一种接近天然分子的多肽融合分子

技术领域

本发明涉及生物医学或生物制药技术领域，更具体地涉及一种接近天然分子的多肽融合分子。

背景技术

蛋白分子在细胞和机体中发挥各种生理功能。其中包括抗体，T细胞受体，酶和各种细胞因子等。目前大多数生物药大分子均由抗体分子通过各种蛋白工程手段演变而来。当组合多个蛋白结构域在一起时，最常用的方法就是利用一个蛋白结构域的C端通过柔性肽接上另一结构域的N端。比如scFv是通过柔性肽将抗体的重链可变区和轻链可变区连接，以形成单链抗体。柔性肽的最大的作用是使重链和相应的轻链表达成单一的多肽长链分子，以方便表达和下游的制备处理等。但该结构抗体成药后会有产生免疫源性的风险，因此这类生物药亟待一种能生成接近天然状态分子的方法避免上述风险。

发明内容

本发明的目的是为了获得一种接近天然状态的多结构域融合蛋白复合分子。组成这些接近天然状态的多结构域融合蛋白复合分子的各元件，例如结构如式Ia或Ib所示的融合蛋白、元件A2、元件B2经过混合后可以形成具有生物学功能的多结构域融合蛋白复合分子。

本发明的第一方面，提供了一种融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白包含从N端到C端的结构如式Ia或Ib所示的多肽：

A1-L-B (Ia)；

B-L-A1 (Ib)；

其中，

元件A1为无免疫效应的多肽分子；

元件B为特异性结合pMHC表位的多肽受体分子或其组成部分、或其片段；

元件L为柔性接头；所述柔性接头是可选择的；

“-”为共价键。

在一些具体实施方式中，公开了一种融合蛋白，所述融合蛋白从N端到C端的结构如式Ia或Ib所示：

A1-L-B (Ia)；

B-L-A1 (Ib)；

其中，

元件A1为无免疫效应的多肽分子；

元件B为特异性结合pMHC表位的多肽受体分子或其组成部分、或其片段；

元件L为柔性接头；

“-”为共价键。

在一些具体实施方式中，所述融合蛋白从N端到C端的结构如式Ia所示。

在一些具体实施方式中，所述融合蛋白中，B(特异性结合pMHC表位的多肽受体分子或其组成部分、或其片段)的N末端与A1(例如无免疫效应的抗体单链分子)的C末端连接。

在一些具体实施方式中，所述的柔性接头为肽接头。

在一些具体实施方式中，所述的肽接头具有1-50个氨基酸，较佳地1-20个氨基酸，较佳地1-10个氨基酸，更佳地1-6个氨基酸。

在一些具体实施方式中，所述的肽接头具有(GGGGS)n的结构，其中n为1-5的正整数。

在一些具体实施方式中，所述的肽接头为GGGGS(SEQ ID No: 9)。

在一些具体实施方式中，所述元件A1选自抗体的重链可变区或抗体的轻链可变区。

在一些具体实施方式中，所述抗体具备结合T细胞表面分子的特性。

在一些具体实施方式中，所述抗体可以是UCHT1，OK3，12F6等，或这些抗体的突变分子，所述突变分子的氨基酸序列与野生型的相应分子的氨基酸序列相比具有至少95%以上、98%以上、99%以上、99.9%以上一致性的序列。

在一些具体实施方式中，根据Kabat编号系统，所述抗体的重链可变区44位的氨基酸突变为半胱氨酸(Cys)；所述抗体的轻链可变区100位的氨基酸突变为半胱氨酸(Cys)。

在一些具体实施方式中，根据Kabat编号系统，所述抗体的重链可变区105位的氨基酸突变为半胱氨酸(Cys)；所述抗体的轻链可变区43位的氨基酸突变为半胱氨酸(Cys)。

在一些具体实施方式中，所述抗体中，用半胱氨酸(Cys)取代所述的抗体重链的可变区44位(Kabat 计数系统，以下同)的氨基酸例如甘氨酸(Gly)和抗体轻链的可变区100位的氨基酸例如谷氨酰胺(Gln)。

在一些具体实施方式中，所述抗体中，用半胱氨酸(Cys)取代所述的抗体重链的可变区105位的氨基酸例如谷氨酰胺(Gln)和抗体轻链的可变区43位的氨基酸例如丙氨酸(Ala)。

在一些具体实施方式中，所述元件A1不结合或可结合T细胞表面抗原例如CD3抗

原，但不激活T细胞。

在一些具体实施方式中，所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列包含如SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 20或SEQ ID NO: 5所示的序列。

在一些具体实施方式中，所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列包含如SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 22或SEQ ID NO: 10所示的序列。

在一些具体实施方式中，所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列为如SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 20或SEQ ID NO: 5所示的序列。

在一些具体实施方式中，所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列为如SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 22或SEQ ID NO: 10所示的序列。

在一些具体实施方式中，所述元件B选自下组：TCR分子、单链α β TCR、TCRα链/TCRβ链异二聚体复合分子、抗体分子Fab复合分子、单链抗体分子、或其组合。

在一些具体实施方式中，所述元件B由B1和B2通过二硫键组合而成，其中B1为TCRα链，B2为TCRβ链；或者B1为TCRβ链，B2 TCRα链。

在一些具体实施方式中，所述异二聚体的α链或β链的N末端，或单链α βTCR的N末端，或TCRα链的N末端，或TCRβ链的N末端，或抗体分子Fab的重链或轻链的N末端，或单链抗体分子的N末端，与无免疫效应的抗体单链分子的C末端氨基酸连接。

在一些具体实施方式中，所述融合蛋白的元件B(即特异性结合pMHC表位的多肽受体分子或其组成部分、或其片段)特异性结合pMHC，元件A1(即无免疫效应的抗体单链分子)不能结合T细胞的抗原分子，或者可结合T细胞的抗原分子，但不能有效地诱导T细胞活化或产生生理效应。

在一些具体实施方式中，所述融合蛋白与游离的另一无免疫效应的多肽结构域分子A2混合时，所述融合蛋白与A2形成融合蛋白-A2复合分子，所述融合蛋白-A2复合分子重定向T细胞，并可有效地使该重定向的T细胞活化和产生免疫生理效应。

在一些具体实施方式中，所述的TCR分子是异二聚体α β TCR多肽对，其中所述α和β多肽各自含有TCR可变区和恒定区，但没有TCR跨膜区和胞内区。

在一些具体实施方式中，所述的TCR分子的α和β多肽的恒定区通过用半胱氨酸(Cys)取代TRAC*01的外显子1中的第47位苏氨酸(Thr)和TRBC*01或TRBC*02的外显子1中的第56位丝氨酸(Ser)形成的二硫键连接。

在一些具体实施方式中，所述的TCR分子的α和β多肽的恒定区通过用半胱氨酸(Cys)取代TRAC*01的外显子1中的IMTG排序法的第52位精氨酸(Arg)和TRBC*01或TRBC*02的外显子1中的第53位丝氨酸(Ser)形成的二硫键连接。

在一些具体实施方式中，所述的TCR分子的α和β多肽的恒定区通过用半胱氨酸(Cys)取代TRAC*01的外显子1中的IMTG排序法的第88位脯氨酸(Pro)和TRBC*01或TRBC*02的外显子1中的第18位丙氨酸(Ala)形成的二硫键连接。

在一些具体实施方式中，所述的TCR分子的α和β多肽的恒定区通过用半胱氨酸

(Cys)取代TRAC*01的外显子1中的IMTG排序法的第9位酪氨酸(Tyr)和TRBC*01或TRBC*02的外显子1中的第19位谷氨酸(Glu)形成的二硫键。

在一些具体实施方式中，所述TRAC*01的氨基酸序列如SEQ ID NO:34所示。

在一些具体实施方式中，所述TRBC*01的氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示。

在一些具体实施方式中，所述TRBC*02的氨基酸序列如SEQ ID NO:36所示。

在一些具体实施方式中，所述的TCRα链氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

在一些具体实施方式中，所述的TCRβ链氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

在一些具体实施方式中，所述融合蛋白的氨基酸序列包含如SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:32所示的序列，或者与SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:32具有至少95%以上、98%以上、99%以上、99.9%以上一致性的序列。

在一些具体实施方式中，所述融合蛋白的氨基酸序列为如SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:32所示的序列，或者与SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:32具有至少95%以上、98%以上、99%以上、99.9%以上一致性的序列。

本发明的第二方面，提供了一种融合蛋白复合分子，所述融合蛋白复合分子从N端到C端的结构如式Ic或Id所示：

A2…A1-L-B (Ic)；

B-L-A1…A2 (Id)；

其中，

元件A1、A2各自独立地为无免疫效应的多肽分子；

元件B为特异性结合pMHC表位的多肽受体分子或其组成部分、或其片段；和

元件L为柔性接头；

“-”为共价键；

“…”为二硫键或蛋白结构域间的非共价相互作用。

在一些具体实施方式中，所述“…”为二硫键。

在一些具体实施方式中，所述元件A1、A2各自独立地选自下组：抗体的重链可变区、抗体的轻链可变区。例如，所述元件A1为抗体的重链可变区，且所述A2元件为抗体的轻链可变区；或者，所述元件A1为抗体的轻链可变区，且所述A2元件为抗体的重链可变区。本发明所述抗体可以是UCHT1，OK3，12F6等，或这些抗体的突变分子，所述突变分子的氨基酸序列与野生型的相应分子的氨基酸序列相比具有至少95%以上、98%以上、99%以上、99.9%以上一致性的序列。

在一些具体实施方式中，所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列包含如SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 20或SEQ ID NO: 5所示的序列。

在一些具体实施方式中，所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列包含如SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 22或SEQ ID NO: 10所示的序列。

在一些具体实施方式中，所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列为如SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 20或SEQ ID NO: 5所示的序列。

在一些具体实施方式中，所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列为如SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 22或SEQ ID NO: 10所示的序列。

在一些具体实施方式中，所述元件B可包含选自下组：TCR分子、单链α β TCR、TCRα链、TCRβ链、抗体分子Fab、单链抗体分子、或其组合。

在一些具体实施方式中，所述的TCRα链氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

在一些具体实施方式中，所述的TCRβ链氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

在一些具体实施方式中，所述元件B为TCR分子，所述TCR分子的TCRα链氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示，TCRβ链氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

在一些具体实施方式中，所述元件B为TCR分子，所述TCR分子的TCRα链氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示，TCRβ链氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示，且所述元件A1通过L偶联于TCRβ链的N末端。

在一些具体实施方式中，所述元件L包含如(GGGGS)n的结构，其中n为1-5的正整数，优选包含如SEQ ID NO:9所示的序列。

本发明的第三方面，提供了一种多核苷酸，所述多核苷酸编码本发明第一方面所述的融合蛋白或本发明第二方面所述的融合蛋白复合分子。

在一些具体实施方式中，所述多核苷酸编码选自下组的蛋白质或多肽：本发明第一方面所述的融合蛋白、元件A1、元件A2、元件B(包括B1、B2)、单链α β TCR、TCRα链、TCRβ链、抗体分子Fab、或单链抗体分子。

在一些具体实施方式中，所述多核苷酸具有如SEQ ID NO:2、4、15、17、19、21、23、25、27、29、6、8、11、13、31或33所示的核苷酸序列。

在一些具体实施方式中，所述多核苷酸具有如SEQ ID NO:19、SEQ ID NO:25、SEQ ID NO:27、SEQ ID NO:29、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:13或SEQ ID NO:33所示的核苷酸序列。

在一些具体实施方式中，所述的多核苷酸包括DNA或RNA。

本发明的第四方面，提供了一种表达载体，所述表达载体含有本发明第三方面所述的多核苷酸。

在一些具体实施方式中，所述的表达载体选自下组：DNA、RNA、病毒载体、质粒、转座子、其他基因转移系统、或其组合。

优选地，所述表达载体包括病毒载体，如慢病毒、腺病毒、AAV病毒、逆转录病毒、或其组合。

本发明的第五方面，提供了一种宿主细胞，所述宿主细胞含有本发明第四方面所述的表达载体，或其基因组中整合有本发明第三方面所述的多核苷酸。

在一些具体实施方式中，所述的宿主细胞包括原核细胞或真核细胞。

在一些具体实施方式中，所述的宿主细胞选自下组：大肠杆菌、酵母细胞、哺乳动物细胞、噬菌体、或其组合。

在一些具体实施方式中，所述原核细胞选自下组：大肠杆菌、枯草杆菌、乳酸菌、链霉菌、奇异变形菌、或其组合。

在一些具体实施方式中，所述真核细胞选自下组：毕赤酵母、酿酒酵母、裂殖酵母、木霉、或其组合。

在一些具体实施方式中，所示真核细胞选自下组：草地粘虫等昆虫细胞、烟草等植物细胞、BHK细胞、CHO细胞、COS细胞、骨髓瘤细胞、或其组合。

在一些具体实施方式中，所述宿主细胞优选为哺乳动物细胞，更优选HEK293细胞、CHO细胞、BHK细胞、NSO细胞或COS细胞。

在一些具体实施方式中，所述的宿主细胞为毕赤酵母。

本发明的第六方面，提供了一种产生本发明第一方面所述融合蛋白或本发明第二方面所述融合蛋白复合分子的方法，包括步骤：

(a)在适合产生本发明第一方面所述融合蛋白或本发明第二方面所述融合蛋白复合分子的条件下，培养本发明第五方面所述的宿主细胞，从而获得含所述融合蛋白或所述融合蛋白复合分子的培养物；

(b)从所述培养物中分离或回收所述的融合蛋白或融合蛋白复合分子；以及

(c)任选地，纯化和/或修饰步骤(b)中获得的融合蛋白或融合蛋白复合分子。

在一些具体实施方式中，所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:32。

本发明的第七方面，提供了一种免疫偶联物，该免疫偶联物含有：

(a)本发明第一方面所述的融合蛋白或本发明第二方面所述的融合蛋白复合分子；和

(b)选自下组的偶联部分：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、金纳米颗粒/纳米棒、纳米磁粒、病毒外壳蛋白或VLP、或其组合。

在一些具体实施方式中，所述的放射性核素包括：

(i) 诊断用同位素，所述的诊断用同位素选自下组：Tc-99m、Ga-68、F-18、I-123、

I-125、I-131、In-111、Ga-67、Cu-64、Zr-89、C-11、Lu-177、Re-188、或其组合；和/或

(ii) 治疗用同位素，所述的治疗用同位素选自下组：Lu-177、Y-90、Ac-225、As-211、Bi-212、Bi-213、Cs-137、Cr-51、Co-60、Dy-165、Er-169、Fm-255、Au-198、Ho-166、I-125、I-131、Ir-192、Fe-59、Pb-212、Mo-99、Pd-103、P-32、K-42、Re-186、Re-188、Sm-153、Ra223、Ru-106、Na24、Sr89、Tb-149、Th-227、Xe-133、Yb-169、Yb-177、或其组合。

在一些具体实施方式中，所述偶联部分为药物或毒素。

在一些具体实施方式中，所述的药物为细胞毒性药物。

在一些具体实施方式中，所述的细胞毒性药物选自下组：抗微管蛋白药物、DNA小沟结合试剂、DNA复制抑制剂、烷化试剂、抗生素、叶酸拮抗物、抗代谢药物、化疗增敏剂、拓扑异构酶抑制剂、长春花生物碱、或其组合。

在一些具体实施方式中，特别有用的细胞毒性药物的例子包括，例如，DNA小沟结合试剂、DNA烷基化试剂、和微管蛋白抑制剂、典型的细胞毒性药物包括、例如奥瑞他汀(auristatins)、喜树碱(camptothecins)、多卡霉素/倍癌霉素(duocarmycins)、依托泊甙(etoposides)、美登木素(maytansines)和美登素类化合物(maytansinoids)(例如DM1和DM4)、紫杉烷(taxanes)、苯二氮卓类(benzodiazepines)或者含有苯二氮卓的药物(benzodiazepine containing drugs)(例如吡咯并[1,4]苯二氮卓类(PBDs)，吲哚啉苯并二氮卓类(indolinobenzodiazepines)和噁唑烷并苯并二氮卓类(oxazolidinobenzodiazepines))、长春花生物碱(vinca alkaloids)、或其组合。

在一些具体实施方式中，所述的毒素选自下组：耳他汀类(例如，耳他汀E、耳他汀F、MMAE和MMAF)、金霉素、类美坦西醇、篦麻毒素、篦麻毒素A-链、考布他汀、多卡米星、多拉司他汀、阿霉素、柔红霉素、紫杉醇、顺铂、cc1065、溴化乙锭、丝裂霉素、依托泊甙、替诺泊甙(tenoposide)、长春新碱、长春碱、秋水仙素、二羟基炭疽菌素二酮、放线菌素、白喉毒素、假单胞菌外毒素(PE)A、PE40、相思豆毒素、相思豆毒素A链、蒴莲根毒素A链、α-八叠球菌、白树毒素、迈托毒素(mitogellin)、局限曲菌素(retstrictocin)、酚霉素、依诺霉素、麻疯树毒蛋白(curicin)、巴豆毒素、卡奇霉素、肥皂草(Sapaonaria officinalis)抑制剂、糖皮质激素、或其组合。

在一些具体实施方式中，所述偶联部分为可检测标记物。

在一些具体实施方式中，所述偶联部分选自下组：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、放射性核素、生物毒素、细胞因子(如IL-2等)、抗体、抗体Fc片段、抗体scFv片段、金纳米颗粒/纳米棒、病毒颗粒、脂质体、纳米磁粒、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))或任何形式的纳米颗粒。

本发明的第八方面，提供了一种药物组合物，所述药物组合物含有：

(i)如本发明第一方面所述的融合蛋白、如本发明第二方面所述的融合蛋白复合分子、如本发明第三方面所述的多核苷酸、如本发明第四方面所述的表达载体、如本发明第五方面所述的宿主细胞或如本发明第七方面所述的免疫偶联物，或其组合；

(ii)任选地，元件A2；以及

(iii)药学上可接受的载体。

在一些具体实施方式中，所述元件A2选自下组：抗体的重链可变区、抗体的轻链可变区，或其组合。

在一些具体实施方式中，所述的免疫偶联物的偶联部分为药物、毒素、和/或治疗用同位素。

在一些具体实施方式中，所述的药物组合物为注射剂型。

在一些具体实施方式中，所述的药物组合物中还含有治疗肿瘤的其他药物。

在一些具体实施方式中，所述的药物组合物用于制备预防和/或治疗肿瘤的药物。

本发明的第九方面，提供了一种治疗疾病的方法，所述方法包括，给需要的对象施用如本发明第一方面所述的融合蛋白、如本发明第二方面所述的融合蛋白复合分子、如本发明第七方面所述的免疫偶联物、如本发明第八方面所述的药物组合物。

在一些具体实施方式中，所述的对象包括哺乳动物，如人、狨猴。

本发明的第十方面，提供了一种重组蛋白，所述的重组蛋白具有：

(i) 如本发明第一方面所述的融合蛋白、如本发明第二方面所述的融合蛋白复合分子；以及

(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

在一些具体实施方式中，所述的标签序列包括Fc标签、HA标签和6His标签。

本发明的第十一方面，提供了如本发明第一方面所述的融合蛋白、如本发明第二方面所述的融合蛋白复合分子、如本发明第三方面所述的多核苷酸、如本发明第四方面所述的表达载体、如本发明第五方面所述的宿主细胞、如本发明第七方面所述的免疫偶联物、如本发明第八方面所述的药物组合物、如本发明第十方面所述的重组蛋白的用途，用于制备在受试者中预防和/或治疗肿瘤的药物。

在一些具体实施方式中，所述肿瘤包括但不限于：乳腺癌、肺癌、肝癌，或其组合。

在一些具体实施方式中，所述受试者是哺乳动物，优选为人。

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

图1a显示了1G4 TCR α链的氨基酸序列(SEQ ID No: 1)。

图1b显示了1G4 TCR α链的核酸序列(SEQ ID No: 2)。

图2a显示了1G4 TCR β链的氨基酸序列(SEQ ID No: 3)。

图2b显示了1G4 TCR β链的核酸序列(SEQ ID No: 4)。

图3a显示了抗体重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID No: 5)。

图3b显示了抗体重链可变区的核酸序列(SEQ ID No: 6)。

图4a显示了1G4 TCR β链N-末端融合抗体重链可变区的氨基酸序列(SEQ ID No: 7)。

图4b显示了1G4 TCR β链N-末端融合抗体重链可变区的核酸序列(SEQ ID No: 8)。

图5显示了多肽接头的氨基酸序列(SEQ ID No: 9)。

图6a显示了抗体轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID No: 10)。

图6b显示了抗体轻链可变区的核酸序列(SEQ ID No: 11)。

图7a显示了1G4 TCR β链N-末端融合抗体轻链可变区的氨基酸序列(SEQ ID No: 12)。

图7b显示了1G4 TCR β链N-末端融合抗体轻链可变区的核酸序列(SEQ ID No: 13)。

图8a显示了抗体重链可变区的氨基酸序列中Gly44Cys取代后的序列(SEQ ID No: 14)。

图8b显示了图8a所示序列(即SEQ ID No: 14)的编码核酸序列(SEQ ID No: 15)。

图9a显示了抗体轻链可变区的氨基酸序列中Gln100Cys取代后的序列(SEQ ID No: 16)。

图9b显示了图9a所示序列(即SEQ ID No: 16)的编码核酸序列(SEQ ID No: 17)。

图10a显示了1G4 TCR β链N-末端融合抗体重链可变区的氨基酸序列中Gly44Cys取代后的序列(SEQ ID No: 18)

图10b显示了图10a所示序列(即SEQ ID No: 18)的编码核酸序列(SEQ ID No: 19)。

图11a显示了抗体重链可变区的氨基酸序列中Gln105Cys取代后的序列(SEQ ID No: 20)。

图11b显示了图11a所示序列(即SEQ ID No: 20)的编码核酸序列(SEQ ID No: 21)。

图12a显示了抗体轻链可变区的氨基酸序列中Ala43Cys取代后的序列(SEQ ID No: 22)。

图12b显示了图12a所示序列(即SEQ ID No: 22)的编码核酸序列(SEQ ID No: 23)。

图13a显示了1G4 TCR β链N-末端融合抗体重链可变区的氨基酸序列中Gln105Cys取代后的序列(SEQ ID No: 24)。

图13b显示了图13a所示序列(即SEQ ID No: 24)的编码核酸序列(SEQ ID No: 25)。

图14a显示了1G4 TCR β链N-末端融合抗体轻链可变区的氨基酸序列中Ala43Cys取代后的序列(SEQ ID No: 26)。

图14b显示了图14a所示序列(即SEQ ID No: 26)的编码的核酸序列(SEQ ID No: 27)。

图15a显示了1G4 TCR β链N-末端融合抗体轻链可变区的氨基酸序列中Gln100Cys取代后的序列(SEQ ID No: 28)。

图15b显示了图15a所示序列(即SEQ ID No: 28)的编码核酸序列(SEQ ID No: 29)。

图16a显示了AFP TCR α链的氨基酸序列(SEQ ID No: 30)。

图16b显示了AFP TCR α链的核酸序列(SEQ ID No: 31)。

图17a显示了AFP TCR β链N-末端融合抗体重链可变区的氨基酸序列中Gln105Cys取代后的序列(SEQ ID No: 32)。

图17b显示了图17a所示序列(即SEQ ID No: 32)的编码核酸序列(SEQ ID No: 33)。

图18显示了TRAC*01的氨基酸序列(SEQ ID No: 34)。

图19显示了TRBC*01的氨基酸序列(SEQ ID No: 35)。

图20显示了TRBC*02的氨基酸序列(SEQ ID No: 36)。

图21显示了1G4 TCR结合表位NY-ESO-1(157-165)(SEQ ID No: 37)。

图22显示了AFP TCR结合表位 AFP(158-166) (SEQ ID No: 38)。

图23显示了VH-TCRβ形式双结构域融合蛋白示意图。

图24显示了VL-TCRβ形式双结构域融合蛋白示意图。

图25显示了VH44-TCRβ形式三结构域融合分子示意图。

图26显示了VH105-TCRβ形式三结构域融合分子示意图。

图27显示了VL43-TCRβ形式三结构域融合分子示意图。

图28显示了VL100-TCRβ形式三结构域融合分子示意图。

图29显示了VH-TCRβ与VL-TCRβ形式双结构域融合蛋白SDS-PAGE图。

图30显示了VH44-TCRβ与VH105-TCRβ形式三结构域融合分子SDS-PAGE图。

图31显示了VL43-TCRβ与VL100-TCRβ形式三结构域融合分子SDS-PAGE图。

图32显示了AFP VH105-TCRβ形式三结构域融合分子SDS-PAGE图。

图33a显示了LDH法检测1G4双结构域融合分子(VH-TCRβ，VL-TCRβ形式)介导CD8+细胞杀伤MDA-MB-231(A2阳性，NY-ESO-1阴性，乳腺癌细胞系)。

图33b显示了LDH法检测1G4双结构域融合分子(VH-TCRβ，VL-TCRβ形式)介导CD8+细胞杀伤MDA-MB-231(A2阳性，NY-ESO-1阳性，乳腺癌细胞系)。

图34a显示了LDH法检测1G4双结构域融合分子(VH-TCRβ，VL-TCRβ形式)介导CD8+细胞杀伤NCI-H1299-A2(NY-ESO-1阳性，A2阴性)肺癌细胞系。

图34b显示了LDH法检测1G4双结构域融合分子(VH-TCRβ，VL-TCRβ形式)介导CD8+细胞杀伤NCI-H1299-A2(NY-ESO-1阳性，A2阳性)肺癌细胞系。

图35a显示了LDH法检测1G4多结构域融合分子(VH44-TCRβ，VH105-TCRβ，VL43-TCRβ，VL100-TCRβ形式)介导CD8+细胞杀伤NCI-H1299-A2(NY-ESO-1阳性，A2阳性)肺癌细胞系。

图35b显示了LDH法检测1G4多结构域融合分子(VH44-TCRβ，VH105-TCRβ，VL43-TCRβ，VL100-TCRβ形式)介导CD8+细胞杀伤NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阴性)肺癌细胞系。

图36a显示了LDH法检测1G4多结构域融合分子(VH44-TCRβ，VH105-TCRβ)介导CD8+细胞杀伤MDA-MB-231(A2阳性，NY-ESO-1阳性，乳腺癌细胞系)。

图36b显示了LDH法检测1G4多结构域融合分子(VH44-TCRβ，VH105-TCRβ)介导CD8+细胞杀伤MDA-MB-231(A2阳性，NY-ESO-1阴性，乳腺癌细胞系)。

图37显示了LDH法检测AFP多结构域融合分子(VH105-TCRβ形式)介导CD8+细胞杀伤HepG2(A2阳性，AFP阳性，肝癌细胞系)和NCI-H1299-A2(A2阳性，AFP阴性，肺癌细胞系)。

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入地研究，经过大量的筛选，首次意外地发现一类由无免疫效应的抗体单链分子A1和特异性结合pMHC表位的多肽受体分子或其组成部分、或其片段B通过L偶联形成的融合蛋白(例如从N端到C端的结构如式Ia或Ib所示的融合蛋白)，所述融合蛋白与元件A2(优选地无免疫效应的元件A2)经过简单混合后可以形成具有双重生物学功能的融合蛋白复合分子(例如从N端到C端的结构如式Ic或Id所示融合蛋白复合分子)，该融合蛋白复合分子为接近天然状态的多结构域融合分子，不需要或仅需要较短的肽段(例如5个氨基酸GGGGS)连接元件A1(优选地无免疫效应的元件A1)和特异性结合pMHC抗原的元件B即可，可以避免传统融合蛋白中引入人工柔性肽链(通常大于5个氨基酸)将各结构域连接成单一多肽分子而可能存在免疫源性的风险。本发明融合蛋白复合分子生成简便，接近天然状态。由此完成了本发明。

具体地，本发明中，发明人将突变后的无免疫效应的抗体重链可变区VH或无免疫效应的抗体轻链可变区VL通过GGGGS偶联于TCR β链的N末端，然后与TCR α链混合在合适的条件下形成融合蛋白，但不能诱发T细胞活化。然而当上述分子与无免疫效应的抗体轻链可变区VL或无免疫效应的抗体重链可变区VH混合，经还原、复性、透析即可得到另一种融合蛋白复合分子。实验结果表明，所述融合蛋白复合分子具备能重定向$CD8^+$T细胞以杀伤多种肿瘤细胞的能力(例如MDA-MB-231乳腺癌细胞系、NCI-H1299

肺癌细胞系和HepG2肝癌细胞系等)。

术语

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相同含义。

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。

抗体

如本文所用，术语“抗体”或“免疫球蛋白”是有相同结构特征的约150000道尔顿的异四聚糖蛋白，其由两个相同的轻链(L)和两个相同的重链(H)组成。每条轻链通过一个共价二硫键与重链相连，而不同免疫球蛋白同种型的重链间的二硫键数目不同。每条重链和轻链也有规则间隔的链内二硫键。每条重链的一端有可变区(VH)，其后是多个恒定区。每条轻链的一端有可变区(VL)，另一端有恒定区；轻链的恒定区与重链的第一个恒定区相对，轻链的可变区与重链的可变区相对。特殊的氨基酸残基在轻链和重链的可变区之间形成界面。

如本文所用，术语“可变”表示抗体中可变区的某些部分在序列上有所不同，它形成了各种特定抗体对其特定抗原的结合和特异性。然而，可变性并不均匀地分布在整个抗体可变区中。它集中于轻链和重链可变区中称为互补决定区(CDR)或超变区中的三个片段中。可变区中较保守的部分称为构架区(FR)。天然重链和轻链的可变区中各自包含四个FR区，它们大致上呈b-折叠构型，由形成连接环的三个CDR相连，在某些情况下可形成部分b折叠结构。每条链中的CDR通过FR区紧密地靠在一起并与另一链的CDR一起形成了抗体的抗原结合部位(参见Kabat等, NIH Publ. No. 91-3242, 卷I，647-669页(1991))。恒定区不直接参与抗体与抗原的结合，但是它们表现出不同的效应功能，例如参与抗体的依赖于抗体的细胞毒性。

如本领域技术人员所知，免疫偶联物及融合表达产物包括：药物、毒素、细胞因子(cytokine)、放射性核素、酶和其他诊断或治疗分子与本发明的抗体或其片段结合而形成的偶联物。

如本文所用，术语“重链可变区”与“VH”可互换使用；术语“轻链可变区”与“VL”可互换使用。

如本文所用，术语“可变区”与“互补决定区(complementarity determining region, CDR)”可互换使用。

在本发明的一个优选的实施方式中，所述抗体的重链可变区包括三个互补决定区CDR1、CDR2、和CDR3。

一般，抗体的抗原结合特性可由位于重链可变区的3个特定的区域来描述，称为可变区域(CDR)，将该段间隔成4个框架区域(FR)，4个FR的氨基酸序列相对比较保守，不直接参与结合反应。这些CDR形成环状结构，通过其间的FR形成的β折叠在空间结构上相互靠近，重链上的CDR和相应轻链上的CDR构成了抗体的抗原结合位点。可以通过比较同类型的抗体的氨基酸序列来确定是哪些氨基酸构成了FR或CDR区域。

本发明抗体的重链的可变区特别令人感兴趣，因为它们中至少部分涉及结合抗原。因此，本发明包括那些具有带CDR的抗体重链可变区的分子，只要其CDR与此处鉴定的CDR具有90%以上(较佳地95%以上，最佳地98%以上)的同源性。

本发明不仅包括完整的抗体，还包括具有免疫活性的抗体的片段或抗体与其他序列形成的融合蛋白。因此，本发明还包括所述抗体的片段、衍生物和类似物。

如本文所用，术语“片段”、“衍生物”和“类似物”是指基本上保持本发明抗体相同的生物学功能或活性的多肽。本发明的多肽片段、衍生物或类似物可以是(i)有一个或多个保守或非保守性氨基酸残基(优选保守性氨基酸残基)被取代的多肽，而这样的取代的氨基酸残基可以是也可以不是由遗传密码编码的，或(ii)在一个或多个氨基酸残基中具有取代基团的多肽，或(iii)成熟多肽与另一个化合物(比如延长多肽半衰期的化合物，例如聚乙二醇)融合所形成的多肽，或(iv)附加的氨基酸序列融合到此多肽序列而形成的多肽(如前导序列或分泌序列或用来纯化此多肽的序列或蛋白原序列，或与6His标签形成的融合蛋白)。根据本文的教导，这些片段、衍生物和类似物属于本领域熟练技术人员公知的范围。

该多肽的变异形式包括：同源序列、保守性变异体、等位变异体、天然突变体、诱导突变体、在高或低的严紧度条件下能与本发明抗体的编码DNA杂交的DNA所编码的蛋白、以及利用抗本发明抗体的抗血清获得的多肽或蛋白。

在本发明中，“本发明抗体的保守性变异体”指与本发明抗体的氨基酸序列相比，有至多10个，较佳地至多8个，更佳地至多5个，最佳地至多3个氨基酸被性质相似或相近的氨基酸所替换而形成多肽。这些保守性变异多肽最好根据表1进行氨基酸替换而产生。

表1

最初的残基	代表性的取代	优选的取代
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu	Glu
Cys (C)	Ser	Ser
Gln (Q)	Asn	Asn
Glu (E)	Asp	Asp

Gly (G)	Pro; Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe	Leu
Leu (L)	Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Leu
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala	Leu

典型地，在本发明中，无免疫效应的抗体重链可变区和轻链可变区之间通过人工引入半胱氨酸的形式形成链间二硫键，因此得到稳定的二聚体。

具体地，在本发明的一个优选例中，通过用半胱氨酸取代重链可变区Gly44和轻链可变区Gln100来建立重轻链之间的二硫键连接。在本发明的另一个优选例中，通过用半胱氨酸取代重链可变区Ala43和轻链可变区Gln105来建立重轻链之间的二硫键连接。这样在抗体的重链和轻链之间就不需要引入15-30个氨基酸的柔性肽，避免了其形成非人体分子或非人体蛋白表面抗原决定簇进而诱发的免疫应答的情况，降低了该双功能分子的免疫原性风险。

T细胞受体(T cell receptor,TCR)

可以采用国际免疫遗传学信息系统(IMGT)来描述TCR。天然α β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IMGT的TRAJ和TRBJ确定TCR的连接区，通过IMGT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IMGT命名法中，TRAV和TRBV的不同编号分别指代不同Vα类型和Vβ的类型。在IMGT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IMGT数据库可以获得TCRα与β链的恒定区基因序列。

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，“TCRα链

可变域”指连接的 TRAV 和 TRAJ 区，同样地，“TCRβ链可变域”指连接的 TRBV 和 TRBD/TRBJ 区。TCRα链可变域的 3 个 CDR 分别为 CDR1α、CDR2α和 CDR3α；TCRβ链可变域的 3 个 CDR 分别为 CDR1β、CDR2β和 CDR3β。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。

在本发明的一个优选例中，TCR部分为异源二聚体，其中所述α和β多肽包括了TCR分子的可变区和恒定区，但没有胞内区和跨膜区。该异源二聚体通过人工的引入的链间二硫键连接。具体地，α和β多肽的恒定区通过取代TRAC*01的外显子1中Thr47和TRBC*01的外显子1中的Ser56的半胱氨酸之间的二硫键连接。

优选地，本发明所述的TCR分子是异二聚体α β TCR多肽对，其中所述α和β多肽各自含有TCR可变区和恒定区，但没有TCR跨膜区和胞内区。

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。

在本发明的一个优选例中，所述的TCR分子的α和β多肽的恒定区通过用半胱氨酸(Cys)取代TRAC*01的外显子1中的第47位苏氨酸(Thr)和TRBC*01或TRBC*02的外显子1中的第56位丝氨酸(Ser)形成的二硫键连接。

在本发明的一个优选例中，所述的TCR分子的α和β多肽的恒定区通过用半胱氨酸(Cys)取代TRAC*01的外显子1中的IMTG排序法的第52位精氨酸(Arg)和TRBC*01或TRBC*02的外显子1中的第53位丝氨酸(Ser)形成的二硫键连接。

在本发明的一个优选例中，所述的TCR分子的α和β多肽的恒定区通过用半胱氨酸(Cys)取代TRAC*01的外显子1中的IMTG排序法的第88位脯氨酸(Pro)和TRBC*01或TRBC*02的外显子1中的第18位丙氨酸(Ala)形成的二硫键连接。

在本发明的一个优选例中，所述的TCR分子的α和β多肽的恒定区通过用半胱氨酸(Cys)取代TRAC*01的外显子1中的IMTG排序法的第9位酪氨酸(Tyr)和TRBC*01或TRBC*02的外显子1中的第19位谷氨酸(Glu)形成的二硫键连接。

在本发明的一个优选例中，所述的TCRα链氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

在本发明的一个优选例中，所述的TCRβ链氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

在本发明的一个优选的实施例中，所述TRAC*01的氨基酸序列如SEQ ID NO:34所示(见图18)。

在本发明的一个优选的实施例中，所述TRBC*01的氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示(见图19)。

在本发明的一个优选的实施例中，所述TRBC*02的氨基酸序列如SEQ ID NO:36所示(见图20)。

融合蛋白

如本文所用，融和蛋白是指所述蛋白分子的基因编码是连续的，并且由单一mRNA

翻译的两个或两个以上的结构域组成的单一融合的蛋白多肽链，并且是指非自然状态结构域之间的融合。

本发明中，提供一种融合蛋白，所述融合蛋白从N端到C端的结构如式Ia或Ib所示：

A1-L-B (Ia)；

B-L-A1 (Ib)；

其中，

元件A1为无免疫效应的抗体单链分子；

元件B为特异性结合pMHC表位的多肽受体分子或其组成部分、或其片段；

元件L为柔性接头；

“-”为共价键。

优选地，所述融合蛋白从N端到C端的结构如式Ia所示。

优选地，所述融合蛋白中，B(特异性结合pMHC表位的多肽受体分子或其组成部分、或其片段)的N末端与A1(无免疫效应的抗体单链分子)的C末端连接。

优选地，所述的柔性接头为肽接头。

优选地，所述的肽接头为GGGGS(SEQ ID No: 9)。

优选地，所述元件A1选自下组：抗体的重链可变区、抗体的轻链可变区。

在本发明的另一个优选的实施例中，所述抗体中，用半胱氨酸(Cys)取代所述的抗体重链的可变区44位(Kabat 计数系统，以下同)的甘氨酸(Gly)和抗体轻链的可变区100位的谷氨酰胺(Gln)。

在本发明的一个优选的实施例中，所述抗体中，用半胱氨酸(Cys)取代所述的抗体重链的可变区105位的谷氨酰胺(Gln)和抗体轻链的可变区43位的丙氨酸(Ala)。

在本发明的一个优选的实施例中，所述元件A1结合的是CD3抗原。

在本发明的一个优选的实施例中，所述抗体选自下组：UCHT1、 OKT3、12F6。

在本发明的一个优选的实施例中，所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 20或SEQ ID NO: 5所示。

在本发明的一个优选的实施例中，所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 22或SEQ ID NO: 10所示。

典型地，所述元件B选自下组：TCR分子、单链αβTCR、TCRα链、TCRβ链、抗体分子Fab、单链抗体分子、或其组合。

在本发明的一个优选的实施例中，所述元件B由B1和B2通过二硫键组合而成，其中B1为TCRα链，B2为TCRβ链；或者B1为TCRβ链，B2 TCRα链。

典型地，本发明中，TCR β链的N端可以连接抗体的无免疫效应的重链或轻链可变区结构域。

在本发明的一种实施方式中，TCR β链的N-末端通过一个5肽的接头GGGGS(SEQ ID No: 9)连接到抗体重链(重链可变区)的C-末端。

在本发明的一种实施方式中，TCR β链的N-末端通过一个5肽的接头GGGGS(SEQ ID No: 9)连接到抗体轻链(轻链可变区)的C-末端。

在本发明的一个优选的实施例中，所述异二聚体的α链或β链的N末端，或单链αβTCR的N末端，或TCRα链的N末端，或TCRβ链的N末端，或抗体分子Fab的重链或轻链的N末端，或单链抗体分子的N末端，与无免疫效应的抗体单链分子的C末端氨基酸连接。

在本发明的一个优选的实施例中，所述融合蛋白的元件B(即特异性结合pMHC表位的多肽受体分子或其组成部分、或其片段)特异性结合pMHC，元件A1(即无免疫效应的抗体单链分子)不能结合T细胞的抗原分子，或者可结合T细胞的抗原分子，但不能有效地诱导T细胞活化或产生生理效应。

在本发明的一个优选的实施例中，所述融合蛋白与游离的另一无免疫效应的多肽结构域分子A2混合时，所述融合蛋白与A2形成融合蛋白-A2复合物，所述融合蛋白-A2复合物重定向T细胞，并可有效地使该重定向的T细胞活化和产生免疫生理效应。

在本发明的一个优选的实施例中，所述的TCR分子是异二聚体αβ TCR多肽对，其中所述α和β多肽各自含有TCR可变区和恒定区，但没有TCR跨膜区和胞内区。

在本发明的一个优选的实施例中，所述的TCR分子的α和β多肽的恒定区通过用半胱氨酸(Cys)取代TRAC*01的外显子1中的第47位苏氨酸(Thr)和TRBC*01或TRBC*02的外显子1中的第56位丝氨酸(Ser)形成的二硫键连接。

在本发明的一个优选的实施例中，所述的TCR分子的α和β多肽的恒定区通过用半胱氨酸(Cys)取代TRAC*01的外显子1中的IMTG排序法的第52位精氨酸(Arg)和TRBC*01或TRBC*02的外显子1中的第53位丝氨酸(Ser)形成的二硫键连接。

在本发明的一个优选的实施例中，所述的TCR分子的α和β多肽的恒定区通过用半胱氨酸(Cys)取代TRAC*01的外显子1中的IMTG排序法的第88位脯氨酸(Pro)和TRBC*01或TRBC*02的外显子1中的第18位丙氨酸(Ala)形成的二硫键连接。

在本发明的一个优选的实施例中，所述的TCR分子的α和β多肽的恒定区通过用半胱氨酸(Cys)取代TRAC*01的外显子1中的IMTG排序法的第9位酪氨酸(Tyr)和TRBC*01或TRBC*02的外显子1中的第19位谷氨酸(Glu)形成的二硫键连接。

在本发明的一个优选例中，所述TRAC*01的氨基酸序列如SEQ ID NO:34所示。

在本发明的一个优选例中，所述TRBC*01的氨基酸序列如SEQ ID NO:35所示。

在本发明的一个优选例中，所述TRBC*02的氨基酸序列如SEQ ID NO:36所示。

在本发明的一个优选的实施例中，所述的TCRα链氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

在本发明的一个优选的实施例中，所述的TCRβ链氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

在本发明的另一个优选的实施例中，所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:32所示。

融合蛋白复合分子

如本文所用，融合蛋白复合分子是只由两个或两个以上的基因分别编码的，并且由两个或两个以上的 mRNA 翻译的两个或两个以上的蛋白多肽链在细胞外通过非共价和/或共价形式组合在一起的具备单一或两个或两个以上的生理或生物物理功能的复合分子，并且是指非自然状态的多肽复合分子。

如本文所用，术语“融合蛋白复合分子”、“接近天然状态的多结构域融合分子”、“多结构域融合分子”、“融合蛋白-A2 复合物” 具有相同的含义，可互换使用，均指由两个元件 A1、A2，与 L、B 形成的具有双重生物学功能的融合蛋白复合分子(例如从 N 端到 C 端的结构如式 Ic 或 Id 所示融合蛋白复合分子)。优选地，元件 A1、A2 无免疫效应。

优选地，本发明的融合蛋白复合分子由融合蛋白 A1-L-B (Ia)或 B-L-A1 (Ib)与元件 A2 组装得到。

优选地，所述融合蛋白从N端到C端的结构如式Ic或Id所示：

A2…A1-L-B (Ic)；

B-L-A1…A2 (Id)；

其中，

元件A1、A2各自独立地为无免疫效应的抗体单链分子；

元件B为特异性结合pMHC表位的多肽受体分子或其组成部分、或其片段；和

元件L为柔性接头；

“-”为共价键；

“…”为二硫键或蛋白结构域间的非共价相互作用，优选地为二硫键。

优选地，所述元件A1、A2各自独立地选自下组：抗体的重链可变区、抗体的轻链可变区。更优选地，所述元件A1、A2各自独立地选自下组：无免疫效应的抗体的重链可变区、无免疫效应的抗体的轻链可变区。

在本发明的一个优选的实施例中，所述的抗体的重链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 20或SEQ ID NO: 5所示。

在本发明的一个优选的实施例中，所述的抗体的轻链可变区的氨基酸序列如SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 22或SEQ ID NO: 10所示。

典型地，所述元件B选自下组：TCR分子、单链α β TCR、TCRα链、TCRβ链、抗体分子Fab、单链抗体分子、或其组合。

典型地，所述的TCRα链氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示。

典型地，所述的TCRβ链氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

典型地，所述元件B为TCR分子，所述TCR分子的TCRα链氨基酸序列如SEQ ID NO:1所示，TCRβ链氨基酸序列如SEQ ID NO:3所示。

典型地，所述元件 B 由 B1 和 B2 通过二硫键组合而成，其中 B1 为 TCRα链，B2 为 TCRβ链；或者 B1 为 TCRβ链，B2 TCRα链。

在本发明的一个优选的实施例中，所述融合蛋白的氨基酸序列如SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:32所示。

在本发明的另一个优选的实施例中，所述的 TCRα链氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，所述的 TCRβ链氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示。

在本发明的另一个优选的实施例中，所述元件 B 为 TCR 分子，所述 TCR 分子的 TCRα链氨基酸序列如 SEQ ID NO:1 所示，TCRβ链氨基酸序列如 SEQ ID NO:3 所示，且所述元件 A1 通过 L 偶联于 TCRβ链的 N 末端。

典型地，所述元件A1、A2各自独立地选自下组：抗体的重链可变区或抗体的轻链可变区。优选地，元件A1、A2各自独立地选自下组：无免疫效应的抗体的重链可变区、无免疫效应的抗体的轻链可变区。

多核苷酸、宿主细胞

本发明还提供了编码上述融合蛋白、元件A1、元件A2、元件B(包括B1、B2)、单链α βTCR、TCRα链、TCRβ链、抗体分子Fab、或单链抗体分子的多核苷酸分子。本发明的多核苷酸可以是DNA形式或RNA形式。DNA形式包括cDNA、基因组DNA或人工合成的DNA。DNA可以是单链的或是双链的。DNA可以是编码链或非编码链。

编码本发明的成熟多肽的多核苷酸包括：只编码成熟多肽的编码序列；成熟多肽的编码序列和各种附加编码序列；成熟多肽的编码序列(和任选的附加编码序列)以及非编码序列。

术语“编码多肽的多核苷酸”可以是包括编码此多肽的多核苷酸，也可以是还包括附加编码和/或非编码序列的多核苷酸。

本发明还涉及与上述的序列杂交且两个序列之间具有至少50%，较佳地至少70%，更佳地至少80%相同性的多核苷酸。本发明特别涉及在严格条件下与本发明所述多核苷酸可杂交的多核苷酸。在本发明中，“严格条件”是指：(1)在较低离子强度和较高温度下的杂交和洗脱，如0.2×SSC，0.1%SDS，60℃；或(2)杂交时加有变性剂，如50%(v/v)甲酰胺，0.1%小牛血清/0.1% Ficoll，42℃等；或(3)仅在两条序列之间的相同性至少在90%以上,更好是95%以上时才发生杂交。并且，可杂交的多核苷酸编码的多肽与成熟多肽有相同的生物学功能和活性。

本发明的抗体的核苷酸全长序列或其片段通常可以用PCR扩增法、重组法或人工合成的方法获得。一种可行的方法是用人工合成的方法来合成有关序列，尤其是片段长度较短时。通常，通过先合成多个小片段，然后再进行连接可获得序列很长的片段。此外，还可将重链的编码序列和表达标签(如6His)融合在一起，形成融合蛋白。

一旦获得了有关的序列，就可以用重组法来大批量地获得有关序列。这通常是将其克隆入载体，再转入细胞，然后通过常规方法从增殖后的宿主细胞中分离得到有关序列。本发明所涉及的生物分子(核酸、蛋白等)包括以分离的形式存在的生物分子。

目前，已经可以完全通过化学合成来得到编码本发明蛋白(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。此外，还可通过化学合成将突变引入本发明蛋白序列中。

本发明还涉及包含上述的适当DNA序列以及适当启动子或者控制序列的载体。这些载体可以用于转化适当的宿主细胞，以使其能够表达蛋白质。

宿主细胞可以是原核细胞，如细菌细胞；或是低等真核细胞，如酵母细胞；或是高等真核细胞，如哺乳动物细胞。代表性例子有：大肠杆菌，链霉菌属；鼠伤寒沙门氏菌的细菌细胞；真菌细胞如酵母；果蝇S2或Sf9的昆虫细胞；CHO、COS7、293细胞的动物细胞等。

用重组DNA转化宿主细胞可用本领域技术人员熟知的常规技术进行。当宿主为原核生物如大肠杆菌时，能吸收DNA的感受态细胞可在指数生长期后收获，用$CaCl_2$法处理，所用的步骤在本领域众所周知。另一种方法是使用$MgCl_2$。如果需要，转化也可用电穿孔的方法进行。当宿主是真核生物，可选用如下的DNA转染方法：磷酸钙共沉淀法，常规机械方法如显微注射、电穿孔，脂质体包装等。

获得的转化子可以用常规方法培养，表达本发明的基因所编码的多肽。根据所用的宿主细胞，培养中所用的培养基可选自各种常规培养基。在适于宿主细胞生长的条件下进行培养。当宿主细胞生长到适当的细胞密度后，用合适的方法(如温度转换或化学诱导)诱导选择的启动子，将细胞再培养一段时间。

在上面的方法中的重组多肽可在细胞内、或在细胞膜上表达、或分泌到细胞外。如果需要，可利用其物理的、化学的和其它特性通过各种分离方法分离和纯化重组的蛋白。这些方法是本领域技术人员所熟知的。这些方法的例子包括但并不限于：常规的复性处理、用蛋白沉淀剂处理(盐析方法)、离心、渗透破菌、超处理、超离心、分子筛层析(凝胶过滤)、吸附层析、离子交换层析、高效液相层析(HPLC)和其它各种液相层析技术及这些方法的结合。

免疫偶联物

本发明的融合蛋白和/或融合蛋白复合分子可以单独使用，也可与可检测标记物(为诊断目的)、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。

可与本发明抗体结合或偶联的治疗剂包括但不限于： 1. 放射性核素；2. 生物毒；3. 细胞因子如IL-2等； 4. 金纳米颗粒/纳米棒；5. 病毒颗粒；6. 脂质体；7. 纳米磁粒；8.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))等。

药物组合物

本发明还提供了一种组合物。优选地，所述的组合物是药物组合物，它含有上述的融合蛋白和/或融合蛋白复合分子，以及药学上可接受的载体。通常，可将这些物质配制于无毒的、惰性的和药学上可接受的水性载体介质中，其中pH通常约为5-8，较佳地pH约为6-8，尽管pH值可随被配制物质的性质以及待治疗的病症而有所变化。配制好的药物组合物可以通过常规途径进行给药，其中包括(但并不限于)：腹膜内、静脉内、或局部给药。

本发明的药物组合物可直接用于重定向 $CD8^+$T 细胞以杀伤多种肿瘤细胞，因而可用于治疗肿瘤。此外，还可同时使用其他治疗剂。

本发明的药物组合物含有安全有效量(如0.001-99wt%,较佳地0.01-90wt%，更佳地0.1-80wt%)的本发明上述的融合蛋白和/或融合蛋白复合分子(或其免疫偶联物)以及药学上可接受的载体或赋形剂。这类载体包括(但并不限于)：盐水、缓冲液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、及其组合。药物制剂应与给药方式相匹配。本发明的药物组合物可以被制成针剂形式，例如用生理盐水或含有葡萄糖和其他辅剂的水溶液通过常规方法进行制备。药物组合物如针剂、溶液宜在无菌条件下制造。活性成分的给药量是治疗有效量，例如每天约10微克/千克体重-约50毫克/千克体重。此外，本发明的多肽还可与其他治疗剂一起使用。

使用药物组合物时，是将安全有效量的融合蛋白和/或融合蛋白复合分子(或其免疫偶联物)施用于哺乳动物，其中该安全有效量通常至少约10微克/千克体重，而且在大多数情况下不超过约50毫克/千克体重，较佳地该剂量是约10微克/千克体重-约30毫克/千克体重。当然，具体剂量还应考虑给药途径、病人健康状况等因素，这些都是熟练医师技能范围之内的。

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。

本发明的主要优点在于：

(1)本发明的融合蛋白避免了像scFV分子那样引入了柔性多肽接头，因此更接近天然抗体分子的天然状态。

(2)本发明的融合蛋白降低了由于多肽柔性接头的引入而产生的免疫原性的风险。

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。

实施例1-7中的1G4 TCR能结合呈递在HLA-A*0201分子上的SLLMWITQC(SEQ ID NO:37)短肽。

实施例1

制备1G4 TCR β链的N-末端通融合抗体重链可变区的融合蛋白(VH-TCR β形式)

SEQ ID NO: 1(图1a)是1G4 TCR α链的氨基酸序列，其中Cys162置换其TRAC恒定区的Thr47。

SEQ ID NO: 2(图1b)是SEQ ID NO: 1对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 3(图2a)是1G4 TCR β链的氨基酸序列，其中Cys168置换其TRBC恒定区的Ser56。

SEQ ID NO: 4(图2b)是SEQ ID NO: 3对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 5(图3a)是抗体重链可变区的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 6(图3b)是SEQ ID NO: 5对应的核酸序列。

图23以框图形式显示了多结构域融合分子的结构，其含有SEQ ID NO：1所示的α链和SEQ ID NO: 3所示的β链，并含有SEQ ID NO: 5所示的抗体的重链可变区。所述抗体重链经接头融合在SEQ ID NO: 3所示的TCR β链的N-末端，序列如SEQ ID NO: 7(图4a)所示。接头序列为GGGGS(SEQ ID No: 9)。

SEQ ID NO: 8(图4b)是SEQ ID NO: 7对应的核酸序列。

载体构建

将编码1G4 TCR α链的SEQ ID NO: 2(图1b)和抗体重链融合1G4 TCR β链的SEQ ID NO: 8(图4b)基因分别克隆到pET-28a的表达质粒，该质粒含有T7启动子，以便在大肠杆菌BL21-DE3菌株中高水平表达目的基因。

表达

构建好的质粒分别转化到大肠杆菌菌株BL21-DE3中，卡那霉素抗性的单克隆在LB培养基(卡那霉素50 μg/ml)中37℃生长至OD_{600}为1.0左右，然后用1 mM的IPTG诱导蛋白表达。诱导后3小时，在Thermo Scientific HERAEUS X1R离心机中以4000 g离心15分钟收集细胞。使用20 ml的BugBuster Master Mix(Merck Millipore)，涡旋震荡重悬菌体，然后在室温振荡处理20 min后，放入提前预冷好的高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min，然后去除上清。再次加入10 ml的BugBuster Master Mix，涡旋震荡重悬沉淀，室温振荡处理5 min。再次向其中加入30 ml的稀释10倍的BugBuster(Merck Millipore)，上下颠倒几次以混匀液体，再次放入高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min。弃上清后，加入30 ml的稀释10倍的BugBuster，涡旋震荡重悬沉淀，放入高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min。弃去上清，重复上一步两次。弃去上清，加入30 ml 的PBS 重悬包涵体，并且6000 g，4℃，离心15 min。弃去上清后，加入6 M 的盐酸胍溶解包涵体。将纯化的包涵体进行倍比稀释，然后取样进行SDS-PAGE 检测其纯度和估计其产量，并将所有的包涵体进行蛋白定量，并分装，转入-80℃进行保存。

复性

配制TCR的复性缓冲液(5 M尿素，100 mM Tris pH 8.1，0.4 M L-精氨酸，2 mM EDTA，6.5 mM 半胱胺，1.87 mM 胱胺)，并提前预冷至4℃。从冻存液中解冻约12 mg的TCR α链和11.2 mg的抗体重链-TCR β链。分别加入到6 ml 6 M盐酸胍溶液中，并加入终浓度为15 mM的DTT，混匀后，放置在37℃温箱中孵育40 min。将孵育好的TCR α 链和重链-TCR β链的包涵体分别加入到TCR 的复性缓冲液中，并在冷库中反应30 min。准备10 kDa的透析袋，将反应后的复性液加入到透析袋中，然后放入到提前预冷好的去离子水中，在冷库中透析过夜。第二天，将透析袋转移至提前预冷好的10 mM Tris-HCl中进行透析。晚上再将透析袋转移至提前预冷好的10 mM Tris-HCl中进行透析过夜。

纯化

通过下文所述3步纯化方法将可溶性且正确折叠的多结构域融合分子与错误折叠、降解产物和杂质分离。

首先使用阴离子交换纯化。将复性透析好的样品放入提前预冷好的高速离心机中，8000×g，15 min，4℃以离心去除沉淀，并且再次用0.45 μm 的滤膜过滤上清。利用阴离子交换柱HiTrap® Q HP(GE Healthcare)来纯化复性的样品。先用A液(10mM Tris-HCl，pH8.0)冲洗4 个柱体积后，再以流速为5 ml/min 的流速进行上样。待样品完全上样后，再次用A液冲洗柱子约4个柱体积，当电导和UV_{280}都趋于稳定的时候开始进行梯度洗脱，设置0-100%的B液(1M NaCl+10mM Tris-HCl，PH 8.0)，时间为50 min，以3 ml/min 的流速洗脱样品，当UV_{280}明显升高时开始收集，各管收集1 ml。通过12%

SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。

之后再使用分子筛(Superdex 75， GE Healthcare)纯化。上一步纯化的样品用10 kDa 的超滤管进行浓缩，以3500×g，4℃浓缩至500 μl，之后进行分子筛纯化。将分子筛先用去离子水进行平衡，然后用PBS 再次平衡。清洗500 μl 的上样环并且进行上样，上样结束后再次用PBS 进行平衡及洗脱，流速为1 ml/min，各管收集0.4 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。

最后再进行一次阴离子交换纯化，使用阴离子交换柱HiTrap® Q HP(GE Healthcare)。将上一步纯化的样品使用预冷的10 mM Tris 稀释20倍，再进行上样。先用A液冲洗4个柱体积后，再以流速为5 ml/min 的流速进行上样。待样品完全上样后，再次用A液冲洗柱子约4个柱体积，当电导和UV_{280}都趋于稳定的时候开始进行梯度洗脱，设置0-100%的B液，时间为50 min，以3 ml/min 的流速洗脱样品，当UV_{280}明显升高时开始收集，各管收集1 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。用10 kDa的超滤管进行浓缩，以3500×g，4℃浓缩至500 μl，并使用PBS缓冲液进行缓冲液置换，并测定其浓度，然后分装保存于-80℃。

纯化的蛋白的SDS-PAGE情况如图29(A)所示：泳道1：非还原状态下的1G4 TCR β链的N-末端通融合抗体重链可变区的融合蛋白(VH-TCR β形式)；泳道2：分子量标记；泳道3，还原状态下的1G4 TCR β链的N-末端通融合抗体重链可变区的融合蛋白(VH-TCR β形式)。

实施例2

制备1G4 TCR β链的N-末端通融合抗体轻链可变区的融合分子(VL-TCR β形式)

SEQ ID NO: 1(图1a)是1G4 TCR α链的氨基酸序列，其中Cys162置换其TRAC恒定区的Thr47。

SEQ ID NO: 2(图1b)是SEQ ID NO: 1对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 3(图2a)是1G4 TCR β链的氨基酸序列，其中Cys168置换其TRBC恒定区的Ser56。

SEQ ID NO: 4(图2b)是SEQ ID NO: 3对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 10(图6a)是抗体轻链可变区的氨基酸序列。

SEQ ID NO: 11(图6b)是SEQ ID NO: 10对应的核酸序列。

图24以框图形式显示了多结构域融合分子的结构，其含有SEQ ID NO：1所示的α链和SEQ ID NO: 3所示的β链，并含有SEQ ID NO: 10所示的抗体的轻链。所述抗体轻链经接头融合在SEQ ID NO: 3所示的TCR β链的N-末端，序列如SEQ ID NO: 12(图7a)所示。接头序列为GGGGS(SEQ ID No: 9)。

SEQ ID NO: 13(图7b)是SEQ ID NO: 12对应的核酸序列。

载体构建

将编码1G4 TCR α链的SEQ ID NO: 2(图1b)和抗体轻链融合1G4 TCR β链的SEQ ID NO: 13(图7b)基因分别克隆到pET-28a的表达质粒，该质粒含有T7启动子，以便在大肠杆菌BL21-DE3菌株中高水平表达目的基因。

表达

构建好的质粒分别转化到大肠杆菌菌株BL21-DE3中，卡那霉素抗性的单克隆在LB培养基(卡那霉素50 μg/ml)中37℃生长至OD_{600}为1.0左右，然后用1 mM的IPTG诱导蛋白表达。诱导后3小时，在Thermo Scientific HERAEUS X1R离心机中以4000 g离心15分钟收集细胞。使用20 ml的BugBuster Master Mix(Merck Millipore)，涡旋震荡重悬菌体，然后在室温振荡处理20 min后，放入提前预冷好的高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min，然后去除上清。再次加入10 ml的BugBuster Master Mix，涡旋震荡重悬沉淀，室温振荡处理5 min。再次向其中加入30 ml的稀释10倍的BugBuster(Merck Millipore)，上下颠倒几次以混匀液体，再次放入高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min。弃上清后，加入30 ml的稀释10倍的BugBuster，涡旋震荡重悬沉淀，放入高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min。弃去上清，重复上一步两次。弃去上清，加入30 ml 的PBS 重悬包涵体，并且6000 g，4℃，离心15 min。弃去上清后，加入6 M 的盐酸胍溶解包涵体。将纯化的包涵体进行倍比稀释，然后取样进行SDS-PAGE 检测其纯度和估计其产量，并将所有的包涵体进行蛋白定量，并分装，转入-80℃进行保存。

复性

配制TCR的复性缓冲液(5 M尿素，100 mM Tris pH 8.1，0.4 M L-精氨酸，2 mM EDTA，6.5 mM 半胱胺，1.87 mM 胱胺)，并提前预冷至4℃。从冻存液中解冻约12 mg的TCR α链和11.2 mg的抗体轻链-TCR β链。分别加入到6 ml 6 M盐酸胍溶液中，并加入终浓度为15 mM的DTT，混匀后，放置在37℃温箱中孵育40 min。将孵育好的TCR α 链和轻链-TCR β链的包涵体分别加入到TCR 的复性缓冲液中，并在冷库中反应30 min。准备10 kDa的透析袋，将反应后的复性液加入到透析袋中，然后放入到提前预冷好的去离子水中，在冷库中透析过夜。第二天，将透析袋转移至提前预冷好的10 mM Tris-HCl中进行透析。晚上再将透析袋转移至提前预冷好的10 mM Tris-HCl中进行透析过夜。

纯化

通过下文所述3步纯化方法将可溶性且正确折叠的多结构域融合分子与错误折叠、降解产物和杂质分离。

首先使用阴离子交换纯化。将复性透析好的样品放入提前预冷好的高速离心机中，8000×g，15 min，4℃以离心去除沉淀，并且再次用0.45 μm 的滤膜过滤上清。利用阴离子交换柱HiTrap® Q HP(GE Healthcare)来纯化复性的样品。先用A液(10mM Tris-HCl，pH8.0)冲洗4 个柱体积后，再以流速为5 ml/min 的流速进行上样。待样

品完全上样后，再次用A液冲洗柱子约4个柱体积，当电导和UV_{280}都趋于稳定的时候开始进行梯度洗脱，设置0-100%的B液(1M NaCl+10mM Tris-HCl，PH 8.0)，时间为50 min，以3 ml/min 的流速洗脱样品，当UV_{280}明显升高时开始收集，各管收集1 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。

之后再使用分子筛(Superdex 75， GE Healthcare)纯化。上一步纯化的样品用10 kDa 的超滤管进行浓缩，以3500×g，4℃浓缩至500 μl，之后进行分子筛纯化。将分子筛先用去离子水进行平衡，然后用PBS 再次平衡。清洗500 μl 的上样环并且进行上样，上样结束后再次用PBS 进行平衡及洗脱，流速为1 ml/min，各管收集0.4 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。

最后再进行一次阴离子交换纯化，使用阴离子交换柱HiTrap® Q HP(GE Healthcare)。将上一步纯化的样品使用预冷的10 mM Tris 稀释20倍，再进行上样。先用A液冲洗4个柱体积后，再以流速为5 ml/min 的流速进行上样。待样品完全上样后，再次用A液冲洗柱子约4个柱体积，当电导和UV_{280}都趋于稳定的时候开始进行梯度洗脱，设置0-100%的B液，时间为50 min，以3 ml/min 的流速洗脱样品，当UV_{280}明显升高时开始收集，各管收集1 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。用10 kDa的超滤管进行浓缩，以3500×g，4℃浓缩至500 μl，并使用PBS缓冲液进行缓冲液置换，并测定其浓度，然后分装保存于-80℃。

纯化的蛋白的SDS-PAGE情况如图29(B)所示：泳道1：非还原状态下的1G4 TCR β链的N-末端通融合抗体轻链可变区的融合蛋白(VL-TCR β形式)；泳道2：分子量标记；泳道3，还原状态下的1G4 TCR β链的N-末端通融合抗体轻链可变区的融合蛋白(VL-TCR β形式)。

实施例3

1G4 TCR β链的N-末端通融合抗体重链可变区(VH-TCR β形式)和1G4 TCR β链的N-末端通融合抗体轻链可变区(VL-TCR β形式)的融合分子的性质

双功能融合分子能够重定向T细胞特异性杀伤肿瘤细胞已在多篇研究中报道。其基本原理是其可以模拟T细胞活化发挥效应功能的关键信号，一方面通过其高亲和的特异性TCR识别肿瘤细胞表面的pMHC复合物，另一方面通过其CD3抗体端激活T细胞活化的下游信号通路，从而定向T细胞特异性杀伤肿瘤细胞。

以下实施例证明本发明的仅融合抗体重链可变区或者抗体轻链可变区融合分子不能定向$CD8^+$T细胞以杀伤靶细胞系。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)转化为红色的甲臜(formanzan)。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490 nm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。本实施例LDH实验选用的靶细胞系为MDA-MB-231(NY-ESO-1阳性，A2阳性，乳腺癌细胞系)、MDA-MB-231(NY-ESO-1阴性，A2阳性，乳腺癌细胞系)和NCI-H1299-A2(NY-ESO-1阳性，A2阳性，肺癌细胞系)、NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阴性，肺癌细胞系)。

将$CD8^+$T细胞作为效应细胞，将MDA-MB-231(NY-ESO-1阳性，A2阳性)乳腺癌细胞系与NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阳性)肺癌细胞系作为靶细胞，所选用的效靶比为5:1。将所需要的效应细胞和靶细胞都按照所需要的细胞数用培养基稀释好，即所需要的效应细胞的细胞密度为1×10^6/ml，而所需要的靶细胞的细胞密度为2×10^5/ml。同时使用MDA-MB-231(NY-ESO-1阴性，A2阳性)乳腺癌细胞系和NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阴性)肺癌细胞系作为阴性对照靶细胞。

当NCI-H1299肺癌细胞系或者MDA-MB-231乳腺癌细胞系作为靶细胞时，将1G4 TCR β链的N-末端通融合抗体重链可变区(VH-TCR β形式)和1G4 TCR β链的N-末端通融合抗体轻链可变区(VL-TCR β形式)的蛋白用培养基全部稀释成4×10^{-7} M，4×10^{-8} M，4×10^{-9} M，4×10^{-10} M，4×10^{-11} M，4×10^{-12} M。

准备好96 孔圆底板，然后向孔中加入50 μl的效应细胞，50 μl的多结构域双功能融合分子蛋白和100 μl的靶细胞，同时设置靶细胞最大裂解孔，靶细胞自发孔，效应细胞自发孔，培养基自发孔以及培养基加裂解液的自发孔，每个孔的终体积均为200 μl，并且各有三个复孔。将加完细胞的96孔圆底板放入37℃，5% CO_2的细胞培养箱中培养24h。之后将96孔圆底细胞培养板放入到离心机中，250×g，4 min。取出50 μl上清到96孔平底板中，并且加入50 μl底物液，避光常温反应30 min。反应结束后，加入50 μl的终止液，立即用酶标仪测定490 nm 处的吸光值。根据产品说明书计算特异性杀伤的效率=(实验孔-效应细胞自发孔-靶细胞自发孔)/(靶细胞最大裂解孔-靶细胞自发孔)。

结果如图33a、图33b和图34a、图34b所示，仅融合抗体重链可变区或者抗体轻链可变区形式的融合分子，不能介导$CD8^+$T细胞对于MDA-MB-231(NY-ESO-1阳性，A2阳性)乳腺癌细胞系和NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阳性)肺癌细胞系的杀伤，也无法杀伤MDA-MB-231(NY-ESO-1阴性，A2阳性)乳腺癌细胞系和NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阴性)肺癌细胞系。

实施例4

制备1G4 TCR β链的N-末端通融合抗体重链可变区的多结构域融合蛋白复合分子(VH44-TCR β形式)

SEQ ID NO: 1(图1a)是1G4 TCR α链的氨基酸序列，其中Cys162置换其TRAC恒定区的Thr47。

SEQ ID NO: 2(图1b)是SEQ ID NO: 1对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 3(图2a)是1G4 TCR β链的氨基酸序列，其中Cys168置换其TRBC恒定区的Ser56。

SEQ ID NO: 4(图2b)是SEQ ID NO: 3对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 14(图8a)是在抗体重链可变区的氨基酸序列中使用Cys44置换其原始序列的Gly44得到的序列。

SEQ ID NO: 15(图8b)是SEQ ID NO: 14对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 16(图9a)是在抗体轻链可变区的氨基酸序列中使用Cys100置换其原始序列的Gln100得到的序列。

SEQ ID NO: 17(图9b)是SEQ ID NO: 16对应的核酸序列。

图25以框图形式显示了多结构域融合分子的结构，其含有SEQ ID NO：1所示的α链和SEQ ID NO: 3所示的β链，并含有SEQ ID NO: 14所示的抗体重链可变区和SEQ ID NO: 16所示的抗体轻链可变区。所述抗体重链经接头融合在SEQ ID NO: 3所示的TCR β链的N-末端，序列如SEQ ID NO: 18(图10a)所示。接头序列为GGGGS(SEQ ID No: 9)。

SEQ ID NO: 19(图10b)是SEQ ID NO: 18对应的核酸序列。

载体构建

将编码1G4 TCR α链的SEQ ID NO: 2(图1b)和抗体重链融合1G4 TCR β链的SEQ ID NO: 19(图10b)，以及抗体轻链的SEQ ID NO: 17(图9b)基因分别克隆到pET-28a的表达质粒，该质粒含有T7启动子，以便在大肠杆菌BL21-DE3菌株中高水平表达目的基因。

表达

构建好的质粒分别转化到大肠杆菌菌株BL21-DE3中，卡那霉素抗性的单克隆在LB培养基(卡那霉素50 μg/ml)中37℃生长至OD_{600}为1.0左右，然后用1 mM的IPTG诱导蛋白表达。诱导后3小时，在Thermo Scientific HERAEUS X1R离心机中以4000 g离心15分钟收集细胞。使用20 ml的BugBuster Master Mix(Merck Millipore)，涡旋震荡重悬菌体，然后在室温振荡处理20 min后，放入提前预冷好的高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min，然后去除上清。再次加入10 ml的BugBuster Master Mix，涡旋震荡重悬沉淀，室温振荡处理5 min。再次向其中加入30 ml的稀释10倍的BugBuster(Merck Millipore)，上下颠倒几次以混匀液体，再次放入高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min。弃上清后，加入30 ml的稀释10倍的BugBuster，涡旋震荡重悬沉淀，放入高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min。弃去上清，重复上一步两次。弃去上清，加入30 ml 的PBS 重悬包涵体，并且6000 g，4℃，离心15 min。弃去上清后，加入6 M 的盐酸胍溶解包涵体。将纯化的包涵体进行倍比稀释，然后取样进行SDS-PAGE 检测其纯度和估计其产量，并将所有的包涵体进行蛋白定量，并分装，转入-80℃进行保存。

复性

配制TCR的复性缓冲液(5 M尿素，100 mM Tris pH 8.1，0.4 M L-精氨酸，2 mM EDTA,

6.5 mM 半胱胺，1.87 mM 胱胺)，并提前预冷至4℃。从冻存液中解冻约12 mg的TCR α链和11.2 mg的抗体重链-TCR β链，6 mg抗体轻链包涵体。分别加入到6 ml 6 M盐酸胍溶液中，并加入终浓度为15 mM的DTT，混匀后，放置在37℃温箱中孵育40 min。将孵育好的TCR α 链和重链-TCR β链，以及抗体轻链的包涵体分别加入到TCR 的复性缓冲液中，并在冷库中反应30 min。准备10 kDa的透析袋，将反应后的复性液加入到透析袋中，然后放入到提前预冷好的去离子水中，在冷库中透析过夜。第二天，将透析袋转移至提前预冷好的10 mM Tris-HCl中进行透析。晚上再将透析袋转移至提前预冷好的10 mM Tris-HCl中进行透析过夜。

纯化

通过下文所述3步纯化方法将可溶性且正确折叠的多结构域融合分子与错误折叠、降解产物和杂质分离。

首先使用阴离子交换纯化。将复性透析好的样品放入提前预冷好的高速离心机中，8000×g，15 min，4℃以离心去除沉淀，并且再次用0.45 μm 的滤膜过滤上清。利用阴离子交换柱HiTrap® Q HP(GE Healthcare)来纯化复性的样品。先用A液(10mM Tris-HCl，pH8.0)冲洗4 个柱体积后，再以流速为5 ml/min 的流速进行上样。待样品完全上样后，再次用A液冲洗柱子约4个柱体积，当电导和UV_{280}都趋于稳定的时候开始进行梯度洗脱，设置0-100%的B液(1M NaCl+10mM Tris-HCl，PH 8.0)，时间为50 min，以3 ml/min 的流速洗脱样品，当UV_{280}明显升高时开始收集，各管收集1 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。

之后再使用分子筛(Superdex 75， GE Healthcare)纯化。上一步纯化的样品用10 kDa 的超滤管进行浓缩，以3500×g，4℃浓缩至500 μl，之后进行分子筛纯化。将分子筛先用去离子水进行平衡，然后用PBS 再次平衡。清洗500 μl 的上样环并且进行上样，上样结束后再次用PBS 进行平衡及洗脱，流速为1 ml/min，各管收集0.4 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。

最后再进行一次阴离子交换纯化，使用阴离子交换柱HiTrap® Q HP(GE Healthcare)。将上一步纯化的样品使用预冷的10 mM Tris 稀释20倍，再进行上样。先用A液冲洗4个柱体积后，再以流速为5 ml/min 的流速进行上样。待样品完全上样后，再次用A液冲洗柱子约4个柱体积，当电导和UV_{280}都趋于稳定的时候开始进行梯度洗脱，设置0-100%的B液，时间为50 min，以3 ml/min 的流速洗脱样品，当UV_{280}明显升高时开始收集，各管收集1 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。用10 kDa的超滤管进行浓缩，以3500×g，4℃浓缩至500 μl，并使用PBS缓冲液进行缓冲液置换，并测定其浓度，然后分装保存于-80℃。

纯化的蛋白的SDS-PAGE情况如图30所示：泳道1：非还原状态下的多结构域双功能融合分子VH44-TCR β形式；泳道3：分子量标记；泳道4，还原状态下的多结构域双功能融合分子VH44-TCR β形式。

实施例5

制备1G4 TCR β链的N-末端通融合抗体重链可变区的多结构域融合蛋白复合分子(VH105-TCR β形式)

SEQ ID NO: 1(图1a)是1G4 TCR α链的氨基酸序列，其中Cys162置换其TRAC恒定区的Thr47。

SEQ ID NO: 2(图1b)是SEQ ID NO: 1对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 3(图2a)是1G4 TCR β链的氨基酸序列，其中Cys168置换其TRBC恒定区的Ser56。

SEQ ID NO: 4(图2b)是SEQ ID NO: 3对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 20(图11a)是在抗体重链可变区的氨基酸序列中使用Cys105置换其原始序列的Gln105得到的序列。

SEQ ID NO: 21(图11b)是SEQ ID NO: 20对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 22(图12a)是在抗体轻链可变区的氨基酸序列中使用Cys43置换其原始序列的Ala43得到的序列。

SEQ ID NO: 23(图12b)是SEQ ID NO: 22对应的核酸序列。

图26以框图形式显示了多结构域融合分子的结构，其含有SEQ ID NO：1所示的α链和SEQ ID NO: 3所示的β链，并含有SEQ ID NO: 20所示的抗体的重链和SEQ ID NO: 22所示的抗体的轻链。所述抗体重链经接头融合在SEQ ID NO: 3所示的TCR β链的N-末端，序列如SEQ ID NO: 24(图13a)所示。接头序列为GGGGS(SEQ ID No: 9)。

SEQ ID NO: 25(图13b)是SEQ ID NO: 24对应的核酸序列。

载体构建

将编码1G4 TCR α链的SEQ ID NO: 2(图1b)和抗体重链融合1G4 TCR β链的SEQ ID NO: 25(图13b)，以及抗体轻链的SEQ ID NO: 23(图12b)基因分别克隆到pET-28a的表达质粒，该质粒含有T7启动子，以便在大肠杆菌BL21-DE3菌株中高水平表达目的基因。

表达

构建好的质粒分别转化到大肠杆菌菌株BL21-DE3中，卡那霉素抗性的单克隆在LB培养基(卡那霉素50 μg/ml)中37℃生长至OD_{600}为1.0左右，然后用1 mM的IPTG诱导蛋白表达。诱导后3小时，在Thermo Scientific HERAEUS X1R离心机中以4000 g离心15分钟收集细胞。使用20 ml的BugBuster Master Mix(Merck Millipore)，涡旋震荡重悬菌体，然后在室温振荡处理20 min后，放入提前预冷好的高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min，然后去除上清。再次加入10 ml的BugBuster Master Mix，涡旋震荡重悬沉淀，室温振荡处理5 min。再次向其中加入30 ml的稀释10倍的BugBuster(Merck Millipore)，上下颠倒几次以混匀液体，再次放入高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min。弃上清后，加入30 ml的稀释10倍的BugBuster，涡旋震

荡重悬沉淀，放入高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min。弃去上清，重复上一步两次。弃去上清，加入30 ml 的PBS 重悬包涵体，并且6000 g，4℃，离心15 min。弃去上清后，加入6 M 的盐酸胍溶解包涵体。将纯化的包涵体进行倍比稀释，然后取样进行SDS-PAGE 检测其纯度和估计其产量，并将所有的包涵体进行蛋白定量，并分装，转入-80℃进行保存。

复性

配制TCR的复性缓冲液(5 M尿素，100 mM Tris pH 8.1，0.4 M L-精氨酸，2 mM EDTA，6.5 mM 半胱胺，1.87 mM 胱胺)，并提前预冷至4℃。从冻存液中解冻约12 mg的TCR α链和11.2 mg的抗体重链-TCR β链，6 mg抗体轻链包涵体。分别加入到6 ml 6 M盐酸胍溶液中，并加入终浓度为15 mM的DTT，混匀后，放置在37℃温箱中孵育40 min。将孵育好的TCR α 链和重链-TCR β链，以及抗体轻链的包涵体分别加入到TCR 的复性缓冲液中，并在冷库中反应30 min。准备10 kDa的透析袋，将反应后的复性液加入到透析袋中，然后放入到提前预冷好的去离子水中，在冷库中透析过夜。第二天，将透析袋转移至提前预冷好的10 mM Tris-HCl中进行透析。晚上再将透析袋转移至提前预冷好的10 mM Tris-HCl中进行透析过夜。

纯化

通过下文所述3步纯化方法将可溶性且正确折叠的多结构域融合分子与错误折叠、降解产物和杂质分离。

首先使用阴离子交换纯化。将复性透析好的样品放入提前预冷好的高速离心机中，8000×g，15 min，4℃以离心去除沉淀，并且再次用0.45 μm 的滤膜过滤上清。利用阴离子交换柱HiTrap® Q HP(GE Healthcare)来纯化复性的样品。先用A液(10mM Tris-HCl，pH8.0)冲洗4 个柱体积后，再以流速为5 ml/min 的流速进行上样。待样品完全上样后，再次用A液冲洗柱子约4个柱体积，当电导和UV_{280}都趋于稳定的时候开始进行梯度洗脱，设置0-100%的B液(1M NaCl+10mM Tris-HCl，PH 8.0)，时间为50 min，以3 ml/min 的流速洗脱样品，当UV_{280}明显升高时开始收集，各管收集1 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。

之后再使用分子筛(Superdex 75， GE Healthcare)纯化。上一步纯化的样品用10 kDa 的超滤管进行浓缩，以3500×g，4℃浓缩至500 μl，之后进行分子筛纯化。将分子筛先用去离子水进行平衡，然后用PBS 再次平衡。清洗500 μl 的上样环并且进行上样，上样结束后再次用PBS 进行平衡及洗脱，流速为1 ml/min，各管收集0.4 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。

最后再进行一次阴离子交换纯化，使用阴离子交换柱HiTrap® Q HP(GE Healthcare)。将上一步纯化的样品使用预冷的10 mM Tris 稀释20倍，再进行上样。先用A液冲洗4个柱体积后，再以流速为5 ml/min 的流速进行上样。待样品完全上样后，再次用A液冲洗柱子约4个柱体积，当电导和UV_{280}都趋于稳定的时候开始进行梯度

洗脱，设置0-100%的B液，时间为50 min，以3 ml/min 的流速洗脱样品，当UV_{280}明显升高时开始收集，各管收集1 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。用10 kDa的超滤管进行浓缩，以3500×g，4℃浓缩至500 μl，并使用PBS缓冲液进行缓冲液置换，并测定其浓度，然后分装保存于-80℃。

纯化的蛋白的SDS-PAGE情况如图30所示：泳道2：非还原状态下的多结构域双功能融合分子VH105-TCR β形式；泳道3：分子量标记；泳道5，还原状态下的多结构域双功能融合分子VH105-TCR β形式。

实施例6

制备1G4 TCR β链的N-末端通融合抗体轻链可变区的多结构域融合蛋白复合分子(VL43-TCR β形式)

SEQ ID NO: 1(图1a)是1G4 TCR α链的氨基酸序列，其中Cys162置换其TRAC恒定区的Thr47。

SEQ ID NO: 2(图1b)是SEQ ID NO: 1对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 3(图2a)是1G4 TCR β链的氨基酸序列，其中Cys168置换其TRBC恒定区的Ser56。

SEQ ID NO: 4(图2b)是SEQ ID NO: 3对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 22(图12a)是抗体轻链可变区的氨基酸序列，其中Cys43置换其原始序列的Ala43。

SEQ ID NO: 23(图12b)是SEQ ID NO: 22对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 20(图11a)是抗体重链可变区的氨基酸序列，其中Cys105置换其原始序列的Gln105。

SEQ ID NO: 21(图11b)是SEQ ID NO: 20对应的核酸序列。

图27以框图形式显示了多结构域融合分子的结构，其含有SEQ ID NO：1所示的α链和SEQ ID NO: 3所示的β链，并含有SEQ ID NO: 22所示的抗体的轻链和SEQ ID NO: 20所示的抗体的重链。所述抗体轻链经接头融合在SEQ ID NO: 3所示的TCR β链的N-末端，序列如SEQ ID NO: 26(图14a)所示。接头序列为GGGGS(SEQ ID No: 9)。

SEQ ID NO: 27(图14b)是SEQ ID NO: 26对应的核酸序列。

载体构建

将编码1G4 TCR α链的SEQ ID NO: 2(图1b)和抗体轻链融合1G4 TCR β链的SEQ ID NO: 27(图14b)，以及抗体重链的SEQ ID NO: 21(图11b)基因分别克隆到pET-28a的表达质粒，该质粒含有T7启动子，以便在大肠杆菌BL21-DE3菌株中高水平表达目的基因。

表达

构建好的质粒分别转化到大肠杆菌菌株BL21-DE3中，卡那霉素抗性的单克隆在LB培养基(卡那霉素50 μg/ml)中37℃生长至OD_{600}为1.0左右，然后用1 mM的IPTG诱导蛋

白表达。诱导后3小时，在Thermo Scientific HERAEUS X1R离心机中以4000 g离心15分钟收集细胞。使用20 ml的BugBuster Master Mix(Merck Millipore)，涡旋震荡重悬菌体，然后在室温振荡处理20 min后，放入提前预冷好的高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min，然后去除上清。再次加入10 ml的BugBuster Master Mix，涡旋震荡重悬沉淀，室温振荡处理5 min。再次向其中加入30 ml的稀释10倍的BugBuster(Merck Millipore)，上下颠倒几次以混匀液体，再次放入高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min。弃上清后，加入30 ml的稀释10倍的BugBuster，涡旋震荡重悬沉淀，放入高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min。弃去上清，重复上一步两次。弃去上清，加入30 ml 的PBS 重悬包涵体，并且6000 g，4℃，离心15 min。弃去上清后，加入6 M 的盐酸胍溶解包涵体。将纯化的包涵体进行倍比稀释，然后取样进行SDS-PAGE 检测其纯度和估计其产量，并将所有的包涵体进行蛋白定量，并分装，转入-80℃进行保存。

复性

配制TCR的复性缓冲液(5 M尿素，100 mM Tris pH 8.1，0.4 M L-精氨酸，2 mM EDTA，6.5 mM 半胱胺，1.87 mM 胱胺)，并提前预冷至4℃。从冻存液中解冻约12 mg的TCR α链和11.2 mg的抗体轻链-TCR β链，6 mg抗体重链包涵体。分别加入到6 ml 6 M盐酸胍溶液中，并加入终浓度为15 mM的DTT，混匀后，放置在37℃温箱中孵育40 min。将孵育好的TCR α 链和轻链-TCR β链，以及抗体重链的包涵体分别加入到TCR 的复性缓冲液中，并在冷库中反应30 min。准备10 kDa的透析袋，将反应后的复性液加入到透析袋中，然后放入到提前预冷好的去离子水中，在冷库中透析过夜。第二天，将透析袋转移至提前预冷好的10 mM Tris-HCl中进行透析。晚上再将透析袋转移至提前预冷好的10 mM Tris-HCl中进行透析过夜。

纯化

通过下文所述3步纯化方法将可溶性且正确折叠的多结构域融合分子与错误折叠、降解产物和杂质分离。

首先使用阴离子交换纯化。将复性透析好的样品放入提前预冷好的高速离心机中，8000×g，15 min，4℃以离心去除沉淀，并且再次用0.45 μm 的滤膜过滤上清。利用阴离子交换柱HiTrap® Q HP(GE Healthcare)来纯化复性的样品。先用A液(10mM Tris-HCl，pH8.0)冲洗4个柱体积后，再以流速为5 ml/min 的流速进行上样。待样品完全上样后，再次用A液冲洗柱子约4个柱体积，当电导和UV_{280}都趋于稳定的时候开始进行梯度洗脱，设置0-100%的B液(1M NaCl+10mM Tris-HCl，PH 8.0)，时间为50 min，以3 ml/min 的流速洗脱样品，当UV_{280}明显升高时开始收集，各管收集1 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。

之后再使用分子筛(Superdex 75， GE Healthcare)纯化。上一步纯化的样品用10 kDa 的超滤管进行浓缩，以3500×g，4℃浓缩至500 μl，之后进行分子筛纯化。

将分子筛先用去离子水进行平衡，然后用PBS 再次平衡。清洗500 μl 的上样环并且进行上样，上样结束后再次用PBS 进行平衡及洗脱，流速为1 ml/min，各管收集0.4 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。

最后再进行一次阴离子交换纯化，使用阴离子交换柱HiTrap® Q HP(GE Healthcare)。将上一步纯化的样品使用预冷的10 mM Tris 稀释20倍，再进行上样。先用A液冲洗4个柱体积后，再以流速为5 ml/min 的流速进行上样。待样品完全上样后，再次用A液冲洗柱子约4个柱体积，当电导和UV_{280}都趋于稳定的时候开始进行梯度洗脱，设置0-100%的B液，时间为50 min，以3 ml/min 的流速洗脱样品，当UV_{280}明显升高时开始收集，各管收集1 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。用10 kDa 的超滤管进行浓缩，以3500×g，4℃浓缩至500 μl，并使用PBS缓冲液进行缓冲液置换，并测定其浓度，然后分装保存于-80℃。

纯化的蛋白的SDS-PAGE情况如图31(A)所示：泳道1：非还原状态下的多结构域双功能融合分子VL43-TCR β形式；泳道2：分子量标记；泳道3，还原状态下的多结构域双功能融合分子VL43-TCR β形式。

实施例7

制备1G4 TCR β链的N-末端通融合抗体轻链可变区的多结构域双功能融合分子(VL100-TCR β形式)

SEQ ID NO: 1(图1a)是1G4 TCR α链的氨基酸序列，其中Cys162置换其TRAC恒定区的Thr47。

SEQ ID NO: 2(图1b)是SEQ ID NO: 1对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 3(图2a)是1G4 TCR β链的氨基酸序列，其中Cys168置换其TRBC恒定区的Ser56。

SEQ ID NO: 4(图2b)是SEQ ID NO: 3对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 16(图9a)是抗体轻链可变区的氨基酸序列，其中Cys100置换其原始序列的Gln100。

SEQ ID NO: 17(图9b)是SEQ ID NO: 16对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 14(图8a)是抗体重链可变区的氨基酸序列，其中Cys44置换其原始序列的Gly44。

SEQ ID NO: 15(图8b)是SEQ ID NO: 14对应的核酸序列。

图28以框图形式显示了多结构域融合分子的结构，其含有SEQ ID NO：1所示的α链和SEQ ID NO: 3所示的β链，并含有SEQ ID NO: 16所示的抗体的轻链和SEQ ID NO: 14所示的抗体的重链可变区。所述抗体轻链可变区经接头融合在SEQ ID NO: 3所示的TCR β链的N-末端，序列如SEQ ID NO: 28(图15a)所示。接头序列为GGGGS(SEQ ID No: 9)。

SEQ ID NO: 29(图15b)是SEQ ID NO: 28对应的核酸序列。

载体构建

将编码1G4 TCR α链的SEQ ID NO: 2(图1b)和抗体轻链融合1G4 TCR β链的SEQ ID NO: 29(图15b)，以及抗体重链的SEQ ID NO: 6(图3b)基因分别克隆到pET-28a的表达质粒，该质粒含有T7启动子，以便在大肠杆菌BL21-DE3菌株中高水平表达目的基因。

表达

构建好的质粒分别转化到大肠杆菌菌株BL21-DE3中，卡那霉素抗性的单克隆在LB培养基(卡那霉素50 μg/ml)中37℃生长至OD_{600}为1.0左右，然后用1 mM的IPTG诱导蛋白表达。诱导后3小时，在Thermo Scientific HERAEUS X1R离心机中以4000 g离心15分钟收集细胞。使用20 ml的BugBuster Master Mix(Merck Millipore)，涡旋震荡重悬菌体，然后在室温振荡处理20 min后，放入提前预冷好的高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min，然后去除上清。再次加入10 ml的BugBuster Master Mix，涡旋震荡重悬沉淀，室温振荡处理5 min。再次向其中加入30 ml的稀释10倍的BugBuster(Merck Millipore)，上下颠倒几次以混匀液体，再次放入高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min。弃上清后，加入30 ml的稀释10倍的BugBuster，涡旋震荡重悬沉淀，放入高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min。弃去上清，重复上一步两次。弃去上清，加入30 ml 的PBS 重悬包涵体，并且6000 g，4℃，离心15 min。弃去上清后，加入6 M 的盐酸胍溶解包涵体。将纯化的包涵体进行倍比稀释，然后取样进行SDS-PAGE 检测其纯度和估计其产量，并将所有的包涵体进行蛋白定量，并分装，转入-80℃进行保存。

复性

配制TCR的复性缓冲液(5 M尿素，100 mM Tris pH 8.1，0.4 M L-精氨酸，2 mM EDTA，6.5 mM 半胱胺，1.87 mM 胱胺)，并提前预冷至4℃。从冻存液中解冻约12 mg的TCR α链和11.2 mg的抗体轻链-TCR β链，6 mg抗体重链包涵体。分别加入到6 ml 6 M盐酸胍溶液中，并加入终浓度为15 mM的DTT，混匀后，放置在37℃温箱中孵育40 min。将孵育好的TCR α 链和轻链-TCR β链，以及抗体重链的包涵体分别加入到TCR 的复性缓冲液中，并在冷库中反应30 min。准备10 kDa的透析袋，将反应后的复性液加入到透析袋中，然后放入到提前预冷好的去离子水中，在冷库中透析过夜。第二天，将透析袋转移至提前预冷好的10 mM Tris-HCl中进行透析。晚上再将透析袋转移至提前预冷好的10 mM Tris-HCl中进行透析过夜。

纯化

通过下文所述3步纯化方法将可溶性且正确折叠的多结构域融合分子与错误折叠、降解产物和杂质分离。

首先使用阴离子交换纯化。将复性透析好的样品放入提前预冷好的高速离心机中，8000×g，15 min，4℃以离心去除沉淀，并且再次用0.45 μm 的滤膜过滤上清。

利用阴离子交换柱HiTrap® Q HP(GE Healthcare)来纯化复性的样品。先用A液(10mM Tris-HCl，pH8.0)冲洗4个柱体积后，再以流速为5 ml/min 的流速进行上样。待样品完全上样后，再次用A液冲洗柱子约4个柱体积，当电导和UV_{280}都趋于稳定的时候开始进行梯度洗脱，设置0-100%的B液(1M NaCl+10mM Tris-HCl，PH 8.0)，时间为50 min，以3 ml/min 的流速洗脱样品，当UV_{280}明显升高时开始收集，各管收集1 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。

之后再使用分子筛(Superdex 75， GE Healthcare)纯化。上一步纯化的样品用10 kDa 的超滤管进行浓缩，以3500×g，4℃浓缩至500 μl，之后进行分子筛纯化。将分子筛先用去离子水进行平衡，然后用PBS 再次平衡。清洗500 μl 的上样环并且进行上样，上样结束后再次用PBS 进行平衡及洗脱，流速为1 ml/min，各管收集0.4 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。

最后再进行一次阴离子交换纯化，使用阴离子交换柱HiTrap® Q HP(GE Healthcare)。将上一步纯化的样品使用预冷的10 mM Tris 稀释20倍，再进行上样。先用A液冲洗4个柱体积后，再以流速为5 ml/min 的流速进行上样。待样品完全上样后，再次用A液冲洗柱子约4个柱体积，当电导和UV_{280}都趋于稳定的时候开始进行梯度洗脱，设置0-100%的B液，时间为50 min，以3 ml/min 的流速洗脱样品，当UV_{280}明显升高时开始收集，各管收集1 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。用10 kDa 的超滤管进行浓缩，以3500×g，4℃浓缩至500 μl，并使用PBS缓冲液进行缓冲液置换，并测定其浓度，然后分装保存于-80℃。

纯化的蛋白的SDS-PAGE情况如图31(B)所示：泳道1：非还原状态下的多结构域双功能融合分子VL100-TCR β形式；泳道2：分子量标记；泳道3，还原状态下的多结构域双功能融合分子VL100-TCR β形式。

实施例8

制备AFP TCR β链的N-末端通融合抗体重链的多结构域双功能融合分子(VH105-TCR β形式)

SEQ ID NO: 30(图16a)是AFP TCR α链的氨基酸序列，其中Cys200置换其TRAC恒定区的Pro88。

SEQ ID NO: 31(图16b)是SEQ ID NO: 30对应的核酸序列。

SEQ ID NO: 32(图17a)是AFP TCR β链的N-末端经接头融合了抗体重链可变区的氨基酸序列(Gln105Cys)，并且其中Cys257置换其TRBC恒定区的Ala18。

SEQ ID NO: 33(图17b)是SEQ ID NO: 32对应的核酸序列。

本实施例中的AFPTCR能结合呈递在HLA-A*0201分子上的FMNKFIYEI(SEQ ID NO:38)短肽。

载体构建

将编码AFP TCR α链的SEQ ID NO: 31(图16b)和抗体重链融合AFP TCR β链的SEQ ID NO: 33(图17b)，以及抗体轻链的SEQ ID NO: 23(图12b)基因分别克隆到pET-28a的表达质粒，该质粒含有T7启动子，以便在大肠杆菌BL21-DE3菌株中高水平表达目的基因。

表达

构建好的质粒分别转化到大肠杆菌菌株BL21-DE3中，卡那霉素抗性的单克隆在LB培养基(卡那霉素50 μg/ml)中37℃生长至OD_{600}为1.0左右，然后用1 mM的IPTG诱导蛋白表达。诱导后3小时，在Thermo Scientific HERAEUS X1R离心机中以4000 g离心15分钟收集细胞。使用20 ml的BugBuster Master Mix(Merck Millipore)，涡旋震荡重悬菌体，然后在室温振荡处理20 min后，放入提前预冷好的高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min，然后去除上清。再次加入10 ml的BugBuster Master Mix，涡旋震荡重悬沉淀，室温振荡处理5 min。再次向其中加入30 ml的稀释10倍的BugBuster(Merck Millipore)，上下颠倒几次以混匀液体，再次放入高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min。弃上清后，加入30 ml的稀释10倍的BugBuster，涡旋震荡重悬沉淀，放入高速离心机中，6000 g，4℃，离心15 min。弃去上清，重复上一步两次。弃去上清，加入30 ml 的PBS 重悬包涵体，并且6000 g，4℃，离心15 min。弃去上清后，加入6 M 的盐酸胍溶解包涵体。将纯化的包涵体进行倍比稀释，然后取样进行SDS-PAGE 检测其纯度和估计其产量，并将所有的包涵体进行蛋白定量，并分装，转入-80℃进行保存。

复性

配制TCR的复性缓冲液(5 M尿素，100 mM Tris pH 8.1，0.4 M L-精氨酸，2 mM EDTA，6.5 mM 半胱胺，1.87 mM 胱胺)，并提前预冷至4℃。从冻存液中解冻约12 mg的TCR α链和11.2 mg的抗体重链-TCR β链，6 mg抗体轻链包涵体。分别加入到6 ml 6 M盐酸胍溶液中，并加入终浓度为15 mM的DTT，混匀后，放置在37℃温箱中孵育40 min。将孵育好的TCR α 链和重链-TCR β链，以及抗体轻链的包涵体分别加入到TCR 的复性缓冲液中，并在冷库中反应30 min。准备10 kDa的透析袋，将反应后的复性液加入到透析袋中，然后放入到提前预冷好的去离子水中，在冷库中透析过夜。第二天，将透析袋转移至提前预冷好的20 mM Tris-HCl中进行透析。晚上再将透析袋转移至提前预冷好的20 mM Tris-HCl中进行透析过夜。

纯化

通过下文所述2步纯化方法将可溶性且正确折叠的多结构域融合分子与错误折叠、降解产物和杂质分离。

首先使用阴离子交换纯化。将复性透析好的样品放入提前预冷好的高速离心机中，8000×g，15 min，4℃以离心去除沉淀，并且再次用0.45 μm 的滤膜过滤上清。利用阴离子交换柱HiTrap® Q HP(GE Healthcare)来纯化复性的样品。先用A液(10mM

Tris-HCl，pH8.0)冲洗4 个柱体积后，再以流速为5 ml/min 的流速进行上样。待样品完全上样后，再次用A液冲洗柱子约4个柱体积，当电导和UV_{280}都趋于稳定的时候开始进行梯度洗脱，设置0-100%的B液(1M NaCl+10mM Tris-HCl，PH 8.0)，时间为50 min，以3 ml/min 的流速洗脱样品，当UV_{280}明显升高时开始收集，各管收集1 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。

之后再使用分子筛(Superdex 75， GE Healthcare)纯化。上一步纯化的样品用10 kDa 的超滤管进行浓缩，以3500×g，4℃浓缩至500 μl，之后进行分子筛纯化。将分子筛先用去离子水进行平衡，然后用PBS 再次平衡。清洗500 μl 的上样环并且进行上样，上样结束后再次用PBS 进行平衡及洗脱，流速为1 ml/min，各管收集0.4 ml。通过12% SDS-PAGE分析峰组分，然后合并。并使用PBS缓冲液进行缓冲液置换，并测定其浓度，然后分装保存于-80℃。

纯化的蛋白的SDS-PAGE情况如图32所示：泳道1：分子量标记；泳道2：非还原状态下的多结构域双功能融合分子VH105-TCR β形式；泳道3:还原状态下的多结构域双功能融合分子VH105-TCR β形式。

实施例9

VH-TCR β或者VL-TCR β形式的多结构域双功能融合分子的性质

双功能融合分子能够重定向T细胞特异性杀伤肿瘤细胞已在多篇研究中报道。其基本原理是其可以模拟T细胞活化发挥效应功能的关键信号，一方面通过其高亲和的特异性TCR识别肿瘤细胞表面的pMHC复合物，另一方面通过其CD3抗体端激活T细胞活化的下游信号通路，从而定向T细胞特异性杀伤肿瘤细胞。

以下实施例证明本发明的多结构域双功能融合分子能够重定向$CD8^+$T细胞以杀伤靶细胞系。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)转化为红色的甲臜(formanzan)。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490 nm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。本实施例LDH实验选用的靶细胞系为MDA-MB-231(NY-ESO-1阳性，A2阳性，乳腺癌细胞系)、MDA-MB-231(NY-ESO-1阴性，A2阳性，乳腺癌细胞系)和NCI-H1299-A2(NY-ESO-1阳性，A2阳性，肺癌细胞系)、NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阴性，肺癌细胞系)、HepG2(A2阳性，AFP阳性，肝癌细胞系)、NCI-H1299-A2(A2阳性，AFP阴性，肺癌细胞系)、HepG2(A2阳性，gp100阳性，肝癌细胞系)、NCI-H1299(A2阴性，gp100阳性，肺癌细胞系)。

9.1 VH44-TCR β-1G4、VH105-TCR β-1G4的多结构域双功能融合分子重定向$CD8^+$T细胞杀伤MDA-MB-231(NY-ESO-1阳性，A2阳性)乳腺癌细胞系和

NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阳性)肺癌细胞系

将$CD8^+$T细胞作为效应细胞，将MDA-MB-231(NY-ESO-1阳性，A2阳性)乳腺癌细胞系与NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阳性)肺癌细胞系作为靶细胞，所选用的效靶比为5:1。将所需要的效应细胞和靶细胞都按照所需要的细胞数用培养基稀释好，即所需要的效应细胞的细胞密度为1×10^6/ml，而所需要的靶细胞的细胞密度为2×10^5/ml。同时使用MDA-MB-231(NY-ESO-1阴性，A2阳性)乳腺癌细胞系和NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阴性)肺癌细胞系作为阴性对照靶细胞。

当NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阳性)肺癌细胞系作为靶细胞时，将VH44-TCR β-1G4、VH105-TCR β-1G4多结构域双功能融合分子与对照分子(VH-TCR β-1G4无免疫活性的二聚体融合分子)的蛋白用培养基全部稀释成4×10^{-7} M，4×10^{-8} M，4×10^{-9} M，4×10^{-10} M，4×10^{-11} M，4×10^{-12} M。

当MDA-MB-231(NY-ESO-1阳性，A2阳性)乳腺癌细胞系作为靶细胞时，将VH44-TCR β-1G4、VH105-TCR β-1G4多结构域双功能融合分子与对照分子(VH-TCR β-1G4无免疫活性的二聚体融合分子)的蛋白用培养基全部稀释成4×10^{-9}M，4×10^{-10}M，4×10^{-11} M，4×10^{-12} M，4×10^{-13} M。

准备好96 孔圆底板，然后向孔中加入50 μl的效应细胞，50 μl的多结构域双功能融合分子蛋白和100 μl的靶细胞，同时设置靶细胞最大裂解孔，靶细胞自发孔，效应细胞自发孔，培养基自发孔以及培养基加裂解液的自发孔，每个孔的终体积均为200 μl，并且各有三个复孔。将加完细胞的96孔圆底板放入37℃，5% CO_2的细胞培养箱中培养24h。之后将96孔圆底细胞培养板放入到离心机中，250×g，4 min。取出50 μl上清到96孔平底板中，并且加入50 μl底物液，避光常温反应30 min。反应结束后，加入50 μl的终止液，立即用酶标仪测定490 nm 处的吸光值。根据产品说明书计算特异性杀伤的效率=(实验孔-效应细胞自发孔-靶细胞自发孔)/(靶细胞最大裂解孔-靶细胞自发孔)。

结果如图35和图36所示，VH44-TCR β-1G4、VH105-TCR β-1G4形式的多结构域双功能分子，能够介导$CD8^+$T细胞对于MDA-MB-231(NY-ESO-1阳性，A2阳性)乳腺癌细胞系和NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阳性)肺癌细胞系的杀伤，而无法杀伤MDA-MB-231(NY-ESO-1阴性，A2阳性)乳腺癌细胞系和NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阴性)肺癌细胞系。用Graphpad Prism软件将各孔观察到的杀伤百分比对相应蛋白浓度作图，确定EC50值。其中VH44-TCR β-1G4形式对MDA-MB-231(NY-ESO-1阳性，A2阳性)乳腺癌细胞系的EC50值为$2.9e^{-12}$，对NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阳性)肺癌细胞系的EC50值为$5.7e^{-11}$；VH105-TCR β-1G4形式对MDA-MB-231(NY-ESO-1阳性，A2阳性)乳腺癌细胞系的EC50值为$2.7e^{-12}$，对NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阳性)肺癌细胞系的EC50值为$2.4e^{-11}$。

9.2 VL43-TCR β-1G4、VL100-TCR β-1G4形式的多结构域双功能融合分子重定向$CD8^+$细胞杀伤NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阳性)肺癌细胞系

将$CD8^+$T细胞作为效应细胞，将NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阳性)肺癌细胞系作为靶细胞，所选用的效靶比为5:1。将所需要的效应细胞和靶细胞都按照所需要的细胞数用培养基稀释好，即所需要的效应细胞的细胞密度为1×10^6/ml，而所需要的靶细胞的细胞密度为2×10^5/ml。同时使用NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阴性)肺癌细胞系作为阴性对照靶细胞。

将VL43-TCR β-1G4、VL100-TCR β-1G4形式的多结构域双功能融合分子与对照分子(VL-TCR β-1G4无免疫活性的二聚体融合分子)的蛋白浓度用培养基全部稀释成4×10^{-7} M，4×10^{-8} M，4×10^{-9} M，4×10^{-10} M，4×10^{-11} M，4×10^{-12} M。

准备好96孔圆底板，然后向孔中加入50 μl的效应细胞，50 μl的多结构域双功能融合分子蛋白和100 μl的靶细胞，同时设置靶细胞最大裂解孔，靶细胞自发孔，效应细胞自发孔，培养基自发孔以及培养基加裂解液的自发孔，每个孔的终体积均为200 μl，并且各有三个复孔。将加完细胞的96孔圆底板放入37℃，5% CO_2的细胞培养箱中培养24 h。之后将96孔圆底细胞培养板放入到离心机中，250×g，4 min。取出50 μl上清到96孔平底板中，并且加入50 μl底物液，避光常温反应30 min。反应结束后，加入50 μl的终止液，立即用酶标仪测定490 nm 处的吸光值。根据产品说明书计算特异性杀伤的效率=(实验孔-效应细胞自发孔-靶细胞自发孔)/(靶细胞最大裂解孔-靶细胞自发孔)。

结果如图35所示，VL43-TCR β-1G4、VL100-TCR β-1G4形式的多结构域双功能分子，能够介导$CD8^+$T细胞对于NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阳性)肺癌细胞系的杀伤而无法杀伤NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阴性)肺癌细胞系。用Graphpad Prism软件将各孔观察到的杀伤百分比对相应蛋白浓度作图，确定EC50值。其中VL44-TCR β-1G4形式对NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阳性)肺癌细胞系的EC50值为$1.7e^{-10}$；VL100-TCR β-1G4形式对NCI-H1299(NY-ESO-1阳性，A2阳性)肺癌细胞系的EC50值为$3.4e^{-10}$

9.3 VH105-TCR β-AFP形式的多结构域双功能融合分子重定向$CD8^+$细胞杀伤HepG2(A2阳性，AFP阳性，肝癌细胞系)

将$CD8^+$T细胞作为效应细胞，将HepG2(A2阳性，AFP阳性)肝癌细胞系作为靶细胞，所选用的效靶比为1:1。将所需要的效应细胞和靶细胞都按照所需要的细胞数用培养基稀释好，即所需要的效应细胞的细胞密度为2×10^5/ml，而所需要的靶细胞的细胞密度为2×10^5/ml。同时使用NCI-H1299-A2(A2阳性，AFP阴性)肺癌细胞系作为阴性对照靶细胞。

将VH105-TCR β-AFP形式的多结构域双功能融合分子的蛋白浓度，用培养基全部稀释成4×10^{-7}M，4×10^{-8}M，4×10^{-9}M，4×10^{-10}M，4×10^{-11}M，4×10^{-12}M，4×10^{-13}M。

准备好96孔圆底板，然后向孔中加入50 μl的效应细胞，50 μl的多结构域双功能融合分子蛋白和100 μl的靶细胞，同时设置靶细胞最大裂解孔，靶细胞自发孔，效应细胞自发孔，培养基自发孔以及培养基加裂解液的自发孔，每个孔的终体积均为200 μl，并且各有三个复孔。将加完细胞的96孔圆底板放入37℃，5% CO_2的细胞培养箱中培养24 h。之后将96孔圆底细胞培养板放入到离心机中，250×g，4 min。取出50 μl上清到96孔平底板中，并且加入50 μl底物液，避光常温反应30 min。反应结束后，加入50 μl的终止液，立即用酶标仪测定490 nm 处的吸光值。根据产品说明书计算特异性杀伤的效率=(实验孔-效应细胞自发孔-靶细胞自发孔)/(靶细胞最大裂解孔-靶细胞自发孔)。

结果如图37所示，VH105-TCR β-AFP多结构域双功能分子，能够介导$CD8^+$T细胞对HepG2(A2阳性，AFP阳性)肝癌细胞系的高效杀伤，对NCI-H1299-A2(A2阳性，AFP阴性)肺癌细胞系的杀伤效率低；当蛋白在安全剂量下(<1×10^{-9} M),不杀伤阴性靶细胞。用Graphpad Prism软件将各孔观察到的杀伤百分比对相应蛋白浓度作图，确定EC50值。VH105-TCR β-AFP对HepG2(A2阳性，AFP阳性)肝癌细胞系的EC50值为$1.05e^{-8}$；对NCI-H1299-A2(A2阳性，AFP阴性)肺癌细胞系的EC50值为$2.7e^{-6}$。

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。

权 利 要 求

1. 一种融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白包含从N端到C端的结构如式Ia或Ib所示的多肽：

A1-L-B (Ia)；

B-L-A1 (Ib)；

其中，

元件A1为无免疫效应的多肽分子；

元件B为特异性结合pMHC表位的多肽受体分子或其组成部分、或其片段；

元件L为柔性接头；所述柔性接头是可选择的；

“-”为共价键。

2. 一种融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白从N端到C端的结构如式Ia或Ib所示：

A1-L-B (Ia)；

B-L-A1 (Ib)；

其中，

元件A1为无免疫效应的多肽分子；

元件B为特异性结合pMHC表位的多肽受体分子或其组成部分、或其片段；

元件L为柔性接头；

“-”为共价键。

3. 如权利要求1或2所述融合蛋白，其特征在于，所述元件A1为抗体的重链可变区或抗体的轻链可变区。

4. 如权利要求3所述的融合蛋白，其特征在于，所述抗体的重链可变区包含如SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 20或SEQ ID NO: 5所示的序列。

5. 如权利要求3所述的融合蛋白，其特征在于，所述抗体的轻链可变区包含如SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 22或SEQ ID NO: 10所示的序列。

6. 如权利要求1或2所述融合蛋白，其特征在于，所述元件B选自下组：TCR分子、单链αβTCR、TCRα链/TCRβ链异二聚体复合分子、抗体分子Fab复合分子、单链抗体分子、或其组合。

7. 如权利要求6所述的融合蛋白，其特征在于，所述TCRα链氨基酸序列包含如SEQ ID NO:1所示的序列，TCRβ链氨基酸序列包含如SEQ ID NO:3所示的序列。

8. 如权利要求7所述的融合蛋白，其特征在于，所述元件A1通过柔性接头L链接于TCRβ链。

9. 如权利要求1或2所述融合蛋白，其特征在于，所述元件L包含如(GGGGS)n的结构，其中n为1-5的正整数，优选包含如SEQ ID NO: 9所示的序列。

10. 如权利要求1所述融合蛋白，其特征在于，所述融合蛋白的氨基酸序列包含如SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:32所示的序列，或者与SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:24、SEQ ID NO:26、SEQ ID NO:28、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:32具有至少95%以上、98%以上、99%以上、99.9%以上一致性的序列。

11. 一种融合蛋白复合分子，其特征在于，所述融合蛋白复合分子的结构如式Ic或Id所示：

A2…A1-L-B (Ic)；

B-L-A1…A2 (Id)；

其中，

元件A1、A2各自独立地为无免疫效应的多肽分子；

元件B为特异性结合pMHC表位的多肽受体分子或其组成部分、或其片段；和

元件L为柔性接头；

“-”为共价键；

“…”为二硫键或蛋白结构域间的非共价相互作用。

12. 如权利要求11所述的融合蛋白复合分子，其特征在于，所述元件A1为抗体的重链可变区，且所述A2元件为抗体的轻链可变区；或者，所述元件A1为抗体的轻链可变区，且所述A2元件为抗体的重链可变区。

13. 如权利要求12所述的融合蛋白复合分子，其特征在于，所述抗体的重链可变区包含如SEQ ID NO: 14、SEQ ID NO: 20或SEQ ID NO: 5所示的序列。

14. 如权利要求12所述的融合蛋白复合分子，其特征在于，所述抗体的轻链可变区包含如SEQ ID NO: 16、SEQ ID NO: 22或SEQ ID NO: 10所示的序列。

15. 如权利要求11所述的融合蛋白复合分子，其特征在于，所述元件B选自下组：TCR分子、单链αβTCR、TCRα链/TCRβ链异二聚体复合分子、抗体分子Fab复合分子、单链抗体分子、或其组合。

16. 如权利要求15所述的融合蛋白复合分子，其特征在于，所述TCRα链氨基酸序列包含如SEQ ID NO:1所示的序列，TCRβ链氨基酸序列包含如SEQ ID NO:3所示的序列。

17. 如权利要求16所述的融合蛋白复合复合分子，其特征在于，所述元件A1通过柔性接头L链接于TCRβ链。

18. 如权利要求11所述的融合蛋白复合分子，其特征在于，所述元件L包含如(GGGGS)n的结构，其中n为1-5的正整数，优选包含如SEQ ID NO:9所示的序列。

19. 一种多核苷酸，其特征在于，所述多核苷酸编码如权利要求1至10中任一项所述的融合蛋白或如权利要求11至18中任一项所述的融合蛋白复合分子。

20. 一种表达载体，其特征在于，所述表达载体含有权利要求19所述的多核苷酸。

21. 一种宿主细胞，其特征在于，所述宿主细胞含有权利要求20所述的表达载体或权利要求19所述的多核苷酸。

22. 一种产生如权利要求1至10中任一项所述融合蛋白或者如权利要求11至18中任一项所述融合蛋白复合分子的方法，其特征在于，包括步骤：

(a)在适合产生如权利要求1至10中任一项所述融合蛋白或者如权利要求11至18中任一项所述融合蛋白复合分子的条件下，培养权利要求21所述的宿主细胞，从而获得含所述融合蛋白或所述融合蛋白复合分子的培养物；

(b)从所述培养物中分离或回收所述的融合蛋白或融合蛋白复合分子；以及

(c)任选地，纯化和/或修饰步骤(b)中获得的融合蛋白或融合蛋白复合分子。

23. 一种免疫偶联物，其特征在于，所述免疫偶联物含有：

(a) 如权利要求1至10中任一项所述融合蛋白或者如权利要求11至18中任一项所述融合蛋白复合分子；和

(b)选自下组的偶联部分：可检测标记物、药物、毒素、细胞因子、放射性核素、酶、金纳米颗粒/纳米棒、纳米磁粒、病毒外壳蛋白或VLP、或其组合。

24. 一种药物组合物，其特征在于，所述药物组合物包含如权利要求1至10中任一项所述融合蛋白、如权利要求11至18中任一项所述融合蛋白复合分子、如权利要求19所述的多核苷酸、如权利要求20所述的表达载体、如权利要求21所述的宿主细胞、如权利要求23所述的免疫偶联物，或其组合，以及药学上可接受的载体。

25. 一种重组蛋白，所述的重组蛋白包含

(i) 如权利要求1至10中任一项所述融合蛋白、如权利要求11至18中任一项所述融合蛋白复合分子；以及

(ii) 任选的协助表达和/或纯化的标签序列。

26. 如权利要求1至10中任一项所述融合蛋白、如权利要求11至18中任一项所述融合蛋白复合分子、如权利要求19所述的多核苷酸、如权利要求20所述的表达载体、如权利要求21所述的宿主细胞、如权利要求23所述的免疫偶联物、如权利要求24所述的药物组合物、或如权利要求25所述的重组蛋白的用途，其特征在于，用于制备在受试者中预防或治疗肿瘤的药物。

27. 如权利要求26所述的用途，其特征在于，所述肿瘤包含乳腺癌、肺癌、肝癌，或其组合。

28. 如权利要求26所述的用途，其特征在于，所述受试者是哺乳动物，优选为人。