



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I875737 B

(45)公告日：中華民國 114 (2025) 年 03 月 11 日

(21)申請案號：109107114

(22)申請日：中華民國 109 (2020) 年 03 月 04 日

(51)Int. Cl.：

*C07K14/725 (2006.01)**A61K31/675 (2006.01)**A61K35/12 (2015.01)**C12N15/62 (2006.01)**C12N15/86 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2019/03/04

美國

62/813,639

(71)申請人：大學健康網絡(加拿大) UNIVERSITY HEALTH NETWORK (CA)

加拿大

(72)發明人：平野直人 HIRANO, NAOTO (JP)；村田健司 MURATA, KENJI (JP)；佐蘇佳代子

SASO, KAYOKO (JP)

(74)代理人：林志剛

(56)參考文獻：

CN 101815785A

US 2003/0050451A1

US 2016/0024174A1

審查人員：張茜毓

申請專利範圍項數：11 項 圖式數：9 共 110 頁

(54)名稱

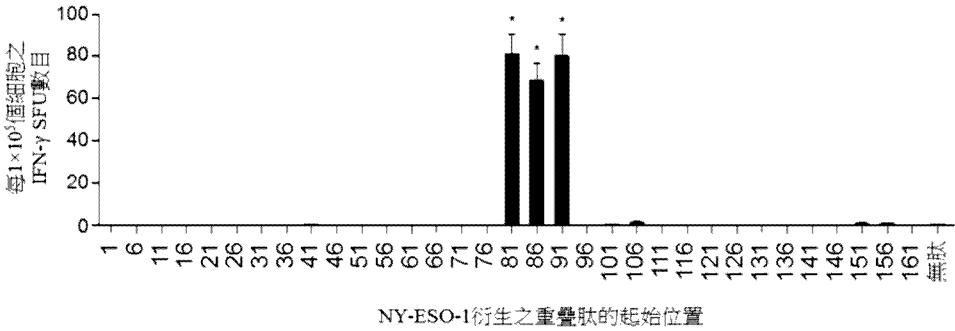
T細胞受體及其使用方法

(57)摘要

本發明係有關能夠結合 NY-ESO-1 抗原決定基之重組 T 細胞受體及編碼該等重組 T 細胞受體之核酸分子。在一些實施例中，該等核酸分子進一步包含第二核苷酸序列，其中該第二核苷酸序列或由該第二核苷酸序列編碼之多肽抑制內源 TCR 之表現。本發明之其他態樣係有關包含該核酸分子之載體及包含該重組 TCR、該核酸分子或該載體之細胞。本發明之其他態樣係有關其使用之方法。在一些實施例中，該等方法包括治療有需要之個體的癌症。

The present disclosure is directed recombinant T cell receptors capable of binding an NY-ESO-1 epitope and nucleic acid molecules encoding the same. In some embodiments, the nucleic acid molecules further comprise a second nucleotide sequence, wherein the second nucleotide sequence or the polypeptide encoded by the second nucleotide sequence inhibits the expression of an endogenous TCR. Other aspects of the disclosure are directed to vectors comprising the nucleic acid molecule and cells comprising the recombinant TCR, the nucleic acid molecule, or the vector. Still other aspects of the disclosure are directed to methods of using the same. In some embodiments, the methods comprise treating a cancer in a subject in need thereof.

指定代表圖：



【圖 1】



I875737

**【發明摘要】****【中文發明名稱】**

T 細胞受體及其使用方法

**【英文發明名稱】**

T CELL RECEPTORS AND METHODS OF USE THEREOF

**【中文】**

本發明係有關能夠結合 NY-ESO-1 抗原決定基之重組 T 細胞受體及編碼該等重組 T 細胞受體之核酸分子。在一些實施例中，該等核酸分子進一步包含第二核苷酸序列，其中該第二核苷酸序列或由該第二核苷酸序列編碼之多肽抑制內源 TCR 之表現。本發明之其他態樣係有關包含該核酸分子之載體及包含該重組 TCR、該核酸分子或該載體之細胞。本發明之其他態樣係有關其使用之方法。在一些實施例中，該等方法包括治療有需要之個體的癌症。

## 【 英文 】

The present disclosure is directed recombinant T cell receptors capable of binding an NY-ESO-1 epitope and nucleic acid molecules encoding the same. In some embodiments, the nucleic acid molecules further comprise a second nucleotide sequence, wherein the second nucleotide sequence or the polypeptide encoded by the second nucleotide sequence inhibits the expression of an endogenous TCR. Other aspects of the disclosure are directed to vectors comprising the nucleic acid molecule and cells comprising the recombinant TCR, the nucleic acid molecule, or the vector. Still other aspects of the disclosure are directed to methods of using the same. In some embodiments, the methods comprise treating a cancer in a subject in need thereof.

【指定代表圖】第( 1 )圖。

【代表圖之符號簡單說明】無

【特徵化學式】無

# 【發明說明書】

## 【中文發明名稱】

T 細胞受體及其使用方法

## 【英文發明名稱】

T CELL RECEPTORS AND METHODS OF USE THEREOF

## 【技術領域】

【0001】本發明提供特異性結合人類 NY-ESO-1 之重組 T 細胞受體(「TCR」)及其用途。

## 【先前技術】

【0002】在與包括癌症之多種疾病之鬥爭中免疫療法作為關鍵工具而出現。T 細胞療法處於免疫治療劑發展之最前方，且抗腫瘤 T 細胞之接受性轉移已顯示在癌症患者中誘導臨床反應。雖然許多 T 細胞療法靶向突變之腫瘤抗原，但對於各患者而言絕大多數新抗原並非共同擁有的而為獨特的。

【0003】潛在非突變抗原超出突變抗原數目多個數量級。闡明衍生自共同擁有之抗原的 T 細胞抗原決定基可促進較大群癌症患者輕易可獲得之有效且安全之接受性 T 細胞療法的穩健發展。然而，非突變抗原之絕對數目及 HLA 基因之高多型性可能已妨礙了對非突變抗原之抗腫瘤 T 細胞反應的特異性之綜合分析。

【0004】本發明提供非突變抗原NY-ESO-1之新穎抗原決定基及能夠特異性結合該等抗原決定基之TCR。此等新穎抗原決定基與特定HLA等位基因相關。此等腫瘤反應性HLA限制性NY-ESO-1 TCR之使用支持加寬抗NY-ESO-1 TCR基因療法尤其在免疫腫瘤學中之適用性。

### 【發明內容】

【0005】本發明之某些態樣係有關一種核酸分子，其包含(i)第一核苷酸序列，其編碼特異性結合人類NY-ESO-1之重組T細胞受體(TCR)或其抗原結合部分(「抗NY-ESO-1 TCR」)；及(ii)第二核苷酸序列，其中第二核苷酸序列或由第二核苷酸序列編碼之多肽抑制內源TCR之表現，其中抗NY-ESO-1 TCR與參考TCR交叉競爭結合於人類NY-ESO-1，該參考TCR包含 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈，且其中 $\alpha$ 鏈包含如SEQ ID NO: 1中所列之胺基酸序列且 $\beta$ 鏈包含如SEQ ID NO: 2中所列之胺基酸序列。

【0006】本發明之某些態樣係有關一種核酸分子，其包含(i)第一核苷酸序列，其編碼特異性結合人類NY-ESO-1之重組T細胞受體(TCR)或其抗原結合部分(「抗NY-ESO-1 TCR」)；及(ii)第二核苷酸序列，其中第二核苷酸序列或由第二核苷酸序列編碼之多肽抑制內源TCR之表現，其中抗NY-ESO-1 TCR結合人類NY-ESO-1之與參考TCR相同的抗原決定基或重疊的抗原決定基，該參考TCR包含 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈，其中 $\alpha$ 鏈包含如SEQ ID NO: 1中所列之胺基酸序列

且 $\beta$ 鏈包含如SEQ ID NO: 2中所列之胺基酸序列。

【0007】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR結合於NY-ESO-1之由如SEQ ID NO: 13中所列之胺基酸序列組成的抗原決定基。在一些實施例中，HLA I類分子為HLA-C\*03等位基因。在一些實施例中，HLA I類分子選自HLA-C\*03:02等位基因、HLA-C\*03:03等位基因、HLA-C\*03:04等位基因、HLA-C\*03:05等位基因及HLA-C\*03:06等位基因。在一些實施例中，HLA I類分子為HLA-C\*03:03等位基因。

【0008】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈，其中 $\alpha$ 鏈包含含有 $\alpha$ 鏈CDR1、 $\alpha$ 鏈CDR2及 $\alpha$ 鏈CDR3之可變區；且其中 $\beta$ 鏈包含含有 $\beta$ 鏈CDR1、 $\beta$ 鏈CDR2及 $\beta$ 鏈CDR3之可變域；其中 $\alpha$ 鏈CDR3包含如SEQ ID NO: 7中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈CDR3包含如SEQ ID NO: 10中所列之胺基酸序列。

【0009】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈，其中 $\alpha$ 鏈包含含有 $\alpha$ 鏈CDR1、 $\alpha$ 鏈CDR2及 $\alpha$ 鏈CDR3之可變區；且其中 $\beta$ 鏈包含含有 $\beta$ 鏈CDR1、 $\beta$ 鏈CDR2及 $\beta$ 鏈CDR3之可變域；其中抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈CDR3包含如SEQ ID NO: 10中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈CDR3包含如SEQ ID NO: 7中所列之胺基酸序列。

【0010】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈CDR1包含如SEQ ID NO: 5中所列之胺基酸序列。在一些實

施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈CDR1包含如SEQ ID NO: 8中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈CDR2包含如SEQ ID NO: 6中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈CDR2包含如SEQ ID NO: 9中所列之胺基酸序列。

【0011】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈可變域包含SEQ ID NO: 1所列之胺基酸序列中存在的可變域之胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈可變域包含SEQ ID NO: 2所列之胺基酸序列中存在的可變域之胺基酸序列。

【0012】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈進一步包含恆定區，其中該恆定區不同於 $\alpha$ 鏈之內源恆定區。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈進一步包含恆定區，其中 $\alpha$ 鏈恆定區包含與SEQ ID NO: 1所列之胺基酸序列中存在之恆定區具有至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%或至少約99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中， $\alpha$ 鏈恆定區包含相對於SEQ ID NO: 1所列之胺基酸序列中存在之恆定區包含至少1個、至少2個、至少3個、至少4個或至少5個胺基酸取代的胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈進一步包含恆定區，其中該恆定區不同於 $\beta$ 鏈之內源恆定區。

【0013】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈進一步包含恆定區，其中 $\beta$ 鏈恆定區包含與SEQ ID NO: 2所

列之胺基酸序列中存在之恆定區具有至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%或至少約99%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中， $\beta$ 鏈恆定區包含相對於SEQ ID NO: 2所列之胺基酸序列中存在之恆定區包含至少1個、至少2個、至少3個、至少4個或至少5個胺基酸取代的胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈包含如SEQ ID NO: 1中所列之胺基酸序列。

【0014】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈包含如SEQ ID NO: 2中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，第二核苷酸序列為降低內源TCR之表現的一或多個siRNA。

【0015】在一些實施例中，一或多個siRNA與編碼內源TCR之恆定區之核苷酸序列內的目標序列互補。在一些實施例中，一或多個siRNA包含選自由SEQ ID NO: 53-56組成之群的一或多個核苷酸序列。

【0016】在一些實施例中，第二核苷酸序列編碼Cas9。

【0017】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含 $\alpha$ 鏈恆定區、 $\beta$ 鏈恆定區或兩者；且其中 $\alpha$ 鏈恆定區、 $\beta$ 鏈恆定區或兩者包含相對於內源TCR之對應胺基酸序列在目標序列內具有至少1個、至少2個、至少3個、至少4個或至少5個取代的胺基酸序列。

【0018】本發明之某些態樣係有關一種包含本文所揭

示之核酸分子的載體。在一些實施例中，載體為病毒載體、哺乳動物載體或細菌載體。在一些實施例中，載體為反轉錄病毒載體。在一些實施例中，載體選自由以下組成之群：腺病毒載體、慢病毒、仙台病毒(Sendai virus)載體、桿狀病毒載體、艾司坦巴爾病毒載體(Epstein Barr viral vector)、乳多空病毒載體、痘瘡病毒載體、單純疱疹病毒載體、雜合載體及腺相關病毒(AAV)載體。在一些實施例中，載體為慢病毒。

【0019】本發明之某些態樣係有關一種T細胞受體(TCR)或其抗原結合部分，其包含本文所揭示之抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈可變域及本文所揭示之抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈可變域。在一些實施例中，特異性結合人類NY-ESO-1之重組T細胞受體(TCR)或其抗原結合部分(「抗NY-ESO-1 TCR」)與參考TCR交叉競爭結合於人類NY-ESO-1；其中參考TCR包含 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈，且其中 $\alpha$ 鏈包含如SEQ ID NO: 1中所列之胺基酸序列且 $\beta$ 鏈包含如SEQ ID NO: 2中所列之胺基酸序列；且其中抗NY-ESO-1 TCR包含 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈，其中 $\alpha$ 鏈包含恆定區，且其中 $\beta$ 鏈包含恆定區；其中(i) $\alpha$ 鏈恆定區包含相對於SEQ ID NO: 1所列之胺基酸序列中存在之恆定區具有至少1個、至少2個、至少3個、至少4個或至少5個胺基酸取代的胺基酸序列，或(ii) $\beta$ 鏈恆定區包含相對於SEQ ID NO: 2之胺基酸序列中存在之恆定區具有至少1個、至少2個、至少3個、至少4個或至少5個胺基酸取代的胺基酸序列。

【0020】本發明之某些態樣係有關一種特異性結合人類 NY-ESO-1 之重組 T 細胞受體 (TCR) 或其抗原結合部分 (「抗 NY-ESO-1 TCR」)，其結合人類 NY-ESO-1 之與參考 TCR 相同的抗原決定基或重疊的抗原決定基；其中參考 TCR 包含  $\alpha$  鏈及  $\beta$  鏈，且其中  $\alpha$  鏈包含如 SEQ ID NO: 1 中所列之胺基酸序列且  $\beta$  鏈包含如 SEQ ID NO: 2 中所列之胺基酸序列；且其中抗 NY-ESO-1 TCR 包含  $\alpha$  鏈及  $\beta$  鏈，其中  $\alpha$  鏈包含恆定區，且其中  $\beta$  鏈包含恆定區；其中 (i)  $\alpha$  鏈恆定區包含相對於 SEQ ID NO: 1 所列之胺基酸序列中存在之恆定區具有至少 1 個、至少 2 個、至少 3 個、至少 4 個或至少 5 個胺基酸取代的胺基酸序列，或 (ii)  $\beta$  鏈恆定區包含相對於 SEQ ID NO: 2 所列之胺基酸序列中存在之恆定區具有至少 1 個、至少 2 個、至少 3 個、至少 4 個或至少 5 個胺基酸取代的胺基酸序列。在一些實施例中，抗 NY-ESO-1 TCR 結合於 NY-ESO-1 之由如 SEQ ID NO: 13 中所列之胺基酸序列組成的抗原決定基。

【0021】在一些實施例中，抗原決定基與 HLA I 類分子複合。在一些實施例中，HLA I 類分子為 HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F 或 HLA-G 等位基因。在一些實施例中，HLA I 類分子為 HLA-C\*03 等位基因。在一些實施例中，HLA I 類分子選自 HLA-C\*03:02 等位基因、HLA-C\*03:03 等位基因、HLA-C\*03:04 等位基因、HLA-C\*03:05 等位基因及 HLA-C\*03:06 等位基因。在一些實施例中，HLA I 類分子為 HLA-C\*03:03 等位基因。

【0022】 在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈包含含有 $\alpha$ 鏈CDR1、 $\alpha$ 鏈CDR2及 $\alpha$ 鏈CDR3之可變域；且其中抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈包含含有 $\beta$ 鏈CDR1、 $\beta$ 鏈CDR2及 $\beta$ 鏈CDR3之可變域；其中抗NY-ESO-1之 $\alpha$ 鏈CDR3包含如SEQ ID NO: 7中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈CDR3包含如SEQ ID NO: 10中所列之胺基酸序列。

【0023】 在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈包含含有 $\alpha$ 鏈CDR1、 $\alpha$ 鏈CDR2及 $\alpha$ 鏈CDR3之可變域；且其中抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈包含含有 $\beta$ 鏈CDR1、 $\beta$ 鏈CDR2及 $\beta$ 鏈CDR3之可變域；其中抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈CDR3包含如SEQ ID NO: 10中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈CDR3包含如SEQ ID NO: 7中所列之胺基酸序列。

【0024】 在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈CDR1包含如SEQ ID NO: 5中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈CDR1包含如SEQ ID NO: 8中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈CDR2包含如SEQ ID NO: 6中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈CDR2包含如SEQ ID NO: 9中所列之胺基酸序列。

【0025】 在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈可變域包含SEQ ID NO: 1所列之胺基酸序列中存在的可變域之胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈

可變域包含 SEQ ID NO: 2 所列之胺基酸序列中存在的可變域之胺基酸序列。

【0026】在一些實施例中， $\alpha$ 鏈恆定區包含與 SEQ ID NO: 1 所列之胺基酸序列中存在之恆定區的胺基酸序列具有至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98% 或至少約 99% 序列一致性之胺基酸序列。

【0027】在一些實施例中， $\beta$ 鏈恆定區包含與 SEQ ID NO: 2 所列之胺基酸序列中存在之恆定區的胺基酸序列具有至少約 85%、至少約 90%、至少約 95%、至少約 96%、至少約 97%、至少約 98% 或至少約 99% 序列一致性之胺基酸序列。

【0028】在一些實施例中，抗 NY-ESO-1 TCR 之  $\alpha$  鏈包含如 SEQ ID NO: 1 中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，抗 NY-ESO-1 TCR 之  $\beta$  鏈包含如 SEQ ID NO: 2 中所列之胺基酸序列。

【0029】本發明之某些態樣係有關一種包含第一抗原結合結構域及第二抗原結合結構域之雙特異性 TCR，其中第一抗原結合結構域包含本文所揭示之 TCR 或其抗原結合部分或本文所揭示之 TCR 或其抗原結合部分。在一些實施例中，第一抗原結合結構域包含單鏈可變片段(「scFv」)。在一些實施例中，第二抗原結合結構域特異性結合於 T 細胞表面所表現之蛋白質。在一些實施例中，第二抗原結合結構域特異性結合於 CD3。在一些實施例中，第二抗原結合

結構域包含 scFv。在一些實施例中，第一抗原結合結構域與第二抗原結合結構域藉由共價鍵鍵聯或關聯。在一些實施例中，第一抗原結合結構域與第二抗原結合結構域藉由肽鍵鍵聯。

【0030】本發明之某些態樣係有關一種包含本文所揭示之核酸分子、本文所揭示之載體、本文所揭示之 TCR、本文所揭示之重組 TCR 或本文所揭示之雙特異性 TCR 的細胞。在一些實施例中，該細胞進一步表現 CD3。在一些實施例中，該細胞選自由以下組成之群：T 細胞、自然殺手 (NK) 細胞、自然殺手 T (NKT) 細胞或 ILC 細胞。

【0031】本發明之某些態樣係有關一種治療有需要之個體之癌症的方法，該方法包括向個體投與本文所揭示之細胞。在一些實施例中，癌症選自由以下組成之群：黑色素瘤、骨癌、胰臟癌、皮膚癌、頭頸癌、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區癌症、胃癌、睪丸癌、子宮癌、輸卵管癌瘤、子宮內膜癌瘤、子宮頸癌瘤、陰道癌瘤、外陰癌瘤、霍奇金氏病 (Hodgkin's Disease)、非霍奇金氏淋巴瘤 (NHL)、原發性縱隔大 B 細胞淋巴瘤 (PMBC)、彌漫性大 B 細胞淋巴瘤 (DLBCL)、濾泡性淋巴瘤 (FL)、轉型濾泡性淋巴瘤、脾邊緣區淋巴瘤 (SMZL)、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、慢性或急性白血病、急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴母細胞性白血病 (ALL) (包括非 T 細胞 ALL)、慢性淋巴細胞性白血病

(CLL)、兒童期實體腫瘤、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎臟或輸尿管癌、腎盂癌瘤、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、腫瘤血管生成、脊柱軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、垂體腺瘤、卡波西氏肉瘤(Kaposi's sarcoma)、表皮樣癌、鱗狀細胞癌、T細胞淋巴瘤、環境誘發之癌症(包括由石棉誘發之彼等癌症)、其他B細胞惡性腫瘤及該等癌症之組合。

【0032】在一些實施例中，癌症為復發性或難治性的。在一些實施例中，癌症為局部晚期的。在一些實施例中，癌症為晚期的。在一些實施例中，癌症為轉移性的。

【0033】在一些實施例中，細胞係獲自個體。在一些實施例中，細胞係獲自除該個體外之供體。在一些實施例中，個體在投與細胞之前經預處理。在一些實施例中，預處理包括向個體投與化學療法、細胞介素、蛋白質、小分子或其任何組合。在一些實施例中，預處理包括投與介白素。在一些實施例中，預處理包括投與IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21或其任何組合。在一些實施例中，預處理包括投與選自由以下組成之群的預處理劑：環磷醯胺、氟達拉濱(fludarabine)、維生素C、AKT抑制劑、ATRA、雷帕黴素(Rapamycin)或其任何組合。在一些實施例中，預處理包括投與環磷醯胺、氟達拉濱或兩者。

【0034】本發明之某些態樣係有關一種對靶向抗原之細胞進行工程改造之方法，該方法包括將自需要T細胞療法之個體收集的細胞用本文所揭示之核酸或本文所揭示之

載體轉導。在一些實施例中，靶向抗原之細胞進一步表現CD3。在一些實施例中，細胞為T細胞或自然殺手(NK)細胞。

【0035】本發明之某些態樣係有關一種與肽複合之HLA I類分子，其中HLA I類分子包含 $\alpha 1$ 結構域、 $\alpha 2$ 結構域、 $\alpha 3$ 結構域及 $\beta 2m$ ，且其中該肽由如SEQ ID NO: 14中所列之胺基酸序列組成。

【0036】在一些實施例中，HLA I類分子為HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F或HLA-G。在一些實施例中，HLA I類分子為HLA-C。在一些實施例中，HLA I類分子為HLA-C\*03等位基因。在一些實施例中，HLA I類分子選自HLA-C\*03:02等位基因、HLA-C\*03:03等位基因、HLA-C\*03:04等位基因、HLA-C\*03:05等位基因及HLA-C\*03:06等位基因。在一些實施例中，HLA I類分子為HLA-C\*03:03等位基因。在一些實施例中，HLA I類分子為HLA-C\*03:04等位基因。

【0037】在一些實施例中，HLA I類分子為單體。在一些實施例中，HLA I類分子為二聚體。在一些實施例中，HLA I類分子為三聚體。在一些實施例中，HLA I類分子為四聚體。在一些實施例中，HLA I類分子為五聚體。

【0038】本發明之某些態樣係有關一種抗原呈遞細胞(APC)，其包含本文所揭示之HLA I類分子。在一些實施例中，HLA I類分子在APC之表面表現。

【0039】本發明之某些態樣係有關一種富集獲自人類

個體之T細胞之目標群體的方法，該方法包括使T細胞與本文所揭示之HLA I類分子或本文所揭示之APC接觸，其中在接觸之後，相對於接觸之前能夠結合HLA I類分子之T細胞數目，經富集之T細胞群體包含更高數目之能夠結合HLA I類分子的T細胞。

【0040】本發明之某些態樣係有關一種富集獲自人類個體之T細胞之目標群體的方法，該方法包括使T細胞在活體外與肽接觸，其中該肽由如SEQ ID NO: 13中所列之胺基酸序列組成，其中在接觸之後，相對於接觸之前能夠靶向腫瘤細胞之T細胞數目，經富集之T細胞群體包含更高數目之能夠靶向腫瘤細胞的T細胞。

【0041】在一些實施例中，獲自人類個體之T細胞為腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)。

【0042】本發明之某些態樣係有關一種治療有需要之個體之腫瘤的方法，該方法包括向個體投與本文所揭示之經富集之T細胞群體。

【0043】本發明之某些態樣係有關一種增強罹患癌症之個體中細胞毒性T細胞介導之癌細胞靶向的方法，該方法包括向個體投與具有如SEQ ID NO: 13中所列之胺基酸序列的肽。

【0044】本發明之某些態樣係有關一種癌症疫苗，其包含具有如SEQ ID NO: 13中所列之胺基酸序列的肽。

【0045】本發明之某些態樣係有關一種選擇能夠靶向腫瘤細胞之T細胞之方法，該方法包括使經分離之T細胞的

群體在活體外與肽接觸，其中該肽由如SEQ ID NO: 11中所列之胺基酸序列組成。在一些實施例中，T細胞為腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)。

### 【圖式簡單說明】

【0046】[圖1]為說明在用使用重疊肽脈衝處理之人工APC刺激之後黑色素瘤TIL中的C\*03:04/NY-ESO-1 T細胞之數目的柱狀圖。在IFN- $\gamma$  ELISPOT分析中使用TIL作為反應細胞。採用用使用用於涵蓋NY-ESO-1之全蛋白的重疊肽脈衝處理之C\*03:04-人工APC作為刺激細胞。當用使用NY-ESO-1衍生之重疊肽脈衝處理之C\*03:04-人工APC刺激時TIL顯示對具有共同擁有之序列<sub>91</sub>YLAMPFATPM<sub>100</sub>的兩個相鄰肽的陽性反應。(亦參見表5)。

【0047】[圖2A-2C]為黑色素瘤TIL之C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub>多聚體染色之圖解表示。圖2A顯示使用C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub>多聚體對TIL之染色。使用C\*03:04/MAGE-A1<sub>230-238</sub>(圖2B)及C\*03:04/未交換(圖2C)多聚體作為陰性對照。顯示CD8<sup>+</sup> T細胞中多聚體<sup>+</sup>細胞之百分比。

【0048】[圖3]為說明C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub>多聚體陽性黑色素瘤TIL之功能評估的柱狀圖。TIL以C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub>特異性方式產生IFN- $\gamma$ 。在IFN- $\gamma$  ELISPOT分析中，採用TIL作為反應細胞。將使用所指示之肽脈衝處理之C\*03:04-人工APC用作刺激細胞。採用

MAGE-A1<sub>230-238</sub>肽作為對照。一式三份進行實驗，且誤差線展示標準偏差(SD)。\*\*\* $P < 0.001$ 。

【 0049 】 [圖 4A-4I] 為用在同源多聚體情況下 C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub> TCR基因轉導之 Jurkat 76/CD8細胞之陽性染色的圖解表示。將用 C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub> TCR(圖 4B、4E及4H)轉導之 Jurkat 76/CD8細胞用 C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub>多聚體(圖 4B)染色。採用 C\*03:04/HIV gag<sub>164-172</sub>多聚體(圖 4D、4E及4F)、C\*07:02/MAGE-A1<sub>289-297</sub> TCR(純系 CL2；圖 4C、4F及4I)及未交換多聚體(圖 4G、4H及4I)以及未用 TCR轉導之 Jurkat 76/CD8(圖 4A、4D及4G)作為對照。顯示多聚體<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>細胞之百分比。

【 0050 】 [圖 5A-5D] 為用在同源多聚體情況下 C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub> TCR基因(圖 5B及5D)轉導之人類原代T細胞之陽性染色的圖解表示。將用 C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub> TCR轉導之原代T細胞用 C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub>(圖 5B)或 C\*03:04/HIV gag<sub>164-172</sub>對照多聚體(圖 5D)染色。採用未轉導之原代T細胞作為陰性對照(圖 5A及5C)。顯示多聚體<sup>+</sup>CD8<sup>+</sup>T細胞之百分比。

【 0051 】 [圖 6] 為說明用 C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub> TCR基因轉導之人類原代T細胞與由目標I類分子呈遞之同源肽強烈反應的柱狀圖。在 IFN- $\gamma$  ELISPOT 分析中，將用 C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub> TCR基因轉導之原代T細胞或未轉導之原代T細胞(x軸)用作反應細胞。產生 HLA-C\*03:04轉導之 T2細胞(T2-C\*03:04)。使用用 NY-ESO-1<sub>92-100</sub> 或 HIV

gag<sub>164-172</sub>肽(對照)脈衝處理之T2或T2-C\*03:04細胞作為刺激細胞。一式三份進行實驗，且誤差線展示SD。 $***P < 0.001$ 。

【0052】[圖7A及7B]為說明用C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub> TCR基因轉導之原代T細胞識別腫瘤細胞的圖解表示(圖7A)及其圖例(圖7B)。在IFN- $\gamma$  ELISPOT分析中，採用用C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub> TCR基因轉導之原代T細胞或未轉導之原代T細胞作為反應細胞。在用100 ng/ml IFN- $\gamma$ 處理48小時之後如圖7B(圖7A之圖例)中所指示採用未轉導或用HLA-C\*03:04或NY-ESO-1轉導之A375、SK-MEL-37、LM-MEL-53及SK-MEL-21細胞作為刺激細胞。一式三份進行實驗，且誤差線展示SD。 $*P < 0.05$ ， $**P < 0.01$ ， $***P < 0.001$ 。

【0053】[圖8A-8E]為衍生自內源或經轉導之全長基因之NY-ESO-1之表現的圖解表示。在用抗NY-ESO-1 mAb(空心曲線)及同型對照(實心曲線)染色之後，經由細胞內流式細胞術對衍生自內源或經轉導之全長基因之NY-ESO-1在目標細胞中之表現進行分析。

【0054】[圖9A-9D]為 $\Delta$ NGFR在用使用 $\Delta$ NGFR標記之全長HLA-C\*03:04基因轉導之目標細胞(圖9B及9D)中之表現的圖解表示。在用抗NGFR mAb(空心曲線)及同型對照(實心曲線)染色之後，藉由流式細胞術對 $\Delta$ NGFR在用使用 $\Delta$ NGFR標記之全長HLA-C\*03:04基因轉導之目標細胞中之表面表現進行分析。將單獨 $\Delta$ NGFR用作對照(圖9A及9C)。

**【實施方式】**

相關申請案之交叉引用

**【0055】** 此PCT申請案主張2019年3月4日申請之美國臨時申請案第62/813,639號之優先權權益，該臨時申請案以全文引用之方式併入本文中。

經由EFS-WEB以電子方式提交之序列表之引用

**【0056】** 以電子方式提交之序列表(名稱：4285\_001PC01\_SequenceListing\_ST25.txt，大小：\_\_\_\_\_位元組；且創建日期：2020年3月\_\_)以全文引用之方式併入本文中。

**【0057】** 本發明係有關特異性結合於NY-ESO-1上之抗原決定基的TCR或其抗原結合部分、編碼該TCR之核酸分子及包含該TCR或該核酸分子之細胞。本發明之一些態樣係有關治療有需要之個體之癌症的方法，所述方法包括向個體投與細胞。本發明之其他態樣係有關與包含NY-ESO-1之抗原決定基的肽複合之HLA I類分子。

**I. 術語**

**【0058】** 為使本發明可更容易理解，首先定義某些術語。如本申請案中所用，除非本文中以其他方式明確提供，否則以下術語中之每一者應具有下文所闡述之含義。本申請案中闡述了其他定義。

**【0059】** 應當注意，術語「一個(或種)(a/an)」實體

係指一或多個(種)該實體；舉例而言，「一個核苷酸序列」應理解為表示一或多個核苷酸序列。因而，術語「一個(或種)(a/an)」、「一或多個(或種)」及「至少一個(或種)」在本文中可互換使用。

**【0060】**此外，「及/或」當在本文中使用时應視為在存在或不存在另一者之情況下特定地揭示兩個指定特徵或組分中之每一者。因此，術語「及/或」當在本文中用於諸如「A及/或B」之片語中時，旨在包括「A及B」、「A或B」、「A」(單獨)以及「B」(單獨)。同樣地，術語「及/或」當用於諸如「A、B及/或C」之片語中時，旨在涵蓋以下態樣中之每一者：A、B及C；A、B或C；A或C；A或B；B或C；A及C；A及B；B及C；A(單獨)；B(單獨)；及C(單獨)。

**【0061】**術語「約」在本文中用於指大約、大致、約摸或在.....附近。當術語「約」與一數值範圍結合使用时，其藉由擴大所闡述數值以上及以下之界限來修飾該範圍。一般而言，術語「約」在本文中用於修飾向上或向下(更高或更低)偏差為10%之高於和低於所陳述值的數值。

**【0062】**應瞭解，在本文中無論何處使用措辭「包含」描述態樣，均亦提供以術語「由.....組成」及/或「基本上由.....組成」描述之以其他方式類似之態樣。

**【0063】**除非另外定義，否則本文所用之所有技術及科學術語具有一般熟習本發明相關技術者通常所理解相同之含義。舉例而言，Concise Dictionary of Biomedicine and

Molecular Biology, Juo, Pei-Show, 第 2 版, 2002, CRC Press; The Dictionary of Cell and Molecular Biology, 第 3 版, 1999, Academic Press; 及 Oxford Dictionary Of Biochemistry And Molecular Biology, 修訂版, 2000, Oxford University Press 為熟習此項技術者提供本發明中所用之許多術語之綜合詞典。

【0064】單位、字首及符號以其國際單位制(Système International de Unites, SI)所接收之形式表示。數值範圍包括界定範圍之數字。除非另外指出, 否則核苷酸序列自左至右以 5'至 3'方向書寫。胺基酸序列自左至右以胺基至羧基方向書寫。本文所提供之標題並非對本發明之各種態樣的限制, 可藉由參考說明書作為整體而具有該等標題。因此, 下文緊接著所定義之術語藉由整體地參考本說明書而被更完整地定義。

【0065】「投與」係指使用熟習此項技術者已知之各種方法及遞送系統中之任一者以物理方式向個體引入藥劑。用於本文所揭示之調配物之示例性投藥途徑包括靜脈內、肌肉內、皮下、腹膜內、經脊柱或其他非經腸投藥途徑, 例如藉由注射或輸注。如本文所用之片語「非經腸投與」意謂除經腸及局部投與外之投與模式, 通常藉由注射進行, 且包括但不限於靜脈內、肌肉內、動脈內、鞘內、淋巴管內、病損內、囊內、眶內、心內、真皮內、腹膜內、經氣管、皮下、表皮下、關節內、囊下、蛛網腹下、脊柱內、硬膜外及胸骨內注射及輸注以及活體內電穿孔。

在一些實施例中，經由非非經腸途徑(例如經口)投與調配物。其他非非經腸途徑包括經局部、經表皮或經黏膜投藥途徑，例如鼻內、經陰道、經直腸、舌下或經局部投與。亦可例如一次、複數次及/或歷時一或多個延長之時間段進行投與。

【0066】如本文所用，術語「T細胞受體」(TCR)係指能夠特異性地與目標抗原相互作用之異質細胞表面受體。如本文所用，「TCR」包括但不限於天然存在及非天然存在之TCR；全長TCR及其抗原結合部分；嵌合TCR；TCR融合構築體；及合成TCR。在人類中，TCR在T細胞之表面表現，且其負責T細胞識別及抗原呈遞細胞之靶向。抗原呈遞細胞(APC)展示外來蛋白(抗原)之片段與主要組織相容性複合物(MHC；本文中亦稱為與HLA分子，例如HLA 1類分子複合)複合。TCR識別且結合於抗原:HLA複合物且募集CD3(由T細胞表現)，從而活化TCR。活化之TCR起始下游信號傳導及免疫反應，包括EPC之破壞。

【0067】一般而言，TCR可包含藉由二硫鍵相互連接之兩條鏈， $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈(或不太常見為 $\gamma$ 鏈及 $\delta$ 鏈)。各鏈包含可變域( $\alpha$ 鏈可變域及 $\beta$ 鏈可變域)及恆定區( $\alpha$ 鏈恆定區及 $\beta$ 鏈恆定區)。可變域定位於細胞膜遠端，且可變域與抗原相互作用。恆定區定位於細胞膜近端。TCR可進一步包含跨膜區及胞質尾部。如本文所用，術語「恆定區」涵蓋跨膜區及胞質尾部(當存在時)以及傳統「恆定區」。

【0068】可變域可進一步再分成穿插有更保守之稱為

構架區(FR)之區域的具有高變異性之區域，稱為互補決定區(CDR)。各 $\alpha$ 鏈可變域及 $\beta$ 鏈可變域包含三個CDR及四個FR：FR1、CDR1、FR2、CDR2、FR3、CDR3、FR4。各可變域含有與抗原相互作用之結合結構域。雖然各鏈上之三個CDR全部參與抗原結合，但可信CDR3為主要抗原結合區。CDR1亦與抗原相互作用，而CD2可信主要識別HLA複合物。

【0069】在未明確陳述之情況下，且除非上下文另外指示，否則術語「TCR」亦包括本文所揭示之任何TCR之抗原結合片段或抗原結合部分，且包括單價及二價片段或部分，及單鏈TCR。術語「TCR」不限於結合於T細胞表面之天然存在之TCR。如本文所用，術語「TCR」進一步指本文所描述之在除T細胞外之細胞(例如如本文所描述天然表現或經修飾以表現CD3之細胞)表面表現之TCR，或本文所描述之擺脫細胞膜之TCR(例如經分離之TCR或可溶性TCR)。

【0070】「抗原結合分子」、「TCR之部分」或「TCR片段」係指TCR之小於整體之任何部分。抗原結合分子可包括抗原互補決定區(CDR)。

【0071】「抗原」係指引起免疫反應或能夠由TCR結合之任何分子，例如肽。如本文所用，「抗原決定基」係指多肽中引起免疫反應或能夠由TCR結合之部分。免疫反應可涉及抗體產生或特異性免疫機能健全之細胞的活化或兩者。熟習此項技術者將容易理解，包括實際上所有蛋白

質或肽之任何大分子均可充當抗原。抗原及/或抗原決定基可內源表現，亦即由基因組DNA表現，或可重組表現。抗原及/或抗原決定基可對某一組織(諸如癌細胞)具特異性，或其可廣泛表現。此外，較大分子之片段可充當抗原。在一個實施例中，抗原為腫瘤抗原。抗原決定基可存在於較長多肽中(例如蛋白質中)，或抗原決定基可作為較長多肽之片段而存在。在一些實施例中，抗原決定基與主要組織相容性複合物(MHC；本文中亦稱為與HLA分子，例如HLA 1類分子複合)複合。

【0072】如本文所用，「NY-ESO-1」、「紐約食管鱗狀細胞癌1」、「癌症-睪丸抗原1B」或「CTAG1B」係指在許多癌症類型中具有表現之腫瘤抗原。NY-ESO-1為癌症-睪丸抗原家族之成員，其特徵為表現主要限於睪丸生殖細胞及胎盤滋養層，且在健康成人體細胞中幾乎沒有表現。NY-ESO-1表現可在胚胎發育期間偵測，且NY-ESO-1表現維持在精原細胞及初級精母細胞中。在雌性中，在雌性卵原細胞中NY-ESO-1表現快速降低。在卵巢及子宮內膜組織中已低水準偵測到NY-ESO-1 RNA；然而，在此等組織中尚未發現NY-ESO-1蛋白。NY-ESO-1蛋白(SEQ ID NO: 52；表1)為具有180個胺基酸之18-kDa蛋白質。參見例如Thomas等人, *Front. Immunol.* 9:947(2018)。

表 1. NY-ESO-1 胺基酸序列

| SEQ ID NO: | NY-ESO-1 胺基酸序列                                                                                                                                                                                     |
|------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 52         | MQAEGRGTGGSTGDADGPGGPGIPDGPGGNAGGPGGEAGATGGRGP<br>RGAGAAARASGPGGGAPRGPHGGAASGLNGCCRCGARGPESRLLEF<br>YLAMPFATPMEAELARRSLAQDAPPLPVPGVLLKEFTVSGNILTIRLT<br>AADHRQLQLSISSCLQQLSLLMWITQCFLPVFLAQPPSGQRR |

【0073】如本文所用，術語「HLA」係指人類白細胞抗原。HLA基因編碼人類中之主要組織相容性複合物(MHC)蛋白。MHC蛋白在細胞表面表現，且參與免疫反應之活化。HLA I類基因編碼MHC I類分子，其以與自身或非自身蛋白之肽片段(抗原)之複合物形式在細胞表面表現。表現TCR及CD3之T細胞識別抗原:MHC I類複合物且起始免疫反應以靶向及破壞展示非自身蛋白之抗原呈遞細胞。

【0074】如本文所用，「HLA I類分子」或「HLA I類分子」係指編碼MHC I類分子之野生型或變異體HLA I類基因之蛋白質產物。因此，「HLA I類分子」及「MHC I類分子」在本文中可互換使用。

【0075】MHC I類分子包含兩條蛋白質鏈： $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 2-微球蛋白( $\beta$ 2m)鏈。人類 $\beta$ 2m由B2M基因編碼。 $\beta$ 2m之胺基酸序列闡述於SEQ ID NO: 16中(表2)。MHC I類分子之 $\alpha$ 鏈由HLA基因複合體編碼。HLA複合物定位於人類染色體6之短臂上的6p21.3區域內且含有具有多種功能之超過220個基因。HLA基因為高度變異的，具有超過20,000個HLA等位基因及相關等位基因，包括超過15,000個此項技術中已知的HLA I類等位基因，其編碼數千種HLA蛋白質，包括超過10,000種HLA I類蛋白質(參見例如hla.alleles.org，

最後訪問日期2019年2月27日)。HLA複合物中存在至少三種編碼MHC I類 $\alpha$ 鏈蛋白質的基因：HLA-A、HLA-B及HLA-C。此外，HLA-E、HLA-F及HLA-G編碼與MHC I類分子締合之蛋白質。

表 2. 人類  $\beta 2m$  之胺基酸序列

| SEQ ID NO: | 序列                                                                                                                              |
|------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 16         | MSRSVALAVLALLSLSGLEAIQRTPKIQVYSRHPAENGKSNFLNCYV<br>SGFHPSDIEVDLLKNGERIEKVEHSDLSFSKDWSFYLLYYTEFTPTEK<br>DEYACRVNHVTLSQPKIVKWDRDM |

【0076】術語「自體」係指任何材料衍生自與隨後再引入所述任何材料之個體相同的個體。舉例而言，自體T細胞療法包括向個體投與自相同個體分離之T細胞。術語「同種異體」係指任何材料衍生自一個個體且接著引入相同物種之另一個體。舉例而言，同種異體T細胞移植包括向個體投與自除該個體外之供體獲得的T細胞。

【0077】「癌症」係指大量以體內異常細胞生長不受控制為特徵之各種疾病。無序細胞分裂及生長導致形成惡性腫瘤，該等惡性腫瘤侵入相鄰組織且亦可通過淋巴系統或血流轉移至身體遠端部分。「癌症」或「癌症組織」可包括腫瘤。可藉由本發明之方法治療之癌症的實例包括但不限於免疫系統之癌症，包括淋巴瘤、白血病及其他白細胞惡性腫瘤。在一些實施例中，本發明之方法可用於減小腫瘤之腫瘤尺寸，該腫瘤衍生自例如骨癌、腎癌、前列腺癌、乳腺癌、結腸癌、肺癌、皮膚或眼內惡性黑色素瘤、胰臟癌、皮膚癌、頭頸癌、皮膚或眼內惡性黑色素瘤、子

宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區癌症、胃癌、睪丸癌、子宮癌、輸卵管癌瘤、子宮內膜癌瘤、子宮頸癌瘤、陰道癌瘤、外陰癌瘤、霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、原發性縱隔大B細胞淋巴瘤(PMBC)、彌漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡性淋巴瘤(FL)、轉型濾泡性淋巴瘤、脾邊緣區淋巴瘤(SMZL)、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、慢性或急性白血病、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病、急性淋巴母細胞性白血病(ALL)(包括非T細胞ALL)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、兒童期實體腫瘤、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎臟或輸尿管癌、腎盂癌瘤、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、腫瘤血管生成、脊柱軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、垂體腺瘤、卡波西氏肉瘤、表皮樣癌、鱗狀細胞癌、T細胞淋巴瘤、環境誘發之癌症(包括由石棉誘發之彼等癌症)、其他B細胞惡性腫瘤及該等癌症之組合。特定癌症可對化學療法或放射療法有反應或癌症可為難治性的。難治性癌症係指不適合手術干預之癌症，且該癌症最初對化學療法或放射療法無反應或該癌症隨時間推移變得無反應。

【0078】如本文所用，「抗腫瘤效應」係指可以以下形式存在之生物效應：腫瘤體積減小、腫瘤細胞數目減少、腫瘤細胞增殖減少、轉移數目減少、總存活或無進展存活增加、預期壽命增加或與腫瘤相關之各種生理症狀改

善。抗腫瘤效應亦可指預防腫瘤發生，例如疫苗。

【0079】術語「無進展存活」可為縮寫為PFS，其如本文所用係指自治療日至根據經修訂之惡性淋巴瘤IWG反應準則(IWG Response Criteria for Malignant Lymphoma)之疾病進展或因任何原因而死亡之日期的時間。

【0080】「疾病進展」或「進行性疾病」可縮寫為PD，其如本文所用係指與特定疾病相關之一或多種症狀之惡化。舉例而言，罹患癌症之個體的疾病進展可包括一或多處惡性病變之數目或尺寸增加、腫瘤轉移及死亡。

【0081】「反應持續時間」可縮寫為DOR，其如本文所用係指個體首次客觀反應至根據經修訂之惡性淋巴瘤IWG反應準則確認疾病進展或死亡之日期之間的時間段。

【0082】術語「總存活」可縮寫為OS，其定義為自治療日至死亡日之時間。

【0083】如本文所用，「細胞介素」係指一種細胞響應於與特異性抗原接觸而釋放之非抗體蛋白質，其中細胞介素與第二細胞相互作用以介導第二細胞中之反應。細胞介素可由細胞內源表現或向個體投與。細胞介素可由包括巨噬細胞、B細胞、T細胞及肥大細胞之免疫細胞釋放以擴散免疫反應。細胞介素可在受體細胞中誘導各種反應。細胞介素可包括穩態性細胞介素、趨化因子、促炎性細胞介素、效應子及急性期蛋白。舉例而言，包括介白素(IL)7及IL-15之穩態性細胞介素促進免疫細胞存活及增殖，且促炎性細胞介素可促成發炎反應。穩態性細胞介素之實例

包括但不限於 IL-2、IL-4、IL-5、IL-7、IL-10、IL-12p40、IL-12p70、IL-15 及干擾素 (IFN) $\gamma$ 。促炎性細胞介素之實例包括但不限於 IL-1A、IL-1B、IL-6、IL-13、IL-17A、腫瘤壞死因子 (TNF)- $\alpha$ 、TNF- $\beta$ 、纖維母細胞生長因子 (FGF)2、粒細胞巨噬細胞集落刺激因子 (GM-CSF)、可溶性細胞間黏附分子 1 (sICAM-1)、可溶性血管黏附分子 1 (sVCAM-1)、血管內皮生長因子 (VEGF)、VEGF-C、VEGF-D 及胎盤生長因子 (PLGF)。效應子之實例包括但不限於顆粒酶 A、顆粒酶 B、可溶性 Fas 配位體 (sFasL) 及穿孔素。急性期蛋白之實例包括但不限於 C-反應蛋白 (CRP) 及血清澱粉樣蛋白 A (SAA)。

【0084】「趨化因子」為一類介導細胞趨化性或定向運動之細胞介素。趨化因子之實例包括但不限於 IL-8、IL-16、伊紅趨素 (eotaxin)、伊紅趨素-3、巨噬細胞衍生之趨化因子 (MDC 或 CCL22)、單核細胞趨化蛋白 1 (MCP-1 或 CCL2)、MCP-4、巨噬細胞炎性蛋白 1 $\alpha$  (MIP-1 $\alpha$ 、MIP-1a)、MIP-1 $\beta$  (MIP-1b)、 $\gamma$ -誘導蛋白 10 (IP-10) 以及胸腺及活化調控趨化因子 (TARC 或 CCL17)。

【0085】本發明之分析物及細胞介素之其他實例包括但不限於趨化因子 (C-C 基元) 配位體 (CCL)1、CCL5、單核細胞特異性趨化因子 3 (MCP3 或 CCL7)、單核細胞趨化蛋白 2 (MCP-2 或 CCL8)、CCL13、IL-1、IL-3、IL-9、IL-11、IL-12、IL-14、IL-17、IL-20、IL-21、粒細胞集落刺激因子 (G-CSF)、白血病抑制因子 (LIF)、制瘤素 M (OSM)、

CD154、淋巴細胞毒素(LT) $\beta$ 、4-1BB配位體(4-1BBL)、增殖誘導配位體(APRIL)、CD70、CD153、CD178、糖皮質素誘導之TNFR相關配位體(GITRL)、腫瘤壞死因子超家族成員14(TNFSF14)、OX40L、TNF相關及ApoL相關之白細胞表現之配位體1(TALL-1)或TNF相關凋亡誘導配位體(TRAIL)。

【0086】藥物或治療劑之「治療有效量」、「有效劑量」、「有效量」或「治療有效劑量」為藥物在單獨或與另一治療劑組合使用時防止個體疾病發作或促成由疾病症狀嚴重程度降低、疾病無症狀期頻率及持續時間增加或防止因疾病折磨而引起損傷或殘疾證實之疾病消退的任何量。治療劑促進疾病消退之能力可使用熟練從業者已知之多種方法來評估，諸如在臨床試驗期間在人類個體中、在預示在人類中之功效的動物模型系統中或藉由分析藥劑在活體外分析中之活性。

【0087】如本文所用之術語「淋巴細胞」包括自然殺手(NK)細胞、T細胞或B細胞。NK細胞為一類代表固有免疫系統之主要組分的細胞毒性(cytotoxic/cell toxic)淋巴細胞。NK細胞排斥腫瘤及由病毒感染之細胞。其通過凋亡或程式化細胞死亡之過程工作。其被稱為「自然殺手」，因為其不需要進行活化來殺死細胞。T細胞在細胞介導之免疫性(不涉及抗體)中發揮主要作用。T細胞受體(TCR)區分T細胞與其他淋巴細胞類型。免疫系統之特化器官胸腺主要負責T細胞之成熟。存在六種類型之T細胞，亦即：輔

助 T 細胞 (例如 CD4<sup>+</sup>細胞)、細胞毒性 T 細胞 (亦稱為 TC、細胞毒性 T 淋巴細胞、CTL、T-殺手細胞、細胞溶解性 T 細胞、CD8<sup>+</sup> T 細胞或殺手 T 細胞)、記憶 T 細胞 ((i) 幹細胞樣記憶 T<sub>SCM</sub> 細胞 (如原初細胞) 為 CD45RO<sup>-</sup>、CCR7<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup>、CD62L<sup>+</sup> (L-選擇素)、CD27<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup> 及 IL-7R $\alpha$ <sup>+</sup>，但其亦表現大量 CD95、IL-2R $\beta$ 、CXCR3 及 LFA-1，且顯示記憶細胞之許多特有功能特徵)；(ii) 中心記憶 T<sub>CM</sub> 細胞表現 L-選擇素及 CCR7，其分泌 IL-2，但不分泌 IFN $\gamma$  或 IL-4，且 (iii) 然而，效應記憶 T<sub>EM</sub> 細胞不表現 L-選擇素或 CCR7，但產生效應子細胞介素，如 IFN $\gamma$  及 IL-4)、調控 T 細胞 (Treg、抑制 T 細胞或 CD4<sup>+</sup>CD25<sup>+</sup> 調控 T 細胞)、自然殺手 T 細胞 (NKT) 及  $\gamma\delta$ T 細胞。另一方面，B 細胞在體液免疫性 (涉及抗體) 中發揮主要作用。B 細胞產生抗體及抗原且發揮抗原呈遞細胞 (APC) 之作用且在藉由抗原相互作用活化之後變成記憶 B 細胞。在哺乳動物中，在衍生出 B 細胞名稱之骨髓中形成不成熟 B 細胞。

**【0088】** 術語「基因工程改造」或「工程改造」係指對細胞之基因組進行修飾之方法，包括但不限於缺失編碼或非編碼區或其一部分或插入編碼區或其一部分。在一些實施例中，所修飾之細胞為淋巴細胞，例如 T 細胞或表現 CD3 之經修飾細胞，其可獲自患者或供體。細胞可經修飾以表現併入細胞基因組中之外源性構築體，諸如本文所揭示之 T 細胞受體 (TCR)。在一些實施例中，細胞經修飾以表現 CD3。

【0089】「免疫反應」係指免疫系統之細胞(例如T淋巴細胞、B淋巴細胞、自然殺手(NK)細胞、巨噬細胞、嗜伊紅白血球、肥大細胞、樹突細胞及嗜中性白血球)及由此等細胞中之任一者或肝臟產生的可溶性大分子(包括Ab、細胞介素及補體)的動作，該動作引起脊椎動物體內之侵入病原體、病原體感染之細胞或組織、癌細胞或其他異常細胞或者自體免疫或病理炎症情況下之正常人類細胞或組織的選擇性靶向、結合、損壞、破壞及/或消除。

【0090】術語「免疫療法」係指藉由包括誘導、增強、抑制或以其他方式改變免疫反應之方法治療罹患疾病或處於感染疾病或遭受疾病復發之風險中的個體。免疫療法之實例包括但不限於T細胞療法。T細胞療法可包括接受性T細胞療法、腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)免疫療法、自體細胞療法、工程改造自體細胞治療(eACT)及同種異體T細胞移植。

【0091】用於本文所描述之免疫療法中之細胞可來自此項技術中已知之任何來源。舉例而言，T細胞可在活體外與造血幹細胞群體區分開，或T細胞可獲自個體。T細胞可獲自例如外周血單核細胞、骨髓、淋巴結組織、臍帶血、胸腺組織、來自感染位點之組織、腹水、胸膜滲出液、脾臟組織及腫瘤。此外，T細胞可衍生自此項技術中可獲得之一或多個T細胞株。T細胞亦可獲自使用熟練技工已知之諸如FICOLL™分離及/或單采術(apheresis)之任何數目之技術自個體收集的一單位血液。分離用於T細胞療

法之T細胞之其他方法揭示於美國專利公開案第2013/0287748號中，該專利公開案以全文引用之方式併入本文中。免疫療法亦可包括向個體投與經修飾之細胞，其中經修飾之細胞表現CD3及本文所揭示之TCR。在一些實施例中，經修飾之細胞不為T細胞。

【0092】如本文所用之「患者」包括罹患癌症(例如淋巴瘤或白血病)之任何人類。術語「個體」及「患者」在本文中可互換使用。

【0093】術語「肽」、「多肽」及「蛋白質」可互換使用，且指包含藉由肽鍵共價鍵聯之胺基酸殘基的化合物。蛋白質或肽一定含有至少兩個胺基酸，且對可包含蛋白質或肽之序列的最大胺基酸數目沒有限制。多肽包括包含藉由肽鍵彼此連接之兩個或更多個胺基酸的任何肽或蛋白質。如本文所用，該術語係指短鏈，其在此項技術中通常亦稱為例如肽、寡肽及寡聚物；與較長鏈，其在此項技術中通常稱為蛋白質，蛋白質存在許多類型。「多肽」包括例如生物活性片段、實質上同源之多肽、寡肽、均二聚體、異二聚體、多肽變異體、經修飾之多肽、衍生物、類似物、融合蛋白等。多肽包括天然肽、重組肽、合成肽或其組合。

【0094】如本文所用，「刺激」係指由刺激分子與其同源配位體結合誘導之主要反應，其中該結合介導信號轉導事件。「刺激分子」為T細胞上與存在於抗原呈遞細胞上之同源刺激配位體特異性結合之分子，例如T細胞受體

(TCR)/CD3複合物。「刺激配位體」為當存在於抗原呈遞細胞(例如aAPC、樹突細胞、B細胞及類似細胞)上時可與T細胞上之刺激分子特異性結合，由此介導由T細胞引起之主要反應，包括但不限於活化、起始免疫反應、增殖及類似反應的配位體。刺激配位體包括但不限於加載有肽之MHC I類分子、抗CD3抗體、超促效劑抗CD28抗體及超促效劑抗CD2抗體。

【0095】術語「處理」及「預處理」在本文中可互換使用且指示準備需要T細胞療法之患者用於適合之情況。如本文所用之處理包括但不限於在T細胞療法之前降低內源淋巴細胞數目、移除細胞介素池(cytokine sink)、增加一或多個穩態性細胞介素或促炎性因子之血清含量、增強處理後投與之T細胞之效應功能、增強抗原呈遞細胞活化及/或可獲得性或其任何組合。在一個實施例中，「處理」包括增加一或多種細胞介素，例如介白素7(IL-7)、介白素15(IL-15)、介白素10(IL-10)、介白素5(IL-5)、 $\gamma$ -誘導蛋白10(IP-10)、介白素8(IL-8)、單核細胞趨化蛋白1(MCP-1)、胎盤生長因子(PLGF)、C-反應蛋白(CRP)、可溶性細胞間黏附分子1(sICAM-1)、可溶性血管黏附分子1(sVCAM-1)或其任何組合之血清含量。在另一實施例中，「處理」包括增加IL-7、IL-15、IP-10、MCP-1、PLGF、CRP或其任何組合之血清含量。

【0096】個體之「治療(treatment/treating)」係指對個體進行之任何類型之干預或處理或向個體投與活性劑，

目的為逆轉、緩解、改善、抑制、減慢或預防與疾病相關之症狀、併發症或病狀或生物化學標誌的發作、進展、發展、嚴重程度或復發。在一個實施例中，「治療(treatment/treating)」包括部份緩解。在另一實施例中，「治療(treatment/treating)」包括完全緩解。

【0097】替代(例如「或」)之使用應理解為意謂替代物中之一者、兩者或其任何組合。如本文所用，不定冠詞「一個(或種)」應理解為指任何所敘述或列舉之組分中之「一或多個(或種)」。

【0098】術語「約」或「基本上包含」係指特定值或組合物之如由一般熟習此項技術者所確定在可接受誤差範圍內之值或組合物，其將部分取決於如何量測或測定該值或組合物，亦即，量測系統之限制。舉例而言，「約」或「基本上包含」可意謂根據此項技術中之慣例在1個或超過1個標準偏差以內。或者，「約」或「基本上包含」可意謂至多10%之範圍(亦即， $\pm 10\%$ )。舉例而言，約3mg可包括2.7 mg與3.3 mg(對於10%)之間的任何數目。此外，特定而言就生物系統或方法而言，該等術語可意謂至多一個數量級或值之至多5倍。當本申請案及申請專利範圍中提供特定值或組合物時，除非另外說明，否則「約」或「基本上包含」之含義應被假定為在該特定值或組合物之可接受誤差範圍內。

【0099】除非另外指出，否則如本文所描述，任何濃度範圍、百分比範圍、比率範圍或整數範圍應理解為包括

在所敘述範圍內之任何整數值及(適當時)其分數(諸如整數之十分之一及百分之一)。

【0100】以下小節中更詳細描述本發明之各種態樣。

## II. 本發明之組合物

【0101】本發明係有關特異性結合於NY-ESO-1上之抗原決定基的T細胞受體(TCR)或其抗原結合部分、編碼該TCR之核酸分子及包含該TCR或該核酸分子之細胞。本發明之一些態樣係有關治療有需要之個體之癌症的方法，該等方法包括向個體投與包含本文所描述之TCR的細胞。本發明之其他態樣係有關一種結合於TCR的NY-ESO-1之抗原決定基，及與包含NY-ESO-1之抗原決定基之肽複合的HLA I類分子。

【0102】T細胞受體或TCR為存在於T細胞或T淋巴細胞表面之分子，其負責識別作為結合於主要組織相容性複合物(MHC)分子之肽的抗原之片段。TCR與抗原肽之間的結合具有相對低的親和力且為簡併的：換言之，許多TCR識別相同抗原肽且許多抗原肽由相同TCR識別。

【0103】TCR由兩條不同的蛋白質鏈組成(換言之，其為異二聚體)。在人類中，在95%之T細胞中，TCR由 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈(分別由TRA及TRB編碼)組成，但在5%之T細胞中，TCR由 $\gamma$ 及 $\delta$ 鏈(分別由TRG及TRD編碼)組成。此比率在個體發育期間及患病狀態(諸如白血病)中發生變化。其在物種間亦不同。在各種物種中已定位4個基因座之直系同源

物。各基因座可產生具有恆定區及可變區之多種多肽。

【0104】當TCR與抗原肽及MHC(肽/MHC)接合時，T淋巴細胞通過信號轉導活化，信號轉導為由相關酶、共受體、特化銜接分子及活化或釋放之轉錄因子介導之一系列生物化學事件。

## II.A. 核酸分子

【0105】本發明之某些態樣係有關核酸分子，其包含(i)第一核苷酸序列，其編碼特異性結合人類NY-ESO-1之重組TCR或其抗原結合部分(「抗NY-ESO-1 TCR」)；及(ii)第二核苷酸序列，其中第二核苷酸序列或由第二核苷酸序列編碼之多肽抑制內源TCR之表現。在一些實施例中，第二核苷酸序列為非天然存在之序列。在其他實施例中，第二核苷酸序列為合成的。在其他實施例中，第二核苷酸序列包含靶向編碼內源TCR之核苷酸序列的序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR與參考TCR交叉競爭結合於人類NY-ESO-1。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR結合人類NY-ESO-1之與參考TCR相同之抗原決定基或重疊之抗原決定基。

【0106】在一些實施例中，參考TCR包含 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈；其中 $\alpha$ 鏈包含互補決定區1(CDR1)、CDR2及CDR3；其中 $\beta$ 鏈包含CDR1、CDR2及CDR3；且其中參考TCR包含SEQ ID NO: 7中所列之 $\alpha$ 鏈CDR3及SEQ ID NO: 10中所列之 $\beta$ 鏈CDR3。在一些實施例中， $\alpha$ 鏈CDR1、CDR2及CDR3序列

存在於SEQ ID NO: 1所列之胺基酸序列中，且參考TCR包含SEQ ID NO: 2所列之胺基酸序列中存在之β鏈CDR1、CDR2及CDR3序列。在一些實施例中，參考TCR包含α鏈及β鏈，其中α鏈包含如SEQ ID NO: 1中所列之胺基酸序列且β鏈包含如SEQ ID NO: 2中所列之胺基酸序列。

表 3. α 鏈及 β 鏈 TCR 序列

| SEQ ID NO: | TCR 鏈    | 序列                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                            |
|------------|----------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1          | α 鏈(胺基酸) | MLLELIPLLLGIHFVLRRTARAQSVTQPDIHITVSEGASLELRCNYSYGA<br>TPYLFWYVQSPGQGLQLLLKYFSGDTLVQGIKGFEAEFKRSQSSFN<br>LRKPSVHWSDAAEYFCAGMDSNYQLIWGAGTKLIHKPDIQNPDP<br>AVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRS<br>MDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVE<br>KSFETDTNLFQNLVIGFRILLK VAGFNLLMTLRLWSSZ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
| 17         | α 鏈(核苷酸) | ATGCTCCTGGAGCTTATCCCACTGCTGGGGATACATTTTGTCTCTGA<br>GAACTGCCAGAGCCCAGTCAGTGACCCAGCCTGACATCCACATC<br>ACTGTCTCTGAAGGAGCCTCACTGGAGTTGAGATGTAACATATCC<br>TATGGGGCAACACCTTATCTCTTCTGGTATGTCCAGTCCCCCGGCC<br>AAGGCCTCCAGCTGCTCCTGAAGTACTTTTCAGGAGACACTCTG<br>GTTCAAGGCATTAAAGGCTTTGAGGCTGAATTTAAGAGGAGTCA<br>ATCTTCCTTCAATCTGAGGAAACCCTCTGTGCATTGGAGTGATGC<br>TGCTGAGTACTTCTGTGCCGGCATGGATAGCAACTATCAGTTAATC<br>TGGGGCGCTGGGACCAAGCTAATTATAAAGCCAGATATCCAGAAC<br>CCTGACCCTGCCGTGTACCAGCTGAGAGACTCTAAATCCAGTGA<br>CAAGTCTGTCTGCCATTACACCGATTTTGATTCTCAAACAAATGTG<br>TCACAAAGTAAGGATTCTGATGTGTATATCACAGACAAAACCTGTG<br>CTAGACATGAGGTCTATGGACTTCAAGAGCAACAGTGCTGTGGC<br>CTGGAGCAACAAATCTGACTTTGCATGTGCAAACGCCTTCAACA<br>ACAGCATTATTCCAGAAGACACCTTCTTCCCCAGCCCAGAAAGTT<br>CCTGTGATGTCAAGCTGGTTCGAGAAAAGCTTTGAAACAGATACG<br>AACCTAACTTTCAAAACCTGTCAAGTATTGGGTTCCGAATCCTC<br>CTCCTGAAAGTGGCCGGGTTTAATCTGCTCATGACGCTGCGGCTG<br>TGGTCCAGCTGA |
| 2          | β 鏈(胺基酸) | MSIGLLCCVAFSLLWASPVNAGVTQTPKFQVLKTGQSMTLQCAQD<br>MNHNSMYWYRQDPGMGLRLIYYSASEGTTDKGEVPNGYNVSR<br>LNKREFSLRLESAAPSQTSVYFCASSLPLGYEQYFGPGTRLTVTE<br>DLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSW<br>VNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPR<br>NHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTVQIVSAEAWGRADCGFT<br>SESYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVLSALVLMAMVKRKDSRGZ                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                              |

|    |          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 18 | β 鏈(核苷酸) | ATGAGCATCGGGCTCCTGTGCTGTGTGGCCTTTTCTCTCCTGTGG<br>GCAAGTCCAGTGAATGCTGGTGTCACTCAGACCCCAAATTCCA<br>GGTCCTGAAGACAGGACAGAGCATGACACTGCAGTGTGCCAG<br>GATATGAACCATAACTCCATGTACTGGTATCGACAAGACCCAGGC<br>ATGGGACTGAGGCTGATTTATTACTCAGCTTCTGAGGGTACCACT<br>GACAAAGGAGAAGTCCCCAATGGCTACAATGTCTCCAGATTAAA<br>CAAACGGGAGTTCTCGCTCAGGCTGGAGTCGGCTGCTCCCTCCC<br>AGACATCTGTGTACTTCTGTGCCAGCAGTCTCCCTCTAGGCTACG<br>AGCAGTACTTCGGGCCGGGCACCAGGCTCACGGTCACAGAGGA<br>CCTGAAAAACGTGTTCCCACCCGAGGTCGCTGTGTTTGAGCCAT<br>CAGAAGCAGAGATCTCCCACACCCAAAAGGCCACACTGGTGTGC<br>CTGGCCACAGGCTTCTACCCCGACCACGTGGAGCTGAGCTGGTG<br>GGTGAATGGGAAGGAGGTGCACAGTGGGGTCAGCACAGACCCG<br>CAGCCCCTCAAGGAGCAGCCCGCCCTCAATGACTCCAGATACTG<br>CCTGAGCAGCCGCCTGAGGGTCTCGGCCACCTTCTGGCAGAACC<br>CCCGCAACCACTTCCGCTGTCAAGTCCAGTTCTACGGGCTCTCGG<br>AGAATGACGAGTGGACCCAGGATAGGGCCAAACCTGTCACCCAG<br>ATCGTCAGCGCCGAGGCCTGGGGTAGAGCAGACTGTGGCTTCAC<br>CTCCGAGTCTTACCAGCAAGGGGTCTGTCTGCCACCATCCTCTA<br>TGAGATCTTGCTAGGGAAGGCCACCTTGTATGCCGTGCTGGTCAG<br>TGCCCTCGTGCTGATGGCCATGGTCAAGAGAAAGGATTCCAGAG<br>GCTAG |
|----|----------|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|

II.A.1. 由第一核苷酸序列編碼之 TCR

【0107】本發明係有關一種由本文所描述之第一核苷酸序列編碼的 TCR。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗 NY-ESO-1 TCR 包含 α 鏈及 β 鏈，其中 α 鏈包含含有 α 鏈 CDR1、α 鏈 CDR2 及 α 鏈 CDR3 之可變域；且其中 β 鏈包含含有 β 鏈 CDR1、β 鏈 CDR2 及 β 鏈 CDR3 之可變域。在一些實施例中，抗 NY-ESO-1 TCR 包含含有如 SEQ ID NO: 7(CAGMDSNYQLIW)中所列之胺基酸序列的 α 鏈 CDR3。在一些實施例中，抗 NY-ESO-1 TCR 包含含有如 SEQ ID NO: 10(CASSLPLGYEQYF)中所列之胺基酸序列的 β 鏈 CDR3。在一些實施例中，α 鏈及 / 或 β 鏈中之非 CDR 區進一步經修飾，例如一個胺基酸、兩個胺基酸、三個胺基酸、四個胺基酸、五個胺基酸或六個胺基酸之取代或突變，由此 α 鏈

及/或 $\beta$ 鏈不為天然存在的。在一些實施例中，取代或突變可以各種方式改良本文所描述之TCR，例如結合親和力、結合特異性、穩定性、黏度或其任何組合。

【0108】在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含 $\alpha$ 鏈CDR1，其中抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈CDR1包含如SEQ ID NO: 5(YGATPY)中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含 $\beta$ 鏈CDR1，其中抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈CDR1包含如SEQ ID NO: 8(MNHNS)中所列之胺基酸序列。

【0109】在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含 $\alpha$ 鏈CDR2，其中抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈CDR2包含如SEQ ID NO: 6(YFSGDTLV)中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含 $\beta$ 鏈CDR2，其中抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈CDR2包含如SEQ ID NO: 9(SASEGT)中所列之胺基酸序列。

【0110】在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 1中所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列之可變域具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的 $\alpha$ 鏈可變域。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 1中所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列之可變域

具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%或至少約99%序列一致性的 $\alpha$ 鏈可變域，其中抗NY-ESO-1 TCR包含含有如SEQ ID NO: 7中所列之胺基酸序列的 $\alpha$ 鏈CDR3。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含SEQ ID NO: 1所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列中存在的 $\alpha$ 鏈可變域。

【0111】在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 2中所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列之可變域具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的 $\beta$ 鏈可變域。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 2中所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列之可變域具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%或至少約99%序列一致性的 $\beta$ 鏈可變域，其中抗NY-ESO-1 TCR包含含有如SEQ ID NO: 10中所列之胺基酸序列的 $\beta$ 鏈CDR3。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含SEQ ID NO: 2所列之胺基酸序列中存在的 $\beta$ 鏈可變域。

【0112】在一些實施例中，由第一核苷酸編碼之抗NY-ESO-1 TCR進一步包含 $\alpha$ 鏈恆定區、 $\beta$ 鏈恆定區或 $\alpha$ 鏈恆定區與 $\beta$ 鏈恆定區兩者。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 1中所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列之恆定區具有至少約80%、至少約85%、至

少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的 $\alpha$ 鏈恆定區。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 1中所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列之恆定區具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%或至少約99%序列一致性的 $\alpha$ 鏈恆定區，其中抗NY-ESO-1 TCR包含含有如SEQ ID NO: 7中所列之胺基酸序列的 $\alpha$ 鏈CDR3。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含SEQ ID NO: 1所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列中存在的 $\alpha$ 鏈恆定區。在一些實施例中，由第一核苷酸編碼之抗NY-ESO-1 TCR進一步包含不同於 $\alpha$ 鏈之內源(例如天然存在之)恆定區的 $\alpha$ 恆定區。在一些實施例中， $\alpha$ 鏈恆定區包含相對於SEQ ID NO: 1中所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列之恆定區之胺基酸序列包含至少1個、至少2個、至少3個、至少4個或至少5個胺基酸取代的胺基酸序列。

【0113】在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 2中所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列之恆定區具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的 $\beta$ 鏈恆定區。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 2中所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列之恆定區具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、

至少約96%、至少約97%、至少約98%或至少約99%序列一致性的 $\beta$ 鏈恆定區，其中該抗NY-ESO-1 TCR包含含有如SEQ ID NO: 10中所列之胺基酸序列的 $\beta$ 鏈CDR3。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含SEQ ID NO: 2所列之胺基酸序列中存在的 $\beta$ 鏈恆定區。在一些實施例中，由第一核苷酸編碼之抗NY-ESO-1 TCR進一步包含不同於 $\beta$ 鏈之內源(例如天然存在之)恆定區的 $\beta$ 恆定區。在一些實施例中， $\beta$ 鏈恆定區包含相對於SEQ ID NO: 2中所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列之恆定區的胺基酸序列包含至少1個、至少2個、至少3個、至少4個或至少5個胺基酸取代的胺基酸序列。

【0114】在某些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 1中所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的 $\alpha$ 鏈。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 1中所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的 $\alpha$ 鏈，其中抗NY-ESO-1 TCR包含含有如SEQ ID NO: 7中所列之胺基酸序列的 $\alpha$ 鏈CDR3。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含含有SEQ ID NO: 1中所列之胺基酸序列的 $\alpha$ 鏈。

【0115】在某些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 2中所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的 $\beta$ 鏈。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 2中所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的 $\beta$ 鏈，其中抗NY-ESO-1 TCR包含含有如SEQ ID NO: 10中所列之胺基酸序列的 $\beta$ 鏈CDR3。在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含含有SEQ ID NO: 2中所列之胺基酸序列的 $\beta$ 鏈。

【0116】在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR包含 $\alpha$ 鏈恆定區、 $\beta$ 鏈恆定區或兩者；且其中 $\alpha$ 鏈恆定區、 $\beta$ 鏈恆定區或兩者包含相對於內源TCR之對應胺基酸序列在目標序列內具有至少1個、至少2個、至少3個、至少4個或至少5個取代的胺基酸序列。

## II.A.2. 抗原決定基

【0117】在一些實施例中，由第一核苷酸序列編碼之抗NY-ESO-1 TCR結合與參考TCR相同之抗原決定基。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR結合於NY-ESO-1之包含SEQ ID NO: 13(LAMPFATPM)中所列之胺基酸序列的抗原

決定基。在一些實施例中，抗 NY-ESO-1 TCR 結合於 NY-ESO-1 之由如 SEQ ID NO: 13 中所列之胺基酸序列組成的抗原決定基。在一些實施例中，抗原決定基由 NY-ESO-1 之胺基酸殘基 92-100 (SEQ ID NO: 52) 組成，例如「NY-ESO-1<sub>92-100</sub>」。

【0118】在某些實施例中，抗原決定基與 HLA I 類分子複合。人類白細胞抗原 (HLA) 系統 (人類中之主要組織相容性複合物 [MHC]) 為免疫系統之重要部分且受定位於染色體 6 上之基因控制。其編碼經特化以將抗原肽呈遞至 T 細胞上之 T 細胞受體 (TCR) 之細胞表面分子。(亦參見 Overview of the Immune System。)呈遞抗原 (Ag) 之 MHC 分子分為 2 個主要類別：I 類 MHC 分子及 II 類 MHC 分子。

【0119】I 類 MHC 分子以跨膜醣蛋白形式存在於所有有核細胞之表面。完整 I 類分子由結合於  $\beta$ -2 微球蛋白分子之  $\alpha$  重鏈組成。重鏈由 2 個肽結合結構域、Ig 樣結構域及具有胞質尾部之跨膜區組成。I 類分子之重鏈由 HLA-A、HLA-B 及 HLA-C 基因座處之基因編碼。表現 CD8 分子之 T 細胞與 I 類 MHC 分子反應。此等淋巴細胞常常具有細胞毒性功能，此需要其能夠識別任何感染之細胞。因為每個有核細胞均表現 I 類 MHC 分子，故所有感染之細胞均可充當 CD8 T 細胞之抗原呈遞細胞 (CD8 結合於 I 類重鏈之非多型部分)。一些 I 類 MHC 基因編碼非經典 MHC 分子，諸如 HLA-G (其可在保護胎兒不受母體免疫反應影響中起作用) 及 HLA-E (其將肽呈遞至自然殺手 [NK] 細胞上之某些受體)。

【0120】在一些實施例中，HLA 1類分子選自HLA-A、HLA-B及HLA-C等位基因。在一些實施例中，HLA 1類分子選自HLA-E、HLA-F及HLA-G等位基因。在某些實施例中，HLA 1類分子為HLA-A等位基因。在某些實施例中，HLA 1類分子為HLA-B等位基因。在某些實施例中，HLA 1類分子為HLA-C等位基因。

【0121】許多HLA-A、HLA-B及HLA-C等位基因為此項技術中已知的，且已知等位基因中之任一者均可用於本發明中。HLA等位基因之更新列表可在[hla.alleles.org/](http://hla.alleles.org/)(最後訪問日期2019年2月27日)獲得。在一些實施例中，HLA 1類分子為選自以下之HLA-C等位基因：HLA-C\*03:02等位基因、HLA-C\*03:03等位基因、HLA-C\*03:04等位基因、HLA-C\*03:05等位基因及HLA-C\*03:06等位基因。在某些實施例中，HLA-C等位基因為HLA-C\*03:02等位基因。在某些實施例中，HLA-C等位基因為HLA-C\*03:03等位基因。在某些實施例中，HLA-C等位基因為HLA-C\*03:04等位基因。在某些實施例中，HLA-C等位基因為HLA-C\*03:05等位基因。在某些實施例中，HLA-C等位基因為HLA-C\*03:06等位基因。

【0122】在某些實施例中，HLA 1類分子為選自由以下組成之群的HLA-C等位基因：HLA-C\*03:02:01；HLA-C\*03:02:02:01；HLA-C\*03:02:02:02；HLA-C\*03:02:02:03；HLA-C\*03:02:02:04；HLA-C\*03:02:02:05；HLA-C\*03:02:03；HLA-C\*03:02:04；HLA-C\*03:02:05；HLA-C\*03:02:06；

HLA-C\*03:02:07 ; HLA-C\*03:02:08 ; HLA-C\*03:02:09 ;  
 HLA-C\*03:02:10 ; HLA-C\*03:02:11 ; HLA-C\*03:02:12 ;  
 HLA-C\*03:02:13 ; HLA-C\*03:02:14 ; HLA-C\*03:02:15 ;  
 HLA-C\*03:02:16 ; HLA-C\*03:02:17 ; HLA-C\*03:02:18 ;  
 HLA-C\*03:02:19 ; HLA-C\*03:02:20 ; HLA-C\*03:02:21 ;  
 HLA-C\*03:02:22 ; 及其任何組合。在某些實施例中，HLA  
 1類分子為選自由以下組成之群的HLA-C等位基因：HLA-  
 C\*03:03:01:01 ; HLA-C\*03:03:01:02 ; HLA-C\*03:03:01:03 ; HLA-  
 C\*03:03:01:04 ; HLA-C\*03:03:01:05 ; HLA-C\*03:03:01:06 ; HLA-  
 C\*03:03:01:07 ; HLA-C\*03:03:01: 08 ; HLA-C\*03:03:01:09 ;  
 HLA-C\*03:03:01:10 ; HLA-C\*03: 03:01:11 ; HLA-C\*03:03:01:12 ;  
 HLA-C\*03:03:01:13 ; HLA-C\*03:03:01:14 ; HLA-C\*03:03:02 ;  
 HLA-C\*03:03:03 ; HLA-C\*03:03:04 ; HLA-C\*03:03:05 ; HLA-  
 C\*03:03:06 ; HLA-C\*03:03:07 ; HLA-C\*03:03:08 ; HLA-C\*03:  
 03:09 ; HLA-C\*03:03:10 ; HLA-C\*03:03:11 ; HLA-C\*03: 03:12 ;  
 HLA-C\*03:03:13 ; HLA-C\*03:03:14 ; HLA-C\*03: 03:15 ; HLA-  
 C\*03:03:16 ; HLA-C\*03:03:17 ; HLA-C\*03: 03:18 ; HLA-C\*03:03:19 ;  
 HLA-C\*03:03:20 ; HLA-C\*03: 03:21 ; HLA-C\*03:03:22 ; HLA-C\*03:  
 03:23 ; HLA-C\*03: 03:24 ; HLA-C\*03:03:25 ; HLA-C\*03:03:26 ; HLA-  
 C\*03:03:27 ; HLA-C\*03:03:28 ; HLA-C\*03:03:29 ; HLA-C\*03: 03:30 ;  
 HLA-C\*03:03:31 ; HLA-C\*03:03:32 ; HLA-C\*03: 03:33 ; HLA-  
 C\*03:03:34 ; HLA-C\*03:03:35 ; HLA-C\*03: 03:36 ; HLA-C\*03:03:37 ;  
 HLA-C\*03:03:38 ; HLA-C\*03: 03:39 ; HLA-C\*03:03:40 ; HLA-  
 C\*03:03:41 ; HLA-C\*03: 03:42 ; HLA-C\*03:03:43 ; HLA-C\*03:03:44 ;

HLA-C\*03: 03:45 ; HLA-C\*03:03:46 ; HLA-C\*03:03:47 ; HLA-C\*03:03:48 ; HLA-C\*03:03:49 ; HLA-C\*03:03:50 ; HLA-C\*03: 03:51 ; HLA-C\*03:03:52 ; HLA-C\*03:03:53 ; 及其任何組合。在某些實施例中，HLA 1類分子為選自由以下組成之群的HLA-C等位基因：HLA-C\*03:04:01:01 ; HLA-C\*03: 04:01:02 ; HLA-C\*03:04:01:03 ; HLA-C\*03:04:01:04 ; HLA-C\*03:04:01:05 ; HLA-C\*03:04:01:06 ; HLA-C\*03:04:01:07 ; HLA-C\*03:04:01:08 ; HLA-C\*03:04: 01:09 ; HLA-C\*03:04:01: 10 ; HLA-C\*03:04:01:11 ; HLA-C\*03:04:01:12 ; HLA-C\*03: 04:01:13 ; HLA-C\*03:04:02 ; HLA-C\*03:04:03 ; HLA-C\*03:04:04 ; HLA-C\*03:04:05 ; HLA-C\*03:04:06 ; HLA-C\*03:04:07 ; HLA-C\*03:04:08 ; HLA-C\*03:04:09 ; HLA-C\*03:04:10 ; HLA-C\*03:04:11 ; HLA-C\*03:04:12 ; HLA-C\*03:04:13 ; HLA-C\*03:04:14 ; HLA-C\*03:04:15 ; HLA-C\*03:04:16 ; HLA-C\*03:04:17 ; HLA-C\*03:04:18 ; HLA-C\*03:04:19 ; HLA-C\*03:04:20 ; HLA-C\*03:04:21 ; HLA-C\*03:04:22 ; HLA-C\*03:04:23 ; HLA-C\*03:04:24 ; HLA-C\*03:04:25 ; HLA-C\*03:04:26 ; HLA-C\*03:04:27 ; HLA-C\*03:04:28 ; HLA-C\*03:04:29 ; HLA-C\*03:04:30 ; HLA-C\*03:04:31 ; HLA-C\*03:04:32 ; HLA-C\*03:04:33 ; HLA-C\*03:04:34 ; HLA-C\*03:04:35 ; HLA-C\*03:04:36 ; HLA-C\*03:04:37 ; HLA-C\*03:04:38 ; HLA-C\*03:04:39 ; HLA-C\*03:04:40 ; HLA-C\*03:04:41 ; HLA-C\*03:04:42 ; HLA-C\*03:04:43 ; HLA-C\*03:04:44 ; HLA-C\*03:04:45 ; HLA-C\*03:04:46 ; HLA-C\*03:04:47 ; HLA-C\*03:04:48 ; HLA-

C\*03:04:49 ; HLA-C\*03:04:50 ; HLA-C\*03:04:51 ; HLA-C\*03:04:52 ; HLA-C\*03:04:53 ; HLA-C\*03:04:54 ; HLA-C\*03:04:55 ; HLA-C\*03:04:56 ; HLA-C\*03:04:57 ; HLA-C\*03:04:58 ; HLA-C\*03:04:59 ; HLA-C\*03:04:60 ; HLA-C\*03:04:61 ; HLA-C\*03:04:62 ; HLA-C\*03:04:63 ; HLA-C\*03:04:64 ; HLA-C\*03:04:65 ; HLA-C\*03:04:66 ; HLA-C\*03:04:67 ; HLA-C\*03:04:68 ; HLA-C\*03:04:69 ; HLA-C\*03:04:70 ; HLA-C\*03:04:71 ; HLA-C\*03:04:72 ; HLA-C\*03:04:73 ; 及其任何組合。在某些實施例中，HLA 1類分子為選自由以下組成之群的HLA-C等位基因：HLA-C\*03:05；HLA-C\*03:06:01；及HLA-C\*03:06:02。

### II.A.3 第二核苷酸序列

【0123】本文所揭示之核酸分子之第二核苷酸序列可為能夠抑制內源TCR之表現的任何序列或可編碼能夠抑制內源TCR之表現的任何多肽。在一些實施例中，第二核苷酸序列為一或多個siRNA。在一些實施例中，一或多個siRNA與編碼內源TCR之恆定區之核苷酸序列內的目標序列互補。在某些實施例中，一或多個siRNA與編碼野生型人類TCR之恆定區之核苷酸序列內的目標序列互補。在一些實施例中，一或多個siRNA與編碼野生型TCR之 $\alpha$ 鏈之恆定區的核苷酸序列內之目標序列互補。在一些實施例中，一或多個siRNA與編碼野生型TCR之 $\beta$ 鏈之恆定區的核苷酸序列內之目標序列互補。在一些實施例中，一或多個

siRNA包含(i)與編碼野生型TCR之 $\alpha$ 鏈之恆定區的核苷酸序列內之目標序列互補的一或多個siRNA及(ii)與編碼野生型TCR之 $\beta$ 鏈之恆定區的核苷酸序列內之目標序列互補的一或多個siRNA。

【0124】 在一些實施例中，一或多個siRNA包含選自由SEQ ID NO: 53-56組成之群的核苷酸序列(表4)。在一些實施例中，核酸分子之第二核苷酸序列編碼一或多個siRNA，其中該一或多個siRNA與編碼野生型TCR之 $\alpha$ 鏈之恆定區的核苷酸序列內之目標序列互補，且其中該一或多個siRNA包含SEQ ID NO: 53及54中所列之核酸序列。

表 4. siRNA 序列

| SEQ ID NO: | siRNA        | 序列(核苷酸 1-19 為核糖核苷酸；核苷酸 20-21 為去氧核糖核苷酸) |
|------------|--------------|----------------------------------------|
| 53         | siRNA-TCRa-1 | GUAAGGAUUCUGAUGUGUATT                  |
| 54         | siRNA-TCRa-2 | UACACAUCAGAAUCCUUA CTT                 |
| 55         | siRNA-TCRb-1 | CCACCAUCCUCUAUGAGAU TT                 |
| 56         | siRNA-TCRb-2 | AUCUCAUAGAGGAUGGUG GTT                 |

【0125】 在一些實施例中，核酸分子之第二核苷酸序列編碼一或多個siRNA，其中該一或多個siRNA與編碼野生型TCR之 $\beta$ 鏈之恆定區的核苷酸序列內之目標序列互補，且其中該一或多個siRNA包含SEQ ID NO: 55及56中所列之核酸序列。在一些實施例中，核酸分子之第二核苷酸序列編碼一或多個siRNA，其中該一或多個siRNA包含(i)與編碼野生型TCR之 $\alpha$ 鏈之恆定區的核苷酸序列內之目標

序列互補的一或多個 siRNA，其中該一或多個 siRNA 包含 SEQ ID NO: 53 及 54 中所列之核酸序列；及(ii)與編碼野生型 TCR 之  $\beta$  鏈之恆定區的核苷酸序列內之目標序列互補的一或多個 siRNA，其中該一或多個 siRNA 包含 SEQ ID NO: 55 及 56 中所列之核酸序列。

【0126】在一些實施例中，核酸分子之第二核苷酸序列包含 SEQ ID NO: 53-56。在一些實施例中，第二核苷酸序列包含 SEQ ID NO: 53-56，其中 SEQ ID NO: 53-56 中之一或多者由一或多個不編碼 siRNA 之核酸隔開。在某些實施例中，該一或多個 siRNA 選自揭示於美國公開案第 2010/0273213 A1 號中之 siRNA，該公開案以全文引用之方式併入本文中。

【0127】在一些實施例中，核酸分子之第二核苷酸序列編碼蛋白質，其中該蛋白質能夠抑制內源(例如野生型)TCR 之表現。在一些實施例中，第二核苷酸序列編碼 Cas9。

### II.A.3 載體

【0128】本發明之某些態樣係有關包含本文所揭示之核酸分子的載體。在一些實施例中，載體為病毒載體。在一些實施例中，載體為病毒粒子或病毒。在一些實施例中，載體為哺乳動物載體。在一些實施例中，載體為細菌載體。

【0129】在某些實施例中，載體為反轉錄病毒載體。

在一些實施例中，載體選自由以下組成之群：腺病毒載體、慢病毒、仙台病毒、桿狀病毒載體、艾司坦巴爾病毒載體、乳多空病毒載體、痘瘡病毒載體、單純疱疹病毒載體及腺相關病毒(AAV)載體。在特定實施例中，載體為AAV載體。在一些實施例中，載體為慢病毒。在特定實施例中，載體為AAV載體。在一些實施例中，載體為仙台病毒。在一些實施例中，載體為雜合載體。可用於本發明中之雜合載體的實例可見於Huang及Kamihira, *Biotechnol. Adv.* 31(2):208-23(2103)中，該參考文獻以全文引用之方式併入本文中。

## II.B. 重組T細胞受體(TCR)

【0130】本發明之某些態樣係有關特異性結合人類NY-ESO-1之重組T細胞受體(TCR)或其抗原結合部分(「抗NY-ESO-1 TCR」)。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR由本文所揭示之核酸分子編碼。

【0131】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR與參考TCR交叉競爭結合於人類NY-ESO-1。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR結合人類NY-ESO-1之與參考TCR相同之抗原決定基或重疊之抗原決定基。在一些實施例中，參考TCR包含 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈，且參考TCR之 $\alpha$ 鏈包含如SEQ ID NO: 1中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，參考TCR之 $\beta$ 鏈包含如SEQ ID NO: 2中所列之胺基酸序列。

【0132】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含 $\alpha$ 鏈

及 $\beta$ 鏈，其中 $\alpha$ 鏈包含恆定區，且其中 $\beta$ 鏈包含恆定區；其中 $\alpha$ 鏈恆定區包含相對於包含SEQ ID NO: 1中所列之胺基酸序列的 $\alpha$ 鏈之恆定區具有至少1個、至少2個、至少3個、至少4個或至少5個胺基酸取代的胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈，其中 $\alpha$ 鏈包含恆定區，且其中 $\beta$ 鏈包含恆定區；其中 $\beta$ 鏈恆定區包含相對於包含SEQ ID NO: 2中所列之胺基酸序列的 $\beta$ 鏈之恆定區具有至少1個、至少2個、至少3個、至少4個或至少5個胺基酸取代的胺基酸序列。

【0133】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈，其中 $\alpha$ 鏈包含恆定區，且其中 $\beta$ 鏈包含恆定區；其中(i) $\alpha$ 鏈恆定區包含相對於包含SEQ ID NO: 1中所列之胺基酸序列的 $\alpha$ 鏈之恆定區具有至少1個、至少2個、至少3個、至少4個或至少5個胺基酸取代的胺基酸序列；且(ii) $\beta$ 鏈恆定區包含相對於包含SEQ ID NO: 2中所列之胺基酸序列的 $\beta$ 鏈之恆定區具有至少1個、至少2個、至少3個、至少4個或至少5個胺基酸取代的胺基酸序列。

【0134】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈包含含有 $\alpha$ 鏈CDR1、 $\alpha$ 鏈CDR2及 $\alpha$ 鏈CDR3之可變域；且抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈包含含有 $\beta$ 鏈CDR1、 $\beta$ 鏈CDR2及 $\beta$ 鏈CDR3之可變域。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含含有如SEQ ID NO: 7中所列之胺基酸序列的 $\alpha$ 鏈CDR3。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含含有如SEQ ID NO: 10中所列之胺基酸序列的 $\beta$ 鏈CDR3。

【0135】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈CDR1包含如SEQ ID NO: 5中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈CDR1包含如SEQ ID NO: 8中所列之胺基酸序列。

【0136】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\alpha$ 鏈CDR2包含如SEQ ID NO: 6中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR之 $\beta$ 鏈CDR2包含如SEQ ID NO: 9中所列之胺基酸序列。

【0137】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 1中所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列之可變域具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的 $\alpha$ 鏈可變域。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 1中所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列之可變域具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%或至少約99%序列一致性的 $\alpha$ 鏈可變域，其中抗NY-ESO-1 TCR包含含有如SEQ ID NO: 7中所列之胺基酸序列的 $\alpha$ 鏈CDR3。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含SEQ ID NO: 1所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列中存在的 $\alpha$ 鏈可變域。

【0138】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 2中所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列之可變域具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序

列一致性的 $\beta$ 鏈可變域。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 2中所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列之可變域具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%或至少約99%序列一致性的 $\beta$ 鏈可變域，其中抗NY-ESO-1 TCR包含含有如SEQ ID NO: 10中所列之胺基酸序列的 $\beta$ 鏈CDR3。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含SEQ ID NO: 2所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列中存在的 $\beta$ 鏈可變域。

【0139】在一些實施例中，由第一核苷酸編碼之抗NY-ESO-1 TCR進一步包含 $\alpha$ 鏈恆定區、 $\beta$ 鏈恆定區或 $\alpha$ 鏈恆定區與 $\beta$ 鏈恆定區兩者。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 1中所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列之恆定區具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的 $\alpha$ 鏈恆定區。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 1中所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列之恆定區具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%或至少約99%序列一致性的 $\alpha$ 鏈恆定區，其中抗NY-ESO-1 TCR包含含有如SEQ ID NO: 7中所列之胺基酸序列的 $\alpha$ 鏈CDR3。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含SEQ ID NO: 1所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列中存在的 $\alpha$ 鏈恆定區。在一些實施例中，由第一核苷酸編碼之抗NY-ESO-1 TCR進一步包含不同於 $\alpha$ 鏈之內源(例如天然存在之)恆定區的 $\alpha$ 恆定區。在一些實施

例中， $\alpha$ 鏈恆定區包含相對於SEQ ID NO: 1中所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列之恆定區的胺基酸序列含有至少1個、至少2個、至少3個、至少4個或至少5個胺基酸取代的胺基酸序列。

【0140】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 2中所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列之恆定區具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的 $\beta$ 鏈恆定區。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 2中所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列之恆定區具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%或至少約99%序列一致性的 $\beta$ 鏈恆定區，其中抗NY-ESO-1 TCR包含含有如SEQ ID NO: 10中所列之胺基酸序列的 $\beta$ 鏈CDR3。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含SEQ ID NO: 2所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列中存在的 $\beta$ 鏈恆定區。在一些實施例中，由第一核苷酸編碼之抗NY-ESO-1 TCR進一步包含不同於 $\beta$ 鏈之內源(例如天然存在之)恆定區的 $\beta$ 恆定區。在一些實施例中， $\beta$ 鏈恆定區包含相對於SEQ ID NO: 2中所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列之恆定區的胺基酸序列包含至少1個、至少2個、至少3個、至少4個或至少5個胺基酸取代的胺基酸序列。

【0141】在某些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 1中所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的 $\alpha$

鏈。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 1中所列之 $\alpha$ 鏈胺基酸序列具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的 $\alpha$ 鏈，其中抗NY-ESO-1 TCR包含含有如SEQ ID NO: 7中所列之胺基酸序列的 $\alpha$ 鏈CDR3。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含含有SEQ ID NO: 1中所列之胺基酸序列的 $\alpha$ 鏈。

【0142】在某些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 2中所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的 $\beta$ 鏈。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含與SEQ ID NO: 2中所列之 $\beta$ 鏈胺基酸序列具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的 $\beta$ 鏈，其中抗NY-ESO-1 TCR包含含有如SEQ ID NO: 10中所列之胺基酸序列的 $\beta$ 鏈CDR3。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含含有SEQ ID NO: 2中所列之胺基酸序列的 $\beta$ 鏈。

【0143】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR包含 $\alpha$ 鏈恆定區、 $\beta$ 鏈恆定區或兩者；且其中 $\alpha$ 鏈恆定區、 $\beta$ 鏈恆定區或兩者包含相對於內源TCR之對應胺基酸序列在目標序列內具有至少1個、至少2個、至少3個、至少4個或至少5個取代的胺基酸序列。

## II.B.2. 抗原決定基

【0144】在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR與參考TCR結合相同之抗原決定基。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR結合於NY-ESO-1之包含SEQ ID NO: 13 (LAMPFATPM)中所列之胺基酸序列的抗原決定基。在一些實施例中，抗NY-ESO-1 TCR結合於NY-ESO-1之由如SEQ ID NO: 13中所列之胺基酸序列組成的抗原決定基。在一些實施例中，抗原決定基由NY-ESO-1之胺基酸殘基92-100(SEQ ID NO: 52)組成，例如「NY-ESO-1<sub>92-100</sub>」。

【0145】在某些實施例中，抗原決定基與HLA I類分子複合。在一些實施例中，HLA I類分子選自HLA-A、HLA-B及HLA-C等位基因。在一些實施例中，HLA I類分子選自HLA-E、HLA-F及HLA-G等位基因。在某些實施例中，HLA I類分子為HLA-A等位基因。在某些實施例中，HLA I類分子為HLA-B等位基因。在某些實施例中，HLA I類分子為HLA-C等位基因。

【0146】許多HLA-A、HLA-B及HLA-C等位基因為此項技術中已知的，且已知等位基因中之任一者均可用於本發明中。HLA等位基因之更新列表可在[hla.alleles.org/](http://hla.alleles.org/)(最後訪問日期2019年2月27日)獲得。在一些實施例中，HLA I類分子為選自以下之HLA-C等位基因：HLA-C\*03:02等位基因、HLA-C\*03:03等位基因、HLA-C\*03:04等位基因、HLA-C\*03:05等位基因及HLA-C\*03:06等位基因。在某些實施例中，HLA-C等位基因為HLA-C\*03:02等位基因。在

某些實施例中，HLA-C等位基因為HLA-C\*03:03等位基因。在某些實施例中，HLA-C等位基因為HLA-C\*03:04等位基因。在某些實施例中，HLA-C等位基因為HLA-C\*03:05等位基因。在某些實施例中，HLA-C等位基因為HLA-C\*03:06等位基因。

【0147】在某些實施例中，HLA 1類分子為選自由以下組成之群的HLA-C等位基因：HLA-C\*03:02:01；HLA-C\*03:02:02:01；HLA-C\*03:02:02:02；HLA-C\*03:02:02:03；HLA-C\*03:02:02:04；HLA-C\*03:02:02:05；HLA-C\*03:02:03；HLA-C\*03:02:04；HLA-C\*03:02:05；HLA-C\*03:02:06；HLA-C\*03:02:07；HLA-C\*03:02:08；HLA-C\*03:02:09；HLA-C\*03:02:10；HLA-C\*03:02:11；HLA-C\*03:02:12；HLA-C\*03:02:13；HLA-C\*03:02:14；HLA-C\*03:02:15；HLA-C\*03:02:16；HLA-C\*03:02:17；HLA-C\*03:02:18；HLA-C\*03:02:19；HLA-C\*03:02:20；HLA-C\*03:02:21；HLA-C\*03:02:22；及其任何組合。在某些實施例中，HLA 1類分子為選自由以下組成之群的HLA-C等位基因：HLA-C\*03:03:01:01；HLA-C\*03:03:01:02；HLA-C\*03:03:01:03；HLA-C\*03:03:01:04；HLA-C\*03:03:01:05；HLA-C\*03:03:01:06；HLA-C\*03:03:01:07；HLA-C\*03:03:01:08；HLA-C\*03:03:01:09；HLA-C\*03:03:01:10；HLA-C\*03:03:01:11；HLA-C\*03:03:01:12；HLA-C\*03:03:01:13；HLA-C\*03:03:01:14；HLA-C\*03:03:02；HLA-C\*03:03:03；HLA-C\*03:03:04；HLA-C\*03:03:05；HLA-C\*03:03:06；HLA-C\*03:03:07；HLA-C\*03:03:08；

HLA-C\*03:03:09 ; HLA-C\*03:03:10 ; HLA-C\*03:03:11 ;  
 HLA-C\*03:03:12 ; HLA-C\*03:03:13 ; HLA-C\*03:03:14 ;  
 HLA-C\*03:03:15 ; HLA-C\*03:03:16 ; HLA-C\*03:03:17 ;  
 HLA-C\*03:03:18 ; HLA-C\*03:03:19 ; HLA-C\*03:03:20 ;  
 HLA-C\*03:03:21 ; HLA-C\*03:03:22 ; HLA-C\*03:03:23 ;  
 HLA-C\*03:03:24 ; HLA-C\*03:03:25 ; HLA-C\*03:03:26 ;  
 HLA-C\*03:03:27 ; HLA-C\*03:03:28 ; HLA-C\*03:03:29 ;  
 HLA-C\*03:03:30 ; HLA-C\*03:03:31 ; HLA-C\*03:03:32 ;  
 HLA-C\*03:03:33 ; HLA-C\*03:03:34 ; HLA-C\*03:03:35 ;  
 HLA-C\*03:03:36 ; HLA-C\*03:03:37 ; HLA-C\*03:03:38 ;  
 HLA-C\*03:03:39 ; HLA-C\*03:03:40 ; HLA-C\*03:03:41 ;  
 HLA-C\*03:03:42 ; HLA-C\*03:03:43 ; HLA-C\*03:03:44 ;  
 HLA-C\*03:03:45 ; HLA-C\*03:03:46 ; HLA-C\*03:03:47 ;  
 HLA-C\*03:03:48 ; HLA-C\*03:03:49 ; HLA-C\*03:03:50 ;  
 HLA-C\*03:03:51 ; HLA-C\*03:03:52 ; HLA-C\*03:03:53 ;  
 及其任何組合。在某些實施例中，HLA 1類分子為選自由  
 以下組成之群的HLA-C等位基因：HLA-C\*03:04:01:01；HLA-  
 C\*03:04:01:02；HLA-C\*03:04:01:03；HLA-C\*03:04:01:04；HLA-  
 C\*03:04:01:05；HLA-C\*03:04:01:06；HLA-C\*03:04:01:07；HLA-  
 C\*03:04:01:08；HLA-C\*03:04:01:09；HLA-C\*03:04:01:10；HLA-  
 C\*03:04:01:11 ； HLA-C\*03:04:01:12 ； HLA-C\*03:04:01:13 ；  
 HLA-C\*03:04:02 ； HLA-C\*03:04:03 ； HLA-C\*03:04:04 ；  
 HLA-C\*03:04:05 ； HLA-C\*03:04:06 ； HLA-C\*03:04:07 ；  
 HLA-C\*03:04:08 ； HLA-C\*03:04:09 ； HLA-C\*03:04:10 ；

HLA-C\*03:04:11 ; HLA-C\*03:04:12 ; HLA-C\*03:04:13 ;  
 HLA-C\*03:04:14 ; HLA-C\*03:04:15 ; HLA-C\*03:04:16 ;  
 HLA-C\*03:04:17 ; HLA-C\*03:04:18 ; HLA-C\*03:04:19 ;  
 HLA-C\*03:04:20 ; HLA-C\*03:04:21 ; HLA-C\*03:04:22 ;  
 HLA-C\*03:04:23 ; HLA-C\*03:04:24 ; HLA-C\*03:04:25 ;  
 HLA-C\*03:04:26 ; HLA-C\*03:04:27 ; HLA-C\*03:04:28 ;  
 HLA-C\*03:04:29 ; HLA-C\*03:04:30 ; HLA-C\*03:04:31 ;  
 HLA-C\*03:04:32 ; HLA-C\*03:04:33 ; HLA-C\*03:04:34 ;  
 HLA-C\*03:04:35 ; HLA-C\*03:04:36 ; HLA-C\*03:04:37 ;  
 HLA-C\*03:04:38 ; HLA-C\*03:04:39 ; HLA-C\*03:04:40 ;  
 HLA-C\*03:04:41 ; HLA-C\*03:04:42 ; HLA-C\*03:04:43 ;  
 HLA-C\*03:04:44 ; HLA-C\*03:04:45 ; HLA-C\*03:04:46 ;  
 HLA-C\*03:04:47 ; HLA-C\*03:04:48 ; HLA-C\*03:04:49 ;  
 HLA-C\*03:04:50 ; HLA-C\*03:04:51 ; HLA-C\*03:04:52 ;  
 HLA-C\*03:04:53 ; HLA-C\*03:04:54 ; HLA-C\*03:04:55 ;  
 HLA-C\*03:04:56 ; HLA-C\*03:04:57 ; HLA-C\*03:04:58 ;  
 HLA-C\*03:04:59 ; HLA-C\*03:04:60 ; HLA-C\*03:04:61 ;  
 HLA-C\*03:04:62 ; HLA-C\*03:04:63 ; HLA-C\*03:04:64 ;  
 HLA-C\*03:04:65 ; HLA-C\*03:04:66 ; HLA-C\*03:04:67 ;  
 HLA-C\*03:04:68 ; HLA-C\*03:04:69 ; HLA-C\*03:04:70 ;  
 HLA-C\*03:04:71 ; HLA-C\*03:04:72 ; HLA-C\*03:04:73 ;  
 及其任何組合。在某些實施例中，HLA 1類分子為選自由  
 以下組成之群的HLA-C等位基因：HLA-C\*03:05；HLA-  
 C\*03:06:01；及HLA-C\*03:06:02。

### II.B.3. 雙特異性T細胞受體(TCR)

【0148】本發明之某些態樣係有關一種包含第一抗原結合結構域及第二抗原結合結構域之雙特異性TCR，其中第一抗原結合結構域包含本文所揭示之TCR或其抗原結合部分。在一些實施例中，第一抗原結合結構域包含單鏈可變片段(「scFv」)。

【0149】在一些實施例中，第二抗原結合結構域特異性結合於T細胞表面所表現之蛋白質。T細胞表面表現之任何蛋白質均可由本文所揭示之雙特異性抗體靶向。在某些實施例中，T細胞表面所表現之蛋白質不由其他細胞表現。在一些實施例中，T細胞表面所表現之蛋白質在一或多種其他人類免疫細胞之表面表現。在一些實施例中，T細胞表面所表現之蛋白質在一或多種其他人類免疫細胞之表面表現，但其不在人類非免疫細胞之表面表現。在一些實施例中，第二抗原結合結構域特異性結合於T細胞表面所表現之選自以下之蛋白質：CD3、CD2、CD5、CD6、CD8、CD11a(LFA-1 $\alpha$ )、CD43、CD45及CD53。在某些實施例中，第二抗原結合結構域特異性結合於CD3。在一些實施例中，第二抗原結合結構域包含scFv。

【0150】在一些實施例中，第一抗原結合結構域與第二抗原結合結構域藉由共價鍵鍵聯或關聯。在一些實施例中，第一抗原結合結構域與第二抗原結合結構域藉由肽鍵鍵聯。

## II.C. 表現 TCR 之細胞

【0151】本發明之某些態樣係有關包含本文所揭示之核酸分子、本文所揭示之載體、本文所揭示之重組 TCR、本文所揭示之雙特異性 TCR 或其任何組合的細胞。任何細胞均可用於本發明中。

【0152】在某些實施例中，細胞表現 CD3。CD3 表現可為天然存在的，例如 CD3 自由細胞內源表現之核酸序列表現。舉例而言，T 細胞及自然殺手 (NK) 細胞天然地表現 CD3。因此，在一些實施例中，細胞為 T 細胞或自然殺手細胞。在某些實施例中，細胞為選自自然殺手 T (NKT) 細胞及先天淋巴樣細胞 (ILC) 之 T 細胞。

【0153】在一些實施例中，T 細胞係分離自人類個體。在一些實施例中，人類個體為將最終接受 T 細胞療法之相同個體。在其他實施例中，個體為供體個體，其中供體個體不為將接受 T 細胞療法之相同個體。

【0154】在一些實施例中，細胞為不天然地表現 CD3 之細胞，其中細胞已經修飾以表現 CD3。在一些實施例中，細胞包含編碼 CD3 之轉殖基因，其中轉殖基因由細胞表現。在一些實施例中，細胞包含編碼活化細胞之內源 CD3 表現之蛋白質的轉殖基因。在一些實施例中，細胞包含編碼抑制細胞中之 CD3 表現抑制劑的蛋白質或 siRNA 之轉殖基因。在一些實施例中，轉殖基因併入細胞之基因組。在一些實施例中，轉殖基因未併入細胞之基因組。

【0155】在一些實施例中，經修飾以表現 CD3 之細胞

係分離自人類個體。在一些實施例中，人類個體為將最終接受細胞療法之相同個體。在其他實施例中，個體為供體個體，其中供體個體不為將接受細胞療法之相同個體。

## II.D. HLA I類分子

【0156】本發明之某些態樣係有關一種與肽複合之HLA I類分子，其中該肽包含SEQ ID NO: 13中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，該肽由SEQ ID NO: 13中所列之胺基酸序列組成。

【0157】在一些實施例中，HLA I類分子為HLA-A、HLA-B或HLA-C。在一些實施例中，HLA I類分子為HLA-E、HLA-F或HLA-G。在一些實施例中，HLA I類分子為選自以下之HLA-C等位基因：HLA-C\*03:02等位基因、HLA-C\*03:03等位基因、HLA-C\*03:04等位基因、HLA-C\*03:05等位基因及HLA-C\*03:06等位基因。在某些實施例中，HLA-C等位基因為HLA-C\*03:02等位基因。在某些實施例中，HLA-C等位基因為HLA-C\*03:03等位基因。在某些實施例中，HLA-C等位基因為HLA-C\*03:04等位基因。在某些實施例中，HLA-C等位基因為HLA-C\*03:05等位基因。在某些實施例中，HLA-C等位基因為HLA-C\*03:06等位基因。在一些實施例中，HLA等位基因為本文所揭示之任何HLA等位基因，例如同上。

【0158】在一些實施例中，HLA I類分子包含 $\alpha$ 鏈及 $\beta 2m$ 。在一些實施例中， $\alpha$ 鏈包含 $\alpha 1$ 結構域、 $\alpha 2$ 結構域、

$\alpha$ 3結構域。在一些實施例中， $\beta$ 2m包含與SEQ ID NO: 16中所列之胺基酸序列具有至少約80%、至少約85%、至少約90%、至少約95%、至少約96%、至少約97%、至少約98%、至少約99%或約100%序列一致性的胺基酸序列。在一些實施例中， $\alpha$ 鏈之序列選自在hla.alleles.org(最後訪問日期2019年2月27日)可獲得之HLA蛋白質序列中的任一者。

【0159】在一些實施例中，HLA I類分子為單體。在一些實施例中，HLA I類分子為二聚體。在一些實施例中，HLA I類分子為多聚體。在一些實施例中，HLA I類分子為三聚體。在一些實施例中，HLA I類分子為四聚體。在一些實施例中，HLA I類分子為五聚體。

【0160】本發明之某些態樣係有關包含本文所揭示之任何HLA I類分子的抗原呈遞細胞(APC)。在某些實施例中，APC表現APC表面之HLA I類分子。在某些實施例中，APC包含超過一個本文所揭示之HLA I類分子。

## II.D. 疫苗

【0161】本發明之某些態樣一種癌症疫苗，其包含含有如SEQ ID NO: 13中所列之胺基酸序列的肽。在一些實施例中，癌症疫苗包含由SEQ ID NO: 13中所列之胺基酸序列組成的肽。在一些實施例中，疫苗進一步包含一或多種賦形劑。在一些實施例中，疫苗進一步包含一或多種其他肽。在一些實施例中，該一或多種其他肽包含一或多個

其他抗原決定基。

### III. 本發明之方法

【0162】本發明之某些態樣係有關治療有需要之個體之癌症的方法。本發明之其他態樣係有關對靶向抗原之細胞進行工程改造的方法。本發明之其他態樣係有關富集獲自人類個體之T細胞之目標群體的方法。

#### III.A. 治療癌症之方法

【0163】本發明之某些態樣係有關治療有需要之個體之癌症的方法，該等方法包括向個體投與本文所揭示之核酸分子、本文所揭示之重組TCR、本文所揭示之雙特異性TCR、本文所揭示之抗原決定基或本文所揭示之HLA I類分子或者包含以上中之任一者的載體或細胞。

【0164】在一些實施例中，癌症選自黑色素瘤、骨癌、腎癌、前列腺癌、乳腺癌、結腸癌、肺癌、皮膚或眼內惡性黑色素瘤、胰臟癌、皮膚癌、頭頸癌、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛門區癌、胃癌、睪丸癌、子宮癌、輸卵管癌瘤、子宮內膜癌瘤、子宮頸癌瘤、陰道癌瘤、外陰癌瘤、霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤(NHL)、原發性縱隔大B細胞淋巴瘤(PMBC)、彌漫性大B細胞淋巴瘤(DLBCL)、濾泡性淋巴瘤(FL)、轉型濾泡性淋巴瘤、脾邊緣區淋巴瘤(SMZL)、食管癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、副甲狀腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道

癌、陰莖癌、慢性或急性白血病、急性骨髓性白血病(AML)、慢性骨髓性白血病、急性淋巴母細胞性白血病(ALL)(包括非T細胞ALL)、慢性淋巴細胞性白血病(CLL)、兒童期實體腫瘤、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎臟或輸尿管癌、腎盂癌瘤、中樞神經系統(CNS)贅瘤、原發性CNS淋巴瘤、腫瘤血管生成、脊柱軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、垂體腺瘤、卡波西氏肉瘤、表皮樣癌、鱗狀細胞癌、T細胞淋巴瘤、環境誘發之癌症(包括由石棉誘發之彼等癌症)、其他B細胞惡性腫瘤及該等癌症之組合。在一些實施例中，癌症黑色素瘤。

【0165】在一些實施例中，癌症為復發的。在一些實施例中，癌症為難治性的。在一些實施例中，癌症為晚期的。在一些實施例中，癌症為轉移性的。

【0166】在一些實施例中，本文所揭示之方法治療個體之癌症。在一些實施例中，本文所揭示之方法降低一或多種癌症症狀之嚴重程度。在一些實施例中，本文所揭示之方法減小衍生自癌症之腫瘤的尺寸或數目。在一些實施例中，相對於未提供本文所揭示之方法的個體，本文所揭示之方法增加個體之總存活。在一些實施例中，相對於未提供本文所揭示之方法的個體，本文所揭示之方法增加個體之無進展存活。在一些實施例中，本文所揭示之方法在個體中引起部分反應。在一些實施例中，本文所揭示之方法在個體中引起完全反應。

【0167】在一些實施例中，本文所揭示之方法包括治

療有需要之個體的癌症，包括向個體投與本文所描述之細胞，其中該細胞包含本文所揭示之核酸分子、本文所揭示之載體、本文所揭示之重組TCR及/或本文所揭示之雙特異性抗體。在一些實施例中，細胞為T細胞。在一些實施例中，細胞為經修飾以表現CD3之細胞。

【0168】在一些實施例中，細胞(例如T細胞)係獲自個體。在一些實施例中，細胞(例如T細胞)係獲自除該個體外之供體。

【0169】在一些實施例中，個體在投與細胞之前經預處理。預處理可包含有助於T細胞功能及/或存活之任何物質。在一些實施例中，預處理包括向個體投與化學療法、細胞介素、蛋白質、小分子或其任何組合。在一些實施例中，預處理包括投與介白素。在一些實施例中，預處理包括投與IL-2、IL-4、IL-7、IL-9、IL-15、IL-21或其任何組合。在一些實施例中，預處理包括投與環磷醯胺、氟達拉濱或兩者。在一些實施例中，預處理包括投與維生素C、AKT抑制劑、ATRA(vesanoid，維甲酸)、雷帕黴素或其任何組合。

### III.B. 對靶向抗原之細胞進行工程改造之方法

【0170】本發明之某些態樣係有關對靶向抗原之細胞進行工程改造之方法。在一些實施例中，抗原為NY-ESO-1抗原。在一些實施例中，該方法包括用本文所揭示之核酸分子或本文所揭示之載體轉導細胞。細胞可為本文所描

述之任何細胞。在一些實施例中，細胞為本文所描述之T細胞。在一些實施例中，細胞為如本文所描述經修飾以表現CD3之細胞。在一些實施例中，細胞(例如T細胞)係獲自需要T細胞療法之個體。在一些實施例中，細胞係獲自除需要T細胞療法之個體外的供體。在一些實施例中，細胞為T細胞或自然殺手細胞。

### III.C. 富集T細胞之目標群體之方法

【0171】本發明之某些態樣係有關富集獲自人類個體之T細胞之目標群體的方法。在一些實施例中，該方法包括使T細胞與本文所揭示之HLA I類分子接觸。在一些實施例中，該方法包括使T細胞與本文所揭示之APC接觸。在一些實施例中，在接觸之後，相對於接觸之前能夠結合HLA I類分子之T細胞數目，經富集之T細胞群體包含較高數目之能夠結合HLA I類分子的T細胞。

【0172】在一些實施例中，該方法包括使T細胞在活體外與肽接觸，其中該肽包含SEQ ID NO: 13中所列之胺基酸序列。在一些實施例中，該方法包括使T細胞在活體外與肽接觸，其中該肽由SEQ ID NO: 13中所列之胺基酸序列組成。在一些實施例中，在接觸之後，相對於接觸之前能夠結合HLA I類分子之T細胞數目，經富集之T細胞群體包含較高數目之能夠結合HLA I類分子的T細胞。

【0173】本發明之一些態樣係有關一種選擇能夠靶向腫瘤細胞之T細胞的方法。在一些實施例中，該方法包括

使經分離T細胞之群體在活體外與肽接觸，其中該肽由如SEQ ID NO: 13中所列之胺基酸序列組成。在一些實施例中，T細胞係獲自人類個體。

【0174】獲自人類個體之T細胞可為本文所揭示之任何T細胞。在一些實施例中，獲自人類個體之T細胞為腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)。

【0175】在一些實施例中，該方法進一步包括向人類個體投與經富集之T細胞。在一些實施例中，如本文所描述，個體在接受T細胞之前經預處理。

【0176】本文所描述之各種態樣、實施例及選擇全部可以任何及所有變化型式組合。

【0177】本說明書中提及之所有出版物、專利以及專利申請案以引用之方式併入本文中，所達到之程度如同特定地且個別地指示各個別出版物、專利或專利申請案以引用之方式併入一般。

【0178】在已總體上描述了本發明之情況下，可通過參考本文所提供之實例獲得進一步理解。此等實例僅用於說明之目的且不在具限制性。

## 實例

### 實例1

【0179】自轉移性黑色素瘤患者分離TIL，接著在活體外進行多純系擴增，且針對HLA-C\*03:04等位基因檢驗其NY-ESO-1抗原特異性。已將使用肽/HLA(pHLA)多聚體

之基於結構之分析與功能分析的組合用於量測Ag-特異性T細胞反應。

【0180】由於pHLA多聚體產生需要使用具有已知確切序列之肽，故使用基於pHLA多聚體之策略針對新抗原決定基肽進行高通量篩選為不直接或實際的。除使用pHLA多聚體之基於結構之分析外，亦可應用功能分析來測定T細胞之抗原特異性。吾人使用人工抗原呈遞細胞(APC)進行功能分析，該等人工抗原呈遞細胞可處理和加工較長之肽且作為刺激細胞經由I類分子呈遞抗原決定基肽。使用用於涵蓋NY-ESO-1之全蛋白的重疊肽(表5)對HLA-C\*03:04人工APC進行脈衝處理且在細胞介素ELISPOT分析中用作刺激劑。當用使用NY-ESO-1衍生之重疊肽脈衝處理之C\*03:04-人工APC刺激時，在IFN- $\gamma$  ELISPOT分析中，C\*03:04<sup>+</sup>黑色素瘤TIL顯示對具有共同擁有之序列<sub>91</sub>YLAMPFATPM<sub>100</sub>之三個相鄰肽的陽性反應(圖1)。使用一系列突變體缺失肽，吾人確定了由C\*03:04分子呈遞之最低需求肽抗原決定基<sub>92</sub>LAMPFATPM<sub>100</sub>。重要地，C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub>多聚體成功染色達至18.2%之多純系擴增之TIL，表明C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub>T細胞為TIL之優勢群體(圖2A-2C)。根據ELISPOT分析，多聚體陽性T細胞以HLA限制性肽特異性方式分泌可偵測之IFN- $\gamma$ (圖3)。

表 5. NY-ESO-1 重疊肽

| 位置  | 肽序列                   | SEQ ID NO |
|-----|-----------------------|-----------|
| 1   | MQAEGRGTGGSTGDADGPGG  | 19        |
| 6   | RGTGGSTGDADGPGGPGIPD  | 20        |
| 11  | STGDADGPGGPGIPDGPGGN  | 21        |
| 16  | DGPGGPGIPDGPGGNAGGPG  | 22        |
| 21  | PGIPDGPGGNAGGPGGEAGAT | 23        |
| 26  | GPGGNAGGPGGEAGATGGRGP | 24        |
| 31  | AGGPGEAGATGGRGPRGAGA  | 25        |
| 36  | EAGATGGRGPRGAGAARASG  | 26        |
| 41  | GGRGPRGAGAARASGPGGGA  | 27        |
| 46  | RGAGAARASGPGGGAPRGPH  | 28        |
| 51  | ARASGPGGGAPRGPHGGAAS  | 29        |
| 56  | PGGGAPRGPHGGAASGLNGC  | 30        |
| 61  | PRGPHGGAASGLNGCCRCGA  | 31        |
| 66  | GGAASGLNGCCRCGARGPES  | 32        |
| 71  | GLNGCCRCGARGPESRLLEF  | 33        |
| 76  | CRCGARGPESRLLEFYLAMP  | 34        |
| 81  | RGPESRLLEFYLAMPFATPM  | 35        |
| 86  | RLLEFYLAMPFATPMEELA   | 36        |
| 91  | YLAMPFATPMEELARRSLA   | 37        |
| 96  | FATPMEELARRSLAQDAPP   | 38        |
| 101 | EAELARRSLAQDAPPLVPG   | 39        |
| 106 | RRSLAQDAPPLVPGVLLKE   | 40        |
| 111 | QDAPPLVPGVLLKEFTVSG   | 41        |
| 116 | LPVPGVLLKEFTVSGNILT   | 42        |
| 121 | VLLKEFTVSGNILTIRLTAA  | 43        |
| 126 | FTVSGNILTIRLTAAADHRQL | 44        |
| 131 | NILTIRLTAAADHRQLQLSIS | 45        |
| 136 | RLTAADHRQLQLSISSCLQQ  | 46        |
| 141 | DHRQLQLSISSCLQQLSLLM  | 47        |
| 146 | QLSISSCLQQLSLLMWITQC  | 48        |
| 151 | SCLQQLSLLMWITQCFLPVF  | 49        |
| 156 | LSLLMWITQCFLPVFLAQPP  | 50        |
| 161 | WITQCFLPVFLAQPPSGQRR  | 51        |

【0181】收集多聚體陽性抗腫瘤T細胞且對其TCR基因進行分子選殖(圖4A-4I，SEQ ID NO: 1及2)。藉由TCR重構T細胞之多聚體染色及ELISPOT分析來驗證經選殖TCR之抗原特異性及功能反應性。當基於原代T細胞重構時，C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub> TCR轉導之T細胞在同源多聚

體情況下成功染色(圖 5A-5D)且與由表面 C\*03:04 分子呈遞之 NY-ESO-1<sub>92-100</sub> 肽強烈反應(圖 6)。重要的是，此等細胞能夠識別天然表現 NY-ESO-1 基因之 C\*03:04 匹配且未經肽脈衝處理之腫瘤細胞。雖然 A375 與 SK-MEL-37 黑色素瘤細胞株均針對 C\*03:04 為陰性的，但其內源地表現 NY-ESO-1 基因。當 C\*03:04 分子異位表現時，兩種黑色素瘤細胞株均由 C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub> TCR 轉導之 T 細胞成功識別。此外，缺乏 NY-ESO-1 之內源表現的 SK-MEL-21 黑色素瘤細胞在全長 NY-ESO-1 基因經轉導時變得對 C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub> TCR 轉導之 T 細胞具反應性(圖 7A-7B、8A-8E 及 9A-9D)。此等結果清楚地證實 C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub> TCR 轉導之 T 細胞充分熱衷於識別腫瘤細胞且經選殖之 C\*03:04/NY-ESO-1<sub>92-100</sub> TCR 為腫瘤反應性的。

【0182】新選殖之腫瘤反應性 C\*03:04 限制性 NY-ESO-1 TCR 基因的使用可將抗 NY-ESO-1 TCR 基因療法之適用性加寬至 HLA-A\*02:01 陽性癌症患者以外。

## 方法

### 細胞樣品

【0183】在機構審查委員會批准之後自健康供體獲得外周血樣品。經由密度梯度離心(Ficoll-Paque PLUS；GE Healthcare)獲得單核細胞。K562 為具有缺陷型 HLA 表現之紅白血病細胞株。T2 為 HLA-A\*02:01<sup>+</sup> T 細胞白血病/B-LCL 雜合細胞株。Jurkat 76 為缺乏 TCR 及 CD8 表現之 T 細胞

白血病細胞株。A375、SK-MEL-21、SK-MEL-37及LM-MEL-53為黑色素瘤細胞株。使除LM-MEL-53外之黑色素瘤細胞株在補充有10% FBS及50  $\mu\text{g/ml}$ 慶大黴素(Invitrogen)之DMEM中生長。將K562、T2、Jurkat 76及LM-MEL-53細胞株在補充有10% FBS及50  $\mu\text{g/ml}$ 慶大黴素之RPMI 1640中培養。使分離自轉移性黑色素瘤患者之TIL在活體外生長。

### 肽

【0184】將合成肽在DMSO中溶解至50  $\mu\text{g/ml}$ 。所用之肽為用於涵蓋NY-ESO-1之全蛋白的20聚體重疊肽以及C\*03:04限制性NY-ESO-1<sub>92-100</sub>(LAMPFATPM)、MAGE-A1<sub>230-238</sub>(SAYGEPRKL)及HIV gag<sub>164-172</sub>(YVDRFFKTL)肽。使用MAGE-A1<sub>230-238</sub>及HIV gag<sub>164-172</sub>肽作為陰性對照。

### 基因

【0185】使HLA-C\*03:04基因經由內部核糖體進入位點與截短型式之人類神經生長因子受體( $\Delta\text{NGFR}$ )稠合。使用抗NGFR單株抗體(mAb)分離 $\Delta\text{NGFR}$ 轉導之細胞。經由RT-PCR根據所公佈之序列(SEQ ID NO: 52)自Me275細胞選殖全長NY-ESO-1基因。使用SMARTer RACE cDNA擴增套組(Takara Bio)藉由cDNA末端5'-快速擴增(RACE)PCR對TCR基因進行選殖。為選殖TCR $\alpha$ 基因，對於第一輪PCR，使用所供應之5'-RACE引物及3'-TCR $\alpha$ 未轉譯區引物(5'-

GGAGAGTTCCCTCTGTTTGGAGAG-3' ; SEQ ID NO: 57) 擴增 cDNA 。 使用 經 修 飾 之 5'-RACE 引 物 (5'-GTGTGGTGGTACGGGAATTCAAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT-3' ; SEQ ID NO: 58) 及 3'-TCR $\alpha$  引 物 (5'-ACCACTGTGCTGGCGGCCGCTCAGCTGGACCACAGCCGCAGCG-3' ; SEQ ID NO: 59) 進行第二輪 PCR 。 為 選 殖 TCR $\beta$  基 因 ， 對 於 第一輪 PCR ， 使 用 所 供 應 之 5'-RACE 引 物 及  $\beta$  C 區 特 異 性 反 向 引 物 3'-C $\beta$ -1 (5'-ATCGTCGACCACTGTGCTGGCGGCCGCTCGAGTTCCAGGGCTGCCTTCAGAAATCC-3' ; SEQ ID NO: 60) 及 3'-C $\beta$ -2 (5'-GACCACTGTGCTGGCGGCCGCTCGAGCTAGCCTCTGGAATCCTTTCTCTTGACCATTGC-3' ; SEQ ID NO: 61) 擴增 cDNA 。 使用 經 修 飾 之 5'-RACE 引 物 及  $\beta$  C 區 特 異 性 反 向 引 物 進 行 第二輪 PCR 。 TCR $\alpha$  及  $\beta$  基 因 等 位 基 因 名 稱 符 合 國 際 ImMunoGeneTics 資 訊 系 統 唯 一 基 因 命 名 法 (<http://www.imgt.org>) 。 將 所 有 基 因 選 殖 至 pMX 反 轉 錄 病 毒 載 體 中 且 使 用 基 於 293GPG 細 胞 之 反 轉 錄 病 毒 系 統 轉 導 。

### 轉染體

【0186】 用 個 別 TCR $\alpha$  及 TCR $\beta$  基 因 轉 導 Jurkat 76/CD8 細 胞 。 使 用 CD3 微 珠 粒 (Miltenyi Biotec) 將 Jurkat 76/CD8 衍 生 之 TCR 轉 染 體 純 化 (>95% 純 度) 。 先 前 已 報 道 基 於 K562 之 人 工 APC 個 別 地 將 各 種 HLA I 類 基 因 表 現 為 單 一 HLA 等 位 基 因 與 CD80 及 CD83 結 合 (Butler 及 Hirano, *Immunol. Rev.* 257:191-209(2014) ; Hirano 等 人, *Clin. Cancer Res.* 12:2967

-75(2006))。使用PG13衍生之反轉錄病毒上清液將TCR基因轉導至人類原代T細胞中。使用TransIT293(Mirus Bio)將TCR基因轉染至293GPG細胞株中。用全長NY-ESO-1基因反轉錄病毒轉導NY-ESO-1<sup>+</sup> SK-MEL-21細胞以產生SK-MEL-21/NY-ESO-1細胞。在用抗NY-ESO-1 mAb(純系D1Q2U; Cell Signaling Technology)染色之後藉由流式細胞術評估經轉導之NY-ESO-1的表現。

【0187】用HLA-C\*03:04反轉錄病毒轉導HLA-C\*03:04<sup>+</sup>A375及SK-MEL-37細胞以產生A375/C\*03:04及SK-MEL-37/C\*03:04細胞。用如上文所描述之 $\Delta$ NGFR基因標記HLA-C\*03:04基因，且將 $\Delta$ NGFR<sup>+</sup>細胞純化(>95%純度)且用於後續實驗中。反轉錄病毒轉導單獨的 $\Delta$ NGFR基因作為對照。

### 流式細胞術及細胞分選

【0188】將細胞表面分子用PC5綴合之抗CD8 mAb(純系B9.11; Beckman Coulter)、FITC綴合之抗NGFR(純系ME20.4; Biolegend)及APC/Cy7綴合之抗CD3(純系UCHT1; Biolegend)染色。用活/死可固定水性死細胞染色套組(LIVE/DEAD Fixable Aqua Dead Cell Stain kit, Life Technologies)辯別死細胞。對於細胞內染色，將細胞固定且藉由使用Cytofix/Cytoperm套組(BD Biosciences)透性化。用流式細胞術(BD Biosciences)分析經染色之細胞，且使用FlowJo(Tree Star)進行資料分析。使用FACS Aria

II(BD Bioscience)進行細胞分選。

### 細胞介素ELISPOT分析

【0189】如先前所描述進行IFN- $\gamma$  ELISPOT分析(參見例如 Kagoya 等人, *Nat. Commun.* 9:1915(2018); Anczurowski等人, *Sci. Rep.* 8:4804(2018); 及 Yamashita 等人, *Nat Commun.* 8:15244(2017))。將PVDF板(Millipore, Bedford, MA)用捕獲mAb(1-D1K; MABTECH, Mariemont, OH)包被, 且在存在或不存在肽之情況下將T細胞與每孔 $2 \times 10^4$ 個目標細胞一起在37°C下孵育20-24小時。隨後將板洗滌且與生物素綴合之偵測mAb(7-B6-1; MABTECH)一起孵育。接著添加HRP綴合之SA(Jackson ImmunoResearch), 且使IFN- $\gamma$ 點顯影。藉由用冷自來水充分沖洗使反應停止。掃描ELISPOT板且使用免疫墨點讀板儀及免疫墨點5.0版軟體(Cellular Technology Limited, Shaker Heights, OH)計數。

### 用經選殖之TCR轉導之原代CD8<sup>+</sup> T細胞的擴增

【0190】使用全T細胞分離套組(Miltenyi Biotec)通過負磁選將CD3<sup>+</sup> T細胞純化。以20:1之E:T比率用經200 Gy照射之人工APC/mOKT3刺激經純化之T細胞。從第二天開始, 經由連續3天在32°C下在1,000 g下離心1小時用經選殖之TCR基因反轉錄病毒轉導經活化之T細胞。在第二天, 將100 IU/ml IL-2及10 ng/ml IL-15添加至TCR轉導之T細胞

中。每2-3天補充一次培養基。

### *基於哺乳動物細胞之pHLA多聚體之製備*

【0191】將親和力成熟之HLA I類基因工程改造以帶有在 $\alpha 2$ 結構域之位置115的代替Gln(Q)殘基的Glu(E)殘基及替代HLA I類 $\alpha 3$ 結構域的小鼠K<sup>b</sup>基因衍生之 $\alpha 3$ 結構域。藉由使親和力成熟之HLA I類基因之細胞外結構域依次與Gly-Ser(GS)柔性接頭及6x His標籤融合，吾人產生了可溶性HLA類別I<sup>Q115E</sup>-K<sup>b</sup>基因。使用基於293GPG細胞之反轉錄病毒系統用各種可溶性HLA類別I<sup>Q115E</sup>-K<sup>b</sup>基因以及 $\beta 2m$ 基因個別地轉導HEK293T細胞<sup>43</sup>。使異位表現可溶性親和力成熟之類別I<sup>Q115E</sup>-K<sup>b</sup>之穩定HEK293T細胞生長至匯合，且接著更換培養基。四十八小時後，收穫條件培養基且即刻使用或冷凍直至使用。將由HEK293T轉染體產生之含有可溶性HLA類別I<sup>Q115E</sup>-K<sup>b</sup>之上清液與100-1000  $\mu\text{g/ml}$ 之相關I類限制性肽在37°C下孵育隔夜用於活體外肽交換。以2:1莫耳比使用綴合至諸如藻紅素(PE)之螢光染料的抗His mAb(純系AD1.1.10；Abcam)將加載有肽之可溶性單聚類別I<sup>Q115E</sup>-K<sup>b</sup>二聚化，在室溫下持續2小時或在4°C下隔夜。分別使用抗全I類mAb(純系W6/32，內部)及抗His標籤生物素化mAb(純系AD1.1.10，R&D systems)作為捕獲及偵測Ab藉由特異性ELISA量測功能性可溶性HLA類別I<sup>Q115E</sup>-K<sup>b</sup>分子之濃度。

*pHLA* 多聚體染色

【0192】在存在 50 nM 達沙替尼 (dasatinib)(LC laboratories)之情況下，將 T細胞 ( $1 \times 10^5$ ) 在 37°C 下孵育 30 分鐘。接著將細胞洗滌且與 5-10  $\mu\text{g/ml}$  之多聚體一起在室溫下孵育 30 分鐘，且在 4°C 下添加 R-藻紅素綴合之 AffiniPure Fab 片段山羊抗小鼠 IgG1(Jackson ImmunoResearch Laboratories)持續 15 分鐘。接著，將細胞洗滌三次且在 4°C 下與抗 CD8 mAb 共染色 15 分鐘。最後使用活/死可固定死細胞染色套組辯別死細胞。

## 統計分析

【0193】使用 GraphPad Prism 5.0e 進行統計分析。為確定兩個組之給定變數是否顯著不同，吾人使用韋爾奇氏 t 檢驗 (Welch's t test)(雙側)進行分析。 $P$  值  $< 0.05$  被視為顯著的。

【序列表】

- <110> 大學健康網絡(University Health Network)
- <120> T 細胞受體及其使用方法
- <140> TW 109107114
- <141> 2020-03-04
- <150> US 62/813,639
- <151> 2019-03-04
- <160> 61
- <170> PatentIn 3.5 版
- <210> 1
- <211> 273
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> α 鏈胺基酸序列
- <400> 1

Met Leu Leu Glu Leu Ile Pro Leu Leu Gly Ile His Phe Val Leu Arg  
1 5 10 15  
Thr Ala Arg Ala Gln Ser Val Thr Gln Pro Asp Ile His Ile Thr Val  
20 25 30  
Ser Glu Gly Ala Ser Leu Glu Leu Arg Cys Asn Tyr Ser Tyr Gly Ala  
35 40 45  
Thr Pro Tyr Leu Phe Trp Tyr Val Gln Ser Pro Gly Gln Gly Leu Gln  
50 55 60  
Leu Leu Leu Lys Tyr Phe Ser Gly Asp Thr Leu Val Gln Gly Ile Lys  
65 70 75 80  
Gly Phe Glu Ala Glu Phe Lys Arg Ser Gln Ser Ser Phe Asn Leu Arg  
85 90 95  
Lys Pro Ser Val His Trp Ser Asp Ala Ala Glu Tyr Phe Cys Ala Gly  
100 105 110  
Met Asp Ser Asn Tyr Gln Leu Ile Trp Gly Ala Gly Thr Lys Leu Ile  
115 120 125  
Ile Lys Pro Asp Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg  
130 135 140  
Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp  
145 150 155 160  
Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr  
165 170 175

Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser  
180 185 190

Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe  
195 200 205

Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser  
210 215 220

Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn  
225 230 235 240

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu  
245 250 255

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser  
260 265 270

Glx

<210> 2  
<211> 311  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> β鏈胺基酸序列

<400> 2

Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Val Ala Phe Ser Leu Leu Trp Ala  
1 5 10 15

Ser Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu  
20 25 30

Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His  
35 40 45

Asn Ser Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu  
50 55 60

Ile Tyr Tyr Ser Ala Ser Glu Gly Thr Thr Asp Lys Gly Glu Val Pro  
65 70 75 80

Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Leu Asn Lys Arg Glu Phe Ser Leu Arg  
85 90 95

Leu Glu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser  
100 105 110

Ser Leu Pro Leu Gly Tyr Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu  
115 120 125

Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
130 135 140

Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
145 150 155 160

Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
165 170 175

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln  
180 185 190

Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
195 200 205

Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
210 215 220

Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
225 230 235 240

Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
245 250 255

Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly  
260 265 270

Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr  
275 280 285

Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys  
290 295 300

Arg Lys Asp Ser Arg Gly Glx  
305 310

- <210> 3
- <400> 3  
000
- <210> 4
- <400> 4  
000
- <210> 5
- <211> 6
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)



<211> 13  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223>  $\beta$  CDR3

<400> 10

Cys Ala Ser Ser Leu Pro Leu Gly Tyr Glu Gln Tyr Phe  
1 5 10

<210> 11

<400> 11  
000

<210> 12

<400> 12  
000

<210> 13  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 抗原決定基

<400> 13

Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met  
1 5

<210> 14

<400> 14  
000

<210> 15

<400> 15  
000

<210> 16  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> B2m 胺基酸序列

<400> 16

Met Ser Arg Ser Val Ala Leu Ala Val Leu Ala Leu Leu Ser Leu Ser  
1 5 10 15

Gly Leu Glu Ala Ile Gln Arg Thr Pro Lys Ile Gln Val Tyr Ser Arg  
20 25 30

His Pro Ala Glu Asn Gly Lys Ser Asn Phe Leu Asn Cys Tyr Val Ser  
35 40 45

Gly Phe His Pro Ser Asp Ile Glu Val Asp Leu Leu Lys Asn Gly Glu  
50 55 60

Arg Ile Glu Lys Val Glu His Ser Asp Leu Ser Phe Ser Lys Asp Trp  
65 70 75 80

Ser Phe Tyr Leu Leu Tyr Tyr Thr Glu Phe Thr Pro Thr Glu Lys Asp  
85 90 95

Glu Tyr Ala Cys Arg Val Asn His Val Thr Leu Ser Gln Pro Lys Ile  
100 105 110

Val Lys Trp Asp Arg Asp Met  
115

<210> 17  
<211> 819  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> α鏈核苷酸序列

<400> 17  
atgctcctgg agcttatccc actgctgggg atacattttg tcctgagaac tgccagagcc 60  
cagtcagtga cccagcctga catccacatc actgtctctg aaggagcctc actggagttg 120  
agatgtaact attcctatgg ggcaacacct tatctcttct ggtatgtcca gtcccccggc 180  
caaggcctcc agctgctcct gaagtacttt tcaggagaca ctctggttca aggcattaaa 240  
ggctttgagg ctgaatttaa gaggagtcaa tcttccttca atctgaggaa accctctgtg 300  
cattggagtg atgctgctga gtacttctgt gccggcatgg atagcaacta tcagttaatc 360  
tggggcgctg ggaccaagct aattataaag ccagatatcc agaaccctga ccctgccgtg 420  
taccagctga gagactctaa atccagtgaac aagtctgtct gcctattcac cgattttgat 480  
tctcaaacaa atgtgtcaca aagtaaggat tctgatgtgt atatcacaga caaaactgtg 540  
ctagacatga ggtctatgga cttcaagagc aacagtgtg tggcctggag caacaaatct 600  
gactttgcat gtgcaaacgc cttcaacaac agcattattc cagaagacac cttcttcccc 660  
agcccagaaa gttcctgtga tgtcaagctg gtcgagaaaa gctttgaaac agatacgaac 720  
ctaaactttc aaaacctgtc agtgattggg ttccgaatcc tcctcctgaa agtggccggg 780  
tttaatctgc tcatgacgct gcggctgtgg tccagctga 819

<210> 18  
<211> 933  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> β鏈核苷酸序列

<400> 18  
atgagcatcg ggctcctgtg ctgtgtggcc ttttctctcc tgtgggcaag tccagtgaat 60  
gctgggtgtca ctcagacccc aaaattccag gtccctgaaga caggacagag catgacactg 120  
cagtgtgccc aggatatgaa ccataactcc atgtactggg atcgacaaga cccaggcatg 180  
ggactgaggc tgatttatta ctcagcttct gagggtagca ctgacaaagg agaagtcctc 240  
aatggctaca atgtctccag attaaacaaa cgggagttct cgctcaggct ggagtcggct 300  
gtccctccc agacatctgt gtacttctgt gccagcagtc tccctctagg ctacgagcag 360  
tacttcgggc cgggcaccag gctcacggtc acagaggacc tgaaaaacgt gttcccaccc 420  
gaggtcgctg tgtttgagcc atcagaagca gagatctccc acacccaaaa ggccacactg 480  
gtgtgcctgg ccacaggctt ctaccccgac cacgtggagc tgagctgggt ggtgaatggg 540  
aaggaggtgc acagtggggt cagcacagac ccgcagcccc tcaaggagca gcccgccctc 600  
aatgactcca gatactgcct gagcagccgc ctgagggtct cgccacctt ctggcagaac 660  
ccccgaacc acttccgctg tcaagtcag ttctacgggc tctcgagaa tgacgagtgg 720  
accagcata gggccaaacc tgtcaccag atcgtcagcg ccgaggcctg gggtagagca 780  
gactgtggct tcacctccga gtcttaccag caaggggtcc tgtctgccac catcctctat 840  
gagatcttgc tagggaaggc caccttgtat gccgtgctgg tcagtgcctt cgtgctgatg 900  
gccaatggtca agagaaagga ttccagaggc tag 933

<210> 19  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 19  
Met Gln Ala Glu Gly Arg Gly Thr Gly Gly Ser Thr Gly Asp Ala Asp  
1 5 10 15  
  
Gly Pro Gly Gly  
20

<210> 20  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 20  
Arg Gly Thr Gly Gly Ser Thr Gly Asp Ala Asp Gly Pro Gly Gly Pro  
1 5 10 15

Gly Ile Pro Asp  
20

<210> 21  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 21

Ser Thr Gly Asp Ala Asp Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ile Pro Asp Gly  
1 5 10 15

Pro Gly Gly Asn  
20

<210> 22  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 22

Asp Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ile Pro Asp Gly Pro Gly Gly Asn Ala  
1 5 10 15

Gly Gly Pro Gly  
20

<210> 23  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 23

Pro Gly Ile Pro Asp Gly Pro Gly Gly Asn Ala Gly Gly Pro Gly Glu  
1 5 10 15

Ala Gly Ala Thr  
20

<210> 24  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 24

Gly Pro Gly Gly Asn Ala Gly Gly Pro Gly Glu Ala Gly Ala Thr Gly  
1 5 10 15

Gly Arg Gly Pro  
20

<210> 25  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 25

Ala Gly Gly Pro Gly Glu Ala Gly Ala Thr Gly Gly Arg Gly Pro Arg  
1 5 10 15

Gly Ala Gly Ala  
20

<210> 26  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 26

Glu Ala Gly Ala Thr Gly Gly Arg Gly Pro Arg Gly Ala Gly Ala Ala  
1 5 10 15

Arg Ala Ser Gly  
20

<210> 27  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 27

Gly Gly Arg Gly Pro Arg Gly Ala Gly Ala Ala Arg Ala Ser Gly Pro  
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ala  
20

<210> 28  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽  
  
<400> 28  
Arg Gly Ala Gly Ala Ala Arg Ala Ser Gly Pro Gly Gly Gly Ala Pro  
1 5 10 15  
  
Arg Gly Pro His  
20

<210> 29  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽  
  
<400> 29  
Ala Arg Ala Ser Gly Pro Gly Gly Gly Ala Pro Arg Gly Pro His Gly  
1 5 10 15  
  
Gly Ala Ala Ser  
20

<210> 30  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽  
  
<400> 30  
Pro Gly Gly Gly Ala Pro Arg Gly Pro His Gly Gly Ala Ala Ser Gly  
1 5 10 15  
  
Leu Asn Gly Cys  
20

<210> 31  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽  
  
<400> 31  
Pro Arg Gly Pro His Gly Gly Ala Ala Ser Gly Leu Asn Gly Cys Cys  
1 5 10 15  
  
Arg Cys Gly Ala  
20

<210> 32  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
<220>  
<223> 合成肽  
  
<400> 32

Gly Gly Ala Ala Ser Gly Leu Asn Gly Cys Cys Arg Cys Gly Ala Arg  
1 5 10 15  
  
Gly Pro Glu Ser  
20

<210> 33  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
<220>  
<223> 合成肽  
  
<400> 33

Gly Leu Asn Gly Cys Cys Arg Cys Gly Ala Arg Gly Pro Glu Ser Arg  
1 5 10 15  
  
Leu Leu Glu Phe  
20

<210> 34  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
<220>  
<223> 合成肽  
  
<400> 34

Cys Arg Cys Gly Ala Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu Phe Tyr  
1 5 10 15  
  
Leu Ala Met Pro  
20

<210> 35  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
<220>  
<223> 合成肽  
  
<400> 35

Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Ala Met Pro Phe  
1 5 10 15

Ala Thr Pro Met  
20

- <210> 36
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> 合成肽
- <400> 36

Arg Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu  
1 5 10 15

Ala Glu Leu Ala  
20

- <210> 37
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> 合成肽
- <400> 37

Tyr Leu Ala Met Pro Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala Arg  
1 5 10 15

Arg Ser Leu Ala  
20

- <210> 38
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> 合成肽
- <400> 38

Phe Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ser Leu Ala Gln  
1 5 10 15

Asp Ala Pro Pro  
20

- <210> 39
- <211> 20
- <212> PRT
- <213> 人工序列(Artificial Sequence)
- <220>
- <223> 合成肽

<400> 39

Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ser Leu Ala Gln Asp Ala Pro Pro Leu  
1 5 10 15

Pro Val Pro Gly  
20

<210> 40  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 40

Arg Arg Ser Leu Ala Gln Asp Ala Pro Pro Leu Pro Val Pro Gly Val  
1 5 10 15

Leu Leu Lys Glu  
20

<210> 41  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 41

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

Thr Val Ser Gly  
20

<210> 42  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 42

Leu Pro Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val Ser Gly Asn  
1 5 10 15

Ile Leu Thr Ile  
20

<210> 43  
<211> 20



20

<210> 47  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 47

Asp His Arg Gln Leu Gln Leu Ser Ile Ser Ser Cys Leu Gln Gln Leu  
1 5 10 15

Ser Leu Leu Met  
20

<210> 48  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 48

Gln Leu Ser Ile Ser Ser Cys Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp  
1 5 10 15

Ile Thr Gln Cys  
20

<210> 49  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 49

Ser Cys Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe  
1 5 10 15

Leu Pro Val Phe  
20

<210> 50  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 合成肽

<400> 50

Leu Ser Leu Leu Met Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu  
1 5 10 15

Ala Gln Pro Pro  
20

<210> 51  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
<220>  
<223> 合成肽  
  
<400> 51

Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser  
1 5 10 15

Gly Gln Arg Arg  
20

<210> 52  
<211> 180  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
  
<220>  
<223> NY-ESO-1 胺基酸序列  
  
<400> 52

Met Gln Ala Glu Gly Arg Gly Thr Gly Gly Ser Thr Gly Asp Ala Asp  
1 5 10 15

Gly Pro Gly Gly Pro Gly Ile Pro Asp Gly Pro Gly Gly Asn Ala Gly  
20 25 30

Gly Pro Gly Glu Ala Gly Ala Thr Gly Gly Arg Gly Pro Arg Gly Ala  
35 40 45

Gly Ala Ala Arg Ala Ser Gly Pro Gly Gly Gly Ala Pro Arg Gly Pro  
50 55 60

His Gly Gly Ala Ala Ser Gly Leu Asn Gly Cys Cys Arg Cys Gly Ala  
65 70 75 80

Arg Gly Pro Glu Ser Arg Leu Leu Glu Phe Tyr Leu Ala Met Pro Phe  
85 90 95

Ala Thr Pro Met Glu Ala Glu Leu Ala Arg Arg Ser Leu Ala Gln Asp  
100 105 110

Ala Pro Pro Leu Pro Val Pro Gly Val Leu Leu Lys Glu Phe Thr Val  
115 120 125

Ser Gly Asn Ile Leu Thr Ile Arg Leu Thr Ala Ala Asp His Arg Gln  
130 135 140

Leu Gln Leu Ser Ile Ser Ser Cys Leu Gln Gln Leu Ser Leu Leu Met  
145 150 155 160

Trp Ile Thr Gln Cys Phe Leu Pro Val Phe Leu Ala Gln Pro Pro Ser  
165 170 175

Gly Gln Arg Arg  
180

- <210> 53  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> siRNA-TCRa-1

<400> 53  
guaaggauc ugauguguat t21
- <210> 54  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> siRNA-TCRa-2

<400> 54  
uacacaucag aaucuuact t21
- <210> 55  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> siRNA-TCRb-1

<400> 55  
ccaccauccu cuaugagaut t21
- <210> 56  
<211> 21  
<212> DNA  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> siRNA-TCRb-2

<400> 56  
aucucauaga ggaugguggt t21
- <210> 57  
<211> 24

|       |                                                                  |    |
|-------|------------------------------------------------------------------|----|
| <212> | DNA                                                              |    |
| <213> | 人工序列(Artificial Sequence)                                        |    |
| <220> |                                                                  |    |
| <223> | 3-TCR $\alpha$ 未轉譯區引物                                            |    |
| <400> | 57                                                               |    |
|       | ggagagttcc ctctgtttgg agag                                       | 24 |
| <210> | 58                                                               |    |
| <211> | 43                                                               |    |
| <212> | DNA                                                              |    |
| <213> | 人工序列(Artificial Sequence)                                        |    |
| <220> |                                                                  |    |
| <223> | 經修飾 5'-RACE 引物                                                   |    |
| <400> | 58                                                               |    |
|       | gtgtgtgtggt acgggaattc aagcagtgggt atcaacgcag agt                | 43 |
| <210> | 59                                                               |    |
| <211> | 43                                                               |    |
| <212> | DNA                                                              |    |
| <213> | 人工序列(Artificial Sequence)                                        |    |
| <220> |                                                                  |    |
| <223> | 3'-TCR-a 引物                                                      |    |
| <400> | 59                                                               |    |
|       | accactgtgc tggcggccgc tcagctggac cacagccgca gcg                  | 43 |
| <210> | 60                                                               |    |
| <211> | 56                                                               |    |
| <212> | DNA                                                              |    |
| <213> | 人工序列(Artificial Sequence)                                        |    |
| <220> |                                                                  |    |
| <223> | $\beta$ C 區特異性反向引物 3-C $\beta$ -1                                |    |
| <400> | 60                                                               |    |
|       | atcgtcgacc actgtgctgg cggccgctcg agttccaggg ctgccttcag aaatcc    | 56 |
| <210> | 61                                                               |    |
| <211> | 59                                                               |    |
| <212> | DNA                                                              |    |
| <213> | 人工序列(Artificial Sequence)                                        |    |
| <220> |                                                                  |    |
| <223> | $\beta$ C 區特異性反向引物 3-C $\beta$ -2                                |    |
| <400> | 61                                                               |    |
|       | gaccactgtg ctggcggccg ctcgagctag cctctggaat cctttctctt gaccattgc | 59 |

## 【發明申請專利範圍】

【請求項1】一種核酸分子，其包含：

(i)第一核苷酸序列，其編碼特異性結合由如SEQ ID NO: 13中所列之胺基酸序列組成的人類NY-ESO-1的抗原決定基之重組T細胞受體(TCR)或其抗原結合部分(「抗NY-ESO-1 TCR」)，其中該抗原決定基與HLA I類分子HLA-C\*03等位基因複合，其中該抗NY-ESO-1 TCR包含 $\alpha$ 鏈及 $\beta$ 鏈，其中該 $\alpha$ 鏈包含可變域且該 $\alpha$ 鏈包含之可變域包含 $\alpha$ 鏈CDR1、 $\alpha$ 鏈CDR2及 $\alpha$ 鏈CDR3，且其中該 $\beta$ 鏈包含可變域且該 $\beta$ 鏈包含之可變域包含 $\beta$ 鏈CDR1、 $\beta$ 鏈CDR2及 $\beta$ 鏈CDR3，且其中：

(1)該抗NY-ESO-1 TCR之該 $\beta$ 鏈CDR3包含如SEQ ID NO: 10中所列之胺基酸序列；

(2)該抗NY-ESO-1 TCR之該 $\beta$ 鏈CDR2包含如SEQ ID NO: 9中所列之胺基酸序列；

(3)該抗NY-ESO-1 TCR之該 $\beta$ 鏈CDR1包含如SEQ ID NO: 8中所列之胺基酸序列；

(4)該抗NY-ESO-1 TCR之該 $\alpha$ 鏈CDR3包含如SEQ ID NO: 7中所列之胺基酸序列；

(5)該抗NY-ESO-1 TCR之該 $\alpha$ 鏈CDR2包含如SEQ ID NO: 6中所列之胺基酸序列；且

(6)該抗NY-ESO-1 TCR之該 $\alpha$ 鏈CDR1包含如SEQ ID NO: 5中所列之胺基酸序列；及

(ii)第二核苷酸序列，其中該第二核苷酸序列或由該

第二核苷酸序列編碼之多肽抑制內源TCR之表現。

【請求項2】如請求項1之核酸分子，其中該HLA I類分子HLA-C\*03等位基因選自HLA-C\*03:02等位基因、HLA-C\*03:03等位基因、HLA-C\*03:04等位基因、HLA-C\*03:05等位基因及HLA-C\*03:06等位基因。

【請求項3】如請求項1之核酸分子，其中

- (i) 該抗NY-ESO-1 TCR之該 $\alpha$ 鏈可變域包含SEQ ID NO: 1所列之胺基酸序列中存在之可變域的胺基酸序列；
- (ii) 該抗NY-ESO-1 TCR之該 $\beta$ 鏈可變域包含SEQ ID NO: 2所列之胺基酸序列中存在之可變域的胺基酸序列；或
- (iii) 該(i)和(ii)二者。

【請求項4】如請求項3之核酸分子，其中該抗NY-ESO-1 TCR之該 $\alpha$ 鏈進一步包含恆定區，其中該 $\alpha$ 鏈恆定區包含與SEQ ID NO: 1所列之胺基酸序列中存在之恆定區具有至少85%序列一致性的胺基酸序列。

【請求項5】如請求項3之核酸分子，其中該抗NY-ESO-1 TCR之該 $\beta$ 鏈進一步包含恆定區，其中該 $\beta$ 鏈恆定區包含與SEQ ID NO: 2所列之胺基酸序列中存在之恆定區具有至少85%序列一致性的胺基酸序列。

【請求項6】如請求項1至5中任一項之核酸分子，其中

- (i) 該抗NY-ESO-1 TCR之該 $\alpha$ 鏈包含如SEQ ID NO: 1

中所列之胺基酸序列；

(ii) 該抗NY-ESO-1 TCR之該 $\beta$ 鏈包含如SEQ ID NO: 2

中所列之胺基酸序列；或

(iii) 該(i)和(ii)二者。

【請求項7】如請求項1至5中任一項之核酸分子，其中該第二核苷酸序列

(i) 為降低內源TCR之表現的一或多個siRNA，其中該一或多個siRNA與編碼該等內源TCR之恆定區之核苷酸序列內的目標序列互補；

(ii) 編碼Cas9；或

(iii) 該(i)和(ii)二者。

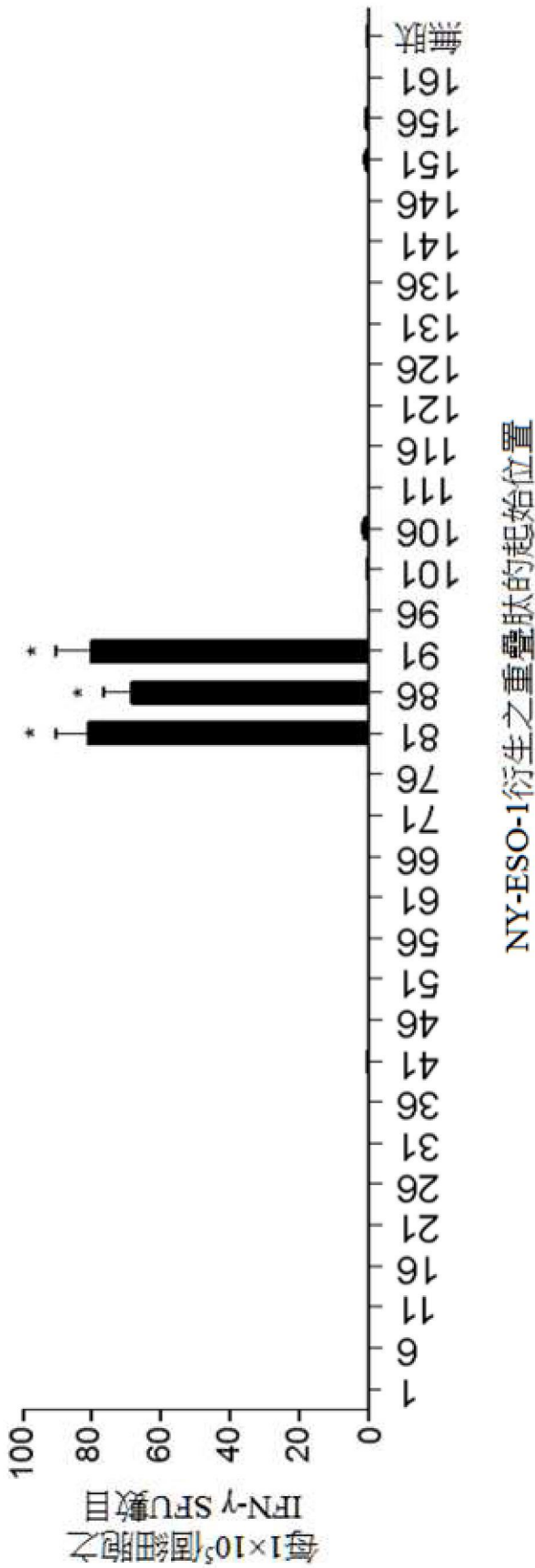
【請求項8】如請求項7之核酸分子，其中該一或多個siRNA包含選自由SEQ ID NO: 53-56組成之群的一或多個核苷酸序列。

【請求項9】一種載體，其包含如請求項1至8中任一項之核酸分子。

【請求項10】一種細胞，其包含如請求項1至8中任一項之核酸分子或如請求項9之載體，其中該細胞選自T細胞、自然殺手(NK)細胞、自然殺手T(NKT)細胞及ILC細胞。

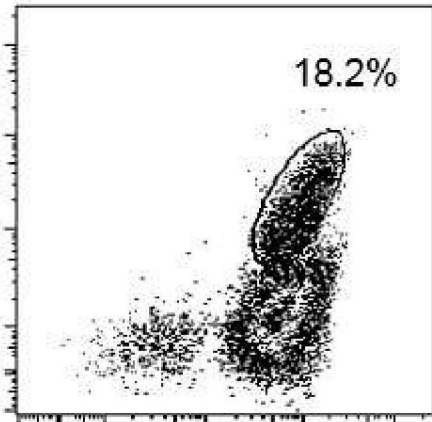
【請求項11】一種如請求項10之細胞於製造藥物之用途，該藥物係用於治療有需要之個體之癌症。

【發明圖式】

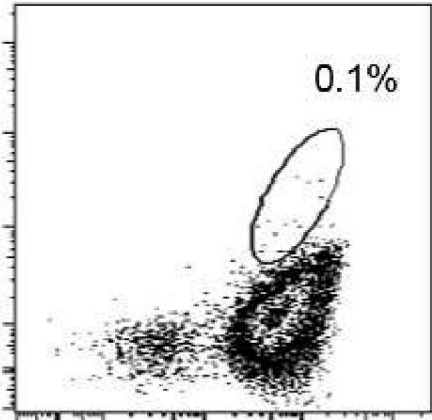


【圖 1】

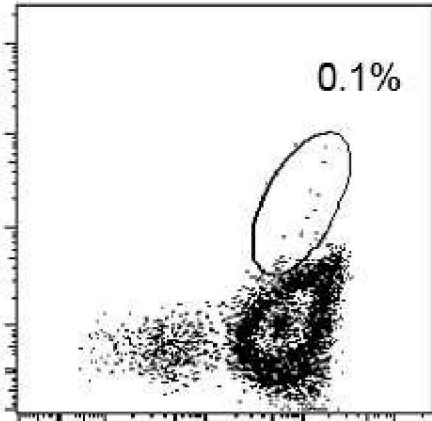
C\*03:04/  
NY-ESO-1<sub>92-100</sub>  
多聚體



C\*03:04/  
MAGE-A1<sub>230-238</sub>  
多聚體



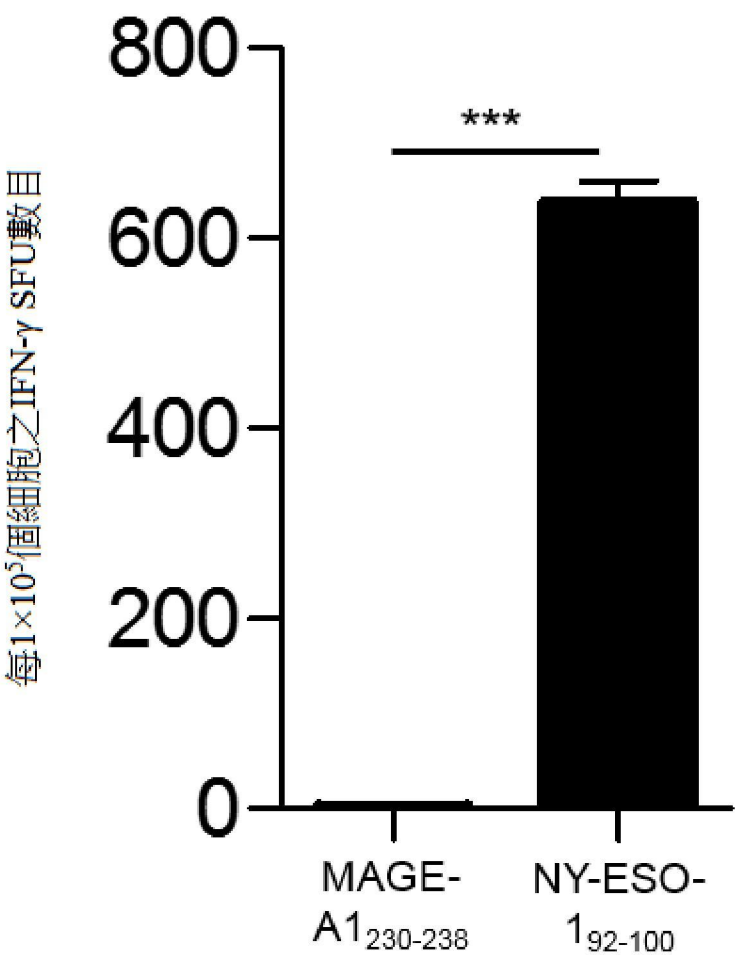
C\*03:04/  
未交換多聚體



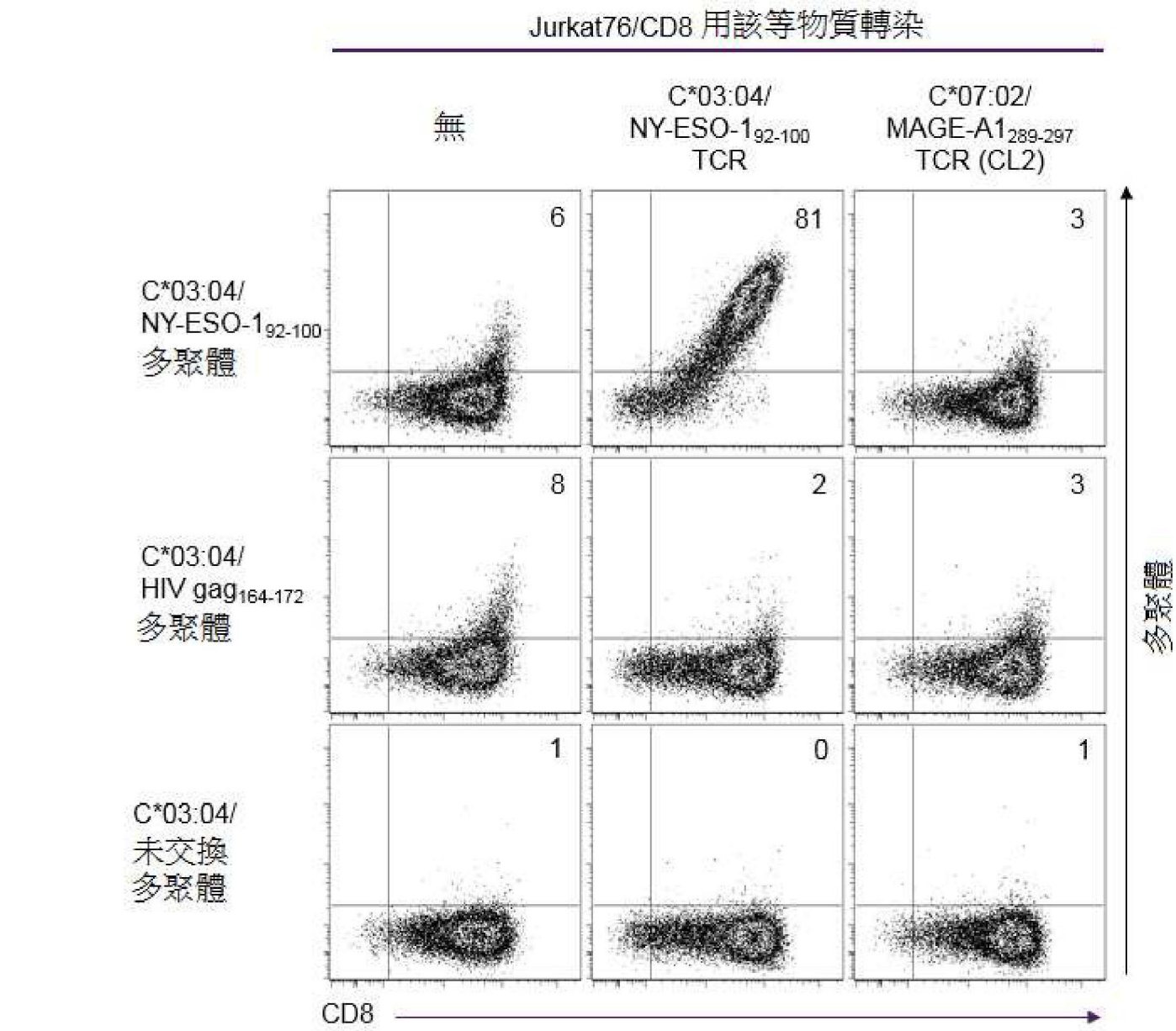
多聚體

CD8

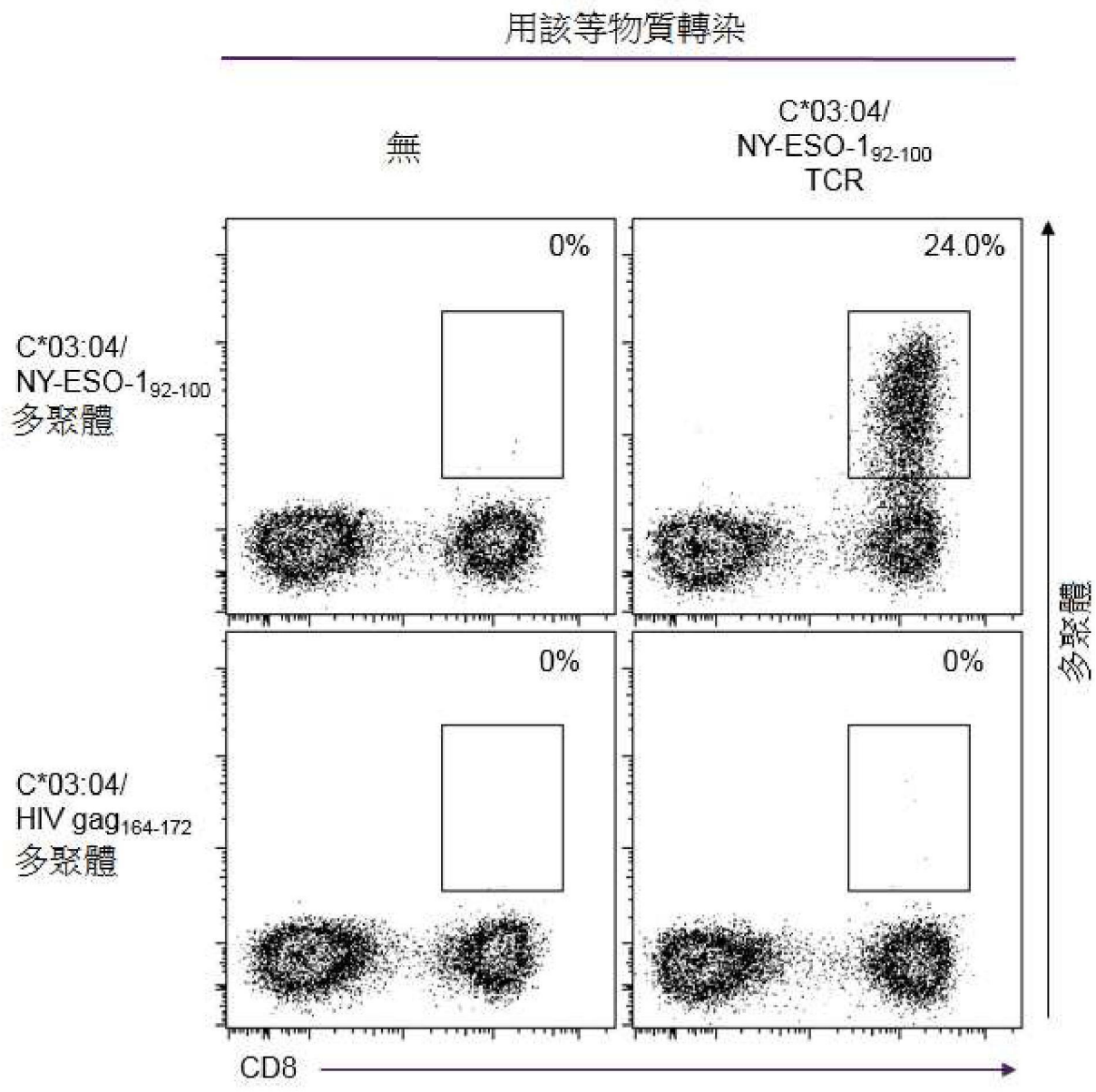
【圖 2A-圖 2C】



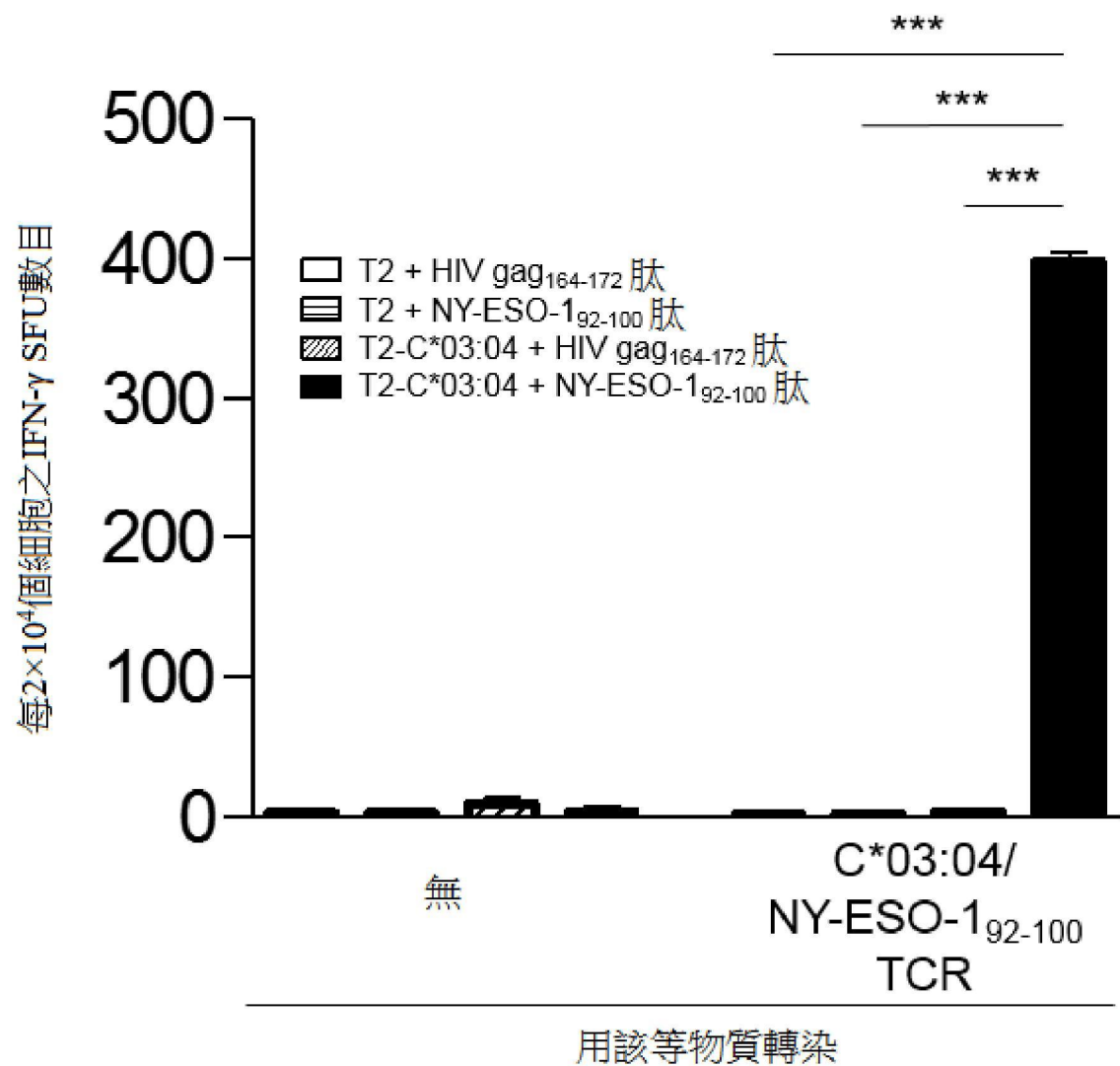
【圖 3】



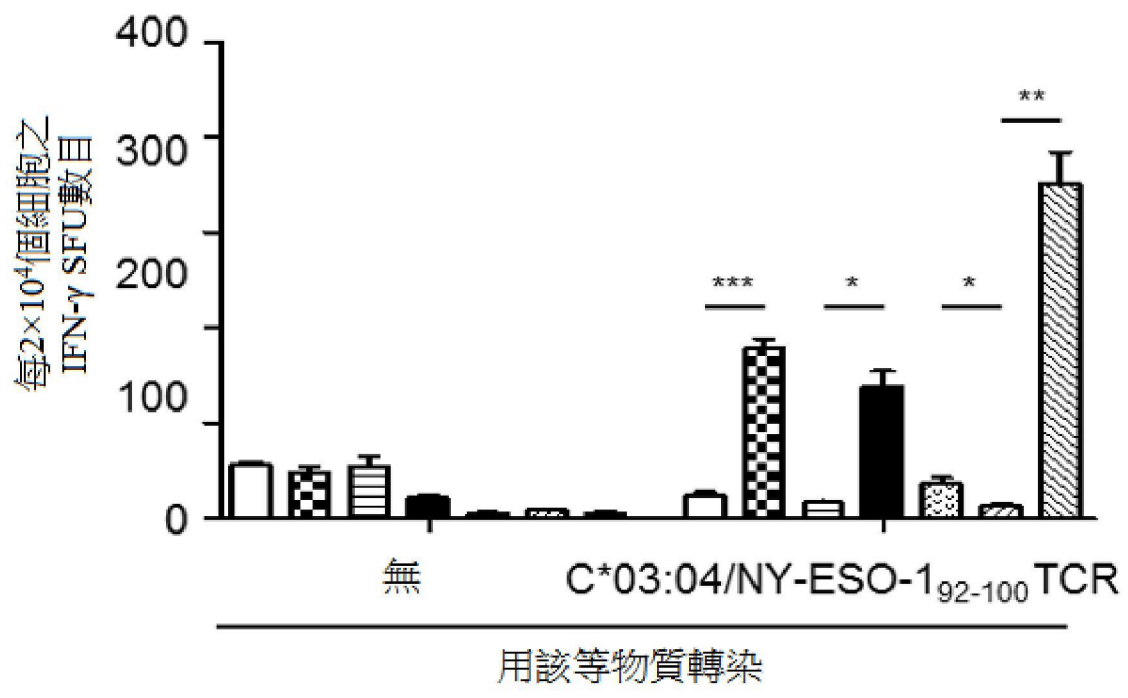
【圖 4A-圖 4I】



【圖 5A-圖 5D】



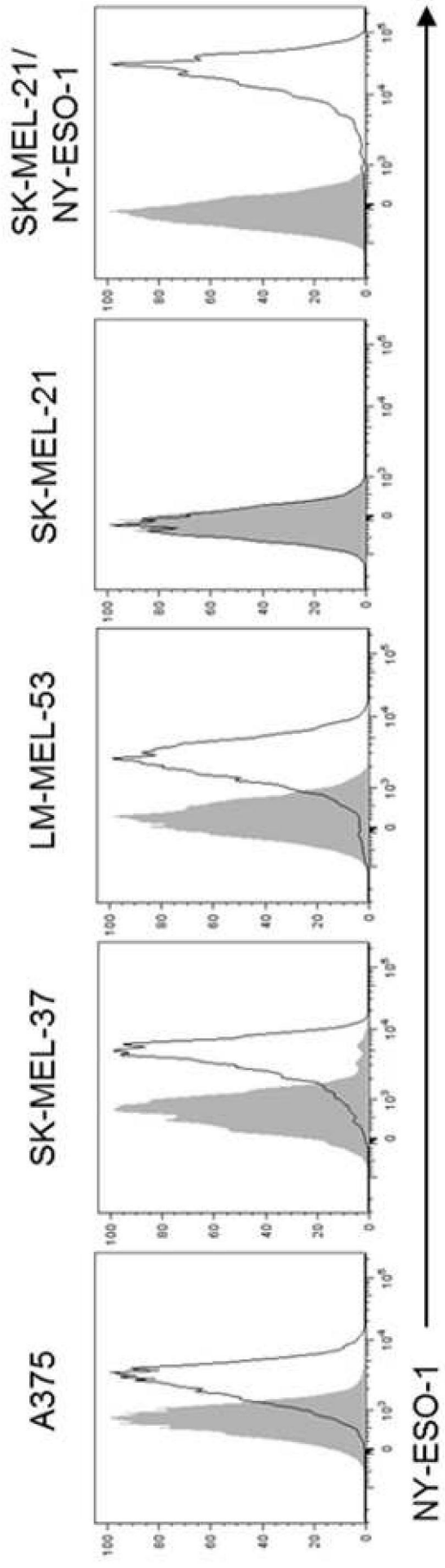
【圖 6】



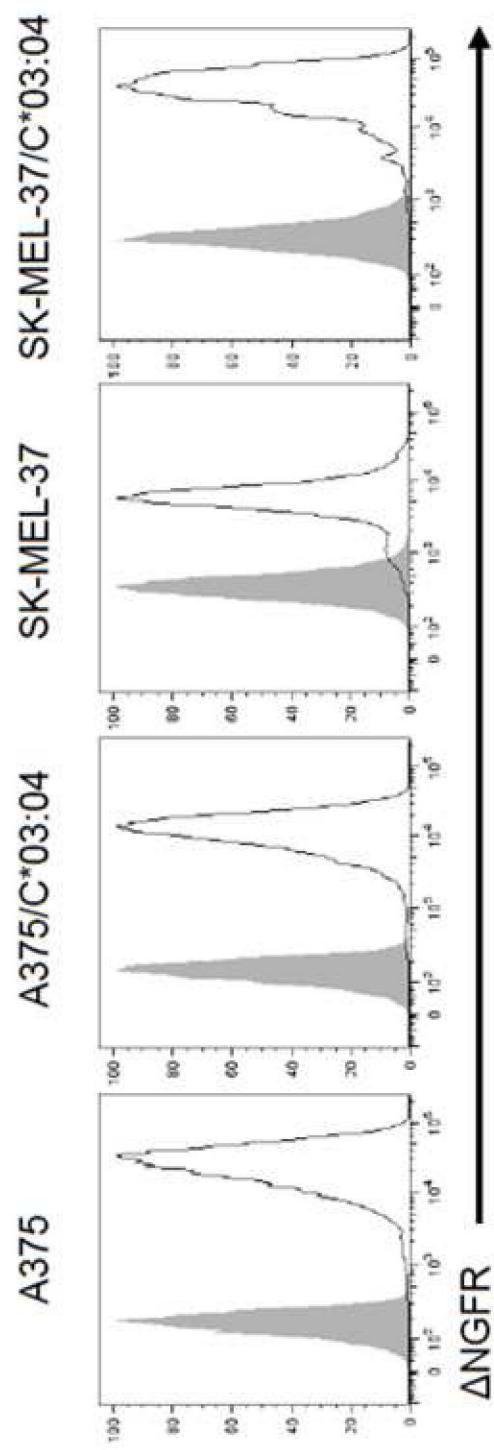
【圖 7A】

|                                | C*03:04 | NY-ESO-1 |
|--------------------------------|---------|----------|
| <div></div> A375               | -       | +        |
| <div></div> A375/C*03:04       | +       | +        |
| <div></div> SK-MEL-37          | -       | +        |
| <div></div> SK-MEL-37/C*03:04  | +       | +        |
| <div></div> LM-MEL-53          | +       | +        |
| <div></div> SK-MEL-21          | +       | -        |
| <div></div> SK-MEL-21/NY-ESO-1 | +       | +        |

【圖 7B】



【圖 8A-圖 8E】



【圖 9A-圖 9D】