



(21) 申请号 201780038176.8

(22) 申请日 2017.05.09

(65) 同一申请的已公布的文献号
申请公布号 CN 109328196 A

(43) 申请公布日 2019.02.12

(30) 优先权数据
1608052.5 2016.05.09 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日
2018.12.19

(86) PCT国际申请的申请数据
PCT/EP2017/061087 2017.05.09

(87) PCT国际申请的公布数据
WO2017/194555 EN 2017.11.16

(73) 专利权人 奥斯陆大学医院HF
地址 挪威奥斯陆

(72) 发明人 E·M·因德贝格 G·高德纳克
S·瓦赤莉 G·科瓦尔海姆

(74) 专利代理机构 北京信诺创成知识产权代理
有限公司 11728

专利代理师 尹吉伟

(51) Int.Cl.

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 14/495 (2006.01)

(56) 对比文件

CN 103732623 A, 2014.04.16

CN 102574922 A, 2012.07.11

CN 105008380 A, 2015.10.28

WO 2015189267 A2, 2015.12.17

E.Inderberg-Suso et al..Enhanced
expression and anti-tumour activity of T
cells engineered to express a cysteine-
modified TCR targeting a frameshift
mutation in MSI-HI colorectal cancer.

《Cytotherapy》.2014,第16卷(第4期),

耿洪刚等.HNPCC大肠腺瘤及癌组织微卫星
不稳定与TGF β RII表达的关系.《胃肠病学和肝
病学杂志》.2008,第17卷(第7期),

审查员 王静

权利要求书3页 说明书40页

序列表64页 附图10页

(54) 发明名称

识别TGF β RII的移码突变体的T细胞受体

(57) 摘要

本发明涉及TCR分子,其识别在人TGF β RII
中癌症相关的“-1A”移码突变而产生的新肽。该
TCR分子能够在SEQ ID NO:1的肽由MHC I类呈递
时结合所述肽,并且包含 α 链结构域和 β 链结构
域,每个链结构域包含三个CDR序列,其中,a) α
链结构域的CDR1、2和3分别具有SEQ ID NO:2、3
和4的序列;以及b) β 链结构域的CDR1、2和3分别
具有SEQ ID NO:5、6和7的序列,并且其中一个或
多个所述CDR序列可以任选地通过1个或2个氨基
酸的取代、添加或缺失来修饰。提供了编码这种
TCR的核酸分子,还提供了具有这些CDR序列的可
溶性TCR分子。本发明的核酸分子可用于修饰免

疫效应细胞以表达如本文所定义的TCR,并且此
类修饰的免疫效应细胞可用于治疗癌症,如上定
义的可溶性TCR亦是如此。

1. 编码针对突变的TGFβRII蛋白的T细胞受体 (TCR) 分子的核酸分子, 所述突变的TGFβRII蛋白的氨基酸序列包含SEQ ID NO:1的序列, 其中当包含HLA-A2的主要组织相容性复合体 (MHC) I类呈递SEQ ID NO:1的肽时, 所述TCR分子能够结合SEQ ID NO:1的肽, 并且其中所述TCR分子包含α链结构域和β链结构域, 每个链结构域包含三个CDR, 其中

- a) α链结构域的CDR1、2和3的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:2、3和4的序列组成; 和
- b) β链结构域的CDR1、2和3的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:5、6和7的序列组成; 并且其中所述α链结构域包含:

i) 含有SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列或与其具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的可变区; 和

ii) 包含SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列或相对于SEQ ID NO:9包含一个或多个氨基酸取代或插入并且与SEQ ID NO:9具有至少95%序列同一性的SEQ ID NO:9的修饰形式或SEQ ID NO:9的鼠源化形式的恒定区; 并且

所述β链结构域包含:

i) 含有SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列或与其具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的可变区; 和

ii) 包含SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列或与SEQ ID NO:14具有至少95%序列同一性的氨基酸序列或SEQ ID NO:14的鼠源化形式的恒定区。

2. 根据权利要求1所述的核酸分子, 其中所述α链结构域和/或所述β链结构域包含具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的双Myc标签。

3. 根据权利要求1所述的核酸分子, 其中所述α链结构域的恒定区通过插入半胱氨酸残基或取代为半胱氨酸残基而被修饰; 并且

所述β链结构域的恒定区通过插入半胱氨酸残基或取代为半胱氨酸残基而被修饰。

4. 根据权利要求1所述的核酸分子, 其中

(i) 所述α链结构域包含可变区和恒定区, 所述可变区的氨基酸序列包含如SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列, 所述恒定区的氨基酸序列包含如SEQ ID NO:9所示的氨基酸序列; 并且

(ii) 所述β链结构域包含可变区和恒定区, 所述可变区的氨基酸序列包含如SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列, 所述恒定区的氨基酸序列包含如SEQ ID NO:14所示的氨基酸序列。

5. 根据权利要求4所述的核酸分子, 其中所述α链结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列并且所述β链结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列。

6. 根据权利要求1所述的核酸分子, 其中所述α链结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列并且所述β链结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:31的氨基酸序列。

7. 根据权利要求3所述的核酸分子, 其中所述α链结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列并且所述β链结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:17的氨基酸序列。

8. 根据权利要求3所述的核酸分子, 其中所述α链结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列并且所述β链结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:32的氨基酸序列。

9. 编码针对突变的TGFβRII蛋白的可溶性T细胞受体 (TCR) 分子的核酸分子, 所述突变的TGFβRII蛋白的氨基酸序列包含SEQ ID NO:1的序列, 其中当包含HLA-A2的主要组织相容

性复合体 (MHC) I类呈递SEQ ID NO:1的肽时,所述TCR分子能够结合SEQ ID NO:1的肽,并且其中所述可溶性TCR分子包含 α 链结构域和 β 链结构域,每个链结构域包含三个CDR,其中

- a) α 链结构域的CDR1、2和3的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:2、3和4的序列组成;和
- b) β 链结构域的CDR1、2和3的氨基酸序列分别由SEQ ID NO:5、6和7的序列组成;并且其中所述 α 链结构域包含:

i) 含有SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列或与其具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的可变区;和

ii) 包含SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列或与其具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的恒定区;并且

所述 β 链结构域包含:

i) 含有SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列或与其具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的可变区;和

ii) 包含SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列或与其具有至少95%序列同一性的氨基酸序列的恒定区。

10. 根据权利要求9所述的核酸分子,其中所述 α 链结构域的恒定区通过插入半胱氨酸残基或取代为半胱氨酸残基而被修饰;并且所述 β 链结构域的恒定区通过插入半胱氨酸残基或取代为半胱氨酸残基而被修饰。

11. 根据权利要求9所述的核酸分子,其中所述 α 链结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:73所示的氨基酸序列并且所述 β 链结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:76所示的氨基酸序列。

12. 根据权利要求10所述的核酸分子,其中所述 α 链结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:74所示的氨基酸序列,并且所述 β 链结构域的氨基酸序列包含SEQ ID NO:77所示的氨基酸序列。

13. 根据权利要求1至12任一项所述的核酸分子,其中所述TCR分子被编码为单链TCR (scTCR),其包含与 β 链结构域通过自剪接的接头连接的 α 链结构域。

14. 根据权利要求13所述的核酸分子,其中所述接头是2A肽并且所述2A肽的氨基酸序列由SEQ ID NO:18的氨基酸序列组成。

15. 根据权利要求14所述的核酸分子,其中所述scTCR的氨基酸序列包含SEQ ID NO:33至40中任一个的氨基酸序列。

16. 根据权利要求1至12中任一项所述的核酸分子,其中所述核酸是RNA。

17. 一种载体,其包含根据权利要求1至16中任一项所述的核酸分子。

18. 根据权利要求17所述的载体,其中所述载体是表达载体或克隆载体。

19. 根据权利要求18所述的载体,其中所述载体是mRNA表达载体。

20. 根据权利要求17所述的载体,其中所述载体是病毒载体。

21. 根据权利要求20所述的载体,其中载体是逆转录病毒或慢病毒载体。

22. 一种根据权利要求9至12中任一项定义的可溶性TCR分子。

23. 一种宿主细胞,其包含根据权利要求1至16中任一项所述的核酸分子或根据权利要求17至21中任一项所述的载体。

24. 根据权利要求23所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是免疫效应细胞,所述核酸分

子根据权利要求1-8中任一项所定义,或所述载体包含根据权利要求1-8中任一项所定义的核酸分子。

25. 根据权利要求24所述的宿主细胞,其中所述免疫效应细胞是T细胞或NK细胞。

26. 根据权利要求23所述的宿主细胞,其中所述宿主细胞是生产宿主细胞,所述核酸分子根据权利要求9-12中任一项所定义或所述载体包含根据权利要求9-12中任一项所定义的核酸分子。

27. 根据权利要求26所述的宿主细胞,其中所述生产宿主细胞是人细胞。

28. 一种组合物,其包含根据权利要求22所述的TCR分子或根据权利要求24或25中所述的免疫效应细胞,和至少一种生理学上可接受的载体或赋形剂。

29. 一种产生TGFβRII移码突变体特异性免疫效应细胞的方法,所述方法包括将根据权利要求1-8中任一项所定义的核酸分子或根据权利要求17-21中任一项所定义的载体引入免疫效应细胞,所述载体包含根据权利要求1-8中任一项所定义的核酸分子。

30. 根据权利要求29所述的方法,其中所述方法还包括在引入所述核酸分子或载体之前和/或之后刺激所述细胞并诱导其增殖。

31. 根据权利要求29或30所述的方法,其中所述细胞是T细胞或NK细胞。

32. 根据权利要求22所述的TCR分子或根据权利要求24或25中所述的免疫效应细胞在制备用于治疗癌症的药物中的用途,其中所述癌症表达突变的TGFβRII蛋白,所述突变的TGFβRII蛋白的氨基酸序列包含SEQ ID NO:1。

33. 根据权利要求32所述的用途,其中所述癌症是结肠直肠癌。

34. 根据权利要求32或33所述的用途,其中所述癌症在患有Lynch综合征的个体中。

识别TGFβRII的移码突变体的T细胞受体

技术领域

[0001] 本发明涉及识别转化生长因子-β受体II (TGFβRII) 的移码突变体的T细胞受体 (TCR)。这些TCR可用于治疗癌症,特别是含有TGFβRII的特定移码突变的癌症。本发明提供了TCR分子,编码这种TCR的核酸分子和含有这些核酸分子的载体。提供的核酸分子和载体可用于修饰免疫效应细胞,尤其包括T细胞,以表达TCR。核酸分子和载体也可用于修饰生产宿主细胞以产生TCR。这种修饰的免疫效应细胞可用于过继细胞转移疗法。特别地,本发明的TCR基于或衍生自特定的TCR,在本文中鉴定为Radium-1,其在从用TGFβRII移码肽免疫的临床应答患者分离的细胞毒性T淋巴细胞 (CTL) 克隆中鉴定,并且识别移码肽新表位序列 RLSSCPVA (SEQ ID NO:1)。

背景技术

[0002] 在世界范围内,结肠直肠癌 (CRC) 是男性中第三大常见癌症,在女性中是第二大常见癌症,在西方可见CRC的比率最高。Lynch综合征或遗传性非息肉病性结直肠癌 (HNPCC) 是一种遗传性疾病,其中DNA错配修复受损,导致微卫星不稳定性 (MSI)。Lynch综合症患者存在发展成各种癌症的高风险,包括CRC。部分散发性癌症 (即非遗传性癌症),包括结肠直肠癌和胃癌,也显示出MSI。

[0003] MSI导致在短重复DNA序列中插入或缺失单核苷酸或二核苷酸。当这种突变发生在编码蛋白质的基因中时,它们引起基因阅读框的转变 (即它们是移码突变)。此类突变通常导致截短的非功能性蛋白质的产生。

[0004] 转化生长因子-β (TGF-β) 蛋白结合细胞表面的TGFβRII受体蛋白,激活导致细胞周期停滞的信号传导途径。TGFβRII的突变可导致该途径的失活,从而促成癌发生。使TGFβRII失活的移码突变发生在约90%的微卫星不稳定性 (MSI+) 和约15%的微卫星稳定性 (MSS, 非MSI+或MSI-) 结肠癌中。这些突变主要发生在TGFβRII的外显子3中易于突变的多腺嘌呤术中。

[0005] MSI+结肠癌被认为比MSS癌症更具免疫原性,因为产生新肽 (即个体中具有非天然发现的序列的肽,因此被免疫系统识别为“非自身”),该新肽由在含有包含在其转录序列中的微卫星重复的基因中的移码突变产生。与其他散发性结肠癌患者相比,Lynch综合征患者和散发性结肠癌的MSI+亚型患者具有改善的预后。MSI+结肠癌中某些移码突变的数量和存在,与表征这些癌症的肿瘤浸润淋巴细胞 (TIL) 的密度增加相关。与非MSI+结肠直肠癌相比,MSI+结肠直肠癌中TIL密度增加与存活率提高之间的相关性也已得到很好的证实。增强的宿主免疫应答可以至少部分地解释这些癌症的改善的预后。这些观察结果表明,一些MSI+CRC患者可能受益于靶向TGFβRII等基因移码突变产物的免疫疗法。

[0006] 已经在这些移码突变衍生的新肽中鉴定出T细胞表位。TGFβRII“-1A”突变,其中一个腺嘌呤残基在TGFβRII的外显子3中从上述多腺嘌呤术中丢失,是导致产生含有T细胞表位的新肽的突变的实例,包括CD4⁺和CD8⁺T细胞表位。

[0007] T细胞表位被TCR识别,TCR是从T细胞的细胞膜突出的蛋白质复合物。大多数TCR包

含 α 链和 β 链,它们都由可变区和恒定区组成。可变区位于链的N末端,并且完全是细胞外的;恒定区位于链的C末端,由细胞外结构域、跨膜结构域和短胞质结构域组成。TCR链以未成熟的形式编码和合成,具有N-末端信号(或前导)序列。当合成时,该序列形成 α -或 β -TCR链的可变区的N-末端。合成TCR链后,信号序列被切割,因此不存在于位于细胞表面的成熟TCR中。最近,已经开发了可溶性TCR(sTCR),其包含天然TCR中存在的 α 和 β 链的可变区和恒定区的细胞外结构域,但缺少恒定区的跨膜和胞质结构域。可溶性TCR可以由任何细胞表达且被分泌。

[0008] α 和 β 链的可变区包含三个高变的互补决定区(CDR)。这些CDR确定TCR的特异性,CDR3(即,来自N-末端的第三个CDR)是决定TCR特异性的最重要的CDR。不形成CDR的TCR链可变区的区段称为框架区。TCR可变区包含四个这样的框架区。框架区1是CDR1的N末端;框架区2连接CDR1和CDR2;框架区3连接CDR2和CDR3;框架区3将CDR3连接到TCR链的恒定区。这些框架区比CDR更不易变形,并形成CDR的支架。框架区的序列对于TCR功能是重要的,因为它们决定了TCR链的可变区的整体结构。该结构必须使CDR保持在正确的方向和相对位置,以使它们结合靶抗原。

[0009] 因此,TCR的可变区结合靶抗原,TCR抗原为蛋白质。由TCR结合的抗原的特定部分是T细胞表位。T细胞表位是短抗原片段,通常长度为8-17个氨基酸的肽。相关抗原片段通过主要组织相容性复合物(MHC)呈递给TCR。在结合抗原后,TCR激活信号转导途径,其激活T细胞以启动免疫应答。

[0010] 有两类MHC:I类和II类。MHC I类由所有有核细胞表达;MHC II类仅由专职抗原呈递细胞(APC)表达,例如树突细胞。所有MHC的功能是呈现短肽片段以供T细胞识别。MHC I类呈递来自其表达的细胞内的肽片段,并被CD8⁺T细胞(细胞毒性T细胞)识别。如果CD8⁺T细胞识别由MHC I类呈递的肽作为抗原,则T细胞触发表达MHC I类的细胞的凋亡。MHC II类呈现来自蛋白质的肽片段,所述蛋白质已被表达它的APC内吞,并被CD4⁺T细胞(辅助T细胞)识别。如果幼稚CD4⁺T细胞识别由MHC II类呈递的肽作为抗原,它将增殖。其子细胞将分化为效应、记忆和调节性T细胞,它们共同介导免疫系统其他成分的免疫反应,并为感染提供长期免疫力。因此,MHC I类通常对于启动针对病毒感染的细胞或含有突变的细胞的免疫应答很重要,这些突变导致它们产生异常蛋白质(如癌细胞或癌前细胞);MHC II类通常在启动对细胞外病原体的免疫应答中是重要的。

[0011] 在人类中,MHC由称为人白细胞抗原(HLA)的蛋白质组成。每个人都有3个主要的MHC I类HLA基因(HLA-A,HLA-B和HLA-C)和6个主要的MHC II类HLA基因(HLA-DPA1,HLA-DPB1,HLA-DQA 1,HLA-DQB1,HLA-DRA和HLA-DRB1)。当TCR结合MHC-抗原复合物时,TCR接触抗原和MHC蛋白,这意味着TCR识别特异性MHC-抗原复合物,而不仅仅是抗原。TCR与MHC的这种相互作用被认为是通过CDR2,并且意味着TCR仅在它们与特定HLA蛋白复合时才识别抗原,该特征称为MHC限制。HLA基因的多态性很高,意味着不同的个体倾向于携带不同的HLA等位基因,并且特定的TCR不是在所有个体中都起作用(仅在携带TCR受限的适当HLA等位基因的那些中起作用)。

[0012] 识别肿瘤抗原的TCR可用于癌症治疗,特别是过继性T细胞转移疗法(June,C.,J Clin Invest.2007Jun 1;117(6):1466-1476)。通过转移编码识别肿瘤抗原的TCR的基因,可以使T细胞重新靶向肿瘤细胞。可以将这些重新靶向的T细胞引入患有产生相关抗原的癌

症的癌症患者中。然后,这些T细胞应该对癌细胞发起免疫反应,导致癌细胞被杀死。希望这可以减小目标肿瘤的大小,这可能导致患者被治愈,或者至少延长其寿命。

[0013] 但是,最近的临床试验表明TCR重定向T细胞靶向癌症种系抗原的过继转移可能与严重毒性相关,强调需要仔细考虑抗原的选择。在一项研究中,9名癌症患者中有3名接受了自体抗MAGE-A3 TCR工程化T细胞治疗(MAGE-A3是黑色素瘤相关抗原3,一种与包括黑色素瘤的癌症相关的功能未知的蛋白质,但也存在在健康细胞中)由于TCR的交叉反应而经历严重的神经毒性(在两种情况下是致命的)(Morgan,R.A.等,(2013),*Journal of Immunotherapy*,36(2):133-151)。针对具有HLA-A*01限制性TCR的骨髓瘤和黑素瘤患者中的MAGE-A3的第二项研究显示出与心肌损伤的致死的交叉反应性(Linette,G.P.等,(2013),*Blood* 122(6):863-871;Cameron,B.J.等,(2013),*Science Translational Medicine* 5(197):197ra103)。因此,真正的肿瘤特异性新抗原可能是TCR治疗的理想靶标,在没有正常组织破坏的情况下选择性靶向肿瘤。然而,大多数此类新抗原由于患者之间不共享的独特突变可能是有问题的。用T细胞过继细胞转移疗法的另一个问题是,如上所述,TCR是MHC限制的。因此,单个TCR仅在携带其受限的HLA等位基因或相关同种型的个体中起作用。

[0014] 本申请的发明人已经分离了TCR,其可用于过继性T细胞转移疗法。该TCR是一种HLA-A2限制性TGFβRII移码突变特异性TCR,分离自接种了TGFβRII移码肽的MSI+结肠癌患者。这种被称为Radium-1的TCR已被证明是特别有效地重定向T细胞识别携带移码突变的癌细胞和减少动物模型中的癌症生长。Radium-1是一种非常有效的TCR,其特性使其在医学中特别有用。Radium-1对其同源抗原/MHC复合物具有非常高的亲和力。其对同源抗原/MHC复合物的亲和力高于MART-1特异性TCR DMF5对于其同源抗原/MHC复合物的亲和力。DMF5已在临床上成功用于黑素瘤治疗。对其抗原的高亲和力是临床使用的TCR的基本特征,并且Radium-1对其靶标的高亲和力与在动物模型中非常成功地治疗肿瘤相结合,证明其具有临床应用的强大潜力。Radium-1还具有独特的CD4和CD8共受体独立的特性。大多数TCR需要共同受体CD8或CD4与靶细胞上的MHC复合物之间的相互作用来介导靶细胞杀伤,但Radium-1并非如此,这意味着CD8+和CD4+T细胞都能在功能上表达Radium-1,并且已经显示能够直接介导靶细胞杀伤。

[0015] 从用SEQ ID NO:49的肽(SLVRLSSCPVALMSAMTTSSSQ)接种的患者中分离Radium-1 TCR。WO 1999/058552中描述了这种肽在人类疫苗接种中的用途。从以与WO 1999/058552中描述的研究相同方式接种疫苗的患者获得的T细胞克隆中分离Radium-1。然而,衍生出Radium-1的特定患者不是该特定研究的一部分,而是2001年后期临床试验的一部分。Radium-1识别具有SEQ ID NO:1 (RLSSCPVA) 序列的表位。这是由上述TGFβRII的-1A移码突变产生的新肽,其本身是对于过继性T细胞转移疗法的理想靶标,因为该序列在正常人类蛋白质组中未发现,这意味着TCR毒性应该是最小的。从频繁出现的移码突变(例如SEQ ID NO:1)获得的新抗原是过继性T细胞转移疗法的理想靶标。

[0016] 此外,Radium-1是HLA-A2限制的(HLA-A2是HLA-A等位基因)。已经证明Radium-1在HLA-A2的HLA-A*02:01同种型背景下识别抗原,但可以识别其他HLA-A2同种型。HLA-A2是最常见的HLA等位基因之一,HLA-A*02:01由约40%至50%的高加索裔美国人和欧洲人携带(www.allele frequencies.net)。因此,预计TCR将在很大比例的西方人口中发挥作用。用

Radium-1或本发明的相关TCR重新定向的T细胞因而可用于癌症治疗。特别是,它们可用于过继细胞转移疗法,例如与T细胞。这种重定向的T细胞或其他免疫效应细胞特别用于治疗任何含有-1A TGF β R111移码突变的癌症,包括MSI+CRC,例如在Lynch综合征患者中常见的那些。

[0017] 由TGF β R111的-1A移码突变产生的新肽先前已被描述为癌症免疫疗法的可能靶标(参见例如WO 1999/058552; Sæterdal, I.等,2001,Proc.Natl.Acad.Sci.USA,Vol.98, pp.13255-13260; Sæterdal, I.等,2001,Cancer Immunol Immunother 50 (9):469-476; Linnebacher, M.等,2001,International journal of cancer.Journal international du cancer 93 (1):6-11)。然而,不可能仅仅根据相关抗原序列的知识设计能够结合靶抗原的功能性TCR。不可能预测TCR在特定HLA蛋白质等位基因的背景下结合特定抗原所需的蛋白质序列。因此,尽管认识到在常见HLA等位基因的情况下结合从TGF β R111移码突变获得的新抗原的TCR可能是有用的,但缺乏这种TCR有效的可用性,特别是缺乏针对这种TCR的已知序列,一直是个问题,因为使用现在可用的工具,技术人员不可能设计这样的TCR。重要的是要注意,并非所有识别移码新抗原肽的TCR在实践中都可以针对表达肽的癌细胞有效地刺激细胞应答。本文公开的Radium-1TCR正是这样的TCR,其分离和表征提供了该问题的解决方案。

[0018] 本文公开的Radium-1 TCR以前还没有公开获得。Radium-1 TCR的 α 链和 β 链的CDR3序列在2011年奥斯陆大学的Else Marit Inderberg Suso撰写的博士论文“癌症疫苗和癌症特异性T细胞疗法;开发新型癌症免疫疗法”中公开。本发明现在提供本文要求的Radium-1 TCR的完整序列信息。

发明内容

[0019] 因此,本发明首先提供编码针对突变的TGF β R111蛋白的TCR分子的核酸分子,其包含SEQ ID NO:1的序列,其中当由MHC I类呈递SEQ ID NO:1的肽时,所述TCR分子能够结合所述肽,并且其中所述TCR分子包含 α 链结构域和/或 β 链结构域,每个链结构域包含三个CDR序列,其中

[0020] a) α 链结构域的CDR1、2和3分别具有SEQ ID NO:2、3和4的序列;和

[0021] b) β 链结构域的CDR1、2和3分别具有SEQ ID NO:5、6和7的序列,并且

[0022] 其中一个或多个所述CDR序列,并且在更具体的实施方案中,所述CDR1或CDR2序列中的一个或多个可以任选地通过1个或2个氨基酸的取代、添加或缺失进行修饰。

[0023] Radium-1 α 链的CDR1和CDR2的氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO:2和SEQ ID NO:3中,以及先前公开的Radium-1 α 链的CDR3的序列显示于SEQ ID NO:4中。Radium-1 β 链的CDR1和CDR2的氨基酸序列分别显示于SEQ ID NO:5和SEQ ID NO:6中,以及先前公开的Radium-1 β 链的CDR3的序列显示于SEQ ID NO:7中。

[0024] α 链的CDR序列是或对应于Radium-1 α 链的可变区的CDR序列。Radium-1 α 链的可变区的序列显示于SEQ ID NO:8中。 β 链的CDR序列是或对应于Radium-1 β 链的可变区的CDR序列。Radium-1 β 链的可变区的序列显示于SEQ ID NO:13中。分别对应于Radium-1 α 链的CDR1、2和3的SEQ ID NO:2、3和4分别位于SEQ ID NO:8的47-51、69-73和107-117位。分别对应于

Radium-1 β 链的CDR1、2和3的SEQ ID NO:5、6和7分别位于SEQ ID NO:13的46-50、68-73和110-122位。

[0025] 改变TCR链的CDR1或CDR2的序列一般不会改变TCR的特异性,并且可以改善TCR与其靶抗原的结合亲和力。因此,在优选的实施方案中,CDR3是未修饰的,并且在进一步优选的实施方案中,所有CDR都未被修饰。

[0026] 本发明的核酸分子可用于制备针对表达突变的TGF β RII受体的细胞的免疫效应细胞(更特别是经修饰的免疫效应细胞),或更具体地,呈递SEQ ID NO:1的移码肽。这种(经修饰的)免疫效应细胞在其细胞表面上表达TCR,并且能够识别或结合呈递SEQ ID NO:1的肽的靶细胞,例如,癌细胞。因此,核酸分子可以是这样的:表达所述TCR的免疫效应细胞(即由核酸分子编码的TCR)能够具有针对(例如杀死)呈递SEQ ID NO:1的移码肽的靶细胞的效应活性(例如细胞毒活性)。换句话说,在免疫效应细胞表面上表达时,核酸分子编码TCR分子在SEQ ID NO:1的肽由MHC I类呈递时能够结合SEQ ID NO:1的肽。因此,经修饰的免疫效应细胞是遗传修饰的或工程化的免疫效应细胞,或者表达已经用本发明的核酸分子转导的免疫效应细胞。

[0027] 因此可以看出,在一个实施方案中,本发明提供了编码针对突变的TGF β RII蛋白的TCR分子的核酸分子,其包含SEQ ID NO:1的序列,其中所述TCR分子在表面上表达时当所述肽由MHC I类呈递时,免疫效应细胞能够结合SEQ ID NO:1的肽,并且其中所述TCR分子包含 α 链结构域和/或 β 链结构域,每个链包含三个CDR序列的结构域,其中

[0028] a) α 链结构域的CDR1、2和3分别具有SEQ ID NO:2、3和4的序列;

[0029] b) β 链结构域的CDR1、2和3分别具有SEQ ID NO:5、6和7的序列,和

[0030] 其中一个或多个所述CDR序列,并且在更具体的实施方案中,一个或多个所述CDR序列,可以任选地通过1个或2个氨基酸的取代、添加或缺失进行修饰。

[0031] 或者,本发明的核酸分子可用于宿主细胞表达可溶性TCR分子。当所述肽由MHC I类呈递时,本发明的可溶性TCR分子能够结合SEQ ID NO:1的肽,并且特别可用于将毒素递送至呈递SEQ ID NO:1的移码肽的靶细胞,以杀死靶细胞。因此,本发明的核酸分子可以编码TCR,当由免疫效应细胞表达时,TCR定位于细胞表面;或者,本发明的核酸分子可编码可溶性TCR。

[0032] 因此可以看出,在另一个实施方案中,本发明提供了编码针对突变的TGF β RII蛋白(其包含SEQ ID NO:1的序列)的可溶性TCR分子的核酸分子,其中,所述TCR分子当由宿主表达时被分泌,且当SEQ ID NO:1的肽由MHC I类呈递时,所述TCR分子能够结合SEQ ID NO:1的肽,并且其中所述TCR分子包含 α 链结构域和/或 β 链结构域,每个链结构域包含三个CDR序列,其中

[0033] a) α 链结构域的CDR1、2和3分别具有SEQ ID NO:2、3和4的序列;和

[0034] b) β 链结构域的CDR1、2和3分别具有SEQ ID NO:5、6和7的序列,并且

[0035] 其中一个或多个所述CDR序列,并且在更具体的实施方案中,一个或多个所述CDR序列,可以任选地通过1个或2个氨基酸的取代、添加或缺失进行修饰。

[0036] 可以将本发明的核酸分子引入细胞,特别是免疫效应细胞如T细胞或生产宿主细胞,作为mRNA或DNA用于在细胞中的表达。载体可用于将核酸分子转移到细胞中或产生用于转移的核酸(例如产生用于转移的mRNA,或产生用于制备表达载体以转移到细胞中的核酸

分子)。

[0037] 因此,本发明的另一方面提供了包含如本文定义的本发明的核酸分子的载体。

[0038] 载体可以是例如mRNA表达载体、克隆载体或用于转移到免疫细胞或生产宿主细胞中的表达载体,例如病毒载体。如果载体是病毒载体,它可以是例如逆转录病毒载体或慢病毒载体。

[0039] 本发明的另一方面提供免疫效应细胞,其包含如本文定义的本发明的核酸分子或载体。在优选的实施方案中,免疫效应细胞可以是T细胞或NK细胞。

[0040] 在其中免疫效应细胞是T细胞(或更特别是CD8⁺T细胞或人CD8⁺T细胞)的特定实施方案中,TCR,或更特别地核酸分子,对于T细胞不是天然的,即核酸分子不是内源性地存在于T细胞中,而是被引入T细胞中。换句话说,T细胞用核酸分子或载体修饰,即将其修饰以表达TCR;它不是天然的或天然存在的T细胞。

[0041] 本发明还提供了生产宿主细胞,其包含如本文定义的本发明的核酸分子或载体。在优选的实施方案中,生产宿主是哺乳动物细胞,例HEK-293、HEK-293T或CHO细胞。

[0042] 还提供了产生免疫效应细胞的方法,其特异性识别SEQ ID NO:1的TGFβRII移码肽,所述方法包括将本发明的核酸分子或载体引入免疫效应细胞。

[0043] 这种方法可包括在引入核酸分子或载体之前和/或之后刺激细胞并诱导其增殖。

[0044] 本发明还提供如本文所定义的TCR分子,特别是可溶的如本文所定义的TCR分子。如上所述和下文进一步描述的,可溶性TCR在治疗中具有实用性。

[0045] 如上所述,本发明的可溶性TCR和免疫效应细胞在治疗中具有实用性。因此,本发明的其他方面包括:

[0046] 组合物,特别是治疗或药物组合物,其包含本文定义的本发明的可溶性TCR或免疫效应细胞和至少一种生理学上可接受的载体或赋形剂;

[0047] 如本文所定义的本发明的可溶性TCR、免疫效应细胞或组合物,用于治疗,特别是过继性细胞转移疗法;

[0048] 如本文所定义的本发明的可溶性TCR、免疫效应细胞或组合物,用于治疗癌症,特别是用于治疗由HNPCC引起的结肠直肠癌;

[0049] 一种治疗癌症,特别是结肠直肠癌的方法,所述方法包括向有此需要的受试者施用如本文定义的本发明的可溶性TCR、免疫效应细胞或组合物,特别是有效量的所述细胞或组合物;以及

[0050] 如本文所定义的本发明的可溶性TCR或免疫效应细胞用于制备用于癌症治疗,特别是用于治疗结肠直肠癌的药物(或组合物)的用途。

[0051] 在产生本发明的经修饰的免疫效应细胞的方法中,通过引入本发明的核酸分子而修饰的免疫效应细胞可以从待治疗的受试者(例如患有癌症(如结肠直肠癌)的受试者)中获得。在修饰免疫效应细胞和任选地体外扩增后,可以将表达TCR的修饰的免疫效应细胞重新引入(即施用)给受试者。因此,自体免疫效应细胞可用于本发明的治疗方法和用途。或者,可以使用异源(即供体或同种异体,或同基因或异基因)免疫效应细胞。

[0052] 免疫效应细胞可以是能够针对呈递SEQ ID NO:1的肽的靶细胞进行免疫应答的任何免疫细胞。更具体地,免疫效应细胞能够消除、破坏或删除靶细胞,即减少或抑制靶细胞的活力,优选杀死靶细胞(换句话说,使靶细胞减少或无法存活)。因此,免疫效应细胞优选

是细胞毒性免疫效应细胞。

[0053] 术语“细胞毒性”与“细胞溶解”同义,并且在本文中用于指能够通过靶细胞中的裂解或凋亡诱导细胞死亡的细胞。

[0054] 如本文所用的术语“免疫效应细胞”不仅包括成熟或完全分化的免疫效应细胞,还包括其前体(或祖细胞)细胞,包括干细胞(更特别是造血干细胞,HSC)或衍生自HSC的细胞。因此,免疫效应细胞可以是T细胞,NK细胞,NKT细胞,嗜中性粒细胞,巨噬细胞,或衍生自HSC的细胞,该HSC细胞包含于衍生自造血组织(例如,来源于骨髓、脐带血、或血液,如动员外周血,其给予受试者后分化产生成熟的免疫效应细胞)的CD34⁺细胞群。如下面将更详细描述,在优选的实施方案中,免疫效应细胞是T细胞或NK细胞。原代细胞,例如可以使用从待治疗的受试者或从供体受试者分离的细胞,任选地具有插入的细胞培养步骤(例如用于扩增细胞)或其他培养的细胞或细胞系(例如NK细胞系,如NK92细胞系)。

[0055] 术语“针对SEQ ID NO:1的肽”与“对SEQ ID NO:1的肽具有特异性”是同义词,即它仅表示TCR能够特异性结合肽。特别地,TCR的抗原结合结构域能够特异性结合肽(更特别是当TCR在免疫效应细胞的表面上表达时)。特异性结合可以区别于非特异性结合非靶抗原(在这种情况下是指除SEQ ID NO:1的肽之外的肽)。因此,表达根据本发明的TCR的免疫效应细胞被重定向以特异性结合并显示对呈递SEQ ID NO:1的肽的靶细胞的细胞毒性(例如杀死)。或者表达,修饰免疫效应细胞以将细胞毒性重定向至呈递肽的靶细胞,或表达包含肽的突变TGFBR1受体的靶细胞。

[0056] TCR的抗原结合结构域与靶细胞表面上的肽的结合向含有TCR的细胞递送激活刺激,导致效应细胞信号传导途径的诱导。因此,与靶肽的结合可以触发增殖、细胞因子产生、吞噬作用、裂解活性和/或分子的产生,所述分子可以以MHC非依赖性方式介导靶细胞的细胞死亡。

[0057] 本发明的可溶性TCR可以通过任何合适的生产宿主细胞产生。这种细胞优选是哺乳动物细胞,例如人细胞或啮齿动物细胞。可以使用任何合适的细胞系,包括HEK-293、HEK-293T和CHO细胞。本发明的可溶性TCR与靶细胞表面上的肽的结合导致MHC I类抗原-TCR复合物的内化。因此,可溶性TCR可用于将毒素特异性递送至靶细胞,导致靶细胞死亡。

[0058] 本发明的TCR分子可包含本发明的 α 链结构域和本发明的 β 链结构域。或者,TCR分子可含有本发明的 α 链结构域,但不含本发明的 β 链结构域;或者TCR分子可以含有本发明的 β 链结构域,但不含本发明的 α 链结构域。换句话说,本发明的TCR分子包含本发明的 α 链结构域和/或本发明的 β 链结构域。然而,优选地,本发明的TCR分子包含如本文定义的 α 链结构域和如本文定义的 β 链结构域。

[0059] 在该优选实施方案中,其中本发明的TCR分子包含本发明的 α 链结构域(此后称为“ α 链结构域”)和本发明的 β 链结构域(此后称为“ β 链结构域”) α 链结构域和 β 链结构域可以分开编码(即它们由不同的基因编码,或者更具体地通过单独的核酸分子或核酸分子的单独部分(在单独控制部分的意义上)或开放阅读框(ORF)编码,并作为单独的蛋白质合成)。或者,它们可以通过单个基因(即单个核酸分子或单个ORF等)一起编码,在这种情况下,它们作为单一蛋白质合成。在 α 链结构域和 β 链结构域编码为单一蛋白质的情况下,该蛋白质被称为单链TCR(scTCR)。scTCR包含与 β 链结构域连接的 α 链结构域。如本文所用,术语“ α 链结构域”是指TCR α 链,其构成单个蛋白质或形成蛋白质的一部分,特别是scTCR的一部分。如

本文所用,术语“ β 链结构域”是指TCR β 链,其构成单个蛋白质或形成蛋白质的一部分,特别是scTCR的一部分。在单个scTCR分子中表达 α 和 β 链结构域确保两个链结构域在相同时间和相似水平表达。在本发明的一个优选实施方案中,本发明的TCR分子编码为scTCR。

[0060] 在本发明的TCR分子编码为scTCR的情况下, α 和 β 链结构域可以通过接头连接。该接头由 α 和 β 链结构域之间的氨基酸序列组成。优选地, α 链结构域位于scTCR的N末端,接着是接头,接着是在scTCR的C末端的 β 链结构域。然而, β 链结构域可替代地位于scTCR的N末端,以及C末端为 α 链结构域和其间的接头。

[0061] 接头的氨基酸序列可以是任何合适的长度。接头序列可以是1-30个氨基酸长,或更优选1-25或1-20个氨基酸长。然而,接头应该优选是可切割的,这样可以分离两条TCR链;除非这两条链可以分开,否则这它们可能无法采用正确的构象并恰当地相互作用,可能导致TCR无法正常工作。

[0062] 在优选的实施方案中,接头是自剪接的。自剪接头能够在接头位置催化scTCR分子的裂解,从而分离 α 和 β 链结构域。该剪接反应不需要刺激或诱导,并且剪接反应理想地在 α 和 β 链结构域转运至细胞表面之前发生。切割反应可以从TCR分子中完全切除接头;或者,接头或接头的一部分可以保持附着于一个或两个所得的单独TCR链。由接头催化的剪接反应可以在翻译后发生(即它可以是自催化蛋白水解反应),或者它可以共翻译发生。共翻译剪接可以通过防止在接头内或接头与其任一侧上的一个链结构域之间形成肽键而发生。

[0063] 优选的自剪接头是衍生自小RNA病毒自切割2A肽的接头。2A肽长约20-25个氨基酸,以保守序列基序Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly-Pro (SEQ ID NO:52) 结束。2A肽通过阻止在保守的甘氨酸残基和最终的脯氨酸残基之间形成肽键,经历共翻译自剪接,从而有效地在这两个氨基酸之间切割蛋白质。切割后,2A肽(除C末端脯氨酸外)保持与上游蛋白质的C末端连接;最终的脯氨酸残基仍然附着在下游蛋白质的N末端。特别优选的2A肽衍生的接头序列示于SEQ ID NO:18。然而,保守的C末端2A序列基序 (SEQ ID NO:52) 上游的肽序列可以变化而不会显著丧失自剪接活性。因此,接头可以具有与SEQ ID NO:18具有至少40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%序列同一性的序列,只要它以上述保守序列基序结束并保留自剪接活性即可。特别地,SEQ ID NO:18的自剪接变体可以保留SEQ ID NO:18的肽的自剪接活性的至少70%、75%、80%、85%、90%或95%。

[0064] α 链结构域的CDR1、CDR2和CDR3的序列分别衍生自SEQ ID NO:2、3和4,而 β 链结构域的CDR1、CDR2和CDR3的序列分别衍生自SEQ ID NO:5、6和7。也就是说, α 链结构域的CDR1、CDR2和CDR3分别具有SEQ ID NO:2、3和4的序列,或者具有通过1个或2个氨基酸的取代、添加或缺失修饰的这些序列的变体。 β 链结构域的CDR1、CDR2和CDR3分别具有SEQ ID NO:5、6和7的序列,或者具有通过1个或2个氨基酸的取代、添加或缺失进行修饰的这些序列的变体。变体CDR在功能上等同于它们各自对应的天然未修饰的CDR。功能上等同是指蛋白质或氨基酸序列(此处为CDR)保留或基本上保留从其衍生或基于其(即与其对应)的蛋白质或氨基酸序列(此处为CDR)的功能或活性。特别地,功能等同变体可以保留相应(未修饰的)蛋白质或氨基酸序列的活性或功能的至少70%,或更特别是至少75、80、85、90或95%。在实践中,这意味着变体CDR不会对其存在的TCR的功能或活性或性质产生负面影响或基本上不会产生负面影响(与天然或未修饰的TCR相比,或与其中CDR区未被修饰的TCR相比)。原则上,这意味着变体CDR不影响TCR的结合特异性,即当SEQ ID NO:1肽适当地呈递在靶细胞上时,TCR

保留特异性结合SEQ ID NO:1肽的能力。此外,与天然或未修饰的TCR或具有未修饰的CDR区的TCR相比,TCR的结合亲和力基本上没有降低。然而,可以通过修饰CDR区,特别是CDR1和/或2来改善TCR的结合亲和力。

[0065] 因此,如上所述修饰(或突变)的CDR1和CDR2序列可具有改善的与其靶抗原结合的亲和力,而不丧失其结合特异性。因此,这种突变序列可用于治疗其中产生SEQ ID NO:1的新肽的癌症。这些有用的修饰的TCR序列可以通过筛选其CDR1和/或CDR2区域中随机产生的突变的TCR克隆文库来鉴定。具有与其靶抗原结合改善的亲亲和力的可溶性TCR克隆可通过例如表面等离子体共振或热波动测定鉴定。具有与其靶抗原结合改善的亲亲和力的非可溶性TCR克隆可通过例如功能测定来鉴定,其中分析细胞因子释放以监测通过TCR的免疫效应细胞活化。然而,在优选的实施方案中, α 链结构域和 β 链结构域的CDR1和CDR2序列都是未修饰的(即 α 链结构域的CDR1和CDR2分别具有SEQ ID NO:2和3的序列,并且 β 链结构域的CDR1和2分别具有SEQ ID NO:5和6的序列)。 α 和 β 链结构域的CDR3序列优选分别具有SEQ ID NO:4和7的序列,并且优选不改变或修饰它们。

[0066] 当在免疫效应细胞(例如T细胞)的表面上表达时,本发明的全长TCR(即,当由免疫效应细胞表达时,定位于细胞表面的不溶性TCR),能够重新导向其表达的细胞,使得当SEQ ID NO:1的新抗原由MHC I类呈递时,细胞识别SEQ ID NO:1的新抗原。换句话说,本发明的这种TCR激活免疫效应细胞以定向其作用或功能,例如,其细胞毒性活性针对在TGF β RII中遭受-1A移码突变的靶细胞,或实际上任何导致产生具有SEQ ID NO:1的新抗原的类似突变。在其表面上表达本发明的全长TCR的免疫效应细胞可以是如上文和下文进一步讨论的任何免疫效应细胞,但是在一个优选的实施方案中,它是CD4⁺T细胞、CD8⁺T细胞或任何其他类型的T细胞。

[0067] 当SEQ ID NO:1的新抗原由MHC I类呈递时,本发明的可溶性TCR能够识别,即结合SEQ ID NO:1的新抗原,该新抗原因此被靶细胞选择性内化。可以通过本领域已知的任何方法鉴定本发明的可溶性TCR的选择性内化。例如,可溶性TCR可以与荧光团(例如荧光蛋白,如GFP)缀合,并且因此通过荧光内化鉴定TCR的内化。如果可溶性TCR被表达SEQ ID NO:1的新抗原的细胞内化,但未被不表达SEQ ID NO:1的细胞内化(或较低程度内化),则可溶性TCR可以说被靶细胞选择性内化。如上所述,可溶性TCR包含 α 链和 β 链,但每个链在其C-末端通过缺失恒定区的跨膜和细胞内结构域而被截短。因此,可溶性TCR的链包含N-末端前导序列(直至其在多肽成熟期间被切割)、可变区和恒定区的N-末端(即细胞外结构域)。因此,可溶性TCR可以说是截短的TCR,具有截短的 α 链和 β 链,而不可溶的TCR(例如野生型TCR),其在免疫效应细胞(例如T细胞)的表面上表达,可以说是全长TCR,具有全长的 α 链和 β 链。

[0068] MHC I类,其将SEQ ID NO:1的新抗原呈递给本发明的TCR(该TCR在溶液的背景下,即可溶性TCR,或表达全长TCR的T细胞)本发明的实施方案)可以包含HLA-A等位基因HLA-A2。更具体地,MHC I类可包含HLA-A2的HLA-A*02:01同种型。然而,MHC I类不限于包含HLA-A*02:01或实际上HLA-A2的那些;它可以包含TCR能够识别的任何HLA蛋白。特别地,它可以包含除HLA-A*02:01之外的HLA-A2同种型。也就是说它可以包含任何HLA-A2的同种型。

[0069] 如上所述,TCR的 α 或 β 链的CDR位于链的可变区内。每个可变区在4个框架序列的支架中包含3个CDR序列。仅从CDR序列不可能预测哪种框架区序列将CDR序列保持在功能性TCR中。如上所述,Radium-1 TCR的 α 链和 β 链可变区的氨基酸序列分别在SEQ ID NO:8和13

中示出。然而,通常可以进行一些天然框架序列的修饰而不会不利地影响TCR的功能。因此,在本发明的TCR中, α 和/或 β 链结构域的可变区的框架区可以与天然Radium-1受体的框架区相同(即,当其在自然中被分离或发现),但不必须相同。因此,可以修饰Radium-1受体可变区的框架区(例如通过氨基酸取代、添加、插入或缺失),这包括它们可以被取代,例如用小鼠或鼠源化的框架区取代。(因此框架区的氨基酸序列可以被修饰和/或取代)。

[0070] 在本发明的一个实施方案中,TCR的 α 链结构域包含可变区,其具有或包含SEQ ID NO:8的氨基酸序列或与其具有至少90%、95%、97%、98%或99%的序列同一性的氨基酸序列,或由其组成。在TCR的 α 链结构域包含作为SEQ ID NO:8的变体的序列的情况下(即,相对于SEQ ID NO:8具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列,但与其不相同), α 链结构域的CDR序列是如上定义的本发明的CDR序列。

[0071] 在本发明的另一个实施方案中,TCR的 β 链结构域包含可变区,其具有或包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列或与其具有至少90%、95%、97%、98%或99%的序列同一性的氨基酸序列,或由其组成。在TCR的 β 链结构域包含作为SEQ ID NO:13的变体的序列的情况下(即,相对于SEQ ID NO:13具有至少90%、95%、97%、98%或99%序列同一性的序列,但与其不相同), β 链结构域的CDR序列是如上定义的本发明的CDR序列。

[0072] 从上面可以看出,可以修饰天然Radium-1 TCR的可变区。如上文在讨论CDR修饰的情况中所指出的,本发明因此包括Radium-1 TCR的功能等同变体。这些TCR、或 α 和/或 β 链结构域,或其可变区和/或恒定区的功能等同变体,其中Radium-1TCR的天然氨基酸序列(或链结构域或其区)已被修改,保留或基本上保留了如上所述的TCR或其链结构域或其区的活性、性质或功能。特别地,在TCR分子的背景下,这种修饰的、功能等同的TCR分子或其修饰的、功能等同的链结构域或区保留或基本上保留TCR受体的活性,例如,如上所述,保留在至少70%或更多的活性,例如TCR识别靶细胞(例如癌细胞)和/或对靶细胞发挥细胞毒性作用的活性。

[0073] 如上所述,过继细胞转移疗法可给患者带来安全风险。作为故障保护机制,可以在本发明的TCR内编码标签,其允许靶向杀死表达全长TCR的细胞。如果患者对治疗产生负面反应,则可以进行这种靶向杀伤。可以使用识别引入标签的抗体进行靶向细胞杀伤。这种机制描述于Kieback,E.等,2007,Proc.Natl.Acad.Sci.U S A,Vol.105,pp.623-628。在本发明的一个实施方案中,TCR包含共同标签序列。这种标签的实例是本领域公知的,包括FLAG标签、多组氨酸标签(His标签)、HA标签、Strep标签、S标签和Myc标签。在优选的实施方案中,本发明的TCR包含Myc标签。TCR中可存在多个(即两个或更多个,例如2到10个,2到8个或2到6个),优选连续的标签序列拷贝。在特别优选的实施方案中,TCR包含双Myc标签。这种双Myc标签具有SEQ ID NO:19中所示的氨基酸序列。

[0074] 标签可以位于TCR的任一链中。为了使理想抗体能够接近标签,优选位于TCR链的N末端。在一个实施方案中, α 链结构域包含可变区,该可变区进一步包含具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的双Myc标签。在另一个实施方案中, β 链结构域包含可变区,该可变区进一步包含具有SEQ ID NO:19的氨基酸序列的双Myc标签。在另一个实施方案中, α 和 β 链结构域均包含可变区,该可变区包含双Myc标签。

[0075] 如上所述,合成的TCR链的N-末端构成信号肽。这种信号肽的长度通常为约15至约30个氨基酸。预测Radium-1 α 链的信号肽由SEQ ID NO:8的前20个氨基酸组成,由SEQ ID

N0:50所表示。预测Radium-1 β 链的信号肽由SEQ ID N0:13的前16个氨基酸组成,由SEQ ID N0:51所表示。如上所述,这些前导序列不存在于成熟TCR中。

[0076] 为了使标签位于成熟TCR链的N末端,可以在前导序列之后立即将标签序列插入TCR链结构域的可变区。标签可以插入 α 链结构域或 β 链结构域。在一个优选的实施方案中,将具有SEQ ID N0:19的双Myc标签插入到具有SEQ ID N0:8的 α 链结构域可变区中,该SEQ ID N0:8紧邻具有SEQ ID N0:50的前导序列的C末端。在该实施方案中,本发明的TCR的 α 链结构域的可变区具有或包含SEQ ID N0:20的氨基酸序列或与其具有至少90%、95%、97%、98%或99%的序列同一性的氨基酸序列或由其组成。在本发明的 α 链结构域的可变区具有或包含SEQ ID N0:20的变体(即与其具有至少90%、95%、97%、98%或99%的序列同一性但不相同的氨基酸序列)或由其组成的情况下,CDR序列是如上定义的本发明的 α 链结构域的那些序列,并且双Myc标签的序列保持SEQ ID N0:19的序列不变。

[0077] 如上所述,具有包含具有如SEQ ID N0:20所示氨基酸序列的可变区的 α 链结构域的TCR保持功能,但相对于具有包含如SEQ ID N0:8所示氨基酸序列的可变区的 α 链结构域的TCR,活性可能具有较小的降低。优选用于治疗,因为如果需要(如果患者对治疗产生严重的阴性反应),通过输注 α -Myc标签抗体,可以杀死在其表面表达TCR的细胞。

[0078] 本发明的全长和截短(可溶性)TCR均可包含具有如上所述可变区的 α 和/或 β 链结构域。

[0079] 如上所述, α 和 β TCR链均包含可变区和恒定区。Radium-1 TCR的 α -链的恒定区序列示于SEQ ID N0:9,Radium-1 TCR的 β 链恒定区序列示于SEQ ID N0:14。像所有全长TCR链恒定区一样,它们包括细胞外结构域、跨膜螺旋和短细胞内结构域(如前所述,可溶性TCR的截短TCR链的恒定区仅包含相应完整长度序列的细胞外结构域)。

[0080] 本发明的全长TCR的 α 链结构域的恒定区可以具有或包含Radium-1 α 链的恒定区序列或由其组成。换句话说, α 链结构域可包含恒定区,即包含SEQ ID N0:9的序列或由SEQ ID N0:9的序列组成。或者, α 链结构域可包含具有与SEQ ID N0:9的序列相似的序列的恒定区。具体地,本发明的TCR的 α 链结构域可以包含具有,即包含与SEQ ID N0:9的序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的序列同一性的序列或由其组成的恒定区。因此,如上所述,本发明包括Radium-1 α 链恒定区的序列修饰的功能等同变体。

[0081] 在另一个实施方案中,本发明的全长TCR的 α 链结构域可以包含恒定区,其具有或包含与Radium-1 α 链恒定区相当的鼠的序列或由其组成。也就是说, α 链结构域可以包含具有SEQ ID N0:9的鼠源化形式的序列的恒定区。可以看出这样的 α 链结构域已经将其人恒定区交换为鼠恒定区。

[0082] 鼠TCR α 链恒定结构域的序列,其与SEQ ID N0:9中所示的Radium-1 TCR α 链恒定结构域的序列等同,为SEQ ID N0:23的序列。在其中 α 链结构域的恒定区被鼠源化的特定实施方案中,鼠源化恒定区具有或包含SEQ ID N0:23的氨基酸序列或由其组成。在另一个实施方案中,鼠源化恒定区具有或包含与SEQ ID N0:23的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列或由其组成。

[0083] 本发明的全长TCR的 β 链结构域的恒定区可以具有或包含Radium-1 β -链的恒定区序列或由其组成。换句话说, β 链结构域可包含恒定区,即包含SEQ ID N0:14的序列或由SEQ ID N0:14的序列组成。或者, β 链结构域可包含具有与SEQ ID N0:14的序列相似的序列的恒

定区。具体地,本发明的TCR的 β 链结构域可以包含具有,即包含至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的序列同一性的序列或由其组成的恒定区。因此,如上所述,本发明包括Radium-1 β 链恒定区的序列修饰的功能等同变体。

[0084] 在另一个实施方案中,本发明的全长TCR的 β 链结构域可以包含恒定区,该恒定区具有或包含与Radium-1 β 链恒定区相当的鼠的序列或由其组成。也就是说, β 链结构域可以包含具有SEQ ID NO:14的鼠源化形式的序列的恒定区。可以看出这样的 β 链结构域已经将其人恒定区交换为鼠恒定区。

[0085] 鼠TCR β 链恒定结构域的序列,其与SEQ ID NO:14中所示的Radium-1 TCR β 链恒定结构域的序列相同,是SEQ ID NO:29的序列。在其中 β 链结构域的恒定区被鼠源化的特定实施方案中,鼠源化恒定区具有或包含SEQ ID NO:29的氨基酸序列或由其组成。在另一个实施方案中,鼠源化恒定区具有或包含与SEQ ID NO:29的氨基酸序列具有至少95%序列同一性的序列或由其组成。

[0086] 在本发明的TCR中,尽管 α 链和 β 链可以编码为单一多肽链(即作为scTCR),但是在它们的成熟形式中它们形成分开的链。 α 链和 β 链既可被编码为单独的多肽,它们也可以被编码为scTCR,在这种情况下它们通过接头连接(所述接头在其成熟之前被切割)并转运至细胞膜。这意味着在本发明的成熟TCR中, α 链和 β 链形成离散的多肽链:即它们不再通过肽键连接。

[0087] 在所有成熟的 $\alpha\beta$ -TCR中, α 链和 β 链通过链间二硫键共价连接,所述链间二硫键在位于每条链的恒定区中的半胱氨酸残基之间形成。链间二硫键确保一旦TCR形成,两个TCR链保持紧密结合,这对于TCR功能是必不可少的。当TCR在T细胞中外源表达时,存在外源编码的TCR链与内源编码的TCR链复合的风险,导致形成含有外源编码的 α 链和内源编码的 β 链的混合TCR。反之亦然。在本发明的上下文中,这意味着本发明的 α 链(例如Radium-1 α 链)可以与由T细胞编码的TCR β 链形成TCR复合物,其中TCR β 链在该T细胞中表达。反之亦然。在这种情况下,与本发明的TCR链彼此复合的情况相比,本发明的TCR(例如Radium-1 TCR)的活性可能降低。

[0088] 已经发现通过将额外的半胱氨酸残基引入本发明TCR的 α 和 β 链结构域的恒定区,可以促进 α 链和 β 链的优先配对。已经显示这可以增强TCR在一些T细胞中的表达和功能。因此,可以通过引入半胱氨酸残基来修饰 α 链结构域的恒定区和/或 β 链结构域的恒定区。优选地,通过引入半胱氨酸残基来修饰 α 和 β 链结构域的恒定区。额外的半胱氨酸残基可以通过插入(即通过将额外的氨基酸残基插入 α 或 β 链结构域的恒定区)或通过取代(即通过取代已存在于 α 或 β 链结构域的恒定区中的非半胱氨酸氨基酸为半胱氨酸)引入。如果要在 α 和 β 链结构域的恒定区都引入半胱氨酸残基,则可以在每个链结构域中使用不同的半胱氨酸引入方法。引入了额外半胱氨酸的本发明的TCR链或链结构域可称为“半胱氨酸修饰的”。

[0089] 在本发明的一个优选实施方案中,全长TCR的 α 链的恒定区具有Radium-1 α -链的半胱氨酸修饰的恒定区的序列。在特别优选的实施方案中,Radium-1 α 链的恒定区通过T48C取代进行修饰。即,SEQ ID NO:9的苏氨酸48被半胱氨酸取代。由带有T48C取代的SEQ ID NO:9组成的 α 链结构域恒定区的序列在SEQ ID NO:10中给出,因此在特别优选的实施方案中, α 链结构域包含具有SEQ ID NO:10的序列的恒定区,即包含或由SEQ ID NO:10的序列组成。或者, α 链结构域可包含恒定区,其具有,即包含与SEQ ID NO:10的序列具有至少60%、

65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的序列同一性的氨基酸序列或由其组成,只要第48位的半胱氨酸残基(或对应于SEQ ID NO:10的48位的位置)保持不变即可。

[0090] 在本发明的另一个优选实施方案中,全长TCR的 β 链的恒定区具有Radium-1 β -链的半胱氨酸修饰的恒定区的序列。在特别优选的实施方案中,Radium-1 β 链的恒定区通过S57C取代进行修饰。即,SEQ ID NO:14的丝氨酸57被半胱氨酸取代。由带有S57C取代的SEQ ID NO:14组成的 β 链结构域恒定区的序列在SEQ ID NO:15中给出,因此在特别优选的实施方案中, β 链结构域包含具有SEQ ID NO:15的序列的恒定区,即包含或由SEQ ID NO:15的序列组成。或者, β 链结构域可包含恒定区,其具有,即包含与SEQ ID NO:15的序列具有至少60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%的序列同一性的氨基酸序列或由其组成,只要第57位的半胱氨酸残基(或对应于SEQ ID NO:15的第57位的位置)保持不变即可。

[0091] 在其中一个或两个TCR链结构域包含鼠源化恒定区的实施方案中,鼠源化恒定区可以是半胱氨酸修饰的。本发明的全长TCR的 α 链结构域的半胱氨酸修饰的鼠源化恒定区的优选序列示于SEQ ID NO:24。SEQ ID NO:24代表SEQ ID NO:23的半胱氨酸修饰形式。SEQ ID NO:24是通过用鼠SEQ ID NO:23中的相当于人SEQ ID NO:9的苏氨酸48的残基取代为半胱氨酸残基获得。因此, α 链结构域可以包含半胱氨酸修饰的鼠源化恒定区,其具有,即包含SEQ ID NO:24的氨基酸序列或与其具有至少95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成,其中半胱氨酸第47位的残基(或对应于SEQ ID NO:24的第47位的位置)保持不变。

[0092] 本发明的全长TCR的 β 链结构域的半胱氨酸修饰的鼠源化恒定区的优选序列示于SEQ ID NO:30。SEQ ID NO:30代表SEQ ID NO:29的半胱氨酸修饰形式。SEQ ID NO:30是通过用鼠SEQ ID NO:29中相当于人SEQ ID NO:14的丝氨酸57的残基取代为半胱氨酸残基获得。因此, β 链结构域可以包含半胱氨酸修饰的鼠源化恒定区,其具有,即包含SEQ ID NO:30的氨基酸序列或与其具有至少95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成,其中半胱氨酸第56位的残基(或对应于SEQ ID NO:30的第56位的位置)保持不变。

[0093] 如本文所述,本发明的全长TCR的 α 和 β 链结构域可各自包含可变区和恒定区或由其组成,其具有上文定义和描述的可变区和恒定区序列。各种可变区和恒定区序列可以以任何可能的组合方式组合,尽管最优选 α -链可变区序列与 α -链恒定区序列组合,并且 β -链可变区序列与 β 链恒定区序列组合。

[0094] 在本发明的全长TCR的一个实施方案中, α 链结构域包含可变区和恒定区,其具有Radium-1TCR的 α 链的可变区和恒定区的各自序列。在该实施方案中,本发明的 α 链结构域可具有Radium-1 TCR的 α 链序列,其如SEQ ID NO:11中所示。因此,在本发明的一个实施方案中, α 链结构域具有SEQ ID NO:11的氨基酸序列,或者包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列或由其组成。

[0095] 如上所述, α 链结构域可在其可变结构域中包含标签。这种标签优选位于 α 链结构域前导序列的C末端,使得它形成成熟链结构域的极端N末端。优选的标签是双Myc标签。直接插入C末端至前导序列的带有双Myc标签的Radium-1 TCR的 α 链具有SEQ ID NO:21的序列。因此,在本发明的另一个实施方案中,全长TCR的 α 链结构域具有SEQ ID NO:21的序列,或者包含SEQ ID NO:21的序列或由SEQ ID NO:21的序列组成。全长TCR的 α 链结构域可以替代地具有或包含与SEQ ID NO:11或SEQ ID NO:21中的任一个具有至少90%或95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。只要CDR序列(和存在双Myc标签序列的情况)如上文所定义

即可。

[0096] 如上所述,本发明的 α 链结构域的恒定区可以替代地是鼠的:特别地,它可以是SEQ ID NO:9的鼠的(或鼠源化)形式,尽管它可以是任何其他鼠的TCR α 链恒定区。在 α 链结构域的恒定区被鼠源化的情况下,可变区也可以被鼠源化(特别是可变结构域的框架区可以被鼠源化),尽管这不是必需的。在本发明的一个优选实施方案中,当 α 链结构域的恒定区被小鼠化时,可变区是人的。在本发明的优选实施方案中,当全长TCR α 链结构域的恒定区是鼠的时,它具有SEQ ID NO:23的序列,而可变区是Radium-1 α 链的可变区。具有Radium-1 α 链可变区和具有SEQ ID NO:23序列的恒定区的全长TCR α 链序列示于SEQ ID NO:25。在本发明的一个实施方案中,TCR的 α 链结构域包含鼠源化恒定区和人可变区,并且具有SEQ ID NO:25的序列,或者包含SEQ ID NO:25的序列或由SEQ ID NO:25的序列组成。

[0097] 在另一个实施方案中,全长 α 链结构域包含鼠的恒定区和可变区,其包含标签,优选双Myc标签,优选直接在前导序列的C末端。在该实施方案中,恒定结构域优选具有SEQ ID NO:23的序列,并且可变结构域优选具有SEQ ID NO:20的序列(SEQ ID NO:20代表具有双Myc标签立即插入前导序列的C末端的Radium-1 α -链可变区)。由SEQ ID NO:23的鼠恒定区和具有SEQ ID NO:20的可变区组成的 α 链结构域的序列示于SEQ ID NO:27。因此,本发明的全长TCR的 α 链结构域可以具有SEQ ID NO:27的序列,或者包含SEQ ID NO:27的序列或由SEQ ID NO:27的序列组成。全长TCR的 α 链结构域可以替代地具有或包含与SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:27中的任一个具有至少95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成,只要CDR序列(和存在双Myc标签序列的情况)如上文所定义即可。

[0098] 如上所述, α 和 β 链结构域的恒定区可以是半胱氨酸修饰的,以改善本发明TCR的 α 链和 β 链之间相互作用的特异性。这种修饰的恒定区可以与本发明的任何可变区配对:例如,半胱氨酸修饰的恒定区可以与包含双Myc标签的可变区配对,但这绝不是必需的。因此, α 链结构域可以包含已被半胱氨酸修饰的恒定区。上文已经描述了 α 链结构域的优选半胱氨酸修饰的恒定区:全长半胱氨酸修饰的Radium-1 α -链恒定结构域具有SEQ ID NO:10的序列,而半胱氨酸修饰的鼠源化的SEQ ID NO:10的等价物显示在SEQ ID NO:24中。

[0099] 在本发明的优选实施方案中,全长 α 链结构域包含具有SEQ ID NO:8的Radium-1 α -链可变结构域和SEQ ID NO:10的半胱氨酸修饰的Radium-1恒定结构域或半胱氨酸修饰的SEQ ID NO:24的鼠源化恒定结构域。由具有SEQ ID NO:8的可变结构域和具有SEQ ID NO:10的恒定结构域组成的 α 链结构域具有SEQ ID NO:12的序列,以及由具有SEQ ID NO:8的可变结构域和具有SEQ ID NO:24的恒定结构域组成的 α 链结构域具有SEQ ID NO:26的序列。因此,在本发明的一个优选实施方案中,全长 α 链结构域具有或包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列或由其组成,或者 α 链结构域可具有或包含与其具有至少90%或95%的序列同一性的氨基酸序列或由其组成,只要CDR序列和半胱氨酸修饰如上文所定义即可。在本发明的另一个优选实施方案中,全长 α 链结构域具有或包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列或由其组成,或者 α 链结构域可具有或包含与其具有至少90%或95%的序列同一性的氨基酸序列或由其组成,只要CDR序列和半胱氨酸修饰如上文所定义即可。

[0100] 在本发明更优选的实施方案中,全长 α 链结构域包含Radium-1 α -链可变结构域,其通过插入标签进行修饰,优选双Myc-标签,如SEQ ID NO:20所示。在本发明最优选的实施方案中, α 链结构域包含具有SEQ ID NO:20的序列的可变区和半胱氨酸修饰的SEQ ID NO:10

的Radium-1恒定结构域或半胱氨酸修饰的SEQ ID NO:24的鼠源化恒定结构域。由具有SEQ ID NO:20的可变结构域和具有SEQ ID NO:10的恒定结构域组成的 α 链结构域具有SEQ ID NO:22的序列,并且由具有SEQ ID NO:20的可变结构域和具有SEQ ID NO:24的恒定结构域组成的 α 链结构域具有SEQ ID NO:28的序列。

[0101] 因此,在本发明最优选的实施方案中,全长 α 链结构域具有或包含SEQ ID NO:22的序列或者由其组成,或者 α 链结构域可以具有或包含与其具有至少90%或95%序列同一性的氨基酸序列或者由其组成。只要CDR序列、双Myc-标签序列和半胱氨酸修饰如上文所定义即可。在本发明的另一个最优选的实施方案中, α 链结构域具有或包含SEQ ID NO:28的序列或者由其组成,或者 α 链结构域可以具有或包含与其具有至少95%序列同一性的氨基酸序列或者由其组成。只要CDR序列、双Myc-标签序列和半胱氨酸修饰如上文所定义即可。

[0102] 类似于 α 链结构域,在本发明的一个实施方案中,全长 β 链结构域包含可变区和恒定区,其具有Radium-1的 β -链的可变区和恒定区的各自序列。在该实施方案中,本发明的 β 链结构域可以具有Radium-1TCR的 β 链序列,其如SEQ ID NO:16中所示。因此,在本发明的一个实施方案中, β 链结构域具有SEQ ID NO:16的氨基酸序列,或者包含SEQ ID NO:16的氨基酸序列或者由其组成。或者, β 链结构域可具有或包含与SEQ ID NO:16具有至少90%或95%序列同一性的氨基酸序列或者由其组成,只要CDR序列如上文所定义即可。

[0103] 如 α 链结构域,本发明的全长 β 链结构域的恒定区可以替代地是鼠的:特别地,它可以是SEQ ID NO:14的鼠的(或鼠源化)形式,尽管它可以是任何其他鼠的TCR β 链恒定区。在 β 链结构域的恒定区被小鼠化的情况下,可变区也可以被小鼠化(特别是可变结构域的框架区可以被小鼠化),尽管这不是必需的。在本发明的一个优选实施方案中,当 β 链结构域的恒定区被小鼠化时,可变区是人的。在本发明的优选实施方案中,当全长TCR β 链结构域的恒定区是鼠的时,它具有SEQ ID NO:29的序列,而可变区是Radium-1 β 链的可变区。具有Radium-1 β 链可变区和具有SEQ ID NO:29序列的恒定区的TCR β 链序列示于SEQ ID NO:31。在本发明的一个实施方案中,TCR的 β 链结构域包含鼠源化恒定区和人可变区,并且具有SEQ ID NO:31的序列,或者包含SEQ ID NO:31的序列或由SEQ ID NO:31的序列组成。或者, β 链结构域可具有或包含与SEQ ID NO:31具有至少95%序列同一性的氨基酸序列或者由其组成,只要CDR序列如上文所定义即可。

[0104] 如 α 链结构域,全长 β 链结构域可包含已经半胱氨酸修饰的恒定区。上文已经描述了 β 链结构域的优选半胱氨酸修饰的恒定区:半胱氨酸修饰的Radium-1 β -链恒定结构域具有SEQ ID NO:15的序列,而半胱氨酸修饰的鼠源化修饰的SEQ ID NO:15的等同物如SEQ ID NO:30所示。

[0105] 在本发明的优选实施方案中,全长 β 链结构域包含具有SEQ ID NO:13的Radium-1 β -链可变结构域和SEQ ID NO:15的半胱氨酸修饰的Radium-1恒定结构域或半胱氨酸修饰的SEQ ID NO:30的鼠源化恒定结构域。由具有SEQ ID NO:13的可变结构域和具有SEQ ID NO:15的恒定结构域组成的 β 链结构域具有SEQ ID NO:17的序列,并且由具有SEQ ID NO:13的可变结构域和具有SEQ ID NO:30的恒定结构域组成的 β 链结构域具有SEQ ID NO:32的序列。因此,在本发明的一个优选实施方案中,全长 β 链结构域具有或包含SEQ ID NO:17的序列或者由其组成,或者 β 链结构域可以具有或包含与其具有至少90%或95%的序列同一性的氨基酸序列或者由其组成,只要CDR序列和半胱氨酸修饰如上文所定义即可。在本发明的另一

个优选实施方案中,β链结构域具有或包含SEQ ID NO:32的序列或由其组成,或者β链结构域可以具有或包含与其具有至少95%的序列同一性的氨基酸序列或由其组成,只要CDR序列和半胱氨酸修饰如上文所定义即可。

[0106] 如上所述,β链结构域可在其可变结构域中包含标签。这种标签优选位于β链结构域前导序列的C末端,使得它形成成熟链结构域的极端N末端。优选的这种标签是双Myc标签。

[0107] 在本发明的可溶性TCR中,α和β链结构域的恒定区可以对应于上述全长恒定区的截短形式。在本发明的一个具体实施方案中,α链结构域的截短恒定区对应于Radium-1α链恒定区的氨基酸1-95(即SEQ ID NO:9的氨基酸1-95)。该序列如SEQ ID NO:60所示。本发明的可溶性TCR可包含含有恒定区的α链结构域,所述恒定区包含SEQ ID NO:60所示的氨基酸序列或与其具有至少60、65、70、75、80、85、90或95%的序列同一性的氨基酸序列或由其组成。在本发明的另一个实施方案中,β链结构域的截短的恒定区对应于Radium-1β链的恒定区的氨基酸1-131(即SEQ ID NO:14的氨基酸1-131)。该序列如SEQ ID NO:62所示。本发明的可溶性TCR可包含含有恒定区的β链结构域,所述恒定区包含SEQ ID NO:62所示的氨基酸序列或与其具有至少60、65、70、75、80、85、90或95%的序列同一性的氨基酸序列或由其组成。

[0108] 可溶性TCR的一个必要方面是成熟TCR的α链和β链连接在一起。如果它们没有连接在一起,链条将在溶液中扩散分开,如果全部分开的话,TCR将运行不良。链可以共价或非共价连接。α链和β链可以共价连接的优选方法是通过一个或多个二硫键。这些可以在天然TCR链序列中存在的半胱氨酸残基之间形成,但是在一个优选的实施方案中,将一个或多个半胱氨酸残基引入每条链的恒定区,在它们之间可以形成二硫键。至于全长TCR,在本发明的一个优选实施方案中,可溶性TCR的α和β链结构域的恒定区是半胱氨酸修饰的。对于全长TCR链,可以通过插入半胱氨酸残基或将天然残基取代为半胱氨酸残基来修饰每个链。

[0109] 在一个特别优选的实施方案中,Radium-1α链的截短的恒定区(即SEQ ID NO:60)通过T48C取代修饰。这种半胱氨酸修饰的截短的α链结构域恒定区的序列如SEQ ID NO:61所示(并且对应于SEQ ID NO:10的氨基酸1-95,SEQ ID NO:10列出了半胱氨酸修饰的全长Radium-1α链恒定区序列)。因此,在一个优选的实施方案中,本发明的可溶性TCR包含α链结构域,所述α链结构域包含恒定区,所述恒定区包含SEQ ID NO:61所示的氨基酸序列或与其具有至少60、65、70、75、80、85、90或95%的序列同一性的氨基酸序列或由其组成。当α链结构域是SEQ ID NO:61的变体(即它具有与SEQ ID NO:61至少60%但小于100%的序列同一性的序列)时,第48位的氨基酸(或对应于SEQ ID NO:61的48位的位置)是半胱氨酸。

[0110] 在另一个优选的实施方案中,Radium-1β链的截短恒定区(即SEQ ID NO:62)通过S57C取代进行修饰。这种半胱氨酸修饰的截短的β链结构域恒定区的序列如SEQ ID NO:63所示(并且对应于SEQ ID NO:15的氨基酸1-131,SEQ ID NO:15列出了半胱氨酸修饰的全长Radium-1β链恒定区序列)。因此,在一个优选的实施方案中,本发明的可溶性TCR包含β链结构域,所述β链结构域包含恒定区,所述恒定区包含SEQ ID NO:63所示的氨基酸序列或与其具有至少60、65、70、75、80、85、90或95%的序列同一性的氨基酸序列或由其组成。当α链结构域是SEQ ID NO:63的变体(即其具有与SEQ ID NO:63至少60%但小于100%的序列同一性的序列)时,第48位的氨基酸(或对应于SEQ ID NO:63的48位的位置)是半胱氨酸。

[0111] 可溶性TCR的 α 链和 β 链可以连接的另一种方法是通过非共价相互作用。在一个具体实施方案中,亮氨酸拉链用于非共价连接链。在该实施方案中, α 链和 β 链均在其截短的恒定区的C末端包含亮氨酸拉链结构域(即, α 链在其C末端包含亮氨酸拉链结构域,并且 β 链在其C末端包含亮氨酸拉链结构域)。亮氨酸拉链及其序列在本领域中是众所周知的,并且在例如Busch&Sassone-Corsi (1990), Trends Genet 6:36-40中进行了综述。在一些实施方案中,共价和非共价方法均可用于连接可溶性TCR的 α 链和 β 链,例如, α 链和 β 链可以都是半胱氨酸修饰的并且包括亮氨酸拉链结构域。

[0112] 因此,本发明的可溶性TCR可以包含对应于Radium-1的截短的 α 链的 α 链结构域,其中缺失C末端46个氨基酸。这种截短的 α 链具有SEQ ID NO:64(对应于SEQ ID NO:11的残基1-222)中所示的序列。如果恒定区是如上所述的半胱氨酸修饰的(即恒定区含有相对于野生型序列的Thr→Cys取代,对应于SEQ ID NO:64中的T175C取代),则截短的 α 链具有SEQ ID NO:65所示的序列。在一个优选的实施方案中,可溶性TCR的 α 链结构域包含SEQ ID NO:64或SEQ ID NO:65所示的序列或与其具有至少90或95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。当 α 链包含SEQ ID NO:64或65的变体或其组成时,CDR序列如上所定义,并且在SEQ ID NO:65的变体的情况下,第175位的残基(或对应于SEQ ID NO:65的位置175的位置)是半胱氨酸。

[0113] 本发明的可溶性TCR的 β 链结构域可以对应于Radium-1的截短的 β 链,其中缺失C末端48个氨基酸。这种截短的 β 链具有SEQ ID NO:66(对应于SEQ ID NO:16的残基1-262)所示的序列。如果恒定区是如上所述的半胱氨酸修饰的(即恒定区含有相对于野生型序列的Ser→Cys取代,对应于SEQ ID NO:66中的S188C取代),则截短的 β 链具有SEQ ID NO:67所示的序列。在优选的实施方案中,可溶性TCR的 β 链结构域包含SEQ ID NO:66或SEQ ID NO:67所示的序列或与其具有至少90或95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。当 α -链包含SEQ ID NO:66或67的变体或由其组成时,CDR序列如上所定义,并且在SEQ ID NO:67的变体的情况下,第188位的残基(或对应于SEQ ID NO:67的位置188的位置)是半胱氨酸。

[0114] 在某些实施方案中,如上所述的纯化标签在 α 或 β 链结构域的C-末端编码。优选的标签是六组氨酸(His-)标签。这种标签可以通过接头(例如短接头Gly-Gly-Gly)连接到 α 链或 β 链的C末端。

[0115] 在本发明的一些实施方案中,TCR仅包含上述 α 和 β 链结构域之一。例如,它可以包含本发明的 α 链结构域,但是 β 链结构域不属于本发明的范围;它可以包含本发明的 β 链结构域,但是 α 链结构域不属于本发明的范围。或者,本发明的TCR分子可仅包含本发明的 α 链结构域,或仅包含本发明的 β 链结构域。然而,优选TCR分子包含本发明的 α 链结构域和本发明的 β 链结构域。

[0116] 当本发明的TCR包含本发明的 α 链结构域和本发明的 β 链结构域时,它可以包含本发明的上述 α 链结构域和 β 链结构域的任何组合。例如,包含人恒定区的 α 链结构域可以与包含鼠恒定区的 β 链配对,反之亦然。通常优选的是相似的配对,例如,包含人恒定区的 α 链结构域与包含人恒定区的 β 链结构域配对,反之亦然;包含鼠恒定区的 α 链结构域与包含鼠恒定区的 β 链结构域配对,反之亦然;或包含已经半胱氨酸修饰的恒定区的 α 链结构域与包含已经半胱氨酸修饰的恒定区的 β 链结构域配对,反之亦然。

[0117] 如上所述,在本发明的优选实施方案中,TCR编码为scTCR,其中 α 链结构域的C末端

通过接头与β链结构域的N末端连接。接头应该是可切割的：优选地，它是自剪接的接头，例如衍生自小RNA病毒2A肽的接头。最优选地，它具有SEQ ID NO:18的序列，或其变体。

[0118] 本发明的全长TCR可以编码为scTCR。在一个这样的实施方案中，scTCR包含具有Radium-1α链序列的α链结构域和具有Radium-1β链序列的β链结构域，通过SEQ ID NO:18的接头连接。这种scTCR具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列。

[0119] 在本发明的优选实施方案中，SEQ ID NO:33的scTCR的α和β链结构域的恒定区是半胱氨酸修饰的。如上所述，半胱氨酸修饰的Radium-1α链结构域的优选序列具有SEQ ID NO:12的序列，并且半胱氨酸修饰的Radium-1β链结构域的优选序列具有SEQ ID NO:17的序列。包含通过SEQ ID NO:18的接头连接的具有SEQ ID NO:12的序列的半胱氨酸修饰的Radium-1α链结构域和具有SEQ ID NO:17的序列的半胱氨酸修饰的Radium-1β链结构域的scTCR，具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列。

[0120] 在另一个优选的实施方案中，特别是本发明的全长TCR，本发明的TCR的α和/或β链结构域的可变区包含标签的序列，优选双Myc标签。优选地，仅α链结构域或β链结构域之一的可变区包含标签的序列，最优选的是α链结构域的可变区。如上所述，本发明优选的全长α链结构域是具有Radium-1α链的序列，其中双Myc标签直接插入其前导序列的C-末端，如SEQ ID NO:21所示。SEQ ID NO:21的双Myc标记的α链结构域可优选与全长Radium-1β链结构域（其具有SEQ ID NO:16的序列）组合。包含具有SEQ ID NO:21的双Myc标记的α链结构域和与SEQ ID NO:16的Radium-1β链结构域通过SEQ ID NO:18的接头连接的scTCR具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列。

[0121] 在另一个优选的实施方案中，特别是本发明的全长TCR，α链结构域的可变区包含双Myc标签，α和β链结构域的恒定区是半胱氨酸修饰的。如上所述，具有包含双Myc标签和半胱氨酸修饰的恒定区的可变区的全长α链结构域的优选序列具有SEQ ID NO:22的氨基酸序列。SEQ ID NO:22的双Myc标记的半胱氨酸修饰的α链结构域可优选与SEQ ID NO:17的全长半胱氨酸修饰的β链结构域组合。包含SEQ ID NO:22的双Myc标记的半胱氨酸修饰的α链结构域和与SEQ ID NO:17的半胱氨酸修饰的β链结构域通过SEQ ID NO:18的接头连接的scTCR具有氨基酸SEQ ID NO:36的序列。

[0122] 因此，在本发明的一个实施方案中，TCR分子是具有SEQ ID NO:33的氨基酸序列的scTCR，或者该scTCR可以具有与SEQ ID NO:33至少90%或95%序列同一性的氨基酸序列。只要CDR序列如上文所定义，并且2A衍生的接头保留其自剪接活性即可。

[0123] 在本发明的一个优选实施方案中，TCR分子是具有SEQ ID NO:34的氨基酸序列的scTCR，或者该scTCR可以具有与SEQ ID NO:34至少90%或95%序列同一性的氨基酸序列。只要CDR序列和半胱氨酸修饰如上文所定义，并且2A衍生的接头保留其自剪接活性即可。

[0124] 在本发明的另一个优选实施方案中，TCR分子是具有SEQ ID NO:35的氨基酸序列的scTCR，或者该scTCR可以具有与SEQ ID NO:35至少90%或95%序列同一性的氨基酸序列。只要CDR序列和双Myc标签序列如上文所定义，并且2A衍生的接头保留其自剪接活性即可。

[0125] 在本发明的另一个优选实施方案中，TCR分子是具有SEQ ID NO:36的氨基酸序列的scTCR，或者该scTCR可以具有与SEQ ID NO:36至少90%或95%序列同一性的氨基酸序列。只要CDR序列、半胱氨酸修饰和双Myc标签序列如上文所定义，并且2A衍生的接头保留其

自剪接活性即可。

[0126] 如上所述,本发明的 α 和/或 β 链结构域的恒定区可以被鼠源化。具有鼠恒定区的优选的全长 α 链结构域具有SEQ ID NO:25的序列,具有鼠恒定区的优选的全长 β 链结构域具有SEQ ID NO:31的序列。包含具有SEQ ID NO:25的序列的 α 链结构域和具有SEQ ID NO:31的序列的 β 链结构域通过SEQ ID NO:18的接头连接的scTCR具有SEQ ID NO:37的序列。

[0127] 如上所述,在优选的实施方案中, α 和 β 链结构域的恒定区是半胱氨酸修饰的。包含半胱氨酸修饰的、鼠源化恒定区的全长 α 链结构域的优选序列示于SEQ ID NO:26,并且包含半胱氨酸修饰的、鼠源化恒定区的全长 β 链结构域的优选序列示于SEQ ID NO:32。包含具有SEQ ID NO:26的序列的 α 链结构域和SEQ ID NO:32的 β 链结构域通过SEQ ID NO:18的接头连接的scTCR具有SEQ ID NO:38的序列。

[0128] 如上所述,在另一个优选的实施方案中, α 链结构域的可变区包含双Myc标签。包含含有双Myc标签和鼠源化恒定区的可变区的全长 α 链结构域的优选序列示于SEQ ID NO:27。包含具有SEQ ID NO:27序列的含有双Myc标签和鼠源化恒定区的可变区的 α 链结构域可优选与包含具有SEQ ID NO:31序列的鼠源化恒定区的全长 β 链结构域组合。包含具有SEQ ID NO:27的序列的 α 链结构域和具有SEQ ID NO:31的序列的 β 链结构域通过SEQ ID NO:18的接头连接的scTCR具有SEQ ID NO:39的序列。

[0129] 在另一个优选的实施方案中, α 链结构域包含含有双Myc标签并且 α 和 β 链结构域的恒定区是半胱氨酸修饰的可变区。包含含有双Myc标签和半胱氨酸修饰的鼠源化恒定区的可变区的优选的全长 α 链结构域具有SEQ ID NO:28的序列。包含具有SEQ ID NO:28序列的含有双Myc标签和半胱氨酸修饰的鼠源化恒定区的可变区的 α 链结构域可优选与包含具有SEQ ID NO:32序列的半胱氨酸修饰的鼠源化恒定区的全长 β 链结构域组合。包含具有SEQ ID NO:28的序列的 α 链结构域和具有SEQ ID NO:32的序列的 β 链结构域通过SEQ ID NO:18的接头连接的scTCR具有SEQ ID NO:40的序列。

[0130] 因此,在本发明的具体实施方案中,TCR分子是具有SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:40的氨基酸序列的scTCR。或者,scTCR可具有与SEQ ID NO:37、SEQ ID NO:38、SEQ ID NO:39或SEQ ID NO:40之一具有至少90%或95%序列同一性的氨基酸序列,只要CDR序列、存在双Myc-标签和/或半胱氨酸修饰时如上文所定义,并且2A衍生的接头保留其自剪接活性即可。

[0131] 具有SEQ ID NO:33至40的scTCR多肽分别由SEQ ID NO:41至48的核苷酸序列编码。本发明的核酸分子是编码本发明的TCR分子的核酸分子。因此,本发明的核酸分子可以包含编码如上定义的本发明的任何TCR分子的核苷酸序列。编码具有包含人恒定区的 α 和 β 链结构域的scTCR的本发明的核酸分子可特别包含SEQ ID NO:41,SEQ ID NO:42,SEQ ID NO:43或SEQ ID NO:44中任一个的核苷酸序列。编码具有包含鼠恒定区的 α 和 β 链结构域的scTCR的本发明的核酸分子可特别包含SEQ ID NO:45、SEQ ID NO:46、SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:48中任一个的核苷酸序列。

[0132] 因此,本发明的核酸分子可包含SEQ ID NO:41至44或45至48中任一个的核苷酸序列。或者,本发明的核酸分子可包含与SEQ ID NO:41至44或45至48中任一个具有至少90%或95%序列同一性的核苷酸序列,或者为SEQ ID NO:41至44或45至48中任一个核苷酸序列的简并核苷酸序列。包含具有与本发明的任何上述定义的核酸分子的反向互补序列的核苷

酸序列的核酸分子也属于本发明的范围。

[0133] 本发明的可溶性TCR可以编码为scTCR。可溶性TCR的优选scTCR对应于上文针对全长TCR描述的那些,使用相应的截短的 α -和 β 链结构域。至于本发明的全长TCR,优选scTCR在其N-末端编码 α 链结构域,在其C-末端编码 β 链结构域,两个结构域通过接头分开。优选地,具有SEQ ID NO:18所示序列的小RNA病毒2A肽或其衍生物,如上所定义。

[0134] 在一个实施方案中,可溶性scTCR包含具有SEQ ID NO:65(或其变体)所示氨基酸序列的 α 链结构域和具有SEQ ID NO:67(或其变体)所示氨基酸序列的 β 链结构域,两条链由2A衍生的接头分开。在一个具体实施方案中,该scTCR包含SEQ ID NO:68所示序列或与其具有至少90或95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。当scTCR包含SEQ ID NO:68的变体或由其组成时,CDR序列如上所定义,并且第175和436位的残基(或对应于SEQ ID NO:68的第175和436位的位置)是半胱氨酸(这些位置分别对应于 α 和 β 链结构域的位置175和188)。

[0135] 在另一个实施方案中,His-标签位于SEQ ID NO:68的scTCR的C-末端(scTCR的C-末端对应于 β -链的C-末端),His-标签通过Gly-Gly-Gly接头与 β -链分开。这种scTCR具有SEQ ID NO:69所示的序列。在另一个优选的实施方案中,本发明提供了scTCR,其包含SEQ ID NO:69所示序列或与其具有至少90或95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。当scTCR包含SEQ ID NO:69的变体或由其组成时,CDR序列如上所定义,并且第175和436位的残基(或对应于SEQ ID NO:69的第175和436位的位置)是半胱氨酸(这些位置分别对应于 α 和 β 链结构域的位置175和188)。

[0136] SEQ ID NO:68和69的氨基酸序列由SEQ ID NO:70和71中所示的核苷酸序列编码。本发明的核酸分子是编码本发明TCR的核酸分子,包括编码全长TCR的核酸分子和编码可溶性TCR的核酸分子。在某些实施方案中,本发明的核酸分子是包含SEQ ID NO:70或SEQ ID NO:71所示核苷酸序列或与SEQ ID NO:70或SEQ ID NO:71具有至少90或95%序列同一性的核苷酸序列或由其组成。包含SEQ ID NO:70、SEQ ID NO:71的反向互补序列或与其具有至少90或95%序列同一性的核苷酸序列或由其组成的核酸分子或也属于本发明的范围。

[0137] 如上所述,本发明的某些实施方案涉及与特定的确定序列(参考序列)具有一定水平的序列同一性的多肽或多核苷酸。在本文关于特定参考序列给出%序列同一性的情况下,在参考序列的整个长度上确定%序列同一性。当比较多肽或多核苷酸序列时,如果两个序列中的核苷酸序列在对齐以获得最大对应性时是相同的,则称两个序列是“相同的”。用于确定序列同一性的方法是本领域熟知的,并且可以使用任何方便或可用的方法。

[0138] 用于比较的序列的最佳比对可以使用Lasergene生物信息学软件套件(DNASTAR, Inc.,Madison,WI)中的Megalign程序,使用默认参数进行。或者,用于比较的序列的最佳比对可以通过Smith和Waterman,局部同一性算法(Smith and Waterman,Add.APL.Math 2: 482(1981))进行,通过Needleman和Wunsch的身份对齐算法(Needleman和Wunsch, J.Mol.Biol.48:443(1970)),通过寻找Pearson和Lipman的相似性方法(Pearson和Lipman, Proc.Natl.Acad.Sci.USA 85:2444(1988)),通过这些算法的计算机化实现(威斯康星遗传学软件包中的GAP、BESTFIT、BLAST、FASTA和TFASTA,Genetics Computer Group(GCG), 575Science Dr.,Madison,WI),或通过检查。

[0139] 类似地,变体序列中的氨基酸位置定义为“对应于”参考序列中的特定氨基酸位置,如上所述,可以通过序列比对鉴定相应的位置。当变体序列与参考序列对齐时,在任何

特定位置对齐的氨基酸在本文中定义为“对应的”。例如,如果SEQ ID NO:10的变体与SEQ ID NO:10对齐,则对应于SEQ ID NO:10的变体序列的48位的位置是与SEQ ID NO:10的氨基酸48对齐的氨基酸。对应于参考序列中的位置的变体序列的位置可以与参考序列中的位置相同,例如,SEQ ID NO:10的第48位可以对应于SEQ ID NO:10的变体的第48位。但是,相应的位置可能位于不同的位置。例如,如果从SEQ ID NO:10的变体的N末端缺失单个氨基酸(并且没有进行其他突变),则SEQ ID NO:10的第48位对应于变体序列的第47位。

[0140] 本领域普通技术人员将理解,由于遗传密码的简并性,有许多核苷酸序列可以编码如本文所述的每个单独的TCR分子。

[0141] 本发明的核酸分子可以是分离的核酸分子,并且可以包括DNA(包括cDNA)或RNA或DNA或RNA的化学衍生物,包括具有放射性同位素或化学加合物的分子,例如荧光团、发色团或生物素(“标签”)。因此,核酸可包含修饰的核苷酸。所述修饰包括碱基修饰(例如溴尿苷),核糖修饰(例如阿拉伯糖苷和2',3'-双脱氧核糖)以及核苷酸间键修饰(例如硫代磷酸酯,二硫代磷酸酯,硒代磷酸酯,二硫代磷酸酯,硫代磷酸酯,磷酰胺酸酯和氨基磷酸酯)。术语“核酸分子”具体包括单链和双链形式的DNA和RNA。

[0142] 修饰核苷酸序列以引入各种TCR区域的氨基酸序列变化的方法是本领域熟知的,例如,可以使用诱变方法,例如位点特异性诱变。制备编码TCR分子的核酸分子的方法也是公知的,例如,常规聚合酶链式反应(PCR)克隆技术可用于构建核酸分子。例如,可以将核酸分子克隆到通用克隆载体中,例如来自Invitrogen Inc.的pENTR(Gateway)、pUC19、pBR322、pBluescript载体(Stratagene Inc.)或pCR TOPO[®]。然后将携带编码TCR的核酸分子的所得核酸构建体(重组载体)亚克隆到用于蛋白质表达的表达载体或病毒载体中,例如,用于蛋白质表达。在哺乳动物细胞中。这可以用于制备TCR蛋白,或用于在免疫效应细胞中表达,例如人T细胞或细胞系或其他人免疫效应细胞。此外,可以将核酸引入mRNA表达载体中以产生编码TCR的mRNA。然后将mRNA转移到免疫效应细胞中。因此,本发明的另一方面提供了包含本发明核酸分子的载体。

[0143] 或者,mRNA表达载体可以在体外转录以产生编码TCR的mRNA。对于体外转录(IVT),首先获得模板。这可以是线性化的mRNA表达载体。例如,可以使用限制酶对载体进行线性化。或者,可通过表达盒的PCR扩增或本领域技术人员公知的任何其他方式获得模板。然后纯化并转录模板。可以使用IVT试剂盒进行转录,例如MEGAscript[™]试剂盒,RiboMAX[™]试剂盒或MAXIscript[™]试剂盒。然后通过DNA酶消化样品除去DNA模板,再纯化mRNA。IVT的方法是本领域技术人员公知的。

[0144] 可以将本发明的核酸分子引入载体中的细胞中或作为分离的核酸分子或重组构建体。无论是在构建体/载体制备方面还是在将核酸分子(载体或构建体)引入细胞方面,异源基因表达的方法在本领域是已知的。因此,适用于哺乳动物细胞,特别是T细胞的启动子和/或其他表达控制序列以及合适的载体(例如病毒载体)是本领域熟知的。

[0145] 因此,可以将核酸分子引入或插入载体中。如本文所用的术语“载体”是指可以将核酸分子引入其中(例如共价插入)以便实现TCR蛋白质或mRNA的表达和/或核酸分子的克隆的载体。因此,载体可以是克隆载体或表达载体。

[0146] 可以使用本领域已知的任何合适的方法将核酸分子插入载体中,例如但不限于,可以使用合适的限制酶消化载体,然后将具有匹配限制性末端的核酸分子连接。

[0147] 表达载体可含有多种控制序列,其是指特定宿主细胞中转录和可能翻译的可操作连接的编码序列所必需的核酸序列。除了控制转录和翻译的控制序列之外,载体还可以含有其他功能的其他核酸序列,包括例如复制功能或作为选择标记的功能等。

[0148] 表达载体应具有必需的5'上游和3'下游调节元件,用于在其各自的宿主细胞中进行有效的基因转录和翻译,例如启动子序列,其实例包括CMV,PGK和EF1a启动子,用于核糖体识别和结合的TATA盒,以及3'UTR AATAAA (SEQ ID NO:53) 转录终止序列。其他合适的启动子包括猿猴病毒40 (SV40) 的组成型“早期启动子”,小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV) 启动子,人免疫缺陷病毒 (HIV) 长末端重复序列 (LTR) 启动子,莫洛尼鼠白血病毒 (MoMuLV) 启动子,禽白血病毒 (ALV) 启动子,Epstein-Barr病毒 (EBV) 立即早期启动子和劳氏肉瘤病毒 (RSV) 启动子。还可以使用人基因启动子,包括但不限于肌动蛋白启动子,肌球蛋白启动子,血红蛋白启动子和肌酸激酶启动子。在某些实施方案中,诱导型启动子也是预期作为表达TCR的载体的一部分。这提供了能够打开或关闭核酸分子表达的分子开关。诱导型启动子的实例包括但不限于金属硫蛋白启动子,糖皮质激素启动子,孕酮启动子或四环素启动子。

[0149] 此外,表达载体可含有5'和3'非翻译调节序列,其可用作增强子序列,和/或终止子序列,其可促进或增强核酸分子的有效转录。

[0150] 载体的实例包括质粒、自主复制序列和转座因子。另外的示例性载体包括但不限于质粒,噬菌粒,粘粒,人工染色体如酵母人工染色体 (YAC),细菌人工染色体 (BAC) 或P1衍生的人工染色体 (PAC),噬菌体如 λ 噬菌体或M13噬菌体和动物病毒。可用作载体的动物病毒类别的实例包括但不限于逆转录病毒(包括慢病毒),腺病毒,腺相关病毒,疱疹病毒(例如单纯疱疹病毒),痘病毒,杆状病毒,乳头瘤病毒和乳多空病毒(例如,SV40)。表达载体的实例是在哺乳动物细胞用于表达的pCI-neo载体 (Promega) 和pLenti4/V5-DESTTM和pLenti6/V5-DESTTM用于慢病毒介导的基因转移和在哺乳动物细胞中的表达。

[0151] 在某些实施方案中,优选病毒载体。病毒载体可以衍生自逆转录病毒,特别是慢病毒或泡沫病毒/泡沫病毒。如本文所用,术语“病毒载体”是指核酸载体构建体,其包含至少一种病毒来源的元件并且具有包装到病毒载体颗粒中的能力。病毒载体可含有本发明的核酸分子代替非必需的病毒基因。载体和/或颗粒可用于在体外或离体将DNA、RNA或其他核酸转移到细胞中。

[0152] 因此,本发明的另一方面包括病毒颗粒,其包含如本文定义和描述的核酸分子,或包含此类病毒颗粒的制剂或组合物。这种组合物还可含有至少一种生理上可接受的载体。

[0153] 许多形式的病毒载体是本领域已知的。在某些实施方案中,病毒载体是逆转录病毒载体或慢病毒载体。载体可以是自失活载体,其中3'LTR增强子-启动子区域(称为U3区域)已被修饰(例如,通过缺失或取代)以防止病毒转录超过第一轮病毒复制。因此,载体能够感染并且然后仅整合到宿主基因组中一次,并且不能进一步传递。

[0154] 用于本文的逆转录病毒载体可以衍生自任何已知的逆转录病毒,例如,C型逆转录病毒,如莫洛尼鼠肉瘤病毒 (M-MSV),哈维鼠肉瘤病毒 (Ha-MuSV),小鼠乳腺肿瘤病毒 (MMTV),长臂猿白血病毒 (GaLV),猫白血病毒 (FLV),泡沫病毒,弗里德病毒 (Friend virus),鼠干细胞病毒 (MSCV) 和劳氏肉瘤病毒 (RSV); 人类T细胞白血病毒,例如HTLV-1和HTLV-2; 和逆转录病毒的慢病毒家族,如人类免疫缺陷病毒HIV-1和HIV-2,猴免疫缺陷病毒 (SIV),猫免疫缺陷病毒 (FIV),马免疫缺陷病毒 (EIV) 和其他类型的逆转录病毒。

[0155] 慢病毒载体衍生自慢病毒,其为一组(或属)逆转录病毒,其引起缓慢发展的疾病。该组中包括的病毒包括HIV(人类免疫缺陷病毒;包括HIV 1型和HIV 2型)。

[0156] 逆转录病毒包装细胞系(通常是哺乳动物细胞系)可用于产生病毒颗粒,然后可用于转导T细胞。示例性病毒载体描述于W02002087341, W02002083080, W02002082908, W02004000220和W02004054512。示例性逆转录病毒载体是如Wälchli等人2011年所描述的pMP71。其他合适的载体包括pBABE, pWZL, pMCs-CAG, pMXs-CMV, pMXs-EF1 α , pMXs-IRES, pMXs-SRa和pMYs-IRES。

[0157] 包括使得携带本发明的载体或构建体的免疫效应细胞易于在体内进行阴性选择的基因区段属于本发明的范围。“阴性选择”是指由于个体体内状况的改变可以消除输注细胞。负选择表型可以由插入赋予对给药剂(例如化合物)敏感的基因而产生。可选择的负基因是本领域已知的,尤其包括以下:单纯疱疹病毒I型胸苷激酶(HSV-I TK)基因(Wigler等, Cell 11(1):223-232, 1977)赋予更昔洛韦敏感性;细胞次黄嘌呤磷酸核糖基转移酶(HPRT)基因,细胞腺嘌呤磷酸核糖转移酶(APRT)基因和细菌胞嘧啶脱氨酶(Mullen等, Proc.Natl.Acad.Sci.USA.89:33-37 (1992))。因此,本发明的载体或构建体可包含这种基因。

[0158] 在一些实施方案中,在本发明的载体或构建体中包括能够在体外选择具有负选择性表型的细胞的阳性标记物是有用的。选择遗传修饰的免疫效应细胞。阳性选择标记可以是这样的基因,其在被引入宿主细胞后表达显性表型,允许阳性选择携带该基因的细胞。这种类型的基因是本领域已知的,尤其包括赋予对潮霉素B的抗性的潮霉素-B磷酸转移酶基因(hph),来自Tn5编码对抗生素G418的氨基糖苷磷酸转移酶基因(neo或aph),二氢叶酸还原酶(DHFR)基因,腺苷脱氨酶基因(ADA)的抗性以及多药耐药(MDR)基因。

[0159] 优选地,正选择标记和负选择要素(negatively selectable element)被连接,使得负选择要素的损失也必然是伴随着正选择标记的丧失。甚至更优选地,正和负选择标记是融合的,因此一个丢失必然导致另一个的丢失。赋予上述所需的正和负选择特征的作为表达产物的融合多核苷酸的实例是潮霉素磷酸转移酶-胸苷激酶融合基因(HyTK)。该基因的表达产生赋予潮霉素B抗性的多肽,用于体外阳性选择,以及更昔洛韦对体内阴性选择的敏感性。(参见Lupton S.D.等, Mol.and Cell.Biology 11:3374-3378, 1991.)

[0160] 为了克隆核酸分子,可以将载体导入宿主细胞(例如分离的宿主细胞),并且含有本发明克隆载体的这种“克隆宿主细胞”构成本发明的另一方面。合适的克隆宿主细胞可包括但不限于原核细胞,真菌细胞,酵母细胞或高等真核细胞如哺乳动物细胞。用于此目的的合适的原核细胞包括但不限于真细菌,例如革兰氏阴性或革兰氏阳性生物,例如肠杆菌科(如埃希氏菌属,如大肠杆菌),肠杆菌,欧文氏菌,克雷伯氏菌,变形杆菌,沙门氏菌(例如鼠伤寒沙门氏菌),沙雷氏菌(例如粘质沙雷氏菌)和志贺氏菌,以及芽孢杆菌和地衣芽孢杆菌等杆菌,铜绿假单胞菌等假单胞菌和链霉菌。或者,克隆宿主细胞可含有包含核酸分子的mRNA表达载体。

[0161] 使用本领域已知的转染和/或转导技术将核酸分子或载体引入宿主细胞(例如克隆宿主细胞,生产宿主细胞或T细胞)。如本文所用,术语“转染”和“转导”是指将外源核酸序列引入宿主细胞的过程。核酸可以整合到宿主细胞DNA中或可以维持在染色体外。核酸可以短暂维持或可以是稳定的。转染可通过本领域已知的多种方法完成,包括但不限于磷酸钙-

DNA共沉淀,DEAE-葡聚糖介导的转染,聚凝胺介导的转染,电穿孔,显微注射,脂质体融合,脂质转染,原生质体融合,逆转录病毒感染和生物射弹。转导是指通过病毒感染而非转染,使用病毒或逆转录病毒载体递送基因。在某些实施方案中,通过在与细胞接触之前将载体包装入病毒颗粒或病毒体中来转导逆转录病毒载体。

[0162] 本发明还提供了包含本发明的核酸分子或载体的宿主细胞。这种宿主细胞可以是任何合适的宿主,包括克隆宿主、生产宿主或免疫效应细胞。宿主细胞可以源自任何物种,实际上可以是适合于其功能的任何生命领域。

[0163] 在一个实施方案中,本发明提供免疫效应细胞,其包含本发明的核酸分子或载体,其编码本发明的全长TCR。“免疫效应细胞”是免疫系统的任何细胞,其具有一种或多种效应功能(例如,细胞毒性细胞杀伤活性,细胞因子的分泌,ADCC和/或CDC的诱导)。因此,代表性免疫效应细胞包括T淋巴细胞,特别是细胞毒性T细胞(CTL;CD8⁺T细胞)和辅助T细胞(HTL;CD4⁺T细胞)。其他T细胞群也可用于本文,例如幼稚T细胞和记忆T细胞。其他免疫效应细胞包括NK细胞,NKT细胞,中性粒细胞和细胞巨噬细胞。如上所述,免疫效应细胞还包括效应细胞的祖细胞,其中可以诱导这些祖细胞在体内或体外分化成免疫效应细胞。T细胞和NK细胞代表根据本发明的优选免疫效应细胞。

[0164] 本发明的T细胞可以是任何T细胞。它可以是细胞毒性T细胞(CD8⁺T细胞),辅助T细胞(CD4⁺T细胞),幼稚T细胞,记忆T细胞或任何其他类型的T细胞。优选地,T细胞是CD8⁺T细胞。如本文所定义,本发明的T细胞还可以是未成熟的T细胞,例如CD4⁻/CD8⁻细胞或CD4⁺/CD8⁺细胞,或T细胞的祖细胞。

[0165] 术语“NK细胞”是指大颗粒淋巴细胞,是来自共同淋巴祖细胞的细胞毒性淋巴细胞,其并非天然地包含抗原特异性受体(例如T细胞受体或B细胞受体)。NK细胞可通过其CD3⁻/CD56⁺表型分化。因此,本文使用的术语包括任何已知的NK细胞或任何NK样细胞或具有NK细胞特征的任何细胞。因此可以使用原代NK细胞,或者在替代实施方案中,可以使用本领域已知的先前已经分离和培养的NK细胞。因此可以使用NK细胞系。文献中已知并报道了许多不同的NK细胞,并且可以使用任何这些细胞,或者可以从原代NK细胞制备细胞系,例如通过病毒转化(Vogel等,2014,Leukemia 28:192-195)。除NK-92外,合适的NK细胞还包括(但不限于)NK-YS、NK-YT、MOTN-1、NKL、KHYG-1、HANK-1或NKG细胞系。在优选的实施方案中,细胞是NK-92细胞(Gong等,1994,Leukemia 8:652-658),或其变体。

[0166] 已经制备并描述或获得了许多原始NK-92细胞的不同变体,包括非免疫原性的NK-92变体。可以使用任何这样的变体并将其包括在术语“NK-92”中。也可以使用其他细胞系的变体。

[0167] 本发明的免疫效应细胞优选是人。这种免疫效应细胞可以源自任何人类个体。优选地,当免疫效应细胞用于治疗用途时,它是自体免疫效应细胞:即它来源于待治疗的患者,其确保组织相容性和非免疫原性,意味着一旦经过基因修饰,它将不会诱导患者的免疫反应。当免疫效应细胞是用于治疗用途的非自体细胞(即,它是从患者以外的个体获得的供体细胞)时,优选其是非免疫原性的,使得当施用于免疫原性细胞时,它不产生免疫反应而影响、干扰或阻止在治疗中使用细胞的免疫应答。因此,本发明的免疫效应细胞可以是离体细胞。它可以替代地或也可以是体外细胞。

[0168] 如果与患者HLA匹配,即它们表达相同的HLA等位基因,非自体免疫效应细胞可以

是天然的非免疫原性细胞。非自体免疫效应细胞,包括那些与患者无HLA匹配且因此具有免疫原性的细胞,以及与患者HLA匹配且可能不具有免疫原性的细胞,可被修饰以消除MHC分子的表达,或仅在其表面微弱地表达MHC分子。或者,可修饰此类细胞以表达非功能性MHC分子。

[0169] 包括破坏功能性MHC分子表达的任何方法。因此,这可能包括敲除或敲低MHC复合物的分子,和/或其可能包括阻止在细胞表面适当转运和/或正确表达MHC分子或整个复合物的修饰。

[0170] 特别地,可以破坏本发明的免疫效应细胞表面上的一种或多种功能性MHC I类蛋白的表达。在一个实施方案中,免疫效应细胞可以是HLA阴性的人细胞,例如其中一种或多种HLA分子(例如HLA MHC I类复合物的分子)的表达被破坏(例如敲除)的细胞。

[0171] 在一个优选的实施方案中,可以通过敲除编码 β_2 -微球蛋白(β_2 -m)的基因来进行MHC I类表达的破坏,所述基因是成熟的MHC I类复合物的组分。可以通过靶向破坏 β_2 -m基因来消除 β_2 -m的表达,例如通过 β_2 -m启动子的定点诱变(以使启动子失活),或在编码 β_2 -m蛋白的基因内引入一种阻止 β_2 -m蛋白表达的失活突变,例如基因内的移码突变或过早的终止密码子。或者,定点诱变可用于产生不能在细胞表面形成活性MHC蛋白的非功能性 β_2 -m蛋白。以这种方式, β_2 -m蛋白或MHC可以保留在细胞内,或者可以存在但在细胞表面无功能。

[0172] 或者,免疫效应细胞可以在施用于受试者之前进行辐射。不希望受理论束缚,认为细胞的辐射导致细胞仅瞬时存在于受试者中,因此减少了受试者免疫系统对细胞产生免疫应答的可用时间。虽然这些细胞可以在其细胞表面表达功能性MHC分子,但它们也可以被认为是非免疫原性的。辐射可以来自 α 、 β 或 γ 辐射的任何来源,或者可以是X射线辐射或紫外光。5-10Gy的辐射剂量可足以消除增殖,但其他合适的辐射剂量可以是1-10、2-10、3-10、4-10、6-10、7-10、8-10或9-10Gy或更高剂量,例如11、12、13、14、15或20Gy。或者,可以修饰细胞以表达“自杀基因”,其允许细胞被诱导性地杀死或防止响应于外部刺激而复制。

[0173] 因此,根据本发明的免疫效应细胞可通过降低其增殖能力(即减低细胞的增殖能力)而被修饰为非免疫原性的。

[0174] 本发明的经修饰的免疫效应细胞还可以以其他方式进行修饰,例如改变或修饰细胞功能或行为的其他方面,和/或表达其他蛋白质。例如,可以修饰细胞以表达归巢受体或定位受体,其作用于靶向或改善细胞对特定组织或位置的定位。

[0175] 本发明还提供了制备表达本文所述TCR的免疫效应细胞的方法。在一个实施方案中,该方法包括转染或转导分离自受试者(可以是患者或供体)的T细胞,使得T细胞表达如本文所述的一种或多种TCR。在某些实施方案中,从受试者分离T细胞并通过引入核酸分子进行修饰而无需在体外进一步操作。然后将这些细胞直接再次给予受试者。在进一步的实施方案中,首先激活T细胞并在被修饰以表达TCR之前刺激体外增殖(这种激活和刺激增殖可以称为扩增)。在这方面,T细胞可以在遗传修饰之前或之后培养(即转导或转染以表达如本文所述的TCR)。

[0176] T细胞可以从许多来源获得,包括外周血单核细胞(PBMC),骨髓,淋巴结组织,脐带血,胸腺组织,感染部位的组织,腹水,胸腔积液,脾组织和肿瘤。在某些实施方案中,T细胞可以使用本领域技术人员已知的任何数量的技术从例如从受试者收集的血液单位获得,例如FICOLL™分离。在一个实施方案中,来自受试者的循环血液的细胞通过单采血液成分术获

得。单采血液成分产品通常含有淋巴细胞,包括T细胞,单核细胞,粒细胞,B细胞,其他有核白细胞,红细胞和血小板。在一个实施方案中,可以洗涤通过单采血液成分术收集的细胞以除去血浆部分并将细胞置于合适的缓冲液或培养基中用于后续处理。在本发明的一个实施方案中,用PBS洗涤细胞。在一个替代实施方案中,洗涤的溶液缺乏钙和/或镁,或者可能缺少许多(如果不是全部)二价阳离子。如本领域普通技术人员所理解的,洗涤步骤可以通过本领域技术人员已知的方法完成,例如通过使用半自动流通式离心机。例如,Cobe 2991细胞处理器,Baxter CytoMate等。洗涤后,可将细胞重悬浮于各种生物相容性缓冲液或其他盐水溶液中,其中可有或没有缓冲液。在某些实施方案中,可以在细胞直接重悬的培养基中除去单采血液成分样品中不希望的组分。

[0177] 在某些实施方案中,T细胞是从PBMC分离的。PBMC可以从通过全血的密度梯度离心获得的血沉棕黄层分离,例如通过LYMPHOPREP™梯度,PERCOLL™梯度或FICOLL™梯度离心。可以通过耗尽单核细胞从PBMC分离T细胞,例如通过使用CD14 DYNABEADS®。在一些实施方案中,可以在密度梯度离心之前裂解红细胞。

[0178] 如果需要,可以通过阳性或阴性选择技术进一步分离特定的T细胞亚群,例如CD28⁺,CD4⁺,CD8⁺,CD45RA⁺或CD45RO⁺T细胞。例如,通过负选择富集T细胞群可以通过针对负选择细胞特有的表面标志物的抗体组合来实现。本文使用的一种方法是通过负磁免疫粘附或流式细胞术进行细胞分选和/或选择,其使用针对负面选择的细胞上存在的细胞表面标志物的单克隆抗体混合物。例如,为了通过阴性选择富集CD4⁺细胞,单克隆抗体混合物通常包括针对CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR和CD8的抗体。流式细胞术和细胞分选也可用于分离用于本发明的目标细胞群。

[0179] 在某些实施方案中,细胞毒性和辅助性T细胞均可在遗传修饰和/或扩增之前或之后分选为幼稚、记忆和效应T细胞亚群。可以通过使用如上所述的标准方法获得CD8⁺T细胞。在一些实施方案中,通过鉴定与这些类型的每种类型相关的细胞表面抗原,将CD8⁺T细胞进一步分类为幼稚、中枢记忆和效应细胞。记忆T细胞可以存在于CD8⁺外周血T细胞的CD62L⁺和CD62L⁻子集中。在用抗CD8和抗CD62L抗体染色后,将T细胞分选成CD62L⁻/CD8⁺和CD62L⁺/CD8⁺部分。中枢记忆T细胞(TCM)的表型标志物可包括CD45RO,CD62L,CCR7,CD28,CD3和CD127的表达,以及缺乏颗粒酶B的表达。TCM可以是CD45RO⁺/CD62L⁺/CD8⁺T细胞。效应T细胞可能对CD62L,CCR7,CD28和CD127表达呈阴性,对于颗粒酶B和穿孔素表达呈阳性。幼稚CD8⁺细胞的特征在于幼稚T细胞的表型标志物的表达,包括CD62L,CCR7,CD28,CD3,CD127和CD45RA。

[0180] 分离的免疫效应细胞可以在分离后进行修饰,或者可以在修饰之前在体外激活和扩增(或者,在祖细胞的情况下分化)。在一个实施方案中,通过引入本发明的核酸分子修饰细胞,然后在体外活化和扩增。在另一个实施方案中,细胞在体外被活化和扩增,然后通过引入本发明的核酸分子进行修饰。用于激活和扩增T细胞的方法是本领域已知的,并且描述于例如US6905874,US6867041,US6797514和W02012079000中。通常,此类方法包括使PBMC或分离的T细胞与刺激剂和共刺激剂接触,例如抗CD3和抗CD28抗体,通常附着于珠子或其他表面(例如以CD3/CD28 DYNABEADS®的形式),在补充有适当细胞因子如IL-2的培养基中。附着有抗CD3和抗CD28抗体的珠子充当替代的抗原呈递细胞(APC)。在其他实施方案中,可以使用诸如US6040177、US5827642和W02012129514中描述的方法激活和刺激T细胞与饲养细胞和适当的抗体和细胞因子一起增殖。

[0181] 在一个实施方案中,用根据本发明的核酸分子转导或转染T细胞。上文描述了转导和转染的方法。本发明的核酸分子可以是包含本发明的核酸分子的载体(即编码本发明的TCR分子的载体)。或者,可以是编码本发明TCR分子的mRNA分子。

[0182] 在另一个实施方案中,用根据本发明的核酸分子转导或转染CD34⁺细胞。在某些实施方案中,修饰的(例如转染的或转导的)CD34⁺细胞在施用于受试者(通常是最初分离细胞的受试者)后在体内分化成成熟免疫效应细胞。在另一个实施方案中,根据本领域已知的方法,CD34⁺细胞可以在引入核酸分子之前或之后在体外用一种或多种以下细胞因子刺激:F1t-3配体(FL),干细胞因子(SF),巨核细胞生长和分化因子(TPO),IL-3和IL-6。

[0183] 在另一个实施方案中,本发明提供了生产宿主细胞,其包含编码本发明的可溶性TCR的本发明的核酸分子或载体。生产宿主细胞适合于表达和产生可溶性TCR。生产宿主细胞可以是适合蛋白质生产的任何细胞。例如,生产宿主细胞可以是原核细胞,特别是细菌细胞,例如革兰氏阴性细菌细胞(例如,大肠杆菌)或革兰氏阳性细菌细胞(例如,枯草芽孢杆菌)。然而,生产宿主细胞优选是真核细胞。本发明的真核生产宿主细胞可以是简单的真核细胞,例如酵母或真菌细胞。优选地,真核生产宿主细胞是动物细胞。动物细胞可以是昆虫细胞或任何其他动物细胞,但优选是哺乳动物细胞。例如,哺乳动物生产宿主细胞可以是灵长类动物细胞,特别是人细胞或啮齿动物细胞:例如它可以是HEK-293,HEK-293T,COS(例如,COS-7)或CHO细胞。哺乳动物生产宿主细胞,特别是人类生产宿主细胞是优选的,因为当可溶性TCR在人细胞中表达时,进行适当的翻译后修饰。本领域技术人员可以容易地选择适当的生产宿主细胞。

[0184] 本发明还提供如本文所定义的TCR分子,特别是如本文所定义的可溶性TCR分子。本发明的可溶性TCR是蛋白质或蛋白质复合物,其包含截短的 α 链结构域和截短的 β 链结构域,如上所定义。可溶性TCR在Walseng等人中有详细描述(Walseng等,(2015),PLoS ONE 10(4):e0119559)。

[0185] 本发明的可溶性TCR优选编码为单链。单链可溶性TCR如上所述,并且如所详述的,这种scTCR优选包括 α 和 β 链结构域之间的自切割接头序列,因此产生分开的 α 链和 β 链。因此,本发明的可溶性TCR优选是包含 α 链和 β 链的TCR复合物,其构成单独的多肽链。本发明的可溶性TCR是由本发明的核酸分子编码的TCR,如上所定义。如上所述, α 链和 β 链的可变区被编码并与前导序列合成,该前导序列指导链插入膜中,或者在可溶性TCR情况下分泌。这些前导序列在分泌时被切割。包含前导序列的TCR链被称为未成熟的,而其前导序列被切割的TCR链被称为成熟的。本发明的可溶性TCR优选是成熟的可溶性TCR,其中不存在 α 链和 β 链的前导序列。

[0186] 本发明的可溶性TCR由如上定义的核酸分子编码。因此,在优选的实施方案中,可溶性TCR α 链用可变区编码,所述可变区具有SEQ ID NO:8所示的序列。如上所述,Radium-1 α 链的前导序列如SEQ ID NO:50所示,其对应于SEQ ID NO:8的氨基酸1-20。Radium-1 α 链可变区的成熟形式(即不含前导序列的可变区)具有SEQ ID NO:72所示的序列。优选地,本发明的可溶性TCR包含 α 链,所述 α 链包含可变区,所述可变区包含SEQ ID NO:72所示的氨基酸序列或与其具有至少90或95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。在SEQ ID NO:72的变体的情况下,CDR序列如上所定义。

[0187] 如上所述,可溶性TCR α 链的截短恒定区优选具有SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:61的

序列。因此,本发明的可溶性TCR的 α 链优选具有带有SEQ ID NO:72序列的可变区和带有SEQ ID NO:60或SEQ ID NO:61序列的恒定区。这些 α 链序列分别在SEQ ID NO:73和74中列出。因此,本发明的可溶性TCR优选包含含有SEQ ID NO:73或SEQ ID NO:74所示氨基酸序列或与其具有至少90或95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成的 α 链。在SEQ ID NO:73或74的变体的情况下,CDR序列如上所定义;在SEQ ID NO:74的变体的情况下,第155位的氨基酸(或对应于SEQ ID NO:74的第155位的位置)是半胱氨酸。SEQ ID NO:74的位置155对应于SEQ ID NO:65所示的未成熟半胱氨酸修饰的截短的 α 链序列的位置175。

[0188] 在另一个优选的实施方案中,可溶性TCR β 链用可变区编码,其具有SEQ ID NO:13所示的序列。还如上所述,Radium-1 β 链的前导序列如SEQ ID NO:51所示,其对应于SEQ ID NO:13的氨基酸1-16。Radium-1 β 链可变区的成熟形式(即没有前导序列的可变区)具有SEQ ID NO:75所示的序列。优选地,本发明的可溶性TCR包含 β 链,所述 β 链包含可变区,所述可变区包含SEQ ID NO:75所示的氨基酸序列或与其具有至少90或95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。在SEQ ID NO:75的变体的情况下,CDR序列如上所定义。

[0189] 如上所述,可溶性TCR β 链的截短恒定区优选具有SEQ ID NO:62或SEQ ID NO:63的序列。因此,本发明的可溶性TCR的 β 链优选具有带有SEQ ID NO:75序列的可变区和带有SEQ ID NO:62或SEQ ID NO:63序列的恒定区。这些 β 链序列分别在SEQ ID NO:76和77中列出。因此,本发明的可溶性TCR优选包含含有SEQ ID NO:76或SEQ ID NO:77所示氨基酸序列或与其具有至少90或95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成的 α 链。在SEQ ID NO:76或77的变体的情况下,CDR序列如上所定义;在SEQ ID NO:77的变体的情况下,第172位的氨基酸(或对应于SEQ ID NO:77的第172位的位置)是半胱氨酸。SEQ ID NO:77的位置172对应于如SEQ ID NO:66所示的未成熟半胱氨酸修饰的截短的 α -链序列的位置188。

[0190] 在另一个优选的实施方案中,如上所述,可溶性TCR的 α -链和 β -链各自在C末端包含亮氨酸拉链序列。

[0191] 在另一个优选的实施方案中,可溶性TCR的至少一条链用纯化标签编码。这种标签可以是技术人员已知的任何合适的标签,例如,FLAG标签,His标签,HA标签,Strep标签,S标签或Myc标签,谷胱甘肽S-转移酶(GST),麦芽糖结合蛋白(MBP)等。标签优选位于 α 链或 β 链的C末端,最优选位于 β 链的C末端。因此,本发明的可溶性TCR可在其 α 链和/或 β 链中包含纯化标签,优选在链的C末端。TCR链可以用主链序列(即可变结构域和存在的恒定结构域的区段,并且存在亮氨酸拉链结构域)和纯化标签之间的接头和/或蛋白酶切割位点编码。合适的蛋白酶切割位点是本领域技术人员公知的,包括凝血酶,因子Xa,肠激酶,人鼻病毒(HRV)3C和烟草蚀刻病毒(TEV)切割位点。在一个具体实施方案中,本发明的可溶性TCR的 β -链包含通过Gly-Gly-Gly接头与链连接的His-标签。

[0192] SEQ ID NO:74的 α 链以及其C末端由His-标签通过Gly-Gly-Gly接头连接的序列如SEQ ID NO:78所示。SEQ ID NO:77的 β -链以及其C末端由His-标签通过Gly-Gly-Gly接头连接的序列如SEQ ID NO:79所示。在本发明的优选实施方案中,可溶性TCR α 链包含SEQ ID NO:78的氨基酸序列或与其具有至少90或95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成,和/或可溶性TCR β -链包含SEQ ID NO:79的氨基酸序列或与其具有至少90或95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成。在SEQ ID NO:78的变体的情况下,CDR序列如上所定义,158位的氨基酸(或对应于SEQ ID NO:78的158位的位置)是半胱氨酸并且C-末端的六His标签没有改变;

在SEQ ID NO:79的变体的情况下,CDR序列如上所定义,第172位的氨基酸(或对应于SEQ ID NO:79的172位的位置)是半胱氨酸,并且C-末端的六His标签没有改变的。

[0193] 如上所述,在本发明的一个优选实施方案中,可溶性TCR编码为scTCR,其中 α 和 β 链结构域被2A接头分开。2A接头如上文讨论,并且如上所述,这些序列在其最终的脯氨酸残基和倒数第二个甘氨酸残基之间经历共翻译切割。因此,2A接头的末端脯氨酸形成下游多肽的N-末端残基,而2A接头的的所有其他残基形成上游多肽的C-末端。在本发明优选的scTCR中, α 链结构域形成上游多肽, β 链结构域形成下游多肽。如上所述,TCR的每条链的N末端是在多肽成熟过程中被切割的前导序列。在本发明的scTCR中,2A接头的末端脯氨酸残基将形成 β 链的N末端残基,并将从带有前导序列的链上切割下来。因此残基不会存在于成熟的 β 链中。然而,2A接头的其他残基将形成 α 链的C末端并且将存在于成熟的 α 链中。

[0194] 因此,在本发明的一个具体实施方案中,可溶性TCR包含 α 链,其中C末端由除2A肽的最终残基之外的所有残基形成。特别地, α 链的C末端(即最终的25个残基)可以是SEQ ID NO:18中所示的2A序列的1-25位氨基酸。在该实施方案中,可溶性TCR α 链可以特别地包含SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列或与其具有至少90或95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成的氨基酸序列或由其组成。SEQ ID NO:81所示的氨基酸序列是具有SEQ ID NO:18的残基1-25的C末端添加的SEQ ID NO:73(成熟的截短的Radium-1 α 链)的氨基酸序列。在另一个实施方案中,可溶性TCR包含SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列或与其具有至少90或95%序列同一性的氨基酸序列或由其组成的氨基酸序列或由其组成。SEQ ID NO:82所示的氨基酸序列是具有SEQ ID NO:18的残基1-25的C末端添加的SEQ ID NO:74(成熟的截短的半胱氨酸修饰的Radium-1 α -链)的氨基酸序列。在 α 链是SEQ ID NO:81或82的变体的情况下,CDR序列如上所定义;在 α 链是SEQ ID NO:82的变体的情况下,第155位的氨基酸(或对应于SEQ ID NO:82的第155位的位置)是半胱氨酸。

[0195] 如上所述,可溶性TCR的 α 链和 β 链彼此连接,这是一种要求,否则复合物将在溶液中分离。如上所述, α 链和 β 链可以共价连接,例如,通过二硫键,或通过位于链的C-末端的亮氨酸拉链结构域非共价连接。

[0196] 如上所述,所有 α 和 β TCR链都用N-末端前导序列表达,该序列将多肽链导向膜以插入/分泌。本发明的可溶性TCR的 α 链用这种序列编码,并且在本发明的可溶性TCR中可以包含N-末端前导序列或可以不包含这样的序列。相同地,本发明的可溶性TCR的 β 链用这种序列编码,并且在本发明的可溶性TCR中可以包含N-末端前导序列或可以不包含这样的序列。上文描述了这种 α 链和 β 链及其前导序列。

[0197] 本发明的可溶性TCR可以通过本领域已知的任何方法生产,特别是通过如上定义的宿主生产细胞生产。可以在标准条件下使用标准蛋白质表达技术表达可溶性TCR。 α 链和 β 链的前导序列靶向链以从表达它们的细胞(例如生产宿主细胞)输出。因此, α 链和 β 链从生产宿主细胞输出到细胞外环境中,其中链形成复合物,例如通过二硫键或亮氨酸拉链结构域的二聚化。然后可以纯化可溶性TCR复合物:首先,可以离心细胞培养物并分离上清液。然后可以使用 α 和/或 β 链的C末端的纯化标签,通过亲和层析从上清液中纯化可溶性TCR复合物。如果蛋白酶切割位点存在于纯化标签的N末端,则可以使用适当的蛋白酶将标签从链上切割下来。

[0198] 如果需要,可以将可溶性TCR多聚化以形成可溶性TCR多聚体。这种多聚体形成了

本发明的一个方面。例如,可以通过将TCR分子缀合至纳米珠(例如磁性纳米珠)进行多聚化。这种缀合的方法在本领域中是众所周知的。在另一个实施方案中,可溶性TCR复合物可以是生物素化的并与链霉抗生物素蛋白缀合,以产生四聚体可溶性TCR复合物。为了使可溶性TCR复合物生物素化,TCR链之一应在其C-末端带有BirA序列(SEQ ID NO:59)的情况下表达。然后可以使用大肠杆菌BirA(生物素连接酶)进行BirA序列的TCR复合物的生物素化。一旦生物素化,可将可溶性TCR复合物与链霉抗生物素蛋白一起温育以产生可溶性TCR四聚体。

[0199] 在本发明特别优选的实施方案中,可溶性TCR与毒素缀合。所选择的毒素是一种单独地不能进入、杀死或以其他方式破坏人细胞的毒素,但当该毒素被人体细胞通过缀合分子吸收时,能够发挥其毒性作用。因此,这种毒素仅被本发明的可溶性TCR结合的且将可溶性TCR吸收到其中的细胞吸收并发挥其靶效应。毒素可以是任何已知的合适的细胞毒性物质,即它可以是任何合适的细胞毒素。本文所用的“细胞毒素”是指抑制细胞生长和/或存活的任何毒素。生长包括靶细胞(即其进入的细胞)的分裂。因此,毒素可以是减少或对细胞活力或存活产生负面影响的任何毒素,特别是包括诱导靶细胞死亡的任何毒素,例如可以诱导靶细胞的凋亡或坏死的毒素。

[0200] 这种毒素可以是缺乏靶向结构域的肽毒素。例如,它可以是天然缺乏靶向结构域的肽毒素,或者它可以是相对于其天然形式修饰以去除其靶向结构域的肽毒素。这种毒素的实例包括皂草素和白树毒素,它们是相同家族(例如,蓖麻毒素)的核糖体失活蛋白(RIP),但不能穿过细胞的质膜。类似地,可以使用病原体的细胞毒素的酶促结构域(即催化结构域),例如细菌细胞毒素(如白喉毒素、假单胞菌外毒素A或梭菌细胞毒素(如索氏梭菌的TcsL)的酶促结构域)的酶促结构域。

[0201] 本发明的可溶性TCR可以编码为融合蛋白,其中毒素位于 α 链或 β 链的C末端。或者,可以使用本领域已知的任何合适方法将毒素与可溶性TCR缀合。例如,可溶性TCR分子可以在其 α 链或 β 链上生物素化并与链霉抗生物素蛋白缀合的毒素缀合(或反之亦然)。其他合适的方法是本领域技术人员已知的。

[0202] 本发明提供了用于治疗癌症的修饰的免疫效应细胞,该修饰的免疫效应细胞表达本文公开的TCR。例如,修饰的免疫效应细胞可以从获自诊断患有MSI+结肠直肠癌的患者获得的PBMC制备。标准程序可用于存储(例如,冷冻保存)修饰的免疫效应细胞和/或用于人或其他受试者的制剂。

[0203] 表达本发明TCR的经修饰的免疫效应细胞可用于根据已知技术的过继性细胞转移免疫疗法的方法和组合物中。在一些实施方案中,通过首先从其培养基中收获细胞,然后将细胞洗涤并浓缩在适于施用的培养基和容器系统(“药学上可接受的”载体)中以治疗有效量来配制细胞。合适的输注介质可以是任何等渗介质制剂,通常是生理盐水、Normosol R (Abbott)或Plasma-Lyte A (Baxter),但也可以使用5%葡萄糖水溶液或林格氏(Ringer's)乳酸盐。输注介质可以补充人血清白蛋白。

[0204] 组合物中治疗有效量的细胞是至少2个细胞(例如,至少1个CD8⁺中枢记忆T细胞和至少1个CD4⁺辅助T细胞亚群)或更通常更大超过10²个细胞,以及高达10⁶个细胞,直至并包括10⁸个细胞或10⁹个细胞,并且可以超过10¹⁰个细胞。细胞的数量将取决于组合物的最终用途以及其中包含的细胞类型。对于本文提供的用途,细胞通常为1升或更少、500毫升或更

少、甚至250毫升或100毫升或更少的体积。因此,所需细胞的密度通常大于 10^6 个细胞/ml,通常大于 10^7 个细胞/ml,通常为 10^8 个细胞/ml或更大。临床相关数量的免疫细胞可以分配到多次输注中,累积等于或超过 10^5 、 10^6 、 10^7 、 10^8 、 10^9 、 10^{10} 、 10^{11} 或 10^{12} 个细胞。例如,可以以24或48小时,或每3、4、5、6或7天的间隔向患者施用2、3、4、5、6或更多个单独的输注。输注也可以每周、每两周或每月间隔,或间隔6周或2、3、4、5或6个月间隔。也可以进行每年输注。在本发明的一些方面,由于所有输注的细胞被重定向至特定的靶抗原(即具有SEQ ID NO:1序列的TGF β R11移码肽),因而在 10^6 /kg的范围内,可以施用更低数量的细胞(每位患者 10^6 - 10^8)。细胞组合物可以在这些范围内的剂量下多次给药。如果需要,治疗还可包括施用分裂素(例如,PHA)或淋巴因子、细胞因子和/或趋化因子(例如,IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 、IL-18和TNF- β 、GM-CSF、IL-4、IL-13、Flt3-L、RANTES、MIP-1 α 等)以增强免疫应答的诱导。

[0205] 表达本发明的TCR分子的本发明的免疫效应细胞可以单独施用,或作为药物组合物与稀释剂和/或与其他组分如IL-2或其他细胞因子或细胞群组合施用。简而言之,本发明的药物组合物包含表达TCR的免疫效应细胞,例如本文所述的T细胞群,与一种或多种药学上或生理学上可接受的载体、稀释剂或赋形剂组合。此类组合物可包含缓冲液(例如中性缓冲盐水、磷酸盐缓冲盐水等);碳水化合物(如葡萄糖,甘露糖,蔗糖或葡聚糖,甘露醇);蛋白质;多肽或氨基酸(如甘氨酸);抗氧化剂;螯合剂(如EDTA或谷胱甘肽);佐剂(例如氢氧化铝);和防腐剂。本发明的组合物优选配制为用于静脉内给药。

[0206] 如在别处关于用于编码TCR的载体的体内选择标记所述,在用本发明的核酸分子修饰细胞之前、之后或同时,可以通过用自杀基因(例如诱导型半胱天冬酶9或胸苷激酶)转导表达TCR的免疫效应细胞来最小化不良事件。或者,如关于本发明的TCR所述,TCR可包含标签,特别是双Myc标签,允许使用识别所用标签的抗体靶向杀死本发明的T细胞(例如,抗Myc抗体)。

[0207] 本发明还提供如本文所定义的可溶性TCR,和包含这种可溶性TCR的组合物,其用于治疗,特别是用于治疗癌症。

[0208] 液体药物组合物,无论它们是溶液、悬浮液或其他类似形式,可包括下列中的一种或多种:无菌稀释剂,例如水,盐溶液(优选生理盐水),林格氏溶液,等渗氯化钠,固定油(例如合成的甘油单酯或甘油二酯(可用作溶剂或悬浮介质)),聚乙二醇,甘油,丙二醇或其他溶剂;抗菌剂,如苯甲醇或对羟基苯甲酸甲酯;抗氧化剂,如抗坏血酸或亚硫酸氢钠;螯合剂,如乙二胺四乙酸(EDTA);缓冲剂,如乙酸盐,柠檬酸盐或磷酸盐,以及调节渗透压的试剂,如氯化钠或葡萄糖。肠胃外制剂可以封装在安瓿,一次性注射器或由玻璃或塑料制成的多剂量小瓶中。注射剂药物组合物优选是无菌的。

[0209] 本发明的药物组合物可以以适合于待治疗(或预防)的疾病的方式施用。给药的数量和频率将由诸如患者的状况以及患者的疾病的类型和严重性等因素确定,尽管适当的剂量可以通过临床试验确定。

[0210] 如本文所述,通过施用表达本发明TCR的免疫效应细胞在受试者中诱导的免疫应答可包括由细胞毒性T细胞介导的细胞免疫应答或能够杀死靶细胞的NK细胞(即表达SEQ ID NO:1的TGF β R11移码肽的肿瘤细胞),调节性T细胞和辅助性T细胞。还可以诱导主要由能够激活B细胞并因此产生抗体应答的辅助T细胞介导的体液免疫应答。

[0211] 如本文所述,向受试者施用携带毒素的可溶性TCR使得靶细胞摄取TCR/毒素缀合

物,导致毒素直接和选择性杀死靶细胞。当指示“有效量”时,可以由医生在考虑年龄、体重、恶性程度和患者(受试者)的一般状况的个体差异的情况下确定待施用的组合物的精确量。通过监测受试者的疾病迹象并相应地调整治疗,医学领域的技术人员可以容易地确定特定患者的最佳剂量和治疗方案。

[0212] 因此,本发明提供了对被诊断患有或疑似患有或有发展表达TGFβRII的移码突变体的癌症的受试者的治疗,所述移码突变体在其序列中包含SEQ ID NO:1的新肽。这种癌症可能是MSI+癌症,但可能是非MSI+。癌症可以是表达SEQ ID NO:1新肽的任何癌症。特别地,非限制性实施方案中,癌症是结肠直肠癌,胃癌,肝癌,壶腹癌,子宫内膜癌,胰腺癌或白血病。癌症可能特别是患有Lynch综合征/HNPCC的患者。在一个具体实施方案中,本发明提供了对患有HNPCC的受试者的结肠直肠癌的治疗。

[0213] 本发明的免疫效应细胞和/或可溶性TCR可以与一种或多种其他治疗剂组合施用,所述其他治疗剂可以包括任何其他已知的癌症治疗,例如放射疗法,化疗,移植,免疫疗法,激素疗法,光动力疗法等。本发明的免疫效应细胞和可溶性TCR可以组合在一起给药。该组合物还可以与抗生素或其他治疗剂联合给药,包括例如抗生素或其他治疗剂。细胞因子(例如IL-1,IL-2,IL-3,IL-4,IL-5,IL-6,IL-7,IL-8,IL-9,IL-10,IL-11,IL-12,IL-13,IL-15和IL-17),生长因子,类固醇,NSAIDs,DMARDs,抗炎药,镇痛药,化学治疗药(如单甲基auristatin E,氟达拉滨,吉西他滨,卡培他滨,甲氨蝶呤,紫杉醇,泰索帝,巯基嘌呤,疏鸟嘌呤,羟基脲,阿糖胞苷,环磷酰胺,异环磷酰胺,亚硝基脲,顺铂,卡铂,奥沙利铂,丝裂霉素,达卡巴嗪,丙卡巴肼,依托泊苷,替尼泊苷,campathecins,博来霉素,多柔比星,伊达比星,柔红霉素,放线菌素,普力霉素,米托蒽醌,L-天冬酰胺酶和5-氟尿嘧啶),放射治疗药物,免疫检查点抑制剂(如Tremelimumab,伊匹单抗,纳武单抗,MK-3475,Urelumab,巴维昔单抗,MPDL3280A和MEDI4736),小分子抑制剂或其他活性和辅助剂。

[0214] 因此,本发明的免疫效应细胞、可溶性TCR和组合物可用于治疗或可用于制备用于治疗,特别是癌症治疗的药物,更特别是用于治疗MSI+癌症或结肠直肠癌的药物。如本文所述,本发明的免疫效应细胞(和包含它们的组合物)可特别用于过继性细胞转移疗法(也称为过继性细胞疗法)。术语“靶细胞”是指被本发明的经修饰的免疫效应细胞或可溶性TCR杀死或消除的任何细胞。如上所述,它通常是表达TGFβRII的移码突变体的癌症(或表达的肿瘤)细胞,所述移码突变体在其序列内包含SEQ ID NO:1的新肽。在某些实施方案中,靶细胞可以是MSI+癌细胞,或结肠直肠癌或胃癌细胞,或实际上是来自上文列出的任何癌症的癌细胞。

[0215] 本文广义地定义癌症包括任何肿瘤病症,无论是恶性的,恶变前的还是非恶性的。然而,通常,它可能是恶性病症。包括实体和非实体肿瘤,术语“癌细胞”可以与“肿瘤细胞”同义。

[0216] 在本发明的一个实施方案中,本发明的细胞、可溶性TCR和/或组合物可以静脉内给予受试者。在另一个实施方案中,细胞,可溶性TCR和/或组合物可通过肿瘤内注射直接施用于肿瘤。

[0217] 使用本发明的方法和细胞治疗的受试者可以是任何哺乳动物物种。例如,受试者可以是任何种类的家养宠物,例如小鼠、大鼠、沙鼠、兔子、豚鼠、仓鼠、猫或狗,或家畜,例如山羊、绵羊、猪、牛或马。在本发明的另一个优选实施方案中,受试者可以是灵长类动物,例

如猴子、长臂猿、大猩猩、红毛猩猩、黑猩猩或倭黑猩猩。然而,在本发明的一个优选实施方案中,受试者是人。预期用于本发明的免疫效应细胞可以从任何种类的哺乳动物获得,然而,在优选的实施方案中,免疫效应细胞来自与待治疗的受试者相同的哺乳动物物种。

附图说明

[0218] 从以下非限制性实施例和参考附图可以更全面地理解本发明,其中:

[0219] 图1显示初始分离的T细胞克隆为TGF β RII移码突变特异性的,CD8⁻/CD4⁻/CD56⁺并以剂量依赖性方式杀死靶细胞。

[0220] (a) 显示原始T细胞克隆是CD8⁻CD4⁻和CD56⁺。

[0221] (b) 显示了⁵¹Cr-释放测定的结果,证明了结肠癌细胞系的T细胞克隆26的特异性裂解,该细胞系载有1 μ M p573肽(其具有SEQ ID NO:1的序列)或对照肽I540(其具有SEQ ID NO:54的序列),如所示的各种效应物与靶标的比(E:T)。

[0222] (c) 显示了⁵¹Cr-释放测定的结果,证明了自体EBV-LCL(Epstein Barr病毒转化的淋巴母细胞样细胞系)或T2细胞的T细胞克隆的特异性裂解,其载有滴定浓度的p573肽。还显示了在最高肽浓度下用抗-HLA I类阻断。E:T比为25:1。显示的结果代表三个独立实验。

[0223] 图2显示转染的体外扩增T细胞中TGF β RII-1A移码突变(TGF β RII^{mut})特异性TCR表达。TGF β RII^{mut}特异性TCR表达对应于其为VB3⁺的T细胞(VB3=TCR β 链可变区TRBV28)。模拟转染的T细胞,TCR mRNA转染的T细胞和原始T细胞克隆都进行了测试。

[0224] 图3显示TCR转染的CD4⁺和TCR转染的CD8⁺T细胞响应于携带TGF β RII-1A移码突变的结肠癌细胞系而产生IFN- γ 和TNF- α 。用TCR mRNA转染T细胞并放置过夜,然后与表达突变的TGF β RII的结肠癌细胞系LS174T和SW480共孵育。LS174T是HLA I类阴性而SW480表达HLA-A2。用TGF β RII移码肽p573加载(+)或不加载(-)SW480细胞。在过夜刺激后,细胞在胞内染色以产生细胞因子。图显示了所示的CD4或CD8门控T细胞。显示的结果代表三个独立实验。

[0225] 图4显示TGF β RII^{mut}-TCR转染的CD8⁺T细胞响应于负载有肽p573的结肠癌细胞系,比原始T细胞克隆产生更多的IFN- γ 并且更有效地脱粒。将TCR转染的CD8⁺T细胞和原始T细胞克隆与结肠癌细胞系一起温育6小时,然后进行CD107a和IFN- γ 的染色。结肠癌细胞系都含有TGF β RII-1A移码突变。HCT116和SW480都是HLA-A2⁺,而结肠癌细胞系LS174T是HLA-A2⁻。图是CD8门控T细胞。显示的结果代表三次独立实验。

[0226] 图5显示TGF β RII^{mut}-TCR转染的T细胞杀死携带TGF β RII-1A移码突变的靶细胞,其效率与原始T细胞克隆相当。结肠癌细胞系LS174和HCT116加载有⁵¹Cr。一半的HCT116细胞负载TGF β RII移码肽p573。如图所示,以E:T比加入原始患者T细胞克隆、TCR转染的CD8⁺T细胞和模拟转染的CD8⁺T细胞。将细胞共温育6小时,然后测量⁵¹Cr释放。显示的结果代表两次独立实验。

[0227] 图6显示TGF β RII^{mut}-TCR转导的T细胞在体外和体内均有效。用TGF β RII^{mut}-TCR或作为阴性对照的DMF5(MART-1-特异性)TCR转导供体T细胞。

[0228] (a) 显示当T细胞用抗-VB3抗体(TGF β RII^{mut}-TCR)或MART-1表位dextramer(DMF5)染色时,发现每种TCR的转导效率约为60%。

[0229] 在(b)中,输注前测试转导的T细胞对同源抗原的反应性。HLA-A2⁺EBV-LCL装载有覆盖CD8⁺T细胞表位的长TGF β RII-1A移码突变肽(p621,SEQ ID NO:55)或天然MART-1 26-

35肽 (SEQ ID NO:56)。将转导的T细胞与EBV-LCL共孵育5小时,E:T比为1:3,并染色以进行脱粒 (CD107a) 和TNF- α 。

[0230] 在(c)中,NSG小鼠 (TGF β RII^{mut}-TCR,n=10;MART-1TCR,n=10) 腹膜内 (ip) 注射表达萤火虫荧光素的 10^6 个HCT116细胞,两天后腹膜内注射 8×10^6 TCR转导的T细胞(分别在第0天和第2天注射)。在第5天和第10天用 2×10^7 TGF β RII^{mut}-TCR⁺T细胞重复治疗。在第2天、第9天、第16天、第24天和第30天通过生物发光成像评估肿瘤负荷。

[0231] 在(d)中,所有小鼠的生物发光信号(光子/秒)显示在散点图中,显示为平均值(+/-SD)。

[0232] 在(e)中,Kaplan-Meyer分析显示,与对照小鼠相比,TGF β RII^{mut}-TCR⁺T细胞处理的小鼠具有显著延长的存活($p=0.038$;非配对t-检验)。体内实验重复三次,并显示一个代表性实验。

[0233] 在(f)中,从安乐死的小鼠中解剖肿瘤,制备单细胞悬浮液,并使用抗CD3和抗V β 3抗体 (TGF β RII^{mut}-TCR) 或MART-1dextramer (DMF5) 对转导的T细胞的存在进行染色。对照组肿瘤中MART-1特异性T细胞的百分比显著低于用TGF β RII^{mut}特异性TCR处理的小鼠肿瘤中TGF β RII^{mut}特异性T细胞的百分比($p=0.0038$)。

[0234] 图7显示TCR转染的CD8⁺T细胞的CD107a表达在用载有肽的HLA-A2⁺HEK细胞刺激后略微减少,不能结合CD8。用编码HLA-A2 wt或突变型HLA-A2的mRNA转染HEK293细胞,不能结合CD8。将HEK293细胞负载肽p573并用于刺激转染TGF β RII^{mut}特异性TCR的CD8⁺T细胞5小时。

[0235] 图8显示结肠癌细胞HCT116表达TRAIL-受体4 (CD261)。左图显示了具有同种型对照的HCT116细胞的染色;右图显示了HCT116细胞上CD261和CCR6的染色。

[0236] 图9显示用Radium-1 TCR重定向的CD4⁺和CD8⁺T细胞都直接杀死呈递同源抗原的靶细胞。用Radium-1mRNA电穿孔的纯化的CD4⁺T细胞(A)或纯化的CD8⁺T细胞(B)可杀死携带特异性TGF β RII移码突变和HLA-A2 (HCT116,结肠癌细胞)的靶细胞(“无肽”)。添加外源长TGF β RII移码肽p621 (SEQ ID NO:55),其含有SEQ ID NO:1(也称为序列p573),导致细胞杀伤增加。纯化的CD4⁺T细胞(C)或纯化的CD8⁺T细胞(D)也能够杀死负载有外源肽p621的HLA-A2阳性细胞系(Granta;B细胞淋巴瘤细胞系,TGF β RII移码阴性)。所有数据均代表至少两个独立的实验。

[0237] 图10显示用Radium-1 TCR mRNA电穿孔的T细胞在多次输注后减少小鼠体内肿瘤生长。(A)显示实验时间轴;(B)显示通过生物发光测量的各种小鼠组的肿瘤负荷(每组n=10)。生物发光信号显示为总通量(光子/秒)。所有小鼠的平均值如上图所示;误差棒表示标准偏差。

[0238] 图11比较了表达Radium-1TCR的CD8-T细胞的EC₅₀相对于表达DMF5 TCR的CD8-T细胞的EC₅₀,各自识别其同源抗原。所有数据均代表两个独立实验。

[0239] 图12显示了用于鉴定可溶性Radium-1 TCR结合的SupT1细胞的流式细胞术的结果。可溶性TCR不结合呈递非特异性肽(B)的HLA-A2阴性细胞(A)或HLA-A2阳性细胞。然而,显示可溶性TCR结合HLA-A2阳性细胞,其上呈递TGF β RII移码肽p573 (SEQ ID NO:1)。

具体实施方式

[0240] 实施例1

[0241] 材料和方法:

[0242] 细胞系,培养基和试剂

[0243] 从MSI+结肠癌患者的血液中分离TGFβRII移码突变-反应性,HLA-A2限制性CTL(细胞毒性T淋巴细胞)克隆,并通过有限稀释克隆。患者接种了23-mer TGFβRII(-1A)移码肽(具有SEQ ID NO:49的肽)。该临床试验得到了挪威药品管理局,南方医学研究伦理委员会和医院审查委员会的批准。治疗依据世界医学会赫尔辛基宣言进行。从患者获得知情同意书。通过转化来自供体的B细胞产生自体Epstein Barr病毒转化的淋巴母细胞样细胞系(EBV-LCL)。抗原加工缺陷型T2细胞系用作流式细胞术和细胞毒性测定中的T细胞靶。从ATCC(Rockville,MD,USA)获得结肠癌细胞系HCT116,SW480和LS174T以及人胚肾(HEK)293细胞。Hek-Phoenix(Hek-P,发明者收集)在DMEM(PAA,Pasching,Austria)生长,补充10%HyClone FCS(HyClone,Logan,UT,USA)和1%抗生素-抗真菌(青霉素/链霉素,p/s,PAA)。

[0244] 在没有其他指示的情况下,将细胞在RPMI-1640(PAA Laboratories,Pasching,Austria)中培养,补充庆大霉素,10%热灭活FCS(PAA Laboratories,Pasching,Austria)。在用作靶细胞之前,将结肠癌细胞系用500U/ml IFN-γ(PeproTech,Rocky Hill,NJ,USA)处理过夜。

[0245] 所有T细胞在CellGro DC培养基(CellGenix,Freiburg,Germany)中生长,补充有5%热灭活的人血清(Trina Bioreactives AG,Nänikon,Switzerland),10mM N-乙酰半胱氨酸(Mucomyst,AstraZeneca AS,London,UK),0.01M HEPES(Life Technologies,Norway)和0.05mg/mL庆大霉素(Garamycin,Schering-Plough Europe,Belgium),下文表示完全培养基,除非另有说明。

[0246] 产生对TGFβRII移码肽特异的T细胞系和克隆

[0247] 接种前和接种后收集的PBMC可用于分析。如前所述,PBMC已被分离和冷冻(Brunsvig,PF等,(2006),Cancer Immunol Immunother 55(12):1553-1564)。在体外用肽刺激解冻的PBMC 10-12天,然后使用自体PBMC作为APC在T细胞增殖测定(3H-胸苷)中一式三份进行测试。用TGFβRII移码肽刺激来自不同时间点的PBMC。这包括来自TGFβRII移码蛋白的肽573(p573,SEQ ID NO:1)和621(p621,SEQ ID NO:55),该TGFβRII移码蛋白产生于在来自TGFβRII的碱基编号709-718的腺苷舒展(A10)中的1bp缺失(-1A)。(野生型人TGFβRII的GenBank序列是:NM 003242。)hTERT肽I540(SEQ ID NO:54)用作阴性对照。两种肽均由Norsk Hydro,ASA,Porsgrunn,Norway提供。

[0248] 具有SEQ ID NO:56的MART-1肽(天然MART-1的氨基酸26-35)由英国ProImmune Ltd制造。然后在针对载有肽的APC(自体PBMC或EBV-LCL)的增殖试验中测试刺激的T细胞。刺激指数(SI)定义为肽增殖除以无肽增殖,SI≥2被认为是阳性反应。如前所述产生来自响应T细胞系的T细胞克隆(Saeterdal,I等,(2001),Cancer Immunol Immunother 50(9):469-476)。

[0249] TCR和HLA-A2克隆

[0250] 使移码特异性T细胞克隆(26和30)生长并制备总RNA。使用改良的5'-RACE方法进行克隆。简言之,使用oligo-dT引物合成cDNA,并在5'末端用一段胞嘧啶加尾。使用聚鸟苷引物和恒定结构域特异性引物来扩增TCR链。对扩增子进行克隆和测序。通过用特异性引物分别扩增TCRα和β链来制备表达构建体,并进行第二次PCR以将TCR链融合为TCR-2A构建体。

将TCR-2A阅读框克隆到pENTR (Invitrogen) 中,随后重组到其他表达载体中。

[0251] 对于RNA合成,将插入物亚克隆到通道 (Gateway) 修饰形式的pClpA₁₀₂中 (Saeboe-Larssen, S等, (2002), J Immunol Methods 259 (1-2):191-203)。详细的方法以及引物序列可以在 (Wälchli, S等, (2011), PloS one 6 (11):e27930) 中找到。对于逆转录病毒转导,将插入物亚克隆到pM71载体中。如前所述克隆HLA-A*0201-pClpA₁₀₂构建体 (Stronen, E等, (2009), Scand J Immunol 69 (4):319-328)。该构建体用作模板以通过靶向残基D227和T228并分别用K和A替换它们来产生CD8结合缺陷型突变体,如 (Xu, XN等, (2001), Immunity 14 (5):591-602)。使用以下引物进行标准的位点直接诱变:5'-GAGGACCAGACCCAGAAGGCGGAGCTCGTGGAGAC-3' (SEQ ID NO:57) 和5'-GTCTCCACGAGCTCCGCTTCTGGGTCTGGTCCTC-3' (SEQ ID NO:58)。使用FuGENE-6 (Roche, Switzerland) 按照制造商的方案用这些构建体转染HEK 293细胞。

[0252] 体外mRNA转录

[0253] 基本上如前所述进行体外mRNA合成 (Almasbak, H等, (2011), Cytotherapy 13 (5):629-640)。使用Anti-Reverse Cap Analog (Trilink Biotechnologies Inc., San Diego, CA, USA) 来覆盖RNA。通过琼脂糖凝胶电泳和Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA) 评估mRNA。

[0254] 人T细胞的体外扩增

[0255] 使用适于GMP生产T细胞的方案,扩增来自健康供体的T细胞,使用Dynabeads CD3/CD28,基本上如前所述 (Almasbak, H.等, (2011), Cytotherapy 13 (5):629-640)。简而言之,通过密度梯度离心从血沉棕黄层中分离PBMC,并与Dynabeads (Dynabeads®ClinExVivo™ CD3/CD28,由Dyna1 invitrogen, Oslo, Norway友情提供) 以3:1的比例在100U/mL的完全CellGro DC培养基中培养。重组人白细胞介素-2 (IL-2) (Proleukin, Novartis Healthcare, USA), 持续10天。将细胞冷冻并将等分试样解冻并在转染前在完全培养基中静置。

[0256] 扩增的T细胞的电穿孔

[0257] 将膨胀的T细胞洗涤两次并重悬于CellGro DC培养基 (CellGenix GmbH) 中并重悬至 7×10^7 个细胞/mL。将mRNA与细胞悬浮液以100μg/mL混合,并使用BTX 830方波电穿孔仪 (BTX Technologies Inc., Hawthorne, NY, USA) 在500-mm, 4mL间隙比色杯中电穿孔,时间常数为2毫秒。转染后立即将T细胞转移至完全培养基中,在37°C, 5%CO₂的条件下过夜以进行TCR表达。

[0258] 抗体和流式细胞术

[0259] 在含有0.1%人血清白蛋白 (HSA) 和0.1%叠氮化钠的磷酸盐缓冲盐水 (PBS) 组成的染色缓冲液 (SB) 中洗涤T细胞,然后在室温下染色20分钟。然后将细胞在SB中洗涤并固定在含有1%多聚甲醛的SB中。对于细胞内染色,T细胞用APC刺激6小时或过夜,装载或不装载p573,T细胞与靶标的比例为2:1,并且存在BD GolgiPlug和BD GolgiStop下1/1000稀释。根据制造商的说明书 (Beckman Coulter Inc, USA), 使用PerFix-nc试剂盒对细胞进行细胞外和细胞内染色。使用以下抗体:Vβ3-FITC (Beckman Coulter-Immunotech SAS, France)、CD3-eFluor 450、CD4-eFluor 450、CD4-PE-Cy7、CD8-APC、CD8-eFluor450、CD8-PE-Cy7、

CD56-PE-Cy5.5 (BD Biosciences, USA) 和 CD107a-PE-Cy5 (BD Biosciences, USA)、CXCR2-PE、IFN- γ -FITC、IL-2-APC、TNF- α -PE (BD Biosciences, USA)、CD261/TRAIL-R4-PE (BD Biosciences, USA)。按照制造商的推荐,用 dextramer 染色 (Immudex, Denmark) 检测 MART-1 (aa 26-35) 特异性 TCR。除非另有说明,否则所有抗体均购自美国 eBioscience。在 BD LSR II 流式细胞仪上获得细胞,并使用 FlowJo 软件 (Treestar Inc., Ashland, OR, USA) 分析数据。

[0260] ^{51}Cr 释放测定

[0261] 通过用 $\text{Na}_2^{51}\text{CrO}_4$ (7.5 MBq) (Perkin Elmer, Waltham, MA, USA) 在 0.5 ml FCS 中标记 2×10^6 个靶细胞 1 小时,每 15 分钟轻轻混合,来进行 ^{51}Cr 释放细胞毒性测定。将细胞在冷 RPMI-1640 中洗涤三次,并在 96 孔 U 形底微量滴定板中接种于 2×10^3 个靶细胞。将自体 EBV-LCL, T2 靶细胞或结肠癌细胞系 HCT116、SW480 和 LS174T 用 $10 \mu\text{M}$ P573 或 pI540 在 37°C 脉冲 1 小时。以所示的效应物:靶标 (E:T) 的比例加入原始 T 细胞克隆、TCR 转染的 T 细胞或模拟转染的 T 细胞,并将板在 37°C 下放置 4 小时,如所示。在分别用 5% Triton X-100 (Sigma-Aldrich, Oslo, Norway) 或培养基温育后,测量靶细胞的最大和自发的 ^{51}Cr 释放。将上清液收获到 Luma Plates (Packard, Meriden, CT) 上,并使用 TopCount 微孔板闪烁计数器 (Packard Instrument Company, Meriden, USA) 测量从裂解细胞释放的 ^{51}Cr 。通过下式计算特定铬释放的百分比: $[(\text{实验释放} - \text{自发释放}) / (\text{最大释放} - \text{自发释放})] \times 100$ 。

[0262] 逆转录病毒转导

[0263] 在预涂有抗 CD3 (OKT-3) 和抗 CD28 抗体 (BD Biosciences, USA) 的 24 孔板中,将从健康供体分离的 PBMC 在补充有 5% 人血清 (HS) 和 100 U/ml IL2 (Proleukin, Novartis Healthcare) 的 CellGro DC 培养基 (CellGenix GmbH, Germany) 中培养并活化 48 小时。培养两天后,收获 PBMC 并用逆转录病毒上清液转导两次。用预先涂有纤维连接蛋白 ($20 \mu\text{g}/\text{mL}$, Takara Bio. Inc., Shiga, Japan) 的 12 孔培养物未处理的板 (Nunc A/S, Roskilde, Denmark) 中的 1 体积的逆转录病毒上清液进行 PBMC 的旋转接种。两天后,用 PBS-EDTA (0.5 mM) 收获细胞。如上所述使用 Dynabeads CD3/CD28 进一步扩增转导的 T 细胞。

[0264] 小鼠异种移植研究

[0265] NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG) 小鼠在批准的机构动物护理方案下在内部饲养,并在无病原体条件下维持。6-8 周龄小鼠腹腔内注射 $1-1.5 \times 10^6$ HCT116 肿瘤细胞。用逆转录病毒载体 (由 Dr. Rainer Löw, EUFETS AG, Idar-Oberstein, Germany 提供) 表达萤火虫荧光素酶和 EGFP。使用 Xenogen Spectrum 系统和 Living Image v3.2 软件通过生物发光成像监测肿瘤生长。麻醉的小鼠腹腔注射 $150 \text{ mg}/\text{kg}$ 体重的 D-荧光素 (Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA)。在注射荧光素后 10 分钟对动物成像。

[0266] 统计分析

[0267] 用中位数、平均值和范围描述连续数据。Mann Whitney 检验用于分析肿瘤负荷,而存活率使用 Kaplan Meier 方法计算,非配对 t 检验用于比较组间存活率。给出的所有 p 值都是双尾值。低于 0.05 的 p 值被认为是显著的。所有统计分析均使用 *GraphPad Prism*® (GraphPad Software, Inc. USA) 进行。

[0268] 结果

[0269] 分离TGFβRII移码突变特异性T细胞克隆

[0270] 从MSI+结肠癌患者的血液中分离出TGFβRII移码突变-反应性,HLA-A2限制性CTL。患者接种了SEQ ID NO:49的23-mer TGFβRII移码肽。显示CTL克隆是CD8⁺CD4⁻,并且约50%的细胞表达CD56(图1a)。先前怀疑CTL克隆是单克隆的,因为它们显示出表达TCR Vβ3(或TRBV 28,IMGT命名法)(Kyte,JA(2009),Expert Opin Investig Drugs 18(5):687-694)。分子克隆显示它们确实是姐妹克隆,具有相同的一对TCR链。观察到在不存在外源性肽的情况下结肠癌细胞系HCT116和SW480的特异性裂解。然而,用内源肽裂解细胞系所需的E:T比高于用TGFβRII移码肽(p573,SEQ ID NO:1)外源加载细胞系所需的E:T比。作为对照,未杀死另一种结肠癌细胞系LS174T,其为HLA-A2阴性但表达TGFβRII突变(图1b)。重要的是,尽管在T细胞克隆上表达CD56(图1a),但HLA-A2阴性LS174 T细胞系未被杀死,表明杀伤不是由自然杀伤(NK)细胞样活性介导的,但通过特异性识别载有肽的MHC分子。

[0271] 为了测试T细胞克隆的相对亲和力,用TAP缺陷的T2细胞加载滴定量的肽(0.01-1.0μM)。我们观察到杀死活性遵循肽浓度(图1c)。添加HLA特异性阻断抗体减少了杀伤(图1c),支持TCR的HCR I类限制。当自体EBV-LCL用作APC时,进行了类似的观察。总之,数据显示TGFβRII^{mut}-特异性T细胞是共受体阴性、肽特异性和HLA I类受限的。

[0272] 在mRNA电穿孔后,表达TGFβRII^{mut}-TCR并在CD4⁺和CD8⁺T细胞中具有活性

[0273] 鉴定了来自TGFβRII^{mut}-反应性T细胞姊妹克隆的TCR的α和β链,并在下文中称为Radium-1 TCR。我们将两条链克隆到mRNA表达载体中(参见材料和方法),并且将10天体外扩增的T细胞进行电穿孔以评估它们识别其靶标的能力。使用抗-Vβ3(TRBV 28)抗体通过表面染色在CD4⁺和CD8⁺T细胞中测量Radium-1 TCR表达(图2)。大约70%的转染T细胞表达Vβ3链,其中42%的这些T细胞是CD8阳性的,32%的T细胞表达CD4,而少于5%的细胞天然表达Vβ3。

[0274] 然后,我们在与结肠癌细胞系SW480和LS174T共温育后,通过细胞内细胞因子染色监测Radium-1转染的T细胞的活性。在不存在和存在外源加载的肽的情况下,结肠癌细胞系SW480被CD8⁺和CD4⁺T细胞识别。T细胞产生TNF-α和IFN-γ(图3)。正如预期,结肠癌细胞系LS174T未被识别。这些数据证实了Radium-1 TCR的HLA-肽限制及其有效重定向CD4⁺和CD8⁺T细胞的能力。

[0275] 在Radium-1 TCR转染的CD8⁺T细胞中产生CD107a和IFN-γ

[0276] 为了确定TCR转染的CD8⁺T细胞对结肠癌细胞系的细胞毒性潜力,将mRNA-电穿孔的T细胞与结肠癌细胞系共温育6小时,并用针对脱粒标记物CD107a和IFN-γ的抗体染色(图4)。在不存在外源负载的肽的情况下检测到非常低水平的IFN-γ产生和CD107a表达。加入肽p573(SEQ ID NO:1)后,Radium-1 TCR转染的T细胞和原始T细胞克隆都被强烈激活。有趣的是,TCR转染的T细胞是更有效的IFN-γ生产者,并且还显示出比原始T细胞克隆更高水平的脱粒,而模拟转染的T细胞未被激活。为了测试TCR的共受体独立性,用野生型(wt)HLA-A2或不能结合CD8的突变体HLA-A2转染HEK293细胞,载有p573并用于刺激TCR转染的CD8⁺T细胞。表达CD107a的T细胞数为36%(wt HLA-A2)和26%(突变型HLA-A2),表明该TCR至少部分是共受体依赖性的(图7)。

[0277] Radium-1 TCR转染的T细胞能够介导特异性肿瘤细胞裂解

[0278] 除细胞因子产生外,过继转移的重定向T细胞所需的主要功能是特异性杀死肿瘤

细胞。为了研究TCR转染的T细胞是否能够进行靶细胞裂解,在6小时的铬释放试验中针对结肠癌细胞系对它们进行了测试(图5)。TCR转染的T细胞以与原始患者克隆相当的水平裂解HCT116细胞。如所预期的,当加入外源性p573(SEQ ID NO:1)时,裂解进一步增加。HLA-A2阴性细胞系LS174T的裂解与模拟转染的T细胞的裂解相似,表明HCT116的低背景裂解可能是由于靶细胞上的TRAIL-R表达所致(图8)。其他人报道该细胞系对TRAIL介导的裂解敏感(Tang,W等,(2009),*Febs J* 276(2):581-593)。

[0279] Radium-1-TCR-转导的T细胞在体外和体内都是有效的

[0280] 我们通过腹膜内注射HCT116细胞(Kishimoto,H等,(2009),*Proc Natl Acad Sci U S A* 106(34):14514-14517)建立了结肠癌的异种移植小鼠模型。用TCR逆转录病毒转导T细胞并测试表达,对于用作对照的Radium-1 TCR和MART-1特异性TCR(DMF5),表达均为约60%(图6a)。在注射之前,针对负载有长TGFβRII移码肽(p621,SEQ ID NO:55)或低亲和力(wt)MART-1肽(SEQ ID NO:56)的HLA-A2⁺EBV-LCL,功能性地测试T细胞(图6b)。表达Radium-1 TCR的T细胞均对负载有长TGFβRII移码肽的EBV-LCL作出反应,而大约一半表达MART-1TCR的细胞对低亲和力MART-1肽作出反应。NSG小鼠在第0天腹腔注射10⁶HCT116,以及在2、5和10天腹腔注射8×10⁶(第2天)和2×10⁷(第5和10天)T细胞(图6c)。用表达MART-1特异性TCR的T细胞处理对照小鼠。

[0281] 小鼠的体内活体成像显示,与MART-1特异性对照T细胞相比,接受TGFβRII^{mut}-特异性T细胞治疗的小鼠中的肿瘤负荷显著降低(p=0.038)(图6d)。与对照小鼠相比,接受TGFβRII^{mut}-特异性T细胞的小鼠也具有增强的存活率(p=0.038,图6e)。从由于高肿瘤负荷而不得不被安乐死的小鼠解剖肿瘤。制备肿瘤的单细胞悬浮液并用抗人CD3和抗Vβ3或MART-1Dextramer染色。尽管两者的转导效率很高,但在接受TGFβRII^{mut}-特异性T细胞治疗的小鼠中,发现肿瘤中TCR表达T细胞的百分比显著更高(p=0.0038,图6f)。T细胞群非常相似,表明TGFβRII^{mut}-特异性T细胞更有效地集中到肿瘤中或者由于抗原刺激它们在体内增殖。总之,这些数据证明了Radium-1 TCR在体内的临床前效力。

[0282] 实施例2

[0283] 为了研究用Radium-1 TCR转导的CD4⁺和CD8⁺T细胞杀死靶细胞,稳定转导靶细胞以表达荧光素酶。使用两组靶细胞:HCT116细胞系和Granta细胞系。HCT116细胞如上所述;Granta细胞系是人B细胞淋巴瘤细胞系。生物发光的变化用于测量用Radium-1-转导的T细胞培养期间靶细胞数的变化,代表T细胞对靶细胞的杀死。

[0284] 将荧光素酶转导的靶细胞与效应T细胞在效应物上共培养至靶标(E:T)比为30:1,并测量生物发光。将细胞共培养24小时,并在1、2、3、4、5、8、11、20、21、22、23和24小时测量生物发光。将效应T细胞与含有和不含外源肽p621(SEQ ID NO:55)的Granta细胞共培养,所述外源肽p621包含SEQ ID NO:1的序列。

[0285] 纯化的CD4⁺T细胞和用Radium-1mRNA转导的纯化的CD8⁺T细胞均被发现杀死HCT116细胞和Granta细胞(图9)。在p621(“+TGFβRII肽”)存在下,CD4⁺和CD8⁺T细胞对Granta细胞的杀伤显著高于其不存在(“无肽”)的情况。这表明Radium-1-转导的CD4⁺T细胞能够在不与CD8⁺T细胞相互作用的情况下杀死靶细胞。

[0286] 在小鼠中进一步研究了用Radium-1瞬时转导的T细胞的体内杀伤活性。用10⁶个HCT116细胞腹腔注射NSG小鼠,稳定转导以表达荧光素酶。两天后(即第2天),用8-10×10⁶

个Radium-1转染的T细胞腹腔注射或者静脉注射(静脉内)至小鼠。在第5、7、10、13、15和21天进一步注射Radium-1转染的T细胞,并在第2、7、17、29、45、53和60天通过生物发光成像评估肿瘤负荷(参见图10A;未显示最终成像)。

[0287] 用Radium-1 TCR转染的T细胞处理的小鼠显示出比用模拟转染的T细胞处理的小鼠显著更低的肿瘤负荷(图10B) (* $p=0.01$, Wilcoxon Mann Whitney检验)。由于T细胞的同种异体反应,模拟转染的T细胞在多次注射后对肿瘤生长有一些影响,如图所示。但是,这种影响只是暂时的。由于在这种情况下TCR表达是瞬时的,静脉内(i.v.)注射的T细胞对肿瘤生长没有影响。

[0288] 将Radium-1 TCR的有效性在体外与已知的高亲和力TCR进行比较。选择MART-1特异性TCR DMF5用于比较。DMF5已被临床用于治疗黑色素瘤(Johnson, L.A.等, (2006), J Immunol 177 (9):6548-6559)。

[0289] 用Radium-1和MART-1转导CD8-T细胞并分选。将TCR+T细胞与载有TGF β RII移码肽p573(SEQ ID NO:1)和MART-1 26-35肽类似物ELAGIGILTV(SEQ ID NO:80)的HLA-A2+T2细胞(T2是不表达MHC II类分子的人类淋巴母细胞系)一起温育5小时,接着对脱粒标记物CD107a作为杀伤能力的标记进行染色,然后进行流式细胞术分析。SEQ ID NO:80的MART-1 26-35肽类似物相对于SEQ ID NO:56的野生型肽具有单个氨基酸取代,即SEQ ID NO:56的2位的丙氨酸被取代为亮氨酸。所得的类似肽具有有利的性质,因为它对HLA-A2具有增强的亲和力,导致与野生型肽相比,含有HLA-A2的MHC I类分子增强了肽的呈递。

[0290] 对于Radium-1的p573的EC₅₀显示为2nM,而具有DMF5的SEQ ID NO:56的MART-1肽的值为7nM(图11)。这表明了Radium-1对其同源抗原/MHC复合物具有非常高的亲和力,并且与CD8无关。此外,显示Radium-1对其同源抗原/MHC复合物具有比已知临床有效的DMF5 TCR更高的亲和力。

[0291] 实施例3

[0292] 由SEQ ID NO:69的scTCR编码的可溶性His标记的Radium-1 TCR在HEK细胞中表达。分离表达HEK细胞的上清液。转导SupT1细胞(HLA-A2阴性细胞系)以表达HLA-A2,其与未被Radium-1识别的非特异性无关肽或TGF β RII移码肽融合。将转导的细胞在室温下与可溶性Radium-1 TCR一起温育30分钟;还将未转导的细胞与可溶性TCR一起温育,作为另外的阴性对照。温育后,洗涤细胞,然后用别藻蓝蛋白(APC)染色以鉴定可溶性TCR结合。染色使用原代小鼠抗His抗体,然后使用第二APC缀合的抗小鼠IgG抗体进行。然后通过流式细胞术分析染色的细胞(图12)。

[0293] 如图12A和12B所示,基本上没有观察到阴性对照的染色,证明可溶性Radium-1 TCR不结合不表达HLA-A2的细胞,或表达HLA-A2但不呈递TGF β RII移码肽的细胞。图12C显示表达HLA-A2并呈递TGF β RII移码肽的细胞被可溶性Radium-1 TCR识别,表明它具有预期的特异性。

[0001] 序列表
[0002] <110> 奥斯陆大学医院HF
[0003] <120> 识别TGFβRII的移码突变体的T细胞受体
[0004] <130> FP1V182258ZX
[0005] <150> GB 1608052.5
[0006] <151> 2016-05-09
[0007] <160> 82
[0008] <170> PatentIn 版本号 3.5
[0009] <210> 1
[0010] <211> 9
[0011] <212> PRT
[0012] <213> 智人
[0013] <400> 1
[0014] Arg Leu Ser Ser Cys Val Pro Val Ala
[0015] 1 5
[0016] <210> 2
[0017] <211> 5
[0018] <212> PRT
[0019] <213> 智人
[0020] <400> 2
[0021] Asp Ser Val Asn Asn
[0022] 1 5
[0023] <210> 3
[0024] <211> 5
[0025] <212> PRT
[0026] <213> 智人
[0027] <400> 3
[0028] Ile Pro Ser Gly Thr
[0029] 1 5
[0030] <210> 4
[0031] <211> 11
[0032] <212> PRT
[0033] <213> 智人
[0034] <400> 4
[0035] Cys Ala Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe
[0036] 1 5 10
[0037] <210> 5
[0038] <211> 5
[0039] <212> PRT
[0040] <213> 智人
[0041] <400> 5

[0042]	Met Asp His Glu Asn		
[0043]	1	5	
[0044]	<210>	6	
[0045]	<211>	6	
[0046]	<212>	PRT	
[0047]	<213>	智人	
[0048]	<400>	6	
[0049]	Ser Tyr Asp Val Lys Met		
[0050]	1	5	
[0051]	<210>	7	
[0052]	<211>	13	
[0053]	<212>	PRT	
[0054]	<213>	智人	
[0055]	<400>	7	
[0056]	Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe		
[0057]	1	5	10
[0058]	<210>	8	
[0059]	<211>	127	
[0060]	<212>	PRT	
[0061]	<213>	智人	
[0062]	<400>	8	
[0063]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val		
[0064]	1	5	10 15
[0065]	Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile		
[0066]		20	25 30
[0067]	Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser		
[0068]		35	40 45
[0069]	Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile		
[0070]		50	55 60
[0071]	Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser		
[0072]	65	70	75 80
[0073]	Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser		
[0074]		85	90 95
[0075]	Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly		
[0076]		100	105 110
[0077]	Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro		
[0078]		115	120 125
[0079]	<210>	9	
[0080]	<211>	141	
[0081]	<212>	PRT	
[0082]	<213>	智人	
[0083]	<400>	9	

[0084]	His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
[0085]	1 5 10 15
[0086]	Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
[0087]	20 25 30
[0088]	Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
[0089]	35 40 45
[0090]	Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
[0091]	50 55 60
[0092]	Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
[0093]	65 70 75 80
[0094]	Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
[0095]	85 90 95
[0096]	Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe
[0097]	100 105 110
[0098]	Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
[0099]	115 120 125
[0100]	Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0101]	130 135 140
[0102]	<210> 10
[0103]	<211> 141
[0104]	<212> PRT
[0105]	<213> 人工序列
[0106]	<220>
[0107]	<223> 半胱氨酸修饰的Radium-1 α 链恒定区
[0108]	<400> 10
[0109]	His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
[0110]	1 5 10 15
[0111]	Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
[0112]	20 25 30
[0113]	Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys
[0114]	35 40 45
[0115]	Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
[0116]	50 55 60
[0117]	Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
[0118]	65 70 75 80
[0119]	Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp
[0120]	85 90 95
[0121]	Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe
[0122]	100 105 110
[0123]	Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala
[0124]	115 120 125
[0125]	Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser

[0126]	130	135	140
[0127]	<210> 11		
[0128]	<211> 268		
[0129]	<212> PRT		
[0130]	<213> 智人		
[0131]	<400> 11		
[0132]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val		
[0133]	1 5 10 15		
[0134]	Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile		
[0135]	20 25 30		
[0136]	Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser		
[0137]	35 40 45		
[0138]	Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile		
[0139]	50 55 60		
[0140]	Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser		
[0141]	65 70 75 80		
[0142]	Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser		
[0143]	85 90 95		
[0144]	Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly		
[0145]	100 105 110		
[0146]	Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His		
[0147]	115 120 125		
[0148]	Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser		
[0149]	130 135 140		
[0150]	Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn		
[0151]	145 150 155 160		
[0152]	Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val		
[0153]	165 170 175		
[0154]	Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp		
[0155]	180 185 190		
[0156]	Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile		
[0157]	195 200 205		
[0158]	Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val		
[0159]	210 215 220		
[0160]	Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln		
[0161]	225 230 235 240		
[0162]	Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly		
[0163]	245 250 255		
[0164]	Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0165]	260 265		
[0166]	<210> 12		
[0167]	<211> 268		

[0168]	<212>	PRT
[0169]	<213>	人工序列
[0170]	<220>	
[0171]	<223>	半胱氨酸修饰的Radium-1 α 链
[0172]	<400>	12
[0173]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val	
[0174]	1 5 10 15	
[0175]	Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile	
[0176]	20 25 30	
[0177]	Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser	
[0178]	35 40 45	
[0179]	Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile	
[0180]	50 55 60	
[0181]	Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser	
[0182]	65 70 75 80	
[0183]	Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser	
[0184]	85 90 95	
[0185]	Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly	
[0186]	100 105 110	
[0187]	Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His	
[0188]	115 120 125	
[0189]	Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser	
[0190]	130 135 140	
[0191]	Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn	
[0192]	145 150 155 160	
[0193]	Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val	
[0194]	165 170 175	
[0195]	Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp	
[0196]	180 185 190	
[0197]	Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile	
[0198]	195 200 205	
[0199]	Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val	
[0200]	210 215 220	
[0201]	Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln	
[0202]	225 230 235 240	
[0203]	Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly	
[0204]	245 250 255	
[0205]	Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser	
[0206]	260 265	
[0207]	<210>	13
[0208]	<211>	131
[0209]	<212>	PRT

[0210]	<213>	智人
[0211]	<400>	13
[0212]	Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val	
[0213]	1	5 10 15
[0214]	Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys	
[0215]	20	25 30
[0216]	Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His	
[0217]	35	40 45
[0218]	Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu	
[0219]	50	55 60
[0220]	Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro	
[0221]	65	70 75 80
[0222]	Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile	
[0223]	85	90 95
[0224]	Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser	
[0225]	100	105 110
[0226]	Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu	
[0227]	115	120 125
[0228]	Thr Val Leu	
[0229]	130	
[0230]	<210>	14
[0231]	<211>	179
[0232]	<212>	PRT
[0233]	<213>	智人
[0234]	<400>	14
[0235]	Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro	
[0236]	1	5 10 15
[0237]	Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu	
[0238]	20	25 30
[0239]	Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn	
[0240]	35	40 45
[0241]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys	
[0242]	50	55 60
[0243]	Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu	
[0244]	65	70 75 80
[0245]	Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys	
[0246]	85	90 95
[0247]	Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp	
[0248]	100	105 110
[0249]	Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg	
[0250]	115	120 125
[0251]	Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser	

[0252]	130	135	140
[0253]	Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala		
[0254]	145	150	155 160
[0255]	Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp		
[0256]	165	170	175
[0257]	Ser Arg Gly		
[0258]	<210> 15		
[0259]	<211> 179		
[0260]	<212> PRT		
[0261]	<213> 人工序列		
[0262]	<220>		
[0263]	<223> 半胱氨酸修饰的Radium-1 β 链恒定区		
[0264]	<400> 15		
[0265]	Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro		
[0266]	1 5 10 15		
[0267]	Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu		
[0268]	20 25 30		
[0269]	Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn		
[0270]	35 40 45		
[0271]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys		
[0272]	50 55 60		
[0273]	Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu		
[0274]	65 70 75 80		
[0275]	Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys		
[0276]	85 90 95		
[0277]	Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp		
[0278]	100 105 110		
[0279]	Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg		
[0280]	115 120 125		
[0281]	Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser		
[0282]	130 135 140		
[0283]	Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala		
[0284]	145 150 155 160		
[0285]	Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp		
[0286]	165 170 175		
[0287]	Ser Arg Gly		
[0288]	<210> 16		
[0289]	<211> 310		
[0290]	<212> PRT		
[0291]	<213> 智人		
[0292]	<400> 16		
[0293]	Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val		

[0294]	1	5	10	15
[0295]	Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys			
[0296]	20	25	30	
[0297]	Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His			
[0298]	35	40	45	
[0299]	Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu			
[0300]	50	55	60	
[0301]	Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro			
[0302]	65	70	75	80
[0303]	Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile			
[0304]	85	90	95	
[0305]	Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser			
[0306]	100	105	110	
[0307]	Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu			
[0308]	115	120	125	
[0309]	Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val			
[0310]	130	135	140	
[0311]	Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu			
[0312]	145	150	155	160
[0313]	Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp			
[0314]	165	170	175	
[0315]	Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln			
[0316]	180	185	190	
[0317]	Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser			
[0318]	195	200	205	
[0319]	Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His			
[0320]	210	215	220	
[0321]	Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp			
[0322]	225	230	235	240
[0323]	Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala			
[0324]	245	250	255	
[0325]	Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly			
[0326]	260	265	270	
[0327]	Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr			
[0328]	275	280	285	
[0329]	Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys			
[0330]	290	295	300	
[0331]	Arg Lys Asp Ser Arg Gly			
[0332]	305	310		
[0333]	<210> 17			
[0334]	<211> 310			
[0335]	<212> PRT			

[0336]	<213> 人工序列															
[0337]	<220>															
[0338]	<223> 半胱氨酸修饰的Radium-1 β 链															
[0339]	<400> 17															
[0340]	Met	Gly	Ile	Arg	Leu	Leu	Cys	Arg	Val	Ala	Phe	Cys	Phe	Leu	Ala	Val
[0341]	1				5					10				15		
[0342]	Gly	Leu	Val	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Gln	Ser	Ser	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys
[0343]					20				25					30		
[0344]	Arg	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Phe	Leu	Glu	Cys	Val	Gln	Asp	Met	Asp	His
[0345]					35				40					45		
[0346]	Glu	Asn	Met	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu
[0347]					50				55					60		
[0348]	Ile	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Asp	Val	Lys	Met	Lys	Glu	Lys	Gly	Asp	Ile	Pro
[0349]	65					70					75				80	
[0350]	Glu	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Lys	Lys	Glu	Arg	Phe	Ser	Leu	Ile
[0351]					85					90					95	
[0352]	Leu	Glu	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn	Gln	Thr	Ser	Met	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser
[0353]					100					105					110	
[0354]	Ser	Ser	Gly	Val	Thr	Gly	Glu	Leu	Phe	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Arg	Leu
[0355]					115					120					125	
[0356]	Thr	Val	Leu	Glu	Asp	Leu	Lys	Asn	Val	Phe	Pro	Pro	Glu	Val	Ala	Val
[0357]					130					135					140	
[0358]	Phe	Glu	Pro	Ser	Glu	Ala	Glu	Ile	Ser	His	Thr	Gln	Lys	Ala	Thr	Leu
[0359]	145					150					155				160	
[0360]	Val	Cys	Leu	Ala	Thr	Gly	Phe	Tyr	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser	Trp
[0361]					165					170					175	
[0362]	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro	Gln
[0363]					180					185					190	
[0364]	Pro	Leu	Lys	Glu	Gln	Pro	Ala	Leu	Asn	Asp	Ser	Arg	Tyr	Cys	Leu	Ser
[0365]					195					200					205	
[0366]	Ser	Arg	Leu	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	Gln	Asn	Pro	Arg	Asn	His
[0367]					210					215					220	
[0368]	Phe	Arg	Cys	Gln	Val	Gln	Phe	Tyr	Gly	Leu	Ser	Glu	Asn	Asp	Glu	Trp
[0369]	225					230					235				240	
[0370]	Thr	Gln	Asp	Arg	Ala	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Ile	Val	Ser	Ala	Glu	Ala
[0371]					245					250					255	
[0372]	Trp	Gly	Arg	Ala	Asp	Cys	Gly	Phe	Thr	Ser	Glu	Ser	Tyr	Gln	Gln	Gly
[0373]					260					265					270	
[0374]	Val	Leu	Ser	Ala	Thr	Ile	Leu	Tyr	Glu	Ile	Leu	Leu	Gly	Lys	Ala	Thr
[0375]					275					280					285	
[0376]	Leu	Tyr	Ala	Val	Leu	Val	Ser	Ala	Leu	Val	Leu	Met	Ala	Met	Val	Lys
[0377]					290					295					300	

[0378]	Arg Lys Asp Ser Arg Gly														
[0379]	305													310	
[0380]	<210> 18														
[0381]	<211> 26														
[0382]	<212> PRT														
[0383]	<213> 小RNA病毒														
[0384]	<400> 18														
[0385]	Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln														
[0386]	1				5					10					15
[0387]	Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro														
[0388]					20					25					
[0389]	<210> 19														
[0390]	<211> 20														
[0391]	<212> PRT														
[0392]	<213> 人工序列														
[0393]	<220>														
[0394]	<223> 双Myc标签														
[0395]	<400> 19														
[0396]	Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln Lys Leu Ile Ser														
[0397]	1				5					10					15
[0398]	Glu Glu Asp Leu														
[0399]					20										
[0400]	<210> 20														
[0401]	<211> 147														
[0402]	<212> PRT														
[0403]	<213> 人工序列														
[0404]	<220>														
[0405]	<223> 具有双Myc标签的Radium-1 α 链可变区														
[0406]	<400> 20														
[0407]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val														
[0408]	1				5					10					15
[0409]	Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln														
[0410]					20					25					30
[0411]	Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro														
[0412]					35					40					45
[0413]	Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn														
[0414]					50					55					60
[0415]	Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp														
[0416]	65									70					80
[0417]	Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn														
[0418]										85					95
[0419]	Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu														

[0420]	100	105	110
[0421]	Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala		
[0422]	115	120	125
[0423]	Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met		
[0424]	130	135	140
[0425]	Val Lys Pro		
[0426]	145		
[0427]	<210> 21		
[0428]	<211> 288		
[0429]	<212> PRT		
[0430]	<213> 人工序列		
[0431]	<220>		
[0432]	<223> 具有双Myc标签的Radium-1 α 链		
[0433]	<400> 21		
[0434]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val		
[0435]	1 5 10 15		
[0436]	Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln		
[0437]	20 25 30		
[0438]	Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro		
[0439]	35 40 45		
[0440]	Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn		
[0441]	50 55 60		
[0442]	Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp		
[0443]	65 70 75 80		
[0444]	Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn		
[0445]	85 90 95		
[0446]	Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu		
[0447]	100 105 110		
[0448]	Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala		
[0449]	115 120 125		
[0450]	Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met		
[0451]	130 135 140		
[0452]	Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg		
[0453]	145 150 155 160		
[0454]	Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp		
[0455]	165 170 175		
[0456]	Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr		
[0457]	180 185 190		
[0458]	Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser		
[0459]	195 200 205		
[0460]	Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe		
[0461]	210 215 220		

[0462]	Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser
[0463]	225 230 235 240
[0464]	Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn
[0465]	245 250 255
[0466]	Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu
[0467]	260 265 270
[0468]	Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0469]	275 280 285
[0470]	<210> 22
[0471]	<211> 288
[0472]	<212> PRT
[0473]	<213> 人工序列
[0474]	<220>
[0475]	<223> 具有双Myc标签的半胱氨酸修饰的Radium-1 α 链
[0476]	<400> 22
[0477]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val
[0478]	1 5 10 15
[0479]	Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln
[0480]	20 25 30
[0481]	Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro
[0482]	35 40 45
[0483]	Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn
[0484]	50 55 60
[0485]	Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp
[0486]	65 70 75 80
[0487]	Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn
[0488]	85 90 95
[0489]	Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu
[0490]	100 105 110
[0491]	Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala
[0492]	115 120 125
[0493]	Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met
[0494]	130 135 140
[0495]	Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
[0496]	145 150 155 160
[0497]	Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
[0498]	165 170 175
[0499]	Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
[0500]	180 185 190
[0501]	Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser
[0502]	195 200 205
[0503]	Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe

[0504]	210	215	220
[0505]	Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser		
[0506]	225	230	235 240
[0507]	Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn		
[0508]	245	250	255
[0509]	Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu		
[0510]	260	265	270
[0511]	Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0512]	275	280	285
[0513]	<210> 23		
[0514]	<211> 136		
[0515]	<212> PRT		
[0516]	<213> 小鼠		
[0517]	<400> 23		
[0518]	Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser		
[0519]	1 5 10 15		
[0520]	Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn		
[0521]	20 25 30		
[0522]	Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val		
[0523]	35 40 45		
[0524]	Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp		
[0525]	50 55 60		
[0526]	Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn		
[0527]	65 70 75 80		
[0528]	Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu		
[0529]	85 90 95		
[0530]	Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val		
[0531]	100 105 110		
[0532]	Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu		
[0533]	115 120 125		
[0534]	Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0535]	130 135		
[0536]	<210> 24		
[0537]	<211> 136		
[0538]	<212> PRT		
[0539]	<213> 人工序列		
[0540]	<220>		
[0541]	<223> 半胱氨酸修饰的鼠源化Radium-1 α 链恒定区		
[0542]	<400> 24		
[0543]	Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser		
[0544]	1 5 10 15		
[0545]	Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn		

[0546]	20	25	30
[0547]	Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Cys Val		
[0548]	35	40	45
[0549]	Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp		
[0550]	50	55	60
[0551]	Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn		
[0552]	65	70	75
[0553]	Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu		
[0554]	85	90	95
[0555]	Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val		
[0556]	100	105	110
[0557]	Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu		
[0558]	115	120	125
[0559]	Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0560]	130	135	
[0561]	<210> 25		
[0562]	<211> 263		
[0563]	<212> PRT		
[0564]	<213> 人工序列		
[0565]	<220>		
[0566]	<223> 具有鼠源化恒定区的Radium-1 α 链		
[0567]	<400> 25		
[0568]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val		
[0569]	1	5	10
[0570]	Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile		
[0571]	20	25	30
[0572]	Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser		
[0573]	35	40	45
[0574]	Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile		
[0575]	50	55	60
[0576]	Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser		
[0577]	65	70	75
[0578]	Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser		
[0579]	85	90	95
[0580]	Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly		
[0581]	100	105	110
[0582]	Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro Ile		
[0583]	115	120	125
[0584]	Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln		
[0585]	130	135	140
[0586]	Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val		
[0587]	145	150	155
			160

[0588]	Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu
[0589]	165 170 175
[0590]	Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser
[0591]	180 185 190
[0592]	Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala
[0593]	195 200 205
[0594]	Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys
[0595]	210 215 220
[0596]	Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met
[0597]	225 230 235 240
[0598]	Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met
[0599]	245 250 255
[0600]	Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0601]	260
[0602]	<210> 26
[0603]	<211> 263
[0604]	<212> PRT
[0605]	<213> 人工序列
[0606]	<220>
[0607]	<223> 具有半胱氨酸修饰的鼠源化恒定区的Radium-1 α 链
[0608]	<400> 26
[0609]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val
[0610]	1 5 10 15
[0611]	Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile
[0612]	20 25 30
[0613]	Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser
[0614]	35 40 45
[0615]	Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile
[0616]	50 55 60
[0617]	Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser
[0618]	65 70 75 80
[0619]	Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser
[0620]	85 90 95
[0621]	Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly
[0622]	100 105 110
[0623]	Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro Ile
[0624]	115 120 125
[0625]	Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln
[0626]	130 135 140
[0627]	Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val
[0628]	145 150 155 160
[0629]	Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu

[0630]	165	170	175
[0631]	Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser		
[0632]	180	185	190
[0633]	Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala		
[0634]	195	200	205
[0635]	Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys		
[0636]	210	215	220
[0637]	Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met		
[0638]	225	230	235
[0639]	Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met		
[0640]	245	250	255
[0641]	Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0642]	260		
[0643]	<210> 27		
[0644]	<211> 283		
[0645]	<212> PRT		
[0646]	<213> 人工序列		
[0647]	<220>		
[0648]	<223> 具有双Myc标签和鼠源化恒定区的Radium-1 α 链		
[0649]	<400> 27		
[0650]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val		
[0651]	1	5	10
[0652]	Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln		
[0653]	20	25	30
[0654]	Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro		
[0655]	35	40	45
[0656]	Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn		
[0657]	50	55	60
[0658]	Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp		
[0659]	65	70	75
[0660]	Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn		
[0661]	85	90	95
[0662]	Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu		
[0663]	100	105	110
[0664]	Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala		
[0665]	115	120	125
[0666]	Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met		
[0667]	130	135	140
[0668]	Val Lys Pro Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp		
[0669]	145	150	155
[0670]	Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser		
[0671]	165	170	175

[0672]	Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp
[0673]	180 185 190
[0674]	Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala
[0675]	195 200 205
[0676]	Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys
[0677]	210 215 220
[0678]	Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr
[0679]	225 230 235 240
[0680]	Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn
[0681]	245 250 255
[0682]	Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe
[0683]	260 265 270
[0684]	Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
[0685]	275 280
[0686]	<210> 28
[0687]	<211> 283
[0688]	<212> PRT
[0689]	<213> 人工序列
[0690]	<220>
[0691]	<223> 具有双Myc标签和半胱氨酸修饰的鼠源化恒定区的Radium-1 α 链
[0692]	<400> 28
[0693]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val
[0694]	1 5 10 15
[0695]	Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln
[0696]	20 25 30
[0697]	Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro
[0698]	35 40 45
[0699]	Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn
[0700]	50 55 60
[0701]	Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp
[0702]	65 70 75 80
[0703]	Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn
[0704]	85 90 95
[0705]	Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu
[0706]	100 105 110
[0707]	Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala
[0708]	115 120 125
[0709]	Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met
[0710]	130 135 140
[0711]	Val Lys Pro Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp
[0712]	145 150 155 160
[0713]	Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser

[0714]	165	170	175
[0715]	Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp		
[0716]	180	185	190
[0717]	Lys Cys Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala		
[0718]	195	200	205
[0719]	Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys		
[0720]	210	215	220
[0721]	Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr		
[0722]	225	230	235
[0723]	Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn		
[0724]	245	250	255
[0725]	Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe		
[0726]	260	265	270
[0727]	Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[0728]	275	280	
[0729]	<210> 29		
[0730]	<211> 125		
[0731]	<212> PRT		
[0732]	<213> 小鼠		
[0733]	<400> 29		
[0734]	Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro		
[0735]	1	5	10
[0736]	Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu		
[0737]	20	25	30
[0738]	Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn		
[0739]	35	40	45
[0740]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys		
[0741]	50	55	60
[0742]	Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala		
[0743]	65	70	75
[0744]	Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe		
[0745]	85	90	95
[0746]	His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro		
[0747]	100	105	110
[0748]	Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala		
[0749]	115	120	125
[0750]	<210> 30		
[0751]	<211> 125		
[0752]	<212> PRT		
[0753]	<213> 人工序列		
[0754]	<220>		
[0755]	<223> 半胱氨酸修饰的鼠源化Radium-1 β 链恒定区		

[0756]	<400> 30
[0757]	Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
[0758]	1 5 10 15
[0759]	Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
[0760]	20 25 30
[0761]	Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
[0762]	35 40 45
[0763]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys
[0764]	50 55 60
[0765]	Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
[0766]	65 70 75 80
[0767]	Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
[0768]	85 90 95
[0769]	His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
[0770]	100 105 110
[0771]	Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
[0772]	115 120 125
[0773]	<210> 31
[0774]	<211> 256
[0775]	<212> PRT
[0776]	<213> 人工序列
[0777]	<220>
[0778]	<223> 具有鼠源化恒定区的Radium-1 β链
[0779]	<400> 31
[0780]	Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val
[0781]	1 5 10 15
[0782]	Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys
[0783]	20 25 30
[0784]	Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His
[0785]	35 40 45
[0786]	Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu
[0787]	50 55 60
[0788]	Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro
[0789]	65 70 75 80
[0790]	Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile
[0791]	85 90 95
[0792]	Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser
[0793]	100 105 110
[0794]	Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu
[0795]	115 120 125
[0796]	Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu
[0797]	130 135 140

[0798]	Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu
[0799]	145 150 155 160
[0800]	Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
[0801]	165 170 175
[0802]	Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln
[0803]	180 185 190
[0804]	Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg
[0805]	195 200 205
[0806]	Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln
[0807]	210 215 220
[0808]	Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser
[0809]	225 230 235 240
[0810]	Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
[0811]	245 250 255
[0812]	<210> 32
[0813]	<211> 256
[0814]	<212> PRT
[0815]	<213> 人工序列
[0816]	<220>
[0817]	<223> 具有半胱氨酸修饰的鼠源化恒定区的Radium-1 β 链
[0818]	<400> 32
[0819]	Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val
[0820]	1 5 10 15
[0821]	Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys
[0822]	20 25 30
[0823]	Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His
[0824]	35 40 45
[0825]	Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu
[0826]	50 55 60
[0827]	Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro
[0828]	65 70 75 80
[0829]	Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile
[0830]	85 90 95
[0831]	Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser
[0832]	100 105 110
[0833]	Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu
[0834]	115 120 125
[0835]	Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu
[0836]	130 135 140
[0837]	Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu
[0838]	145 150 155 160
[0839]	Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp

[0840]		165		170		175
[0841]	Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln					
[0842]		180		185		190
[0843]	Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg					
[0844]		195		200		205
[0845]	Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln					
[0846]		210		215		220
[0847]	Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser					
[0848]	225		230		235	240
[0849]	Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala					
[0850]		245		250		255
[0851]	<210> 33					
[0852]	<211> 604					
[0853]	<212> PRT					
[0854]	<213> 人工序列					
[0855]	<220>					
[0856]	<223> 具有2A接头的Radium-1 scTCR					
[0857]	<400> 33					
[0858]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val					
[0859]	1	5		10		15
[0860]	Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile					
[0861]		20		25		30
[0862]	Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser					
[0863]		35		40		45
[0864]	Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile					
[0865]		50		55		60
[0866]	Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser					
[0867]	65		70		75	80
[0868]	Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser					
[0869]		85		90		95
[0870]	Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly					
[0871]		100		105		110
[0872]	Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His					
[0873]		115		120		125
[0874]	Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser					
[0875]		130		135		140
[0876]	Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn					
[0877]	145		150		155	160
[0878]	Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val					
[0879]		165		170		175
[0880]	Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp					
[0881]		180		185		190

[0882]	Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile		
[0883]	195	200	205
[0884]	Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val		
[0885]	210	215	220
[0886]	Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln		
[0887]	225	230	235 240
[0888]	Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly		
[0889]	245	250	255
[0890]	Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser Arg Ala Lys Arg		
[0891]	260	265	270
[0892]	Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val		
[0893]	275	280	285
[0894]	Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala		
[0895]	290	295	300
[0896]	Phe Cys Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser		
[0897]	305	310	315 320
[0898]	Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys		
[0899]	325	330	335
[0900]	Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro		
[0901]	340	345	350
[0902]	Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys		
[0903]	355	360	365
[0904]	Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys		
[0905]	370	375	380
[0906]	Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser		
[0907]	385	390	395 400
[0908]	Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe		
[0909]	405	410	415
[0910]	Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe		
[0911]	420	425	430
[0912]	Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His		
[0913]	435	440	445
[0914]	Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp		
[0915]	450	455	460
[0916]	His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly		
[0917]	465	470	475 480
[0918]	Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp		
[0919]	485	490	495
[0920]	Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp		
[0921]	500	505	510
[0922]	Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu		
[0923]	515	520	525

[0924]	Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln
[0925]	530 535 540
[0926]	Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser
[0927]	545 550 555 560
[0928]	Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile
[0929]	565 570 575
[0930]	Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val
[0931]	580 585 590
[0932]	Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
[0933]	595 600
[0934]	<210> 34
[0935]	<211> 604
[0936]	<212> PRT
[0937]	<213> 人工序列
[0938]	<220>
[0939]	<223> 具有2A接头的半胱氨酸修饰的Radium-1 scTCR
[0940]	<400> 34
[0941]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val
[0942]	1 5 10 15
[0943]	Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile
[0944]	20 25 30
[0945]	Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser
[0946]	35 40 45
[0947]	Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile
[0948]	50 55 60
[0949]	Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser
[0950]	65 70 75 80
[0951]	Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser
[0952]	85 90 95
[0953]	Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly
[0954]	100 105 110
[0955]	Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His
[0956]	115 120 125
[0957]	Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser
[0958]	130 135 140
[0959]	Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn
[0960]	145 150 155 160
[0961]	Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val
[0962]	165 170 175
[0963]	Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp
[0964]	180 185 190
[0965]	Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile

[0966]	195	200	205
[0967]	Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val		
[0968]	210	215	220
[0969]	Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln		
[0970]	225	230	235
[0971]	Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly		
[0972]	245	250	255
[0973]	Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser Arg Ala Lys Arg		
[0974]	260	265	270
[0975]	Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val		
[0976]	275	280	285
[0977]	Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala		
[0978]	290	295	300
[0979]	Phe Cys Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser		
[0980]	305	310	315
[0981]	Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys		
[0982]	325	330	335
[0983]	Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro		
[0984]	340	345	350
[0985]	Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys		
[0986]	355	360	365
[0987]	Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys		
[0988]	370	375	380
[0989]	Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser		
[0990]	385	390	395
[0991]	Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe		
[0992]	405	410	415
[0993]	Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe		
[0994]	420	425	430
[0995]	Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His		
[0996]	435	440	445
[0997]	Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp		
[0998]	450	455	460
[0999]	His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly		
[1000]	465	470	475
[1001]	Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp		
[1002]	485	490	495
[1003]	Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp		
[1004]	500	505	510
[1005]	Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu		
[1006]	515	520	525
[1007]	Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln		

[1008]	530	535	540
[1009]	Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser		
[1010]	545	550	555 560
[1011]	Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile		
[1012]		565	570 575
[1013]	Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val		
[1014]		580	585 590
[1015]	Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly		
[1016]	595	600	
[1017]	<210> 35		
[1018]	<211> 624		
[1019]	<212> PRT		
[1020]	<213> 人工序列		
[1021]	<220>		
[1022]	<223> 具有2A接头和双Myc标签的Radium-1 scTCR		
[1023]	<400> 35		
[1024]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val		
[1025]	1	5	10 15
[1026]	Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln		
[1027]		20	25 30
[1028]	Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro		
[1029]		35	40 45
[1030]	Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn		
[1031]		50	55 60
[1032]	Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp		
[1033]	65	70	75 80
[1034]	Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn		
[1035]		85	90 95
[1036]	Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu		
[1037]		100	105 110
[1038]	Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala		
[1039]		115	120 125
[1040]	Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met		
[1041]		130	135 140
[1042]	Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg		
[1043]	145	150	155 160
[1044]	Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp		
[1045]		165	170 175
[1046]	Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr		
[1047]		180	185 190
[1048]	Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser		
[1049]		195	200 205

[1050]	Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe		
[1051]	210	215	220
[1052]	Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser		
[1053]	225	230	235 240
[1054]	Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn		
[1055]	245	250	255
[1056]	Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu		
[1057]	260	265	270
[1058]	Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[1059]	275	280	285
[1060]	Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln		
[1061]	290	295	300
[1062]	Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu		
[1063]	305	310	315 320
[1064]	Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val Lys		
[1065]	325	330	335
[1066]	Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val		
[1067]	340	345	350
[1068]	Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr		
[1069]	355	360	365
[1070]	Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp		
[1071]	370	375	380
[1072]	Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser		
[1073]	385	390	395 400
[1074]	Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr		
[1075]	405	410	415
[1076]	Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly		
[1077]	420	425	430
[1078]	Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu		
[1079]	435	440	445
[1080]	Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala		
[1081]	450	455	460
[1082]	Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly		
[1083]	465	470	475 480
[1084]	Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu		
[1085]	485	490	495
[1086]	Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro		
[1087]	500	505	510
[1088]	Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser		
[1089]	515	520	525
[1090]	Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln		
[1091]	530	535	540

[1092]	Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys
[1093]	545 550 555 560
[1094]	Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys
[1095]	565 570 575
[1096]	Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile
[1097]	580 585 590
[1098]	Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val
[1099]	595 600 605
[1100]	Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
[1101]	610 615 620
[1102]	<210> 36
[1103]	<211> 624
[1104]	<212> PRT
[1105]	<213> 人工序列
[1106]	<220>
[1107]	<223> 具有2A接头和双Myc标签的半胱氨酸修饰的Radium-1 scTCR
[1108]	<400> 36
[1109]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val
[1110]	1 5 10 15
[1111]	Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln
[1112]	20 25 30
[1113]	Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro
[1114]	35 40 45
[1115]	Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn
[1116]	50 55 60
[1117]	Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp
[1118]	65 70 75 80
[1119]	Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn
[1120]	85 90 95
[1121]	Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu
[1122]	100 105 110
[1123]	Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala
[1124]	115 120 125
[1125]	Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met
[1126]	130 135 140
[1127]	Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg
[1128]	145 150 155 160
[1129]	Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp
[1130]	165 170 175
[1131]	Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr
[1132]	180 185 190
[1133]	Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser

[1134]	195	200	205
[1135]	Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe		
[1136]	210	215	220
[1137]	Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser		
[1138]	225	230	235
[1139]	Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn		
[1140]	245	250	255
[1141]	Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu		
[1142]	260	265	270
[1143]	Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser		
[1144]	275	280	285
[1145]	Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln		
[1146]	290	295	300
[1147]	Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu		
[1148]	305	310	315
[1149]	Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val Lys		
[1150]	325	330	335
[1151]	Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val		
[1152]	340	345	350
[1153]	Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr		
[1154]	355	360	365
[1155]	Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp		
[1156]	370	375	380
[1157]	Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser		
[1158]	385	390	395
[1159]	Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr		
[1160]	405	410	415
[1161]	Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly		
[1162]	420	425	430
[1163]	Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu		
[1164]	435	440	445
[1165]	Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala		
[1166]	450	455	460
[1167]	Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly		
[1168]	465	470	475
[1169]	Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu		
[1170]	485	490	495
[1171]	Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro		
[1172]	500	505	510
[1173]	Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser		
[1174]	515	520	525
[1175]	Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln		

[1176]	530	535	540
[1177]	Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys		
[1178]	545	550	555 560
[1179]	Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys		
[1180]		565	570 575
[1181]	Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile		
[1182]		580	585 590
[1183]	Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val		
[1184]		595	600 605
[1185]	Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly		
[1186]	610	615	620
[1187]	<210> 37		
[1188]	<211> 545		
[1189]	<212> PRT		
[1190]	<213> 人工序列		
[1191]	<220>		
[1192]	<223> 具有鼠源化恒定区和2A接头的Radium-1 scTCR		
[1193]	<400> 37		
[1194]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val		
[1195]	1	5	10 15
[1196]	Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile		
[1197]		20	25 30
[1198]	Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser		
[1199]		35	40 45
[1200]	Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile		
[1201]	50	55	60
[1202]	Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser		
[1203]	65	70	75 80
[1204]	Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser		
[1205]		85	90 95
[1206]	Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly		
[1207]		100	105 110
[1208]	Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro Ile		
[1209]		115	120 125
[1210]	Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln		
[1211]	130	135	140
[1212]	Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val		
[1213]	145	150	155 160
[1214]	Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu		
[1215]		165	170 175
[1216]	Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser		
[1217]		180	185 190

[1218]	Asn	Gln	Thr	Ser	Phe	Thr	Cys	Gln	Asp	Ile	Phe	Lys	Glu	Thr	Asn	Ala
[1219]				195				200					205			
[1220]	Thr	Tyr	Pro	Ser	Ser	Asp	Val	Pro	Cys	Asp	Ala	Thr	Leu	Thr	Glu	Lys
[1221]			210					215					220			
[1222]	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Met	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Val	Met
[1223]	225					230					235					240
[1224]	Gly	Leu	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu	Met
[1225]					245					250						255
[1226]	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser	Arg	Ala	Lys	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr
[1227]				260						265						270
[1228]	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly
[1229]			275					280								285
[1230]	Pro	Met	Gly	Ile	Arg	Leu	Leu	Cys	Arg	Val	Ala	Phe	Cys	Phe	Leu	Ala
[1231]		290						295								300
[1232]	Val	Gly	Leu	Val	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Gln	Ser	Ser	Arg	Tyr	Leu	Val
[1233]	305					310					315					320
[1234]	Lys	Arg	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Phe	Leu	Glu	Cys	Val	Gln	Asp	Met	Asp
[1235]					325					330						335
[1236]	His	Glu	Asn	Met	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg
[1237]				340						345						350
[1238]	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Asp	Val	Lys	Met	Lys	Glu	Lys	Gly	Asp	Ile
[1239]			355					360								365
[1240]	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Lys	Lys	Glu	Arg	Phe	Ser	Leu
[1241]		370						375								380
[1242]	Ile	Leu	Glu	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn	Gln	Thr	Ser	Met	Tyr	Leu	Cys	Ala
[1243]	385					390					395					400
[1244]	Ser	Ser	Ser	Gly	Val	Thr	Gly	Glu	Leu	Phe	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Arg
[1245]					405						410					415
[1246]	Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	Asn	Val	Thr	Pro	Pro	Lys	Val	Ser
[1247]				420						425						430
[1248]	Leu	Phe	Glu	Pro	Ser	Lys	Ala	Glu	Ile	Ala	Asn	Lys	Gln	Lys	Ala	Thr
[1249]			435					440								445
[1250]	Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Arg	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser
[1251]		450						455								460
[1252]	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Ser	Thr	Asp	Pro
[1253]	465					470					475					480
[1254]	Gln	Ala	Tyr	Lys	Glu	Ser	Asn	Tyr	Ser	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu
[1255]					485						490					495
[1256]	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	His	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys
[1257]				500						505						510
[1258]	Gln	Val	Gln	Phe	His	Gly	Leu	Ser	Glu	Glu	Asp	Lys	Trp	Pro	Glu	Gly
[1259]			515							520						525

[1260]	Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
[1261]	530 535 540
[1262]	Ala
[1263]	545
[1264]	<210> 38
[1265]	<211> 545
[1266]	<212> PRT
[1267]	<213> 人工序列
[1268]	<220>
[1269]	<223> 具有半胱氨酸修饰的鼠源化恒定区和2A接头的Radium-1 scTCR
[1270]	<400> 38
[1271]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val
[1272]	1 5 10 15
[1273]	Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile
[1274]	20 25 30
[1275]	Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser
[1276]	35 40 45
[1277]	Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile
[1278]	50 55 60
[1279]	Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser
[1280]	65 70 75 80
[1281]	Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser
[1282]	85 90 95
[1283]	Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly
[1284]	100 105 110
[1285]	Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro Ile
[1286]	115 120 125
[1287]	Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln
[1288]	130 135 140
[1289]	Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val
[1290]	145 150 155 160
[1291]	Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu
[1292]	165 170 175
[1293]	Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser
[1294]	180 185 190
[1295]	Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala
[1296]	195 200 205
[1297]	Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys
[1298]	210 215 220
[1299]	Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met
[1300]	225 230 235 240
[1301]	Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met

[1302]	245							250							255			
[1303]	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser	Arg	Ala	Lys	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala	Thr		
[1304]	260							265							270			
[1305]	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro	Gly		
[1306]	275							280							285			
[1307]	Pro	Met	Gly	Ile	Arg	Leu	Leu	Cys	Arg	Val	Ala	Phe	Cys	Phe	Leu	Ala		
[1308]	290							295							300			
[1309]	Val	Gly	Leu	Val	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Gln	Ser	Ser	Arg	Tyr	Leu	Val		
[1310]	305							310							315			320
[1311]	Lys	Arg	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Phe	Leu	Glu	Cys	Val	Gln	Asp	Met	Asp		
[1312]	325							330							335			
[1313]	His	Glu	Asn	Met	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg		
[1314]	340							345							350			
[1315]	Leu	Ile	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Asp	Val	Lys	Met	Lys	Glu	Lys	Gly	Asp	Ile		
[1316]	355							360							365			
[1317]	Pro	Glu	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Lys	Lys	Glu	Arg	Phe	Ser	Leu		
[1318]	370							375							380			
[1319]	Ile	Leu	Glu	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn	Gln	Thr	Ser	Met	Tyr	Leu	Cys	Ala		
[1320]	385							390							395			400
[1321]	Ser	Ser	Ser	Gly	Val	Thr	Gly	Glu	Leu	Phe	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Arg		
[1322]	405							410							415			
[1323]	Leu	Thr	Val	Leu	Glu	Asp	Leu	Arg	Asn	Val	Thr	Pro	Pro	Lys	Val	Ser		
[1324]	420							425							430			
[1325]	Leu	Phe	Glu	Pro	Ser	Lys	Ala	Glu	Ile	Ala	Asn	Lys	Gln	Lys	Ala	Thr		
[1326]	435							440							445			
[1327]	Leu	Val	Cys	Leu	Ala	Arg	Gly	Phe	Phe	Pro	Asp	His	Val	Glu	Leu	Ser		
[1328]	450							455							460			
[1329]	Trp	Trp	Val	Asn	Gly	Lys	Glu	Val	His	Ser	Gly	Val	Cys	Thr	Asp	Pro		
[1330]	465							470							475			480
[1331]	Gln	Ala	Tyr	Lys	Glu	Ser	Asn	Tyr	Ser	Tyr	Cys	Leu	Ser	Ser	Arg	Leu		
[1332]	485							490							495			
[1333]	Arg	Val	Ser	Ala	Thr	Phe	Trp	His	Asn	Pro	Arg	Asn	His	Phe	Arg	Cys		
[1334]	500							505							510			
[1335]	Gln	Val	Gln	Phe	His	Gly	Leu	Ser	Glu	Glu	Asp	Lys	Trp	Pro	Glu	Gly		
[1336]	515							520							525			
[1337]	Ser	Pro	Lys	Pro	Val	Thr	Gln	Asn	Ile	Ser	Ala	Glu	Ala	Trp	Gly	Arg		
[1338]	530							535							540			
[1339]	Ala																	
[1340]	545																	
[1341]	<210> 39																	
[1342]	<211> 565																	
[1343]	<212> PRT																	

[1344]	<213> 人工序列															
[1345]	<220>															
[1346]	<223> 具有鼠源化恒定区和双Myc标签的Radium-1 scTCR															
[1347]	<400> 39															
[1348]	Met	Lys	Arg	Ile	Leu	Gly	Ala	Leu	Leu	Gly	Leu	Leu	Ser	Ala	Gln	Val
[1349]	1				5					10					15	
[1350]	Cys	Cys	Val	Arg	Glu	Gln	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Glu	Gln
[1351]					20					25					30	
[1352]	Lys	Leu	Ile	Ser	Glu	Glu	Asp	Leu	Gly	Ile	Gln	Val	Glu	Gln	Ser	Pro
[1353]					35					40					45	
[1354]	Pro	Asp	Leu	Ile	Leu	Gln	Glu	Gly	Ala	Asn	Ser	Thr	Leu	Arg	Cys	Asn
[1355]					50					55					60	
[1356]	Phe	Ser	Asp	Ser	Val	Asn	Asn	Leu	Gln	Trp	Phe	His	Gln	Asn	Pro	Trp
[1357]	65					70					75					80
[1358]	Gly	Gln	Leu	Ile	Asn	Leu	Phe	Tyr	Ile	Pro	Ser	Gly	Thr	Lys	Gln	Asn
[1359]					85					90						95
[1360]	Gly	Arg	Leu	Ser	Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Thr	Glu	Arg	Tyr	Ser	Leu	Leu
[1361]					100					105					110	
[1362]	Tyr	Ile	Ser	Ser	Ser	Gln	Thr	Thr	Asp	Ser	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala
[1363]					115					120					125	
[1364]	Val	Asn	Ala	Gly	Asn	Met	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Met
[1365]					130					135					140	
[1366]	Val	Lys	Pro	Ile	Gln	Asn	Pro	Glu	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Lys	Asp
[1367]	145					150					155					160
[1368]	Pro	Arg	Ser	Gln	Asp	Ser	Thr	Leu	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser
[1369]					165					170					175	
[1370]	Gln	Ile	Asn	Val	Pro	Lys	Thr	Met	Glu	Ser	Gly	Thr	Phe	Ile	Thr	Asp
[1371]					180					185					190	
[1372]	Lys	Thr	Val	Leu	Asp	Met	Lys	Ala	Met	Asp	Ser	Lys	Ser	Asn	Gly	Ala
[1373]					195					200					205	
[1374]	Ile	Ala	Trp	Ser	Asn	Gln	Thr	Ser	Phe	Thr	Cys	Gln	Asp	Ile	Phe	Lys
[1375]					210					215					220	
[1376]	Glu	Thr	Asn	Ala	Thr	Tyr	Pro	Ser	Ser	Asp	Val	Pro	Cys	Asp	Ala	Thr
[1377]	225					230					235					240
[1378]	Leu	Thr	Glu	Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Met	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln	Asn
[1379]					245					250					255	
[1380]	Leu	Ser	Val	Met	Gly	Leu	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Phe
[1381]					260					265					270	
[1382]	Asn	Leu	Leu	Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser	Arg	Ala	Lys	Arg	Gly
[1383]					275					280					285	
[1384]	Ser	Gly	Ala	Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu
[1385]					290					295					300	

[1386]	Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe		
[1387]	305	310	315 320
[1388]	Cys Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser		
[1389]		325 330	335
[1390]	Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val		
[1391]		340 345	350
[1392]	Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly		
[1393]		355 360	365
[1394]	Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu		
[1395]		370 375	380
[1396]	Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu		
[1397]		385 390	395 400
[1398]	Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met		
[1399]		405 410	415
[1400]	Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly		
[1401]		420 425	430
[1402]	Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro		
[1403]		435 440	445
[1404]	Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys		
[1405]		450 455	460
[1406]	Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His		
[1407]		465 470	475 480
[1408]	Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val		
[1409]		485 490	495
[1410]	Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu		
[1411]		500 505	510
[1412]	Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn		
[1413]		515 520	525
[1414]	His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys		
[1415]		530 535	540
[1416]	Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu		
[1417]		545 550	555 560
[1418]	Ala Trp Gly Arg Ala		
[1419]		565	
[1420]	<210> 40		
[1421]	<211> 565		
[1422]	<212> PRT		
[1423]	<213> 人工序列		
[1424]	<220>		
[1425]	<223> 具有半胱氨酸修饰的鼠源化恒定区和2A接头和双Myc标签的Radium-1 scTCR		
[1426]	<400> 40		
[1427]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val		

[1428]	1	5	10	15
[1429]	Cys Cys Val Arg Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Glu Gln			
[1430]		20	25	30
[1431]	Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro			
[1432]		35	40	45
[1433]	Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn			
[1434]		50	55	60
[1435]	Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp			
[1436]	65	70	75	80
[1437]	Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn			
[1438]		85	90	95
[1439]	Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu			
[1440]		100	105	110
[1441]	Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala			
[1442]		115	120	125
[1443]	Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met			
[1444]		130	135	140
[1445]	Val Lys Pro Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp			
[1446]	145	150	155	160
[1447]	Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser			
[1448]		165	170	175
[1449]	Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp			
[1450]		180	185	190
[1451]	Lys Cys Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala			
[1452]		195	200	205
[1453]	Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys			
[1454]		210	215	220
[1455]	Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr			
[1456]	225	230	235	240
[1457]	Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn			
[1458]		245	250	255
[1459]	Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe			
[1460]		260	265	270
[1461]	Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser Arg Ala Lys Arg Gly			
[1462]		275	280	285
[1463]	Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu			
[1464]		290	295	300
[1465]	Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe			
[1466]	305	310	315	320
[1467]	Cys Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser			
[1468]		325	330	335
[1469]	Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val			

[1470]	340	345	350
[1471]	Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly		
[1472]	355	360	365
[1473]	Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu		
[1474]	370	375	380
[1475]	Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu		
[1476]	385	390	395 400
[1477]	Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met		
[1478]	405	410	415
[1479]	Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly		
[1480]	420	425	430
[1481]	Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro		
[1482]	435	440	445
[1483]	Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys		
[1484]	450	455	460
[1485]	Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His		
[1486]	465	470	475 480
[1487]	Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val		
[1488]	485	490	495
[1489]	Cys Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu		
[1490]	500	505	510
[1491]	Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn		
[1492]	515	520	525
[1493]	His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys		
[1494]	530	535	540
[1495]	Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu		
[1496]	545	550	555 560
[1497]	Ala Trp Gly Arg Ala		
[1498]	565		
[1499]	<210> 41		
[1500]	<211> 1815		
[1501]	<212> DNA		
[1502]	<213> 人工序列		
[1503]	<220>		
[1504]	<223> 编码 SEQ ID NO: 33		
[1505]	<400> 41		
[1506]	atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga 60		
[1507]	ggaatacaag tggagcagag tcttccagac ctgattctcc aggaggagc caattccacg 120		
[1508]	ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgcagt ggtttcatca aaacccttgg 180		
[1509]	ggacagctca tcaacctgtt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc 240		
[1510]	gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca 300		
[1511]	gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga 360		

[1512]	acaaggttaa tggtaaacc ccatatccag aaccctgacc ctgccgtgta ccagctgaga	420
[1513]	gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcaccg attttgattc tcaaacaaat	480
[1514]	gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat atcacagaca aaactgtgct agacatgagg	540
[1515]	tctatggact tcaagagcaa cagtgtctgt gcctggagca acaaactctga ctttgcatgt	600
[1516]	gcaaacgcct tcaacaacag cattattcca gaagacacct tcttccccag cccagaaagt	660
[1517]	tcctgtgatg tcaagctggt cgagaaaagc tttgaaacag atacgaacct aaactttcaa	720
[1518]	aacctgtcag tgattgggtt ccgaatcctc ctctctaaaag tggccgggtt taatctgctc	780
[1519]	atgacgtgc ggctgtggc cagcagagcc aagagaggca gcggcgccac caacttcagc	840
[1520]	ctgctgaagc aggccggcga cgtggaagag aaccctggac caatgggaat caggctcctc	900
[1521]	tgctgtgtgg cttttgttt cctggctgta ggcctcgtag atgtgaaagt aaccagagc	960
[1522]	tcgagatata tagtcaaaag gacgggagag aaagtttttc tggaatgtgt ccagatatg	1020
[1523]	gaccatgaaa atatgttctg gtatcgacaa gaccaggtc tggggctacg gctgatctat	1080
[1524]	ttctcatatg atgttaaaat gaaagaaaaa ggagatatc ctgaggggta cagtgtctct	1140
[1525]	agagagaaga aggagcgctt ctccctgatt ctggagtccg ccagcaccaa ccagacatct	1200
[1526]	atgtacctct gtgccagcag ttctggagtc accggggagc tgtttttttg agaaggctct	1260
[1527]	aggtgaccg tactggagga cctgaaaaac gtgttccac ccgaggtcgc tgtgtttgag	1320
[1528]	ccatcagaag cagagatctc ccacaccaa aaggccacac tgggtgtgcct ggccacaggc	1380
[1529]	ttctaccccg accacgtgga gctgagctgg tgggtgaatg ggaaggaggt gcacagtggg	1440
[1530]	gtcagcacag acccgagcc cctcaaggag cagcccgccc tcaatgactc cagatactgc	1500
[1531]	ctgagcagcc gcctgagggt ctggccacc ttctggcaga accccgcaa ccacttcgc	1560
[1532]	tgtaagtc agttctacgg gctctcgag aatgacgagt ggaccagga tagggccaaa	1620
[1533]	cctgtcacc agatcgtcag cgccgaggcc tggggtagag cagactgtgg cttcacctcc	1680
[1534]	gagtcttacc agcaaggggt cctgtctgcc accatcctct atgagatctt gctaggaag	1740
[1535]	gccaccttgt atgccgtgct ggtcagtgc ctcgtgctga tggccatggt caagagaaag	1800
[1536]	gattccagag gctag	1815
[1537]	<210>	42
[1538]	<211>	1815
[1539]	<212>	DNA
[1540]	<213>	人工序列
[1541]	<220>	
[1542]	<223>	编码 SEQ ID NO: 34
[1543]	<400>	42
[1544]	atgaagagga tattgggagc tctgtctggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga	60
[1545]	ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggaggagc caattccacg	120
[1546]	ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgcagt ggtttcatca aaacccttgg	180
[1547]	ggacagctca tcaacctgtt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc	240
[1548]	gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca	300
[1549]	gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgetcacctt tggaggggga	360
[1550]	acaaggttaa tggtaaacc ccatatccag aaccctgacc ctgccgtgta ccagctgaga	420
[1551]	gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattcaccg attttgattc tcaaacaaat	480
[1552]	gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat atcacagaca aatgcgtgct agacatgagg	540
[1553]	tctatggact tcaagagcaa cagtgtctgt gcctggagca acaaactctga ctttgcatgt	600

[1554]	gcaaacgcct tcaacaacag cattattcca gaagacacct tcttccccag cccagaaagt	660
[1555]	tcctgtgatg tcaagctggg cgagaaaagc ttgaaacag atacgaacct aaactttcaa	720
[1556]	aacctgtcag tgattgggtt ccgaatcctc ctctaaaag tggccgggtt taatctgctc	780
[1557]	atgacgtgc ggctgtggc cagcagagcc aagagaggca gcggcgccac caacttcagc	840
[1558]	ctgtgaagc aggcggcgga cgtggaagag aaccctggac caatgggaat caggctcctc	900
[1559]	tgctgtgtgg cttttgttt cctggctgta ggcctcgtag atgtgaaagt aaccagagc	960
[1560]	tcgatatatc tagtcaaaag gacgggagag aaagttttcc tggaatgtgt ccaggatatg	1020
[1561]	gaccatgaaa atatgttctg gtatcgacaa gaccaggtc tggggctacg gctgatctat	1080
[1562]	ttctcatatg atgttaaaat gaaagaaaaa ggagatatcc ctgaggggta cagtgtctct	1140
[1563]	agagagaaga aggagcgctt ctccctgatt ctggagtcgc ccagcaccaa ccagacatct	1200
[1564]	atgtacctct gtgccagcag ttctggagtc accggggagc tgtttttttg agaaggctct	1260
[1565]	aggctgaccg tactggagga cctgaaaaac gtgttccac ccgaggtcgc tgtgtttgag	1320
[1566]	ccatcagaag cagagatctc ccacaccaa aaggccacac tgggtgtgcct ggccacaggc	1380
[1567]	ttctaccccg accacgtgga gctgagctgg tgggtgaatg ggaaggaggt gcacagtggg	1440
[1568]	gtctgtacag accgcagcc cctcaaggag cagcccgccc tcaatgactc cagatactgc	1500
[1569]	ctgagcagcc gcctgagggt ctcgccacc ttctggcaga accccgcaa ccacttccgc	1560
[1570]	tgtcaagtcc agttctacgg gctctcggag aatgacgagt ggaccagga tagggccaaa	1620
[1571]	cctgtcacc agatcgtcag cgccgaggcc tggggtagag cagactgtgg cttcacctcc	1680
[1572]	gagtcttacc agcaaggggt cctgtctgcc accatcctct atgagatctt gctaggaag	1740
[1573]	gccaccttgt atgccgtgct ggtcagtgcc ctctgtctga tggccatggt caagagaaag	1800
[1574]	gattccagag gctag	1815
[1575]	<210>	43
[1576]	<211>	1875
[1577]	<212>	DNA
[1578]	<213>	人工序列
[1579]	<220>	
[1580]	<223>	编码 SEQ ID NO: 35
[1581]	<400>	43
[1582]	atgaagagga tattgggagc tctgtgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga	60
[1583]	gagcagaagc tgatcagcga ggaggacctg gagcagaagc tgatcagcga ggaggacctg	120
[1584]	ggaatacaag tggagcagag tctccagac ctgattctcc aggaggagc caattccacg	180
[1585]	ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgagc ggtttcatca aaacccttgg	240
[1586]	ggacagctca tcaacctgtt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc	300
[1587]	gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca ttctctctc ccagaccaca	360
[1588]	gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga	420
[1589]	acaaggttaa tgggtcaaac ccatatccag aaccctgacc ctgccgtgta ccagctgaga	480
[1590]	gactctaaat ccagtgacaa gtctgtctgc ctattaccg attttgattc tcaacaaat	540
[1591]	gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat atcacagaca aaactgtgct agacatgagg	600
[1592]	tctatggact tcaagagcaa cagtgtgtg gcctggagca acaaatctga ctttgcatgt	660
[1593]	gcaaacgcct tcaacaacag cattattcca gaagacacct tcttccccag cccagaaagt	720
[1594]	tcctgtgatg tcaagctggg cgagaaaagc ttgaaacag atacgaacct aaactttcaa	780
[1595]	aacctgtcag tgattgggtt ccgaatcctc ctctaaaag tggccgggtt taatctgctc	840

[1596]	atgacgctgc	ggctgtggtc	cagcagagcc	aagagaggca	gcggcgccac	caacttcagc	900
[1597]	ctgctgaagc	aggccggcga	cgtggaagag	aaccctggac	caatgggaat	caggctcctc	960
[1598]	tgctgtgtgg	ccttttgttt	cctggctgta	ggcctcgtag	atgtgaaagt	aaccagagc	1020
[1599]	tccagatata	tagtcaaaag	gacgggagag	aaagtttttc	tggaatgtgt	ccaggatatg	1080
[1600]	gaccatgaaa	atatgttctg	gtatcgacaa	gacccaggtc	tggggctacg	gctgatctat	1140
[1601]	ttctcatatg	atgttaaaat	gaaagaaaaa	ggagatattc	ctgaggggta	cagtgtctct	1200
[1602]	agagagaaga	aggagcgctt	ctccctgatt	ctggagtccg	ccagcaccaa	ccagacatct	1260
[1603]	atgtacctct	gtgccagcag	ttctggagtc	accggggagc	tgtttttttg	agaaggctct	1320
[1604]	aggctgaccg	tactggagga	cctgaaaaac	gtgttcccac	ccgaggtcgc	tgtgtttgag	1380
[1605]	ccatcagaag	cagagatctc	ccacacccaa	aaggccacac	tgggtgtgct	ggccacaggc	1440
[1606]	ttctaccccg	accacgtgga	gctgagctgg	tgggtgaatg	ggaaggaggt	gcacagtggg	1500
[1607]	gtcagcacag	acccgcagcc	cctcaaggag	cagcccggcc	tcaatgactc	cagatactgc	1560
[1608]	ctgagcagcc	gcctgagggt	ctcggccacc	ttctggcaga	acccccgcaa	ccacttccgc	1620
[1609]	tgtcaagtcc	agttctacgg	gctctcggag	aatgacgagt	ggaccagga	tagggccaaa	1680
[1610]	cctgtcaccc	agatcgtcag	cgccgaggcc	tggggtagag	cagactgtgg	cttcacctcc	1740
[1611]	gagtcttacc	agcaaggggt	cctgtctgcc	accatcctct	atgagatctt	gctaggaag	1800
[1612]	gccaccttgt	atgccgtgct	ggtcagtgcc	ctcgtgctga	tggccatggt	caagagaaag	1860
[1613]	gattccagag gctag 1875						
[1614]	<210> 44						
[1615]	<211> 1875						
[1616]	<212> DNA						
[1617]	<213> 人工序列						
[1618]	<220>						
[1619]	<223> 编码 SEQ ID NO: 36						
[1620]	<400> 44						
[1621]	atgaagagga	tattgggagc	tctgctgggg	ctcttgagtg	cccaggtttg	ctgtgtgaga	60
[1622]	gagcagaagc	tgatcagcga	ggaggacctg	gagcagaagc	tgatcagcga	ggaggacctg	120
[1623]	ggaatacaag	tggagcagag	tcctccagac	ctgattctcc	aggagggagc	caattccacg	180
[1624]	ctgcggtgca	atttttctga	ctctgtgaac	aatttgagtg	ggtttcatca	aaaccttgg	240
[1625]	ggacagctca	tcaacctgtt	ttacattccc	tcagggacaa	aacagaatgg	aagattaagc	300
[1626]	gccacgactg	tcgctacgga	acgctacagc	ttattgtaca	tttctcttcc	ccagaccaca	360
[1627]	gactcaggcg	tttatttctg	tgctgtgaat	gcaggcaaca	tgctcacctt	tggaggggga	420
[1628]	acaaggttaa	tgggtcaaac	ccatatccag	aaccctgacc	ctgccgtgta	ccagctgaga	480
[1629]	gactctaaat	ccagtacaaa	gtctgtctgc	ctattcaccg	attttgattc	tcaaacaaat	540
[1630]	gtgtcacaaa	gtaaggattc	tgatgtgtat	atcacagaca	aatgcgtgct	agacatgagg	600
[1631]	tctatggact	tcaagagcaa	cagtgtgtgt	gcctggagca	acaaatctga	ctttgcatgt	660
[1632]	gcaaacgcct	tcaacaacag	cattattcca	gaagacacct	tcttccccag	cccagaaagt	720
[1633]	tcctgtgatg	tcaagctggt	cgagaaaagc	tttgaaacag	atacgaacct	aaactttcaa	780
[1634]	aacctgtcag	tgattgggtt	ccgaatcctc	ctcctaaaag	tggccgggtt	taatctgctc	840
[1635]	atgacgctgc	ggctgtggtc	cagcagagcc	aagagaggca	gcggcgccac	caacttcagc	900
[1636]	ctgctgaagc	aggccggcga	cgtggaagag	aaccctggac	caatgggaat	caggctcctc	960
[1637]	tgctgtgtgg	ccttttgttt	cctggctgta	ggcctcgtag	atgtgaaagt	aaccagagc	1020

[1638]	tcgagatatc tagtcaaaag gacgggagag aaagtttttc tggaatgtgt ccaggatatg	1080
[1639]	gaccatgaaa atatgttctg gtatcgacaa gacccaggtc tggggctacg gctgatctat	1140
[1640]	ttctcatatg atgttaaaat gaaagaaaaa ggagatatc ctgaggggta cagtgtctct	1200
[1641]	agagagaaga aggagcgctt ctccctgatt ctggagtccg ccagcaccaa ccagacatct	1260
[1642]	atgtacctct gtgccagcag ttctggagtc accggggagc tgtttttttg agaaggctct	1320
[1643]	aggctgaccg tactggagga cctgaaaaac gtgttccac ccgaggtcgc tgtgtttgag	1380
[1644]	ccatcagaag cagagatctc ccacaccaa aaggccacac tgggtgtgcct ggccacaggc	1440
[1645]	ttctaccccg accacgtgga gctgagctgg tgggtgaatg ggaaggaggt gcacagtggg	1500
[1646]	gtctgtacag acccgagcc cctcaaggag cagcccgccc tcaatgactc cagatactgc	1560
[1647]	ctgagcagcc gcctgagggt ctcgccacc ttctggcaga acccccgcaa ccacttccgc	1620
[1648]	tgtcaagtcc agttctacgg gctctcgag aatgacgagt ggaccagga tagggccaaa	1680
[1649]	cctgtcacc agatcgtcag cgccgaggcc tgggtagag cagactgtgg cttcacctcc	1740
[1650]	gagtcttacc agcaagggt cctgtctgcc accatcctct atgagatctt gctagggaag	1800
[1651]	gccaccttgt atgccgtgct ggtcagtgcc ctctgtctga tggccatggt caagagaaag	1860
[1652]	gattccagag gctag 1875	
[1653]	<210> 45	
[1654]	<211> 1638	
[1655]	<212> DNA	
[1656]	<213> 人工序列	
[1657]	<220>	
[1658]	<223> 编码 SEQ ID NO: 37	
[1659]	<400> 45	
[1660]	atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga	60
[1661]	ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccacg	120
[1662]	ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgagcgt ggtttcatca aaacccttgg	180
[1663]	ggacagctca tcaacctgtt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc	240
[1664]	gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca	300
[1665]	gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga	360
[1666]	acaaggttaa tgggtcaaacc catccagaac ccagaacctg ctgtgtacca gttaaaagat	420
[1667]	cctcggtctc aggacagcac cctctgcctg ttcaccgact ttgactccca aatcaatgtg	480
[1668]	ccgaaaacca tggaatctgg aacgttcac actgacaaaa ctgtgctgga catgaaagct	540
[1669]	atggattcca agagcaatgg ggccattgcc tggagcaacc agacaagctt cacctgcca	600
[1670]	gatatcttca aagagaccaa cgccacctac ccagttcag acgttccttg tgatgccacg	660
[1671]	ttgactgaga aaagctttga aacagatatg aacctaaact ttcaaaacct gtcagttatg	720
[1672]	ggactccgaa tcctcctgct gaaagtagcc ggatttaacc tgctcatgac gctgaggctg	780
[1673]	tgggtccagta gagccaagag aggcagcggc gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc	840
[1674]	ggcgacgtgg aagagaaccc tggaccaatg ggaatcaggc tcctctgtcg tgtggccttt	900
[1675]	tgtttcctgg ctgtaggcct cgtagatgtg aaagtaaccc agagctcgag atatctagtc	960
[1676]	aaaaggacgg gagagaaagt ttttctggaa tgtgtccagg atatggacca tgaataatg	1020
[1677]	ttctggtatc gacaagaccc aggtctgggg ctacggctga tctatttctc atatgatgtt	1080
[1678]	aaaatgaaag aaaaaggaga tattcctgag gggtagctg tctctagaga gaagaaggag	1140
[1679]	cgcttctccc tgattctgga gtccgccagc accaaccaga catctatgta cctctgtgcc	1200

[1680]	agcagttctg gagtcaccgg ggagctgttt tttggagaag gctctaggct gaccgtactg	1260
[1681]	gaggatctga gaaatgtgac tccaccaag gtctccttgt ttgagccatc aaaagcagag	1320
[1682]	attgcaaaca aacaaaaggc taccctcgtg tgcttggcca ggggcttctt ccctgaccac	1380
[1683]	gtggagctga gctggtgggt gaatggcaag gaggtccaca gtggggctcag cacggaccct	1440
[1684]	caggcctaca aggagagcaa ttatagctac tgcctgagca gccgcctgag ggtctctgct	1500
[1685]	accttctggc acaatcctcg aaaccacttc cgctgccaaag tgcagttcca tgggctttca	1560
[1686]	gaggaggaca agtggccaga gggctcacc aaacctgtca cacagaacat cagtgcagag	1620
[1687]	gcctggggcc gagcatag	1638
[1688]	<210>	46
[1689]	<211>	1638
[1690]	<212>	DNA
[1691]	<213>	人工序列
[1692]	<220>	
[1693]	<223>	编码 SEQ ID NO: 38
[1694]	<400>	46
[1695]	atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga	60
[1696]	ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggaggagc caattccacg	120
[1697]	ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgcagt ggtttcatca aaacccttgg	180
[1698]	ggacagctca tcaacctgtt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc	240
[1699]	gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca ttctctcttc ccagaccaca	300
[1700]	gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga	360
[1701]	acaaggttaa tggtaaacc catccagaac ccagaacctg ctgtgtacca gttaaaagat	420
[1702]	cctcggtctc aggacagcac cctctgcctg ttcaccgact ttgactccca aatcaatgtg	480
[1703]	ccgaaaacca tggaatctgg aacgttcatc actgacaaat gcgtgctgga catgaaagct	540
[1704]	atggattcca agagcaatgg ggccattgcc tggagcaacc agacaagctt cacctgccaa	600
[1705]	gatatcttca aagagaccaa cgccacctac cccagttcag acgttccctg tgatgccacg	660
[1706]	ttgactgaga aaagcttga aacagatatg aacctaaact ttcaaacct gtcagttatg	720
[1707]	ggactccgaa tcctcctgct gaaagtagcc ggatttaacc tgctcatgac gctgaggctg	780
[1708]	tggctccagta gagccaagag aggcagcggc gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc	840
[1709]	ggcgacgtgg aagagaacct tggaccaatg ggaatcaggc tcctctgtcg tgtggccttt	900
[1710]	tgtttctctg ctgtaggcct cgtagatgtg aaagtaacct agagctcgag atatctagtc	960
[1711]	aaaaggacgg gagagaaagt ttttctggaa tgtgtccagg atatggacca tgaaaatatg	1020
[1712]	ttctggtatc gacaagacct aggtctgggg ctacggctga tctatttctc atatgatgtt	1080
[1713]	aaaatgaaag aaaaaggaga tattcctgag gggtacagtg tctctagaga gaagaaggag	1140
[1714]	cgcttctccc tgattctgga gtccgccagc accaaccaga catctatgta cctctgtgcc	1200
[1715]	agcagttctg gagtcaccgg ggagctgttt tttggagaag gctctaggct gaccgtactg	1260
[1716]	gaggatctga gaaatgtgac tccaccaag gtctccttgt ttgagccatc aaaagcagag	1320
[1717]	attgcaaaca aacaaaaggc taccctcgtg tgcttggcca ggggcttctt ccctgaccac	1380
[1718]	gtggagctga gctggtgggt gaatggcaag gaggtccaca gtggggctctg tacggaccct	1440
[1719]	caggcctaca aggagagcaa ttatagctac tgcctgagca gccgcctgag ggtctctgct	1500
[1720]	accttctggc acaatcctcg aaaccacttc cgctgccaaag tgcagttcca tgggctttca	1560
[1721]	gaggaggaca agtggccaga gggctcacc aaacctgtca cacagaacat cagtgcagag	1620

[1722] gcctggggcc gagcatag 1638
 [1723] <210> 47
 [1724] <211> 1698
 [1725] <212> DNA
 [1726] <213> 人工序列
 [1727] <220>
 [1728] <223> 编码 SEQ ID NO: 39
 [1729] <400> 47
 [1730] atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga 60
 [1731] gagcagaagc tgatcagcga ggaggacctg gagcagaagc tgatcagcga ggaggacctg 120
 [1732] ggaataacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccacg 180
 [1733] ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgagcgt ggtttcatca aaacccttgg 240
 [1734] ggacagctca tcaacctgtt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc 300
 [1735] gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca 360
 [1736] gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga 420
 [1737] acaaggttaa tgggtcaaacc catccagaac ccagaacctg ctgtgtacca gttaaaagat 480
 [1738] cctcggtctc aggacagcac cctctgcctg ttcaccgact ttgactccca aatcaatgtg 540
 [1739] ccgaaaacca tggaatctgg aacgttcac actgacaaaa ctgtgctgga catgaaagct 600
 [1740] atggattcca agagcaatgg ggccattgcc tggagcaacc agacaagctt cacctgcca 660
 [1741] gatattctca aagagaccaa cgccacctac cccagttcag acgttccctg tgatgccacg 720
 [1742] ttgactgaga aaagctttga aacagatatg aacctaaact ttcaaacct gtcagttatg 780
 [1743] ggactccgaa tcctcctgct gaaagtagcc ggatttaacc tgctcatgac gctgaggctg 840
 [1744] tgggtccagta gagccaagag aggcagcggc gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc 900
 [1745] ggcgacgtgg aagagaaccc tggaccaatg ggaatcaggc tcctctgtcg tgtggccttt 960
 [1746] tgtttcctgg ctgtaggcct cgtagatgtg aaagtaaccc agagctcgag atatctagtc 1020
 [1747] aaaaggacgg gagagaaagt ttttctggaa tgtgtccagg atatggacca tgaaaatatg 1080
 [1748] ttctggtatc gacaagaccc aggtctgggg ctacggctga tctatttctc atatgatgtt 1140
 [1749] aaaaatgaaag aaaaaggaga tattcctgag gggtagctg tctctagaga gaagaaggag 1200
 [1750] cgcttctccc tgattctgga gtccgccagc accaaccaga catctatgta cctctgtgcc 1260
 [1751] agcagttctg gagtcaccgg ggagctgttt tttggagaag gctctaggct gaccgtactg 1320
 [1752] gaggatctga gaaatgtgac tccaccaag gtctccttgt ttgagccatc aaaagcagag 1380
 [1753] attgcaaaca aacaaaaggc taccctcgtg tgcttgccca ggggcttctt ccctgaccac 1440
 [1754] gtggagctga gctggtgggt gaatggcaag gaggtccaca gtggggtcag cacggacct 1500
 [1755] caggcctaca aggagagcaa ttatagctac tgccctgagca gccgcctgag ggtctctgct 1560
 [1756] accttctggc acaatcctcg aaaccacttc cgctgccaag tgcagttcca tgggctttca 1620
 [1757] gaggaggaca agtggccaga gggctcacc aaacctgtca cacagaacat cagtgcagag 1680
 [1758] gcctggggcc gagcatag 1698
 [1759] <210> 48
 [1760] <211> 1698
 [1761] <212> DNA
 [1762] <213> 人工序列
 [1763] <220>

[1764]	<223> 编码 SEQ ID NO: 40
[1765]	<400> 48
[1766]	atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga 60
[1767]	gagcagaagc tgatcagcga ggaggacctg gagcagaagc tgatcagcga ggaggacctg 120
[1768]	ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccacg 180
[1769]	ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgcaat ggtttcatca aaacccttgg 240
[1770]	ggacagctca tcaacctgtt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc 300
[1771]	gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca ttctctcttc ccagaccaca 360
[1772]	gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga 420
[1773]	acaaggttaa tgggtcaaacc catccagaac ccagaacctg ctgtgtacca gttaaaagat 480
[1774]	cctcggtctc aggacagcac cctctgcctg ttcaccgact ttgactccca aatcaatgtg 540
[1775]	ccgaaaacca tggaatctgg aacgttcac actgacaaat gcgtgctgga catgaaagct 600
[1776]	atggattcca agagcaatgg ggccattgcc tggagcaacc agacaagctt cacctgccaa 660
[1777]	gatatcttca aagagaccaa cgccacctac cccagttcag acgttccctg tgatgccacg 720
[1778]	ttgactgaga aaagctttga aacagatatg aacctaaact ttcaaaacct gtcagttatg 780
[1779]	ggactccgaa tcctcctgct gaaagtagcc ggatttaacc tgctcatgac gctgaggctg 840
[1780]	tggtccagta gagccaagag aggcagcggc gccaccaact tcagcctgct gaagcaggcc 900
[1781]	ggcgacgtgg aagagaaccc tggaccaatg ggaatcaggc tcctctgtcg tgtggccttt 960
[1782]	tgtttcctgg ctgtaggcct cgtagatgtg aaagtaaccc agagctcgag atatctagtc 1020
[1783]	aaaaggacgg gagagaaagt ttttctggaa tgtgtccagg atatggacca tgaaaatatg 1080
[1784]	ttctggtatc gacaagaccc aggtctgggg ctacggctga tctatttctc atatgatgtt 1140
[1785]	aaaatgaaag aaaaaggaga tattcctgag gggtacagtg tctctagaga gaagaaggag 1200
[1786]	cgcttctccc tgattctgga gtccgccagc accaaccaga catctatgta cctctgtgcc 1260
[1787]	agcagtcttg gagtcaccgg ggagctgttt tttggagaag gctctaggct gaccgtactg 1320
[1788]	gaggatctga gaaatgtgac tccaccaag gtctccttgt ttgagccatc aaaagcagag 1380
[1789]	attgcaaaca aacaaaaggc taccctctg tgcttgccca ggggcttctt ccctgaccac 1440
[1790]	gtggagctga gctggtgggt gaatggcaag gaggtccaca gtggggctctg tacggaccct 1500
[1791]	caggcctaca aggagagcaa ttatagctac tgcctgagca gccgcctgag ggtctctgct 1560
[1792]	accttctggc acaatcctcg aaaccacttc cgctgccaaag tgcagttcca tgggctttca 1620
[1793]	gaggaggaca agtggccaga gggctcaccc aaacctgtca cacagaacat cagtgcagag 1680
[1794]	gcctggggcc gagcatag 1698
[1795]	<210> 49
[1796]	<211> 23
[1797]	<212> PRT
[1798]	<213> 智人
[1799]	<400> 49
[1800]	Ser Leu Val Arg Leu Ser Ser Cys Val Pro Val Ala Leu Met Ser Ala
[1801]	1 5 10 15
[1802]	Met Thr Thr Ser Ser Ser Gln
[1803]	20
[1804]	<210> 50
[1805]	<211> 20

[1806]	<212>	PRT
[1807]	<213>	智人
[1808]	<400>	50
[1809]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val	
[1810]	1	5 10 15
[1811]	Cys Cys Val Arg	
[1812]	20	
[1813]	<210>	51
[1814]	<211>	16
[1815]	<212>	PRT
[1816]	<213>	智人
[1817]	<400>	51
[1818]	Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val	
[1819]	1	5 10 15
[1820]	<210>	52
[1821]	<211>	8
[1822]	<212>	PRT
[1823]	<213>	小RNA病毒
[1824]	<220>	
[1825]	<221>	X
[1826]	<222>	(2) .. (2)
[1827]	<223>	Val 或 Ile
[1828]	<220>	
[1829]	<221>	X
[1830]	<222>	(4) .. (4)
[1831]	<223>	任何氨基酸
[1832]	<400>	52
[1833]	Asp Xaa Glu Xaa Asn Pro Gly Pro	
[1834]	1	5
[1835]	<210>	53
[1836]	<211>	6
[1837]	<212>	DNA
[1838]	<213>	智人
[1839]	<400>	53
[1840]	aataaa	
[1841]	<210>	54
[1842]	<211>	9
[1843]	<212>	PRT
[1844]	<213>	智人
[1845]	<400>	54
[1846]	Ile Leu Ala Lys Phe Leu His Trp Leu	
[1847]	1	5

89

[1890]	<400> 60
[1891]	His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
[1892]	1 5 10 15
[1893]	Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
[1894]	20 25 30
[1895]	Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr
[1896]	35 40 45
[1897]	Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
[1898]	50 55 60
[1899]	Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
[1900]	65 70 75 80
[1901]	Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys
[1902]	85 90 95
[1903]	<210> 61
[1904]	<211> 95
[1905]	<212> PRT
[1906]	<213> 人工序列
[1907]	<220>
[1908]	<223> 半胱氨酸修饰的截短型Radium-1 α 链恒定区
[1909]	<400> 61
[1910]	His Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys
[1911]	1 5 10 15
[1912]	Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr
[1913]	20 25 30
[1914]	Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys
[1915]	35 40 45
[1916]	Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala
[1917]	50 55 60
[1918]	Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser
[1919]	65 70 75 80
[1920]	Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys
[1921]	85 90 95
[1922]	<210> 62
[1923]	<211> 131
[1924]	<212> PRT
[1925]	<213> 智人
[1926]	<400> 62
[1927]	Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
[1928]	1 5 10 15
[1929]	Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
[1930]	20 25 30
[1931]	Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn

[1932]	35	40	45
[1933]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys		
[1934]	50	55	60
[1935]	Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu		
[1936]	65	70	75
[1937]	Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys		
[1938]	85	90	95
[1939]	Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp		
[1940]	100	105	110
[1941]	Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg		
[1942]	115	120	125
[1943]	Ala Asp Cys		
[1944]	130		
[1945]	<210> 63		
[1946]	<211> 131		
[1947]	<212> PRT		
[1948]	<213> 人工序列		
[1949]	<220>		
[1950]	<223> 半胱氨酸修饰的截短型Radium-1 β 链恒定区		
[1951]	<400> 63		
[1952]	Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro		
[1953]	1	5	10
[1954]	Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu		
[1955]	20	25	30
[1956]	Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn		
[1957]	35	40	45
[1958]	Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys		
[1959]	50	55	60
[1960]	Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu		
[1961]	65	70	75
[1962]	Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys		
[1963]	85	90	95
[1964]	Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp		
[1965]	100	105	110
[1966]	Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg		
[1967]	115	120	125
[1968]	Ala Asp Cys		
[1969]	130		
[1970]	<210> 64		
[1971]	<211> 222		
[1972]	<212> PRT		
[1973]	<213> 智人		

[1974]	<400> 64
[1975]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val
[1976]	1 5 10 15
[1977]	Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile
[1978]	20 25 30
[1979]	Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser
[1980]	35 40 45
[1981]	Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile
[1982]	50 55 60
[1983]	Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser
[1984]	65 70 75 80
[1985]	Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser
[1986]	85 90 95
[1987]	Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly
[1988]	100 105 110
[1989]	Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His
[1990]	115 120 125
[1991]	Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser
[1992]	130 135 140
[1993]	Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn
[1994]	145 150 155 160
[1995]	Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val
[1996]	165 170 175
[1997]	Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp
[1998]	180 185 190
[1999]	Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile
[2000]	195 200 205
[2001]	Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys
[2002]	210 215 220
[2003]	<210> 65
[2004]	<211> 222
[2005]	<212> PRT
[2006]	<213> 人工序列
[2007]	<220>
[2008]	<223> 半胱氨酸修饰的截短型Radium-1 α 链
[2009]	<400> 65
[2010]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val
[2011]	1 5 10 15
[2012]	Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile
[2013]	20 25 30
[2014]	Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser
[2015]	35 40 45

[2016]	Val	Asn	Asn	Leu	Gln	Trp	Phe	His	Gln	Asn	Pro	Trp	Gly	Gln	Leu	Ile
[2017]	50						55					60				
[2018]	Asn	Leu	Phe	Tyr	Ile	Pro	Ser	Gly	Thr	Lys	Gln	Asn	Gly	Arg	Leu	Ser
[2019]	65					70					75				80	
[2020]	Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Thr	Glu	Arg	Tyr	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ser
[2021]					85					90					95	
[2022]	Ser	Gln	Thr	Thr	Asp	Ser	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Val	Asn	Ala	Gly
[2023]				100					105					110		
[2024]	Asn	Met	Leu	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Arg	Leu	Met	Val	Lys	Pro	His
[2025]			115					120					125			
[2026]	Ile	Gln	Asn	Pro	Asp	Pro	Ala	Val	Tyr	Gln	Leu	Arg	Asp	Ser	Lys	Ser
[2027]	130						135					140				
[2028]	Ser	Asp	Lys	Ser	Val	Cys	Leu	Phe	Thr	Asp	Phe	Asp	Ser	Gln	Thr	Asn
[2029]	145				150					155					160	
[2030]	Val	Ser	Gln	Ser	Lys	Asp	Ser	Asp	Val	Tyr	Ile	Thr	Asp	Lys	Cys	Val
[2031]				165						170					175	
[2032]	Leu	Asp	Met	Arg	Ser	Met	Asp	Phe	Lys	Ser	Asn	Ser	Ala	Val	Ala	Trp
[2033]				180						185					190	
[2034]	Ser	Asn	Lys	Ser	Asp	Phe	Ala	Cys	Ala	Asn	Ala	Phe	Asn	Asn	Ser	Ile
[2035]			195					200					205			
[2036]	Ile	Pro	Glu	Asp	Thr	Phe	Phe	Pro	Ser	Pro	Glu	Ser	Ser	Cys		
[2037]	210						215					220				
[2038]	<210>	66														
[2039]	<211>	262														
[2040]	<212>	PRT														
[2041]	<213>	智人														
[2042]	<400>	66														
[2043]	Met	Gly	Ile	Arg	Leu	Leu	Cys	Arg	Val	Ala	Phe	Cys	Phe	Leu	Ala	Val
[2044]	1				5					10					15	
[2045]	Gly	Leu	Val	Asp	Val	Lys	Val	Thr	Gln	Ser	Ser	Arg	Tyr	Leu	Val	Lys
[2046]				20						25				30		
[2047]	Arg	Thr	Gly	Glu	Lys	Val	Phe	Leu	Glu	Cys	Val	Gln	Asp	Met	Asp	His
[2048]			35						40					45		
[2049]	Glu	Asn	Met	Phe	Trp	Tyr	Arg	Gln	Asp	Pro	Gly	Leu	Gly	Leu	Arg	Leu
[2050]	50						55					60				
[2051]	Ile	Tyr	Phe	Ser	Tyr	Asp	Val	Lys	Met	Lys	Glu	Lys	Gly	Asp	Ile	Pro
[2052]	65					70					75				80	
[2053]	Glu	Gly	Tyr	Ser	Val	Ser	Arg	Glu	Lys	Lys	Glu	Arg	Phe	Ser	Leu	Ile
[2054]					85						90				95	
[2055]	Leu	Glu	Ser	Ala	Ser	Thr	Asn	Gln	Thr	Ser	Met	Tyr	Leu	Cys	Ala	Ser
[2056]				100						105					110	
[2057]	Ser	Ser	Gly	Val	Thr	Gly	Glu	Leu	Phe	Phe	Gly	Glu	Gly	Ser	Arg	Leu

[2058]	115	120	125
[2059]	Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val		
[2060]	130	135	140
[2061]	Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu		
[2062]	145	150	155
[2063]	Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp		
[2064]	165	170	175
[2065]	Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln		
[2066]	180	185	190
[2067]	Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser		
[2068]	195	200	205
[2069]	Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His		
[2070]	210	215	220
[2071]	Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp		
[2072]	225	230	235
[2073]	Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala		
[2074]	245	250	255
[2075]	Trp Gly Arg Ala Asp Cys		
[2076]	260		
[2077]	<210> 67		
[2078]	<211> 262		
[2079]	<212> PRT		
[2080]	<213> 人工序列		
[2081]	<220>		
[2082]	<223> 半胱氨酸修饰的截短型Radium-1 β 链		
[2083]	<400> 67		
[2084]	Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val		
[2085]	1	5	10
[2086]	Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys		
[2087]	20	25	30
[2088]	Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His		
[2089]	35	40	45
[2090]	Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu		
[2091]	50	55	60
[2092]	Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro		
[2093]	65	70	75
[2094]	Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile		
[2095]	85	90	95
[2096]	Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser		
[2097]	100	105	110
[2098]	Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu		
[2099]	115	120	125

[2100]	Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
[2101]	130 135 140
[2102]	Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
[2103]	145 150 155 160
[2104]	Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
[2105]	165 170 175
[2106]	Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln
[2107]	180 185 190
[2108]	Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
[2109]	195 200 205
[2110]	Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
[2111]	210 215 220
[2112]	Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
[2113]	225 230 235 240
[2114]	Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
[2115]	245 250 255
[2116]	Trp Gly Arg Ala Asp Cys
[2117]	260
[2118]	<210> 68
[2119]	<211> 510
[2120]	<212> PRT
[2121]	<213> 人工序列
[2122]	<220>
[2123]	<223> 具有2A接头的可溶性半胱氨酸修饰的Radium-1 scTCR
[2124]	<400> 68
[2125]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val
[2126]	1 5 10 15
[2127]	Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile
[2128]	20 25 30
[2129]	Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser
[2130]	35 40 45
[2131]	Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile
[2132]	50 55 60
[2133]	Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser
[2134]	65 70 75 80
[2135]	Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser
[2136]	85 90 95
[2137]	Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly
[2138]	100 105 110
[2139]	Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His
[2140]	115 120 125
[2141]	Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser

[2142]	130	135	140
[2143]	Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn		
[2144]	145	150	155 160
[2145]	Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val		
[2146]	165	170	175
[2147]	Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp		
[2148]	180	185	190
[2149]	Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile		
[2150]	195	200	205
[2151]	Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Arg Ala		
[2152]	210	215	220
[2153]	Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly		
[2154]	225	230	235 240
[2155]	Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg		
[2156]	245	250	255
[2157]	Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr		
[2158]	260	265	270
[2159]	Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu		
[2160]	275	280	285
[2161]	Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln		
[2162]	290	295	300
[2163]	Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys		
[2164]	305	310	315 320
[2165]	Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu		
[2166]	325	330	335
[2167]	Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln		
[2168]	340	345	350
[2169]	Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu		
[2170]	355	360	365
[2171]	Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn		
[2172]	370	375	380
[2173]	Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile		
[2174]	385	390	395 400
[2175]	Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr		
[2176]	405	410	415
[2177]	Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His		
[2178]	420	425	430
[2179]	Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu		
[2180]	435	440	445
[2181]	Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr		
[2182]	450	455	460
[2183]	Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr		

[2184]	465	470	475	480
[2185]	Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val			
[2186]		485	490	495
[2187]	Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys			
[2188]		500	505	510
[2189]	<210> 69			
[2190]	<211> 519			
[2191]	<212> PRT			
[2192]	<213> 人工序列			
[2193]	<220>			
[2194]	<223> 具有C末端His标签和接头的可溶性半胱氨酸修饰的Radium-1 scTCR			
[2195]	<400> 69			
[2196]	Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val			
[2197]	1	5	10	15
[2198]	Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile			
[2199]		20	25	30
[2200]	Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser			
[2201]		35	40	45
[2202]	Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile			
[2203]		50	55	60
[2204]	Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser			
[2205]	65	70	75	80
[2206]	Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser			
[2207]		85	90	95
[2208]	Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly			
[2209]		100	105	110
[2210]	Asn Met Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His			
[2211]		115	120	125
[2212]	Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser			
[2213]		130	135	140
[2214]	Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn			
[2215]	145	150	155	160
[2216]	Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val			
[2217]		165	170	175
[2218]	Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp			
[2219]		180	185	190
[2220]	Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile			
[2221]		195	200	205
[2222]	Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Arg Ala			
[2223]		210	215	220
[2224]	Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly			
[2225]	225	230	235	240

[2226]	Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Ile Arg Leu Leu Cys Arg		
[2227]		245	250 255
[2228]	Val Ala Phe Cys Phe Leu Ala Val Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr		
[2229]		260	265 270
[2230]	Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu		
[2231]		275	280 285
[2232]	Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln		
[2233]		290	295 300
[2234]	Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys		
[2235]		305	310 315 320
[2236]	Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu		
[2237]		325	330 335
[2238]	Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln		
[2239]		340	345 350
[2240]	Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu		
[2241]		355	360 365
[2242]	Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn		
[2243]		370	375 380
[2244]	Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile		
[2245]		385	390 395 400
[2246]	Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr		
[2247]		405	410 415
[2248]	Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His		
[2249]		420	425 430
[2250]	Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu		
[2251]		435	440 445
[2252]	Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr		
[2253]		450	455 460
[2254]	Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr		
[2255]		465	470 475 480
[2256]	Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val		
[2257]		485	490 495
[2258]	Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Gly		
[2259]		500	505 510
[2260]	Gly His His His His His His		
[2261]		515	
[2262]	<210> 70		
[2263]	<211> 1530		
[2264]	<212> DNA		
[2265]	<213> 人工序列		
[2266]	<220>		
[2267]	<223> 编码 SEQ ID NO: 69		

[2268]	<400> 70	
[2269]	atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga	60
[2270]	ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccacg	120
[2271]	ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgagtg ggtttcatca aaacccttgg	180
[2272]	ggacagctca tcaacctgtt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc	240
[2273]	gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca	300
[2274]	gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga	360
[2275]	acaagggttaa tgggtcaaacc ccatatccag aaccctgacc ctgccgtgta ccagctgaga	420
[2276]	gactctaaat ccagtacaa gtctgtctgc ctattcaccg attttgattc tcaaacaaat	480
[2277]	gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat atcacagaca aatgcgtgct agacatgagg	540
[2278]	tctatggact tcaagagcaa cagtgtgtg gcctggagca acaaatctga ctttgcatgt	600
[2279]	gcaaacgect tcaacaacag cattattcca gaagacacct tcttccccag cccagaaagt	660
[2280]	tcctgtagag ccaagagagg cagcggcgcc accaacttca gcctgtgtaa gcaggccggc	720
[2281]	gacgtggaag agaaccctgg accaatggga atcaggctcc tctgtcgtgt ggccttttgt	780
[2282]	ttcttggtg taggcctcgt agatgtgaaa gtaaccaga gctcgagata tctagtcaaa	840
[2283]	aggacgggag agaaagtgtt tctggaatgt gtccaggata tggaccatga aaatatgttc	900
[2284]	tggtatcgac aagaccagg tctggggcta cggctgatct atttctcata tgatgttaaa	960
[2285]	atgaaagaaa aaggagatat tcctgagggg tacagtgtct ctagagagaa gaaggagcgc	1020
[2286]	ttctccctga ttctggagtc cgccagcacc aaccagacat ctatgtacct ctgtgccagc	1080
[2287]	agttctggag tcaccgggga gctgtttttt ggagaaggct ctaggctgac cgtactggag	1140
[2288]	gacctgaaaa acgtgttccc acccgaggtc gctgtgtttg agccatcaga agcagagatc	1200
[2289]	tcccacaccc aaaaggccac actggtgtgc ctggccacag gcttctaccc cgaccacgtg	1260
[2290]	gagctgagct ggtgggtgaa tgggaaggag gtgcacagtg gggctctgtac agaccgcgag	1320
[2291]	ccctcaagg agcagcccgc cctcaatgac tccagatact gcctgagcag ccgcctgagg	1380
[2292]	gtctcggeca cttcttggea gaacccccgc aaccattcc gctgtcaagt ccagttctac	1440
[2293]	gggctctcgg agaatgacga gtggaccag gatagggcca aacctgtcac ccagatcgtc	1500
[2294]	agcggcgagg cctggggtag agcagactgt	1530
[2295]	<210> 71	
[2296]	<211> 1557	
[2297]	<212> DNA	
[2298]	<213> 人工序列	
[2299]	<220>	
[2300]	<223> 编码 SEQ ID NO: 69	
[2301]	<400> 71	
[2302]	atgaagagga tattgggagc tctgctgggg ctcttgagtg cccaggtttg ctgtgtgaga	60
[2303]	ggaatacaag tggagcagag tcctccagac ctgattctcc aggagggagc caattccacg	120
[2304]	ctgcggtgca atttttctga ctctgtgaac aatttgagtg ggtttcatca aaacccttgg	180
[2305]	ggacagctca tcaacctgtt ttacattccc tcagggacaa aacagaatgg aagattaagc	240
[2306]	gccacgactg tcgctacgga acgctacagc ttattgtaca tttcctcttc ccagaccaca	300
[2307]	gactcaggcg tttatttctg tgctgtgaat gcaggcaaca tgctcacctt tggaggggga	360
[2308]	acaagggttaa tgggtcaaacc ccatatccag aaccctgacc ctgccgtgta ccagctgaga	420
[2309]	gactctaaat ccagtacaa gtctgtctgc ctattcaccg attttgattc tcaaacaaat	480

[2310]	gtgtcacaaa gtaaggattc tgatgtgtat atcacagaca aatgcgtgct agacatgagg	540
[2311]	tctatggact tcaagagcaa cagtgtctgt gcctggagca acaaactctga ctttgcattgt	600
[2312]	gcaaacgect tcaacaacag cattattcca gaagacacct ttttccccag cccagaaagt	660
[2313]	tcctgtagag ccaagagagg cagcggcgcc accaacttca gcctgctgaa gcaggccggc	720
[2314]	gacgtggaag agaaccctgg accaatggga atcaggctcc tctgtcgtgt ggccttttgt	780
[2315]	ttctggctg taggcctcgt agatgtgaaa gtaaccaga gctcgagata tctagtcaaa	840
[2316]	aggacgggag agaaagtttt tctggaatgt gtccaggata tggaccatga aaatatgttc	900
[2317]	tggtatcgac aagaccagg tctggggcta cggctgatct atttctcata tgatgttaaa	960
[2318]	atgaaagaaa aaggagatat tcctgagggg tacagtgtct ctagagagaa gaaggagcgc	1020
[2319]	ttctccctga ttctggagtc cgccagcacc aaccagacat ctatgtacct ctgtgccagc	1080
[2320]	agttctggag tcaccgggga gctgtttttt ggagaaggct ctaggctgac cgtactggag	1140
[2321]	gacctgaaaa acgtgttccc acccgaggtc gctgtgtttg agccatcaga agcagagatc	1200
[2322]	ttccacaccc aaaaggccac actggtgtgc ctggccacag gcttctaccc cgaccacgtg	1260
[2323]	gagctgagct ggtgggtgaa tgggaaggag gtgcacagtg gggctctgtac agaccgcag	1320
[2324]	cccccaagg agcagcccgc cctcaatgac tccagatact gcctgagcag ccgcctgagg	1380
[2325]	gtctcggeca cttctggca gaacccccgc aaccacttcc gctgtcaagt ccagttctac	1440
[2326]	gggctctcgg agaattgacga gtggaccag gataggcca aacctgtcac ccagatcgtc	1500
[2327]	agcggcgagg cctggggtag agcagactgt ggtggcggtc atcaccatca ccatcac	1557
[2328]	<210>	72
[2329]	<211>	107
[2330]	<212>	PRT
[2331]	<213>	智人
[2332]	<400>	72
[2333]	Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly	
[2334]	1 5 10 15	
[2335]	Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu	
[2336]	20 25 30	
[2337]	Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr	
[2338]	35 40 45	
[2339]	Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val	
[2340]	50 55 60	
[2341]	Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr	
[2342]	65 70 75 80	
[2343]	Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr	
[2344]	85 90 95	
[2345]	Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro	
[2346]	100 105	
[2347]	<210>	73
[2348]	<211>	202
[2349]	<212>	PRT
[2350]	<213>	智人
[2351]	<400>	73

[2352]	Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly
[2353]	1 5 10 15
[2354]	Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu
[2355]	20 25 30
[2356]	Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr
[2357]	35 40 45
[2358]	Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val
[2359]	50 55 60
[2360]	Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr
[2361]	65 70 75 80
[2362]	Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr
[2363]	85 90 95
[2364]	Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro
[2365]	100 105 110
[2366]	Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser
[2367]	115 120 125
[2368]	Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser
[2369]	130 135 140
[2370]	Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg
[2371]	145 150 155 160
[2372]	Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser
[2373]	165 170 175
[2374]	Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp
[2375]	180 185 190
[2376]	Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys
[2377]	195 200
[2378]	<210> 74
[2379]	<211> 202
[2380]	<212> PRT
[2381]	<213> 人工序列
[2382]	<220>
[2383]	<223> 成熟的截短型半胱氨酸修饰的Radium-1 α 链
[2384]	<400> 74
[2385]	Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly
[2386]	1 5 10 15
[2387]	Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu
[2388]	20 25 30
[2389]	Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr
[2390]	35 40 45
[2391]	Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val
[2392]	50 55 60
[2393]	Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr

[2394]	65	70	75	80
[2395]	Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr			
[2396]	85	90	95	
[2397]	Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro			
[2398]	100	105	110	
[2399]	Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser			
[2400]	115	120	125	
[2401]	Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser			
[2402]	130	135	140	
[2403]	Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg			
[2404]	145	150	155	160
[2405]	Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser			
[2406]	165	170	175	
[2407]	Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp			
[2408]	180	185	190	
[2409]	Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys			
[2410]	195	200		
[2411]	<210> 75			
[2412]	<211> 115			
[2413]	<212> PRT			
[2414]	<213> 智人			
[2415]	<400> 75			
[2416]	Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys			
[2417]	1	5	10	15
[2418]	Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His			
[2419]	20	25	30	
[2420]	Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu			
[2421]	35	40	45	
[2422]	Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro			
[2423]	50	55	60	
[2424]	Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile			
[2425]	65	70	75	80
[2426]	Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser			
[2427]	85	90	95	
[2428]	Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu			
[2429]	100	105	110	
[2430]	Thr Val Leu			
[2431]	115			
[2432]	<210> 76			
[2433]	<211> 246			
[2434]	<212> PRT			
[2435]	<213> 智人			

[2436]	<400> 76
[2437]	Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys
[2438]	1 5 10 15
[2439]	Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His
[2440]	20 25 30
[2441]	Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu
[2442]	35 40 45
[2443]	Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro
[2444]	50 55 60
[2445]	Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile
[2446]	65 70 75 80
[2447]	Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser
[2448]	85 90 95
[2449]	Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu
[2450]	100 105 110
[2451]	Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
[2452]	115 120 125
[2453]	Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
[2454]	130 135 140
[2455]	Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
[2456]	145 150 155 160
[2457]	Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln
[2458]	165 170 175
[2459]	Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
[2460]	180 185 190
[2461]	Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
[2462]	195 200 205
[2463]	Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
[2464]	210 215 220
[2465]	Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
[2466]	225 230 235 240
[2467]	Trp Gly Arg Ala Asp Cys
[2468]	245
[2469]	<210> 77
[2470]	<211> 246
[2471]	<212> PRT
[2472]	<213> 人工序列
[2473]	<220>
[2474]	<223> 成熟的截短型半胱氨酸修饰的Radium-1 β 链
[2475]	<400> 77
[2476]	Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys
[2477]	1 5 10 15

[2478]	Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His
[2479]	20 25 30
[2480]	Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu
[2481]	35 40 45
[2482]	Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro
[2483]	50 55 60
[2484]	Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile
[2485]	65 70 75 80
[2486]	Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser
[2487]	85 90 95
[2488]	Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu
[2489]	100 105 110
[2490]	Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
[2491]	115 120 125
[2492]	Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
[2493]	130 135 140
[2494]	Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
[2495]	145 150 155 160
[2496]	Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln
[2497]	165 170 175
[2498]	Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
[2499]	180 185 190
[2500]	Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
[2501]	195 200 205
[2502]	Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
[2503]	210 215 220
[2504]	Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
[2505]	225 230 235 240
[2506]	Trp Gly Arg Ala Asp Cys
[2507]	245
[2508]	<210> 78
[2509]	<211> 211
[2510]	<212> PRT
[2511]	<213> 人工序列
[2512]	<220>
[2513]	<223> 具有接头和His-标签的成熟的截短型半胱氨酸修饰Radium-1 α 链
[2514]	<400> 78
[2515]	Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly
[2516]	1 5 10 15
[2517]	Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu
[2518]	20 25 30
[2519]	Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr

[2520]	35	40	45
[2521]	Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val		
[2522]	50	55	60
[2523]	Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr		
[2524]	65	70	75
[2525]	Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr		
[2526]	85	90	95
[2527]	Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro		
[2528]	100	105	110
[2529]	Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser		
[2530]	115	120	125
[2531]	Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser		
[2532]	130	135	140
[2533]	Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg		
[2534]	145	150	155
[2535]	Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser		
[2536]	165	170	175
[2537]	Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp		
[2538]	180	185	190
[2539]	Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Gly Gly Gly His His His		
[2540]	195	200	205
[2541]	His His His		
[2542]	210		
[2543]	<210> 79		
[2544]	<211> 255		
[2545]	<212> PRT		
[2546]	<213> 人工序列		
[2547]	<220>		
[2548]	<223> 具有接头和His-标签的成熟的截短型半胱氨酸修饰的Radium-1 β 链		
[2549]	<400> 79		
[2550]	Gly Leu Val Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys		
[2551]	1	5	10
[2552]	Arg Thr Gly Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His		
[2553]	20	25	30
[2554]	Glu Asn Met Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu		
[2555]	35	40	45
[2556]	Ile Tyr Phe Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro		
[2557]	50	55	60
[2558]	Glu Gly Tyr Ser Val Ser Arg Glu Lys Lys Glu Arg Phe Ser Leu Ile		
[2559]	65	70	75
[2560]	Leu Glu Ser Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser		
[2561]	85	90	95

[2562]	Ser Ser Gly Val Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu
[2563]	100 105 110
[2564]	Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val
[2565]	115 120 125
[2566]	Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu
[2567]	130 135 140
[2568]	Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
[2569]	145 150 155 160
[2570]	Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln
[2571]	165 170 175
[2572]	Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser
[2573]	180 185 190
[2574]	Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His
[2575]	195 200 205
[2576]	Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp
[2577]	210 215 220
[2578]	Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala
[2579]	225 230 235 240
[2580]	Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Gly Gly His His His His His His
[2581]	245 250 255
[2582]	<210> 80
[2583]	<211> 10
[2584]	<212> PRT
[2585]	<213> 人工序列
[2586]	<220>
[2587]	<223> MART-1 26-35 肽类似物
[2588]	<400> 80
[2589]	Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
[2590]	1 5 10
[2591]	<210> 81
[2592]	<211> 227
[2593]	<212> PRT
[2594]	<213> 人工序列
[2595]	<220>
[2596]	<223> 在C末端具有2A肽衍生残基的成熟的截短型Radium-1 α 链
[2597]	<400> 81
[2598]	Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly
[2599]	1 5 10 15
[2600]	Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu
[2601]	20 25 30
[2602]	Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr
[2603]	35 40 45

[2604]	Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val
[2605]	50 55 60
[2606]	Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr
[2607]	65 70 75 80
[2608]	Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr
[2609]	85 90 95
[2610]	Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro
[2611]	100 105 110
[2612]	Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser
[2613]	115 120 125
[2614]	Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser
[2615]	130 135 140
[2616]	Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg
[2617]	145 150 155 160
[2618]	Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser
[2619]	165 170 175
[2620]	Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp
[2621]	180 185 190
[2622]	Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Arg Ala Lys Arg Gly Ser
[2623]	195 200 205
[2624]	Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu
[2625]	210 215 220
[2626]	Asn Pro Gly
[2627]	225
[2628]	<210> 82
[2629]	<211> 227
[2630]	<212> PRT
[2631]	<213> 人工序列
[2632]	<220>
[2633]	<223> 在C末端具有2A肽衍生残基的成熟的截短型半胱氨酸修饰的Radium-1 α 链
[2634]	<400> 82
[2635]	Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile Leu Gln Glu Gly
[2636]	1 5 10 15
[2637]	Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser Val Asn Asn Leu
[2638]	20 25 30
[2639]	Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile Asn Leu Phe Tyr
[2640]	35 40 45
[2641]	Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser Ala Thr Thr Val
[2642]	50 55 60
[2643]	Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser Ser Gln Thr Thr
[2644]	65 70 75 80
[2645]	Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Asn Ala Gly Asn Met Leu Thr

[2646]		85		90		95
[2647]	Phe Gly Gly Gly Thr Arg Leu Met Val Lys Pro His Ile Gln Asn Pro					
[2648]		100		105		110
[2649]	Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser					
[2650]		115		120		125
[2651]	Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser					
[2652]		130		135		140
[2653]	Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg					
[2654]	145		150		155	160
[2655]	Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser					
[2656]		165		170		175
[2657]	Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp					
[2658]		180		185		190
[2659]	Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Arg Ala Lys Arg Gly Ser					
[2660]		195		200		205
[2661]	Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu					
[2662]		210		215		220
[2663]	Asn Pro Gly					
[2664]	225					

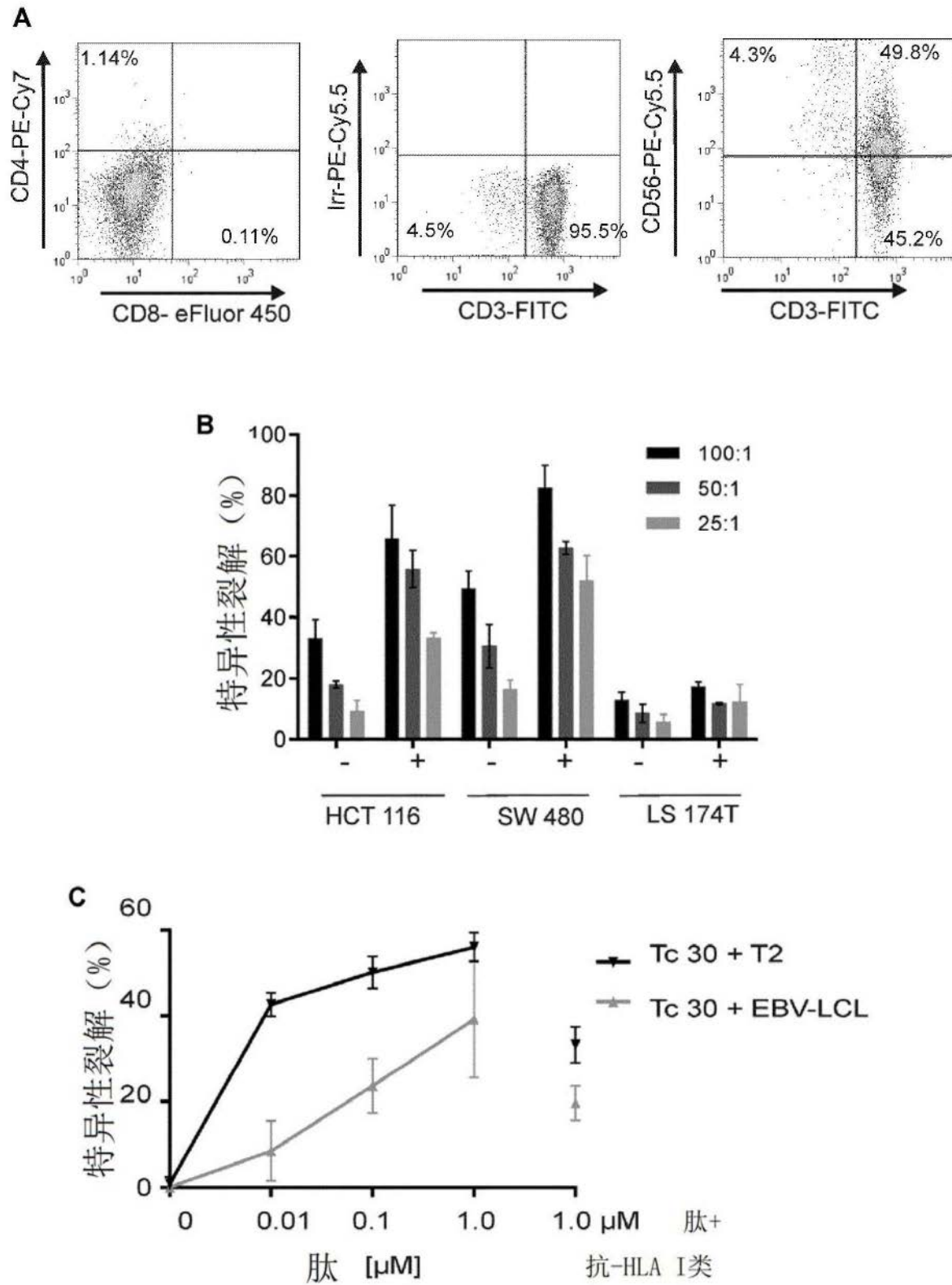


图1

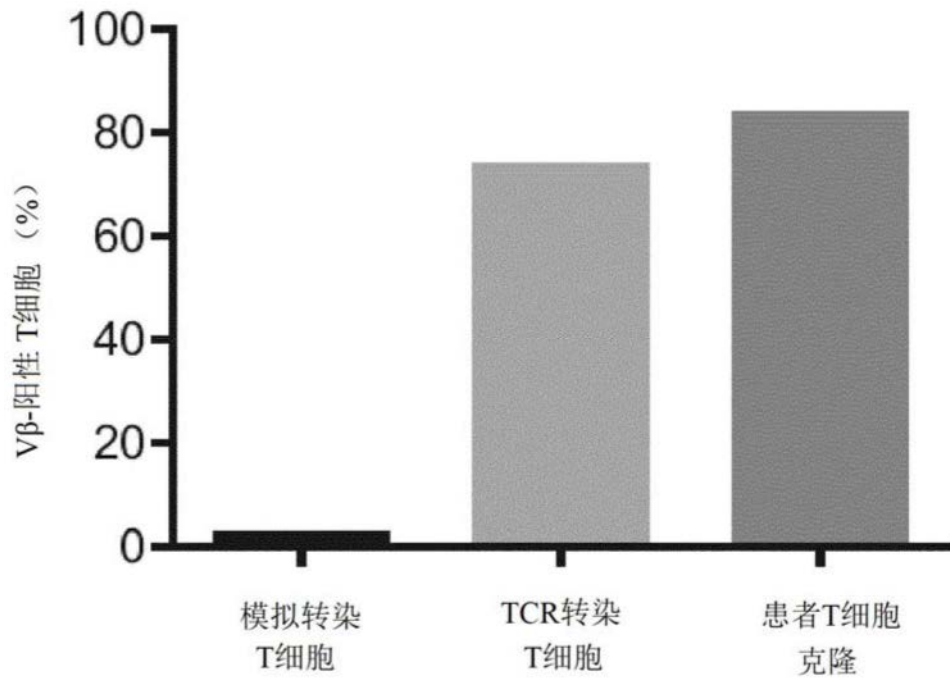


图2

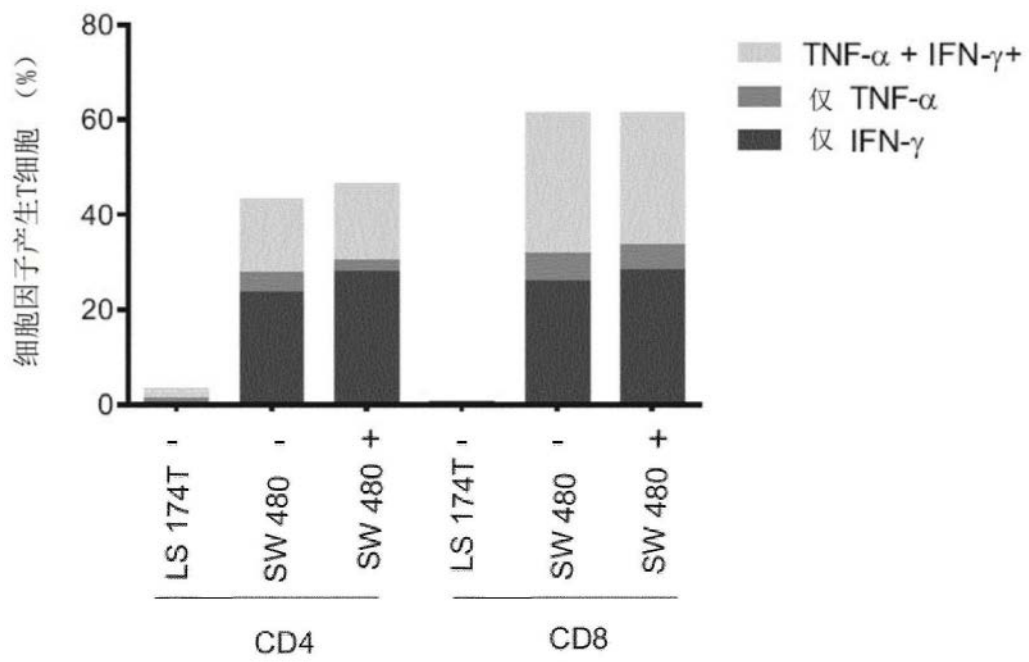


图3

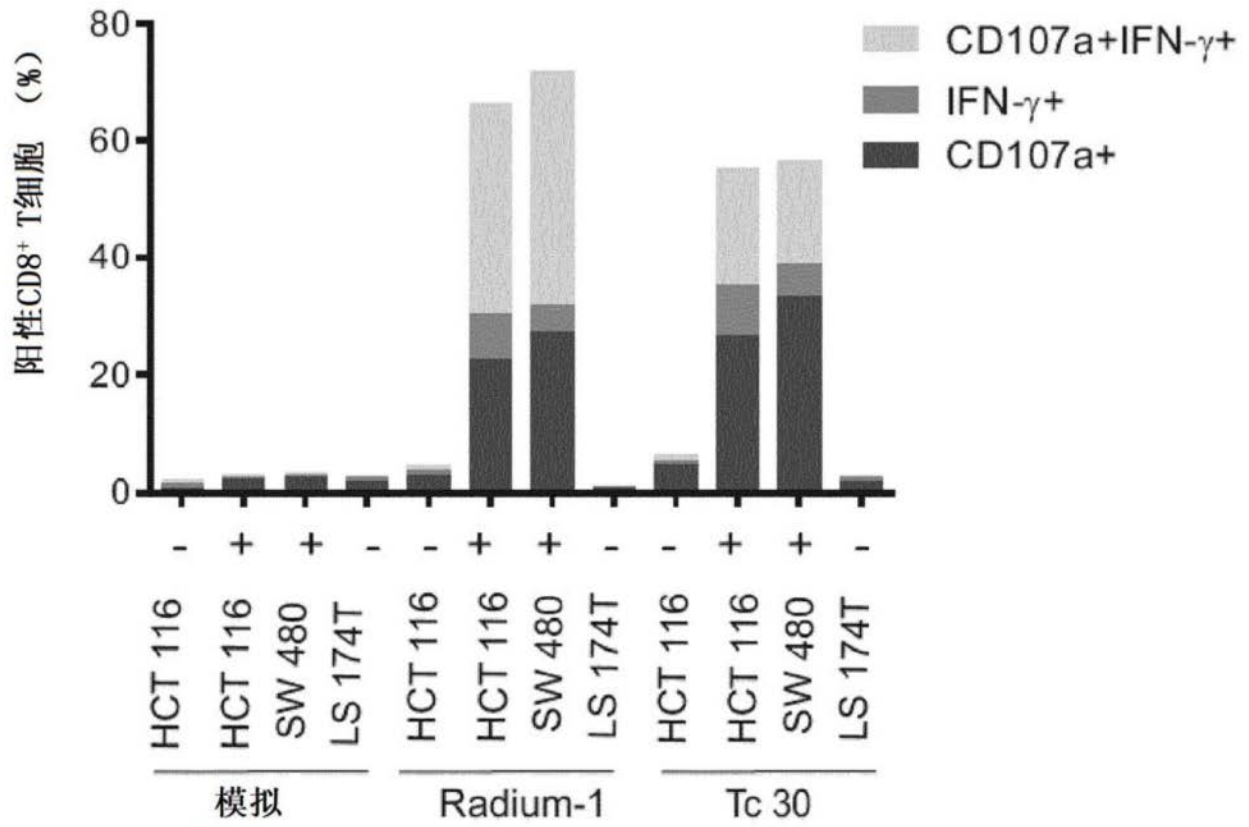


图4

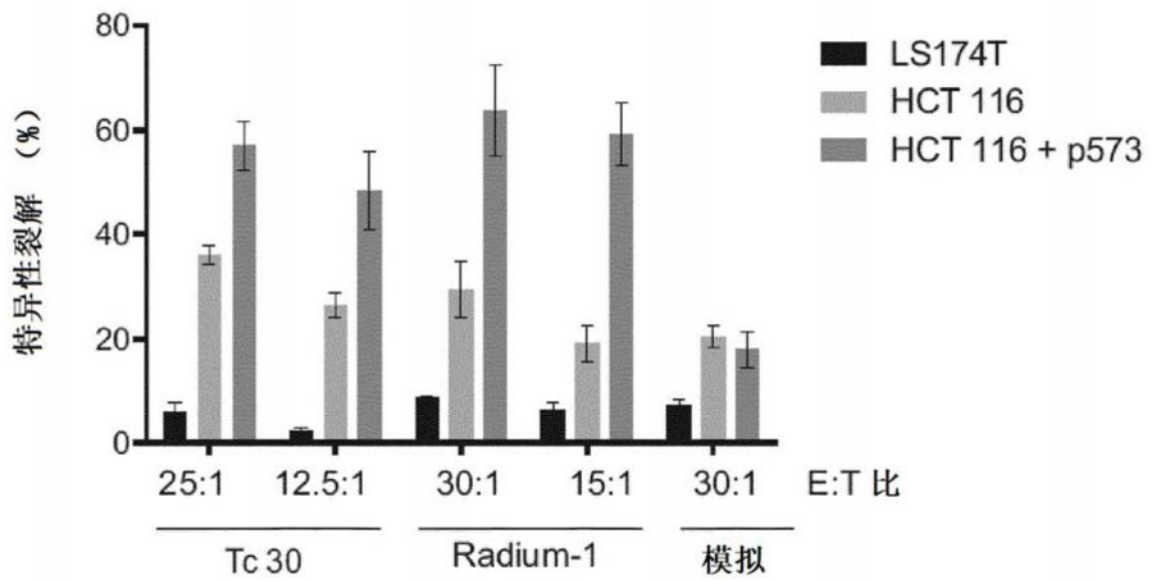


图5

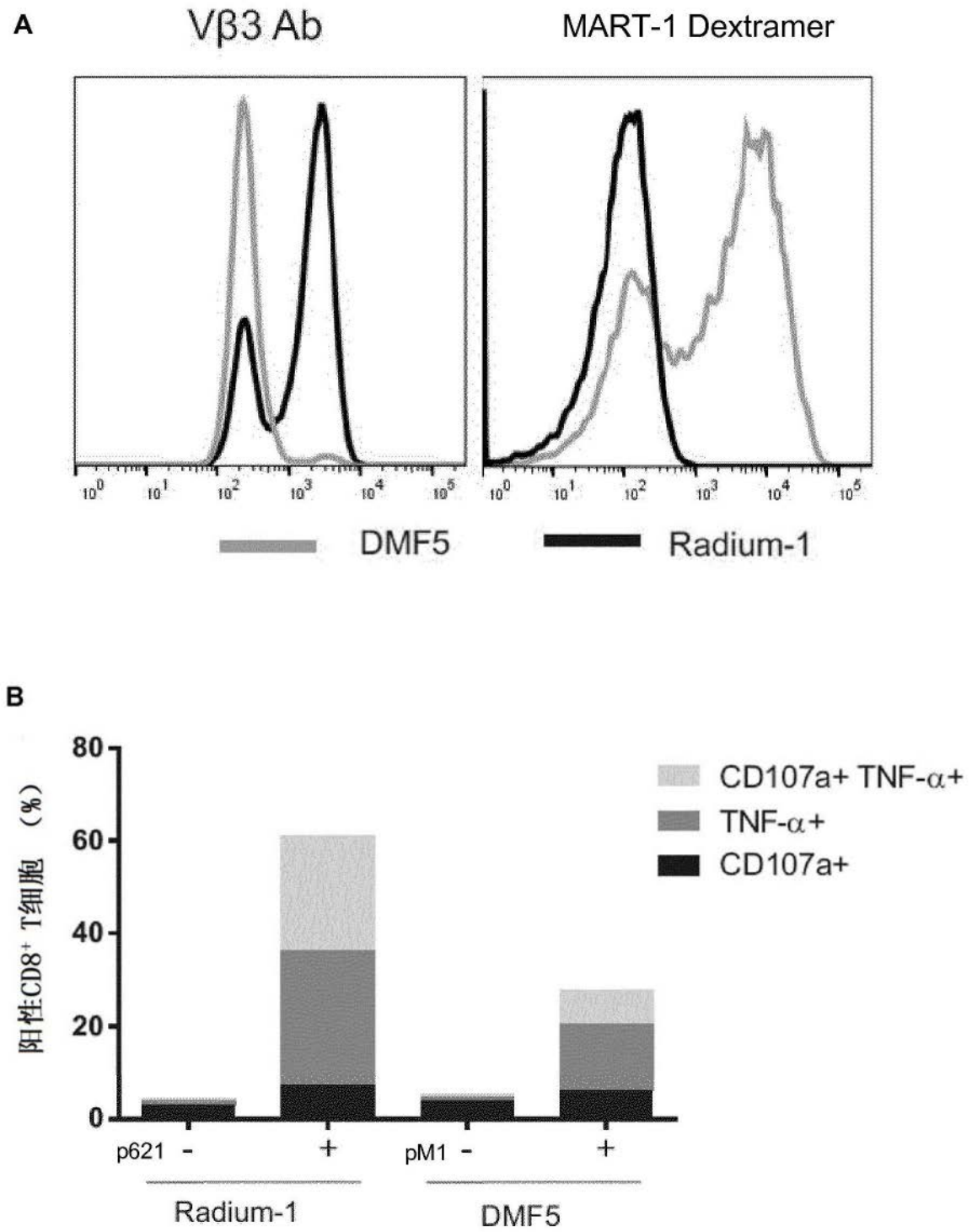


图6

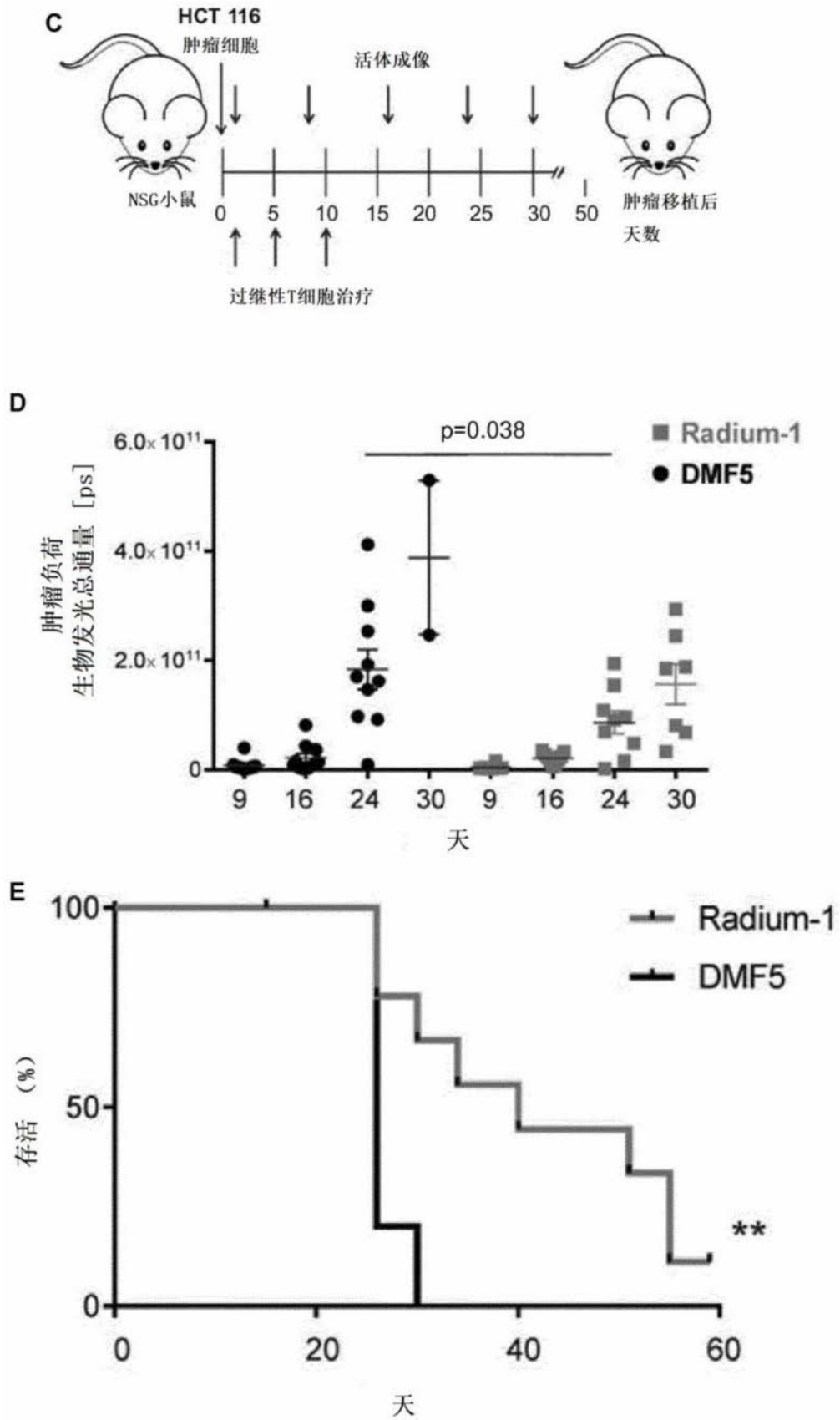


图6(续)

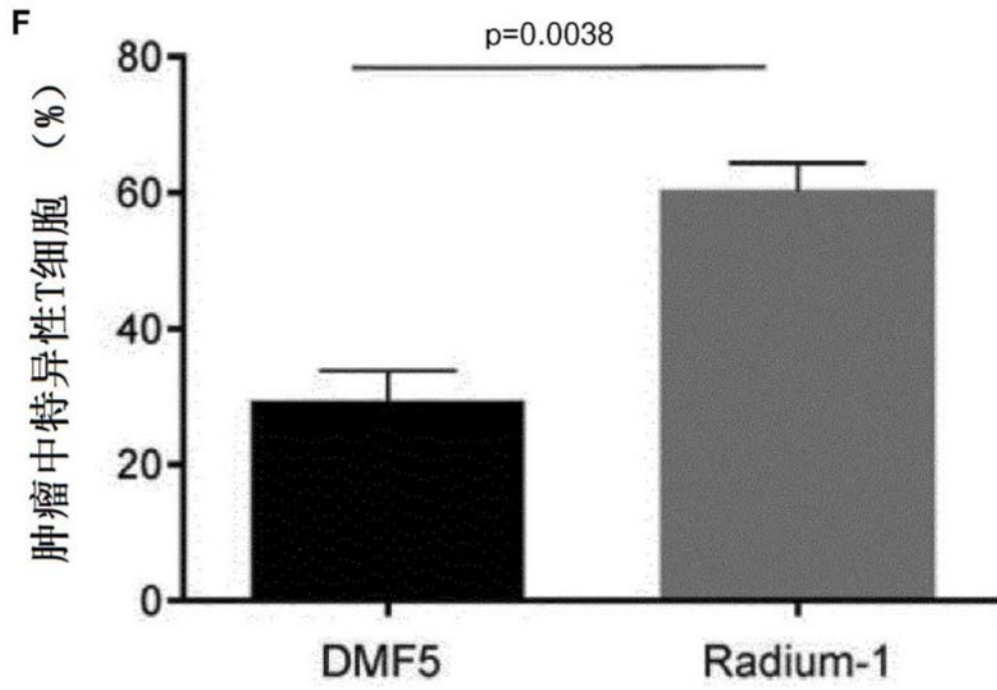


图6(续)

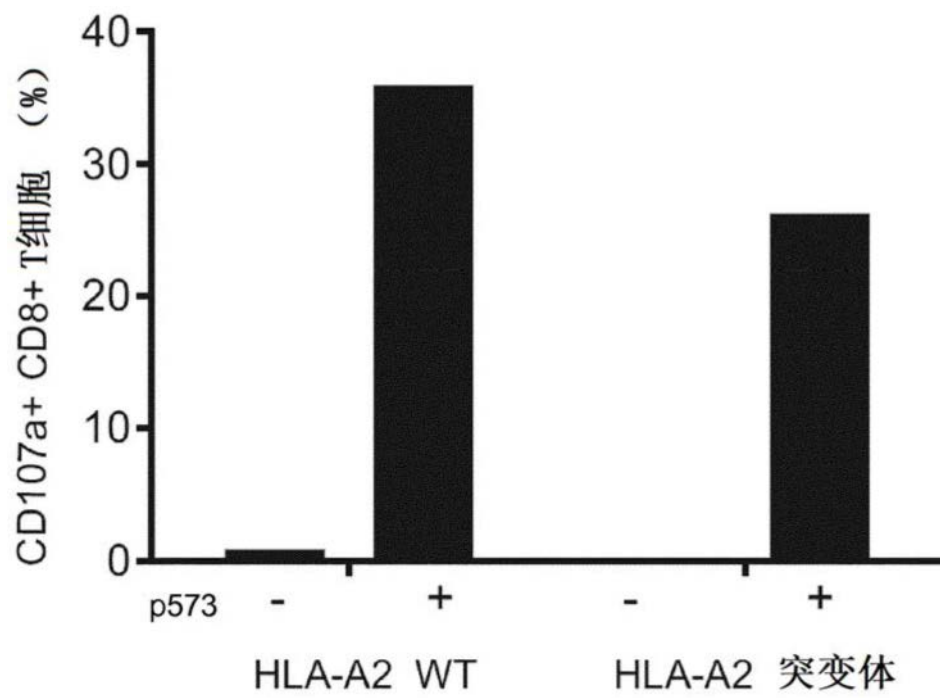


图7

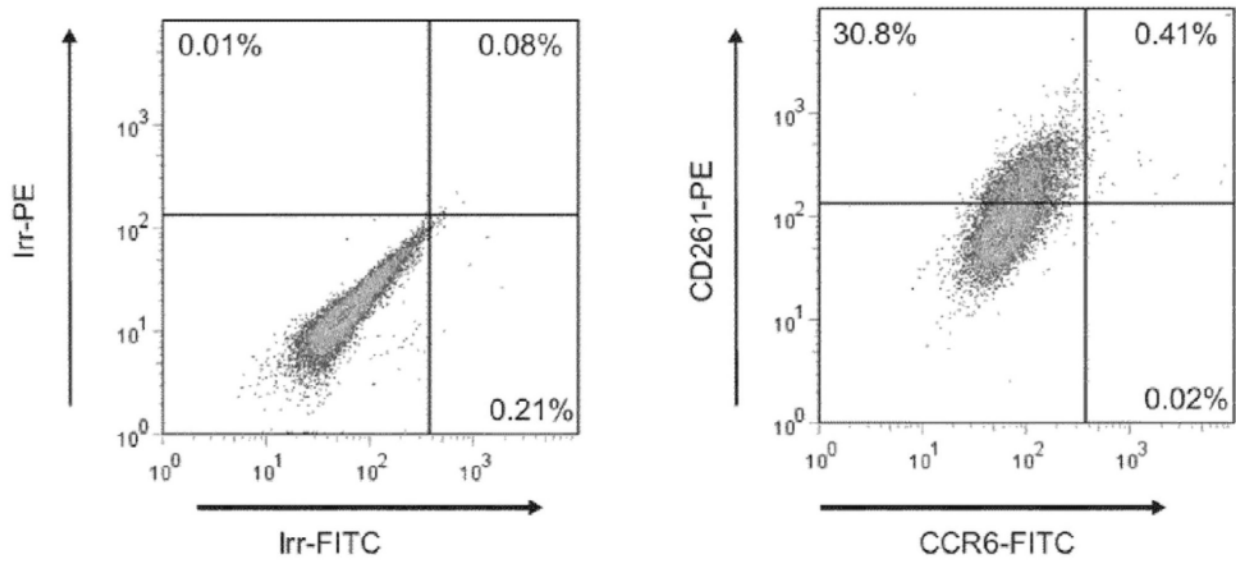


图8

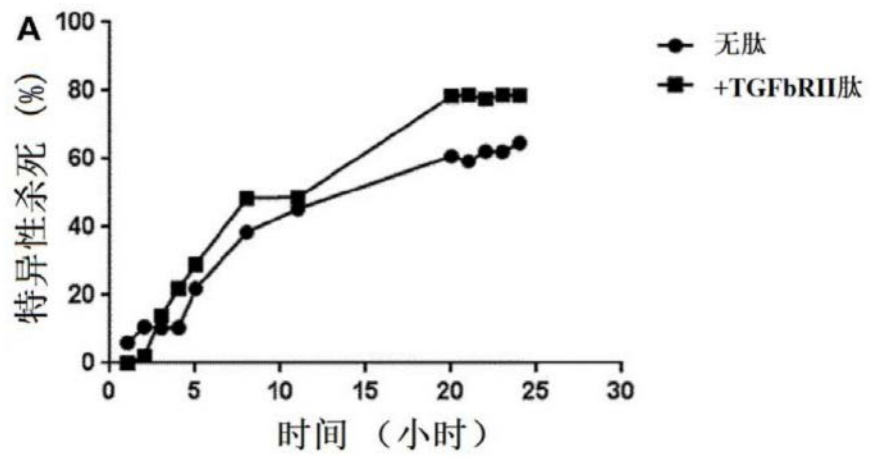


图9

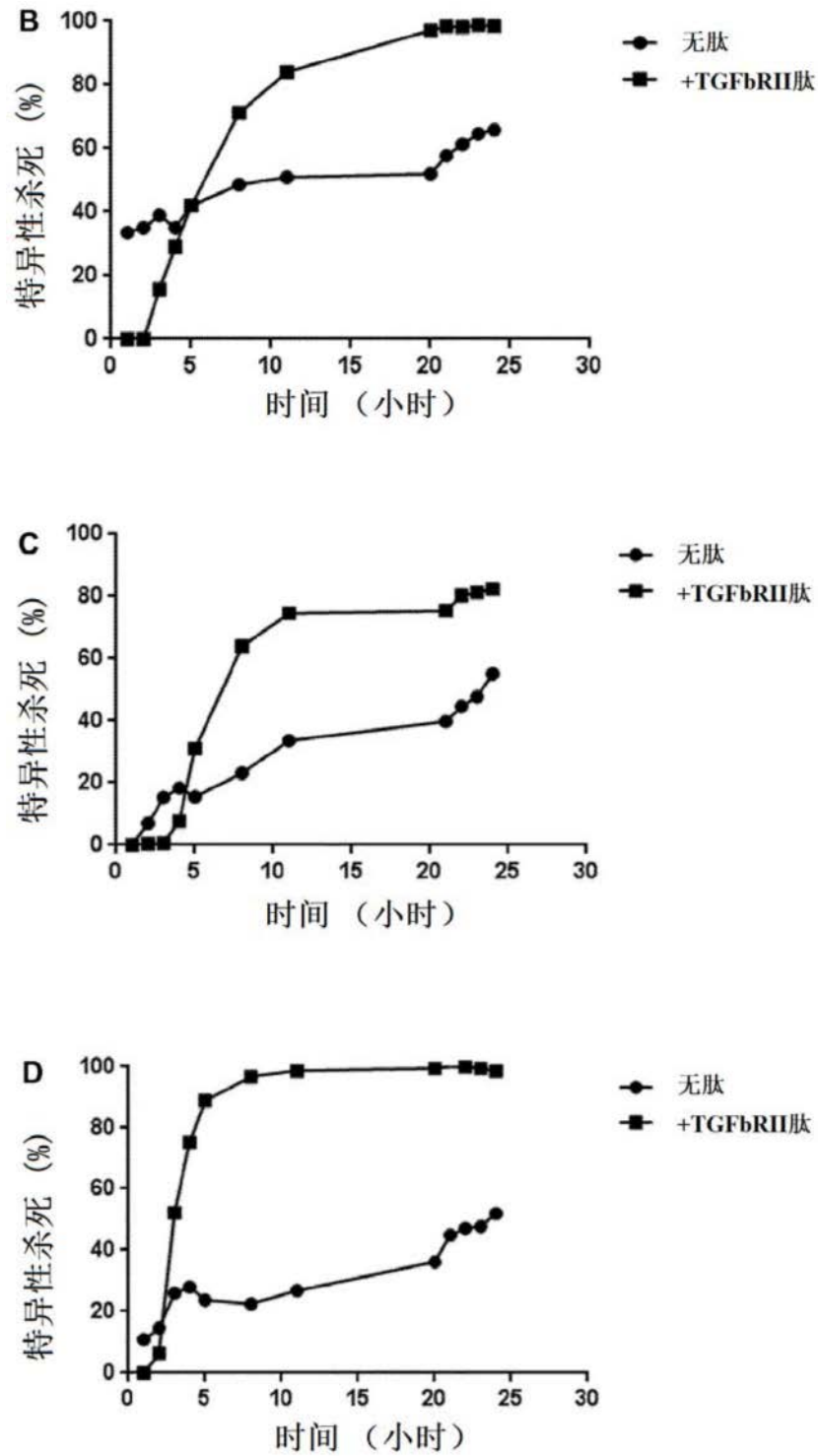


图9(续)

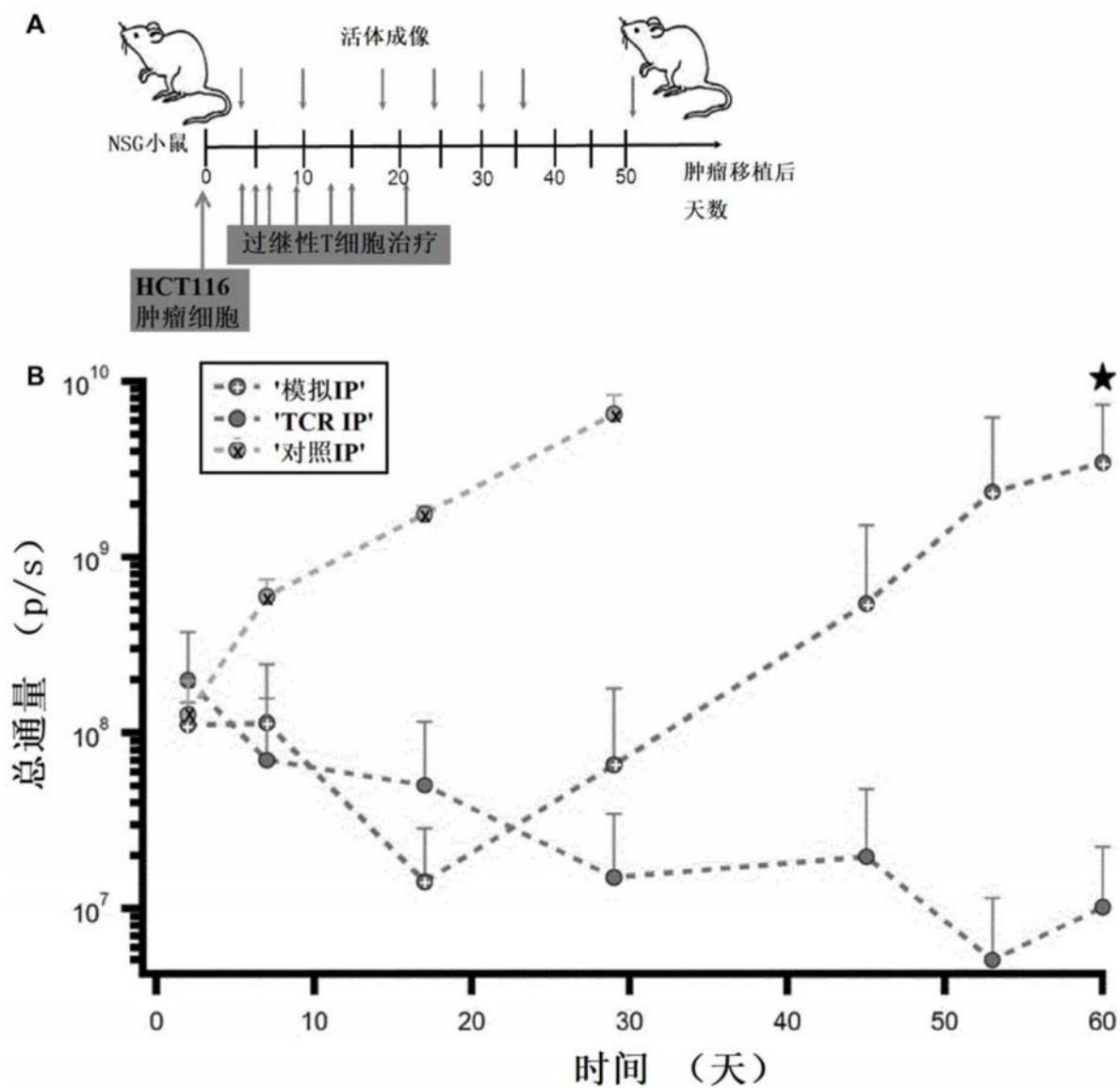


图10

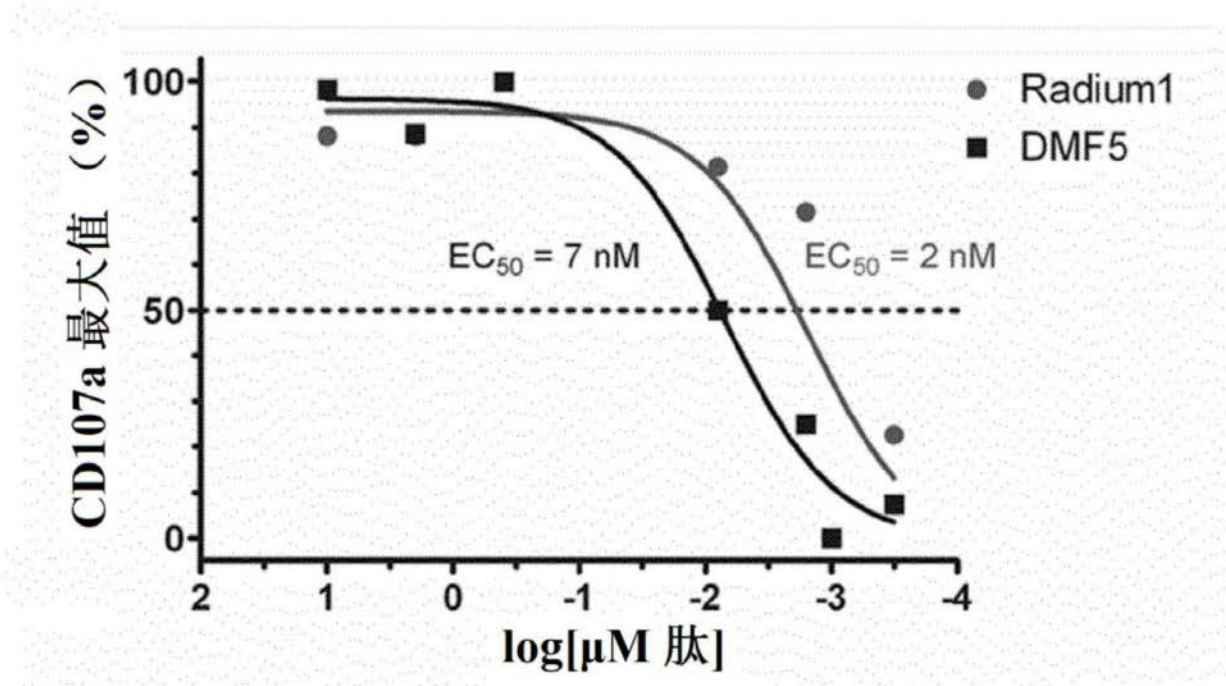


图11

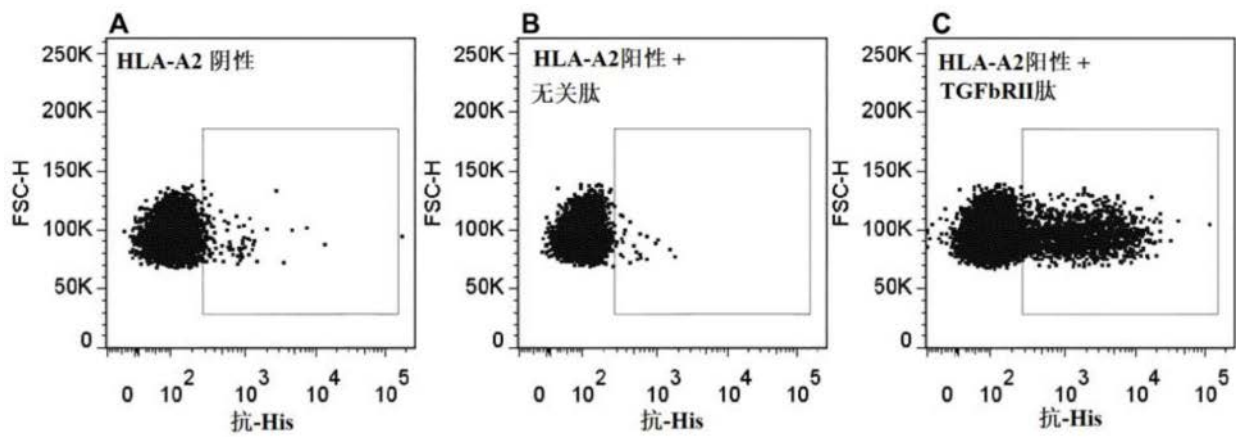


图12