

(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
2020 年 7 月 2 日 (02.07.2020)



(10) 国际公布号
WO 2020/133050 A1

(51) 国际专利分类号:
C07K 14/725 (2006.01) *C12N 15/12* (2006.01)
C12N 5/10 (2006.01) *A61P 35/00* (2006.01)

(21) 国际申请号: PCT/CN2018/124294

(22) 国际申请日: 2018 年 12 月 27 日 (27.12.2018)

(25) 申请语言: 中文

(26) 公布语言: 中文

(71) 申请人: 深圳华大生命科学研究院 (BGI SHENZHEN) [CN/CN]; 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。

(72) 发明人: 王飞 (WANG, Fei); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 赵正琦 (CHAO, Chengchi); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 王石雷 (WANG, Shilei); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 尹悦露 (YIN, Yuelu); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 李波 (LI, Bo); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼, Guangdong 518083 (CN)。 侯勇 (HOU, Yong); 中国广东省深圳市盐田区盐田街道北山工业区综合楼 11F-3, Guangdong 518083 (CN)。

(74) 代理人: 北京纪凯知识产权代理有限公司 (JEEKAI & PARTNERS); 中国北京市丰台区广安路 9 号 5 号楼 15A 层, Beijing 100055 (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, 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, SM, ST, SV, SY, TH, TJ, TM, TN, TR, TT, TZ, UA, UG, US, UZ, VC, VN, 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))。
- 包括说明书序列表部分 (细则 5.2(a))。

(54) Title: EBV EPITOPE HIGH AFFINITY T CELL RECEPTOR

(54) 发明名称: EBV 表位高亲和力 T 细胞受体

(57) Abstract: Disclosed is an EBV epitope high affinity T cell receptor. The EBV epitope high affinity T cell receptor provided by the present invention comprises a chain α and a chain β . The chain α comprises three complementarity determining regions, and comprises the sequences of positions 43-49, 67-71, and 106-116 of SEQ ID No: 3, respectively. The chain β comprises three complementarity determining regions, and comprises amino acid sequences of 46-50, 68-73, and 111-118 of SEQ ID No: 4, respectively. The TCR-expressing T cell provided by the present invention can effectively recognize an EBV antigen polypeptide loaded on a T2 cell and secrete IFN- γ , thereby demonstrating the functionality thereof. The EBV epitope high affinity T cell receptor provided by the present invention has important applications.

(57) 摘要: 本发明公开了一种 EBV 表位高亲和力 T 细胞受体。本发明所提供的 EBV 表位高亲和力 T 细胞受体包含 α 链和 β 链; 所述 α 链包含三个互补决定区, 序列分别为 SEQ ID No.3 的第 43-49 位、第 67-71 位以及第 106-116 位; 所述 β 链包含三个互补决定区, 氨基酸序列分别为 SEQ ID No.4 的第 46-50 位、第 68-73 位以及第 111-118 位。本发明所提供的表达 TCR 的 T 细胞可以有效的识别 T2 细胞负载的 EBV 抗原多肽, 并分泌 IFN- γ , 证明其具有功能。本发明提供的 EBV 表位高亲和力 T 细胞受体具有重要的应用价值。

WO 2020/133050 A1

EBV 表位高亲和力 T 细胞受体

技术领域

本发明属于生物技术领域，具体涉及一种EBV表位高亲和力T细胞受体。

5 背景技术

鼻咽癌（nasopharyngeal carcinoma, NPC）是上皮细胞来源的肿瘤，与EBV病毒（Epstein-Barr virus, EBV）的感染高度相关，所有EBV阳性的NPC恶性肿瘤都伴随了EBV的潜伏感染。化疗与放疗是治疗NPC的传统方案，能有效控制疾病发展，但不能完全清除微小病灶和循环中转移的肿瘤细胞。随着免疫疗法在
10 肿瘤治疗中取得越来越多的瞩目成果，将NPC的传统治疗和免疫疗法相结合，在提高疗效，降低副反应，清除微小病灶等方面将会有较好的效果。

在肿瘤免疫方面，已知细胞毒性T淋巴细胞（cytotoxic T lymphocyte, CTL）在抗感染和肿瘤特异性免疫应答中发挥关键作用。启动免疫应答程序的并不是整个抗原分子，而是与MHC分子结合的氨基酸短肽，即CTL表位。随着生物信息学的发展，越来越多的与病毒、肿瘤抗原相关的MHC I 类分子限制性CTL表
15 位被成功预测并鉴定出来。鼻咽癌细胞可通过人类白细胞抗原（human leukocyte antigen, HLA）I类分子递呈内部表达的病毒抗原，产生特异的CTL，这为鼻咽癌的免疫治疗提供了契机。

EBV潜伏感染时表达的病毒蛋白包括6种核抗原（EBNA_s1, 2, 3A, 3B, 3C和LP）、3种潜伏膜蛋白（LMP_s1, 2A和2B）以及*Bam*HI-A向右开放读码框的转录产物（BART_s）。EBV的这些潜伏基因产物在不同肿瘤组织中呈现不同
20 表达方式，包括潜伏0型，潜伏I型，潜伏II型和潜伏III型，在NPC中以潜伏II型方式存在，仅表达EBNA1、LMP1、LMP2A、LMP2B和BARF1。其中LMP2A序列较为保守，在肿瘤相关组织中能持续表达，且含有多重受HLA限制的CTL表位，
25 是目前EBV相关NPC免疫治疗的理想靶抗原。目前随着研究的深入，不断有LMP2A的表位肽被鉴定出来，其中有多条表位肽在针对NPC的体内和体外免疫治疗实验中均取得了不错效果。

目前针对NPC的免疫治疗主要集中在主动免疫治疗。根据靶抗原设计相应的表位肽疫苗，选择合适的抗原呈递给患者，诱导特异性免疫反应以清除肿瘤细胞。Lin等报道了LMP2多肽负载自体DCs治疗16例难治性鼻咽癌的研究。由DC
30 分别负载自体来源的HLA-A1101、HLA-A2402和HLA-B40011限制型的表位多肽后输回患者体内，以LMP2 特异性CD8⁺ T淋巴细胞为评价标准，9例患者（56%）表现出较强的针对LMP2 多肽的免疫反应。此外，两例病人肿瘤消退，无瘤期分别为10个月和 12个月以上。该研究表明相关的表位多肽对于激发NPC患者的
35 免疫应答的可行性，对后期进行其他免疫疗法具有极大地参考价值。

发明公开

本发明的目的是提供一种识别EBV抗原的T细胞受体。其中，所述EBV抗原的

氨基酸序列如SEQ ID No.5所示（LMP2表位）。

本发明所提供的识别 EBV 抗原的 T 细胞受体，包含 α 链和 β 链。其中，所述 α 链包含三个互补决定区，氨基酸序列分别为 SEQ ID No. 3 的第 43-49 位、第 67-71 位以及第 106-116 位；或这些序列的具有至多 3 个、2 个或 1 个氨基酸改变的变体。所述 β 链包含三个互补决定区，氨基酸序列分别为 SEQ ID No. 4 的第 46-50 位、第 68-73 位以及第 111-118 位；或这些序列的具有至多 3 个、2 个或 1 个氨基酸改变的变体。

进一步地，所述 α 链的可变区的氨基酸序列为 SEQ ID No. 3 的第 18-127 位；或这些序列的具有至多 3 个、2 个或 1 个氨基酸改变的变体。所述 β 链的可变区的氨基酸序列为 SEQ ID No. 4 的第 20-128 位；或这些序列的具有至多 3 个、2 个或 1 个氨基酸改变的变体。

所述 α 链的恒定区的氨基酸序列为 SEQ ID No. 3 的第 128-268。所述 β 链的恒定区的氨基酸序列为 SEQ ID No. 4 的第 129-307 位。

更进一步地，所述 α 链的氨基酸序列具体为 SEQ ID No. 3；所述 β 链的氨基酸序列具体为 SEQ ID No. 4。

编码所述 T 细胞受体的核酸分子也属于本发明的保护范围。

编码所述 T 细胞受体的核酸分子包含编码所述 T 细胞受体的 α 链的核酸分子和编码所述 T 细胞受体的 β 链的核酸分子。

其中，编码所述 T 细胞受体的 α 链中三个互补决定区的核酸分子的序列分别为 SEQ ID No. 1 的第 127-147 位、第 199-213 位以及第 316-348 位；或与这些序列具有 99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者 80%以上同一性且编码相同氨基酸残基的序列。编码所述 T 细胞受体的 β 链中三个互补决定区的核酸分子的序列分别为 SEQ ID No. 2 的第 136-150 位、第 202-219 位以及第 331-354 位；或与这些序列具有 99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者 80%以上同一性且编码相同氨基酸残基的序列。

进一步地，编码所述 α 链的可变区的核酸分子的序列为 SEQ ID No. 1 的第 52-381 位；或与这些序列具有 99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者 80%以上同一性且编码相同氨基酸残基的序列。编码所述 β 链的可变区的核酸分子的序列为 SEQ ID No. 2 的第 58-384 位；或与这些序列具有 99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者 80%以上同一性且编码相同氨基酸残基的序列。

所述 α 链的恒定区的核苷酸序列为 SEQ ID No. 1 的第 382-804。所述 β 链的恒定区的核苷酸序列为 SEQ ID No. 2 的第 385-921 位。

更进一步地，编码所述 α 链的核酸分子的序列具体为 SEQ ID No.1。编码所述 β 链的核酸分子的序列具体为 SEQ ID No. 2。

含有所述核酸分子的表达盒、载体或细胞也属于本发明的保护范围。

进一步地，所述载体可为慢病毒载体。

所述载体可为向载体 pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE 的多克隆位点（如限

制性内切酶 BamHI 和 SalI) 之间插入编码所述 T 细胞受体的 α 链的核酸分子和编码所述 T 细胞受体的 β 链的核酸分子, 得到的重组质粒。

所述载体具体可为向载体 pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE 的多克隆位点 (如限制性内切酶 BamHI 和 SalI) 之间插入 DNA 序列, 得到的重组质粒; 所述 DNA 序列为将编码所述 α 链的核酸分子和编码所述 β 链的核酸分子用连接肽 (如 P2A 肽) 的编码序列连接而成。

在本发明的一个实施例中, 所述载体具体可为向载体 pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE 的限制性内切酶 BamHI 和 SalI 之间插入 SEQ ID No.6 所示的 DNA 分子。

进一步地, 所述细胞可为 T 细胞。

具有上述任一所述 T 细胞受体的 T 细胞也属于本发明的保护范围。

含有所述载体或所述细胞、或、含有上述任一所述 T 细胞受体的 T 细胞的药物组合物也属于本发明的保护范围。

其中, 所述药物组合物可用于预防和/或治疗由 EBV 感染所致疾病。

所述 T 细胞受体、或、所述核酸分子、或、所述载体或细胞、或、含有上述任一所述 T 细胞受体的 T 细胞在制备预防和/或治疗由 EBV 感染所致疾病的药物中的应用也属于本发明的保护范围。

所述 T 细胞受体、或、所述核酸分子、或、所述载体或细胞、或、含有上述任一所述 T 细胞受体的 T 细胞在预防和/或治疗由 EBV 感染所致疾病中的应用也属于本发明的保护范围。

本发明还要求保护一种预防和/或治疗由 EBV 感染所致疾病的方法。该方法可包括如下步骤: 以前文所述的 T 细胞受体、或、所述核酸分子、或、所述载体或细胞、或、含有上述任一所述 T 细胞受体的 T 细胞来预防和/或治疗由 EBV 感染所致疾病。

其中, 前文所述的由 EBV 感染所致疾病具体可为鼻咽癌和/或口咽鳞状细胞瘤和/或 T 细胞恶性肿瘤。

实验证明, 本发明通过 EBV 抗原多肽体外刺激特异性 T 细胞, 获得特异性 T 细胞群体, 利用单细胞配对 TCR 测序技术, 获得 EBV 抗原多肽对应的有效 T 淋巴细胞的 TCR 序列集合, 再将这些序列集合通过丰度排序, 进行体外的功能验证, 最终获得了本发明请求保护的 TCR。实验证明, 本发明所提供的表达 TCR 的 T 细胞可以有效的识别 T2 细胞负载的 EBV 抗原多肽 (靶细胞), 并分泌 IFN- γ , 证明这群 T 细胞是具有功能的。本发明提供的 EBV 表位高亲和力 T 细胞受体具有重要的应用价值。

附图说明

图 1 为 EBV 抗原多肽第一轮刺激后的流式检测结果。左图为未经过多肽刺激的 T 细胞对照组; 右图为经过 EBV 多肽一轮刺激的 T 细胞。

图 2 为 EBV 抗原多肽特异性 T 细胞 Elispot 检测结果。左图为 EBV 多肽刺激的特异性 T 细胞与抗原 (T2+EBV 多肽) 反应可以有效的分泌 INF- γ , 右图为无关多肽

对照组，不能分泌IFN- γ 。

图3为单细胞TCR扩增电泳图，框标记的扩增的TCR α/β 目的条带。

图4为TA克隆的菌落PCR电泳图，不同泳道代表扩增的不同阳性单细胞克隆。

5 实施发明的最佳方式

以下的实施例便于更好地理解本发明，但并不限定本发明。下述实施例中的实验方法，如无特殊说明，均为常规方法。下述实施例中所用的试验材料，如无特殊说明，均为自常规生化试剂商店购买得到的。以下实施例中的定量试验，均设置三次重复实验，结果取平均值。

10 以下的实施例中所用到的实验试剂物品具体如下：

实验物品：采血管（含ACD抗凝剂），注射器，离心管，0.2 μ m滤膜，MS分选柱，磁力架，低吸附六孔板；0.2 μ m滤膜，达优冻存试剂盒，PCR管。

实验试剂：无菌盐溶液（DPBS），RPMI1640培养基，Ficoll，AIM-V培养基，无菌超纯水（0.1 μ m滤膜过滤），MACS running buffer；AIM-V培养基，15 GM-CSF，IL-4，IFN- γ ，LPS，IL-7。抗原呈递 beads，AIM-V培养基，IL-21，IL-2，IL-15。无菌盐溶液（PBS），Human IFN- γ ELISpot 试剂盒（MABTECH），四聚体（EBV 四聚体）。载体 pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE 为 Addgene 公司的产品。

实施例 1、EBV 表位高亲和力 T 细胞受体全长序列的获得

20 一、EBV 特异性 T 细胞刺激

1、健康人外周血 PBMC 分离

1) 血样收集于 50ml，室温 100g、15min 离心（ACC 2，DEC2）；

2) 分别收上层血浆和下层血细胞，上层血浆室温 1100g，20min 离心，弃沉淀；

3) 56 $^{\circ}$ C（30min）灭活后，放于-20 $^{\circ}$ C冷冻层静置 15min；

25 4) 室温 3800rpm，20min 离心，离心后上清即为人血清，取之备用；

5) 取 DPBS 补足下层血细胞加至 50ml，上下颠倒混匀；

6) 吸取 Ficoll 20mL 加入到 50mL 离心管中；

7) 在 Ficoll 上方小心加入混匀后的血样 25mL，室温离心；

8) 离心结束后，液体分为四层，从上至下分别为血浆层、白膜层、Ficoll 层和30 血细胞层，用巴氏滴管将白膜层小心的吸出，并转移至一个无菌的离心管中；

9) 加入 3 倍体积的 1640 培养基洗涤吸出的白膜层，并轻轻的吹打数次，室温 500g，10min 离心，小心的吸去上清，沉淀即为 PBMC；

10) 加入 DNAase 消化成团细胞，肉眼判断成单细胞悬液加入 5-6ml 4 $^{\circ}$ C MACS running buffer 终止。

35 11) 将终止后的单细胞悬液加到 70 μ m 的细胞筛网上，1-2ml 的 MACS running buffer 洗三遍管子和筛网，室温 300g，10min 离心，重悬后计数。

2、CD8 $^{+}$ T 细胞分选

- 1) 计数后 PBMC 按 80 μ l buffer/ 10^7 细胞加入 MACS running buffer 重悬, 并加入 20 μ l CD8 磁珠/ 10^7 cells, 混匀, 于 4 $^{\circ}$ C 孵育 15min;
- 2) 孵育结束后加入 1-2mL buffer/ 10^7 cells 洗涤;
- 3) 完全吸去上清, PBMC 弹散, 并加入 500 μ l buffer ($0-10^8$ total cells) 重悬;
- 5 4) 分选柱置于磁力架上, 加入 MACS running buffer 平衡分选柱。(MS: 500 μ l, LS: 3mL) 加入细胞悬液, 用 MACS running buffer 洗涤管子和分选柱三次, 每次体积同上;
- 5) 将柱子取下, 加入 1ml MACS running buffer 后猛推柱子活塞, 推出的液体即为 CD8 $^{+}$ T 细胞, 计数后按 10^7 /ml 冻存;
- 10 6) CD8 $^{-}$ T 细胞 (阴性细胞) 贴壁取 DC 细胞 (1.5-2h 或过夜)。
- 3、DC 负载 EBV 抗原多肽
- 1) 阴性细胞重悬于 5% 人血清 AIM-V 中, 铺板;
- 2) 摇晃培养皿使未贴壁细胞重悬于上清中, 吸出上清, 再加入 AIM-V 培养基滴洗;
- 15 3) 贴壁细胞加入 DC 培养基, 48h 后补加半量 5% 人血清 AIM-V 培养基, 24h 后用冷的 DPBS 将细胞吹下来 (原培养基与后续加入 DPBS 吹洗下来的细胞液分开在不同的管子), 并按照 12 孔板 5×10^5 cells, 1ml 培养基每孔, 培养基为 5% 人血清 AIM-V, 并加入细胞因子诱导 DC 细胞成熟, 得到成熟的 DC 细胞。
- 4) 向成熟的 DC 细胞中加入多肽 (EBV 抗原多肽, LMP2 表位, aa426-aa434, SEQ ID No.5), 得到体系。该体系中, EBV 抗原多肽的浓度为 10 μ g/ml。
- 20 5) 取步骤 4) 得到的体系, 37 $^{\circ}$ C 培养 4h, 得到负载 EBV 抗原多肽的 DC 细胞。
- 4、负载 EBV 抗原多肽的 DC 细胞与 CD8 $^{+}$ T 细胞共培养
- 1) 16h 后将负载 EBV 抗原多肽的 DC 细胞用冷的 DPBS 吹打下来与复苏的 CD8 $^{+}$ T 共培养;
- 25 2) 将 CD8 $^{+}$ 吹洗下来, 并用 AIM-V 培养基吹洗孔板至少 3 遍, 室温 400g, 5min 离心;
- 3) 1ml AIM-V 重悬, 加入 DNAase 消化至单细胞悬液 0-5min 后加入 5ml AIM-V 终止, 室温 400g, 5min 离心;
- 4) T 细胞用 5% 人血清 AIM-V 重悬, 按 6.25×10^5 细胞/ cm^2 铺板。
- 30 5) 按照比例加入负载 EBV 抗原多肽的 DC 细胞, 并加入 IL-21;
- 6) 72h 后加入, 每隔 2-3 天补液或半量换液, 并补加细胞因子总体积的 IL2, IL-7 和 IL-15;
- 7) 每隔 2-3 天, 补加细胞因子或换液;
- 8) 培养至第 5 天时, 制备第二轮刺激所用抗原呈递 beads: 加入等体积硼酸溶液洗两次后等体积重悬, 加入 CD28 和 HLA-A2:Ig, 4 $^{\circ}$ C 摇床过夜。培养至
- 35 第 10 天, 重悬细胞, 取出用于检测和流式分选的细胞数, 余下细胞用于进行第二轮共培养。

二、EBV 抗原多肽特异性 T 细胞的单细胞 TCR 测序

1、加载了 EBV 表位多肽的 HLA-A*02 四聚体的合成

四聚体有四个单体连接而成，单个 HLA 分子蛋白与多肽形成的复合物称为单体，通过生物素-亲和链霉素连接四个单体，形成的四聚体。单体置换指的是
5 单体上的多肽交换的过程，因不同实验需要，需要针对不同的抗原构建四聚体，不同抗原（多肽序列）的置换，称为单体置换。

1) 取 5 μ l 10mM EBV 表位多肽（LMP2 表位，aa426-aa434，SEQ ID No.5），加入 120 μ l PBS，放置冰上；

2) 向 U 型底部 96 孔板中加入 20 μ l 已稀释目的多肽和 HLA-A*02 单体，混匀；

10 3) 用锡箔纸封板，反应溶液至板底；

4) UV 灯管 365nm 交联 30min，37 $^{\circ}$ C 避光孵育 30min；

5) 取 30 μ l EBV 表位多肽置换 HLA-A*02 单体于新的平板中，加入 3.3 μ l 荧光偶联链霉亲和素，冰上放置 30min；

15 6) 冰上孵育期间，配制终止液。4 $^{\circ}$ C 过夜，冰上避光 30min，得到加载了 EBV 表位多肽的 HLA-A*02 四聚体（以下简称四聚体）。

2、EBV 抗原多肽特异性 T 细胞流式检测

重悬步骤一 4 中经过刺激后的细胞并计数，取出用于流式分选细胞数 2×10^5 /管，加入 1ml PBS 重悬，4 $^{\circ}$ C 500g，5min 离心后，小心弃去上清，加入 200 μ l PBS 重悬；向 tube 中加入步骤 1 制备的四聚体（10 μ l/ml），混匀并 4 $^{\circ}$ C 反应 30min；反
20 应时间结束后，加入 1ml PBS 重悬，4 $^{\circ}$ C 500g，5min 离心，小心弃去上清，加入 200 μ l PBS 重悬，置于冰上用于流式检测；流式上样后，选择阳性群体用于分选单细胞。

EBV 抗原多肽第一轮刺激后的流式检测结果如图 1 所示，可见：相比于对照组（对照组为相同条件下培养，未经过刺激的 T 细胞），用 EBV 抗原多肽抗原刺激后的 T 细胞可以用四聚体检测出 8.9% 的阳性肿瘤特异性 T 细胞。

25 3、EBV 抗原多肽特异性 T 细胞 Elispot 检测

准备靶细胞：T2 细胞计数，取出所需细胞数量，室温 400g，5min 离心后，用无血清 IMDM 培养基重悬。

靶细胞负载 EBV 抗原多肽：根据取出的细胞数量确定合适的孔板和负载体积，EBV 抗原多肽（LMP2 表位，aa426-aa434，SEQ ID No.5）配制成 10 μ g/ μ l，按
30 1000X 加入负载体积中，重悬混匀，37 $^{\circ}$ C，5%的 CO₂ 孵箱培养 4h。同时设置负载无关多肽的对照组。

准备效应细胞（第二轮刺激后的流式筛选出的 EBV 抗原多肽特异性 T 细胞）：效应细胞计数，取出所需细胞，室温 300g，10min 离心后，用 5% 人血清 AIM-V 培养基重悬，置于冰上。

35 洗板：至抗原负载还剩 45min 时，在超净台中取出 Human IFN- γ ELISpot 试剂盒中的反应孔板，加入 PBS，静置 30s 后拍掉孔中液体，该动作重复五次后，加入 10% FBS RPMI1640 培养基 100 μ l/孔，37 $^{\circ}$ C，5%的 CO₂ 孵箱孵育 30min。

加样：抗原负载时间结束后，用 5%人血清 AIM-V 培养基将孔板中的 T2 细胞吹洗下来，室温 400g，5min 离心后，用 5%人血清 AIM-V 培养基重悬。将效应细胞 50 μ l/孔加到反应孔板中后，加入靶细胞悬液 50 μ l/孔，放入 37 $^{\circ}$ C，5%的 CO₂ 孵箱培养 16-48h；培养时间结束后，加入 PBS 150 μ l/孔，静置 30s 后拍掉孔中液体，该动作重复五次后，用 0.5%FBS 的 PBS（0.2 μ m 滤膜过滤）配制抗人 IFN- γ 检测抗体溶液（7-b6-1-ALP）。200X 加入 7-b6-1-ALP 抗体并充分混匀 0.5%FBS 的 PBS 后，100 μ l/孔加到反应孔板中，反应板放入 37 $^{\circ}$ C，5%的 CO₂ 孵箱反应 2h；反应时间结束后，加入 PBS 150 μ l/孔，静置 30s 后拍掉孔中液体，该动作重复五次后，避光加入 NBT/BCIP（0.2 μ m 滤膜过滤）100 μ l/孔到反应孔中，避光显色 30s-5min（以观察到阳性对照斑点明显为反应终点）后以大量自来水冲洗，晾干后观察结果。

结果如图 2 所示。相比于对照组（对照组为 EBV 特异性 T 细胞与 T2 负载的无关多肽反应），EBV 抗原多肽特异性 T 细胞可以有效的识别 T2 负载的多肽（靶细胞），并分泌 IFN- γ ，证明这群细胞是具有功能的。

4、单细胞 TCR 测序

所用试剂如表1所示。

表1.单细胞TCR全长测序所需试剂

M0314L	Rnase Inhibitor, Murine	NEB
T8787	Triton x-100	SIGMA
4030	dNTP Mixture	TAKARA
18064071	SuperScript II Reverse Transcriptase	Invitrogen
B0300-1VL	Betaine solution	SIGMA
20-303	MgCl ₂	MILLIPORE
KK2602	KAPA HiFi HotStart ReadyMix	KAPA BIOSYSTEMS
AM9938	Nuclease-free Water	AMBION
B7022S	Gel Loading dye, Orange	NEB
MD109-2	100bp DNA ladder	TIANGEN

所用引物序列如表2。

表2.EBV抗原多肽特异性T细胞的单细胞TCR全长测序所需引物

$\alpha\beta$ 链	引物名称	序列(5'-3')	Tm/ $^{\circ}$ C	GC%
TCRA	Outer	GCAGACAGACTTGTCCTGG	59.1	55
	Middle	TGGATTTAGAGTCTCTCAGCTGGTACACG	66.1	48.3
	Inner	GGTACACGGCAGGGTCAGGGTTC	67.6	65.2
TCRB	Outer	TGGTCGGGGAAGAAGCCTGTG	63.4	65
	Middle	TCTGCTTCTGATGGCTCAAACACAGC	66.3	50
	Inner	TTCTGATGGCTCAAACACAGCGA	63.5	47.8

(1) 细胞裂解

按照表 3 配制细胞裂解混合液。

表 3.细胞裂解混合液

细胞裂解混合液	体积 μl	终浓度
RNase/DNase-free water	1.86	
10 μM Oligo-dT Primer	1	2.5 μM
10mM dNTP	1	2.5 mM
40 U/ μl RNase Inhibitor	0.1	2 U/ μl
10%Triton X-100	0.04	0.2%
总体积	4	

配制时，按样品数 110%配制（如有 10 个细胞样品，则配制 11 管的量）。

- 5 配制好的裂解液吹打混匀后分装到洁净 PCR 管中，4 $^{\circ}\text{C}$ 14000rpm，30s 离心（将液滴离心到管底并去除气泡），冰盒放置，待后续分入细胞；选择阳性群体（即步骤 1 所得的 EBV 抗原多肽特异性 T 细胞）并向装有裂解液的 PCR 管分入单细胞；分选完毕后，盖好管盖，短时离心，并调试好 PCR 仪准备进行单细胞裂解。

- 10 将 0.2ml PCR 管置于 PCR 仪内，72 $^{\circ}\text{C}$ ，3min 孵育（细胞细胞为 bulk 样本增至 5min），热盖温度为 75 $^{\circ}\text{C}$ ，裂解完成后立即置于冰上 1min；10000 rpm 4 $^{\circ}\text{C}$ 离心 30 s，后立即转至冰上；此步后，所有 mRNAs 都从单细胞中释放，并且 Oligo-dT 引物也已与 mRNAs 结合。

(2) 按表4配制逆转录体系。

表4.逆转录体系

成分	体积 μl	终浓度
5 $\times$ SuperScript II	2	1X
5M Betaine	2	1M
100mM MgCl ₂	0.9	9mM
100mM DTT	0.25	2.5mM
100 μM TSO	0.1	1 μM
40U/ μl RNase inhibitor	0.25	1U/ μL
200U/ μl SSII	0.5	10U/ μL
总体积	6	

- 15 配制时，按样品数+0.5个配制（如有9个细胞样品，则配制9.5管的量）。配制好的Mix充分混匀后，依次加入到上步离心管中；

(3) 吹打混匀、瞬时离心后，按如表5所示的条件进行逆转录反应（75 $^{\circ}\text{C}$ 热盖）。

表5.逆转录反应条件

循环	温度	时间
1	42 $^{\circ}\text{C}$	90min

10	50°C	2min
	42°C	2min
1	70°C	15min
1	4°C	forever

此步后，所有mRNAs的第一链cDNA合成完毕；

(4) 按表6配制第一轮PCR Mix。

表6.第一轮PCR Mix

成分	体积 μ l	终浓度
2×KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5	1X
IS PCR Primer (10 μ M)	1	0.4 μ M
TCRA-out Primer (10 μ M)	0.5	0.2 μ M
TCRB-out Primer (10 μ M)	0.5	0.2 μ M
NF-water	0.5	
总体积	15	

配制时，按样品数+0.5配制（如有9个细胞样品，则配制9.5管的量）。配制好的Mix充分混匀后，依次取15 μ l加入到上步离心管中，吹打混匀、瞬时离心后，按表7所示条件预扩增。

表7.第一轮PCR预扩增条件

循环	温度	时间
1	95°C	3min
25	98°C	20s
	55°C	15s
	72°C	2min
1	72°C	5min
1	4°C	forever

(5) 按表8配制第二轮PCR Mix。

表8.第二轮PCR Mix

成分	体积 μ l	终浓度
2×KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5	1X
IS PCR Primer (10 μ M)	1	0.4 μ M
TCRA-middle Primer (10 μ M)	0.5	0.2 μ M
TCRB-middle Primer (10 μ M)	0.5	0.2 μ M
NF-water	9.5	
总体积	24	

配制时，按样品数+0.5配制（如有9个细胞样品，则配制9.5管的量）。配制好的Mix充分混匀后，依次取24 μ l加入到上步离心管中，吹打混匀、瞬时离心后，

按表9所示条件预扩增。

表9.第二轮PCR预扩增条件

循环	温度	时间
1	95℃	3min
25	98℃	20s
	60℃	15s
	72℃	2min
1	72℃	5min
1	4℃	forever

(6) 按表10配制第三轮PCR Mix。

表10.第三轮PCR Mix

成分	体积 μ l	终浓度
2×KAPA HiFi HotStart ReadyMix	12.5	1X
IS PCR Primer (10 μ M)	1	0.4 μ M
TCRA-in Primer (10 μ M)	0.5	0.2 μ M
TCRB-in Primer (10 μ M)	0.5	0.2 μ M
NF-water	9.5	
总体积	24	

5 配制时，按样品数+0.5配制（如有9个细胞样品，则配制9.5管的量）。配制好的Mix充分混匀后，依次取24 μ l加入到上步离心管中，吹打混匀、瞬时离心后，按表11所示条件预扩增。

表11.第三轮PCR预扩增条件

循环	温度	时间
1	95℃	3min
35	98℃	20s
	60℃	15s
	72℃	2min
1	72℃	5min
1	4℃	forever

10 (7) 电泳检测：PCR 完成后电泳检测，采用 2%琼脂糖凝胶，取 15 μ L 产物，加 3 μ l Loading buffer 混匀，130V 电泳 45min，目的条带切胶回收。之后与 T 载体连接，然后再进行菌落 PCR 鉴定。

图 3 为单细胞 TCR 扩增电泳图；图 4 为 TA 克隆的菌落 PCR 电泳图。图中结果显示，扩增出来的 TCR 片段与 T 载体连接成功，通过菌落 PCR 可以有效的检测出成功构建的插入片段载体。

15 (8)TA 克隆阳性的目的克隆，送 sanger 测序，获得 TCR α/β 序列，序列在 IMGT

数据库进行比对。

三、EBV 抗原多肽特异性 TCR 序列的筛选及功能验证

1、将步骤二获得的 EBV 抗原多肽特异性 T 细胞的单细胞 TCR 序列合集按照丰度由高到低的顺序进行排序，选择丰度高（top3）的序列进行初步的功能验证，以确定最终的用于治疗 TCR 全长序列。其中，一个丰度达到 3% 的功能性配对的 TCR α/β 序列，找到起始密码子后，根据恒定区（TRAC/TRBC）实际序列进行拼接，形成新序列， α 链的完整编码基因的序列为 SEQ ID No.1（编码 SEQ ID No.3 所示 α 链）， β 链的完整编码基因的序列为 SEQ ID No.2（编码 SEQ ID No.4 所示 β 链）。其中，SEQ ID No.1 的第 52-381 位为 α 链可变区的编码基因（第 127-147 位、第 199-213 位和第 316-348 位分别为三个 CDR 的编码基因），SEQ ID No.2 的第 58-384 位为 β 链可变区的编码基因（第 136-150 位、第 202-219 位和第 331-354 位分别为三个 CDR 的编码基因）。 α 链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID No. 3 的第 18-127 位（第 43-49 位、第 67-71 位和第 106-116 位分别为三个互补决定区）。 β 链可变区的氨基酸序列为 SEQ ID No. 4 的第 20-128 位（第 46-50 位、第 68-73 位和第 111-118 位分别为三个互补决定区）。

2、将 SEQ ID No.1 所示的 α 链的编码基因和 SEQ ID No.2 所示的 β 链的编码基因通过 P2A 肽的基因序列连接后构建到载体 pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE 中，得到重组病毒载体。该重组病毒载体的结构描述为：向载体 pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE 的限制性内切酶 BamHI 和 SalI 之间插入 SEQ ID No.6 所示的 DNA 分子。

3、将步骤 2 构建的重组病毒载体感染 T 细胞，然后参照步骤二中 3 的方法进行 Elispot 检测。

4、将载体 pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE 感染 T 细胞，然后参照步骤二中 3 的方法进行 Elispot 检测（作为对照组）。

结果表明，相比于对照组，重组病毒载体感染的 T 细胞可以有效的识别 T2 负载的 EBV 抗原多肽，并分泌 IFN- γ ，即可以有效的与靶细胞反应。

工业应用

本发明通过 EBV 抗原多肽体外刺激特异性 T 细胞，获得特异性 T 细胞群体，利用单细胞配对 TCR 测序技术，获得 EBV 抗原多肽对应的有效 T 淋巴细胞的 TCR 序列集合，再将这些序列集合通过丰度排序，进行体外的功能验证，最终获得了本发明请求保护的 TCR。实验证明，本发明所提供的表达 TCR 的 T 细胞可以有效的识别 T2 细胞负载的 EBV 抗原多肽（靶细胞），并分泌 IFN- γ ，证明这群 T 细胞是具有功能的。有效的全体通过 TCR 序列集合能够快速验证，比以往的方法可以更全面更有效的信息，这些信息经过体外功能验证、人源化小鼠的功能验证，即可以推向临床，具有极高的临床应用价值。

权利要求

1、一种识别 EBV 抗原的 T 细胞受体，包含 α 链和 β 链；

5 所述 α 链包含三个互补决定区，氨基酸序列分别为 SEQ ID No. 3 的第 43-49 位、第 67-71 位以及第 106-116 位；或这些序列的具有至多 3 个、2 个或 1 个氨基酸改变的变体；

所述 β 链包含三个互补决定区，氨基酸序列分别为 SEQ ID No. 4 的第 46-50 位、第 68-73 位以及第 111-118 位；或这些序列的具有至多 3 个、2 个或 1 个氨基酸改变的变体。

10 2、根据权利要求 1 所述的 T 细胞受体，其特征在于：所述 α 链的可变区的氨基酸序列为 SEQ ID No. 3 的第 18-127 位；或这些序列的具有至多 3 个、2 个或 1 个氨基酸改变的变体；

所述 β 链的可变区的氨基酸序列为 SEQ ID No. 4 的第 20-128 位；或这些序列的具有至多 3 个、2 个或 1 个氨基酸改变的变体。

15 3、根据权利要求 1 或 2 所述的 T 细胞受体，其特征在于：所述 α 链的恒定区的氨基酸序列为 SEQ ID No. 3 的第 128-268 位；所述 β 链的恒定区的氨基酸序列为 SEQ ID No. 4 的第 129-307 位。

4、根据权利要求 1-3 中任一所述的 T 细胞受体，其特征在于：所述 α 链的氨基酸序列为 SEQ ID No. 3；所述 β 链的氨基酸序列为 SEQ ID No. 4。

20 5、编码权利要求 1-4 中任一所述 T 细胞受体的核酸分子。

6、根据权利要求 5 所述的核酸分子，其特征在于：编码所述 T 细胞受体的核酸分子包含编码所述 T 细胞受体的 α 链的核酸分子和编码所述 T 细胞受体的 β 链的核酸分子；

25 编码所述 T 细胞受体的 α 链中三个互补决定区的核酸分子的序列分别为 SEQ ID No. 1 的第 127-147 位、第 199-213 位以及第 316-348 位；或与这些序列具有 99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者 80%以上同一性且编码相同氨基酸残基的序列；

30 编码所述 T 细胞受体的 β 链中三个互补决定区的核酸分子的序列分别为 SEQ ID No. 2 的第 136-150 位、第 202-219 位以及第 331-354 位；或与这些序列具有 99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者 80%以上同一性且编码相同氨基酸残基的序列。

35 7、根据权利要求 5 或 6 所述的核酸分子，其特征在于：编码所述 α 链的可变区的核酸分子的序列为 SEQ ID No. 1 的第 52-381 位；或与这些序列具有 99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者 80%以上同一性且编码相同氨基酸残基的序列；

编码所述 β 链的可变区的核酸分子的序列为 SEQ ID No. 2 的第 58-384 位；或与这些序列具有 99%以上、95%以上、90%以上、85%以上或者 80%以上同一性

且编码相同氨基酸残基的序列。

8、根据权利要求 5-7 中任一所述的核酸分子，其特征在于：编码所述 α 链的核酸分子的序列为 SEQ ID No.1；编码所述 β 链的核酸分子的序列为 SEQ ID No. 2。

5 9、含有权利要求 5-8 中任一所述核酸分子的表达盒、载体或细胞。

10、根据权利要求 9 所述的载体，其特征在于：所述载体为向载体 pRRLSIN.cPPT.PGK-GFP.WPRE 的多克隆位点之间插入编码所述 T 细胞受体的 α 链的核酸分子和编码所述 T 细胞受体的 β 链的核酸分子，得到的重组质粒。

11、根据权利要求 9 所述的细胞，其特征在于：所述细胞为 T 细胞。

10 12、具有权利要求 1-4 中任一所述 T 细胞受体的 T 细胞。

13、含有权利要求 9-11 中任一所述载体或细胞、或、含有权利要求 12 所述的 T 细胞的药物组合物。

14、权利要求 1-4 中任一所述的 T 细胞受体、或、权利要求 5-8 中任一所述的核酸分子、或、权利要求 9-11 中任一所述的载体或细胞、或、权利要求 12 所
15 述的 T 细胞在制备预防和/或治疗由 EBV 感染所致疾病的药物中的应用。

15、权利要求 1-4 中任一所述的 T 细胞受体、或、权利要求 5-8 中任一所述的核酸分子、或、权利要求 9-11 中任一所述的载体或细胞、或、权利要求 12 所述的 T 细胞在预防和/或治疗由 EBV 感染所致疾病中的应用。

16、一种预防和/或治疗由 EBV 感染所致疾病的方法，包括如下步骤：以权
20 利要求 1-4 中任一所述的 T 细胞受体、或、权利要求 5-8 中任一所述的核酸分子、或、权利要求 9-11 中任一所述的载体或细胞、或、权利要求 12 所述的 T 细胞来预防和/或治疗由 EBV 感染所致疾病。

17、根据权利要求 14 或 15 所述的应用或权利要求 16 所述的方法，其特征
25 在于：所述由 EBV 感染所致疾病为鼻咽癌和/或口咽鳞状细胞瘤和/或 T 细胞恶性肿瘤。

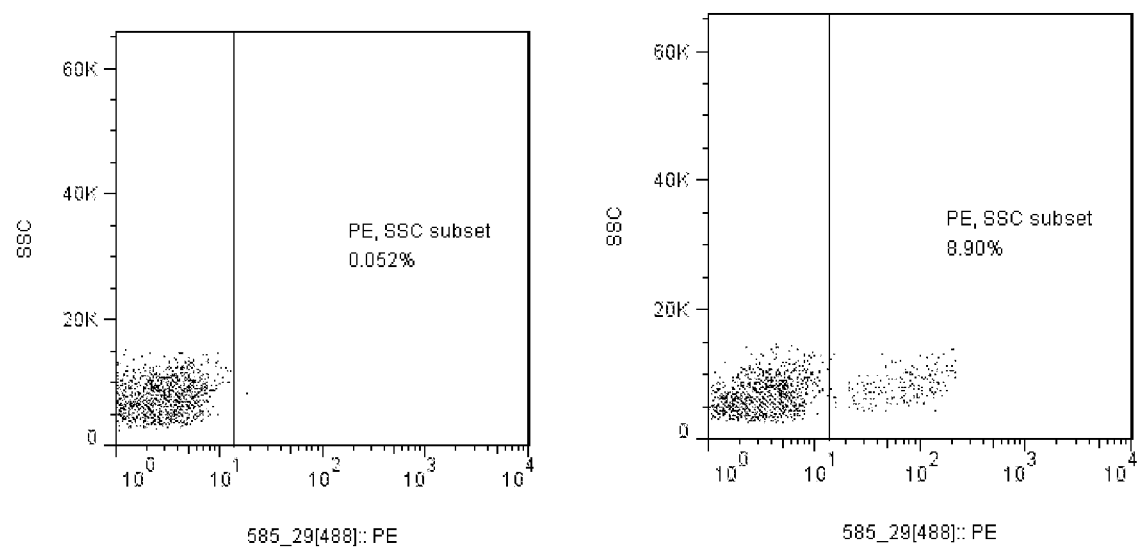


图 1

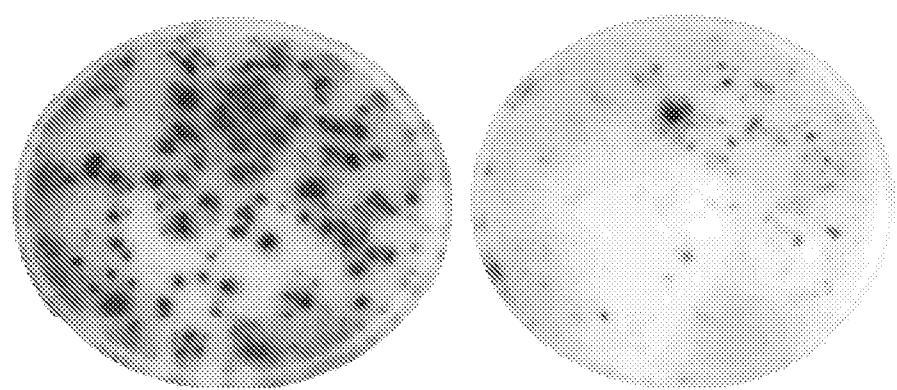


图 2

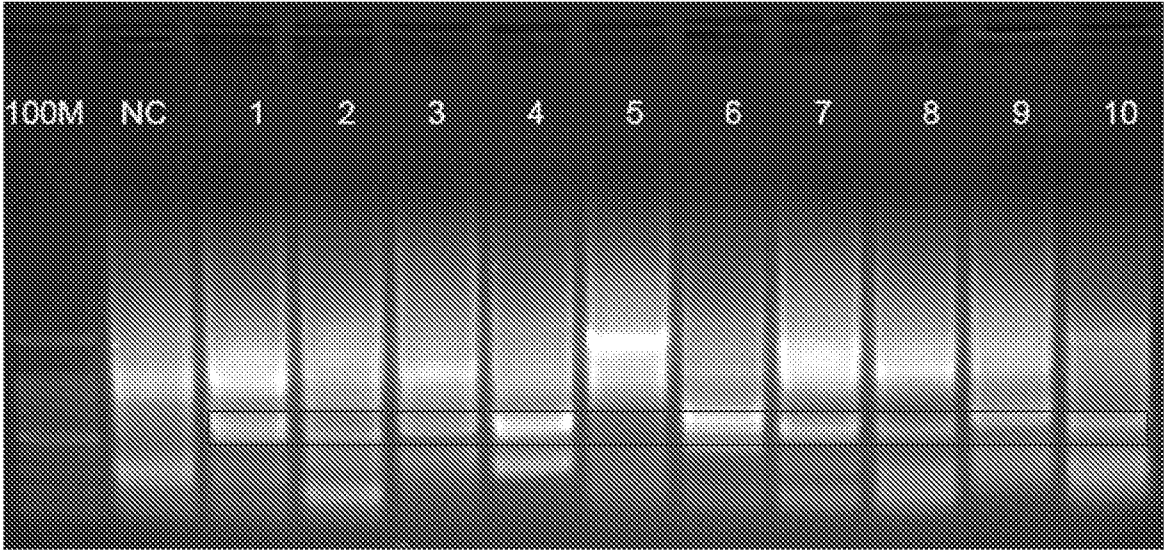


图 3

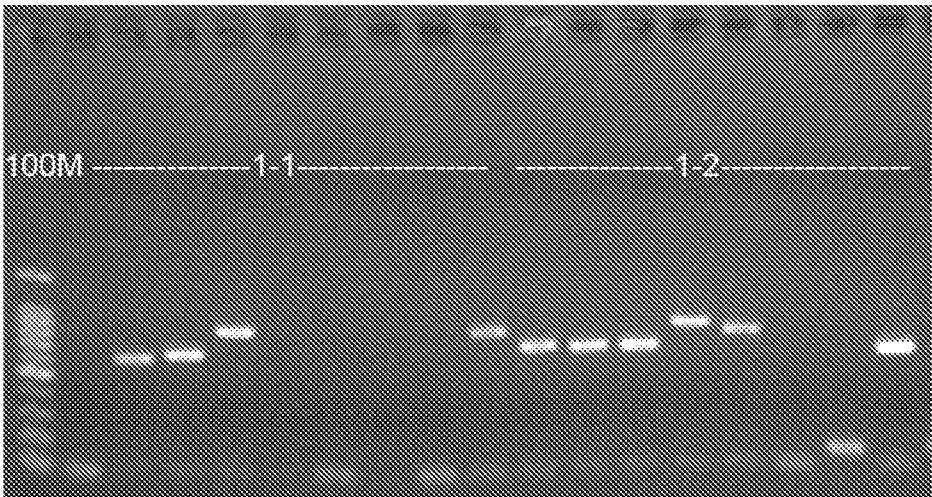


图 4

INTERNATIONAL SEARCH REPORT

International application No.

PCT/CN2018/124294

A. CLASSIFICATION OF SUBJECT MATTER

C07K 14/725(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)i

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

B. FIELDS SEARCHED

Minimum documentation searched (classification system followed by classification symbols)

C07K; C12N; A61P

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)

CNABS; CNKI; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ISI Web of Science; CA: T细胞受体, EB 病毒, EBV, Epstein-Barr virus, LMP2, T cell receptor, CLGGLTMV, et al.; 中国专利生物序列检索系统; China Patents Biological Sequence Search System; Genbank; EMBL; STN和检索的序列: SEQ ID NOs: 1-6, et al.; STN and search for SEQ ID NOs: 1-6, et al.

C. DOCUMENTS CONSIDERED TO BE RELEVANT

Category*	Citation of document, with indication, where appropriate, of the relevant passages	Relevant to claim No.
A	CN 106414482 A (IMMUNOCORE LTD.) 15 February 2017 (2017-02-15) see entire document	1-14, 17 (partial)
A	CN 102695717 A (UCL BUSINESS PLC) 26 September 2012 (2012-09-26) see entire document	1-14, 17 (partial)
A	CN 108289950 A (MEMORIAL SLOAN KETTERING CANCER CENTER) 17 July 2018 (2018-07-17) see entire document	1-14, 17 (partial)
A	CN 109081867 A (PEKING UNIVERSITY) 25 December 2018 (2018-12-25) see entire document	1-14, 17 (partial)
A	CN 107922950 A (MEDIGENE IMMUNOTHERAPIES GMBH) 17 April 2018 (2018-04-17) see entire document	1-14, 17 (partial)



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

02 July 2019

Date of mailing of the international search report

17 July 2019

Name and mailing address of the ISA/CN

National Intellectual Property Administration, PRC (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/CN2018/124294

Box No. II Observations where certain claims were found unsearchable (Continuation of item 2 of first sheet)

This international search report has not been established in respect of certain claims under Article 17(2)(a) for the following reasons:

1. ☒ Claims Nos.: **15、16、17** (部分)
because they relate to subject matter not required to be searched by this Authority, namely:
[1] PCT Rule 39.1 (iv)- a method for treatment of the human or animal body by surgery or therapy.
2. ☐ Claims Nos.:
because they relate to parts of the international application that do not comply with the prescribed requirements to such an extent that no meaningful international search can be carried out, specifically:
3. ☐ Claims Nos.:
because they are dependent claims and are not drafted in accordance with the second and third sentences of Rule 6.4(a).

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/124294

Patent document cited in search report			Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)			Publication date (day/month/year)
CN	106414482	A	15 February 2017	WO	2015022520	A1	19 February 2015
				EP	3033353	A1	22 June 2016
				SG	11201600849U	A	30 March 2016
				JP	2016528244	A	15 September 2016
				AU	2014307725	A1	03 March 2016
				CA	2920444	A1	19 February 2015
				PH	12016500272	A1	02 May 2016
				EA	201690180	A1	29 July 2016
				US	2016199479	A1	14 July 2016
				KR	20160058767	A	25 May 2016
				ZA	201600959	B	29 November 2017
				MX	2016001837	A	24 May 2016
				HK	1221724	A1	09 June 2017
				GB	201314404	D0	25 September 2013
				BR	112016002687	A2	12 September 2017
CN	102695717	A	26 September 2012	AU	2010302477	B2	19 January 2017
				EP	2483294	B1	13 July 2016
				KR	101760277	B1	21 July 2017
				CN	102695717	B	10 August 2016
				US	8889141	B2	18 November 2014
				WO	2011039508	A2	07 April 2011
				JP	2016047064	A	07 April 2016
				JP	2013505734	A	21 February 2013
				WO	2011039508	A3	30 June 2011
				GB	0917090	D0	11 November 2009
				AU	2010302477	A1	19 April 2012
				EP	2483294	A2	08 August 2012
				IN	2993DEN2012	A	31 July 2015
				JP	6180114	B2	16 August 2017
				ES	2584541	T3	28 September 2016
				US	2012244132	A1	27 September 2012
CN	108289950	A	17 July 2018	KR	20120074291	A	05 July 2012
				EP	3307319	A4	22 May 2019
				AU	2016274767	A1	04 January 2018
				MX	2017015666	A	06 July 2018
				WO	2016201124	A2	15 December 2016
				CA	2988768	A1	15 December 2016
				WO	2016201124	A3	30 March 2017
				KR	20180023949	A	07 March 2018
				EP	3307319	A2	18 April 2018
				US	2018258187	A1	13 September 2018
CN	109081867	A	25 December 2018	JP	2018517713	A	05 July 2018
				US	2018245242	A1	30 August 2018
CN	107922950	A	17 April 2018	CA	2987857	A1	08 December 2016
				EP	3303591	A1	11 April 2018
				AU	2016273213	B2	14 March 2019
				EA	201792660	A1	31 May 2018
				None			

INTERNATIONAL SEARCH REPORT
Information on patent family members

International application No.

PCT/CN2018/124294

Patent document cited in search report	Publication date (day/month/year)	Patent family member(s)	Publication date (day/month/year)
		WO 2016193299 A1	08 December 2016
		AU 2016273213 A1	07 December 2017
		EP 3303591 B1	03 April 2019

国际检索报告

国际申请号

PCT/CN2018/124294

A. 主题的分类

C07K 14/725(2006.01)i; C12N 5/10(2006.01)i; C12N 15/12(2006.01)i; A61P 35/00(2006.01)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; C12N; A61P

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))

CNABS; CNKI; CNTXT; DWPI; SIPOABS; EPTXT; USTXT; WOTXT; JPTXT; ISI Web of Science; CA和检索词: T细胞受体, EB病毒, EBV, Epstein-Barr virus, LMP2, T cell receptor, CLGGLTMV, 等; 中国专利生物序列检索系统; Genbank; EMBL; STN和检索的序列: SEQ ID NOs: 1-6, 等

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	CN 106414482 A (英美诺科有限公司) 2017年 2月 15日 (2017 - 02 - 15) 参见全文	1-14、17 (部分)
A	CN 102695717 A (UCL商务股份有限公司) 2012年 9月 26日 (2012 - 09 - 26) 参见全文	1-14、17 (部分)
A	CN 108289950 A (纪念斯隆凯特琳癌症中心) 2018年 7月 17日 (2018 - 07 - 17) 参见全文	1-14、17 (部分)
A	CN 109081867 A (北京大学) 2018年 12月 25日 (2018 - 12 - 25) 参见全文	1-14、17 (部分)
A	CN 107922950 A (基因医疗免疫疗法有限责任公司) 2018年 4月 17日 (2018 - 04 - 17) 参见全文	1-14、17 (部分)

☐ 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

2019年 7月 2日

国际检索报告邮寄日期

2019年 7月 17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

何睿

电话号码 (86-10)-62411106

第II栏

某些权利要求被认为是不能检索的意见(续第1页第2项)

根据条约第17条(2)(a)，对某些权利要求未做国际检索报告的理由如下：

1. ☒ 权利要求： 15、16、17（部分）
因为它们涉及不要求本单位进行检索的主题，即：
[1] PCT细则39.1（iv）——处置人体或者动物体的外科手术方法或治疗方法。
2. ☐ 权利要求：
因为它们涉及国际申请中不符合规定的要求的部分，以致不能进行任何有意义的国际检索， 具体地说：
3. ☐ 权利要求：
因为它们是从属权利要求，并且没有按照细则6.4(a)第2句和第3句的要求撰写。

国际检索报告
关于同族专利的信息

国际申请号

PCT/CN2018/124294

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	106414482	A	2017年 2月 15日	WO	2015022520	A1	2015年 2月 19日
				EP	3033353	A1	2016年 6月 22日
				SG	11201600849U	A	2016年 3月 30日
				JP	2016528244	A	2016年 9月 15日
				AU	2014307725	A1	2016年 3月 3日
				CA	2920444	A1	2015年 2月 19日
				PH	12016500272	A1	2016年 5月 2日
				EA	201690180	A1	2016年 7月 29日
				US	2016199479	A1	2016年 7月 14日
				KR	20160058767	A	2016年 5月 25日
				ZA	201600959	B	2017年 11月 29日
				MX	2016001837	A	2016年 5月 24日
				HK	1221724	A1	2017年 6月 9日
				GB	201314404	D0	2013年 9月 25日
				BR	112016002687	A2	2017年 9月 12日
CN	102695717	A	2012年 9月 26日	AU	2010302477	B2	2017年 1月 19日
				EP	2483294	B1	2016年 7月 13日
				KR	101760277	B1	2017年 7月 21日
				CN	102695717	B	2016年 8月 10日
				US	8889141	B2	2014年 11月 18日
				WO	2011039508	A2	2011年 4月 7日
				JP	2016047064	A	2016年 4月 7日
				JP	2013505734	A	2013年 2月 21日
				WO	2011039508	A3	2011年 6月 30日
				GB	0917090	D0	2009年 11月 11日
				AU	2010302477	A1	2012年 4月 19日
				EP	2483294	A2	2012年 8月 8日
				IN	2993DEN2012	A	2015年 7月 31日
				JP	6180114	B2	2017年 8月 16日
				ES	2584541	T3	2016年 9月 28日
				US	2012244132	A1	2012年 9月 27日
CN	108289950	A	2018年 7月 17日	KR	20120074291	A	2012年 7月 5日
				EP	3307319	A4	2019年 5月 22日
				AU	2016274767	A1	2018年 1月 4日
				MX	2017015666	A	2018年 7月 6日
				WO	2016201124	A2	2016年 12月 15日
				CA	2988768	A1	2016年 12月 15日
				WO	2016201124	A3	2017年 3月 30日
				KR	20180023949	A	2018年 3月 7日
				EP	3307319	A2	2018年 4月 18日
				US	2018258187	A1	2018年 9月 13日
CN	109081867	A	2018年 12月 25日	JP	2018520667	A	2018年 8月 2日
				IL	256035	D0	2018年 1月 31日
				无			
CN	107922950	A	2018年 4月 17日	JP	2018517713	A	2018年 7月 5日
				US	2018245242	A1	2018年 8月 30日
				CA	2987857	A1	2016年 12月 8日
				EP	3303591	A1	2018年 4月 11日
				AU	2016273213	B2	2019年 3月 14日

表 PCT/ISA/210 (同族专利附件) (2015年1月)

国际申请号
PCT/CN2018/124294

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)
		EA 201792660 A1	2018年 5月 31日
		WO 2016193299 A1	2016年 12月 8日
		AU 2016273213 A1	2017年 12月 7日
		EP 3303591 B1	2019年 4月 3日