

一种识别 KRAS 突变的 T 细胞受体及其编码序列

技术领域

本发明涉及能够识别源自 KRAS G12V 抗原短肽的 TCR 及其编码序列，本发明还涉及
5 转导上述 TCR 来获得的 KRAS G12V 特异性的 T 细胞，及他们在预防和治疗 KRAS G12V 相关疾病中的用途。

背景技术

KRAS 基因 (p21 基因)，是一种鼠类肉瘤病毒癌基因，长约 35kb，位于 12 号染色体，
10 是 ras 基因家族成员之一，编码 KRAS 蛋白。KRAS 基因分为野生型或突变型。正常状态下，即野生型的 KRAS 能控制调控细胞生长的路径。而其一旦发生突变，则会持续刺激细胞生长，导致肿瘤的发生。KRAS 基因常见的突变位点位于 KRAS 基因 2 号外显子的 12 号和 13 号的密码子上，其中 G12V 为 7 个常见突变位点之一 (Chin J Lab Med. November 2012, Vol.35, No.11)。KRAS 突变体 (mKRAS)编码的 KRAS 蛋白将处于持续激活的状态，进而细胞增殖
15 失控，导致肿瘤的形成。研究表明，KRAS-G12V 与多种人类恶性肿瘤有关，包括但不限于，肺癌、结直肠癌 (Tumour Biol. 2016 May; 37(5): 6823-30)、胰腺癌、胃癌 (J Cancer 2019; 10(4): 821-828)等，并且携带 KRAS-G12V 突变的肿瘤患者生存期最短 (Br J Cancer. 2015 Oct 20; 113(8): 1206-1215)。VVGAVGVGK (SEQ ID NO: 9)或 VVVGAVGVGK (SEQ ID NO: 38)是衍生自 KRAS G12V 抗原的短肽，是 KRAS G12V 相关疾病治疗的一种靶标。

20 T 细胞过继免疫治疗是将对靶细胞抗原具有特异性的反应性 T 细胞转入病人体内，使其针对靶细胞发挥作用。T 细胞受体 (TCR)是 T 细胞表面的一种膜蛋白，其能够识别相应的靶细胞表面的抗原短肽。在免疫系统中，通过抗原短肽特异性的 TCR 与短肽-主组织相容性复合体 (pMHC 复合物)的结合引发 T 细胞与抗原呈递细胞 (APC)直接的物理接触，然后 T 细胞及 APC 两者的其他细胞膜表面分子就发生相互作用，引起一系列后续的细胞信号传递
25 和其他生理反应，从而使得不同抗原特异性的 T 细胞对其靶细胞发挥免疫效应。因此，本领域技术人员致力于分离出对 KRAS G12V 抗原突变短肽具有特异性的 TCR，以及将该 TCR 转导 T 细胞来获得对 KRAS G12V 抗原短肽具有特异性的 T 细胞，从而使他们在细胞免疫治疗中发挥作用。

30 发明内容

本发明的目的在于提供一种识别 KRAS G12V 抗原短肽的 T 细胞受体。

本发明的第一方面，提供了一种 T 细胞受体 (TCR)，所述 TCR 能够与 VVGAVGVGK-HLA A1101 复合物特异性结合。

在另一优选例中，所述 TCR 包含 TCR α 链可变域和 TCR β 链可变域，所述 TCR α 链可变域的 CDR3 的氨基酸序列为 ASLKGNNDMR (SEQ ID NO: 12); 和/或所述 TCR β 链可变域的 CDR3 的氨基酸序列为 ASSSSRWEQQF (SEQ ID NO: 15)。
35

在另一优选例中,所述 TCR α 链可变域的 3 个互补决定区(CDR)为:

α CDR1- DRVSQS (SEQ ID NO: 10)

α CDR2- IYSNGD (SEQ ID NO: 11)

α CDR3- ASLKGNNDMR (SEQ ID NO: 12); 和/或

5 所述 TCR β 链可变域的 3 个互补决定区为:

β CDR1- SGHVS (SEQ ID NO: 13)

β CDR2- FQNEAQ (SEQ ID NO: 14)

β CDR3- ASSSSRWEQQF (SEQ ID NO: 15)。

在另一优选例中,所述 TCR 还能够与 VVVGAVGVGK-HLA A1101 复合物特异性结合。

10 在另一优选例中,所述 TCR 包含 TCR α 链可变域和 TCR β 链可变域,所述 TCR α 链可变域为与 SEQ ID NO: 1 具有至少 90%序列相同性的氨基酸序列;和/或所述 TCR β 链可变域为与 SEQ ID NO: 5 具有至少 90%序列相同性的氨基酸序列。

在另一优选例中,所述 TCR 包含 α 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 1。

在另一优选例中,所述 TCR 包含 β 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 5。

15 在另一优选例中,所述 TCR 为 $\alpha\beta$ 异质二聚体,其包含 TCR α 链恒定区 TRAC*01 和 TCR β 链恒定区 TRBC1*01 或 TRBC2*01。

在另一优选例中,所述 TCR 的 α 链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 3 和/或所述 TCR 的 β 链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 7。

在另一优选例中,所述 TCR 是可溶的。

20 在另一优选例中,所述 TCR 为单链。

在另一优选例中,所述 TCR 是由 α 链可变域与 β 链可变域通过肽连接序列连接而成。

25 在另一优选例中,所述 TCR 在 α 链可变区氨基酸第 11、13、19、21、53、76、89、91 或第 94 位,和/或 α 链 J 基因短肽氨基酸倒数第 3 位、倒数第 5 位或倒数第 7 位中具有一个或多个突变;和/或所述 TCR 在 β 链可变区氨基酸第 11、13、19、21、53、76、89、91 或第 94 位,和/或 β 链 J 基因短肽氨基酸倒数第 2 位、倒数第 4 位或倒数第 6 位中具有一个或多个突变,其中氨基酸位置编号按 IMGT (国际免疫遗传学信息系统)中列出的位置编号。

在另一优选例中,所述 TCR 的 α 链可变域氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 32 和/或所述 TCR 的 β 链可变域氨基酸序列包含 SEQ ID NO: 34。

在另一优选例中,所述 TCR 的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 30。

30 在另一优选例中,所述 TCR 包括(a) 除跨膜结构域以外的全部或部分 TCR α 链;以及 (b) 除跨膜结构域以外的全部或部分 TCR β 链;

并且(a)和(b)各自包含功能性可变结构域,或包含功能性可变结构域和所述 TCR 链恒定结构域的至少一部分。

在另一优选例中,半胱氨酸残基在所述 TCR 的 α 和 β 链恒定域之间形成人工二硫键。

35 在另一优选例中,在所述 TCR 中形成人工二硫键的半胱氨酸残基取代了选自下列的一组或多组位点:

TRAC*01 外显子 1 的 Thr48 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser57;
TRAC*01 外显子 1 的 Thr45 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser77;
TRAC*01 外显子 1 的 Tyr10 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser17;
TRAC*01 外显子 1 的 Thr45 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Asp59;
5 TRAC*01 外显子 1 的 Ser15 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Glu15;
TRAC*01 外显子 1 的 Arg53 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser54;
TRAC*01 外显子 1 的 Pro89 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ala19; 和
TRAC*01 外显子 1 的 Tyr10 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Glu20。

10 在另一优选例中, 所述 TCR 的 α 链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 26 和/或所述 TCR 的 β 链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 28。

在另一优选例中, 所述 TCR 的 α 链可变区与 β 链恒定区之间含有人工链间二硫键。

在另一优选例中, 其特征在于, 在所述 TCR 中形成人工链间二硫键的半胱氨酸残基取代了选自下列的一组或多组位点:

15 TRAV 的第 46 位氨基酸和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的第 60 位氨基酸;
TRAV 的第 47 位氨基酸和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的第 61 位氨基酸;
TRAV 的第 46 位氨基酸和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的第 61 位氨基酸; 或
TRAV 的第 47 位氨基酸和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的第 60 位氨基酸。

20 在另一优选例中, 所述 TCR 包含 α 链可变域和 β 链可变域以及除跨膜结构域以外的全部或部分 β 链恒定域, 但其不包含 α 链恒定域, 所述 TCR 的 α 链可变域与 β 链形成异质二聚体。

在另一优选例中, 所述 TCR 的 α 链和/或 β 链的 C-或 N-末端结合有偶联物。

在另一优选例中, 与所述 T 细胞受体结合的偶联物为可检测标记物、治疗剂、PK 修饰部分或任何这些物质的组合。优选地, 所述治疗剂为抗-CD3 抗体。

25 本发明的第二方面, 提供了一种多价 TCR 复合物, 其包含至少两个 TCR 分子, 并且其中的至少一个 TCR 分子为本发明第一方面所述的 TCR。

本发明的第三方面, 提供了一种核酸分子, 所述核酸分子包含编码本发明第一方面所述的 TCR 分子的核酸序列或其互补序列。

30 在另一优选例中, 所述核酸分子包含编码 TCR α 链可变域的核苷酸序列 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 33。

在另一优选例中, 所述的核酸分子包含编码 TCR β 链可变域的核苷酸序列 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 35。

35 在另一优选例中, 所述核酸分子包含编码 TCR α 链的核苷酸序列 SEQ ID NO: 4 和/或包含编码 TCR β 链的核苷酸序列 SEQ ID NO: 8。

本发明的第四方面，提供了一种载体，所述的载体含有本发明第三方面所述的核酸分子；优选地，所述的载体为病毒载体；更优选地，所述的载体为慢病毒载体。

5 本发明的第五方面，提供了一种分离的宿主细胞，所述的宿主细胞中含有本发明第四方面所述的载体或基因组中整合有外源的本发明第三方面所述的核酸分子。

本发明的第六方面，提供了一种细胞，所述细胞转导本发明第三方面所述的核酸分子或本发明第四方面所述的载体；优选地，所述细胞为 T 细胞或干细胞。

10 本发明的第七方面，提供了一种药物组合物，所述组合物含有药学上可接受的载体以及本发明第一方面所述的 TCR、本发明第二方面所述的 TCR 复合物、本发明第三方面所述的核酸分子、本发明第四方面所述的载体、或本发明第六方面所述的细胞。

15 本发明的第八方面，提供了本发明第一方面所述的 T 细胞受体、或本发明第二方面所述的 TCR 复合物、本发明第三方面所述的核酸分子、本发明第四方面所述的载体、或本发明第六方面所述的细胞的用途，用于制备治疗肿瘤或自身免疫疾病的药物。优选地，所述肿瘤为胰腺癌、结肠癌、直肠癌或肺癌。

20 本发明的第九方面，提供了本发明第一方面所述的 T 细胞受体、或本发明第二方面所述的 TCR 复合物、本发明第三方面所述的核酸分子、本发明第四方面所述的载体、或本发明第六方面所述的细胞用作治疗肿瘤或自身免疫疾病的药物。优选地，所述肿瘤为胰腺癌、结肠癌、直肠癌或肺癌。

25 本发明的第十方面，提供了一种治疗疾病的方法，包括给需要治疗的对象施用适量的本发明第一方面所述的 T 细胞受体、或本发明第二方面所述的 TCR 复合物、本发明第三方面所述的核酸分子、本发明第四方面所述的载体、或本发明第六方面所述的细胞、或本发明第七方面所述的药物组合物；

优选地，所述的疾病为肿瘤；更优选地，所述肿瘤为胰腺癌、结肠癌、直肠癌或肺癌。

30 应理解，在本发明范围内中，本发明的上述各技术特征和在下文(如实施例)中具体描述的各技术特征之间都可以互相组合，从而构成新的或优选的技术方案。限于篇幅，在此不再一一累述。

附图说明

35 图 1a、图 1b、图 1c、图 1d、图 1e 和图 1f 分别为 TCR α 链可变域氨基酸序列、TCR α 链可变域核苷酸序列、TCR α 链氨基酸序列、TCR α 链核苷酸序列、具有前导序列的 TCR α

链氨基酸序列以及具有前导序列的 TCR α 链核苷酸序列。

图 2a、图 2b、图 2c、图 2d、图 2e 和图 2f 分别为 TCR β 链可变域氨基酸序列、TCR β 链可变域核苷酸序列、TCR β 链氨基酸序列、TCR β 链核苷酸序列、具有前导序列的 TCR β 链氨基酸序列以及具有前导序列的 TCR β 链核苷酸序列。

5 图 3 为单克隆细胞的 CD8⁺及四聚体-PE 双阳性染色结果。

图 4a 和图 4b 分别为可溶性 TCR α 链的氨基酸序列和核苷酸序列。

图 5a 和图 5b 分别为可溶性 TCR β 链的氨基酸序列和核苷酸序列。

图 6a 和图 6b 为纯化后得到的可溶性 TCR 的胶图。其中，图 6a 和图 6b 的右侧泳道分别为还原胶和非还原胶，左侧泳道都为分子量标记 (marker)。

10 图 7a 和图 7b 分别为单链 TCR 的氨基酸序列和核苷酸序列。

图 8a 和图 8b 分别为单链 TCR α 链可变域的氨基酸序列和核苷酸序列。

图 9a 和图 9b 分别为单链 TCR β 链可变域的氨基酸序列和核苷酸序列。

图 10a 和图 10b 分别为单链 TCR 连接序列 (linker)的氨基酸序列和核苷酸序列。

15 图 11 为纯化后得到的可溶性单链 TCR 的胶图。左侧泳道为分子量标记 (marker)，右侧泳道为非还原胶。

图 12 为本发明可溶性 TCR 与 VVGAVGVGK-HLA A1101 复合物结合的 BIAcore 动力学图谱。

图 13 为本发明可溶性单链 TCR 与 VVGAVGVGK-HLA A1101 复合物结合的 BIAcore 动力学图谱。

20 图 14 为得到的 T 细胞克隆的 ELISPOT 激活功能验证结果。

图 15 为转导本发明的 TCR 的效应细胞的 ELISPOT 激活功能验证结果 (靶细胞为 T2)。

图 16 为转导本发明的 TCR 的效应细胞的 ELISPOT 激活功能验证结果 (靶细胞为肿瘤细胞系)。

图 17 为转导本发明的 TCR 的效应细胞的 LDH 杀伤功能验证结果。

25

具体实施方式

30 本发明人经过广泛而深入的研究,找到了与 KRAS G12V 抗原短肽 VVGAVGVGK (SEQ ID NO: 9)或 VVVGAVGVGK (SEQ ID NO: 38)能够特异性结合的 TCR, 所述抗原短肽 VVGAVGVGK 或 VVVGAVGVGK 可分别与 HLA A1101 形成复合物并一起被呈递到细胞表面。本发明还提供了编码所述 TCR 的核酸分子以及包含所述核酸分子的载体。另外, 本发明还提供了转导本发明 TCR 的细胞。

术语

35 MHC 分子是免疫球蛋白超家族的蛋白质, 可以是 I 类或 II 类 MHC 分子。因此, 其对于抗原的呈递具有特异性, 不同的个体有不同的 MHC, 能呈递一种蛋白抗原中不同的短肽到各自的 APC 细胞表面。人类的 MHC 通常称为 HLA 基因或 HLA 复合体。

T 细胞受体 (TCR), 是呈递在主组织相容性复合体 (MHC) 上的特异性抗原肽的唯一受体。在免疫系统中, 通过抗原特异性的 TCR 与 pMHC 复合物的结合引发 T 细胞与抗原呈递细胞 (APC) 直接的物理接触, 然后 T 细胞及 APC 两者的其他细胞膜表面分子就发生相互作用, 这就引起了一系列后续的细胞信号传递和其他生理反应, 从而使得不同抗原特异性的 T 细胞对其靶细胞发挥免疫效应。

TCR 是由 α 链/ β 链或者 γ 链/ δ 链以异质二聚体形式存在的细胞膜表面的糖蛋白。在 95% 的 T 细胞中 TCR 异质二聚体由 α 和 β 链组成, 而 5% 的 T 细胞具有由 γ 和 δ 链组成的 TCR。天然 $\alpha\beta$ 异质二聚 TCR 具有 α 链和 β 链, α 链和 β 链构成 $\alpha\beta$ 异源二聚 TCR 的亚单位。广义上讲, α 和 β 各链包含可变区、连接区和恒定区, β 链通常还在可变区和连接区之间含有短的多变区, 但该多变区常视作连接区的一部分。各可变区包含嵌合在框架结构 (framework regions) 中的 3 个 CDR (互补决定区), CDR1、CDR2 和 CDR3。CDR 区决定了 TCR 与 pMHC 复合物的结合, 其中 CDR3 由可变区和连接区重组而成, 被称为超变区。TCR 的 α 和 β 链一般看作各有两个“结构域”即可变域和恒定域, 可变域由连接的可变区和连接区构成。TCR 恒定域的序列可以在国际免疫遗传学信息系统 (IMGT) 的公开数据库中找到, 如 TCR 分子 α 链的恒定域序列为“TRAC*01”, TCR 分子 β 链的恒定域序列为“TRBC1*01”或“TRBC2*01”。此外, TCR 的 α 和 β 链还包含跨膜区和胞质区, 胞质区很短。

在本发明中, 术语“本发明多肽”、“本发明的 TCR”、“本发明的 T 细胞受体”可互换使用。

天然链间二硫键与人工链间二硫键

在天然 TCR 的近膜区 C α 与 C β 链间存在一组二硫键, 本发明中称为“天然链间二硫键”。在本发明中, 将人工引入的, 位置与天然链间二硫键的位置不同的链间共价二硫键称为“人工链间二硫键”。

为方便描述二硫键的位置, 本发明中 TRAC*01 与 TRBC1*01 或 TRBC2*01 氨基酸序列的位置编号按从 N 端到 C 端依次顺序进行位置编号, 如 TRBC1*01 或 TRBC2*01 中, 按从 N 端到 C 端依次顺序第 60 个氨基酸为 P(脯氨酸), 则本发明中可将其描述为 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Pro60, 也可将其表述为 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的第 60 位氨基酸, 又如 TRBC1*01 或 TRBC2*01 中, 按从 N 端到 C 端依次顺序第 61 个氨基酸为 Q(谷氨酰胺), 则本发明中可将其描述为 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Gln61, 也可将其表述为 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的第 61 位氨基酸, 其他以此类推。本发明中, 可变区 TRAV 与 TRBV 的氨基酸序列的位置编号, 按照 IMGT 中列出的位置编号。如 TRAV 中的某个氨基酸, IMGT 中列出的位置编号为 46, 则本发明中将其描述为 TRAV 第 46 位氨基酸, 其他以此类推。本发明中, 其他氨基酸的序列位置编号有特殊说明的, 则按特殊说明。

发明详述

TCR 分子

在抗原加工过程中, 抗原在细胞内被降解, 然后通过 MHC 分子携带至细胞表面。T 细

胞受体能够识别抗原呈递细胞表面的肽-MHC 复合物。因此，本发明的第一方面提供了一种能够结合 VVGAVGVGK-HLA A1101 或 VVVGAVGVGK-HLA A1101 复合物的 TCR 分子。优选地，所述 TCR 分子是分离的或纯化的。该 TCR 的 α 和 β 链各具有 3 个互补决定区 (CDR)。

在本发明的一个优选地实施方式中，所述 TCR 的 α 链包含具有以下氨基酸序列的 CDR：

5 α CDR1- DRVSQS (SEQ ID NO: 10)

α CDR2- IYSNGD (SEQ ID NO: 11)

α CDR3- ASLKGNNDMR (SEQ ID NO: 12); 和/或

所述 TCR β 链可变域的 3 个互补决定区为：

β CDR1- SGHVS (SEQ ID NO: 13)

10 β CDR2- FQNEAQ (SEQ ID NO: 14)

β CDR3- ASSSSRWEQQF (SEQ ID NO: 15)。

可以将上述本发明的 CDR 区氨基酸序列嵌入到任何适合的框架结构中来制备嵌合 TCR。只要框架结构与本发明的 TCR 的 CDR 区兼容，本领域技术人员根据本发明公开的 CDR 区就能够设计或合成出具有相应功能的 TCR 分子。因此，本发明 TCR 分子是指包含上
15 述 α 和/或 β 链 CDR 区序列及任何适合的框架结构的 TCR 分子。本发明 TCR α 链可变域为与 SEQ ID NO: 1 具有至少 90%，优选地 95%，更优选地 98% 序列相同性的氨基酸序列；和/或本发明 TCR β 链可变域为与 SEQ ID NO: 5 具有至少 90%，优选地 95%，更优选地 98% 序列相同性的氨基酸序列。

在本发明的一个优选例中，本发明的 TCR 分子是由 α 与 β 链构成的异质二聚体。具体地，
20 一方面所述异质二聚 TCR 分子的 α 链包含可变域和恒定域，所述 α 链可变域氨基酸序列包含上述 α 链的 CDR1 (SEQ ID NO: 10)、CDR2 (SEQ ID NO: 11) 和 CDR3 (SEQ ID NO: 12)。优选地，所述 TCR 分子包含 α 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 1。更优选地，所述 TCR 分子的 α 链可变域氨基酸序列为 SEQ ID NO: 1。另一方面，所述异质二聚 TCR 分子的 β 链包含可变域和恒定域，所述 β 链可变域氨基酸序列包含上述 β 链的 CDR1 (SEQ ID NO: 13)、CDR2 (SEQ ID
25 NO: 14) 和 CDR3 (SEQ ID NO: 15)。优选地，所述 TCR 分子包含 β 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 5。更优选地，所述 TCR 分子的 β 链可变域氨基酸序列为 SEQ ID NO: 5。

在本发明的一个优选例中，本发明的 TCR 分子是由 α 链的部分或全部和/或 β 链的部分或全部组成的单链 TCR 分子。有关单链 TCR 分子的描述可以参考文献 Chung *et al* (1994) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 91, 12654-12658。根据文献中所述，本领域技术人员能够容易地构建包
30 含本发明 CDRs 区的单链 TCR 分子。具体地，所述单链 TCR 分子包含 V α 、V β 和 C β ，优选地按照从 N 端到 C 端的顺序连接。

所述单链 TCR 分子的 α 链可变域氨基酸序列包含上述 α 链的 CDR1 (SEQ ID NO: 10)、CDR2 (SEQ ID NO: 11) 和 CDR3 (SEQ ID NO: 12)。优选地，所述单链 TCR 分子包含 α 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 1。更优选地，所述单链 TCR 分子的 α 链可变域氨基酸序列为
35 SEQ ID NO: 1。所述单链 TCR 分子的 β 链可变域氨基酸序列包含上述 β 链的 CDR1 (SEQ ID NO: 13)、CDR2 (SEQ ID NO: 14) 和 CDR3 (SEQ ID NO: 15)。优选地，所述单链 TCR 分子包

含 β 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 5。更优选地, 所述单链 TCR 分子的 β 链可变域氨基酸序列为 SEQ ID NO: 5。

在本发明的一个优选例中, 本发明的 TCR 分子的恒定域是人的恒定域。本领域技术人员知晓或可以通过查阅相关书籍或 IMGT (国际免疫遗传学信息系统) 的公开数据库来获得人的恒定域氨基酸序列。例如, 本发明 TCR 分子 α 链的恒定域序列可以为“TRAC*01”, TCR 分子 β 链的恒定域序列可以为“TRBC1*01”或“TRBC2*01”。IMGT 的 TRAC*01 中给出的氨基酸序列的第 53 位为 Arg, 在此表示为: TRAC*01 外显子 1 的 Arg53, 其他以此类推。优选地, 本发明 TCR 分子 α 链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 3, 和/或 β 链的氨基酸序列为 SEQ ID NO: 7。

天然存在的 TCR 是一种膜蛋白, 通过其跨膜区得以稳定。如同免疫球蛋白(抗体)作为抗原识别分子一样, TCR 也可以被开发应用于诊断和治疗, 这时需要获得可溶性的 TCR 分子。可溶性的 TCR 分子不包括其跨膜区。可溶性 TCR 有很广泛的用途, 它不仅可用于研究 TCR 与 pMHC 的相互作用, 也可用作检测感染的诊断工具或作为自身免疫病的标志物。类似地, 可溶性 TCR 可以被用来将治疗剂(如细胞毒素化合物或免疫刺激性化合物)输送到呈递特异性抗原的细胞, 另外, 可溶性 TCR 还可与其他分子(如, 抗-CD3 抗体)结合来重新定向 T 细胞, 从而使其靶向呈递特定抗原的细胞。本发明也获得了对 KRAS G12V 抗原短肽具有特异性的可溶性 TCR。

为获得可溶性 TCR, 一方面, 本发明 TCR 可以是在其 α 和 β 链恒定域的残基之间引入人工二硫键的 TCR。半胱氨酸残基在所述 TCR 的 α 和 β 链恒定域间形成人工链间二硫键。

半胱氨酸残基可以取代在天然 TCR 中合适位点的其他氨基酸残基以形成人工链间二硫键。例如, 取代 TRAC*01 外显子 1 的 Thr48 和取代 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser57 的半胱氨酸残基来形成二硫键。引入半胱氨酸残基以形成二硫键的其他位点还可以是:

TRAC*01 外显子 1 的 Thr45 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser77; TRAC*01 外显子 1 的 Tyr10 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser17; TRAC*01 外显子 1 的 Thr45 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Asp59; TRAC*01 外显子 1 的 Ser15 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Glu15; TRAC*01 外显子 1 的 Arg53 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser54; TRAC*01 外显子 1 的 Pro89 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ala19; 或 TRAC*01 外显子 1 的 Tyr10 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Glu20。即半胱氨酸残基取代了上述 α 与 β 链恒定域中任一组位点。可在本发明 TCR 恒定域的一个或多个 C 末端截短最多 50 个、或最多 30 个、或最多 15 个、或最多 10 个、或最多 8 个或更少的氨基酸, 以使其不包括半胱氨酸残基来达到缺失天然二硫键的目的, 也可通过将形成天然二硫键的半胱氨酸残基突变为另一氨基酸来达到上述目的。

如上所述, 本发明的 TCR 可以包含在其 α 和 β 链恒定域的残基间引入的人工二硫键。应注意, 恒定域间含或不含上文所述的引入的人工二硫键, 本发明的 TCR 均可含有 TRAC 恒定域序列和 TRBC1 或 TRBC2 恒定域序列。TCR 的 TRAC 恒定域序列和 TRBC1 或 TRBC2 恒定域序列可通过存在于 TCR 中的天然二硫键连接。

为获得可溶性 TCR，另一方面，本发明 TCR 还包括在其疏水芯区域发生突变的 TCR，这些疏水芯区域的突变优选为能够使本发明可溶性 TCR 的稳定性提高的突变，如在公开号为 WO2014/206304 的专利文献中所述。这样的 TCR 可在其下列可变域疏水芯位置发生突变：(α 和/或 β 链)可变区氨基酸第 11、13、19、21、53、76、89、91、94 位，和/或 α 链 J 基因 (TRAJ) 短肽氨基酸位置倒数第 3、5、7 位，和/或 β 链 J 基因 (TRBJ) 短肽氨基酸位置倒数第 2、4、6 位，其中氨基酸序列的位置编号按国际免疫遗传学信息系统 (IMGT) 中列出的位置编号。本领域技术人员知晓上述国际免疫遗传学信息系统，并可根据该数据库得到不同 TCR 的氨基酸残基在 IMGT 中的位置编号。

10 本发明中疏水芯区域发生突变的 TCR 可以由一柔性肽链连接 TCR 的 α 与 β 链的可变域而构成的稳定性可溶单链 TCR。应注意，本发明中柔性肽链可以是任何适合连接 TCRα 与 β 链可变域的肽链。如在本发明实施例 4 中构建的单链可溶性 TCR，其 α 链可变域氨基酸序列为 SEQ ID NO: 32，编码的核苷酸序列为 SEQ ID NO: 33；β 链可变域氨基酸序列为 SEQ ID NO: 34，编码的核苷酸序列为 SEQ ID NO: 35。

15 另外，对于稳定性而言，专利文献 201680003540.2 还公开了在 TCR 的 α 链可变区与 β 链恒定区之间引入人工链间二硫键能够使 TCR 的稳定性显著提高。因此，本发明的高亲和力 TCR 的 α 链可变区与 β 链恒定区之间还可以含有人工链间二硫键。具体地，在所述 TCR 的 α 链可变区与 β 链恒定区之间形成人工链间二硫键的半胱氨酸残基取代了：TRAV 的第 46 位氨基酸和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的第 60 位氨基酸；TRAV 的第 47 位氨基酸和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的第 61 位氨基酸；TRAV 的第 46 位氨基酸和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的第 61 位氨基酸；或 TRAV 的第 47 位氨基酸和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的第 60 位氨基酸。优选地，这样的 TCR 可以包含(i) 除其跨膜结构域以外的全部或部分 TCRα 链，和(ii) 除其跨膜结构域以外的全部或部分 TCRβ 链，其中(i)和(ii) 均包含 TCR 链的可变域和至少一部分恒定域，α 链与 β 链形成异质二聚体。更优选地，这样的 TCR 可以包含 α 链可变域和 β 链可变域以及除跨膜结构域以外的全部或部分 β 链恒定域，但其不包含 α 链恒定域，所述 TCR 的 α 链可变域与 β 链形成异质二聚体。

25 本发明的 TCR 也可以多价复合体的形式提供。本发明的多价 TCR 复合体包含两个、三个、四个或更多个本发明 TCR 相结合而形成的多聚物，如可以用 p53 的四聚结构域来产生四聚体，或多个本发明 TCR 与另一分子结合而形成的复合物。本发明的 TCR 复合物可用于体外或体内追踪或靶向呈递特定抗原的细胞，也可用于产生具有此类应用的其他多价 TCR 复合物的中间体。

30 本发明的 TCR 可以单独使用，也可与偶联物以共价或其他方式结合，优选以共价方式结合。所述偶联物包括可检测标记物 (为诊断目的，其中所述 TCR 用于检测呈递 VVGAVGVGK-HLA A1101 或 VVGAVGVGK-HLA A1101 复合物的细胞的存在)、治疗剂、PK (蛋白激酶)修饰部分或任何以上这些物质的组合结合或偶联。

35 用于诊断目的的可检测标记物包括但不限于：荧光或发光标记物、放射性标记物、MRI (磁共振成像)或 CT (电子计算机 X 射线断层扫描技术)造影剂、或能够产生可检测产物的酶。

可与本发明 TCR 结合或偶联的治疗剂包括但不限于：1. 放射性核素 (Koppe 等, 2005, 癌转移评论 (Cancer metastasis reviews) 24, 539); 2. 生物毒 (Chaudhary 等, 1989, 自然(Nature) 339, 394; Epel 等, 2002, 癌症免疫学和免疫治疗 (Cancer Immunology and Immunotherapy) 51, 565); 3. 细胞因子如 IL-2 等 (Gillies 等, 1992, 美国国家科学院院刊(PNAS) 89, 1428; 5 Card 等, 2004, 癌症免疫学和免疫治疗 (Cancer Immunology and Immunotherapy) 53, 345; Halin 等, 2003, 癌症研究 (Cancer Research) 63, 3202); 4. 抗体 Fc 片段 (Mosquera 等, 2005, 免疫学杂志 (The Journal Of Immunology) 174, 4381); 5. 抗体 scFv 片段 (Zhu 等, 1995, 癌症国际期刊 (International Journal of Cancer) 62, 319) ; 6. 金纳米颗粒/纳米棒 (Lapotko 等, 2005, 癌症通信 (Cancer letters) 239, 36; Huang 等, 2006, 美国化学学会杂志 (Journal of the 10 American Chemical Society) 128, 2115); 7. 病毒颗粒 (Peng 等, 2004, 基因治疗 (Gene therapy) 11, 1234); 8. 脂质体 (Mamot 等, 2005, 癌症研究 (Cancer research) 65, 11631); 9. 纳米磁粒; 10. 前药激活酶 (例如, DT-心肌黄酶 (DTD)或联苯基水解酶-样蛋白质 (BPHL)); 11. 化疗剂 (例如, 顺铂)或任何形式的纳米颗粒等。

另外, 本发明的 TCR 还可以是包含衍生自超过一种物种序列的杂合 TCR。例如, 有研究 15 显示鼠科 TCR 在人 T 细胞中比人 TCR 能够更有效地表达。因此, 本发明 TCR 可包含人可变域和鼠的恒定域。这一方法的缺陷是可能引发免疫应答。因此, 在其用于过继性 T 细胞治疗时应当有调节方案来进行免疫抑制, 以允许表达鼠科的 T 细胞的植入。

应理解, 本文中氨基酸名称采用国际通用的单英文字母或三英文字母表示, 氨基酸名称的单英文字母与三英文字母的对应关系如下: Ala (A)、Arg (R)、Asn (N)、Asp (D)、Cys (C)、 20 Gln (Q)、Glu (E)、Gly (G)、His (H)、Ile (I)、Leu (L)、Lys (K)、Met (M)、Phe (F)、Pro (P)、Ser (S)、Thr (T)、Trp (W)、Tyr (Y)、Val (V)。

核酸分子

本发明的第二方面提供了编码本发明第一方面 TCR 分子或其部分的核酸分子, 所述部分可以是一个或多个 CDR, α 和/或 β 链的可变域, 以及 α 链和/或 β 链。

25 编码本发明第一方面 TCR 分子 α 链 CDR 区的核苷酸序列如下:

α CDR1- gaccgagtttcccagtcc (SEQ ID NO: 16)

α CDR2- atatactccaatggtgac (SEQ ID NO: 17)

α CDR3- gcctccctcaagggaacaatgacatgcgc (SEQ ID NO: 18)

编码本发明第一方面 TCR 分子 β 链 CDR 区的核苷酸序列如下:

30 β CDR1- tcgggtcatgtatcc (SEQ ID NO: 19)

β CDR2- ttccagaatgaagctcaa (SEQ ID NO: 20)

β CDR3- gccagcagctccagtaggtgggagcagcagttc (SEQ ID NO: 21)

因此, 编码本发明 TCR α 链的本发明核酸分子的核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 17 和 SEQ ID NO: 18, 和/或编码本发明 TCR β 链的本发明核酸分子的核苷酸序列包 35 括 SEQ ID NO: 19、SEQ ID NO: 20 和 SEQ ID NO: 21。

本发明核酸分子的核苷酸序列可以是单链或双链的, 该核酸分子可以是 RNA 或 DNA,

并且可以包含或不包含内含子。优选地，本发明核酸分子的核苷酸序列不包含内含子但能够编码本发明多肽，例如编码本发明 TCR α 链可变域的本发明核酸分子的核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 2 和/或编码本发明 TCR β 链可变域的本发明核酸分子的核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 6。或者，编码本发明 TCR α 链可变域的本发明核酸分子的核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 33 和/或编码本发明 TCR β 链可变域的本发明核酸分子的核苷酸序列包括 SEQ ID NO: 35。更优选地，本发明核酸分子的核苷酸序列包含 SEQ ID NO: 4 和/或 SEQ ID NO: 8。或者，本发明核酸分子的核苷酸序列为 SEQ ID NO: 31。

应理解，由于遗传密码的简并，不同的核苷酸序列可以编码相同的多肽。因此，编码本发明 TCR 的核酸序列可以与本发明附图中所示的核酸序列相同或是简并的变异体。以本发明中的其中一个例子来说明，“简并的变异体”是指编码具有 SEQ ID NO: 1 的蛋白序列，但与 SEQ ID NO: 2 的序列有差别的核酸序列。

核苷酸序列可以是经密码子优化的。不同的细胞在具体密码子的利用上是不同的，可以根据细胞的类型，改变序列中的密码子来增加表达量。哺乳动物细胞以及多种其他生物的密码子选择表是本领域技术人员公知的。

本发明的核酸分子全长序列或其片段通常可以用但不限于 PCR 扩增法、重组法或人工合成的方法获得。目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明 TCR(或其片段，或其衍生物)的 DNA 序列。然后可将该 DNA 序列引入本领域中已知的各种现有的 DNA 分子(或如载体)和细胞中。DNA 可以是编码链或非编码链。

载体

本发明还涉及包含本发明的核酸分子的载体，包括表达载体，即能够在体内或体外表达的构建体。常用的载体包括细菌质粒、噬菌体和动植物病毒。

病毒递送系统包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、疱疹病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、杆状病毒载体。

优选地，载体可以将本发明的核苷酸转移至细胞中，例如 T 细胞中，使得该细胞表达 KRAS G12V 抗原特异性的 TCR。理想的情况下，该载体应当能够在 T 细胞中持续高水平地表达。

细胞

本发明还涉及用本发明的载体或编码序列经基因工程产生的宿主细胞。所述宿主细胞中含有本发明的载体或染色体中整合有本发明的核酸分子。宿主细胞选自：原核细胞和真核细胞，例如大肠杆菌、酵母细胞、CHO 细胞等。

另外，本发明还包括表达本发明的 TCR 的分离的细胞，特别是 T 细胞。该 T 细胞可衍生自从受试者分离的 T 细胞，或者可以从受试者中分离的混合细胞群，诸如外周血淋巴细胞(PBL)群的一部分。如，该细胞可以分离自外周血单核细胞(PBMC)，可以是 CD4⁺辅助 T 细胞或 CD8⁺细胞毒性 T 细胞。该细胞可在 CD4⁺辅助 T 细胞/CD8⁺细胞毒性 T 细胞的混合群中。一般地，该细胞可以用抗体(如，抗-CD3 或抗-CD28 的抗体)活化，以便使它们能够更容易接受转染，例如用包含编码本发明 TCR 分子的核苷酸序列的载体进行转染。

备选地，本发明的细胞还可以是或衍生自干细胞，如造血干细胞 (HSC)。将基因转移至 HSC 不会导致在细胞表面表达 TCR，因为干细胞表面不表达 CD3 分子。然而，当干细胞分化为迁移至胸腺的淋巴前体 (lymphoid precursor) 时，CD3 分子的表达将启动在胸腺细胞的表面表达该引入的 TCR 分子。

- 5 有许多方法适合于用编码本发明 TCR 的 DNA 或 RNA 进行 T 细胞转染 (如, Robbins 等., (2008) J. Immunol. 180: 6116-6131)。表达本发明 TCR 的 T 细胞可以用于过继免疫治疗。本领域技术人员能够知晓进行过继性治疗的许多合适方法 (如, Rosenberg 等., (2008) Nat Rev Cancer 8(4): 299-308)。

KRAS G12V 抗原相关疾病

- 10 本发明还涉及在受试者中治疗和/或预防与 KRAS G12V 相关疾病的方法，其包括过继性转移 KRAS G12V 特异性 T 细胞至该受试者的步骤。该 KRAS G12V 特异性 T 细胞可识别 VVGAVGVGK-HLA A1101 或 VVGAVGVGK-HLA A1101 复合物。

- 本发明的 KRAS G12V 特异性的 T 细胞可用于治疗任何呈递 KRAS G12V 抗原短肽 VVGAVGVGK-HLA A1101 或 VVGAVGVGK-HLA A1101 复合物的 KRAS G12V 相关疾
- 15 病，包括但不限于肿瘤，如胰腺癌、肺癌、结肠癌直肠癌等。

未发生突变的即野生型 KRAS 蛋白的前 20 个氨基酸序列为 MTEYKLVVVG AGGVGKSALT (SEQ ID NO: 39)，其第 12 位氨基酸为 G。VVGAGGVGK 和 VVGAGGVGK 分别对应 KRAS 蛋白的第 8-16 位和 7-16 位，上述相应位置发生 G12V 突变后即形成短肽 VVGAVGVGK 和 VVGAVGVGK。

20 治疗方法

- 可以通过分离患有与 KRAS G12V 抗原相关疾病的病人或志愿者的 T 细胞，并将本发明的 TCR 导入上述 T 细胞中，随后将这些基因工程修饰的细胞回输到病人体内来进行治疗。因此，本发明提供了一种治疗 KRAS G12V 相关疾病的方法，包括将分离的表达本发明 TCR 的 T 细胞，优选地，该 T 细胞来源于病人本身，输入到病人体内。一般地，包括(1) 分离病人
- 25 人的 T 细胞，(2) 用本发明核酸分子或能够编码本发明 TCR 分子的核酸分子体外转导 T 细胞，(3) 将基因工程修饰的 T 细胞输入到病人体内。分离、转染及回输的细胞的数量可以由医师决定。

本发明的主要优点在于：

- 30 (1) 本发明的 TCR 能够与 KRAS G12V 抗原短肽复合物 VVGAVGVGK-HLA A1101 或 VVGAVGVGK-HLA A1101 结合，同时转导了本发明 TCR 的细胞能够被特异性激活。
- (2) 转导本发明 TCR 的效应细胞对靶细胞有很好的特异性杀伤作用。

- 下面的具体实施例，进一步阐述本发明。应理解，这些实施例仅用于说明本发明而不用
- 35 于限制本发明的范围。下列实施例中未注明具体条件的实验方法，通常按照常规条件，例如 (Sambrook 和 Russell 等人, 分子克隆: 实验室手册 (Molecular Cloning-A Laboratory Manual)

(第三版)(2001) CSHL 出版社)中所述的条件,或按照制造厂商所建议的条件。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。除非另外说明,否则百分比和份数按重量计算。以下实施例中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

5 实施例 1 克隆 KRAS G12V 抗原短肽特异性 T 细胞

利用合成短肽 VVGAVGVGK (SEQ ID NO: 9) (北京赛百盛基因技术有限公司)刺激来自于基因型为 HLA-A1101 的健康志愿者的外周血淋巴细胞 (PBL)。将短肽与带有生物素标记的 HLA-A1101 复性,制备 pHLA 单倍体。这些单倍体与用 PE 标记的链霉亲和素 (BD 公司)组合成 PE 标记的四聚体,分选该四聚体及抗 CD8-APC 双阳性细胞。扩增分选的细胞,并按上述方法进行二次分选,随后用有限稀释法进行单克隆。单克隆细胞用四聚体染色,筛选到的双阳性克隆如图 3 所示。经过层层筛选得到的双阳性克隆,还需要满足进一步的功能测试。

通过 ELISPOT 实验进一步检测该 T 细胞克隆的功能及特异性。本领域技术人员熟知利用 ELISPOT 实验检测细胞功能的方法。本实施例 IFN- γ ELISPOT 实验中所用的效应细胞为本发明中获得的 T 细胞克隆,靶细胞为负载了本发明短肽的 LCLs 细胞,对照组为负载了其他短肽的 LCLs 细胞及未负载任何短肽的 LCLs 细胞。

首先准备 ELISPOT 平板,ELISPOT 实验步骤如下:将试验的各个组分加入 ELISPOT 平板:LCLs 细胞 2×10^4 个/孔、T 细胞克隆 2×10^3 个/孔后,实验组加入 20 μ L 特异性短肽,对照组加入 20 μ L 非特异性短肽,空白组加入 20 μ L 培养基(试验培养基),并设置 2 复孔。然后温育过夜 (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)。随后洗涤平板并进行二级检测和显色,干燥平板 1 小时,再利用免疫斑点平板读数计 (ELISPOT READER system; AID 公司)计数膜上形成的斑点。实验结果如图 14 所示,得到的特定抗原特异性 T 细胞克隆对负载本发明短肽的 LCLs 细胞有明显的特异性反应,而对负载其他无关肽及未负载短肽的 LCLs 细胞基本没有反应。

25 实施例 2 获取 KRAS G12V 抗原短肽特异性 T 细胞克隆的 TCR 基因与载体的构建

用 Quick-RNA™ MiniPrep (ZYMO research)抽提实施例 1 中筛选到的抗原短肽特异性、HLA-A1101 限制性的 T 细胞克隆的总 RNA。cDNA 的合成采用 clontech 的 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒,采用的引物是设计在人类 TCR 基因的 C 端保守区。将序列克隆至 T 载体 (TAKARA)上进行测序。应注意,该序列为互补序列,不包含内含子。经测序,该双阳性克隆表达的 TCR 的 α 链和 β 链序列结构分别如图 1 和图 2 所示,图 1a、图 1b、图 1c、图 1d、图 1e 和图 1f 分别为 TCR α 链可变域氨基酸序列、TCR α 链可变域核苷酸序列、TCR α 链氨基酸序列、TCR α 链核苷酸序列、具有前导序列的 TCR α 链氨基酸序列以及具有前导序列的 TCR α 链核苷酸序列;图 2a、图 2b、图 2c、图 2d、图 2e 和图 2f 分别为 TCR β 链可变域氨基酸序列、TCR β 链可变域核苷酸序列、TCR β 链氨基酸序列、TCR β 链核苷酸序列、具有前导序列的 TCR β 链氨基酸序列以及具有前导序列的 TCR β 链核苷酸序列。

经鉴定, α 链包含具有以下氨基酸序列的 CDR:

α CDR1- DRVSQS (SEQ ID NO: 10)

α CDR2- IYSNGD (SEQ ID NO: 11)

α CDR3- ASLKGNNDMR (SEQ ID NO: 12)

β 链包含具有以下氨基酸序列的 CDR:

5 β CDR1- SGHVS (SEQ ID NO: 13)

β CDR2- FQNEAQ (SEQ ID NO: 14)

β CDR3- ASSSSRWEQQF (SEQ ID NO: 15)。

通过重叠(overlap)PCR 分别将 TCR α 链和 β 链的全长基因克隆至慢病毒表达载体 pLenti(addgene)。具体为: 用 overlap PCR 将 TCR α 链和 TCR β 链的全长基因进行连接得到 TCR α -2A-TCR β 片段。将慢病毒表达载体及 TCR α -2A-TCR β 酶切连接得到 pLenti-TRA-2A-TRB-IRES-NGFR 质粒。作为对照用,同时也构建表达 eGFP 的慢病毒载体 pLenti-eGFP。之后再用 293T/17 包装假病毒。

实施例 3 KRAS G12V 抗原短肽特异性可溶 TCR 的表达、重折叠和纯化

15 为获得可溶的 TCR 分子, 本发明的 TCR 分子的 α 和 β 链可以分别只包含其可变域及部分恒定域, 并且 α 和 β 链的恒定域中分别引入了一个半胱氨酸残基以形成人工链间二硫键, 引入半胱氨酸残基的位置分别为 TRAC*01 外显子 1 的 Thr48 和 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser57; 其 α 链的氨基酸序列与核苷酸序列分别如图 4a 和图 4b 所示, 其 β 链的氨基酸序列与核苷酸序列分别如图 5a 和图 5b 所示。通过《分子克隆实验室手册》(Molecular Cloning a Laboratory Manual) (第三版, Sambrook 和 Russell) 中描述的标准方法将上述 TCR α 和 β 链的目的基因序列经合成后分别插入到表达载体 pET28a+ (Novagene), 上下游的克隆位点分别是 NcoI 和 NotI。插入片段经过测序确认无误。

25 将 TCR α 和 β 链的表达载体分别通过化学转化法转化进入表达细菌 BL21(DE3), 细菌用 LB 培养液生长, 于 OD₆₀₀ = 0.6 时用终浓度 0.5 mM IPTG 诱导, TCR 的 α 和 β 链表达后形成的包涵体通过 BugBuster Mix (Novagene) 进行提取, 并且经 BugBuster 溶液反复多次洗涤, 包涵体最后溶解于 6 M 盐酸胍, 10 mM 二硫苏糖醇 (DTT), 10 mM 乙二胺四乙酸(EDTA), 20 mM Tris(pH 8.1) 中。

30 溶解后的 TCR α 和 β 链以 1:1 的质量比快速混合于 5 M 尿素, 0.4 M 精氨酸, 20 mM Tris (pH 8.1), 3.7 mM cystamine, 6.6 mM β -mercaptoethylamine (4°C) 中, 终浓度为 60 mg/mL。混合后将溶液置于 10 倍体积的去离子水中透析(4°C), 12 小时后将去离子水换成缓冲液(20 mM Tris, pH 8.0)继续于 4°C 透析 12 小时。透析完成后的溶液经 0.45 μ M 的滤膜过滤后, 通过阴离子交换柱(HiTrap Q HP, 5ml, GE Healthcare)纯化。洗脱峰含有复性成功的 α 和 β 二聚体的 TCR 通过 SDS-PAGE 胶确认。TCR 随后通过凝胶过滤层析(HiPrep 16/60, Sephacryl S-100 HR, GE Healthcare)进一步纯化。纯化后的 TCR 纯度经过 SDS-PAGE 测定大于 90%, 浓度由 BCA 法确定。本发明得到的可溶性 TCR 的 SDS-PAGE 胶图如图 6a 和图 6b 所示。

实施例 4 KRAS G12V 抗原短肽特异性的可溶性单链 TCR 的产生

根据专利文献 WO2014/206304 中所述, 利用定点突变的方法将实施例 2 中 TCR α 与 β 链的可变域构建成了一个以柔性短肽(linker)连接的稳定的可溶性单链 TCR 分子。该单链 TCR 分子的氨基酸序列及核苷酸序列分别如图 7a 和图 7b 所示。其 α 链可变域的氨基酸序列及核苷酸序列分别如图 8a 和图 8b 所示; 其 β 链可变域的氨基酸序列及核苷酸序列分别如图 9a 和图 9b 所示; 其 linker 序列的氨基酸序列及核苷酸序列分别如图 10a 和图 10b 所示。

将目的基因经 Nco I 和 Not I 双酶切, 与经过 Nco I 和 Not I 双酶切的 pET28a 载体连接。连接产物转化至 *E.coli* DH5 α , 涂布含卡那霉素的 LB 平板, 37 $^{\circ}$ C 倒置培养过夜, 挑取阳性克隆进行 PCR 筛选, 对阳性重组子进行测序, 确定序列正确后抽提重组质粒转化至 *E.coli* BL21(DE3), 用于表达。

实施例 5 KRAS G12V 抗原短肽特异性的可溶性单链 TCR 的表达、复性和纯化

将实施例 4 中制备的含有重组质粒 pET28a-模板链的 BL21(DE 3)菌落全部接种于含有卡那霉素的 LB 培养基中, 37 $^{\circ}$ C 培养至 OD600 为 0.6-0.8, 加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mM, 37 $^{\circ}$ C 继续培养 4 h。5000 rpm 离心 15 min 收获细胞沉淀物, 用 Bugbuster Master Mix(Merck)裂解细胞沉淀物, 6000 rpm 离心 15 min 回收包涵体, 再用 Bugbuster(Merck)进行洗涤以除去细胞碎片和膜组分, 6000 rpm 离心 15 min, 收集包涵体。将包涵体溶解在缓冲液(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M 尿素)中, 高速离心去除不溶物, 上清液用 BCA 法定量后进行分装, 于 -80 $^{\circ}$ C 保存备用。

向 5 mg 溶解的单链 TCR 包涵体蛋白中, 加入 2.5 mL 缓冲液(6 M Gua-HCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.1, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA), 再加入 DTT 至终浓度为 10 mM, 37 $^{\circ}$ C 处理 30 min。用注射器向 125 mL 复性缓冲液(100 mM Tris-HCl pH 8.1, 0.4 M L-精氨酸, 5 M 尿素, 2 mM EDTA, 6.5 mM β -mercapthoethylamine, 1.87 mM Cystamine)中滴加上述处理后的单链 TCR, 4 $^{\circ}$ C 搅拌 10 min, 然后将复性液装入截留量为 4 kDa 的纤维素膜透析袋, 透析袋置于 1 L 预冷的水中, 4 $^{\circ}$ C 缓慢搅拌过夜。17 小时后, 将透析液换成 1L 预冷的缓冲液(20 mM Tris-HCl pH 8.0), 4 $^{\circ}$ C 继续透析 8 h, 然后将透析液换成相同的新鲜缓冲液继续透析过夜。17 小时后, 样品经 0.45 μ m 滤膜过滤, 真空脱气后通过阴离子交换柱(HiTrap Q HP, GE Healthcare), 用 20 mM Tris-HCl pH 8.0 配制的 0-1M NaCl 线性梯度洗脱液纯化蛋白, 收集的洗脱组分进行 SDS-PAGE 分析, 包含单链 TCR 的组分浓缩后进一步用凝胶过滤柱(Superdex 75 10/300, GE Healthcare)进行纯化, 目标组分也进行 SDS-PAGE 分析。

用于 BIAcore 分析的洗脱组分进一步采用凝胶过滤法测试其纯度。条件为: 色谱柱 Agilent Bio SEC-3(300 A, ϕ 7.8 $\times$ 300 mm), 流动相为 150 mM 磷酸盐缓冲液, 流速 0.5 mL/min, 柱温 25 $^{\circ}$ C, 紫外检测波长 214 nm。

本发明获得的可溶性单链 TCR 的 SDS-PAGE 胶图如图 11 所示。

实施例 6 结合表征

BIAcore 分析

本实施例测定了可溶性的本发明 TCR 分子与 VVGAVGVGK-HLA A1101 复合物特异性结合的亲和力。

使用 BIAcore T200 实时分析系统检测实施例 3 和实施例 5 中得到的 TCR 分子与

- 5 VVGAVGVGK-HLA A1101 复合物的结合活性。将抗链霉亲和素的抗体(GenScript)加入偶联缓冲液(10 mM 醋酸钠缓冲液, pH 4.77), 然后将抗体流过预先用 EDC 和 NHS 活化过的 CM5 芯片, 使抗体固定在芯片表面, 最后用乙醇胺的盐酸溶液封闭未反应的活化表面, 完成偶联过程, 偶联水平约为 15, 000 RU。

- 10 使低浓度的链霉亲和素流过已包被抗体的芯片表面, 然后将 VVGAVGVGK-HLA A1101 复合物流过检测通道, 另一通道作为参比通道, 再将 0.05 mM 的生物素以 10 μ L/min 的流速流过芯片 2 min, 封闭链霉亲和素剩余的结合位点。

上述 VVGAVGVGK-HLA A1101 复合物的制备过程如下:

a. 纯化

- 15 收集 100 ml 诱导表达重链或轻链的 E. coli 菌液, 于 4 $^{\circ}$ C 8000 g 离心 10 min 后用 10 ml PBS 洗涤菌体一次, 之后用 5 ml BugBuster Master Mix Extraction Reagents(Merck) 剧烈震荡重悬菌体, 并于室温旋转孵育 20 min, 之后于 4 $^{\circ}$ C, 6000 g 离心 15 min, 弃去上清, 收集包涵体。

- 20 将上述包涵体重悬于 5 ml BugBuster Master Mix 中, 室温旋转孵育 5 min; 加 30 ml 稀释 10 倍的 BugBuster, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 6000 g 离心 15 min; 弃去上清, 加 30 ml 稀释 10 倍的 BugBuster 重悬包涵体, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 6000 g 离心 15 min, 重复两次, 加 30 ml 20 mM Tris-HCl pH 8.0 重悬包涵体, 混匀, 4 $^{\circ}$ C 6000 g 离心 15 min, 最后用 20 mM Tris-HCl 8M 尿素溶解包涵体, SDS-PAGE 检测包涵体纯度, BCA 试剂盒测浓度。

b. 复性

- 25 将合成的短肽 VVGAVGVGK (北京赛百盛基因技术有限公司)溶解于 DMSO 至 20 mg/ml 的浓度。轻链和重链的包涵体用 8 M 尿素、20 mM Tris pH 8.0、10 mM DTT 来溶解, 复性前加入 3 M 盐酸胍、10 mM 醋酸钠、10 mM EDTA 进一步变性。将 VVGAVGVGK 肽以 25 mg/L(终浓度)加入复性缓冲液(0.4 M L-精氨酸、100 mM Tris pH 8.3、2 mM EDTA、0.5 mM 氧化性谷胱甘肽、5 mM 还原型谷胱甘肽、0.2 mM PMSF, 冷却至 4 $^{\circ}$ C), 然后依次加入 20 mg/L 的轻链和 90 mg/L 的重链(终浓度, 重链分三次加入, 8 h/次), 复性在 4 $^{\circ}$ C 进行至少 3 天至完成, SDS-PAGE 检测能否复性成功。

c. 复性后纯化

- 35 用 10 体积的 20 mM Tris pH 8.0 作透析来更换复性缓冲液, 至少更换缓冲液两次来充分降低溶液的离子强度。透析后用 0.45 μ m 醋酸纤维素滤膜过滤蛋白质溶液, 然后加载到 HiTrap Q HP(GE 通用电气公司)阴离子交换柱上(5 ml 床体积)。利用 Akta 纯化仪(GE 通用电气公司), 20 mM Tris pH 8.0 配制的 0-400 mM NaCl 线性梯度液洗脱蛋白, pMHC 约在 250 mM NaCl 处洗脱, 收集诸峰组分, SDS-PAGE 检测纯度。

d. 生物素化

用 Millipore 超滤管将纯化的 pMHC 分子浓缩,同时将缓冲液置换为 20 mM Tris pH 8.0, 然后加入生物素化试剂 0.05 M Bicine pH 8.3、10 mM ATP、10 mM MgOAc、50 μ M D-Biotin、100 μ g/ml BirA 酶(GST-BirA), 室温孵育混合物过夜, SDS-PAGE 检测生物素化是否完全。

5 e. 纯化生物素化后的复合物

用 Millipore 超滤管将生物素化标记后的 pMHC 分子浓缩至 1 ml, 采用凝胶过滤层析纯化生物素化的 pMHC, 利用 Akta 纯化仪(GE 通用电气公司), 用过滤过的 PBS 预平衡 HiPrep™ 16/60 S200 HR 柱(GE 通用电气公司), 加载 1 ml 浓缩过的生物素化 pMHC 分子, 然后用 PBS 以 1 ml/min 流速洗脱。生物素化的 pMHC 分子在约 55 ml 时作为单峰洗脱出现。合并含有蛋白质的组分, 用 Millipore 超滤管浓缩, BCA 法(Thermo)测定蛋白质浓度, 加入蛋白酶抑制剂 cocktail(Roche)将生物素化的 pMHC 分子分装保存在-80℃。

利用 BIAcore Evaluation 软件计算动力学参数, 得到本发明可溶性的 TCR 分子以及本发明构建的可溶性单链 TCR 分子与 VVGAVGVGK-HLA A1101 复合物结合的动力学图谱分别如图 12 和图 13 所示。图谱显示, 本发明得到的可溶性 TCR 分子以及可溶性单链 TCR 分子都能够与 VVGAVGVGK-HLA A1101 复合物结合。同时, 还利用上述方法检测了本发明可溶性的 TCR 分子与其他几种无关抗原短肽与 HLA 复合物的结合活性, 结果显示本发明 TCR 分子与其他无关抗原均无结合。

实施例 7 转导本发明 TCR 的 T 细胞的激活实验(靶细胞为 T2)

20 本领域技术人员熟知利用 ELISPOT 实验检测细胞功能的方法。利用 ELISPOT 试验检测的 IFN- γ 产量作为 T 细胞激活的读出值, 以证明本发明 TCR 转导的 T 细胞对靶细胞特异性的激活反应。

首先准备好试剂, 其中包括试验培养基: 10%FBS(Gibco, #16000-044)、RPMI 1640(Gibco, #C11875500BT); 洗涤缓冲液(PBST): 0.01M PBS(Gibco, #C10010500BT)/0.05% 吐温 20; PVDF ELISPOT 96 孔板(Merck Millipore, #MSIPS4510); 人 IFN- γ ELISPOT PVDF-酶试剂盒(BD)装有所需的所有其他试剂(捕捉和检测抗体, 链霉亲和素-碱性磷酸酶和 BCIP/NBT 溶液)。

本实验中所用的靶细胞为负载特异性短肽的 T2 细胞、负载非特异性短肽的 T2 细胞、不负载短肽的 T2 细胞。T2 细胞转染了 HLA-A1101。其中, 特异性短肽为 30 VVGAVGVGK(KRAS G12V, 9 肽)、和 VVGAVGVGK(KRAS G12V, 10 肽);非特异性短肽为 VVGAGGVGK(未发生突变的 KRAS 短肽)、VVGAGGVGK(未发生突变的 KRAS 短肽)、VVGADGVGK(KRAS G12D, 第 12 位为其他突变的 KRAS 短肽)、VVGADGVGK(KRAS G12D, 第 12 位为其他突变的 KRAS 短肽)和 SSCSSCPLSK(其他抗原短肽)。

本实验中所用的效应细胞(T 细胞)是表达本发明 KRAS G12V 抗原短肽特异性 TCR 的 35 CD3+ T 细胞, 并以同一志愿者未转染本发明 TCR 的 CD3+ T 细胞作为对照组。用抗 CD3/CD28 包被珠(T 细胞扩增物, life technologies)刺激 T 细胞, 用携带 KRAS G12V 抗原短

肽特异性 TCR 基因的慢病毒转导,在含有 50IU/ml IL-2 和 10ng/ml IL-7 的含 10%FBS 的 1640 培养基扩增直至转导后 9-12 天,然后将这些细胞置于试验培养基中,300 g 常温离心 10 分钟进行洗涤。然后将细胞以 $2 \times$ 所需终浓度重悬在试验培养基中。同样处理阴性对照效应细胞。然后加入对应短肽,使短肽在 ELISPOT 孔板中的终浓度为 10^{-6} M。

- 5 按照生产商提供的说明书,如下所述准备孔板:以每块板 10 毫升无菌 PBS 按 1:200 稀释抗人 IFN- γ 捕捉抗体,然后将 100 μ 升的稀释捕捉抗体等分加入各孔。4 $^{\circ}$ C 下孵育孔板过夜。孵育后,洗涤孔板以除去多余的捕捉抗体。加入 100 μ 升/孔含有 10%FBS 的 RPMI 1640 培养基,并在室温下温育孔板 2 小时以封闭孔板。然后从孔板中洗去培养基,通过在纸上轻弹和轻拍 ELISPOT 孔板以除去任何残余的洗涤缓冲液。然后将试验的诸组分加入 ELISPOT
- 10 孔板:靶细胞 2×10^4 个/孔、效应细胞 1×10^3 个/孔(按转染阳性率计算),并设置两个复孔。

- 然后温育孔板过夜 (37 $^{\circ}$ C/5% CO₂)第二天,弃培养基,用双蒸水洗涤孔板 2 次,再用洗涤缓冲液洗涤 3 次,在纸巾上轻拍以除去残余的洗涤缓冲液。然后用含有 10%FBS 的 PBS 按 1:200 稀释检测抗体,按 100 μ 升/孔加入各孔。室温下温育孔板 2 小时,再用洗涤缓冲液洗涤 3 次,在纸巾上轻拍孔板以除去过量的洗涤缓冲液。用含有 10%FBS 的 PBS 按 1:100
- 15 稀释链霉亲和素-碱性磷酸酶,将 100 μ 升稀释的链霉亲和素-碱性磷酸酶加入各孔并在室温下温育孔板 1 小时。然后用洗涤缓冲液洗涤 4 次 PBS 洗涤 2 次,在纸巾上轻拍孔板以除去过量的洗涤缓冲液和 PBS。洗涤完毕后加入试剂盒提供的 BCIP/NBT 溶液 100 μ 升/孔进行显影。在显影期间用锡箔纸覆盖孔板避光,静置 5-15 分钟。在此期间常规检测显影孔板的斑点,确定终止反应的最佳时间。去除 BCIP/NBT 溶液并用双蒸水冲洗孔板以中止显影反应,甩干,
- 20 然后将孔板底部去除,在室温下干燥孔板直至每个孔完全干燥,再利用免疫斑点平板计数计 (CTL, 细胞技术有限公司 (Cellular Technology Limited))计数孔板内底膜形成的斑点。

通过 ELISPOT 实验(如上所述)检验本发明 TCR 转导的 T 细胞对靶细胞起反应的 IFN- γ 释放。利用 graphpad prism6 绘制各孔中观察到的 ELSPOT 斑点数量。

- 实验结果如图 15 所示,转导本发明 TCR 的 T 细胞 (效应细胞)针对负载 KRAS G12V (9 肽和 10 肽)的靶细胞都有很好的激活反应,针对未发生突变的即野生型的 KRAS(9 肽和 10 肽)、第 12 位发生其他突变的 KRAS G12D (9 肽和 10 肽)、其他抗原短肽以及未负载的靶细胞都没有激活反应。说明本发明 TCR 能够与 KRAS G12V (9 肽和 10 肽)特异性结合,并产生细胞激活反应。

30 实施例 8 转导本发明 TCR 的 T 细胞的激活实验(靶细胞为肿瘤细胞系)

本实施例同样为验证转染本发明高亲和力 TCR 的效应细胞对靶细胞有很好的特异性激活作用。通过 ELISPOT 实验检测本发明高亲和力 TCR 在细胞中的功能及特异性。

- 本领域技术人员熟知利用 ELISPOT 实验检测细胞功能的方法。所用的效应细胞 (T 细胞)是转染本发明 KRAS G12V 抗原短肽特异性 TCR 的 CD3+T 细胞,并以同一志愿者未转染
- 35 本发明 TCR 的 CD3+T 细胞作为对照组。靶细胞系为 A562-A11-TMG1 (A11 和 KRAS G12V 过表达)、A562-A11 (A11 过表达)、A562-A11-TMG2 (A11 和 KRAS G12D 过表达)、SK-MEL-1、

SW620-A11 (A11 过表达)和 SW620 细胞。其中,靶细胞系 A562-A11-TMG1 和 SW620-A11 作为阳性肿瘤细胞系; A562-A11、A562-A11-TMG2、SK-MEL-1 和 SW620 为阴性肿瘤细胞系,作为对照。

首先准备 ELISPOT 平板。ELISPOT 平板乙醇活化包被, 4℃过夜。实验第 1 天, 去掉包被液, 洗涤封闭, 室温下孵育两个小时, 去除封闭液, 将试验的各个组分加入 ELISPOT 平板: 靶细胞为 2×10^4 个/孔, 效应细胞为 10^3 个/孔 (按转染的阳性率计算), 并设置二个复孔。温育过夜 (37℃, 5% CO₂)。实验第 2 天, 洗涤平板并进行二级检测和显色, 干燥平板, 再利用免疫斑点平板读数计 (ELISPOT READER system; AID20 公司)计数膜上形成的斑点。

实验结果如图 16 所示, 针对阳性靶细胞系, 转染本发明 TCR 的效应细胞产生了很好的特异性激活作用, 对阴性靶细胞系没有反应。另外, 针对靶细胞, 转导其他 TCR 的效应细胞基本没有产生激活作用。

实施例 9. 转染本发明 TCR 的效应细胞的 LDH 杀伤功能实验

本实施例通过非放射性细胞毒性实验, 测定 LDH 的释放, 从而验证转导本发明 TCR 的细胞的杀伤功能。该试验是 51Cr 释放细胞毒性试验的比色替代试验, 定量测定细胞裂解后释放的乳酸脱氢酶 (LDH)。采用 30 分钟偶联的酶反应来检测释放在培养基中的 LDH, 在酶反应中 LDH 可使一种四唑盐 (INT)转化为红色的甲臍 (formazan)。生成的红色产物的量与裂解的细胞数成正比。可以用标准的 96 孔读板计收集 490nm 可见光吸光值数据。

本领域技术人员熟知利用 LDH 的释放实验检测细胞功能的方法。所用的效应细胞 (T 细胞)是转染本发明 KRAS TCR 的 CD3+ T 细胞, 并以同一志愿者未转染本发明 TCR 的 CD3+ T 细胞作为对照组。靶细胞系为负载了 KRAS G12V (9 肽)VVGAVGVGK 的 T2-A11 (A11 过表达)、T2-A11 (A11 过表达)、SK-MEL-28、SW620-A11 (A11 过表达)、SW620 和 SW480-A11 (A11 过表达)细胞。其中, 负载 VVGAVGVGK 短肽的 T2-A11、SW620-A11 和 SW480-A11 为阳性肿瘤细胞系; T2-A11、SK-MEL-28 和 SW620 为阴性肿瘤细胞系, 作为对照。

首先准备 LDH 平板。实验第 1 天, 将试验的各个组分加入平板: 靶细胞系 3×10^4 个细胞/孔、效应细胞 3×10^4 个细胞/孔, 并设置三个复孔。同时设置效应细胞自发孔, 靶细胞自发孔, 靶细胞最大孔, 体积校正对照孔及培养基背景对照孔。温育过夜(37℃, 5% CO₂)。实验第 2 天, 检测显色, 终止反应后用酶标仪(Bioteck)在 490nm 记录吸光值。

实验结果如图 17 所示, 针对阳性靶细胞系, 转导本发明 TCR 的效应细胞对其具有很强的杀伤作用, 而对阴性靶细胞没有杀伤作用。另外, 转导其他 TCR 的效应细胞对靶细胞基本没有杀伤作用。

在本发明提及的所有文献都在本申请中引用作为参考, 就如同每一篇文献被单独引用作为参考那样。此外应理解, 在阅读了本发明的上述讲授内容之后, 本领域技术人员可以对本发明作各种改动或修改, 这些等价形式同样落于本申请所附权利要求书所限定的范围。