



(12) 发明专利申请

(10) 申请公布号 CN 118475601 A

(43) 申请公布日 2024. 08. 09

(21) 申请号 202280079730.8

(22) 申请日 2022.12.29

(66) 本国优先权数据

202210005890.X 2022.01.05 CN

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2024.06.06

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/CN2022/143567 2022.12.29

(87) PCT国际申请的公布数据

WO2023/131053 ZH 2023.07.13

(71) 申请人 苏州系统医学研究所

地址 215000 江苏省苏州市工业园区崇文路100号

(72) 发明人 李贵登 程洪成 邱雅静 许悦

(74) 专利代理机构 苏州锦尚知识产权代理事务所(普通合伙) 32502

专利代理人 滕锦林

(51) Int.Cl.

C07K 14/725 (2006.01)

C07K 19/00 (2006.01)

G12N 5/10 (2006.01)

A61K 39/00 (2006.01)

A61K 35/17 (2015.01)

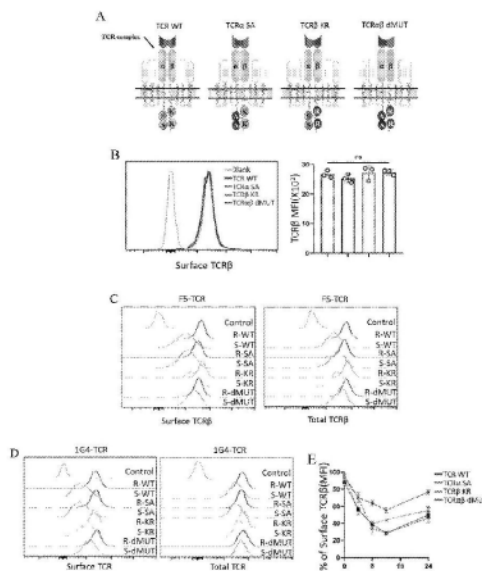
A61P 35/00 (2006.01)

(54) 发明名称

一种T细胞受体及其制备方法和用途

(57) 摘要

提供一种T细胞受体的构建及其用途。利用T细胞受体α链和β链胞内恒定区位点的突变,抑制了TCR抗原信号激活后T细胞受体的降解,维持了细胞表面TCR的水平,提高TCR-T细胞疗法的功效,该方法适用于不同的TCR-T细胞疗法。



(12) 按照专利合作条约所公布的国际申请

(19) 世界知识产权组织
国际局

(43) 国际公布日
2023年7月13日 (13.07.2023)



(10) 国际公布号
WO 2023/131053 A1

(51) 国际专利分类号:
A61P 35/00 (2006.01) *A61K 35/17* (2015.01)
C12N 5/10 (2006.01) *A61K 39/00* (2006.01)
C07K 19/00 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2022/143567

(22) 国际申请日: 2022年12月29日 (29.12.2022)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
202210005890.X 2022年1月5日 (05.01.2022) CN

(71) 申请人: 苏州系统医学研究所(SUZHOU INSTITUTE OF SYSTEMS MEDICINE) [CN/CN]; 中国江

苏省苏州市工业园区崇文路100号, Jiangsu 215123 (CN)。

(72) 发明人: 李贵登 (LI, Guideng); 中国江苏省苏州市工业园区崇文路100号, Jiangsu 215123 (CN)。程洪成 (CHENG, Hongcheng); 中国江苏省苏州市工业园区崇文路100号, Jiangsu 215123 (CN)。邱雅静 (QIU, Yajing); 中国江苏省苏州市工业园区崇文路100号, Jiangsu 215123 (CN)。许悦 (XU, Yue); 中国江苏省苏州市工业园区崇文路100号, Jiangsu 215123 (CN)。

(74) 代理人: 苏州锦尚知识产权代理事务所(普通合伙) (SUZHOU JINSHANG INTELLECTUAL PROPERTY LAW FIRM (GENERAL

(54) Title: T CELL RECEPTOR, AND PREPARATION METHOD THEREFOR AND USE THEREOF

(54) 发明名称: 一种T细胞受体及其制备方法和用途

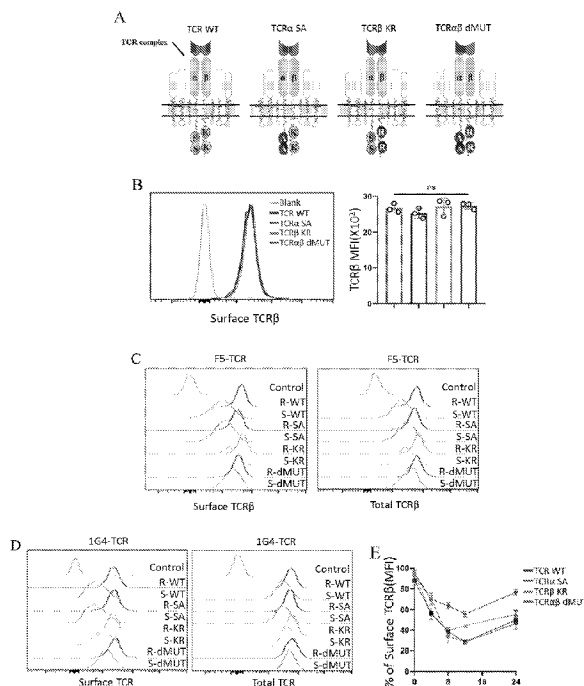


图 2

(57) Abstract: Provided are construction of a T cell receptor and the use thereof. The mutation of α -chain and β -chain intracellular constant region sites of the T cell receptor inhibits the degradation of the T cell receptor after the activation of TCR antigen signal, thereby maintaining the level of TCR on the cell surface and improving the efficacy of TCR-T cell therapy. The method is suitable for different TCR-T cell therapies.

(57) 摘要: 提供一种T细胞受体的构建及其用途。利用T细胞受体 α 链和 β 链胞内恒定区位点的突变, 抑制了TCR抗原信号激活后T细胞受体的降解, 维持了细胞表面TCR的水平, 提高TCR-T细胞疗法的功效, 该方法适用于不同的TCR-T细胞疗法。

[见续页]

WO 2023/131053 A1

PARTNERSHIP); 中国江苏省苏州市高新区竹园路209号4号楼2101室, Jiangsu 215000 (CN)。

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

本国际公布:

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

一种 T 细胞受体及其制备方法和用途

技术领域

本申请涉及 T 细胞受体领域，具体涉及经改造的 T 细胞受体的构建及其用途。

5 背景技术

恶性肿瘤严重威胁人类的健康和生命,是人类死亡的主要病因之一,其发病率逐年上升。传统的肿瘤治疗方法主要是以手术治疗为主，放疗，化疗为辅，而与传统疗法相比，肿瘤免疫疗法是以免疫系统为靶点，激发对肿瘤的全身性反应，此外，据临床数据显示肿瘤免疫治疗能够显著改善特定肿瘤类型患者的
10 预后。而抗原特异 T 细胞的过继转移是肿瘤免疫治疗的主要手段之一，现已经被研究用于血液瘤以及实体瘤治疗。它主要是基于 T 细胞表面的 T 细胞受体可以识别不同的肿瘤抗原，从而实现对肿瘤细胞的杀伤和清除。

现阶段研究较多的 T 细胞过继疗法主要包括 CAR-T 细胞疗法和 TCR-T 疗法，其中 CAR-T 是将能识别某种肿瘤抗原的抗体的抗原结合部分与 CD3- ζ 链体外偶联为一个嵌合蛋白，通过基因转导的方法转染患者的 T 细胞，使其表达嵌
15 合抗原受体。当患者的 T 细胞被“重新编码”后，生成大量的肿瘤 T 细胞，从而达到发挥杀伤肿瘤作用。而 TCR-T 疗法是 T 细胞通过其表面的 TCR 识别靶细胞表面的主要组织相容性复合物(Major Histocompatibility Complex, MHC)所呈递的抗原，从而实现对靶细胞的直接攻击和杀伤。它是基于天然的 TCR 或者对
20 TCR 进行微弱的改造所开发的 T 细胞治疗技术。由于其能够识别肿瘤细胞表面主要组织相容性复合物分子所呈递的肿瘤表位，因而具有更广泛的适用性。

TCR-T 细胞疗法的靶向性取决于 T 细胞表面表达的抗原 TCR，而 TCR 是 T 细胞表面的受体，其以非共价键与 CD3 结合，形成 TCR-CD3 复合物，通过识

别并结合 MHC 呈递的抗原从而激活 T 细胞,促进 T 细胞的分裂与分化。与 CAR 不同的是,大多数 TCR 是由 α 链和 β 链组成的异源二聚体,其 α 链和 β 链均包含抗原结合区、恒定区和跨膜结构域。而这些 α 链和 β 链通过位于每条链固定区域内的保守半胱氨酸残基之间的二硫键共价连接。与 CAR-T 疗法相比较, 5 TCR-T 可针对大多数胞内抗原,而不局限在表面抗原,即 TCR-T 可以靶向大部分的肿瘤抗原,特别是能够识别肿瘤细胞胞内抗原。因此,T 细胞受体对肿瘤的识别范围比抗体类药物以及依赖于抗体识别肿瘤的 CAR-T 的应用范围更广。此外,CAR-T 在实体瘤治疗方面存在不足,而 TCR-T 技术有望解决这一难题。

目前,已经有多种 TCR-T 优化改造的方法用于改善或增强 TCR-T 肿瘤治疗效果,其主要通过改造 T 细胞结合肿瘤抗原的“探头”-TCR,以加强 T 细胞针对 10 肿瘤细胞的识别过程,提高 T 淋巴细胞对于肿瘤细胞的亲和力,使得原来无肿瘤识别能力的 T 细胞能够有效地识别并杀伤肿瘤细胞。具体的包括:

(1) 增加外源性 TCR 的表达,以增强 TCR-T 抗肿瘤效果。a. TCR 恒定区鼠源化:借助基因工程手段将 TCR 恒定区鼠源化,以降低或阻止内源性和外源 15 性 TCR 错配,促进外源性 TCR 的优先配对,提高 T 细胞表面抗原 TCR 表达水平,从而增强 TCR-T 的抗肿瘤效果;b. TCR 恒定区半胱氨酸插入法:TCR α 链和 β 链的恒定区引入半胱氨酸,以促进外源性 TCR 的优先配对,增加外源性的 TCR 表面表达水平,并减少与内源性 TCR 链的错配,此方法可以提高肿瘤反应性 T 细胞的有效性和安全性;c. TCR 跨膜区插入疏水性突变:通过增加 TCR α 链 20 跨膜区的疏水性,提高 TCR 稳定性,使得 T 细胞表面 TCR 表达增强,从而提高细胞亲和力和抗肿瘤 TCR 活性。

(2) 增加外源性 TCR 与肿瘤抗原的亲和力。合成 T 细胞受体和抗原受体法 (STAR: synthetic T cell receptor and antigen receptor):将抗体抗原结合区域

的 VH 和 VL 分别插入至到 TCR $\alpha\beta$ 恒定区，既具有 CAR 的高亲和力，又具有 TCR 复合体高信号传递能力，从而增强 TCR-T 的抗肿瘤效果。

虽然修饰的 TCR-T 细胞过继疗法已经在转移性黑色素瘤和其他恶性肿瘤的治疗过程中取得很好的效果，但是在肿瘤治疗过程依然存在诸多局限性：

5 (1) T 细胞功能紊乱。a. 肿瘤微环境内部持续的抗原刺激导致 CD8⁺ T 细胞耗竭，如 PD-1、Lag-3、CD39 以及 TIM-3 等抑制性受体表达增加； b. 低氧低 pH 的肿瘤微环境使得 T 细胞效应功能进行性丧失，如 IFN- γ ，TNF- α 等促炎性细胞因子分泌水平降低以及导致 T 细胞增殖和自我更新能力变差，代谢活性失调等。

10 (2) T 细胞表面 TCR 表达水平降低。肿瘤微环境内抗原刺激导致 CD8⁺ T 细胞表面外源性 TCR 表达降低或是降解加快，使得没有足够的 TCR-T 细胞攻击肿瘤细胞。

(3) 临床治疗过程中存在治疗毒性。目前，TCR-T 靶向的抗原很少具有肿瘤组织，因此，在治疗过程中会产生肿瘤靶向的瘤外毒性。

15

发明内容

发明要解决的问题

鉴于上述所述的 TCR-T 细胞疗法的一些技术缺点，本申请的目的在于提供一种能够抑制降解的 T 细胞受体，并增强 TCR-T 细胞的抗肿瘤效果。

20 用于解决问题的方案

一方面，本申请提供一种 T 细胞受体 (TCR) 分离的 TCR α 链或其片段，所述 TCR α 链包括 TCR α 链恒定区，所述 TCR α 链恒定区包括依次连接的 TCR α 链胞外恒定区、TCR α 链跨膜区和 TCR α 链胞内恒定区，所述 TCR α 链胞内恒定区为突变的 TCR α 链胞内恒定区，所述突变的 TCR α 链胞内恒定区是野生

型 TCR α 链胞内恒定区中至少一个丝氨酸突变为丙氨酸形成。

另一方面，本申请提供一种 T 细胞受体 (TCR) 分离的 TCR β 链或其片段，所述 TCR β 链包括 TCR β 链恒定区，所述 TCR β 链恒定区包括依次连接的 TCR β 链胞外恒定区、TCR β 链跨膜区和 TCR β 链胞内恒定区，所述 TCR β 链胞内
5 恒定区为突变的 TCR β 链胞内恒定区，所述突变的 TCR β 链胞内恒定区是野生型 TCR β 链胞内恒定区中至少一个赖氨酸突变为精氨酸或丙氨酸形成。

另一方面，本申请提供一种分离的 T 细胞受体或其片段，所述 T 细胞受体包括前述任一项的 TCR α 链和/或 TCR β 链。

另一方面，本申请提供一种或多种 T 细胞受体，例如 F5-WT TCR、F5-SA
10 TCR、F5-KR TCR 或 F5-dMUT TCR，例如 1G4-WT TCR、1G4-SA TCR、1G4-KR TCR 或 1G4-dMUT TCR。

另一方面，本申请提供一种分离的核酸或其片段，其编码前述任意一项分离的 TCR α 链或其片段、TCR β 链或其片段、或 T 细胞受体或其片段。

另一方面，本申请提供一种核酸构建物，其包含前述任意一项分离的核酸
15 或其片段。

另一方面，本申请提供一种载体，其包含前述任意一项的核酸构建物。

另一方面，本申请提供一种工程化细胞，其包含前述任意一项的核酸构建物或载体。

另一方面，本申请还提供一种 TCR 复合物，其由本申请的前述任意一项 TCR
20 核酸构建物在 T 细胞中产生。

另一方面，本申请提供了 TCR-T 细胞在体外培养过程中进行了功能性检测。

另一方面，本申请提供了前述任一项所述分离的 TCR α 链或其片段、TCR β 链或其片段、T 细胞受体或其片段、核酸或其片段、核酸构建物、载体或工程化

细胞在下述任意一种或多种用途中的应用：

- (1) 在抗原刺激过程中的抑制 T 细胞受体降解中的应用；
- (2) 提供对肿瘤的杀伤效果，或抑制肿瘤生长；
- (3) 维持 T 细胞的增殖能力；
- 5 (4) 抗肿瘤的免疫药物及细胞的制备。

另一方面，本申请提供的突变TCR-T细胞疗法可以单独使用或联合其他疗法同时使用，或联合PD-1/PD-L1抗体，或联合细胞因子疗法，或联合放化疗，共同结合使用。

另一方面，本申请提供一种 T 细胞受体的改造方法，包括：

- 10 (1) 将野生型 TCR β 链胞内恒定区中至少一个的赖氨酸突变为精氨酸或丙氨酸；和/或
- (2) 将野生型 TCR α 链胞内恒定区中至少一个的丝氨酸突变为丙氨酸。

发明的效果

本申请利用 T 细胞受体 α 链和 β 链胞内恒定区泛素化修饰位点的突变，抑制了 TCR 抗原信号激活后 T 细胞受体的降解，维持了细胞表面 TCR 的水平，该方法适用于不同的 TCR-T 细胞疗法。

一方面，抗原刺激之后，相比于 WT TCR 细胞(野生型 TCR 细胞)，SA TCR、KR TCR 和 dMUT TCR 细胞有更多的细胞表面 TCR 表达，并且体外培养的过程中，SA TCR、KR TCR 和 dMUT TCR 细胞展现出向中央记忆 T 细胞分化的表型，体外耗竭模型显示相较于 WT TCR，KR TCR 和 dMUT TCR 细胞耗竭水平更低，这种表型的转变得益于 SA TCR、KR TCR 和 dMUT TCR 细胞内更健康的线粒体状态，其表现为体外培养的突变体 TCR-T 细胞展现出更低的线粒体膜电势及 ROS 水平。另一方面，本申请通过小鼠移植瘤-T 细胞过继模型，发现相比较于 WT TCR，KR TCR 和 dMUT TCR 细胞有更强的抗肿瘤效果，并发现 dMUT TCR

突变体组在小鼠脾脏和血液中有更多的 TCR-T 细胞存在，而在肿瘤组织中，KR TCR 和 dMUT TCR 细胞数量比例明显增多。从细胞表型来说，在小鼠脾脏中 SA TCR，KR TCR 和 dMUT TCR 组积累了更多的中央记忆 T 细胞，而在肿瘤组织中 dMUT 突变的 TCR-T 细胞展现出更低的 T 细胞耗竭表型及增殖能力。因此，
5 在过继等量的 TCR-T 细胞治疗的过程中，KR TCR 和 dMUT TCR 细胞表现出更具优势的抑制肿瘤生长的潜力。

可以理解的是，本申请通过对 TCR 胞内恒定区氨基酸的突变，不仅抑制 TCR 降解，也提高了 TCR-T 细胞疗法的功效，可以有效的遏制肿瘤的生长，所述肿瘤不局限于实体瘤，可以是血液瘤或者淋巴瘤。

10

附图说明

图1.抗原刺激促进了细胞表面TCR的降解。（A）K562-NYESO-1 接种的荷瘤小鼠，1G4-TCR-T细胞过继第十二天后，检测脾脏及肿瘤中TCR-T细胞表面TCR的表达情况。（B）体外功能实验均在人原代T
15 细胞上进行，体外培养1G4-TCR-T细胞，分别跟K562-NYESO-1和K562-MART-1细胞共孵育12小时，检测TCR的降解情况。（C）体外培养活化的F5-TCR-T细胞，CD3抗体刺激12小时后，检测TCR的降解情况。（D）体外培养活化的1G4-TCR-T细胞，CD3抗体刺激12小时后，检测TCR的降解情况。

20 图2.突变抑制TCR下调和降解的结果图。体外功能实验均在人原代T细胞上进行。（A）降解受抑制的TCR突变模式图。（B）突变后的1G4-TCR在人原代T细胞上的表达。（C）体外活化的不同突变F5-TCR-T细胞，CD3抗体刺激12小时后，检测不同TCR的降解情况（“R”代表无CD3抗体刺激，“S”代表有CD3抗体刺激）。（D）体外活化的不同突
25 变1G4-TCR-T细胞，CD3抗体刺激12小时后，检测不同TCR的降解情

况（“R”代表无CD3抗体刺激，“S”代表有CD3抗体刺激）。（E）体外活化的不同突变1G4-TCR-T细胞，CD3抗体刺激不同时间，检测不同TCR的表达情况。

图3.突变对1G4-TCR-T细胞体外功能的影响图。体外功能实验均在人原代T细胞上进行。（A）体外活化的TCR-T细胞，以CD45RO和CD27为记忆T细胞分化指标，进行流式检测。（B）活化的1G4-TCR-T细胞，检测记忆T细胞分化指标CD62L。（C）体外活化的1G4-TCR-T细胞，检测记忆T细胞分化指标TCF-1。（D）利用体外耗竭模型，检测不同突变体TCR-T细胞耗竭分子LAG-3的表达。（E）利用体外耗竭模型，检测TCR-T细胞耗竭关键转录因子TOX的表达。（F）利用体外耗竭模型，检测突变体TCR-T细胞因子的产生。

图4.不同突变1G4-TCR-T细胞线粒体功能状态的对比图。体外实验均在人原代T细胞上进行。（A）不同TCR-T细胞体外激活12天后检测胞内线粒体数量。（B）检测突变后的1G4-TCR-T细胞内线粒体膜电势的变化。（C）体外活化的1G4-TCR-T细胞，检测其胞内线粒体ROS的产生水平。（D）不同TCR-T细胞体外激活12天后，2-NBDG处理后，FACS流式分析，检测TCR-T细胞对葡萄糖的摄取。（E）Bodipy FL C16摄取实验检测不同突变组TCR-T细胞对胞外脂肪酸的利用效率。

图5.不同突变1G4-TCR-T细胞的抗肿瘤效果对比图。（A）1G4-TCR-T细胞接种的K562-NYESO-1 NSG荷瘤小鼠，不同时间点肿瘤大小的统计图。K562-NYESO-1 NSG荷瘤小鼠过继T细胞后，第十二天检测不同突变组肿瘤组织的重量（B），同时检测荷瘤小鼠血液（C），脾脏（D）及肿瘤组织（E）中过继TCR-T细胞的比例。

图6.突变对1G4-TCR-T细胞在小鼠体内功能的影响图。（A）NSG荷瘤小鼠脾脏内，以CD45RO和CD27为记忆T细胞分化指标，对不同突变组进行流式检测。（B）NSG荷瘤小鼠肿瘤组织内，检测不同突变组记忆T细胞分化指标CD62L的表达。（C）NSG荷瘤小鼠肿瘤组织内，检测不同突变组记忆T细胞分化指标CCR7的表达。（D）NSG荷瘤小

鼠肿瘤组织内，检测不同突变组耗竭T细胞PD-1⁺TIM-3⁺双阳性细胞比例及统计图。检测NSG荷瘤小鼠肿瘤组织内不同突变组TCR-T细胞免疫抑制性分子PD-1 (E)，TIM-3 (F)，LAG-3 (G)和CD39 (H)的表达。(I) NSG荷瘤小鼠肿瘤组织内，检测不同突变组转录因子TOX的表达。(J) 检测NSG荷瘤小鼠肿瘤组织内，IFN- γ ⁺阳性的CD8⁺ T细胞比例。(K) 检测NSG荷瘤小鼠肿瘤组织内，IFN- γ ⁺ TNF- α ⁺双阳性的TCR-T细胞比例。

具体实施方式

10 一方面，本申请提供一种T细胞受体(TCR)分离的TCR α 链或其片段，所述TCR α 链包括TCR α 链恒定区，所述TCR α 链恒定区包括依次连接的TCR α 链胞外恒定区、TCR α 链跨膜区和TCR α 链胞内恒定区。可选的，所述TCR α 链进一步包括TCR α 链可变区。

15 在一些实施方式中，所述TCR α 链恒定区及其相对应的TCR α 链胞外恒定区、TCR α 链跨膜区和TCR α 链胞内恒定区分别来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型T细胞受体(TCR)恒定区。

在一些实施方式中，所述TCR α 链胞内恒定区为人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型TCR α 链胞内恒定区，例如包含SEQ ID NO:3所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的野生型TCR α 链胞内恒定区。

20 在一些实施方式中，所述TCR α 链胞内恒定区为突变的TCR α 链胞内恒定区，所述突变的TCR α 链胞内恒定区是野生型TCR α 链胞内恒定区中至少一个丝氨酸突变为丙氨酸形成，例如人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型TCR α 链胞内恒定区中至少一个丝氨酸突变为丙氨酸形成突变的TCR α 链胞内恒定区。

在一些实施方式中，所述突变的 TCR α 链胞内恒定区是野生型 TCR α 链胞内恒定区中至少一个丝氨酸突变为丙氨酸形成，所述野生型 TCR α 链胞内恒定区包含 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的，例如 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列中 1 个或 2 个(全部)丝氨酸突变为丙氨酸形成突变的 TCR α 链胞内恒定区。

在一些实施方式中，所述突变的 TCR α 链胞内恒定区包含 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的。

在一些实施方式中，所述 TCR α 链包括 TCR α 链可变区，所述 TCR α 链可变区可以结合并识别一种或多种抗原，包括但不限于多肽类抗原（例如 NYESO-1、AFP 和 MART-1）、脂类抗原（例如 β -GlcCer、eLPA 和 LPE）和多糖类抗原（例如 CA199、CA72-4 和 CA125）。

在一些实施方式中，所述抗原为肿瘤抗原、微生物抗原或自身抗原，例如 BCMA、CA9、CTAG、CCL-1、CSPG4、EGFR、EPG-2、EPG-40、FCRL5、FBP、OGD2、GPC3、GPRC5D、HER3、HER4、HLA-A1、HLA-A2、LRRC8A、CMV、MUC1、MUC16、MART-1、NCAM、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、TPBG、TAG72、TRP1、TRP2、VEGFR、VEGFR2、WT-1、MAGE-A1/A3/A4/A6/A10/C2、gp100、CEA、NYESO-1、AFP、MART-1、HERV-E、HER2、LMP1/2、BRLF-1、BMLF-1、HPV-16E6/E7、KRAS G12D、KRAS G12V、TP53 R175H、 β -GlcCer、eLPA、LPE、CA199、CA72-4 或 CA125 中的一种或多种抗原。

在一些实施方式中，所述抗原为肿瘤抗原，例如 MAGE-A1/A3/A4/A6/A10/C2、gp100、CEA、NYESO-1、AFP、MART-1、HERV-E、HER2、LMP1/2、BRLF-1、BMLF-1、HPV-16E6/E7、KRAS G12D、KRAS G12V、TP53 R175H、 β -GlcCer、eLPA、LPE、CA199、CA72-4 或 CA125 中的一种或

多种。所述抗原可以是细胞表面抗原，或细胞胞内抗原。

在一些实施方式中，所述 TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:13 所示氨基酸序列或由其组成，其识别肿瘤抗原 MART-1；或包含 SEQ ID NO:21 所示氨基酸序列或由其组成，其识别肿瘤抗原 NYESO-1。

5 在一些实施方式中，所述 TCR α 链可变区包含互补决定区(CDR)，如 CDR1，CDR2，CDR3。所述互补决定区包含于 SEQ ID NO:13 所示氨基酸序列中，或包含 SEQ ID NO:21 所示氨基酸序列中。

10 在一些实施方式中，所述 TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:14 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID NO:15 所示氨基酸序列的 CDR2 和 SEQ ID NO:16 所示氨基酸序列的 CDR3，其识别肿瘤抗原 MART-1；或包含 SEQ ID NO:22 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID NO:23 所示氨基酸序列的 CDR2 和 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列的 CDR3，其识别肿瘤抗原 NYESO-1。

在一些实施方式中，所述 TCR α 链胞外恒定区为来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的 TCR α 链胞外恒定区。

15 在一些实施方式中，所述 TCR α 链胞外恒定区为包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列相比具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个突变的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

20 在一些实施方式中，所述 TCR α 链跨膜区为来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的 TCR α 链跨膜区。

在一些实施方式中，所述 TCR α 链跨膜区包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列相比具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或

10 个突变的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

5 在一些实施方式中，所述 TCR α 链恒定区包含 SEQ ID NO:5 或 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

一方面，本申请提供一种 T 细胞受体 (TCR) 分离的 TCR β 链或其片段，所述 TCR β 链包括 TCR β 链恒定区，所述 TCR β 链恒定区包括依次连接的 TCR β 链胞外恒定区、TCR β 链跨膜区和 TCR β 链胞内恒定区。可选的，所述 TCR β 链进一步包括 TCR β 链可变区。

10 在一些实施方式中，所述 TCR β 链恒定区及其相对应的 TCR β 链胞外恒定区、TCR β 链跨膜区和 TCR β 链胞内恒定区分别来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型 T 细胞受体 (TCR) 恒定区。

15 在一些实施方式中，所述 TCR β 链胞内恒定区为人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型 TCR β 链胞内恒定区，例如包含 SEQ ID NO:9 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的野生型 TCR β 链胞内恒定区；例如包含 SEQ ID NO:47 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的野生型 TCR β 链胞内恒定区；例如包含 SEQ ID NO:48 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的野生型 TCR β 链胞内恒定区。

20 在一些实施方式中，所述 TCR β 链胞内恒定区为突变的 TCR β 链胞内恒定区，所述突变的 TCR β 链胞内恒定区是野生型 TCR β 链胞内恒定区中至少一个赖氨酸突变为精氨酸或丙氨酸形成，例如人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型 TCR β 链胞内恒定区中至少一个赖氨酸突变为精氨酸或丙氨酸形成突变的 TCR β 链胞内恒定区。

在一些实施方式中，所述突变的 TCR β 链胞内恒定区是野生型 TCR β 链胞内恒定区中至少一个赖氨酸突变为精氨酸或丙氨酸形成，所述野生型 TCR β 链胞内恒定区包含 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:47 或 SEQ ID NO:48 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的，例如 SEQ ID NO:9 所示氨基酸序列中 1 个、2 5 个或 3 个（全部）赖氨酸突变为精氨酸或丙氨酸形成突变的 TCR β 链胞内恒定区；例如 SEQ ID NO:47 或 SEQ ID NO:48 中 1 个或 2 个（全部）赖氨酸突变为精氨酸或丙氨酸形成突变的 TCR β 链胞内恒定区。

在一些实施方式中，所述突变的 TCR β 链胞内恒定区包含 SEQ ID NO:10 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的。

10 在一些实施方式中，所述 TCR β 链包括 TCR β 链可变区，所述 TCR β 链可变区可以结合并识别一种或多种抗原，包括但不限于多肽类抗原（例如 NYESO-1、AFP 和 MART-1）、脂类抗原（例如 β -GlcCer、eLPA 和 LPE）和多糖类抗原（例如 CA199、CA72-4 和 CA125）。

在一些实施方式中，所述抗原为肿瘤抗原、微生物抗原或自身抗原，例如 15 BCMA、CA9、CTAG、CCL-1、CSPG4、EGFR、EPG-2、EPG-40、FCRL5、FBP、OGD2、GPC3、GPC5D、HER3、HER4、HLA-A1、HLA-A2、LRRC8A、CMV、MUC1、MUC16、MART-1、NCAM、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、TPBG、TAG72、TRP1、TRP2、VEGFR、VEGFR2、WT-1、MAGE-A1/A3/A4/A6/A10/C2、gp100、CEA、NYESO-1、AFP、MART-1、HERV-E、HER2、LMP1/2、BRLF-1、20 BMLF-1、HPV-16E6/E7、KRAS G12D、KRAS G12V、TP53 R175H、 β -GlcCer、eLPA、LPE、CA199、CA72-4 或 CA125 中的一种或多种抗原。

在一些实施方式中，所述抗原为肿瘤抗原，例如 MAGE-A1/A3/A4/A6/A10/C2、gp100、CEA、NYESO-1、AFP、MART-1、HERV-E、

HER2、LMP1/2、BRLF-1、BMLF-1、HPV-16E6/E7、KRAS G12D、KRAS G12V、TP53 R175H、 β -GlcCer、eLPA、LPE、CA199、CA72-4 或 CA125 中的一种或多种。所述抗原可以是细胞表面抗原，或细胞胞内抗原。

5 在一些实施方式中，所述 TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:17 所示氨基酸序列或由其组成，其识别肿瘤抗原 MART-1；或包含 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列或由其组成，其识别肿瘤抗原 NYESO-1。

在一些实施方式中，所述 TCR β 链可变区包含互补决定区(CDR)，如 CDR1，CDR2，CDR3。所述互补决定区包含于 SEQ ID NO: 17 所示氨基酸序列中，或包含 SEQ ID NO: 25 所示氨基酸序列中。

10 在一些实施方式中，所述 TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:18 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的 CDR2 和 SEQ ID NO:20 所示氨基酸序列的 CDR3，其识别肿瘤抗原 MART-1；或包含 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列的 CDR2 和 SEQ ID NO:28 所示氨基酸序列的 CDR3，其识别肿瘤抗原 NYESO-1。

15 在一些实施方式中，所述 TCR β 链胞外恒定区为来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的 TCR β 链胞外恒定区。

在一些实施方式中，所述 TCR β 链胞外恒定区为包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列相比具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个突变的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列具有至少
20 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方式中，所述 TCR β 链跨膜区为来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的 TCR β 链跨膜区。

5 在一些实施方式中,所述 TCR β 链跨膜区包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列,或包含与 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列相比具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个突变的氨基酸序列,或包含与 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或 99%的氨基酸序列,或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方式中,所述 TCR β 链恒定区包含 SEQ ID NO:11 或 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

另一方面,本申请提供一种分离的 T 细胞受体或其片段,所述 T 细胞受体包括前述任意一种 TCR α 链和/或 TCR β 链。

10 在一些实施方式中,所述 T 细胞受体包括前述任意一种 TCR α 链,所述 TCR α 链胞内恒定区选自:

(1) 来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型 TCR α 链胞内恒定区;

(2) 包含 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的野生型 TCR α 链胞内恒定区;

15 (3) 突变的 TCR α 链胞内恒定区,所述突变的 TCR α 链胞内恒定区为(1)或(2)所述的野生型 TCR α 链胞内恒定区中至少一个的丝氨酸突变为丙氨酸形成;或

(4) 包含 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的突变的 TCR α 链胞内恒定区。

20 在一些实施方式中,所述 T 细胞受体包括前述任意一种 TCR β 链,所述 TCR β 链胞内恒定区选自:

(1) 来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型 TCR β 链胞内恒定区;

(2) 包含 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:47 或 SEQ ID NO:48 所示氨基酸序列

或由所述氨基酸序列组成的野生型 TCR β 链胞内恒定区；

(3) 突变的 TCR β 链胞内恒定区，所述突变的 TCR β 链胞内恒定区为 (1) 或 (2) 所述的野生型 TCR β 链胞内恒定区中至少一个的赖氨酸突变为精氨酸或丙氨酸形成；或

5 (4) 包含 SEQ ID NO:10 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的突变的 TCR β 链胞内恒定区。

在一些实施方式中，所述 T 细胞受体包括前述任意一种 TCR α 链和 TCR β 链，并且，其中所述 TCR α 链胞内恒定区与所述 TCR β 链胞内恒定区不同时为野生型。例如，当 TCR α 链胞内恒定区为前述任意一种野生型 TCR α 链胞内恒
10 定区时，TCR β 链胞内恒定区为前述任意一种突变的 TCR β 链胞内恒定区；当 TCR α 链胞内恒定区为前述任意一种突变的 TCR α 链胞内恒定区时，TCR β 链胞内恒定区为前述任意一种野生型或突变的 TCR β 链胞内恒定区。

在一些实施方式中，本申请提供一种分离的 T 细胞受体或其片段，所述 T 细胞受体包括 TCR α 链和 TCR β 链，其中，所述 TCR β 链包括 TCR β 链可变区
15 和 TCR β 链恒定区，所述 TCR β 链恒定区包括依次连接的 TCR β 链胞外恒定区、TCR β 链跨膜区和 TCR β 链胞内恒定区，所述 TCR β 链胞内恒定区选自：

(1) 突变的 TCR β 链胞内恒定区，所述突变的 TCR β 链胞内恒定区为野生型 TCR β 链胞内恒定区中至少一个的赖氨酸突变为精氨酸或丙氨酸；或

(2) 包含 SEQ ID NO:10 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的突变的
20 的 TCR β 链胞内恒定区。

进一步的，所述野生型 TCR β 链胞内恒定区选自本申请前述任意一种野生型 TCR β 链胞内恒定区，例如：

(1) 来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型 TCR β 链胞内恒定区；

(2) 包含 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:47 或 SEQ ID NO:48 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的野生型 TCR β 链胞内恒定区。

进一步的，所述 TCR α 链包括 TCR α 链恒定区，所述 TCR α 链恒定区包括依次连接的 TCR α 链胞外恒定区、TCR α 链跨膜区和 TCR α 链胞内恒定区，所述 TCR α 链胞内恒定区选自本申请前述任意一种野生型 TCR α 链胞内恒定区或突变的 TCR α 链胞内恒定区，例如：

(1) 来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型 TCR α 链胞内恒定区；

(2) 包含 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的野生型 TCR α 链胞内恒定区；

(3) 突变的 TCR α 链胞内恒定区，所述突变的 TCR α 链胞内恒定区为 (1) 或 (2) 所述的野生型 TCR α 链胞内恒定区中至少一个的丝氨酸突变为丙氨酸；

(4) 包含 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的突变的 TCR α 链胞内恒定区；

进一步的，所述 TCR α 链包括 TCR α 链可变区。

在一些实施方式中，本申请提供一种分离的 T 细胞受体或其片段，所述 T 细胞受体包括 TCR α 链和 TCR β 链，其特征在于，所述 TCR α 链包括 TCR α 链可变区和 TCR α 链恒定区，所述 TCR α 链恒定区包括依次连接的 TCR α 链胞外恒定区、TCR α 链跨膜区和 TCR α 链胞内恒定区，所述 TCR α 链胞内恒定区选自：

(1) 突变的 TCR α 链胞内恒定区，所述突变的 TCR α 链胞内恒定区为野生型 TCR α 链胞内恒定区中至少一个丝氨酸突变为丙氨酸；

(2) 包含 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的突变的 TCR α 链胞内恒定区。

进一步的，所述野生型 TCR α 链胞内恒定区选自本申请前述任意一种野生型 TCR α 链胞内恒定区，例如：

(1) 来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型 TCR α 链胞内恒定区；

(2) 包含 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的野生型
5 TCR α 链胞内恒定区。

进一步的，所述 TCR β 链包括 TCR β 链恒定区，所述 TCR β 链恒定区包括依次连接的 TCR β 链胞外恒定区、TCR β 链跨膜区和 TCR β 链胞内恒定区，所述 TCR β 链胞内恒定区选自本申请前述任意一种野生型 TCR β 链胞内恒定区或突变的 TCR β 链胞内恒定区，例如：

10 (1) 来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型 TCR β 链胞内恒定区；

(2) 包含 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:47 或 SEQ ID NO:48 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的野生型 TCR β 链胞内恒定区；

(3) 突变的 TCR β 链胞内恒定区，所述突变的 TCR β 链胞内恒定区为 (1) 或 (2) 所述的野生型 TCR β 链胞内恒定区中至少一个的赖氨酸突变为精氨酸或
15 丙氨酸形成；

(4) 包含 SEQ ID NO:10 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的突变的 TCR β 链胞内恒定区。

进一步的，所述 TCR β 链包括 TCR β 链可变区。

在一些实施方式中，所述 T 细胞受体包含 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的野生型 TCR α 链胞内恒定区，和/或包含 SEQ ID NO:10
20 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的突变的 TCR β 链胞内恒定区。

在一些实施方式中，所述 T 细胞受体包含 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的突变的 TCR α 链胞内恒定区，和/或包含 SEQ ID NO:9、

SEQ ID NO:47 或 SEQ ID NO:48 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的野生型 TCR β 链胞内恒定区。

在一些实施方式中，所述 T 细胞受体 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的突变的 TCR α 链胞内恒定区，和/或包含 SEQ ID NO:10 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的突变的 TCR β 链胞内恒定区。

在一些实施方式中，前述任意一种 T 细胞受体包括前述任意一种 TCR α 链可变区和/或 TCR β 链可变区。所述 TCR α 链可变区和/或 TCR β 链可变区可以结合并识别一种或多种抗原，包括但不限于多肽类抗原（例如 NYESO-1、AFP 和 MART-1）、脂类抗原（例如 β -GlcCer、eLPA 和 LPE）和多糖类抗原（例如 CA199、CA72-4 和 CA125）。所述抗原可以是肿瘤抗原、微生物抗原或自身抗原，例如 BCMA、CA9、CTAG、CCL-1、CSPG4、EGFR、EPG-2、EPG-40、FCRL5、FBP、OGD2、GPC3、GPC5D、HER3、HER4、HLA-A1、HLA-A2、LRRC8A、CMV、MUC1、MUC16、MART-1、NCAM、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、TPBG、TAG72、TRP1、TRP2、VEGFR、VEGFR2、WT-1、MAGE-A1/A3/A4/A6/A10/C2、gp100、CEA、NYESO-1、AFP、MART-1、HERV-E、HER2、LMP1/2、BRLF-1、BMLF-1、HPV-16E6/E7、KRAS G12D、KRAS G12V、TP53 R175H、 β -GlcCer、eLPA、LPE、CA199、CA72-4 或 CA125 中的一种或多种抗原；优选为 MAGE-A1/A3/A4/A6/A10/C2、gp100、CEA、NYESO-1、AFP、MART-1、HERV-E、HER2、LMP1/2、BRLF-1、BMLF-1、HPV-16E6/E7、KRAS G12D、KRAS G12V、TP53 R175H、 β -GlcCer、eLPA、LPE、CA199、CA72-4 或 CA125 中的一种或多种。所述抗原可以是细胞表面抗原，或细胞胞内抗原。

在一些实施方式中，前述任一项的 T 细胞受体包括前述任一项的 TCR β 链可变区，例如：

(1) TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:17 所示氨基酸序列所含的三个互补决定区 CDR;

(2) TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列所含的三个互补决定区 CDR;

5 (3) TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:18 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的 CDR2 和/或 SEQ ID NO:20 所示氨基酸序列的 CDR3;

(4) TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列的 CDR2 和/或 SEQ ID NO:28 所示氨基酸序列的 CDR3;

(5) TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:17 所示氨基酸序列或由其组成; 或

10 (6) TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方式中, 前述任一项的 T 细胞受体包括前述任一项的 TCR α 链可变区, 例如:

(1) TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:13 所示氨基酸序列所含的三个互补决定区 CDR;

15 (2) TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:21 所示氨基酸序列所含的三个互补决定区 CDR;

(3) TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:14 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID NO:15 所示氨基酸序列的 CDR2 和/或 SEQ ID NO:16 所示氨基酸序列的 CDR3;

20 (4) TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:22 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID NO:23 所示氨基酸序列的 CDR2 和/或 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列的 CDR3;

(5) TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:13 所示氨基酸序列或由其组成; 或

(6) TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:21 所示氨基酸序列或由其组成。

在一些实施方式中, 前述任一项的 T 细胞受体的 TCR α 链可变区和 TCR β

链可变区选自：

(1) 所述 TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:13 所示氨基酸序列所含的三个互补决定区 CDR，所述 TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:17 所示氨基酸序列所含的三个互补决定区 CDR；

5 (2) 所述 TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:21 所示氨基酸序列所含的三个互补决定区 CDR，所述 TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列所含的三个互补决定区 CDR；

(3) 所述 TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:14 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID NO:15 所示氨基酸序列的 CDR2 和 SEQ ID NO:16 所示氨基酸序列的 CDR3，所述 TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:18 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的 CDR2 和 SEQ ID NO:20 所示氨基酸序列的 CDR3；

(4) 所述 TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:22 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID NO:23 所示氨基酸序列的 CDR2 和 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列的 CDR3，所述 TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列的 CDR2 和 SEQ ID NO:28 所示氨基酸序列的 CDR3；

(5) 所述 TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:13 所示氨基酸序列或由其组成，所述 TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:17 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(6) 所述 TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:21 所示氨基酸序列或由其组成，所述 TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方式中，所述 T 细胞受体包括前述任意一种 TCR α 链胞外恒定区和/或 TCR β 链胞外恒定区。

在一些实施方式中，所述 T 细胞受体包括前述任意一种 TCR α 链跨膜区和/或 TCR β 链跨膜区。

在一些实施方式中，所述 T 细胞受体包括前述任意一种 TCR α 链恒定区和/或 TCR β 链恒定区。例如，所述 TCR α 链恒定区和 TCR β 链恒定区选自：

5 (1)所述 TCR α 链恒定区包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，所述 TCR β 链恒定区包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

(2)所述 TCR α 链恒定区包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，所述 TCR β 链恒定区包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(3)所述 TCR α 链恒定区包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，所述 TCR β 链恒定区包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

另一方面，本申请提供一种或多种 T 细胞受体 F5-TCR，包括 F5-WT TCR、F5-SA TCR、F5-KR TCR 或 F5-dMUT TCR。所述 F5-TCR 可变区识别肿瘤抗原 MART-1，所述 F5-TCR α 链可变区为 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列，所述 F5-TCR β 链可变区为 SEQ ID NO:17 的氨基酸序列；

进一步，所述 F5-WT TCR α 链恒定区为 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列，F5-WT TCR β 链恒定区为 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列；

20 进一步，所述 F5-SA TCR α 链恒定区为 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列，F5-SA TCR β 链恒定区为 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列；

进一步，所述 F5-KR TCR α 链恒定区为 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列，F5-KR TCR β 链恒定区为 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列；

进一步，所述 F5- dMUT TCR α 链恒定区为 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列，
F5- dMUT TCR β 链恒定区为 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列。

另一方面，本申请提供一种或多种 T 细胞受体 1G4-TCR，包括 1G4-WT TCR、
1G4-SA TCR、1G4-KR TCR 或 1G4-dMUT TCR。所述 1G4-TCR 可变区识别肿
5 瘤抗原 NYESO-1，所述 1G4-TCR α 链可变区为 SEQ ID NO:21 的氨基酸序列或，
所述 1G4-TCR β 链可变区为 SEQ ID NO:25 的氨基酸序列；

进一步，所述 1G4-WT TCR α 链恒定区为 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列，
1G4-WT TCR β 链恒定区为 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列；

进一步，所述 1G4- SA TCR α 链恒定区为 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列，1G4-
10 SA TCR β 链恒定区为 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列；

进一步，所述 1G4- KR TCR α 链恒定区为 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列，1G4-
KR TCR β 链恒定区为 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列。

进一步，所述 1G4- dMUT TCR α 链恒定区为 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列，
1G4- dMUT TCR β 链恒定区为 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列。

15 另一方面，前述任意一种 TCR α 链、TCR β 链或 T 细胞受体进一步与信号
肽结合，所述信号肽与 TCR α 链可变区和/或 TCR β 链可变区形成信号肽-可变
区结构。

在一些实施方式中，所述信号肽选自人生长激素信号肽、CD8 α 信号肽、免
疫球蛋白信号肽。

20 在一些实施方式中，所述信号肽包含 SEQ ID NO:29 和/或 SEQ ID NO:30 的
氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方式中，TCR α 链信号肽氨基酸序列包含 SEQ ID NO:29 的氨基
酸序列或由所述氨基酸序列组成。

在一些实施方式中，TCR β 链信号肽氨基酸序列包含 SEQ ID NO:30 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

形成本申请的前述任意一种 TCR α 链、TCR β 链或 T 细胞受体的上述各个部分，相互之间可直接相连，或通过接头序列连接。接头序列可以是 GGGG、
5 GGGGS、GSGSA 和 GGSGG 等基序相邻连接的，重复 1~5 个基序，长度 3~25 个氨基酸残基的序列。

另一方面，本申请提供一种分离的核酸或其片段，其编码前述任意一项分离的 TCR α 链或其片段、TCR β 链或其片段、或 T 细胞受体或其片段。

在一些实施方式中，编码野生型 TCR α 链恒定区核酸序列包含 SEQ ID
10 NO:31 的核酸序列或由所述核酸序列组成。

在一些实施方式中，编码野生型 TCR β 链恒定区核酸序列包含 SEQ ID NO:32 的核酸序列或由所述核酸序列组成。

在一些实施方式中，编码 SA TCR α 链恒定区核酸序列包含 SEQ ID NO:33 的核酸序列或由所述核酸序列组成。

15 在一些实施方式中，编码 KR TCR β 链恒定区核酸序列包含 SEQ ID NO:34 的核酸序列或由所述核酸序列组成。

在一些实施方式中，编码 F5-TCR α 链可变区核酸序列包含 SEQ ID NO:35 的核酸序列或由所述核酸序列组成。

20 在一些实施方式中，编码 F5-TCR β 链可变区核酸序列包含 SEQ ID NO:36 的核酸序列或由所述核酸序列组成。

在一些实施方式中，编码 1G4-TCR α 链可变区核酸序列包含 SEQ ID NO:37 的核酸序列或由所述核酸序列组成。

在一些实施方式中，编码 1G4-TCR β 链可变区核酸序列包含 SEQ ID NO:38

的核酸序列或由所述核酸序列组成。

在一些实施方式中，编码 F5-WT-TCR 核酸序列包含 SEQ ID NO:39 的核酸序列或由所述核酸序列组成。

5 在一些实施方式中，编码 F5-SA-TCR 核酸序列包含 SEQ ID NO:40 的核酸序列或由所述核酸序列组成。

在一些实施方式中，编码 F5-KR-TCR 核酸序列包含 SEQ ID NO:41 的核酸序列或由所述核酸序列组成。

在一些实施方式中，编码 F5- dMUT -TCR 核酸序列包含 SEQ ID NO:42 的核酸序列或由所述核酸序列组成。

10 在一些实施方式中，编码 1G4-WT-TCR 核酸序列包含 SEQ ID NO:43 的核酸序列或由所述核酸序列组成。

在一些实施方式中，编码 1G4- SA -TCR 核酸序列包含 SEQ ID NO:44 的核酸序列或由所述核酸序列组成。

15 在一些实施方式中，编码 1G4- KR -TCR 核酸序列包含 SEQ ID NO:45 的核酸序列或由所述核酸序列组成。

在一些实施方式中，编码 1G4- dMUT -TCR 核酸序列包含 SEQ ID NO:46 的核酸序列或由所述核酸序列组成。另一方面，本申请提供一种核酸构建物，其包含前述任意一项分离的核酸或其片段。

20 在一些实施方式中，所述核酸构建物还包括与前述核酸操作性连接的一个或多个调控序列。例如，包括但不限于在宿主细胞中显示转录活性的启动子序列、在宿主细胞中被识别并终止转录的与编码序列的 3'末端操作性连接的转录终止子序列、对宿主细胞翻译重要的与编码序列的 5'末端操作性连接的前导序列。

另一方面，本申请提供一种载体，其包含前述任意一项的核酸构建物。

在一些实施方式中，所述载体为表达载体或 *crisper* 基因编辑载体，例如逆转录病毒载体、慢病毒载体、杆状病毒载体、疱疹病毒载体、腺病毒载体、腺相关病毒(AAV)载体。

5 在一些实施方式中，所述逆转录病毒载体的构建主要包括复制起始位点、5'-LTR、3'-LTR 及前述任意一项的核酸序列或核酸构建物。

通常可操作性的将启动子与编码 T 细胞受体的核酸序列相连，并将核酸构建物并入表达载体，实现编码 T 细胞受体的多核苷酸序列的表达。编码本申请 T 细胞受体的核酸序列可被克隆入许多类型载体。例如，包括但不限于质粒、噬
10 菌体、动物病毒等。

合适的表达载体包含一种或多种在有机体中起作用的启动子序列、复制起点、合适的酶切位点和可选择的标记。

合适的启动子包括但不限于即时早期巨细胞病毒 (CMV) 启动子、延伸生长因子-1a (EF-1a)、人猿病毒 40 (SV40) 早期启动子、小鼠乳癌病毒 (MMTV)、
15 人免疫缺陷病毒 (HIV)、长末端重复 (LTR) 启动子等组成型启动子序列，能够驱动任何连接其上的任何多核苷酸序列高水平表达；也包括但不限于金属硫蛋白启动子、四环素启动子等诱导型启动子，用于在期望多核苷酸序列表达时打开，不期望其表达时关闭。

可选择的标记包括标记基因和报告基因，为了便于鉴定通过病毒载体感染的
20 的细胞群中的选择表达的细胞。合适的标记基因包括但不限于抗生素抗性基因、neo 基因等。合适的报告基因包括但不限于 β -半乳糖苷酶、绿色荧光蛋白基因、荧光素酶、氯霉素乙酰转移酶等。

另一方面，本申请提供一种工程化细胞，其包含前述任意一项的核酸构建

物或载体。

在一些实施方式中，所述工程化细胞为获自受试者的原代细胞。在一些实施方式中，受试者为哺乳动物受试者，例如受试者为人类。

在一些实施方式中，工程化细胞为 T 细胞，优选地人 T 细胞。

5 在一些实施方式中，工程化细胞为 NK 细胞，NKT 细胞，巨噬细胞， $\gamma\delta$ T 细胞，人 $CD4^+$ T 细胞， $CD8^+$ T 细胞，或 $CD4^+$ T/ $CD8^+$ T 细胞的混合细胞群。

通过常规的重组 DNA 技术，可利用本申请的 TCR 核酸构建物或包含所述核酸构建物的载体来表达或生产 TCR 或包含所述 TCR 的工程化细胞。通常所述方法包括：

10 (1)用编码本申请的 TCR 核酸构建物或包含所述核酸构建物的载体转化或转导合适的宿主细胞；

(2)在合适的培养基中培养宿主细胞；

(3)从培养基或细胞中分离、纯化出本申请工程化细胞或 TCR。

15 将不同核酸序列或载体导入工程化细胞的方法目前是领域内已经熟知的，通过物理方法，化学方法及生物学方法可以将目的基因导入宿主细胞。

在一些实施方式中，本申请使用逆转录病毒来完成目的序列导入宿主细胞，逆转录病毒感染法是目前使用非常广泛的感染人或鼠源原代细胞的方法。本申请一些实施方式中，将不同突变 TCR 核酸序列构建到逆转录病毒载体之后，通过
20 使用优选的病毒包膜蛋白或衣壳蛋白包装产生病毒颗粒。随后将重组的病毒颗粒传递进宿主或离体培养的细胞中，完成目的基因在宿主细胞的表达。

上述的病毒颗粒中包含 TCR 核酸序列、逆转录病毒载体及包装蛋白的核酸序列。

另一方面，本申请还提供一种 TCR 复合物，其由本申请的前述任意一项 TCR

核酸构建物在 T 细胞中产生。

另一方面,本申请提供了 TCR-T 细胞在体外培养过程中进行了功能性检测。具体的,包括 TCR-T 细胞记忆性表型检测,体外耗竭模型中检测 TCR-T 细胞耗竭表型以及 TCR-T 细胞线粒体表型检测。上述 TCR-T 细胞记忆性表型和线粒体
5 表型检测在人原代 T 细胞激活后,利用细胞流式进行检测。上述突变 TCR-T 细胞耗竭检测使用了体外构建好的耗竭模型,具体的,利用 CD3 抗体体外多轮刺激不同突变的 TCR-T 细胞,然后利用流式细胞技术检测耗竭相关分子表达。

另一方面,本申请提供了前述任一项所述分离的 TCR α 链或其片段、TCR β 链或其片段、T 细胞受体或其片段、核酸或其片段、核酸构建物、载体或工程化
10 细胞在下述任意一种或多种用途中的应用:

- (1) 在抗原刺激过程中的抑制 T 细胞受体降解中的应用;
- (2) 提供对肿瘤的杀伤效果,或抑制肿瘤生长;
- (3) 维持 T 细胞的增殖能力;
- (4) 抗肿瘤的免疫药物及细胞的制备。

另一方面,本申请提供的突变 TCR-T 细胞疗法可以单独使用或联合其他疗
15 法同时使用,或联合 PD-1/PD-L1 抗体,或联合细胞因子疗法,或联合放化疗,共同结合使用。上述疗法单独使用或联合使用时,其使用数量和频率由病症特性及病症的严重程度等多种因素共同确定。理论上,本申请所提供的 TCR-T 细胞疗法可以低剂量多次使用,上述的使用剂量范围为 10^4 - 10^9 个细胞/千克。而本
20 申请所提供的 TCR-T 细胞的过继治疗方式遵循国际上公认过的继技术实施。在本文的一个实施例中 5×10^6 个 TCR-T 细胞通过尾静脉注射进行实施。原则上,T 细胞疗法联用物可以直接注入肿瘤组织或感染部位。

另一方面,本申请提供一种 T 细胞受体的改造方法,包括:

(1) 将前述任一项野生型 TCR β 链胞内恒定区中至少一个的赖氨酸突变为精氨酸或丙氨酸；和/或

(2) 将前述任一项野生型 TCR α 链胞内恒定区中至少一个的丝氨酸突变为丙氨酸。

5 为了更容易理解本申请公开内容，定义如下某些术语。

T 细胞受体 (TCR) 是存在于 T 细胞表面的分子，其负责识别肽-MHC 复合物。在一些实施方案中，所述 TCR 是完整或全长 TCR。在一些实施方案中，本申请提供一种 TCR 片段，其小于全长 TCR，但仍保留与 MHC 分子的特定抗原肽即 MHC-肽复合物的结合。在一些实施方案中，TCR 是由 α 和 β 链组成的异二聚体。在一些实施方案中，TCR 也可以是单链 TCR(scTCR)。

术语“可变区”或“可变域”是指 TCR α 或 β 链的结构域，其参与 TCR 与抗原-MHC 复合物的结合。天然 TCR 的 α 链和 β 链的可变区通常具有类似的结构，每个结构区均包含四个保守框架区(FR)和三个高变区或互补决定区 (CDR)。其中各可变区中的 CDR3 是负责识别经加工的抗原的主要 CDR。单个 TCR α 链可变区或 TCR β 链可变区可能足以赋予对肽-MHC 复合物的结合。

应当理解，在一些实施方案中，本申请的 TCR α 链可以是人 TCR α 链、人源化 TCR α 链、嵌合 TCR α 链或鼠源 TCR α 链。在本申请的一些实施方案中，TCR α 链是嵌合 TCR α 链，其包含衍生自多于一种物种的序列，例如衍生自人和小鼠的序列。举例来说，将人 TCR 恒定区用鼠对应物交换可以改善人 T 细胞的功能以及表达水平(参见，例如，Daniel Sommermeyer et al., *J Immunol.* 2010 Jun 1;184(11):6223-31., 其通过引用并入本文作为参考)。因此，TCR 可以包含人衍生的可变区和鼠衍生的恒定区。

同样，在一些实施方案中，本申请的 TCR β 链也可以是人 TCR β 链、人源化

TCR β 链、嵌合 TCR β 链或鼠源 TCR β 链。嵌合 TCR β 链，其包含衍生自多于一种物种的序列，例如衍生自人和小鼠的序列。

依据本申请所描述的 TCR α 链恒定区和/或 TCR β 链恒定区，其包括依次连接的胞外恒定区、跨膜区和胞内恒定区，其中胞外恒定区可以包括 TCR α 链和 TCR β 链铰链区，参与 TCR α 链 TCR β 链二硫键的形成；跨膜区亦属于恒定区，其作用包括参与 TCR α 链、TCR β 链的细胞膜锚定以及与 CD3 亚基的相互作用，形成 TCR-CD3 复合物；胞内恒定区可能的作用包括参与 TCR 信号转导后，TCR-CD3 复合物构象的转变及信号传导。

术语“抗原”是指细胞表面分子或胞内由 MHC 分子或 MHC-like 分子呈递，可被抗体或 T 细胞受体(TCR)结合分子，包括但不限于多肽类抗原（例如 NYESO-1、AFP 和 MART-1）、脂类抗原（例如 β -GlcCer、eLPA 和 LPE）或多糖类抗原（例如 CA199、CA72-4 和 CA125）。所述抗原可以是肿瘤抗原，例如肿瘤细胞相关抗原（Tumor-associated antigen, TAA），或肿瘤特异性抗原（Tumor specific antigen, TSA）。

术语“分离的”是指已经从其天然状态移出或以其他方式进行人为操作的材料，例如本文所述的 α 链、 β 链、T 细胞受体和核酸。分离的材料可以基本上或实质上没有通常在其天然状态伴随其的组分，或者可以经操作而处于人造状态，其与通常在其天然状态伴随其的组分在一起。分离的材料可以是天然的、化学合成的或重组的形式。分离的材料也可以或备选地是富集的、部分纯化的或纯化的形式。

应当理解，本发明“野生型”是指一类天然存在的氨基酸序列或编码核酸序列，或与天然存在氨基酸序列或编码核酸序列相比具有至少 90%-100% 的同源性，或与天然存在氨基酸序列或编码核酸序列相比具有不超过 1-10 个或 1-5 个

氨基酸突变(尤其是保守氨基酸取代), 并且仍然具有与该区域相同或相似的活性和/或功能。

“野生型”作为本申请相应突变或突变组合的模板而引入, 例如“来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型”, 是指所述区域具有天然人、天然小鼠或大鼠、或其他哺乳动物种属的该区域的氨基酸序列或编码核酸序列, 或由该氨基酸序列或编码核酸序列组成。“来源于”人、鼠或其他哺乳动物种属的区域还涵盖这样的区域, 其基本上与天然人、天然小鼠或大鼠、或其他哺乳动物种属的该区域的氨基酸序列或编码核酸序列相同, 例如与天然存在氨基酸序列或编码核酸序列相比具有至少 90%-100% 的同一性, 或与天然存在氨基酸序列或编码核酸序列相比具有不超过 1-10 个或 1-5 个氨基酸突变(尤其是保守氨基酸取代), 并且仍然具有与该区域相同或相似的活性和/或功能。

术语“突变”可以理解为一个或多个氨基酸或核酸的取代、缺失或添加。例如可以是氨基酸的保守取代, 保守氨基酸取代是本领域已知的, 并且包括这样的氨基酸取代, 其中一个具有一定物理和/或化学性质的氨基酸被交换为另一个具有相同化学或物理性质的氨基酸。例如, 所述保守氨基酸取代可以是酸性氨基酸取代另一个酸性氨基酸(如, Asp 或 Glu), 具有非极性侧链的氨基酸取代另一个具有非极性侧链的氨基酸(如, Ala、Gly、Val、He、Leu、Met、Phe、Pro、Trp、Val 等), 碱性氨基酸取代另一个碱性氨基酸(Lys、Arg 等), 具有极性侧链的氨基酸取代另一个具有极性侧链的氨基酸(Asn、Cys、Gin、Ser, Thr, Tyr 等)等, 所述保守取代可以例如基于极性、电荷、溶解度、疏水性、亲水性和/或所涉及残基的两亲性质的相似性来进行。

在涉及本申请 TCR α 链胞内恒定区和/或 TCR β 链胞内恒定区的“突变”时, 其优选为氨基酸的取代。例如, 突变的 TCR α 链胞内恒定区是指野生型 TCR α

链胞内恒定区中至少一个丝氨酸取代为丙氨酸；突变的 TCR β 链胞内恒定区是指野生型 TCR β 链胞内恒定区中至少一个赖氨酸取代为精氨酸或丙氨酸。

如下进行序列之间序列同一性的计算。

为确定两个氨基酸序列或两个核酸序列的同一性百分数，将所述序列出于
5 最佳比较目的比对(例如，可以为了最佳比对而在第一和第二氨基酸序列或核酸
序列之一或二者中引入空位或可以为比较目的而抛弃非同源序列)。在一个优选
实施方案中，为比较目的，所比对的参考序列的长度是至少 30%、优选地至少
40%、更优选地至少 50%、60%和甚至更优选地至少 70%、80%、90%、100%的
参考序列长度。随后比较在对应氨基酸位置或核酸位置处的氨基酸残基或核酸。
10 当第一序列中的位置由第二序列中对应位置处的相同氨基酸残基或核酸占据
时，则所述分子在这个位置处是相同的。

可以利用数学算法实现两个序列间的序列比较和同一性百分数的计算。在
一个优选实施方案中，使用已经集成至 GCG 软件包的 GAP 程序中的 Needleman
和 Wunsch ((1970) J.Mol. Biol. 48:444-453)算法(在 <http://www.gcg.com> 可获得)，
15 使用 Blossum 62 矩阵或 PAM250 矩阵和空位权重 16、14、12、10、8、6 或 4
和长度权重 1、2、3、4、5 或 6，确定两个氨基酸序列之间的同一性百分数。在
又一个优选的实施方案中，使用 GCG 软件包中的 GAP 程序(在
<http://www.gcg.com> 可获得)，使用 NWSgapdna.CMP 矩阵和空位权重 40、50、
60、70 或 80 和长度权重 1、2、3、4、5 或 6，确定两个核酸序列之间的同一性
20 百分数。特别优选的参数集合(和除非另外说明否则应当使用的一个参数集合)
是采用空位罚分 12、空位延伸罚分 4 和移码空位罚分 5 的 Blossum 62 评分矩阵。

还可以使用 PAM120 加权余数表、空位长度罚分 12，空位罚分 4，利用已
经并入 ALIGN 程序(2.0 版)的 E. Meyers 和 W. Miller 算法, ((1989) CABIOS,

4:11-17)确定两个氨基酸序列或核酸序列之间的同一性百分数。

额外地或备选地，可以进一步使用本文所述的核酸序列和蛋白质序列作为“查询序列”以针对公共数据库执行检索，以例如鉴定其他家族成员序列或相关序列。

5 如本领域已知，在本文中可交换使用的“核苷酸”或“核酸”是指任何长度的核酸链，并且包括 DNA 和 RNA。核酸可以是脱氧核糖核酸、核糖核酸、修饰的核酸或碱基、和/或它们的类似物、或者能够通过 DNA 或 RNA 聚合酶掺入链的任何底物。

10 本文所述的核酸序列可根据本文公开的核苷酸序列设计引物，通过 PCR 扩增法获得，或通过技术人员制备 cDNA 库进行 PCR 扩增获得。

应当理解，本申请中“野生型”和“WT”可以互换地使用；“SA”指 α 链胞内恒定区的氨基酸序列中至少一个丝氨酸突变为丙氨酸；“KR”指 β 链胞内恒定区的氨基酸序列中至少一个赖氨酸突变为精氨酸；“dMUT”指 α 链胞内恒定区中“SA”突变和 β 链胞内恒定区的氨基酸序列中“KR”突变同时存在。

15 应当理解，本申请中 F5-TCR 是指一类可以识别肿瘤抗原 MART-1 的 TCR，其所包括的 F5-WT TCR、F5-SA TCR、F5-KR TCR 和 F5-dMUT TCR 具有相同的 TCR α 链可变区和 TCR β 链可变区，所述 F5-WT TCR、F5-SA TCR、F5-KR TCR 和 F5-dMUT TCR 依据 α 链胞内恒定区或 β 链胞内恒定区中突变不同而划分。

20 同样，本申请中 1G4-TCR 是指一类可以识别肿瘤抗原 NYESO-1 的 TCR，其所包括的 1G4-WT TCR、1G4-SA TCR、1G4-KR TCR 或 1G4-dMUT TCR 具有相同的 TCR α 链可变区和 TCR β 链可变区，所述 1G4-WT TCR、1G4-SA TCR、1G4-KR TCR 或 1G4-dMUT TCR 依据 α 链胞内恒定区或 β 链胞内恒定区中突变不同而划分。

“载体”表示其能够将一种或多种所关注的基因或序列递送入宿主细胞并且优选在宿主细胞中表达所述基因或序列。载体的实例包括但不限于病毒载体、质粒、粘粒或噬菌体载体。

术语“宿主细胞”是指已经引入外源性核酸的细胞，包括这些细胞的子代。

5 应当理解，在基因克隆操作中，所设计的合适的酶切位点会在所表达的氨基酸序列的两端引入一个或多个不相干的残基，且并不影响目的序列的活性。例如，包括但不限于 NotI、BamHI、XhoI 等酶切位点。

应当理解，为了构建融合蛋白或获得自动定位到宿主细胞膜上的重组蛋白或促进重组蛋白的表达，需要将氨基酸片段添加至重组蛋白的 N-末端、C-末端
10 或蛋白内合适的区域，例如，包括但不限于信号肽、前导肽、2A 肽、末端延伸等。

应当理解，为了对所构建重组蛋白进行纯化，所构建的蛋白的氨基端或羧基端含有一个或多个蛋白标签。例如，包括但不限于 FLAG、HA、c-Myc、Poly-His 等。

15 应当理解，以上实施例（实施方式）均为示例性的，不用于包含权利要求所包含的所有可能的实施方式。在不脱离本公开的范围的情况下，还可以在以上实施例的基础上做出各种变形和改变。同样的，也可以对以上实施例的各个技术特征进行任意组合，以形成可能没有被明确描述的本申请的另外的实施例。因此，上述实施例仅表达了本申请的几种实施方式，不对本申请专利的保护范
20 围进行限制。

本申请序列表及注释

SEQ ID NO	序列	序列描述
1	IQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTM ESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFC QDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLFQ N	TCR α 链胞外恒定区氨基酸序列

SEQ ID NO	序列	序列描述
2	LSVMGLRILLKLVAGFNLLMTL	TCR α 链跨膜区氨基酸序列
3	RLWSS	野生型 TCR α 链胞内恒定区氨基酸序列
4	RLWAA	SA TCR α 链胞内恒定区氨基酸序列
5	IQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTM ESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFC QDIFKETNATYPSSDVPCDATALTEKSFETDMNLFQ NLSVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS	野生型 (WT) TCR α 链恒定区氨基酸序列
6	IQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTM ESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNNGAIAWSNQTSTFC QDIFKETNATYPSSDVPCDATALTEKSFETDMNLFQ NLSVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWAA	SA TCR α 链恒定区氨基酸序列
7	LRNVTTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPD HVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSS RLRVSATFWHNPRNHFRQCQVQFHGLSEEDKWPEGS PKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSAT	TCR β 链胞外恒定区氨基酸序列
8	ILYEILLGKATLYAVLVSGLVL	TCR β 链跨膜区氨基酸序列
9	MAMVKKKNS	野生型 (WT) 鼠源 TCR β 链胞内恒定区氨基酸序列
10	MAMVRKRNS	基于 WT 鼠源的 KR TCR β 链胞内恒定区氨基酸序列
11	LRNVTTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPD HVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSS RLRVSATFWHNPRNHFRQCQVQFHGLSEEDKWPEGS PKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYE ILLGKATLYAVLVSGLVLMAMVKKKNS	野生型 (WT) TCR β 链恒定区氨基酸序列
12	LRNVTTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPD HVELSWVWNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSS RLRVSATFWHNPRNHFRQCQVQFHGLSEEDKWPEGS PKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYHQGVLSATILYE ILLGKATLYAVLVSGLVLMAMVRKRNS	基于 WT 鼠源的 KR TCR β 链恒定区氨基酸序列
13	QQKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFW YRQYSGKSPELIMFIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQY VSLLRDSQPSDSATYLCAVNFVGGGKLIFGQGTELSV KPN	F5-TCR α 链可变区氨基酸序列
14	DRGSQS	F5-TCR α 链可变区 CDR1 氨基酸序列
15	IYSNGD	F5-TCR α 链可变区 CDR2 氨基酸序列
16	AVNFGGGKLI	F5-TCR α 链可变区 CDR3 氨基酸序列
17	GITQAPTSQILAAGRMTLRCTQDMRHNAMEYWYR QDLGLGLRLIHYSNTAGTTGKGEVDPDGYSVSRANT DDFPLTLASAVPSQTSVYFCASSLSFGTEAFFGQGR LTVVED	F5-TCR β 链可变区氨基酸序列
18	MRHNA	F5-TCR β 链可变区 CDR1 氨基酸序列
19	SNTAGT	F5-TCR β 链可变区 CDR2 氨基酸序列
20	ASSLSFGTEAF	F5-TCR β 链可变区 CDR3 氨基酸序列
21	KQEVTVQIPAALSVPEGENLVLNCSFTDSAIYNLQWF RQDPGKGLTSLLLIQSSQREQTSGRNLNASLDKSSGRS	1G4-TCR α 链可变区氨基酸序列

SEQ ID NO	序列	序列描述
	TLYIAASQPGDSATYLC AVRPTSGGSYIPTFGRGTSLI VHPY	
22	DSAIYN	1G4-TCR α 链可变区 CDR1 氨基酸序列
23	IQSSQ	1G4-TCR α 链可变区 CDR2 氨基酸序列
24	PTSGGSYIPT	1G4-TCR α 链可变区 CDR3 氨基酸序列
25	GVTQTPKFQVLKTGQSM T LQCAQDMNHEYMSWY RQDPGMGLRLIHYSV GAGITDQGEV PNGYNVSRST TEDFPLRLLSAAPSQTSVYFCASSYV GNTGELFFGE GSRLTVLED	1G4-TCR β 链可变区氨基酸序列
26	MNHEY	1G4-TCR β 链可变区 CDR1 氨基酸序列
27	GAGI	1G4-TCR β 链可变区 CDR2 氨基酸序列
28	YVGN	1G4-TCR β 链可变区 CDR3 氨基酸序列
29	MATGSRTSLLLA FGLLCLPWLQEASA	TCR α 链信号肽氨基酸序列
30	MATGSRTSLLLA FGLLCLPCLQE GSA	TCR β 链信号肽氨基酸序列
31	atccagaacccccgagccccgctgtaccagctgaaggacccagaagccagga cagcacctgtgctgtcaccgacttcagagccagatcaacgtgcccaagacc atggagagcggcaccttcaccgacaagaccgtgctggacatgaaggccatg gacagcaagagcaacggcgccatcgctgtccaaccagaccagcttcacatg ccaggacatctcaaggagaccaacgccacctacccagcagcagctgcccctg cgacgccaccctgaccgagaagagcttcgagaccgacatgaacctgaactcca gaacctgagcgtgatggcctgagaatcctgctgctgaaggtggccggctcaac ctgctgatgaccctgaggctgtggagcagc	野生型 (WT) TCR α 链恒定区核苷酸序列
32	ctgaggaacgtgaccccccaaggtgtccctgttcgagcccagcaaggccga gatgccacaagcagaaggccaccctggtgtcctggccaggggcttctccc cgaccactgtgagctgtcttgggtggaacggcaaggaggtgcacagcggcg tgagcaccgacccccaggcctacaaggagagcaactacagctactgctgagc agcaggctgagagtgagcggcaccttctggcacaacccaggaaccacttccgc tgtcaggtgcagttccacggcctgagcagaggagacaagtggcccagggcag ccccagcccgtgaccagaacatcagcggcaggcctggggcagagccgac tgcggcatcaccagcggcagctaccaccaggcgtgctgtccgccaccatctg tacgagatcctgctgggcaaggccacactgtacgccgtgctggtgtccggcctgg tgctgatggccatggtgaagaagaagaacagc	野生型 (WT) TCR β 链恒定区核苷酸序列
33	atccagaacccccgagccccgctgtaccagctgaaggacccagaagccagga cagcacctgtgctgtcaccgacttcagagccagatcaacgtgcccaagacc atggagagcggcaccttcaccgacaagaccgtgctggacatgaaggccatg gacagcaagagcaacggcgccatcgctgtccaaccagaccagcttcacatg ccaggacatctcaaggagaccaacgccacctacccagcagcagctgcccctg cgacgccaccctgaccgagaagagcttcgagaccgacatgaacctgaactcca gaacctgagcgtgatggcctgagaatcctgctgctgaaggtggccggctcaac ctgctgatgaccctgaggctgtgggcccgc	SA TCR α 链恒定区核苷酸序列
34	ctgaggaacgtgaccccccaaggtgtccctgttcgagcccagcaaggccga gatgccacaagcagaaggccaccctggtgtcctggccaggggcttctccc cgaccactgtgagctgtcttgggtggaacggcaaggaggtgcacagcggcg tgagcaccgacccccaggcctacaaggagagcaactacagctactgctgagc agcaggctgagagtgagcggcaccttctggcacaacccaggaaccacttccgc tgtcaggtgcagttccacggcctgagcagaggagacaagtggcccagggcag ccccagcccgtgaccagaacatcagcggcaggcctggggcagagccgac tgcggcatcaccagcggcagctaccaccaggcgtgctgtccgccaccatctg tacgagatcctgctgggcaaggccacactgtacgccgtgctggtgtccggcctgg	KR TCR β 链恒定区核苷酸序列

SEQ ID NO	序列	序列描述
	tgctgatggccatggtgaggaagaggaacagc	
35	caacagaaggagggtggagcagaattctggaccctcagtggtccagagggagcc attgcctctcactgcacttacagtgaccgaggtccagtccttcttctgtgaca gacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtcatatactccaatggtgaca aagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagtagtttctctg ctcatcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctgtgccgtgaactt cggaggaggaaagcttctcggacagggaacggagttatctgtgaaacccaat	F5-TCR α 链可变区核苷酸序列
36	gggatcaccagcaccacaatctcagatcctggcagcaggacggcgcagatgac actgagatgtaaccaggatatgagacataatgcatgtactggtatagacaagatc taggactggggctaaaggctcatccattattcaataactgcaggtaccactggcaaa ggagaagtcctgatggttatagtgtctccagagcaaacacagatgattcccct cacgttggcgtctgctgtaccctcagacatctgtgtacttctgtgccagcagccta agtttcggcactgaagcttcttggacaaggcaccagactcacagttgtagagga c	F5-TCR β 链可变区核苷酸序列
37	aaacaggaggtgacgcagattcctgcagctctgagtgcccagaaggagaaaaac ttggtctcaactgcagttcactgatagcgtattacaacctccagtggttaggca ggaccctgggaaaggctcacatctctgttcttattcagcaagtcagagagagc aaacaagtggaaagacttaaatgcctcgtggataaatcatcaggacgtagactttat acattgcagcttctcagcctgggtgactcagccacctctgtgctgtgagggccc acatcaggaggaagctacatactacatttgaagaggaaccagccttattgtcat ccgtat	1G4-TCR α 链可变区核苷酸序列
38	ggtgctactcagaccccaaaattccaggctcgaagacaggacagagcatgaca ctgcagtggtgccaggatatgaaccatgaatacgtcctggtatcgacaagacc aggcatggggctgaggctgattcactcagttggtgctggtatcactgaccaag gagaagtcccgaatggtacaatgtctccagatcaaccacagaggattcccgcctc aggctgctgctggctgctcctcccagacatctgtgtacttctgtgccagcagttac gtcgggaacaccggggagctgtttttggagaaggctctaggctgaccgtactgg aggac	1G4-TCR β 链可变区核苷酸序列
39	atggcgacgggttcaagaactccctactcttgcatttggcctgcttcttggcctg gttacaggaagcctcagcacaacagaaggaggtggagcagaattctggaccct cagtggtccagagggagccattgcctctcactgcacttacagtgaccgaggtt cccagtccttctgtgtacagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtt catatactccaatggtgacaaaagatggaaggtttacagcacagctcaataaa gccagccagatgtttctctgctcatcagagactcccagcccagtgattcagccac ctacctgtgccgtgaaactcggaggaggaagcttattcttggacagggaaagc gagttatctgtgaaaccaataatccagaaccccgagcccgcctgtaccagctga aggaccccagaagccaggacagcaccctgtcctgttaccgacttcgacagcc agatcaactgcccagaccatggagagcggcaccctcaccgacaagacc gtgctggacatgaaggccatggacagcaagagcaacggcgcctgctgctg caaccagaccagcttcacatgccaggacatctcaaggagaccaacgccacct ccccagcagcagctgcccctgacgcccacctgaccgagaagagcttcgaga ccgacatgaacctgaactccagaacctgagcgtgatggcctgagaatcctgct gtgaaaggtggccgctcaacctgctgataccctgaggtgtggagcagcag ggcaaaacgttcgggtcgggtgcccagtaaagcagacattaaactttgatttgc tgaacttgcaggtgatgtagagtcaaatccaggtccaatggcaacagggagcc gaacctctgctccttcttgggctccttgcctaccgtgctgacaggaggct cggcagggatcaccaggcaccacaatctcagatcctggcagcagagcggcgc atgacactgagatgtaccaggatatgagacataatgccatgtactggtatagaca agatctaggactgggctaaaggctcatccattattcaataactgcaggtaccactg gcaaaaggagaagtcctgatggttatagtgtctccagagcaaacacagatgattc cccctcacgttggcgtctgtgtaccctcagacatctgtgtacttctgtgccagca gcctaagtttcggcactgaagcttcttggacaaggcaccagactcacagttgtag aggactgaggaacgtgaccccccaagggtgcctgttcgagcccagcaag gccgagatcccaacaagcagaagggccacctggtgtgctgcccaggggctt ctccccgaccagctggagctgtcttgggtggaacggcaaggaggtgcacag cggcgtgagcaccgacccccaggcctacaaggagagcaactacagctactgcc tgagcagcaggtgagagtgagcggccaccttggcacaacccagggaaccact	F5-WT-TCR 全长核苷酸序列

SEQ ID NO	序列	序列描述
	<p>tccgctgcagggtcagttccacggcctgagcgaggaggacaagtggcccagagggcagcccaagcccgtgaccagaacatcagcggcaggcctggggcagagccgactcggcaccaccagcggcagctaccaccagggcgtgctgtccgccaccatcctgtacgagatcctgctggcaaggccacactgtacgccgtgctggtgtccggcctggtgctgatggccatggtgaagaagaagaacagctaa</p>	
40	<p>atggcgacgggtcaagaactccctactcttgcatttggcctgctttgttggcgtggttacaggaagcctcagcacaacagaaggaggtggagcagaattctggaccctcagtggtccagagggagccattgcctctctcaactgcaactacagtgaccgaggttcccagtcctcttctgtgtacagacaatattctggaaaagcccagttgataatggtcatatactccaatggtgacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagatgtttctgctcatcagagactccagcccagtgattcagccactacctgtgcccgtgaactcggaggaggaagcttatcttcggacagggaaacggagttatctgtgaaaccaatatecagaaccccagcccgcctgtaccagctgaaggaccccagaagccaggacagcaccctgtgcctgttaccgacttcgacagccagatcaacgtgcccagaccatggagagcggcaccctcataccgacaagaccgtgctggacatgaaggccatggacagcaagagcaacggcgcctgcctggtccaaccagaccagcttcacatgccaggacatctcaaggagaccaacgccacctaccccagcagcagctgccctgcgacgccaccctgaccgagaagagcttcgagaccgacatgaacctgaacttcagaacctgagcgtgatgggctgagaatcctgctgctgaaggtggcccgttcaacctgctgatgacctgaggctgtggcccagggcaaaacgttcgggtcgggtgcgccagtaaagcagacattaaactttgatttctgaaacttcaggtgatgtagagtcataatccaggctcaatggcaacaggagaccgaacctctctgctccttgccttgggtcctttgctaccgtgctgcaggagggtcggcagggatcaccagggcaccacatctcagatcctggcagcaggacggcgcctatgacactgagatgtaccagatagagacataatgccatgactgtgtatagacaagatctaggactgggctaaaggctcatcattatcaataactgcaggtaccctggcaaaaggagaagtcctgatggttatagtgtctccagagcaaacacagatgattccccctcacgttgccgtgctgtaccctctcagacatctgtgtacttctgtgccagcagcctaagtttcggcactgaagcttcttggacaaggccaccagactcacagttgtagaggactgaggaacgtgaccccccaagggtgcctgttcgagcccagcaaggccgagatcggcaacaagcagaagggccaccctggtgtgcctggccaggggcttctccccgaccagctggagctgtcttgggtgggtaacggcaaggaggtgcacagcggcgtgagcaccgacccccagcctacaaggagagcaactacagctactccctgagcagcaggctgagagtgagcggcacccttggcacaaccccaggaaccaatccgctgtcaggtgcagttccacggcctgagcggaggagacaagtggcccagggcagcccaagcccgtgaccagaacatcagcggcaggcctggggcagagccgactcggcaccaccagcggcagctaccaccagggcgtgctgtccgccaccatcctgtacgagatcctgctggcaaggccacactgtacgccgtgctggtgtccggcctggtgctgatggccatggtgaagaagaagaacagctaa</p>	F5-SA-TCR 全长核苷酸序列
41	<p>atggcgacgggtcaagaactccctactcttgcatttggcctgctttgttggcgtggttacaggaagcctcagcacaacagaaggaggtggagcagaattctggaccctcagtggtccagagggagccattgcctctctcaactgcaactacagtgaccgaggttcccagtcctcttctgtgtacagacaatattctggaaaagcccagttgataatggtcatatactccaatggtgacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaagccagccagatgtttctgctcatcagagactccagcccagtgattcagccactacctgtgcccgtgaactcggaggaggaagcttatcttcggacagggaaacggagttatctgtgaaaccaatatecagaaccccagcccgcctgtaccagctgaaggaccccagaagccaggacagcaccctgtgcctgttaccgacttcgacagccagatcaacgtgcccagaccatggagagcggcaccctcataccgacaagaccgtgctggacatgaaggccatggacagcaagagcaacggcgcctgcctggtccaaccagaccagcttcacatgccaggacatctcaaggagaccaacgccacctaccccagcagcagctgccctgcgacgccaccctgaccgagaagagcttcgagaccgacatgaacctgaacttcagaacctgagcgtgatgggctgagaatcctgctgctgaaggtggcccgttcaacctgctgatgacctgaggctgtggcccagggcaaaacgttcgggtcgggtgcgccagtaaagcagacattaaactttgatttctgaaacttcaggtgatgtagagtcataatccaggctcaatggcaacaggagaccgaacctctctgctccttgccttgggtcctttgctaccgtgctgcaggagggtcggcagggatcaccagggcaccacatctcagatcctggcagcaggacggcgc</p>	F5-KR-TCR 全长核苷酸序列

SEQ ID NO	序列	序列描述
	atgacactgagatgtaccaggatatgagacataatgccatgtactggtatagaca agatctaggactggggctaaggctcatcattatcaataactgcaggtaccactg gcaaaggagaagtcctgatggtatagtgctccagagcaaacacagatgatttc cccctcacgttggcgtctgtgtaccctctcagacatctgtgtacttctgtgccagca gcctaagttcggcactgaagctttcttgacaaggcaccagactcacagttgtag aggacctgaggaacgtgaccccccaagggtgcctgttcgagcccagcaag gccgagatcgccaacaagcagaaggccaccctggtgtgcctggcccagggctt ctccccgaccactggagctgtcttgggggtgaaaggcaaggaggtgcacag cggcgtgagcaccgacccccaggcctacaaggagagcaactacagctactgcc tgagcagcaggctgagagtgagcggccacctctggcacaaccccaggaaccact tccgctgtcaggtgcagttccacggcctgagcaggaggacaagtggcccag ggcagcccaagcccgtgaccagaacatcagcggcaggcctggggcagag ccgactgcggcatcaccagcggcagctaccaccagggcgtgctgtccgccacc atctgtacgagatcctgctggcaaggccacactgtacggcgtgctgtgtccg gctggtgctgatggccatggtgaagaagaagaacagctaa	
42	atggcgacgggtcaagaactccctactcttgcatttggcctgctttgttgcctg gttacaggaagcctcagcacaacagaaggaggtgagcagaattctggacccct cagtgtccagaggagccattgctctcactcacttgcactfacagtgaccgaggtt cccagtcctcttctgttacagacaatattctggaaaagccctgagttgataatgt cataactccaatggtgacaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaa gccagccagatgtttctctgtcatcagagacteccagcccagtgattcagccac ctacctgtgtccgtgaactcggagaggaaagcttatcttcggacagggaacg gaggttatctgtgaacccaatatecagaaccccagcccggcgtgtaccagctga aggaccccagaagccaggacagcaccctgtgcctgttcaccgactcagacgcc agatcaactgtgccaaagacatggagagcggcaccctcaccgacaagacc gtgtcggacatgaaggccatggacagcaagagcaacggcggcaccgctggtc caaccagaccagcttcacatgccaggacatctcaaggagaccaacgccacct ccccagcagcagctgcccctgcagcggcaccctgaccgagaagagcttcgaga ccgacatgaactgaactccagaacctgagcgtgatgggctgagaatcctgct gctgaagggtggcggcttcaacctgctgatgccctgaggtgtgggcccag ggcaaacgttcgggttcgggtgcgccagtaaagcagacattaactttgatttgc tgaacttgcaggtgatgtagagtcaaatcagggtcaatgcaacagggagcc gaacctctctccttcttcttgggctccttggcctaccgtgctgcaggagggt cggcagggatcaccaggeaccaacatctcagatcctggcagcaggacggcgc atgacactgagatgtaccaggatatgagacataatgccatgtactggtatagaca agatctaggactggggctaaggctcatcattatcaataactgcaggtaccactg gcaaaggagaagtcctgatggtatagtgctccagagcaaacacagatgatttc cccctcacgttggcgtctgtgtaccctctcagacatctgtgtacttctgtgccagca gcctaagttcggcactgaagctttcttgacaaggcaccagactcacagttgtag aggacctgaggaacgtgaccccccaagggtgcctgttcgagcccagcaag gccgagatcgccaacaagcagaaggccaccctggtgtgcctggcccagggctt ctccccgaccactggagctgtcttgggggtgaaaggcaaggaggtgcacag cggcgtgagcaccgacccccaggcctacaaggagagcaactacagctactgcc tgagcagcaggctgagagtgagcggccacctctggcacaaccccaggaaccact tccgctgtcaggtgcagttccacggcctgagcaggaggacaagtggcccag ggcagcccaagcccgtgaccagaacatcagcggcaggcctggggcagag ccgactgcggcatcaccagcggcagctaccaccagggcgtgctgtccgccacc atctgtacgagatcctgctggcaaggccacactgtacggcgtgctgtgtccg gcctggtgctgatggccatggtgaggaaggaacagctaa	F5-dMUT-TCR 全长核苷酸序列
43	atggcgacgggtcaagaactccctactcttgcatttggcctgctttgttgcctg gttacaggaagcctcagcaaacaggaggtgacgcagattcctgcagctctgagt gtcccagaaggagaaaacttgggtctcaactgcagttcactgatagcgtatttac aacctccagtggttaggcaggacctgggaaaggtctcactctctgttcttatt cagtcaagtcagagagagcaaacagtgaagacttaagcctcgtcgataaat catcaggacgtagtactttatcattgcagcttctcagcctggtgactcagccact acctctgtgctgtgaggccacatcaggaggaagctacatacctacatttgaaga ggaaccagccttattgtcatccgtatatccagaaccccagcccggcgtgtacca gctgaaggaccccagaagccaggacagcaccctgtgcctgttaccgactcga	1G4-WT-TCR 全长核苷酸序列

SEQ ID NO	序列	序列描述
	<p>cagccagatcaacgtgcccaagaccatggagagcggcaccttcaccgacaa gaccgtgctggacatgaaggccatggacagcaagagcaacggcgccatgcct ggtccaaccagaccagcttcacatgccaggacatctcaaggagaccaacgcca cctaccccagcagcagctgccctgcgacgccaccctgaccgagaagagcttc gagaccgacatgaacctgaactccagaacctgagcgtgatggcctgagaatc ctgctgctgaagggtggccggctcaacctgctgatgaccctgaggctgtggagca gcagggcaaacgctcgggtcgggtgcgccagtaaacgacattaacctttga tttctgaaactgacagtgatgtagagtaaatccaggccaatggcaacaggga gccgaacctctgctccttgccttcgggctccttgctaccgtgcctgcaggagg gctcggcaggtgtcactcagaccccaaaattccaggtcctgaagacaggacaga gcatgacactgcagtggtcccaggatatgaacctgaatacatgtcctggtatcga caagaccagcagtgaggctgaggtgattcattactcagttggtgctggtatcac tgaccaaggagaagtcccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggat ttccgctcaggtgctgctggctgctcctccagacatctgttactctgtgcca gcagttacgtcgggaacaccggggagctgtttttggagaaggctctaggctgac cgtactggaggacctgaggaacgtgaccccccaagggtgacctgttcgagcc cagcaaggccgagatcgccaacaagcagaagccaccctggtgtgacctggcca ggggcttctccccaccacgtggagctgtcttgggtggaacggcaaggaggt gcacagcggcgtgagcaccgacccccaggcctacaaggagagcaactacagc tactgctgagcagcaggtgagagtgagcggcaccttctggcacaaccccagg aaccactccgctgtcaggtgcagttccacggcctgagcaggaggacaagtgg cccagggcagccccaaagcccgtgaccagaacatcagcggcaggcctggg gcagagccgactgcggcatcaccagcggcagctaccaccaggcgtgctgtcc gccaccatcctgtacgagatcctgctgggcaagccacactgtaccctgtctgg tgtccggcctgtgctgatggccatggtgaagaagaagaacagctaa</p>	
44	<p>atggcgacgggtcaagaactccctactcttgcatttggcctgctttgttgcctg gttacaggaagcctcagcaaacaggaggtgacgcagattcctgcagctctgagt gtccagaaggagaaaaacttgggtctcaactgcagtttactgatagcctatttac aacctccagtggtttagcagcagacctgggaaaggtctcacatctctgttctatt cagtcaagtgcagagagcaaacagtggaagactaatgcctcgtctggataaat catcaggacgtactttatacttgcagcttctcagcctggtgactcagccact acctctgtgctgtgaggeccacatcaggaggaagctacatacctacatttgaaga ggaaccagccttattgtcatcctgtatatccagaaccccagcccggcgtgtacca gctgaaggaccccagaagccaggacagcaccctgtgectgttcaccgacttga cagccagatcaacgtgcccaagaccatggagagcggcaccttcaccgacaa gaccgtgctggacatgaaggccatggacagcaagagcaacggcgccatgcct ggtccaaccagaccagcttcacatgccaggacatctcaaggagaccaacgcca cctaccccagcagcagctgccctgcgacgccaccctgaccgagaagagcttc gagaccgacatgaacctgaactccagaacctgagcgtgatggcctgagaatc ctgctgctgaagggtggccggctcaacctgctgatgaccctgaggctgtggccg ccagggcaaacgctcgggtcgggtgcgccagtaaacgacattaacctttga tttctgaaactgacagtgatgtagagtaaatccaggccaatggcaacaggga gccgaacctctgctccttgccttcgggctccttgctaccgtgcctgcaggagg gctcggcaggtgtcactcagaccccaaaattccaggtcctgaagacaggacaga gcatgacactgcagtggtcccaggatatgaacctgaatacatgtcctggtatcga caagaccagcagtgaggctgaggtgattcattactcagttggtgctggtatcac tgaccaaggagaagtcccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggat ttccgctcaggtgctgctggctgctcctccagacatctgttactctgtgcca gcagttacgtcgggaacaccggggagctgtttttggagaaggctctaggctgac cgtactggaggacctgaggaacgtgaccccccaagggtgacctgttcgagcc cagcaaggccgagatcgccaacaagcagaagccaccctggtgtgacctggcca ggggcttctccccaccacgtggagctgtcttgggtggaacggcaaggaggt gcacagcggcgtgagcaccgacccccaggcctacaaggagagcaactacagc tactgctgagcagcaggtgagagtgagcggcaccttctggcacaaccccagg aaccactccgctgtcaggtgcagttccacggcctgagcaggaggacaagtgg cccagggcagccccaaagcccgtgaccagaacatcagcggcaggcctggg gcagagccgactgcggcatcaccagcggcagctaccaccaggcgtgctgtcc gccaccatcctgtacgagatcctgctgggcaagccacactgtaccctgtctgg</p>	1G4-SA-TCR 全长核苷酸序列

SEQ ID NO	序列	序列描述
	tgtccggcctggtgctgatggccatggtgaagaagaagaacagctaa	
45	<p>atggcgacgggtcaagaactccctactcttgcatttggcctgctttgtttgccgtg gttacaggaagcctcagcaaaacaggaggtgacgcagattcctgcagctctgagt gtccagaaggagaaaaacttggttctcaactgcagttcactgatagcgtatttac aacctccagtggtttaggcaggacctgggaaaggtctcacatctctgttgcattt cagtcaagtcagagagagcaacaagtgaagacttaatgcctcgttgataaat catcaggacgtagtactttatacattgcagcttctcagcctggtgactcagccact acctctgtgctgtgaggccacatcaggaggaagctacatacctacatttgaaga ggaaccagccttattgtcatccgtatatccagaaccccagccccccgtgtacca gctgaaggaccccagaagccaggacagcacctgtgctgttaccgacttcca cagccagatcaacgtgcccaagaccatggagagcggcaccctcatcaccgacaa gaccgtgctggacatgaaggccatggacagcaagagcaacggcgcctcgcct ggtccaaccagaccagcttccatgccaggacatctcaaggagaccaacgcca cctaccccagcagcagctgacctgcgacgccaccctgaccgagaagagcttc gagaccgacatgaacctgaactccagaacctgagcgtgatggcctgagaatc ctgtgctgaaggtggccgcttcaacctgctgatgacctgaggctgtggagca gcagggcaaacggtcgggtcgggtgcgccagtaagcagacattaactttga tttgcgtaaaactgacaggtgatgtagagcaaatccaggtccaatggcaacaggga gccgaacctctctgctccttgccttccggctccttgcctaccgtgctgcaggagg gctcggcaggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacaga gcatgacactgcagtggtgccaggatgaacctgaatacatgtctggtatcga caagaccagcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctggtatcac tgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggat tccccgtcaggtgctgctggctgctcctcccagacatctgttacttctgtgcca gcagttacgtcgggaacaccggggagctgtttttggagaaggctctaggctgac cgtactggaggacctgaggaaacgtgaccccccaagggtgctcctgttcgagcc cagcaaggccgagatcgcaacaagcagaagccaccctggtgtgctggtgcca ggggcttctccccaccacgtggagctgtcttgggtgggtaacggcaaggaggt gcacagcggcgtgagcaccgacccccaggcctacaaggagagcaactacagc tactgctgagcagcaggtgagagtgagcggcaccctctggcacaaccccagg aaccacttccgtgtcaggtgacgttccacggcctgagcagaggagcaagtgg cccagggcagccccagcccgtgaccagaacatcagcggcagggcctggg gcagagccgactgcccacaccagcggcagctaccaccagggcgtgctgtcc gccaccatcctgtacagatcctgctggcaagggcaccactgtaccgctgctgg tgtccggcctggtgctgatggccatggtgagggaagaggaaacagctaa</p>	1G4-KR-TCR 全长核苷酸序列
46	<p>atggcgacgggtcaagaactccctactcttgcatttggcctgctttgtttgccgtg gttacaggaagcctcagcaaaacaggaggtgacgcagattcctgcagctctgagt gtccagaaggagaaaaacttggttctcaactgcagttcactgatagcgtatttac aacctccagtggtttaggcaggacctgggaaaggtctcacatctctgttgcattt cagtcaagtcagagagagcaacaagtgaagacttaatgcctcgttgataaat catcaggacgtagtactttatacattgcagcttctcagcctggtgactcagccact acctctgtgctgtgaggccacatcaggaggaagctacatacctacatttgaaga ggaaccagccttattgtcatccgtatatccagaaccccagccccccgtgtacca gctgaaggaccccagaagccaggacagcacctgtgctgttaccgacttcca cagccagatcaacgtgcccaagaccatggagagcggcaccctcaccgacaa gaccgtgctggacatgaaggccatggacagcaagagcaacggcgcctcgcct ggtccaaccagaccagcttccatgccaggacatctcaaggagaccaacgcca cctaccccagcagcagctgacctgcgacgccaccctgaccgagaagagcttc gagaccgacatgaacctgaactccagaacctgagcgtgatggcctgagaatc ctgtgctgaaggtggccggcttcaacctgctgatgacctgaggctgtggggccg ccagggcaaacggtcgggtcgggtgcgccagtaagcagacattaactttga tttgcgtaaaactgacaggtgatgtagagcaaatccaggtccaatggcaacaggga gccgaacctctctccttgccttccggctccttgcctaccgtgctgcaggagg gctcggcaggtgtcactcagacccccaaaattccaggtcctgaagacaggacaga gcatgacactgcagtggtgccaggatgaacctgaatacatgtctggtatcga caagaccagcatggggctgaggctgattcattactcagttggtgctggtatcac tgaccaaggagaagtccccaatggctacaatgtctccagatcaaccacagaggat tccccgtcaggtgctgctggctgctcctcccagacatctgttacttctgtgcca</p>	1G4-dMUT-TCR 全长核苷酸序列

SEQ ID NO	序列	序列描述
	gcagttacgtcgggaacaccggggagctgtttttggagaaggctctaggctgac cgtactggaggacctgaggaacgtgaccccccaaggtgtccctgttcgagcc cagcaaggccgagatcgccaacaagcagaaggccaccctggtgtgcctggcca ggggcttctccccgaccacgtggagctgtcttgggtggaacggcaaggaggt gcacagcggcgtgagcaccgacccccaggcctacaaggagagcaactacagc tactgctgagcagcaggctgagagtgagcggcaccttctggcacaaccccagg aaccactccgctgtcaggtgcagttccacggcctgagcaggaggacaagtgg cccgagggcagcccaagcccgtgaccagaacatcagcggcaggcctggg gcagagccgactgcggcatcaccagcggcagctaccaccaggcgtgctgtcc gccaccatcctgtacgagatcctgtgggcaagggcacactgtaccgtgctgg gtccggcctggtgctgatggccatggtgaggaagaggaacagctaa	
47	MAMVKRKDSRG	第一种野生型 (WT) 人源 TCR β 链胞内恒定区氨基酸序列
48	MAMVKRKDF	第二种野生型 (WT) 人源 TCR β 链胞内恒定区氨基酸序列

实施例 1. TCR 表达载体构建

分别构建 F5-TCR、1G4-TCR，其中 F5-TCR 包括 F5-WT TCR、F5-SA TCR、F5-KR TCR 和 F5-dMUT TCR，其中 1G4-TCR 包括 1G4-WT TCR、1G4-SA TCR、
5 1G4-KR TCR 和 1G4-dMUT TCR。

依照前文所述，各 F5-TCR 或 1G4-TCR 分别包括 TCR α 链与 TCR β 链，其中 TCR α 链分别由人生长激素信号肽、TCR α 链可变区、TCR α 链胞外恒定区、TCR α 链跨膜区、TCR α 链胞内区依次连接构成；TCR β 链分别由人生长激素信号肽、TCR β 链可变区、TCR β 链胞外恒定区、TCR β 链跨膜区、TCR β 链胞内区
10 依次连接构成。TCR α 链与 TCR β 链通过 F2A 肽串联起来。以上各 TCR α 链与 TCR β 链氨基酸或核苷酸序列如本申请前述实施方式所记载。

以上氨基酸序列以及 TCR α 链胞内恒定区丝氨酸突变为丙氨酸、TCR β 链恒定区赖氨酸突变为精氨酸的氨基酸序列均经过密码子优化后转换为碱基序列，并由公司合成 (GenScript)。

15 所述 F5-WT TCR、F5-SA TCR、F5-KR TCR 和 F5-dMUT TCR，以及 1G4-WT TCR、1G4-SA TCR、1G4-KR TCR 和 1G4-dMUT TCR 的全长核苷酸序列分别如

SEQ ID NO:39-46 所记载。

本申请中所有 TCR 的碱基序列最终通过酶切, T4 连接酶连接的方式克隆至 pMSGV-LNGFR-P2A 载体中。

实施例 2. 逆转录病毒包装制备方法

5 将从实施例 1 中所构建的 TCR 表达载体 (pMSGV-TCR), 同包膜质粒 pHIT60/RD114 共转染到 HEK293T 细胞中, 包装逆转录病毒。具体的, 包装比例体系为 MSGV-TCR: pHIT60: RD114=2: 2: 1.3, OPTI-DMEM 培养基中混匀, 加入 15.9 μ l 的 TransIT293-Mirus 转染试剂 (Mirusbio #MIR 2700), 吹打混匀后, 室温下静置 25 分钟之后, 将上述混合脂质体液体加入 HEK293T 细胞培
10 养皿中, 放入 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 48h。然后收取病毒液, 经过 0.22 μ m 滤膜过滤, 放置于 -80 $^{\circ}$ C 冰箱备用。

实施例 3. 人原代突变 TCR-T 细胞的制备及培养方法

人原代 T 细胞培养: 人原代 T 细胞购买于商业化公司 (ALLCELLS)。培养原代 T 细胞的完全培养基包含 5% 的人血清 (Gemini #100-512), 含有双抗
15 (Gibco #15140-122) 的 RPMI-1640 培养基 (Hyclone #SH30809.01) 及 1xGlutMAX (Gibco #35050-061), 同时培养基中要加入 100U/ml 的 rhIL-2 (PeproTech #200-02)。用 1ml 上述完全培养基重悬人原代 T 细胞于经 1 μ g/ml hCD3 (Biolegend #317347) 和 1 μ g/ml hCD28 抗体 (Biolegend #102121) 所包被的 24 孔板 (Nest #702001) 中, 置于 37 $^{\circ}$ C 培养箱培养 48 小时后进行病毒感染实
20 验。

逆转录病毒感染人原代 T 细胞: 重悬 24 孔板中的人原代 T 细胞, 吸取 750 μ l 与 EP 管中 (Axygen #MCT-105C), 2500rpm 离心 5 分钟, 弃掉上清, 使用 500 μ l 相对应的病毒液 (即突变 TCR 逆转录病毒) 重悬 T 细胞, 并加入 0.75 μ l 的

Polybrene (SANTA CRUZ #SC-134220), 吹打均匀后加入相对应的 24 孔板中, 此时感染体系为 750 μ l。30°C, 2500rpm 离心 90 分钟后, 从 24 孔板中吸取 500 μ l 上清与 EP 管中, 2500rpm 离心 5 分钟, 弃掉上清, 加入 750 μ l 的 T 细胞完全培养基 (1.25 倍的 rhIL-2) 于 24 孔板中, 放置 37°C 培养箱培养 24 小时。转天进行第二次病毒感染操作, 具体步骤与前述操作相同, 完成感染后的人原代 T 细胞每个 1-2 天补充新鲜的 RPMI-1640 完全培养基。

实施例 4. 细胞流式技术分析方法

流式细胞分析技术使用 BD LSR Fortessa 仪器 (BD Bioscience) 进行检测。

对于细胞表面分子的检测: 吸取 2×10^5 个细胞置于 96 孔 U 底板中, 1800rpm 离心 5 分钟后, 弃掉上清, 加入 FACS 缓冲液 (含 2% 血清的 1xPBS) 配制的流式抗体, 冰上避光染色 25 分钟, FACS 缓冲液洗一次, 流式上机检测。

对于细胞因子的染色: 吸取 2×10^5 个细胞置于 96 孔 U 底板中, 1800rpm 离心 5 分钟后, 弃掉上清, 加入 FACS 缓冲液 (含 2% 血清的 1xPBS) 配制的流式抗体, 冰上避光染色 25 分钟, FACS 缓冲液洗一次, 使用多聚甲醛固定液 (Biolegend #420801) 固定细胞 20 分钟, FACS 缓冲液洗一次, 加入使用破膜液 (Invitrogen #00-8333-56) 配制的细胞因子流式抗体, 冰上避光染色 25 分钟, FACS 缓冲液洗一次, 流式上机检测。

对于转录因子的染色: 吸取 2×10^5 个细胞置于 96 孔 U 底板中, 1800rpm 离心 5 分钟后, 弃掉上清, 加入 FACS 缓冲液 (含 2% 血清的 1xPBS) 配制的流式抗体, 冰上避光染色 25 分钟, FACS 缓冲液洗一次, 使用 FOXP3 转录因子固定液 (Invitrogen #00-5523-00) 固定细胞 20 分钟, FACS 缓冲液洗一次, 加入使用破膜液配制的细胞因子流式抗体, 冰上避光染色 25 分钟, FACS 缓冲液洗一次, 流式上机检测。流式数据使用 FlowJo software 软件(Tree Star)进行数据分析。

实施例 5. 抗原刺激引起的 TCR 降解

体内肿瘤抗原刺激引起 TCR 表达下调实验：K562-NYESO-1 接种的荷瘤小鼠，1G4-TCR-T 细胞过继第十二天后，检测脾脏及肿瘤中 TCR-T 细胞表面 TCR 的表达情况。如图 1(A) 所示肿瘤组织中肿瘤抗原刺激引起了 TCR 表达的下调。

5 体外靶细胞抗原刺激引起 TCR 下调和降解实验：1G4-TCR-T 细胞与 K562-NYESO-1 靶细胞或 K562-MART-1 非靶细胞按 1:1 比例混合 24 孔板中，37°C 培养箱共孵育 12 小时（应理解的，具体时间由不同实验决定），吸取细胞进行流式 FACS 检测，检测 TCR 下调通过染色 T 细胞表面 TCR 来测定，而分析 TCR 降解水平则通过细胞固定破膜之后染色胞内 TCR 进行检测，结果如图 1

10 (B) 所示靶细胞抗原刺激促进了 TCR 的下调和降解；hCD3 抗体刺激引起 TCR 下调和降解实验：活化之后的 1G4-TCR-T 细胞和 F5-TCR-T 细胞重悬后，加入由 hCD3 抗体包被过的 24 孔板中，37°C 培养箱共孵育 12 小时（应理解的，具体时间由不同实验决定），吸取细胞进行流式 FACS 检测，检测 TCR 下调通过染色 T 细胞表面 TCR 来测定，而分析 TCR 降解水平则通过细胞固定破膜之后染色胞内 TCR 进行检测，如图 1 (C、D) 所示体外 CD3 抗体刺激促进了 TCR 在人源 T 细胞中的下调和降解。不同突变 TCR 的表达对比实验：活化之后的不同突变 1G4-TCR-T 细胞重悬后，FACS 染色检测不同 TCR 的表达，如图 2 (B)

15 所示不同突变 TCR 相较于野生型 TCR 其表达无明显差别。hCD3 抗体刺激引起不同突变 TCR 下调和降解的对比实验：活化之后的 1G4-TCR-T 细胞和 F5-TCR-T 细胞重悬后，加入由 hCD3 抗体包被过的 24 孔板中，37°C 培养箱共孵育实验所需时间，检测 TCR 下调通过染色 T 细胞表面 TCR 来测定，而分析 TCR 降解水平则通过细胞固定破膜之后染色胞内 TCR 进行检测，结果如图 2 (C、D) 所示相比于 WT TCR，突变组 SA TCR，KR TCR 和 dMUT TCR 展现出更多 T 细胞

膜驻留，并且能够显著抵抗由抗体刺激引起的下调和降解，而这一现象在 dMUT TCR 组显得尤其明显。而图 (E) 所示，由 hCD3 抗体刺激不同时间点检测表面 TCR 表达的实验显示，相比于其他组，dMUT TCR 具有最强的抵抗降解的能力。

实施例 6. T 细胞体外功能检测及耗竭模型构建

5 T 细胞体外功能检测：体外活化的人原代 T 细胞经不同突变 1G4-TCR 逆转录病毒感染后，T 细胞在 RPMI-1640 完全培养基中培养 12 天，吸取 2×10^5 个细胞至 96 孔板中，进行流式 FACS 检测，检测指标为 T 细胞记忆性分子的表达如：CD62L、TCF1、CD27 和 CD45RO，结果如图 3 (A-C) 所示，相比于 WT TCR 组，SA TCR、KR TCR 和 dMUT TCR-T 细胞中 $CD27^+CD45RO^+$ (中央记忆 T 细胞) 比例显著增加，突变组更倾向于分化为记忆性 T 细胞，同时，T 细胞记忆性分子 CD62L 和 TCF1 的表达升高，尤其 dMUT TCR-T 细胞最为明显。

10

T 细胞体外耗竭模型构建：体外活化的人原代 T 细胞经不同突变 1G4-TCR 逆转录病毒感染 48 小时后，取出 T 细胞，2500rpm 离心 5 分钟，用完全培养基重悬 TCR-T 细胞于 $2 \mu\text{g/ml}$ hCD3 抗体预先包被过的 24 孔板中(每孔 10^6 个细胞)，

15 再次刺激 TCR-T 细胞 48 小时，之后重复上述步骤 2 次，结束培养，收取 TCR-T 细胞进行流式检测。此体外耗竭模型构建参考了本领域内公认的相关文章 (Santosh A. Vardhana et al., *Nat Immunol.* 2020 Sep;21(9):1022-1033.)，检测指标为耗竭相关分子 PD-1、TIM3、LAG-3、TOX 等和细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 以及 $\text{IFN-}\gamma$ ，结果如图 3 (D-F) 所示，耗竭相关分子 LAG-3 和 TOX 的表达在 KR TCR-T 细胞和 dMUT TCR-T 细胞中明显减少，同时有更多 dMUT TCR-T 细胞产生细胞因子 $\text{TNF-}\alpha$ 和 $\text{IFN-}\gamma$ ，总体说明 KR TCR-T 细胞和 dMUT TCR-T 细胞能更好的抵抗 T 细胞耗竭的发生。

20

实施例 7. T 细胞线粒体功能检测及代谢分析

线粒体指标检测：体外活化的人原代 T 细胞经不同突变 1G4-TCR 逆转录病毒感染后，T 细胞在 RPMI-1640 完全培养基中培养 12 天，吸取 2×10^5 个细胞至 EP 管中，加入 MitoTracker Green (Invitrogen #M7514) 染色，终浓度为 50nM，37°C 避光染色 1 小时后进行流式 FACS 检测，结果如图 4 (A) 所示，相比于 WT TCR 细胞，不同突变 TCR-T 细胞中，线粒体数量无明显变化。对于线粒体膜电势的检测方法为吸取 2×10^5 个细胞至 EP 管中，加入 TMRE (Invitrogen #T669) 染色，终浓度为 200 nM，37°C 避光染色 1 小时后进行流式 FACS 检测，结果如图 4 (B) 所示，相比于 WT TCR 细胞，SA TCR，KR TCR 和 dMUT TCR-T 细胞中线粒体膜电势明显降低，而 dMUT TCR-T 细胞尤为明显。对于线粒体活性氧的检测方法为吸取 2×10^5 个细胞至 EP 管中，加入 MitoSOX (Invitrogen #M36008) 染色，终浓度为 $5 \mu\text{M}$ ，37°C 避光染色 1 小时后进行流式 FACS 检测，如图 4 (C) 所示，相比于 WT TCR 细胞，SA TCR，KR TCR 和突变 TCR-T 细胞中线粒体 ROS 的产生明显减少。总结上述实施例结果说明，不同的 TCR 突变并不影响 T 细胞内的线粒体数量，但突变 TCR 细胞尤其 dMUT TCR-T 细胞中线粒体展现出更加健康的状态，这与 dMUT TCR-T 细胞体外培养过程中表现出记忆性表型并抵抗 T 细胞耗竭有关。

代谢相关指标检测：感染突变 1G4-TCR 逆转录病毒的人原代 T 细胞，体外 37°C 培养箱 RPMI-1640 完全培养基中培养 12 天，吸取 2×10^5 个细胞于 EP 管中，2500rpm 离心 5 分钟，弃掉上清，然后使用无糖无血清培养基重悬 T 细胞于 24 孔板中，终浓度 $50 \mu\text{M}$ 的 2-NBDG (Invitrogen #N13195) 或 $1 \mu\text{M}$ 的 Bodipy FL C16 (Invitrogen #D3821) 处理细胞，37°C 避光染色 30 分钟后进行流式 FACS 检测，流式上机之前可根据实验需求标记其他标记性分子，如图 4 (D、E) 结果显示，相比于 WT TCR 细胞，SA TCR，KR TCR 和 dMUT TCR-T 细胞对葡萄糖的摄入

量明显降低，而对于胞外脂肪酸的摄入则无明显变化。

实施例 8. 突变 TCR-T 细胞的抗肿瘤功能检测

突变 TCR-T 细胞的抗肿瘤实验在 4-8 周龄的免疫缺陷 NSG 小鼠体内进行。为比较突变 TCR-T 细胞相较于野生型 TCR-T 细胞具有更好的抗肿瘤效果，首先在 NSG 小鼠右侧后肢腋窝处皮下接种 8×10^5 个 K562-NYESO-1 细胞，待靶细胞在小鼠皮下生长 8-12 天左右，使用游标卡尺检测肿瘤体积，具体的，肿瘤体积在 80mm^3 - 120mm^3 时，NSG 小鼠尾静脉注射 5×10^6 个感染了不同突变 1G4-TCR 的人原代 T 细胞，接下来每隔 2 天对肿瘤体积进行测量，大约 14 天左右时（具体操作时间由实验现象决定），收取 NSG 小鼠的血液、脾脏和肿瘤组织，首先对肿瘤组织重量进行称量，然后使用红细胞裂解液（Biolegend #420301）分别对小鼠血液和脾脏进行裂解红细胞处理，小鼠肿瘤组织经研磨后进行 Percoll 密度梯度离心（Cytiva #17089110），收取由小鼠血液、脾脏和肿瘤组织中所分离尾静脉过继的人原代 T 细胞，经流式染色后进行分析。

具体结果如图 5 和图 6 所示，首先，图 5 (A) 通过对肿瘤生长体积的统计发现，相比较于 WT TCR 组，过继 KR TCR-T 细胞和 dMUT TCR-T 细胞的实验组，其中肿瘤生长速度明显减缓。对肿瘤组织进行称重后发现，过继 KR TCR-T 细胞和 dMUT TCR-T 细胞的实验组，肿瘤重量明显降低，如图 5 (B) 所示。另外，本实施例中统计了荷瘤 NSG 小鼠脾脏、血液和肿瘤组织中过继的 CD8^+ TCR-T 细胞的比例，结果如图 5 (C-E) 所示，在小鼠脾脏和血液中，相比于 WT TCR-T 细胞，dMUT TCR-T 细胞的比例明显升高。而在小鼠肿瘤组织中，相比于 WT TCR-T 细胞，KR TCR-T 细胞和 dMUT TCR-T 细胞的比例明显升高。这说明 KR TCR-T 细胞和 dMUT TCR-T 细胞在 NSG 小鼠免疫过继模型中具有更强的抗肿瘤持久性。进一步通过细胞表型分析发现，相比于野生型 TCR-T 细胞，

脾脏中 SA TCR、KR TCR 和 dMUT TCR-T 细胞的 CD27⁺CD45RO⁺（中央记忆 T 细胞）比例明显增加，如图 6（A）所示。同时通过对肿瘤组织中 TCR-T 细胞分析，发现相比于 WT TCR -T 细胞，dMUT TCR-T 细胞表达更高的 T 细胞干性分子 CD62L 和 CCR7，如图 6(B、C)所示。图 6(D)显示肿瘤组织之中，PD-1⁺TIM-3⁺ 5 双阳性的细胞比例在 SA TCR、KR TCR 和 dMUT TCR 组要明显少于 WT TCR 组，进一步，通过检测抑制性分子 PD-1、TIM-3、LAG-3 和 CD39 的荧光强度，发现与 WT TCR -T 细胞相比，突变组 TCR-T 细胞中抑制性分子的表达明显降低，如图 6(E-H)所示。另外发现，耗竭关键转录因子 TOX 的表达在 dMUT TCR-T 细胞中明显减少如图 6（I）。综上说明在体内抗肿瘤模型中，突变组 TCR-T 细
10 胞能够抵抗 T 细胞耗竭的发生。同时检测了肿瘤组织中 TCR-T 细胞细胞因子的产生情况，如图 6（J、K）所示，过继 KR TCR-T 细胞组和 dMUT TCR-T 细胞组，IFN- γ ⁺CD8⁺细胞比例明显增多，显示出 KR TCR 和 dMUT TCR-T 细胞有更强的抗肿瘤效果，同时发现 CD8⁺KR TCR-T 细胞和 CD8⁺dMUT TCR-T 细胞中 TNF- α ⁺ IFN- γ ⁺双阳性细胞比例明显增加，表明 KR TCR-T 细胞比 WT TCR 细胞
15 产生更多的细胞因子，但少于 dMUT TCR-T 细胞，这说明 dMUT TCR-T 细胞在肿瘤组织中有更强的效应功能。

T 细胞过继性免疫治疗中无论采集病人体内有限的 T 细胞去大量扩增 TCR-T 细胞，还是过继之后在肿瘤病人体内所面临的 T 细胞功能持久性降低及 T 细胞耗竭的发生都是目前 TCR-T 细胞治疗所面临的困难。而本申请所提供的
20 的突变 TCR-T 细胞改造方法尤其是 dMUT TCR-T 改造，使得 TCR-T 细胞在经过体外扩增并回输到肿瘤模型中之后，展现出更加持久性抗肿瘤功效，并能抵抗 T 细胞耗竭的发生。这提示我们利用 dMUT TCR 突变改造的 TCR-T 细胞有望在临床生产及治疗上实现持续高效的抗肿瘤功能。

权利要求书

1. 一种分离的 T 细胞受体或其片段，所述 T 细胞受体包括 TCR α 链和 TCR β 链，其特征在于，所述 TCR β 链包括 TCR β 链可变区和 TCR β 链恒定区，所述 TCR β 链恒定区包括依次连接的 TCR β 链胞外恒定区、TCR β 链跨膜区和 TCR β 链胞内恒定区，所述 TCR β 链胞内恒定区选自：

(1) 突变的 TCR β 链胞内恒定区，所述突变的 TCR β 链胞内恒定区为野生型 TCR β 链胞内恒定区中至少一个的赖氨酸突变为精氨酸或丙氨酸；或

(2) 包含 SEQ ID NO:10 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的突变的 TCR β 链胞内恒定区。

2. 如权利要求 1 所述的分离的 T 细胞受体，其特征在于，所述野生型 TCR β 链胞内恒定区选自：

(1) 来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型 TCR β 链胞内恒定区；或

(2) 包含 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:47 或 SEQ ID NO:48 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的野生型 TCR β 链胞内恒定区。

3. 如权利要求 1-2 任一项所述的分离的 T 细胞受体，其特征在于，所述 TCR α 链包括 TCR α 链恒定区，所述 TCR α 链恒定区包括依次连接的 TCR α 链胞外恒定区、TCR α 链跨膜区和 TCR α 链胞内恒定区，所述 TCR α 链胞内恒定区选自：

(1) 来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型 TCR α 链胞内恒定区；

(2) 包含 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的野生型 TCR α 链胞内恒定区；

(3) 突变的 TCR α 链胞内恒定区，所述突变的 TCR α 链胞内恒定区为 (1)

或 (2) 所述的野生型 TCR α 链胞内恒定区中至少一个的丝氨酸突变为丙氨酸；
或

(4) 包含 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的突变的 TCR α 链胞内恒定区；

5 可选的，所述 TCR α 链进一步包括 TCR α 链可变区。

4. 一种分离的 T 细胞受体或其片段，所述 T 细胞受体包括 TCR α 链和 TCR β 链，其特征在于，所述 TCR α 链包括 TCR α 链可变区和 TCR α 链恒定区，所述 TCR α 链恒定区包括依次连接的 TCR α 链胞外恒定区、TCR α 链跨膜区和 TCR α 链胞内恒定区，所述 TCR α 链胞内恒定区选自：

10 (1) 突变的 TCR α 链胞内恒定区，所述突变的 TCR α 链胞内恒定区为野生型 TCR α 链胞内恒定区中至少一个丝氨酸突变为丙氨酸；或

(2) 包含 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的突变的 TCR α 链胞内恒定区。

5. 如权利要求 4 所述的分离的 T 细胞受体，其特征在于，所述野生型 TCR α 链胞内恒定区选自：

(1) 来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型 TCR α 链胞内恒定区；
或

(2) 包含 SEQ ID NO:3 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的野生型 TCR α 链胞内恒定区。

20 6. 如权利要求 4-5 任一项所述的分离的 T 细胞受体，其特征在于，所述 TCR β 链包括 TCR β 链恒定区，所述 TCR β 链恒定区包括依次连接的 TCR β 链胞外恒定区、TCR β 链跨膜区和 TCR β 链胞内恒定区，所述 TCR β 链胞内恒定区选自：

(1) 来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的野生型 TCR β 链胞内恒定区；

(2) 包含 SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:47 或 SEQ ID NO:48 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的野生型 TCR β 链胞内恒定区；

(3) 突变的 TCR β 链胞内恒定区，所述突变的 TCR β 链胞内恒定区为 (1) 或 (2) 所述的野生型 TCR β 链胞内恒定区中至少一个的赖氨酸突变为精氨酸或丙氨酸形成；或

(4) 包含 SEQ ID NO:10 所示氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成的突变的 TCR β 链胞内恒定区；

可选的，所述 TCR β 链进一步包括 TCR β 链可变区。

7. 前述权利要求任一项所述的分离的 T 细胞受体，其特征在于，所述分离的 T 细胞受体识别多肽类抗原、脂类抗原或多糖类抗原。

8. 前述权利要求任一项所述的分离的 T 细胞受体，其特征在于，所述分离的 T 细胞受体识别肿瘤抗原、微生物抗原或自身抗原。

9. 如权利要求 8 所述的分离的 T 细胞受体，其特征在于，所述分离的 T 细胞受体识别 BCMA、CA9、CTAG、CCL-1、CSPG4、EGFR、EPG-2、EPG-40、FCRL5、FBP、OGD2、GPC3、GPRC5D、HER3、HER4、HLA-A1、HLA-A2、LRRC8A、CMV、MUC1、MUC16、MART-1、NCAM、PRAME、PSCA、PSMA、ROR1、TPBG、TAG72、TRP1、TRP2、VEGFR、VEGFR2、WT-1、MAGE-A1/A3/A4/A6/A10/C2、gp100、CEA、NYESO-1、AFP、MART-1、HERV-E、HER2、LMP1/2、BRLF-1、BMLF-1、HPV-16E6/E7、KRAS G12D、KRAS G12V、TP53 R175H、 β -GlcCer、eLPA、LPE、CA199、CA72-4 或 CA125 中的一种或多种抗原；优选为 MAGE-A1/A3/A4/A6/A10/C2、gp100、CEA、NYESO-1、AFP、MART-1、HERV-E、HER2、LMP1/2、BRLF-1、BMLF-1、HPV-16E6/E7、KRAS

G12D、KRAS G12V、TP53 R175H、 β -GlcCer、eLPA、LPE、CA199、CA72-4 或 CA125 中的一种或多种抗原。

10. 前述权利要求任一项所述的分离的 T 细胞受体，其特征在于，所述 TCR β 链可变区选自：

5 (1) TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:17 所示氨基酸序列所含的三个互补决定区 CDR；

(2) TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列所含的三个互补决定区 CDR；

10 (3) TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:18 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列的 CDR2 和/或 SEQ ID NO:20 所示氨基酸序列的 CDR3；

(4) TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列的 CDR2 和/或 SEQ ID NO:28 所示氨基酸序列的 CDR3；

(5) TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:17 所示氨基酸序列或由其组成；或

(6) TCR β 链可变区包含 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列或由其组成。

15 11. 前述权利要求任一项所述的分离的 T 细胞受体，其特征在于，所述 TCR α 链可变区选自：

(1) TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:13 所示氨基酸序列所含的三个互补决定区 CDR；

20 (2) TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:21 所示氨基酸序列所含的三个互补决定区 CDR；

(3) TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:14 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID NO:15 所示氨基酸序列的 CDR2 和/或 SEQ ID NO:16 所示氨基酸序列的 CDR3；

(4) TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:22 所示氨基酸序列的 CDR1、SEQ ID

NO:23 所示氨基酸序列的 CDR2 和/或 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列的 CDR3;

(5) TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:13 所示氨基酸序列或由其组成; 或

(6) TCR α 链可变区包含 SEQ ID NO:21 所示氨基酸序列或由其组成。

12. 前述权利要求任一项所述的分离的 T 细胞受体, 还包括以下特征中的
5 一项或多项:

(1) 所述 TCR α 链胞外恒定区来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的
TCR α 链胞外恒定区;

(2) 所述 TCR α 链胞外恒定区包含 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列, 或包含与
SEQ ID NO:1 的氨基酸序列相比具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个突变
10 的氨基酸序列, 或包含与 SEQ ID NO:1 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、
93%、94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的氨基酸序列, 或由所述氨基酸序
列组成;

(3) 所述 TCR α 链跨膜区来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的 TCR α
链跨膜区;

15 (4) 所述 TCR α 链跨膜区包含 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列, 或包含与 SEQ
ID NO:2 的氨基酸序列相比具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个突变的氨
基酸序列, 或包含与 SEQ ID NO:2 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、
94%、95%、96%、97%、98% 或 99% 的氨基酸序列, 或由所述氨基酸序列组成;

(5) 所述 TCR β 链胞外恒定区来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的
20 TCR β 链胞外恒定区;

(6) 所述 TCR β 链胞外恒定区包含 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列, 或包含与
SEQ ID NO:7 的氨基酸序列相比具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个突变
的氨基酸序列, 或包含与 SEQ ID NO:7 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、

93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成；

(7) 所述 TCR β 链跨膜区来源于人源、鼠源或其他哺乳动物种属的 TCR β 链跨膜区；

5 (8) 所述 TCR β 链跨膜区包含 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列相比具有 1、2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 个突变的氨基酸序列，或包含与 SEQ ID NO:8 的氨基酸序列具有至少 90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%的氨基酸序列，或由所述氨基酸序列组成。

10 13. 前述权利要求任一项所述的分离的 T 细胞受体，其特征在于，所述 TCR α 链恒定区和 TCR β 链恒定区选自：

(1) 所述 TCR α 链恒定区包含 SEQ ID NO:5 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，所述 TCR β 链恒定区包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；

15 (2) 所述 TCR α 链恒定区包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，所述 TCR β 链恒定区包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成；或

(3) 所述 TCR α 链恒定区包含 SEQ ID NO:6 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成，所述 TCR β 链恒定区包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列或由所述氨基酸序列组成。

20 14. 前述权利要求中任一项分离的 T 细胞受体，进一步包括信号肽，所述信号肽与 TCR α 链可变区和/或 TCR β 链可变区形成信号肽-可变区结构。

15. 如权利要求 14 所述的分离的 T 细胞受体，其特征在于，所述信号肽为人生长激素信号肽、CD8 α 信号肽或免疫球蛋白信号肽。

16. 分离的核酸或其片段，其编码前述权利要求中任意一项分离的 T 细胞受体或其片段。

17. 核酸构建物，其包含权利要求 16 所述分离的核酸或其片段。

18. 载体，其包含权利要求 17 所述核酸构建物。

5 19. 如权利要求 18 所述载体，其为表达载体或 *crisper* 基因编辑载体，优选为逆转录病毒载体。

20. 工程化细胞，其包含权利要求 17 所述的核酸构建物，或权利要求 18-19 任一项所述的载体。

21. 权利要求 20 所述工程化细胞为 T 细胞，例如人 T 细胞。

10 22. 生产工程化细胞的方法，其包括：

(1) 用权利要求 17 所述的核酸构建物或权利要求 18-19 任一项所述的载体转化或转导宿主细胞；

(2) 在合适的培养基中培养宿主细胞；

(3) 从培养基或细胞中分离、纯化出工程化细胞。

15 23. 前述任一项权利要求所述分离的 T 细胞受体或其片段、核酸或其片段、核酸构建物、载体或工程化细胞在下述任意一种或多种用途中的应用：

(1) 在抗原刺激过程中的抑制 T 细胞受体降解中的应用；

(2) 提供对肿瘤的杀伤效果，或抑制肿瘤生长；

(3) 维持 T 细胞的增殖能力；

20 (4) 抗肿瘤的免疫药物及细胞的制备。

24. 一种 T 细胞受体的改造方法，包括：

(1) 将野生型 TCR β 链胞内恒定区中至少一个的赖氨酸突变为精氨酸或丙氨酸；和/或

(2) 将野生型 TCR α 链胞内恒定区中至少一个的丝氨酸突变为丙氨酸。

25. 如权利要求 24 所述的 T 细胞受体的改造方法，其特征在于：

(1) 所述野生型 TCR β 链胞内恒定区选自权利要求 2 所述的野生型 TCR β 链胞内恒定区；和/或

5 (2) 所述野生型 TCR α 链胞内恒定区选自权利要求 5 所述的野生型 TCR α 链胞内恒定区。

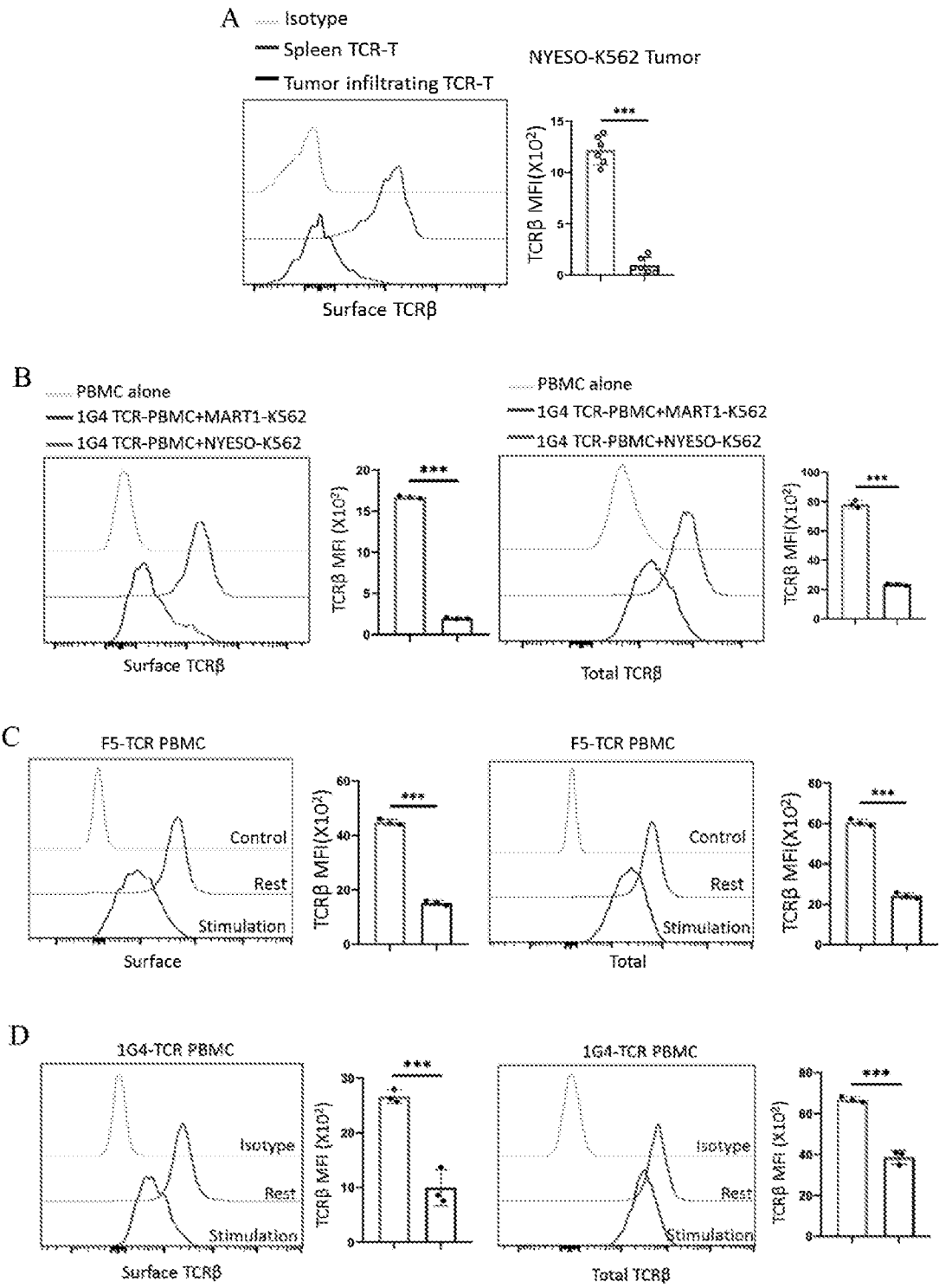


图 1

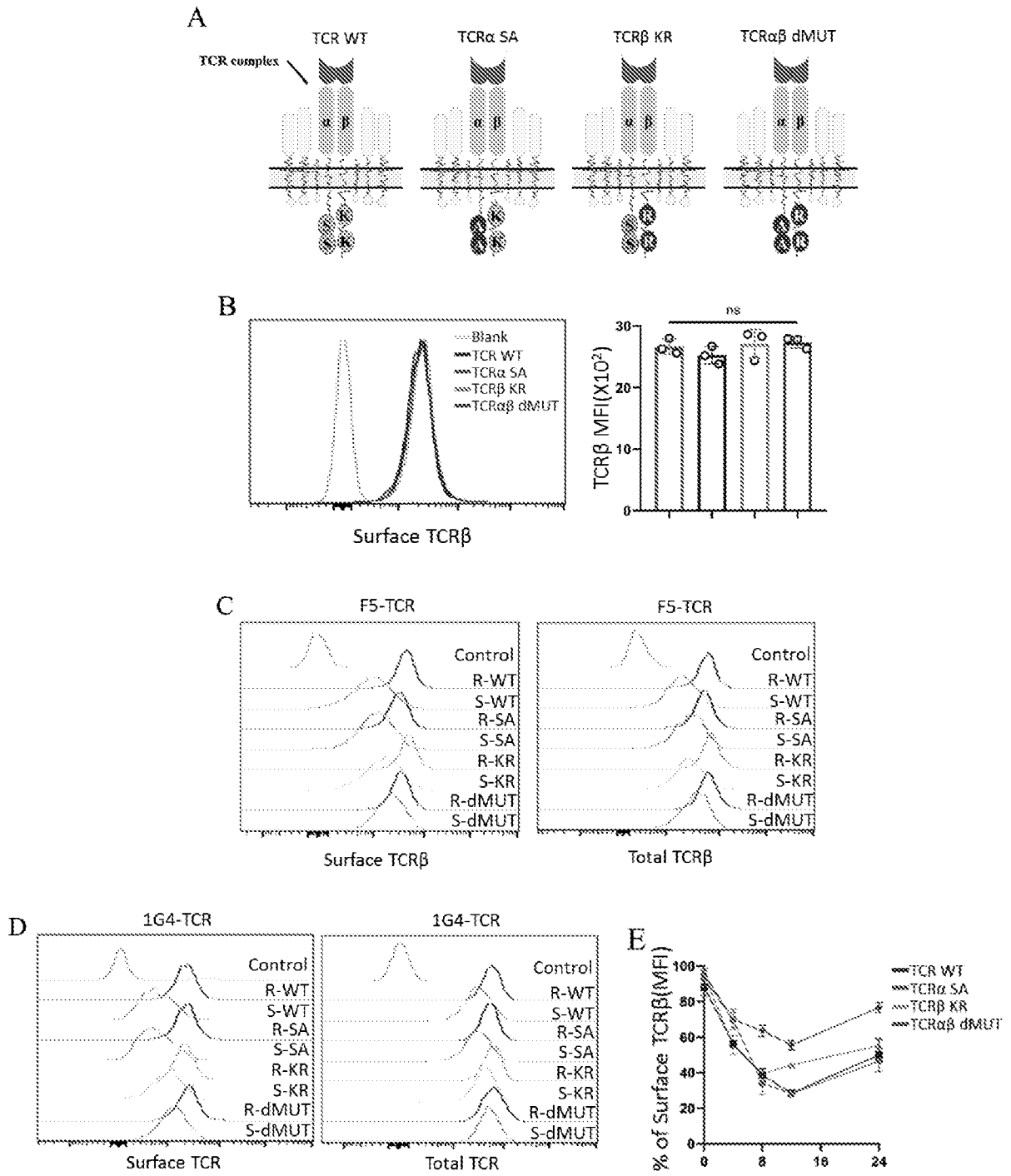
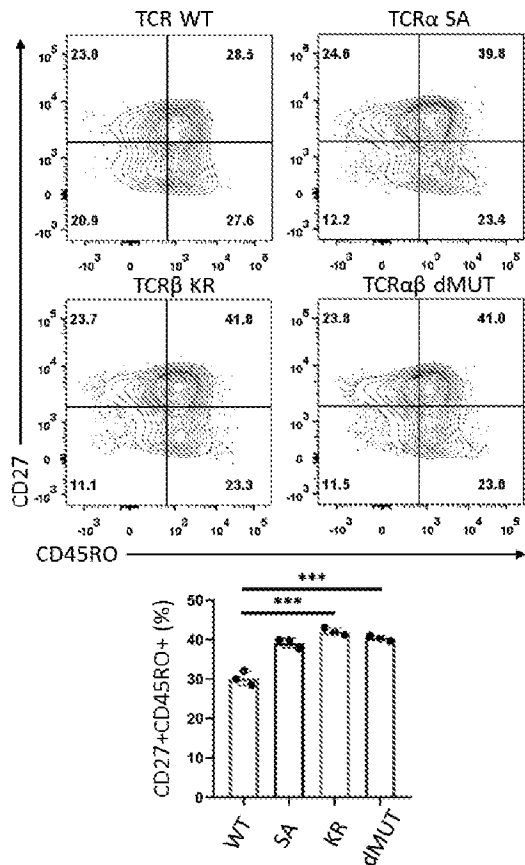
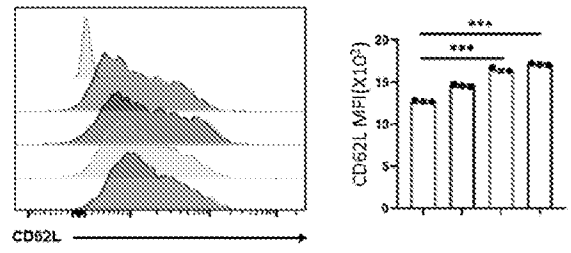


图 2

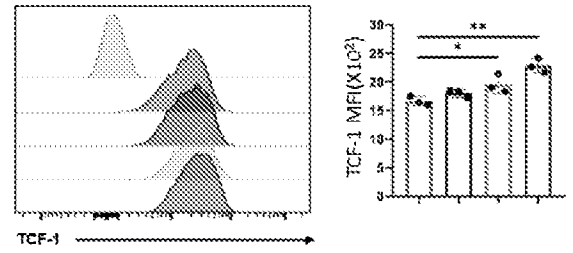
A:



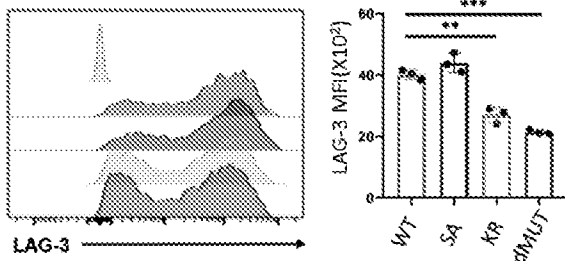
B:



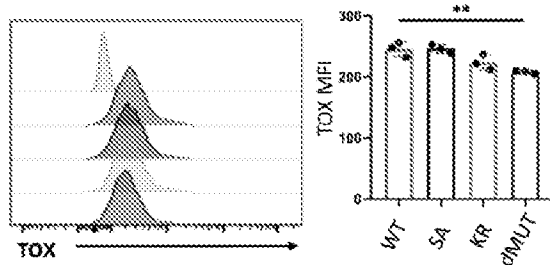
C:



D:



E:



F:

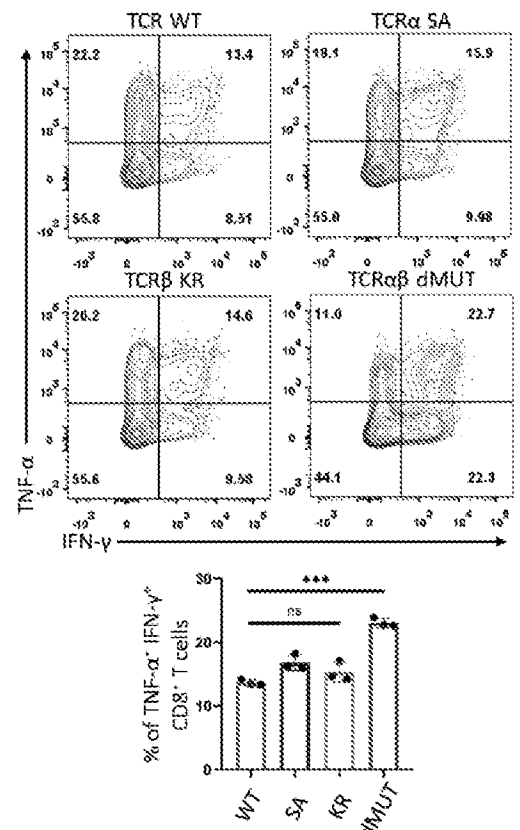
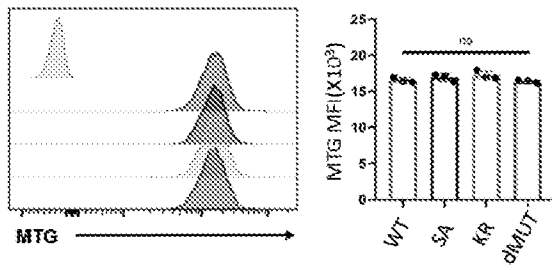
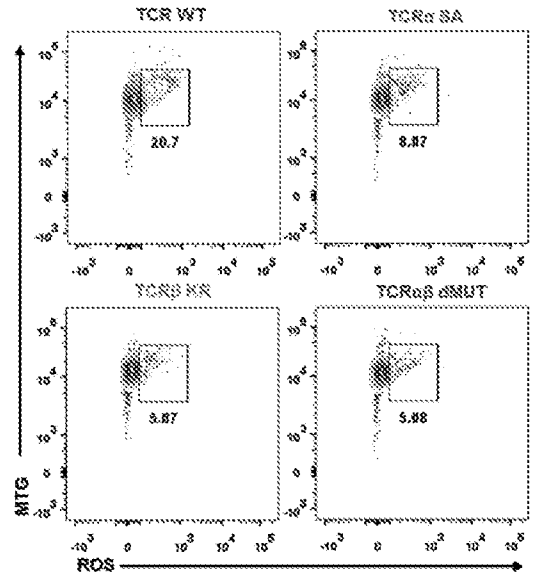


图 3

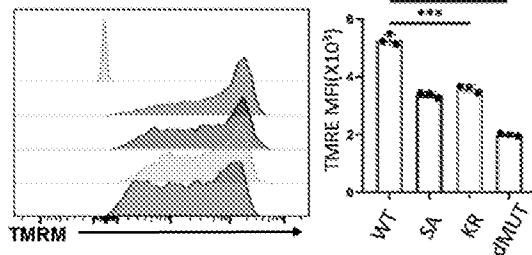
A:



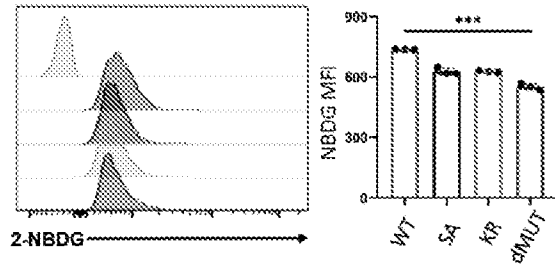
C:



B:



D:



E:

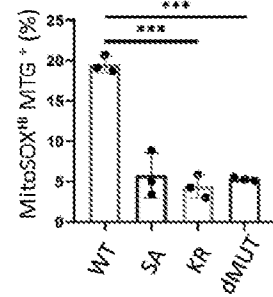
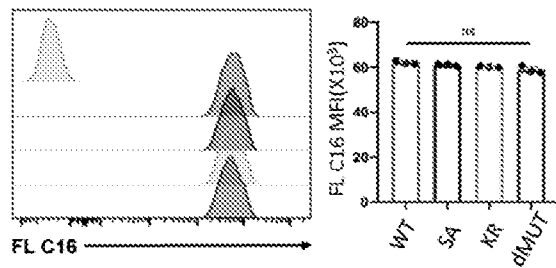
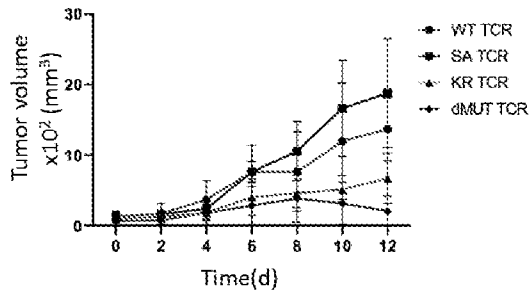
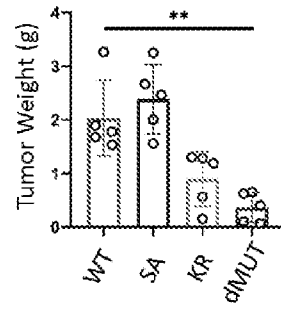


图 4

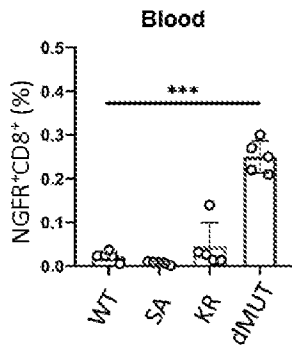
A:



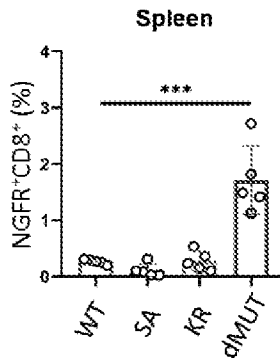
B:



C:



D:



E:

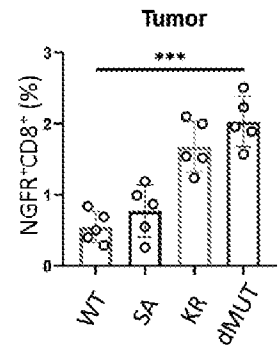
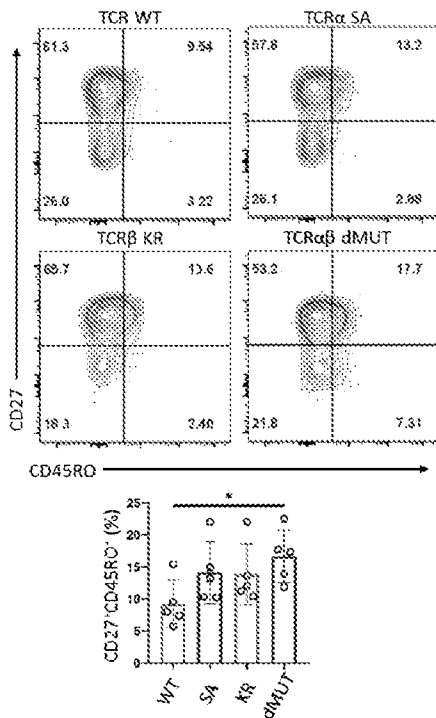
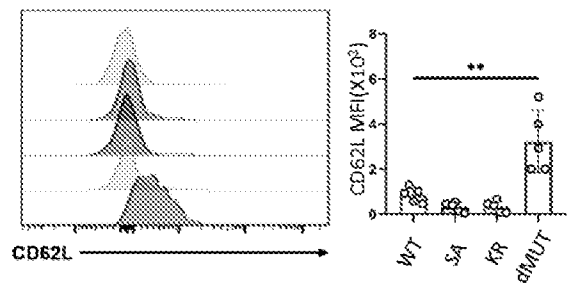


图 5

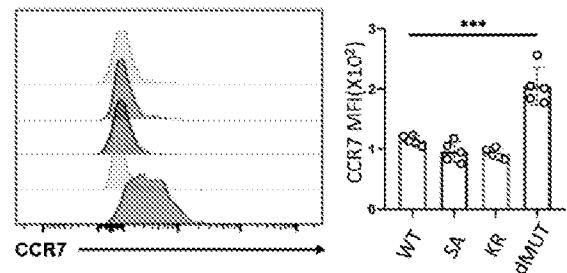
A:



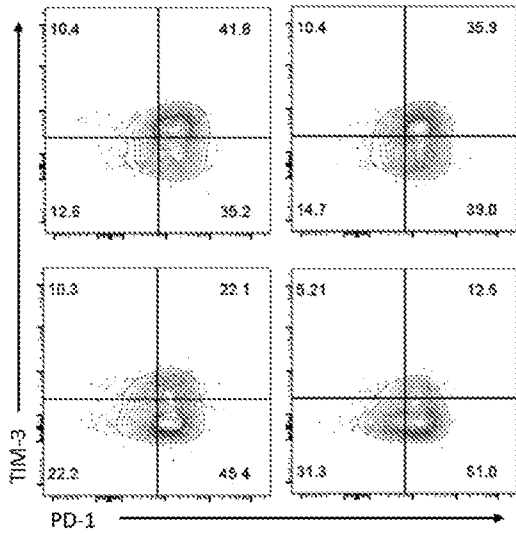
B:



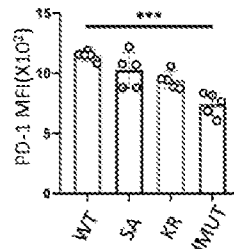
C:



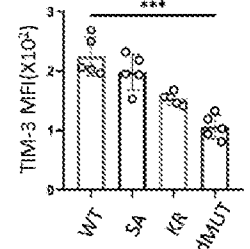
D:



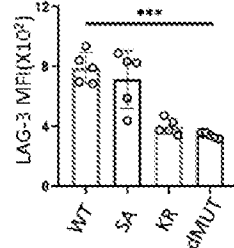
E:



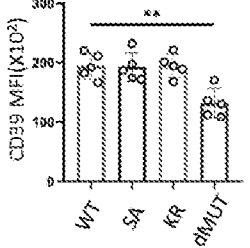
F:



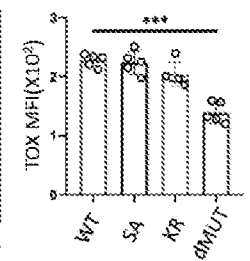
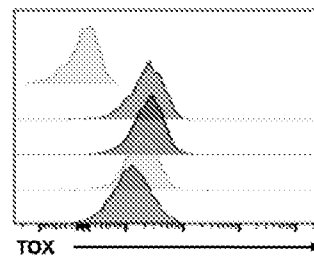
G:



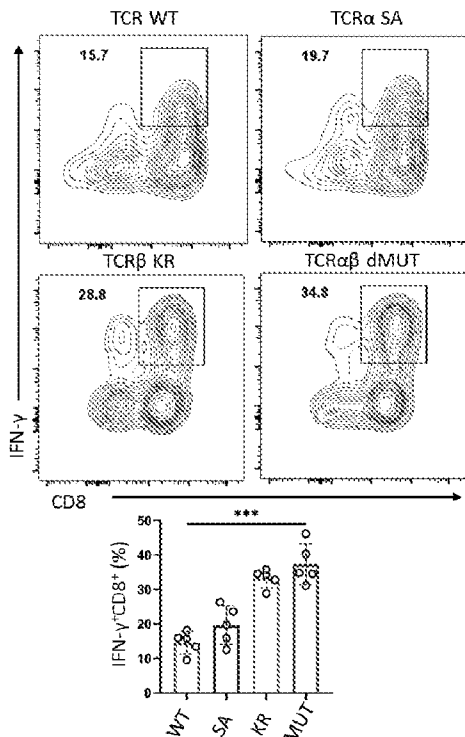
H:



I:



J:



K:

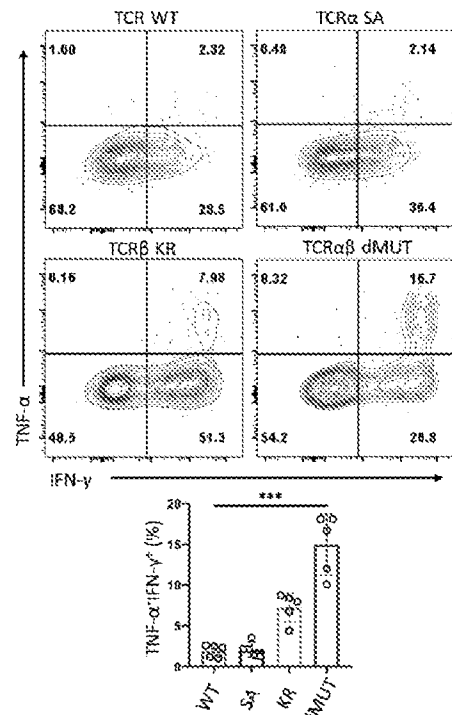


图 6

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2022/143567

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

A61P35/00(2006.01)i;C12N5/10(2006.01)i;C07K19/00(2006.01)i;A61K35/17(2015.01)i;A61K39/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

A61P; C12N; C07K; A61K

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

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

CNTXT, WPABSC, ENTXTC, ENTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, VEN, CNKI, 万方 WANFANG, 百度 BAIDU, PUBMED, ISI Web of Knowledge, NCBI GenBank, EBI-EMBL, 读秀: SEQ ID Nos: 1-48, tcr, 恒定区, 胞内, 突变, α 链, β 链, 赖氨酸, 精氨酸, 丙氨酸, 丝氨酸, 丙氨酸, 内吞, 降解, 稳定, T细胞, 抗原, 抗体, 肿瘤, 癌, Constant region, intracellular, muta+, lysine, arginine, alanine, serine, alanine, endocytosis, T cell, antigen, antibody, SA, KA, degrad+, stab+, tumor, cancer.**C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT**

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2021238903 A1 (CHINA IMMUNOTECH (BEIJING) BIOTECHNOLOGY CO., LTD. et al.) 02 December 2021 (2021-12-02) claims 1-62, and description, paragraph 205	1-25
A	CN 113396216 A (KSQ THERAPEUTICS, INC.) 14 September 2021 (2021-09-14) description, paragraphs 164-165	1-25
A	CN 110818802 A (CHINA IMMUNOTECH (BEIJING) BIOTECHNOLOGY CO., LTD. et al.) 21 February 2020 (2020-02-21) entire document	1-25
A	CN 110857319 A (HANGZHOU CONVERD CO., LTD. et al.) 03 March 2020 (2020-03-03) entire document	1-25

 Further documents are listed in the continuation of Box C. See patent family annex.

* Special categories of cited documents:

“A” document defining the general state of the art which is not considered to be of particular relevance

“D” document cited by the applicant in the international application

“E” earlier application or patent but published on or after the international filing date

“L” document which may throw doubts on priority claim(s) or which is cited to establish the publication date of another citation or other special reason (as specified)

“O” document referring to an oral disclosure, use, exhibition or other means

“P” document published prior to the international filing date but later than the priority date claimed

“T” later document published after the international filing date or priority date and not in conflict with the application but cited to understand the principle or theory underlying the invention

“X” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered novel or cannot be considered to involve an inventive step when the document is taken alone

“Y” document of particular relevance; the claimed invention cannot be considered to involve an inventive step when the document is combined with one or more other such documents, such combination being obvious to a person skilled in the art

“&” document member of the same patent family

Date of the actual completion of the international search

09 March 2023

Date of mailing of the international search report

15 March 2023

Name and mailing address of the ISA/CN

China National Intellectual Property Administration (ISA/
CN)
China No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District,
Beijing 100088

Facsimile No. (86-10)62019451

Authorized officer

Telephone No.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT		
Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	徐隆昌等 (XU, Longchang et al.). "TCR T细胞疗法的研究挑战和审评考虑 (Non-official translation: Research Challenges and Examination Considerations for TCR T Cell Therapy)" <i>中国生物制品学杂志 (Chinese Journal of Biologicals)</i> , Vol. 33, No. 3, 31 March 2020 (2020-03-31), entire document	1-25
A	FRONING, K. et al. "Computational stabilization of T cell receptors allows pairing with antibodies to form bispecifics" <i>Nature Communications</i> , 11 May 2020 (2020-05-11), pages 1-13	1-25
A	FEIGE, M. J. et al. "Dimerization-dependent Folding Underlies Assembly Control of the Clonotypic $\alpha\beta$ T Cell Receptor Chains" <i>The Journal of Biological Chemistry</i> , Vol. 290, No. 44, 30 October 2015 (2015-10-30), pages 26821-26831	1-25

Box No. I Nucleotide and/or amino acid sequence(s) (Continuation of item 1.c of the first sheet)

1. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, the international search was carried out on the basis of a sequence listing:
 - a. forming part of the international application as filed.
 - b. furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search (Rule 13ter.1(a)),
 accompanied by a statement to the effect that the sequence listing does not go beyond the disclosure in the international application as filed.
2. With regard to any nucleotide and/or amino acid sequence disclosed in the international application, this report has been established to the extent that a meaningful search could be carried out without a WIPO Standard ST.26 compliant sequence listing.
3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2022/143567

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
WO	2021238903	A1	02 December 2021	CA	3185145	A1	02 December 2021
CN	113396216	A	14 September 2021	AU	2020217715	A1	23 September 2021
				KR	20210138587	A	19 November 2021
				JP	2022519595	A	24 March 2022
				WO	2020163365	A2	13 August 2020
				WO	2020163365	A3	24 September 2020
				SG	11202108452	WA	29 September 2021
				EP	3920942	A2	15 December 2021
				EP	3920942	A4	18 January 2023
				IL	285307	A	30 September 2021
				CA	3128823	A1	13 August 2020
				US	2020347386	A1	05 November 2020
CN	110818802	A	21 February 2020	WO	2020029774	A1	13 February 2020
CN	110857319	A	03 March 2020	TW	202009240	A	01 March 2020
				WO	2020038491	A1	27 February 2020

<p>A. 主题的分类</p> <p>A61P35/00(2006.01)i;C12N5/10(2006.01)i;C07K19/00(2006.01)i;A61K35/17(2015.01)i;A61K39/00(2006.01)i</p> <p>按照国际专利分类(IPC)或者同时按照国家分类和IPC两种分类</p>																				
<p>B. 检索领域</p> <p>检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)</p> <p>A61P; C12N; C07K; A61K</p> <p>包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献</p> <p>在国际检索时查阅的电子数据库(数据库的名称, 和使用的检索词(如使用))</p> <p>CNXTX, WPABSC, ENTXT, ENTXT, USTXT, WOTXT, CJFD, VEN, CNKI, 万方, 百度, PUBMED, ISI Web of Knowledge, NCBI GenBank, EBI-EMBL, 读秀:SEQ ID Nos: 1-48, tcr, 恒定区, 胞内, 突变, α链, β链, 赖氨酸, 精氨酸, 丙氨酸, 丝氨酸, 丙氨酸, 内吞, 降解, 稳定, T细胞, 抗原, 抗体, 肿瘤, 癌, Constant region, intracellular, muta+, lysine, arginine, alanine, serine, alanine, endocytosis, T cell, antigen, antibody, SA, KA, degrad+, stab+, tumor, cancer.</p>																				
<p>C. 相关文件</p> <table border="1"> <thead> <tr> <th>类型*</th> <th>引用文件, 必要时, 指明相关段落</th> <th>相关的权利要求</th> </tr> </thead> <tbody> <tr> <td>A</td> <td>W0 2021238903 A1 (华夏英泰(北京)生物技术有限公司等) 2021年12月2日 (2021 - 12 - 02) 权利要求1-62, 说明书205段</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 113396216 A (KSQ治疗公司) 2021年9月14日 (2021 - 09 - 14) 说明书第164-165段</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110818802 A (华夏英泰(北京)生物技术有限公司等) 2020年2月21日 (2020 - 02 - 21) 全文</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>CN 110857319 A (杭州康万达医药科技有限公司等) 2020年3月3日 (2020 - 03 - 03) 全文</td> <td>1-25</td> </tr> <tr> <td>A</td> <td>徐隆昌等. "TCR T细胞疗法的研究挑战和审评考虑" 中国生物制品学杂志, 第33卷, 第3期, 2020年3月31日 (2020 - 03 - 31), 全文</td> <td>1-25</td> </tr> </tbody> </table> <p><input checked="" type="checkbox"/> 其余文件在C栏的续页中列出。 <input checked="" type="checkbox"/> 见同族专利附件。</p> <p>* 引用文件的具体类型: "A" 认为不特别相关的表示了现有技术一般状态的文件 "D" 申请人在国际申请中引证的文件 "E" 在国际申请日的当天或之后公布的在先申请或专利 "L" 可能对优先权要求构成怀疑的文件, 或为确定另一篇引用文件的公布日而引用的或者因其他特殊理由而引用的文件(如具体说明的) "O" 涉及口头公开、使用、展览或其他方式公开的文件 "P" 公布日先于国际申请日但迟于所要求的优先权日的文件 "T" 在申请日或优先权日之后公布, 与申请不相抵触, 但为了理解发明之理论或原理的在后文件 "X" 特别相关的文件, 单独考虑该文件, 认定要求保护的发明不是新颖的或不具有创造性 "Y" 特别相关的文件, 当该文件与另一篇或者多篇该类文件结合并且这种结合对于本领域技术人员为显而易见时, 要求保护的发明不具有创造性 "&" 同族专利的文件</p>			类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求	A	W0 2021238903 A1 (华夏英泰(北京)生物技术有限公司等) 2021年12月2日 (2021 - 12 - 02) 权利要求1-62, 说明书205段	1-25	A	CN 113396216 A (KSQ治疗公司) 2021年9月14日 (2021 - 09 - 14) 说明书第164-165段	1-25	A	CN 110818802 A (华夏英泰(北京)生物技术有限公司等) 2020年2月21日 (2020 - 02 - 21) 全文	1-25	A	CN 110857319 A (杭州康万达医药科技有限公司等) 2020年3月3日 (2020 - 03 - 03) 全文	1-25	A	徐隆昌等. "TCR T细胞疗法的研究挑战和审评考虑" 中国生物制品学杂志, 第33卷, 第3期, 2020年3月31日 (2020 - 03 - 31), 全文	1-25
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求																		
A	W0 2021238903 A1 (华夏英泰(北京)生物技术有限公司等) 2021年12月2日 (2021 - 12 - 02) 权利要求1-62, 说明书205段	1-25																		
A	CN 113396216 A (KSQ治疗公司) 2021年9月14日 (2021 - 09 - 14) 说明书第164-165段	1-25																		
A	CN 110818802 A (华夏英泰(北京)生物技术有限公司等) 2020年2月21日 (2020 - 02 - 21) 全文	1-25																		
A	CN 110857319 A (杭州康万达医药科技有限公司等) 2020年3月3日 (2020 - 03 - 03) 全文	1-25																		
A	徐隆昌等. "TCR T细胞疗法的研究挑战和审评考虑" 中国生物制品学杂志, 第33卷, 第3期, 2020年3月31日 (2020 - 03 - 31), 全文	1-25																		
国际检索实际完成的日期	2023年3月9日	国际检索报告邮寄日期	2023年3月15日																	
ISA/CN的名称和邮寄地址	中国国家知识产权局 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	授权官员	沈晶晶 电话号码 (+86) 010-53961944																	

C. 相关文件		
类型*	引用文件, 必要时, 指明相关段落	相关的权利要求
A	FRONING, K. 等. "Computational stabilization of T cell receptors allows pairing with antibodies to form bispecifics" NATURE COMMUNICATIONS, 2020年5月11日 (2020 - 05 - 11), 第1-13页	1-25
A	FEIGE, M. J. 等. "Dimerization-dependent Folding Underlies Assembly Control of the Clonotypic $\alpha\beta$ T Cell Receptor Chains" THE JOURNAL OF BIOLOGICAL CHEMISTRY, 第290卷, 第44期, 2015年10月30日 (2015 - 10 - 30), 第26821-26831页	1-25

第1栏

核苷酸和/或氨基酸序列(续第1页第1.c项)

1. 关于国际申请中所公开的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 国际检索是基于下列序列列表进行的:

- a. 作为国际申请的一部分提交的;
- b. 为国际检索的目的在国际申请日之后提交(细则13之三.1(a)),
 附有说明序列列表不超出所提交国际申请公开范围的声明。

2. 本报告是在没有收到符合WIPO ST. 26标准的序列列表的情况下, 考虑了国际申请中披露的任何核苷酸和/或氨基酸序列, 在可进行有意义检索的范围内做出的。

3. 补充意见:

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2022/143567

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
WO	2021238903	A1	2021年12月2日	CA	3185145	A1	2021年12月2日
CN	113396216	A	2021年9月14日	AU	2020217715	A1	2021年9月23日
				KR	20210138587	A	2021年11月19日
				JP	2022519595	A	2022年3月24日
				WO	2020163365	A2	2020年8月13日
				WO	2020163365	A3	2020年9月24日
				SG	11202108452	WA	2021年9月29日
				EP	3920942	A2	2021年12月15日
				EP	3920942	A4	2023年1月18日
				IL	285307	A	2021年9月30日
				CA	3128823	A1	2020年8月13日
				US	2020347386	A1	2020年11月5日
CN	110818802	A	2020年2月21日	WO	2020029774	A1	2020年2月13日
CN	110857319	A	2020年3月3日	TW	202009240	A	2020年3月1日
				WO	2020038491	A1	2020年2月27日