202207975

(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本 (11)公開編號：TW 202207975 A

(43)公開日： 中華民國 111 (2022) 年 03 月 01 日

(21)申請案號：110116825 (22)申請日： 中華民國 110 (2021) 年 05 月 10 日

(51)Int. Cl.： *A61K39/00 (2006.01)* *A61K35/17 (2015.01)*
A61K47/68 (2017.01) *A61K39/395 (2006.01)*
C12N5/078 (2010.01) *A61P35/00 (2006.01)*

(30)優先權：2020/05/11 美國 63/023,193
2020/10/23 美國 63/105,135

(71)申請人：瑞士商赫孚孟拉羅股份公司 (瑞士) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)
瑞士
美商ＳＱＺ生物科技公司 (美國) SQZ BIOTECHNOLOGIES COMPANY (US)
美國

(72)發明人：尤瑪那 帕洛 UMANA, PABLO (CR)；克萊 克里斯俊 KLEIN, CHRISTIAN (DE)；川普海勒 克莉斯汀 TRUMPFHELLER, CHRISTINE (DE)；尼可利尼 維樂瑞雅 G NICOLINI, VALERIA G. (ES)；柯達瑞 迪克 蘿拉 CODARRI DEAK, LAURA (CH)；洛克希德 史考特 LOUGHHEAD, SCOTT (US)；布蒂 馬修 BOOTY, MATTHEW (US)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：204 項 圖式數：12 共 232 頁

(54)名稱

使用經修飾之ＰＢＭＣ及免疫結合體之組合療法

(57)摘要

本申請提供刺激個體之免疫反應之方法，該等方法包含投予有核細胞 (例如 PBMC) 的組成物併以投予包含變異體 IL-2 多肽及第二多肽的免疫結合體，該等有核細胞包含細胞內外源性抗原。該變異體 IL-2 多肽展現對 IL-2 受體之 α-次單元減小的親和力。該第二多肽靶向腫瘤細胞或 T 細胞。

The present application provides methods for stimulating an immune response in an individual comprising administering a composition of nucleated cells (e.g., PBMCs) comprising an intracellular exogenous antigen in conjunction with administering an immunoconjugate comprising a variant IL-2 polypeptide and a second polypeptide. The variant IL-2 polypeptide exhibits reduced affinity to the α-subunit of the IL-2 receptor. The second polypeptide targets a tumor cell or a T cell.

指定代表圖：

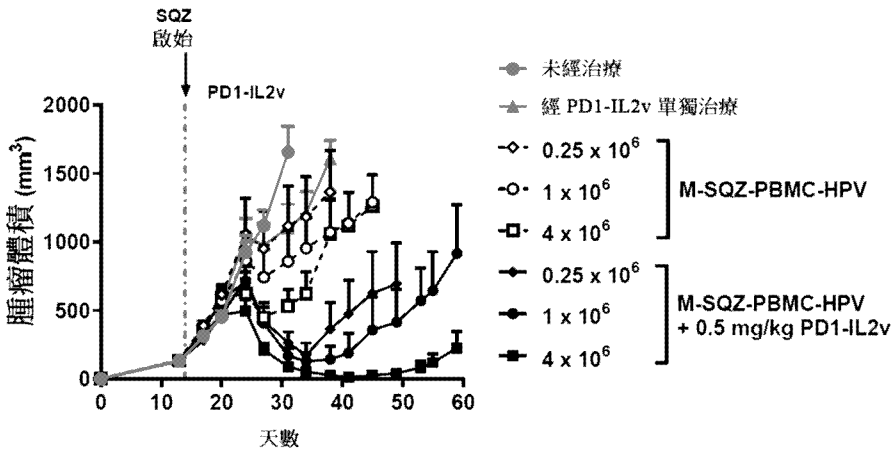

SQZ
啟始
PD1-IL2v
腫瘤體積 (mm3)
2000
1500
1000
500
0
0
10
20
30
40
50
60
天數
未經治療
經 PD1-IL2v 單獨治療
0.25 x 10^6
1 x 10^6
4 x 10^6
M-SQZ-PBMC-HPV
0.25 x 10^6
1 x 10^6
4 x 10^6
M-SQZ-PBMC-HPV
+ 0.5 mg/kg PD1-IL2v

圖 1

20220707
專利案號：110116825
202207975

【發明摘要】

【中文發明名稱】　使用經修飾之 PBMC 及免疫結合體之組合療法

【英文發明名稱】　COMBINATION THERAPY WITH MODIFIED PBMCS AND AN IMMUNOCONJUGATE

【中文】本申請提供刺激個體之免疫反應之方法，該等方法包含投予有核細胞(例如 PBMC) 的組成物併以投予包含變異體 IL-2 多肽及第二多肽的免疫結合體，該等有核細胞包含細胞內外源性抗原。該變異體 IL-2 多肽展現對 IL-2 受體之 α-次單元減小的親和力。該第二多肽靶向腫瘤細胞或 T 細胞。

【英文】The present application provides methods for stimulating an immune response in an individual comprising administering a composition of nucleated cells (*e.g.*, PBMCs) comprising an intracellular exogenous antigen in conjunction with administering an immunoconjugate comprising a variant IL-2 polypeptide and a second polypeptide. The variant IL-2 polypeptide exhibits reduced affinity to the α-subunit of the IL-2 receptor. The second polypeptide targets a tumor cell or a T cell.

【指定代表圖】

圖 1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】　使用經修飾之 PBMC 及免疫結合體之組合療法

【英文發明名稱】　COMBINATION THERAPY WITH MODIFIED PBMCS AND AN IMMUNOCONJUGATE

【技術領域】

【0001】 本申請提供刺激個體之免疫反應之方法，該等方法包含投予有核細胞 (例如 PBMC) 的組成物併以投予包含變異體 IL-2 多肽及第二多肽的免疫結合體，該等有核細胞包含細胞內外源性抗原。該變異體 IL-2 多肽展現對 IL-2 受體之 α-次單元減小的親和力。該第二多肽靶向腫瘤細胞或 T 細胞。

【先前技術】

【0002】 免疫療法可分為兩種主要的介入類型，即被動介入或主動介入。被動方案包括投予預先活化及/或經工程化改造之細胞、疾病特異性治療抗體及/或細胞介素。主動免疫療法策略旨在刺激體內免疫系統效應子功能。現有若干主動方案包括採用疾病相關之肽、溶解產物或同種異體全細胞的疫苗接種策略、輸注作為腫瘤抗原遞送之載體的自體 DC 及輸注免疫檢查點調節物。*參見* Papaioannou, Nikos E.，*等人* *Annals of translational medicine* 4.14 (2016)。

【0003】 疾病相關之抗原所刺激的 CD8+ 細胞毒性 T 淋巴細胞 (CTL) 及 CD4+ 輔助 T (Th) 細胞具有靶向及破壞患病細胞的潛力；但是，目前用于誘導內源性 T 細胞反應的方法面臨挑戰。一種使用周邊血單核細胞 (PBMC) 的方法描述於 PCT/US2020/020194 中。

【0004】介白素-2 (IL-2) 亦稱爲 T 細胞生長因子 (TCGF)，是一種 15.5 kDa 的球狀糖蛋白，在淋巴細胞生成、存活及體內穩態中具有核心作用。IL-2 主要藉由活化之 T 細胞 (特別是 CD4+ 輔助 T 細胞) 合成。它刺激 T 細胞的增殖及分化，誘導細胞毒性 T 淋巴細胞 (CTL) 的生成及周邊血淋巴細胞向細胞毒性細胞及淋巴因子活化之殺手 (LAK) 細胞的分化，促進藉由 T 細胞之細胞介素和溶細胞分子的表現，有利於 B 細胞的增殖及分化及藉由 B 細胞的免疫球蛋白的合成，並刺激自然殺手 (NK) 細胞的生成、增殖及活化 (綜述於*例如*：Waldmann，*Nat Rev Immunol* 6，595-601 (2009)；Olejniczak 及 Kasprzak，*Med Sci Monit* 14，RA179-89 (2008)；Malek，*Annu Rev Immunol* 26，453-79 (2008) 中)。

【0005】其擴增體內淋巴細胞族群並增加這些細胞的效應子功能的能力賦予 IL-2 以抗腫瘤作用，使 IL-2 免疫療法成為某些轉移性癌症的有吸引力的治療選擇。因此，大劑量 IL-2 治療已獲批准用於治療轉移性腎細胞癌及惡性黑色素瘤患者。

【0006】另一方面，IL-2 在免疫反應中具有雙重功能，其不僅介導效應子細胞的擴增及活性，而且在保持周圍免疫耐受性方面起到至關重要的作用。因此，IL-2 並非抑制腫瘤生長的最佳方法，因為在 IL-2 存在下，生成的 CTL 可能將腫瘤識別為自身細胞並發生 AICD，或免疫反應可能受 IL-2 依賴性 T_{reg} 細胞的抑制。與 IL-2 免疫療法有關的另一個問題是重組人 IL-2 治療產生的副作用。接受大劑量 IL-2 治療的患者經常出現嚴重的心血管、肺、腎、肝、胃腸、神經、皮膚、血液及全身性不良事件，該等不良事件需要加強監測及住院管理。這些副作用中的大多數可藉由所謂血管 (或微血管) 滲漏症候群 (VLS) 的

發展來解釋，該症候群為血管通透性之病理性增加導致多個器官中的液體外滲(引起*例如*肺及皮膚水腫及肝細胞損傷)及血管內液耗盡(導致血壓下降及心率代償性升高)。

【0007】一種特定的突變型 IL-2 多肽旨在克服上述與 IL-2 免疫療法相關之問題(由 VLS 誘導引起之毒性，由 AICD 誘導引起之腫瘤耐受性，及由 Treg 細胞活化引起之免疫抑制)描述於 WO 2012/107417 中。IL-2 之位置 42 處之苯丙胺酸殘基被丙胺酸取代、位置 45 處之酪胺酸殘基被丙胺酸取代且位置 72 處之白胺酸被甘胺酸取代，基本上消除了該突變型 IL-2 多肽與 IL-2 受體(CD25)之 α-次單元的結合。

【0008】除上述方法以外，還可藉由將 IL-2 選擇性靶向腫瘤來改善 IL-2 免疫療法，*例如*呈包含與腫瘤細胞上表現之的抗原結合的抗體的免疫結合體的形式。若干此等免疫結合體已有描述(*參見例如* Ko *等人*，*J Immunother* (2004) 27，232-239；Klein *等人*，*Oncoimmunology* (2017) 6(3)，e1277306)。

【0009】但是，腫瘤可能藉由脫落、突變或下調抗體的靶抗原而逃脫此等作用。此外，在主動排斥淋巴細胞的腫瘤微環境中，靶向腫瘤的 IL-2 可能無法與效應子細胞(如細胞毒性 T 淋巴細胞(CTL))達成最佳接觸。因此，仍然需要進一步改善 IL-2 免疫療法。一種可能避免腫瘤靶向問題的方法是將 IL-2 直接靶向效應子細胞，特別是 CTL。IL-2 之融合蛋白及 PD-1 抗原結合蛋白描述於 WO 2018/184964 A1 中。

【0010】仍然需要改善之方法以誘導有效的內源性 T 細胞反應。

【0011】在本文中引用的所有參考文獻，包括專利申請和公開，是藉由引用方式全部併入。

【發明內容】

【0012】 在一些態樣中，本發明提供了一種刺激個體之免疫反應之方法，該方法包含：a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性抗原；及 b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【0013】 在一些態樣中，本發明提供了一種刺激個體中對腫瘤抗原之免疫反應的方法，該方法包含：a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性腫瘤抗原；及 b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【0014】 在一些態樣中，本發明提供了一種增強基於有核細胞之免疫療法之方法，該方法包含投予有效量之免疫結合體併以投予該基於有核細胞之免疫療法，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【0015】在一些態樣中，本發明提供了一種治療個體之疾病的方法，該方法包含：a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含與該疾病有關之外源性抗原；及 b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。在一些實施例中，疾病為癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【0016】在一些態樣中，本發明提供了一種為有此需要之個體接種疫苗的方法，該方法包含：a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性抗原；及 b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。在一些實施例中，個體患有對疫苗接種產生反應之疾病。在一些實施例中，疾病為癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【0017】在一些態樣中，本發明提供了一種減少個體之腫瘤生長的方法，該方法包含：a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性腫瘤抗原；及 b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【0018】在本發明的一些實施例中，第二多肽結合 T 細胞。在一些實施例中，第二多肽結合在 T 細胞上表現的 PD-1。在一些實施例中，第二多肽為特異性結合 PD-1 的抗原結合部分。在一些實施例中，抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH) 及輕鏈可變區 (VL)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:2 之胺基酸序列；HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:3 之胺基酸序列；及 FR-H3，其包含在根據 Kabat 編號之位置 71-73 處之 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列；該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列；HVR-L2，其包含 SEQ ID NO:5 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列；或 (b) 重鏈可變區 (VH) 及輕鏈可變區 (VL)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列；及 HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列；該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列；HVR-L2，其包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含與 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含與選自以下各項所組成之群組之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18。在一些實施例中，抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18 之胺基酸序列。在一些實施例中，抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含 SEQ ID NO:15 之胺基酸序列。在

一些實施例中，免疫結合體包含：多肽，其包含與 SEQ ID NO:22 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；多肽，其包含與 SEQ ID NO:24 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及多肽，其包含與 SEQ ID NO:25 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列。在一些實施例中，免疫結合體包含 SEQ ID NO:22 之多肽序列、SEQ ID NO:24 之多肽序列及兩個 SEQ ID NO:25 之多肽序列。

【0019】 在本發明的一些實施例中，第二多肽特異性結合存在於腫瘤細胞上或腫瘤細胞環境中的靶抗原。在一些實施例中，靶抗原選自以下各項所組成之群組：纖維母細胞活化蛋白 (FAP)、腱生蛋白 C 之 A1 域 (TNC A1)、腱生蛋白 C 之 A2 域 (TNC A2)、纖網蛋白之外加域 B (EDB)、癌胚抗原 (CEA) 及黑色素瘤相關之硫酸軟骨素蛋白多醣 (MCSP)。在一些實施例中，第二多肽結合 FAP。在一些實施例中，第二多肽為特異性結合 FAP 的抗原結合部分。在一些實施例中，特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) SEQ ID NO:29 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:28 之輕鏈可變區序列；(ii) SEQ ID NO:31 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:30 之輕鏈可變區序列；(iii) SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列；(iv) SEQ ID NO:35 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:34 之輕鏈可變區序列；或 (v) SEQ ID NO:37 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:36 之輕鏈可變區序列。在一些實施例中，特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) 與 SEQ ID NO:42 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:43 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；(ii) 與 SEQ ID NO:38 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、

98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:39 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:231 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；或 (iii) 與 SEQ ID NO:44 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:45 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列。在一些實施例中，特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含 SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列。在一些實施例中，免疫結合體包含 SEQ ID NO:38 之多肽序列、SEQ ID NO:39 之多肽序列及 SEQ ID NO:40 之多肽序列。

【0020】 在本發明的一些實施例中，突變型 IL-2 多肽進一步包含胺基酸取代 T3A 及/或胺基酸取代 C125A。在一些實施例中，突變型 IL-2 多肽包含與 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列，其中該突變型 IL-2 多肽與野生型 IL-2 多肽相比，表現出對高親和力 IL-2 受體之減小的親和力及對中等親和力 IL-2 受體之大致類似的親和力。在一些實施例中，突變型 IL-2 多肽包含 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列。

【0021】 在本發明的一些實施例中，有核細胞為免疫細胞。在一些實施例中，有核細胞為多個周邊血單核細胞 (PBMC)。在一些實施例中，該等多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞或 NK-T 細胞中之兩種或更多種。在一些實施例中，有核細胞為 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞及/或 NK-T 細胞中之一種或多種。

【0022】 在本發明的一些實施例中，外源性抗原經胞內 (intracellularly) 遞送至有核細胞。在一些實施例中，外源性抗原為疾病相關之抗原。在一些實施

例中，疾病相關之抗原為癌症抗原、感染性疾病抗原或病毒相關之疾病抗原。在一些實施例中，外源性抗原為人類乳突病毒 (HPV)抗原。

【0023】 在本發明的一些實施例中，組成物進一步包含佐劑。在一些實施例中，佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)、LPS、IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C (聚肌胞苷酸)、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。

【0024】 在本發明的一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞藉由包含以下步驟的方法來製備：a) 使包含輸入有核細胞的細胞懸浮液通過細胞變形收縮物，其中該收縮物之直徑為該懸浮液中該等輸入有核細胞的直徑的函數，從而使該等輸入有核細胞具有足夠大的擾動以使該外源性抗原通過而形成經擾動之輸入有核細胞；b) 將該等經擾動之輸入有核細胞與外源性抗原一起孵育足夠長的時間，以使該外源性抗原進入該等經擾動之輸入有核細胞，從而生成包含該外源性抗原之有核細胞。在一些實施例中，收縮物之寬度為輸入有核細胞的平均直徑的約 10% 至約 99%。在一些實施例中，收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 6 μm。在一些實施例中，收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 4.8 μm。在一些實施例中，收縮物之寬度為約 4.5 μm。在一些實施例中，使包含該等多個輸入有核細胞的細胞懸浮液通過多個收縮物，其中該等多個收縮物串聯及/或並聯佈置。在一些實施例中，在該等經擾動之輸入有核細胞與該外源性抗原一起孵育後，該外源性抗原存在於至少約 70% 的有核細胞中。

【0025】 在本發明的一些實施例中，有核細胞經佐劑調節以形成經調節之細胞。在一些實施例中，有核細胞與佐劑一起孵育約 1 小時至約 24 小時、約 2 小時至約 10 小時、約 3 小時至約 6 小時或約 4 小時以對該等細胞進行調節。在一些實施例中，有核細胞在外源性抗原引入該等有核細胞中之前或之後經調節。在一些實施例中，佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)、LPS、IFN-α、

STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C (聚肌胞苷酸)、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。在一些實施例中，佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)。在一些實施例中，佐劑為 CpG 7909。在一些實施例中，經調節之細胞為經調節之多個經修飾之 PBMC。在一些實施例中，該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以增加共刺激分子中之一者或多者之表現。在一些實施例中，共刺激分子為 B7-H2 (ICOSL)、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155 或 CD112。在一些實施例中，該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以增加一種或多種細胞介素之表現。在一些實施例中，細胞介素為 IL-15、IL-12、IL-2、IFN-α 或 IL-21。在一些實施例中，與該等多個未經修飾之 PBMC 中的 B 細胞相比，該等經調節之多個經修飾之 PBMC 的 B 細胞中的一種或多種共刺激分子上調，其中該共刺激分子為 CD80 及/或 CD86。在一些實施例中，與多個未經調節之 PBMC 相比，該等多個經修飾之 PBMC 具有表現增加之 IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種。在一些實施例中，與該等多個未經調節之 PBMC 相比，IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種的表現增加多於約 1.2 倍、1.5 倍、1.8 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、8 倍或多於約 10 倍。

【0026】 在本發明的一些實施例中，免疫結合體於投予包含有核細胞的組成物之前、同時或之後投予。在一些實施例中，包含有核細胞的組成物經多次投予。在一些實施例中，免疫結合體於投予包含有核細胞的組成物之後多次投予。在一些實施例中，組成物及/或免疫結合體經靜脈內投予。在一些實施例中，免疫結合體經皮下或瘤內投予。在一些實施例中，免疫結合體與透明質酸酶聯合經皮下投予。

【0027】在本發明的一些實施例中，個體為人。在一些實施例中，個體患有癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。在一些實施例中，有核細胞及/或免疫結合體之組成物於投予另一種療法之前、同時或之後投予。在一些實施例中，該另一種療法為化學治療或放射治療。

【0028】在一些態樣中，本發明提供一種包含有核細胞之組成物，該等有核細胞包含外源性抗原，該組成物用於治療個體之疾病的方法中，其中該組成物與包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽的免疫結合體組合使用；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子。在一些實施例中，疾病為癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。在一些實施例中，包含有核細胞的組成物於免疫結合體之前、同時或之後投予。

【0029】在一些態樣中，本發明提供了一種包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽之免疫結合體，其用於治療個體之疾病的方法中，其中該免疫結合體與包含有核細胞的組成物組合使用，該等有核細胞包含外源性抗原。在一些實施例中，疾病為癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。在一些實施例中，包含有核細胞的組成物於免疫結合體之前、同時或之後投予。

【0030】在一些態樣中，本發明提供了有效量之免疫結合體之用途，其用於製造用於刺激個體之免疫反應的藥物，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子；其中該免疫結合體配製用於與包含有核細胞的組成物合併投予，其中該等有核細胞包含外源性抗原。在一些實施例中，免疫結合體於包含有核細胞的組成物之前、同時或之後投予。

【0031】在一些態樣中，本發明提供了有效量之組成物之用途，其用於製造用於刺激個體之免疫反應的藥物，其中該組成物包含有核細胞，該等有核細胞包含外源性抗原；其中該組成物配製用於與免疫結合體合併投予，該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子。在一些實施例中，包含有核細胞的組成物於免疫結合體之前、同時或之後投予。

【0032】在一些態樣中，本發明提供了用於本文所述之方法中之任一者中之套組。在一些實施例中，本發明提供了一種包含有核細胞的組成物及免疫結合體之套組，該等有核細胞包含外源性抗原，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子；其中該組成物及該免疫結合體組合用於刺激個體中對該外源性抗原之免疫反應。在一些實施例中，本發明提供了一種包含有核細胞的組成物之套組，該等有核細胞包含外源性抗原，其中該組成物與免疫結合體合併用於刺激個體對該外源性抗原之免疫反應；其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；且其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子。在一些實施例中，本發明提供了一種包含免疫結合體之套組，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子；其中該免疫結合體與包含外源性抗原的有核細胞之組成物合併用於刺激個體對該外源性抗原之免疫反應。

【0033】在一些態樣中，本發明提供了一種用於產生免疫結合體之方法，該免疫結合體與包含有核細胞的組成物聯合用於刺激個體之免疫反應，該方法包含在產生該免疫結合體的條件下在細胞中表現編碼該免疫結合體的核酸，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子；其中該免疫結合體用於與包含有核細胞的組成物合併投予，其中該等有核細胞包含外源性抗原。在一些實施例中，免疫結合體為融合蛋白。

【0034】在一些態樣中，本發明提供了一種用於產生包含有核細胞的組成物之方法，該組成物與免疫結合體合併用於刺激個體之免疫反應，該方法包含將外源性抗原經胞內引入有核細胞族群中；其中該組成物用於與免疫結合體合併投予；其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；且其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子。

【圖式簡單說明】

【0035】

圖 1 係顯示 TC1 小鼠腫瘤模型中腫瘤體積隨時間變化的圖。小鼠接受 PD1-IL2v 單獨治療，接受包含三劑細胞的 SQZ-PBMC (包含經胞內遞送之 HPV 抗原 SQZ-PBMC) 單次治療，或給予單一劑量範圍內的 PD1-IL2v 三次。SQZ-PBMC 之投予表示為「SQZ 啟始」。PD1-IL2v 之投予週期表示爲灰色條。

圖 2A 至 2F 為顯示接受 SQZ-PBMC 單獨治療與未經治療之 TC1 小鼠模型中腫瘤體積之比較 (圖 2A 至 2C) 或接受合併固定劑量之 PD1-IL2v 組合治療與未經治療之 TC1 小鼠模型中腫瘤體積之比較 (圖 2D 至 2F) 的圖。SQZ-PBMC 之劑量為 0.25×10^6 (圖 2A 及 2D)、1.0×10^6 (圖 2B 及 2E) 或 4.0×10^6 (圖 2C 及 2F)。SQZ-PBMC 之投予表示爲垂直虛線。PD1-IL2v 之投予週期表示爲灰色條。

圖 3A 及 3B 為顯示接受 SQZ-PBMC 與 FAP-IL-2v (圖 3A) 及 PD-1-IL-2v (圖 3B) 組合治療的小鼠中之 TC1 小鼠腫瘤模型中腫瘤體積的圖。SQZ-PBMC 及免疫結合體投予表示爲垂直虛線。

圖 4A 至 4E 為蜘蛛圖，顯示了 TC1 小鼠模型接受 SQZ-PBMC 單獨治療與未經治療之腫瘤體積的比較 (圖 4A)、接受 FAP-IL2v 單獨治療與未經治療之腫瘤體積的比較 (圖 4B)、接受 PD-1-IL-2v 單獨治療與未經治療之腫瘤體積的比較 (圖 4C)、接受 FAP-IL2v 與 SQZ-PBMC 組合治療與未經治療之腫瘤體積的比較 (圖 4D) 或接受 PD-1-IL-2v 與 SQZ-PBMC 組合治療與未經治療之腫瘤體積的比較 (圖 4E)。SQZ-PBMC 及免疫結合體之投予表示爲垂直虛線。

圖 5 為顯示小鼠中之 TC1 小鼠腫瘤模型中接受 PD-1-IL-2v、SQZ-PBMC 或 PD-1-IL-2v 與 SQZ-PBMC 組合治療的腫瘤體積的圖。SQZ-PBMC 及免疫結合體投予表示爲垂直虛線。

圖 6 為顯示原始腫瘤接受治療後重新用藥的圖。在小鼠右脅處形成之 TC1 腫瘤接受 0.25×10^6、1×10^6 或 4×10^6 SQZ-PBMC 或 PD1-IL2v 單獨治療。在小鼠左脅處重新用藥 TC1 腫瘤。

圖 7A 至 7D 為顯示在接受 SQZ-PBMC 及 PD-1-IL2v 治療後腫瘤中之腫瘤浸潤白血球 (TIL) 之分析的圖。圖 7A 顯示腫瘤中 T 細胞之增殖，其藉由 %Ki-67+ 細胞來衡量。圖 7B 顯示細胞毒性，其藉由顆粒酶 B 平均螢光強度 (MFI) 來衡

量。圖 7C 及圖 7D 顯示了經 E7 刺激之樣品及未經刺激之 IFNγ 及 TNFα 產生。未經治療表示為 Untr，接受 PD-1-IL2v 單獨治療表示為 PD-1-IL2v，接受 SQZ-PBMC 單獨治療表示為 SQZ，接受 SQZ-PBMC 及 PD-1-IL2v 組合治療表示為 Combo。在所有圖中，由 ** 表示之統計顯著性為 $p<0.01$，由 *** 表示之統計顯著性為 $p<0.001$。

圖 8A 至 8H 為一系列圖，顯示了 TC1 小鼠腫瘤模型中治療後第 24 天 (圖 8A 至 8D) 及 28 天 (圖 8E 至 8H) 的腫瘤免疫浸潤。顯示的參數包括腫瘤體積 (圖 8A 及 8E)、CD45+ 細胞數 (圖 8B 及 8F)、CD8+ T 細胞數 (圖 8C 及 8G) 及 E7 特異性 CD8+ 細胞 (圖 8D 及 8H)。未經治療表示為 Untr，接受 PD-1-IL2v 單獨治療表示為 PD-1-IL2v，接受 SQZ-PBMC 單獨治療表示為 SQZ，接受 SQZ-PBMC 及 PD-1-IL2v 組合治療表示為 Combo。在所有圖中，由 ** 表示之統計顯著性為 $p<0.05$，由 ** 表示之統計顯著性為 $p<0.01$，由 *** 表示之統計顯著性為 $p<0.001$。

圖 9A 至 9D 顯示了小鼠接受治療後的腫瘤和脾臟中的免疫細胞數量。圖 9A 顯示了腫瘤中之 CD8+ T 細胞數量。圖 9B 顯示了腫瘤中之 E7 特異性 CD8+ T 細胞數量。圖 9C 顯示了脾臟中之 CD8+ T 細胞數量。圖 9D 顯示了脾臟中之 E7 特異性 CD8+ T 細胞數量。未經治療表示為 Untr，接受 PD-1-IL2v 單獨治療表示為 PD-1-IL2v，接受 SQZ-PBMC 單獨治療表示為 SQZ，接受 SQZ-PBMC 及 PD-1-IL2v 組合治療表示為 Combo。在所有圖中，由 ** 表示之統計顯著性為 $p<0.05$，由 ** 表示之統計顯著性為 $p<0.01$，由 *** 表示之統計顯著性為 $p<0.001$。還顯示了選定值之間的倍數差異。

圖 10A 至 10D 顯示了治療對腫瘤中調節性 T 細胞 (Treg) 及 NK 細胞的作用。圖 10A 顯示了藉由每 mg 腫瘤中 CD4+FOXP3+CD25+ 細胞數衡量之 Treg 數量。圖 10B 顯示了 CD8+ 細胞對 Treg 細胞之比率。圖 10C 顯示了腫瘤中之

NK1.1+ 細胞數量，圖 10D 顯示了脾臟中之 NK1.1+ 細胞數量。未經治療表示為 Untr，接受 PD-1-IL2v 單獨治療表示為 PD-1-IL2v，接受 SQZ-PBMC 單獨治療表示為 SQZ，接受 SQZ-PBMC 及 PD-1-IL2v 組合治療表示為 Combo。在所有圖中，由 ** 表示之統計顯著性為 $p<0.01$，由 *** 表示之統計顯著性為 $p<0.001$，由 **** 表示之統計顯著性為 $p<0.0001$。

圖 11A 至 11C 顯示了 TC1 小鼠腫瘤模型中肽疫苗及免疫結合體組合治療之效應。小鼠接受肽疫苗單獨治療 (VAX，圖11A)、接受疫苗及 FAP-IL2v 治療 (圖 11B) 或接受疫苗及 PD1-IL2v 治療 (圖 11C)。

圖 12 顯示於 SQZ-PBMC 免疫後投予 PD1-IL2v 增強了抗原特異性 CD8+ T 細胞反應。

【實施方式】

相關申請的交叉引用

【0036】 本申請案主張於 2020 年 5 月 11 日提出申請之美國臨時申請案第 63/023,193 號、於 2020 年 10 月 23 日提出申請之美國臨時申請案第 63/105,135 號之優先權權益，該等申請案各自以全文引用之方式併入本文中。

以ASCII文字檔案形式提交序列表

【0037】 以下 ASCII 文本申請件上的提交內容全文以引用方式併入本申請：序列表的計算機可讀形式 (CRF)（文件名：202902000142SEQLIST.TXT，記錄日期：2021 年 5 月 6 日，大小：72.6 KB)。

【0038】 在一些態樣中，本發明提供了刺激個體之免疫反應之方法，該等方法包含：a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性抗原；及 b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取

代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。在一些態樣中，本發明提供了刺激個體中對腫瘤抗原之免疫反應的方法，該等方法包含：a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性腫瘤抗原；及 b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。在一些態樣中，本發明提供了增強基於有核細胞之免疫療法之方法，該等方法包含投予有效量之免疫結合體併以投予該基於有核細胞之免疫療法，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。在一些態樣中，本發明提供了治療個體之疾病的方法，該等方法包含：a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含與該疾病有關之外源性抗原；及 b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。在一些態樣中，本發明提供了為有此需要之個體接種疫苗的方法，該等方法包含：a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性抗原；及 b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分

子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。在一些態樣中，本發明提供了減少個體之腫瘤生長的方法，該等方法包含：a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性腫瘤抗原；及 b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。在上述態樣的一些實施例中，第二多肽能夠特異性結合 PD-1。在上述態樣的一些實施例中，第二多肽能夠特異性結合 FAP。

【0039】 在一些實施例中，本發明提供了有核細胞的組成物，該等有核細胞包含外源性抗原，該組成物與免疫結合體組合使用，該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽。在一些實施例中，本發明提供了提供了一種包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽的免疫結合體，其與包含外源性抗原的有核細胞的組成物組合使用。亦考慮了上述組成物及免疫結合體的用途及套組。

一般技術

【0040】 本文所述或引用之技術和程序為本領域中的技術人員一般眾所周知並通常使用常規方法來實施的，例如，以下文獻中所述之得到廣泛應用的方法：*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* (Sambrook 等人，第 4 版，Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，N.Y.，2012)；*Current Protocols in Molecular Biology* (F.M.Ausubel 等人主編，2003)；叢書 *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.)；*PCR 2: A Practical Approach* (M.J. MacPherson，B.D.Hames 和 G.R.Taylor 主編，1995)；*Antibodies, A Laboratory*

Manual (Harlow 和 Lane 主編，1988)；*Culture of Animal Cells: A Manual of Basic Technique and Specialized Applications* (R.I.Freshney，第 6 版，J. Wiley and Sons, 2010)；*Oligonucleotide Synthesis* (M.J. Gait, 主編，1984)；*Methods in Molecular Biology*，Humana Press；*Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E.Cellis 主編，Academic Press，1998)；*Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather 和 P.E.Roberts，Plenum Press，1998)；*Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle，J.B.Griffiths 和 D.G.Newell 主編，J. Wiley and Sons，1993-8)；*Handbook of Experimental Immunology* (D.M.Weir 和 C.C.Blackwell 主編，1996)；*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells (J.M.*Miller 和 M.P. Calos 主編，1987)；*PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis 等人主編，1994)；*Current Protocols in Immunology* (J.E.Coligan 等人主編，1991)；*Short Protocols in Molecular Biology* (Ausubel 等人主編，J. Wiley and Sons，2002)；*Immunobiology* (C.A.Janeway 等人，2004)；*Antibodies* (P. Finch, 1997)；*Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty. 主編，IRL Press，1988-1989)；*Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd 和 C. Dean 主編，Oxford University Press，2000)；*Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow 和 D. Lane，Cold Spring Harbor Laboratory Press，1999)；*The Antibodies* (M. Zanetti 和 J. D. Capra 主編，Harwood Academic Publishers，1995)；及 *Cancer: Principles and Practice* of Oncology (V.T.DeVita 等人主編，J.B.Lippincott Company，2011)。

定義

【0041】出於解釋本說明書之目的，將適用以下定義，且在任何適當的情況下，以單數使用的術語還將包括複數，反之亦然。如果下文示出之任何定義與通過引用併入本文之任何文件相衝突，則所示之定義爲準。

【0042】如本文所用，單數形式的「一種 (a)」、「一個 (an)」和「該 (the)」包括複數指示內容，除非上下文指出。

【0043】應理解，本文所述之本發明之態樣及具體實例包括「包含」態樣及具體實例、「由」態樣及具體實例「組成」及「基本上由」態樣及具體實例「組成」。

【0044】如本文所用，術語「約」係指本技術領域技術人員易於知曉的各個值的通常誤差範圍。本文提及「約」值或參數包括（和描述）針對該值或參數*本身*的實施例。

【0045】除非另有說明，否則如本文所使用之術語「介白素-2 (IL-2)」係指來自任何脊椎動物來源之任何天然 IL-2，該脊椎動物包括哺乳動物，例如靈長類動物 (*例如*人類) 及嚙齒類動物 (*例如*小鼠和大鼠)。該術語涵蓋未處理之 IL-2 以及在細胞處理中得到的任何形式的 IL-2。該術語亦涵蓋天然生成之 IL-2 變異體，*例如*，剪接變異體或對偶基因變異體。例示性人 IL-2 之胺基酸序列如 SEQ ID NO:19 所示。未經處理之人 IL-2 還包含 N 端 20 胺基酸訊息肽，其具有 SEQ ID NO:59 之序列，該序列不存在於成熟 IL-2 分子中。

【0046】如本文所用之術語「IL-2 突變」或「突變型 IL-2 多肽」旨在涵蓋任意突變形式之 IL-2 分子，包括全長 IL-2、截短形式之 IL-2 及其中 IL-2 藉由融合或化學結合與另一個分子連接之形式。「全長」在用於指 IL-2 時旨在表示成熟、天然長度之 IL-2 分子。例如，全長人 IL-2 係指具有 133 個胺基酸的分子 (參見*例如* SEQ ID NO:19)。各種形式之 IL-2 突變的特徵在於具有至少一個影響 IL-2 與 CD25 之交互作用的胺基酸突變。該突變可涉及通常位於該位置的野生型胺基酸殘基的取代、缺失、截短或修飾。較佳的是藉由胺基酸取代獲得的突變。除非另有說明，否則 IL-2 突變在本文中可以稱為突變型 IL-2 肽序列、突變型 IL-2 多肽、突變型 IL-2 蛋白質或突變型 IL-2 類似物。

【0047】本文中所指的各種形式的 IL-2 係關於 SEQ ID NO:19 所示的序列。本文可使用各種名稱指示同一突變。例如，位置 42 處之苯丙胺酸突變為丙胺酸可表示爲 42A、A42、A42、F42A 或 Phe42Ala。

【0048】如本文所用之「人 IL-2 分子」意指包含與 SEQ ID NO:19 之人 IL-2序列至少約 90%、至少約 91%、至少約 92%、至少約 93%、至少約 94%、至少約 95% 或至少約 96% 相同之胺基酸序列的 IL-2分子。特言之，序列同一性為至少約 95%，更特言之，序列同一性為至少約 96%。在特定實施例中，人 IL-2 分子為全長 IL-2 分子。

【0049】如本文所用的術語「胺基酸突變」，意指涵蓋胺基酸取代、缺失、插入和修飾。可實施取代、缺失、插入和修飾之任意組合以得到最終構建體，前提條件是最終構建體具有所需之特徵，*例如*減少與 CD25 之結合。胺基酸序列缺失和插入包括胺基酸之胺基及/或羧基末端之缺失和插入。末端缺失的一個實例為全長人 IL-2 之位置 1 處的丙胺酸殘基缺失。較佳胺基酸突變為胺基酸取代。為改變*例如* IL-2 多肽之結合特徵，特別較佳地非保守胺基酸取代，*即*將一種胺基酸取代爲具有不同結構及/或化學性質之另一種胺基酸。较佳的胺基酸取代包括親水性胺基酸被疏水性胺基酸取代。胺基酸取代包括用二十種標準胺基酸之非天然存在之胺基酸或天然存在之胺基酸衍生物 (*例如*，4-羥基脯胺酸、3-甲基組胺酸、鳥胺酸、高絲胺酸、5-羥基離胺酸) 取代。可使用本領域中熟知的遺傳或化學方法產生胺基酸突變。遺傳方法可包括定點誘變、PCR、基因合成等。預期透過遺傳工程以外之方法諸如化學修飾改變胺基酸之側鏈基團的方法也可能有用。

【0050】如本文所用，「野生型」形式的 IL-2 係與突變型 IL-2 多肽相同的 IL-2 形式，區別僅在於野生型形式在突變型 IL-2 多肽的每個胺基酸位置處均具有野生型胺基酸。例如，如果 IL-2 突變為全長 IL-2 (*即* IL-2 未與任何其他

分子融合或結合)，則野生型形式的該突變為全長天然 IL-2。如果 IL-2 突變為 IL-2 與 IL-2 下游編碼的另一種多肽之間的融合體 (*例如*，抗體鏈)，則野生型形式的該 IL-2 突變為具有野生型胺基酸序列的 IL-2，其融合至相同的下游多肽。此外，如果 IL-2 突變為截短形式的 IL-2 (IL-2 的非截短部分內的突變或修飾序列)，則野生型形式的該 IL-2 突變為具有野生型序列的類似的截短 IL-2。為比較各種形式的 IL-2 突變與對應的野生型形式的 IL-2 的 IL-2 受體結合親和力或生物學活性，術語野生型涵蓋包含相比於自然發生的天然 IL-2 不影響 IL-2 受體結合的一個或多個胺基酸突變 (*例如*在對應於人 IL-2 的殘基 125 的位置處之半胱胺酸取代為丙胺酸) 的 IL-2 形式。在一些實施例中，用於本發明之目的的野生型 IL-2 包含胺基酸取代 C125A (參見 SEQ ID NO:26)。在根據本發明之某些實施例中，與突變型 IL-2 多肽進行比較之野生型 IL-2 多肽包含 SEQ ID NO:19 之胺基酸序列。在其他實施例中，與突變型 IL-2 多肽進行比較之野生型 IL-2 多肽包含 SEQ ID NO:26 之胺基酸序列。

【0051】 除非另有說明，否則如本文所使用之術語「CD25」或「IL-2 受體之 α-次單元」係指來自任何脊椎動物來源之任何天然 CD25，該脊椎動物包括哺乳動物，例如靈長類動物 (*例如*人類) 及嚙齒類動物 (*例如*小鼠和大鼠)。該術語涵蓋「全長」、未處理之 CD25 以及在細胞處理中得到的任何形式的 CD25。該術語亦涵蓋天然生成之 CD25 變異體，*例如*，剪接變異體或對偶基因變異體。在某些實施例中，CD25 為人 CD25。人 CD25 胺基酸序列參見*例如* UniProt 登錄編號 P01589 (版本 185)。

【0052】 如本文所使用之術語「高親和力 IL-2 受體」係指異三聚體形式的 IL-2 受體，由受體 γ-次單元 (亦稱爲共同細胞介素受體 γ-次單元、γc 或 CD132，參見 UniProt 登錄編號 P14784 (版本 192))、受體 β-次單元 (亦稱爲 CD122 或 p70，參見 UniProt 登錄編號 P31785 (版本 197)) 及受體 α-次單元 (亦

稱爲 CD25 或 p55，參見 UniProt 登錄編號 P01589 (版本 185))。相比之下，術語「中等親和力 IL-2 受體」係指僅包括 γ-次單元及 β-次單元而不含 α-次單元的 IL-2 受體 (有關綜述，參見*例如*：Olejniczak 及 Kasprzak，*Med Sci Monit* 14，RA179-189 (2008))。

【0053】「親和力」係指分子 (*例如*受體) 之單個結合位點與其結合配偶體 (*例如*配位體) 之間的非共價相互作用總和的強度。除非另有說明，否則如本文中所使用的「結合親和力」，係指反映結合對成員 (*例如*，抗原結合部分及抗原或受體及其配位體) 之間 1:1 相互作用之內在結合親和力。分子 X 對其搭配物 Y 之親和力通常可以解離常數 (K_D)表示，其係解離速率常數與締合速率常數 (分別為 k_{off} 及 k_{on}) 之比。因此，等效親和力可包括不同速率常數，只要速率常數比保持相同即可。可藉由此項技術中已知的既定方法測定親和力，包括彼等本文所述之方法。用於測定親和力之特定方法為表面電漿子共振 (SPR)。

【0054】突變型或野生型 IL-2 多肽對各種形式之 IL-2 受體的親和力可根據 WO 2012/107417 中所述之方法使用標準儀器如 BIAcore 儀器 (GE Healthcare) 藉由表面電漿子共振 (SPR) 來測定，且受體次單元諸如可藉由重組表現來獲得 (參見*例如* Shanafelt *等人*，*Nature Biotechnol* 18，1197-1202 (2000))。可替代地，IL-2 突變對不同形式之 IL-2 受體的結合親和力可使用已知表現一種或另一種此類受體形式的細胞來評估。下文描述了用於量測結合親和力的具體的說明性和示例性實施例。

【0055】「調節性 T 細胞」或「Treg 細胞」意指一種特殊類型的 CD4+ T 細胞，其可抑制其他 T 細胞的反應。Treg 細胞之特徵在於表現 IL-2 受體 (CD25) 之 α-次單元及轉錄因子叉頭框 (forkhead box) P3 (FOXP3) (Sakaguchi，*Annu Rev Immunol* 22，531-62 (2004))，且在誘導及維持抗原 (包括腫瘤所表現

之抗原) 的周圍自體耐受性中起到至關重要的作用。Treg 細胞需要 IL-2 以發揮其功能，發展並誘導其抑制特性。

【0056】 如本文所用，術語「效應子細胞」係指介導 IL-2 之細胞毒性作用的淋巴細胞族群。效應子細胞包括效應子 T 細胞，如 CD8+ 細胞毒性 T 細胞、NK 細胞、淋巴因子活化之殺手 (LAK) 細胞及巨噬細胞/單核細胞。

【0057】 如本文所用，術語「PD1」、「人 PD1」、「PD-1」或「人 PD-1」(亦稱爲程式性細胞死亡蛋白 1 或程序性死亡 1) 係指人蛋白 PD1。另外參見 UniProt 登錄編號 Q15116 (版本 156)。如本文所用，「與 PD-1 結合」、「與 PD-1 特異性結合」、「與 PD-1 結合」之抗體或「抗 PD-1 抗體」係指以足夠高的親和力結合 PD-1 (尤其是細胞表面上所表現之 PD-1 多肽) 的抗體，其使得該抗體用作靶向 PD-1 之診斷及/或治療劑。在一個實施例中，抗 PD-1 抗體與不相關之非 PD-1 蛋白的結合程度小於該抗體與 PD-1 的結合程度的約 10%，該結合程度藉由*例如*放射免疫分析 (RIA) 或流式細胞術 (FACS) 或使用生物感測器系統 (例如 Biacore® 系統) 藉由表面電漿子共振測定所量測。在某些實施例中，與 PD-1 結合之抗體與人 PD-1 結合之結合親和力之 KD 值為 ≤ 1 μM、≤ 100 nM、≤ 10 nM、≤ 1 nM、≤ 0.1 nM、≤ 0.01 nM 或 ≤ 0.001 nM (*例如* 10-8 M 或更小，*例如* 10^{-8} M 至 10^{-13} M，*例如* 10^{-9} M 至 10^{-13} M)。在一個實施例中，結合親和力之 K_D 值在表面電漿子共振測定中使用人 PD-1 之胞外域 (ECD) (PD-1-ECD) 作爲抗原來測定。

【0058】 除非另有說明，否則術語「纖維母細胞活化蛋白 (FAP)」亦稱爲脯胺醯內肽酶 FAP 或 Seprase (EC 3.4.21)，係指來自任何脊椎動物來源之任何天然 FAP，該脊椎動物包括哺乳動物，諸如靈長類動物 (*例如*，人類)、非人靈長類動物 (*例如*，食蟹猴) 及嚙齒動物 (*例如*，小鼠和大鼠)。該術語涵蓋「全長」、未處理之 FAP 以及在細胞處理中得到的任何形式 FAP。該術語亦涵蓋天

然生成之 FAP 變異體，*例如*，剪接變異體或對偶基因變異體。在一個實施例中，本發明之抗原結合分子能夠特異性結合人、小鼠及/或食蟹猴 FAP。人 FAP 之胺基酸序列顯示在 UniProt (全球資訊網 web.uniprot.org) 登錄編號 Q12884 (版本 149) 或NCBI (全球資訊網 web.ncbi.nlm.nih.gov/) RefSeq NP_004451.2 中。人 FAP 之胞外域 (ECD) 從胺基酸位置 26 處延伸至位置 760 處。小鼠 FAP 之胺基酸序列顯示在 UniProt 登錄編號 P97321 或 NCBI RefSeq NP_032012.1 中。小鼠 FAP 之胞外域 (ECD) 從胺基酸位置 26 處延伸至位置 761 處。在一些實施例中，本發明之抗 FAP 結合分子與 FAP 之胞外域結合。例示性抗 FAP 結合分子描述於國際專利申請第 WO 2012/020006 A2 號中。在一個實施例中，抗 FAP 抗體與不相關之非 FAP 蛋白的結合程度小於該抗體與 FAP 的結合程度的約 10%，該結合程度藉由*例如*放射免疫分析 (RIA) 或流式細胞術 (FACS) 或使用生物感測器系統 (例如 Biacore® 系統) 藉由表面電漿子共振測定所量測。在某些實施例中，與 FAP 結合之抗體與人 FAP 結合之結合親和力之 K_D 值為 ≤ 1 μM、≤ 100 nM、≤ 10 nM、≤ 1 nM、≤ 0.1 nM、≤ 0.01 nM 或 ≤ 0.001 nM (*例如* 10^{-8} M 或更小，*例如* 10^{-8} M 至 10^{-13} M，*例如* 10^{-9} M 至 10^{-13} M)。在一個實施例中，結合親和力之 K_D 值在表面電漿子共振測定中使用人 FAP 之胞外域 (ECD) 作爲抗原來測定。

【0059】 本文中的術語「抗體」以最廣義使用且涵蓋各種抗體結構，包括但不限於單株抗體、多株抗體、多特異性抗體 (*例如*，雙特異性抗體) 及抗體片段，只要其等展示出預期抗原結合活性即可。

【0060】 如本文所用的術語「單株抗體」係指獲自實質上同源抗體族群之抗體，*即*包含族群的個體抗體是相同的和/或結合相同的抗原決定基，除了*例如*含有天然生成之突變或於單株抗體製劑生產過程中產生的可能的變異體抗體之外，此等變異體通常係以少量存在。與通常包括針對不同決定位 (抗原決定

基) 之不同抗體之多株抗體製劑相反，單株抗體製劑之每個單株抗體係針對於抗原上的單一決定位。因此，修飾詞「單株」表示抗體之特徵係獲自實質上同質之抗體群體，且不應解釋為需要藉由任何特定方法產生抗體。例如，意欲根據本發明使用的單株抗體可藉由多種技術來製造，包括但不限於融合瘤方法、重組 DNA 方法、噬菌體展示方法、及利用包含全部或部分人免疫球蛋白基因座之轉殖基因動物之方法，本文描述此等方法及用於製備單株抗體之其他例示性方法。

【0061】「經分離之 (isolated)」抗體係與其自然環境之組分分離之分離的抗體，*即*不在其天然環境中之分離的抗體。不需要特定純化水平。例如，可自其天然或自然環境中移除經分離之抗體。出於本發明之目的，在宿主細胞中表現的重組產生之抗體被視作經分離的，視為係已藉由任何適宜技術分離、分級或部分或實質上純化之天然或重組抗體。因此，將本發明之免疫結合體分離。在一些實施例中，將抗體純化至大於 95% 或 99% 純度，藉由 (例如) 電泳 (*例如* SDS-PAGE、等電位聚焦 (IEF)、毛細管電泳) 或層析 (*例如*，離子交換或反相 HPLC 法) 來確定。關於評估抗體純度之方法的綜述，*參見例如* Flatman *等人*，*J. Chromatogr. B* 848:79-87 (2007)。

【0062】術語「全長抗體」、「完整抗體」及「全抗體」在本文中可互換使用，係指具有與天然抗體結構大致類似的結構之抗體。

【0063】「抗體片段」係指除完整抗體以外的分子，其包含結合完整抗體所結合抗原之完整抗體的一部分。抗體片段之實例包括 (但不限於) Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')2、雙功能抗體、線性抗體、單鏈抗體分子 (*例如* scFv) 及單域抗體。關於某些抗體片段的綜述，*參見* Holliger 及 Hudson, *Nature Biotechnology* 23:1126-1136 (2005)。

【0064】術語「免疫球蛋白分子 (immunoglobulin molecule)」係指具有天然生成之抗體之結構之蛋白質。例如，IgG 類的免疫球蛋白為約 150,000 道耳頓、由二條輕鏈及二條重鏈經二硫鍵鍵合所構成之異四聚體糖蛋白。從 N 端至 C 端，每條重鏈具有可變域 (VH)，亦稱為重鏈可變域或重鏈可變區，接著係三個恆定域 (CH1、CH2 及 CH3)，亦稱為重鏈恆定區。類似地，從 N 端至 C 端，每條輕鏈具有可變域 (VL)，亦稱為輕鏈可變域或輕鏈可變區，接著為輕鏈恆定 (CL) 域，亦稱為輕鏈恆定區。免疫球蛋白之重鏈可分配為五種類型之一，稱為 α (IgA)、δ (IgD)、ε (IgE)、γ (IgG) 或 μ (IgM)，其中一些可以進一步分為以下亞型，*例如* γ1 (IgG1)、γ2 (IgG2)、γ3 (IgG3)、γ4 (IgG4)、α1 (IgA1) 及 α2 (IgA2)。基於其恆定域之胺基酸序列，免疫球蛋白之輕鏈可被歸類為兩種類型中的一種，稱為卡帕 (κ) 及蘭姆達 (λ)。免疫球蛋白基本上由經由免疫球蛋白鉸鏈區連接的二個 Fab 分子及一個 Fc 域組成。

【0065】術語「抗原結合域 (antigen binding domain)」係指抗體之部分，其包含特異性結合抗原之部分或全部且與其互補之區域。抗原結合域可由例如一個或多個抗體可變域 (亦稱為抗體可變區) 提供。特言之，抗原結合域包含抗體輕鏈可變域 (VL) 及抗體重鏈可變域 (VH)。

【0066】術語「可變區 (variable region)」或「可變域 (variable domain)」係指參與抗體與抗原結合之抗體重鏈或輕鏈之域。天然抗體之重鏈及輕鏈 (分別為 VH 及 VL) 之可變域通常具有類似的結構，且每個域均包含四個保守性框架區 (FR) 及三個高度可變區 (HVR)。參見*例如*，Kindt *等人*，*Kuby Immunology*，第 6 版，W.H. Freeman and Co.，第 91 頁 (2007)。單個 VH 或 VL 域可能足以賦予抗原結合特異性。如在本文中結合可變區序列所使用的「Kabat 編號」，係指 Kabat *等人*，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5

版 Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda, MD (1991) 描述的編號系統。

【0067】 如本文中所使用的重鏈及輕鏈之所有恆定區及域之胺基酸位置，係根據描述於 Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD (1991) 的 Kabat 編號系統 (在本文中稱為「根據 Kabat 編號」或「Kabat 編號」) 編號。具體言之，Kabat 編號系統 (參見 Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda，MD (1991) 的第 647-660 頁) 係用於卡帕及蘭姆達同型之輕鏈恆定域 CL 及 Kabat 及 EU 索引編號系統 (參見第 661-723 頁) 係用於重鏈恆定域 (CH1、鉸鏈、CH2 及 CH3)，在此情況中，其於本文中藉由參考「根據 Kabat EU 指數編號」進一步闡明。

【0068】 如本申請所用，術語「高度可變區」或「HVR」係指抗體可變域的每個區域，該區域在序列中是個高度可變的 (「互補性決定區」或「CDR」) 及/或形成結構上定義的環 (「高度可變環」) 及/或包含抗原接觸殘基 (「抗原接觸處」)。一般而言，抗體包含六個 HVR；三個在 VH 中 (H1、H2、H3)，及三個在 VL 中 (L1、L2、L3)。在本文中，例示性 HVR 包括：

(a) 存在於胺基酸殘基 26-32 (L1)、50-52 (L2)、91-96 (L3)、26-32 (H1)、53-55 (H2)、及 96-101 (H3) 之高度可變環 (Chothia 及 Lesk，*J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987))；

(b) 存在於胺基酸殘基 24-34 (L1)、50-56 (L2)、89-97 (L3)、31-35b (H1)、50-65 (H2) 及 95-102 (H3) 之CDR (Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版，Public Health Service，National Institutes of Health，Bethesda, MD (1991))；

(c) 存在於胺基酸殘基 27c-36 (L1)、46-55 (L2)、89-96 (L3)、30-35b (H1)、47-58 (H2) 及 93-101 (H3) 之抗原接觸 (MacCallum 等人 J. *Mol. Biol.* 262: 732-745 (1996))；及

(d) (a)、(b) 及/或 (c) 之組合，包括 HVR 胺基酸殘基 46-56 (L2)、47-56 (L2)、48-56 (L2)、49-56 (L2)、26-35 (H1)、26-35b (H1)、49-65 (H2)、93-102 (H3)、及 94-102 (H3)。

除非另有說明，否則可變域中之 HVR 殘基及其他殘基 (*例如* FR 殘基) 在本文中係根據 Kabat 等人 (*同上文*) 編號。

【0069】「骨架 (framework)」或「FR」係指除高度可變區 (hypervariable region) (HVR) 殘基之外的可變域殘基。可變域之 FR 通常由四個 FR 域組成：FR1、FR2、FR3、及 FR4。因此，HVR 及 FR 序列通常以如下順序出現在 VH (或 VL) 中：FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4。

【0070】「人源化 (humanized)」抗體係指包含來自非人 HVR 之胺基酸殘基及來自人 FR 之胺基酸殘基之嵌合抗體。在某些實施例中，人源化抗體將包括實質上所有至少一個 (且通常兩個) 可變域，其中所有或實質上所有 HVR (*例如* CDR) 對應於非人抗體之其等，及所有或實質上所有 FR 對應對於人抗體之其等。此等可變域在本文中稱為「人源化可變區 (humanized variable region)」。人源化抗體視情況可包含衍生自人抗體之抗體恆定區之至少一部分。在一些具體實例中，人源化抗體中之一些 FR 殘基經來自非人類抗體 (*例如* 衍生 HVR 殘基之抗體) 之對應殘基取代，*例如*以恢復或提高抗體特異性或親和力。抗體 (*例如*非人抗體) 之「人源化形式 (humanized form)」係指已經歷人源化之抗體。本發明所涵蓋的「人源化抗體 (humanized 抗體)」之其他形式為其中恆定區已自原始抗體之形式另外修飾或改變者，以產生根據本發明之性質、尤其關於 C1q 結合及/或 Fc 受體 (FcR) 結合之性質。

【0071】「人抗體 (human antibody)」為具有胺基酸序列之抗體，該胺基酸序列對應於由人或人體細胞產生或自利用人抗體譜系 (antibody repertoire) 或其他人抗體編碼序列之非人來源衍生之抗體之胺基酸序列。人抗體的該定義具體而言排除包含非人抗原結合殘基之人源化抗體。在某些實施例中，人抗體係衍生自非人轉殖基因哺乳動物，例如小鼠、大鼠、或兔。在某些實施例中，人抗體係衍生自融合瘤細胞株。從人抗體庫分離的抗體或抗體片段在本文中亦被視作人抗體或人抗體片段。

【0072】抗體或免疫球蛋白之「類別 (class)」係指為其重鏈所具有的恆定域或恆定區之類型。有五大類抗體：IgA、IgD、IgE、IgG 及 IgM，且此等類別中之若干者可進一步分成子類 (同種型)，*例如* IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgA1 及 IgA2。對應於不同類別之免疫球蛋白的重鏈恆定域分別稱為 α、δ、ε、γ 及 μ。

【0073】本文中的術語「Fc 域」或「Fc 區域」，用於定義包含至少一部分恆定區的免疫球蛋白重鏈的 C 端區域。該術語包括天然序列 Fc 區域和變異 Fc 區域。儘管 IgG 重鏈之 Fc 區域之邊界可能略有變化，但通常將人 IgG 重鏈之 Fc 區域定義爲從 Cys226 或 Pro230 延伸至該重鏈之羧基端。但是，由宿主細胞產生的抗體可能經歷重鏈 C 端的一種或多種，特定而言一種或兩種胺基酸之翻譯後切割。因此，由宿主細胞透過表現編碼全長重鏈的特定核酸分子而產生的抗體可包括全長重鏈，或者可包括全長重鏈的切割變異體 (在本文中也稱為「切割變異體重鏈」)。重鏈的最後兩個 C 端胺基酸為甘胺酸 (G446) 及離胺酸 (K447，根據 Kabat EU 指數編號)。因此，可以存在或可以不存在 Fc 區域之 C 端離胺酸 (Lys447) 或 C 端甘胺酸 (Gly446) 及離胺酸 (K447)。除非另有說明，否則包括 Fc 域 (或本文定義的 Fc 域的次單元) 之重鏈之胺基酸序列在本文中表示不含 C 端甘胺酸-離胺酸二肽。在本發明之一個實施例中，根據本發明

所述之免疫結合體中所含之重鏈 (包含本文所指定之 Fc 域之次單元) 包含額外之 C 端甘胺酸-離胺酸二肽 (G446 及 K447，根據 Kabat EU 指數編號)。在本發明之一個實施例中，根據本發明所述之免疫結合體中所含之重鏈 (包含本文所指定之 Fc 域之次單元) 包含額外之 C 端甘胺酸殘基 (G446，根據 Kabat EU 指數編號)。本發明之組成物，如本文所述之醫藥組成物，包含本發明之免疫結合體族群。免疫結合體族群可包含具有全長重鏈之分子及具有切割變異體重鏈之分子。免疫結合體族群可由具有全長重鏈之分子及具有切割變異體重鏈之分子之混合物組成，其中，免疫結合體之至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80% 或至少 90% 具有切割變異體重鏈。在本發明之一個實施例中，包含本發明之免疫結合體族群之組成物包含免疫結合體，該免疫結合體包含重鏈，該重鏈具有本文指定之 Fc 域之次單元及額外之 C 端甘胺酸-離胺酸二肽 (G446 及 K447，根據 Kabat EU 指數編號)。在本發明之一個實施例中，包含本發明之免疫結合體族群之組成物包含免疫結合體，該免疫結合體包含重鏈，該重鏈具有本文指定之 Fc 域之次單元及額外之 C 端甘胺酸殘基 (G446，根據 Kabat EU 指數編號)。在本發明之一個實施例中，此等組成物包含免疫結合體族群，該免疫結合體群由以下分子組成：包含以下重鏈之分子，該重鏈包含本文所指定之 Fc 域之次單元；包含以下重鏈之分子，該重鏈包含本文所指定之 Fc 域之次單元及額外的 C 端甘胺酸殘基 (G446，根據 Kabat EU 指數編號)；以及包含以下重鏈之分子，該重鏈包含本文所指定之 Fc 域之次單元及額外之 C 端甘胺酸-離胺酸二肽 (G446 和 K447，根據 Kabat EU 指數編號)。除非本文另有說明，否則 Fc 區或恆定區中胺基酸殘基之編號根據 EU 編號系統 (亦稱為 EU 指數) 進行，如 Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest，第 5 版 Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991 所述 (另見上文)。如本文中所使用的 Fc 域之「次單元」，係指形成二聚體 Fc 域之兩個多肽

之一，*即*包含能夠穩定自締合之免疫球蛋白重鏈之 C 端恆定區之多肽。例如，IgG Fc 域之次單元包含 IgG CH2 及 IgG CH3 恆定域。

【0074】「促進 Fc 域之第一次單元及第二次單元之締合之修飾」係對胜肽主鏈的操作或對 Fc 域次單元之翻譯後修飾，其減少或阻止包含 Fc 域次單元之多肽與相同多肽之締合形成同源二聚體。本文所用之促進締合之修飾，特別包括對期望締合之兩個 Fc 域次單元 (*即* Fc 域之第一次單元及第二次單元) 中的每一個所進行之單獨修飾，其中，該修飾彼此互補，以便促進兩個 Fc 域次單元之締合。例如，促進締合之修飾可改變一個或兩個 Fc 域次單元之結構或電荷，以分別使其在空間或靜電上有利。因此，(雜)二聚化發生在包含第一 Fc 域次單元之多肽與包含第二 Fc 域次單元之多肽之間，其就融合到每個次單元 (*例如*，抗原結合部分) 的其他組分而言可能有所不同。在一些實施例中，促進締合之修飾包括 Fc 域中之胺基酸突變，特別是胺基酸取代。在一個特定實施例中，促進締合之修飾包括 Fc 域之兩個次單元的每一個中之單獨的胺基酸突變，特別是胺基酸取代。

【0075】術語「效應功能」用於指抗體時，係指歸因於抗體的 Fc 區域的那些生物活性，其隨抗體同種型而變化。抗體效應功能的實例包括：C1q 結合及補體依賴性細胞毒性 (CDC)、Fc 受體結合、抗體依賴性細胞介導之細胞毒性 (ADCC)、抗體依賴性細胞吞噬作用 (ADCP)、細胞介素分泌、抗原呈遞細胞攝取之免疫複合物介導抗原、細胞表面受體 (*例如*，B 細胞受體) 降調及 B 細胞活化。

【0076】抗體依賴性細胞介導的細胞毒性 (ADCC) 為一種免疫機制，其導致免疫效應細胞裂解抗體包被的標靶細胞。標靶細胞為抗體或其衍生物包含 Fc 區域的細胞，其通常透過作爲 N 端的蛋白質部分與 Fc 區域特異性結合。如本文中所使用的術語「減少 ADCC」，係指透過上文定義的 ADCC 機制在給定

時間內以標靶細胞周圍之培養基中給定濃度的抗體在給定時間內裂解的標靶細胞數量的減少，及/或透過 ADCC 機制在給定時間內實現給定數量的標靶細胞之裂解所需的標靶細胞周圍之培養基中抗體濃度的增加。ADCC 的減少相對於使用相同標準生產、純化、配製和儲存方法 (本技術領域具有通常知識者已知的方法) 由相同類型的宿主細胞所生產的相同抗體 (但尚未工程化) 所介導的 ADCC。例如，由 Fc 域中包含減少 ADCC 的胺基酸取代的抗體所介導的 ADCC 的減少為相對於在 Fc 域中不含此胺基酸取代的相同抗體所介導的 ADCC。用於測量 ADCC 的合適的測定法為本技術領域中熟知的 (參見*例如* PCT 公開號 WO 2006/082515 或 PCT 公開號 WO 2012/130831)。

【0077】「活化 Fc 受體」為在抗體之 Fc 域參與之後引起刺激受體攜帶細胞執行效應功能的信號轉導事件的 Fc 受體。人活化 Fc 受體包括 FcγRIIIa (CD16a)、FcγRI (CD64)、FcγRIIa (CD32) 和 FcαRI (CD89)。

【0078】如本文中所使用的術語「工程改造 (engineer、engineered、engineering)」，被認為包括對胜肽主鏈的任何操作或天然存在的或重組的多肽或其片段的轉譯後修飾。工程改造包括修改胺基酸序列、醣基化模式、或單個胺基酸的側鏈基團，以及這些方法的組合。

【0079】「減少結合」，例如減少結合 Fc 受體或 CD25，係指 (例如) 藉由 SPR 測得各自相互作用之親和力降低。為清楚起見，該術語亦包括將親和力降低至零 (或低於分析方法的檢測限度)，*即*相互作用完全廢除。相反，「增加結合」係指各自相互作用之結合親和性增加。

【0080】如本文所用，術語「免疫結合體」係指包括至少一個 IL-2 分子和至少一個抗體的多肽分子。IL-2 分子可藉由多種交互作用及多種構型連接至抗體，如本文所述。在特定實施例中，IL-2分子經由肽連接子與抗體融合。根

據本發明之特定免疫結合體基本上由藉由一個或多個連接子序列連接的一個 IL-2 分子及抗體組成。

【0081】「融合」意指組分 (*例如*抗體及 IL-2分子) 藉由肽鍵直接或經由一或多個肽連接子連接。

【0082】如本文所用，關於 Fc 域次單元等的術語「第一」及「第二」係用於方便區分每一類型之部分何時存在多於一個。除非明確說明，否則使用此等術語並非旨在賦予免疫結合體特定之順序或方向。

【0083】「特異性結合」意指結合對抗原具有選擇性且可區分出非所欲或非特定之相互作用。抗體與具體抗原 (*例如* PD-1 或 FAP) 結合之能力可藉由酶聯免疫吸附檢定 (ELISA) 或熟習此項技術者熟悉的其他技術，*例如*表面電漿子共振 (SPR) 技術 (*例如*於 BIAcore 儀器上分析) (Liljeblad 等人，*Glyco J* 17，323-329 (2000)) 及傳統的結合檢定 (Heeley，*Endocr Res* 28，217-229 (2002)) 來測定。在一個實施例中，抗體與不相關的蛋白質之結合程度低於該抗體與抗原的結合約 10%，*例如*藉由 SPR 所量測。

【0084】如本文所用，「周邊血單核細胞」或「PBMC」係指具有圓形核的異質性血細胞族群。可見於 PBMC 族群中之細胞實例包括淋巴細胞如 T 細胞、B 細胞、NK 細胞 (包括 NKT 細胞及 CIK 細胞) 及單核細胞如巨噬細胞及樹狀細胞。如本文所用，「多個 PBMC」係指包含至少兩種類型的血細胞的細胞的 PBMC 製品。在一些實施例中，多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、巨噬細胞或樹狀細胞中之兩種或更多種。在一些實施例中，多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、巨噬細胞或樹狀細胞中之三種或更多種。在一些實施例中，多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、巨噬細胞或樹狀細胞中之四種或更多種。在一些實施例中，多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、巨噬細胞及樹狀細胞。

【0085】 PBMC 可藉由本領域已知的方法分離。例如，可基於 PBMC 之密度與其他血細胞的差異，從個體的周邊血中提取 PBMC。在一些實施例中，使用細胞大小差異及/或基於細胞密度差異的分級技術，從個體的周邊血中提取 PBMC。在一些實施例中，使用 Ficoll (*例如* ficoll 梯度)，從個體的周邊血中提取 PBMC。在一些實施例中，使用 ELUTRA® 細胞分離系統，從個體的周邊血中提取 PBMC。

【0086】 在一些實施例中，將 PBMC 族群與個體分離。在一些實施例中，多個 PBMC 為 PBMC 的自體族群，其中該族群來源於特定個體，藉由本文所述的任意方法進行操作，然後返回特定個體。在一些實施例中，多個 PBMC 為 PBMC 的同種異體族群，其中該族群來源於一個個體，藉由本文所述的任意方法進行操作，然後投予第二個個體。

【0087】 在一些實施例中，多個 PBMC 為 PBMC 的再組製劑。在一些實施例中，該多個 PBMC 可藉由混合通常存在於 PBMC 族群中的細胞來生成；例如，藉由混合 T 細胞、B 細胞、NK 細胞或單核細胞中的兩個或更多個的族群來生成。在一些實施例中，對脾細胞族群中的細胞比例進行調整 (*例如*精心調校)，以更好地反映人 PBMC 之族群特徵。例如，可以從脾細胞族群中耗盡 B 細胞，以更好地反映人 PBMC 之族群。

【0088】 如本文所用之術語「孔」係指開口，包括但不限於材料內之臼、撕裂、腔、口、缺口、間隙或穿孔。在一些實例中，(在有說明的情況下)該術語係指本揭露之表面內的孔。在其他實例中，(在有說明的情況下) 孔可以指細胞膜中的孔。

【0089】 如本文所用之術語「膜」係指包含孔的選擇性屏障或片 。該術語包括用作邊界或襯裡的柔韌的片狀結構。在一些實例中，該術語係指包含孔的表面或過濾器。該術語不同於術語「細胞膜」。

【0090】 如本文所用之術語「過濾器」係指允許選擇性地通過孔的多孔製品。在一些實例中，該術語係指包含孔的表面或膜。

【0091】 如本文所用之術語「異質性」係指在結構或組成上混合或不均勻的對象。在一些實例中，該術語係指在給定表面內具有變化的尺寸、形狀或分佈的孔。

【0092】 如本文所用之術語「均質性」係指在整個結構或組成上一致或均勻的對象。在一些實例中，該術語係指在給定表面內具有一致的尺寸、形狀或分佈的孔。

【0093】 涉及核酸序列 (例如編碼序列和對照序列) 的術語「異源性」表示通常不連接在一起及/或通常不與特定細胞締合的序列。因此，核酸構建體或載體之「異源性」區域是在另一個核酸分子內或與該另一個核酸分子連接的核酸片段，在自然界中未發現該核酸片段與其他分子締合。因此，核酸構建體之異源性區域可包括側接自然界中未發現與該編碼序列締合的序列的編碼序列。異源性編碼序列的另一個实例為自然界中未发现編碼序列本身的構建體 (*例如*，具有與天然基因不同的密碼子的合成序列)。類似地，出于本發明之目的，由通常不存在於細胞中的構建體所轉換的細胞將被視爲異源性細胞。如本文所用，對偶基因變異或自然發生的突變事件不產生異源性 DNA。

【0094】 涉及胺基酸序列 (例如肽序列和多肽序列) 的術語「異源性」表示通常不連接在一起及/或通常不與特定細胞締合的序列。因此，肽序列之「異源性」區域是在另一個胺基酸分子內或與該另一個胺基酸分子連接的胺基酸片段，在自然界中未發現該胺基酸片段與其他分子締合。例如，肽構建體之異源性區域可包括該肽的以下胺基酸序列，該胺基酸序列側接自然界中未發現與該肽之胺基酸序列締合的序列。異源性肽序列的另一個实例為自然界中未发现肽序列本身的構建體 (*例如*，具有與天然基因編碼的胺基酸不同的胺基酸的合成

序列)。類似地，出于本發明之目的，由表現通常不存在於細胞中的胺基酸構建體的載體所轉換的細胞將被視爲異源性細胞。如本文所用，對偶基因變異或自然發生的突變事件不產生異源性肽。

【0095】 術語「外源性」在用於指與細胞有關的藥劑 (抗原或佐劑) 時，係指從細胞外部遞送至細胞中的藥劑。細胞中可能已經存在或不存在該藥劑，且在遞送該外源性藥劑後可能產生或不產生該藥劑。

【0096】 如本文所用，術語「禁止」可以指阻斷、減少、消除或以其他方式拮抗特定標靶之存在或活性的行為。禁止可以指部分禁止或完全禁止。例如，禁止免疫反應可以指導致免疫反應之阻滯、減少、消除或任何其他拮抗作用的任何行為。在其他實例中，對核酸表現之禁止可包括但不限於核酸轉錄之減少、mRNA 豐度之降低 (*例如*，默化 mRNA 轉錄)、mRNA 之降解、mRNA 翻譯之抑制，依此類推。

【0097】 如本文所用，術語「抑制」可以指降低、減少、禁止、限制、縮小或以其他方式減少特定標靶之存在或活性的行爲。抑制可以指部分抑制或完全抑制。例如，抑制免疫反應可以指導致免疫反應降低、減少、禁止、限制、縮小或以其他方式減少的任何行為。在其他實例中，對核酸表現之抑制可包括但不限於核酸轉錄之減少、mRNA 豐度之降低 (*例如*，默化 mRNA 轉錄)、mRNA 之降解、mRNA 翻譯之抑制，依此類推。

【0098】 如本文所用，術語「增強」可以指改善、增強、增加或以其他方式提高特定標靶之存在或活性的行為。例如，增強免疫反應可以指導致免疫反應改善、增強、增加或以其他方式提高的任何行為。在一個例示性實例中，增強免疫反應可以指採用抗原和/或佐劑來改善、增強、增加或以其他方式提高免疫反應。在其他實例中，增強核酸之表現可包括但不限於核酸轉錄之增加、

mRNA 豐度之提高 (*例如*，增加 mRNA 轉錄)、mRNA 降解之減少、mRNA 翻譯之增加，依此類推。

【0099】 如本文所用，術語「調節」可以指改變、修改、變化或以其他方式修改特定標靶之存在或活性的行為。例如，調節免疫反應可以指導致免疫反應改變、修改、變化或以其他方式修改的任何行為。在其他實例中，調節核酸之表現可包括但不限於核酸轉錄之變化、mRNA 豐度之變化 (*例如*，增加 mRNA 轉錄)、mRNA 降解之相應變化、mRNA 翻譯之變化，依此類推。

【0100】 如本文所用，術語「誘導」可以指引發、促進、刺激、建立或以其他方式產生結果的行爲。例如，誘導免疫反應可以指導致引發、促進、刺激、建立或以其他方式產生所需之免疫反應的任何行爲。在其他實例中，誘導核酸之表現可包括但不限於引發核酸之轉錄、引發 mRNA 翻譯，依此類推。

【0101】 如本文所用，術語「同源性」係指來源於相同生物的分子。在一些實例中，該術語係指通常在給定生物中發現或表現的核酸或蛋白質。

【0102】 如本文所用之術語「多核苷酸」或「核酸」係指任意長度之核苷酸的聚合形式，即核糖核苷酸或去氧核糖核苷酸。因此，該術語包括但不限於單鏈、雙鏈或多鏈 DNA 或 RNA、基因組 DNA、cDNA、DNA-RNA 襍合體或包含嘌呤和嘧啶鹼基之聚合物或其他天然、化學或生化修飾的非天然的或衍生的核苷酸鹼基。多核苷酸至主鏈可包含糖和磷酸基團 (如通常存在於 RNA 或 DNA 中的)，或經修飾或取代的糖或磷酸基團。可替代地，多核苷酸之主鏈可包含合成次單元之聚合物，例如胺基磷酸酯及硫代磷酸酯，因此可以為寡去氧核苷胺基磷酸酯 (P-NH_2) 或混合型胺基磷酸酯-磷酸二酯低聚物。另外，可藉由合成互補鏈並在適當條件下使鏈退火，或藉由使用 DNA 聚合酶與適當引物從頭合成互補鏈，由化學合成的單鏈多核苷酸產物獲得雙鏈多核苷酸。

【0103】術語「多肽」和「蛋白質」可互換使用，係指胺基酸殘基的聚合物，且最小長度不限。該等胺基酸殘基的聚合體可包含天然或非天然胺基酸殘基，且包括但不限於胺基酸殘基的肽、寡肽、二聚體、三聚體及多聚體。該定義同時涵蓋全長蛋白質及其片段。該術語還包括多肽之表現後修飾，例如醣基化、唾液酸化、乙醯化、磷酸化等。此外，出於本發明之目的，「多肽」係指以下蛋白質，其包括對天然序列之修飾，例如缺失、添加和取代 (本質上通常是保守型修飾)，只要該蛋白質保持所需的活性即可。這些修飾可能是故意修飾，例如通過定點誘變實現，也可能是意外修飾，例如通過產生蛋白質的宿主突變或 PCR 擴增引起的錯誤實現。

【0104】如本文所用，術語「佐劑」係指直接或間接調節和/或產生免疫反應的物質。通常，與單獨的抗原相比，將佐劑與抗原合併投予以增強對抗原的免疫反應。在一些實施例中，佐劑用於調節多個 PBMC (*例如*實例中所述)。各種佐劑如本文所述。

【0105】術語「CpG 寡去氧核苷酸」及「CpG ODN」係指包含由磷酸酯分開的胞嘧啶及鳥嘌呤的二核苷酸的 DNA 分子 (在本文中亦稱為「CpG」二核苷酸或「CpG」)。本揭露之 CpG ODN 包含至少一種未甲基化的 CpG 二核苷酸。即，CpG 二核苷酸中之胞嘧啶未經甲基化 (*即*，并非 5-甲基胞嘧啶)。CpG ODN 可能具有部分或完整的硫代磷酸酯 (PS) 主鏈。

【0106】如本申請所用，「治療 (treatment)」或「治療 (treating)」是用於獲得有益或期望結果包括臨床結果的方法。出於本發明之目的，有益或期望的臨床結果包括但不限於以下一種或多種：減輕由疾病引起的一種或多種症狀，減輕疾病的程度，穩定疾病 (*例如*，預防或延緩疾病的惡化)，預防或延緩疾病的擴散 (*例如*，轉移)，預防或延緩疾病的復發，延緩或減慢疾病的進展，改善疾病狀態，提供疾病的緩解 (部分或全部)，減少治療疾病所需的一種或多種其

他藥物的劑量，延緩疾病的進展，增加或改善生活質量，增加體重和/或延長生存期。本發明之方法涵蓋治療的這些方面中的任何一個或多個。

【0107】 如本文所用，「組合療法」意指第一藥劑與另一種藥劑合併投予。「合併」係指在投予一種治療方式以外投予另一種治療方式，例如在向同一個體投予如本文所述之免疫結合體以外投予如本文所述之有核細胞的組成物。因此，「合併」係指在向個體提供一種治療方式之前、之中或之後投予另一種治療方式。

【0108】 本文使用的術語「有效量」係指足以治療特定病症、狀況或疾病 (例如改善、緩和、減輕及/或延遲其症狀中之一者或多者) 的化合物或組成物的量。關於癌症，有效量包含足以引起腫瘤縮小和/或降低腫瘤的生長速率 (例如抑制腫瘤生長) 或防止或延遲癌症中之其他不需要的細胞增殖的量。在一些實施例中，有效量為足以延遲癌症之發展的量。在一些實施例中，有效量為足以防止或延遲復發的量。有效量可於一次或多次給藥中投予。對於癌症，有效量之組成物或免疫結合體可以：(i) 減少癌細胞數；(ii) 減小腫瘤尺寸；(iii) 在一定程度上禁止、延遲或減緩且較佳地停止癌細胞浸潤入周邊器官中；(iv) 禁止 (*即*，在一定程度上減緩或較佳地停止) 腫瘤轉移；(v) 禁止腫瘤生長；(vi) 防止或延遲腫瘤之復發；(vii) 在一定程度上減輕與該癌症相關之症狀；及/或 (viii) 阻斷 (例如破壞) 癌間質。

【0109】 如本文所用，術語「同時投予」意指組合療法中的第一療法和第二療法以不超過約 15 分鐘的時間間隔 (例如不超過約 10 分鐘、5 分鐘或 1 分鐘中之任一者) 投予。當第一療法及第二療法同時投予時，第一療法及第二療法可包含在相同的組成物 (*例如*，同時包含第一療法及第二療法的組成物) 中或單獨的組成物 (*例如*，第一療法包含在一種組成物中，第二療法包含在另一種組成物中)。

【0110】如本文所用，術語「順序投予」意指組合療法中的第一療法和第二療法以超過約 15 分鐘的時間間隔 (例如超過約 20 分鐘、30 分鐘、40 分鐘、50 分鐘、60 分鐘或更長時間中之任一者) 投予。可首先投予第一療法或第二療法。第一療法或第二療法包含於單獨的組成物中，其可以包含於相同或不同之包裝或套組中。

【0111】如本文所用，術語「並行投予」意指組合療法中的第一療法之投予及第二療法之投予彼此重疊。

【0112】如本文所用，術語「預防性治療」係指以下治療，其中已知或疑似個體患有疾病，或個體具有罹患病症的風險但尚未表現出該病症之症狀或最小症狀。接受預防性治療的個體可以在症狀發作之前接受治療。

【0113】藥劑*例如*醫藥組成物的「治療有效量」係指在所需之給藥劑量和時間段內有效實現所需的治療效果的量。治療有效量的藥劑例如消除、減少、延遲、最小化或防止疾病的不利影響。

【0114】藥劑*例如*醫藥組成物的「預防有效量」係指在所需之給藥劑量和時間段內有效實現所需的預防效果的量。例如，預防有效量之藥劑可預防疾病。

【0115】「個體」或「受試者」為哺乳動物。哺乳動物包括但不限於馴養的動物 (*例如*牛、綿羊、貓、狗和馬)、靈長類動物 (*例如*人及非人類靈長類動物諸如猴)、兔以及嚙齒動物 (*例如*小鼠及大鼠)。特別地，個體或受試者為人類。

【0116】術語「醫藥組成物」係指以下製劑：其呈允許其中所含之活性成分之生物活性有效之形式，且不含對將投予組成物之受試者具有不可接受毒性之額外組分。

【0117】如本申請所用，「醫藥上可接受的」或「藥理上相容的」係指不是生物學上或其他方面不期望的材料，*例如*，該材料可以摻入投予患者的藥物組成物中而不會引起任何顯著的不期望的生物學效應或以有害的方式與其中所含組成物的任何其他組分相互作用。藥學上可接受的載劑或賦形劑較佳的是滿足毒理學和製造測試的要求標準和/或包括在美國食品和藥物管理局編制的非活性成分指南中。

【0118】對於本文中所述之任何結構和功能特徵，確定這些特徵的方法為本領域中已知的。

突變型 IL-2 多肽

【0119】根據本發明之免疫結合體包含具有免疫療法之有利特性的突變型 IL-2 多肽。特言之，消除突變型 IL-2 多肽中可導致毒性、但對 IL-2 之功效並非必需之 IL-2 的藥理特性。此類突變型 IL-2 多肽詳細描述於 WO 2012/107417 中，該專利全文以引用方式併入本文。不同形式的 IL-2 受體由不同的次單元組成，且對 IL-2 具有不同的親和力。由 β 及 γ 受體次單元組成之中等親和力 IL-2 受體靜止效應子細胞上表現，且足以實現 IL-2 信號傳導。高親和力 IL-2 受體，還包含受體 (CD25) 之 α-次單元，主要在調節性 T (Treg) 細胞以及活化之效應子細胞上表現，IL-2 可分別促進其活化 Treg 細胞所介導之免疫抑制或活化誘導之細胞死亡 (AICD)。因此，不希望被理論束縛，減少或消除 IL-2 對 IL-2 受體之 α-次單元的親和力應藉由調節性 T 細胞減少 IL-2 所誘導之效應子細胞功能之下調，並藉由 AICD 之過程減少腫瘤耐受性之形成。另一方面，保持對中等親和力 IL-2 受體之親和力應保持 IL-2 對 NK 和 T 細胞等效應子細胞之增殖和活化的誘導。在一些實施例中，免疫結合體之 IL-2 多肽包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號)。

【0120】 可降低對 CD25 之親和力的人 IL-2 (hIL-2) 的其他胺基酸取代基可以在例如胺基酸位置 35、38 或 43 或其組合處 (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 及與 F42A、Y45A 及 L72G 之組合處生成。例示性胺基酸取代包括 K35E、K35A、R38A、R38E、R38N、R38F、R38S、R38L、R38G、R38Y、R38W 及 K43E。與野生型形式的 IL-2 突變相比，這些突變與中等親和力 IL-2 受體表現出大致類似的結合親和力，且與 IL-2 受體及高親和力 IL-2 受體之 α-次單元表現出大幅減小的親和力。

【0121】 有用突變之其他特徵可包括誘導攜帶 IL-2 受體之 T 細胞及/或 NK 細胞增殖的能力、誘導攜帶 IL-2 受體之 T 細胞及/或 NK 細胞的 IL-2 信號傳導的能力、藉由 NK 細胞生成干擾素 (IFN) -γ 作為次級細胞介素的能力、下降的藉由周邊血單核細胞 (PBMC) 誘導次級細胞介素 (特別是 IL-10 及 TNF-α) 之細化的能力、下降的活化調節性 T 細胞的能力、下降的誘導 T 細胞之凋亡的能力及降低的體內毒性型態。

【0122】 在某些實施例中，所述胺基酸突變使突變型 IL-2 多肽對 IL-2 受體之 α-次單元的親和力降低至少 5 倍，具體地降低至少 10 倍，更具體地降低至少 25 倍。在其中存在多餘一個使突變型 IL-2 多肽對 IL-2 受體之 α-次單元的親和力降低的胺基酸突變的實施例中，這些胺基酸突變之組合可以使突變型 IL-2 多肽對 IL-2 受體之 α-次單元的親和力降低至少 30 倍、至少 50 倍或甚至至少 100 倍。在一個實施例中，所述胺基酸突變或胺基酸突變之組合消除突變型 IL-2 多肽對 IL-2 受體之 α-次單元的親和力，使得藉由表面電漿子共振無法檢出結合。

【0123】 當 IL-2 突變表現出的親和力大於野生型形式的 IL-2 突變對中等親和力 IL-2 受體之親和力約 70% 時，實現與中等親和力受體大致類似的結

合，*即*保持突變型 IL-2 多肽對所述受體之親和力。本發明之 IL-2 突變可表現出大於約 80% 及甚至大於約 90% 的此類親和力。

【0124】 IL-2 對 IL-2 受體之 α-次單元之親和力的下降及消除 IL-2 的 O-醣基化作用的消除可得到具有改善之特性的 IL-2 蛋白質。例如，當哺乳動物細胞 (例如 CHO 或 HEK 細胞) 中表現突變型 IL-2 多肽時，消除 O-醣基化位點後，得到更均一的產物。

【0125】 因此，在某些實施例中，突變型 IL-2 多肽包含額外的胺基酸突變，該額外的胺基酸突變消除 IL-2 中在與人 IL-2 之殘基 3 相對應的位置處的 O-醣基化位點。在一個實施例中，所述消除 IL-2 中在與人 IL-2 之殘基 3 相對應的位置處的 O-醣基化位點的額外的胺基酸突變為胺基酸取代。例示性胺基酸取代包括 T3A、T3G、T3Q、T3E、T3N、T3D、T3R、T3K 及 T3P。在一個具體實施例中，所述額外的胺基酸突變為胺基酸取代 T3A。

【0126】 在某些實施例中，突變型 IL-2 多肽基本上為全長 IL-2分子，且包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號)。在某些實施例中，突變型 IL-2 多肽為人 IL-2 分子。在一個具體實施例中，包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 的突變型 IL-2 多肽可引發選自以下各項所組成之群組中之細胞反應中之一種或多種：在活化的 T 淋巴細胞中增殖、在活化的 T 淋巴細胞中分化、細胞毒性 T 細胞 (CTL) 活性、在活化的 B 細胞中增殖、在活化的 B 細胞中分化、在自然殺手細胞 (NK) 中增殖、在自然殺手細胞 (NK) 中分化、活化的 T 細胞或 NK 細胞分泌細胞介素及 NK/淋巴細胞活化的殺手細胞 (LAK) 抗腫瘤細胞毒性。

【0127】 在一個實施例中，與野生型 IL-2 多肽相比，包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 的突變型 IL-2

多肽誘導調節性 T 細胞中之 IL-2 信號傳導的能力下降。在一個實施例中，與野生型 IL-2 多肽相比，突變型 IL-2 多肽誘導 T 細胞中較少活化誘導之細胞死亡(AICD)。在一個實施例中，與野生型 IL-2 多肽相比，突變型 IL-2 多肽具有降低的體內毒性型態。在一個實施例中，與野生型 IL-2 多肽相比，突變型 IL-2 多肽具有延長的血清半衰期。

【0128】 一種可用於本發明之特定突變型 IL-2 多肽包含在對應於人 IL-2 的殘基 3、42、45 及 72 的位置處之四個胺基酸取代。具體胺基酸取代為 T3A、F42A、Y45A 及 L72G。如 WO 2012/107417 中所證明的，所述四重突變型 IL-2 多肽表現出與 CD25 的無法檢出之結合、降低的誘導 T 細胞中凋亡的能力、降低的誘導 Treg細胞中 IL-2 信號傳導的能力及降低的體內毒性型態。但是，它保留了活化效應子細胞中 IL-2 信號傳導、誘導效應子細胞增殖及藉由 NK 細胞生成 IFN-γ 作為次級細胞介素的能力。

【0129】 此外，如 WO 2012/107417 中所述，所述突變型 IL-2 多肽具有更多有利特性，例如降低的表面疏水性、良好的穩定性及良好的表現產量。出乎意料地，與野生型 IL-2 相比，所述突變型 IL-2 多肽還提供了延長的血清半衰期。

【0130】 可用於本發明中的 IL-2 突變除具有在形成 IL-2 與 CD25 或醣基化位點的界面的 IL-2 區域內的突變以外，還可以在這些區域以外的胺基酸序列中具有一個或多個突變。人 IL-2 中的此類額外的突變可提供額外的優勢，例如升高之表現或穩定性。例如，位置 125 處之半胱胺酸可以被中性胺基酸諸如絲胺酸、丙胺酸、蘇胺酸或纈胺酸取代，分別得到 C125S IL-2、C125A IL-2、C125T IL-2 或 C125V IL-2，如美國專利第 4,518,584 號中所述。如該專利中所述，也可以缺失 IL-2 的 N 端丙胺酸殘基，得到如 des-A1 C125S 或 des-A1 C125A 的突變。可替代地或結合地，IL-2 突變可包括以下突變，其中通常存在

於野生型人 IL-2 的位置 104 處的蛋氨酸被中性胺基酸 (例如丙胺酸) 取代 (參見美國專利第 5,206,344 號)。所得突變，例如 des-A1 M104A IL-2、des-A1 M104A C125S IL-2、M104A IL-2、M104A C125A IL-2、des-A1 M104A C125A IL-2 或 M104A C125S IL-2 (這些及其他突變可見於以下文獻中：美國專利第 5,116,943 號；及 Weiger 等人 *Eur J Biochem* 180，295-300 (1989))，可以與本發明之特定 IL-2 突變合併使用。

【0131】 因此，在某些實施例中，突變型 IL-2 多肽包含額外的胺基酸突變，該額外的胺基酸突變在與人 IL-2 之殘基 125 相對應的位置處。在一個實施例中，所述額外的胺基酸突變為胺基酸取代 C125A。

【0132】 技術人員將能夠確定哪些額外的突變可出於本發明的目的提供額外的優勢。例如，技術人員將認識到，IL-2 序列中之可能降低或消除 IL-2 對中等親和力 IL-2 受體 (例如 D20T、N88R 或 Q126D) 之親和力之胺基酸突變 (參見*例如* US 2007/0036752) 可能不適合包含在根據本發明的突變型 IL-2 多肽中。

【0133】 在一個實施例中，與對應的野生型 IL-2 序列 (*例如*，人 IL-2序列 SEQ ID NO:19) 相比，突變型 IL-2 多肽包含不超過 12 個、不超過 11 個、不超過 10 個、不超過 9 個、不超過 8 個、不超過 7 個、不超過 6 個或不超過 5 個胺基酸突變。在一個特定實施例中，與對應的野生型 IL-2 序列 (*例如*，人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19) 相比，突變型 IL-2 多肽包含不超過 5 個胺基酸突變。

【0134】 在一個實施例中，突變型 IL-2 多肽包含 SEQ ID NO:20 之序列。在一個實施例中，突變型 IL-2 多肽由 SEQ ID NO:20 之序列組成。

【0135】 在一些實施例中，本發明提供了包含突變型介白素-2 (IL-2) 多肽的免疫結合體，該多肽包含與 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列。在一些實施例中，本發明

提供了包含突變介白素-2 (IL-2) 多肽的免疫結合體，該多肽包含與 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列，其中 IL-2 多肽與野生型 IL-2 多肽相比，表現出對突變型 IL-2 多肽對高親和力 IL-2 受體之減小的親和力，且保留突變型 IL-2 多肽對中等親和力 IL-2 受體之親和力。在一些實施例中，本發明提供了包含突變介白素-2 (IL-2) 多肽的免疫結合體，該多肽包含至少一個胺基酸突變，與野生型 IL-2 多肽相比，該等至少一個胺基酸突變消除或降低了突變型 IL-2 多肽對高親和力 IL-2 受體之親和力，且保留突變型 IL-2 多肽對中等親和力 IL-2 受體之親和力。在一些實施例中，本發明提供了包含突變介白素-2 (IL-2) 多肽的免疫結合體，該多肽包含至少一個胺基酸突變，其中與 SEQ ID NO:20 之序列組成的突變型 IL-2 多肽相比，該突變型 IL-2 對高親和力 IL-2 受體具有較低 (或消除) 之親和力且對中等親和力 IL-2 受體具有較高 (或相等) 之親和力。

免疫複合體

【0136】 如本文所述之免疫結合體包含 IL 分子及第二多肽，其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。此類免疫結合體藉由將 IL-2 直接靶向*例如*腫瘤微環境中以顯著提高 IL-2 療法之功效。在一些實施例中，免疫結合體中包含的抗原結合部分可為完整抗體或免疫球蛋白或其一部分或變異體，該部分或變異體具有生物學功能，例如抗原特異性結合親和力。

【0137】 在一些實施例中，免疫結合體多肽中包含的抗原結合部分能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合，並將免疫結合體分子靶向腫瘤位點。因此，可將高濃度之 IL-2 遞送至腫瘤微環境中，從而使用比未結合之 IL-2 所需劑量低得多的劑量的免疫結合體實現本文所述的多種免疫效應子細胞的活化和增殖。此外，由於以免疫結合體形式應用 IL-2 能夠降低細胞介素本身

的劑量，因此限制了 IL-2 產生不良副作用的可能性，且與未結合之 IL-2 相比，通過免疫結合體將 IL-2 靶向體內特定位點還還可導致全身暴露量下降，由此減少副作用。此外，與未結合之 IL-2 相比，免疫結合體之增加的循環半衰期有助於提高免疫結合體的功效。但是，IL-2 免疫結合體的該特徵可再次加重 IL-2 分子的潛在副作用：由於 IL-2 免疫結合體在血液中的循環半衰期相對於未結合之 IL-2 明顯更長，因此 IL-2 或融合蛋白分子之其他部分活化通常存在於脈管系統中的組分的可能性增加。同樣的問題也適用於其他包含融合至另一部分 (例如 Fc 或白蛋白) 的 IL-2 的融合蛋白，從而延長 IL-2 在循環中的半衰期。因此，包含如本文及 WO 2012/107417 中所述的突變型 IL-2 多肽的免疫結合體相比於野生型形式的 IL-2 具有更低的毒性，其爲特別有利的。

【0138】 如上所述，將 IL-2 直接靶向免疫效應子細胞而不是腫瘤細胞可能對 IL-2 免疫療法是有利的。

【0139】 因此，在一些實施例中，本發明提供了如前文所述之突變型 IL-2 多肽及與 PD-1 結合之抗原結合部分。在一個實施例中，突變型 IL-2 多肽及 PD-1 抗原結合部分形成融合蛋白，*即*突變型 IL-2 多肽與 PD-1 抗原結合部分共享肽鍵。在一些實施例中，PD-1 抗原結合部分包含 Fc 域，該 Fc 域由第一次單元及第二次單元組成。在一個具體實施例中，突變型 IL-2 多肽在其胺基端胺基酸融合至Fc 域的次單元中的一個的羧基端胺基酸，視情況通過連接子肽實現。在一些實施例中，PD-1 抗原結合部分為全長抗體。在一些實施例中，抗體為免疫球蛋白分子，特別是 IgG 類免疫球蛋白分子，更特別是 IgG1 亞類免疫球蛋白分子。在一個此類實施例中，突變型 IL-2 多肽與免疫球蛋白重鏈之一共享胺基端肽鍵。在某些實施例中，PD-1 抗原結合部分為抗體片段。在一些實施例中，PD-1 抗原結合部分為 Fab 分子或 scFv 分子。在一個實施例中，PD-1 抗原結合部分為 Fab 分子。在另一個實施例中，PD-1 抗原結合部分為 scFv 分子。

免疫結合體還可包含多於一個抗原結合部分。在免疫結合體中包含多於一個抗原結合部分 (*例如*，第一抗體及第二抗體) 的情況下，每個抗體可獨立地選自各種形式的抗體及抗體片段。例如，第一抗體可為 Fab分子，且第二抗體可為 scFv 分子。在一個具體實施例中，所述第一抗體及第二抗體中的每一個為 scFv 分子，或所述第一抗體及第二抗體中的每一個為 Fab分子。在一個特定實施例中，所述第一抗體及第二抗體中的每一個為 Fab分子。在一個實施例中，所述第一抗體及所述第二抗體中的每一個與 PD-1 結合。

【0140】 在一些實施例中，本發明提供了如上所述之突變型 IL-2 多肽及抗原結合部分，該抗原結合部分特異性結合腫瘤細胞上或腫瘤細胞環境中存在的靶抗原。在一些實施例中，靶抗原選自以下各項所組成之群組：纖維母細胞活化蛋白 (FAP)、腱生蛋白 C 之 A1 域 (TNC A1)、腱生蛋白 C 之 A2 域 (TNC A2)、纖網蛋白之外加域 B (EDB)、癌胚抗原 (CEA) 及黑色素瘤相關之硫酸軟骨素蛋白多醣 (MCSP)。

【0141】 在一些實施例中，本發明提供了如上所述之突變型 IL-2 多肽及與 FAP 結合之抗原結合部分。在一個實施例中，突變型 IL-2 多肽及 FAP 抗原結合部分形成融合蛋白，*即*突變型 IL-2 多肽與 FAP 抗原結合部分共享肽鍵。在一些實施例中，FAP 抗原結合部分包含 Fc 域，該 Fc 域由第一次單元及第二次單元組成。在一個具體實施例中，突變型 IL-2 多肽在其胺基端胺基酸融合至 Fc 域的次單元中的一個的羧基端胺基酸，視情況通過連接子肽實現。在一些實施例中，FAP 抗原結合部分為全長抗體。在一些實施例中，抗體為免疫球蛋白分子，特別是 IgG 類免疫球蛋白分子，更特別是 IgG1 亞類免疫球蛋白分子。在一個此類實施例中，突變型 IL-2 多肽與免疫球蛋白重鏈之一共享胺基端肽鍵。在某些實施例中，FAP 抗原結合部分為抗體片段。在一些實施例中，FAP 抗原結合部分為 Fab 分子或 scFv 分子。在一個實施例中，FAP 抗原結合部分

為 Fab 分子。在另一個實施例中，FAP 抗原結合部分為 scFv 分子。免疫結合體還可包含多於一個抗原結合部分。在免疫結合體中包含多於一個抗原結合部分 (*例如*，第一抗體及第二抗體) 的情況下，每個抗體可獨立地選自各種形式的抗體及抗體片段。例如，第一抗體可為 Fab分子，且第二抗體可為 scFv 分子。在一個具體實施例中，所述第一抗體及第二抗體中的每一個為 scFv分子，或所述第一抗體及第二抗體中的每一個為 Fab分子。在一個特定實施例中，所述第一抗體及第二抗體中的每一個為 Fab分子。在一個實施例中，所述第一抗體及所述第二抗體中的每一個與 FAP 結合。

免疫結合體形式

【0142】 一種例示性免疫結合體形式描述於 PCT 公開號 WO 2018/184964 中，該專利全文以引用方式併入本文。在特定實施例中，免疫結合體包含如本文所述之突變型 IL-2 多肽及第二多肽。在一些實施例中，第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。在一些實施例中，第二多肽結合 T 細胞、腫瘤細胞或結合腫瘤細胞環境中之抗原。

【0143】 在一些實施例中，第二多肽結合 T 細胞上所表現的 PD-1。在一些實施例中，第二多肽為特異性結合 PD-1 的抗原結合部分。

【0144】 在一些實施例中，其中第二多肽特異性結合存在於腫瘤細胞上或腫瘤細胞環境中的靶抗原。在一些實施例中，靶抗原選自以下各項所組成之群組：纖維母細胞活化蛋白 (FAP)、腱生蛋白 C 之 A1 域 (TNC A1)、腱生蛋白 C 之 A2 域 (TNC A2)、纖網蛋白之外加域 B (EDB)、癌胚抗原 (CEA) 及黑色素瘤相關之硫酸軟骨素蛋白多醣 (MCSP)。在一些實施例中，腫瘤抗原為 FAP。在一些實施例中，第二多肽結合 FAP。在一些實施例中，第二多肽為特異性結合 FAP 的抗原結合部分。在一些實施例中，抗原結合部分為免疫球蛋白，特別是 IgG分子，更特別是 IgG1分子。在一個實施例中，免疫結合體包含不超過一

個突變型 IL-2 多肽。在一個實施例中，免疫球蛋白分子為人類分子。在一個實施例中，免疫球蛋白分子包含人恆定區，*例如*人 CH1、CH2、CH3 及/或 CL 域。在一個實施例中，免疫球蛋白包含人 Fc 域，特別是人 IgG1 Fc 域。在一個實施例中，突變型 IL-2 多肽與免疫球蛋白分子共享胺基或羧基端肽鍵。在一個實施例中，免疫結合體基本上由藉由一個或多個連接子序列連接之突變型 IL-2 多肽及免疫球蛋白分子組成，該免疫球蛋白分子特別是 IgG 分子，更特別是 IgG1 分子。在一個具體實施例中，突變型 IL-2 多肽在其胺基端胺基酸融合至免疫球蛋白重鏈中的一個的羧基端胺基酸，視情況通過連接子肽實現。

【0145】 突變型 IL-2 多肽可直接融合至抗體或通過連接子肽融合至抗體，該連接子肽包含一個或多個胺基酸，通常包含約 2-20 個胺基酸。連接子肽為本領域中所知且如本文所述。合適的非免疫原性連接子肽包括例如 $(G_4S)_n$、$(SG_4)_n$、$(G_4S)_n$ 或 $G_4(SG_4)_n$ 連接子肽。「N」通常為 1 至 10 的整數，特別為 2 至 4。在一個實施例中，連接子肽的長度為至少 5 個胺基酸；在一個實施例中，長度為 5 至 100 個胺基酸；在另一個實施例中，長度為 10 至 50 個胺基酸。在一個特定實施例中，連接子肽的長度為 15 個胺基酸。在一個實施例中，連接子肽為 $(G_xS)_n$ 或 $(G_xS)_nG_m$，其中 G=甘胺酸，S=絲胺酸，並且 (x=3，n=3、4、5 或 6，且 m=0、1、2 或 3) 或 (x=4，n=2、3、4 或 5，且 m=0、1、2 或 3)；在一個實施例中，x=4 且 n=2 或 3；在另一個實施例中，x=4 且 n=3。在一個特定實施例中，連接子肽為 $(G_4S)3$ (SEQ ID NO:21)。在一個實施例中，連接子肽具有 SEQ ID NO:21 之胺基酸序列或由該胺基酸序列組成。

【0146】 在一個特定實施例中，免疫結合體包含突變型 IL-2 分子及抗原結合部分，其中該抗原結合部分為與 PD-1 結合之免疫球蛋白分子，特別是 IgG1 亞類免疫球蛋白分子，其中該突變型 IL-2 分子在其胺基端胺基酸通過 SEQ ID NO:21 之連接子肽融合至免疫球蛋白重鏈之一的羧基端胺基酸。

【0147】在一個特定實施例中，免疫結合體包含突變型 IL-2 分子及與 PD-1 結合之抗原結合部分，其中該抗原結合部分包含 Fc 域，特別是人 IgG1 Fc 域，其由第一次單元及第二次單元構成，且該突變型 IL-2 分子在其胺基端胺基酸通過 SEQ ID NO:21 之連接子肽融合至 Fc 域的次單元之一的羧基端胺基酸。

【0148】在一個特定實施例中，免疫結合體包含突變型 IL-2 分子及抗原結合部分，其中該抗原結合部分為與 FAP 結合之免疫球蛋白分子，特別是 IgG1 亞類免疫球蛋白分子，其中該突變型 IL-2 分子在其胺基端胺基酸通過 SEQ ID NO:21 之連接子肽融合至免疫球蛋白重鏈之一的羧基端胺基酸。

【0149】在一個特定實施例中，免疫結合體包含突變型 IL-2 分子及與 FAP 結合之抗原結合部分，其中該抗原結合部分包含 Fc 域，特別是人 IgG1 Fc 域，其由第一次單元及第二次單元構成，且該突變型 IL-2 分子在其胺基端胺基酸通過 SEQ ID NO:21 之連接子肽融合至 Fc 域的次單元之一的羧基端胺基酸。在一些實施例中，免疫結合體為 simlukafusp alfa。

PD-1 抗原結合部分

【0150】在一些實施例中，免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及 PD-1 抗原結合部分。在一些實施例中，PD-1 抗原結合部分為抗 PD-1 抗體。

【0151】本發明之免疫結合體中包含的 PD-1 抗原結合部分與 PD-1 (特別是人 PD-1) 結合，且能夠將突變型 IL-2 多肽導向其中表現 PD-1 的靶位點，特別是導向表現 PD-1 之 T 細胞；例如，與腫瘤或 T 細胞相關的能夠與腫瘤抗原結合的 T 細胞。

【0152】可用於本發明之免疫結合體中的合適的 PD-1 抗體描述於 PCT 專利申請號 PCT/EP2016/073248，該專利全文以引用方式併入本文。

【0153】本發明之免疫結合體可包含兩個或更多個 PD-1 抗原結合部分，該等抗原結合部分可以與相同或不同抗原結合。在一個實施例中，本發明之免

疫結合體中包含的抗原結合部分為單特異性的。在一個特定實施例中，免疫結合體包含單個單特異性抗體，特別是單特異性免疫球蛋白分子。

【0154】 抗原結合部分可以是保留與 PD-1 (特別是人 PD-1) 之特異性結合的任意類型的抗體或其片段。抗體片段包括但不限於 Fv 分子、scFv 分子、Fab 分子及 F(ab')2 分子。但是，在特定實施例中，抗體為全長抗體。在一些實施例中，抗體包含 Fc 域，該 Fc 域由第一次單元及第二次單元構成。在一些實施例中，抗體為免疫球蛋白，特別是 IgG 類，更特別是 IgG1 亞類免疫球蛋白。

【0155】 在一些實施例中，抗體為單株抗體。

【0156】 在一些實施例中，PD-1 抗原結合部分包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:2 之胺基酸序列；HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:3 之胺基酸序列；FR-H3，其包含在根據 Kabat 編號之位置 71-73 處之 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列；HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列；HVR-L2，其包含 SEQ ID NO:5 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列。

【0157】 在一些實施例中，PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:2 之胺基酸序列；HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:3 之胺基酸序列；及 FR-H3，其包含在根據 Kabat 編號之位置 71-73 處之 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列；HVR-L2，其包含 SEQ ID NO:5 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列。在一些實施例中，重鏈可變區及/或輕鏈可變區為人源化可變區。在一些實施例中，重鏈可變區及/或輕鏈可變區包含人類骨架區 (FR)。

【0158】在一些實施例中，PD-1 抗原結合部分包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列；HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列；HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列；HVR-L2，其包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。

【0159】在一些實施例中，PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列；及 HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列；HVR-L2，其包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。在一些實施例中，重鏈可變區及/或輕鏈可變區為人源化可變區。在一些實施例中，重鏈可變區及/或輕鏈可變區包含人類骨架區 (FR)。

【0160】在一些實施例中，PD-1 抗原結合部分包含重鏈可變區 (VH)，該重鏈可變區包含與 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列。在一些實施例中，PD-1 抗原結合部分包含輕鏈可變區 (VL)，該輕鏈可變區包含與選自以下各項所組成之群組之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18。在一些實施例中，PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含與 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含與選自以下各項所組成之群組之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18。在一些實施例中，

PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含與 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含與選自以下各項所組成之群組之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18，其中 PD-1 抗原結合部分特異性結合 PD-1。

【0161】 在一個特定實施例中，PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含 SEQ ID NO:15 之胺基酸序列。

【0162】 在一些實施例中，PD-1 抗原結合部分為人源化抗體。在一個實施例中，抗體為包含人恆定區的免疫球蛋白分子，特別為包含人 CH1、CH2、CH3 和/或 CL 域的 IgG 類免疫球蛋白分子。人恆定域人 κ 和 λ CL 域及人 IgG1 重鏈恆定域 CH1-CH2-CH3 的例示性序列。特定而言，如本文所述，重鏈恆定區可在 Fc 域中包含胺基酸突變。

FAP 抗原結合部分

【0163】 在一些實施例中，免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及 FAP 抗原結合部分。本發明之免疫結合體中包含的抗體與 FAP、特別是人 FAP 結合，且能夠將突變型 IL-2 多肽引導至表現 FAP 的靶位點 (例如，表現 FAP 的腫瘤細胞)。包含突變型 IL-2 多肽及 FAP 抗原結合域的免疫結合體描述於 EP3075745B1 中。

【0164】 在一些實施例中，特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) SEQ ID NO:29 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:28 之輕鏈可變區序列；(ii) SEQ ID NO:31 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:30 之輕鏈可變區序列；(iii) SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列；(iv)

SEQ ID NO:35 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:34 之輕鏈可變區序列；或 (v) SEQ ID NO:37 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:36 之輕鏈可變區序列。

【0165】 在一些實施例中，特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) 與 SEQ ID NO:42 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:43 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；(ii) 與 SEQ ID NO:38 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:39 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:40 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；或 (iii) 與 SEQ ID NO:44 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:45 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列。

【0166】 在一些實施例中，特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含 SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列。在一些實施例中，免疫結合體包含 SEQ ID NO:38 之多肽序列、SEQ ID NO:39 之多肽序列及 SEQ ID NO:40 之多肽序列。

【0167】 在一些實施例中，免疫結合體包含：融合至 IL2v 的 PD-1 結合部分之重鏈，其包含 SEQ ID NO:22 之胺基酸序列；PD-1 結合部分重鏈，其包含 SEQ ID NO:24 之胺基酸序列；及兩個 PD-1 結合部分輕鏈，其包含 SEQ ID NO:25 之胺基酸序列。在一些實施例中，免疫結合體包含：融合至 IL2v 的 FAP 結合部分之重鏈，其包含 SEQ ID NO:38 之胺基酸序列；FAP 結合部分重

鏈，其包含 SEQ ID NO:39 之胺基酸序列；及兩個 FAP 結合部分輕鏈，其包含 SEQ ID NO:40 之胺基酸序列。在一些實施例中，免疫結合體為 simlukafusp alfa。

Fc 域

【0168】 在特定實施例中，根據本發明之免疫結合體中包含的抗體包含 Fc 域，該 Fc 域由第一次單元及第二次單元構成。抗體之 Fc 域由包含免疫球蛋白分子之重鏈域的一對多肽鏈組成。例如，免疫球蛋白 G (IgG) 分子之 Fc 域為二聚體，其每個次單元包含 CH2 及 CH3 IgG 重鏈恆定域。Fc 域之兩個次單元能夠彼此穩定締合。在一個實施例中，本發明之免疫結合體包含不超過一個 Fc 域。

【0169】 在一個實施例中，免疫結合體中包含的抗體的 Fc 域為 IgG Fc 域。在一個特定實施例中，Fc 域為 IgG1 Fc 域。在另一實施例中，該 Fc 域為 IgG4 Fc 域。在一個更具體之實施例中，Fc 域為 IgG4 Fc 域，其包含在位置 S228 (根據 Kabat EU 指數編號) 的胺基酸取代，特別是胺基酸取代 S228P。該胺基酸取代減少體內 IgG4 抗體之 Fab 臂交換 (*參見* Stubenrauch *等人*，*Drug Metabolism and Disposition* 38，84-91 (2010))。在另一個特定實施例中，Fc 域為人 Fc 域。在一個甚至更特定的實施例中，Fc 域為人 IgG1 Fc 域。

促進異源性二聚化的 Fc 域修飾

【0170】 根據本發明之免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽，特別是單個 (不超過一個) 突變型 IL-2 多肽，其與 Fc 域之兩個次單元中的一個或另一個融合，因此 Fc 域之兩個次單元通常包含在兩個非同源多肽鏈中。這些多肽的重組共表達及隨後的二聚化導致兩種多肽具有若干可能的組合。為改善重組生產中免疫結合體之產率和純度，在抗體之 Fc 域中引入促進所需之多肽締合之修飾將為有利的。

【0171】因此，在特定實施例中，根據本發明之免疫結合體中之抗體的Fc域包含促進Fc域之第一次單元及第二次單元的締合的修飾。人IgG Fc域之兩個次單元之間最廣泛的蛋白質-蛋白質相互作用位點在Fc域之CH3域中。因此，在一個實施例中，所述修飾在Fc域之CH3域中。

【0172】存在多種對Fc域之CH3域進行修飾以便增強異源性二聚化之方法，這些方法很好地描述於*例如*WO 96/27011、WO 98/050431、EP 1870459、WO 2007/110205、WO 2007/147901、WO 2009/089004、WO 2010/129304、WO 2011/90754、WO 2011/143545、WO 2012058768、WO 2013157954、WO 2013096291中。通常，在所有此等方法中，Fc域之第一次單元的CH3域及Fc域之第二次單元的CH3域均以互補的方式進行工程改造，以使每個CH3域(或包含CH3域的重鏈)不再能夠與自身發生同源二聚化，而是被迫與經互補工程改造之其他CH3域進行異源性二聚化(使得第一CH3域及第二CH3域異源性二聚化，並且在兩個第一CH3域或兩個第二CH3域之間不形成同源二聚體)。

【0173】在一個具體實施例中，所述促進Fc域之第一次單元及第二次單元之締合之修飾為所謂的「杵臼(knob-into-hole)」修飾，其包括在Fc域之兩個次單元中的一個的「杵」修飾及Fc域之兩個次單元中的另一個的「臼」修飾。

【0174】「杵臼」技術描述於*例如*：US 5,731,168；US 7,695,936；Ridgway等人，*Prot Eng* 9，617-621 (1996)；及Carter，*J Immunol Meth* 248，7-15 (2001)。通常，該方法包括在第一多肽之界面處引入一個突起(「杵」)，並且在第二多肽之界面中引入一個對應的空腔(「臼」)，以使該突起可定位於空腔中，從而促進異源二聚體形成並阻礙同源二聚體形成。透過用較大側鏈(*例如*酪胺酸或色胺酸)替換第一多肽界面上之較小的胺基酸側鏈來構建突起。透

過將較大胺基酸側鏈替換為較小的胺基酸側鏈 (*例如*丙胺酸或蘇胺酸)，在第二多肽之界面中形成與突起具有相同或相近大小的代償空腔。

有核細胞之組成物

【0175】 在一些實施例中，本發明之方法提供用於向有此需要之個體投予有效量之包含外源性抗原的有核細胞的組成物併以投予有效量之包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽的免疫結合體，其中突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子。在一些實施例中，有核細胞的組成物為免疫細胞的組成物。在一些實施例中，有核細胞的組成物包含多個 PBMC。在一些實施例中，有核細胞為 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞及/或 NK-T 細胞中之一種或多種。

【0176】 在本發明的一個特定實施例中，組成物之包含外源性抗原的有核細胞為 PBMC。如本文所用，PBMC 可藉由白血球去除術與獲自個體之全血分離。還提供了藉由混合來自同一個體或不同個體的不同 PBMC 庫而重構的 PBMC 組成物。在其他實例中，PBMC 也可以藉由將不同之細胞族群混合到具有生成之形態的混合細胞組成物中來再組。在一些實施例中，用於再組 PBMC 的細胞族群為混合細胞族群 (例如 T 細胞、B 細胞、NK 細胞或單核細胞中的一種或多種的混合物)。在一些實施例中，用於再組 PBMC 的細胞群為純細胞群 (例如純 T 細胞、B 細胞、NK 細胞或單核細胞)。在另外的實例中，用於再組 PBMC 組成物的不同細胞族群可分離自同一個體 (*例如*自體) 或分離自不同個體 (*例如*同種異體及/或異源性)。

【0177】 因此，在根據本文所述之方法的一些實施例中，該等多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞或 NK-T 細胞中之一種或多種。在一些實施例中，該等多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK

細胞、單核細胞、樹狀細胞或 NK-T 細胞。在一些實施例中，該等多個 PBMC 包含 CD3+ T 細胞、CD20+ B 細胞、CD14+ 單核細胞、CD56+ NK 細胞中之一種或多種。在一些實施例中，該等多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞，且 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞對該等多個 PBMC 中之 PBMC 之總數之比與 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞對全血中之 PBMC 之總數之比基本上相同。在一些實施例中，該等多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞，且 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞對該等多個 PBMC 中之 PBMC 之總數之比與 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞對來自全血之白血球去除術產物中之 PBMC 之總數之比基本上相同。在一些實施例中，該等多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞，且 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞對該等多個 PBMC 中之 PBMC 之總數之比與 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞對全血中之 PBMC 之總數之比相差不超過 1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40% 或 50% 中之任一者。在一些實施例中，該等多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞，且 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞對該等多個 PBMC 中之 PBMC 之總數之比與 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞對全血中之 PBMC 之總數之比相差不超過 10% 中之任一者。在一些實施例中，該等多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞，且 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞對該等多個 PBMC 中之 PBMC 之總數之比與 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞對來自全血之白血球去除術產物中之 PBMC 之總數之比相差不超過 1%、2%、5%、10%、15%、20%、25%、30%、40% 或 50% 中之任一者。在一些實施例中，該等多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞，且 T 細胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞對該等多個 PBMC 中之 PBMC 之總數之比與 T 細

胞、B 細胞、NK 細胞及單核細胞對來自全血之白血球去除術產物中之 PBMC 之總數之比相差不超過 10% 中之任一者。

【0178】在根據本文所述之方法的一些實施例中，經修飾之 PBMC 中之約 25% 至約 70% 為 T 細胞。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 中之約 2.5% 至約 14% 為 B 細胞。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 中之約 3.5% 至約 35% 為 NK 細胞。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 中之約 4% 至約 25% 為 NK 細胞。

【0179】在根據本文所述之方法的一些實施例中，PBMC 中之至少約 15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70% 或 75% 中之任一者為 T 細胞。在一些實施例中，PBMC 中之至少約 25% 為 T 細胞。在一些實施例中，PBMC 中之至少約 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、6%、7%、7.5%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、或 30% 中之任一者為 B 細胞。在一些實施例中，PBMC 中之至少約 2.5% 為 B 細胞。在一些實施例中，PBMC 中之至少約 0.5%、1%、1.5%、2%、2.5%、3%、4%、5%、6%、7%、7.5%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25% 或 30% 中之任一者為 NK 細胞。在一些實施例中，PBMC 中之至少約 3.5% 為 NK 細胞。在一些實施例中，PBMC 中之至少約 1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、25%、30%、35% 或 40% 中之任一者為單核細胞。在一些實施例中，PBMC 中之至少約 4% 為單核細胞。在一些實施例中，PBMC 中之至少約 25% 為 T 細胞；PBMC 中之至少約 2.5% 為 B 細胞；PBMC 中之至少約 3.5% 為 NK 細胞；且 PBMC 中之至少約 4% 為單核細胞。

【0180】在根據本文所述之方法的一些實施例中，PBMC 中之不超過約 40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85% 或 90% 中之任一者為 T 細胞。在一些實施例中，PBMC 中之不超過約 70% 為 T 細胞。在一些實施例中，PBMC 中之不超過約 5%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、22%、25%、30%、35%、40% 或 50% 中之任一者為 B 細胞。在一些實施例中，PBMC 中之不超過約 14% 為 B 細胞。在一些實施例中，PBMC 中之不超過約 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50% 或 60% 中之任一者為 NK 細胞。在一些實施例中，PBMC 中之不超過約 35% 為 NK 細胞。在一些實施例中，PBMC 中之不超過約 5%、10%、12%、14%、16%、18%、20%、22%、25%、30%、35%、40% 或 50% 中之任一者為單核細胞。在一些實施例中，PBMC 中之不超過約 4% 為單核細胞。在一些實施例中，PBMC 中之不超過約 25% 為 T 細胞；PBMC 中之不超過約 2.5% 為 B 細胞；PBMC 中之不超過約 3.5% 為 NK 細胞；且 PBMC 中之不超過約 4% 為單核細胞。

【0181】在根據本文所述之方法的一些實施例中，經修飾之 PBMC 中之約 20% 至 25%、25% 至 30%、30% 至 35%、35% 至 40%、40% 至 45%、45% 至 50%、50% 至 55%、55% 至 60%、60% 至 65%、65% 至 70% 或 70% 至 75% 中之任一者為 T 細胞。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 中之約 25% 至約 70% 為 T 細胞。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 中之約 1% 至 2.5%、2.5% 至 4%、4% 至 6%、6% 至 8%、8% 至 10%、10% 至 12%、12% 至 14%、14% 至 16%、16% 至 20% 或 20% 至 25% 中之任一者為 B 細胞。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 中之約 2.5% 至約 14% 為 B 細胞。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 中之約 1% 至 2%、2% 至 3.5%、3.5% 至 5%、5% 至 8%、8% 至 10%、10% 至 12%、12% 至 14%、14% 至 16%、16% 至 20% 或 20% 至 25% 中之任一者為 B 細胞。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 中之約 3.5% 至約 35% 為

NK 細胞。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 中之約 2% 至 4%、4% 至 6%、6% 至 8%、8% 至 10%、10% 至 12%、12% 至 14%、14% 至 16%、16% 至 20%、20% 至 25%、25% 至 30%、30% 至 35% 或 35% 至 40% 中之任一者為單核細胞。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 中之約 4% 至約 25% 為單核細胞。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 中之約 25% 至約 70% 為 T 細胞，經修飾之 PBMC 中之約 2.5% 至約 14% 為 B 細胞，經修飾之 PBMC 中之約 3.5% 至約 35% 為 NK 細胞，且經修飾之 PBMC 中之約 4% 至約 25% 為 NK 細胞。

【0182】 如本文所用，PBMC 還可在操作單核血細胞 (例如淋巴細胞和單核細胞) 的混合細胞族群的組成物後生成。在一些情況下，PBMC 在減少 (例如耗盡) 單核血細胞的混合細胞族群內的某些亞族群 (例如 B 細胞) 後生成。可操作個體的單核血細胞的混合細胞族群中的組成物，以使該細胞群更類似於來自同一個體中全血的白血球去除術產物。在其他實例中，還可以操作單核血細胞 (例如，小鼠脾細胞) 的混合細胞族群中的組成物，以使該細胞群更類似於分離自人全血的白血球去除術產物的人 PBMC。

【0183】 在本發明的一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞的組成物為 PBMC 中存在之細胞族群。在一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞的組成物包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞或 NK-T 細胞中之一種或多種。在一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞的組成物包含 CD3+ T 細胞、CD20+ B 細胞、CD14+ 單核細胞、CD56+ NK 細胞中之一種或多種。在一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞的組成物包含至少約 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 中之任一者的 T 細胞。在一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞的組成物包含 100% 之 T 細胞。在一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞的組成物包含至少約 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 中之任一者的 B 細胞。在一些實施例中，包含外源性

抗原的有核細胞的組成物包含 100% 之 B 細胞。在一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞的組成物包含至少約 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 中之任一者的 NK 細胞。在一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞的組成物包含 100% 之 NK 細胞。在一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞的組成物包含至少約 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 中之任一者的單核細胞。在一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞的組成物包含 100% 之單核細胞。在一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞的組成物包含至少約 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 中之任一者的樹狀細胞。在一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞的組成物包含 100% 之樹狀細胞。在一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞的組成物包含至少約 70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% -T中之任一者的 NK-T 細胞。在一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞的組成物包含 100% 之 NK-T 細胞。

抗原

【0184】 在一些實施例中，本發明提供了提供了刺激個體對外源性抗原之免疫反應的方法，該方法包含：a) 向個體投予有效量之包含有核細胞 (*例如*，PBMC) 之組成物，其中該等有核細胞包含外源性抗原；及 b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子。在一些實施例中，外源性抗原為疾病相關之抗原。在一些實施例中，外源性抗原來源於分離自患病細胞的肽或 mRNA。在一些實施例中，外源性抗原非自體抗原。在一些實施例中，外源性抗原為腫瘤抗原、病毒抗原、細菌抗原或真菌抗原。在一些實施例中，外源性抗原來源於溶解產物 (例如患病細胞之溶解產物)。在一些實施例中，外源性抗原來源於腫瘤溶解產物。在一些實施例中，外源性抗原為腫瘤抗原或與腫瘤相

關之抗原。在一些實施例中，外源性抗原與癌症相關。在一些實施例中，癌症為頭頸癌、子宮頸癌、陰門癌、陰道癌、陰莖癌、肛門癌、肛周癌、肛門-生殖器癌、口腔癌或唾腺癌。在一些實施例中，外源性抗原為頭頸癌抗原、子宮頸癌抗原、陰門癌抗原、陰道癌抗原、陰莖癌抗原、肛門癌抗原、肛周癌抗原、肛門-生殖器癌抗原、口腔癌抗原、唾腺癌抗原、乳癌抗原、皮膚癌抗原、膀胱癌抗原、結腸癌抗原、直腸癌抗原、子宮內膜癌抗原、腎癌抗原、白血病抗原、肺癌抗原、黑色素瘤抗原、非何杰金氏淋巴瘤抗原、胰腺癌抗原、前列腺癌抗原或甲狀腺癌抗原。在某些實施例中，癌症為實體癌。在一些實施例中，癌症為血液系統癌症。在一些實施例中，癌症為病毒相關之癌症。

【0185】在一些實施例中，外源性抗原為 HPV 相關之癌症中存在的癌症抗原。在一些實施例中，癌症為局部癌症。在一些實施例中，癌症為轉移性癌症。在一些實施例中，外源性抗原與感染性疾病相關。在一些實施例中，感染性疾病與 HIV、HPV、EBV、MCV、HBV 或 HCV 相關。

【0186】在根據本文所述之方法的一些實施例中，外源性抗原包含一種或多種蛋白質。在一些實施例中，外源性抗原由一種或多種核酸編碼，並以一種或多種核酸的形式 (例如但不限於 DNA、cDNA、mRNA 及質粒) 進入有核細胞。在一些實施例中，外源性抗原由一種或多種 mRNA 編碼，並以一種或多種 mRNA 的形式進入有核細胞。

【0187】在根據本文所述之方法的一些實施例中，外源性抗原為人類乳突病毒 (HPV) 抗原。乳突病毒為無包膜的小分子 DNA 病毒，病毒體直徑為約 55 nm。100 多種 HPV 基因型得到完全表徵，且推測存在更多的 HPV 基因型。HPV 為子宮頸癌以及一些外陰、陰道、陰莖、口咽、肛門和直腸癌症的已知病因。儘管大多數 HPV 感染無症狀且自發清除，但是發生一種致癌 HPV 類型的持續性感染可能發展為初癌或癌症。其他 HPV 相關性疾病可包括尋常疣、足

底疣、扁平疣、肛門生殖器疣、肛門病變、表皮增生、局灶性上皮增生、口腔乳頭狀瘤、疣狀囊腫、喉乳頭狀瘤病、鱗狀上皮內病變 (SIL)、子宮頸上皮內瘤樣病變 (CIN)、外陰上皮內瘤變 (VIN) 及陰道上皮內瘤變 (VAIN)。許多已知的人類乳突病毒 (HPV) 類型引起良性病變，其中一部分是癌性病變。基於流行病學與系統發育關係，HPV 類型分為 15 種「高風險型」(HPV 16、18、31、33、35、39、45、51、52、56、58、59、68、73 及 82) 及 3 種「可能的高風險型」(HPV 26、53 及 66)，已知它們共同表現為低度和高度宮頸變化及癌症以及其他惡性腫瘤 (例如外陰、陰道、陰莖、肛門和肛周癌症以及頭頸癌)。最近，還描述了高風險型 HPV 16 及 18 與乳癌的關係。已知歸類爲「低風險型」(HPV 6、11、40、42、43、44、54、61、70、72 及 81) 的 11 種 HPV 類型表現為良性低度宮頸變化、生殖器疣及復發性呼吸道乳頭狀瘤病。皮膚 HPV 型 5、8 及 92 與皮膚癌相關。在一些 HPV 相關之癌症中，免疫系統受到抑制，且相應地，抗腫瘤反應明顯受損。參見 Suresh 及 Burtness，*Am J Hematol Oncol* 13(6):20-27 (2017)。在一些實施例中，外源性抗原是由多種多肽組成之庫，該等多肽引發對相同或不同抗原之反應。在一些實施例中，多個抗原之庫中的抗原不降低針對該多個抗原之庫中的其他抗原的免疫反應。在一些實施例中，HPV 抗原為一種多肽，其包含抗原性 HPV 抗原決定基及一個或多個異源性肽序列。在一些實施例中，HPV 抗原與自身、與其他抗原或與佐劑複合。在一些實施例中，HPV 為 HPV-16 或 HPV-18。在一些實施例中，HPV 抗原由 HLA-A2 特異性抗原決定基組成。在一些實施例中，HPV 抗原為 HPV E6 抗原或 HPV E7 抗原。在一些實施例中，抗原包含來源於 HPV E6 及/或 E7 之肽。在一些實施例中，抗原包含來源於 HPV E6 及/或 E7 之 HLA-A2 限制性肽。在一些實施例中，HLA-A2 限制性肽包含 SEQ ID NO:50-57 中之任一者的胺基酸序列。在一些實施例中，HPV 抗原包含與 SEQ ID NO:50-57 中之任一者具有至少

90% 之相似性的胺基酸序列。在一些實施例中，HPV 抗原包含與 SEQ ID NO:50 具有至少 90% 之相似性的胺基酸序列。在一些實施例中，HPV 抗原包含與 SEQ ID NO:51 具有至少 90% 之相似性的胺基酸序列。在一些實施例中，HPV 抗原包含 SEQ ID NO:52 之胺基酸序列。在一些實施例中，HPV 抗原由 SEQ ID NO:53 之胺基酸序列組成。在一些實施例中，HPV 抗原包含 SEQ ID NO:54 之胺基酸序列。在一些實施例中，HPV 抗原由 SEQ ID NO:55 之胺基酸序列組成。在一些實施例中，HPV 抗原由 SEQ ID NO:56 之胺基酸序列組成。在一些實施例中，HPV 抗原由 SEQ ID NO:57 之胺基酸序列組成。在一些實施例中，外源性抗原包含 SEQ ID NO:x 中之任一者的胺基酸序列。在一些實施例中，外源性抗原為多個抗原，該等多個抗原包含 SEQ ID NO:50-57 中之任一者的胺基酸序列中的至少一個。在一些實施例中，外源性抗原為多個抗原，該等多個抗原包含 SEQ ID NO:50-57 中之任一者的胺基酸序列中的 2 個、3 個、4 個、5 個、6 個、7 個或 8 個。在一些實施例中，外源性抗原為多個抗原，該等多個抗原包含與 SEQ ID NO:51 具有至少 90% 之相似性的胺基酸序列及與 SEQ ID NO:55 具有至少 90% 之相似性的胺基酸序列。在一較佳的實施例中，外源性抗原為多個抗原，該等多個抗原包含 SEQ ID NO:51 之胺基酸序列及 SEQ ID NO:55 之胺基酸序列。在一些實施例中，該等多個抗原包含於非共價連接的肽庫中。在一些實施例中，該等多個抗原包含於非共價連接的肽庫中，其中每個肽包含不超過一個抗原。在一些實施例中，該等多個抗原包含於非共價連接的肽庫中，其中 SEQ ID NO:51 之胺基酸序列及 SEQ ID NO:55 之胺基酸序列包含於單獨的肽中。

【0188】 在根據本文所述之方法的一些實施例中，有核細胞 (*例如* PBMC) 包含多個外源性抗原，該等多個外源性抗原包含多個免疫原性抗原決定基。在另外的實施例中，在向個體投予包含多個抗原 (其包含多個免疫原性抗

原決定基) 的有核細胞後，該等多個免疫原性抗原決定基中無抗原決定基導致個體中對其他免疫原性抗原決定基中任一者的免疫反應降低。在一些實施例中，外源性抗原為多肽，且免疫原性抗原決定基為免疫原性肽抗原決定基。在一些實施例中，免疫原性肽抗原決定基融合至 N 端側接多肽及/或 C 端側接多肽。在一些實施例中，外源性抗原為包含免疫原性肽抗原決定基及一個或多個異源性肽序列的多肽。在一些實施例中，外源性抗原為包含免疫原性肽抗原決定基的多肽，該免疫原性肽抗原決定基藉由異源性肽序列側接在 N 端及/或 C 端。在一些實施例中，側接異源性肽序列來源於疾病相關之免疫原性肽。在一些實施例中，側接異源性肽序列非天然存在的序列。在一些實施例中，側接異源性肽序列來源於免疫原性合成長肽 (SLP)。在一些實施例中，N 端側接多肽包含 SEQ ID NO:60-65 中之任一項的胺基酸序列，且 C 端側接多肽包含 SEQ ID NO:66-72 中之任一項的胺基酸序列。在一些實施例中，外源性抗原能夠被處理成 MHC I 類限制性肽及/或 MHC II 類限制性肽。

佐劑

【0189】 如本文所用，術語「佐劑」可以指直接或間接調節和/或產生免疫反應的物質。在本發明的一些實施例中，佐劑用於調節有核細胞族群，例如 PBMC 群 (*即*，在投予個體之前，將細胞與佐劑一起孵育)。在一些情況下，與單獨的外源性抗原相比，將佐劑與外源性抗原合併投予以增強對外源性抗原的免疫反應。因此，佐劑可用於增強對外源性抗原的免疫細胞反應 (*例如* T 細胞反應) 的誘導。例示性佐劑包括但不限於乾擾素基因 (STING) 促效劑、視黃酸誘導基因 I (RIG-I) 促效劑、及 TLR3、TLR4、TLR7、TLR8 及/或 TLR9 的促效劑。例示性佐劑包括但不限於 CpG ODN、干擾素-α (IFN-α)、聚肌苷-聚胞苷酸 (polyI:C)、咪喹莫特 (R837)、瑞喹莫德（resiquimod） (R848) 或脂多醣 (LPS)。在一些實施例中，佐劑為 CpG ODN、LPS、IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促

效劑、poly I:C、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。在特定實施例中，佐劑為 CpG ODN。在一些實施例中，佐劑為 CpG ODN。在一些實施例中，CpG ODN 為 A 類 CpG ODN、B 類 CpG ODN 或 C 類 CpG ODN。在一些實施例中，CpG ODN 佐劑包含選自由以下項組成之群組：CpG ODN 1018、CpG ODN 1585、CpG ODN 2216、CpG ODN 2336、CpG ODN 1668、CpG ODN 1826、CPG ODN 2006、CpG ODN 2007、CpG ODN BW006、CpG ODN D-SL01、CpG ODN 2395、CpG ODN M362、CpG ODN D-SL03。在一些實施例中，CpG ODN 佐劑為 CpG ODN 1826 (TCCATGACGTTCCTGACGTT (SEQ ID NO:58)) 或 CpG ODN 2006 (亦稱爲 CpG 7909) (TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT (SEQ ID NO:73)) 寡核苷酸。在一些實施例中，佐劑為 CpG 7909。在一些實施例中，RIG-I 促效劑包含聚肌苷-聚胞苷酸 (polyI:C)。多種佐劑也可與外源性抗原合併使用以增強對免疫反應之誘導。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 包含多於一種佐劑。多種佐劑也可與外源性抗原合併使用以增強對免疫反應之誘導。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 包含多於一種佐劑。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 包含佐劑 CpG ODN、LPS、IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑之任意組合。

組成物、配方和給藥途徑

【0190】在一些態樣中，本發明提供了醫藥組成物，該等醫藥組成物包含如本文所述之免疫結合體及/或包含外源性抗原的有核細胞，其*例如*用於以下治療方法中之任一者中。在一些實施例中，醫藥組成物包含本文所提供之免疫結合體中之任一者及醫藥上可接受之載劑。在一些實施例中，醫藥組成物包含本文所提供之包含外源性抗原的有核細胞中之任一者及醫藥上可接受之載劑。

【0191】在一些實施例中，本發明提供了配製免疫結合體及/或包含外源性抗原的有核細胞與至少一種醫藥上可接受之載劑，從而配製用於體內投予的免疫結合體的製劑。

【0192】在一些實施例中，本發明之醫藥組成物包含溶解或分散於醫藥上可接受之載劑中的治療有效量之免疫結合體。在一些實施例中，本發明之醫藥組成物包含治療有效量之包含外源性抗原的有核細胞，該等有核細胞懸浮於醫藥上可接受之載劑中。短語「醫藥上或藥理學上可接受」係指在採用的劑量和濃度下通常對受體無毒的分子實體和組成物，*即*給予動物 (例如人) 時不產生不利的、過敏或其他不良反應 (在適當情況下)。根據本揭露，本領域技術人員將認識到免疫結合體及視情況存在的額外活性成分的醫藥組成物的製備方法，如 Remington's Pharmaceutical Sciences 第 18 版 (Mack Printing Company，1990) 所例示，該文獻以引用方式併入本文中。此外，對於動物 (*例如*，人) 投予，應當理解，製劑應符合 FDA 生物製品標準辦公室或其他國家/地區的有關部門所要求的無菌性、熱原性、一般安全性和純度標準。優選的組成物為凍乾製劑或水溶液。如本文所使用的「醫藥上可接受之載劑」，包括任何及所有溶劑、緩沖液、分散介質、包衣、表面活性劑、抗氧化劑、防腐劑 (*例如*抗菌劑、抗真菌劑)、等滲劑、吸收延遲劑、鹽、防腐劑、抗氧化劑、蛋白質、藥物、藥物穩定劑、聚合物、凝膠、黏合劑、賦形劑、崩解劑、潤滑劑、甜味劑、調味劑、染料，諸如本技術領域具有通常知識者已知的材料及其組合 (*參見*例如，Remington's Pharmaceutical Sciences，第 18 版，Mack Printing Company，1990，pp. 1289-1329，該文獻以引用方式併入本文)。除非任何常規載劑與活性成分不相容，否則考慮其在治療或醫藥組合物中的用途。

【0193】本發明之免疫結合體可透過任何合適的方式投予，包括腸胃外、肺內和鼻內投予，並且如果需要局部治療，則可以採用病灶內投予。腸胃

外輸注包括肌內、靜脈內、動脈內、腹膜內或皮下給藥。給藥可通過任何合適的途徑進行，*例如*通過注射，例如靜脈內或皮下注射，部分取決於短暫給藥還是長期投予。在一些實施例中，免疫結合體經瘤內投予。包含外源性抗原的有核細胞的組成物通常藉由血管內投予進行遞送。

【0194】腸胃外組成物包括設計用於透過注射投予的那些，*例如*皮下、皮內、病灶內、靜脈內、動脈內肌內、鞘內或腹膜內注射。對於注射，可在水溶液中 (較佳地在生理相容性緩衝液中，例如 Hanks 溶液、Ringer 溶液或生理鹽水緩衝液) 配製本發明之免疫結合體。該溶液可包含配製劑，例如懸浮劑、穩定劑及/或分散劑。可替代地，免疫結合體可以呈粉末形式，以便在使用前與合適的載劑 (*例如*無菌無熱原水) 一起配製。藉由將所需量的本發明之免疫結合體併入適當的溶劑以及所需的以下枚舉之多種其他成分中來製備無菌注射溶液。無菌性可易於*例如*透過無菌濾膜過濾來實現。通常，藉由將各種滅菌后的活性成分摻入含有基本分散介質及/或其他成分的無菌載劑中來製備分散液。對於用於製備無菌注射液、混懸劑或乳劑的無菌粉末，優選的製備方法是真空乾燥或冷凍乾燥技術，該技術可從先前過濾後的無菌液體介質中得到活性成分與任何其他所需成分的粉末。如有必要，應適當緩衝液體介質，並且在注射足夠的鹽水或葡萄糖之前先使液體稀釋劑等滲。組成物必須在製造和儲存條件下保持穩定，並且必須能夠抵抗諸如細菌和真菌等微生物的污染作用。應當理解，內毒素污染應最小限度地保持在安全濃度，例如，小於 0.5 ng/mg 蛋白質。合適的醫藥上可接受之載劑包括但不限於：緩沖劑，例如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸；抗氧化劑，包括抗壞血酸和蛋氨酸；防腐劑 (例如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六烴季銨；氯化卞二甲烴銨；氯化苯索寧；苯酚、丁醇或苄醇；對羥基苯甲酸烷基酯，如對羥基苯甲酸甲酯或對羥基苯甲酸丙酯；鄰苯二酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇和間甲酚)；低分子量 (小於約 10 個殘基) 多

肽；蛋白質，例如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，例如聚乙烯吡咯烷酮；胺基酸，例如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺酸、組胺酸、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣及其他碳水化合物，包括葡萄糖、甘露糖或糊精；螯合劑 (例如 EDTA)；糖，例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨糖醇；成鹽抗衡離子，例如鈉；金屬錯合物 (*例如*鋅蛋白錯合物)；及/或非離子表面活性劑，例如聚乙二醇 (PEG)。水性注射懸浮液可包含提高混懸劑黏度的化合物，例如羧甲基纖維素鈉、山梨糖醇、右旋葡萄聚糖等。視情況，懸浮液還可包含合適的穩定劑或提高化合物溶解度的試劑，以製備高濃度溶液。另外，可將活性化合物的懸浮液製備為合適的油性注射懸浮液。合適的親脂性溶劑或載劑包括脂肪油 (例如芝麻油) 或合成脂肪酸酯 (例如 ethyl cleats 或甘油三酯) 或脂質體。

【0195】 包含本發明之免疫結合體的醫藥組成物可以利用習用的混合、溶解、乳化、包膜、誘捕或凍乾方法來製備。可使用一種或多種有助於將蛋白質加工成可藥用製劑的生理上可接受之載劑、稀釋劑、賦形劑或助劑以習用方式配製藥學組成物。適宜的製劑視所選的給藥途徑而定。

【0196】 免疫結合體以游離酸或鹼、中性或鹽形式配製成組成物。藥學上可接受之鹽為基本上保持游離酸或鹼的生物學活性的鹽類。這些包括酸加成鹽，*例如*與蛋白質組成物的游離氨基形成的那些，或與無機酸 (例如，鹽酸或磷酸) 或有機酸 (諸如乙酸、草酸、酒石酸或苦杏仁酸) 形成的那些。與游離羧基形成的鹽類還可以衍生自：無機鹼，例如氫氧化鈉、氫氧化鉀、氫氧化銨、氫氧化鈣或氫氧化鐵；或有機鹼，諸如異丙胺、三甲胺、組胺酸或普魯卡因。藥用鹽趨向於比對應的游離鹼形式更易溶於水性溶劑和其他質子性溶劑。

【0197】 在一些實施例中，在磷酸鹽緩衝鹽水中配製包含外源性抗原的有核細胞。在一些實施例中，用 50% (w/w) Cryostor® 10、約 30%

HypoThermasol® 及約 20% (w/w) 的 25% 人血清白蛋白配製包含外源性抗原的有核細胞。

治療方法

【0198】在一些態樣中，本發明提供了刺激個體之免疫反應之方法，該等方法包含：a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性抗原；及 b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。在一些實施例中，第二多肽結合 PD-1。在一些實施例中，第二多肽為特異性結合 PD-1 的抗原結合部分。在一些實施例中，第二多肽特異性結合腫瘤抗原或腫瘤細胞環境中之抗原。在一些實施例中，腫瘤抗原為纖維母細胞活化蛋白 (FAP)。在一些實施例中，第二多肽結合 FAP。在一些實施例中，第二多肽為特異性結合 FAP 的抗原結合部分。在一些實施例中，外源性抗原為疾病相關之抗原。在一些實施例中，疾病相關之抗原為癌症抗原、感染性疾病抗原或病毒相關之疾病抗原。在一些實施例中，個體患有癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【0199】在一些實施例中，本發明提供了本發明之免疫結合體與本發明之包含外源性抗原的有核細胞的組成物合併用於刺激個體對腫瘤抗原之免疫反應的方法。在一些實施例中，本發明提供了提供了本發明之免疫結合體與本發明之包含外源性抗原的有核細胞的組成物合併用於治療個體之疾病之方法，其中該疾病為癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。在一些實施例中，本發明提供了本發明之免疫結合體與本發明之包含外源性抗原的有核細胞的組成物合併用於減少個體之腫瘤生長的方法。在一些實施例中，本發明提供了將本發明之

免疫結合體與本發明之包含外源性抗原的有核細胞的組成物合併用於增強基於細胞之免疫療法之方法。在一些實施例中，本發明提供了提供了將本發明之免疫結合體與本發明之包含外源性抗原的有核細胞的組成物合併用於為有此需要之個體接種疫苗的方法；例如其中該個體患有對疫苗接種產生反應之疾病；其中該疾病為癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【0200】在一些實施例中，本發明提供了用於刺激個體之免疫反應的組成物，其中該組成物包含免疫結合體，該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合；其中該組成物配置用於與包含有核細胞的組成物合併投予，其中該等有核細胞包含外源性抗原。在一些實施例中，本發明提供了用於刺激個體之免疫反應的組成物，其中該組成物包含有核細胞，該等有核細胞包含外源性抗原；其中該組成物配製用於與免疫結合體合併投予，該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。在一些實施例中，T 細胞上之抗原決定基為 PD-1 抗原決定基。在一些實施例中，第二多肽結合 PD-1。在一些實施例中，第二多肽為特異性結合 PD-1 的抗原結合部分。在一些實施例中，第二多肽特異性結合腫瘤抗原或腫瘤細胞環境中之抗原。在一些實施例中，腫瘤抗原為纖維母細胞活化蛋白 (FAP)。在一些實施例中，第二多肽結合 FAP。在一些實施例中，第二多肽為特異性結合 FAP 的抗原結合部分。在一些實施例中，外源性抗原為疾病相關之抗原。在一些實施例中，疾病相關之抗原為癌症抗原、感染性疾病抗原

或病毒相關之疾病抗原。在一些實施例中，個體患有癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【0201】在一些實施例中，本發明提供了有效量之免疫結合體之用途，其用於製造用於刺激個體之免疫反應的藥物，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合；其中該免疫結合體配製用於與包含有核細胞的組成物合併投予，其中該等有核細胞包含外源性抗原。在一些實施例中，本發明提供了有效量之組成物之用途，其用於製造用於刺激個體之免疫反應的藥物，其中該組成物包含有核細胞，該等有核細胞包含外源性抗原；其中該組成物配製用於與免疫結合體合併投予，該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。在一些實施例中，T 細胞上之抗原決定基為 PD-1 抗原決定基。在一些實施例中，第二多肽結合 PD-1。在一些實施例中，第二多肽為特異性結合 PD-1 的抗原結合部分。在一些實施例中，第二多肽特異性結合腫瘤抗原或腫瘤細胞環境中之抗原。在一些實施例中，腫瘤抗原為纖維母細胞活化蛋白 (FAP)。在一些實施例中，第二多肽結合 FAP。在一些實施例中，第二多肽為特異性結合 FAP 的抗原結合部分。在一些實施例中，外源性抗原為疾病相關之抗原。在一些實施例中，疾病相關之抗原為癌症抗原、感染性疾病抗原或病毒相關之疾病抗原。在一些實施例中，個體患有癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【0202】在一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞的組成物進一步包含佐劑。在一些實施例中，有核細胞在外源性抗原引入細胞中之前或之後經

調節。在一些實施例中，佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)、LPS、IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C (聚肌胞苷酸)、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。

【0203】在一些實施例中，經調節之有核細胞為經調節之多個經修飾之 PBMC。在一些實施例中，該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以增加共刺激分子中之一者或多者之表現。

【0204】在本發明的一些實施例中，免疫結合體於投予包含外源性抗原的有核細胞的組成物之前、同時或之後投予。在一些實施例中，有核細胞的組成物經多次投予。在一些實施例中，有核細胞的組成物投予多於一次、兩次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次或多於十次。在一些實施例中，免疫結合體於投予有核細胞的組成物之後多次投予。在一些實施例中，免疫結合體於投予有核細胞的組成物之後投予多於一次、兩次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次或多於十次。在一些實施例中，免疫結合體於每次投予有核細胞的組成物之後投予多於一次、兩次、三次、四次、五次、六次、七次、八次、九次、十次或多於十次。在一些實施例中，於投予有核細胞的組成物之後 1 天、2 天、3 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天、12 天、13 天、14 天或 21 天中的一者或多者，向個體投予免疫結合體。在一些實施例中，於投予有核細胞的組成物之後 0 天、3 天、7 天、14 天或 21 天中的一者或多者，向個體投予免疫結合體。在一些實施例中，於投予有核細胞的組成物同一天及投予之後 3 天及 7 天，向個體投予免疫結合體。在一些實施例中，於投予有核細胞的組成物之後 7 天、14 天及 21 天，向個體投予免疫結合體。在一些實施例中，於投予有核細胞的組成物之後，每周向個體投予免疫結合體。在一些實施例中，於投予有核細胞的組成物之前 1 天、2 天、3 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11

天、12 天、13 天、14 天或 21 天中的一者或多者，向個體投予免疫結合體。在一些實施例中，於投予有核細胞的組成物之前 0 天、3 天、7 天、14 天或 21 天中的一者或多者，向個體投予免疫結合體。在一些實施例中，於投予有核細胞的組成物同一天及投予之前 3 天及 7 天，向個體投予免疫結合體。在一些實施例中，於投予有核細胞的組成物之前 7 天、14 天及 21 天，向個體投予免疫結合體。在一些實施例中，於投予有核細胞的組成物之前，每周向個體投予免疫結合體。

【0205】在一些實施例中，提供了用作藥物的本發明之免疫結合體，該等免疫結合體與投予包含外源性抗原的有核細胞的組成物合併使用。在一些實施例中，提供了用作藥物的本發明之包含外源性抗原的有核細胞的組成物，該組成物與投予免疫結合體聯合使用。在另外的態樣中，提供了用於彼此合併以治療疾病的免疫結合體及包含外源性抗原的有核細胞的組成物。在某些實施例中，提供了用於治療方法中的免疫結合體及包含外源性抗原的有核細胞的組成物。在一個實施例中，本發明提供了用於治療有此需要之個體之疾病的如本文所述之免疫結合體及包含外源性抗原的有核細胞的組成物。在某些實施例中，本發明提供了用於治療患有疾病之個體的方法中的免疫結合體及包含外源性抗原的有核細胞的組成物，該方法以彼此合併的方式將治療有效量之免疫結合體及包含外源性抗原的有核細胞的組成物投予個體。在某些實施例中，待治療之疾病為增生性病症。在一個特定實施例中，疾病為癌症。在某些實施例中，該方法進一步包含向該個體投予治療有效量之至少一種其他治療劑，*例如*抗癌劑(如果該待治療的疾病為癌症)。在另外的實施例中，本發明提供了用於刺激免疫系統的免疫結合體及包含外源性抗原的有核細胞的組成物。在某些實施例中，本發明提供了用於刺激免疫系統的方法中的免疫結合體及包含外源性抗原的有核細胞的組成物，該方法包含以彼此合併的方式將治療有效量之免疫結合

體及包含外源性抗原的有核細胞的組成物投予個體以刺激免疫系統。根據上述任一實施例中「個體」可為哺乳動物，例如為人。根據以上實施例中任一項之「免疫系統之刺激」可包括免疫功能之總體提高、T 細胞功能之提高、B 細胞功能之提高、淋巴細胞功能之恢復、IL-2 受體之表達升高、T 細胞反應增加、自然殺手細胞活性或淋巴因子活化之殺手 (LAK) 細胞活性升高等中之任一者或多者。

【0206】 在一些實施例中，本發明提供了本發明之免疫結合體與包含外源性抗原的有核細胞的組成物合併用於製造或製備藥物之用途。在一些實施例中，本發明提供了本發明之包含外源性抗原的有核細胞的組成物與免疫結合體合併用於製造或製備藥物之用途。在一個實施例中，藥物用於有此需要之個體的疾病。在一個實施例中，藥物用於治療疾病的方法中，該方法包括向患有疾病的個體投予治療有效量之藥物。在某些實施例中，待治療之疾病為增生性疾病。在一個特定實施例中，疾病為癌症。在一個實施例中，該方法進一步包含向該個體投予治療有效量之至少一種其他治療劑，*例如*抗癌劑 (如果該待治療的疾病為癌症)。在另一個實施例中，藥物用於刺激免疫系統。在另一個實施例中，藥物用於刺激個體之免疫系統的方法中，該方法包括向個體投予有效量之藥物以刺激免疫系統。根據上述任一實施例中「個體」可為哺乳動物，較佳地為人。根據以上實施例中任一項之「免疫系統之刺激」可包括免疫功能之總體提高、T 細胞功能之提高、B 細胞功能之提高、淋巴細胞功能之恢復、IL-2 受體之表達升高、T 細胞反應增加、自然殺手細胞活性或淋巴因子活化之殺手 (LAK) 細胞活性升高等中之任一者或多者。在一些實施例中，免疫系統之刺激包括免疫細胞如腫瘤浸潤淋巴細胞 (TIL) 對腫瘤的浸潤。在一些實施例中，免疫系統之刺激包含 CD8+ T 細胞優先於 T_{reg} 細胞發生擴增。在一些實施例中，

免疫系統之刺激包括誘導保護性免疫記憶；例如，以使對隨後暴露於抗原的反應速度更快及/或特異性更高。

【0207】在一些實施例中，本發明提供了用於治療個體之疾病的方法。在一個實施例中，該方法包含向患有此類疾病的個體投予治療有效量之免疫結合體及治療有效量之本發明的包含外源性抗原的有核細胞的組成物。在一個實施例中，向所述個體投予組成物，該組成物包含醫藥上可接受形式的本發明之免疫結合體，且與醫藥上可接受形式的本發明之包含外源性抗原的有核細胞的組成物合併投予。在某些實施例中，待治療之疾病為增生性病症。在一個特定實施例中，疾病為癌症。在某些實施例中，該方法進一步包含向該個體投予治療有效量之至少一種其他治療劑，*例如*抗癌劑 (如果該待治療的疾病為癌症)。在另一個態樣中，本發明提供了一種刺激個體之免疫系統的方法，該方法包含向個體投予有效量之免疫結合體及有效量之包含外源性抗原的有核細胞的組成物以刺激免疫系統。根據上述任一實施例中「個體」可為哺乳動物，較佳地為人。根據以上實施例中任一項之「免疫系統之刺激」可包括免疫功能之總體提高、T 細胞功能之提高、B 細胞功能之提高、淋巴細胞功能之恢復、IL-2 受體之表達升高、T 細胞反應增加、自然殺手細胞活性或淋巴因子活化之殺手 (LAK) 細胞活性升高等中之任一者或多者。在一些實施例中，免疫系統之刺激包括免疫細胞如腫瘤浸潤淋巴細胞 (TIL) 對腫瘤的浸潤。在一些實施例中，免疫系統之刺激包含 CD8+ T 細胞優先於 T_{reg} 細胞發生擴增。在一些實施例中，免疫系統之刺激包括誘導保護性免疫記憶；例如，以使對隨後暴露於抗原的反應速度更快及/或特異性更高。

【0208】在某些實施例中，待治療之疾病為增生性病症，特別地為癌症。癌症的非限制性實例包括膀胱癌、腦癌、頭頸癌、胰腺癌、肺癌、乳癌、卵巢癌、子宮癌、子宮頸癌、子宮內膜癌、食管癌、結腸癌、結腸直腸癌、直

腸癌、胃癌、前列腺癌、血癌、皮膚癌、鱗狀細胞癌、骨癌和腎癌。可使用本發明免疫結合體治療的其他細胞增殖性病症包括但不限於定位在以下部位中的腫瘤：腹部、骨骼、乳腺、消化系統、肝、胰腺、腹膜、內分泌腺 (腎上腺、副甲狀腺、垂體、睾丸、卵巢、胸腺、甲狀腺)、眼、頭和頸、神經系統 (中樞和外周)、淋巴系統、骨盆、皮膚、軟組織、脾臟、胸部和泌尿生殖系統。還包括癌前狀況或病變和癌症轉移。在某些實施例中，癌症選自由以下項所組成之群組：腎癌、皮膚癌、肺癌、大腸直腸癌、腺癌、腦癌、頭頸癌、前列腺癌及膀胱癌。技術人員易於認識到，在許多情況下，免疫結合體及包含外源性抗原的有核細胞的組成物合併使用時可能無法治愈，而只能提供部分益處。在一些實施例中，還認為具有某種益處的生理變化在治療上有益。因此，在一些實施例中，提供生理變化的免疫結合體的量及包含外源性抗原的有核細胞的組成物的量被視爲「有效量」或「治療有效量」。需要治療的受試者、患者或個體通常為哺乳動物，更具體而言人。

產生免疫結合體及包含外源性抗原的有核細胞的組成物的方法

【0209】在一些實施例中，本發明提供了用於產生免疫結合體的方法，該免疫結合體與包含有核細胞的組成物聯合用於刺激個體之免疫反應，該方法包含在產生該免疫結合體的條件下在細胞中表現編碼該免疫結合體的核酸，其中該免疫結合體為包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽的融合蛋白，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合；其中免疫結合體與包含有核細胞的組成物合併投予，其中該等有核細胞包含外源性抗原。在其他實施例中，本發明提供了用於產生包含有核細胞的組成物的方法，該組成物與合併用於刺激個體之免疫反應，該方法包含將外源性抗原經免疫結合體經胞內引入有核細胞族群中；其中該組成物

用於與免疫結合體一起投予；其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，且其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

產生免疫結合體的方法

【0210】 可藉由固態肽合成 (*例如* Merrifield 固相合成) 或重組生產獲得本發明之免疫結合體。在重組生產時，將*例如*如上所述之編碼免疫結合體 (或其片段) 之一種或多種多核苷酸分離並插入一種或多種載體中，以在宿主細胞中進一步選殖及/或表現。此等多核苷酸可易於使用習知方法進行分離和測序。在一個實施例中，提供了包含本發明之多核苷酸中的一種或多種的載體，較佳的是包含表現載體。可使用本領域的技術人員所公知的方法來構建包含免疫結合體 (片段) 之編碼序列以及適當的轉錄/轉譯控制信號的表現載體。這些方法包括體外重組 DNA 技術、合成技術及體內重組/基因重組。參見例如以下文獻中所述之技術：Maniatis 等人，MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL，Cold Spring Harbor Laboratory，N.Y.(1989)；及 Ausubel 等人，CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY，Greene Publishing Associates and Wiley Interscience，N.Y (1989)。表現載體可以為質體、病毒的一部分，也可以為核酸片段。表現載體包括表達盒，其中將編碼免疫結合體 (片段) (*即*編碼區) 的多核苷酸與啟動子及/或其他轉錄或轉翻控制元件可操縱地締合以進行選殖。如本文所用的「編碼區」，為由翻譯成胺基酸的密碼子組成的核酸的一部分。儘管「終止密碼子」 (TAG、TGA 或 TAA) 不翻譯成胺基酸，但可以將其視為編碼區的一部分 (如果存在)，但是任何側翼序列 (例如啟動子、核醣體結合位點、轉錄終止子、內含子、5’ 和 3’ 非翻譯區等) 不屬於編碼區的一部分。兩個或更多個編碼區可存在於單個多核苷酸構建體中，*例如*存在

於單個載體上，或存在於單獨的多核苷酸構建體中，*例如*存在於單獨的 (不同的) 載體上。此外，任何載體可包含單個編碼區，或可包含兩個或更多個編碼區，*例如*，本發明之載體可編碼一種或多種多肽，該多肽經由蛋白水解後翻譯或共翻譯分離成最終蛋白。另外，本發明之載體、多核苷酸或核酸可編碼異源性編碼區，其與編碼本發明之免疫結合體的多核苷酸或其變異體或衍生物融合或不融合。異源編碼區包括但不限於專門的元件或基序 (諸如分泌訊息肽) 或異源性功能域。可操作的締合係指基因產物的編碼區 (*例如*多肽) 與一個或多個調節序列締合，從而使基因產物的表現處於調節序列的影響或控制之下。如果啟動子功能的誘導導致編碼所需基因產物的 mRNA 轉錄，並且兩個 DNA 片段之間的連接子性質不干擾表現調節序列指導基因產物表現的能力，也不干擾 DNA 模板被轉錄的能力，則兩個 DNA 片段 (例如多肽編碼區以及與之相締合的啟動子)「可操縱地締合」。因此，如果啟動子能夠影響核酸的轉錄，則該啟動子區將與編碼多肽的核酸可操縱地締合。啟動子可以為細胞特異性啟動子，其僅指導預定細胞中 DNA 的大量轉錄。除啟動子外，其他轉錄控制元件，例如增強子、操縱子、阻遏子和轉錄終止信號，可與多核苷酸可操縱地締合以指導細胞特異性轉錄。本文公開了合適的啟動子及其他轉錄控制區。各種轉錄控制區為本領域的技術人員所公知的。其中包括但不限於在脊椎動物細胞中起作用的轉錄控制區，諸如但不限於鉅細胞病毒 (*例如*直接早期啟動子，與內含子 A 結合)、猿猴病毒 40 (*例如*早期啟動子) 和反轉錄病毒 (*例如* Rous氏肉瘤病毒)。其他轉錄控制區包括來源於脊椎動物基因的那些，例如肌動蛋白、熱休克蛋白、牛生長激素和兔 β-珠蛋白以及能夠控制真核細胞中基因表達的其他序列。其他合適的轉錄控制區包括組織特異性啟動子和增強子以及誘導型啟動子 (*例如*四環素誘導的啟動子)。類似地，各種翻譯控制元件為本領域的普通技術人員所公知的。其中包括但不限於核醣體結合位點、翻譯起始和終止密碼子以及來源於

病毒體系的元件 (特定而言內部核醣體進入位點或 IRES，也稱為 CITE 序列)。表達盒還可包含其他特徵，例如複製起點及/或染色體整合元件，例如反轉錄病毒長末端重複序列 (LTR) 或腺相關病毒 (AAV) 反向末端重複序列 (ITR)。

【0211】 本發明之多核苷酸及核酸編碼區可與編碼分泌或訊息肽的其他編碼區締合，該分泌或訊息肽指導由本發明之多核苷酸編碼的多肽的分泌。根據訊息假說，哺乳動物細胞所分泌之蛋白質具有訊息肽或分泌前導序列，其在增長的蛋白質鏈透過粗內質網輸出時從成熟蛋白質上裂解下來。本領域的普通技術人員將認識到，脊椎動物細胞所分泌之多肽通常具有與多肽之 N 端融合的訊息肽，其從翻譯後的多肽上裂解下來以產生分泌或「成熟」形式的多肽。例如，人 IL-2 由多肽的 N 端的 20 胺基酸信號序列翻譯，隨後被裂解以產生成熟的 133 胺基酸人 IL-2。在某些實施例中，使用天然訊息肽，*例如* IL-2 訊息肽或免疫球蛋白重鏈或輕鏈訊息肽或該序列的功能性衍生物，該功能性衍生物保留指導與之可操縱地締合的多肽之分泌的能力。可替代地，可使用異源性哺乳動物訊息肽或其功能性衍生物。例如，野生型前導序列可被人組織胞漿素原活化物 (TPA) 或小鼠 β-葡萄醣醛酸苷酶的前導序列取代。

【0212】 編碼可用於促進以後的純化 (*例如*組胺酸標籤) 或輔助標記免疫結合體的短蛋白質序列的 DNA 可包括在編碼多核苷酸的免疫結合體 (片段) 的內部或末端。

【0213】 在另一個實施例中，提供了包含本發明之一種或多種多核苷酸的宿主細胞。在某些實施例中，提供了包含本發明之一種或多種載體的宿主細胞。多核苷酸和載體可分別單獨或組合結合本文中相對於多核苷酸和載體所述的任何特徵。在一個此類實施例中，宿主細胞包含一種或多種載體 (*例如*已被其轉化或轉染)，該載體包含一種或多種編碼本發明之免疫結合體 (片段) 的多核苷酸。如本文所用的術語「宿主細胞」，係指可被工程改造以產生本發明之

免疫結合體或其片段的任何類型的細胞體系。適於複製並支持免疫結合體之表現的宿主細胞為此領域中所公知。可在適當情況下用特定的表現載體轉染或轉導此等細胞，並且可生長大量包含載體的細胞以接種大規模發酵劑，獲得足夠量的免疫結合體以用於臨床應用。合適的宿主細胞包括原核微生物 (諸如大腸桿菌) 或各種真核細胞 (諸如中國倉鼠卵巢細胞 (CHO)、昆蟲細胞等)。例如，多肽可能在細菌中產生，特定而言在無需醣基化的情況下。在表現後，多肽可與細菌細胞糊中的可溶性部分分離，並可經過進一步純化。除原核生物以外，真核微生物 (如絲狀真菌或酵母菌) 也為合適的多肽編碼載體的克隆或表現宿主，包括其醣基化途徑已被「人源化」的真菌和酵母菌株，從而導致具有部分或完全人醣基化模式的多肽的產生。參見：Gerngross，*Nat Biotech* 22，1409-1414 (2004)；及 Li 等人，*Nat Biotech* 24，210-215 (2006)。用於表現 (醣基化) 多肽的合適的宿主細胞也來源於多細胞生物 (無脊椎動物和脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物和昆蟲細胞。已鑑定出許多桿狀病毒株，它們可以與昆蟲細胞結合使用，特定而言用於轉染草地貪夜蛾 (*Spodoptera frugiperda*) 細胞。植物細胞培養物也可以用作宿主。參見*例如*美國專利第 5,959,177、6,040,498、6,420,548、7,125,978 及 6,417,429 號 (描述了在基因轉殖植物中生產抗體的 PLANTIBODIESTM 技術)。脊椎動物細胞也可用作宿主。例如，可使用適於在懸浮液中生長的哺乳動物細胞係。可用的哺乳動物宿主細胞系的其他示例包括：由 SV40 (COS-7) 轉化的猴腎 CV1 系；人胚胎腎系 (*例如* Graham 等人，*J Gen Virol* 36，59 (1977) 中所述的 293 或 293T 細胞)；幼地鼠腎細胞 (BHK)；小鼠睾丸支持細胞 (*例如* Mather，*Biol Reprod* 23，243-251 (1980) 中所述的 TM4 細胞)；猴腎細胞 (CV1)；非洲綠猴腎細胞 (VERO-76)；人宮頸癌細胞 (HELA)；犬腎細胞 (MDCK)；Buffalo 大鼠肝細胞 (BRL 3A)；人肺細胞 (W138)；人肝細胞 (Hep G2)；小鼠乳腺腫瘤 (MMT 060562)；TRI 細胞 (*例如*

Mather 等人，*Annals N.Y.Acad Sci* 383，44-68 (1982) 所述)；MRC 5 細胞；及 FS4 細胞。其他可用的哺乳動物宿主細胞系包括中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞，包括 dhfr- CHO 細胞 (Urlaub 等人，*Proc Natl Acad Sci USA* 77，4216 (1980))；及骨髓瘤細胞系，例如 YO、NS0、P3X63 和 Sp2/0。有關某些適用於蛋白質生產的哺乳動物宿主細胞系的綜述，參見*例如*：Yazaki 和 Wu，*Methods in Molecular Biology*，第 248 卷 (B.K.C. Lo 主編，Humana Press，Totowa, NJ)，第 255-268 頁 (2003)。宿主細胞包括培養的細胞，*例如*哺乳動物培養細胞、酵母細胞、昆蟲細胞、細菌細胞和植物細胞等，還包括轉基因動物、轉基因植物或培養的植物或動物組織內的細胞。在一個實施例中，宿主細胞為真核細胞，較佳的是哺乳動物細胞，例如中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞、人胚腎 (HEK) 細胞或淋巴樣細胞 (*例如*，Y0、NS0、Sp20 細胞)。

【0214】 標準技術為此領域中所公知，可在這些系統中表現外源基因。可對表現融合至抗體的重鏈或輕鏈的突變-IL-2 多肽的細胞進行工程改造，使其也表現其他抗體從而使表現的突變型 IL-2 融合產物為兼有重鏈和輕鏈的抗體。

【0215】 在一個實施例中，提供了一種產生根據本發明之免疫結合體的方法，其中該方法包括在適合於免疫結合體表現的條件下培養包含如本文所述之編碼免疫結合體的一種或多種多核苷酸的宿主細胞，並視情況從宿主細胞 (或宿主細胞培養基) 中回收該免疫結合體。

【0216】 可能需要對本發明之免疫結合體進行進一步的化學修飾。例如，可藉由大致呈直鏈的聚合物如聚乙二醇 (PEG) 或聚丙二醇 (PPG) 結合來改善免疫原性及半衰期短的問題 (參見*例如* WO 87/00056)。

【0217】 按照本文所述之方法製備的免疫結合體可藉由本領域中已知的技術 (如高效能液相層析法、離子交換層析法、凝膠電泳、親和力層析法、粒徑篩析層析法等) 進行純化。用於純化特定蛋白質之實際條件將部分取決於淨

電荷、疏水性、親水性等因素，並且對本領域的技術人員而言為顯而易見的。對於親和力層析純化使用抗體、配體、受體或抗原以結合免疫結合體。例如，可使用特異性結合突變型 IL-2 多肽的抗體。例如，對於本發明之免疫結合體的親和力層析純化，可使用具有蛋白質 A 或蛋白質 G 的基體。例如，可使用順序蛋白質 A 或 G 親和力層析法和粒徑篩析層析法分離基本上如實例中所述之免疫結合體。免疫結合體純度可透過多種熟知的分析方法 (包括凝膠電泳法、高壓液相層析法等) 中的任一種進行測定。

產生包含外源性抗原的有核細胞的組成物的方法

【0218】 在一些實施例中，本發明提供了與本發明之免疫結合體合併用於刺激免疫反應的包含外源性抗原的有核細胞的組成物。在一些實施例中，有核細胞為免疫細胞；例如，多個 PBMC 或 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞或 NK-T 細胞中之一種或多種。在一些實施例中，外源性抗原經胞內遞送至有核細胞。將外源性抗原引入有核細胞的方法為本領域中已知的。

【0219】 在一些實施例中，藉由以下方式將外源性抗原引入有核細胞中：使細胞通過收縮物，使得將瞬時孔引入細胞膜中，從而允許外源性抗原進入細胞。基於收縮物將化合物遞送至細胞中的實例描述於 WO 2013/059343、WO 2015/023982、WO 2016/070136、WO2017041050、WO2017008063、WO 2017/192785、WO 2017/192786、WO 2019/178005、WO 2019/178006、WO 2020/072833、PCT/US2020/15098 及 PCT/US2020/020194 中。

【0220】 在一些實施例中，藉由使包含有核細胞 (*例如*，PBMC) 的細胞懸浮液通過收縮物，將外源性抗原遞送至有核細胞中以產生本發明之有核細胞，其中收縮物使細胞變形，由此引起細胞擾動，使得外源性抗原進入細胞。在一些實施例中，收縮物包含於微流體通道中。在一些實施例中，可在微流體通道內並聯及/或串聯放置多個收縮物。

【0221】在一些實施例中，微流體通道內的收縮物包括入口部分、中心點及出口部分。在一些實施例中，微流體通道內收縮物的長度、深度及寬度可以變化。在一些實施例中，微流體通道內收縮物的寬度為有核細胞直徑的函數。測定有核細胞直徑的方法是本領域已知的；例如，高容量成像、細胞計數器或流式細胞分析技術。

【0222】在將外源性抗原引入有核細胞的基於收縮物的遞送系統中，收縮物之寬度為約 3 μm 至約 15 μm。在一些實施例中，收縮物之寬度為約 3 μm 至約 10 μm。在一些實施例中，收縮物之寬度為約 3 μm 至約 6 μm。在一些實施例中，收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 6 μm。在一些實施例中，收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 4.8 μm。在一些實施例中，收縮物之寬度為約或小於 2 μm、2.5 μm、3 μm、3.5 μm、4 μm、4.5 μm、5 μm、5.5 μm、6 μm、6.5 μm、7 μm、7.5 μm、8 μm、8.5 μm、9 μm、9.5 μm、10 μm、10.5 μm、11 μm、11.5 μm、12 μm、12.5 μm、13 μm、13.5 μm、14 μm、14.5 μm 或 15 μm 中之任一者。在一些實施例中，收縮物之寬度為約或小於 4.0 μm、4.1 μm、4.2 μm、4.3 μm、4.4 μm、4.5 μm、4.6 μm、4.7 μm、4.8 μm、4.9 μm 或 5.0 μm 中之任一者。在一些實施例中，收縮物之寬度為約 4.5 μm。

【0223】在本發明的一些實施例中，組成物包含有核細胞族群中的多個有核細胞 (*例如*，多個 PBMC)。在一些實施例中，收縮物之寬度為有核細胞族群內具有最小直徑的有核細胞之亞族群的平均直徑的約 10% 至約 99%。在一些實施例中，收縮物之寬度為有核細胞族群內具有最小直徑的有核細胞之亞族群的平均直徑的約 10% 至約 90%、約 10% 至約 80%、約 10% 至約 70%、約 20% 至約 60%、約 40% 至約 60%、約 30% 至約 45%、約 50% 至約 99%、約 50% 至約 90%、約 50% 至約 80%、約 50% 至約 70%、約 60% 至約 90%、約 60% 至約 80% 或約 60% 至約 70% 中之任一者。在一些實施例中，收縮物之寬度為

有核細胞族群內具有最小直徑的有核細胞之亞族群的平均直徑的約 10% 至約 20%、約 20% 至約 30%、約 30% 至約 40%、約 40% 至約 50%、約 50% 至約 60%、約 60% 至約 70%、約 70% 至約 80%、約 80% 至約 90% 或約 90% 至約 99% 中之任一者。在一些實施例中，收縮物之寬度為有核細胞族群內具有最小直徑的有核細胞之亞族群的平均直徑的約 10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 中之任一者。在一些實施例中，在多個輸入 PBMC 內有最小平均直徑的有核細胞之亞族群為淋巴細胞族群，其中淋巴細胞群的直徑為約 6 μm 至約 10 μm。在一些實施例中，淋巴細胞族群之平均直徑為約 7 μm。在一些實施例中，淋巴細胞族群為一群 T 細胞。在一些實施例中，淋巴細胞為 T 細胞。在一些實施例中，在多個輸入 PBMC 內有最小平均直徑的有核細胞之亞族群為 T 細胞。

【0224】 在本發明的一些實施例中，組成物包含有核細胞族群中的多個有核細胞 (*例如*，多個 PBMC)。在一些實施例中，收縮物之寬度為有核細胞族群內具有最大直徑的有核細胞之亞族群的平均直徑的約 10% 至約 99%。在一些實施例中，收縮物之寬度為有核細胞族群內具有最大直徑的有核細胞之亞族群的平均直徑的約 10% 至約 90%、約 10% 至約 80%、約 10% 至約 70%、約 20% 至約 60%、約 40% 至約 60%、約 30% 至約 45%、約 15% 至約 30%、約 15% 至約 20%、約 20% 至約 25%、約 25% 至約 30%、約 20% 至約 30%、約 30% 至約 70% 或約 30% 至約 60% 中之任一者。在一些實施例中，收縮物之寬度為有核細胞族群內具有最大直徑的有核細胞之亞族群的平均直徑的約 5% 至約 10%、約 10% 至約 20%、約 20% 至約 30%、約 30% 至約 40%、約 40% 至約 50%、約 50% 至約 60%、約 60% 至約 70%、約 70% 至約 80%、約 80% 至約 90% 或約 90% 至約 99% 中之任一者。在一些實施例中，收縮物之寬度為有核

細胞族群內具有最大直徑的有核細胞之亞族群的平均直徑的約 5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95% 或 99% 中之任一者。在一些實施例中，在多個輸入 PBMC 內有最大平均直徑的有核細胞之亞族群為單核細胞群，其中單核細胞族群的直徑為約 15 μm 至約 25 μm。在一些實施例中，單核細胞族群之平均直徑為約 18 μm。在一些實施例中，在多個輸入 PBMC 內有最大平均直徑的有核細胞之亞族群為單核細胞。

【0225】 許多參數可能影響化合物藉由本文所述之方法遞送至有核細胞中以刺激免疫反應。在一些實施例中，細胞懸浮液在通過收縮物之前、同時或之後與化合物接觸。儘管可在有核細胞通過收縮物後將化合物添加至細胞懸浮液中，但有核細胞可通過懸浮於包含待遞送之化合物的溶液中的收縮物。在一些實施例中，待遞送之化合物塗布於收縮物上。

【0226】 可能影響化合物向有核細胞中之遞送的參數的包括但不限於收縮物的尺寸、收縮物的入射角、收縮物的表面特性 (*例如*，粗糙度、化學修飾、親水性、疏水性等)、工作流速 (*例如*，細胞通過收縮物的時間)、細胞濃度、細胞懸浮液中化合物的濃度、細胞懸浮液中的緩衝液及有核細胞通過收縮物後恢復或孵育的時間，這些參數可能影響所遞送之化合物通過有核細胞的過程。影響化合物遞送至有核細胞中的其他參數可包括收縮物中有核細胞的速度、收縮物中的剪切速率、細胞懸浮液的粘度、垂直於流速的速度分量及處於收縮物中的時間。另外，包含串聯及/或並聯通道的多個芯片可能影響遞送至有核細胞的過程。並聯的多個芯片可能有助於提高通量。此類參數可設計用於控制化合物之遞送。在一些實施例中，細胞濃度在約 10 個細胞/mL 至至少約 10^{12} 個細胞/mL 的範圍內，或為兩者之間的任意濃度或濃度範圍。在一些實施例中，遞送化合物可以在約 10 ng/mL 至約 1 g/mL 的範圍內，或為兩者之間的任

意濃度或濃度範圍。在一些實施例中，遞送化合物可以在約 1 pM 至至少約 2 M 的範圍內，或為兩者之間的任意濃度或濃度範圍。

【0227】在一些實施例中，與有核細胞一起孵育的外源性抗原之濃度介於約 0.01 μM 至約 10 mM 之間。例如，在一些實施例中，與有核細胞一起孵育的外源性抗原之濃度為小於約 0.01 μM、約 0.1 μM、約 1 μM、約 10 μM、約 100 μM、約 1 mM 或約 10 mM 中之任一者。在一些實施例中，與有核細胞一起孵育的外源性抗原之濃度大於約 10 mM。在一些實施例中，與有核細胞一起孵育的外源性抗原之濃度為介於約 0.01 μM 至約 0.1 μM 之間、介於約 0.1 μM 至約 1 μM 之間、介於約 1 μM 至約 10 μM 之間、介於約 10 μM 至約 100 μM 之間、介於約 100 μM 至約 1 mM 之間或介於 1 mM 至約 10 mM 之間中之任一者。在一些實施例中，與有核細胞一起孵育的外源性抗原之濃度介於約 0.1 μM 至約 1 mM 之間。在一些實施例中，與有核細胞一起孵育的外源性抗原之濃度介於約 0.1 μM 至約 10 μM 之間。在一些實施例中，與有核細胞一起孵育的外源性抗原之濃度為 1 μM。

【0228】在一些實施例中，有核細胞包含濃度介於約 1 nM 至約 1 mM 之間的編碼外源性抗原的核酸。在一些實施例中，有核細胞包含濃度為小於約 0.1 nM、約 1 nM、約 0.01 μM、約 0.1 μM、約 1 μM、約 10 μM、約 100 μM、約 1 mM 或約 10 mM 中之任一者的編碼外源性抗原的核酸。在一些實施例中，有核細胞包含濃度大於約 10 mM 的編碼外源性抗原的核酸。在一些實施例中，有核細胞包含濃度為介於約 0.1 nM 至約 1 nM 之間、介於約 1 nM 至約 10 nM 之間、介於約 10 nM 至約 100 nM 之間、介於約 0.1 μM 至約 1 μM 之間、介於約 1 μM 至約 10 μM 之間、介於約 10 μM 至約 100 μM 之間、介於約 100 μM 至約 1 mM 之間或介於約 1 mM 至約 10 mM 之間中之任一者的編碼外源性抗原的核酸。在一些實施例中，有核細胞包含濃度介於約 10 nM 至約 100 nM 之間

的編碼外源性抗原的核酸。在一些實施例中，有核細胞包含濃度介於約 1 nM 至約 10 nM 之間的編碼外源性抗原的核酸。在一些實施例中，有核細胞包含濃度爲約 50 nM 的外源性抗原。在一些實施例中，核酸為 mRNA。

細胞之調節

【0229】 在根據本文所述之方法中任一者的一些實施例中，包含外源性抗原的有核細胞 (*例如*，PBMC) 經過調節。在另外的實施例中，有核細胞為成熟細胞。在一些實施例中，在收縮物介導的遞送之後，對有核細胞進行調節。在一些實施例中，將包含外源性抗原的有核細胞與佐劑一起孵育足夠長的時間，以使包含由收縮物遞送的外源性抗原的細胞經過調節，從而生成包含外源性抗原的經調節之細胞的組成物。在一些實施例中，在收縮物介導的遞送之後，對有核細胞進行調節。在一些實施例中，將包含由收縮物遞送的外源性抗原的有核細胞與佐劑一起孵育足夠長的時間，以使包含由收縮物遞送的外源性抗原的有核細胞經過調節，從而生成包含外源性抗原的經調節之有核細胞的組成物。在一些態樣中，提供了包含外源性抗原的經調節之有核細胞的組成物，該組成物藉由以下方法製備，該方法包括以下步驟：a) 使細胞懸浮液通過細胞變形收縮物，其中收縮物之寬度為懸浮液中有核細胞的函數，由此使得有核細胞的擾動足夠大，以使外源性抗原通過，形成經擾動之有核細胞；b) 將經擾動之有核細胞與外源性抗原一起孵育足夠長的時間，以使外源性抗原進入經擾動之有核細胞中，由此生成包含外源性抗原的經修飾之有核細胞；及 c) 將包含由收縮物遞送至外源性抗原的經修飾之有核細胞與佐劑一起孵育足夠長的時間，以使包含由收縮物遞送至外源性抗原的經修飾之有核細胞經過調節，由此生成包含外源性抗原的經調節之有核細胞的組成物。在一些實施例中，該方法進一步包含在與佐劑一起孵育以調節經修飾之有核細胞之前，從細胞懸浮液分離出包含外源性抗原的經修飾之有核細胞。

【0230】在一些實施例中，在收縮物介導的遞送之前，對有核細胞 (*例如*，PBMC) 進行調節。在一些實施例中，將有核細胞與佐劑一起孵育足夠長的時間以對該等有核細胞進行調節，由此生成經調節之有核細胞。在一些實施例中，提供了包含外源性抗原的經調節之有核細胞的組成物，該組成物藉由以下方法製備，該方法包括以下步驟：a) 將有核細胞與佐劑一起孵育足夠長的時間以對該等有核細胞進行調節，由此生成經調節之有核細胞；b) 使包含經調節之有核細胞的細胞懸浮液通過細胞變形收縮物，其中收縮物之寬度為懸浮液中有核細胞直徑的函數，由此使得有核細胞的擾動足夠大，以使外源性抗原通過，形成經擾動之有核細胞；及 c) 將經擾動之有核細胞與外源性抗原一起孵育足夠長的時間，以使外源性抗原進入經調節之經擾動之有核細胞中，由此生成包含外源性抗原的經調節之有核細胞。在一些實施例中，該方法進一步包含在使經調節之有核細胞通過細胞變形收縮物之前，從佐劑中分離經調節之有核細胞。

【0231】在根據本文所述之方法中任一者的一些實施例中，將包含外源性抗原的有核細胞 (*例如*，PBMC) 與佐劑一起孵育約 1 小時至約 24 小時以對該等有核細胞進行調節。在一些實施例中，將有核細胞與佐劑一起孵育約 2 小時至約 10 小時以對該等有核細胞進行調節。在一些實施例中，將有核細胞與佐劑一起孵育約 3 小時至約 6 小時以對該等有核細胞進行調節。在一些實施例中，將有核細胞與佐劑一起孵育約 1 小時、2 小時、3 小時、3.5 小時、4 小時、4.5 小時、5 小時、5.5 小時、6 小時、8 小時、12 小時、16 小時、20 小時或 24 小時中之任一者以對該等有核細胞進行調節。在一些實施例中，將有核細胞與佐劑一起孵育約 4 小時以對該等有核細胞進行調節。

【0232】在一些實施例中，提供了包含外源性抗原的經調節之多個 PBMC，其製備方法為：將包含外源性抗原的多個 PBMC 與佐劑一起孵育足夠長的時間以調節 PBMC，由此生成包含外源性抗原的經調節之多個 PBMC。在

一些實施例中，提供了包含外源性抗原的經調節之多個 PBMC，其製備方法為：將多個 PBMC 與佐劑一起孵育足夠長的時間以調節 PBMC，然後將外源性抗原引入 PBMC 中，由此生成包含外源性抗原的經調節之多個 PBMC。

【0233】在根據本文所述之經調節之多個 PBMC 中之任一者的一些實施例中，將多個 PBMC 與佐劑一起孵育約 1 小時至約 24 小時以調節 PBMC。在一些實施例中，將多個 PBMC 與佐劑一起孵育約 2 小時至約 10 小時以調節 PBMC。在一些實施例中，將多個 PBMC 與佐劑一起孵育約 3 小時至約 6 小時以調節 PBMC。在一些實施例中，將多個 PBMC 與佐劑一起孵育約 1 小時、2 小時、3 小時、3.5 小時、4 小時、4.5 小時、5 小時、5.5 小時、6 小時、8 小時、12 小時、16 小時、20 小時或 24 小時以調節 PBMC。在一些實施例中，將多個 PBMC 與佐劑一起孵育約 4 小時以調節 PBMC。

【0234】在根據本文所述之經調節之多個 PBMC 中之任一者的一些實施例中，與未經調節之多個經修飾之 PBMC 相比，經調節之多個經修飾之 PBMC 中的一種或多種共刺激分子上調。在一些實施例中，與未經調節之多個經修飾之 PBMC 中的細胞亞族群相比，經調節之多個經修飾之 PBMC 中的細胞亞族群中的一種或多種共刺激分子上調。在一些實施例中，與未經調節之多個經修飾之 PBMC 中的 B 細胞相比，經調節之多個經修飾之 PBMC 中的 B 細胞中的一種或多種共刺激分子上調。在一些實施例中，共刺激分子為 CD80 及/或 CD86。在一些實施例中，共刺激分子為 CD86。在一些實施例中，與未經調節之多個經修飾之 PBMC 中的 B 細胞相比，經調節之多個經修飾之 PBMC 中的 B 細胞中的 CD80 及/或 CD86 上調超過約 1.2 倍、1.5 倍、1.8 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、8 倍或多於 10 倍。在一些實施例中，與未經調節之多個經修飾之 PBMC 中的 B 細胞相比，經調節之多個經修飾之 PBMC 中的 B 細胞中的 CD80 及/或 CD86 上調約 1.2 倍至約 1.5 倍、約 1.5 倍至約 1.8 倍、約 1.8 倍至約 2

倍、約 2 倍至約 3 倍、約 3 倍至約 4 倍、約 4 倍至約 5 倍、約 5 倍至約 8 倍、約 8 倍至約 10 倍、約 10 倍至約 20 倍、約 20 倍至約 50 倍、約 50 倍至約 100 倍、約 100 倍至約 200 倍、約 200 倍至約 500 倍或超過約 500 倍中之任一者。在一些實施例中，與未經調節之多個經修飾之 PBMC 相比，經調節之多個經修飾之 PBMC 中的 IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種之表現增加。在一些實施例中，與未經調節之多個經修飾之 PBMC 之細胞亞族群相比，經調節之多個經修飾之 PBMC 中之細胞亞族群中的 IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種之表現增加。在一些實施例中，與未經調節之多個經修飾之 PBMC 相比，經調節之多個經修飾之 PBMC 中的 IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種之表現增加約 1.2 倍、1.5 倍、1.8 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、8 倍或多於約 10 倍。在一些實施例中，與未經調節之多個經修飾之 PBMC 相比，經調節之多個經修飾之 PBMC 中的 IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種之表現增加約 1.2 倍至約 1.5 倍、約 1.5 倍至約 1.8 倍、約 1.8 倍至約 2 倍、約 2 倍至約 3 倍、約 3 倍至約 4 倍、約 4 倍至約 5 倍、約 5 倍至約 8 倍、約 8 倍至約 10 倍、約 10 倍至約 20 倍、約 20 倍至約 50 倍、約 50 倍至約 100 倍、約 100 倍至約 200 倍、約 200 倍至約 500 倍或多於約 500 倍。

包含外源性抗原的有核細胞的組成物之進一步修飾

【0235】 在根據本文所述之方法中之任一項的一些實施例中，有核細胞(*例如*，PBMC) 的組成物進一步包含一種藥劑，與對應的不含該藥劑的有核細胞的組成物相比，該藥劑增強了有核細胞的生存力及/或功能。在一些實施例中，有核細胞的組成物進一步包含一種藥劑，與對應的不含該藥劑的有核細胞的組成物相比，該藥劑增強了有核細胞經凍融循環後的生存力及/或功能。在一些實施例中，該藥劑為凍存劑及/或低溫保存劑。在一些實施例中，與對應的在

任何凍融循環之前不含凍存劑或低溫保存劑的有核細胞的組成物相比，凍存劑或低溫保存劑不引起包含該藥劑的組成物中超過 10% 或 20% 的細胞死亡。在一些實施例中，至少約 70%、約 80% 或約 90% 的有核細胞在經過 1、2、3、4、5 次凍融循環後仍然存活。在一些實施例中，藥劑為增強內吞作用的化合物、穩定劑或輔因子。在一些實施例中，藥劑為白蛋白。在一些實施例中，白蛋白為小鼠白蛋白、牛白蛋白或人白蛋白。在一些實施例中，藥劑為人白蛋白。在一些實施例中，藥劑為以下各項中之一種或多種：二價金屬陽離子、葡萄糖、ATP、鉀、甘油、海藻糖、D-蔗糖、PEG1500、L-精胺酸、L-麩醯胺酸或 EDTA。在一些實施例中，二價金屬陽離子為 Mg2+、Zn2+ 或 Ca2+ 中之一種或多種。在一些實施例中，藥劑為以下各項中之一種或多種：丙酮酸鈉、腺嘌呤、海藻糖、右旋糖、甘露糖、蔗糖、人血清白蛋白 (HSA)、DMSO、HEPES、甘油、麩胱甘肽、肌苷、磷酸氫二鈉、磷酸二氫鈉、鈉離子、鉀離子、鎂離子、氯離子、醋酸鹽、葡萄糖酸鹽、蔗糖、氫氧化鉀或氫氧化鈉。在一些實施例中，藥劑為以下各項中之一種或多種：丙酮酸鈉、腺嘌呤、Rejuvesol®、海藻糖、右旋糖、甘露糖、蔗糖、人血清白蛋白 (HSA)、PlasmaLyte®、DMSO、Cryostor® CS2、Cryostor® CS5、Cryostor® CS10、Cryostor® CS15、HEPES、甘油、麩胱甘肽、HypoThermosol®。

【0236】 在根據本文所述之方法中之任一項的一些實施例中，有核細胞的組成物包含多個經修飾之 PBMC，該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以提高共刺激分子中之一種或多種之表現。在一些實施例中，共刺激分子為 B7-H2 (ICOSL)、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155 或 CD112。在一些實施例中，該等多個經修飾之 PBMC 包含核酸，該核酸導致一種或多種共刺激分子之表現升高。在一些實施例中，該等多個經修

飾之 PBMC 包含 mRNA，該 mRNA 導致一種或多種共刺激分子之表現升高。在一些實施例中，共刺激分子為刺激 T 細胞活化的信號 2 效應子。

【0237】 在根據本文所述之方法中之任一項的一些實施例中，經修飾之 PBMC 經進一步修飾以提高一種或多種細胞介素之表現。在一些實施例中，細胞介素為 IL-2、IL-12、IL-21 或 IFNα2 中之一者或多者。在一些實施例中，該等多個經修飾之 PBMC 包含核酸，該核酸導致一種或多種細胞介素之表現及/或分泌升高。在一些實施例中，細胞介素為刺激 T 細胞活化的信號 3 效應子。

【0238】 在根據本文所述之方法中之任一項的一些實施例中，該等多個經修飾之 PBMC 中的至少一個細胞對 HLA-A2 之表現呈陽性。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 包含進一步修飾以調節 MHC I 類表現。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 包含進一步修飾以調節 HLA-A02 MHC I 類之表現。在一些實施例中，經修飾之 PBMC 包含進一步修飾以調節 MHC II 類之表現。在一些實施例中，與個體中對同種異體的上下文中的對應的不含進一步修飾的經修飾之 PBMC 之投予的先前先天免疫反應相比，個體中對同種異體的上下文中的經修飾之 PBMC 之投予的先天免疫反應有所下降。在一些實施例中，與對應的不含進一步修飾的經修飾之 PBMC 在其所投予的個體中的循環半衰期相比，經修飾之 PBMC 在其所投予的個體中的循環半衰期有所延長。在一些實施例中，與對應的不含進一步修飾的經修飾之 PBMC 在其所投予的個體中的循環半衰期相比，經修飾之 PBMC 在其所投予的個體中的循環半衰期延長約 10%、25%、50%、75%、100%、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、10 倍、25 倍、50 倍、100 倍、200 倍或 500 倍或更多中之任一者。在一些實施例中，對應的不含進一步修飾的經修飾之 PBMC 在其所投予的個體中的循環半衰期相比，經投予經修飾之 PBMC 在其所投予的個體中的循環半衰期基本上相同。

【0239】在根據本文所述之方法中之任一項的一些實施例中，該方法進一步包含了將有核細胞的組成物與藥劑一起孵育的步驟，該藥劑增強該等有核細胞相比於對應的不經進一步孵育步驟所製備的有核細胞的生存力及/或功能。

系統及套組

【0240】在一些態樣中，本發明提供了用於調節個體之免疫反應之套組或製成品。在一些實施例中，該套組包含有核細胞的組成物及免疫結合體，該等有核細胞包含外源性抗原，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合；其中該組成物及免疫結合體聯合用於刺激個體中對該外源性抗原之免疫反應。在一些實施例中，該套組包含有核細胞的組成物之套組，該等有核細胞包含外源性抗原，其中該組成物與免疫結合體合併用於刺激個體對該外源性抗原之免疫反應，且其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。在一些實施例中，該套組包含免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合；其中該免疫結合體與包含外源性抗原的細胞的組成物合併用於刺激個體對該外源性抗原之免疫反應。在一些實施例中，該等套組包含合適的包裝中之本文所述之成分 (*例如*包含外源性抗原的有核細胞的組成物及/或免疫結合體)。合適的包裝材料為本領域中已知的，且包括例如小瓶 (例如密封小瓶)、容器、安瓿、瓶、廣口瓶、柔

性包裝 (*例如*，密封的 Mylar 或塑料袋) 等。這些製成品可經過進一步消毒和/或密封。

【0241】 本發明還提供了套組，該等套組包含本文所述之方法的組分，且可以進一步包含執行所述方法以調節個體之免疫反應的指令及/或執行所述方法以將外源性抗原引入有核細胞的指令。本文所述之套組可進一步包括其他材料，該等其他材料包括緩衝液、稀釋劑、過濾器、針頭、注射器及包裝插頁，及用於執行本文所述之方法中的任一者的指令；*例如*，調節個體之免疫反應的指令或修飾有核細胞以包含外源性抗原的指令。

示例性實施例

【0242】 本發明提供了以下列舉實施例。

【0243】 1. 一種刺激個體之免疫反應之方法，該方法包含

a) 向該個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性抗原；及

b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【0244】 2. 一種刺激個體對腫瘤抗原之免疫反應之方法，該方法包含

a) 向該個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性腫瘤抗原；及

b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【0245】 3. 一種增強基於有核細胞之免疫療法之方法，該方法包含投予有效量之免疫結合體併以投予該基於有核細胞之免疫療法，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【0246】 4. 一種治療個體之疾病之方法，該方法包含

a) 向該個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含與該疾病有關之外源性抗原；及

b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【0247】 5. 一種為有此需要之個體接種疫苗之方法，該方法包含

a) 向該個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性抗原；及

b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【0248】 6. 如實施例 5 之方法，其中該個體患有對疫苗接種產生反應之疾病。

【0249】 7. 如實施例 4 至 6 中任一項之方法，其中該疾病為癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【0250】 8. 一種減少個體之腫瘤生長之方法，該方法包含

a) 向該個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性腫瘤抗原；及

b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【0251】 9. 如實施例 1 至 8 中任一項之方法，其中該第二多肽結合 T 細胞。

【0252】 10. 如實施例 11 之方法，其中該第二多肽結合 T 細胞上所表現之 PD-1。

【0253】 11. 如實施例 10 之方法，其中該第二多肽為特異性結合 PD-1 的抗原結合部分。

【0254】 12. 如實施例 11 之方法，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含

(a) 重鏈可變區 (VH) 及輕鏈可變區 (VL)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:2 之胺基酸序列；HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:3 之胺基酸序列；及 FR-H3，其包含在根據 Kabat 編號之位置 71-73 處之 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列；該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列；HVR-L2，其包含 SEQ ID NO:5 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列；或

(b) 重鏈可變區 (VH) 及輕鏈可變區 (VL)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列；及 HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列；該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列；HVR-L2，

其包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。.

【0255】 13. 如實施例 11 或 12 之方法，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含與 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含與選自以下各項所組成之群組之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18。

【0256】 14. 如實施例 11 至 13 中任一項之方法，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18 之胺基酸序列。

【0257】 15. 如實施例 11 至 14 中任一項之方法，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含 SEQ ID NO:15 之胺基酸序列。

【0258】 16. 如實施例 11 至 15 中任一項之方法，其中該免疫結合體包含：多肽，其包含與 SEQ ID NO:22 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；多肽，其包含與 SEQ ID NO:24 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及多肽，其包含與 SEQ ID NO:25 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列。

【0259】 17. 如實施例 11 至 16 中任一項之方法，其中該免疫結合體包含 SEQ ID NO:22 之多肽序列、SEQ ID NO:24 之多肽序列及兩個 SEQ ID NO:25 之多肽序列。

【0260】 18. 如實施例 1 至 8 中任一項之方法，其中該第二多肽特異性結合存在於腫瘤細胞上或腫瘤細胞環境中的靶抗原。

【0261】 19. 如實施例 18 之方法，其中該靶抗原選自以下各項所組成之群組：纖維母細胞活化蛋白 (FAP)、腱生蛋白 C 之 A1 域 (TNC A1)、腱生蛋白 C 之 A2 域 (TNC A2)、纖網蛋白之外加域 B (EDB)、癌胚抗原 (CEA) 及黑色素瘤相關之硫酸軟骨素蛋白多醣 (MCSP)。

【0262】 20. 如實施例 1 至 8 及 18 至 19 中任一項之方法，其中該第二多肽結合 FAP。

【0263】 21. 如實施例 19 或 20 之方法，其中該第二多肽為特異性結合 FAP 之抗原結合部分。

【0264】 22. 如實施例 21 之方法，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) SEQ ID NO:29 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:28 之輕鏈可變區序列；(ii) SEQ ID NO:31 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:30 之輕鏈可變區序列；(iii) SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列；(iv) SEQ ID NO:35 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:34 之輕鏈可變區序列；或 (v) SEQ ID NO:37 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:36 之輕鏈可變區序列。

【0265】 23. 如實施例 21 或 22 之方法，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) 與 SEQ ID NO:42 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:43 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ

ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；(ii) 與 SEQ ID NO:38 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:39 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:231 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；或 (iii) 與 SEQ ID NO:44 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:45 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列。

【0266】 24. 如實施例 21 至 23 中任一項之方法，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含 SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列。

【0267】 25. 如實施例 21 至 24 中任一項之方法，其中該免疫結合體包含 SEQ ID NO:38 之多肽序列、SEQ ID NO:39 之多肽序列及 SEQ ID NO:40 之多肽序列。

【0268】 26. 如實施例 1 至 25 中任一項之方法，其中該突變型 IL-2 多肽進一步包含胺基酸取代 T3A 及/或胺基酸取代 C125A。

【0269】 27. 如實施例 1 至 26 中任一項之方法，其中該突變型 IL-2 多肽包含與 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列，其中該突變型 IL-2 多肽與野生型 IL-2 多肽相比，表現出對高親和力 IL-2 受體之減小的親和力及對中等親和力 IL-2 受體之大致類似的親和力。

【0270】 28. 如實施例 1 至 27 中任一項之免疫結合體，其中該突變型 IL-2 多肽包含 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列。

【0271】 29. 如實施例 1 至 28 中任一項之方法，其中該等有核細胞為免疫細胞。

【0272】 30. 如實施例 1 至 29 中任一項之方法，其中該等有核細胞為多個周邊血單核細胞 (PBMC)。

【0273】 31 如實施例 30 之方法，其中該等多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞或 NK-T 細胞中之兩種或更多種。

【0274】 32. 如實施例 1 至 31 中任一項之方法，其中該等有核細胞為 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞及/或 NK-T 細胞中之一種或多種。

【0275】 33. 如實施例 1 至 32 中任一項之方法，其中該外源性抗原經胞內遞送至該等有核細胞。

【0276】 34. 如實施例 1 至 33 中任一項之方法，其中該外源性抗原為疾病相關之抗原。

【0277】 35. 如實施例 34 之方法，其中該疾病相關之抗原為癌症抗原、感染性疾病抗原或病毒相關之疾病抗原。

【0278】 36. 如實施例 1 至 35 中任一項之方法，其中該外源性抗原為人類乳突病毒 (HPV) 抗原。

【0279】 37. 如實施例 1 至 36 中任一項之方法，其中該組成物進一步包含佐劑。

【0280】 38. 如實施例 37 之方法，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)、LPS、IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。

【0281】 39. 如實施例 1 至 38 中任一項之方法，其中包含該外源性抗原的該等有核細胞藉由包含以下步驟的方法來製備：

a) 使包含輸入有核細胞的細胞懸浮液通過細胞變形收縮物，其中該收縮物之直徑為該懸浮液中該等輸入有核細胞的直徑的函數，從而使該等輸入有核細胞具有足夠大的擾動以使該外源性抗原通過而形成經擾動之輸入有核細胞；

b) 將該等經擾動之輸入有核細胞與外源性抗原一起孵育足夠長的時間，以使該外源性抗原進入該等經擾動之輸入有核細胞，從而生成包含該外源性抗原之有核細胞。

【0282】 40. 如實施例 39 之方法，其中該收縮物之寬度為該等輸入有核細胞的平均直徑的約 10% 至約 99%。

【0283】 41. 如實施例 39 或 40 之方法，其中該收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 6 μm。

【0284】 42. 如實施例 39 至 41 中任一項之方法，其中該收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 4.8 μm。

【0285】 43. 如實施例 39 至 42 中任一項之方法，其中該收縮物之寬度為約 4.5 μm。

【0286】 44. 如實施例 39 至 43 中任一項之方法，其中使包含該等多個輸入有核細胞的細胞懸浮液通過多個收縮物，其中該等多個收縮物串聯及/或並聯佈置。

【0287】 45. 如實施例 39 至 44 中任一項之方法，其中在該等經擾動之輸入有核細胞與該外源性抗原一起孵育後，該外源性抗原存在於至少約 70% 的該等有核細胞中。

【0288】 46. 如實施例 1 至 45 中任一項之方法，其中該等有核細胞經佐劑調節以形成經調節之細胞。

【0289】 47. 如實施例 46 之方法，其中該等有核細胞與該佐劑一起孵育約 1 小時至約 24 小時、約 2 小時至約 10 小時、約 3 小時至約 6 小時或約 4 小時以對該等有核細胞進行調節。

【0290】 48. 如實施例 46 或 47 之方法，其中有核細胞在外源性抗原引入該等有核細胞中之前或之後經調節。

【0291】 49. 如實施例 46 至 48 中任一項之方法，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)、LPS、IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。

【0292】 50. 如實施例 46 至 49 中任一項之方法，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)。

【0293】 51. 如實施例 46 至 50 中任一項之方法，其中該佐劑為 CpG 7909。

【0294】 52. 如實施例 46 至 51 中任一項之方法，其中該等經調節之細胞為經調節之多個經修飾之 PBMC。

【0295】 53. 如實施例 52 之方法，其中該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以增加共刺激分子中之一者或多者之表現。

【0296】 54. 如實施例 53 之方法，其中該等共刺激分子為 B7-H2 (ICOSL)、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155 或 CD112。

【0297】 55. 如實施例 52 至 54 中任一項之方法，其中該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以增加一種或多種細胞介素之表現。

【0298】 56. 如實施例 55 之方法，其中該細胞介素為 IL-15、IL-12、IL-2、IFN-α 或 IL-21。

【0299】 57. 如實施例 52 至 56 中任一項之方法，其中與該等多個未經修飾之 PBMC 中的 B 細胞相比，該等經調節之多個經修飾之 PBMC 的 B 細胞中的一種或多種共刺激分子上調，其中該共刺激分子為 CD80 及/或 CD86。

【0300】 58. 如實施例 52 至 57 中任一項之方法，其中與多個未經調節之 PBMC 相比，該等多個經修飾之 PBMC 具有表現增加之 IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種。

【0301】 59. 如實施例 58 之方法，其中與該等多個未經調節之 PBMC 相比，IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種的表現增加多於約 1.2 倍、1.5 倍、1.8 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、8 倍或多於約 10 倍。

【0302】 60. 如實施例 1 至 59 中任一項之方法，其中該免疫結合體於投予包含有核細胞的組成物之前、同時或之後投予。

【0303】 61. 如實施例 1 至 60 中任一項之方法，其中包含有核細胞的該組成物經多次投予。

【0304】 62. 如實施例 1 至 61 中任一項之方法，其中該免疫結合體於投予包含有核細胞的該組成物之後多次投予。

【0305】 63. 如實施例 1 至 62 中任一項之方法，其中該組成物及/或免疫結合體經靜脈內投予。

【0306】 64. 如實施例 1 至 63 中任一項之方法，其中該免疫結合體經皮下或瘤內投予。

【0307】 65. 如實施例 64 之方法，其中該免疫結合體與透明質酸酶聯合經皮下投予。

【0308】66. 如實施例 1 至 65 中任一項之方法，其中該個體為人。

【0309】67. 如實施例 1 至 66 中任一項之方法，其中該個體患有癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【0310】68. 如實施例 1 至 67 中任一項之方法，其中該有核細胞及/或免疫結合體之組成物於投予另一種療法之前、同時或之後投予。

【0311】69. 如實施例 68 之方法，其中該另一種療法為化學治療或放射治療。

【0312】70. 一種包含有核細胞之組成物，該等有核細胞包含外源性抗原，該組成物用於治療個體之疾病的方法中，其中該組成物與包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽的免疫結合體組合使用；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子。

【0313】71. 如實施例 70 之組成物，其中該疾病為癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【0314】72. 如實施例 70 或 71 之組成物，其中包含有核細胞的該組成物於該免疫結合體之前、同時或之後投予。

【0315】73. 如實施例 70 至 72 中任一項之組成物，其中該免疫結合體於投予包含有核細胞的該組成物之後多次投予。

【0316】74. 如實施例 70 至 73 中任一項之組成物，其中該第二多肽結合 T 細胞。

【0317】75. 如實施例 70 至 74 中任一項之組成物，其中該第二多肽結合 T 細胞上所表現之 PD-1。

【0318】76. 如實施例 70 至 75 中任一項之組成物，其中該第二多肽為特異性結合 PD-1 的抗原結合部分。

【0319】77. 如實施例 76 之組成物，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含

(a) 重鏈可變區 (VH) 及輕鏈可變區 (VL)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:2 之胺基酸序列；HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:3 之胺基酸序列；及 FR-H3，其包含在根據 Kabat 編號之位置 71-73 處之 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列；該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列；HVR-L2，其包含 SEQ ID NO:5 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列；或

(b) 重鏈可變區 (VH) 及輕鏈可變區 (VL)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列；及 HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列；該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列；HVR-L2，其包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。

【0320】78. 如實施例 76 或 77 之組成物，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含與 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含與選自以下各項所組成之群組之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18。

【0321】79. 如實施例 76 至 78 中任一項之組成物，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18 之胺基酸序列。

【0322】 80. 如實施例 76 至 79 中任一項之組成物，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含 SEQ ID NO:15 之胺基酸序列。

【0323】 81. 如實施例 70 至 80 中任一項之組成物，其中該免疫結合體包含：多肽，其包含與 SEQ ID NO:24 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；多肽，其包含與 SEQ ID NO:24 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及多肽，其包含與 SEQ ID NO:25 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列。

【0324】 82. 如實施例 70 至 81 中任一項之組成物，其中該免疫結合體包含 SEQ ID NO:22 之多肽序列、SEQ ID NO:24 之多肽序列及 SEQ ID NO:25 之多肽序列。

【0325】 83. 如實施例 70 至 73 中任一項之組成物，其中該第二多肽特異性結合存在於腫瘤細胞上或腫瘤細胞環境中的靶抗原。

【0326】 84. 如實施例 83 之組成物，其中該靶抗原選自以下各項所組成之群組：纖維母細胞活化蛋白 (FAP)、腱生蛋白 C 之 A1 域 (TNC A1)、腱生蛋白 C 之 A2 域 (TNC A2)、纖網蛋白之外加域 B (EDB)、癌胚抗原 (CEA) 及黑色素瘤相關之硫酸軟骨素蛋白多醣 (MCSP)。

【0327】 85. 如實施例 70 至 73 及 83 至 84 中任一項之組成物，其中該第二多肽結合 FAP。

【0328】 86. 如實施例 70 至 73 及 83 至 85 中任一項之組成物，其中該第二多肽為特異性結合 FAP 之抗原結合部分。

【0329】87. 如實施例 70 至 73 及 83 至 86 中任一項之組成物，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) SEQ ID NO:29 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:28 之輕鏈可變區序列；(ii) SEQ ID NO:31 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:30 之輕鏈可變區序列；(iii) SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列；(iv) SEQ ID NO:35 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:34 之輕鏈可變區序列；或 (v) SEQ ID NO:37 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:36 之輕鏈可變區序列。

【0330】88. 如實施例 70 至 73 及 83 至 87 中任一項之組成物，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) 與 SEQ ID NO:42 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:43 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；(ii) 與 SEQ ID NO:38 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:39 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:231 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；或 (iii) 與 SEQ ID NO:44 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:45 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列。

【0331】89. 如實施例 70 至 73 及 83 至 88 中任一項之組成物，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含 SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列。

【0332】90. 如實施例 70 至 73 及 83 至 89 中任一項之組成物，其中該免疫結合體包含 SEQ ID NO:38 之多肽序列、SEQ ID NO:39 之多肽序列及 SEQ ID NO:40 之多肽序列。

【0333】91. 如實施例 70 至 90 中任一項之組成物，其中該突變型 IL-2 多肽進一步包含胺基酸取代 T3A 及/或胺基酸取代 C125A。

【0334】92. 如實施例 70 至 91 中任一項之組成物，其中該突變型 IL-2 多肽包含與 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列，其中該突變型 IL-2 多肽與野生型 IL-2 多肽相比，表現出對高親和力 IL-2 受體之減小的親和力及對中等親和力 IL-2 受體之大致類似的親和力。

【0335】93. 如實施例 70 至 92 中任一項之組成物，其中該突變型 IL-2 多肽包含 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列。

【0336】94. 如實施例 70 至 93 中任一項之組成物，其中該等有核細胞為免疫細胞。

【0337】95. 如實施例 70 至 94 中任一項之組成物，其中該等有核細胞為多個周邊血單核細胞 (PBMC)。

【0338】96. 如實施例 95 之組成物，其中該等多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞或 NK-T 細胞中之兩種或更多種。

【0339】97. 如實施例 70 至 94 中任一項之組成物，其中該等有核細胞為 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞及/或 NK-T 細胞中之一種或多種。

【0340】98. 如實施例 70 至 97 中任一項之組成物，其中該外源性抗原經胞內遞送至該等有核細胞。

【0341】 99. 如實施例 70 至 98 中任一項之組成物，其中該外源性抗原為疾病相關之抗原。

【0342】 100.如實施例 70 至 99 中任一項之組成物，其中該疾病相關之抗原為癌症抗原、感染性疾病抗原或病毒相關之疾病抗原。

【0343】 101.如實施例 70 至 100 中任一項之組成物，其中該外源性抗原為人類乳突病毒 (HPV) 抗原。

【0344】 102.如實施例 70 至 101 中任一項之組成物，其中該組成物進一步包含佐劑。

【0345】 103.如實施例 102 之組成物，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)、LPS、IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。

【0346】 104.如實施例 70 至 103 中任一項之組成物，其中包含該外源性抗原的該等有核細胞藉由包含以下步驟的方法來製備：

a) 使包含輸入有核細胞的細胞懸浮液通過細胞變形收縮物，其中該收縮物之直徑為該懸浮液中該等輸入有核細胞的直徑的函數，從而使該等輸入有核細胞具有足夠大的擾動以使該外源性抗原通過而形成經擾動之輸入有核細胞；

b) 將該等經擾動之輸入有核細胞與外源性抗原一起孵育足夠長的時間，以使該外源性抗原進入該等經擾動之輸入有核細胞，從而生成包含該外源性抗原之有核細胞。

【0347】 105.如實施例 104 之組成物，其中該收縮物之寬度為該等輸入有核細胞的平均直徑的約 10% 至約 99%。

【0348】 106.如實施例 104 或 105 之組成物，其中該收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 6 μm。

【0349】107.如實施例 104 至 106 中任一項之組成物，其中該收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 4.8 μm。

【0350】108.如實施例 104 至 107 中任一項之組成物，其中該收縮物之寬度為約 4.5 μm。

【0351】109.如實施例 104 至 108 中任一項之組成物，其中使包含該等多個輸入有核細胞的細胞懸浮液通過多個收縮物，其中該等多個收縮物串聯及/或並聯佈置。

【0352】110.如實施例 104 至 109 中任一項之組成物，其中在該等經擾動之輸入有核細胞與該外源性抗原一起孵育後，該外源性抗原存在於至少約 70% 的該等有核細胞中。

【0353】111.如實施例 70 至 110 中任一項之組成物，其中該等有核細胞經佐劑調節以形成經調節之細胞。

【0354】112.如實施例 111 之組成物，其中該等有核細胞與該佐劑一起孵育約 1 小時至約 24 小時、約 2 小時至約 10 小時、約 3 小時至約 6 小時或約 4 小時以對該等有核細胞進行調節。

【0355】113.如實施例 111 或 112 之組成物，其中有核細胞在外源性抗原引入該等有核細胞中之前或之後經調節。

【0356】114.如實施例 111 至 113 中任一項之組成物，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)、LPS、IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。

【0357】115.如實施例 111 至 114 中任一項之組成物，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)。

【0358】116.如實施例 111 至 115 中任一項之組成物，其中該佐劑為 CpG 7909。

【0359】117.如實施例 111 至 116 中任一項之組成物，其中該等經調節之細胞為經調節之多個經修飾之 PBMC。

【0360】118.如實施例 117 之組成物，其中該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以增加共刺激分子中之一者或多者之表現。

【0361】119.如實施例 118 之組成物，其中該等共刺激分子為 B7-H2 (ICOSL)、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155 或 CD112。

【0362】120.如實施例 117 至 119 中任一項之組成物，其中該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以增加一種或多種細胞介素之表現。

【0363】121.如實施例 120 之組成物，其中該細胞介素為 IL-15、IL-12、IL-2、IFN-α 或 IL-21。

【0364】122.如實施例 117 至 123 中任一項之組成物，其中與該等多個未經修飾之 PBMC 中的 B 細胞相比，該等經調節之多個經修飾之 PBMC 的 B 細胞中的一種或多種共刺激分子上調，其中該共刺激分子為 CD80 及/或 CD86。

【0365】123.如實施例 117 至 124 中任一項之組成物，其中與多個未經調節之 PBMC 相比，該等多個經修飾之 PBMC 具有表現增加之 IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種。

【0366】124.如實施例 117 至 123 中任一項之組成物，其中與該等多個未經調節之 PBMC 相比，IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種的表現增加多於約 1.2 倍、1.5 倍、1.8 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、8 倍或多於約 10 倍。

【0367】125.如實施例 70 至 124 中任一項之組成物，其中該組成物及/或免疫結合體經靜脈內投予。

【0368】 126.如實施例 70 至 125 中任一項之組成物，其中該免疫結合體經皮下或瘤內投予。

【0369】 127.如實施例 126 之組成物，其中該免疫結合體與透明質酸酶聯合經皮下投予。

【0370】 128.如實施例 70 至 127 中任一項之組成物，其中該個體為人。

【0371】 129.如實施例 70 至 128 中任一項之組成物，其中該個體患有癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【0372】 130.如實施例 70 至 129 中任一項之組成物，其中該組成物於投予另一種療法之前、同時或之後投予。

【0373】 131.如實施例 130 之組成物，其中該另一種療法為化學治療或放射治療。

【0374】 132.一種包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽之免疫結合體，其用於治療個體之疾病的方法中，其中該免疫結合體與包含有核細胞的組成物組合使用，該等有核細胞包含外源性抗原。

【0375】 133.如實施例 132 之免疫結合體，其中該疾病為癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【0376】 134.如實施例 132 或 133 之免疫結合體，其中包含該等有核細胞的該組成物於該免疫結合體之前、同時或之後投予。

【0377】 135.如實施例 132 至 134 中任一項之免疫結合體，其中該免疫結合體於投予包含有核細胞的該組成物之後多次投予。

【0378】 136.如實施例 132 至 135 中任一項之免疫結合體，其中該第二多肽結合 T 細胞。

【0379】 137.如實施例 132 至 136 中任一項之免疫結合體，其中該第二多肽結合 T 細胞上所表現之 PD-1。

【0380】 138.如實施例 132 至 137 中任一項之免疫結合體，其中該第二多肽為特異性結合 PD-1 的抗原結合部分。

【0381】 139.如實施例 138 之免疫結合體，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含

(a) 重鏈可變區 (VH) 及輕鏈可變區 (VL)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:2 之胺基酸序列；HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:3 之胺基酸序列；及 FR-H3，其包含在根據 Kabat 編號之位置 71-73 處之 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列；該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列；HVR-L2，其包含 SEQ ID NO:5 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列；或

(b) 重鏈可變區 (VH) 及輕鏈可變區 (VL)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列；及 HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列；該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列；HVR-L2，其包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。

【0382】 140.如實施例 138 或 139 之免疫結合體，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含與 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含與選自以下各項所組成之群組之胺基酸序列至少約 95%、

96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18。

【0383】 141.如實施例 138 至 140 中任一項之免疫結合體，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18 之胺基酸序列。

【0384】 142.如實施例 138 至 141 中任一項之免疫結合體，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含 SEQ ID NO:15 之胺基酸序列。

【0385】 143.如實施例 132 至 142 中任一項之免疫結合體，其中該免疫結合體包含：多肽，其包含與 SEQ ID NO:22 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；多肽，其包含與 SEQ ID NO:24 之胺基酸序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及多肽，其包含與 SEQ ID NO:25 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列。

【0386】 144.如實施例 132 至 143 中任一項之免疫結合體，其中該免疫結合體包含 SEQ ID NO:22 之多肽序列、SEQ ID NO:24 之多肽序列及 SEQ ID NO:25 之多肽序列。

【0387】 145.如實施例 132 至 135 中任一項之免疫結合體，其中該第二多肽特異性結合存在於腫瘤細胞上或腫瘤細胞環境中的靶抗原。

【0388】 146.如實施例132 至 135 及 145 中任一項之免疫結合體，其中該靶抗原選自以下各項所組成之群組：纖維母細胞活化蛋白 (FAP)、腱生蛋白 C

之 A1 域 (TNC A1)、腱生蛋白 C 之 A2 域 (TNC A2)、纖網蛋白之外加域 B (EDB)、癌胚抗原 (CEA) 及黑色素瘤相關之硫酸軟骨素蛋白多醣 (MCSP)。

【0389】 147.如實施例 132 至 135 及 145 至 146 中任一項之免疫結合體，其中該第二多肽結合 FAP。

【0390】 148.如實施例 132 至 135 及 145 至 147 中任一項之免疫結合體，其中該第二多肽為特異性結合 FAP 之抗原結合部分。

【0391】 149.如實施例 148 之免疫結合體，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) SEQ ID NO:29 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:28 之輕鏈可變區序列；(ii) SEQ ID NO:31 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:30 之輕鏈可變區序列；(iii) SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列；(iv) SEQ ID NO:35 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:34 之輕鏈可變區序列；或 (v) SEQ ID NO:37 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:36 之輕鏈可變區序列。

【0392】 150.如實施例 148 或 149 之免疫結合體，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) 與 SEQ ID NO:42 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:43 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；(ii) 與 SEQ ID NO:38 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:39 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:231 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；或 (iii) 與 SEQ ID NO:44 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:45 至

少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列。

【0393】 151.如實施例 148 至 150 中任一項之免疫結合體，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含 SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列。

【0394】 152.如實施例 132 至 135 及 145 至 151 中任一項之免疫結合體，其中該免疫結合體包含 SEQ ID NO:38 之多肽序列、SEQ ID NO:39 之多肽序列及 SEQ ID NO:40 之多肽序列。

【0395】 153.如實施例 132 至 152 中任一項之免疫結合體，其中該突變型 IL-2 多肽進一步包含胺基酸取代 T3A 及/或胺基酸取代 C125A。

【0396】 154.如實施例 132 至 153 中任一項之免疫結合體，其中該突變型 IL-2 多肽包含與 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列，其中該突變型 IL-2 多肽與野生型 IL-2 多肽相比，表現出對高親和力 IL-2 受體之減小的親和力及對中等親和力 IL-2 受體之大致類似的親和力。

【0397】 155.如實施例 132 至 154 中任一項之免疫結合體，其中該突變型 IL-2 多肽包含 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列。

【0398】 156.如實施例 132 至 155 中任一項之免疫結合體，其中該等有核細胞為免疫細胞。

【0399】 157.如實施例 132 至 156 中任一項之免疫結合體，其中該等有核細胞為多個周邊血單核細胞 (PBMC)。

【0400】 158.如實施例 157 之免疫結合體，其中該等多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞或 NK-T 細胞中之兩種或更多種。

【0401】 159.如實施例 132 至 156 中任一項之免疫結合體，其中該等有核細胞為 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞及/或 NK-T 細胞中之一種或多種。

【0402】 160.如實施例 132 至 159 中任一項之免疫結合體，其中該外源性抗原經胞內遞送至該等有核細胞。

【0403】 161.如實施例 132 至 160 中任一項之免疫結合體，其中該外源性抗原為疾病相關之抗原。

【0404】 162.如實施例 132 至 161 中任一項之免疫結合體，其中該疾病相關之抗原為癌症抗原、感染性疾病抗原或病毒相關之疾病抗原。

【0405】 163.如實施例 132 至 162 中任一項之免疫結合體，其中該外源性抗原為人類乳突病毒 (HPV) 抗原。

【0406】 164.如實施例 132 至 163 中任一項之免疫結合體，其中該組成物進一步包含佐劑。

【0407】 165.如實施例 164 之免疫結合體，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)、LPS、IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。

【0408】 166.如實施例 132 至 165 中任一項之免疫結合體，其中包含該外源性抗原的該等有核細胞藉由包含以下步驟的方法來製備：

a) 使包含輸入有核細胞的細胞懸浮液通過細胞變形收縮物，其中該收縮物之直徑為該懸浮液中該等輸入有核細胞的直徑的函數，從而使該等輸

入有核細胞具有足夠大的擾動以使該外源性抗原通過而形成經擾動之輸入有核細胞；

b) 將該等經擾動之輸入有核細胞與外源性抗原一起孵育足夠長的時間，以使該外源性抗原進入該等經擾動之輸入有核細胞，從而生成包含該外源性抗原之有核細胞。

【0409】 167.如實施例 166 之免疫結合體，其中該收縮物之寬度為該等輸入有核細胞的平均直徑的約 10% 至約 99%。

【0410】 168.如實施例 166 或 167 之免疫結合體，其中該收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 6 μm。

【0411】 169.如實施例 166 至 168 中任一項之免疫結合體，其中該收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 4.8 μm。

【0412】 170.如實施例 166 至 169 中任一項之免疫結合體，其中該收縮物之寬度為約 4.5 μm。

【0413】 171.如實施例 166 至 170 中任一項之免疫結合體，其中使包含該等多個輸入有核細胞的細胞懸浮液通過多個收縮物，其中該等多個收縮物串聯及/或並聯佈置。

【0414】 172.如實施例 166 至 171 中任一項之免疫結合體，其中在該等經擾動之輸入有核細胞與該外源性抗原一起孵育後，該外源性抗原存在於至少約 70% 的該等有核細胞中。

【0415】 173.如實施例 132 至 172 中任一項之免疫結合體，其中該等有核細胞經佐劑調節以形成經調節之細胞。

【0416】 174.如實施例 173 之免疫結合體，其中該等有核細胞與該佐劑一起孵育約 1 小時至約 24 小時、約 2 小時至約 10 小時、約 3 小時至約 6 小時或約 4 小時以對該等有核細胞進行調節。

【0417】 175.如實施例 173 或 174 之免疫結合體，其中有核細胞在外源性抗原引入該等有核細胞中之前或之後經調節。

【0418】 176.如實施例 173 至 175 中任一項之免疫結合體，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)、LPS、IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。

【0419】 177.如實施例 173 至 176 中任一項之免疫結合體，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)。

【0420】 178.如實施例 173 至 177 中任一項之免疫結合體，其中該佐劑為 CpG 7909。

【0421】 179.如實施例 173 至 178 中任一項之免疫結合體，其中該等經調節之細胞為經調節之多個經修飾之 PBMC。

【0422】 180.如實施例 179 之免疫結合體，其中該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以增加共刺激分子中之一者或多者之表現。

【0423】 181.如實施例 180 之免疫結合體，其中該等共刺激分子為 B7-H2 (ICOSL)、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155 或 CD112。

【0424】 182.如實施例 179 至 181 中任一項之免疫結合體，其中該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以增加一種或多種細胞介素之表現。

【0425】 183.如實施例 182 之免疫結合體，其中該細胞介素為 IL-15、IL-12、IL-2、IFN-α 或 IL-21。

【0426】 184.如實施例 179 至 183 中任一項之免疫結合體，其中與該等多個未經修飾之 PBMC 中的 B 細胞相比，該等經調節之多個經修飾之 PBMC 的

B 細胞中的一種或多種共刺激分子上調，其中該共刺激分子為 CD80 及/或 CD86。

【0427】 185.如實施例 179 至 184 中任一項之免疫結合體，其中與多個未經調節之 PBMC 相比，該等多個經修飾之 PBMC 具有表現增加之 IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種。

【0428】 186.如實施例 179 至 185 中任一項之免疫結合體，其中與該等多個未經調節之 PBMC 相比，IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種的表現增加多於約 1.2 倍、1.5 倍、1.8 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、8 倍或多於約 10 倍。

【0429】 187.如實施例 132 至 186 中任一項之免疫結合體，其中該組成物及/或免疫結合體經靜脈內投予。

【0430】 188.如實施例 132 至 186 中任一項之免疫結合體，其中該免疫結合體經皮下或瘤內投予。

【0431】 189.如實施例 188 之免疫結合體，其中該免疫結合體與透明質酸酶聯合經皮下投予。

【0432】 190.如實施例 132 至 189 中任一項之免疫結合體，其中該個體為人。

【0433】 191.如實施例 132 至 190 中任一項之免疫結合體，其中該個體患有癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【0434】 192.如實施例 132 至 191 中任一項之免疫結合體，其中該組成物於投予另一種療法之前、同時或之後投予。

【0435】 193.如實施例 192 之免疫結合體，其中該另一種療法為化學治療或放射治療。

【0436】 194.一種有效量之免疫結合體之用途，其用於製造用於刺激個體之免疫反應的藥物，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號)之人 IL-2 分子；

其中該免疫結合體配製用於與包含有核細胞的組成物合併投予，其中該等有核細胞包含外源性抗原。

【0437】 195.如實施例 194 之用途，其中該免疫結合體於包含有核細胞的組成物之前、同時或之後投予。

【0438】 196.一種有效量之組成物之用途，其用於製造用於刺激個體之免疫反應的藥物，其中該組成物包含有核細胞，該等有核細胞包含外源性抗原；

其中該組成物配製用於與免疫結合體合併投予，該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子。

【0439】 197.如實施例 196 之組成物，其中包含該等有核細胞的該組成物於該免疫結合體之前、同時或之後投予。

【0440】 198.一種用於如實施例 1 至 69 中任一項之方法中之套組。

【0441】 199. 一種包含有核細胞的組成物及免疫結合體之套組，該等有核細胞包含外源性抗原，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子；其中該組成物及該免疫結合體組合用於刺激個體對該外源性抗原之免疫反應。

【0442】200. 一種包含有核細胞的組成物之套組，該等有核細胞包含外源性抗原，其中該組成物與免疫結合體合併用於刺激個體對該外源性抗原之免疫反應；

其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；且其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子。

【0443】201. 一種包含免疫結合體之套組，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子；

其中該免疫結合體與包含外源性抗原的有核細胞的組成物合併用於刺激個體對該外源性抗原之免疫反應。

【0444】202.一種用於產生免疫結合體之方法，該免疫結合體與包含有核細胞的組成物合併用於刺激個體之免疫反應，該方法包含在產生該免疫結合體的條件下在細胞中表現編碼該免疫結合體的核酸，

其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子；

其中該免疫結合體用於與包含有核細胞的組成物合併投予，其中該等有核細胞包含外源性抗原。

【0445】203.如實施例 202 之方法，其中該免疫結合體為融合蛋白。

【0446】 204.一種用於產生包含有核細胞的組成物之方法，該組成物與免疫結合體合併用於刺激個體之免疫反應，該方法包含將外源性抗原經胞內引入有核細胞族群中；

其中該組成物用於與免疫結合體合併投予；

其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；且其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號)之人 IL-2 分子。

實例

【0447】 本領域之技術人員將認識到，在本發明之範圍和精神內，若干實施例是可能的。現在將參考以下非限制性實例更詳細地描述本發明。以下實例進一步說明本發明，但是當然不應解釋為以任何方式限製本發明之範圍。

【0448】 在以下實例中，SQZ-PBMC 係指包含外源性抗原的經調節之 PCMC 的組成物，該外源性抗原為使用本文所述的 SQZ 技術經胞內遞送的 HPV16 E7(43-77) SLP (SEQ ID NO:56)。PD1-IL2v 係指包含變異體 IL-2 多肽及 PD-1 抗原結合部分的免疫結合體。FAP-IL2v 係指係指包含變異體 IL-2 多肽及 FAP 抗原結合部分免疫結合體

實例 1.SQZ-PBMC 與 PD1-IL2v 組合治療在所有細胞劑量下均具有協同優勢

【0449】 將 TC1 細胞 (由馬里蘭州巴的摩的約翰霍布金斯大學的 TC Wu 教授提供) 以 100 μL HBBS 中含 5×10^5 個細胞的濃度經皮下植入 C57BL/6NCrl 小鼠 (購自 Charles River) 之脅下。通過卡尺使用公式 $V=W^2L\pi/6$ 量測腫瘤生長。依據獲批准的許可證 VD3142 開展動物試驗。

【0450】 用包含 TC1 腫瘤植入物的小鼠測試 SQZ-PBMC (包含經胞內遞送之 E7 HPV 抗原) 與 PD1-IL2v 組合療法之有效性。在 TC1 細胞植入後第 7、

10 和 13 天，將組合治療經靜脈內投予小鼠。在腫瘤生長開始後 10-60 天之間，每週約 2-3 次定期量測腫瘤體積。每天監測生存情況，每週量測兩次腫瘤生長。用卡尺量測腫瘤之長度 (mm) 及寬度 (mm)，並以腫瘤之長度 (mm) × 寬度 (mm) × 寬度 (mm) 之乘積計算腫瘤體積 (mm^3)。每週量測兩次每隻小鼠的體重，並將其與腫瘤植入前的初始體重進行比較。每組小鼠接受固定劑量之 SQZ-PBMC 治療的小鼠替代品，如下表 1 所述。向接受 SQZ-PBMC 組合療法的小鼠給予相同劑量的細胞及固定劑量的 PD1-IL2v。

表 1.治療組及治療劑量

對照組	**不治療**
PD1-IL2v	0.5 mg/kg PD1-IL2v
SQZ-PMBC	0.25×10^6 個 SQZ-PBMC 細胞
SQZ-PMBC	1×10^6 個 SQZ-PBMC 細胞
SQZ-PMBC	4×10^6 個 SQZ- PBMC 細胞
SQZ-PMBC + PD1-IL2v	0.25×10^6 個 SQZ-PBMC 細胞 + 0.5 mg/kg PD1-IL2v
SQZ-PMBC + PD1-IL2v	1×10^6 個 SQZ-PBMC 細胞 + 0.5 mg/kg PD1-IL2v
SQZ-PMBC + PD1-IL2v	4×10^6 個 SQZ-PBMC 細胞 + 0.5 mg/kg PD1-IL2v

【0451】根據圖 1，相對於在投予後約 27 天後不進行治療，PD1-IL2v 治療或低濃度 SQZ-PBMC 有效減小了腫瘤體積。單獨使用 SQZ-PBMC 的有效性隨細胞劑量之增加而提高。

【0452】在腫瘤植入後第 14 天給予小鼠 SQZ-PBMC，然後在腫瘤植入後第 21、24 及 27 天投予三次 PD1-IL2v。在 SQZ-PBMC 與 PD1-IL2v 組合治療組中，觀察到最大幅度之腫瘤體積減小 (圖 1)。接受 SQZ-PBMC 單獨治療之小鼠腫瘤體積發生中等程度之減小。與 PD1-IL2v 組合使用時，在 4×10^6 SQZ-PBMC 的細胞劑量下，10 隻小鼠中之 6 隻在第 12 週無腫瘤 (圖 1，圖 2F)。此外，在 1×10^6 (圖 1，圖 2E) 及 0.25×10^6 (圖 1，圖 2D) SQZ 組合細胞劑量下，分別有 10 隻小鼠中之 3 隻及 10 隻小鼠中之 1 隻無腫瘤。

【0453】 PD1-IL2v 對腫瘤清除之有益作用不僅限於靶向 PD1 的分子。通過用 FAP-IL2v 進行治療並用相似的方法量測最終腫瘤體積，以實施進一步試驗。試驗在另一同齡群中進行 (表 2)。在該組試驗中，將 12 隻小鼠用於所有治療組，其中包括：不治療；SQZ-PBMC (1.0×10^6 個細胞)；SQZ+ FAP-IL2v (1.0×10^6 個細胞+ 2 mg/kg)；FAP-IL2v (2 mg/kg)；SQZ+ PD1-IL2v (1.0×10^6 個細胞+ 1 mg/kg)；及 PD1-IL2v (1 mg/kg)。接受 SQZ 治療之小鼠在第 14 天接受靜脈注射，且對於組合給藥組，在第 21、28 和 35 天分別接受額外之靜脈注射 FAP-IL2v 或 PD1-IL2v。

表 2.組合治療組

組	**SQZ-PBMC**	**聯合給藥**	**小鼠數量**
不治療	---	---	12
SQZ-PBMC	1.0×10^6 個細胞	---	12
SQZ-PBMC + FAP-IL2v	1.0×10^6 個細胞	2 mg/kg	12
FAP-IL2v	---	2 mg/kg	12
SQZ-PBMC + PD1-IL2v	1.0×10^6 個細胞	1 mg/kg	11
PD1-IL2v	---	1 mg/kg	12

【0454】 在兩個治療組中，相對於未接受任何形式的治療的對照組，接受 FAP-IL2v 或 PD1-IL2v 單獨治療對小鼠的腫瘤體積具有中等影響或無影響 (圖 3A-B)。在兩幅圖中繪製接受 SQZ-PBMC 單獨治療的結果，表明 PBMC 本身在治療後幾週內可有效減小腫瘤體積。當 SQZ-PBMC 與 FAP-IL2v 或 PD1-IL2v 組合使用時，治療後腫瘤體積顯著減小，且抑制效果持續數個月之久。發現接受 SQZ-PBMC + FAP-IL2v 組合治療的所有小鼠中 75% 的小鼠在試驗第 49 天無腫瘤，而接受 SQZ-PBMC + PD1-IL2v 治療的所有小鼠中 100% 的小鼠在該試驗的同一時間點無腫瘤。相比之下，僅接受 SQZ-PBMC 治療的小鼠中 17% 的小鼠在試驗結束時無腫瘤。蜘蛛圖顯示了個體小鼠的腫瘤體積，如圖 4 所示，突出顯示了各隻小鼠的腫瘤體積的一致性。接受 SQZ-PBMC 及 SQZ-

PBMC+ PD1-IL2v 組合療法的小鼠在第 24 天左右均表現出腫瘤體積減小，且在試驗過程中直至第 28 天，腫瘤體積持續減小 (圖 5)。

【0455】 最後，通過將腫瘤再次引入小鼠體內來評估對腫瘤形成的長期影響。在首次植入腫瘤後 12 週，向無腫瘤小鼠左脅下再次植入腫瘤。在 TC-1 腫瘤重新用藥後，評估未接受治療或接受 0.25×10^6、1×10^6 或 4×10^6 SQZ-PBMC 與 0.5 mg/kg PD1-IL2v 組合治療的小鼠左脅腹腫瘤的體積。接受 SQZ-PBMC 及 PD1-IL2v 治療後，小鼠對腫瘤重新用藥具有抵抗力 (圖 6)。

實例 2.使用 TIL 分析評估 PD1-IL2v 對 SQZ-PBMC 治療的影響

【0456】 對腫瘤樣品進行腫瘤浸潤白血球 (TIL) 分析，以確定 PD1-IL2v 對 SQZ-PBMC 治療效果的影響。將小鼠分入四個治療組中，該等治療組包括：對照組 (不接受治療)；僅 PD1-IL2v 治療組 (接受 0.5 mg/kg PD1-IL2v)；僅 SQZ 治療組 (接受劑量為 1×10^6 的 SQZ-PBMC)；及 SQZ-PBMC + PD1-IL2v 組合治療組 (接受 1×10^6 SQZ-PBMC 與 0.5 mg/kg PD1-IL2v)。

【0457】 在第 14 天投予 SQZ-PBMC，並在第 21、24 和 27 天投予 PDL1-IL2v。治療後，使用 E7-四聚體細胞中 Ki67+ 表現之百分比來量化腫瘤內 T 細胞增殖。與接受 SQZ-PBMC 單獨治療相比，用 SQZ-PBMC + PDL1-IL2v 組合治療後，Ki67+ 表現之總百分比明顯更高 (圖 7A)。通過評估腫瘤樣品中總顆粒酶 B 之平均螢光強度 (MFI) 來量化細胞毒性。在免疫反應期間，NK 細胞及 T 細胞分泌顆粒酶 B，而顆粒酶 B 之高含量與免疫反應的誘導有關。與所有治療組相比，接受 SQZ-PBMC + PD1-IL2v 之組合治療後，得到最高含量的顆粒酶 B MFI。與未經治療的對照組相比，接受 PD1-IL2v 單獨治療及 SQZ-PBMC 單獨治療導致顆粒酶 B MFI 略有升高 (圖 7B)。接下來，通過量化干擾素 γ (IFN-γ) 及腫瘤壞死因子 (TNF) 在 CD8+ 細胞上之表現百分比來量測細胞介素產生。在所有治療組中，在未經刺激和 E7 刺激的抗原決定基中量化表現細胞介素的

CD8+ T 細胞的百分比。與組合治療後的未經刺激之樣品相比，E7 抗原決定基腫瘤樣品中之細胞介素產生顯著增加 (圖 7C-7D)。這表明靶向細胞毒性 T 細胞特異性募集到腫瘤。在所有其他條件下，細胞介素水平均較低。

【0458】 在第 24 天 (圖 8A) 及第 28 天 (圖 8E) 量化腫瘤塊。截至第 24 天及第 28 天，接受 SQZ-PBMC 單獨治療或接受 SQZ-PBMC 與 PD1-IL2v 組合治療的組中的腫瘤大小相當 (圖 8A，圖 8E)。值得注意的是，第 28 天過早，無法觀察到 SQZ-PBMC 單獨治療與 SQZ-PBMC + PD1-IL2v 組合治療之間的差異。SQZ-PBMC 及 SQZ-PBMC 與 PD1 組合療法導緻小鼠腫瘤塊減小幅度最大。此外，與單獨使用 SQZ-PBMC 相比，PD1-IL2v 使腫瘤內 E7 特異性 $CD8^+$ T 細胞增加 3 倍以上 (圖 8C，圖 8G)。

【0459】 還使用流式細胞分析技術對每個治療組的每 mg 腫瘤中的 CD45+ 細胞及 CD8+ 細胞的數量進行量化。免疫細胞之標記物 CD45 可用於評估給定組織中的免疫浸潤程度。與其他治療組相比，SQZ-PBMC 與 PD1-IL2v 之組合療法導致導致每個腫瘤的 CD45+ 細胞密度最大 (圖 8B，圖 8F)。參與識別和清除腫瘤的免疫力。接受組合療法之小鼠的腫瘤中 $CD45^+$ 細胞的增加表明，該療法有助於參與識別並清除腫瘤的免疫性。

【0460】 接下來，量化每個治療組中每個腫瘤的 CD8+ 細胞。如前所述，SQZ-PBMC 與 PD1-IL2v 之組合治療導致每個腫瘤中 CD8+ 細胞的數量最大 (圖 8C，圖 8G)。未經治療及 PD1-IL2v 治療組每個腫瘤的 CD8+ 細胞幾乎為零，表明接受 PD1-IL2v 單獨治療不導致 CD8+ 細胞募集到腫瘤。相對於未經治療及 PD1-IL2v 治療組，單獨使用 SQZ-PBMC 治療顯著提高了 CD8+ 表現。結果表明，SQZ-PBMC 對 CD8+ 細胞之募集有效，但 SQZ-PBMC 與 PD1-IL2v 之組合治療對於將 CD8+ 細胞募集到腫瘤最有效 (圖 8C，圖 8G)。最後，在第 24 天和第 28 天，藉由流式細胞分析技術量化 E7 四聚體細胞之表現，對所有治

療組中每個腫瘤塊的 E7 四聚體+ 細胞進行量化。未經治療及經 PD1-IL2v 治療的小鼠之 E7 特異性 CD8 T 細胞量化結果為零。接受 SQZ-PBMC 治療的小鼠之 E7 特異性細胞明顯多於未經治療及經 PD1-IL2v 治療的小鼠。SQZ-PBMC 與 PD1-IL2v 之組合療法導致 E7 特異性 CD8+ T 細胞之增加幅度明顯大於其他任何治療組 (圖 8D，圖 8H)。這表明結合 SQZ-PBMC 與 PD1-IL2v 之組合療法在小鼠腫瘤中募集 E7 特異性 CD8 T 細胞最有效，且免疫反應具有抗原特異性。

實例 3.PD1-IL2v 治療對抗原特異性及非特異性 CD8 T 細胞的影響看起來等效

【0461】 量化所有治療組中小鼠的腫瘤和脾臟中之免疫細胞的總量。在正常條件下，腫瘤通常不含免疫細胞，而脾臟則具有基線量之免疫細胞。為確定組合療法對增加腫瘤細胞環境中免疫細胞總量之功效，對所有治療組 (包括未經治療、接受 PD1-IL2v 治療、接受 SQZ-PBMC 治療及接受 PD1-IL2v 與 SQZ-PBMC 組合治療之小鼠) 中小鼠的腫瘤和脾臟中之 CD8+ 細胞及 E7 四聚體特異性 T 細胞進行比較。如所預期的，未經治療之小鼠在腫瘤中無可檢出之 $CD8^+$ T 細胞 (圖 9A，圖 9B)，而未經治療的小鼠組中的脾臟中具有可量測之含量的 CD8+ 細胞 (圖 9C)，但不具有 E7 四聚體特異性 CD8+ T 細胞 (圖 9D)。

【0462】 類似地，僅使用 PD1-IL2v 治療也不引起腫瘤內 CD8+ (圖 9A) 或 E7 特異性 CD8+ T 細胞 (圖 9C) 之募集。在接受 PD1-IL2v 治療的小鼠中，脾臟中的 CD8+ T 細胞比未經治療之小鼠的脾臟中的 CD8+ T 細胞增加 3.2 倍 (圖 9C)，表明接受 PD1-IL2v 單獨治療能夠增加循環系統中的免疫細胞。總之，資料表明單獨使用 PD1-IL2v 能夠增加免疫細胞之總量，但是單獨使用時不足以增加腫瘤內 E7 四聚體特異性 CD8+ T 細胞。在脾臟中，PD1 治療也沒有促進 E7 四聚體特異性 T 細胞之增加，表明小鼠在該單一治療方案中未形成 HPV 特異性免疫細胞 (圖 9D)。PD1-IL2v 與 SQZ-PBMC 之組合治療的令人驚訝的協同效應在腫瘤中最爲明顯。根據圖 9B，與 SQZ-PBMC 單獨治療相比，組合治療

導致腫瘤中之 CD8+ 細胞增加 3 倍 (圖 9A) 且 E7 特異性 T 細胞增加 3.1 倍 (圖 9B)。還在脾臟中觀察到 T 細胞數量增加，與 SQZ-PBMC 單獨治療相比，組合治療導致 CD8+ 細胞增加 3.2 倍 (圖 9C) 且 E7 特異性 T 細胞增加 2.1 倍 (圖 9D)。表明該組合療法改善了免疫細胞 (特別是 E7-四聚體特異性 CD8+ T 細胞) 靶向募集到腫瘤內和/或腫瘤中。免疫細胞之增加反映了總體免疫細胞數量之系統性增加，如在同一隻小鼠的脾臟中所量測的結果所示。

實例 4.治療對調節性 T 細胞 (Treg) 及 NK 細胞的影響

【0463】 調節性 T 細胞共表現 CD4、FOXP3 及 CD25 蛋白質，這些蛋白質有助於支持這些 T 細胞的功能。藉由量化未經治療組、PD1-IL2v 單一療法組、SQZ-PBMC 單一療法組及 PD1-IL2v 與 SQZ-PBMC 組合療法組中的 CD4、FOXP3 及 CD25+ 細胞來量測腫瘤內存在的免疫陽性標記物的數量。在腫瘤植入後第 24 天或第 28 天進行量測，並使用流式細胞分析技術對免疫螢光表現進行量化。在所有試驗的治療組中，免疫陽性標記物的總量之間無顯著差異 (圖 10A)。相比之下，量化 CD8+ 細胞相對於 FOXP3+ 及 CD25+ 細胞之組合表現的比率發現，與未經治療及 PD1-IL2v 單一療法條件相比，組合治療導致免疫細胞比率顯著增加。這些結果表明，在組合療法組中，募集更多的 CD8+ 細胞毒性 T 細胞以主動靶向 HPV 腫瘤，而 T 調節性細胞則正常發揮作用以維持小鼠的總體免疫系統 (圖 10B)。Treg 在兩個 PD1-IL2v 治療組的腫瘤內均發生擴增，且浸潤 CD8+ 細胞之擴增大於 SQZ-PBMC + PD1-IL2v 組合治療組中 Treg 之擴增。

【0464】 接下來，對所有治療組的腫瘤中之 NK1.1+ 細胞總數進行量化。根據圖 10C，與未經治療的小鼠相比，PD1-IL2v 單一療法導致腫瘤中之 NK 細胞顯著增加。相比之下，SQZ-PBMC 單一療法對腫瘤內 NK 細胞總數無任何影響。PD1-IL2v 與 SQZ-PBMC 之組合療法進一步增加了 NK 細胞總數。類似

地，PD1-IL2v 單一療法及 PD1-IL2v 與 SQZ-PBMC 組合療法導致脾臟中 CD45+ 中之 NK1.1+ 細胞百分比顯著增加 (圖 10D)。總體而言，SQZ-PBMC 與 PD1-IL2v 組合療法導致腫瘤浸潤性 NK 細胞顯著增加；但是，在脾臟中，組合療法所導致的 NK1.1+ 細胞之增加與 PD1-IL2v 單一療法的效果相似。

實例 5.肽疫苗與免疫結合體之組合

【0465】 為評估 PD1-IL2v 結合肽疫苗方法的治療效果，TC1 荷瘤小鼠接受由 E7 長肽 (E7-LP) 及 CpG 組成的肽疫苗單獨治療或接受該肽疫苗與 PD1-IL2v 雙特異性分子組合治療。將 TC1 細胞 (由馬里蘭州巴的摩的約翰霍布金斯大學的 TC Wu 教授提供) 以 100 μl HBBS 中含 5×10^5 個細胞的濃度經皮下植入 C57BL/6NCrl 小鼠 (購自 Charles River) 之脅下。通過卡尺使用公式 V=W2Lπ/6 量測腫瘤生長。依據獲批准的許可證 VD3142 開展動物試驗。

【0466】 CpG-B 1826 寡核苷酸 (5′-TCCATGAGCTTCCTGACGTT-3′ 作爲硫代磷酸酯化 DNA 鹼基；SEQ ID NO:58) 購自 Microsynth。HPV16 E7 長肽 GQAEPDRAHYNIVTFCCKCDSTLRLCVQSTHVDIR (E7-LP，胺基酸 43–77，純度 > 90%；SEQ ID NO:56) 購自 Proimmune。

【0467】 基於腫瘤體積將荷瘤小鼠隨機分入不同的組中。TC1 細胞植入後第 11 天的平均起始腫瘤體積為 180 mm^3。用 15 μg E7-LP 及 20 μg CpG 使小鼠免疫。在四肢經皮下進行小鼠免疫。在第 11 天以 1 mg/kg 的劑量經腹腔投予 PD1-IL2v，每週一次並持續 4 週。

【0468】 腫瘤體積分析顯示，添加 PD1-IL2v 增強了 E7 疫苗之的功效 (VAX，圖 11A，圖 11B)。藉由計算相對腫瘤體積來估計對治療的反應，且當 TC1 細胞植入後第 29 天的相對腫瘤體積小於 2 時，認爲對治療具有反應。通過使用該標準，僅 50% 的 VAX 小鼠對治療具有反應，而在接受 VAX+PD1-

IL2v 治療的小鼠中，反應率為 75%。長期存活分析顯示，與僅接受 VAX 的組相比，VAX+PD1-IL2v 治療組的小鼠的存活率發生適度增加 (圖 11)。

實例 6.SQZ-PBMC 免疫後投予 PD1-IL2v 增強了抗原特異性 CD8+ T 細胞反應

【0469】 C57BL6 小鼠 (7 週齡) 購自 The Jackson Laboratories。收集來自供體小鼠的脾臟，並將其處理成單細胞懸浮液。使用 SQZ Biotechnologies Cell Squeeze® 技術耗盡 B 細胞並釋放卵白蛋白 (OVA)。將壓縮的脾細胞在 CpG (1 μM) 中調節 4 小時，重懸於 PBS 中，並在受體 C57BL6 小鼠中經眶後投予。按照表 3，在適當日期，PD1-IL2v 以 1.5 mg/kg 的單一劑量經眶後投予。

表 3. 治療組及小鼠數量

SQZ 免疫作用 ($5x10^6$ 細胞/小鼠)	**PD1-IL2v 投予日 (1.5mg/kg)**	**小鼠數量**
SQZ-PBMC	無	5
SQZ-PBMC-OVA	無	5
SQZ-PBMC-OVA	第 2 天	5
SQZ-PBMC-OVA	第 3 天	5
SQZ-PBMC-OVA	第 4 天	4

【0470】 在免疫後 14 天，對小鼠實施安樂死，分離脾臟，處理成細胞懸浮液，並在 α-CD28 (2 μg/mL) 存在下用 OVA 肽 (SIINFEKL, 1μg/mL) 進行離體再刺激，然後進行 IFN-γ 細胞內細胞介素染色。利用該測定中產生的 IFN-γ 用作 OVA 抗原 (OVA) 特異性 CD8+ T 細胞的代替物。

【0471】 SQZ-PBMC-OVA 與 PD1-IL2v 之組合導致表現 IFN-γ 的 CD8+ 細胞總數增加 (圖 12)。表明在 SQZ-PBMC 免疫後，PD1-IL2v 擴增了抗原特異性 CD8+ T 細胞。

序列

	胺基酸序列 N 端至 C 端	**序列識別號**

PD-1 最小 HVR-H1	SSYT	1
PD-1 最小 HVR-H2	SGGGRDIY	2
PD-1 最小 HVR-H3	GRVYF	3
PD-1 最小 HVR-L1	TSDNSF	4
PD-1 最小 HVR-L2	RSSTLES	5
PD-1 最小 HVR-L3	NYDVPW	6
FR-H3 之片段 (Kabat 位置 71-73 處之 RDN)	RDN	7
PD-1 HVR-H1	GFSFSSY	8
PD-1 HVR-H2	GGR	9
PD-1 HVR-H3	TGRVYFALD	10
PD-1 HVR-L1	SESVDTSDNSF	11
PD-1 HVR-L2	RSS	12
PD-1 HVR-L3	NYDVPW	13
PD-1 VH (1, 2, 3, 4)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQ APGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTLVT VSS	14
PD-1 VL (1)	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWY QQKPGQSPKLLIYRSSTLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	15
PD-1 VL (2)	DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRASESVDTSDNSFIHWYQ QRPGQSPRLLIYRSSTLESGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE AEDVGVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	16
PD-1 VL (3)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIHWYQ QKPGQSPRLLIYRSSTLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	17
PD-1 VL (4)	EIVLTQSPATLSLSPGERATLSCRASESVDTSDNSFIHWYQ QKPGQSPRLLIYRSSTLESGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLEP EDFAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIK	18

人 IL-2	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWI TFCQSIISTLT	19
人 IL-2 (T3A, F42A, Y45Y, L72G, C125A)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TAKFAMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFH LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFAQSIISTLT	20
連接子	GGGGSGGGGSGGGGS	21
PD-1 IL2v – 含 IL2v 的 HC (Fc 杵，LALAPG)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQ APGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPP CRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTKK TQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPK KATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNI NVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIIST LT	22
PD-1 IL2v – 不含 IL2v 的 HC (Fc 臼，LALAPG)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQ APGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNHYTQKSLSLSP	23

PD-1 IL2v – 不含 IL2v 的 HC (Fc 臼，LALAPG，HYRF)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFSFSSYTMSWVRQ APGKGLEWVATISGGGRDIYYPDSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCVLLTGRVYFALDSWGQGTLVT VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGT QTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAA GGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKF NWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDW LNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYK TTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEA LHNRFTQKSLSLSP	24
PD-1 IL2v – LC	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKASESVDTSDNSFIHWY QQKPGQSPKLLIYRSSTLESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSL QAEDVAVYYCQQNYDVPWTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	25
人 IL-2 (C125A)	APTSSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TFKFYMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNLAQSKNFHL RPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWI TFCQSIISTLTAPASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNY KNPKLTRMLTAKFAMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVL NGAQSKNFHLRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADET ATIVEFLNRWITFAQSIISTLT	26
人 IL-2 T3A / F42A / Y45A / L72G (C125A)	APASSSTKKTQLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRML TAKFAMPKKATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFH LRPRDLISNINVIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNR WITFAQSIISTLT	27
FAP 3F2VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKP GQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK	28
FAP 3F2VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS	29
FAP 4G8 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKP GQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIK	30

FAP 4G8 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVS S	31
FAP 4B9 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKP GQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIK	32
FAP 4B9 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS	33
FAP 28H1 VL	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKP GQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIK	34
FAP 28H1 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQ APGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVS S	35
FAP 29B11 VL	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAIIGSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS	36
FAP 29B11 VH	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAIIGSGGITYYADSVKGRFTISRDNSKNTLY LQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS	37
FAP 融合至 IL2v 的 4B9 HC (杵)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTKKT QLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTL T	38

FAP 4B9 HC (臼)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAIIGSGASTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWFGGFNYWGQGTLVTVSS ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	39
FAP 3F2 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVTSSYLAWYQQKP GQAPRLLINVGSRRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPED FAVYYCQQGIMLPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTTLSKADYEKH KVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	40
FAP 4G8 LC	EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSCRASQSVSRSYLAWYQQKP GQAPRLLIIGASTRATGIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLEPEDF AVYYCQQGQVIPPTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQ LKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESV TEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC	41
FAP 融合至 IL-2 的 HC (杵)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQ APGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTKKT QLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTL T	42

FAP 28H1 HC (臼)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSHAMSWVRQ APGKGLEWVSAIWASGEQYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	43
FAP 4G8 HC (杵)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPC RDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGGGGGSGGGGSGGGGSAPASSSTKKT QLQLEHLLLDLQMILNGINNYKNPKLTRMLTAKFAMPKK ATELKHLQCLEEELKPLEEVLNGAQSKNFHLRPRDLISNIN VIVLELKGSETTFMCEYADETATIVEFLNRWITFAQSIISTL T	44
FAP 4G8 HC (臼)	EVQLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQ APGKGLEWVSAISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDNSKNTL YLQMNSLRAEDTAVYYCAKGWLGNFDYWGQGTLVTVS SASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAG GPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWL NGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVCTLPPS RDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKT TPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL HNHYTQKSLSLSPGK	45

HPV16-E6(29-38)，人抗原決定基	TIHDIILECV	46
HPV16-E6(48-57)，鼠抗原決定基	EVYDFAFRDL	47
HPV16-E7(11-20)，人抗原決定基	YMLDLQPETT	48
HPV16-E7(49-57)，鼠抗原決定基	RAHYNIVTF	49
HPV16-E6(19-54) SLP，人	LPQLSTELQTTIHDIILECVYSKQQLLRREVYDFAF	50
HPV16-E6(21-45) SLP，人	QLCTELQTTIHDIILECVYCKQQLL	51
HPV16-E6(41-65) SLP，天然鼠	KQQLLRREVYDFAFRDLCIVYRDGN	52
HPV16-E6(38-72) SLP，經典鼠	VYSKQQLLRREVYDFAFRDLSIVYRDGNPYAVSDK	53
HPV16-E7(1-35) SLP，人	MHGDTPTLHEYMLDLQPETTDLYCYEQLNDSSEEE	54
HPV16-E7.6 SLP，人	QLCTELQTYMLDLQPETTYCKQQLL	55
HPV16-E7(43-77) SLP，天然鼠	GQAEPDRAHYNIVTFCCKCDSTLRLCVQSTHVDIR	56
HPV16-E7(43-77) SLP，經典鼠	GQAEPDRAHYNIVTFSSKSDSTLRLSVQSTHVDIR	57
hIL-2 訊息肽	MYRMQLLSCIALSLALVTNS	59
HPV16-E6(19-28) N端多肽，人	LPQLSTELQT	60

HPV16-E6(21-28) N端多肽，人	QLCTELQT	61
HPV16-E6(41-47) N端多肽，天然鼠	KQQLLRR	62
HPV16-E6(38-47) N端多肽，經典鼠	VYSKQQLLRR	63
HPV16-E7(1-10) N端多肽，人	MHGDTPTLHE	64
HPV16-E7(43-48) N端多肽，鼠	GQAEPD	65
HPV16-E6(39-54) C端多肽，人	YSKQQLLRREVYDFAF	66
HPV16-E6(39-45) C端多肽，人	YCKQQLL	67
HPV16-E6(58-65) C端多肽，天然鼠	CIVYRDGN	68
HPV16-E6(58-72) C端多肽，經典鼠	SIVYRDGNPYAVSDK	69
HPV16-E7(21-35) C端多肽，人	DLYCYEQLNDSSEEE	70
HPV16-E7(58-77 C端多肽，天然鼠	CCKCDSTLRLCVQSTHVDIR	71

HPV16-E7(58-77) C 端多肽，經典鼠	SSKSDSTLRLSVQSTHVDIR	72
	核酸序列 (5’ 至 3’)	
CpG-B 1826	TCCATGAGCTTCCTGACGTT 作爲硫代磷酸酯化 DNA 鹼基	58
CpG ODN 2006 (亦稱爲 CpG 7909)	TCGTCGTTTTGTCGTTTTGTCGTT	73

【序列表】

<110> 瑞士商赫孚孟拉羅股份公司 (F. HOFFMANN-LA ROCHE AG)
美商ＳＱＺ生物科技公司 (SQZ BIOTECHNOLOGIES COMPANY)

<120> 使用經修飾之 PBMC 及免疫結合體之組合療法

<130> 20290-20001.42

<140> TW 110116825
<141> 2021-05-10

<150> US 63/105,135
<151> 2020-10-23

<150> US 63/023,193
<151> 2020-05-11

<160> 73

<170> 用於 Windows 之 FastSEQ，4.0 版

<210> 1
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 1
Ser Ser Tyr Thr
1

<210> 2
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 2
Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr
1 5

<210> 3

<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 3
Gly Arg Val Tyr Phe
 1   5

<210> 4
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 4
Thr Ser Asp Asn Ser Phe
 1   5

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 5
Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser
 1   5

<210> 6
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 6
Asn Tyr Asp Val Pro Trp
 1   5

<210> 7
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 7
Arg Asp Asn
 1

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 8
Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
 1   5

<210> 9
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 9
Gly Gly Arg
 1

<210> 10
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 10
Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp

1 5

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 11
Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser Asp Asn Ser Phe
1 5 10

<210> 12
<211> 3
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 12
Arg Ser Ser
1

<210> 13
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 13
Asn Tyr Asp Val Pro Trp
1 5

<210> 14
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 14
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
            20   25   30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln
            100   105   110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115   120

<210> 15
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 15
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1   5   10   15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
            20   25   30
Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
        35   40   45
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50   55   60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65   70   75   80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
                85   90   95
Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100   105   110

<210> 16
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構建體

<400> 16

```
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1               5                  10                  15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
            20                  25                  30
Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser Pro
        35                  40                  45
Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
    50                  55                  60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser
65                  70                  75                  80
Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
                85                  90                  95
Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 17
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 17

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1               5                  10                  15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
            20                  25                  30
Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
        35                  40                  45
Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
    50                  55                  60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65                  70                  75                  80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
                85                  90                  95
Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 18
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構建體

<400> 18
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1   5   10   15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
            20   25   30
Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
        35   40   45
Arg Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
    50   55   60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65   70   75   80
Ser Leu Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
                85   90   95
Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100   105   110

<210> 19
<211> 133
<212> PRT
<213> 智人

<400> 19
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1   5   10   15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
            20   25   30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
        35   40   45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
    50   55   60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65   70   75   80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
                85   90   95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
            100   105   110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
        115   120   125
Ile Ser Thr Leu Thr
    130

<210> 20
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 20
Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1   5   10   15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
            20   25   30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys
        35   40   45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
    50   55   60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65   70   75   80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
                85   90   95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
            100   105   110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
        115   120   125
Ile Ser Thr Leu Thr
    130

<210> 21
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 21
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
 1   5   10   15

<210> 22
<211> 597
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 22
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
            20   25   30

```
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225                 230                 235                 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
            340                 345                 350
Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365
Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430
```

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445
Gly Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
450 455 460
Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
465 470 475 480
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
485 490 495
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys
500 505 510
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
515 520 525
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
530 535 540
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
545 550 555 560
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
565 570 575
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
580 585 590
Ile Ser Thr Leu Thr
595

<210> 23
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 23
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala

```
    130                 135                 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225                 230                 235                 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
            340                 345                 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400
Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
                405                 410                 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
            420                 425                 430
Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
        435                 440                 445
```

<210> 24
<211> 448
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 24

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ser Phe Ser Ser Tyr
            20                  25                  30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ala Thr Ile Ser Gly Gly Gly Arg Asp Ile Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Val Leu Leu Thr Gly Arg Val Tyr Phe Ala Leu Asp Ser Trp Gly Gln
            100                 105                 110
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
        115                 120                 125
Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
    130                 135                 140
Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145                 150                 155                 160
Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
                165                 170                 175
Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
            180                 185                 190
Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
        195                 200                 205
Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
    210                 215                 220
Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225                 230                 235                 240
Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
                245                 250                 255
Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
            260                 265                 270
Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
        275                 280                 285
Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
    290                 295                 300
Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305                 310                 315                 320
Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu
                325                 330                 335
Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys
            340                 345                 350
Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
        355                 360                 365
Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
    370                 375                 380
Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385                 390                 395                 400
```

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415
Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430
Glu Ala Leu His Asn Arg Phe Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

<210> 25
<211> 218
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 25
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ala Ser Glu Ser Val Asp Thr Ser
20 25 30
Asp Asn Ser Phe Ile His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro
35 40 45
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ser Ser Thr Leu Glu Ser Gly Val Pro Asp
50 55 60
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser
65 70 75 80
Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr
85 90 95
Asp Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
100 105 110
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln
115 120 125
Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr
130 135 140
Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser
145 150 155 160
Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr
165 170 175
Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys
180 185 190
His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro
195 200 205
Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 26
<211> 266
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 26

```
Ala Pro Thr Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1               5                  10                  15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
            20                  25                  30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Phe Lys Phe Tyr Met Pro Lys
        35                  40                  45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
    50                  55                  60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65                  70                  75                  80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
                85                  90                  95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
            100                 105                 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile
        115                 120                 125
Ile Ser Thr Leu Thr Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln
    130                 135                 140
Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly
145                 150                 155                 160
Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys
                165                 170                 175
Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu
            180                 185                 190
Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser
        195                 200                 205
Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val
    210                 215                 220
Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr
225                 230                 235                 240
Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr
                245                 250                 255
Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu Thr
            260                 265
```

<210> 27
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 27
Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
 1   5   10   15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
            20   25   30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys
        35   40   45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
    50   55   60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65   70   75   80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
                85   90   95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
            100   105   110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
        115   120   125
Ile Ser Thr Leu Thr
    130

<210> 28
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 28
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1   5   10   15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
            20   25   30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35   40   45
Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50   55   60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65   70   75   80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
                85   90   95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100   105

<210> 29
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 29
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20   25   30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100   105   110
Val Thr Val Ser Ser
        115

<210> 30
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 30
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1   5   10   15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
            20   25   30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35   40   45
Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50   55   60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65   70   75   80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
                85   90   95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100   105

<210> 31
<211> 117

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 31
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20   25   30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100   105   110
Val Thr Val Ser Ser
        115

<210> 32
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 32
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1   5   10   15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
            20   25   30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35   40   45
Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50   55   60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65   70   75   80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
                85   90   95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100   105

<210> 33
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 33
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20   25   30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95
Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
            100   105   110
Val Thr Val Ser Ser
        115

<210> 34
<211> 108
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 34
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1   5   10   15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
            20   25   30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
        35   40   45
Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
    50   55   60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65   70   75   80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
                85   90   95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100   105

<210> 35
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 35
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
            20   25   30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50   55   60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65   70   75   80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85   90   95
Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100   105   110
Thr Val Ser Ser
        115

<210> 36
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 36
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1   5   10   15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
            20   25   30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35   40   45
Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
    50   55   60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65   70   75   80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85   90   95

Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 37
<211> 117
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 37
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Gly Ile Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 38
<211> 594
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 38
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala
450 455 460

Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
465 470 475 480
Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
485 490 495
Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr
500 505 510
Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
515 520 525
Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
530 535 540
Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
545 550 555 560
Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
565 570 575
Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr
580 585 590
Leu Thr

<210> 39
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 39
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ile Gly Ser Gly Ala Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Trp Phe Gly Gly Phe Asn Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser

```
                165                 170                 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
            180                 185                 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
        195                 200                 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
    210                 215                 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225                 230                 235                 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
                245                 250                 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
            260                 265                 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
        275                 280                 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    290                 295                 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                 310                 315                 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                325                 330                 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
            340                 345                 350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
        355                 360                 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    370                 375                 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385                 390                 395                 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                405                 410                 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            420                 425                 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 40
<211> 214
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 40

```
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
 1               5                  10                  15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Thr Ser Ser
            20                  25                  30
```

Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Asn Val Gly Ser Arg Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Ile Met Leu Pro
85 90 95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser
115 120 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
130 135 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145 150 155 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
165 170 175
Ser Ser Thr Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr
180 185 190
Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser
195 200 205
Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 41
<211> 215
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 41
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15
Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Arg Ser
20 25 30
Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu
35 40 45
Ile Ile Gly Ala Ser Thr Arg Ala Thr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
50 55 60
Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu Glu
65 70 75 80
Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Gly Gln Val Ile Pro
85 90 95
Pro Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala
100 105 110
Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser

```
        115                 120                 125
Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu
    130                 135                 140
Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser
145                 150                 155                 160
Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
                165                 170                 175
Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
            180                 185                 190
Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
        195                 200                 205
Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 42
<211> 593
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 42

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
            20                  25                  30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95
Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                165                 170                 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205
```

Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
210 215 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225 230 235 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
245 250 255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
260 265 270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
275 280 285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
305 310 315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro
340 345 350
Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val
355 360 365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly Gly
435 440 445
Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala Ser
450 455 460
Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu Asp
465 470 475 480
Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys Leu
485 490 495
Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr Glu
500 505 510
Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu Glu
515 520 525
Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg Asp
530 535 540
Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser Glu
545 550 555 560
Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val Glu
565 570 575
Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr Leu
580 585 590
Thr

<210> 43
<211> 446
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 43

```
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
 1               5                  10                  15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser His
            20                  25                  30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
        35                  40                  45
Ser Ala Ile Trp Ala Ser Gly Glu Gln Tyr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
    50                  55                  60
Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65                  70                  75                  80
Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
                85                  90                  95
Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
            100                 105                 110
Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala
        115                 120                 125
Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu
    130                 135                 140
Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly
145                 150                 155                 160
Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                165                 170                 175
Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu
            180                 185                 190
Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr
        195                 200                 205
Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
    210                 215                 220
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe
225                 230                 235                 240
Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro
                245                 250                 255
Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val
            260                 265                 270
Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr
        275                 280                 285
Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
    290                 295                 300
Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys
```

305 310 315 320
Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser
325 330 335
Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro Pro
340 345 350
Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala Val
355 360 365
Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly
370 375 380
Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp
385 390 395 400
Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp
405 410 415
Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His
420 425 430
Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 44
<211> 594
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 44
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175

Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys
275 280 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
290 295 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
325 330 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro
340 345 350
Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu
355 360 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
370 375 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385 390 395 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
405 410 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
420 425 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Gly Gly
435 440 445
Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Ala Pro Ala
450 455 460
Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His Leu Leu Leu
465 470 475 480
Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys Asn Pro Lys
485 490 495
Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys Lys Ala Thr
500 505 510
Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys Pro Leu Glu
515 520 525
Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu Arg Pro Arg
530 535 540
Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu Lys Gly Ser
545 550 555 560
Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala Thr Ile Val
565 570 575

Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile Ile Ser Thr
580 585 590
Leu Thr

<210> 45
<211> 447
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 45
Glu Val Gln Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Ala Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Lys Gly Trp Leu Gly Asn Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu
100 105 110
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu
115 120 125
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys
130 135 140
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser
145 150 155 160
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser
165 170 175
Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
180 185 190
Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn
195 200 205
Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His
210 215 220
Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val
225 230 235 240
Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr
245 250 255
Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu
260 265 270
Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys

```
        275                 280                 285
Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser
    290                 295                 300
Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305                 310                 315                 320
Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile
                325                 330                 335
Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr Leu Pro
            340                 345                 350
Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys Ala
        355                 360                 365
Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn
    370                 375                 380
Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser
385                 390                 395                 400
Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg
                405                 410                 415
Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu
            420                 425                 430
His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
        435                 440                 445
```

<210> 46
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 46

```
Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu Cys Val
 1               5                  10
```

<210> 47
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 47

```
Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp Leu
 1               5                  10
```

<210> 48
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 48

```
Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu Thr Thr
```

1 5 10

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 49
Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe
1 5

<210> 50
<211> 36
<212> PRT
<213> 智人

<400> 50
Leu Pro Gln Leu Ser Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile
1 5 10 15
Leu Glu Cys Val Tyr Ser Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr
20 25 30
Asp Phe Ala Phe
35

<210> 51
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 51
Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Thr Ile His Asp Ile Ile Leu Glu
1 5 10 15
Cys Val Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu
20 25

<210> 52
<211> 25
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 52
Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe Arg Asp
1 5 10 15
Leu Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn
20 25

<210> 53
<211> 35
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 53
Val Tyr Ser Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala
 1   5   10   15
Phe Arg Asp Leu Ser Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val
            20   25   30
Ser Asp Lys
        35

<210> 54
<211> 35
<212> PRT
<213> 智人

<400> 54
Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu Tyr Met Leu Asp Leu Gln
 1   5   10   15
Pro Glu Thr Thr Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser
            20   25   30
Glu Glu Glu
        35

<210> 55
<211> 25
<212> PRT
<213> 智人

<400> 55
Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr Tyr Met Leu Asp Leu Gln Pro Glu
 1   5   10   15
Thr Thr Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu
            20   25

<210> 56
<211> 35
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 56
Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Cys
 1   5   10   15
Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His Val

20 25 30
Asp Ile Arg
35

<210> 57
<211> 35
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 57
Gly Gln Ala Glu Pro Asp Arg Ala His Tyr Asn Ile Val Thr Phe Ser
1 5 10 15
Ser Lys Ser Asp Ser Thr Leu Arg Leu Ser Val Gln Ser Thr His Val
20 25 30
Asp Ile Arg
35

<210> 58
<211> 20
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 58
tccatgagct tcctgacgtt 20

<210> 59
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 59
Met Tyr Arg Met Gln Leu Leu Ser Cys Ile Ala Leu Ser Leu Ala Leu
1 5 10 15
Val Thr Asn Ser
20

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 60
Leu Pro Gln Leu Ser Thr Glu Leu Gln Thr
 1   5   10

<210> 61
<211> 8
<212> PRT
<213> 智人

<400> 61
Gln Leu Cys Thr Glu Leu Gln Thr
 1   5

<210> 62
<211> 7
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 62
Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg
 1   5

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 63
Val Tyr Ser Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg
 1   5   10

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> 智人

<400> 64
Met His Gly Asp Thr Pro Thr Leu His Glu
 1   5   10

<210> 65
<211> 6
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 65
Gly Gln Ala Glu Pro Asp
1 5

<210> 66
<211> 16
<212> PRT
<213> 智人

<400> 66
Tyr Ser Lys Gln Gln Leu Leu Arg Arg Glu Val Tyr Asp Phe Ala Phe
1 5 10 15

<210> 67
<211> 7
<212> PRT
<213> 智人

<400> 67
Tyr Cys Lys Gln Gln Leu Leu
1 5

<210> 68
<211> 8
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 68
Cys Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn
1 5

<210> 69
<211> 15
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 69
Ser Ile Val Tyr Arg Asp Gly Asn Pro Tyr Ala Val Ser Asp Lys
1 5 10 15

<210> 70
<211> 15
<212> PRT
<213> 智人

<400> 70
Asp Leu Tyr Cys Tyr Glu Gln Leu Asn Asp Ser Ser Glu Glu Glu
 1   5   10   15

<210> 71
<211> 20
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 71
Cys Cys Lys Cys Asp Ser Thr Leu Arg Leu Cys Val Gln Ser Thr His
 1   5   10   15
Val Asp Ile Arg
            20

<210> 72
<211> 20
<212> PRT
<213> 小鼠

<400> 72
Ser Ser Lys Ser Asp Ser Thr Leu Arg Leu Ser Val Gln Ser Thr His
 1   5   10   15
Val Asp Ile Arg
            20

<210> 73
<211> 24
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成構建體

<400> 73
tcgtcgtttt gtcgttttgt cgtt   24

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種刺激個體之免疫反應之方法，該方法包含

a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性抗原；及

b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【請求項2】

一種刺激個體對腫瘤抗原之免疫反應之方法，該方法包含

a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性腫瘤抗原；及

b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【請求項3】

一種增強基於有核細胞之免疫療法之方法，該方法包含投予有效量之免疫結合體併以投予該基於有核細胞之免疫療法，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-

2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【請求項4】

一種治療個體之疾病之方法，該方法包含

a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含與該疾病有關之外源性抗原；及

b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【請求項5】

一種為有此需要之個體接種疫苗之方法，該方法包含

a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性抗原；及

b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【請求項6】

如請求項 5 之方法，其中該個體患有對疫苗接種產生反應之疾病。

【請求項7】

如請求項 4 至 6 中任一項之方法，其中該疾病為癌症、感染性疾病或

病毒相關之疾病。

【請求項8】

一種減少個體之腫瘤生長之方法，該方法包含

a) 向個體投予有效量之包含有核細胞之組成物，其中該等有核細胞包含外源性腫瘤抗原；及

b) 向該個體投予有效量之免疫結合體，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及第二多肽，其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子，且其中該第二多肽能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合。

【請求項9】

如請求項 1 至 8 中任一項之方法，其中該第二多肽結合 T 細胞。

【請求項10】

如請求項 11 之方法，其中該第二多肽結合 T 細胞上所表現之 PD-1。

【請求項11】

如請求項 10 之方法，其中該第二多肽為特異性結合 PD-1 的抗原結合部分。

【請求項12】

如請求項 11 之方法，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含

(a) 重鏈可變區 (VH) 及輕鏈可變區 (VL)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:2 之胺基酸序列；HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:3 之胺基酸序列；及 FR-H3，其包含在根據 Kabat 編號之位置 71-73 處之 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列；該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列；HVR-

L2，其包含 SEQ ID NO:5 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列；或

(b) 重鏈可變區 (VH) 及輕鏈可變區 (VL)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列；及 HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列；該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列；HVR-L2，其包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。

【請求項13】

如請求項 11 或 12 之方法，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含與 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含與選自以下各項所組成之群組之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18。

【請求項14】

如請求項 11 至 13 中任一項之方法，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18 之胺基酸序列。

【請求項15】

如請求項 11 至 14 中任一項之方法，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含 SEQ ID NO:15 之胺基酸序列。

【請求項16】

如請求項 11 至 15 中任一項之方法，其中該免疫結合體包含：多肽，其包含與 SEQ ID NO:22 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；多肽，其包含與 SEQ ID NO:24 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及多肽，其包含與 SEQ ID NO:25 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列。

【請求項17】

如請求項 11 至 16 中任一項之方法，其中該免疫結合體包含 SEQ ID NO:22 之多肽序列、SEQ ID NO:24 之多肽序列及兩個 SEQ ID NO:25 之多肽序列。

【請求項18】

如請求項 1 至 8 中任一項之方法，其中該第二多肽特異性結合存在於腫瘤細胞上或腫瘤細胞環境中的靶抗原。

【請求項19】

如請求項 18 之方法，其中該靶抗原選自以下各項所組成之群組：纖維母細胞活化蛋白 (FAP)、腱生蛋白 C (Tenascin-C) 之 A1 域 (TNC A1)、腱生蛋白 C 之 A2 域 (TNC A2)、纖網蛋白之外加域 B (EDB)、癌胚抗原 (CEA) 及黑色素瘤相關之硫酸軟骨素蛋白多醣 (MCSP)。

【請求項20】

如請求項 1 至 8 及 18 至 19 中任一項之方法，其中該第二多肽結合 FAP。

【請求項21】

如請求項 19 或 20 之方法，其中該第二多肽為特異性結合 FAP 之抗原結合部分。

【請求項22】

如請求項 21 之方法，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) SEQ ID NO:29 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:28 之輕鏈可變區序列；(ii) SEQ ID NO:31 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:30 之輕鏈可變區序列；(iii) SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列；(iv) SEQ ID NO:35 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:34 之輕鏈可變區序列；或 (v) SEQ ID NO:37 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:36 之輕鏈可變區序列。

【請求項23】

如請求項 21 或 22 之方法，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) 與 SEQ ID NO:42 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:43 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；(ii) 與 SEQ ID NO:38 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:39 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:231 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；或 (iii) 與 SEQ ID NO:44 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:45 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、

96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列。

【請求項24】

如請求項 21 至 23 中任一項之方法，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含 SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列。

【請求項25】

如請求項 21 至 24 中任一項之方法，其中該免疫結合體包含 SEQ ID NO:38 之多肽序列、SEQ ID NO:39 之多肽序列及 SEQ ID NO:40 之多肽序列。

【請求項26】

如請求項 1 至 25 中任一項之方法，其中該突變型 IL-2 多肽進一步包含胺基酸取代 T3A 及/或胺基酸取代 C125A。

【請求項27】

如請求項 1 至 26 中任一項之方法，其中該突變型 IL-2 多肽包含與 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列，其中該突變型 IL-2 多肽與野生型 IL-2 多肽相比，表現出對高親和力 IL-2 受體之減小的親和力及對中等親和力 IL-2 受體之大致類似的親和力。

【請求項28】

如請求項 1 至 27 中任一項之免疫結合體，其中該突變型 IL-2 多肽包含 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列。

【請求項29】

如請求項 1 至 28 中任一項之方法，其中該等有核細胞為免疫細胞。

【請求項30】

如請求項 1 至 29 中任一項之方法，其中該等有核細胞為多個周邊血單核細胞 (PBMC)。

【請求項31】

如請求項 30 之方法，其中該等多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞或 NK-T 細胞中之兩種或更多種。

【請求項32】

如請求項 1 至 31 中任一項之方法，其中該等有核細胞為 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞及/或 NK-T 細胞中之一種或多種。

【請求項33】

如請求項 1 至 32 中任一項之方法，其中該外源性抗原經胞內 (intracellularly) 遞送至該等有核細胞。

【請求項34】

如請求項 1 至 33 中任一項之方法，其中該外源性抗原為疾病相關之抗原。

【請求項35】

如請求項 34 之方法，其中該疾病相關之抗原為癌症抗原、感染性疾病抗原或病毒相關之疾病抗原。

【請求項36】

如請求項 1 至 35 中任一項之方法，其中該外源性抗原為人類乳突病毒 (HPV) 抗原。

【請求項37】

如請求項 1 至 36 中任一項之方法，其中該組成物進一步包含佐劑。

【請求項38】

如請求項 37 之方法，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)、LPS、

IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。

【請求項39】

如請求項 1 至 38 中任一項之方法，其中包含該外源性抗原的該等有核細胞藉由包含以下步驟的方法來製備：

a) 使包含輸入有核細胞的細胞懸浮液通過細胞變形收縮物，其中該收縮物之直徑為該懸浮液中該等輸入有核細胞的直徑的函數，從而使該等輸入有核細胞具有足夠大的擾動以使該外源性抗原通過而形成經擾動之輸入有核細胞；

b) 將該等經擾動之輸入有核細胞與該外源性抗原一起孵育足夠長的時間，以使該外源性抗原進入該等經擾動之輸入有核細胞，從而生成包含該外源性抗原之有核細胞。

【請求項40】

如請求項 39 之方法，其中該收縮物之寬度為該等輸入有核細胞的平均直徑的約 10% 至約 99%。

【請求項41】

如請求項 39 或 40 之方法，其中該收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 6 μm。

【請求項42】

如請求項 39 至 41 中任一項之方法，其中該收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 4.8 μm。

【請求項43】

如請求項 39 至 42 中任一項之方法，其中該收縮物之寬度為約 4.5 μm。

【請求項44】

如請求項 39 至 43 中任一項之方法，其中使包含該等多個輸入有核細胞的細胞懸浮液通過多個收縮物，其中該等多個收縮物串聯及/或並聯佈置。

【請求項45】

如請求項 39 至 44 中任一項之方法，其中在該等經擾動之輸入有核細胞與該外源性抗原一起孵育後，該外源性抗原存在於至少約 70% 的該等有核細胞中。

【請求項46】

如請求項 1 至 45 中任一項之方法，其中該等有核細胞經佐劑調節以形成經調節之細胞。

【請求項47】

如請求項 46 之方法，其中該等有核細胞與該佐劑一起孵育約 1 小時至約 24 小時、約 2 小時至約 10 小時、約 3 小時至約 6 小時或約 4 小時以對該等細胞進行調節。

【請求項48】

如請求項 46 或 47 之方法，其中該等有核細胞在該外源性抗原引入該等有核細胞中之前或之後經調節。

【請求項49】

如請求項 46 至 48 中任一項之方法，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)、LPS、IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。

【請求項50】

如請求項 46 至 49 中任一項之方法，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷

酸 (ODN)。

【請求項51】

如請求項 46 至 50 中任一項之方法，其中該佐劑為 CpG 7909。

【請求項52】

如請求項 46 至 51 中任一項之方法，其中該等經調節之細胞為經調節之多個經修飾之 PBMC。

【請求項53】

如請求項 52 之方法，其中該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以增加共刺激分子中之一者或多者之表現。

【請求項54】

如請求項 53 之方法，其中該共刺激分子為 B7-H2 (ICOSL)、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155 或 CD112。

【請求項55】

如請求項 52 至 54 中任一項之方法，其中該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以增加一種或多種細胞介素之表現。

【請求項56】

如請求項 55 之方法，其中該細胞介素為 IL-15、IL-12、IL-2、IFN-α 或 IL-21。

【請求項57】

如請求項 52 至 56 中任一項之方法，其中與該等多個未經修飾之 PBMC 中的 B 細胞相比，該等經調節之多個經修飾之 PBMC 的 B 細胞中的一種或多種共刺激分子上調，其中該共刺激分子為 CD80 及/或 CD86。

【請求項58】

如請求項 52 至 57 中任一項之方法，其中與多個未經調節之 PBMC 相比，該等多個經修飾之 PBMC 具有表現增加之 IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種。

【請求項59】

如請求項 58 之方法，其中與該等多個未經調節之 PBMC 相比，IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種的表現增加多於約 1.2 倍、1.5 倍、1.8 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、8 倍或多於 10 倍。

【請求項60】

如請求項 1 至 59 中任一項之方法，其中該免疫結合體於投予包含有核細胞的組成物之前、同時或之後投予。

【請求項61】

如請求項 1 至 60 中任一項之方法，其中包含有核細胞的該組成物經多次投予。

【請求項62】

如請求項 1 至 61 中任一項之方法，其中該免疫結合體於投予包含有核細胞的該組成物之後多次投予。

【請求項63】

如請求項 1 至 62 中任一項之方法，其中該組成物及/或免疫結合體經靜脈內投予。

【請求項64】

如請求項 1 至 63 中任一項之方法，其中該免疫結合體經皮下或瘤內投予。

【請求項65】

如請求項 64 之方法，其中該免疫結合體與透明質酸酶聯合經皮下投予。

【請求項66】

如請求項 1 至 65 中任一項之方法，其中該個體為人。

【請求項67】

如請求項 1 至 66 中任一項之方法，其中該個體患有癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【請求項68】

如請求項 1 至 67 中任一項之方法，其中該有核細胞及/或免疫結合體之組成物於投予另一種療法之前、同時或之後投予。

【請求項69】

如請求項 68 之方法，其中該另一種療法為化學治療或放射治療。

【請求項70】

一種包含有核細胞之組成物，該等有核細胞包含外源性抗原，該組成物用於治療個體之疾病的方法中，其中該組成物與包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽的免疫結合體組合使用；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子。

【請求項71】

如請求項 70 之組成物，其中該疾病為癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【請求項72】

如請求項 70 或 71 之組成物，其中包含有核細胞的該組成物於該免疫結合體之前、同時或之後投予。

【請求項73】

如請求項 70 至 72 中任一項之組成物，其中該免疫結合體於投予包含有核細胞的該組成物之後多次投予。

【請求項74】

如請求項 70 至 73 中任一項之組成物，其中該第二多肽結合 T 細胞。

【請求項75】

如請求項 70 至 74 中任一項之組成物，其中該第二多肽結合 T 細胞上所表現之 PD-1。

【請求項76】

如請求項 70 至 75 中任一項之組成物，其中該第二多肽為特異性結合 PD-1 的抗原結合部分。

【請求項77】

如請求項 76 之組成物，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含

(a) 重鏈可變區 (VH) 及輕鏈可變區 (VL)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:2 之胺基酸序列；HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:3 之胺基酸序列；及 FR-H3，其包含在根據 Kabat 編號之位置 71-73 處之 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列；該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列；HVR-L2，其包含 SEQ ID NO:5 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列；或

(b) 重鏈可變區 (VH) 及輕鏈可變區 (VL)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列；及 HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列；該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列；HVR-L2，

其包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。

【請求項78】

如請求項 76 或 77 之組成物，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含與 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含與選自以下各項所組成之群組之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18。

【請求項79】

如請求項 76 至 78 中任一項之組成物，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18 之胺基酸序列。

【請求項80】

如請求項 76 至 79 中任一項之組成物，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含 SEQ ID NO:15 之胺基酸序列。

【請求項81】

如請求項 70 至 80 中任一項之組成物，其中該免疫結合體包含：多肽，其包含與 SEQ ID NO:24 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；多肽，其包含與 SEQ ID NO:24 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及多肽，其包含與 SEQ ID NO:25 之序列至少

約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列。

【請求項82】

如請求項 70 至 81 中任一項之組成物，其中該免疫結合體包含 SEQ ID NO:22 之多肽序列、SEQ ID NO:24 之多肽序列及 SEQ ID NO:25 之多肽序列。

【請求項83】

如請求項 70 至 73 中任一項之組成物，其中該第二多肽特異性結合存在於腫瘤細胞上或腫瘤細胞環境中的靶抗原。

【請求項84】

如請求項 83 之組成物，其中該靶抗原選自以下各項所組成之群組：纖維母細胞活化蛋白 (FAP)、腱生蛋白 C 之 A1 域 (TNC A1)、腱生蛋白 C 之 A2 域 (TNC A2)、纖網蛋白之外加域 B (EDB)、癌胚抗原 (CEA) 及黑色素瘤相關之硫酸軟骨素蛋白多醣 (MCSP)。

【請求項85】

如請求項 70 至 73 及 83 至 84 中任一項之組成物，其中該第二多肽結合 FAP。

【請求項86】

如請求項 70 至 73 及 83 至 85 中任一項之組成物，其中該第二多肽為特異性結合 FAP 之抗原結合部分。

【請求項87】

如請求項 70 至 73 及 83 至 86 中任一項之組成物，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) SEQ ID NO:29 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:28 之輕鏈可變區序列；(ii) SEQ ID NO:31 之重鏈可變區序列及

SEQ ID NO:30 之輕鏈可變區序列；(iii) SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列；(iv) SEQ ID NO:35 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:34 之輕鏈可變區序列；或 (v) SEQ ID NO:37 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:36 之輕鏈可變區序列。

【請求項88】

如請求項 70 至 73 及 83 至 87 中任一項之組成物，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) 與 SEQ ID NO:42 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:43 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；(ii) 與 SEQ ID NO:38 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:39 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:231 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；或 (iii) 與 SEQ ID NO:44 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:45 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列。

【請求項89】

如請求項 70 至 73 及 83 至 88 中任一項之組成物，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含 SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列。

【請求項90】

如請求項 70 至 73 及 83 至 89 中任一項之組成物，其中該免疫結合體包含 SEQ ID NO:38 之多肽序列、SEQ ID NO:39 之多肽序列及 SEQ ID NO:40 之多肽序列。

【請求項91】

如請求項 70 至 90 中任一項之組成物，其中該突變型 IL-2 多肽進一步包含胺基酸取代 T3A 及/或胺基酸取代 C125A。

【請求項92】

如請求項 70 至 91 中任一項之組成物，其中該突變型 IL-2 多肽包含與 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列，其中該突變型 IL-2 多肽與野生型 IL-2 多肽相比，表現出對高親和力 IL-2 受體之減小的親和力及對中等親和力 IL-2 受體之大致類似的親和力。

【請求項93】

如請求項 70 至 92 中任一項之組成物，其中該突變型 IL-2 多肽包含 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列。

【請求項94】

如請求項 70 至 93 中任一項之組成物，其中該等有核細胞為免疫細胞。

【請求項95】

如請求項 70 至 94 中任一項之組成物，其中該等有核細胞為多個周邊血單核細胞 (PBMC)。

【請求項96】

如請求項 95 之組成物，其中該等多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、

NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞或 NK-T 細胞中之兩種或更多種。

【請求項97】

如請求項 70 至 94 中任一項之組成物，其中該等有核細胞為 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞及/或 NK-T 細胞中之一種或多種。

【請求項98】

如請求項 70 至 97 中任一項之組成物，其中該外源性抗原經胞內遞送至該等有核細胞。

【請求項99】

如請求項 70 至 98 中任一項之組成物，其中該外源性抗原為疾病相關之抗原。

【請求項100】

如請求項 70 至 99 中任一項之組成物，其中該疾病相關之抗原為癌症抗原、感染性疾病抗原或病毒相關之疾病抗原。

【請求項101】

如請求項 70 至 100 中任一項之組成物，其中該外源性抗原為人類乳突病毒 (HPV) 抗原。

【請求項102】

如請求項 70 至 101 中任一項之組成物，其中該組成物進一步包含佐劑。

【請求項103】

如請求項 102 之組成物，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)、LPS、IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。

【請求項104】

如請求項 70 至 103 中任一項之組成物，其中包含該外源性抗原的該等有核細胞藉由包含以下步驟的方法來製備：

a) 使包含輸入有核細胞的細胞懸浮液通過細胞變形收縮物，其中該收縮物之直徑為該懸浮液中該等輸入有核細胞的直徑的函數，從而使該等輸入有核細胞具有足夠大的擾動以使該外源性抗原通過而形成經擾動之輸入有核細胞；

b) 將該等經擾動之輸入有核細胞與該外源性抗原一起孵育足夠長的時間，以使該外源性抗原進入該等經擾動之輸入有核細胞，從而生成包含該外源性抗原之有核細胞。

【請求項105】

如請求項 104 之組成物，其中該收縮物之寬度為該等輸入有核細胞的平均直徑的約 10% 至約 99%。

【請求項106】

如請求項 104 或 105 之組成物，其中該收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 6 μm。

【請求項107】

如請求項 104 至 106 中任一項之組成物，其中該收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 4.8 μm。

【請求項108】

如請求項 104 至 107 中任一項之組成物，其中該收縮物之寬度為約 4.5 μm。

【請求項109】

如請求項 104 至 108 中任一項之組成物，其中使包含該等多個輸入有核細胞的細胞懸浮液通過多個收縮物，其中該等多個收縮物串聯及/或並

聯佈置。

【請求項110】

如請求項 104 至 109 中任一項之組成物，其中在該等經擾動之輸入有核細胞與該外源性抗原一起孵育後，該外源性抗原存在於至少約 70% 的該等有核細胞中。

【請求項111】

如請求項 70 至 110 中任一項之組成物，其中該等有核細胞經佐劑調節以形成經調節之細胞。

【請求項112】

如請求項 111 之組成物，其中該等有核細胞與該佐劑一起孵育約 1 小時至約 24 小時、約 2 小時至約 10 小時、約 3 小時至約 6 小時或約 4 小時以對該等細胞進行調節。

【請求項113】

如請求項 111 或 112 之組成物，其中該等有核細胞在該外源性抗原引入該等有核細胞中之前或之後經調節。

【請求項114】

如請求項 111 至 113 中任一項之組成物，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)、LPS、IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。

【請求項115】

如請求項 111 至 114 中任一項之組成物，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)。

【請求項116】

如請求項 111 至 115 中任一項之組成物，其中該佐劑為 CpG 7909。

【請求項117】

如請求項 111 至 116 中任一項之組成物，其中該等經調節之細胞為經調節之多個經修飾之 PBMC。

【請求項118】

如請求項 117 之組成物，其中該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以增加共刺激分子中之一者或多者之表現。

【請求項119】

如請求項 118 之組成物，其中該共刺激分子為 B7-H2 (ICOSL)、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155 或 CD112。

【請求項120】

如請求項 117 至 119 中任一項之組成物，其中該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以增加一種或多種細胞介素之表現。

【請求項121】

如請求項 120 之組成物，其中該細胞介素為 IL-15、IL-12、IL-2、IFN-α 或 IL-21。

【請求項122】

如請求項 117 至 123 中任一項之組成物，其中與該等多個未經修飾之 PBMC 中的 B 細胞相比，該等經調節之多個經修飾之 PBMC 的 B 細胞中的一種或多種共刺激分子上調，其中該共刺激分子為 CD80 及/或 CD86。

【請求項123】

如請求項 117 至 124 中任一項之組成物，其中與多個未經調節之 PBMC 相比，該等多個經修飾之 PBMC 具有表現增加之 IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種。

【請求項124】

如請求項 117 至 123 中任一項之組成物，其中與該等多個未經調節之 PBMC 相比，IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種的表現增加多於約 1.2 倍、1.5 倍、1.8 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、8 倍或多於 10 倍。

【請求項125】

如請求項 70 至 124 中任一項之組成物，其中該組成物及/或免疫結合體經靜脈內投予。

【請求項126】

如請求項 70 至 125 中任一項之組成物，其中該免疫結合體經皮下或瘤內投予。

【請求項127】

如請求項 126 之組成物，其中該免疫結合體與透明質酸酶聯合經皮下投予。

【請求項128】

如請求項 70 至 127 中任一項之組成物，其中該個體為人。

【請求項129】

如請求項 70 至 128 中任一項之組成物，其中該個體患有癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【請求項130】

如請求項 70 至 129 中任一項之組成物，其中該組成物於投予另一種療法之前、同時或之後投予。

【請求項131】

如請求項 130 之組成物，其中該另一種療法為化學治療或放射治療。

【請求項132】

一種包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽之免疫結合體，其用於治療個體之疾病的方法中，其中該免疫結合體與包含有核細胞的組成物組合使用，該等有核細胞包含外源性抗原。

【請求項133】

如請求項 132 之免疫結合體，其中該疾病為癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【請求項134】

如請求項 132 或 133 之免疫結合體，其中包含該等有核細胞的該組成物於該免疫結合體之前、同時或之後投予。

【請求項135】

如請求項 132 至 134 中任一項之免疫結合體，其中該免疫結合體於投予包含有核細胞的該組成物之後多次投予。

【請求項136】

如請求項 132 至 135 中任一項之免疫結合體，其中該第二多肽結合 T 細胞。

【請求項137】

如請求項 132 至 136 中任一項之免疫結合體，其中該第二多肽結合 T 細胞上所表現之 PD-1。

【請求項138】

如請求項 132 至 137 中任一項之免疫結合體，其中該第二多肽為特異性結合 PD-1 的抗原結合部分。

【請求項139】

如請求項 138 之免疫結合體，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含

(a) 重鏈可變區 (VH) 及輕鏈可變區 (VL)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:1 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:2 之胺基酸序列；HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:3 之胺基酸序列；及 FR-H3，其包含在根據 Kabat 編號之位置 71-73 處之 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列；該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:4 之胺基酸序列；HVR-L2，其包含 SEQ ID NO:5 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:6 之胺基酸序列；或

(b) 重鏈可變區 (VH) 及輕鏈可變區 (VL)，該重鏈可變區包含：HVR-H1，其包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列；HVR-H2，其包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列；及 HVR-H3，其包含 SEQ ID NO:10 之胺基酸序列；該輕鏈可變區包含：HVR-L1，其包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列；HVR-L2，其包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列；及 HVR-L3，其包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。

【請求項140】

如請求項 138 或 139 之免疫結合體，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含與 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含與選自以下各項所組成之群組之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列：SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18。

【請求項141】

如請求項 138 至 140 中任一項之免疫結合體，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列；

及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含 SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17 及 SEQ ID NO:18 之胺基酸序列。

【請求項142】

如請求項 138 至 141 中任一項之免疫結合體，其中該抗 PD-1 抗原結合部分包含：(a) 重鏈可變區 (VH)，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列；及 (b) 輕鏈可變區 (VL)，其包含 SEQ ID NO:15 之胺基酸序列。

【請求項143】

如請求項 132 至 142 中任一項之免疫結合體，其中該免疫結合體包含：多肽，其包含與 SEQ ID NO:22 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；多肽，其包含與 SEQ ID NO:24 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列；及多肽，其包含與 SEQ ID NO:25 之序列至少約 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列。

【請求項144】

如請求項 132 至 143 中任一項之免疫結合體，其中該免疫結合體包含 SEQ ID NO:22 之多肽序列、SEQ ID NO:24 之多肽序列及 SEQ ID NO:25 之多肽序列。

【請求項145】

如請求項 132 至 135 中任一項之免疫結合體，其中該第二多肽特異性結合存在於腫瘤細胞上或腫瘤細胞環境中的靶抗原。

【請求項146】

如請求項 132 至 135 及 145 中任一項之免疫結合體，其中該靶抗原選自以下各項所組成之群組：纖維母細胞活化蛋白 (FAP)、腱生蛋白 C 之

A1 域 (TNC A1)、腱生蛋白 C 之 A2 域 (TNC A2)、纖網蛋白之外加域 B (EDB)、癌胚抗原 (CEA) 及黑色素瘤相關之硫酸軟骨素蛋白多醣 (MCSP)。

【請求項147】

如請求項 132 至 135 及 145 至 146 中任一項之免疫結合體，其中該第二多肽結合 FAP。

【請求項148】

如請求項 132 至 135 及 145 至 147 中任一項之免疫結合體，其中該第二多肽為特異性結合 FAP 之抗原結合部分。

【請求項149】

如請求項 148 之免疫結合體，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) SEQ ID NO:29 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:28 之輕鏈可變區序列；(ii) SEQ ID NO:31 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:30 之輕鏈可變區序列；(iii) SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列；(iv) SEQ ID NO:35 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:34 之輕鏈可變區序列；或 (v) SEQ ID NO:37 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:36 之輕鏈可變區序列。

【請求項150】

如請求項 148 或 149 之免疫結合體，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含：(i) 與 SEQ ID NO:42 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:43 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；(ii) 與 SEQ ID NO:38 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:39

至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:231 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列；或 (iii) 與 SEQ ID NO:44 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列、與 SEQ ID NO:45 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列及與 SEQ ID NO:41 至少 80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之多肽序列。

【請求項151】

如請求項 148 至 150 中任一項之免疫結合體，其中該特異性結合 FAP 之抗原結合部分包含 SEQ ID NO:33 之重鏈可變區序列及 SEQ ID NO:32 之輕鏈可變區序列。

【請求項152】

如請求項 132 至 135 及 145 至 151 中任一項之免疫結合體，其中該免疫結合體包含 SEQ ID NO:38 之多肽序列、SEQ ID NO:39 之多肽序列及 SEQ ID NO:40 之多肽序列。

【請求項153】

如請求項 132 至 152 中任一項之免疫結合體，其中該突變型 IL-2 多肽進一步包含胺基酸取代 T3A 及/或胺基酸取代 C125A。

【請求項154】

如請求項 132 至 153 中任一項之免疫結合體，其中該突變型 IL-2 多肽包含與 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列至少約 95%、96%、97%、98%、99% 或 100% 相同之胺基酸序列，其中該突變型 IL-2 多肽與野生型 IL-2 多肽相比，表現出對高親和力 IL-2 受體之減小的親和力及對中等親和力 IL-2 受體之大致類似的親和力。

【請求項155】

如請求項 132 至 154 中任一項之免疫結合體，其中該突變型 IL-2 多肽包含 SEQ ID NO:20 之胺基酸序列。

【請求項156】

如請求項 132 至 155 中任一項之免疫結合體，其中該等有核細胞為免疫細胞。

【請求項157】

如請求項 132 至 156 中任一項之免疫結合體，其中該等有核細胞為多個周邊血單核細胞 (PBMC)。

【請求項158】

如請求項 157 之免疫結合體，其中該等多個 PBMC 包含 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞或 NK-T 細胞中之兩種或更多種。

【請求項159】

如請求項 132 至 156 中任一項之免疫結合體，其中該等有核細胞為 T 細胞、B 細胞、NK 細胞、單核細胞、樹狀細胞及/或 NK-T 細胞中之一種或多種。

【請求項160】

如請求項 132 至 159 中任一項之免疫結合體，其中該外源性抗原經胞內遞送至該等有核細胞。

【請求項161】

如請求項 132 至 160 中任一項之免疫結合體，其中該外源性抗原為疾病相關之抗原。

【請求項162】

如請求項 132 至 161 中任一項之免疫結合體，其中該疾病相關之抗

原為癌症抗原、感染性疾病抗原或病毒相關之疾病抗原。

【請求項163】

如請求項 132 至 162 中任一項之免疫結合體，其中該外源性抗原為人類乳突病毒 (HPV) 抗原。

【請求項164】

如請求項 132 至 163 中任一項之免疫結合體，其中該組成物進一步包含佐劑。

【請求項165】

如請求項 164 之免疫結合體，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)、LPS、IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。

【請求項166】

如請求項 132 至 165 中任一項之免疫結合體，其中包含該外源性抗原的該等有核細胞藉由包含以下步驟的方法來製備：

a) 使包含輸入有核細胞的細胞懸浮液通過細胞變形收縮物，其中該收縮物之直徑為該懸浮液中該等輸入有核細胞的直徑的函數，從而使該等輸入有核細胞具有足夠大的擾動以使該外源性抗原通過而形成經擾動之輸入有核細胞；

b) 將該等經擾動之輸入有核細胞與該外源性抗原一起孵育足夠長的時間，以使該外源性抗原進入該等經擾動之輸入有核細胞，從而生成包含該外源性抗原之有核細胞。

【請求項167】

如請求項 166 之免疫結合體，其中該收縮物之寬度為該等輸入有核細胞的平均直徑的約 10% 至約 99%。

【請求項168】

如請求項 166 或 167 之免疫結合體，其中該收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 6 μm。

【請求項169】

如請求項 166 至 168 中任一項之免疫結合體，其中該收縮物之寬度為約 4.2 μm 至約 4.8 μm。

【請求項170】

如請求項 166 至 169 中任一項之免疫結合體，其中該收縮物之寬度為約 4.5 μm。

【請求項171】

如請求項 166 至 170 中任一項之免疫結合體，其中使包含該等多個輸入有核細胞的細胞懸浮液通過多個收縮物，其中該等多個收縮物串聯及/或並聯佈置。

【請求項172】

如請求項 166 至 171 中任一項之免疫結合體，其中在該等經擾動之輸入有核細胞與該外源性抗原一起孵育後，該外源性抗原存在於至少約 70% 的該等有核細胞中。

【請求項173】

如請求項 132 至 172 中任一項之免疫結合體，其中該等有核細胞經佐劑調節以形成經調節之細胞。

【請求項174】

如請求項 173 之免疫結合體，其中該等有核細胞與該佐劑一起孵育約 1 小時至約 24 小時、約 2 小時至約 10 小時、約 3 小時至約 6 小時或約 4 小時以對該等細胞進行調節。

【請求項175】

如請求項 173 或 174 之免疫結合體，其中該等有核細胞在該外源性抗原引入該等有核細胞中之前或之後經調節。

【請求項176】

如請求項 173 至 175 中任一項之免疫結合體，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)、LPS、IFN-α、STING 促效劑、RIG-I 促效劑、poly I:C、R837、R848、TLR3 促效劑、TLR4 促效劑或 TLR 9 促效劑。

【請求項177】

如請求項 173 至 176 中任一項之免疫結合體，其中該佐劑為 CpG 寡去氧核苷酸 (ODN)。

【請求項178】

如請求項 173 至 177 中任一項之免疫結合體，其中該佐劑為 CpG 7909。

【請求項179】

如請求項 173 至 178 中任一項之免疫結合體，其中該等經調節之細胞為經調節之多個經修飾之 PBMC。

【請求項180】

如請求項 179 之免疫結合體，其中該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以增加共刺激分子中之一者或多者之表現。

【請求項181】

如請求項 180 之免疫結合體，其中該共刺激分子為 B7-H2 (ICOSL)、B7-1 (CD80)、B7-2 (CD86)、CD70、LIGHT、HVEM、CD40、4-1BBL、OX40L、TL1A、GITRL、CD30L、TIM4、SLAM、CD48、CD58、CD155 或 CD112。

【請求項182】

如請求項 179 至 181 中任一項之免疫結合體，其中該等多個經修飾之 PBMC 經進一步修飾以增加一種或多種細胞介素之表現。

【請求項183】

如請求項 182 之免疫結合體，其中該細胞介素為 IL-15、IL-12、IL-2、IFN-α 或 IL-21。

【請求項184】

如請求項 179 至 183 中任一項之免疫結合體，其中與該等多個未經修飾之 PBMC 中的 B 細胞相比，該等經調節之多個經修飾之 PBMC 的 B 細胞中的一種或多種共刺激分子上調，其中該共刺激分子為 CD80 及/或 CD86。

【請求項185】

如請求項 179 至 184 中任一項之免疫結合體，其中與多個未經調節之 PBMC 相比，該等多個經修飾之 PBMC 具有表現增加之 IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種。

【請求項186】

如請求項 179 至 185 中任一項之免疫結合體，其中與該等多個未經調節之 PBMC 相比，IFN-γ、IL-6、MCP-1、MIP-1β、IP-10 或 TNF-α 中之一種或多種的表現增加多於約 1.2 倍、1.5 倍、1.8 倍、2 倍、3 倍、4 倍、5 倍、8 倍或多於 10 倍。

【請求項187】

如請求項 132 至 186 中任一項之免疫結合體，其中該組成物及/或免疫結合體經靜脈內投予。

【請求項188】

如請求項 132 至 186 中任一項之免疫結合體，其中該免疫結合體經皮下或瘤內投予。

【請求項189】

如請求項 188 之免疫結合體，其中該免疫結合體與透明質酸酶聯合經皮下投予。

【請求項190】

如請求項 132 至 189 中任一項之免疫結合體，其中該個體為人。

【請求項191】

如請求項 132 至 190 中任一項之免疫結合體，其中該個體患有癌症、感染性疾病或病毒相關之疾病。

【請求項192】

如請求項 132 至 191 中任一項之免疫結合體，其中該組成物於投予另一種療法之前、同時或之後投予。

【請求項193】

如請求項 192 之免疫結合體，其中該另一種療法為化學治療或放射治療。

【請求項194】

一種有效量之免疫結合體之用途，其用於製造用於刺激個體之免疫反應的藥物，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子；

其中該免疫結合體配製用於與包含有核細胞的組成物合併投予，其中該等有核細胞包含外源性抗原。

【請求項195】

如請求項 194 之用途，其中該免疫結合體於包含有核細胞的組成物之前、同時或之後投予。

【請求項196】

一種有效量之組成物之用途，其用於製造用於刺激個體之免疫反應的藥物，其中該組成物包含有核細胞，該等有核細胞包含外源性抗原；

其中該組成物配製用於與免疫結合體合併投予，該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子。

【請求項197】

如請求項 196 之組成物，其中包含該等有核細胞的該組成物於該免疫結合體之前、同時或之後投予。

【請求項198】

一種用於如請求項 1 至 69 中任一項之方法中之套組。

【請求項199】

一種包含有核細胞的組成物及免疫結合體之套組，該等有核細胞包含外源性抗原，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子；其中該組成物及該免疫結合體組合用於刺激個體對該外源性抗原之免疫反應。

【請求項200】

一種包含有核細胞的組成物之套組，該等有核細胞包含外源性抗原，

其中該組成物與免疫結合體合併用於刺激個體對該外源性抗原之免疫反應；

其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；且其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子。

【請求項201】

一種包含免疫結合體之套組，其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子；

其中該免疫結合體與包含外源性抗原的有核細胞的組成物合併用於刺激個體對該外源性抗原之免疫反應。

【請求項202】

一種用於產生免疫結合體之方法，該免疫結合體與包含有核細胞的組成物合併用於刺激個體之免疫反應，該方法包含在產生該免疫結合體的條件下在細胞中表現編碼該免疫結合體的核酸，

其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子；

其中該免疫結合體用於與包含有核細胞的組成物合併投予，其中該等有核細胞包含外源性抗原。

【請求項203】

如請求項 202 之方法，其中該免疫結合體為融合蛋白。

【請求項204】

一種用於產生包含有核細胞的組成物之方法，該組成物與免疫結合體合併用於刺激個體之免疫反應，該方法包含將外源性抗原經胞內引入有核細胞族群中；

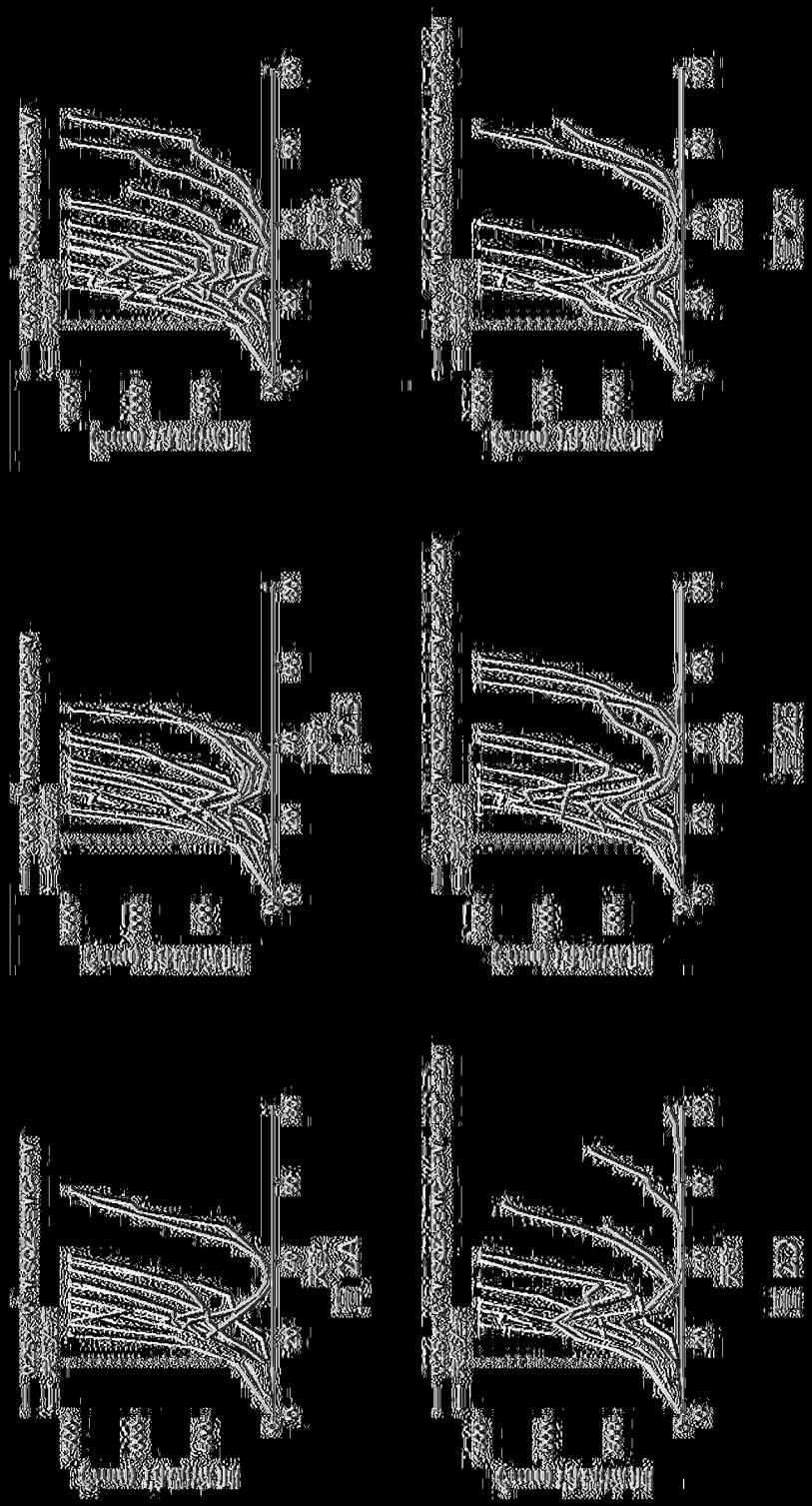
其中該組成物用於與免疫結合體合併投予；

其中該免疫結合體包含突變型 IL-2 多肽及能夠與 T 細胞、腫瘤細胞或腫瘤細胞環境特異性結合的第二多肽；且其中該突變型 IL-2 多肽為包含胺基酸取代 F42A、Y45A 及 L72G (相對於人 IL-2 序列 SEQ ID NO:19 編號) 之人 IL-2 分子。

(發明圖式)



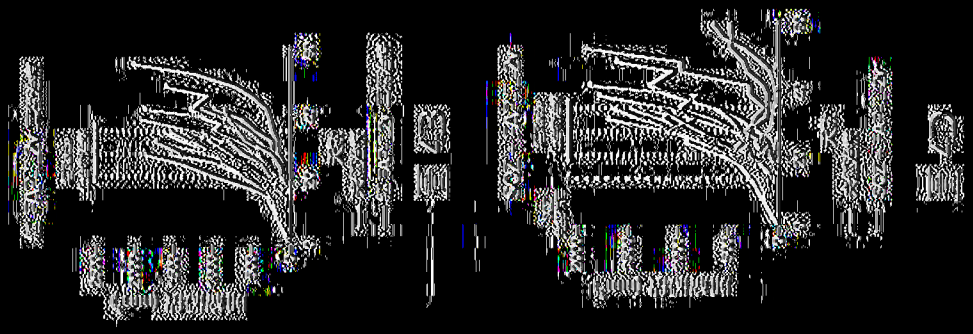
202207975



202207975

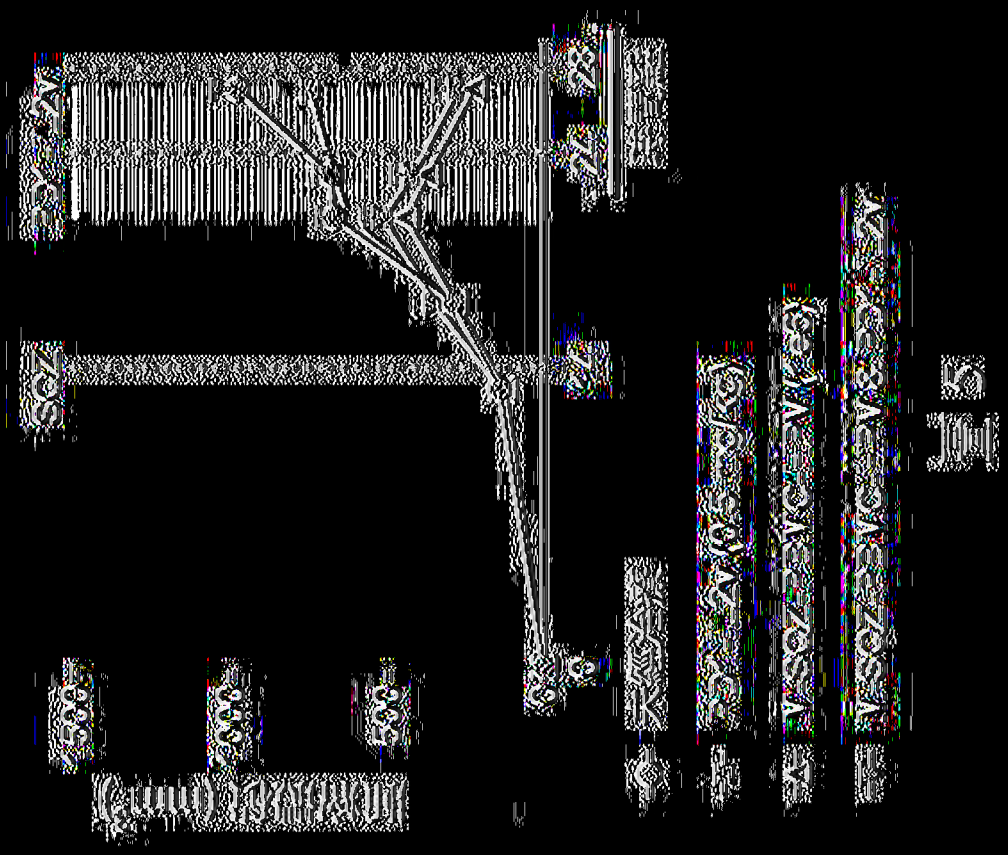
202207975



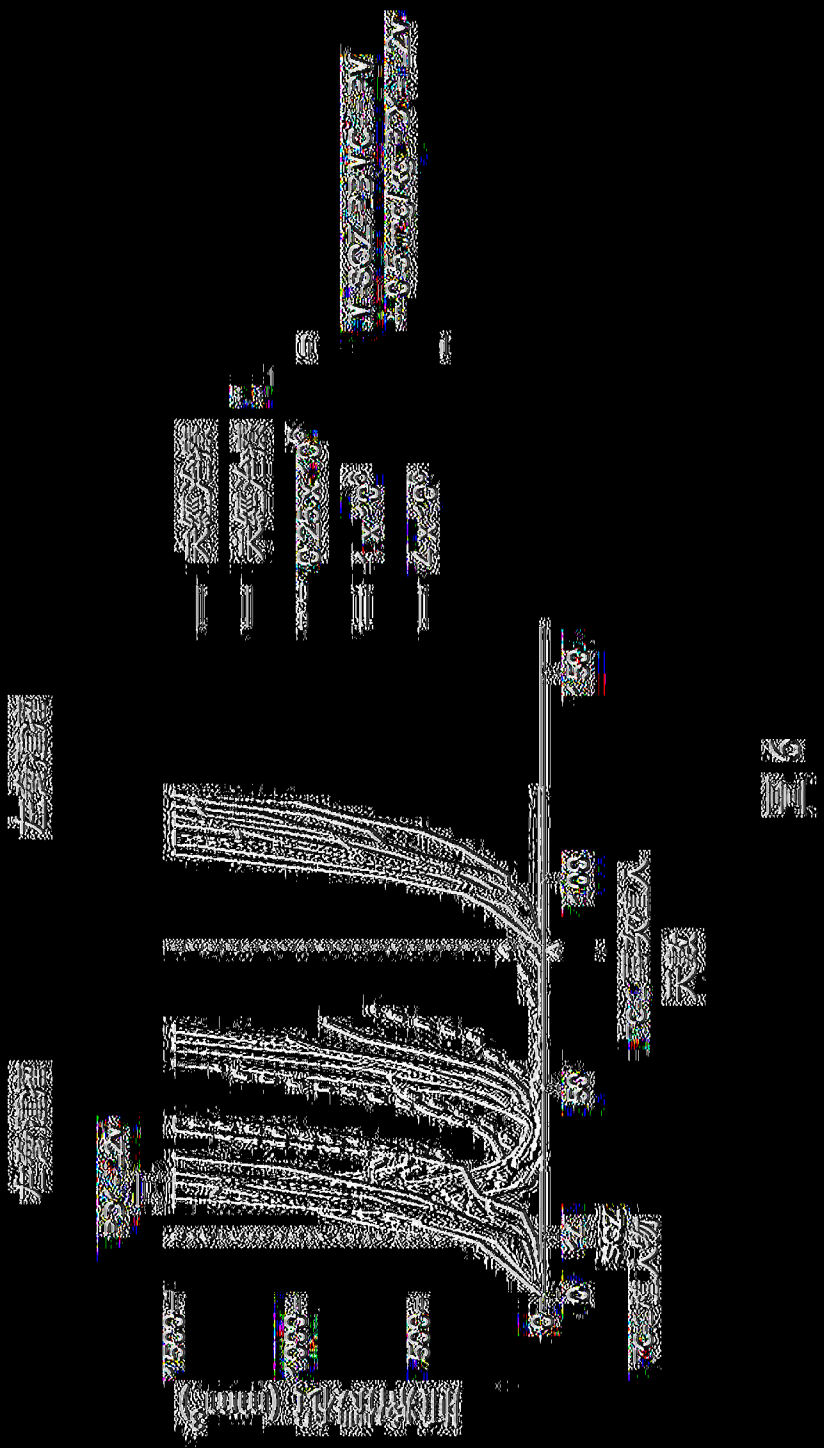




202207975



202207975



202207975

202207975

