

针对 NY-ESO 的高亲和力 TCR

技术领域

本发明涉及生物技术领域，更具体地涉及能够识别衍生自 NY-ESO-1 蛋白多肽的 T 细胞受体(T cell receptor,TCR)。本发明还涉及所述受体的制备和用途。

背景技术

仅仅有两种类型的分子能够以特异性的方式识别抗原。其中一种是免疫球蛋白或抗体；另一种是 T 细胞受体(TCR)，它是由 α 链/ β 链或者 γ 链/ δ 链以异二聚体形式存在的细胞膜表面的糖蛋白。免疫系统的 TCR 总谱的组成是在胸腺中通过 V(D)J 重组，然后进行阳性和阴性选择而产生的。在外周环境中，TCR 介导了 T 细胞对主组织相容性复合体-肽复合物(pMHC)的特异性识别，因此其对免疫系统的细胞免疫功能是至关重要的。

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，这种外源肽或内源肽可能会是细胞出现异常的唯一迹象。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。

与 TCR 相对应的 MHC I 类和 II 类分子配体也是免疫球蛋白超家族的蛋白质但对于抗原的呈递具有特异性，不同的个体有不同的 MHC，从而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。

短肽 SLLMWITQC 源自于被多种肿瘤细胞表达的 NY-ESO-1 蛋白(Chen et al.,(1997)PNAS USA 94 1914-1918)。肿瘤细胞的 I 型 HLA 分子呈递包括 SLLMWITQC 在内的源自于 NY-ESO-1 的短肽。因此，SLLMWITQC-HLA A2 复合物提供了一种 TCR 可靶向肿瘤细胞的标记。能够结合 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的 TCR 对肿瘤的治疗具有很高的应用价值。例如，能够靶向该肿瘤细胞标记的 TCR 可用于将细胞毒性剂或免疫刺激剂递送到靶细胞，或被转化入 T 细胞，使表达该 TCR 的 T 细胞能够破坏肿瘤细胞，以便在被称为过继免疫治疗的治疗过程中给予患者。对于前一目的，理想的 TCR 是具有较高的亲和力的，从而使该 TCR 能够长期驻留在所靶向的细胞上面。对于后一目的，则优选使用中等亲和力的 TCR。因此，本领域技术人员致力于开发可用于满足不同目的的靶向肿瘤细胞标记的 TCR。

发明内容

本发明的目的在于提供一种对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物具有较高亲和力的 TCR。

本发明的再一目的是提供一种上述类型 TCR 的制备方法及上述类型 TCR 的用途。

本发明的第一方面，提供了一种 T 细胞受体(TCR)，其具有结合 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的活性。

在另一优选例中，所述 T 细胞受体(TCR)具有结合 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的活

性，并且所述 T 细胞受体包含 TCR α 链可变域和 TCR β 链可变域，所述 TCR α 链可变域包含 3 个 CDR 区，所述 TCR α 链可变域的 3 个 CDR 区的基准序列如下，

CDR1 α : TSINN

CDR2 α : IRSNERE

5 CDR3 α : ATDANGKII，并且含有至少一个下列突变：

突变前的残基	突变后的残基
CDR1 α 的第 1 位 T	G
CDR1 α 的第 2 位 S	W
CDR1 α 的第 3 位 I	A 或 V
CDR1 α 的第 4 位 N	Q
CDR2 α 的第 3 位 S	T
CDR2 α 的第 4 位 N	G
CDR2 α 的第 5 位 E	Q
CDR2 α 的第 6 位 R	A 或 Q
CDR3 α 的第 1 位 A	M
CDR3 α 的第 2 位 T	Y
CDR3 α 的第 4 位 A	E 或 Q
CDR3 α 的第 5 位 N	F 或 Y 或 W
CDR3 α 的第 6 位 G	A 或 Q
CDR3 α 的第 7 位 K	W 或 R 或 T 或 S 或 M 或 L
CDR3 α 的第 8 位 I	W 或 V 或 Y 或 P，和
CDR3 α 的第 9 位 I	N 或 E 或 D 或 Q 或 V 或 K 或 G 或 M 或 S

和/或，所述 TCR β 链可变域包含 3 个 CDR 区，所述 TCR β 链可变域的 3 个 CDR 区的基准序列如下，

CDR1 β : SGHDY

CDR2 β : FNNNVP

10 CDR3 β : ASSLGSENEY，并且含有至少一个下列突变：

突变前的残基	突变后的残基
CDR2 β 的第 3 位 N	H
CDR2 β 的第 4 位 N	G
CDR2 β 的第 5 位 V	A
CDR2 β 的第 6 位 P	V
CDR3 β 的第 3 位 S	Q 或 M
CDR3 β 的第 4 位 L	R 或 K 或 M，和
CDR3 β 的第 6 位 S	A 或 G 或 P

在另一优选例中，所述 TCR α 链 CDR 区的突变个数可以为 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个、11 个、或 12 个。

15 在另一优选例中，所述 TCR β 链 CDR 区的突变个数可以为 1 个、2 个、3 个、4 个、5 个、6 个、7 个、8 个、9 个、10 个或 11 个。

在另一优选例中,根据本发明的 T 细胞受体(TCR),包含 TCR α 链可变域和 TCR β 链可变域,所述 TCR α 链可变域包括 CDR1 α 、CDR2 α 、和 CDR3 α 。

在另一优选例中,所述 CDR3 α 包含序列:

5 [3 α X1][3 α X2]D[3 α X3][3 α X4][3 α X5][3 α X6][3 α X7][3 α X8],其中,[3 α X1]、[3 α X2]、[3 α X3]、[3 α X4]、[3 α X5]、[3 α X6]、[3 α X7]、[3 α X8]独立地选自任意的天然氨基酸残基。

在另一优选例中,所述[3 α X1]为 A 或 M。

在另一优选例中,所述[3 α X2]为 T 或 Y。

在另一优选例中,所述[3 α X3]为 A 或 E 或 Q。

10 在另一优选例中,所述[3 α X4]为 N 或 F 或 Y 或 W。

在另一优选例中,所述[3 α X5]为 G 或 A 或 Q。

在另一优选例中,所述[3 α X6]为 K 或 W 或 R 或 T 或 S 或 M 或 L。

在另一优选例中,所述[3 α X7]为 I 或 W 或 V 或 Y 或 P。

在另一优选例中,所述[3 α X8]为 I 或 N 或 E 或 D 或 Q 或 V 或 K 或 G 或 M 或 S。

15 在另一优选例中,所述[3 α X1]为 A、[3 α X2]为 T、[3 α X3]为 A、[3 α X4]为 N 或 F 或 W、[3 α X5]为 A、[3 α X6]为 W 或 R、[3 α X7]为 W、并且[3 α X8]为 I 或 N 或 E 或 D。

在另一优选例中,所述 CDR3 α 包含选自下组的序列:

ATDANARWN、ATDANARWE、ATDANARWD、ATDAFAWWI、和 ATDAWARWI。

20

在另一优选例中,所述 CDR1 α 包含序列:

[1 α X1][1 α X2][1 α X3][1 α X4]N,其中,[1 α X1]、[1 α X2]、[1 α X3]、[1 α X4]、[1 α X5]独立地选自任意的天然氨基酸残基。

在另一优选例中,所述[1 α X1]为 T 或 G。

25 在另一优选例中,所述[1 α X2]为 S 或 W。

在另一优选例中,所述[1 α X3]为 I 或 A 或 V。

在另一优选例中,所述[1 α X4]为 N 或 Q。

在另一优选例中,所述[1 α X1]为 G、[1 α X2]为 S 或 W、[1 α X3]为 I 或 A 或 V、并且[1 α X4]为 Q。

30 在另一优选例中,所述 CDR1 α 包含选自下组的序列:

GSIQN、GWAQN、GWVQN 和 TSINN。

在另一优选例中,所述 CDR2 α 包含序列:

35 IR [2 α X1][2 α X2][2 α X3][2 α X4]E,其中,[2 α X1]、[2 α X2]、[2 α X3]、[2 α X4]独立地选自任意的天然氨基酸残基。

在另一优选例中,所述[2 α X1]为 S 或 T。

在另一优选例中, 所述[2 α X2]为 N 或 G。

在另一优选例中, 所述[2 α X3]为 E 或 Q。

在另一优选例中, 所述[2 α X4]为 R、A 或 Q。

在另一优选例中, 所述 CDR2 α 包含选自下组的序列:

5 IRTGEQE、IRTGQAE 和 IRSNERE。

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 β 链可变域包含 CDR1 β 、CDR2 β 和 CDR3 β , 其中所述 CDR1 β 包含序列: SGHDY。

在另一优选例中, 所述 CDR2 β 包含序列:

10 FN[2 β X1][2 β X2][2 β X3][2 β X4], 其中, [2 β X1]、[2 β X2]、[2 β X3]、和[2 β X4]、各独立地选自任意的天然氨基酸残基。

在另一优选例中, 所述[2 β X1]为 N 或 H。

在另一优选例中, 所述[2 β X2]为 N 或 G。

在另一优选例中, 所述[2 β X3]为 V 或 A。

15 在另一优选例中, 所述[2 β X4]为 P 或 V。

在另一优选例中, 所述 CDR2 β 包含选自下组的序列:

FNHGAV、和 FNNNVP。

在另一优选例中, 所述 CDR3 β 包含序列: AS[3 β X1][3 β X2]G[3 β X3]NEQY, 其中,
20 [3 β X1]、[3 β X2]、[3 β X3]独立地选自任意的天然氨基酸残基。

在另一优选例中, 所述[3 β X1]为 S、Q 或 M。

在另一优选例中, 所述[3 β X2]为 L、R、K、或 M。

在另一优选例中, 所述[3 β X3]为 S、A、G 或 P。

在另一优选例中, 所述 CDR3 β 包含选自下组的序列:

25 ASQRGSNEQY、ASQKGANEQY、ASQLGSNEQY、ASQLGANEQY、ASQLGGNEQY、
ASQLGPNEQY、ASQRGANEQY、ASQMGSNEQY、ASQMGANEQY 和 ASMLGSNEQY。

在另一优选例中, 所述 TCR 的 TCR α 链可变域不同时包含如下 CDR:

CDR1 α : TSINN; CDR2 α : IRSNERE; 和 CDR3 α : ATDANGKII。

30 在另一优选例中, 所述 TCR 的 TCR β 链可变域不同时包含如下 CDR: CDR1 β :
SGHDY; CDR2 β : FNNNVP; 和 CDR3 β : ASSLGSNEQY。

在另一优选例中, 所述突变发生在 α 链和/或 β 链可变域的一个或多个 CDR 区中。

在另一优选例中, 所述突变发生在 α 链的 CDR1、CDR2 和/或 CDR3 中, 和/或所述突
35 变发生在 β 链的 CDR2 和/或 CDR3 中。

在本发明的一个优选例中, 所述 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的亲和力是野生

型 TCR 的至少 2 倍；优选地，至少 5 倍；更优选地，至少 10 倍。

在另一优选例中，所述 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的亲和力是野生型 TCR 的至少 50 倍；优选地，至少 100 倍；更优选地，至少 500 倍；最优选地，至少 1000 倍。

在另一优选例中，所述 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的亲和力是野生型 TCR 的至少 10^4 倍；优选地，至少 10^5 倍；更优选地，至少 10^6 倍；最优选地，至少 10^7 倍。

具体地，所述 TCR 对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的解离平衡常数 $K_D \leq 20 \mu\text{M}$ ；

在另一优选例中，所述 TCR 对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的解离平衡常数 $5 \mu\text{M} \leq K_D \leq 10 \mu\text{M}$ ；优选地， $0.1 \mu\text{M} \leq K_D \leq 1 \mu\text{M}$ ；更优选地， $1 \text{nM} \leq K_D \leq 100 \text{nM}$ ；

在另一优选例中，所述 TCR 对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的解离平衡常数 $100 \text{pM} \leq K_D \leq 1000 \text{pM}$ ；优选地， $10 \text{pM} \leq K_D \leq 100 \text{pM}$ ；更优选地， $1 \text{pM} \leq K_D \leq 10 \text{pM}$ 。

在另一优选例中，所述 TCR 具有选自下组的 CDR：

TCR 编号	CDR1 α	CDR2 α	CDR3 α	CDR1 β	CDR2 β	CDR3 β
1	TSINN	IRSNERE	ATDAFAWWI	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
2	GWAQN	IRTGEQE	ATDANARWN	SGHDY	FNHGAV	ASSLGSNEQY
3	GSIQN	IRTGEQE	ATDANARWE	SGHDY	FNHGAV	ASSLGSNEQY
4	GSIQN	IRTGEQE	ATDANARWE	SGHDY	FNHGAV	ASQRGSNEQY
5	GSIQN	IRTGEQE	ATDANARWE	SGHDY	FNHGAV	ASQKGANEQY
6	GSIQN	IRTGEQE	ATDANARWD	SGHDY	FNHGAV	ASQLGSNEQY
7	GWAQN	IRSNERE	ATDANARWN	SGHDY	FNHGAV	ASQLGSNEQY
8	GWVQN	IRTGEQE	ATDANARWD	SGHDY	FNHGAV	ASSLGSNEQY
9	GSIQN	IRSNERE	ATDANARWD	SGHDY	FNHGAV	ASQLGANEQY
10	GWAQN	IRSNERE	ATDANARWD	SGHDY	FNHGAV	ASQLGSNEQY
11	GSIQN	IRSNERE	ATDANARWE	SGHDY	FNHGAV	ASQKGANEQY
12	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQLGGNEQY
13	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQKGANEQY
14	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQLGPNEQY
15	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQRGANEQY
16	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQMGSNEQY
17	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQLGSNEQY
18	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQLGANEQY
19	TSINN	IRSNERE	MYDENGKII	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
20	TSINN	IRSNERE	MYDQNGKII	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
21	TSINN	IRSNERE	ATDAYGTVQ	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
22	TSINN	IRSNERE	ATDANGTVQ	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
23	TSINN	IRSNERE	ATDANGSVQ	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
24	TSINN	IRSNERE	ATDAYGRYI	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
25	TSINN	IRSNERE	ATDANQMWK	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
26	TSINN	IRSNERE	ATDAYGLPI	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
27	TSINN	IRSNERE	ATDANGLPV	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
28	TSINN	IRSNERE	ATDANGRWE	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
29	TSINN	IRSNERE	ATDANGTVG	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
30	TSINN	IRSNERE	ATDANGRWM	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
31	TSINN	IRSNERE	ATDANGLWS	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
32	GWAQN	IRTGEQE	ATDANARWD	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
33	GWAQN	IRTGQAE	ATDANARWE	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
34	GSIQN	IRSNERE	ATDAFAWWI	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
35	GWVQN	IRTGEQE	ATDANARWN	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
36	GWAQN	IRTGEQE	ATDANARWN	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
37	GWVQN	IRTGEQE	ATDANARWD	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
38	GSIQN	IRTGEQE	ATDAWARWI	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
39	GWVQN	IRTGQAE	ATDANARWE	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
40	GSIQN	IRTGEQE	ATDANARWN	SGHDY	FNNNVP	ASSLGSNEQY
41	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQMGSNEQY
42	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQRGSNEQY
43	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVP	ASQMGAANEQY

44	TSINN	IRSNERE	ATDANGKII	SGHDY	FNNNVVP	ASMLGSNEQY
----	-------	---------	-----------	-------	---------	------------

在另一优选例中，所述 TCR 是可溶的。

在另一优选例中，所述 TCR 为 $\alpha\beta$ 异质二聚 TCR 或单链 TCR。

在另一优选例中，本发明所述 TCR 是 $\alpha\beta$ 异质二聚 TCR，所述 TCR 的 α 链可变域包含与 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列有至少 85%，优选地，至少 90%；更优选地，至少 92%；
5 最优选地，至少 94% (如，可以是至少 88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列同源性的) 的序列同源性的氨基酸序列；和/或所述 TCR 的 β 链可变域包含与 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列有至少 90%，优选地，至少 92%；更优选地，至少 94%；最优选地，至少 97%；(如，可以是至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列同源性的) 的序列同源性的氨基酸序列。

10 在另一优选例中，所述 TCR 包含 (i) 除其跨膜结构域以外的全部或部分 TCR α 链，和 (ii) 除其跨膜结构域以外的全部或部分 TCR β 链，其中 (i) 和 (ii) 均包含 TCR 链的可变域和至少一部分恒定域。

在另一优选例中，所述 TCR 是 $\alpha\beta$ 异质二聚 TCR，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。

15 在另一优选例中，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选自下列的一组或多组位点：

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

20 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。

在另一优选例中， α 链可变区与 β 链恒定区之间含有人工链间二硫键的 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， α 链可变区与 β 链恒定区之间含有人工链间二硫键的 TCR 包含 (i)
25 除其跨膜结构域以外的全部或部分 TCR α 链，和 (ii) 除其跨膜结构域以外的全部或部分 TCR β 链，其中 (i) 和 (ii) 均包含 TCR 链的可变域和至少一部分恒定域。

在另一优选例中，所述 TCR 为 $\alpha\beta$ 异质二聚 TCR，其包含 (i) 除其跨膜结构域以外的全部或部分 TCR α 链，和 (ii) 除其跨膜结构域以外的全部或部分 TCR β 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 链恒定区与 β 链恒定区之间含有人工链间二硫键。

30 在另一优选例中，在所述 TCR α 与 β 链的恒定区之间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：

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；

35 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; 和

TRAC*01 外显子 1 的 Tyr10 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Glu20。

5 在另一优选例中, 所述 TCR 为单链 TCR。

在另一优选例中, 所述 TCR 是由 α 链可变域和 β 链可变域组成的单链 TCR, 所述 α 链
 可变域和 β 链可变域由一柔性短肽序列(linker)连接。

在另一优选例中, 所述 TCR α 链可变域和/或 β 链可变域的疏水芯发生突变。

10 在另一优选例中, 所述疏水芯发生突变的 TCR 是由 α 可变域和 β 可变域组成的单链
 TCR, 所述 α 可变域和 β 可变域由一柔性短肽序列(linker)连接。

在另一优选例中, 采用 SEQ ID NO:1 所示的编号, 本发明 TCR 的 α 链可变域疏水芯氨
 基酸残基 19A(即 IMGT 中列出的 α 链可变区第 19 位)、21M(即 IMGT 中列出的 α 链可变区
 第 21 位)、79S(即 IMGT 中列出的 α 链可变区第 94 位)中有一个或多个发生突变和/或采用 SEQ
 ID NO:2 所示的编号, 所述 TCR β 链可变域疏水芯氨基酸残基 13T(即 IMGT 中列出的 β 链可
 15 变区第 13 位)、82S(即 IMGT 中列出的 β 链可变区第 94 位)中有一个或多个发生突变。

在另一优选实施例中, 采用 SEQ ID NO:1 所示的编号, 本发明 α 链可变域疏水芯包含
 氨基酸残基 19V、21I 和 79V 中的一个或多个和/或采用 SEQ ID NO:2 所示的编号, 所述 TCR β
 可变域疏水芯包含氨基酸残基 13V 和 82V 中的一个或多个。更具体地, 所述 TCR α 可变域
 疏水芯的突变形式包括 A19V、M21I 和 S79V 中的一组或几组; 所述 TCR β 可变域疏水芯的
 20 突变形式包括 T13V 和 S82V 中的一组或几组。

在另一优选例中, 本发明所述 TCR 是单链 TCR, 所述 TCR 的 α 链可变域包含与 SEQ ID
 NO:3 所示的氨基酸序列有至少 85%, 优选地, 至少 90%; 更优选地, 至少 92%; 最优选地,
 至少 94%(如, 可以是至少 88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97
 %、98%、99%的序列同源性的)的序列同源性的氨基酸序列; 和/或所述 TCR 的 β 链可变域包
 25 含与 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列有至少 90%, 优选地, 至少 92%; 更优选地, 至少 94
 %; 最优选地, 至少 97%; (如, 可以是至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、
 98%、99%的序列同源性的)的序列同源性的氨基酸序列。

在另一优选例中, 所述 TCR 的 α 链可变域氨基酸序列选自: SEQ ID NO: 9-37 和 58-86;
 和/或所述 TCR 的 β 链可变域氨基酸序列选自: SEQ ID NO: 38-53 和 87-102。

30 在另一优选例中, 所述 TCR 选自下组:

TCR 编号	α 链可变域序列 SEQ ID NO:	β 链可变域序列 SEQ ID NO:
s-1	9	4
s-2	10	38
s-3	11	38
s-4	11	39
s-5	11	40
s-6	12	41

s-7	13	41
s-8	14	38
s-9	15	42
s-10	16	41
s-11	17	40
s-12	3	43
s-13	3	44
s-14	3	45
s-15	3	46
s-16	3	47
s-17	3	48
s-18	3	49
s-19	18	4
s-20	19	4
s-21	20	4
s-22	21	4
s-23	22	4
s-24	23	4
s-25	24	4
s-26	25	4
s-27	26	4
s-28	27	4
s-29	28	4
s-30	29	4
s-31	30	4
s-32	31	4
s-33	32	4
s-34	33	4
s-35	34	4
s-36	10	4
s-37	14	4
s-38	35	4
s-39	36	4
s-40	37	4
s-41	3	50
s-42	3	51
s-43	3	52
s-44	3	53

在另一优选例中，所述 TCR 选自下组：

TCR 编号	α 链可变域序列 SEQ ID NO:	β 链可变域序列 SEQ ID NO:
1	58	2
2	59	87
3	60	87
4	60	88
5	60	89
6	61	90
7	62	90
8	63	87

9	64	91
10	65	90
11	66	89
12	1	92
13	1	93
14	1	94
15	1	95
16	1	96
17	1	97
18	1	98
19	67	2
20	68	2
21	69	2
22	70	2
23	71	2
24	72	2
25	73	2
26	74	2
27	75	2
28	76	2
29	77	2
30	78	2
31	79	2
32	80	2
33	81	2
34	82	2
35	83	2
36	59	2
37	63	2
38	84	2
39	85	2
40	86	2
41	1	99
42	1	100
43	1	101
44	1	102

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 TCR 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。

在另一优选例中，与所述 TCR 结合的治疗剂为连接于所述 TCR 的 α 或 β 链的 C-或 N-末端的抗-CD3 抗体。

在本发明的一个优选的实施方式中，所述 T 细胞受体(TCR)，其具有结合 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的活性，并包含 TCR α 链可变域和 TCR β 链可变域，所述 TCR 在 SEQ ID NO: 1 所示的 α 链可变域中发生突变，所述突变的氨基酸残基位点包括 27T、28S、29I、30N、51S、52N、53E、54R、90A、91T、93A、94N、95G、96K、97I 和 98I 中的一个或多个，其中，氨基酸残基编号采用 SEQ ID NO:56 或 1 所示的编号；和/或所述 TCR 在 SEQ ID NO: 2

所示的 β 链可变域中发生突变, 所述突变的氨基酸残基位点包括 51N、52N、53V、54P、95S、96L 和 98S 中的一个或多个, 其中, 氨基酸残基编号采用 SEQ ID NO:57 或 2 所示的编号;

优选地, 突变后的所述 TCR α 链可变域包括选自下组的一个或多个氨基酸残基: 27G、28W、29A 或 29V、30Q、51T、52G、53Q、54Q 或 54A、90M、91Y、93E 或 93Q、94F 或 94Y 或 94W、95A 或 95Q、96W 或 96R 或 96T 或 96S 或 96M 或 96L、97W 或 97V 或 97Y 或 97P、和 98E 或 98N 或 98D 或 98Q 或 98K 或 98V 或 98G 或 98M 或 98S, 其中, 氨基酸残基编号采用 SEQ ID NO:1 所示的编号; 和/或突变后的所述 TCR β 链可变域包括选自下组的一个或多个氨基酸残基: 51H、52G、53A、54V、95Q 或 95M、96R 或 96K 或 96M、和 98A 或 98G 或 98P, 氨基酸残基编号采用 SEQ ID NO:2 所示的编号。

10

本发明的第二方面, 提供了一种多价 TCR 复合物, 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。

15 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 分子或者本发明第二方面所述的多价 TCR 复合物的核酸序列或其互补序列;

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所述的核酸分子。

20 本发明的第五方面, 提供了一种宿主细胞, 所述的宿主细胞中含有本发明第四方面所述的载体或染色体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, 提供了一种分离的细胞, 所述细胞表达本发明第一方面所述的 TCR。

25 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、或本发明第二方面所述的 TCR 复合物、或本发明第六方面所述的细胞。

30 本发明的第八方面, 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 TCR、或本发明第二方面所述的 TCR 复合物、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。

本发明的第九方面, 提供了本发明第一方面所述的 TCR、或本发明第二方面所述的 TCR 复合物、或本发明第六方面所述的细胞的用途, 用于制备治疗肿瘤的药物。

35

本发明的第十方面, 提供了一种制备本发明第一方面所述的 T 细胞受体的方法, 包括

步骤:

- (i) 培养本发明第五方面所述的宿主细胞,从而表达本发明第一方面所述的 T 细胞受体;
- (ii) 分离或纯化出所述的 T 细胞受体。

5 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

10 图 1a 和图 1b 分别显示了对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物能够特异性结合的野生型 TCR α 与 β 链可变域氨基酸序列。

图 2a 和图 2b 分别为本发明构建的单链模板 TCR 的 α 可变域的氨基酸序列和 β 链可变域的氨基酸序列。

15 图 3a 和图 3b 分别为本发明构建的单链模板 TCR 的 α 可变域的 DNA 序列和 β 链可变域的 DNA 序列。

图 4a 和图 4b 分别为本发明构建的单链模板 TCR 的连接短肽(linker)的氨基酸序列和核苷酸序列。

图 5(1)-(29)分别显示了对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物具有高亲和力的单链 TCR 的 α 链可变域氨基酸序列,突变的残基以加下划线表示。

20 图 6(1)-(16)分别显示了对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物具有高亲和力的单链 TCR 的 β 链可变域氨基酸序列,突变的残基以加下划线表示。

图 7a 和图 7b 分别为本发明构建的单链模板 TCR 的氨基酸序列和 DNA 序列。

图 8a 和图 8b 分别显示了本发明中参比 TCR α 与 β 链的氨基酸序列。

25 图 9(1)-(29)分别显示了对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物具有高亲和力的异质二聚 TCR 的 α 链可变域氨基酸序列,突变的残基以加下划线表示。

图 10(1)-(16)分别显示了对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物具有高亲和力的异质二聚 TCR 的 β 链可变域氨基酸序列,突变的残基以加下划线表示。

图 11a 和图 11b 分别显示了对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物能够特异性结合的野生型 TCR α 与 β 链氨基酸序列。

30 图 12 为参比 TCR 即野生型 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的结合曲线。

图 13 为转染本发明高亲和力 TCR 的效应细胞的 INF- γ 激活实验结果图。

图 14 为转染本发明高亲和力 TCR 的效应细胞对靶细胞的杀伤实验结果图。

图 15a 和 15b 为融合蛋白对效应细胞的重定向实验结果图。

图 16 为转染本发明高亲和力 TCR 的效应细胞的体内效力结果图。

35 具体实施方式

本发明通过广泛而深入的研究,获得一种识别 SLLMWITQC 短肽(衍生自 NY-ESO-1 蛋

白)的高亲和性 T 细胞受体(TCR), 所述 SLLMWITQC 短肽以肽-HLA A2 复合物的形式被呈递。所述高亲和性 TCR 在其 α 链可变域的 3 个 CDR 区

CDR1 α : TSINN

CDR2 α : IRSNERE

5 CDR3 α : ATDANGKII 中发生突变; 和/或在其 β 链可变域的 3 个 CDR 区

CDR1 β : SGHDY

CDR2 β : FNNNVP

CDR3 β : ASSLGSENEY 中发生突变; 并且, 突变后本发明 TCR 对上述 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的亲和力和/或结合半衰期是野生型 TCR 的至少 2 倍。

10 在描述本发明之前, 应当理解本发明不限于所述的具体方法和实验条件, 因为这类方法和条件可以变动。还应当理解本文所用的术语其目的仅在于描述具体实施方案, 并且其意图不是限制性的, 本发明的范围将仅由所附的权利要求书限制。

除非另外定义, 否则本文中所用的全部技术与科学术语均具有如本发明所属领域的普通技术人员通常理解的含义。

15 虽然在本发明的实施或测试中可以使用与本发明中所述相似或等价的任何方法和材料, 本文在此处例举优选的方法和材料。

术语

T 细胞受体(T cell receptor, TCR)

可以采用国际免疫遗传学信息系统(IMG T)来描述 TCR。天然 $\alpha\beta$ 异源二聚 TCR 具有 α 链和 β 链。广义上讲, 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。通过独特的 IMG T 的 TRAJ 和 TRBJ 确定 TCR 的连接区, 通过 IMG T 的 TRAC 和 TRBC 确定 TCR 的恒定区。

各可变区包含嵌合在框架序列中的 3 个 CDR(互补决定区), CDR1、CDR2 和 CDR3。在 IMG T 命名法中, TRAV 和 TRBV 的不同编号分别指代不同 $V\alpha$ 类型和 $V\beta$ 的类型。在 IMG T 系统中, α 链恒定结构域具有以下的符号: TRAC*01, 其中“TR”表示 T 细胞受体基因; “A”表示 α 链基因; C 表示恒定区; “*01”表示等位基因 1。 β 链恒定结构域具有以下的符号: TRBC1*01 或 TRBC2*01, 其中“TR”表示 T 细胞受体基因; “B”表示 β 链基因; C 表示恒定区; “*01”表示等位基因 1。 α 链的恒定区是唯一确定的, 在 β 链的形式中, 存在两个可能的恒定区基因“C1”和“C2”。本领域技术人员通过公开的 IMG T 数据库可以获得 TCR α 与 β 链的恒定区基因序列。

30 TCR 的 α 和 β 链一般看作各有两个“结构域”即可变域和恒定结构域。可变域由连接的可变区和连接区构成。因此, 在本申请的说明书和权利要求书中, “TCR α 链可变域”指连接的 TRAV 和 TRAJ 区, 同样地, “TCR β 链可变域”指连接的 TRBV 和 TRBD/TRBJ 区。 TCR α 链可变域的 3 个 CDR 分别为 CDR1 α 、CDR2 α 和 CDR3 α ; TCR β 链可变域的 3 个 CDR 分别为 CDR1 β 、CDR2 β 和 CDR3 β 。本发明 TCR 可变域的框架序列可以为鼠源的或人源的, 优选为人源的。 TCR 的恒定结构域包含胞内部分、跨膜区和胞外部分。为获得可溶性 TCR,

以便测定 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物之间的亲和力,本发明 TCR 优选地不包含跨膜区。更优选地,本发明 TCR 的氨基酸序列是指 TCR 的胞外氨基酸序列。

本发明中所述“野生型 TCR”的 α 链氨基酸序列及 β 链氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:103 和 SEQ ID NO: 104, 如图 11a 和 11b 所示。本发明中所述“参比 TCR”的 α 链氨基酸序列及 β 链氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:56 和 SEQ ID NO: 57, 如图 8a 和 8b 所示。本发明中, 能够结合 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的野生型 TCR 的 α 与 β 链可变域氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO: 2, 如图 1a 和 1b 所示。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。

10 在本发明地一个较佳地实施方式中,根据本发明的 T 细胞受体(TCR),包含 TCR α 链可变域和 TCR β 链可变域,所述 TCR α 链可变域包括 CDR1 α 、CDR2 α 、和 CDR3 α 。

在另一优选例中,所述 CDR3 α 包含序列:

[3 α X1][3 α X2]D[3 α X3][3 α X4][3 α X5][3 α X6][3 α X7][3 α X8], 其中, [3 α X1]、[3 α X2]、[3 α X3]、[3 α X4]、[3 α X5]、[3 α X6]、[3 α X7]、[3 α X8]独立地选自任意的天然氨基酸残基。

15 在另一优选例中,所述[3 α X1]为 A 或 M。

在另一优选例中,所述[3 α X2]为 T 或 Y。

在另一优选例中,所述[3 α X3]为 A 或 E 或 Q。

在另一优选例中,所述[3 α X4]为 N 或 F 或 Y 或 W。

在另一优选例中,所述[3 α X5]为 G 或 A 或 Q。

20 在另一优选例中,所述[3 α X6]为 K 或 W 或 R 或 T 或 S 或 M 或 L。

在另一优选例中,所述[3 α X7]为 I 或 W 或 V 或 Y 或 P。

在另一优选例中,所述[3 α X8]为 I 或 N 或 E 或 D 或 Q 或 V 或 K 或 G 或 M 或 S。

在另一优选例中,所述[3 α X1]为 A、[3 α X2]为 T、[3 α X3]为 A、[3 α X4]为 N 或 F 或 W、[3 α X5]为 A、[3 α X6]为 W 或 R、[3 α X7]为 W、并且[3 α X8]为 I 或 N 或 E 或 D。

25 在另一优选例中,所述 CDR3 α 包含选自下组的序列:

ATDANARWN、ATDANARWE、ATDANARWD、ATDAFAWWI、和 ATDAWARWI。

在另一优选例中,所述 CDR1 α 包含序列:

[1 α X1][1 α X2][1 α X3][1 α X4]N,其中, [1 α X1]、[1 α X2]、[1 α X3]、[1 α X4]、[1 α X5]独立地选自任意的天然氨基酸残基。

30 在另一优选例中,所述[1 α X1]为 T 或 G。

在另一优选例中,所述[1 α X2]为 S 或 W。

在另一优选例中,所述[1 α X3]为 I 或 A 或 V。

在另一优选例中,所述[1 α X4]为 N 或 Q。

35 在另一优选例中,所述[1 α X1]为 G、[1 α X2]为 S 或 W、[1 α X3]为 I 或 A 或 V、并且[1 α X4]为 Q。

在另一优选例中,所述 CDR1 α 包含选自下组的序列:

GSIGN、GWAQN、GWVQN 和 TSINN。

在另一优选例中，所述 CDR2 α 包含序列：

IR [2 α X1][2 α X2][2 α X3][2 α X4]E,其中，[2 α X1]、[2 α X2]、[2 α X3]、[2 α X4]独立地选自任意的天然氨基酸残基。

5 在另一优选例中，所述[2 α X1]为 S 或 T。

在另一优选例中，所述[2 α X2]为 N 或 G。

在另一优选例中，所述[2 α X3]为 E 或 Q。

在另一优选例中，所述[2 α X4]为 R、A 或 Q。

在另一优选例中，所述 CDR2 α 包含选自下组的序列：

10 IRTGEQE、IRTGQAE 和 IRSNERE。

在本发明地一个较佳地实施方式中，所述 TCR 包含 TCR α 链可变域和 TCR β 链可变域，所述 TCR β 链可变域包含 CDR1 β 、CDR2 β 和 CDR3 β ，其中所述 CDR1 β 包含序列：SGHDY。

在另一优选例中，所述 CDR2 β 包含序列：

15 FN[2 β X1][2 β X2][2 β X3][2 β X4],其中，[2 β X1]、[2 β X2]、[2 β X3]、和[2 β X4]、各独立地选自任意的天然氨基酸残基。

在另一优选例中，所述[2 β X1]为 N 或 H。

在另一优选例中，所述[2 β X2]为 N 或 G。

在另一优选例中，所述[2 β X3]为 V 或 A。

20 在另一优选例中，所述[2 β X4]为 P 或 V。

在另一优选例中，所述 CDR2 β 包含选自下组的序列：

FNHGAV、和 FNNNVP。

在另一优选例中，所述 CDR3 β 包含序列：AS[3 β X1][3 β X2]G[3 β X3]NEQY,其中，[3 β X1]、[3 β X2]、[3 β X3]独立地选自任意的天然氨基酸残基。

25 在另一优选例中，所述[3 β X1]为 S、Q 或 M。

在另一优选例中，所述[3 β X2]为 L、R、K、或 M。

在另一优选例中，所述[3 β X3]为 S、A、G 或 P。

在另一优选例中，所述 CDR3 β 包含选自下组的序列：

30 ASQRGSNEQY、ASQKGANEQY、ASQLGSNEQY、ASQLGANEQY、ASQLGGNEQY、ASQLGPNEQY、ASQRGANEQY、ASQMGSNEQY、ASQMGANEQY 和 ASMLGSNEQY。

在另一优选例中，所述 TCR 的 TCR α 链可变域不同时包含如下 CDR：

CDR1 α ：TSINN；CDR2 α ：IRSNERE；和 CDR3 α ：ATDANGKII。

在另一优选例中，所述 TCR 的 TCR β 链可变域不同时包含如下 CDR：CDR1 β ：SGHDY；CDR2 β ：FNNNVP；和 CDR3 β ：ASSLGSNEQY。

35

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,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 端依次的顺序进行位置编号,如 TRBC1*01 或 TRBC2*01 中,按从 N 端到 C 端依次的顺序第 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 端依次的顺序第 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。

15 肿瘤

术语“肿瘤”指包括所有类型的癌细胞生长或致癌过程,转移性组织或恶性转化细胞、组织或器官,不管病理类型或侵染的阶段。肿瘤的实施例非限制性地包括:实体瘤,软组织瘤,和转移性病灶。实体瘤的实施例包括:不同器官系统的恶性肿瘤,例如肉瘤,肺鳞癌和癌症。例如:感染的前列腺,肺,乳房,淋巴,肠胃(例如:结肠),和生殖泌尿道(例如:肾脏,上皮细胞),咽头。肺鳞癌包括恶性肿瘤,例如,多数的结肠癌,直肠癌,肾细胞癌,肝癌,肺部的非小细胞癌,小肠癌和食道癌。上述癌症的转移性病变可同样用本发明的方法和组合物来治疗和预防。

发明详述

25 众所周知,TCR 的 α 链可变域与 β 链可变域各含有 3 个 CDR,类似于抗体的互补决定区。CDR3 与抗原短肽相互作用,CDR1 和 CDR2 与 HLA 相互作用。因此,TCR 分子的 CDR 决定了其与抗原短肽-HLA 复合物的相互作用。能够结合抗原短肽 SLLMWITQC 与 HLA A2 复合物(即,SLLMWITQC-HLA A2 复合物)的野生型 TCR 的 α 链可变域氨基酸序列与 β 链可变域氨基酸序列分别为 SEQ ID NO:1 和 SEQ ID NO: 2,该序列为本发明人首次发现。其具有下列 CDR 区:

30 α 链可变域 CDR CDR1 α : TSINN
CDR2 α : IRSNERE
CDR3 α : ATDANGKII
和 β 链可变域 CDR CDR1 β : SGHDY
35 CDR2 β : FNNNVP
CDR3 β : ASSLGSNEQY

本发明通过对上述 CDR 区进行突变筛选,获得了与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的亲

和力是野生型 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物亲和力至少 2 倍的高亲和力 TCR。

本发明提供了一种 T 细胞受体(TCR)，其具有结合 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的活性。

所述 T 细胞受体包含 TCR α 链可变域和 TCR β 链可变域，所述 TCR α 链可变域包含 3 个 CDR 区，所述 TCR α 链可变域的 3 个 CDR 区的基准序列如下，

CDR1 α : TSINN

CDR2 α : IRSNERE

CDR3 α : ATDANGKII，并且含有至少一个下列突变：

突变前的残基	突变后的残基
CDR1 α 的第 1 位 T	G
CDR1 α 的第 2 位 S	W
CDR1 α 的第 3 位 I	A 或 V
CDR1 α 的第 4 位 N	Q
CDR2 α 的第 3 位 S	T
CDR2 α 的第 4 位 N	G
CDR2 α 的第 5 位 E	Q
CDR2 α 的第 6 位 R	A 或 Q
CDR3 α 的第 1 位 A	M
CDR3 α 的第 2 位 T	Y
CDR3 α 的第 4 位 A	E 或 Q
CDR3 α 的第 5 位 N	F 或 Y 或 W
CDR3 α 的第 6 位 G	A 或 Q
CDR3 α 的第 7 位 K	W 或 R 或 T 或 S 或 M 或 L
CDR3 α 的第 8 位 I	W 或 V 或 Y 或 P，和
CDR3 α 的第 9 位 I	N 或 E 或 D 或 Q 或 V 或 K 或 G 或 M 或 S

和/或，所述 TCR β 链可变域包含 3 个 CDR 区，所述 TCR β 链可变域的 3 个 CDR 区的基准序列如下，

CDR1 β : SGHDY

CDR2 β : FNNNVP

CDR3 β : ASSLSNEQY，并且含有至少一个下列突变：

突变前的残基	突变后的残基
CDR2 β 的第 3 位 N	H
CDR2 β 的第 4 位 N	G
CDR2 β 的第 5 位 V	A
CDR2 β 的第 6 位 P	V
CDR3 β 的第 3 位 S	Q 或 M
CDR3 β 的第 4 位 L	R 或 K 或 M，和
CDR3 β 的第 6 位 S	A 或 G 或 P

更详细地，所述 TCR α 链 CDR 区的突变个数为 3 个或 4 个或 6 个或 8 个或 9 个或 11 个或 12 个；和/或所述 TCR β 链 CDR 区的突变个数为 1 个或 2 个或 3 个或 4 个或 5 个或 6 个或 7 个。

进一步,本发明所述 TCR 是 $\alpha\beta$ 异质二聚 TCR,所述 TCR 的 α 链可变域包含与 SEQ ID NO:1 所示的氨基酸序列有至少 85%,优选地,至少 90%;更优选地,至少 92%;最优选地,至少 94%(如,可以是至少 88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列同源性的)的序列同源性的氨基酸序列;和/或所述 TCR 的 β 链可变域包含与 SEQ ID NO:2 所示的氨基酸序列有至少 90%,优选地,至少 92%;更优选地,至少 94%;最优选地,至少 97%;(如,可以是至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列同源性的)的序列同源性的氨基酸序列。

进一步,本发明所述 TCR 是单链 TCR,所述 TCR 的 α 链可变域包含与 SEQ ID NO:3 所示的氨基酸序列有至少 85%,优选地,至少 90%;更优选地,至少 92%;最优选地,至少 94%(如,可以是至少 88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列同源性的)的序列同源性的氨基酸序列;和/或所述 TCR 的 β 链可变域包含与 SEQ ID NO:4 所示的氨基酸序列有至少 90%,优选地,至少 92%;更优选地,至少 94%;最优选地,至少 97%;(如,可以是至少 91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99% 的序列同源性的)的序列同源性的氨基酸序列。

15 优选地,所述 TCR 包含(i)除其跨膜结构域以外的全部或部分 TCR α 链,和(ii)除其跨膜结构域以外的全部或部分 TCR β 链,其中(i)和(ii)均包含 TCR 链的可变域和至少一部分恒定域。

本发明中野生型 TCR α 链可变域 SEQ ID NO: 1 的 3 个 CDR 即 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别位于 SEQ ID NO: 1 的第 27-31 位、第 49-55 位和第 90-98 位。据此,氨基酸残基编号采用 SEQ ID NO:1 所示的编号,27T 即为 CDR1 α 的第 1 位 T,28S 即为 CDR1 α 的第 2 位 S,29I 即为 CDR1 α 的第 3 位 I,30N 即为 CDR1 α 的第 4 位 N,51S 即为 CDR2 α 的第 3 位 S,52N 即为 CDR2 α 的第 4 位 N,53E 即为 CDR2 α 的第 5 位 E,54R 即为 CDR2 α 的第 6 位 R,90A 即为 CDR3 α 的第 1 位 A,91T 即为 CDR3 α 的第 2 位 T,93A 即为 CDR3 α 的第 4 位 A,94N 即为 CDR3 α 的第 5 位 N,95G 即为 CDR3 α 的第 6 位 G,96K 即为 CDR3 α 的第 7 位 K,25 97I 即为 CDR3 α 的第 8 位 I,98I 即为 CDR3 α 的第 9 位 I。

同理,本发明中野生型 TCR β 链可变域 SEQ ID NO: 2 的 3 个 CDR 即 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别位于 SEQ ID NO: 2 的第 27-31 位、第 49-54 位和第 93-102 位。因此,氨基酸残基编号采用 SEQ ID NO:2 所示的编号,51N 即为 CDR2 β 的第 3 位 N,52N 即为 CDR2 β 的第 4 位 N,53V 即为 CDR2 β 的第 5 位 V,54P 即为 CDR2 β 的第 6 位 P,95S 即为 CDR3 β 的第 3 位 S,96L 即为 CDR3 β 的第 4 位 L,98S 即为 CDR3 β 的第 6 位 S。

本发明提供具有结合 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的特性的 TCR,并包含 α 链可变域和 β 链可变域,其特征在于,所述 TCR 在 SEQ ID NO: 1 所示的 α 链可变域中发生突变,所述突变的氨基酸残基位点包括 27T、28S、29I、30N、51S、52N、53E、54R、90A、91T、93A、94N、95G、96K、97I 和 98I 中的一个或多个,其中,氨基酸残基编号采用 SEQ ID NO:1 所示的编号;和/或所述 TCR 在 SEQ ID NO: 2 所示的 β 链可变域中发生突变,所述突变的氨基酸残基位点包括 51N、52N、53V、54P、95S、96L 和 98S 中的一个或多个,其中,氨

氨基酸残基编号采用 SEQ ID NO:2 所示的编号;

优选地, 突变后的所述 TCR α 链可变域包括选自下组的一个或多个氨基酸残基: 27G、28W、29A 或 29V、30Q、51T、52G、53Q、54Q 或 54A、90M、91Y、93E 或 93Q、94F 或 94Y 或 94W、95A 或 95Q、96W 或 96R 或 96T 或 96S 或 96M 或 96L、97W 或 97V 或 97Y 或 97P、和 98E 或 98N 或 98D 或 98Q 或 98K 或 98V 或 98G 或 98M 或 98S, 其中, 氨基酸残基编号采用 SEQ ID NO:1 所示的编号; 和/或突变后的所述 TCR β 链可变域包括选自下组的一个或多个氨基酸残基: 51H、52G、53A、54V、95Q 或 95M、96R 或 96K 或 96M、和 98A 或 98G 或 98P, 氨基酸残基编号采用 SEQ ID NO:2 所示的编号。

更具体地, α 链可变域中所述突变的具体形式包括 T27G、S28W、I29A/V、N30Q、S51T、N52G、E53Q、R54Q/A、A90M、T91Y、A93E/Q、N94F/Y/W、G95A/Q、K96W/R/T/S/M/L、I97W/V/Y/P 和 I98N/E/D/Q/K/V/G/M/S 中的一组或几组; β 链可变域中所述突变的具体形式包括 N51H、N52G、V53A、P54V、S95Q/M、L96R/K/M 和 S98A/G/P 中的一组或几组。

根据本领域技术人员熟知的定点突变的方法, 将野生型 TCR α 链恒定区 TRAC*01 外显子 1 的 Thr48 突变为半胱氨酸, β 链恒定区 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser57 突变为半胱氨酸, 即得到参比 TCR, 其氨基酸序列分别如图 8a 和 8b 所示, 突变后的半胱氨酸残基以加粗字母表示。上述半胱氨酸取代能使参比 TCR 的 α 与 β 链的恒定区之间形成人工链间二硫键, 以形成更加稳定的可溶性 TCR, 从而能够更加方便地评估 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物之间的结合亲和力和/或结合半衰期。应理解, TCR 可变区的 CDR 区决定了其与 pMHC 复合物之间的亲和力, 因此, 上述 TCR 恒定区的半胱氨酸取代并不会对 TCR 的结合亲和力和/或结合半衰期产生影响。所以, 在本发明中, 测得的参比 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物之间的结合亲和力即认为是野生型 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物之间的结合亲和力。同样地, 如果测得本发明 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物之间的结合亲和力是参比 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物之间的结合亲和力的至少 10 倍, 即等同于本发明 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物之间的结合亲和力的至少 10 倍。

可通过任何合适的方法测定结合亲和力和(与解离平衡常数 K_D 成反比)和结合半衰期(表示为 $T_{1/2}$)。应了解, TCR 的亲和力翻倍将导致 K_D 减半。 $T_{1/2}$ 计算为 $\ln 2$ 除以解离速率(K_{off})。因此, $T_{1/2}$ 翻倍会导致 K_{off} 减半。优选采用相同的试验方案检测给定 TCR 的结合亲和力或结合半衰期数次, 例如 3 次或更多, 取结果的平均值。在优选的实施方式中, 采用本文实施例中的表面等离子共振(BIAcore)方法进行这些检测。该方法检测到参比 TCR 对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的解离平衡常数 K_D 为 $4.3E-05M$, 即 $43\mu M$, 本发明中即认为野生型 TCR 对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的解离平衡常数 K_D 也为 $43\mu M$ 。由于 TCR 的亲和力翻倍将导致 K_D 减半, 所以若检测到高亲和力 TCR 对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的解离平衡常数 K_D 为 $4.3E-06M$, 即 $4.3\mu M$, 则说明该高亲和力 TCR 对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的亲和力是野生型 TCR 对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的亲和力的 10 倍。本领域技术人员熟知 K_D 值单位间的换算关系, 即 $1M=1000\mu M$, $1\mu M=1000nM$, $1nM=1000pM$ 。

在本发明的一个优选例中,所述 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的亲和力是野生型 TCR 的至少 2 倍;优选地,至少 5 倍;更优选地,至少 10 倍。

在另一优选例中,所述 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的亲和力是野生型 TCR 的至少 50 倍;优选地,至少 100 倍;更优选地,至少 500 倍;最优选地,至少 1000 倍。

5 在另一优选例中,所述 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的亲和力是野生型 TCR 的至少 10^4 倍;优选地,至少 10^5 倍;更优选地,至少 10^6 倍;最优选地,至少 10^7 倍。

具体地,所述 TCR 对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的解离平衡常数 $K_D \leq 20 \mu\text{M}$;

在另一优选例中,所述 TCR 对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的解离平衡常数 $5 \mu\text{M} \leq K_D \leq 10 \mu\text{M}$;优选地, $0.1 \mu\text{M} \leq K_D \leq 1 \mu\text{M}$;更优选地, $1 \text{nM} \leq K_D \leq 100 \text{nM}$;

10 在另一优选例中,所述 TCR 对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物的解离平衡常数 $100 \text{pM} \leq K_D \leq 1000 \text{pM}$;优选地, $10 \text{pM} \leq K_D \leq 100 \text{pM}$;更优选地, $1 \text{pM} \leq K_D \leq 10 \text{pM}$ 。

可采用任何合适的方法进行突变,包括但不限于依据聚合酶链式反应(PCR)的那些、依据限制性酶的克隆或不依赖连接的克隆(LIC)方法。许多标准分子生物学教材详述了这些方法。聚合酶链式反应(PCR)诱变和依据限制性酶的克隆的更多细节可参见 Sambrook 和 Russell, 15 (2001) 分子克隆-实验室手册(Molecular Cloning-A Laboratory Manual)(第三版)CSHL 出版社。LIC 方法的更多信息可见(Rashtchian,(1995)Curr Opin Biotechnol 6(1):30-6)。

产生本发明的 TCR 的方法可以是但不限于从展示此类 TCR 的噬菌体颗粒的多样性文库中筛选出对 SLLMWITQC-HLA-A2 复合物具有高亲和性的 TCR,如文献(Li, *et al*(2005)Nature Biotech 23(3):349-354)中所述。

20 应理解,表达野生型 TCR α 和 β 链可变域氨基酸的基因或者表达略作修饰的野生型 TCR 的 α 和 β 链可变域氨基酸的基因都可用来制备模板 TCR。然后在编码该模板 TCR 的可变域的 DNA 中引入产生本发明的高亲和力 TCR 所需的改变。

本发明的高亲和性 TCR 包含 α 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、25 83、84、85、86 之一和/或 β 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102 之一。因此,含有野生型 TCR 的 α 链可变域氨基酸序列(SEQ ID NO:1)的 TCR α 链可与包含 SEQ ID NO: 87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102 之一的 TCR β 链组合形成异质二聚 TCR 或单链 TCR 分子。或者,含有野生型 TCR 的 β 链可变域氨基酸序列(SEQ ID NO:2)的 TCR β 链可与包含 SEQ 30 ID NO: 58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86 之一的 TCR α 链组合形成异质二聚 TCR 或单链 TCR 分子。又或者,包含 TCR α 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86 之一的 TCR α 链可与包含 TCR β 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 87、88、89、35 90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102 之一的 TCR β 链组合形成异质二聚 TCR 或单链 TCR 分子。本发明中,形成异质二聚 TCR 分子的 α 链可变域与 β 链可变

域的氨基酸序列优选自下表 1:

表 1

TCR 序号	α 链可变域序列 SEQ ID NO:	β 链可变域序列 SEQ ID NO:
1	58	2
2	59	87
3	60	87
4	60	88
5	60	89
6	61	90
7	62	90
8	63	87
9	64	91
10	65	90
11	66	89
12	1	92
13	1	93
14	1	94
15	1	95
16	1	96
17	1	97
18	1	98
19	67	2
20	68	2
21	69	2
22	70	2
23	71	2
24	72	2
25	73	2
26	74	2
27	75	2
28	76	2
29	77	2
30	78	2
31	79	2
32	80	2
33	81	2
34	82	2
35	83	2
36	59	2
37	63	2
38	84	2
39	85	2
40	86	2
41	1	99
42	1	100
43	1	101
44	1	102

基于本发明的目的, 本发明 TCR 是具有至少一个 TCR α 和/或 TCR β 链可变域的部分。

它们通常同时包含 TCR α 链可变域和 TCR β 链可变域。它们可以是 $\alpha\beta$ 异源二聚体或是单链形式或是其他任何能够稳定存在的形式。在过继性免疫治疗中, 可将 $\alpha\beta$ 异源二聚 TCR 的全长链(包含胞质和跨膜结构域)进行转染。本发明 TCR 可用作将治疗剂递送至抗原呈递细胞的靶向剂或与其他分子结合制备双功能多肽来定向效应细胞, 此时 TCR 优选为可溶形式。

5 对于稳定性而言, 现有技术中公开了在 TCR 的 α 与 β 链恒定域之间引入人工链间二硫键能够获得可溶且稳定的 TCR 分子, 如专利文献 PCT/CN2015/093806 中所述。因此, 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链间二硫键的 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
10 和取代 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser57 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
15 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 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链间二硫键的目的, 也可通过将形成天然链
20 间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链间二硫键。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 中的天然链间二硫键连接。

25 另外, 对于稳定性而言, 专利文献 PCT/CN2016/077680 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 61 位氨基酸; TRAV 的第 46 位氨基酸和
30 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 TCR α 链, 和(ii)除其跨膜结构域以外的全部或部分 TCR β 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,
35 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。

对于稳定性而言,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 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(IMG T)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 IMG T 中的位置编号。

更具体地, 本发明中疏水芯区域发生突变的 TCR 可以是由一柔性肽链连接 TCR 的 α 与 β 链的可变域而构成的高稳定性单链 TCR。TCR 可变区的 CDR 区决定了其与短肽-HLA 复合物之间的亲和力, 疏水芯的突变能够使 TCR 更加稳定, 但并不会影响其与短肽-HLA 复合物之间的亲和力。应注意, 本发明中柔性肽链可以是任何适合连接 TCR α 与 β 链可变域的肽链。本发明实施例 1 中构建的用于筛选高亲和性 TCR 的模板链即为上述含有疏水芯突变的高稳定性单链 TCR。采用稳定性较高的 TCR, 能够更方便的评估 TCR 与 SLLMWITQC-HLA-A2 复合物之间的亲和力。

该单链模板 TCR 的 α 链可变域及 β 链可变域的 CDR 区与野生型 TCR 的 CDR 区完全相同。即 α 链可变域的 3 个 CDR 分别为 CDR1 α : TSINN, CDR2 α : IRSNERE,

CDR3 α : ATDANGKII 和 β 链可变域的 3 个 CDR 分别为 CDR1 β : SGHDY, CDR2 β : FNNNVP, CDR3 β : ASSLG SNEQY。该单链模板 TCR 的氨基酸序列(SEQ ID NO:54)及核苷酸序列(SEQ ID NO:55)分别如图 7a 和 7b 所示。以此筛选出对 SLLMWITQC-HLA A2 复合物具有高亲和性的由 α 链可变域和 β 链可变域构成的单链 TCR。

本发明中单链模板 TCR α 链可变域 SEQ ID NO:3 的 3 个 CDR 即 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别位于 SEQ ID NO: 3 的第 27-31 位、第 49-55 位和第 90-98 位。据此, 氨基酸残基编号采用 SEQ ID NO:3 所示的编号, 27T 即为 CDR1 α 的第 1 位 T, 28S 即为 CDR1 α 的第 2 位 S, 29I 即为 CDR1 α 的第 3 位 I, 30N 即为 CDR1 α 的第 4 位 N, 51S 即为 CDR2 α 的第 3 位 S, 52N 即为 CDR2 α 的第 4 位 N, 53E 即为 CDR2 α 的第 5 位 E, 54R 即为 CDR2 α 的第 6 位 R, 90A 即为 CDR3 α 的第 1 位 A, 91T 即为 CDR3 α 的第 2 位 T, 93A 即为 CDR3 α 的第 4 位 A, 94N 即为 CDR3 α 的第 5 位 N, 95G 即为 CDR3 α 的第 6 位 G, 96K 即为 CDR3 α 的第 7 位 K, 97I 即为 CDR3 α 的第 8 位 I, 98I 即为 CDR3 α 的第 9 位 I。

同理, 本发明中单链模板 TCR β 链可变域 SEQ ID NO: 4 的 3 个 CDR 即 CDR1、CDR2 和 CDR3 分别位于 SEQ ID NO: 2 的第 27-31 位、第 49-54 位和第 93-102 位。因此, 氨基酸残基编号采用 SEQ ID NO:2 所示的编号, 51N 即为 CDR2 β 的第 3 位 N, 52N 即为 CDR2 β 的第 4 位 N, 53V 即为 CDR2 β 的第 5 位 V, 54P 即为 CDR2 β 的第 6 位 P, 95S 即为 CDR3 β 的第 3 位 S, 96L 即为 CDR3 β 的第 4 位 L, 98S 即为 CDR3 β 的第 6 位 S。

本发明的对 SLLMWITQC-HLA-A2 复合物具有高亲和性的 $\alpha\beta$ 异质二聚体的获得是通过将筛选出的高亲和性单链 TCR 的 α 与 β 链可变域的 CDR 区转移到野生型 TCR α 链可变域

(SEQ ID NO:1)与 β 链可变域(SEQ ID NO:2)的相应位置而得到。

在本发明的一些实施例中,采用 SEQ ID NO:1 所示的编号,本发明 TCR 的 α 链可变域疏水芯氨基酸残基 19A(即 IMGT 中列出的 α 链可变区第 19 位)、21M(即 IMGT 中列出的 α 链可变区第 21 位)、79S(即 IMGT 中列出的 α 链可变区第 94 位)中有一个或多个发生突变和/或采用 SEQ ID NO:2 所示的编号,所述 TCR β 链可变域疏水芯氨基酸残基 13T(即 IMGT 中列出的 β 链可变区第 13 位)、82S(即 IMGT 中列出的 β 链可变区第 94 位)中有一个或多个发生突变。

更具体地,在本发明的一些优选实施例中,采用 SEQ ID NO:1 所示的编号,本发明 α 链可变域疏水芯包含氨基酸残基 19V、21I 和 79V 中的一个或多个和/或采用 SEQ ID NO:2 所示的编号,所述 TCR β 可变域疏水芯包含氨基酸残基 13V 和 82V 中的一个或多个。更具体地,所述 TCR α 可变域疏水芯的突变形式包括 A19V、M21I 和 S79V 中的一组或几组;所述 TCR β 可变域疏水芯的突变形式包括 T13V 和 S82V 中的一组或几组。

本发明的高亲和性 TCR 还包含 α 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO:9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36 和 37 之一和/或 β 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52 和 53 之一。因此,上述作为模板链的高稳定性单链 TCR α 链可变域(SEQ ID NO: 3)可与氨基酸序列为 SEQ ID NO: 38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52 或 53 的 TCR β 链可变域组合形成所述单链 TCR 分子。或者,上述作为模板链的高稳定性单链 TCR β 链可变域(SEQ ID NO: 4)可与氨基酸序列为 SEQ ID NO: 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36 或 37 的 TCR α 链可变域组合形成所述单链 TCR 分子。又或者,TCR α 链可变域 SEQ ID NO: 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36 和 37 之一与 TCR β 链可变域 SEQ ID NO: 38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52 和 53 之一组合形成所述单链 TCR 分子。本发明中,高亲和力单链 TCR 分子的 α 链可变域与 β 链可变域的氨基酸序列优选自下表 2:

表 2

TCR 编号	α 链可变域序列 SEQ ID NO:	β 链可变域序列 SEQ ID NO:
s-1	9	4
s-2	10	38
s-3	11	38
s-4	11	39
s-5	11	40
s-6	12	41
s-7	13	41
s-8	14	38
s-9	15	42
s-10	16	41

s-11	17	40
s-12	3	43
s-13	3	44
s-14	3	45
s-15	3	46
s-16	3	47
s-17	3	48
s-18	3	49
s-19	18	4
s-20	19	4
s-21	20	4
s-22	21	4
s-23	22	4
s-24	23	4
s-25	24	4
s-26	25	4
s-27	26	4
s-28	27	4
s-29	28	4
s-30	29	4
s-31	30	4
s-32	31	4
s-33	32	4
s-34	33	4
s-35	34	4
s-36	10	4
s-37	14	4
s-38	35	4
s-39	36	4
s-40	37	4
s-41	3	50
s-42	3	51
s-43	3	52
s-44	3	53

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。

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 SLLMWITQC-HLA-A2 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。

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; 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 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。

与本发明 TCR 结合的抗体或其片段包括抗-T 细胞或 NK-细胞决定抗体, 如抗-CD3 或抗-CD28 或抗-CD16 抗体, 上述抗体或其片段与 TCR 的结合能够对效应细胞进行定向来更好地靶向靶细胞。一个优选的实施方式是本发明 TCR 与抗-CD3 抗体或所述抗-CD3 抗体的功能片段或变体结合。具体地, 本发明的 TCR 与抗 CD3 单链抗体的融合分子包括选自下组的 TCR α 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、58、59、60、61、62、63、64、65、66、67、68、69、70、71、72、73、74、75、76、77、78、79、80、81、82、83、84、85、86 和选自下组的 TCR β 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52、53、87、88、89、90、91、92、93、94、95、96、97、98、99、100、101、102。

本发明还涉及编码本发明 TCR 的核酸分子。本发明的核酸分子可以是 DNA 形式或 RNA 形式。DNA 可以是编码链或非编码链。例如，编码本发明 TCR 的核酸序列可以与本发明附图所示的核酸序列相同或是简并的变异体。举例说明“简并的变异体”的含义，如本文所用，“简并的变异体”在本发明中是指编码具有 SEQ ID NO: 54 的蛋白序列，但与 SEQ ID NO:55 的序列有差别的核酸序列。

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。

本发明也涉及包含本发明的核酸分子的载体，以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。

本发明还包括表达本发明 TCR 的分离细胞,特别是 T 细胞。有许多方法适合于用编码本发明的高亲和力 TCR 的 DNA 或 RNA 进行 T 细胞转染(如,Robbins 等.,(2008)J.

Immunol.180:6116-6131)。表达本发明高亲和性 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

5 Cancer8(4): 299-308)。

本发明还提供一种药物组合物,所述药物组合物含有药学上可接受的载体以及本发明 TCR、或本发明 TCR 复合物、或呈递本发明 TCR 的细胞。

本发明还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 TCR、或本发明 TCR 复合物、或呈递本发明 TCR 的细胞、或本发明的药物组合物。

10 应理解,本文中氨基酸名称采用国际通用的单英文字母标识,与其相对应的氨基酸名称三英文字母缩写分别是:Ala (A)、Arg (R)、Asn (N)、Asp (D)、Cys (C)、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);

本发明中,Pro60 或者 60P 均表示第 60 位脯氨酸。另外,本发明中所述突变的具体形式的表述方式如“T27G”代表第 27 位的 T 被 G 取代,同理,“I29A/V”代表第 29 位的 I 被 A 取代或被 V 取代。其他以此类推。

在本领域中,用性能相近或相似的氨基酸进行取代时,通常不会改变蛋白质的功能。在 C 末端和/或 N 末端添加一个或数个氨基酸通常也不会改变蛋白质的结构和功能。因此,本发明 TCR 还包括本发明 TCR 的至多 5 个,较佳地至多 3 个,更佳地至多 2 个,最佳地 1
20 个氨基酸(尤其是位于 CDR 区之外的氨基酸),被性质相似或相近的氨基酸所替换,并仍能够保持其功能性的 TCR。

本发明还包括对本发明 TCR 略作修饰后的 TCR。修饰(通常不改变一级结构)形式包括:本发明 TCR 的化学衍生形式如乙酰化或羧基化。修饰还包括糖基化,如那些在本发明 TCR 的合成和加工中或进一步加工步骤中进行糖基化修饰而产生的 TCR。这种修饰可以通过将
25 TCR 暴露于进行糖基化的酶(如哺乳动物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修饰形式还包括具有磷酸化氨基酸残基(如磷酸酪氨酸,磷酸丝氨酸,磷酸苏氨酸)的序列。还包括被修饰从而提高了其抗蛋白水解性能或优化了溶解性能的 TCR。

本发明的 TCR、TCR 复合物或本发明 TCR 转染的 T 细胞可与药学上可接受的载体一起
30 在药物组合物中提供。本发明的 TCR、多价 TCR 复合物或细胞通常作为无菌药物组合物的一部分提供,所述组合物通常包括药学上可接受的载体。该药物组合物可以是任何合适的形式(取决于给予患者的所需方法)。其可采用单位剂型提供,通常在密封的容器中提供,可作为试剂盒的一部分提供。此类试剂盒(但非必需)包括使用说明书。其可包括多个所述单位剂型。

此外,本发明的 TCR 可以单用,也可与其他治疗剂结合或偶联在一起使用(如配制在同一
35 一药物组合物中)。

药物组合物还可含有药学上可接受的载体。术语“药学上可接受的载体”指用于治疗剂给

药的载体。该术语指这样一些药剂载体：它们本身不诱导产生对接受该组合物的个体有害的抗体，且给药后没有过分的毒性。这些载体是本领域普通技术人员所熟知的。在雷明顿药物科学(Remington's Pharmaceutical Sciences(Mack Pub. Co., N.J. 1991))中可找到关于药理学上可接受的赋形剂的充分讨论。这类载体包括(但不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、佐剂、及其组合。

治疗性组合物中药理学上可接受的载体可含有液体，如水、盐水、甘油和乙醇。另外，这些载体中还可能存在辅助性的物质，如润湿剂或乳化剂、pH 缓冲物质等。

通常，可将治疗性组合物制成可注射剂，例如液体溶液或悬液；还可制成在注射前适合配入溶液或悬液中、液体载体的固体形式。

一旦配成本发明的组合物，可将其通过常规途径进行给药，其中包括(但不限于)：眼内、肌内、静脉内、皮下、皮内、或局部给药，优选为胃肠外包括皮下、肌肉内或静脉内。待预防或治疗的对象可以是动物；尤其是人。

当本发明的药物组合物被用于实际治疗时，可根据使用情况而采用各种不同剂型的药物组合物。较佳地，可以例举的有针剂、口服剂等。

这些药物组合物可根据常规方法通过混合、稀释或溶解而进行配制，并且偶尔添加合适的药物添加剂，如赋形剂、崩解剂、粘合剂、润滑剂、稀释剂、缓冲剂、等渗剂(isotonicities)、防腐剂、润湿剂、乳化剂、分散剂、稳定剂和助溶剂，而且该配制过程可根据剂型用惯常方式进行。

本发明的药物组合物还可以缓释剂形式给药。例如，本发明 TCR 可被掺入以缓释聚合物为载体的药丸或微囊中，然后将该药丸或微囊通过手术植入待治疗的组织。作为缓释聚合物的例子，可例举的有乙烯-乙烯基乙酸酯共聚物、聚羟基甲基丙烯酸酯(polyhydrometaacrylate)、聚丙烯酰胺、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纤维素、乳酸聚合物、乳酸-乙醇酸共聚物等，较佳地可例举的是可生物降解的聚合物如乳酸聚合物和乳酸-乙醇酸共聚物。

当本发明的药物组合物被用于实际治疗时，作为活性成分的本发明 TCR 或 TCR 复合物或呈递本发明 TCR 的细胞，可根据待治疗的每个病人的体重、年龄、性别、症状程度而合理地加以确定，最终由医师决定合理的用量。

本发明的主要优点在于：

(1)本发明的 TCR 对所述 SLLMWITQC-HLA-A2 复合物的亲和力和/或结合半衰期是野生型 TCR 的至少 2 倍，优选地，至少 10 倍。

(2)本发明的 TCR 对所述 SLLMWITQC-HLA-A2 复合物的亲和力和/或结合半衰期是野生型 TCR 的至少 100 倍，优选地，至少 1000 倍，更优选地，可达 10^4 - 10^7 倍。

(3)转导本发明的高亲和力 TCR 的效应细胞对靶细胞有很强的杀伤作用。

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并不用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。

材料和方法

5 本发明实施例中所用的实验材料如无特殊说明均可从市售渠道获得,其中, *E.coli* DH5 α 购自 Tiangen, *E.coli* BL21(DE3)购自 Tiangen, *E. coli* Tuner (DE3)购自 Novagen, 质粒 pET28a 购自 Novagen。

实施例 1. 疏水芯突变的稳定性单链 TCR 模板链的产生

10 本发明利用定点突变的方法,根据专利文献 WO2014/206304 中所述,构建了一个柔性短肽(linker)连接 TCR α 与 β 链可变域而构成的稳定性单链 TCR 分子,其氨基酸及 DNA 序列分别为 SEQ ID NO:54 和 SEQ ID NO:55,如图 7a 和图 7b 所示。并以该单链 TCR 分子为模板进行高亲和性 TCR 分子的筛选。该模板链的 α 可变域(SEQ ID NO:3)及 β 可变域(SEQ ID NO:4)的氨基酸序列如图 2a 和 2b 所示;其对应的 DNA 序列分别为 SEQ ID NO:5 和 6,如图 3a 和 3b 所示;
15 柔性短肽(linker)的氨基酸序列及 DNA 序列分别为 SEQ ID NO:7 和 8,如图 4a 和 4b 所示。

将携带模板链的目的基因经 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。

20

实施例 2. 实施例 1 中构建的稳定性单链 TCR 的表达、复性和纯化

将实施例 1 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
25 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 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,
35 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 Å, ϕ 7.8×300 mm), 流动相为 150 mM 磷酸盐缓冲液, 流速 0.5 mL/min, 柱温 25℃, 紫外检测波长 214 nm。

实施例 3. 结合表征

BIAcore 分析

使用 BIAcore T200 实时分析系统检测 TCR 分子与 SLLMWITQC-HLA-A2 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。

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 SLLMWITQC-HLA-A2 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。采用单循环动力学分析方法测定其亲和力, 将 TCR 用 HEPES-EP 缓冲液(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20, pH 7.4)稀释成几个不同的浓度, 以 30 μ L/min 的流速, 依次流过芯片表面, 每次进样的结合时间为 120 s, 最后一次进样结束后让其解离 600 s。每一轮测定结束后用 pH 1.75 的 10 mM Gly-HCl 再生芯片。利用 BIAcore Evaluation 软件计算动力学参数。

上述 SLLMWITQC-HLA-A2 复合物的制备过程如下:

a. 纯化

收集 100 ml 诱导表达重链或轻链的 E. coli 菌液, 于 4℃ 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℃, 6000 g 离心 15 min, 弃去上清, 收集包涵体。

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℃ 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℃ 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℃ 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

将合成的短肽 SLLMWITQC(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 SLLMWITQC 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℃), 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 °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

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。

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 °C。

20

实施例 4. 高亲和性单链 TCR 的产生

噬菌体展示技术是产生 TCR 高亲和力变体文库以筛选高亲和力变体的一种手段。将 Li 等((2005)Nature Biotech 23(3):349-354)描述的 TCR 噬菌体展示和筛选方法应用于实施例 1 中的单链 TCR 模板。通过突变该模板链的 CDR 区来建立高亲和性 TCR 的文库并进行淘选。经过几轮淘选后的噬菌体文库均和相应抗原具有特异性结合, 从中挑取单克隆, 并进行序列分析。

采用实施例 3 中 BIAcore 方法分析 TCR 分子与 SLLMWITQC-HLA-A2 复合物的相互作用, 筛选出了亲和力和/或结合半衰期是野生型 TCR 的至少 2 倍的高亲和性 TCR, 即筛选出的高亲和性 TCR 结合 SLLMWITQC-HLA-A2 复合物的解离平衡常数 K_D 小于等于野生型 TCR 结合 SLLMWITQC-HLA-A2 复合物的解离平衡常数 K_D 的二分之一, 结果如下表 3 所示。利用上述方法检测到参比 TCR 与 SLLMWITQC-HLA-A2 复合物相互作用的 K_D 值为 43 μ M, 其相互作用曲线如图 12 所示, 即野生型 TCR 与 SLLMWITQC-HLA-A2 复合物相互作用的 K_D 值也为 43 μ M, 即 4.3E-05M。

具体地, 采用 SEQ ID NO:1 中所示的编号, 这些高亲和力 TCR 突变体的 α 链可变域在下列一个或多个位点的氨基酸发生突变: 27T、28S、29I、30N、51S、52N、53E、54R、90A、91T、93A、94N、95G、96K、97I 和 98I 和/或采用 SEQ ID NO:41 中所示的编号, 这些高亲

和力 TCR 突变体的 β 链可变域在下列一个或多个位点 51N、52N、53V、54P、95S、96L 和 98S 中发生突变。

- 更具体地, 采用 SEQ ID NO:1 所示的编号, 这些高亲和力 TCR 的 α 链可变域包含选自下组的一个或多个氨基酸残基 27G、28W、29A 或 29V、30Q、51T、52G、53Q、54Q 或 54A、
 5 90M、91Y、93E 或 93Q、94F 或 94Y 或 94W、95A 或 95Q、96W 或 96R 或 96T 或 96S 或 96M 或 96L、97W 或 97V 或 97Y 或 97P、和 98E 或 98N 或 98D 或 98Q 或 98K 或 98V 或 98G 或 98M 或 98S; 和/或采用 SEQ ID NO:2 所示的编号, 这些高亲和力 TCR 的 β 链可变域包含选自下组的一个或多个氨基酸残基 51H、52G、53A、54V、95Q 或 95M、96R 或 96K 或 96M、和 98A 或 98G 或 98P。
- 10 高亲和性单链 TCR 的 α 链可变域(SEQ ID NO: 9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36 和 37) 和 β 链可变域(SEQ ID NO: 38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48、49、50、51、52 和 53)的具体氨基酸序列分别如图 5(1)-(29)和图 6(1)-(16)所示。

表 3

单链 TCR 编号	单链 TCR 可变域 (SEQ ID NO.)		$K_D(M)$
	α	β	
s-1	9	4	2.97E-09
s-2	10	38	2.66E-10
s-3	11	38	2.78E-10
s-4	11	39	4.75E-10
s-5	11	40	3.57E-10
s-6	12	41	3.42E-10
s-7	13	41	2.95E-10
s-8	14	38	3.41E-10
s-9	15	42	3.17E-10
s-10	16	41	4.25E-10
s-11	17	40	5.72E-10
s-12	3	43	3.80E-07
s-13	3	44	1.58E-06
s-14	3	45	4.91E-06
s-15	3	46	8.51E-07
s-16	3	47	1.69E-06
s-17	3	48	1.01E-07
s-18	3	49	1.57E-07
s-19	18	4	4.73E-06
s-20	19	4	3.33E-07
s-21	20	4	1.08E-07
s-22	21	4	1.54E-07
s-23	22	4	3.25E-07
s-24	23	4	2.79E-07
s-25	24	4	1.97E-07
s-26	25	4	1.06E-07
s-27	26	4	1.09E-06

s-28	27	4	3.96E-07
s-29	28	4	1.27E-06
s-30	29	4	1.04E-06
s-31	30	4	1.31E-06
s-32	31	4	4.71E-10
s-33	32	4	3.14E-10
s-34	33	4	7.16E-10
s-35	34	4	5.11E-10
s-36	10	4	8.43E-10
s-37	14	4	8.55E-10
s-38	35	4	9.43E-10
s-39	36	4	1.08E-09
s-40	37	4	1.11E-09
s-41	3	50	5.21E-08
s-42	3	51	7.60E-08
s-43	3	52	9.39E-08
s-44	3	53	6.68E-08

实施例 5. 高亲和性 $\alpha\beta$ 异质二聚 TCR 的产生

将实施例 4 中筛选到的高亲和力的单链 TCR 的 CDR 区突变引入到 $\alpha\beta$ 异质二聚 TCR 的可变域的相应位点中，并通过 BIAcore 来检测其与 SLLMWITQC-HLA-A2 复合物的亲和力。上述 CDR 区高亲和力突变点的引入采用本领域技术人员熟知的定点突变的方法。上述野生型 TCR 的 α 链与 β 链可变域氨基酸序列分别如图 1a(SEQ ID NO:1)和 1b(SEQ ID NO:2)所示。

应注意，为获得更加稳定的可溶性 TCR，以便更方便地评估 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A2 复合物之间的结合亲和力和/或结合半衰期， $\alpha\beta$ 异质二聚 TCR 可以是在 α 和 β 链的恒定区中分别引入了一个半胱氨酸残基以形成人工链间二硫键的 TCR，本实施例中引入半胱氨酸残基后 TCR α 与 β 链的氨基酸序列分别如图 8a(SEQ ID NO:56)和 8b 所示(SEQ ID NO:57)，引入的半胱氨酸残基以加粗字母表示。

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待表达的 TCR α 和 β 链的胞外序列基因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。CDR 区的突变通过本领域技术人员熟知的重叠 PCR(overlap PCR)引入。插入片段经过测序确认无误。

实施例 6. $\alpha\beta$ 异质二聚 TCR 的表达、复性和纯化

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 $OD_{600} = 0.6$ 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。

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-mercapoethylamine (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 μM 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。

实施例 7. BIAcore 分析结果

采用实施例 3 中所述方法检测引入高亲和力 CDR 区的 αβ 异质二聚 TCR 与 SLLMWITQC-HLA-A2 复合物的亲和力。

将高亲和性单链 TCRα 与 β 链中筛选出的 CDR 区分别转移到野生型 TCRα 链可变域 SEQ ID NO:1 和 β 链可变域 SEQ ID NO:2 的相应位置, 形成 αβ 异质二聚 TCR。得到的新的 TCRα 和 β 链可变域氨基酸序列, 分别如图 9(1)-(29)和图 10(1)-(16)所示。由于 TCR 分子的 CDR 区决定了其与相应的 pMHC 复合物的亲和力, 所以本领域技术人员能够预料引入高亲和力突变点的 αβ 异质二聚 TCR 也具有对 SLLMWITQC-HLA-A2 复合物的高亲和力。利用实施例 5 中所述方法构建表达载体, 利用实施例 6 中所述方法对上述引入高亲和力突变的 αβ 异质二聚 TCR 进行表达、复性和纯化, 然后利用 BIAcore T200 测定其与 SLLMWITQC-HLA-A2 复合物的亲和力, 如下表 4 所示。

表 4

TCR 编号	TCR 可变域 (SEQ ID NO)		K _D (M)
	α	β	
1	58	2	2.90E-10
2	59	87	1.10E-11
3	60	87	1.13E-11
4	60	88	1.43E-11
5	60	89	1.35E-11
6	61	90	1.19E-11
7	62	90	6.63E-12
8	63	87	8.77E-12
9	64	91	8.41E-12
10	65	90	6.05E-12
11	66	89	9.70E-12
12	1	92	2.13E-06
13	1	93	1.72E-06
14	1	94	1.02E-06
15	1	95	1.04E-06
16	1	96	1.60E-06
17	1	97	3.01E-07
18	1	98	1.33E-07
19	67	2	9.69E-07

20	68	2	2.24E-05
21	69	2	3.26E-08
22	70	2	1.12E-07
23	71	2	3.57E-07
24	72	2	1.54E-07
25	73	2	3.10E-07
26	74	2	1.15E-07
27	75	2	5.69E-07
28	76	2	2.97E-07
29	77	2	5.90E-07
30	78	2	4.37E-07
31	79	2	6.86E-07
32	80	2	2.57E-11
33	81	2	3.80E-11
34	82	2	2.17E-11
35	83	2	4.55E-11
36	59	2	3.55E-11
37	63	2	3.03E-11
38	84	2	3.29E-11
39	85	2	5.70E-11
40	86	2	1.13E-10
41	1	99	1.59E-06
42	1	100	2.43E-06
43	1	101	1.04E-06
44	1	102	7.02E-06

由上表4可知,引入CDR区突变点的 $\alpha\beta$ 异质二聚TCR保持了对SLLMWITQC-HLA-A2复合物的高亲和力。所述异质二聚TCR的亲和力是野生型TCR对SLLMWITQC-HLA-A2复合物的亲和力的至少2倍。

5 实施例8. 抗-CD3抗体与高亲和性单链TCR的融合体的表达、复性和纯化

将本发明的高亲和性单链TCR分子与抗CD3抗体的单链分子(scFv)进行融合,构建融合分子。通过重叠(overlap)PCR的方法,设计引物,连接抗-CD3抗体及高亲和性单链TCR分子的基因,设计中间的连接短肽(linker)为GGGGS,并且使融合分子的基因片段带上限制性内切酶位点Nco I和Not I。将PCR扩增产物经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 感受态细胞,涂布含卡那霉素的LB平板,37℃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)感受态细胞,用于表达。

融合蛋白的表达

将含有目的基因的表达质粒转化入大肠杆菌菌株BL21(DE3)中,涂布LB平板(卡那霉素50 μ g/ml)置于37℃培养过夜。次日,挑克隆接种至10 ml LB液体培养基(卡那霉素50 μ g/ml)培养2-3 h,按体积比1:100接种至1L LB培养基(卡那霉素50 μ g/ml)中,继续培养至OD₆₀₀为0.5-0.8,然后使用终浓度为0.5 mM的IPTG诱导目的蛋白的表达。诱导4小时以后,以6000 rpm离心10 min收获细胞。PBS缓冲液洗涤菌体一次,并且分装菌体,取相当于200 ml

的细菌培养物的菌体用 5ml BugBuster Master Mix (Novagen)裂解细菌, 以 6000g 离心 15min 收集包涵体。然后进行 4 次洗涤剂洗涤以去除细胞碎片和膜组分。然后, 用缓冲液如 PBS 洗涤包涵体以除去洗涤剂和盐。最终, 将包涵体用含 8M 尿素的 Tris 缓冲溶液溶解, 并测定包涵体浓度, 将其分装后置于-80℃冷冻保存。

5 融合蛋白的重折叠

从-80℃超低温冰箱中取出约 10mg 包涵体解冻, 加二硫苏糖醇(DTT)至终浓度为 10 mM, 在 37 °C 中温育 30 min 到 1 小时以确保二硫键完全打开。然后将包涵体样品溶液分别滴入 200 ml 4℃预冷重折叠缓冲液(100 mM Tris pH 8.1, 400 mM L-精氨酸, 2 mM EDTA, 5 M 尿素, 6.5 mM β -mercapthoethylamine, 1.87 mM Cystamine), 4℃缓慢搅拌约 30 分钟。复性溶液用 8 倍体积预冷的 H₂O 透析 16-20 小时。再用 8 倍体积的 10 mM Tris pH 8.0 透析两次, 4℃继续透析约 8 小时, 透析后样品过滤后进行以下纯化。

融合蛋白的第一步纯化

经过透析的重折叠物(10 mM Tris pH 8.0 中)使用 POROS HQ/20 阴离子交换层析预装柱 (Applied Biosystems), 在 AKTA 纯化仪(GE Healthcare)用 0-600 mM NaCl 进行梯度洗脱。通过考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 分析各个组分, 然后合并。

融合蛋白的第二步纯化

将第一步纯化合并的样品溶液浓缩以供此步纯化, 利用在 PBS 缓冲液中预平衡的 Superdex 75 10/300 GL 凝胶过滤层析预装柱(GE Healthcare)纯化融合蛋白, 考马斯亮蓝染色的 SDS-PAGE 分析出峰的组分, 然后合并。

20

实施例 9. 抗-CD3 抗体与高亲和性 $\alpha\beta$ 异质二聚 TCR 的融合体的表达、复性和纯化

将抗-CD3 的单链抗体(scFv)与 $\alpha\beta$ 异质二聚 TCR 融合, 制备融合分子。抗-CD3 的 scFv 与 TCR 的 β 链融合, 该 TCR β 链可以包含任一上述高亲和性 $\alpha\beta$ 异质二聚 TCR 的 β 链可变域, 融合分子的 TCR α 链可以包含任一上述高亲和性 $\alpha\beta$ 异质二聚 TCR 的 α 链可变域。

25 融合分子表达载体的构建

1. α 链表达载体的构建

将携带 $\alpha\beta$ 异质二聚 TCR 的 α 链的目的基因经 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 , 涂布于含卡那霉素的 LB 平板, 37 °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 Tuner (DE3), 用于表达。

30 2. 抗-CD3(scFv)- β 链表达载体的构建

通过重叠(overlap)PCR 的方法, 设计引物将抗-CD3 scFv 和高亲和性异质二聚 TCR β 链基因连接起来, 中间的连接短肽(linker)为 GGGGS, 并且使抗-CD3 的 scFv 与高亲和性异质二聚 TCR β 链的融合蛋白的基因片段带上限制性内切酶位点 Nco I (CCATGG)和

35 Not I (GCGGCCGC)。将 PCR 扩增产物经 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 感受态细胞, 涂布含卡那霉素的 LB

平板, 37℃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 Tuner (DE3)感受态细胞, 用于表达。

融合蛋白的表达、复性及纯化

将表达质粒分别转化进入 E. coli Tuner (DE3)感受态细胞, 涂布 LB 平板(卡那霉素 50
5 $\mu\text{g/mL}$)置于 37 °C 培养过夜。次日, 挑克隆接种至 10 mL LB 液体培养基(卡那霉素 50 $\mu\text{g/mL}$)
培养 2-3 h, 按体积比 1:100 接种至 1L LB 培养基中, 继续培养至 OD₆₀₀ 为 0.5-0.8, 加入终
浓度为 1mM IPTG 诱导目的蛋白的表达。诱导 4 小时以后, 以 6000 rpm 离心 10 min 收获细
10 胞。PBS 缓冲液洗涤菌体一次, 并且分装菌体, 取相当于 200mL 的细菌培养物的菌体用 5mL
BugBuster Master Mix (Merck)裂解细菌, 以 6000 g 离心 15 min 收集包涵体。然后进行 4 次
洗涤剂洗涤以去除细胞碎片和膜组分。然后, 用缓冲液如 PBS 洗涤包涵体以除去洗涤剂和盐。
最终, 将包涵体用含 6M 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 缓冲溶液溶解, 并测定包涵体浓度, 将其分装后置于-80 °C 冷冻保存。

溶解后的 TCR α 链和抗-CD3 (scFv)- β 链以 2:5 的质量比快速混合于 5 M 尿素(urea), 0.4
M L-精氨酸(L-arginine), 20 mM Tris pH 8.1, 3.7 mM cystamine, 6.6 mM β -mercapoethylamine
15 (4 °C), 终浓度 α 链和抗-CD3 (scFv)- β 链分别为 0.1 mg/mL, 0.25 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(10
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 μm 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 TCR α 链与抗-CD3
(scFv)- β 链二聚体的 TCR 通过 SDS-PAGE 胶确认。TCR 融合分子随后通过尺寸排阻色谱法(S-100
20 16/60, GE healthcare)进一步纯化, 以及阴离子交换柱(HiTrap Q HP 5ml, GE healthcare)再次纯化。
纯化后的 TCR 融合分子纯度经过 SDS-PAGE 测定大于 90%, 浓度由 BCA 法测定。

实施例 10. 转染本发明高亲和力 TCR 的效应细胞的激活功能实验

本实施例验证了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。

25 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。本实施例 IFN- γ ELISPOT 实验用从健康
志愿者的血液中分离到的 CD8⁺ T 细胞细胞经慢病毒转染 TCR 作为效应细胞, 分别标号
TCR1(α 链可变域 SEQ ID NO:67, β 链可变域 SEQ ID NO:2)和 TCR2(α 链可变域 SEQ ID
NO:68, β 链可变域 SEQ ID NO:2)对照组效应细胞标号为 WT-TCR(转染野生型 TCR)和
30 GFP(转染 GFP)。靶细胞系为 A375、Mel624、Mel526 和 NCI-H1650 细胞。其中, 靶细胞系
A375 和 Mel624 表达相关抗原, Mel526 和 NCI-H1650 不表达相关抗原作为对照。

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, 按以下顺序将试验的各个组分加入
ELISPOT 平板: 培养基调整效应细胞至 1×10^5 个细胞/毫升, 培养基调整各靶细胞系至 $2 \times$
35 10^5 个细胞/毫升。混合均匀后取 100 μL 靶细胞系 2×10^5 个细胞/毫升(即 20, 000 个细胞/孔)、
100 μL 效应细胞 1×10^5 个细胞/毫升(即 10,000 个细胞/孔)加入对应孔中, 并设置二个复孔。

温育过夜(37 °C, 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 13 所示, 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。

实施例 11. 转染本发明高亲和力 TCR 的效应细胞的杀伤功能实验

- 5 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)转化为红色的甲臢(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。
- 10 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。本实施例 LDH 实验用从健康志愿者的血液中分离到的 PBL 细胞经慢病毒转染 TCR 作为效应细胞。靶细胞系为 A375(3525)、MEL624 (1605)、NCI-H1650(2) 和 MEL526 (4)细胞。其中, A375(3525)和 MEL624(1605)表达 NY-ESO-1 抗原。NCI-H1650(2) 和 MEL526(4)基本不表达 NY-ESO-1 抗原, 以此作为对照。
- 15 首先准备 LDH 平板。实验第 1 天, 按以下顺序将试验的各个组分加入平板: 培养基调整效应细胞至 2×10^6 个细胞/毫升, 培养基调整各靶细胞系至 5×10^5 个细胞/毫升。混合均匀后取 100 μ L 靶细胞系 5×10^5 个细胞/毫升(即 50, 000 个细胞/孔)、100 μ L 效应细胞 2×10^6 个细胞/毫升(即 200,000 个细胞/孔)加入对应孔中, 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 °C, 5% CO₂)。实验第 2 天, 检测显色, 终止反应后用酶标仪(Biotek)在 490nm 记录吸光值。实验结果如图 14 所示, 转导本发明 TCR 的细胞对表达相关抗原的靶细胞具有很强的杀伤作用, 而对不表达相关抗原的靶细胞基本没有杀伤作用。
- 20

实施例 12. 本发明高亲和力 TCR 与抗-CD3 抗体的融合蛋白的功能实验

- 25 本实施例验证了本发明高亲和力 TCR 与抗-CD3 抗体的融合蛋白能够重定向效应细胞, 并具有很好的激活作用。
- 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从健康志愿者的血液中分离到的 CD8⁺ T 细胞, 靶细胞系为 IM9 和 293T, 其中 IM9 表达相关抗原, 293T 不表达相关抗原。随机选择本发明的高亲和力 TCR, 按实施例 8 中所述制备融合蛋白, 具体地, 所选的高亲和力 TCR 的 α 与 β 链如下:
- 30 α 链 SEQ ID NO:14, β 链 SEQ ID NO:38; α 链 SEQ ID NO:17, β 链 SEQ ID NO:40; α 链 SEQ ID NO:13, β 链 SEQ ID NO:41; α 链 SEQ ID NO:11, β 链 SEQ ID NO:40; α 链 SEQ ID NO:15, β 链 SEQ ID NO:42; α 链 SEQ ID NO:16, β 链 SEQ ID NO:41; α 链 SEQ ID NO:11, β 链 SEQ ID NO:38; α 链 SEQ ID NO:11, β 链 SEQ ID NO:39; α 链 SEQ ID NO:10, β 链 SEQ ID NO:38;
- 35 α 链 SEQ ID NO:12, β 链 SEQ ID NO:41。

首先准备 ELISPOT 平板。ELISPOT 平板乙醇活化包被, 4°C 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，按以下顺序将试验的各个组分加入 ELISPOT 平板：培养基调整 CD8⁺ T 细胞至 2×10^4 个细胞/毫升，培养基调整各靶细胞系至 2×10^5 个细胞/毫升，培养基将融合蛋白稀释至浓度为 0.04 μ M，逐一 10 倍梯度稀释，共 6 个浓度梯度。混合均匀后取 50 μ L 融合蛋白稀释液、50 μ L 靶细胞系 2×10^5 个细胞/毫升(即 10,000 个细胞/孔)、100 μ L 效应细胞 2×10^4 个细胞/毫升(即 2,000 个效应细胞/孔)加入对应孔中，并设置二个复孔。温育过夜(37 $^{\circ}$ C, 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 15a 和 15b 所示，本发明高亲和力 TCR 与抗-CD3 抗体的融合蛋白能够重定向效应细胞，并具有很好的激活作用。

10

实施例 13. 本发明高亲和力 TCR 分子的体内效力

将本发明高亲和力 TCR 转染的 T 细胞注射进入黑色素瘤异种移植模型的小鼠体内，检测其在体内对肿瘤的抑制效果。

实验采用 NSG 小鼠(南京大学-南京生物医药研究院)(雌性，实验周龄 6-8 周)作为实验对象，实验开始前 10 天以培养后收集并混悬好的 A375 肿瘤细胞(ATCC)悬液按 3×10^6 个/只(注射体积 200 μ L)的数量对小鼠进行腹部单侧皮下注射，建立人黑色素瘤异种移植小鼠模型。

实验开始当天用游标卡尺对每只小鼠已成型肿瘤的长径(a)、短径(b)分别进行测量，并按如下公式计算肿瘤体积： $V = a \times b^2 / 2$ ；随后根据分组设置：PBS 组 5 只、对照组(转染无关 TCR 的 T 细胞)7 只、转染 TCR1(α 链可变域 SEQ ID NO:67, β 链可变域 SEQ ID NO:2)的 T 细胞组 10 只和转染 TCR2(α 链可变域 SEQ ID NO:68, β 链可变域 SEQ ID NO:2)的 T 细胞组 10 只，按肿瘤体积对小鼠进行随机分组。分组完毕后取已制备好的 T 细胞按 1×10^7 个/只分别对上述分组小鼠进行尾部静脉注射，PBS 组小鼠尾部静脉注射 100 μ L PBS。

TCR-T 细胞注射后，再取制备好的 IL-2 溶液(50000IU/100UL)对每只小鼠腹腔注射 100 μ L，随后 4 天每天连续注射等量 IL-2 溶液。自实验开始，按上述方法每 3 天测量一次小鼠肿瘤瘤径和计算体积，持续至小鼠因肿瘤过大影响行动或者肿瘤消退为止，整理以上数据对每组小鼠肿瘤体积作数据统计分析处理。

所得实验结果如图 16 所示，注射了转染本发明高亲和力 TCR 的 T 细胞的小鼠组，肿瘤的生长明显受到抑制并且呈现缩小的趋势，而注射了转染无关 TCR 的 T 细胞组以及注射 PBS 组的小鼠组的肿瘤体积增长依然很快。

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。

35