



(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 110612446 A

(43)申请公布日 2019.12.24

(21)申请号 201880022673.3

(22)申请日 2018.03.28

(30)优先权数据

62/479,398 2017.03.31 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日

2019.09.29

(86)PCT国际申请的申请数据

PCT/US2018/024828 2018.03.28

(87)PCT国际申请的公布数据

W02018/183485 EN 2018.10.04

(71)申请人 美国卫生和人力服务部

地址 美国马里兰州

(72)发明人 卢勇成 彼得·菲茨杰拉德

郑志丽 史蒂文·A·罗森伯格

(74)专利代理机构 北京英赛嘉华知识产权代理
有限责任公司 11204

代理人 王达佐 洪欣

(51)Int.Cl.

G01N 33/53(2006.01)

C12Q 1/686(2006.01)

C07K 14/705(2006.01)

权利要求书4页 说明书21页

序列表6页 附图20页

(54)发明名称

分离新抗原-特异性T细胞受体序列的方法

(57)摘要

公开了分离配对的T细胞受体(TCR) α 和 β 链序列或其抗原结合部分的方法。还公开了自动鉴定TCR的TCR α 和 β 链V区段序列和CDR3序列的方法,所述TCR对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性。还公开了制备表达配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的细胞群的方法。还公开了通过所述方法制备的经分离的TCR α 和 β 链序列对和经分离的细胞群。

1. 分离配对的T细胞受体 (TCR) α 和 β 链序列或其抗原结合部分的方法,所述方法包括:

(a) 从生物样品分离对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞;

(b) 与呈递经突变的氨基酸序列的抗原呈递细胞 (APC) 一起共培养经分离的T细胞,使得所述T表达一种或多种T细胞活化标志物;

(c) 将共培养的T细胞分选成单独的单T细胞样品;

(d) 从每个单独的单T细胞样品分离mRNA;

(e) 对来自每个单独的单T细胞样品的mRNA进行测序,其中所述测序包括:

(i) 从所述mRNA产生cDNA并扩增所述cDNA;

(ii) 产生经扩增的cDNA的多个片段和标记所述多个片段;

(iii) 扩增所述cDNA的经标记的多个片段;和

(iv) 对所述cDNA的经扩增的标记的多个片段进行测序;

其中所述测序鉴定所述cDNA的多个片段中的每一个的序列;

(f) 将所述cDNA的多个片段中的每一个的序列与一种或多种T细胞活化标志物的已知序列比对,以鉴定哪个单T细胞样品含有表达一种或多种T细胞活化标志物的单个T细胞;

(g) 将所述cDNA的多个片段中的每一个的序列与参考TCR序列数据库比对,以鉴定在(f)中鉴定的表达一种或多种T细胞活化标志物的每个单独的单T细胞样品的cDNA的多个片段的TCR α 链可变(V)区段序列和TCR β 链V区段序列;

(h) 在含有(g)中鉴定的所述TCR α 链V区段序列的所述cDNA的多个片段中和在含有(g)中鉴定的所述TCR β 链V区段序列的所述cDNA的多个片段中鉴定TCR互补决定区3(CDR3)序列;

(i) 对共用相同 α 链CDR3氨基酸序列的cDNA的多个片段的数目和共用相同 β 链CDR3氨基酸序列的cDNA的多个片段的数目进行计数;

(j) 收集编码相同 α 链CDR3序列的cDNA的最高数目的多个片段、编码相同 β 链CDR3序列的cDNA的最高数目的多个片段和任选地,编码相同 α 链CDR3序列的cDNA的第二高数目的多个片段,其中由cDNA的第二高数目的多个片段编码的 α 链CDR3序列不同于由cDNA的最高数目的多个片段编码的 α 链CDR3序列,

以鉴定所述TCR α 和 β 链CDR3序列;

(k) 鉴定(j)中收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR α 链V区段序列,(j)中收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR β 链V区段序列,和任选地,(j)中收集的cDNA的第二高数目的多个片段的TCR α 链V区段序列,

以鉴定所述TCR α 和 β 链V区段序列;和

(l) 组装编码以下的一条或多条核苷酸序列:

TCR α 链,其包含(k)中鉴定的所述TCR α 链V区段序列和(j)中收集的TCR α 链CDR3序列,和TCR β 链,其包含(k)中鉴定的所述TCR β 链V区段序列和(j)中收集的TCR β 链CDR3序列,任选地组装编码以下的第二一条或多条核苷酸序列:

第二TCR α 链,其包含(k)中鉴定的cDNA的第二高数目的多个片段的TCR α 链V区段序列和(j)中收集的cDNA的第二高数目的多个片段的TCR α 链CDR3序列,和

所述TCR β 链,其包含(k)中鉴定的TCR β 链V区段序列和(j)中收集的TCR β 链CDR3序列,

以产生经分离的配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中所述一种或多种T细胞活化标志物包括以下中的一种或多种:干扰素(IFN)- γ 、白介素(IL)-2、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、程序化细胞死亡1(PD-1)、淋巴细胞活化基因3(LAG-3)、T细胞免疫球蛋白和粘液素结构域3(TIM-3)、4-1BB、OX40、CD107a、颗粒酶B、粒细胞/单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-17和IL-22。

3. 根据权利要求1或2所述的方法,其还包括用针对每个单独的单T细胞样品的不同标签标记来自每个单独的单T细胞样品的mRNA。

4. 根据权利要求1-3中任一项所述的方法,其中(h)包括通过鉴定编码位于由所述 α 和 β 链的V区段编码的氨基酸序列的C-末端附近的保守氨基酸残基的cDNA序列来鉴定TCR CDR3序列。

5. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中(k)还包括鉴定(j)中收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR α 链恒定(C)区序列和(j)中收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR β 链C区序列。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中(l)包括组装包含(k)中鉴定的所述TCR α 链V区段序列,(k)中鉴定的所述TCR α 链C区序列,和(j)中收集的所述TCR α 链CDR3序列的TCR α 链,和组装包含(k)中鉴定的所述TCR β 链V区段序列、(k)中鉴定的所述TCR β 链C区序列和(j)中收集的所述TCR β 链CDR3序列的TCR β 链。

7. 根据权利要求1-4中任一项所述的方法,其中(l)包括组装包含(k)中鉴定的所述TCR α 链V区段序列、外源TCR α 链C区序列和(j)中收集的所述TCR α 链CDR3序列的TCR α 链,和组装包含(k)中鉴定的所述TCR β 链V区段序列、外源TCR β 链C区序列和(j)中收集的所述TCR β 链CDR3序列的TCR β 链。

8. 根据权利要求1-7中任一项所述的方法,其还包括在用户计算设备处接收(f)中鉴定的所述单个T细胞的cDNA的多个片段的序列;

其中(g)包括对所述cDNA的多个片段中的每一个的序列与参考TCR序列数据库进行计算机化比对,以鉴定(f)中鉴定的所述单个T细胞的cDNA的多个片段的TCR α 链可变(V)区段序列和TCR β 链V区段序列;

其中(h)包括对含有(g)中鉴定的所述TCR α 链V区段序列的cDNA的多个片段中和含有(g)中鉴定的所述TCR β 链V区段序列的cDNA的多个片段中的TCR CDR3序列进行计算机化鉴定;

其中(i)包括对共用相同 α 链CDR3氨基酸序列的cDNA的多个片段的数目和共用相同 β 链CDR3氨基酸序列的cDNA的多个片段的数目进行计算机化计数;

其中(j)包括对编码相同 α 链CDR3序列的cDNA的最高数目的多个片段、编码相同 β 链CDR3序列的cDNA的最高数目的多个片段和任选地,编码相同 α 链CDR3序列的cDNA的第二高数目的多个片段进行计算机化收集,其中由cDNA的第二高数目的多个片段编码的 α 链CDR3序列不同于由cDNA的最高数目的多个片段编码的 α 链CDR3序列,

以鉴定所述TCR α 和 β 链CDR3序列;和

其中(k)包括对(j)中收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR α 链V区段序列、(j)中收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR β 链V区段序列和任选地,(j)中收集的cDNA的第二高

数目的多个片段的TCR α 链V区段序列进行计算机化鉴定，

以鉴定所述TCR α 和 β 链V区段序列。

9. 制备表达配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的细胞群的方法，所述方法包括：

根据权利要求1-8中任一项所述的方法分离配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分，
和

将编码经分离的配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的核苷酸序列引入宿主细胞中，以获得表达所述配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的细胞。

10. 根据权利要求9所述的方法，其还包括扩大表达所述配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的宿主细胞的数目。

11. 一对TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分，其根据权利要求1-8中任一项所述的方法分离。

12. 经分离的细胞群，其根据权利要求9或10制备。

13. 药物组合物，其包含 (a) 权利要求11所述的一对TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分，或 (b) 权利要求12所述的经分离的T细胞群，以及药学上可接受的载体。

14. 如权利要求11所述的一对TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分，如权利要求12所述的经分离的细胞群，或如权利要求13所述的药物组合物，其用于治疗或预防哺乳动物中的癌症的用途。

15. 根据权利要求14所述用途的经分离的细胞群或包含所述经分离的细胞群的药物组合物，其中所述细胞群是哺乳动物自体的。

16. 自动鉴定T细胞受体 (TCR) 的TCR α 和 β 链V区段序列和CDR3序列的方法，所述TCR对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性，所述方法包括：

(a) 在用户计算设备处接收cDNA的多个片段的序列，其中在将单个T细胞与呈递所述经突变的氨基酸序列的抗原呈递细胞 (APC) 共培养，使得所述T细胞表达一种或多种T细胞活化标志物后，所述cDNA由这样的T细胞产生的mRNA编码；

(b) 对所述cDNA的多个片段中的每一个的序列与参考TCR序列数据库进行计算机化比对，以鉴定所述cDNA的多个片段的TCR α 链可变 (V) 区段序列和TCR β 链V区段序列；

(c) 对含有 (b) 中鉴定的所述TCR α 链V区段序列的cDNA的多个片段中和含有 (b) 中鉴定的所述TCR β 链V区段序列的cDNA的多个片段中的TCR互补决定区3 (CDR3) 序列进行计算机化鉴定；

(d) 对共用相同 α 链CDR3氨基酸序列的cDNA的多个片段的数目和共用相同 β 链CDR3氨基酸序列的cDNA的多个片段的数目进行计算机化计数；

(e) 对编码相同 α 链CDR3序列的cDNA的最高数目的多个片段、编码相同 β 链CDR3序列的cDNA的最高数目的多个片段和任选地，编码相同 α 链CDR3序列的cDNA的第二高数目的多个片段进行计算机化收集，其中由cDNA的第二高数目的多个片段编码的 α 链CDR3序列不同于由cDNA的最高数目的多个片段编码的 α 链CDR3序列，

以鉴定所述TCR α 和 β 链CDR3序列；和

(f) 对 (e) 中收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR α 链V区段序列、(e) 中收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR β 链V区段序列和任选地，(e) 中收集的cDNA的第二高数目的多个片段的TCR α 链V区段序列进行计算机化鉴定，

以鉴定所述TCR α 和 β 链V区段序列。

17. 根据权利要求16所述的方法, 其中(c)包括通过鉴定编码位于由所述 α 和 β 链的V区段编码的氨基酸序列的C-末端附近的保守氨基酸残基的cDNA序列来鉴定TCR CDR3序列。

18. 根据权利要求17所述的方法, 其中所述保守氨基酸残基包含YX₁CX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂ (SEQ ID NO:5)的氨基酸序列, 其中:

X₁-X₉中的每一个是任何天然存在的氨基酸,

X₁₀-X₂₁中的每一个不是氨基酸或是任何天然存在的氨基酸, 和

X₂₂是苯基丙氨酸或色氨酸。

19. 根据权利要求16-18中任一项所述的方法, 其中(f)还包括对(e)中收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR α 链恒定(C)区序列和(e)中收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR β 链C区序列进行计算机化鉴定。

分离新抗原-特异性T细胞受体序列的方法

[0001] 相关申请的交叉引用

[0002] 本专利申请要求2017年3月31日提交的美国临时专利申请第62/479,398号的权益,其通过引用并入。

[0003] 关于联邦资助的研究和开发的声明

[0004] 本发明是在美国国立卫生研究院,美国国立癌症研究所授予的项目号ZIABC010985的政府支持下完成的。政府对本发明享有一定的权利。

[0005] 通过引用并入以电子方式提交的材料

[0006] 通过引用整体并入本文的是计算机可读的核苷酸/氨基酸序列列表,其与本文同时提交并标识如下:一个名为“737921SeqListing_ST25.txt”的5,530字节的ASCII(文本)文件,日期为2018年3月22日。

[0007] 发明背景

[0008] 使用已经遗传工程化以表达癌症抗原(如,新抗原(neoantigen))-特异性T细胞受体(TCR)的细胞的过继性细胞疗法(ACT)可以在一些癌症患者中产生阳性临床响应。然而,成功使用TCR-工程化的细胞来广泛治疗癌症和其他疾病的障碍仍然存在。例如,特异性识别癌症抗原(如,新抗原)的TCR可能难以鉴定和/或从患者分离。因此,需要改进的获得癌症-反应性(如,新抗原-反应性)TCR的方法。

[0009] 发明简述

[0010] 本发明的实施方案提供了分离配对的T细胞受体(TCR) α 和 β 链序列或其抗原结合部分的方法,所述方法包括:(a)从生物样品分离对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞;(b)与呈递经突变的氨基酸序列的抗原呈递细胞(APC)一起共培养经分离的T细胞,使得所述T表达一种或多种T细胞活化标志物;(c)将共培养的T细胞分选成单独的单T细胞样品;(d)从每个单独的单T细胞样品分离mRNA;(e)对来自每个单独的单T细胞样品的mRNA进行测序,其中测序包括:(i)从所述mRNA产生cDNA并扩增所述cDNA;(ii)产生经扩增的cDNA的多个片段和标记所述多个片段;(iii)扩增所述cDNA的经标记的多个片段;和(iv)对所述cDNA的经扩增的经标记的多个片段进行测序;其中所述测序鉴定所述cDNA的多个片段中的每一个的序列;(f)将所述cDNA的多个片段中的每一个的序列与一种或多种T细胞活化标志物的已知序列比对,以鉴定哪个单T细胞样品含有表达一种或多种T细胞活化标志物的单个T细胞;(g)将所述cDNA的多个片段中的每一个的序列与参考TCR序列数据库比对,以鉴定在(f)中鉴定以表达一种或多种T细胞活化标志物的每个单独的单T细胞样品的cDNA的多个片段的TCR α 链可变(V)区段序列和TCR β 链V区段序列;(h)在含有(g)中鉴定的所述TCR α 链V区段序列的所述cDNA的多个片段中和在含有(g)中鉴定的所述TCR β 链V区段序列的所述cDNA的多个片段中鉴定TCR互补决定区3(CDR3)序列;(i)对共用相同 α 链CDR3氨基酸序列的cDNA的多个片段的数目和共用相同 β 链CDR3氨基酸序列的cDNA的多个片段的数目进行计数;(j)收集编码相同 α 链CDR3序列的cDNA的最高数目的多个片段、编码相同 β 链CDR3序列的cDNA的最高数目的多个片段和任选地,编码相同 α 链CDR3序列的cDNA的第二高数目的多个片段,其中由cDNA的第二高数目的多个片段编码的 α 链CDR3序

列不同于由cDNA的最高数目的多个片段编码的 α 链CDR3序列,以鉴定所述TCR α 和 β 链CDR3序列;(k)鉴定(j)中收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR α 链V区段序列、(j)中收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR β 链V区段序列和任选地,(j)中收集的cDNA的第二高数目的多个片段的TCR α 链V区段序列,以鉴定所述TCR α 和 β 链V区段序列;和(1)组装编码以下的一条或多条核苷酸序列:TCR α 链,其包含(k)中鉴定的所述TCR α 链V区段序列和(j)中收集的TCR α 链CDR3序列,和TCR β 链,其包含(k)中鉴定的所述TCR β 链V区段序列和(j)中收集的TCR β 链CDR3序列,任选地组装编码以下的第二一条或多条核苷酸序列:第二TCR α 链,其包含(k)中鉴定的cDNA的第二高数目的多个片段的TCR α 链V区段序列和(j)中收集的cDNA的第二高数目的多个片段的TCR α 链CDR3序列,和TCR β 链,其包含(k)中鉴定的TCR β 链V区段序列和(j)中收集的TCR β 链CDR3序列,以产生经分离的配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分。

[0011] 本发明的另一个实施方案提供了自动鉴定T细胞受体(TCR)的TCR α 和 β 链V区段序列和CDR3序列的方法,所述TCR对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性,所述方法包括:(a)在用户计算设备处接收cDNA的多个片段的序列,其中在将单个T细胞与呈递所述经突变的氨基酸序列的抗原呈递细胞(APC)共培养,使得所述T细胞表达一种或多种T细胞活化标志物后,所述cDNA由这样的T细胞产生的mRNA编码;(b)对所述cDNA的多个片段中的每一个的序列与参考TCR序列数据库进行计算机化比对,以鉴定所述cDNA的多个片段的TCR α 链可变(V)区段序列和TCR β 链V区段序列;(c)对含有(b)中鉴定的所述TCR α 链V区段序列的cDNA的多个片段中和含有(b)中鉴定的所述TCR β 链V区段序列的cDNA的多个片段中的TCR互补决定区3(CDR3)序列进行计算机化鉴定;(d)对共用相同 α 链CDR3氨基酸序列的cDNA的多个片段的数目和共用相同 β 链CDR3氨基酸序列的cDNA的多个片段的数目进行计算机化计数;(e)对编码相同 α 链CDR3序列的cDNA的最高数目的多个片段、编码相同 β 链CDR3序列的cDNA的最高数目的多个片段和任选地,编码相同 α 链CDR3序列的cDNA的第二高数目的多个片段进行计算机化收集,其中由cDNA的第二高数目的多个片段编码的 α 链CDR3序列不同于由cDNA的最高数目的多个片段编码的 α 链CDR3序列,以鉴定所述TCR α 和 β 链CDR3序列;和(f)对(e)中收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR α 链V区段序列、(e)中收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR β 链V区段序列和任选地,(e)中收集的cDNA的第二高数目的多个片段的TCR α 链V区段序列进行计算机化鉴定,以鉴定所述TCR α 和 β 链V区段序列。

[0012] 本发明的另一个实施方案提供了制备表达配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的细胞群的方法,所述方法包括:根据本文所述的本发明方法中任一项分离配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分,和将编码经分离的配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的核苷酸序列引入宿主细胞中以获得表达所述配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的细胞。

[0013] 本发明的另一个实施方案提供了根据本文所述的本发明方法中任一项分离的一对TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分。

[0014] 本发明的又一个实施方案提供了根据本文所述的本发明方法中任一项制备的分离的细胞群。

[0015] 本发明的另外实施方案提供了相关的药物组合物和治疗或预防癌症的方法。

[0016] 附图的几幅图的简述

[0017] 图1是说明鉴定新抗原-反应性TIL的方法的示意图。

[0018] 图2是说明鉴定新抗原-特异性TCR的方法的示意图。

[0019] 图3A和图3B是显示在与TMG-5-脉冲的自体DC共培养4小时,然后进行单细胞RNA-seq分析的4090 F7 T细胞中测量的总R1读取内IFN- γ (A) 和IL-2 (B) 读取的百分比的图。

[0020] 图3C是显示未转导的(无阴影柱)或用4090TCR转导的(阴影柱)供体T细胞在与用TMG-5或TMG-6脉冲的DC共培养后所分泌的IFN- γ 的量(pg/mL)的图。未用TMG脉冲的DC(“w/o”)用作阴性对照。

[0021] 图3D是显示4090 TCR-转导的T细胞在与已经用突变的25-mer肽(对应于来自TMG-5的指定小基因之一)脉冲的4090 DC共培养后所分泌的IFN- γ 的量(pg/mL)的图。

[0022] 图3E是显示4090 TCR-转导的T细胞在与已经用指定浓度(conc.) (μ M)的纯化的25-mer WT(空心圆)或突变的(实心圆)USP8肽脉冲的4090DC共培养后所分泌的IFN- γ 的量(pg/mL)的图。

[0023] 图4A和图4B是显示在与TMG-1-脉冲的自体DC共培养4小时,然后进行单细胞RNA-seq分析的4095 F5 T细胞中测量的总R1读取内IFN- γ (A) 和IL-2 (B) 读取的百分比的图。

[0024] 图4C是显示在图4B中表达可检测的IL-2读取的单细胞中测量的总R1读取内IFN- γ 和IL-2读取的百分比的图。

[0025] 图4D是显示未转导的(无阴影柱)或用4095 TCR转导的(阴影柱)供体T细胞在与用全长WT或突变的KRAS mRNA脉冲的DC共培养后所分泌的IFN- γ 的量(pg/mL)的图。未用肽脉冲的DC(“w/o”)用作阴性对照。

[0026] 图4E是显示4095 TCR-转导的T细胞在与已经用指定浓度(μ M)的纯化的9-mer WT(空心圆)或突变的(实心圆)KRAS肽脉冲的4095 DC共培养后所分泌的IFN- γ 的量(pg/mL)的图。

[0027] 图5A和图5B是显示在与TMG-9-脉冲的自体DC共培养4小时,然后进行单细胞RNA-seq分析的4112 F5 T细胞中测量的总R1读取内IFN- γ (A) 和IL-2 (B) 读取的百分比的图。

[0028] 图5C是显示在图5B中表达可检测的IL-2读取的8个单细胞中测量的总R1读取内IFN- γ 和IL-2读取的百分比的图。

[0029] 图5D是显示未转导的(无阴影柱)或用4112 TCR转导的(阴影柱)供体T细胞在与用TMG-9或TMG-10脉冲的DC共培养后所分泌的IFN- γ 的量(pg/mL)的图。未用肽脉冲的DC(“w/o”)用作阴性对照。

[0030] 图5E是显示4112 TCR-转导的T细胞在与用指定的短肽集合(SPP-1至SPP-10)脉冲的EBV-转化的B细胞共培养后所分泌的IFN- γ 的量(pg/mL)的图。未用肽脉冲的EBV-转化的B细胞(“w/o”)用作阴性对照。

[0031] 图5F是显示4112 TCR-转导的T细胞在与用SPP-9或指定肽VWDALFADGLSLCL (SEQ ID NO:18);WRRVAWSYDSTLL (SEQ ID NO:19);WSYDSTLL (SEQ ID NO:20);WSYDSTLLA (SEQ ID NO:21);WSYDSTLLAY (SEQ ID NO:22);YLALVDKNIIGY (SEQ ID NO:23);或YSEPDVSGK (SEQ ID NO:24)中的一种脉冲的EBV-转化的B细胞共培养后所分泌的IFN- γ 的量(pg/mL)的图。未用肽脉冲的EBV-转化的B细胞(“w/o”)用作阴性对照。

[0032] 图5G是显示4112 TCR-转导的T细胞在与用纯化的突变(实心圆)NBAS肽WSYDSTLLAY (C>S) (SEQ ID NO:4)或其WT(空心圆)对应物脉冲的EBV-转化的B细胞共培养后所分泌的IFN- γ 的量(pg/mL)的图。

[0033] 图6是说明根据本发明的一些实施方案的系统的框图。

[0034] 图7是说明根据本发明的实施方案的计算设备的组件的框图。

[0035] 图8是用于根据本发明的实施方案,自动鉴定对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞受体(TCR)的TCR α 和 β 链V区段序列和CDR3序列的方法步骤的流程图。

[0036] 图9A是显示在ELISPOT测定中针对编码突变的25-mer长肽集合(PP)文库筛选TIL4171F6 T细胞后检测到的IFN- γ 阳性斑点的数目的图。用OKT3抗体处理的T细胞用作阳性对照。未用肽集合培养的T细胞(w/o)用作阴性对照。

[0037] 图9B和9C是显示TIL 4171 F6 T细胞在与PP-3-脉冲的自体DC共培养后的IFN- γ (FPKM(每千碱基转录物片段/百万个映射的读取)) (图9B) 和IL-2 (图9C) 表达的图。

[0038] 图9D是组合图9B和9C的数据的二维散点图,显示每个单细胞中IFN- γ 和IL-2表达的关系(每个点代表单细胞)。

[0039] 图9E是显示在未转导的(无阴影柱)或4171TCR-转导的(阴影柱)细胞与PP-脉冲的DC共转染后产生的IFN- γ 的量(pg/mL)的图。未用肽集合培养的T细胞(w/o)用作阴性对照。

[0040] 图9F是显示在4171TCR-转导的T细胞与用指定肽脉冲的DC共培养后产生的IFN- γ 的量(pg/mL)的图。未用肽集合培养的T细胞(pg/mL)用作阴性对照。

[0041] 图9G是显示在4171TCR-转导的T细胞与用指定浓度(μ M)的WT(空心圆)或突变的(实心圆)SIN3A肽脉冲的DC共培养后产生的IFN- γ 的量(pg/mL)的图。

[0042] 发明详述

[0043] 本发明的实施方案提供了分离配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的方法。

[0044] 本发明的方法可以解决具有所需抗原特异性的功能性TCR的鉴定和分离的各种不同挑战中的任一种。这些挑战可包括,例如,TCR序列的大量多样性,需要TCR α 和 β 链正确配对以提供所需的抗原特异性,和成熟T细胞的高达约三分之一可表达两条功能性TCR α 链,而TCR α 链中只有一条可能具有所需的特异性。

[0045] 本发明的方法可以提供各种优点中的任一种。例如,本发明的方法可以显著减少在生物样品(如,肿瘤样品)从患者移除之后分离和鉴定对癌症抗原(如,新抗原)具有抗原特异性的TCR的序列所必需的时间和/或成本。在分离和鉴定TCR序列后,可以用TCR序列转导宿主细胞(如,自体T细胞),可以扩大转导细胞的数量,并且可以将扩大数量的转导细胞施用给患者以治疗和/或预防癌症。本发明的方法可以(i) 鉴定癌症抗原和识别癌症抗原的TCR的序列和/或(ii) 促进靶向癌症抗原(如,新抗原)的高度个性化的TCR疗法。此外,与通过有限稀释使用T细胞克隆分离配对的TCR α / β 序列的方法相比,本发明的方法可以有利地更省时、更省力并且具有更高的成功率。本发明的方法还可能有效地鉴定具有多于一种功能性TCR α 基因的那些T细胞中正确的TCR α 和 β 链对。本发明的方法还可以从高度多样化的T细胞群中鉴定和分离配对的TCR α 和 β 链序列(具有所需的抗原特异性)。

[0046] $\alpha\beta$ TCR是由 α 和 β 蛋白链组成的异二聚体。每条链包括两个胞外结构域、可变(V)区和恒定(C)区,其后是跨膜区和短胞质尾。TCR α -链和 β -链中的每一个的可变结构域具有接触并识别肽-MHC复合物的三个“互补决定区”(CDR1、CDR2和CDR3)。特别地, α 和 β CDR3负责识别加工的抗原。从T细胞到T细胞,CDR3 α 和CDR3 β 的氨基酸序列中存在极高程度的多态性。这种水平的多态性是T细胞识别免疫系统面临的广泛抗原所必需的。CDR3 α 和CDR3 β 的氨基酸

序列中的多态性由在T细胞成熟期间发生的TCR α 和 β 基因内的DNA重排产生。

[0047] 编码TCR的基因由称为TCR α -基因中的“V区段”和“J区段”以及TCR β -链中的“V区段”、“D区段”和“J区段”的编码序列盒组成。基因组DNA中的随机重排导致这些DNA区段并列,从而产生功能性TCR基因。这些重排可能是不精确的,并且V α -J α 和V β -Dc-J β 区段的连接可能是高度可变的。 α 链的CDR3由一部分的V区段和所有J区段编码。 β 链的CDR3由一部分的V区段、所有J区段和所有D区段编码。

[0048] 该方法可以包括从生物样品中分离对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞。可以使用任何适合的生物样品。在本发明的实施方案中,生物样品是肿瘤样品或外周血样品。可根据本发明使用的生物样品的实例包括但不限于来自原发性肿瘤的组织、来自转移性肿瘤位点的组织、渗出物、积液、腹水、分级分离的外周血细胞、骨髓、外周血血沉棕黄层和脑脊液。因此,生物样品可以通过任何适合的方式获得,包括但不限于抽吸、活检、切除、静脉穿刺、动脉穿刺、腰椎穿刺、分流、导管插入或放置引流管。

[0049] 从生物样品中分离的T细胞对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性。短语“抗原特异性”,如本文所用,意指TCR或其抗原结合部分可以特异性结合至并免疫识别由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列。癌症特异性突变可以是任何编码经突变的氨基酸序列(还被称为“非沉默突变”)并在癌细胞中表达但不在正常非癌性细胞中表达的基因中的任何突变。分离对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞的方法描述于例如WO 2016/053338和WO 2016/053339中。例如,分离对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞可包括:鉴定患者癌细胞核酸中的一个或多个基因,每个基因含有编码经突变的氨基酸序列的癌症特异性突变;诱导患者的自体抗原呈递细胞(APC)呈递经突变的氨基酸序列;将患者的自体T细胞与呈递经突变的氨基酸序列的自体APC共培养;和选择自体T细胞,其(a)与呈递经突变的氨基酸序列的自体APC共培养,和(b)对在由患者表达的主要组织相容性复合物(MHC)分子的背景下呈递的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性,以提供对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的经分离的T细胞。

[0050] 一旦分离出对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的T细胞,本发明的方法还包括将那些分离的T细胞与呈递经突变的氨基酸序列的APC共培养,使得T细胞表达一种或多种T细胞活化标志物。APC可以包括呈递与其细胞表面上的主要组织相容性复合物(MHC)分子相缔合的蛋白质的肽片段的任何细胞。APC可包括例如巨噬细胞、树突细胞(DC)、朗格汉斯细胞、B-淋巴细胞和T细胞中的任一种或多种。优选地,APC是DC。可以使用多种T细胞活化标志物中的任一种或多种来鉴定对经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的那些T细胞。T细胞活化标志物的实例包括但不限于以下中的任一种或多种:程序化细胞死亡1(PD-1)、淋巴细胞-活化基因3(LAG-3)、T细胞免疫球蛋白和粘液素结构域3(TIM-3)、4-1BB、OX40、CD107a、颗粒酶B、干扰素(IFN)- γ 、白介素(IL)-2、肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、粒细胞/单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-17和IL-22。

[0051] 该方法还包括将共培养的T细胞分选成单独的单T细胞样品和从每个单独的单T细胞样品分离mRNA。分选成单独的单T细胞样品和分离mRNA可以是自动化的。例如,可以使用FLUIDIGM C1自动化单细胞分离和制备系统(可从Fluidigm, South San Francisco, CA获

得) 进行分选成单独的单T细胞样品和分离mRNA。本发明的方法可以有利地提供任意数目的单独的单细胞mRNA样品(例如,约2、约3、约4、约5、约10、约11、约12、约13、约14、约15、约20、约25、约30、约40、约50、约60、约70、约80、约90、约100、约150、约200、约400、约600、约800、约1000、约1500、约2000或更多,或由前述任何两个值限定的范围)。在本发明的实施方案中,该方法包括制备约96个单独的单细胞mRNA样品。

[0052] 在本发明的实施方案中,该方法还可以包括用针对每个单独的单T细胞样品的不同标签(如,条形码)标记来自每个单独的单T细胞样品的mRNA。例如,可以使用ILLUMINA Nextera XT DNA文库制备试剂盒(可从Illumina, San Diego, CA获得)标记来自每个单独的单T细胞样品的mRNA。

[0053] 本发明方法还包括对来自每个单独的单T细胞样品的mRNA进行测序。可以以本领域已知的任何适合的方式进行测序。可用于本发明方法的测序技术的优选实例包括下一代测量(NGS)(还被称为“大规模并行测序技术”或“深度测序”)或第三代测序。NGS是指不是基于Sanger的高通量DNA测序技术。对于NGS,可以对数百万或数十亿的DNA链并行测序,产生显著更大的通量并最大限度地减少对基因组的Sanger测序中经常使用的片段-克隆方法的需要。在NGS中,通过将整个基因组分成小块,可以沿整个基因组并行随机读取核酸模板。NGS可以有利地在非常短的时间段内(如,在约1至约2周内,优选在约1至约7天内,或最优选地,在不到24小时内)提供来自每个单独的单个T细胞mRNA样品的核酸序列信息。可商购获得的或在文献中描述的多个NGS平台可以用于本发明方法的背景中,如Zhang等人, *J. Genet. Genomics*, 38(3):95-109(2011)和Voelkerding等人, *Clinical Chemistry*, 55:641-658(2009)中所述的那些。

[0054] NGS技术和平台的非限制性实例包括边合成边测序(也称为“焦磷酸测序”)(如例如使用GS-FLX 454基因组测序仪,454 Life Sciences(Branford,CT),ILLUMINA SOLEXA基因组分析仪(Illumina Inc., San Diego,CA),ILLUMINA HISEQ 2000基因组分析仪(Illumina),或ILLUMINA MISEQ系统(Illumina)实施,或如例如Ronaghi等人, *Science*, 281(5375):363-365(1998)中所述),边连接边测序(如例如使用SOLID平台(Life Technologies Corporation, Carlsbad,CA)或POLONATOR G.007平台(Dover Systems, Salem,NH)实施),单分子测序(如例如使用PACBIO RS系统(Pacific Biosciences(Menlo Park,CA)或HELISCOPE平台(Helicos Biosciences(Cambridge,MA)实施),用于单分子测序的纳米技术(如例如使用Oxford Nanopore Technologies(Oxford,UK)的GRIDION平台、由Nabsys(Providence,RI)开发的杂交-辅助的纳米孔测序(HANS)平台,和使用DNA纳米球(DNB)技术的基于连接酶的DNA测序平台(被称为探针-锚连接(cPAL)实施),用于单分子测序的基于电子显微术的技术,和离子半导体测序。

[0055] 在这方面,对来自每个单独的单T细胞样品的mRNA进行测序可以包括从mRNA产生cDNA并扩增cDNA,产生扩增的cDNA的多个片段并标记多个片段,扩增cDNA的经标记的多个片段,并对cDNA的经扩增的标记的多个片段进行测序。标记可以包括向多个片段的每一个添加核苷酸序列,使得多个片段可以彼此区分。该测序鉴定cDNA的多个片段中的每一个的序列。cDNA的多个片段中的每一个的序列还被称为“读取”。mRNA的测序可产生任何数量的读取。例如,对于每个单T细胞样品,mRNA的测序可产生约1,000,000个读取、约900,000个读取、约800,000个读取、约700,000个读取、约600,000个读取、约500,000个读取、约400,000

个读取、约300,000个读取、约200,000个读取、约100,000个读取或更多个读取,或由前述任何两个值限定的范围。在许多NGS平台中,可能有两个读取方向:一个是正向读取(也称为“读取1”或“R1”),和另一个是反向读取(也称为“读取2”或“R2”)。对于cDNA片段,R1和R2可以彼此互补。在本发明的实施方案中,该方法包括仅测量R1读取,仅测量R2读取,或测量R1和R2读取两者。R1可能具有比R2更高的测序质量。优选地,该方法包括仅测量R1读取。

[0056] 该方法还包括将cDNA的多个片段中的每一个的序列与一种或多种T细胞活化标志物的已知序列比对,以鉴定哪个单T细胞样品含有表达一种或多种T细胞活化标志物的单个T细胞。与呈递由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列的APC共培养后表达一种或多种T细胞活化标志物的一种或多种单个T细胞被鉴定为表达对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的TCR。

[0057] 该方法还包括将cDNA的多个片段中的每一个的序列与参考TCR序列数据库比对,以鉴定经鉴定表达一种或多种T细胞活化标志物的每个单独的单T细胞样品的cDNA的多个片段的TCR α 链可变(V)区序列和TCR β 链V区序列。在这方面,将cDNA的多个片段中的每一个的序列针对已知的TCR可变区段序列比对,以便鉴定哪些cDNA片段含有可变区段序列的全部或部分并在cDNA片段上定位可变区段序列的3'末端的大致位置。可变区段序列的3'末端表示CDR3的大致位置。

[0058] 参考TCR序列数据库可以是任何适合的参考TCR序列数据库。参考TCR序列数据库的实例可包括从Lefranc等人,Nucleic Acids Res.,43:D413-422(2015)中所述的国际免疫遗传信息系统(IMGT)数据库([//www.imgt.org](http://www.imgt.org))获得的序列。可以例如使用Li等人,Bioinformatics,25:1754-60(2009)和Li等人,Bioinformatics,26(5):589-95(2010)中所述的Burrows-Wheeler Aligner(BWA)软件包([//bio-bwa.sourceforge.net/](http://bio-bwa.sourceforge.net/))进行cDNA的多个片段中的每一个的序列与参考TCR序列数据库的比对。

[0059] 该方法还包括在含有经鉴定的TCR α 链V区段序列的cDNA的多个片段中和含有经鉴定的TCR β 链V区段序列的cDNA的多个片段中鉴定TCR互补决定区3(CDR3)序列。可以以任何适合的方式鉴定CDR3区序列。在本发明的实施方案中,鉴定TCR CDR3序列是通过鉴定编码位于由 α 和 β 链的V区段编码的氨基酸序列的C-末端附近的保守氨基酸残基的cDNA序列进行的。例如,鉴定TCR CDR3序列可以通过鉴定编码YX₁CX₂X₃X₄X₅X₆X₇X₈X₉X₁₀X₁₁X₁₂X₁₃X₁₄X₁₅X₁₆X₁₇X₁₈X₁₉X₂₀X₂₁X₂₂(SEQ ID NO:5)的氨基酸序列基序的任何cDNA序列来进行,其中X₁-X₉中的每一个是任何天然存在的氨基酸,X₁₀-X₂₁中的每一个不是氨基酸或是任何天然存在的氨基酸,并且X₂₂是苯基丙氨酸或色氨酸。SEQ ID NO:5的氨基酸序列基序是位于由V区段编码的氨基酸序列的C-末端附近的保守氨基酸序列基序。

[0060] 在本发明的实施方案中,该方法还包括鉴定所收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR α 链恒定(C)区序列和所收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR β 链C区序列。任选地,该方法还包括鉴定所收集的cDNA的第二高数目的多个片段的TCR α 链C区序列。TCR α 链有一种可能的恒定区氨基酸序列。TCR β 链具有两种可能的恒定区氨基酸序列中的一种。

[0061] 该方法还包括对cDNA的共用相同的 α 链CDR3氨基酸序列的多个片段的数目和cDNA的共用相同的 β 链CDR3氨基酸序列的多个片段的数目进行计数。

[0062] 该方法还包括收集编码相同的 α 链CDR3序列的cDNA的最高数目的多个片段、编码相同的 β 链CDR3序列的cDNA的最高数目的多个片段和任选地,编码相同的 α 链CDR3序列的

cDNA的第二高数目的多个片段,以鉴定TCR α 和 β 链CDR3序列。由cDNA的第二高数目的多个片段编码的 α 链CDR3序列不同于由cDNA的最高数目的多个片段编码的 α 链CDR3序列。鉴定的CDR3序列可包括对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的TCR的 β 链CDR3序列和 α 链CDR3序列,和任选地,由T细胞表达但不与 β 链CDR3序列配对以形成对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的TCR的另外的 α 链CDR3序列。据估计,约1/3的成熟T细胞可表达两种TCR α 链。只有一种表达的 α 链与表达的TCR β 链配对,以提供对由癌症特异性突变编码的氨基酸序列具有抗原特异性的TCR。

[0063] 该方法还包括鉴定所收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR α 链V区段序列、所收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR β 链V区段序列和任选地,所收集的cDNA的第二高数的多个片段的TCR α 链V区段序列,以鉴定TCR α 和 β 链V区段序列。编码由单个活化的T细胞表达的优势TCR的CDR3序列的cDNA的多个片段的数目将超过编码任何其他TCR CDR3序列的cDNA片段(其可能由于污染而存在)的数目约10至约100倍。污染源可能是附近的单细胞样品或未知来源。由单个T细胞(其响应于与呈递经突变的氨基酸序列的APC共培养来表达一种或多种T细胞活化标志物)表达的优势TCR是对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的TCR。

[0064] 该方法还包括组装编码TCR α 链和TCR β 链的一条或多条核苷酸序列,所述TCR α 链包含经鉴定的TCR α 链V区段序列和经收集的TCR α 链CDR3序列,所述TCR β 链包含经鉴定的TCR β 链V区段序列和经收集的TCR β 链CDR3序列。编码相同CDR3序列的cDNA的各种多个片段可以具有各种长度并且可以彼此重叠。通过将各种长度的编码相同 α 链CDR3序列的cDNA的各种多个片段彼此比对,可以确定优势TCR α 链的整个V区段、J区段和任选地恒定区的序列。通过将各种长度的编码相同 β 链CDR3序列的cDNA的各种多个片段彼此比对,可以确定优势TCR β 链的整个V区段、J区段、D区段和任选地恒定区的序列。可以使用常规技术组装编码优势TCR α 链的整个V区段、J区段和任选地恒定区的核苷酸序列,以及编码优势TCR β 链的整个V区段、J区段、D区段和任选地恒定区的核苷酸序列。可以产生经分离的配对TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分。

[0065] 在本发明的实施方案中,组装一条或多条核苷酸序列包括组装包含在样品中鉴定的TCR α 链V区段序列、在样品中鉴定的TCR α 链C区序列和收集的TCR α 链CDR3序列的TCR α 链,和组装包含在样品中鉴定的TCR β 链V区段序列、在样品中鉴定的TCR β 链C区序列和收集的TCR β 链CDR3序列的TCR β 链。在这方面,组装的核苷酸序列可包含内源C区序列。

[0066] 在本发明的实施方案中,组装一条或多条核苷酸序列包括组装包含在样品中鉴定的TCR α 链V区段序列、外源TCR α 链C区序列和收集的TCR α 链CDR3序列的TCR α 链,和组装包含在样品中鉴定的TCR β 链V区段序列、外源TCR β 链C区序列和收集的TCR β 链CDR3序列的TCR β 链。外源C区序列是对于T细胞而言并非天然(非天然存在于T细胞上)的C区序列。在这方面,通过该方法产生的经分离的配对TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分可以是嵌合或杂合TCR,其由来源于来自两种不同哺乳动物物种的TCR的氨基酸序列组成。例如,TCR可以包含来源于人TCR的可变区和小鼠TCR的恒定区,使得TCR被“鼠源化”。制备嵌合或杂合TCR的方法描述于,例如Cohen等人,Cancer Res.,66:8878-8886(2006);Cohen等人,Cancer Res.,67:3898-3903(2007);和Haga-Friedman等人,J.Immunol.,188:5538-5546(2012)中。

[0067] 单个T细胞通常表达一种TCR β 链和一种或两种TCR α 链。单个样品中存在一种以上

TCR β 链可能是不完美分选T细胞至单独的T细胞样品的结果。不完美分选可能导致一个样品中无意中包含两个或更多个T细胞。如果发现单个样品表达一种以上TCR β 链,则此样品可以从随后的分析中去除。

[0068] 如上所讨论,估计约1/3的成熟T细胞可表达两种TCR α 链。只有一种表达的 α 链与表达的TCR β 链配对,以提供对由癌症特异性突变编码的氨基酸序列具有抗原特异性的TCR。为了确定哪种TCR α 链与TCR β 链配对以提供所需的特异性,该方法可以包括组装第一核苷酸序列,其编码包含如本文所述鉴定的cDNA的最高数目的多个片段的第一TCR α 链V区段序列和如本文所述收集的TCR α 链CDR3序列的第一TCR α 链以及包含如本文所述鉴定的TCR β 链V区段序列和如本文所述收集的TCR β 链CDR3序列的TCR β 链。该方法可任选地还包括组装第二一条或多条核苷酸序列,其编码:包含鉴定的cDNA的第二高数目的多个片段的TCR α 链V区段序列和收集的cDNA的第二高数目的多个片段的TCR α 链CDR3序列的第二TCR α 链,及包含鉴定的TCR β 链V区段序列和收集的TCR β 链CDR3序列的TCR β 链。

[0069] 该方法还可以包括将第一和第二核苷酸序列分别独立引入第一和第二宿主细胞群,并且独立地共培养第一和第二宿主细胞群与呈递由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列的APC。该方法还可以包括选择宿主细胞群,所述宿主细胞群(a)与呈递经突变的氨基酸序列的APC共培养,和(b)对经突变的氨基酸序列具有抗原特异性。对经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的共培养的宿主细胞群将表达TCR α 链,所述TCR α 链与TCR β 链一起提供所需的特异性。

[0070] 对于经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的细胞可以通过本领域已知的任何适合的方法鉴定。例如,对于经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的细胞可以基于一种或多种T细胞活化标志物和/或一种或多种细胞因子的表达来鉴定,如例如WO 2016/053338和WO 2016/053339所述。T细胞活化标志物可以如本文就本发明的其他方面所述。细胞因子可以包括任何细胞因子,其由T细胞分泌是T细胞活化的特征(如,由特异性结合并免疫识别经突变的氨基酸序列的T细胞表达的TCR)。其分泌是T细胞活化的特征的细胞因子的非限制性实例包括IFN- γ 、IL-2、颗粒酶B和肿瘤坏死因子 α (TNF- α)、粒细胞/单核细胞集落刺激因子(GM-CSF)、IL-4、IL-5、IL-9、IL-10、IL-17和IL-22。

[0071] 在一些实施方案中,使用软件系统进行本发明方法的一个或多个步骤。在这方面,本发明的实施方案提供了自动鉴定TCR的TCR α 和 β 链V区段序列和CDR3序列的方法,所述TCR对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性。

[0072] 图6是根据本发明的某些实施方案的系统100的框图。系统100可以包括一个或多个测序仪计算设备101、用户计算设备103以及用户计算设备103和测序仪计算设备101之间的网络连接102。测序仪计算设备101可以是能够对来自每个单独的单T细胞样品的mRNA进行测序的任何系统。测序仪计算设备101的实例可以包括NGS技术和本文就本发明的其他方面描述的平台任何一种。

[0073] 用户计算设备101可以是支持网络通信的任何类型的通信设备,包括个人计算机、膝上型计算机或个人数字助理(PDA)等。在一些实施方案中,用户计算设备101可以支持多种类型的网络。例如,用户计算设备101可以具有使用IP(因特网方案)的有线或无线网络连接,或者可以具有允许通过蜂窝和数据网络的移动网络连接。

[0074] 如本文更详细描述,用户计算设备103用于捕获由测序仪计算设备101提供的

cDNA的多个片段中的每一个的序列。可以通过网络连接102发送序列。网络连接102的实例是共享磁盘空间。

[0075] 图7是根据本发明一些方面的用于计算设备103的基本功能组件的框图。在图7所示的实施方案中,计算设备103包括一个或多个处理器202、存储器204、网络接口206、存储设备208、电源210、一个或多个输出设备212、一个或多个输入设备214,和软件模块-操作系统216和序列应用218-存储在存储器204中。软件模块被提供为包含在存储器204中,但在某些实施方案中,软件模块包含在存储设备208或者存储器204和存储设备208的组合中。每个组件(包括处理器202、存储器204、网络接口206、存储设备208、电源210、输出设备212、输入设备214、操作系统216和序列应用218)物理地、通信地和/或可操作地互连以用于组件间通信。

[0076] 如图所示,处理器202经配置以实现用于在客户端设备103内执行的功能和/或处理指令。例如,处理器202执行存储在存储器204中的指令或存储在存储设备208上的指令。存储器204,可以是非暂时性计算机可读存储介质,经配置以在操作期间在客户端设备103内存储信息。在一些实施方案中,存储器204包括临时存储器,即当客户端设备103关闭时不保持信息的区域。此类临时存储器的实例包括易失性存储器,诸如随机存取存储器(RAM)、动态随机存取存储器(DRAM)和静态随机存取存储器(SRAM)。存储器204还维护用于由处理器202执行的程序指令。

[0077] 存储设备208还包括一个或多个非暂时性计算机可读存储介质。存储设备208通常经配置以比存储器204存储更大量的信息。存储设备208还可以经配置以用于长期存储信息。在一些实施方案中,存储设备208包括非易失性存储元件。非易失性存储元件的非限制性实例包括磁性硬盘、光盘、软盘、闪存或电可编程存储器(EPROM)或电可擦除和可编程(EEPROM)存储器的形式。

[0078] 用户计算设备103可以使用网络接口206以经由一个或多个网络102(参见图6)以及可以通过其建立与用户计算设备103通信的其他类型的网络与外部测序仪计算设备101通信。网络接口206可以是网络接口卡,诸如以太卡、光学收发器、射频收发器或者可以发送和接收信息的任何其他类型的设备。网络接口的其他非限制性实例包括客户端计算设备中的蓝牙®、3G和Wi-Fi无线电,以及通用串行总线(USB)。

[0079] 用户计算设备103包括一个或多个电源210以向设备提供电力。电源210的非限制性实例包括一次性电源、可再充电电源和/或由镍-镉、锂离子或其他适合的材料开发的电源。

[0080] 一个或多个输出设备212也包括在用户计算设备103中。输出设备212经配置以使用触觉、音频和/或视频刺激向用户提供输出。输出设备212可以包括显示屏(存在灵敏性屏幕的一部分)、声卡、视频图形适配卡,或用于将信号转换成人或机器可理解的适当形式的任何其他类型的设备。输出设备212的另外实例包括扬声器诸如耳机、阴极射线管(CRT)监视器、液晶显示器(LCD)或可以向用户产生可理解输出的任何其他类型的设备。

[0081] 用户计算设备包括一个或多个输入设备214。输入设备214经配置以通过触觉、音频和/或视频反馈从用户或用户周围环境接收输入。输入设备214的非限制性实例包括照相机和摄像机、存在灵敏性屏幕、鼠标、键盘、语音响应系统、麦克风或任何其他类型的输入设备。在一些实例中,存在灵敏性屏幕包括触敏屏幕。

[0082] 客户端设备103包括操作系统216。操作系统216控制客户端设备103的组件的操作。例如,操作系统216促进处理器202、存储器204、网络接口206、存储设备208、输入设备214、输出设备212和电源210的交互。

[0083] 如本文更详细描述,用户计算设备可以使用序列应用218来捕获被鉴定为在与呈递经突变的氨基酸序列的APC共培养后表达一种或多种T细胞活化标志物的单个T细胞的cDNA的多个片段的序列。在一些实施方案中,序列应用218可以与测序仪计算设备接口连接并从测序仪计算设备接收输入。在一些实施方案中,用户可以将单个鉴定的T细胞的cDNA的多个片段的序列从测序仪计算设备101下载至可移动磁盘,诸如例如USB闪存驱动器。用户计算设备可以从可移动磁盘获得单个鉴定的T细胞的cDNA的多个片段的序列。

[0084] 用户计算设备103可以包括存储在存储器中并由处理器执行的软件,以鉴定TCR的TCR α 和 β 链V区段序列和CDR3序列,所述TCR对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性,如本文就本发明的其他方面所述。

[0085] 图8是用于自动鉴定TCR的TCR α 和 β 链V区段序列和CDR3序列的方法步骤的流程图,所述TCR对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性。如图所示,方法400开始于步骤402,其中用户计算设备103接收单个T细胞的cDNA的多个片段的序列,所述单个T细胞被鉴定为在与呈递由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列的APC共培养后表达一种或多种T细胞活化标志物。该方法可以包括通过电子网络或经由可移动磁盘(如,USB驱动器)在计算设备处接收cDNA的多个片段的序列。

[0086] 在步骤403,用户计算设备103对cDNA的多个片段中的每一个的序列与参考TCR序列数据库进行计算机化比对,以鉴定单个T细胞的cDNA的多个片段的TCR α 链V区段序列和TCR β 链V区段序列,所述单个T细胞经鉴定在与呈递由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列的APC共培养后表达一种或多种T细胞活化标志物。

[0087] 在步骤404,用户计算设备103对含有经鉴定的TCR α 链V区段序列的cDNA的多个片段中和含有经鉴定的TCR β 链V区段序列的cDNA的多个片段中的TCR CDR3序列进行计算机化鉴定。

[0088] 在步骤405,用户计算设备103对共用相同 α 链CDR3氨基酸序列的cDNA的多个片段的数目和共用相同 β 链CDR3氨基酸序列的cDNA的多个片段的数目进行计算机化计数。

[0089] 在步骤406,用户计算设备进行编码相同 α 链CDR3序列的cDNA的最高数目的多个片段、编码相同 β 链CDR3序列的cDNA的最高数目的多个片段和任选地,编码相同 α 链CDR3序列的cDNA的第二高数目的多个片段的计算机化收集,其中由cDNA的第二高数目的多个片段编码的 α 链CDR3序列不同于由cDNA的最高数目的多个片段编码的 α 链CDR3序列,以鉴定TCR α 和 β 链CDR3序列。

[0090] 在步骤407,用户计算设备103对所收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR α 链V区段序列、所收集的cDNA的最高数目的多个片段的TCR β 链V区段序列和任选地,所收集的cDNA的第二高数目的多个片段的TCR α 链V区段序列进行计算机化鉴定,以鉴定TCR α 和 β 链V区段序列。

[0091] 本发明的另一个实施方案提供了根据本文就本发明的其他方面所述的任何方法分离的一对TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分。本发明的实施方案提供了经分离的TCR,其包含两条多肽(即,多肽链),诸如TCR的 α (α)链和TCR的 β (β)链。本发明分离的一对TCR α 和 β

链序列(还在本文中称为“本发明的TCR”)或其抗原结合部分的多肽可包含任何氨基酸序列,前提是TCR或其抗原结合部分对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性。

[0092] 如本文所用,经分离的一对TCR α 和 β 链序列的“抗原结合部分”,是指包含其作为一部分的TCR的连续氨基酸的任何部分,前提是抗原结合部分特异性结合由如本文就本发明的其他方面描述的癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列。术语“抗原结合部分”是指通过本发明方法分离的TCR的任何部分或片段,所述部分或片段保留其作为一部分的TCR(亲本TCR)的生物活性。抗原结合部分涵盖,例如,TCR的那些保留特异性结合经突变的氨基酸序列的能力、或以与亲本TCR相比类似的程度或相同的程度或更高的程度检测、治疗或预防癌症的部分。关于亲本TCR,抗原结合部分可占例如亲本TCR的约10%、25%、30%、50%、68%、80%、90%、95%或更大。

[0093] 抗原结合部分可以包含通过本发明方法分离的TCR的 α 链和 β 链中的任一个或两个的抗原结合部分,诸如包含通过本发明方法分离的TCR的 α 链和/或 β 链的可变区的互补决定区(CDR)1、CDR2和CDR3中的一个或多个的部分。在本发明的实施方案中,抗原结合部分可包含以下各项的氨基酸序列: α 链的CDR1(CDR1 α)、 α 链的CDR2(CDR2 α)、 α 链的CDR3(CDR3 α)、 β 链的CDR1(CDR1 β)、 β 链的CDR2(CDR2 β)、 β 链的CDR3(CDR3 β)或其任何组合。优选地,抗原结合部分包含通过本发明方法分离的TCR的CDR1 α 、CDR2 α 和CDR3 α 的氨基酸序列;CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 的氨基酸序列;或所有CDR1 α 、CDR2 α 、CDR3 α 、CDR1 β 、CDR2 β 和CDR3 β 的氨基酸序列。

[0094] 在本发明的实施方案中,抗原结合部分可包含例如通过本发明方法分离的TCR的可变区,其包含上述CDR区的组合,例如上述所有六个CDR区。在这方面,抗原结合部分可包含通过本发明方法分离的TCR的 α 链可变区(V α)的氨基酸序列、 β 链可变区的氨基酸序列(V β),或V α 和V β 两者的氨基酸序列。

[0095] 在本发明的实施方案中,抗原结合部分可包含可变区和恒定区的组合。在这方面,抗原结合部分可包含通过本发明方法分离的TCR的 α 链或 β 链或 α 链和 β 链两者的整个长度。

[0096] 通过本发明方法分离的经分离的配对TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分可用于制备用于过继细胞疗法的细胞。在这方面,该方法的另一个实施方案提供了制备表达配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的细胞群的方法。根据本文就本发明的其他方面所述的任何方法,该方法可包括分离配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分。

[0097] 该方法还可以包括将编码经分离的配对TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的核苷酸序列引入宿主细胞中,以获得表达配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的细胞。在这方面,该方法可以包括使用如例如,Green等人(编辑),Molecular Cloning:A Laboratory Manual,Cold Spring Harbor Laboratory Press;第4版(2012)中所述的已建立的分子克隆技术,将编码经分离的配对TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的核苷酸序列克隆至重组表达载体中。为了本文的目的,术语“重组表达载体”意指经遗传修饰的寡核苷酸或多核苷酸构建体,当构建体包含编码mRNA、蛋白、多肽或肽的核苷酸序列,并且载体与细胞在足以使细胞表达mRNA、蛋白、多肽或肽的条件下接触时,其允许宿主细胞表达mRNA、蛋白质、多肽或肽。本发明的载体作为一个整体并非是天然存在的。然而,载体的各部分可以是天然存在的。重组表达载体可包含任何类型的核苷酸,包括但不限于DNA和RNA(其可以是单链或双链的,合成的或部分地由天然来源获得),并且可以含有天然、非天然或改变的核苷酸。重组表

达载体可包含天然存在的、非天然存在的核苷酸间键联,或两种类型的键联。优选地,非天然存在的或改变的核苷酸或核苷酸间键联不妨碍载体的转录或复制。

[0098] 本发明的重组表达载体可以是任何适合的重组表达载体,并且可以用于转化或转染任何适合的宿主细胞。适合的载体包括经设计用于繁殖和扩增或用于表达或两者的那些,诸如质粒和病毒。载体可以选自:转座子/转座酶、pUC系列(Fermentas Life Sciences)、pBluescript系列(Stratagene,LaJolla,CA)、pET系列(Novagen,Madison,WI)、pGEX系列(Pharmacia Biotech,Uppsala,Sweden)和pEX系列(Clontech,Palo Alto,CA)。也可以使用噬菌体载体,诸如 λ GT10、 λ GT11、 λ ZapII(Stratagene)、 λ EMBL4和 λ NM1149。植物表达载体的实例包括pBI01、pBI101.2、pBI101.3、pBI121和pBIN19(Clontech)。动物表达载体的实例包括pEUK-C1、pMAM和pMAMneo(Clontech)。优选地,重组表达载体是病毒载体,如逆转录病毒载体。

[0099] 将编码经分离的配对TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的核苷酸序列(如,重组表达载体)引入宿主细胞可以以如例如Green等人同上所述的本领域已知的多种不同方式中的任一种进行。可用于将核苷酸序列引入宿主细胞的技术的非限制性实例包括转化、转导、转染和电穿孔。

[0100] 在本发明的实施方案中,该方法包括将编码经分离的配对TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的核苷酸序列引入对于提供生物样品的患者是自体的宿主细胞中。在这方面,通过本发明方法鉴定和分离的TCR或其抗原结合部分可以针对每名患者进行个性化。然而,在另一个实施方案中,本发明的方法可以鉴定和分离TCR或其抗原结合部分,其对由复发性(还被称为“热点”)癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性。在这方面,该方法可以包括将编码经分离的配对TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的核苷酸序列引入对患者是同种异体的宿主细胞。例如,该方法可包括将编码经分离的配对TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的核苷酸序列引入另一患者的宿主细胞,该患者的肿瘤在与最初表达TCR的患者相同的MHC分子的背景下表达相同的突变。

[0101] 在本发明的实施方案中,宿主细胞是外周血单核细胞(PBMC)。PBMC可包括T细胞。T细胞可以从患者的多种来源获得,包括但不限于肿瘤、血液、骨髓、淋巴结、胸腺或其他组织或液体。T细胞可以包括任何类型的T细胞,并且可以属于任何发育阶段,包括但不限于CD4+/CD8+双阳性T细胞,CD4+辅助T细胞如Th1和Th2细胞,CD8+T细胞(如,细胞毒性T细胞),肿瘤浸润细胞(如,肿瘤浸润性淋巴细胞(TIL)),外周血T细胞,记忆T细胞,天然T细胞等。T细胞可以是CD8+T细胞、CD4+T细胞,或CD4+和CD8+T细胞两者。

[0102] 不受特定理论或机制的束缚,据信与较高分化的“较老的”T细胞相比,较少分化的“较年轻的”T细胞可与最佳的体内持久性、增殖和抗肿瘤活性中的任一种或多种相关联。因此,本发明的方法可以有利地鉴定和分离对经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的配对TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分,并引入配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分至“较年轻的”T细胞,所述“较年轻的”T细胞与可以从中分离出TCR或其抗原结合部分的“较老的”T细胞(如,患者肿瘤中的效应细胞)相比可提供最佳的体内持久性、增殖和抗肿瘤活性中的任一种或多种。

[0103] 在本发明的实施方案中,该方法还包括扩大其中已引入TCR或其抗原结合部分的宿主细胞的数量。细胞数量的扩大可以如例如美国专利8,034,334;美国专利8,383,099;美

国专利申请公布号2012/0244133;Dudley等人,J.Immunother.,26:332-42(2003);和Riddell等人,J.Immunol.Methods,128:189-201(1990)中所述,通过本领域已知的许多方法中的任一种方法完成。在实施方案中,通过用OKT3抗体、IL-2和饲养PBMC(如,经辐照的同种异体PBMC)培养T细胞来进行细胞数量的扩大。

[0104] 本发明的另一个实施方案提供了根据本文就本发明的其他方面所述的任何方法制备的经分离的细胞群。细胞群可以是异质群,其包括表达经分离的TCR或其抗原结合部分的宿主细胞,以及至少一种其他细胞,如不表达经分离的TCR或其抗原结合部分的宿主细胞(如,PBMC),或除T细胞以外的细胞(如B细胞、巨噬细胞、嗜中性粒细胞、红细胞、肝细胞、内皮细胞、上皮细胞、肌肉细胞、脑细胞等)。可替代地,细胞群可以是基本上同质的群体,其中群体主要包括(如,基本上由以下组成)表达经分离的TCR或其抗原结合部分的宿主细胞。群体也可以是克隆的细胞群,其中群体的所有细胞都是表达经分离的TCR或其抗原结合部分的单个PBMC的克隆,使得群体的所有细胞表达经分离的TCR或其抗原结合部分。在本发明的一实施方案中,细胞群是包含表达如本文所述的经分离的TCR或其抗原结合部分的宿主细胞的克隆群。通过将编码经分离的TCR或其抗原结合部分的核苷酸序列引入宿主细胞,本发明的方法可以有利地提供包括高比例的表达经分离的TCR并对经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的宿主细胞的细胞群。在本发明的实施方案中,约1%至约100%,例如约1%、约5%、约10%、约15%、约20%、约25%、约30%、约35%、约40%、约45%、约50%、约55%、约60%、约65%、约70%、约75%、约80%、约85%、约90%、约95%、约96%、约97%、约98%、约99%或约100%或由前述任何两个值限定的范围的细胞群包括表达经分离的TCR且对经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的宿主细胞。不受特定理论或机制的束缚,据信包括高比例的表达经分离的TCR并且对于经突变的氨基酸序列具有抗原特异性的宿主细胞的细胞群,具有较低比例的可能会阻碍宿主细胞的功能(如宿主细胞靶向癌细胞的破坏和/或治疗或预防癌症的能力)的无关细胞。

[0105] 本发明的TCR或其抗原结合部分和细胞群可以被配制为组合物,诸如药物组合物。在这方面,本发明提供了药物组合物,其包含本发明的TCR或其抗原结合部分或细胞群中的任一种和药物上可接受的载体。本发明的药物组合物可包含本发明的TCR或其抗原结合部分或细胞群,以及另一种药物活性剂或药物诸如化学治疗剂,如天冬酰胺酶、白消安、卡铂、顺铂、道诺霉素、多柔比星、氟尿嘧啶、吉西他滨、羟基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔单抗、长春碱、长春新碱等。

[0106] 优选地,载体是药学上可接受的载体。关于药物组合物,载体可以是那些常规用于所考虑的特定的本发明TCR或其抗原结合部分或细胞群中的任一种。此类药学上可接受的载体对于本领域技术人员来说是公知的并且容易为公众所获得。药学上可接受的载体优选是在使用条件下没有有害副作用或毒性的载体。

[0107] 载体的选择将部分地由特定的本发明的TCR、其抗原结合部分或细胞群,以及由用于施用本发明的TCR、其抗原结合部分或细胞群的特定方法来决定。因此,存在本发明的药物组合物的多种适合的制剂。适合的制剂可包括经口、肠胃外、皮下、静脉内、肌肉内、动脉内、鞘内或腹膜内施用中的任一种。可以使用一种以上的途径来施用本发明的TCR或细胞群,并且在某些情况下,特定途径可以提供比另一种途径更直接和更有效的响应。

[0108] 优选地,本发明的TCR、其抗原结合部分或细胞群通过注射,如静脉内注射施用。当

要施用本发明的细胞群时,注射用细胞的药学上可接受的载体可以包括任何等渗载体,诸如例如生理盐水(约0.90%w/v的NaCl水溶液、约300mOsm/L NaCl水溶液或约9.0g NaCl/水L)、NORMOSOL R电解质溶液(Abbott,Chicago,IL)、血浆-LYTE A(Baxter,Deerfield,IL)、约5%右旋糖水溶液或林格氏乳酸盐。在实施方案中,药学上可接受的载体补充有人血清白蛋白。

[0109] 预期本发明的TCR、其抗原结合部分、细胞群和药物组合物可用于治疗或预防癌症的方法中。不受特定理论或机制的束缚,本发明的TCR或其抗原结合部分被认为特异性结合由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列,使得TCR或其抗原结合部分当由细胞表达时能够介导针对表达经突变的氨基酸序列的靶细胞的免疫应答。在这方面,本发明的实施方案提供了治疗或预防哺乳动物癌症的方法,其包括向哺乳动物以有效治疗或预防哺乳动物癌症的量施用本文所述的本发明的药物组合物、经分离的TCR α 和 β 链序列对、其抗原结合部分或细胞群中的任一个。

[0110] 本发明的另一个实施方案提供了本文就本发明的其他方面所述的用于治疗或预防哺乳动物的癌症的本发明TCR或其抗原结合部分、细胞群或药物组合物中的任一个。

[0111] 术语“治疗”和“预防”以及由此产生的词语,如本文所用,并不一定意味着100%或完全治疗或预防。相反,存在不同程度的治疗或预防,本领域普通技术人员认为其具有潜在益处或治疗作用。在这方面,本发明的方法可以在哺乳动物中提供任何量的任何水平的癌症治疗或预防。此外,由本发明方法提供的治疗或预防可包括治疗或预防所治疗或预防的癌症的一种或多种病况或症状。例如,治疗或预防可以包括促进肿瘤的消退。而且,出于本文的目的,“预防”可以涵盖延迟癌症或其症状或病况的发作。

[0112] 出于本发明的目的,本发明的TCR、其抗原结合部分、细胞群或药物组合物的施用量(如,当施用本发明的细胞群时的细胞数量)应足以在合理的时间范围内在哺乳动物中实现如治疗性或预防性响应。例如,本发明的TCR、其抗原结合部分、细胞群或药物组合物的剂量应足以在从施用时起约2小时或更久(如12至24小时或更多小时)的时间段内结合由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列,或检测、治疗或预防癌症。在某些实施方案中,时间段甚至可以更久。剂量将通过施用的特定的本发明的TCR、其抗原结合部分、细胞群或药物组合物的功效和哺乳动物(如,人)的情况,以及待治疗的哺乳动物(如,人)的体重来确定。

[0113] 用于测定施用剂量的许多测定在本领域中是已知的。为了本发明的目的,一种测定可用于确定待施用给哺乳动物的起始剂量,所述测定包括在向一组哺乳动物中的哺乳动物(其被各自给予不同剂量的表达本发明的TCR或其抗原结合部分的T细胞)施用给定剂量的所述T细胞之后,比较由这样的T细胞裂解靶细胞或分泌IFN- γ 的程度。可以通过本领域已知的方法测定在施用一定剂量后靶细胞被裂解或IFN- γ 分泌的程度。

[0114] 本发明的TCR、其抗原结合部分、细胞群或药物组合物的剂量也将由可能伴随特定的本发明的TCR、其抗原-其结合部分、细胞群或药物组合物的施用的任何不良副作用的存在、性质和程度来确定。通常,主治医师将考虑多种因素,诸如年龄、体重、一般健康状况、饮食、性别、待施用的本发明的TCR、其抗原结合部分、细胞群或药物组合物、施用途径和所治疗的病况的严重程度,来决定用于治疗每个单个患者的本发明TCR、其抗原结合部分、细胞群或药物组合物的剂量。

[0115] 在其中待施用本发明的细胞群的实施方案中,每次输注所施用的细胞数可以变化,例如,在一百万到一千亿个细胞的范围内;然而,低于或高于该示例范围的量在本发明的范围内。例如,本发明的宿主细胞的日剂量可以是约1百万至约1500亿个细胞(如,约500万个细胞、约2500万个细胞、约5亿个细胞、约10亿个细胞、约50亿个细胞、约200亿个细胞、约300亿个细胞、约400亿个细胞、约600亿个细胞、约800亿个细胞、约1000亿个细胞、约1200亿个细胞、约1300亿个细胞、约1500亿个细胞或由任何两个前述值限定的范围),优选约1000万至约1300亿个细胞(如,约2000万个细胞、约3000万个细胞、约4000万个细胞、约6000万个细胞、约7000万个细胞、约8000万个细胞、约9000万个细胞、约100亿个细胞、约250亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞、约1000亿个细胞、约1100亿个细胞、约1200亿个细胞、约1300亿个细胞或由任何两个前述值限定的范围),更优选约1亿个细胞至约1300亿个细胞(如,约1.2亿个细胞、约2.5亿个细胞、约3.5亿个细胞、约4.5亿个细胞、约6.5亿个细胞、约8亿个细胞、约9亿个细胞、约30亿个细胞、约300亿个细胞、约450亿个细胞、约500亿个细胞、约750亿个细胞、约900亿个细胞、约1000亿个细胞、约1100亿个细胞、约1200亿个细胞、约1300亿个细胞或由任何两个前述值限定的范围)。

[0116] 出于本发明方法的目的,其中施用细胞群,细胞可以是哺乳动物同种异体或自体的细胞。优选地,细胞对哺乳动物来说是自体的。

[0117] 本发明的另一个实施方案提供了用于治疗或预防哺乳动物的癌症的本文所述的本发明的TCR、其抗原结合部分、经分离的细胞群或药物组合物中的任一个。

[0118] 癌症可以有利地是任何癌症,包括以下中的任一种:急性淋巴细胞癌、急性髓性白血病、肺泡视网膜母细胞瘤、骨癌、脑癌、乳房癌、肛门癌、肛管癌或肛门直肠癌、眼癌、肝内胆管癌、关节癌、颈癌、胆囊癌或胸膜癌、鼻咽癌、鼻腔癌或中耳癌、口腔癌、阴道癌、外阴癌、胆管癌,慢性淋巴细胞性白血病、慢性骨髓性癌、结肠癌、食道癌、子宫颈癌、胃肠道类癌肿瘤、胶质瘤、霍奇金淋巴瘤、下咽癌、肾脏癌、喉癌、肝癌、肺癌、恶性间皮瘤、黑色素瘤、多发性骨髓瘤、鼻咽癌、非霍奇金淋巴瘤、口咽癌、卵巢癌、阴茎癌、胰腺癌、腹膜癌、大网膜癌和肠系膜癌、咽癌、前列腺癌、直肠癌、肾癌、皮肤癌、小肠癌、软组织癌、胃癌、睾丸癌、甲状腺癌、子宫癌、输尿管癌、膀胱癌、实体瘤和液体瘤。优选地,癌症是上皮癌。在实施方案中,癌症是胆管癌、黑色素瘤、结肠癌或直肠癌。

[0119] 本发明方法中提到的哺乳动物可以是任何哺乳动物。如本文所用,术语“哺乳动物”是指任何哺乳动物,包括但不限于啮齿目动物,诸如小鼠和仓鼠,以及兔形目的哺乳动物,诸如兔。优选地,哺乳动物来自食肉目(Carnivora),包括猫科动物(猫)和犬科动物(狗)。优选地,哺乳动物来自偶蹄目,包括牛科动物(牛)和猪科动物(猪),或属于奇蹄目,包括马科动物(马)。优选地,哺乳动物属于灵长目、猿目(Ceboids)或猴目(Simoids)(猴)或属于类人猿目(人和猿)。更优选的哺乳动物是人。在特别优选的实施方案中,哺乳动物是表达癌症特异性突变的患者。

[0120] 以下实施例进一步说明了本发明,但当然不应解释为以任何方式限制其范围。

[0121] 实施例1-5

[0122] 以下材料和方法用于实施例1-5中描述的实验。

[0123] 新抗原-反应性TIL的筛选

[0124] 所有患者材料均获自美国国立癌症研究所机构审查委员会(National Cancer

Institute Institutional Review Board) 批准的临床试验 (试验注册ID:NCT01174121)。鉴定新抗原和新抗原-反应性TIL群的方法已在W02016/053338中描述。简而言之,将肿瘤碎块切除并在含有IL-2 (6000IU/mL) 的培养基中培养3至6周 (Dudley等人, *J. Immunother.*, 26:332-342 (2003))。筛选具有扩大数量的细胞的TIL培养物以用于对新抗原的识别。为了筛选扩增的TIL培养物以用于对新抗原的识别,通过全外显子组和RNA测序 (RNA-seq) 在肿瘤中鉴定出非同义突变。合成了涵盖非同义突变的串联小基因 (TMG) 文库。筛选表达TMG的自体树突细胞 (DC) 以鉴定TIL识别的新抗原 (Lu等人, *Clin. Cancer Res.*, 20:3401-3410 (2014)) (参见图1)。

[0125] 从单细胞RNA-seq数据鉴定新抗原-特异性TCR序列

[0126] 从单细胞RNA测序 (RNA-seq) 数据鉴定新抗原-特异性TCR序列的方法总结在图2所示的示意图中。在鉴定出新抗原-反应性TIL培养物后,将 1×10^6 个TIL与 1×10^6 个TMG-脉冲的DC共培养四 (4) 小时 (h)。共培养后,将T细胞重新悬浮并充分洗涤。然后根据制造商的说明书 (Fluidigm (San Francisco, CA) 和Clontech (Mountain View, CA)) 对T细胞进行单细胞分选和RNA-seq样品制备。所有96个单细胞RNA-seq样品均使用Nextera XT DNA文库制备试剂盒 (Illumina (San Diego, CA)) 进行条形码化,然后使用Illumina MiSeq系统使用试剂试剂盒V3 (2 \times 250个碱基对 (b.p.)) 进行测序。

[0127] 单细胞RNA-seq数据通过Burrows-Wheeler Aligner (BWA) (Li等人, *Bioinformatics*, 25:1754-60 (2009); Li等人, *Bioinformatics*, 26 (5):589-95 (2010)) 使用来自国际免疫遗传信息系统 (IMGT) 数据库的TCR α / β 可变 (V) 区序列 ((Lefranc等人, *Nucleic Acids Res.*, 43:D413-422 (2015)) 比对。将CDR3区序列基于V区的C-末端附近的保守氨基酸残基 (C \cdots F/W) 鉴定,由软件分析和报告。一些具有非生产性 (框架外) 序列的TCR从分析中移除。另外,由于FLUIDIGM C1单细胞mRNA测序系统的分选机制不完善,一些样品可能含有一个以上的T细胞。结果,从随后的分析中消除了具有一种以上TCRB的样品。另外,将RNA-seq数据与IFN- γ 、IL-2或其他潜在的T细胞活化标志物的序列比对。提取与高IFN- γ 单细胞相关的比对的TCR片段,并鉴定TCR V、CDR3和恒定 (C) 区。为了组装配对的全长TCR序列,将不完整的5' V区序列与来自IMGT数据库的经鉴定的人全长TCR V区序列组装在一起。为了增强TCR α / β 的配对并避免错误配对,将3' C区序列替换为经修饰的小鼠恒定区序列 (Cohen等人, *Cancer Res.*, 66:8878-8886 (2006); Cohen等人, *Cancer Res.*, 67:3898-3903 (2007); Haga-Friedman等人, *J. Immunol.*, 188:5538-5546 (2012)) (图2)。

[0128] 新抗原-特异性TCR的验证

[0129] 详细的方案已描述于Morgan等人, *Science*, 314:126-129 (2006), 本文描述了一些小的修改。通过弗林蛋白酶SGSGP2A接头 (RAKRSGSGATNFSLLKQAGDVEENPGP) (SEQ ID NO:1) 连接的具有修饰的小鼠恒定区的全长TCR α 和TCR β 序列被合成并克隆到MSGV8逆转录病毒表达载体中 (Wargo等人, *Cancer Immunol. Immunother.*, 58:383-394 (2009))。使用LIPOFECTAMINE 2000转染试剂 (Thermo Fisher Scientific), 将MSGV8-TCR质粒 (1.5 μ g) 和0.75 μ g的VSV-G (RD114) 质粒共转染至每个6孔内的 1×10^6 个293GP细胞中。48小时后,将上清液收获并以3000转/分钟 (rpm) 旋转10分钟 (min) 以除去碎片。将逆转录病毒上清液通过以2000g离心2小时加载到RETRONECTIN试剂 (Takara, Otsu, Japan) 包被的6孔板上。

[0130] 另外,在含有5%人血清的AIM V培养基中,用50ng/mL抗CD3 mAb OKT3和300IU/mL

IL-2刺激来自健康供体的 1×10^6 /mL PBMC。2天后,收获刺激的细胞并重新混悬于没有OKT3的相同培养基中。将受刺激的PBMC以 2×10^6 个细胞/孔加入到每个逆转录病毒加载的孔,并以1000g旋转10分钟。将板在37°C下孵育过夜。第二天,将PBMC转移到新的逆转录病毒加载的孔,并重复转导程序。在实验之前,将TCR-转导的T细胞在含有300IU/mL IL-2和5%人血清的AIM V培养基中再连续培养5天。

[0131] 为了测试TCR-转导的T细胞的特异性,用TMG RNA、全长mRNA或肽脉冲自体DC或EBV转化的B细胞24小时。然后将 1×10^5 个T细胞与 1×10^5 个DC或EBV转化的B细胞在96孔U形底板中过夜共培养。收获上清液,并通过酶联免疫吸附测定(ELISA)(Thermo Fisher Scientific)测定来自T细胞的IFN- γ 分泌。

[0132] 实施例1

[0133] 该实施例说明了从TIL 4090培养物中分离新抗原-特异性TCR的配对 α 和 β 链序列的方法。

[0134] TIL 4090培养物从患有结直肠癌的患者切除的转移性肺病变中生长。基于TMG文库筛选的结果,其中一种培养物TIL 4090 F7识别了TMG-5。为了分离新抗原-特异性TCR,将TIL 4090 F7细胞与TMG-5-脉冲的自体DC共培养4小时,并进行单细胞RNA-seq分析。在单细胞RNA-seq数据的所有序列读取中,两个单细胞表达高百分比的IFN- γ 读取(总R1读取的6.42%和12.25%)(图3A)。其余的单细胞仅表达0~0.16%的IFN- γ 读取(图3A)。没有一个单细胞使用这种方法表达可检测的IL-2(图3B)。这些数据表明这两个T细胞对DC所呈递的新抗原具有特异性反应。接下来,从这两个T细胞的单细胞RNA-seq数据鉴定TCR α / β 可变区和CDR3序列,并且来自两个T细胞的TCR序列是相同的(表1)。

[0135] 表1

TCR 可变区	CDR3 (核苷酸序列)	CDR3 (氨基酸序列)
[0136] TRAV3	TGTGCTGTGAGAGACCATAGCAACTATCAGTTAATCTGG (SEQ ID NO: 6)	CAVRDHSNYQLIW (SEQ ID NO: 7)
TRBV14	TGTGCCAGCAGCCAATCCGGTGGGGGCGGGTTCTCCTA CAATGAGCAGTTCTTC (SEQ ID NO: 8)	CASSQSGGGGFSYN EQFF(SEQ ID NO: 9)

[0137] 实施例2

[0138] 该实施例说明了,用实施例1中分离的TCR α 和 β 链序列转导的T细胞特异性识别由实施例1的患者的癌症表达的新抗原。

[0139] 为了验证从TIL 4090 F7分离的TCR,合成通过弗林蛋白酶SGSGP2A接头连接的具有经修饰的小鼠恒定区的全长TCR α 和TCR β 序列,并将其克隆到MSGV8逆转录病毒表达载体中。将外周血T细胞用4090 TCR转导,并与TMG-5-脉冲的4090 DC共培养过夜。基于T细胞对IFN- γ 的分泌,4090 TCR-转导的T细胞识别TMG-5-脉冲的DC,但不识别用无关TMG脉冲的DC(图3C)。

[0140] 进行另外的实验以测试4090 TCR的特异性。TMG-5共含有12个小基因。合成对应于每个小基因的25-mer突变的长肽并将其脉冲在4090 DC上24小时。洗涤后,将肽脉冲的DC与4090 TCR-转导的T细胞共培养过夜。4090TCR-转导的T细胞仅与用突变的USP8(遍在蛋白特异性肽酶8)肽WAKFLDPITGTFHYHSPNTNVHMY (R>H) (SEQ ID NO:2) 脉冲的DC有反应,表明4090TCR识别突变的USP8(图3D)。最后,将高效液相色谱(HPLC)-纯化的突变USP8长肽和野

生型 (WT) 对应物在4090DC上脉冲24小时。然后,将肽脉冲的DC与4090TCR-转导的T细胞共培养过夜。4090TCR转导的T细胞在0.01 μ M的最小浓度下与突变的USP8肽反应,但未显示对WT USP8肽的显著识别。(图3E)。

[0141] 实施例3

[0142] 该实施例说明了从TIL 4095培养物中分离新抗原-特异性TCR的配对 α 和 β 链序列的方法。

[0143] TIL 4095培养物从患有结直肠癌的患者切除的转移性肺病变中生长。基于TMG文库筛选的结果,TIL 4095 F5识别了TMG-1。为了分离新抗原-特异性TCR,将TIL 4095 F5细胞与TMG-1脉冲的自体DC共培养4小时,并进行单细胞RNA-seq分析。鉴定了具有高水平IFN- γ 读取(0.79%~3.74%)的所有单细胞(图4A)。这些T细胞都含有完全相同的TCR α / β 可变序列和CDR3序列(表2)。只有一个单细胞表达可检测的IL-2读取(0.03%)(图4B),并且该单细胞以高水平(1.07%)共表达IFN- γ (图4C)。

[0144] 表2

TCR 可变区	CDR3 (核苷酸序列)	CDR3 (氨基酸序列)
[0145] TRAV4	TGCCTCGTGGGTGACATGGACCAGGCAGGAACTGC TCTGATCTTT (SEQ ID NO: 10)	CLVGDMDQAGTALIF (SEQ ID NO: 11)
TRBV5-6	TGTGCCAGCAGCTTGGGGAGGGCAAGCAATCAGC CCCAGCATTTT (SEQ ID NO: 12)	CASSLGRASNQPQHF (SEQ ID NO: 13)

[0146] 实施例4

[0147] 该实施例说明了,用实施例3中分离的TCR α 和 β 链序列转导的T细胞特异性识别由实施例3的患者的癌症表达的新抗原。

[0148] 为了验证从实施例3的TIL 4095 F5分离的TCR,合成具有经修饰的小鼠恒定区的全长TCR α 和TCR β 序列,并将其克隆到MSGV8逆转录病毒表达载体中,然后转导到供体T细胞中。在先前的研究中,鉴定了以HLA-C0802-限制性方式识别突变的KRAS (G12D) 肽的TCR (Tran等人,Science,350:1387-1390 (2015))。因为发现患者4095对于HLA-C0802和KRAS (G12D) 是阳性的,并且因为TMG-1编码KRAS (G12D),所以测试了该4095 TCR是否也识别HLA-C0802-限制性KRAS (G12D)。如图4D所示,将4095 TCR-转导的T细胞与全长KRAS WT或G12D mRNA-脉冲的自体DC共培养过夜。4095 TCR-转导的T细胞识别KRAS (G12D)-脉冲的DC,但不识别用WT KRAS脉冲的DC。最后,用HLA-C0802-限制性KRAS (G12D) 抗原的最小表位GADGVGKSA (SEQ ID NO:3) 脉冲自体DC 2小时。4095 TCR-转导的T细胞在0.01 μ M的最小浓度下识别KRAS (G12D) 表位,并且不识别WT对应物(图4E)。

[0149] 实施例5

[0150] 该实施例说明了从TIL 4112培养物中分离新抗原-特异性TCR的配对 α 和 β 链序列的方法。

[0151] TIL 4112培养物从患有胆管癌的患者切除的转移性肝病生长。基于TMG文库筛选的结果,发现其中一种培养物TIL 4112 F5识别了TMG-9。为了鉴定新抗原-特异性TCR,将TIL 4112 F5细胞与TMG-9脉冲的自体DC共培养4小时,并进行单细胞RNA-seq分析。具有高水平IFN- γ 读取(>2%)的二十二(22)个单细胞含有完全相同的TCR序列(图5A、图5C和表3)。然而,由于该克隆型中TCR α 表达水平低,22个单细胞中有13个不含可检测的TCR α 。八(8)个单细胞表达可检测的IL-2读取,范围为0.01%~0.1%(图5B和图5C)。其中,6个单细胞表

达相同的TCR α / β 序列。一个单细胞表达相同的TCR β 序列,但TCR α 未检测到。此外,一个单细胞不表达任何可检测的TCR α / β 序列(图5A-5C)。

[0152] 表3

TCR 可变区	CDR3 (核苷酸序列)	CDR3 (氨基酸序列)
[0153] TRAV38-1	TGTGCTTTCATGTGGGGATTAGGTCAG AATTTTGTCTTT (SEQ ID NO: 14)	CAFMWGLGQNFVF (SEQ ID NO: 15)
TRBV28	TGTGCCAGCAGTGTGGAGCGGGAGAA CACCGGGGAGCTGTTTTTT (SEQ ID NO: 16)	CASSVERENTGELFF (SEQ ID NO: 17)

[0154] 为了验证从TIL 4112 F5鉴定的TCR,合成具有经修饰的小鼠恒定区的全长TCR α 和TCR β 序列,然后将其转导至供体T细胞中。4112 TCR-转导的T细胞识别TMG-9-脉冲的DC,但不识别用不相关TMG脉冲的DC(图5D)。接着,将TMG-9的氨基酸序列提交给免疫表位数据库(IEDB)和分析资源网站(iedb.org)以及生物序列中心(CBS)分析NetMHC网站(cbs.dtu.dk/services/NetMHC/),以预测对患者4112的6个HLA具有高亲和力的肽。合成来自IEDB(Rank<1%) and NetMHC(Rank<2%)的总共67种预测的高亲力肽,并组合成10个集合。4112 TCR-转导的T细胞识别在自体EBV-转化的B细胞上脉冲的短肽集合(SPP)-9(图5E)。在随后的实验中,突变的NBAS(神经母细胞瘤扩增的序列)肽WSYDSTLLAY(C>S)(SEQ ID NO:4)被鉴定为由4112 TCR转导的T细胞识别的最小表位(图5F,5G)。

[0155] 实施例6

[0156] 该实施例说明了从TIL 4171培养物中分离新抗原-特异性TCR的配对 α 和 β 链序列的方法。

[0157] TIL 4171培养物从患有结直肠癌的患者切除的转移性肺病变生长。合成了128种长肽(25-mer),并且每种肽含有在两侧侧接有12个正常氨基酸的非同义突变。针对肽文库筛选TIL 4171培养物,并且培养物之一TIL4171F6识别肽集合3(PP-3)(图9A)。然后将TIL4171F6细胞与PP-3脉冲的自体DC共培养4小时,并进行单细胞RNA-seq分析。测量IFN- γ 和IL-2的表达(图9B-9D)。9个样品含有高水平的IFN- γ mRNA(2209~24845 FPKM(每千碱基转录物片段/百万个映射的读取))(图9B)。其中,六个样品具有相同的TCR β CDR3序列。两个样品不含任何可检测的TCR β ,并且一个样品含有两种不同的TCR β CDR3序列,这可能是由另一种T细胞污染引起的。然而,这些样品中没有一个含有任何可检测的TCR α 链序列。类似地,四个样品含有可检测的IL-2 mRNA(331.2~1497 FPKM)。这些样品都含有相同的TCR β CDR3序列,但没有一个样品具有任何可检测的TCR α 链序列。

[0158] 为了发现缺失的TCR α 链,进一步研究了在该实验中获得的单细胞RNA-seq数据。发现4个IFN- γ ⁺单细胞和2个IL-2⁺单细胞表达独特的TCR链,其包括V基因区段DV3、J基因区段AJ56和C基因区段AC。TCR α 和TCR δ 链之间共用几个V基因区段,包括AV14/DV4、AV23/DV6、AV29/DV5、AV36/DV7和AV38-2/DV8(Lefranc,Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons,Inc.,pp.A.10.1-A.10.23(2001))。已发现这些V基因区段重排为AJ连接基因区段用于TCR α ,并重排为DD多样性基因区段和DJ连接基因区段用于TCR δ 。值得注意的是,DV3转录的方向是倒置的。到目前为止,还没有报道TCR α 链可以利用DV3基因区段。

[0159] 为了测试这种独特TCR链的功能,将该TCR链与鉴定的TCR β 链连接,然后克隆到逆转录病毒载体中。4171TCR转导的T细胞对PP-3具有强烈反应性(图9E)。该肽集合PP-3含有14种突变的25-mer-肽。

[0160] 接下来,用来自肽集合PP-3的各肽脉冲自体DC 24小时。将肽脉冲的DC与4171TCR转导的T细胞共培养。4171TCR识别突变的肽SIN3A (SIN3转录调节物家族成员A)-脉冲的DC (图9F)。

[0161] 最后,将纯化的25-mer WT或突变的SIN3A肽 (LGKFPPELFNWFKIFLGYKESVHLET (SEQ ID NO:25), N>I) 在自体DC上脉冲24小时。将肽脉冲的DC与转导的T细胞共培养。通过ELISA测定来自T细胞的IFN- γ 分泌。4171TCR-转导的T细胞显示特异性识别突变的SIN3A肽,但不识别野生型对应物(图9G)。

[0162] 因此,这种独特的TCR是功能性的,并且它可以特异性地识别突变的SIN3A。与其他V基因区段类似,这些数据表明DV3基因区段可以在TCR α 和TCR δ 链之间共用。

[0163] 本文引用的所有参考文献,包括出版物、专利申请和专利均通过引用并入本文,其程度如同每个参考文献被单独且具体地指出通过引用并入并且在本文中完整地阐述。

[0164] 在描述本发明的上下文中(特别是在以下权利要求的上下文中)使用术语“一”和“一个”和“该”和“至少一个”以及类似的指示物应被解释为涵盖单数形式和复数形式,除非本文另有说明或与上下文明显矛盾。使用术语“至少一个”后跟一个或多个项目的列表(例如,“A和B中的至少一个”)应被解释为意指从列出的项目(A或B)或列出的项目(A和B)的两个或多个的任何组合中选择一个项目,除非本文另有说明或与上下文明显矛盾。除非另有说明,否则术语“包含”、“具有”、“包括”和“含有”应被解释为开放式术语(即,意指“包括但不限于”)。除非本文另有说明,否则本文中对数值范围的引用仅旨在用作单独提及落入该范围内的每个单独值的简写方法,并且每个单独的值并入本说明书中,如同其在本文中单独引用一样。除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则本文所述的所有方法均可以任何适合的顺序进行。除非另外声明,否则使用本文提供的任何和所有实例或示例性语言(如,“诸如”)仅旨在更好地说明本发明,而不是对本发明的范围进行限制。说明书中的任何语言都不应被解释为表明任何未要求保护的要素对于本发明的实践是必不可少的。

[0165] 本文描述了本发明优选的实施方案,包括发明人已知地实施本发明的最佳方式。在阅读前面的描述后,那些优选的实施方案的变化对于本领域普通技术人员来说是显而易见的。发明人期望熟练的技术人员适当地采用这些变化,并且发明人希望本发明以不同于本文具体描述的方式实施。因此,本发明包括适用法律允许的所附权利要求中所述主题的所有修改和等同物。此外,除非本文另有说明或与上下文明显矛盾,否则本发明涵盖所有可能变型中上述要素的任何组合。

序列表

<110> 美国卫生和人力服务部

<120> 分离新抗原-特异性T细胞受体序列的方法

<130> 737921

<150> US 62/479,398

<151> 2017-03-31

<160> 25

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 27

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 1

Arg Ala Lys Arg Ser Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys

1 5 10 15

Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro

20 25

<210> 2

<211> 25

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 2

Trp Ala Lys Phe Leu Asp Pro Ile Thr Gly Thr Phe His Tyr Tyr His

1 5 10 15

Ser Pro Thr Asn Thr Val His Met Tyr

20 25

<210> 3

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 3

Gly Ala Asp Gly Val Gly Lys Ser Ala

1 5

<210> 4

<211> 10

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 4

Cys Ala Ser Ser Leu Gly Arg Ala Ser Asn Gln Pro Gln His Phe
 1 5 10 15

<210> 14

<211> 39

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 14

tgtgctttca tgtggggatt aggtcagaat tttgtcttt 39

<210> 15

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 15

Cys Ala Phe Met Trp Gly Leu Gly Gln Asn Phe Val Phe

1 5 10

<210> 16

<211> 45

<212> DNA

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 16

tgtgccagca gtgtggagcg ggagaacacc ggggagctgt ttttt 45

<210> 17

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 17

Cys Ala Ser Ser Val Glu Arg Glu Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe

1 5 10 15

<210> 18

<211> 14

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 18

Val Trp Asp Ala Leu Phe Ala Asp Gly Leu Ser Leu Cys Leu

1 5 10

<210> 19

<211> 13

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<211> 25

<212> PRT

<213> 智人 (Homo sapiens)

<400> 25

Leu Gly Lys Phe Pro Glu Leu Phe Asn Trp Phe Lys Ile Phe Leu Gly

1

5

10

15

Tyr Lys Glu Ser Val His Leu Glu Thr

20

25

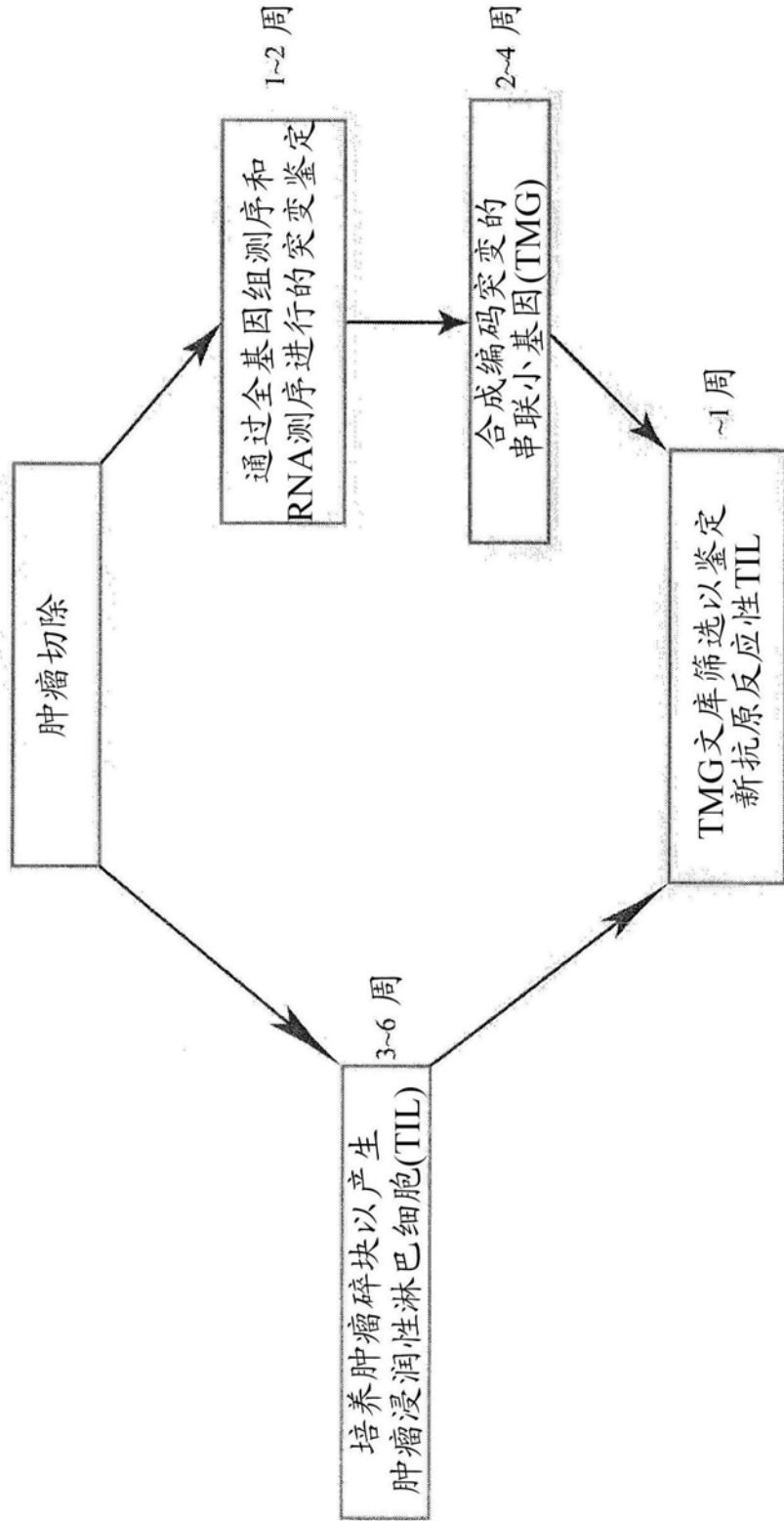


图1

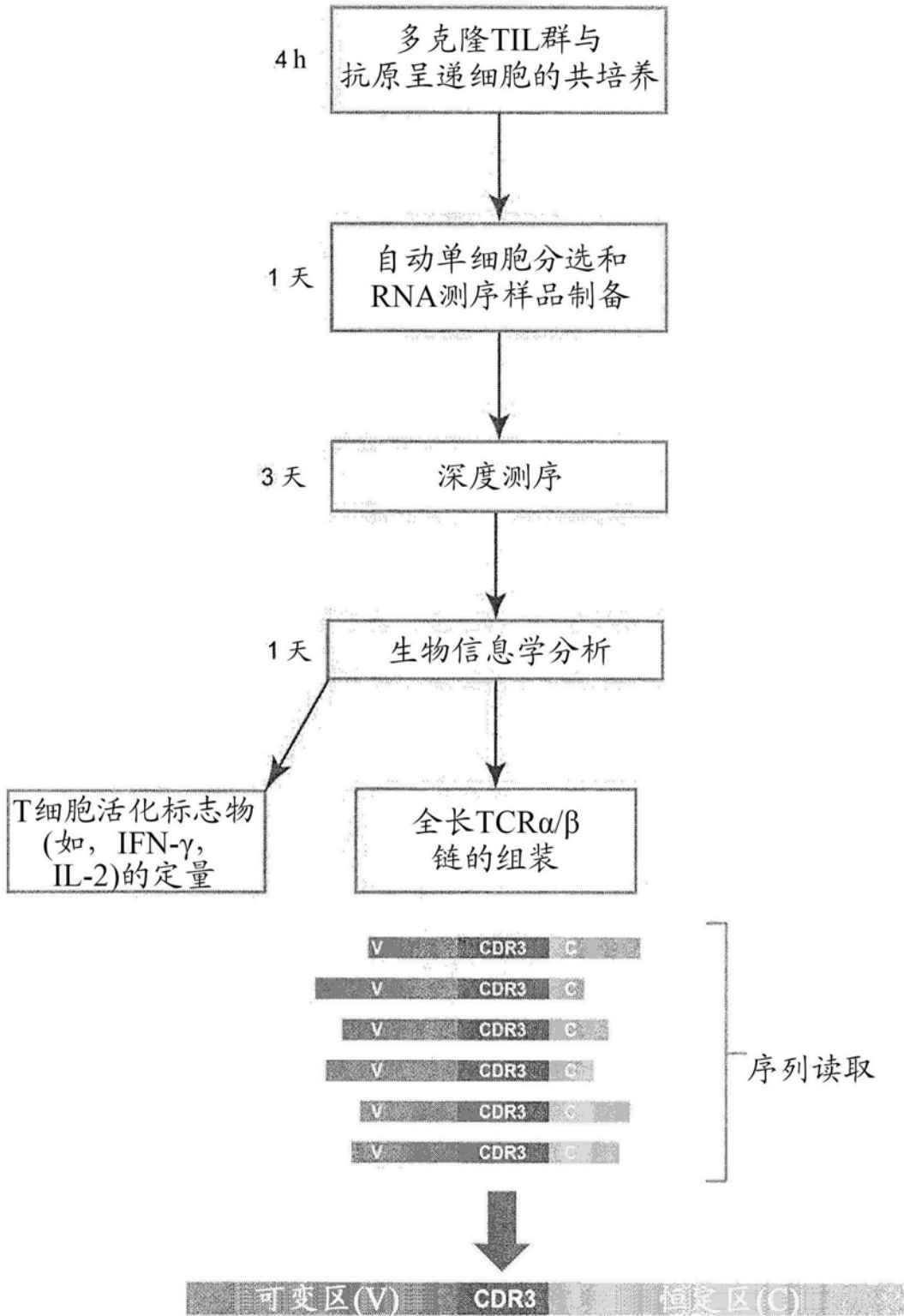


图2

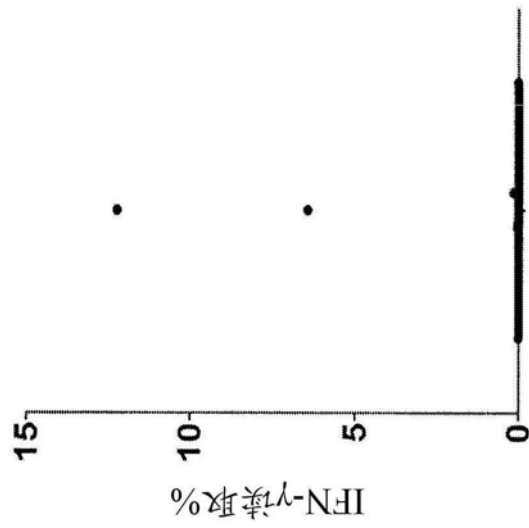


图3A

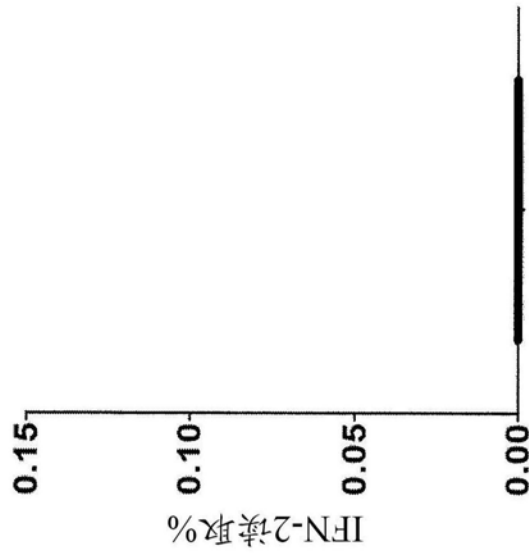


图3B

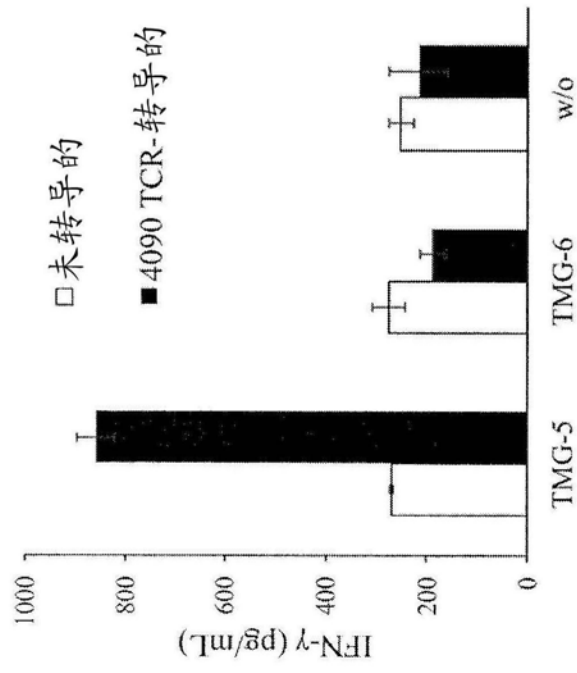


图3C

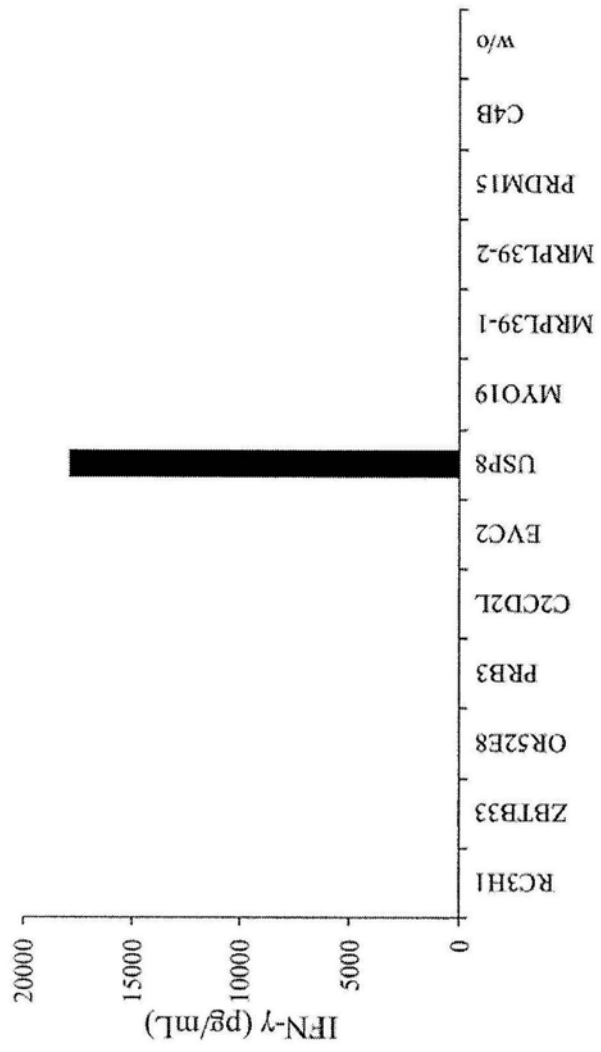


图3D

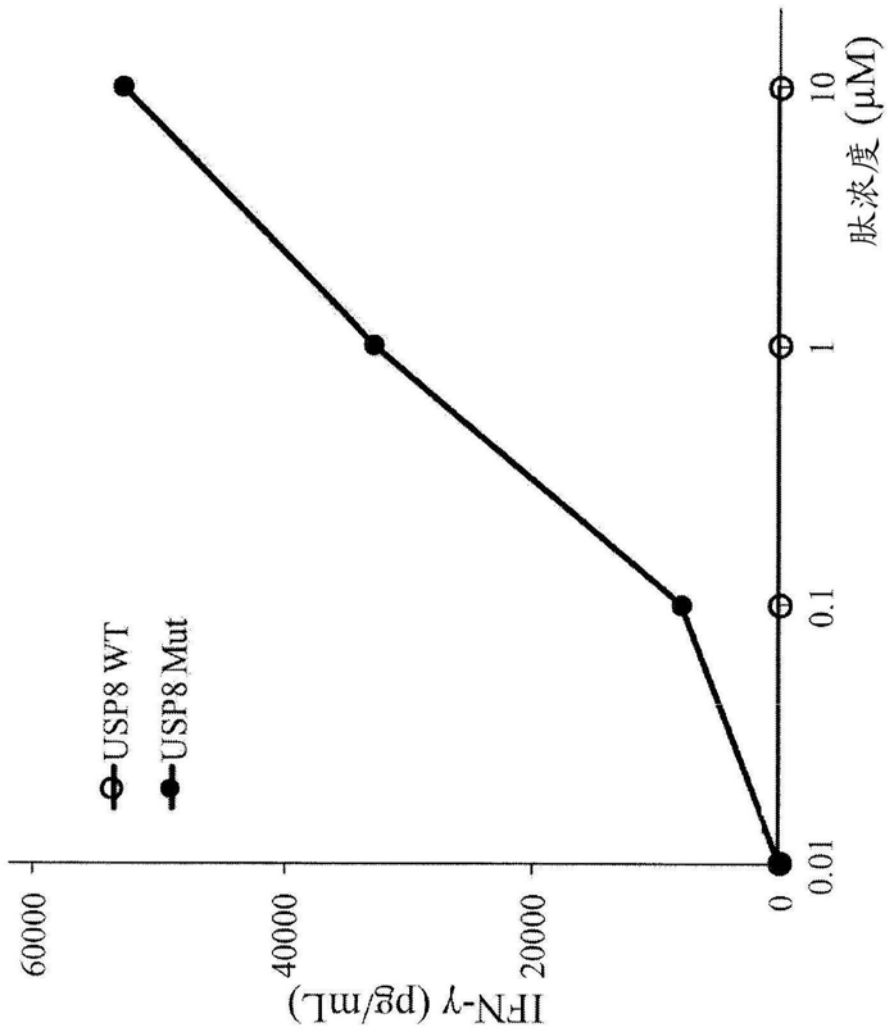


图3E

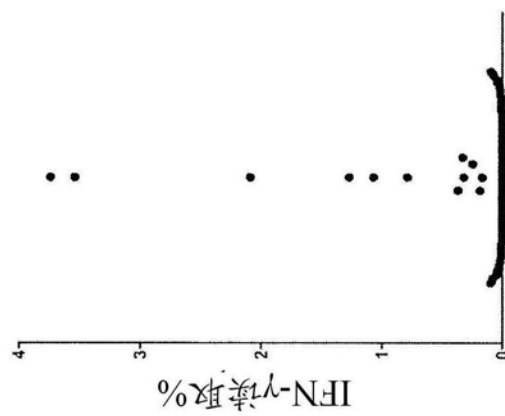


图4A

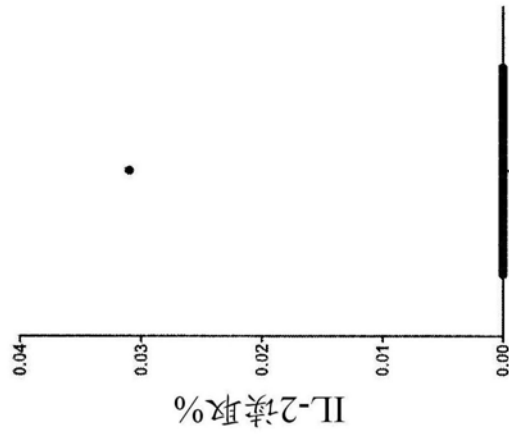


图4B

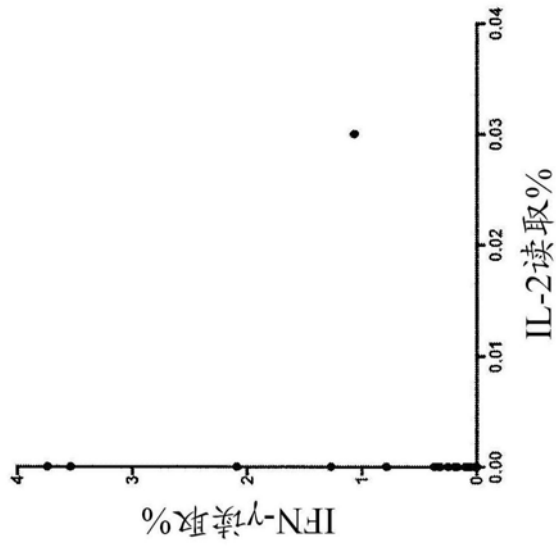


图4C

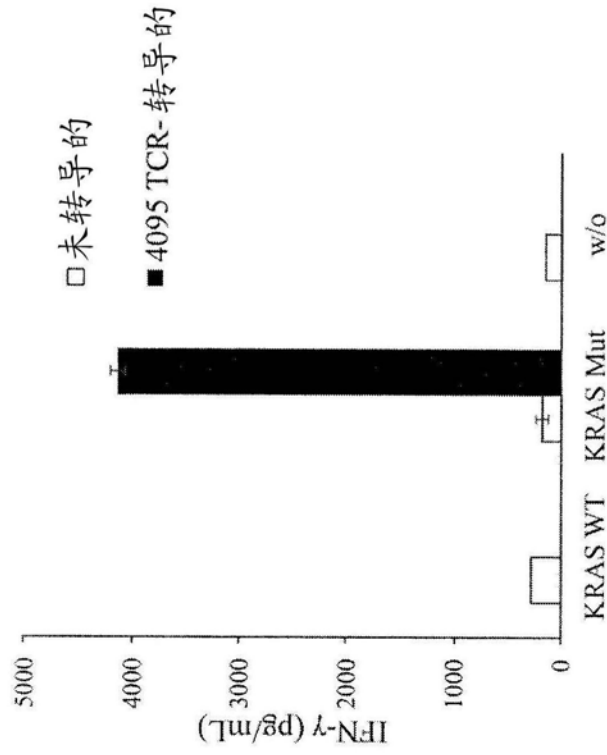


图4D

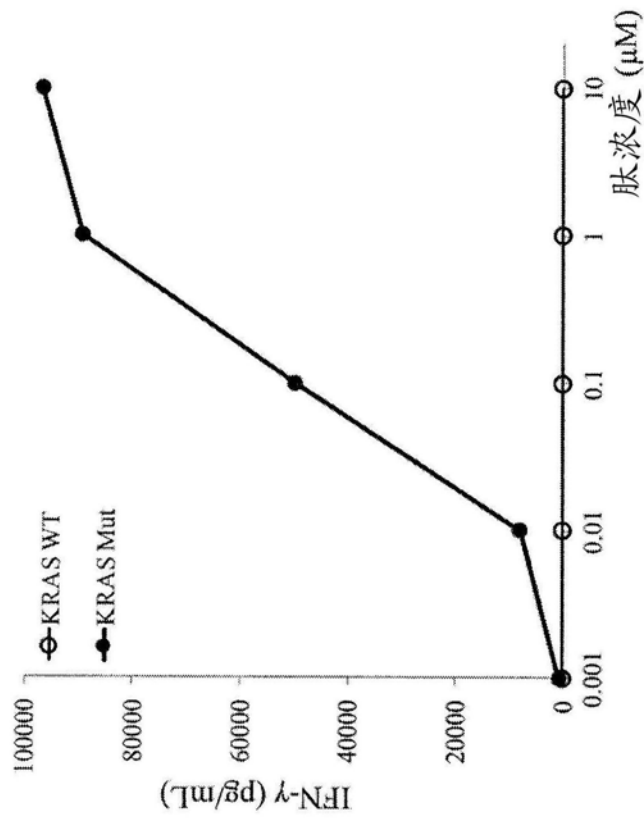


图4E

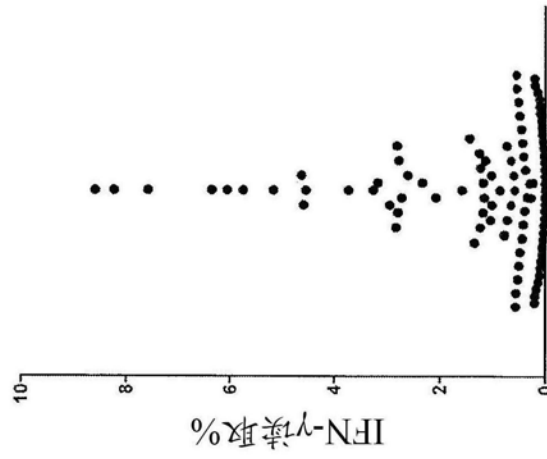


图5A

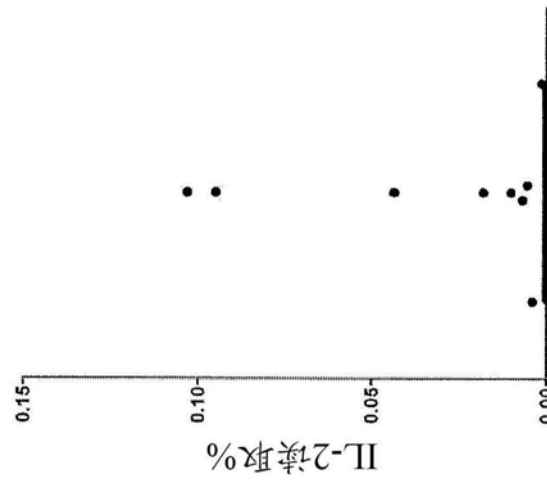


图5B

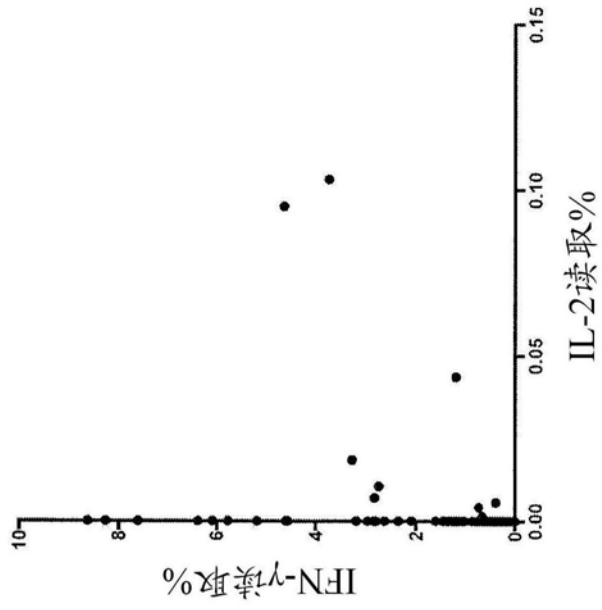


图5C

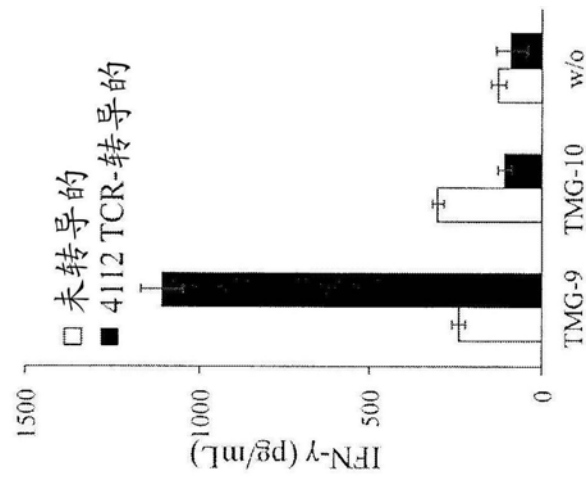


图5D

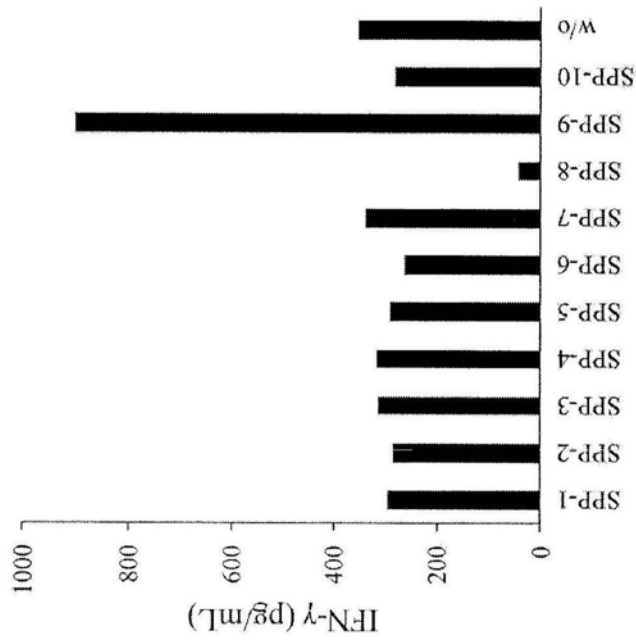


图5E

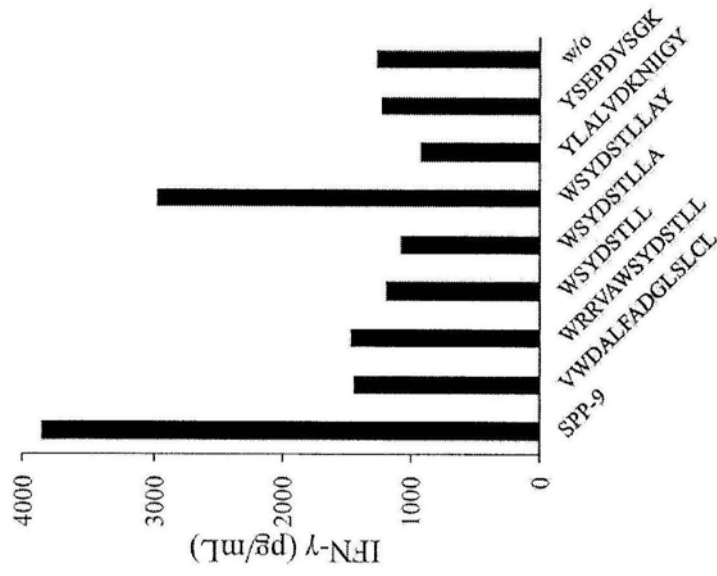


图5F

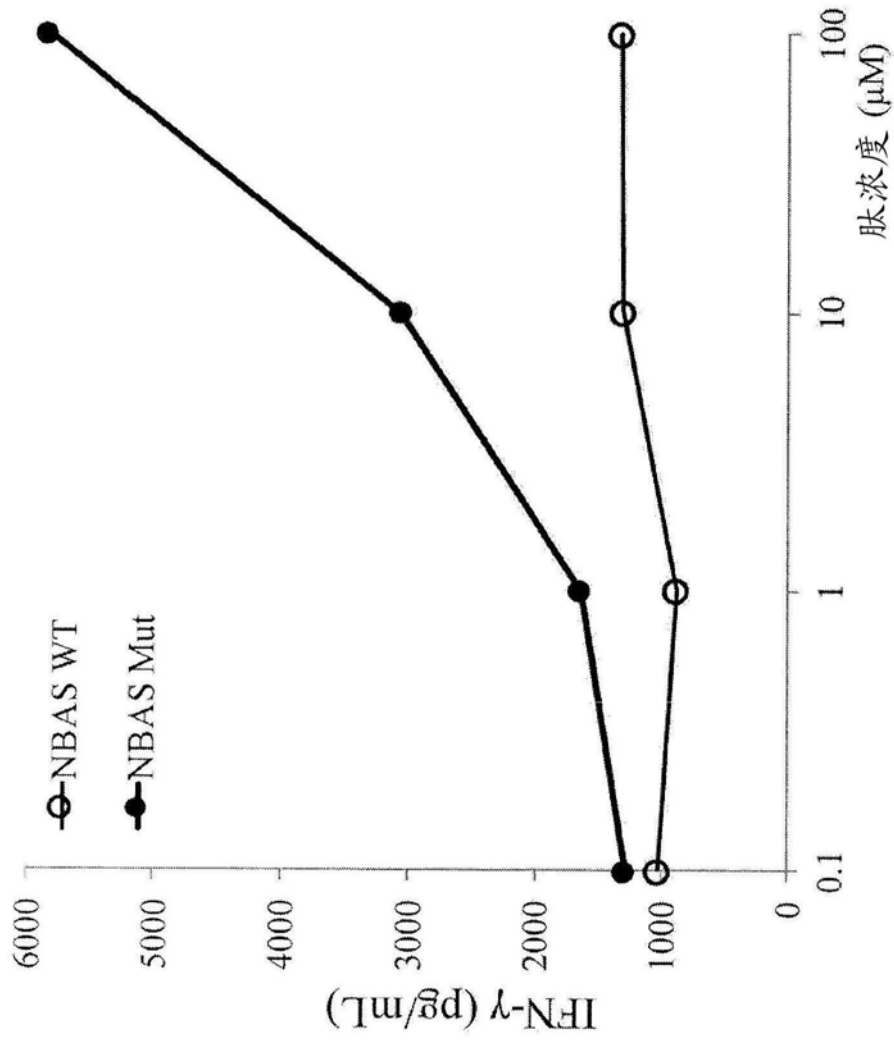


图5G

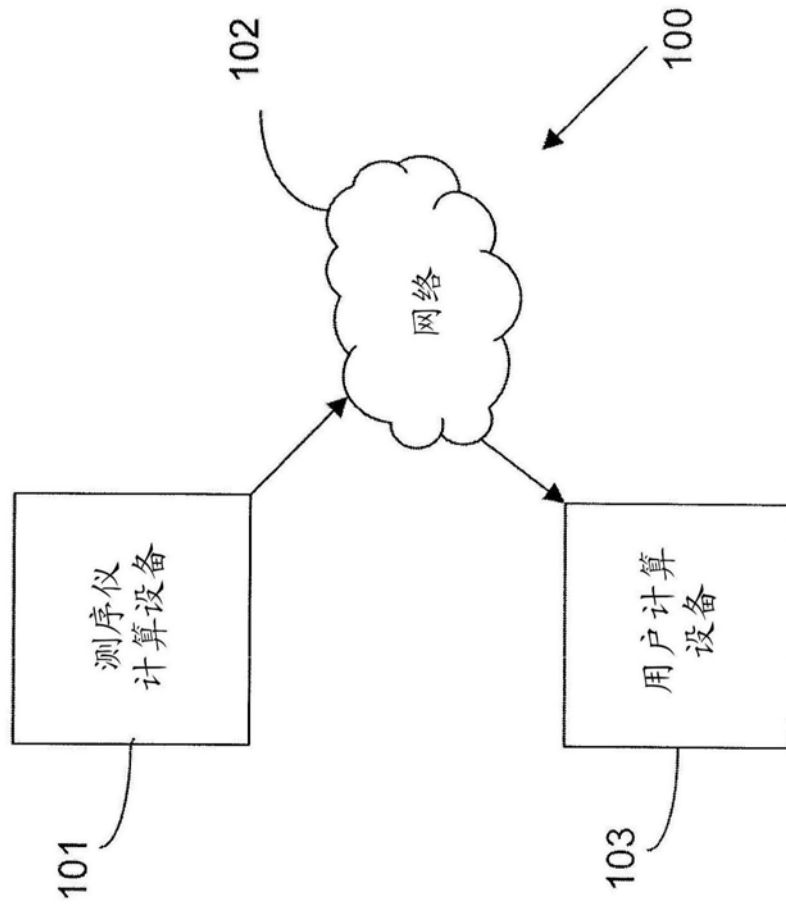


图6

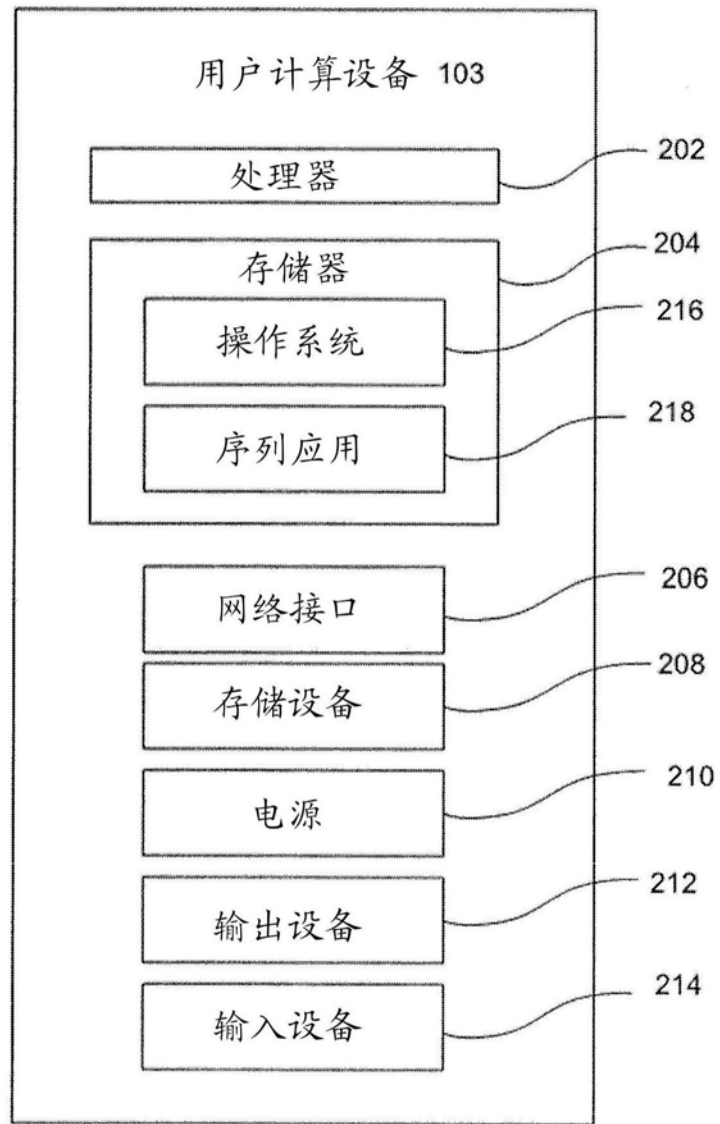


图7

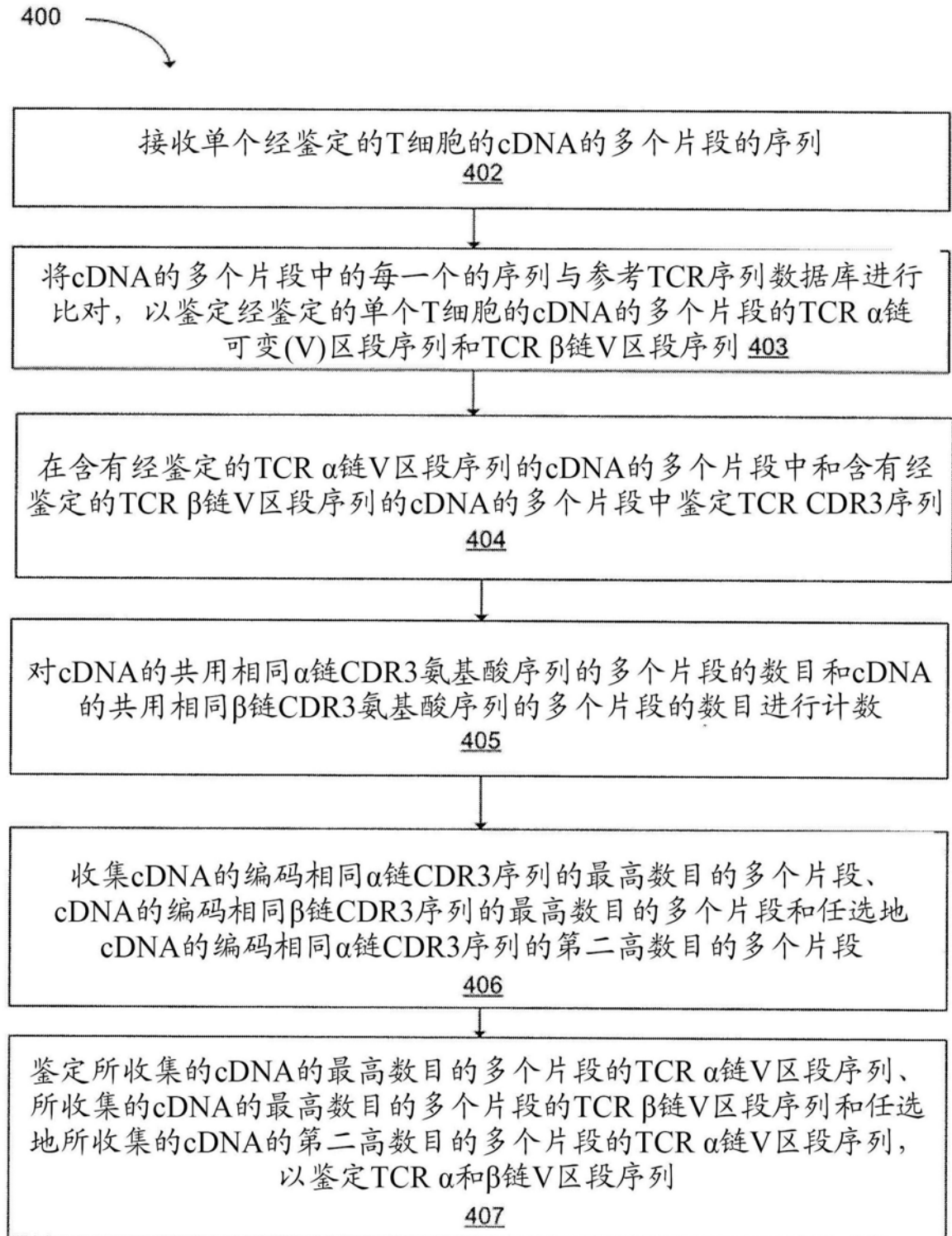


图8

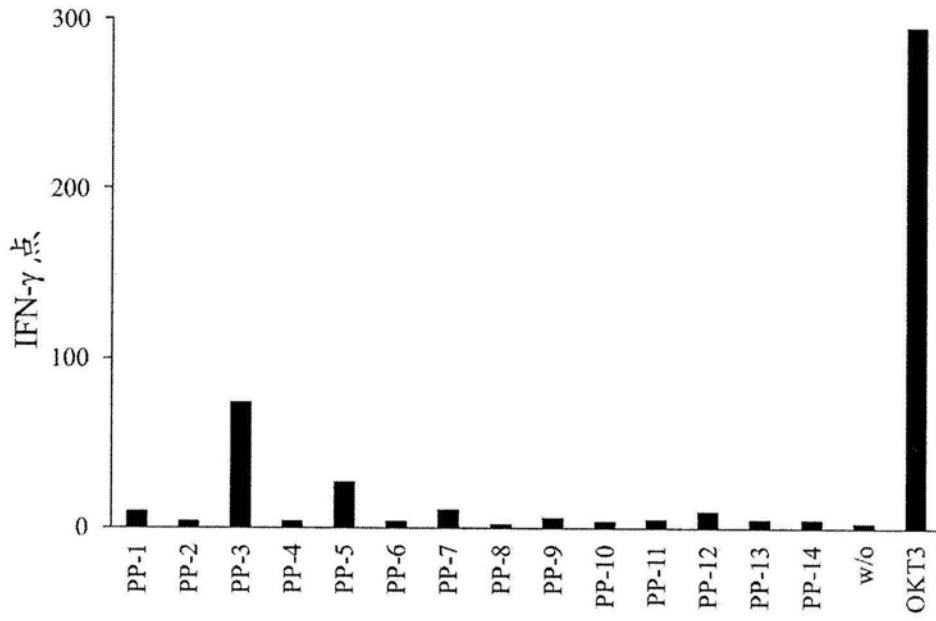


图9A

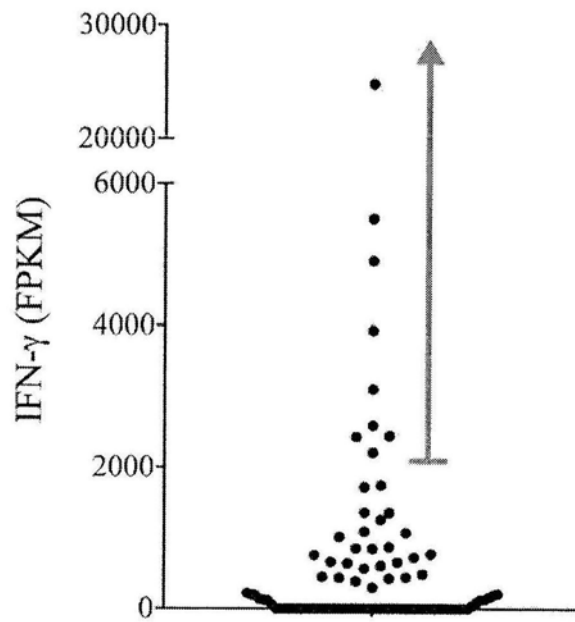


图9B

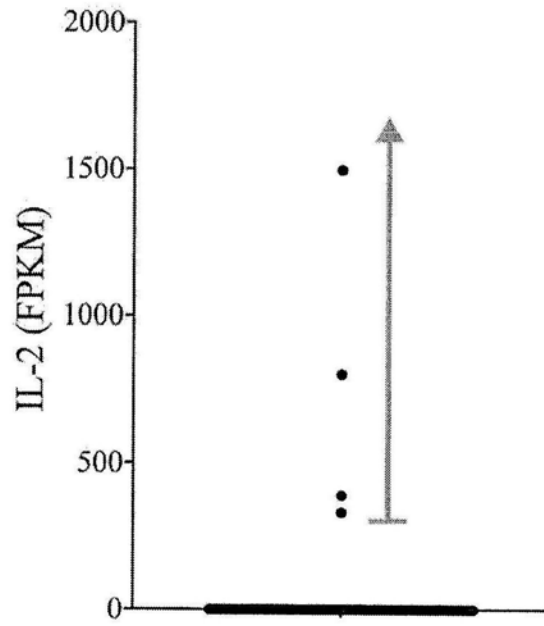


图9C

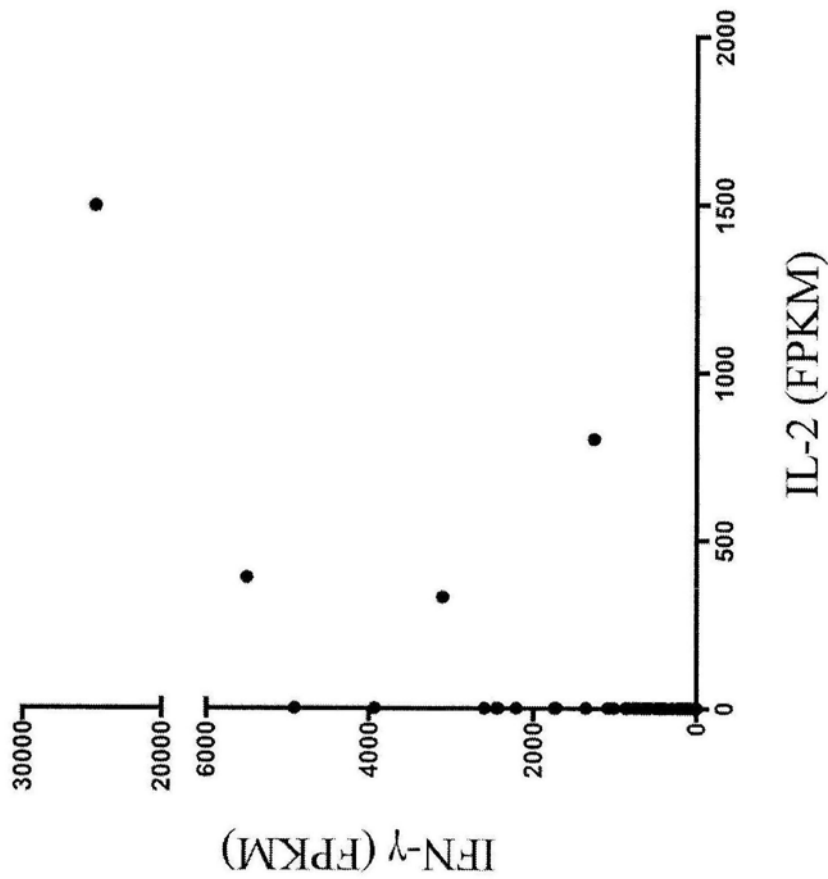


图9D

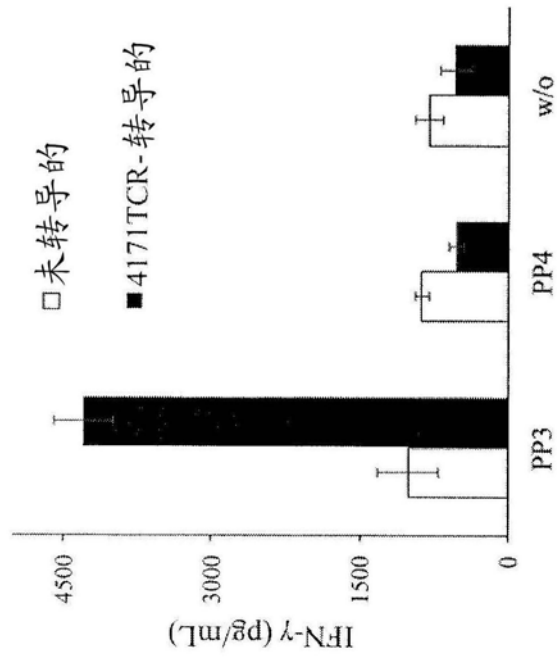


图9E

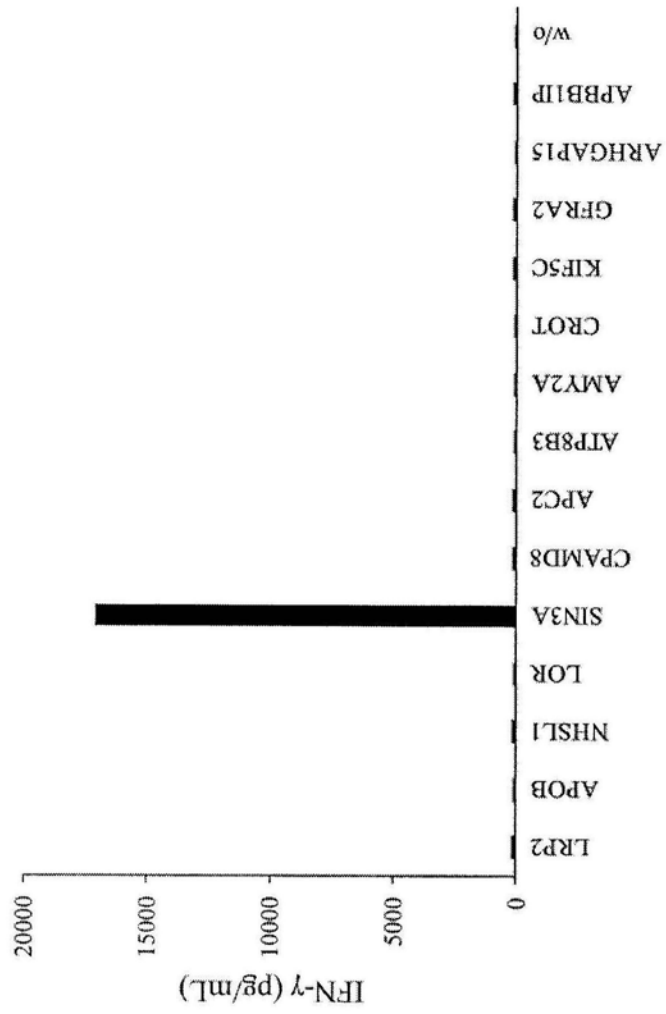


图9F

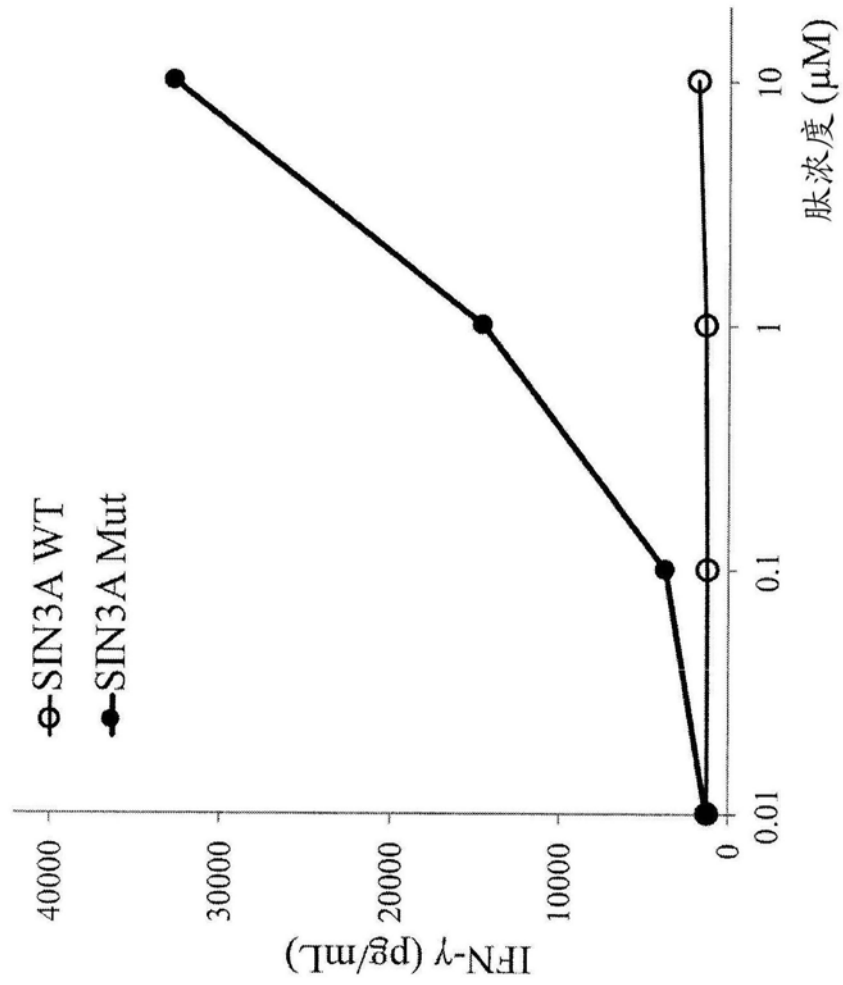


图9G

专利名称(译)	分离新抗原-特异性T细胞受体序列的方法		
公开(公告)号	CN110612446A	公开(公告)日	2019-12-24
申请号	CN201880022673.3	申请日	2018-03-28
[标]申请(专利权)人(译)	美国卫生及公共服务部		
申请(专利权)人(译)	美国卫生和人力服务部		
当前申请(专利权)人(译)	美国卫生和人力服务部		
[标]发明人	卢勇成 彼得菲茨杰拉德 郑志丽 史蒂文A罗森伯格		
发明人	卢勇成 彼得·菲茨杰拉德 郑志丽 史蒂文·A·罗森伯格		
IPC分类号	G01N33/53 C12Q1/686 C07K14/705		
CPC分类号	C07K14/705 C12Q1/6811 C12Q1/686 G01N33/56972 G16B20/00 G16B30/10 A61K35/17 C07K14/7051 C12N5/0636 C12N15/1003 C12N15/1096 C12N2502/30 C12Q1/6881 G16B30/20		
代理人(译)	洪欣		
优先权	62/479398 2017-03-31 US		
外部链接	Espacenet SIPO		

摘要(译)

公开了分离配对的T细胞受体(TCR) α 和 β 链序列或其抗原结合部分的方法。还公开了自动鉴定TCR的TCR α 和 β 链V区段序列和CDR3序列的方法,所述TCR对由癌症特异性突变编码的经突变的氨基酸序列具有抗原特异性。还公开了制备表达配对的TCR α 和 β 链序列或其抗原结合部分的细胞群的方法。还公开了通过所述方法制备的经分离的TCR α 和 β 链序列对和经分离的细胞群。

TCR可变区	CDR3 (核苷酸序列)	CDR3 (氨基酸序列)
TRAV3	TGTGCTGTGAGAGACCATAGCAACTATCAGTTAATCTGG (SEQ ID NO: 6)	CAVRDHSNYQLIW (SEQ ID NO: 7)
TRBV14	TGTGCCAGCAGCCAATCCGGTGGGGCGGGTTCTCCTA CAATGAGCAGTTCTTC (SEQ ID NO: 8)	CASSQSGGGGFSYN EQFF(SEQ ID NO: 9)