



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 120082603 A

(43) 申请公布日 2025. 06. 03

(21) 申请号 202510245856.3

(22) 申请日 2018.09.19

(30) 优先权数据

62/560,930 2017.09.20 US

(62) 分案原申请数据

201880060535.4 2018.09.19

(71) 申请人 美国卫生和人力服务部

地址 美国马里兰州

(72) 发明人 拉米·约瑟夫 盖尔·卡弗里

保罗·F·罗宾斯

史蒂文·A·罗森伯格

(74) 专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理

有限责任公司 11204

专利代理师 王达佐 洪欣

(51) Int.Cl.

C12N 15/867 (2006.01)

C12N 5/10 (2006.01)

C12N 15/12 (2006.01)

A61K 40/32 (2025.01)

A61K 40/42 (2025.01)

A61P 35/00 (2006.01)

权利要求书8页 说明书30页

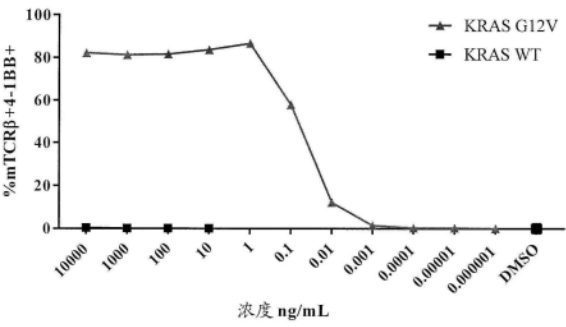
序列表(电子公布) 附图10页

(54) 发明名称

针对突变的RAS的HLA II类限制性T细胞受体

(57) 摘要

公开了分离或纯化的T细胞受体(TCR),其中该TCR对人类白细胞抗原(HLA)II类分子呈递的突变的Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(KRAS)具有抗原特异性。还提供了相关多肽及蛋白质,以及相关核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群体及药物组合物。还公开了检测哺乳动物中癌症存在的方法及治疗或预防哺乳动物癌症的方法。



1. 制备表达T细胞受体 (TCR) 的细胞或细胞群的方法,所述方法包括:

将重组表达载体导入分离的或纯化的人细胞或者分离的或纯化的人细胞群,其中所述重组表达载体包含编码TCR的核苷酸序列,

其中所述TCR对人类白细胞抗原 (HLA) II类分子呈递的突变的人类RAS氨基酸序列具有抗原特异性,

其中所述突变的人类RAS氨基酸序列是突变的人类Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (KRAS) 的氨基酸序列、突变的人类Harvey大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (HRAS) 的氨基酸序列、或突变的人类神经母细胞瘤大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (NRAS) 的氨基酸序列,以及

其中所述TCR包含:

(a) SEQ ID NO:1的 α 链互补决定区 (CDR) 1氨基酸序列、SEQ ID NO:2的 α 链CDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:3的 α 链CDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:4的 β 链CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:5的 β 链CDR2氨基酸序列以及SEQ ID NO:6的 β 链CDR3氨基酸序列;或者

(b) SEQ ID NO:7的 α 链CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:8的 α 链CDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:9的 α 链CDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:10的 β 链CDR1的氨基酸序列、SEQ ID NO:11的 β 链CDR2氨基酸序列以及SEQ ID NO:12的 β 链CDR3氨基酸序列。

2. 如权利要求1所述的方法,其中所述HLA II类分子是HLA-DR分子。

3. 如权利要求1所述的方法,其中所述HLA II类分子是HLA-DRB1分子。

4. 如权利要求1所述的方法,其中所述HLA II类分子是HLA-DRB1*07:01分子或HLA-DRB1*11:01分子。

5. 如权利要求1所述的方法,其中所述突变的人类RAS氨基酸序列包括取代位置12处甘氨酸的野生型人类KRAS、野生型人类HRAS或野生型人类NRAS氨基酸序列,其中位置12是通过分别参照所述野生型人类KRAS、野生型人类HRAS或野生型人类NRAS蛋白来限定的。

6. 如权利要求5所述的方法,其中所述取代是使用缬氨酸或半胱氨酸取代位置12处的甘氨酸。

7. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述TCR包括:

(i) SEQ ID NO:13的氨基酸序列;

(ii) SEQ ID NO:14的氨基酸序列;

(iii) SEQ ID NO:15的氨基酸序列;

(iv) SEQ ID NO:16的氨基酸序列;或者

(v) (i) 和 (ii) 两者;或者 (iii) 和 (iv) 两者。

8. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述TCR还包括:

(a) α 链恒定区,其包括SEQ ID NO:30的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:30的位置48处的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:30的位置112处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:30的位置114处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;及

(iv) SEQ ID NO:30的位置115处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) β 链恒定区,其包括SEQ ID NO:31的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:31的位置57处的X是Ser或Cys;或

(c) (a) 和 (b) 二者。

9. 如权利要求1至6中任一项所述的方法,其中所述TCR包括:

(a) α 链,所述 α 链包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:34的位置179处的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:34的位置243处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:34的位置245处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及

(iv) SEQ ID NO:34的位置246处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) β 链,所述 β 链包括SEQ ID NO:35的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:35的位置189处的X是Ser或Cys;

(c) α 链,所述 α 链包括SEQ ID NO:36的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:36的位置180处的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:36的位置244处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:36的位置246处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及

(iv) SEQ ID NO:36的位置247处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(d) β 链,所述 β 链包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:37的位置194处的X是Ser或Cys;或者

(e) (a) 和 (b) 两者;或者 (c) 和 (d) 两者。

10. 制备表达多肽的细胞或细胞群的方法,所述方法包括:

将重组表达载体导入分离的或纯化的人细胞或者分离的或纯化的人细胞群,其中所述重组表达载体包含编码包含T细胞受体 (TCR) 的功能部分的多肽的核苷酸序列,

其中所述功能部分对人类白细胞抗原 (HLA) II类分子呈递的突变的人类RAS氨基酸序列具有抗原特异性,

其中所述突变的人类RAS氨基酸序列是突变的人类Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (KRAS) 的氨基酸序列、突变的人类Harvey大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (HRAS) 的氨基酸序列、或突变的人类神经母细胞瘤大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (NRAS) 的氨基酸序列,以及

其中所述功能部分包含:

(a) TCR α 链序列和TCR β 链序列,所述TCR α 链序列包含SEQ ID NO:1的TCR α 链互补决定区 (CDR) 1氨基酸序列、SEQ ID NO:2的TCR α 链CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:3的TCR α 链CDR3氨基酸序列;所述TCR β 链序列包含SEQ ID NO:4的TCR β 链CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:5的TCR β 链CDR2氨基酸序列以及SEQ ID NO:6的TCR β 链CDR3氨基酸序列;或者

(b) TCR α 链序列和TCR β 链序列,所述TCR α 链序列包含SEQ ID NO:7的TCR α 链CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:8的TCR α 链CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:9的TCR α 链CDR3氨基酸序列;所述TCR β 链序列包含SEQ ID NO:10的TCR β 链CDR1的氨基酸序列、SEQ ID NO:11的TCR β 链CDR2氨基酸序列以及SEQ ID NO:12的TCR β 链CDR3氨基酸序列。

11. 如权利要求10所述的方法,其中所述功能部分包括:

(i) SEQ ID NO:13的氨基酸序列;

(ii) SEQ ID NO:14的氨基酸序列;

(iii) SEQ ID NO:15的氨基酸序列;

(iv) SEQ ID NO:16的氨基酸序列;或者

(v) (i) 和 (ii) 两者;或者 (iii) 和 (iv) 两者。

12. 如权利要求11所述的方法,其中所述功能部分还包括:

(a) SEQ ID NO:30的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:30的位置48处的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:30的位置112处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:30的位置114处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及

(iv) SEQ ID NO:30的位置115处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) SEQ ID NO:31的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:31的位置57处的X是Ser或Cys;或者

(c) (a) 和 (b) 两者。

13. 如权利要求11所述的方法,其中所述多肽包括:

(a) SEQ ID NO:34的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:34的位置179处的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:34的位置243处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:34的位置245处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;及

(iv) SEQ ID NO:34的位置246处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) SEQ ID NO:35的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:35的位置189处的X是Ser或Cys;

(c) SEQ ID NO:36的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:36的位置180处的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:36的位置244处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:36的位置246处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;及

(iv) SEQ ID NO:36的位置247处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(d) SEQ ID NO:37的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:37的位置194处的X是Ser或Cys;或者

(e) (a) 和 (b) 两者;或者 (c) 和 (d) 两者。

14. 制备表达蛋白的细胞或细胞群的方法,所述方法包括:

将重组表达载体导入分离的或纯化的人细胞或者分离的或纯化的人细胞群,其中所述重组表达载体包含编码蛋白的核苷酸序列,

其中所述蛋白对人类白细胞抗原 (HLA) II类分子呈递的突变的人类RAS氨基酸序列具有抗原特异性,

其中所述突变的人类RAS氨基酸序列是突变的人类Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (KRAS) 的氨基酸序列、突变的人类Harvey大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (HRAS) 的氨基酸序列、或突变的人类神经母细胞瘤大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (NRAS) 的氨基酸序列,以及

其中所述蛋白包含:

(a) TCR α 链和TCR β 链,所述TCR α 链包含SEQ ID NO:1的TCR α 链互补决定区 (CDR) 1氨基酸序列、SEQ ID NO:2的TCR α 链CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:3的TCR α 链CDR3氨基酸序列;所述TCR β 链包含SEQ ID NO:4的TCR β 链CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:5的TCR β 链CDR2氨基酸序列以及SEQ ID NO:6的TCR β 链CDR3氨基酸序列;或者

(b) TCR α 链和TCR β 链,所述TCR α 链包含SEQ ID NO:7的TCR α 链CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:8的TCR α 链CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:9的TCR α 链CDR3氨基酸序列;所述TCR β 链包含SEQ ID NO:10的TCR β 链CDR1的氨基酸序列、SEQ ID NO:11的TCR β 链CDR2氨基酸序列以及SEQ ID NO:12的TCR β 链CDR3氨基酸序列。

15. 如权利要求14所述的方法, 其中:

(i) 所述TCR α 链包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列, 以及所述TCR β 链包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列; 或者

(ii) 所述TCR α 链序列包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列, 以及所述TCR β 链包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

16. 如权利要求14所述的方法, 其中:

(a) 所述TCR α 链还包括SEQ ID NO:30的氨基酸序列, 其中:

(i) SEQ ID NO:30的位置48处的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:30的位置112处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:30的位置114处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 及

(iv) SEQ ID NO:30的位置115处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) 所述TCR β 链还包括SEQ ID NO:31的氨基酸序列, 其中SEQ ID NO:31的位置57处的X是Ser或Cys; 或者

(c) (a) 和 (b) 二者。

17. 如权利要求14所述的方法, 其中:

(a) 所述TCR α 链包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列, 其中:

(i) SEQ ID NO:34的位置179处的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:34的位置243处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:34的位置245处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 及

(iv) SEQ ID NO:34的位置246处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) 所述TCR β 链包括SEQ ID NO:35的氨基酸序列, 其中SEQ ID NO:35的位置189处的X是Ser或Cys;

(c) 所述TCR α 链包括SEQ ID NO:36的氨基酸序列, 其中:

(i) SEQ ID NO:36的位置180处的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:36的位置244处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:36的位置246处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 及

(iv) SEQ ID NO:36的位置247处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(d) 所述TCR β 链包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列, 其中SEQ ID NO:37的位置194处的X是Ser或Cys; 或者

(e) (a) 和 (b) 两者; 或者 (c) 和 (d) 两者。

18. 以下在制备用于在哺乳动物中诱导对癌症的免疫反应的药物中的用途:

(i) T细胞受体 (TCR),

(ii) 包含编码所述TCR的核苷酸序列的核酸,

(iii) 包含所述核酸的重组表达载体,

(iv) 包含所述重组表达载体的宿主细胞, 或者

(v) 包含所述宿主细胞的细胞群,

其中所述TCR对人类白细胞抗原 (HLA) II类分子呈递的突变的人类RAS氨基酸序列具有抗原特异性,

其中所述突变的人类RAS氨基酸序列是突变的人类Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源

物 (KRAS) 的氨基酸序列、突变的人类Harvey大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (HRAS) 的氨基酸序列、或突变的人类神经母细胞瘤大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (NRAS) 的氨基酸序列,以及其中所述TCR包含:

(a) SEQ ID NO:1的 α 链互补决定区 (CDR) 1氨基酸序列、SEQ ID NO:2的 α 链CDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:3的 α 链CDR3氨基酸序列、SEQ ID NO:4的 β 链CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:5的 β 链CDR2氨基酸序列以及SEQ ID NO:6的 β 链CDR3氨基酸序列;或者

(b) SEQ ID NO:7的 α 链CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:8的 α 链CDR2氨基酸序列、SEQ ID NO:9的 α 链CDR3氨基酸序列,SEQ ID NO:10的 β 链CDR1的氨基酸序列、SEQ ID NO:11的 β 链CDR2氨基酸序列以及SEQ ID NO:12的 β 链CDR3氨基酸序列。

19. 如权利要求18所述的用途,其中所述HLAII类分子是HLA-DR分子。

20. 如权利要求18所述的用途,其中所述HLA II类分子是HLA-DRB1分子。

21. 如权利要求18所述的用途,其中所述HLA II类分子是HLA-DRB1*07:01分子或HLA-DRB1*11:01分子。

22. 如权利要求18所述的方法,其中所述突变的人类RAS氨基酸序列包括取代位置12处甘氨酸的野生型人类KRAS、野生型人类HRAS或野生型人类NRAS氨基酸序列,其中位置12是通过分别参照所述野生型人类KRAS、野生型人类HRAS或野生型人类NRAS蛋白来限定的。

23. 如权利要求22所述的用途,其中所述取代是使用缬氨酸或半胱氨酸取代位置12处的甘氨酸。

24. 如权利要求18至23中任一项所述的用途,其中所述TCR包括:

(i) SEQ ID NO:13的氨基酸序列;

(ii) SEQ ID NO:14的氨基酸序列;

(iii) SEQ ID NO:15的氨基酸序列;

(iv) SEQ ID NO:16的氨基酸序列;或者

(v) (i) 和 (ii) 两者;或者 (iii) 和 (iv) 两者。

25. 如权利要求18至23中任一项所述的用途,其中所述TCR还包括:

(a) α 链恒定区,其包括SEQ ID NO:30的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:30的位置48处的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:30的位置112处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:30的位置114处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;及

(iv) SEQ ID NO:30的位置115处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) β 链恒定区,其包括SEQ ID NO:31的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:31的位置57处的X是Ser或Cys;或

(c) (a) 和 (b) 二者。

26. 如权利要求18至23中任一项所述的用途,其中所述TCR包括:

(a) α 链,所述 α 链包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:34的位置179处的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:34的位置243处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:34的位置245处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及

(iv) SEQ ID NO:34的位置246处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) β 链,所述 β 链包括SEQ ID NO:35的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:35的位置189处的X是Ser或Cys;

(c) α 链,所述 α 链包括SEQ ID NO:36的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:36的位置180处的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:36的位置244处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:36的位置246处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及

(iv) SEQ ID NO:36的位置247处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(d) β 链,所述 β 链包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:37的位置194处的X是Ser或Cys;或者

(e) (a) 和 (b) 两者;或者 (c) 和 (d) 两者。

27. 以下在制备用于在哺乳动物中诱导对癌症的免疫反应的药物中的用途:

(i) 包含T细胞受体 (TCR) 的功能部分的多肽,

(ii) 包含编码所述多肽的核苷酸序列的核酸,

(iii) 包含所述核酸的重组表达载体,

(iv) 包含所述重组表达载体的宿主细胞,或者

(v) 包含所述宿主细胞的细胞群,

其中所述功能部分对人类白细胞抗原 (HLA) II类分子呈递的突变的人类RAS氨基酸序列具有抗原特异性,

其中所述突变的人类RAS氨基酸序列是突变的人类Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (KRAS) 的氨基酸序列、突变的人类Harvey大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (HRAS) 的氨基酸序列、或突变的人类神经母细胞瘤大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (NRAS) 的氨基酸序列,以及

其中所述功能部分包含:

(a) TCR α 链序列和TCR β 链序列,所述TCR α 链序列包含SEQ ID NO:1的TCR α 链互补决定区 (CDR) 1氨基酸序列、SEQ ID NO:2的TCR α 链CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:3的TCR α 链CDR3氨基酸序列;所述TCR β 链序列包含SEQ ID NO:4的TCR β 链CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:5的TCR β 链CDR2氨基酸序列以及SEQ ID NO:6的TCR β 链CDR3氨基酸序列;或者

(b) TCR α 链序列和TCR β 链序列,所述TCR α 链序列包含SEQ ID NO:7的TCR α 链CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:8的TCR α 链CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:9的TCR α 链CDR3氨基酸序列;所述TCR β 链序列包含SEQ ID NO:10的TCR β 链CDR1的氨基酸序列、SEQ ID NO:11的TCR β 链CDR2氨基酸序列以及SEQ ID NO:12的TCR β 链CDR3氨基酸序列。

28. 如权利要求27所述的用途,其中所述功能部分包括:

(i) SEQ ID NO:13的氨基酸序列;

(ii) SEQ ID NO:14的氨基酸序列;

(iii) SEQ ID NO:15的氨基酸序列;

(iv) SEQ ID NO:16的氨基酸序列;或者

(v) (i) 和 (ii) 两者;或者 (iii) 和 (iv) 两者。

29. 如权利要求27所述的用途,其中所述功能部分还包括:

(a) SEQ ID NO:30的氨基酸序列,其中:

(i) SEQ ID NO:30的位置48处的X是Thr或Cys;

- (ii) SEQ ID NO:30的位置112处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (iii) SEQ ID NO:30的位置114处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;以及
- (iv) SEQ ID NO:30的位置115处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (b) SEQ ID NO:31的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:31的位置57处的X是Ser或Cys;或者
- (c) (a) 和 (b) 两者。

30. 如权利要求28所述的用途,其中所述多肽包括:

- (a) SEQ ID NO:34的氨基酸序列,其中:
 - (i) SEQ ID NO:34的位置179处的X是Thr或Cys;
 - (ii) SEQ ID NO:34的位置243处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
 - (iii) SEQ ID NO:34的位置245处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;及
 - (iv) SEQ ID NO:34的位置246处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (b) SEQ ID NO:35的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:35的位置189处的X是Ser或Cys;
- (c) SEQ ID NO:36的氨基酸序列,其中:
 - (i) SEQ ID NO:36的位置180处的X是Thr或Cys;
 - (ii) SEQ ID NO:36的位置244处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
 - (iii) SEQ ID NO:36的位置246处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;及
 - (iv) SEQ ID NO:36的位置247处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;
- (d) SEQ ID NO:37的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:37的位置194处的X是Ser或Cys;或者
- (e) (a) 和 (b) 两者;或者 (c) 和 (d) 两者。

31. 以下在制备用于在哺乳动物中诱导对癌症的免疫反应的药物中的用途:

- (i) 蛋白,
- (ii) 包含编码所述蛋白的核苷酸序列的核酸,
- (iii) 包含所述核酸的重组表达载体,
- (iv) 包含所述重组表达载体的宿主细胞,或者
- (v) 包含所述宿主细胞的细胞群,

其中所述蛋白对人类白细胞抗原 (HLA) II类分子呈递的突变的人类RAS氨基酸序列具有抗原特异性,

其中所述突变的人类RAS氨基酸序列是突变的人类Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (KRAS) 的氨基酸序列、突变的人类Harvey大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (HRAS) 的氨基酸序列、或突变的人类神经母细胞瘤大鼠肉瘤病毒癌基因同源物 (NRAS) 的氨基酸序列,以及

其中所述蛋白包含:

(a) TCR α 链和TCR β 链,所述TCR α 链包含SEQ ID NO:1的TCR α 链互补决定区 (CDR) 1氨基酸序列、SEQ ID NO:2的TCR α 链CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:3的TCR α 链CDR3氨基酸序列;所述TCR β 链包含SEQ ID NO:4的TCR β 链CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:5的TCR β 链CDR2氨基酸序列以及SEQ ID NO:6的TCR β 链CDR3氨基酸序列;或者

(b) TCR α 链和TCR β 链,所述TCR α 链包含SEQ ID NO:7的TCR α 链CDR1氨基酸序列、SEQ ID NO:8的TCR α 链CDR2氨基酸序列和SEQ ID NO:9的TCR α 链CDR3氨基酸序列;所述TCR β 链包含SEQ ID NO:10的TCR β 链CDR1的氨基酸序列、SEQ ID NO:11的TCR β 链CDR2氨基酸序列以及SEQ ID NO:12的TCR β 链CDR3氨基酸序列。

32. 如权利要求31所述的用途, 其中:

(i) 所述TCR α 链包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列, 以及所述TCR β 链包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列; 或者

(ii) 所述TCR α 链序列包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列, 以及所述TCR β 链包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

33. 如权利要求31所述的用途, 其中:

(a) 所述TCR α 链还包括SEQ ID NO:30的氨基酸序列, 其中:

(i) SEQ ID NO:30的位置48处的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:30的位置112处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:30的位置114处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 及

(iv) SEQ ID NO:30的位置115处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) 所述TCR β 链还包括SEQ ID NO:31的氨基酸序列, 其中SEQ ID NO:31的位置57处的X是Ser或Cys; 或者

(c) (a) 和 (b) 二者。

34. 如权利要求31所述的用途, 其中:

(a) 所述TCR α 链包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列, 其中:

(i) SEQ ID NO:34的位置179处的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:34的位置243处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:34的位置245处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 及

(iv) SEQ ID NO:34的位置246处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(b) 所述TCR β 链包括SEQ ID NO:35的氨基酸序列, 其中SEQ ID NO:35的位置189处的X是Ser或Cys;

(c) 所述TCR α 链包括SEQ ID NO:36的氨基酸序列, 其中:

(i) SEQ ID NO:36的位置180处的X是Thr或Cys;

(ii) SEQ ID NO:36的位置244处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(iii) SEQ ID NO:36的位置246处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 及

(iv) SEQ ID NO:36的位置247处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;

(d) 所述TCR β 链包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列, 其中SEQ ID NO:37的位置194处的X是Ser或Cys; 或者

(e) (a) 和 (b) 两者; 或者 (c) 和 (d) 两者。

35. 如权利要求18-34中任一项所述的用途, 其中所述突变的人类RAS氨基酸序列包括取代位置12处甘氨酸的野生型人类KRAS、野生型人类HRAS或野生型人类NRAS氨基酸序列, 其中位置12是通过分别参照所述野生型人类KRAS、野生型人类HRAS或野生型人类NRAS氨基酸序列来限定的。

36. 如权利要求35所述的用途, 其中所述取代是使用缬氨酸或半胱氨酸取代位置12处的甘氨酸。

37. 如权利要求18-36中任一项所述的用途, 其中所述癌症是胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌或前列腺癌。

针对突变的RAS的HLA II类限制性T细胞受体

[0001] 本申请是第201880060535.4号中国专利申请的分案申请,第201880060535.4号中国专利申请的申请日为2018年9月19日,其全部内容并入本文。

[0002] 相关申请的交叉引用

[0003] 本专利申请要求2017年9月20日提交的美国临时专利申请第62/560,930号的权益,该美国临时专利申请在本文中通过引用以其整体并入。

[0004] 关于联邦政府资助的研究或开发的声明

[0005] 本发明是在政府支持下由国立卫生研究院(National Institutes of Health)的国家癌症研究院(National Cancer Institute)以项目号BC010984作出。该政府享有本发明的某些权利。

[0006] 以电子方式提交的材料通过引用并入

[0007] 通过引用整体并入本文的是随本文同时提交的并且如下确定的计算机可读的核苷酸/氨基酸序列表:名称为“739664_ST25.txt”,日期为2018年9月5日的一份59,753字节ASCII(文本)文件。

[0008] 发明背景

[0009] 一些癌症可具有极有限之治疗选择,尤其在癌症变为转移性及不可切除性时。尽管诸如手术、化学疗法及辐射疗法等治疗已获进展,但许多癌症(例如胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌及前列腺癌)的预后可能较差。因此,存在对癌症的其它治疗的未满足需求。

[0010] 发明简述

[0011] 本发明的实施方案提供了分离或纯化的T细胞受体(TCR),其中该TCR对由人类白细胞抗原(HLA) II类分子呈递的突变的人类Ras氨基酸序列具有抗原特异性,其中突变的人类RAS氨基酸序列是突变的人类Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(KRAS)氨基酸序列、突变的人类Harvey大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(HRAS)氨基酸序列或突变的人类神经母细胞瘤大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(NRAS)氨基酸序列。

[0012] 本发明的另一实施方案提供了包括本发明TCR的功能部分的分离或纯化的多肽,其中该功能部分包括以下氨基酸序列:(a)全部SEQ ID NO:1-3,(b)全部SEQ ID NO:4-6,(c)全部SEQ ID NO:7-9,(d)全部SEQ ID NO:10-12,(e)全部SEQ ID NO:1-6,或(f)全部SEQ ID NO:7-12。

[0013] 本发明的再一实施方案提供了包括至少一种本发明多肽的分离或纯化的蛋白。

[0014] 本发明的实施方案还提供了与本发明的TCR、多肽及蛋白相关的核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群体及药物组合物。

[0015] 本发明的实施方案还提供了检测哺乳动物中癌症存在的方法及治疗或预防哺乳动物中癌症的方法。

[0016] 附图中几个视图的简要说明

[0017] 图1描绘说明通过流式细胞术检测针对同种型(对照)染色的细胞或针对PD-1和/或OX40表达染色的细胞的实验数据(点图)。直方图中的数值代表表达PD-1的细胞的百分

比。

[0018] 图2是展示干扰素 γ (IFN γ) 阳性斑点数/孔的图形,其是在将效应自体T细胞的汇集培养物(培养物编号W1-W16)与用指示的25-mer肽的池(PP)或由涵盖各种肿瘤特异性突变的25-mer串联小基因(TMG)所编码的肽的池脉冲的靶DC共培养时所检测的。单独培养的、与二甲基亚砜(DMSO)或OKT3抗体一起培养的自体T细胞用作对照。加框符号(▼)指示分离TCR的汇集培养物(7及8)。

[0019] 图3是展示IFN γ 阳性斑点数/ 2×10^4 (2E4) 个细胞的图形,其是在将培养物编号7(W7)的自体T细胞与用来自肽池1(PP1)的肽1-17(P1-P17)中的每一种脉冲的自体DC共培养时所检测的。与二甲基亚砜(DMSO)或OKT3抗体一起培养的自体T细胞用作对照。

[0020] 图4是展示在HLA-封闭抗体W6/32(抗HLA-A、-B、-C)、IVA12(泛特异性,抗HLA II类)、B7/21(抗HLA-DP)、HB55(抗HLA-DR)或SPV-L3(HLA-DQ)(靶细胞)存在下与用KRAS G12V肽(1ng/mL)脉冲的靶自体APC共培养后,经实施例2中表达4-1BB的TCR转导的效应T细胞的百分比的图形。单独培养的、与DMSO或佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯(PMA)一起培养的效应转导细胞用作对照。经与靶自体APC(用1ng/mL KRAS G12V肽脉冲的)一起共培养的空载体(模拟)转导的效应细胞用作再一对照。

[0021] 图5是展示以下结果的图形:(i)通过ELISPOT测量的IFN- γ 数/ 2×10^4 个细胞;及(ii)通过流式细胞术测量的mTCR β +CD8+4-1BB+细胞的百分比,其皆是在将经实施例2的TCR转导的T细胞与自体APC(4148MB)或来自具有DRB101:01或DRB107:01单倍型的供体且用KRAS^{G12V}肽或WT KRAS肽脉冲的APC共培养时所测量的。将效应细胞与来自HLA-DRB1阳性供体(“DRB错配”)的APC(作为对照)共培养。单独培养的、与DMSO或佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯-离子霉素(PMA:Iono)一起培养的效应细胞用作其他对照。

[0022] 图6是展示以下结果的图形:(i)通过ELISPOT测量的IFN- γ 数/ 2×10^4 个细胞(影线条);及(ii)通过流式细胞术测量的表达4-1BB和/或OX40的细胞的百分比(黑条),其皆是在将经实施例2的TCR转导的T细胞与用表达下列KRAS G12突变之一的肿瘤细胞系的细胞裂解物脉冲的自体DC共培养时所测量的:G12R、G12C、G12D或G12V。与用表达WT KRAS的肿瘤细胞系的细胞裂解物脉冲的自体DC共培养的转导细胞用作对照。单独培养或与PMA或DMSO一起培养的转导细胞用作其他对照。

[0023] 图7是展示通过流式细胞术测量的mTCR β +CD8+4-1BB+细胞的百分比的图形,其是在将经实施例2的TCR转导的T细胞与用指示浓度的KRAS^{G12V}肽(三角形)或WT KRAS肽(正方形)脉冲的自体DC过夜共培养时所测量的。

[0024] 图8是展示通过ELISPOT所测量的IFN- γ 数/ 2×10^4 个细胞的图形,其是在将经实施例2的TCR转导的T细胞与用指示浓度的表9中的肽脉冲的自体DC共培养时所测量的。

[0025] 图9描绘说明表达鼠类TCR β 链及4-1BB的细胞的百分比的实验数据(点图),其是在将经编码KRAS^{G12C} TCR的MSGV-1-逆转录病毒转导的细胞与DMSO(对照)或在指示浓度下加载指示WT KRAS或KRAS^{G12C}肽的DC共培养时所测定。点图指示以下细胞的百分比:mTCR β + /4-1BB- (左上象限(Q1)); mTCR β + /4-1BB+ (右上象限(Q2)); mTCR β - /4-1BB+ (右下象限(Q3)); mTCR β - /4-1BB- (左下象限(Q4)),且展示如下(括号中的百分比):DMSO:Q1(71.0), Q2(0.96), Q3(0.20), Q4(27.9)。WT 10 μ g/ml:Q1(64.5), Q2(4.27), Q3(0.43), Q4(30.8)。WT 1 μ g/ml:Q1(70.6), Q2(1.13), Q3(0.20), Q4(28.1)。G12C 10 μ g/ml:Q1(13.6), Q2(51.7), Q3

(1.61), Q4(33.0)。G12C 1 μ g/ml:Q1(19.7), Q2(46.9), Q3(1.67), Q4(31.7)。

[0026] 图10是展示表达CD3及4-1BB的细胞的百分比的图形,其是在使用针对HLA-DQ、DR、DP的抗体或针对全部HLA-DQ、DR及DP的抗体阻断膜MHC-II分子后将经KRAS^{G12C} TCR转导的T细胞与匹配于单一HLA-DRB15:01或HLA-DRB11:01等位基因且用KRAS^{G12C} 24-mer肽脉冲的自体DC或同种异体DC共培养后测定。用WT KRAS肽脉冲的DC共培养的转导细胞用作对照。与PMA/ion共培养的转导细胞用作另一对照。

[0027] 发明详述

[0028] RAS家族蛋白属于小GTPase的大家族。不受限于特定理论或机制,认为,在突变时,RAS蛋白可参与许多人类癌症的肿瘤形成早期的信号转导。单个氨基酸取代可活化蛋白质。突变的RAS蛋白产物可组成型活化。突变的RAS蛋白可表达于各种人类癌症(例如胰腺癌(pancreatic cancer)(例如胰腺癌(pancreatic carcinoma))、结肠直肠癌、肺癌(例如肺腺癌)、子宫内膜癌、卵巢癌(例如上皮卵巢癌)及前列腺癌)中的任一种中。人类RAS家族蛋白包括Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(KRAS)、Harvey大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(HRAS)及神经母细胞瘤大鼠肉瘤病毒癌基因同源物(NRAS)。

[0029] KRAS亦称为GTPase KRas、V-Ki-Ras2 Kirsten大鼠肉瘤病毒癌基因或KRAS2。存在KRAS的两种转录物变体:KRAS变体A及KRAS变体B。野生型(WT)KRAS变体A具有SEQ ID NO:17的氨基酸序列。野生型(WT)KRAS变体B具有SEQ ID NO:18的氨基酸序列。在下文中,除非另外指定,否则提及“KRAS”(突变或未突变的(WT))是指变体A及变体B。在活化时,突变的KRAS结合鸟苷-5'-三磷酸(GTP)且将GTP转化成鸟苷-5'-二磷酸(GDP)。

[0030] HRAS是RAS蛋白家族的另一成员。HRAS亦称为Harvey大鼠肉瘤病毒癌蛋白、V-Ha-Ras Harvey大鼠肉瘤病毒癌基因同源物或Ras家族小GTP结合蛋白H-Ras。WT HRAS具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列。

[0031] NRAS是RAS蛋白家族的再一成员。NRAS亦称为GTPase NRas、V-Ras神经母细胞瘤RAS病毒癌基因同源物或NRAS1。WT NRAS具有SEQ ID NO:20的氨基酸序列。

[0032] 本发明的实施方案提供了分离或纯化的TCR,其对由人类白细胞抗原(HLA)II类分子呈递的突变的人类RAS氨基酸序列(下文的“突变的RAS”)具有抗原特异性,其中突变的人类RAS氨基酸序列是突变的人类KRAS、突变的人类HRAS或突变的人类NRAS氨基酸序列。在下文中,除非另外指定,否则所提及的“TCR”亦是指TCR的功能部分及功能变体。

[0033] 本发明的TCR可对任何突变的人类RAS蛋白、多肽或肽氨基酸序列具有抗原特异性。在本发明的实施方案中,突变的人类RAS氨基酸序列是突变的人类KRAS氨基酸序列、突变的人类HRAS氨基酸序列或突变的人类NRAS氨基酸序列。WT人类KRAS、NRAS及HRAS蛋白的氨基酸序列各自具有188-189个氨基酸残基的长度且彼此具有高度同一性。例如,WT人类NRAS蛋白的氨基酸序列与WT人类KRAS蛋白是86.8%相同的。WT人类NRAS蛋白与WT人类KRAS蛋白的氨基酸残基1-86是100%相同的。WT人类HRAS蛋白的氨基酸序列与WT人类KRAS蛋白是86.3%相同的。WT人类HRAS蛋白与WT人类KRAS蛋白的氨基酸残基1-94是100%相同的。在下文中,除非另外指定,否则所提及的“RAS”(突变或未突变的(WT))统称为KRAS、HRAS及NRAS。

[0034] 在本发明的实施方案中,突变的人类RAS氨基酸序列包括在位置12处的甘氨酸被取代的WT RAS氨基酸序列,其中分别通过参照WT RAS蛋白来限定位置12。WT RAS蛋白可为

WT KRAS蛋白 (SEQ ID NO:17或18)、WT HRAS蛋白 (SEQ ID NO:19) 或WT NRAS蛋白 (SEQ ID NO:20) 中的任一种,这是因为如上文所阐释的,WT人类NRAS蛋白及WT人类KRAS蛋白的氨基酸残基1-86是100%相同的,且WT人类HRAS蛋白及WT人类KRAS蛋白的氨基酸残基1-94是100%相同的。因此,WT KRAS、WT HRAS及WT NRAS蛋白中每一种的位置12处的氨基酸残基是相同的,也就是甘氨酸。

[0035] WT RAS氨基酸序列的位置12处的甘氨酸可用除甘氨酸外的任意氨基酸残基取代。在本发明的实施方案中,该取代是使用缬氨酸或半胱氨酸取代WT RAS氨基酸序列的位置12处的甘氨酸。就此而言,本发明的实施方案提供对具有G12V突变或G12C突变的任何WT RAS蛋白、多肽或肽氨基酸序列具有抗原特异性的TCR。

[0036] 在本文中,通过参照WT RAS蛋白的氨基酸序列来限定RAS的突变及取代。因此,在本文中,通过参照存在于WT RAS蛋白中特定位置的氨基酸残基、随后是位置编号、随后是以所论述特定突变或取代代替该残基的氨基酸残基来描述RAS的突变及取代。RAS氨基酸序列(例如RAS肽)可包括少于全长WT RAS蛋白的所有氨基酸残基的氨基酸残基。因此,在本文中,通过参照WT全长RAS蛋白(亦即SEQ ID NO:17-20中的任一个)来限定位置12,且应理解,相应残基在RAS氨基酸序列的特定实例中的实际位置可有所不同。在位置是如通过SEQ ID NO:17-20中任一个所限定时,术语“G12”是指通常存在于SEQ ID NO:17-20中任一个的位置12处的甘氨酸,且“G12V”指示,通常存在于SEQ ID NO:17-20中任一个的位置12处的甘氨酸由缬氨酸代替。例如,在RAS氨基酸序列的特定实例是(例如)TEYKLVVVGAGGVGKSALTIQLI (SEQ ID NO:29)(对应于SEQ ID NO:17的连续氨基酸残基2至24的示例性WT KRAS肽)时,“G12V”是指SEQ ID NO:29中加下划线的甘氨酸被缬氨酸取代,即使SEQ ID NO:29中加下划线的甘氨酸的实际位置为11。

[0037] 具有G12V或G12C突变的全长RAS蛋白的实例示于下表1中。

[0038] 表1

[0039]

突变的全长RAS蛋白	SEQIDNO:
G12VKRAS变体A	21
G12VKRAS变体B	22
G12VHRAS	23
G12VNRAS	24
G12CKRAS变体A	25
G12CKRAS变体B	26
G12CHRAS	27
G12CNRAS	28

[0040] 在本发明的实施方案中,TCR对具有上述G12V突变或G12C突变的RAS肽具有抗原特异性,其中突变的RAS肽具有任何长度。在本发明的实施方案中,突变的RAS肽具有适于结合本文所述的任何HLA II类分子的任何长度。例如,TCR可对具有G12V突变或G12C突变的RAS肽具有抗原特异性,该RAS肽具有约11至约30个氨基酸残基、约12至约24个氨基酸残基或约18至约20个氨基酸残基的长度。突变的RAS肽可包括包含G12V或G12C突变的突变的RAS蛋白的任何连续氨基酸残基。在本发明的实施方案中,TCR可对具有G12V突变或G12C突变的RAS肽具有抗原特异性,该突变的RAS肽具有以下长度:约30个氨基酸残基、约29个氨基酸残基、

约28个氨基酸残基、约27个氨基酸残基、约26个氨基酸残基、约25个氨基酸残基、约24个氨基酸残基、约23个氨基酸残基、约22个氨基酸残基、约21个氨基酸残基、约20个氨基酸残基、约19个氨基酸残基、约18个氨基酸残基、约17个氨基酸残基、约16个氨基酸残基、约15个氨基酸残基、约14个氨基酸残基、约13个氨基酸残基、约12个氨基酸残基、约11个氨基酸残基或前述值中任何两个的范围。可由本发明的G12V TCR识别的各自具有G12V突变的具体肽的实例示于表9中。

[0041] 在本发明的实施方案中,本发明的TCR能够识别由HLA II类分子呈递的突变的RAS。就此而言,TCR可在结合HLA II类分子背景内的突变的RAS时引发免疫应答。本发明的TCR能够识别由HLA II类分子呈递的突变的RAS且除突变的RAS外还可结合HLA II类分子。

[0042] 在本发明的实施方案中,HLA II类分子是HLA-DR分子。HLA-DR分子是 α 链及 β 链的异二聚体。HLA-DR α 链可由HLA-DRA基因编码。HLA-DR β 链可由HLA-DRB1基因、HLA-DRB3基因、HLA-DRB4基因或HLA-DRB5基因编码。HLA-DR分子可为任何HLA-DR分子。HLA-DR分子的实例可包括但不限于:HLA-DR1、HLA-DR2、HLA-DR3、HLA-DR4、HLA-DR5、HLA-DR6、HLA-DR7、HLA-DR8、HLA-DR9、HLA-DR10、HLA-DR11、HLA-DR12、HLA-DR13、HLA-DR14、HLA-DR15及HLA-DR16。优选地,HLA-DR分子是HLA-DR7或HLA-DR11。

[0043] 在本发明的实施方案中,HLA II类分子是HLA-DRB1分子。HLA-DRB1分子可为任何HLA-DRB1分子。HLA-DRB1分子的实例可包括但不限于:HLA-DRB1*01:01、HLA-DRB1*01:02、HLA-DRB1*01:03、HLA-DRB1*03:01、HLA-DRB1*04:01、HLA-DRB1*04:02、HLA-DRB1*04:03、HLA-DRB1*04:04、HLA-DRB1*04:05、HLA-DRB1*04:07、HLA-DRB1*07:01、HLA-DRB1*08:01、HLA-DRB1*08:03、HLA-DRB1*09:01、HLA-DRB1*10:01、HLA-DRB1*11:01、HLA-DRB1*11:03、HLA-DRB1*11:04、HLA-DRB1*12:01、HLA-DRB1*13:01、HLA-DRB1*13:02、HLA-DRB1*13:03、HLA-DRB1*14:01、HLA-DRB1*15:01、HLA-DRB1*15:02及HLA-DRB1*16:01。优选地,HLA II类分子是HLA-DRB1*07:01分子或HLA-DRB1*11:01分子。

[0044] 本发明的TCR可提供诸多优点中的任何一种或多种,包含在由细胞表达时用于过继性细胞转移。突变的RAS由癌细胞表达且并不由正常、非癌性细胞表达。不受限于特定理论或机制,认为,本发明的TCR有利地靶向癌细胞的破坏,同时最小化或消除正常、非癌性细胞的破坏,由此减小毒性(例如最小化或消除)。此外,本发明的TCR可有利地、成功地治疗或预防对其他类型治疗(例如化学疗法、手术或辐射)无反应的突变的RAS阳性癌症。例如,KRAS G12V突变分别表达于约27%及约8%的胰腺癌及结肠直肠癌患者中,且KRAS G12C突变表达于约15%的肺癌患者中。另外,本发明的TCR可提供对突变的RAS的高度亲合识别,这可提供识别未经处理的肿瘤细胞(例如未用干扰素(IFN)- γ 处理的、未用编码突变的RAS及HLA-DRB1*07:01中之一或两者、突变的RAS及HLA-DRB1*11:01中之一或两者的载体转染的、未用具有G12V突变的RAS肽脉冲的、未用具有G12C突变的RAS肽脉冲的或其组合处理的肿瘤细胞)的能力。此外,在美国,HLA-DRB1*07:01及HLA-DRB1*11:01等位基因分别表达于约25%及约10.5%的高加索种族个体中。因此,本发明的TCR可增加符合免疫疗法条件的癌症患者之数量以包含表达HLA-DRB1*07:01及HLA-DRB1*11:01等位基因之一或两者的患者,其可能不适用于使用识别由其他MHC分子所呈递的RAS的TCR的免疫疗法。

[0045] 本文所用的短语“抗原特异性”意指TCR能够以高亲合力特异性结合且免疫性识别突变的RAS。例如,如果在与(a)用低浓度突变的RAS肽(例如约0.05ng/mL至约10ng/mL、1ng/

mL、2ng/mL、5ng/mL、8ng/mL、10ng/mL或通过前述值中的任两个限定的范围)脉冲的抗原阴性、HLA II类分子阳性靶细胞或(b)已引入编码突变的RAS的核苷酸序列以便靶细胞表达突变的RAS的抗原阴性、HLA II类分子阳性靶细胞一起共培养时,约 1×10^4 至约 1×10^5 个表达TCR的T细胞分泌至少约200pg/mL或更多(例如200pg/mL或更多、300pg/mL或更多、400pg/mL或更多、500pg/mL或更多、600pg/mL或更多、700pg/mL或更多、1000pg/mL或更多、5,000pg/mL或更多、7,000pg/mL或更多、10,000pg/mL或更多、20,000pg/mL或更多或通过前述值中的任两个限定的范围)的IFN- γ ,则TCR可被认为对突变的RAS具有“抗原特异性”。表达本发明TCR的细胞也可在与用较高浓度的突变的RAS肽脉冲的抗原阴性、HLA II类分子阳性靶细胞共培养时分泌IFN- γ 。HLA II类分子可为本文所述的任何HLA II类分子(例如HLA-DRB1*07:01分子或HLA-DRB1*11:01分子)。

[0046] 可选地或另外地,如果在与(a)用低浓度突变的RAS肽脉冲的抗原阴性、HLA II类分子阳性靶细胞或(b)已引入编码突变的RAS的核苷酸序列以便靶细胞表达突变的RAS的抗原阴性、HLA II类分子阳性靶细胞共培养时,表达TCR的T细胞分泌至少两倍于通过阴性对照表达的IFN- γ 量的IFN- γ ,则TCR可被认为对突变的RAS具有“抗原特异性”。阴性对照可为(例如)(i)与以下细胞共培养的表达TCR的T细胞:(a)用相同浓度的不相关肽(例如具有来自突变的RAS肽的不同序列的一些其他肽)脉冲的抗原阴性、HLA II类分子阳性靶细胞,或(b)已引入编码不相关肽的核苷酸序列以便靶细胞表达不相关肽的抗原阴性、HLA II类分子阳性靶细胞;或(ii)与以下细胞共培养的未转导的T细胞(例如衍生自不表达TCR的PBMC):(a)用相同浓度的突变的RAS肽脉冲的抗原阴性、HLA II类分子阳性靶细胞,或(b)已引入编码突变的RAS的核苷酸序列以便靶细胞表达突变的RAS的抗原阴性、HLA II类分子阳性靶细胞。由阴性对照的靶细胞表达的HLA II类分子与由与所测试T细胞共培养的靶细胞表达的HLA II类分子相同。HLA II类分子可为本文所述的任何HLA II类分子(例如HLA-DRB1*07:01分子或HLA-DRB1*11:01分子)。可通过本领域已知的方法(例如酶联免疫吸附分析,ELISA)测量IFN- γ 分泌。

[0047] 可选地或另外地,如果在与(a)用低浓度的突变的RAS肽脉冲的抗原阴性、HLA II类分子阳性靶细胞或(b)已引入编码突变的RAS的核苷酸序以便靶细胞表达突变的RAS的抗原阴性、HLA II类分子阳性靶细胞共培养时,与分泌IFN- γ 的阴性对照T细胞的数量相比,至少两倍数量的表达TCR的T细胞分泌IFN- γ ,则TCR可被认为对突变的RAS具有“抗原特异性”。HLA II类分子、肽浓度及阴性对照可如本文针对本发明的其他方面所述。可通过本领域已知的方法(例如ELISPOT)测量分泌IFN- γ 的细胞的数量。

[0048] 可选地或另外地,如果表达TCR的T细胞上调一种或多种T细胞活化标志物的表达,则TCR可被认为对突变的RAS具有“抗原特异性”,如通过(例如)流式细胞术在使用表达突变的RAS的靶细胞刺激后所测量的。T细胞活化标志物的实例包含4-1BB、OX40、CD107a、CD69及在抗原刺激时上调的细胞因子(例如肿瘤坏死因子(TNF)、白介素(IL)-2等)。

[0049] 本发明的实施方案提供了TCR,其包括两个多肽(即多肽链,例如TCR的 α 链、TCR的 β 链、TCR的 γ 链、TCR的 δ 链或其组合)。本发明TCR的多肽可包括任何氨基酸序列,条件是該TCR对突变的RAS具有抗原特异性。

[0050] 在本发明的实施方案中,TCR包括两条多肽链,其各自包括含有TCR的互补决定区(CDR)1、CDR2及CDR3的可变区。在本发明的实施方案中,TCR包括第一多肽链及第二多肽链,

第一多肽链包括含有SEQ ID NO:1氨基酸序列的CDR1 (α 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:2氨基酸序列的CDR2 (α 链的CDR2)及含有SEQ ID NO:3氨基酸序列的CDR3 (α 链的CDR3),第二多肽链包括含有SEQ ID NO:4氨基酸序列的CDR1 (β 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:5氨基酸序列的CDR2 (β 链的CDR2)及含有SEQ ID NO:6氨基酸序列的CDR3 (β 链的CDR3)。

[0051] 在本发明的另一实施方案中,TCR包括第一多肽链及第二多肽链,第一多肽链包括含有SEQ ID NO:7氨基酸序列的CDR1 (α 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:8氨基酸序列的CDR2 (α 链的CDR2)及含有SEQ ID NO:9氨基酸序列的CDR3 (α 链的CDR3),第二多肽链包括含有SEQ ID NO:10氨基酸序列的CDR1 (β 链的CDR1)、含有SEQ ID NO:11氨基酸序列的CDR2 (β 链的CDR2)及含有SEQ ID NO:12氨基酸序列的CDR3 (β 链的CDR3)。

[0052] 就此而言,本发明的TCR可包括选自SEQ ID NO:1-12的氨基酸序列中的任何一个或多个。在本发明的实施方案中,TCR包括以下氨基酸序列:(a)全部SEQ ID NO:1-3,(b)全部SEQ ID NO:4-6,(c)全部SEQ ID NO:7-9,(d)全部SEQ ID NO:10-12,(e)全部SEQ ID NO:1-6,或(f)全部SEQ ID NO:7-12。在特别优选的实施方案中,TCR包括以下氨基酸序列:(i)全部SEQ ID NO:1-6或(ii)全部SEQ ID NO:7-12。

[0053] 在本发明的实施方案中,TCR包括含有上述CDR的TCR的可变区的氨基酸序列。就此而言,TCR可包括以下氨基酸序列:SEQ ID NO:13 (α 链的可变区);SEQ ID NO:14 (β 链的可变区);SEQ ID NO:15 (α 链的可变区);SEQ ID NO:16 (β 链的可变区);SEQ ID NO:13及14二者;或SEQ ID NO:15及16二者。优选地,TCR包括以下氨基酸序列:(i)SEQ ID NO:13及14二者,或(ii)SEQ ID NO:15及16二者。

[0054] 本发明的TCR还可包括 α 链恒定区及 β 链恒定区。恒定区可衍生自任何合适的物种(例如人类或小鼠)。在本发明的实施方案中,TCR还包括鼠类 α 链及 β 链恒定区或人类 α 链及 β 链恒定区。如本文中所使用,在提及TCR或本文所述的TCR的任何组分(例如互补决定区(CDR)、可变区、恒定区、 α 链和/或 β 链)时,术语“鼠类”或“人类”意指TCR(或其组分)分别衍生自小鼠或人类,即,TCR(或其组分)分别源自小鼠T细胞或人类T细胞或由其一性表达。

[0055] 本发明的实施方案提供包括人类可变区及鼠类恒定区的嵌合TCR,其中该TCR对由HLA II类分子呈递的突变的人类RAS氨基酸序列具有抗原特异性。鼠类恒定区可提供任何一种或多种优点。例如,鼠类恒定区可减弱本发明TCR与引入本发明TCR的宿主细胞的内源性TCR的错误配对。可选地或另外地,与具有人类恒定区的相同TCR相比,鼠类恒定区可增加本发明TCR的表达。嵌合TCR可包括SEQ ID NO:32(野生型(WT)鼠类 α 链恒定区)、SEQ ID NO:33(WT鼠类 β 链恒定区)或SEQ ID NO:32及33二者的氨基酸序列。优选地,本发明的TCR包括SEQ ID NO:32及33二者的氨基酸序列。嵌合TCR可包括本文所述的任何鼠类恒定区与如本文针对本发明的其他方面所述的任何CDR区的组合。就此而言,TCR可包括以下氨基酸序列:(a)全部SEQ ID NO:1-3及32;(b)全部SEQ ID NO:4-6及33;(c)全部SEQ ID NO:7-9及32;(d)全部SEQ ID NO:10-12及33;(e)全部SEQ ID NO:1-6及32-33;或(f)全部SEQ ID NO:7-12及32-33。在本发明的另一实施方案中,嵌合TCR可包括本文所述的任何鼠类恒定区与本文针对本发明的其他方面所述的任何可变区的组合。就此而言,TCR可包括以下氨基酸序列:(i)SEQ ID NO:13及32二者;(ii)SEQ ID NO:14及33二者;(iii)SEQ ID NO:15及32二者;(iv)SEQ ID NO:16及33二者;(v)全部SEQ ID NO:13-14及32-33;或(vi)全部SEQ ID NO:15-16及32-33。

[0056] 在本发明的另一实施方案中,TCR包括以下氨基酸序列:SEQ ID NO:38(具有WT鼠类恒定区的 α 链)、SEQ ID NO:39(具有WT鼠类恒定区的 β 链)、SEQ ID NO:40(具有WT鼠类恒定区的 α 链)、SEQ ID NO:41(具有WT鼠类恒定区的 β 链)、SEQ ID NO:38-39二者或SEQ ID NO:40-41二者。

[0057] 在本发明的实施方案中,TCR包括含有可变区及恒定区的 α 链及含有可变区及恒定区的 β 链。就此而言,TCR可包括(a)包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列的 α 链,其中:(i)SEQ ID NO:34的位置179处的X是Thr或Cys;(ii)SEQ ID NO:34的位置243处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(iii)SEQ ID NO:34的位置245处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;且(iv)SEQ ID NO:34的位置246处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(b)包括SEQ ID NO:35的氨基酸序列的 β 链,其中SEQ ID NO:35的位置189处的X是Ser或Cys;(c)包括SEQ ID NO:36的氨基酸序列的 α 链,其中:(i)SEQ ID NO:36的位置180处的X是Thr或Cys;(ii)SEQ ID NO:36的位置244处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(iii)SEQ ID NO:36的位置246处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;且(iv)SEQ ID NO:36的位置247处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(d)包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列的 β 链,其中SEQ ID NO:37的位置194处的X是Ser或Cys;(e) (a)及(b)二者;或(f) (c)及(d)二者。

[0058] 在本发明的实施方案中,TCR包括取代的恒定区。就此而言,TCR可包括本文所述任何TCR的氨基酸序列在 α 链及 β 链之一或二者的恒定区中具有一个、两个、三个或四个氨基酸取代。优选地,TCR包括鼠类恒定区在 α 链及 β 链之一或两者之鼠类恒定区中具有一个、两个、三个或四个氨基酸取代。在特别优选的实施方案中,TCR包括鼠类恒定区在 α 链的鼠类恒定区中具有一个、两个、三个或四个氨基酸取代且在 β 链的鼠类恒定区中具有一个氨基酸取代。在一些实施方案中,与包括未取代(野生型)恒定区的亲代TCR相比,包括取代的恒定区的TCR有利地提供以下之一或多者:增加突变的RAS⁺靶的识别、增加宿主细胞的表达、减少与内源TCR的错误配对及增加抗肿瘤活性。一般而言,TCR α 链及 β 链的鼠类恒定区的取代的氨基酸序列SEQ ID NO:30及31分别对应于未取代的鼠类恒定区氨基酸序列SEQ ID NO:32及33的全部或一部分,其中SEQ ID NO:30与SEQ ID NO:32相比具有一个、两个、三个或四个氨基酸取代且SEQ ID NO:31与SEQ ID NO:33相比具有一个氨基酸取代。就此而言,本发明的实施方案提供包括以下氨基酸序列的TCR:(a)SEQ ID NO:30(α 链的恒定区),其中(i)位置48处的X是Thr或Cys;(ii)位置112处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(iii)位置114处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;及(iv)位置115处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(b)SEQ ID NO:31(β 链的恒定区),其中位置57处的X是Ser或Cys;或(c)SEQ ID NO:30及31二者。在本发明的实施方案中,包括SEQ ID NO:30的TCR不包括SEQ ID NO:32(α 链的未取代的鼠类恒定区)。在本发明的实施方案中,包括SEQ ID NO:31的TCR不包括SEQ ID NO:33(β 链的未取代的鼠类恒定区)。

[0059] 在本发明的实施方案中,取代的恒定区包含 α 链及 β 链之一或两者的恒定区中的半胱氨酸取代以提供半胱氨酸取代的TCR。 α 链及 β 链中的相对半胱氨酸提供二硫键,该二硫键使取代的TCR的 α 链及 β 链的恒定区彼此连接且并不存在于包括未取代鼠类恒定区的TCR中。就此而言,TCR可为半胱氨酸取代的TCR,其中SEQ ID NO:32的位置48处的天然Thr(Thr48)及SEQ ID NO:33的位置57处的天然Ser(Ser57)中的一者或两者可经Cys取代。优选地,SEQ

ID NO:32的天然Thr48及SEQ ID NO:33的天然Ser57二者皆经Cys取代。经半胱氨酸取代的TCR恒定区序列的实例示于表2中。在本发明的实施方案中,经半胱氨酸取代的TCR包括(i)SEQ ID NO:30、(ii)SEQ ID NO:31或(iii)SEQ ID NO:30及31二者,其中SEQ ID NO:30及31二者如表2中所定义。除本文所述的任何CDR或可变区外,本发明的经半胱氨酸取代的TCR可包含经取代的恒定区。

[0060] 在本发明的实施方案中,经半胱氨酸取代的嵌合TCR包括全长 α 链及全长 β 链。经半胱氨酸取代的嵌合TCR α 链及 β 链序列的实例示于表2中。在本发明的实施方案中,TCR包括(i)SEQ ID NO:34、(ii)SEQ ID NO:35、(iii)SEQ ID NO:36、(iv)SEQ ID NO:37、(v)SEQ ID NO:34及35二者或(vi)SEQ ID NO:36及37二者,其中全部SEQ ID NO:34-37如表2中所定义。

[0061] 表2

[0062]

SEQ ID NO:	“X” 的定义
SEQ ID NO: 30 (恒定区 α 链)	位置48处的X是Cys, 位置112处的X是Ser, 位置114处的X是Met, 且 位置115处的X是Gly。
SEQ ID NO: 31 (恒定区 β 链)	位置57处的X是Cys
SEQ ID NO: 34 (RAS ^{G12V} - HLA-DRB1*07:01 α 链)	位置179处的X是Cys, 位置243处的X是Ser, 位置245处的X是Met, 且 位置246处的X是Gly。
SEQ ID NO: 35 (RAS ^{G12V} - HLA-DRB1*07:01 β 链)	位置189处的X是Cys
SEQ ID NO: 36 (RAS ^{G12C} - HLA-DRB1*11:01 α 链)	位置180处的X是Cys, 位置244处的X是Ser, 位置246处的X是Met, 且 位置247处的X是Gly。
SEQ ID NO: 37 (RAS ^{G12C} - HLA-DRB1*11:01 β 链)	位置194处的X是Cys

[0063] 在本发明的实施方案中,取代的氨基酸序列包含具有疏水性氨基酸的 α 链及 β 链之一或两者的恒定区中跨膜(TM)结构域中的一个、两个或三个氨基酸的取代,从而提供经疏水性氨基酸取代的TCR(亦在本文中称为“LVL修饰的TCR”)。与在TM结构域中缺乏疏水性氨基酸取代的TCR相比,TCR的TM结构域中的疏水性氨基酸取代可增加TCR的TM结构域的疏水

性。就此而言,TCR是LVL修饰的TCR,其中SEQ ID NO:32的天然Ser112、Met114及Gly115中的一个、两个或三个可独立地经Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp取代;优选地经Leu、Ile或Val取代。优选地,SEQ ID NO:32的天然Ser112、Met114及Gly115中的所有三个皆可独立地经Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp取代;优选地经Leu、Ile或Val取代。在本发明的实施方案中,LVL修饰的TCR包括(i)SEQ ID NO:30、(ii)SEQ ID NO:31或(iii)SEQ ID NO:30及31二者,其中SEQ ID NO:30及31二者如表3中所定义。除本文所述的任何CDR或可变区外,本发明的LVL修饰的TCR可包含取代的恒定区。

[0064] 在本发明的实施方案中,LVL修饰的TCR包括全长 α 链及全长 β 链。LVL修饰的TCR α 链及 β 链序列的实例示于表3中。在本发明的实施方案中,LVL修饰的TCR包括(i)SEQ ID NO:34、(ii)SEQ ID NO:35、(iii)SEQ ID NO:36、(iv)SEQ ID NO:37、(v)SEQ ID NO:34及35二者或(vi)SEQ ID NO:36及37二者,其中全部SEQ ID NO:34-37如表3中所定义。

[0065] 表3

SEQ ID NO:	“X” 的定义
SEQ ID NO: 30 (恒定区 α 链)	位置48处的X是Thr; 位置112处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp; 优选地,其中位置112处的X是Leu、Ile或Val; 特别优选地,其中位置112处的X是Leu; 位置114处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 优选地,其中位置114处的X是Leu、Ile或Val; 特别优选地,其中位置114处的X是Ile; 且 位置115处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp; 优选地,其中位置115处的X是Leu、Ile或Val; 特别优选地,其中位置115处的X是Val; 其中SEQ ID NO: 30不包括SEQ ID NO: 32 (α 链的未取代的恒定区)
SEQ ID NO: 31 (恒	位置57处的X是Ser

[0066]

[0067]

SEQ ID NO:	“X” 的定义
定区β链)	
SEQ ID NO: 34 (RAS ^{G12V} - HLA- DRB1*07:01 α链)	<p>位置179处的X是Thr;</p> <p>位置243处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;</p> <p>优选地, 其中位置243处的X是Leu、Ile或Val;</p> <p>特别优选地, 其中位置243处的X是Leu;</p> <p>位置245处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;</p> <p>优选地, 其中位置245处的X是Leu、Ile或Val;</p> <p>特别优选地, 其中位置245处的X是Ile; 且</p> <p>位置246处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;</p> <p>优选地, 其中位置246处的X是Leu、Ile或Val;</p> <p>特别优选地, 其中位置246处的X是Val,</p> <p>其中SEQ ID NO: 34不包括SEQ ID NO: 38 (未取代的α链)</p>
SEQ ID NO: 35 (RAS ^{G12V} - HLA- DRB1*07:01 β链)	位置189处的X是Ser
SEQ ID NO: 36 (RAS ^{G12C} - HLA- DRB1*11:01 α链)	<p>位置180处的X是Thr;</p> <p>位置244处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;</p> <p>优选地, 其中位置244处的X是Leu、Ile或Val;</p> <p>特别优选地, 其中位置244处的X是Leu;</p> <p>位置246处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;</p> <p>优选地, 其中位置246处的X是Leu、Ile或Val;</p> <p>特别优选地, 其中位置246处的X是Ile; 且</p> <p>位置247处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;</p> <p>优选地, 其中247处的X位置是Leu、Ile或Val;</p>

[0068]	SEQ ID NO:	“X” 的定义
		特别优选地, 其中位置247处的X是Val; 其中SEQ ID NO: 36不包括SEQ ID NO: 40 (未取代的 α 链)
	SEQ ID NO: 37 (RAS ^{G12C} - HLA- DRB1*11:01 β 链)	位置194处的X是Ser

[0069] 在本发明的实施方案中, 取代的氨基酸序列包含 α 链及 β 链之一或两者的恒定区中的半胱氨酸取代组合包含具有疏水性氨基酸的 α 链及 β 链之一或两者的恒定区中跨膜(TM)结构域中的一个、两个或三个氨基酸的取代(亦在本文中称为“半胱氨酸取代的、LVL修饰的TCR”)。就此而言, TCR是半胱氨酸取代的、LVL修饰的嵌合TCR, 其中SEQ ID NO: 32的天然Thr48经Cys取代; SEQ ID NO: 32的天然Ser112、Met114及Gly115中的一个、两个或三个独立地经Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp取代; 优选地经Leu、Ile或Val取代; 且SEQ ID NO: 33的天然Ser57经Cys取代。优选地, SEQ ID NO: 32的天然Ser112、Met114及Gly115中的所有三个皆可独立地经Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp取代; 优选地经Leu、Ile或Val取代。在本发明的实施方案中, 半胱氨酸取代的、LVL修饰的TCR包括(i) SEQ ID NO: 30、(ii) SEQ ID NO: 31或(iii) SEQ ID NO: 30及31二者, 其中SEQ ID NO: 30及31二者如表4中所定义。除本文所述的任何CDR或可变区外, 本发明的半胱氨酸取代的、LVL修饰的TCR可包含取代的恒定区。

[0070] 在实施方案中, 半胱氨酸取代的、LVL修饰的TCR包括全长 α 链及全长 β 链。在本发明的实施方案中, 半胱氨酸取代的、LVL修饰的TCR包括(i) SEQ ID NO: 34、(ii) SEQ ID NO: 35、(iii) SEQ ID NO: 36、(iv) SEQ ID NO: 37、(v) SEQ ID NO: 34及35二者或(vi) SEQ ID NO: 36及37二者, 其中全部SEQ ID NO: 34-37如表4中所定义。

[0071] 表4

[0072]	SEQ ID NO:	“X” 的定义
	SEQ ID NO: 30 (恒定区 α 链)	位置48处的X是Cys; 位置112处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、 Met或Trp;

[0073]

SEQ ID NO:	“X” 的定义
	<p>优选地，其中位置112处的X是Leu、Ile或Val； 特别优选地，其中位置112处的X是Leu； 位置114处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp； 优选地，其中位置114处的X是Leu、Ile或Val； 特别优选地，其中位置114处的X是Ile；且 位置115处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp； 优选地，其中位置115处的X是Leu、Ile或Val；且 特别优选地，其中位置115处的X是Val， 其中SEQ ID NO: 30不同时包括位置112处的Ser、位置114处的Met及位置115处的Gly的全部。</p>
SEQ ID NO: 31 (恒定区β链)	位置57处的X是Cys
SEQ ID NO: 34 (RAS ^{G12V} -HLA-DRB1*07:01 α链)	<p>位置179处的X是Cys； 位置243处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp； 优选地，其中位置243处的X是Leu、Ile或Val； 特别优选地，其中位置243处的X是Leu； 位置245处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp； 优选地，其中位置245处的X是Leu、Ile或Val； 特别优选地，其中位置245处的X是Ile；且 位置246处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp； 优选地，其中位置246处的X是Leu、Ile或Val；且 特别优选地，其中位置246处的X是Val， 其中SEQ ID NO: 34不同时包括位置243处的Ser、位置245处的Met及位置246处的Gly的全部。</p>
SEQ ID NO: 35	位置189处的X是Cys

[0074]

SEQ ID NO:	“X” 的定义
(RAS ^{G12V} - HLA-DRB1*07:01 β链)	
SEQ ID NO: 36 (RAS ^{G12C} - HLA-DRB1*11:01 α链)	位置180处的X是Cys; 位置244处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp; 优选地, 其中位置244处的X是Leu、Ile或Val; 特别优选地, 其中位置244处的X是Leu; 位置246处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp; 优选地, 其中位置246处的X是Leu、Ile或Val; 特别优选地, 其中位置246处的X是Ile; 且 位置247处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp; 优选地, 其中位置247处的X是Leu、Ile或Val; 且 特别优选地, 其中位置247处的X是Val, 其中SEQ ID NO: 36不同时包括位置244处的Ser、位置246处的Met及位置247处的Gly的全部。
SEQ ID NO: 37 (RAS ^{G12C} - HLA-DRB1*11:01 β链)	位置194处的X是Cys

[0075] 本发明亦提供包括本文所述的任何TCR的功能部分的多肽。本文所用的术语“多肽”包含寡肽且是指由一个或多个肽键连接的氨基酸的单链。

[0076] 就本发明的多肽而言, 功能部分可为包括TCR的连续氨基酸且是其一部分的任何部分, 条件是该功能部分特异性结合突变的RAS。术语“功能部分”在提及TCR使用时是指本发明TCR的任何部分或片段, 该部分或片段保留产生该部分的TCR(亲代TCR)的生物活性。功能部分涵盖(例如) TCR中保留以下能力的那些部分: 特异性结合突变的RAS(例如在HLA-DRB1*07:01分子或HLA-DRB1*11:01分子的背景内) 或与亲代TCR相比以类似程度、相同程度或较高程度检测、治疗或预防癌症。提及亲代TCR, 功能部分可包括(例如) 约10%、约25%、约30%、约50%、约68%、约80%、约90%、约95%或更多的亲代TCR。

[0077] 功能部分可在该部分的氨基或羧基末端处或在两个末端处包括另外的氨基酸, 所述另外的氨基酸并未发现于亲代TCR的氨基酸序列中。期望地, 另外的氨基酸并不干扰功能部分的生物功能, 例如特异性结合突变的RAS和/或具有检测癌症、治疗或预防癌症的能力等。更期望地, 与亲代TCR的生物活性相比, 另外的氨基酸增强了生物活性。

[0078] 多肽可包括本发明TCR的α链及β链中的任何一个或两个的功能部分, 例如包括本发明TCR的α链和/或β链中可变区的CDR1、CDR2及CDR3中的一个或多个的功能部分。在本发

明的实施方案中,多肽可包括SEQ ID NO:1(α 链的CDR1)、SEQ ID NO:2(α 链的CDR2)、SEQ ID NO:3(α 链的CDR3)、SEQ ID NO:4(β 链的CDR1)、SEQ ID NO:5(β 链的CDR2)、SEQ ID NO:6(β 链的CDR3)的氨基酸序列或其组合。在本发明的另一实施方案中,多肽可包括SEQ ID NO:7(α 链的CDR1)、SEQ ID NO:8(α 链的CDR2)、SEQ ID NO:9(α 链的CDR3)、SEQ ID NO:10(β 链的CDR1)、SEQ ID NO:11(β 链的CDR2)、SEQ ID NO:12(β 链的CDR3)的氨基酸序列或其组合。

[0079] 就此而言,本发明的多肽可包括选自SEQ ID NO:1-12的氨基酸序列中的任何一个或多个。在本发明的实施方案中,TCR包括以下氨基酸序列:(a)全部SEQ ID NO:1-3,(b)全部SEQ ID NO:4-6,(c)全部SEQ ID NO:7-9,(d)全部SEQ ID NO:10-12,(e)全部SEQ ID NO:1-6,或(f)全部SEQ ID NO:7-12。在优选的实施方案中,多肽包括以下氨基酸序列:(i)全部SEQ ID NO:1-6或(ii)全部SEQ ID NO:7-12。

[0080] 在本发明的实施方案中,本发明的多肽可包括(例如)本发明TCR中包括上述CDR区的组合的可变区。就此而言,多肽可包括以下氨基酸序列:(i)SEQ ID NO:13(α 链的可变区),(ii)SEQ ID NO:14(β 链的可变区),(iii)SEQ ID NO:13及14二者,(iv)SEQ ID NO:15(α 链的可变区),(v)SEQ ID NO:16(β 链的可变区),或(vi)SEQ ID NO:15及16二者。优选地,多肽包括以下氨基酸序列:(i)SEQ ID NO:13及14二者或(ii)SEQ ID NO:15及16二者。

[0081] 在本发明的实施方案中,本发明的多肽还可包括本发明TCR的上述恒定区。就此而言,多肽还可包括以下氨基酸序列:SEQ ID NO:32(α 链的WT鼠类恒定区)、SEQ ID NO:33(β 链的WT鼠类恒定区)、SEQ ID NO:30(α 链的取代的鼠类恒定区)、SEQ ID NO:31(β 链的取代的鼠类恒定区)、SEQ ID NO:32及33二者或SEQ ID NO:30及31二者。优选地,多肽还包括SEQ ID NO:30及31或SEQ ID NO:32及33的氨基酸序列与本文针对本发明其他方面所述的任何CDR区或可变区的组合。在本发明的实施方案中,多肽的SEQ ID NO:30及31中的一个或两个如表2-4中的任一个所定义。

[0082] 在本发明的实施方案中,本发明的多肽可包括本文所述TCR的 α 或 β 链的整个长度。就此而言,本发明的多肽可包括SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36及SEQ ID NO:37的氨基酸序列。可选地,本发明的多肽可包括本文所述TCR的两条链。

[0083] 例如,本发明的多肽可包括:(a)SEQ ID NO:34的氨基酸序列,其中:(i)SEQ ID NO:34的位置179处的X是Thr或Cys;(ii)SEQ ID NO:34的位置243处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(iii)SEQ ID NO:34的位置245处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;且(iv)SEQ ID NO:34的位置246处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(b)SEQ ID NO:35的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:35的位置189处的X是Ser或Cys;(c)SEQ ID NO:36的氨基酸序列,其中:(i)SEQ ID NO:36的位置180处的X是Thr或Cys;(ii)SEQ ID NO:36的位置244处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(iii)SEQ ID NO:36的位置246处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;且(iv)SEQ ID NO:36的位置247处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(d)SEQ ID NO:37的氨基酸序列,其中SEQ ID NO:37的位置194处的X是Ser或Cys;(e)(a)及(b)二者;或(f)(c)及(d)二者。在本发明的实施方案中,多肽的SEQ ID NO:34-37中的任何一个或多个如表2-4中的任何一个所定义。

[0084] 本发明还提供包括本文所述的至少一种多肽的蛋白质。“蛋白质”意指包括一条或多条多肽链的分子。

[0085] 在实施方案中,本发明蛋白质可包括(a)包括SEQ ID NO:1-3的氨基酸序列的第一多肽链及包括SEQ ID NO:4-6的氨基酸序列的第二多肽链;或(b)包括SEQ ID NO:7-9的氨基酸序列的第一多肽链及包括SEQ ID NO:10-12的氨基酸序列的第二多肽链。

[0086] 在本发明的另一实施方案中,蛋白质可包括(i)包括SEQ ID NO:13的氨基酸序列的第一多肽链及包括SEQ ID NO:14的氨基酸序列的第二多肽链;或(ii)包括SEQ ID NO:15的氨基酸序列的第一多肽链及包括SEQ ID NO:16的氨基酸序列的第二多肽链。

[0087] 本发明的蛋白质还可包括本文针对本发明其他方面所述的任何恒定区。就此而言,在本发明的实施方案中,第一多肽链还可包括SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:32的氨基酸序列且第二多肽链还可包括SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:33的氨基酸序列。在本发明的实施方案中,蛋白质的SEQ ID NO:30及31之一或两者如表2-4中的任何一个所定义。

[0088] 可选地或另外地,本发明实施方案的蛋白质可包括(a)包括SEQ ID NO:34的氨基酸序列的第一多肽链,其中:(i)SEQ ID NO:34的位置179处的X是Thr或Cys;(ii)SEQ ID NO:34的位置243处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(iii)SEQ ID NO:34的位置245处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;且(iv)SEQ ID NO:34的位置246处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(b)包括SEQ ID NO:35的氨基酸序列的第二多肽链,其中SEQ ID NO:35的位置189处的X是Ser或Cys;(c)包括SEQ ID NO:36的氨基酸序列的第一多肽链,其中:(i)SEQ ID NO:36的位置180处的X是Thr或Cys;(ii)SEQ ID NO:36的位置244处的X是Ser、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(iii)SEQ ID NO:36的位置246处的X是Met、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe或Trp;且(iv)SEQ ID NO:36的位置247处的X是Gly、Ala、Val、Leu、Ile、Pro、Phe、Met或Trp;(d)包括SEQ ID NO:37的氨基酸序列的第二多肽链,其中SEQ ID NO:37的位置194处的X是Ser或Cys;(e) (a)及(b)二者;或(f) (c)及(d)二者。在本发明的实施方案中,SEQ ID NO:34-37中的一个或多个如表2-4中的任一个所定义。

[0089] 本发明的蛋白质可为TCR。可选地,例如,如果蛋白质包括含有SEQ ID NO:34及35二者、SEQ ID NO:36及37二者的氨基酸序列的单一多肽链,或如果蛋白质的第一和/或第二多肽链还包括其他氨基酸序列(例如编码免疫球蛋白或其部分的氨基酸序列),则本发明的蛋白质可为融合蛋白。就此而言,本发明亦提供包括本文所述的至少一种本发明多肽以及至少一种其他多肽的融合蛋白。其他多肽可作为融合蛋白的单独多肽存在,或可以与本文所述的一种本发明多肽同框(串联)表达的多肽形式存在。其他多肽可编码任何肽或蛋白质分子或其部分,包括但不限于:免疫球蛋白、CD3、CD4、CD8、MHC分子、CD1分子(例如CD1a、CD1b、CD1c、CD1d)等。

[0090] 融合蛋白可包括一个或多个拷贝的本发明多肽和/或一个或多个拷贝的其他多肽。例如,融合蛋白可包括1、2、3、4、5或更多个拷贝的本发明多肽和/或其他多肽。制备融合蛋白的合适方法是本领域已知的且包含(例如)重组方法。

[0091] 在本发明的一些实施方案中,本发明的TCR、多肽及蛋白质可表达为包括连接 α 链及 β 链的接头肽的单一蛋白质。就此而言,本发明的TCR、多肽及蛋白质还可包括接头肽。接头肽可有利地促进重组TCR、多肽和/或蛋白质在宿主细胞中的表达。接头肽可包括任何合适的氨基酸序列。例如,接头肽可为包括SEQ ID NO:54的氨基酸序列的弗林蛋白酶(furin)-SGSG-P2A接头。在包含接头肽的构建体由宿主细胞表达时,接头肽可被切割,从而

产生分离的 α 链及 β 链。在本发明的实施方案中,TCR、多肽或蛋白质可包括含有全长 α 链、全长 β 链及定位于 α 链与 β 链之间的接头肽的氨基酸序列。

[0092] 本发明的蛋白质可为包括本文所述的至少一种本发明多肽的重组抗体或其抗原结合部分。如本文中所使用,“重组抗体”是指包括本发明多肽及抗体或其抗原结合部分的多肽链中的至少一者的重组(例如基因改造)蛋白。抗体或其抗原结合部分的多肽可为抗体的重链、轻链、重链或轻链的可变或恒定区、单链可变片段(scFv)或Fc、Fab或F(ab)₂’片段等。抗体或其抗原结合部分的多肽链可作为重组抗体的单独多肽存在。可选地,抗体或其抗原结合部分的多肽链可以与本发明多肽同框(串联)表达的多肽形式存在。抗体或其抗原结合部分的多肽可为任何抗体或任何抗体片段(包含本文所述的任何抗体及抗体片段)的多肽。

[0093] 本发明范围包含本文所述的本发明TCR、多肽或蛋白质的功能变体。本文所用的术语“功能变体”是指与亲代TCR、多肽或蛋白质具有大量或显著的序列同一性或类似性的TCR、多肽或蛋白质,该功能变体保留产生该变体的TCR、多肽或蛋白质的生物活性。功能变体涵盖(例如)本文所述的TCR、多肽或蛋白质(亲代TCR、多肽或蛋白质)的那些变体,其保留与亲代TCR、多肽或蛋白质相比以类似程度、相同程度或较高程度特异性结合突变的RAS(亲代TCR对其具有抗原特异性或亲代多肽或蛋白质与其特异性结合)的能力。参照亲代TCR、多肽或蛋白质,功能变体的氨基酸序列与亲代TCR、多肽或蛋白质可分别(例如)至少约30%、约50%、约75%、约80%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或更高相同的。

[0094] 功能变体可(例如)包括具有至少一个保守氨基酸取代的亲代TCR、多肽或蛋白质的氨基酸序列。保守氨基酸取代为本领域已知的,且包含其中一个具有某些物理和/或化学性质的氨基酸交换为另一具有相同化学或物理性质的氨基酸的氨基酸取代。例如,保守氨基酸取代可为一个酸性氨基酸取代另一酸性氨基酸(例如Asp或Glu)、具有非极性侧链的氨基酸取代具有非极性侧链的另一氨基酸(例如Ala、Gly、Val、Ile、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val等)、碱性氨基酸取代另一碱性氨基酸(Lys、Arg等)、具有极性侧链的氨基酸取代具有极性侧链的另一氨基酸(Asn、Cys、Gln、Ser、Thr、Tyr等)等。

[0095] 可选地或另外地,功能变体可包括具有至少一个非保守氨基酸取代的亲代TCR、多肽或蛋白质的氨基酸序列。在此情形下,优选地,非保守氨基酸取代并不干扰或抑制功能变体的生物活性。优选地,非保守氨基酸取代增强了功能变体的生物活性,使得与亲代TCR、多肽或蛋白质相比,功能变体的生物活性增加。

[0096] TCR、多肽或蛋白质可基本上由指定氨基酸序列或本文所述的序列组成,从而TCR、多肽或蛋白质的其他组分(例如其他氨基酸)并不实质上改变TCR、多肽或蛋白质的生物活性。就此而言,本发明的TCR、多肽或蛋白质可(例如)基本上由SEQ ID NO:34、SEQ ID NO:35、SEQ ID NO:36、SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:34-35二者或SEQ ID NO:36-37二者的氨基酸序列组成。同样,例如,本发明的TCR、多肽或蛋白质可基本上由(i) SEQ ID NO:13、(ii) SEQ ID NO:14、(iii) SEQ ID NO:15、(iv) SEQ ID NO:16、(v) SEQ ID NO:13及14二者或(vi) SEQ ID NO:15及16二者的氨基酸序列组成。另外,本发明的TCR、多肽或蛋白质可基本上由以下氨基酸序列组成:(a) SEQ ID NO:1-12中的任何一个或多个;(b) 全部SEQ ID NO:1-3;(c) 全部SEQ ID NO:4-6;(d) 全部SEQ ID NO:7-9;(e) 全部SEQ ID NO:10-12;(f) 全部SEQ ID NO:1-6;或(g) 全部SEQ ID NO:7-12。

[0097] 本发明的TCR、多肽及蛋白质可具有任何长度,即可包括任何数量的氨基酸,条件是TCR、多肽或蛋白质保留其生物活性(例如能够特异性结合突变的RAS;检测哺乳动物的癌症;或治疗或预防哺乳动物的癌症等)。例如,多肽的长度可在约50至约5000个氨基酸的范围内,例如长约50、约70、约75、约100、约125、约150、约175、约200、约300、约400、约500、约600、约700、约800、约900、约1000或更多个氨基酸。就此而言,本发明的多肽亦包含寡肽。

[0098] 本发明的TCR、多肽及蛋白质可包括合成氨基酸来代替一种或多种天然存在的氨基酸。此类合成氨基酸是本领域已知的且包含(例如)氨基环己烷甲酸、正亮氨酸、 α -氨基正癸酸、高丝氨酸、S-乙酰基氨基甲基-半胱氨酸、反式-3-羟基脯氨酸及反式-4-羟基脯氨酸、4-氨基苯基丙氨酸、4-硝基苯基丙氨酸、4-氯苯基丙氨酸、4-羧基苯基丙氨酸、 β -苯基丝氨酸- β -羟基苯基丙氨酸、苯基甘氨酸、 α -萘基丙氨酸、环己基丙氨酸、环己基甘氨酸、二氢吡啶-2-甲酸、1,2,3,4-四氢异喹啉-3-甲酸、氨基丙二酸、氨基丙二酸单酰胺、N'-苄基-N'-甲基-赖氨酸、N',N'-二苄基-赖氨酸、6-羟基赖氨酸、鸟氨酸、 α -氨基环戊烷甲酸、 α -氨基环己烷甲酸、 α -氨基环庚烷甲酸、 α -(2-氨基-2-降莰烷)-甲酸、 α , γ -二氨基丁酸、 α , β -二氨基丙氨酸、高苯基丙氨酸及 α -叔丁基甘氨酸。

[0099] 本发明的TCR、多肽及蛋白质可经由(例如)二硫桥发生糖基化、酰胺化、羧基化、磷酸化、酯化、N-酰化、环化,或转化成酸加成盐和/或任选地二聚化或聚合或缀合。

[0100] 可通过本领域已知的方法(例如重新合成)来获得本发明的TCR、多肽和/或蛋白质。同样,可使用本文所述的核酸且使用标准重组方法以重组方式来产生多肽及蛋白质。例如参见Green和Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第4版, Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY (2012)。可选地,本文所述的TCR、多肽和/或蛋白质可在商业上由公司(例如Synpep (Dublin, CA)、Peptide Technologies Corp. (Gaithersburg, MD) 及Multiple Peptide Systems (San Diego, CA)) 来合成。就此而言,本发明的TCR、多肽及蛋白质可为合成的、重组的、分离的和/或纯化的。

[0101] 本发明范围包含含有任何本发明TCR、多肽或蛋白质(包含其任何功能部分或变体)、核酸、重组表达载体、宿主细胞、宿主细胞群体或抗体或其抗原结合部分的缀合物(例如生物缀合物)。本领域已知缀合物以及合成缀合物的一般方法。

[0102] 本发明的实施方案提供包括编码本文所述的任何TCR、多肽或蛋白质的核苷酸序列的核酸。本文所用的“核酸”包含“多核苷酸”、“寡核苷酸”及“核酸分子”且通常意指DNA或RNA的聚合物,其可为单链或双链的,其可含有天然、非天然或改变的核苷酸,且其可含有天然、非天然或改变的核苷酸间键联(例如磷酸酯键联或硫代磷酸酯键联)来代替发现于未修饰寡核苷酸的核苷酸之间的磷酸二酯。在实施方案中,核酸包括互补DNA(cDNA)。通常优选地,核酸不包括任何插入、缺失、倒置和/或取代。然而,在一些情况下,如本文所论述,核酸可适于包括一个或多个插入、缺失、倒置和/或取代。

[0103] 优选地,本发明的核酸是重组的。如本文中所使用,术语“重组”是指:(i) 分子是通过使天然或合成核酸区段接合至可复制于活细胞中的核酸分子而构建于活细胞外部,或(ii) 分子源自上文(i)中所述那些的复制。出于本文目的,复制可为体外复制或体内复制。

[0104] 可基于化学合成和/或酶促连接反应使用本领域已知的程序来构建核酸。例如参见Green及Sambrook等人(见上文)。例如,可使用天然存在的核苷酸或以各种方式修饰的核苷酸以化学方式来合成核酸,该经修饰核苷酸经设计以增加分子的生物稳定性或增加在杂

交时形成的双链体(例如硫代磷酸酯衍生物及吡啶取代的核苷酸)的物理稳定性。可用于生成核酸的修饰核苷酸的实例包括但不限于:5-氟尿嘧啶、5-溴尿嘧啶、5-氯尿嘧啶、5-碘尿嘧啶、次黄嘌呤、黄嘌呤、4-乙酰基胞嘧啶、5-(羧基羟甲基)尿嘧啶、5-羧基甲基氨基甲基-2-硫基尿苷、5-羧基甲基氨基甲基尿嘧啶、二氢尿嘧啶、 β -D-半乳糖基腺苷、肌苷、 N^6 -异戊烯基腺嘌呤、1-甲基鸟嘌呤、1-甲基肌苷、2,2-二甲基鸟嘌呤、2-甲基腺嘌呤、2-甲基鸟嘌呤、3-甲基胞嘧啶、5-甲基胞嘧啶、 N^6 取代的腺嘌呤、7-甲基鸟嘌呤、5-甲基氨基甲基尿嘧啶、5-甲氧基氨基甲基-2-硫基尿嘧啶、 β -D-甘露糖基腺苷、5'-甲氧基羧基甲基尿嘧啶、5-甲氧基尿嘧啶、2-甲基硫基- N^6 -异戊烯基腺嘌呤、尿嘧啶-5-氧基乙酸(v)、怀丁氧苷(wybutoxosine)、假尿嘧啶、腺苷(queosine)、2-硫基胞嘧啶、5-甲基-2-硫基尿嘧啶、2-硫基尿嘧啶、4-硫基尿嘧啶、5-甲基尿嘧啶、尿嘧啶-5-氧基乙酸甲酯、3-(3-氨基-3-N-2-羧基丙基)尿嘧啶及2,6-二氨基嘌呤。可选地,一种或多种本发明核酸可购自诸如Macromolecular Resources(Fort Collins,CO)及Synthegen(Houston,TX)等公司。

[0105] 核酸可包括编码本文所述的任何TCR、多肽或蛋白质的任何核苷酸序列。在本发明的实施方案中,核酸可包括SEQ ID NO:42-45中任一个的核苷酸序列(表5)。在本发明的实施方案中,核酸包括SEQ ID NO:42-43二者或SEQ ID NO:44-45二者的核苷酸序列。

[0106] 表5

[0107]	TCR ID	TCR链	核苷酸序列
	RAS ^{G12V} - HLA- DRB1*07:01	α (TRAV13-1)	SEQ ID NO: 42
		β (TRBV20-1)	SEQ ID NO: 43
	RAS ^{G12C} - HLA- DRB1*11:01	α (TRAV24)	SEQ ID NO: 44
		β (TRBV12-4)	SEQ ID NO: 45

[0108] 在本发明的实施方案中,核酸包括编码本文所述的任何TCR、多肽或蛋白质的密码子优化的核苷酸序列。不受限于任何特定理论或机制,认为,核苷酸序列的密码子优化可增加mRNA转录物的翻译效率。核苷酸序列的密码子优化可涉及替换天然密码子得到另一密码子,该另一密码子编码相同氨基酸,但可通过在细胞内更易于获得的tRNA来翻译,由此增加翻译效率。核苷酸序列的优化亦可减少干扰翻译的二级mRNA结构,由此增加翻译效率。

[0109] 本发明亦提供包括与本文所述任何核酸的核苷酸序列互补的核苷酸序列或在严格条件下与本文所述任何核酸的核苷酸序列杂交的核苷酸序列的核酸。

[0110] 在严格条件下杂交的核苷酸序列优选地在高严格条件下杂交。“高严格条件”意指核苷酸序列以可检测地强于非特异性杂交的量与靶序列(本文所述任何核酸的核苷酸序列)特异性杂交。高严格条件包括将含有准确互补序列的多核苷酸或者仅含有数个分散的错配的多核苷酸与恰巧具有匹配核苷酸序列的数个小的区域(例如3-10个碱基)的随机序

列区分开的条件。此类小的互补区域比14-17个或者更多个碱基的全长互补体更易熔化,且高严格杂交使其易于区分。相对高的严格条件将包括例如低盐和/或高温条件,例如由约0.02-0.1M NaCl或等效物在约50-70°C的温度所提供。此类高严格条件容忍(如果存在)核苷酸序列与模板或靶标链之间很少的错配,并且特别适合于检测任何本发明的TCR的表达。普遍认为通过添加增加量的甲酰胺可以导致更严格的条件。

[0111] 本发明亦提供包括与本文所述的任何核酸至少约70%或更高(例如约80%、约90%、约91%、约92%、约93%、约94%、约95%、约96%、约97%、约98%或约99%)相同的核苷酸序列的核酸。就此而言,核酸可基本上由本文所述的任何核苷酸序列组成。

[0112] 本发明核酸可掺入重组表达载体中。就此而言,本发明提供包括本发明的任何核酸的重组表达载体。在本发明的实施方案中,重组表达载体包括编码 α 链、 β 链及接头肽的核苷酸序列。

[0113] 出于本文的目的,术语“重组表达载体”意指经基因修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,在该构建体包括编码mRNA、蛋白质、多肽或肽的核苷酸序列且使该载体与细胞在足以使mRNA、蛋白质、多肽或肽表达于细胞内的条件下接触时,允许宿主细胞表达mRNA、蛋白质、多肽或肽。本发明的载体并非是整个天然存在的。然而,载体的部分可为天然存在的。本发明的重组表达载体可包括任何类型的核苷酸,包括但不限于:DNA及RNA,可为单链或双链的,合成或部分自天然来源获得,且可含有天然、非天然或改变的核苷酸。重组表达载体可包括天然存在的、非天然存在的核苷酸间键联,或两种类型的键联。优选地,非天然存在的或改变的核苷酸或核苷酸间键联不阻碍载体的转录或复制。

[0114] 本发明的重组表达载体可为任何合适的重组表达载体,且可用于转化或转染任何合适宿主细胞。合适载体包含经设计用于繁殖及扩增或用于表达或用于二者的载体,例如质体及病毒。载体可选自:pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene, La Jolla, CA)、pET系列(Novagen, Madison, WI)、pGEX系列(Pharmacia Biotech, Uppsala, Sweden)及pEX系列(Clontech, Palo Alto, CA)。亦可使用噬菌体载体,例如 λ GT10、 λ GT11、 λ ZapII(Stratagene)、 λ EMBL4及 λ NM1149。植物表达载体的实例包含pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121及pBIN19(Clontech)。动物表达载体的实例包含pEUK-C1、pMAM及pMAMneo(Clontech)。优选地,重组表达载体是病毒载体(例如逆转录病毒载体)。在特别优选的实施方案中,重组表达载体是MSGV1载体。

[0115] 可使用描述于(例如)Green及Sambrook等人(见上文)的标准重组DNA技术来制备本发明的重组表达载体。可制备表达载体的环形或线性构建体以含有原核或真核宿主细胞中的功能复制系统。复制系统可衍生自(例如)ColE1、2 μ 质体、 λ 、SV40、牛乳头瘤病毒等。

[0116] 期望地,重组表达载体包含调控序列,如转录和翻译起始密码子和终止密码子,其对待引入载体的宿主细胞类型(例如细菌、真菌、植物或动物)为特异的,视情况而定并且考虑载体是否基于DNA或RNA。

[0117] 重组表达载体可包含一种或多种标志物基因,此允许选择经转化或转染的宿主细胞。标志物基因包含杀生物剂抗性(例如对抗生素、重金属等的抗性)、营养缺陷型宿主细胞中的互补性以提供原营养等。用于本发明表达载体的合适标志物基因包含(例如)新霉素(neomycin)/G418抗性基因、潮霉素(hygromycin)抗性基因、组胺醇抗性基因、四环素(tetracycline)抗性基因及氨苄青霉素(ampicillin)抗性基因。

[0118] 重组表达载体可包括天然或非天然启动子,该启动子可操作地连接至编码TCR、多肽或蛋白质的核苷酸序列或连接至与编码TCR、多肽或蛋白质的核苷酸序列互补或杂交的核苷酸序列。启动子的选择,例如强、弱、可诱导的、组织特异的和发育特异的,在本领域普通技术人员的能力内。类似地,核苷酸序列与启动子的组合也在技术人员的能力内。启动子可为非病毒启动子或病毒启动子,例如巨细胞病毒(CMV)启动子、SV40启动子、RSV启动子及发现于鼠类干细胞病毒的长末端重复中的启动子。

[0119] 本发明的重组表达载体可经设计用于瞬时表达、稳定表达或用于二者。同样,重组表达载体可经制备以用于组成型表达或用于可诱导表达。

[0120] 另外,重组表达载体可经制备以包含自杀基因。如本文中所使用,术语“自杀基因”是指使得表达自杀基因的细胞死亡的基因。自杀基因可以是赋予基因在其中表达的细胞针对试剂(例如药物)的敏感性的基因,并且当细胞与所述试剂接触或者暴露于所述试剂时引起细胞死亡。自杀基因为本领域已知的且包含(例如)单纯疱疹病毒(HSV)胸苷激酶(TK)基因、胞嘧啶脱氨酶、嘌呤核苷磷酸化酶、硝基还原酶及可诱导半胱天冬酶(caspase)9基因系统。

[0121] 本发明的另一实施方案还提供包括本文所述的任何重组表达载体的宿主细胞。如本文中所使用,术语“宿主细胞”是指可含有本发明重组表达载体的任何类型的细胞。宿主细胞可为真核细胞(例如植物、动物、真菌或藻类),或可为原核细胞(例如细菌或原生动物)。宿主细胞可为经培养细胞或原代细胞(亦即直接分离自诸如人类等有机体)。宿主细胞可为贴壁细胞或悬浮细胞,亦即在悬浮液中生长的细胞。合适宿主细胞为本领域已知的,且包含(例如)DH5 α 大肠杆菌(E.coli)细胞、中国仓鼠卵巢细胞、猴VERO细胞、COS细胞、HEK293细胞等。出于扩增或复制重组表达载体的目的,宿主细胞优选是原核细胞,例如DH5 α 细胞。出于产生重组TCR、多肽或蛋白质的目的,宿主细胞优选是哺乳动物细胞。更优选地,宿主细胞是人类细胞。尽管宿主细胞可为任何细胞类型,可源自任何类型组织,且可处于任何发育阶段,但宿主细胞优选是外周血淋巴细胞(PBL)或外周血单核细胞(PBMC)。更优选地,宿主细胞是T细胞。

[0122] 出于本文的目的,T细胞可为任何T细胞,例如经培养T细胞(例如原代T细胞,或来自经培养T细胞系(例如Jurkat、SupT1等)的T细胞,或自哺乳动物获得的T细胞。如果自哺乳动物获得,则T细胞可自多种来源获得,包括但不限于:血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其他组织或流体。T细胞亦可经富集或经纯化。优选地,T细胞是人类T细胞。T细胞可为任何类型的T细胞且可处于任何发育阶段,包括但不限于:CD4⁺/CD8⁺双阳性T细胞、CD4⁺辅助T细胞(例如Th₁及Th₂细胞)、CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞(例如细胞毒性T细胞)、肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)、记忆T细胞(例如中心记忆T细胞及效应记忆T细胞)、初始T细胞等。

[0123] 本发明亦提供包括本文所述的至少一种宿主细胞的细胞群体。细胞群体可以是除了至少一种其它细胞外还包含含有所述任何重组表达载体的宿主细胞的异质群体,所述其它细胞例如不包含任何重组表达载体的宿主细胞(例如T细胞)或者除了T细胞之外的细胞,例如B细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、红细胞、肝细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌细胞、脑细胞等。可选地,细胞群体可以是基本同质的群体,其中所述群体主要包含含有重组表达载体的宿主细胞(例如基本由含有重组表达载体的宿主细胞组成)。群体也可以是克隆细胞群体,其中群体的所有细胞均为含有重组表达载体的单个宿主细胞的克隆,以使群体的所有细胞

均包含重组表达载体。在本发明的一个实施方案中,细胞群体是包括含有如本文所述的重组表达载体的宿主细胞的克隆群体。

[0124] 在本发明的实施方案中,群体中的细胞数目可快速扩增。T细胞数目的扩增可以通过例如,美国专利8,034,334;美国专利8,383,099;美国专利申请公开号2012/0244133;Dudley等人,J.Immunother.,26:332-42(2003);以及Riddell等人,J.Immunol.Methods,128:189-201(1990)中所述的本领域已知的许多方法的任一种来实现。。在实施方案中,通过将T细胞与OKT3抗体、IL-2及饲养PBMC(例如经辐照的同种异体PBMC)一起培养来扩增T细胞数目。

[0125] 本发明的TCR、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体及宿主细胞(包含其群体)可以是分离的和/或纯化的。本文所用的术语“分离的”意指自其天然环境取出。本文所用的术语“纯化的”意指具有增加的纯度,其中“纯度”是相对术语,且无需解释为绝对纯度。例如,纯度可为至少约50%,可大于约60%、约70%、约80%、约90%、约95%,或可为约100%。

[0126] 本发明的TCR、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体及宿主细胞(包含其群体)(其在下文中通称为“本发明TCR材料”)可配制成组合物(例如药物组合物)。就此而言,本发明提供药物组合物,其包括本文所述的TCR、多肽、蛋白质、核酸、表达载体及宿主细胞(包含其群体)中的任一种及药学上可接受的载体。含有任何本发明TCR材料的本发明药物组合物可包括一种以上的本发明TCR材料(例如多肽及核酸)或两种或更多种不同的TCR。可选地,药物组合物可包括本发明TCR材料与另一药物活性剂或药物的组合,该另一药物活性剂或药物是(例如)化学治疗剂,例如天冬酰胺酶、白消安(busulfan)、卡铂(carboplatin)、顺铂(cisplatin)、柔红霉素(daunorubicin)、多柔比星(doxorubicin)、氟尿嘧啶、吉西他滨(gemcitabine)、羟基脲(hydroxyurea)、甲氨喋呤(methotrexate)、紫杉醇(paclitaxel)、利妥昔单抗(rituximab)、长春碱(vinblastine)、长春新碱(vincristine)等。

[0127] 优选地,载体是药学上可接受的载体。就药物组合物而言,载体可为常规用于所考虑的具体的本发明的TCR材料的那些载体中的任何载体。制备可给予的组合物的方法为本领域技术人员已知的或对于本领域技术人员是显而易见的且更详细地描述于(例如)Remington:The Science and Practice of Pharmacy,第22版,Pharmaceutical Press(2012)中。优选地,药学上可接受的载体是在使用条件下无有害副作用或毒性的载体。

[0128] 载体的选择部分地取决于特定本发明TCR材料以及用于施用本发明TCR材料的特定方法。因此,存在本发明的药物组合物的各种合适制剂。合适的制剂可包含用于肠胃外、皮下、静脉内、肌内、动脉内、鞘内、肿瘤内或腹膜内施用的那些制剂中的任何制剂。可使用一种以上途径来施用本发明的TCR材料,且在某些情况下,特定途径可较另一途径提供更直接且更有效的反应。

[0129] 优选地,通过注射(例如经静脉内)施用本发明TCR材料。在本发明TCR材料是表达本发明TCR的宿主细胞(或其群体)时,用于注射用细胞的药学上可接受的载体可包含任何等渗载体,例如生理盐水(于水中的约0.90%w/v NaCl、于水中的约300mOsm/L NaCl或约9.0g NaCl/升水)、NORMOSOL R电解质溶液(Abbott,Chicago,IL)、PLASMA-LYTE A(Baxter,Deerfield,IL)、于水中的约5%右旋糖或林格氏乳酸盐(Ringer's lactate)。在实施方案中,药学上可接受的载体补充有人类血清白蛋白。

[0130] 出于本发明的目的,所施用的本发明TCR材料的量或剂量(例如在本发明TCR材料

是一种或多种细胞时的细胞数)应足以在合理的时间范围内引起个体或动物中的例如治疗或预防反应。例如,本发明TCR材料的剂量应足以在自施用时开始约2小时或更长(例如12至24或更多小时)的时段内结合癌症抗原(例如突变的RAS)或检测、治疗或预防癌症。在某些实施方案中,该时间段甚至可能更长。剂量将由本发明的具体TCR材料的功效和动物(例如人)的状况以及待治疗的动物(例如人)的体重来确定。

[0131] 用于测定施用剂量的许多分析为本领域已知的。出于本发明的目的,可使用一种分析来测定拟施用于哺乳动物的起始剂量,所述分析包括在一组各自给予不同剂量的T细胞的哺乳动物中,在向哺乳动物施用给定剂量的表达本发明TCR、多肽或蛋白质的T细胞后,比较靶细胞裂解或T细胞分泌IFN- γ 的程度。可通过本领域已知的方法来分析在施用某一剂量时靶细胞裂解或IFN- γ 分泌的程度。

[0132] 本发明TCR材料的剂量亦取决于可伴随施用特定本发明TCR材料的任何不良副作用的存在、性质及程度。通常,主治医师将考虑各种因素来决定用以治疗每一个体患者的本发明TCR材料的剂量,该因素是(例如)年龄、体重、一般健康状况、饮食、性别、拟施用的本发明TCR材料、施用途径及所治疗癌症的严重程度。在本发明TCR材料是细胞群体的实施方案中,每一输注所施用的细胞数可有所变化,例如约 1×10^6 至约 1×10^{12} 个细胞或更多。在某些实施方案中,可施用少于 1×10^6 个细胞。

[0133] 本领域普通技术人员将易于了解,可以任何数量的方式来修饰本发明的发明性TCR材料,从而经由修饰来增加本发明TCR材料的治疗或预防功效。例如,本发明TCR材料可直接或经由桥间接缀合至化学治疗剂。本领域已知使化合物缀合至化学治疗剂的实践。本领域普通技术人员认识到,本发明TCR材料上并非本发明TCR材料的功能所需的位点是用于附接桥和/或化学治疗剂的合适位点,条件是桥和/或化学治疗剂在附接至本发明TCR材料后并不干扰本发明TCR材料的功能(亦即能够结合突变的RAS或能够检测、治疗或预防癌症)。

[0134] 本发明的药物组合物、TCR、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体、宿主细胞及细胞群体预计可用于治疗或预防癌症的方法中。不受限于特定理论,认为,本发明TCR特异性结合突变的RAS,从而TCR(或相关本发明多肽或蛋白质)在由细胞表达时能够介导针对表达突变的RAS的靶细胞的免疫应答。就此而言,本发明提供治疗或预防哺乳动物的癌症的方法,其包括以有效治疗或预防哺乳动物的癌症的量向哺乳动物施用以下物质:本文所述的任何药物组合物、TCR、多肽或蛋白质;任何包括编码本文所述的任何TCR、多肽、蛋白质的核苷酸序列的核酸或重组表达载体;或任何包括编码本文所述的任何TCR、多肽或蛋白质的重组载体的宿主细胞或细胞群体。

[0135] 本发明的实施方案提供用于治疗或预防哺乳动物的癌症的以下物质:本文所述的任何药物组合物、TCR、多肽或蛋白质;任何包括编码本文所述的任何TCR、多肽、蛋白质的核苷酸序列的核酸或重组表达载体;或任何包括编码本文所述的任何TCR、多肽或蛋白质的重组载体的宿主细胞或细胞群体。

[0136] 本文所用的术语“治疗”及“预防”以及源于其的词语未必暗示100%或完全治疗或预防。相反,存在不同程度的治疗或预防,其被本领域普通技术人员认为具有潜在的益处或治疗效果。在这方面,本发明的方法可以提供任何量任何水平的哺乳动物中癌症的治疗或预防。另外,由本发明方法提供的治疗或预防可包含治疗或预防所治疗或预防癌症的一种

或多种病状或症状。例如,治疗或预防可包含促进肿瘤消退。同样,出于本文目的,“预防”可涵盖延迟癌症或其症状或病状的发作。可选地或另外地,“预防”可涵盖预防或延迟癌症或其症状或病状的复发。

[0137] 亦提供检测哺乳动物中癌症存在的方法。该方法包括:(i)使包括来自哺乳动物的一个或多个细胞的样品与本文所述的任何本发明TCR、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体、宿主细胞、细胞群体或药物组合物接触,由此形成复合物;及检测复合物,其中检测到复合物指示哺乳动物存在癌症。

[0138] 就检测哺乳动物的癌症的本发明方法而言,细胞样品可为包括全细胞、其裂解物或全细胞裂解物级分(例如细胞核或细胞质级分、全蛋白级分或核酸级分)的样品。

[0139] 出于检测癌症的本发明方法的目的,接触可发生于哺乳动物的体外或体内。优选地,接触是在体外。

[0140] 同样,可经由本领域已知的任何数量的方式来检测复合物。例如,本文所述的本发明TCR、多肽、蛋白质、核酸、重组表达载体、宿主细胞或细胞群体可经可检测标记物进行标记,所述可检测标记物是(例如)放射性同位素、荧光团(例如异硫氰酸荧光素(FITC)、藻红素(PE))、酶(例如碱性磷酸酶、辣根过氧化物酶)及元素颗粒(例如金颗粒)。

[0141] 出于施用宿主细胞或细胞群体的本发明方法的目的,细胞可为哺乳动物的同种异体或自体细胞。优选地,细胞是哺乳动物自体的。

[0142] 就本发明方法而言,癌症可为任何癌症,包含以下癌症中的任一种:急性淋巴细胞性癌症、急性骨髓样白血病、肺泡横纹肌肉瘤、骨癌、脑癌、乳癌、肛门癌、肛管癌或直肠肛门癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、阴道癌、外阴癌、慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓样癌症、结肠癌、结肠直肠癌、子宫内膜癌、食管癌、宫颈癌、胃肠道类癌肿瘤、胶质瘤、霍奇金淋巴瘤(Hodgkin lymphoma)、下咽癌、肾癌、喉癌、肝癌、肺癌、恶性间皮瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤(non-Hodgkin lymphoma)、口咽癌、卵巢癌、阴茎癌、胰腺癌、腹膜癌、网膜癌及肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、输尿管癌及膀胱癌。优选的癌症是胰腺癌、结肠直肠癌、肺癌、子宫内膜癌、卵巢癌或前列腺癌。优选地,肺癌是肺腺癌,卵巢癌是上皮卵巢癌,且胰腺癌是胰脏腺癌。在本发明的实施方案中,癌症表达突变的人类RAS氨基酸序列,其中突变的人类RAS氨基酸序列是突变的人类KRAS、突变的人类HRAS或突变的人类NRAS氨基酸序列。由癌症表达的突变的人类KRAS、突变的人类HRAS及突变的人类NRAS可如本文针对本发明其他方面所述。

[0143] 本发明方法中所提及的哺乳动物可为任何哺乳动物。如本文中所使用,术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物,包括但不限于:啮齿目(Rodentia)哺乳动物(例如小鼠及仓鼠)及兔形目(Logomorpha)哺乳动物(例如兔)。优选地,哺乳动物来自食肉目(Carnivora),包含猫类(猫)及犬类(狗)。更优选地,哺乳动物来自偶蹄目(Artiodactyla)(包含牛类(牛)及猪类(猪))或奇蹄目(Perssodactyla)(包含马类(马))。最优选地,哺乳动物是灵长目(Primate)、猿目(Ceboid)或猴目(Simoid)(猴)或类人猿目(人类及猿)。特别优选的哺乳动物是人类。

[0144] 下列实施例进一步阐释本发明,但当然不应理解为以任何方式限制本发明范围。

[0145] 实施例1

[0146] 此实施例证实,分离出对由HLA-DRB1*07:01分子呈递的具有G12V突变的人类KRAS具有抗原特异性的TCR。

[0147] 自患者的子宫内膜肿瘤样品分离对由HLA-DRB1*07:01分子呈递的具有G12V突变的人类KRAS具有抗原特异性的TCR。简言之,将肿瘤样品切碎,消化,并冷冻。在细胞分选前,将肿瘤消化物解冻并在无细胞因子下放置过夜。基于PD-1和/或OX40表达(设门于PI⁻(活细胞)>CD3+)使用FACS自肿瘤消化物分选T细胞。FACS结果展示于图1中。将同种型染色的细胞用作对照。

[0148] 根据快速扩增方案(REP)来将分选细胞数扩增3.5周。对于REP而言,将T细胞在OKT3抗体、IL-2及辐照同种异体PBMC存在下培养于微量滴定96孔板中(3个细胞/孔)。

[0149] 汇集扩增数量的细胞,并针对用汇集的25-mer肽或由涵盖检测于患者肿瘤中的各种肿瘤特异性突变的25-mer串联小基因(TMG)编码的肽脉冲的自体树突状细胞(DC)测试反应性。每一池各自含有17-21个肽或TMG。通过酶联免疫斑点(ELISPOT)测量干扰素- γ (IFN- γ)分泌。结果展示于图2中。如图2中所展示,培养物编号7及8中的所汇集效应自体T细胞识别用肽池1(PP1)及肽池2(PP2)脉冲的靶标DC。

[0150] 针对用来自相关肽池的每个单一肽脉冲的自体DC来测试突变反应性T细胞培养物。图3展示在将自体T细胞培养物编号7(W7)与用来自肽池1(PP1)的肽1-17(P1-P17)中的每一者脉冲的自体DC共培养后所获得的结果。如图3中所展示,培养物编号7的T细胞针对肽P17展示高特异性。肽17(P17)编码KRAS^{G12V}突变。

[0151] 从自体T细胞培养物编号(W7)的细胞分离总RNA。然后使用TCR- α 及- β 链恒定引物,总RNA进行5'互补DNA端(5' RACE)的快速扩增。然后通过标准琼脂糖凝胶电泳及凝胶提取来分离TCR PCR产物。对产物直接测序。TCR α 链及 β 链可变区的核苷酸序列分别是SEQ ID NO: 42及43。TCR α 链及 β 链可变区的氨基酸序列展示于表6中。将互补决定区(CDR)加下划线。

[0152] 表6

[0153]

TCR ID	TCR链	氨基酸序列 将互补决定区(CDR)加下划线
KRAS ^{G12V} -HLA-	α	MTSIRAVFIFLWLQLDLVNGENVEQHPS

[0154]	DRB1*07:01	(TRAV13-1)	T L S V Q E G D S A V I K C T Y S D S A S N Y F P W Y K Q E L G K G P Q L I I D I R S N V G E K K D Q R I A V T L N K T A K H F S L H I T E T Q P E D S A V Y F C A A S T <u>G G G N K L T F G T G T Q L K V E L</u> (SEQ ID NO: 13)
		β (TRBV20-1)	M L L L L L L L G P A G S G L G A V V S Q H P S R V I C K S G T S V K I E C R S L D F Q A T T M F W Y R Q F P K Q S L M L M A T S N E G S K A T Y E Q G V E K D K F L I N H A S L T L S T L T V T S A H P E D S S F Y I C S A R E <u>G A G G M G T Q Y F G P G T R L L V L</u> (SEQ ID NO: 14)

[0155] 实施例2

[0156] 此实施例证实,实施例1中所分离的TCR识别HLA-DR分子背景中呈递的KRAS G12V肽抗原。

[0157] 将编码实施例1的分离的G12V反应性TCR(包括SEQ ID NO:42及SEQ ID NO:43的核苷酸序列)且包含半胱氨酸取代的、LVL修饰的鼠类恒定区的核酸序列克隆至逆转录病毒表达载体中。 α 链鼠类恒定区包括SEQ ID NO:30的氨基酸序列,其中位置48的X是Cys,位置112的X是Leu,位置114的X是Ile,且位置115的X是Val。 β 链恒定区包括SEQ ID NO:31的氨基酸序列,其中位置57的X是Cys。包括SEQ ID NO:54的氨基酸序列的接头定位于 α 链恒定区与 β 链可变区之间。使用逆转录病毒表达载体转导同种异体T细胞。

[0158] 将转导细胞(效应细胞)与用KRAS^{G12V}肽(1ng/mL)脉冲的靶自体抗原呈递细胞(APC)以及HLA-封闭抗体W6/32(抗HLA-A、-B、-C)、IVA12(泛特异性,抗HLA II类)、B7/21(抗HLA-DP)、HB55(抗HLA-DR)或SPV-L3(HLA-DQ)(靶细胞)共培养。单独培养的、与DMSO或佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯(PMA)一起培养的效应转导细胞用作对照。经与靶自体APC(用1ng/mL KRAS G12V肽(SEQ ID NO:53)脉冲的)共培养的空载体(模拟)转导的效应细胞用作再一对照。

[0159] 通过使用流式细胞术检测的4-1BB表达来测量效应细胞针对靶细胞的反应性(设门于CD3+mTCR β 链+细胞)。结果展示于图4中。如图4中所展示,IVA12及HB55抗体阻断效应细胞针对靶细胞的反应性,从而指示经转导效应细胞识别HLA-DR分子背景中呈递的KRAS G12V肽抗原。

[0160] 实施例3

[0161] 此实施例证实,实施例2的TCR识别HLA-DRB1*07:01分子背景中呈递的KRAS G12V肽抗原。

[0162] 将经实施例2的TCR转导的同种异体T细胞(效应细胞)与实施例1患者的自体APC或来自具有DRB101:01或DRB107:01单倍型的供体的APC(靶细胞)共培养。用KRAS^{G12V}肽(SEQ ID NO:53)或WT KRAS肽(SEQ ID NO:55)脉冲靶细胞。将效应细胞与来自HLA-DRB1阳性供体

的APC(作为对照)共培养(其中一个而非两个供体等位基因是DRB1*07:01) (“DRB错配”)。单独培养的、与DMSO或与PMA-离子霉素一起培养的效应细胞用作其他对照。通过ELISPOT测量IFN- γ 分泌。对阳性孔数进行计数。结果展示于表7及图5中。在表7中,“TNTC”代表“过多以致无法计数”。也通过流式细胞术测量表达4-1BB的mTCR表达细胞的百分比。结果展示于图5中。结果展示,TCR针对由HLA-DRB*07:01呈递的突变的KRAS具有特异性反应性。

[0163] 表7

	自体 (患者4148)	DRB1 01:01 供体	DRB1 07:01 供体	HLA-DRB1 错配供体
[0164] KRAS WT	约(~) 354	2	~291	58
KRAS G12V	TNTC	27	TNTC	41
DMSO	102	2	123	~180
仅细胞	12	3	1	1
OKT3	~1122	~1019	~1007	~983

[0165] 实施例4

[0166] 此实施例证实,分离出对由HLA-DRB1*11:01分子呈递的具有G12C突变的人类KRAS具有抗原特异性的TCR。

[0167] 使用来自具有KRAS^{G12C}-表达肿瘤的卵巢癌患者的外周血T细胞子组的重复体外敏化(IVS)来鉴别KRAS^{G12C}反应性TCR。

[0168] 用G12C突变的肽(SEQ ID NO:56)脉冲自体DC并与经分选T细胞子组共培养10天,然后如实施例1中所述测试反应性。

[0169] 为进一步富集反应性细胞,基于4-1BB/OX40表达来分选针对KRAS突变的肽的反应性部分并使用突变的肽再次刺激。基于4-1BB/OX40表达来分选反应性T细胞并测序。

[0170] 自细胞分离总RNA。然后使用TCR- α 及- β 链恒定引物,总RNA进行5' 互补DNA端(5' RACE)的快速扩增。然后通过标准琼脂糖凝胶电泳及凝胶提取来分离TCR PCR产物。对产物直接测序。TCR α 链及 β 链可变区的核苷酸序列分别是SEQ ID NO:44及45。TCR α 链及 β 链可变区的氨基酸序列展示于表8中。将互补决定区(CDR)加下划线。

[0171] 表8

TCR ID	TCR链	氨基酸序列 将互补决定区(CDR)加下划线
[0172] KRAS ^{G12C} - HLA- DRB1*11:01	α (TRAV24)	MEKNPLAAPLLILWFHLDCVSSILNVEQSPQSLH VQEGDSTNFTCSFP <u>SSNFYALHWYRWETAKSPE</u> ALFVMTLNGDEKKKGRISATLNTKEGYSLYIKG SQPEDSATYLCAFTTGNQFYFGTGTSLTVIP (SEQ ID NO: 15)
	β (TRBV12-4)	MGSWTLCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTE MGQEVTLRCKPISGHDYLFWYRQTMMRGLELLI YFNNNPIDDSGMPEDRFSKMPNASFSTLKIQP SEPRDSAVYFCASSYGGYSNQPQHFGDGTRLISI LED (SEQ ID NO: 16)

[0173] 实施例5

[0174] 此实施例证实,实施例4中所分离的TCR识别HLA-DR分子背景中呈递的KRAS G12C肽抗原。

[0175] 将编码实施例4的分离的G12C反应性TCR(包括SEQ ID NO:44及SEQ ID NO:45的核苷酸序列)且包含半胱氨酸取代的、LVL修饰的鼠类恒定区的核酸序列克隆至逆转录病毒表达载体中。 α 链鼠类恒定区包括SEQ ID NO:30的氨基酸序列,其中位置48的X是Cys,位置112的X是Leu,位置114的X是Ile,且位置115的X是Val。 β 链恒定区包括SEQ ID NO:31的氨基酸序列,其中位置57的X是Cys。包括SEQ ID NO:54的氨基酸序列的接头定位于 α 链恒定区与 β 链可变区之间。使用逆转录病毒表达载体转导同种异体T细胞。

[0176] 在使用针对HLA-DQ、HLA-DR或HLA-DP的抗体或针对HLA-DP、HLA-DR及HLA-DQ的全部的泛特异性抗体阻断膜MHC II类分子后,将转导细胞(效应细胞)与匹配于单一HLA-DRB15:01或HLA-DRB11:01等位基因且脉冲输送有KRAS^{G12C} 24-mer肽(SEQ ID NO:56)的靶自体DC或同种异体DC共培养。与佛波醇肉豆蔻酸乙酸酯(PMA)或WT KRAS(SEQ ID NO:55)一起培养的效应转导细胞用作对照。

[0177] 通过使用流式细胞术检测的4-1BB表达来测量效应细胞针对靶细胞的反应性(设门于CD3+mTCR β 链+细胞)。结果展示于图10中。如图10中所展示,TCR针对由HLA-DRB*11:01呈递的KRAS^{G12C}具有特异性反应性。

[0178] 实施例6

[0179] 此实施例证实,经实施例5的KRAS^{G12C} TCR转导的PBMC识别用KRAS^{G12C}肽脉冲的自体DC。

[0180] 使用编码实施例5的KRAS^{G12C} TCR的MSGV-1-逆转录病毒对同种异体T细胞进行基因改造。向自体DC加载WT KRAS(SEQ ID NO:55)或KRAS^{G12C}肽(SEQ ID NO:56)并与TCR转导的细胞共培养18小时,随后使用流式细胞术分析4-1BB上调。结果展示于图9中。如图9中所

展示,经实施例5的KRAS^{G12C} TCR转导的PBMC识别用KRAS^{G12C}肽脉冲的自体DC。

[0181] 实施例7

[0182] 此实施例证实,KRAS G12V突变的蛋白经受处理且由DC呈递,并由实施例2的TCR识别。

[0183] 将经实施例2中G12V-DRB1*07:01转导的同种异体T细胞与用表达下列KRAS G12突变之一的肿瘤细胞系的细胞裂解物脉冲的自体DC共培养过夜:G12R、G12C、G12D或G12V。与用表达WT KRAS的肿瘤细胞系的细胞裂解物脉冲的自体DC共培养的转导细胞用作对照。单独培养或与PMA或DMSO一起培养的转导细胞用作其他对照。通过流式细胞术测量上调4-1BB和/或OX40的细胞的百分比。通过ELISPOT测量表达IFN γ 的细胞数(斑点/ 2×10^4 个细胞)。结果展示于图6中。如图6中所展示,KRAS G12V突变的蛋白经受处理且由DC呈递,并由实施例2的TCR识别。

[0184] 实施例8

[0185] 此实施例证实,经实施例2的G12V-DRB1*07:01TCR转导的细胞特异性识别KRAS^{G12V}肽。

[0186] 将经实施例2的G12V-DRB1*07:01TCR转导的同种异体T细胞与用各种浓度的24-mer肽KRAS^{G12V}(SEQ ID NO:53)或WT KRAS(SEQ ID NO:55)脉冲的自体DC共培养过夜。通过流式细胞术测量mTCR β +CD8+4-1BB+细胞的百分比。结果展示于图7中。如图7中所展示,经实施例2的G12V-DRB1*07:01TCR转导的细胞特异性识别KRAS^{G12V}肽。

[0187] 实施例9

[0188] 经实施例2的G12V-DRB1*07:01TCR转导的细胞特异性识别各种KRAS^{G12V}肽。

[0189] 将经实施例2的G12V-DRB1*07:01TCR转导的同种异体T细胞与用各种浓度的下表9中所列的肽脉冲的自体DC共培养过夜。通过ELISPOT测量IFN γ 分泌。结果展示于图8中。如图8中所展示,尽管经实施例2的G12V-DRB1*07:01TCR转导的细胞特异性识别所有KRAS^{G12V}肽,但SEQ ID NO:52最佳。

[0190] 表9

	名称	序列	SEQ ID NO:
[0191]	KRAS G12V 11mer	LVVVGAVGVGK	46
	KRAS G12V 12mer_1	KLVVVGAVGVGK	47
	KRAS G12V 12mer_2	LVVVGAVGVGKS	48
[0192]	KRAS G12V 13mer_1	YKLVVVGAVGVGK	49
	KRAS G12V 13mer_2	KLVVVGAVGVGKS	50
	KRAS G12V 13mer_3	LVVVGAVGVGKSA	51
	KRAS G12V 15mer_3	EYKLVVVGAVGVGKS	52
	KRAS G12V 24mer	MTEYKLVVVGAVGVGKSALTIQLI	53

[0193] 本文所引用的所有参考文献(包括出版物、专利申请及专利)皆以引用方式并入本文中,其并入程度如同将每一参考文献单独且特别指示以通过引用并入本文中且以其整体示于本文中一般。

[0194] 除非本文另外指示或上下文明显矛盾,否则在描述本发明的上下文(尤其在下述权利要求的上下文)中,术语“一个/一种(a)”和“一个/一种(an)”及“该”以及“至少一者”及类似指示物的使用皆应解释为涵盖单数及复数二者。除非本文另外指示或上下文明显矛盾,否则紧接着一或多个物项的列表使用的术语“至少一者”(例如“A及B中的至少一者”)应解释为意指选自所列物项的一个物项(A或B)或两个或更多个所列物项的任何组合(A及B)。除非另外注明,否则术语“包括”、“具有”、“包含”及“含有”应解释为开放式术语(亦即,意指“包括但不限于”)。除非本文另外指示,否则本文中数值范围的叙述仅意欲作为单独提及落入此范围内的每一单独值的速记方法,并且每一单独值是如同在本文单独列举一般并入说明书中。除非本文另外指示或上下文另外明显矛盾,否则本文所述的所有方法皆可以以任何合适顺序实施。除非另有主张,否则,本文中所提供的任何及所有实施例或示例性语言(例如“如”)的使用仅意欲更佳地阐明本发明且并不对本发明范围强加限制。本说明书中的任何语言皆不应解释为指示任何未要求保护的要素对于本发明实践是必需的。

[0195] 本文描述了本发明的优选实施方案,包含发明人已知用于实施本发明的最佳模式。通过阅读前面的描述,这些优选实施方案的变化对那些本领域普通技术人员是显而易见的。发明人期望技术人员适当地应用此类变型,并且发明人意欲以不同于本文具体描述的方式实施本发明。因此,如适用法律所允许的,本发明包括所附权利要求中叙述的主题的所有修饰和等同主题。此外,本发明包括上述元素以其所有可能的变体形式的任何组合,除非本文另外指明或者与上下文明显矛盾。

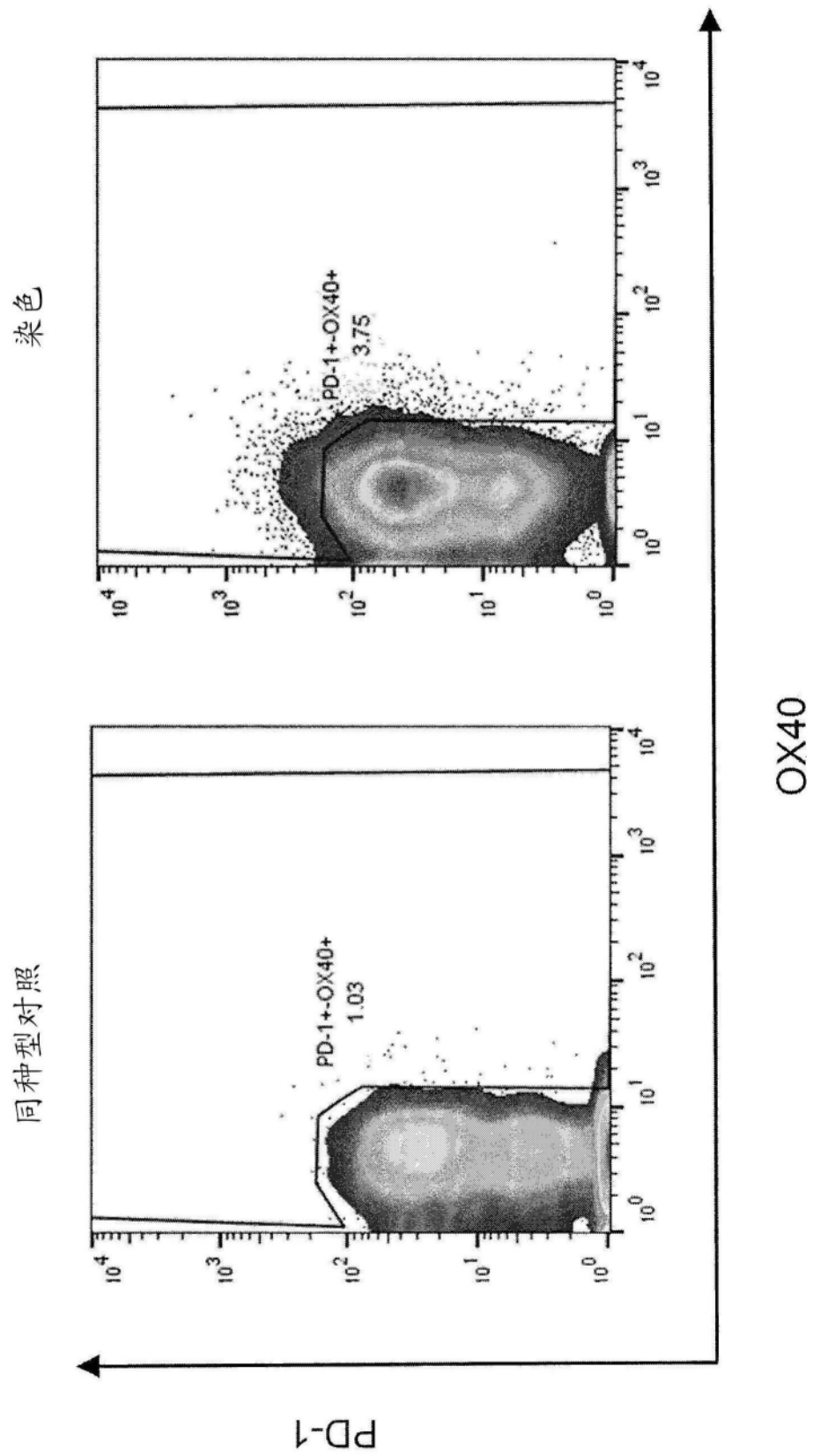


图1

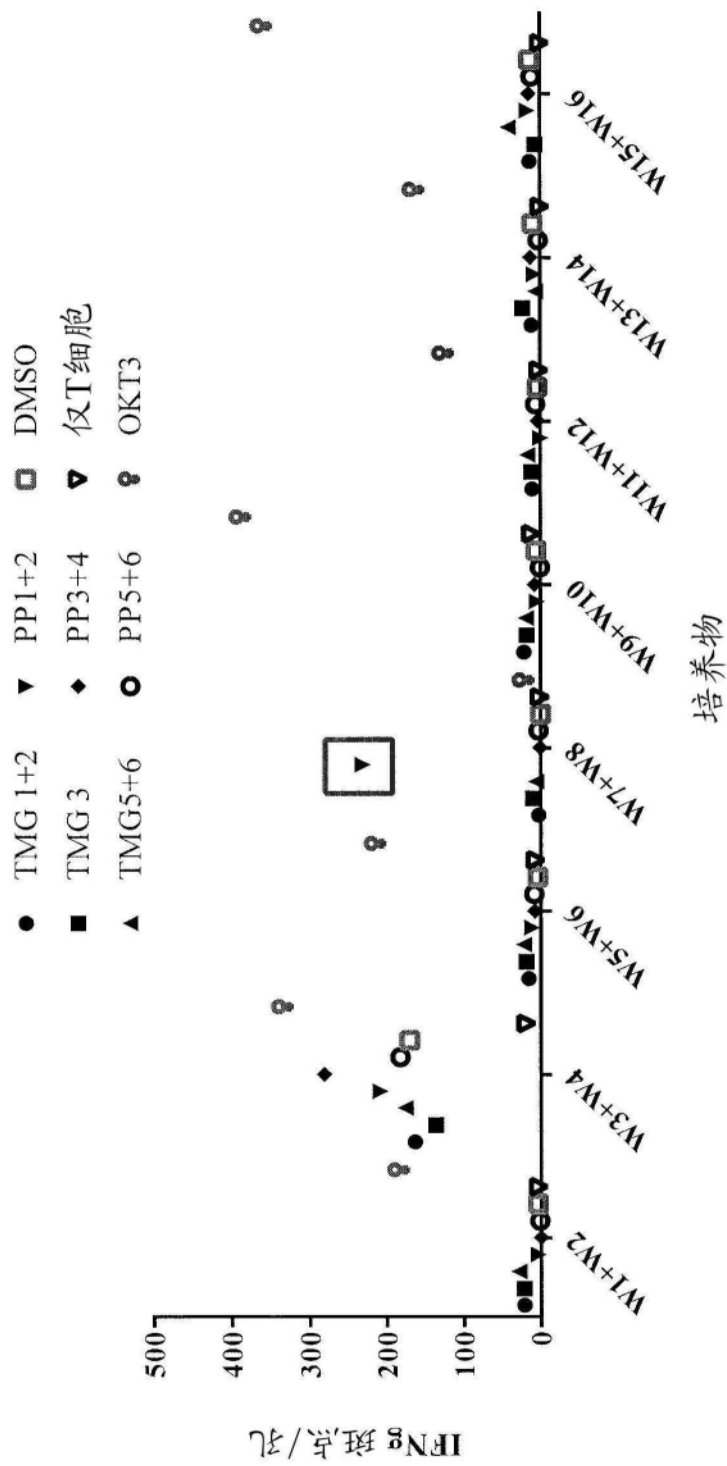


图2

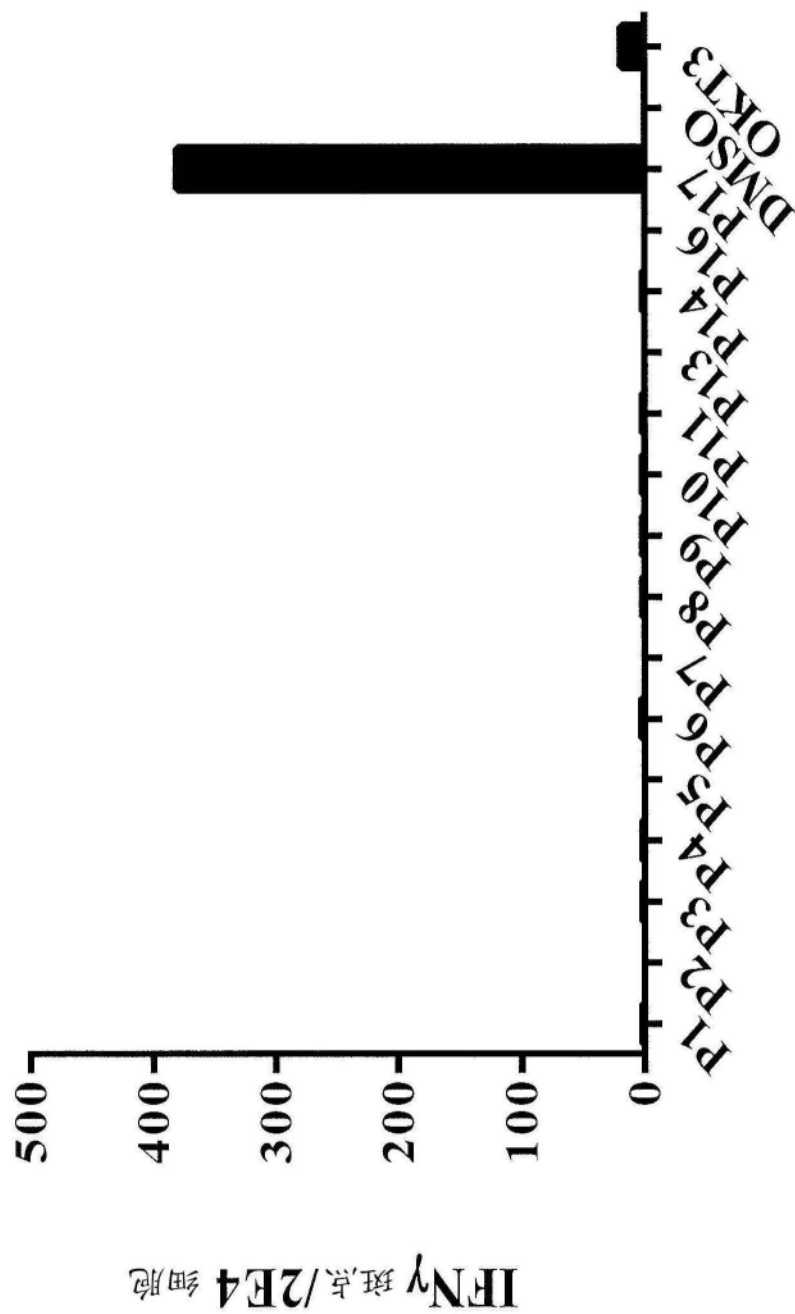


图3

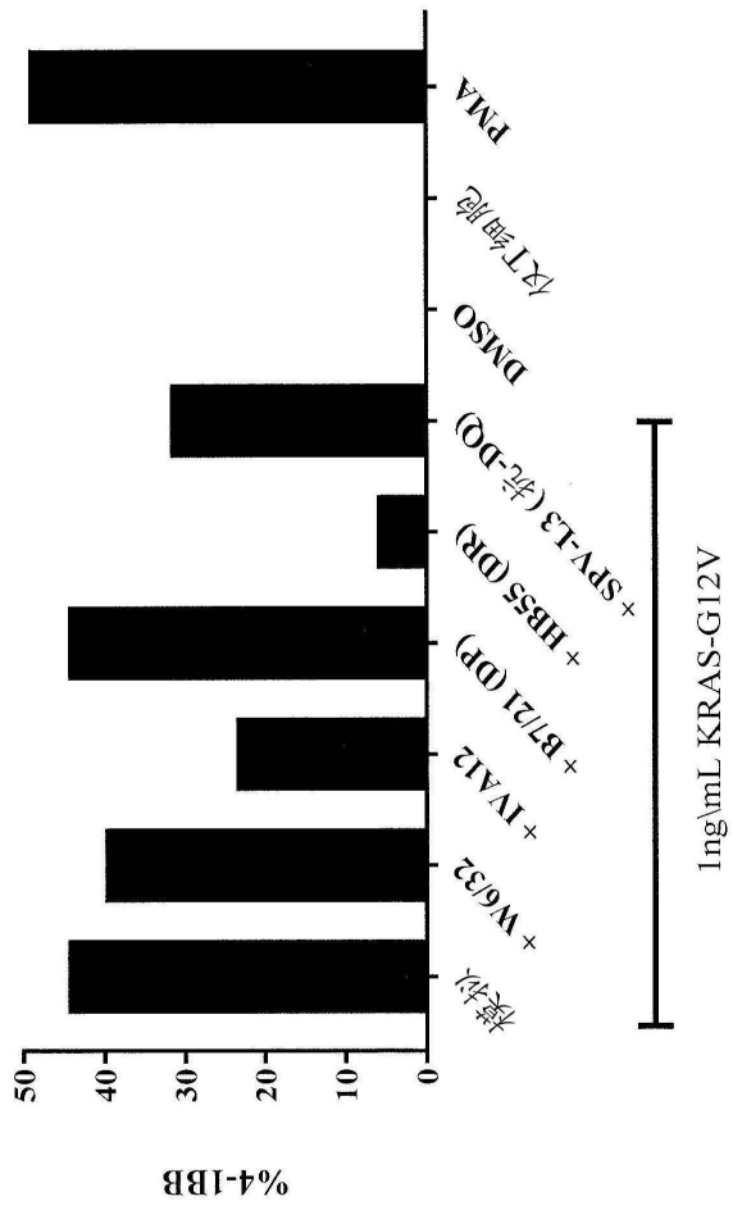


图4

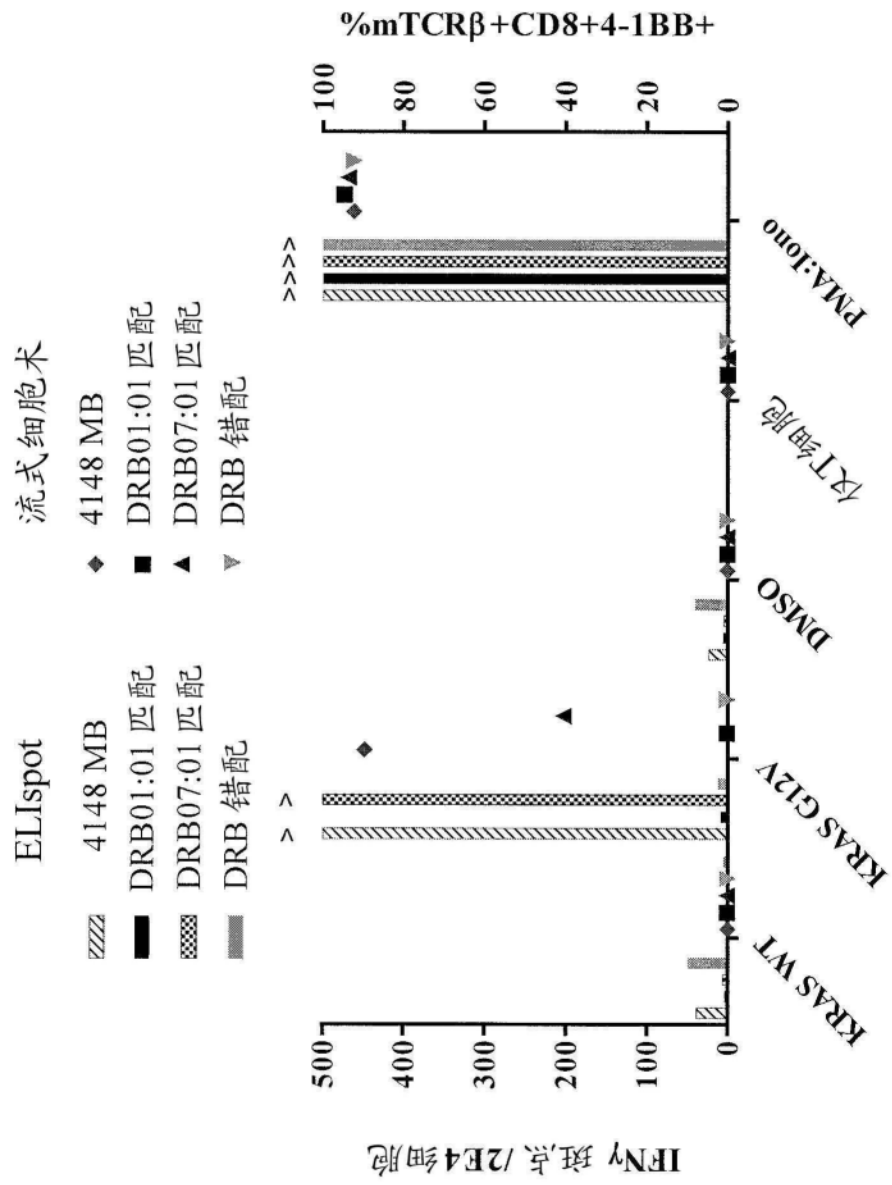


图5

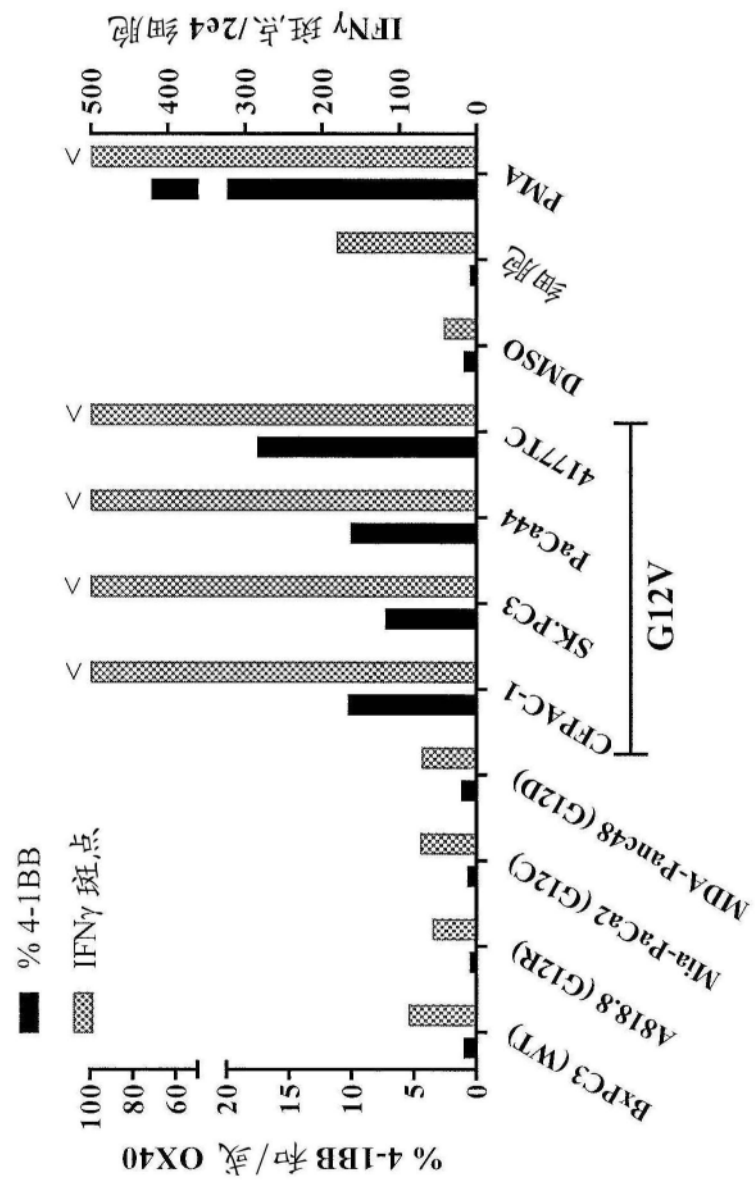


图6

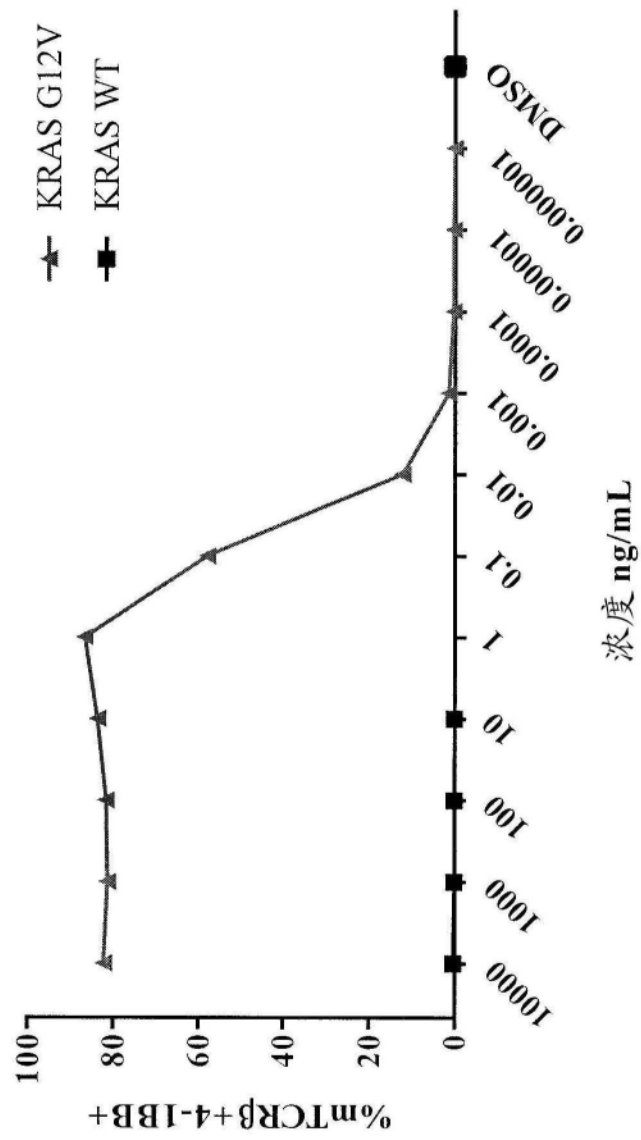


图7

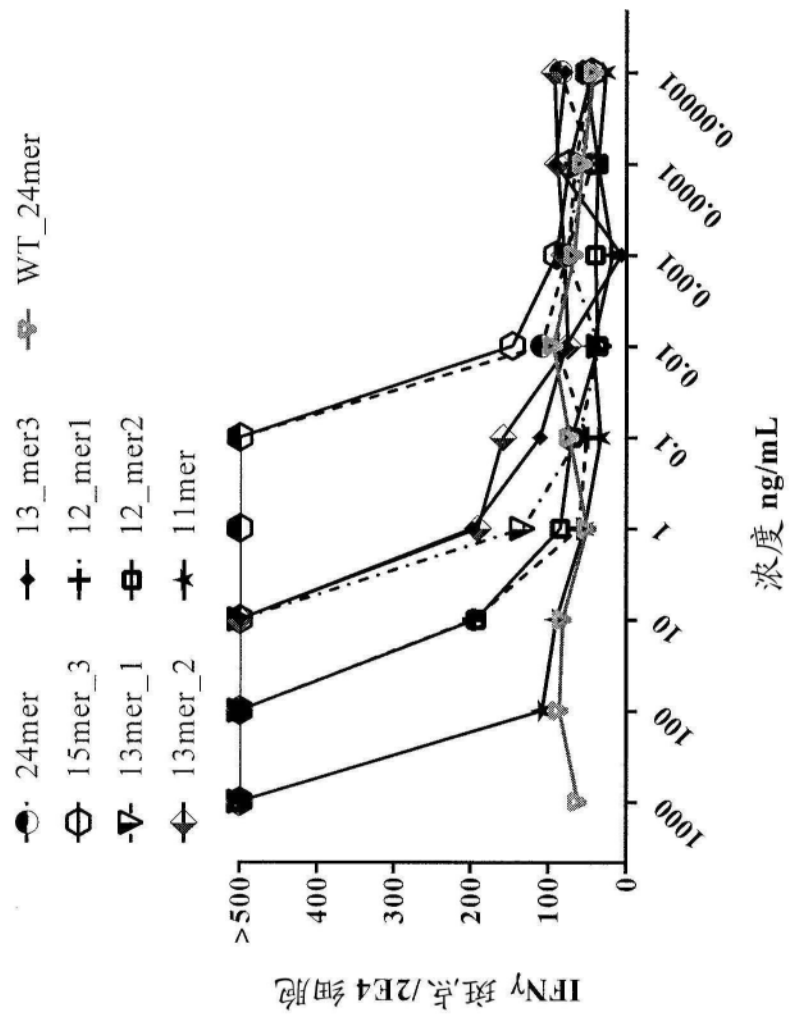


图8

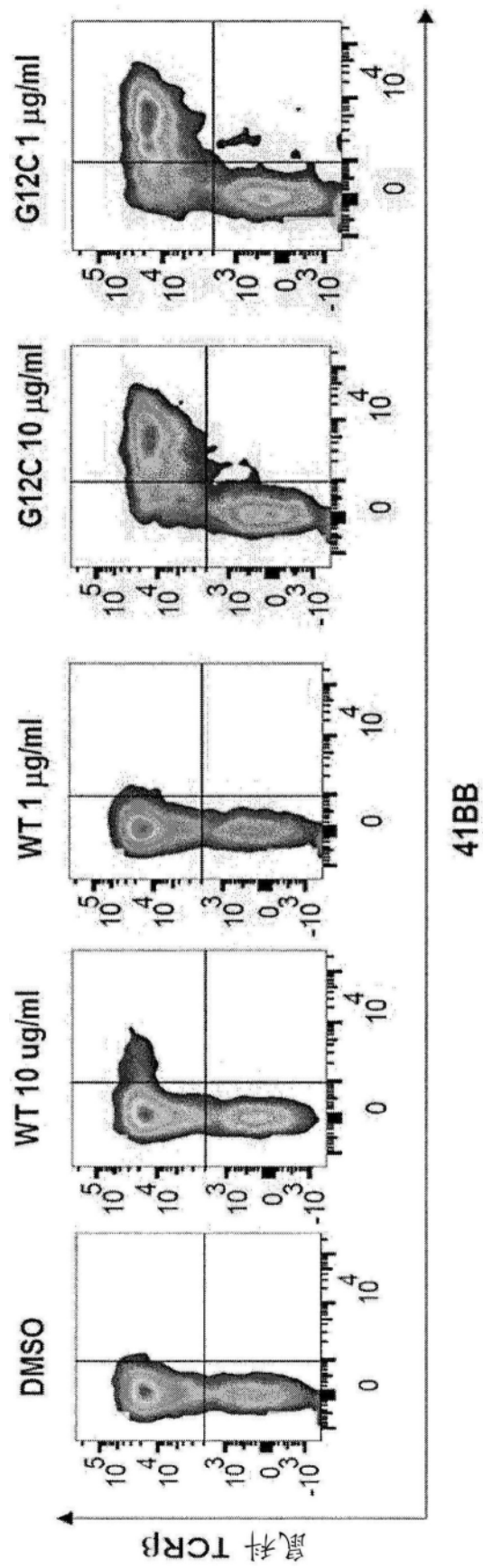


图9

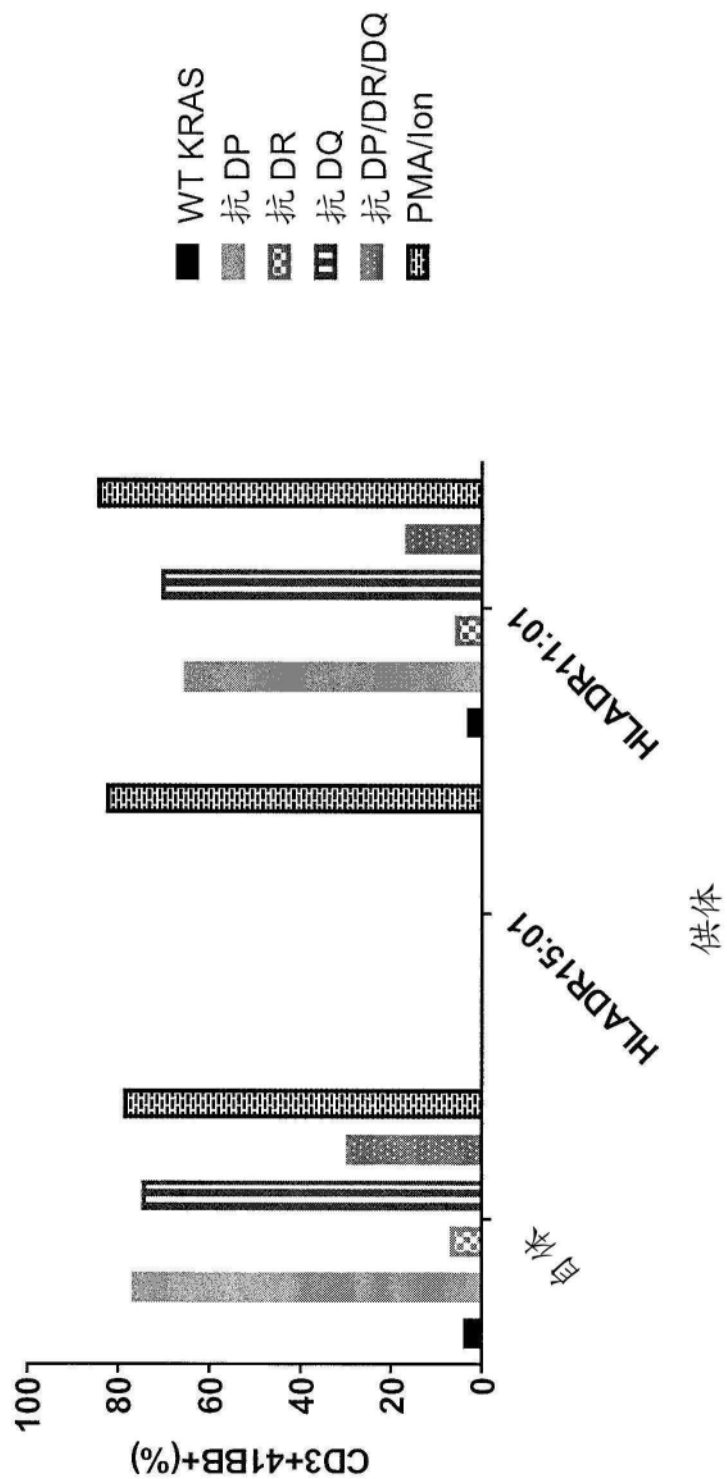


图10