



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 114641487 A

(43) 申请公布日 2022.06.17

(21) 申请号 202080074667.X

(22) 申请日 2020.10.22

(30) 优先权数据

1915359.2 2019.10.23 GB

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.04.22

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2020/052657 2020.10.22

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/079120 EN 2021.04.29

(71) 申请人 UCL商业有限公司

地址 英国伦敦

(72) 发明人 H·施陶斯 S·托马斯

O·普雷汉姆

(74) 专利代理机构 北京市中咨律师事务所  
11247

专利代理师 黄革生 隋晓平

(51) Int.Cl.

*C07K 14/725* (2006.01)

*C07K 14/47* (2006.01)

*G12N 5/0783* (2006.01)

*A61K 35/17* (2006.01)

权利要求书2页 说明书32页

序列表35页 附图23页

(54) 发明名称

工程化的调节性T细胞

(57) 摘要

本发明涉及工程化的调节性T细胞(Treg)，其包含能够在髓鞘碱性蛋白(MBP)肽由主要组织相容性复合体(MHC)分子呈递时，与该肽或其变体或片段特异性结合的T细胞受体(TCR)。本发明还涉及提供工程化的Treg的方法并涉及所述工程化Treg和编码所述Treg的载体和载体套件的方法和用途。

1. 工程化的Treg,其包含T细胞受体(TCR),其中TCR包含 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链,其中 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链各自包含三个互补决定区(CDR)并且各自的CDR3的序列如下:  
CDR3 $\alpha$ -TVYGGATNKLI (SEQ ID NO:1)  
CDR3 $\beta$ -SARGGSYNSPLH (SEQ ID NO:2)  
或这些序列的具有多达三个氨基酸变化的变体。
2. 根据权利要求1所述的工程化Treg,其中TCR的 $\alpha$ 链包含三个具有以下氨基酸序列的CDR:  
CDR1 $\alpha$ -TISGTDY (SEQ ID NO:3)  
CDR2 $\alpha$ -GLTSN (SEQ ID NO:4)  
CDR3 $\alpha$ -TVYGGATNKLI (SEQ ID NO:1)  
或这些序列的具有多达三个氨基酸变化的变体;  
并且其中TCR的 $\beta$ 链包含三个具有以下氨基酸序列的CDR:  
CDR1 $\beta$ -DFQATT (SEQ ID NO:5)  
CDR2 $\beta$ -SNEGSKA (SEQ ID NO:6)  
CDR3 $\beta$ -SARGGSYNSPLH (SEQ ID NO:2)  
或这些序列的具有多达三个氨基酸变化的变体。
3. 根据权利要求2所述的工程化Treg,其中:
  - a) TCR的 $\alpha$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:7具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,其中序列同一性不包含如权利要求4中限定的CDR序列;并且
  - b) TCR的 $\beta$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,其中序列同一性不包含如权利要求4中限定的CDR序列。
4. 根据权利要求1至3中任一项所述的工程化Treg,其中:
  - (a) TCR的 $\beta$ 链包含人恒定区氨基酸序列,其在对应于如SEQ ID NO:27所示的位置22处包含半胱氨酸残基;或者
  - (b) TCR的 $\alpha$ 链包含与SEQ ID NO:26具有至少80%序列同一性的人恒定区氨基酸序列和/或TCR的 $\beta$ 链包含与SEQ ID NO:27具有至少80%序列同一性的人恒定区氨基酸序列。
5. 根据任一前述权利要求所述的工程化Treg,其中TCR的 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链的恒定区结构域各自包含额外的半胱氨酸残基,从而使得在 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链之间形成额外二硫键成为可能。
6. 根据任一前述权利要求所述的工程化Treg,其中:
  - (a) TCR的 $\alpha$ 链包含与SEQ ID NO:9具有80%序列同一性的氨基酸序列;并且
  - (b) TCR的 $\beta$ 链包含与SEQ ID NO:10具有80%序列同一性的氨基酸序列。
7. 根据任一前述权利要求所述的工程化Treg,其中Treg衍生自从受试者分离的T细胞。
8. 药物组合物,包含根据任一前述权利要求所述的工程化Treg。
9. 根据任一前述权利要求所述的工程化Treg或药物组合物,用于治疗疾病。
10. 根据权利要求1至8中任一项所述的工程化Treg或药物组合物在制备药物中的用途。
11. 在有需要的受试者中治疗或预防疾病的方法,所述方法包括步骤:向受试者施用根据权利要求1至8中任一项所述的工程化Treg或药物组合物。
12. 根据权利要求9至11中任一项所述的工程化Treg或药物组合物用法、用途或方法,

其中疾病是多发性硬化。

13. 根据权利要求9至12中任一项所述的工程化Treg或药物组合物用法、用途或方法，其中受试者为HLADRB1\*0401阳性受试者。

14. 载体，其包含了编码如权利要求1至7中任一项所限定的TCR的核酸序列和编码FOXP3的核酸序列。

15. 根据权利要求14所述的载体，其中：

(a) 编码TCR $\alpha$ 链的核酸序列包含与SEQ ID NO:28或29具有至少90%序列同一性的序列；

(b) 编码TCR $\beta$ 链的核酸序列包含与SEQ ID NO:30或31具有至少90%序列同一性的序列；

(c) 核酸序列以5'  $\alpha$ 链- $\beta$ 链3'的方向提供TCR链，并包含(i) 编码TCR的 $\alpha$ 链并与SEQ ID NO:28具有至少90%序列同一性的序列和(ii) 编码TCR的 $\beta$ 链并与SEQ ID NO:30具有至少90%序列同一性的序列；或者

(d) 核酸序列以5'  $\beta$ 链- $\alpha$ 链3'的方向提供TCR链，并包含(i) 编码TCR的 $\beta$ 链并与SEQ ID NO:31具有至少90%序列同一性的序列和(ii) 编码TCR的 $\alpha$ 链并且与SEQ ID NO:29具有至少90%序列同一性的序列。

16. 多核苷酸或载体套件，所述套件包含第一多核苷酸或载体和第二多核苷酸或载体，所述第一多核苷酸或载体包含了编码如权利要求1至7中任一项所限定的TCR的核酸序列，所述第二多核苷酸或载体包含了编码FOXP3的核酸序列。

17. 多核苷酸或载体套件，所述套件包含如权利要求15中所定义的多核苷酸或载体。

18. 产生根据权利要求1至7中任一项的工程化Treg的方法，所述方法包括步骤：向体外或离体细胞引入编码根据权利要求1至9中任一项所限定的TCR的多核苷酸。

19. 根据权利要求18所述的方法，其中该方法还包括步骤：向体外或离体细胞引入编码FOXP3蛋白的多核苷酸。

20. 根据权利要求18所述的方法，其中细胞是T细胞。

21. 根据权利要求20所述的方法，其中T细胞是表达FOXP3的天然Treg。

22. 根据权利要求20所述的方法，其中T细胞是常规T细胞。

23. 根据权利要求19至权利要求22所述的方法，其中依次、分别或同时进行引入编码TCR的多核苷酸和编码FOXP3的多核苷酸的步骤。

24. 根据权利要求23所述的方法，其中使用根据权利要求16的载体，向细胞引入编码TCR的多核苷酸和编码FOXP3的多核苷酸。

## 工程化的调节性T细胞

### 发明领域

[0001] 本发明涉及工程化的调节性T细胞 (Treg)。特别地,本发明涉及包含T细胞受体 (TCR) 的Treg,所述T细胞受体能够与髓鞘碱性蛋白 (MBP) 特异性结合。本发明还涉及提供工程化Treg的方法并涉及所述工程化Treg的方法和用途。

### 背景技术

[0002] 许多自身免疫性和炎性中枢神经系统 (CNS) 疾病涉及自身反应性T细胞。例如,多发性硬化 (MS),其是中枢神经系统的自身免疫性炎性脱髓鞘性疾病并且是青年当中最常见的神经系统疾病。

[0003] 自身免疫性和炎性CNS疾病的现有治疗通常抑制免疫系统。例如,一种治疗包括移植骨髓连同施用细胞抑制剂和免疫抑制药物。自体造血干细胞移植可能对一些患者具有持久有益效果,但该程序需要与巨大毒性和风险相关的激进清髓预处理 (myelo-ablative conditioning)。

[0004] 尽管已经批准了几种降低临床复发频率的病情改善疗法 (DMT),但按照现行治疗方案,大部分患者继续在临床上加重。DMT或干细胞移植均不能介导对于自身免疫性疾病和炎性CNS疾病的免疫病理的CNS特异性抑制。

[0005] 目前,不存在有效的自身免疫性疾病和炎性CNS疾病疗法。治疗仅致力于减少其症状,通常借助于免疫系统的总体抑制。需要特异性靶向与CNS疾病的发作和进展相关的局部免疫应答的疗法。

### [0006] 发明概述

[0007] 本发明至少部分地基于发明人确定:T细胞受体基因转移技术可以用来产生抗原特异性Tregs。已经显示,人抗原特异性Tregs可以抑制活化的T细胞。

[0008] 特别地,发明人已经生产例如MBP特异性Tregs,通过将MBP-TCR基因经逆转录病毒转入纯化的Tregs和通过将MBP-TCR和叉头框P3 (FOXP3) 基因经逆转录病毒转入常规的CD4<sup>+</sup> T细胞来产生。不希望受理论约束,具有MBP特异性TCR的这些工程化的Tregs可以用于抑制例如自身免疫性疾病的疾病,其中,在中枢神经系统 (CNS) 内MBP特异性Tregs的局部活化可以抑制如MS和其他CNS炎性病征中所见的CNS病理。

[0009] 不希望受理论约束,出乎意料的是发明人已经能够开发出抑制致病性T细胞增殖的Treg。本领域先前提出,相比常规T细胞中的TCRs,Tregs中的TCR对自身抗原具有更高亲和力 (Pacholczyk和Kern, Immunology, 2008. 125 (4) 450-458,通过引用方式并入本文)。也已经被报道的是,经胰岛抗原特异性TCR转导的Tregs的有效性逊于表达病毒性抗原特异性TCR的Tregs。提出这可能归因于Treg特异性TCR要求-例如某种亲和力要求。因此,Treg组库是高度多样的并且认为与常规T细胞的组库相比,其具有不同的T细胞受体集合。发明人已经出乎意料地表明,从常规T细胞分离的MBP特异性TCR可以成功地表达于Treg细胞中并且可以产生有功能的Treg。

[0010] 此外,大量的TCR不能作为外源性TCR成功表达。无法预测哪些TCR可以作为外源

TCR有效表达,特别是在Treg中。

[0011] 因此,本发明提供工程化的调节性T细胞(Treg),其包含T细胞受体,其中TCR包含 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链,

[0012] 其中 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链各自包含三个互补决定区(CDR)并且每个CDR3的序列如下:

[0013] CDR3 $\alpha$ -TVYGGATNKLI (SEQ ID NO:1)

[0014] CDR3 $\beta$ -SARGGSYNSPLH (SEQ ID NO:2)

[0015] 或这些序列的具有多达三个氨基酸变化的变体。

[0016] 当多肽由主要组织相容性复合体(MHC)分子呈递时,TCR可以与多肽特异性结合,该多肽与MBP 111-129 (SEQ ID NO:12)或其片段有至少90%的一致性。

[0017] MBP111-129多肽与DRB1\*0401 (HLA-DR4)结合较弱。这与例如MBP81-99相反,后者以高亲和力与HLA-DR15结合。

[0018] TCR的 $\alpha$ 链可以包含三个具有以下氨基酸序列的CDR:

[0019] CDR1 $\alpha$ -TISGTDY (SEQ ID NO:3)

[0020] CDR2 $\alpha$ -GLTSN (SEQ ID NO:4)

[0021] CDR3 $\alpha$ -TVYGGATNKLI (SEQ ID NO:1)

[0022] 或这些序列的具有多达三个氨基酸变化的变体;

[0023] 并且TCR的 $\beta$ 链可以包含三个具有以下氨基酸序列的CDR:

[0024] CDR1 $\beta$ -DFQATT (SEQ ID NO:5)

[0025] CDR2 $\beta$ -SNEGSKA (SEQ ID NO:6)

[0026] CDR3 $\beta$ -SARGGSYNSPLH (SEQ ID NO:2)

[0027] 或这些序列的具有多达三个氨基酸变化的变体。

[0028] TCR的 $\alpha$ 链的可变区可以包含与SEQ ID NO:7具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,其中序列同一性不包含CDR序列;并且

[0029] TCR的 $\beta$ 链的可变区可以包含与SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性的氨基酸序列,其中序列同一性不包含CDR序列。

[0030] TCR的 $\alpha$ 链的可变区可以包含与SEQ ID NO:7具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;并且

[0031] TCR的 $\beta$ 链的可变区可以包含与SEQ ID NO:8具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。

[0032] TCR的 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链的恒定区结构域可以各自包含额外的半胱氨酸残基,从而使得在 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链之间形成额外二硫键成为可能。适当地,额外的二硫键减少与内源TCR链的错误配对。

[0033] 适当地,该TCR可包含如下恒定结构域:

[0034] (a) TCR的 $\beta$ 链可以包含人恒定区氨基酸序列,其在对应于如SEQ ID NO:27所示的第22位的位置上包含一个半胱氨酸残基;或

[0035] (b) TCR的 $\alpha$ 链可以包含与SEQ ID NO:26具有至少80%序列同一性的人恒定区氨基酸序列,和/或TCR的 $\beta$ 链可以包含与SEQ ID NO:27具有至少80%序列同一性的人恒定区氨基酸序列。

[0036] TCR的 $\alpha$ 链可以包含与SEQ ID NO:9具有至少80%序列同一性的氨基酸序列;并且

- [0037] TCR的β链可以包含与SEQ ID NO:10具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。
- [0038] 在一个方面,Treg衍生自从受试者分离的T细胞。
- [0039] 在另一个方面,本发明提供包含根据本发明的工程化Treg的药物组合物。
- [0040] 在一个方面,本发明涉及根据本发明的工程化Treg或药物组合物用于治疗疾病。
- [0041] 在另一个方面,本发明涉及根据本发明的工程化Treg或药物组合物在制备药物中的用途。
- [0042] 在一个方面,提供了一种在有需要的受试者中治疗或预防疾病的方法,所述方法包括步骤:向受试者施用本发明的工程化Treg或药物组合物。
- [0043] 在另一个方面,提供了根据本发明的工程化Treg或药物组合物用法、或用途或方法,其中疾病是多发性硬化。
- [0044] 在另一个方面,提供根据本发明的工程化Treg或药物组合物用法、或用途或方法,其中受试者为HLADRB1\*0401阳性受试者。
- [0045] 适当地,本发明提供了一种编码根据本发明的TCR的载体,其中:
- [0046] (a) 编码TCR的α链的核酸序列包含与SEQ ID NO:28或29具有至少90%序列同一性的序列;
- [0047] (b) 编码TCR的β链的核酸序列包含与SEQ ID NO:30或31具有至少90%序列同一性的序列;
- [0048] (c) 该核酸序列以5'α链-β链3'的方向提供TCR链,并且包含(i) 编码TCR的α链并与SEQ ID NO:28具有至少90%序列同一性的序列和(ii) 编码TCR的β链并与SEQ ID NO:30具有至少90%序列同一性的序列;或
- [0049] (d) 该核酸序列以5'β链-α链3'的方向提供TCR链,并且包含(i) 编码TCR的β链并与SEQ ID NO:31具有至少90%的序列同一性的序列;(ii) 编码TCR的α链的并与SEQ ID NO:29具有至少90%的序列同一性的序列。
- [0050] 在另一个方面,提供一种载体,其包含了编码如本文定义的TCR的核酸序列和编码FOXP3的核酸序列。
- [0051] 在一个方面,提供一种多核苷酸套件或载体套件,所述套件包含第一多核苷酸或载体和第二多核苷酸或载体,所述第一多核苷酸或载体包含了编码如本文定义的TCR的核酸序列,所述第二多核苷酸或载体包含了编码FOXP3的核酸序列。适当地,第一和第二多核苷酸或载体是分离的。
- [0052] 在一个方面,提供一种产生根据本发明的工程化Treg的方法,所述方法包括步骤:向体外或离体细胞引入编码如本文定义的TCR的多核苷酸。
- [0053] 适当地,T细胞是表达FOXP3的天然Treg。
- [0054] 在一个方面,该方法还包括步骤:向体外或离体细胞引入编码FOXP3蛋白的多核苷酸。
- [0055] 适当地,细胞是T细胞。
- [0056] 适当地,T细胞是‘常规’T细胞。
- [0057] 适当地,细胞是人类细胞,例如人类T细胞。适当地,细胞是人的Treg细胞。
- [0058] 在本发明方法的一个方面,依次、分别或同时进行引入编码TCR的多核苷酸和编码FOXP3的多核苷酸的步骤。

[0059] 在本发明方法的另一个方面,使用本发明的载体,向细胞引入编码TCR的多核苷酸和编码FOXP3的多核苷酸。

### 附图说明

[0060] 图1-显示编码(A)MBP TCR $\alpha$ 链和 $\beta$ 链和(B)FOXP3加TCR $\alpha$ 链和 $\beta$ 链的pMP71逆转录病毒载体的示意图。

[0061] 图2-MS2-3C8 TCR pMP71。MS2-3C8 TCR识别由HLA-DRB1\*0401呈递的MBP 111-129 (SEQ ID NO:3)。TCR已经过密码子优化并且恒定 $\alpha$ 和 $\beta$ 结构域已经鼠化,并且已经在c- $\alpha$ 和c- $\beta$ 之间添加额外的二硫键。

[0062] 图3-FOXP3-2A-MS2-3C8 TCR pMP71包含在3' T2A位点移除了终止密码子、插入MS-2TCR上游RsrII和EcoR1位点中的FOXP3基因。

[0063] 图4-显示研究设计的示意图。A)在工程化的Treg中演示MBP特异性抑制功能。B)工程化的Treg在HLA-转基因小鼠模型中抑制MS样免疫病理的用途

[0064] 图5-各图显示在第7天进行以通过鼠TCR恒定区和FOXP3的表达评估转导水平的代表性流式细胞分析。将Treg细胞和Tconv细胞转导空白对照,或用TCR (MS-2) 或TCR+FOXP3 (MS-2FOXP3) 转导。

[0065] 图6-显示在非转导细胞(d0)上或对转导的细胞群体(d7) n=2-4设门的Treg表面标志物的相对表达的曲线。这些结果显示调节性T细胞在体外扩增期间维持FOXP3表达。

[0066] 图7-显示用肽再刺激效应T细胞的曲线。用人HLA-DR4和CD80或CD86转导中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。将表达CD80或CD86的细胞按相等份额混合在一起用于后续实验。将CHO细胞按 $10 \times 10^6$ /mL重悬于含饱和量( $10 \mu\text{M}/\text{ml}$ ) MBP 111-129 (SEQ ID NO:3) (LSRFSWGAEGQRPGFGYGG)的培养基中。洗涤用MS2或MS2-FOXP3构建体转导的T细胞,计数并按 $0.5 \times 10^6$ 个细胞/ml重悬于完全RPMI中。将细胞按1:1与CHO细胞铺种在有肽和无肽情况下孵育4小时。将细胞固定并通透化,之后用针对IL-2和IFN  $\gamma$ 的抗体染色。T细胞的转导效率用'Td='指示。

[0067] 图8-显示用肽再刺激Treg的曲线。方法如上文对图7描述,使用Tregs替代效应T细胞。

[0068] 图9-转导的T细胞与或不与肽冲击的照射的APC一起培养4天。收集上清液并通过ELISA分析IL-2和IFN $\gamma$  (n=2-4)。这些数据显示TCR转导的Treg和TCR-FOXP3转化的Tconv对同源肽的反应性低。

[0069] 图10-显示来自表达MS2 TCR的细胞和来自表达MS2 TCR和FOXP3的T细胞(n=3)的IL-2和IFN  $\gamma$ 产生。相比经单独TCR转导的常规细胞,经TCR和TCR<sup>+</sup>FOXP3转导的常规T细胞(Tconv)产生更少的IL-2。

[0070] 图11-将TCR转导的T conv用CFSE染色并且按1Tconv:0.1APC的比率,与或不与肽冲击的照射的APC一起培养4天。按所示比率添加空白对照Treg(最左侧上的图标)、MBP TCR转导的Treg(从左起第二图标)、MBP TCR-FOXP3转导的Treg(从左起第三图标)和MBP TCR-FOXP3转导的Tconv(每个组从左起第四图标)。通过分析CFSE染色的Tconv的稀释物测定增殖(B)。这些数据显示TCR转导的Treg以抗原特异性方式抑制T细胞应答。

[0071] 图12-将TCR转导的T conv用CFSE染色并且按1Tconv:0.1APC的比率,与或不与肽

冲击的照射的APC一起培养4天。按所示比率添加空白对照Treg (最左侧上的图标)、MBP TCR转导的Treg (从左起第二图标)、MBP TCR-FOXP3转导的Treg (从左起第三图标)和MBP TCR-FOXP3转导的Tconv (每个组从左起第四图标)。收集上清液并通过ELISA对其测定IL-2。这些数据显示TCR转导的Treg以抗原特异性方式抑制T细胞应答。

[0072] 图13-通过珠分选法从HLA-DRB\*0401转基因小鼠的淋巴结和脾细胞分离CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg。用TCR+鼠FOXP3转导Treg。将转导的细胞和等同数目的CD45.1+OTI转基因T细胞注入用4Gy辐照预备的HLA-DRB\*0401转基因宿主。7天后,在小鼠右侧腹或左侧腹皮下注射Freud不完全佐剂中的30ug卵清蛋白(OVA)或30ug OVA和30ug人髓鞘碱性蛋白(MBP)。A.配对的FACS图显示相同小鼠的右侧或左侧腹股沟淋巴结中依据CD45.1鉴定的OTI细胞。左图显示来自未注射侧腹(无肽)的数据并且右图显示来自注射过OVA肽的侧腹的数据。B.配对的FACS图显示相同小鼠的右侧或左侧腹股沟淋巴结中的OTI细胞。左图显示来自注射过OVA肽的侧腹的数据并且右图显示来自注射过OVA+MBP肽的侧腹的数据。C.来自3个独立实验的累积性数据,其显示接受过OVA或OVA+MBP的侧腹的腹股沟淋巴结(n=9)中CD45.1<sup>+</sup>细胞%(左小图)和CD45.1细胞的绝对数。

[0073] 图14-MS2-3C8 TCR的逆转录病毒载体示意图以及MS2-3C8 TCR的表达和功能研究。(a)顶部栏:以下TCR使用 $\alpha$ 链-P2A- $\beta$ 链-T2A-截短的小鼠CD19(tmCD19)构造被克隆到逆转录病毒pMP71载体中:MS2-3C8野生型序列;MS2-3C8和MS2-3C8鼠恒定区。底部栏:MS2-3C8 ba TCR变体被克隆到逆转录病毒pMP71载体中,使用 $\beta$ 链-P2A- $\alpha$ 链-T2A-截短的小鼠CD19(tmCD19)构造。截短的小鼠CD19被用来作为转导效率的标志物。除了MS2-3C8野生型序列,所有TCR都含有经过密码子优化的可变和恒定结构域。(b)3个独立实验的代表性实例显示了用编码所指明的TCR的逆转录病毒构建体转导的Jurkat细胞(不表达内源性TCR)。顶部栏:CD19的表达水平。底部栏:在门控的CD19<sup>high</sup>细胞中的CD3表达水平和TRBV20(IMG T命名法)表达水平。CD3用作TCR细胞表面表达的代用标志物。细胞用抗TRBV20抗体染色以确定可变 $\beta$ 链的表达。(c)4个独立实验的代表性实例显示了MACS分选的用编码所指明的TCR的逆转录病毒构建体转导的CD4<sup>+</sup>人T细胞。顶部栏:CD19的表达水平。底部栏:门控的CD19<sup>high</sup>细胞中表达TRBV20的CD4<sup>+</sup>细胞的百分比。细胞用抗TRBV20抗体染色以确定可变 $\beta$ 链的表达。(d)4个独立实验的代表性实例显示用所指明的TCR转导并用加载了饱和浓度的相关肽或对照肽的APC进行刺激的人类CD4<sup>+</sup>T细胞。显示了门控的CD19<sup>high</sup>细胞的频率,所述细胞产生IL2和/或IFN $\gamma$ ,如在有BFA存在的情况下刺激18小时后通过细胞内细胞因子染色确定的。APCs是表达CD80和CD86以及HLA-DRB1\*1501的CHO细胞。(e)评估产生MBP特异性促炎症细胞因子的抑制试验。用MS2-3C8转导FACS分选的效应CD4<sup>+</sup>T细胞(CD25<sup>low</sup>CD127<sup>high</sup>),并用MS2-3C8或mock转导供体匹配的FACS分选的Treg(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>high</sup>CD127<sup>low</sup>)。在96孔板中,每孔多至50,000个表达MS2-3C8的Treg和50,000个T效应细胞与5,000个加载了相关MBP肽的APC共同培养3天。通过ELISA测量培养液中IL-2和IFN- $\gamma$ 的浓度。

[0074] 图15-TCR转导的调节性T细胞可以移植到辐照过的宿主体内,但需要外源FOXP3的表达来防止TCR+FOXP3-细胞的积累。通过珠分选法从HLA-DRB\*0401转基因小鼠的淋巴结和脾细胞分离Thy1.1+CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg。Treg用TCR或TCR+鼠类FOXP3进行转导或用无病毒上清液(模拟)培养。转导1天后,将TCR或TCR+FOXP3转导的细胞注射到经4Gy照射预处理的HLA-DRB\*0401转基因宿主体内。7周后用流式细胞仪确定转导的Treg的移植。A.转导效率是通过

转导后第1天人可变2.1和小鼠Foxp3的表达来确定的B.接受了由TCR或TCR+FOXP3转导的Treg的小鼠的脾细胞对Thy1.1染色以鉴定转移的细胞(顶部栏)和FOXP3和TCR.C.累积数据显示了用TCR或TCR+FOXP3转导的Treg的转导效率(左图)和转导细胞的绝对数量(右图)相对于注射日的倍数变化(n=3)。误差条显示了平均值的标准误差。通过未配对的t检验进行统计分析.D.转导7周后转导细胞内FOXP3的代表性表达。图中显示了第7周时转导群体中FOXP3+细胞的累积百分比(左),以及FOXP3+细胞相对于注射当天的倍数变化(n=3)。误差条显示平均值的标准误差。\*P=>0.05,\*\*P=>0.01,通过非配对t检验确定。

[0075] 图16-表达外源性FOXP3的Treg在体内7周后仍保持Treg功能,而不表达外源性FOXP3的Tregs获得产生效应细胞因子的能力.A将脾细胞与用无关肽或10uM MBP脉冲过的CD86+HLA-DR4+CHO细胞培养4小时。通过流式细胞仪测定IL-2和IFN $\gamma$ 的产生。流式细胞术图显示CD45.1细胞(顶部栏)含有单独表达TCR的Treg,以及Thy1.1细胞含有表达TCR+FOXP3的Treg.B图显示表达TCR(深灰色)和表达TCR+FOXP3(浅灰色)的Treg的IL-2和IFN $\gamma$ 的产生累积。误差条显示平均值的标准差(n=3)。

[0076] 发明详述

[0077] 髓鞘碱性蛋白(MBP)肽

[0078] 髓鞘碱性蛋白在神经的髓鞘形成过程中重要并且存在于神经系统的髓鞘细胞中,如少突胶质细胞和Schwann细胞。MBP转录物还存在于骨髓和免疫系统中。髓鞘的一个功能是增加轴突脉冲传导的速度。MBP有助维持髓鞘质的正确结构并且与髓鞘质膜中的脂质相互作用。已知MBP定位于CNS及各种造血细胞。

[0079] MBP已经涉及脱髓鞘病诸如多发性硬化(MS)的发病机制。研究已经展示针对MBP的抗体在MS发病机制中的作用。

[0080] 在一个方面,MBP的示意性氨基酸序列包含UniProtKB登录号P02686-1的序列,其显示为SEQ ID NO:11:

[0081] MGNHAGKRELNAEKASTNSETNRGESEKRNRLGELSRTTSEDNEVFGEADANQNGTSSQDTAVTDSK  
RTADPKNAWQDAHPADPGSRPHLIRLFSRDAPGRENTFKDRPSEDELQTIQEDSAATSESLDVMSQKRPSQRH  
GSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFGGDRGAPKRGSGKDSHHPARTAHYGSPLQKSHGRTQDENPV  
VHFFKNIIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSWGAEGQRPFGYGGGRASDYKSAHKGFKGVDAQGTLISKIFKLGGRDSR  
SGSPMARR(SEQ ID NO:11)。

[0082] MBP的示意性氨基酸序列可以包含SEQ ID NO:11或其变体或片段。

[0083] 适当地,MBP的示意性氨基酸序列可以是UniProtKB登录号P02686-1的同工型,如UniProtKB登录号P02686-5。同工型P02686-5不同于上文在SEQ ID NO:11中如下所示的规范序列,氨基酸残基1-133丢失。

[0084] 将UniProtKB登录号P02686-5显示为SEQ ID NO:13:

[0085] MASQKRPSQRHGSKYLATASTMDHARHGFLPRHRDTGILDSIGRFFGGDRGAPKRGSGKDSHHPARTAHYGSPLQKSHGRTQDENPVVHFFKNIIVTPRTPPPSQGKGRGLSLSRFSWGAEGQRPFGYGGGRASDYKSAHKGFKGVDAQGTLISKIFKLGGRDSRSGSPMARR(SEQ ID NO:13)。

[0086] 除非另外声明,否则如本文所用的MBP XXX-XXX指Muraro等人,JCI 1997;100,2,339-349中所用的编号,所述文献通过引用方式或通过引用SEQ ID NO:13(不包括起始的甲硫氨酸)的方式并入本文。

[0087] 使用本领域可用的方法,可以确定肽是否能够被MHC分子呈递并被T细胞识别。例如,某测定法可以包括将表达MHC:待测试肽复合体的抗原呈递细胞(APCs)与包含本文定义的TCR的T细胞共培养。随后可以测定T细胞增殖作为成功呈递肽的指标(例如通过羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)测定法)。备选地,也可以测量效应子细胞因子产生。

[0088] 如本文所用,“特异性结合”意指TCR与该肽结合,但不与其他肽结合,或以较低亲和力和与其他肽结合。

[0089] 可以定量两个分子(例如TCR和肽)或其片段之间的结合亲和力,例如,通过测定解离常数(KD)来定量。可以通过例如通过表面等离子体共振(SPR)法(Biacore™)测量TCR和肽之间复合物形成和解离的动力学,确定KD。与复合物缔合和解离相对应的速率常数分别称作结合速率常数 $k_a$ (或 $k_{on}$ )和解离速率常数 $k_d$ (或 $k_{off}$ )。KD通过等式 $KD = k_d/k_a$ ,与 $k_a$ 和 $k_d$ 有关。

[0090] 可以通过比较各个TCR/肽复合物的KD值,比较与不同的分子相互作用相关的结合亲和力例如比较不同TCRs和肽的结合亲和力。

[0091] 肽可能能够由任何的人白细胞抗原-抗原D相关(HLA-DR)呈递。

[0092] 在一个方面,肽能够由HLA-DR4呈递。

[0093] 在一个方面,肽能够由HLA-DRB1\*0401分子呈递。

[0094] 在一个方面,该肽与MBP 111-129:LSRFSWGAEGQRPGFGYGG (SEQ ID NO:12)具有至少90%同一性。与MBP 111-129 (SEQ ID NO:12)相比,MBP肽可以经突变。例如,可以通过氨基酸插入、缺失或置换使MBP肽突变,只要修饰的MBP肽保留未修饰的肽的MHC结合特异性并且能够呈递给T细胞即可。该肽可以相对于MBP 111-129 (SEQ ID NO:12)例如具有3、2、1或0个突变。适当地,该肽可以相对于MBP 111-129 (SEQ ID NO:12)例如具有3、2、1或0个保守性突变。适当地,该肽可以相对于MBP 111-129 (SEQ ID NO:12)例如具有3、2、1或0个插入。适当地,MBP肽片段可以相对于MBP 111-129 (SEQ ID NO:12)例如具有3、2、1或0个缺失。适当地,MBP 111-129 (SEQ ID NO:12)肽片段保留MBP 111-129 (SEQ ID NO:12)肽的MHC结合特异性,并且能够被呈递给T细胞。

[0095] T细胞受体(TCR)

[0096] TCR $\alpha$ -链和 $\beta$ -链两者的可变结构域各自具有三个高变或互补决定区(CDR)。CDR3是负责识别已加工抗原的主要CDR,不过还已经显示 $\alpha$ 链的CDR1与抗原性肽的N端部分相互作用,而 $\beta$ -链的CDR1与肽的C端部分相互作用。认为CDR2识别MHC分子。框架区(FRs)是位于CDR之间。这些区域提供TCR可变区的结构。

[0097] 本发明的TCR包含其足够的可变结构域,以能够与其肽/MHC复合物相互作用。例如,可以使用Biacore™仪器测量这种相互作用。适当地,TCR可以与HLA-DR4或HLADRB1\*0401相互作用。

[0098] 通过组合性连接可变基因(V)、连接基因(J)和多样性基因(D)并且通过N区多样化(通过脱氧核苷酸转移酶插入的核苷酸),产生TCR可变区的组库。

[0099]  $\alpha$ 链从V区段和J区段之间的重组事件形成。 $\beta$ 链从涉及V区段、D区段和J区段的重组事件形成。

[0100] 人TCR $\alpha$ 基因座,其也包含TCR $\delta$ 基因座,位于第14号染色体(14q11.2)上。TCR $\beta$ 基因座位于第7号染色体(7q34)上。TCR $\alpha$ 链的可变区由46个不同V $\alpha$ (可变)区段之一和58个J $\alpha$ (连

接)区段之一之间的重组形成(Koop等人,1994;Genomics;19:478-493,所述文献通过引用方式并入本文)。TCR $\beta$ 链的可变区从54个V $\beta$ 、14个J $\beta$ 和2个D $\beta$ (多样性)区段之间的重组形成(Rowen等人,1996;Science;272:1755-1762,所述文献通过引用方式并入本文)。

[0101] 已经鉴定每个TCR链基因座的V和J(和D如果适宜)基因区段并且已知并注释每个基因的种系序列(例如参见Scaviner和Lefranc;2000;Exp Clin Immunogenet;17:83-96及Folch和Lefranc;2000;Exp Clin Immunogenet;17:42-54,所述文献通过引用方式并入本文)。

[0102] 天然TCR的 $\alpha$ 链的FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3和CDR3由V $\alpha$ 基因编码。天然TCR的 $\beta$ 链的FR1、CDR1、FR2、CDR2和FR3由V $\alpha$ 基因编码。

[0103] 由于本领域已知每个可变基因的种系序列(参见Scaviner与Lefranc;如上文;和Folch与Lefranc;上文),可以对具体TCR的V $\alpha$ 和/或V $\beta$ 测序并且可以鉴定TCR中使用的种系V区段(参见,例如,Hodges等人,2003;J Clin Pathol;56:1-11;Zhou等人,2006;Laboratory Investigation;86:314-321;所述文献通过引用方式并入本文)。

[0104] 本发明提供包含工程化T细胞受体的工程化Treg。

[0105] 本发明提供工程化的Treg,其包含能够在相对于MBP 111-129(SEQ ID NO:12)或其片段包含至少90%同一性的肽由主要组织相容性复合体(MHC)分子呈递时,与该肽特异性结合的TCR。

[0106] 在一个方面,TCR包含 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链,

[0107] 其中 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链各自包含三个互补决定区(CDR)并且每个CDR3的序列如下:

[0108] CDR3 $\alpha$ -TVYGGATNKLI(SEQ ID NO:1)

[0109] CDR3 $\beta$ -SARGGSYNSPLH(SEQ ID NO:2)

[0110] 或这些序列的具有多达三个氨基酸变化的变体。

[0111] 在一个方面,TCR的 $\alpha$ 链包含三个具有以下氨基酸序列的CDR:

[0112] CDR1 $\alpha$ -TISGTDY(SEQ ID NO:3)

[0113] CDR2 $\alpha$ -GLTSN(SEQ ID NO:4)

[0114] CDR3 $\alpha$ -TVYGGATNKLI(SEQ ID NO:1)

[0115] 或这些序列的具有多达三个氨基酸变化的变体;

[0116] 并且其中TCR的 $\beta$ 链包含三个具有以下氨基酸序列的CDR:

[0117] CDR1 $\beta$ -DFQATT(SEQ ID NO:5)

[0118] CDR2 $\beta$ -SNEGSKA(SEQ ID NO:6)

[0119] CDR3 $\beta$ -SARGGSYNSPLH(SEQ ID NO:2)

[0120] 或这些序列的具有多达三个氨基酸变化的变体。

[0121] 适当地,CDR中的氨基酸变化是保守性置换、插入或缺失。优选地,氨基酸变化是保守性置换。

[0122] 在一个方面,TCR的 $\alpha$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:7具有80%序列同一性的氨基酸序列,并且TCR的 $\beta$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:8具有80%序列同一性的氨基酸序列,其中序列同一性不包含CDR序列。适当地,CDR序列是如本文中公开那样。适当地,TCR的 $\alpha$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:7具有80%、85%、90%、95%或97%序列同一性的氨基酸序列、并且TCR的 $\beta$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:8具有80%、85%、90%、95%或97%序列同一性的

氨基酸序列。

[0123] 适当地,TCR的 $\alpha$ 链的可变区可以包含与SEQ ID NO:7具有85%序列同一性的氨基酸序列,并且TCR的 $\beta$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:8具有85%序列同一性的氨基酸序列,其中序列同一性不包含CDR序列。适当地,TCR的 $\alpha$ 链的可变区可以包含与SEQ ID NO:7具有90%序列同一性的氨基酸序列,并且TCR的 $\beta$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:8具有90%序列同一性的氨基酸序列,其中序列同一性不包含CDR序列。

[0124] 适当地,TCR的 $\alpha$ 链的可变区可以包含与SEQ ID NO:7具有95%序列同一性的氨基酸序列,并且TCR的 $\beta$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:8具有95%序列同一性的氨基酸序列,其中序列同一性不包含CDR序列。适当地,TCR的 $\alpha$ 链的可变区可以包含与SEQ ID NO:7具有97%序列同一性的氨基酸序列,并且TCR的 $\beta$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:8具有97%序列同一性的氨基酸序列,其中序列同一性不包含CDR序列。适当地,TCR的 $\alpha$ 链的可变区可以包含SEQ ID NO:7中所述的氨基酸序列,并且TCR的 $\beta$ 链的可变区包含SEQ ID NO:8中所述的氨基酸序列,其中序列同一性不包含CDR序列。

[0125] 换言之,TCR可以包含如本文定义的并且以与SEQ ID NO:7和/或SEQ ID NO:8的剩余序列中至少80%,85%,90%,95%或97%序列同一性的 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链。

[0126] 在另一个方面,TCR的 $\alpha$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:7具有80%序列同一性的氨基酸序列,并且TCR的 $\beta$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:8具有80%序列同一性的氨基酸序列。

[0127] 适当地,TCR的 $\alpha$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:7具有85%序列同一性的氨基酸序列,并且TCR的 $\beta$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:8具有85%序列同一性的氨基酸序列。适当地,TCR的 $\alpha$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:7具有90%序列同一性的氨基酸序列,并且TCR的 $\beta$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:8具有90%序列同一性的氨基酸序列。适当地,TCR的 $\alpha$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:197具有95%序列同一性的氨基酸序列,并且TCR的 $\beta$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:8具有95%序列同一性的氨基酸序列。适当地,TCR的 $\alpha$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:7具有97%序列同一性的氨基酸序列,并且TCR的 $\beta$ 链的可变区包含与SEQ ID NO:8具有97%序列同一性的氨基酸序列。

[0128] 例证性的TCR $\alpha$ 链可变区(SEQ ID NO:7)

[0129] DAKTTQPNSMESNEEEPVHLPCNHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIHGLTSNVNRRMASLAI AEDRK  
SSTLILHRATLRDAAVYYCTVYGGATNKLIFGTGTL LAVQPN

[0130] 例证性的TCR $\beta$ 链可变区(SEQ ID NO:8)

[0131] GAVVSQHPSWVICKSGT SVKIECRSLDFQATTFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGV EKDKFLI  
NHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYIC SARGGSYNSPLHFGNGTRLTVT

[0132] 适当地,TCR的 $\alpha$ 链包含与SEQ ID NO:26具有至少80%序列同一性的人恒定区氨基酸序列和/或TCR的 $\beta$ 链包含与SEQ ID NO:27具有至少80%序列同一性的人恒定区氨基酸序列。

[0133] 适当地,TCR $\alpha$ 链恒定区可以包含与SEQ ID NO:26具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。适当地,TCR $\alpha$ 链恒定区可以包含与SEQ ID NO:26具有至少80%、至少85%、至少90%、至少95%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0134] 合适地,TCR $\alpha$ 链恒定区可以包含与SEQ ID NO:27具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。适当地,TCR $\alpha$ 链恒定区可以包含与SEQ ID NO:27具有至少80%、至少85%、至少

90%、至少95%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。

[0135] 适当地,TCR的β链包含人恒定区氨基酸序列,其在如SEQ ID NO:27中所示的第22位包含半胱氨酸残基。

[0136] 例证性的TCRα链恒定区(SEQ ID NO:26)

[0137] IQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQKSDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSD  
FACANAFNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

[0138] 例证性的TCRβ链恒定区(SEQ ID NO:27)

[0139] EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPAL  
NDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCVQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSAT  
ILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

[0140] 在一个方面,TCR的α链包含与SEQ ID NO:9具有80%序列同一性的氨基酸序列,并且TCR的β链包含与SEQ ID NO:10具有80%序列同一性的氨基酸序列。

[0141] 例证性的TCRα链(SEQ ID NO:9)

[0142] DAKTTQPNSMESNEEEPVHLPCNHSTISGTDYIHWYRQLPSQGPEYVIHGLTSNVNRMASLAI AEDRK  
SSTLILHRATLRDAAVYYCTVYGGATNKLIFGTGTLAVQPNIQNPDPVAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQ  
SKSDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPRESSCDVKLVEKSFETDTNLFQ  
NLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS

[0143] 例证性的TCRβ链(SEQ ID NO:10)

[0144] GAVVSQHPSVWICKSGT SVKIECRSLDFQATTFWYRQFPKQSLMLMATSNEGSKATYEQGVKDKFLI  
NHASLTLSTLTVTSAHPEDSSFYICSARGGSYNPLHFGNGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLV  
CLATGFYPDHVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCVQVQFYGLSEN  
DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDSRG

[0145] 适当地,TCR的β链包含人恒定区氨基酸序列,其在恒定区(下划线)位置22处包含半胱氨酸残基,如SEQ ID NO:10中所示。

[0146] 适当地,TCR的α链包含与SEQ ID NO:9具有85%序列同一性的氨基酸序列,并且TCR的β链包含与SEQ ID NO:10具有85%序列同一性的氨基酸序列。适当地,TCR的α链包含与SEQ ID NO:9具有90%序列同一性的氨基酸序列,并且TCR的β链包含与SEQ ID NO:10具有90%序列同一性的氨基酸序列。适当地,TCR的α链包含与SEQ ID NO:9具有95%序列同一性的氨基酸序列,并且TCR的β链包含与SEQ ID NO:10具有95%序列同一性的氨基酸序列。适当地,TCR的α链包含与SEQ ID NO:9具有97%序列同一性的氨基酸序列,并且TCR的β链包含与SEQ ID NO:10具有97%序列同一性的氨基酸序列。

[0147] 在另一个方面,TCR的α链和β链的恒定区结构域各自包含额外的半胱氨酸残基,从而使得在α链和β链之间形成额外二硫键成为可能。

[0148] 适当地,恒定α链中的残基48从苏氨酸转换成半胱氨酸并且恒定β链中的残基57从丝氨酸转换成半胱氨酸,以便形成额外的二硫键。

[0149] 适当地,TCR经密码子优化。

[0150] 适当地,TCR针对小鼠中表达进行密码子优化。

[0151] 在一个方面,TCR中所用的恒定结构域是鼠序列。

[0152] 适当地,恒定区已经鼠化。例如,恒定-α结构域和恒定-β结构域均已经鼠化。

[0153] 在另一个方面,TCR针对人类中表达进行密码子优化。适当地,TCR中所用的恒定结构域是人序列。

[0154] 在一个方面,TCR可以例如包含人可变区和鼠恒定区。

[0155] 本发明的TCR可以包含不由种系Va或V $\beta$ 基因编码的一个或多个如本文定义的氨基酸残基。换言之,TCR可以包含 $\alpha$ 链和/或 $\beta$ 链的部分,其中与如未改变的种系Va或V $\beta$ 基因编码的相应 $\alpha$ 链和/或 $\beta$ 链相比,所述的部分在本文所述的一个或多个位置包含改变的氨基酸残基。

[0156] 根据国际免疫遗传学信息体系(IMG T)鉴定了本文中作为构架区(FR)或互补性决定区(CDR)鉴定的氨基酸残基。这个体系是本领域公知的(Lefrance等人,2003;Dev Comp Immunol;27:55-77)并基于高保守的可变区结构。编号考虑并合并了FR和CDR的定义、来自X光衍射研究的结构数据和高变环的表征。

[0157] 在IMG T编号体系范围内规定FR区和CDR区的定界。FR1区包含位置1-26(25-26个氨基酸,取决于V-GENE群或亚群),第1-CYS在位置23处。FR2区包含位置39-55(16-17个氨基酸),在位置41处有一个保守的TRP。FR3区包含位置66-104(36-39个氨基酸,取决于VGENE群或亚群),在位置89处有一个保守的疏水性氨基酸且在位置104处具有第2-CYS。IMG T编号体系的残基1是FR1中的第一残基。IMG T编号体系的残基104是FR3中的最后残基。

[0158] 本领域已知适于生成本发明TCR的方法。

[0159] 例如,可以进行诱变,以改变编码TCR的核酸序列中的具体核苷酸。这种诱变将改变TCR的氨基酸序列,从而它包含一个或多个如本文所述的氨基酸残基。

[0160] 诱变方法的实例是Quikchange法(Papworth等人;1996;Strategies;9(3);3-4)。这种方法涉及使用一对互补性致突变引物,使用高保真无链置换作用的DNA聚合酶(如pfu聚合酶),在热循环反应中扩增模板核酸序列。

[0161] 如本文所用的术语“一个或多个”或“至少一个”可以包括一、二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九、二十个或更多个如本文所述的氨基酸残基。

[0162] 如本文所用的术语“两个或更多个”可以包括二、三、四、五、六、七、八、九、十、十一、十二、十三、十四、十五、十六、十七、十八、十九、二十个或更多个如本文所述的氨基酸残基。

[0163] 保守性置换

[0164] 适当地,本发明中在给定位置存在的氨基酸残基可以定义为是与针对给定SEQ ID NOs所列举的氨基酸在生物化学上相似的残基。

[0165] 具有相似生物化学属性的氨基酸可以定义为可以经由保守性置换来替换的氨基酸。

[0166] 可以基于残基的极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或两性本质的相似性进行“保守性”氨基酸置换,只要保留TCR高表达即可。例如,带负电荷的氨基酸包括天冬氨酸和谷氨酸;带正电荷的氨基酸包括赖氨酸和精氨酸;并且具有相似亲水性值的具有不带电荷极性头部基团的氨基酸包括亮氨酸、异亮氨酸、缬氨酸、甘氨酸、丙氨酸、天冬酰胺、谷氨酰胺、丝氨酸、苏氨酸、苯丙氨酸和酪氨酸。

[0167] 可以例如根据下表3进行保守性置换。在第二列中处于相同格子内并且优选处于

第三列相同行中的氨基酸可以互相置换。

[0168] 表3

脂族	非极性	G A P
		I L V
	极性-不带电荷	C S T M
		N Q
	极性-带电荷的	D E
K R		
芳族		H F W Y

[0170] 本发明还涵盖同源性置换(置换和替换在本文中均用来意指现存氨基酸残基与替代性残基的互换),即,同质置换,如碱性对碱性、酸性对酸性、极性对极性置换等。

[0171] 除非本文中通过引用具体、独立的氨基酸的方式另外明确地声明,否则可以使用如下文所列举的保守性置换,置换氨基酸。

[0172] 脂族非极性氨基酸可以是甘氨酸、丙氨酸、脯氨酸、异亮氨酸、亮氨酸或缬氨酸残基。脂族、极性不带电荷的氨基酸可以是半胱氨酸、丝氨酸、苏氨酸、甲硫氨酸、天冬酰胺或谷氨酰胺残基。

[0173] 脂族、极性带电荷的氨基酸可以是天冬氨酸、谷氨酸、赖氨酸或精氨酸残基。

[0174] 芳族氨基酸可以是组氨酸、苯丙氨酸、色氨酸或酪氨酸残基。

[0175] 适当地,可以在表3的相同行里的氨基酸之间进行保守性置换。

[0176] 序列

[0177] 本发明还提供编码本文所述的TCR $\alpha$ 链和/或 $\beta$ 链的核苷酸序列。在一个方面,可以向细胞引入编码本文所述的TCR的核苷酸序列。

[0178] 适当地,编码TCR的 $\alpha$ 链可变区的核苷酸序列可以包含SEQ ID NO:14或32或与SEQ ID NO:14或32具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。适当地,所述核苷酸序列可以具有与SEQ ID NO:14或32至少85%、90%、95%或99%的同一性。

[0179] SEQ ID NO:14

[0180] GACGCCAAGACCACACAGCCCAACAGCATGGAAAGCAACGAAGAGGAACCCGTGCATCTGCCCTGCAAC  
CACAGCACAATCAGCGGCACCGACTACATCCACTGGTACAGACAGCTGCCAGCCAGGGACCTGAGTATGTGATCCA  
CGGCCTGACCAGCAACGTGAACAACAGAATGGCCAGCCTGGCTATCGCCGAGGACAGAAAGAGCAGCACCCCTGATCC  
TGCACAGAGCCACACTGAGAGATGCCGCCGTGTACTACTGCACCGTGTATGGCGGAGCCACCAACAAGCTGATCTTC  
GGCACTGGAACACTGCTGGCCGTGCAGCCCAAT

[0181] SEQ ID NO:32

[0182] GACGCCAAGACCACACAGCCCAACAGCATGGAAAGCAACGAAGAGGAACCCGTGCATCTGCCCTGCAAC  
CACAGCACAATCAGCGGCACCGACTACATCCACTGGTATAGACAGCTGCCCTCTCAGGGCCCCGAGTATGTGATTCA  
CGGCCTGACCAGCAACGTGAACAACCGGATGGCCTCTCTGGCCATTGCCGAGGACAGAAAGTCCAGCACACTGATCC  
TGCACCGGGCCACACTGAGAGATGCCGCCGTGTATTACTGCACCGTGTACGGCGGAGCCACCAACAAGCTGATCTTT  
GGCACAGGCACACTGCTGGCCGTGCAGCCCAAT

[0183] 适当地,编码TCR的 $\beta$ 链可变区的核苷酸序列可以包含SEQ ID NO:15或33或与SEQ ID NO:15或33具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。适当地,所述核苷酸序列可以具有

与SEQ ID NO:15或33至少85%、90%、95%或99%的同一性。

[0184] SEQ ID NO:15

[0185] GGAGCTGTGGTGTCTCAGCACCCCTCTTGGGTCATCTGCAAGAGCGGCACCAGCGTGAAGATCGAGTGC  
AGAAGCCTGGACTTCCAGGCCACCACCATGTTTTGGTACAGGCAGTTCCCCAAGCAGAGCCTGATGCTGATGGCCAC  
CTCTAACGAGGGCAGCAAGGCCACATATGAGCAGGGCGTCGAGAAGGACAAGTTCCTGATCAACCACGCCAGCCTGA  
CACTGAGCACACTGACCGTGACAAGCGCCATCCTGAGGACTCCAGCTTCTACATCTGTAGCGCCAGAGGCGGCAGC  
TACAACAGCCCTCTGCACTTTGGCAACGGCACCAGACTGACAGTGACC

[0186] SEQ ID NO:33

[0187] GGAGCTGTGGTGTCTCAGCACCCCTTCTTGGGTCATCTGCAAGAGCGGCACCAGCGTGAAGATCGAGTGC  
AGAAGCCTGGACTTCCAGGCCACCACCATGTTCTGGTACAGACAGTTCCCCAAGCAGAGCCTGATGCTGATGGCCAC  
CTCTAACGAGGGCAGCAAGGCCACATATGAGCAGGGCGTCGAGAAGGACAAGTTCCTGATCAACCACGCCAGCCTGA  
CACTGAGCACCCCTGACAGTGACAAGCGCCATCCTGAGGACAGCAGCTTCTACATCTGTAGCGCCAGAGGCGGCAGC  
TACAACAGCCCTCTGCACTTTGGCAACGGCACCAGACTGACCGTGACC

[0188] 适当地,编码TCR的 $\alpha$ 链的核苷酸序列可以包含SEQ ID NO:16或与SEQ ID NO:16具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。适当地,所述核苷酸序列可以具有与SEQ ID NO:16至少85%、90%、95%或99%的同一性。

[0189] SEQ ID NO:16

[0190] GATGCTAAGACCACACAGCCAAATTC AATGGAGAGTAACGAAGAAGAGCCTGTTC ACTTGCC TTGTAAC  
CACTCCACAATCAGTGGAACTGATTACATACATTGGTATCGACAGCTTCCCTCCCAGGGTCCAGAGTACGTGATTCA  
TGGTCTTACAAGCAATGTGAACAACAGAATGGCCTCTCTGGCAATCGCTGAAGACAGAAAGTCCAGTACCTTGATCC  
TGCACCGTGCTACCTTGAGAGATGCTGCTGTGTACTACTGCACCGTGTATGGCGGAGCCACCAACAAGCTGATCTTC  
GGCACTGGAACACTGCTGGCCGTGCAGCCCAATATCCAGAACCCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAA  
ATCCAGTGACAAGTCTGTCTGCCTATTCACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTGTCAAAAGTAAGGATTCTGATG  
TGTATATCACAGACAAAACACTGTGCTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGCCTGGAGCAAC  
AAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACAACAGCATTATTCAGAAGACACCTTCTTCCCAGCCCAGAAAG  
TTCTGTGATGTCAAGCTGGTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACGAACCTAAACTTTCAAACCTGTCAAGTATTG  
GGTTCCGAATCCTCCTCCTGAAAGTGGCCGGTTAATCTGCTCATGACGCTGCGGCTGTGGTCCAGC

[0191] 适当地,编码TCR的 $\beta$ 链的核苷酸序列可以包含SEQ ID NO:17或与SEQ ID NO:17具有至少80%序列同一性的氨基酸序列。适当地,所述核苷酸序列可以具有与SEQ ID NO:17至少85%、90%、95%或99%的同一性。

[0192] SEQ ID NO:17

[0193] GGTGCTGTCGTCTCTCAACATCCGAGCTGGGTTATCTGTAAGAGTGGAACCTCTGTGAAGATCGAGTGC  
CGTTCCCTGGACTTTCAGGCCACAACACTATGTTTTGGTATCGTCAGTTCGGAAACAGAGTCTCATGCTGATGGCAAC  
TTCCAATGAGGGCTCCAAGGCCACATACGAGCAAGGCGTCGAGAAGGACAAGTTTCTCATCAACCATGCAAGCCTGA  
CCTTGTCCACTCTGACAGTGACCAGTGCCATCCTGAAGACAGCAGCTTCTACATCTGCAGTGCTAGAGGCGGCAGC  
TACAACAGCCCTCTGCACTTTGGCAACGGCACCAGACTGACAGTGACCGAGGACCTGAAAAACGTGTTCCACCCGA  
GGTCGCTGTGTTTGAGCCATCAGAAGCAGAGATCTCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGCCTGGCCACAGGCT  
TCTACCCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTGGGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCGAG  
CCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTGCCTGAGCAGCCGCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTG

GCAGAACCCCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGGAGAATGACGAGTGGACCCAGGATA  
GGGCCAAACCTGTACCCAGATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGGGTAGAGCAGACTGTGGCTTACCTCCGAGTCTTAC  
CAGCAAGGGTCTGTCTGCCACCATCCTCTATGAGATCTTGCTAGGGAAGGCCACCTTGTATGCCGTGCTGGTCAG  
TGCCCTCGTGCTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAGGC

[0194] 适当地,编码TCR的 $\alpha$ 链的核酸序列包含与SEQ ID NO:28或30具有至少90%序列同一性的序列。适当地,编码TCR的 $\alpha$ 链的核酸序列包含与SEQ ID NO:28或30具有至少95%或至少99%序列同一性的序列。

[0195] 适当地,编码TCR的 $\beta$ 链的核酸序列包含与SEQ ID NO:29或31具有至少90%序列同一性的序列。适当地,编码TCR的 $\alpha$ 链的核酸序列包含与SEQ ID NO:29或31具有至少95%或至少99%序列同一性的序列。

[0196] 适当地,所述核酸序列以5' $\alpha$ 链- $\beta$ 链3'的方向提供TCR链,并包含(i)编码TCR的 $\alpha$ 链并与SEQ ID NO:28具有至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性的序列和(ii)编码TCR的 $\beta$ 链并与SEQ ID NO:30具有至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性。

[0197] 适当地,该核酸序列以5' $\beta$ 链- $\alpha$ 链3'的方向提供TCR链,并包含(i)编码TCR的 $\beta$ 链并与SEQ ID NO:31具有至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性的序列;(ii)编码TCR的 $\alpha$ 链并与SEQ ID NO:29具有至少90%、至少95%或至少99%的序列同一性的序列。

[0198] SEQ ID NO:28-例证性的TCR $\alpha$ 链

[0199] GACGCCAAGACCACACAGCCCAACAGCATGGAAAGCAACGAAGAGGAACCCGTGCATCTGCCCTGCAAC  
CACAGCACAATCAGCGGCACCGACTACATCCACTGGTACAGACAGCTGCCAGCCAGGGACCTGAGTATGTGATCCA  
CGGCCTGACCAGCAACGTGAACAACAGAATGGCCAGCCTGGCTATCGCCGAGGACAGAAAGAGCAGCACCCCTGATCC  
TGCACAGAGCCCACTGAGAGATGCCGCCGTGTACTACTGCACCGTGTATGGCGGAGCCACCAACAAGCTGATCTTC  
GGCACTGGAACACTGCTGGCCGTGCAGCCCAATATTCAGAACCCAGATCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACAGCAA  
GTCCAGCGACAAGAGCGTGTGCTTACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACTCCGATG  
TGTATATCACCGACAAGACCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAAC  
AAGAGCGATTTGCGCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCTGAGGACACATTCTTCCAAGTCCTGAGAG  
CAGCTGCGACGTGAAACTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTGAGCGTGATCG  
GCTTCAGAATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGAGACTTTGGAGCAGC

[0200] SEQ ID NO:29-例证性的TCR $\alpha$ 链

[0201] GACGCCAAGACCACACAGCCCAACAGCATGGAAAGCAACGAAGAGGAACCCGTGCATCTGCCCTGCAAC  
CACAGCACAATCAGCGGCACCGACTACATCCACTGGTATAGACAGCTGCCCTCTCAGGGCCCCGAGTATGTGATTCA  
CGGCCTGACCAGCAACGTGAACAACCGGATGGCCTCTCTGGCCATTGCCGAGGACAGAAAGTCCAGCACACTGATCC  
TGCACCGGGCCCACTGAGAGATGCCGCCGTGTACTACTGCACCGTGTACGGCGGAGCCACCAACAAGCTGATCTTT  
GGCACAGGCACACTGCTGGCCGTGCAGCCCAATATTCAGAACCCTGATCCAGCCGTGTACCAGCTGAGAGACAGCAA  
GAGCAGCGACAAGTCTGTGTGTCTGTTCACCGACTTCGACAGCCAGACCAACGTGTCCCAGAGCAAGGACTCCGATG  
TGTATATCACCGACAAGACCGTGCTGGACATGCGGAGCATGGACTTCAAGAGCAACAGCGCCGTGGCCTGGTCCAAC  
AAGAGCGATTTGCGCTGCGCCAACGCCTTCAACAACAGCATTATCCCGGAGGACACATTCTTCCAAGTCCTGAGAG  
CAGCTGCGACGTGAAACTGGTGGAAAAGAGCTTCGAGACAGACACCAACCTGAACTTCCAGAACCTGAGCGTGATCG  
GCTTCAGAATCCTGCTGCTGAAGGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGAGACTGTGGTCTAGC

[0202] SEQ ID NO:30-例证性的TCR $\beta$ 链

[0203] GGAGCTGTGGTGTCTCAGCACCCCTCTTGGGTCATCTGCAAGAGCGGCACCAGCGTGAAGATCGAGTGC  
AGAAGCCTGGACTTCCAGGCCACCACCATGTTTTGGTACAGGCAGTTCCCAAGCAGAGCCTGATGCTGATGGCCAC  
CTCTAACGAGGGCAGCAAG

[0204] GCCACATATGAGCAGGGCGTCGAGAAGGACAAGTTCCTGATCAACCACGCCAGCCTGACACTGAGCACA  
CTGACCGTGACAAGCGCCATCTGAGGACTCCAGCTTCTACATCTGTAGCGCCAGAGGCGGCAGCTACAACAGCCC  
TCTGCACTTTGGCAACGGCACCAGACTGACAGTGACCGAGGACCTGAAGAACGTGTTCCACCTGAGGTGGCCGTGT  
TCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCCACACACAGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCCACCGGCTTCTATCCCGAT  
CACGTGGAAGTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACAGATCCCCAGCCTCTGAAAGA  
ACAGCCCCTCTGAACGACAGCCGTAAGTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTGGCAGAACCCCA  
GAAACCACTTCCAGATGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGGATAGAGCCAAGCCT  
GTGACACAGATCGTGTCTGCCAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGCGAGAGCTACCAGCAAGGCGT  
GCTGTCTGCCACCATCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAAGCCACTCTGTACGCCGTGCTGGTGTCTGCCCTGGTCC  
TGATGGCTATGGTCAAGCGGAAGGACAGCAGAGGC

[0205] SEQ ID NO:31-例证性的TCR $\beta$ 链

[0206] GGAGCTGTGGTGTCTCAGCACCCCTTCTTGGGTCATCTGCAAGAGCGGCACCAGCGTGAAGATCGAGTGC  
AGAAGCCTGGACTTCCAGGCCACCACCATGTTCTGGTACAGACAGTTCCCAAGCAGAGCCTGATGCTGATGGCCAC  
CTCTAACGAGGGCAGCAAGGCCACATATGAGCAGGGCGTCGAGAAGGACAAGTTCCTGATCAACCACGCCAGCCTGA  
CACTGAGCACCCCTGACAGTGACAAGCGCCATCCTGAGGACAGCAGCTTCTACATCTGTAGCGCCAGAGGCGGCAGC  
TACAACAGCCCTCTGCACTTTGGCAACGGCACCAGACTGACCGTGACCGAGGACCTGAAGAACGTGTTCCACCTGA  
GGTGGCCGTGTTTCGAGCCTTCTGAGGCCGAGATCAGCCACACACAGAAAGCCACACTCGTGTGTCTGGCCACCGGCT  
TCTATCCCGATCACGTGCAACTGTCTTGGTGGGTCAACGGCAAAGAGGTGCACAGCGGCGTCAGCACAGATCCCCAG  
CCTCTGAAAGAACAGCCCGCTCTGAACGACAGCCGTAAGTGTCTGAGCAGCAGACTGAGAGTGTCCGCCACCTTCTG  
GCAGAACCCAGAAACCACTTCCAGGTGCCAGGTGCAGTTCTACGGCCTGAGCGAGAACGATGAGTGGACCCAGGATA  
GAGCCAAGCCTGTGACACAGATCGTGTCTGCCAAGCCTGGGGCAGAGCCGATTGTGGCTTTACCAGCGAGAGCTAC  
CAGCAAGGCGTGTGTCTGCCACCATCCTGTACGAGATCCTGCTGGGCAAAGCCACTCTGTACGCCGTGCTGGTGTCT  
TGCCCTGGTCTGATGGCTATGGTCAAGCGGAAGGACTCCAGAGGC

[0207] 如本文所用,术语“引入”指将外来DNA插入细胞中的方法。如本文所用,术语引入包括转导法和转染法。转染是通过非病毒方法向细胞引入核酸的过程。转导是借助病毒载体向细胞引入外来DNA的过程。

[0208] 如本文所用,术语“多核苷酸”和“核酸”意在彼此同义。核酸序列可以是任何合适类型的核苷酸序列,如合成性RNA/DNA序列、cDNA序列或部分基因组DNA序列。

[0209] 如本文所用的术语“多肽”按正常含义用来意指一般通过毗邻氨基酸的 $\alpha$ -氨基和羧基之间的肽键彼此连接的一连串残基,一般是L-氨基酸。该术语同义于“蛋白质”。

[0210] 技术人员将理解,作为遗传密码简并性的结果,众多不同的多核苷酸和核酸可以编码相同的多肽。此外,应当理解,熟练技术人员可以利用例行技术,做出不影响由本文所述多核苷酸编码的多肽序列的核苷酸替换,以反映其中待表达多肽的任何具体宿主生物的密码子选择。

[0211] 本发明的核酸可以包括DNA或RNA。它们可以是单链或双链的。它们也可以是在其内部包括合成性或修饰的核苷酸的多核苷酸。本领域已知许多不同类型的寡核苷酸修饰。

这些修饰包括甲基磷酸酯主链和硫代磷酸酯主链、在分子的3'末端和/或5'末端添加吡啶或聚赖氨酸链。出于如本文所述的用途的目的,应当理解,可以通过本领域中可用的任何方法修饰多核苷酸。可以实施这类修饰以增强目的多核苷酸的体内活性或寿命。

[0212] 多核苷酸可以处于分离或重组的形式。可以将它并入载体中并且可以将载体并入宿主细胞中。这类载体和合适的宿主又形成本发明的其他方面。

[0213] 多核苷酸可以是双链或单链的,并且可以是RNA或DNA。

[0214] 多核苷酸可以经密码子优化。不同细胞在其特定密码子利用率方面不同。这种密码子偏好性对应于细胞类型中特定tRNA的相对丰度的偏倚。通过改变序列中的密码子,从而调整它们以匹配于相应tRNA的相对丰度,可以增加表达。适当地,多核苷酸可以为疾病的鼠模型中表达进行密码子优化。适当地,多核苷酸可以为人类受试者中表达进行密码子优化。

[0215] 许多病毒,包括HIV和其他慢病毒,使用多种稀有密码子,并且通过改变这些稀有密码子,以对应于常用的哺乳动物密码子,可以在哺乳动物生产细胞中实现包装组件的表达增加。本领域已知哺乳动物细胞以及多种其他生物的密码子选择表。

[0216] 密码子优化还可以涉及消除mRNA不稳定性基序和隐匿性剪接位点。

[0217] 多核苷酸可以包含一个核酸序列,所述核酸序列使得编码 $\alpha$ 链的核酸序列和编码 $\beta$ 链的核酸序列二者从同一mRNA转录物表达成为可能。

[0218] 例如,多核苷酸可以在编码 $\alpha$ 链和 $\beta$ 的核酸序列之间包含内部核糖体进入位点(IRES)。IRES是允许在mRNA序列的中间启动翻译的核苷酸序列。

[0219] 多核苷酸可以包含由内部自我剪切性序列连接的编码 $\alpha$ 链的核酸序列和编码 $\beta$ 链的核酸序列。

[0220] 内部自我剪切性序列可以是使得包含 $\alpha$ 链的多肽和包含 $\beta$ 链的多肽变得分离成为可能的任何序列。

[0221] 该剪切位点可以有自我剪切性,从而当产生多肽时,它立即被切割成独立肽,无需任何外部剪切活性。

[0222] 出于方便,本文中使用的术语“剪切”,但是剪切位点可以通过除经典剪切作用之外的机制,使肽分离成独立的实体。例如,对于口蹄疫病毒(FMDV) 2A自我剪切性肽,已经提出多种模型解释“剪切”活性:借助宿主细胞蛋白酶的蛋白水解、自动蛋白酶解或翻译效应(Donnelly等人(2001) *J. Gen. Virol.* 82:1027-1041,所述文献通过引用方式并入本文)。出于本发明目的,这类“剪切作用”的确切机制不重要,只要位于编码蛋白质的核酸序列之间时,剪切位点引起蛋白质作为独立实体表达即可。

[0223] 自我剪切性肽可以是来自口蹄疫病毒或心病毒的2A自我剪切性肽。

[0224] 可以根据相似性(即具有相似化学属性/功能的氨基酸残基)认定变体,优选地,根据术语序列同一性表述变体。

[0225] 可以通过肉眼或更常见地借助轻易可获得的序列比较程序,进行序列比较。这些公众可获得且市售的计算机程序可以计算两个或多个序列之间的序列同一性。

[0226] 可以在连续序列范围内计算序列同一性,即,将一个序列与另一个序列对齐并且将一个序列中的每个氨基酸与另一个序列中的相应氨基酸直接比较,一次一个残基。这称作“无空位比对”。一般,这类无空位比对仅在相对小数目的残基范围(例如少于50个连续氨

基酸)内进行。

[0227] 尽管这是一种非常简单和一致的方法,但是它没有考虑到例如当执行全局比对时,例如在另外的相同序列对中,一个插入或缺失将导致后续氨基酸残基从比对结果中出局,因此可能造成同源性%大大降低。因此,大部分序列比较方法设计成产生最佳比对结果,所述的最佳比对结果考虑了可能的插入和缺失,而没有不当地罚除总体同源性评分。这通过在序列比对结果中插入“空位”以尽力使局部同源性最大化来实现。

[0228] 然而,这些更复杂的方法向比对结果中出现的每个空位赋予“空位罚分”,从而,对于相同数目的相同氨基酸,空位尽可能少-反映两个所比较序列之间更高的相关性-的序列比对结果将比具有许多空位的一个序列比对结果实现更高评分。一般使用“仿射空位成本”,它对缺口的存在要求相对高的成本并且对空位中的每个后续残基要求较小的罚分。这是最常用的空位评分系统。高空位罚分当然将产生具有更少空位的优化比对结果。大多数比对程序允许调整空位罚分。然而,使用这种软件用于序列比较时,优选使用默认值。例如,使用GCG Wisconsin Bestfit软件包(参见下文)时,氨基酸序列的默认空位罚分是空位-12和每个延伸-4。

[0229] 最大序列同一性%的计算因而首先要求在考虑空位罚分的情况下产生最佳比对结果。用于开展此类比对的合适计算机程序是GCG Wisconsin Bestfit软件包(美国威斯康辛大学;Devereux等人,1984,Nucleic Acids Research 12:387,所述文献通过引用方式并入本文)。可以执行序列比较的其他软件的实例包括但不限于BLAST软件包(参见Ausubel等人,1999ibid-第18章)、FASTA(Atschul等人,1990,J.Mol.Biol.,403-410,所述文献通过引用方式并入本文)和GENEWORKS比较工具软件包。BLAST和FASTA均可用于离线和在线搜索(见Ausubel等人,1999ibid,第7-58页至第7-60页,所述文献通过引用方式并入本文)。然而,优选使用GCG Bestfit程序。

[0230] 在一个实施方案中,在整个序列范围内测定序列同一性。在一个实施方案中,在与本文援引的序列正在比较的整个候选序列范围内测定序列同一性。

[0231] 尽管可以就同一性方面测量最终序列同一性,然而比对过程本身一般不基于全或无配对比较。相反,通常使用比例相似性评分矩阵,该评分矩阵基于化学相似性或进化距离对每个成对比较结果分配评分。此种常使用的矩阵的例子是BLOSUM62矩阵-即程序BLAST套装的默认矩阵。GCG Wisconsin程序通常使用公共默认值或定制符号比较表,若提供(关于进一步细节,参见用户手册)。优选使用GCG软件包的公共默认值,或在其他软件的情况下,优选使用默认矩阵,如BLOSUM62。

[0232] 一旦软件已经产生最佳比对结果,则可能计算序列同一性%。该软件一般将此作为序列比较的一部分并产生数值结果。

[0233] 本发明的术语“变体”包括从序列中或对序列进行任何置换、变异、修饰、替换、缺失或添加一个或多个氨基酸,条件是所得到的氨基酸序列基本上保留与未修饰的序列相同的活性。例如,可以进行保守性氨基酸置换。如本文所用,变体多肽意在包括一种多肽,所述多肽包含与本文中所示序列至少70%、80%、85%、90%、95%、98%或99%相同的氨基酸序列。在一个方面,变体维持亲本序列的功能。

[0234] FOXP3

[0235] 在一个方面,根据本发明的细胞包含已经被引入细胞的编码FOXP3蛋白的核苷酸

序列。

[0236] 在一个方面,本发明的细胞、工程化Treg或药物组合物可以包含工程化的编码FOXP3蛋白的核酸序列,换言之,该工程化的核酸序列不是细胞内源性基因组的部分。

[0237] FOXP3是转录因子FOX蛋白家族的成员并且作为调节性T细胞发育和功能中调节途径的主调节因子发挥作用。

[0238] 适当地,FOXP3多肽来自人,例如UniProtKB登录号:Q9BZS1:

[0239] MPNPRPGKPSAPSLALGSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHASSSS

[0240] LNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIV AAGSQGPVVPAWSGPREADSLFAVRR

[0241] HLWGS HG NSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGA VWTVDLEFRKRSQRPSRCSNPTPGP (SEQ ID NO:18)。

[0242] 适当地,FOXP3多肽包含SEQ ID NO:18中所述的氨基酸序列或其片段。适当地,FOXP3多肽包含与SEQ ID NO:18至少80%相同的氨基酸序列或其片段。适当地,该多肽包含与SEQ ID NO:18为85%、90%、95%、98%或99%相同的氨基酸序列或其片段。适当地,该片段保留FOXP3活性。适当地,该片段能够与FOXP3靶结合并充当转录因子。

[0243] 适当地,FOXP3多肽可以是SEQ ID NO:18的天然变体。适当地,FOXP3多肽是SEQ ID NO:18的同工型。例如,FOXP3多肽可以相对于SEQ ID NO:18包含氨基酸位置72-106的缺失。备选地,FOXP3多肽可以相对于SEQ ID NO:18包含氨基酸位置246-272的缺失。

[0244] 适当地,FOXP3多肽包含SEQ ID NO:25中所述的氨基酸序列。

[0245] MPNPRPGKPSAPSLALGSPGASPSWRAAPKASDLLGARGPGGTFQGRDLRGGAHASSSSLNPMPPSQLQLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKARPLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLANGVCKWPGCEKVFEEDFLKHCQADHLLDEKGRAQCLLQREMVQSLEQVEELSAMQAHLAGKMALTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPAWSGPREADSLFAVRRHLWGS HG NSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGA VWTVDLEFRKRSQRPSRCSNPTPGPEGRGSLTTCGDVEEN (SEQ ID NO:19)。

[0246] 适当地,FOXP3多肽包含SEQ ID NO:19中所述的氨基酸序列或其片段。适当地,FOXP3多肽包含与SEQ ID NO:19至少80%相同的氨基酸序列或其片段。适当地,该多肽包含与SEQ ID NO:19为85%、90%、95%、98%或99%相同的氨基酸序列或其片段。适当地,该片段保留FOXP3活性。适当地,该片段能够与FOXP3靶结合并充当转录因子。

[0247] 适当地,FOXP3多肽可以是SEQ ID NO:19的天然变体。适当地,FOXP3多肽是SEQ ID NO:19的同工型。例如,FOXP3多肽可以相对于SEQ ID NO:19包含氨基酸位置72-106的缺失。备选地,FOXP3多肽可以相对于SEQ ID NO:19包含氨基酸位置246-272的缺失。

[0248] 适当地,FOXP3多肽由SEQ ID NO:20中所述的多核苷酸序列编码:

[0249] ATGCCCAACCCAGGCCTGGCAAGCCCTCGGCCCTTCCTTGGCCCTTGGCCATCCCCAGGAGCCTCGCCAGCTGGAGGGCTGCACCAAGCCTCAGACCTGCTGGGGGCCCGGGGCCAGGGGAACCTTCCAGGGCCGAGATCTTCGAGGCGGGCCCATGCCTCCTTCTTCTTGAACCCATGCCACCATCGCAGCTGCAGCTGCCACAC

TGCCCCTAGTCATGGTGGCACCCTCCGGGGCACGGCTGGGCCCTTGCCCCACTTACAGGCACTCCTCCAGGACAG  
GCCACATTTTCATGCACCAGCTCTCAACGGTGGATGCCACGCCCCGACCCTGTGCTGCAGGTGCACCCCTGGAG  
AGCCCAGCCATGATCAGCCTCACACCACCACCACCACCCTGGGGTCTTCTCCCTCAAGGCCCGCCTGGCCTCC  
CACCTGGGATCAACGTGGCCAGCCTGGAATGGGTGTCCAGGGAGCCGGCACTGCTCTGCACCTCCCAAATCCCAG  
TGCACCCAGGAAGGACAGCACCCCTTTCGGCTGTGCCCCAGAGCTCTACCCACTGCTGGCAAATGGTGTCTGCAAG  
TGGCCCGGATGTGAGAAGGTCTTCGAAGAGCCAGAGGACTTCTCAAGCACTGCCAGGCGGACCATCTTCTGGATG  
AGAAGGGCAGGGCACAATGTCTCTCCAGAGAGAGATGGTACAGTCTCTGGAGCAGCAGCTGGTGTGGAGAAGGA  
GAAGCTGAGTGCCATGCAGGCCACCTGGCTGGGAAAATGGCACTGACCAAGGCTTCATCTGTGGCATCATCCGAC  
AAGGGCTCCTGCTGCATCGTAGCTGCTGGCAGCCAAGGCCCTGTCGTCCCAGCCTGGTCTGGCCCCCGGGAGGCC  
CTGACAGCCTGTTTGCTGTCCGGAGGCACCTGTGGGGTAGCCATGGAAACAGCACATTCCCAGAGTTCCTCCACAA  
CATGGACTACTTCAAGTTCACAACATGCGACCCCTTTCACCTACGCCACGCTCATCCGCTGGGCCATCCTGGAG  
GCTCCAGAGAAGCAGCGGACACTCAATGAGATCTACCACTGGTTCACACGCATGTTTGCCTTCTCAGAAACCATC  
CTGCCACCTGGAAGAACGCCATCCGCCACAACCTGAGTCTGCACAAGTGTCTTGTGCGGGTGGAGAGCGAGAAGGG  
GGCTGTGTGGACCGTGGATGAGCTGGAGTTCGCAAGAAACGGAGCCAGAGGCCAGAGGCCCAGCAGGTGTTCAACCCTACA  
CCTGGCCCCTGA (SEQ ID NO:20)

[0250] 在本发明的一些实施方案中,编码FOXP3多肽或变体的多核苷酸包含与SEQ ID NO:20或其功能性片段至少80%相同的多核苷酸序列。适当地,编码FOXP3多肽或变体的多核苷酸包含与SEQ ID NO:20或其功能性片段至少85%、90%、95%、98%或99%相同的多核苷酸序列。在本发明的一些实施方案中,编码FOXP3多肽或变体的多核苷酸包含SEQ ID NO:20或其功能性片段。

[0251] 适当地,FOXP3多肽由SEQ ID NO:21中所述的核酸序列编码:

[0252] GAATTCGTCGACATGCCCAACCCAGACCCGGCAAGCCTTCTGCCCTTCTCTGGCCCTGGGACCATC  
TCCTGGCGCCTCCCCATCTTGGAGAGCCGCCCTAAAGCCAGCGATCTGCTGGGAGCTAGAGGCCCTGGCGGCACA  
TTCCAGGGCAGAGATCTGAGAGGCGGAGCCACGCCTCTAGCAGCAGCCTGAATCCCATGCCCCCTAGCCAGCTGC  
AGCTGCCTACACTGCCTCTCGTGATGGTGGCCCTAGCGGAGCTAGACTGGGCCCTCTGCCTCATCTGCAGGCTCT  
GCTGCAGGACCGGCCCACTTTATGCACCAGCTGAGCACCGTGGACGCCACGCCAGAACACCTGTGCTGCAGGTG  
CACCCCTGGAAAGCCCTGCCATGATCAGCCTGACCCCTCCAACCACAGCCACCGGCGTGTTCAGCCTGAAGGCCA  
GACCTGGACTGCCCCCTGGCATCAATGTGGCCAGCCTGGAATGGGTGTCCCGCAACCTGCCCTGCTGTGCACCTT  
CCCCAATCCTAGCGCCCCCAGAAAGGACAGCACACTGTCTGCCGTGCCCCAGAGCAGCTATCCCCTGCTGGCTAAC  
GGCGTGTGCAAGTGGCTGGCTGCGAGAAGGTGTTTCAGGAACCCGAGGACTTCTGAAGCACTGCCAGGCCGACC  
ATCTGCTGGACGAGAAAGGACAGAGCCAGTGCCTGCTGCAGCGCGAGATGGTGCAGTCCCTGGAACAGCAGCTGGT  
GCTGGAAAAAGAAAAGCTGAGCGCCATGCAGGCCACCTGGCCGGAAAGATGGCCCTGACAAAAGCCAGCAGCGTG  
GCCAGCTCCGACAAGGGCAGCTGTTGTATCGTGGCCGCTGGCAGCCAGGGACCTGTGGTGCCTGCTTGGAGCGGAC  
CTAGAGAGGCCCCGATAGCCTGTTTGCCTGCGGAGACACCTGTGGGGCAGCCACGGCAACTCTACCTTCCCCGA  
GTTCTCTGCACAACATGGACTACTTCAAGTTCACAACATGAGGCCCCCTTACCTACGCCACCCTGATCAGATGG  
GCCATTCTGGAAGCCCCGAGAAGCAGCGGACCCTGAACGAGATCTACCACTGGTTTACCCGGATGTTTCGCTTCT  
TCCGGAACCACCCGCCACCTGGAAGAACGCCATCCGGCACAATCTGAGCCTGCACAAGTGTCTCGTGGGGTGGGA  
AAGCGAGAAGGGCGCCGTGTGGACAGTGGACGAGCTGGAATTTCCGGAAGAAGCGGTCCCAGAGGCCAGCCGGTGT  
AGCAATCCTACACCTGGCCCTGAGGGCAGAGGAAGTCTGCTAACATGCGGTGACGTCGAGGAGAATCC (SEQ ID

NO:21)。

[0253] 适当地,FOXP3多肽由SEQ ID NO:21中所述的核酸序列或其片段编码。适当地,FOXP3多肽由与SEQ ID NO:21至少80%相同的核酸序列或其片段编码。适当地,FOXP3多肽由与SEQ ID NO:21为85%、90%、95%、98%或99%相同的核酸序列或其片段编码。适当地,该片段保留FOXP3活性。适当地,该片段编码的多肽能够与FOXP3靶结合并充当转录因子。

[0254] 编码TCR和/或FOXP3的核酸可以包含起始密码子上游的前导序列。这个序列可以调节转录物的翻译。通过举例,用于本发明中的合适的前导序列是:MEKMLECAFIVLWLQLGWLSG (SEQ ID NO:22) 和MLCSLLALLLGTFFGVR (SEQ ID NO:23)。

[0255] 在又一个方面,本发明提供一种核酸序列套件,其包含:

[0256] 编码如本文定义的TCR的第一核酸序列和编码FOXP3的第二核酸。

[0257] 载体

[0258] 本发明还提供一种载体,其包含编码如本文所述的TCR的核苷酸序列。适当地,该载体可以另外包含编码叉头框P3 (FOXP3) 多肽的核苷酸序列。在一个方面,提供一种载体套件,其包含一个或多个本发明核酸序列,诸如编码如本文定义的TCR的核酸和编码FOXP3的核酸。

[0259] 术语“载体”包括表达载体,即,使得本发明TCR即 $\alpha$ 链和/或 $\beta$ 链的表达成为可能的构建体。适当地,载体额外地使得表达FOXP3多肽的表达成为可能。在一些实施方案中,载体是克隆载体。

[0260] 如果该载体除了包括编码FOXP3的多核苷酸外,还包含编码TCR的多核苷酸;该载体可以具有以下方向:5'FOXP3-TCR 3'。因此,编码FOXP3的多核苷酸可以在编码TCR的多核苷酸的5'方向。

[0261] 适当地,编码FOXP3的多核苷酸可以与编码TCR的多核苷酸被核酸序列分隔开,这使得编码FOXP3的核酸序列和编码TCR的核酸序列都能从同一个mRNA转录本上表达。

[0262] 例如,多核苷酸可以在编码(i) FOXP3和(ii) TCR的核酸序列之间包含一个内部核糖体进入位点(IRES)。IRES是一种允许在mRNA序列的中间启动翻译的核苷酸序列。

[0263] 该多核苷酸可以包含由内部自剪切序列连接的编码(i) FOXP3和(ii) TCR的核酸序列。编码TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 链的多核苷酸也可以通过内部自剪切序列分隔开。

[0264] 适当地,该载体可以具有这样的结构。5'强启动子(例如LTR)-F<sub>ox</sub>P3-2A-TCR-3'LTR。这里,FOXP3的表达是由强LTR启动子直接驱动的,以达到最佳表达。TCR前有一个2A序列,因此TCR的表达依赖于LTR启动子活性和2A自剪切活性两者。重要的是,FOXP3在5'到3'方向先于TCR的配置确保了TCR的表达只能在FOXP3已经表达时发生,并且没有FOXP3表达的TCR的表达不会发生。这在本发明的工程化Treg中是一个特别的优势,因为它降低了工程Treg获得效应表型的风险和/或降低了与引入TCR到起始群体中存在的T效应细胞之中相关的风险。

[0265] 剪切序列可以是任何序列,其使得包含(i) FOXP3和(ii) TCR的多肽分离。

[0266] 剪切位点可以是自剪切的,这样当多肽产生时,它立即被剪切成单个的多肽,而不需要任何外部剪切活性。

[0267] 为方便起见,这里使用了“剪切”一词,但剪切位点可以通过经典剪切以外的机制使多肽分成单个的实体。例如,对于口蹄疫病毒(FMDV) 2A自剪切肽,已经提出了各种模型来

解释“剪切”活性：宿主细胞蛋白酶的蛋白水解、自体蛋白分解或翻译效应(translational effect) (Donnelly等人(2001) J.Gen.Virol.82:1027-1041,以参考方式并入本文)。只要当剪切位点位于编码蛋白质的核酸序列之间时引起蛋白质作为单独的实体被表达,这种“剪切”的确切机制对本发明的目的来说并不重要。

[0268] 自剪切多肽可以是来自口蹄疫或心病毒的2A自剪切多肽。

[0269] 变体可以从相似性(即具有相似的化学性质/功能的氨基酸残基)方面考虑,优选以序列同一性来表示变体。

[0270] 序列比较可以通过肉眼进行,或更通常地,借助于现成的序列比较程序。这些公开的和商业化的计算机程序可以计算两个或多个序列之间的序列同一性。

[0271] 适当地,从本载体中表达的FOXP3多肽可以被定位在一个自剪切肽例如2A自剪切肽的N端。这样的FOXP3-2A多肽可以包含SEQ ID NO:24或25所示的序列;或SEQ ID NO:24或25的变体,其与之至少80%相同。合适地,该变体可与SEQ ID NO:24或25至少85、90、95、98或99%相同。

[0272] SEQ ID NO:24

[0273] MPNPRPGKPSAPSLALGSPGASPSWRAAPKASDLLGARGGGTFQGRDLRGGAHASSSSLNMPPPSQL  
QLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKAR  
PGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLAVCKWPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHL  
LDEKGRAQCLLQREMQSLEQQLVLEKEKLSAMQAHLGKMLTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPWWSGPRE  
APDSLFAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNH  
PATWKNAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAWTVDELEFRKKRSQRPSRCSNPTPGPGATNFSLLKQAGDVEENPGPS

[0274] SEQ ID NO:25

[0275] MPNPRPGKPSAPSLALGSPGASPSWRAAPKASDLLGARGGGTFQGRDLRGGAHASSSSLNMPPPSQL  
QLPTLPLVMVAPSGARLGPLPHLQALLQDRPHFMHQLSTVDAHARTPVLQVHPLESPAMISLTPPTTATGVFSLKAR  
PGLPPGINVASLEWVSREPALLCTFPNPSAPRKDSTLSAVPQSSYPLLAVCKWPGCEKVFEEPEDFLKHCQADHL  
LDEKGRAQCLLQREMQSLEQVEELSAMQAHLGKMLTKASSVASSDKGSCCIVAAGSQGPVVPWWSGPREAPDSL  
FAVRRHLWGSHGNSTFPEFLHNMDYFKFHNMRPPFTYATLIRWAILEAPEKQRTLNEIYHWFTRMFAFFRNHPATWK  
NAIRHNLSLHKCFVRVESEKGAWTVDELEFRKKRSQRPSRCSNPTPGPEGRGSLTTCGDVEENGATNFSLLKQAGD  
VEENPGPS

[0276] 合适的载体可以包括但不限于质粒、病毒载体、转座子、与多肽复合或固定化到固相粒子上的核酸。

[0277] 病毒递送系统包括但不限于腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体、疱疹病毒载体、逆转录病毒载体、慢病毒载体、杆状病毒载体。

[0278] 逆转录病毒是生活周期异于裂解性病毒的RNA病毒。在这个方面,逆转录病毒是借助DNA中间体复制的感染性实体。当逆转录病毒感染细胞时,其基因组由逆转录酶转化成DNA形式。DNA副本充当模板,所述模板用于产生为组装出感染性病毒粒子必需的新RNA基因组和病毒编码的蛋白质。

[0279] 存在许多逆转录病毒,例如鼠白血病病毒(MLV)、人免疫缺陷病毒(HIV)、马传染性贫血病毒(EIAV)、小鼠乳腺肿瘤病毒(MMTV)、劳斯肉瘤病毒(RSV)、Fujinami肉瘤病毒(FuSV)、莫洛尼鼠白血病病毒(Mo-MLV)、FBR鼠骨肉瘤病毒(FBR MSV)、莫洛尼鼠肉瘤病毒

(Mo-MSV)、Abelson鼠白血病病毒(A-MLV)、禽髓细胞增多症病毒-29(MC29)和禽成红细胞增多症病毒(AEV)和全部其他逆转录病毒科病毒,包括慢病毒。

[0280] 可以在Coffin等人(“Retroviruses”1997Cold Spring Harbour Laboratory Press编者:JM Coffin,SM Hughes,HE Varmus第758-763页)中找到详细的逆转录病毒名单,所述文献通过引用方式并入本文。

[0281] 慢病毒也属于逆转录病毒科,不过它们可以感染分裂性和非分裂性细胞(Lewis等人(1992)EMBO J.3053-3058),所述文献通过引用方式并入本文。

[0282] 载体可以有能力将本发明的多核苷酸转移至细胞,例如如本文定义的宿主细胞。载体应当理想地能够在宿主细胞中持久地高水平表达,从而 $\alpha$ 链和/或 $\beta$ 链适当地在宿主细胞中表达。

[0283] 载体可以是逆转录病毒载体。载体可以基于或可衍生自MP71载体骨架。载体可以缺少全长或截短形式的美洲旱獭肝炎反应元件(WPRE)。

[0284] 为了高效感染人细胞,可以用兼嗜性包膜蛋白或长臂猿猴白血病病毒包膜蛋白包装病毒粒子。

[0285] 细胞

[0286] 本发明还提供包含本发明多核苷酸或载体的细胞,例如宿主细胞。

[0287] 宿主细胞是可以用来表达并产生TCR的任何细胞。

[0288] 适当地,细胞是T细胞,如常规T细胞。

[0289] 适当地,细胞是Treg细胞。

[0290] 在一个方面,细胞,如T细胞或Treg,可以分离自从受试者获得的血液。适当地,细胞,如T细胞或Treg,分离自从受试者获得的外周血单个核细胞(PBMCs)。

[0291] 适当地,细胞是表达FOXP3的天然Treg。

[0292] 在一个方面,细胞是干细胞。

[0293] 在另一个方面,细胞是祖细胞。

[0294] 如本文所用,术语“干细胞”意指能够无限产生相同类型的更多干细胞并且可以从其中通过分化生成其他专化细胞的未分化细胞。干细胞是多能的。干细胞可以例如是胚胎干细胞或成年干细胞。

[0295] 如本文所用,术语“祖细胞”意指能够分化以形成一个或多个类型细胞,但在体外具有有限自我更新的细胞。

[0296] 适当地,细胞能够分化成T细胞,如Treg。

[0297] 适当地,细胞有能力分化成表达FOXP3的T细胞如Treg。

[0298] 适当地,细胞是人细胞。适当地,细胞是人Treg。

[0299] 适当地,细胞可以是胚胎干细胞(ESC)。适当地,细胞是造血干细胞或造血祖细胞。适当地,细胞是诱导型多潜能干细胞(iPSC)。适当地,细胞是从获得的脐带血。适当地,细胞是从成体外周血获得。

[0300] 在一些方面,可以从脐带血获得造血干细胞和祖细胞(HSPC)。脐带血可以根据本领域已知的技术收获(例如,美国专利号7,147,626和7,131,958,所述文献通过引用方式并入本文)。

[0301] 在一个方面,HSPC可以从多潜能干细胞源(例如,诱导型多潜能干细胞(iPSCs)和

胚胎干细胞(ESCs))获得。

[0302] 如本文所用,术语“造血干细胞和祖细胞”或“HSPC”指表达抗原性标志物CD34(CD34<sup>+</sup>)的细胞和这类细胞的群体。在具体的实施方案中,术语“HSPC”指依据存在抗原性标志物CD34(CD34<sup>+</sup>)和不存在谱系(lin)标志物鉴定的细胞。包含CD34<sup>+</sup>和/或Lin(-)细胞的细胞群体包括造血干细胞和造血祖细胞。

[0303] HSPC可以从成体骨髓获得或分离,所述成体骨髓包括股骨、髌骨、肋骨、胸骨和其他骨。可以使用针头和注射器,从髌骨直接获得或分离含有HSPC的骨髓穿刺物。其他HSPC来源包括脐带血、胎盘血、动员的外周血,Wharton胶、胎盘、胎儿血、胎儿肝或胎儿脾。在具体的实施方案中,收获足够的量HSPC用于治疗应用可能需要在受试者中动员干细胞和祖细胞。

[0304] 如本文所用,术语“诱导型多潜能干细胞”或“iPSC”指已经被再编程到多能状态的非多能细胞。一旦已经将受试者的细胞再编程到多潜能状态,则可以将细胞编程到达所需的细胞类型,如造血干细胞或祖细胞(分别是HSC和HPC)。

[0305] 如本文所用,术语“再编程”涉及一种增加细胞潜力到较低分化状态的方法。

[0306] 如本文所用,术语“编程”涉及一种降低细胞潜力或使细胞分化到较高分化状态的方法。

[0307] 适当地,细胞匹配于受试者或相对受试者为自体。细胞可以从自患者的自身外周血(第1部分)、或在来自供体外周血的造血干细胞移植物的情况下(第2部分)、或在来自无关供体的外周血时的情况下(第3部分)离体生成。

[0308] 适当地,细胞相对受试者为自体。适当地,受试者是人。

[0309] 在一些方面,细胞可以从诱导性祖细胞或胚性祖细胞离体分化成免疫细胞衍生。在这些情况下,通过采用许多手段之一(包括用病毒载体转导、用DNA或RNA转染),引入编码本发明TCR的DNA或RNA,产生细胞。

[0310] 适当地,通过采用许多手段之一(包括用病毒载体转导、或者用DNA或RNA转染),除本发明的TCR以外引入编码FOXP3的DNA或RNA,产生细胞。

[0311] 如本文所用,术语“常规T细胞”或Tconv意指表达 $\alpha\beta$ T细胞受体(TCR)以及可以是分化抗原簇4(CD4)或分化抗原簇8(CD8)的辅助受体的T淋巴细胞细胞。常规T细胞存在于外周血、淋巴结和组织中。FOXP3由胸腺衍生的Tregs表达并且可以由新近活化的常规T细胞表达。

[0312] 如本文所用,术语“调节性T细胞”或Treg意指表达标志物CD4、CD25和FOXP3的T细胞(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>)。也可以使用细胞表面标志物CD4和CD25,在表面蛋白CD127不存在下或组合其低水平的表达(CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>),鉴定Treg。Treg还可以在细胞表面上表达高水平的CTLA-4(细胞毒T-淋巴细胞相关分子-4)或GITR(糖皮质激素诱导的TNF受体)。不通于常规T细胞,调节性T细胞不产生IL-2并且因此在基线时无活力。Treg细胞包括胸腺衍生的天然Treg(nTreg)细胞和外周生成的诱导型Treg(iTreg)细胞。

[0313] 在一个方面,Treg为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>T细胞

[0314] 在一个方面,Treg为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>T细胞。

[0315] 在一个方面,Treg为CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>CD127<sup>-</sup>T细胞。

[0316] 如本文所用,术语“天然T reg”意指胸腺衍生的Treg。天然T regs是CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>

FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>+</sup>Neuropilin1<sup>+</sup>。与iTreg相比,nTregs具有更高的PD-1(程序性细胞死亡-1, pdcd1)、神经纤毛蛋白1(Nrp1)、Helios(Ikzf2)和CD73表达。nTreg可以基于单独地表达Helios蛋白或神经纤毛蛋白1(Nrp1)与iTreg区分。

[0317] 如本文所用,术语“诱导的调节性T细胞”(iTreg)意指从胸腺外部成熟CD4<sup>+</sup>常规T细胞发育而来的CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>FOXP3<sup>+</sup>Helios<sup>-</sup>Neuropilin1<sup>-</sup>T细胞。例如,iTregs可以在IL-2和TGF-β存在下从CD4<sup>+</sup>CD25<sup>-</sup>FOXP3<sup>-</sup>细胞体外诱导。

[0318] 本发明的方法可包括将编码本TCR的第一核苷酸序列和编码FOXP3的第二核苷酸序列引入如本文所描述的天然Treg(其已表达内源性FOXP3)。适当地,本发明的方法包括引入一个载到如本文定义的天然Treg中,所述载体除了包含编码FOXP3的多核苷酸外,还包含编码本TCR的多核苷酸;其中该载体具有以下方向:5'FOXP3-TCR 3'(如本文所述)。因此,编码FOXP3的多核苷酸可以在编码TCR的多核苷酸的5'方向。在不希望受理论约束的情况下,本发明人已经表明,外源性FOXP3在调节性T细胞(Tregs)(已经表达内源性FOXP3)中的表达会增强其调节功能。特别是,本发明人已经确定,在已经表达内源性FOXP3的Treg中增加FOXP3的表达(例如通过引入外源性FOXP3),比在不表达内源性FOXP3的常规T细胞中表达外源性FOXP3所提供的调节功能,能增强Treg的调节功能到更高的程度。此外,在已经表达内源性FOXP3的Treg中增加FOXP3的表达,使得Treg在给受试者服用后具有改善的功能谱的体内保留。例如,已经确定不表达外源性FOXP3的天然Tregs在给受试者用药后可能会失去它们的Treg谱——例如不表达外源性FOXP3的天然Tregs在给受试者用药后的一段时间后可能具有降低的FOXP3表达水平,并能够产生促炎症、效应细胞因子。由本发明提供的Tregs可以在给受试者用药后的一段时间后保留FOXP3的表达,并具有降低的产生促炎症、效应细胞因子的能力。

[0319] 组合物

[0320] 本发明还提供包含本发明的工程化Treg、载体或细胞的组合物。适当地,本发明提供包含根据本发明的工程化Treg的组合物。适当地,本发明提供包含根据本发明载体的组合物。适当地,本发明提供包含根据本发明的细胞的组合物。

[0321] 在一些实施方案中,组合物是药物组合物。这种药物组合物可以包含可药用载体、稀释剂、辅料或辅助剂。可以根据预期施用途径和标准药物实践选择药用载体,辅料或稀释剂的选项。作为载体、辅料或稀释剂(或除其之外),药物组合物可以包含任何合适的粘合剂、润滑剂、助悬剂、包衣剂、增溶剂和其他载体剂。

[0322] 药物组合物一般应当是无菌的并且在制造和储存条件下稳定。肠胃外施用制剂包括但不限于如本文中讨论的混悬剂、溶液剂、油质或水质载体中的乳剂、糊剂和植入式持续释放或可生物降解制剂。可以使用肠胃外可接受的无毒稀释剂或溶剂制备无菌注射制剂。根据本发明使用的药物组合物可以包含在所用剂量和浓度对受试者无毒的可药用分散剂、润湿剂、助悬剂、等渗剂、包衣、抗菌剂和抗真菌剂、载体、辅料、盐或稳定剂。优选地,这种组合物还可以包含用于治疗疾病的可药用载体或辅料,所述可药用载体或辅料与给定的施用方法和/或部位(例如肠胃外(例如皮下、皮内或静脉内注射)或鞘内施用)相容。

[0323] 在药物组合物包含本发明细胞的情况下,可以使用现行药品生产管理规范(cGMP)产生组合物。

[0324] 适当地,包含细胞的药物组合物可以包含有机溶剂,如但不限于,乙酸甲酯、二甲

基亚砷 (DMSO)、N,N-二甲基甲酰胺 (DMF)、二甲氧基乙烷 (DME) 和二甲基乙酰胺, 包括其混合物或组合。

[0325] 适当地, 包含细胞的药物组合物无内毒素。

[0326] 治疗方法

[0327] 本发明提供一种治疗和/或预防疾病的方法, 所述方法包括步骤: 向受试者施用本发明的工程化Treg。

[0328] 本发明提供一种治疗和/或预防疾病的方法, 所述方法包括步骤: 向受试者施用本发明的药物组合物。

[0329] 本发明还提供本发明的工程化Treg用于治疗 and/或预防疾病。

[0330] 本发明还提供本发明的药物组合物用于治疗 and/或预防疾病。

[0331] 本发明还涉及本发明的工程化Treg、载体或细胞在制造治疗和/或预防疾病的药物中的用途。

[0332] 优选地, 本发明的治疗方法涉及向受试者施用本发明的药物组合物。

[0333] 术语“治疗/处置/处理”涉及向患有现存疾病或病状的受试者施用如本文所述的工程化的Treg、细胞, 载体或药物组合物, 旨在减轻、减少或改善至少一个与疾病相关的症状和/或减缓、减少或阻断疾病进展。

[0334] 如本文所用的提及“预防”/“防止”(或预防), 指延迟或防止疾病症状的初起。预防可以是绝对的(从而, 无疾病发生)或可以仅在一些个体中有效或有限时间量有效。

[0335] 在本发明的一个优选实施方案中, 本文所述的任何方法的受试者是哺乳动物、优选地猫、犬、马、驴、羊、猪、山羊、牛、小鼠、大鼠、兔或豚鼠。优选地, 受试者是人。

[0336] 可以使用使得有效成分生物可利用的多种途径中任一者, 实现施用本发明的药物组合物。例如, 可以将Treg、细胞、载体或药物组合物静脉内、鞘内、通过口服和肠胃外途径、鼻内、腹腔内、皮下、透皮或肌内施用。

[0337] 在一个方面, 静脉内施用本发明的工程化Treg或本发明的药物组合物。

[0338] 在另一个方面, 鞘内施用本发明的工程化Treg或本发明的药物组合物。

[0339] 一般, 医师将确定最合适于个体受试者的实际剂量, 并且该计量将随具体患者的年龄、重量和反应变动。剂量是这样的, 它从而足以减少和/或防止疾病症状。

[0340] 本领域技术人员将领会, 例如, 递送途径(例如, 口服与静脉内与皮下等)可能影响给药量和/或要求的给药量可能影响递送途径。例如, 在特定部位或位置内部特别高浓度的药剂有意义的情况下, 聚焦递送可能是需要的和/或有用的。优化给定治疗方案的途径和/或给药方案时待考虑的其他因素可以包括, 例如, 正在接受治疗的疾病(例如, 类型或分期等)、受试者的临床状况(例如, 年龄、总体健康等)、存在或不存联合疗法和医疗执业者已知的其他因素。

[0341] 剂量是这样的, 它从而足以稳定或改善疾病的症状。

[0342] 本发明还提供一种治疗和/或预防疾病的方法, 所述方法包括步骤: 向受试者施用本发明的药物组合物, 所述药物组合物包含细胞, 例如本发明的T细胞。

[0343] 适当地, 本发明还提供一种治疗和/或预防疾病的方法, 所述方法包括步骤: 向受试者施用本发明的工程化Treg。

[0344] 该方法可以包括以下步骤:

- [0345] (i) 从受试者分离含有细胞的样品；
- [0346] (ii) 向细胞引入编码TCR的核酸序列和任选地，编码FOXP3蛋白的核酸；并且
- [0347] (iii) 向受试者施用来自 (ii) 的细胞。
- [0348] 适当地，来自 (ii) 的细胞可以在施用至受试者之前体外扩增。
- [0349] 该方法可以包括以下步骤：
- [0350] (i) 向含有细胞的样品引入编码TCR的核酸序列和任选地，编码FOXP3蛋白的核酸；
- [0351] 并且
- [0352] (ii) 向受试者施用来自 (i) 的细胞。
- [0353] 疾病
- [0354] 通过本发明的方法和用途待治疗和/或预防的疾病可以是诱导T细胞介导免疫应答的任何疾病。
- [0355] 疾病可以例如是癌症、传染性疾病或自身免疫疾病。
- [0356] 适当地，通过本发明的方法和用途待治疗和/或预防的疾病可以是自身免疫疾病。
- [0357] 不希望受理论约束，通过本发明的方法和用途待治疗和/或预防的疾病可以是其中MBP是抗原例如其中MBP是自身抗原的任何疾病。
- [0358] 适当地，疾病可以是自身免疫性疾病和炎性中枢神经系统疾病 (例如慢性神经变性病)。
- [0359] 适当地，疾病可以是慢性神经变性病如多发性硬化 (MS)、阿尔茨海默病、帕金森病、嗜神经病毒性感染、卒中、副肿瘤性 (paraneoplastic) 病症和外伤性脑损伤。
- [0360] 在一个方面，疾病是多发性硬化。
- [0361] 适当地，疾病是慢性进展型多发性硬化。
- [0362] 适当地，疾病是复发/缓解型多发性硬化。
- [0363] 在一个方面，疾病可以具有全身性自身免疫性和炎性疾病 (如Behçet病、类肉状瘤病 (sarcoidosis)、系统性红斑狼疮、幼年特发性关节炎、硬皮病和Sjögren综合征) 的中枢神经系统 (CNS) 累及。
- [0364] 适当地，疾病存在于HLA-DRB1\*0401阳性受试者中。
- [0365] 适当地，疾病是多发性硬化并且受试者为HLA-DRB1\*0401阳性。
- [0366] 适当地，疾病是慢性进展型多发性硬化并且受试者为HLA-DRB1\*0401阳性。
- [0367] 适当地，疾病是复发/缓解型多发性硬化并且受试者为HLA-DRB1\*0401阳性。
- [0368] 多发性硬化
- [0369] 多发性硬化 (MS) 是欧洲和美国青年当中最常见的神经系统疾病。MS特征在于脱髓鞘病并且是中枢神经系统慢性退行性疾病，其中髓鞘质逐步破坏呈片状遍及脑和/或脊髓发生，干扰神经连接性并造成肌肉虚弱、协调障碍和言语与视觉障碍。
- [0370] 已经鉴定几种MS进展类型或样式，包括临床孤立综合征 (CIS)、复发缓解型MS (RRMS)、原发进展型MS (PPMS) 和继发进展型MS (SPMS)。对于一些患者，失能增加或进展为非常逐步，并且对于其他患者，它可能更快地发生。然而，通常，从侵袭中恢复变得越来越不完整，并且症状倾向于增加且失能增长。
- [0371] 尽管已经批准了几种降低临床复发频率的病情改善疗法 (DMT)，但按照现行治疗方案，大部分患者继续在临床上加重。自体造血干细胞移植可能对患者具有持久有益效果，

但该程序需要与巨大毒性相关的激进清髓预处理。DMT或干细胞移植均不能介导MS的免疫病理的抗原特异性抑制。不希望受理论约束,在未来,施用一个剂量的本发明的工程化Treg可能提供对MS免疫病理学的持久抑制,无全身性副作用。这将显著影响MS罹患者中疾病的进展。

[0372] 适当地,本发明的Treg、载体或药物组合物可以减少或减轻一个或多个MS症状,所述症状包括视力减弱或减退、步态蹒跚和不均匀、言语不清、尿频和失禁、情绪变化和抑郁、肌痉挛和麻痹。

[0373] 方法

[0374] 本发明也提供一种产生工程化Treg的方法,所述方法包括向体外或离体细胞引入编码如本文定义的TCR的多核苷酸。适当地,该方法还包括在允许本发明TCR分子表达的条件下孵育细胞。任选地,该方法还可以包括步骤:纯化工程化的Treg细胞。

[0375] 适当地,细胞是T细胞。

[0376] 适当地,细胞是Treg细胞。

[0377] 适当地,细胞是表达FOXP3的天然Treg。

[0378] 在一个方面,细胞是干细胞。适当地,在本发明的方法中,已经将编码如本文定义TCR的核酸引入干细胞并且干细胞随后分化成表达FOXP3的T细胞如Treg。

[0379] 适当地,干细胞具有分化成表达FOXP3的T细胞如Treg的能力。适当地,细胞可以是胚胎干细胞(ESC)。适当地,细胞可以是获得的脐带血。适当地,细胞可以是成体外周血获得。适当地,细胞是造血干细胞和祖细胞(HSPC)。适当地,细胞是诱导型多潜能干细胞(iPSC)。

[0380] 在另一个方面,细胞是祖细胞。适当地,祖细胞具有分化成表达FOXP3的T细胞如Treg的能力。

[0381] 在另一个方面,本发明提供一种产生工程化Treg的方法,所述方法包括向体外或离体细胞引入编码如本文定义的TCR的多核苷酸和编码FOXP3蛋白的多核苷酸。适当地,细胞可以是如本文定义天然Treg。适当地,编码如本文定义的TCR的多核苷酸和编码FOXP3蛋白的多核苷酸作为各自独立的多核苷酸提供。适当地,将独立的多肽分别、依次或同时引入细胞中。在分别或依次引入多肽的情况下,适当地,首先引入编码TCR的多核苷酸。在分别或依次引入多肽的情况下,适当地,首先引入编码FOXP3的多核苷酸。适当地,在相同的多核苷酸上提供编码如本文定义的TCR的多核苷酸和编码FOXP3蛋白的多核苷酸。

[0382] 在一些实施方案中,根据本发明的方法包括。

[0383] (a) 从细胞群中分离出天然Treg;以及

[0384] (b) 增加天然Treg中的FOXP3表达。

[0385] “从细胞群中分离Treg”的表述意为从多种不同类型的细胞的异质混合物中分出Treg。适当的细胞群是来自人类受试者的样本。

[0386] 适当地,Treg被分离为Treg的群体。

[0387] 适当地,Treg群包含至少70%的Treg,诸如75%、85%、90%或95%的Treg。

[0388] 适当地,该方法还包括在引起FOXP3和本发明TCR分子表达的条件下孵育细胞。任选地,该方法还可以包括步骤:纯化工程化的Treg细胞。

[0389] 在一个方面,本发明提供一种产生工程化Treg的方法,所述方法包括向体外或离

体细胞引入编码如本文定义的TCR的多核苷酸和编码FOXP3蛋白的多核苷酸并且使细胞分化成表达FOXP3的T细胞,如Treg。适当地,该方法还包括在引起FOXP3和本发明TCR分子表达的条件下孵育细胞。任选地,该方法还可以包括步骤:纯化工程化的Treg细胞。

[0390] 适当地,在一个方面,向细胞引入FOXP3之前,使细胞分化成T细胞。

[0391] 可以通过本领域已知的任何方法实现对工程化Treg的纯化。适当地,可以使用细胞群体正向和/或负向选择,使用荧光激活细胞分选(FACS)或免疫磁性分离(即,使用与磁性纳米粒子或珠连接的抗体),纯化工程化的Treg。

[0392] 适当地,可以使用如本文定义的TCR的表达,纯化工程化的T细胞。

[0393] 本公开不受本文公开的示例性方法和材料限制,并且与本文所述的那些方法和材料相似或等同的任何方法和材料可以用于实施或检验本公开的实施方案。数值范围包括界定该范围的数值。除非另外说明,否则任何核酸序列从左至右以5'至3'方向书写;氨基酸序列从左至由以氨基至羧基方向书写,各自地。

[0394] 在提供一个值范围的情况下,应当理解除非上下文明确说明,否则还具体地披露了这个范围的上限与下限之间的每个中间值至该下限的十分之一单位。本公开范围内涵盖在所述范围内任一所述值或居间值与这个所述范围内任一其他所述值或居间值之间的每个较小范围。这些较小范围的上限值和下限值可以独立地纳入该范围内或排除在外,并且本公开范围内还涵盖其中两个限值中任一者纳入、二者均不纳入或二者均纳入较小范围情况下的每个范围,受所述范围中任何具体排除的限值约束。在所述的范围包含所述限值中一者或两者情况下,排除这些已纳入限值中任一者或两者的范围也纳入公开。

[0395] 必须指出,除非上下文另外明确指出,否则如本文中中和所附权利要求中所用,单数形式“一个(a)”、“一种(an)”和“该(the)”包括复数称谓。

[0396] 如本文所用的术语“包含”、“包括”和“包含了”同义于“含”、“内含”或“含有”、“包含有”,并且是包含性的或开放式的并且不排除附加、未列举的成员、要素或方法步骤。术语“包含”、“包括”和“包含了”还包括术语“由……组成”。

[0397] 应当指出,如本文所述的本发明实施方案可以组合。

[0398] 本文讨论的出版物仅因它们的公开先于本申请的提交日而提供。本文中这些出版物均不得解释为承认这类出版物相对于所附权利要求构成现有技术。

[0399] 现在将通过实施例进一步描述本发明,所述实施例意在起到辅助本领域普通技术人员实施本发明的作用并且不意图以任何方式限制本发明的范围。

## 实施例

[0400] 实施例1-产生编码TCR和TCR+FOXP3的逆转录病毒载体

[0401] MS2-3C8 TCR

[0402] MS2-3C8 TCR识别HLA-DRB1\*0401呈递的MBP 111-129 (SEQ ID NO:12),如通过引用方式并入本文的Muraro等人,JCI 1997;100,2,339-349所述。通过将密码子优化的MS2-TCR  $\alpha$ 、鼠化恒定 $\alpha$ 结构域、密码子优化的MS2-TCR  $\beta$ 和鼠化恒定 $\beta$ 结构域克隆入逆转录病毒表达盒pMP71,构建了编码MS2-3C8 TCR的密码子优化的MS-2TCR表达盒(图1和图2)。如通过引用方式并入本文的Blood.2007Mar 15;109(6):2331-2338.and Cancer Res.2007Apr 15;67(8):3898-3903中所述,在恒定- $\alpha$ 结构域和恒定- $\beta$ 结构域之间添加了一个额外的二硫

键。恒定- $\alpha$ 结构域和MS2-TCR  $\nu\beta$ 结构域由P2A序列分隔。

[0403] MS2-3C8 FOXP3

[0404] 通过修改上文描述的MS-2TCR,构建了编码FOXP3和MS-2TCR的表达盒(图1和图3)。利用MS-2TCR上游RsrII和EcoR1位点,将移除了终止密码子的FOXP3基因和T2A序列插入pMP71载体。

[0405] 实施例2-用TCR和TCR+FOXP3转导T细胞

[0406] 将Phoenix-Ampho细胞以 $2 \times 10^6$ 接种于8mL Iscove改良Dulbecco培养基(IMDM)按标准组织培养条件持续24小时。在第1天,使用与 $2.5 \mu\text{g}$ 相关质粒DNA和 $1.5 \mu\text{g}$ 编码亲嗜性逆转录病毒辅助受体的pCL-Amp混合的**FuGENE®**转染试剂和最佳培养基,在室温转染细胞20分钟。将转染混合物添加至Phoenix Amphotropic (Phoenix-AMPHO)贴壁细胞并且孵育进一步的24小时。在第2天,培养基更换成5mL **TexMACS®** (Miltenyi) 组织培养培养基,并将细胞孵育另外24小时。

[0407] 使用CD4+正向选择试剂盒,分离CD4+T细胞。随后将细胞用流式细胞CD4、CD25和CD127抗体染色,之后使用BD**FACSAria®**细胞计进行细胞分选。

[0408] 在聚丙烯管中收集CD4+CD25<sup>hi</sup>CD127-Treg和CD4+CD25-CD127+Tconv。通过添加FOXP3 PE抗体,测定细胞分选纯度。CD4+CD25+CD127-FOXP3+细胞的纯度常规地 $>70\%$ 。

[0409] 在第0天,通过与抗CD3珠和抗-CD28珠1:1培养,将FACS分选的细胞活化48小时。在第2天,计数细胞并且在用于Tconv的Roswell Park Memorial Institute完全培养基(RPMI-1640) (Gibco)或用于Treg的**TexMACS®**培养基中以 $1 \times 10^6/\text{mL}$ 重悬。通过纤维连接蛋白(retronectin)包被,预先准备非组织培养处理的24孔平板,随后接着用磷酸盐缓冲盐水(PBS)中的2%牛血清白蛋白封闭并且用PBS洗涤2次。按1:1混合细胞悬液。用于Tconv的IL-2终浓度 $300 \text{u/ml}$ ,用于Treg的是 $1000 \text{u/ml}$ 。将细胞在37度孵育过夜,之后移除上清液并补充新鲜的完全培养基和IL-2。隔日更换培养基。

[0410] 在补充10%热灭活胎牛血清(FBS);100单位/mL青霉素; $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素;2mM L-谷氨酰胺的RPMI-1640中培育Tconv细胞。在补充100单位/mL青霉素; $100 \mu\text{g}/\text{mL}$ 链霉素的**TexMACX®**培养基中培养调节性T细胞。

[0411] 图5中的FACS点图显示在第7天进行以通过测量鼠TCR恒定区和FOXP3的表达来评估转导水平的代表性流式细胞分析。

[0412] 实施例3-体外扩增期间的FOXP3表达

[0413] 如上文实施例2中所述那样分离T细胞。在第0天,通过流式细胞术测量FOXP3和Treg细胞表面标志物CTLA-4(也称作CD152)与CD25的表达。

[0414] 如上文实施例2中所述那样转导并培养T细胞。在第7天,通过流式细胞术分析细胞并且将点图对转导的细胞群体设门。测量FOXP3、CTLA-4和CD25的相对表达。图6显示了描述体外扩增第7天时FOXP3、CTLA-4和CD25表达的条图。体外扩增期间,FOXP3表达维持。

[0415] 抗原特异性活化MS-2TCR转导的T细胞

[0416] 实施例4-对效应T细胞和Tregs的肽再刺激

[0417] 用人HLA-DR4和CD80或CD86转导中国仓鼠卵巢(CHO)细胞。将表达CD80或CD86的细胞按相等份额混合在一起用于后续实验。

[0418] 将CHO细胞按 $10 \times 10^6/\text{mL}$ 重悬于含饱和量( $10 \mu\text{M}/\text{mL}$ )MBP 111-129 (SEQ ID NO:12)

(LSRFSWGAEGQRPGFGYGG)的培养基中。将悬液以标准组织培养条件孵育2小时,之后照射、洗涤和重悬。

[0419] 用MS2或MS2-FOXP3构建体转导T细胞经洗涤、计数并按 $0.5 \times 10^6$ 个细胞/ml重悬于完全RPMI中。将细胞按1:1与CHO细胞铺板,在有肽和无肽情况下孵育4小时。将细胞固定并通透化,之后用针对IL-2和IFN $\gamma$ 的抗体染色。

[0420] 图7展示了显示对效应T细胞进行肽再刺激的FACS点图。T细胞的转导效率用‘Td=’指示。

[0421] 如上文所述,将Treg细胞与CHO细胞培养。图8展示了显示对Treg细胞进行肽再刺激的FACS点图。T细胞的转导效率用‘Td=’指示。

[0422] 实施例5-TCR转导和TCR-FOXP3转导的针对同源肽的T细胞应答

[0423] 将TCR转导的T<sub>conv</sub>、TCR转导的Tregs、TCR-FOXP3转化的T<sub>conv</sub>和TCR-FOXP3转化的T<sub>conv</sub>(上文所描述方法),与或不与肽冲击的照射的APC一起培养4天。从培养物收集上清液并且通过ELISA测定IL-2和IFN $\gamma$ (n=2-4)。图9显示TCR转导的Treg和TCR-FOXP3转化的T<sub>conv</sub>对同源肽的反应。

[0424] 实施例6-TCR转导和TCR-FOXP3转导

[0425] 如上述制备CHO细胞。用TCR或用TCR+FOXP3转导T<sub>conv</sub>细胞。通过磁珠分选法分离转导的T细胞。将转导的细胞用缀合于APC的抗鼠恒定 $\beta$ 抗体染色。彻底地洗涤细胞并用抗APC第二抗体染色。洗涤细胞并使其穿过磁柱,并且捕获并洗脱转导的细胞。常规地,>95%纯化的细胞为APC+。

[0426] 无CHO细胞下培养的未刺激的细胞充当阴性对照。PMA(佛波醇12-肉豆蔻酸酯13-乙酸酯)刺激的细胞充当阳性对照。白色标度显示来自表达MS2 TCR的细胞的细胞因子产生,而黑色标度显示来自表达MS2 TCR和FOXP3的T细胞的细胞因子产生(n=3)。图10显示相比经单独TCR转导的常规细胞,经TCR和TCR<sup>+</sup>FOXP3转导的常规T细胞产生更少的IL-2。

[0427] MS-2 TCR转导的Treg的抗原特异性抑制

[0428] 实施例7-TCR转导的T细胞的增殖

[0429] 将CD80+CD86+DR4+CHO细胞载以肽并且如上文所述照射,之后以 $0.1 \times 10^6$ 个细胞/ml重悬。将转导的反应者T细胞用加温的PBS中的CFSE细胞追踪染料在37度染色3分钟,之后前添加等体积的温暖FBS并且孵育另外3分钟。

[0430] 将细胞在5x体积完全培养基中洗涤,之后计数并以 $1 \times 10^6$ 个转导细胞/ml重悬。通过流式细胞术测T<sub>conv</sub>和Treg的转导效率。将调节性T细胞从培养物移除、洗涤并以 $1 \times 10^6$ 个转导的细胞/ml重悬于完全RPMI中。将细胞按1个Treg细胞:0.1个CHO细胞及不同比率的T<sub>conv</sub>铺板。通过分析羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)染色的T<sub>conv</sub>,测定增殖。

[0431] 图11中的数据显示TCR转导的Treg以抗原特异性方式抑制增殖。从培养基收集上清液并通过ELISA对其分析IL-2。图12中呈现的数据显示TCR转导的Treg以抗原特异性方式抑制IL-2产生。

[0432] 实施例8-实验性自身免疫性脑脊髓炎的过继转移模型中的工程化treg

[0433] 通过过继转移,将已经用MS2-3C8 TCR转导的人常规T细胞施用至HLADRB1\*0401转基因的免疫缺陷性NOD scid $\gamma$ 小鼠(NSG)。

[0434] 过继转移人T细胞可以在小鼠中诱导实验性自身免疫性脑脊髓炎(EAE)类型的疾

病。随后用已经过MS2-3C8 TCR转导的人Treg细胞或对照Treg处理小鼠。

[0435] 除脊髓和脊神经根之外,HLA-DRB1+0401-限制型MBP 111-129 (SEQ ID NO:12) -特异性人源化TCR转基因小鼠还具有定位于脑干和脑神经根中的MS2-3C8转基因T细胞浸润和炎性病灶(Quandt等人,J.Exp.Med.V.200(2);2004,所述文献通过引用方式并入本文)。

[0436] 例如依据CFSE、IL-2和/或IFN  $\gamma$  水平在小鼠模型中测量TCR诱导的Tregs对致病性T细胞增殖的抑制。

[0437] 实施例9-实验性自身免疫性脑脊髓炎经典模型中的工程化Treg

[0438] 用的Mog(髓鞘少突胶质细胞蛋白质)免疫小鼠以诱导EAE,一个广泛接受的MS动物模型。

[0439] 随后用已经过MS2-3C8 TCR转导的人Treg细胞或对照Treg处理小鼠。例如依据CFSE、IL-2和/或IFN  $\gamma$  水平在小鼠模型中测量TCR诱导的Tregs对致病性T细胞增殖的抑制。

[0440] 实施例10-TCR转导调节性T细胞可以植入照射的宿主

[0441] 通过珠分选法从HLA-DRB\*0401转基因小鼠的淋巴结和脾细胞分离CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg。用TCR转导Treg。转导后1天,将TCR或TCR+FOXP3转导的细胞注入用4Gy辐照预备的HLA-DRB\*0401转基因宿主(第0天)。7周后,用流式细胞术通过TCR染色确定转导的Treg的植入(+7周)。

[0442] 图13中的结果显示施用后7周,Tregs和抗原特异性抑制作用持续存在。

[0443] 实施例14--用密码优化的MS2-3C8表达和功能研究

[0444] 使用 $\alpha$ 链-P2A- $\beta$ 链-T2A-截短的小鼠CD19(tmCD19)或 $\beta$ 链-P2A- $\alpha$ 链-T2A-截短的小鼠CD19(tmCD19)配置,将MS2-3C8 TCR的密码优化序列克隆到逆转录病毒pMP71载体上(图14A)。

[0445] MS2-3C8 TCRs在Jurkat细胞(图14B)和CD4<sup>+</sup>人T细胞(图14C)中高效表达。结果与MS2-3C\*野生型序列和带有鼠恒定结构域的MS2-3C8 TCR进行了比较。

[0446] 用密码子优化的MS2-3C8 TCR、野生型MS2-3C8 TCR或带有鼠恒定结构域的MS2-3C8 TCR转导的人类CD4<sup>+</sup>T细胞,在用加载了饱和浓度相关肽的APC刺激下,能够产生抗原特异性细胞因子反应(图14D)。

[0447] 还进行了评估生产MBP特异性促炎症细胞因子的抑制试验,显示MS2-3C8 TCR的抗原特异性抑制数据(图14E)。

[0448] 实施例15-抗原特异性抑制与参考MBP TCR转导的Tregs

[0449] 将CD80+CD86+DR4+CHO细胞装载肽并辐照,然后按 $0.1 \times 10^6$ 个细胞/ml重悬。转导的响应T细胞在37度的温热PBS中用CFSE细胞示踪染料染色3分钟,然后加入等量的温热FBS再孵育3分钟。

[0450] 细胞在计数前用5倍体积的完全培养基进行清洗,并以 $1 \times 10^6$ 个转导细胞/ml的比例重悬。通过流式细胞术确定Tconv和Treg的转导效率。调节性T细胞从培养物中取出,清洗并以 $1 \times 10^6$ 个转导细胞/ml重悬在完全RPMI中。细胞以1个Treg:0.1个CHO细胞:以及不同比例的Tconv铺板。通过分析羧基荧光素琥珀酰亚胺酯(CFSE)染色的T conv的稀释度来确定增殖。

[0451] 图15中的数据显示,TCR诱导的Tregs以抗原特异性方式抑制增殖。从培养基中收集上清液,通过ELISA测定IL-2。图15中的数据显示,TCR转导的Treg以抗原特异性方式抑制

IL-2的产生。

[0452] 本参考实验中使用的表达盒以5'-3'方向编码FOXP3和参考MBP TCR。

[0453] 实施例16A-表达外源性FOXP3的移植、持续存在和保留FoxP3、CD25和TCR表达

[0454] 通过珠分选法从HLA-DRB\*0401转基因小鼠的淋巴结和脾细胞分离Thy1.1+CD4+CD25+或CD45.1+CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup>Treg。用TCR转导CD45.1+Treg,并用TCR+鼠FOXP3转导Thy1.1+Treg。转导后1天,将TCR或TCR+FOXP3转导的细胞以1:1的比例注入用4Gy辐照预备的HLA-DRB\*0401转基因宿主。FACS图显示了注射细胞的CD45.1:Thy1.1的比例和它们各自的FOXP3表达。

[0455] 7周后用流式细胞术通过TCR染色来识别移植的细胞。确定TCR+群体内CD45.1:Thy1.1的比例,并通过FOXP3和CD25染色检查移植的CD45.1(用TCR转导的Treg)或Thy1.1(用TCR+FOXP3转导的Treg)细胞的表型。

[0456] Thy1.1+CD4+CD25+Treg是通过珠分选法从HLA-DRB\*0401转基因小鼠的淋巴结和脾细胞分离出的。用TCR、TCR+鼠FOXP3转导Treg或用无病毒上清(mock)培养Treg。转导后1天,将TCR或TCR+FOXP3转导的细胞以1:1的比例注入用4Gy辐照预备的HLA-DRB\*0401转基因宿主。7周后用流式细胞术确定转导的Treg的移植情况。图15,A显示转导后第1天通过人的可变2.1和鼠Foxp3的表达来确定转导效率。图15,B显示了来自接受了TCR或TCR+FOXP3转导的Treg的小鼠的脾细胞,用Thy1.1染色以识别转导的细胞(顶部栏)和FOXP3和TCR(底部栏)。图15,C显示累积数据,显示转导效率的倍数变化(左图)和转导细胞绝对数量的倍数变化(右图),相对于用TCR或TCR+FOXP3转导的Treg的注射之日。图15,D显示转导7周后转导细胞内FOXP3的代表性表达。图中显示了第7周时转导群体中FOXP3+细胞的百分比累积(左),以及FOXP3+细胞相对于注射当天的倍数变化。

[0457] 实施例16B--表达外源性FOXP3的Treg在体内7周后保持Treg功能,而不表达外源性FOXP3的Tregs获得产生效应细胞因子的能力

[0458] 将脾细胞与用无关肽或10uM MBP脉冲的CD86+HLA-DR4+CHO细胞培养4小时。表达外源性FOXP3的Treg在体内7周后保持Treg功能,正如所表现出的缺乏效应细胞因子的产生,而不表达外源性FOXP3的Tregs获得了产生效应细胞因子的能力(图16)。

[0459] 以上说明书中提到的全部出版物均通过引用的方式并入本文。本发明所述方法和系统的多种修改和变化对于本领域技术人员将显而易见,而不脱离本发明的范围和精神。虽然已经联系具体的优选实施方案描述本发明,应当理解如要求的本发明不应不当地受限于此类具体的实施方案。实际上,用于实施本发明的所述模式的多种修改,对于分子生物学、细胞免疫学或相关领域的技术人员显而易见,意在属于所附权利要求的范围内。

<110> UCL 商业有限公司

<120> 工程化的调节性 T 细胞

<130> P118837PCT

<150> GB 1915359.2

<151> 2019-10-23

<160> 33

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> T 细胞受体 (TCR) alpha 链互补决定区 (CDR), CDR3alpha

[0001] <400> 1

Thr Val Tyr Gly Gly Ala Thr Asn Lys Leu Ile  
1                    5                    10

<210> 2

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TCR beta 链 CDR, CDR3beta

<400> 2

Ser Ala Arg Gly Gly Ser Tyr Asn Ser Pro Leu His  
1                    5                    10

<210> 3

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TCR alpha 链 CDR, CDR1alpha

<400> 3

Thr Ile Ser Gly Thr Asp Tyr

1 5

<210> 4

<211> 5

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TCR alpha 链 CDR, CDR2alpha

<400> 4

[0002]

Gly Leu Thr Ser Asn

1 5

<210> 5

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TCR beta 链 CDR, CDR1beta

<400> 5

Asp Phe Gln Ala Thr Thr

1 5

<210> 6

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; TCR beta 链 CDR, CDR2beta

&lt;400&gt; 6

Ser Asn Glu Gly Ser Lys Ala

1 5

&lt;210&gt; 7

&lt;211&gt; 111

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 例证性的 TCR  $\alpha$  链可变区

&lt;400&gt; 7

Asp Ala Lys Thr Thr Gln Pro Asn Ser Met Glu Ser Asn Glu Glu Glu

1 5 10 15

[0003]

Pro Val His Leu Pro Cys Asn His Ser Thr Ile Ser Gly Thr Asp Tyr

20 25 30

Ile His Trp Tyr Arg Gln Leu Pro Ser Gln Gly Pro Glu Tyr Val Ile

35 40 45

His Gly Leu Thr Ser Asn Val Asn Asn Arg Met Ala Ser Leu Ala Ile

50 55 60

Ala Glu Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Ile Leu His Arg Ala Thr Leu

65 70 75 80

Arg Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ala Thr Asn

85 90 95

Lys Leu Ile Phe Gly Thr Gly Thr Leu Leu Ala Val Gln Pro Asn

100 105 110

<210> 8

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 例证性的 TCR  $\beta$  链可变区

<400> 8

Gly Ala Val Val Ser Gln His Pro Ser Trp Val Ile Cys Lys Ser Gly  
1                   5                   10                   15

Thr Ser Val Lys Ile Glu Cys Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr  
                  20                   25                   30

Met Phe Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Lys Gln Ser Leu Met Leu Met Ala  
                  35                   40                   45

[0004]

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

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

Val Thr Ser Ala His Pro Glu Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Cys Ser Ala  
                  85                   90                   95

Arg Gly Gly Ser Tyr Asn Ser Pro Leu His Phe Gly Asn Gly Thr Arg  
                  100                   105                   110

Leu Thr Val Thr  
                  115

<210> 9

<211> 251  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 例证性的 TCR  $\alpha$  链

<400> 9

Asp Ala Lys Thr Thr Gln Pro Asn Ser Met Glu Ser Asn Glu Glu Glu  
 1                    5                    10                    15

Pro Val His Leu Pro Cys Asn His Ser Thr Ile Ser Gly Thr Asp Tyr  
                   20                    25                    30

Ile His Trp Tyr Arg Gln Leu Pro Ser Gln Gly Pro Glu Tyr Val Ile  
                   35                    40                    45

[0005] His Gly Leu Thr Ser Asn Val Asn Asn Arg Met Ala Ser Leu Ala Ile  
                   50                    55                    60

Ala Glu Asp Arg Lys Ser Ser Thr Leu Ile Leu His Arg Ala Thr Leu  
 65                    70                    75                    80

Arg Asp Ala Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Val Tyr Gly Gly Ala Thr Asn  
                   85                    90                    95

Lys Leu Ile Phe Gly Thr Gly Thr Leu Leu Ala Val Gln Pro Asn Ile  
                   100                    105                    110

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

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

Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu  
145 150 155 160

Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser  
165 170 175

Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile  
180 185 190

Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys  
195 200 205

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

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

[0006]

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

&lt;210&gt; 10

&lt;211&gt; 295

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 例证性的 TCR  $\beta$  链

&lt;400&gt; 10

Gly Ala Val Val Ser Gln His Pro Ser Trp Val Ile Cys Lys Ser Gly  
1 5 10 15

Thr Ser Val Lys Ile Glu Cys Arg Ser Leu Asp Phe Gln Ala Thr Thr  
20 25 30

Met Phe Trp Tyr Arg Gln Phe Pro Lys Gln Ser Leu Met Leu Met Ala  
 35 40 45

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

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

Val Thr Ser Ala His Pro Glu Asp Ser Ser Phe Tyr Ile Cys Ser Ala  
 85 90 95

Arg Gly Gly Ser Tyr Asn Ser Pro Leu His Phe Gly Asn Gly Thr Arg  
 100 105 110

[0007] Leu Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala  
 115 120 125

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr  
 130 135 140

Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser  
 145 150 155 160

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro  
 165 170 175

Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu  
 180 185 190

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn  
 195 200 205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu  
 210 215 220

Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu  
 225 230 235 240

Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln  
 245 250 255

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

Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val  
 275 280 285

Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
 290 295

[0008]

<210> 11  
 <211> 304  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 11

Met Gly Asn His Ala Gly Lys Arg Glu Leu Asn Ala Glu Lys Ala Ser  
 1 5 10 15

Thr Asn Ser Glu Thr Asn Arg Gly Glu Ser Glu Lys Lys Arg Asn Leu  
 20 25 30

Gly Glu Leu Ser Arg Thr Thr Ser Glu Asp Asn Glu Val Phe Gly Glu  
 35 40 45

Ala Asp Ala Asn Gln Asn Asn Gly Thr Ser Ser Gln Asp Thr Ala Val  
 50 55 60



Arg Gly Leu Ser Leu Ser Arg Phe Ser Trp Gly Ala Glu Gly Gln Arg  
 245 250 255

Pro Gly Phe Gly Tyr Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His  
 260 265 270

Lys Gly Phe Lys Gly Val Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe  
 275 280 285

Lys Leu Gly Gly Arg Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg  
 290 295 300

<210> 12  
 <211> 19  
 <212> PRT  
 <213> 智人

[0010]

<400> 12

Leu Ser Arg Phe Ser Trp Gly Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly  
 1 5 10 15

Tyr Gly Gly

<210> 13  
 <211> 171  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 13

Met Ala Ser Gln Lys Arg Pro Ser Gln Arg His Gly Ser Lys Tyr Leu  
 1 5 10 15

Ala Thr Ala Ser Thr Met Asp His Ala Arg His Gly Phe Leu Pro Arg  
 20 25 30

His Arg Asp Thr Gly Ile Leu Asp Ser Ile Gly Arg Phe Phe Gly Gly  
 35 40 45

Asp Arg Gly Ala Pro Lys Arg Gly Ser Gly Lys Asp Ser His His Pro  
 50 55 60

Ala Arg Thr Ala His Tyr Gly Ser Leu Pro Gln Lys Ser His Gly Arg  
 65 70 75 80

Thr Gln Asp Glu Asn Pro Val Val His Phe Phe Lys Asn Ile Val Thr  
 85 90 95

Pro Arg Thr Pro Pro Pro Ser Gln Gly Lys Gly Arg Gly Leu Ser Leu  
 100 105 110

[0011] Ser Arg Phe Ser Trp Gly Ala Glu Gly Gln Arg Pro Gly Phe Gly Tyr  
 115 120 125

Gly Gly Arg Ala Ser Asp Tyr Lys Ser Ala His Lys Gly Phe Lys Gly  
 130 135 140

Val Asp Ala Gln Gly Thr Leu Ser Lys Ile Phe Lys Leu Gly Gly Arg  
 145 150 155 160

Asp Ser Arg Ser Gly Ser Pro Met Ala Arg Arg  
 165 170

<210> 14

<211> 333

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 编码 TCR  $\alpha$  链可变区的序列

<400> 14  
 gagccaaga ccacacagcc caacagcatg gaaagcaacg aagaggaacc cgtgcatctg 60  
 ccctgcaacc acagcacaat cagcggcacc gactacatcc actggtacag acagctgccc 120  
 agccagggac ctgagtatgt gatccacggc ctgaccagca acgtgaacaa cagaatggcc 180  
 agcctggcta tcgccgagga cagaaagagc agcacctga tcctgcacag agccacactg 240  
 agagatgccg ccgtgtacta ctgcaccgtg tatggcggag ccaccaacaa gctgatcttc 300  
 ggcaactgaa cactgctggc cgtgcagccc aat 333

<210> 15  
 <211> 348  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 编码 TCR  $\beta$  链可变区的序列

[0012]

<400> 15  
 ggagctgtgg tgtctcagea ccctcttgg gtcactctgca agagcggcac cagcgtgaag 60  
 atcgagtgca gaagcctgga cttccagccc accaccatgt tttggtacag gcagttcccc 120  
 aagcagagcc tgatgctgat ggccacctct aacgagggca gcaaggccac atatgagcag 180  
 ggcgctgaga aggacaagtt cctgatcaac cacgccagcc tgacactgag cacactgacc 240  
 gtgacaagcg cccatcctga ggactccagc ttctacatct gtagcggcag aggcggcagc 300  
 tacaacagcc ctctgcactt tggcaacggc accagactga cagtgacc 348

<210> 16  
 <211> 753  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列  
 <220>  
 <223> 编码 TCR  $\alpha$  链的序列

	<400> 16	
	gatgctaaga ccacacagcc aaattcaatg gagagtaacg aagaagagcc tgttcacttg	60
	ccttgtaacc actccacaat cagtggaaact gattacatac attggtatcg acagettccc	120
	tcccagggtc cagagtacgt gattcatggt cttacaagca atgtgaacaa cagaatggcc	180
	tctctggcaa tcgctgaaga cagaaagtcc agtaccttga tctgcaccg tgetacctg	240
	agagatgctg ctgtgtacta ctgcaccgtg tatggcggag ccaccaacaa gctgatcttc	300
	ggcactggaa cactgctggc cgtgcagccc aatatccaga accctgacct tgcctgttac	360
	cagctgagag actctaaatc cagtgacaag tctgtctgcc tattcaccga ttttgattct	420
	caaacaaatg tgtcacaag taaggattct gatgtgtata tcacagacaa aactgtgcta	480
	gacatgaggt ctatggactt caagagcaac agtgctgtgg cctggagcaa caaatctgac	540
	tttgcattgt caaacgcctt caacaacagc attattccag aagacacctt cttccccagc	600
[0013]	ccagaaagtt cctgtgatgt caagctggtc gagaaaagct ttgaaacaga tacgaaccta	660
	aactttcaaa acctgtcagt gattgggttc cgaatectcc tctgaaagt ggccgggttt	720
	aatctgctca tgacgtgcg gctgtgtcc agc	753
	<210> 17	
	<211> 885	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码 TCR $\beta$ 链的序列	
	<400> 17	
	ggtgctgtcg tctctcaaca tccgagctgg gttatctgta agagtggaac ctctgtgaag	60
	atcgagtgcc gttccctgga ctttcaggcc acaactatgt tttggtatcg tcagttcccg	120
	aaacagagtc tcatgctgat ggcaacttcc aatgagggt ccaaggccac atacgagcaa	180
	ggcgtcgaga aggacaagtt tetcatcaac catgcaagcc tgacctgtc cactctgaca	240

gtgaccagtg cccatcctga agacagcagc ttctacatct gcagtgctag aggcggcagc 300  
 tacaacagcc ctctgcactt tggcaacggc accagactga cagtgaccga ggacctgaaa 360  
 aacgtgttcc cacccgaggt cgctgtgttt gagccatcag aagcagagat ctcccacacc 420  
 caaaaggcca cactgggtgtg cctggccaca ggcttctacc ccgaccacgt ggagctgagc 480  
 tggtaggtga atgggaagga ggtgcacagt ggggtcagca cagacccgca gccctcaag 540  
 gagcagcccc ccctcaatga ctccagatac tgcctgagca gccgcctgag ggtctcggcc 600  
 acctctggc agaacccccg caaccacttc cgctgtcaag tccagttcta cgggctctcg 660  
 gagaatgacg agtggacceca ggatagggcc aaacctgtca cccagatcgt cagcgccgag 720  
 gcctggggta gagcagactg tggtttcacc tccgagtctt accagcaagg ggtcctgtct 780  
 gccaccatcc totatgagat cttgctaggg aaggccacct tgtatgccgt gctggtcagt 840  
 gccctcgtgc tgatggccat ggtcaagaga aaggattcca gaggc 885

[0014]

<210> 18  
 <211> 431  
 <212> PRT  
 <213> 智人

<400> 18

Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu  
 1                    5                    10                    15

Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro Lys Ala  
                   20                    25                    30

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

Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn Pro Met  
                   50                    55                    60

Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val Ala  
65 70 75 80

Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu  
85 90 95

Gln Asp Arg Pro His Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp Ala His  
100 105 110

Ala Arg Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu Glu Ser Pro Ala Met  
115 120 125

Ile Ser Leu Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Gly Val Phe Ser Leu Lys  
130 135 140

[0015]

Ala Arg Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp  
145 150 155 160

Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu Cys Thr Phe Pro Asn Pro Ser Ala  
165 170 175

Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro  
180 185 190

Leu Leu Ala Asn Gly Val Cys Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe  
195 200 205

Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu Lys His Cys Gln Ala Asp His Leu Leu  
210 215 220

Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln  
225 230 235 240

Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu Ser Ala Met  
 245 250 255

Gln Ala His Leu Ala Gly Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser Ser Val  
 260 265 270

Ala Ser Ser Asp Lys Gly Ser Cys Cys Ile Val Ala Ala Gly Ser Gln  
 275 280 285

Gly Pro Val Val Pro Ala Trp Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro Asp Ser  
 290 295 300

Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu Trp Gly Ser His Gly Asn Ser Thr  
 305 310 315 320

Phe Pro Glu Phe Leu His Asn Met Asp Tyr Phe Lys Phe His Asn Met  
 325 330 335

[0016]

Arg Pro Pro Phe Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu  
 340 345 350

Ala Pro Glu Lys Gln Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr  
 355 360 365

Arg Met Phe Ala Phe Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys Asn Ala  
 370 375 380

Ile Arg His Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val Glu Ser  
 385 390 395 400

Glu Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe Arg Lys Lys  
 405 410 415

Arg Ser Gln Arg Pro Ser Arg Cys Ser Asn Pro Thr Pro Gly Pro

420

425

430

&lt;210&gt; 19

&lt;211&gt; 441

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; FOXP3 多肽序列

&lt;400&gt; 19

Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu  
 1                    5                    10                    15

Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro Lys Ala  
                   20                    25                    30

[0017] Ser Asp Leu Leu Gly Ala Arg Gly Pro Gly Gly Thr Phe Gln Gly Arg  
                   35                    40                    45

Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn Pro Met  
                   50                    55                    60

Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val Ala  
 65                    70                    75                    80

Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu  
                   85                    90                    95

Gln Asp Arg Pro His Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp Ala His  
                   100                    105                    110

Ala Arg Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu Glu Ser Pro Ala Met  
                   115                    120                    125

Ile Ser Leu Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Gly Val Phe Ser Leu Lys  
 130 135 140

Ala Arg Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp  
 145 150 155 160

Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu Cys Thr Phe Pro Asn Pro Ser Ala  
 165 170 175

Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro  
 180 185 190

Leu Leu Ala Asn Gly Val Cys Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe  
 195 200 205

Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu Lys His Cys Gln Ala Asp His Leu Leu  
 210 215 220

[0018]

Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln  
 225 230 235 240

Ser Leu Glu Gln Val Glu Glu Leu Ser Ala Met Gln Ala His Leu Ala  
 245 250 255

Gly Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser Ser Val Ala Ser Ser Asp Lys  
 260 265 270

Gly Ser Cys Cys Ile Val Ala Ala Gly Ser Gln Gly Pro Val Val Pro  
 275 280 285

Ala Trp Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro Asp Ser Leu Phe Ala Val Arg  
 290 295 300

Arg His Leu Trp Gly Ser His Gly Asn Ser Thr Phe Pro Glu Phe Leu

305	310	315	320
His Asn Met Asp Tyr Phe Lys Phe His Asn Met Arg Pro Pro Phe Thr			
	325	330	335
Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu Ala Pro Glu Lys Gln			
	340	345	350
Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr Arg Met Phe Ala Phe			
	355	360	365
Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys Asn Ala Ile Arg His Asn Leu			
	370	375	380
Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val Glu Ser Glu Lys Gly Ala Val			
385	390	395	400

[0019]

Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe Arg Lys Lys Arg Ser Gln Arg Pro			
	405	410	415
Ser Arg Cys Ser Asn Pro Thr Pro Gly Pro Glu Gly Arg Gly Ser Leu			
	420	425	430
Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn			
	435	440	

&lt;210&gt; 20

&lt;211&gt; 1296

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 20

atgcccaacc ccaggcctgg caagccctcg gcccttctt tggcccttgg cccatcccca 60

ggagcctcgc ccagctggag ggctgcaccc aaagcctcag acctgctggg ggccccgggc 120

	ccaggggaa ccttccagg cagagatctt cgaggcggg cccatgcctc ctcttcttc	180
	ttgaaccca tgccaccatc gcagctgcag ctgcccacac tgcccctagt catggtggca	240
	ccctccggg cacggctggg ccccttgcce cacttacagg cactctcca ggacaggcca	300
	catttcatgc accagctctc aacggtggat gcccacgccc ggaccctgt gctgcaggtg	360
	cacccctgg agagcccage catgatcage ctcacaccac ccaccaccgc cactggggtc	420
	ttctccctca aggcccggc tggcctcca cctgggatca acgtggccag cctggaatgg	480
	gtgtccagg agccggcact gctctgcacc ttccaaatc ccagtgcacc caggaaggac	540
	agcaccctt cggtgtgccc ccagagctcc taccactgc tggcaaatgg tgtctgcaag	600
	tggcccggat gtgagaaggt cttcgaagag ccagaggact tcctcaagca ctgccaggcg	660
	gaccatctt tggatgagaa gggcagggca caatgtctc tcagagaga gatggtacag	720
	tctctggagc agcagctggt gctggagaag gagaagctga gtgccatgca ggcccacctg	780
[0020]	gctgggaaaa tggcactgac caagcttca tctgtggcat catccgaca gggtctctgc	840
	tgcatcgtag ctgctggcag ccaaggcct gtcgtcccag cctggtctgg ccccgggag	900
	gcccctgaca gctgtttgc tgtccggagg cacctgtgg gtagccatgg aacagcaca	960
	ttccagagt tcctccaca catggactac ttcaagtcc acaacatgag acccccttc	1020
	acctacgcca cgctcatccg ctgggccatc ctggaggctc cagagaagca gcggacactc	1080
	aatgagatct accactggtt cacacgatg tttgccttct tcagaaacca tcctgccacc	1140
	tggaagaacg ccatccgcca caacctgagt ctgcacaagt gctttgtgag ggtggagagc	1200
	gagaagggg ctgtgtggac cgtggatgag ctggagtcc gcaagaaacg gagccagagg	1260
	cccagcaggt gttccaacce tacacctgce cctga	1296

<210> 21

<211> 1352

<212> DNA

<213> 人工序列

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 编码 FOXP3 多肽的序列

&lt;400&gt; 21

gaattcgtcg acatgccc aa cccagaccc ggcaagcctt ctgcccttc tctggccctg	60
ggaccatctc ctggcgcctc cccatcttgg agagccgccc ctaaagccag cgatctgctg	120
ggagctagag gccctggcgg cacattccag ggcagagatc tgagaggcgg agcccacgcc	180
tctagcagca gcctgaatcc catgcccct agccagctgc agctgcctac actgcctctc	240
gtgatggtgg cccctagcgg agctagactg ggccctctgc ctcatctgca ggctctgctg	300
caggaccggc cccactttat gcaccagctg agcaccgtgg acgcccacgc cagaacacct	360
gtgctgcagg tgcaccccct ggaaagccct gccatgatca gcctgacccc tccaaccaca	420
gccaccggcg tgttcagcct gaaggccaga cctggactgc cccctggcat caatgtggcc	480
agcctggaat ggggtgtccg cgaacctgcc ctgctgtgca ctttcccaa tcttagcggc	540
[0021] cccagaaagg acagcacact gtctgccgtg cccagagca gctatcccct gctggctaac	600
ggcgtgtgca agtggcctgg ctgcgagaag gtgttcgagg aaccgagga ctctctgaag	660
cactgccagg ccgacctct gctggacgag aaaggcagag cccagtgcct gctgcagcgc	720
gagatggtgc agtccctgga acagcagctg gtgctgaaa aagaaaagct gagcgccatg	780
caggcccacc tggccgaaa gatggcctg acaaaagcca gcagcgtggc cagctccgac	840
aaggcagct gttgtatcgt ggccgctggc agccaggac ctgtggtgcc tgcttgagc	900
ggacctagag aggccccga tagcctgttt gccgtgcgga gacacctgtg gggcagccac	960
ggcaacteta ctttccccga gttcctgcac aacatggact acttcaagtt ccacaacatg	1020
aggccccct tcacctacgc caccctgate agatgggcca ttctggaagc ccccagaaag	1080
cagcggaccc tgaacgagat ctaccactgg ttaccggga tgttcgctt cttccggaac	1140
caccccgcca cctggaagaa cgccatccgg cacaatctga gcctgcacaa gtgcttcgtg	1200



<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FOXP3-2A 多肽 (FOXP3 多肽-2A 自剪切多肽)

<400> 24

Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu  
1                   5                   10                   15

Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro Lys Ala  
                  20                   25                   30

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

Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn Pro Met  
50                   55                   60

[0023]

Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val Ala  
65                   70                   75                   80

Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu  
                  85                   90                   95

Gln Asp Arg Pro His Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp Ala His  
                  100                   105                   110

Ala Arg Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu Glu Ser Pro Ala Met  
          115                   120                   125

Ile Ser Leu Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Gly Val Phe Ser Leu Lys  
130                   135                   140

Ala Arg Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp

145	150	155	160
Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu Cys Thr Phe Pro Asn Pro Ser Ala			
	165	170	175
Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro			
	180	185	190
Leu Leu Ala Asn Gly Val Cys Lys Trp Pro Gly Cys Glu Lys Val Phe			
	195	200	205
Glu Glu Pro Glu Asp Phe Leu Lys His Cys Gln Ala Asp His Leu Leu			
	210	215	220
Asp Glu Lys Gly Arg Ala Gln Cys Leu Leu Gln Arg Glu Met Val Gln			
	225	230	235
235			240
[0024]			
Ser Leu Glu Gln Gln Leu Val Leu Glu Lys Glu Lys Leu Ser Ala Met			
	245	250	255
Gln Ala His Leu Ala Gly Lys Met Ala Leu Thr Lys Ala Ser Ser Val			
	260	265	270
Ala Ser Ser Asp Lys Gly Ser Cys Cys Ile Val Ala Ala Gly Ser Gln			
	275	280	285
Gly Pro Val Val Pro Ala Trp Ser Gly Pro Arg Glu Ala Pro Asp Ser			
	290	295	300
Leu Phe Ala Val Arg Arg His Leu Trp Gly Ser His Gly Asn Ser Thr			
	305	310	315
			320
Phe Pro Glu Phe Leu His Asn Met Asp Tyr Phe Lys Phe His Asn Met			
	325	330	335

Arg Pro Pro Phe Thr Tyr Ala Thr Leu Ile Arg Trp Ala Ile Leu Glu  
 340 345 350

Ala Pro Glu Lys Gln Arg Thr Leu Asn Glu Ile Tyr His Trp Phe Thr  
 355 360 365

Arg Met Phe Ala Phe Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys Asn Ala  
 370 375 380

Ile Arg His Asn Leu Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val Glu Ser  
 385 390 395 400

Glu Lys Gly Ala Val Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe Arg Lys Lys  
 405 410 415

[0025] Arg Ser Gln Arg Pro Ser Arg Cys Ser Asn Pro Thr Pro Gly Pro Gly  
 420 425 430

Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn  
 435 440 445

Pro Gly Pro Ser  
 450

<210> 25

<211> 462

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> FOXP3-2A 多肽 (FOXP3 多肽-2A 自剪切多肽)

<400> 25

Met Pro Asn Pro Arg Pro Gly Lys Pro Ser Ala Pro Ser Leu Ala Leu

1	5	10	15
Gly Pro Ser Pro Gly Ala Ser Pro Ser Trp Arg Ala Ala Pro Lys Ala	20	25	30
Ser Asp Leu Leu Gly Ala Arg Gly Pro Gly Gly Thr Phe Gln Gly Arg	35	40	45
Asp Leu Arg Gly Gly Ala His Ala Ser Ser Ser Ser Leu Asn Pro Met	50	55	60
Pro Pro Ser Gln Leu Gln Leu Pro Thr Leu Pro Leu Val Met Val Ala	65	70	75
Pro Ser Gly Ala Arg Leu Gly Pro Leu Pro His Leu Gln Ala Leu Leu	85	90	95
[0026]			
Gln Asp Arg Pro His Phe Met His Gln Leu Ser Thr Val Asp Ala His	100	105	110
Ala Arg Thr Pro Val Leu Gln Val His Pro Leu Glu Ser Pro Ala Met	115	120	125
Ile Ser Leu Thr Pro Pro Thr Thr Ala Thr Gly Val Phe Ser Leu Lys	130	135	140
Ala Arg Pro Gly Leu Pro Pro Gly Ile Asn Val Ala Ser Leu Glu Trp	145	150	155
Val Ser Arg Glu Pro Ala Leu Leu Cys Thr Phe Pro Asn Pro Ser Ala	165	170	175
Pro Arg Lys Asp Ser Thr Leu Ser Ala Val Pro Gln Ser Ser Tyr Pro	180	185	190



Phe Arg Asn His Pro Ala Thr Trp Lys Asn Ala Ile Arg His Asn Leu  
 370 375 380

Ser Leu His Lys Cys Phe Val Arg Val Glu Ser Glu Lys Gly Ala Val  
 385 390 395 400

Trp Thr Val Asp Glu Leu Glu Phe Arg Lys Lys Arg Ser Gln Arg Pro  
 405 410 415

Ser Arg Cys Ser Asn Pro Thr Pro Gly Pro Glu Gly Arg Gly Ser Leu  
 420 425 430

Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu  
 435 440 445

Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Ser  
 450 455 460

[0028]

&lt;210&gt; 26

&lt;211&gt; 140

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列

&lt;220&gt;

<223> 例证性的 TCR  $\alpha$  链恒定区

&lt;400&gt; 26

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 1 5 10 15

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 20 25 30

Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 35 40 45

Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 50 55 60

Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 65 70 75 80

Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val  
 85 90 95

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

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

[0029] Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
 130 135 140

<210> 27

<211> 179

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 例证性的 TCR  $\beta$  链恒定区

<400> 27

Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro  
 1 5 10 15

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

Ala Thr Gly Phe Tyr 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 Pro Leu Lys  
 50 55 60

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu  
 65 70 75 80

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

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp  
 100 105 110

Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg  
 115 120 125

[0030]

Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser  
 130 135 140

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

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp  
 165 170 175

Ser Arg Gly

<210> 28

<211> 753

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

	<223> 例证性的 TCR $\alpha$ 链	
	<400> 28	
	gacgccaaga ccacacagcc caacagcatg gaaagcaacg aagaggaacc cgtgcatctg	60
	ccctgcaacc acagcacaat cagcggcacc gactacatcc actggtacag acagctgccc	120
	agccagggac ctgagtatgt gatccacggc ctgaccagca acgtgaacaa cagaatggcc	180
	agcctggcta tcgccgagga cagaaagagc agcacccctga tectgcacag agccacactg	240
	agagatgccg ccgtgtacta ctgcaccgtg tatggcggag ccaccaacaa gctgatcttc	300
	ggcactggaa cactgctggc cgtgcagccc aatattcaga acccagatcc tgccgtgtac	360
	cagctgagag acagcaagtc cagcgacaag agcgtgtgcc tgttcaccga cttcgacagc	420
	cagaccaacg tgtcccagag caaggactcc gatgtgtata tcaccgacaa gaccgtgctg	480
	gacatgcgga gcatggactt caagagcaac agcgcctgg cctggtccaa caagagcgt	540
[0031]	ttcgctgcg ccaacgcctt caacaacagc attatccctg aggacacatt cttcccaagt	600
	cctgagagca gctgcgacgt gaaactggtg gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg	660
	aacttcaga acctgagcgt gatcgcttc agaatcctgc tgctgaaggt ggccgcttc	720
	aacctgctga tgaccctgag actttggagc agc	753
	<210> 29	
	<211> 753	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 例证性的 TCR $\alpha$ 链	
	<400> 29	
	gacgccaaga ccacacagcc caacagcatg gaaagcaacg aagaggaacc cgtgcatctg	60
	ccctgcaacc acagcacaat cagcggcacc gactacatcc actggtatag acagctgccc	120
	tctcagggcc ccgagtatgt gattcacggc ctgaccagca acgtgaacaa ccggatggcc	180

tctctggcca ttgccgagga cagaaagtcc agcacactga tctgcaccg ggccacactg	240
agagatgccg ccgtgtatta ctgcaccgtg tacggcggag ccaccaacaa gctgatcttt	300
ggcacaggca cactgctggc cgtgcagccc aatattcaga accctgatcc agccgtgtac	360
cagctgagag acagcaagag cagcgacaag tctgtgtgtc tgttcaccga cttegacagc	420
cagaccaacg tgtcccagag caaggactcc gatgtgtata tcaccgacaa gaccgtgctg	480
gacatgcgga gcatggactt caagagcaac agcgcctggg cctggtccaa caagagcgt	540
tttgctgcg ccaacgcctt caacaacagc attatccccg aggacacatt cttccaagt	600
cctgagagca gctgcgacgt gaaactggtg gaaaagagct tcgagacaga caccaacctg	660
aacttcaga acctgagcgt gatcggcttc agaatcctgc tgctgaaggt ggccggcttc	720
aacctgctga tgacctgag actgtgtct agc	753

[0032]

<210> 30  
 <211> 885  
 <212> DNA  
 <213> 人工序列

<220>  
 <223> 例证性的 TCR  $\beta$  链

<400> 30	
ggagctgtgg tgtctcagca cccctcttgg gtcatctgca agagcggcac cagcgtgaag	60
atcgagtgca gaagcctgga cttccaggcc accaccatgt ttigtacag gcagttcccc	120
aagcagagcc tgatgctgat ggccacctct aacgagggca gcaaggccac atatgagcag	180
ggcgtcgaga aggacaagtt cctgatcaac cacgccagcc tgacactgag cacactgacc	240
gtgacaagcg cccatcctga ggactccagc ttctacatct gttagcggcag aggcggcagc	300
tacaacagcc ctctgcactt tggcaacggc accagactga cagtgaccga ggacctgaag	360
aacgtgttcc cacctgaggt ggccgtgttc gagccttctg aggccgagat cagccacaca	420
cagaaagcca cactcgtgtg tctggccacc ggcttctatc ccgatcacgt ggaactgtct	480

	tggtgggtca acggcaaaga ggtgcacagc ggcgtcagca cagatcccca gcctctgaaa	540
	gaacagcccc ctctgaacga cagccggtac tgtctgagca gcagactgag agtgtccgcc	600
	acctctggc agaaccccag aaaccacttc agatgccagg tgcagttcta cggcctgagc	660
	gagaacgatg agtggacca ggatagagcc aagcctgtga cacagatcgt gtctgccgaa	720
	gcctggggca gagccgattg tggctttacc agcgagagct accagcaagg cgtgtgtct	780
	gccaccatcc tgtacgagat cctgtgggc aaagccactc tgtacgccgt gctggtgtct	840
	gccctggtcc tgatggctat ggtcaagcgg aaggacagca gaggc	885
	<210> 31	
	<211> 885	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
[0033]	<223> 例证性的 TCR β 链	
	<400> 31	
	ggagctgtgg tgtctcagca cccttcttgg gtcattctga agagcggcac cagcgtgaag	60
	atcgagtgca gaagcctgga cttccaggcc accacatgt tctggtacag acagttcccc	120
	aagcagagcc tgatgctgat ggccacctct aacgagggca gcaaggccac atatgagcag	180
	ggcgtcgaga aggacaagtt cctgatcaac cagccagcc tgacactgag caccctgaca	240
	gtgacaagcg cccatcctga ggacagcagc ttctacatct gtagcggcag aggcggcagc	300
	tacaacagcc ctctgcactt tggcaacggc accagactga ccgtgaccga ggacctgaag	360
	aacgtgttcc cacctgaggt ggccgtgttc gacccttctg aggccgagat cagccacaca	420
	cagaaagcca cactcgtgtg tctggccacc ggtttctatc ccgatcacgt cgaactgtct	480
	tggtgggtca acggcaaaga ggtgcacagc ggcgtcagca cagatcccca gcctctgaaa	540
	gaacagcccc ctctgaacga cagccggtac tgtctgagca gcagactgag agtgtccgcc	600

	accittctggc agaacccccag aaaccacttc aggtgccagg tgcagttcta cggcctgagc	660
	gagaacgatg agtggaccca ggatagagcc aagcctgtga cacagatcgt gtctgccgaa	720
	gcctggggca gagccgattg tggctttacc agcgagagct accagcaagg cgtgctgtct	780
	gccaccatcc tgtacgagat cctgctgggc aaagccactc tgtacgccgt gctggtgtct	840
	gcctgtgtcc tgatggctat ggtcaagcgg aaggactcca gaggc	885
	<210> 32	
	<211> 333	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码 TCR $\alpha$ 链可变区的序列	
	<400> 32	
	gacgccaaga ccacacagcc caacagcatg gaaagcaacg aagaggaacc cgtgcatctg	60
[0034]	ccctgcaacc acagcacaat cagcggcacc gactacatcc actggtatag acagctgccc	120
	tctcagggcc ccgagtatgt gattcacggc ctgaccagca acgtgaacaa ccggatggcc	180
	tctctggcca ttgccgagga cagaaagtcc agcacactga tcttgcaccg ggccacactg	240
	agagatgccg ccgigtatta ctgcaccgtg tacggcggag ccaccaacaa gctgatcttt	300
	ggcacaggca cactgctggc cgtgcagccc aat	333
	<210> 33	
	<211> 348	
	<212> DNA	
	<213> 人工序列	
	<220>	
	<223> 编码 TCR $\beta$ 链可变区的序列	
	<400> 33	
	ggagctgtgg tgtctcagca cccttcttgg gtcactctgca agagcggcac cagcgtgaag	60
	atcgagtgca gaagcctgga cttccagcc accaccatgt tctggtacag acagttcccc	120

---

	aagcagagcc tgatgctgat ggccacctct aacgagggca gcaaggccac atatgagcag	180
	ggcgtcgaga aggacaagtt cctgatcaac cagccagcc tgacctgag caccctgaca	240
[0035]	gtgacaagcg cccatcctga ggacagcagc ttctacatct gtagcggcag aggcggcagc	300
	tacaacagcc ctctgcactt tggcaacggc accagactga ccgtgacc	348

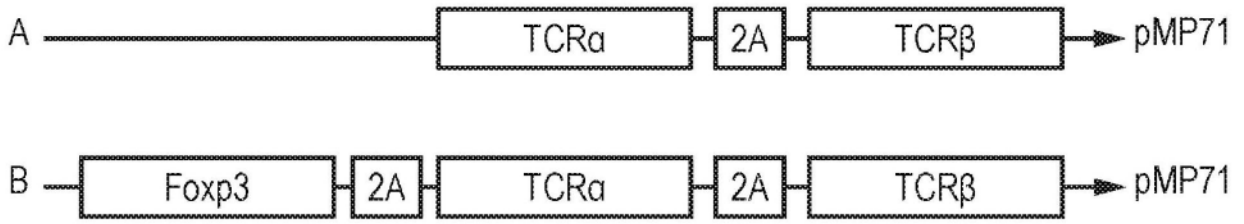


图1

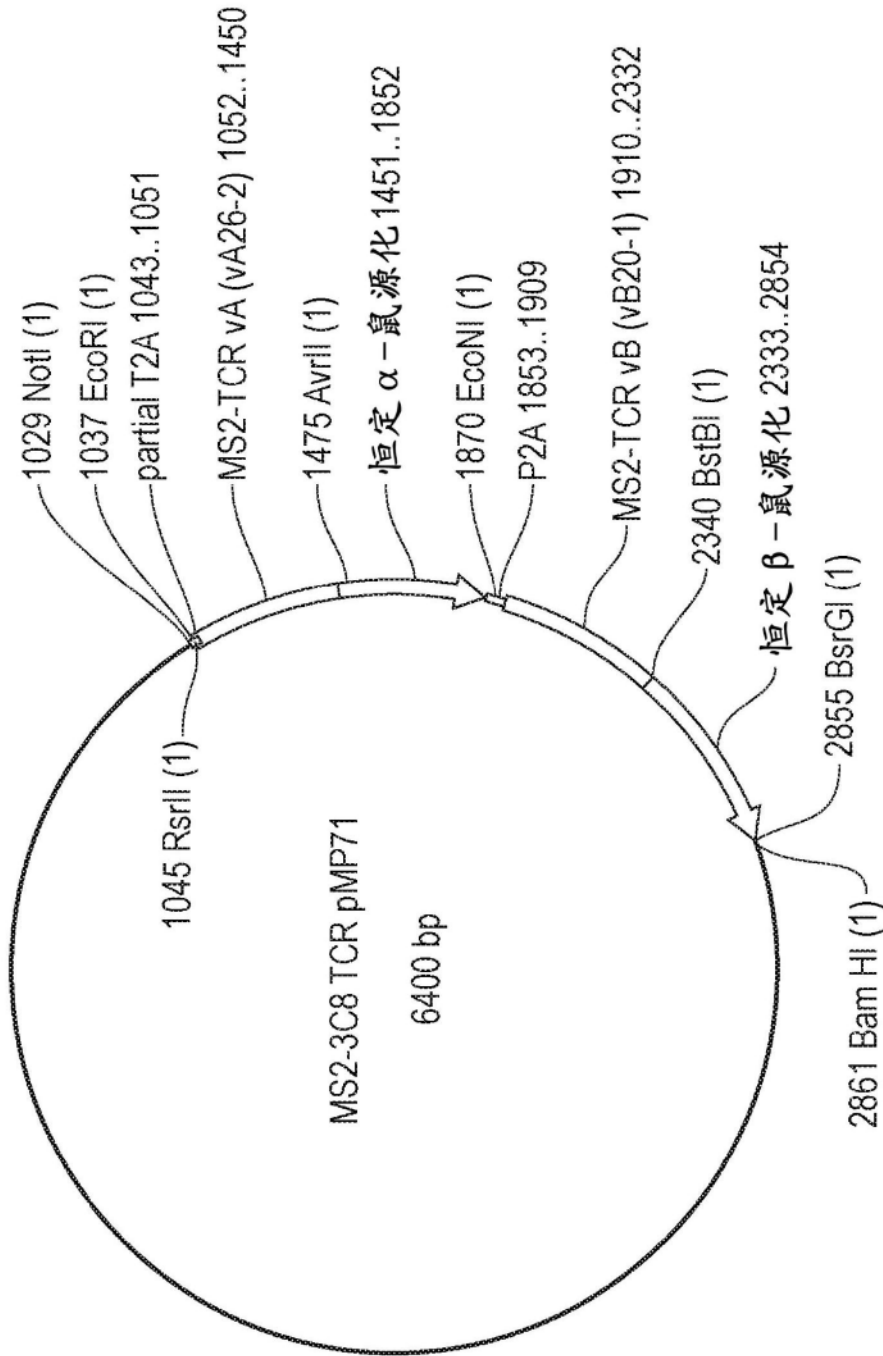


图2

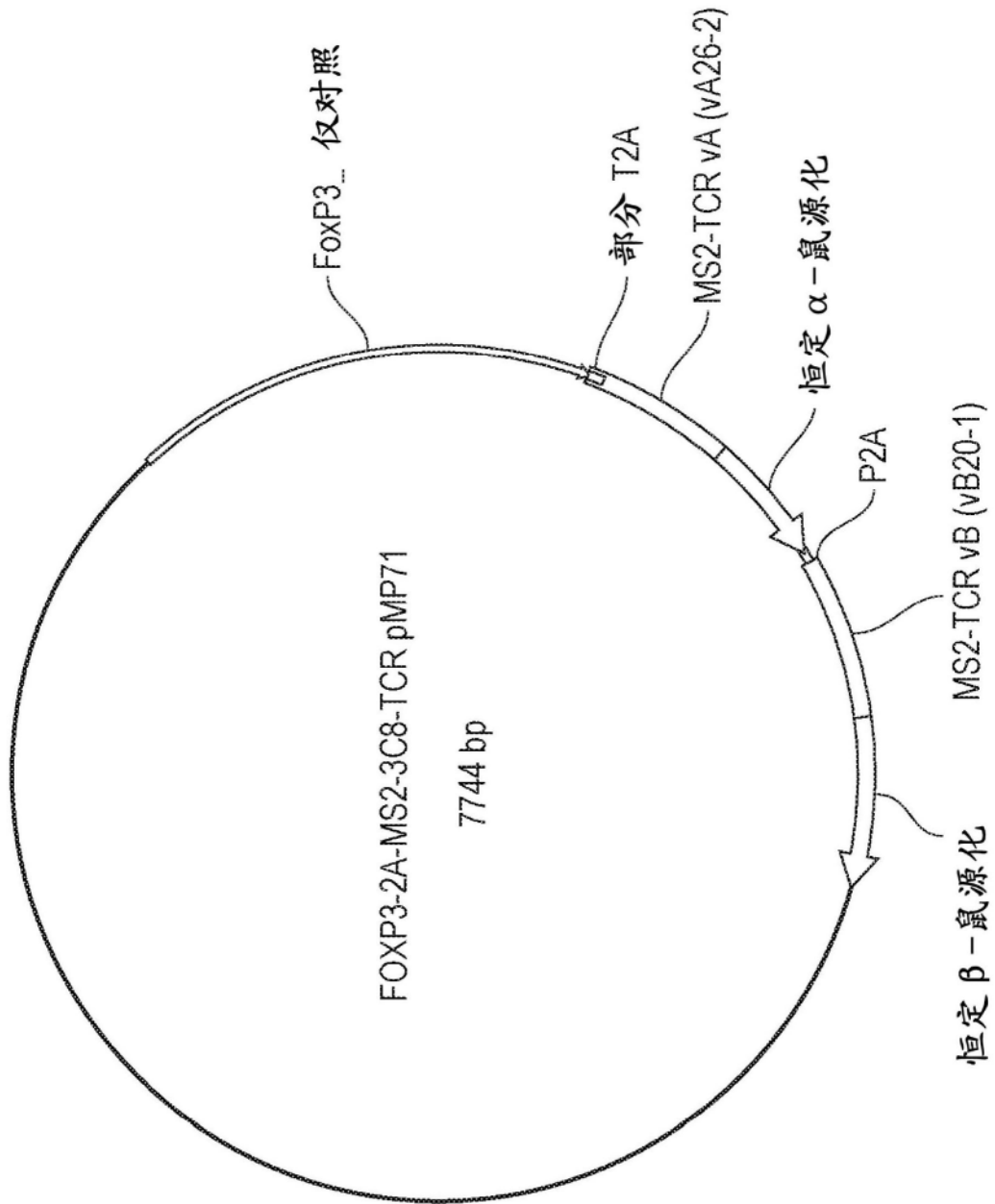


图3

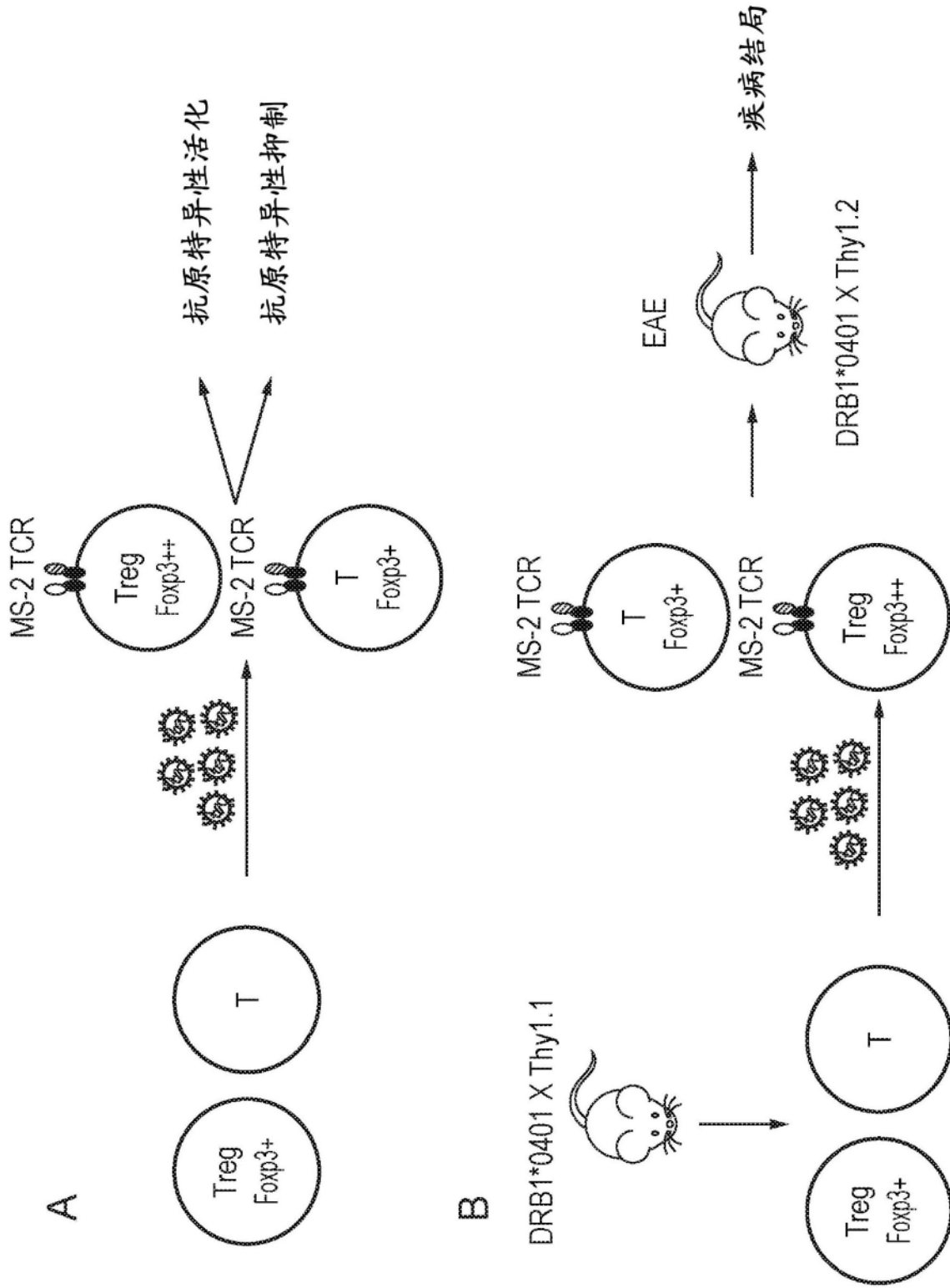


图4

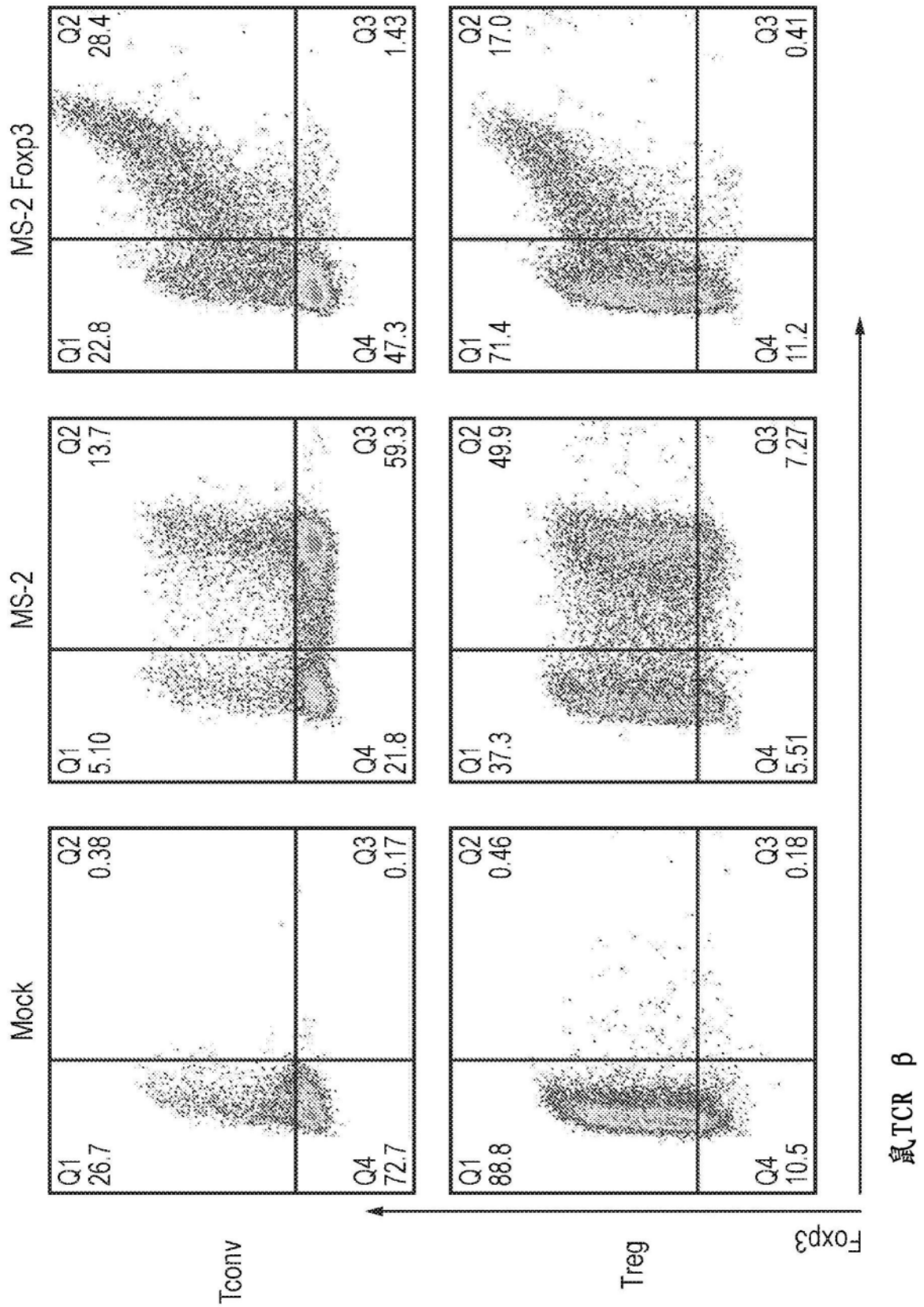


图5

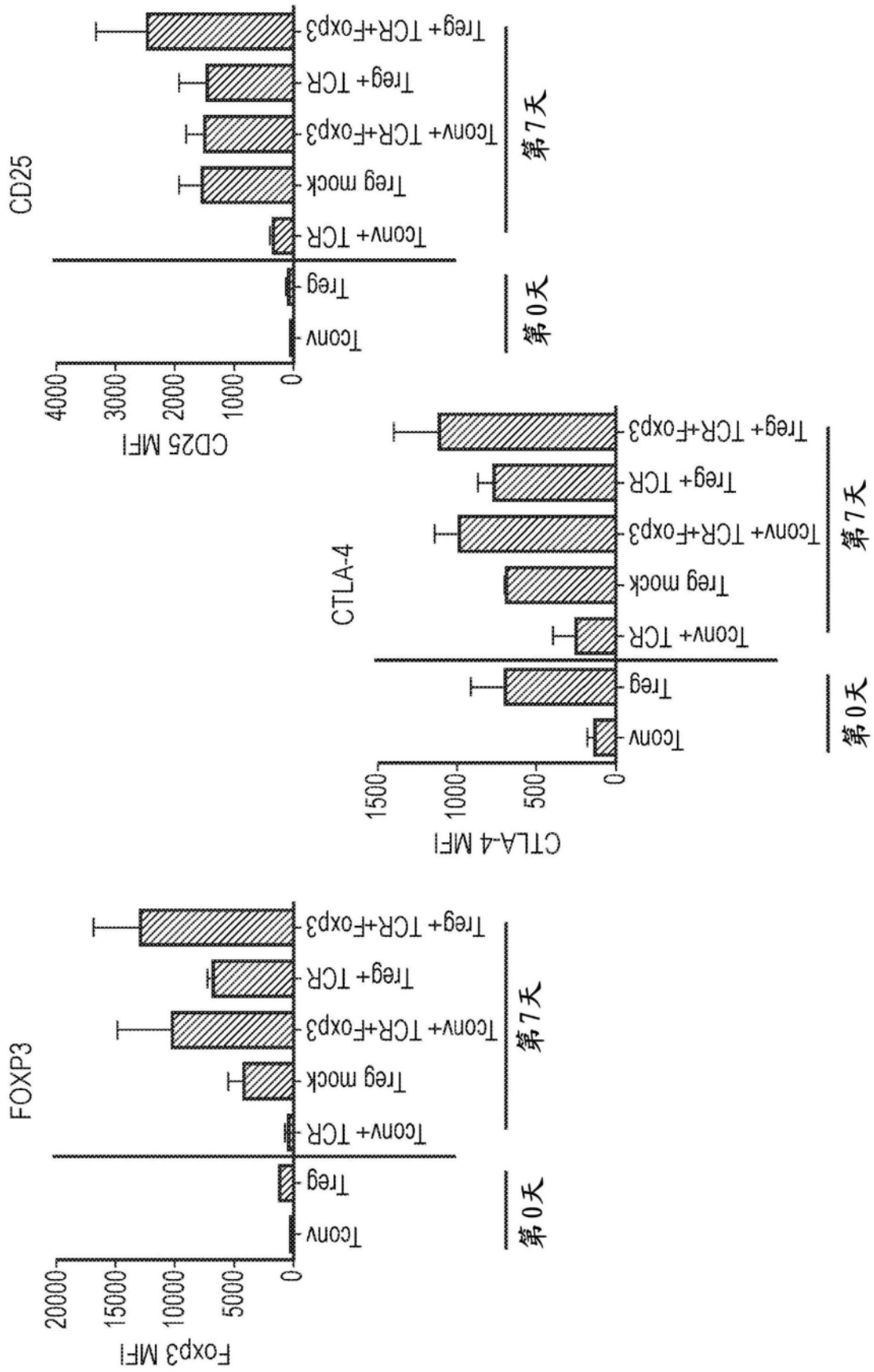


图9

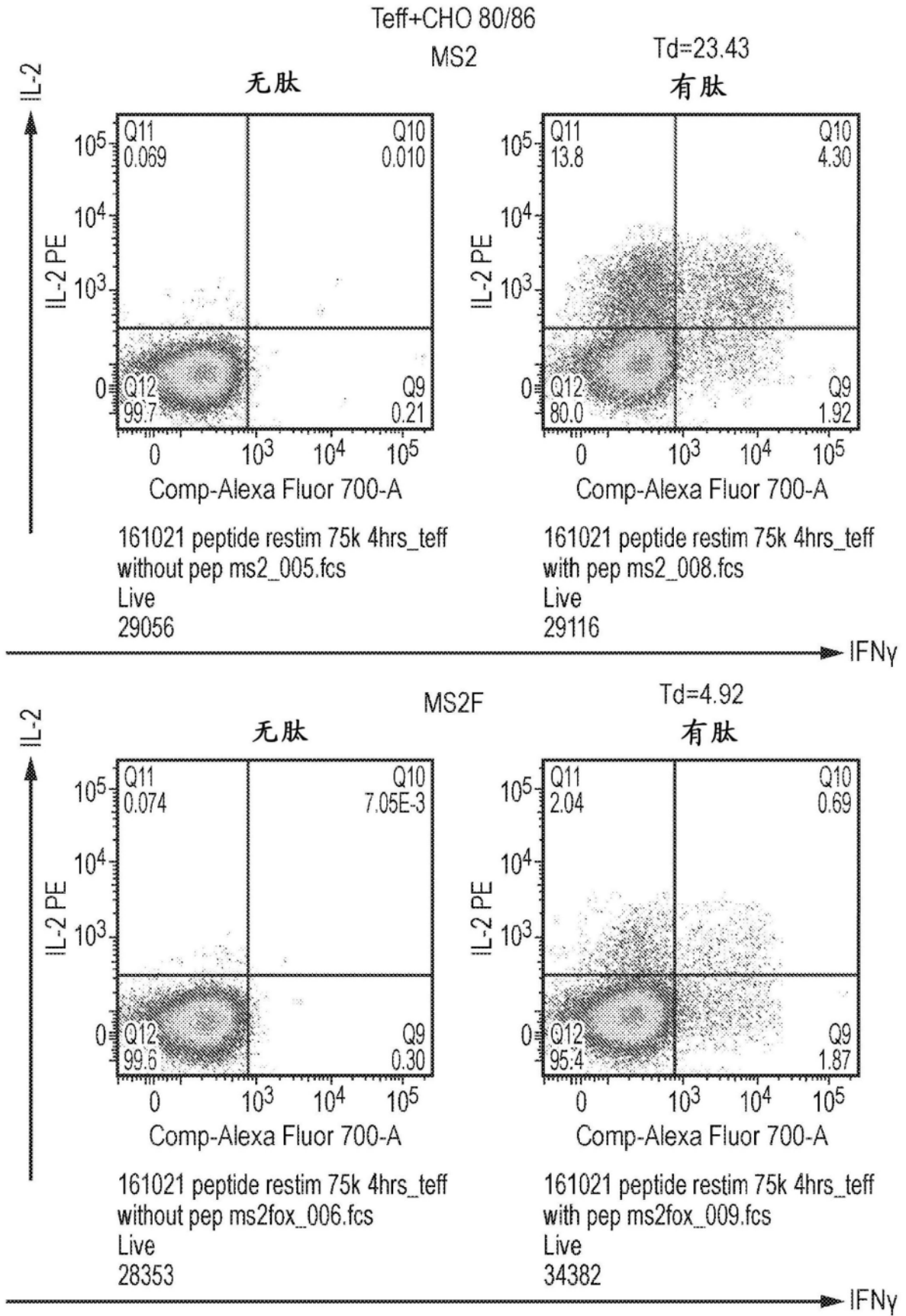


图7

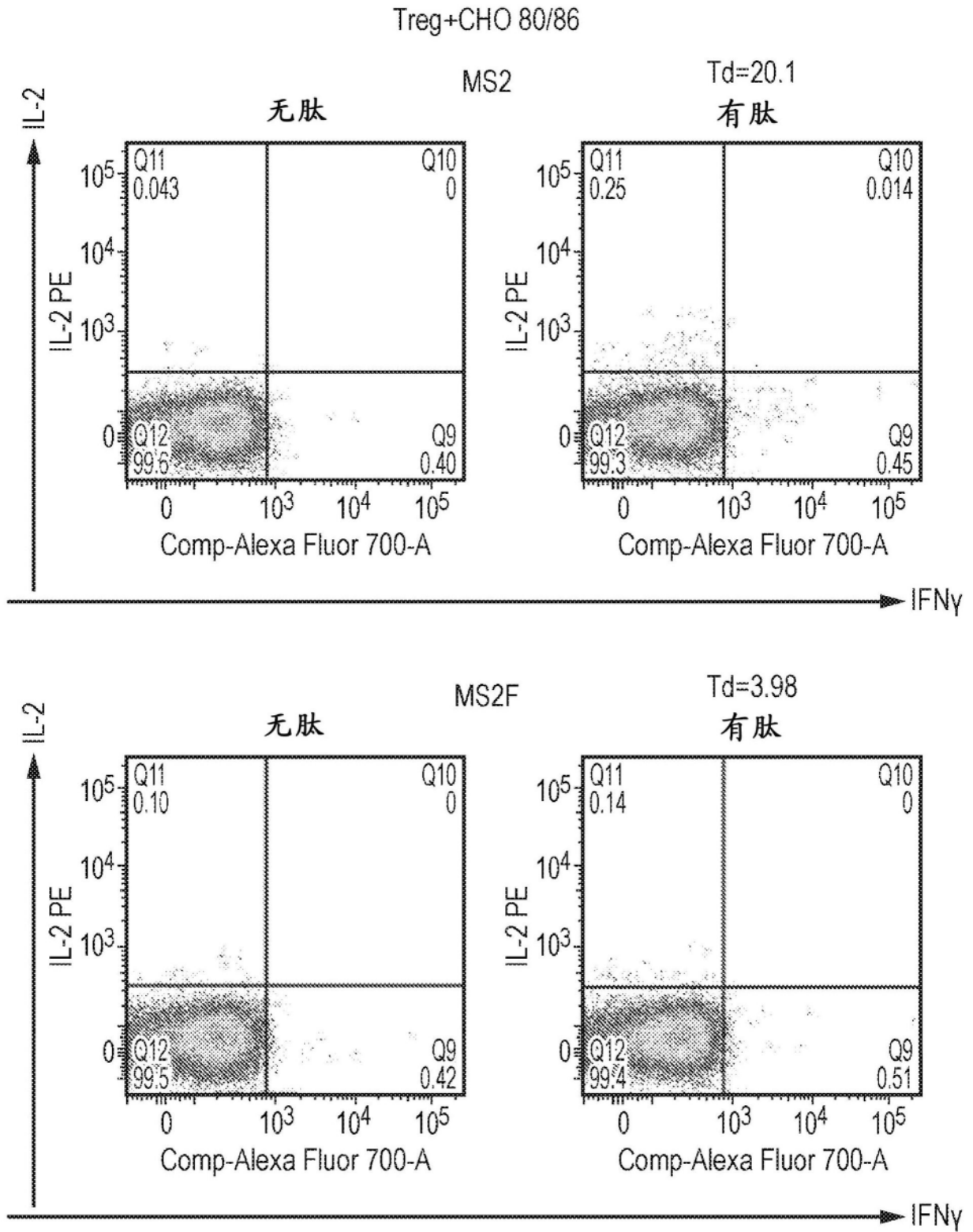


图8

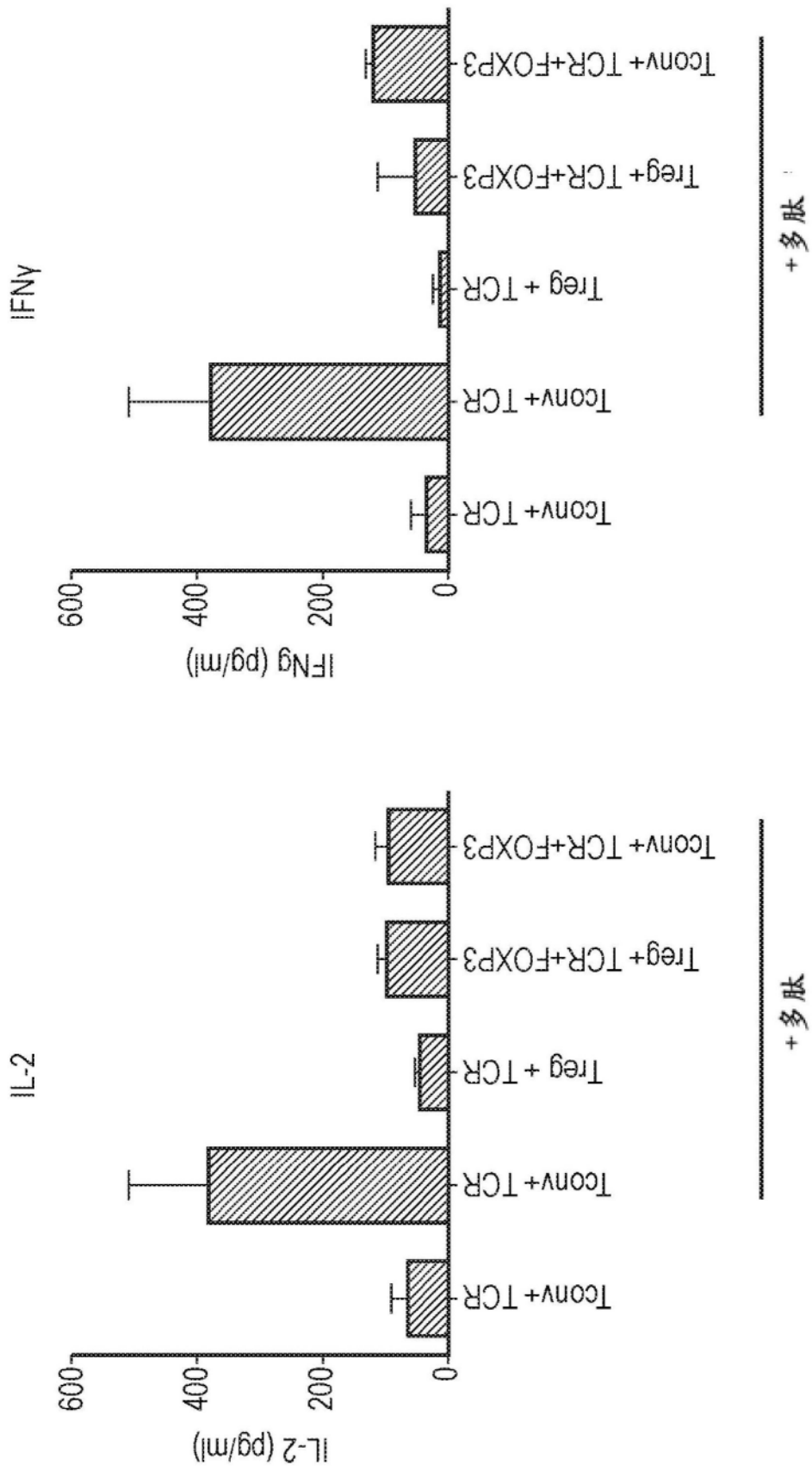


图9

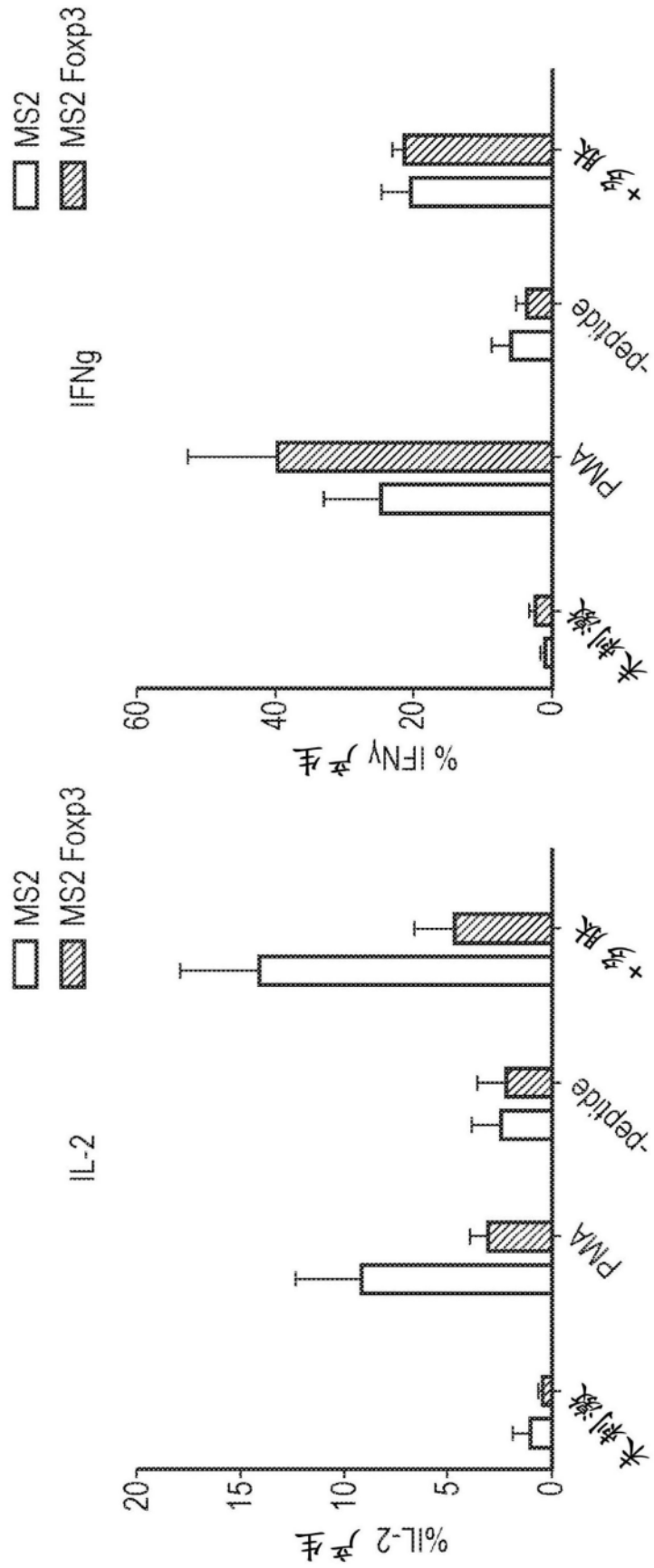


图10

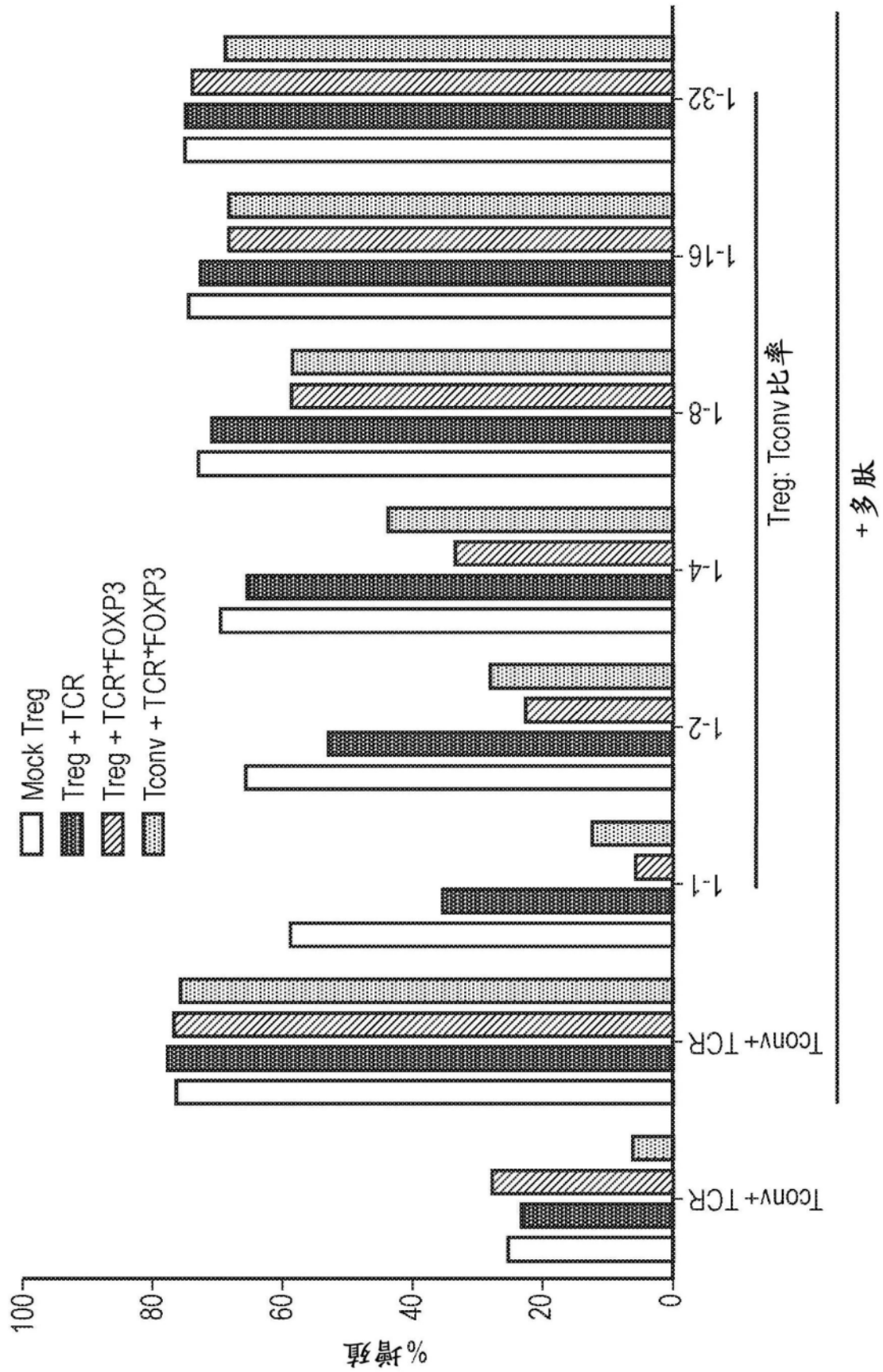


图11

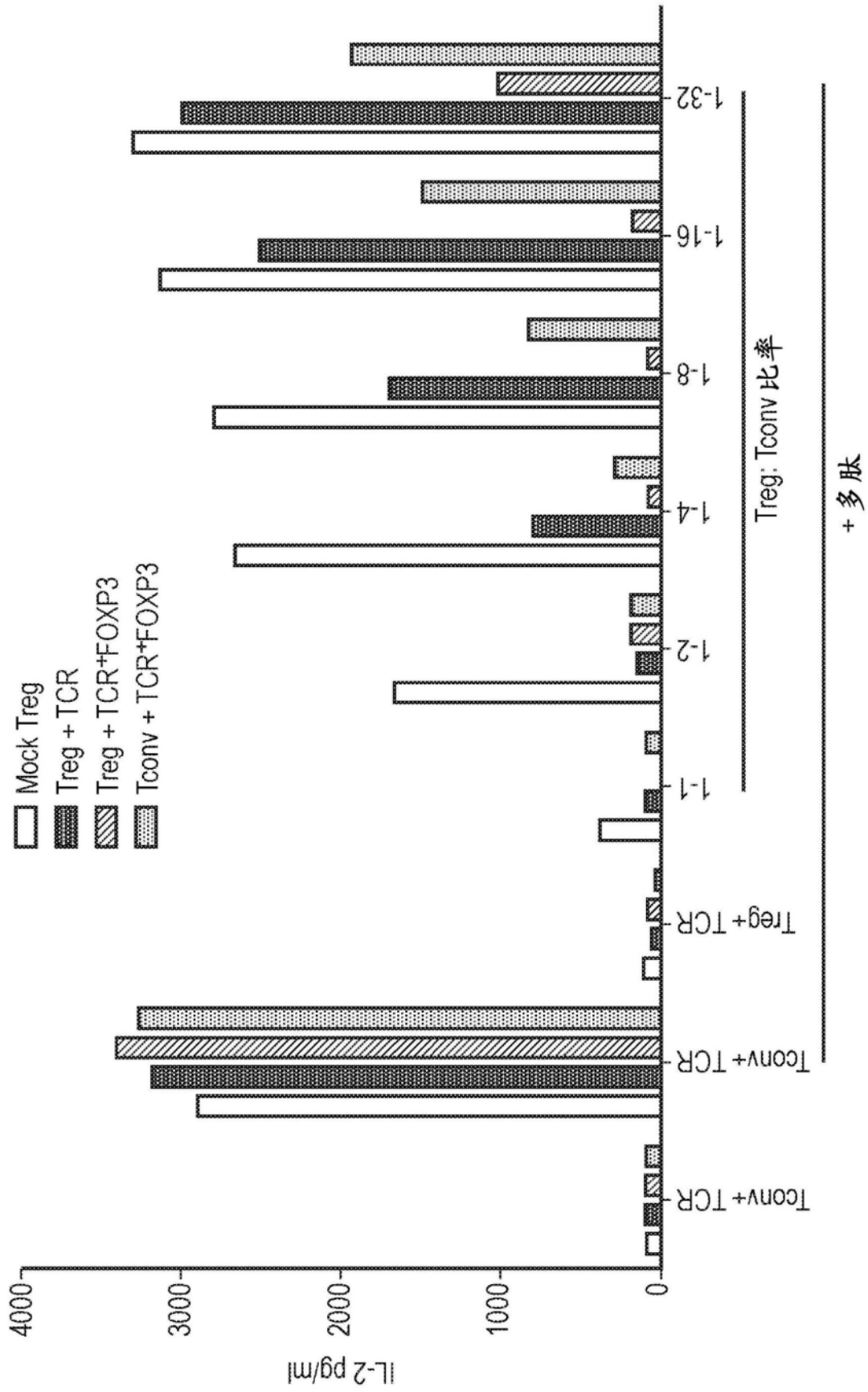


图12

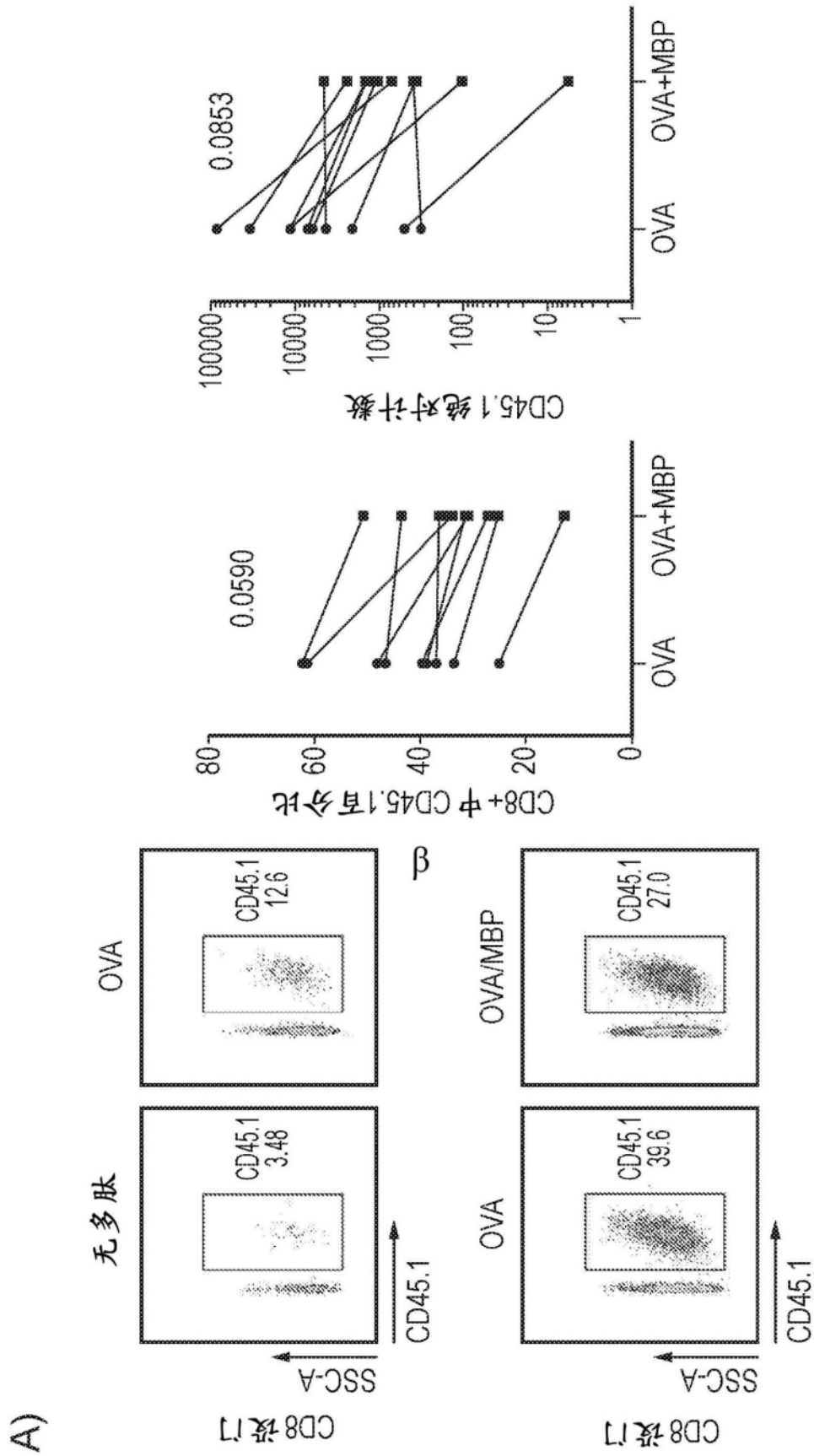


图13

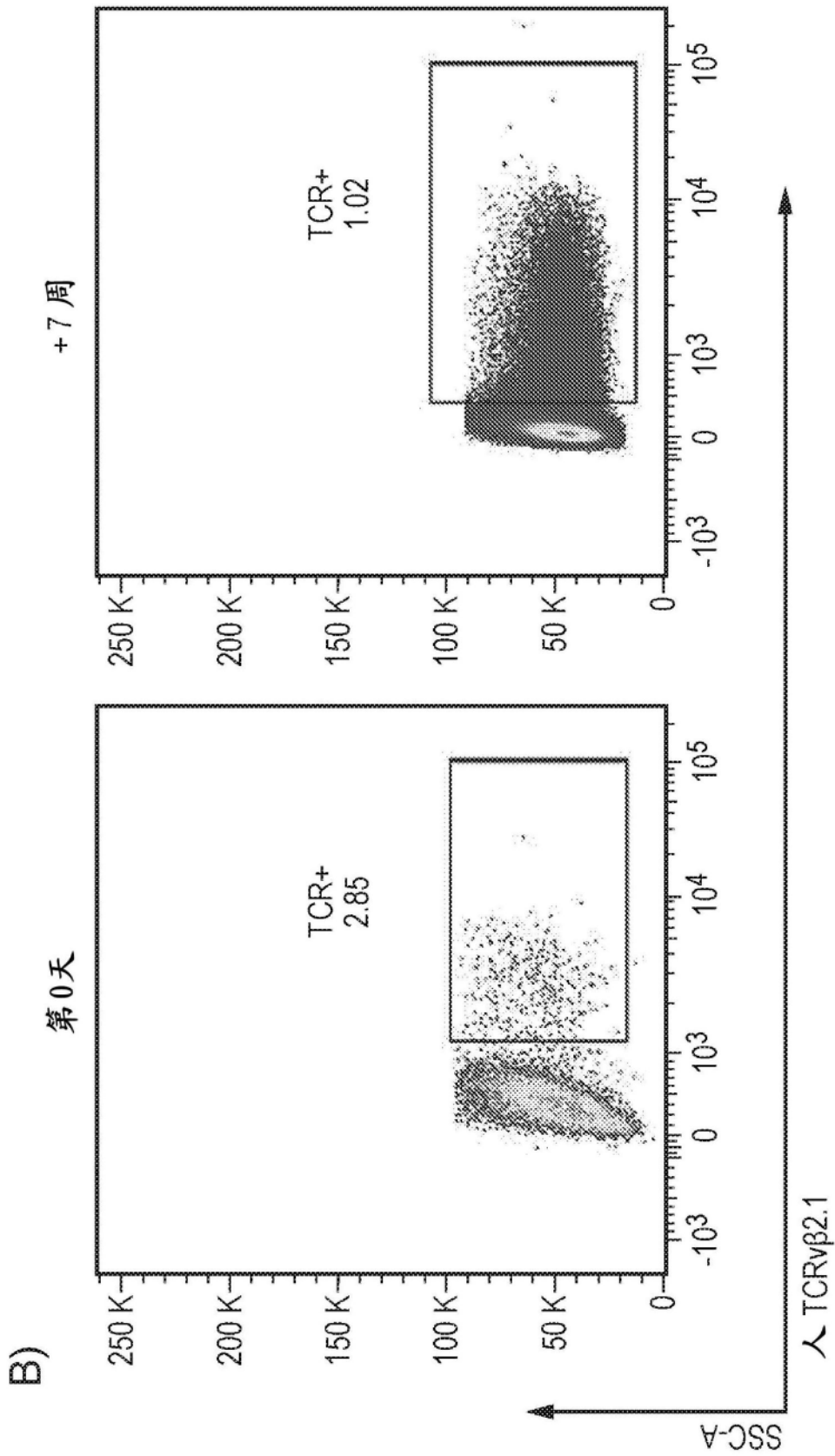


图13(续)

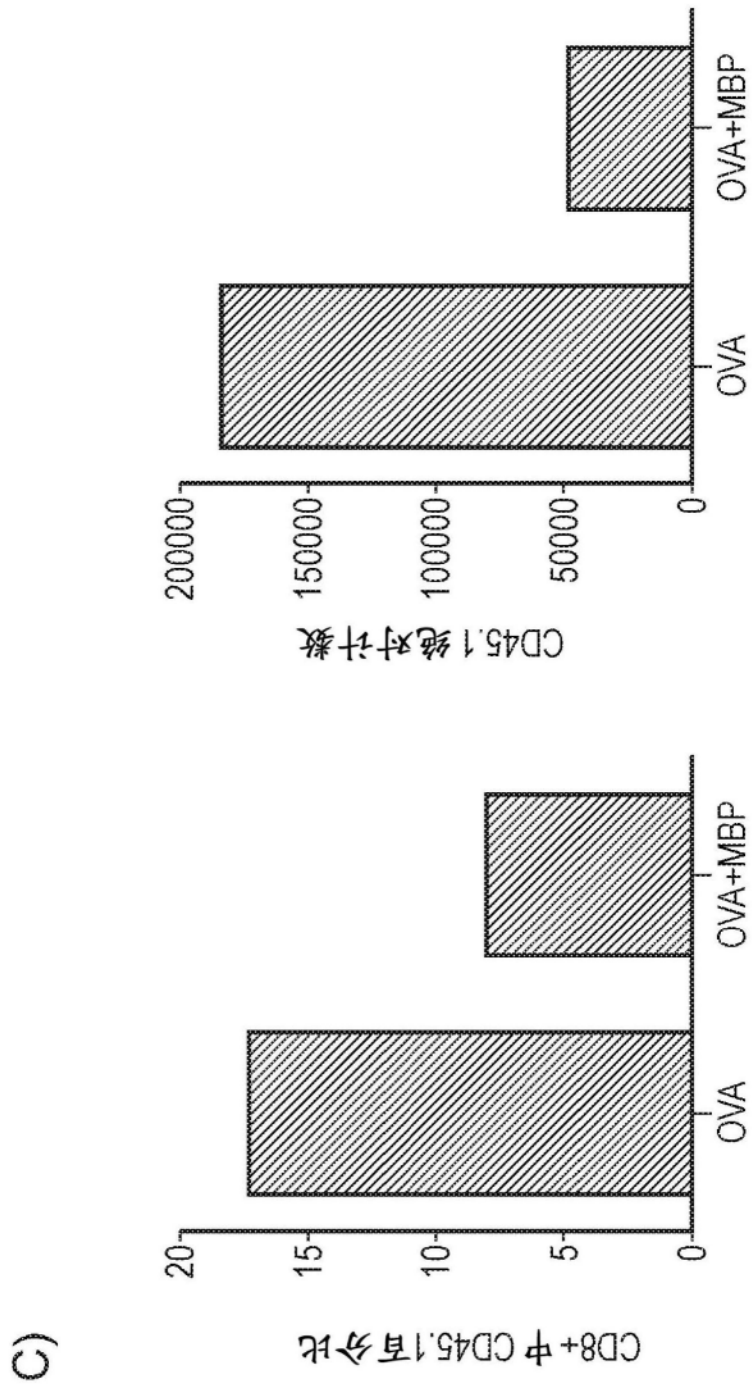


图13(续)

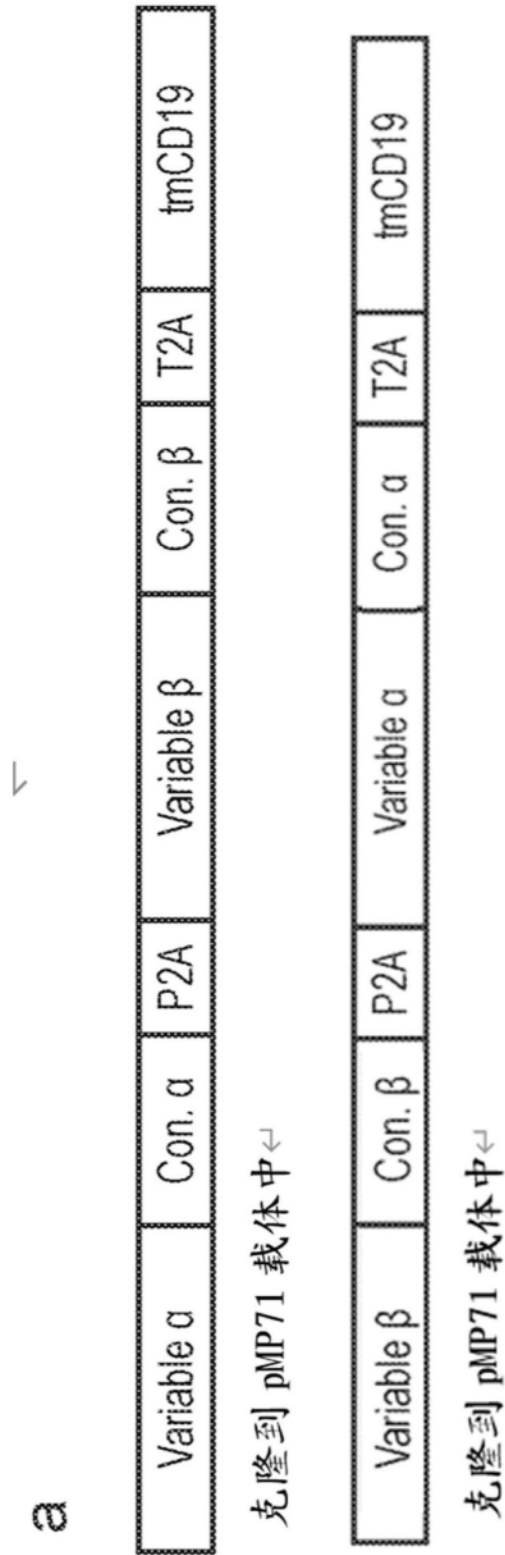


图14

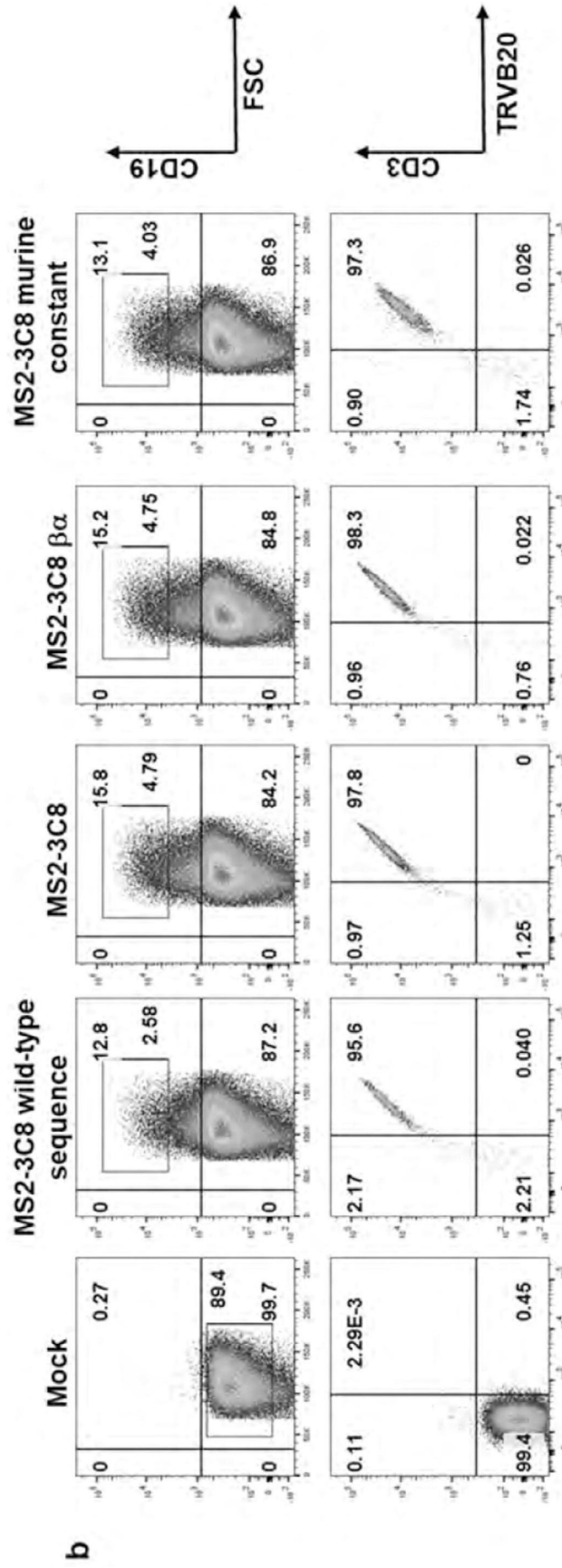


图14(续)

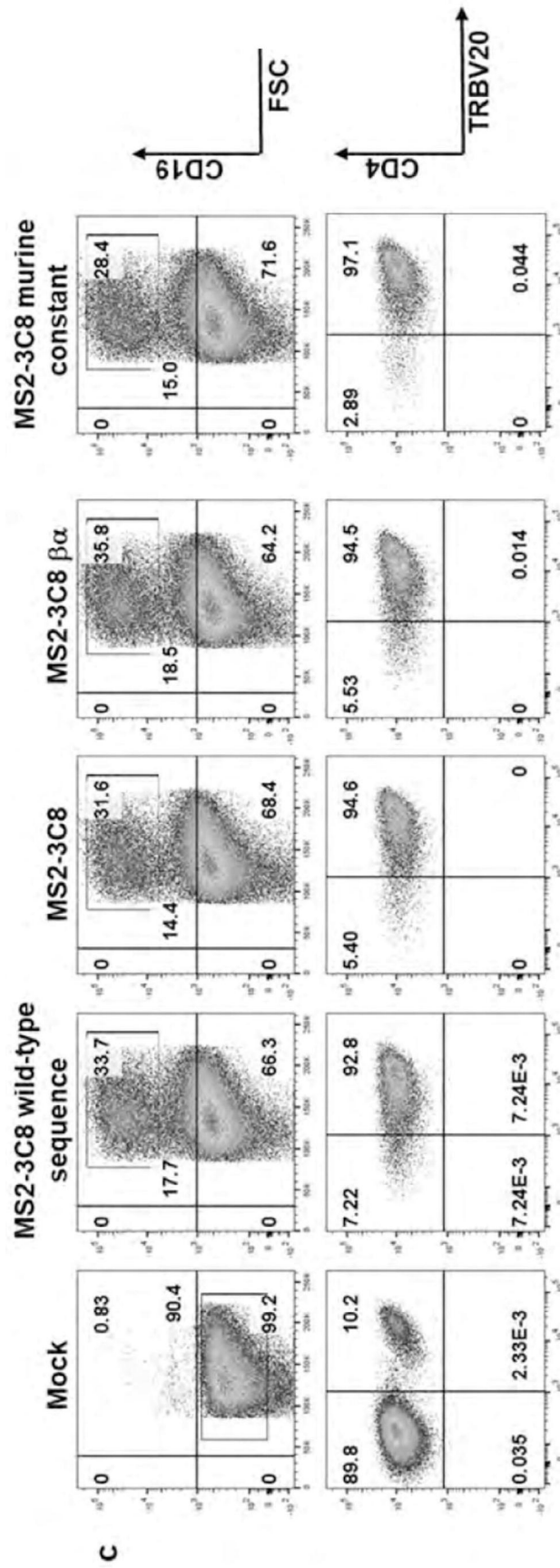


图14(续)

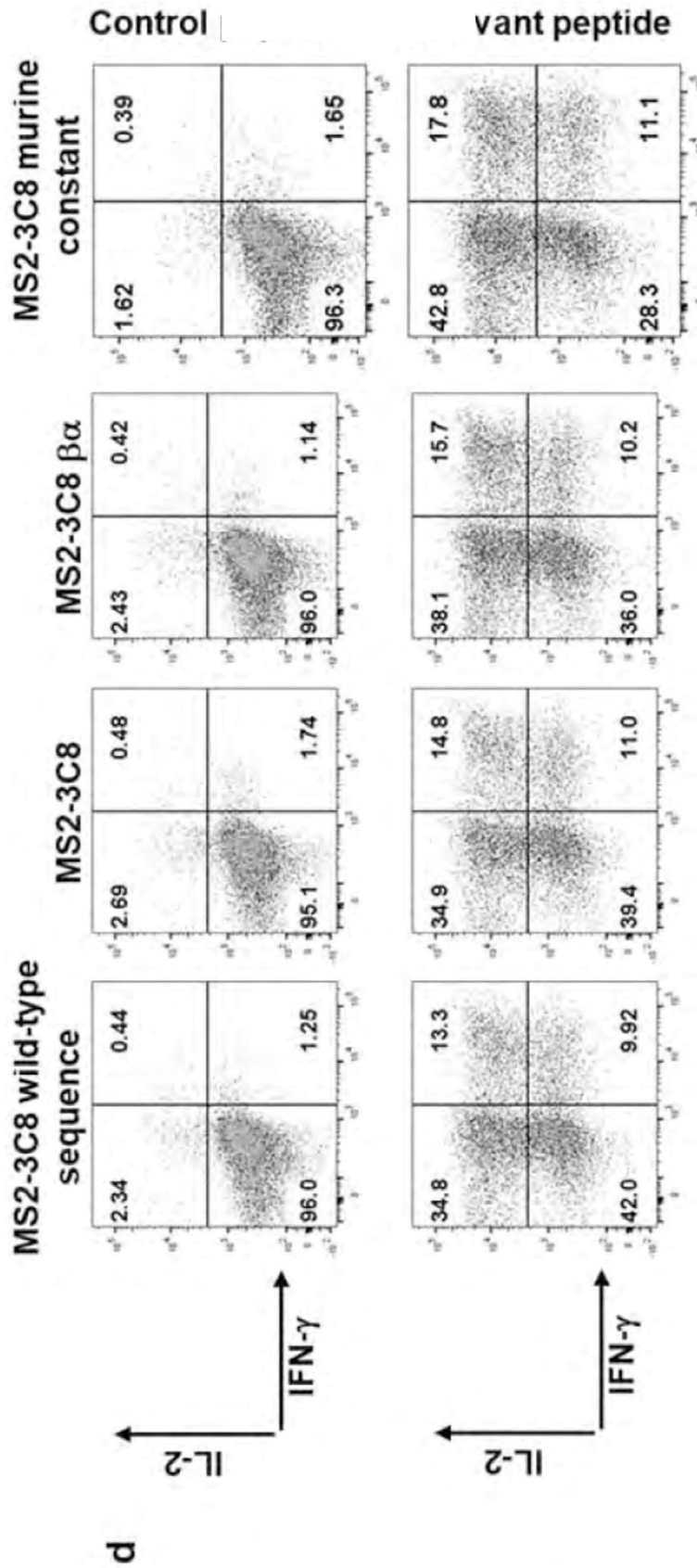
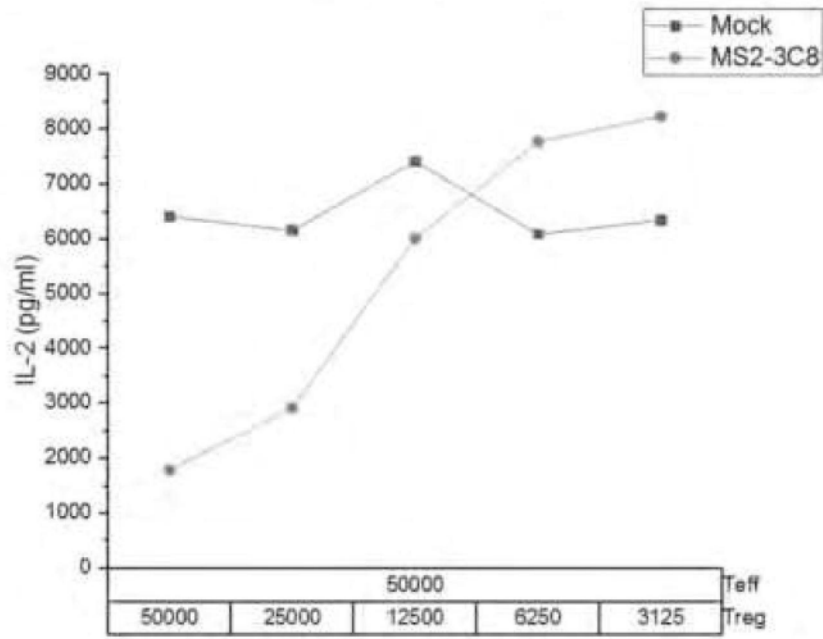


图14(续)

e



Interferon-gamma

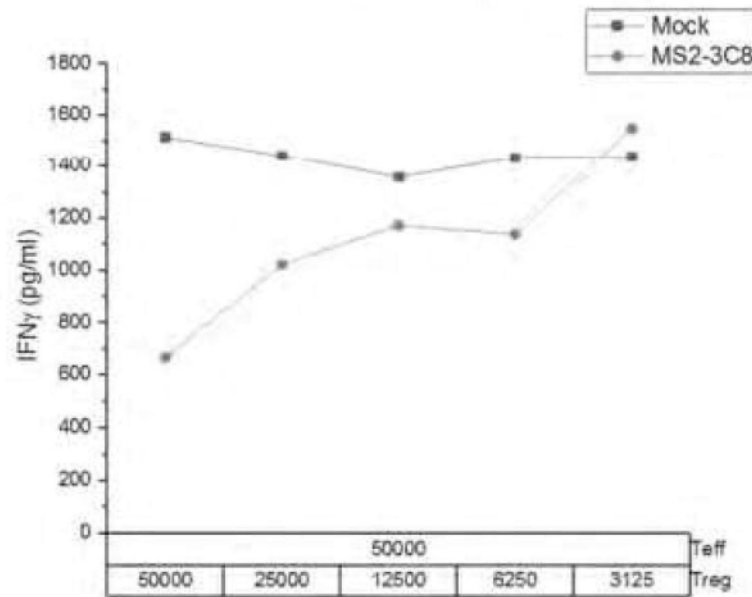


图14(续)

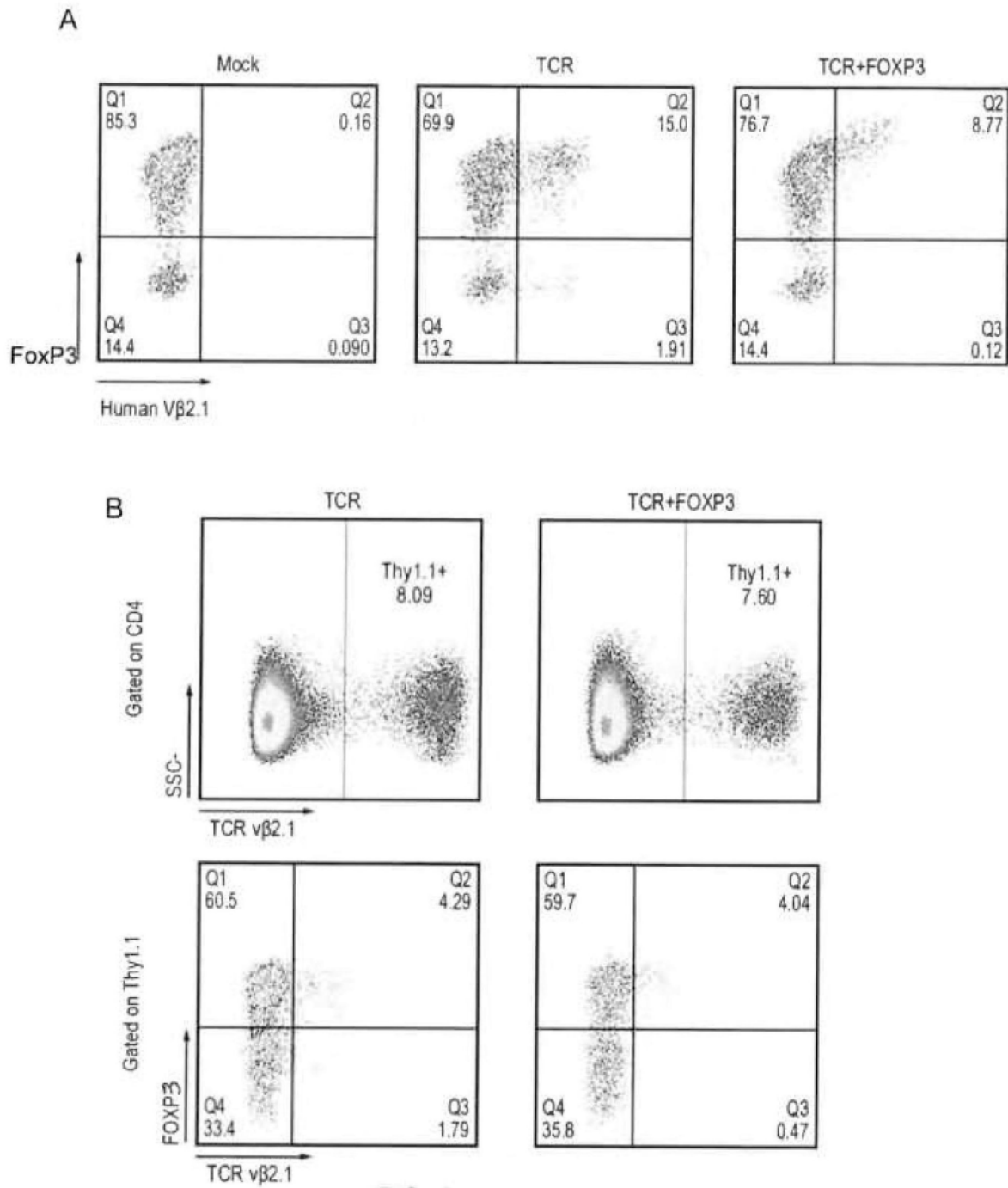


图15

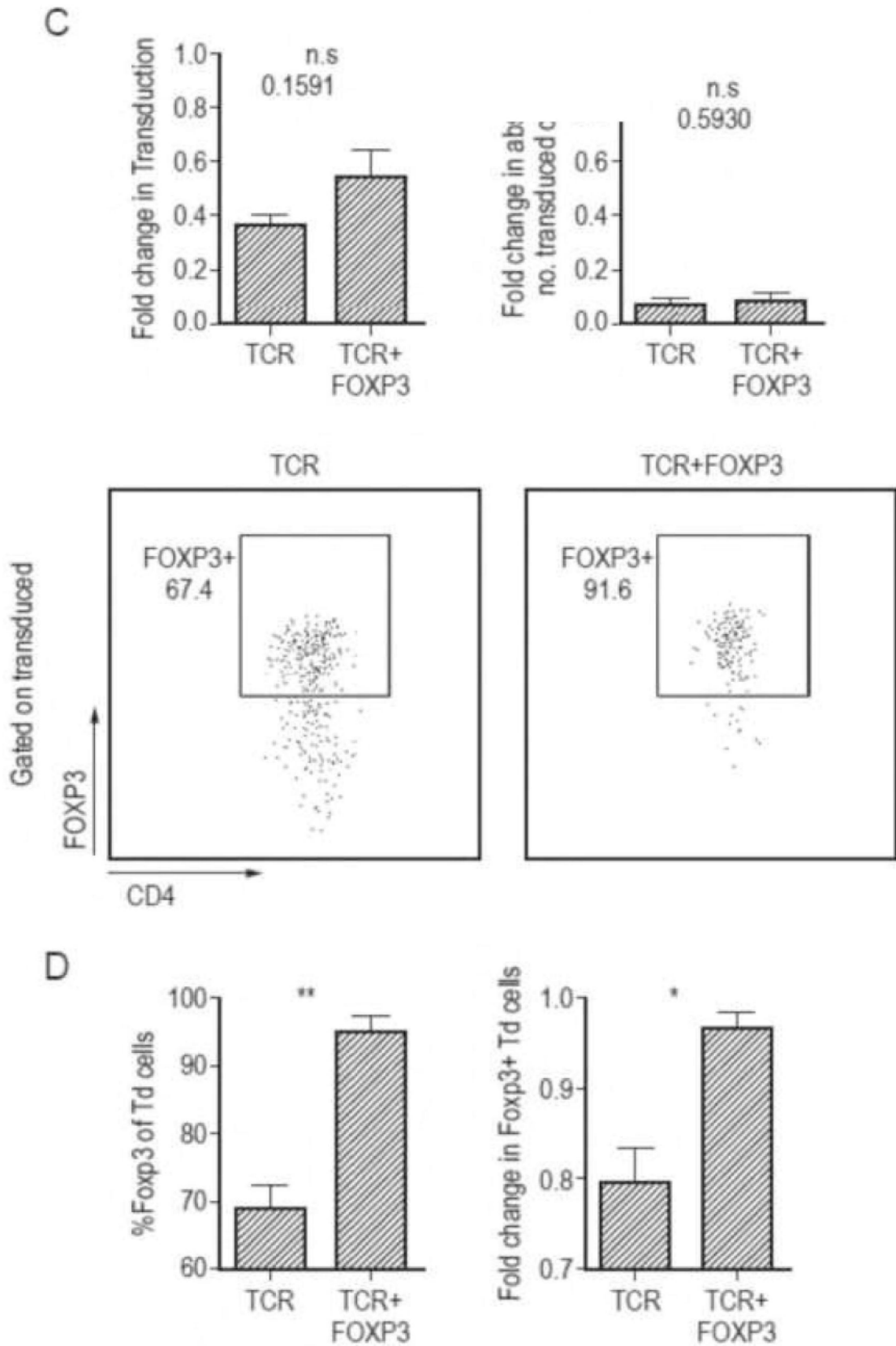


图15(续)

A)

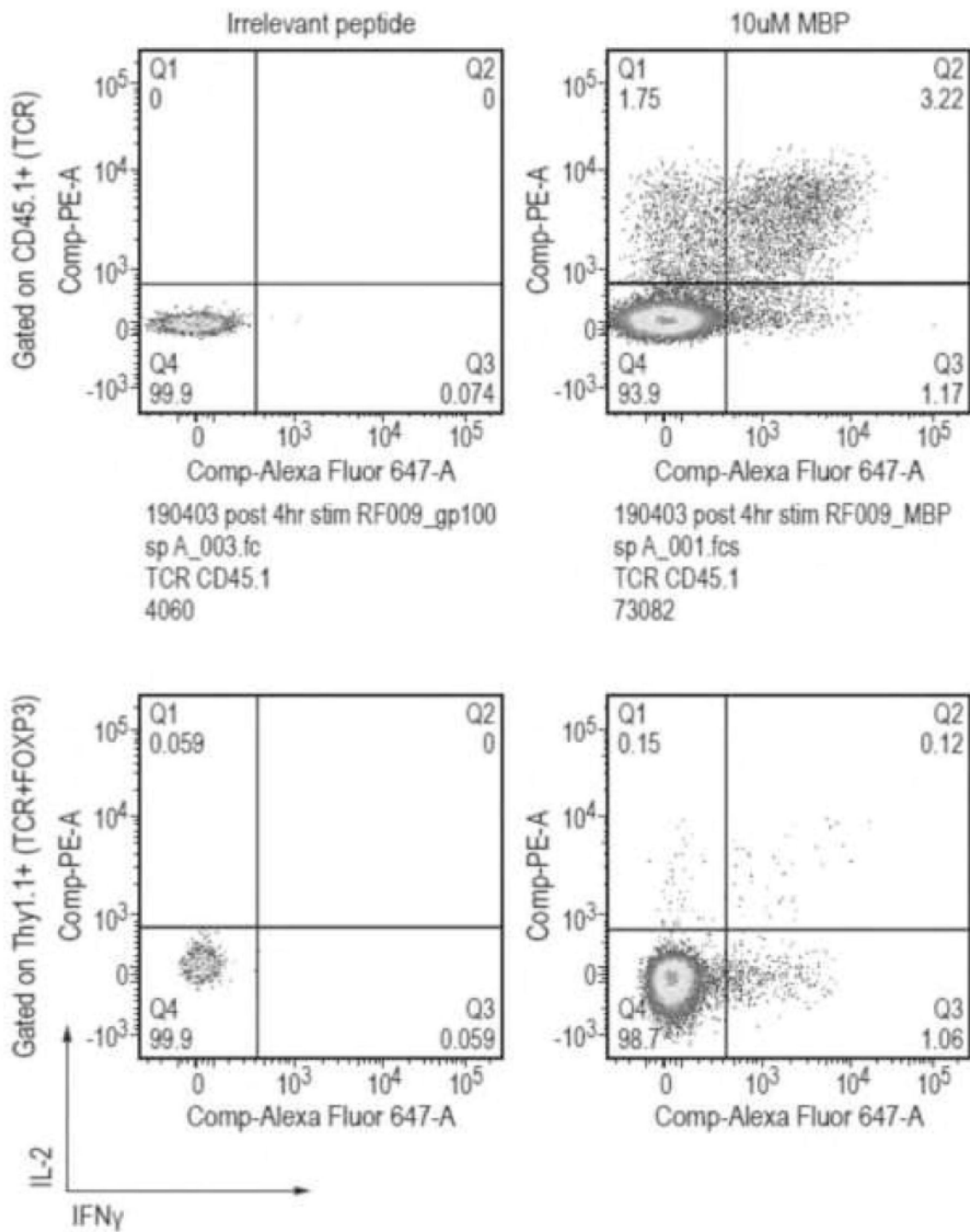


图16

B)

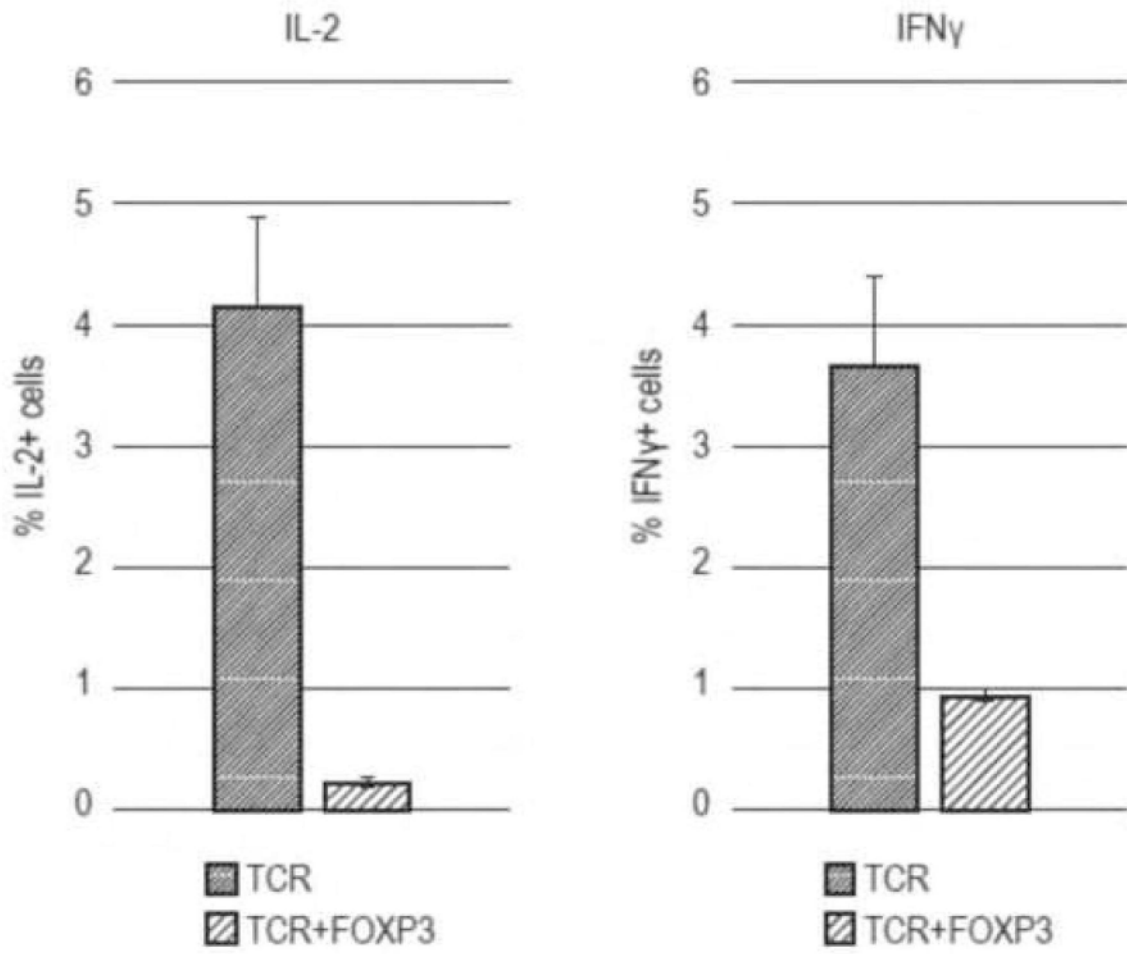


图16(续)