权利要求203所述的TCR的肽结合区。

205.权利要求204所述的融合蛋白,其中所述TCR的肽结合区包含TCR的α和β可变区。

206.权利要求204或205所述的融合蛋白,其中所述T细胞结合区包含CD3结合区。

207.权利要求206所述的融合蛋白,其中所述CD3结合区包含抗CD3Fab。

208.用于对患者进行预后或用于在患者中检测T细胞应答的方法,所述方法包括:使来自所述患者的生物样品与权利要求1至10中任一项所述的肽或权利要求11所述的分子复合物接触。

209.权利要求208所述的方法,其中所述生物样品包含血液样品或其级分。

210.权利要求209所述的方法,其中所述生物样品包含淋巴细胞。

211.权利要求210所述的方法,其中所述生物样品包含含有淋巴细胞的分级样品。

212.权利要求208至211中任一项所述的方法,其中所述肽与固体支持物连接。

213.权利要求212所述的方法,其中所述肽与所述固体支持物缀合或者与缀合至所述固体支持物的抗体结合。

214.权利要求212所述的方法,其中所述固体支持物包含微板、珠、玻璃表面、载片或细胞培养皿。

215.权利要求208至214中任一项所述的方法,其中检测T细胞应答包括检测所述肽与所述T细胞或TCR的结合。

216.权利要求208至215中任一项所述的方法,其中检测T细胞应答包括ELISA、ELISPOT或四聚体测定。

217.组合物,其包含至少一种MHC多肽和权利要求1至10中任一项所述的肽。

218.权利要求217所述的组合物,其中所述MHC多肽与检测标签缀合和/或肽与检测标签缀合。

219.权利要求217或218所述的组合物,其中所述MHC多肽和肽有效连接以形成肽-MHC复合物。

220.权利要求219所述的组合物,其中所述MHC多肽和肽通过肽键有效连接。

221.权利要求219所述的组合物,其中所述MHC多肽和肽通过范德华力有效连接。

222.权利要求219至221中任一项所述的组合物,其中至少两个肽-MHC复合物彼此有效连接。

223.权利要求222所述的组合物,其中至少3或4个肽-MHC复合物彼此有效连接。

224.权利要求217至223中任一项所述的组合物,其中MHC多肽与肽的平均比率为1:1至4:1。

225.方法,其包括使权利要求218至224中任一项所述的组合物与包含T细胞的组合物接触,以及通过对检测标签进行检测来检测具有结合肽和/或MHC多肽的T细胞。

226.权利要求225所述的方法,其中所述方法还包括对与肽和/或MHC结合的T细胞的数目进行计数。

227.权利要求225或226所述的方法,其中所述包含T细胞的组合物分离自患有或被怀疑患有癌症的患者。

228.权利要求227所述的方法,其中所述癌症包含肽特异性癌症。

229.权利要求227所述的方法,其中所述肽选自SEQ ID NO:1或2的肽。

230.权利要求225至229中任一项所述的方法,其中所述方法还包括分选与肽和/或MHC结合的T细胞的数目。

231.权利要求230所述的方法,其中所述方法还包括对来自与肽和/或MHC结合的T细胞的一个或更多个TCR基因进行测序。

232.权利要求231所述的方法,其中所述方法还包括通过互补位热点(GLIPH)分析对淋巴细胞相互作用进行分组。

233.药盒,其在容器中包含权利要求1至10中任一项所述的肽。

234.权利要求233所述的药盒,其中所述肽包含在药物制剂中。

235.权利要求234所述的药盒,其中所述药物制剂被配制成用于肠胃外施用或吸入。

236.权利要求233所述的药盒,其中所述肽包含在细胞培养基中。

包含MHC Ⅰ类肽的方法和组合物

[0001] 背景

[0002] 本申请要求于2021年4月19日提交的美国临时专利申请No.63/176,477的优先权,其在此通过引用整体并入本文。

Ⅰ.技术领域

[0003] 本发明涉及癌症治疗领域。

Ⅱ.背景技术

[0004] 过继性T细胞治疗(adoptive T cell therapy,ACT;还称作“过继性细胞转移”)已经显示出作为用于治疗黑素瘤的方法的显著前景;遗憾的是,这种方法也已由于包括对非癌组织的毒性在内的限制而受到阻碍。ACT通常涉及,其涉及将大量自体活化的肿瘤特异性T细胞输注到患者中,例如,以治疗癌症。ACT已在黑素瘤患者中引起治疗性临床应答(Yee 2002;Dudley 2002;Yee 2014;Chapuis 2016)。一般而言,为了产生有效的抗肿瘤T细胞应答,通常需要以下三个步骤:使抗原特异性T细胞致敏并活化,使活化的T细胞迁移至肿瘤部位,以及通过抗原特异性T细胞来识别并杀伤肿瘤。靶抗原的选择对于诱导有效的抗原特异性T细胞是重要的。

[0005] 虽然已经鉴定了黑素瘤和少数其他实体瘤恶性肿瘤的数种肿瘤相关抗原,但是对于胰腺癌、卵巢癌、胃癌、肺癌、宫颈癌、乳腺癌和头颈癌的免疫原性靶标很少。鉴定和验证这些通常用于治疗恶性肿瘤和难以治疗恶性肿瘤的新表位和靶抗原是有必要的。

发明内容

[0006] 本公开内容通过提供用于对个体进行治疗和疫苗接种以对抗癌症的方法和组合物而满足了本领域的需求。因此,本公开内容的一些方面涉及包含与IYNGKLFDL(SEO ID NO:1)或SSSQESVPK(SEQ ID NO:2)的肽具有至少70%序列同一性的分离肽。还公开了包含本公开内容的肽和MHC多肽的分子复合物。另一些方面涉及包含分离肽、分子复合物的药物组合物,编码该肽的核酸,表达载体以及包含本公开内容的核酸和肽的宿主细胞。还提供了包含本公开内容的肽、核酸或表达载体的体外分离的树突细胞。还考虑了包含本公开内容的一种或更多种肽的多肽。

[0007] 另一些方面涉及制备细胞的方法,其包括将本公开内容的核酸或表达载体转移到细胞中,例如宿主细胞中。在一些方面中,方法还包括分离所表达的肽或多肽。本公开内容的另一些方面涉及产生癌症特异性免疫效应细胞的方法,其包括:(a)获得起始免疫效应细胞群;以及(b)使起始免疫效应细胞群与本公开内容的肽接触,从而产生肽特异性免疫效应细胞。

[0008] 本公开内容还描述了根据本公开内容的方法产生的肽特异性的经改造T细胞和包含经改造T细胞的药物组合物。另一些方面涉及在对象中治疗或预防癌症的方法,该方法包括向对象施用有效量的本公开内容的肽、分子复合物、药物组合物、核酸、表达载体、树突细

胞、肽特异性T细胞、多肽、TCR或融合蛋白。还提供了在对象中刺激免疫应答的方法,该方法包括向对象施用有效量的本公开内容的肽、分子复合物、药物组合物、核酸、表达载体、树突细胞、肽特异性T细胞、多肽、TCR或融合蛋白。另一些方面涉及克隆肽特异性T细胞受体(TCR)的方法,该方法包括(a)获得起始免疫效应细胞群;(b)使起始免疫效应细胞群与本公开内容的肽接触,从而产生肽特异性免疫效应细胞;(c)纯化对肽具有特异性的免疫效应细胞,以及(d)从所纯化的免疫效应细胞中分离TCR序列。还提供了用于对患者进行预后或用于在患者中检测T细胞应答的方法,该方法包括:使来自患者的生物样品与本公开内容的肽接触。

[0009] 本公开内容还提供了包含抗原结合可变区的多肽,所述抗原结合可变区包含含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3。一些方面涉及包含抗原结合可变区的多肽,所述抗原结合可变区包含含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列或与SEQ ID NO:16具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3。还描述了包含抗原结合可变区的多肽,所述抗原结合可变区包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列或与SEQ ID NO:23具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3。另一些方面涉及包含抗原结合可变区的多肽,所述抗原结合可变区包含含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列或与SEQ ID NO:30具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3。另一些方面涉及包含TCR-a区和TCR-b区的经改造T细胞受体(TCR),其中TCR-a区包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3,并且TCR-b区包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列或与SEQ ID NO:16具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3。另一些方面涉及包含TCR-a区和TCR-b区的经改造T细胞受体(TCR),其中TCR-a区包含具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列或与SEQ ID NO:23具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3,并且TCR-b区包含具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列或与SEQ ID NO:30具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3。

[0010] 本公开内容还涉及包含本公开内容的TCR和CD3结合区的融合蛋白。在一些方面中,CD3结合区包含CD3特异性抗原结合片段(fragment antigen binding,Fab)、单链可变片段(single chain variable fragment,scFv)、单结构域抗体或单链抗体。

[0011] 本公开内容还涉及编码本公开内容的TCR和多肽的核酸,以及包含这样的核酸、TCR和多肽的组合物和细胞。一些方面还提供了包含本公开内容核酸的表达载体。

[0012] 本公开内容的一些方面还提供了包含至少一种MHC多肽和本公开内容的肽的组合物。本公开内容的另一些方面涉及通过本公开内容的方法产生的T细胞受体(TCR)和包含与T细胞结合区融合的TCR的肽结合区的融合蛋白。在一些方面中,TCR的肽结合区包含TCR的α可变区和β可变区。在一些方面中,TCR的肽结合区包含TCR的γ可变区和δ可变区。在一些方面中,T细胞结合区包含CD3结合区。在一些方面中,CD3结合区包含抗CD3 Fab。在一些方面中,肽结合区和/或T细胞结合区可以是抗原结合片段例如scFv、Fab、单链抗体或TCR、TCR模拟抗体、纳米抗体、骆驼科抗体(camellid)、适配体和/或DARPIN。

[0013] 另一些方面涉及与本公开内容的肽结合或与肽-MHC复合物结合的肽特异性结合分子。示例性结合分子包括抗体、TCR模拟抗体、scFv、纳米抗体、骆驼科抗体、适配体和DARPIN。相关方法提供了这样的方法,其包括使包含至少一种MHC多肽和本公开内容的肽的组合物与包含T细胞的组合物接触,以及通过对检测标签进行检测来检测具有结合肽和/或

MHC多肽的T细胞。另一些方面涉及包含本公开内容的肽、核酸、表达载体或组合物的药盒。

[0014] 在一些方面中,肽包含SEQ ID NO:1或2的肽的至少6个连续氨基酸。在一些方面中,肽包含SEQ ID NO:1或2的肽的至少4、5、6、7、8或9个连续氨基酸。在一些方面中,肽包含SEQ ID NO:1或SEQ ID NO:2或者由其组成。在一些方面中,肽的长度为13个氨基酸或更短。在一些方面中,肽具有至少、至多、恰好7、8、9、10、11、12、13、14或15个氨基酸,或由其组成(或其中可推导出的任何范围)。在一个具体方面中,肽由9个氨基酸组成。在一些方面中,所述肽是免疫原性的。术语免疫原性可指产生免疫应答,例如保护性免疫应答。在一些方面中,所述肽是经修饰的。在一些方面中,修饰包括与分子缀合。该分子可以是抗体、脂质、佐剂或检测部分(标签)。在一些方面中,肽与SEQ ID NO:1或2的肽具有100%序列同一性。本公开内容的肽还包括与SEQ ID NO:1或2的肽具有至少

[0015] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0016] 序列同一性的那些。本公开内容的肽可相对于SEQ ID NO:1或2的肽具有1、2或3个替换。在一些方面中,所述肽相对于SEQ ID NO:1或2的肽具有至少或至多1、2、3、4或5个替换。

[0017] 本公开内容的多肽或TCR可包含或可包含含有CDR1、CDR2和/或CDR3的可变区。在一些方面中,多肽包含T细胞受体α(TCR-a)可变区。在一些方面中,多肽包含TCR-a可变区和恒定区。在一些方面中,多肽还包含信号肽。在一些方面中,多肽在同一多肽上包含TCR-a可变区和TCR-b可变区。

[0018] 在一些方面中,本公开内容涉及包含抗原结合可变区的多肽,所述抗原结合可变区包含含有SEQ ID NO:9的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9具有至少

[0019] 55,56-57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%,

[0020] 序列同一性的氨基酸序列的CDR3。在一些方面中,多肽包含或可变区包含分别具有SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8的氨基酸序列,或分别与SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性的CDR1和/或CDR2。在一些方面中,多肽包含或可变区包含分别与SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8具有至少

[0021] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0022] 序列同一性的氨基酸的CDR1和/或CDR2。在一些方面中,可变区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5具有至少70%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面中,多肽包含或可变区包含与SEQ ID NO:5具有至少

[0023] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0024] 序列同一性的氨基酸序列。在一些方面中,信号肽包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列或与SEQ ID NO:6具有至少80%同一性的氨基酸序列。在一些方面中,多肽包含或信号肽包含与SEQ ID NO:6具有至少55、

[0025] 56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0026] 序列同一性的氨基酸序列。

[0027] 本公开内容还提供了包含抗原结合可变区的多肽,所述抗原结合可变区包含含有SEQ ID NO:16的氨基酸序列或与SEQ ID NO:16具有至少

[0028] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0029] 序列同一性的氨基酸序列的CDR3。在一些方面中,多肽包含或可变区包含分别具有SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15的氨基酸序列,或分别与SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15具有至少80%序列同一性的CDR1和/或CDR2。在一些方面中,多肽包含或可变区包含分别与SEQ ID NO:14和SEQ ID NO:15具有至少55、

[0030] 56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0031] 序列同一性的氨基酸的CDR1和/或CDR2。在一些方面中,可变区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12具有至少70%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面中,多肽包含或可变区包含与SEQ ID NO:12具有至少

[0032] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0033] 序列同一性的氨基酸序列。在一些方面中,信号肽包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列或与SEQ ID NO:13具有至少80%同一性的氨基酸序列。在一些方面中,多肽包含或信号肽包含与SEQ ID NO:13具有至少

[0034] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0035] 序列同一性的氨基酸序列。

[0036] 本公开内容的一些方面涉及包含抗原结合可变区的多肽,所述抗原结合可变区包含含有SEQ ID NO:23的氨基酸序列或与SEQ ID NO:23具有至少

[0037] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64.65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0038] 序列同一性的氨基酸序列的CDR3。在一些方面中,多肽包含或可变区包含分别具有SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22的氨基酸序列,或分别与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22具有至少80%序列同一性的CDR1和/或CDR2。在一些方面中,多肽包含或可变区包含与SEQ ID NO:21和SEQ ID NO:22具有至少

[0039] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0040] 序列同一性的氨基酸的CDR1和/或CDR2。在一些方面中,可变区包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或与SEQ ID NO:19具有至少70%序列同一性的氨基酸序列。在一些方面中,多肽包含或可变区包含与SEQ ID NO:19具有至少

[0041] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0042] 序列同一性的氨基酸序列。在一些方面中,信号肽包含SEQ ID NO:20的氨基酸序列或与SEQ ID NO:20具有至少80%同一性的氨基酸序列。在一些方面中,多肽包含或信号

肽包含与SEQ ID NO:20具有至少

[0043] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0044] 序列同一性的氨基酸序列。

[0045] 本公开内容的一些方面涉及包含抗原结合可变区的多肽,所述抗原结合可变区包含含有SEQ ID NO:30的氨基酸序列或与SEQ ID NO:30具有至少

[0046] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0047] 序列同一性的氨基酸序列的CDR3。在一些方面中,多肽包含或可变区包含分别具有SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29的氨基酸序列,或分别与SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29具有至少80％序列同一性的CDR1和/或CDR2。在一些方面中,多肽包含或可变区包含分别与SEQ ID NO:28和SEQ ID NO:29具有至少

[0048] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0049] 序列同一性的氨基酸的CDR1和/或CDR2。在一些方面中,可变区包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列或与SEQ ID NO:26具有至少70％序列同一性的氨基酸序列。在一些方面中,多肽包含或可变区包含与SEQ ID NO:26具有至少

[0050] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％序列同一性的氨基酸序列。在一些方面中,信号肽包含SEQ ID NO:27的氨基酸序列或与SEQ ID NO:27具有至少80％同一性的氨基酸序列。在一些方面中,多肽包含或信号肽包含与SEQ ID NO:27具有至少

[0051] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0052] 序列同一性的氨基酸序列。

[0053] 本公开内容还描述了包含TCR-a区和TCR-b区的经改造T细胞受体(TCR),其中TCR-a区包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9具有至少

[0054] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0055] 序列同一性的氨基酸序列的CDR3,并且TCR-b区包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列或与SEQ ID NO:16具有至少

[0056] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0057] 序列同一性的氨基酸序列的CDR3。在一些方面中,TCR-a区包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列或与SEQ ID NO:7具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR1,和/或TCR-b区包含具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列或与SEQ ID NO:14具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR1。在一些方面中,TCR包含与SEQ ID NO:7具有至少

[0058] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0059] 序列同一性的氨基酸序列的CDR1。在一些方面中,TCR包含与SEQ ID NO:14具有至少

[0060] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％序列同一性的氨基酸序列的CDR1。在一些方面中,TCR-a区包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列或与SEQ ID NO:8具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR2,和/或TCR-b区包含具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列或与SEQ ID NO:15具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR2。在一些方面中,TCR包含与SEQ ID NO:8具有至少

[0061] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0062] 序列同一性的氨基酸序列的CDR2。在一些方面中,TCR包含与SEQ ID NO:15具有至少

[0063] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0064] 序列同一性的氨基酸序列的CDR2。在一些方面中,TCR-a区的CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:7、8和9的氨基酸序列,并且其中TCR-b区的CDR1、CDR3和CDR3分别包含SEQ ID NO:14、15和16的氨基酸序列。在一些方面中,TCR-a区包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5具有至少70％序列同一性的氨基酸序列,并且TCR-b区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12具有至少70％序列同一性的氨基酸序列。在一些方面中,TCR包含与SEQ ID NO:5具有至少

[0065] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0066] 序列同一性的氨基酸序列。在一些方面中,TCR包含与SEQ ID NO:12具有至少

[0067] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0068] 序列同一性的氨基酸序列。

[0069] 本公开内容还描述了包含TCR-a区和TCR-b区的经改造T细胞受体(TCR),其中TCR-a区包含具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列或与SEQ ID NO:23具有至少

[0070] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0071] 序列同一性的氨基酸序列的CDR3,并且TCR-b区包含具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列或与SEQ ID NO:30具有至少

[0072] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0073] 序列同一性的氨基酸序列的CDR3。在一些方面中,TCR-a区包含具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列或与SEQ ID NO:21具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR1,和/或TCR-b区包含具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列或与SEQ ID NO:28具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR1。在一些方面中,TCR包含与SEQ ID NO:21具有至少

[0074] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,

78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0075] 序列同一性的氨基酸序列的CDR1。在一些方面中,TCR包含与SEQ ID NO:28具有至少

[0076] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0077] 序列同一性的氨基酸序列的CDR1。在一些方面中,TCR-a区包含具有SEQID NO:22的氨基酸序列或与SEQ ID NO:22具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR2,和/或TCR-b区包含具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列或与SEQ ID NO:29具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR2。在一些方面中,TCR包含与SEQ ID NO:22具有至少

[0078] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0079] 序列同一性的氨基酸序列的CDR2。在一些方面中,TCR包含与SEQ ID NO:29具有至少

[0080] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0081] 序列同一性的氨基酸序列的CDR2。在一些方面中,TCR-a区的CDR1、CDR2和CDR3分别包含SEQ ID NO:21、22和23的氨基酸序列,并且其中TCR-b区的CDR1、CDR3和CDR3分别包含SEQ ID NO:28、29和30的氨基酸序列。在一些方面中,TCR-a区包含SEQ ID NO:19的氨基酸序列或与SEQ ID NO:19具有至少70％序列同一性的氨基酸序列,并且TCR-b区包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列或与SEQ ID NO:26具有至少70％序列同一性的氨基酸序列。在一些方面中,TCR包含与SEQ ID NO:19具有至少

[0082] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0083] 序列同一性的氨基酸序列。在一些方面中,TCR包含与SEQ ID NO:26具有至少

[0084] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0085] 序列同一性的氨基酸序列。

[0086] 本公开内容的一些方面涉及编码TCR-a区和/或TCR-b区的核酸,其中TCR-a区包含具有SEQ ID NO:9的氨基酸序列或与SEQ ID NO:9具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR3,并且TCR-b区包含具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列或与SEQ ID NO:16具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR3。在一些方面中,所述核酸编码:TCR-a区,其包含与SEQ ID NO:9具有至少

[0087] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0088] 序列同一性的CDR3;和/或TCR-b区,其包含与SEQ ID NO:16具有至少

[0089] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0090] 序列同一性的CDR3。在一些方面中,所述核酸编码:TCR-a区,其包含具有SEQ ID NO:7的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:7具有至少80％序列同一性的氨基酸序列的CDR1;

和/或TCR-b区,其包含具有SEQ ID NO:14的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:14具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR1。在一些方面中,所述核酸编码:TCR-a区,其包含具有与SEQ ID NO:7具有至少

[0091] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0092] 序列同一性的氨基酸序列的CDR1;和/或TCR-b区,其包含具有与SEQ ID NO:14具有至少

[0093] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0094] 序列同一性的氨基酸序列的CDR1。在一些方面中,所述核酸编码:TCR-a区,其包含具有SEQ ID NO:8的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR2;和/或TCR-b区,其包含具有SEQ ID NO:15的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:15具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR2。在一些方面中,所述核酸编码:TCR-a区,其包含具有与SEQ ID NO:8具有至少

[0095] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0096] 序列同一性的氨基酸序列的CDR2;和/或TCR-b区,其包含具有与SEQ ID NO:15具有至少

[0097] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0098] 序列同一性的氨基酸序列的CDR2。在一些方面中,核酸编码:具有SEQ ID NO:5的氨基酸序列或与SEQ ID NO:5具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的TCR-a可变区,和/或具有SEQ ID NO:12的氨基酸序列或与SEQ ID NO:12具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的TCR-b可变区。在一些方面中,所述核酸编码:TCR-a可变区,其具有与SEQ ID NO:5具有至少

[0099] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0100] 序列同一性的氨基酸序列;和/或TCR-b可变区,其具有与SEQ ID NO:12具有至少

[0101] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0102] 序列同一性的氨基酸序列。在一些方面中,核酸编码:具有SEQ ID NO:4的氨基酸序列或与SEQ ID NO:4具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的TCR-a区,和/或具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列或与SEQ ID NO:11具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的TCR-b区。在一些方面中,核酸编码:包含与SEQ ID NO:4具有至少

[0103] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0104] 序列同一性的氨基酸序列的TCR-a区,和/或具有与SEQ ID NO:11具有至少

[0105] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0106] 序列同一性的氨基酸序列的TCR-b区。在一些方面中,核酸包含SEQ ID NO:3、10,和/或其片段。在一些方面中,核酸与SEQ ID NO:3、10,和/或其片段具有至少

[0107] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%的序列同一性。

[0108] 本公开内容的一些方面涉及编码TCR-a区和/或TCR-b区的核酸,其中TCR-a区包含具有SEQ ID NO:23的氨基酸序列或与SEQ ID NO:23具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3,并且TCR-b区包含具有SEQ ID NO:30的氨基酸序列或与SEQ ID NO:30具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR3。在一些方面中,所述核酸编码:TCR-a区,其包含与SEQ ID NO:23具有至少

[0109] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0110] 序列同一性的CDR3;和/或TCR-b区,其包含与SEQ ID NO:30具有至少

[0111] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0112] 序列同一性的CDR3。在一些方面中,所述核酸编码:TCR-a区,其包含具有SEQ ID NO:21的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:21具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR1;和/或TCR-b区,其包含具有SEQ ID NO:28的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:28具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR1。在一些方面中,所述核酸编码:TCR-a区,其包含具有与SEQ ID NO:21具有至少

[0113] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0114] 序列同一性的氨基酸序列的CDR1;和/或TCR-b区,其包含具有与SEQ ID NO:28具有至少

[0115] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0116] 序列同一性的氨基酸序列的CDR1。在一些方面中,所述核酸编码:TCR-a区,其包含具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:22具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR2;和/或TCR-b区,其包含具有SEQ ID NO:29的氨基酸序列或具有与SEQ ID NO:29具有至少80%序列同一性的氨基酸序列的CDR2。在一些方面中,所述核酸编码:TCR-a区,其包含具有与SEQ ID NO:22具有至少

[0117] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0118] 序列同一性的氨基酸序列的CDR2;和/或TCR-b区,其包含具有与SEQ ID NO:29具有至少

[0119] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100%

[0120] 序列同一性的氨基酸序列的CDR2。在一些方面中,所述核酸编码:具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列或与SEQ ID NO:19具有至少70%序列同一性的氨基酸序列的TCR-a可变

区,和/或具有SEQ ID NO:26的氨基酸序列或与SEQ ID NO:26具有至少70％序列同一性的氨基酸序列的TCR-b可变区。在一些方面中,所述核酸编码:TCR-a可变区,其具有与SEQ ID NO:19具有至少

[0121] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0122] 序列同一性的氨基酸序列;和/或TCR-b可变区,其具有与SEQ ID NO:26具有至少

[0123] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0124] 序列同一性的氨基酸序列。在一些方面中,所述核酸编码:具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列或与SEQ ID NO:18具有至少70％序列同一性的氨基酸序列的TCR-a区,和/或具有SEQ ID NO:25的氨基酸序列或与SEQ ID NO:25具有至少70％序列同一性的氨基酸序列的TCR-b区。在一些方面中,所述核酸编码:包含与SEQ ID NO:18具有至少

[0125] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0126] 序列同一性的氨基酸序列的TCR-a区,和/或具有与SEQ ID NO:25具有至少

[0127] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％

[0128] 序列同一性的氨基酸序列的TCR-b区。在一些方面中,所述核酸包含SEQ ID NO:17、24,和/或其片段。在一些方面中,所述核酸与SEQ ID NO:17、24,和/或其片段具有至少

[0129] 55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100％的序列同一性。

[0130] 本公开内容的核酸可编码包含CDR1、CDR2和CDR3的TCR-a区和/或包含CDR1、CDR2和CDR3的TCR-b区。在一些方面中,核酸在同一核酸上包含至少一个TCR-a(TRA)和至少一个TCR-b(TRB)基因。所述核酸还可编码包含本公开内容的TCR和第二抗原结合区的双特异性多肽。第二抗原结合区可以是例如scFv、单链抗体、单结构域抗体或双抗体。在一些方面中,核酸是多顺反子的。在一些方面中,核酸包含内部核糖体进入位点(internal ribosome entry site,IRES)或2A可切割接头。在一些方面中,核酸包含编码TCR-a和/或TCR-b基因的cDNA。在一些方面中,核酸还编码包含CD3结合区的多肽。在一些方面中,CD3结合区包含CD3特异性抗原结合片段(Fab)、单链可变片段(scFv)、单结构域抗体或单链抗体。在一些方面中,载体包含指导核酸表达的启动子。在一些方面中,启动子包含鼠干细胞病毒(murine stem cell virus,MSCV)启动子。在一些方面中,载体包含TCR-a和TCR-b基因。本公开内容的核酸还可进一步被限定为cDNA(互补DNA)。

[0131] 还公开了制备经改造细胞的方法,其包括将本公开内容的核酸或载体转移到细胞中。在一些方面中,该方法还包括在培养基中培养细胞、在允许细胞分裂的条件下孵育细胞、筛选细胞,和/或冷冻细胞。

[0132] 在一些方面中,本公开内容的细胞包含干细胞、祖细胞、免疫细胞或自然杀伤(natural killer,NK)细胞。在一些方面中,细胞包括造血干细胞或祖细胞、T细胞、从间充质干细胞(mesenchymal stem cell,MSC)或诱导多能干细胞(induced pluripotent stem

cell,iPSC)分化的细胞。在一些方面中,细胞分离自或来源于外周血单个核细胞(peripheral blood mononuclear cell,PBMC)。在一些方面中,T细胞包含细胞毒性T淋巴细胞(cytotoxic T lymphocyte,CTL)、CD8+T细胞、CD4+T细胞、恒定NK T(iNKT)细胞、γ-δT细胞、NKT细胞、调节性T细胞或CD4+T调节性细胞。在一些方面中,细胞分离自癌症患者。在一些方面中,该组合物已被确定为无血清、无支原体、无内毒素和/或无菌的。

[0133] 在一些方面中,药物组合物被配制成用于肠胃外施用、静脉内注射、肌内注射、吸入或皮下注射。在一些方面中,肽包含在脂质体、含脂质的纳米粒或基于脂质的载体中。在一些方面中,药物制剂被配制成用于注射或作为鼻喷剂吸入。在一些方面中,本公开内容的组合物被配制为疫苗。在一些方面中,组合物还包含佐剂。

[0134] 在关于本公开内容的树突细胞的一些方面中,树突细胞包含成熟树突细胞。在一些方面中,细胞是具有HLA-A型的细胞。HLA可以是HLA-A、HLA-B或HLA-C。在一些方面中,细胞为HLA-A24型。在一些方面中,细胞为HLA-A11型。在一些方面中,细胞为HLA-A01、HLA-A02、HLA-A11、HLA-A24、HLA-B07、HLA-B08、HLA-B15或HLA-B40。

[0135] 在一些方面中,方法还包括分离所表达的肽或多肽。在一些方面中,T细胞包含CD8+T细胞。在一些方面中,T细胞是CD4+T细胞、Th1、Th2、Th17、Th9或Tfh T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞、中央记忆T细胞或效应记忆T细胞。

[0136] 在本公开内容的方法的一些方面中,接触进一步限定为将起始免疫效应细胞群与抗原呈递细胞(antigen presenting cell,APC)、人工抗原呈递细胞(artificial antigen presenting cell,aAPC)或人工抗原呈递表面(artificial antigen presenting surface,aAPS)共培养;其中APC、aAPC或aAPS在其表面上呈递肽。在某些方面中,APC是树突细胞。

[0137] 在本公开内容的一些方面中,免疫效应细胞是T细胞、外周血淋巴细胞、自然杀伤(NK)细胞、恒定NK细胞或NKT细胞。免疫效应细胞可以是已从间充质干细胞(MSC)或诱导多能干(iPS)细胞分化而来的细胞。T细胞的一些方面包括被进一步限定为$CD8^+$T细胞、$CD4^+$T细胞或γδT细胞的T细胞。在某些方面中,T细胞是细胞毒性T淋巴细胞(CTL)。

[0138] 在一些方面中,在本公开内容的方法中描述的对象是人。在一些方面中,对象是实验动物。在一些方面中,对象是小鼠、大鼠、猪、马、兔或豚鼠。一些方面还涉及包括还施用至少第二治疗剂的方法。在一些方面中,第二治疗剂是抗癌剂。如在本公开内容的方法中所限定的,治疗可包括以下中的一种或更多种:降低肿瘤尺寸;提高总存活率;降低癌症复发(recurrence)的风险;降低进展的风险;和/或提高无进展存活、无再发(relapse)存活和/或无复发存活的机会。

[0139] 本公开内容的方法中的生物样品可包含血液样品或其级分。在一些方面中,生物样品包含淋巴细胞。在一些方面中,生物样品包含含有淋巴细胞的分级样品。在一些方面中,生物样品是本文描述的生物样品。

[0140] 本公开内容的TCR可以进一步限定为单链TCR。在一些方面中,TCR-a和TCR-b区在同一多肽上。在一些方面中,多肽进一步被限定为重组的。在一些方面中,TCR-a和TCR-b区域在不同的多肽上。还提供了包含本公开内容的TCR的多肽。在一些方面中,多肽可以是双特异性的。例如,多肽可以具有来自TCR的一个肽特异性和来自另一个抗原结合区的第二个特异性。例如,另一抗原结合区可以是另一TCR、scFv、双抗体或单链抗体。

[0141] 在一些方面中,本公开内容的组合物包含MHC多肽和本公开内容的肽,并且其中MHC多肽和/或肽与检测标签缀合。因此,合适的检测标签包括但不限于放射性同位素、荧光色素、化学发光化合物、染料和蛋白质,包括酶。标签可进行简单检测或者可被量化。进行简单检测的响应通常包括其存在仅被确认的响应,而进行量化的响应通常包括具有可量化(例如,数值可报告)值的响应,例如强度、偏振和/或其他特性。在发光或荧光测定中,可直接使用与实际参与结合的测定组分相关的发光团或荧光团,或者间接使用与另一组分(例如,报道物或指示剂)相关的发光团或荧光团来产生可检测的响应。产生信号的发光标签的实例包括但不限于生物发光和化学发光。合适的荧光标签的实例包括但不限于荧光素、罗丹明、四甲基罗丹明、伊红、赤藓红、香豆素、甲基-香豆素、芘、孔雀石绿(Malacite green)、芪、萤虫黄、Cascade Blue.TM.和德克萨斯红(Texas Red)。另一些合适的光学染料描述于Haugland,Richard P.(1996)Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals(第6版)中。检测标签还包括链霉亲和素或其结合配偶体生物素。

[0142] 在一些方面中,MHC多肽和肽是有效连接的。术语"有效连接"是指其中两种组分组合或能够组合以形成复合物的情况。例如,组分可共价连接和/或在同一多肽上,例如在融合蛋白中,或者组分可对彼此具有一定程度的结合亲和力,例如通过范德华力产生的结合亲和力。因此,本公开内容的一些方面涉及其中MHC多肽和肽通过肽键有效连接。另一些方面涉及其中MHC多肽和肽通过范德华力有效连接。肽-MHC可有效连接以形成pMHC复合物。在一些方面中,至少两个pMHC复合物有效连接在一起。另一些方面包括,包括至少,或包括至多2、3、4、5、6、7、8、9或10个彼此有效连接的pMHC复合物。在一些方面中,至少两个MHC多肽与一个肽连接。在另一些方面中,MHC多肽与肽的平均比率为1:1至4:1。在一些方面中,比率或平均比率为至少、至多或约1、2、3、4、5或6至约1、2、3、4、5或6(或其中可推导出的任何范围)。

[0143] 在本公开内容的一些方面中,肽与MHC复合。在一些方面中,MHC包含HLA-A型。MHC可进一步限定为HLA-A3或HLA-A11型。肽可被负载到树突细胞、淋巴母细胞、外周血单个核细胞(PBMC)、人工抗原呈递细胞(aAPC)或人工抗原呈递表面上。在一些方面中,人工抗原呈递表面包含与表面缀合或连接的MHC多肽。示例性表面包括珠、微板、载片或细胞培养板。

[0144] 本公开内容的方法可进一步包括对与肽和/或MHC结合的T细胞的数目进行计数。包含T细胞的组合物可分离自患有或被怀疑患有癌症的患者。癌症可包含肽特异性癌症,其中肽是SEQ ID NO:1或2的肽或本公开内容的肽。对象可以是已被诊断出和/或确定患有癌症的对象。对象或患者也可以是已被表征为患有肽特异性癌症的对象或患者,肽是例如本公开内容的肽或SEQ ID NO:1或2的肽。在一些方面中,方法还包括分选与肽和/或MHC结合的T细胞的数目。本公开内容的方法还可包括或进一步包括对来自与肽和/或MHC结合的T细胞的一个或更多个TCR基因进行测序。在一些方面中,方法包括或进一步包括对来自TCR(例如与本公开内容的肽结合的TCR)的TCRα和/或TCRβ基因进行测序。方法还可包括或进一步包括通过互补位(paratope)热点(GLIPH)分析对淋巴细胞相互作用进行分组。这进一步描述于Glanville et al.,Nature.2017Jul6;547(7661):94-98中,其通过引用并入本文中。

[0145] 本公开内容的组合物可以是无血清、无支原体、无内毒素和/或无菌的。所述方法还可包括在培养基中培养本公开内容的细胞,在允许细胞分裂的条件下孵育细胞,筛选细胞,和/或冷冻细胞。在一些方面中,所述方法还包括从本公开内容的细胞中分离所表达的

肽或多肽。

[0146] 本公开内容的方法可包括或进一步包括针对一种或更多种细胞特性对树突细胞进行筛选。在一些方面中,所述方法还包括使细胞与一种或更多种细胞因子或生长因子接触。一种或更多种细胞因子或生长因子可包含GM-CSF。在一些方面中,细胞特性包含CD86、HLA和CD14中的一者或更多者的细胞表面表达。在一些方面中,树突细胞来源于CD34+造血干细胞或祖细胞。

[0147] 本公开内容的方法中的接触可进一步限定为使起始免疫效应细胞群与抗原呈递细胞(APC)共培养,其中APC在其表面上呈递肽。在一个具体方面中,APC是树突细胞。在一些方面中,树突细胞来源于外周血单个核细胞(PBMC)。在一些方面中,树突细胞分离自PBMC。在一些方面中,树突细胞是其中DC来源于白细胞去除术(leukaphereses)或通过白细胞去除术分离出来的细胞。

[0148] 在本公开内容的一些方面中,肽-MHC(pMHC)复合物可通过使本公开内容的肽与MHC复合物接触来制备。在一些方面中,肽在细胞中表达,并与内源性MHC复合物结合以形成pMHC。在一些方面中,肽交换用于制备pMHC复合物。例如,可切割肽,例如光可切割肽,可被设计成与MHC结合并稳定MHC。除非在“拯救肽”的存在下进行UV暴露,否则肽的切割(例如通过光切割肽的辐照)会使肽与HLA复合物解离,并产生快速分解的空HLA复合物。因此,本公开内容的肽可在肽交换过程中用作“拯救肽”。本公开内容的另一些方面涉及包含本公开内容的肽的pMHC复合物。pMHC复合物可以与固体支持物有效连接,或者可以与可检测部分例如荧光分子、放射性同位素或抗体附接。本公开内容的另一些方面涉及肽-MHC多聚体复合物,其包括、至少包括或至多包括1、2、3、4、5或6个彼此有效连接的肽-MHC分子。连接可以是共价的(例如通过肽键),或者是非共价的。在一些方面中,pMHC分子可以与生物素分子结合。这样的pMHC分子可以通过与链霉亲和素分子结合而被多聚化。pMHC多聚体可用于检测在组合物中或在组织中的抗原特异性T细胞或TCR分子。在一些方面中,多聚体可用于在原位中或在活检样品中检测肽特异性T细胞。在另一些方面中,多聚体可以结合到固体支持物上或沉积在固体支持物上,例如阵列或载片上。然后可以将细胞添加至载片上,并可进行pMHC多聚体和细胞之间的结合检测。因此,本公开内容的pMHC分子和多聚体可用于在对象中检测和诊断癌症,或用于在患有癌症的个体中确定免疫应答。

[0149] 在本公开内容的一些方面中,如本文中所述方法中所限定的,获得包含从外周血单个核细胞(PBMC)中分离起始免疫效应细胞群。在一些方面中,起始免疫效应细胞群获自对象。对象可以是患有癌症例如肽特异性癌症的对象。在一些方面中,对象已被确定为患有表达本公开内容的肽的癌症。在一些方面中,癌症包含白血病、肺癌或皮肤癌。癌症也可进一步限定为实体瘤。在一个具体方面中,癌症包含肺癌。肺癌可包含腺癌或鳞状细胞癌。在一些方面中,本公开内容的方法包括或进一步包括在共培养之前将肽或编码肽的核酸引入到树突细胞中。肽的引入可通过用编码肽的核酸转染或感染树突细胞,或者通过将肽与树突细胞一起孵育来完成。在一些方面中,通过电穿孔引入肽或编码肽的核酸。转移核酸的另一些方法是本领域已知的,所述方法例如脂质体转染、磷酸钙转染、用DEAE-右旋糖酐转染、显微注射和病毒介导的转导。在一些方面中,通过将肽或编码肽的核酸添加至树突细胞培养基中来引入肽或编码肽的核酸。在一些方面中,免疫效应细胞与已引入肽或编码肽的核酸的第二树突细胞群共培养。在一些方面中,在共培养之后,从免疫效应细胞纯化CD4阳性

或CD8阳性和肽MHC四聚体阳性T细胞群。在一些方面中,CD4阳性或CD8阳性和肽MHC四聚体阳性T细胞群通过荧光激活细胞分选(fluorescence activated cell sorting,FACS)进行纯化。在一些方面中,通过限制或连续稀释,随后是通过快速扩增方案扩增单个克隆来产生肽特异性免疫效应细胞的克隆群。

[0150] 在一些方面中,纯化还包括通过限制或连续稀释分选细胞,随后是通过快速扩增方案扩增单个克隆来产生肽特异性免疫效应细胞的克隆群。在一些方面中,本公开内容的方法包括或进一步包括从肽特异性免疫效应细胞的克隆群中克隆T细胞受体(TCR)。在一些方面中,本公开内容方法中的术语“分离”定义为从肽特异性免疫效应细胞的克隆群中克隆T细胞受体(TCR)。在一些方面中,克隆TCR是克隆TCRα链和TCRβ链。在一些方面中,TCR是使用5’-cDNA末端快速扩增(rapid amplification of cDNAend,RACE)方法克隆的。在一些方面中,TCRα和β链是使用5’-cDNA末端快速扩增(RACE)方法克隆的。在一些方面中,所克隆的TCR被亚克隆至表达载体中。在一些方面中,表达载体包含TCRα序列与TCRβ序列之间的接头结构域。在一些方面中,表达载体是逆转录病毒或慢病毒载体。载体也可以是本文中描述的表达载体。接头结构域可包含编码一个或更多个肽切割位点的序列。一个或更多个切割位点可以是弗林蛋白酶切割位点和/或P2A切割位点。在一些方面中,TCRα序列和TCRβ序列通过IRES序列连接。

[0151] 本公开内容的宿主细胞可用表达载体转导以产生表达TCRα和/或β链的经改造细胞。在一些方面中,宿主细胞是免疫细胞。免疫细胞可以是T细胞,并且经改造细胞可被称为经改造T细胞。T细胞可以是本文中所述的T细胞类型,例如$CD8^+$T细胞、CD4+T细胞或γδT细胞。在一些方面中,起始免疫效应细胞群获自患有癌症或肽特异性癌症的对象,并且宿主细胞与该对象是同种异体的或自体的。在一些方面中,肽特异性T细胞是自体的或同种异体的。在一些方面中,CD4阳性或CD8阳性和肽MHC四聚体阳性的经改造T细胞群是从转导的宿主细胞中纯化的。在一些方面中,通过限制或连续稀释,随后是通过快速扩增方案扩增单个克隆来产生肽特异性的经改造T细胞的克隆群。在一些方面中,本公开内容的方法中的纯化定义为在共培养之后从免疫效应细胞中纯化CD4阳性或CD8阳性和肽MHC四聚体阳性T细胞群。

[0152] 在一些方面中,肽与固体支持物连接。在一些方面中,肽与固体支持物缀合,或者与缀合于固体支持物的抗体结合。在一些方面中,固体支持物包含微板、珠、玻璃表面、载片或细胞培养皿。在一些方面中,固体支持物包含纳米流体芯片。在一些方面中,检测T细胞应答包含检测肽与T细胞或TCR的结合。在一些方面中,检测T细胞应答包含ELISA、ELISPOT或四聚体测定。

[0153] 本公开内容的一些方面的药盒可在容器中包含本公开内容的肽。所述肽可包含在药物制剂中。在一些方面中,所述药物制剂配制成用于肠胃外施用或吸入。在一些方面中,所述肽包含在细胞培养基中。

[0154] 在本申请通篇,术语“约”根据其在细胞和分子生物学领域中的清晰且普通含义使用,以指示值包括用于确定该值所采用的装置或方法的误差的标准偏差。

[0155] 当与术语“包含/包括”结合使用时,没有数量词修饰的名词的使用可意指“一个/种”,但是其也符合“一个/种或更多个/种”、“至少一个/种”和“一个/种或多于一个/种”的含义。

[0156] 如本文中所用,术语“或/或者”和“和/或/或者”用于描述组合或相互排斥的多个组分。例如,“x、y和/或z”可以是指单独的“x”、单独的“y”、单独的“z”、“x、y和z”、“(x和y)或z”、“x或(y和z)”或者“x或y或z”。特别地预期x、y或z可被特别地排除在实施方案或方面之外。

[0157] 词语“包含”(及其任何变化形式)、“具有”(及其任何变化形式)、“包括”(及其任何变化形式)、“特征为”(及其任何变化形式)或“含有”(及其任何变化形式)是包括性的或开放式的,并且不排除另外的未记载的要素或方法步骤。

[0158] 组合物和方法根据其用途可“包含/包括”在本说明书通篇公开的任何成分或步骤、“基本上由其组成”或“由其组成”。短语“由.....组成”不包括任何未指定的要素、步骤或成分。短语“基本上由.....组成”将所述主题的范围限制为指定的物质或步骤以及不实质影响其基本的和新的特征的那些物质或步骤。预期在术语“包含/包括”的情况下所述的实施方案和方面也可在术语“由.....组成”或“基本上由.....组成”的情况下实施。

[0159] 在治疗性、诊断性或生理性目的或作用的背景下的任何方法也可以以“用途”权利要求语言描述,例如本文中所讨论的任何化合物、组合物或药剂用于实现或实施所描述的治疗性、诊断性或生理性目的或作用的“用途”。

[0160] 可基于本文中所述的任何方法使用一种或更多种序列或组合物。本申请通篇讨论了另一些实施方案和方面。关于本公开内容的一个方面所讨论的任何实施方案或方面也适用于本公开内容的另一些方面,反之亦然。

[0161] 特别预期了关于本发明的一个实施方案或方面所讨论的任何限制均可应用于本发明的任何其他实施方案或方面。此外,本发明的任何组合物均可用于本发明的任何方法,并且本发明的任何方法均可用于产生或利用本发明的任何组合物。在实施例中阐述的实施方案的一些方面也是可在不同实施例中的其他地方或在本申请中的其他地方(例如在发明内容、具体实施方式、权利要求书和附图说明中)讨论的一些实施方案的背景下实施的实施方案。

[0162] 根据以下详细描述,本发明的其他目的、特征和优点将变得明显。然而,应理解,尽管具体实施方式和具体实施例指示了本发明的一些具体实施方案和一些方面,但是它们仅以举例说明的方式给出,因为从该详细描述中,本发明的精神和范围内的多种变化和修改对本领域技术人员而言将变得明显。

附图说明

[0163] 以下附图构成本说明书的一部分,并且被包括在内以进一步说明本发明的某些方面。通过结合本文中给出的具体实施方案的详细描述来参考这些附图中的一个或更多个可以更好地理解本发明。

[0164] 图1使用MHC免疫亲和沉淀和质谱分析鉴定Hormad1 HLA-A1101限制性肽。

[0165] 图2HORMAD1 HLA-A11限制性肽(HMD-375,SSSQESVPK-SEQ ID NO:2)CTL产生。

[0166] 图3肽滴定测定检测HMD-375肽特异性CTL细胞系表位识别亲和力。

[0167] 图4A-D HMD-375肽特异性CTL细胞系的功能验证。细胞靶标包括:(A)K562-A11细胞系,强制表达eGFP或HORMAD1;(B)H1299(HLA-A2-,HORMAD1+)和H1299-A11(HLA-A11强制表达);(C)H1623(HLA-A11+,HORMAD1+)和H647(HLA-A11+,HORMAD1-);(D)M14-eGFP(HLA-

A11+,HORMAD1-,eGFP强制表达)和M14-HMD(HLA-A11+,HORMAD1强制表达)。

[0168] 图5HMD-375特异性TCR-T细胞系产生。

[0169] 图6肽滴定测定检测HMD-375特异性TCR-T细胞系的识别亲和力。

[0170] 图7A-D HMD-375特异性TCR-T细胞系的功能验证。细胞靶标包括:(A)K562-A11细胞系,强制表达eGFP或HORMAD1;(B)H1299(HLA-A2-,HORMAD1+)和H1299-A11(HLA-A11强制表达);(C)H1623(HLA-A11+,HORMAD1+)和H647(HLA-A11+,HORMAD1-);(D)M14-eGFP(HLA-A11+,HORMAD1-,eGFP强制表达)和M14-HMD(HLA-A11+,HORMAD1强制表达)。

[0171] 图8A-B使用显示IFN-γ(A)和TNF-α(B)细胞因子染色的细胞内细胞因子染色(intracellular cytokine staining,ICS)测定对HMD-375特异性TCR-T细胞系进行功能验证。

[0172] 图9KIF2C在人正常组织中的表达水平(GTEx数据库)。

[0173] 图10KIF2C在人癌组织中的表达水平(TCGA数据库)。

[0174] 图11从K562-A24细胞中洗脱HLA-A2402限制性肽-IYNGKLFDL(SEQ ID NO:1),并用质谱鉴定。图上的序列对应于SEQ ID NO:1。

[0175] 图12KIF2C-404肽(IYNGKLFDL-SEQ ID NO:2)特异性CTL产生。

[0176] 图13肽滴定测定检测KIF2C-404肽特异性CTL细胞系表位识别亲和力。

[0177] 图14A-E KIF2C-404肽特异性CTL细胞系的功能验证。细胞靶标包括(A)H650;(B)U118G;(C)LN18;(D)H1299;(E)Panc 03.27。

[0178] 图15KIF2C-404特异性TCR-T细胞系产生。

[0179] 图16KIF2C-404肽特异性TCR T细胞系的功能验证。

具体实施方式

[0180] I.使用本公开内容的肽的免疫治疗

[0181] 如本文中所述的肽(例如,SEQ ID NO:1或2的肽)可用于癌症的免疫治疗。例如,SEQ ID NO:1或2的肽可与T细胞群接触或用于刺激T细胞群,以诱导识别或结合所述肽的T细胞的增殖。在另一些方面中,本公开内容的肽可施用于对象,例如人患者,以增强对象针对癌症的免疫应答。

[0182] 本公开内容的肽可包括在主动免疫治疗(例如,癌症疫苗)或被动免疫治疗(例如,过继性免疫治疗)中。主动免疫治疗包括用纯化的肽抗原或免疫显性肽(天然的或经修饰的)对对象进行免疫接种;或者,可将用本公开内容的肽脉冲(或用编码包含所述肽的抗原的基因转染)的抗原呈递细胞施用于对象。所述肽可以是经修饰的或者包含一个或更多个突变,例如替换突变。被动免疫治疗包括过继性免疫治疗。过继性免疫治疗通常涉及向对象施用细胞,其中所述细胞(例如,细胞毒性T细胞)已在体外针对本公开内容的肽致敏(参见,例如,US 7910109)。

[0183] 在一些方面中,可在过继性免疫治疗中使用流式细胞术以用于通过与基于羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(carboxyfluorescein succinimidyl ester,CFSE)的增殖测定组合使用例如T细胞受体(TCR)Vβ抗体来迅速分离人肿瘤抗原特异性T细胞克隆。参见,例如,Lee et al.,J.Immunol.Methods,331:13-26,2008,其通过引用并入用于所有目的。在一些方面中,可以使用四聚体引导的细胞分选,例如Pollack et al.,J Immunother Cancer.2014;

2:36中所述的方法,其通过引用并入本文用于所有目的。多种培养方案对于过继性免疫治疗也是已知的,并且可在本公开内容的一些方面中使用。在一些方面中,细胞可以在不需要使用抗原呈递细胞的条件下培养(例如,Hida et al.,Cancer Immunol.Immunotherapy,51:219-228,2002,其通过引用并入)。在另一些方面中,T细胞可在利用抗原呈递细胞(例如树突细胞)的培养条件下扩增(Nestle et al.,1998,其通过引用并入),并且在一些方面中,人工抗原呈递细胞可用于此目的(Maus et al.,2002,其通过引用并入)。用于过继性免疫治疗的另外的一些方法在Dudley et al.(2003)中公开,其通过引用并入,所述方法可与本公开内容的一些方面一起使用。已知有多种方法并且可用于克隆和扩增人抗原特异性T细胞(参见,例如,Riddell et al.,1990,其通过引用并入本文)。

[0184] 在某些方面中,以下方案可用于产生选择性识别本公开内容肽的T细胞。肽特异性T细胞系可使用先前报道的方法(Hida et al.,2002),从正常供体或HLA限制性正常供体和患者中产生。简言之,可在96孔U型底微培养板(Corning Incorporated,Lowell,MA)中的约200μl培养基中用约10μg/ml的每种肽一式四份地进行刺激PBMC(1×10^5个细胞/孔)。培养基可由以下组成:50%AIM-V培养基(Invitrogen)、50%RPMI 1640培养基(Invitrogen)、10%人AB血清(Valley Biomedical,Winchester,VA)和100IU/ml白介素-2(IL-2)。可用相应的肽约每3天再次刺激细胞。在5次刺激后,可洗涤来自每个孔的T细胞并在存在或不存在相应肽的情况下将其与T2细胞一起孵育。约18小时后,可通过ELISA来确定上清液中干扰素(IFN)-γ的产生。分泌大量IFN-γ的T细胞可通过快速扩增方案进一步扩增(Riddell et al.,1990;Yee et al.,2002b)。

[0185] 在一些方面中,免疫治疗可利用与细胞渗透剂(例如脂质体或细胞渗透肽(cell penetrating peptide,CPP))缔合的本公开内容的肽。用肽脉冲的抗原呈递细胞(例如树突细胞)可用于增强抗肿瘤免疫(Celluzzi et al.,1996;Young et al.,1996)。脂质体和CPP在以下进一步详细描述。在一些方面中,免疫治疗可利用编码本公开内容的肽的核酸,其中所述核酸例如在病毒载体或非病毒载体中递送。

[0186] 在一些方面中,本公开内容的肽可在免疫治疗中使用,以治疗哺乳动物对象(例如人患者)的癌症。

[0187] II.经改造T细胞受体

[0188] T细胞受体包含通过二硫键连接的两条不同的多肽链,称为T细胞受体α(TCRα))和β(TCRβ)链。这些α:β异二聚体在结构上与免疫球蛋白分子的Fab片段非常相似,并且它们解释了大多数T细胞的抗原识别。少数T细胞携带由一对不同的多肽链(称为γ和δ)构成的另一种但结构相似的受体。两种类型的T细胞受体均不同于充当B细胞受体的膜结合免疫球蛋白:T细胞受体只有一个抗原结合位点,而B细胞受体有两个,并且T细胞受体从不分泌,而免疫球蛋白可以作为抗体分泌。

[0189] T细胞受体的两条链均具有与免疫球蛋白V结构域具有同源性的氨基末端可变(V)区、与免疫球蛋白C结构域具有同源性的恒定(C)区,以及含有形成链间二硫键的半胱氨酸残基的短的铰链区。每条链通过疏水跨膜结构域跨越脂质双层,并以短的胞质尾终止。

[0190] T细胞受体的三维结构已经确定。该结构确实与抗体Fab片段的结构相似,正如对编码其的基因的早期研究所怀疑的那样。T细胞受体链的折叠方式与Fab片段非常相似,但是最终结构看起来更短一点且更宽一点。然而,T细胞受体与Fab片段之间存在一些明显的

差异。最显著的差异是在Cα结构域,其中折叠不同于任何其他免疫球蛋白样结构域。与Cβ结构域并置的一半结构域形成与在其他免疫球蛋白样结构域中存在的β折叠类似的β折叠,但另一半结构域由松散堆积的链和短的α螺旋区段形成。分子内二硫键在免疫球蛋白样结构域中通常连接两条β链,在Cα结构域中将β链与这个α螺旋区段连接。

[0191] 结构域相互作用的方式也存在差异。两个T细胞受体链的V与C结构域之间的界面比抗体中的界面更广泛,其可能使结构域之间的铰链连接更不灵活。并且在碳水化合物的辅助下,Cα与Cβ结构域之间的相互作用是独特的,来自Cα结构域的糖基团与Cβ结构域形成许多氢键。最后,可变结合位点的比较表明,虽然互补决定区(complementarity-determining region,CDR)环与抗体分子的环非常紧密地对齐,但是相对于抗体分子的环存在一些位移。这种位移在VαCDR2环中特别明显,其取向与抗体V结构域中的等同环大致成直角,这是将环的一端从结构域的一个面锚定至另一个面的β链的移位的结果。链位移还导致在结构已知的七个Vβ结构域中的两个中的VβCDR2环的取向发生变化。迄今为止,七种T细胞受体的晶体结构已得以在这个分辨水平求解。

[0192] 本公开内容的一些方面涉及经改造T细胞受体。术语“经改造”是指具有接枝到TCR恒定区上的TCR可变区,以制备与本公开内容的肽和抗原结合的嵌合多肽的T细胞受体。在某些方面中,TCR包含这样的插入序列,其用于构建体的克隆、增强表达、检测或用于构建体的治疗性对照,但是不存在于内源性TCR例如多克隆位点、接头、铰链序列、经修饰铰链序列、经修饰跨膜序列、检测多肽或分子、或者可允许选择或筛选包含TCR的细胞的治疗性对照中。

[0193] 在一些方面中,TCR包含非TCR序列。因此,某些方面涉及具有并非来自TCR基因序列的TCR。在一些方面中,TCR是嵌合的,因为其除包含通常在TCR基因中存在的序列之外,还包含来自自然界中不一定一起存在的至少两个TCR基因的序列。

[0194] 在一些方面中,本公开内容的经改造TCR包含如下所示的方面:

[0195] 表1:TCR方面

[0196]

描述	序列	SEQ ID NO:
KIF2C-404 F11 TCR (TRAV21*02F-TRBV11-2*03F) DNA 序列：α链	ATGGAGACCCTCTTGGGCCTGCTTATCCTTTGGCTGC AGCTGCAATGGGTGAGCAGCAAACAGGAGGTGACA CAGATTCCTGCAGCTCTGAGTGTCCCAGAAGGAGAA AACTTGGTTCTCAACTGCAGTTTCACTGATAGCGCT ATTTACAACCTCCAGTGGTTTAGGCAGGACCCTGGG AAAGGTCTCACATCTCTGTTGCTTATTCAGTCAAGTC AGAGAGAGCAAACAAGTGGAAGACTTAATGCCTCG CTGGATAAATCATCAGGACGTAGTACTTTATACATT GCAGCTTCTCAGCCTGGTGACTCAGCCACCTACCTC TGTGCTGTGGATACTGGAGCCAATAGTAAGCTGACA TTTGGAAAAGGAATAACTCTGAGTGTTAGACCAGAT ATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGA GACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTC ACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCACAAAGT AAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACTGTG CTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGT GCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGT GCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCCAGAAGAC ACCTTCTTCCCCAGCCCAGAAAGTTCCTGTGATGTC AAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAA CCTAAACTTTCAAAACCTGTCAGTGATTGGGTTCCG AATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGGTTTAATCTGCT CATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTAA	3
KIF2C-404 F11 TCR (TRAV21*02F-TRBV11-2*03F)蛋白质序列α链	METLLGLLILWLQLQWVSSKQEVTQIPAALSVPEGENL VLNCSFTDSAIYNLQWFRQDPGKGLTSLLLIQSSQREQ TSGRLNASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVDTG ANSKLTFGKGITLSVRPDIQNPDPAVYQLRDSKSSDKS VCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDV KLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMT LRLWSS	4
KIF2C-404 F11 TCR (TRAV21*02F-TRBV11-2*03F) 可变区：α链	KQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWFRQ DPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRLNASLDKSSGRSTLYI AASQPGDSATYLCAVDTGANSKLTFGKGITLSVRPD	5
KIF2C-404 F11 TCR (TRAV21*02F-TRBV11-2*03F) 前导肽：α链	METLLGLLILWLQLQWVSS	6
KIF2C-404 F11 TCR (TRAV21*02F-TRBV11-2*03F) **α链 CDR1**	DSAIYN	7
KIF2C-404 F11 TCR (TRAV21*02F-TRBV11-2*03F) **α链 CDR2**	IQSSQRE	8

[0197]

KIF2C-404 F11 TCR (TRAV21*02F-TRBV11-2*03F) α链 **CDR3**	AVDTGANSKLT	9
KIF2C-404 F11 TCR (TRAV21*02F-TRBV11-2*03F) DNA 序列：β链	ATGGGCACCAGGCTCCTCTGCTGGGCGGCCCTCTGT CTCCTGGGAGCAGAACTCACAGAAGCTGGAGTTGCC CAGTCTCCCAGATATAAGATTATAGAGAAAAGGCA GAGTGTGGCTTTTTGGTGCAATCCTATATCTGGCCAT GCTACCCTTTACTGGTACCAGCAGATCCTGGGACAG GGCCCAAAGCTTCTGATTCAGTTTCAGAATAACGGT GTAGTGGATGATTCACAGTTGCCTAAGGATCGATTT TCTGCAGAGAGGCTCAAAGGAGTAGACTCCACTCTC AAGATCCAACCTGCAAAGCTTGAGGACTCGGCCGTG TATCTCTGTGCCAGCAGCTATCATAGCTATGGCTAC ACCTTCGGTTCGGGGACCAGGTTAACCGTTGTAGAG GACCTGAACAAGGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTGTG TTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCCACACCCAA AAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCTTCTTC CCTGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGG GAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACGGACCCGC AGCCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCA GATACTGCCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCA CCTTCTGGCAGAACCCCCCGCAACCACTTCCGCTGTC AAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGT GGACCCAGGATAGGGCCAAACCCGTCACCCAGATC GTCAGCGCCGAGGCCTGGGGTAGAGCAGACTGTGG CTTTACCTCGGTGTCCTACCAGCAAGGGGTCCTGTC TGCCACCATCCTCTATGAGATCCTGCTAGGGAAGGC CACCCTGTATGCTGTGCTGGTCAGCGCCCTTGTGTTG ATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTTCTAA	10
KIF2C-404 F11 TCR (TRAV21*02F-TRBV11-2*03F)蛋白质序列 β链	MGTRLLCWAALCLLGAELTEAGVAQSPRYKIIEKRQS VAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNNGVV DDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLC ASSYHSYGYTFGSGTRLTVVEDLNKVFPPEVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRN HFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGR ADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAL VLMAMVKRKDF	11
KIF2C-404 F11 TCR (TRAV21*02F-TRBV11-2*03F) 可变区：β链	EAGVAQSPRYKIIEKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQI LGQGPKLLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDS TLKIQPAKLEDSAVYLCASSYHSYGYTFGSGTRLTVV	12
KIF2C-404 F11 TCR (TRAV21*02F-TRBV11-2*03F) 前导肽：β链	MGTRLLCWAALCLLGAELT	13

[0198]

KIF2C-404 F11 TCR (TRAV21*02F-TRBV11-2*03F) **β 链 CDR1**	SGHAT	14
KIF2C-404 F11 TCR (TRAV21*02F-TRBV11-2*03F) **β 链 CDR2**	FQNNGV	15
KIF2C-404 F11 TCR (TRAV21*02F-TRBV11-2*03F) **β 链 CDR3**	ASSYHSYGYT	16
HMD-375 CTL B5 TCR (TRAV38-2/DV8*01 F, TRBV7-9*03 F) **DNA 序列： α 链**	ATGGCATGCCCTGGCTTCCTGTGGGCACTTGTGATC TCCACCTGTCTTGAATTTAGCATGGCTCAGACAGTC ACTCAGTCTCAACCAGAGATGTCTGTGCAGGAGGCA GAGACCGTGACCCTGAGCTGCACATATGACACCAGT GAGAGTGATTATTATTTATTCTGGTACAAGCAGCCT CCCAGCAGGCAGATGATTCTCGTTATTCGCCAAGAA GCTTATAAGCAACAGAATGCAACAGAGAATCGTTTC TCTGTGAACTTCCAGAAAGCAGCCAAATCCTTCAGT CTCAAGATCTCAGACTCACAGCTGGGGGATGCCGCG ATGTATTTCTGTGCTTATAGGAGCGCGGTTCGGCAG AAGCTGCTCTTTGCAAGGGGAACCATGTTAAAGGTG GATCTTAATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTAC CAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGACAAGTCTGTC TGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGT CACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACA AAACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGA GCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAACAAATCTGACT TTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTC CAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGAAAGTTCCT GTGATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACA GATACGAACCTAAACTTTCAAAACCTGTCAGTGATT GGGTTCCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGGTTT AATCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGCTAA	17
HMD-375 CTL B5 TCR (TRAV38-2/DV8*01 F, TRBV7-9*03 F) **蛋白质序列 α 链**	MACPGFLWALVISTCLEFSMAQTVTQSQPEMSVQEAE TVTLSCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYK QQNATENRFSVNFQKAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFC AYRSAVRQKLLFARGTMLKVDLNIQNPDPAVYQLRDS KSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDM RSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS PESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAG FNLLMTLRLWSS	18
HMD-375 CTL B5 TCR (TRAV38-2/DV8*01 F, TRBV7-9*03 F) **可变区： α 链**	AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESDYYLFWY KQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQKAAKS FSLKISDSQLGDAAMYFCAYRSAVRQKLLFARGTMLK VDLN	19

[0199]

HMD-375 CTL B5 TCR (TRAV38-2/DV8*01 F, TRBV7-9*03 F) 前导肽：α链	MACPGFLWALVISTCLEFSM	20
HMD-375 CTL B5 TCR (TRAV38-2/DV8*01 F, TRBV7-9*03 F) α链 **CDR1**	TSESDYY	21
HMD-375 CTL B5 TCR (TRAV38-2/DV8*01 F, TRBV7-9*03 F) α链 **CDR2**	QEAYKQQN	22
HMD-375 CTL B5 TCR (TRAV38-2/DV8*01 F, TRBV7-9*03 F) α链 **CDR3**	AYRSAVRQKLL	23
HMD-375 CTL B5 TCR (TRAV38-2/DV8*01 F, TRBV7-9*03 F) DNA 序列：β链	ATGGGCACCAGCCTCCTCTGCTGGATGGCCCTGTGT CTCCTGGGGGCAGATCACGCAGATACTGGAGTCTCC CAGGACCCCAGACACAAGATCACAAAGAGGGGACA GAATGTAACTTTCAGGTGTGATCCAATTTCTGAACA CAACCGCCTTTATTGGTACCGACAGACCCTGGGGCA GGGCCCAGAGTTTCTGACTTACTTCCAGAATGAAGC TCAACTAGAAAAATCAAGGCTGCTCAGTGATCGGTT CTCTGCAGAGAGGCCTAAGGGATCTTTCTCCACCTT GGAGATCCAGCGCACAGAGCAGGGGGACTCGGCCA TGTATCTCTGTGCCAGCAGCTCCCCGGGGGGCCGGT CCTACAATGAGCAGTTCTTCGGGCCAGGGACACGGC TCACCGTGCTAGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCCAC CCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGA TCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGG CCACAGGCTTCTTCCCTGACCACGTGGAGCTGAGCT GGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTC AGCACGGACCCGCAGCCCCTCAAGGAGCAGCCCGC CCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCCT GAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACCCCCGCAA CCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTC GGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAAC CCGTCACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGGGTA GAGCAGACTGTGGCTTTACCTCGGTGTCCTACCAGC AAGGGGTCCTGTCTGCCACCATCCTCTATGAGATCC TGCTAGGGAAGGCCACCCTGTATGCTGTGCTGGTCA GCGCCCTTGTGTTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGG ATTTCTAA	24
HMD-375 CTL B5 TCR (TRAV38-2/DV8*01 F, TRBV7-9*03 F)蛋白质序列β链	MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQDPRHKITKRGQ NVTFRCDPISEHNRLYWYRQTLGQGPEFLTYFQNEAQ LEKSRLLSDRFSAERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLC ASSSPGGRSYNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVF EPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKE VHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQ NPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL VSALVLMAMVKRKDF	25

[0200]

HMD-375 CTL B5 TCR (TRAV38-2/DV8*01 F, TRBV7-9*03 F) **可变区：β链**	DTGVSQDPRHKITKRGQNVTFRCDPISEHNRLYWYRQTLGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERPKGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCASSSPGGRSYNEQFFGPGTRLTVL	26
HMD-375 CTL B5 TCR (TRAV38-2/DV8*01 F, TRBV7-9*03 F) **前导肽：β链**	MGTSLLCWMALCLLGADHA	27
HMD-375 CTL B5 TCR (TRAV38-2/DV8*01 F, TRBV7-9*03 F) **β链 CDR1**	SEHNR	28
HMD-375 CTL B5 TCR (TRAV38-2/DV8*01 F, TRBV7-9*03 F) **β链 CDR2**	FQNEAQ	29
HMD-375 CTL B5 TCR (TRAV38-2/DV8*01 F, TRBV7-9*03 F) **β链 CDR3**	ASSSPGGRSYNEQF	30

[0201] III.细胞渗透肽

[0202] 本公开内容的肽也可与细胞渗透肽(CPP)缔合或共价结合。可与本公开内容的肽共价结合的细胞渗透肽包括,例如,HIV Tat、疱疹病毒VP22、果蝇触角足(Drosophila Antennapedia)同源框(homeobox)基因产物、信号序列、融合序列或抗微生物肽I。使肽与CPP共价结合可延长树突细胞对肽的呈递,从而增强抗肿瘤免疫(Wang和Wang,2002)。在一些方面中,本公开内容的肽(例如包含在肽或多表位串内)可与CPP共价结合(例如通过肽键)以产生融合蛋白。在另一些方面中,根据本公开内容,肽或编码肽的核酸可以被包封在脂质体(例如多层、多囊泡或多囊泡脂质体)内或与其缔合。

[0203] 本文中使用的“缔合”意指物理缔合、化学缔合或二者。例如,缔合可以涉及共价键、疏水性相互作用、包封、表面吸附等。

[0204] 本文中使用的“细胞渗透剂”是指增强肽/多表位串向抗原呈递细胞的胞内递送的组合物或化合物。例如,细胞渗透剂可以是在与肽缔合时增强其穿过质膜之能力的脂质。或者,细胞渗透剂可以是肽。细胞渗透肽(CPP)是本领域中已知的,并且包括例如HIV的Tat蛋白(Frankel和Pabo,1988)、HSV的VP22蛋白(Elliott和O'Hare,1997)和成纤维细胞生长因子(Lin et al.,1995)。

[0205] 已从果蝇触角足同源框基因(Drosophila Antennapedia homeobox gene,Antp)的第三螺旋、HIV Tat和疱疹病毒VP22中鉴定出细胞渗透肽(或“蛋白质转导结构域”),其中的所有均包含富含精氨酸和赖氨酸残基的带正电荷的结构域(Schwarze et al.,2000;Schwarze et al.,1999)。此外,来自于信号序列的疏水性肽已被鉴定为细胞渗透肽。(Rojas et al.,1996;Rojas et al.,1998;Du et al.,1998)。已经显示,使这些肽与标志物蛋白(例如β-半乳糖苷酶)偶联赋予标志物蛋白被高效地内化到细胞中,并且包含这些肽的嵌合框内融合蛋白已经被用于在体外和体内将蛋白质递送到广谱细胞类型中(Drin et

al.,2002)。这些细胞渗透肽与本公开内容的肽的融合可增强多肽的细胞摄取。

[0206] 在一些方面中,通过使脂质(例如硬脂酸酯或豆蔻酸酯)与多肽附接来促进细胞摄取。已经显示,脂化增强了肽向细胞中的进入。脂质部分的附接是本发明提高细胞的多肽摄取的另一种方式。

[0207] 本公开内容的肽可包含在脂质体疫苗组合物中。例如,脂质体组合物可以是蛋白脂质体组合物或包含蛋白脂质体组合物。例如,在Neelapu et al.(2007)和Popescu et al.(2007)中描述了用于产生可与本发明一起使用的蛋白脂质体组合物的方法。在一些方面中,蛋白脂质体组合物可用于治疗黑素瘤。

[0208] 通过增强本公开内容的多肽的摄取,降低治疗所需的蛋白质或肽的量可能是可以的。这进而可以显著降低治疗成本并提高治疗剂的供应。较低的剂量还可以使肽的潜在免疫原性最小化并限制毒性副作用。

[0209] 在一些方面中,本公开内容的肽可与纳米粒缔合以形成纳米粒-多肽复合物。在一些方面中,纳米粒是脂质体或其他基于脂质的纳米粒,例如基于脂质的囊泡(例如,DOTAP:胆固醇囊泡)。在另一些方面中,纳米粒是基于铁氧化物的超顺磁性纳米粒。直径为约10nm至100nm的超顺磁性纳米粒足够小以避免被脾隔离(sequester),但足够大以避免被肝清除。该尺寸的颗粒可以渗透非常小的毛细血管并且可以有效地分布在身体组织中。可使用超顺磁性纳米粒-多肽复合物作为MRI造影剂来鉴定和追踪摄取肽的那些细胞。在一些方面中,纳米粒是半导体纳米晶体或半导体量子点,其二者均可用于光学成像。在另一些方面中,纳米粒可以是纳米壳,其在二氧化硅核芯上包含金层。纳米壳的一个优点是可使用标准化学来使多肽与金层缀合。在另一些方面中,纳米粒可以是富勒烯或纳米管(Gupta et al.,2005)。

[0210] 肽通过肾从循环中快速除去,并且在血清中对通过蛋白酶的降解敏感。通过使肽与纳米粒缔合,本发明的纳米粒-多肽复合物可防止降解和/或降低通过肾的清除。这可提高多肽的血清半衰期,从而降低有效治疗的多肽剂量需求。此外,这可降低治疗成本,并且使治疗的免疫学问题和毒性反应最小化。

[0211] IV.多表位串

[0212] 在一些方面中,肽包括或包含在多表位串中。多表位串是包含来自连接在一起的一个或更多个抗原的多个抗原表位的肽或多肽。多表位串可用于在对象(例如人对象)中诱导免疫应答。多表位串先前已被用于靶向疟疾和其他病原体(Baraldo et al.,2005;Moorthy et al.,2004;Baird et al.,2004)。多表位串可指核酸(例如,编码包括本公开内容的肽的多种抗原的核酸)或肽或多肽(例如,包含包括本公开内容的肽的多种抗原)。多表位串可包含在癌症疫苗组合物中。

[0213] V.抗原肽的应用

[0214] 多个方面涉及可用于治疗和预防某些癌症的抗原性肽的开发和用途。在许多方面中,抗原性肽是通过化学合成或通过宿主细胞中的分子表达来产生的。肽可被纯化并用于多种应用中,包括(但不限于)用于确定肽免疫原性的测定、用于确定T细胞识别的测定、用于治疗癌症的肽疫苗、经改造的T细胞的TCR的开发和抗体的开发。

[0215] 肽可通过多种方法化学合成。一种常见的方法是使用固相肽合成(solid-phase peptide synthesis,SPPS)。通常,SPPS是通过重复交替的N端去保护和偶联反应的循环来

进行的,从C端到N端构建肽。第一个氨基酸的C端与树脂偶联,其中随后胺被废弃,并且随后与第二个氨基酸的游离酸偶联。这个循环一直重复,直到肽被合成。

[0216] 也可利用分子工具和宿主细胞合成肽。可以合成与抗原肽相对应的核酸序列。在一些方面中,合成核酸在体外合成仪(例如,亚磷酰胺合成仪)、细菌重组系统或其他合适的方法中合成。此外,合成的核酸可以被纯化和冻干,或者保存在生物系统(例如,细菌、酵母)中。为了在生物系统中使用,可将合成的核酸分子插入质粒载体或类似物中。质粒载体也可以是表达载体,其中合适的启动子和合适的3'-polyA尾与转录序列组合。

[0217] 一些方面还涉及产生抗原性肽或蛋白质的表达载体和表达系统。这些表达系统可并入表达载体,以在合适的表达系统中表达转录物和蛋白质。典型的表达系统包括细菌(例如大肠杆菌(E.coli))、昆虫(例如SF9)、酵母(例如酿酒酵母(S.cerevisiae))、动物(例如CHO)或人(例如HEK 293)细胞系。可使用标准的生物技术生产过程从这些系统中纯化RNA和/或蛋白质分子。

[0218] 可进行用于确定免疫原性和/或TCR结合的测定。一种是例如dextramer流式细胞术测定。通常,开发或购买定制的HLA匹配的MHC I类dextramer:肽(pMHC)复合物(Immudex,Copenhagen,Denmark)。使来自外周血单个核细胞(PBMC)或肿瘤浸润淋巴细胞(tumor-infiltrating lymphocyte,TIL)的T细胞与pMHC复合物孵育并染色,并且随后通过流式细胞仪运行来确定肽是否能够与T细胞的TCR结合。

[0219] 本公开内容的肽也可用于分离和/或鉴定与肽结合的T细胞受体。T细胞受体包含通过二硫键连接的两条不同的多肽链,称为T细胞受体α(TCRα)和β(TCRβ)链。这些α:β异二聚体在结构上与免疫球蛋白分子的Fab片段非常相似,并且它们解释了大多数T细胞的抗原识别。少数T细胞携带由一对不同的多肽链(称为γ和δ)构成的另一种但结构相似的受体。两种类型的T细胞受体均不同于充当B细胞受体的膜结合免疫球蛋白:T细胞受体只有一个抗原结合位点,而B细胞受体有两个,并且T细胞受体从不分泌,而免疫球蛋白可以作为抗体分泌。

[0220] T细胞受体的两条链均具有与免疫球蛋白V结构域具有同源性的氨基末端可变(V)区、与免疫球蛋白C结构域具有同源性的恒定(C)区,以及含有形成链间二硫键的半胱氨酸残基的短的铰链区。每条链通过疏水跨膜结构域跨越脂质双层,并以短的胞质尾终止。

[0221] T细胞受体的三维结构已经确定。该结构确实与抗体Fab片段的结构相似,正如对编码其的基因的早期研究所怀疑的那样。T细胞受体链的折叠方式与Fab片段非常相似,但是最终结构看起来更短一点且更宽一点。然而,T细胞受体与Fab片段之间存在一些明显的差异。最显著的差异是在Cα结构域,其中折叠不同于任何其他免疫球蛋白样结构域。与Cβ结构域并置的一半结构域形成与在其他免疫球蛋白样结构域中存在的β折叠类似的β折叠,但另一半结构域由松散堆积的链和短的α螺旋区段形成。分子内二硫键在免疫球蛋白样结构域中通常连接两条β链,在Cα结构域中将β链与这个α螺旋区段连接。

[0222] 结构域相互作用的方式也存在差异。两个T细胞受体链的V与C结构域之间的界面比抗体中的界面更广泛,其可能使结构域之间的铰链连接更不灵活。并且在碳水化合物的辅助下,Cα与Cβ结构域之间的相互作用是独特的,来自Cα结构域的糖基团与Cβ结构域形成许多氢键。最后,可变结合位点的比较表明,虽然互补决定区(CDR)环与抗体分子的环非常紧密地对齐,但是相对于抗体分子的环存在一些位移。这种位移在VαCDR2环中特别明显,其

取向与抗体V结构域中的等同环大致成直角,这是将环的一端从结构域的一个面锚定至另一个面的β链的移位的结果。链位移还导致在结构已知的七个Vβ结构域中的两个中的VβCDR2环的取向发生变化。迄今为止,七种T细胞受体的晶体结构已得以在这个分辨水平求解。

[0223] 本公开内容的一些方面涉及与本公开内容的肽(例如SEQ ID NO:1或2的肽)结合的经改造T细胞受体。术语"经改造"是指具有接枝到TCR恒定区上的TCR可变区,以制备与本公开内容的肽和抗原结合的嵌合多肽的T细胞受体。在某些方面中,TCR包含这样的插入序列,其用于构建体的克隆、增强表达、检测或用于构建体的治疗性对照,但是不存在于内源性TCR例如多克隆位点、接头、铰链序列、经修饰铰链序列、经修饰跨膜序列、检测多肽或分子、或者可允许选择或筛选包含TCR的细胞的治疗性对照中。

[0224] 在一些方面中,TCR包含非TCR序列。因此,某些方面涉及具有并非来自TCR基因序列的TCR。在一些方面中,TCR是嵌合的,因为其除包含通常在TCR基因中存在的序列之外,还包含来自自然界中不一定一起存在的至少两个TCR基因的序列。

[0225] VI.抗体

[0226] 本公开内容的一些方面涉及靶向本公开内容的肽或其片段的抗体。术语"抗体"是指任何同种型的完整免疫球蛋白,或者其可与完整抗体竞争与靶抗原特异性结合的片段,并且包括嵌合抗体、人源化抗体、完全人抗体和双特异性抗体。本文中使用的术语"抗体"或"免疫球蛋白"可互换使用,并且是指作为动物免疫应答的一部分起作用的数类结构相关蛋白中的任何一者,包括IgG、IgD、IgE、IgA、IgM和相关蛋白,以及包含保留抗原结合活性的抗体CDR结构域的多肽。

[0227] 术语"抗原"是指能够被选择性结合剂(例如抗体)结合的分子或分子的一部分。抗原可具有能够与不同抗体相互作用的一个或更多个表位。

[0228] 术语"表位"包括能够通过与免疫球蛋白或T细胞受体结合而引发免疫应答的分子的任何区域或部分。表位决定簇可包括化学活性表面基团,例如氨基酸、糖侧链、磷酰基或磺酰基,并且可具有特定的三维结构特征和/或特定的电荷特征。通常,对特定靶抗原具有特异性的抗体将优先识别复杂混合物内靶抗原上的表位。

[0229] 可使用本领域公知的许多不同的表位作图技术来鉴定给定多肽的表位区域,所述技术包括:X射线晶体学、核磁共振波谱法、定点突变作图、蛋白质展示阵列,参见例如Epitope Mapping Protocols,(Johan Rockberg和Johan Nilvebrant,Ed.,2018)Humana Press,New York,N.Y.。这样的技术是本领域中已知的,并且在例如美国专利No.4,708,871;Geysen et al.Proc.Natl.Acad.Sci.USA81:3998-4002(1984);Geysen et al.Proc.Natl.Acad.Sci.USA82:178-182(1985);Geysen et al.Molec.Immunol.23:709-715(1986)中描述。此外,蛋白质的抗原区域也可使用标准的抗原性图和亲水性图来预测和鉴定。

[0230] 术语"免疫原性序列"意指这样的分子,其包括至少一个表位的氨基酸序列以使得该分子能够在合适的宿主中刺激抗体的产生。术语"免疫原性组合物"意指包含至少一种免疫原性分子(例如,抗原或碳水化合物)的组合物。

[0231] 完整的抗体通常由两条全长重链和两条全长轻链构成,但是在一些情况下可包含较少的链,例如天然存在于骆驼科中的抗体,其可仅包含重链。本文中公开的抗体可以仅来

源于单一来源,或者可以是“嵌合的”,即抗体的不同部分可以来源于两种不同的抗体。例如,可变区或CDR区可以来源于大鼠或鼠源,而恒定区来源于不同的动物源,例如人。抗体或结合片段可以通过重组DNA技术,或通过完整抗体的酶切割或化学切割在杂交瘤中产生。除非另有说明,术语“抗体”包括其衍生物、变体、片段和突变蛋白,其实例如下所述(Sela-Culang et al.,Front Immunol.2013;4:302;2013)。

[0232] 术语“轻链”包括全长轻链及其具有足够可变区序列以赋予结合特异性的片段。全长轻链具有约为25,000道尔顿的分子量,并且包括可变区结构域(本文中缩写为VL)和恒定区结构域(本文中缩写为CL)。轻链有两种分类,标识为kappa(κ)和lambda(λ)。术语“VL片段”意指单克隆抗体的轻链的片段,其包括全部或部分轻链可变区,包括CDR。VL片段可进一步包括轻链恒定区序列。轻链的可变区结构域位于多肽的氨基末端处。

[0233] 术语“重链”包括全长重链及其具有足够可变区序列以赋予结合特异性的片段。全长重链具有约为50,000道尔顿的分子量,并且包括可变区结构域(本文中缩写为VH)和三个恒定区结构域(本文中缩写为CH1、CH2和CH3)。术语“VH片段”意指单克隆抗体重链的片段,其包括全部或部分重链可变区,包括CDR。VH片段可进一步包括重链恒定区序列。重链恒定区结构域的数目将取决于同种型。VH结构域位于多肽的氨基末端处,并且CH结构域位于羧基末端处,其中CH3最靠近-COOH末端。抗体的同种型可以是IgM、IgD、IgG、IgA或IgE,并且由存在的重链定义,其中有五种分类:分别是mu(μ)、delta(δ)、gamma(γ)、alpha(α)或epsilon(ε)链。IgG具有数个亚型,包括但不限于IgG1、IgG2、IgG3和IgG4。IgM亚型包括IgM1和IgM2。IgA亚型包括IgA1和IgA2。

[0234] VII.抗体缀合物

[0235] 本公开内容的一些方面涉及针对本公开内容的肽的抗体(通常为单克隆类型),其与至少一种药剂连接以形成抗体缀合物。为了提高抗体分子作为诊断剂或治疗剂的效力,常规地与至少一种期望的分子或部分连接或共价结合或复合。这样的分子或部分可以是,但不限于,至少一种效应分子或报道分子。效应分子包括具有期望活性,例如细胞毒性活性的分子。已与抗体附接的效应分子的非限制性实例包括毒素、抗肿瘤剂、治疗性酶、放射性标记的核苷酸、抗病毒剂、螯合剂、细胞因子、生长因子和寡核苷酸或多核苷酸。相比之下,报道分子被定义为可使用测定检测的任何部分。已与抗体缀合的报道分子的非限制性实例包括酶、放射性标记、半抗原、荧光标记、磷光分子、化学发光分子、发色团、发光分子、光亲和分子、有色颗粒或配体(例如生物素)。

[0236] 可使用具有足够选择性、特异性或亲和力的任何抗体作为抗体缀合物的基础。可以使用本领域技术人员已知的常规免疫学筛选方法来评估这样的性质。抗体分子中用于与生物活性分子结合的位点除典型的抗原结合位点之外还包括可结合以下的位于可变结构域中的位点:病原体、B细胞超抗原、T细胞共受体CD4和HIV-1包膜(Sasso et al.,1989;Shorki et al.,1991;Silvermann et al.,1995;Cleary et al.,1994;Lenert et al.,1990;Berberian et al.,1993;Kreier et al.,1991)。此外,可变结构域参与抗体自结合(Kang et al.,1988),并且包含被抗抗体(anti-antibody)识别的表位(独特位(idiotope))(Kohler et al.,1989)。

[0237] 抗体缀合物的某些实例是其中抗体与可检测标记连接的那些缀合物。“可检测标记”是由于其特定的功能特性和/或化学特征而可进行检测的化合物和/或元素,其使用允

许检测和/或如果期望的话进一步量化与其附接的抗体。另一种这样的实例是形成包含与细胞毒性或抗细胞剂连接的抗体的缀合物,其可以称为“免疫毒素”。

[0238] 通常优选使用抗体缀合物作为诊断剂。抗体诊断剂通常属于两类:用于体外诊断例如用于多种免疫测定的那些,和/或用于通常称为“抗体指导的成像”的体内诊断方案的那些。

[0239] 许多合适的成像剂是本领域中已知的,用于使其与抗体连接的方法也如此(参见例如美国专利No.5,021,236;4,938,948;以及4,472,509,其各自通过引用并入本文)。所使用的成像部分可以是顺磁性离子;放射性同位素;荧光色素;NMR可检测物质;X射线成像。

[0240] 在顺磁性离子的情况下,可通过以下示例性离子来提及:例如铬(III)、锰(II)、铁(III)、铁(II)、钴(II)、镍(II)、铜(II)、钕(III)、钐(III)、镱(III)、钆(III)、钒(II)、钪(III)、铽(III)、钬(III)和/或铒(III),其中特别优选钆。在另一些情况(例如X-射线成像)下可用的离子包括但不限于镧(III)、金(III)、铅(II)和尤其是铋(III)。

[0241] 在用于治疗和/或诊断应用的放射性同位素的情况下,可以提及砹^{211}、^{14}碳、^{51}铬、^{36}氯、^{57}钴、^{58}钴、铜^{67}、^{152}Eu、镓^{67}、^{3}氢、碘^{123}、碘^{125}、碘^{131}、铟^{111}、^{59}铁、^{32}磷、铼^{186}、铼^{188}、^{75}硒、^{35}硫、锝^{99m}和/或钇^{90}。^{125}I通常优选用于某些方面,并且锝^{99m}和/或铟^{111}也通常是优选的,因为它们的能量低且适用于长距离检测。本发明的放射性标记的单克隆抗体可根据本领域中公知的方法来产生。例如,可通过与碘化钠和/或碘化钾和化学氧化剂(例如次氯酸钠)或酶促氧化剂(例如乳过氧化物酶)接触来使单克隆抗体碘化。可通过配体交换过程来用锝^{99m}标记根据本发明的单克隆抗体,例如通过用二价锡溶液还原高锝酸盐(pertechnate),将还原后的锝螯合到Sephadex柱上,并将抗体施加至该柱上来进行。或者,可使用直接标记技术,例如通过孵育高锝酸盐、还原剂(例如$SNCl_2$)、缓冲溶液(例如邻苯二甲酸钠钾溶液)和抗体进行。通常用于使作为金属离子存在的放射性同位素与抗体结合的中间官能团是二乙烯三胺五乙酸(diethylenetriaminepentaacetic acid,DTPA)或乙二胺四乙酸(ethylene diaminetetracetic acid,EDTA)。

[0242] 考虑用作缀合物的荧光标记包括Alexa 350、Alexa 430、AMCA、BODIPY 630/650、BODIPY 650/665、BODIPY-FL、BODIPY-R6G、BODIPY-TMR、BODIPY-TRX、Cascade Blue、Cy3、Cy5、6-FAM、异硫氰酸荧光素、HEX、6-JOE、Oregon Green 488、Oregon Green 500、Oregon Green 514、Pacific Blue、REG、罗丹明绿、罗丹明红、肾造影剂(Renographin)、ROX、TAMRA、TET、四甲基罗丹明和/或德克萨斯红(Texas Red)。

[0243] 在本发明中考虑的另一种类型的抗体缀合物是主要意图用于体外使用的那些,其中抗体与第二结合配体和/或在与显色底物接触后将产生着色产物的酶(酶标签)连接。合适的酶的一些实例包括脲酶、碱性磷酸酶、(辣根)过氧化氢酶或葡萄糖氧化酶。优选的第二结合配体是生物素和/或亲和素和链霉亲和素化合物。这样的标记的用途对于本领域技术人员是公知的,并且在例如美国专利3,817,837、3,850,752、3,939,350、3,996,345、4,277,437、4,275,149和4,366,241中描述,其各自通过引用并入本文。

[0244] 分子与抗体的位点特异性连接的另一种已知方法包括使抗体与基于半抗原的亲和标记反应。实质上,基于半抗原的亲和标记与抗原结合位点中的氨基酸反应,从而破坏该位点并阻断特异性抗原反应。然而,这可能是不利的,因为其导致通过抗体缀合物的抗原结合丧失。

[0245] 包含叠氮基的分子也可用于经由通过低强度紫外光产生的反应性氮烯中间体来与蛋白质形成共价键(Potter和Haley,1983)。特别地,已经使用嘌呤核苷酸的2-叠氮类似物和8-叠氮类似物作为定点光探针以鉴定粗制细胞提取物中的核苷酸结合蛋白(Owens&Haley,1987;Atherton et al.,1985)。2-叠氮类似物和8-叠氮类似物还已被用于对经纯化蛋白的核苷酸结合结构域进行作图(Khatoon et al.,1989;King et al.,1989;和Dholakia et al.,1989)并且可用作抗体结合剂。

[0246] 用于使抗体与其缀合部分连接或缀合的数种方法是本领域中已知的。一些附接方法涉及使用与抗体相连的金属螯合络合物,其利用例如有机螯合剂,例如二乙烯三胺五乙酸酐(DTPA)、亚乙基三胺四乙酸、N-氯-对甲苯磺酰胺、和/或四氯-3α-6α-二苯基甘脲-3(美国专利No.4,472,509和4,938,948,其各自通过引用并入本文)。单克隆抗体还可在存在偶联剂例如戊二醛或高碘酸盐的情况下与酶反应。具有荧光素标记物的缀合物在存在这些偶联剂的情况下或通过与异硫氰酸酯反应来制备。在美国专利No.4,938,948中,使用单克隆抗体实现乳腺肿瘤的成像并且使用接头(例如对羟基苯甲亚氨酸甲酯或N-琥珀酰亚胺基-3-(4-羟基苯基)丙酸酯)使可检测成像部分与抗体结合。

[0247] 在另一些方面中,考虑了通过使用不改变抗体结合位点的反应条件选择性地将巯基引入免疫球蛋白的Fc区中来使免疫球蛋白衍生化。公开了根据该方法产生的抗体缀合物表现出改善的寿命、特异性和敏感性(美国专利No.5,196,066,通过引用并入本文)。在文献中也已经公开了效应分子或报道分子的位点特异性连接,其中报道分子或效应分子与Fc区中的碳水化合物残基缀合(O'Shannessy et al.,1987)。已经报道该方法产生目前处于临床评价之中的在诊断和治疗方面有希望的抗体。

[0248] 在本公开内容的另一方面中,抗体可与半导体纳米晶体连接,例如美国专利No.6,048,616;5,990,479;5,690,807;5,505,928;5,262,357(其全部以其整体并入本文);以及PCT公开No.99/26299(1999年5月27日公开)中描述的那些。特别地,在本发明的生物和化学测定中作为半导体纳米晶体使用的示例性材料包括但不限于上述那些,其包括第II-VI族、第III-V族和第IV族半导体,例如

[0249] ZnS,ZnSe,ZnTe,CdS,CdSe,CdTe,MgS,MgSe,MgTe,CaS,CaSe,CaTe,SrS,SrSe,SrTe,BaS,BaSe,BaTe,GaN,GaP,GaAs,GaSb,InP,InAs,InSb,AlS,AlP,AlSb,PbS,PbSe,Ge和Si,及其三元和四元混合物。用于使半导体纳米晶体与抗体连接的方法在美国专利No.6,630,307和6,274,323中描述。

[0250] 在另一些方面中,本发明涉及用于结合、纯化、除去、量化和/或以其他方式一般地检测例如T细胞或者选择性地结合或识别本公开内容的肽的生物组分的免疫检测方法。在一些方面中,四聚体测定可用于本发明。四聚体测定通常涉及产生可结合抗原特异性T淋巴细胞的可溶性肽-MHC四聚体,并且例如在Altman et al.(1996)中描述了四聚体测定方法。可使用的一些免疫检测方法包括例如酶联免疫吸附测定(ELISA)、放射免疫测定(RIA)、免疫放射测定、荧光免疫测定、化学发光测定、生物发光测定、四聚体测定和Western印迹。多种有用的免疫检测方法的步骤已在科学文献(例如Doolittle和Ben-Zeev,1999;Gulbis和Galand,1993;De Jager et al.,1993;和Nakamura et al.,1987,其各自通过引用并入本文)中进行描述。

[0251] VIII.MHC多肽

[0252] 本公开内容的一些方面涉及包含MHC多肽的组合物。在一些方面中,MHC多肽包含至少2、3或4个MHC多肽,其可作为单独的多肽或作为融合蛋白表达。抗原向T细胞的呈递由两类不同的分子MHC I类(MHC-I)和MHC II类(MHC-II)(在本文中也称为“pMHC”)介导,其利用不同的抗原加工途径。来源于细胞内抗原的肽通过几乎在所有细胞上表达的MHC I类分子呈递至CD8+T细胞,而细胞外抗原来源的肽通过MHC-II分子呈递至CD4+T细胞。在某些方面中,在合适的MHC I类或II类多肽的情况下,在抗原-MHC复合物中识别并呈递特定的抗原。在某些方面中,可评估对象的基因构成以确定哪种MHC多肽将用于特定的患者和特定的肽组。在某些方面中,MHC I类多肽包含HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F、HLA-G或CD-1分子中的全部或部分。在其中MHC多肽是MHC II类多肽的一些方面中,MHC II类多肽可包含HLA-DR、HLA-DQ或HLA-DP中的全部或部分。

[0253] 非经典MHC多肽也考虑在本发明的MHC复合物中使用。非经典MHC多肽是非多态性的,在物种间保守,并具有窄、深、疏水的配体结合口袋。这些结合口袋能够使糖脂和磷脂呈递至自然杀伤T(NKT)细胞或CD8+T细胞的某些亚群,例如Qa1、HLA-E限制性CD8+T细胞或MAIT细胞。NKT细胞代表共表达NK细胞标志物和半恒定T细胞受体(TCR)的独特淋巴细胞群。它们参与与多种疾病相关的免疫应答的调节。

[0254] IX.宿主细胞

[0255] 如本文中所使用的术语“细胞”、“细胞系”和“细胞培养物”可互换使用。所有这些术语还包括新鲜分离的细胞和离体培养、活化或扩增的细胞二者。所有这些术语也包括其子代,即任何和所有的后代。应当理解,由于有意或无意的突变,所有后代可不相同。在表达异源核酸序列的的情况中,“宿主细胞”是指原核或真核细胞,其包括能够复制载体或表达载体编码的异源基因的任何可转化生物体。宿主细胞可以并且已经用作载体或病毒的接受者。宿主细胞可以是“经转染的”或“经转化的”,这是指通过其将外源核酸(例如编码重组蛋白的序列)转移或引入宿主细胞的过程。转化细胞包括原代对象细胞及其后代。

[0256] 在某些方面中,转染可在任何原核或真核细胞上进行。在一些方面中,电穿孔涉及人细胞的转染。在另一些方面中,电穿孔涉及动物细胞的转染。在某些方面中,转染涉及细胞系或杂交细胞类型的转染。在一些方面中,被转染的细胞是癌细胞、肿瘤细胞或永生化细胞。在一些情况下,肿瘤、癌、永生化细胞或细胞系被诱导,并且在另一些情况下,肿瘤、癌、永生化细胞或细胞系进入其各自的天然状态或条件。在某些方面中,细胞或细胞系可以是A549、B细胞、B16、BHK-21、C2C12、C6、CaCo-2、CAP/、CAP-T、CHO、CHO2、CHO-DG44、CHO-K1、COS-1、Cos-7、CV-1、树突细胞、DLD-1、胚胎干(Embryonic Stem,ES)细胞或衍生物、H1299、HEK、293、293T、293FT、Hep G2、造血干细胞、HOS、Huh-7、诱导性多能干细胞(induced pluripotent stem cell,iPS)或衍生物、Jurkat、K562、L5278Y、LNCaP、MCF7、MDA-MB-231、MDCK、间充质细胞、Min-6、单核细胞、Neuro2a、NIH 3T3、NIH3T3L1、K562、NK-细胞、NS0、Panc-1、PC12、PC-3、外周血细胞、浆细胞、原代成纤维细胞、RBL、Renca、RLE、SF21、SF9、SH-SY5Y、SK-MES-1、SK-N-SH、SL3、SW403、刺激性触发多能性获得(Stimulus-triggered Acquisition ofPluripotency,STAP)细胞或衍生物SW403、T细胞、THP-1、肿瘤细胞、U2OS、U937、外周血淋巴细胞、经扩增T细胞、造血干细胞或Vero细胞。

[0257] X.另外的药剂

[0258] A.免疫刺激剂

[0259] 在一些方面中,该方法还包括施用另外的药剂。在一些方面中,另外的药剂是免疫刺激剂。本文中使用的术语“免疫刺激剂”是指可在对象中刺激免疫应答的化合物,并且可包含佐剂。在一些方面中,免疫刺激剂是不构成特定抗原但可增强对抗原的免疫应答的强度和持久性的物质。这样的免疫刺激剂可包括但不限于:模式识别受体(例如Toll-样受体、RIG-1和NOD样受体(NOD-like receptor,NLR))的激动剂、矿物盐例如明矾、与肠杆菌(例如大肠杆菌(Escherihia coli)、明尼苏达沙门氏菌(Salmonella minnesota)、鼠伤寒沙门氏菌(Salmonella typhimurium)或福氏志贺菌(Shigella flexneri))的单磷酰脂质(monphosphoryl lipid,MPL)A组合(或具体地分别与上述细菌的MPL(ASO4)、MPL A组合)的明矾、皂苷(例如QS-21、Quil-A、ISCOM、ISCOMATRIX)、乳剂(例如MF59、Montanide、ISA51和ISA720)、ASO2(QS21+角鲨烯+MPL)、脂质体和脂质体制剂(例如ASO1)、合成的或特别制备的微粒和微载体例如淋球菌(N.gonorrheae)、沙眼衣原体(Chlamydia trachomatis)以及其他等细菌来源的外膜囊泡(outer membrane vesicle,OMV),或者壳聚糖颗粒、储库形成剂(例如Pluronic嵌段共聚物)、特别地经修饰或经制备的肽(例如胞壁酰二肽)、氨基烷基葡糖胺4-磷酸酯(例如RC529)、或蛋白质(例如细菌类毒素或毒素片段)。

[0260] 在一些方面中,另外的药剂包含模式识别受体(pattern recognition receptor,PRR)的激动剂,所述模式识别受体包括但不限于Toll-样受体(TLR),特别是TLR 2、3、4、5、7、8、9和/或其组合。在一些方面中,另外的药剂包含Toll-样受体3的激动剂、Toll-样受体7和8的激动剂或Toll-样受体9的激动剂;优选地,所述免疫刺激剂包含咪唑并喹啉;例如R848;腺嘌呤衍生物,例如在美国专利No.6,329,381、美国公开专利申请2010/0075995或WO 2010/018132中公开的那些;免疫刺激性DNA或免疫刺激性RNA。在一些方面中,另外的药剂还可包含免疫刺激性RNA分子,例如但不限于dsRNA、poly I:C或poly I:poly C12U(可作为Ampligen.RTM.获得,poly I:C和poly I:poly C12U二者均已知为TLR3刺激剂),和/或在以下中公开的那些:F.Heil et al.,"Species-Specific Recognition of Single-Stranded RNAvia Toll-like Receptor 7and 8"Science303(5663),1526-1529(2004);J.Vollmer et al.,"Immune modulation by chemically modified ribonucleosides and oligoribonucleotides"WO 2008033432A2;A.Forsbach et al.,"Immunostimulatory oligoribonucleotides containing specific sequence motif(s)and targeting the Toll-like receptor 8pathway"WO 2007062107 A2;E.Uhlmann et al.,"Modified oligoribonucleotide analogs with enhanced immunostimulatory activity" U.S.Pat.Appl.Publ.US2006241076;G.Lipford et al.,"Immunostimulatory viral RNAoligonucleotides and use for treating cancer and infections"WO 2005097993A2;G.Lipford et al.,"Immunostimulatory G,U-containing oligoribonucleotides,compositions,and screening methods"WO 2003086280A2。在一些方面中,另外的药剂可以是TLR-4激动剂,例如细菌脂多糖(lipopolysaccharide,LPS)、VSV-G和/或HMGB-1。在一些方面中,另外的药剂可包含TLR-5激动剂,(例如鞭毛蛋白,或其部分或衍生物),包括但不限于美国专利No.6,130,082,6,585,980和7,192,725中公开的那些。

[0261] 在一些方面中,另外的药剂可以是从坏死细胞释放的促炎刺激物(例如,尿酸盐结晶)。在一些方面中,另外的药剂可以是补体级联的激活组分(例如,CD21、CD35等)。在一些

方面中,另外的药剂可以是免疫复合物的激活组分。另外的药剂还包括补体受体激动剂,例如与CD21或CD35结合的分子。在一些方面中,补体受体激动剂诱导合成纳米载体的内源性补体调理作用。在一些方面中,免疫刺激剂是细胞因子,其是由细胞释放并且对细胞-细胞相互作用、通讯和其他细胞的行为具有特定作用的小蛋白质或生物因子(在5kD至20kD的范围内)。在一些方面中,细胞因子受体激动剂是小分子、抗体、融合蛋白或适配体。

[0262] B.免疫治疗

[0263] 在一些方面中,另外的治疗包含癌症免疫治疗。癌症免疫治疗(有时称为免疫肿瘤学(immuno-oncology),缩写IO)是利用免疫系统来治疗癌症。可将免疫治疗分类为主动的、被动的或混合的(主动的和被动的)。这些方法运用了以下事实:癌细胞通常在其表面具有可被免疫系统检测到的分子,称为肿瘤相关抗原(tumor-associated antigen,TAA);它们通常是蛋白质或其他大分子(例如碳水化合物)。主动免疫治疗通过靶向TAA引导免疫系统攻击肿瘤细胞。被动免疫治疗增强现有的抗肿瘤应答,并包括使用单克隆抗体、淋巴细胞和细胞因子。免疫治疗是本领域中已知的,并且一些如下所述。

[0264] 1.共刺激分子的抑制

[0265] 在一些方面中,免疫治疗包含共刺激分子的抑制剂。在一些方面中,抑制剂包含B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、CD28、ICOS、OX40(TNFRSF4)、4-1BB(CD137;TNFRSF9)、CD40L(CD40LG)、GITR(TNFRSF18)及其组合的抑制剂。抑制剂包括抑制性抗体、多肽、化合物和核酸。

[0266] 2.树突细胞治疗

[0267] 树突细胞治疗通过使树突细胞将肿瘤抗原呈递给淋巴细胞来引发抗肿瘤应答,这使树突细胞活化,引发其杀伤呈递抗原的其他细胞。树突细胞是哺乳动物免疫系统中的抗原呈递细胞(APC)。在癌症治疗中,它们有助于靶向癌症抗原。基于树突细胞的细胞癌治疗的一个实例是sipuleucel-T。

[0268] 诱导树突细胞呈递肿瘤抗原的一种方法是通过用自体肿瘤裂解物或短肽(对应于癌细胞上的蛋白质抗原的小部分蛋白)进行疫苗接种。这些肽通常与佐剂(高免疫原性物质)组合来给予,以提高免疫和抗肿瘤应答。另一些佐剂包括吸引和/或活化树突细胞的蛋白质或其他化学物质,例如粒细胞巨噬细胞集落刺激因子(granulocyte macrophage colony-stimulating factor,GM-CSF)。

[0269] 树突细胞也可通过使肿瘤细胞表达GM-CSF在体内被活化。这可以通过对肿瘤细胞进行遗传改造以产生GM-CSF来实现,或者通过用表达GM-CSF的溶瘤病毒感染肿瘤细胞来实现。

[0270] 另一策略是从患者血液中去除树突细胞并在体外活化它们。树突细胞在存在肿瘤抗原的情况下被活化,肿瘤抗原可以是单肿瘤特异性肽/蛋白质或肿瘤细胞裂解物(分解的肿瘤细胞的溶液)。这些细胞(与任选的佐剂)被输注并引发免疫应答。

[0271] 树突细胞治疗包括使用与树突细胞表面上的受体结合的抗体。可将抗原添加至抗体并且可诱导树突细胞成熟并提供对肿瘤的免疫。树突细胞受体例如TLR3、TLR7、TLR8或CD40已被用作抗体靶标。

[0272] 3.CAR-T细胞治疗

[0273] 嵌合抗原受体(CAR,也称为嵌合免疫受体、嵌合T细胞受体或人工T细胞受体)是经

改造的受体,其将新的特异性与免疫细胞组合以靶向癌细胞。通常,这些受体将单克隆抗体的特异性接枝到T细胞上。所述受体被称为嵌合的,因为其是由来自不同来源的部分融合的。CAR-T细胞治疗是指使用这样的经转化细胞进行癌症治疗的治疗。

[0274] CAR-T细胞设计的基本原理涉及组合抗原结合和T细胞活化功能的重组受体。CAR-T细胞的一般前提是人工产生靶向癌细胞上存在的标志物的T细胞。科学家可从人中取出T细胞,对其进行遗传改变,并将其放回患者中,用于使其攻击癌细胞。一旦T细胞被改造变成CAR-T细胞,其就可充当“活的药物”。CAR-T细胞在胞外配体识别结构域与胞内信号传导分子之间建立联系,进而活化T细胞。胞外配体识别结构域通常是单链可变片段(scFv)。CAR-T细胞治疗安全性的一个重要方面是如何确保仅靶向癌性肿瘤细胞,而不是正常细胞。CAR-T细胞的特异性由对所靶向的分子的选择决定。

[0275] 示例性的CAR-T治疗包括Tisagenlecleucel(Kymriah)和Axicabtagene ciloleucel(Yescarta)。在一些方面中,CAR-T治疗靶向CD19。

[0276] 4.细胞因子治疗

[0277] 细胞因子是由肿瘤内存在的许多类型的细胞产生的蛋白质。它们可调节免疫应答。肿瘤通常利用它们来使其生长并降低免疫应答。这些免疫调节作用使得它们被用作引发免疫应答的药物。两种常用的细胞因子是干扰素和白介素。

[0278] 干扰素由免疫系统产生。它们通常参与抗病毒应答,但对于癌症也有用途。它们分为三组:I型(IFNα和IFNβ)、II型(IFNγ)和III型(IFNλ)。

[0279] 白介素具有一系列的免疫系统作用。IL-2是示例性的白介素细胞因子治疗。

[0280] 5.过继性T细胞治疗

[0281] 过继性T细胞治疗是通过输注T细胞(过继性细胞转移)的被动免疫接种的一种形式。其存在于血液和组织中,并且通常在其发现外来病原体时会活化。具体地,当T细胞的表面受体遇到在其表面抗原上展示出部分外来蛋白质的细胞时,它们就会活化。这些可以是感染的细胞,或者是抗原呈递细胞(APC)。它们存在于正常组织中和肿瘤组织中,在那里它们被称为肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)。它们在存在APC(例如呈递肿瘤抗原的树突细胞)的情况下被活化。尽管这些细胞可攻击肿瘤,但是肿瘤内的环境是高度免疫抑制的,这阻止免疫介导的肿瘤死亡。

[0282] 已经开发了产生和获得肿瘤靶向T细胞的多种方法。对肿瘤抗原具有特异性的T细胞可从肿瘤样品(TIL)中除去,或从血液过滤。随后的活化和培养离体进行,并将所得物进行再输注。活化可通过基因治疗或通过将T细胞暴露于肿瘤抗原来进行。

[0283] 6.检查点抑制剂和组合治疗

[0284] 在一些方面中,另外的治疗包括免疫检查点抑制剂。某些方面在下文进一步描述。

[0285] a.PD-1、PDL1和PDL2抑制剂

[0286] PD-1可在其中T细胞遇到感染或肿瘤的肿瘤微环境中发挥作用。活化的T细胞上调PD-1并继续在外周组织中将其表达。细胞因子(例如IFN-γ)诱导上皮细胞和肿瘤细胞上PDL1的表达。PDL2在巨噬细胞和树突细胞上表达。PD-1的主要作用是在免疫应答期间限制外周中效应T细胞的活性并防止对组织的过度损伤。本公开内容的抑制剂可阻断PD-1和/或PDL1活性的一种或更多种功能。

[0287] “PD-1”的替代名称包括CD279和SLEB2。“PDL1”的替代名称包括B7-H1、B7-4、CD274

和B7-H。“PDL2”的替代名称包括B7-DC、Btdc和CD273。在一些方面中,PD-1、PDL1和PDL2是人PD-1、PDL1和PDL2。

[0288] 在一些方面中,PD-1抑制剂是抑制PD-1与其配体结合配偶体结合的分子。在一个具体方面中,PD-1配体结合配偶体是PDL1和/或PDL2。在另一个方面中,PDL1抑制剂是抑制PDL1与其结合配偶体结合的分子。在一个具体方面中,PDL1结合配偶体是PD-1和/或B7-1。在另一个方面中,PDL2抑制剂是抑制PDL2与其结合配偶体结合的分子。在一个具体方面中,PDL2结合配偶体是PD-1。抑制剂可以是抗体、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白或寡肽。示例性抗体描述于美国专利No.8,735,553、8,354,509和8,008,449中,其全部通过引用并入本文。用于本文中提供的方法和组合物中的其他PD-1抑制剂是本领域已知的,例如描述于美国专利申请No.US2014/0294898、US2014/022021和US2011/0008369中,其全部通过引用并入本文。

[0289] 在一些方面中,PD-1抑制剂是抗PD-1抗体(例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)。在一些方面中,抗PD-1抗体选自纳武单抗(nivolumab)、派姆单抗(pembrolizumab)和皮地利珠单抗(pidilizumab)。在一些方面中,PD-1抑制剂是免疫黏附素(例如,包含与恒定区(例如,免疫球蛋白序列的Fc区)融合的PDL1或PDL2的胞外部分或PD-1结合部分的免疫黏附素)。在一些方面中,PDL1抑制剂包含AMP-224。纳武单抗(也称为MDX-1106-04、MDX-1106、ONO-4538、BMS-936558和OPDIVO®)是描述于WO2006/121168中的抗PD-1抗体。派姆单抗(也称为MK-3475、Merck3475、兰罗利珠单抗(lambrolizumab)、KEYTRUDA®和SCH-900475)是描述于WO2009/114335中的抗PD-1抗体。皮地利珠单抗(也称为CT-011、hBAT或hBAT-1)是描述于WO2009/101611中的抗PD-1抗体。AMP-224(也称为B7-DCIg)是描述于WO2010/027827和WO2011/066342中的PDL2-Fc融合可溶性受体。另外的PD-1抑制剂包括MEDI0680,也称为AMP-514和REGN2810。

[0290] 在一些方面中,免疫检查点抑制剂是PDL1抑制剂,例如度伐单抗(Durvalumab),也称为MEDI4736;阿特珠单抗(atezolizumab),也称为MPDL3280A;阿维单抗(avelumab),也称为MSB00010118C、MDX-1105、BMS-936559;或其组合。在某些方面中,免疫检查点抑制剂是PDL2抑制剂例如rHIgM12B7。

[0291] 在一些方面中,抑制剂包含纳武单抗、派姆单抗或皮地利珠单抗的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个方面中,抑制剂包含纳武单抗、派姆单抗或皮地利珠单抗的VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及纳武单抗、派姆单抗或皮地利珠单抗的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个方面中,抗体与上述抗体竞争PD-1、PDL1或PDL2上相同表位的结合和/或与之结合。在另一个方面中,抗体与上述抗体具有至少约70、75、80、85、90、95、97或99%(或其中可推导出的任何范围)的可变区氨基酸序列同一性。

[0292] b.CTLA-4、B7-1和B7-2

[0293] 在本文中提供的方法中可靶向的另一免疫检查点是细胞毒性T淋巴细胞相关蛋白4(cytotoxic T-lymphocyte-associated protein 4,CTLA-4),也称为CD152。人CTLA-4的完整cDNA序列具有Genbank登录号L15006。CTLA-4存在于T细胞表面上,并且当与抗原呈递细胞表面上的B7-1(CD80)或B7-2(CD86)结合时充当“关闭”开关。CTLA4是免疫球蛋白超家族的成员,其在辅助性T细胞的表面上表达并向T细胞传递抑制信号。CTLA4与T细胞共刺激蛋白CD28类似,并且这两种分子均与抗原呈递细胞上的B7-1和B7-2结合。CTLA-4向T细胞传

递抑制信号,而CD28传递刺激信号。胞内CTLA-4也存在于调节性T细胞中并且对其功能可以是重要的。通过T细胞受体和CD28的T细胞活化导致CTLA-4(B7分子的抑制性受体)的表达提高。本公开内容的抑制剂可阻断CTLA-4、B7-1和/或B7-2活性的一种或更多种功能。在一些方面中,抑制剂阻断CTLA-4与B7-1的相互作用。在一些方面中,抑制剂阻断CTLA-4与B7-2的相互作用。

[0294] 在一些方面中,免疫检查点抑制剂是抗CTLA-4抗体(例如,人抗体、人源化抗体或嵌合抗体)、其抗原结合片段、免疫黏附素、融合蛋白或寡肽。

[0295] 适用于本公开内容的方法中的抗人CTLA-4抗体(或来源于其的VH和/或VL结构域)可使用本领域中公知的方法来产生。或者,可使用本领域中公认的抗CTLA-4抗体。例如,公开于以下中的抗CTLA-4抗体可用于本文公开的方法中:US 8,119,129、WO 01/14424、WO 98/42752;WO 00/37504(CP675,206,也称为曲美木单抗(tremelimumab);先前称为替西木单抗(ticilimumab)),美国专利No.6,207,156;Hurwitz et al.,1998。每个前述出版物的教导在此通过引用并入。也可使用与这些本领域公认的抗体中任一者竞争与CTLA-4结合的抗体。例如,人源化CTLA-4抗体描述于国际专利申请No.WO2001/014424、WO2000/037504和美国专利No.8,017,114中;所有均通过引用并入本文。

[0296] 在本公开内容的方法和组合物中可用作检查点抑制剂的另一抗CTLA-4抗体是伊匹单抗(ipilimumab)(也称为10D1、MDX-010、MDX-101和Yervoy®)或者其抗原结合片段和变体(参见,例如WO01/14424)。

[0297] 在一些方面中,抑制剂包含曲美木单抗或伊匹单抗的重链和轻链CDR或VR。因此,在一个方面中,抑制剂包含曲美木单抗或伊匹单抗的VH区的CDR1、CDR2和CDR3结构域,以及曲美木单抗或伊匹单抗的VL区的CDR1、CDR2和CDR3结构域。在另一个方面中,抗体与上述抗体竞争PD-1、B7-1或B7-2上相同表位的结合和/或与之结合。在另一个方面中,抗体与上述抗体具有至少约70、75、80、85、90、95、97或99%(或其中可推导出的任何范围)的可变区氨基酸序列同一性。

[0298] C.溶瘤病毒

[0299] 在一些方面中,另外的治疗包含溶瘤病毒。溶瘤病毒是优先感染并杀伤癌细胞的病毒。当感染的癌细胞被溶瘤作用破坏时,它们释放出新的感染性病毒颗粒或病毒粒子来帮助破坏剩余的肿瘤。认为溶瘤病毒不仅造成肿瘤细胞的直接破坏,而且还刺激宿主的抗肿瘤免疫应答以用于长期的免疫治疗。

[0300] D.多糖

[0301] 在一些方面中,另外的治疗包含多糖。存在于蘑菇中的某些化合物(主要是多糖)可上调免疫系统并可具有抗癌特性。例如,β-葡聚糖(例如香菇多糖)在实验室研究中已显示出刺激巨噬细胞、NK细胞、T细胞和免疫系统细胞因子,并在临床试验中已经作为免疫佐剂进行了研究。

[0302] E.新生抗原

[0303] 在一些方面中,另外的治疗包含新生抗原施用。许多肿瘤表达突变。这些突变潜在地产生新的可靶向抗原(新生抗原)以用于T细胞免疫治疗。如使用RNA测序数据所确定的,在具有高突变负荷的肿瘤中,癌症病变中CD8+T细胞的存在较高。与自然杀伤细胞和T细胞的细胞溶解活性相关的转录水平与许多人肿瘤中的突变负荷呈正相关。

[0304] F.化学治疗

[0305] 在一些方面中,另外的治疗包含化学治疗。合适的化学治疗剂类别包括:(a)烷化剂,例如氮芥类(例如,二氯甲基二乙胺、环磷酰胺、异环磷酰胺、美法仑、苯丁酸氮芥)、乙烯亚胺和甲基三聚氰胺类(例如,六甲基三聚氰胺、噻替派)、烷基磺酸酯类(例如白消安(busulfan))、亚硝基脲类(例如,卡莫司汀(carmustine)、洛莫司汀(lomustine)、氯脲菌素(chlorozoticin)、链脲菌素)和三嗪类(例如,达卡巴嗪(dicarbazine));(b)抗代谢物,例如叶酸类似物(例如,甲氨蝶呤)、嘧啶类似物(例如,5-氟尿嘧啶、氟尿苷、阿糖胞苷、氮尿苷)以及嘌呤类似物和相关物质(例如,6-巯基嘌呤、6-硫鸟嘌呤、喷司他丁(pentostatin));(c)天然产物,例如长春花生物碱(例如,长春花碱、长春新碱)、表鬼臼毒素(epipodophylotoxin)(例如,依托泊苷(etoposide)、替尼泊苷(teniposide))、抗生素(例如,放线菌素D、柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、博来霉素(bleomycin)、普卡霉素(plicamycin)和米托蒽醌(mitoxanthrone))、酶(例如,L-天冬酰胺酶),和生物响应调节剂(例如,干扰素-α);以及(d)其他药剂,例如铂配位复合物(例如,顺铂、卡铂)、经取代脲(例如,羟基脲)、甲基肼衍生物(例如,丙卡巴肼(procarbazine)),和肾上腺皮质抑制剂(例如,泰素(Taxol)和米托坦)。在一些方面中,顺铂是特别合适的化学治疗剂。

[0306] 顺铂已被广泛用于治疗癌症,例如如转移性睾丸或卵巢癌、晚期膀胱癌、头颈癌、宫颈癌、肺癌或其他肿瘤。顺铂不经口吸收并因此必须通过其他途径例如如静脉内、皮下、瘤内或腹膜内注射来递送。顺铂可单独使用或与其他药剂组合使用,在某些方面中,预期在临床应用中使用的有效剂量包括:约15mg/m2至约20mg/m2持续每三周5天,总共三个疗程。在一些方面中,与包含与编码治疗性多肽的多核苷酸可操作地连接的Egr-1启动子的构建体联合递送至细胞和/或对象的顺铂的量少于单独使用顺铂时将递送的量。

[0307] 其他合适的化学治疗剂包括抗微管剂,例如紫杉醇(“泰素”)和盐酸多柔比星(“多柔比星”)。确定通过腺病毒载体递送的Egr-1启动子/TNFα构建体与多柔比星的组合在克服对化学治疗和/或TNF-α的抗性方面是有效的,这表明构建体与多柔比星的组合治疗克服了对多柔比星和TNF-α二者的抗性。

[0308] 多柔比星吸收差,并且优选静脉内施用。在某些方面中,对于成人,合适的静脉内剂量包括:约60mg/m2至约75mg/m2,以约21天的间隔;或者约25mg/m2至约30mg/m2,以约3周至约4周的间隔,以连续2或3天中的每一者重复;或者约20mg/m2,每周一次。在年长患者中,当存在由先前化学治疗或肿瘤性骨髓浸润导致的先前骨髓抑制或当药物与其他骨髓生成抑制药物组合时,应使用最低剂量。

[0309] 氮芥类是可用于本公开内容方法中的另一合适的化学治疗剂。氮芥类可包括但不限于二氯甲基二乙胺(HN2)、环磷酰胺和/或异环磷酰胺、美法仑(L-溶肉瘤素)和苯丁酸氮芥。环磷酰胺((CYTOXAN®)可从Mead Johnson获得并且NEOSTAR®可从Adria获得)是另一合适的化学治疗剂。对于成人,合适的经口剂量包括:例如约1mg/kg/天至约5mg/kg/天,静脉内剂量包括:例如,最初在约2天至约5天的时间内约40mg/kg至约50mg/kg的分剂量,或者约每7天至约10天约10mg/kg至约15mg/kg,或者每周两次约3mg/kg至约5mg/kg,或者约1.5mg/kg/天至约3mg/kg/天。由于不良的胃肠道作用,优选静脉内途径。药物有时也通过渗透或进入体腔内而肌内施用。

[0310] 另外的合适的化学治疗剂包括嘧啶类似物,如阿糖胞苷(胞嘧啶阿拉伯糖苷)、5-氟尿嘧啶(氟尿嘧啶;5-FU)和氟尿苷(氟脱氧尿苷;FudR)。5-FU可以以约7.5至约1000mg/m2之间的任何剂量施用于对象。此外,5-FU给药方案可以是多种时间段,例如长至六周,或由本公开内容所属领域的普通技术人员确定。

[0311] 另一种合适的化学治疗剂吉西他滨(gemcitabine)二磷酸酯(GEMZAR®,Eli Lilly&Co.,"吉西他滨")被推荐用于治疗晚期和转移性胰腺癌,并且因此也将可用于本公开内容以用于这些癌症。

[0312] 递送至患者的化学治疗剂的量可以是可变的。在一个合适的方面中,当化学治疗与构建体一起施用时,化学治疗剂可以以有效地在宿主中引起癌症的抑制或消退的量来施用。在另一些方面中,化学治疗剂可以以比化学治疗剂的化学治疗有效剂量少2至10,000倍之间的任何量来施用。例如,化学治疗剂可以以比化学治疗剂的化学治疗有效剂量少约20倍、少约500倍或甚至少约5000倍的量来施用。本公开内容的化学治疗剂可在体内与构建体组合测试用于期望的治疗活性,以及用于确定有效剂量。例如,这样的化合物可以在人中测试之前在合适的动物模型系统(包括但不限于大鼠、小鼠、鸡、牛、猴、兔等)中进行测试。如实施例中所述,体外测试也可用于确定合适的组合和剂量。

[0313] G.放射治疗

[0314] 在一些方面中,另外的治疗或先前的治疗包括辐射,例如电离辐射。本文中所用的"电离辐射"意指包含通过核相互作用具有足够能量或可产生足够能量以产生电离(电子的获得或损失)的粒子或光子的辐射。示例性并且优选的电离辐射是x辐射。用于将x辐射递送至靶组织或细胞的手段是本领域中公知的。

[0315] 在一些方面中,电离辐射的量大于20Gy并且以一剂施用。在一些方面中,电离辐射的量为18Gy并且以三剂施用。在一些方面中,电离辐射的量为至少、至多或恰好是

[0316] 2,4,6,8,10,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,18,19,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,或40Gy

[0317] 或其中可推导出的任何范围)。在一些方面中,电离辐射以至少、至多或恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9或10剂(或其中可推导出的任何范围)施用。当施用多于一剂时,剂量可相隔约1、4、8、12或24小时,或者1、2、3、4、5、6、7或8天,或者1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14或16周,或其中可推导出的任何范围。

[0318] 在一些方面中,IR的量可表示为IR的总剂量,其然后以分次剂量施用。例如,在一些方面中,总剂量为50Gy,以每次5Gy的10次分次剂量施用。在一些方面中,总剂量为50至90Gy,以每次2至3Gy的20至60次分次剂量施用。在一些方面中,IR的总剂量为至少、至多或约

[0319] 20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,125,130,135,140,或150

[0320] (或其中可推导出的任何范围)。在一些方面中,总剂量以至少、至多或恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、12、14、15、20、25、30、35、40、45或50Gy(或其中可推导出的任何范围)的分

次剂量施用。在一些方面中,施用至少、至多或恰好

[0321] 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100

[0322] (或其中可推导出的任何范围)次分次剂量。在一些方面中,每天施用至少、至多或恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12(或其中可推导出的任何范围)次分次剂量。在一些方面中,每周施用至少、至多或恰好1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29或30(或其中可推导出的任何范围)次分次剂量。

[0323] H.手术

[0324] 约60%的患有癌症的人将经历一些类型的手术,其包括预防性、诊断性或阶段性、治愈性和姑息性手术。治愈性手术包括切除术,其中将所有或部分的癌性组织物理地去除、切除和/或破坏,并且可与其他治疗,例如本发明的一些方面的治疗、化学治疗、放射治疗、激素治疗、基因治疗、免疫治疗和/或替代治疗联合使用。肿瘤切除是指物理去除肿瘤的至少一部分。除肿瘤切除术之外,通过手术的治疗包括激光手术、冷冻手术、电外科手术和显微控制的手术(莫氏手术(Mohs' surgery))。

[0325] 在切除部分或全部癌性细胞、组织或肿瘤之后,可在体内形成腔。治疗可通过灌注、直接注射或在该区域局部应用另外的抗癌治疗来完成。这样的治疗可例如每1、2、3、4、5、6或7天,或者每1、2、3、4和5周,或者每1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11或12个月重复进行。这些治疗也可具有多种剂量。

[0326] I.其他药剂

[0327] 考虑可将其他药剂与本发明一些方面的某些方面组合使用以提高治疗的治疗效力。这些另外的药剂包括影响细胞表面受体和GAP连接的上调的药剂、细胞抑制剂和分化剂、细胞黏附抑制剂、提高过度增殖细胞对凋亡诱导剂的敏感性的药剂,或其他生物药剂。通过提高GAP连接数而提高胞间信号传导将提高对邻近过度增殖细胞群的抗过度增殖作用。在另一些方面中,细胞抑制剂或分化剂可与本发明一些方面的某些方面组合使用以提高治疗的抗过度增殖效力。考虑了细胞黏附抑制剂以提高本发明一些方面的效力。细胞黏附抑制剂的一些实例是黏着斑激酶(focal adhesion kinase,FAK)抑制剂和洛伐他汀。还考虑了可将提高过度增殖细胞对凋亡的敏感性的其他药剂(例如抗体c225)与本发明一些方面的某些方面组合使用以提高治疗效力。

[0328] XI.蛋白质组合物

[0329] 本文中使用的"蛋白质"、"肽"或"多肽"是指包含至少五个氨基酸残基的分子。本文中使用的术语"野生型"是指在生物体中天然存在的分子的内源形式。在一些方面中,使用蛋白质或多肽的野生型形式,然而,在本公开内容的许多方面中,使用经修饰的蛋白质或多肽来产生免疫应答。上述术语可以互换使用。"经修饰蛋白质"或"经修饰多肽"或"变体"是指其化学结构、特别是其氨基酸序列相对于野生型蛋白质或多肽发生改变的蛋白质或多肽。在一些方面中,经修饰/变体蛋白质或多肽具有至少一种经修饰的活性或功能(认识到蛋白质或多肽可具有多种活性或功能)。特别考虑了经修饰/变体蛋白质或多肽可在一种活性或功能方面改变,但在另一些方面中(例如免疫原性)保留野生型活性或功能。

[0330] 在本文中具体提及蛋白质的情况下,其通常是指天然(野生型)或重组(经修饰)蛋白质,或任选地,其中已去除任何信号序列的蛋白质。蛋白质可以从其天然的生物体中直接分离,通过重组DNA/外源表达方法产生,或通过固相肽合成(solid-phasepeptidesynthesis,SPPS)或其他体外方法产生。在一些具体方面中,存在并入编码多肽(例如,抗体或其片段)的核酸序列的分离的核酸区段和重组载体。术语"重组"可与多肽或特定多肽的名称联合使用,并且这通常是指由已在体外操作的核酸分子或者是这样的分子的复制产物产生的多肽。

[0331] 在某些方面中,蛋白质或多肽(野生型或经修饰)的尺寸可包括但不限于

[0332] 5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,110,120,130,140,150,160,170,180,190,200,210,220,230,240,250,275,300,325,350,375,400,425,450,475,500,525,550,575,600,625,650,675,700,725,750,775,800,825,850,875,900,925,950,1000,1200,1400,1600,1800,或2000

[0333] 或更多(以及其中可推导出的任何范围)个氨基酸残基或核酸残基,或本文中描述或提及的相应氨基酸序列的衍生物。考虑了多肽可通过截短发生突变,使它们比其相应的野生型形式更短,它们也可通过融合或缀合具有特定功能(例如,用于靶向或定位,用于增强免疫原性,用于纯化目的等)的异源蛋白质或多肽序列而改变。

[0334] 本公开内容的多肽、蛋白质或者编码这样的多肽或蛋白质的多核苷酸可包含

[0335] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,或50

[0336] 个(或其中可推导出的任何范围)或更多个变体氨基酸或核酸替换,或者与SEQ ID NO:1至34的至少或至多

[0337] 3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,300,400,500,550,1000个(或其中可推导出的任何范围)或更多个连续氨基酸或核酸具有至少

[0338] 60%,61%,62%,63%,64%,65%,66%,67%,68%,69%,70%,71%,72%,73%,74%,75%,76%,77%,78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%

[0339] (或其中可推导出的任何范围)的相似性、同一性或同源性。在一些具体方面中,肽

或多肽是人序列或是基于人序列的。在某些方面中,肽或多肽不是天然存在的和/或是肽或多肽的组合。

[0340] 在一些方面中,蛋白质、多肽或核酸可包含SEQ ID NO:1至34的第1至2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,或320

[0341] (或其中可推导出的任何范围)位氨基酸或核苷酸。

[0342] 在一些方面中,蛋白质可包含、多肽可包含、核酸可包含或者由核酸编码的多肽或蛋白质可包含SEQ ID NO:1至34的1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320

[0343] 个(或其中可推导出的任何范围)连续氨基酸或核酸。

[0344] 在一些方面中,蛋白质可包含、多肽可包含、核酸可包含或者由核酸编码的多肽或蛋白质可包含SEQ ID NO:1至34的至少、至多或恰好

[0345] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,

27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,或320

[0346] 个(或其中可推导出的任何范围)连续氨基酸,其与SEQIDNO:1至34中的一者具有至少、至多或恰好

[0347] 60%,61%,62%,63%,64%,65%,66%,67%,68%,69%,70%,71%,72%,73%,74%,75%,76%,77%,78%,79%,80%,81%,82%,83%,84%,85%,86%,87%,88%,89%,90%,91%,92%,93%,94%,95%,96%,97%,98%,99%,或100%

[0348] (或其中可推导出的任何范围)的相似性、同一性或同源性。

[0349] 在一些方面中,存在这样的核酸分子或多肽,其起始于SEQ ID NO:1至34中任一者的第

[0350] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,

368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,501,502,503,504,505,506,507,508,509,510,511,512,513,514,515,516,517,518,519,520,521,522,523,524,525,526,527,528,529,530,531,532,533,534,535,536,537,538,539,540,541,542,543,544,545,546,547,548,549,550,551,552,553,554,555,556,557,558,559,560,561,562,563,564,565,566,567,568,569,570,571,572,573,574,575,576,577,578,579,580,581,582,583,584,585,586,587,588.589,590,591,592,593,594,595,596,597,598,599,600,601,602,603,604,605,606,607,608,609,610,611,612,613,614,615,616,617,618,619,620,621,622,623,624,625,626,627,628,629,630,631,632,633,634,635,636,637,638,639,640,641,642,643,644,645,646,647,648,649,650,651,652,653,654,655,656,657,658,659,660,661,662,663,664,665,666,667,668,669,670,671,672,673,674,675,676,677,678,679,680,681,682,683,684,685,686,687,688,689,690,691,692,693,694,695,696,697,698,699,700,701,702,703,704,705,706,707,708,709,710,711,712,713,714,715,716,717,718,719,720,721,722,723,724,725,726,727,728,729,730,731,732,733,734,735,736,737,738,739,740,741,742,743,744,745,746,747,748,749,750,751,752,753,754,755,756,757,758,759,760,761,762,763,764,765.766,767,768,769,770,771,772,773,774,775,776,777,778,779,780,781,782,783,784,785,786,787,788,789,790,791,792,793,794,795,796,797,798,799,800,801,802,803,804,805,806,807,808,809,810,811,812,813,814,815,816,817,818,819,820,821,822,823,824,825,826,827,828,829,830,831,832,833,834,835,836,837,838,839,840,841,842,843,844,845,846,847,848,849,850,851,852,853,854,855,856,857,858,859,860,861,862,863,864,865,866,867,868,869,870,871,872,873,874,875,876,877,878,879,880,881,882,883,884,885,886,887,888,889,890,891,892,893,894,895,896,897,898,899,900,901,902,903,904,905,906,907,908,909,910,911,912,913,914,915,916,917,918,919,920,921,922,923,924,925,926,927,928,929,930,931,932,933,934,935,936,937,938,939,940,941,942,943,944,945,946,947,948,949,或950

[0351] 位,并且其包含SEQ ID NO:1至34中任一者的至少、至多或恰好

[0352] 2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,

159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,400,401,402,403,404,405,406,407,408,409,410,411,412,413,414,415,416,417,418,419,420,421,422,423,424,425,426,427,428,429,430,431,432,433,434,435,436,437,438,439,440,441,442,443,444,445,446,447,448,449,450,451,452,453,454,455,456,457,458,459,460,461,462,463,464,465,466,467,468,469,470,471,472,473,474,475,476,477,478,479,480,481,482,483,484,485,486,487,488,489,490,491,492,493,494,495,496,497,498,499,500,501,502,503,504,505,506,507,508,509,510,511,512,513,514,515,516,517,518,519,520,521,522,523,524,525,526,527,528,529,530,531,532,533,534,535,536,537,538,539,540,541,542,543,544,545,546,547,548,549,550,551,552,553,554,555,556,557,558,559,560,561,562,563,564,565,566,567,568,569,570,571,572,573,574,575,576,577,578,579,580,581,582,583,584,585,586,587,588,589,590,591,592,593,594,595,596,597,598,599,600,601,602,603,604,605,606,607,608,609,610,611,612,613,614,615,616,617,618,619,620,621,622,623,624,625,626,627,628,629,630,631,632,633,634,635,636,637,638,639,640,641,642,643,644,645,646,647,648,649,650,651,652,653,654,655,656,657,658,659,660,661,662,663,664,665,666,667,668,669,670,671,672,673,674,675,676,677,678,679,680,681,682,683,684,685,686,687,688,689,690,691,692,693,694,695,696,697,698,699,700,701,702,703,704,705,706,707,708,709,710,711,712,713,714,715,716,717,718,719,720,721,722,723,724,725,726,727,728,729,730,731,732,733,734,735,736,737,738,739,740,741,742,743,744,745,746,747,748,749,750,751,752,753,754,755,756,757,758,759,760,761,762,763,764,765,766,767,768,769,770,771,772,773,774,775,776,777,778,779,780,781,782,783,784,785,786,787,788,789,790,791,792,793,794,795,796,797,798,799,800,801,802,803,804,805,806,807,808,809,810,811,812,813,814,815,816,817,818,819,820,821,822,823,824,825,826,827,828,829,830,831,832,833,834,835,836,837,838,839,840,841,842,843,844,845,846,847,848,849,850,851,852,853,854,855,856,857,858,859,860,861,862,863,864,865,866,867,868,869,870,871,872,873,874,875,876,877,878,879,880,881,882,883,884,885,886,887,888,889,890,891,892,893,894,895,896,897,898,899,

900,901,902,903,904,905,906,907,908,909,910,911,912,913,914,915,916,917,918,919,920,921,922,923,924,925,926,927,928,929,930,931,932,933,934,935,936,937,938,939,940,941,942,943,944,945,946,947,948,949,或950

[0353] 个(或其中可推导出的任何范围)连续氨基酸或核苷酸。

[0354] 在一些方面中,SEQ ID NO:1至34的一者的肽或多肽的第

[0355] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,100,101,102,103,104,105,106,107,108,109,110,111,112,113,114,115,116,117,118,119,120,121,122,123,124,125,126,127,128,129,130,131,132,133,134,135,136,137,138,139,140,141,142,143,144,145,146,147,148,149,150,151,152,153,154,155,156,157,158,159,160,161,162,163,164,165,166,167,168,169,170,171,172,173,174,175,176,177,178,179,180,181,182,183,184,185,186,187,188,189,190,191,192,193,194,195,196,197,198,199,200,201,202,203,204,205,206,207,208,209,210,211,212,213,214,215,216,217,218,219,220,221,222,223,224,225,226,227,228,229,230,231,232,233,234,235,236,237,238,239,240,241,242,243,244,245,246,247,248,249,250,251,252,253,254,255,256,257,258,259,260,261,262,263,264,265,266,267,268,269,270,271,272,273,274,275,276,277,278,279,280,281,282,283,284,285,286,287,288,289,290,291,292,293,294,295,296,297,298,299,300,301,302,303,304,305,306,307,308,309,310,311,312,313,314,315,316,317,318,319,320,321,322,323,324,325,326,327,328,329,330,331,332,333,334,335,336,337,338,339,340,341,342,343,344,345,346,347,348,349,350,351,352,353,354,355,356,357,358,359,360,361,362,363,364,365,366,367,368,369,370,371,372,373,374,375,376,377,378,379,380,381,382,383,384,385,386,387,388,389,390,391,392,393,394,395,396,397,398,399,或400

[0356] 位的氨基酸被丙氨酸、精氨酸、天冬酰胺、天冬氨酸、半胱氨酸、谷氨酰胺、谷氨酸、甘氨酸、组氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、苯丙氨酸、脯氨酸、丝氨酸、苏氨酸、色氨酸、酪氨酸或缬氨酸替换。

[0357] 多种基因的核苷酸以及蛋白质、多肽和肽序列先前已公开,并且可在公认的计算机化数据库中找到。两个常用的数据库是国家生物技术信息中心基因库(NationalCenterforBiotechnologyInformation'sGenbank)和GenPept数据库(在万维网上的ncbi.nlm.nih.gov/处)和通用蛋白质资源(UniProt;在万维网上的uniprot,org处)。这些基因的编码区可使用本文中公开的技术或本领域普通技术人员已知的技术进行扩增和/或表达。

[0358] 预期在本公开内容的组合物中,每ml有约0.001mg至约10mg的总多肽、肽和/或蛋白质。组合物中蛋白质的浓度可以是约、至少约或至多约0.001、0.010、0.050、0.1、0.2、0.3、0.4、0.5、0.6、0.7、0.8、0.9、1.0、1.5、2.0、2.5、3.0、3,5、4.0、4.5、5.0、5.5、6.0、6.5、7.0、7.5、8.0、8.5、9.0、9.5、10.0mg/ml或更多(或其中可推导出的任何范围)。

[0359] 以下是关于改变蛋白质的氨基酸亚基以产生等同的或甚至改善的第二代变体多

肽或肽的讨论。例如,某些氨基酸可以替换蛋白质或多肽序列中的其他氨基酸,而与结构(例如如抗体的抗原结合区或底物分子上的结合位点)的相互作用结合能力有或没有明显的损失。由于是蛋白质的相互作用能力和性质决定了该蛋白质的功能性活性,因此可以在蛋白质序列及其相应的DNA编码序列中进行某些氨基酸替换,但仍会产生具有相似或所期望特性的蛋白质。因此,本发明人预期可以在编码蛋白质的基因的DNA序列中进行多种改变,而不会明显损失其生物学效用或活性。

[0360] 术语"功能等同密码子"在本文中用于是指编码相同氨基酸的密码子,例如用于精氨酸的六个不同的密码子。还考虑了"中性替换"或"中性突变",其是指编码生物等同氨基酸的一个或更多个密码子的改变。

[0361] 本公开内容的氨基酸序列变体可以是替换、插入或缺失变体。与野生型相比,本公开内容的多肽中的变化可影响蛋白质或多肽的

[0362] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,

[0363] 个(或其中可推导出的任何范围)或更多个非连续或连续氨基酸。变体可包含与本文提供或引用的任何序列具有至少50%、60%、70%、80%或90%(包括其间的所有值和范围)同一性的氨基酸序列。变体可包含2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20个或更多个替换氨基酸。

[0364] 还应理解,氨基酸和核酸序列可分别包含另外的残基,例如另外的N端或C端氨基酸,或者5′或3′序列,并且仍与本文中公开的序列之一中示出的基本上相同,只要序列满足上述标准,包括在涉及蛋白质表达时维持的生物学蛋白质活性。末端序列的添加特别适用于这样的核酸序列,其可例如包括位于编码区的5′或3′部分侧翼的多个非编码序列。

[0365] 缺失变体通常缺少天然或野生型蛋白质的一个或更多个残基。可以缺失单个残基,或者可以缺失许多个连续氨基酸。终止密码子可以被引入(通过替换或插入)到编码核酸序列中以产生截短的蛋白质。

[0366] 插入突变体通常涉及在多肽中的非末端点添加氨基酸残基。这可包括插入一个或更多个氨基酸残基。还可产生末端添加,并且可包括为本文描述或提及的一种或更多种肽或多肽的多聚体或多联体的融合蛋白。

[0367] 替换变体通常包含在蛋白质或多肽内的一个或更多个位点处的一个氨基酸与另一个氨基酸的交换,并且可以被设计成在损失或不损失其他功能或特性的情况下调节多肽的一个或更多个特性。替换可以是保守的,即一个氨基酸被具有类似化学特性的一个氨基酸替换。"保守氨基酸替换"可涉及一种氨基酸类别的成员与同一类别的另一成员的交换。保守替换是本领域公知的,并且其包括例如:丙氨酸变为丝氨酸;精氨酸变为赖氨酸;天冬酰胺变为谷氨酰胺或组氨酸;天冬氨酸变为谷氨酸;半胱氨酸变为丝氨酸;谷氨酰胺变为天冬酰胺;谷氨酸变为天冬氨酸;甘氨酸变为脯氨酸;组氨酸变为天冬酰胺或谷氨酰胺;异亮氨酸变为亮氨酸或缬氨酸;亮氨酸变为缬氨酸或异亮氨酸;赖氨酸变为精氨酸;甲硫氨酸变为亮氨酸或异亮氨酸;苯丙氨酸变为酪氨酸、亮氨酸或甲硫氨酸;丝氨酸变为苏氨酸;苏氨酸变为丝氨酸;色氨酸变为酪氨酸;酪氨酸变为色氨酸或苯丙氨酸;以及缬氨酸变为异亮氨酸或亮氨酸。保守氨基酸替换可涵盖非天然存在的氨基酸残基,其通常通过化学肽合成而不是通过在生物系统中的合成来并入。这些包括肽模拟物或氨基酸部分的其他反转或倒转

形式。

[0368] 或者,替换可以是“非保守的”,使得多肽的功能或活性受到影响。非保守变化通常涉及用化学上相异的氨基酸残基替换氨基酸残基,例如用极性或带电荷的氨基酸替换非极性或不带电荷的氨基酸,反之亦然。非保守替换可涉及一种氨基酸类别的成员与另一类别的成员的交换。

[0369] 本领域技术人员可使用公知的技术确定本文中示出的多肽的合适变体。本领域技术人员可通过靶向被认为对活性不重要的区域来鉴定可被改变而不破坏活性的分子的合适区域。熟练的技术人员还将能够鉴定在类似蛋白质或多肽中保守的氨基酸残基和分子部分。在另一些方面中,对生物活性或对结构可能重要的区域可进行保守氨基酸替换而不显著改变生物活性或者对蛋白质或多肽结构没有不利影响。

[0370] 在进行这样的改变时,可考虑氨基酸的亲水指数(hydropathic index)。蛋白质的亲水特性是通过为每个氨基酸分配一个数值(“亲水指数”)并随后沿肽链重复地平均化这些值来计算的。每个氨基酸已基于其疏水性和电荷特性分配了一个值。它们是:异亮氨酸(+4.5);缬氨酸(+4.2);亮氨酸(+3.8);苯丙氨酸(+2.8);半胱氨酸/半胱氨酸(+2.5);甲硫氨酸(+1.9);丙氨酸(+1.8);甘氨酸(-0.4);苏氨酸(-0.7);丝氨酸(-0.8);色氨酸(-0.9);酪氨酸(-1.3);脯氨酸(1.6);组氨酸(-3.2);谷氨酸(-3.5);谷氨酰胺(-3.5);天冬氨酸(-3.5);天冬酰胺(-3.5);赖氨酸(-3.9);和精氨酸(-4.5)。亲水氨基酸指数在赋予蛋白质相互作用的生物学功能中的重要性是本领域普遍理解的(Kyte et al.,J.Mol.Biol.157:105-131(1982))。公认的是,氨基酸的相对亲水特性有助于所得蛋白质或多肽的二级结构,其转而限定了该蛋白质或多肽与其他分子(例如酶、底物、受体、DNA、抗体、抗原等)的相互作用。还已知某些氨基酸可替换具有相似亲水指数或评分的其他氨基酸,并且仍保留类似的生物活性。在某些方面中,在基于亲水指数进行改变时,包括亲水指数在±2以内的氨基酸的替换。在本发明的一些方面中,包括在±1以内的那些,并且在本发明的另一些方面中,包括在±0.5以内的那些。

[0371] 本领域中还理解的是,可基于亲水性有效地进行类似氨基酸的替换。美国专利4,554,101(通过引用并入本文)指出:蛋白质的最大局部平均亲水性(如受其邻近氨基酸的亲水性控制)与蛋白质的生物学特性相关。在某些方面中,蛋白质的最大局部平均亲水性(如受其邻近氨基酸的亲水性控制)与其免疫原性和抗原结合相关,即,作为该蛋白质的生物学特性。已将以下亲水值分配给这些氨基酸残基:精氨酸(+3.0);赖氨酸(+3.0);天冬氨酸(+3.0±1);谷氨酸(+3.0±1);丝氨酸(+0.3);天冬酰胺(+0.2);谷氨酰胺(+0.2);甘氨酸(0);苏氨酸(-0.4);脯氨酸(-0.5±1);丙氨酸(-0.5);组氨酸(-0.5);半胱氨酸(-1.0);甲硫氨酸(-1.3);缬氨酸(-1.5);亮氨酸(-1.8);异亮氨酸(-1.8);酪氨酸(-2.3);苯丙氨酸(-2.5);和色氨酸(-3.4)。在某些方面中,在基于类似的亲水值进行改变时,包括其亲水值在±2以内的氨基酸的替换,在另一些方面中,包括在±1以内的那些,并且在另一些方面中,包括在±0.5以内的那些。在一些情况下,也可基于亲水性从一级氨基酸序列中鉴定表位。这些区域也被称为“表位核心区”。应理解,氨基酸可替换具有类似亲水性值的另一氨基酸并仍产生生物学上等同和免疫学上等同的蛋白质。

[0372] 此外,本领域技术人员可回顾在类似多肽或蛋白质中鉴定对活性或结构重要的残基的结构-功能研究。鉴于这样的比较,可预测蛋白质中氨基酸残基的重要性,所述氨基酸

残基对应于类似蛋白质中对活性或结构重要的氨基酸残基。本领域技术人员可为这样的经预测的重要氨基酸残基选择化学上类似的氨基酸替换。

[0373] 本领域技术人员还可分析与类似蛋白质或多肽中的结构相关的三维结构和氨基酸序列。鉴于这样的信息,本领域技术人员可预测抗体的氨基酸残基相对于其三维结构的排列。本领域技术人员可选择不对被预测为在蛋白质表面上的氨基酸残基进行改变,因为这样的残基可能涉及与其他分子的重要相互作用。此外,本领域技术人员可产生在每个期望的氨基酸残基处包含单个氨基酸替换的测试变体。然后可使用针对结合和/或活性的标准测定筛选这些变体,从而获得从这样的常规实验中收集的信息,这可使本领域技术人员确定这样的氨基酸位置:在这里应避免单独或与其他突变组合的另外的替换。可用于确定二级结构的多种工具可在万维网在expasy.org/proteomics/protein structure上找到。

[0374] 在本发明的一些方面中,进行了氨基酸替换,其:(1)降低对蛋白酶解的易感性,(2)降低对氧化的易感性,(3)改变对于形成蛋白复合物的结合亲和力,(4)改变配体或抗原结合亲和力,和/或(5)赋予或修饰这样的多肽上的其他物理化学或功能特性。例如,可在天然存在的序列中进行单个或多个氨基酸替换(在某些方面中,保守氨基酸替换)。可在位于形成分子间接触的结构域之外的抗体部分中进行替换。在这样的方面中,可使用不显著改变蛋白质或多肽的结构特征的保守氨基酸替换(例如,一个或更多个不破坏表征天然抗体的二级结构的替代氨基酸)。

[0375] XII.核酸

[0376] 在某些方面中,核酸序列可以以多种情况存在,例如:编码本公开内容的肽和多肽,或其片段、衍生物、突变蛋白或变体的并入序列或重组多核苷酸的分离区段和重组载体,足以作为杂交探针使用的多核苷酸,用于鉴定、分析、突变或扩增编码多肽的多核苷酸的测序引物或PCR引物,用于抑制多核苷酸表达的反义核酸,以及本文前述的互补序列。还提供了编码包含这些肽的融合蛋白的核酸。核酸可以是单链或双链的,并且可以包含RNA和/或DNA核苷酸及其人工变体(例如,肽核酸)。

[0377] 术语“多核苷酸”是指重组的或已从总基因组核酸中分离的核酸分子。术语“多核苷酸”中包括寡核苷酸(长度为100个残基或更少的核酸)、重组载体,包括例如质粒、黏粒、噬菌体、病毒等。在某些方面中,多核苷酸包括基本上从其天然存在的基因或蛋白质编码序列中分离出来的调控序列。多核苷酸可以是单链(编码链或反义链)或双链的,并且可以是RNA、DNA(基因组、cDNA或合成的)、其类似物,或其组合。另外的编码序列或非编码序列可以但不一定存在于多核苷酸内。

[0378] 在此方面中,术语“基因”、“多核苷酸”或“核酸”用于指编码蛋白质、多肽或肽的核酸(包括合适的转录、翻译后修饰或定位所需的任何序列)。如本领域技术人员将理解的,该术语涵盖表达或可适合于表达蛋白质、多肽、结构域、肽、融合蛋白和突变体的基因组序列、表达盒、cDNA序列和更小的经改造核酸区段。编码多肽的全部或一部分的核酸可包含编码这样的多肽的全部或一部分的连续核酸序列。还考虑了可通过包含具有轻微不同的核酸序列的变化,但是仍编码相同的或基本上相似的蛋白质的核酸来编码特定的多肽。

[0379] 在某些方面中,存在与本文公开的序列具有基本同一性的多核苷酸变体;使用本文中描述的方法(例如,使用标准参数的BLAST分析)与本文中提供的多核苷酸序列相比,包含至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%或更高序列同一性(包括

其间的所有值和范围)的那些序列。在某些方面中,分离的多核苷酸将包含编码多肽的核苷酸序列,所述多肽在序列的整个长度上与本文中所述的氨基酸序列具有至少90%,优选95%及以上的同一性;或与所述分离的多核苷酸互补的核苷酸序列。

[0380] 不管编码序列自身的长度如何,核酸区段可与另一些核酸序列(例如启动子、多腺苷酸化信号、另外的限制性酶位点、多克隆位点、另一些编码区段等)组合,使得其总长度可以有很大变化。核酸可以是任何长度的。它们的长度可以是例如5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、75、100、125、175、200、250、300、350、400、450、500、750、1000、1500、3000、5000个或更多个核苷酸,和/或者可包含一个或更多个另外的序列(例如调控序列),和/或者是更大的核酸(例如载体)的一部分。因此考虑了可使用几乎任何长度的核酸片段,其总长度优选受制备的方便性和在预期的重组核酸方案中的用途的限制。在一些情况下,核酸序列可与另外的异源编码序列一起编码多肽序列,例如以允许用于纯化多肽、转运、分泌、翻译后修饰或治疗益处例如靶向或效力。如以上所讨论,可将标签或其他异源多肽添加至经修饰的多肽编码序列,其中"异源"是指与经修饰的多肽不同的多肽。

[0381] A.杂交

[0382] 核酸在特定杂交条件下与其他核酸杂交。用于杂交核酸的方法是本领域公知的。参见,例如,Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley and Sons,N.Y.(1989),6.3.1-6.3.6。如本文所限定的,适度严格的杂交条件使用:包含以下的预洗涤溶液:5×氯化钠/柠檬酸钠(SSC)、0.5%SDS、1.0mM EDTA(pH 8.0);杂交缓冲液:约50%甲酰胺、6×SSC;以及55℃的杂交温度(或其他类似的杂交溶液,例如包含约50%甲酰胺的杂交溶液,杂交温度为42℃),以及在0.5×SSC、0.1%SDS中60℃的洗涤条件。严格的杂交条件在6×SSC中在45℃下进行杂交,然后在0.1×SSC、0.2%SDS中在68℃下进行一次或更多次洗涤。此外,本领域的技术人员可以操作杂交和/或洗涤条件来提高或降低杂交的严格性,使得包含与彼此具有至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的核苷酸序列的核酸通常维持与彼此杂交。

[0383] 影响杂交条件选择的参数和设计合适条件的指南由以下示出:例如Sambrook、Fritsch和Maniatis(Molecular Cloning:ALaboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press,Cold Spring Harbor,N.Y.,第9和11章(1989);Current Protocols in Molecular Biology,Ausubel et al.,eds.,John Wiley and Sons,Inc.,第2.10和6.3至6.4节(1995),其二者通过引用整体并入本文用于所有目的),并且可以由本领域普通技术人员基于例如DNA的长度和/或碱基组成容易地确定。

[0384] B.突变

[0385] 可通过突变向核酸中引入变化,从而导致其编码的多肽(例如,抗原性肽或多肽)的氨基酸序列的变化。可以使用本领域已知的任何技术引入突变。在一个方面中,使用例如定点诱变方案改变一个或更多个特定的氨基酸残基。在另一方面中,使用例如随机诱变方案改变一个或更多个随机选择的残基。无论如何制备,突变体多肽都可以被表达并筛选出期望的特性。

[0386] 可在核酸中引入突变,而不显著改变其编码的多肽的生物活性。例如,可以进行核苷酸替换,导致非必需氨基酸残基处的氨基酸替换。或者,可以在核酸中引入一个或更多个

突变,其选择性地改变该核酸编码的多肽的生物活性。参见例如Romain Studer et al., Biochem.J.449:581-594(2013)。例如,突变可以定量或定性地改变生物活性。定量改变的实例包括提高、降低或消除活性。定性改变的实例包括改变抗体的抗原特异性。

[0387] C.探针

[0388] 在另一方面中,核酸分子适合用作检测核酸序列的引物或杂交探针。核酸分子可仅包含编码全长多肽的核酸序列的一部分,例如,可用作探针或引物的片段或编码给定多肽的活性部分的片段。

[0389] 在另一方面中,核酸分子可用作特定核酸序列的探针或PCR引物。例如,核酸分子探针可用于诊断方法中,或者核酸分子PCR引物可用于扩增DNA区域,所述DNA区域尤其可用于分离用于产生本公开内容的经改造细胞的核酸序列。在一个优选的方面中,核酸分子是寡核苷酸。

[0390] 基于所期望核酸序列的探针可用于检测核酸或类似核酸,例如编码目的多肽的转录物。探针可包含标记基团,例如放射性同位素、荧光化合物、酶或酶辅因子。这样的探针可用于鉴定表达多肽的细胞。

[0391] XIII.多肽表达

[0392] 在一些方面中,存在编码本公开内容的多肽或肽的核酸分子(例如,抗体、TCR基因、MHC分子和免疫原性肽)。这些可以通过本领域已知的方法产生例如,从已免疫和分离的小鼠的B细胞中分离,噬菌体展示,在任何合适的重组表达系统中表达并允许组装以形成抗体分子,或者通过重组方法产生。

[0393] 核酸分子可用于表达大量多肽。如果核酸分子来源于非人、非转基因动物,则核酸分子可用于抗体或TCR基因的人源化。

[0394] A.载体

[0395] 在一些方面中,预期的是包含编码所期望序列的多肽或其部分(例如,含有一个或更多个CDR或一个或更多个可变区结构域的片段)的核酸分子的表达载体。包含核酸分子的表达载体可编码重链、轻链或其抗原结合部分。在一些方面中,包含核酸分子的表达载体可编码融合蛋白、抗原性肽和多肽、TCR基因、MHC分子、经修饰的抗体、抗体片段及其探针。除了控制转录和翻译的控制序列之外,载体和表达载体还可包含用于其他功能的核酸序列。

[0396] 为了表达本公开内容的多肽或肽,将编码所述多肽或肽的DNA插入表达载体中,使得基因区域与转录和翻译控制序列有效连接。在一些方面中,对编码功能完整的人CH或CL免疫球蛋白序列(具有适当限制性位点)的载体进行改造,使得任何VH或VL序列都可以容易地插入和表达。在一些方面中,对编码功能完整的人TCRα或TCRβ序列(具有适当限制性位点)的载体进行改造,使得任何可变序列或CDR1、CDR2和/或CDR3可容易地插入和表达。通常,在任何宿主细胞中使用的表达载体包含用于质粒或病毒维持以及用于外源核苷酸序列的克隆和表达的序列。统称为“侧翼序列”的这样的序列通常包含以下有效地连接的核苷酸序列中的一种或更多种:启动子、一种或更多种增强子序列、复制起点、转录终止序列、含有供体和接受体剪接位点的完整内含子序列、编码用于多肽分泌的前导序列的序列、核糖体结合位点、多腺苷酸化序列、用于插入编码待表达多肽的核酸的多接头区、以及选择标记元件。这样的序列和使用它们的方法是本领域公知的。

[0397] B.表达系统

[0398] 存在许多表达系统,其包含以上所讨论表达载体中的至少一部分或全部。基于原核生物和/或真核生物的系统可用于与一个方面一起使用以产生核酸序列或其同源多肽、蛋白质和肽。商业上和广泛可用的系统包括但不限于细菌、哺乳动物、酵母和昆虫细胞系统。不同的宿主细胞具有用于蛋白质的翻译后加工和修饰的特征性和特定机制。可选择适当的细胞系或宿主系统以确保所表达的外来蛋白质的正确修饰和加工。本领域技术人员能够使用合适的表达系统来表达载体以产生核酸序列或其同源多肽、蛋白质或肽。

[0399] C.基因转移方法

[0400] 用于核酸递送以实现组合物表达的合适方法被认为实际上包括可以将核酸(例如,DNA,包括病毒和非病毒载体)引入细胞、组织或生物体中的任何方法,如本文中所述或如本领域普通技术人员已知的。这样的方法包括但不限于直接递送DNA,例如通过注射(美国专利5,994,624、5,981,274、5,945,100、5,780,448、5,736,524、5,702,932、5,656,610、5,589,466和5,580,859,各自通过引用并入本文),包括显微注射(Harland and Weintraub,1985;美国专利5,789,215,通过引用并入本文);通过电穿孔(美国专利No.5,384,253,通过引用并入本文);通过磷酸钙沉淀(Graham and Van Der Eb,1973;Chen and Okayama,1987;Rippe et al.,1990);通过使用DEAE-葡聚糖,随后使用聚乙二醇(Gopal,1985);通过直接声加载(Fechheimer et al.,1987);通过脂质体介导的转染(Nicolau and Sene,1982;Fraley et al.,1979;Nicolau et al.,1987;Wong et al.,1980;Kaneda et al.,1989;Kato et al.,1991);通过微粒轰击(PCT申请No.WO 94/09699和95/06128;美国专利5,610,042;5,322,783、5,563,055、5,550,318、5,538,877和5,538,880,并且各自通过引用并入本文);通过与碳化硅纤维一起搅拌(Kaeppler et al.,1990;美国专利5,302,523和5,464,765,各自通过引用并入本文);通过土壤杆菌属(Agrobacterium)介导的转化(美国专利5,591,616和5,563,055,各自通过引用并入本文);或者通过PEG介导的原生质体的转化(Omirulleh et al.,1993;美国专利4,684,611和4,952,500,各自通过引用并入本文);通过干燥/抑制介导的DNA摄取(Potrykus et al.,1985)。另一些方法包括病毒转导,例如通过慢病毒或逆转录病毒转导的基因转移。

[0401] D.宿主细胞

[0402] 在另一个方面中,预期使用已导入重组表达载体的宿主细胞。多肽可在多种细胞类型中表达。可根据本领域已知的多种方法将编码本公开内容的多肽或肽的表达构建体转染至细胞中。可通过常规转化或转染技术将载体DNA引入原核或真核细胞中。一些载体可采用允许其在原核和真核细胞二者中复制和/或表达的控制序列。本领域技术人员将理解在其下孵育宿主细胞以维持它们并允许载体复制的条件。还理解和已知的是允许大规模产生载体以及产生由载体编码的核酸及其同源多肽、蛋白质或肽的技术和条件。

[0403] 为了稳定转染哺乳动物细胞,已知根据所使用的表达载体和转染技术,只有一小部分细胞可将外源DNA整合到其基因组中。为了鉴定和选择这些整合体,通常将可选择标记(例如,用于抗生素抗性)与目的基因一起引入宿主细胞中。用引入的核酸稳定转染的细胞可通过药物选择(例如,已并入选择标记基因的细胞将存活,而其他细胞将死亡)以及本领域已知的其他方法鉴定。

[0404] XIV.细胞的培养和配制

[0405] 在一些具体方面中,本公开内容的细胞可以被特别配制和/或者其可以在特定培

养基中培养。细胞可以以适于递送至接受体而无有害作用的方式配制。

[0406] 在某些方面中,培养基可以使用用于培养动物细胞的培养基作为其基础培养基来制备,例如以下中的任一种:AIM V、X-VIVO-15、NeuroBasal、EGM2、TeSR、BME、BGJb、CMRL1066、Glasgow MEM、经改良MEM锌选择(Improved MEM Zinc Option)、IMDM、199培养基、Eagle MEM、αMEM、DMEM、Ham、RPMI-1640和Fischer培养基,及其任意组合,但是培养基可以不特别限于此,只要其可以用于培养动物细胞即可。特别地,培养基可以是无异源(xeno-free)或是化学限定的。

[0407] 培养基可以是含血清培养基或无血清培养基或无异源培养基。从防止异源动物来源组分污染的角度来看,血清可以与干细胞来源于同一动物。无血清培养基是指不具有未经加工或未经纯化血清的培养基,并且因此可以包括具有经纯化血液来源组分或动物组织来源组分(例如生长因子)的培养基。

[0408] 培养基可包含或可不包含血清的任何替代品。血清的替代品可包括适当地包含以下的材料:白蛋白(例如富含脂质的白蛋白、牛白蛋白、白蛋白替代物如重组白蛋白或人源化白蛋白、植物淀粉、右旋糖酐和蛋白质水解物)、转铁蛋白(或其他铁转运蛋白)、脂肪酸、胰岛素、胶原前体、微量元素、2-巯基乙醇、3'-硫代甘油(3'-thiolgiycerol)、或其等同物。血清的替代品可以通过例如国际公开No.98/30679中公开的方法制备(其整体并入本文)。或者,可以使用任何可商购获得的材料以获得更多便利。可商购获得的材料包括敲除血清替代品(knockout Serum Replacement,KSR)、化学限定脂质浓缩物(Gibco)和Glutamax(Gibco)。

[0409] 在某些方面中,培养基可包含以下中的一、两、三、四、五、六、七、八、九、十、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20种或更多种:维生素(例如生物素);DLα-生育酚乙酸酯;DLα-生育酚;维生素A(乙酸酯);蛋白质(例如BSA(牛血清白蛋白)或人白蛋白,无脂肪酸级分V);过氧化氢酶;人重组胰岛素;人转铁蛋白;超氧化物歧化酶;其他组分例如皮质酮;D-半乳糖;乙醇胺HCl;谷胱甘肽(还原型);L-肉碱HCl;亚油酸;亚麻酸;孕酮;腐胺2HCl;亚硒酸钠;和/或T3(三碘-I-甲腺原氨酸)。在一些具体方面中,这些中的一个或多个可被明确排除。

[0410] 在一些方面中,培养基还包含维生素。在一些方面中,培养基包含以下中的1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12或13种(和其中可推导出的任何范围):生物素、DLα-生育酚乙酸酯、DLα-生育酚、维生素A、氯化胆碱、泛酸钙、泛酸、叶酸烟酰胺、吡哆醇、核黄素、硫胺、肌醇、维生素B12,或者培养基包含其组合或其盐。在一些方面中,培养基包含以下或基本上由以下组成:生物素、DLα-生育酚乙酸酯、DLα-生育酚、维生素A、氯化胆碱、泛酸钙、泛酸、叶酸烟酰胺、吡哆醇、核黄素、硫胺、肌醇和维生素B12。在一些方面中,维生素包括以下或基本上由以下组成:生物素、DLα-生育酚乙酸酯、DLα-生育酚、维生素A、或其组合或盐。在一些方面中,培养基还包含蛋白质。在一些方面中,蛋白质包括白蛋白或牛血清白蛋白、BSA的级分、过氧化氢酶、胰岛素、转铁蛋白、超氧化物歧化酶、或其组合。在一些方面中,培养基还包含以下中的一种或更多种:皮质酮、D-半乳糖、乙醇胺、谷胱甘肽、L-肉毒碱、亚油酸、亚麻酸、孕酮、腐胺、亚硒酸钠或三碘-I-甲腺原氨酸、或其组合。在一些方面中,培养基包含以下中的一种或更多种:B-27®补充剂,无异源B-27®补充剂,GS21TM补充剂、或其组合。在一些方面中,培养基包含或还包含氨基酸、单糖、无机离子。在一些方面中,氨基酸包括精氨酸、胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、组氨酸、酪

氨酸或缬氨酸、或其组合。在一些方面中,无机离子包含钠、钾、钙、镁、氮或磷、或其组合或盐。在一些方面中,培养基还包含以下中的一种或更多种:钼、钒、铁、锌、硒、铜或锰、或其组合。在某些方面中,培养基包含一种或更多种本文讨论的维生素和/或一种或更多种本文讨论的蛋白质和/或以下中的一种或更多种,或者基本上由其组成:皮质酮、D-半乳糖、乙醇胺、谷胱甘肽、L-肉毒碱、亚油酸、亚麻酸、孕酮、腐胺、亚硒酸钠或三碘-I-甲腺原氨酸、B-27®补充剂、无异源B-27®补充剂、GS21TM补充剂、氨基酸(例如精氨酸、胱氨酸、异亮氨酸、亮氨酸、赖氨酸、甲硫氨酸、谷氨酰胺、苯丙氨酸、苏氨酸、色氨酸、组氨酸、酪氨酸或缬氨酸)、单糖、无机离子(例如钠、钾、钙、镁、氮和/或磷)或其盐、和/或钼、钒、铁、锌、硒、铜或锰。在一些具体方面中,其中一种或更多种可被明确排除。

[0411] 培养基还可包含一种或更多种外部添加的脂肪酸或脂质、氨基酸(例如非必需氨基酸)、维生素、生长因子、细胞因子、抗氧化剂物质、2-巯基乙醇、丙酮酸、缓冲剂、和/或无机盐。在一些具体方面中,其中一种或更多种可被明确排除。

[0412] 一种或更多种培养基组分可以以以下浓度添加:至少、至多或约0.1、0.5、1、2、3、4、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、95、100、150、180、200、250ng/L、ng/ml、μg/ml、mg/ml,或其中可推导出的任何范围。

[0413] 在一些具体方面中,具体配制本公开内容的细胞。它们可配制成细胞悬液,也可不配制成细胞悬液。在特定情况下,它们以单剂量形式配制。它们可以配制成全身施用或局部施用。在一些情况下,细胞被配制成在使用之前储存,并且细胞制剂可包含一种或更多种冷冻保存剂,例如DMSO(例如,在5%DMSO中)。细胞制剂可包含白蛋白,包括人白蛋白,其中特定制剂包含2.5%人白蛋白。细胞可被配制成特别用于静脉内施用;例如,它们被配制用于静脉内施用持续少于1小时。在一些具体方面中,细胞处于配制的细胞悬液中,所述细胞悬液从解冻时起在室温下稳定1、2、3或4小时或更长时间。

[0414] 在一些方面中,所述方法还包括使T细胞致敏。在一些方面中,T细胞用抗原呈递细胞致敏。在一些方面中,抗原呈递细胞呈递肿瘤抗原或肽,例如本文中公开的那些。

[0415] 在一些具体方面中,本公开内容的细胞包含外源性TCR,其可以具有限定的抗原特异性,例如对SEQ ID NO:1具有限定的抗原特异性。在一些方面中,TCR可基于对预期接受者的同种异体反应性的不存在或降低来对其进行选择(一些实例包括某些病毒特异性TCR、异种特异性TCR或癌-睾丸抗原特异性TCR)。在外源性TCR不具有同种异体反应性的实例中,在T细胞分化期间,外源性TCR通过称为等位基因排斥的发育过程抑制内源性TCR基因座的重排和/或表达,产生仅表达非同种异体反应性外源性TCR并且因此具有非同种异体反应性的T细胞。在一些方面中,外源性TCR的选择可以不必然基于同种异体反应性的缺乏来限定。在一些方面中,内源性TCR基因已通过基因组编辑进行修饰,使得其不表达蛋白质。基因编辑方法例如使用CRISPR/Cas9系统的方法在本领域中是已知的并且在本文中描述。

[0416] XV.治疗性组合物的施用

[0417] 本公开内容的方法涉及治疗患有癌症的对象。在一些方面中,治疗可针对已患有或已确定患有针对本公开内容的特定肽(例如SEQ ID NO:1或2的肽)的癌症的那些人。在一些方面中,所述方法可用于对于这样的癌症测试呈阳性、具有一种或更多种癌症症状或被认为处于发生这样的癌症的风险之中的个体。

[0418] 本公开内容的某些方面涉及癌症的治疗和/或癌症抗原的使用。待治疗的癌症或

抗原可以是与本领域已知的任何癌症或例如以下相关的抗原:上皮癌(例如乳腺癌、胃肠癌、肺癌)、前列腺癌、膀胱癌、肺(例如小细胞肺)癌、结肠癌、卵巢癌、脑癌、胃癌、肾细胞癌、胰腺癌、肝癌、食管癌、头颈癌或结直肠癌。在一些方面中,待治疗的癌症或抗原来自以下癌症之一:腺皮质癌、原因不明的髓样化生、AIDS相关癌症(例如AIDS相关淋巴瘤)、肛门癌、阑尾癌、星形细胞瘤(例如小脑和脑)、基底细胞癌、胆管癌(例如肝外)、膀胱癌、骨癌、(骨肉瘤和恶性纤维组织细胞瘤)、脑瘤(例如神经胶质瘤、脑干神经胶质瘤、小脑或大脑星形细胞瘤(例如毛细胞性星形细胞瘤、弥漫性星形细胞瘤、间变性(恶性)星形细胞瘤)、恶性神经胶质瘤、室管膜瘤、少突神经胶质瘤(oligodenglioma)、脑脊膜瘤、脑脊膜肉瘤(meningiosarcoma)、颅咽管瘤、成血管细胞瘤(haemangioblastomas)、成神经管细胞瘤、幕上原始神经外胚层肿瘤、视觉通路和下丘脑胶质瘤和成胶质细胞瘤)、乳腺癌、支气管腺癌/类癌、类癌肿瘤(例如胃肠类癌肿瘤)、未知原发癌、中枢神经系统淋巴瘤、宫颈癌、结肠癌、结直肠癌、慢性骨髓增殖性疾病、子宫内膜癌(例如子宫癌)、室管膜瘤、食管癌、尤因家族肿瘤(Ewing's family of tumor)、眼癌(例如眼内黑素瘤和视网膜母细胞瘤)、胆囊癌、胃(胃部)癌、胃肠类癌肿瘤、胃肠道间质瘤(GIST)、生殖细胞瘤(例如颅外、性腺外、卵巢)、妊娠滋养细胞肿瘤、头颈癌、肝细胞(肝)癌(例如hepatic carcinoma和heptoma)、下咽癌、岛细胞癌(内分泌胰腺)、喉癌、喉癌、白血病、唇和口腔癌症、口腔癌、肝癌、肺癌(例如小细胞肺癌、非小细胞肺癌、肺腺癌和肺鳞状癌)、淋巴样赘生物(例如淋巴瘤)、成神经管细胞瘤、卵巢癌、间皮瘤、转移性鳞状颈癌、口癌、多发性内分泌瘤形成综合征、骨髓增生异常综合征、骨髓增生异常/骨髓增殖性疾病、鼻腔和鼻旁窦癌、鼻咽癌、神经母细胞瘤、神经内分泌癌、口咽癌、卵巢癌(例如卵巢上皮癌、卵巢生殖细胞瘤、卵巢低度恶性潜在肿瘤)、胰腺癌、甲状旁腺癌、阴茎癌、腹膜癌、咽癌、嗜铬细胞瘤、松果体母细胞瘤和幕上原始神经外胚层肿瘤、垂体瘤、胸膜肺母细胞瘤、淋巴瘤、原发性中枢神经系统淋巴瘤(小胶质细胞瘤)、肺淋巴管肌瘤病、直肠癌、肾癌、肾盂和输尿管癌(移行细胞癌)、横纹肌肉瘤、唾液腺癌、皮肤癌(例如非黑素瘤(例如鳞状细胞癌)、黑素瘤和梅克尔细胞癌(Merkel cell carcinoma))、小肠癌、鳞状细胞癌、睾丸癌、喉癌、胸腺瘤和胸腺癌、甲状腺癌、结节性硬化症、尿道癌、阴道癌、外阴癌、维尔姆斯瘤(Wilms'tumor)和移植后淋巴增殖性疾病(PTLD)、与瘢痣病(phakomatoses)相关的异常血管增生、水肿(如与脑瘤相关)或梅格斯综合征(Meigs'syndrome)。

[0419] 本文提供的治疗可包括施用治疗剂(例如第一抗癌治疗和第二抗癌治疗)的组合。治疗可以以本领域中已知的任何合适的方式施用。例如,第一和第二癌症治疗可以顺序(在不同时间)或同时(在同一时间)施用。在一些方面中,第一和第二癌症治疗以单独的组合物施用。在一些方面中,第一和第二癌症治疗在同一组合物中。

[0420] 本公开内容的一些方面涉及组合物和方法,其包含治疗性组合物。不同的治疗可以以一种组合物或多于一种组合物(例如2种组合物、3种组合物或4种组合物)施用。可采用药剂的多种组合。

[0421] 本公开内容的治疗剂可通过相同的施用途径或通过不同的施用途径来施用。在一些方面中,癌症治疗经静脉内、肌内、皮下、表面、经口、经皮、腹膜内、眼眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、心室内或鼻内施用。在一些方面中,抗生素经静脉内、肌内、皮下、表面、经口、经皮、腹膜内、眼眶内、通过植入、通过吸入、鞘内、心室内或鼻内施用。合适的剂量可基于待治疗的疾病类型、疾病的严重程度和进程、个体的临床状况、个体的临床病史和对治疗的响

应以及主治医师的判断来确定。

[0422] 治疗可包括多种“单位剂量”。单位剂量被定义为含有预定量的治疗性组合物。待施用的量以及具体途径和制剂在临床领域技术人员的技能决定范围内。单位剂量不需要作为单次注射施用,但可包含在设定时间段内连续输注。在一些方面中,单位剂量包含单一可施用剂量。

[0423] 根据治疗次数和单位剂量二者,待施用的量取决于所期望的治疗效果。有效剂量被理解为是指实现特定效果所需的量。在某些方面中的实践中,预期在10mg/kg至200mg/kg范围内的剂量可影响这些药剂的保护能力。因此,预期剂量包括以下剂量:约0.1、0.5、1、5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80、85、90、100、105、110、115、120、125、130、135、140、145、150、155、160、165、170、175、180、185、190、195、和200、300、400、500、1000μg/kg、mg/kg、μg/天、或mg/天、或其中可推导出的任何范围。此外,这样的剂量可在一天内、和/或数天、数周或数月内多次施用。

[0424] 在某些方面中,药物组合物的有效剂量是可提供约1μM至150μM的血液水平的剂量。在另一个方面中,有效剂量提供以下血液水平:约4μM至100μM;或约1μM至100μM;或约1μM至50μM;或约1μM至40μM;或约1μM至30μM;或约1μM至20μM;或约1μM至10μM;或约10μM至150μM;或约10μM至100μM;或约10μM至50μM;或约25μM至150μM;或约25μM至100μM;或约25μM至50μM;或约50μM至150μM;或约50μM至100μM(或其中可推导出的任何范围)。在另一些方面中,剂量可提供药剂的以下血液水平(其是由向对象施用的治疗剂产生的):约、至少约或至多约

[0425] 1,2,3,4,5,6,7,8,9,10,11,12,13,14,15,16,17,18,19,20,21,22,23,24,25,26,27,28,29,30,31,32,33,34,35,36,37,38,39,40,41,42,43,44,45,46,47,48,49,50,51,52,53,54,55,56,57,58,59,60,61,62,63,64,65,66,67,68,69,70,71,72,73,74,75,76,77,78,79,80,81,82,83,84,85,86,87,88,89,90,91,92,93,94,95,96,97,98,99,或100μM或其中可推导出的任何范围。在某些方面中,施用于对象的治疗剂在体内被代谢为经代谢的治疗剂,在这种情况下,血液水平可指该治疗剂的量。或者,到了治疗剂不被对象代谢的程度,本文中讨论的血液水平可指未经代谢的治疗剂。

[0426] 治疗性组合物的确切量还取决于从业人员的判断并且对每个个体是特有的。影响剂量的因素包括患者的身体和临床状态、施用途径、预期的治疗目标(症状的减轻与治愈)以及对象可能正在经受的特定治疗物质或其他治疗的效力、稳定性和毒性。

[0427] 本领域技术人员将理解并意识到,可将μg/kg或mg/kg体重的剂量单位转换并以μg/ml或mM(血液水平)的相当浓度单位(例如4μM至100μM)来表示。还应理解,摄取依赖于物种和器官/组织。待进行的与摄取和浓度测量有关的适用转换因素和生理学假设是公知的,并且将允许本领域技术人员将一种浓度测量转换为另一种浓度测量,并对本文中所述的剂量、效力和结果做出合理的比较和结论。

[0428] 在一些所选择的方面中,考虑了本公开内容的肽可以包含在疫苗组合物中,并向对象施用以在对象中诱导针对癌症的治疗性免疫应答。用于在对象中的药物用途的疫苗组合物可包含本文中公开的肽组合物和可药用载体。

[0429] 短语“药物的”、“可药用的”或“药理学上可接受的”是指当在适当时向动物(例如如人)施用时不产生不良反应、变态反应或其他不利反应的分子实体和组合物。如本文中所

用,“可药用载体”包括任何和所有溶剂、分散介质、包衣、表面活性剂、抗氧化剂、防腐剂(例如,抗细菌剂、抗真菌剂)、等张剂、吸收延迟剂、盐类、防腐剂、药物、药物稳定剂、凝胶剂、黏合剂、赋形剂、崩解剂、润滑剂、甜味剂、矫味剂、染料、类似物质及其组合,如本领域普通技术人员所知(参见,例如,Remington:TheScienceandPracticeofPharmacy,21stedition,PharmaceuticalPress,2011,通过引用并入本文)。除非任何常规载体与活性成分不相容,否则其在本发明疫苗组合物中的使用在考虑之中。

[0430] 本文中使用的“保护性免疫应答”是指由哺乳动物宿主的免疫系统针对癌症的应答。保护性免疫应答可为癌症的治疗提供治疗作用,例如降低肿瘤尺寸、提高存活等。

[0431] 在一些方面中,疫苗组合物可通过微结构化经皮递送或弹道微粒递送来施用。作为疫苗制剂的载体的微结构是用于疫苗应用的理想构造,并且是本领域中广泛已知的(Gerstel和Place,1976(美国专利3,964,482);Ganderton和McAinsh,1974(美国专利3,814,097);美国专利5,797,898、5,770,219和5,783,208,以及美国专利申请2005/0065463)。这样的配制成用于弹道颗粒递送的疫苗组合物可包含固定在支持基底表面上的本文中公开的分离肽。在这些方面中,支持基底可包括但不限于微囊、微粒、微球、纳米囊、纳米粒、纳米球、或其组合。

[0432] 在另一些方面中,疫苗组合物包含本文中公开的固定的或包封的肽或者抗体以及支持基底。在这些方面中,支持基底可包括但不限于脂质微球、脂质纳米粒、醇质体(ethosome)、脂质体、泡囊(niosome)、磷脂、鞘脂体(sphingosome)、表面活性剂、转移体(transferosome)、乳剂、或其组合。脂质体和其他脂质纳米载体制剂和脂质微载体制剂的形成和使用通常是本领域普通技术人员已知的,并且脂质体、微粒、纳米囊等的使用已在治疗剂的递送方面得到广泛应用(例如,美国专利5,741,516,特别地通过引用整体并入本文)。已经综述了作为潜在药物载体的脂质体和脂质体样制剂的许多方法,其包括肽包封(美国专利5,567,434、5,552,157、5,565,213、5,738,868和5,795,587,其各自特别地通过引用整体并入)。

[0433] 除本文中所述的递送方法之外,还考虑了许多替代技术用于施用所公开的疫苗组合物。作为非限制性实例,疫苗组合物可通过以下施用:已在美国专利5,656,016中使用并描述的用于增强药物渗透进入并通过循环系统的速率和效力的超声波导入法(sonophoresis)(即超声)、骨内注射(美国专利5,779,708)、或反馈控制递送(美国专利5,697,899),并且本段中的每个专利都特别地通过引用整体并入本文。

[0434] XVI.样品制备

[0435] 在某些方面中,方法涉及从对象获得样品。本文提供的获得方法可包括活检方法,例如细针抽吸、芯针活检、真空辅助活检、切开活检、切除活检、穿孔活检、刮涂活检或皮肤活检。在某些方面中,样品通过先前提到的任何活检方法从卵巢或子宫内膜组织的活检中获得。在另一些方面中,样品可以从本文中提供的任何组织获得,所述组织包括但不限于非癌性或癌性组织以及来自卵巢上皮、输卵管上皮、卵巢、宫颈、输卵管或子宫的非癌性或癌性组织。或者,样品可以从任何其他来源获得,包括但不限于血液、血清、血浆、汗液、毛囊、颊组织、泪、月经、粪便或唾液。在当前方法的某些方面中,任何医疗专业人员(例如医生、护士或医疗技术人员),都可以获得用于测试的生物样品。此外,生物样品可在没有医疗专业人员的帮助情况下获得。

[0436] 样品可以包括但不限于组织、细胞或者来自对象的细胞或衍生自对象的细胞的生物材料。生物样品可以是异质或均质的细胞群或组织群。生物样品可以使用本领域已知的可提供适用于本文所述分析方法的样品的任何方法来获得。样品可以通过非侵入性方法获得,所述方法包括但不限于:皮肤或宫颈的刮屑(scraping),颊的擦拭(swabbing),唾液收集,尿液收集,粪便收集,月经、泪或精液的收集。

[0437] 样品可以通过本领域已知的方法获得。在某些方面中,样品通过活检获得。在另一些方面中,样品通过擦拭、内窥镜检查、刮擦、静脉切开术或本领域已知的任何其他方法获得。在一些情况下,可以使用本发明方法的试剂盒的组件来获得、储存或运输样品。在一些情况下,可以通过本文描述的方法获得多个样品(例如,多个血浆或血清样品)用于诊断。在另一些情况下,多个样品,例如来自一种组织类型(例如卵巢或相关组织)的一个或更多个样品和来自另一样本(例如血清)的一个或更多个样品可以通过所述方法获得用于诊断。可以在不同时间获得样品、通过不同的方法存储和/或分析。例如,可以获得样品并通过常规染色方法或任何其他细胞学分析方法分析样品。

[0438] 在一些方面中,生物样品可以由以下人员获得:医师、护士或其他医疗专业人员例如医疗技术人员、内分泌学家、细胞学家、抽血医师、放射科医师或肺脏学家。医疗专业人员可以指明对样本进行的适当测试或测定。在某些方面中,可以向分子谱分析(molecular profiling)企业咨询最适合指明哪些测定或测试。在当前方法的另一些方面中,患者或对象可以在没有医疗专业人员帮助的情况下获得用于测试的生物样品,例如获得全血样品、尿液样品、粪便样品、颊样品(buccal sample)或唾液样品。

[0439] 在另一些情况下,样品通过侵入性操作获得,侵入性操作包括但不限于:活检、针抽吸、抽血、内窥镜检查或静脉切开术。针抽吸的方法还可以包括细针抽吸、芯针活检、真空辅助活检或大核心活检。在一些方面中,可以通过本文中的方法获得多个样品以确保足够的生物材料量。

[0440] 用于获得生物样品的一般方法也是本领域已知的。出版物(例如Ramzy,Ibrahim Clinical Cytopathology and Aspiration Biopsy 2001,其通过引用整体并入本文)描述了用于活检的一般方法和细胞学方法。

[0441] 在本发明方法的一些方面中,分子谱分析企业可以从对象直接获得生物样品,从医疗专业人员、从第三方或者从分子谱分析企业或第三方提供的试剂盒获得生物样品。在一些情况下,生物样品可在对象、医疗专业人员或第三方获取所述生物样品并将其送至分子谱分析企业之后由分子谱分析企业获得。在一些情况下,分子谱分析企业可以提供合适的容器和赋形剂,用于将生物样品储存和运输至分子谱分析企业。

[0442] 在本文所述方法的一些方面中,医疗专业人员不需要参与初始诊断或样品获取。个人也可通过使用非处方(over the counter,OTC)试剂盒来获得样品。OTC试剂盒可包含用于获得如本文所述的所述样品的装置、用于储存所述样品以供检查的装置以及正确使用试剂盒的说明。在一些情况下,分子谱分析服务包括在购买试剂盒的价格中。在另一些情况下,分子谱分析服务单独收费。适合分子谱分析企业使用的样品可以是包含以下的任何材料:待测试个体的组织、细胞、核酸、基因、基因片段、表达产物、基因表达产物或基因表达产物片段。提供了用于确定样品适用性和/或充分性的方法。

[0443] 在一些方面中,可以将对象送转(refer)至专家,例如肿瘤学家、外科医师或内分

泌学家。专家同样可以获得用于测试的生物样品或将个体送转至测试中心或实验室以提交生物样品。在一些情况下,医疗专业人员可以将对象送转至测试中心或实验室以提交生物样品。在另一些情况下,对象可以提供样品。在一些情况下,分子谱分析企业可以获得样品。

[0444] XVII.检测和疫苗接种药盒

[0445] 本公开内容的肽或抗体可包括在药盒中。在药盒中的肽或抗体可被可检测地标记或固定在也包含在药盒中的支持基底的表面上。肽或抗体可例如以合适的形式(例如无菌、冻干或二者)在药盒中提供。

[0446] 包含于本发明的药盒中的支持基底可以基于待进行的方法来选择。作为非限制性实例,支持基底可以是多孔板或微板、膜、过滤器、纸、乳剂、珠、微珠、微球、纳米珠、纳米球、纳米粒、醇质体、脂质体、泡囊、转移体、浸棒、卡片、赛璐珞条(celluloid strip)、玻璃载片、微载片、生物传感器、侧向流装置、微芯片、梳状物、二氧化硅颗粒、磁性颗粒或自组装单层。

[0447] 与所进行的方法相适应,药盒还可包含一个或更多个用于将组合物递送至对象或用于以其他方式处理本发明组合物的装置。作为非限制性实例,药盒可包括作为以下的装置:注射器、滴眼器、弹道颗粒施加器(例如,在美国专利5,797,898、5,770,219和5,783,208以及美国专利申请2005/0065463中公开的施加器)、匙(scoopula)、微载片盖、测试条保持器或盖子,等。

[0448] 用于标记药盒组分的检测试剂可任选地包含在药盒中用于进行本发明的方法。在一些具体方面中,标记或检测试剂选自包含本领域中通常使用的试剂并且包括但不限于以下的组:放射性元素、酶、吸收UV范围内的光的分子以及荧光团(例如荧光素、罗丹明、金胺(auramine)、德克萨斯红、AMCA蓝和萤虫黄)。在另一些方面中,提供了包含一个或更多个容器装置和已经用检测试剂标记的BST蛋白试剂的药盒,所述检测试剂选自包含以下的组:放射性元素、酶、吸收UV范围内的光的分子和荧光团。

[0449] 当包含于药盒的试剂和/或组分以冻干形式(冻干物)或作为干粉末提供时,冻干物或粉末可通过添加合适的溶剂来重构。在一些具体方面中,溶剂可以是无菌的可药用缓冲剂和/或其他稀释剂。预期这样的溶剂也可以作为药盒的一部分提供。

[0450] 当药盒的组分在一种和/或更多种液体溶液中提供时,作为非限制性实例,液体溶液可以是无菌水溶液。组合物还可配制成施用组合物。在这种情况下,容器装置自身可以是注射器、吸移管、局部施加器等,从其中可将制剂施加至身体的受影响区域、注射到对象中、和/或施加至药盒的其他组分或与其混合。

[0451] XVIII.实施例

[0452] 给出以下实施例是为了举例说明本发明的多个方面,并且不意在以任何方式限制本发明。本领域技术人员将容易理解,本发明很好地适于实现目标并获得所提及的目的和优点,以及本文中固有的那些目标、目的和优点。本实施例以及本文中描述的方法目前代表了优选实施方案,是示例性的,并且不意图作为对本发明范围的限制。对于本领域技术人员来说,在由权利要求书的范围所限定的本发明的精神内所涵盖的其中的变化和其他用途是可以想到的。

[0453] 实施例1:Hormad1 HLA-A1101限制性肽鉴定、CTL产生和TCR-T开发

[0454] 使用NP-40缓冲液裂解K562-A11-HORMAD1(HLA-A1101等位基因基因和HORMAD1

cDNA强制表达K562细胞系)细胞系,并且将裂解物与偶联有抗MHC I类抗体的Sepharose Fast Flow珠一起孵育。洗涤以除去未结合蛋白质后,将MHC结合肽用10%乙酸洗脱。将洗脱的肽溶液浓缩,并使用串联质谱分析(图1)。一个肽(HMD-375,SSSQESVPK-SEQ ID NO:2)与HORMAD1序列相对应。离子评分是60。

[0455] 将HMD-375(SSSQESVPK-SEQ ID NO:2)肽脉冲至成熟树突细胞,并随后与来自HLA-A1101阳性健康供体的自体PBMC在48孔板中共培养。两轮刺激后,从每个孔中收集部分T细胞,用四聚体和抗CD8染色进行流式细胞术检测。在3个孔中观察到小的CD8+/四聚体+群。挑选显示出四聚体+/CD8+群的孔中的T细胞,并且将四聚体+/CD8+群分选并用快速扩增方案(rapid expansion protocol,REP)扩增。在REP两周后,观察到高纯度细胞毒性T淋巴细胞(CTL-四聚体+群超过90%)(图2)。

[0456] 将用多种浓度的HMD-375肽脉冲的K562-A11细胞用作靶标。用Cr51释放测定(Cr51 release assay,CRA)检测不同HMD-375CTL细胞系的裂解能力(图3)。效应物与靶标(E:T)的比率为20:1。HMD-375B5和HMD-375D10 CTL细胞系显示出良好的表位识别。

[0457] 表2.用于HMD-375CTL系杀伤测定的肿瘤细胞系靶标

[0458]

	K562-eGFP	K562-A11-HMD	H1299	H1299-A11`	H1623	H647	M14-eGFP	M14-HMD
癌症类型	**白血病**	**白血病**	**肺癌**	**肺癌**	**肺癌**	**肺癌**	**黑素瘤**	**黑素瘤**
HLA-A1101	+	+	-	+	+	+	+	+
HORMAD1	-	+	+	+	+	-	-	+

[0459] 将不同的肿瘤细胞系用作靶标,并与不同的HMD-375特异性CTL细胞系共培养(表2)。用Cr51释放测定(CRA)检测HMD-375 CTL细胞系的裂解能力。效应物与靶标(E:T)的比率为40:1至1.25:1。将强制表达eGFP或HORMAD1的K562-A11细胞系用作靶标(图4A)。将肿瘤细胞系H1299(HLA-A2-,HORMAD1+)和H1299-A11(HLA-A11强制表达)(图4B);H1623(HLA-A11+,HORMAD1+)和H647(HLA-A11+,HORMAD1-)(图4C);以及M14-eGFP(HLA-A11+,HORMAD1-,eGFP强制表达)和M14-HMD(HLA-A11+,HORMAD1强制表达)(图4D)用作靶标。与阴性对照相比,HMD-375B5 CTL细胞系和D10 CTL细胞系二者均显示出对阳性靶标的更高的杀伤水平(图4A-D)。

[0460] 将全长TCRα链和β链与弗林-P2A跳读肽(skip peptide)组装,并插入至逆转录病毒载体pMSGV3中。将重组逆转录病毒载体用于感染健康供体的PBMC。感染后,在流式细胞术检测下出现CD8+/四聚体+群。在四聚体引导分选和扩增后,产生了来自两个供体的高纯度TCR-T细胞系(图5)。

[0461] 表3:从HMD-375 B5 CTL细胞系克隆出的TCR和序列分析-α链

[0462]

结果概述	生产性 TRA 重排序列（无终止密码子和框内连接）		
V-GENE 和等位基因	Homsap TRAV38-2/DV8*01 F	评分 =1375	同一性=100.00%（276/276 nt）
J-GENE 和等位基因	Homsap TRAJ16*01 F	评分=234	同一性=92.59%（50/54 nt）
FM-IMGT 长度、CDR-IMGT 长度和 AA 连接	[26.17.34.11]	[7.8.11]	CAYRSAVRQKLLF（SEQ ID NO:31）

[0463] 表4:从HMD-375 B5 CTL细胞系克隆出的TCR和序列分析-β链

[0464]

结果概述	生产性 TRB 重排序列（无终止密码子和框内连接）		
V-GENE 和等位基因	Homsap TRBV7-9*03F	评分 =1375	同一性=100.00%（276/276 nt）
J-GENE 和等位基因	Homsap TRBJ2-1*01 F	评分=241	同一性=98.00%（49/50 nt）

[0465]

通过 IMGT/连接分析的等位基因和 D-GENE	Homsap TRBD2*01 F	D 区位于阅读框 2 中	
FM-IMGT 长度、CDR-IMGT 长度和 AA 连接	[26.17.38.10]	[5.6.14]	CASSSPGGRSYNEQFF（SEQ ID NO:32）

[0466] 将用多种浓度的HMD-375肽脉冲的K562-A11细胞用作靶标。用Cr51释放测定(CRA)检测不同HMD-375TCR-T的裂解能力(图6)。效应物与靶标(E:T)的比率为20:1。两种HMD-375TCR-T均表现出良好的表位识别。

[0467] 将不同的肿瘤细胞系用作靶标,并与不同的HMD-375特异性TCR-T细胞系共培养。用Cr51释放测定(CRA)检测HMD-375TCR-T细胞系的裂解能力。效应物与靶标(E:T)的比率为40:1至1.25:1。将强制表达eGFP或HORMAD1的K562-A11细胞系作为靶标(图7A)。将肿瘤细胞系H1299(HLA-A2-,HORMAD1+)和H1299-A11(HLA-A11强制表达)(图7B);H1623(HLA-A11+,HORMAD1+)和H647(HLA-A11+,HORMAD1-)(图7C);M14-eGFP(HLA-A11+,HORMAD1-,eGFP强制表达)和M14-HMD(HLA-A11+,HORMAD1强制表达)(图7D)用作靶标。与阴性对照相比,来自两个健康供体的两种HMD-375特异性TCR-T细胞系均显示出对阳性靶标的更高杀伤水平(图7A-D)。

[0468] 将HMD-375特异性TCR-T细胞系与K562-A11-eGFP、K562-A11-HORMAD1、H1299、H1299-A11、M14-eGFP、M14-HORMAD1、H647和H1623共培养(E:T＝10:1)。共培养过夜后,用ICS测定来检测TCR通路下游活化标志物CD137、CD69、IFN-γ和TNF-α。与阴性靶标相比,当与阳性靶标K562-A11-HORMAD1、H1299-A11、M14-HORMAD1和H1623共培养时,HMD-375特异性TCR-T细胞系的CD137、CD69、IFN-γ和TNF-α水平显著增强(图8A-B)。

[0469] 实施例2:KIF2C-404(IYNGKLFDL-SEQ ID NO:1)抗原特异性CTL产生和TCR-T开发

[0470] 将KIF2C-404肽(IYNGKLFDL-SEQ ID NO:1)脉冲至成熟树突细胞,并随后与来自HLA-A2402阳性健康供体的自体PBMC在48孔板中共培养。两轮刺激后,从每个孔中收集部分T细胞,用四聚体和抗CD8染色进行流式细胞术检测。在2个孔中观察到小的CD8+/四聚体+群。挑选显示出四聚体+/CD8+群的孔中的T细胞,并且将四聚体+/CD8+群分选并用快速扩增方案(REP)扩增。在REP两周后,观察到高纯度CTL(四聚体+群超过90%)(图12)。

[0471] 将用多种浓度的KIF2C-404肽脉冲的H1299细胞用作靶标。用51Cr释放测定(CRA(图13))检测不同KIF2C-404CTL细胞系的裂解能力。效应物与靶标(E:T)的比率为20:1。

[0472] 将不同的肿瘤细胞系用作靶标,并与KIF2C-404特异性CTL细胞系共培养。用CRA检测KIF2C-404CTL细胞系的裂解能力(图14)。效应物与靶标(E:T)的比率为40:1至1.25:1。

[0473] 表5:从KIF2C-404F11 CTL细胞系克隆出的TCR和序列分析-α链

[0474]

结果概述	生产性 TRA 重排序列（无终止密码子和框内连接）		
V-GENE 和等位基因	Homsap TRAV21*02 (F)	评分=1345	同一性=100.00%（270/270 nt）
J-GENE 和等位基因	Homsap TRAJ56*01 F	评分=292	同一性=96.77%（60/62 nt）
FM-IMGT 长度、CDR-IMGT 长度和 AA 连接	[26.17.34.11]	[6.7.11]	CAVDTGANSKLTF（SEQ ID NO:33）

[0475] 表6:从KIF2C-404F11 CTL细胞系克隆出的TCR和序列分析-β链

[0476]

结果概述	生产性 TRB 重排序列（无终止密码子和框内连接）		
V-GENE 和等位基因	Homsap TRBV11-2*03 F	评分 =1375	同一性=100.00%（276/276 nt）
J-GENE 和等位基因	Homsap TRBJ1-2*01 F	评分=222	同一性=95.83%（46/48 nt）
通过IMGT/连接分析的等位基因和 D-GENE	Homsap TRBD2*01 F	D 区位于阅读框 1 中	
FM-IMGT 长度、CDR-IMGT 长度和 AA 连接	[26.17.38.10]	[5.6.10]	CASSYHSYGYTF（SEQ ID NO:34）

[0477] 将全长TCRα链和β链与弗林-P2A跳读肽组装,并插入至逆转录病毒载体pMSGV3中。将重组逆转录病毒载体用于感染健康供体的PBMC。感染后,在流式细胞仪检测下出现CD8+/四聚体+群。在四聚体引导分选和扩增后,产生了高纯度的TCR-T细胞系(图15)。

[0478] 将不同的肿瘤细胞系以及肽脉冲的H1299细胞用作靶标,并与KIF2C-404特异性TCR-T细胞系共培养。用CRA检测KIF2C-404CTL细胞系的裂解能力(图16)。

[0479] ***

[0480] 根据本公开内容,本文中公开和要求保护的所有方法无需过度实验即可进行和实施。尽管已根据一些优选实施方案描述了本发明的组合物和方法,但对于本领域技术人员

来说明显的是,在不脱离本发明的概念、精神和范围的情况下,可对本文中所述方法以及所述方法的步骤或步骤顺序作出改变。更具体地,将明显的是,可以用在化学上和生理学两个方面均相关的某些试剂代替本文中所述的试剂,同时实现相同或类似的结果。所有这样的对本领域技术人员而言明显的类似替代和修改都被认为在所附权利要求书所限定的本发明的精神、范围和概念之内。

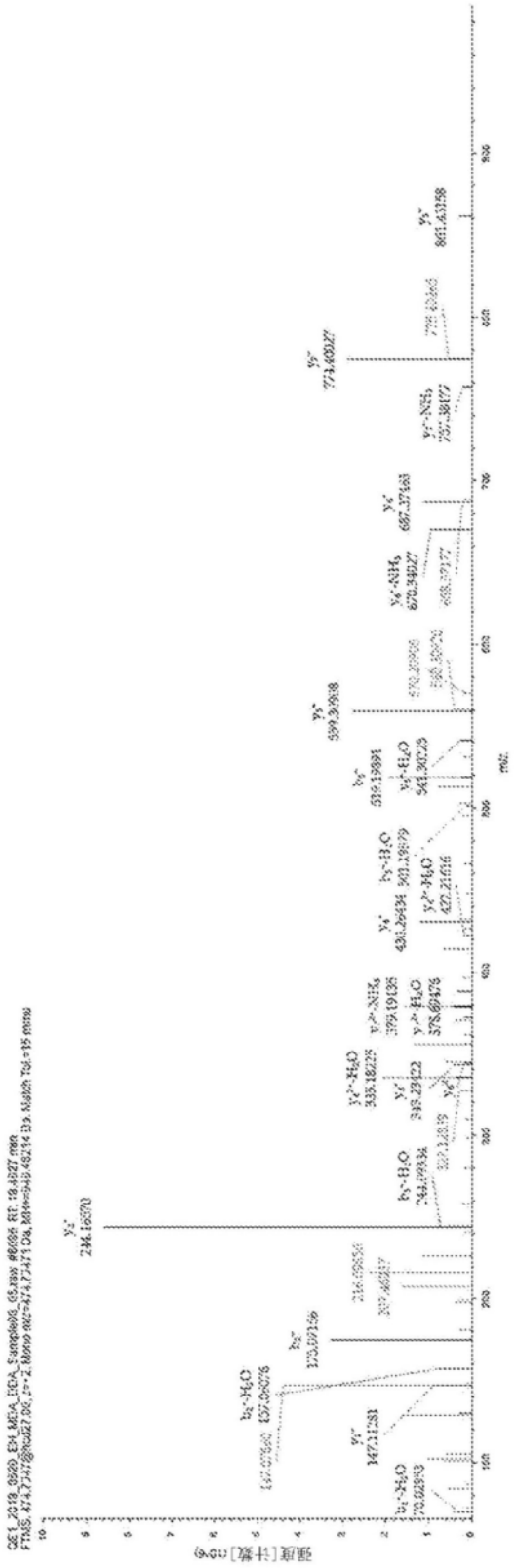


图1

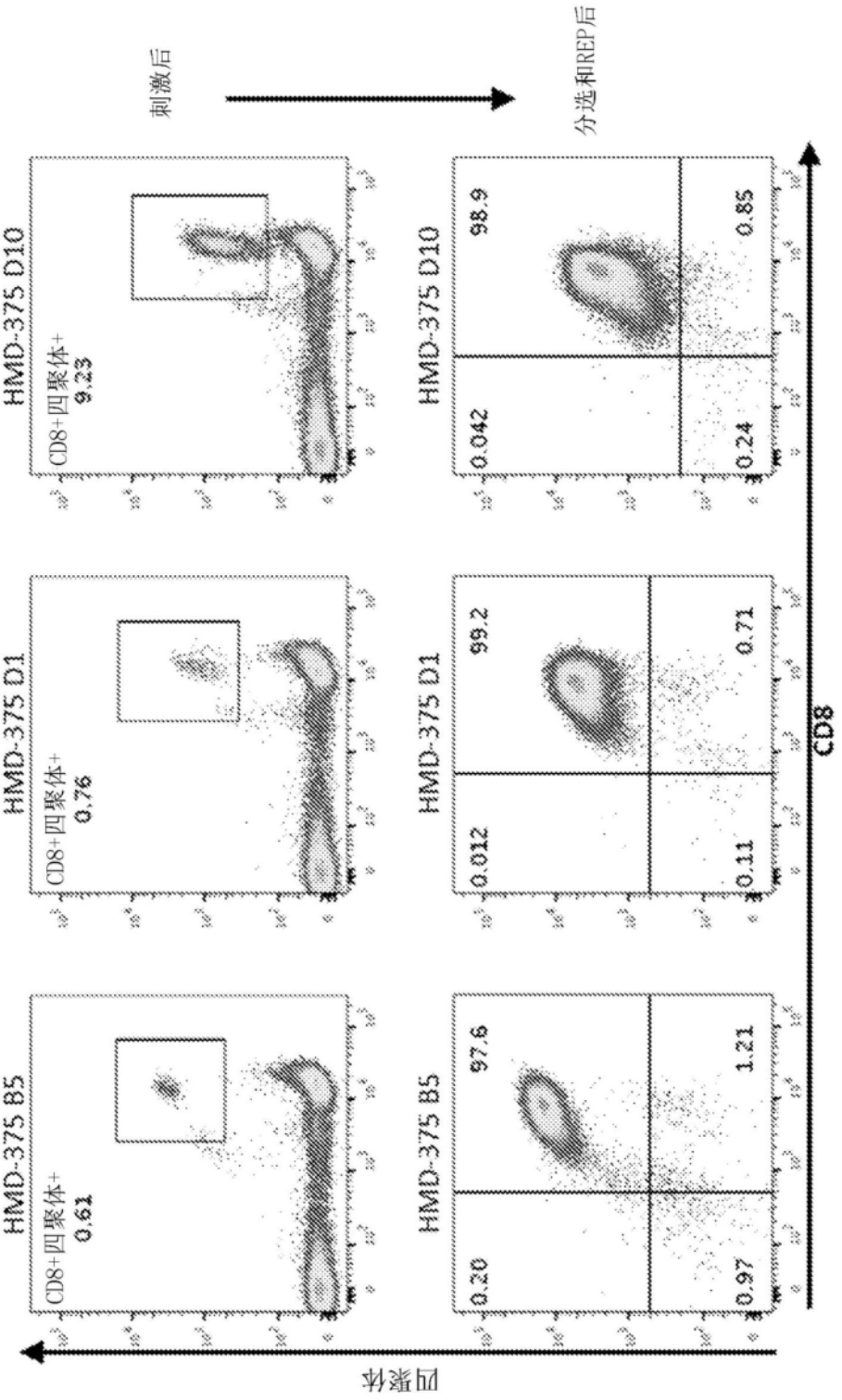

刺激后
分选和REP后
HMD-375 B5
CD8+四聚体+
0.61
HMD-375 D1
CD8+四聚体+
0.76
HMD-375 D10
CD8+四聚体+
9.23
HMD-375 B5
0.20
97.6
0.97
1.21
HMD-375 D1
0.012
99.2
0.11
0.71
HMD-375 D10
0.042
98.9
0.24
0.85
四聚体
CD8

图2

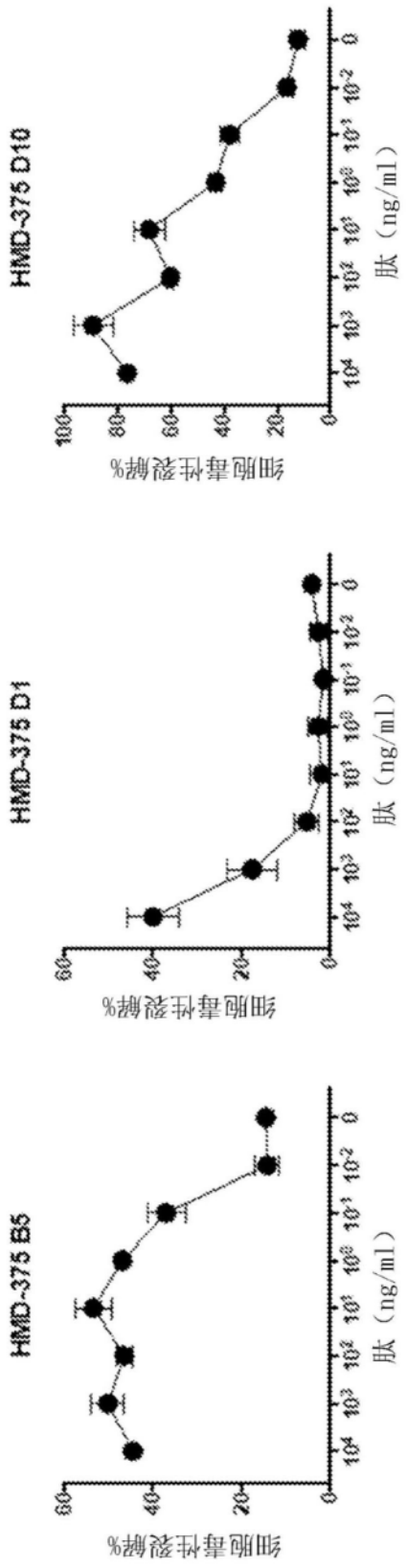


图3

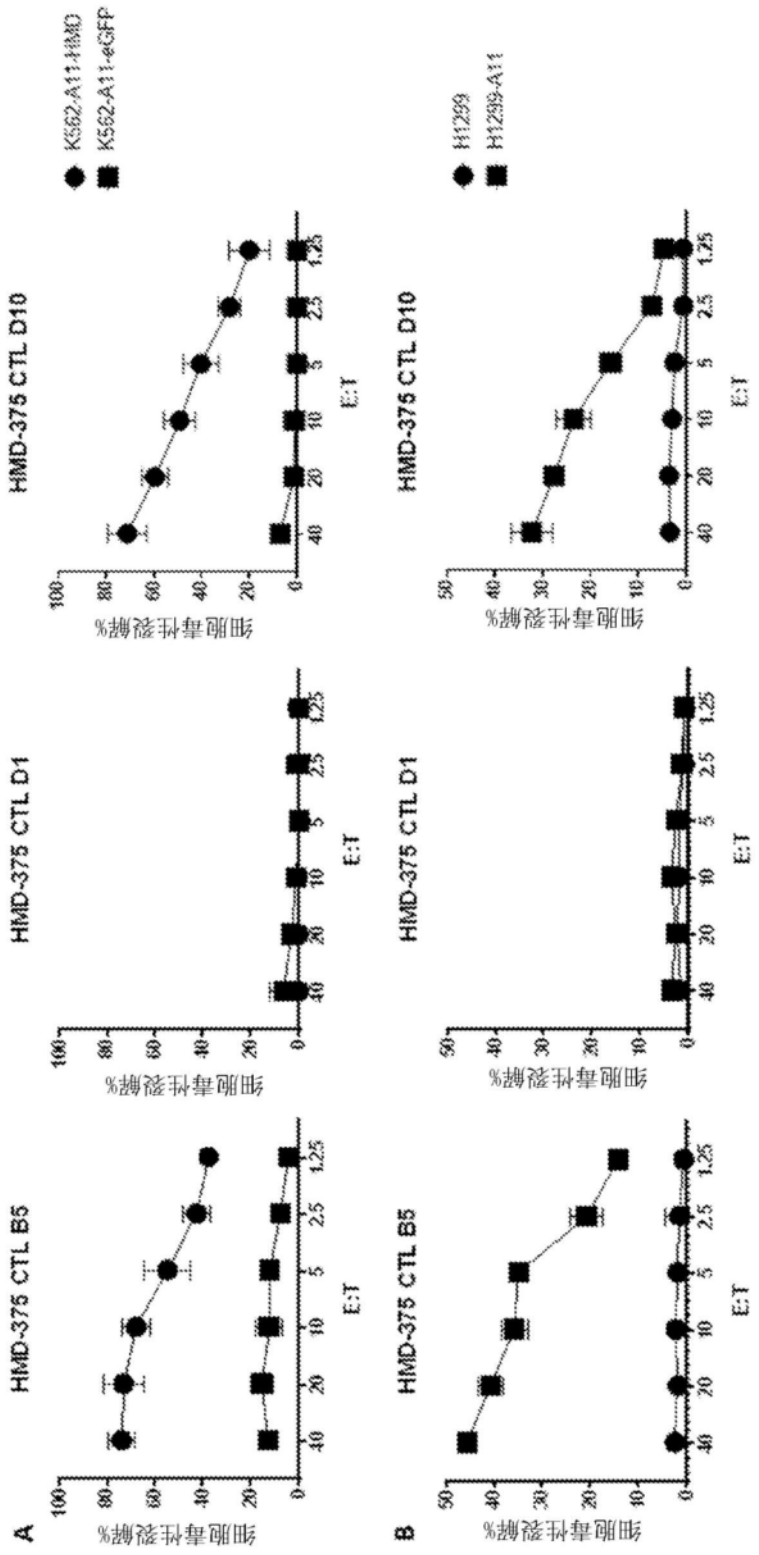

A
B
HMD-375 CTL B5
HMD-375 CTL D1
HMD-375 CTL D10
K562-A11-HMD
K562-A11-eGFP
H11299
H11299-A11
细胞毒性裂解%
E:T

图4A-B

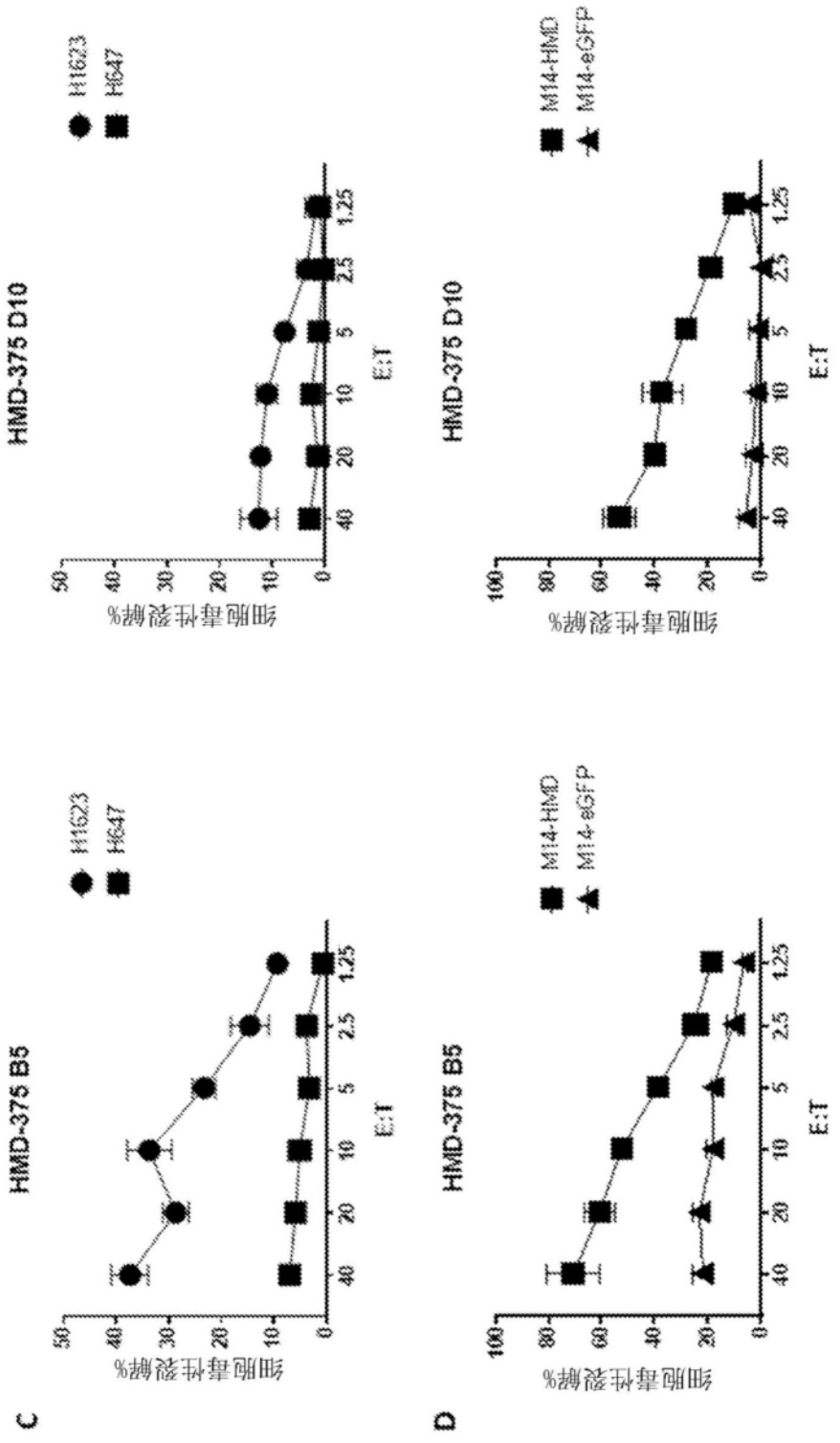


图4C-D

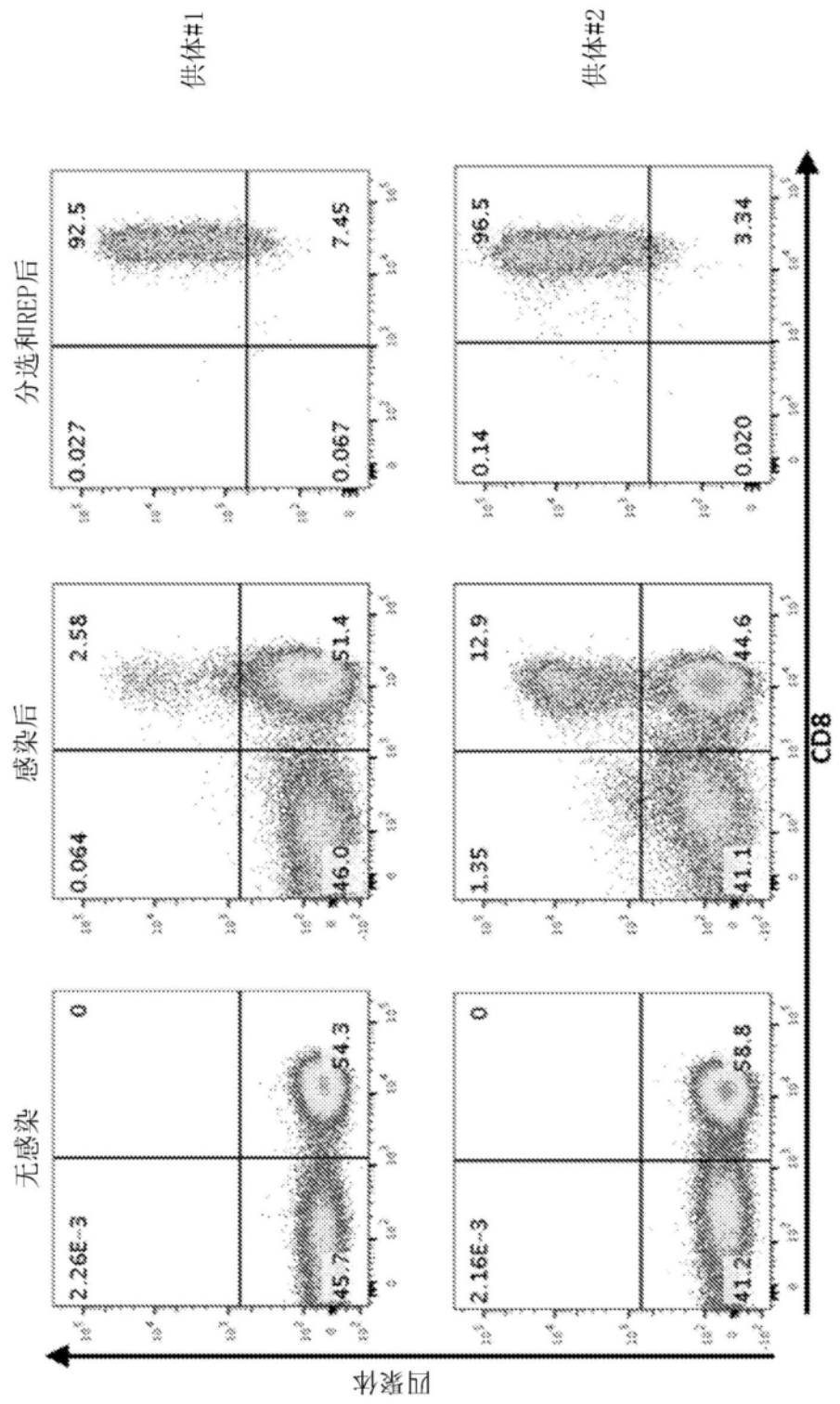

供体#1
供体#2
分选和REP后
感染后
无感染
0.027
92.5
0.067
7.45
0.14
96.5
0.020
3.34
0.064
2.58
46.0
51.4
1.35
12.9
41.1
44.6
2.26E-3
0
45.7
54.3
2.16E-3
0
41.2
58.8
四聚体
CD8

图5

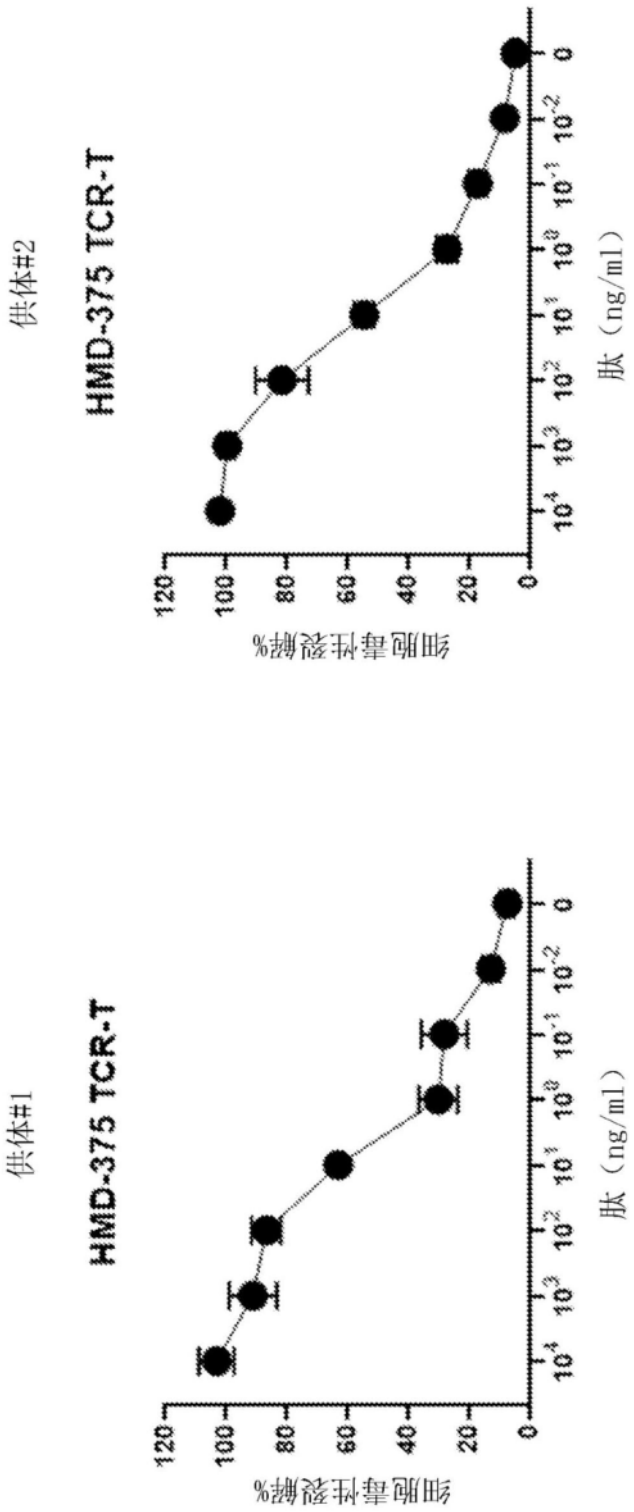


图6

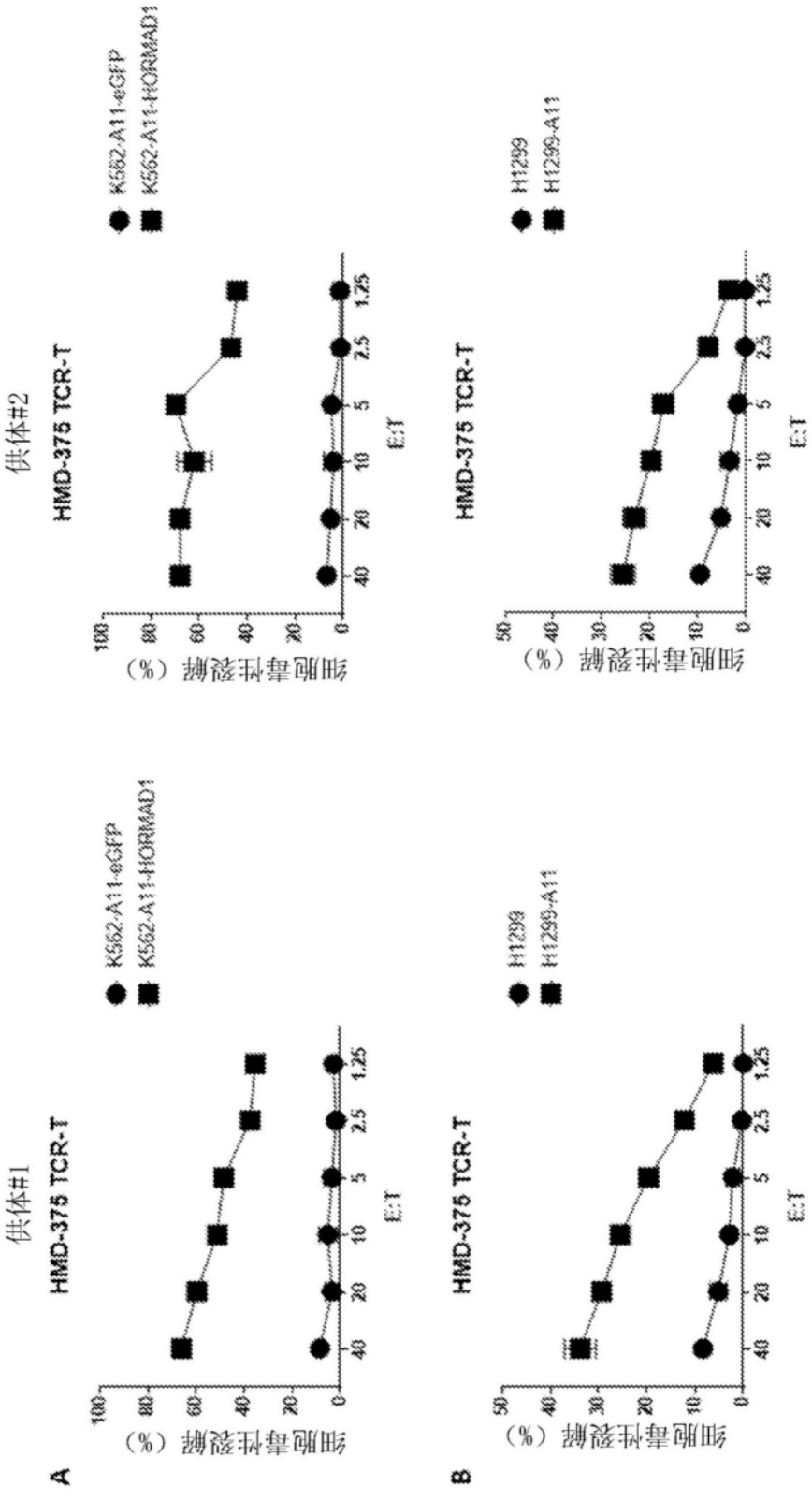

A
供体#1
HMD-375 TCR-T
K562-A11-eGFP
K562-A11-HORMAD1
细胞毒性裂解（%）
E:T
B
H1299
H1299-A11
供体#2

图7A-B

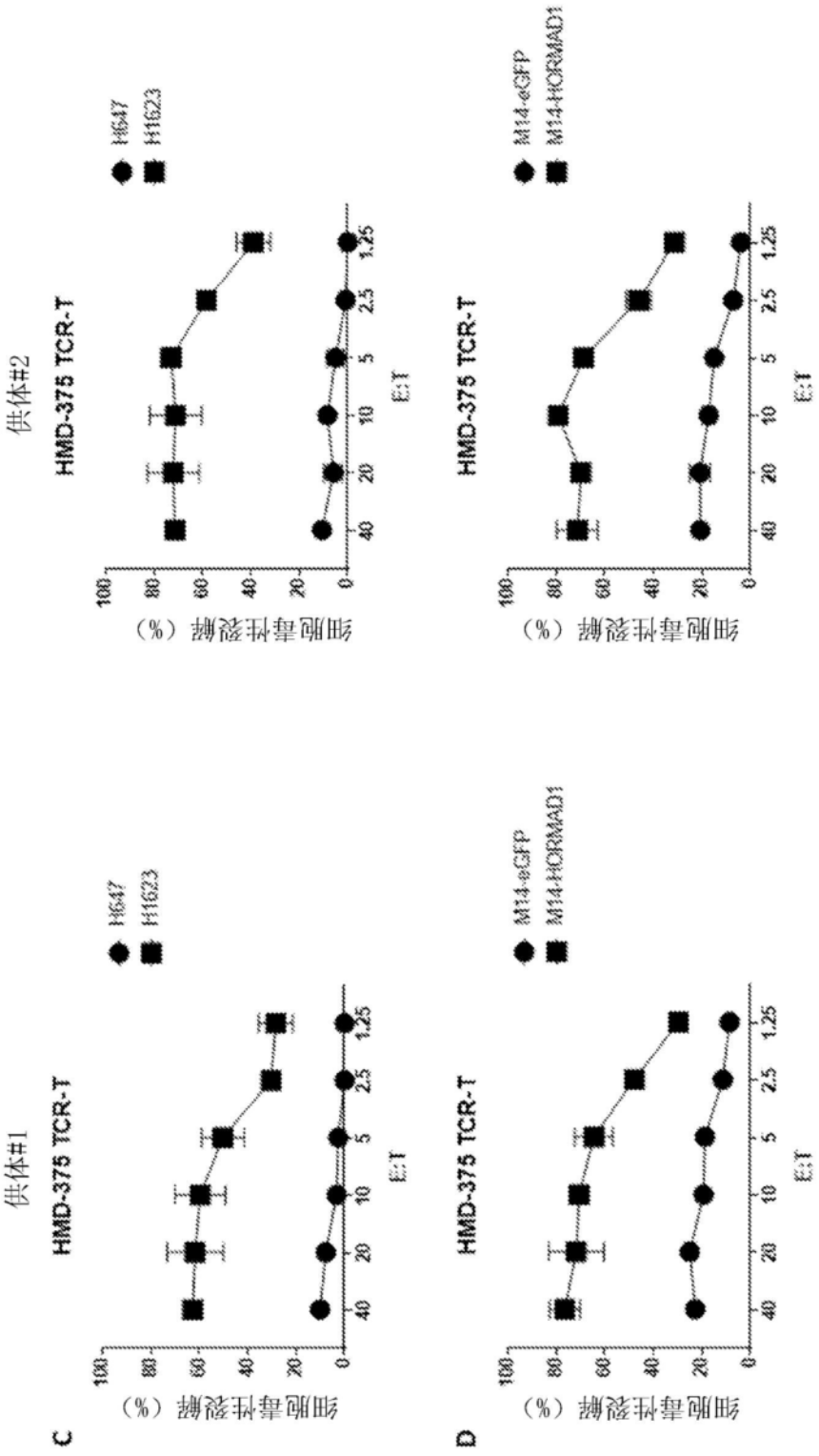

供体#2
HMD-375 TCR-T
H647
H1623
细胞毒性裂解（%）
E:T
M14-eGFP
M14-HORMAD1
供体#1
C
D

图7C-D

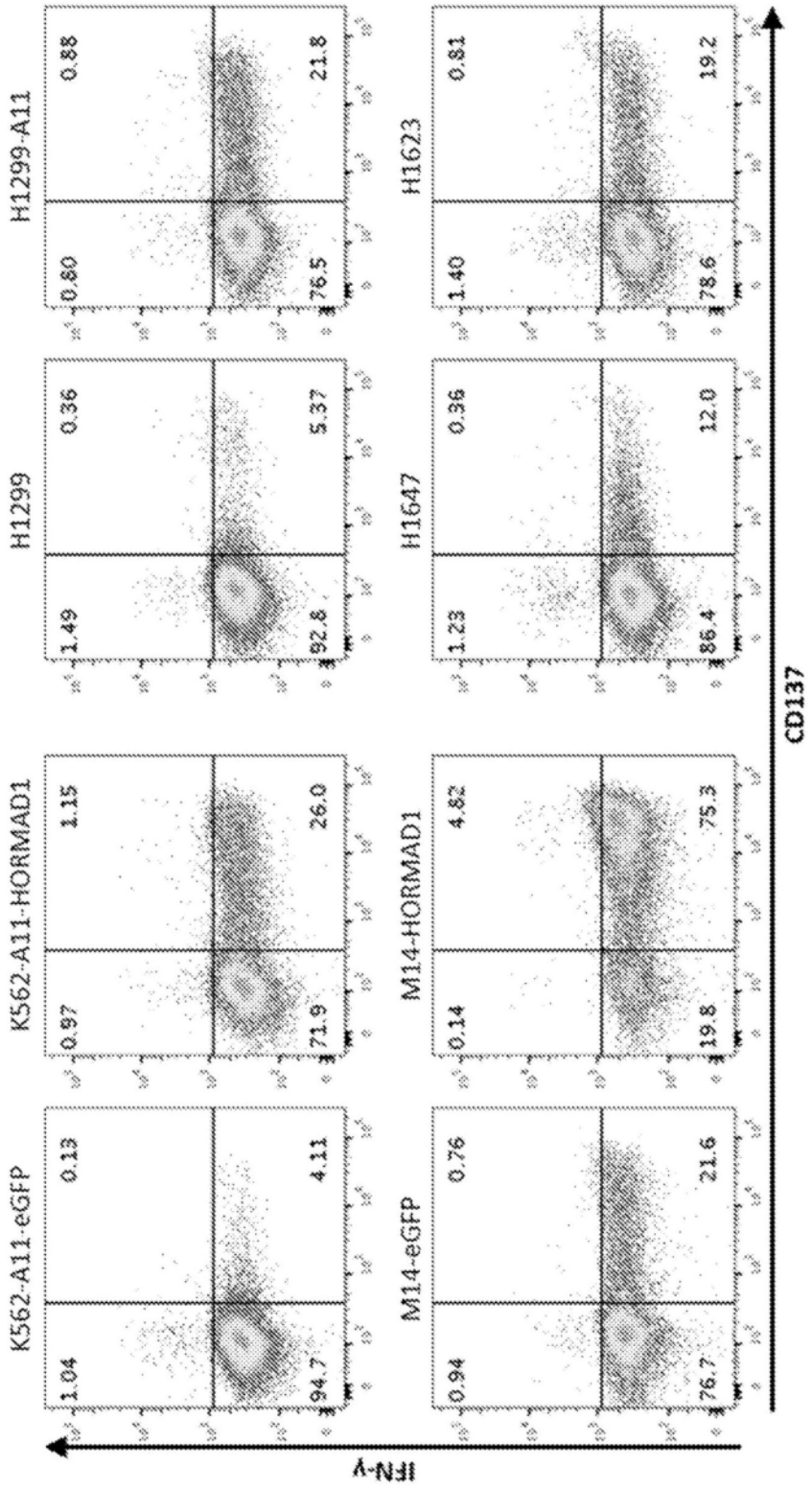

K562-A11-eGFP
K562-A11-HORMAD1
H1299
H1299-A11
M14-eGFP
M14-HORMAD1
H1647
H1623
1.04
0.13
94.7
4.11
0.97
1.15
71.9
26.0
1.49
0.36
92.8
5.37
0.80
0.88
76.5
21.8
0.94
0.76
76.7
21.6
0.14
4.82
19.8
75.3
1.23
0.36
86.4
12.0
1.40
0.81
78.6
19.2
IFN-γ
CD137

图8A

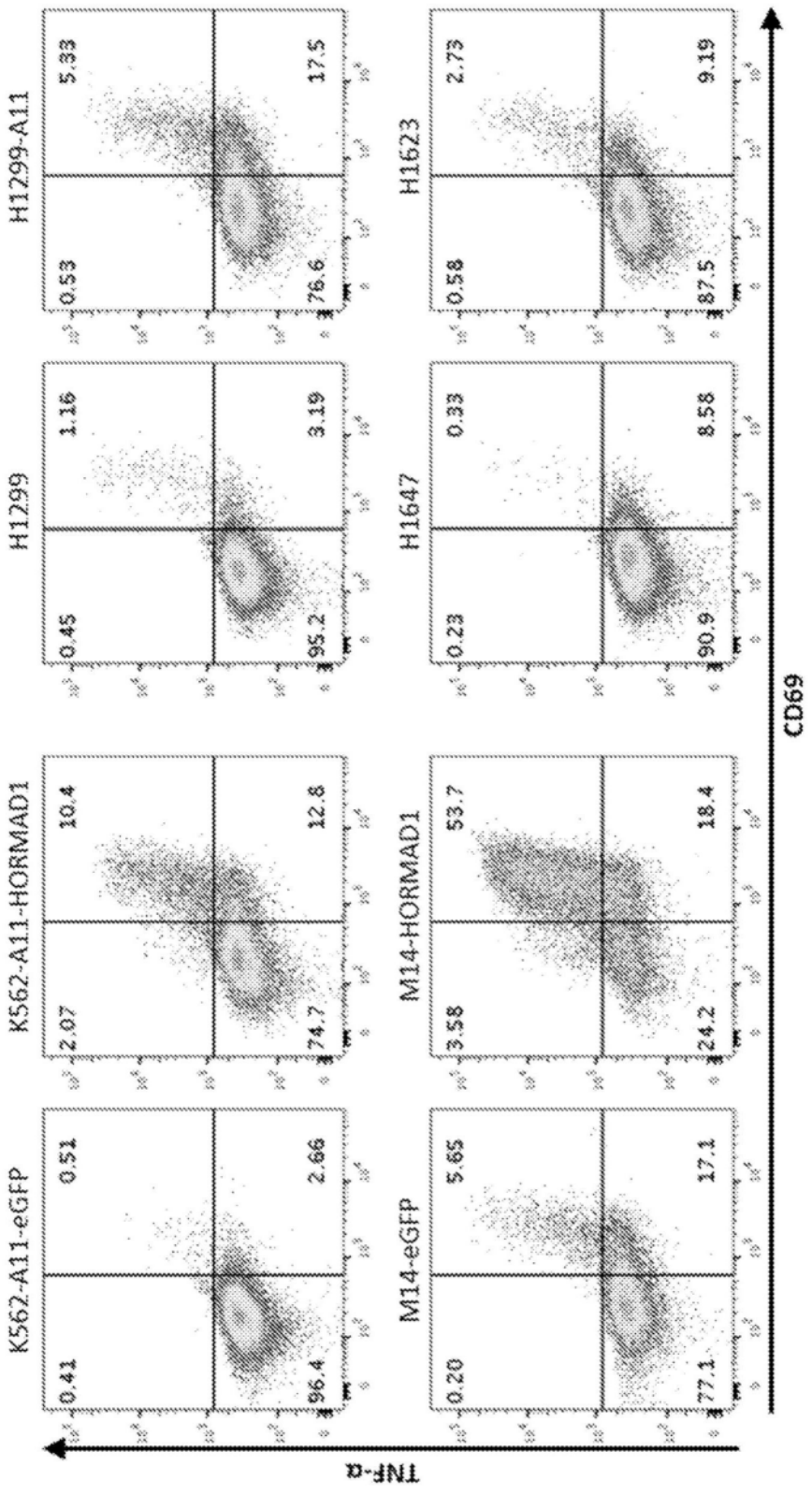

K562-A11-eGFP
K562-A11-HORMAD1
H1299
H1299-A11
M14-eGFP
M14-HORMAD1
H1647
H1623
0.41
0.51
96.4
2.66
2.07
10.4
74.7
12.8
0.45
1.16
95.2
3.19
0.53
5.33
76.6
17.5
0.20
5.65
77.1
17.1
3.58
53.7
24.2
18.4
0.23
0.33
90.9
8.58
0.58
2.73
87.5
9.19
TNF-α
CD69

图8B

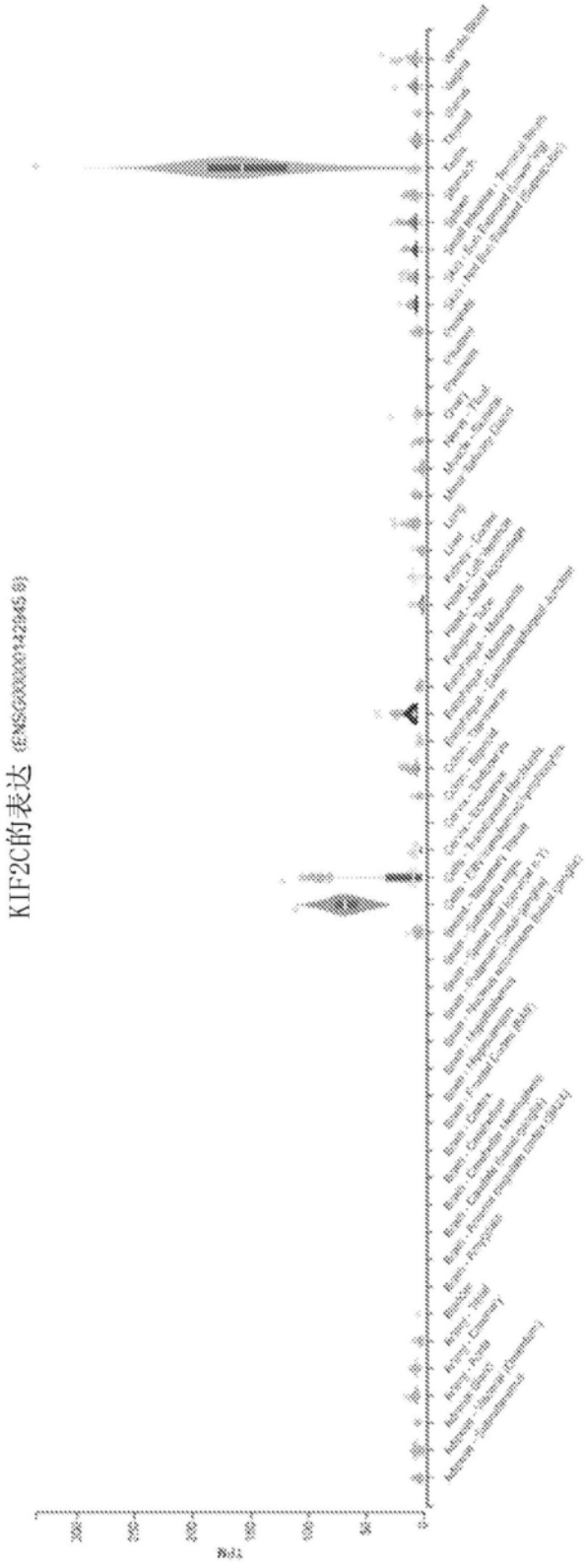


图9

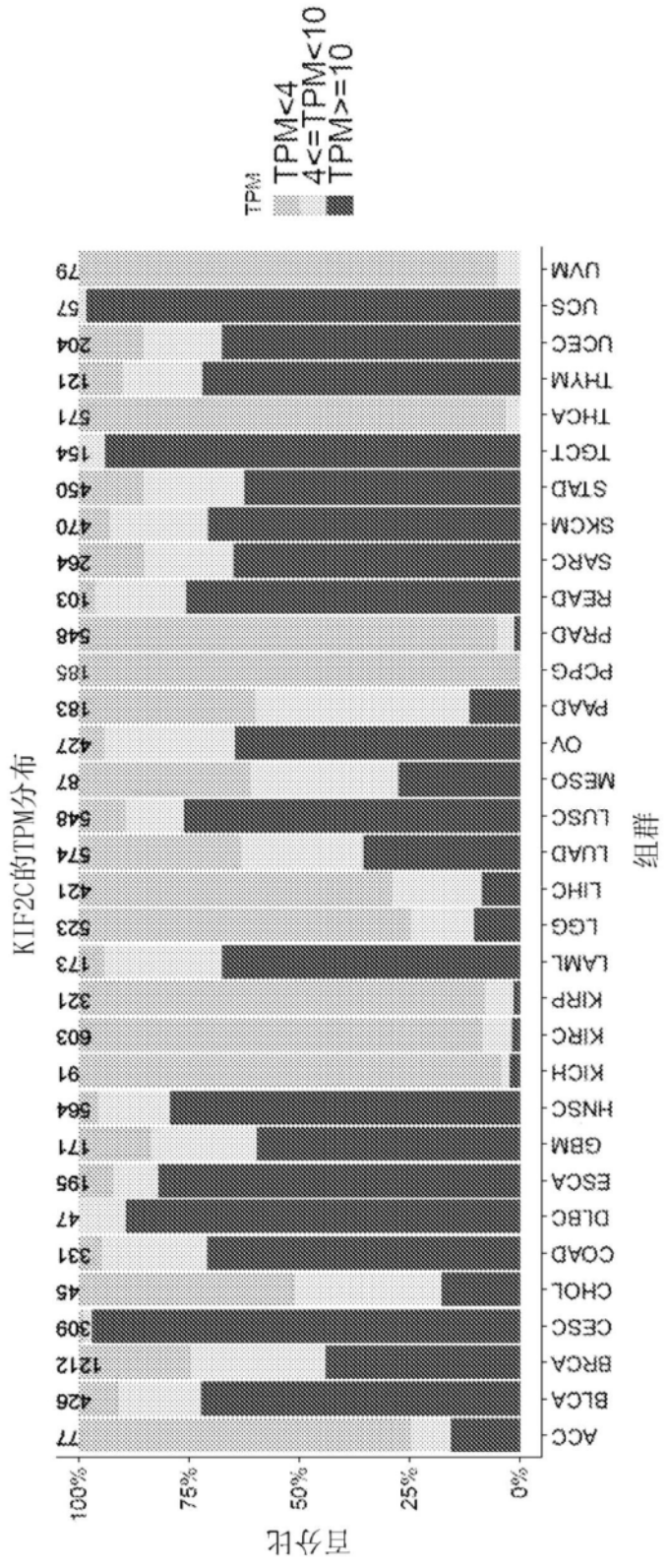

TPM
TPM<4
4<=TPM<10
TPM>=10
KIF2C的TPM分布
百分比
100%
75%
50%
25%
0%
组群
ACC
BLCA
BRCA
CESC
CHOL
COAD
DLBC
ESCA
GBM
HNSC
KICH
KIRC
KIRP
LAML
LGG
LIHC
LUAD
LUSC
MESO
OV
PAAD
PCPG
PRAD
READ
SARC
SKCM
STAD
TGCT
THCA
THYM
UCEC
UCS
UVM
77
426
1212
309
45
331
47
195
171
564
91
603
321
173
523
421
574
548
87
427
183
185
548
103
264
470
450
154
571
121
204
57
79

图10

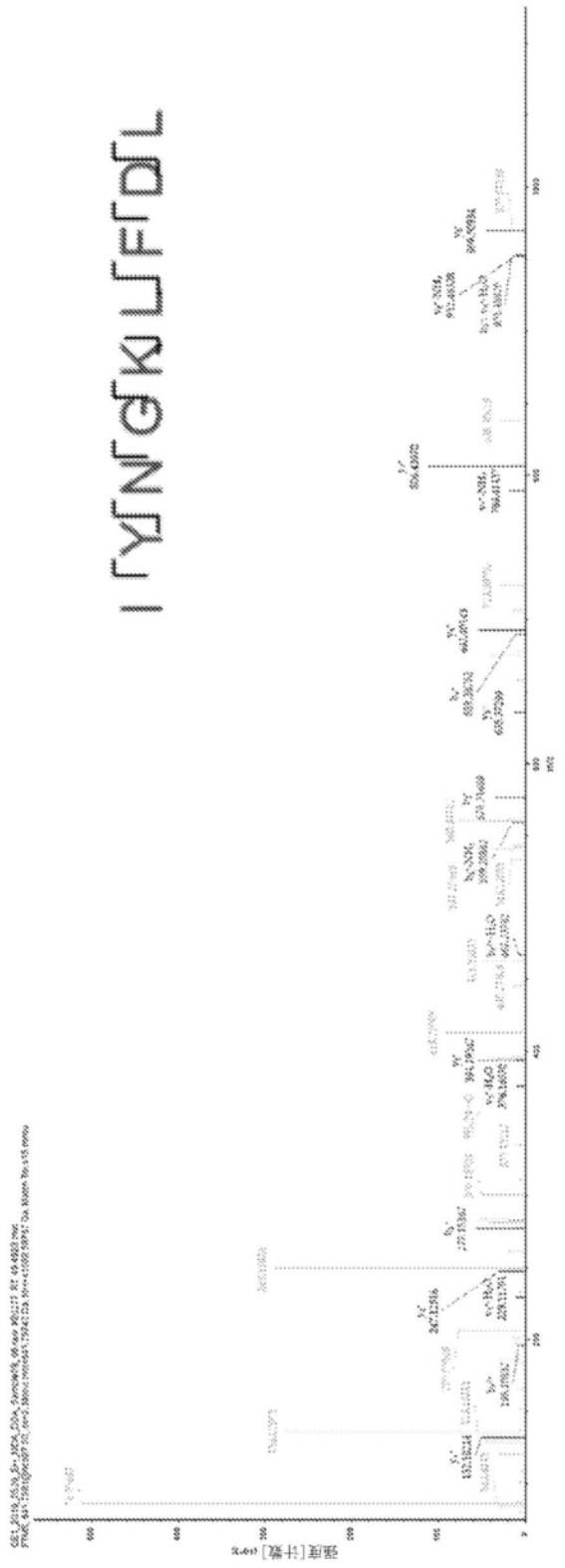


图11

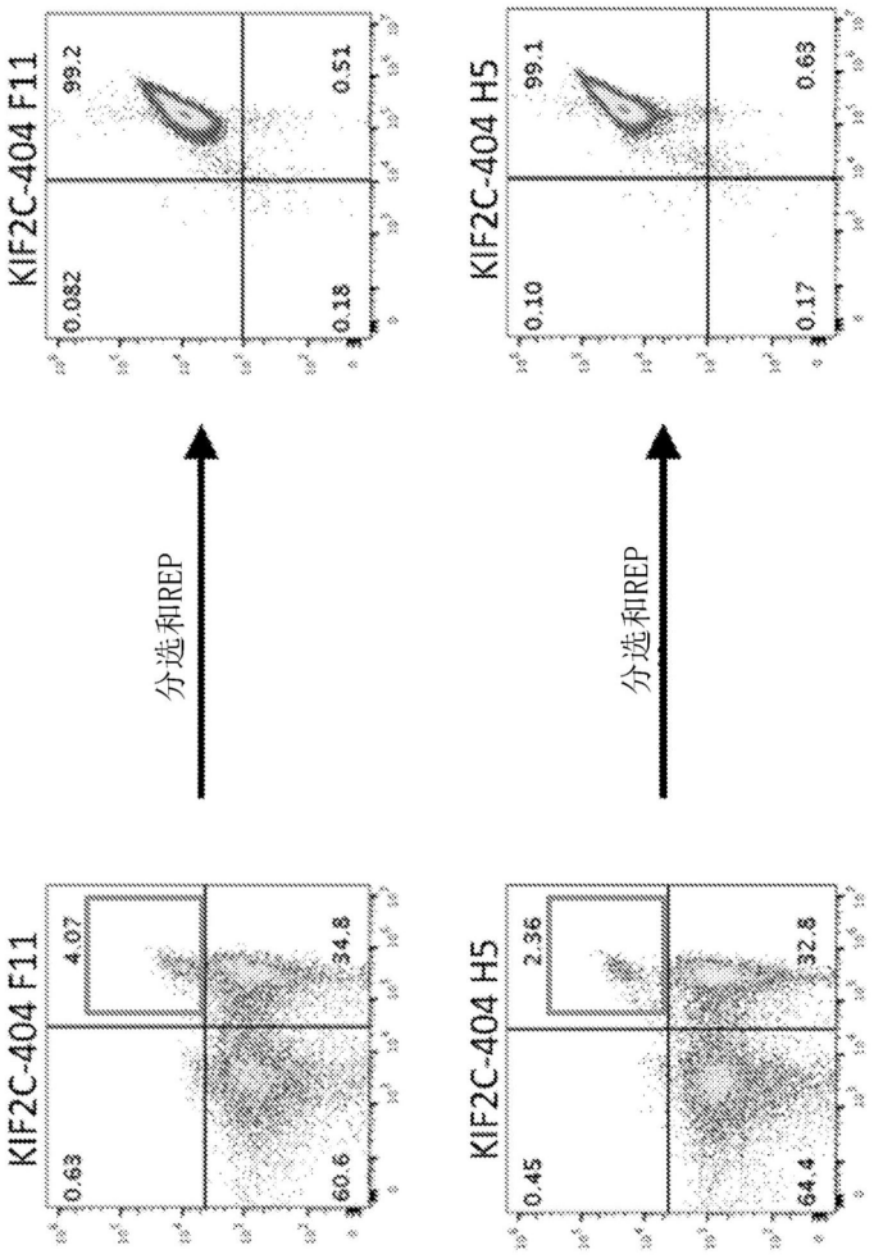

KIF2C-404 F11
99.2
0.082
0.51
0.18
KIF2C-404 H5
99.1
0.10
0.63
0.17
分选和REP
分选和REP
KIF2C-404 F11
4.07
0.63
34.8
60.6
KIF2C-404 H5
2.36
0.45
32.8
64.4

图12

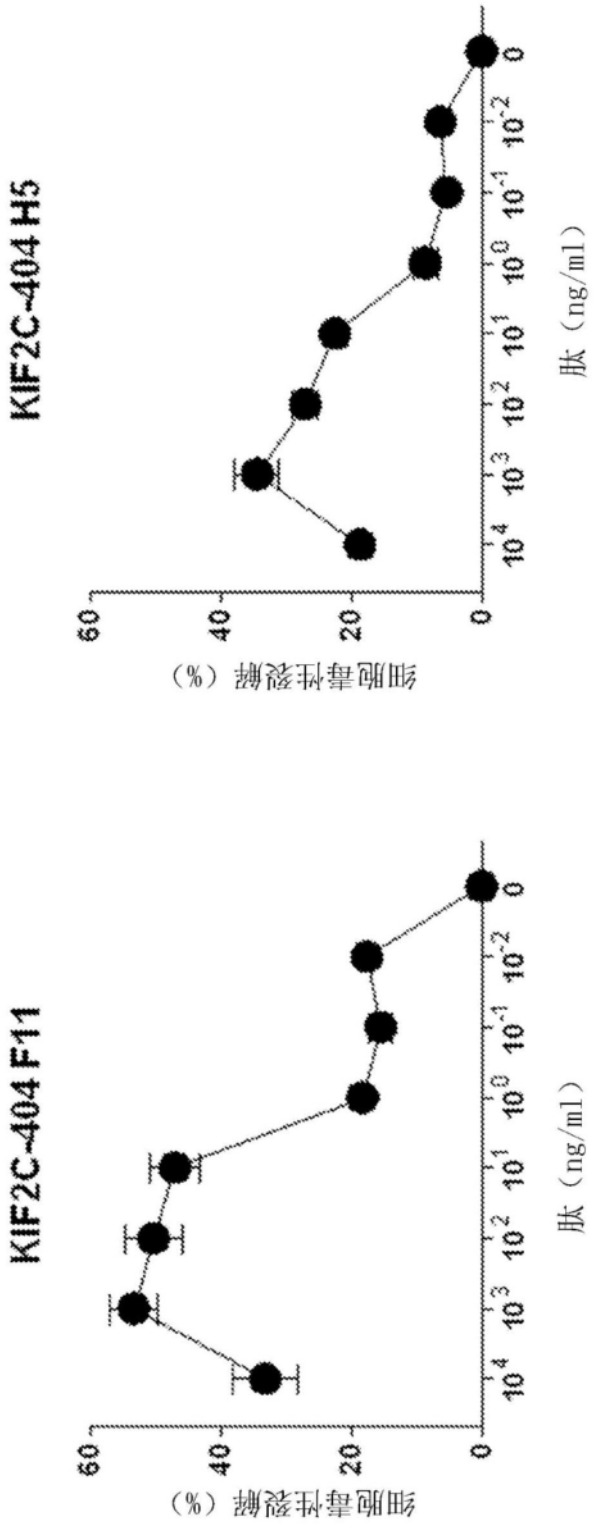

KIF2C-404 H5
细胞毒性裂解（%）
0
20
40
60
肽（ng/ml）
0
10-2
10-1
100
101
102
103
104
KIF2C-404 F11
细胞毒性裂解（%）
0
20
40
60
肽（ng/ml）
0
10-2
10-1
100
101
102
103
104

图13

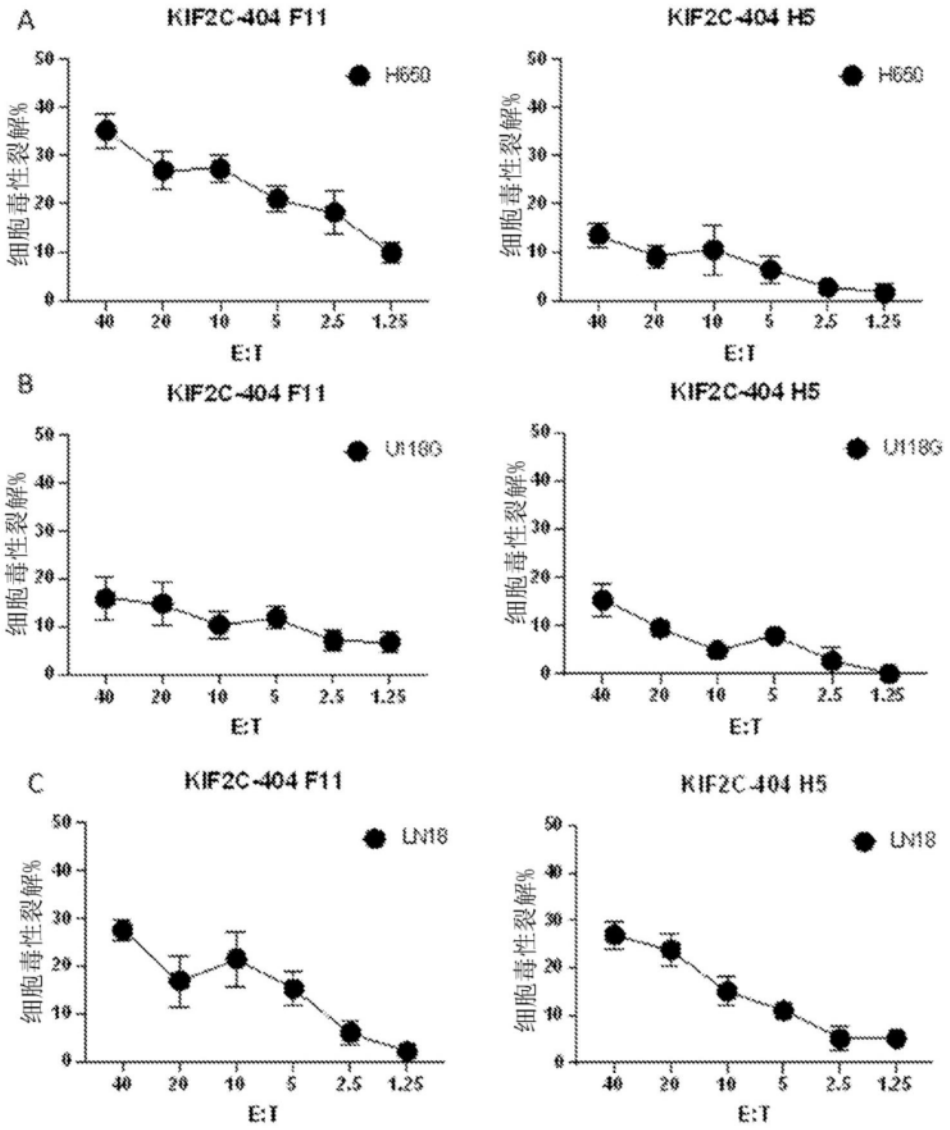

A
KIF2C-404 F11
KIF2C-404 H5
H650
细胞毒性裂解%
E:T
40
20
10
5
2.5
1.25
B
KIF2C-404 F11
KIF2C-404 H5
UN18G
C
KIF2C-404 F11
KIF2C-404 H5
UN18

图14A-C

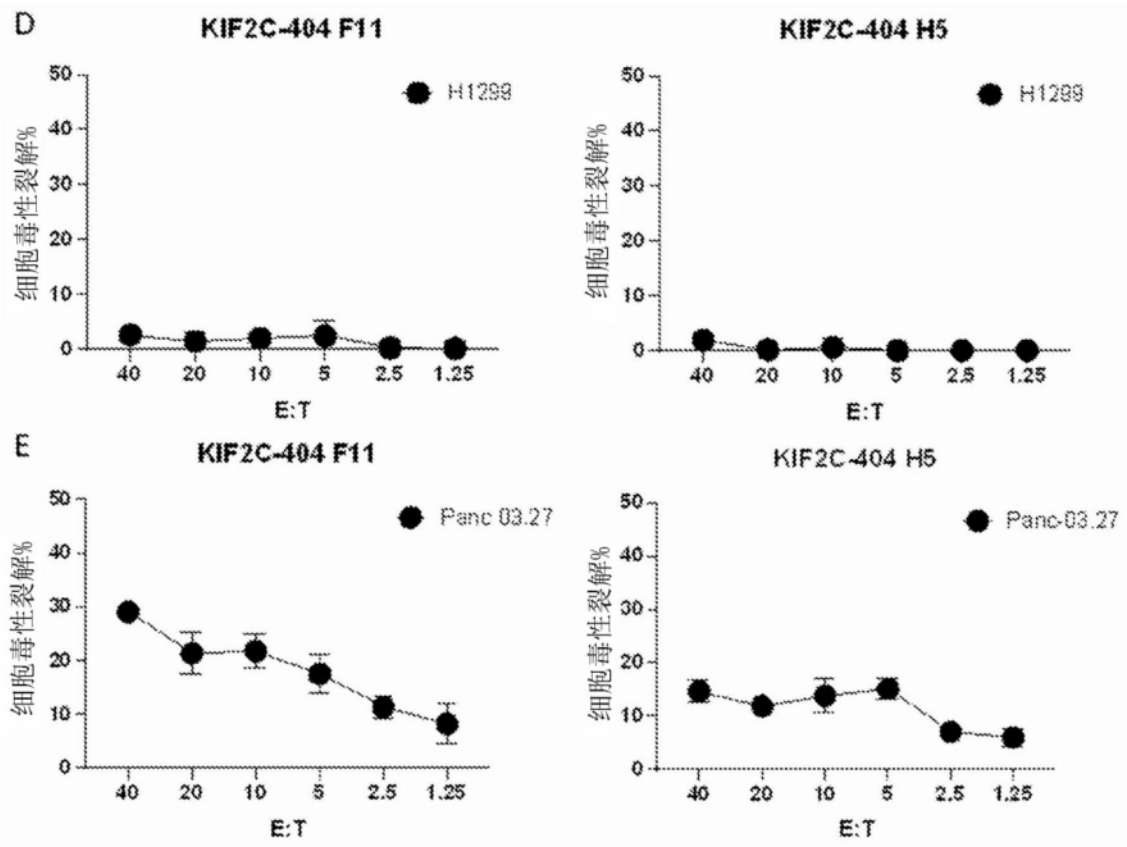

D
KIF2C-404 F11
H1299
细胞毒性裂解%
50
40
30
20
10
0
40
20
10
5
2.5
1.25
E:T
KIF2C-404 H5
H1299
细胞毒性裂解%
E:T
E
KIF2C-404 F11
Panc 03.27
细胞毒性裂解%
E:T
KIF2C-404 H5
Panc-03.27
细胞毒性裂解%
E:T

图14D-E

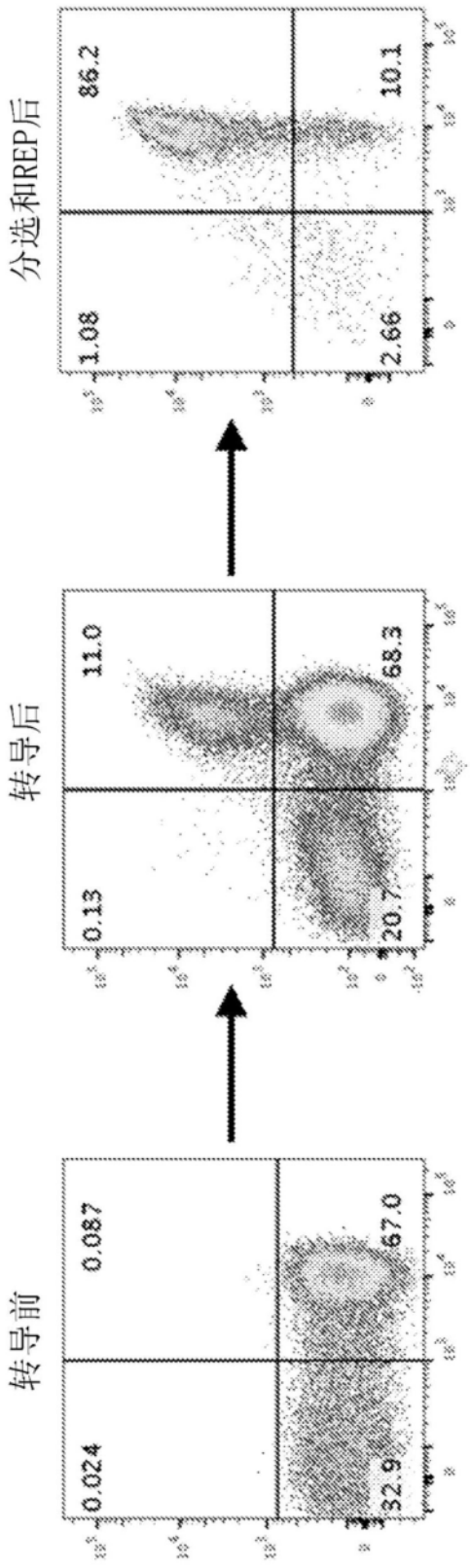

转导前
0.024
0.087
32.9
67.0
转导后
0.13
11.0
20.7
68.3
分选和REP后
1.08
86.2
2.66
10.1

图15

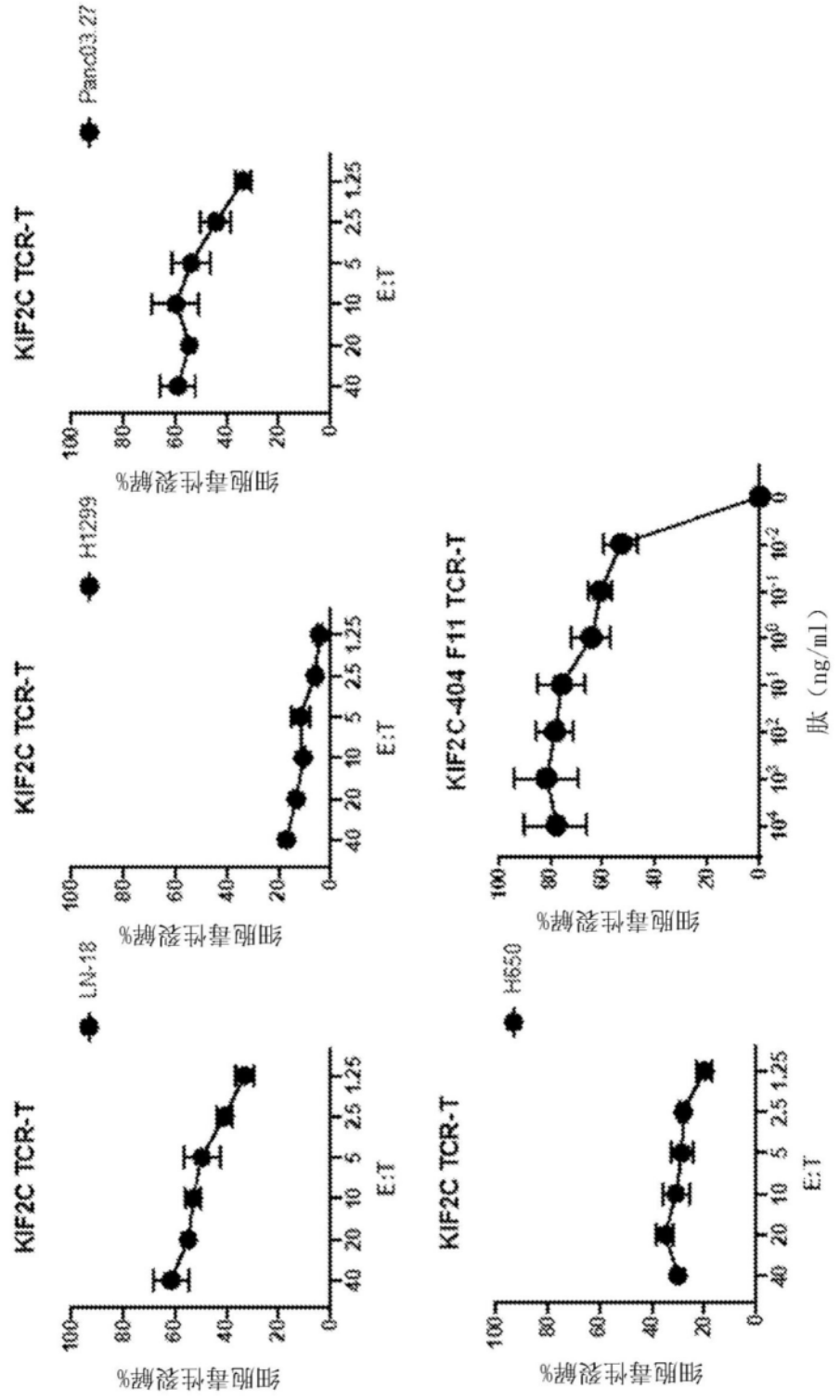

KIF2C TCR-T
Panc03.27
H1299
LN-18
H650
KIF2C-404 F11 TCR-T
细胞毒性裂解%
E:T
肽（ng/ml）

图16