(19)中华人民共和国国家知识产权局

(12)发明专利申请

(10)申请公布号 CN 108350430 A
(43)申请公布日 2018.07.31

(21)申请号 201680064904.8

(22)申请日 2016.09.09

(30)优先权数据
62/217,677 2015.09.11 US

(85)PCT国际申请进入国家阶段日
2018.05.07

(86)PCT国际申请的申请数据
PCT/US2016/050850 2016.09.09

(87)PCT国际申请的公布数据
WO2017/044672 EN 2017.03.16

(71)申请人 艾吉纳斯公司
地址 美国马萨诸塞州

(72)发明人 M·V·迪杰克 S·沃尔克
R·B·斯坦

(74)专利代理机构 北京市金杜律师事务所 11256
代理人 陈文平 徐志明

(51)Int.Cl.
C12N 5/0783(2010.01)
A61K 35/17(2015.01)

权利要求书8页 说明书51页
序列表45页 附图14页

(54)发明名称

经改造的宿主细胞及其使用方法

(57)摘要

本文提供了适合于表达功能性T细胞受体(TCR)的经改造的宿主细胞,以及使用这些细胞来鉴定特异性结合所需肽-主要组织相容性复合物(MHC)复合物的TCR的方法。

CN 108350430 A

1.一种源自淋巴细胞的经分离的细胞，所述细胞包含编码重组共受体或其第一链的第一多核苷酸，其中所述细胞在所述细胞表面上表达CD3，但不表达内源性T细胞受体(TCR)。

2.根据权利要求1所述的细胞，其中所述CD3是内源性CD3。

3.根据权利要求1所述的细胞，其中所述CD3是重组CD3。

4.一种源自淋巴细胞的经分离的细胞，所述细胞包含编码重组共受体或其第一链的第一多核苷酸，其中所述淋巴细胞是不变NKT(iNKT)细胞或多样NKT(dNKT)细胞。

5.根据权利要求1-4中任一项所述的细胞，其中所述细胞在所述细胞表面上表达所述重组共受体或其第一链。

6.一种源自淋巴细胞的经分离的细胞，所述细胞包含编码重组共受体或其第一链的第一多核苷酸，其中所述细胞能够以可调节的方式在所述细胞表面上表达所述重组共受体或其第一链。

7.根据权利要求1-6中任一项所述的细胞，其中所述细胞以可调节的方式在所述细胞表面上表达所述重组共受体或其第一链。

8.根据权利要求1-7中任一项所述的细胞，其中所述细胞在所述细胞表面上不表达内源性共受体。

9.根据权利要求8所述的细胞，其中所述内源性共受体是CD8或CD4。

10.根据权利要求1-9中任一项所述的细胞，其中所述重组共受体或其第一链包含胞外区、跨膜区和胞质区，其中所述胞外区与所述跨膜区连接，并且所述跨膜区与所述胞质区连接。

11.根据权利要求10所述的细胞，其中所述重组共受体或其第一链的胞质区的氨基酸序列与来自与所述淋巴细胞相同物种的天然存在的共受体或其第一链的相应胞质区的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同。

12.根据权利要求10所述的细胞，其中所述重组共受体或其第一链的跨膜区和胞质区一起的氨基酸序列与来自与所述淋巴细胞相同物种的天然存在的共受体或其第一链的相应跨膜区和胞质区一起的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同。

13.根据权利要求10-12中任一项所述的细胞，其中所述重组共受体或其第一链的胞外区的氨基酸序列与来自与所述淋巴细胞不同物种的天然存在的共受体或其第一链的相应胞外区的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同。

14.根据权利要求13所述的细胞，其中来自与所述淋巴细胞不同物种的所述天然存在的共受体或其第一链是人的。

15.根据权利要求1-14中任一项所述的细胞，其中所述重组共受体是CD8或CD4。

16.根据权利要求1-15中任一项所述的细胞，所述细胞还包含编码所述重组共受体的第二链的第二多核苷酸，其中所述第二链包含胞外区、跨膜区和胞质区，并且其中所述第二链的胞外区与所述第二链的跨膜区连接，且所述第二链的跨膜区与所述第二链的胞质区连接。

17.根据权利要求16所述的细胞，其中所述第二链的胞质区的氨基酸序列与来自与所述淋巴细胞相同物种的天然存在的共受体链的相应胞质区的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同。

18.根据权利要求16所述的细胞，其中所述第二链的跨膜区和胞质区一起的氨基酸序列与来自与所述淋巴细胞相同物种的天然存在的共受体链的相应跨膜区和胞质区一起的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同。

19.根据权利要求16-18中任一项所述的细胞，其中所述第二链的胞外区的氨基酸序列与来自与所述淋巴细胞不同物种的天然存在的共受体链的相应胞外区的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同。

20.根据权利要求19所述的细胞，其中来自与所述淋巴细胞不同物种的所述天然存在的共受体链是人的。

21.根据权利要求16-20中任一项所述的细胞，其中所述重组共受体是CD8。

22.根据权利要求21所述的细胞，其中所述重组共受体的第一链的胞质区包含SEQ ID NO:1的残基183-212的氨基酸序列。

23.根据权利要求21所述的细胞，其中所述重组共受体的第一链的跨膜区和胞质区一起包含SEQ ID NO:1的残基162-212的氨基酸序列。

24.根据权利要求21-23中任一项所述的细胞，其中所述重组共受体的第一链的胞外区包含SEQ ID NO:1的残基1-161的氨基酸序列。

25.根据权利要求21所述的细胞，其中所述重组共受体的第二链的胞质区包含SEQ ID NO:2的残基171-187的氨基酸序列。

26.根据权利要求21所述的细胞，其中所述重组共受体的第二链的跨膜区和胞质区一起包含SEQ ID NO:2的残基150-187的氨基酸序列。

27.根据权利要求21、25和26中任一项所述的细胞，其中所述重组共受体的第二链的胞外区包含SEQ ID NO:2的残基1-149的氨基酸序列。

28.根据权利要求21所述的细胞，其中所述重组共受体是包含下述的嵌合CD8：

a)包含人CD8α的胞外区以及小鼠CD8α的跨膜区和胞质区的嵌合CD8α链，和

b)包含人CD8β的胞外区以及小鼠CD8β的跨膜区和胞质区的嵌合CD8β链。

29.一种源自小鼠淋巴细胞的经分离的细胞，所述细胞包含：

a)编码包含人CD8α的胞外区以及小鼠CD8α的跨膜区和胞质区的嵌合CD8α链的第一多核苷酸，和

b)编码包含人CD8β的胞外区以及小鼠CD8β的跨膜区和胞质区的嵌合CD8β链的第二多核苷酸，

其中所述细胞在所述细胞表面上表达CD3，但不表达内源性TCR。

30.根据权利要求28或29所述的细胞，其中所述嵌合CD8α链包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列，并且所述嵌合CD8β链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。

31.根据权利要求30所述的细胞，其中所述嵌合CD8α链的氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成，并且所述嵌合CD8β链的氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。

32.根据权利要求1-31中任一项所述的细胞，其中所述重组共受体或其链的表面表达是可调节的。

33.根据权利要求32所述的细胞，其中所述第一多核苷酸的侧面为第一对相容位点特异性重组序列。

34.根据权利要求32所述的细胞，其中所述第二多核苷酸的侧面为第二对相容位点特

异性重组序列。

35.根据权利要求32所述的细胞，其中所述第一多核苷酸的一部分的侧面为第一对相容位点特异性重组序列，所述部分编码跨膜区和胞质区一起。

36.根据权利要求32所述的细胞，其中所述第二多核苷酸的一部分的侧面为第二对相容位点特异性重组序列，所述部分编码跨膜区和胞质区一起。

37.根据权利要求33-36中任一项所述的细胞，其中所述第一对相容位点特异性重组序列与所述第二对相容位点特异性重组序列不交叉反应。

38.根据权利要求33-37中任一项所述的细胞，其中所述重组共受体或其链的表面表达可通过使所述第一多核苷酸和/或所述第二多核苷酸与同源位点特异性重组酶接触得到减弱，所述同源位点特异性重组酶识别所述第一多核苷酸的第一对相容位点特异性重组序列和/或所述第二多核苷酸的第二对相容位点特异性重组序列。

39.根据权利要求33-37中任一项所述的细胞，其中所述重组共受体或其链的表面表达可通过使所述第一多核苷酸和/或所述第二多核苷酸与同源位点特异性重组酶接触得到取消，所述同源位点特异性重组酶识别所述第一多核苷酸的第一对相容位点特异性重组序列和/或所述第二多核苷酸的第二对相容位点特异性重组序列。

40.根据权利要求33-39中任一项所述的细胞，其中所述细胞还包含编码同源位点特异性重组酶的第三多核苷酸，所述同源位点特异性重组酶识别所述第一对相容位点特异性重组序列和/或第二对相容位点特异性重组序列。

41.根据权利要求40所述的细胞，其中所述第三多核苷酸的转录通过诱导型启动子调节。

42.根据权利要求38-41中任一项所述的细胞，其中所述第一对位点特异性重组序列和第二对位点特异性重组序列是lox位点的相容对，并且所述同源位点特异性重组酶是Cre重组酶。

43.根据权利要求42所述的细胞，其中所述lox位点的相容对是loxP位点的相容对。

44.根据权利要求32-43中任一项所述的细胞，其中所述重组共受体是CD8。

45.根据权利要求44所述的细胞，其中所述第一多核苷酸包含SEQ ID NO:3的残基1-675的多核苷酸序列。

46.根据权利要求44所述的细胞，其中所述第一多核苷酸包含SEQ ID NO:3的多核苷酸序列。

47.根据权利要求44所述的细胞，其中所述第二多核苷酸包含SEQ ID NO:4的残基1-600的多核苷酸序列。

48.根据权利要求44的细胞，其中所述第二多核苷酸包含SEQ ID NO:4的多核苷酸序列。

49.根据权利要求44所述的细胞，其中所述重组共受体的第一链包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列。

50.根据权利要求49所述的细胞，其中所述重组共受体的第一链包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。

51.根据权利要求44所述的细胞，其中所述重组共受体的第二链包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。

52.根据权利要求51所述的细胞，其中所述重组共受体的第二链包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

53.根据权利要求32所述的细胞，其中所述第一多核苷酸的转录通过诱导型启动子调节。

54.根据权利要求32或53所述的细胞，其中所述第二多核苷酸的转录通过诱导型启动子调节。

55.根据权利要求1-54中任一项所述的细胞，其中所述细胞还包含一种或多种报道系统。

56.根据权利要求55所述的细胞，其中所述一种或多种报道系统提供所述细胞的选自激活T细胞核因子(NFAT)信号传导、IL-2信号传导、激活物蛋白-1(AP1)信号传导、NFκB/Rel信号传导和钙流动的一种或多种活性的指示。

57.根据权利要求55或56所述的细胞，其中所述一种或多种报道系统包含多核苷酸，所述多核苷酸包含与编码可检测标志物的多核苷酸序列可操作连接的启动子区。

58.根据权利要求57所述的细胞，其中所述启动子区包含选自激活T细胞核因子(NFAT)应答元件、激活物蛋白-1(AP1)应答元件和NFκB/Rel应答元件的一种或多种转录应答元件。

59.根据权利要求57或58所述的细胞，其中所述可检测标志物选自荧光蛋白、细胞表面标志物和抗生素选择标志物。

60.根据权利要求57所述的细胞，其中所述启动子区是IL-2启动子。

61.根据权利要求60所述的细胞，其中所述IL-2启动子是最小IL-2启动子。

62.根据权利要求60所述的细胞，其中所述IL-2启动子包含一个或多个NFAT结合位点。

63.根据权利要求62所述的细胞，其中所述IL-2启动子包含三个NFAT结合位点。

64.根据权利要求60-63中任一项所述的细胞，其中所述可检测标志物是增强型绿色荧光蛋白(EGFP)。

65.根据权利要求1-62中任一项所述的细胞，其中所述细胞源自单一细胞，并且其中当所述细胞扩增为至少10^5的多个细胞，且用编码TCRα链和TCRβ链的分开的多核苷酸载体转导或转染，以在最大化转导或转染效率的条件下表达包含所述TCRα链和TCRβ链的重组TCR时，所述多个细胞的至少20％在所述细胞表面上表达所述重组TCR。

66.根据权利要求65所述的细胞，其中所述细胞先前已经受一轮或多轮转导或转染。

67.根据权利要求1-66中任一项所述的细胞，其中所述淋巴细胞是T细胞、B细胞或NK细胞。

68.根据权利要求67所述的细胞，其中所述淋巴细胞是选自$CD8^+$细胞毒性T细胞、$CD8^+$调节性T细胞、$CD4^+$细胞毒性T细胞、$CD4^+$辅助性T细胞和$CD4^+$调节性T细胞的T细胞。

69.根据权利要求1-68中任一项所述的细胞，其中所述淋巴细胞是哺乳动物淋巴细胞。

70.根据权利要求69所述的细胞，其中所述淋巴细胞是鼠淋巴细胞。

71.根据权利要求70所述的细胞，其中所述淋巴细胞选自RAG1或RAG2敲除鼠细胞、未成熟鼠T细胞、小鼠DO-11.10.7 58α-β-(58-/-)细胞和小鼠Bw5147细胞。

72.根据权利要求70或71所述的细胞，其中所述淋巴细胞是小鼠淋巴细胞。

73.根据权利要求1-72中任一项所述的细胞，其中所述细胞还在所述细胞表面上表达重组TCR，所述重组TCR包含TCRα链和TCRβ链，其中所述TCRα链和TCRβ链各自包含可变区和

非可变区，每个非可变区包含恒定区、跨膜区和胞质区，其中对于每条链，所述可变区与所述恒定区连接，所述恒定区与所述跨膜区连接，并且所述跨膜区与所述胞质区连接。

74.根据权利要求73所述的细胞，其中对于所述TCRα链和所述TCRβ链各自，所述胞质区的氨基酸序列与来自与所述淋巴细胞相同物种的天然存在的TCR链的相应胞质区的氨基酸序列至少60％相同，任选70、80、90或100％相同。

75.根据权利要求73所述的细胞，其中对于所述TCRα链和TCRβ链各自，所述跨膜区和胞质区的氨基酸序列一起与来自与所述淋巴细胞相同物种的天然存在的TCR链的相应区的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同。

76.根据权利要求75所述的细胞，其中所述TCRα链的跨膜区和胞质区的氨基酸序列一起包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。

77.根据权利要求75或76所述的细胞，其中所述TCRβ链的跨膜区和胞质区的氨基酸序列一起包含选自SEQ ID NO:16、18和20的氨基酸序列。

78.根据权利要求73-75中任一项所述的细胞，其中对于所述TCRα链和TCRβ链各自，所述非可变区的氨基酸序列与来自与所述淋巴细胞相同物种的天然存在的TCR链的相应非可变区的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同。

79.根据权利要求78所述的细胞，其中所述TCRα链的非可变区包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。

80.根据权利要求78或79所述的细胞，其中所述TCRβ链的非可变区包含选自SEQ ID NO:15、17和19的氨基酸序列。

81.根据权利要求73-80中任一项所述的细胞，其中每个可变区的所述氨基酸序列源自来自与所述淋巴细胞不同物种的TCR链的相应可变区。

82.根据权利要求73-75中任一项所述的细胞，其中对于所述TCRα链和TCRβ链各自，所述可变区和恒定区的氨基酸序列一起源自来自与所述淋巴细胞不同物种的TCR链的相应区。

83.根据权利要求81或82所述的细胞，其中来自与所述淋巴细胞不同物种的TCR是人的。

84.根据权利要求73-83中任一项所述的细胞，其中所述重组TCR是包含共刺激信号传导区的融合分子。

85.根据权利要求84所述的细胞，其中所述共刺激信号传导区与TCRα链的胞质区或TCRβ链的胞质区融合。

86.根据权利要求84或85所述的细胞，其中所述共刺激信号传导区包含选自CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、NKG2D、B7-H3和特异性结合CD83的配体的共刺激分子的信号传导区。

87.根据权利要求86所述的细胞，其中所述共刺激信号传导区包含CD28的信号传导区、4-1BB的信号传导区或其组合。

88.根据权利要求84-87中任一项所述的细胞，其中所述融合分子还包含CD3ζ信号传导区。

89.根据权利要求73-88中任一项所述的细胞，其中所述重组TCR的表达与下述的表达偶联：

(1)至少一种抗生素选择标志物;

(2)至少一种筛选标志物;或

(3)其组合。

90.根据权利要求89所述的细胞,其中所述至少一种筛选标志物是荧光蛋白或细胞表面标志物。

91.根据权利要求73-90中任一项所述的细胞,其中所述重组TCR源自选自下述的来源:胎儿胸腺、脐带血、从癌症患者中分离的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、接种疫苗的受试者、天然暴露于目的抗原的受试者、健康受试者和合成文库。

92.根据权利要求91所述的细胞,其中所述接种疫苗的受试者是已接受HPV疫苗、EBV疫苗或癌症疫苗的人。

93.根据权利要求91所述的细胞,其中所述接种疫苗的受试者是已用目的抗原免疫的表达人主要组织相容性复合物(MHC)的转基因小鼠。

94.根据权利要求93所述的细胞,其中所述接种疫苗的受试者是已用目的抗原免疫的表达HLA-A2的转基因小鼠。

95.根据权利要求73-94中任一项所述的细胞,其中所述细胞表达(1)重组TCRα链和重组TCRβ链,(2)重组TCRα链和多条不同的重组TCRβ链,(3)重组TCRβ链和多条不同的重组TCRα链,或(4)多条不同的重组TCRα链和多条不同的重组TCRβ链。

96.一种细胞文库,所述细胞文库包含根据权利要求73-95中任一项所述的多个细胞。

97.根据权利要求96所述的细胞文库,其中所述细胞文库具有至少10^7、10^8或10^9的TCR多样性。

98.一种用于分离和鉴定具有所需特征的TCR的方法,所述方法包括使根据权利要求73-95中任一项所述的多个细胞或根据权利要求96或97所述的细胞文库经受选择过程,所述选择过程包括在所需肽-MHC复合物的存在下选择所述所需特征,分离表达TCR的细胞,并且确定所述经分离的细胞的TCR具有所述所需特征。

99.一种用于鉴定编码具有所需特征的TCR的至少一种多核苷酸的方法,所述方法包括:

(a)提供根据权利要求1-72中任一项所述的多个细胞,

(b)用编码多种TCR的多种表达构建体转导或转染所述细胞,

(c)在所述细胞的表面上表达所述TCR,

(d)在所需肽-MHC复合物的存在下,就所述所需特征选择表达所述TCR的细胞,

(e)从所选择的细胞中分离编码具有所述所需特征的TCR的至少一种多核苷酸,和

(f)鉴定步骤(e)中分离的编码具有所述所需特征的TCR的至少一种多核苷酸。

100.一种用于鉴定编码具有所需特征的TCR的至少一种多核苷酸的方法,所述方法包括:

(a)提供根据权利要求1-72中任一项所述的多个细胞,

(b)用编码多种TCR的多种表达构建体转导或转染所述细胞,

(c)在所述细胞的表面上表达所述TCR,

(d)在所需肽-MHC复合物的存在下,就所述所需特征选择表达所述TCR的细胞,

(e)调节步骤(d)中选择的所述细胞中的所述重组共受体或其链的活性,

(f)在所述所需肽-MHC复合物的存在下，就所述所需特征进一步选择由步骤(e)产生的表达所述TCR的细胞，

(g)从步骤(f)中选择的所述细胞中分离编码具有所述所需特征的TCR的至少一种多核苷酸，和

(h)鉴定步骤(g)中分离的编码具有所述所需特征的TCR的至少一种多核苷酸。

101.根据权利要求100所述的方法，其中步骤(d)在所述重组共受体或其链的表面表达的存在下执行，并且其中步骤(e)包括所述重组共受体或其链的细胞表面表达的取消。

102.根据权利要求101的方法，其中步骤(a)的所述多个细胞包含根据权利要求33-40中任一项所述的细胞，并且其中在步骤(e)中，所述重组共受体或其链的细胞表面表达通过使所述第一多核苷酸和/或第二多核苷酸中的位点特异性重组序列与同源位点特异性重组酶接触得到取消。

103.根据权利要求102所述的方法，其中所述同源位点特异性重组酶在诱导型启动子的控制下在所述细胞中表达。

104.根据权利要求102所述的方法，其中在步骤(e)之前，将所述同源位点特异性重组酶引入步骤(d)中选择的所述细胞内。

105.根据权利要求104所述的方法，其中通过用编码所述位点特异性重组酶的表达构建体转染或转导步骤(d)中选择的所述细胞，来引入所述同源位点特异性重组酶。

106.根据权利要求104所述的方法，其中所述同源位点特异性重组酶作为蛋白质被引入。

107.根据权利要求102-106中任一项所述的方法，其中所述位点特异性重组序列是lox位点，并且所述同源位点特异性重组酶是Cre重组酶。

108.根据权利要求107所述的方法，其中所述位点特异性重组序列是lox位点，并且所述同源位点特异性重组酶是包含蛋白质转导结构域的Cre重组酶融合蛋白。

109.根据权利要求108所述的方法，其中所述蛋白质转导结构域来自HIV Tat。

110.一种用于鉴定编码具有所需特征的TCR的至少一种多核苷酸的方法，所述方法包括：

(a)提供根据权利要求1-72中任一项所述的多个细胞，

(b)用编码多种TCR的多种表达构建体转导或转染所述细胞，

(c)在所述细胞的表面上表达所述TCR，

(d)在与目的肽复合的MHC分子的存在下，就所述所需特征选择表达所述TCR的细胞，其中所述MHC分子是野生型MHC分子的变体，其中与所述野生型MHC分子对于共受体的亲和力相比，所述变体MHC分子以降低的亲和力结合所述共受体，

(e)从步骤(d)中选择的所述细胞中分离编码具有所述所需特征的TCR的至少一种多核苷酸，和

(f)鉴定步骤(e)中分离的编码具有所述所需特征的TCR的至少一种多核苷酸。

111.根据权利要求110所述的方法，其中所述共受体是CD8，并且其中所述变体MHC分子是包含α链的变体MHC I类分子，所述α链是野生型MHC I类α链的变体。

112.根据权利要求111所述的方法，其中所述共受体是人CD8，并且其中所述变体MHC I类分子是包含α链的变体HLA-A2，所述α链是野生型HLA-A2α链的变体。

113.根据权利要求112所述的方法，其中所述变体HLA-A2α链包含根据成熟蛋白质序列编号的A245V突变或D227K/T228A突变。

114.根据权利要求98-113中任一项所述的方法，其中所述所需特征选自对于所述所需肽-MHC复合物的高选择性、对于所述所需肽-MHC复合物的高亲和力、以及在所述所需肽-MHC复合物的存在下阳性功能读出的证实。

115.根据权利要求114所述的方法，其中所述功能读出选自激活标志物的表达、信号传导途径的触发、细胞因子的产生、钙流动、增殖和报道系统的激活。

116.根据权利要求115所述的方法，其中所述激活标志物是CD69或CD137。

117.根据权利要求115或116所述的方法，其中所述多个细胞包含根据权利要求55-64中任一项所述的细胞，并且其中所述功能读出是所述一种或多种报道系统的激活。

118.根据权利要求99-117中任一项所述的方法，其中所述多种表达构建体编码(i)TCRα链和TCRβ链，(ii)TCRα链和多条不同的TCRβ链，(iii)TCRβ链和多条不同的TCRα链，或(iv)多条不同的TCRα链和多条不同的TCRβ链。

119.根据权利要求98-118中任一项所述的方法，其中所述所需肽-MHC复合物包含MHC I类或MHC II类分子。

120.根据权利要求98-119中任一项所述的方法，其中所述所需肽-MHC复合物是无细胞肽-MHC复合物。

121.根据权利要求120所述的方法，其中所述所需肽-MHC复合物包含MHC分子的二聚体、四聚体或多聚体。

122.根据权利要求98-119中任一项所述的方法，其中所述所需肽-MHC复合物在细胞的表面上展示。

123.根据权利要求122所述的方法，其中所述细胞是哺乳动物细胞、酵母细胞或昆虫细胞。

124.根据权利要求122所述的方法，其中所述细胞是T2细胞或抗原呈递细胞。

125.根据权利要求98-124中任一项所述的方法，其中所述肽是磷酸肽或磷酸肽模拟物。

126.根据权利要求99-125中任一项所述的方法，其中在步骤(b)中，使用包含PVC-211鼠白血病病毒的包膜的逆转录病毒载体颗粒，将编码多种TCR的所述多种表达构建体转导到所述细胞内。

127.根据权利要求99-125中任一项所述的方法，其中每个TCR包含TCRα链和TCRβ链，其中所述TCRα链和TCRβ链由分开的表达构建体编码。

经改造的宿主细胞及其使用方法

[0001] 相关申请

[0002] 本专利申请要求2015年9月11日提交的美国临时申请号62/217,677的权益，所述美国临时申请以引用的方式全文并入本文。

技术领域

[0003] 本公开内容提供了适合于表达功能性T细胞受体(TCR)的经改造的宿主细胞，以及使用这些细胞来鉴定特异性结合所需肽-主要组织相容性复合物(MHC)复合物的TCR的方法。

背景技术

[0004] 在哺乳动物中，获得性免疫系统包含两种主要组分：涉及抗体的体液免疫应答和涉及T细胞的细胞免疫应答。T细胞是适应性细胞免疫的主要介质，并且通过TCR介导的与主要组织相容性复合物(MHC)分子结合的肽表位的识别发挥其作用。免疫系统含有涵盖广泛范围的肽-MHC特异性的大量T细胞。然而，胸腺中的阴性和阳性选择过程导致对T细胞多样性的限制，限制了体内T细胞反应性的范围。例如，阴性选择导致对于自身抗原特异性的高亲和性T细胞储库的去除，并且这包括例如对于在肿瘤组织上表达的自身抗原具有期望特异性的T细胞。

[0005] 癌症免疫疗法(患者对癌细胞的免疫应答的增强)具有很大的希望。主动免疫疗法通过刺激荷瘤患者的内源性免疫系统来进行。被动或过继免疫疗法涉及将免疫感受态细胞转移到患者内。过继疗法的一种方法是使用基因治疗技术将对于已知癌症特异性肽-MHC复合物特异性的TCR引入癌症患者的T细胞内。然而，这种方法依赖获得以合适的亲和力特异性结合癌症特异性肽-MHC复合物的TCR。

[0006] 相应地，本领域需要特异性结合所需肽-MHC复合物(例如，包含癌症特异性肽抗原的肽-MHC复合物)的新型TCR，以及发现这种TCR的技术。

发明内容

[0007] 本文提供了适合于表达功能性TCR的经改造的宿主细胞，以及使用这些细胞来鉴定特异性结合所需肽-MHC复合物的TCR的方法。

[0008] 在一个方面，本公开内容提供了源自淋巴细胞的细胞(例如经分离的细胞)，所述细胞包含编码重组共受体或其第一链的第一多核苷酸，其中所述细胞在细胞表面上表达CD3，但不表达内源性TCR。在某些实施例中，CD3是内源性CD3。在某些实施例中，CD3是重组CD3。在某些实施例中，细胞在细胞表面上表达重组共受体或其第一链，和/或细胞以可调节的方式在细胞表面上表达重组共受体或其第一链，和/或细胞在细胞表面上不表达内源性共受体，和/或内源性共受体是CD8或CD4。

[0009] 在另一个方面，本公开内容还提供了源自淋巴细胞的细胞(例如经分离的细胞)，所述细胞包含编码重组共受体或其第一链的第一多核苷酸，其中所述淋巴细胞是不变NKT

(iNKT)细胞或多样(diverse)NKT(dNKT)细胞。在某些实施例中,细胞在细胞表面上表达重组共受体或其第一链。在某些实施例中,细胞在细胞表面上不表达内源性共受体,和/或内源性共受体是CD8或CD4。

[0010] 在另一个方面,本公开内容提供了源自淋巴细胞的细胞(例如经分离的细胞),所述细胞包含编码重组共受体或其第一链的第一多核苷酸,其中所述细胞能够以可调节的方式在细胞表面上表达重组共受体或其第一链。在某些实施例中,细胞以可调节的方式在细胞表面上表达重组共受体或其第一链。在某些实施例中,细胞在细胞表面上不表达内源性共受体。在某些实施例中,内源性共受体是CD8或CD4。

[0011] 下述实施例各自应用于本文所述的本发明的细胞。

[0012] 在某些实施例中,重组共受体或其第一链包含胞外区、跨膜区和胞质区,其中胞外区与跨膜区连接,并且跨膜区与胞质区连接。

[0013] 在某些实施例中,重组共受体或其第一链的胞质区的氨基酸序列与来自与淋巴细胞相同物种的天然存在的共受体或其第一链的相应胞质区的氨基酸序列可至少90%相同,任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%相同。

[0014] 在某些实施例中,重组共受体或其第一链的跨膜区和胞质区一起的氨基酸序列与来自与淋巴细胞相同物种的天然存在的共受体或其第一链的相应跨膜区和胞质区一起的氨基酸序列可至少90%相同,任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%相同。

[0015] 在某些实施例中,重组共受体或其第一链的胞外区的氨基酸序列与来自与淋巴细胞不同物种的天然存在的共受体或其第一链的相应胞外区的氨基酸序列至少90%相同,任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%相同。在某些实施例中,来自与淋巴细胞不同物种的天然存在的共受体或其第一链是人的。

[0016] 在某些实施例中,重组共受体或其第一链的胞质区与来自与淋巴细胞相同物种的天然存在的共受体或其第一链的相应胞质区的氨基酸序列至少90%相同,任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%相同,和/或重组共受体或其第一链的跨膜区和胞质区一起的氨基酸序列与来自与淋巴细胞相同物种的天然存在的共受体或其第一链的相应跨膜区和胞质区一起的氨基酸序列可至少90%相同,任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%相同,并且重组共受体或其第一链的胞外区的氨基酸序列与来自与淋巴细胞不同物种的天然存在的共受体或其第一链的相应胞外区的氨基酸序列至少90%相同,任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%相同。在一个实施例中,来自与淋巴细胞不同物种的天然存在的共受体或其第一链是人的。

[0017] 在某些实施例中,重组共受体是CD8或CD4。

[0018] 在某些实施例中,如本文中公开的细胞还包含编码所述重组共受体的第二链的第二多核苷酸,其中所述第二链包含胞外区、跨膜区和胞质区,其中第二链的胞外区与第二链的跨膜区连接,且第二链的跨膜区与第二链的胞质区连接。在某些实施例中,第二链的胞质区的氨基酸序列与来自与淋巴细胞相同物种的天然存在的共受体链的相应胞质区的氨基酸序列至少90%相同,任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%相同。在某些实施例中,第二链的跨膜区和胞质区一起的氨基酸序列与来自与淋巴细胞相同物种的天然存在的共受体链的相应跨膜区和胞质区一起的氨基酸序列至少90%相同,任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%相同。在某些实施例中,第二链的胞外区的氨基酸序列与来自与淋巴细胞

不同物种的天然存在的共受体链的相应胞外区的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同。可来自与淋巴细胞不同物种的天然存在的共受体链是人的。

[0019] 因此，在某些实施例中，第二链的胞质区的氨基酸序列与来自与淋巴细胞相同物种的天然存在的共受体链的相应胞质区的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同，和/或第二链的跨膜区和胞质区一起的氨基酸序列与来自与淋巴细胞相同物种的天然存在的共受体链的相应跨膜区和胞质区一起的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同，并且第二链的胞外区的氨基酸序列与来自与淋巴细胞不同物种的天然存在的共受体链的相应胞外区的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同。在一个实施例中，来自与淋巴细胞不同物种的天然存在的共受体链是人的。

[0020] 在某些实施例中，重组共受体是CD8。在某些实施例中，重组共受体的第一链的胞质区包含SEQ ID NO:1的残基183-212的氨基酸序列。在某些实施例中，重组共受体的第一链的跨膜区和胞质区一起包含SEQ ID NO:1的残基162-212的氨基酸序列。在某些实施例中，重组共受体的第一链的胞外区包含SEQ ID NO:1的残基1-161的氨基酸序列。在某些实施例中，重组共受体的第二链的胞质区包含SEQ ID NO:2的残基171-187的氨基酸序列。在某些实施例中，重组共受体的第二链的跨膜区和胞质区一起包含SEQ ID NO:2的残基150-187的氨基酸序列。在某些实施例中，重组共受体的第二链的胞外区包含SEQ ID NO:2的残基1-149的氨基酸序列。因此，在某些实施例中，重组共受体的第一链的胞质区包含SEQ ID NO:1的残基183-212的氨基酸序列，和/或重组共受体的第一链的跨膜区和胞质区一起包含SEQ ID NO:1的残基162-212的氨基酸序列，例如，其中重组共受体的第一链的胞外区包含SEQ ID NO:1的残基1-161的氨基酸序列。在一个实施例中，重组共受体的第二链的胞质区包含SEQ ID NO:2的残基171-187的氨基酸序列，和/或重组共受体的第二链的跨膜区和胞质区一起包含SEQ ID NO:2的残基150-187的氨基酸序列。在一个实施例中，重组共受体的第二链的胞外区包含SEQ ID NO:2的残基1-149的氨基酸序列。

[0021] 在某些实施例中，重组共受体是包含下述的嵌合CD8：a)包含人CD8α的胞外区以及小鼠CD8α的跨膜区和胞质区的嵌合CD8α链，和b)包含人CD8β的胞外区以及小鼠CD8β的跨膜区和胞质区的嵌合CD8β链。在一个实施例中，嵌合CD8α链包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列，并且嵌合CD8β链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列，例如，其中所述嵌合CD8α链的氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成，并且所述嵌合CD8β链的氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。

[0022] 在另一个方面，本公开内容还提供了源自小鼠淋巴细胞的经分离的细胞，所述细胞包含：a)编码包含人CD8α的胞外区以及小鼠CD8α的跨膜区和胞质区的嵌合CD8α链的第一多核苷酸，和b)编码包含人CD8β的胞外区以及小鼠CD8β的跨膜区和胞质区的嵌合CD8β链的第二多核苷酸，其中所述细胞在细胞表面上表达CD3，但不表达内源性TCR。在某些实施例中，嵌合CD8α链包含SEQ ID NO:1的氨基酸序列，并且嵌合CD8β链包含SEQ ID NO:2的氨基酸序列。在某些实施例中，嵌合CD8α链的氨基酸序列由SEQ ID NO:1的氨基酸序列组成，并且嵌合CD8β链的氨基酸序列由SEQ ID NO:2的氨基酸序列组成。

[0023] 在某些实施例中，重组共受体或其链的表面表达是可调节的。

[0024] 在某些实施例中，第一多核苷酸的侧面为第一对相容位点特异性重组序列。

[0025] 在某些实施例中，第二多核苷酸的侧面为第二对相容位点特异性重组序列。

[0026] 在某些实施例中，第一多核苷酸的一部分的侧面为第一对相容位点特异性重组序列，所述部分编码跨膜区和/或胞质区。

[0027] 在某些实施例中，第二多核苷酸的一部分的侧面为第二对相容位点特异性重组序列，所述部分编码跨膜区和/或胞质区。

[0028] 在某些实施例中，第一对相容位点特异性重组序列与第二对相容位点特异性重组序列不交叉反应。

[0029] 在某些实施例中，重组共受体或其链的表面表达可通过使第一多核苷酸和/或第二多核苷酸与同源位点特异性重组酶接触得到减弱，所述同源位点特异性重组酶识别所述第一多核苷酸的第一对相容位点特异性重组序列和/或所述第二多核苷酸的第二对相容位点特异性重组序列。

[0030] 在某些实施例中，重组共受体或其链的表面表达可通过使第一多核苷酸和/或第二多核苷酸与同源位点特异性重组酶接触得到取消，所述同源位点特异性重组酶识别所述第一多核苷酸的第一对相容位点特异性重组序列和/或所述第二多核苷酸的第二对相容位点特异性重组序列。

[0031] 因此，在某些实施例中，第一对相容位点特异性重组序列与第二对相容位点特异性重组序列不交叉反应，例如，其中重组共受体或其链的表面表达可通过使第一多核苷酸和/或第二多核苷酸与同源位点特异性重组酶接触得到减弱，所述同源位点特异性重组酶识别所述第一多核苷酸的第一对相容位点特异性重组序列和/或所述第二多核苷酸的第二对相容位点特异性重组序列，或其中重组共受体或其链的表面表达可通过使第一多核苷酸和/或第二多核苷酸与同源位点特异性重组酶接触得到取消，所述同源位点特异性重组酶识别所述第一多核苷酸的第一对相容位点特异性重组序列和/或所述第二多核苷酸的第二对相容位点特异性重组序列。

[0032] 在某些实施例中，细胞还包含编码同源位点特异性重组酶的第三多核苷酸，所述同源位点特异性重组酶识别所述第一对相容位点特异性重组序列和/或第二对相容位点特异性重组序列。在某些实施例中，第三多核苷酸的转录通过诱导型启动子调节。

[0033] 在某些实施例中，第一对位点特异性重组序列和第二对位点特异性重组序列是lox位点的相容对，并且同源位点特异性重组酶是Cre重组酶。

[0034] 在某些实施例中，lox位点的相容对是loxP位点的相容对。因此，在一个实施例中，第一对位点特异性重组序列和第二对位点特异性重组序列是lox位点的相容对，并且同源位点特异性重组酶是Cre重组酶，例如，其中lox位点的相容对是loxP位点的相容对。

[0035] 在某些实施例中，重组共受体是CD8。在某些实施例中，第一多核苷酸包含SEQ ID NO:3的残基1-675的多核苷酸序列。在某些实施例中，第一多核苷酸包含SEQ ID NO:3的多核苷酸序列。在某些实施例中，第二多核苷酸包含SEQ ID NO:4的残基1-600的多核苷酸序列。在某些实施例中，第二多核苷酸包含SEQ ID NO:4的多核苷酸序列。在某些实施例中，重组共受体的第一链包含SEQ ID NO:25的氨基酸序列。在某些实施例中，重组共受体的第一链包含SEQ ID NO:5的氨基酸序列。在某些实施例中，重组共受体的第二链包含SEQ ID NO:26的氨基酸序列。在某些实施例中，重组共受体的第二链包含SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

因此，在本发明的一个实施例中，重组共受体是CD8，例如，其中第一多核苷酸包含SEQ ID NO:3的残基1-675的多核苷酸序列，或第一多核苷酸包含SEQ ID NO:3的多核苷酸序列，和/或其中第二多核苷酸包含SEQ ID NO:4的残基1-600的多核苷酸序列，或第二多核苷酸包含SEQ ID NO:4的多核苷酸序列。在另一个实施例中，重组共受体是CD8，并且重组共受体的第一链包含SEQ ID NO:25或SEQ ID NO:5的氨基酸序列，和/或重组共受体的第二链包含SEQ ID NO:26或SEQ ID NO:6的氨基酸序列。

[0036] 在某些实施例中，第一多核苷酸的转录通过诱导型启动子调节，和/或第二多核苷酸的转录通过诱导型启动子调节。

[0037] 在某些实施例中，细胞还包含一种或多种报道系统。在某些实施例中，一种或多种报道系统提供细胞的选自激活T细胞核因子(NFAT)信号传导、激活物蛋白-1(AP1)信号传导、NFκB/Rel信号传导和钙流动的一种或多种活性的指示。在某些实施例中，一种或多种报道系统包含多核苷酸，所述多核苷酸包含与编码可检测标志物的多核苷酸序列可操作连接的启动子区。在某些实施例中，启动子区包含选自激活T细胞核因子(NFAT)应答元件、激活物蛋白-1(AP1)应答元件和NFκB/Rel应答元件的一种或多种转录应答元件。在某些实施例中，可检测标志物选自荧光蛋白、细胞表面标志物和抗生素选择标志物。在某些实施例中，启动子区是IL-2启动子。在某些实施例中，IL-2启动子是最小IL-2启动子。在某些实施例中，IL-2启动子包含一个或多个NFAT结合位点。在某些实施例中，IL-2启动子包含三个NFAT结合位点。在某些实施例中，可检测标志物是增强型绿色荧光蛋白(EGFP)。在某些实施例中，启动子区是包含三个NFAT结合位点的IL-2启动子，并且可检测标志物是增强型绿色荧光蛋白(EGFP)。

[0038] 在某些实施例中，所述细胞源自单一细胞，其中当所述细胞扩增为至少10^5的多个细胞，且用编码TCRα链和TCRβ链的分开的多核苷酸载体转导或转染，以在最大化转导或转染效率的条件下表达包含TCRα链和TCRβ链的重组TCR时，所述多个细胞的至少20％在细胞表面上表达重组TCR。在某些实施例中，所述细胞先前已经受一轮或多轮转导或转染。

[0039] 在某些实施例中，淋巴细胞是T细胞、B细胞或NK细胞。在某些实施例中，淋巴细胞是选自$CD8^+$细胞毒性T细胞、$CD8^+$调节性T细胞、$CD4^+$细胞毒性T细胞、$CD4^+$辅助性T细胞和$CD4^+$调节性T细胞的T细胞。在某些实施例中，淋巴细胞是哺乳动物淋巴细胞。在某些实施例中，淋巴细胞是鼠淋巴细胞。在某些实施例中，淋巴细胞选自RAG1或RAG2敲除鼠细胞、未成熟鼠T细胞、小鼠DO-11.10.758α-β-(58-/-)细胞和小鼠Bw5147细胞。在某些实施例中，淋巴细胞是小鼠淋巴细胞。因此，在本发明的细胞的另一个实施例中，淋巴细胞是T细胞、B细胞或NK细胞，例如，淋巴细胞是选自$CD8^+$细胞毒性T细胞、$CD8^+$调节性T细胞、$CD4^+$细胞毒性T细胞、$CD4^+$辅助性T细胞和$CD4^+$调节性T细胞的T细胞，和/或其中淋巴细胞是哺乳动物淋巴细胞，例如鼠淋巴细胞，例如选自RAG1或RAG2敲除鼠细胞、未成熟鼠T细胞、小鼠DO-11.10.7 58α-β-(58-/-)细胞和小鼠Bw5147细胞的淋巴细胞。在一个实施例中，淋巴细胞是小鼠淋巴细胞。

[0040] 在某些实施例中，所述细胞还在细胞表面上表达重组TCR，所述重组TCR包含TCRα链和TCRβ链，其中TCRα链和TCRβ链各自包含可变区和非可变区，每个非可变区包含恒定区、跨膜区和胞质区，其中对于每条链，可变区与恒定区连接，恒定区与跨膜区连接，并且跨膜区与胞质区连接。在某些实施例中，对于TCRα链和TCRβ链各自，胞质区的氨基酸序列与来自与淋巴细胞相同物种的天然存在的TCR链的相应胞质区的氨基酸序列至少60％相同，任选

70、80、90或100％相同。在某些实施例中，对于TCRα链和TCRβ链各自，跨膜区和胞质区的氨基酸序列一起与来自与淋巴细胞相同物种的天然存在的TCR链的相应区的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同。在某些实施例中，TCRα链的跨膜区和胞质区的氨基酸序列一起包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列。在某些实施例中，TCRβ链的跨膜区和胞质区的氨基酸序列一起包含选自SEQ ID NO:16、18和20的氨基酸序列。在某些实施例中，对于TCRα链和TCRβ链各自，非可变区的氨基酸序列与来自与淋巴细胞相同物种的天然存在的TCR链的相应非可变区的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同。在某些实施例中，TCRα链的非可变区包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列。在某些实施例中，TCRβ链的非可变区包含选自SEQ ID NO:15、17和19的氨基酸序列。

[0041] 因此，在某些实施例中，所述细胞还在细胞表面上表达重组TCR，所述重组TCR包含TCRα链和TCRβ链，其中TCRα链和TCRβ链各自包含可变区和非可变区，每个非可变区包含恒定区、跨膜区和胞质区，其中对于每条链，可变区与恒定区连接，恒定区与跨膜区连接，并且跨膜区与胞质区连接。在一个实施例中，对于TCRα链和TCRβ链各自，胞质区的氨基酸序列与来自与淋巴细胞相同物种的天然存在的TCR链的相应胞质区的氨基酸序列至少60％相同，任选70、80、90或100％相同。在另一个实施例中，对于TCRα链和TCRβ链各自，跨膜区和胞质区的氨基酸序列一起与来自与淋巴细胞相同物种的天然存在的TCR链的相应区的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同，例如，其中TCRα链的跨膜区和胞质区的氨基酸序列一起包含SEQ ID NO:14的氨基酸序列，和/或其中TCRβ链的跨膜区和胞质区的氨基酸序列一起包含选自SEQ ID NO:16、18和20的氨基酸序列。在另一个实施例中，对于TCRα链和TCRβ链各自，非可变区的氨基酸序列与来自与淋巴细胞相同物种的天然存在的TCR链的相应非可变区的氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同，例如，其中TCRα链的非可变区包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列，和/或TCRβ链的非可变区包含选自SEQ ID NO:15、17和19的氨基酸序列。

[0042] 在某些实施例中，每个可变区的氨基酸序列源自来自与淋巴细胞不同物种的TCR链的相应可变区。在一个实施例中，来自与淋巴细胞不同物种的TCR是人的。

[0043] 在某些实施例中，每个可变区的氨基酸序列源自来自与淋巴细胞不同物种的TCR链的相应可变区，例如，其中对于TCRα链和TCRβ链各自，可变区和恒定区的氨基酸序列一起源自来自与淋巴细胞不同物种的TCR链的相应区。在一个实施例中，来自与淋巴细胞不同物种的TCR是人的。

[0044] 在某些实施例中，重组TCR是包含共刺激信号传导区的融合分子。在某些实施例中，共刺激信号传导区与TCRα链的胞质区或TCRβ链的胞质区融合。在某些实施例中，共刺激信号传导区包含选自CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、NKG2D、B7-H3和特异性结合CD83的配体的共刺激分子的信号传导区。在某些实施例中，共刺激信号传导区包含CD28的信号传导区、4-1BB的信号传导区或其组合。在某些实施例中，融合分子还包含CD3ζ信号传导区。

[0045] 因此，在某些实施例中，重组TCR是包含共刺激信号传导区的融合分子，例如，其中所述共刺激信号传导区与TCRα链的胞质区或TCRβ链的胞质区融合，和/或其中所述共刺激信号传导区包含选自CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1

(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、NKG2D、B7-H3和特异性结合CD83的配体的共刺激分子的信号传导区。在一个实施例中，共刺激信号传导区包含CD28的信号传导区、4-1BB的信号传导区或其组合，和/或融合分子还包含CD3ζ信号传导区。

[0046] 在某些实施例中，重组TCR的表达与下述的表达偶联：(1)至少一种抗生素选择标志物；(2)至少一种筛选标志物；或(3)其组合，例如，其中所述至少一种筛选标志物是荧光蛋白或细胞表面标志物。

[0047] 在某些实施例中，重组TCR源自选自下述的来源：胎儿胸腺、脐带血、从癌症患者中分离的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)、接种疫苗的受试者、天然暴露于目的抗原的受试者、健康受试者和合成文库，例如，其中所述接种疫苗的受试者是已接受HPV疫苗、EBV疫苗或癌症疫苗的人，或所述接种疫苗的受试者是已用目的抗原免疫的表达人主要组织相容性复合物(MHC)的转基因小鼠，和/或其中所述接种疫苗的受试者是已用目的抗原免疫的表达HLA-A2的转基因小鼠。

[0048] 在上述本发明的某些实施例中，所述细胞表达(1)重组TCRα链和重组TCRβ链，(2)重组TCRα链和多条不同的重组TCRβ链，(3)重组TCRβ链和多条不同的重组TCRα链，或(4)多条不同的重组TCRα链和多条不同的重组TCRβ链。

[0049] 在另一个方面，本公开内容还提供了包含多个本文公开的细胞中的任何一种的细胞文库。在某些实施例中，细胞文库具有至少10^7、10^8或10^9的TCR多样性。在另一个方面，本发明涉及包含多个本发明的细胞中的任何一种的细胞文库，其中所述细胞还在细胞表面上表达细胞TCR。本文关于本发明的细胞公开的实施例也应用于本发明的细胞文库。

[0050] 在另一个方面，本公开内容还提供了用于分离和鉴定具有所需特征的TCR的方法，所述方法包括使多个本文公开的细胞或细胞文库中的任何一种经受选择过程，所述选择过程包括在所需肽-MHC复合物的存在下选择所需特征，分离表达TCR的细胞，并且确定经分离的细胞的TCR具有所需特征。本文关于本发明的细胞(其中所述细胞还在细胞表面上表达细胞TCR)公开的实施例和本文关于本发明的细胞文库公开的实施例也应用于本发明的方法。

[0051] 在另一个方面，本发明还提供了用于鉴定编码具有所需特征的TCR的至少一种多核苷酸的方法，所述方法包括：(a)提供多个所公开的细胞中的任何一种，(b)用编码多种TCR的多种表达构建体转导或转染所述细胞，(c)在所述细胞的表面上表达所述TCR，(d)在所需肽-MHC复合物的存在下，就所需特征选择表达TCR的细胞，(e)从所选择的细胞中分离编码具有所需特征的TCR的至少一种多核苷酸，和(f)鉴定步骤(e)中分离的编码具有所需特征的TCR的至少一种多核苷酸。本文关于本发明的细胞公开的实施例也应用于本发明的方法。优选地，该方法是体外方法。

[0052] 在另一个方面，本发明还提供了用于鉴定编码具有所需特征的TCR的至少一种多核苷酸的方法，所述方法包括：(a)提供多个本文公开的细胞中的任何一种，(b)用编码多种TCR的多种表达构建体转导或转染所述细胞，(c)在所述细胞的表面上表达所述TCR，(d)在所需肽-MHC复合物的存在下，就所需特征选择表达TCR的细胞，(e)调节步骤(d)中选择的细胞中的重组共受体或其链的活性，(f)在所需肽-MHC复合物的存在下，就所需特征进一步选择由步骤(e)产生的表达TCR的细胞，(g)从步骤(f)中选择的所述细胞中分离编码具有所需特征的TCR的至少一种多核苷酸，和(h)鉴定步骤(g)中分离的编码具有所需特征的TCR的至少一种多核苷酸。本文关于本发明的细胞公开的实施例也应用于本发明的方法。优选地，该

方法是体外方法。

[0053] 在某些实施例中，步骤(d)在重组共受体或其链的表面表达的存在下执行，并且步骤(e)包括重组共受体或其链的细胞表面表达的取消。

[0054] 在某些实施例中，步骤(a)的多个细胞包含本文公开的细胞中的任何一种，并且在步骤(e)中，重组共受体或其链的细胞表面表达通过使第一多核苷酸和/或第二多核苷酸中的位点特异性重组序列与同源位点特异性重组酶接触得到取消。在某些实施例中，同源位点特异性重组酶在诱导型启动子的控制下在细胞中表达。在某些实施例中，在步骤(e)之前，将同源位点特异性重组酶引入步骤(d)中选择的细胞内。在某些实施例中，通过用编码位点特异性重组酶的表达构建体转染或转导步骤(d)中选择的细胞，来引入同源位点特异性重组酶。在某些实施例中，同源位点特异性重组酶作为蛋白质被引入。在某些实施例中，位点特异性重组序列是lox位点，并且同源位点特异性重组酶是Cre重组酶。在某些实施例中，位点特异性重组序列是lox位点，并且同源位点特异性重组酶是包含蛋白质转导结构域的Cre重组酶融合蛋白。在某些实施例中，蛋白质转导结构域来自HIV Tat。因此，在本发明的方法的某些实施例中，步骤(d)在重组共受体或其链的表面表达的存在下执行，并且步骤(e)包括重组共受体或其链的细胞表面表达的取消，例如，其中步骤(a)的多个细胞包含本文公开的细胞中的任何一种，并且其中在步骤(e)中，重组共受体或其链的细胞表面表达通过使第一多核苷酸和/或第二多核苷酸中的位点特异性重组序列与同源位点特异性重组酶接触得到取消，和/或其中同源位点特异性重组酶在诱导型启动子的控制下在细胞中表达。在另一个实施例中，在步骤(e)之前，将同源位点特异性重组酶引入步骤(d)中选择的细胞内，特别地，其中通过用编码位点特异性重组酶的表达构建体转染或转导步骤(d)中选择的细胞，来引入同源位点特异性重组酶，或其中同源位点特异性重组酶作为蛋白质被引入。在一个实施例中，位点特异性重组序列是lox位点，并且同源位点特异性重组酶是Cre重组酶，例如，其中位点特异性重组序列是lox位点，并且同源位点特异性重组酶是包含蛋白质转导结构域的Cre重组酶融合蛋白，特别地，其中所述蛋白质转导结构域来自HIV Tat。

[0055] 在另一个方面，本公开内容还提供了用于鉴定编码具有所需特征的TCR的至少一种多核苷酸的方法，所述方法包括：(a)提供多个本文公开的细胞中的任何一种，(b)用编码多种TCR的多种表达构建体转导或转染所述细胞，(c)在所述细胞的表面上表达TCR，(d)在与目的肽复合的MHC分子的存在下，就所需特征选择表达TCR的细胞，其中所述MHC分子是野生型MHC分子的变体，其中与所述野生型MHC分子对于共受体的亲和力相比，所述变体MHC分子以降低的亲和力结合所述共受体，(e)从步骤(d)中选择的细胞中分离编码具有所需特征的TCR的至少一种多核苷酸，和(f)鉴定步骤(e)中分离的编码具有所需特征的TCR的至少一种多核苷酸。本文关于本发明的细胞公开的实施例也应用于本发明的方法。优选地，该方法是体外方法。

[0056] 在上述方法中任一种的某些实施例中，所述共受体是CD8，并且所述变体MHC分子是包含α链的变体MHC I类分子，所述α链是野生型MHC I类α链的变体，例如，其中所述共受体是人CD8，并且所述变体MHC I类分子是包含α链的变体HLA-A2，所述α链是野生型HLA-A2α链的变体，和/或其中所述变体HLA-A2α链包含根据成熟蛋白质序列编号的A245V突变或D227K/T228A突变。

[0057] 在上述方法中任一种的某些实施例中，所需特征选自对于所需肽-MHC复合物的高

选择性、对于所需肽-MHC复合物的高亲和力、以及在所需肽-MHC复合物的存在下阳性功能读出的证实。在某些实施例中，功能读出选自激活标志物的表达、信号传导途径的触发、细胞因子的产生、钙流动、增殖和报道系统的激活。在某些实施例中，激活标志物是CD69或CD137。在某些实施例中，信号传导途径是NFAT信号传导、IL-2信号传导、激活物蛋白-1信号传导或NFκB/Rel信号传导。在某些实施例中，细胞因子是IL-2、TNF-α或IFN-γ。在某些实施例中，增殖是T细胞的增殖。在某些实施例中，功能读出是细胞中的一种或多种报道系统的激活。在某些实施例中，报道系统是IL-2-EGFP报道系统。因此，上述本发明的方法中任一种的某些实施例，所需特征选自对于所需肽-MHC复合物的高选择性、对于所需肽-MHC复合物的高亲和力、以及在所需肽-MHC复合物的存在下阳性功能读出的证实，例如，其中功能读出选自激活标志物的表达、信号传导途径的触发、细胞因子的产生、钙流动、增殖和报道系统特别是如上文关于本发明的细胞描述的报道系统的激活，例如，其中激活标志物是CD69或CD137。在一个实施例中，信号传导途径是NFAT信号传导、IL-2信号传导、激活物蛋白-1信号传导或NFκB/Rel信号传导。在一个实施例中，细胞因子是IL-2、TNF-α或IFN-γ。在一个实施例中，增殖是T细胞的增殖。在一个实施例中，功能读出是细胞中的一种或多种报道系统的激活。在一个实施例中，报道系统是IL-2-EGFP报道系统。

[0058] 在上述方法中任一种的某些实施例中，所述多种表达构建体编码(i)TCRα链和TCRβ链，(ii)TCRα链和多条不同的TCRβ链，(iii)TCRβ链和多条不同的TCRα链，或(iv)多条不同的TCRα链和多条不同的TCRβ链。

[0059] 在上述方法中任一种的某些实施例中，所需肽-MHC复合物包含MHC I类或MHC II类分子。在某些实施例中，所需肽-MHC复合物是无细胞肽-MHC复合物。在某些实施例中，所需肽-MHC复合物包含MHC分子的二聚体、四聚体或多聚体。在某些实施例中，所需肽-MHC复合物在细胞的表面上展示。在上述本发明的方法中任一种的示例性实施例中，所需肽-MHC复合物在细胞的表面上展示，例如，其中所述细胞是哺乳动物细胞、酵母细胞或昆虫细胞，或者所述细胞是T2细胞或抗原呈递细胞。在某些实施例中，所述细胞是哺乳动物细胞、酵母细胞或昆虫细胞。在某些实施例中，所述细胞是T2细胞或抗原呈递细胞。因此，在上述本发明的方法中任一种的一个实施例中，所需肽-MHC复合物包含MHC I类或MHC II类分子，和/或所需肽-MHC复合物是无细胞肽-MHC复合物，特别地，其中所需肽-MHC复合物包含MHC分子的二聚体、四聚体或多聚体。

[0060] 在上述方法中任一种的某些实施例中，所述肽是磷酸肽或磷酸肽模拟物。

[0061] 在上述方法中任一种的某些实施例中，在步骤(b)中，使用包含PVC-211鼠白血病病毒的包膜的逆转录病毒载体颗粒，将编码多种TCR的多种表达构建体转导到细胞内，其中所述逆转录病毒载体颗粒包含编码TCRα链或TCRβ链的逆转录病毒表达构建体。

[0062] 在上述方法中任一种的某些实施例中，每个TCR包含TCRα链和TCRβ链，其中所述TCRα链和TCRβ链由分开的表达构建体编码。

附图说明

[0063] 图1是条形图，显示了在MTCD8mCD8αβ-chiCD8αβ+chiC58αβ+细胞与抗CD3和抗CD28抗体过夜共温育后，通过ELISA测量的培养上清液中的相对IL-2水平。y轴显示了光密度(OD)信号。

[0064] 图2A、2B、2C、2D和2E:图2A是显示在AK-D10细胞、表达嵌合DMF4的AK-D10细胞(AK-D10chiDMF4)和表达嵌合DMF5的AK-D10细胞(AK-D10chiDMF5)上,PE标记的HLA-A*0201Mart-1四聚体和APC标记的抗TCRβ链抗体的共染色的一组流式细胞术图。在每个图中指示了四聚体+TCR+细胞的百分比。最右边的图显示了AK-D10chiDMF4细胞和AK-D10chiDMF5细胞的叠加。图2B和2C是条形图,显示了在AK-D10chiDMF4细胞(图2B)或AK-D10chiDMF5细胞(图2C)与以所示浓度的装载有Mart-1肽ELAGIGILTV(SEQ ID NO:30)的DimerX(DimerX/Mart-1)或不含任何肽的单独DimerX(DimerX)过夜温育后,通过ELISA测量的相对IL-2产生。y轴显示了光密度(OD)信号。图2D和2E是条形图,分别显示了在与未装载的DimerX(灰色条)或者装载有Mart-1肽ELAGIGILTV(SEQ ID NO:30)(对于AK-D10 chiDMF4和AK-D10 chiDMF5)或NY-ESO-1肽SLLMWITQV(SEQ ID NO:31)(对于AK-D10chiC58)的DimerX(黑色条)过夜温育后,来自表达嵌合TCR的AK-D10细胞的IL-2和TNFα的细胞内染色的结果。y轴显示了TCR+IL-2+(图2D)或TCR+TNFα+(图2E)细胞的百分比(%)。

[0065] 图3是一组流式细胞术图,显示了嵌合CD8在LOT-D08 chiCD8α^{flox}+chiCD8β^{flox}+细胞的表面上的表达,以及在用Cre重组酶转导后,嵌合CD8从细胞表面的后续消除。在每个图中指示了chiCD8α+chiCD8β+细胞的百分比。

[0066] 图4A、4B和4C是来自测试HLA-A*02:01Mart-1四聚体与表达嵌合DMF4(chiDMF4)或DMF5(chiDMF5)的BB8细胞(MTCD8 mCD8αβ-chiCD8α^{flox}+chiCD8β^{flox}+IL-2-(NFAT)$_3$-EGFP+)的结合的测定的结果。图4A和4B是一组流式细胞术图,显示了经转导以表达Cre重组酶(底部)或未经转导(顶部)的表达嵌合DMF4的BB8细胞。图中指示了在X轴和Y轴上显示的参数对。图4C是显示HLA-A*02:01Mart-1四聚体与表达嵌合DMF4或DMF5的BB8细胞的结合的条形图。细胞被转导以表达Cre重组酶(标记为“CD8-”)或未被转导(标记为“CD8+”)。y轴显示了如通过流式细胞术测量的对于四聚体结合检测的中值荧光强度(MFI)。

[0067] 图5是条形图,显示了通过ELISA测量的,在与抗CD3抗体(左)或抗CD3和抗CD28抗体(右)温育后,通过AK-D10细胞(标记为“ch5C58-”)或表达报道构建体和嵌合TCR C58两者的AK-D10细胞(标记为“chiC58+”)产生的培养上清液中的相对IL-2水平。y轴显示了光密度(OD)信号。

[0068] 图6A、6B和6C是显示了EGFP表达的一组流式细胞术图。测试的细胞是在抗CD3抗体的存在下(图6A)或不存在下(图6B)温育的表达IL-2报道构建体和嵌合TCR DMF4的AK-D10细胞(AK-D10 IL-2-(NFAT)$_3$-EGFP+chiDMF4+),或与抗CD3抗体一起温育的仅表达IL-2报道构建体的AK-D10细胞(AK-D10 IL-2-(NFAT)$_3$-EGFP+)(图6C)。在每个图中指示了EGFP阳性细胞的百分比。

[0069] 图7A、7B和7C是来自测定的一组流式细胞术图,在测定中表达IL-2报道构建体和嵌合TCR C259的AK-D10细胞(AK-D10 IL-2-(NFAT)$_3$-EGFP+chiC259+)与用NY-ESO-1肽SLLMWITQV(SEQ ID NO:31)脉冲的T2细胞一起温育(图7A),与非脉冲的T2细胞一起温育(图7B),或在T2细胞的不存在下温育(图7C),并且使用流式细胞术测量TCR和EGFP表达。在每个图的右上方小图中指示了TCR^{高}EGFP+细胞的百分比。在每个图的右下方小图中指示了TCR^{低}EGFP+细胞的百分比。

[0070] 图8是显示了来自测定的结果的条形图,在测定中表达报道构建体IL-2-(NFAT)$_3$-EGFP和嵌合TCR C58(标记为“chiC58”)或C259(标记为“chiC259”)的AK-D10细胞与用NY-

ESO-1肽SLLMWITQV(SEQ ID NO:31)脉冲的T2细胞共培养，或与非脉冲的T2细胞共培养，并且使用流式细胞术分析TCR、EGFP、CD69和CD137的表达。显示了TCR+EGFP+细胞、TCR+CD69+细胞或TCR+CD137+细胞的百分比(%)。

[0071] 图9A和9B是显示了来自测定的结果的图，在测定中表达报道构建体IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP和嵌合TCR DMF4(标记为“chiDMF4”，图9A)或DMF5(标记为“chiDMF5”，图9B)的AK-D10细胞与用不同浓度的Mart-1肽ELAGIGILTV(SEQ ID NO:30)脉冲的T2细胞共培养，并且使用流式细胞术测量TCR和EGFP表达。TCR+EGFP+细胞的百分比(%)针对Mart-1肽的浓度进行绘制。

[0072] 图10A和10B是显示了来自测定的结果的图，在测定中表达嵌合TCR DMF4或DMF5的BB8细胞被转导以表达Cre重组酶(在图10A中标记为“chiDMF4Cre”，且在图10B中标记为“chiDMF5Cre”)，或不被转导(在图10A中标记为“chiDMF4”，且在图10B中标记为“chiDMF5”)。细胞然后与用50μg/ml、5μg/ml或0.5μg/ml的Mart-1肽ELAGIGILTV(SEQ ID NO:30)脉冲的T2细胞共培养，并且使用流式细胞术测量TCR、CD8和EGFP表达。TCR+EGFP+细胞的百分比(%)针对激活的长度进行绘制。

具体实施方式

[0073] 本文公开了用于生成和筛选高度多样化的T细胞受体(TCR)细胞文库的方法，所述方法允许用于免疫疗法应用的抗原反应性治疗性TCR的快速鉴定和分离。

[0074] 在本发明的优选实施例中，根据本发明的细胞不是人胚胎细胞。

[0075] 本文描述的“经分离的细胞”的所有情况另外被视为可能但不必是经分离的细胞。本文描述的“经分离的多核苷酸”的所有情况另外被视为可能但不必是经分离的多核苷酸。本文描述的“细胞”的所有情况另外被视为可能但不必是经分离的细胞。本文描述的“多核苷酸”的所有情况另外被视为可能但不必是经分离的多核苷酸。

[0076] I.定义

[0077] 除非本文另有定义，否则本文使用的科学和技术术语具有本领域普通技术人员通常理解的含义。在任何潜在的歧义的情况下，本文提供的定义优先于任何字典或外部定义。除非上下文另有要求，否则单数术语应包括复数，并且复数术语应包括单数。除非另有说明，否则“或”的使用意指“和/或”。术语“包括(including)”以及其他形式(例如“包括(includes)”和“包括(included)”)的使用不是限制性的。

[0078] 此处应注意，除非上下文另有明确规定，否则如本说明书和所附权利要求中使用的，单数形式“一个”、“一种”和“该/所述”也包括复数指示物。

[0079] 术语“约”或“大约”意指在给定值或范围的10％内，且更优选在5％(或1％或更少)内。

[0080] 如本文使用的，术语“经分离的细胞”指已从其体内位置取出的细胞。

[0081] 如本文使用的，术语“T细胞受体”和“TCR”可互换使用，并且指全长异二聚体αβ或γδTCR、TCR的抗原结合片段和包含TCR CDR或可变区的分子。TCR的例子包括但不限于全长TCR、TCR的抗原结合片段、缺乏跨膜区和胞质区的可溶性TCR、含有TCR的通过柔性接头附着的可变区的单链TCR、通过经改造的二硫键连接的TCR链、单特异性TCR、多特异性TCR(包括双特异性TCR)、TCR融合物、人TCR、人源化TCR、嵌合TCR、重组产生的TCR和合成TCR。该术语

涵盖野生型TCR和遗传改造的TCR(例如包含嵌合TCR链的嵌合TCR,该嵌合TCR链包含来自第一物种的TCR的第一部分和来自第二物种的TCR的第二部分)。

[0082] 如本文使用的,术语“TCR可变区”理解为涵盖给定TCR的氨基酸,其不包括在如由TCRα链的TRAC基因以及TCRβ链的TRBC1或TRBC2基因编码的非可变区内。在一些实施例中,TCR可变区涵盖给定TCR的所有氨基酸,其由TCRα链的TRAV基因或TRAJ基因、或者TCRβ链的TRBV基因、TRBD基因或TRBJ基因编码(参见例如T cell receptor Factsbook,(2001)LeFranc和LeFranc,Academic Press,ISBN 0-12-441352-8,其以引用的方式全文并入本文)。

[0083] 如本文使用的,关于TCR的术语“恒定区”指TCR的细胞外部分,其由TCRα链的TRAC基因以及TCRβ链的TRBC1或TRBC2基因编码。术语恒定区不包括由TCRα链的TRAV基因或TRAJ基因、或者TCRβ链的TRBV基因、TRBD基因或TRBJ基因编码的TCR可变区(参见例如T cell receptor Factsbook,(2001)LeFranc和LeFranc,Academic Press,ISBN 0-12-441352-8,其以引用的方式全文并入本文)。

[0084] 如本文使用的,术语“重组”分子指并非天然存在于它在其中表达的细胞中的分子。在某些实施例中,重组分子例如共受体或其链,来自与它在其中表达的细胞不同的物种。

[0085] 如本文使用的,术语“内源性”分子指天然存在于它在其中表达的细胞中的分子。

[0086] 如本文使用的,术语“共刺激信号传导区”指共刺激分子的负责介导细胞内信号传导事件的细胞内部分。

[0087] 如本文使用的,关于重组蛋白质的术语“细胞外的”指重组跨膜蛋白质的位于细胞外部的一个或多个部分。

[0088] 如本文使用的,关于重组蛋白质的术语“跨膜的”指重组跨膜蛋白质的嵌入细胞的质膜中的一个或多个部分。

[0089] 如本文使用的,关于重组蛋白质的术语“细胞质的”指重组蛋白质的位于细胞的细胞质中的一个或多个部分。

[0090] 如本文使用的,术语“嵌合”蛋白质指重组蛋白质,其中第一重组蛋白质的第一区与第二重组蛋白质的第二区任选使用肽接头在框内融合。在一个实施例中,第一重组蛋白质和第二重组蛋白质来自相同的物种,并且第一区不同于第二区。在另一个实施例中,第一重组蛋白质和第二重组蛋白质来自不同物种。

[0091] 如本文使用的,术语“CD3”指“分化簇3”或其功能部分。CD3的例子包括但不限于包含形成以下三个二聚体的六种多肽的复合物:CD3ε/CD3γ、CD3ε/CD3δ和CD3ζ/CD3ζ。

[0092] 如本文使用的,术语“CD8”指“分化簇8”,TCR的共受体或其功能部分。CD8的例子包括但不限于CD8α/CD8β异源二聚体、CD8α/CD8α同源二聚体和CD8β/CD8β同源二聚体。该术语涵盖野生型CD8和遗传改造的CD8(例如,包含嵌合CD8链的嵌合CD8,该嵌合CD8链包括来自第一物种的CD8的第一部分和来自第二物种的CD8的第二部分)。

[0093] 如本文使用的,术语“CD4”指“分化簇4”,TCR的共受体或其功能部分。该术语涵盖野生型CD4和遗传改造的CD4(例如包含来自第一物种的CD4的第一部分和来自第二物种的CD4的第二部分的嵌合CD4)。

[0094] 如本文使用的,术语“共受体”指连同TCR一起结合肽-MHC复合物并且增强T细胞激

活的细胞表面分子。共受体的例子包括但不限于CD4和CD8。

[0095] 如本文使用的，术语“内部核糖体进入位点(IRES)元件”指核糖体可与之结合的结构，其无需在mRNA的5’端处。因此它可指导核糖体在mRNA内的第二个起始密码子处启动翻译，允许从单个mRNA产生多于一种多肽。示例性的IRES元件包括但不限于从脊髓灰质炎病毒、鼻病毒、脑心肌炎病毒、口蹄疫病毒、甲型肝炎和丙型肝炎病毒中分离的IRES元件(参见例如Mokrejs等人(2006)Nucleic Acids Res.34(Database issue):D125-30，其以引用的方式全文并入本文)。

[0096] 如本文使用的，术语“TCR接合”指TCR与其配体的结合。在某些实施例中，配体是肽-MHC复合物。

[0097] 如本文使用的，术语“主要组织相容性复合物”和“MHC”可互换使用，并且指MHC I类分子和/或MHC II类分子。

[0098] 如本文使用的，术语“MHC I类”指MHC I类α链和β2-微球蛋白链的二聚体，并且术语“MHC II类”指MHC II类α链和MHC II类β链的二聚体。

[0099] 如本文使用的，术语“可溶性MHC”指缺乏跨膜区和胞质区的MHC分子。

[0100] 如本文使用的，术语“肽-MHC复合物”指具有在本领域公认的MHC的肽结合袋中结合的肽的MHC分子(MHC I类或MHC II类)。

[0101] 如本文使用的，术语“DO-11.10.7 58α-β-细胞”和“58-/-细胞”可互换使用，并且指如Letourneur和Malissen Eur J Immunol.1989;19(12):2269-74中所述的小鼠T细胞杂交瘤细胞系，所述参考文献以引用的方式全文并入本文。

[0102] 如本文使用的，术语“T2细胞”指如Salter RD等人Genes regulating HLA class I antigen expression in T-B lymphoblast hybrids.Immunogenetics 21:235-246,1985中所述的人成淋巴细胞细胞系，所述参考文献以引用的方式全文并入本文。

[0103] 如本文使用的，术语“Bw5147细胞”指如Ralph P.Retention of lymphocyte characteristics by myelomas and theta^{+}-lymphomas:sensitivity to cortisol and phytohemagglutinin.J.Immunol.110:1470-1475,1973中所述的小鼠T淋巴细胞细胞系，所述参考文献以引用的方式全文并入本文。

[0104] 如本文使用的，术语“位点特异性重组”指通过同源位点特异性重组酶在单个核酸分子上的两个相容序列特异性重组位点之间实现的重组事件。如果一对位点特异性重组位点的成员可通过同源位点特异性重组酶指导该位点特异性重组位点之间的重组，则所述对被说成是“相容的”。在一个实施例中，重组事件导致位点特异性重组位点之间的间插核苷酸序列的切除。如果任何一对相容位点特异性重组位点不能与任何其他对的相容位点特异性重组位点重组，则那些对的相容位点特异性重组位点被说成是“非交叉反应性的”。

[0105] 如本文使用的，术语“位点特异性重组酶”指介导位点特异性重组的酶。位点特异性重组酶的例子包括但不限于Cre重组酶和FLP重组酶。“同源”位点特异性重组酶指可识别和实现一对相容序列特异性重组位点之间的重组的重组酶。例如，细菌噬菌体P1Cre重组酶识别lox重组位点，而酵母FLP重组酶识别FRT重组位点。

[0106] 如本文使用的，术语“Cre重组酶”指能够介导细菌噬菌体P1的Cre蛋白的位点特异性重组酶活性的蛋白质(Hamilton,D.L.等人，J.Mol.Biol.178:481-486(1984)，其以引用的方式全文并入本文)。细菌噬菌体P1的Cre蛋白介导称为“loxP”序列的专门重组序列之间

的位点特异性重组。参见例如Hoess等人,Proc.Natl.Acad.Sci.USA 79:3398-3402(1982)和Sauer,B.L.,美国专利号4,959,317,其以引用的方式全文并入本文。该术语涵盖天然存在的Cre重组酶的任何衍生物,其保留实现两个相容lox位点之间的重组的能力。

[0107] 重组产物取决于lox位点的位置和相对取向。当具有相同取向的两个lox序列存在于同一DNA分子内时,侧面为两个lox序列的DNA序列被Cre重组酶切除,以形成环状分子(切除反应)。相反,当两个lox序列存在于不同的DNA分子中,其中一个是环状DNA时,环状DNA经由lox序列插入另一个DNA分子内(插入反应)。在另一个实施例中,Cre重组酶可为优化的Cre重组酶。参见例如国际专利申请公开号WO2014158593,其以引用的方式全文并入本文。在一个实施例中,Tat-Cre重组酶包括核定位信号。

[0108] 如本文使用的,术语“FLP重组酶”指具有酵母FLP(酿酒酵母(Saccharomyces cerevisiae))的位点特异性重组酶活性的蛋白质。由酵母2μDNA编码的FLP蛋白介导一对相容FRT重组位点之间的位点特异性重组。参见例如Babineau等人,J.Biol.Chem.,260,12313-12319(1985),其以引用的方式全文并入本文。该术语涵盖天然存在的FLP重组酶的任何衍生物,其保留实现两个相容FRT位点之间的重组的能力。重组产物取决于FRT位点的位置和相对取向。当具有相同取向的两个FRT序列存在于同一DNA分子内时,侧面为两个FRT序列的DNA序列被FLP重组酶切除,以形成环状分子(切除反应)。相反,当两个FRT序列存在于不同的DNA分子中,其中一个是环状DNA时,环状DNA经由FRT序列插入另一个DNA分子内(插入反应)。在一个实施例中,FLP重组酶可为优化的FLP重组酶。参见例如美国专利申请公开号2010/0050279,其以引用的方式全文并入本文。

[0109] 在一个实施例中,术语“位点特异性重组酶”指能够重组一对相容FRT或lox重组位点的Cre:FLP融合蛋白。参见例如Djukanovic等人Plant Biotechnol J.2008Oct;6(8):770-81,其以引用的方式全文并入本文。

[0110] 如本文使用的,术语“包含蛋白质转导结构域的重组酶融合蛋白”指包含位点特异性DNA重组酶结构域(例如Cre或FLP)、蛋白质转导结构域(例如源自TAT、VP22、FGF或Antp)和核定位结构域的融合蛋白。参见例如国际专利申请公开号WO 2003076561,其以引用的方式全文并入本文。在一个实施例中,重组酶融合蛋白是包含与HIV Tat蛋白的碱性膜易位肽或其细胞穿透片段融合的Cre DNA重组酶结构域的“TAT-Cre”融合蛋白。重组TAT-Cre蛋白是例如从Excellgen(目录号:EG-1001)或EMD-Millipore(目录号:SCR508)商购可得的。

[0111] 如本文使用的,术语“lox位点”指任何领域公认的lox重组位点或其变体,其包括细菌噬菌体P1中的34个碱基对的loxP位点以及许多变体lox位点,包括但不限于Lox 511、Lox 5171、Lox 2272、M2、M3、M7、M11、Lox71和Lox66(Missirlis等人BMC Genomics 7:73.1471-2164,其以引用的方式全文并入本文)。非交叉反应性相容对的突变型lox位点的例子公开于美国专利号7,696,335;7,060,499和7,696,335中,所述美国专利以引用的方式全文并入本文。

[0112] 如本文使用的,术语“FRT位点”指任何领域公认的酵母FRT重组位点或其变体,其包括34个碱基对的FRT位点,其中8个碱基对的间隔区的侧面为13个碱基对的两个反向重复。参见例如Jayaram等人,Proc.Natl.Acad.Sci.82,5875-5879(1985);Umlauf S.W.等人,EMBO Journal,7,1845-1852(1988);Lee J.等人,EMBO Journal,18,784-791,1999,所述参考文献以引用的方式全文并入本文。例如,非交叉反应性相容对的突变型FRT位点对的例子

公开于美国专利号7,476,539和7,736,897中，所述美国专利以引用的方式全文并入本文。

[0113] 如本文使用的，术语“转导”或“经转导的”指使用逆转录病毒将多核苷酸引入宿主细胞基因组内。

[0114] 如本文使用的，术语“稳定表达”指来自引入宿主细胞基因组内的多核苷酸的基因的表达。

[0115] 如本文使用的，术语“启动子”指与核苷酸序列(例如蛋白质编码序列)可操作地连接的DNA调节区。该启动子含有被称为转录因子的蛋白质识别的特定DNA序列和应答元件。这些因子结合RNA聚合酶II并且将RNA聚合酶II招募至启动子，由此促进下游核苷酸序列的转录。包含蛋白质编码序列的转录的mRNA然后翻译以产生表达的蛋白质。

[0116] 如本文使用的，术语“可操作的连接”指启动子序列和蛋白质编码区之间的允许蛋白质编码区在宿主细胞中转录的构型。

[0117] 如本文使用的，术语“可调节的”意指蛋白质编码区的转录可以负面方式激活或“下调”；或以正面方式激活或“上调”。在一个实施例中，蛋白质编码序列的表达可通过诱导型启动子来调节。在另一个实施例中，蛋白质编码序列的表面表达可在切除蛋白质编码序列的至少一部分之后通过位点特异性重组下调。

[0118] 如本文使用的，术语“诱变条件”指导致细胞中的多核苷酸(例如编码TCR的多核苷酸)的遗传改变的条件。非限制性诱变条件包括已进行改造以表达激活诱导的(胞苷)脱氨酶(AID)基因的细胞。

[0119] 如本文使用的，术语“特异性结合”指TCR结合抗原(例如肽-MHC复合物)的能力，如这种结合由本领域技术人员所理解的。例如，特异性结合抗原的TCR可与其他抗原结合，一般具有较低的亲和力，如通过例如免疫测定、BIAcore®或本领域已知的其他测定(参见例如Savage等人，Immunity.1999,10(4):485-92，其以引用的方式全文并入本文)确定的。在一个具体实施例中，特异性结合抗原的TCR与抗原结合的结合常数(K_a)是TCR与另一种抗原结合时的K_a的至少2倍、5倍、10倍、50倍、100倍、500倍、1,000倍、5,000倍或10,000倍大。

[0120] 如本文使用的，术语“高亲和力”指TCR以至少10^4M^{-1}，例如至少10^5M^{-1}、至少10^6M^{-1}、至少10^7M^{-1}、至少10^8M^{-1}、至少10^9M^{-1}、至少$10^{10}M^{-1}$、至少$10^{11}M^{-1}$或至少$10^{12}M^{-1}$的结合常数(K_a)与抗原(例如肽-MHC复合物)结合的能力。

[0121] 如本文使用的，术语“高选择性”指TCR与所需抗原(例如所需肽-MHC复合物)特异性结合的结合常数(Ka)是TCR与另一种抗原(例如肽-MHC复合物)结合时的Ka的至少5倍、10倍、50倍、100倍、500倍、1,000倍、5,000倍或10,000倍大。

[0122] 如本文使用的，术语“模拟物”指生物学模拟一些其他分子的作用或活性的分子。模拟分子的一个例子是模拟磷酸化分子的作用或活性的磷酸模拟分子；因此磷酸肽模拟物是通过例如用磷酸模拟残基替代磷酸化肽中的磷酸化氨基酸残基来模拟磷酸化肽的作用或活性的肽。磷酸模拟基团或残基的非限制性例子包括O-硼烷磷酸、二羟硼基(borono)、O-二硫代磷酸、磷酰胺、H-膦酸酯、烷基膦酸酯、硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯和氟代磷酸酯，其中的任何一种可在Tyr、Thr、Ser、Arg、Lys或His残基上衍生化。在某些实施例中，Asp或Glu残基用作磷酸模拟物。Asp或Glu残基可取代肽中的磷酸-Tyr、磷酸-Thr、磷酸-Ser、磷酸-Arg、磷酸-Lys和/或磷酸-His残基。

[0123] 如本文使用的，如果在细胞中的内源性TCR表达使用本领域公认的方法(例如RT-

PCR或流式细胞术分析)无法检测,则该细胞"不表达"内源性TCR。如本文使用的,如果细胞中的内源性CD4或CD8的表达水平使用本领域公认的方法(例如RT-PCR或流式细胞术分析)无法检测,则该细胞"不表达"内源性CD4或CD8。

[0124] 如本文使用的,如果85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%先前在细胞表面上表达蛋白质的细胞不再在细胞表面上表达蛋白质,和/或在给定细胞上的蛋白质表面表达水平降低至少85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%,则蛋白质的表面表达被"取消"。

[0125] 如本文使用的,术语TCR细胞文库的"TCR多样性"指在细胞表面上表达的TCR的数目,该TCR包括TCRα链氨基酸序列和TCRβ链氨基酸序列的不同组合。

[0126] 在下文中,提供了本发明的细胞、细胞文库和/或方法的优选实施例。

[0127] II.适合于TCR展示的宿主细胞系的生成

[0128] 1)用于TCR基因文库表达和细胞表面展示的宿主细胞系的选择

[0129] 本文公开的TCR展示技术采用宿主细胞系,其提供了用于在宿主细胞表面上的功能性T细胞受体的表达和正确装配的合适环境。另外,例如,为了达到高转导效率和快速倍增时间,所选择的宿主细胞系忠实地再现蛋白质运输至翻译后修饰(例如糖基化、棕榈酰化和/或磷酸化)在其中发生以及其中与伴侣蛋白的相互作用确保新生多肽的正确折叠的细胞区室是有利的。辅助膜蛋白随后促进膜沉积,其中CD3使所表达的TCR在细胞表面上的组装稳定。另外,组装的TCR蛋白的肽-MHC复合物识别和信号传导活性依赖于共受体、表面表达的CD3以及粘附和辅助蛋白,例如CD2和LFA-1。

[0130] 在一个实施例中,宿主细胞是脊椎动物细胞,优选来自哺乳动物,包括但不限于小鼠或人。在另一个实施例中,宿主细胞源自淋巴细胞,例如T或B淋巴细胞谱系的细胞。在一个实施例中,宿主细胞可源自T细胞祖细胞、发育中的T细胞或成熟T淋巴细胞。

[0131] 在一个实施例中,T细胞谱系的宿主细胞从胎儿肝脏、胚胎胸腺、成人胸腺或胸腺瘤中分离。T淋巴细胞也可源自来源于多能干细胞分化的T细胞,所述多能干细胞包括但不限于胚胎干细胞、诱导多能干(iPS)细胞、成体干细胞或$CD34^+$造血干细胞。

[0132] 在另一个实施例中,宿主细胞可源于遗传改造的动物的T淋巴细胞,所述遗传改造的动物例如敲除小鼠,其中调节基因的破坏导致T细胞祖细胞的积累,所述T细胞祖细胞在T细胞发育的确定阶段被阻断(Bradley等人Mamm.Genome 20120ct;23(9-10):580-6,其以引用的方式全文并入本文)。具有阻滞的T细胞发育的突变型小鼠的例子包括但不限于SCID小鼠以及GATA3、RAG1、RAG2、ku80、TCRβ、CD3ε、Lck/Fyn双重敲除、ZAP-70/Syk双重敲除、LAT、SLP-76、GADS、VAV1/2/3三重敲除、TCRα、CD3δ、RAG1/RAG2双重敲除或ZAP-70的无效突变(Miosge和Goodnow,Immunology and Cell Biology(2005)83,318-335,其以引用的方式全文并入本文)。

[0133] 在一个实施例中,宿主细胞可为例如$CD8^+$细胞毒性T细胞、$CD8^+$调节性T细胞、$CD4^+$细胞毒性T细胞、$CD4^+$辅助性T(包括T_H1、T_H2、T_H3、T_H17、Th9或T_{FH}亚型)、$CD4^+$调节性T细胞或不变NKT(iNKT)细胞。在其他实施例中,宿主细胞可为B细胞或NK细胞。

[0134] 通过用端粒酶逆转录酶的逆转录病毒转染(Barsov,E.V.,Methods Mol Biol.2009;511:143-58,其以引用的方式全文并入本文),以及本领域众所周知的其他技术

(参见例如公开的美国专利申请号2005/0123521、2010/0279401和国际PCT申请PCT/US1989/001526,或Robek,M.D.和Ratner,L.,Virology,1999,73:4856-4865,所述参考文献各自以引用的方式全文并入本文),可以将上文列出的其为原代细胞的宿主细胞永生化为细胞系。如本文所公开的,然后基于倍增时间、逆转录病毒转导效率和TCR激活后IL-2分泌或报道物活性的量,来选择保留上文概述的必要性质的永生化宿主细胞系。

[0135] 在一个实施例中,宿主细胞可源自具有组装和表达T细胞受体所需的细胞内组分的鼠前B 1624-5细胞系(参见例如美国专利号8,748,353,其以引用的方式全文并入本文)。

[0136] 在另一个实施例中,宿主细胞可源自DO-11.10.7小鼠T细胞杂交瘤,58α-β-(58-/-),其在细胞表面上不表达功能性T细胞受体α/β链,但在其细胞表面上确实表达CD3(参见例如Letourneur和Malissen Eur J Immunol.1989;19(12):2269-74,其以引用的方式全文并入本文)。

[0137] 在另一个实施例中,宿主细胞可源自不表达功能性T细胞受体α/β链的鼠胸腺瘤细胞系Bw5147。

[0138] 2)宿主细胞系中的内源性基因表达的遗传破坏

[0139] 取决于TCR细胞文库筛选的具体实验设计,取消涉及TCR活性和抗原-MHC识别的一种或多种内源性宿主细胞基因的表达,以避免干扰经转导的T细胞受体文库和/或共受体(例如CD4和/或CD8)。

[0140] 宿主细胞中的基因沉默可使用本领域众所周知的多种方法来实现。

[0141] 例如,在细胞表面上不再表达细胞表面标志物的突变型宿主细胞系可通过体细胞诱变来生成,使用例如化学诱变剂、γ照射(例如Letourneur和Malissen Eur J Immunol.1989;19(12):2269-74中所述的58α-/β-细胞系,所述参考文献以引用的方式全文并入本文)、或转座子介导的插入诱变(例如在美国专利号8,592,211和7,767,454中描述的,所述美国专利以引用的方式全文并入本文)。然后可通过FACS选择就细胞表面标志物表达中的缺陷筛选所得到的突变型宿主细胞系。

[0142] 所靶向的内源性基因的表达也可经由基因座特异性同源重组(参见例如美国专利号5,530,178(CD8敲除小鼠)或美国专利号5,698,765(CD4敲除小鼠),所述美国专利以引用的方式全文并入本文)通过常规敲除来取消。

[0143] 另外,可使用多种基因组编辑技术来破坏任何选择的内源性靶基因的表达,所述基因组编辑技术包括但不限于设计者锌指(例如在美国专利号8,106,255(一般方法)和美国专利号8,956,828(使用经改造的锌指蛋白核酸酶靶向破坏T细胞受体基因)中描述,所述美国专利以引用的方式全文并入本文)、转录激活物样效应物核酸酶(TALEN;例如在美国专利号8,614,092中描述,所述美国专利以引用的方式全文并入本文)、归巢大范围核酸酶(例如在美国专利号7,842,489中描述,所述美国专利以引用的方式全文并入本文)、或CRISPR/cas基因组编辑系统(例如在美国专利号8,697,359中描述,所述美国专利以引用的方式全文并入本文)。

[0144] 在一个实施例中,还可使用位点定向重组技术取消内源性宿主细胞基因表达,所述定点重组技术包括但不限于Cre重组酶(例如在美国专利号4,959,317中描述,所述美国专利以引用的方式全文并入本文)或FLP重组酶(例如在美国专利号5,885,836中描述,所述美国专利以引用的方式全文并入本文)。

[0145] 在另一个实施例中，可通过RNA干扰(RNAi；例如在美国专利号8,329,463中描述，所述美国专利以引用的方式全文并入本文)沉默所靶向的基因的宿主细胞表达。例如，序列特异性小发夹RNA(shRNA)已显示抑制内源性TCR基因和/或共受体(例如TCR-α和TCR-β，参见例如美国专利申请公布号2012/0321667，所述美国专利申请以引用的方式全文并入本文)。通过阻断这些蛋白质中的一种或多种的表达，T细胞不再能够产生TCR复合物的关键组分中的一种或多种，由此使TCR复合物失稳且阻止功能性TCR的细胞表面表达。

[0146] 在一个实施例中，实施上述方法中的任何一种，以生成在其细胞表面上不表达内源性TCR的T淋巴细胞来源的宿主细胞系。

[0147] 在一个实施例中，T淋巴细胞来源的宿主细胞系在其细胞表面上不表达内源性TCR(即TCRα和TCRβ)或内源性CD4(在本文中称为$TCR\alpha^-/\beta^-CD4^-$宿主细胞)。

[0148] 在另一个实施例中，小鼠T淋巴细胞来源的宿主细胞系在其细胞表面上不表达小鼠TCR(即mTCRα和mTCRβ)或小鼠CD4(在本文中称为$mTCR\alpha^-/\beta^-mCD4^-$宿主细胞)。

[0149] 在另一个实施例中，T淋巴细胞来源的宿主细胞系在其细胞表面上不表达内源性TCR(即TCRα和TCRβ)或内源性CD8(例如CD8α和CD8β)(在本文中称为$TCR\alpha^-/\beta^-CD8^-$宿主细胞)。

[0150] 在另一个实施例中，小鼠T淋巴细胞来源的宿主细胞系在其细胞表面上不表达小鼠TCR(即mTCRα和mTCRβ)或小鼠CD8(例如mCD8α和mCD8β)(在本文中称为$mTCR\alpha^-/\beta^-mCD8^-$宿主细胞)。

[0151] 在另一个实施例中，T淋巴细胞来源的宿主细胞系在其细胞表面上不表达内源性TCR(即TCRα和TCRβ)或内源性MHC I(在本文中称为$TCR\alpha^-/\beta^-$MHC I^-宿主细胞)。

[0152] 在另一个实施例中，小鼠T淋巴细胞来源的宿主细胞系在其细胞表面上不表达小鼠TCR(即mTCRα和mTCRβ)或小鼠MHC I(在本文中称为$mTCR\alpha^-/\beta^-$mMHC I^-宿主细胞)。

[0153] 在另一个实施例中，T淋巴细胞来源的宿主细胞系在其细胞表面上不表达内源性TCR(即TCRα和TCRβ)或内源性MHC II(在本文中称为$TCR\alpha^-/\beta^-$MHC II^-宿主细胞)。

[0154] 在另一个实施例中，小鼠T淋巴细胞来源的宿主细胞系在其细胞表面上不表达小鼠TCR(即mTCRα和mTCRβ)或小鼠MHC II(在本文中称为$mTCR\alpha^-/\beta^-$mMHC II^-宿主细胞)。

[0155] 3)表达重组T细胞共受体的宿主细胞系的生成

[0156] 跨膜糖蛋白CD8和CD4是T淋巴细胞不同群体的特征，所述群体的抗原应答分别受主要组织相容性复合物I类和II类蛋白(MHC，在人中也称为HLA)的限制。CD4作为单体在细胞表面上表达，而CD8作为二聚体表达。CD4和CD8通过结合其同源MHC而充当T细胞受体的共受体，由此促进T细胞受体与MHC结合的抗原肽的接合。$CD4^+$T细胞响应与MHC II类分子结合的抗原，并且$CD8^+$T细胞响应与MHC I类分子结合的抗原。体外研究(Laugel等人，J.Biol.Chem.2007;282(33):23799-810，其以引用的方式全文并入本文)指示CD8共受体通过对结合速率和解离速率两者的作用，基本上增强了以次最佳TCR/肽-MHC I亲和力的结合效率。在TCR、肽-MHC I和CD8中的三分子相互作用也已显示是协同的(Jiang等人，Immunity.2011;34(1):13-23)。因此发现共受体依赖性的程度与TCR/肽-MHC I亲和力负相关。

[0157] 为了在TCR细胞文库筛选过程中评估T细胞受体对于肽-MHC复合物的亲和力，可改造$TCR\alpha^-/\beta^-CD4$或CD8阴性$CD3^+$宿主细胞，以表达重组CD4或CD8共受体。

[0158] 在一个实施例中，可改造TCRα⁻/β⁻CD4⁻CD3⁺宿主细胞，以表达重组CD4(例如，人CD4:UniProtKB-P01730;小鼠CD4:UniProtKB-P06332)。

[0159] 在另一个实施例中，可改造TCRα⁻/β⁻CD4⁻CD3⁺宿主细胞，以表达重组嵌合CD4。

[0160] 在另一个实施例中，可改造人TCRα⁻/β⁻CD4⁻CD3⁺宿主细胞，以表达重组小鼠CD4蛋白的胞外区(例如UniProtKB-P06332的残基27-394)。

[0161] 在另一个实施例中，可改造小鼠TCRα⁻/β⁻CD4⁻CD3⁺宿主细胞，以表达重组人CD4蛋白的胞外区(例如UniProtKB-P01730的残基26-396)。

[0162] 在另一个实施例中，可改造人TCRα⁻/β⁻CD4⁻CD3⁺宿主细胞，以表达具有与人CD4跨膜区和胞质区在框内融合的小鼠CD4多肽的胞外区的重组嵌合CD4蛋白。

[0163] 在另一个实施例中，可改造非人TCRα⁻/β⁻CD4⁻CD3⁺宿主细胞，以表达具有与非人CD4跨膜区和胞质区在框内融合的人CD4多肽的胞外区的重组嵌合CD4蛋白。

[0164] 在另一个实施例中，可改造小鼠TCRα⁻/β⁻CD4⁻CD3⁺宿主细胞，以表达具有与小鼠CD4跨膜区和胞质区在框内融合的人CD4多肽的胞外区的重组嵌合CD4蛋白。

[0165] 编码嵌合人/小鼠CD4的人胞外区的氨基酸序列可与野生型人CD4的相应氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同。

[0166] 编码嵌合人/小鼠CD4的小鼠跨膜区和胞质区的氨基酸序列可与野生型小鼠CD4的相应氨基酸序列至少90％相同，任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100％相同。

[0167] 在另一个实施例中，可改造TCRα⁻/β⁻CD8⁻CD3⁺宿主细胞，以表达重组CD8α和CD8β。

[0168] 下文列出了示例性小鼠CD8α和CD8β氨基酸序列。

[0169] 小鼠CD8α多肽同种型1(UniProtKB:P01731-1)：

[0170]

KPQAPELRIFPKKMDAELGQKVDLVCEVLGSVSQGCSWLFQNSSSKLPQPTFVVYMASSHNKITWDEKLNSSKLFSAMRDTNNKYVLTLNKFSKENEGYYFCSVISNSVMYFSSVVPVLQKVNSTTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGSVKGTGLDFACDIYIWAPLAGICVALLLSLIITLICYHRSRKRVCKCPRPLVRQEGKPRPSEKIV(SEQ ID NO.:21)(粗体:胞外区;正常:跨膜;斜体:胞质区)

[0171] 小鼠CD8β多肽(UniProtKB:P10300)

[0172]

LIQTPSSLLVQTNHTAKMSCEVKSISKLTSIYWLRERQDPKDKYFEFLASWSSSKGVLYGESVDKKRNIILESSDSRRPFLSIMNVKPEDSDFYFCATVGSPKMVFGTGTKLTVVDVLPTTAPTKKTTLKMKKKKQCPFPHPETQKGLTCSLTTLSLLVVCILLLLAFLGVAVYFYCVRRRARIHFMKQFHK(SEQ ID NO.:22)(粗体:胞外区;正常:跨膜;斜体:胞质区)

[0173] 下文列出了示例性人CD8α和CD8β氨基酸序列：

[0174] 人CD8α多肽同种型1(UniProtKB:P01732-1)：

[0175]

SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEGLDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYFCSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV(SEQ ID NO.:23)(粗体:胞外区;正常:跨膜;斜体:胞质区)

[0176] 人CD8β多肽同种型1(UniProtKB:P10966-1)：

[0177]

LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRIYWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHGEEVEQEKIAVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYFCMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTKKSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITLGLLVAGVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRARLRFMKQFYK(SEQ ID NO.:24)(粗体:胞外区;正常:跨膜;斜体:胞质区)

[0178] 在另一个实施例中,可改造TCRα$^-$/β$^-$CD8$^-$CD3$^+$宿主细胞,以表达重组人/小鼠嵌合CD8α和人/小鼠嵌合CD8β(chiCD8αβ$^+$)。

[0179] 在另一个实施例中,可改造人TCRα$^-$/β$^-$CD8$^-$CD3$^+$宿主细胞,以表达具有小鼠CD8α和小鼠CD8β的胞外区的重组嵌合CD8蛋白。

[0180] 在另一个实施例中,可改造小鼠TCRα$^-$/β$^-$CD8$^-$CD3$^+$宿主细胞,以表达具有人CD8α和人CD8β的胞外区的重组嵌合CD8蛋白。

[0181] 在其他例子中,可改造重组嵌合人/小鼠CD8α和人/小鼠CD8β多肽,其中人CD8α胞外区与小鼠CD8α跨膜区和胞质区在框内融合,并且人CD8β胞外区与小鼠CD8β跨膜区和胞质区在框内融合。

[0182] 编码嵌合人/小鼠CD8α和人/小鼠CD8β多肽的人胞外区的氨基酸序列可分别与野生型人CD8α和CD8β的相应氨基酸序列至少90%相同,任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%相同。

[0183] 编码嵌合人/小鼠CD8α和人/小鼠CD8β多肽的小鼠跨膜区和胞质区的氨基酸序列可分别与野生型小鼠CD8α和CD8β的相应氨基酸序列至少90%相同,任选91、92、93、94、95、96、97、98、99或100%相同。

[0184] 相关多肽的同一性可通过已知方法容易地计算。这些方法包括但不限于在下述中描述的那些:Computational Molecular Biology,Lesk,A.M.,编辑,Oxford University Press,New York(1988);Biocomputing:Informatics and Genome Projects,Smith,D.W.,编辑,Academic Press,New York(1993);Computer Analysis of Sequence Data,Part 1,Griffin,A.M.和Griffin,H.G.,编辑Humana Press,New Jersey(1994);Sequence Analysis in Molecular Biology,von Heinje,G.,Academic Press(1987);Sequence Analysis Primer,Gribskov,M.和Devereux,J.,编辑,M.Stockton Press,New York(1991);和Carillo等人,SIAM J.Applied Math,48:1073(1988),所有这些参考文献的内容都以引用的方式全文并入本文。确定两种多肽的相关性或同一性百分比的方法设计为给出在所测试的序列之间的最大匹配。确定两个序列之间同一性的优选计算机程序方法包括但不限于GCG程序包,包括GAP(Devereux等人,Nucl.Acid.Res.,12:387(1984),其以引用的方式全文并入本文;Genetics Computer Group,University of Wisconsin,Madison,Wis.,BLASTP、BLASTN和FASTA(Altschul等人,J.Mol.Biol.,215:403-410(1990),其以引用的方式全文并入本文)。BLASTX程序可从美国国家生物技术信息中心(National Center for Biotechnology Information)(NCBI)和其他来源(BLAST Manual,Altschul等人NCB/NLM/NIH Bethesda,Md.20894;Altschul等人,同上(1990))公开获得。众所周知的Smith Waterman算法也可用于确定同一性。

[0185] 在一个实施例中,嵌合CD8α和CD8β分别包含SEQ ID NO.:1和2的氨基酸序列。

[0186] 对于在TCRα$^-$/β$^-$CD8$^-$CD3$^+$宿主细胞中的表达,可将所选的CD8α和CD8β编码区克隆

到表达盒(例如逆转录病毒或慢病毒表达盒)中的合适启动子的下游。

[0187] 对于在TCRα⁻/β⁻CD4⁻CD3⁺宿主细胞中的表达,可将所选的CD4编码区克隆到表达盒(例如逆转录病毒或慢病毒表达盒)中的合适启动子的下游。

[0188] 取决于TCR细胞文库筛选的设计,启动子可为组成型启动子或可调节的启动子。

[0189] 组成型启动子的示例性实施例包括但不限于来自多瘤病毒、腺病毒、巨细胞病毒(CMV)和猿猴病毒40(SV40)的病毒启动子。在示例性配置中,蛋白质编码序列在上游(即5')侧面为人巨细胞病毒IE启动子,且在下游(即3')侧面为SV40聚(A)信号。人巨细胞病毒IE启动子在Boshart等人(1985)Cell 41:521 530中描述,所述参考文献以引用的方式全文并入本文。可使用的其他遍在表达启动子包括HSV-TK启动子、β-肌动蛋白启动子和EF-1α启动子。在某些实施例中,组成型启动子可为T细胞特异性的,例如CD3δT细胞特异性启动子。

[0190] 合适的可调节的表达系统应该具有例如下述性质:在非诱导状态下低水平的基础表达;不促进多效性效应的诱导剂;在诱导状态下高水平的表达;目的候选核酸的表达的高度特异性诱导;和诱导表达的水平的调节。具有这种性质的可调节的表达系统的例子包括但不限于:Tet可诱导系统(参见例如Gossen等人(1992)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 89:5547 5551;Gossen等人(1995)Science 268:1766 1769,其以引用的方式全文并入本文);FK506/雷帕霉素可诱导系统(参见例如Spencer等人(1993)Science 262:1019 1024;Belshaw等人(1996)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 93:4604 4607,其以引用的方式全文并入本文);RU486/米非司酮可诱导系统(Wang等人Proceedings of the National Academy of Sciences (1994)91(17):8180-4,,其以引用的方式全文并入本文);cumate可诱导系统(Mullick等人BMC Biotechnol.2006Nov 3;6:43,其以引用的方式全文并入本文)或蜕皮激素可诱导系统(关于综述参见Rossi等人(1989)Curr.Op.Biotech.9:451 456,其以引用的方式全文并入本文)。许多组成型、组织特异性和诱导型启动子现在从供应商如Origene、Promega、Invitrogen、System Biosciences和Invivogen商购可得。

[0191] 在某些实施例中,将CD8α和CD8β克隆到分开的表达载体内。

[0192] 在其他实施例中,CD8α和CD8β的表达可在同一逆转录病毒表达构建体上连接。这可通过例如从一个启动子表达CD8α和CD8β或其片段,并且通过IRES元件分开CD8α和CD8β或其片段的编码区来实现。

[0193] 可替代地,可通过将两个分开的表达盒克隆到单一逆转录病毒主链内来实现CD8的两条链的共表达,使得分开控制每条个别结合蛋白链的表达。

[0194] 在另一个实施例中,可通过使用在相反方向赋予转录活性的双向启动子从同一载体表达CD8α和CD8β链。该选项具有不发生启动子干扰的优点,这可负面影响紧密接近的启动子的表达水平。

[0195] 取决于筛选策略,可设计共受体表达盒以包括侧接共受体的编码区或编码区的一部分的位点特异性重组序列。因此,在将转导的共受体表达盒整合到TCR阴性、共受体阴性宿主细胞内之后,位于两个位点特异性重组位点之间的核苷酸序列可通过在宿主细胞中表达相应的位点特异性重组酶来切除。

[0196] 在另一个实施例中,共受体表达盒包含侧面为位点特异性重组序列的间插DNA序列,插入所述位点特异性重组序列以破坏共受体的编码区的翻译。然后可通过位点特异性重组酶介导的位于位点特异性重组序列之间的间插DNA序列的切除来恢复共受体基因翻

译。

[0197] 可用于本发明的示例性位点特异性重组系统包括但不限于CRE-LOX或FLP/FRT系统(在Ann.Rev.Biochem.(2006)75:567-605和Gaj等人Biotechnol Bioeng.2014Jan;111(1):1-15.中综述,所述参考文献以引用的方式全文并入本文)。

[0198] 如上所述,适当的位点特异性重组酶的表达可由组成型T细胞特异性或诱导型启动子来驱动。

[0199] 在其他实施例中,位点特异性重组酶可作为融合蛋白(例如Tat-Cre融合蛋白)递送到TCRα$^-$/β$^-$宿主细胞(Joshi等人Genesis(2002)33:48-54;Peitz等人,(2002)Proc.Natl.Acad.Sci.USA 99:4489-94,其内容以引用的方式全文并入本文)。TAT-Cre已显示在体外诱导成纤维细胞和鼠胚胎干细胞中大于95%的重组效率。

[0200] 在另一个实施例中,Cre重组酶可连接到雌激素受体的配体结合结构域(参见例如Feil等人,(1996)PNAS 93:10887-10890,其以引用的方式全文并入本文)。这允许响应用他莫昔芬处理细胞的Cre的核易位。

[0201] 在另一个实施例中,用共受体表达盒转导TCRα$^-$/β$^-$mCD8$^-$CD3$^+$宿主细胞,所述共受体表达盒含有侧接嵌合人/小鼠CD8α编码区和人/小鼠CD8β编码区的小鼠跨膜区和胞质区的lox重组位点(chiCD8αβ$^+$/flox$^+$)。

[0202] 在另一个实施例中,用共受体表达盒转导TCRα$^-$/β$^-$mCD4$^-$CD3$^+$宿主细胞,所述共受体表达盒含有侧接嵌合人/小鼠CD4编码区的小鼠跨膜区和胞质区的lox重组位点(chiCD4$^+$/flox$^+$)。

[0203] 4)具有用于测量抗原-MHC特异性TCR信号传导的一种或多种报道构建体的衍生宿主细胞系的生成

[0204] T细胞受体复合物是包含可变TCRαβ或TCRγδ异源二聚体,以及在其胞质区(例如CD3)内包含基于免疫受体酪氨酸的激活基序(ITAM)的非可变信号转导亚基的多亚基组装。通过肽-MHC复合物的TCR接合触发Lck(Src型酪氨酸激酶)与CD4或CD8共受体的结合,以及CD3的细胞内区域的每个ITAM基序内的两个Tyr的磷酸化。ZAP70(Syk型酪氨酸激酶)然后与由Lck激活的ITAM基序结合。其后,信号经由各种衔接蛋白(例如,LAT和SLP-76)传递至丝氨酸/苏氨酸蛋白磷酸酶(例如,通过钙调蛋白-钙调磷酸酶的钙信号传导)、丝氨酸/苏氨酸蛋白激酶(例如PKC、MAPK超家族)等等。这些事件最终导致三种关键转录因子的激活:NFκB、NFAT和AP-1,其各自在早期细胞因子产生的诱导中起关键作用(例如白细胞介素(如IL-2、-4、-6和-17)、TNF-α和IFN-γ),这是激活的T淋巴细胞的克隆扩增所需的。

[0205] 通过将肽/MHC-TCR应答性报道构建体掺入宿主细胞内,可从报道物读出实时确定重组表达的TCR和/或共受体与肽-MHC复合物和随后诱导的T细胞信号传导活性之间的相互作用。

[0206] 提供信号传导活性的读出的报道蛋白是本领域众所周知的,并且包括但不限于细胞表面标志物和生物发光(萤光素酶)或荧光蛋白(例如绿色荧光蛋白(GFP)、增强型绿色荧光蛋白(EGFP)、黄色荧光蛋白(YFP)、蓝色荧光蛋白(BFP)和红色荧光蛋白(RFP),最近由Senutovitch等人Exp.Biol.Med.(2015);240(6):795-808综述,所述参考文献以引用的方式全文并入本文)。

[0207] 在某些实施例中,可使用具有适当的转录应答元件(TRE)例如NFκB/Rel、NFAT或

AP-1的启动子，个别监测由TCR激活诱导的每个信号事件。信号转导途径GFP或萤光素酶报道分子的阵列现在从例如Sambio Sciences/Qiagen、Addgene和Invitrogen商购可得。各个TRE或其组合可在宿主细胞中表达。

[0208] III.细胞TCR展示文库的生成

[0209] 为了提供含有TCRα可变区Vα和Jα基因以及TCRβ可变区Vβ、Jβ和Dβ基因的DNA源，从例如人胎儿胸腺、脐带血、肿瘤浸润淋巴细胞(来自患者)、接种疫苗的患者(例如针对人乳头状瘤病毒(HPV)、EB病毒(EBV)或癌症接种疫苗的患者)、或用目的抗原接种疫苗的HLA-A2转基因小鼠制备聚A^+RNA。

[0210] 编码TCRβ链的cDNA可由分离的mRNA生成，所述mRNA例如从已完成Vβ和DJβ重排的前T淋巴细胞分离。这些T淋巴细胞可为$CD44^{低}CD25^+$DN3或$DN4CD44^-CD25^-$T淋巴细胞。

[0211] 编码TCRα链的cDNA可由例如从已完成Vα和Jα重排的未成熟双重阳性T淋巴细胞分离的mRNA生成。这些淋巴细胞可为$CD4^+CD8^+CD3^{低}$T淋巴细胞。

[0212] 制备cDNA并且用作TCR可变区的基于聚合酶链反应(PCR)的扩增的模板。然后将包含TCRα和TCRβ可变区开放读码框(ORF)的经分离的PCR产物克隆到表达系统内，所述表达系统允许各种可变区基因的基因产物在宿主细胞的细胞表面上以功能性形式表达，所述宿主细胞在细胞表面上不表达内源性TCR。

[0213] 对于由分开的表达构建体编码的TCR的表达，优选不同多肽链的表达与不同的选择标志物相关联，由此允许分开选择相应表达构建体的表达。

[0214] 可用于选择经转导或转染的宿主细胞的赋予对抗生素抗性的选择标志物包括例如关于嘌呤霉素、新霉素、潮霉素B、霉酚酸、组胺醇、博莱霉素和腐草霉素抗性的基因。细胞表面蛋白和荧光蛋白也适合于用作选择标志物。

[0215] 在一个实施例中，通过PCR扩增编码人TCRα或TCRβ可变区的cDNA序列，并且克隆到嵌合TCRα或TCRβ表达载体主链内。

[0216] 具体地，TCRα表达盒含有启动子、人TCR信号序列、克隆位点，随后为编码小鼠TCRα非可变区的核苷酸序列。编码人TCRα可变区的核苷酸序列通过PCR从TCRαcDNA文库中扩增出来，并且克隆到TCRα表达盒的克隆位点内，以便与小鼠TCRα非可变区在框内。然后将所得到的文库转化到大肠杆菌内，并且将质粒DNA引入宿主细胞内，以生成重组嵌合人/小鼠TCRα文库。

[0217] 以类似的方式，TCRβ表达盒含有启动子、人TCR信号序列、克隆位点，随后为编码小鼠TCRβ非可变区的核苷酸序列。编码人TCRβ可变区的核苷酸序列通过PCR从TCRβcDNA文库中扩增出来，并且克隆到TCRβ表达盒的克隆位点内，以便与小鼠TCRβ非可变区在框内。然后将所得到的文库转化到大肠杆菌内，并且将质粒DNA引入宿主细胞内，以生成重组嵌合人/小鼠TCRβ文库。

[0218] 在一个实施例中，通过PCR扩增编码人TCRα或TCRβ胞外区的cDNA序列，并且克隆到嵌合TCRα或TCRβ表达载体主链内。

[0219] 具体地，TCRα表达盒含有启动子、人TCR信号序列、克隆位点，随后为编码小鼠TCRα跨膜区和胞质区的核苷酸序列。编码人TCRα胞外区的核苷酸序列通过PCR从TCRαcDNA文库中扩增出来，并且克隆到TCRα表达盒的克隆位点内，以便与小鼠TCRα跨膜区和胞质区在框内。然后将所得到的文库转化到大肠杆菌内，并且将质粒DNA引入宿主细胞内，以生成重组

嵌合人/小鼠TCRα文库。

[0220] 以类似的方式，TCRβ表达盒含有启动子、人TCR信号序列、克隆位点，随后为编码小鼠TCRβ跨膜区和胞质区的核苷酸序列。编码人TCRβ胞外区的核苷酸序列通过PCR从TCRβ cDNA文库中扩增出来，并且克隆到TCRβ表达盒的克隆位点内，以便与小鼠TCRβ跨膜区和胞质区在框内。然后将所得到的文库转化到大肠杆菌内，并且将质粒DNA引入宿主细胞内，以生成重组嵌合人/小鼠TCRβ文库。

[0221] 在某些实施例中，共刺激分子的信号传导区与TCRα和/或TCRβ胞质区的C末端融合。共刺激分子可选自CD27、CD28、4-1BB、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴细胞功能相关抗原-1(LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、NKG2D、B7-H3、特异性结合CD83的配体、TCRζ链或其任何组合。

[0222] 在一个实施例中，用TCRα基因文库转导或转染$TCR\alpha^{-}/\beta^{-}CD8^{-}CD3^{+}chiCD8\alpha\beta^{+}/flox^{+}$ TRE-GFP宿主细胞系，随后为稳定转化体的选择。通过RT-PCR分析可证实转化体中TCRα的表达。将所得到的克隆合并，然后用TCRβ基因文库进行转导或转染，随后为稳定双重转化体的选择。

[0223] 在其他实施例中，首先用TCRβ基因文库随后为TCRα基因文库转导或转染$TCR\alpha^{-}/\beta^{-}CD8^{-}CD3^{+}chiCD8\alpha\beta^{+}/flox^{+}$TRE-GFP宿主细胞系。

[0224] 在另一个实施例中，用TCRα基因文库转导或转染$TCR\alpha^{-}/\beta^{-}CD4^{-}CD3^{+}chiCD4^{+}/flox^{+}$ TRE-GFP宿主细胞系，随后为稳定转化体的选择。通过RT-PCR可证实转化体中TCRα的表达。将所得到的克隆合并，然后用TCRβ基因文库进行转导或转染，随后为稳定双重转化体的选择。

[0225] 在其他实施例中，首先用TCRβ基因文库随后为TCRα基因文库转导或转染$TCR\alpha^{-}/\beta^{-}CD4^{-}CD3^{+}chiCD4^{+}/flox^{+}$TRE-GFP宿主细胞系。

[0226] 在某些实施例中，通过逆转录病毒转导将TCR基因文库引入宿主细胞系内。可控制逆转录病毒转导，以确保大部分逆转录病毒转导的细胞仅通过一种重组逆转录病毒构建体进行遗传修饰，导致至少一种TCR蛋白的克隆表达。在一个实施例中，通过利用感染复数(MOI)来控制逆转录病毒转导。MOI可为10、1、0.5、0.1或更少。在另一个实施例中，控制逆转录病毒转导，以确保转导后少于5-6％的细胞表达由逆转录病毒表达载体编码的重组蛋白质。

[0227] 来自不同表达载体的TCRα和TCRβ链的分开表达提供了以下优点：编码TCRα链的多样集合的表达载体集合可与编码TCRβ链的多样集合的表达载体集合随机组合。即使当TCRα和TCRβ链集合的总数目有限时(例如，10^{4}条不同的TCRα链，与10^{4}条不同的TCRα链随机组合，理论上导致10^{8}个TCR，其各自可具有不同的特异性)，该TCRα和TCRβ链改组也可产生不同结合特异性的很大程度的多样性。

[0228] 接受重组互补TCRα和TCRβ链的$TCR\alpha^{-}/\beta^{-}CD8^{-}CD3^{+}chiCD8\alpha\beta^{+}/flox^{+}$TRE-GFP或$TCR\alpha^{-}/\beta^{-}CD4^{-}CD3^{+}chiCD4^{+}/flox^{+}$TRE-GFP报告宿主细胞在细胞表面上表达功能性TCR，所述功能性TCR然后可通过荧光激活细胞分选(FACS)或磁激活细胞分选(MACS)富集，以生成高度多样的细胞TCR展示文库。

[0229] IV.细胞TCR展示文库的筛选

[0230] 本文公开了用于分离和鉴定具有所需特征的T细胞受体(TCR)的方法，所述方法包

括用编码不同的重组TCR的表达构建体的文库转导或转染不表达内源性TCR的宿主细胞，以生成其中细胞在其细胞表面上表达不同的重组TCR的重组TCR细胞文库，在所需肽-MHC复合物的存在下就所需特征选择在细胞文库内的细胞，并且分离且鉴定编码具有所需特征的重组TCR的表达构建体。

[0231] 所需特征的例子包括但不限于对于所需肽-MHC复合物的高选择性、对于所需肽-MHC复合物的高亲和力、以及在所需肽-MHC复合物的存在下阳性功能读出的证实。

[0232] 1)在共受体细胞表面表达的存在或不存在下，筛选细胞TCR展示文库

[0233] 本文公开了用于在共受体例如CD4或CD8的细胞表面表达的存在和不存在下，分离和鉴定编码特异性结合所需肽-MHC复合物的T细胞受体(TCR)的至少一种核酸的方法。

[0234] 在一个实施例中，如本文所公开的，用重组TCRα和TCRβ的基因文库转导或转染表达重组共受体的小鼠$TCR\alpha^-/\beta^-$共受体$^-CD3^+$宿主细胞。然后选择具有TCRα/β表面表达的转化体。通过FACS或MACS从非结合宿主细胞群体中富集表达细胞表面重组TCR蛋白的宿主细胞，所述细胞表面重组TCR蛋白以所需亲和力或选择性与所需肽-MHC复合物结合(在本文中称为共受体依赖性结合剂)。然后可通过PCR分离编码TCR的核苷酸序列且测序，在共受体的存在下，所述TCR以所需亲和力或选择性结合所需肽-MHC复合物。

[0235] 在某些实施例中，编码重组共受体或重组共受体的一部分的多核苷酸的侧面为位点特异性重组位点。为了鉴定在共受体依赖性结合剂群体中表达高亲和力TCR的宿主细胞克隆，使用如本文公开的同源位点特异性重组酶缺失重组共受体表达盒，并且富集在其细胞表面上不再表达重组共受体的细胞。然后就细胞表面重组TCR蛋白重新筛选这个共受体阴性细胞群体，所述细胞表面重组TCR蛋白与所需肽-MHC复合物结合(在本文中称为共受体非依赖性结合剂)。然后可通过PCR分离编码TCR的核苷酸序列且测序，在共受体的不存在下，所述TCR结合所需肽-MHC复合物。在某些实施例中，共受体非依赖性结合剂能够在共受体的不存在下与同源配体(例如肽-MHC复合物)特异性结合，和/或能够在共受体的不存在下在同源配体(例如肽-MHC复合物)的存在下介导信号传导。

[0236] 在一个实施例中，可调节重组共受体的活性。在一个实施例中，可使用诱导型启动子调节重组共受体的细胞表面表达。在另一个实施例中，可使用Cre/loxP系统调节重组共受体的细胞表面表达。然后可如上所述根据降低重组共受体的表达筛选TCR文库的与所需肽-MHC复合物的结合。

[0237] 可与MHC I类或II类蛋白结合且呈递给T细胞的任何T细胞抗原都可用于筛选细胞TCR展示文库。肽抗原可化学合成或源自天然来源。在一个实施例中，肽抗原源自肿瘤细胞。

[0238] 本文公开的方法和组合物广泛适用于特异性结合目的抗原的TCR的表达、筛选和鉴定。然而，可使用具有任何天然存在的或人工改造的修饰的TCR的任何(功能性)片段。关于全长TCR，可利用TCR结合区的任何种类的人工改造或设计的修饰，例如，通过位点定向诱变或区域定向诱变生成的修饰、来自不同TCR的天然存在序列的融合、CDR序列的随机化、DNA改组和易错PCR。

[0239] a)CD8依赖性TCR激活

[0240] 在一个实施例中，测定表达重组TCR的$TCR\alpha^-/\beta^-CD8^-CD3^+chiCD8\alpha\beta^+/flox^+$TRE-GFP宿主细胞文库在各种MHC I类等位基因的背景下与任何目的T细胞表位的结合，其形式为与直接或间接荧光标记的MHC四聚体、二聚体或其他多聚体复合物复合的特定9至11聚体肽。

[0241] 在一个实施例中，具有适当TCR的细胞可通过FACS进行捕获且富集，并且将α和β链回收且表征。

[0242] 在其他实施例中，可通过激活标志物(例如CD69或CD137)的表达、信号传导途径(例如NFAT信号传导、IL-2信号传导、激活物蛋白-1信号传导或NFκB/Rel信号传导)的触发、细胞因子(例如IL-2、TNF-α或IFN-γ)的产生、钙流动、细胞增殖(例如T细胞增殖)和报道系统(例如，IL-2-EGFP报道系统)的激活，来确定通过各个TCR的细胞表面表达的肽-MHC I类接合。

[0243] 作为共受体，CD8也可结合与TCR相同的MHC I类分子的α3结构域，以促进TCR信号传导。诱变数据指示人MHC I类α链的残基223-229对于CD8-MHC I类相互作用是必需的(Salter等人Nature345:41-46 1990)。

[0244] 可使用本文公开的TCR细胞文库筛选来研究CD8-α3相互作用在所需肽-MHC I类复合物的T细胞接合中的作用。

[0245] 在一个实施例中，表达重组TCR的小鼠TCRα$^-$/β$^-$CD8$^+$CD3$^+$TRE-GFP宿主细胞文库可与在人MHC I类α3结构域的残基223-229处具有一个或多个氨基酸突变的所需肽-人/小鼠嵌合MHC I类蛋白接触。通过报道物读出，即GFP产生来评价TCR激活。然后通过FACS分离GFP$^+$细胞，并且通过PCR扩增重组TCR的可变区且测序。

[0246] 在另一个实施例中，在细胞例如抗原呈递细胞上表达在人MHC I类α3结构域的残基223-229处具有一个或多个氨基酸突变的肽-人/小鼠嵌合MHC I类蛋白。

[0247] b)CD8非依赖性TCR激活

[0248] 在另一个实施例中，使表达重组TCR的TCRα$^-$/β$^-$CD8$^-$CD3$^+$chiCD8αβ$^+$/flox$^+$TRE-GFP宿主细胞文库经受两轮筛选方案。

[0249] 在第一轮中，在嵌合人/小鼠CD8的细胞表面表达的存在下，筛选TCR细胞文库的肽-MHC I激活。然后鉴定在嵌合CD8共受体的存在下接合靶肽-MHC I复合物的阳性TCR细胞克隆。

[0250] 在第二轮中，将Cre重组酶递送至鉴定的阳性TCR细胞克隆导致重组嵌合CD8共受体的缺失和CD8共受体从细胞表面的后续去除。

[0251] 在其细胞表面上不再表达嵌合CD8的FACS分选的阳性TCR细胞克隆就肽-MHC I激活再次进行筛选。然后在CD8共受体的不存在下接合靶肽-MHC I复合物的阳性TCR细胞克隆被鉴定为高亲和力结合剂。

[0252] 在另一个实施例中，分离与在MHC Iα3结构域的残基223-229处具有一个或多个氨基酸突变的所需肽-MHC I复合物结合的高亲和力TCR。

[0253] 在一个实施例中，在细胞表面上表达重组TCR的小鼠TCRα$^-$/β$^-$CD8$^-$CD3$^+$TRE-GFP宿主细胞文库与在MHC Iα3结构域的残基223-229处具有一个或多个氨基酸突变的肽-chiMHC I蛋白接触。通过报道物读出，即GFP产生来评价TCR激活。然后通过FACS分离GFP$^+$细胞，并且通过PCR扩增重组TCR的可变区且测序。

[0254] 在另一个实施例中，在细胞例如抗原呈递细胞上表达在MHC Iα3结构域的残基223-229处具有一个或多个氨基酸突变的肽-chiMHC I蛋白。

[0255] c)CD4依赖性TCR激活

[0256] 在一个实施例中，测定表达重组TCR的TCRα$^-$/β$^-$CD4$^-$CD3$^+$chiCD4$^+$/flox$^+$TRE-GFP宿

主细胞文库在直接或间接荧光标记的各种MHC II类等位基因的背景下与任何目的T细胞表位的结合。

[0257] 在一个实施例中，具有适当TCR的细胞可通过FACS进行捕获且富集，并且将α和β链回收且表征。

[0258] 在其他实施例中，可通过激活标志物(例如CD69或CD137)的表达、信号传导途径(例如NFAT信号传导、IL-2信号传导、激活物蛋白-1信号传导或NFκB/Rel信号传导)的触发、细胞因子(例如IL-2、TNF-α或IFN-γ)的产生、钙流动、细胞增殖(例如T细胞增殖)和报道系统(例如，IL-2-EGFP报道系统)的激活，来确定通过各个TCR的细胞表面表达的肽-MHC II接合。

[0259] 在另一个实施例中，表达重组TCR的TCRα$^-$/β$^-$CD4$^+$CD3$^+$TRE-GFP宿主细胞文库可在用肽-chiMHC II蛋白呈递后筛选TCR激活，在所述肽-chiMHC II蛋白中人β-链β2结构域包含一个或多个突变，所述一个或多个突变减弱或取消变体MHC II与CD4的结合(Rolf Li-Yun KönigHuang &Ronald N.Germain(1992)Nature 356,796-798，其全文并入本文)。

[0260] 在另一个实施例中，表达重组TCR的TCRα$^-$/β$^-$CD4$^+$CD3$^+$TRE-GFP宿主细胞文库可在用细胞的表面上表达的肽-chiMHCII呈递后筛选TCR激活。

[0261] d)CD4非依赖性TCR激活

[0262] 在另一个实施例中，使表达重组TCR的TCRα$^-$/β$^-$CD4$^-$CD3$^+$chiCD4/flox$^+$TRE-GFP宿主细胞文库经受两轮筛选方案。

[0263] 在第一轮中，在嵌合人/小鼠CD4的细胞表面表达的存在下，筛选TCR细胞文库的肽-MHC II激活。然后鉴定在嵌合CD4共受体的存在下接合靶肽-MHC II复合物的阳性TCR细胞克隆。

[0264] 在第二轮中，将Cre重组酶递送至鉴定的阳性TCR细胞克隆导致重组嵌合CD4共受体的缺失和CD4共受体从细胞表面的后续去除。

[0265] 在其细胞表面上不再表达CD4的FACS分选的阳性TCR细胞克隆就肽-MHC II激活再次进行筛选。然后鉴定在CD4共受体的不存在下接合靶肽-MHC II复合物的阳性TCR细胞克隆。

[0266] e)TCR可变区的体外进化

[0267] 定向蛋白质进化是生成关于特定肽-MHC复合物的TCR的非常有力的工具。该过程涉及改造或修饰TCR，使得TCR的突变体显示出关于同源肽-MHC复合物(野生型TCR细胞对于其特异性的原始抗原)的不同特征(例如增加的亲和力和/或增强的信号传导能力)。因此，野生型TCR可用作在一个或多个CDR中产生诱变文库的模板，并且可通过与同源肽-MHC复合物结合来选择具有不同特征(例如，更高的亲和力和/或增强的信号传导能力)的突变体。

[0268] 在一个实施例中，在激活诱导的胞苷脱氨酶(AID)(使胞嘧啶碱基脱氨基以产生被识别为胸腺嘧啶的尿嘧啶的酶)的存在下，TCRα/β的可变区可通过体细胞超突变进行突变。使用AID用于体外诱变的示例性方法公开于例如美国专利号8,685,897和8,603,950中，所述美国专利以引用的方式全文并入本文)。AID诱变的体内方法公开于例如美国专利申请号2012/0309011中，所述美国专利申请全文并入本文。

[0269] 高亲和力的一些例子包括对于靶配体在约10^{-4}M至10^{-12}M之间的平衡结合常数以及其中的所有个别值和范围。这个范围涵盖被报道为野生型亲和力的那些(10^{-4}至10^{-6}M)和已

通过定向进化分离的那些(约10^{-12}M)之间的亲和力。

[0270] 通过与本文所述的测定结合的标准诱变技术，本领域技术人员可获得改变的TCR序列，并且测试它们的特定结合亲和力和/或特异性。本领域已知的有用的诱变技术包括但不限于从头基因合成、寡核苷酸定向诱变、区域特异性诱变、接头扫描诱变和通过PCR的位点定向诱变(参见例如Sambrook等人(1989)和Ausubel等人(1999))。

[0271] 在获得变体TCR编码序列时，本领域普通技术人员将认识到，TCR来源的蛋白可通过某些氨基酸置换、添加、缺失和翻译后修饰进行修饰，而不丧失或降低生物活性。特别地，众所周知保守性氨基酸置换，即一个氨基酸被具有相似大小、电荷、极性和构象的另一个氨基酸置换，不可能显著改变蛋白质功能。

[0272] 可变区中的任何一个或多个区域中的另外突变可导致稳定化蛋白质。在一个实施例中，一个或多个另外的突变位于TCRα链或β链的CDR1、CDR2、HV4、CDR3、FR2和FR3的一个或多个中。用于诱变的区域可通过定向进化来确定，其中晶体结构或分子模型用于生成TCR的与目的配体(例如抗原)相互作用的区域。在其他例子中，可通过添加或缺失氨基酸来重塑可变区，以改造TCR与配体之间的所需相互作用。

[0273] 2)在肽-变体MHC复合物的存在或不存在下，筛选细胞TCR展示文库

[0274] 本文公开了用于分离和鉴定具有所需特征的T细胞受体(TCR)的方法，所述方法包括用编码不同的重组TCR的表达构建体的文库转导或转染不表达内源性TCR的宿主细胞，以生成其中细胞在其细胞表面上表达不同的重组TCR的重组TCR细胞文库，在与目的肽复合的MHC分子的存在下就所需特征选择表达TCR的细胞，其中MHC分子包含其为野生型MHC链的变体的MHC链，并且其中与野生型MHC链对于共受体的亲和力相比，变体MHC链以降低的亲和力结合共受体，并且分离且鉴定编码具有所需特征的重组TCR的表达构建体。

[0275] 所需特征的例子包括但不限于对于所需肽-变体MHC复合物的高选择性、对于所需肽-变体MHC复合物的高亲和力、以及在所需肽-变体MHC复合物的存在下阳性功能读出的证实。

[0276] a)通过肽-变体MHC I复合物的TCR激活

[0277] 在一个实施例中，通过包括下述的方法分离且鉴定具有所需特征的T细胞受体(TCR)：用编码不同的重组TCR的表达构建体的文库转导或转染不表达内源性TCR的宿主细胞，以生成其中细胞在其细胞表面上表达不同的重组TCR的重组TCR细胞文库，在所需肽-变体MHC I复合物的存在下就所需特征选择在细胞文库内的细胞，其中MHC I分子包含其为野生型MHC Iα链的变体的MHC Iα链，并且其中与野生型MHC Iα链对于CD8共受体的亲和力相比，变体MHC Iα链以降低的亲和力结合CD8共受体，并且分离且鉴定编码具有所需特征的重组TCR的表达构建体。

[0278] 所需特征的例子包括但不限于对于所需肽-变体MHC复合物具有高选择性或高亲和力的T细胞受体(TCR)。

[0279] 在一个实施例中，通过测量TCR激活的功能读出，例如一种或多种报道系统的激活，在所需肽-变体MHC I复合物的存在下选择重组TCR。

[0280] 在一个实施例中，所需肽-MHC I复合物是无细胞肽-MHC I复合物。在一个实施例中，所需肽-MHC I复合物包含二聚体、四聚体或多聚体。在一个实施例中，所需肽-MHC I复合物在细胞的表面上表达，所述细胞例如哺乳动物细胞、酵母细胞或昆虫细胞。在一个实施

例中,哺乳动物细胞是T2细胞。

[0281] 在一个实施例中,变体MHC Iα链是HLA-A2α链的变体。在一个实施例中,变体MHC I分子包含在MHC Iα链的α3区域内的一个或多个突变,所述一个或多个突变减弱或阻止与CD8共受体的结合。例如,变体MHC I分子可具有根据成熟蛋白质序列编号的A245V突变或D227K/T228A突变。

[0282] α3区域突变的例子例如在Pittet等人J Immunol.2003171(4):1844-9;Dutoit等人J Immunol.2003 170(10):5110-7和美国专利公开号2004/0146520中描述,所述参考文献以引用的方式全文并入本文。

[0283] 在一个实施例中,所需肽-变体MHC I复合物是无细胞肽-变体MHC I复合物。在一个实施例中,所需肽-变体MHC I复合物包含二聚体、四聚体或多聚体。在一个实施例中,所需肽-变体MHC I复合物在细胞的表面上表达,所述细胞例如哺乳动物细胞、酵母细胞或昆虫细胞。

[0284] b)通过肽-变体MHC II复合物的TCR激活

[0285] 在一个实施例中,通过包括下述的方法分离且鉴定具有所需特征的T细胞受体(TCR):用编码不同的重组TCR的表达构建体的文库转导或转染不表达内源性TCR的宿主细胞,以生成其中细胞在其细胞表面上表达不同的重组TCR的重组TCR细胞文库,在所需肽-变体MHC II复合物的存在下就所需特征选择在细胞文库内的细胞,其中MHC II分子包含其为野生型MHC IIβ链的变体的MHC IIβ链,并且其中与野生型MHC II的β链对于CD4共受体的亲和力相比,变体MHC IIβ链以降低的亲和力结合CD4共受体,并且分离且鉴定编码具有所需特征的重组TCR的表达构建体。

[0286] 在一个实施例中,变体MHC II类β链包含β2结构域中的一个或多个突变,所述一个或多个突变减弱或取消变体MHC II与CD4的结合(Rolf Li-Yun KönigHuang &Ronald N.Germain(1992)Nature 356,796-798,其全文并入本文)。

[0287] 所需特征的例子包括但不限于对于所需肽-变体MHC II复合物具有高选择性或高亲和力的T细胞受体(TCR)。

[0288] 在一个实施例中,通过测量TCR激活的功能读出,例如一种或多种报道系统的激活,在所需肽-变体MHC II复合物的存在下选择重组TCR。

[0289] 在一个实施例中,所需肽-变体MHC II复合物是无细胞肽-变体MHC II复合物。在一个实施例中,所需肽-变体MHC II复合物包含二聚体、四聚体或多聚体。在一个实施例中,所需肽-变体MHC II复合物在细胞的表面上表达,所述细胞例如哺乳动物细胞、酵母细胞或昆虫细胞。在一个实施例中,哺乳动物细胞是抗原呈递细胞(APC)。

[0290] V.实例

[0291] 下文已阐述了实例用于示出且描述本发明的某些特定实施例的目的。然而,权利要求的范围并不以任何方式受本文阐述的实例的限制。对所公开的实施例的各种改变和修改对于本领域技术人员将是显而易见的,并且可做出这样的改变和修改,包括但不限于与本发明的包装载体、细胞系和/或方法有关的那些改变和修改,而不背离本发明的精神和所附权利要求的范围。

[0292] 除非另有说明,否则本发明的实践采用本领域技术范围内的常规分子生物学和免疫学技术。这些技术对于技术人员是众所周知的,并且在文献中充分说明。参见例如

Bailey,J.E.和Ollis,D.F.,Biochemical Engineering Fundamentals,McGraw-Hill Book Company,NY,1986;Current Protocols in Immunology,John Wiley&Sons,Inc.,NY,N.Y.(1991-2015),包括所有补充;Current Protocols in Molecular Biology,John Wiley&Sons,Inc.,NY,N.Y.(1987-2015),包括所有补充;Sambrook等人,Molecular Cloning:A Laboratory Manual,第2版,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989);以及Harlow和Lane,Antibodies,a Laboratory Manual,Cold Spring Harbor,N.Y.(1989),所有参考文献的内容以引用的方式全文并入本文。

[0293] 实例1:适合于TCR展示的鼠T细胞系的生成

[0294] 为了开发用于TCR展示的T细胞系,将鼠胸腺瘤来源的TCR阴性小鼠CD8阳性细胞系("MTCD8")用作起始点。将MTCD8细胞在锥形瓶(在Multitron标准培养箱中的80rpm,INFORS HT)或过滤盖细胞培养瓶(Cellstar)中的补充有2%胎牛血清(FCS,Amimed)和0.1%β-巯基乙醇的SF-IMDM培养基(Amimed)中在37℃下在10%CO_2下进行培养。

[0295] 如下所述修饰细胞系MTCD8,以生成用于哺乳动物TCR展示的受体细胞系。

[0296] 1)表达人-小鼠嵌合CD8的MTCD8来源的细胞系的生成

[0297] 为了促进人TCR在MTCD8细胞中的表达,CD8α和β链在MTCD8细胞中表达为包含与小鼠CD8跨膜区和胞内区融合的人CD8胞外区的嵌合蛋白。所得到的嵌合CD8α(chiCD8α)和CD8β(chiCD8β)分别包含SEQ ID NO.:1和2的氨基酸序列。

[0298] 简言之,将chiCD8α和chiCD8β基因各自分别包装到非复制型逆转录病毒颗粒内。HEK 293细胞(ATCC)用三种不同载体共转染:编码gag-pol基因的pVPack载体(pVPack载体系统,Stratagene)、编码PVC 211env基因的第二载体、以及编码嵌合CD8α或CD8β的逆转录病毒载体。根据制造商的说明,使用FuGENE 6Transfection Reagent(Roche Applied Science)进行转染。两天或三天后收获所得到的逆转录病毒上清液并且直接用于转导MTCD8细胞。

[0299] 通过荧光激活细胞分选(FACS),使用抗人CD8αFITC(eBioscience,目录号:11-0086)和抗人CD8βAPC(BD Biosciences,目录号:641058)富集表达嵌合CD8α和CD8β的MTCD8细胞(MTCD8chiCD8αβ+)。使用BD FACSAria I或II与FACSDiva软件(Becton-Dickinson)执行FACS。每轮FACS富集使用校准量的FITC或APC标记的抗体/1.0×10^6个细胞在4℃下执行30分钟。Fc受体阻断剂(BD Biosciences,目录号:553142)用于消除检测抗体的Fc区与MTCD8细胞的背景结合。不表达嵌合CD8的MTCD8细胞用于检测非特异性结合剂。标记反应之间的所有洗涤都通过在具有2%FCS的PBS(PAA)中在4℃下以300g离心细胞5分钟来进行。在适当轮的本体富集后,MTCD8chiCD8αβ+细胞群体变得通过流式细胞术可检测。

[0300] 2)从MTCD8细胞或衍生物中耗尽小鼠CD8

[0301] 通过荧光激活细胞分选(FACS)来分选如上生成的MTCD8细胞或表达嵌合CD8的MTCD8细胞,以富集不表达小鼠CD8α或CD8β的细胞。使用下述抗体:抗小鼠CD8αAPC(BD Biosciences,目录号:561093)、抗小鼠CD8βPE(BD Biosciences,目录号:550798)、抗人CD8αPE(eBioscience,目录号:12-0086)和抗人CD8βAPC(BD Biosciences,目录号:641058)。使用FACSAria I或II与FACSDiva软件(Becton-Dickinson)执行FACS。每轮FACS富集使用校准量的PE或APC标记的抗体/1.0×10^6个细胞在4℃下执行30分钟。Fc受体阻断剂(BD Biosciences,目录号:553142)用于消除检测抗体的Fc区与MTCD8细胞或衍生物的背景结

合。标记反应之间的所有洗涤都通过在具有2%FCS的PBS(PAA)中在4℃下以300g离心细胞5分钟来进行。

[0302] 在适当轮的本体富集后，不表达小鼠CD8的MTCD8细胞群体变得通过流式细胞术可检测(MTCD8 mCD8αβ-chiCD8αβ-和MTCD8 mCD8αβ-chiCD8αβ+)，并且将单个T细胞分选在96孔板中。这些单个T细胞在约一周内生长成T细胞克隆，并且这些克隆中的细胞不再在其表面上表达小鼠CD8。

[0303] 随后，通过流式细胞术分析这些单细胞克隆，以证实小鼠CD8α和CD8β的表面表达的缺乏，以及在适用时，嵌合CD8α和CD8β的阳性表面表达的缺乏。流式细胞术分析在BD FACSCalibur上的96孔板(Cellstar)中执行。使用FlowJo软件(Treestar)分析所有流式细胞仪数据。

[0304] 3)基于转导效率、APC背景和信号传导能力选择克隆

[0305] 在本实例中，选择(i)MTCD8mCD8αβ-chiCD8αβ+和(ii)MTCD8 mCD8αβ-chiCD8αβ-的合适克隆，所述克隆满足下述特征：(i)高转导效率、(ii)低APC背景、和(iii)强TCR介导的信号传导能力。

[0306] 简言之，将MTCD8mCD8αβ-chiCD8αβ+细胞和MTCD8 mCD8αβ-chiCD8αβ-细胞重复铺平板，并且转导以表达嵌合TCRC58(MTCD8 mCD8αβ-chiCD8αβ+chiC58αβ+和MTCD8 mCD8αβ-chiCD8αβ-chiC58αβ+)的α和β链。在美国专利号8,367,804(以引用的方式全文并入本文)中称为c58c61的C58是在HLA-A*0201的背景下对源自NY-ESO-1的肽特异性的TCR。将C58表达为嵌合TCR，其中人可变区与鼠非可变区融合，以确保适当锚定和与鼠CD3的相互作用，以及鼠信号传导途径的适当触发。嵌合C58的α和β链分别包含SEQ ID NO:7和8的氨基酸序列。经转导的细胞使用校准量的抗小鼠TCR PE(BD Biosciences，目录号:553172)/1.0×10^6个细胞在4℃下染色30分钟。Fc受体阻断剂(BD Biosciences，目录号:553142)用于消除检测抗体的Fc区与MTCD8细胞衍生物的背景结合。为了检测非特异性结合剂，使用TCR阴性MTCD8细胞。所有洗涤都通过在具有2%FCS的PBS(PAA)中在4℃下以300g离心细胞5分钟来进行。使用FACSCalibur(Becton Dickinson)执行流式细胞术，并且使用FlowJo软件(Treestar)分析数据。大多数克隆在转导后显示对于TCR表达0-30%的阳性。选择具有高转导效率(对于TCR表达20-30%的阳性)和低APC背景染色(数据未显示)的克隆。

[0307] 将上文生成的MTCD8 mCD8αβ-chiCD8αβ+chiC58αβ+和MTCD8 mCD8αβ-chiCD8αβ-chiC58αβ+细胞激活，并且测试IL-2表达以鉴定具有强TCR介导的信号传导能力的克隆。简言之，用平板结合的抗CD3抗体(eBioscience，目录号:16-0032)和可溶性抗CD28抗体(eBioscience，目录号:16-0281)激活细胞。收获上清液并且使用小鼠IL-2ELISA试剂盒(eBioscience，目录号:88-7024)测试IL-2表达。图1显示了来自一次测试的个别克隆的示例性IL-2产生数据。仅选择显示强IL-2产生的克隆。

[0308] 所选择的MTCD8 mCD8αβ-chiCD8αβ+克隆命名为AK-D10，并且所选择的MTCD8 mCD8αβ-chiCD8αβ-克隆命名为LOT-D08。

[0309] 4)嵌合DMF4和DMF5在AK-D10细胞中的表达

[0310] 接下来，在上文生成的AK-D10细胞(MTCD8mCD8αβ-chiCD8αβ+)中表达嵌合DMF4和DMF5，两者在HLA-A*0201的背景下均为MART-1反应性TCR。DMF4和DMF5TCR两者均在美国专利号8,088,379(以引用的方式全文并入本文)中描述。为了确保与鼠CD3的适当相互作用和

鼠信号传导途径的适当触发，DMF4和DMF5两者均表达为嵌合TCR，其中人可变区与鼠非可变区融合。嵌合DMF4的α和β链分别包含SEQ ID NO:9和10的氨基酸序列。嵌合DMF5的α和β链分别包含SEQ ID NO:11和12的氨基酸序列。嵌合DMF4或DMF5TCRα和β链基因各自分别包装到非复制型逆转录病毒颗粒内。HEK 293细胞(ATCC)用三种不同载体共转染：编码gag-pol基因的pVPack载体(pVPack载体系统，Stratagene)、编码PVC 211env基因的第二载体、以及编码嵌合TCRα或β链的逆转录病毒载体。根据制造商的说明，使用FuGENE 6Transfection Reagent(Roche Applied Science)进行转染。三天后收获所得到的逆转录病毒上清液并且直接用于转导AK-D10细胞。

[0311] 使用BD FACSAria I或II与FACSDiva软件(Becton-Dickinson)，通过荧光激活细胞分选(FACS)，使用HLA-A*0201Mart-1(ELAGIGILTV)(SEQ ID NO:30)四聚体PE(MBL，目录号：T01008)和仓鼠抗小鼠TCRβ链抗体APC(BD Biosciences，目录号：553174)，富集表达嵌合DMF4或DMF5的AK-D10细胞(AK-D10chiTCRαβ+)。每轮FACS富集使用校准量的PE-标记的抗原或APC标记的抗体/1.0×10^{6}个细胞在4℃下执行30分钟。Fc受体阻断剂(BD Biosciences，目录号：553142)用于消除检测抗体的Fc区与AK-D10细胞的背景结合。TCR阴性AK-D10细胞用于检测非特异性结合剂。标记反应之间的所有洗涤都通过在具有2%FCS的PBS(PAA)中在4℃下以300g离心细胞5分钟来进行。

[0312] 在适当数目的本体富集步骤之后，表达嵌合DMF4或DMF5的AK-D10细胞群体变得通过流式细胞术可检测。图2A显示了PE标记的HLA-A*0201Mart-1(ELAGIGILTV(SEQ ID NO:30))四聚体和APC标记的抗TCRβ链抗体的共染色。与DMF5具有比DMF4更高的亲和力的事实一致，在类似的TCR表达水平下，表达嵌合DMF5的细胞显示比表达嵌合DMF4的细胞更强的与肽-MHC四聚体的结合。

[0313] 5)TCR/肽-MHC相互作用和TCR介导的信号传导强度之间的关联

[0314] 在该实例中，使用肽-MHC复合物激活如上生成的表达嵌合DMF4或DMF5的AK-D10细胞，然后测试IL-2产生。DimerX(BD Biosciences，目录号：551263)是由与小鼠IgG_1的VH区融合的三个细胞外主要组织相容性复合物(MHC)I类HLA-A2结构域组成的HLA-A2:Ig融合蛋白。DimerX可装载有限于HLA-A2的任何肽。通过将DimerX和目的肽在37℃下温育过夜来进行肽装载。

[0315] 使用装载有不同浓度(2μg/ml、1μg/ml和0.5μg/ml)的Mart-1肽ELAGIGILTV(SEQ ID NO:30)的DimerX，激活在表面上表达嵌合DMF4或DMF5的AK-D10细胞。简言之，将96孔板用DimerX/肽复合物包被并且在37℃下温育3小时，随后用PBS洗涤。随后，将表达嵌合DMF4或DMF5的$1x\ 10^{5}$个AK-D10细胞重悬浮于150μl SF-IMDM中，并且加入96孔板中。在过夜温育后，使用小鼠IL-2 ELISA试剂盒(eBioscience，目录号：88-7024)测试上清液的IL-2表达。DimerX/肽复合物在表达嵌合DMF4(图2B)或嵌合DMF5(图2C)的AK-D10细胞中诱导剂量依赖性IL-2产生。不含任何肽的单独的DimerX用作阴性对照。

[0316] 在类似于上述测定的测定中使用DimerX/肽复合物激活表达嵌合DMF4、DMF5或C58的AK-D10细胞，并且使用细胞内细胞因子染色(ICS)测试IL-2和TNFα产生。简言之，在染色前5小时，用莫能菌素(eBioscience，目录号：00-4505)处理细胞。然后根据制造商的说明，将细胞固定并且用Cytofix-Cytoperm(BD Biosciences，目录号：554714)渗透化处理，用于细胞内染色。流式细胞术染色使用校准量的抗小鼠IL-2PE(eBioscience，目录号：12-7021)

或抗小鼠TNFαPE(eBioscience,目录号:12-7321)/1.0×10^6个细胞在4℃下进行30分钟。Fc受体阻断剂(BD Biosciences,目录号:553142)用于消除检测抗体的Fc区与AK-D10细胞的背景结合。不含DimerX/肽激活的表达嵌合TCR的AK-D10细胞用作阴性对照。标记反应之间的所有洗涤都通过在具有2%FCS的PBS(PAA)中在4℃下以300g离心细胞5分钟来进行。细胞然后经受流式细胞术分析。门控TCR阳性细胞,并且使用FlowJo软件(Treestar)测定TCR+IL-2+和TCR+TNFα+细胞的百分比。与通过ELISA检测到的IL-2产生一致,表达嵌合TCR的细胞在使用DimerX/肽复合物激活后显示阳性IL-2(图2D)和TNFα(图2E)细胞内染色。

[0317] 实例2:细胞TCR展示文库的生成

[0318] 本实例中描述的筛选系统基于在哺乳动物细胞例如MTCD8细胞或其衍生物中逆转录病毒介导的全长TCR的表达。通过连续转导从分开的载体表达TCRα和β链文库。逆转录病毒转导是用于哺乳动物细胞的稳定遗传修饰的有效方法。可通过修饰病毒滴度的感染复数(MOI)来调节每个细胞经转导的α或β链的数目,使得每个细胞平均产生例如仅一条α和/或β链、一条α链和多条β链、一条β链和多条α链、或多条α和β链。生成用于TCRα或β链的分开的逆转录病毒表达载体,其经由内部核糖体进入位点(IRES)将目的基因(TCRα或β链)的表达转录地偶联至报道基因。示例性报道基因包括但不限于表面蛋白例如人CD6和CD7,以及抗生素抗性基因例如嘌呤霉素抗性基因。

[0319] 1)高度多样性的人TCR基因文库的生成

[0320] 通过MACS(Miltenyi Biotec)或类似方法从来自人供体的白细胞去除术材料分离的$CD4^+$或$CD8^+$T细胞用于生成TCRα或β基因文库。细胞源包括健康成人供体和脐带血。另外源可包括胎儿胸腺、从癌症患者分离的肿瘤浸润淋巴细胞(TIL)和来自接种疫苗的患者的PBMC。

[0321] 从经分离的T细胞制备总mRNA,并且使用SMARTer® RACE 5'/3' cDNA Synthesis Kit(Clontech Laboratories,目录号:634860)合成cDNA。文库构建分别按照α链或β链家族执行,以便达到至少1.0×10^9个集落形成单位的所需高复杂性。用家族特异性引物PCR扩增TCRα或β家族的可变区,用限制性酶消化,并且连接到TCRα或β逆转录病毒表达载体内。空逆转录病毒TCRα和β链表达构建体含有α或β链非可变区的编码信息和非可变区上游的限制性酶侧接的非编码填充序列,所述非可变区可替换为来自人或合成来源的克隆的可变TCRα和β链编码区。在其中鼠宿主细胞用于展示人TCR的情况下,构建TCR表达载体以包含与鼠TCR非可变区融合的人TCR可变区,以确保适当锚定和与鼠CD3的相互作用,以及鼠信号传导途径的适当触发。克隆来自所选择的TCR的单个TCRα和β编码区,以生成在细胞表面上表达特异性重组TCR的细胞。此外,该方法生成了使用TCRα和β链特异性引物通过RT-PCR从人T细胞源分离的或通过基因合成生成的展示TCRα和β链的多样储库的细胞。

[0322] 用连接的TCRα或β链文库转化大肠杆菌DH10B,并且在LB(Amp)琼脂平板上铺平板。收集细菌菌落并且纯化质粒DNA。合并所有TCRα或β家族的DNA制备物。所得的TCRα或β链文库通过执行下一代测序(NGS)进行质量控制。在NGS分析中,1-3μg纯化的PCR产物用于测序反应,在多路化运行中使用来自Illumina的MiSeq。就完整的TRAV-、TRAJ-、TRBV-、TRBD-和TRBJ-读出,将所获得的序列数据过滤,并且使用CD-HIT应用组(www.cd-hit.org)执行聚类分析。分析作为测序的总基因百分比的TCRα或β家族的相对表示。

[0323] 2)高度多样性的人TCR细胞文库的生成

[0324] 部分基于对于用嗜亲性MLV包膜的逆转录病毒颗粒转导的高允许性，选择鼠胸腺瘤来源的TCR阴性细胞系MTCD8及其衍生物(例如，上文生成的LOT-D08和AK-D10细胞)作为用于人TCR细胞文库的宿主细胞。MTCD8细胞缺乏内源性小鼠TCR表达，并且含有用于人TCR的表达、配对、折叠、信号传导和表面展示的所有必需细胞组分。另外，这些细胞在悬浮中生长并且具有大约10-12小时的非常短的倍增时间，因此使快速扩增成为可能。

[0325] 下述实例中示出了在两个阶段中的TCR细胞文库的生成：在阶段1中引入TCRβ链，并且在阶段2中引入TCRα链。

[0326] 3)逆转录病毒颗粒产生

[0327] 将TCRα和β链基因文库各自分别包装到非复制型逆转录病毒颗粒内。HEK 293细胞(ATCC)用三种不同载体共转染：编码gag-pol基因的pVPack载体(pVPack载体系统，Stratagene)、编码PVC 211 env基因的载体、以及逆转录病毒TCRα-IRES-人CD7或TCRβ-IRES-人CD6表达载体。根据制造商的说明，使用FuGENE 6 Transfection Reagent(Roche Applied Science)执行转染。三天后收获所得到的逆转录病毒上清液，并且直接使用或保持在-80℃下冷冻。TCRα或β链逆转录病毒颗粒原种的逆转录病毒颗粒滴度通过下述在实验中确定：执行MTCD8细胞的测试转导，并且测量经转导的MTCD8细胞群体上的人CD7或人CD6表面表达。基于滴定结果，计算稀释度，其得到每个经转导的细胞的TCRα和β链的所需平均拷贝数。粗略地，5％或更少的转导率给出>90％的α或β链的单拷贝整合。随后，将MTCD8细胞或衍生物在30℃下用逆转录病毒上清液旋转转导3小时。TCRα和β链基因文库分开和序贯地进行转导。用1.5×10^{8}个细胞/板在6孔板(Cellstar)中和在Eppendorf离心机中执行转导。转导后，将细胞转移到锥形瓶中，其中细胞浓度为3.0×10^{6}个细胞/1ml，并且允许扩增24小时。

[0328] 4)转导TCRβ链(阶段1)

[0329] 在该实例中，从脐带血源中选择TCRβ链(最多3x 10^{8}条不同的β链)，以：a)与种系100％同源，和b)代表所有已知的功能性β基因家族，其比率对应于它们在人外周血中的正态分布。将TCRβ-IRES-人CD6逆转录病毒表达载体包装到复制缺陷型逆转录病毒颗粒内，然后将所述复制缺陷型逆转录病毒颗粒用于转导MTCD8细胞或衍生物。成功的β链基因转移和后续表达通过在细胞表面上人CD6的存在来证明。转导后，大约6％的细胞表达人CD6，指示单个β链基因的成功整合和表达。通过使用荧光激活细胞分选(FACS)富集CD6阳性细胞来分离TCRβ链表达细胞。分选后，回收TCRβ链表达细胞并且扩增2天。扩增的TCRβ链细胞文库以即用型等分试样冷冻。也可使用除CD6外的选择标志物。

[0330] 5)转导TCRα链(阶段2)

[0331] 在阶段2中引入TCRα链基因文库。类似于TCRβ链构建体，TCRα基因与内部核糖体进入位点(IRES)-偶联的人CD7标志物基因共表达。人CD7标志物允许滴定在空MTCD8细胞上生成的含逆转录病毒颗粒的上清液，使得少于5％的经转导的细胞表达TCRα链。在这些条件下，大约90％的细胞含有单个整合的TCRα基因拷贝。

[0332] TCRα链文库转导后，使用抗小鼠TCRβ-PE抗体(BD Biosciences，目录号：553172)就TCR表达进行细胞染色，并且通过流式细胞术进行分析。然后使用抗Biotin Microbeads(Miltenyi Biotec，目录号：130-090-485)，通过磁激活细胞分选(MACS)分离表达TCR的细胞。在每次TCRα链转导的FACS或MACS后回收约3.0-5.0x 10^{9}个活细胞。多于85％的这些细

胞表达表面TCR。然后将细胞回收且扩增两天。

[0333] 6)细胞文库的质量控制

[0334] 最后，在扩增阶段结束时，将所有细胞合并且在-80℃下在冷冻袋(cryobag)中冷冻，每个袋含有大约1.0×10^9个活细胞。

[0335] 通过从来自10个单细胞克隆/转导的基因组DNA扩增整合的TCRα或β基因及其相邻载体区域，并且直接对PCR产物测序，分析已整合了一个TCRα或一个TCRβ基因拷贝/细胞的细胞百分比。如果PCR产物得到一个单一清晰可读的TCRα或β基因序列，则得出结论，在起源细胞中仅存在一个基因拷贝。在其中至少两个不同的TCRα或β基因序列的重叠在共扩增的共同载体区域之后出现的情况下，得出结论在该细胞中存在至少两个TCRα或TCRβ拷贝。根据该分析，能够确定TCR细胞文库中仅包含整合到宿主细胞内的一个TCRα和一个TCRβ基因拷贝的细胞百分比。

[0336] 7)高度多样性的鼠TCR基因文库的生成

[0337] 可替代地，TCRα和β基因文库可基于从动物(例如用目的靶免疫的HLA-A2转基因小鼠)中分离的TCR生成。鼠TCR基因文库可与上文对于人TCR基因文库所描述的类似地构建。随后，可遵循类似的方案以生成含有在细胞表面上不表达内源性展示鼠TCR的TCR的细胞的细胞文库。

[0338] 实例3:使用肽-MHC复合物筛选TCR细胞文库

[0339] 1)筛选方案

[0340] 购买或合成重组肽-MHC复合物并且在使用前就功能进行质量检查。使用BD FACSAria I或II与FACSDiva软件(Becton-Dickinson)，通过荧光激活细胞分选(FACS)，使用标记的(例如荧光标记的)肽-MHC复合物(例如，MHC四聚体、MHC dextramer或装载有肽的DimerX)筛选上文生成的TCR细胞文库。荧光标记的抗TCR抗体用于显现TCR表达水平。Fc受体阻断剂(BD Biosciences，目录号:553142)用于消除背景结合。首先使用校准量的荧光标记的MHC四聚体或DimerX/肽复合物/1.0×10^6个细胞在4℃下筛选TCR细胞文库30分钟。为了耗尽非特异性结合剂，来自第一次筛选的阳性命中还与校准量的具有阴性对照肽的MHC四聚体或不具有肽的DimerX/1.0×10^6个细胞一起在4℃下温育15分钟。门控出与具有阴性对照肽的MHC四聚体或不具有肽的DimerX结合的细胞。标记反应之间的所有洗涤都通过在具有2%FCS的PBS(PAA)中在4℃下以300rpm离心细胞10分钟来进行。

[0341] 在适当数目的本体富集步骤之后，清晰且特异性识别目的抗原的表达TCR的MTCD8细胞或衍生物群体在流式细胞术分析中变得可见，并且将单个T细胞分选在96孔板中。这些单个T细胞在约一周内生长成T细胞克隆。

[0342] 随后，通过流式细胞术分析这些单细胞克隆，以验证它们结合目的抗原并且未显示非特异性背景结合。另外，分析在这些单细胞克隆的表面上表达的TCR的其他性质，例如信号传导和针对其他肽-MHC复合物的交叉反应性。

[0343] 除基于它们与目的肽-MHC复合物的结合来筛选表达TCR的细胞之外，还可基于在目的肽-MHC复合物的存在下的功能读出(例如激活标志物的表达、信号传导途径的触发、细胞因子的产生、钙流动、细胞增殖和报道测定的激活)来筛选表达TCR的细胞。来自结合筛选的命中可与来自功能筛选的命中进行比较，以鉴定特异性结合目的肽-MHC复合物并且起始相关信号传导途径的TCR。

[0344] 部分由于大量未成熟的T细胞的存在，可能能够鉴定针对源自来自脐带血或胎儿胸腺的T细胞的TCR文库中的自身抗原的TCR。这些细胞表达针对无数自身抗原的TCR，并且作为免疫系统成熟的部分，在T细胞耐受性检查点中尚未被去除。使用基于与目的肽-MHC复合物结合，然后针对不具有肽或具有阴性对照肽的MHC分子反筛选的两层筛选方法，富集非多反应性TCR。

[0345] 除自然出现的自反应性TCR之外，第二种机制可有助于从TCR文库中分离自反应性TCR的可能性。如上所述，当生成TCR文库时，分离如来自人供体的T细胞中存在的原始同源TCRα和β对，并且将每条α或β链分别与大量非原始互补β链或α链重新配对。这种策略导致可能显示改变的性质，例如对于自身抗原的不同亲和力或特异性的新型TCR的表达。

[0346] 与严格的抗原特异性筛选方法组合的高度多样的TCR文库允许分离和鉴定靶向人自身抗原或与自身抗原具有高度相似性的抗原的TCR。

[0347] 2)TCRα和β链基因回收

[0348] 通过基于平板的PCR扩增从个别T细胞克隆中回收TCRα和β基因：使T细胞裂解，并且分别地直接对细胞裂解产物执行关于TCRα和β链可变区的PCR，而无需基因组DNA的先前分离。然后使用IIS型限制性酶，在单个限制/连接步骤中，将编码TCRα或β链的扩增的PCR产物作为库克隆到适当的表达载体内。平行地，对PCR产物进行测序：如果T细胞克隆含有α和β链的单拷贝，则可在此阶段获得可靠的序列信息。在其中T细胞克隆含有两条或更多条整合的TCRα和/或β链的情况下，将个别链克隆到标准载体内并且分开测序。将所得到的连接的质粒库转化到大肠杆菌内，并且通过来自经转化的细胞库的本体小量制备回收DNA(无先前铺平板)。进一步分析在该步骤中鉴定的TCR的结合亲和力、特异性、信号传导能力和/或其他特征。

[0349] 3)可替代的细胞文库组成

[0350] 如本文所述通过MTCD8衍生物的逆转录病毒转导的TCR基因转移的高效率允许生成对于特定用途定制的各种不同类型的细胞文库。

[0351] 4)用于从头筛选的多拷贝TCRα和/或β链文库

[0352] 通过改变感染复数，可控制整合到受体MTCD8细胞或衍生物基因组内的TCRα和β链基因的平均数目。该策略以下述变化使用。

[0353] 为了生成涵盖TCR多样性的最高水平的细胞文库，构建了文库以表达多条不同的TCRα链和多条不同的TCRβ链/细胞。在给定的细胞中并非所有的TCRα和β链都有效地配对，并且因此许多未能在表面上呈现。尽管如此，通过提供多个选项/细胞，确保大得多的百分比的经转导的细胞在细胞表面上表达至少一种功能性TCR。这种多拷贝文库设计提供了两个益处：首先，文库生成过程效率高得多(更少的退出(drop-out))，其次，与使用单拷贝文库相比，所得到的文库中的TCR多样性可能基本上更高。潜在的进一步优点是通过在T细胞表面上表达许多相同TCR所引起的亲合力效应大大降低，这在理论上可导致鉴定更高亲和力的TCR。

[0354] 使用多拷贝文库需要第二步来鉴定哪些TCRα链与来自给定T细胞克隆的哪些β链配对。建立了一种方法作为回收α和β对的示例性方法：分选证实靶特异性结合的单个T细胞，将阳性T细胞克隆合并在一起，使用上述回收程序回收来自这些合并的靶特异性T细胞的所有TCRα和β链(通常约100-200个T细胞克隆)，并且通过以单拷贝形式组合现在小得多

的所回收的TCRα和β链集合来构建第二个细胞文库。然后用这个小得多且更集中的细胞文库重复TCR筛选，并且遵循上述步骤回收目的TCR。组合地，与从开始使用单拷贝文库相比，这两个步骤将允许覆盖大得多的TCR多样性。

[0355] 5)引导选择

[0356] 引导选择是筛选过程，其从具有所需特征的现有TCR(例如，小鼠TCR、从人患者分离的TCR或在从头筛选中分离的TCR)开始，并且序贯地替换个别链。在示例性研究中，通过筛选与TCRβ链文库组合的原始TCRα链来代替原始TCRβ链，然后所选择的TCRβ链连同多样的TCRα链文库一起筛选，以找到互补的新的人TCRα链(或反之亦然)。逆转录病毒转导过程的高效率与TCRα和β链基因在分开的表达文库中的事实组合，允许用任何TCR组合物快速生成新文库。

[0357] 实例4:CD8依赖性和非依赖性筛选

[0358] CD8形成由一对CD8链组成的二聚体。最常见形式的CD8由CD8α链和CD8β链组成。CD8α链的胞外IgV样区与MHC I类分子的α3部分相互作用。在抗原特异性激活期间，这种相互作用使细胞毒性T细胞的TCR和靶细胞的肽-MHC复合物紧密结合在一起。T细胞激活的特异性取决于肽-MHC复合物和TCR的相互作用。经由共受体如CD4和CD8或共刺激相互作用如CD28和CD80/CD86的其他信号看起来充当放大器，其增加TCR信号的幅度和/或持续时间，并且不独立作用。不同的TCR可显示关于结合和信号传导对CD8的不同依赖水平。一般而言，其为CD8非依赖性的TCR倾向于针对肽-MHC复合物具有更高的亲和力。通过增强现有TCR的亲和力，能够将由这种TCR介导的T细胞激活从CD8依赖性改变为CD8非依赖性的。另外，CD8非依赖性是用于开发可溶性TCR作为治疗剂的理想特点。因此，通过在文库筛选和克隆表征期间调节或取消在展示文库/细胞克隆上的CD8表达，能够查询TCR或TCR文库的CD8依赖性水平是显著有利的。这允许在相同的细胞或细胞群体中直接评价CD8对结合强度和特异性的相对影响，以及所得到的在TCR和MHC-肽复合物之间的相互作用的细胞内信号传导事件。

[0359] 这种筛选系统可通过使用Cre/loxP系统来实现。Cre重组酶是源自P1细菌噬菌体的酪氨酸重组酶。该酶使用拓扑异构酶I样机制，以催化两个DNA识别位点(loxP位点)之间的位点特异性重组事件。34个碱基对(bp)的loxP识别位点由侧接8bp间隔区的两个13bp的回文序列组成。以相同方向取向的两个loxP位点之间的DNA作为DNA的环状环被切除。

[0360] 在该实例中，在LOT-D08细胞中表达包含侧接跨膜区和胞质区的loxP位点的嵌合CD8α和CD8β。在Cre介导的重组后，嵌合CD8α和CD8β的跨膜区和胞质区被切除，并且因而宿主T细胞不表达膜结合的嵌合CD8。

[0361] 1)表达侧面为loxP位点的嵌合CD8的LOT-D08细胞的生成

[0362] 包含融合至小鼠CD8跨膜区和胞质区的人CD8胞外区的嵌合CD8α和CD8β进一步进行修饰，以包括侧接小鼠跨膜区和胞质区的两个loxP位点(chiCD8α^{flox}和chiCD8β^{flox})。

[0363] 将chiCD8α^{flox}和chiCD8β^{flox}基因各自分别包装到非复制型逆转录病毒颗粒内。HEK293细胞(ATCC)用三种不同载体共转染:编码gag-pol基因的pVPack载体(pVPack载体系统，Stratagene)、编码PVC 211env基因的载体、以及编码chiCD8α^{flox}或chiCD8β^{flox}的逆转录病毒表达载体。根据制造商的说明，使用FuGENE 6Transfection Reagent(Roche Applied Science)执行转染。三天后收获所得到的逆转录病毒上清液并且直接用于转导LOT-D08细胞。

[0364] 通过荧光激活细胞分选(FACS)，使用抗人CD8αFITC(eBioscience，目录号：11-0086)和抗人CD8βAPC(BD Biosciences，目录号：641058)富集表达chiCD8α^{flox}和chiCD8β^{flox}的LOT-D08细胞(LOT-D08chiCD8α^{flox}+chiCD8β^{flox}+)。使用BD FACSAria I或II与FACSDiva软件(Becton-Dickinson)执行FACS。每轮FACS富集使用校准量的FITC或APC标记的抗体/1.0×10^{6}个细胞在4℃下执行30分钟。Fc受体阻断剂(BD Biosciences，目录号：553142)用于消除检测抗体的Fc区与LOT-D08细胞的背景结合。对于非特异性结合剂的检测，使用LOT-D08细胞。标记反应之间的所有洗涤都通过在具有2％FCS的PBS(PAA)中在4℃下以300g离心细胞5分钟来进行。

[0365] 随后，通过流式细胞术分析生成的LOT-D08chiCD8α^{flox}+chiCD8β^{flox}+细胞，以验证chiCD8α^{flox}和chiCD8β^{flox}的表面表达。使用BD FACSAria I或II与FACSDiva软件(Becton-Dickinson)执行流式细胞术分析。使用FlowJo软件(Treestar)分析所有流式细胞仪数据。

[0366] 2)在LOT-D08chiCD8α^{flox}+chiCD8β^{flox}+细胞中表达Cre

[0367] 用编码Cre重组酶的表达载体转导上文生成的LOT-D08 chiCD8α^{flox}+chiCD8β^{flox}+细胞。在Cre表达后，通过流式细胞术分析细胞克隆，以验证嵌合CD8的表面表达的缺乏。

[0368] 将Cre重组酶基因包装到非复制型逆转录病毒颗粒内。HEK 293细胞(ATCC)用三种不同载体共转染：编码gag-pol基因的pVPack载体(pVPack载体系统，Stratagene)、编码PVC 211env基因的载体、以及编码Cre-IRES-嘌呤霉素抗性基因的逆转录病毒载体。根据制造商的说明，使用FuGENE 6Transfection Reagent(Roche Applied Science)执行转染。三天后收获所得到的逆转录病毒上清液，并且直接使用或保持在-80℃下冷冻。来自Cre逆转录病毒颗粒原种的逆转录病毒颗粒滴度通过下述在实验中确定：执行LOT-D08细胞的测试转导，并且测量经转导的LOT-D08细胞群体的嘌呤霉素抗性。Cre重组酶在1.5ml Eppendorf管(Eppendorf)中进行转导，使用5×10^{5}个细胞/管。转导后，将细胞转移至过滤盖细胞培养瓶(Cellstar)中，其中细胞浓度为1×10^{5}个细胞/ml，并且允许在37℃下在10％CO_2下扩增24小时，然后加入嘌呤霉素以开始选择。

[0369] 通过流式细胞术分析表达Cre的LOT-D08chiCD8α^{flox}+chiCD8β^{flox}+细胞(LOT-D08chiCD8α^{flox}+chiCD8β^{flox}+Cre+)，以使用抗人CD8α和抗人CD8β抗体证实这些细胞在细胞表面上不表达嵌合CD8。Fc受体阻断剂(BD Biosciences，目录号：553142)用于消除检测抗体的Fc区与MTCD8衍生物的背景结合。标记反应之间的所有洗涤都通过在具有2％FCS的PBS(PAA)中在4℃下以300g离心细胞5分钟来进行。使用FlowJo软件(Treestar)分析流式细胞仪数据。如图3所示，Cre重组酶的转导有效地消除了嵌合CD8在细胞表面上的表达。

[0370] 3)TCR与肽-MHC复合物结合的CD8依赖性

[0371] 接下来，检查Cre重组酶介导的CD8缺失对TCR/肽-MHC相互作用的影响。本实例中使用的展示细胞是用报道构建体转导的LOT-D08chiCD8α^{flox}+chiCD8β^{flox}+细胞，所述报道构建体包含IL-2启动子和与编码EGFP的核苷酸序列可操作连接的三个NFAT结合位点。这些细胞被命名为BB8细胞。关于报道构建体的更多细节，参见实例5。如上所述转导表达嵌合TCR DMF4或DMF5的BB8细胞，以表达Cre重组酶。使用0.2μg/ml的iTAg Tetramer/PE-HLA-A*02:01 Mart-1(ELAGIGILTV)(SEQ ID NO:30)(MBL，目录号：T01008)进行具有或不具有Cre表达的细胞的染色。使用抗小鼠TCRβ抗体(BD Biosciences，目录号：553174)检查TCR表达。使用抗人CD8α-PE(eBioscience，目录号：12-0086)证实表面CD8表达的存在或不存在。在染色

后，将细胞洗涤并且使用FACSCalibur(BD Biosciences)分析。

[0372] 虽然Cre表达不影响表面TCR水平(图4A和4B)，但当CD8表达通过Cre8重组酶取消时，嵌合DMF4与Mart-1/HLA-A*0201四聚体的结合减少30％(图4C)。相反，在CD8的存在或不存在下，高亲和力嵌合TCR DMF5显示出与四聚体的类似结合(图4C)。该研究证实表达loxP侧接的CD8的展示细胞可用于查询TCR的CD8依赖性。该研究中使用的四聚体含有在MHC重链α3结构域中的A245V突变，其显示降低MHC与CD8的总体结合强度(参见例如Bodinier等人，Nat Med.2000Jun;6(6):707-10，其以引用的方式全文并入本文)。使用与CD8更强结合的野生型四聚体可能能够增加灵敏度，并且允许检测在CD8的存在或不存在下TCR/四聚体结合之间甚至更小的差异。

[0373] 4)使用Cre/loxP系统的CD8依赖性和非依赖性筛选

[0374] 如上所述，具有或不具有报道构建体的LOT-D08chiCD8α^{flox}+chiCD8β^{flox}+细胞用于生成多样的人TCR细胞文库。更具体地，将先前生成的TCRα和β链基因文库各自分别包装到非复制型逆转录病毒颗粒内，并且序贯地转导到LOT-D08chiCD8α^{flox}+chiCD8β^{flox}+细胞内。所得到的细胞文库进行质量检查，然后如上所述使用目的肽-MHC复合物进行筛选。

[0375] 此外，为了鉴定CD8非依赖性TCR，如先前所述用Cre-IRES-嘌呤霉素抗性基因构建体转导在上述筛选中与肽-MHC复合物结合的细胞。在Cre重组酶表达后，chiCD8α和chiCD8β的跨膜区和胞质区被缺失，并且嵌合CD8不再在细胞表面上表达。

[0376] 在嘌呤霉素选择后，再次使用校准量的目的MHC-肽复合物筛选表达TCR的LOT-D08chiCD8α^{flox}+chiCD8β^{flox}+Cre+细胞，随后为使用上述方法的TCRα和β链基因回收。

[0377] 具有在筛选活动内在CD8阳性和CD8阴性系统之间切换的能力，展示细胞系LOT-D08chiCD8α^{flox}+chiCD8β^{flox}+提供了通用系统，其可容易地用于鉴定CD8依赖性低至中等亲和力TCR以及CD8非依赖性高亲和力TCR。

[0378] 5)使用突变MHC分子的CD8依赖性和非依赖性筛选

[0379] 可替代地，当使用组成型表达CD8的细胞时，可通过使用野生型MHC I类分子或影响CD8/MHC I类相互作用的MHC I类突变来实现CD8依赖性和非依赖性筛选。已鉴定了许多这样的MHC I类突变体，包括减少而不是完全取消HLA-A2与CD8的结合的HLA-A2 A245V，以及取消CD8结合而不影响肽-MHC/TCR相互作用的HLA-A2 D227K/T228A。TCR细胞文库可直接针对四聚体进行筛选，所述四聚体含有装载有目的肽的HLA-A2 A245V突变体或HLA-A2 D227K/T228A突变体。可替代地，采用两步筛选方法。在该方法中，首先使用含有装载有目的肽的野生型HLA-A2的四聚体筛选在细胞表面上表达CD8和TCR的TCR细胞文库。在该第一步中鉴定的阳性命中然后针对四聚体进行筛选，所述四聚体含有装载有目的肽的HLA-A2 A245V突变体或HLA-A2 D227K/T228A突变体。可分离且鉴定CD8非依赖性高亲和力TCR。

[0380] 实例5:使用报道测定筛选TCR细胞文库

[0381] TCR细胞文库也可基于与肽-MHC复合物的相互作用的功能结果进行筛选。可能的读出包括激活标志物(例如CD69或CD137)的表达、信号传导途径(例如NFAT信号传导、IL-2信号传导、激活物蛋白-1信号传导或NFκB/Rel信号传导)的触发、钙流动、细胞增殖(例如T细胞增殖)以及细胞因子(例如IL-2、TNF-α或IFN-γ)的产生。

[0382] 可替代地，可生成衍生展示细胞系以表达一种或多种报道构建体。通常使用的报道构建体编码在靶启动子(例如，包含NFAT结合位点的IL-2启动子、包含NFκB转录应答元件

的NFκB启动子、或包含TPA诱导的转录应答元件的激活物蛋白-1启动子)的控制下的可选择标志物(例如荧光或发光蛋白、表面表达蛋白或抗生素抗性标志物)。

[0383] 在该实例中,生成了包含IL-2-EGFP报道构建体的衍生展示细胞系。在T细胞激活和IL-2信号传导级联的后续激活后,激活IL-2启动子,导致EGFP的合成。读出,例如在这种情况下的EGFP表达,可用于使用例如流式细胞术分析来定性或定量测量IL-2信号传导的强度。将报道构建体以逆转录病毒方式转导到上文生成的展示细胞系AK-D10内。

[0384] 类似的报道构建体也被引入其他展示细胞,例如上文生成的LOT-D08细胞以及表达chiCD8α^{flox}和chiCD8β^{flox}的LOT-D08细胞内。

[0385] 1)包含IL-2报道构建体的AK-D10细胞的生成

[0386] 首先进行研究,以检查使用IL-2产生作为T细胞激活的功能读出的可行性。简言之,使用抗CD3抗体或抗CD3/抗CD28抗体混合物刺激AK-D10细胞或表达嵌合TCR C58的AK-D10细胞,然后通过测量IL-2产生来检查激活。将抗CD3抗体(eBioscience,目录号:16-0032)或抗CD3和抗CD28(eBioscience,目录号:16-0281)抗体以5μg/ml的浓度包被到96孔板上,并且在37℃下温育3小时。随后,将重悬浮于200μl SF-IMDM中的1x 10^5个细胞加入每个孔中,并且在37℃和10%CO_2下温育24小时。使用小鼠IL-2ELISA试剂盒(eBioscience,目录号:88-7024),检查在具有或不具有C58表达的激活AK-D10细胞的培养物上清液中的IL-2产生。

[0387] 在抗CD3或抗CD3/抗CD28抗体刺激下,仅表达嵌合TCR C58的AK-D10细胞,而不是缺乏TCR表达的AK-D10细胞分泌IL-2(图5)。

[0388] 在确定IL-2产生可充当T细胞激活的有用功能读出之后,转导AK-D10细胞以表达IL-2-EGFP报道构建体,其提供IL-2产生的替代读出。产生三种报道构建体,其中最小IL-2启动子、包含三个NFAT结合位点的IL-2启动子、或包含六个NFAT结合位点的IL-2启动子与编码EGFP的核苷酸序列(分别是mIL-2-EGFP、IL-2-(NFAT)$_3$-EGFP和IL-2-(NFAT)$_6$-EGFP)可操作地连接。报道构建体包含潮霉素B抗性基因作为选择标志物。报道构建体基因各自分别包装到非复制型逆转录病毒颗粒内。HEK 293细胞(ATCC)用三种不同载体共转染:编码gag-pol基因的pVPack载体(pVPack载体系统,Stratagene)、编码PVC 211env基因的载体、以及编码三种报道构建体之一的逆转录病毒载体。根据制造商的说明,使用FuGENE 6Transfection Reagent(Roche Applied Science)执行转染。三天后收获所得到的逆转录病毒上清液并且直接用于转导上文生成的AK-D10细胞。使用潮霉素B抗生素以800μg/ml的工作浓度选择表达报道构建体的AK-D10细胞。在4天的选择时间后,将来自潮霉素抗性AK-D10细胞群体的单个T细胞分选在96孔板中。这些单个T细胞在约一周内生长成T细胞克隆。随后,将这些单细胞克隆用TCR转导,用同源肽-MHC复合物或抗CD3抗体激活,并且通过流式细胞术进行分析以证实报道基因开启,如通过EGFP表达所证明的。

[0389] 2)使用抗CD3抗体激活包含IL-2报道构建体的AK-D10细胞

[0390] 在该实例中,在如上所述的平板结合的抗CD3抗体的存在或不存在下,激活表达IL-2-(NFAT)$_3$-EGFP报道构建体和嵌合TCR DMF4(AK-D10IL-2-(NFAT)$_3$-EGFP+chiDMF4+)的AK-D10细胞,然后使用流式细胞术检查EGFP表达。使用FlowJo软件(Treestar)分析所有流式细胞术数据。仅表达IL-2报道构建体但不表达重组TCR的AK-D10细胞用作阴性对照。

[0391] 如通过EGFP表达所证明的,IL-2报道构建体的激活仅在与抗CD3抗体共培养的

DMF4表达细胞中观察到(图6A)。在抗CD3抗体的不存在下(图6B),或在TCR表达的不存在下(图6C),检测到最小的报道激活。

[0392] 3)使用由肽脉冲的T2细胞激活包含IL-2报道构建体的AK-D10细胞或BB8细胞

[0393] 接下来,进行一系列研究,以检查通过肽脉冲的T2细胞激活表达IL-2报道构建体和重组TCR的AK-D10细胞或BB8细胞。

[0394] 在第一项研究中,测试了两种NY-ESO-1特异性TCR:上文已描述的C58,以及其为在HLA-A*0201的背景下对于源自NY-ESO-1的肽特异性的TCR的C259。参见例如Rapoport等人,Nat Med.2015,21(8):914-921;Robbins等人,J Clin Oncol.2011,29(7):917-924;Robbins等人,J Immunol.2008,180(9):6116-6131;和美国专利号8,008,438,所述参考文献各自以引用的方式全文并入本文。C259被表达为嵌合TCR,其中人可变区与鼠非可变区融合,以确保适当锚定和与鼠CD3的相互作用,以及鼠信号传导途径的适当触发。嵌合C259的α和β链分别包含SEQ ID NO:35和36的氨基酸序列。

[0395] 用50μg/ml NY-ESO-1抗原肽SLLMWITQV(SEQ ID NO:31)(IBA Lifesciences,目录号:6-7013-901)在37℃下脉冲T2细胞(在200μl PBS中的1.0x 10^6个细胞)3小时。接下来,转导以表达IL-2报道构建体和嵌合TCR C58(AK-D10IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+chiC58+)或嵌合TCR C259(AK-D10IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+chiC259+)的5.0x10^4个AK-D10细胞与5.0x 10^4个脉冲的T2细胞一起在200μl SF-IMDM培养基中在37℃和10%CO_2下共温育16小时。作为对照,AK-D10衍生物也与非脉冲的T2细胞一起温育或在T2细胞的不存在下温育。在温育后,使用抗小鼠TCRβ抗体(BD Biosciences,目录号:553174)就TCR表达进行细胞染色。为了评价T细胞激活标志物CD69和CD137的表达,使用抗小鼠CD69-BV421(Biolegend,目录号:104528)和抗小鼠CD137-APC(eBioscience,目录号:17-1371)进行细胞染色。然后使细胞经受流式细胞术分析。门控TCR阳性细胞,并且使用FlowJo软件(Treestar)测定TCR+EGFP+、TCR+CD69+和TCR+CD137+细胞的百分比。

[0396] 如通过EGFP表达(图7A-7C和图8)所证明的,与用同源肽脉冲的T2细胞共温育增强IL-2报道构建体的激活。一致地,与脉冲的T2细胞共培养也上调了T细胞激活标志物CD69和CD137的表达(图8)。值得注意的是,表面TCR表达在激活后下调(图7A-7C),突出显示此处开发的IL-2报道测定可能对鉴定具有优异信号传导能力的TCR特别有用。如果增强的四聚体结合被下调的表面TCR表达所抵消,则基于结合的筛选(例如使用MHC四聚体)可能提供较少信息。

[0397] 在第二项研究中,使用由剂量滴定的同源肽脉冲的T2细胞检查了IL-2-EGFP报道构建体的灵敏度。简言之,用范围为0.125μM至256μM的Mart-1抗原肽ELAGIGILTV(SEQ ID NO:30)(P&E,目录号:EP04197)在37℃下脉冲22.0x 10^6个T2细胞3小时。对于肽脉冲,加入阴性对照肽ILLWQPIPV(SEQ ID NO:34)(Genscript,定制次序),以维持512μM的恒定总肽浓度。随后,转导以表达IL-2报道构建体和嵌合TCR DMF4(AK-D10IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+chiDMF4+)或嵌合TCR DMF5(AK-D10IL-2-$(NFAT)_3$-EGFP+chiDMF5+)的5.0x 10^4个AK-D10细胞与5.0x 10^4个脉冲的T2细胞一起在200μl SF-IMDM培养基中在37℃和10%CO_2下共温育12小时。使用抗人TCRα/β-APC(BD Biosciences,目录号:563826)就TCR表达进行细胞染色,并且通过流式细胞术进行分析。门控TCR阳性细胞,并且使用FlowJo软件(Treestar)测定TCR+EGFP+细胞的百分比。

[0398] 如图9A和9B所示，用同源肽脉冲的T2细胞以剂量依赖性方式激活IL-2-EGFP报道构建体。

[0399] 第三项研究着眼于IL-2-EGFP报道构建体的激活如何受因素例如用于脉冲T2细胞的肽浓度、激活的长度以及CD8的存在或不存在的影响。用50μg/ml、5μg/ml或0.5μg/ml的Mart-1抗原肽ELAGIGILTV(SEQ ID NO:30)(P&E，目录号:EP04197)在37℃下脉冲T2细胞(在200μl PBS中的5.0x 10^5个细胞)3小时。转导表达嵌合TCR DMF4或DMF5的BB8细胞(MTCD8mCD8αβ-chiCD8α^{flox}+chiCD8β^{flox}+IL-2-(NFAT)$_3$-EGFP+)以表达Cre重组酶或不进行转导。接下来，将5.0x 10^4个BB8衍生物与5.0x 10^4个脉冲的T2细胞在200μl SF-IMDM培养基中在37℃和10％CO_2下共温育经过0-25小时的时间进程。然后使用抗小鼠TCRβ-APC(BD Biosciences，目录号:553174)和抗人CD8-PE(BD Biosciences，目录号:555635)就TCR和CD8进行细胞染色，并且通过流式细胞术进行分析。门控TCR阳性细胞，并且使用FlowJo软件(Treestar)测定TCR+EGFP+细胞的百分比。

[0400] 如图10A和10B所示，IL-2-EGFP报道构建体的激活是测量持续时间内的时间的函数。激活的程度随着T2细胞用浓度渐增的同源肽脉冲而增加。CD8染色证实，Cre重组酶的转导成功耗尽了表面CD8表达(数据未显示)，其减少了通过肽脉冲的T2细胞诱导的Il-2信号传导激活。

[0401] 实例6:从人供体中分离TCR

[0402] 在该实例中，就对于目的靶特异性的TCR筛选来自人受试者的T细胞。更具体地，从人供体中分离对于HPV E6或E7衍生的肽特异性的TCR。来自已针对E6或E7接种疫苗的人的T细胞也可用于分离对于E6或E7衍生的肽特异性的TCR。

[0403] 1)从体外刺激的人T细胞中分离TCR

[0404] 使用标准方法从PBMC中分离人T细胞。为了鉴定对于HPV E6或E7衍生的肽特异性的TCR，用(i)装载有来自JPT肽的肽库PepMix™ HPV 16(蛋白质E6或E7)的自体树突状细胞、(ii)装载有源自HPV E6或E7的HLA-A2限制性肽的T2细胞、或(iii)肽-MHC复合物(装载有E6或E7衍生的肽的DimerX)激活经分离的T细胞。在后两种情况下，E6衍生的肽KLPQLCTEL(SEQ ID NO:31)和E7衍生的肽GTLGIVCPI(SEQ ID NO:32)用于装载T2细胞和DimerX。可替代地，经分离的T细胞也可使用由编码目的抗原的体外转录的(IVT)RNA转染的抗原呈递细胞来激活。

[0405] 随后，收获激活的细胞，用荧光缀合的抗IFNγ抗体(Secretion Assay Kit，Miltenyi Biotec)以及T细胞特异性抗体(抗CD8或抗CD4抗体)染色，并且对于IFNγ/CD8或IFNγ/CD4双重阳性的细胞进行本体分选或单细胞分选。使用BD FACSAria流式细胞仪(BD Biosciences)进行分选。可替代地，激活的细胞也可使用抗IL-2抗体连同抗CD8或抗CD4抗体一起进行染色，然后分选IL-2/CD8或IL-2/CD4双重阳性细胞。

[0406] 使用例如重组IL-2、抗CD3/抗CD28抗体或同源肽-MHC复合物扩增本体或单细胞分选的激活的T细胞。直接从单细胞分选或本体分选的抗原特异性CD8+或CD4+T淋巴细胞克隆TCRα和β链。克隆的TCR在功能测定中直接测试或用于文库生成。

[0407] 2)从使用目的肽-MHC复合物分选的T细胞中分离TCR

[0408] 使用标准方法从PBMC中分离人T细胞。经分离的T细胞使用装载有E6衍生的肽KLPQLCTEL(SEQ ID NO:31)或E7衍生的肽GTLGIVCPI(SEQ ID NO:32)的DimerX染色，并且使

用BD FACSAria流式细胞仪(BD Biosciences)进行本体或单细胞分选。不进行T细胞的激活。

[0409] 使用例如重组IL-2、抗CD3/抗CD28抗体或用于分选的特异性肽-MHC复合物扩增本体或单细胞分选的T细胞。直接从单细胞分选或本体分选的抗原特异性CD8+或CD4+T淋巴细胞克隆TCRα和β链。克隆的TCR在功能测定中直接测试或用于文库生成。

[0410] 表1示例性共受体、TCR、MHC和肽抗原的氨基酸序列

[0411]

SEQ ID NO:	描述（蛋白质序列，除非另有说明）	序列
1	嵌合 CD8α	SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTS GCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEG LDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYF CSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIWAPLAGICVALLLSLIITLICYHRSRKRV CKCPRPLVRQEGKPRPSEKIV
2	嵌合 CD8β	LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRI YWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHG EEVEQEKIAVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYF CMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTK KSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPLSLLVVCI LLLLAFLGVAVYFYCVRRRARIHFMKQFHK
3	具有 loxp 位点的嵌合 CD8α（核苷	AGCCAGTTCAGAGTGTCCCCCCTGGACAGA ACCTGGAACCTGGGCGAGACAGTGGAACT

[0412]

	酸序列）	GAAGTGCCAGGTGCTGCTGAGCAACCCCA CCAGCGGCTGTAGCTGGCTGTTCCAGCCTA GAGGCGCCGCTGCCAGCCCTACCTTTCTGC TGTACCTGAGCCAGAACAAGCCCAAGGCC GCCGAGGGCCTGGACACCCAGAGATTCAG CGGCAAGAGACTGGGCGACACCTTCGTGCT GACCCTGAGCGACTTCAGAAGAGAGAACG AGGGCTACTACTTCTGCAGCGCCCTGAGCA ACAGCATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGC CCGTGTTTCTGCCCGCCAAGCCTACCACAA CCCCTGCCCCTAGACCTCCTACCCCAGCCC CTACAATCGCCAGCCAGCCTCTGTCTCTGA GGCCCGAGGCTTGTAGACCAGCTGCTGGCG GAGCCGTGCACACAAGAGGCCTGGACTTC GCCTGCGACATAACTTCGTATAGCATACAT TATACGAAGTTATCTATCTGGGCTCCACTG GCCGGCATTTGTGTGGCACTGCTGCTGTCC CTGATCATCACCCTGATCTGCTACCACAGA TCCCGGAAGCGCGTGTGCAAGTGCCCTAGA CCACTCGTGCGGCAGGAAGGCAAGCCCAG ACCCAGCGAGAAGATTGTCTGAATAACTTC GTATAGCATACATTATACGAAGTTAT
4	具有 loxp 位点的嵌合 CD8β（核苷酸序列）	CTGCAGCAGACCCCCGCCTACATCAAGGTG CAGACCAACAAGATGGTCATGCTGAGCTG CGAGGCCAAGATCAGCCTGAGCAACATGA GAATCTACTGGCTGAGACAGAGACAGGCC CCCAGCAGCGACAGCCACCACGAGTTTCTG GCCCTGTGGGACAGCGCCAAGGGCACCAT CCATGGCGAGGAAGTGGAACAGGAAAAGA TCGCCGTGTTCAGGGACGCCAGCAGATTCA TCCTGAACCTGACCAGCGTGAAGCCCGAG GACAGCGGAATCTACTTCTGCATGATCGTG GGCAGCCCCGAGCTGACCTTCGGCAAGGG AACACAGCTGAGCGTGGTGGACTTCCTGCC TACCACCGCCCAGCCCACCAAGAAGTCTAC

[0413]

		CCTGAAGAAAAGAGTGTGCAGACTGCCCA GACCCGAGACACAGAAAGGCCCTCTGTGC AGCCCTATAACTTCGTATAGCATACATTAT ACGAAGTTATCTCTGAGCCTGCTGGTCGTG TGCATCCTCCTGCTGCTGGCTTTTCTGGGCG TGGCCGTGTACTTCTACTGCGTGCGGAGAA GGGCCAGGATCCACTTTATGAAGCAGTTCC ACAAATGAATAACTTCGTATAGCATACATT ATACGAAGTTAT
5	具有 loxp 位点的嵌合 CD8α（氨基酸序列）	SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTS GCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEG LDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYF CSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDITSYSIHYTKLSIWAPLAGICVALLLSLIIT LICYHRSRKRVCKCPRPLVRQEGKPRPSEKIV
6	具有 loxp 位点的嵌合 CD8β（氨基酸序列）	LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRI YWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHG EEVEQEKIAVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYF CMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTK KSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITSYSIHYT KLSLSLLVVCILLLLAFLGVAVYFYCVRRRA RIHFMKQFHK
7	嵌合 C58 α 链	KQEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYN LQWFRQDPGKGLTSLLLITPWQREQTSGRLN ASLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVRPL LDGTYIPTFGRGTSLIVHPYIQNPEPAVYQLK DPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFIT DKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQD IFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLN FQNLSVMGLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
8	嵌合 C58 β 链	NAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNH EYMSWYRQDPGMGLRLIHYSVAIQTTDQGE VPNGYNVSRSTIEDFPLRLLSAAPSQTSVYFC

[0414]

		ASSYLGNTGELFFGEGSRLTVLEDLRNVTPPK VSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHV ELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYC LSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEE DKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSAS YHQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSGLVL MAMVKKKNS
9	嵌合 DMF4 α 链	GQQLNQSPQSMFIQEGEDVSMNCTSSSIFNT WLWYKQDPGEGPVLLIALYKAGELTSNGRL TAQFGITRKDSFLNISASIPSDVGIYFCAGGTG NQFYFGTGTSLTVIPYIQNPEPAVYQLKDPRS QDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTV LDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKET NATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNL SVMGLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
10	嵌合 DMF4 β 链	DAGITQSPRHKVTETGTPVTLRCHQTENHRY MYWYRQDPGHGLRLIHYSYGVKDTDKGEVS DGYSVSRSKTEDFLLTLESATSSQTSVYFCAI SEVGVGQPQHFGDGTRLSILEDLRNVTPPKV SLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVEL SWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLS SRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDK WPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYQ QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMA MVKRKNS
11	嵌合 DMF5 α 链	QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQS FFWYRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTA QLNKASQYVSLLIRDSQPSDSATYLCAVNFG GGKLIFGQGTELSVKPYIQNPEPAVYQLKDPR SQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKT VLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFK ETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQ NLSVMGLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
12	嵌合 DMF5 β 链	IAGITQAPTSQILAAGRRMTLRCTQDMRHNA

[0415]

		MYWYRQDLGLGLRLIHYSNTAGTTGKGEVP DGYSVSRANTDDFPLTLASAVPSQTSVYFCA SSLSFGTEAFFGQGTRLTVVEDLRNVTPPKVS LFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELS WWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSS RLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDK WPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYQ QGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMA MVKRKNS
13	小鼠 TCR α 链非可变区 (A0A075B662)	XIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQI NVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAI AWSNQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDAT LTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAG FNLLMTLRLWSS X 可为任何氨基酸
14	小鼠 TCR α 链跨膜区和胞质区	SVMGLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
15	小鼠 TCR β 链非可变区 (Trbc1) (A0A0A6YWV4)	XDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVC LARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQ AYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRC QVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWG RADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLY AVLVSTLVVMAMVKRKNS X 可为任何氨基酸
16	小鼠 TCR β 链 (Trbc1)跨膜区和胞质区	EILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS
17	小鼠 TCR β 链非可变区 (Trbc1) (A0A075B5J3)	XDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVC LARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQ AYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRC QVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWG RADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLY AVLVSTLVVMAMVRNR X 可为任何氨基酸

[0416]

18	小鼠 TCR β 链(Trbc1)跨膜区和胞质区	EILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVRNR
19	小鼠 TCR β 链非可变区(Trbc2)(A0A075B5J4)	XDLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVC LARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQ AYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRC QVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWG RADCGITSASYHQGVLSATILYEILLGKATLY AVLVSGLVLMAMVKKKNS X 可为任何氨基酸
20	小鼠 TCR β 链(Trbc2)跨膜区和胞质区	EILLGKATLYAVLVSGLVLMAMVKKKNS
21	小鼠 CD8α 同种型 1	KPQAPELRIFPKKMDAELGQKVDLVCEVLGS VSQGCSWLFQNSSSKLPQPTFVVYMASSHNK ITWDEKLNSSKLFSAMRDTNNKYVLTLNKFS KENEGYYFCSVISNSVMYFSSVVPVLQKVNS TTTKPVLRTPSPVHPTGTSQPQRPEDCRPRGS VKGTGLDFACDIYIWAPLAGICVALLLSLIITL ICYHRSRKRVCKCPRPLVRQEGKPRPSEKIV
22	小鼠 CD8β	LIQTPSSLLVQTNHTAKMSCEVKSISKLTSIY WLRERQDPKDKYFEFLASWSSSKGVLYGES VDKKRNIILESSDSRRPFLSIMNVKPEDSDFYF CATVGSPKMVFGTGTKLTVVDVLPTTAPTK KTTLKMKKKKQCPFPHPETQKGLTCSLTTLS LLVVCILLLLAFLGVAVYFYCVRRRARIHFM KQFHK
23	人 CD8α 同种型 1	SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTS GCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEG LDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYF CSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCNHRN RRRVCKCPRPVVKSGDKPSLSARYV

[0417]

24	人 CD8β 同种型 1	LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRI YWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHG EEVEQEKIAVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYF CMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTK KSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITLGLLVA GVLVLLVSLGVAIHLCCRRRRARLRFMKQFY K
25	具有 loxp 位点的嵌合 CD8α（氨基酸序列）	SQFRVSPLDRTWNLGETVELKCQVLLSNPTS GCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNKPKAAEG LDTQRFSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYYF CSALSNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPT PAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDF ACDITSYSIHYTKLXIWAPLAGICVALLLSLII TLICYHRSRKRVCKCPRPLVRQEGKPRPSEKI V X 是 S、F、L、Y、C 或 W
26	具有 loxp 位点的嵌合 CD8β（氨基酸序列）	LQQTPAYIKVQTNKMVMLSCEAKISLSNMRI YWLRQRQAPSSDSHHEFLALWDSAKGTIHG EEVEQEKIAVFRDASRFILNLTSVKPEDSGIYF CMIVGSPELTFGKGTQLSVVDFLPTTAQPTK KSTLKKRVCRLPRPETQKGPLCSPITSYSIHYT KLXLSLLVVCILLLLAFLGVAVYFYCVRRRA RIHFMKQFHK X 是 S、F、L、Y、C 或 W
27	HLA-A2 α 链	GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDT QFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWD GETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGYYNQSEAG SHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDG KDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEA AHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETL QRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFY PAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGT FQKWAAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPL TLRWEPSSQPTIPIVGIIAGLVLFGAVITGAVV

[0418]

		AAVMWRRKSSDRKGGSYSQAASSDSAQGSD VSLTACKV
28	HLA-A2 α 链 A245V	GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDT QFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWD GETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGYYNQSEAG SHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDG KDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEA AHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETL QRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFY PAEITLTWQRDGEDQTQDTELVETRPAGDGT FQKWVAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPL TLRWEPSSQPTIPIVGIIAGLVLFGAVITGAVV AAVMWRRKSSDRKGGSYSQAASSDSAQGSD VSLTACKV
29	HLA-A2 α 链 D227K/T228A	GSHSMRYFFTSVSRPGRGEPRFIAVGYVDDT QFVRFDSDAASQRMEPRAPWIEQEGPEYWD GETRKVKAHSQTHRVDLGTLRGYYNQSEAG SHTVQRMYGCDVGSDWRFLRGYHQYAYDG KDYIALKEDLRSWTAADMAAQTTKHKWEA AHVAEQLRAYLEGTCVEWLRRYLENGKETL QRTDAPKTHMTHHAVSDHEATLRCWALSFY PAEITLTWQRDGEDQTQKAELVETRPAGDGT FQKWAAVVVPSGQEQRYTCHVQHEGLPKPL TLRWEPSSQPTIPIVGIIAGLVLFGAVITGAVV AAVMWRRKSSDRKGGSYSQAASSDSAQGSD VSLTACKV
30	Mart-1 肽	ELAGIGILTV
31	E6 肽	KLPQLCTEL
32	E7 肽	GTLGIVCPI
33	NY-ESO-1 肽	SLLMWITQV
34	肽	ILLWQPIPV
35	嵌合 C259 α 链	QEVTQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNL QWFRQDPGKGLTSLLLIPFWQREQTSGRLNA SLDKSSGRSTLYIAASQPGDSATYLCAVRPLY

[0419]

		GGSYIPTFGRGTSLIVHPYIQNPEPAVYQLKD PRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITD KTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDI FKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLN FQNLSVMGLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS
36	嵌合 C259 β 链	AGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQDMNHE YMSWYRQDPGMGLRLIHYSVSVGMTDQGE VPNGYNVSRSTTEDFPLRLLSAAPSQTSVYFC ASSYVGNTGELFFGEGSRLTVLEDLRNVTPP KVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDH VELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSY CLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSE EDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSA SYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVV MAMVKRKNS

[0420] 本发明在范围中不受本文描述的具体实施例的限制。实际上，根据前面说明书和附图，除所描述的那些之外的本发明的各种修改对于本领域技术人员变得显而易见。这些修改预期落入所附权利要求的范围内。

[0421] 在说明书中鉴定的任何专利、专利申请、出版物或其他公开材料在此以引用的方式全文并入且用于所有目的，其程度与每个此类个别参考文献(例如专利、专利申请、出版物或其他公开材料)特别且个别地指出以引用的方式全文并入且用于所有目的一样。被说成以引用的方式并入本文但与本文阐述的现有定义、陈述或其他公开材料冲突的任何材料或其一部分仅以引用的方式并入，至在以引用的方式并入的参考材料和本公开内容材料之间不发生冲突的程度。

[0422] 其他实施例在下述权利要求内。

序列表

<110> Agenus Inc.

<120> 经改造的宿主细胞及其使用方法

<130> 584671:AGBW-002PC

<150> US 62/217,677
<151> 2015-09-11

<160> 36

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1
<211> 212
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
[0001] <223> 嵌合 CD8a

<400> 1

Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly
20 25 30

Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Phe
35 40 45

Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp
50 55 60

Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val Leu Thr
65 70 75 80

Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala
85 90 95

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu
100 105 110

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
115 120 125

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
130 135 140

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
145 150 155 160

Asp Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser
[0002] 165 170 175

Leu Ile Ile Thr Leu Ile Cys Tyr His Arg Ser Arg Lys Arg Val Cys
180 185 190

Lys Cys Pro Arg Pro Leu Val Arg Gln Glu Gly Lys Pro Arg Pro Ser
195 200 205

Glu Lys Ile Val
210

<210> 2
<211> 187
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合 CD8b

<400> 2

Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val
1 5 10 15

Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr
20 25 30

Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp Ser His His Glu Phe
35 40 45

Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val
50 55 60

Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala Ser Arg Phe Ile Leu
65 70 75 80

[0003]

Asn Leu Thr Ser Val Lys Pro Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Phe Cys Met
85 90 95

Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Gln Leu Ser
100 105 110

Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala Gln Pro Thr Lys Lys Ser Thr
115 120 125

Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly
130 135 140

Pro Leu Cys Ser Pro Leu Ser Leu Leu Val Val Cys Ile Leu Leu Leu
145 150 155 160

Leu Ala Phe Leu Gly Val Ala Val Tyr Phe Tyr Cys Val Arg Arg Arg

165 170 175

Ala Arg Ile His Phe Met Lys Gln Phe His Lys
180 185

<210> 3
<211> 709
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有 loxp 位点的嵌合 CD8a（核苷酸序列）

<400> 3
agccagttca gagtgtcccc cctggacaga acctggaacc tgggcgagac agtggaactg 60

aagtgccagg tgctgctgag caaccccacc agcggctgta gctggctgtt ccagcctaga 120

ggcgccgctg ccagccctac ctttctgctg tacctgagcc agaacaagcc caaggccgcc 180

[0004]

gagggcctgg acacccagag attcagcggc aagagactgg gcgacacctt cgtgctgacc 240

ctgagcgact tcagaagaga gaacgagggc tactacttct gcagcgccct gagcaacagc 300

atcatgtact tcagccactt cgtgcccgtg tttctgcccg ccaagcctac cacaacccct 360

gcccctagac ctcctacccc agcccctaca atcgccagcc agcctctgtc tctgaggccc 420

gaggcttgta gaccagctgc tggcggagcc gtgcacacaa gaggcctgga cttcgcctgc 480

gacataactt cgtatagcat acattatacg aagttatcta tctgggctcc actggccggc 540

atttgtgtgg cactgctgct gtccctgatc atcaccctga tctgctacca cagatcccgg 600

aagcgcgtgt gcaagtgccc tagaccactc gtgcggcagg aaggcaagcc cagacccagc 660

gagaagattg tctgaataac ttcgtatagc atacattata cgaagttat 709

<210> 4
<211> 634
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>
<223> 具有 loxp 位点的嵌合 CD8b（核苷酸序列）

<400> 4

ctgcagcaga ccccgcctа catcaaggtg cagaccaaca agatggtcat gctgagctgc 60

gaggccaaga tcagcctgag caacatgaga atctactggc tgagacagag acaggccccc 120

agcagcgaca gccaccacga gtttctggcc ctgtgggaca gcgccaaggg caccatccat 180

ggcgaggaag tggaacagga aaagatcgcc gtgttcaggg acgccagcag attcatcctg 240

aacctgacca gcgtgaagcc cgaggacagc ggaatctact tctgcatgat cgtgggcagc 300

cccgagctga ccttcggcaa gggaacacag ctgagcgtgg tggacttcct gcctaccacc 360

gcccagccca ccaagaagtc taccctgaag aaaagagtgt gcagactgcc cagacccgag 420

acacagaaag gccctctgtg cagccctata acttcgtata gcatacatta tacgaagtta 480

[0005]

tctctgagcc tgctggtcgt gtgcatcctc ctgctgctgg cttttctggg cgtggccgtg 540

tacttctact gcgtgcggag aagggccagg atccacttta tgaagcagtt ccacaaatga 600

ataacttcgt atagcataca ttatacgaag ttat 634

<210> 5
<211> 224
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有 loxp 位点的嵌合 CD8a（氨基酸序列）

<400> 5

Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly

20 25 30

Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Phe
35 40 45

Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp
50 55 60

Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val Leu Thr
65 70 75 80

Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala
85 90 95

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu
100 105 110

[0006]

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
115 120 125

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
130 135 140

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
145 150 155 160

Asp Ile Thr Ser Tyr Ser Ile His Tyr Thr Lys Leu Ser Ile Trp Ala
165 170 175

Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr
180 185 190

Leu Ile Cys Tyr His Arg Ser Arg Lys Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg

195 200 205

Pro Leu Val Arg Gln Glu Gly Lys Pro Arg Pro Ser Glu Lys Ile Val
210 215 220

<210> 6
<211> 199
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有 loxp 位点的嵌合 CD8b（氨基酸序列）

<400> 6

Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val
1 5 10 15

[0007] Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr
20 25 30

Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp Ser His His Glu Phe
35 40 45

Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val
50 55 60

Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala Ser Arg Phe Ile Leu
65 70 75 80

Asn Leu Thr Ser Val Lys Pro Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Phe Cys Met
85 90 95

Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Gln Leu Ser
100 105 110

Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala Gln Pro Thr Lys Lys Ser Thr
115 120 125

Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly
130 135 140

Pro Leu Cys Ser Pro Ile Thr Ser Tyr Ser Ile His Tyr Thr Lys Leu
145 150 155 160

Ser Leu Ser Leu Leu Val Val Cys Ile Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu
165 170 175

Gly Val Ala Val Tyr Phe Tyr Cys Val Arg Arg Arg Ala Arg Ile His
180 185 190

Phe Met Lys Gln Phe His Lys
[0008] 195

<210> 7
<211> 251
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合 C58 α链

<400> 7

Lys Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val Pro Glu Gly
1 5 10 15

Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn
20 25 30

Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu

35 40 45

Leu Ile Thr Pro Trp Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala
50 55 60

Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Ala Ala Ser
65 70 75 80

Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Pro Leu Leu
85 90 95

Asp Gly Thr Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val
100 105 110

His Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp
115 120 125

[0009]

Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser
130 135 140

Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp
145 150 155 160

Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala
165 170 175

Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys
180 185 190

Glu Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr
195 200 205

Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn

210 215 220

Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe
225 230 235 240

Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
245 250

<210> 8
<211> 286
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合 C58 β 链

<400> 8

[0010] Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly
1 5 10 15

Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met
20 25 30

Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
35 40 45

Ser Val Ala Ile Gln Thr Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr
50 55 60

Asn Val Ser Arg Ser Thr Ile Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser
65 70 75 80

Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr Leu
85 90 95

Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val
100 105 110

Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu
115 120 125

Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys
130 135 140

Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val
145 150 155 160

Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr
165 170 175

[0011]

Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser
180 185 190

Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln
195 200 205

Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys
210 215 220

Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys
225 230 235 240

Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr His Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile
245 250 255

Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val
260 265 270

Ser Gly Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Lys Lys Asn Ser
275 280 285

<210> 9
<211> 246
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合 DMF4 α 链

<400> 9

Gly Gln Gln Leu Asn Gln Ser Pro Gln Ser Met Phe Ile Gln Glu Gly
1 5 10 15

Glu Asp Val Ser Met Asn Cys Thr Ser Ser Ser Ile Phe Asn Thr Trp
20 25 30

[0012]

Leu Trp Tyr Lys Gln Asp Pro Gly Glu Gly Pro Val Leu Leu Ile Ala
35 40 45

Leu Tyr Lys Ala Gly Glu Leu Thr Ser Asn Gly Arg Leu Thr Ala Gln
50 55 60

Phe Gly Ile Thr Arg Lys Asp Ser Phe Leu Asn Ile Ser Ala Ser Ile
65 70 75 80

Pro Ser Asp Val Gly Ile Tyr Phe Cys Ala Gly Gly Thr Gly Asn Gln
85 90 95

Phe Tyr Phe Gly Thr Gly Thr Ser Leu Thr Val Ile Pro Tyr Ile Gln
100 105 110

Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp

115 120 125

Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro
130 135 140

Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp
145 150 155 160

Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn
165 170 175

Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Thr
180 185 190

Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser
195 200 205

[0013]

Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met Gly
210 215 220

Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr
225 230 235 240

Leu Arg Leu Trp Ser Ser
245

<210> 10
<211> 286
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合 DMF4 β 链

<400> 10

Asp Ala Gly Ile Thr Gln Ser Pro Arg His Lys Val Thr Glu Thr Gly
1 5 10 15

Thr Pro Val Thr Leu Arg Cys His Gln Thr Glu Asn His Arg Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly His Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
35 40 45

Ser Tyr Gly Val Lys Asp Thr Asp Lys Gly Glu Val Ser Asp Gly Tyr
50 55 60

Ser Val Ser Arg Ser Lys Thr Glu Asp Phe Leu Leu Thr Leu Glu Ser
65 70 75 80

[0014]

Ala Thr Ser Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ile Ser Glu Val
85 90 95

Gly Val Gly Gln Pro Gln His Phe Gly Asp Gly Thr Arg Leu Ser Ile
100 105 110

Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu
115 120 125

Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys
130 135 140

Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val
145 150 155 160

Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr
165 170 175

Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser
180 185 190

Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln
195 200 205

Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys
210 215 220

Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys
225 230 235 240

Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile
245 250 255

Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val
[0015] 260 265 270

Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
275 280 285

<210> 11
<211> 247
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合 DMF5 α 链

<400> 11

Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly
1 5 10 15

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser

20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met
35 40 45

Phe Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln
50 55 60

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln
65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Phe Gly Gly Gly
85 90 95

Lys Leu Ile Phe Gly Gln Gly Thr Glu Leu Ser Val Lys Pro Tyr Ile
100 105 110

[0016]

Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln
115 120 125

Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val
130 135 140

Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu
145 150 155 160

Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser
165 170 175

Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala
180 185 190

Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys

195 200 205

Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met
210 215 220

Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met
225 230 235 240

Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
245

<210> 12
<211> 285
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
[0017] <223> 嵌合 DMF5 β 链

<400> 12

Ile Ala Gly Ile Thr Gln Ala Pro Thr Ser Gln Ile Leu Ala Ala Gly
1 5 10 15

Arg Arg Met Thr Leu Arg Cys Thr Gln Asp Met Arg His Asn Ala Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Leu Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr
35 40 45

Ser Asn Thr Ala Gly Thr Thr Gly Lys Gly Glu Val Pro Asp Gly Tyr
50 55 60

Ser Val Ser Arg Ala Asn Thr Asp Asp Phe Pro Leu Thr Leu Ala Ser
65 70 75 80

Ala Val Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Ser
85 90 95

Phe Gly Thr Glu Ala Phe Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Thr Val Val
100 105 110

Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
115 120 125

Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
130 135 140

Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
145 150 155 160

[0018]

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys
165 170 175

Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
180 185 190

Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
195 200 205

His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
210 215 220

Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
225 230 235 240

Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu
245 250 255

Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser
260 265 270

Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
275 280 285

<210> 13
<211> 137
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 变体
<222> (1)..(1)
<223> X 可为任何氨基酸

<400> 13

[0019] Xaa Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg
1 5 10 15

Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile
20 25 30

Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr
35 40 45

Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala
50 55 60

Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr
65 70 75 80

Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr
85 90 95

Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser
100 105 110

Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu
115 120 125

Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
130 135

<210> 14
<211> 26
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 14

Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn
1 5 10 15

[0020]

Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
20 25

<210> 15
<211> 173
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 变体
<222> (1)..(1)
<223> X 可为任何氨基酸

<400> 15

Xaa Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
1 5 10 15

Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
20 25 30

Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys
50 55 60

Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
65 70 75 80

Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
85 90 95

[0021]

His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
100 105 110

Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
115 120 125

Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu
130 135 140

Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser
145 150 155 160

Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
165 170

<210> 16
<211> 28

<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 16

Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Thr
1 5 10 15

Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
20 25

<210> 17
<211> 171
<212> PRT
<213> 小家鼠

<220>
<221> 变体
<222> (1)..(1)
[0022] <223> X 可为任何氨基酸

<400> 17

Xaa Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
1 5 10 15

Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
20 25 30

Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys
50 55 60

Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
65 70 75 80

Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
85 90 95

His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
100 105 110

Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
115 120 125

Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu
130 135 140

Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser
145 150 155 160

[0023] Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Arg Asn Arg
165 170

<210> 18
<211> 26
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 18

Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Thr
1 5 10 15

Leu Val Val Met Ala Met Val Arg Asn Arg
20 25

<210> 19
<211> 173
<212> PRT

<213> 小家鼠

<220>
<221> 变体
<222> (1)..(1)
<223> X可为任何氨基酸

<400> 19

Xaa Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
1 5 10 15

Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
20 25 30

Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
35 40 45

[0024]

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys
50 55 60

Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
65 70 75 80

Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
85 90 95

His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
100 105 110

Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
115 120 125

Ile Thr Ser Ala Ser Tyr His Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu
130 135 140

Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser
145 150 155 160

Gly Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Lys Lys Asn Ser
165 170

<210> 20
<211> 28
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 20

Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Gly
1 5 10 15

[0025]

Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Lys Lys Asn Ser
20 25

<210> 21
<211> 220
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 21

Lys Pro Gln Ala Pro Glu Leu Arg Ile Phe Pro Lys Lys Met Asp Ala
1 5 10 15

Glu Leu Gly Gln Lys Val Asp Leu Val Cys Glu Val Leu Gly Ser Val
20 25 30

Ser Gln Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Asn Ser Ser Ser Lys Leu Pro
35 40 45

Gln Pro Thr Phe Val Val Tyr Met Ala Ser Ser His Asn Lys Ile Thr
50 55 60

Trp Asp Glu Lys Leu Asn Ser Ser Lys Leu Phe Ser Ala Met Arg Asp
65 70 75 80

Thr Asn Asn Lys Tyr Val Leu Thr Leu Asn Lys Phe Ser Lys Glu Asn
85 90 95

Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Val Ile Ser Asn Ser Val Met Tyr Phe
100 105 110

Ser Ser Val Val Pro Val Leu Gln Lys Val Asn Ser Thr Thr Thr Lys
115 120 125

[0026]

Pro Val Leu Arg Thr Pro Ser Pro Val His Pro Thr Gly Thr Ser Gln
130 135 140

Pro Gln Arg Pro Glu Asp Cys Arg Pro Arg Gly Ser Val Lys Gly Thr
145 150 155 160

Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly
165 170 175

Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr Leu Ile Cys Tyr
180 185 190

His Arg Ser Arg Lys Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Leu Val Arg
195 200 205

Gln Glu Gly Lys Pro Arg Pro Ser Glu Lys Ile Val
210 215 220

<210> 22
<211> 192
<212> PRT
<213> 小家鼠

<400> 22

Leu Ile Gln Thr Pro Ser Ser Leu Leu Val Gln Thr Asn His Thr Ala
1 5 10 15

Lys Met Ser Cys Glu Val Lys Ser Ile Ser Lys Leu Thr Ser Ile Tyr
20 25 30

Trp Leu Arg Glu Arg Gln Asp Pro Lys Asp Lys Tyr Phe Glu Phe Leu
35 40 45

Ala Ser Trp Ser Ser Ser Lys Gly Val Leu Tyr Gly Glu Ser Val Asp
50 55 60

[0027]

Lys Lys Arg Asn Ile Ile Leu Glu Ser Ser Asp Ser Arg Arg Pro Phe
65 70 75 80

Leu Ser Ile Met Asn Val Lys Pro Glu Asp Ser Asp Phe Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Thr Val Gly Ser Pro Lys Met Val Phe Gly Thr Gly Thr Lys Leu
100 105 110

Thr Val Val Asp Val Leu Pro Thr Thr Ala Pro Thr Lys Lys Thr Thr
115 120 125

Leu Lys Met Lys Lys Lys Lys Gln Cys Pro Phe Pro His Pro Glu Thr
130 135 140

Gln Lys Gly Leu Thr Cys Ser Leu Thr Thr Leu Ser Leu Leu Val Val

145 150 155 160

Cys Ile Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu Gly Val Ala Val Tyr Phe Tyr
165 170 175

Cys Val Arg Arg Arg Ala Arg Ile His Phe Met Lys Gln Phe His Lys
180 185 190

<210> 23
<211> 214
<212> PRT
<213> 智人

<400> 23

Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu Gly Glu
1 5 10 15

[0028]

Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly
20 25 30

Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Phe
35 40 45

Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp
50 55 60

Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val Leu Thr
65 70 75 80

Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala
85 90 95

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu
100 105 110

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
115 120 125

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
130 135 140

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
145 150 155 160

Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu
165 170 175

Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His Arg Asn Arg Arg Arg
180 185 190

[0029] Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser Gly Asp Lys Pro Ser
195 200 205

Leu Ser Ala Arg Tyr Val
210

<210> 24
<211> 189
<212> PRT
<213> 智人

<400> 24

Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val
1 5 10 15

Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr
20 25 30

Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp Ser His His Glu Phe
35 40 45

Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val
50 55 60

Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala Ser Arg Phe Ile Leu
65 70 75 80

Asn Leu Thr Ser Val Lys Pro Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Phe Cys Met
85 90 95

Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Gln Leu Ser
100 105 110

Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala Gln Pro Thr Lys Lys Ser Thr
[0030] 115 120 125

Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly
130 135 140

Pro Leu Cys Ser Pro Ile Thr Leu Gly Leu Leu Val Ala Gly Val Leu
145 150 155 160

Val Leu Leu Val Ser Leu Gly Val Ala Ile His Leu Cys Cys Arg Arg
165 170 175

Arg Arg Ala Arg Leu Arg Phe Met Lys Gln Phe Tyr Lys
180 185

<210> 25
<211> 224
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 具有 loxp 位点的嵌合 CD8a（氨基酸序列）

<220>
<221> 变体
<222> (173)..(173)
<223> X 可为 S、F、L、Y、C 或 W

<400> 25

Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr Trp Asn Leu Gly Glu
1 5 10 15

Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly
20 25 30

[0031] Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala Ala Ser Pro Thr Phe
35 40 45

Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala Ala Glu Gly Leu Asp
50 55 60

Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp Thr Phe Val Leu Thr
65 70 75 80

Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr Tyr Phe Cys Ser Ala
85 90 95

Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe Val Pro Val Phe Leu
100 105 110

Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala
115 120 125

Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg
130 135 140

Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys
145 150 155 160

Asp Ile Thr Ser Tyr Ser Ile His Tyr Thr Lys Leu Xaa Ile Trp Ala
165 170 175

Pro Leu Ala Gly Ile Cys Val Ala Leu Leu Leu Ser Leu Ile Ile Thr
180 185 190

Leu Ile Cys Tyr His Arg Ser Arg Lys Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg
195 200 205

[0032] Pro Leu Val Arg Gln Glu Gly Lys Pro Arg Pro Ser Glu Lys Ile Val
210 215 220

<210> 26
<211> 199
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 具有 loxp 位点的嵌合 CD8b（氨基酸序列）

<220>
<221> 变体
<222> (161)..(161)
<223> X 可为 S、F、L、Y、C 或 W

<400> 26

Leu Gln Gln Thr Pro Ala Tyr Ile Lys Val Gln Thr Asn Lys Met Val
1 5 10 15

Met Leu Ser Cys Glu Ala Lys Ile Ser Leu Ser Asn Met Arg Ile Tyr
20 25 30

Trp Leu Arg Gln Arg Gln Ala Pro Ser Ser Asp Ser His His Glu Phe
35 40 45

Leu Ala Leu Trp Asp Ser Ala Lys Gly Thr Ile His Gly Glu Glu Val
50 55 60

Glu Gln Glu Lys Ile Ala Val Phe Arg Asp Ala Ser Arg Phe Ile Leu
65 70 75 80

Asn Leu Thr Ser Val Lys Pro Glu Asp Ser Gly Ile Tyr Phe Cys Met
85 90 95

[0033]

Ile Val Gly Ser Pro Glu Leu Thr Phe Gly Lys Gly Thr Gln Leu Ser
100 105 110

Val Val Asp Phe Leu Pro Thr Thr Ala Gln Pro Thr Lys Lys Ser Thr
115 120 125

Leu Lys Lys Arg Val Cys Arg Leu Pro Arg Pro Glu Thr Gln Lys Gly
130 135 140

Pro Leu Cys Ser Pro Ile Thr Ser Tyr Ser Ile His Tyr Thr Lys Leu
145 150 155 160

Xaa Leu Ser Leu Leu Val Val Cys Ile Leu Leu Leu Leu Ala Phe Leu
165 170 175

Gly Val Ala Val Tyr Phe Tyr Cys Val Arg Arg Arg Ala Arg Ile His
180 185 190

Phe Met Lys Gln Phe His Lys
195

<210> 27
<211> 341
<212> PRT
<213> 智人

<400> 27

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
35 40 45

[0034]

Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr
50 55 60

Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr
65 70 75 80

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln
85 90 95

Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly
100 105 110

Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu
115 120 125

Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys

130 135 140

His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175

Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
180 185 190

Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
210 215 220

[0035]

Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg
245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
260 265 270

Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile
275 280 285

Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala
290 295 300

Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr

305 310 315 320

Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu
325 330 335

Thr Ala Cys Lys Val
340

<210> 28
<211> 341
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HLA-A2 α链 A245V

<400> 28

[0036] Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
35 40 45

Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr
50 55 60

Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr
65 70 75 80

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln
85 90 95

Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly
100 105 110

Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu
115 120 125

Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys
130 135 140

His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175

[0037]

Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
180 185 190

Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
210 215 220

Thr Gln Asp Thr Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr
225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Val Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg
245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
260 265 270

Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile
275 280 285

Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala
290 295 300

Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr
305 310 315 320

Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu
325 330 335

Thr Ala Cys Lys Val
340

[0038] <210> 29
<211> 341
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> HLA-A2 α链 D227K/T228A

<400> 29

Gly Ser His Ser Met Arg Tyr Phe Phe Thr Ser Val Ser Arg Pro Gly
1 5 10 15

Arg Gly Glu Pro Arg Phe Ile Ala Val Gly Tyr Val Asp Asp Thr Gln
20 25 30

Phe Val Arg Phe Asp Ser Asp Ala Ala Ser Gln Arg Met Glu Pro Arg
35 40 45

Ala Pro Trp Ile Glu Gln Glu Gly Pro Glu Tyr Trp Asp Gly Glu Thr

50 55 60

Arg Lys Val Lys Ala His Ser Gln Thr His Arg Val Asp Leu Gly Thr
65 70 75 80

Leu Arg Gly Tyr Tyr Asn Gln Ser Glu Ala Gly Ser His Thr Val Gln
85 90 95

Arg Met Tyr Gly Cys Asp Val Gly Ser Asp Trp Arg Phe Leu Arg Gly
100 105 110

Tyr His Gln Tyr Ala Tyr Asp Gly Lys Asp Tyr Ile Ala Leu Lys Glu
115 120 125

Asp Leu Arg Ser Trp Thr Ala Ala Asp Met Ala Ala Gln Thr Thr Lys
130 135 140

[0039]

His Lys Trp Glu Ala Ala His Val Ala Glu Gln Leu Arg Ala Tyr Leu
145 150 155 160

Glu Gly Thr Cys Val Glu Trp Leu Arg Arg Tyr Leu Glu Asn Gly Lys
165 170 175

Glu Thr Leu Gln Arg Thr Asp Ala Pro Lys Thr His Met Thr His His
180 185 190

Ala Val Ser Asp His Glu Ala Thr Leu Arg Cys Trp Ala Leu Ser Phe
195 200 205

Tyr Pro Ala Glu Ile Thr Leu Thr Trp Gln Arg Asp Gly Glu Asp Gln
210 215 220

Thr Gln Lys Ala Glu Leu Val Glu Thr Arg Pro Ala Gly Asp Gly Thr

225 230 235 240

Phe Gln Lys Trp Ala Ala Val Val Val Pro Ser Gly Gln Glu Gln Arg
245 250 255

Tyr Thr Cys His Val Gln His Glu Gly Leu Pro Lys Pro Leu Thr Leu
260 265 270

Arg Trp Glu Pro Ser Ser Gln Pro Thr Ile Pro Ile Val Gly Ile Ile
275 280 285

Ala Gly Leu Val Leu Phe Gly Ala Val Ile Thr Gly Ala Val Val Ala
290 295 300

Ala Val Met Trp Arg Arg Lys Ser Ser Asp Arg Lys Gly Gly Ser Tyr
305 310 315 320

[0040]

Ser Gln Ala Ala Ser Ser Asp Ser Ala Gln Gly Ser Asp Val Ser Leu
325 330 335

Thr Ala Cys Lys Val
340

<210> 30
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> Mart-1 肽

<400> 30

Glu Leu Ala Gly Ile Gly Ile Leu Thr Val
1 5 10

<210> 31
<211> 9
<212> PRT
<213> 人乳头状瘤病毒 16 型

<400> 31

Lys Leu Pro Gln Leu Cys Thr Glu Leu
1 5

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> 人乳头状瘤病毒 16 型

<400> 32

Gly Thr Leu Gly Ile Val Cys Pro Ile
1 5

[0041]

<210> 33
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 33

Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Val
1 5

<210> 34
<211> 9
<212> PRT
<213> 智人

<400> 34

Ile Leu Leu Trp Gln Pro Ile Pro Val
1 5

<210> 35
<211> 250
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合 C259 α 链

<400> 35

Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu Ser Val Pro Glu Gly Glu
1 5 10 15

Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp Ser Ala Ile Tyr Asn Leu
20 25 30

Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly Leu Thr Ser Leu Leu Leu
35 40 45

[0042]

Ile Pro Phe Trp Gln Arg Glu Gln Thr Ser Gly Arg Leu Asn Ala Ser
50 55 60

Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu Tyr Ile Ala Ala Ser Gln
65 70 75 80

Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Arg Pro Leu Tyr Gly
85 90 95

Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly Thr Ser Leu Ile Val His
100 105 110

Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro
115 120 125

Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln

130 135 140

Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys
145 150 155 160

Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile
165 170 175

Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu
180 185 190

Thr Asn Ala Thr Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu
195 200 205

Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu
210 215 220

[0043]

Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn
225 230 235 240

Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
245 250

<210> 36
<211> 285
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 嵌合 C259 β 链

<400> 36

Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu Lys Thr Gly Gln
1 5 10 15

Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His Glu Tyr Met Ser
20 25 30

Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu Ile His Tyr Ser
35 40 45

Val Ser Val Gly Met Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro Asn Gly Tyr Asn
50 55 60

Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg Leu Leu Ser Ala
65 70 75 80

Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Tyr Val Gly
85 90 95

[0044]

Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg Leu Thr Val Leu
100 105 110

Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
115 120 125

Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
130 135 140

Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
145 150 155 160

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr Lys
165 170 175

Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
180 185 190

Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
195 200 205

His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
210 215 220

Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
225 230 235 240

[0045]

Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu
245 250 255

Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser
260 265 270

Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
275 280 285

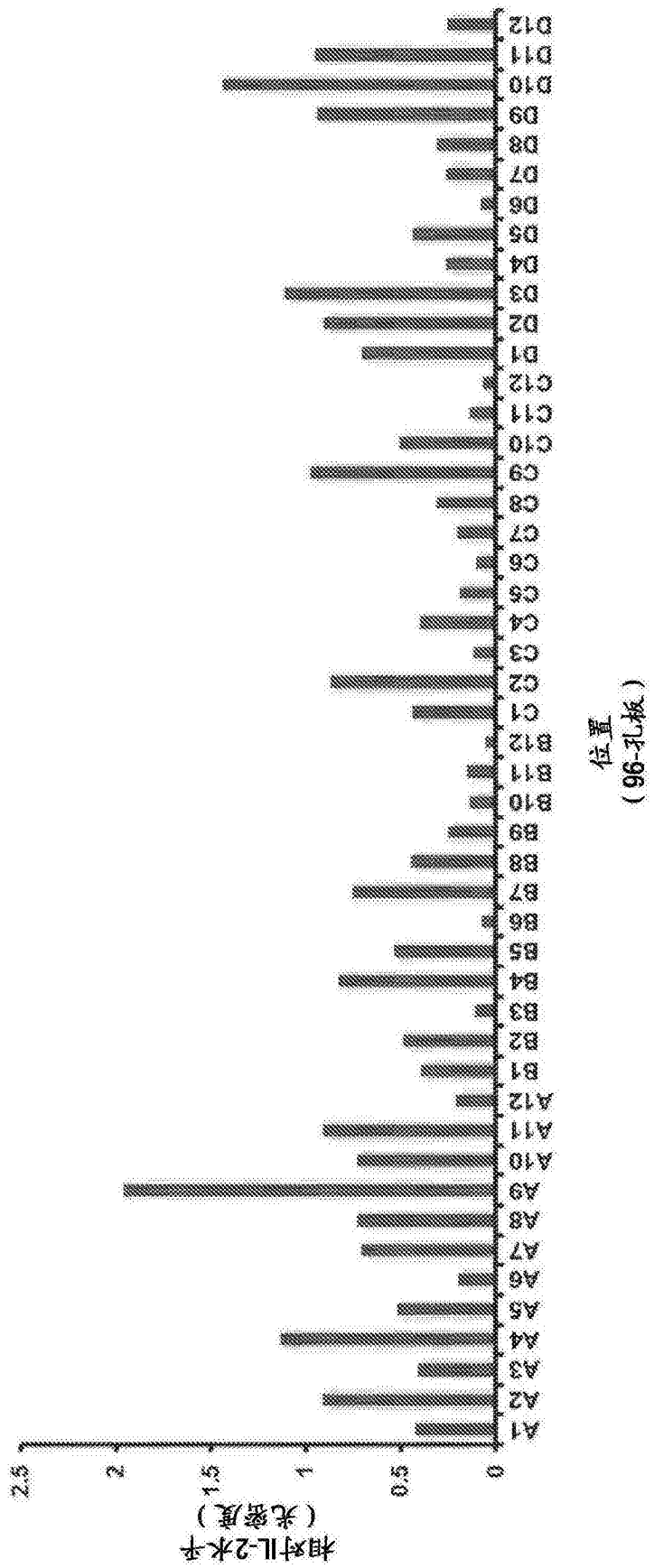

相对IL-2水平
（光密度）
2.5
2
1.5
1
0.5
0
位置
（96孔板）
A1
A2
A3
A4
A5
A6
A7
A8
A9
A10
A11
A12
B1
B2
B3
B4
B5
B6
B7
B8
B9
B10
B11
B12
C1
C2
C3
C4
C5
C6
C7
C8
C9
C10
C11
C12
D1
D2
D3
D4
D5
D6
D7
D8
D9
D10
D11
D12

图1

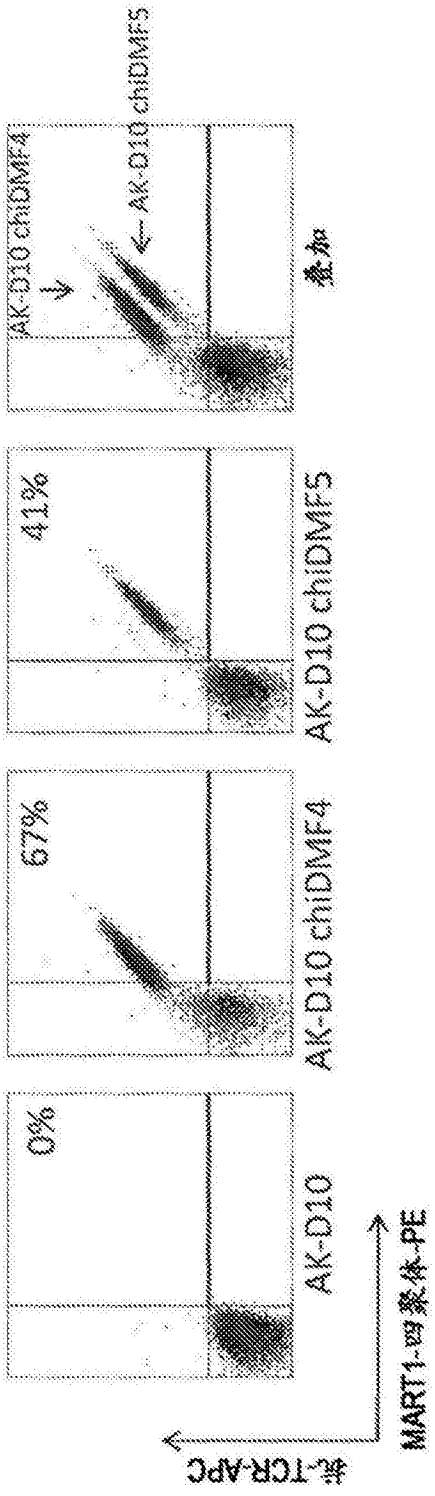

AK-D10 chIDMF4
AK-D10 chIDMF5
叠加
41%
AK-D10 chIDMF5
67%
AK-D10 chIDMF4
0%
AK-D10
MART1-四聚体-PE
抗-TCR-APC

图2A

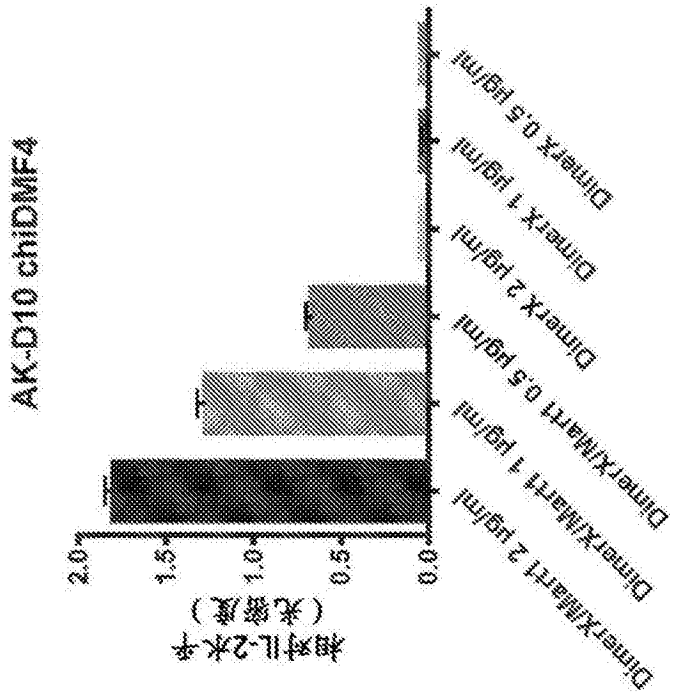

AK-D10 chiDMF4
相对IL-2水平
（光密度）
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
DimerX/Mart1 2 μg/ml
DimerX/Mart1 1 μg/ml
DimerX/Mart1 0.5 μg/ml
DimerX 2 μg/ml
DimerX 1 μg/ml
DimerX 0.5 μg/ml

图2B

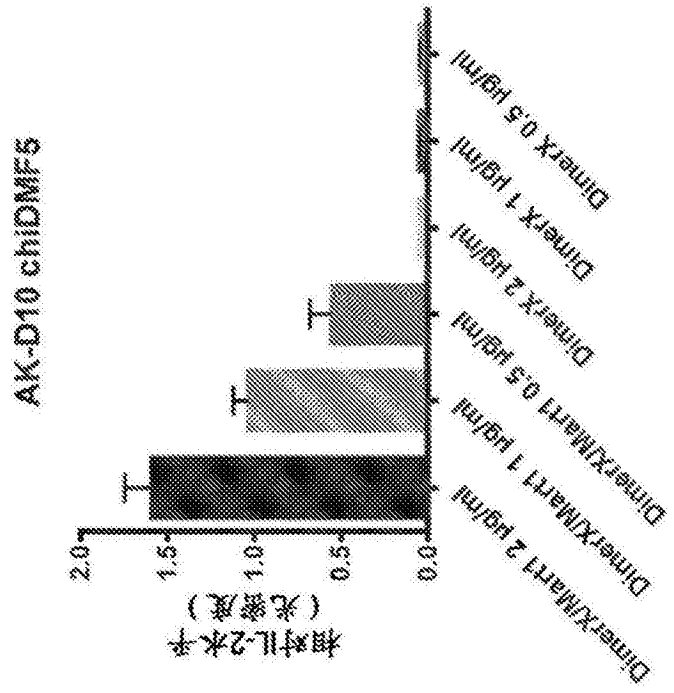

AK-D10 chiDMF5
相对IL-2水平
（光密度）
2.0
1.5
1.0
0.5
0.0
DimerX/Mart1 2 μg/ml
DimerX/Mart1 1 μg/ml
DimerX/Mart1 0.5 μg/ml
DimerX 2 μg/ml
DimerX 1 μg/ml
DimerX 0.5 μg/ml

图2C

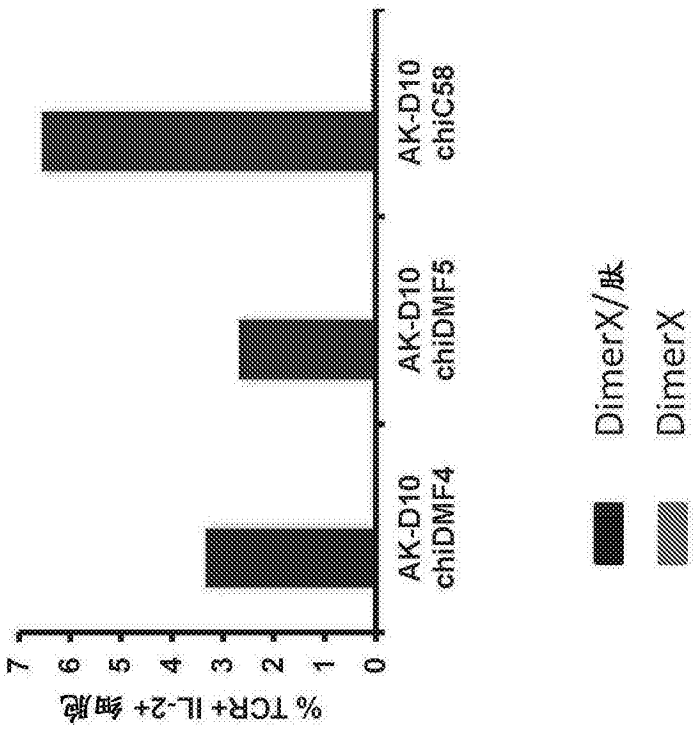

% TCR+ IL-2+ 细胞
0
1
2
3
4
5
6
7
AK-D10 chiDMF4
AK-D10 chiDMF5
AK-D10 chiC58
DimerX/肽
DimerX

图2D

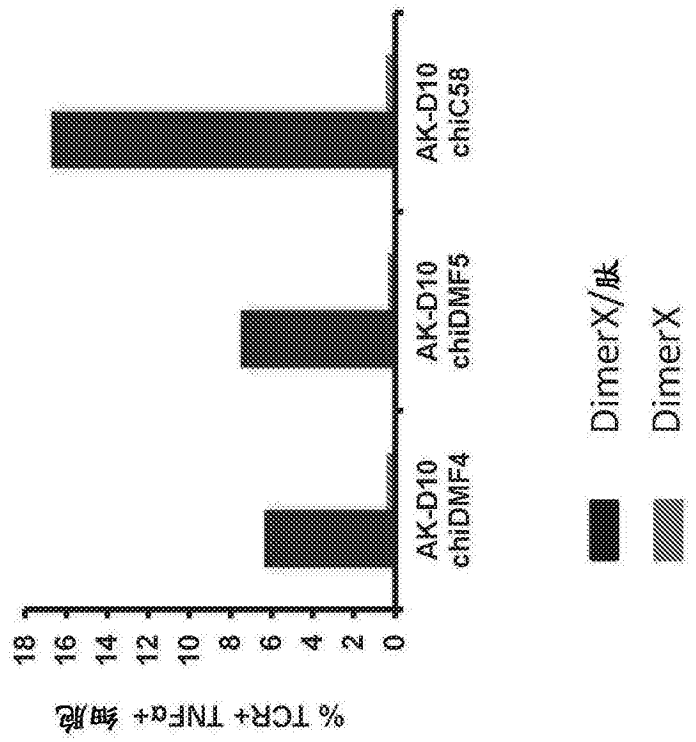

% TCR+ TNFα+ 细胞
0
2
4
6
8
10
12
14
16
18
AK-D10 chiDMF4
AK-D10 chiDMF5
AK-D10 chiC58
DimerX/肽
DimerX

图2E

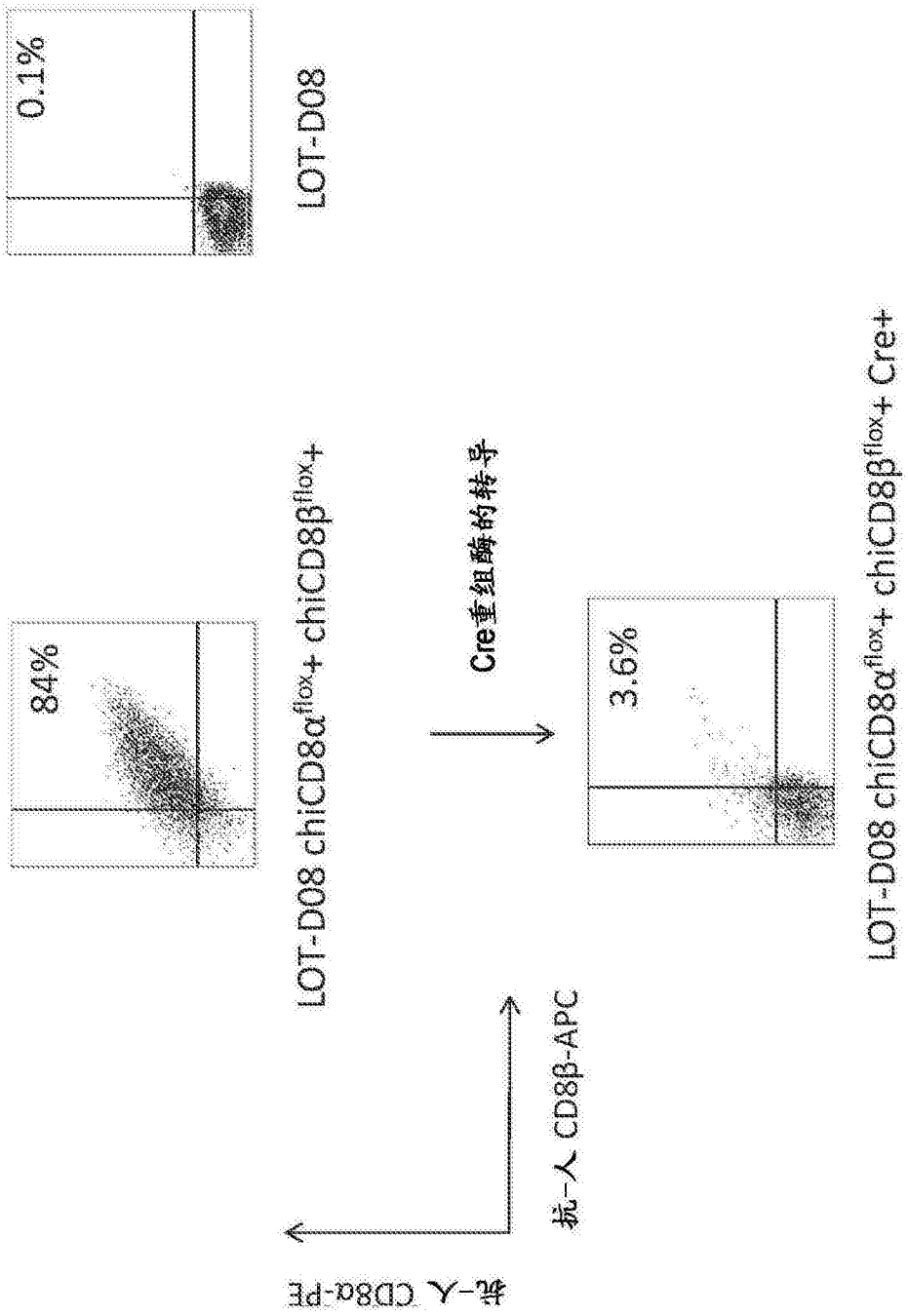

0.1%
LOT-D08
84%
LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+
Cre重组酶的转导
3.6%
LOT-D08 chiCD8α^{flox}+ chiCD8β^{flox}+ Cre+
抗-人 CD8β-APC
抗-人 CD8α-PE

图3

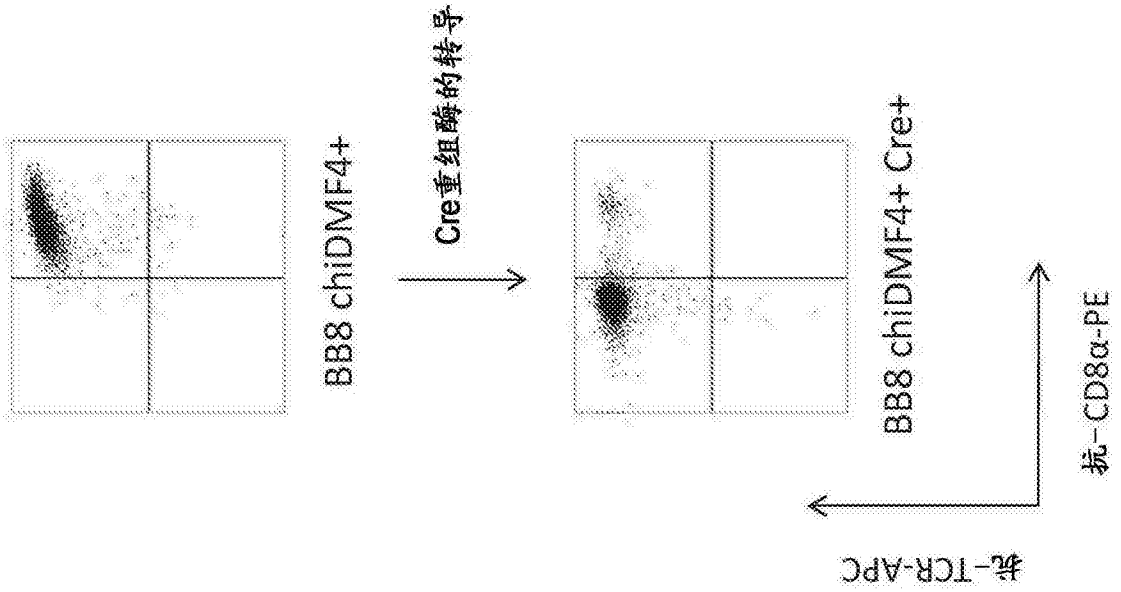

BB8 chiDMF4+
Cre重组酶的转导
BB8 chiDMF4+ Cre+
抗-CD8α-PE
抗-TCR-APC

图4A

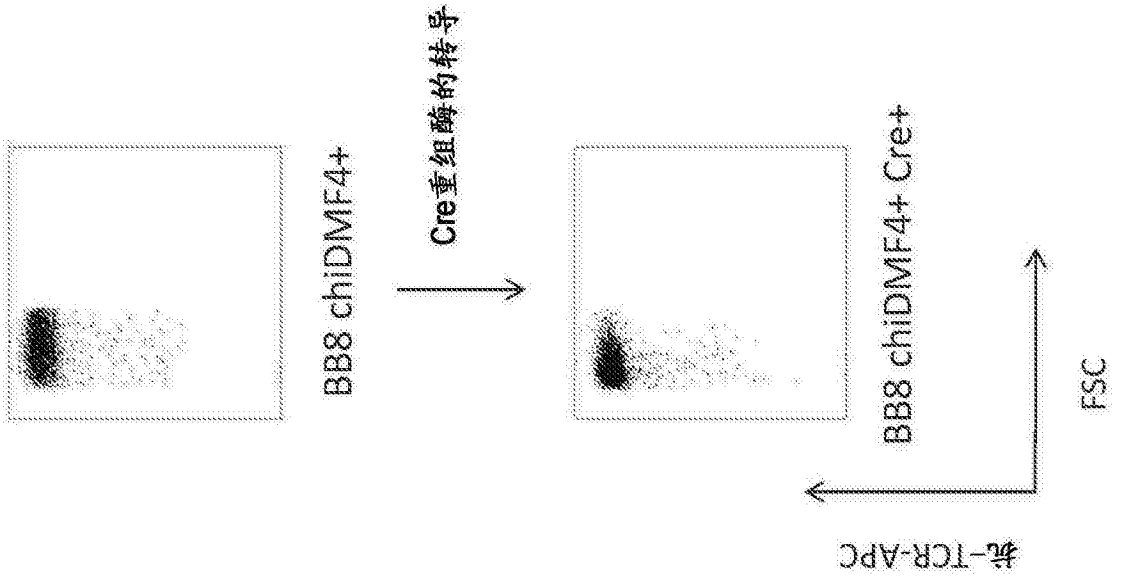

BB8 chiDMF4+
Cre重组酶的转导
BB8 chiDMF4+ Cre+
FSC
抗-TCR-APC

图4B

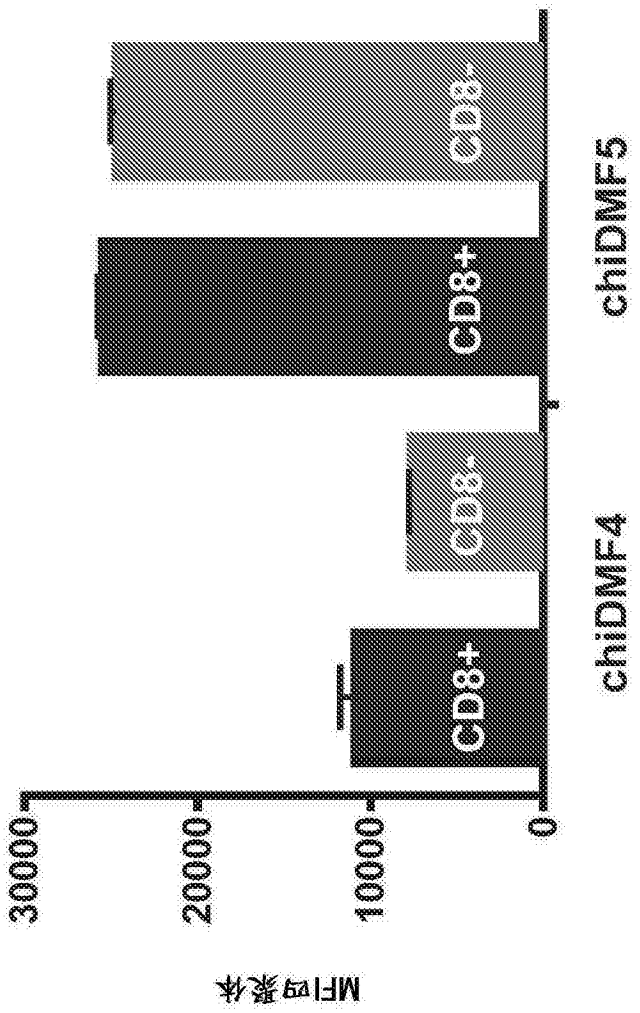


图4C

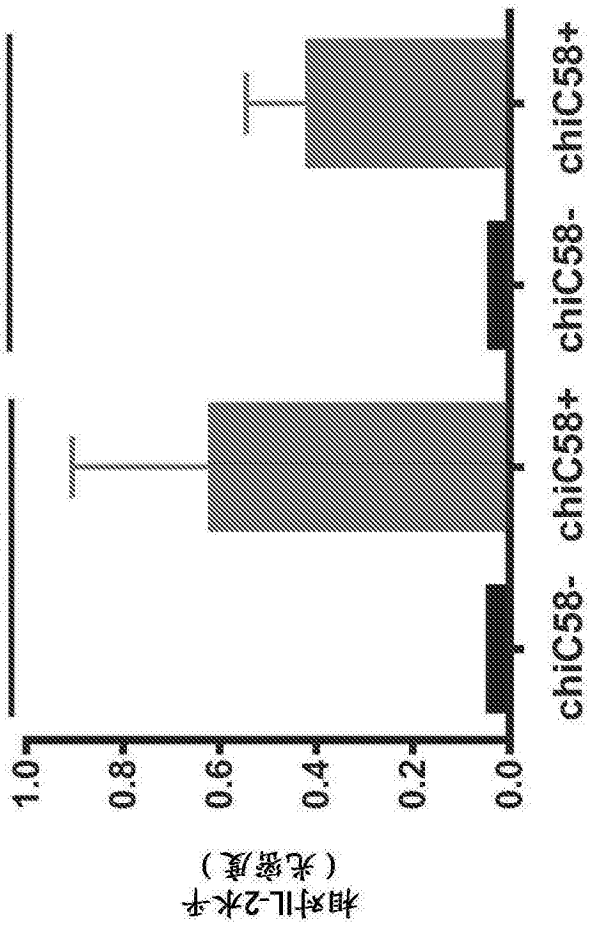
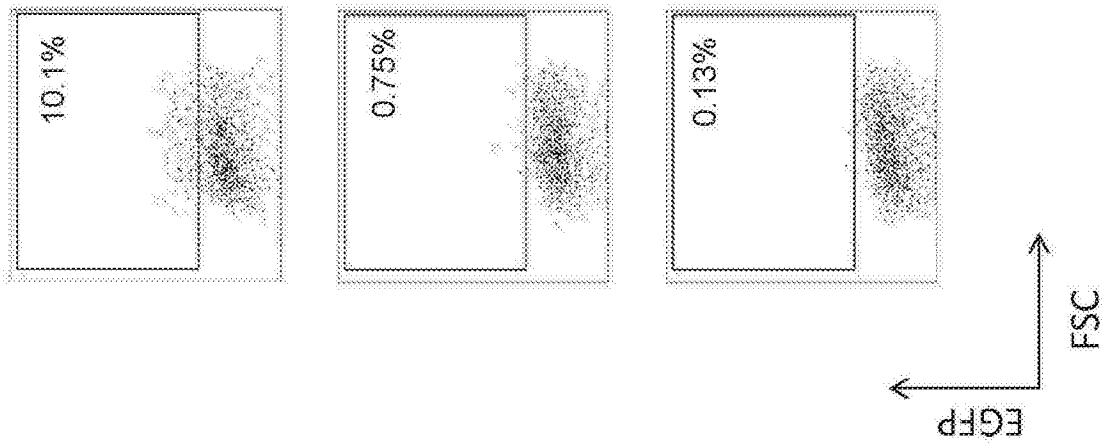
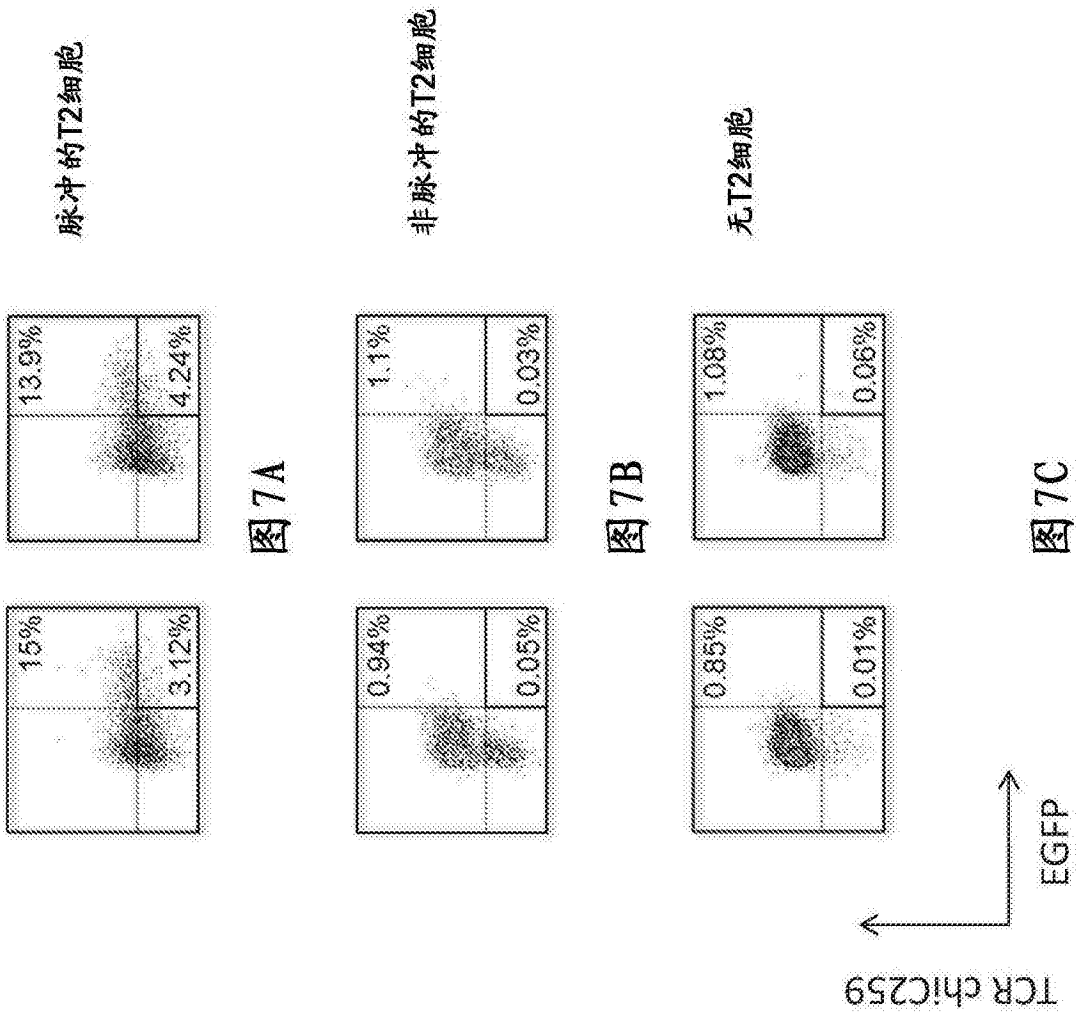

αCD3
αCD3/αCD28
chiC58-
chiC58+
chiC58-
chiC58+
0.0
0.2
0.4
0.6
0.8
1.0
相对IL-2水平
（光密度）

图5


AK-D10 IL-2-(NFAT)3-EGFP+ chiDMF4+
与抗-CD3抗体孵育
10.1%
图6A
AK-D10 IL-2-(NFAT)3-EGFP+ chiDMF4+
不与抗-CD3抗体孵育
0.75%
图6B
AK-D10 IL-2-(NFAT)3-EGFP+
与抗-CD3抗体孵育
0.13%
图6C
EGFP
FSC


脉冲的T2细胞
13.9%
4.24%
15%
3.12%
图7A
非脉冲的T2细胞
1.1%
0.03%
0.94%
0.05%
图7B
无T2细胞
1.08%
0.06%
0.85%
0.01%
图7C
EGFP
TCR chiC259

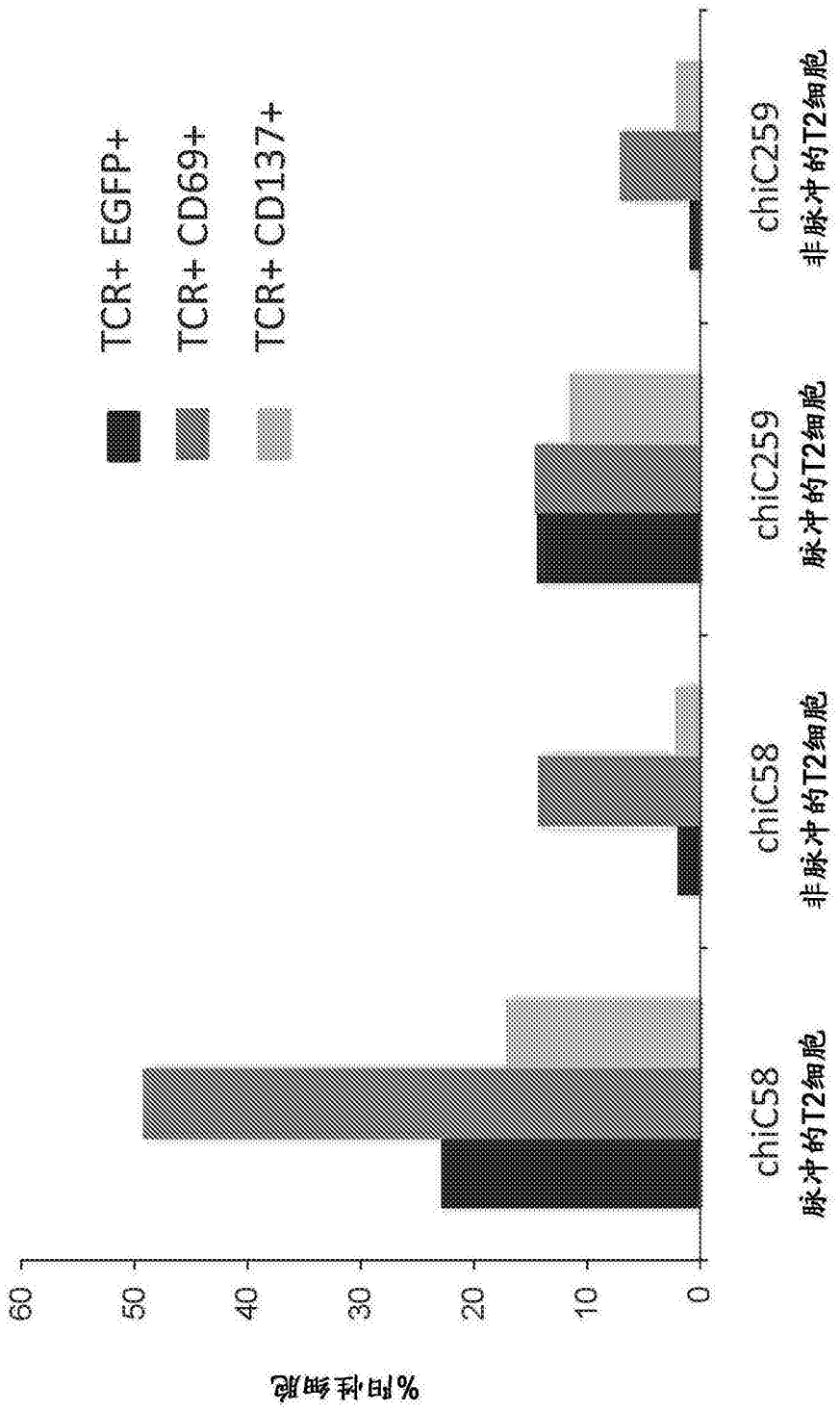

TCR+ EGFP+
TCR+ CD69+
TCR+ CD137+
%阳性细胞
0
10
20
30
40
50
60
chiC58
脉冲的T2细胞
chiC58
非脉冲的T2细胞
chiC259
脉冲的T2细胞
chiC259
非脉冲的T2细胞

图8

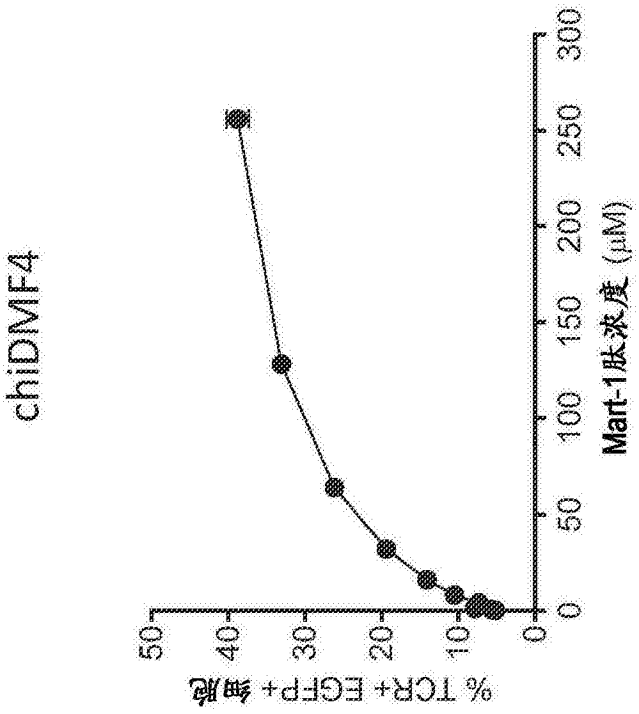

chiDMF4
% TCR+ EGFP+ 细胞
Mart-1肽浓度 (μM)
0
10
20
30
40
50
0
50
100
150
200
250
300

图9A

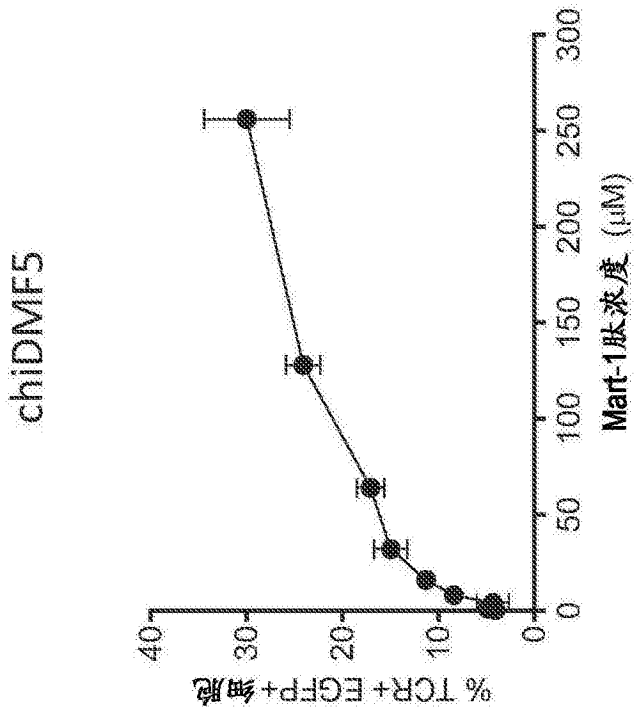

chiDMF5
% TCR+ EGFP+ 细胞
Mart-1肽浓度 (μM)
0
10
20
30
40
0
50
100
150
200
250
300

图9B

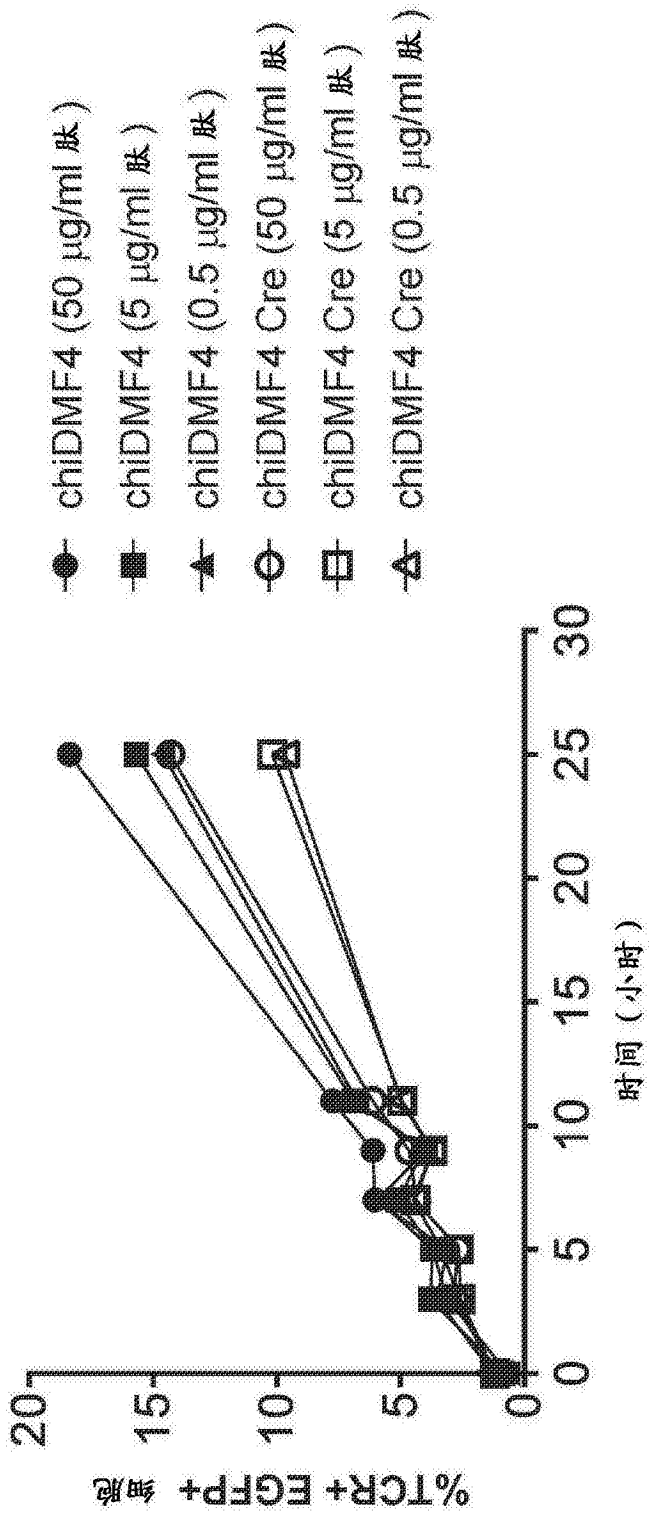

chiDMF4 (50 μg/ml 肽)
chiDMF4 (5 μg/ml 肽)
chiDMF4 (0.5 μg/ml 肽)
chiDMF4 Cre (50 μg/ml 肽)
chiDMF4 Cre (5 μg/ml 肽)
chiDMF4 Cre (0.5 μg/ml 肽)
%TCR+ EGFP+ 细胞
20
15
10
5
0
0
5
10
15
20
25
30
时间（小时）

图10A

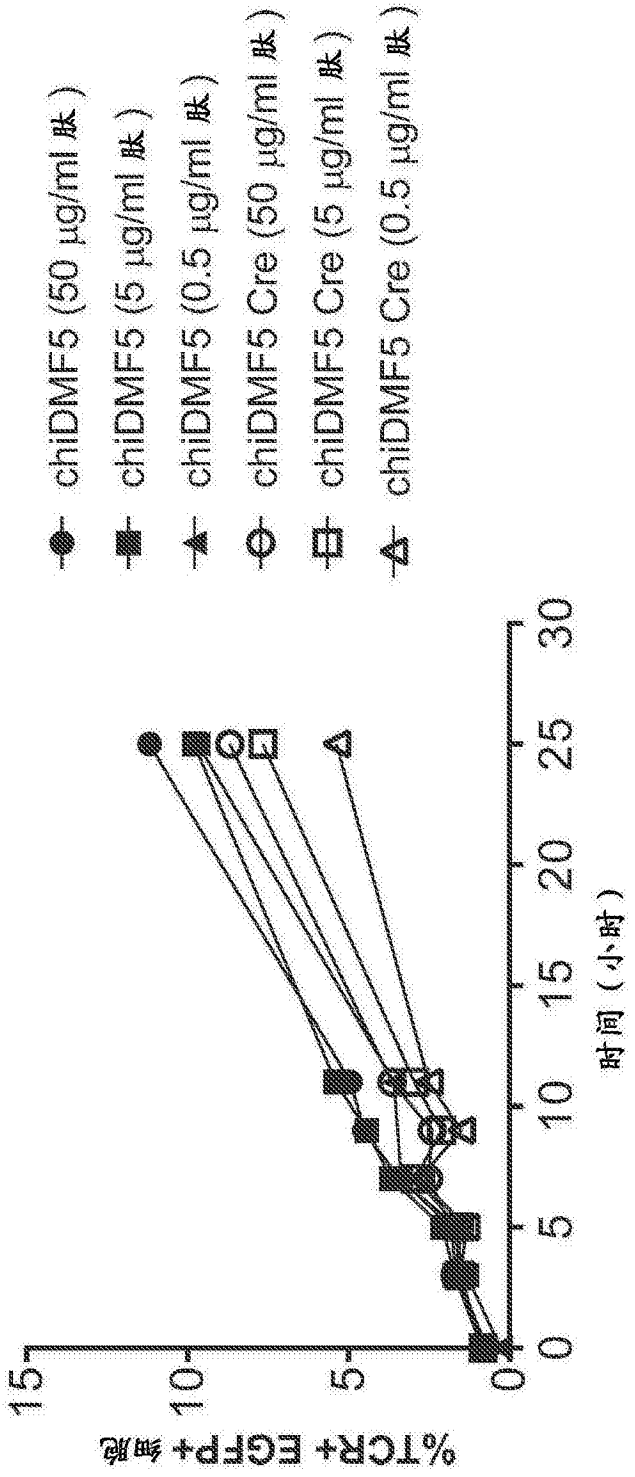

chiDMF5 (50 μg/ml 肽)
chiDMF5 (5 μg/ml 肽)
chiDMF5 (0.5 μg/ml 肽)
chiDMF5 Cre (50 μg/ml 肽)
chiDMF5 Cre (5 μg/ml 肽)
chiDMF5 Cre (0.5 μg/ml 肽)
%TCR+ EGFP+ 细胞
15
10
5
0
0
5
10
15
20
25
30
时间（小时）

图10B