

(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2016年11月10日 (10.11.2016)



(10) 国际公布号
WO 2016/177339 A1

- (51) 国际专利分类号:
C07K 14/725 (2006.01) A61K 48/00 (2006.01)
C12N 15/12 (2006.01) A61K 35/17 (2015.01)
C12N 15/867 (2006.01) A61P 35/00 (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) A61P 37/02 (2006.01)
A61K 38/17 (2006.01)
- (21) 国际申请号: PCT/CN2016/081180
- (22) 国际申请日: 2016年5月5日 (05.05.2016)
- (25) 申请语言: 中文
- (26) 公布语言: 中文
- (30) 优先权:
201510228932.6 2015年5月6日 (06.05.2015) CN
- (71) 申请人: 广州市香雪制药股份有限公司 (GUANG-ZHOU XIANGXUE PHARMACEUTICAL CO. LTD) [CN/CN]; 中国广东省广州市萝岗区科学城金峰园路2号, Guangdong 510663 (CN)。
- (72) 发明人: 李懿 (LI, Yi); 中国广东省广州市萝岗区科学城金峰园路2号, Guangdong 510663 (CN)。 区裕升 (OU, Yusheng); 中国广东省广州市萝岗区科学城金峰园路2号, Guangdong 510663 (CN)。 吴万里 (WU, Wanli); 中国广东省广州市萝岗区科学城金峰园路2号, Guangdong 510663 (CN)。
- (74) 代理人: 上海一平知识产权代理有限公司 (XU & PARTNERS, LLC.); 中国上海市普陀区真北路 958

号天地科技广场1号楼106室, Shanghai 200333 (CN)。

- (81) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的国家保护): AE, AG, AL, AM, AO, AT, AU, AZ, BA, BB, BG, BH, BN, BR, BW, BY, BZ, CA, CH, CL, CN, CO, CR, CU, CZ, DE, DK, DM, DO, DZ, EC, EE, EG, ES, FI, GB, GD, GE, GH, GM, GT, HN, HR, HU, ID, IL, IN, IR, IS, JP, KE, KG, KN, KP, KR, KZ, LA, LC, LK, LR, LS, LU, LY, MA, MD, ME, MG, MK, MN, MW, MX, MY, MZ, NA, NG, NI, NO, NZ, OM, PA, PE, PG, PH, PL, PT, QA, RO, RS, RU, RW, SA, SC, SD, SE, SG, SK, SL, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, ZA, ZM, ZW。
- (84) 指定国 (除另有指明, 要求每一种可提供的地区保护): ARIPO (BW, GH, GM, KE, LR, LS, MW, MZ, NA, RW, SD, SL, ST, SZ, TZ, UG, ZM, ZW), 欧亚 (AM, AZ, BY, KG, KZ, RU, TJ, TM), 欧洲 (AL, AT, BE, BG, CH, CY, CZ, DE, DK, EE, ES, FI, FR, GB, GR, HR, HU, IE, IS, IT, LT, LU, LV, MC, MK, MT, NL, NO, PL, PT, RO, RS, SE, SI, SK, SM, TR), OAPI (BF, BJ, CF, CG, CI, CM, GA, GN, GQ, GW, KM, ML, MR, NE, SN, TD, TG)。

本国际公布:

- 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
- 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

(54) Title: T CELL RECEPTOR FOR RECOGNIZING NY-ESO-1 ANTIGEN SHORT-CHAIN POLYPEPTIDE

(54) 发明名称: 识别 NY-ESO-1 抗原短肽的 T 细胞受体

(57) Abstract: Provided is a T cell receptor (TCR) capable of binding specifically antigen short-chain polypeptide SLLMWITQC derived from NY-ESO-1. The antigen short-chain polypeptide is capable of forming a complex with HLA A0201 and being presented together on the surface of a cell. Also provided are a nucleic acid molecule encoding the TCR and a vector comprising the nucleic acid molecule. In addition, the present invention also provides a cell for transducing the TCR of the present invention.

(57) 摘要: 本发明提供了一种能够特异性结合衍生自 NY-ESO-1 抗原短肽 SLLMWITQC 的 T 细胞受体(TCR), 所述抗原短肽 SLLMWITQC 可与 HLA A0201 形成复合物并一起被呈递到细胞表面。本发明还提供了编码所述 TCR 的核酸分子以及包含所述核酸分子的载体。另外, 本发明还提供了转导本发明 TCR 的细胞。



WO 2016/177339 A1

说明书

识别 NY-ESO-1 抗原短肽的 T 细胞受体

5 技术领域

本发明涉及能够识别源自 NY-ESO-1 抗原短肽的 TCR, 本发明还涉及转导上述 TCR 来获得的 NY-ESO-1 特异性的 T 细胞, 及他们在预防和治疗 NY-ESO-1 相关疾病中的用途。

10 背景技术

NY-ESO-1 属于肿瘤-睾丸抗原 (Cancer-Testis Antigen, CTA) 家族, 能在睾丸、卵巢组织以及多种不同类型的肿瘤组织中表达, 而在其他正常组织中不表达, 是一种特异性较强的肿瘤抗原。NY-ESO-1 是一种内源性抗原, 在细胞内生成后被降解成小分子多肽, 并与 MHC (主组织相容性复合体) 分子结合形成复合物, 被呈递到细胞表面。SLLMWITQC (157-165) 是衍生自 NY-ESO-1 抗原的短肽, 是 NY-ESO-1 相关疾病治疗的一种靶标。研究显示, NY-ESO-1 在多种肿瘤组织中均有表达, 在神经母细胞瘤 (Rodolfo M, *et al.*, *Cancer Res*, 2003, 63(20):6948-6955)、肉瘤 (Jungbth A A *et al.*, *Int J Cancer*, 2001, 94(2):252-256)、恶性黑色素瘤 (Barrow C, *et al.*, *Clin Cancer Res*, 2006, 12(3 Pt 1):764-771) 中有非常高的表达, 同时在前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、肝细胞癌、口腔鳞癌 (Ries J, *et al.*, *Anticancer RES*, 2009, 29(12):5125-5130)、以及食管癌 (Fujita S, *Clin Cancer Res*, 2004, 10(19):6551-6558) 中也有较高的表达。对于上述疾病的治疗, 可以采用化疗和放射性治疗等方法, 但都会对自身的正常细胞造成损害。

25 T 细胞过继免疫治疗是将对靶细胞抗原具有特异性的反应性 T 细胞转入病人体内, 使其针对靶细胞发挥作用。T 细胞受体 (TCR) 是 T 细胞表面的一种膜蛋白, 其能够识别相应的靶细胞表面的抗原短肽。在免疫系统中, 通过抗原短肽特异性的 TCR 与短肽-主组织相容性复合体 (pMHC 复合物) 的结合引发 T 细胞与抗原呈递细胞 (APC) 直接的物理接触, 然后 T 细胞及 APC 两者的其他细胞膜表面分子就发生相互作用, 引起一系列后续的细胞信号传递和其他生理反应, 从而使得不同抗原特异性的 T 细胞对其靶细胞发挥免疫效应。因此, 本领域技术人员致力于分离出对 NY-ESO-1 抗原短肽具有特异性的 TCR, 以及将该 TCR 转导 T 细胞来获得对 NY-ESO-1 抗原短肽具有特异性的 T 细胞, 从而使他们在细胞免疫治疗中发挥作用。

35 发明内容

本发明的目的在于提供一种识别 NY-ESO-1 抗原短肽的 T 细胞受体及其应用。

本发明的第一方面, 提供了一种 T 细胞受体 (TCR), 所述 TCR 能够与 SLLMWITQC-HLA 复合物特异性地结合, 其包含 TCR α 链可变域和 TCR β 链可变域, 并且所述 TCR α 链可变域为与 SEQ ID NO:1 具有至少 90% (较佳地至少 95%, 更佳地至少 98%, 最佳的至少 99%) 序列相同性的氨基酸序列。

40 在另一优选例中, 所述 TCR β 链可变域为与 SEQ ID NO: 5 具有至少 90% 序列相同性的氨基酸序列。

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

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

- 5 α CDR1- ATGYPS (SEQ ID NO: 10);
 α CDR2- ATKADDK (SEQ ID NO: 11); 和
 α CDR3- ALTLNAGNMLT (SEQ ID NO: 12); 和/或

所述 TCR β 链可变域的 3 个互补决定区为:

- 10 β CDR1- SNHLY (SEQ ID NO: 13);
 β CDR2- FYNNEI (SEQ ID NO: 14); 和
 β CDR3- ASLDPRAGTDTQY (SEQ ID NO: 15)。

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

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

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

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

在另一优选例中, 所述 TCR 是可溶的。

在另一优选例中, 所述 TCR 为单链。

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

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

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

30 在另一优选例中, 所述 TCR 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:30。

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

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

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

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

- 40 TRAC*01 外显子 1 的 Thr48 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser57;
 TRAC*01 外显子 1 的 Thr45 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser77;
 TRAC*01 外显子 1 的 Tyr10 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser17;
 TRAC*01 外显子 1 的 Thr45 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Asp59;

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 的 α 链氨基酸序列为 SEQ ID NO:26 和/或所述 TCR 的 β 链氨基酸序列为 SEQ ID NO:28。

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

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

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

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

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

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

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

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

本发明的第五方面, 提供了一种分离的宿主细胞, 所述的宿主细胞中含有本发明第四方面所述的载体或基因组中整合有外源的本发明第三方面所述的核酸分子。
30

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

35 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所述的 TCR、本发明第二方面所述的 TCR 复合物、本发明第三方面所述的核酸分子、或本发明第六方面所述的细胞。

40 本发明的第八方面, 提供了本发明第一方面所述的 T 细胞受体、或本发明第二方面所述的 TCR 复合物、本发明第三方面所述的核酸分子、本发明第四方面所述的载体或本发明第六方面所述的细胞的用途, 其特征在于, 用于制备治疗肿瘤或自身免疫疾病的药物。

本发明的第九方面，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、本发明第二方面所述的 TCR 复合物、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；

5 优选地，所述的疾病为神经母细胞瘤、肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、肝细胞癌、口腔鳞癌以及食管癌。

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。

10

附图说明

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

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

图 3 为单克隆细胞的 CD8⁺及四聚体-PE 双阳性染色结果。

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

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

图 6 为纯化后得到的可溶性 TCR 的胶图。

图 7a 和图 7b 分别为单链 TCR 的氨基酸序列和核苷酸序列。

图 8a 和图 8b 分别为单链 TCR α 链的氨基酸序列和核苷酸序列。

图 9a 和图 9b 分别为单链 TCR β 链的氨基酸序列和核苷酸序列。

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

图 11 为本发明可溶性 TCR 与 SLLMWITQC-HLA A0201 复合物结合的 BIAcore 动力学图谱。

图 12a 和图 12b 为本发明 TCR 的功能及特异性检测的 ELISPOT 实验结果。

30

具体实施方式

本发明人经过广泛而深入的研究，找到了与 NY-ESO-1 抗原短肽 SLLMWITQC (157-165) (SEQ ID NO:9) 能够特异性结合的 TCR，所述抗原短肽 SLLMWITQC 可与 HLA A0201 形成复合物并一起被呈递到细胞表面。本发明还提供了编码所述 TCR 的核酸分子以及包含所述核酸分子的载体。另外，本发明还提供了转导
35 本发明 TCR 的细胞。

术语

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

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

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

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

发明详述

TCR 分子

在抗原加工过程中，抗原在细胞内被降解，然后通过 MHC 分子携带至细胞表面。T 细胞受体能够识别抗原呈递细胞表面的肽-MHC 复合物。因此，本发明的第一方面提供了一种能够特异性结合 SLLMWITQC-HLA A0201 复合物的 TCR 分子。优选地，所述 TCR 分子是分离的或纯化的。该 TCR 的 α 和 β 链各具有 3 个互补决定区 (CDR)。

α 链包含具有以下氨基酸序列的 CDR:

α CDR1- ATGYPS (SEQ ID NO: 10)

α CDR2- ATKADDK (SEQ ID NO: 11)

α CDR3- ALTLNAGNMLT (SEQ ID NO: 12)

β 链包含具有以下氨基酸序列的 CDR:

β CDR1- SNHLY (SEQ ID NO: 13)

β CDR2- FYNNEI (SEQ ID NO: 14)

β CDR3- ASLDPRAGTDTQY (SEQ ID NO: 15)

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

与 SEQ ID NO: 5 具有至少 90%，优选地 95%，更优选地 98%序列相同性的氨基酸序列。

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

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

所述单链 TCR 分子的 α 链可变域氨基酸序列包含上述 α 链的 CDR1 (SEQ ID NO: 10)、CDR2 (SEQ ID NO: 11) 和 CDR3 (SEQ ID NO :12)。优选地，所述单链 TCR 分子包含 α 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 1。更优选地，所述单链 TCR 分子的 α 链可变域氨基酸序列为 SEQ ID NO:1。所述单链 TCR 分子的 β 链可变域氨基酸序列包含上述 β 链的 CDR1 (SEQ ID NO: 13)、CDR2 (SEQ ID NO: 14) 和 CDR3 (SEQ ID NO: 15)。优选地，所述单链 TCR 分子包含 β 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 5。更优选地，所述单链 TCR 分子的 β 链可变域氨基酸序列为 SEQ ID NO: 5。

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

天然存在的 TCR 是一种膜蛋白，通过其跨膜区得以稳定。如同免疫球蛋白 (抗体) 作为抗原识别分子一样，TCR 也可以被开发应用于诊断和治疗，这时需要获得可溶性的 TCR 分子。可溶性的 TCR 分子不包括其跨膜区。可溶性 TCR 有很广泛的用途，它不仅可用于研究 TCR 与 pMHC 的相互作用，也可用作检测感染的诊断工具或作为自身免疫病的标志物。类似地，可溶性 TCR 可以被用来将治疗剂 (如细胞毒素化合物或免疫刺激性化合物) 输送到呈递特异性抗原的细胞，另外，可溶性 TCR 还可与其他分子 (如，抗-CD3 抗体) 结合来重新定向 T 细胞，从而使其靶向呈递特定抗原的细胞。本发明也获得了对 NY-ESO-1 抗原

短肽具有特异性的可溶性 TCR。

为获得可溶性 TCR，一方面，本发明 TCR 可以是在其 α 和 β 链恒定域的残基之间引入人工二硫键的 TCR。半胱氨酸残基在所述 TCR 的 α 和 β 链恒定域间形成人工链间二硫键。半胱氨酸残基可以取代在天然 TCR 中合适位点的其他氨基酸残基以形成人工链间二硫键。例如，取代 TRAC*01 外显子 1 的 Thr48 和取代 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser57 的半胱氨酸残基来形成二硫键。引入半胱氨酸残基以形成二硫键的其他位点还可以是：TRAC*01 外显子 1 的 Thr45 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser77；TRAC*01 外显子 1 的 Tyr10 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser17；TRAC*01 外显子 1 的 Thr45 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Asp59；TRAC*01 外显子 1 的 Ser15 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Glu15；TRAC*01 外显子 1 的 Arg53 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser54；TRAC*01 外显子 1 的 Pro89 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Ala19；或 TRAC*01 外显子 1 的 Tyr10 和 TRBC1*01 或 TRBC2*01 外显子 1 的 Glu20。即半胱氨酸残基取代了上述 α 与 β 链恒定域中任一组位点。可在本发明 TCR 恒定域的一个或多个 C 末端截短最多 50 个、或最多 30 个、或最多 15 个、或最多 10 个、或最多 8 个或更少的氨基酸，以使其不包括半胱氨酸残基来达到缺失天然二硫键的目的，也可通过将形成天然二硫键的半胱氨酸残基突变为另一氨基酸来达到上述目的。

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

为获得可溶性 TCR，另一方面，本发明 TCR 还包括在其疏水芯区域发生突变的 TCR，这些疏水芯区域的突变优选为能够使本发明可溶性 TCR 的稳定性提高的突变，如在公开号为 W02014/206304 的专利文献中所述。这样的 TCR 可在其下列可变域疏水芯位置发生突变：(α 和/或 β 链)可变区氨基酸第 11, 13, 19, 21, 53, 76, 89, 91, 94 位，和/或 α 链 J 基因 (TRAJ) 短肽氨基酸位置倒数第 3, 5, 7 位，和/或 β 链 J 基因 (TRBJ) 短肽氨基酸位置倒数第 2, 4, 6 位，其中氨基酸序列的位置编号按国际免疫遗传学信息系统 (IMGT) 中列出的位置编号。本领域技术人员知晓上述国际免疫遗传学信息系统，并可根据该数据库得到不同 TCR 的氨基酸残基在 IMGT 中的位置编号。

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

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以其他方式结合，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 A0201 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。

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

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

核酸分子

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

编码本发明第一方面 TCR 分子 α 链 CDR 区的核苷酸序列如下:

α CDR1- gccacaggatacccttcc (SEQ ID NO: 16)

α CDR2- gccacgaaggctgatgacaag (SEQ ID NO: 17)

α CDR3- gctctgacccttaataatgcaggcaacatgctcacc (SEQ ID NO: 18)
 编码本发明第一方面 TCR 分子 β 链 CDR 区的核苷酸序列如下:

β CDR1- tctaateacttatac (SEQ ID NO: 19)

β CDR2- ttttataataatgaaatc (SEQ ID NO: 20)

5 β CDR3- gccagcctggaccacgagcgggcacagatacgcagtat (SEQ ID NO: 21)

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

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

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

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

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

载体

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

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

优选地, 载体可以将本发明的核苷酸转移至细胞中, 例如 T 细胞中, 使得该细胞表达 NY-ESO-1 抗原特异性的 TCR。理想的情况下, 该载体应当能够在 T
 40 细胞中持续高水平地表达。

细胞

本发明还涉及用本发明的载体或编码序列经基因工程产生的宿主细胞。所

述宿主细胞中含有本发明的载体或染色体中整合有本发明的核酸分子。宿主细胞选自：原核细胞和真核细胞，例如大肠杆菌、酵母细胞、CHO 细胞等。

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

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

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

NY-ESO-1 抗原相关疾病

本发明还涉及在受试者中治疗和/或预防与 NY-ESO-1 相关疾病的方法，其包括过继性转移 NY-ESO-1 特异性 T 细胞至该受试者的步骤。该 NY-ESO-1 特异性 T 细胞可识别 SLLMWITQC-HLA A0201 复合物。

本发明的 NY-ESO-1 特异性的 T 细胞可用于治疗任何呈递 NY-ESO-1 抗原短肽 SLLMWITQC-HLA A0201 复合物的 NY-ESO-1 相关疾病。包括但不限于神经母细胞瘤、肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、肝细胞癌、口腔鳞癌以及食管癌。

治疗方法

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

本发明的主要优点在于：

（1）本发明的 TCR 能够与 NY-ESO-1 抗原短肽复合物 SLLMWITQC-HLA A0201 特异性结合，同时转导了本发明 TCR 的细胞能够被特异性激活并且对靶细胞具有很强的杀伤作用。

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。除非另外说明，否则百分比和份数按重量计算。以下实施

5 中所用的实验材料和试剂如无特别说明均可从市售渠道获得。

实施例 1 克隆 NY-ESO-1 抗原短肽特异性 T 细胞

利用合成短肽 SLLMWITQC（北京赛百盛基因技术有限公司）刺激来自于基因型为 HLA-A0201 的健康志愿者的外周血淋巴细胞（PBL）。将 SLLMWITQC 短肽与带有生物素标记的 HLA-A*0201 复性，制备 pHLA 单倍体。这些单倍体与用 PE 标记的链霉亲和素 (BD 公司) 组合成 PE 标记的四聚体，分选该四聚体及抗 -CD8-APC 双阳性细胞。扩增分选的细胞，并按上述方法进行二次分选，随后用有限稀释法进行单克隆。单克隆细胞用四聚体染色，筛选到的双阳性克隆如图 3 所示。

15 实施例 2 获取 NY-ESO-1 抗原短肽特异性 T 细胞克隆的 TCR 基因与载体的构建

用 Quick-RNA™ MiniPrep（ZYMO research）抽提实施例 1 中筛选到的抗原短肽 SLLMWITQC 特异性、HLA-A0201 限制性的 T 细胞克隆的总 RNA。cDNA 的合成采用 clontech 的 SMART RACE cDNA 扩增试剂盒，采用的引物是设计在人类 TCR 基因的 C 端保守区。将序列克隆至 T 载体 (TAKARA) 上进行测序。应注意，该序列为互补序列，不包含内含子。经测序，该双阳性克隆表达的 TCR 的 α 链和 β 链序列结构分别如图 1 和图 2 所示，图 1a、图 1b、图 1c、图 1d、图 1e 和图 1f 分别为 TCR α 链可变域氨基酸序列、TCR α 链可变域核苷酸序列、TCR α 链氨基酸序列、TCR α 链核苷酸序列、具有前导序列的 TCR α 链氨基酸序列以及具有前导序列的 TCR α 链核苷酸序列；图 2a、图 2b、图 2c、图 2d、图 2e 和图 2f 分别为 TCR β 链可变域氨基酸序列、TCR β 链可变域核苷酸序列、TCR β 链氨基酸序列、TCR β 链核苷酸序列、具有前导序列的 TCR β 链氨基酸序列以及具有前导序列的 TCR β 链核苷酸序列。

经鉴定，α 链包含具有以下氨基酸序列的 CDR：

30 α CDR1- ATGYPS (SEQ ID NO: 10)
 α CDR2- ATKADDK (SEQ ID NO: 11)
 α CDR3- ALTLNAGNMLT (SEQ ID NO: 12)
 β 链包含具有以下氨基酸序列的 CDR：
 β CDR1- SNHLY (SEQ ID NO: 13)
 35 β CDR2- FYNNEI (SEQ ID NO: 14)
 β CDR3- ASLDPRAGTDTQY (SEQ ID NO: 15)

通过重叠 (overlap) PCR 分别将 TCR α 链和 β 链的全长基因克隆至慢病毒表达载体。作为对照用，同时也构建表达 eGFP 的慢病毒载体。之后再

40 包装假病毒。

实施例 3 NY-ESO-1 抗原短肽特异性可溶 TCR 的表达、重折叠和纯化

为获得可溶的 TCR 分子，本发明的 TCR 分子的 α 和 β 链可以分别只包含其

可变域及部分恒定域，并且 α 和 β 链的恒定域中分别引入了一个半胱氨酸残基以形成人工链间二硫键，引入半胱氨酸残基的位置分别为 TRAC*01 外显子 1 的 Thr48 和 TRBC2*01 外显子 1 的 Ser57；其 α 链的氨基酸序列与核苷酸序列分别如图 4a 和图 4b 所示，其 β 链的氨基酸序列与核苷酸序列分别如图 5a 和图 5b 所示，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上述 TCR α 和 β 链的目的基因序列经合成后分别插入到表达载体 pET28a+ (Novagene)，上下游的克隆位点分别是 NcoI 和 NotI。插入片段经过测序确认无误。

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 μ M 的滤膜过滤后，通过阴离子交换柱 (HiTrap Q HP, 5ml, GE Healthcare) 纯化。洗脱峰含有复性成功的 α 和 β 二聚体的 TCR 通过 SDS-PAGE 胶确认。TCR 随后通过凝胶过滤层析 (HiPrep 16/60, Sephacryl S-100 HR, GE Healthcare) 进一步纯化。纯化后的 TCR 纯度经过 SDS-PAGE 测定大于 90%，浓度由 BCA 法确定。本发明得到的可溶性 TCR 的 SDS-PAGE 胶图如图 6 所示。

实施例 4 NY-ES0-1 抗原短肽特异性的可溶性单链 TCR 的产生

根据专利文献 W02014/206304 中所述，利用定点突变的方法将实施例 2 中 TCR α 与 β 链的可变域构建成了一个以柔性短肽 (linker) 连接的稳定的可溶性单链 TCR 分子。该单链 TCR 分子的氨基酸序列及核苷酸序列分别如图 7a 和图 7b 所示。其 α 链可变域的氨基酸序列及核苷酸序列分别如图 8a 和图 8b 所示；其 β 链可变域的氨基酸序列及核苷酸序列分别如图 9a 和图 9b 所示；其 linker 序列的氨基酸序列及核苷酸序列分别如图 10a 和图 10b 所示。

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

实施例 5 NY-ES0-1 抗原短肽特异性的可溶性单链 TCR 的表达、复性和纯化

将实施例 4 中制备的含有重组质粒 pET28a-模板链的 BL21 (DE 3) 菌落全部接种于含有卡那霉素的 LB 培养基中，37°C 培养至 OD_{600} 为 0.6-0.8，加入 IPTG 至终浓度为 0.5 mM，37°C 继续培养 4 h。5000 rpm 离心 15 min 收获细胞沉淀

物，用 Bugbuster Master Mix (Merck) 裂解细胞沉淀物，6000 rpm 离心 15 min 回收包涵体，再用 Bugbuster (Merck) 进行洗涤以除去细胞碎片和膜组分，6000 rpm 离心 15 min，收集包涵体。将包涵体溶解在缓冲液(20 mM Tris-HCl pH 8.0, 8 M 尿素)中，高速离心去除不溶物，上清液用 BCA 法定量后进行分装，于-80

5 °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°C 处理 30 min。用注射器向 125 mL 复性缓冲液 (100 mM Tris-HCl pH 8.1, 0.4 M L-精氨酸, 5 M 尿素, 2 mM EDTA, 6.5 mM β -mercapthoethylamine, 1.87 mM Cystamine) 中滴加上述处理后的单链 TCR, 4 °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°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°C 继续透析 8 h, 然后将透析液换成相同的新鲜缓冲液继续透析过夜。17 小时后, 样品经 0.45 μ m 滤膜过滤, 真空

10 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:

20 色谱柱 Agilent Bio SEC-3 (300 A, ϕ 7.8 \times 300 mm), 流动相为 150 mM 磷酸盐缓冲液, 流速 0.5 mL/min, 柱温 25°C, 紫外检测波长 214 nm。

实施例 6 结合表征

BIAcore 分析

25 本实施例证明了可溶性的本发明 TCR 分子能够与 SLLMWITQC-HLA A0201 复合物特异性结合。

使用 BIAcore T200 实时分析系统检测实施例 3 中得到的 TCR 分子与 SLLMWITQC-HLA A0201 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

30 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 A0201 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

35 位点。

上述 SLLMWITQC-HLA A0201 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 °C 8000 g 离心 10 min 后用 10 ml PBS 洗涤菌体一次, 之后用 5 ml BugBuster Master Mix

40 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 °C, 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 °C 6000 g 离心 15 min; 弃去上清, 加 30 ml 稀释 10 倍的 BugBuster 重悬包涵体, 混匀, 4 °C 6000 g 离心 15 min, 重复两次, 加 30 ml 20 mM Tris-HCl pH 8.0 重悬包涵体, 混匀, 4 °C 6000 g 离心 15 min, 最后用 20 mM Tris-HCl 8M 尿素溶解包涵体, SDS-PAGE 检测包涵体纯度, BCA 试剂盒测浓度。

b. 复性

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 °C), 然后依次加入 20 mg/L 的轻链和 90 mg/L 的重链 (终浓度, 重链分三次加入, 8 h/次), 复性在 4 °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 μm 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 μM D-Biotin、100 μg/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。

利用 BIAcore Evaluation 软件计算动力学参数, 得到本发明可溶性的 TCR 分子与 SLLMWITQC-HLA A0201 复合物结合的动力学图谱如图 11 所示。同时, 还利用上述方法检测了本发明可溶性的 TCR 分子与其他抗原短肽包括 KLVALGINAV-HLA A0201 复合物等的结合活性, 结果显示本发明 TCR 分子与其他无关抗原短肽均无结合。

实施例 7 TCR 的功能及特异性

本实施例证明了经本发明所获得的 TCR 转导的 PBL 能够特异性识别

NY-ES0-1 抗原阳性癌细胞的例证。

(a)通过 293T 细胞的快速介导瞬时转染(Express-In-mediated transient transfection)制备慢病毒

利用第三代慢病毒包装系统包装含有编码所需 TCR 的基因的慢病毒。利用 PEI 将 4 种质粒,用(含有 pGZ178-HI WT TRA-2A-TRB 慢病毒载体,以及含有构建传染性但非复制型慢病毒颗粒所必需的其他组分的 3 种质粒)瞬时转染 293T 细胞。

为进行转染,第 0 天种细胞,在 15 厘米培养皿,种上 1.7×10^7 个 293T 细胞,使细胞均匀分布在培养皿上,汇合度略高于 50%。第 1 天转染质粒,包装 pGZ178-HIWTTRA-2A-TRB 和 pLenti-eGFP 假病毒,将以上表达质粒与包装质粒 pMDLg/pRRE, pRSV-REV 和 pMD. 2G 混匀,一个 15 厘米直径平皿的用量如下:22.5 微克:15 微克:15 微克:7.5 微克。转染试剂 PEI-MAX 与质粒的比例是 2:1,每个平皿的使用量为 114.75 微克。具体操作为:把表达质粒与包装质粒加入 1800 微升 OPTI-MEM ((吉布可公司(Gibco),目录号 31985-070)培养基中混合均匀,室温静置 5 分钟成为 DNA 混合液;取相应量 PEI 与 1800 微升 OPTI-MEM 培养基混合均匀,室温静置 5 分钟成为 PEI 混合液。把 DNA 混合液和 PEI 混合液混合在一起并在室温静置 30 分钟,再添加 3150 微升 OPTI-MEM 培养基,混合均匀后加入到已经转换成 11.25 毫升 OPTI-MEM 的 293T 细胞中,轻轻晃动培养皿,使培养基混合均匀,37°C/5% CO₂ 下培养。转染 5-7 小时,去除转染培养基,换成含有 10%胎牛血清的 DMEM ((吉布可公司(Gibco),目录号 C11995500bt))完全培养基,37°C/5% CO₂ 下培养。第 3 和第 4 天收集含有包装的慢病毒的培养基上清。为收获包装的慢病毒,把所收集到的培养上清 3000g 离心 15 分钟去除细胞碎片,再经 0.22 微米过滤器(默克密理博(Merck Millipore),目录号 SLGP033RB)过滤,最后用 50KD 截留量的浓缩管(默克密理博(Merck Millipore),目录号 UFC905096)进行浓缩,除去大部分上清液,最后浓缩到 1 毫升,等分分装后-80°C 冻存。取假病毒样品进行病毒滴度测定,步骤参照 p24 ELISA (Clontech,目录号 632200)试剂盒说明书。作为对照用,同时也包转 pLenti-eGFP 的假病毒。

(b)用含有 HI-WT 特异性 T 细胞受体基因的慢病毒转导 PBL

从健康志愿者的血液中分离到 PBL 细胞,再用包装的慢病毒转导。计数这些细胞,在 48 孔板中,在含有 100IU/ml IL-2 的含 10%FBS(吉布可公司(Gibco),目录号 C10010500BT)的 1640(吉布可公司(Gibco),目录号 C11875500bt)培养基中以 1×10^6 个细胞/毫升(0.5 毫升/孔)与预洗涤的抗 CD3/CD28 抗体-包被小珠(T 细胞扩增物,life technologies,目录号 11452D)共孵育过夜刺激,细胞:珠=3:1。

刺激过夜后,根据 p24 ELISA 试剂盒所测到的病毒滴度,按 MOI=10 的比例加入已浓缩的 HI-WT 特异性 T 细胞受体基因的慢病毒,32°C,900g 离心感染 1 小时。感染完毕后去除慢病毒感染液,用含有 100IU/ml IL-2 的含 10%FBS 的 1640 培养基重悬细胞,37°C/5% CO₂ 下培养 3 天。转导 3 天后计数细胞,稀释细胞至 0.5×10^6 个细胞/毫升。每两天计数一次细胞,替换或加入含有 50IU/ml IL-2 的新鲜培养基,维持细胞在 0.5×10^6 - 1×10^6 个细胞/毫升。从第 3 天开始,经含有 SLLMWITQC 短肽与 HLA-A*0201 的四聚体染色,慢病毒转导的 PBL 通过

流式细胞术的定量分析。当四聚体检测阳性率大于 10%，则于第 5 天开始用于功能试验（例如，IFN- γ 释放的 ELISPOT 和非放射性细胞毒性检测）。

(c) 四聚体染色 TCR 转导的 PBL

5 NY-ESO-1 157-165 SLLMWITQC 短肽 (p1A) 与带有生物素标记的 HLA-A*0201 复性，制备 pHLA 单倍体。这些单倍体用 PE 标记的链霉亲和素 (BD) 组合成 PE 标记的四聚体，称为 p1A-tetramer-PE。此四聚体能把表达了 NY-ESO-1 157-165 SLLMWITQC 特异性 T 细胞受体基因的 T 细胞标记为阳性细胞。把 (b) 中经转染的 T 细胞样品与 p1A-tetramer-PE 在冰上孵育 30 分钟，然后加入 anti-CD8-APC (BioLegend) 抗体，继续冰上孵育 15 分钟。样品用含有 2%FBS 10 的 PBS 清洗 2 次后用 Guava 16HT 检测表达了 NY-ESO-1 157-165 SLLMWITQC 特异性 T 细胞受体基因的 p1A-tetramer-PE 和 CD8 双阳性的 T 细胞，数据分析采用 FlowJo 软件 (Tree Star Inc, Ashland, OR) 分析。

通过 ELISPOT 实验进一步检测转导本发明的 PBL 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 15 ELISPOT 实验中所用的效应细胞为本发明中获得的病毒转导 HI-WT 基因的 PBL，靶细胞系为抗原 (NY-ESO-1) 阳性的 IM9 (ATCC) 和 U266B1 (ATCC) 细胞，对照组为抗原 (NY-ESO-1) 阴性的 293T 细胞。

首先准备 ELISPOT 平板，ELISPOT 实验步骤如下：按以下顺序将试验的各 15 个组分加入 ELISPOT 平板：个组分别加入 ELISPOT 平板：将 T2 细胞用培养基调整到 2×10^5 个细胞/毫升，根据终体积与短肽终浓度将特异性短肽及非特异性短肽分别加到对应的 T2 细胞稀释液中，空白组加入相应量的培养基，混合均匀后取 100 μ L T2 细胞与靶细胞系 2×10^5 个细胞/毫升（即 20,000 个细胞/孔）、100 μ L 效应细胞 2×10^4 个细胞/毫升（即 20,00 个病毒转导细胞/孔），并设置三个复孔。然后温育过夜 (37 $^{\circ}$ C, 5%CO₂)。随后洗涤平板并进行 25 二级检测和显色，干燥平板 1 小时，再利用免疫斑点平板读数计 (ELISPOT READER system; AID20 公司) 计数膜上形成的斑点。实验结果如图 12(a 和 b) 所示，相较于对照组 293T 细胞，本发明得到的病毒转导 HI-WT 基因的 PBL 对负载特异性多肽的 T2 细胞及抗原 (NY-ESO-1) 阳性的 IM9 和 U266B1 细胞系有 30 特异性反应。

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 书

1. 一种 T 细胞受体 (TCR)，其特征在于，所述 TCR 能够与 SLLMWITQC-HLA 复合物特异性地结合，其包含 TCR α 链可变域和 TCR β 链可变域，并且所述 TCR α 链可变域为与 SEQ ID NO:1 具有至少 90% 序列相同性的氨基酸序列。
2. 如权利要求 1 所述的 TCR，其特征在于所述 TCR β 链可变域为与 SEQ ID NO: 5 具有至少 90% 序列相同性的氨基酸序列。
3. 如权利要求 1 或 2 所述的 TCR，其包含 TCR α 链可变域和 TCR β 链可变域，其特征在于，所述 TCR α 链可变域的 CDR3 的氨基酸序列为 ALTLNAGNMLT (SEQ ID NO: 12)；和/或所述 TCR β 链可变域的 CDR3 的氨基酸序列为 ASLDPRA GTDTQY (SEQ ID NO: 15)。
4. 如权利要求 3 所述的 TCR，其特征在于，所述 TCR α 链可变域的 3 个互补决定区 (CDR) 为：
- α CDR1- ATGYPS (SEQ ID NO: 10)
- α CDR2- ATKADDK (SEQ ID NO: 11)
- α CDR3- ALTLNAGNMLT (SEQ ID NO: 12) 和/或所述 TCR β 链可变域的 3 个互补决定区为：
- β CDR1- SNHLY (SEQ ID NO: 13)
- β CDR2- FYNNEI (SEQ ID NO: 14)
- β CDR3- ASLDPRA GTDTQY (SEQ ID NO: 15)
5. 如以上任一权利要求所述的 TCR，其特征在于，所述 TCR 包含 α 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 1。
6. 如以上任一权利要求所述的 TCR，其特征在于，所述 TCR 包含 β 链可变域氨基酸序列 SEQ ID NO: 5。
7. 如以上任一权利要求所述的 TCR，其特征在于，所述 TCR 为 $\alpha\beta$ 异质二聚体，其包含 TCR α 链恒定区 TRAC*01 和 TCR β 链恒定区 TRBC1*01 或 TRBC2*01。
8. 如权利要求 7 中所述的 TCR，其特征在于，所述 TCR 的 α 链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 3 和/或所述 TCR 的 β 链氨基酸序列为 SEQ ID NO: 7。
9. 如权利要求 1-6 中任一所述的 TCR，其特征在于，所述 TCR 是可溶的。
10. 如权利要求 9 所述的 TCR，其特征在于，所述 TCR 为单链。
11. 如权利要求 10 所述的 TCR，其特征在于，所述 TCR 是由 α 链可变域与 β 链可变域通过肽连接序列连接而成。
12. 如权利要求 11 所述的 TCR，其特征在于，所述 TCR 在 α 链可变区氨基酸第 11、13、19、21、53、76、89、91、或第 94 位，和/或 α 链 J 基因短肽氨基酸倒数第 3 位、倒数第 5 位或倒数第 7 位中具有一个或多个突变；和/或所述 TCR 在 β 链可变区氨基酸第 11、13、19、21、53、76、89、91、或第 94 位，和/或 β 链 J 基因短肽氨基酸倒数第 2 位、倒数第 4 位或倒数第 6 位中具有一个或多个突变，其中氨基酸位置编号按 IMGT (国际免疫遗传学信息系统) 中列出的位置编号。
13. 如权利要求 12 所述的 TCR，其特征在于，所述 TCR 的 α 链可变域氨基酸序列包含 SEQ ID NO:32 和/或所述 TCR 的 β 链可变域氨基酸序列包含 SEQ ID

NO:34。

14. 如权利要求 13 所述的 TCR, 其特征在于, 所述 TCR 的氨基酸序列为 SEQ ID NO:30。

15. 如权利要求 9 所述的 TCR, 其特征在于, 所述 TCR 包括(a)除跨膜结构域以外的全部或部分 TCR α 链; 以及(b)除跨膜结构域以外的全部或部分 TCR β 链;

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

16. 如权利要求 15 所述的 TCR, 其特征在于, 半胱氨酸残基在所述 TCR 的 α 和 β 链恒定域之间形成人工二硫键。

17. 如权利要求 16 所述的 TCR, 其特征在于, 在所述 TCR 中形成人工二硫键的半胱氨酸残基取代了选自下列的一组或多组位点:

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

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

18. 如权利要求 17 所述的 TCR, 其特征在于, 所述 TCR 的 α 链氨基酸序列为 SEQ ID NO:26 和/或所述 TCR 的 β 链氨基酸序列为 SEQ ID NO:28。

19. 如以上任一权利要求所述的 TCR, 其特征在于, 所述 TCR 的 α 链和/或 β 链的 C-或 N-末端结合有偶联物。

20. 如权利要求 19 所述的 T 细胞受体, 其特征在于, 与所述 T 细胞受体结合的偶联物为可检测标记物、治疗剂、PK 修饰部分或任何这些物质的组合。优选地, 所述治疗剂为抗-CD3 抗体。

21. 一种多价 TCR 复合物, 其特征在于, 包含至少两个 TCR 分子, 并且其中的至少一个 TCR 分子为上述权利要求中任一项所述的 TCR。

22. 一种核酸分子, 其特征在于, 所述核酸分子包含编码上述任一权利要求所述的 TCR 分子的核酸序列或其互补序列。

23. 如权利要求 22 所述的核酸分子, 其特征在于, 其包含编码 TCR α 链可变域的核苷酸序列 SEQ ID NO: 2 或 SEQ ID NO: 33。

24. 如权利要求 22 或 23 所述的核酸分子, 其特征在于, 其包含编码 TCR β 链可变域的核苷酸序列 SEQ ID NO: 6 或 SEQ ID NO: 35。

25. 如权利要求 22 所述的核酸分子, 其特征在于, 其包含编码 TCR α 链的核苷酸序列 SEQ ID NO: 4 和/或包含编码 TCR β 链的核苷酸序列 SEQ ID NO: 8。

26. 一种载体, 其特征在于, 所述的载体含有权利要求 22-25 中任一所述的核酸分子; 优选地, 所述的载体为病毒载体; 更优选地, 所述的载体为慢病毒载体。

27. 一种分离的宿主细胞, 其特征在于, 所述的宿主细胞中含有权利要求

26 中所述的载体或染色体中整合有外源的权利要求 22-25 中任一所述的核酸分子。

28. 一种细胞，其特征在于，所述细胞转导权利要求 22-25 中任一所述的核酸分子或权利要求 26 中所述载体；优选地，所述细胞为 T 细胞或干细胞。

5 29. 一种药物组合物，其特征在于，所述组合物含有药学上可接受的载体以及权利要求 1-20 中任一项所述的 TCR、权利要求 21 中所述的 TCR 复合物、权利要求 22-25 中任一所述的核酸分子、或权利要求 28 中所述的细胞。

10 30. 权利要求 1-20 中任一项所述的 T 细胞受体、或权利要求 21 中所述的 TCR 复合物或权利要求 28 中所述的细胞的用途，其特征在于，用于制备治疗肿瘤或自身免疫疾病的药物。

31. 一种治疗疾病的方法，其特征在于，包括给需要治疗的对象施用适量的权利要求 1-20 中任一所述的 TCR、权利要求 21 中所述 TCR 复合物、权利要求 28 中所述的细胞或权利要求 29 中所述的药物组合物；

15 优选地，所述的疾病为神经母细胞瘤、肉瘤、恶性黑色素瘤、前列腺癌、膀胱癌、乳腺癌、多发性骨髓瘤、肝细胞癌、口腔鳞癌以及食管癌。

EPEVTQTPSHQVTQMGQEVILRCVPISNHLYFYWYRQILGQKVEFLVSFYNNSEISEKSEIFDDQFS
VERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASLDPRAGTDTQYFGPGTRLTVL (SEQ ID NO:5)

图 2a

Gaacctgaagtcaccagactcccagccatcaggtcacacagatgggacaggaagtgatcttgcgctgtgtccccatctctaatcacttatacttctatt
ggtacagacaaatcttggggcagaaagtcgagttctggtttcctttataataatgaaatctcagagaagtctgaaatattcgatgatcaattctcagttgaa
aggcctgatggatcaaatctcactctgaagatccggtccacaaagctggaggactcagccatgtacttctgtccagcctggaccacagcgggcac
agatacgagatatttggcccaggcaccggctgacagtctc (SEQ ID NO:6)

图 2b

EPEVTQTPSHQVTQMGQEVILRCVPISNHLYFYWYRQILGQKVEFLVSFYNNSEISEKSEIFDDQFS
VERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASLDPRAGTDTQYFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEP
SEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRL
RVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGV
LSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG (SEQ ID NO:7)

图 2c

Gaacctgaagtcaccagactcccagccatcaggtcacacagatgggacaggaagtgatcttgcgctgtgtccccatctctaatcacttatacttctatt
ggtacagacaaatcttggggcagaaagtcgagttctggtttcctttataataatgaaatctcagagaagtctgaaatattcgatgatcaattctcagttgaa
aggcctgatggatcaaatctcactctgaagatccggtccacaaagctggaggactcagccatgtacttctgtccagcctggaccacagcgggcac
agatacgagatatttggcccaggcaccggctgacagtctcagggacctgaaaaacgtgtcccaccagggtcgtgtgtttgagccatcagaag
cagagatctccacacccaaaaggccacactggtatgcctggccacagcttctaccccaccacgtggagctgagctgtgggtgaaatgggaagg
agggtcacagtgggtcagcacagaccgcagcccctcaaggagcagcccgcctcaatgactccagatactgctgagcagccgctgagggtc
tcggccacctctggcagaaccccccaaccactccgctgcaagtccagttctacgggctctcggagaatgacgagtgaccaggtataggcca
aacccgtcaccagatcgtcagcgcgagggcctgggtagagcagactgtggtcctcactccagcttaccagcaaggggtcctgtctgccaccat
cctctatgagatcttctaggggaaggccactgtatgcctgctggtcagtgccctcgtgctgatggccatggtcaagagaaggattccagaggc
(SEQ ID NO:8)

图 2d

MDTWLVCWAIFSLKAGLTEPEVTQTPSHQVTQMGQEVILRCVPISNHLYFYWYRQILGQKVEF
LVSFYNNSEISEKSEIFDDQFSVERPDGSNFTLKIRSTKLEDSAMYFCASLDPRAGTDTQYFGPGTR
LTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDP
QPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAE
AWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG- (SEQ ID
NO:24)

图 2e

atggatacctggctcgtatgctggcaatttttagtctcttgaagcaggactcacagaacctgaagtcaccagactcccagccatcaggtcacacaga
tgggacaggaagtgatcttgcgctgtgtccccatctctaatcacttatacttctattggtacagacaaatcttggggcagaaagtcgagttctggtttccttt
ataataatgaaatctcagagaagtctgaaatattcgatgatcaattctcagttgaaaggcctgatggatcaaatctcactctgaagatccggtccacaaagc
tggaggactcagccatgtacttctgtccagcctggaccacagcgggcacagatacgagatatttggcccaggcaccggctgacagtctcga
ggacctgaaaaacgtgtcccaccaggctcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatctccacacccaaaaggccacactggtatgcctggcc
acaggtcttaccaccagcgtggagctgagctgtgggtgaaatgggaaggagtgcacagtgggtcagcacagaccgcagcccctcaaggga
gcagcccgcctcaatgactccagatactgctgagcagccgctgagggtctcggccaccttctggcagaaccccccaaccactccgctgca
gtccagttctacggctctcggagaatgacgagtgaccaggtataggccaaacccgtcaccagatcgtcagcggcggcctgggtagagc
agactgtggtcctcactccagcttaccagcaaggggtcctgtctgccaccatcctctatgagatcttctaggggaaggccactgtatgcctgctg
gtcagtgccctcgtgctgatggccatggtcaagagaaggattccagaggc TAG (SEQ ID NO:25)

图 2f

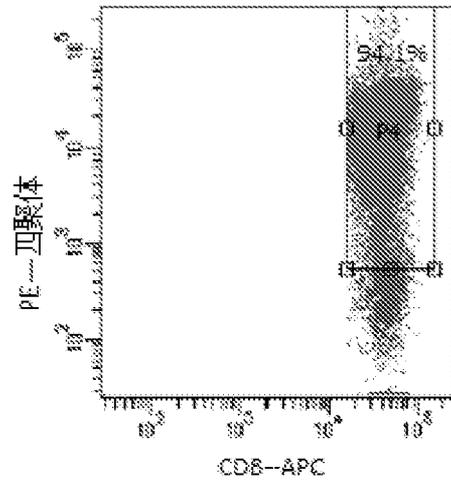


图 3

GNSVTQMEGPVTLSEEFLTINCTYTATGYPSLFWYVQYPGEGLQLLLKATKADDKGS
 NKGFEATYRKETTSFHLEKGSVQVSDSAVYFCALTLNAGNMLTFGGGTRLMVKPHIQ
 NPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKSNS
 AVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPSS

(SEQ ID NO:26)

图 4a

ggcaacagcgtgaccagatggaagggccagtgactctctcagaagaggccttctgactataaactgcacgtacacagccacaggata
 cccttccctttctggtatgtccaatatcctggagaaggtctacagctcctctgaaagccacgaaggctgatgacaaggaagcaacaaa
 ggtttgaagccacataaccgtaaagaaccactctttccacttgagaaaggctcagttcaagtgtcagactcagcgggtgacttctgtgct
 ctgacccttaataatgcaggcaacatgctcaccttggagggggaacaaggtaatgggtcaaacccatatccagaaccctgaccctgcc
 gtgtaccagctgagagactctaagtcgagtgacaagctgtctgcctattcaccgatttgattctcaacaaatgtgtcacaagtaagatt
 ctgatgtgtatatcacagacaaatgcgtgctagacatgaggctatggactcaagagcaacagtgctgtggcctggagcaacaaatctga
 ctttgcattgtgcaaacgcctcaacaacagcattattccagaagacaccttctcccagcccagaaagtcc

(SEQ ID NO:27)

图 4b

EPEVTQTPSHQVTQMGQEVLRCVPISNHLFYFYWRQILGQKVEFLVSFYNNSEIKSEI
 FDDQFSVERPDGSNFLKIRSTKLEDSAMYFCASLDPRAGTDTQYFGPGTRTLTVLEDLK
 NVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPL
 KEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIV
 SAEAWGRAD (SEQ ID NO:28)

图 5a

Gaacggaagtgaccagactccagccatcaggtcacacagatgggacaggaagtgatcttgcgctgtgtcccactcttaactta
 tacttctattggtacagacaaatcttggggcagaaagtcgagtttctggttcctttataataatgaaatctcagagaagtctgaaatattcgat
 gatcaattctcagttgaaaggcctgatggatcaaattcactctgaagatccggtccacaaagctggaggactcagccatgtacttctgtgcc
 agcctggaccacgagcgggcacagatacgcagatttggcccaggcaccggctgacagtgctcgaggacctgaaaaacgtgtcc
 caccggaggtcgtgtgtttgagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactggtgtgcttggccaccggtttctacc
 ccgaccagctggagctgagctgggtggaatgggaaggaggtcacagtggggtctgcacagaccgcagcccctcaaggagcag
 cccgcccctcaatgactccagatacgtctgagcagccgctgagggtctggccaccttctggcaggacccccgaaccacttccgctgt
 caagtccagttctacggctctcgagaaatgacagtgaccagatagggccaaaccgtaaccagatcgtcagcggcaggcct
 ggggtagagcagac (SEQ ID NO:29)

图 5b

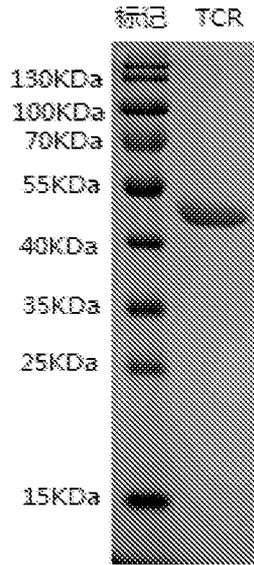


图 6

AGNSVTQSEGPLTVSEEENV TINCTY TATGYPSLFWYRQYPGEGLQLLLKATKADDKGSNKRFE
 ATYRKETTSFHLEIERIQPNDSATYFCALTLN NAGNMLTFGGG TKLSVHNGGGSEG GGGSEGGS
 EGGGSEG GTGEPEITQT PSHLSVQTGQEVTLRCVPISNHLYFYWYRQDPGQKVRFLVSFYNN EIS
 EKSEIPDDRFSVERPDG SNFTLKIRSVKPEDSAMYLCASLDPRAGTDTQYFGPGTRLEVD (SEQ
 ID NO:30)

图 7a

Gcaggtaattctgttacgcagtcggaaggcccgtgacggctcggagaagaaaatgtgacgattaattgtacctatacggcaacgggttaccgag
 cctgttttggtatcgtcagtatccgggtgaaggcctgcaactgctgctgaaagcgaccaagccgatgacaaggtagcaacaaacgtttgaagcaac
 gtaccgcaaagaaaccacgagcttccatctggaattgaacgcacccagccgaatgattctgcaacctatcttgcgctctgacgctgaacaatgctggc
 aacatgctgacctcggcgggtggcacgaaactgagtggtgcacaatgggtggcgggttcagaaggcgggtggctgggaaggtggcggtagcgaaggcgg
 tggctcgaagggtggcaccgggtgaaccggaaattacccaaaccgagccatctgctctcagaccggccaagaagtcacgctgcgttgctgccc
 atcagtaaccacctgtatcttactggtatcgtcaagatccgggcaaaaagtgcgcttctggttctctacaacaacgaaattagtaaaaatccgaaa
 tcccgatgaccgttttcagttgaaccccgatggtcgaattcaccctgaaaattcgagtgcaaacgggaagactccgcatgtacctgtgctgc
 agcctggaccgctgcccggcaccgacacgcagtatcttggctcgggcacccgctggaagtggat (SEQ ID NO:31)

图 7b

AGNSVTQSEGPLTVSEEENV TINCTY TATGYPSLFWYRQYPGEGLQLLLKATKADDKGSNKRFE
 ATYRKETTSFHLEIERIQPNDSATYFCALTLN NAGNMLTFGGG TKLSVHN
 (SEQ ID NO:32)

图 8a

Gcaggtaattctgttacgcagtcggaaggcccgtgacggctcggagaagaaaatgtgacgattaattgtacctatacggcaacgggttaccgag
 cctgttttggtatcgtcagtatccgggtgaaggcctgcaactgctgctgaaagcgaccaagccgatgacaaggtagcaacaaacgtttgaagcaac
 gtaccgcaaagaaaccacgagcttccatctggaattgaacgcacccagccgaatgattctgcaacctatcttgcgctctgacgctgaacaatgctggc
 aacatgctgacctcggcgggtggcacgaaactgagtggtgcacaat (SEQ ID NO:33)

图 8b

EPEITQT PSHLSVQTGQEVTLRCVPISNHLYFYWYRQDPGQKVRFLVSFYNN EISEKSEIPDDRFS
 VERPDG SNFTLKIRSVKPEDSAMYLCASLDPRAGTDTQYFGPGTRLEVD
 (SEQ ID NO:34)

图 9a

gaaccggaattacccaaacgccgagccatctgtctgttcagaccggccaagaagtcacgctgcgttgccgatcagtaaccacct
gtatctttactggtatcgtcaagatccgggccaaaaagtcgctttctggttccttctacaacaacgaaatagtgaaaaatccgaaatcccg
gatgaccgttttcagttgaacgcccgatgggtcgaattcaccctgaaaattcgcagtgcaaacgggaagactccgcgatgtacctgtg
gcgagcctggaccgcgtgcgggcaccgacacgcagtatttcggtccgggcacccgcctggaagtggat

(SEQ ID NO:35)

图 9b

GGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGTG

(SEQ ID NO:36)

图 10a

Ggtggcggttcagaaggcgggtgctcgggaaggtggcggtagcgaaggcgggtggctctgaaggtggcaccggt

(SEQ ID NO:37)

图 10b

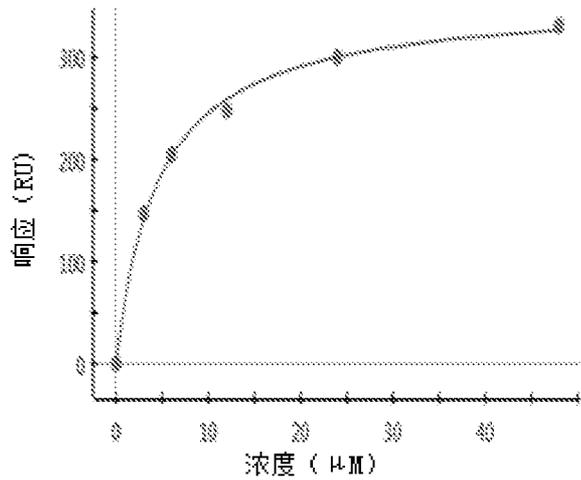


图 11

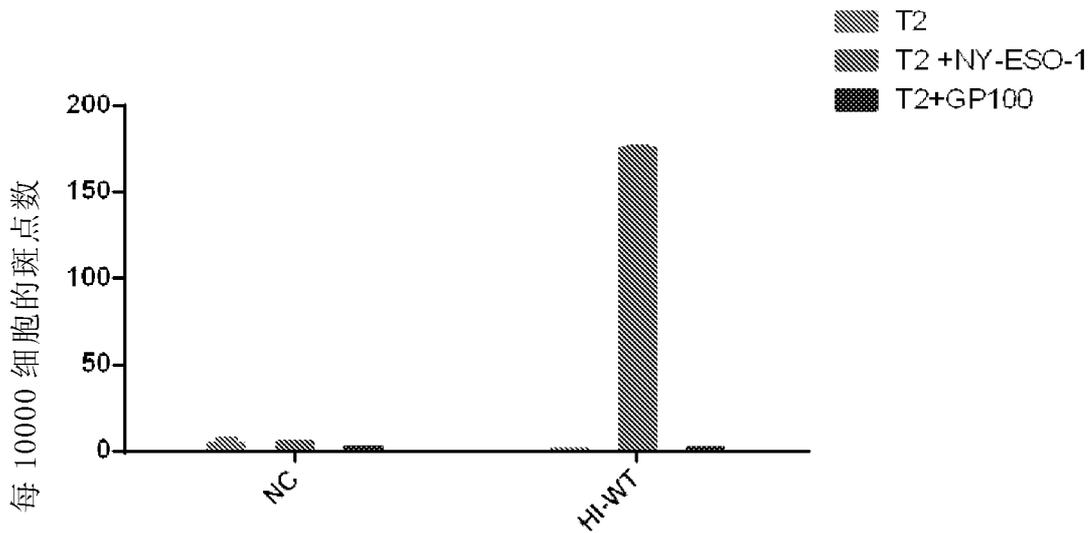


图 12a

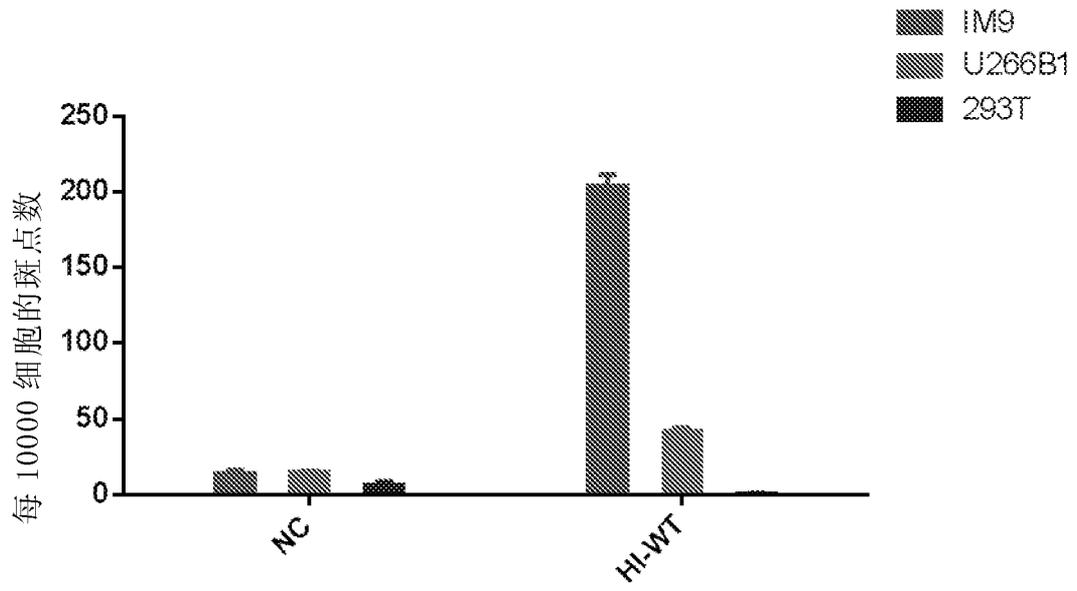


图 12b

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/081180

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

See the extra sheet

According to International Patent Classification (IPC) or to both national classification and IPC

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

IPC: C07K; C12N; A61K; A61P

Documentation searched other than minimum documentation to the extent that such documents are included in the fields searched

Electronic data base consulted during the international search (name of data base and, where practicable, search terms used)

CNABS; CNKI; DWPI; ISI Web of knowledge; IEDB and keywords: sllmwitqc, TCR, t-cell receptor, et al.

Genbank; EMBL and amino acid sequences: SEQ ID Nos: 1, 5

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 1989153 A (AVIDEX LTD.) 27 June 2007 (27.06.2007) the abstract and claims 1-25	1-30
A	CN 1303300 A (LUDWIG INST CANCER RES) 11 July 2001 (11.07.2001) the entire document	1-30
X	Genbank Accession No. AEP20469, Version AEP20469.1 [retrieved on 4 August 2016 (04.08.2016)], retrieved from NCBI [online]; <URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/347730523 >, 01 October 2011 (01.10.2011) the amino acid sequence	1

Further documents are listed in the continuation of Box C.

See patent family annex.

<p>* Special categories of cited documents:</p> <p>“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance</p> <p>“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date</p> <p>“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)</p> <p>“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means</p> <p>“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed</p>	<p>“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention</p> <p>“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone</p> <p>“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art</p> <p>“&” document member of the same patent family</p>
---	---

Date of the actual completion of the international search 04 August 2016	Date of mailing of the international search report 15 August 2016
Name and mailing address of the ISA State Intellectual Property Office of the P. R. China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao Haidian District, Beijing 100088, China Facsimile No. (86-10) 62019451	Authorized officer <p style="text-align: center;">JIA, Tao</p> Telephone No. (86-10) 62411993

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2016/081180

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. Claims Nos.:31
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] Rule 39. 1(iv) PCT—Method for treatment of the human or animal body by therapy.
2. Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

Box No. III Observations where unity of invention is lacking (Continuation of item 3 of first sheet)

This International Searching Authority found multiple inventions in this international application, as follows:

1. As all required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers all searchable claims.
2. As all searchable claims could be searched without effort justifying additional fees, this Authority did not invite payment of additional fees.
3. As only some of the required additional search fees were timely paid by the applicant, this international search report covers only those claims for which fees were paid, specifically claims Nos.:
4. No required additional search fees were timely paid by the applicant. Consequently, this international search report is restricted to the invention first mentioned in the claims; it is covered by claims Nos.:

- Remark on protest**
- The additional search fees were accompanied by the applicant's protest and, where applicable, the payment of a protest fee.
 - The additional search fees were accompanied by the applicant's protest but the applicable protest fee was not paid within the time limit specified in the invitation.
 - No protest accompanied the payment of additional search fees.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2016/081180

Patent Documents referred in the Report	Publication Date	Patent Family	Publication Date
CN 1989153 A	27 June 2007	GB 0411123 D0	23 June 2004
		ZA 200609461 A	27 August 2008
		CN 1989153 B	28 November 2012
CN 1303300 A	11 July 2001	JP 3995884 B2	24 October 2007
		AU 3370699 A	08 November 1999
		US 2004158044 A1	12 August 2004
		CA 2325605 A1	28 October 1999
		EP 1071443 B1	24 May 2006
		DE 69931482 T2	03 May 2007
		JP 2002538074 A	12 November 2002
		CN 100378121 C	02 April 2008
		US 7115729 B2	03 October 2006
		CA 2325605 C	27 November 2012
		EP 1071443 A1	31 January 2001
		DE 69931482 D1	29 June 2006
		WO 9953938 A1	28 October 1999
		AT 326981 T	15 June 2006
		US 6723832 B1	20 April 2004
EP 1071443 A4	27 October 2004		
AU 754961 B2	28 November 2002		

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2016/081180

Continuation of: **A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER**

C07K 14/725 (2006.01) i

C12N 15/12 (2006.01) i

C12N 15/867 (2006.01) i

C12N 5/10 (2006.01) i

A61K 38/17 (2006.01) i

A61K 48/00 (2006.01) i

A61K 35/17 (2015.01) i

A61P 35/00 (2006.01) i

A61P 37/02 (2006.01) i

<p>A. 主题的分类</p> <p>C07K 14/725(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; C12N 15/867(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; A61K 38/17(2006.01)i; A61K 48/00(2006.01)i; A61K 35/17(2015.01)i; A61P 35/00(2006.01)i; A61P 37/02(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>														
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>C07K; C12N; A61K; A61P</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNABS;CNKI;DWPI;ISI Web of knowledge;IEDB和关键词: sllmwitqc, TCR, T细胞受体, t-cell receptor, 等 Genbank;EMBL和氨基酸序列: SEQ ID Nos: 1, 5</p>														
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>X</td> <td>CN 1989153 A (阿维德克斯有限公司) 2007年 6月 27日 (2007 - 06 - 27) 摘要, 权利要求1-25</td> <td>1-30</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 1303300 A (路德维格癌症研究院) 2001年 7月 11日 (2001 - 07 - 11) 全文</td> <td>1-30</td> </tr> <tr> <td>X</td> <td>"Genbank登录号AEP20469, 版本AEP20469.1" [检索于04.8月2016 (04.08.2016)], 检索自NCBI [联机]:<URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/347730523>, 2011年 10月 1日 (2011 - 10 - 01), 氨基酸序列</td> <td>1</td> </tr> </tbody> </table>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	X	CN 1989153 A (阿维德克斯有限公司) 2007年 6月 27日 (2007 - 06 - 27) 摘要, 权利要求1-25	1-30	A	CN 1303300 A (路德维格癌症研究院) 2001年 7月 11日 (2001 - 07 - 11) 全文	1-30	X	"Genbank登录号AEP20469, 版本AEP20469.1" [检索于04.8月2016 (04.08.2016)], 检索自NCBI [联机]:<URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/347730523>, 2011年 10月 1日 (2011 - 10 - 01), 氨基酸序列	1
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求												
X	CN 1989153 A (阿维德克斯有限公司) 2007年 6月 27日 (2007 - 06 - 27) 摘要, 权利要求1-25	1-30												
A	CN 1303300 A (路德维格癌症研究院) 2001年 7月 11日 (2001 - 07 - 11) 全文	1-30												
X	"Genbank登录号AEP20469, 版本AEP20469.1" [检索于04.8月2016 (04.08.2016)], 检索自NCBI [联机]:<URL: http://www.ncbi.nlm.nih.gov/protein/347730523>, 2011年 10月 1日 (2011 - 10 - 01), 氨基酸序列	1												
<p><input type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p>														
<p>* 引用文件的具体类型:</p> <table border="0"> <tr> <td>“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件</td> <td>“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件</td> </tr> <tr> <td>“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利</td> <td>“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)</td> <td>“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性</td> </tr> <tr> <td>“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件</td> <td>“&” 同族专利的文件</td> </tr> <tr> <td>“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件</td> <td></td> </tr> </table>			“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件	“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性	“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性	“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件	“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件			
“A” 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件	“T” 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件													
“E” 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利	“X” 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性													
“L” 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的)	“Y” 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性													
“O” 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件	“&” 同族专利的文件													
“P” 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件														
<p>国际检索实际完成的日期</p> <p>2016年 8月 4日</p>	<p>国际检索报告邮寄日期</p> <p>2016年 8月 15日</p>													
<p>ISA/CN的名称和邮寄地址</p> <p>中华人民共和国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088</p> <p>传真号 (86-10)62019451</p>	<p>受权官员</p> <p>贾涛</p> <p>电话号码 (86-10)62411993</p>													

第II栏 某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. 权利要求： 31
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT实施细则39.1(iv) —治疗人体或者动物体的外科手术或者疗法。
2. 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2016/081180

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	1989153	A	2007年 6月 27日	GB	0411123	D0	2004年 6月 23日
				ZA	200609461	A	2008年 8月 27日
				CN	1989153	B	2012年 11月 28日
<hr/>							
CN	1303300	A	2001年 7月 11日	JP	3995884	B2	2007年 10月 24日
				AU	3370699	A	1999年 11月 8日
				US	2004158044	A1	2004年 8月 12日
				CA	2325605	A1	1999年 10月 28日
				EP	1071443	B1	2006年 5月 24日
				DE	69931482	T2	2007年 5月 3日
				JP	2002538074	A	2002年 11月 12日
				CN	100378121	C	2008年 4月 2日
				US	7115729	B2	2006年 10月 3日
				CA	2325605	C	2012年 11月 27日
				EP	1071443	A1	2001年 1月 31日
				DE	69931482	D1	2006年 6月 29日
				WO	9953938	A1	1999年 10月 28日
				AT	326981	T	2006年 6月 15日
				US	6723832	B1	2004年 4月 20日
				EP	1071443	A4	2004年 10月 27日
				AU	754961	B2	2002年 11月 28日
<hr/>							

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2009年7月)