202115108

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本　(11)公開編號：TW 202115108 A

(43)公開日： 中華民國 110 (2021) 年 04 月 16 日

(21)申請案號：109130582　(22)申請日： 中華民國 109 (2020) 年 09 月 07 日

(51)Int. Cl.：　*C07K14/725 (2006.01)*　*C07H21/04 (2006.01)*

C12N15/64 (2006.01)　*A61K38/16 (2006.01)*

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2019/09/05　中國大陸　201910837691.3

(71)申請人：大陸商廣東香雪精准醫療技術有限公司 (中國大陸)　(CN)

中國大陸

(72)發明人：黃金花 (CN)

(74)代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：無　申請專利範圍項數：10 項　圖式數：11　共 90 頁

(54)名稱

一種識別 SSX2 的高親和力 T 細胞受體

(57)摘要

本發明提供了一種識別 SSX2 的高親和力 T 細胞受體(TCR)，其具有結合 KASEKIFYV-HLA A0201 複合物的特性；並且所述 TCR 對所述 KASEKIFYV-HLA A0201 複合物的結合親和力是野生型 TCR 對 KASEKIFYV-HLA A0201 複合物的結合親和力的至少 2 倍。本發明還提供了此類 TCR 與治療劑的融合分子。此類 TCR 可以單獨使用，也可與治療劑聯用，以標靶呈現 KASEKIFYV-HLA A0201 複合物腫瘤細胞。

指定代表圖：

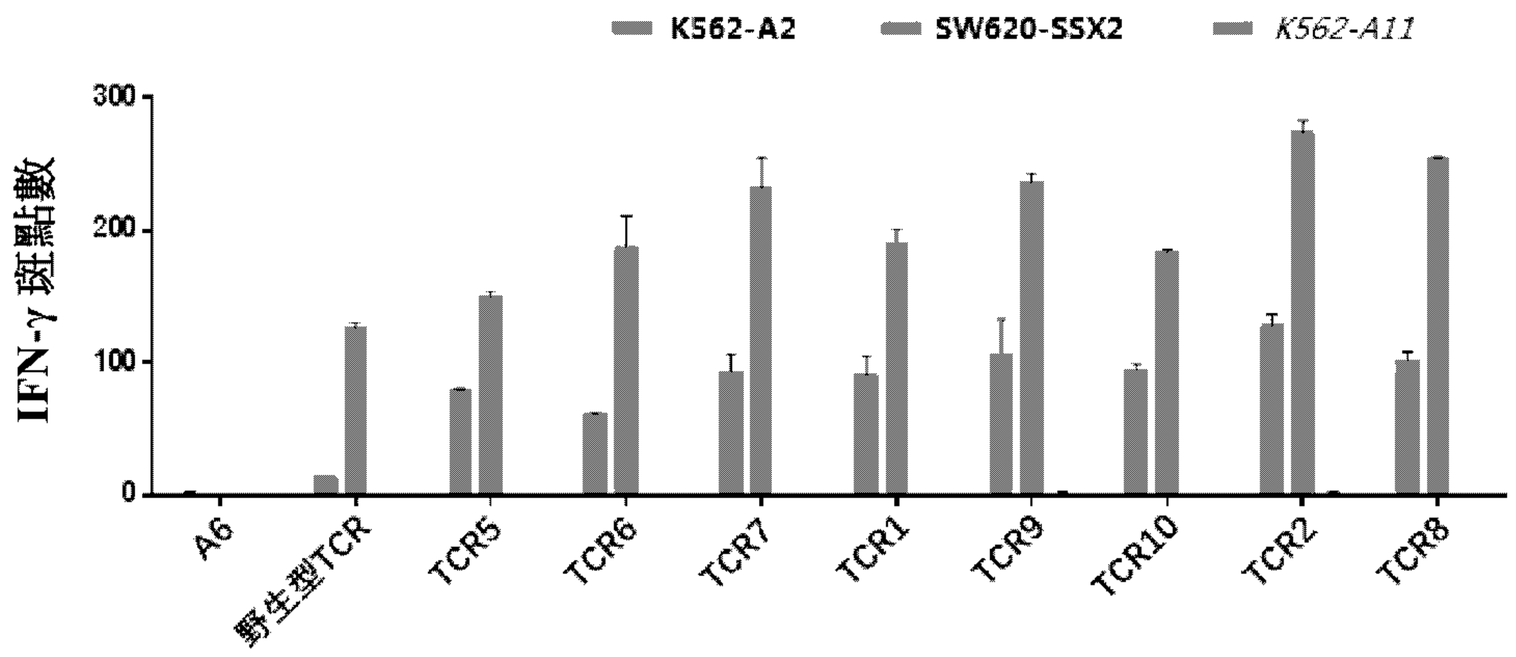

圖 11

202115108

【發明摘要】

【中文發明名稱】　一種識別SSX2的高親和力T細胞受體

【中文】

本發明提供了一種識別 SSX2 的高親和力 T 細胞受體(TCR)，其具有結合 KASEKIFYV-HLA A0201 複合物的特性；並且所述 TCR 對所述 KASEKIFYV-HLA A0201 複合物的結合親和力是野生型 TCR 對 KASEKIFYV-HLA A0201 複合物的結合親和力的至少 2 倍。本發明還提供了此類 TCR 與治療劑的融合分子。此類 TCR 可以單獨使用，也可與治療劑聯用，以標靶呈現 KASEKIFYV-HLA A0201 複合物腫瘤細胞。

【指定代表圖】　圖11

【發明說明書】

【中文發明名稱】　一種識別SSX2的高親和力T細胞受體

【技術領域】

【0001】　本發明涉及生物技術領域，更具體地涉及能夠識別衍生自SSX2蛋白多肽的T細胞受體(T cell receptor, TCR)。本發明還涉及所述受體的製備和用途。

【先前技術】

【0002】　僅僅有兩種類型的分子能夠以專一性的方式識別抗原。其中一種是免疫球蛋白或抗體；另一種是T細胞受體(TCR)，它是由α鏈/β鏈或者γ鏈/δ鏈以異二聚體形式存在的細胞膜表面的糖蛋白。免疫系統的TCR總譜的組成是在胸腺中透過V(D)J重組，然後進行陽性和陰性選擇而產生的。在外周環境中，TCR介導了T細胞對主要組織相容性複合體-胜肽複合物(pMHC)的專一性識別，因此其對免疫系統的細胞免疫功能是至關重要的。

【0003】　TCR是呈現在主要組織相容性複合體(MHC)上的專一性抗原胜肽的唯一受體，這種外源胜肽或內源胜肽可能會是細胞出現異常的唯一跡象。在免疫系統中，透過抗原專一性的TCR與pMHC複合物的結合引發T細胞與抗原呈現細胞(APC)直接的物理接觸，然後T細胞及APC兩者的其他細胞膜表面分子就發生相互作用，這就

引起了一系列後續的細胞信號傳遞和其他生理反應，從而使得不同抗原專一性的T細胞對其標靶細胞發揮免疫效應。

【0004】　與TCR相對應的MHC I類和II類分子配體也是免疫球蛋白超家族的蛋白質但對於抗原的呈現具有專一性，不同的個體有不同的MHC，從而能呈現一種蛋白抗原中不同的短鏈胜肽到各自的APC細胞表面。人類的MHC通常稱為HLA基因或HLA複合體。

【0005】　SSX2是滑膜肉瘤X斷點，也被稱為HOM-MEL-40。SSX2是SSX家族十種高度同源的核酸蛋白之一。SSX蛋白是腫瘤睪丸抗原，只在腫瘤細胞以及沒有MHC表現的睪丸胚細胞中表現。SSX2在多種人類癌細胞中表現，包括但不限於，肝癌、肺癌、纖維肉瘤、乳腺癌、結腸癌、前列腺癌。SSX2在細胞內生成後被降解成小分子多肽，並與MHC(主要組織相容性複合體)分子結合形成複合物，被呈現到細胞表面。KASEKIFYV是衍生自SSX2抗原的短鏈胜肽，是SSX2相關疾病治療的一種標的。

【0006】　因此，KASEKIFYV-HLA A0201複合物提供了一種TCR可標靶腫瘤細胞的標記。能夠結合KASEKIFYV-HLA A0201複合物的TCR對腫瘤的治療具有很高的應用價值。例如，能夠標靶該腫瘤細胞標記的TCR可用於將細胞毒性劑或免疫刺激劑遞送到標靶細胞，或被轉殖入T細胞，使表現該TCR的T細胞能夠破壞腫瘤細胞，以便在被稱為過繼免疫治療的治療過程中給予患者。對於前一

目的，理想的TCR是具有較高的親和力的，從而使該TCR能夠長期駐留在所標靶的細胞上面。對於後一目的，則優選使用中等親和力的TCR。因此，熟悉本發明所屬技藝的人士致力於開發可用於滿足不同目的的標靶腫瘤細胞標記的TCR。

【發明內容】

發明概要

【0007】 本發明的目的在於提供一種對KASEKIFYV-HLA A0201複合物具有較高親和力的TCR。

【0008】 本發明的再一目的是提供一種上述類型TCR的製備方法及上述類型TCR的用途。

【0009】 本發明的第一方面，提供了一種T細胞受體(TCR)，其具有結合KASEKIFYV-HLA A0201複合物的活性。

【0010】 在另一優選例中，所述TCR的α鏈可變域包含與SEQ ID NO: 1所示的胺基酸序列有至少90%；優選地，至少92%；更優選地，至少94% (如，可以是至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的序列同源性)的序列同源性的胺基酸序列；和/或所述TCR的β鏈可變域包含與SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列有至少90%，優選地，至少92%；更優選地，至少94% (如，可以是至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的序列同源性)的序列同源性的胺基酸序列。

【0011】 在另一優選例中，所述TCR在SEQ ID NO： 2所示的β鏈可變域中發生突變，所述突變選自D96V、E98I、L99P、L100E/I/N/P/V、F101D/H/N/Y、Y102A/K/N/P/V、N103A/D/E/P、E104L/V、Q105P/T、F106H中的一組或幾組，其中，胺基酸殘基編號採用SEQ ID NO: 2所示的編號。

【0012】 在另一優選例中，所述TCRα鏈可變域包含3個CDR區，其中CDR3α的胺基酸序列為：AYRSGIIQGAQKLV。

【0013】 在另一優選例中，所述TCRα鏈可變域包含3個CDR區，3個CDR區的序列為：

CDR1α：TSESDYY

CDR2α：QEAYKQQN

CDR3α：AYRSGIIQGAQKLV

【0014】 在另一優選例中，所述TCRα鏈可變域的胺基酸序列為SEQ ID NO: 1。

【0015】 在另一優選例中，所述TCRβ鏈可變域包含3個CDR區，其中CDR1β的胺基酸序列為PRHDT；和CDR2β的胺基酸序列為：FYEKMQ。

【0016】 在另一優選例中，所述TCRβ鏈可變域的CDR3β選自下組：ASSSDRIPPYYNEQF、ASSSDRELNDAPEQF、ASSSVRELNYVDEQF和ASSSDRELLFYNEQF。

【0017】 在另一優選例中，所述TCR具有選自下組的CDR:

CDR編號	CDR1α	CDR2α	CDR3α	CDR1β	CDR2β	CDR3β
1	TSESDYY	QEAYKQQN	AYRSGIIQGAQKLV	PRHDT	FYEKMQ	ASSSDRIPPYYNEQF
2	TSESDYY	QEAYKQQN	AYRSGIIQGAQKLV	PRHDT	FYEKMQ	ASSSVRELNYVDEQF
3	TSESDYY	QEAYKQQN	AYRSGIIQGAQKLV	PRHDT	FYEKMQ	ASSSDRELNDAPEQF
4	TSESDYY	QEAYKQQN	AYRSGIIQGAQKLV	PRHDT	FYEKMQ	ASSSDRELVFNPEQF
5	TSESDYY	QEAYKQQN	AYRSGIIQGAQKLV	PRHDT	FYEKMQ	ASSSDRELLDAPEQF
6	TSESDYY	QEAYKQQN	AYRSGIIQGAQKLV	PRHDT	FYEKMQ	ASSSDRELLFPDLTF
7	TSESDYY	QEAYKQQN	AYRSGIIQGAQKLV	PRHDT	FYEKMQ	ASSSDRELIHPEEQF
8	TSESDYY	QEAYKQQN	AYRSGIIQGAQKLV	PRHDT	FYEKMQ	ASSSDRELLFYAVPH
9	TSESDYY	QEAYKQQN	AYRSGIIQGAQKLV	PRHDT	FYEKMQ	ASSSDRELLNPEEQF
10	TSESDYY	QEAYKQQN	AYRSGIIQGAQKLV	PRHDT	FYEKMQ	ASSSDRELEHPEEQF
11	TSESDYY	QEAYKQQN	AYRSGIIQGAQKLV	PRHDT	FYEKMQ	ASSSDRELPFVPEQF
12	TSESDYY	QEAYKQQN	AYRSGIIQGAQKLV	PRHDT	FYEKMQ	ASSSDRELVFKPEQF

【0018】 在另一優選例中，所述TCR的α鏈可變域胺基酸序列選自：SEQ ID NO: 1；和/或所述TCR的β鏈可變域胺基酸序列選自：SEQ ID NO: 13-24。

【0019】 在另一優選例中，所述TCR選自下組：

TCR編號	α鏈可變域序列 SEQ ID NO:	β鏈可變域序列 SEQ ID NO:
1	1	13
2	1	14
3	1	15

4	1	16
5	1	17
6	1	18
7	1	19
8	1	20
9	1	21
10	1	22
11	1	23
12	1	24

【0020】 在另一優選例中，所述TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物的親和力是野生型TCR的至少2倍。

【0021】 在本發明的一個優選例中，所述TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物的親和力是野生型TCR的至少2倍；優選地，至少5倍；更優選地，至少10倍。

【0022】 在另一優選例中，所述TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物的親和力是野生型TCR的至少50倍；優選地，至少100倍；更優選地，至少300倍。

【0023】 具體地，所述TCR對KASEKIFYV-HLA A0201複合物的解離平衡常數KD ≤ 50 μM；

【0024】 在另一優選例中，所述TCR對KASEKIFYV-HLA A0201複合物的解離平衡常數為1 μM ≤ KD ≤ 50 μM。

【0025】 在另一優選例中，所述TCR是可溶的。

【0026】 在另一優選例中，所述TCR為αβ異質二聚TCR。優選地，所述TCR具有α鏈恆定區序列TRAC*01和β鏈恆定區序列TRBC1*01或TRBC2*01。

【0027】　在另一優選例中，所述TCR包含(i)除其跨膜結構域以外的全部或部分TCRα鏈，和(ii)除其跨膜結構域以外的全部或部分TCRβ鏈，其中(i)和(ii)均包含TCR鏈的可變域和至少一部分恆定域。

【0028】　在另一優選例中，所述TCR的α鏈恆定區與β鏈恆定區之間含有人工鏈間二硫鍵。

【0029】　在另一優選例中，在所述TCRα與β鏈的恆定區之間形成人工鏈間二硫鍵的半胱胺酸殘基取代了選自下列的一組或多組位址：

TRAC*01外顯子1的Thr48和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Ser57；

TRAC*01外顯子1的Thr45和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Ser77；

TRAC*01外顯子1的Tyr10和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Ser17；

TRAC*01外顯子1的Thr45和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Asp59；

TRAC*01外顯子1的Ser15和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Glu15；

TRAC*01外顯子1的Arg53和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Ser54；

TRAC*01外顯子1的Pro89和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Ala19；

和TRAC*01外顯子1的Tyr10和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Glu20。

【0030】 在另一優選例中，所述TCR為單鏈TCR。

【0031】 在另一優選例中，所述TCR是由α鏈可變域和β鏈可變域組成的單鏈TCR，所述α鏈可變域和β鏈可變域由一柔性短鏈胜肽序列(linker)連接。

【0032】 在另一優選例中，所述TCR的α鏈和/或β鏈的C-或N-末端結合有偶聯物。

【0033】 在另一優選例中，與所述TCR結合的偶聯物為可偵測標記物、治療劑、PK修飾部分或任何這些物質的組合。

【0034】 在另一優選例中，與所述TCR結合的治療劑為連接於所述TCR的α或β鏈的C-或N-末端的抗-CD3抗體。

【0035】 本發明的第二方面，提供了一種多價TCR複合物，包含至少兩個TCR分子，並且其中的至少一個TCR分子為本發明第一方面所述的TCR。

【0036】　本發明的第三方面，提供了一種核酸分子，所述核酸分子包含編碼本發明第一方面所述的TCR分子或者本發明第二方面所述的多價TCR複合物的核酸序列或其互補序列。

【0037】　本發明的第四方面，提供了一種載體，所述的載體含有本發明第三方面所述的核酸分子。

【0038】　本發明的第五方面，提供了一種宿主細胞，所述的宿主細胞中含有本發明第四方面所述的載體或染色體中整合有外源的本發明第三方面所述的核酸分子。

【0039】　本發明的第六方面，提供了一種分離的細胞，所述細胞表現本發明第一方面所述的TCR。

【0040】　本發明的第七方面，提供了一種藥物組成物，所述組成物含有藥學上可接受的載體以及本發明第一方面所述的TCR、或本發明第二方面所述的TCR複合物、或本發明第六方面所述的細胞。

【0041】　本發明的第八方面，提供了一種治療疾病的方法，包括給需要治療的對象施用適量的本發明第一方面所述的TCR、或本發明第二方面所述的TCR複合物、或本發明第六方面所述的細胞、或本發明第七方面所述的藥物組成物。

【0042】　本發明的第九方面，提供了本發明第一方面所述的TCR、或本發明第二方面所述的TCR複合物、或本發明第六方面所

述的細胞的用途，用於製備治療腫瘤的藥物，優選地，所述腫瘤為SSX2陽性腫瘤。

【0043】 本發明的第十方面，請求項第一方面所述的T細胞受體、第二方面所述的TCR複合物或第六方面所述的細胞用作治療腫瘤的藥物。優選地，所述腫瘤為SSX2陽性腫瘤。

【0044】 本發明的第十一方面，提供了一種製備本發明第一方面所述的T細胞受體的方法，包括步驟：

(i)培養本發明第五方面所述的宿主細胞，從而表現本發明第一方面所述的T細胞受體；

(ii)分離或純化出所述的T細胞受體。

【0045】 應理解，在本發明範圍內中，本發明的上述各技術特徵和在下文(如實施例)中具體描述的各技術特徵之間都可以互相組合，從而構成新的或優選的技術方案。限於篇幅，在此不再一一累述。

【圖式簡單說明】

【0046】 圖1a和圖1b分別顯示了對KASEKIFYV-HLA A0201複合物能夠專一性結合的野生型TCRα與β鏈可變域胺基酸序列。

【0047】 圖2a和圖2b分別為本發明構建的單鏈模板TCR的α鏈可變域的胺基酸序列和β鏈可變域的胺基酸序列。

【0048】　圖3a和圖3b分別為本發明構建的單鏈模板TCR的α鏈可變域的DNA序列和β鏈可變域的DNA序列。

【0049】　圖4a和圖4b分別為本發明構建的單鏈模板TCR的連接短鏈胜肽(linker)的胺基酸序列和核苷酸序列。

【0050】　圖5a和圖5b分別為本發明構建的單鏈模板TCR的胺基酸序列和DNA序列。

【0051】　圖6a和圖6b分別顯示了本發明中可溶性參考TCRα與β鏈的胺基酸序列。

【0052】　圖7(1)-圖7(12)分別顯示了對KASEKIFYV-HLA A0201複合物具有高親和力的異質二聚TCR的β鏈可變域胺基酸序列，突變的殘基以加底線表示。

【0053】　圖8a和圖8b分別顯示了對KASEKIFYV-HLA A0201複合物能夠專一性結合的野生型TCRα與β鏈胞外胺基酸序列。

【0054】　圖9a和圖9b分別顯示了對KASEKIFYV-HLA A0201複合物能夠專一性結合的野生型TCRα與β鏈的胺基酸序列。

【0055】　圖10為可溶性參考TCR即野生型TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物的結合曲線。

【0056】　圖11為轉染本發明高親和力TCR的效應細胞的活化功能實驗結果。

【實施方式】

發明的詳細說明

具體實施方式

【0057】 本發明透過廣泛而深入的研究，獲得一種識別KASEKIFYV短鏈胜肽(衍生自AFP蛋白)的高親和性T細胞受體(TCR)，所述KASEKIFYV-HLA A0201複合物的形式被呈現。所述高親和性TCR在其α鏈可變域的3個CDR區：

CDR1α：TSESDYY

CDR2α：QEAYKQQN

CDR3α：AYRSGIIQGAQKLV中發生突變；和/或在其β鏈可變域的3個CDR區：

CDR1β：PRHDT

CDR2β：FYEKMQ

CDR3β：ASSSDRELLFYNEQF中發生突變；並且，突變後本發明TCR對上述KASEKIFYV-HLA A0201複合物的親和力和/或結合半衰期是野生型TCR的至少2倍。

【0058】 在描述本發明之前，應當理解本發明不限於所述的具體方法和實驗條件，因為這類方法和條件可以變動。還應當理解本文所用的術語其目的僅在於描述具體實施方案，並且其意圖不是限制性的，本發明的範圍將僅由所附的申請專利範圍限制。

【0059】　除非另外定義，否則本文中所用的全部技術與科學術語均具有如熟悉本發明所屬技藝的人士通常理解的相同含義。

【0060】　雖然在本發明的實施或測試中可以使用與本發明中所述相似或等價的任何方法和材料，本文在此處例舉優選的方法和材料。

術語

T細胞受體(T cell receptor,TCR)

【0061】　可以採用國際免疫遺傳學資訊系統(IMGT)來描述TCR。天然αβ異質二聚TCR具有α鏈和β鏈。廣義上講，各鏈包含可變區、連接區和恆定區，β鏈通常還在可變區和連接區之間含有短的多變區，但該多變區常視作連接區的一部分。透過獨特的IMGT的TRAJ和TRBJ確定TCR的連接區，透過IMGT的TRAC和TRBC確定TCR的恆定區。

【0062】　各可變區包含嵌合在框架序列中的3個CDR（互補決定區)，CDR1、CDR2和CDR3。在IMGT命名法中，TRAV和TRBV的不同編號分別指代不同Vα類型和Vβ的類型。在IMGT系統中，α鏈恆定結構域具有以下的符號：TRAC*01，其中“TR”表示T細胞受體基因；“A”表示α鏈基因；C表示恆定區；“*01”表示等位基因1。β鏈恆定結構域具有以下的符號：TRBC1*01或TRBC2*01，其中“TR”表示T細胞受體基因；“B”表示β鏈基因；C表示恆定區；“*01”

表示等位基因1。α鏈的恆定區是唯一確定的，在β鏈的形式中，存在兩個可能的恆定區基因“C1”和“C2”。熟悉本發明所屬技藝的人士透過公開的IMGT資料庫可以獲得TCRα與β鏈的恆定區基因序列。

【0063】 TCR的α和β鏈一般看作各有兩個“結構域”即可變域和恆定結構域。可變域由連接的可變區和連接區構成。因此，在本申請的說明書和申請專利範圍中，“TCRα鏈可變域”指連接的TRAV和TRAJ區，同樣地，“TCRβ鏈可變域”指連接的TRBV和TRBD/TRBJ區。TCRα鏈可變域的3個CDR分別為CDR1α、CDR2α和CDR3α；TCRβ鏈可變域的3個CDR分別為CDR1β、CDR2β和CDR3β。本發明TCR可變域的框架序列可以為鼠源的或人源的，優選為人源的。TCR的恆定結構域包含胞內部分、跨膜區和胞外部分。為獲得可溶性TCR，以便測定TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物之間的親和力，本發明TCR優選地不包含跨膜區。更優選地，本發明TCR的胺基酸序列是指TCR的胞外胺基酸序列。

【0064】 本發明中所用的TCR序列為人源的。本發明中所述“野生型TCR”的α鏈胺基酸序列及β鏈胺基酸序列分別為SEQ ID NO: 27和SEQ ID NO: 28，如圖9a和9b所示。本發明中所述“參考TCR”的α鏈胺基酸序列及β鏈胺基酸序列分別為SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12，如圖6a和圖6b所示。本發明中所述“野生型TCR”的α鏈胞外胺基酸序列及β鏈胞外胺基酸序列分別為SEQ ID NO: 25和

SEQ ID NO: 26，如圖8a和圖8b所示。本發明中，能夠結合KASEKIFYV-HLA A0201複合物的野生型TCR的α與β鏈可變域胺基酸序列分別為SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2，如圖1a和圖1b所示。在本發明中，術語“本發明多肽”、“本發明的TCR”、“本發明的T細胞受體”可互換使用。

天然鏈間二硫鍵與人工鏈間二硫鍵

【0065】 在天然TCR的近膜區Cα與Cβ鏈間存在一組二硫鍵，本發明中稱為“天然鏈間二硫鍵”。在本發明中，將人工引入的，位置與天然鏈間二硫鍵的位置不同的鏈間共價二硫鍵稱為“人工鏈間二硫鍵”。

【0066】 為方便描述，本發明中TRAC*01與TRBC1*01或TRBC2*01胺基酸序列的位置編號按從N端到C端依次的順序進行位置編號，如TRBC1*01或TRBC2*01中，按從N端到C端依次的順序第60個胺基酸為P（脯胺酸），則本發明中可將其描述為TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Pro60，也可將其表述為TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的第60位胺基酸，又如TRBC1*01或TRBC2*01中，按從N端到C端依次的順序第61個胺基酸為Q（麩醯胺酸），則本發明中可將其描述為TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Gln61，也可將其表述為TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的第61位胺基酸，其他以此類推。本發明中，

可變區TRAV與TRBV的胺基酸序列的位置編號，按照IMGT中列出的位置編號。如TRAV中的某個胺基酸，IMGT中列出的位置編號為46，則本發明中將其描述為TRAV第46位胺基酸，其他以此類推。本發明中，其他胺基酸的序列位置編號有特殊說明的，則按特殊說明。

腫瘤

【0067】 術語“腫瘤”指包括所有類型的癌細胞生長或致癌過程，轉移性組織或惡性轉化細胞、組織或器官，不管病理類型或侵染的階段。腫瘤的實施例非限制性地包括：實體瘤、軟組織瘤，和轉移性病灶。實體瘤的實施例包括：不同器官系統的惡性腫瘤，例如肉瘤、肺鱗癌和癌症。例如：感染的前列腺、肺、乳房、淋巴、腸胃(例如：結腸)，和生殖泌尿道(例如：腎臟，上皮細胞)、咽頭。肺鱗癌包括惡性腫瘤，例如，多數的結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝癌、肺部的非小細胞癌，小腸癌和食道癌。上述癌症的轉移性病變可同樣用本發明的方法和組成物來治療和預防。

發明詳述

【0068】 眾所周知，TCR的α鏈可變域與β鏈可變域各含有3個CDR，類似於抗體的互補決定區。CDR3與抗原短鏈胜肽相互作用，CDR1和CDR2與HLA相互作用。因此，TCR分子的CDR決定了其與抗原短鏈胜肽-HLA複合物的相互作用。能夠結合抗原短鏈胜肽

KASEKIFYV與HLA A0201複合物(即，KASEKIFYV-HLA A0201複合物)的野生型TCR的α鏈可變域胺基酸序列與β鏈可變域胺基酸序列分別為SEQ ID NO: 1和SEQ ID NO: 2，該序列為本發明人首次發現。其具有下列CDR區：

α鏈可變域CDR

CDR1α：TSESDYY

CDR2α：QEAYKQQN

CDR3α：AYRSGIIQGAQKLV

β鏈可變域CDR

CDR1β：PRHDT

CDR2β：FYEKMQ

CDR3β：ASSSDRELLFYNEQF

【0069】 本發明透過對上述CDR區進行突變篩選，獲得了與KASEKIFYV-HLA A0201複合物的親和力是野生型TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物親和力至少2倍的高親和力TCR。

【0070】 本發明提供了一種T細胞受體(TCR)，其具有結合KASEKIFYV-HLA A0201複合物的活性。

【0071】 本發明中野生型TCRα鏈可變域SEQ ID NO: 1的3個CDR即CDR1、CDR2和CDR3分別位於SEQ ID NO: 1的第27-33位、第51-58位和第93-106位。

【0072】 本發明中野生型TCRβ鏈可變域SEQ ID NO: 2的3個CDR即CDR1、CDR2和CDR3分別位於SEQ ID NO: 2的第27-31位、第49-54位和第92-106位。因此，胺基酸殘基編號採用SEQ ID NO: 2所示的編號，96D即為CDR3β的第5位D、98E即為CDR3β的第7位E、99L即為CDR3β的第8位L、100L即為CDR3β的第9位L、101F即為CDR11β的第10位F、102Y即為CDR3β的第11位Y、103N即為CDR3β的第12位N、104E即為CDR3β的第13位E、105Q即為CDR3β的第14位Q和106F即為CDR3β的第15位F。

【0073】 優選地，突變後的所述TCRβ鏈可變域包括選自下組的一個或多個胺基酸殘基：96V、98I、99P、100E或100I或100N或100P或100V、101D或101H或101N或101Y、102A或102K或102N或102P或102V、103A或103D或103E或103P、104L或104V、105P或105T、106H，其中，胺基酸殘基編號採用SEQ ID NO: 2所示的編號。

【0074】 更具體地，β鏈可變域中所述突變的具體形式包括D96V、E98I、L99P、L100E/I/N/P/V、F101D/H/N/Y、Y102A/K/N/P/V、N103A/D/E/P、E104L/V、Q105P/T、F106H中的一組或幾組。

【0075】 進一步，本發明所述TCR是αβ異質二聚TCR，所述TCR的α鏈可變域包含與SEQ ID NO: 1所示的胺基酸序列有至少

90%；優選地，至少92%；更優選地，至少94% (如，可以是至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的序列同源性)的序列同源性的胺基酸序列；和/或所述TCR的β鏈可變域包含與SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列有至少90%，優選地，至少92%；更優選地，至少94% (如，可以是至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的序列同源性)的序列同源性的胺基酸序列。

【0076】 進一步，本發明所述TCR是單鏈TCR，所述TCR的α鏈可變域包含與SEQ ID NO: 3所示的胺基酸序列有至少85%，優選地，至少90%；更優選地，至少92%；最優選地，至少94% (如，可以是至少88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的序列同源性)的序列同源性的胺基酸序列；和/或所述TCR的β鏈可變域包含與SEQ ID NO: 4所示的胺基酸序列有至少85%，優選地，至少90%；更優選地，至少92%；最優選地，至少94%；(如，可以是至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%的序列同源性)的序列同源性的胺基酸序列。

【0077】 優選地，所述TCR包含(i)除其跨膜結構域以外的全部或部分TCRα鏈，和(ii)除其跨膜結構域以外的全部或部分TCRβ鏈，其中(i)和(ii)均包含TCR鏈的可變域和至少一部分恆定域。

【0078】 根據熟悉本發明所屬技藝的人士熟知的定點突變的方法，將野生型TCRα鏈恆定區TRAC*01外顯子1的Thr48突變為半胱胺酸，β鏈恆定區TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Ser57突變為半胱胺酸，即得到參考TCR，其胺基酸序列分別為SEQ ID NO: 11和SEQ ID NO: 12，如圖6a和圖6b所示，突變後的半胱胺酸殘基以加粗字母表示。上述半胱胺酸取代能使參考TCR的α與β鏈的恆定區之間形成人工鏈間二硫鍵，以形成更加穩定的可溶性TCR，從而能夠更加方便地評估TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物之間的結合親和力和/或結合半衰期。應理解，TCR可變區的CDR區決定了其與pMHC複合物之間的親和力，因此，上述TCR恆定區的半胱胺酸取代並不會對TCR的結合親和力和/或結合半衰期產生影響。所以，在本發明中，測得的參考TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物之間的結合親和力即認為是野生型TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物之間的結合親和力，同樣地，如果測得本發明TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物之間的結合親和力是參考TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物之間的結合親和力的至少10倍，即等同於本發明TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物之間的結合親和力是野生型TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物之間的結合親和力的至少10倍。

【0079】 可透過任何合適的方法測定結合親和力(與解離平衡常數K_D成反比)和結合半衰期(表示為$T_{1/2}$)。如採用表面等離子共振技術進行偵測。應瞭解，TCR的親和力翻倍將導致K_D減半。$T_{1/2}$計算為In2除以解離速率(K_{off})。因此，$T_{1/2}$翻倍會導致K_{off}減半。優選採用相同的試驗方案偵測給定TCR的結合親和力或結合半衰期數次，例如3次或更多，取結果的平均值。在優選的實施方式中，採用本文實施例中的表面等離振子共振(BIAcore)方法偵測可溶性TCR的親和力，條件為：溫度25℃，PH值為7.1-7.5。該方法偵測到參考TCR對KASEKIFYV-HLA A0201複合物的解離平衡常數K_D為1.21E-04M，即121 μM，本發明中即認為野生型TCR對KASEKIFYV-HLA A0201複合物的解離平衡常數K_D也為121 μM。由於TCR的親和力翻倍將導致K_D減半，所以若偵測到高親和力TCR對KASEKIFYV-HLA A0201複合物的解離平衡常數K_D為1.21E-05M，即12.1 μM，則說明該高親和力TCR對KASEKIFYV-HLA A0201複合物的親和力是野生型TCR對KASEKIFYV-HLA A0201複合物的親和力的10倍。熟悉本發明所屬技藝的人士熟知K_D值單位間的換算關係，即1 M = 10^6 μM，1 μM = 1000 nM，1 nM = 1000 pM。

【0080】 在本發明的一個優選例中，所述TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物的親和力是野生型TCR的至少2倍；優選地，至少5倍；更優選地，至少10倍。

【0081】 在另一優選例中，所述TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物的親和力是野生型TCR的至少50倍；優選地，至少100倍；更優選地，至少300倍。

【0082】 具體地，所述TCR對KASEKIFYV-HLA A0201複合物的解離平衡常數KD ≤ 60 μM；

【0083】 在另一優選例中，所述TCR對KASEKIFYV-HLA A0201複合物的解離平衡常數為1 μM ≤ KD ≤ 50 μM。

【0084】 可採用任何合適的方法進行突變，包括但不限於依據聚合酶鏈式反應(PCR)的那些、依據限制性酶的選殖或不依賴連接的選殖(LIC)方法。許多標準分子生物學教材詳述了這些方法。聚合酶鏈式反應(PCR)誘變和依據限制性酶的選殖的更多細節可參見Sambrook和Russell，(2001)分子選殖-實驗室手冊(Molecular Cloning-A Laboratory Manual)(第三版)CSHL出版社。LIC方法的更多資訊可見[Rashtchian, (1995) Curr Opin Biotechnol 6(1):30-6]。

【0085】 產生本發明的TCR的方法可以是但不限於從展示此類TCR的噬菌體顆粒的多樣性基因庫中篩選出對

KASEKIFYV-HLA-A0201複合物具有高親和性的TCR，如文獻[Li *et al* (2005) Nature Biotech 23(3):349-354]中所述。

【0086】 應理解，表現野生型TCRα和β鏈可變域胺基酸的基因或者表現略作修飾的野生型TCR的α和β鏈可變域胺基酸的基因都可用來製備模板TCR。然後在編碼該模板TCR的可變域的DNA中引入產生本發明的高親和力TCR所需的改變。

【0087】 本發明中，形成異質二聚TCR分子的α鏈可變域與β鏈可變域的胺基酸序列優選自下表1：

表1

TCR 編號	α 鏈可變域序列 SEQ ID NO:	β 鏈可變域序列 SEQ ID NO:
1	1	13
2	1	14
3	1	15
4	1	16
5	1	17
6	1	18
7	1	19
8	1	20
9	1	21
10	1	22
11	1	23
12	1	24

【0088】 基於本發明的目的，本發明TCR是具有至少一個TCRα和/或TCRβ鏈可變域的部分。它們通常同時包含TCRα鏈可變域和TCRβ鏈可變域。它們可以是αβ異質二聚體或是單鏈形式或是其他任何能夠穩定存在的形式。在過繼性免疫治療中，可將αβ異質二聚TCR的全長鏈(包含胞質和跨膜結構域)進行轉染。本發明TCR可用作將治療劑遞送至抗原呈現細胞的標靶劑或與其他分子結合製備雙功能多肽來定向效應細胞，此時TCR優選為可溶形式。

【0089】 對於穩定性而言，現有技術中公開了在TCR的α與β鏈恆定域之間引入人工鏈間二硫鍵能夠獲得可溶且穩定的TCR分子，如專利文獻PCT/CN2015/093806中所述。因此，本發明TCR可以是在其α和β鏈恆定域的殘基之間引入人工鏈間二硫鍵的TCR。半胱

胺酸殘基在所述TCR的α和β鏈恆定域間形成人工鏈間二硫鍵。半胱胺酸殘基可以取代在天然TCR中合適位址的其他胺基酸殘基以形成人工鏈間二硫鍵。例如，取代TRAC*01外顯子1的Thr48和取代TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Ser57來形成二硫鍵。引入半胱胺酸殘基以形成二硫鍵的其他位址還可以是：TRAC*01外顯子1的Thr45和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Ser77；TRAC*01外顯子1的Tyr10和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Ser17；TRAC*01外顯子1的Thr45和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Asp59；TRAC*01外顯子1的Ser15和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Glu15；TRAC*01外顯子1的 Arg53和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Ser54；TRAC*01外顯子1的Pro89和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Ala19；或TRAC*01外顯子1的Tyr10和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的Glu20。即半胱胺酸殘基取代了上述α與β鏈恆定域中任一組位址。可在本發明TCR恆定域的一個或多個C末端截短最多15個、或最多10個、或最多8個或更少的胺基酸，以使其不包括半胱胺酸殘基來達到缺失天然鏈間二硫鍵的目的，也可透過將形成天然鏈間二硫鍵的半胱胺酸殘基突變為另一胺基酸來達到上述目的。

【0090】 如上所述，本發明的TCR可以包含在其α和β鏈恆定域的殘基間引入的人工鏈間二硫鍵。應注意，恆定域間含或不含上文

所述的引入的人工二硫鍵，本發明的TCR均可含有TRAC恆定域序列和TRBC1或TRBC2恆定域序列。TCR的TRAC恆定域序列和TRBC1或TRBC2恆定域序列可透過存在於TCR中的天然鏈間二硫鍵連接。

【0091】 另外，對於穩定性而言，專利文獻PCT/CN2016/077680還公開了在TCR的α鏈可變區與β鏈恆定區之間引入人工鏈間二硫鍵能夠使TCR的穩定性顯著提高。因此，本發明的高親和力TCR的α鏈可變區與β鏈恆定區之間還可以含有人工鏈間二硫鍵。具體地，在所述TCR的α鏈可變區與β鏈恆定區之間形成人工鏈間二硫鍵的半胱胺酸殘基取代了：TRAV的第46位胺基酸和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的第60位胺基酸；TRAV的第47位胺基酸和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的61位胺基酸；TRAV的第46位胺基酸和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的第61位胺基酸；或TRAV的第47位胺基酸和TRBC1*01或TRBC2*01外顯子1的第60位胺基酸。優選地，這樣的TCR可以包含(i)除其跨膜結構域以外的全部或部分TCRα鏈，和(ii)除其跨膜結構域以外的全部或部分TCRβ鏈，其中(i)和(ii)均包含TCR鏈的可變域和至少一部分恆定域，α鏈與β鏈形成異質二聚體。更優選地，這樣的TCR可以包含α鏈可變域和β鏈可變域以及除跨膜結構域以外的全部或部分β

鏈恆定域，但其不包含α鏈恆定域，所述TCR的α鏈可變域與β鏈形成異質二聚體。

【0092】　對於穩定性而言，另一方面，本發明TCR還包括在其疏水性區域發生突變的TCR，這些疏水性區域的突變優選為能夠使本發明TCR的穩定性提高的突變，如在公開號為WO2014/206304的專利文獻中所述。這樣的TCR可在其下列可變域疏水性位置發生突變：(α和/或β鏈)可變區胺基酸第11、13、19、21、53、76、89、91、94位和/或α鏈J基因(TRAJ)短鏈胜肽胺基酸位置倒數第3、5、7位和/或β鏈J基因(TRBJ)短鏈胜肽胺基酸位置倒數第2、4、6位，其中胺基酸序列的位置編號按國際免疫遺傳學資訊系統(IMGT)中列出的位置編號。熟悉本發明所屬技藝的人士知曉上述國際免疫遺傳學資訊系統，並可根據該資料庫得到不同TCR的胺基酸殘基在IMGT中的位置編號。

【0093】　更具體地，本發明中疏水性區域發生突變的TCR可以是由一柔性胜肽鏈連接TCR的α與β鏈的可變域而構成的高穩定性單鏈TCR。TCR可變區的CDR區決定了其與短鏈胜肽-HLA複合物之間的親和力，疏水性的突變能夠使TCR更加穩定，但並不會影響其與短鏈胜肽-HLA複合物之間的親和力。應注意，本發明中柔性胜肽鏈可以是任何適合連接TCRα與β鏈可變域的胜肽鏈。本發明實施例1中構建的用於篩選高親和性TCR的模板鏈即為上述含有疏水性

突變的高穩定性單鏈TCR。採用穩定性較高的TCR，能夠更方便的評估TCR與KASEKIFYV-HLA-A0201複合物之間的親和力。

【0094】 該單鏈模板TCR的α鏈可變域及β鏈可變域的CDR區與野生型TCR的CDR區完全相同。即α鏈可變域的3個CDR分別為CDR1α：TSESDYY，CDR2α：QEAYKQQN，CDR3α：AYRSGIIQGAQKLV和β鏈可變域的3個CDR分別為CDR1β：PRHDT，CDR2β：FYEKMQ，CDR3β：ASSSDRELLFYNEQF。該單鏈模板TCR的胺基酸序列(SEQ ID NO: 9)及核苷酸序列(SEQ ID NO: 10)分別如圖5a和圖5b所示。以此篩選出對KASEKIFYV-HLA A0201複合物具有高親和性的由α鏈可變域和β鏈可變域構成的單鏈TCR。

【0095】 本發明中單鏈模板TCRα鏈可變域SEQ ID NO: 3的3個CDR，即CDR1、CDR2和CDR3分別位於SEQ ID NO: 1的第27-33位、第51-58位和第93-106位。

【0096】 本發明中單鏈模板TCRβ鏈可變域SEQ ID NO: 4的3個CDR，即CDR1、CDR2和CDR3分別位於SEQ ID NO: 2的第27-31位、第49-54位和第92-106位。因此，胺基酸殘基編號採用SEQ ID NO: 4所示的編號，96D即為CDR3β的第5位D、98E即為CDR3β的第7位E、99L即為CDR3β的第8位L、100L即為CDR3β的第9位L、101F即為CDR11β的第10位F、102Y即為CDR3β的第

11位Y、103N即為CDR3β的第12位N、104E即為CDR3β的第13位E、105Q即為CDR3β的第14位Q和106F即為CDR3β的第15位F。

【0097】 本發明的對KASEKIFYV-HLA-A0201複合物具有高親和性的αβ異質二聚體的獲得是透過將篩選出的高親和性單鏈TCR的α與β鏈可變域的CDR區轉移到野生型TCRα鏈可變域(SEQ ID NO: 1)與β鏈可變域(SEQ ID NO: 2)的相應位置而得到。

【0098】 本發明的TCR也可以多價複合體的形式提供。本發明的多價TCR複合體包含兩個、三個、四個或更多個本發明TCR相結合而形成的多聚物，如可以用p53的四聚結構域來產生四聚體，或多個本發明TCR與另一分子結合而形成的複合物。本發明的TCR複合物可用於體外或體內追蹤或標靶呈現特定抗原的細胞，也可用於產生具有此類應用的其他多價TCR複合物的中間物。

【0099】 本發明的TCR可以單獨使用，也可與偶聯物以共價或其他方式結合，優選以共價方式結合。所述偶聯物包括可偵測標記物(為診斷目的，其中所述TCR用於偵測呈現KASEKIFYV-HLA-A0201複合物的細胞的存在)、治療劑、PK(蛋白激酶)修飾部分或任何以上這些物質的組合結合或偶聯。

【0100】 用於診斷目的的可偵測標記物包括但不限於：螢光或發光標記物、放射性標記物、MRI(磁共振成像)或CT(電子電腦X射線斷層掃描技術)造影劑、或能夠產生可偵測產物的酵素。

【0101】 可與本發明TCR結合或偶聯的治療劑包括但不限於：1.放射性核素[Koppe等，2005，癌轉移評論(Cancer metastasis reviews) 24，539]；2.生物毒[Chaudhary等，1989，自然(Nature) 339，394；Epel等，2002，癌症免疫學和免疫治療(Cancer Immunology and Immunotherapy) 51，565]；3.細胞因子，如IL-2等[Gillies等，1992，美國國家科學院院刊(PNAS)89，1428；Card等，2004，癌症免疫學和免疫治療(Cancer Immunology and Immunotherapy) 53，345；Halin等，2003，癌症研究(Cancer Research) 63，3202]；4.抗體Fc片段[Mosquera等，2005，免疫學雜誌(The Journal Of Immunology) 174，4381]；5.抗體scFv片段[Zhu等，1995，癌症國際期刊(International Journal of Cancer)62, 319]；6.金奈米顆粒/奈米棒[Lapotko等，2005，癌症通信(Cancer letters) 239，36；Huang等，2006，美國化學學會雜誌(Journal of the American Chemical Society) 128，2115]；7.病毒顆粒[Peng等，2004，基因治療(Gene therapy) 11，1234]；8.脂質體[Mamot等，2005，癌症研究(Cancer research) 65，11631]；9.奈米磁粒；10.前驅藥活化酶[例如，DT-心肌黃酶(DTD)或聯苯基水解酶-樣蛋白質(BPHL)]；11.化療劑(例如，順鉑)或任何形式的奈米顆粒等。

【0102】 與本發明TCR結合的抗體或其片段包括抗-T細胞或NK-細胞決定抗體，如抗-CD3或抗-CD28或抗-CD16抗體，上述抗體或其片段與TCR的結合能夠對效應細胞進行定向來更好地標靶標靶細胞。一個優選的實施方式是本發明TCR與抗-CD3抗體或所述抗-CD3抗體的功能片段或變體結合。具體地，本發明的TCR與抗CD3單鏈抗體的融合分子包括TCRα鏈可變域胺基酸序列：SEQ ID NO: 1和/或TCRβ鏈可變域胺基酸序列：SEQ ID NO: 13-24之一。

【0103】 本發明還涉及編碼本發明TCR的核酸分子。本發明的核酸分子可以是DNA形式或RNA形式。DNA可以是編碼鏈或非編碼鏈。例如，編碼本發明TCR的核酸序列可以與本發明附圖中所示的核酸序列相同或是簡併的變異體。舉例說明“簡併的變異體”的含義，如本文所用，“簡併的變異體”在本發明中是指編碼具有SEQ ID NO: 9的蛋白序列，但與SEQ ID NO: 10的序列有差別的核酸序列。

【0104】 本發明的核酸分子全長序列或其片段通常可以用但不限於PCR擴增法、重組法或人工合成的方法獲得。目前，已經可以完全透過化學合成來得到編碼本發明TCR (或其片段，或其衍生物)的DNA序列。然後可將該DNA序列引入本技藝中已知的各種現有的DNA分子(或如載體)和細胞中。

【0105】 本發明也涉及包含本發明的核酸分子的載體，以及用本發明的載體或編碼序列經基因工程產生的宿主細胞。

【0106】 本發明還包括表現本發明TCR的分離細胞，特別是T細胞。有許多方法適合於用編碼本發明的高親和力TCR的DNA或RNA進行T細胞轉染[如，Robbins等，(2008) J. Immunol. 180: 6116-6131]。表現本發明高親和性TCR的T細胞可以用於過繼免疫治療。熟悉本發明所屬技藝的人士能夠知曉進行過繼性治療的許多合適方法[如，Rosenberg等，(2008) Nat Rev Cancer 8(4)：299-308]。

【0107】 本發明還提供一種藥物組成物，所述藥物組成物含有藥學上可接受的載體以及本發明TCR、或本發明TCR複合物、或呈現本發明TCR的細胞。

【0108】 本發明還提供了一種治療疾病的方法，包括給需要治療的對象施用適量的本發明TCR、或本發明TCR複合物、或呈現本發明TCR的細胞、或本發明的藥物組成物。

【0109】 應理解，本文中胺基酸名稱採用國際通用的單英文字母標識，與其相對應的胺基酸名稱三英文字母簡寫分別是：Ala (A)、Arg (R)、Asn (N)、Asp (D)、Cys (C)、Gln (Q)、Glu (E)、Gly (G)、His (H)、Ile (I)、Leu (L)、Lys (K)、Met (M)、Phe (F)、Pro (P)、Ser (S)、Thr (T)、Trp (W)、Tyr (Y)、Val (V)；本發明中，Pro60或者60P均表示第60位脯胺酸。另外，本發明中所述突變的具體形式的表述方式如“D96V”代表第96位的D被V取

代，“E104L/V”代表第104位的E被L取代或被V取代。其他以此類推。

【0110】 在本技藝中，用性能相近或相似的胺基酸進行取代時，通常不會改變蛋白質的功能。在C末端和/或N末端添加一個或數個胺基酸通常也不會改變蛋白質的結構和功能。因此，本發明TCR還包括本發明TCR的至多5個，較佳地至多3個，更佳地至多2個，最佳地1個胺基酸(尤其是位於CDR區之外的胺基酸)，被性質相似或相近的胺基酸所替換，並仍能夠保持其功能性的TCR。

【0111】 本發明還包括對本發明TCR略作修飾後的TCR。修飾(通常不改變一級結構)形式包括：本發明TCR的化學衍生形式如乙醯化或羧基化。修飾還包括糖基化，如那些在本發明TCR的合成和加工中或進一步加工步驟中進行糖基化修飾而產生的TCR。這種修飾可以透過將TCR暴露於進行糖基化的酵素(如哺乳動物的糖基化酶或去糖基化酶)而完成。修飾形式還包括具有磷酸化胺基酸殘基(如磷酸酪胺酸，磷酸絲胺酸，磷酸蘇胺酸)的序列。還包括被修飾從而提高了其抗蛋白水解性能或優化了溶解性能的TCR。

【0112】 本發明的TCR、TCR複合物或本發明TCR轉染的T細胞可與藥學上可接受的載體一起在藥物組成物中提供。本發明的TCR、多價TCR複合物或細胞通常作為無菌藥物組成物的一部分提供，所述組成物通常包括藥學上可接受的載體。該藥物組成物可以

是任何合適的形式(取決於給予患者的所需方法)。其可採用單位劑型提供，通常在密封的容器中提供，可作為套組的一部分提供。此類套組(但非必需)包括使用說明書。其可包括多個所述單位劑型。

【0113】 此外，本發明的TCR可以單用，也可與其他治療劑結合或偶聯在一起使用(如配製在同一藥物組成物中)。

【0114】 藥物組成物還可含有藥學上可接受的載體。術語“藥學上可接受的載體”指用於治療劑給藥的載體。該術語指這樣一些藥劑載體：它們本身不誘導產生對接受該組成物的個體有害的抗體，且給藥後沒有過分的毒性。這些載體是熟悉本發明所屬技藝的人士所熟知的。在雷明頓藥物科學(Remington's Pharmaceutical Sciences, Mack Pub. Co., N.J. 1991)中可找到關於藥學上可接受的賦形劑的充分討論。這類載體包括(但並不限於)：鹽水、緩衝液、葡萄糖、水、甘油、乙醇、佐劑、及其組合。

【0115】 治療性組成物中藥學上可接受的載體可含有液體，如水、鹽水、甘油和乙醇。另外，這些載體中還可能存在輔助性的物質，如潤濕劑或乳化劑、pH緩衝物質等。

【0116】 通常，可將治療性組成物製成可注射劑，例如液體溶液或懸浮液；還可製成在注射前適合配入溶液或懸浮液中、液體載體的固體形式。

【0117】　一旦配成本發明的組成物，可將其透過常規途徑進行給藥，其中包括(但並不限於)：眼內、肌內、靜脈內、皮下、皮內、或局部給藥，優選為胃腸外包括皮下、肌肉內或靜脈內。待預防或治療的對象可以是動物；尤其是人。

【0118】　當本發明的藥物組成物被用於實際治療時，可根據使用情況而採用各種不同劑型的藥物組成物。較佳地，可以例舉的有針劑、口服劑等。

【0119】　這些藥物組成物可根據常規方法透過混合、稀釋或溶解而進行配製，並且偶爾添加合適的藥物添加劑，如賦形劑、崩解劑、粘合劑、潤滑劑、稀釋劑、緩衝劑、等滲劑(isotonicities)、防腐劑、潤濕劑、乳化劑、分散劑、穩定劑和助溶劑，而且該配製過程可根據劑型用慣常方式進行。

【0120】　本發明的藥物組成物還可以緩釋劑形式給藥。例如，本發明TCR可被摻入以緩釋聚合物為載體的藥丸或微囊中，然後將該藥丸或微囊透過手術植入待治療的組織。作為緩釋聚合物的例子，可例舉的有乙烯-乙烯基乙酸酯共聚物、聚羥基甲基丙烯酸酯(polyhydrometaacrylate)、聚丙烯醯胺、聚乙烯吡咯烷酮、甲基纖維素、乳酸聚合物、乳酸-乙醇酸共聚物等，較佳地可例舉的是可生物降解的聚合物如乳酸聚合物和乳酸-乙醇酸共聚物。

【0121】 當本發明的藥物組成物被用於實際治療時，作為活性成分的本發明TCR或TCR複合物或呈現本發明TCR的細胞，可根據待治療的每個病人的體重、年齡、性別、症狀程度而合理地加以確定，最終由醫師決定合理的用量。

本發明的主要優點在於：

(1)本發明的TCR對所述KASEKIFYV-HLA-A0201複合物的親和力和/或結合半衰期是野生型TCR的至少2倍，優選地，至少10倍。

(2)本發明的TCR對所述KASEKIFYV-HLA-A0201複合物的親和力和/或結合半衰期是野生型TCR的至少50倍，優選地，至少100倍，更優選地，可達300倍。

(3)針對標靶細胞，轉導本發明的高親和力TCR的效應細胞對標靶細胞有很強的活化功能。

【0122】 下面的具體實施例，進一步闡述本發明。應理解，這些實施例僅用於說明本發明而不用於限制本發明的範圍。下列實施例中未注明具體條件的實驗方法，通常按照常規條件，例如[Sambrook和Russell等人，分子選殖：實驗室手冊(Molecular Cloning-A Laboratory Manual)(第三版)(2001) CSHL出版社]中所述的條件，或按照製造廠商所建議的條件。除非另外說明，否則百分比和份數按重量計算。

實施例

材料和方法

【0123】 本發明實施例中所用的實驗材料如無特殊說明均可從市售管道獲得，其中，*E.coli* DH5α購自Tiangen、*E.coli* BL21(DE3)購自Tiangen、*E. coli* Tuner (DE3)購自Novagen、質體pET28a購自Novagen。

實施例1. 疏水性突變的穩定性單鏈TCR模板鏈的產生

【0124】 本發明利用定點突變的方法，根據專利文獻WO2014/206304中所述，構建了以一個柔性短鏈胜肽(linker)連接TCRα與β鏈可變域而構成的穩定性單鏈TCR分子，其胺基酸及DNA序列分別為SEQ ID NO: 9和SEQ ID NO: 10，如圖5a和圖5b所示。並以該單鏈TCR分子為模板進行高親和性TCR分子的篩選。該模板鏈的α可變域(SEQ ID NO: 3)及β可變域(SEQ ID NO: 4)的胺基酸序列如圖2a和圖2b所示；其對應的DNA序列分別為SEQ ID NO: 5和6，如圖3a和圖3b所示；柔性短鏈胜肽(linker)的胺基酸序列及DNA序列分別為SEQ ID NO: 7和8，如圖4a和圖4b所示。

【0125】 將攜帶模板鏈的目標基因經Nco I 和Not I 雙酶切，與經過Nco I 和Not I 雙酶切的pET28a載體連接。連接產物轉殖至*E.coli* DH5α，塗佈含卡那黴素的LB培養盤，37℃倒置培養過夜，

挑取陽性轉殖株進行PCR篩選，對陽性重組子進行定序，確定序列正確後萃取重組質體轉殖至*E.coli* BL21(DE3)，用於表現。

實施例2. 實施例1中構建的穩定性單鏈TCR的表現、復性和純化

【0126】 將實施例1中製備的含有重組質體pET28a-模板鏈的BL21(DE 3)菌落全部接種於含有卡那黴素的LB培養基中，37℃培養至OD_{600}為0.6-0.8，加入IPTG至終濃度為0.5 mM，37℃繼續培養4 h。5000 rpm 離心15 min收取細胞沉澱物，用Bugbuster Master Mix (Merck)裂解細胞沉澱物，6000 rpm離心15 min回收包涵體，再用Bugbuster (Merck)進行洗滌以除去細胞碎片和膜組分，6000 rpm 離心15 min，收集包涵體。將包涵體溶解在緩衝液(20 mM Tris-HCl pH 8.0，8 M尿素)中，高速離心去除不溶物，上清液用BCA法定量後進行分裝，於-80℃保存備用。

【0127】 向5 mg溶解的單鏈TCR包涵體蛋白中，加入2.5 mL緩衝液(6 M Gua-HCl, 50 mM Tris-HCl pH 8.1, 100 mM NaCl, 10 mM EDTA)，再加入DTT至終濃度為10 mM，37℃處理30 min。用注射器向125 mL復性緩衝液(100 mM Tris-HCl pH 8.1，0.4 M L-精胺酸，5 M尿素，2 mM EDTA，6.5 mM β-mercapthoethylamine，1.87 mM Cystamine)中滴加上述處理後的單鏈TCR，4℃攪拌10 min，然後將復性液裝入截留量為4 kDa的纖維素膜透析袋，透析袋置於1 L預冷的水中，4℃緩慢攪拌過夜。

17小時後，將透析液換成1L預冷的緩衝液(20 mM Tris-HCl pH 8.0)，4℃繼續透析8 h，然後將透析液換成相同的新鮮緩衝液繼續透析過夜。17小時後，樣品經0.45 μm濾膜過濾，真空脫氣後透過陰離子交換管柱(HiTrap Q HP, GE Healthcare)，用20 mM Tris-HCl pH 8.0配製的0-1M NaCl線性梯度洗提液純化蛋白，收集的洗提組分進行SDS-PAGE分析，包含單鏈TCR的組分濃縮後進一步用凝膠過濾柱(Superdex 75 10/300, GE Healthcare)進行純化，目標群組分也進行SDS-PAGE分析。

【0128】 用於BIAcore分析的洗提組分進一步採用凝膠過濾法測試其純度。條件為：層析管柱Agilent Bio SEC-3(300 A, φ7.8×300 mm)，流動相為150 mM磷酸鹽緩衝液，流速0.5 mL/min，柱溫25℃，紫外偵測波長214 nm。

實施例3. 結合表徵

【0129】 BIAcore分析

【0130】 使用BIAcore T200即時分析系統偵測TCR分子與KASEKIFYV-HLA-A0201複合物的結合活性。將抗鏈黴親和素的抗體(GenScript)加入偶聯緩衝液(10 mM醋酸鈉緩衝液，pH 4.77)，然後將抗體流過預先用EDC和NHS活化過的CM5晶片，使抗體固定在晶片表面，最後用乙醇胺的鹽酸溶液封阻未反應的活化

表面，完成偶聯過程，偶聯位準約為15,000 RU。條件為：溫度25℃，PH值為7.1-7.5。

【0131】 使低濃度的鏈黴親和素流過已塗佈抗體的晶片表面，然後將KASEKIFYV-HLA-A0201複合物流過偵測通道，另一通道作為參考通道，再將0.05 mM的生物素以10 μL/min的流速流過晶片2 min，封阻鏈黴親和素剩餘的結合位址。採用單迴圈動力學分析方法測定其親和力，將TCR用HEPES-EP緩衝液(10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA, 0.005% P20. pH 7.4)稀釋成幾個不同的濃度，以30 μL/min的流速，依次流過晶片表面，每次進樣的結合時間為120 s，最後一次進樣結束後讓其解離600 s。每一輪測定結束後用pH 1.75 的10 mM Gly-HCl再生晶片。利用BIAcore Evaluation軟體計算動力學參數。

【0132】 上述KASEKIFYV-HLA-A0201複合物的製備過程如下：

a.純化

收集100 ml誘導表現重鏈或輕鏈的E. coli菌液，於4℃ 8000 g離心10 min後用10 ml PBS洗滌菌體一次，之後用5 ml BugBuster Master Mix Extraction Reagents (Merck)劇烈震盪重新懸浮菌體，並於室溫旋轉培育20 min，之後於4℃，6000 g 離心15 min，棄去上澄液，收集包涵體。

將上述包涵體重新懸浮於5 ml BugBuster Master Mix中，室溫旋轉培育5 min；加30 ml稀釋10倍的BugBuster，混勻，4℃ 6000 g離心15 min；棄去上澄液，加30 ml稀釋10倍的BugBuster重新懸浮包涵體，混勻，4℃ 6000 g離心15 min，重複兩次，加30 ml 20 mM Tris-HCl pH 8.0重新懸浮包涵體，混勻，4℃ 6000 g離心15 min，最後用20 mM Tris-HCl 8M尿素溶解包涵體，SDS-PAGE偵測包涵體純度，BCA套組測濃度。

b.復性

將合成的短鏈胜肽KASEKIFYV (北京賽百盛基因技術有限公司)溶解於DMSO至20 mg/ml的濃度。輕鏈和重鏈的包涵體用8 M尿素、20 mM Tris pH 8.0、10 mM DTT來溶解，復性前加入3 M鹽酸胍、10 mM醋酸鈉、10 mM EDTA進一步變性。將KASEKIFYV胜肽以25 mg/L(終濃度)加入復性緩衝液(0.4 M L-精胺酸、100 mM Tris pH 8.3、2 mM EDTA、0.5 mM氧化性穀胱甘胜肽、5 mM還原型穀胱甘胜肽、0.2 mM PMSF，冷卻至4℃)，然後依次加入20 mg/L的輕鏈和90 mg/L的重鏈(終濃度，重鏈分三次加入，8 h/次)，復性在4℃進行至少3天至完成，SDS-PAGE偵測能否復性成功。

c.復性後純化

用10體積的20 mM Tris pH 8.0作透析來更換復性緩衝液，至少更換緩衝液兩次來充分降低溶液的離子強度。透析後用0.45 μm

醋酸纖維素濾膜過濾蛋白質溶液，然後加載到HiTrap Q HP (GE通用電氣公司)陰離子交換管柱上(5 ml床體積)。利用Akta純化儀(GE通用電氣公司)，20 mM Tris pH 8.0配製的0-400 mM NaCl線性梯度液洗提蛋白，pMHC約在250 mM NaCl處洗提，收集諸峰組分，SDS-PAGE偵測純度。

d.生物素化

用Millipore超濾管將純化的pMHC分子濃縮，同時將緩衝液置換為20 mM Tris pH 8.0，然後加入生物素化試劑0.05 M Bicine pH 8.3、10 mM ATP、10 mM MgOAc、50 μM D-Biotin、100 μg/ml BirA酶(GST-BirA)，室溫培育混合物過夜，SDS-PAGE偵測生物素化是否完全。

e.純化生物素化後的複合物

用Millipore超濾管將生物素化標記後的pMHC分子濃縮至1 ml，採用凝膠過濾層析純化生物素化的pMHC，利用Akta純化儀(GE通用電氣公司)，用過濾過的PBS預平衡HiPrep™ 16/60 S200 HR柱(GE通用電氣公司)，加載1 ml濃縮過的生物素化pMHC分子，然後用PBS以1 ml/min流速洗提。生物素化的pMHC分子在約55 ml時作為單峰洗提出現。合併含有蛋白質的組分，用Millipore超濾管濃縮，BCA法(Thermo)測定蛋白質濃度，加入蛋白酶抑制劑cocktail (Roche)將生物素化的pMHC分子分裝保存在-80℃。

實施例4. 高親和力TCR的產生

【0133】 噬菌體展示技術是產生TCR高親和力變體基因庫以篩選高親和力變體的一種手段。將Li等[(2005) Nature Biotech 23(3): 349-354]描述的TCR噬菌體展示和篩選方法應用於實施例1中的單鏈TCR模板。透過突變該模板鏈的CDR區來建立高親和性TCR的基因庫並進行淘選。經過幾輪淘選後的噬菌體基因庫均和相應抗原有專一性結合，從中挑取單轉殖株，並進行序列分析。

【0134】 將篩選到的高親和力的單鏈TCR的CDR區突變引入到αβ異質二聚TCR的可變域的相應位址中，並透過BIAcore來偵測其與KASEKIFYV-HLA-A0201複合物的親和力。上述CDR區高親和力突變點的引入採用熟悉本發明所屬技藝的人士熟知的定點突變的方法。上述野生型TCR的α鏈與β鏈可變域胺基酸序列分別如圖1a (SEQ ID NO: 1)和1b (SEQ ID NO: 2)所示。

【0135】 應注意，為獲得更加穩定的可溶性TCR，以便更方便地評估TCR與KASEKIFYV-HLA A0201複合物之間的結合親和力和/或結合半衰期，αβ異質二聚TCR可以是在α和β鏈的恆定區中分別引入了一個半胱胺酸殘基以形成人工鏈間二硫鍵的TCR，本實施例中引入半胱胺酸殘基後TCRα與β鏈的胺基酸序列分別如圖6a (SEQ ID NO: 11)和6b所示(SEQ ID NO: 12)，引入的半胱胺酸殘基以加粗字母表示。

【0136】 透過«分子選殖實驗室手冊»(Molecular Cloning a Laboratory Manual)(第三版，Sambrook和Russell)中描述的標準方法將待表現的TCRα和β鏈的胞外序列基因經合成後分別插入到表現載體pET28a+(Novagene)，上下游的轉殖位址分別是NcoI和NotI。CDR區的突變透過熟悉本發明所屬技藝的人士熟知的重疊PCR (overlap PCR)引入。插入片段經過定序確認無誤。

實施例5. 高親和力TCR的表現、復性和純化

【0137】 將TCR α和β鏈的表現載體分別透過化學轉殖法轉殖進入表現細菌BL21(DE3)，細菌用LB培養液生長，於OD_{600} = 0.6時用終濃度0.5 mM IPTG誘導，TCR的α和β鏈表現後形成的包涵體透過BugBuster Mix (Novagene)進行萃取，並且經BugBuster溶液反復多次洗滌，包涵體最後溶解於6 M鹽酸胍、10 mM二硫蘇糖醇(DTT)、10 mM乙二胺四乙酸(EDTA)、20 mM Tris (pH 8.1)中。

【0138】 溶解後的TCR α和β鏈以1：1的質量比快速混合於5 M尿素、0.4 M精胺酸、20 mM Tris (pH 8.1)、3.7 mM cystamine、6.6 mM β-mercapoethylamine (4℃)中，終濃度為60 mg/mL。混合後將溶液置於10倍體積的去離子水中透析(4℃)，12小時後將去離子水換成緩衝液(20 mM Tris，pH 8.0)繼續於4℃透析12小時。透析完成後的溶液經0.45 μM的濾膜過濾後，透過陰離子交換

管柱(HiTrap Q HP, 5 ml, GE Healthcare)純化。洗提峰含有復性成功的α和β二聚體的TCR透過SDS-PAGE膠確認。TCR隨後透過凝膠過濾層析(HiPrep 16/60, Sephacryl S-100 HR, GE Healthcare)進一步純化。純化後的TCR純度經過SDS-PAGE測定大於90%，濃度由BCA法確定。

實施例6. BIAcore分析結果

【0139】 採用實施例3中所述方法偵測引入高親和力CDR區的αβ異質二聚TCR與KASEKIFYV-HLA-A0201複合物的親和力。

【0140】 本發明得到高親和力TCRβ鏈可變域胺基酸序列，如圖7(1)-圖7(12)所示。由於TCR分子的CDR區決定了其與相應的pMHC複合物的親和力，所以熟悉本發明所屬技藝的人士能夠預料引入高親和力突變點的αβ異質二聚TCR也具有對KASEKIFYV-HLA-A0201複合物的高親和力。利用實施例4中所述方法構建表現載體，利用實施例5中所述方法對上述引入高親和力突變的αβ異質二聚TCR進行表現、復性和純化，然後利用BIAcore T200測定其與KASEKIFYV-HLA-A0201複合物的親和力，如下表2所示。

表2

TCR 編號	TCR 可變域 (SEQ ID NO)		KD(M)
	α	β	
1	1	13	3.00E-05
2	1	14	4.91E-06
3	1	15	1.67E-05
4	1	16	2.58E-05
5	1	17	1.39E-05
6	1	18	2.06E-05
7	1	19	3.71E-06
8	1	20	6.49E-06
9	1	21	3.73E-06
10	1	22	1.69E-05
11	1	23	2.78E-05
12	1	24	3.93E-05

【0141】 由表2可知，本發明得到的高親和力TCR的親和力是野生型TCR對KASEKIFYV-HLA-A0201複合物的親和力的至少2倍。

實施例7. 抗-CD3抗體與高親和性αβ異質二聚TCR的融合體的表現、復性和純化

【0142】 將抗-CD3的單鏈抗體(scFv)與αβ異質二聚TCR融合，製備融合分子。抗-CD3的scFv與TCR的β鏈融合，該TCRβ鏈可以包含任一上述高親和性αβ異質二聚TCR的β鏈可變域，融合分子的TCRα鏈可以包含任一上述高親和性αβ異質二聚TCR的α鏈可變域。

融合分子表現載體的構建

1. α鏈表現載體的構建

【0143】 將攜帶αβ異質二聚TCR的α鏈的目標基因經Nco I 和Not I 雙酶切，與經過Nco I 和Not I 雙酶切的pET28a載體連接。連接產物轉殖至E.coli DH5α，塗佈於含卡那黴素的LB培養盤，37℃倒置培養過夜，挑取陽性轉殖株進行PCR篩選，對陽性重組子進行定序，確定序列正確後萃取重組質體轉殖至E.coli Tuner (DE3)，用於表現。

2. 抗-CD3(scFv)-β鏈表現載體的構建

【0144】 透過重疊(overlap)PCR的方法，設計引子將抗-CD3 scFv和高親和性異質二聚TCRβ鏈基因連接起來，中間的連接短鏈胜肽(linker)為GGGGS，並且使抗-CD3的scFv與高親和性異質二聚TCRβ鏈的融合蛋白的基因片段帶上限制性內切酶位址Nco I (CCATGG)和Not I (GCGGCCGC)。將PCR擴增產物經Nco I 和Not I 雙酶切，與經過Nco I 和Not I 雙酶切的pET28a載體連接。連接產物轉殖至E.coli DH5α勝任細胞，塗佈含卡那黴素的LB培養盤，37℃倒置培養過夜，挑取陽性轉殖株進行PCR篩選，對陽性重組子進行定序，確定序列正確後萃取重組質體轉殖至E.coli Tuner (DE3)勝任細胞，用於表現。

融合蛋白的表現、復性及純化

【0145】 將表現質體分別轉殖進入E. coli Tuner (DE3)勝任細胞，塗佈LB培養盤(卡那黴素50 μg/mL)置於37℃培養過夜。次日，挑轉殖株接種至10 mL LB液體培養基(卡那黴素50 μg/mL)培養2-3 h，按體積比1:100接種至1L LB培養基中，繼續培養至OD600為0.5-0.8，加入終濃度為1mM IPTG誘導目標蛋白的表現。誘導4小時以後，以6000 rpm離心10 min收取細胞。PBS緩衝液洗滌菌體一次，並且分裝菌體，取相當於200mL的細菌培養物的菌體用5mL BugBuster Master Mix (Merck)裂解細菌，以6000 g離心15 min收集包涵體。然後進行4次洗滌劑洗滌以去除細胞碎片和膜組分。然後，用緩衝液如PBS洗滌包涵體以除去洗滌劑和鹽。最終，將包涵體用含6M鹽酸胍、10 mM二硫蘇糖醇(DTT)、10 mM乙二胺四乙酸(EDTA)、20 mM Tris、pH 8.1緩衝溶液溶解，並測定包涵體濃度，將其分裝後置於-80℃冷凍保存。

【0146】 溶解後的TCRα鏈和抗-CD3 (scFv)-β鏈以2：5的質量比快速混合於5 M尿素(urea)、0.4 M L-精胺酸(L-arginine)、20 mM Tris pH 8.1、3.7 mM cystamine、6.6 mM β-mercapoethylamine (4℃)，終濃度α鏈和抗-CD3 (scFv)-β鏈分別為0.1 mg/mL、0.25 mg/mL。

【0147】 混合後將溶液置於10倍體積的去離子水中透析(4℃)，12小時後將去離子水換成緩衝液(10 mM Tris，pH 8.0)繼續

於4℃透析12小時。透析完成後的溶液經0.45 μM的濾膜過濾後，透過陰離子交換管柱(HiTrap Q HP 5ml，GE healthcare)純化。洗提峰含有復性成功的TCRα鏈與抗-CD3 (scFv)-β鏈二聚體的TCR透過SDS-PAGE膠確認。TCR融合分子隨後透過尺寸排阻層析法(S-100 16/60, GE healthcare)進一步純化，以及陰離子交換管柱(HiTrap Q HP 5ml，GE healthcare)再次純化。純化後的TCR融合分子純度經過SDS-PAGE測定大於90%，濃度由BCA法測定。

實施例8. 轉染本發明高親和力TCR的效應細胞的活化功能實驗

【0148】 本實施例驗證了轉染本發明高親和力TCR的效應細胞對標靶細胞有很好的專一性活化作用。透過ELISPOT實驗偵測本發明高親和力TCR在細胞中的功能及專一性。

【0149】 熟悉本發明所屬技藝的人士熟知利用ELISPOT實驗偵測細胞功能的方法。隨機選擇本發明TCR轉染從健康志願者的血液中分離到的CD3+T細胞，作為效應細胞。所述TCR以及其編號從表2獲悉，分別為TCR5 (α鏈可變域SEQ ID NO: 1，β鏈可變域SEQ ID NO: 17)、TCR6 (α鏈可變域SEQ ID NO: 1，β鏈可變域SEQ ID NO: 18)、TCR7 (α鏈可變域SEQ ID NO: 1，β鏈可變域SEQ ID NO: 19)、TCR1 (α鏈可變域SEQ ID NO: 1，β鏈可變域SEQ ID NO: 13)、TCR9 (α鏈可變域SEQ ID NO: 1，β鏈可變域SEQ ID NO: 21)、TCR10 (α鏈可變域SEQ ID NO: 1，β鏈可變域SEQ ID NO:

22)、TCR2 (α鏈可變域SEQ ID NO: 1，β鏈可變域SEQ ID NO: 14)和TCR8 (α鏈可變域SEQ ID NO: 1，β鏈可變域SEQ ID NO: 20)，對照組效應細胞標號為野生型TCR(轉染野生型TCR的細胞)和A6(轉染其他TCR的細胞)。標靶細胞株為K562-A2 (A2過度表現)、SW620-SSX2 (SSX2過度表現)和K562-A11 (A11過度表現)細胞。其中，標靶細胞株K562-A2和SW620-SSX2作為陽性腫瘤細胞株；K562-A11為陰性腫瘤細胞株，作為對照。

【0150】 首先準備ELISPOT培養盤。ELISPOT培養盤乙醇活化塗佈，4℃過夜。實驗第1天，去掉塗覆液，洗滌封阻，室溫下培育兩個小時，去除封阻液，將試驗的各個組分加入ELISPOT培養盤：標靶細胞為2×10^4個/孔，效應細胞為10^3個/孔(按轉染的陽性率計算)，並設置兩個複孔。恆溫培育過夜(37℃，5% CO_2)。實驗第2天，洗滌培養盤並進行二級偵測和顯色，乾燥培養盤，再利用免疫斑點培養盤讀取儀(ELISPOT READER system; AID20公司)計數膜上形成的斑點。

【0151】 實驗結果如圖11所示，針對陽性標靶細胞株，轉染本發明高親和力TCR的效應細胞產生了很好的專一性活化作用，功能要遠遠好於轉染野生型TCR的效應細胞；而轉導其他TCR的細胞基本沒有產生活化作用。

【0152】 在本發明提及的所有文獻都在本申請中引用作為參考，就如同每一篇文獻被單獨引用作為參考那樣。此外應理解，在閱讀了本發明的上述講授內容之後，熟悉本發明所屬技藝的人士可以對本發明作各種改動或修改，這些等價形式同樣落於本申請所附申請專利範圍所限定的範圍。

【序列表】

<110> 廣東香雪精準醫療技術有限公司

<120> 一種識別SSX2的高親和力T細胞受體

<160> 28

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 1

Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser Val Gln Glu Ala
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Glu Ser Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser Leu Lys Ile Ser
65 70 75 80

Asp Ser Gln Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Ala Tyr Arg Ser

85 90 95

Gly Ile Ile Gln Gly Ala Gln Lys Leu Val Phe Gly Gln Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Ile Asn Pro

115

<210> 2

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 2

Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg

1 5 10 15

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Phe Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Leu

115

<210> 3

<211> 117

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 3

Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Leu Ser Val Gln Glu Gly

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Glu Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln Pro Ile Leu Val

35 40 45

Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr Glu Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser Leu Lys Ile Ser

65 70 75 80

Asp Val Gln Pro Gly Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Ala Tyr Arg Ser

85 90 95

Gly Ile Ile Gln Gly Ala Gln Lys Leu Val Phe Gly Gln Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Ile Asn Pro

115

<210> 4

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 4

Ala Ala Gly Val Thr Gln Ser Pro Arg His Leu Ser Val Glu Lys Gly

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Leu Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Ile Ser Ser

65 70 75 80

Val Glu Pro Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Phe Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Asp

115

<210> 5

<211> 351

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 多核苷酸

<400> 5

gctcaaactg ttactcagag ccaaccggag ctgagcgtgc aagagggtga aaccgttacc 60

atcagctgca cctacgacac cagcgaaagc gattactacc tgttctggta taagcagccg 120

ccgagccgtc aaccgatcct ggttattcgt caggaagcgt acaaacagca aaacgcgacc 180

gaaaaccgtt tcagcgtgaa ctttcagaag gcggcgaaaa gcttcagcct gaagatcagc 240

gacgttcaac cgggcgatgc ggcgatgtac ttttgcgcgt atcgtagcgg tatcattcag 300

ggcgcgcaaa aactggtgtt cggtcagggc acccgtctga ccattaaccc g 351

<210> 6

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 多核苷酸

<400> 6

gcggcgggcg tgacccaaag cccgcgtcac ctgagcgtgg agaagggtga aaccgttacc 60

ctgaaatgct atccgatccc gcgtcacgac accgtttact ggtatcagca aggtccgggc 120

caggatctgc aattcctgat cagcttttac gagaagatgc agagcgacaa aggtagcatt 180

ccggatcgtt tcagcgcgca gcaatttagc gactatcaca gcgagctgaa cattagcagc 240

gtggaaccgg gtgacagcgc gctgtacttc tgcgcgagca gcagcgatcg tgagctgctg 300

ttttataacg aacagttctt tggtccgggc acccgtctga ccgttgat 348

<210> 7

<211> 24

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> GGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGTG

<400> 7

Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly

1 5 10 15

Gly Gly Ser Glu Gly Gly Thr Gly

20

<210> 8

<211> 72

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 多核苷酸

<400> 8

ggtggcggta gcgagggcgg tggcagcgaa ggtggcggta gcgagggcgg tggcagcgaa 60

ggtggcaccg gt 72

<210> 9

<211> 257

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 9

Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Leu Ser Val Gln Glu Gly

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Ile Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Glu Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln Pro Ile Leu Val

35 40 45

Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr Glu Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser Leu Lys Ile Ser
65 70 75 80
Asp Val Gln Pro Gly Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Ala Tyr Arg Ser
85 90 95
Gly Ile Ile Gln Gly Ala Gln Lys Leu Val Phe Gly Gln Gly Thr Arg
100 105 110
Leu Thr Ile Asn Pro Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly
115 120 125
Gly Gly Ser Glu Gly Gly Gly Ser Glu Gly Gly Thr Gly Ala Ala Gly
130 135 140
Val Thr Gln Ser Pro Arg His Leu Ser Val Glu Lys Gly Glu Thr Val
145 150 155 160
Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val Tyr Trp Tyr
165 170 175
Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Leu Gln Phe Leu Ile Ser Phe Tyr Glu
180 185 190
Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe Ser Ala Gln
195 200 205
Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Ile Ser Ser Val Glu Pro
210 215 220
Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp Arg Glu Leu
225 230 235 240
Leu Phe Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val
245 250 255

Asp

<210> 10

<211> 771

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 多核苷酸

<400> 10

gctcaaactg ttactcagag ccaaccggag ctgagcgtgc aagagggtga aaccgttacc 60

atcagctgca cctacgacac cagcgaaagc gattactacc tgttctggta taagcagccg 120

ccgagccgtc aaccgatcct ggttattcgt caggaagcgt acaaacagca aaacgcgacc 180

gaaaaccgtt tcagcgtgaa ctttcagaag gcggcgaaaa gcttcagcct gaagatcagc 240

gacgttcaac cgggcgatgc ggcgatgtac ttttgcgcgt atcgtagcgg tatcattcag 300

ggcgcgcaaa aactggtgtt cggtcagggc acccgtctga ccattaaccc gggtggcggt 360

agcgagggcg gtggcagcga aggtggcggt agcgagggcg gtggcagcga aggtggcacc 420

ggtgcggcgg gcgtgaccca aagcccgcgt cacctgagcg tggagaaggg tgaaaccgtt 480

accctgaaat gctatccgat cccgcgtcac gacaccgttt actggtatca gcaaggtccg 540

ggccaggatc tgcaattcct gatcagcttt tacgagaaga tgcagagcga caaaggtagc 600

attccggatc gtttcagcgc gcagcaattt agcgactatc acagcgagct gaacattagc 660

agcgtggaac cgggtgacag cgcgctgtac ttctgcgcga gcagcagcga tcgtgagctg 720

ctgttttata acgaacagtt ctttggtccg ggcacccgtc tgaccgttga t 771

<210> 11

<211> 211

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 11

Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser Val Gln Glu Ala
1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Glu Ser Asp Tyr
20 25 30

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

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

Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser Leu Lys Ile Ser
65 70 75 80

Asp Ser Gln Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Ala Tyr Arg Ser
85 90 95

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

Leu Thr Ile Asn Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln
115 120 125

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
130 135 140

Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
145 150 155 160

Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
165 170 175

Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
180 185 190

Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro
195 200 205

Glu Ser Ser
210

<210> 12

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 12

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

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser
35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe
50 55 60
Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser
65 70 75 80
Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp
85 90 95
Arg Glu Leu Leu Phe Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg
100 105 110
Leu Thr Val Leu 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 Cys Thr Asp Pro
165 170 175
Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu
180 185 190
Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp 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

245

<210> 13

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 13

Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg

1 5 10 15

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Arg Ile Pro Pro Tyr Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Leu

115

<210> 14

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 14

Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg

1 5 10 15

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Val

85 90 95

Arg Glu Leu Asn Tyr Val Asp Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Leu

115

<210> 15

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 15

Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg

1 5 10 15

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Arg Glu Leu Asn Asp Ala Pro Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Leu

115

<210> 16

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 16

Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg

1 5 10 15

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Arg Glu Leu Val Phe Asn Pro Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Leu

115

<210> 17

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 17

Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg

1 5 10 15

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Asp Ala Pro Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Leu

115

<210> 18

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 18

Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg

1 5 10 15

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Phe Pro Asp Leu Thr Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Leu

115

<210> 19

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 19

Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg

1 5 10 15

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Arg Glu Leu Ile His Pro Glu Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Leu

115

<210> 20

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 20

Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg

1 5 10 15

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Phe Tyr Ala Val Pro His Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Leu

115

<210> 21

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 21

Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg

1 5 10 15

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Asn Pro Glu Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Leu

115

<210> 22

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 22

Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg

1 5 10 15

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Arg Glu Leu Glu His Pro Glu Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Leu

115

<210> 23

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 23

Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg

1 5 10 15

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Arg Glu Leu Pro Phe Val Pro Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Leu

115

<210> 24

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 24

Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg

1 5 10 15

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Arg Glu Leu Val Phe Lys Pro Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Leu

115

<210> 25

<211> 211

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 25

Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser Val Gln Glu Ala

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Glu Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln Met Ile Leu Val

35 40 45

Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr Glu Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser Leu Lys Ile Ser

65 70 75 80

Asp Ser Gln Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Ala Tyr Arg Ser

85 90 95

Gly Ile Ile Gln Gly Ala Gln Lys Leu Val Phe Gly Gln Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Ile Asn Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln
115 120 125
Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
130 135 140
Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
145 150 155 160
Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
165 170 175
Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
180 185 190
Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro
195 200 205
Glu Ser Ser
210

<210> 26

<211> 246

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 26

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

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Phe Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Leu 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

245

<210> 27

<211> 258

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 27

Ala Gln Thr Val Thr Gln Ser Gln Pro Glu Met Ser Val Gln Glu Ala

1 5 10 15

Glu Thr Val Thr Leu Ser Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Glu Ser Asp Tyr

20 25 30

Tyr Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Pro Ser Arg Gln Met Ile Leu Val

35 40 45

Ile Arg Gln Glu Ala Tyr Lys Gln Gln Asn Ala Thr Glu Asn Arg Phe

50 55 60

Ser Val Asn Phe Gln Lys Ala Ala Lys Ser Phe Ser Leu Lys Ile Ser

65 70 75 80

Asp Ser Gln Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Phe Cys Ala Tyr Arg Ser
85 90 95

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

Leu Thr Ile Asn Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln
115 120 125

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
130 135 140

Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
145 150 155 160

Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
165 170 175

Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
180 185 190

Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro
195 200 205

Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
210 215 220

Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu
225 230 235 240

Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp
245 250 255

Ser Ser

<210> 28

<211> 295

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 多肽

<400> 28

Ala Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Leu Ile Lys Glu Lys Arg

1 5 10 15

Glu Thr Ala Thr Leu Lys Cys Tyr Pro Ile Pro Arg His Asp Thr Val

20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Gly Pro Gly Gln Asp Pro Gln Phe Leu Ile Ser

35 40 45

Phe Tyr Glu Lys Met Gln Ser Asp Lys Gly Ser Ile Pro Asp Arg Phe

50 55 60

Ser Ala Gln Gln Phe Ser Asp Tyr His Ser Glu Leu Asn Met Ser Ser

65 70 75 80

Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Ser Asp

85 90 95

Arg Glu Leu Leu Phe Tyr Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg

100 105 110

Leu Thr Val Leu 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

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種T細胞受體(TCR)，其特徵在於，其具有結合KASEKIFYV-HLA A0201複合物的活性，並且所述TCR的α鏈可變域包含與SEQ ID NO: 1所示的胺基酸序列有至少90%的序列同源性的胺基酸序列；和/或所述TCR的β鏈可變域包含與SEQ ID NO: 2所示的胺基酸序列有至少90%的序列同源性的胺基酸序列。

【請求項2】 一種多價TCR複合物，其特徵在於，包含至少兩個TCR分子，並且其中的至少一個TCR分子為請求項1所述的TCR。

【請求項3】 一種核酸分子，其特徵在於，所述核酸分子包含編碼請求項1所述的TCR的核酸序列或其互補序列。

【請求項4】 一種載體，其特徵在於，所述的載體含有請求項3所述的核酸分子。

【請求項5】 一種宿主細胞，其特徵在於，所述的宿主細胞中含有請求項4所述的載體或染色體中整合有外源的請求項3所述的核酸分子。

【請求項6】 一種分離的細胞，其特徵在於，所述細胞表現請求項1所述的TCR；優選地，所述細胞為T細胞。

【請求項7】 一種藥物組成物，其特徵在於，所述組成物含有藥學上可接受的載體以及請求項1所述的TCR、或請求項2所述的TCR複合物、或請求項6中所述的細胞。

【請求項8】 請求項1所述的T細胞受體、請求項2所述的TCR複合物或請求項6所述細胞的用途，其特徵在於，用於製備治療腫瘤的藥物；優選地，所述腫瘤為SSX2陽性腫瘤。

【請求項9】 請求項1所述的T細胞受體、請求項2所述的TCR複合物或請求項6所述的細胞，用作治療腫瘤的藥物；優選地，所述腫瘤為SSX2陽性腫瘤。

【請求項10】 一種製備請求項1所述的T細胞受體的方法，其特徵在於，包括步驟：

(i)培養請求項5中所述的宿主細胞，從而表現請求項1所述的T細胞受體；

(ii)分離或純化出所述的 T 細胞受體。

【發明圖式】

AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQ
KAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCAYRSGIIQGAQKLVFGQGTRLTINP（SEQ ID NO:1）

圖 1a

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSDRELLFYNEQFFGPGTRLTVL（SEQ ID NO:2）

圖 1b

AQTVTQSQPELSVQEGETVTISCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQPILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQ
KAAKSFSLKISDVQPGDAAMYFCAYRSGIIQGAQKLVFGQGTRLTINP（SEQ ID NO:3）

圖 2a

AAGVTQSPRHLSVEKGETVTLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDLQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNISSVEPGDSALYFCASSSDRELLFYNEQFFGPGTRLTVD（SEQ ID NO:4）

圖 2b

GCTCAAACTGTTACTCAGAGCCAACCGGAGCTGAGCGTGCAAGAGGGTGAAACCGTTACCATCAGCTGC
ACCTACGACACCAGCGAAAGCGATTACTACCTGTTCTGGTATAAGCAGCCGCCGAGCCGTCAACCGATC
CTGGTTATTCGTCAGGAAGCGTACAAACAGCAAAACGCGACCGAAAACCGTTTCAGCGTGAACTTTCAG
AAGGCGGCGAAAAGCTTCAGCCTGAAGATCAGCGACGTTCAACCGGGCGATGCGGCGATGTACTTTTGC
GCGTATCGTAGCGGTATCATTCAGGGCGCGCAAAAACTGGTGTTCGGTCAGGGCACCCGTCTGACCATT
AACCCG（SEQ ID NO:5）

圖 3a

GCGGCGGGCGTGACCCAAAGCCCGCGTCACCTGAGCGTGGAGAAGGGTGAAACCGTTACCCTGAAATGC
TATCCGATCCCGCGTCACGACACCGTTTACTGGTATCAGCAAGGTCCGGGCCAGGATCTGCAATTCCTG
ATCAGCTTTTACGAGAAGATGCAGAGCGACAAAGGTAGCATTCCGGATCGTTTCAGCGCGCAGCAATTT
AGCGACTATCACAGCGAGCTGAACATTAGCAGCGTGGAACCGGGTGACAGCGCGCTGTACTTCTGCGCG
AGCAGCAGCGATCGTGAGCTGCTGTTTTATAACGAACAGTTCTTTGGTCCGGGCACCCGTCTGACCGTT
GAT（SEQ ID NO:6）

圖 3b

GGGSEGGGSEGGGSEGGGSEGGTG（SEQ ID NO:7）

圖 4a

GGTGGCGGTAGCGAGGGCGGTGGCAGCGAAGGTGGCGGTAGCGAGGGCGGTGGCAGCGAAGGTGGCACC
GGT（SEQ ID NO:8）

圖 4b

AQTVTQSQPELSVQEGETVTISCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQPILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQ
KAAKSFSLKISDVQPGDAAMYFCAYRSGIIQGAQKLVFGQGTRLTINPGGGSEGGGSEGGGSEGGGSEG
GTGAAGVTQSPRHLSVEKGETVTLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDLQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSA
QQFSDYHSELNISSVEPGDSALYFCASSSDRELLFYNEQFFGPGTRLTVD（SEQ ID NO:9）

圖 5a

GCTCAaACtGTtACtCAGAGCCAACCGGAGCTGAGCGTGCAAGAGGGTGAAACCGTTACCATCAGCTGC
ACCTACGACACCAGCGAAAGCGATTACTACCTGTTCTGGTATAAGCAGCCGCCGAGCCGTCAACCGATC
CTGGTTATTCGTCAGGAAGCGTACAAACAGCAAAACGCGACCGAAAACCGTTTCAGCGTGAACTTTCAG
AAGGCGGCGAAAAGCTTCAGCCTGAAGATCAGCGACGTTCAACCGGGCGATGCGGCGATGTACTTTTGC
GCGTATCGTAGCGGTATCATTCAGGGCGCGCAAAAACTGGTGTTCGGTCAGGGCACCCGTCTGACCATT
AACCCGGGTGGCGGTAGCGAGGGCGGTGGCAGCGAAGGTGGCGGTAGCGAGGGCGGTGGCAGCGAAGGT
GGCACCGGTGCGGCGGGCGTGACCCAAAGCCCGCGTCACCTGAGCGTGGAGAAGGGTGAAACCGTTACC
CTGAAATGCTATCCGATCCCGCGTCACGACACCGTTTACTGGTATCAGCAAGGTCCGGGCCAGGATCTG
CAATTCCTGATCAGCTTTTACGAGAAGATGCAGAGCGACAAAGGTAGCATTCCGGATCGTTTCAGCGCG
CAGCAATTTAGCGACTATCACAGCGAGCTGAACATTAGCAGCGTGGAACCGGGTGACAGCGCGCTGTAC
TTCTGCGCGAGCAGCAGCGATCGTGAGCTGCTGTTTTATAACGAACAGTTCTTTGGTCCGGGCACCCGT
CTGACCGTTGAT（SEQ ID NO:10）

圖 5b

AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQ
KAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCAYRSGIIQGAQKLVFGQGTRLTINPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKS
VCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDK**C**VLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS
PESS（SEQ ID NO:11）

圖 6a

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSDRELLFYNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEIS
HTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGV**C**TDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPR
NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD（SEQ ID NO:12）

圖 6b

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSDRIPPYYNEQFFGPGTRLTVL（SEQ ID NO:13）

圖 7(1)

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSVRELNYVDEQFFGPGTRLTVL（SEQ ID NO:14）

圖 7(2)

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSDRELNDAPEQFFGPGTRLTVL（SEQ ID NO:15）

圖 7(3)

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSDRELVFNPEQFFGPGTRLTVL（SEQ ID NO:16）

圖 7(4)

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSDRELLDAPEQFFGPGTRLTVL（SEQ ID NO:17）

圖 7(5)

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSDRELLFPDLTFFGPGTRLTVL（SEQ ID NO:18）

圖 7(6)

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSDRELIHPEEQFFGPGTRLTVL（SEQ ID NO:19）

圖 7(7)

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSDRELLFYAVPHFGPGTRLTVL（SEQ ID NO:20）

圖 7(8)

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSDRELLNPEEQFFGPGTRLTVL（SEQ ID NO:21）

圖 7(9)

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSDRELEHPEEQFFGPGTRLTVL（SEQ ID NO:22）

圖 7(10)

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSDRELPFVPEQFFGPGTRLTVL（SEQ ID NO:23）

圖 7(11)

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSDRELVFKPEQFFGPGTRLTVL（SEQ ID NO:24）

圖 7(12)

AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQ
KAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCAYRSGIIQGAQKLVFGQGTRLTINPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKS
VCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS
PESS（SEQ ID NO:25）

圖 8a

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSDRELLFYNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEIS
HTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPR
NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD（SEQ ID NO:26）

圖 8b

AQTVTQSQPEMSVQEAETVTLSCTYDTSESDYYLFWYKQPPSRQMILVIRQEAYKQQNATENRFSVNFQ
KAAKSFSLKISDSQLGDAAMYFCAYRSGIIQGAQKLVFGQGTRLTINPNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKS
VCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPS
PESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS（SEQ ID NO:27）

圖 9a

AAGVIQSPRHLIKEKRETATLKCYPIPRHDTVYWYQQGPGQDPQFLISFYEKMQSDKGSIPDRFSAQQF
SDYHSELNMSSLELGDSALYFCASSSDRELLFYNEQFFGPGTRLTVLEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEIS
HTQKATLVCLATGFYPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPR
NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSESYQQGVLSATILYEILLGKATLYA
VLVSALVLMAMVKRKDSRG（SEQ ID NO:28）

圖 9b

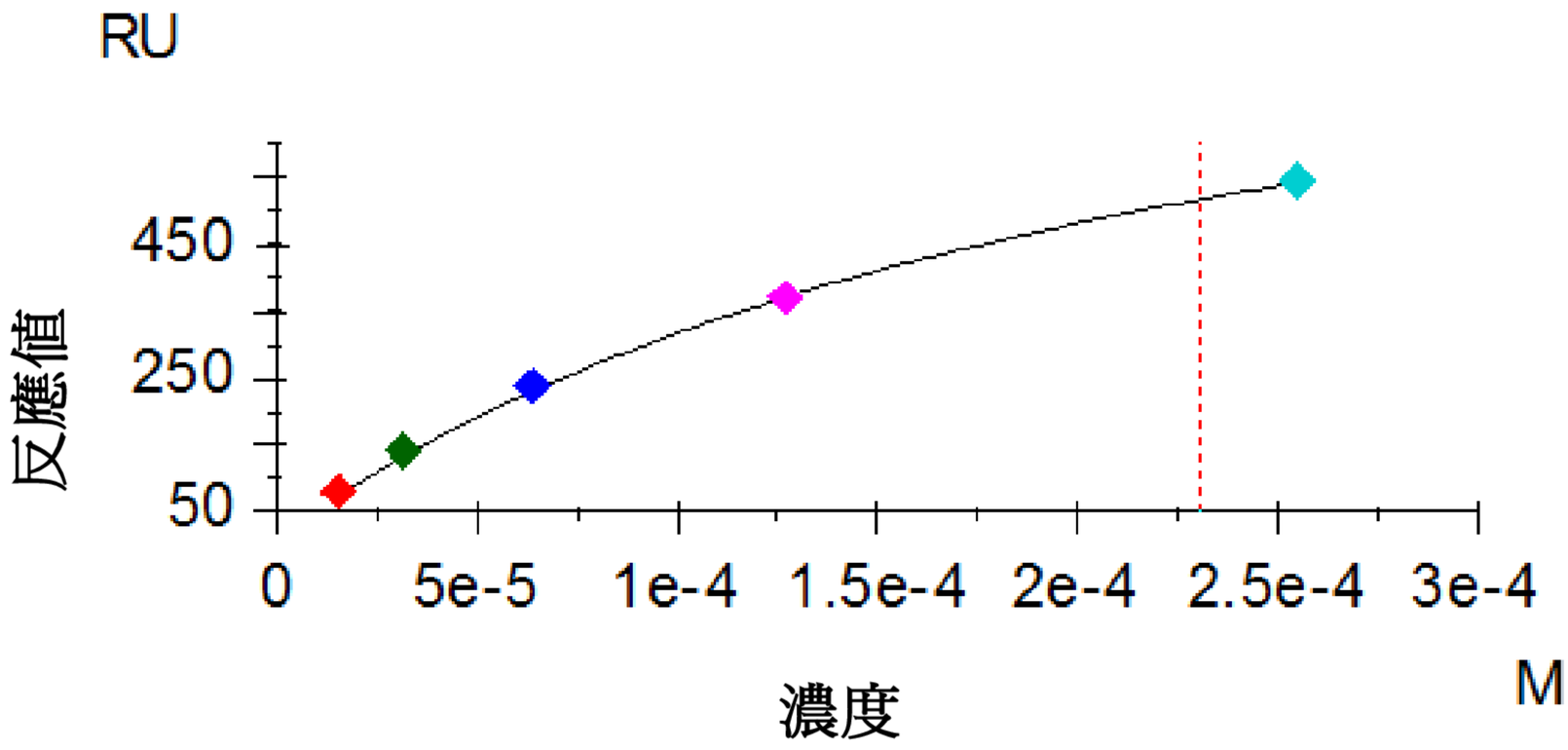
RU
反應值
450
250
50
0
5e-5
1e-4
1.5e-4
2e-4
2.5e-4
3e-4
M
濃度

圖 10

K562-A2
SW620-SSX2
K562-A11
IFN-γ 斑點數
300
200
100
0
A6
野生型TCR
TCR5
TCR6
TCR7
TCR1
TCR9
TCR10
TCR2
TCR8

圖 11