(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
2021 年 7 月 8 日 (08.07.2021)

WIPO | PCT

(10) 国际公布号
WO 2021/135178 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 14/725 (2006.01) *A61K 35/12* (2015.01)
C07K 14/705 (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2020/103687

(22) 国际申请日: 2020 年 7 月 23 日 (23.07.2020)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(30) 优先权:
201911389706.0 2019年12月30日 (30.12.2019) CN

(71) 申请人: 华夏英泰(北京)生物技术有限公司 (**CHINA IMMUNOTECH (BEIJING) BIOTECHNOLOGY CO., LTD.**) [CN/CN]; 中国北京市海淀区开拓路5号二层B214, Beijing 100085 (CN)。

(72) 发明人: 芮魏 (**RUI, Wei**); 中国北京市海淀区开拓路5号二层B214, Beijing 100085 (CN)。 伍春燕 (**WU, Chunyan**); 中国北京市海淀区开拓路5号二层B214, Beijing 100085 (CN)。 刘芳 (**LIU, Fang**); 中国北京市海淀区开拓路5号二层B214, Beijing 100085 (CN)。

(74) 代理人: 北京永新同创知识产权代理有限公司 (**NTD UNIVATION INTELLECTUAL PROPERTY AGENCY LTD**); 中国北京市东城区北三环东路36号北京环球贸易中心C座10层, Beijing 100013 (CN)。

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

本国际公布:
— 包括国际检索报告(条约第21条(3))。
— 包括按细则13之二规定在说明书以外提交的关于生物材料保藏的说明(细则13之二.4(d)(i)和48.2(a)(viii))。
— 包括说明书序列表部分(细则5.2(a))。

WO 2021/135178 A1

(54) **Title:** ENHANCED T-CELL RECEPTOR STAR AND APPLICATION THEREOF

(54) 发明名称: 一种增强型T细胞受体STAR及其应用

(57) **Abstract:** The present invention relates to the field of biomedicine, and particularly relates to an enhanced T-cell receptor STAR and an application thereof. Specifically, disclosed are an improved Synthetic T-Cell Receptor and Antigen Receptor (STAR), T cells containing the STAR, and uses thereof.

(57) 摘要: 涉及生物医药领域，尤其涉及一种增强型T细胞受体STAR及其应用。具体而言，公开了一种改进的合成T细胞受体抗原受体(Snythetic T-Cell Receptor and Antigen Receptor,STAR)、包含所述合成T细胞受体抗原受体的T细胞以及它们的用途。

一种增强型 T 细胞受体 STAR 及其应用

技术领域

本发明涉及生物医药领域，尤其涉及一种增强型 T 细胞受体 STAR 及其应用。具体而言，本发明公开了一种改进的合成 T 细胞受体抗原受体(Snythetic T-Cell Receptor and Antigen Receptor, STAR)、包含所述合成 T 细胞受体抗原受体的 T 细胞以及它们的用途。

发明背景

人体中免疫细胞清除肿瘤细胞是通过以下途径：树突状细胞识别到肿瘤细胞的突变基因，并将这种突变信息展示给 T 细胞。T 细胞随后会寻找携带该突变的肿瘤细胞并对其进行杀伤。有时，肿瘤细胞会下调能展示突变肽段的 MHC 分子，这样就能逃脱 T 细胞的杀伤，逐渐形成不可控制的癌症。

嵌合抗原受体 T 细胞(CAR-T)治疗是近年来收获良好疗效的一种抗癌免疫疗法。不同于天然的 T 细胞识别肿瘤细胞的方式，CAR-T 细胞对肿瘤细胞的识别不依赖于 MHC 分子。CAR 分子包含三大部分：胞外区是来源于抗体的抗原识别结构域，负责识别靶标抗原；跨膜区；胞内区是来源于 T 细胞受体的信号分子和共刺激信号分子，负责在接受刺激后传导 T 细胞激活信号。其工作原理如下：当 CAR 分子与其对应抗原结合的时候，CAR 分子会发生聚集，从而局部磷酸化水平升高、激活下游信号，最终启动 T 细胞的效应功能、杀伤靶标肿瘤细胞。

去靶向 CD19 蛋白的嵌合抗原受体 T 细胞(CD19-CAR-T)疗法已有两项临床应用在美国获批上市，用于复发难治性 B 细胞淋巴瘤的治疗。但是 CAR-T 疗法用于实体肿瘤治疗时遇到困难。T 细胞疗法未能在实体瘤治疗中取得较好疗效有多重因素，其中一个重要原因是 CAR-T 细胞在肿瘤微环境中功能受到抑制、T 细胞容易发生耗竭而凋亡。近来研究表明，这种 T 细胞的失能可能与嵌合抗原受体的信号通路性质有关。

T 细胞受体(TCR)复合物分子含有多条链，TCRα 链和 TCRβ 链负责识别 MHC-多肽分子，其它 6 个 CD3 亚基与 TCRα/β 链结合，起信号转导的功能。天然 TCR 复合体中共含有 10 个 ITAM 信号序列，理论上能传导比 CAR 更强的信号。之前研究表明，TCR 的信号虽然比 CAR 的信号传导得缓慢一些，但是 TCR 的信号更为持久。因此，利用天然 TCR 的信号传导功能，将可能构建出一种新型受体来缓解 T 细胞失能，使其能够更好地发挥抗实体肿瘤作用。

TCR 的胞外区和抗体的 Fab 结构域非常相似，因此可以把 TCR 可变区序列替换成抗体可变区序列，从而得到合成 T 细胞受体抗原受体(Snythetic TCR and Antigen Receptor, STAR)，其既具有抗体的特异性，也具有天然 TCR 的优越的信号传导功能，可以介导完全的 T 细胞激活。

然而，衍生自天然 TCR 的 STAR 仍然存在膜稳定性差、较低的 α/β 链配对能力、与内源性 TCR 存在错配、难以导入 T 细胞等缺点。因此本领域仍然需要改进的 STAR。

附图简述

图 1 示出 STAR 的结构。A、STAR 的原型的结构示意图；B、改进的 STAR 的结构示意图；C、靶向不同靶抗原的 dual-STAR 的结构示意图。

图 2 示出人和鼠 T 细胞受体 α 链恒定区以及 β 链恒定区的序列比对结果。

图 3 示出人和鼠的 TCRα 链恒定区 N 端的 18 个氨基酸的序列比对结果。UserSeq1 为人源序列，UserSeq2 为鼠源序列。

图 4 示出人和鼠的 TCRβ 链恒定区 N 端的 25 个氨基酸的序列比对结果。UserSeq1 为人源序列，UserSeq2 为鼠源序列。

图 5 示出组合不同的修饰的恒定区突变体。

图 6 靶向 EGFR 的 Cetux STAR 各突变体功能。

图 7 靶向 GPC3 的 GC33 STAR 各突变体功能。

图 8 靶向 CD19 的 334 STAR 综合突变体功能。

图 9 靶向 CD19/CD20 的 FMC63-2C6 STAR 综合突变体功能。

图 10 靶向 CD19/CD22 的 FMC63-M791 STAR 综合突变体功能。

发明内容

除非另有指示或定义，否则所有所用术语均具有本领域中的通常含义，该含义将为本领域技术人员所了解。参考例如标准手册，如 Sambrook et al.,“Molecular Cloning: A Laboratory Manual”；Lewin,“Genes VIII”；及 Roitt et al.,“Immunology”(第 8 版)，以及本文中引用的一般现有技术；此外，除非另有说明，否则未具体详述的所有方法、步骤、技术及操作均可以且已经以本身已知的方式进行，该方式将为本领域技术人员所了解。亦参考例如标准手册、上述一般现有技术及其中引用的其他参考文献。

如本文所用，术语“和/或”涵盖由该术语连接的项目的所有组合，应视作各个组合已经单独地在本文列出。例如，“A 和/或 B”涵盖了“A”、“A 和 B”以及“B”。例如，“A、B 和/或 C”涵盖“A”、“B”、“C”、“A 和 B”、“A 和 C”、“B 和 C”以及“A 和 B 和 C”。

“包含”一词在本文中用于描述蛋白质或核酸的序列时，所述蛋白质或核酸可以是由所述序列组成，或者在所述蛋白质或核酸的一端或两端可以具有额外的氨基酸或核苷酸，但仍然具有本发明所述的活性。此外，本领域技术人员清楚多肽 N 端由起始密码子编码的甲硫氨酸在某些实际情况下(例如在特定表达系统表达时)会被保留，但不实质影响多肽的功能。因此，本申请说明书和权利要求书中在描述具体的多肽氨基酸序列时，尽管其可能不包含 N 端由起始密码子编码的甲硫氨酸，然而此时也涵盖包含该甲硫氨酸的序列，相应地，其编码核苷酸序列也可以包含起始密码子；反之亦然。

在一方面，本发明提供一种合成 T 细胞受体抗原受体(STAR)，其包含 α 链和 β 链，所述 α 链包含第一抗原结合区和第一恒定区，所述 β 链包含第二抗原结合区和第二恒定区，

其中第一恒定区是天然 T 细胞受体 α 链恒定区的变体，其相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区包含 i) N 末端修饰； ii) 半胱氨酸取代；和/或 iii) 疏水氨基酸取代，和/或

其中第二恒定区是天然 T 细胞受体 β 链恒定区的变体，其相对于天然 T 细胞受体 β 链恒定区包含 i) N 末端修饰；和/或 ii) 半胱氨酸取代。

在一些实施方案中，所述抗原结合区融合至所述恒定区的 N 末端。

在一些实施方案中，所述 α 链和 β 链在 T 细胞内表达后，能够形成功能性 TCR 复合物。例如，所述 α 链和 β 链在 T 细胞表达后，能够与细胞内源的 CD3 分子(CD3 ε δ、CD3 γ ε、CD3 ζ ζ)相结合形成 8 个亚基的 TCR 复合物，所述 TCR 复合物展示在细胞表面，并且在与靶抗原结合后激活 T 细胞。功能性 TCR 复合物指的是其能够在与靶抗原特异性结合后，激活 T 细胞。

如本文所述，“N 末端修饰”指的是所提及的氨基酸序列(多肽或蛋白)的 N 末端包含一个或更多个氨基酸的取代、缺失和/或添加，该术语还可以包括所提及的氨基酸序列(多肽或蛋白)从 N 末端起一个或更多个连续氨基酸的缺失。

如本文所述，“半胱氨酸取代”或“疏水氨基酸取代”指的是所提及氨基酸序列(多肽或蛋白)中原始氨基酸被半胱氨酸或疏水氨基酸取代。其中疏水氨基酸取代可以是亲水氨基酸被疏水氨基酸取代，也可以是疏水性低的氨基酸被疏水性高的氨基酸取代。

在一些实施方案中，所述第一恒定区衍生自人 T 细胞受体 α 链恒定区、非人灵长类动物 T 细胞受体 α 链恒定区、啮齿动物例如小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区。示例性的人 T 细胞受体 α 链恒定区包含 SEQ ID NO:1 所示氨基酸序列。示例性的小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区包含 SEQ ID NO:2 所示氨基酸序列。在一些优选实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区。

在一些实施方案中，所述第一恒定区相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区包含 N 末端 18 个氨基酸的修饰。在一些实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区缺失 SEQ ID NO:3(DIQNPEPAVYQLKDPRSQ)所示氨基酸序列。在一些具体实施方案中，所述包含 N 末端修饰的第一恒定区包含 SEQ ID NO:4 所示氨基酸序列。(对应于 TCRaC-N.DLT)

在一些实施方案中，所述第一恒定区相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区包含 N 末端修饰，其中 N 末端的第 15-18 位氨基酸中的一个或多个或全部被缺失，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区缺失 N 末端的第 15-18 位氨基酸中的一个或多个或全部，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区缺失 N 末端的第 15-18 位氨基酸中的一个或多个或全部，且其中 N 末端的第 1-14 位氨基

酸被天然人 T 细胞受体 α 链恒定区的相应氨基酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些具体实施方案中，所述包含 N 末端修饰的第一恒定区包含 SEQ ID NO:5 所示氨基酸序列。(对应于 TCRaC-N.Rec-4)

在一些实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，N 末端起 X 个连续氨基酸被缺失，和/或 N 末端的第 X+1 位至第 18 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 α 链恒定区的相应氨基酸取代，其中 X 为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 或 18。

例如，在一些优选实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区缺失 N 末端的第 1-4 位氨基酸，且其中 N 末端的第 5-18 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 α 链恒定区的相应氨基酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些具体实施方案中，所述包含 N 末端修饰的第一恒定区包含 SEQ ID NO:34 所示氨基酸序列。(对应于 TCRaC-N.Rec-1)

在一些实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区缺失 N 末端的第 1-8 位氨基酸，且其中 N 末端的第 9-18 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 α 链恒定区的相应氨基酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些具体实施方案中，所述包含 N 末端修饰的第一恒定区包含 SEQ ID NO:35 所示氨基酸序列。(对应于 TCRaC-N.Rec-2)

在一些实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区缺失 N 末端的第 1-12 位氨基酸，且其中 N 末端的第 13-18 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 α 链恒定区的相应氨基酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些具体实施方案中，所述包含 N 末端修饰的第一恒定区包含 SEQ ID NO:36 所示氨基酸序列。(对应于 TCRaC-N.Rec-3)

在一些实施方案中，相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区，所述第一恒定区在第 48 位包含半胱氨酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些实施方案中，相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区，所述第一恒定区在第 48 位的苏氨酸被突变为半胱氨酸，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些具体实施方案中，所述包含半胱氨酸取代的第一恒定区包含 SEQ ID NO:6 所示氨基酸序列(衍生自人 T 细胞受体 α 链恒定区)。在一些具体实施方案中，所述包含半胱氨酸取代的第一恒定区包含 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列(衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区)。(对应于 TCRaC-Cys)

如本文所用，“氨基酸编号参考 SEQ ID NO:x” (SEQ ID NO:x 为本文所列的某一具体序列)指的是所描述的具体氨基酸的位置编号是该氨基酸在 SEQ ID NO:x 上对应的氨基酸的位置编号。不同序列中的氨基酸的对应性可以根据本领域公知的序列比对方法确定。例如氨基酸对应性可以通过 EMBL-EBI 的在线比对工具来确定(https://www.ebi.ac.uk/Tools/psa/)，其中两个序列可以使用 Needleman-Wunsch 算法，使用默认参数来对齐。例如，一多肽从其 N 末端起第 46 位的氨基酸与 SEQ ID NO:x 的第 48 位的氨基酸在序列比对中对齐，则该多肽中的该氨基酸在本文中也可以被描述为“在

该多肽的第 48 位的丙氨酸，所述氨基酸位置参考 SEQ ID NO:x”。

在一些实施方案中，相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区，所述第一恒定区包含在跨膜区内的疏水氨基酸取代，所述跨膜区例如包含第 111-119 位的氨基酸序列，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些实施方案中，相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区，所述第一恒定区包含在第 112 位、114 位和/或 115 位的疏水氨基酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些实施方案中，相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区，所述第一恒定区包含在第 112 位、114 位和 115 位的疏水氨基酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些实施方案中，相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区，所述第一恒定区在第 112 位的丝氨酸被亮氨酸取代，在 114 位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代，和/或在 115 位的甘氨酸被缬氨酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些实施方案中，相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区，所述第一恒定区在第 112 位的丝氨酸被亮氨酸取代，在 114 位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代，且在 115 位的甘氨酸被缬氨酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些实施方案中，所述包含疏水氨基酸取代的第一恒定区包含 SEQ ID NO:8 所示跨膜区 (衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区)。在一些具体实施方案中，所述包含疏水氨基酸取代的第一恒定区包含 SEQ ID NO:9 所示氨基酸序列(衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区)。(对应于 TCRaC-TM9)

在一些实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区缺失 N 末端的第 1-4 位氨基酸，且其中 N 末端的第 5-18 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 α 链恒定区的相应氨基酸取代，在第 48 位的苏氨酸被突变为半胱氨酸，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些具体实施方案中，所述第一恒定区包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列。 (对应于 TCRaC-Cys-N.Rec-1)

在一些实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区缺失 N 末端的第 1-4 位氨基酸，且其中 N 末端的第 5-18 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 α 链恒定区的相应氨基酸取代，在第 112 位的丝氨酸被亮氨酸取代，在 114 位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代，且在 115 位的甘氨酸被缬氨酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些具体实施方案中，所述第一恒定区包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列。(对应于 TCRaC-TM9-N.Rec-1)

在一些实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，在第 48 位的苏氨酸被突变为半胱氨酸，在第 112 位的丝氨酸被亮氨酸取代，在 114 位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代，且在 115 位的甘氨酸被缬氨酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些具体实施方案中，所述第一恒定区包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列。(对应于 TCRaC-Cys-TM9)

在一些实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区缺失 N 末端的第 1-4 位氨基酸，且其中 N 末端的第 5-18 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 α 链恒定区的相应氨基酸取代，在第 48 位的苏氨酸被突变为半胱氨酸，在第 112 位的丝氨酸被亮氨酸取代，在 114 位的甲硫氨酸被异亮氨酸取

代，且在 115 位的甘氨酸被缬氨酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。在一些具体实施方案中，所述第一恒定区包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列。(对应于 TCRaC-Cys-TM9-N.Rec-1)

在一些实施方案中，所述第二恒定区衍生自人 T 细胞受体 β 链恒定区、非人灵长类动物 T 细胞受体 β 链恒定区、啮齿动物例如小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区。示例性的人 T 细胞受体 β 链恒定区包含 SEQ ID NO:14 所示氨基酸序列。示例性的小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区包含 SEQ ID NO:15 所示氨基酸序列。在一些优选实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区。

在一些实施方案中，所述第二恒定区相对于天然 T 细胞受体 β 链恒定区包含 N 末端 25 个氨基酸的修饰。在一些实施方案中，所述第二恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区缺失 SEQ ID NO:16 (DLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQK)所示氨基酸序列。在一些具体实施方案中，所述包含 N 末端修饰的第二恒定区包含 SEQ ID NO:17 所示氨基酸序列。(对应于 TCRbC-N.DLT)

在一些实施方案中，所述第二恒定区相对于天然 T 细胞受体 β 链恒定区包含 N 末端修饰，其中 N 末端的第 17 和 21-25 位氨基酸中的一个或多个或全部被缺失，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:15。在一些实施方案中，所述第二恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区缺失 N 末端的第 17 和 21-25 位氨基酸中的一个或多个或全部，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:15。在一些实施方案中，所述第二恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区缺失 N 末端的第 17 和 21-25 位氨基酸中的一个或多个或全部，且其中 N 末端的第 1-16 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 β 链恒定区的相应氨基酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:15。在一些具体实施方案中，所述包含 N 末端修饰的第二恒定区包含 SEQ ID NO:18 所示氨基酸序列。(对应于 TCRbC-N.Rec-4)

在一些实施方案中，所述第二恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，N 末端起 X 个连续氨基酸被缺失，和/或 N 末端的第 X+1 位至第 25 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 β 链恒定区的相应氨基酸取代，其中 X 为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25。

在一些实施方案中，所述第二恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区缺失 N 末端的第 1-6 位氨基酸，且其中 N 末端的第 7-25 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 β 链恒定区的相应氨基酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:15。在一些具体实施方案中，所述包含 N 末端修饰的第二恒定区包含 SEQ ID NO:37 所示氨基酸序列。(对应于 TCRbC-N.Rec-1)

在一些实施方案中，所述第二恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区缺失 N 末端的第 1-12 位氨基酸，且其中 N 末端的第 13-25

位氨基酸被天然人 T 细胞受体 β 链恒定区的相应氨基酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:15。在一些具体实施方案中，所述包含 N 末端修饰的第二恒定区包含 SEQ ID NO:38 所示氨基酸序列。(对应于 TCRbC-N.Rec-2)

在一些实施方案中，所述第二恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区缺失 N 末端的第 1-18 位氨基酸，且其中 N 末端的第 19-25 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 β 链恒定区的相应氨基酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:15。在一些具体实施方案中，所述包含 N 末端修饰的第二恒定区包含 SEQ ID NO:39 所示氨基酸序列。(对应于 TCRbC-N.Rec-3)

在一些实施方案中，相对于天然 T 细胞受体 β 链恒定区，所述第二恒定区在第 56 位包含半胱氨酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:15。在一些实施方案中，相对于天然 T 细胞受体 β 链恒定区，所述第二恒定区在第 56 位的丝氨酸被突变为半胱氨酸，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:15。在一些具体实施方案中，所述包含半胱氨酸取代的第二恒定区包含 SEQ ID NO:19 所示氨基酸序列(衍生自人 T 细胞受体 β 链恒定区)。在一些具体实施方案中，所述包含半胱氨酸取代的第二恒定区包含 SEQ ID NO:20 所示氨基酸序列(衍生自小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区)。(对应于 TCRbC-Cys)

在一些实施方案中，所述第二恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区缺失 N 末端的第 1-6 位氨基酸，且其中 N 末端的第 7-25 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 β 链恒定区的相应氨基酸取代，在第 56 位的丝氨酸被突变为半胱氨酸，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:15。在一些具体实施方案中，所述第二恒定区包含 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列。(对应于 TCRbC-Cys-N.Rec-1)

在一些优选实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区缺失 N 末端的第 1-4 位氨基酸，且其中 N 末端的第 5-18 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 α 链恒定区的相应氨基酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2；所述第二恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区缺失 N 末端的第 1-6 位氨基酸，且其中 N 末端的第 7-25 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 β 链恒定区的相应氨基酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:15。在一些具体实施方案中，所述第一恒定区包含 SEQ ID NO:34 所示氨基酸序列，第二恒定区包含 SEQ ID NO:37 所示氨基酸序列。

在一些优选实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，在第 48 位的苏氨酸被突变为半胱氨酸，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2；所述第二恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，在第 56 位的丝氨酸被突变为半胱氨酸，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:15。在一些具体实施方案中，所述第一恒定区包含 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列，所述第二恒定区包含 SEQ ID NO:20 所示氨基酸序列。

在一些优选实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，在第 112 位的丝氨酸被亮氨酸取代，在 114 位的

甲硫氨酸被异亮氨酸取代，且在115位的甘氨酸被缬氨酸取代，所述氨基酸编号参考SEQ ID NO:2；所述第二恒定区是天然小鼠T细胞受体β链恒定区。在一些具体实施方案中，所述第一恒定区包含SEQ ID NO:9所示氨基酸序列，所述所述第二恒定区包含SEQ ID NO:15所示氨基酸序列。

在一些优选实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠T细胞受体α链恒定区，且相对于天然小鼠T细胞受体α链恒定区缺失N末端的第1-4位氨基酸，且其中N末端的第5-18位氨基酸被天然人T细胞受体α链恒定区的相应氨基酸取代，在第48位的苏氨酸被突变为半胱氨酸，所述氨基酸编号参考SEQ ID NO:2；所述第二恒定区衍生自小鼠T细胞受体β链恒定区，且相对于天然小鼠T细胞受体β链恒定区缺失N末端的第1-6位氨基酸，且其中N末端的第7-25位氨基酸被天然人T细胞受体β链恒定区的相应氨基酸取代，在第56位的丝氨酸被突变为半胱氨酸，所述氨基酸编号参考SEQ ID NO:15。在一些具体实施方案中，所述第一恒定区包含SEQ ID NO:11的氨基酸序列，所述第二恒定区包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列。

在一些优选实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠T细胞受体α链恒定区，且相对于天然小鼠T细胞受体α链恒定区缺失N末端的第1-4位氨基酸，且其中N末端的第5-18位氨基酸被天然人T细胞受体α链恒定区的相应氨基酸取代，在第112位的丝氨酸被亮氨酸取代，在114位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代，且在115位的甘氨酸被缬氨酸取代，所述氨基酸编号参考SEQ ID NO:2；所述第二恒定区衍生自小鼠T细胞受体β链恒定区，且相对于天然小鼠T细胞受体β链恒定区缺失N末端的第1-6位氨基酸，且其中N末端的第7-25位氨基酸被天然人T细胞受体β链恒定区的相应氨基酸取代，所述氨基酸编号参考SEQ ID NO:15。在一些具体实施方案中，所述第一恒定区包含SEQ ID NO:12的氨基酸序列，所述第二恒定区包含SEQ ID NO:37所示氨基酸序列。

在一些优选实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠T细胞受体α链恒定区，且相对于天然小鼠T细胞受体α链恒定区，在第48位的苏氨酸被突变为半胱氨酸，在第112位的丝氨酸被亮氨酸取代，在114位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代，且在115位的甘氨酸被缬氨酸取代，所述氨基酸编号参考SEQ ID NO:2；所述第二恒定区衍生自小鼠T细胞受体β链恒定区，且相对于天然小鼠T细胞受体β链恒定区，在第56位的丝氨酸被突变为半胱氨酸，所述氨基酸编号参考SEQ ID NO:15。在一些具体实施方案中，所述第一恒定区包含SEQ ID NO:10的氨基酸序列，第二恒定区包含SEQ ID NO:20所示氨基酸序列。

在一些优选实施方案中，所述第一恒定区衍生自小鼠T细胞受体α链恒定区，且相对于天然小鼠T细胞受体α链恒定区缺失N末端的第1-4位氨基酸，且其中N末端的第5-18位氨基酸被天然人T细胞受体α链恒定区的相应氨基酸取代，在第48位的苏氨酸被突变为半胱氨酸，在第112位的丝氨酸被亮氨酸取代，在114位的甲硫氨酸被异亮氨酸取代，且在115位的甘氨酸被缬氨酸取代，所述氨基酸编号参考SEQ ID NO:2；且，

所述第二恒定区衍生自小鼠T细胞受体β链恒定区，且相对于天然小鼠T细胞受体

β链恒定区缺失N末端的第1-6位氨基酸，且其中N末端的第7-25位氨基酸被天然人T细胞受体β链恒定区的相应氨基酸取代，在第56位的丝氨酸被突变为半胱氨酸，所述氨基酸编号参考SEQ ID NO:15。

在一些优选实施方案中，所述第一恒定区包含SEQ ID NO:13的氨基酸序列，且所述第二恒定区包含SEQ ID NO:21所示的氨基酸序列。

如本文所用，“抗原结合区”意指其独自或者和另一抗原结合区组合可以特异性结合靶抗原。

本文所述“抗原”或“靶抗原”可以是任何能被抗体识别并结合的抗原，优选是疾病相关抗原，更优选是癌症相关抗原。示例性的癌症相关抗原包括但不限于CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、CD138、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR变体III (EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关的抗原、β-人绒毛膜促性腺激素、α胎儿球蛋白(AFP)、外源凝集素反应性AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(prostase)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、Prostein、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI受体、间皮素、呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤维连接蛋白的额外结构域A(EDA)和额外结构域B(EDB)、腱生蛋白-C的A1结构域(TnC A1)、成纤维细胞相关蛋白(fap)、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、Foxp3、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、细胞因子受体、内皮因子、主要组织相容性复合体(MHC)分子、BCMA (CD269、TNFRSF17)、TNFRSF17 (UNIPROT Q02223)、SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25)、GPRC5D(UNIPROT Q9NZD1)、FKBP11(UNIPROT Q9NYL4)、KAMP3、ITGA8 (UNIPROT P53708)和FCRL5(UNIPROT Q68SN8)。

所述抗原结合区可以衍生自一或多种已知抗体，包括任何商业可获得的抗体，如FMC63、利妥昔单抗(rituximab)、阿仑珠单抗(alemtuzumab)、依帕珠单抗(epratuzumab)、曲妥珠单抗(trastuzumab)、比伐珠单抗(bivatuzumab)、西妥昔单抗(cetuximab)、拉贝珠单抗(labetuzumab)、帕利珠单抗(palivizumab)、司韦单抗(sevirumab)、妥韦单抗(tuvirumab)、巴利昔单抗(basiliximab)、达克珠单抗(daclizumab)、英利昔单抗(infliximab)、奥马珠单抗(omalizumab)、依法珠单抗(efalizumab)、凯利昔单抗(Keliximab)、西利珠单抗(siplizumab)、那他珠单抗(natalizumab)、克立昔单抗(clenoliximab)、培马单抗(pemtumomab)、依屈洛单抗(Edrecolomab)、坎妥珠单抗(Cantuzumab)等。在一些优选实施方式中，所述抗原结合区衍生自由保藏号编号为CGMCC No. 17095(于2019年1月21日保藏于地址为北京市朝阳区北辰西路1号院3号，中国科学院微生物研究所的中国

微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心)的杂交瘤细胞 334 产生的单克隆抗体 334。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含特异性结合靶抗原的抗体的重链可变区，且所述第二抗原结合区包含所述抗体的轻链可变区。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含特异性结合靶抗原的抗体的轻链可变区，且所述第二抗原结合区包含所述抗体的重链可变区。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:22 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:23 所示氨基酸序列；或者，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:23 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:22 所示氨基酸序列，由此所述 STAR 特异性结合 EGFR。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:44 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:45 所示氨基酸序列；或者，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:45 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:44 所示氨基酸序列，由此所述 STAR 特异性结合 CD19。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:46 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:47 所示氨基酸序列；或者，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:47 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:46 所示氨基酸序列，由此所述 STAR 特异性结合 CD20。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:48 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:49 所示氨基酸序列；或者，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:49 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:48 所示氨基酸序列，由此所述 STAR 特异性结合 CD22。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列；或者，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列，由此所述 STAR 特异性结合 GPC3。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含特异性结合 CD19 的抗体的重链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:28 所示重链 CDR1、SEQ ID NO:29 所示重链 CDR2 和 SEQ ID NO:30 所示重链 CDR3，且所述第二抗原结合区包含特异性结合 CD19 的抗体的轻链可变区，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:31 所示轻链 CDR1、SEQ ID NO:32 所示轻链 CDR2 和 SEQ ID NO:33 所示轻链 CDR3；或者，所述第一抗原结合区包含特异性结合 CD19 的抗体的轻链可变区，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:31 所示轻链 CDR1、SEQ ID NO:32 所示轻链 CDR2 和 SEQ ID NO:33 所示轻链 CDR3，且所述第二抗原结合区特异性结合 CD19 的抗体的重链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:28 所示重链 CDR1、SEQ ID NO:29 所示重链 CDR2 和 SEQ ID NO:30 所示重链 CDR3，由此所述 STAR 特异性结合 CD19。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列，且

所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列；或者，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列，由此所述 STAR 特异性结合 CD19。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区包含特异性结合靶抗原的单链抗体(如 scFv)或单域抗体(如骆驼抗体)。在一些实施方案中，所述第二抗原结合区包含特异性结合靶抗原的单链抗体(如 scFv)或单域抗体(如骆驼抗体)。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和所述第二抗原结合区结合相同的靶抗原。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和所述第二抗原结合区结合相同靶抗原的不同区域(如不同的表位)。在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和所述第二抗原结合区结合不同的靶抗原。例如，在一些示例性实施方案中，所述两个抗原结合区可以分别结合 CD19 和 CD20，或分别结合 CD19 和 CD22，或分别结合 CD38 和 BCMA，或分别结合 PDL1 和 EGFR。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:22 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:23 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区特异性结合 EGFR。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:44 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:45 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区特异性结合 CD19。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:46 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:47 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区特异性结合 CD20。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:48 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:49 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区特异性结合 CD22。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区特异性结合 GPC3。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:28 所示重链 CDR1、SEQ ID NO:29 所示重链 CDR2 和 SEQ ID NO:30 所示重链 CDR3，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:31 所示轻链 CDR1、SEQ ID NO:32 所示轻链 CDR2 和 SEQ ID NO:33 所示轻链 CDR3，由此所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区特异性结合 CD19。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区特异性结合 CD19。

在另一方面，本发明提供一种合成 T 细胞受体抗原受体(STAR)，其包含 α 链和 β 链，所述 α 链包含第一抗原结合区和第一恒定区，所述 β 链包含第二抗原结合区和第二

恒定区，

其中第一恒定区是天然 T 细胞受体 α 链恒定区或如本文所公开的天然 T 细胞受体 α 链恒定区变体，其中第二恒定区是天然 T 细胞受体 β 链恒定区或如本文所公开的天然 T 细胞受体 β 链恒定区变体，

其中第一抗原结合区和第二抗原结合区特异性地结合不同的靶抗原或相同靶抗原的不同区域。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和/或第二抗原结合区包含特异性结合靶抗原的单链抗体(如 scFv)或单域抗体(如骆驼抗体)。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:22 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:23 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区特异性结合 EGFR。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:44 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:45 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区特异性结合 CD19。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:46 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:47 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区特异性结合 CD20。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:48 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:49 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区特异性结合 CD22。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区特异性结合 GPC3。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:28 所示重链 CDR1、SEQ ID NO:29 所示重链 CDR2 和 SEQ ID NO:30 所示重链 CDR3，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:31 所示轻链 CDR1、SEQ ID NO:32 所示轻链 CDR2 和 SEQ ID NO:33 所示轻链 CDR3，由此所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区特异性结合 CD19。

在一些实施方案中，所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区和/或所述第二抗原结合区特异性结合 CD19。

在一些示例性实施方案中，所述两个抗原结合区可以分别结合 CD19 和 CD20，或分别结合 CD19 和 CD22，或分别结合 CD38 和 BCMA，或分别结合 PDL1 和 EGFR。

在另一方面，本发明提供一种分离的多核苷酸，其包含编码本发明所述合成 T 细胞受体抗原受体(STAR)的 α 链和/或 β 链的核苷酸序列。

在一些实施方案中，所述多核苷酸包含在同一读码框内的 i)编码所述 α 链的核苷酸

序列、ii)编码所述 β 链的核苷酸序列和 iii)位于 i)和 ii)之间的编码自裂解肽的核苷酸序列。编码所述 α 链的核苷酸序列可以位于编码所述 β 链的核苷酸序列的 5'端或 3'端。

如本文所用“自裂解肽”意指可以在细胞内实现自剪切的肽。例如，所述自裂解肽可以包含蛋白酶识别位点，从而被细胞内的蛋白酶识别并特异性切割。

或者，所述自裂解肽可以是 2A 多肽。2A 多肽是一类来自病毒的短肽，其自切割发生在翻译期间。当用 2A 多肽连接两种不同目的蛋白在同一读码框表达时，几乎以 1:1 的比例生成两种目的蛋白。常用的 2A 多肽可以是来自猪捷申病毒（porcine techovirus-1）的 P2A、来自明脉扁刺蛾 β 四体病毒（Thosea asigna virus）的 T2A、马甲型鼻病毒（equine rhinitis A virus）的 E2A 和来自口蹄疫病毒（foot-and-mouth disease virus）的 F2A。其中 P2A 的切割效率最高，因此是优选的。本领域也已知多种这些 2A 多肽的功能性变体，这些变体也可以用于本发明。

在另一方面，本发明提供一种表达载体，其包含与调控序列可操作连接的本发明的多核苷酸。

本发明的“表达载体”可以是线性的核酸片段、环状质粒、病毒载体，或者可以是能够翻译的 RNA(如 mRNA)。在一些优选实施方案中，所述表达载体是病毒载体，例如慢病毒载体。

“调控序列”和“调控元件”可互换使用，指位于编码序列的上游(5'非编码序列)、中间或下游(3'非编码序列)，并且影响相关编码序列的转录、RNA 加工或稳定性或者翻译的核苷酸序列。表达调控元件指的是能够控制感兴趣的核苷酸序列转录、RNA 加工或稳定性或者翻译的核苷酸序列。调控序列可包括但不限于启动子、翻译前导序列、内含子、增强子和多腺苷酸化识别序列。

如本文中所用，术语“可操作地连接”指调控元件(例如但不限于，启动子序列、转录终止序列等)与核酸序列(例如，编码序列或开放读码框)连接，使得核苷酸序列的转录被所述转录调控元件控制和调节。用于将调控元件区域可操作地连接于核酸分子的技术为本领域已知的。

在另一方面，本发明提供一种制备治疗性 T 细胞的方法，包括在 T 细胞中表达本发明的合成 T 细胞受体抗原受体(STAR)。在一些实施方案中，所述方法包括将本发明的多核苷酸或本发明的表达载体导入 T 细胞。

在另一方面，本发明提供一种治疗性 T 细胞，其包含本发明的合成 T 细胞受体抗原受体(STAR)，或其通过本发明的方法获得。

本发明的 T 细胞可以通过各种非限制性方法从许多非限制性来源获得，包括外周血单核细胞、骨髓、淋巴结组织、脐带血、胸腺组织、腹水、胸腔积液、脾组织和肿瘤。在一些实施方案中，细胞可以衍生自健康供体或来自诊断为癌症的患者。在一些实施方案中，细胞可以是呈现不同表型特征的细胞的混合群体的一部分。例如，T 细胞可以通过分离外周血单个核细胞(PBMC)，然后用特异性抗体活化、扩增获得。

在本发明各方面的一些实施方案中，所述 T 细胞衍生自对象的自体细胞。如本文所

用，“自体”是指用于治疗对象的细胞、细胞系或细胞群源自所述对象。在一些实施方案中，所述 T 细胞衍生自异体细胞，例如源自与所述对象人类白细胞抗原(HLA)相容的供体。可以使用标准方案将来自供体的细胞转化为非同种异体反应性细胞，并根据需要进行复制，从而产生可以施用至一个或多个患者的细胞。

在另一方面，本发明提供一种药物组合物，其包含本发明的治疗性 T 细胞，和药物可接受的载体。

本文使用的“药学上可接受的载体”包括生理学相容的任何和所有的溶剂、分散介质、包衣、抗细菌剂和抗真菌剂、等渗剂和吸收延迟剂等。优选地，该载体适合于静脉内、肌内、皮下、肠胃外、脊柱或表皮施用(如通过注射或输注)。

在另一方面，本发明提供本发明的治疗性 T 细胞或本发明的药物组合物在制备用于在对象中治疗疾病例如癌症的药物中的用途。

如本文所用“对象”是指患有或者易于患有可以通过本发明的细胞、方法、或药物组合物治疗的疾病(如癌症)的生物体。非限制性例子包括人、牛、大鼠、小鼠、狗、猴、山羊、绵羊、母牛、鹿，及其它非哺乳动物。在优选实施方案中，对象是人。

在另一方面，本发明提供一种在对象中治疗疾病例如癌症的方法，包括给所述对象施用治疗有效量的本发明的治疗性 T 细胞或本发明的药物组合物。

如本文所用，“治疗有效量”或“治疗有效剂量”或“有效量”指施用于对象之后至少足以产生疗效的物质、化合物、材料或细胞的量。因此，其为防止、治愈、改善、阻滞或部分阻滞疾病或病症的症状所必需的量。例如，“有效量”的本发明的细胞或药物组合物优选地导致疾病症状的严重性降低，疾病无症状期的频率和持续时间增加，或者防止因疾病痛苦而引起的损伤或失能。例如，对于肿瘤的治疗，相对于未接受治疗的对象，“有效量”的本发明的细胞或药物组合物优选地将肿瘤细胞生长或肿瘤生长抑制至少约 10%，优选至少约 20%，更优选至少约 30%，更优选至少约 40%，更优选至少约 50%，更优选至少约 60%，更优选至少约 70%，更优选至少约 80%。抑制肿瘤生长的能力可以在预测对人类肿瘤的疗效的动物模型系统中评价。或者，也可以通过检查抑制肿瘤细胞生长的能力来评价，这种抑制可以通过本领域技术人员公知的试验在体外测定。

实际应用中，本发明药物组合物中细胞的剂量水平可能改变，以获得可有效实现对特定患者、组合物和给药方式的所需治疗反应，而对患者无毒性的活性成分的量。选择的剂量水平取决于多种药物代谢动力学因素，包括应用的本发明特定组合物的活性，给药途径，给药时间，应用的特定化合物的排泄速率，治疗的持续时间，与应用的特定组合物联合应用的其他药物、化合物和/或材料，接受治疗的患者的年龄、性别、体重、状况、总体健康情况和病史，以及医学领域中公知的类似因素。

根据本发明的治疗性 T 细胞或药物组合物或药物的施用可以以任何方便的方式进行，包括通过注射、输注、植入或移植。本文所述的细胞或组合物施用可以通过静脉内、淋巴内、皮内、肿瘤内、髓内、肌内或腹膜内施用。在一个实施方案中，本发明的细胞

或组合物优选通过静脉内注射施用。

在本发明各个方面的实施方案中，所述癌症选自肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体瘤、骨肉瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、前列腺癌、子宫癌、肛区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、阴道癌、阴户癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病(包括急性髓细胞样白血病、慢性髓细胞样白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症，包括石棉诱发的癌症，以及所述癌症的组合。

实施例

实施例 1. STAR 受体及其突变体的恒定区结构域的设计

1.1 STAR 的原型设计

B 细胞产生的分泌抗体(Antibody，Ab)或 B 细胞受体(BCR)与 T 细胞受体(TCR)在基因结构、蛋白结构和空间构象上有很大的相似性。抗体和 TCR 都是由可变区和恒定区组成，其中可变区起到抗原识别和结合的作用，而恒定区结构域起到结构互作和信号转导的作用。通过把 TCRα 和 β 链(或 TCRγ 和 δ 链)的可变区替换为抗体的重链可变区(VH)和轻链可变区(VL)，可以构建出一种人工合成的嵌合分子，称为合成 T 细胞受体抗体受体(Synthetic T-Cell Receptor and Antibody Receptor, STAR)，其结构见图 1。

STAR 分子有两条链，第一条链是抗原识别序列(如抗体的重链可变区 VH)与 T 细胞受体 α 链(TCRα)的恒定区(Cα，human TCRaC-WT，SEQ ID NO:1)相融合而得，第二条链是抗原识别序列(如抗体的轻链可变区 VL)与 T 细胞受体 β 链(TCRβ)的恒定区(Cβ, human TCRbC-WT，SEQ ID NO:14)相融合而得。该构建体中抗原识别结构域(如 VH、VL 或 scFv 等)与恒定区结构域(TCRα、β、γ 和 δ 的恒定区)可以进行排列组合，组成多种构型不同但功能类似的构建体。

STAR 分子的第一、二条链在 T 细胞内表达后，会在内质网中与细胞内源的 CD3εδ、CD3γε、CD3ζζ 链相结合形成 8 个亚基的复合物，并以复合物的形式展示在细胞膜表面。免疫受体酪氨酸活化基序(Immunoreceptor Tyrosine-based Activation Motif，ITAM)是 TCR 分子中起到信号转导作用的基序，其保守序列为 YxxL/V。CD3ε、δ、γ、ε 链的胞内区含有 1 个 ITAM 序列，CD3 ζ 链的胞内区含有 3 个 ITAM 序列，所以一个完整 STAR 复合体共含有 10 个 ITAM 序列。当 STAR 受体的抗原识别序列与其特异性抗原结合后，胞内的 ITAM 序列会逐次被磷酸化，进而激活下游信号通路，激活 NF-κB、NFAT 和 AP-1 等转录因子，引发激活 T 细胞，产生效应功能。

1.2 鼠源化 STAR 的设计

STAR 原型设计使用的是人类来源的 TCRα/β 链(或 TCRγ 和 δ 链)的恒定区序列。由于人源、灵长类动物来源和鼠源 TCRα/β 链(mouse TCRaC-WT，SEQ ID NO:2；mouse TCRbC-WT，SEQ ID NO:15)(或 TCRγ 和 δ 链)的恒定区序列的功能保守性较高，且关键氨基酸序列相同，所以可以相互替换。

STAR 分子被转导入 T 细胞中后，会通过恒定区与 T 细胞内源的 TCR 发生错配。这一错配问题一方面减少了 STAR 分子正确配对的效率、削弱其功能，另一方面增加了错配产生未知特异性的可能、增加了安全性风险。为解决这一问题，本发明将 STAR 分子的恒定区替换为鼠源序列，以增强 STAR 分子转入人类 T 细胞后的功能。人源序列和鼠源序列的比对见图 2。

1.3 STAR 的恒定区 N 端的修饰设计

为进一步优化 STAR 分子的设计，本发明对 STAR 分子中特定序列进行修改，其中一种修改方案为对 STAR 分子恒定区的 N 端进行删除。TCRα 链恒定区删掉 N 端的 18 个氨基酸(鼠源序列为 DIQNPEPAVYQLKDPRSQ，SEQ ID NO:3) (产生恒定区序列为 mouse TCRaC-N.DLT，SEQ ID NO:4)，TCRβ 链恒定区删掉 N 端的 25 个氨基酸(鼠源序列为 DLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQK，SEQ ID NO:16) (产生恒定区序列为 mouse TCRbC-N.DLT， SEQ ID NO:17)。这两个区域位于恒定区的 N 端，不属于类免疫球蛋白 C1 型结构域(Ig-like C1 type domain)，也不参与分子内二硫键的形成，但主要起到铰链的功能，而这一功能对 STAR 的功能是否有影响，为此设计不同删除方案。本发明对恒定区特定序列进行重排，以获得更优效果。重排意为进行部分序列删除，同时对部分序列进行人源化突变。该区域性修饰具有以下优势：第一，铰链区功能优化能够减少 STAR 与内源 TCR 错配。第二，优化后的 STAR 的分子大小与天然 TCR 的大小更相似，更利于共刺激分子的结合、免疫突触的形成和稳定、以及后续 T 细胞的效应功能。

人源化突变的意义在于，在保证 STAR 分子功能的同时，尽可能减少 STAR 分子中的非人源序列，以最大程度规避 STAR-T 细胞在临床应用中被受体排斥的可能。具体重排方案阐述如下。

TCRα 链恒定区 N 端的 18 个氨基酸(鼠源序列为 DIQNPEPAVYQLKDPRSQ)重排方案：

图 3 示出鼠源 TCRα 链恒定区 N 端的 18 个氨基酸与人源序列的比对，UserSeq1 为人源序列，UserSeq2 为鼠源序列。通过氨基酸性质分析，发现鼠源和人源序列在 E6D、K13R、R16K、Q18S 这些位点均属同性质氨基酸替换，而在 P15S 位点属于非极性氨基酸替换为极性氨基酸，因此可认为该位点附近的蛋白质性质不保守、进而可以进行修改而不影响功能。综上，本发明将鼠源 TCRα 链恒定区 N 端的 1-14 位氨基酸序列保留并人源化、并删除 15-18 位氨基酸，产生 mouse TCRaC-N.Rec-4，SEQ ID NO:5。

此外，为考虑此区域的铰链作用，全部截短后可能会对效果产生影响，还将鼠源 TCRα 链恒定区 N 端的 1-4 位氨基酸删除，5-18 位氨基酸人源化，该修饰称作 mouse TCRaC-N.Rec-1，产生恒定区序列为 SEQ ID NO:34；将鼠源 TCRα 链恒定区 N 端的 1-8 位氨基酸删除，9-18 位氨基酸人源化，该修饰称作 mouse TCRaC-N.Rec-2，产生恒定区序列为 SEQ ID NO:35；将鼠源 TCRα 链恒定区 N 端的 1-12 位氨基酸删除，13-18 位氨基酸人源化，产生恒定区序列为 mouse TCRaC-N.Rec-3，SEQ ID NO:36。作为对照，还对鼠源 TCRα 链恒定区 N 端的 1-18 位氨基酸进行了随机重排，产生恒定区序列为 mouse TCRaC-N.rRec，SEQ ID NO:40。

TCRβ 链恒定区 N 端的 25 个氨基酸（鼠源序列为 DLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQK)重排方案：

图 4 示出鼠源 TCRβ 链恒定区 N 端的 25 个氨基酸与人源序列的比对，UserSeq1 为人源序列，UserSeq2 为鼠源序列。通过氨基酸性质分析，发现鼠源和人源序列仅在 R3K 和 L12V 位点属同性质氨基酸替换，而在 T6F、K8E、D11A 、K17E、A21S、N22H 和 K23T 位点均属不同氨基酸性质的替换，因此可认为该位点附近的蛋白质性质不保守、进而可以进行修改而不影响功能。综上，本发明将鼠源 TCRβ 链恒定区 N 端的 1-16 位氨基酸序列保留并人源化、并删除 17、21-25 位氨基酸，产生恒定区序列为 mouse TCRbC-N.Rec-4，SEQ ID NO:18。

此外，为考虑此区域的铰链作用，全部截短后可能会对效果产生影响，还将鼠源 TCRβ 链恒定区 N 端的 1-6 位氨基酸删除，13-25 位氨基酸人源化，产生恒定区序列为 mouse TCRbC-N.Rec-1，SEQ ID NO:37；还将鼠源 TCRβ 链恒定区 N 端的 1-12 位氨基酸删除，13-25 位氨基酸人源化，产生恒定区序列为 mouse TCRbC-N.Rec-2， SEQ ID NO:38；还将鼠源 TCRβ 链恒定区 N 端的 1-18 位氨基酸删除，19-25 位氨基酸人源化，产生恒定区序列为 mouse TCRbC-N.Rec-3，SEQ ID NO:39。作为对照，还对鼠源 TCRβ 链恒定区 N 端的 1-25 位氨基酸进行了随机重排，产生恒定区序列为 mouse TCRbC-N.rRec，SEQ ID NO:41。

1.4 STAR 的恒定区 C 端的修饰设计

本发明还删除了鼠源 TCRα 链恒定区 C 端的 15 个氨基酸，产生恒定区序列为 mouse TCRaC-C.DLT (SEQ ID NO:42)。

本发明还删除了鼠源 TCRβ 链恒定区 C 端的 15 个氨基酸，产生恒定区序列为 mouse TCRbC-C.DLT (SEQ ID NO:43)。

1.5 STAR 半胱氨酸点突变引入分子间二硫键的设计

为进一步优化 STAR 分子的设计，本发明对 STAR 分子中特定序列进行修改，其中一种修改方案为对 STAR 分子进行半胱氨酸点突变，以引入分子间二硫键，增强 STAR 分子两条链间的相互配对，减少与内源 TCR 的错配。具体方案阐述如下。

于 TCRα 链恒定区将 48 位苏氨酸 T 突变为半胱氨酸 C (产生恒定区序列为 human TCRaC-Cys, SEQ ID NO:6；mouse TCRaC-Cys, SEQ ID NO:7)，于 TCRβ 链恒定区将 56 位丝氨酸 S 突变为半胱氨酸 C (产生恒定区序列为 human TCRbC-Cys, SEQ ID NO:19；mouse TCRbC-Cys, SEQ ID NO:20)。这两个新增的半胱氨酸会在 STAR 的两条链间形成二硫键，减少 STAR 两条链与内源性 TCR 链的错配，帮助 STAR 分子形成更加稳定的复合体，进而获得更好的功能。

1.6 STAR 跨膜区疏水氨基酸替换的设计

为进一步优化 STAR 分子的设计，本发明对 STAR 分子中特定序列进行修改，其中一种修改方案为对 STAR 分子的跨膜区进行疏水氨基酸替换，以增加 STAR 分子的稳定性，帮助其发挥更持久功能。具体方案阐述如下。

在 TCRα 链恒定区跨膜区的 111 位至 119 位氨基酸区域内进行 3 个氨基酸位点的突变，将 112 位丝氨酸 S 变成亮氨酸 L、114 位甲硫氨酸 M 变成异亮氨酸 I、115 位甘氨酸 G 变成颉氨酸 V。该区域整体氨基酸序列由 LSVMGLRIL 变为 LLVIVLRIL，该修饰称作 mouse TCRaC-TM9，产生恒定区序列为 SEQ ID NO:9。这一设计增加了跨膜区的疏水性，抵消了 TCR 跨膜区携带正电荷所导致的不稳定性，使得 STAR 分子能在细胞膜上更为稳定地存在，进而获得更好的功能。

1.7 N 端修饰、半胱氨酸修饰和跨膜区修饰的组合

发明人对上述的 N 端修饰、半胱氨酸修饰和跨膜区修饰进行了组合，设计了 mouse TCRaC-Cys-N.Rec-1 (SEQ ID NO:11)、mouse TCRaC-TM9-N.Rec-1 (SEQ ID NO:12)、mouse TCRaC-Cys-TM9 (SEQ ID NO:10)、mouse TCRaC-Cys-TM9-N.Rec-1 (SEQ ID NO:13)，以及 mouse TCRbC-Cys-N.Rec-1 (SEQ ID NO:21)。

1.8 STAR 可变区和恒定区的交换排列组合

STAR 分子可分为可变区结构域和恒定区结构域两部分。可变区结构域由具有抗原识别能力的氨基酸序列组成，一般由以下类别的分子构成：抗体轻链可变区、抗体重链可变区、单链抗体(scFv)、配体-受体结合区、Nanobody 等等。恒定区结构域由具有和 CD3 亚基集合能力的 TCR 恒定区或相关序列组成，一般包括 TCRα、β、γ 和 δ 链的恒定区。

STAR 构建体中抗原识别结构域与恒定区结构域可以进行排列组合，组成多种构型不同但功能类似的构建体。一些可能的排列组合如下表所示：

编号	STAR-α 链		STAR-β 链	
	抗原识别区	恒定区	抗原识别区	恒定区
1	VH	Cα	VL	Cβ
2	VL	Cα	VH	Cβ
3	VH	Cγ	VL	Cδ
4	VL	Cγ	VH	Cδ

5	ScFv1	Cα	ScFv2	Cβ
6	ScFv2	Cα	ScFv1	Cβ
7	ScFv1	Cγ	ScFv1	Cδ
8	ScFv2	Cγ	ScFv2	Cδ
9	Ligand1	Cα	Ligand2	Cβ
10	Ligand2	Cα	Ligand1	Cβ
11	Ligand1	Cγ	Ligand2	Cδ
12	Ligand2	Cγ	Ligand1	Cδ
13	VH	Cα	scFv1	Cβ
14	VL	Cα	scFv1	Cβ
15	scFv1	Cα	Ligand1	Cβ
16	VH	Cα	Ligand1	Cβ
17	VL	Cα	Ligand1	Cβ

实施例 2. STAR 受体的抗原识别结构域的设计

1) 靶点选择

STAR 靶点选择主要通过基因表达的数据库实现，总的来说，合适的 STAR 靶点的表达水平相较于正常细胞一般在疾病或者相关细胞上高表达或者特异性表达。确定合适靶点后，识别靶点的抗原识别结构域一般为抗体、SCFV、VHH 或抗原对应受体等。抗体的重链可变区(VH)、轻链可变区(VL)，羊驼单链抗体(VHH)，以及受体和配体可以通过免疫小鼠、羊驼、测序或者通过已经发表的序列获得。而获得的鼠源或者羊驼序列一般需要经过人源化和密码子优化使其更有利于在人体细胞中表达和行使功能。获得合适的序列后，将所得序列连接到慢病毒或者逆转录病毒载体中，通过测序方法检测载体构建是否正确，再通过病毒包装、感染使其表达与体细胞中，使用标签蛋白 RFP、GFP、MYC、HIS 等用于检测 STAR 蛋白表达、上膜、与抗原结合等。所适用的靶点包括但不限于 GPC3、EGFR VIII、CD22、CD20、MSLN、GD2、LIRB4、ROR1、Cllaudin18.2、CD7、CD47、CD24。

2) 靶细胞系及工具细胞系列表

在本发明中，使用了多种靶标细胞系用于说明 STAR 的功能，并通过基因工程手段使靶标细胞获得 luciferase 基因，从而利于体外功能检测。荧光素酶是常见的用于细胞功能研究的物质，通过在体系中添加荧光素酶底物从而判断酶活性，而荧光素酶活性与目的基因的表达、结合强弱、细胞数量等密切相关。本发明中，建立稳定表达荧光素酶的靶标细胞系，以荧光素酶的多少指代靶标细胞的数量，进而指示功能细胞的杀伤功能。具体细胞如下:

细胞系名称	靶点	对应癌症/疾病或功能
A431	EGFR	皮肤癌
A549	EGFR	肺癌
B16/htEGFR	EGFR	黑色素瘤
HepG2	GPC3	肝癌
HUH7	GPC3	肝癌

RAJI	CD19	淋巴瘤/白血病
RAJI-CD19KO	CD19-	淋巴瘤/白血病
RAJI-CD20KO	CD20-	淋巴瘤
RAJI-CD22KO	CD22-	淋巴瘤
Jurkat		功能检测
Jurkat Clone 5 (JC5)		功能检测/病毒滴度检测

3) 抗原识别结构域的选择(抗体、scFv、Fab、VHH 等)

抗原识别结构域可来源于识别抗原的抗体，抗体的单链可变区、可变区、纳米抗体，于抗原识别的受体等等。在 STAR 的设计中，病毒是主要的 T 细胞改造的途径，慢病毒或者逆转录病毒的包装与包装的尺寸大小相关，因此较小的抗体识别单位会受到较大青睐，如抗体单链可变区和纳米抗体从尺寸上是更好的选择。针对同一抗原，目前已有的抗体作为现有技术是广泛筛选抗体识别结构域的途径之一，同时通过噬菌体文库构建全人源抗体库、亲和力优化、鼠杂交瘤筛选、羊驼单抗筛选、人源化等技术获得全新的识别抗原的抗体。此外抗原的受体作为可识别抗原的一种特异性分子，也是抗原识别结构域的主要选择之一。

实施例 3. STAR 受体及其突变体的质粒构建

1) 质粒来源

本发明中所用的载体，包括慢病毒载体、逆转录病毒载体、蛋白表达载体、噬菌粒、慢病毒包装质粒、逆转录病毒包装质粒等均购买与商业公司或商业公司合成，并获得这些载体的全长序列，已知明确的酶切位点。

2) 片段来源

本发明中采用的基因片段包括信号肽、抗体结合区、铰链区、TCR 恒定区、标签蛋白等均来源于商业化公司合成。通过合成引物 PCR 方式，连接一段或多段目的片段获得相应功能序列。

3) 质粒构建与测序方法

本发明使用中的慢病毒载体为 pHAGE-EF1α-GFP，通过限制性内切酶 Not I/Cla I 获得 pHAGR-EF1A-WPRE-AMP 载体，片段基因通过合成和 PCR 方法获得，通过同源重组方法，在 Gibsson/NEBuilder 等重组酶作用下获得完整载体。逆转录病毒载体 RVKM-CMV-GFP 通过限制性内切酶 Xho I/BamH I 获得载体片段，而插入片段基因通过合成和 PCR 方法获得，通过同源重组方法将载体和片段相连。原核表达载体为 pET-28a 载体，使用的限制性内切酶位点为 XhoI 和 NcoI，真核表达载体为 PVRC8400，使用的限制性内切酶位点为 XhoI 和 XbaI，根据人源抗原基因设计引物，向引物两端加入限制性内切酶酶切位点，从靶细胞全基因中扩增出截断的抗原胞外段以及 C 段的 his-tag，用于后续纯化。利用粘性末端 PCR，根据酶切产物粘性末端正义链和反义链分别设计引物，

分别进行 PCR 后，与酶切后的载体进行一步重组连接，连接后向 50μL DH5α 感受态细胞中加入 5μL 连接产物进行转化，倒置于 37℃培养箱中培养 12-16hr。

4) 质粒提取方法

质粒提取采用碱裂解法，质粒提取后通过 260nm 光吸收检测质粒浓度。初次测序结果正确的质粒，需要转化挑取单克隆，进行小提，并且酶切鉴定质粒是否正确。

通过以上方法获得质粒 pHAGE-EF1A-IRES-RFP；恒定区分别为 TCRa/bC-WT (包含 TCRaC-WT 和 TCRbC-WT)、TCRa/bC-N.DLT(包含 TCRaC-N.DLT 和 TCRbC-N.DLT)、TCRa/bC-C.DLT(包含 TCRaC-C.DLT 和 TCRbC-CDLT)、TCRa/bC-N.Rec-1(包含 TCRaC-N.Rec-1 和 TCRbC-N.Rec-1)、TCRa/bC-N.Rec-2(包含 TCRaC-N.Rec-2 和 TCRbC-N.Rec-2)、TCRa/bC-N.Rec-3(包含 TCRaC-N.Rec-3 和 TCRbC-N.Rec-3)、TCRa/bC-N.Rec-4(包含 TCRaC-N.Rec-4 和 TCRbC-N.Rec-4)、TCRa/bC-N.rRec(包含 TCRaC-N.rRec 和 TCRbC-N.rRec)、TCRa/bC-Cys(包含 TCRaC-Cys 和 TCRbC-Cys)、TCRa/bC-TM9(包含 TCRaC-TM9 和 TCRbC-WT)、TCRa/bC-Cys-N.Rec-1(包含 TCRaC-Cys-N.Rec-1 和 TCRbC-Cys-N.Rec-1)、TCRa/bC-TM9-N.Rec-1(包含 TCRaC-TM9-N.Rec-1 和 TCRbC-N.Rec-1)、TCRa/bC-Cys-TM9(包含 TCRaC- Cys-TM9 和 TCRbC-Cys)、TCRa/bC-Cys-TM9-N.Rec-1(包含 TCRaC-Cys-TM9-N.Rec-1 和 TCRbC-Cys-N.Rec-1)的多种 pHAGE-EF1A-Cetux-VL-TCRaC-P2A-VH-TCRbC-IRES-RFP 和 pHAGE-EF1A-GC33-VL-TCRaC-P2A-VH-TCRbC-IRES-RFP 质粒；以及针对不同靶点，其 TCR 恒定区均为 TCRa/bC-Cys-TM9-N.Rec-1 的 pHAGE-EF1A-334-VL-TCRbC-P2A-VH-TCRaC-IRES-RFP、pHAGE-EF1A-2C6-VL-(G4S)3-VH-TCRbC-P2A-FMC63-VL-(G4S)3-VH-TCRaC-IRES-RFP、pHAGE-EF1A-M971-VL-(G4S)3-VH-TCRbC-P2A-334-VL-(G4S)3-VH-TCRaC-IRES-RFP 等质粒。

实施例 4. 工具质粒和细胞系的构建

1) 质粒 pHAGE-luciferase-GFP 构建

pHAGE 作为一种慢病毒载体可将目的基因稳定的插入到目的细胞基因组中，是构建稳定细胞系的一种重要途径。荧光素酶(Luciferase)是一种具有催化活性的酶，可以催化底物发生化学自发光，通过将目的细胞稳定表达荧光素酶，加入底物后可指示目的细胞的数量，从而反应功能细胞对目的细胞的影响。PHAGE-EF1A 载体携带限制性内切酶 Not I/Cla I 酶切位点，利用这两个酶将载体切开，利用 NCBI 获得荧光素酶和 GFP 序列，通过商业化公司睿博兴科合成片段，通过 Overlap PCR 方法首先将荧光素酶基因和 GFP 基因联合，再通过同源重组方法将荧光素酶-GFP 片段连入 pHAGE 载体中，在 EF1A 和 WPRE 分别设计正反向引物，测序获得载体构建是否成功。

2) 携带 luciferase 靶细胞系构建(含细胞系列表)

带有荧光素酶和 GFP 的慢病毒载体构建成功后，通过 Lentix-293T 包装慢病毒，PEG8000 浓缩方法浓缩慢病毒液，使用梯度稀释法测定病毒滴度，然后感染目的细胞包括但不限于下表中细胞系：

名称	靶点	对应癌症/疾病或功能
A431	EGFR	皮肤癌
A549	EGFR	肺癌
B16/htEGFR	EGFR	黑色素瘤
HepG2	GPC3	肝癌
HUH7	GPC3	肝癌
RAJI	CD19	淋巴瘤/白血病
RAJI-CD19KO	CD19-	淋巴瘤/白血病
RAJI-CD20KO	CD20-	淋巴瘤
RAJI-CD22KO	CD22-	淋巴瘤

感染后 72 小时通过荧光显微镜观察是否有 GFP 阳性细胞，然后通过流式分选仪分选出 GFP 阳性细胞，挑选单克隆，并建库保存。同时，使用荧光素酶底物与目的细胞共孵育，检测荧光酶素表达及检测水平，确定表达水平。

3) TCRa/b 敲除的 Jurkat 细胞系构建

基于 TCR 的结构和序列特征，在 α 链和 β 链的恒定区设计 guide 序列，构建 TCRα-β-Jurkat 细胞系。在 NCBI 分别获取 TCR α 链和 β 链的恒定区 exon 序列，将 α 链和 β 链恒定区的 exon 1 的序列提交到 tools.genome-engineering.org 网站设计 guide 序列，根据结果合成 oligo 序列。然后构建 sgRNA-LentiCRISPR 慢病毒载体，将 CRISPR 慢病毒载体用 BsmBI 限制性酶进行酶切，去除 filter 序列，暴露连接末端，同时将质粒用碱性磷酸酶 37℃处理 1 小时，以减少自连现象。酶切后的体系跑琼脂糖凝胶电泳进行胶回收，目的片段的质粒骨架约 11500bp, 同时在~2000bp 处有切下来的 filter 条带；将合成的 guide 序列的 oligo 单链在体外用 T4 连接酶和 T4 PNK 处理，anneal 成双链和并在末端添加磷酸基团用于连接；将 anneal 的双链 guide 序列用水稀释 200 倍，和 BsmBI 酶切的 LentiCRISPR 进行连接，转化到 Stbl3 大肠杆菌，提取质粒用于包毒感染。α 链的 guide 序列与 LentiCRISPR-puro 进行连接，β 链的 guide 序列与 LentiCRISPR-BSD 进行连接。sgRNA-LentiCRISPR 慢病毒的包装，浓缩：将 HEK-293T 提前铺到 10cm dish, 待细胞长至 80%-90%时，配制转染体系，将转染体系加入 HEK-293T 后，把细胞放回 37 度培养箱，培养。计为 0 小时；转染后 12 小时后，换入新鲜 10% FBS-DMEM。转染 48 小时和 72 小时可收病毒；将含有病毒的培养基离心并过滤，加入 PEG8000 混匀，在 4 度静置 12 小时以上，然后 3500 rpm 离心 30 min；弃上清，用合适体积的培养基重悬沉淀。

-80 冻存，或直接使用。Jurkat T 细胞的感染，药杀筛选和单克隆细胞系的鉴定：将 Jurkat T 细胞接种在 12 或 24 孔板里；细胞密度不宜太大；同时加入合适体积的 α 链和 β 链的 sgRNA-LentiCRISPR 病毒，以及 polybrene(按总体积 1:1000 加入)，混匀。 离心感染，1000rpm，32 度离心 90 min。取出后放入 37 度培养箱，计为 0 小时；10-12 小时后换液；48 小时后，加入 Puromycin 和 Blasticidin 至合适的终浓度，药杀 48 小时，可见未感染的对照组细胞全部死亡。将存活的细胞吸出，离心后用完全培养基培养，即为 TCRα-β- Jurkat 细胞库；将 TCRα-β- Jurkat 细胞库用流式 Aria 分选单细胞到 96 孔板中，培养两周后，将长起来的单克隆吸出，扩大培养；将单克隆细胞系分别用 TCRα 链和 β 链的抗体进行鉴定, 两条链都缺陷的细胞系进行扩增，即获得内源性 TCR 敲除的 Jurkat T 细胞系。

实施例 5. 转导 T 细胞的病毒体系的建立

1) 慢病毒体系与包装方法(不同代次)

将 Lentix-293T 细胞按照 5×10^5 个/mL 接种至 10cm 培养皿中，置于 37℃、5%CO2 培养箱中培养，待细胞密度达到 80%(在显微镜下观察)左右时进行转染。将三质粒按照 PMD2.G :PSPAX:transfer plamid=1:2:3 比例，与 500uL 无血清的 DMEM 混合均匀。将 54uL PEI-max 与 500uL 无血清的 DMEM 混合均匀，室温静置 5min(PEI-Max 和质粒的体积质量比为 3:1)。将 PEI-max 混合液缓慢加至质粒混合液中，轻轻吹打，混匀，室温静置 15min。将最终混合液缓慢加入培养基中，充分混匀后，放回培养箱中继续培养 12h-16h，换到 6%FBS DMEM 培养基中继续培养，收取 48h、72h 病毒液。

2) 病毒滴度测量方法

将 Jurkat-C5 细胞以 1.5×10^5 个/mL 接种在平底 96 孔板中，每孔中加入 100uL 含 10%FBS、0.2uL 1000×polybrene 的 1640 培养基。病毒稀释时用 1640 完全培养基进行 10 倍倍比稀释，若为病毒原液测定时第一个孔病毒量为 100uL，若为浓缩液第一个孔病毒用量为 1uL。将稀释好的细胞加入病毒孔中，100uL/well，混合，32℃，1500rpm，离心 90min， 37℃、5%CO2 培养箱中培养 72h。将 96 孔平底板上的细胞吸入到圆底 96 孔板上，4℃，1800rpm 离心 5min，弃上清。加入 200uL 1×PBS 后，4℃，1800rpm 离心 5min，弃上清。加入 200uL 4%组织固定液，避光保存，上流式细胞仪。用流式细胞仪测感染效率，计算滴度时，选择感染率在 2-30%的孔，计算公式为：滴度(TU/mL) = 1.5×10^4×阳性率 ÷ 病毒体积(uL)×1000。

通过以上方法包装了下列质粒的病毒：pHAGE-EF1A-IRES-RFP；恒定区分别为 TCRa/bC-WT (包含 TCRaC-WT 和 TCRbC-WT)、TCRa/bC-N.DLT(包含 TCRaC-N.DLT 和 TCRbC-N.DLT)、TCRa/bC-C.DLT(包含 TCRaC-C.DLT 和 TCRbC-CDLT)、TCRa/bC-N.Rec-1(包含 TCRaC-N.Rec-1 和 TCRbC-N.Rec-1)、TCRa/bC-N.Rec-2(包含 TCRaC-N.Rec-2 和 TCRbC-N.Rec-2)、TCRa/bC-N.Rec-3(包含 TCRaC-N.Rec-3 和 TCRbC-N.Rec-3)、TCRa/bC-N.Rec-4(包含 TCRaC-N.Rec-4 和 TCRbC-N.Rec-4)、TCRa/bC-N.rRec(包含 TCRaC-

N.rRec 和 TCRbC-N.rRec)、TCRa/bC-Cys(包含 TCRaC-Cys 和 TCRbC-Cys)、TCRa/bC-TM9(包含 TCRaC-TM9 和 TCRbC-WT)、TCRa/bC-Cys-N.Rec-1(包含 TCRaC-Cys-N.Rec-1 和 TCRbC-Cys-N.Rec-1)、TCRa/bC-TM9-N.Rec-1(包含 TCRaC-TM9-N.Rec-1 和 TCRbC-N.Rec-1)、TCRa/bC-Cys-TM9(包含 TCRaC- Cys-TM9 和 TCRbC-Cys)、TCRa/bC-Cys-TM9-N.Rec-1(包含 TCRaC-Cys-TM9-N.Rec-1 和 TCRbC-Cys-N.Rec-1)的多种 pHAGE-EF1A-Cetux-VL-TCRaC-P2A-VH-TCRbC-IRES-RFP 和 pHAGE-EF1A-GC33-VL-TCRaC-P2A-VH-TCRbC-IRES-RFP 质粒；以及针对不同靶点，其 TCR 恒定区均为 TCRa/bC-Cys-TM9-N.Rec-1 的 pHAGE-EF1A-334-VL-TCRbC-P2A-VH-TCRaC-IRES-RFP、pHAGE-EF1A-2C6-VL-(G4S)3-VH-TCRbC-P2A-FMC63-VL-(G4S)3-VH -TCRaC-IRES-RFP、pHAGE-EF1A-M971-VL-(G4S)3-VH-TCRbC-P2A-334-VL-(G4S)3-VH -TCRaC-IRES-RFP 等质粒。

实施例 6. T 细胞的培养与感染方法的建立

1) Jurkat T 细胞系的培养方法

Jurkat T 细胞系用含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基培养。培养密度为 $3*10^5$/ml，最高不超过 $3*10^6$/ml，隔 1-2 天进行传代，细胞计数后取所需量细胞，并补充培养基调整至上述密度，置于 CO_2 培养箱培养。

2) Jurkat T 细胞系的感染方法

细胞计数，取 $1*10^6$/ml 细胞离心换液，用 1ml 含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基重悬，加入 24 孔板中，加入适量病毒液，1500rpm，离心 90min，置于 C02 培养箱培养。感染 12h 后彻底换液为新鲜含 10% FBS 的 RPMI 1640 培养基，72h 检测阳性率。

3) 人原代 T 细胞的培养方法

用 Ficoil 分离法获得原代 T 细胞后，用含 10% FBS 及 100 IU/ml IL-2 的 X-VIVO 培养基培养，初始培养密度为 $1*10^6$/ml，加入 CD3 及 RetroNectin r-Fibronectin(终浓度均为 5ug/ml)预包被的孔板中。后期培养密度为 $5*10^5$/ml，最高不超过 $3*10^6$/ml，隔 1-2 天进行传代。

4) 人原代 T 细胞的感染方法

原代 T 细胞培养 48h 后用加入病毒液， MOI=20，1500rpm，离心 90min，置于 $C0_2$ 培养箱培养。感染 24h 后补充含 10% FBS 及 100 IU/ml IL-2 的 X-VIVO 培养基并转孔，72h 通过标签蛋白或者抗体检测感染效率。

5) 感染效率检测方法

感染 72h 后，细胞吹匀计数，取 $5*10^5$/ml 离心，弃上清，染色液为 PBS+2% FBS+ 2 mM EDTA，加入对应抗体进行孵育，孵育 30min，然后加入 PBS 清洗两次，上机检测。

实施例 7. STAR 受体及其突变体在 T 细胞中的表达检测方法

通过基因改造的手段改造 T 细胞过程中，目的基因的表达、上膜、及其在细胞表面

的分布影响了 T 细胞功能，因此通过荧光蛋白检测病毒感染效率，通过在 STAR N 端连接 myc 抗体，使用流式抗体检测 STAR 上膜效率。因为 STAR 的结构起源于 TCR，因此 STAR 是否和内源 TCR 产生错配会影响完整 STAR 的表达丰度，通过 RFP 阳性比率与 STAR myc 阳性比率比较，评价错配效率。

1) STAR 受体上膜效率检测

将构建好的 pHAGE-EF1A-myc-STAR-IRES-RFP 质粒，通过 Lentix-293T 进行病毒包装，并进行病毒浓缩和滴度检测，然后感染 Jurkat C5 和原代 T 细胞，感染 72h 后，收集感染的细胞，使用 FITC-anti-myc 抗体、APC-anti-mTCR-β 抗体进行染色，并使用流式细胞仪(BD Fortessa)检测流式 RFP/FITC/APC 荧光通道。若 FITC 或 APC 有明显的阳性细胞群，则说明 STAR 可以上膜表达，若二者都不表达则说明 STAR 没有上膜。

2) STAR 受体与内源性 TCR 错配几率评估

将构建好的 pHAGE-EF1A-myc-STAR-IRES-RFP 质粒，通过 Lentix-293T 进行病毒包装，并进行病毒浓缩和滴度检测，然后感染 Jurkat 和原代 T 细胞，感染 72h 后，收集感染的细胞，使用 FITC-anti-myc 抗体、APC-anti-mTCR-β 抗体进行染色，并使用流式细胞仪(BD Fortessa f4)检测流式 RFP/FITC/APC 荧光通道。检测 RFP 阳性率与 FITC 或者 APC 阳性率的区别。

实施例 8. STAR 受体及其突变体在 T 细胞中体外水平的功能检测方法

1) T 细胞与靶细胞体外共培养方法

T 细胞包括 T 细胞系 Jurkat C5，Jurkat 和原代细胞系均为悬浮细胞，而靶细胞根据不同的抗原和细胞系则可分为悬浮细胞和贴壁细胞，如 RAJI 等悬浮靶细胞和 T 细胞共孵育，则同时取相应细胞数量使用靶细胞培养基混匀离心培养即可，若为贴壁靶细胞，则需提前一天接种靶细胞，然后再加入一定量的 T 细胞，具体步骤为：利用包装并纯化好的 STAR 病毒感染 T 细胞系或原代 T 细胞，共培养前一天使用流式检测感染效率，确定功能细胞与靶细胞比值，一般使用 10:1，5:1，1:1 比例，根据感染效率计算总 T 细胞数量，靶细胞一般使用量为 4E5/孔(24 孔板)。

2) T 细胞被靶标抗原刺激方法

本申明的靶点一般为细胞表面蛋白，抗原可直接用于 T 细胞的激活，以检测 T 细胞的功能，通常使用 300 微升 5μg/ml 抗原(1xcoating buffer 稀释，以 24 孔板为例)包被孔板过夜，然后弃去抗原，加入 1E6/孔的阳性 T 细胞，离心激活 6、12、24h 后收集 T 细胞检测 T 细胞功能。

3) T 细胞分泌细胞因子分析：ELISA

T 细胞激活过程中会释放大量细胞因子，以帮助 T 细胞杀伤靶细胞或者促进 T 细胞自身的扩增，常见的有 TNF-α、IFN-γ、IL-2。T 细胞经过与靶细胞或者抗原刺激后，收集 T 细胞，离心，取上清。TNF-α、IFN-γ、IL-2 ELISA 试剂盒使用的为 Human IL-2 Uncoated ELISA、Human TNF-α Uncoated ELISA、Human IFN-γ Uncoated ELISA(货号分别为

88-7025、88-7346、88-7316)。具体步骤为：用 ddH2O 将 10X Coating Buffer 稀释为 1X，加入包被抗体(250X)，混匀后加入 96 孔板(ELISA 专用)，100 μl/孔。保鲜膜密封后于 4℃过夜，1X PBST(又名 Wash Buffer，1X PBS 中加 0.05% Tween 20)洗 3 次，每次 260 μl/孔，用 ddH2O 将 5X ELISA/ELISPOT Diluent 稀释为 1X，加入 96 孔板，200 μl /孔，室温静置 1h。PBST 清洗 1 次，标曲稀释(范围分别为：2~250、4~500、4~500)，样品使用 1xDiluent 稀释 20-50 倍。加入样品和标曲，每孔 100 微升，两个复孔，常温孵育 2h 后，PBST 清洗三次，加入 1xDiluent 稀释好的 Detection antibody，孵育 1h 后，PBST 清洗 3 次，然后加入 1xDiluent 稀释的 HRP，孵育 30 分钟后，清洗 6 次，加入 TMB 显色，显色时间不超过 15min，加入 2N H2SO4 终止，450 nm 光吸收检测光吸收。

4) T 细胞杀伤功能验证：Luciferase 检测

共培养 24 h 后，轻轻吹匀细胞悬液，每孔取 150μL 细胞悬液加入到白色 96 孔板中，每孔取 2 个复孔，加入 luciferase 底物(promega)。振荡(低速)，共孵育 10min 后，使用多功能酶标仪检测化学发光值，增益值固定 100。细胞杀伤计算：杀伤效率=100%-(效应细胞-靶细胞孔值/对照细胞-靶细胞孔值)。

实施例 9. STAR 受体及其突变体在 T 细胞中于动物肿瘤模型水平的功能检测方法

1) 实验动物模型

本实验采用 NSG 免疫缺陷型小鼠为模型。该小鼠基因型为 NOD-Prkdc^{em26}Il2rg^{em26}/Nju，缺乏 T 细胞、B 细胞、NK 细胞，并且其巨噬细胞和树突状细胞也存在缺陷。NSG 小鼠是目前免疫缺陷最完全的小鼠品系，因其不会对移植瘤、T 细胞产生排斥反应，从而广泛应用于 T 细胞治疗的临床前研究。本实验将采用 6～8 周龄的雌性 NSG 小鼠，每批实验中小鼠体重差异控制在 2g 以内。小鼠饲养于无特定病原体(SPF)的清洁级屏障内的独立通风笼中，提供正常饮食和 pH 偏酸的饮用水，以防止病原体污染。

2) 肿瘤模型建立

本发明采用多种肿瘤模型来验证 STAR-T 细胞的功能，以验证其作用的普适性。在构建血液肿瘤模型中，本实验采用人类 Burkitt's 淋巴瘤细胞系 Raji 细胞进行异种移植。Raji 细胞为通过慢病毒载体表达了荧光素酶(luciferase)基因的细胞株，在小鼠体内通过荧光素化学发光、活体成像的方式实时监测 Raji 肿瘤的发展变化。该模型中，不同剂量(一般在 1~3x10^6 细胞左右)的 Raji-luciferase 细胞通过尾静脉回输方式接种于 6～8 周的雌性 NSG 小鼠中。3 天后给小鼠腹腔注射荧光素钾盐溶液，通过活体成像的方式检测到体内肿瘤细胞的荧光信号。Raji 细胞在小鼠体内生长速度快，通过血液分布遍布全身，有一定几率侵染重要器官并形成实体肿瘤，引起小鼠体重降低等症状；在无治疗处理情况下，Raji 肿瘤负担在 30～40 天左右导致小鼠死亡。

在构建异种移植实体肿瘤模型中，本实验选取了多种肿瘤类型，包括人类表皮细胞癌 A431 细胞系、人类非小细胞肺癌 A549 细胞系、人类肝癌 Huh-7 和 HepG2、人类脑

胶质肿瘤 U87 和 U251 细胞系、以及人类乳腺癌 MDA-MB-231 细胞系。这些细胞通过慢病毒载体表达了荧光素酶(luciferase)基因，在小鼠体内可通过荧光素化学发光、活体成像的方式实时监测肿瘤的发展变化。该模型中，不同剂量(根据肿瘤恶性程度和特性不同，从 $2x10^5$ 至 $3x10^6$ 范围内)的细胞与基质胶混合后，通过皮下注射的模式接种于小鼠皮下。3 天后给小鼠腹腔注射荧光素钾盐溶液，可通过活体成像的方式检测到体内肿瘤细胞的荧光信号。皮下接种的实体肿瘤一般不具有侵袭性、不易转移，常在原位皮下形成致密肿瘤包块。通过用游标卡尺测量肿瘤包块的长、宽、高，亦可通过肿瘤体积大小来监测肿瘤进程。在无治疗处理情况下，这些实体肿瘤细胞形成的肿瘤包块在 20～40 天左右达到动物福利伦理标准规定，即当肿瘤包块最大体积超过 15mm、或肿瘤包块体积超过 $1500mm^3$、或皮下肿瘤区域形成溃烂、或肿瘤显著影响到小鼠的活动和进食的时候，应对动物进行安乐死处理。

3) 动物实验操作方法

实验动物小鼠的操作方法包括：捉拿和固定、编号、麻醉、去毛、给药、取血、处死和解剖。其中，实验中使用了的编号方法包括：剪指号、打耳号以及毛色标记法。实验中使用了的麻醉方法包括：异氟烷吸入式麻醉和 Avertin 或戊巴比妥注射式麻醉。去毛方法包括：使用剪刀或剃刀对小鼠局部部位脱毛。给药方式包括：腹腔注射、尾静脉注射、皮下注射、眼底静脉丛注射、颅内注射等。取血方法包括：眼眶采血、摘眼球取血、尾静脉采血等。处死方式包括脱颈处死、二氧化碳处死等。所有操作均在实验动物研究和使用计划(Animal protocol)的审批通过后进行。

4) 肿瘤生长监测手段

本实验主要通过两种手段来检测肿瘤生长。第一种是活体荧光成像方法：带有荧光素酶基因的肿瘤细胞被打入动物体内定植。给小鼠腹腔注射荧光素钾盐溶液，该底物在酶的作用下发出特定波长的光，通过活体成像仪器敏感的 CCD 设备检测到体内肿瘤细胞的荧光信号。进一步，可以通过专业软件，对荧光信号进行定量分析和绘制热图，可以既直观又定量的反映肿瘤生长情况。第二种方法是测量皮下肿瘤的体积：用游标卡尺测量肿瘤的长、宽、高，并通过特定的计算公式得到体积值。常用的计算公司包括：体积=长 x 宽 x 高；体积=长 x 宽 x 宽；体积=3x 长 x 宽 x 高/π等。

5) T 细胞在动物体内活性和扩增检测方法

T 细胞在体内的存活和扩增情况与其最终抗肿瘤效果有直接联系。为检测 T 细胞在动物体内的活性和增殖情况，本实验定期对小鼠采血，并分析外周血中 STAR-T 细胞的比例、细胞状态和细胞分群。具体操作为：每隔约一周时间，用异氟烷麻醉小鼠，对小鼠进行眼眶采血约 100ul。该血样经历抗凝、收集血浆、裂除红细胞等操作后，对剩下的细胞进行流式染色，以检测 CD4 和 CD8 的比例、及 CCR7、CD45RA、PD-1、LAG-3、TIM-3 等分子来进行 T 细胞亚群分析和细胞状态分析。同时，通过流式细胞仪计数或数字 PCR 的方法，得到 STAR-T 细胞在小鼠外周血中的绝对数量值。另外，在到达实验终点是，可解剖小鼠、检测 T 细胞在小鼠其它免疫器官里的比例。

6) T 细胞在动物体内的安全性评估方法

为评估 STAR-T 细胞的毒性和安全性，可检测细胞对实验动物是否造成副作用。通过观察小鼠行为状态、进行小鼠病理分析、对小鼠重要器官切片分析等方式，可评估回输的 T 细胞是否有显著毒性。同时，通过对小鼠非肿瘤的组织进行 T 细胞浸润分析，也可判断 T 细胞是否对其有脱靶杀伤效应。此外，通过检测小鼠血液中的细胞因子水平，如 IL-2、IFN-γ、TNFα 或 IL-6 等，可以判断 T 细胞是否会造成系统性的细胞因子风暴。

7) T 细胞肿瘤浸润能力评估方法

T 细胞浸润肿瘤的能力是其挑战实体肿瘤的核心能力。为检测 T 细胞浸润能力，首先可以分离肿瘤组织、消化研磨得到单细胞，通过流式染色可以检测 T 细胞在肿瘤组织中的占比。同时，可以进一步通过密度梯度离心(如 Percoll 梯度、Ficoll 梯度等)的方法将肿瘤悬液中的肿瘤细胞、肿瘤基质细胞与免疫细胞分离，以便获得纯化的肿瘤浸润 T 细胞，利用测序等方法细致分析其特性，包括趋化因子受体表达、T 细胞耗竭程度等等。

实施例 10. anti-EGFR STAR 受体的构建以及恒定区修饰的鉴定

10.1. anti-EGFR STAR 受体的构建

(1)靶向 EGFR 的抗体序列确定

抗体重链可变区(anti-EGFR Cetux-VH，SEQ ID NO:22)和抗体轻链可变区(anti-EGFR Cetux-VL，SEQ ID NO:23)选择西妥昔单抗(Centuximab，简称 Cetux)。序列经过密码子优化后基因合成而得。

(2) 靶向 EGFR 的 STAR 设计

STAR 含有两条多肽链，将 anti-EGFR Cetux-VL 与 mouse TCRbC-WT 链融合为第一多肽段，将 anti-EGFR Cetux-VH 与 mouse TCRaC-WT 链融合为第二多肽段。两条链均使用 GM-CSF signal peptide 信号肽。STAR 的基因序列通过 Furin-SGSG-p2A 蛋白酶切位点多肽段相连，两条多肽链将一同被转录并翻译表达成蛋白质，之后再被 furin 和 p2A 对应的蛋白酶切割，最终成为两个独立的蛋白链。两条蛋白链与 T 细胞内源的 CD3 亚基(ε,δ,γ,ζ)形成复合体，并且在 GM-CSF 信号肽的引导下，被转运并呈递在细胞膜上(如图 1 所示)。

(3)、基因片段的克隆与组装

通过基因合成和克隆的方式获得的四个片段“anti-EGFR Cetux-VL”，“ mouse TCRbC-WT”，“ anti-EGFR Cetux-VH”，“ mouse TCRaC-WT”。每对引物上都带有与前后同源的 25bp 碱基，四个片段通过 Gibson Assembly 的方法一步重组连接到慢病毒载体 pHAGE 中。从而获得 STAR。

(4). 载体转化和测序

Gibson Assembly 的产物被转化入了 DH5α 菌株，使其在含氨苄的 LB 平板上过夜生长。挑单克隆菌进行测序，测序引物选用 pHAGE 载体上的引物 seq-pHAGE-F 和 seq-pHAGE-R。

(5). 质粒提取

将测序结果正确的菌接种在 LB 液体培养基中，过夜培养。使用具有去内毒素功能的试剂盒提取质粒。质粒浓度用 Nanodrop 测量，质粒终浓度在 1000ng/ul 左右，A260/A280 值大于 1.8。由此获得恒定区为 mouse TCRa/bC-WT 的靶向 EGFR 的 STAR 质粒 pHAGE-EF1A-Cetux-VL-TCRaC-P2A-VH-TCRbC-IRES-RFP。

类似地，构建了恒定区分别为 TCRa/bC-N.DLT(包含 TCRaC-N.DLT 和 TCRbC-N.DLT)、TCRa/bC-C.DLT(包含 TCRaC-C.DLT 和 TCRbC-CDLT)、TCRa/bC-N.Rec-1(包含 TCRaC-N.Rec-1 和 TCRbC-N.Rec-1)、TCRa/bC-N.Rec-2(包含 TCRaC-N.Rec-2 和 TCRbC-N.Rec-2)、TCRa/bC-N.Rec-3(包含 TCRaC-N.Rec-3 和 TCRbC-N.Rec-3)、TCRa/bC-N.Rec-4(包含 TCRaC-N.Rec-4 和 TCRbC-N.Rec-4)、TCRa/bC-N.rRec(包含 TCRaC-N.rRec 和 TCRbC-N.rRec)、TCRa/bC-Cys(包含 TCRaC-Cys 和 TCRbC-Cys)、TCRa/bC-TM9(包含 TCRaC-TM9 和 TCRbC-WT)、TCRa/bC-Cys-N.Rec-1(包含 TCRaC-Cys-N.Rec-1 和 TCRbC-Cys-N.Rec-1)、TCRa/bC-TM9-N.Rec-1(包含 TCRaC-TM9-N.Rec-1 和 TCRbC-N.Rec-1)、TCRa/bC-Cys-TM9(包含 TCRaC- Cys-TM9 和 TCRbC-Cys)、TCRa/bC-Cys-TM9-N.Rec-1(包含 TCRaC-Cys-TM9-N.Rec-1 和 TCRbC-Cys-N.Rec-1)的多种 pHAGE-EF1A-Cetux-VL-TCRaC-P2A-VH-TCRbC-IRES-RFP 质粒。

上述质粒包装成病毒，感染细胞并检测了 STAR 的上膜效率。结果见图 6。

10.2. anti-EGFR STAR 受体的恒定区 N 端修饰和重排突变体的功能

1) STAR 恒定区 N 端特定序列删除使 STAR 失去功能

使用 phge-EF1A-IRES-RFP 载体，通过 Gibsson Assembly 重组构建 Mouse TCRa/bC-N.DLT STAR 和 Mouse TCRa/bC-WT STAR 载体，利用 Lentix-293T 细胞包装病毒，包装质粒为 pSPAX、PMD2.G，包装比例为 Transfer plasmid：pSPAX：PMD2.G=3：2：1，10cm 培养皿每皿质粒共 18μg，与 PEI-MAX 比例为 1：3，即使用 54 微升 PEI，转染后 12h 换液，收获 48h 及 72h 病毒液，通过 20000rpm，4°离心 2h 后，使用无血清培养基重悬，100 倍浓缩病毒，并检测病毒滴度，结果显示 Mouse TCRa/bC-N.DLT STAR 病毒包装效率要优于 Mouse TCRa/bC-WT STAR。相同 MOI 感染 Jurkat C5 和原代 T 细胞发现其感染效率并无显著差异，通过原代 T 细胞中 RFP 与 EGFR-his-APC 染色发现 Mouse TCRa/bC-N.DLT 无法上膜，通过与靶细胞 A431、B16-tEGFR、A549 共培养后发现 Mouse TCRa/bC-N.DLT 没有杀伤能力，与 EGFR 抗原刺激后，不分泌细胞因子 IL-2、TNFα 和 IFNγ。

2) STAR 恒定区 C 端重排使 STAR 失去功能

使用 phge-EF1A-IRES-RFP 载体，通过 Gibsson Assembly 重组构建 Mouse TCRa/bC-C.DLT STAR 载体，利用 Lentix-293T 细胞包装病毒，包装质粒为 pSPAX、PMD2.G，包装比例为 Transfer plasmid：pSPAX：PMD2.G=3：2：1，10cm 培养皿每皿

质粒共 18μg，与 PEI-MAX 比例为 1：3，即使用 54 微升 PEI，转染后 12h 换液，收获 48h 及 72h 病毒液，通过 20000rpm，4°离心 2h 后，使用无血清培养基重悬，100 倍浓缩病毒，并检测病毒滴度。感染 Jurkat C5 和原代 T 细胞，通过原代 T 细胞中蛋白质印记、RFP 与 EGFR-his-APC 染色发现 Mouse TCRa/bC-C.DLT 有蛋白表达却无法上膜，说明 Mouse TCRa/bC-C.DLT 所删除的序列对 STAR 的功能很关键，说明 STAR 的重排并非是随意的。

3) STAR 恒定区 N 端的重排起关键作用

使用 phge-EF1A-IRES-RFP 载体，通过 Gibsson Assembly 重组构建 Mouse TCRa/bC-N.Rec-1 STAR、Mouse TCRa/bC-N.Rec-2 STAR、Mouse TCRa/bC-N.Rec-3 STAR、Mouse TCRa/bC-N.Rec-4 STAR 和 Mouse TCRa/bC-WT STAR 载体，利用 Lentix-293T 细胞包装病毒，包装质粒为 pSPAX、PMD2.G，包装比例为 Transfer plasmid：pSPAX：PMD2.G=3：2：1，10cm 培养皿每皿质粒共 18μg，与 PEI-MAX 比例为 1：3，即使用 54 微升 PEI，转染后 12h 换液，收获 48h 及 72h 病毒液，通过 20000rpm，4°离心 2h 后，使用无血清培养基重悬，100 倍浓缩病毒，并检测病毒滴度，结果显示二者之间的病毒滴度无明显差异。感染 Jurkat C5 和原代 T 细胞发现其感染效率并无显著差异。通过原代 T 细胞中 RFP 与 EGFR-his-APC 染色发现 Mouse TCRa/bC-N.Rec-1 比 Mouse TCRa/bC-WT STAR 在与内源性 TCR 错配方面错配率更低，通过与靶细胞 A431、B16-tEGFR、A549 共培养后发现 Mouse TCRa/bC-N.Rec-1 比 Mouse TCRa/bC-WT STAR 具有更强的杀伤靶细胞能力。序列分析表明 Mouse TCRa/bC-N.Rec-1 比 Mouse TCRa/bC-WT STAR 的序列人源性更高，免疫原性预测分析表明 Mouse TCRa/bC-N.Rec 比 Mouse TCRa/bC-WT STAR 的免疫原性更低。同时 Mouse TCRa/bC-N.Rec-2 STAR、Mouse TCRa/bC-N.Rec-3 STAR、Mouse TCRa/bC-N.Rec-4 STAR 却使 STAR 丧失功能。

4) STAR 恒定区 N 端的重排具有序列特异性，它种重排方式无效

使用 phge-EF1A-IRES-RFP 载体，通过 Gibsson Assembly 重组构建 Mouse TCRa/bC-N.Rec-1 STAR 和 Mouse TCRa/bC-N.rRec STAR 载体，利用 Lentix-293T 细胞包装病毒，包装质粒为 pSPAX、PMD2.G，包装比例为 Transfer plasmid：pSPAX：PMD2.G=3：2：1，10cm 培养皿每皿质粒共 18μg，与 PEI-MAX 比例为 1：3，即使用 54μl PEI，转染后 12h 换液，收获 48h 及 72h 病毒液，通过 20000rpm，4°离心 2h 后，使用无血清培养基重悬，100 倍浓缩病毒，并检测病毒滴度，结果显示二者之间的病毒滴度无明显差异。感染 Jurkat C5 和原代 T 细胞发现其感染效率并无显著差异。通过原代 T 细胞中 RFP 与 EGFR-his-APC 染色发现 Mouse TCRa/bC-N.rRec 与 Mouse TCRa/bC-N.Rec-1 相比，其错配率显著升高，通过与靶细胞 A431、B16-tEGFR、A549 共培养后发现 Mouse TCRa/bC-N.rRec 的杀伤功能几乎丧失，比 Mouse TCRa/bC-N.Rec START 功能差距较大。

10.3. anti-EGFR STAR 受体的半胱氨酸点突变突变体的功能

STAR 受体的半胱氨酸点突变能增加额外的二硫键，起到增强配对、稳定复合体的

作用，使用 phge-EF1A-IRES-RFP 载体，通过 Gibsson Assembly 重组构建 Mouse TCRa/bC-Cys STAR 和 Mouse TCRa/bC-WT STAR 载体，利用 Lentix-293T 细胞包装病毒，包装质粒为 pSPAX、PMD2.G，包装比例为 Transfer plasmid：pSPAX：PMD2.G=3：2：1，10cm 培养皿每皿质粒共 18μg，与 PEI-MAX 比例为 1：3，即使用 54μl PEI，转染后 12h 换液，收获 48h 及 72h 病毒液，通过 20000rpm，4°离心 2h 后，使用无血清培养基重悬，100 倍浓缩病毒，并检测病毒滴度，结果显示二者之间的病毒滴度无明显差异。感染 Jurkat C5 和原代 T 细胞发现其感染效率并无显著差异，通过原代 T 细胞中 RFP 与 EGFR-his-APC 染色发现 Mouse TCRa/bC-Cys 比 Mouse TCRa/bC-WT 在与内源性 TCR 错配方面错配率显著降低，通过与靶细胞 A431、B16-tEGFR、A549 共培养后发现 Mouse TCRa/bC-Cys 比 Mouse TCRa/bC-WT 具有更强的杀伤靶细胞能力。与 EGFR 抗原刺激后，其细胞因子 IL-2、TNFα 和 IFNγ 分泌水平更高。

10.4. anti-EGFR STAR 受体跨膜区特定位点进行疏水氨基酸替换的功能

STAR 受体跨膜区特定位点进行疏水氨基酸替换起到关键作用，STAR 受体的半胱氨酸点突变能增加额外的二硫键，起到增强配对、稳定复合体的作用，使用 phge-EF1A-IRES-RFP 载体，通过 Gibsson Assembly 重组构建 Mouse TCRa/bC-TM9 STAR 和 Mouse TCRa/bC-WT STAR 载体，利用 Lentix-293T 细胞包装病毒，包装质粒为 pSPAX、PMD2.G，包装比例为 Transfer plasmid：pSPAX：PMD2.G=3：2：1，10cm 培养皿每皿质粒共 18μg，与 PEI-MAX 比例为 1：3，即使用 54 微升 PEI，转染后 12h 换液，收获 48h 及 72h 病毒液，通过 20000rpm，4°离心 2h 后，使用无血清培养基重悬，100 倍浓缩病毒，并检测病毒滴度，结果显示二者之间的病毒滴度无明显差异。感染 Jurkat C5 和原代 T 细胞发现其感染效率并无显著差异，通过原代 T 细胞中 RFP 与 EGFR-his-APC 染色发现 Mouse TCRa/bC-TM9 比 Mouse TCRa/bC-WT 在与内源性 TCR 错配方面错配率显著降低，通过与靶细胞 A431、B16-tEGFR、A549 共培养后发现 Mouse TCRa/bC-TM9 比 Mouse TCRa/bC-WT 具有更强的杀伤靶细胞能力。与 EGFR 抗原刺激后，其细胞因子 IL-2、TNFα 和 IFNγ 分泌水平更高。

10.5. anti-EGFR STAR 综合突变体的功能

为比较恒定区修饰策略(N 末端修饰、Cys 取代和跨膜区疏水性修饰)三个组合、两两组合与单一修饰的效果，使用 phge-EF1A-IRES-RFP 载体，通过 Gibsson Assembly 重组构建下表中所有 STAR 载体，利用 Lentix-293T 细胞包装病毒，包装质粒为 pSPAX、PMD2.G，包装比例为 Transfer plasmid：pSPAX：PMD2.G=3：2：1，10cm 培养皿每皿质粒共 18μg，与 PEI-MAX 比例为 1：3，即使用 54 微升 PEI，转染后 12h 换液，收获 48h 及 72h 病毒液，通过 20000rpm，4°离心 2h 后，使用无血清培养基重悬，100 倍浓缩病毒，并检测病毒滴度，感染 Jurkat C5 和原代 T 细胞发现，相同 MOI 感染 T 细胞后感染效率即 RFP 阳性率无显著差异，通过 RFP 与 EGFR-his-APC 抗体染色发现，两两突

变组合的错配率要显著低于单一突变策略。相同 RFP 阳性细胞情况下，两两突变的 STAR-T 细胞对靶细胞 A431、B16-htEGFR、A549 的杀伤显著高于单个突变策略。细胞因子 IL-2、TNFα 和 IFNγ 分泌水平也更高。而将三种突变策略同时组合在一起时，则显示出最低的错配率、同时对靶细胞的杀伤也更强、细胞因子的分泌水平也更高。整体结果见图 6。

比较对象 1	比较对象 2	结果
TCRa/bC-Cys-N.Rec-1	TCRa/bC-Cys 和 TCRa/bC-N.Rec-1	恒定区修饰策略两两组合比单一修饰效果更佳
TCRa/bC-Cys-TM9	TCRa/bC-Cys 和 TCRa/bC-TM9	
TCRa/bC-N.Rec-1-TM9	TCRa/bC-N.Rec-1 和 TCRa/bC-TM9	
TCRa/bC-Cys-N.Rec-1-TM9	TCRa/bC-N.Rec-1,TCRa/bC-Cys,TCRa/bC-TM9,TCRa/bC-Cys-N.Rec-1,TCRa/bC-Cys-TM9 和 TCRa/bC-N.Rec-1-TM9	恒定区修饰策略三个组合比两两组合、单一修饰效果更佳

实施例 11. anti-GPC3 STAR 受体的恒定区 N 端修饰和重排突变体的功能

基于实施例1中所述突变策略，本发明针对恒定区进行N端序列截短、重排、C端重排等优化方案，针对GPC3，抗体序列选择针对GPC3的单克隆抗体GC33，抗体重链可变区(anti-GPC3 GC33-VH，SEQ ID NO:25)和抗体轻链可变区(anti-GPC3 GC33-VL，SEQ ID NO:24) 使用 phage-EF1A-IRES-RFP 载体，通过 Gibsson Assembly 重组构建 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.DLT STAR、Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-C.DLT STAR、Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec-1 STAR、Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec-2 STAR、Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec-3 STAR、Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec-4 STAR和Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT STAR等载体。利用Lentix-293T细胞包装病毒，包装质粒为pSPAX、PMD2.G，包装比例为Transfer plasmid：pSPAX：PMD2.G=3：2：1，10 cm培养皿每皿质粒共18μg，与PEI-MAX比例为1:3，即使用54微升PEI，转染后12h换液，收获48h及72h病毒液，通过20000rpm，4°离心2h后，使用无血清培养基重悬，100倍浓缩病毒，并检测病毒滴度。结果见图7。

1) STAR 恒定区 N 端特定序列截短使 STAR 失去功能

结果显示 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.DLT STAR 和 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT STAR。相同 MOI 感染 Jurkat C5 和原代 T 细胞发现其感染效率并无显著差异，通过原代 T 细胞中 RFP 与 GPC3-FITC 染色发现 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.DLT 无法上膜，通过与靶细胞 Huh-7 和 HepG2 细胞共培养后发现 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.DLT 没有杀伤能力。

2) STAR 恒定区 C 端重排使 STAR 失去功能

感染 Jurkat C5 和原代 T 细胞，通过原代 T 细胞中蛋白质印记、RFP 与 GPC3-FITC 染色发现 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-C.DLT 无法上膜，说明 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-C.DLT 所删除的序列对 STAR 的功能很关键，说明

STAR 的重排并非是随意的，通过与靶细胞 Huh-7 和 HepG2 细胞共培养后发现其没有杀伤功能。

3) STAR 恒定区 N 端的重排起关键作用

感染 Jurkat C5 和原代 T 细胞发现其感染效率并无显著差异。通过原代 T 细胞中 RFP 与 EGFR-his-APC 染色发现 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec-1 比 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT STAR 在与内源性 TCR 错配方面错配率更低，通过与靶细胞 Huh-7 和 HepG2 细胞共培养后发现 MouseGC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec-1 比 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT STAR 具有更强的杀伤靶细胞能力。序列分析表明 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec-1 比 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT STAR 的序列人源性更高，免疫原性预测分析表明 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec 比 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT STAR 的免疫原性更低。同时 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec-2 STAR、Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec-3 STAR、Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec-4 STAR 却使 STAR 丧失功能。

4) STAR 恒定区 N 端的重排具有序列特异性，它种重排方式无效

通过原代 T 细胞中 RFP 与 GPC3-FITC 染色发现 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.rRec 与 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec-1 相比，GC33 scFv 无法上膜，通过与靶细胞 Huh-7 和 HepG2 细胞共培养后发现 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.rRec 的杀伤功能丧失，与 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-N.Rec START 功能差距较大。

实施例 12. anti-GPC3 STAR 受体的半胱氨酸点突变突变体的功能

STAR 受体的半胱氨酸点突变能增加额外的二硫键，起到增强配对、稳定复合体的作用，使用 phage-EF1A-IRES-RFP 载体，通过 Gibsson Assembly 重组构建 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-Cys STAR 和 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT STAR 载体，利用 Lentix-293T 细胞包装病毒，包装质粒为 pSPAX、PMD2.G，包装比例为 Transfer plasmid：pSPAX：PMD2.G=3:2:1，10cm 培养皿每皿质粒共 18μg，与 PEI-MAX 比例为 1:3，即使用 54μl PEI，转染后 12h 换液，收获 48h 及 72h 病毒液，通过 20000rpm，4°离心 2h 后，使用无血清培养基重悬，100 倍浓缩病毒，并检测病毒滴度，结果显示二者之间的病毒滴度无明显差异。感染 Jurkat C5 和原代 T 细胞发现其感染效率并无显著差异，通过原代 T 细胞中 RFP 与 GPC3-FITC 染色发现 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-Cys 比 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT 在与内源性 TCR 错配方面错配率显著降低，通过与靶细胞 Huh-7 和 HepG2 细胞共培养后发现 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-Cys 比 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT 具有更强的杀伤靶细胞能力。

实施例 13. anti-GPC3 STAR 受体跨膜区特定位点进行疏水氨基酸替换的功能

STAR 受体跨膜区特定位点进行疏水氨基酸替换起到关键作用，STAR 受体的半胱氨酸点突变能增加额外的二硫键，起到增强配对、稳定复合体的作用，使用 phage-EF1A-IRES-RFP 载体，通过 Gibsson Assembly 重组构建 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-TM9 STAR 和 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT STAR 载体，利用 Lentix-293T 细胞包装病毒，包装质粒为 pSPAX、PMD2.G，包装比例为 Transfer plasmid：pSPAX：PMD2.G=3：2：1，10cm 培养皿每皿质粒共 18μg，与 PEI-MAX 比例为 1：3，即使用 54 微升 PEI，转染后 12h 换液，收获 48h 及 72h 病毒液，通过 20000rpm，4°离心 2h 后，使用无血清培养基重悬，100 倍浓缩病毒，并检测病毒滴度，结果显示二者之间的病毒滴度无明显差异。感染 Jurkat C5 和原代 T 细胞发现其感染效率并无显著差异，通过原代 T 细胞中 RFP 与 GPC3-FITC 蛋白染色发现 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-TM9 比 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT 在与内源性 TCR 错配方面错配率显著降低，通过与靶细胞 Huh-7 和 HepG2 细胞共培养后发现 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-TM9 比 Mouse GC33-VH TCRa-GC33-VL TCRbC-WT 具有更强的杀伤靶细胞能力。

实施例 14. anti-GPC3 STAR 综合突变体的功能

为比较突变策略三个组合、两两组合与单一突变的效果，使用使用 phage-EF1A-IRES-RFP 载体，通过 Gibsson Assembly 重组构建下表中所有 STAR 载体，利用 Lentix-293T 细胞包装病毒，包装质粒为 pSPAX、PMD2.G，包装比例为 Transfer plasmid：pSPAX：PMD2.G=3:2:1，10cm 培养皿每皿质粒共 18μg，与 PEI-MAX 比例为 1：3，即使用 54 微升 PEI，转染后 12h 换液，收获 48h 及 72h 病毒液，通过 20000rpm，4°离心 2h 后，使用无血清培养基重悬，100 倍浓缩病毒，并检测病毒滴度，感染 Jurkat C5 和原代 T 细胞发现，相同 MOI 感染 T 细胞后感染效率即 RFP 阳性率无显著差异，通过 RFP 与 GPC3-FITC 蛋白染色发现，两两突变组合的上膜效率显著高于单一突变策略。相同 RFP 阳性细胞情况下，两两突变的 STAR-T 细胞对靶细胞 Huh-7 和 HepG2 细胞的杀伤显著高于单个突变策略。而将三种突变策略同时组合在一起时，则显示出最低的错配率、同时对靶细胞的杀伤也更强、细胞因子的分泌水平也更高。具体结果见图 7。

针对 GPC3 GC33 STAR 突变体比较策略：

比较对象 1	比较对象 2	结果
Cys-N.Rec-1	Cys 和 N.Rec-1	突变策略两两组合比单一突变效果更佳
Cys-TM9	Cys 和 TM9	
N.Rec-1-TM9	N.Rec-1 和 TM9	
Cys-N.Rec-1-TM9	N.Rec-1，Cys，TM9，Cys-N.Rec-1，Cys-TM9 和 N.Rec-1-TM9	突变策略三个组合比两两组合、单一突变效果更佳

实施例 15. 基于 334-scFv 的 anti-CD19 STAR 综合突变体的功能

本发明人获得了新的靶向 CD19 的单克隆抗体 334，由保藏号编号为 CGMCC No. 17095(于 2019 年 1 月 21 日保藏于地址为北京市朝阳区北辰西路 1 号院 3 号，中国科学院微生物研究所的中国微生物菌种保藏管理委员会普通微生物中心)的杂交瘤细胞 334 产生。该抗体包含 anti-CD19 334 VL (SEQ ID NO:27)和 anti-CD19 334 VH (SEQ ID NO:26)，其中所述 anti-CD19 334 VH 包含 SEQ ID NO:28 所示重链 CDR1、SEQ ID NO:29 所示重链 CDR2 和 SEQ ID NO:30 所示重链 CDR3，所述 anti-CD19 334 VL 包含 SEQ ID NO:31 所示轻链 CDR1、SEQ ID NO:32 所示轻链 CDR2 和 SEQ ID NO:33 所示轻链 CDR3。

1) 抗体 334 特异性识别 CD19

采用 ELISA 方法鉴定了 334 抗体与靶抗原 CD19 和非靶抗原 CD20 的识别能力，将表达 334 抗体质粒利用转染试剂 PEI 转染 293T 细胞，72 小时后，收取细胞上清，采用 ELISA 方法检测抗原抗体的特异性结合能力。实验结果显示，334 抗体呈现显著的 CD19 靶抗原特异性结合，对非靶抗原 CD20 无结合能力。

为了验证 CD19-334 抗体可以特异性识别人源细胞表达的 CD19 抗原，采用 WB 试验，检测 CD19-334 抗体与人源 CD19 抗原的识别能力。

2) CD19 阳性蛋白样本的制备：

常规培养人淋巴瘤细胞系 Raji 细胞(CD19 抗原阳性高表达)，待细胞融合至 90%，取 6cm dish 的悬浮细胞，离心后，收集细胞沉淀于 1.5mL 离心管内。加入 200uL 总蛋白提取裂解试剂(RIPA)，充分吹打混匀后，冰上裂解 15 分钟。将离心管骆于 4℃预冷的低温冷冻离心机内，4℃，12000rpm，15min，收集上清。加入 5×loading buffer，100℃，5min，蛋白变性。将样本离心后，20 冰上预冷待进行 WB 电泳(采用人肾癌细胞系 M62 作为 CD19 阴性对照组细胞)。

(2)WB 电泳：制备浓缩胶为 4%，分离胶为 10%的 SDS-PAGE 电泳胶。每孔加入提取的 CD19 阳性蛋白样本和 CD19 阴性的蛋白样本 40uL。80V，20min 电泳，后调整电压为 120V，40-60min。

(3)转膜：采用半干转系统，将目的蛋白转印至 0.45μm 的 PVDF 膜上。转膜条件为 15V，1h。

(4)封闭：将转印完成的 PVDF 膜，置于 5%的脱脂奶粉中封闭，室温，摇床 1h。

(5)一抗孵育：将 PVDF 采用 PBST 将残留的奶粉洗净，并采用滤纸将残留 buffer 吸干，置于含有 CD19 抗原杂交瘤上清(5-8 mL)的一抗孵育盒中。4℃，孵育过夜。

(6)PBST 冲洗：5min x 3。

(7)二抗孵育：将 PVDF 置于 HRP 标记的抗鼠(1：20000)单抗中。室温，孵育 1h。

(8)PBST 冲洗：5min x 3。

(9)凝胶成像仪显色，拍照。

试验结果显示，334 抗体可识别人淋巴瘤细胞系 Raji 细胞中的 CD19 蛋白，目标条带大小为 95kD。

3) 抗体 334 的 Kd 值检测

常规培养人淋巴瘤细胞系 Raji 细胞(CD19 抗原阳性高表达)，待细胞融合至 90%，取 6cm dish 的悬浮细胞，离心后，收集细胞沉淀于 1.5mL 离心管内，并用 PBS 重悬细胞沉淀并调整细胞密度为 5×10^6 个细胞/mL。

取 5×10^6 个 Raji 细胞每孔加入至 96 孔板中，并稀释纯化的 334 抗体为 375nM、187.5nM、30nM、3nM、0.3nM、0.03nM、0.003nM 和 0nM，并加入至 96 孔板中的 Raji 细胞中，4℃孵育 30min 后，2000rpm，离心 5min，弃上清，加入 PBS 清洗细胞一次后，加入 goat-anti mouse AlexaFluor 555 荧光二抗孵育 Raji 细胞 30min。4℃孵育 30min，2000rpm，离心 5min，弃上清，加入 PBS 清洗细胞一次后，加入 200μL PBS 重悬细胞，并采用流式细胞术检测不同 CD19-334 抗体浓度下 Raji 细胞的荧光强度，并通过 GraphPad 软件计算得到 CD19-334 抗体的 Kd 值。

检测结果显示，不同抗体浓度下 Raji 细胞的荧光强度所拟合出的结合曲线，并通过 GraphPad 软件计算得到 CD19-334 抗体的 Kd 值为 1.528±0.25nM。

4) 基于 334-scFv 的 anti-CD19 STAR 综合突变体

在 pHAGE-IRES-RFP 载体基础上构建 myc-Cys-N.Rec-1-TM9-STAR- 334-anti-CD19 STAR 结构。使用的抗原结合序列为 anti-CD19 334 VL (SEQ ID NO:27)和 anti-CD19 334 VH (SEQ ID NO:26)，其中所述 anti-CD19 334 VH 包含 SEQ ID NO:28 所示重链 CDR1、SEQ ID NO:29 所示重链 CDR2 和 SEQ ID NO:30 所示重链 CDR3，所述 anti-CD19 334 VL 包含 SEQ ID NO:31 所示轻链 CDR1、SEQ ID NO:32 所示轻链 CDR2 和 SEQ ID NO:33 所示轻链 CDR3。使用二代包装质粒包装病毒后，感染 Jurkat C5 细胞，流式检测结果发现 STAR 可正常上膜，与靶细胞 Raji 和抗原 CD19 蛋白结合可促进 CD69、CD25 等激活分子表达；病毒感染原代 T 细胞后，T 细胞与靶细胞 Raji、Jeko-1 等共培养，可明显刺激 T 细胞分泌 IL-2、TNF-α 和 IFNγ，并诱导杀伤靶细胞，同时 T 细胞也表达 PD1、TIM3、LAG3 等免疫抑制分子，进一步说明 T 细胞被激活，并行使杀伤功能。以 Raji 细胞在 NSG 小鼠上建立淋巴瘤模型，使用 anti-CD19 STAR T 细胞作用于荷瘤小鼠后，与对照组相比，其可明显对肿瘤产生杀伤作用。结果见图 8。

实施例 16. 针对 CD19-CD20 的 FMC63-2C6 STAR 综合突变体功能

STAR 的结构中，Cα 和 Cβ 可分别连接 scFv 的 VH 和 VL，也可以连接不同的 scFv，这样就使得在双靶点或者单靶点双识别位点上成为可能。在 pHAGE-IRES-RFP 载体基础上构建 myc-Cys-N.Rec-1-TM9-STAR-anti-CD19/CD20 STAR 结构，其中针对 CD19 的靶点选择的 FMC63 单抗（FMC63 VH seq No:44 ，FMC63 VL seq No:45），针对 CD20 选择 2C6 单抗，（2C6 VH seq No: 46，2C6 VL seq No: 47），构建 myc-Cys-N.Rec-1-TM9-STAR-FMC63-2C6 结构，使用二代包装质粒包装病毒后，感染 Jurkat C5 细胞，流式检测结果发现 STAR 可正常上膜；病毒感染原代 T 细胞后，T 细胞

与淋巴瘤细胞系 Raji、Raji-CD19KO、Raji-CD20KO 共培养后，可明显刺激 T 细胞分泌 IL-2、TNF-α 和 IFNγ，并诱导杀伤靶细胞，说明 FMC63-2C6 STAR 对两个靶点均具有良好的杀伤，在临床上可避免这两个靶点其中一个丢失造的肿瘤复发。以 90% Raji + 5% Raji-CD19KO + 5% Raji-CD20KO 细胞在 NSG 小鼠上建立荷瘤模型，使用 FMC63-2C6 STAR 细胞作用于荷瘤小鼠后，与对照组相比，其可明显可完全清除肿瘤，进一步证明其对这两个靶点都有杀伤作用。结果见图 9。

实施例 17. 针对 CD19-CD22 334-M971 STAR 综合突变体功能

STAR 的结构中，Cα 和 Cβ 可分别连接 scFv 的 VH 和 VL，也可以连接不同的 scFv，这样就使得在双靶点或者单靶点双识别位点上成为可能。在 pHAGE-IRES-RFP 载体基础上构建 myc-Cys-N.Rec-1-TM9-STAR-anti-CD19/CD22 STAR 结构，其中针对 CD19 的靶点选择的 334 单抗（334 VH seq No:26，334 VL seq No:27），针对 CD22 选择 M971 单抗，（M971 VH seq No: 48，M971 VL seq No: 49），构建 myc-Cys-N.Rec-1-TM9-STAR-334-M971 结构，使用二代包装质粒包装病毒后，感染 Jurkat C5 细胞，流式检测结果发现 STAR 可正常上膜；病毒感染原代 T 细胞后，T 细胞与淋巴瘤细胞系 Raji、Raji-CD19KO、Raji-CD22KO 共培养后，可明显刺激 T 细胞分泌 IL-2、TNF-α 和 IFNγ，并诱导杀伤靶细胞，说明 334-M971 STAR 对两个靶点均具有良好的杀伤，在临床上可避免这两个靶点其中一个丢失造的肿瘤复发。以 90% Raji + 5% Raji-CD19KO + 5% Raji-CD22KO 细胞在 NSG 小鼠上建立荷瘤模型，使用 334-M971 STAR 细胞作用于荷瘤小鼠后，与对照组相比，其可明显可完全清除肿瘤，进一步证明其对这两个靶点都有杀伤作用。结果见图 10。

序列表

SEQ ID NO:1 人 T 细胞受体 α 链恒定区(Human TCRaC - WT)
DIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWS
NKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLM
TLRLWSS

SEQ ID NO:2 小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区(Mouse TCRaC- WT)
DIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWS
NQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAGFNLLMTLR
LWSS

SEQ ID NO:3 小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区 N 末端缺失序列
DIQNPEPAVYQLKDPRSQ

SEQ ID NO:4 包含 N 末端修饰的小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区(Mouse TCRaC-N.DLT)
DSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNATY
PSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO:5 包含 N 末端修饰的小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区(Mouse TCRaC-N.Rec-4)
DIQNPDPAVYQLRDDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTS
FTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO:6 包含半胱氨酸取代的人 T 细胞受体 α 链恒定区(Human TCRaC- Cys)
DIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWS
NKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQNLSVIGFRILLLKVAGFNLLM
TLRLWSS

SEQ ID NO:7 包含半胱氨酸取代的小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区(Mouse TCRaC- Cys)
DIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWS
NQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAGFNLLMTLR
LWSS

SEQ ID NO:8 包含疏水氨基酸取代的小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区跨膜区
LLVIVLRIL

SEQ ID NO:9 包含疏水氨基酸取代的小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区 (mouse TCRaC-TM9)
DIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWS
NQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLLVIVLRILLLKVAGFNLLMTLRL
WSS

SEQ ID NO:10 Mouse TCRaC- Cys- TM9
DIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWS
NQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLLVIVLRILLLKVAGFNLLMTLRL
WSS

SEQ ID NO:11 Mouse TCRaC-Cys-N.Rec-1
PDPAVYQLRDSKSSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTS
FTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO:12 Mouse TCRaC- TM9-N.Rec-1
PDPAVYQLRDSKSSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTS
FTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLLVIVLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO:13 Mouse TCRaC- Cys-TM9-N.Rec-1
PDPAVYQLRDSKSSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKCVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTS
FTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLLVIVLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO:14 人 T 细胞受体 β 链恒定区(Human TCRbC - WT)
DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQP
ALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADC
GFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF

SEQ ID NO:15 小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区(mouse TCRbC - WT)
DLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKES
NYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITS
ASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS

SEQ ID NO:16 小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区 N 末端缺失序列
DLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQK

SEQ ID NO:17 包含 N 末端缺失的小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区(Mouse TCRbC-N.DLT)
ATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFR
CQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL
VSTLVVMAMVKRKNS

SEQ ID NO:18 包含 N 末端修饰的小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区(Mouse TCRbC-N.- Rec-4)
DLKNVFPPEVAVFEPSAEIATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLS
SRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGV
LSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS

SEQ ID NO:19 包含半胱氨酸取代的人 T 细胞受体 β 链恒定区(Human TCRbC- Cys)
DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQP
ALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADC
GFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKDF

SEQ ID NO:20 包含半胱氨酸取代的小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区(Mouse TCRbC- Cys)
DLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQAYKES
NYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITS
ASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS

SEQ ID NO:21 包含 N 末端修饰和半胱氨酸取代的小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区 Mouse TCRbC-Cys-N.Rec-1
PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVCTDPQAYKESNYSYCLS
SRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGV
LSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS

SEQ ID NO:22 anti-EGFR Cetux-VH
QVQLKQSGPGLVQPSQSLSITCTVSGFSLTNYGVHWVRQSPGKGLEWLGVIWSGGNTDYNTPFTS
RLSINKDNSKSQVFFKMNSLQSNDTAIYYCARALTYYDYEFAYWGQGTLVTVSAASTKG

SEQ ID NO:23 Anti-EGFR Cetux-VL
DILLTQSPVILSVSPGERVSFSCRASQSIGTNIHWYQQRTNGSPRLLIKYASESISGIPSRFSGSGSGTD
FTLSINSVESEDIADYYCQQNNNWPTTFGAGTKLELKRTVA

SEQ ID NO:24 Anti-GPC3 GC33 VL
DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVHSNRNTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKVSNRFSGVPDRF
SGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQNTHVPPTFGQGTKLEIKR

SEQ ID NO:25 Anti-GPC3 GC33 VH
QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFTDYEMHWVRQAPGQGLEWMGALDPKTGDTAYSQ
KFKGRVTLTADESTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCTRFYSYTYWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:26 Anti-CD19 334 VH
QVQLQQSGAELVRPGASVKLSCKALGFIFTDYEIHWVKQTPVHGLEWIGAFHPGSGGSAYNQ
KFKGKATLTADKSSSTAYMELSSLTFEDSAVYHCTRQLGPDWGQGTLVTVS

SEQ ID NO:27 Anti-CD19 334 VL
DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLESDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRF
TGSGSGTDFTLRISRVEAEDLGVYYCWQGTQFPWTFGGGTKLEIK

SEQ ID NO:28 Anti-CD19 334 重链 CDR1
GFIFTDYE

SEQ ID NO:29 Anti-CD19 334 重链 CDR2
FHPGSGGS

SEQ ID NO:30 Anti-CD19 334 重链 CDR3
TRQLGPD

SEQ ID NO:31 Anti-CD19 334 轻链 CDR1
QSLLESDGKTY

SEQ ID NO:32 Anti-CD19 334 轻链 CDR2
LVS

SEQ ID NO:33 Anti-CD19 334 轻链 CDR3

WQGTQFPWT

SEQ ID NO:34 TCRaC-N.Rec-1
PDPAVYQLRDSKSSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTS
FTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO:35 TCRaC-N.Rec-2
VYQLRDSKSSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQ
DIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO:36 TCRaC-N.Rec-3
RDSKSSDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFK
ETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAGFNLLMTLRLWSS

SEQ ID NO:37 TCRbC-N.Rec-1
PPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLS
SRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGV
LSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS

SEQ ID NO:38 TCRbC-N.Rec-2
FEPSEAEISHTQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVS
ATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILY
EILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS

SEQ ID NO:39 TCRbC-N.Rec-3
EISHTQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVSATFWH
NPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLG
KATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS

SEQ ID NO:40 N 端 18 个氨基酸随机重排的 mouse TCRaC-N.rRec
NQSVDPDEQLIPYRKAQPDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWS
NQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLKVAGFNLLMTLR
LWSS

SEQ ID NO:41 N 端 25 个氨基酸随机重排的 mouse TCRbC-N.rRec
PEKREKSVAPAVKKLNLITFQDSPNATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESN
YSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITSAS
YQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS

SEQ ID NO:42 小鼠 TCR α 链恒定区 C 端 15 个氨基酸删除的 mouse TCRaC-C.DLT
DIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWS
NQTSFTCQDIFKETNATYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLLK

SEQ ID NO:43 小鼠 TCR β 链恒定区 C 端 15 个氨基酸删除的 mouse TCRbC-C.DLT
DLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKES
NYSYCLSSRLRVSATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISAEAWGRADCGITS
ASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVL

SEQ ID NO:44 Anti-CD19 FMC63 VH
AVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFGDYTMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVK
GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCTKDNQYGSGSTYGLGVWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:45 Anti-CD19 FMC63 VL
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSG
TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:46 Anti-CD20 2C6 VH
AVQLVESGGGLVQPGRSLRLSCAASGFTFGDYTMHWVRQAPGKGLEWVSGISWNSGSIGYADSVK
GRFTISRDNAKNSLYLQMNSLRAEDTALYYCTKDNQYGSGSTYGLGVWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:47 Anti-CD20 2C6 VL
EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASQSVSSYLAWYQQKPGQAPRLLIYDASNRATGIPARFSGSGSG
TDFTLTISSLEPEDFAVYYCQQRSNWPLTFGGGTKVEIK

SEQ ID NO:48 Anti-CD22 M971 VH
QVQLQQSGPGLVKPSQTLSLTCAISGDSVSSNSAAWNWIRQSPSRGLEWLGRTYYRSKWYNDYAV
SVKSRITINPDTSKNQFSLQLNSVTPEDTAVYYCAREVTGDLEDAFDIWGQGTMVTVSS

SEQ ID NO:49 Anti-CD22 M971 VL
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQTIWSYLNWYQQRPGKAPNLLIYAASSLQSGVPSRFSGRGS
GTDFTLTISSLQAEDFATYYCQQSYSIPQTFGQGTKLEIK

权 利 要 求 书

1. 一种合成 T 细胞受体抗原受体(STAR)，其包含 α 链和 β 链，所述 α 链包含第一抗原结合区和第一恒定区，所述 β 链包含第二抗原结合区和第二恒定区，

其中第一恒定区是天然 T 细胞受体 α 链恒定区的变体，其相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区包含 i) N 末端修饰； ii) 半胱氨酸取代；和/或 iii) 疏水氨基酸取代，和/或

其中第二恒定区是天然 T 细胞受体 β 链恒定区的变体，其相对于天然 T 细胞受体 β 链恒定区包含 i) N 末端修饰；和/或 ii) 半胱氨酸取代。

2. 权利要求 1 的合成 T 细胞受体抗原受体，其中所述第一恒定区衍生自人 T 细胞受体 α 链恒定区、非人灵长类动物 T 细胞受体 α 链恒定区、啮齿动物例如小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，优选地，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区。

3. 权利要求 1 或 2 的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第一恒定区相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区包含 N 末端 18 个氨基酸的修饰。

4. 权利要求 1-3 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，N 末端起 X 个连续氨基酸被缺失，和/或 N 末端的第 X+1 位至第 18 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 α 链恒定区的相应氨基酸取代，其中 X 为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17 或 18。

5. 权利要求 1-4 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 α 链恒定区缺失 N 末端的第 1-4 位氨基酸，且其中 N 末端的第 5-18 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 α 链恒定区的相应氨基酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。

6. 权利要求 1-5 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区，所述第一恒定区在第 48 位包含半胱氨酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。

7. 权利要求 1-6 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区，所述第一恒定区在第 48 位的苏氨酸被突变为半胱氨酸，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。

8. 权利要求 1-7 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区，所述第一恒定区包含在跨膜区内的疏水氨基酸取代，所述跨膜区例如包含第 111-119 位的氨基酸序列，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。

9. 权利要求 1-8 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区，所述第一恒定区包含在第 112 位、114 位和/或 115 位的疏水氨基酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。

10. 权利要求 1-9 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，相对于天然 T 细胞受体 α 链恒定区，所述第一恒定区在第 112 位的丝氨酸被亮氨酸取代，在 114 位的甲硫氨酸被

异亮氨酸取代，和/或在 115 位的甘氨酸被缬氨酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:2。

11. 权利要求 1-10 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第一恒定区包含 SEQ ID NO:8 所示跨膜区。

12. 权利要求 1-11 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第一恒定区包含选自 SEQ ID NO:6-7、9-13 和 34-36 的氨基酸序列。

13. 权利要求 1-12 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第二恒定区衍生自人 T 细胞受体 β 链恒定区、非人灵长类动物 T 细胞受体 β 链恒定区、啮齿动物例如小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，优选地，所述第一恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区。

14. 权利要求 1-13 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第二恒定区相对于天然 T 细胞受体 β 链恒定区包含 N 末端 25 个氨基酸的修饰。

15. 权利要求 1-14 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第二恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，N 末端起 X 个连续氨基酸被缺失，和/或 N 末端的第 X+1 位至第 25 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 β 链恒定区的相应氨基酸取代，其中 X 为 0、1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 或 25。

16. 权利要求 1-15 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第二恒定区衍生自小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区，且相对于天然小鼠 T 细胞受体 β 链恒定区缺失 N 末端的第 1-6 位氨基酸，且其中 N 末端的第 7-25 位氨基酸被天然人 T 细胞受体 β 链恒定区的相应氨基酸取代，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:15。

17. 权利要求 1-16 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，相对于天然 T 细胞受体 β 链恒定区，所述第二恒定区在第 56 位的丝氨酸被突变为半胱氨酸，所述氨基酸编号参考 SEQ ID NO:15。

18. 权利要求 1-17 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第二恒定区包含选自 SEQ ID NO:19-21 的氨基酸序列。

19. 权利要求 1-18 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，其中

i) 所述第一恒定区包含 SEQ ID NO:34 所示氨基酸序列，第二恒定区包含 SEQ ID NO:37 所示氨基酸序列；

ii) 所述第一恒定区包含 SEQ ID NO:7 所示氨基酸序列，所述第二恒定区包含 SEQ ID NO:20 所示氨基酸序列；

iii) 所述第一恒定区包含 SEQ ID NO:9 所示氨基酸序列，所述所述第二恒定区包含 SEQ ID NO:15 所示氨基酸序列；

iv) 所述第一恒定区包含 SEQ ID NO:11 的氨基酸序列，所述第二恒定区包含 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列；

v) 所述第一恒定区包含 SEQ ID NO:12 的氨基酸序列，所述第二恒定区包含 SEQ ID NO:37 所示氨基酸序列；

vi) 所述第一恒定区包含 SEQ ID NO:10 的氨基酸序列，第二恒定区包含 SEQ ID NO:20 所示氨基酸序列；或

vii) 所述第一恒定区包含 SEQ ID NO:13 的氨基酸序列，且所述第二恒定区包含 SEQ ID NO:21 所示的氨基酸序列。

20. 权利要求 1-19 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第一抗原结合区和所述第二抗原结合区各自独立地或组合地特异性结合靶抗原。

21. 权利要求 20 的合成 T 细胞受体抗原受体，其中所述靶抗原是疾病相关抗原，优选是癌症相关抗原，例如选自以下的癌症相关抗原：CD16、CD64、CD78、CD96、CLL1、CD116、CD117、CD71、CD45、CD71、CD123、CD138、ErbB2(HER2/neu)、癌胚抗原(CEA)、上皮细胞粘附分子(EpCAM)、表皮生长因子受体(EGFR)、EGFR 变体 III (EGFRvIII)、CD19、CD20、CD30、CD40、双唾液酸神经节苷脂 GD2、导管上皮粘蛋白、gp36、TAG-72、鞘糖脂、神经胶质瘤相关的抗原、β-人绒毛膜促性腺激素、α胎儿球蛋白(AFP)、外源凝集素反应性 AFP、甲状腺球蛋白、RAGE-1、MN-CA IX、人端粒酶逆转录酶、RU1、RU2(AS)、肠羧基酯酶、mut hsp70-2、M-CSF、前列腺酶(prostase)、前列腺酶特异性抗原(PSA)、PAP、NY-ESO-1、LAGA-1a、p53、Prostein、PSMA、存活和端粒酶、前列腺癌肿瘤抗原-1 (PCTA-1)、MAGE、ELF2M、嗜中性粒细胞弹性蛋白酶、肝配蛋白 B2、CD22、胰岛素生长因子(IGF1)-I、IGF-II、IGFI 受体、间皮素、呈递肿瘤特异性肽表位的主要组织相容性复合体(MHC)分子、5T4、ROR1、Nkp30、NKG2D、肿瘤基质抗原、纤维连接蛋白的额外结构域 A(EDA)和额外结构域 B (EDB)、腱生蛋白-C 的 A1 结构域(TnC A1)、成纤维细胞相关蛋白(fap)、CD3、CD4、CD8、CD24、CD25、CD33、CD34、CD133、CD138、Foxp3、B7-1(CD80)、B7-2(CD86)、GM-CSF、细胞因子受体、内皮因子、主要组织相容性复合体(MHC)分子、BCMA (CD269、TNFRSF17)、TNFRSF17 (UNIPROT Q02223)、SLAMF7(UNIPROT Q9NQ25)、GPRC5D(UNIPROT Q9NZD1)、FKBP11(UNIPROT Q9NYL4)、KAMP3、ITGA8 (UNIPROT P53708)和 FCRL5(UNIPROT Q68SN8)。

22. 权利要求 1-21 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第一抗原结合区包含特异性结合靶抗原的抗体的重链可变区，且所述第二抗原结合区包含所述抗体的轻链可变区；或者，所述第一抗原结合区包含特异性结合靶抗原的抗体的轻链可变区，且所述第二抗原结合区包含所述抗体的重链可变区。

23. 权利要求 1-22 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，其中

所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:22 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:23 所示氨基酸序列；或者，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:23 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:22 所示氨基酸序列，由此所述 STAR 特异性结合 EGFR；或

所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:44 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:45 所示氨基酸序列；或者，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:45

所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:44 所示氨基酸序列，由此所述 STAR 特异性结合 CD19；或

所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:46 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:47 所示氨基酸序列；或者，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:47 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:46 所示氨基酸序列，由此所述 STAR 特异性结合 CD20；或

所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:48 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:49 所示氨基酸序列；或者，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:49 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:48 所示氨基酸序列，由此所述 STAR 特异性结合 CD22；或

所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列；或者，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列，由此所述 STAR 特异性结合 GPC3；或

所述第一抗原结合区包含特异性结合 CD19 的抗体的重链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:28 所示重链 CDR1、SEQ ID NO:29 所示重链 CDR2 和 SEQ ID NO:30 所示重链 CDR3，且所述第二抗原结合区包含特异性结合 CD19 的抗体的轻链可变区，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:31 所示轻链 CDR1、SEQ ID NO:32 所示轻链 CDR2 和 SEQ ID NO33 所示轻链 CDR3；或者，所述第一抗原结合区包含特异性结合 CD19 的抗体的轻链可变区，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:31 所示轻链 CDR1、SEQ ID NO:32 所示轻链 CDR2 和 SEQ ID NO:33 所示轻链 CDR3，且所述第二抗原结合区特异性结合 CD19 的抗体的重链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:28 所示重链 CDR1、SEQ ID NO:29 所示重链 CDR2 和 SEQ ID NO:30 所示重链 CDR3，由此所述 STAR 特异性结合 CD19；或

所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列；或者，所述第一抗原结合区包含 SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列，且所述第二抗原结合区包含 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列，由此所述 STAR 特异性结合 CD19。

24. 权利要求 1-22 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第一抗原结合区包含特异性结合靶抗原的单链抗体(如 scFv)或单域抗体(如骆驼抗体)，和/或所述第二抗原结合区包含特异性结合靶抗原的单链抗体(如 scFv)或单域抗体(如骆驼抗体)。

25. 权利要求 24 的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第一抗原结合区和所述第二抗原结合区结合相同的靶抗原。

26. 权利要求 24 的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第一抗原结合区和所述第二抗原结合区结合相同靶抗原的不同区域(如不同的表位)。

27. 权利要求 24 的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第一抗原结合区和所述第二抗

原结合区结合不同的靶抗原，例如，所述两个抗原结合区可以分别结合 CD19 和 CD20，或分别结合 CD19 和 CD22，或分别结合 CD38 和 BCMA，或分别结合 PDL1 和 EGFR。

28. 一种合成 T 细胞受体抗原受体(STAR)，其包含 α 链和 β 链，所述 α 链包含第一抗原结合区和第一恒定区，所述 β 链包含第二抗原结合区和第二恒定区，

其中第一恒定区是天然 T 细胞受体 α 链恒定区或如权利要求 1-19 任一项中限定的天然 T 细胞受体 α 链恒定区变体，其中第二恒定区是天然 T 细胞受体 β 链恒定区或如权利要求 1-19 任一项中限定的天然 T 细胞受体 β 链恒定区变体，

其中第一抗原结合区和第二抗原结合区特异性地结合不同的靶抗原或相同靶抗原的不同区域。

29. 权利要求 28 的合成 T 细胞受体抗原受体，所述第一抗原结合区和/或第二抗原结合区包含特异性结合靶抗原的单链抗体(如 scFv)或单域抗体(如骆驼抗体)。

30. 权利要求 29 的合成 T 细胞受体抗原受体，其中

所述第一抗原结合区或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:22 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:23 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区或所述第二抗原结合区特异性结合 EGFR；或

所述第一抗原结合区或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:44 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:45 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区或所述第二抗原结合区特异性结合 CD19；或

所述第一抗原结合区或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:46 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:47 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区或所述第二抗原结合区特异性结合 CD20；或

所述第一抗原结合区或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:48 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:49 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区或所述第二抗原结合区特异性结合 CD22；或

所述第一抗原结合区或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:24 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:25 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区或所述第二抗原结合区特异性结合 GPC3；或

所述第一抗原结合区或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含重链可变区和轻链可变区，所述重链可变区包含 SEQ ID NO:28 所示重链 CDR1、SEQ ID NO:29 所示重链 CDR2 和 SEQ ID NO:30 所示重链 CDR3，所述轻链可变区包含 SEQ ID NO:31 所示轻链 CDR1、SEQ ID NO:32 所示轻链 CDR2 和 SEQ ID NO:33 所示轻链 CDR3，由此所述第一抗原结合区或所述第二抗原结合区特异性结合 CD19；或

所述第一抗原结合区或所述第二抗原结合区包含的单链抗体包含 SEQ ID NO:26 所示氨基酸序列以及 SEQ ID NO:27 所示氨基酸序列，由此所述第一抗原结合区或所述第二抗原结合区特异性结合 CD19。

31. 权利要求 29 或 30 的合成 T 细胞受体抗原受体，所述两个抗原结合区可以分别

结合 CD19 和 CD20，或分别结合 CD19 和 CD22，或分别结合 CD38 和 BCMA，或分别结合 PDL1 和 EGFR。

32. 一种分离的多核苷酸，其包含编码权利要求 1-31 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体(STAR)的 α 链和/或 β 链的核苷酸序列。

33. 权利要求 32 的多核苷酸，所述多核苷酸包含在同一读码框内的 i)编码所述 α 链的核苷酸序列、ii)编码所述 β 链的核苷酸序列和 iii)位于 i)和 ii)之间的编码自裂解肽的核苷酸序列。

34. 权利要求 33 的多核苷酸，其中所述自裂解肽是 2A 多肽，例如 P2A 多肽。

35. 一种表达载体，其包含与调控序列可操作连接的权利要求 32-34 中任一项的多核苷酸。

36. 权利要求 35 的表达载体，其是病毒载体，例如慢病毒载体。

37. 一种制备治疗性 T 细胞的方法，包括在 T 细胞中表达权利要求 1-31 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体(STAR)。

38. 权利要求 37 的方法，所述方法包括将权利要求 32-34 中任一项的多核苷酸或权利要求 35 或 36 的表达载体导入 T 细胞。

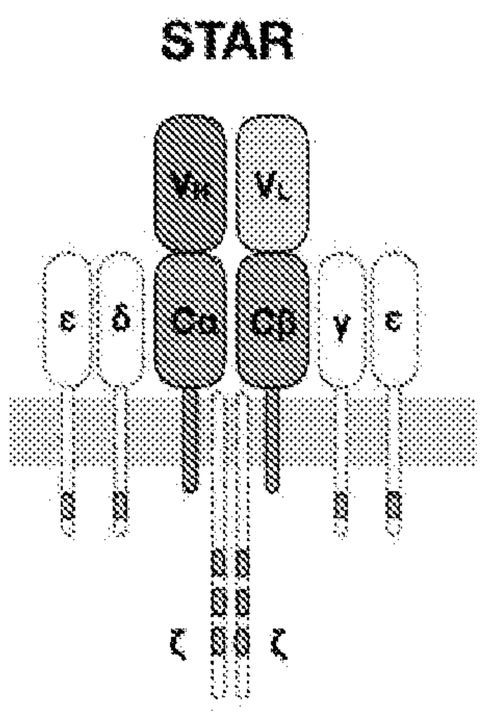
39. 一种治疗性 T 细胞，其包含权利要求 1-31 中任一项的合成 T 细胞受体抗原受体(STAR)，或其通过权利要求 37 或 38 的方法获得。

40. 一种药物组合物，其包含权利要求 39 的治疗性 T 细胞，和药物可接受的载体。

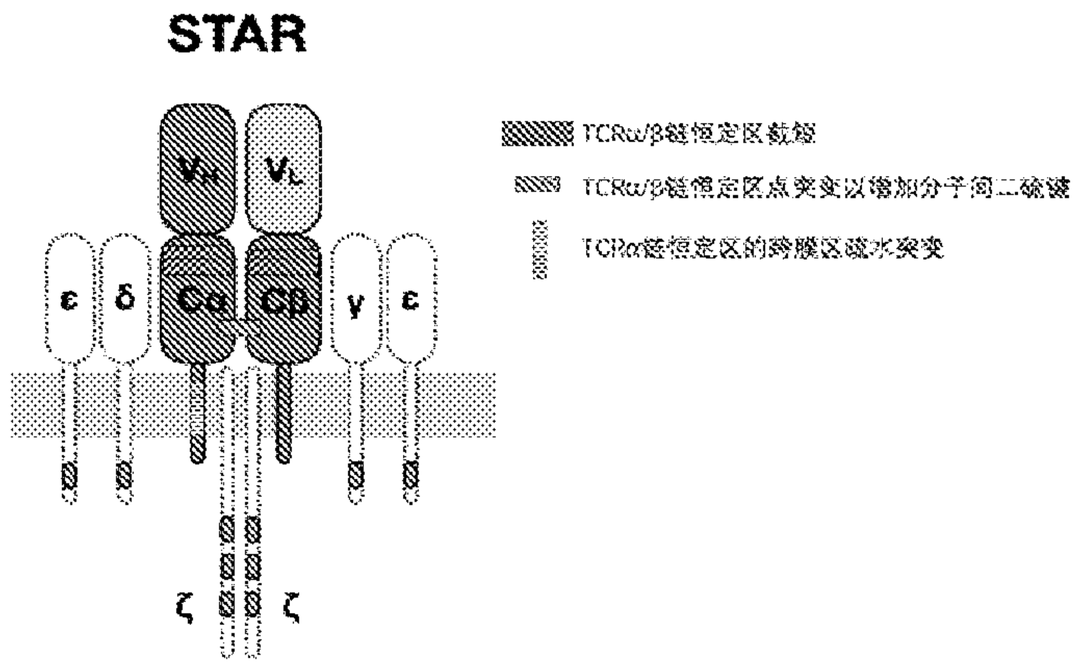
41. 权利要求 39 的治疗性 T 细胞或权利要求 40 的药物组合物在制备用于在对象中治疗疾病例如癌症的药物中的用途。

42. 权利要求 41 的用途，其中所述癌症选自肺癌、卵巢癌、结肠癌、直肠癌、黑色素瘤、肾癌、膀胱癌、乳腺癌、肝癌、淋巴瘤、恶性血液病、头颈癌、胶质瘤、胃癌、鼻咽癌、喉癌、宫颈癌、子宫体瘤、骨肉瘤、骨癌、胰腺癌、皮肤癌、前列腺癌、子宫癌、肛区癌、睾丸癌、输卵管癌、子宫内膜癌、阴道癌、阴户癌、霍奇金病、非霍奇金淋巴瘤、食道癌、小肠癌、内分泌系统癌、甲状腺癌、甲状旁腺癌、肾上腺癌、软组织肉瘤、尿道癌、阴茎癌、慢性或急性白血病(包括急性髓细胞样白血病、慢性髓细胞样白血病、急性淋巴细胞性白血病、慢性淋巴细胞性白血病)、儿童实体瘤、淋巴细胞性淋巴瘤、膀胱癌、肾或输尿管癌、肾盂癌、中枢神经系统(CNS)肿瘤、原发性 CNS 淋巴瘤、肿瘤血管发生、脊柱肿瘤、脑干神经胶质瘤、垂体腺瘤、卡波西肉瘤、表皮状癌、鳞状细胞癌、T 细胞淋巴瘤、环境诱发的癌症，包括石棉诱发的癌症，以及所述癌症的组合。

A


STAR
VH
VL
ε
δ
Cα
Cβ
γ
ε
ζ
ζ

B


STAR
VH
VL
ε
δ
Cα
Cβ
γ
ε
ζ
ζ
TCRα/β链恒定区截短
TCRα/β链恒定区点突变以增加分子间二硫键
TCRα链恒定区的跨膜区疏水突变

C

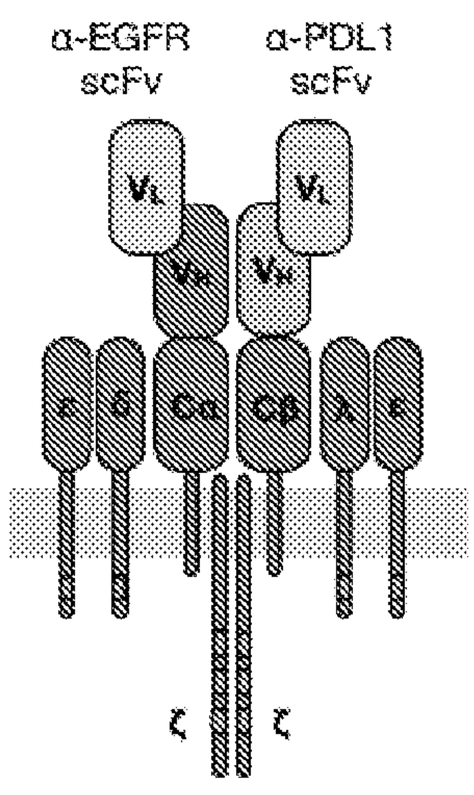

dual STAR
α-EGFR scFv
α-PDL1 scFv
VL
VH
VL
VH
ε
δ
Cα
Cβ
γ
ε
ζ
ζ

图 1


TCRα constant region
63.8% identity in 141 residues overlap; Score: 458.0; Gap frequency: 1.8%
Cysteine modification
Human 1 DIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSV
Mouse 1 DIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTL
5-6
Human 61 SAVAWSNKSDFA
Mouse 61 SAIAWSNQTDFT
Ig domain
Connecting peptide
Human 121 SFLSVLRDFKQPRLAKTFKLNSS
Mouse 117 SFLSVLTDFKQPRLAKTFKLNSS
Transmembrane domain
TCRβ constant region
79.4% identity in 175 residues overlap; Score: 720.0; Gap frequency: 2.3%
Cysteine modification
Human 1 DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQ
Mouse 1 DLENVTPPKVSLFEPSKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQ
5-6
Human 61 PLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIV
Mouse 61 KEKE----SWYSTCLSNRLKVSATFWKDPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNI
Connecting peptide
Human 121 SAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSALVLMAMVKRKD
Mouse 117 SAEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKD
Transmembrane domain

图 2

```
UserSeq1        1 DIQNPDPAVYQLRDSKSS
UserSeq2        1 DIQNPEPAVYQLKDPRSQ
                  ***** ****** *  *
```

图 3

```
UserSeq1        1 DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK
UserSeq2        1 DLRNVTPPKVSLFEPSKAEIANKQK
                  ** ** ** *  **** ***   **
```

图 4

A

突变名称	TCR α 链恒定区改造	TCR β 链恒定区改造
N.Rec-1	N 端截短 4 个 aa，人源化	N 端截短 6 个 aa，人源化
N.Rec-2	N 端截短 8 个 aa，人源化	N 端截短 12 个 aa，人源化
N.Rec-3	N 端截短 12 个 aa，人源化	N 端截短 18 个 aa，人源化
N.Rec-4	N 端 1-14 位 aa 人源化，删除 15-18 位 aa	1-16 位 aa 人源化，删除 17、21-26 位 aa
N.DLT	截短 N 端的 18aa	截短 N 端 25aa
C.DLT	截短 C 端的 15aa	截短 C 端 15aa
N.rRec	N 端 18 个 aa 随机重排	N 端 25 个 aa 随机重排
TM9	α 链跨膜区 111-119 位氨基酸	—
Cys	α 链 48 位苏氨酸 T 突变为半胱氨酸 C	β 链 56 位丝氨酸 S 突变为半胱氨酸 C

B

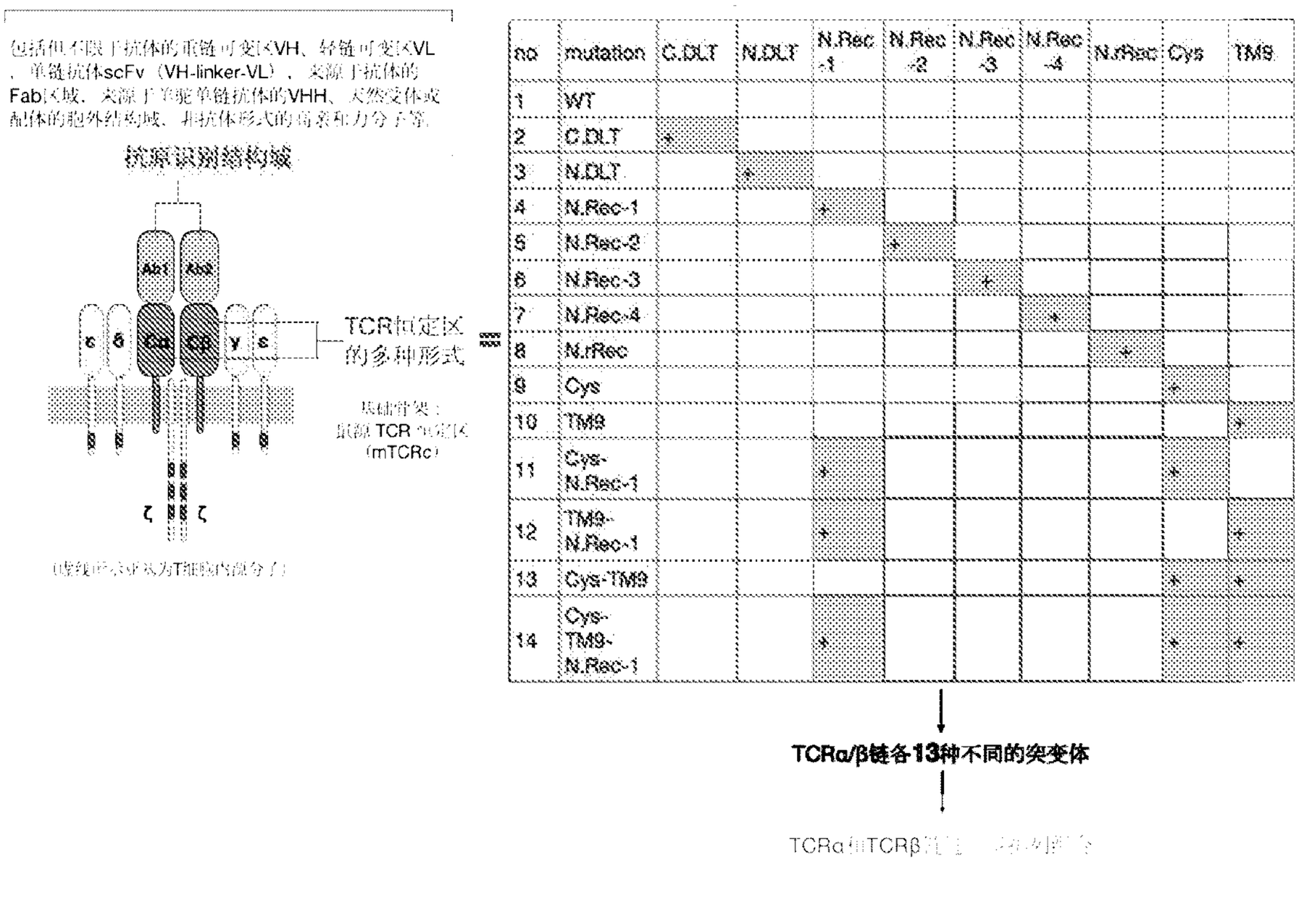
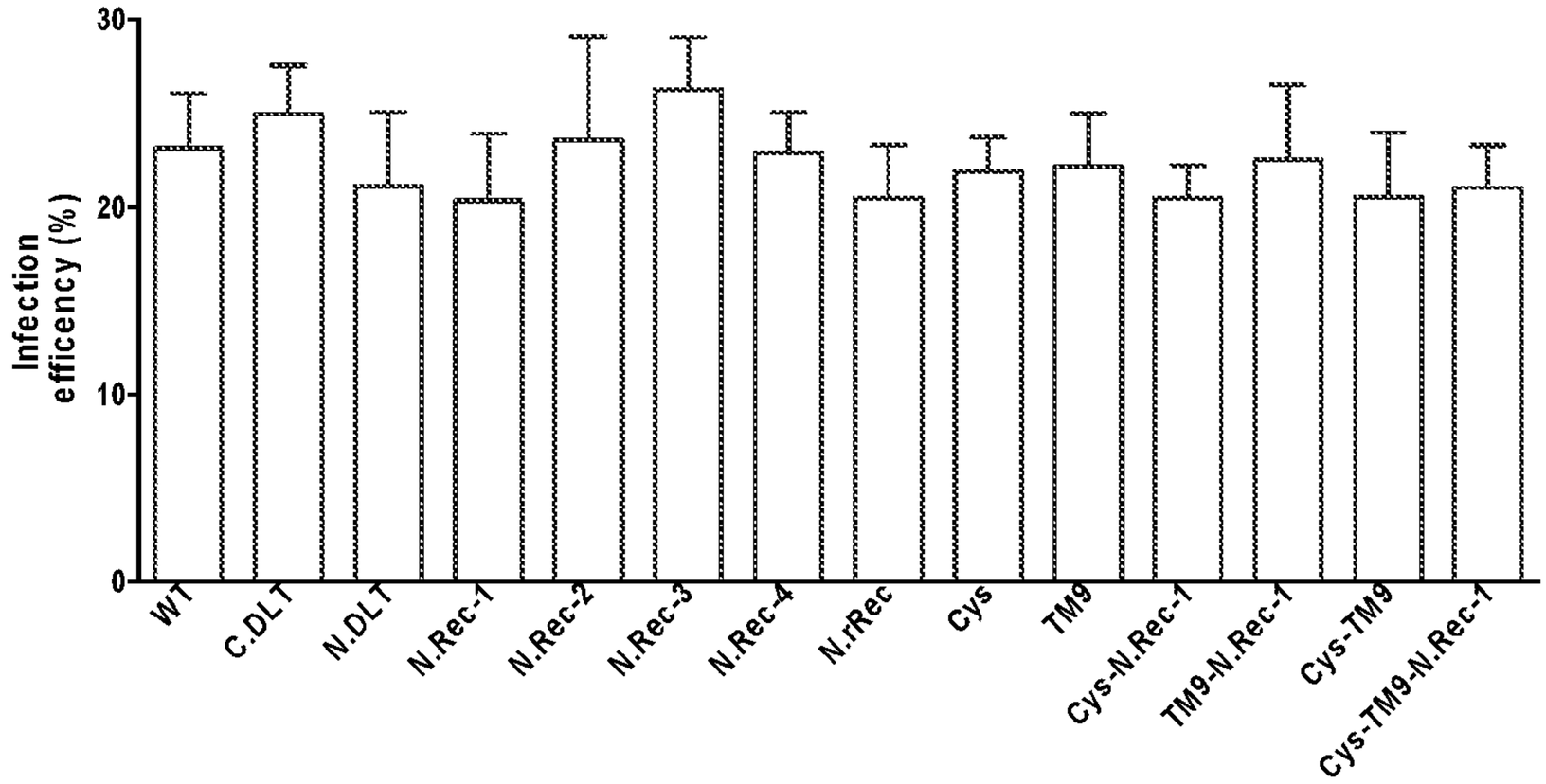
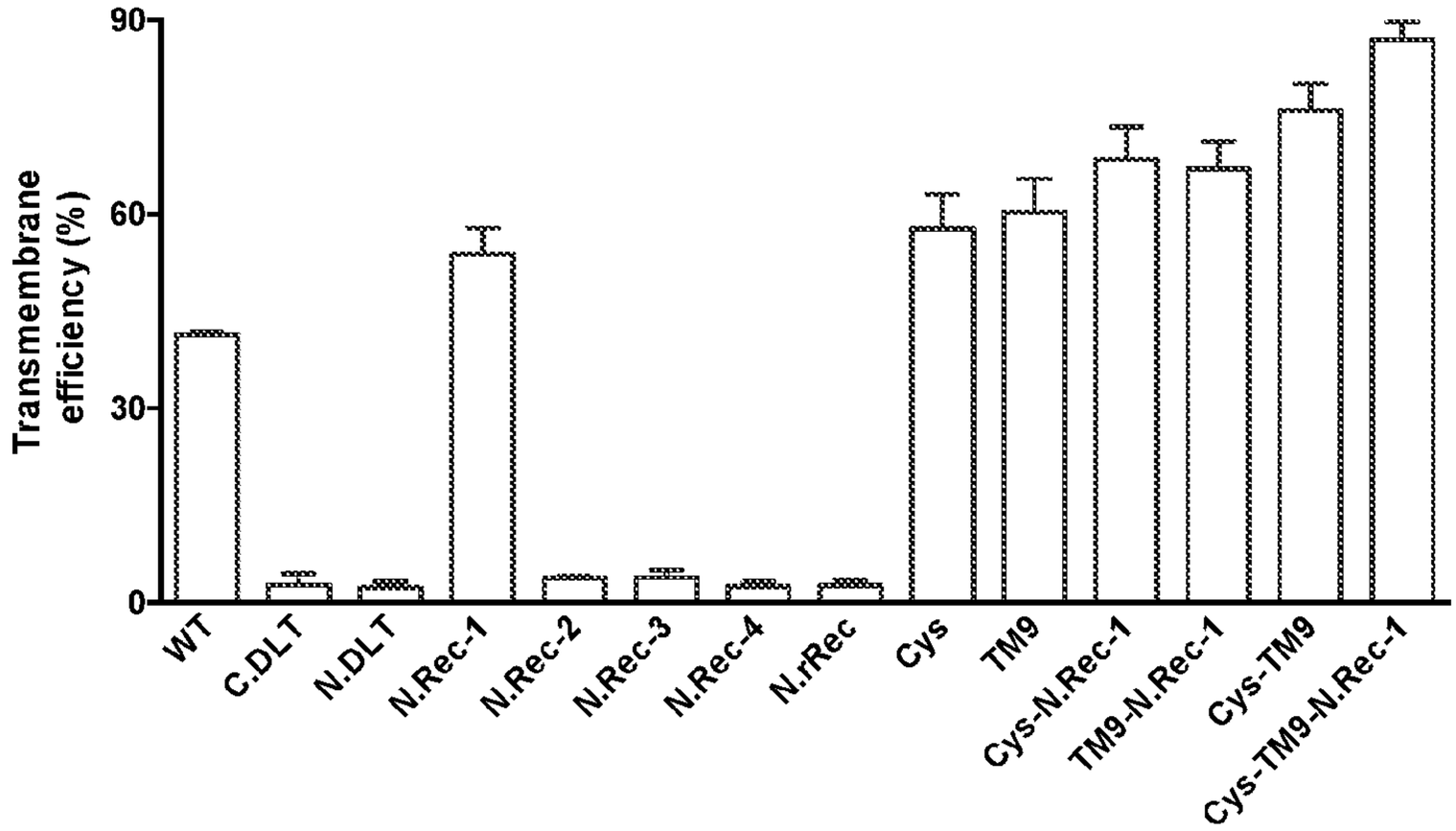


图 5

A


Infection efficency (%)
30
20
10
0
WT
C.DLT
N.DLT
N.Rec-1
N.Rec-2
N.Rec-3
N.Rec-4
N.rRec
Cys
TM9
Cys-N.Rec-1
TM9-N.Rec-1
Cys-TM9
Cys-TM9-N.Rec-1

B


Transmembrane efficiency (%)
90
60
30
0
WT
C.DLT
N.DLT
N.Rec-1
N.Rec-2
N.Rec-3
N.Rec-4
N.rRec
Cys
TM9
Cys-N.Rec-1
TM9-N.Rec-1
Cys-TM9
Cys-TM9-N.Rec-1

C

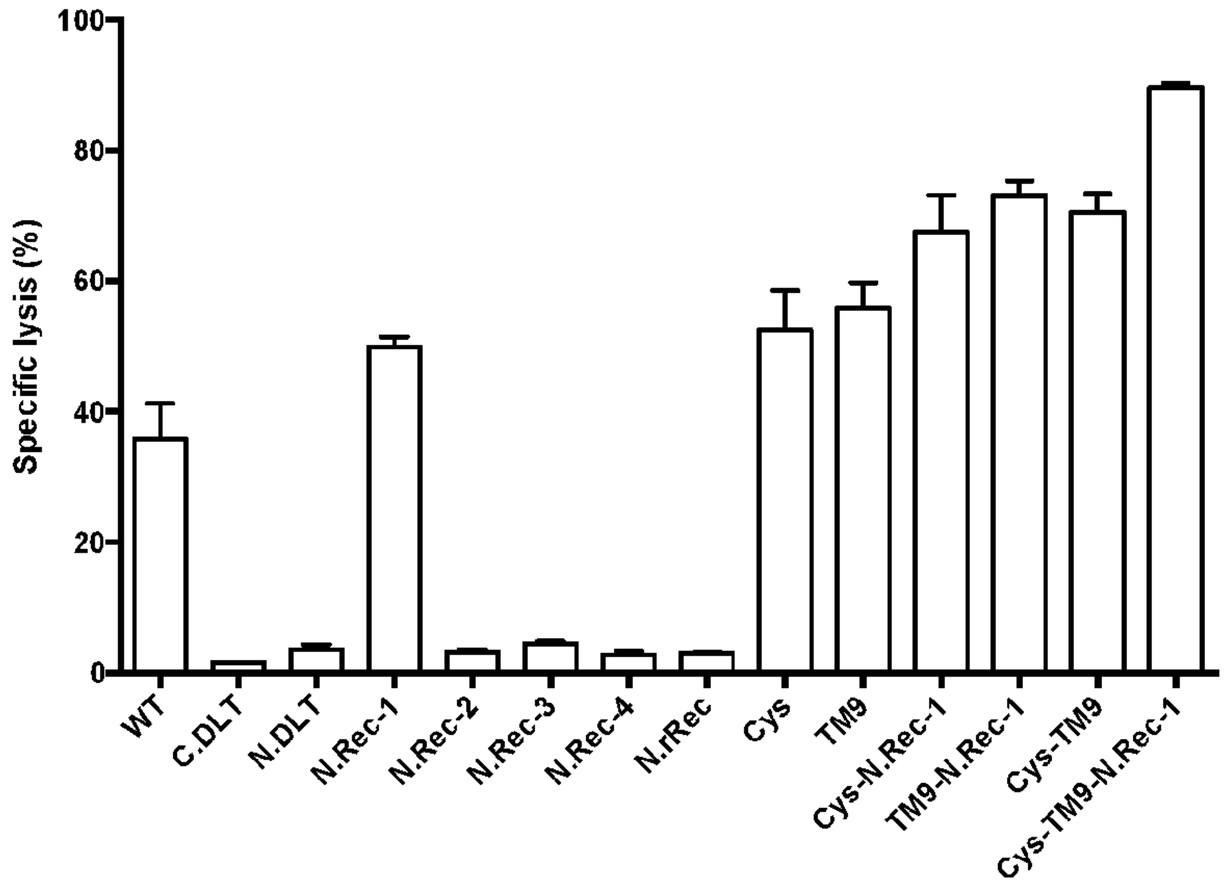
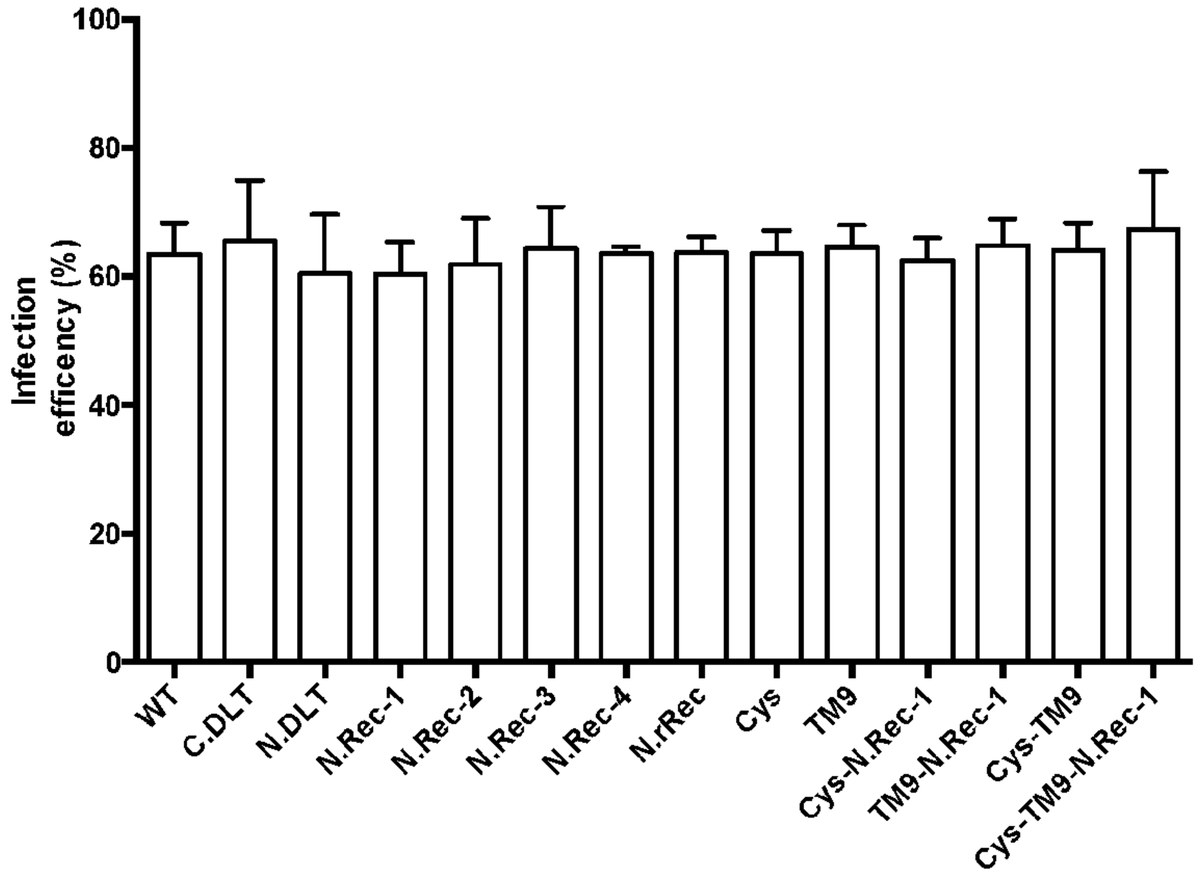
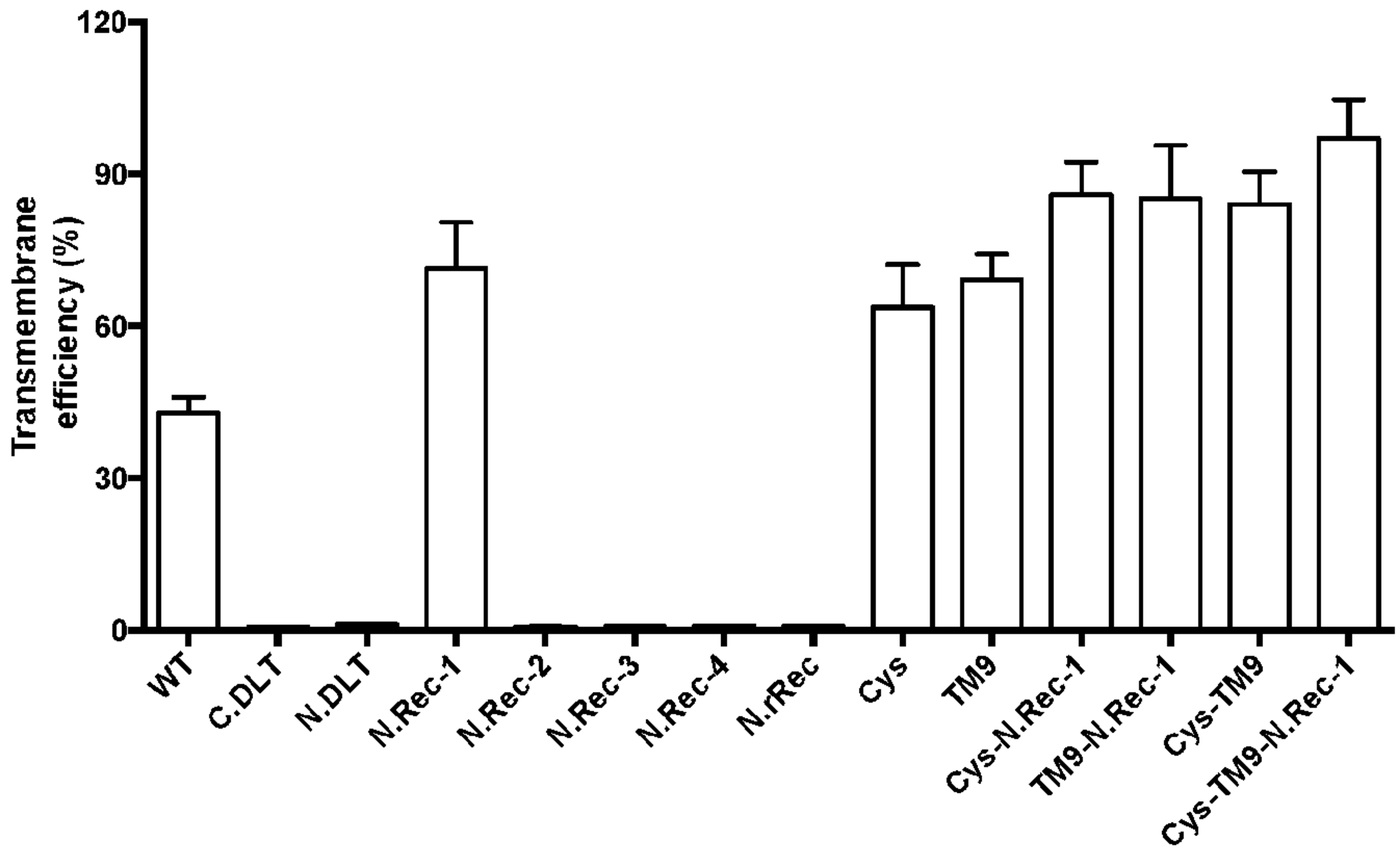

Specific lysis (%)
100
80
60
40
20
0
WT
C.DLT
N.DLT
N.Rec-1
N.Rec-2
N.Rec-3
N.Rec-4
N.rRec
Cys
TM9
Cys-N.Rec-1
TM9-N.Rec-1
Cys-TM9
Cys-TM9-N.Rec-1

图 6

A


Infection efficency (%)
100
80
60
40
20
0
WT
C.DLT
N.DLT
N.Rec-1
N.Rec-2
N.Rec-3
N.Rec-4
N.rRec
Cys
TM9
Cys-N.Rec-1
TM9-N.Rec-1
Cys-TM9
Cys-TM9-N.Rec-1

B


Transmembrane efficiency (%)
120
90
60
30
0
WT
C.DLT
N.DLT
N.Rec-1
N.Rec-2
N.Rec-3
N.Rec-4
N.rRec
Cys
TM9
Cys-N.Rec-1
TM9-N.Rec-1
Cys-TM9
Cys-TM9-N.Rec-1

C

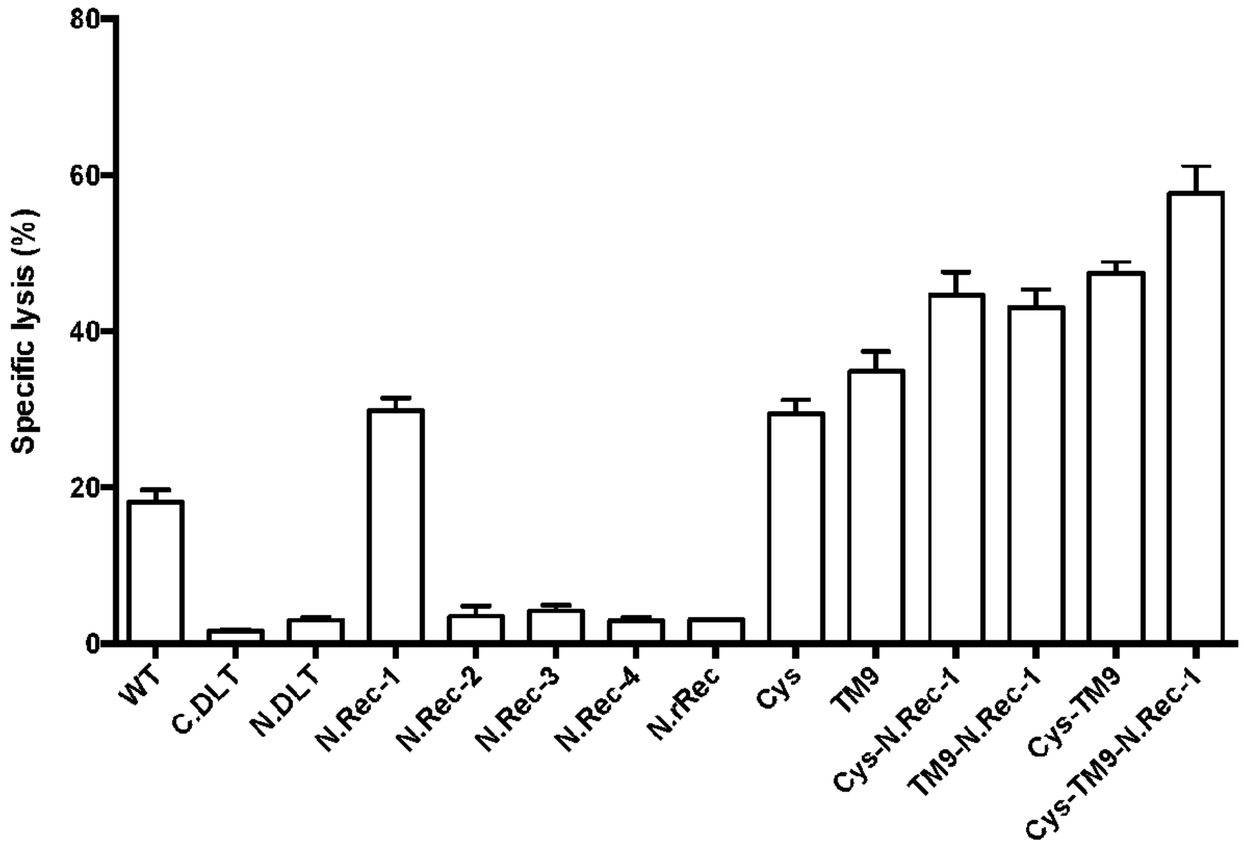

Specific lysis (%)
80
60
40
20
0
WT
C.DLT
N.DLT
N.Rec-1
N.Rec-2
N.Rec-3
N.Rec-4
N.rRec
Cys
TM9
Cys-N.Rec-1
TM9-N.Rec-1
Cys-TM9
Cys-TM9-N.Rec-1

图 7

D

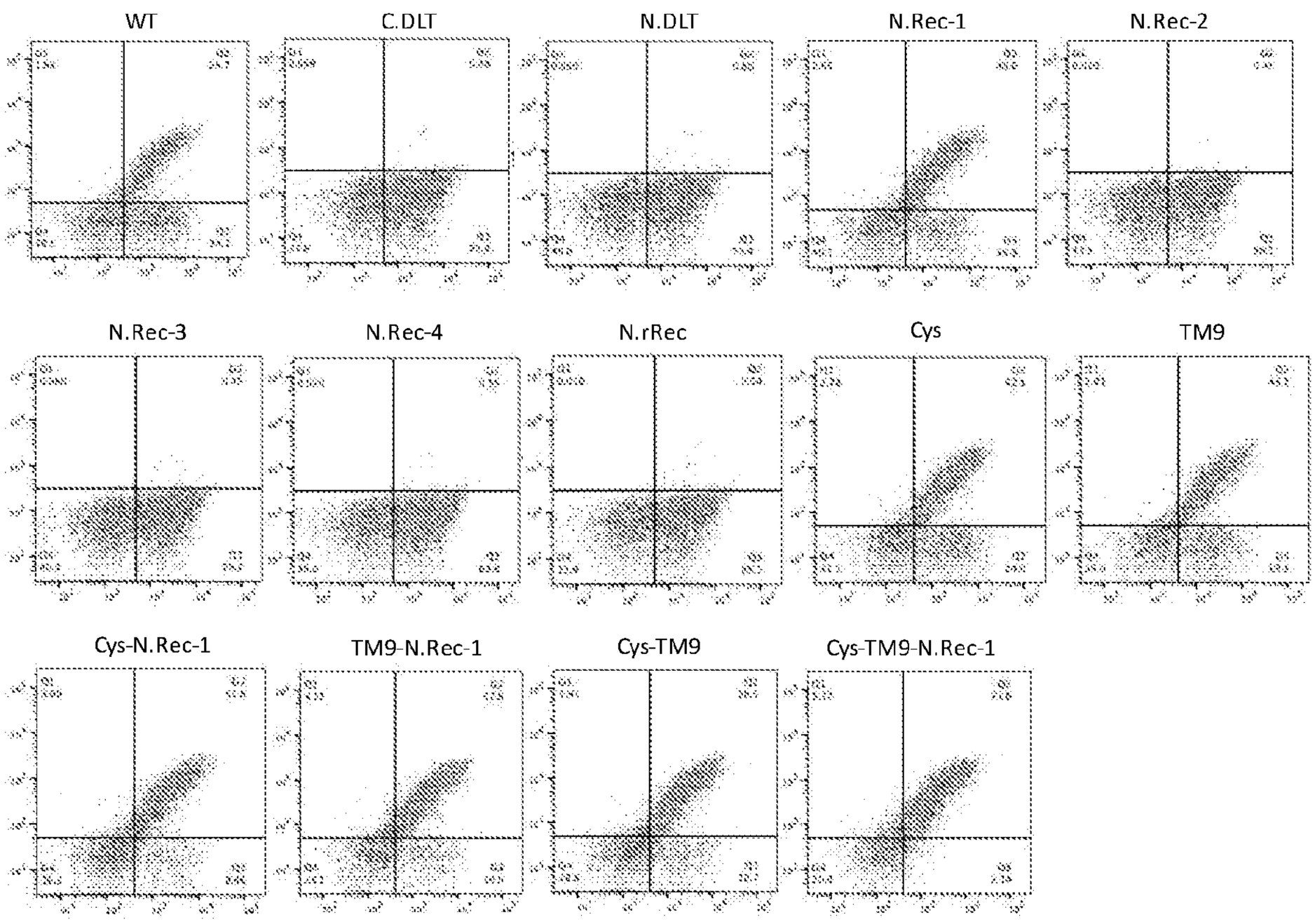
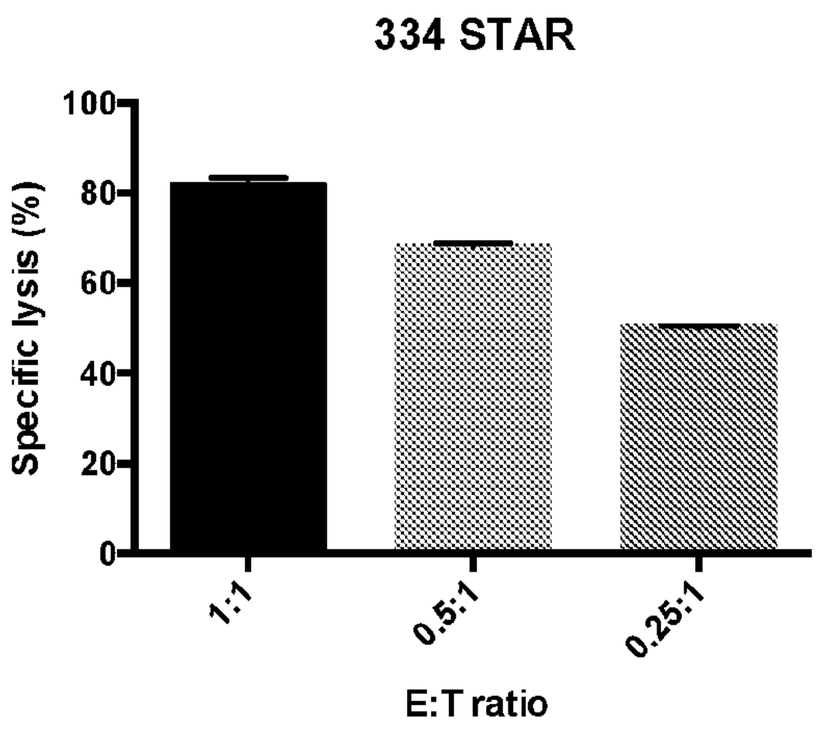
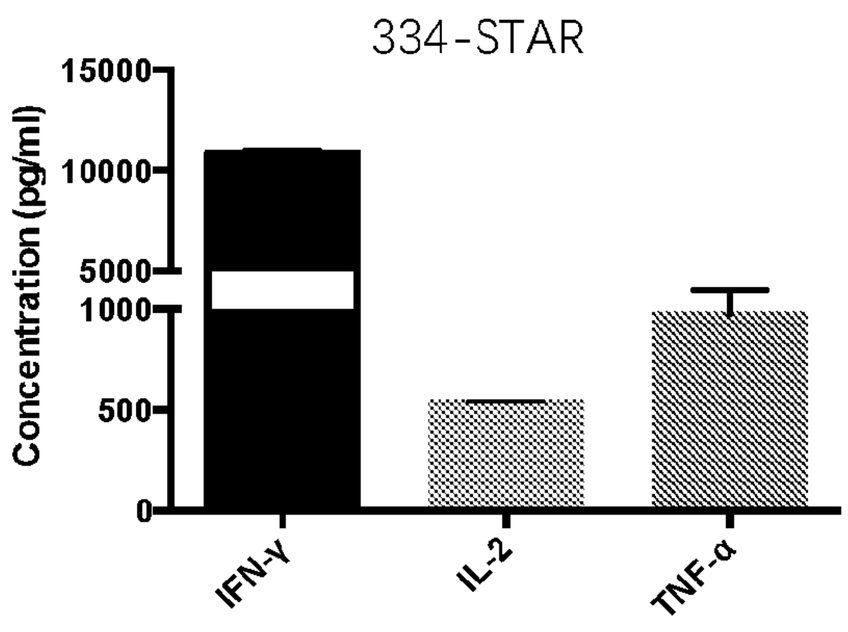

WT
C.DLT
N.DLT
N.Rec-1
N.Rec-2
N.Rec-3
N.Rec-4
N.rRec
Cys
TM9
Cys-N.Rec-1
TM9-N.Rec-1
Cys-TM9
Cys-TM9-N.Rec-1

图 7(续)


334 STAR
Specific lysis (%)
100
80
60
40
20
0
1:1
0.5:1
0.25:1
E:T ratio


334-STAR
Concentration (pg/ml)
15000
10000
5000
1000
500
0
IFN-γ
IL-2
TNF-α

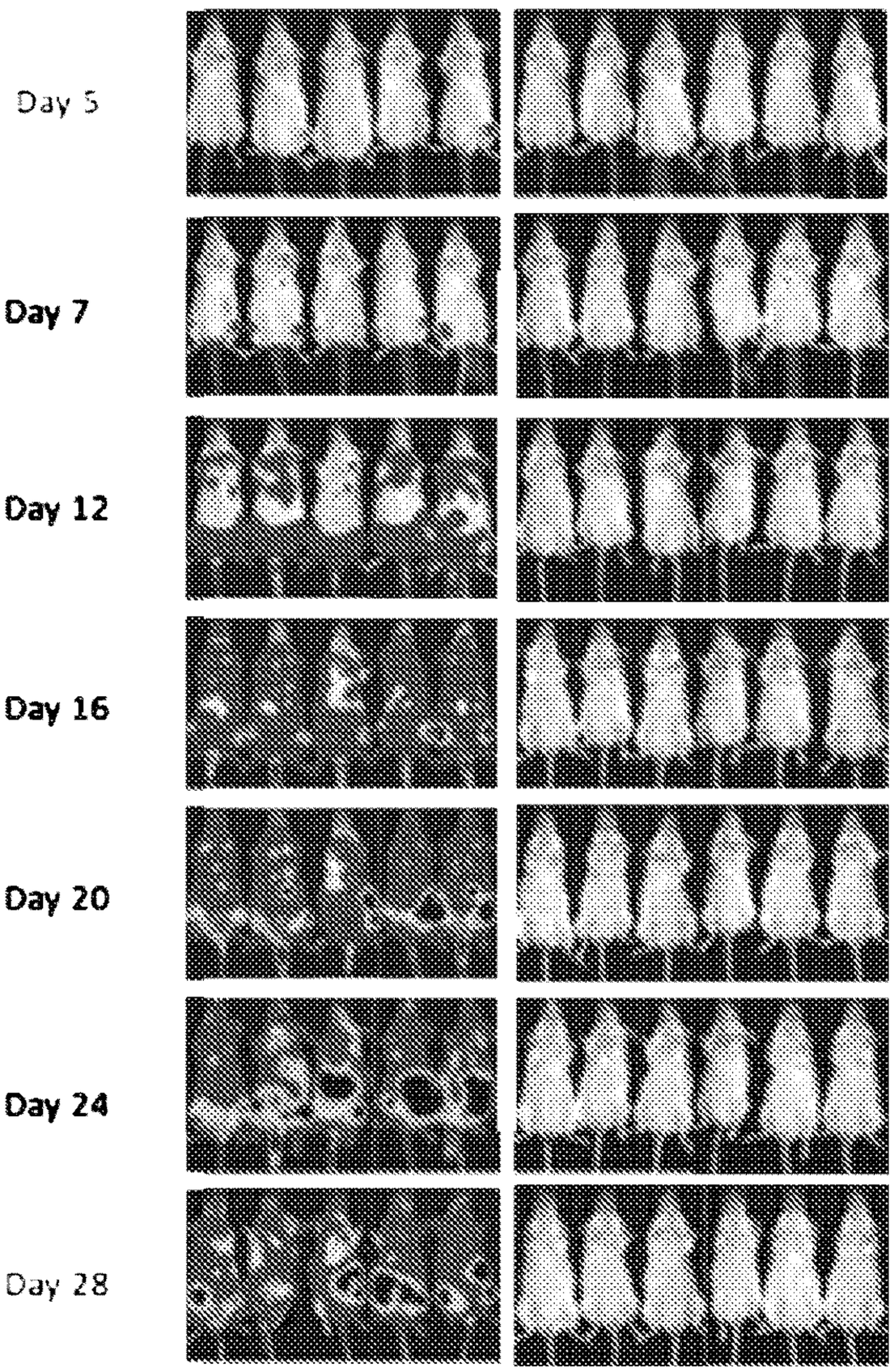
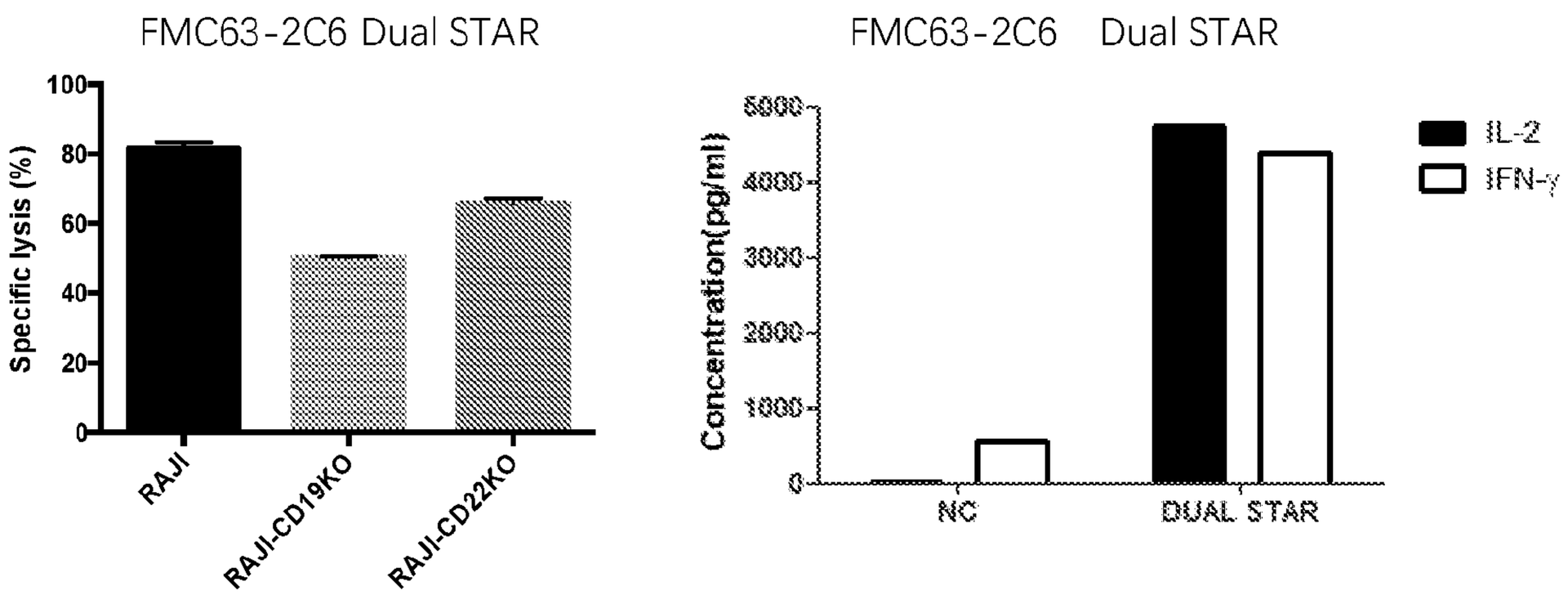

Day 5
Day 7
Day 12
Day 16
Day 20
Day 24
Day 28

图 8


FMC63-2C6 Dual STAR
Specific lysis (%)
100
80
60
40
20
0
RAJI
RAJI-CD19KO
RAJI-CD22KO
FMC63-2C6 Dual STAR
Concentration(pg/ml)
5000
4000
3000
2000
1000
0
NC
DUAL STAR
IL-2
IFN-γ

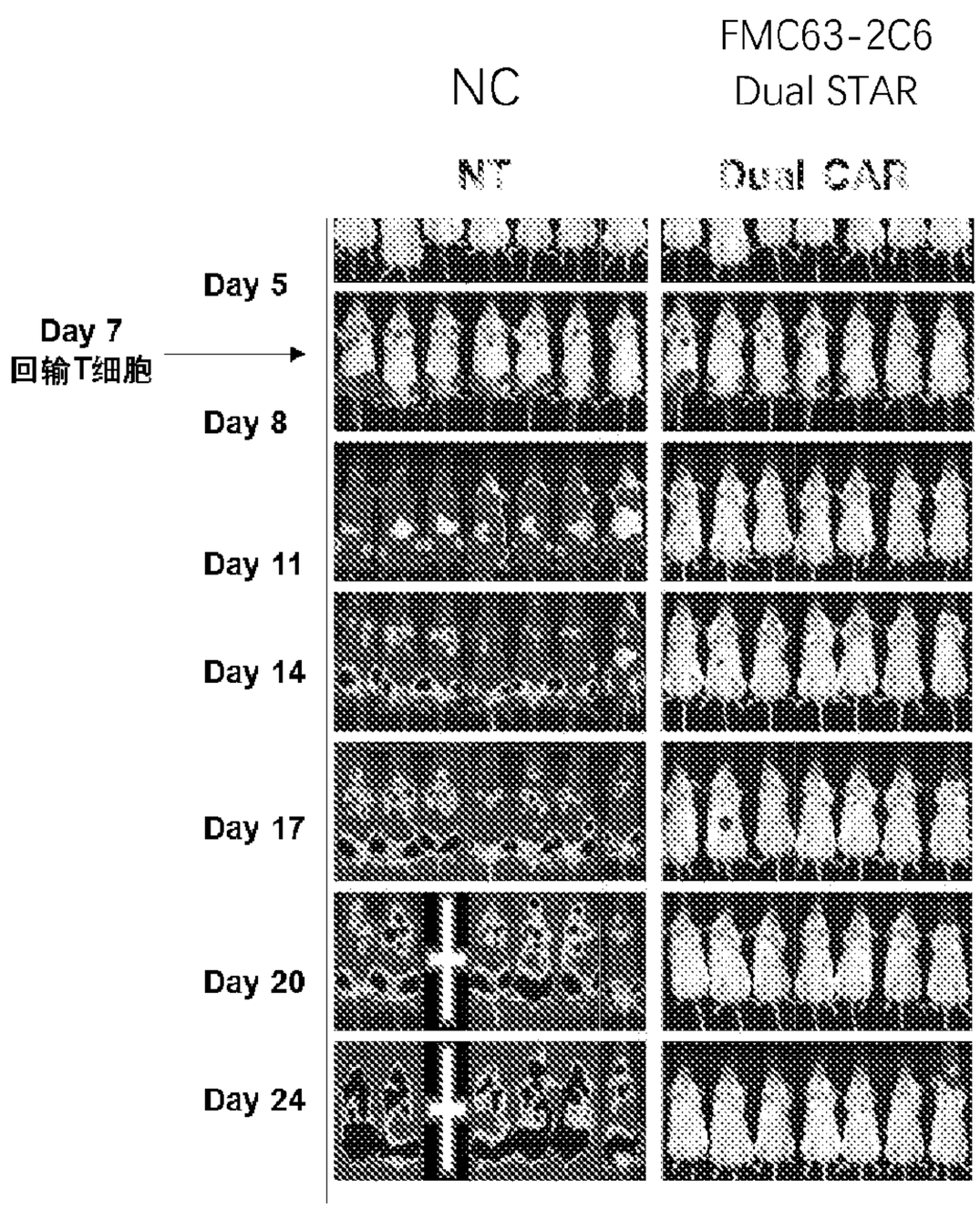
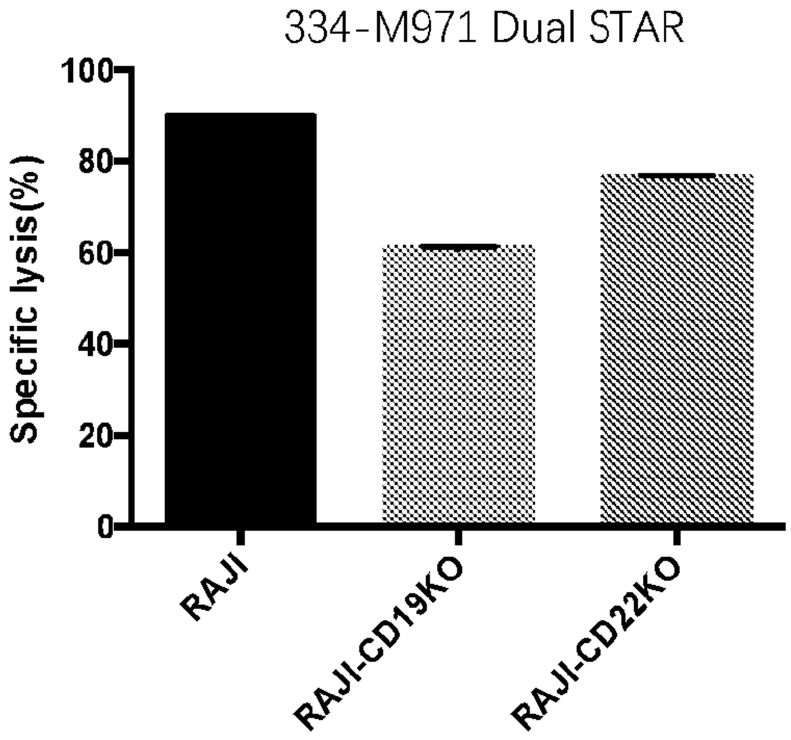
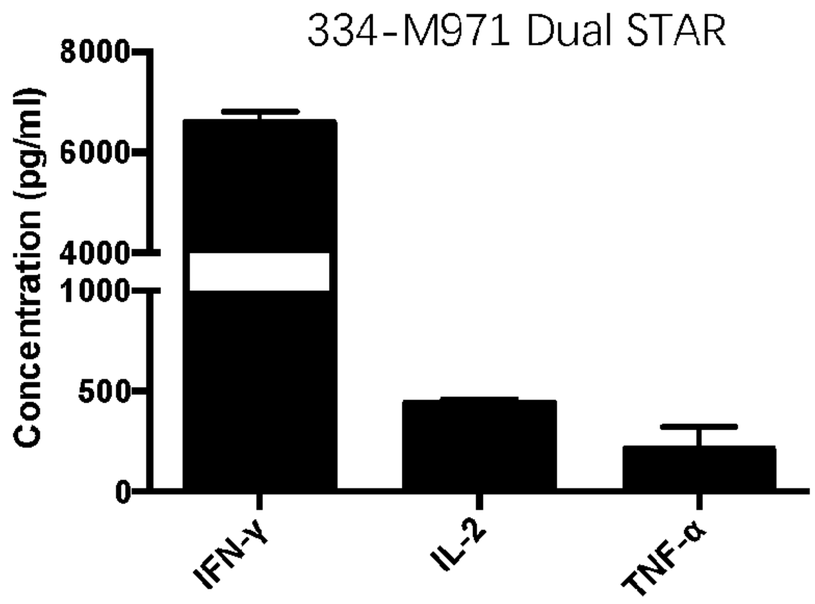

NC
FMC63-2C6
Dual STAR
NT
Dual CAR
Day 5
Day 7
回输T细胞
Day 8
Day 11
Day 14
Day 17
Day 20
Day 24

图 9


334-M971 Dual STAR
Specific lysis(%)
100
80
60
40
20
0
RAJI
RAJI-CD19KO
RAJI-CD22KO


334-M971 Dual STAR
Concentration (pg/ml)
8000
6000
4000
1000
500
0
IFN-γ
IL-2
TNF-α

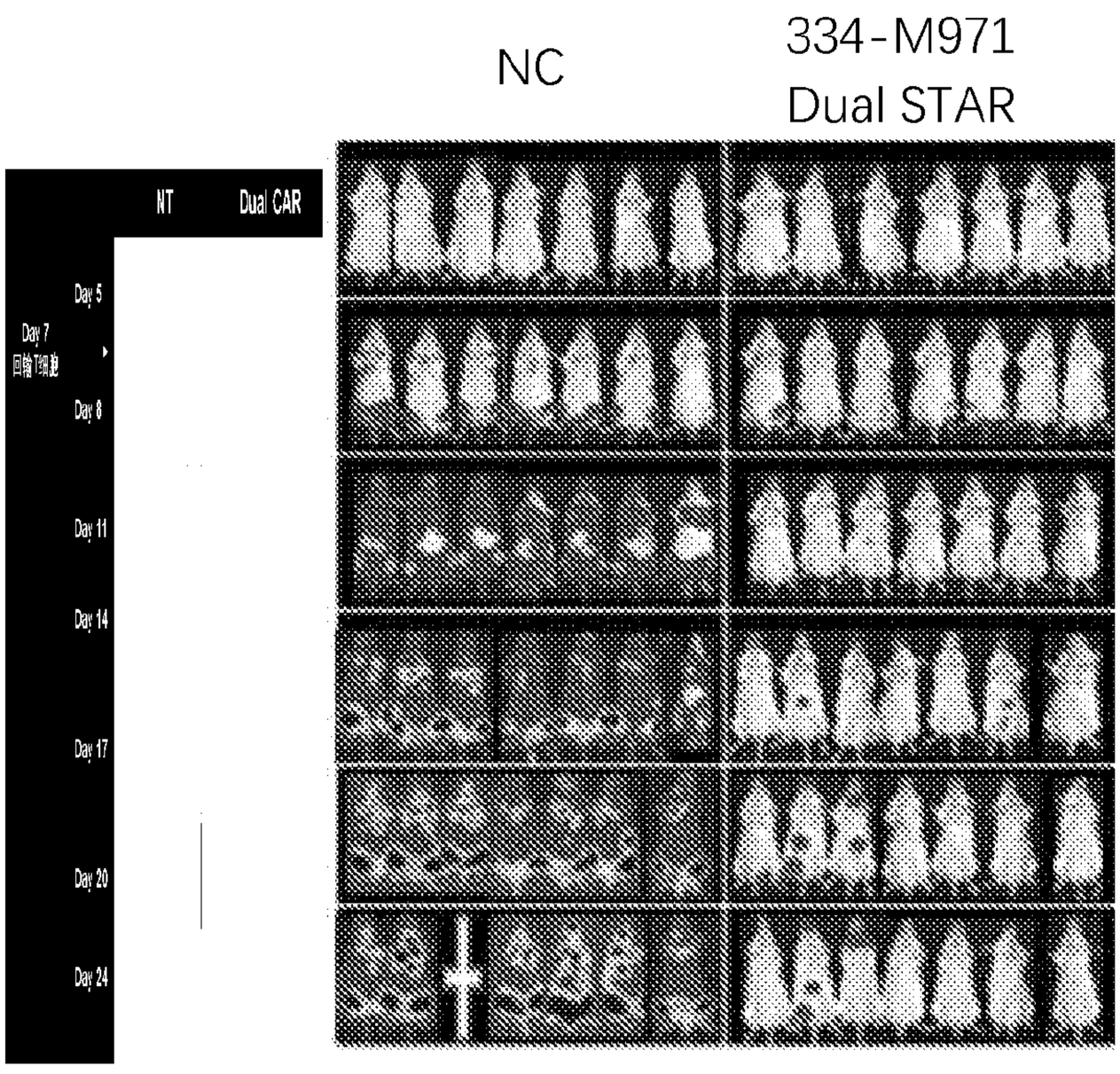

NC
334-M971 Dual STAR
NT
Dual CAR
Day 5
Day 7
回输T细胞
Day 8
Day 11
Day 14
Day 17
Day 20
Day 24

图 10

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/103687

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/725(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i; A61K 35/12(2015.01)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)

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)

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, CHINESE PATENT BIOLOGICAL SEQUENCE RETRIEVAL SYSTEM, NCBI, EMBL, STN: 合成T细胞受体抗原受体, Snythetic TCR and Antigen Receptor, Snythetic T-Cell Receptor and Antigen Receptor, STAR, 嵌合T细胞受体, 合成T细胞受体, 嵌合抗原受体, chimeric antigen receptor, α链, β链, 抗原结合区, 恒定区, SEQ ID NOs:1-49

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
X	CN 109790211 A (THE U.S.A. AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 21 May 2019 (2019-05-21) description, paragraphs [0043]-[0047], [0063]-[0073] and [0084]-[0015], and SEQ ID NO: 44, 48 and 49	1, 2, 6-13, 17-42
A	CN 109790211 A (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 21 May 2019 (2019-05-21) description, paragraphs [0043]-[0047], [0063]-[0073] and [0084]-[0015], and SEQ ID NO: 44, 48 and 49	3-6, 14-16
X	WO 2015184228 A1 (US HEALTH) 03 December 2015 (2015-12-03) description, paragraphs [0024]-[0040] and [0061]-[0108]	1, 2, 6-13, 17-42
A	WO 2015184228 A1 (US HEALTH) 03 December 2015 (2015-12-03) description, paragraphs [0024]-[0040] and [0061]-[0108]	3-6, 14-16
A	US 2014255398 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 11 September 2014 (2014-09-11) entire document	1-42

☑ 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
"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	Date of mailing of the international search report
23 September 2020	**27 October 2020**
Name and mailing address of the ISA/CN **China National Intellectual Property Administration (ISA/CN)** **No. 6, Xitucheng Road, Jimenqiao, Haidian District, Beijing 100088** **China** Facsimile No. **(86-10)62019451**	Authorized officer Telephone No.

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/103687

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	WO 2015157252 A1 (BROGDON, J. et al.) 15 October 2015 (2015-10-15) entire document	1-42
A	CN 104822705 A (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 05 August 2015 (2015-08-05) entire document	1-42
A	WO 2015143382 A1 (ABBVIE INC.) 24 September 2015 (2015-09-24) entire document	1-42
A	WO 2016022400 A1 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER et al.) 11 February 2016 (2016-02-11) entire document	1-42
A	WO 2014065961 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 01 May 2014 (2014-05-01) entire document	1-42

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.
PCT/CN2020/103687

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:
      ☑ in the form of an Annex C/ST.25 text file.
      ☐ on paper or in the form of an image file.
   b. ☐ furnished together with the international application under PCT Rule 13*ter*.1(a) for the purposes of international search only in the form of an Annex C/ST.25 text file.
   c. ☐ furnished subsequent to the international filing date for the purposes of international search only:
      ☐ in the form of an Annex C/ST.25 text file (Rule 13*ter*.1(a)).
      ☐ on paper or in the form of an image file (Rule 13*ter*.1(b) and Administrative Instructions, Section 713).

2. ☐ In addition, in the case that more than one version or copy of a sequence listing has been filed or furnished, the required statements that the information in the subsequent or additional copies is identical to that forming part of the application as filed or does not go beyond the application as filed, as appropriate, were furnished.

3. Additional comments:

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/103687

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
CN 109790211 A	21 May 2019	AU 2017306038 A1	14 February 2019
		SG 11201900654Q A	27 February 2019
		EP 3494133 A1	12 June 2019
		WO 2018026691 A1	08 February 2018
		SG 10201913959W A	30 March 2020
		CA 3032870 A1	08 February 2018
		KR 20190064566 A	10 June 2019
		JP 2019527555 A	03 October 2019
		US 10611816 B2	07 April 2020
		US 2019177395 A1	13 June 2019
WO 2015184228 A1	03 December 2015	US 2019085047 A1	21 March 2019
		US 10174098 B2	08 January 2019
		EP 3149031 B1	18 December 2019
		CN 106661098 A	10 May 2017
		US 2017145070 A1	25 May 2017
		PT 3149031 T	25 March 2020
		DK 3149031 T3	16 March 2020
		IL 248797 D0	31 January 2017
		AU 2015266818 B2	03 October 2019
		BR 112016027805 A2	24 October 2017
		KR 20170003939 A	10 January 2017
		EP 3149031 A1	05 April 2017
		EP 3689900 A1	05 August 2020
		AU 2019283892 A1	23 January 2020
		CA 2950192 A1	03 December 2015
		AU 2015266818 A1	24 November 2016
		MX 2016015383 A	28 February 2017
		JP 2017524372 A	31 August 2017
		LT 3149031 T	25 May 2020
US 2014255398 A1	11 September 2014	KR 20140076594 A	20 June 2014
		CA 2850322 A1	04 April 2013
		MX 2019006188 A	02 October 2019
		WO 2013047729 A1	04 April 2013
		CN 110680920 A	14 January 2020
		SG 10201510341X A	28 January 2016
		US 10556949 B2	11 February 2020
		JP 6352634 B2	04 July 2018
		SG 11201401100U A	30 July 2014
		JP 2018150378 A	27 September 2018
		MX 2014003832 A	27 August 2014
		AU 2012317395 A1	01 May 2014
		CN 104093424 A	08 October 2014
		TW 201326210 A	01 July 2013
		CN 110627902 A	31 December 2019
		EP 2752200 A1	09 July 2014
		BR 112014007484 A2	04 April 2017
		TW 201945034 A	01 December 2019
		AU 2012317395 B2	29 June 2017
		JP WO2013047729 A1	26 March 2015
		MX 366968 B	01 August 2019

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/103687

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		CN	110655578	A	07 January 2020
		EP	2752200	A4	22 April 2015
		US	2020115447	A1	16 April 2020
		HK	1198813	A1	12 June 2015
		RU	2014117504	A	10 November 2015
		RU	2722829	C2	05 June 2020
		TW	I681970	B	11 January 2020
WO 2015157252 A1	15 October 2015	RU	2718542	C2	08 April 2020
		AU	2015244039	A1	15 September 2016
		RU	2016142896	A3	25 January 2019
		TW	201600092	A	01 January 2016
		MX	2016013239	A	03 May 2017
		EP	3129470	A1	15 February 2017
		RU	2020110834	A	27 April 2020
		KR	20160135233	A	25 November 2016
		US	10357514	B2	23 July 2019
		CN	107075482	A	18 August 2017
		US	2015283178	A1	08 October 2015
		JP	2017517488	A	29 June 2017
		CA	2940671	A1	15 October 2015
		SG	11201606909R	A	28 October 2016
		IL	247204	D0	29 September 2016
		WO	2015157252	A8	04 August 2016
		BR	112016022798	A2	17 October 2017
		RU	2016142896	A	07 May 2018
		US	2019388471	A1	26 December 2019
CN 104822705 A	05 August 2015	US	10703816	B2	07 July 2020
		AU	2013335180	B2	12 July 2018
		US	2019085078	A1	21 March 2019
		CN	110229834	A	13 September 2019
		RU	2015117237	A	20 December 2016
		CA	2889055	A1	01 May 2014
		RU	2658485	C2	21 June 2018
		JP	2018153186	A	04 October 2018
		EP	2912061	B1	06 February 2019
		JP	6338252	B2	06 June 2018
		AU	2018204257	A1	05 July 2018
		WO	2014065961	A1	01 May 2014
		JP	2016502512	A	28 January 2016
		CN	104822705	B	12 July 2019
		AU	2013335180	A1	14 May 2015
		EP	2912061	A1	02 September 2015
		BR	112015009003	A2	14 November 2017
		HK	1213922	A1	15 July 2016
		AU	2018204257	B2	05 March 2020
		US	10072078	B2	11 September 2018
		US	2015299317	A1	22 October 2015
		ES	2718903	T3	05 July 2019
		JP	6643394	B2	12 February 2020
WO 2015143382 A1	24 September 2015	PH	12016501828	A1	19 December 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/103687

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		CR	20160487	A	26 April 2017
		TW	I684600	B	11 February 2020
		JP	2020039360	A	19 March 2020
		KR	20160138177	A	02 December 2016
		US	10098968	B2	16 October 2018
		CN	110845616	A	28 February 2020
		US	9827330	B2	28 November 2017
		IL	247936	D0	30 November 2016
		CN	111378041	A	07 July 2020
		JP	2017511376	A	20 April 2017
		RU	2016141267	A	24 April 2018
		CA	2942101	A1	24 September 2015
		EC	SP16082556	A	31 May 2018
		US	9493568	B2	15 November 2016
		CN	106459200	B	06 December 2019
		PE	20161211	A1	27 November 2016
		US	2019134216	A1	09 May 2019
		CN	106459200	A	22 February 2017
		CL	2016002359	A1	12 May 2017
		US	2015337042	A1	26 November 2015
		AU	2015231001	A1	29 September 2016
		US	2017072065	A1	16 March 2017
		BR	112016021717	A2	10 July 2018
		DO	P2016000252	A	15 November 2016
		SG	11201607746Q	A	28 October 2016
		CN	110841074	A	28 February 2020
		US	2018125999	A1	10 May 2018
		CN	110845615	A	28 February 2020
		CL	2018001000	A1	21 December 2018
		MX	2016012207	A	06 April 2017
		AR	099812	A1	17 August 2016
		TW	201623332	A	01 July 2016
		SG	10201808837R	A	29 November 2018
		EP	3126006	A1	08 February 2017
		SG	10201908460Y	A	28 November 2019
		UY	36041	A	30 September 2015
		RU	2016141267	A3	14 November 2018
WO	2016022400	A1	11 February 2016	JP	2018183175	A	22 November 2018
				US	10538572	B2	21 January 2020
				JP	6712261	B2	24 June 2020
				JP	2017523784	A	24 August 2017
				EP	3177314	A1	14 June 2017
				CA	2956545	A1	11 February 2016
				CN	107074970	A	18 August 2017
				US	2016083449	A1	24 March 2016
WO	2014065961	A1	01 May 2014	US	10703816	B2	07 July 2020
				AU	2013335180	B2	12 July 2018
				US	2019085078	A1	21 March 2019
				CN	110229834	A	13 September 2019
				RU	2015117237	A	20 December 2016

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.
PCT/CN2020/103687

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
		CA	2889055	A1	01 May 2014
		RU	2658485	C2	21 June 2018
		JP	2018153186	A	04 October 2018
		EP	2912061	B1	06 February 2019
		JP	6338252	B2	06 June 2018
		AU	2018204257	A1	05 July 2018
		JP	2016502512	A	28 January 2016
		CN	104822705	B	12 July 2019
		AU	2013335180	A1	14 May 2015
		EP	2912061	A1	02 September 2015
		BR	112015009003	A2	14 November 2017
		HK	1213922	A1	15 July 2016
		CN	104822705	A	05 August 2015
		AU	2018204257	B2	05 March 2020
		US	10072078	B2	11 September 2018
		US	2015299317	A1	22 October 2015
		ES	2718903	T3	05 July 2019
		JP	6643394	B2	12 February 2020

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/103687

A. 主题的分类

C07K 14/725(2006.01)i; C07K 14/705(2006.01)i; A61K 35/12(2015.01)i

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

B. 检索领域

检索的最低限度文献(标明分类系统和分类号)

C07K;A61K

包含在检索领域中的除最低限度文献以外的检索文献

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））

CNKI, CNABS, CNTXT, DWPI, SIPOABS, EPTXT, WOTXT, USTXT, JPTXT, ELSEVIER, ISI Web of Knowledge, PubMed, 中国专利生物序列检索系统, NCBI, EMBL, STN: 合成T细胞受体抗原受体, Snythetic TCR and Antigen Receptor, Snythetic T-Cell Receptor and Antigen Receptor, STAR, 嵌合T细胞受体, 合成T细胞受体, 嵌合抗原受体, chimeric antigen receptor, α链, β链, 抗原结合区, 恒定区, SEQ ID NOs:1-49

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
X	CN 109790211 A (美国卫生和人力服务部) 2019年 5月 21日 (2019-05-21) 说明书第0043-0047，0063-0073，0084-0015段，SEQ ID NO：44，48-49	1-2，6-13，17-42
A	CN 109790211 A (美国卫生和人力服务部) 2019年 5月 21日 (2019-05-21) 说明书第0043-0047，0063-0073，0084-0015段，SEQ ID NO：44，48-49	3-6，14-16
X	WO 2015184228 A1 (US HEALTH) 2015年 12月 3日 (2015-12-03) 说明书第0024-0040，0061-0108段	1-2，6-13，17-42
A	WO 2015184228 A1 (US HEALTH) 2015年 12月 3日 (2015-12-03) 说明书第0024-0040，0061-0108段	3-6，14-16
A	US 2014255398 A1 (CHUGAI SEIYAKU KABUSHIKI KAISHA) 2014年 9月 11日 (2014-09-11) 全文	1-42
A	WO 2015157252 A1 (BROGDON, J.等) 2015年 10月 15日 (2015-10-15) 全文	1-42
A	CN 104822705 A (美国卫生和人力服务部) 2015年 8月 5日 (2015-08-05) 全文	1-42

☑ 其余文件在C栏的续页中列出。

☑ 见同族专利附件。

* 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

“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

国际检索实际完成的日期	国际检索报告邮寄日期
2020年 9月 23日	2020年 10月 27日
ISA/CN的名称和邮寄地址 中国国家知识产权局(ISA/CN) 中国北京市海淀区蓟门桥西土城路6号 100088 传真号 (86-10)62019451	受权官员 张蕾 电话号码 86-(10)-53962037

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2020/103687

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	WO 2015143382 A1 (ABBVIE INC.) 2015年 9月 24日 (2015-09-24) 全文	1-42
A	WO 2016022400 A1 (FRED HUTCHINSON CANCER RESEARCH CENTER等) 2016年 2月 11日 (2016-02-11) 全文	1-42
A	WO 2014065961 A1 (THE UNITED STATES OF AMERICA, AS REPRESENTED BY THE SECRETARY, DEPARTMENT OF HEALTH AND HUMAN SERVICES) 2014年 5月 1日 (2014-05-01) 全文	1-42

国际检索报告

国际申请号
PCT/CN2020/103687

第I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表进行的：

a. ☑ 作为国际申请的一部分提交的：
   - ☑ 附件C/ST.25文本文件形式
   - ☐ 纸件或图形文件形式

b. ☐ 根据细则13之三.1(a)仅为国际检索目的以附件C/ST.25文本文件形式与国际申请同时提交的：

c. ☐ 仅为国际检索目的在国际申请日之后提交的：
   - ☐ 附件C/ST.25文本文件形式（细则13之三.1(a)）
   - ☐ 纸件或图形文件形式（细则13之三.1(b)和行政规程第713段）

2. ☐ 另外，在提交/提供了多个版本或副本的序列表的情况下，提供了关于随后提交的或附加的副本中的信息与申请时提交的作为申请一部分的序列表的信息相同或未超出申请时提交的申请中的信息范围（如适用）的所需声明。

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/CN2020/103687

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
CN	109790211	A	2019年 5月 21日	AU	2017306038	A1	2019年 2月 14日
				SG	112019000654Q	A	2019年 2月 27日
				EP	3494133	A1	2019年 6月 12日
				WO	2018026691	A1	2018年 2月 8日
				SG	10201913959W	A	2020年 3月 30日
				CA	3032870	A1	2018年 2月 8日
				KR	20190064566	A	2019年 6月 10日
				JP	2019527555	A	2019年 10月 3日
				US	10611816	B2	2020年 4月 7日
				US	2019177395	A1	2019年 6月 13日
WO	2015184228	A1	2015年 12月 3日	US	2019085047	A1	2019年 3月 21日
				US	10174098	B2	2019年 1月 8日
				EP	3149031	B1	2019年 12月 18日
				CN	106661098	A	2017年 5月 10日
				US	2017145070	A1	2017年 5月 25日
				PT	3149031	T	2020年 3月 25日
				DK	3149031	T3	2020年 3月 16日
				IL	248797	D0	2017年 1月 31日
				AU	2015266818	B2	2019年 10月 3日
				BR	112016027805	A2	2017年 10月 24日
				KR	20170003939	A	2017年 1月 10日
				EP	3149031	A1	2017年 4月 5日
				EP	3689900	A1	2020年 8月 5日
				AU	2019283892	A1	2020年 1月 23日
				CA	2950192	A1	2015年 12月 3日
				AU	2015266818	A1	2016年 11月 24日
				MX	2016015383	A	2017年 2月 28日
				JP	2017524372	A	2017年 8月 31日
				LT	3149031	T	2020年 5月 25日
US	2014255398	A1	2014年 9月 11日	KR	20140076594	A	2014年 6月 20日
				CA	2850322	A1	2013年 4月 4日
				MX	2019006188	A	2019年 10月 2日
				WO	2013047729	A1	2013年 4月 4日
				CN	110680920	A	2020年 1月 14日
				SG	10201510341X	A	2016年 1月 28日
				US	10556949	B2	2020年 2月 11日
				JP	6352634	B2	2018年 7月 4日
				SG	11201401100U	A	2014年 7月 30日
				JP	2018150378	A	2018年 9月 27日
				MX	2014003832	A	2014年 8月 27日
				AU	2012317395	A1	2014年 5月 1日
				CN	104093424	A	2014年 10月 8日
				TW	201326210	A	2013年 7月 1日
				CN	110627902	A	2019年 12月 31日
				EP	2752200	A1	2014年 7月 9日
				BR	112014007484	A2	2017年 4月 4日
				TW	201945034	A	2019年 12月 1日
				AU	2012317395	B2	2017年 6月 29日
				JP	WO2013047729	A1	2015年 3月 26日
				MX	366968	B	2019年 8月 1日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/103687

检索报告引用的专利文件			公布日 (年/月/日)	同族专利			公布日 (年/月/日)
				CN	110655578	A	2020年 1月 7日
				EP	2752200	A4	2015年 4月 22日
				US	2020115447	A1	2020年 4月 16日
				HK	1198813	A1	2015年 6月 12日
				RU	2014117504	A	2015年 11月 10日
				RU	2722829	C2	2020年 6月 5日
				TW	I681970	B	2020年 1月 11日
WO	2015157252	A1	2015年 10月 15日	RU	2718542	C2	2020年 4月 8日
				AU	2015244039	A1	2016年 9月 15日
				RU	2016142896	A3	2019年 1月 25日
				TW	201600092	A	2016年 1月 1日
				MX	2016013239	A	2017年 5月 3日
				EP	3129470	A1	2017年 2月 15日
				RU	2020110834	A	2020年 4月 27日
				KR	20160135233	A	2016年 11月 25日
				US	10357514	B2	2019年 7月 23日
				CN	107075482	A	2017年 8月 18日
				US	2015283178	A1	2015年 10月 8日
				JP	2017517488	A	2017年 6月 29日
				CA	2940671	A1	2015年 10月 15日
				SG	11201606909R	A	2016年 10月 28日
				IL	247204	D0	2016年 9月 29日
				WO	2015157252	A8	2016年 8月 4日
				BR	112016022798	A2	2017年 10月 17日
				RU	2016142896	A	2018年 5月 7日
				US	2019388471	A1	2019年 12月 26日
CN	104822705	A	2015年 8月 5日	US	10703816	B2	2020年 7月 7日
				AU	2013335180	B2	2018年 7月 12日
				US	2019085078	A1	2019年 3月 21日
				CN	110229834	A	2019年 9月 13日
				RU	2015117237	A	2016年 12月 20日
				CA	2889055	A1	2014年 5月 1日
				RU	2658485	C2	2018年 6月 21日
				JP	2018153186	A	2018年 10月 4日
				EP	2912061	B1	2019年 2月 6日
				JP	6338252	B2	2018年 6月 6日
				AU	2018204257	A1	2018年 7月 5日
				WO	2014065961	A1	2014年 5月 1日
				JP	2016502512	A	2016年 1月 28日
				CN	104822705	B	2019年 7月 12日
				AU	2013335180	A1	2015年 5月 14日
				EP	2912061	A1	2015年 9月 2日
				BR	112015009003	A2	2017年 11月 14日
				HK	1213922	A1	2016年 7月 15日
				AU	2018204257	B2	2020年 3月 5日
				US	10072078	B2	2018年 9月 11日
				US	2015299317	A1	2015年 10月 22日
				ES	2718903	T3	2019年 7月 5日
				JP	6643394	B2	2020年 2月 12日
WO	2015143382	A1	2015年 9月 24日	PH	12016501828	A1	2016年 12月 19日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/103687

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)
		CR	20160487	A	2017年 4月 26日
		TW	I684600	B	2020年 2月 11日
		JP	2020039360	A	2020年 3月 19日
		KR	20160138177	A	2016年 12月 2日
		US	10098968	B2	2018年 10月 16日
		CN	110845616	A	2020年 2月 28日
		US	9827330	B2	2017年 11月 28日
		IL	247936	D0	2016年 11月 30日
		CN	111378041	A	2020年 7月 7日
		JP	2017511376	A	2017年 4月 20日
		RU	2016141267	A	2018年 4月 24日
		CA	2942101	A1	2015年 9月 24日
		EC	SP16082556	A	2018年 5月 31日
		US	9493568	B2	2016年 11月 15日
		CN	106459200	B	2019年 12月 6日
		PE	20161211	A1	2016年 11月 27日
		US	2019134216	A1	2019年 5月 9日
		CN	106459200	A	2017年 2月 22日
		CL	2016002359	A1	2017年 5月 12日
		US	2015337042	A1	2015年 11月 26日
		AU	2015231001	A1	2016年 9月 29日
		US	2017072065	A1	2017年 3月 16日
		BR	112016021717	A2	2018年 7月 10日
		DO	P2016000252	A	2016年 11月 15日
		SG	112016077460	A	2016年 10月 28日
		CN	110841074	A	2020年 2月 28日
		US	2018125999	A1	2018年 5月 10日
		CN	110845615	A	2020年 2月 28日
		CL	2018001000	A1	2018年 12月 21日
		MX	2016012207	A	2017年 4月 6日
		AR	099812	A1	2016年 8月 17日
		TW	201623332	A	2016年 7月 1日
		SG	10201808837R	A	2018年 11月 29日
		EP	3126006	A1	2017年 2月 8日
		SG	10201908460Y	A	2019年 11月 28日
		UY	36041	A	2015年 9月 30日
		RU	2016141267	A3	2018年 11月 14日
WO	2016022400	A1	2016年 2月 11日	JP	2018183175	A	2018年 11月 22日
				US	10538572	B2	2020年 1月 21日
				JP	6712261	B2	2020年 6月 24日
				JP	2017523784	A	2017年 8月 24日
				EP	3177314	A1	2017年 6月 14日
				CA	2956545	A1	2016年 2月 11日
				CN	107074970	A	2017年 8月 18日
				US	2016083449	A1	2016年 3月 24日
WO	2014065961	A1	2014年 5月 1日	US	10703816	B2	2020年 7月 7日
				AU	2013335180	B2	2018年 7月 12日
				US	2019085078	A1	2019年 3月 21日
				CN	110229834	A	2019年 9月 13日
				RU	2015117237	A	2016年 12月 20日

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号
PCT/CN2020/103687

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)
		CA	2889055	A1	2014年 5月 1日
		RU	2658485	C2	2018年 6月 21日
		JP	2018153186	A	2018年 10月 4日
		EP	2912061	B1	2019年 2月 6日
		JP	6338252	B2	2018年 6月 6日
		AU	2018204257	A1	2018年 7月 5日
		JP	2016502512	A	2016年 1月 28日
		CN	104822705	B	2019年 7月 12日
		AU	2013335180	A1	2015年 5月 14日
		EP	2912061	A1	2015年 9月 2日
		BR	112015009003	A2	2017年 11月 14日
		HK	1213922	A1	2016年 7月 15日
		CN	104822705	A	2015年 8月 5日
		AU	2018204257	B2	2020年 3月 5日
		US	10072078	B2	2018年 9月 11日
		US	2015299317	A1	2015年 10月 22日
		ES	2718903	T3	2019年 7月 5日
		JP	6643394	B2	2020年 2月 12日