



(10) 申请公布号 CN 115087489 A

(43) 申请公布日 2022.09.20

(21) 申请号 202180014540.3

(22) 申请日 2021.02.12

(30) 优先权数据

62/976,493 2020.02.14 US

(85) PCT国际申请进入国家阶段日

2022.08.12

(86) PCT国际申请的申请数据

PCT/GB2021/050341 2021.02.12

(87) PCT国际申请的公布数据

W02021/161032 EN 2021.08.19

(71) 申请人 艾达普特免疫有限公司

地址 英国牛津郡

(72) 发明人 N·J·庞弗里

(74) 专利代理机构 北京同立钧成知识产权代理有限公司 11205

专利代理师 严罗一 黄健

(51) Int.Cl.

A61P 35/00 (2006.01)

C07K 14/725 (2006.01)

C12N 5/0783 (2006.01)

C12N 15/85 (2006.01)

权利要求书6页 说明书27页

序列表33页 附图17页

(54) 发明名称

癌症或肿瘤的治疗方法

(57) 摘要

本发明涉及一种治疗、预防或延缓受试者的癌症和/或肿瘤的进展的方法,特别是肝细胞癌(HCC)的治疗,包括向受试者施用一种治疗方案,该治疗方案包含有效量的修饰的免疫应答细胞,其表达或呈递具有结合至甲胎蛋白(AFP)或其抗原肽的特性的异源性T细胞受体(TCR)。

1. 一种治疗、预防或延缓受试者的癌症和/或肿瘤的进展的方法,包括向受试者施用一种治疗方案,所述治疗方案包含有效量的修饰的免疫应答细胞,其表达或呈递结合甲胎蛋白(AFP)的肽抗原的异源性T细胞受体(TCR),所述肽抗原包含FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1)或来源于甲胎蛋白(AFP) SEQ ID NO:51的残基158-166。

2. 根据权利要求1所述的方法,其中,所述异源性TCR特异性地和/或选择性地结合至所述肽抗原。

3. 根据权利要求2所述的方法,其中,所述肽抗原与癌性病征、癌症和/或肿瘤相关和/或由癌细胞或组织的肿瘤呈递。

4. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中,所述癌症和/或所述肿瘤为表达AFP的癌症和/或肿瘤,和/或表达甲胎蛋白或其肽抗原或包含FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1)或来源于甲胎蛋白(AFP) SEQ ID NO:51的残基158-166的甲胎蛋白(AFP)的肽抗原。

5. 根据权利要求1至4中任一项所述的方法,其中,所述肽抗原与肽呈递分子复合,任选地与主要组织相容性复合体(MHC)或人类白细胞抗原(HLA)复合,任选地为I类或II类。

6. 根据权利要求5所述的方法,其中,所述肽呈递分子为HLA-A\*02,任选地选自HLA-A\*02:01、HLA-A\*02:02、HLA-A\*02:03、HLA-A\*02:04、HLA-A\*02:05、HLA-A\*02:06、HLA-A\*02:642或HLA-A\*02:07,优选HLA-A\*02:01或HLA-A\*02:642。

7. 根据权利要求1至6中任一项所述的方法,其中,所述异源性TCR特异性地和/或选择性地结合至所述肽抗原和/或所述肽呈递分子和/或其复合物。

8. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中,所述异源性TCR包含TCR $\alpha$ 链可变结构域和TCR $\beta$ 链可变结构域,其中:

(i) 所述 $\alpha$ 链可变结构域包含具有以下序列的CDR:

DRGSQS ( $\alpha$ CDR1), SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:2的氨基酸27-32,或与其具有至少50%序列同一性的序列,

IYSNGD ( $\alpha$ CDR2), SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:2的氨基酸50-55,或与其具有至少50%序列同一性的序列,以及

AVNSDSGYALNF ( $\alpha$ CDR3), SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:2的氨基酸90-101,或与其具有至少50%序列同一性的序列;以及

(ii) 所述 $\beta$ 链可变结构域包含具有以下序列的CDR:

SGDLS ( $\beta$ CDR1), SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:3的氨基酸27-31,或与其具有至少50%序列同一性的序列,

YYNGEE ( $\beta$ CDR2), SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:3的氨基酸49-54,或与其具有至少50%序列同一性的序列,以及

ASSLGGESEQY ( $\beta$ CDR3), SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:3的氨基酸92-102,或与其具有至少50%序列同一性的序列。

9. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中,所述异源性TCR包含TCR,其中,所述 $\alpha$ 链可变结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸残基1-112的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列,和/或所述 $\beta$ 链可变结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸残基1-112的序列具有至少80%同一性的氨基酸序列。

10. 根据权利要求8或9所述的方法,其中,所述异源性TCR包含:

- a. 具有序列DRGSQA, SEQ ID NO:35的 $\alpha$ CDR1,
- b. 具有序列AVNSDSSYALNF, SEQ ID NO:36的 $\alpha$ CDR2,
- c. 具有序列AVNSDSGVALNF, SEQ ID NO:37的 $\alpha$ CDR2,
- d. 具有序列DRGSQA, SEQ ID NO:35的 $\alpha$ CDR1和具有序列AVNSDSGVALNF, SEQ ID NO:37的 $\alpha$ CDR2,
- e. 具有序列AVNSQSGYALNF, SEQ ID NO:38的 $\alpha$ CDR2,
- f. 具有序列AVNSQSGYSLNF, SEQ ID NO:39的 $\alpha$ CDR2,
- g. 具有序列AVNSQSSYALNF, SEQ ID NO:43的 $\alpha$ CDR2,
- h. 具有序列DRGSQA, SEQ ID NO:35的 $\alpha$ CDR1和具有序列AVNSQSGYALNF, SEQ ID NO:38的 $\alpha$ CDR2,
- i. 具有序列AVNSQSGVALNF, SEQ ID NO:39的 $\alpha$ CDR2,
- j. 具有序列AVNSQNGYALNF, SEQ ID NO:40的 $\alpha$ CDR2,
- k. 具有序列DRGSFS, SEQ ID NO:41的 $\alpha$ CDR1,
- l. 具有序列DRGSYS, SEQ ID NO:42的 $\alpha$ CDR1,
- m. 具有序列DRGSYS, SEQ ID NO:42的 $\alpha$ CDR1和具有序列AVNSDSSYALNF, SEQ ID NO:36的 $\alpha$ CDR2,
- n. 具有序列DRGSYS, SEQ ID NO:42的 $\alpha$ CDR1和具有序列AVNSDSSYALNF, SEQ ID NO:36的 $\alpha$ CDR2, 或
- o. 具有序列DRGSYS, SEQ ID NO:42的 $\alpha$ CDR1和具有序列AVNSQSGYALNF, SEQ ID NO:38的 $\alpha$ CDR2。

11. 根据任一项前述权利要求所述的方法, 其中, 表达或呈递异源性TCR的修饰的免疫应答细胞的群体还表达或呈递异源性共受体, 任选地其中, 所述共受体为CD8共受体。

12. 根据权利要求11所述的方法, 其中, 异源性CD8共受体为异源二聚体或同源二聚体、CD8 $\alpha$ b异源二聚体或CD8 $\alpha$  $\alpha$ 同源二聚体。

13. 根据权利要求11或12所述的方法, 其中, 所述异源性CD8共受体包含:

(a) 与氨基酸序列VLLSNPTSG, SEQ ID NO:44具有至少80%序列同一性的CDR 1, 与氨基酸序列YLSQNKPK SEQ ID NO:45具有至少80%序列同一性的CDR 2以及与氨基酸序列LSNSIM SEQ ID NO:46具有至少80%序列同一性的CDR 3,

(b) 氨基酸序列VLLSNPTSG, SEQ ID NO:44的CDR 1, 氨基酸序列YLSQNKPK SEQ ID NO:45的CDR 2以及氨基酸序列LSNSIM SEQ ID NO:46的CDR 3,

(c) 与SEQ ID NO:47的第22至235位氨基酸或SEQ ID NO:47的第22至135位氨基酸具有至少80%序列同一性的氨基酸序列, 或

(d) 与SEQ ID NO:47的序列的第22至235位氨基酸或SEQ ID NO:47的序列的第22至135位氨基酸具有100%序列同一性的氨基酸序列。

14. 根据任一项前述权利要求所述的方法, 其中, 表达或呈递异源性TCR的修饰的免疫应答细胞的群体还表达或呈递异源性共刺激配体, 任选地为4-1BBL或CD80。

15. 根据权利要求1至14中任一项所述的方法, 其中, 所述修饰的免疫应答细胞为(a) B细胞、T细胞或自然杀伤(NK)细胞, 或(b) T细胞, 任选地为CD4<sup>+</sup>T细胞或CD8<sup>+</sup>T细胞。

16. 根据权利要求1至15中任一项所述的方法, 其中, 所述修饰的免疫应答细胞为CD4<sup>+</sup>T

细胞的群体;或CD8<sup>+</sup>T细胞,或CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞的混合群体。

17. 根据权利要求1至16中任一项所述的方法,其中,连续或间歇地施用所述修饰的免疫应答细胞。

18. 根据权利要求1至17中任一项所述的方法,其中,以多剂量施用或以单剂量施用所述修饰的免疫应答细胞。

19. 根据权利要求18所述的方法,其中,在一个或多个给药周期中施用所述单剂量或所述多剂量,任选地其中,所述剂量能够是固定剂量或可变剂量。

20. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中,以约5亿至约10亿个细胞、约20亿至约50亿个细胞、或约60亿至约100亿个细胞的剂量施用所述修饰的免疫应答细胞。

21. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中,以下述方式施用所述修饰的免疫应答细胞:

- (a) 在一个或多个给药周期的每个周期中单剂量,
- (b) 在一个或多个给药周期的每个周期中一个或多个剂量,
- (c) 在一个或多个给药周期的每个周期的第一天单剂量,
- (d) 在一个或多个给药周期的每个周期中一个或多个剂量,在每个周期的第一天至少一个剂量,
- (f) 单剂量。

22. 根据权利要求19至21中任一项所述的方法,其中,所述给药周期为2至6个月或取决于疾病进展。

23. 根据权利要求19至21中任一项所述的方法,其中,所述给药周期取决于:

(a) 先前施用修饰的免疫应答细胞之后的疾病进展,以及所述先前施用修饰的免疫应答细胞之后的12周或更长时间,并且其中,

(b) 所述肿瘤和/或所述癌症表达AFP和/或受试者血清AFP大于或等于100ng/mL。

24. 根据权利要求19至21中任一项所述的方法,其中,所述给药周期取决于:

(a) 先前施用修饰的免疫应答细胞之后的完全或部分缓解,或(b) 所述先前施用修饰的免疫应答细胞之后的大于或等于4个月的疾病稳定期;随后疾病进展,以及所述先前施用修饰的免疫应答细胞之后的12周或更长时间,并且其中,

(c) 所述肿瘤和/或所述癌症表达AFP和/或受试者血清AFP大于或等于100ng/mL。

25. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中,通过静脉内或通过静脉输注施用所述修饰的免疫应答细胞。

26. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中,在治疗前,如由免疫组织化学确定的,所述受试者的肿瘤和/或癌细胞AFP表达在大于或等于20%的肿瘤和/或癌细胞中大于或等于1+的强度,并且,通过免疫组织化学在任何强度下的非癌性AFP表达小于或等于5%的非癌性或非肿瘤组织的细胞。

27. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中,在治疗前,所述受试者的血清AFP水平大于或等于100ng/mL,并且,通过免疫组织化学在任何强度下的AFP表达小于或等于5%的非癌性或非肿瘤组织的细胞。

28. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中,在治疗前,所述受试者具有0至1的东部肿瘤协作组(ECOG)和/或1、2、3、4、5或6中的任一个的Child-Pugh评分和/或根据实体肿

瘤疗效评估标准 (RECIST) 1.1 的可测量的疾病。

29. 根据任一项前述权利要求所述的方法, 其中, 如果在治疗前所述受试者具有以下任一种或多种:

- (a) 血清AFP水平在正常范围内, 小于100ng/mL或小于或等于10ng/mL,
- (b) 肝脏移植,
- (c) 采用PD-1或PD-L1拮抗剂配体的免疫疗法和/或细胞毒性化学疗法,
- (d) HLA-C\*04:04阳性或HLA-B\*51:03阳性状态, 或
- (e) 局部区域疗法; 那么

所述受试者被排除在所述治疗之外。

30. 根据任一项前述权利要求所述的方法, 其中, 所述受试者不耐受标准护理的治疗, 任选地其中, 所述标准护理的治疗选自索拉非尼、PD1或PD-L1拮抗剂或抑制剂、瑞戈非尼、卡博替尼、舒尼替尼、布立尼布、依维莫司、替万替尼、利尼伐尼中的任一种。

31. 根据任一项前述权利要求所述的方法, 其中, 所述癌症和/或所述肿瘤先前已用标准护理的治疗治疗失败, 任选地其中, 所述标准护理的治疗选自索拉非尼、PD1或PD-L1拮抗剂或抑制剂、瑞戈非尼、卡博替尼、舒尼替尼、布立尼布、依维莫司、替万替尼、利尼伐尼中的任一种。

32. 根据任一项前述权利要求所述的方法, 其中, 所述癌症和/或所述肿瘤先前已用局部区域疗法治疗失败, 所述局部区域疗法任选地选自化学和/或热经皮消融和动脉内化学栓塞疗法。

33. 根据任一项前述权利要求所述的方法, 其中, 所述受试者患有或其中所述癌症和/或所述肿瘤为: 原发性癌症、继发性癌症、复发的癌症或难治性癌症或复发性癌症或局部复发性癌症或转移性癌症、不可切除的癌症或局部局限性癌症、没有手术或放射疗法选择的癌症或手术无法治愈的癌症, 任选地其中, 所述癌症不适合移植或局部区域疗法。

34. 根据任一项前述权利要求所述的方法, 其中, 所述癌症和/或所述肿瘤为肝癌, 或选自以下的肝癌: 胆管癌、肝血管肉瘤、肝母细胞瘤、肝细胞癌 (HCC), 任选地其中, 所述癌症不适合移植或切除。

35. 根据权利要求34所述的方法, 其中, 所述癌症和/或所述肿瘤为肝细胞癌 (HCC)。

36. 根据权利要求34或35所述的方法, 其中, 所述肝癌与以下任一种或多种同时发生: 糖尿病、肥胖症、乙型肝炎、丙型肝炎、肝硬化。

37. 根据任一项前述权利要求所述的方法, 其中, 施用表达或呈递异源性T细胞受体 (TCR) 的所述修饰的免疫应答细胞之前, 所述受试者经受淋巴耗竭化疗。

38. 根据权利要求37所述的方法, 其中, 所述淋巴耗竭化疗包括: 任选地以 $500\text{mg}/\text{m}^2/\text{d} \times 3\text{d}$ 环磷酰胺和 $20\text{mg}/\text{m}^2/\text{d} \times 3\text{d}$ 氟达拉滨的剂量或以 $600\text{mg}/\text{m}^2/\text{d} \times 3\text{d}$ 环磷酰胺和 $30\text{mg}/\text{m}^2/\text{d} \times 4\text{d}$ 的剂量施用环磷酰胺和氟达拉滨。

39. 根据权利要求37或38所述的方法, 其中, 施用表达或呈递异源性T细胞受体 (TCR) 的所述修饰的免疫应答细胞之前7至5或7至4天施用所述淋巴耗竭化疗。

40. 根据任一项前述权利要求所述的方法, 其中, 所述受试者没有接受过癌症和/或肿瘤的预先治疗。

41. 根据权利要求1至39中任一项所述的方法, 其中, 所述受试者已经接受了预先癌症

和/或肿瘤治疗和/或对预先癌症和/或肿瘤治疗没有反应。

42. 根据权利要求41所述的方法,其中,所述预先治疗包括:全身的和/或局部的疗法,任选地为手术、放射疗法、冷冻疗法、激光疗法、局部疗法和/或全身疗法中的任一种或多种,例如,化学疗法、激素疗法、靶向药物、靶向化学疗法或免疫疗法中的任一种或多种。

43. 根据权利要求42所述的方法,其中,所述预先治疗包括PD-L1结合拮抗剂或PD-1结合拮抗剂,任选地其中,所述PD-1轴结合拮抗剂或所述PD-L1结合拮抗剂为抗体。

44. 根据权利要求42所述的方法,其中,所述预先治疗包括表皮生长因子受体拮抗剂,任选地为西妥昔单抗。

45. 根据权利要求42所述的方法,其中,所述预先治疗包括包含铂化合物的化学疗法,所述铂化合物任选地选自顺铂脂质体、顺铂、卡铂、奥沙利铂、奈达铂、四硝酸三铂、菲铂、赛特铂、吡铂。

46. 根据权利要求42所述的方法,其中,所述预先治疗包括包含化疗剂的化学疗法,所述化疗剂选自甲氨蝶呤、卡培他滨、紫杉烷、蒽环类药物、紫杉醇、多西他赛、紫杉醇蛋白结合颗粒、多柔比星、表柔比星、5-氟尿嘧啶、环磷酰胺、阿法替尼、长春新碱、依托泊苷或其组合。

47. 根据权利要求42所述的方法,其中,所述预先治疗包括包含化疗剂的化学疗法,所述化疗剂选自FEC:5-氟尿嘧啶、表柔比星、环磷酰胺;FAC:5-氟尿嘧啶、多柔比星、环磷酰胺;AC:多柔比星、环磷酰胺;EC:表柔比星、环磷酰胺。

48. 根据权利要求42所述的方法,其中,所述预先治疗包括索拉非尼、PD1或PD-L1拮抗剂或抑制剂、瑞戈非尼、卡博替尼、舒尼替尼、布立尼布、依维莫司、替万替尼、利尼伐尼或局部区域疗法中的任一种,所述局部区域疗法任选地选自化学和/或热经皮消融和动脉内化学栓塞疗法。

49. 根据权利要求42至48中任一项所述的方法,其中,所述受试者在自上次治疗后小于或等于12个月或者自上次治疗后小于或等于6个月复发时没有接受过预先治疗。

50. 根据权利要求42至48中任一项所述的方法,其中,所述受试者在自上次治疗后小于或等于12个月复发时或者自上次治疗后小于或等于6个月复发时没有接受过任何预先辅助疗法(例如,手术后放疗和/或化疗)或局部区域疗法。

51. 根据任一项前述权利要求所述的方法,其中,与安慰剂治疗相比,或与治疗前相比,或与未治疗相比,或与包含标准护理的治疗相比,所述治疗有效地延长或改善:

- (a) 无进展生存期,
- (b) 进展时间,
- (c) 缓解的持续时间,
- (d) 总生存期,
- (e) 客观缓解或客观缓解率,
- (f) 总体缓解或总体缓解率,
- (g) 部分缓解或部分缓解率,
- (h) 完全缓解或完全缓解率;
- (i) 疾病稳定率或中位疾病稳定;
- (j) 中位无进展生存期,

- (k) 中位进展时间,
- (l) 缓解的中位持续时间,或
- (m) 中位总生存期;
- (n) 中位客观缓解或中位客观缓解率,
- (o) 中位总体缓解或中位总体缓解率,
- (p) 中位部分缓解或中位部分缓解率,
- (q) 中位完全缓解或中位完全缓解,
- (r) 中位疾病稳定率或中位疾病稳定,

任选地其中,所述标准护理的治疗选自索拉非尼、PD1或PD-L1拮抗剂或抑制剂、瑞戈非尼、卡博替尼、舒尼替尼、布立尼布、依维莫司、替万替尼、利尼伐尼中的任一种。

## 癌症或肿瘤的治疗方法

### 技术领域

[0001] 本发明涉及一种治疗、预防或延缓受试者的癌症和/或肿瘤的进展的方法,特别是肝细胞癌(HCC)的治疗,包括向受试者施用一种治疗方案,该治疗方案包含有效量的修饰的免疫应答细胞,其表达或呈递具有结合至甲胎蛋白(Alpha Fetoprotein,AFP)或其抗原肽的性质的异源性T细胞受体(TCR)。

### 背景技术

[0002] 肝细胞癌(HCC)是全球第五大最常见的癌症形式,并且是癌症相关死亡的第三大最常见原因。该疾病常与肝硬化肝病密切相关。肝细胞癌是所有恶性肿瘤中报告的5年生存率最低的其中一种,全球年发病率为120万,并且可能随着乙型肝炎和丙型肝炎的流行而同时发生增加。

[0003] 手术切除目前被认为是标准的治疗策略,然而,这带来复发的高风险和肝硬化患者的肝功能代偿不全的额外风险。对于具有单个结节、良好的肝功能并且无潜在肝硬化(分类为Child-Pugh A类)的少数患者,切除术作为一种治疗选择受到限制,对于具有多种肿瘤的患者,切除术通常不被认为是一种选择。可替代的疗法(如射频消融(RFA))作为小肿瘤的一线治疗没有提供可辨别的优势。经动脉化疗栓塞术(Transarterial chemoembolization,TACE)目前被认为是用于具有中期HCC、具有代偿的肝功能(Child B,高达8个点)、具有大的单个结节(<5cm)或多病灶的HCC且无血管侵入或额外肝扩散的证据的患者的标准治疗。这是一种侵入性疗法,其阻止或减慢对组织或器官的血液供应。它能够用于阻止血液流向肿瘤,以试图导致癌细胞死亡。已经报道了TACE在15%-62%的患者中实现了部分响应,并且已经用于治疗中期HCC,其包括具有可变的肿瘤负荷和肝功能的异质性患者群体,即,Child-Pugh A类或一些B类,大多数为B类。放射性栓塞或选择性内部放射疗法(SIRT)也已被用作中期HCC的可替代的治疗选择。

[0004] 使用HCC发病机理常见的多种信号传导通路的小分子抑制剂,对晚期HCC和中期HCC测试了一般化学疗法和靶向全身化学疗法,该小分子抑制剂包括血管内皮生长因子(VEGF)、表皮生长因子、Ras丝裂原活化蛋白激酶(MAPK)、胰岛素样生长因子受体、肝细胞生长因子/c-MET、PI3K/PTEN/Akt/哺乳动物雷帕霉素靶蛋白(mTOR)和Wnt/ $\beta$ -连环蛋白通路。相关的试验治疗化合物包括:舒尼替尼(Sunitinib,靶向VEGFR和PDGFR的多激酶阻断剂)、布立尼布(Brivanib,成纤维细胞生长因子受体和VEGFR的选择性抑制剂)、依维莫司(Everolimus,mTOR的抑制剂)、替万替尼(Tivantinib,MET受体酪氨酸激酶抑制剂)、利尼伐尼(Linifanib,靶向VEGFR和PDGFR的多激酶抑制剂)和索拉非尼(Sorafenib,Ras/MAPK通路的抑制剂),以及许多细胞表面酪氨酸(VEGF受体、血小板衍生生长因子受体-(PDGFR-) $\beta$ 、RET、c-KIT和FMS样酪氨酸激酶-3)。使用PD1抑制剂的免疫疗法也已经对HCC进行了试验。此外,瑞戈非尼(Regorafenib)表现出双重靶向VEGFR2-TIE2酪氨酸激酶抑制作用,卡博替尼(Cabozantinib)为酪氨酸激酶c-Met和VEGFR2的抑制剂,并且还抑制AXL和RET。

[0005] 因此,希望提供一种用于肿瘤和/或癌症治疗的疗法,如HCC的治疗,该疗法是癌症

特异性的,能够治疗中期或晚期癌症或单个或多个实体肿瘤,特别是在初次治疗或手术后出现失败或复发的情况下,还优选在该疗法最小化或降低毒性或副作用(例如,化疗剂的全身毒性的风险)的情况下。

[0006] 本发明涉及并举例说明了受试者中癌症和/或肿瘤的治疗,包括向受试者施用一种治疗方案,所述治疗方案包含有效量的修饰的T细胞,其表达或呈递具有结合至AFP并且特别是特异性结合至FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1) 的性质的异源性T细胞受体 (TCR)。

[0007] AFP在胎儿发育的过程中表达,是胎儿血清的主要成分。在发育过程中,蛋白质由卵黄囊和肝脏以非常高的水平产生,然后被抑制。AFP表达在肝细胞癌中经常被再活化,并且高水平的该蛋白质被用作疾病的诊断标志物。存在四种已知的来源于AFP的表位:AFP158 (SEQ ID NO:51的残基158-166)、AFP137 (SEQ ID NO:51的残基137-145)、AFP325 (SEQ ID NO:51的残基325-334) 以及AFP542 (SEQ ID NO:51的残基542-550)。特别是,HLA-A2限制性AFP158肽FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1) 为新的免疫治疗干预提供了合适的靶标;这种肽是天然处理的,并且已经从肝癌细胞系中分离出来。

## 发明内容

[0008] 根据本发明的第一方面,提供了一种治疗、预防或延缓受试者的癌症和/或肿瘤的进展的方法,包括向受试者施用一种治疗方案,所述治疗方案包含有效量的修饰的免疫应答细胞,其表达或呈递结合至甲胎蛋白或其AFP抗原肽的异源性T细胞受体 (TCR)。

[0009] 根据本发明,TCR可以结合甲胎蛋白或其抗原肽,例如SEQ ID NO:51的人类甲胎蛋白或甲胎蛋白或其抗原肽。TCR可以结合至抗原肽,其包含:

[0010] (a) SEQ ID NO:51的残基158-166 (AFP158),

[0011] (b) SEQ ID NO:51的残基137-145 (AFP137),

[0012] (c) SEQ ID NO:51的残基325-334 (AFP325),

[0013] (d) SEQ ID NO:51的残基542-550 (AFP542),或

[0014] (e) 残基FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1)。

[0015] 特异性结合TCR

[0016] 根据本发明,异源性TCR和包含异源性T细胞受体 (TCR) 的修饰的免疫应答细胞可以结合至或以高亲和力结合至和/或特异性地和/或选择性地结合癌症和/或肿瘤抗原或其肽抗原,例如甲胎蛋白或其肽抗原。

[0017] 根据本发明,异源性TCR可以结合至或特异性地和/或选择性地结合至与癌性病征、肿瘤和/或癌症相关的和/或由肿瘤或癌细胞或组织呈递的甲胎蛋白或其肽抗原。

[0018] 根据本发明,癌性病征、肿瘤和/或癌症和/或肿瘤为表达AFP的癌症和/或肿瘤,或表达其肽抗原。

[0019] 因此,根据本发明使用的异源性TCR能够特异性地结合至,和/或以高亲和力结合至,和/或选择性地结合至AFP、其肽抗原或包含序列FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1) 的肽抗原,任选地与肽呈递分子复合,例如与主要组织相容性复合体 (MHC) 或HLA复合,任选地为I类或II类,例如与HLA-A2,或选自HLA-A\*02:01、HLA-A\*02:02、HLA-A\*02:03、HLA-A\*02:04、HLA-A\*02:05、HLA-A\*02:06、HLA-A\*02:642或HLA-A\*02:07,优选HLA-A\*02:01或HLA-A\*02:642。

[0020] 可替代地,异源性T细胞受体 (TCR) 和包含异源性T细胞受体 (TCR) 的修饰的免疫应

答细胞可以结合至或特异性地和/或选择性地结合至和/或以高亲和力结合至内源性表达的肿瘤细胞表面甲胎蛋白或其肽抗原,任选地其中,该结合不依赖于细胞表面抗原作为与肽呈递或抗原呈递分子的复合物的呈递,所述分子例如主要组织相容性复合体(MHC)或人类白细胞抗原(HLA)或主要组织相容性复合体类别相关的蛋白(MR)1。因此,根据本发明使用的异源性TCR能够特异性地和/或选择性地结合至和/或以高亲和力结合至AFP、其肽抗原或包含序列FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1)的肽抗原,而不与肽呈递分子复合呈递。

[0021] 特异性描述了异源性TCR与特异性靶标癌和/或肿瘤抗原或其肽抗原之间的结合强度,并且可以通过解离常数 $K_d$ 来描述, $K_d$ 为受体-配体系统的结合状态与未结合状态之间的比率。此外,异源性TCR可以结合的不同癌症和/或肿瘤抗原或其肽抗原越少,其结合特异性就越大。因此,异源性TCR可以任选地以高亲和力结合至少于10、9、8、7、6、5、4、3、2种不同的癌症和/或肿瘤抗原或其肽抗原。

[0022] 根据本发明,异源性TCR可以结合或特异性地结合,或以高亲和力结合,解离常数为 $0.01\mu\text{M}$ 至 $100\mu\text{M}$ , $0.01\mu\text{M}$ 至 $50\mu\text{M}$ , $0.01\mu\text{M}$ 至 $20\mu\text{M}$ , $0.05\mu\text{M}$ 至 $10\mu\text{M}$ , $0.05\mu\text{M}$ 至 $20\mu\text{M}$ ,或者为 $0.01\mu\text{M}$ 、 $0.02\mu\text{M}$ 、 $0.03\mu\text{M}$ 、 $0.04\mu\text{M}$ 、 $0.05\mu\text{M}$ 、 $0.06\mu\text{M}$ 、 $0.07\mu\text{M}$ 、 $0.08\mu\text{M}$ 、 $0.09\mu\text{M}$ 、 $0.1\mu\text{M}$ 、 $0.15\mu\text{M}$ 、 $0.2\mu\text{M}$ 、 $0.25\mu\text{M}$ 、 $0.3\mu\text{M}$ 、 $0.35\mu\text{M}$ 、 $0.4\mu\text{M}$ 、 $0.45\mu\text{M}$ 、 $0.5\mu\text{M}$ 、 $0.55\mu\text{M}$ 、 $0.6\mu\text{M}$ 、 $0.65\mu\text{M}$ 、 $0.7\mu\text{M}$ 、 $0.75\mu\text{M}$ 、 $0.8\mu\text{M}$ 、 $0.85\mu\text{M}$ 、 $0.9\mu\text{M}$ 、 $0.95\mu\text{M}$ 、 $1.0\mu\text{M}$ 、 $1.5\mu\text{M}$ 、 $2.0\mu\text{M}$ 、 $2.5\mu\text{M}$ 、 $3.0\mu\text{M}$ 、 $3.5\mu\text{M}$ 、 $4.0\mu\text{M}$ 、 $4.5\mu\text{M}$ 、 $5.0\mu\text{M}$ 、 $5.5\mu\text{M}$ 、 $6.0\mu\text{M}$ 、 $6.5\mu\text{M}$ 、 $7.0\mu\text{M}$ 、 $7.5\mu\text{M}$ 、 $8.0\mu\text{M}$ 、 $8.5\mu\text{M}$ 、 $9.0\mu\text{M}$ 、 $9.5\mu\text{M}$ 或 $10.0\mu\text{M}$ ;或者为 $10\mu\text{M}$ 至 $1000\mu\text{M}$ , $10\mu\text{M}$ 至 $500\mu\text{M}$ , $50\mu\text{M}$ 至 $500\mu\text{M}$ ,或者为 $10\mu\text{M}$ 、 $20\mu\text{M}$ 、 $30\mu\text{M}$ 、 $40\mu\text{M}$ 、 $50\mu\text{M}$ 、 $60\mu\text{M}$ 、 $70\mu\text{M}$ 、 $80\mu\text{M}$ 、 $90\mu\text{M}$ 、 $100\mu\text{M}$ 、 $150\mu\text{M}$ 、 $200\mu\text{M}$ 、 $250\mu\text{M}$ 、 $300\mu\text{M}$ 、 $350\mu\text{M}$ 、 $400\mu\text{M}$ 、 $450\mu\text{M}$ 或 $500\mu\text{M}$ ;任选地用表面等离子体共振测量,任选地在 $25^\circ\text{C}$ ,任选地在6.5和6.9之间或7.0和7.5之间的pH。解离常数 $K_D$ 或 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 可以通过实验测量解离速率常数 $k_{\text{off}}$ 与结合速率常数 $k_{\text{on}}$ 来确定。可以使用可溶形式的TCR测量TCR解离常数,其中,TCR包含TCR $\alpha$ 链可变结构域和TCR $\beta$ 链可变结构域。

[0023] 根据本发明,异源性TCR可以以0.01至0.05秒、0.05至0.1秒、0.1至0.5秒、0.5至1.0秒、1至1.5秒、1.5至2秒或2至2.5秒的半衰期( $T_{1/2}$ )结合或特异性地结合。

[0024] 根据本发明,TCR可以具有结合包含序列FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1)的肽抗原与HLA-A2的复合物的特性,并且可以具有约 $1\mu\text{M}$ 至约 $21\mu\text{M}$ 的复合物的 $K_D$ 和/或具有约或小于0.5秒至约2秒范围内的复合物的结合半衰期( $T_{1/2}$ )。可以理解的是,将TCR的亲和力加倍导致 $K_D$ 减半。 $T_{1/2}$ 计算为 $\ln 2$ 除以解离速率( $k_{\text{off}}$ )。因此, $T_{1/2}$ 加倍导致 $k_{\text{off}}$ 减半。TCR的 $K_D$ 和 $k_{\text{off}}$ 值通常针对TCR的可溶形式测量,即被截短以去除细胞质和跨膜结构域残基的那些形式。在优选的实施方式中,使用表面等离子体共振(BIAcore)进行这些测量。 $K_D$ 可以通过实验测量解离速率常数 $k_{\text{off}}$ 与结合速率常数 $k_{\text{on}}$ 来确定。平衡常数 $KD$ 计算为 $k_{\text{off}}/k_{\text{on}}$ 。

[0025] 根据本发明,与密切相关的癌症和/或肿瘤抗原或其肽抗原序列相比,TCR结合对于甲胎蛋白或其肽抗原可以是选择性的。密切相关的癌症和/或肿瘤抗原或肽抗原序列可以具有相似或相同的长度和/或可以具有相似数量或相同数量的氨基酸残基。密切相关的肽抗原序列可以共享50%或60%或70%或80%或90%至95%或98%的同一性,优选80%至90%的同一性和/或可以相差1、2、3或4个氨基酸残基。密切相关的肽序列可以来源于序列FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1)的多肽序列。优选地,与密切相关的抗原或其肽抗原序列相比,对于甲胎蛋白或其肽抗原,TCR结合至少紧密10、20、30、40、50、60、70、80、90、100、250、500、

750、1000、2500、5000、7500或10000倍。

[0026] 选择性结合表示,与另一种相比,异源性TCR以更大的亲和力结合至一种癌症和/或肿瘤抗原或其肽抗原。选择性结合由与异源性TCR的复合物中一种配体抗原代替另一种配体抗原的平衡常数表示。

[0027] 根据本发明,修饰的免疫应答细胞,例如修饰的T细胞,可以被修饰以表达异源性TCR,与缺乏异源性TCR或具有可替代的异源性TCR的免疫应答细胞相比,其以增加的特异性、和/或选择性和/或亲和力结合至癌症和/或肿瘤抗原或其肽抗原,例如结合至AFP、其肽抗原或包含序列FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1)的AFP肽抗原。

[0028] 结合亲和力可以通过平衡方法(例如,酶联免疫吸附测定(ELISA)或放射免疫测定(RIA))或动力学(例如,BIACORE™分析)来确定。TCR结合也可以具有高亲合力,其中亲合力是在多个位点的两个分子彼此结合强度的总和,例如,考虑到相互作用的化合价。根据本发明,与缺乏异源性TCR或具有可替代的异源性TCR的免疫应答细胞相比,免疫应答细胞可以表现出对癌症和/或肿瘤抗原或其肽抗原,或由癌细胞和/或组织的肿瘤呈递并被异源性TCR识别的癌症和/或肿瘤抗原或其肽抗原的改善的亲和力(affinity)和/或亲合力(avidity)。

[0029] 根据本发明,修饰的免疫应答细胞,例如修饰的T细胞,可以被修饰以表达异源性TCR,其结合至或特异性地结合至患有疾病病症或癌性病症、癌症和/或肿瘤的受试者、患者或癌症患者的肿瘤细胞和/或组织和/或癌细胞和/或组织。随后,可以用根据本发明的修饰的免疫应答细胞或修饰的T细胞或其群体来治疗受试者、患者或癌症患者。根据本发明用修饰的免疫应答细胞或修饰的T细胞治疗的合适的癌症患者可以通过一种方法鉴定,该方法包括:从具有肿瘤和/或癌症的个体或受试者获得肿瘤和/或癌细胞的样本;并且,将癌细胞鉴定为结合至修饰的免疫应答细胞表达的TCR。

[0030] 根据本发明,异源性TCR可以结合和/或特异性地结合和/或选择性地结合肽呈递分子,例如,呈递或展示癌症和/或肿瘤抗原或其肽抗原(即癌症和/或肿瘤抗原的肽片段)的HLA (pHLA),其中,HLA对应于MHC I类(A、B和C),它们都是HLA I类或其特定等位基因,或HLA对应于MHC II类(DP、DM、DO、DQ和DR)或其特定等位基因,优选地,HLA为I类,优选地,等位基因为HLA-A\*02:01、HLA-A\*02:02、HLA-A\*02:03、HLA-A\*02:04、HLA-A\*02:05、HLA-A\*02:06、HLA-A\*02:642或HLA-A\*02:07,优选HLA-A\*02:01或HLA-A\*02:642。可替代地,异源性TCR可以结合和/或特异性地结合和/或选择性地结合癌症和/或肿瘤抗原或其肽抗原,例如AFP或其肽抗原,其不是由HLA呈递或展示的。

[0031] 优选地,异源性TCR不是由免疫应答细胞自然表达的(即,TCR为外源性的或异源性的)。异源性TCR可以包括 $\alpha\beta$ TCR异源二聚体(heterodimer)。异源性TCR可以是重组的或合成的或人工的TCR,即自然界中不存在的TCR。例如,可以对异源性TCR进行工程化以增加其对特定癌症和/或肿瘤抗原或其肽抗原的亲和力或亲合力(即,亲和力增强的TCR或特定肽增强的亲和力受体(SPEAR)TCR)。亲和力增强的TCR或(SPEAR)TCR可以包含相对于天然存在的TCR的一种或多种突变,例如,TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 链的可变区的高变互补决定区(hypervariable complementarity determining region,CDR)中的一种或多种突变。这些突变可以增加TCR对MHC的亲和力,该MHC任选地在由肿瘤和/或癌细胞表达时展示肿瘤抗原的肽片段。产生亲和力增强的或成熟的TCR的合适方法包括使用噬菌体或酵母展示筛选TCR突变体的文库,并

且是本领域众所周知的(例如,参见Robbins等人的J Immunol (2008) 180 (9) :6116;San Miguel等人的(2015)Cancer Cell 28 (3) 281-283;Schmitt等人的(2013)Blood122 348-256;Jiang等人的(2015)Cancer Discovery 5 901)。优选的亲合力增强的TCR可以结合至表达甲胎蛋白(AFP)或AFP的肽抗原或包含FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1) 或来源于甲胎蛋白(AFP) SEQ ID NO:51的残基158-166的AFP的肽抗原的肿瘤和/或癌细胞。

[0032] 亲本TCR

[0033] 根据本发明,异源性TCR可以是AFP TCR,其可以包含SEQ ID NO:2的 $\alpha$ 链参考氨基酸序列或其变体和/或SEQ ID NO:3的 $\beta$ 链参考氨基酸序列或其变体。变体可以具有与参考氨基酸序列具有至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。TCR可以由SEQ ID NO:21的 $\alpha$ 链参考核苷酸序列或其变体和SEQ ID NO:22的 $\beta$ 链参考核苷酸序列或其变体编码。变体可以具有与参考核苷酸序列具有至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的核苷酸序列。

[0034] 根据本发明,异源性TCR可以包含TCR $\alpha$ 链可变结构域和TCR $\beta$ 链可变结构域,其中:

[0035] (i)  $\alpha$ 链可变结构域包含具有以下序列的CDR:

[0036] **DRGSQS** ( $\alpha$ CDR1), SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:2的氨基酸27-32,或与其具有至少50%序列同一性的序列,

[0037] **IYSNGD** ( $\alpha$ CDR2), SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:2的氨基酸50-55,或与其具有至少50%序列同一性的序列,以及

[0038] **AVNSDSGYALNF** ( $\alpha$ CDR3), SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:2的氨基酸90-101,或与其具有至少50%序列同一性的序列;以及

[0039] (ii)  $\beta$ 链可变结构域包含具有以下序列的CDR:

[0040] **SGDLS** ( $\beta$ CDR1), SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:3的氨基酸27-31,或与其具有至少50%序列同一性的序列,

[0041] **YINGEE** ( $\beta$ CDR2), SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:3的氨基酸49-54,或与其具有至少50%序列同一性的序列,以及

[0042] **ASSLGGESEQY** ( $\beta$ CDR3), SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:3的氨基酸92-102,或与其具有至少50%序列同一性的序列;任选地,序列同一性可以是至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%的序列同一性中的任一个,任选地是100%的序列同一性。

[0043] 根据本发明,异源性TCR可以包含TCR $\alpha$ 链可变结构域和TCR $\beta$ 链可变结构域,其中:

[0044] (i)  $\alpha$ 链可变结构域包含具有以下序列的CDR:

[0045] **DRGSQS** ( $\alpha$ CDR1), SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:2的氨基酸27-32,

[0046] **IYSNGD** ( $\alpha$ CDR2), SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:2的氨基酸50-55,以及

[0047] **AVNSDSGYALNF** ( $\alpha$ CDR3), SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:2的氨基酸90-101,以

及

[0048] (ii)  $\beta$ 链可变结构域包含具有以下序列的CDR:

[0049] **SGDLS** ( $\beta$ CDR1), SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:3的氨基酸27-31,

[0050] **YYNGEE** ( $\beta$ CDR2), SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:3的氨基酸49-54,以及

[0051] **ASSLGGESEQY** ( $\beta$ CDR3), SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:3的氨基酸92-102。

[0052] 因此,异源性TCR可以包含TCR,其中 $\alpha$ 链可变结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸残基1-112的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列,和/或 $\beta$ 链可变结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸残基1-112的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性的氨基酸序列。根据本发明,异源性TCR可以包含 $\alpha$ 链和/或 $\beta$ 链,任选地其中, $\alpha$ 链可变结构域包含与SEQ ID NO:2的氨基酸残基1-112的序列具有至少80%或90%同一性的氨基酸序列,和/或 $\beta$ 链可变结构域包含与SEQ ID NO:3的氨基酸残基1-112的序列具有至少80%或90%同一性的氨基酸序列。因此, $\alpha$ 链可变结构域可以与SEQ ID NO:2的氨基酸残基1-112具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性,和/或 $\beta$ 链可变结构域可以与SEQ ID NO:3的氨基酸残基1-112具有至少91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的序列同一性。

[0053] 根据本发明,异源性TCR可以包含TCR,其中, $\alpha$ 链可变结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸残基1-112, $\beta$ 链可变结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸残基1-112。

[0054] 根据本发明,异源性TCR可以包含包括 $\alpha$ 链TRAC恒定结构域序列和/或 $\beta$ 链TRBC1或TRBC2恒定结构域序列的TCR。SEQ ID NO:2和3分别是本文称为“亲本”AFP TCR的 $\alpha$ 链和 $\beta$ 链细胞外序列。亲本AFP TCR具有以下 $\alpha$ 和 $\beta$ 链用途: $\alpha$ 链:TRAV12-2\*02/TRAJ41\*01/TRAC(亲本AFP TCR $\alpha$ 链的细胞外序列在图1的SEQ ID NO:2中给出。CDR由SEQ ID NO:2的氨基酸27-32(CDR1)、氨基酸50-55(CDR2)和氨基酸90-101(CDR3)定义; $\beta$ 链:TRBV9\*01/TRBD2/TRBJ2-7\*01/TRBC2(亲本AFP TCR $\beta$ 链的细胞外序列在图2(SEQ ID NO:3)中给出。CDR由SEQ ID NO:3的氨基酸27-31(CDR1)、氨基酸49-54(CDR2)和氨基酸92-102(CDR3)定义。术语“\*01”和“\*02”表示该序列存在多于一个等位基因变体,由IMGT命名法指定,并且它是存在于上述TCR克隆中的\*01/\*02变体。没有“\*”限定符意味着相关序列只有一个等位基因是已知的。

[0055] 术语“亲本TCR”在本文中用于指分别包含SEQ ID NO:2和3的氨基酸1-112的AFP TCR $\alpha$ 链和AFP TCR $\beta$ 链的TCR。希望提供相对于亲本TCR突变的或修饰的TCR,其对肽-HLA复合物具有与亲本TCR相同、等效或比亲本TCR更高的亲和力和/或与亲本TCR相同、等效或比亲本TCR更慢的解离速率。根据本发明,相对于亲本TCR,异源性TCR在 $\alpha$ 链可变结构域和/或 $\beta$ 链可变结构域中可以具有多于一个突变,并且可以表示为“工程化的TCR”或“突变体TCR”。这些突变可以改善对AFP或其肽抗原的结合亲和力和/或特异性和/或选择性和/或亲合力。在某些实施例中, $\alpha$ 链可变结构域中存在1、2、3、4、5、6、7或8个突变,例如4或8个突变,和/或 $\beta$ 链可变结构域中存在1、2、3、4或5个突变,例如5个突变。在一些实施方式中,本发明的TCR的 $\alpha$ 链可变结构域可以包含与SEQ ID NO:2的氨基酸1-112的氨基酸残基的序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。在一些实施方式中,本发明的TCR的 $\beta$ 链可变结构域可以

包含与SEQ ID NO:3的氨基酸1-112的氨基酸残基的序列具有至少90%、至少91%、至少92%、至少93%、至少94%、至少95%、至少96%、至少97%、至少98%或至少99%同一性的氨基酸序列。

[0056] 根据本发明,TCR可以包含这样的TCR,其中, $\alpha$ 链可变结构域包含SEQ ID NO:2的氨基酸残基1-112的氨基酸序列,或一种氨基酸序列,其中,其氨基酸残基1-26、33-49、56-89和102-112分别与SEQ ID NO:2的氨基酸残基1-26、33-49、56-89和102-112的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性,和/或其中,氨基酸残基27-32、50-55、90-101、CDR 1、CDR 2、CDR 3分别与SEQ ID NO:2的氨基酸残基27-32、50-55、90-101、CDR 1、CDR 2、CDR 3的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、96%、97%、98%或99%的同一性。

[0057] 根据本发明,该TCR可以包含这样的TCR,其中,在 $\alpha$ 链可变结构域中:

[0058] (i) 其氨基酸残基1-26的序列可以 (a) 与SEQ ID NO:2的氨基酸残基1-26的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,或 (b) 相对于SEQ ID NO:2的残基1-26可以具有一个、两个或三个氨基酸残基插入或缺失,

[0059] (ii) 氨基酸残基27-32的序列是 **DRGSQS** ( $\alpha$ CDR1),SEQ ID NO:29或SEQ ID NO:2的氨基酸27-32,

[0060] (iii) 其氨基酸残基33-49的序列可以 (a) 与SEQ ID NO:2的氨基酸残基33-49的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,或 (b) 相对于SEQ ID NO:2的氨基酸残基33-49的序列可以具有一个、两个或三个氨基酸残基插入或缺失,

[0061] (iv) 氨基酸残基50-55的序列可以是 **IYSNGD**( $\alpha$ CDR2),SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:2的氨基酸50-55,

[0062] (v) 其氨基酸残基56-89的序列可以与SEQ ID NO:2的氨基酸残基56-89的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,或相对于SEQ ID NO:2的氨基酸残基56-89的序列可以具有一个、两个或三个插入、缺失或替换,

[0063] (vi) 氨基酸90-101的序列可以是 **AVNSDSGYALNF** ( $\alpha$ CDR3),SEQ ID NO:31或SEQ ID NO:2的氨基酸90-101,

[0064] (vii) 其氨基酸残基102-112的序列可以与SEQ ID NO:2的氨基酸残基102-112的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,或相对于SEQ ID NO:2的氨基酸残基102-112的序列可以具有一个、两个或三个插入、缺失或替换。

[0065] 根据本发明,该TCR可以包含一种TCR,其中, $\beta$ 链可变结构域包含SEQ ID NO:3的氨基酸残基1-112的氨基酸序列,或一种氨基酸序列,其中,其氨基酸残基1-26、32-48、55-91、103-112分别与SEQ ID NO:3的氨基酸残基1-26、32-48、55-91、103-112的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,并且其中,氨基酸残基27-31、49-54和92-102分别与SEQ ID NO:3的氨基酸残基27-31、49-54和92-102、 $\beta$ CDR1、 $\beta$ CDR2、 $\beta$ CDR3的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性。

[0066] 根据本发明,该TCR可以包含这样的TCR,其中,在 $\beta$ 链可变结构域中:

[0067] (i) 其氨基酸残基1-26的序列可以 (a) 与SEQ ID NO:3的氨基酸残基1-26的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,或 (b) 相对于SEQ ID NO:3的残基1-26

可以具有一个、两个或三个氨基酸残基插入或缺失，

[0068] (ii) 氨基酸残基27-31的序列是 **SGDLS** ( $\beta$ CDR1)，SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:3的氨基酸27-31，

[0069] (iii) 其氨基酸残基32-48的序列可以 (a) 与SEQ ID NO:3的氨基酸残基32-48的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性，或 (b) 相对于SEQ ID NO:3的氨基酸残基32-48的序列可以具有一个、两个或三个氨基酸残基插入或缺失，

[0070] (iv) 氨基酸残基49-54的序列可以是 **YNGEE** ( $\beta$ CDR2)，SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:3的氨基酸49-54，

[0071] (v) 其氨基酸残基55-91的序列可以与SEQ ID NO:3的氨基酸残基55-91的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性，或相对于SEQ ID NO:3的氨基酸残基55-91的序列可以具有一个、两个或三个插入、缺失或替换，

[0072] (vi) 氨基酸92-102的序列可以是 **ASSLGGESEQY** ( $\beta$ CDR3)，SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:3的氨基酸92-102，

[0073] (vii) 其氨基酸残基103-112的序列可以与SEQ ID NO:3的氨基酸残基103-112的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性，或相对于SEQ ID NO:3的氨基酸残基103-112的序列可以具有一个、两个或三个插入、缺失或替换。

[0074] 根据本发明，异源性TCR可以包含这样的TCR，其中， $\alpha$ 链包含SEQ ID NO:49的氨基酸残基，并且 $\beta$ 链可变结构域包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:50的氨基酸残基。

[0075] 突变体TCR

[0076] 本发明的实施方式包括相对于亲本AFP TCR突变的TCR。

[0077] 根据本发明，异源性TCR可以包含：

[0078] a. 具有序列DRGSQA (SEQ ID NO:35) 的 $\alpha$ CDR1；

[0079] b. 具有序列AVNSDSSYALNF (SEQ ID NO:36) 的 $\alpha$ CDR2；

[0080] c. 具有序列AVNSDSGVALNF (SEQ ID NO:37) 的 $\alpha$ CDR2；

[0081] d. 具有序列DRGSQA (SEQ ID NO:35) 的 $\alpha$ CDR1和具有序列AVNSDSGVALNF (SEQ ID NO:37) 的 $\alpha$ CDR2；

[0082] e. 具有序列AVNSQSGYALNF (SEQ ID NO:38) 的 $\alpha$ CDR2；

[0083] f. 具有序列AVNSQSGYSLNF (SEQ ID NO:39) 的 $\alpha$ CDR2；

[0084] g. 具有序列AVNSQSSYALNF (SEQ ID NO:43) 的 $\alpha$ CDR2；

[0085] h. 具有序列DRGSQA (SEQ ID NO:35) 的 $\alpha$ CDR1和具有序列AVNSQSGYALNF (SEQ ID NO:38) 的 $\alpha$ CDR2；

[0086] i. 具有序列AVNSQSGVALNF (SEQ ID NO:39) 的 $\alpha$ CDR2；

[0087] j. 具有序列AVNSQNGYALNF (SEQ ID NO:40) 的 $\alpha$ CDR2；

[0088] k. 具有序列DRGSFS (SEQ ID NO:41) 的 $\alpha$ CDR1；

[0089] l. 具有序列DRGSYS (SEQ ID NO:42) 的 $\alpha$ CDR1；

[0090] m. 具有序列DRGSYS (SEQ ID NO:42) 的 $\alpha$ CDR1和具有序列AVNSDSSYALNF (SEQ ID NO:36) 的 $\alpha$ CDR2；

[0091] n. 具有序列DRGSYS (SEQ ID NO:42) 的 $\alpha$ CDR1和具有序列AVNSDSSYALNF (SEQ ID NO:36) 的 $\alpha$ CDR2，或

[0092] o.具有序列DRGSYS (SEQ ID NO:42)的 $\alpha$ CDR1和具有序列AVNSQSGYALNF (SEQ ID NO:38)的 $\alpha$ CDR2。

[0093] 根据本发明,异源性TCR或突变的TCR可以包含 $\alpha$ 链可变结构域,其包括在对应于根据SEQ ID NO:2中所示的编号31Q、32S、94D、95S、96G、97Y和98A的一个或多个氨基酸中的突变。例如, $\alpha$ 链可变结构域可以具有以下一种或多种突变:根据图1 (SEQ ID NO:2)所示的编号的Q31F/Y、S32A、D94Q、S95N、G96S、Y97V、A98S。

[0094] 因此, $\alpha$ 链可变结构域可以包含与SEQ ID NO:6、SEQ ID NO:7、SEQ ID NO:8、SEQ ID NO:9、SEQ ID NO:10、SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12、SEQ ID NO:13、SEQ ID NO:14、SEQ ID NO:15、SEQ ID NO:16、SEQ ID NO:17、SEQ ID NO:18、SEQ ID NO:19和SEQ ID NO:20中的任一个的残基1-112具有至少90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%或100%的同一性的氨基酸序列,任选地其中,该氨基酸序列还与SEQ ID NO:2的残基1-112具有至少90%的同一性。图5中加下划线的SEQ ID NO:6-20的氨基酸可以是不变的。

[0095] 因此,异源性TCR可以包括包含SEQ ID NO:11、SEQ ID NO:12或SEQ ID NO:13的Q1至H112的 $\alpha$ 链可变结构域,和/或包含SEQ ID NO:3的D1至T112的 $\beta$ 链可变结构域。

[0096] 根据本发明,异源性TCR可以包含TCR $\alpha$ 链可变结构域和TCR $\beta$ 链可变结构域,其中:

[0097] (i)  $\alpha$ 链可变结构域包含具有以下序列的CDR:

[0098] **DRGSQA** ( $\alpha$ CDR1), SEQ ID NO:35或SEQ ID NO:49的氨基酸27-32,

[0099] **IYSNGD** ( $\alpha$ CDR2), SEQ ID NO:30或SEQ ID NO:2的氨基酸50-55,以及

[0100] **AVNSQSGYALNF** ( $\alpha$ CDR3), SEQ ID NO:38或SEQ ID NO:49的氨基酸90-101, 以及

[0101] (ii)  $\beta$ 链可变结构域包含具有以下序列的CDR:

[0102] **SGDLS** ( $\beta$ CDR1), SEQ ID NO:32或SEQ ID NO:3的氨基酸27-31,

[0103] **YYNGEE** ( $\beta$ CDR2), SEQ ID NO:33或SEQ ID NO:3的氨基酸49-54, 以及

[0104] **ASSLGGESEQY** ( $\beta$ CDR3), SEQ ID NO:34或SEQ ID NO:3的氨基酸92-102。

[0105] 根据本发明,异源性TCR可以包含TCR,其中, $\alpha$ 链可变结构域包含SEQ ID NO:49的氨基酸残基1-112,并且 $\beta$ 链可变结构域包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:50的氨基酸残基1-112。

[0106] 根据本发明,异源性TCR可以包含TCR,其中, $\alpha$ 链包含SEQ ID NO:49的氨基酸残基, 并且 $\beta$ 链可变结构域包含SEQ ID NO:3或SEQ ID NO:50的氨基酸残基1-112。

[0107] 可溶性TCR

[0108] 为了针对可以比较本发明的突变TCR的结合属性提供参考TCR的目的,使用具有图3 (SEQ ID NO:4)中给出的AFP TCR $\alpha$ 链的细胞外序列和图4 (SEQ ID NO:5)中给出的AFP TCR  $\beta$ 链的细胞外序列的可溶性TCR是方便的。该TCR在本文中被称为“参考TCR”或“参考AFP TCR”。应当注意的是,除了C159已替换T159(即TRAC的T48)之外,SEQ ID NO:4与亲本 $\alpha$ 链细胞外序列SEQ ID NO:2相同。类似地,除了C169已替换S169(即TRBC2的S57),A187已替换C187,以及D201已替换N201之外,SEQ ID NO:5与亲本 $\beta$ 链细胞外序列SEQ ID NO:3相同。相对于亲本AFP $\alpha$ 和 $\beta$ 链细胞外序列的这些半胱氨酸替换能够形成稳定重折叠的可溶性TCR的链间二硫键,即通过重折叠细胞外 $\alpha$ 和 $\beta$ 链形成的TCR。使用稳定的二硫键连接的可溶性TCR

作为参考TCR能够更方便地评估结合亲和力与结合半衰期。

[0109] 因此,根据本发明的异源性TCR可以包含 $\alpha$ 和/或 $\beta$ 链恒定结构域序列,其通过截短或替换修饰以删除TRAC的外显子2的Cys4与TRBC1或TRBC2的外显子2的Cys2之间的天然二硫键;或其中,通过用半胱氨酸残基替换TRAC的Thr 48和TRBC1或TRBC2的Ser 57来修饰 $\alpha$ 和/或 $\beta$ 链恒定结构域序列,半胱氨酸在TCR的 $\alpha$ 与 $\beta$ 恒定结构域之间形成二硫键。

[0110] 变体TCR

[0111] 同样在本发明范围内的是本文公开的任何TCR的表型沉默变体。如本文所使用的,术语“表型沉默变体”被理解是指对AFP肽抗原具有 $K_D$ 和/或结合半衰期的那些TCR,例如FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1),任选地作为在上文详述的 $K_D$ 和结合半衰期范围内的HLA-A2复合物。例如,如本领域技术人员所已知的,与以上详述的那些相比,可以产生在其恒定和/或可变结构域中掺入变化而不改变与AFP肽抗原相互作用的亲和力的TCR,例如FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1),任选地作为HLA-A2复合物。这种平常的(trivial)变体包括在本发明的范围内。其中进行了一个或多个保守替换的那些TCR也构成了本发明的一部分。

[0112] 氨基酸和核苷酸序列同一性通常根据算法GAP (GCG Wisconsin Package<sup>TM</sup>, Accelrys, San Diego CA) 定义。GAP使用Needleman&Wunsch算法(J.Mol.Biol. (48):444-453 (1970)) 来比对最大化匹配数并最小化空位数的两个完整的序列。通常,使用默认参数,空位创建罚分=12,并且空位扩展罚分=4。使用GAP可以是优选的,但也可以使用其他算法,例如BLAST、psiBLAST或TBLASTN(其使用Altschul et al. (1990) J.Mol.Biol.215:405-410的方法)、FASTA(其使用Pearson和Lipman (1988) PNAS USA 85:2444-2448的方法)或Smith-Waterman算法(Smith和Waterman (1981) J.Mol Biol.147:195-197),通常采用默认参数。

[0113] 特定氨基酸序列变体可以通过插入、添加、替换或缺失1个氨基酸、2、3、4、5-10、10-20或20-30个氨基酸而不同于参考序列。在一些实施方式中,变体序列可以包含具有1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个插入、缺失或替换的残基的参考序列。例如,高达15个、高达20个、高达30个或高达40个残基可以被插入、缺失或替换。

[0114] 在本发明的一些优选实施方式中,变体TCR可以通过1、2、3、4、5、6、7、8、9、10个或更多个保守替换而不同于参考TCR序列。保守替换涉及用具有相似性质的不同氨基酸替换氨基酸。例如,一个脂肪族残基可以被另一个脂肪族残基替换,一个非极性残基可以被另一个非极性残基替换,一个酸性残基可以被另一个酸性残基替换,一个碱性残基可以被另一个碱性残基替换,一个极性残基可以被另一个极性残基替换,或者一个芳香族残基可以被另一个芳香族残基替换。例如,保守替换可以在以下组内的氨基酸之间:

[0115] (i) 丙氨酸和甘氨酸;

[0116] (ii) 谷氨酸、天冬氨酸、谷氨酰胺和天冬酰胺;

[0117] (iii) 精氨酸和赖氨酸;

[0118] (iv) 天冬酰胺、谷氨酰胺、谷氨酸和天冬氨酸;

[0119] (v) 异亮氨酸、亮氨酸和缬氨酸;

[0120] (vi) 苯丙氨酸、酪氨酸和色氨酸;

[0121] (vii) 丝氨酸、苏氨酸和半胱氨酸。

[0122] (viii) 如对本领域技术人员将是显而易见的,可以将在其C-端和/或N-端提供的

序列截短1、2、3、4、5或更多个残基,而基本上不影响TCR的结合特性。本发明涵盖所有这些平常的变体。天然TCR以异源二聚体 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ 形式存在。然而,由 $\alpha\alpha$ 或 $\beta\beta$ 同源二聚体组成的重组TCR先前已经显示结合至肽MHC分子。因此,本发明的TCR可以是异源二聚体 $\alpha\beta$ TCR或可以是 $\alpha\alpha$ 或 $\beta\beta$ 同源二聚体TCR。

[0123] (ix) 用于过继性疗法(adoptive therapy),例如, $\alpha\beta$ 异源二聚体TCR可以转染作为具有细胞质和跨膜结构域的全长链。在某些实施方式中,本发明的TCR可以在各个恒定结构域的残基之间具有引入的二硫键,如例如WO 2006/000830中所述。

[0124] (x) 本发明的TCR,特别是 $\alpha$ - $\beta$ 异源二聚体TCR可以包含 $\alpha$ 链TRAC恒定结构域序列和/或 $\beta$ 链TRBC1或TRBC2恒定结构域序列。 $\alpha$ 和 $\beta$ 链恒定结构域序列可以通过截短或替换来修饰,以删除TRAC的外显子2的Cys4与TRBC1或TRBC2的外显子2的Cys2之间的天然二硫键。也可以通过用半胱氨酸残基替换TRAC的Thr 48和TRBC1或TRBC2的Ser 57来修饰 $\alpha$ 和/或 $\beta$ 链恒定结构域序列,该半胱氨酸在TCR的 $\alpha$ 与 $\beta$ 恒定结构域之间形成二硫键。

[0125] (xi) 本发明的TCR可以以单链形式存在,例如参见WO 2004/033685。单链形式包括V $\alpha$ -L-v $\beta$ 、v $\beta$ -L-V $\alpha$ 、V $\alpha$ -C $\alpha$ -L-V $\beta$ 、V $\alpha$ -L-V $\beta$ -C $\beta$ 、V $\alpha$ -C $\alpha$ -L-V $\beta$ -C $\beta$ 类型的 $\alpha\beta$ TCR多肽,其中,V $\alpha$ 和V $\beta$ 分别为TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 可变区,C $\alpha$ 和C $\beta$ 分别为TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 恒定区,并且L为接头序列。在某些实施方式中,如WO2004/033685中所述,本发明的单链TCR可以在各个恒定结构域的残基之间具有引入的二硫键。

#### [0126] 异源性TCR

[0127] 根据本发明,修饰的免疫应答细胞可以表达异源性T细胞受体(TCR)。在与抗原和/或其抗原肽(如AFP或其肽抗原)结合后,修饰的免疫应答细胞可以对携带抗原(例如AFP)和/或其抗原肽的细胞表现出T细胞效应子(effector)功能和/或细胞溶解效果和/或经受增殖和/或细胞分裂。在某些实施方式中,与包含靶向相同癌症和/或肿瘤抗原(例如AFP)和/或其抗原肽的嵌合抗原受体(chimeric antigen receptor,CAR)的细胞相比,包含TCR的修饰的免疫应答细胞表现出相当或更好的治疗效力。包含TCR的活化的修饰的免疫应答细胞可以分泌抗肿瘤细胞因子,其可以包括但不限于TNF $\alpha$ 、IFN $\gamma$ 和IL2。

[0128] 根据本发明,修饰的免疫应答细胞可以包含编码异源性T细胞受体(TCR)的核酸、构建体或载体,或异源性核酸、构建体或载体。任选地,TCR可以是亲和力增强的TCR,例如特异性肽增强的亲和力受体(SPEAR)TCR。

[0129] 术语“异源性”或“外源性”是指对于特定生物系统(如细胞或宿主细胞),例如对于免疫应答细胞而言是异体的多肽或核酸,并且不是天然存在于该系统中,并且其可以通过人工或重组方式引入该系统。因此,异源性TCR的表达可以由此改变T细胞的免疫原性特异性,使得它们识别或显示对存在于患有癌症的个体的癌细胞表面上的一种或多种肿瘤或癌症抗原(例如AFP)和/或其抗原肽的改进的识别。可以体外(in vitro)和/或离体(ex vivo)实施T细胞的修饰及其随后的扩增。

#### [0130] CD8 $\alpha$ 共受体

[0131] 根据本发明,表达或呈递异源性TCR的修饰的免疫应答细胞的群体还可以表达或呈递异源性共受体。异源性共受体可以是CD8共受体。CD8共受体可以包含二聚体或CD8链对,该CD8链对包含CD8- $\alpha$ 和CD8- $\beta$ 链、或CD8- $\alpha$ 和CD8- $\alpha$ 链。优选地,CD8共受体为包含CD8- $\alpha$ 和CD8- $\alpha$ 链的CD8 $\alpha\alpha$ 共受体。CD8 $\alpha$ 共受体可以包含与SEQ ID NO:47具有至少80%同一性的氨基

酸序列或其变体,或与SEQ ID NO:47具有100%同一性的氨基酸序列或其变体。CD8 $\alpha$ 共受体可以是同源二聚体。

[0132] CD8共受体与1类MHC结合并增强TCR信号传导。根据本发明,CD8共受体可以包含SEQ ID NO:47的参考氨基酸序列或SEQ ID NO:47的氨基酸22-235,或者可以是其变体。变体可以具有与参考氨基酸序列SEQ ID NO:47或SEQ ID NO:47的氨基酸22-235具有至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的氨基酸序列。CD8共受体可以由SEQ ID NO:48的参考核苷酸序列编码或可以是其变体。变体可以具有与参考核苷酸序列SEQ ID NO:48具有至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的核苷酸序列。任选地,CD8共受体可以包含具有以下序列的CDR:

[0133] (i) **VLLSNPTSG**,CDR1,SEQ ID NO:44,或SEQ ID NO:47的氨基酸45-53,

[0134] (ii) **YLSQNKPK**,CDR2,SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47的氨基酸72-79,

[0135] (iii) **LSNSIM**,CDR3,SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:47的氨基酸80-117,

[0136] 或与其具有至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的序列。

[0137] 根据本发明,异源性CD8共受体可以包含CD8共受体,其中,在Ig样V型结构域中包含具有以下序列的CDR:

[0138] (i) **VLLSNPTSG**,CDR1,SEQ ID NO:44,或SEQ ID NO:47的氨基酸45-53,

[0139] (ii) **YLSQNKPK**,CDR2,SEQ ID NO:45或SEQ ID NO:47的氨基酸72-79,

[0140] (iii) **LSNSIM**,CDR3,SEQ ID NO:46或SEQ ID NO:47的氨基酸80-117,

[0141] 或与其具有至少20%、至少25%、至少30%、至少35%、至少40%、至少45%、至少50%、至少55%、至少60%、至少65%、至少70%、至少75%、至少80%、至少85%、至少90%、至少95%、至少98%或至少99%序列同一性的序列。

[0142] 根据本发明,异源性CD8共受体可以包含CD8共受体,其包含或其中在Ig样V型结构域中包含SEQ ID NO:47的氨基酸序列的第22-135位残基,或一种氨基酸序列,其中,其氨基酸残基22-44、54-71、80-117、124-135分别与SEQ ID NO:47的氨基酸残基22-44、54-71、80-117、124-135的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,并且其中,氨基酸残基45-53、72-79和118-123分别与SEQ ID NO:47的氨基酸残基45-53、72-79和118-123的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性。

[0143] 根据本发明,CD8共受体可以包含CD8共受体,其中,或在Ig样V型结构域中:

[0144] (i) 其氨基酸残基22-44的序列可以(a)与SEQ ID NO:47的氨基酸残基22-44的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,或(b)相对于SEQ ID NO:47的残基22-44可以具有一个、两个或三个氨基酸残基插入或缺失,

[0145] (ii) 氨基酸残基45-53的序列是**VLLSNPTSG**,SEQ ID NO:44(CDR1)或SEQ ID NO:47的氨基酸45-53,

[0146] (iii) 其氨基酸残基54-71的序列可以(a)与SEQ ID NO:47的氨基酸残基54-71的

序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,或(b)相对于SEQ ID NO:47的氨基酸残基54-71的序列可以具有一个、两个或三个氨基酸残基插入或缺失,

[0147] (iv) 氨基酸残基72-79的序列可以是 **YLSQNKPK**, SEQ ID NO:45 (CDR2) 或SEQ ID NO:47的氨基酸72-79,

[0148] (v) 其氨基酸残基80-117的序列可以与SEQ ID NO:47的氨基酸残基80-117的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,或相对于SEQ ID NO:47的氨基酸残基80-117的序列可以具有一个、两个或三个插入、缺失或替换;

[0149] (vi) 氨基酸118-123的序列可以是 **LSNSIM**, SEQ ID NO:46 (CDR3) 或SEQ ID NO:47的氨基酸80-117,

[0150] (vii) 其氨基酸残基124-135的序列可以与SEQ ID NO:47的氨基酸残基124-135的序列具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%的同一性,或相对于SEQ ID NO:47的氨基酸残基124-135的序列可以具有一个、两个或三个插入、缺失或替换。

[0151] 如可通过本文公开的测定所确定的,相对于不表达异源性CD8共受体的修饰的免疫应答细胞,表达异源性CD8共受体的修饰免疫应答细胞可以表现出对抗原肽、肿瘤或癌抗原或者通过抗原肽、肿瘤或癌抗原的刺激(任选地在HLA上呈递时)的改善的亲合力和/或亲合力和/或改善的T细胞活化。修饰的免疫应答细胞的异源性CD8可以与MHC相互作用或特异性地结合,该MHC可以是I类或II类,优选为I类主要组织相容性复合体(MHC)、HLA-I分子或具有MHC I类HLA-A/B2M二聚体,优选地,CD8- $\alpha$ 与I类MHC的 $\alpha_3$ 部分(残基223与229之间)相互作用,优选地通过CD8的IgV样结构域。因此,与缺乏异源性CD8的免疫应答细胞相比,异源性CD8改善了免疫应答细胞与HLA和/或由HLA pMHC I或pHLA结合或呈递的抗原肽的TCR结合,任选地在抗原呈递细胞、树突细胞和/或肿瘤或癌细胞、肿瘤或癌组织的表面上。因此,与缺乏异源性CD8的细胞相比,异源性CD8能够改善或增加免疫应答细胞的细胞(TCR)/肽-主要组织相容性复合体I类(pMHC I)相互作用的解离速率( $k_{off}$ ),并且因此改善或增加其半衰期,任选地在抗原呈递细胞、树突细胞和/或肿瘤或癌细胞、或肿瘤或癌组织的表面上,从而还可以提供改善的连接亲合力和/或亲合力。异源性CD8能够改善TCR在免疫应答细胞表面上的组织,以实现pHLA结合的协同性,并且可以提供改善的治疗亲合力。因此,异源性CD8共受体修饰的免疫应答细胞可以以锌依赖的方式与LCK(淋巴细胞特异性蛋白酪氨酸激酶)结合或相互作用,导致转录因子(如NFAT、NF- $\kappa$ B和AP-1)的激活。

[0152] 根据本发明,与缺乏异源性CD8共受体的免疫应答细胞相比,修饰的免疫应答细胞可以具有改善的或增加的CD40L的表达、细胞因子产生、细胞毒活性、树突细胞成熟的诱导或树突细胞细胞因子产生的诱导,任选地响应于癌症和/或肿瘤抗原或其肽抗原,任选地由癌细胞或组织的肿瘤呈递。

[0153] 共刺激配体

[0154] 根据本发明,修饰的免疫应答细胞还可以包含外源性或重组的(例如,细胞被转导)至少一种共刺激配体,任选地为一种、两种、三种或四种。修饰的免疫应答细胞可以共表达异源性TCR和至少一种外源性共刺激配体。异源性TCR与至少一种外源性共刺激配体之间的相互作用可以提供非抗原特异性信号和细胞的活化。共刺激配体包括但不限于肿瘤坏死因子(TNF)超家族成员和免疫球蛋白(Ig)超家族配体。TNF是参与全身炎症的细胞因子,并且刺激急性期反应。TNF超家族成员包括但不限于:神经生长因子(NGF)、CD40L (CD40L)/

CD154、CD137L/4-1BBL、TNF- $\alpha$ 、CD134L/OX40L/CD252、CD27L/CD70、Fas配体 (FasL)、CD30L/CD153、肿瘤坏死因子 $\beta$  (TNFP)/淋巴毒素- $\alpha$  (LTa)、淋巴毒素- $\beta$  (TTb)、CD257/B细胞激活因子 (BAFF)/Blys/THANK/Ta11-1、糖皮质激素诱导的TNF受体配体 (GITRL) 和TNF相关的凋亡诱导配体 (TRAIL)、LIGHT (TNFSF14)。免疫球蛋白 (Ig) 超家族是一大类细胞表面和可溶性蛋白质,其参与细胞的识别、结合或粘附过程。这些蛋白质与免疫球蛋白共享结构特征——它们具有免疫球蛋白结构域(折叠)。免疫球蛋白超家族配体包括但不限于CD80和CD86,两者都是CD28的配体。在某些实施方式中,该至少一种共刺激配体选自4-1BBL、CD275、CD80、CD86、CD70、OX40L、CD48、TNFRSF14及其组合组成的组。至少一种外源性或重组的共刺激配体可以是4-1BBL或CD80,优选地,至少一种外源性或重组的共刺激配体为4-1BBL。修饰的免疫应答细胞可以包含两种外源性重组的共刺激配体,优选地,该两种外源性或重组的共刺激配体为4-1BBL和CD80。

[0155] 修饰的免疫应答细胞可以包含外源性或重组的(例如,细胞被转导)至少一种克服免疫抑制性肿瘤微环境的构建体。此类构建体可以是但不限于环状AMP磷酸二酯酶和显性失活的转化生长因子 $\beta$  (TGF $\beta$ ) 受体II。修饰的免疫应答细胞、修饰的T细胞或修饰的免疫应答细胞的群体(例如T细胞)可以被工程化以释放对所述细胞的细胞溶解活性具有积极影响的细胞因子。此类细胞因子包括但不限于白细胞介素-7、白细胞介素-15和白细胞介素-21。

[0156] 免疫应答细胞

[0157] 根据本发明,修饰的免疫应答细胞可以是淋巴谱系的细胞,包括B细胞、T细胞或自然杀伤(NK)细胞。修饰的免疫应答细胞可以是淋巴谱系的细胞(包括T细胞、自然杀伤T(NKT)细胞)及其前体(包括胚胎干细胞),以及多能干细胞(例如,可以从中分化出淋巴样细胞的那些)。T细胞可以是在胸腺中成熟并且主要负责细胞介导的免疫、也参与适应性免疫系统的淋巴细胞。根据本发明,T细胞可以包括但不限于:辅助T细胞、细胞毒性T细胞、记忆T细胞(包括中枢记忆T细胞、干细胞样记忆T细胞(或类似干细胞的记忆T细胞)和两种类型的效应子记忆T细胞:例如,TEM细胞和TEMRA细胞)、调节性T细胞(也称为抑制性T细胞)、自然杀伤性T细胞、黏膜相关的不变T细胞,以及 $\gamma$ - $\delta$ T细胞。细胞毒性T细胞(CTL或杀伤T细胞)是T淋巴细胞的一个子集,其能够诱导感染的体细胞或肿瘤细胞的死亡。可以通过引入异源性TCR对受试者自身的T细胞进行基因修饰以靶向特异性抗原。优选地,修饰的免疫应答细胞为T细胞,任选地为CD4<sup>+</sup>T细胞或CD8<sup>+</sup>T细胞。因此,修饰的免疫应答细胞可以是T细胞,任选地为CD4<sup>+</sup>T细胞或CD8<sup>+</sup>T细胞,或修饰的免疫应答细胞可以是修饰的T细胞的群体,任选地为CD4<sup>+</sup>T细胞;或CD8<sup>+</sup>T细胞,或CD4<sup>+</sup>T细胞和CD8<sup>+</sup>T细胞的混合群体。

[0158] 疗法

[0159] 血清中的AFP表达

[0160] 与治疗前血清AFP表达或浓度相比或与未治疗相比或与包含标准护理(standard of care)的治疗相比,本发明和本发明的方法、治疗和用途提供了血清AFP表达或浓度的降低。

[0161] 从基线(治疗前)起的血清AFP水平的改变与对治疗的反应相关,并且对应于来自组织活检的肿瘤AFP表达,并表明癌症和/或肿瘤治疗的治疗功效和成功性。

[0162] 因此,与安慰剂治疗相比,或与未治疗相比,或与治疗前相比,或与包含标准护理的治疗相比,本发明和本发明的方法、治疗和用途提供了血清AFP表达或浓度的降低,任选

地其中,标准护理的治疗选自索拉非尼、PD1或PD-L1拮抗剂或抑制剂、瑞戈非尼、卡博替尼、舒尼替尼、布立尼布、依维莫司、替万替尼、利尼伐尼、索拉非尼、PD1或PD-L1拮抗剂或抑制剂、瑞戈非尼、卡博替尼、舒尼替尼、布立尼布、依维莫司、替万替尼、利尼伐尼中的任一种。

[0163] 血清细胞因子和可溶性因子分析以及肿瘤的T细胞浸润

[0164] 与治疗前血清细胞因子和/或干扰素水平或浓度相比,或与未治疗相比,或与包含上述标准护理的治疗相比,本发明和本发明的方法、治疗和用途提供了血清细胞因子和/或干扰素水平或浓度的增加。

[0165] 因此,本发明提供了改善的或增强的癌症和/或肿瘤免疫原性,例如通过激发响应于肿瘤或肿瘤抗原的免疫应答的能力来测量,例如相对于治疗或干预之前的这种水平或与安慰剂相比,或相对于未治疗或相对于包含标准护理的治疗,增强至少10%,可替代地,增强了20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%或更多,例如通过细胞因子和/或干扰素的增加的分泌、增加的T细胞增殖、增加的抗原反应性、靶细胞杀伤、T细胞活化、CD28信号传导、肿瘤的T细胞浸润、识别和结合至树突细胞呈递的抗原的能力来判断。

[0166] 癌症的免疫疗法的功效受到激活的肿瘤特异性T细胞对肿瘤的浸润限制。这些T细胞的活性反过来会受到肿瘤中存在的免疫抑制环境(例如调节性T细胞)的影响。因此,肿瘤内的“免疫景观(immune landscape)”的直接评估对于监测T细胞免疫疗法的疗效具有重要价值,并且可以通过肿瘤活检进行定量,以评估T细胞输注前后的肿瘤的免疫状态。因此,与治疗前(例如治疗前或根据本发明的治疗前)或未治疗相比或与包含标准护理的治疗相比,本发明提供了改善的肿瘤的T细胞浸润和/或T细胞抑制因子的减少,例如通过T-reg<sub>s</sub>、骨髓来源的抑制细胞(MDSC)、PD-L1蛋白表达、选自CCL3、IL8、IL1 $\beta$ 、CXCL10或sIL2R $\alpha$ 的血清细胞因子水平的降低,或选自PD-1、CTLA-4、TIM-3、LAG-3、BTLA或TIGIT的抑制性受体的水平的降低来确定。可替代地,与治疗前或未治疗相比,或与包含本文所述标准护理的治疗相比,根据干扰素- $\gamma$ 、白细胞介素-6、白细胞介素-10、细胞因子(如IL-2、TNF- $\alpha$ 、IFN- $\gamma$ )以及颗粒酶B或先天免疫细胞(如NK细胞)、适应性免疫细胞(CD4<sup>+</sup>和CD8<sup>+</sup>)的水平的增加确定,或改善的T细胞的增殖,例如通过Ki67表达水平判断。

[0167] 根据前文所述,所述标准护理治疗可以选自索拉非尼、PD1或PD-L1拮抗剂或抑制剂、瑞戈非尼、卡博替尼、舒尼替尼、布立尼布、依维莫司、替万替尼、利尼伐尼中的任一种。

[0168] 肿瘤尺寸和肿瘤负荷

[0169] 与治疗前或未治疗或包含标准护理的治疗相比,本发明和本发明的方法、治疗和用途提供了在中止治疗或肿瘤数量或肿瘤负荷后降低肿瘤生长或肿瘤生长率或维持肿瘤尺寸的改善的或增强的水平或缓解(response),例如,通过测量肿瘤尺寸或肿瘤数量来确定,优选改善或增强了至少10%,可替代地,相对于治疗前或未治疗或包含标准护理的治疗改善或增强了20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%或更多。优选地,改善的或增强的水平或缓解可以是持续改善的或增强的水平或缓解和/或可以具有至少与治疗持续时间相同的持续时间,至少是治疗持续时间长度的1.5、2.0、2.5或3.0倍或更多倍。这种改善的或增强的水平或缓解可以从RECIST 1.1测量[E.A.Eisenhauer., et.al., EUROPEAN JOURNAL OF CANCER 45(2009) 228-247]或通过肿瘤活检或液体活检(来自外周血的血浆)以确定游离DNA(cfDNA)或外泌体(稳定mRNA的来源)

来判断。外泌体(由所有细胞产生,包括肿瘤细胞和免疫细胞)和cfDNA(由濒临死亡的肿瘤细胞产生)可以用于监测肿瘤负荷和免疫应答。外泌体和cfDNA的分析可以允许:(a)从外泌体和cfDNA对整体肿瘤负荷(包括AFP mRNA的表达和突变分析)的估计和基因分析,(b)从外泌体对免疫应答(细胞毒性和调节性免疫细胞的基因表达)的系统评估。

[0170] 根据前文所述,所述标准护理的治疗可以选自索拉非尼、PD1或PD-L1拮抗剂或抑制剂、瑞戈非尼、卡博替尼、舒尼替尼、布立尼布、依维莫司、替万替尼、利尼伐尼中的任一种。

[0171] 7.5.5.AFP TCR+细胞持久性

[0172] 与治疗前或未治疗或包含标准护理的治疗相比,本发明和本发明的方法、治疗和用途提供了改善的治疗效果和改善的治疗、预防或延缓受试者的癌症和/或肿瘤的进展,例如,通过测量表达或呈递异源性T细胞受体(TCR)的输注的工程化的和修饰的免疫应答细胞的持久性来确定。输注的工程化的和修饰的免疫应答细胞的持久性与治疗效果相关,也是一种长期的安全措施。细胞持久性可以通过qPCR或流式细胞术(FCM)确定。例如,通过从冷冻PBMC中提取的DNA进行转基因的PCR对AFP TCR+细胞的定量可以用作度量,类似地,通过来自冷冻的PBMC的FCM定量表达AFP TCR的细胞。T细胞表型和活性可以通过一系列测定来确定,例如:

[0173] • 用于确定细胞产物和输注后血液中的T细胞谱系的表型分析。

[0174] • 来自PBMC的T细胞的衰老和活化状态的定量。

[0175] • 反映输注的T细胞(例如AFP TCR+T细胞)的体内功能的可溶性因子的定量。

[0176] • 转导的细胞在不同时间点的离体活性以评估这些细胞的潜在功能性。

[0177] T细胞功能

[0178] 与治疗前相比或与未治疗相比或与包含标准护理的治疗相比,本发明和本发明的方法、治疗和用途提供了T细胞功能的增强。优选地,T细胞功能增强至少10%,可替代地,增强了20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%或更多,例如通过来自CD8+T细胞的增加的 $\gamma$ -干扰素的分泌、增加的T细胞增殖、增加的内部信号传导、增加的抗原反应性、增加的细胞因子和/或干扰素的分泌、增加的靶细胞杀伤、增加的T细胞活化、增加的CD28信号传导、增加的T细胞浸润肿瘤的能力,或增加的认识与结合树突细胞呈递的抗原的能力来判断。

[0179] 根据本发明和本发明的方法和用途,可以减弱肿瘤免疫或肿瘤对免疫识别的逃避,导致免疫系统对肿瘤的改善的识别与攻击,从而治疗肿瘤免疫,例如通过肿瘤结合、肿瘤收缩和肿瘤清除来测量。因此,与治疗前(例如,在治疗之前或根据本发明的治疗之前)相比,或与未治疗相比,或与包含如本文所述的标准护理的治疗相比,本发明提供了肿瘤免疫的治疗和/或提供了增强了至少10%的肿瘤免疫的治疗,可替代地,增强了20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、120%、150%、200%或更多,例如通过肿瘤结合、肿瘤收缩和肿瘤清除来测量。

[0180] 在T细胞活性的情况下,术语“功能障碍”是指对抗原刺激的降低的免疫应答性状态,并且包括T细胞耗竭和/或无反应性(anergy),从而T细胞可以识别并结合抗原,但在进行免疫应答或对抗肿瘤生长方面表现出降低的效力。功能障碍的T细胞表现出将抗原识别转化为下游T细胞效应子功能(如增殖、细胞因子和干扰素的产生或靶细胞杀伤)的能力受

损,和/或表现出难治性或对抗原识别无反应,这是T细胞功能障碍的特征。“T细胞功能障碍”可以与通过PD-1的不适当增加的T细胞信号传导、增殖和/或产生细胞因子和/或细胞溶解活性的能力降低的T细胞、T细胞无反应性、肿瘤免疫相关,或被检测为通过PD-1的不适当增加的T细胞信号传导、增殖和/或产生细胞因子和/或细胞溶解活性的能力降低的T细胞、T细胞无反应性、肿瘤免疫。

[0181] “T细胞耗竭(T-cell exhaustion)”包括由于作为对癌症的反应的一部分的持续的TCR信号传导而导致的T细胞功能障碍的状态,并且阻止对肿瘤的最佳缓解。耗竭可以通过细胞内部负调节(共刺激)途径(例如PD-1、PD-1轴、B7-H3、B7-H4)或通过细胞外部负调节途径(免疫调节细胞因子)来发现作用。T细胞耗竭通过差的效应子功能、抑制性受体的持续表达以及不同于功能性效应子或记忆T细胞的改变的转录活性来表征。即使在共刺激的情况下,T细胞无反应性也经常通过通过T细胞受体的信号传导不足和导致的对抗原刺激无反应的状态发生,因此,此类T细胞不会经受克隆扩增和/或获得效应子功能。

[0182] 治疗施用

[0183] 根据本发明,可以连续或间歇地施用修饰的免疫应答细胞,任选地以单剂量或多于一剂量施用。

[0184] 因此,可以以单剂量或多于一剂量(多剂量)施用修饰的免疫应答细胞。可以以约5亿至以下任一种的剂量施用修饰的免疫应答细胞:约10亿个细胞、约20亿个细胞、约30亿个细胞、约40亿个细胞、约50亿个细胞、约60亿个细胞、约70亿个细胞、约80亿个细胞、约90亿个细胞、约100亿个细胞、约110亿个细胞、约120亿个细胞、约130亿个细胞、约140亿个细胞、约150亿个细胞、约160亿个细胞、约170亿个细胞、约180亿个细胞、约190亿个细胞、约200亿个细胞或约210亿个细胞。可以以约1亿至约2亿个细胞、约3亿至约4亿个细胞、约5亿至约6亿个细胞、约7亿至约8亿个细胞、或约9亿至约10亿个细胞的剂量施用修饰的免疫应答细胞,任选地约5亿至约10亿个细胞、约20亿至约50亿个细胞或约60亿至约100亿个细胞。

[0185] 根据本发明,可以通过静脉内、肌内、皮下、局部、口服、经皮、腹膜内、眼眶内、植入、吸入、鞘内、心室内或鼻内或静脉内输注施用修饰的免疫应答细胞。优选地,可以静脉内或通过静脉内输注施用修饰的免疫应答细胞。

[0186] 根据本发明,可以以下述方式施用修饰的免疫应答细胞:

[0187] (a) 在一个或多个给药周期的每个周期中单剂量,

[0188] (b) 在一个或多个给药周期的每个周期中一个或多个剂量,

[0189] (c) 在一个或多个给药周期的每个周期的第一天单剂量,

[0190] (d) 在一个或多个给药周期的每个周期中一个或多个剂量,包括在一个或多个给药周期的每个周期中的第一天的剂量,

[0191] (e) 在一个或多个给药周期的每个周期中一个或多个剂量,在每个周期的第一天至少一个剂量,

[0192] (f) 单剂量。

[0193] 根据本发明,可以在一个给药周期中施用修饰的免疫应答细胞,其中,该给药周期可以是12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28周中的任一个,或者1个月、2个月、3个月、4个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月或12个月中的任一个。因此,该给药周期可以是10至12周、11至13周、14至17周、14至17周、18至21周、22至

24周、24至27周、28至30周、3个月、4个月、5个月、6个月中的任一个。

[0194] 根据本发明,可以在一个给药周期中施用修饰的免疫应答细胞,其中,该给药周期可以取决于或开始于或重新开始于:

[0195] (a) 先前施用修饰的免疫应答细胞之后的疾病进展,和/或

[0196] (b) 先前施用修饰的免疫应答细胞之后的12周或更长时间,并且其中

[0197] (c) 肿瘤和/或癌症表达AFP,和/或

[0198] (d) 受试者血清AFP高于(above)正常范围。

[0199] 根据本发明,可以在一个给药周期中施用修饰的免疫应答细胞,其中,该给药周期可以取决于或开始于或重新开始于:

[0200] (a) 先前施用修饰的免疫应答细胞之后的确认缓解(confirmed response)或完全缓解(complete response)或部分缓解(partial response),或(b)先前施用修饰的免疫应答细胞之后的大于或等于2、3或4个月的疾病稳定期;随后疾病进展,和/或

[0201] (c) 先前施用修饰的免疫应答细胞之后大于或等于12周,并且其中

[0202] (c) 肿瘤和/或癌症表达AFP,和/或

[0203] (d) 受试者血清AFP高于正常范围。

[0204] 如由免疫组织化学确定的,肿瘤和/或癌症可以在大于或等于15%、16%、17%、18%、19%、20%、21%、22%、23%、24%、25%、26%、27%、28%、29%或30%(优选大于或等于20%)的肿瘤和/或癌细胞中以大于或等于1+的强度的水平表达AFP。高于正常范围的受试者血清AFP可以大于或等于50、60、70、80、90、100、150、200、250、300、350、400、450或500ng/mL,优选地大于或等于100ng/mL。

[0205] 根据本发明,剂量可以是固定剂量或可变剂量。例如,其中,施用多于一剂(即多剂量),剂量可以是固定的,也可以是可变的,例如,其中,施用多于一剂,剂量可以逐步升高或增加,例如在每个给药周期中,即可以具有增加的剂量水平,例如在进展中,例如1亿至5亿到10亿至50亿至100亿个细胞。

[0206] 根据本发明,优选以约50亿至约100亿个细胞的单剂量施用修饰的免疫应答细胞。

[0207] 根据本发明,修饰的免疫应答细胞可以施用指定的时间段,这意味着修饰的免疫应答细胞给药周期可以施用指定的时间段。该指定的时间段可以是1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48个月中的任一个,优选24个月。

[0208] 根据本发明,该方法可以包括以下步骤,其中

[0209] (a) 以单剂量施用修饰的免疫应答细胞,

[0210] (b) 在修饰的免疫应答细胞施用后的一段时间段内确定疾病的状态,并且与修饰的免疫应答细胞施用前的状态进行比较,其中,如果确定疾病进展(progressive disease),那么

[0211] (c) 以单剂量施用修饰的免疫应答细胞,任选地其中,肿瘤和/或癌症表达AFP和/或受试者血清AFP高于上文所述的正常范围。优选地,该时间段大于或等于1、2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24、25、26、27、28、29、30、31、32、33、34、35、36、37、38、39、40、41、42、43、44、45、46、47、48周中的任一个,优选大于或等于12周。

[0212] 根据本发明,该方法可以包括以下步骤,其中

[0213] (a) 以单剂量施用修饰的免疫应答细胞,

[0214] (b) 在修饰的免疫应答细胞施用后的第一时间段和随后的第二时间段确定疾病的状态,并且与修饰的免疫应答细胞施用前的状态进行比较,其中,如果在第一时间段后确定疾病稳定并且在第二时间段后确定疾病进展,那么

[0215] (c) 以单剂量施用修饰的免疫应答细胞,任选地其中,肿瘤和/或癌症表达AFP和/或受试者血清AFP高于上文所述的正常范围。优选地,第一时间段大于或等于1、2、3、4、5、6、7、8个月中的任一个,优选大于或等于4个月。

[0216] 根据本发明,在所有靶病灶或肿瘤已经被评估或测量为消失的情况下,确定“完全缓解”(CR)。例如参考对照或治疗前比较仪,当测量到靶病灶或肿瘤的最长直径(SLD)的总和至少减少30%时,确定“部分缓解”(PR)。自从治疗开始或存在一个或多个新病灶起,例如参考对照或治疗前比较仪,当测量到靶病灶或肿瘤的最长直径(SLD)的总和至少增加20%时,确定“疾病进展”(PD)。以治疗开始以来最小的SLD作为参考,在确定靶病灶或肿瘤的最长直径(SLD)的总和既没有足够的减少或减少以符合PR,也没有足够的增加以符合PD的情况下,确定“疾病稳定(stable disease)”(SD)。

[0217] 根据本发明,如由免疫组织化学确定的,在治疗前,受试者可以在大于或等于10%、15%、20%、25%、30%(优选大于或等于20%)的肿瘤和/或癌细胞中包含大于或等于1+强度的肿瘤和/或癌细胞AFP表达,并且,通过免疫组织化学在任何强度下的非癌性AFP表达小于或等于3%、5%、7%、9%、10%(优选小于或等于5%)的非癌性或非肿瘤组织的细胞。

[0218] 根据本发明,在治疗前,受试者可以包含大于或等于50、100、200、300或400ng/mL的AFP血清水平,优选大于或等于100ng/mL,并且,通过免疫组织化学任何强度下的AFP表达小于或等于3%、5%、7%、9%、10%(优选小于或等于5%)的非癌性或非肿瘤组织的细胞。

[0219] 根据本发明,在治疗前,受试者可以包含0至1的东部肿瘤协作组(Eastern Cooperative Oncology Group, ECOG)和/或1、2、3、4、5或6中的任一个的Child-Pugh评分和/或根据实体肿瘤疗效评估标准(Response Evaluation Criteria in Solid Tumor, RECIST) 1.1的可测量的疾病。

[0220] 根据本发明,如果在治疗前受试者具有以下任一种或多种:

[0221] (a) 血清AFP水平在正常范围内,小于100ng/mL或小于或等于10ng/mL,

[0222] (b) 肝脏移植,

[0223] (c) 采用PD-1或PD-L1拮抗剂配体的免疫疗法和/或细胞毒性化学疗法,

[0224] (d) HLA-C\*04:04阳性或HLA-B\*51:03阳性状态,或

[0225] (e) 局部区域疗法(loco-regional therapy);那么

[0226] 受试者被排除在根据本发明的治疗之外。

[0227] 根据本发明,受试者可以对HLA-A2呈阳性,例如,HLA-A2选自HLA-A\*02:01、HLA-A\*02:02、HLA-A\*02:03、HLA-A\*02:04、HLA-A\*02:05、HLA-A\*02:06、HLA-A\*02:642或HLA-A\*02:07,优选HLA-A\*02:01或HLA-A\*02:642,和/或癌症和/或肿瘤表达甲胎蛋白(AFP)、甲胎蛋白(AFP)的肽抗原、包含FMNKFYIEI (SEQ ID NO:1) 或来源于甲胎蛋白(AFP) SEQ ID NO:51的残基158-166的甲胎蛋白(AFP)的肽抗原。

[0228] 根据本发明,受试者可能不耐受标准护理治疗,附加地或可替代地,受试者和/或

癌症和/或肿瘤可以先前用标准护理的治疗治疗失败,或先前用局部区域疗法失败,局部区域疗法任选地选自化学和/或热经皮消融(thermal percutaneous ablation)和动脉内化学栓塞疗法(intraarterial chemoembolotherapy)。标准护理治疗可以选自索拉非尼、PD1或PD-L1拮抗剂或抑制剂、瑞戈非尼、卡博替尼、舒尼替尼、布立尼布、依维莫司、替万替尼、利尼伐尼中的任一种。

[0229] 根据本发明,癌症可以是原发性癌症、继发性癌症、复发的癌症(relapsed cancer)或难治性癌症或复发性癌症(recurrent cancer)或局部复发性癌症或转移性癌症、不可切除的癌症或局部局限性癌症、没有手术或放射疗法选择的癌症或手术无法治愈的癌症(inoperable cancer)、不适合移植或局部区域疗法的癌症,或其任何组合。受试者可以患有复发的癌症、或难治性癌症、或复发性癌症、或局部复发性癌症、或转移性癌症、或局部局限性癌症或手术无法治愈的癌症,或其任何组合。

[0230] 根据本发明,癌症可以选自:肺癌、非小细胞肺癌(NSCLC)、转移性或晚期NSCLC、鳞状NSCLC、腺癌NSCLC、腺鳞状(adenosquamous)NSCLC、大细胞NSCLC、卵巢癌、胃癌、尿路上皮癌、食管癌、食管胃结合部癌(EGJ)、黑色素瘤、膀胱癌、头颈癌、头颈部鳞状细胞癌(HNSCC)、口腔癌、口咽癌、下咽癌、咽喉癌(cancer of the throat)、喉癌(cancer of the larynx)、扁桃体癌、舌癌、软腭癌、咽癌、滑膜肉瘤、粘液样圆细胞型脂肪肉瘤(myxoid round cell liposarcoma, MRCLS),任选地其中,癌症或肿瘤表达AFP或其肽抗原,任选地,包含FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1)或来源于甲胎蛋白(AFP) SEQ ID NO:51的残基158-166的甲胎蛋白(AFP)的肽抗原。

[0231] 根据本发明,癌症可以选自乳腺癌、转移性乳腺癌、肝癌、肾细胞癌、滑膜肉瘤、尿路上皮癌或肿瘤、胰腺癌、结直肠癌、转移性胃部癌(metastatic stomach cancer)、转移性胃癌(metastatic gastric cancer)、转移性肝癌、转移性卵巢癌、转移性胰腺癌、转移性结直肠癌、转移性肺癌、结直肠癌或腺癌、肺癌或腺癌、胰腺癌或腺癌、黏液性腺瘤、胰腺导管癌、恶性血液病(hematological malignancy)中的任一种,任选地其中,癌症或肿瘤表达AFP或其肽抗原,任选地,包含FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1)或来源于甲胎蛋白(AFP) SEQ ID NO:51的残基158-166的甲胎蛋白(AFP)的肽抗原。

[0232] 根据本发明,癌症可以是肝癌,或可以是选自以下任一种的肝癌:胆管癌、肝血管肉瘤、肝母细胞瘤、肝细胞癌(HCC),任选地其中,癌症不适合移植或切除,可选地,该癌症为肝细胞癌(HCC)。此外,肝癌可以与以下任一种或多种同时发生:糖尿病、肥胖症、乙型肝炎、丙型肝炎、肝硬化。

[0233] 进一步提供了根据本发明的治疗方法或用途,其中受试者没有接受过癌症和/或肿瘤的预先治疗(prior treatment),可替代地,其中,受试者已经接受了癌症和/或肿瘤的预先治疗,和/或对癌症和/或肿瘤的预先癌症治疗没有反应。

[0234] 根据本发明,预先治疗可以包括全身的和/或局部的疗法,例如,手术、放射疗法、冷冻疗法、激光疗法、局部疗法、化学疗法、激素疗法、靶向药物或免疫疗法中的任一种或多种。因此,预先治疗可以包括局部的疗法,例如,手术、放射疗法、冷冻疗法、激光疗法、局部疗法中的任一种或多种;和/或全身疗法,例如,化学疗法、激素疗法、靶向药物或免疫疗法中的任一种或多种。

[0235] 根据本发明,预先治疗可以包括PD-1轴结合拮抗剂、PD-L1结合拮抗剂或PD-1结合

拮抗剂。因此,该预先治疗可以包括以下任一种:

[0236] (a) 抗PD-L1抗体,其抑制PD-L1与PD-1之间和/或PD-L1与B7-1之间的结合,

[0237] (b) 抗PD-L1抗体,其抑制癌细胞表面上的PD-L1将信号转导至细胞内通路,

[0238] (c) 抗PD-1抗体,其抑制PD-L1与PD-1之间和/或PD-L2与PD-1之间的结合,

[0239] (d) 抗PD-1抗体,其抑制T细胞表面上的PD-1将信号转导至细胞内通路,

[0240] (e) PD-L1结合拮抗剂,其选自:

[0241] (i) 德瓦鲁单抗 (Durvalumab、Imfinzi或MEDI4736),

[0242] (ii) 阿特珠单抗 (Atezolizumab、Tecentriq或MPDL3280A),

[0243] (iii) 阿维鲁单抗 (Avelumab、Bavencio或MSB0010718C),

[0244] (iv) MDX-1105、BMS-936559,

[0245] (f) PD-1结合拮抗剂,其选自:

[0246] (i) 派姆单抗 (Pembrolizumab、Keytruda、Lambrolizumab或MK-3475),

[0247] (ii) 塞米普利单抗 (Cemiplimab、Libtayo或REGN-2810),

[0248] (iii) 纳武单抗 (BMS/ONO、Nivolumab、Opdivo、ONO-4538、BMS-936558或MDX1106)。

[0249] 根据本发明,预先治疗可以包括表皮生长因子受体拮抗剂 (Epidermal Growth Factor Receptor Antagonist),任选地为西妥昔单抗 (Cetuximab)。根据本发明,当预先治疗包括化学疗法时,这可以包括一种或多种铂化合物,任选地选自顺铂脂质体 (Lipoplatin)、顺铂 (Cisplatin)、卡铂 (Carboplatin)、奥沙利铂 (Oxaliplatin)、奈达铂 (Nedaplatin)、四硝酸三铂 (Triplatin tetranitrate)、菲铂 (Phenanthriplatin)、赛特铂 (Satraplatin)、吡铂 (Picoplatin)。附加地或可替代地,当预先治疗包括化学疗法时,这可以包括一种或多种化疗剂,其选自甲氨蝶呤 (methotrexate)、卡培他滨 (capecitabine)、紫杉烷 (taxane)、蒽环类药物 (anthracycline)、紫杉醇 (paclitaxel)、多西他赛 (docetaxel)、紫杉醇蛋白结合颗粒、多柔比星 (doxorubicine)、表柔比星 (epirubicine)、5-氟尿嘧啶 (5-fluorouracil)、环磷酰胺 (cyclophosphamide)、阿法替尼 (afatinib)、长春新碱 (vincristine)、依托泊苷 (etoposide) 或其组合。附加地或可替代地,当预先治疗包括化学疗法时,这可以包括一种或多种化疗剂,选自FEC:5-氟尿嘧啶、表柔比星、环磷酰胺; FAC:5-氟尿嘧啶、多柔比星、环磷酰胺; AC:多柔比星、环磷酰胺; EC:表柔比星、环磷酰胺。

[0250] 根据本发明,预先治疗可以包括索拉非尼、PD1或PD-L1拮抗剂或抑制剂、瑞戈非尼、卡博替尼、舒尼替尼、布立尼布、依维莫司、替万替尼、利尼伐尼、索拉非尼、PD1或PD-L1拮抗剂或抑制剂、瑞戈非尼、卡博替尼、舒尼替尼、布立尼布、依维莫司、替万替尼、利尼伐尼或局部区域疗法中的任一种或多种,局部区域疗法任选地选自化学和/或热经皮消融和动脉内化学栓塞疗法。

[0251] 根据本发明,受试者可以在自上次治疗后小于或等于12个月或者自上次治疗后小于或等于6个月复发时没有接受过预先治疗。根据本发明,受试者可以在自上次治疗后小于或等于12个月复发时或者自上次治疗后小于或等于6个月复发时没有接受过任何预先辅助疗法 (手术然后放疗和/或化疗)。

[0252] 根据本发明,与安慰剂治疗相比、或与治疗前相比、或与未治疗相比、或与包含标准护理的治疗相比,治疗延长或改善或者有效地延长或有效地改善以下任一种:

[0253] (a) 无进展生存期 (progression free survival),

- [0254] (b) 进展时间 (time to progression),
- [0255] (c) 缓解的持续时间 (duration of response),
- [0256] (d) 总生存期 (overall survival),
- [0257] (e) 客观缓解 (objective response) 或客观缓解率,
- [0258] (f) 总体缓解 (overall response) 或总体缓解率,
- [0259] (g) 部分缓解或部分缓解率,
- [0260] (h) 完全缓解或完全缓解率;
- [0261] (i) 疾病稳定率或中位疾病稳定;
- [0262] (j) 中位无进展生存期,
- [0263] (k) 中位进展时间,
- [0264] (l) 缓解的中位持续时间, 或
- [0265] (m) 中位总生存期;
- [0266] (n) 中位客观缓解或中位客观缓解率,
- [0267] (o) 中位总体缓解或中位总体缓解率,
- [0268] (p) 中位部分缓解或中位部分缓解率,
- [0269] (q) 中位完全缓解或中位完全缓解,
- [0270] (r) 中位疾病稳定率或中位疾病稳定,

[0271] 任选地其中, 标准护理治疗选自索拉非尼、PD1或PD-L1拮抗剂或抑制剂、瑞戈非尼、卡博替尼、舒尼替尼、布立尼布、依维莫司、替万替尼、利尼伐尼中的任一种。

[0272] “无进展生存期” (PFS) 是指从治疗 (或随机化 (randomization)) 到第一次疾病进展或死亡的时间。“进展时间” (TTP) 对死于接受治疗的癌症或肿瘤以外的其他原因的患者不计数, 但在其他方面等同于PFS。“缓解的持续时间” (DoR) 是癌症、肿瘤或病灶在不生长或扩散的情况下继续对治疗产生反应的时间长度。根据本发明, DoR、TTP和PFS可以通过实体肿瘤疗效评估标准 (RECIST) 来评估, 或可以通过CA-125水平 (癌抗原125) 作为进展的决定性因素来评估。

[0273] 根据本发明, 与安慰剂治疗相比, 或与治疗前相比, 或与未治疗相比, 或与包含例如如本文所述的标准护理的治疗 (“对照”) 相比, PFS和/或TTP和/或DoR或其中位数可以延长或改善至少1个月、2个月、2.3个月、2.5个月、2.9个月、3个月、3.5个月、3.8个月、4个月、4.5个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、16个月、18个月、20个月、22个月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年或10年。

[0274] 在一个实施方式中, 与对照相比, PFS和/或TTP和/或DoR或其中位数延长了约2.9个月至3.8个月。在一个实施方式中, 与对照相比, PFS和/或TTP和/或DoR或其中位数延长了至少约3.8个月。在另一个实施方式中, 与“对照”相比, PFS和/或TTP和/或DoR或其中位数延长了约2.3个月, 在一个实施方式中, PFS和/或TTP和/或DoR或其中位数延长了约6个月。

[0275] “总生存期”是指受试者在限定的时间段内保持存活。根据本发明, 从根据本发明的方法或治疗开始或从初次诊断开始, 总生存期或其中位数改善或延长了约6个月、约1年、约1.5年、约2年、约3年、约4年、约5年、约6年、约7年、约8年、约9年、约10年, 任选地, 用于生存分析的事件可以是任何原因引起的死亡。“生存期 (survival)”是指受试者保持存活并且包括无进展生存期 (PFS) 和总生存期 (OS)。“总生存期”是从疾病、肿瘤和/或癌症的诊断日

期或开始治疗之日起,被诊断患有该疾病的受试者仍然存活的时间长度。可以通过Kaplan-Meier方法估算生存期,并且使用分层对数秩检验(stratified log-rank test)计算生存期的任何差异;“延长生存期”或“增加生存期的可能性”是指,与安慰剂治疗相比,或与治疗前相比,或与未治疗相比,或与包含标准护理的治疗(“对照”)相比,增加治疗的受试者的PFS和/或OS。根据本发明,与安慰剂治疗相比,或与治疗前相比,或与未治疗相比,或与包含标准护理的治疗(“对照”)相比,总生存期或生存期可以延长或改善至少1个月、2个月、2.3个月、2.5个月、2.9个月、3个月、3.5个月、3.8个月、4个月、4.5个月、5个月、6个月、7个月、8个月、9个月、10个月、11个月、12个月、16个月、18个月、20个月、22个月、2年、3年、4年、5年、6年、7年、8年、9年、10年。

[0276] “客观缓解率”(ObRR)是具有预定量的肿瘤尺寸减小的受试者的比例,任选地由靶病灶或肿瘤的最长直径(SLD)的总和以及持续的最短时间段确定。“总体缓解率(ORR)”被定义为对疗法有部分或完全缓解的受试者的比例;它不包括疾病稳定。ORR通常定义为在指定时间段内完全缓解(CR)与部分缓解(PR)的总和。根据本发明,与安慰剂治疗相比,或与治疗前相比,或与未治疗相比,或与包含标准护理的治疗(“对照”)相比,ObRR和/或ORR和/或PR和/或CR和/或SD可以延长或改善至少5%、10%、15%、20%、25%、30%、35%、40%、45%、50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%。

[0277] 根据本发明,该方法还可以包括确定来自受试者的样本中的生物标志物的表达水平,其中,将生物标志物的水平与参考水平进行比较,以确定受试者的对治疗的反应的可能性,或确定受试者对治疗的反应的水平,其中,样本在治疗之前、期间或治疗后获得。该参考水平可以是受试者的治疗前的水平或可以是与癌症的存在或癌症的不存在相关的水平。该生物标志物可以是T-效应子相关基因,例如CD8A、穿孔素(perforin, PRF1)、颗粒酶A(GZMA)、颗粒酶B(GZMB)、干扰素- $\gamma$ (IFN- $\gamma$ )、CXCL9或CXCL10。该生物标志物可以是活化的基质相关基因,例如转化生长因子- $\beta$ (TGF- $\beta$ )、成纤维细胞活化蛋白(FAP)、podoplanin(PDPN)、胶原基因或双糖链蛋白聚糖(biglycan, BGN)。生物标志物可以是一种或一种骨髓(myeloid)来源的抑制细胞相关基因,例如CD68、CD163、FOXP3或雄激素调节基因1。可替代地,生物标志物可以是PD-L1、CD8或雄激素受体(AR)基因。

[0278] 根据本发明,施用表达或呈递异源性T细胞受体(TCR)的修饰的免疫应答细胞之前,受试者经受淋巴耗竭化疗(lymphodepleting chemotherapy)。淋巴耗竭化疗可以包括施用环磷酰胺和/或氟达拉滨(fludarabine)。优选地,以约100、150、200、250、300、350、400、450、500、550、600、650、700、750、800或850mg/m<sup>2</sup>/d[d=天]的剂量施用环磷酰胺,优选约500或600mg/m<sup>2</sup>/d,优选地其中,该施用持续1天、2天( $\times$ 2d)、3天( $\times$ 3d)、4天( $\times$ 4d)或5天( $\times$ 5d)。优选地,以约5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65、70、75、80或85mg/m<sup>2</sup>/d的剂量施用氟达拉滨,优选地其中,该施用持续1天、2天( $\times$ 2d)、3天( $\times$ 3d)、4天( $\times$ 4d)或5天( $\times$ 5d)。优选地,淋巴耗竭化疗包括:任选地以500mg/m<sup>2</sup>/d $\times$ 3d环磷酰胺和20mg/m<sup>2</sup>/d $\times$ 3d氟达拉滨的剂量或以600mg/m<sup>2</sup>/d $\times$ 3d环磷酰胺和30mg/m<sup>2</sup>/d $\times$ 4d的剂量施用环磷酰胺和氟达拉滨。根据本发明,施用表达或呈递异源性T细胞受体(TCR)的修饰的免疫应答细胞之前3、4、5、6、7、8、9、10天,优选7至5或7至4天可以施用淋巴耗竭化疗。环磷酰胺和氟达拉滨的施用可以依次分开或同时进行,该施用可以是静脉内施用或通过静脉输注施用。

[0279] 本发明还提供了一种在患有癌症和/或肿瘤的受试者中的如下方法:

- [0280] (a) 降低血清AFP表达或浓度,
- [0281] (b) 增强免疫功能,
- [0282] (c) 中止治疗后减少肿瘤生长或肿瘤生长速率或维持肿瘤尺寸或减少肿瘤数量或肿瘤负荷,
- [0283] (d) 增加血清细胞因子和/或干扰素水平或浓度,
- [0284] (e) 改善T细胞持久性,或
- [0285] (f) 改善肿瘤的T细胞浸润,
- [0286] 包括:向受试者施用一种治疗方案,该治疗方案包含有效量的修饰的免疫应答细胞,其表达或呈递结合AFP或AFP的肽抗原或包含FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1) 或来源于甲胎蛋白 (AFP) SEQ ID NO:51的残基158-166的AFP的肽抗原的异源性T细胞受体 (TCR),如本文之前参考治疗的方法以及与其相关的方面和实施方式和特征所描述的,任选地,与治疗前或未治疗或包含如本文所述的标准护理的治疗相比。标准护理的治疗可以选自索拉非尼、PD1或PD-L1拮抗剂或抑制剂、瑞戈非尼、卡博替尼、舒尼替尼、布立尼布、依维莫司、替万替尼、利尼伐尼中的任一种。
- [0287] 因此,本发明提供了一种增强免疫功能的方法,其中:
- [0288] (a) 个体中的CD8 T细胞具有增强的引发、活化、增殖和/或细胞溶解活性,
- [0289] (b) CD8 T细胞的数量升高,
- [0290] (c) 受试者中的癌症和/或肿瘤细胞选择性地具有MHC I类抗原表达的升高的表达,任选地其中,受试者的PBMC细胞没有MHC I类抗原的升高的表达,
- [0291] (d) 受试者中的抗原呈递细胞具有增强的成熟和活化,任选地其中,抗原呈递细胞为树突细胞,
- [0292] (e) 个体中IL-10和/或IL-8的血清水平降低,
- [0293] (f) 受试者的癌症和/或肿瘤具有升高的T细胞浸润的水平,或
- [0294] (g) 分别地和任选地,与治疗前或未治疗或包含如本文所述的标准护理的治疗相比,受试者的T细胞具有降低的T细胞PD-1表达的水平。
- [0295] 因此,(a) CD8 T细胞活化可以由 $\gamma$ -IFN<sup>+</sup>CD8 T细胞的频率升高和/或细胞溶解增强表征;(b) 抗原呈递细胞的成熟可以由CD83<sup>+</sup>树突细胞的频率增加表征;(c) 抗原呈递细胞的活化可以由树突细胞上CD80和CD86的表达升高表征;或(d) CD8 T细胞可以是抗原特异性CD8 T细胞。
- [0296] 根据本发明,提供了
- [0297] (a) 一种试剂盒,包含:有效量的表达或呈递异源性T细胞受体 (TCR) 的修饰的免疫应答细胞,该异源性T细胞受体结合AFP或AFP的肽抗原或包含FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1) 或来源于甲胎蛋白 (AFP) SEQ ID NO:51的残基158-166的AFP的肽抗原;以及药品说明书 (package insert),其包括使用修饰的免疫应答细胞以治疗或延缓受试者的癌症和/或肿瘤的进展的说明,
- [0298] (b) 一种试剂盒,包含:有效量的表达或呈递异源性T细胞受体 (TCR) 的修饰的免疫应答细胞,该异源性T细胞受体结合AFP或AFP的肽抗原或包含FMNKFIYEI (SEQ ID NO:1) 或来源于甲胎蛋白 (AFP) SEQ ID NO:51的残基158-166的AFP的肽抗原;以及药品说明书 (package insert),包括在患有如前所述的癌症和/或肿瘤的受试者中在以下方法中使用

修饰的免疫应答细胞的说明：

[0299] (i) 降低血清AFP表达或浓度，

[0300] (ii) 增强免疫功能，

[0301] (iii) 中止治疗后减少肿瘤生长或肿瘤生长速率或维持肿瘤尺寸或减少肿瘤数量或肿瘤负荷，

[0302] (iv) 增加血清细胞因子和/或干扰素水平或浓度，

[0303] (v) 改善T细胞持久性，或

[0304] (vi) 改善肿瘤的T细胞浸润。

[0305] 本发明将通过参考以下附图和实施例进一步描述。

## 附图说明

[0306] 图1. (SEQ ID NO:2) 给出了使用基因TRAV12-2\*02/TRAJ41\*01/TRAC的亲本AFP特异性TCR的 $\alpha$ 链的细胞外部分的氨基酸序列。

[0307] 图2. (SEQ ID NO:3) 给出了使用基因TRBV9\*01/TRBD2/TRBJ2-7\*01/TRBC2的亲本AFP特异性TCR的 $\beta$ 链的细胞外部分的氨基酸序列。

[0308] 图3. (SEQ ID NO:4) 给出了可溶性TCR(本文称为“参考TCR”)的 $\alpha$ 链的氨基酸序列。除了用半胱氨酸(粗体和下划线)替换了SEQ ID NO:2的T159(即TRAC恒定区的T48)之外,该序列与图1(SEQ ID NO:2)的序列相同。

[0309] 图4. (SEQ ID NO:5) 给出了可溶性TCR(本文称为“参考TCR”)的 $\beta$ 链的氨基酸序列。除了用半胱氨酸(粗体和下划线)替换了SEQ ID NO:3的S169(即TRBC2恒定区的S57),并且用A187替换了C187,以及用D201替换了N201之外,该序列与图2(SEQ ID NO:3)的序列相同。

[0310] 图5. (SEQ ID NO:6-20) 给出了可以存在于本发明的TCR中的突变的 $\alpha$ 链的氨基酸序列。CDR区域具有下划线,并且相对于亲本AFP TCR的氨基酸改变具有阴影。

[0311] 图6. (SEQ ID NO:21) 和 (SEQ ID NO:22) 分别给出了编码图3和图4中所示的TCR $\alpha$ 和 $\beta$ 链的DNA序列。

[0312] 图7. (SEQ ID NO:23) 给出了用于转导T细胞的亲本AFP TCR基因(具有猪捷申病毒-1(Porcine teschovirus-1) 2A序列的 $\alpha$ 链-2A- $\beta$ 链构建体,粗体和下划线)的DNA序列。

[0313] 图8. (SEQ ID NO:24) 给出了由图7的DNA序列产生的用于T细胞转导的亲本AFP TCR的氨基酸序列。猪捷申病毒-1 2A序列为粗体和加下划线的。

[0314] 图9. (SEQ ID NO:25-43) 显示了用于生产AFP TCR的克隆引物的DNA序列和变体TCR $\alpha$ 链的氨基酸序列。

[0315] 图10. (SEQ ID NO:44-48) 显示了CD8的氨基酸和DNA序列。

[0316] 图11. (SEQ ID NO:49和50) 显示了AFP TCR变体 $\alpha$ 和 $\beta$ 链氨基酸序列。

[0317] 图12. (SEQ ID NO:51) 人类甲胎蛋白氨基酸序列。

[0318] 图13. ADP-A2AFP (AFPc332T) 工程化的T细胞治疗,50亿细胞剂量靶标, (Cy:600mg/m<sup>2</sup>/d) × 3d; (Flu:30mg/m<sup>2</sup>/d) × 4d, 治疗前(基线) 和治疗开始后8周的立即进行的受试者肝脏的CT扫描显示完全缓解,靶病灶减少100% (由箭头指示)。

[0319] 图14. ADP-A2AFP (AFPc332T) 工程化的T细胞治疗,50亿细胞剂量靶标, (Cy:600mg/m<sup>2</sup>/d) × 3d; (Flu:30mg/m<sup>2</sup>/d) × 4d, 治疗开始后超过8周时间段的血清AFP水平。

[0320] 图15.ADP-A2AFP (AFPc332T) 工程化的T细胞治疗,50亿细胞剂量靶标, (Cy:600mg/m<sup>2</sup>/d) × 3d; (Flu:30mg/m<sup>2</sup>/d) × 4d,通过AFPc332T载体拷贝数量测量的AFPc332T工程化的T细胞的血清水平持久性。

[0321] 图16.ADP-A2AFP (AFPc332T) 工程化的T细胞治疗,50亿细胞剂量靶标, (Cy:600mg/m<sup>2</sup>/d) × 3d; (Flu:30mg/m<sup>2</sup>/d) × 4d,通过AFPc332T转导的T细胞数量测量的AFPc332T工程化的T细胞的血清水平持久性。

[0322] 在以下非限制性示例中进一步描述了本发明。

## 具体实施方式

### [0323] 实施例

[0324] 实施例1——I期开放标签临床试验,在患有晚期肝细胞癌 (HCC) 或其他表达AFP的肿瘤类型的HLA-A2阳性受试者中评估表达增强的甲胎蛋白 (AFPc332T) 特异性TCR的自体T细胞的安全性和抗肿瘤活性。

### [0325] 方法

[0326] 下文介绍了在患有晚期HCC或其他表达AFP的肿瘤类型的HLA-A\*02:01P组阳性受试者中基因工程化的AFPc332T细胞的人体研究。根据RECIST v1.1,疾病可以是组织学或细胞遗传学证实的和/或可测量的疾病。根据HLA类型合格的且符合AFP标准的受试者进行了总体健康、体能状态和疾病分期的筛查。受试者必须在其非癌性肝组织中相对缺乏AFP表达。筛选后,符合所有合格标准 (eligibility criteria) 的受试者经受了血细胞去除术 (leukapheresis) 以得到用于制备带有自体AFP TCR的T细胞的细胞。随后,用对AFP抗原特异性 (特别是特异性AFP抗原肽SEQ ID NO:1) 的ADP-A2AFP、AFPc332T TCR (SEQ ID NO:49、50) 转导细胞,然后将细胞扩增并冷冻保存以供以后使用。一旦AFPc332T细胞可用,则受试者在第-7至-5天或第-7至-4天经受用环磷酰胺加氟达拉滨的淋巴耗竭化疗,然后在第1天输注转导的细胞。

[0327] 三个受试者组分别接受了1亿至50亿个转导的细胞的剂量治疗,而没有逐步升高剂量:

[0328] 1亿个细胞剂量, (环磷酰胺:500mg/m<sup>2</sup>/d) × 3d; (氟达拉滨:20mg/m<sup>2</sup>/d) × 3d

[0329] 10亿个细胞剂量, (环磷酰胺:500mg/m<sup>2</sup>/d) × 3d; (氟达拉滨:20mg/m<sup>2</sup>/d) × 3d

[0330] 50亿个细胞剂量, (环磷酰胺:600mg/m<sup>2</sup>/d) × 3d; (氟达拉滨:30mg/m<sup>2</sup>/d) × 4d

[0331] 受试者在输注后住院7天,并在此后的第4、8、16、24周和每月3次实施CT和MRI监测安全性、T细胞持久性、细胞因子产生,直到疾病进展或早期干预停止,每年的长期随访 (follow up) 计划为期15年。

[0332] 当受试者接受T细胞输注然后进展或者在疾病进展之前死亡时,他/她将被视为完成研究的干预阶段。任选地,可能会进行第二次T细胞输注,并且他们将保持处于研究的干预阶段,直到他们进一步的疾病进展。一旦确定进展,则除了总生存期外,不实施进一步的疗效评估。根据FDA和EMA的规定,从研究的干预部分完成的所有受试者都将进入长期随访 (LTFU) 阶段,以观察输注后15年内的延迟的不良事件 (AE)。当最后一个存活的受试者完成LTFU时,该研究将被认为完成。该研究涵盖了表达AFP的肿瘤的治疗,包括肝细胞癌和其他表达AFP的肿瘤。

[0333] 为了评估AFPc332T的安全性和耐受性,监测了剂量限制性毒性(dose limiting toxicity,DLT)的发生率,确定了最佳耐受剂量范围、不良事件(AE)和严重不良事件(Serious Adverse Event,SAE);实验室评估,包括化学、血液病学和凝结核;以及心脏评估,包括ECG和心肌肌钙蛋白。

[0334] 在研究过程中,血清AFP被评估为肿瘤AFP表达和抗肿瘤活性的生物标志物。实施此操作以关联肿瘤中的抗原表达的水平和在基线以及AFPc332T细胞输注后的血清AFP水平。从而评估血清AFP从基线的变化与对治疗的反应的相关性。评估肿瘤中随时间的治疗后的AFP表达以确定肿瘤免疫或对AFPc332T的抗性。此外,测量并评估循环细胞因子与细胞因子释放综合征(cytokine release syndrome,CRS)和其他不良事件(AE)的关联。此外,AFPc332T细胞输注后,通过确定AFPc332T工程化的T细胞的血清水平持久性来评估转导的细胞持久性,如通过AFPc332T载体拷贝数量与AFPc332T转导的T细胞数量来测量。

[0335] 受试者的关键入选标准包括:

[0336] 1.组织学证实表达AFP的HCC或组织学证实了另一种表达AFP的肿瘤的诊断,不适合移植或切除。

[0337] 2.在淋巴耗竭前根据实体肿瘤疗效评估标准(RECIST)1.1可测量的疾病。

[0338] 3.在淋巴耗竭之前,在接受或不耐受或拒绝标准护理全身疗法出现的疾病进展。

[0339] 4.对于HLA-A\*02:01(或任何A\*02:01P组等位基因)阳性。

[0340] 5.通过免疫组织化学的 $\geq 20\%$ 的肿瘤细胞中AFP表达 $\geq 1+$ ,并且它们的非癌性肝组织有

[0341]  $\leq 5\%$ 的细胞通过免疫组织化学以任何强度进行AFP染色。

[0342] 6. $\geq 100\text{ng/mL}$ 的血清AFP水平及其非癌性肝组织有 $\leq 5\%$ 的细胞通过免疫组织化学以任何强度进行AFP染色。

[0343] 7.预期寿命 $>4$ 个月。

[0344] 8.Child-Pugh评分 $\leq 6$ 。

[0345] 9.东部肿瘤协作组(ECOG)0-1。

[0346] 10.具有生育能力的女性受试者(FCBP)必须具有阴性的血清妊娠试验。

[0347] 受试者的关键排除标准包括:(a)以下等位基因阳性:HLA-C\*04:04或HLA-B\*51:03,(b)之前的肝移植,(c)在血细胞去除术之前接受了:i)3周内使用了细胞毒性化学疗法、免疫疗法和生物疗法,ii)2周内使用了皮质类固醇或任何其他免疫抑制性疗法。

[0348] 为了评估AFPc332T的抗肿瘤活性,以下端点由RECIST v1.1监测;总体缓解率(ORR)被定义为确认的完全缓解(CR)或部分缓解(PR)的受试者比例。监测缓解的持续时间(DoR)、疾病稳定(SD)的持续时间、无进展生存期(PFS)、总生存期(OS)的其他终点。

[0349] 结果

[0350] 图13中显示的数据表明,对于接受50亿个细胞输注的组,在AFPc332T细胞输注后的8周内,靶病灶减少了100%;图14显示这与血清AFP水平的急剧下降一致,表明对治疗和肿瘤AFP表达的可测量反应,这种生物标志物变化表明在该组受试者中对HCC的癌症和肿瘤治疗的治疗效果。输注后长达8周的AFPc332 T细胞血清载体和转导的T细胞测量表明,在受试者中持续存在良好的工程化的AFPc332 T细胞保留了以50亿个细胞给药的HCC组受试者的工程化的TCR。

## 序列表

&lt;110&gt; 艾达普特免疫有限公司

&lt;120&gt; 癌症或肿瘤的治疗方法

&lt;130&gt; PC10113

&lt;150&gt; US62/976,493

&lt;151&gt; 2020-02-14

&lt;160&gt; 51

&lt;170&gt; PatentIn版本3.5

&lt;210&gt; 1

&lt;211&gt; 9

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 智人(Homo Sapiens)

&lt;400&gt; 1

Phe Met Asn Lys Phe Ile Tyr Glu Ile

1 5

&lt;210&gt; 2

&lt;211&gt; 205

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 重组体(recombinant)

&lt;400&gt; 2

Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly

1 5 10 15

Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser

20 25 30

Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met

35 40 45

Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln

50 55 60

Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln

65 70 75 80

Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Ser Asp Ser Gly

85 90 95

Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His

100 105 110

Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser

115 120 125

Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140  
 Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160  
 Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175  
 Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190  
 Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205  
 <210> 3  
 <211> 242  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 重组体  
 <400> 3  
 Asp Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr Ala Thr Gly  
 1 5 10 15  
 Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp Leu Ser Val  
 20 25 30  
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe Leu Ile Gln  
 35 40 45  
 Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu Glu Arg Phe  
 50 55 60  
 Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn Leu Ser Ser  
 65 70 75 80  
 Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Gly  
 85 90 95  
 Gly Glu Ser Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr  
 100 105 110  
 Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro  
 115 120 125  
 Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu  
 130 135 140  
 Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn  
 145 150 155 160  
 Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys  
 165 170 175

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu  
 180 185 190  
 Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys  
 195 200 205  
 Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp  
 210 215 220  
 Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg  
 225 230 235 240  
 Ala Asp  
 <210> 4  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 重组体  
 <400> 4  
 Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser  
 20 25 30  
 Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met  
 35 40 45  
 Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln  
 50 55 60  
 Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln  
 65 70 75 80  
 Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Ser Asp Ser Gly  
 85 90 95  
 Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110  
 Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125  
 Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140  
 Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val  
 145 150 155 160  
 Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175  
 Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile

	180		185		190
Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser					
	195		200		205
<210> 5					
<211> 242					
<212> PRT					
<213> 人工序列(Artificial Sequence)					
<220>					
<223> 重组体					
<400> 5					
Asp Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr Ala Thr Gly					
1	5		10		15
Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp Leu Ser Val					
	20		25		30
Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe Leu Ile Gln					
	35		40		45
Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu Glu Arg Phe					
	50		55		60
Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn Leu Ser Ser					
65	70		75		80
Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Gly					
	85		90		95
Gly Glu Ser Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr					
	100		105		110
Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro					
	115		120		125
Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu					
	130		135		140
Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn					
145	150		155		160
Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys					
	165		170		175
Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Ala Leu Ser Ser Arg Leu					
	180		185		190
Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asp Pro Arg Asn His Phe Arg Cys					
	195		200		205
Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp					
	210		215		220
Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg					

225	230	235	240
Ala Asp			
<210> 6			
<211> 205			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 重组体			
<400> 6			
Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly			
1	5	10	15
Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ala			
	20	25	30
Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met			
	35	40	45
Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln			
	50	55	60
Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln			
65	70	75	80
Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Ser Asp Ser Gly			
	85	90	95
Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His			
	100	105	110
Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser			
	115	120	125
Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn			
	130	135	140
Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val			
145	150	155	160
Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp			
	165	170	175
Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile			
	180	185	190
Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser			
	195	200	205
<210> 7			
<211> 205			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			





65	70	75	80
Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Ser Asp Ser Gly			
	85	90	95
Val Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His			
	100	105	110
Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser			
	115	120	125
Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn			
	130	135	140
Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val			
145	150	155	160
Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp			
	165	170	175
Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile			
	180	185	190
Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser			
	195	200	205
<210> 10			
<211> 205			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 重组体			
<400> 10			
Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly			
1	5	10	15
Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser			
	20	25	30
Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met			
	35	40	45
Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln			
	50	55	60
Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln			
65	70	75	80
Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Ser Gln Ser Gly			
	85	90	95
Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His			
	100	105	110
Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser			

115	120	125
Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn		
130	135	140
Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val		
145	150	155
Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp		
165	170	175
Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile		
180	185	190
Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser		
195	200	205
<210> 11		
<211> 205		
<212> PRT		
<213> 人工序列(Artificial Sequence)		
<220>		
<223> 重组体		
<400> 11		
Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly		
1	5	10
Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser		
20	25	30
Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met		
35	40	45
Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln		
50	55	60
Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln		
65	70	75
Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Ser Gln Ser Gly		
85	90	95
Tyr Ser Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His		
100	105	110
Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser		
115	120	125
Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn		
130	135	140
Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val		
145	150	155
Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp		

	165	170	175
Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile			
	180	185	190
Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser			
	195	200	205
<210> 12			
<211> 205			
<212> PRT			
<213> 人工序列(Artificial Sequence)			
<220>			
<223> 重组体			
<400> 12			
Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly			
1	5	10	15
Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ser			
	20	25	30
Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met			
	35	40	45
Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln			
	50	55	60
Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln			
65	70	75	80
Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Ser Gln Ser Ser			
	85	90	95
Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His			
	100	105	110
Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser			
	115	120	125
Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn			
	130	135	140
Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val			
145	150	155	160
Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp			
	165	170	175
Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile			
	180	185	190
Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser			
	195	200	205
<210> 13			





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

<210> 16

<211> 205

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组体

<400> 16

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

Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110  
 Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125  
 Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140  
 Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160  
 Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175  
 Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190  
 Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205  
 <210> 17  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 重组体  
 <400> 17  
 Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Tyr Ser  
 20 25 30  
 Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met  
 35 40 45  
 Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln  
 50 55 60  
 Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln  
 65 70 75 80  
 Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Ser Asp Ser Gly  
 85 90 95  
 Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110  
 Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125  
 Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140



Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205  
 <210> 19  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 重组体  
 <400> 19  
 Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly  
 1 5 10 15  
 Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Tyr Ser  
 20 25 30  
 Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met  
 35 40 45  
 Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln  
 50 55 60  
 Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln  
 65 70 75 80  
 Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Ser Asp Ser Gly  
 85 90 95  
 Val Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
 100 105 110  
 Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
 115 120 125  
 Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
 130 135 140  
 Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145 150 155 160  
 Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
 165 170 175  
 Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
 180 185 190  
 Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
 195 200 205  
 <210> 20  
 <211> 205  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)



	20		25		30										
Cys	Ala	Gly	Thr	Gly	Thr	Thr	Cys	Cys	Ala	Gly	Ala	Gly	Gly	Gly	Ala
	35		40		45										
Gly	Cys	Cys	Ala	Thr	Thr	Gly	Cys	Cys	Thr	Cys	Thr	Cys	Thr	Cys	Ala
	50		55		60										
Ala	Cys	Thr	Gly	Cys	Ala	Cys	Thr	Thr	Ala	Cys	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala
65			70		75				80						
Cys	Cys	Gly	Ala	Gly	Gly	Thr	Thr	Cys	Cys	Cys	Ala	Gly	Thr	Cys	Cys
			85		90				95						
Thr	Thr	Cys	Thr	Thr	Cys	Thr	Gly	Gly	Thr	Ala	Cys	Ala	Gly	Ala	Cys
	100		105		110										
Ala	Ala	Thr	Ala	Thr	Thr	Cys	Thr	Gly	Gly	Gly	Ala	Ala	Ala	Ala	Gly
	115		120		125										
Cys	Cys	Cys	Thr	Gly	Ala	Gly	Thr	Thr	Gly	Ala	Thr	Ala	Ala	Thr	Gly
	130		135		140										
Thr	Cys	Cys	Ala	Thr	Ala	Thr	Ala	Cys	Thr	Cys	Cys	Ala	Ala	Thr	Gly
145			150		155				160						
Gly	Thr	Gly	Ala	Cys	Ala	Ala	Ala	Gly	Ala	Ala	Gly	Ala	Thr	Gly	Gly
			165		170				175						
Ala	Ala	Gly	Gly	Thr	Thr	Thr	Ala	Cys	Ala	Gly	Cys	Ala	Cys	Ala	Gly
	180		185		190										
Cys	Thr	Cys	Ala	Ala	Thr	Ala	Ala	Ala	Gly	Cys	Cys	Ala	Gly	Cys	Cys
	195		200		205										
Ala	Gly	Thr	Ala	Thr	Gly	Thr	Thr	Thr	Cys	Thr	Cys	Thr	Gly	Cys	Thr
	210		215		220										
Cys	Ala	Thr	Cys	Ala	Gly	Ala	Gly	Ala	Cys	Thr	Cys	Cys	Cys	Ala	Gly
225			230		235				240						
Cys	Cys	Cys	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Thr	Thr	Cys	Ala	Gly	Cys	Cys	Ala
			245		250				255						
Cys	Cys	Thr	Ala	Cys	Cys	Thr	Cys	Thr	Gly	Thr	Gly	Cys	Cys	Gly	Thr
	260		265		270										
Gly	Ala	Ala	Thr	Ala	Gly	Thr	Gly	Ala	Thr	Thr	Cys	Cys	Gly	Gly	Gly
	275		280		285										
Thr	Ala	Thr	Gly	Cys	Ala	Cys	Thr	Cys	Ala	Ala	Cys	Thr	Thr	Cys	Gly
	290		295		300										
Gly	Cys	Ala	Ala	Ala	Gly	Gly	Cys	Ala	Cys	Cys	Thr	Cys	Gly	Cys	Thr
305			310		315				320						
Gly	Thr	Thr	Gly	Gly	Thr	Cys	Ala	Cys	Ala	Cys	Cys	Cys	Cys	Ala	Thr
			325		330				335						

Ala Thr Cys Cys Ala Gly Ala Ala Cys Cys Cys Thr Gly Ala Cys Cys  
340 345 350

Cys Thr Gly Cys Cys Gly Thr Gly Thr Ala Cys Cys Ala Gly Cys Thr  
355 360 365

Gly Ala Gly Ala Gly Ala Cys Thr Cys Thr Ala Ala Gly Thr Cys Gly  
370 375 380

Ala Gly Thr Gly Ala Cys Ala Ala Gly Thr Cys Thr Gly Thr Cys Thr  
385 390 395 400

Gly Cys Cys Thr Ala Thr Thr Cys Ala Cys Cys Gly Ala Thr Thr Thr  
405 410 415

Thr Gly Ala Thr Thr Cys Thr Cys Ala Ala Ala Cys Ala Ala Ala Thr  
420 425 430

Gly Thr Gly Thr Cys Ala Cys Ala Ala Ala Gly Thr Ala Ala Gly Gly  
435 440 445

Ala Thr Thr Cys Thr Gly Ala Thr Gly Thr Gly Thr Ala Thr Ala Thr  
450 455 460

Cys Ala Cys Ala Gly Ala Cys Ala Ala Ala Thr Gly Thr Gly Thr Gly  
465 470 475 480

Cys Thr Ala Gly Ala Cys Ala Thr Gly Ala Gly Gly Thr Cys Thr Ala  
485 490 495

Thr Gly Gly Ala Cys Thr Thr Cys Ala Ala Gly Ala Gly Cys Ala Ala  
500 505 510

Cys Ala Gly Thr Gly Cys Thr Gly Thr Gly Gly Cys Cys Thr Gly Gly  
515 520 525

Ala Gly Cys Ala Ala Cys Ala Ala Ala Thr Cys Thr Gly Ala Cys Thr  
530 535 540

Thr Thr Gly Cys Ala Thr Gly Thr Gly Cys Ala Ala Ala Cys Gly Cys  
545 550 555 560

Cys Thr Thr Cys Ala Ala Cys Ala Ala Cys Ala Gly Cys Ala Thr Thr  
565 570 575

Ala Thr Thr Cys Cys Ala Gly Ala Ala Gly Ala Cys Ala Cys Cys Thr  
580 585 590

Thr Cys Thr Thr Cys Cys Cys Cys Ala Gly Cys Cys Cys Ala Gly Ala  
595 600 605

Ala Ala Gly Thr Thr Cys Cys  
610 615

<210> 22  
<211> 726  
<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组体

<400> 22

gattctggag tcacacaaac cccaaagcac ctgatcacag caactggaca gcgagtgacg 60  
 ctgagatgct cccctaggtc tggagacctc tctgtgtact ggtaccaaca ggcctggac 120  
 cagggcctcc agttcctcat tcagtattat aatggagaag agagagcaaa aggaaacatt 180  
 cttgaacgat tctccgcaca acagtccct gacttgcact ctgaactaaa cctgagctct 240  
 ctggagctgg gggactcagc tttgtatttc tgtgccagca gcctcggggg ggaatctgag 300  
 cagtacttcg ggccgggcac caggctcacg gtcacagagg acctgaaaaa cgtgttccca 360  
 cccgaggtcg ctgtgtttga gccatcagaa gcagagatct cccacacca aaaggccaca 420  
 ctggtgtgcc tggccaccgg tttctacccc gaccacgtgg agctgagctg gtgggtgaat 480  
 gggaaggagg tgcacagtgg ggtctgcaca gaccgcagc ccctcaagga gcagcccgcc 540  
 ctcaatgact ccagatacgc tctgagcagc cgctgaggg tctcggccac cttctggcag 600  
 gacccccgca accacttccg ctgtcaagtc cagttctac ggctctcgga gaatgacgag 660  
 tggaccagg atagggccaa acccgtcacc cagatcgtca gcgccgaggc ctggggtaga 720  
 gcagac 726

<210> 23

<211> 1867

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组体

<400> 23

gctagccgcc accatgatga agtccctgcg ggtgctgctg gtcatectgt ggctgcagct 60  
 gtcctgggtc tgggtcccagc agaaagaggt ggagcagaac agcggccctc tgagcgtgcc 120  
 cgagggcgct atcgccagcc tgaactgcac ctacagcgac agaggcagcc agagcttctt 180  
 ctggtacaga cagtacagcg gcaagagccc cgagctgac atgagcatct acagcaacgg 240  
 cgacaaagag gacggccggt tcaccgcca gctgaacaag gccagccagt acgtgtccct 300  
 gctgatccgg gacagccagc ccagcgacag cgccacctac ctgtgcgccc tgaacagcga 360  
 ctccggctac gccctgaact tcggcaaggg caccagcctg ctggtgacac cccacattca 420  
 gaacccccgac cccgccgtgt accagctgcg ggacagcaag agcagcgaca agagcgtgtg 480  
 cctgttcacc gacttcgaca gccagaccaa cgtgtcccag agcaaggaca gcgacgtgta 540  
 catcaccgac aagaccgtgc tggacatgcg gagcatggac ttcaagagca acagcgcctg 600  
 ggccctggtec aacaagagcg acttcgcctg cgccaacgcc ttcaacaaca gcatcatccc 660  
 cgaggacaca tttttcccaa gccccgagag cagctgcgac gtcaaactgg tggagaagtc 720  
 cttcgagaca gacaccaacc tgaacttcca gaacctgagc gtgatcggct tcagaatcct 780  
 gctgctgaag gtggccggt tcaatctgct gatgacctg cggctgtggt ccagcggcag 840  
 cagagccaag agaagcggat ccggcgccac caacttcagc ctgctgaagc aggccggcga 900

cgtggaggaa aaccctggcc ctaggatggg cttccggctg ctgtgctgcg tggccttctg 960  
 cctgctggga gccggccctg tggatagcgg cgtgaccag accccaagc acctgatcac 1020  
 cgccaccggc cagagagtga ccctgcgctg cagccctaga agcggcgacc tgtccgtgta 1080  
 ctggtatcag cagagcctgg accagggact gcagttcctc atccagtact acaacggcga 1140  
 ggaacgggcc aagggaaca tcctggaaag attcagcgcc cagcagttcc cggacctgca 1200  
 cagcgagctg aacctgagca gcctggaact gggcgactcc gccctgtact tctgcgccag 1260  
 cagcctgggc ggcgagagcg aacagtactt cggccctggc acccggtga cgtaaccga 1320  
 ggacctgaag aacgtgttcc ccccagaggt ggccgtgttc gagccctctg aggccgagat 1380  
 cagccacacc cagaaaagcca ccttggtctg cctggccacc ggcttctacc cggaccacgt 1440  
 ggaactgtct tgggtgggtga acggcaaaga ggtgcacagc ggcgtcagca cggaccctca 1500  
 gccctgaaa gagcagccc cctgaacga cagccggtac tgctgagca gcagactgcg 1560  
 ggtgtccgcc accttctggc agaaccccc gaaccactt agatgccagg tgcagttcta 1620  
 cggcctgagc gagaacgacg agtggacca ggaccgggc aagcctgtga cccagatcgt 1680  
 gtctgccgaa gcatgggggc gcgccgattg cggcttcaca agcgagagct accagcaggg 1740  
 cgtgctgagc gccaccatcc tgtacgagat cctgctgggc aaggccacc tgtacgccgt 1800  
 gctggtgtcc gctctggtgc tgatggccat ggtgaaacgg aaggacagcc ggggctaata 1860  
 agtcgac 1867

<210> 24

<211> 614

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组体

<400> 24

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

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

Thr Val Thr Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val  
 435 440 445  
 Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu  
 450 455 460  
 Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp  
 465 470 475 480  
 Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln  
 485 490 495  
 Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser  
 500 505 510  
 Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His  
 515 520 525  
 Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp  
 530 535 540  
 Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala  
 545 550 555 560  
 Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly  
 565 570 575  
 Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr  
 580 585 590  
 Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys  
 595 600 605  
 Arg Lys Asp Ser Arg Gly  
 610

<210> 25

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组体

<400> 25

gaattccata tgcaaaaaga agttgaacaa aattctggac ccctc 45

<210> 26

<211> 36

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组体

<400> 26

ttgtcagtcg acttagagtc tctcagctgg tacacg 36

<210> 27

<211> 45

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组体

<400> 27

gaattccata tggattctgg agttacacaa accccaaagc acctg 45

<210> 28

<211> 32

<212> DNA

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组体

<400> 28

tagaaaccgg tggccaggca caccagtgtg gc 32

<210> 29

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组体

<400> 29

Asp Arg Gly Ser Gln Ser

1                    5

<210> 30

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组体

<400> 30

Ile Tyr Ser Asn Gly Asp

1                    5

<210> 31

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>  
<223> 重组体  
<400> 31  
Ala Val Asn Ser Asp Ser Gly Tyr Ala Leu Asn Phe  
1                    5                    10  
<210> 32  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 重组体  
<400> 32  
Ser Gly Asp Leu Ser  
1                    5  
<210> 33  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 重组体  
<400> 33  
Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu  
1                    5  
<210> 34  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 重组体  
<400> 34  
Ala Ser Ser Leu Gly Gly Glu Ser Glu Gln Tyr  
1                    5                    10  
<210> 35  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 重组体  
<400> 35

Asp Arg Gly Ser Gln Ala

1 5

<210> 36

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组体

<400> 36

Ala Val Asn Ser Asp Ser Ser Tyr Ala Leu Asn Phe

1 5 10

<210> 37

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组体

<400> 37

Ala Val Asn Ser Asp Ser Gly Val Ala Leu Asn Phe

1 5 10

<210> 38

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组体

<400> 38

Ala Val Asn Ser Gln Ser Gly Tyr Ala Leu Asn Phe

1 5 10

<210> 39

<211> 12

<212> PRT

<213> 人工序列(Artificial Sequence)

<220>

<223> 重组体

<400> 39

Ala Val Asn Ser Gln Ser Gly Tyr Ser Leu Asn Phe

1 5 10

<210> 40

<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 重组体  
<400> 40  
Ala Val Asn Ser Gln Asn Gly Tyr Ala Leu Asn Phe  
1                   5                   10  
<210> 41  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 重组体  
<400> 41  
Asp Arg Gly Ser Phe Ser  
1                   5  
<210> 42  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 重组体  
<400> 42  
Asp Arg Gly Ser Tyr Ser  
1                   5  
<210> 43  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列(Artificial Sequence)  
<220>  
<223> 重组体  
<400> 43  
Ala Val Asn Ser Gln Ser Ser Tyr Ala Leu Asn Phe  
1                   5                   10  
<210> 44  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 智人

<400> 44

Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> 智人

<400> 45

Val Leu Leu Ser Asn Pro Thr Ser Gly

1 5

<210> 46

<211> 6

<212> PRT

<213> 智人

<400> 46

Leu Ser Asn Ser Ile Met

1 5

<210> 47

<211> 235

<212> PRT

<213> 智人

<400> 47

Met Ala Leu Pro Val Thr Ala Leu Leu Leu Pro Leu Ala Leu Leu Leu

1 5 10 15

His Ala Ala Arg Pro Ser Gln Phe Arg Val Ser Pro Leu Asp Arg Thr

20 25 30

Trp Asn Leu Gly Glu Thr Val Glu Leu Lys Cys Gln Val Leu Leu Ser

35 40 45

Asn Pro Thr Ser Gly Cys Ser Trp Leu Phe Gln Pro Arg Gly Ala Ala

50 55 60

Ala Ser Pro Thr Phe Leu Leu Tyr Leu Ser Gln Asn Lys Pro Lys Ala

65 70 75 80

Ala Glu Gly Leu Asp Thr Gln Arg Phe Ser Gly Lys Arg Leu Gly Asp

85 90 95

Thr Phe Val Leu Thr Leu Ser Asp Phe Arg Arg Glu Asn Glu Gly Tyr

100 105 110

Tyr Phe Cys Ser Ala Leu Ser Asn Ser Ile Met Tyr Phe Ser His Phe

115 120 125

Val Pro Val Phe Leu Pro Ala Lys Pro Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg

130	135	140
Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg		
145	150	155
Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly Gly Ala Val His Thr Arg Gly		
	165	170
Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr		
	180	185
Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val Ile Thr Leu Tyr Cys Asn His		
	195	200
Arg Asn Arg Arg Arg Val Cys Lys Cys Pro Arg Pro Val Val Lys Ser		
	210	220
Gly Asp Lys Pro Ser Leu Ser Ala Arg Tyr Val		
225	230	235

&lt;210&gt; 48

&lt;211&gt; 745

&lt;212&gt; DNA

&lt;213&gt; 智人

&lt;400&gt; 48

```

atggccttac cagtgaccgc cttgctcctg ccgctggcct tgctgctcca cgccgccagg 60
ccgagccagt tccgggtgtc gccgctggat cggacctgga acctgggcca gacagtggag 120
ctgaagtgcc aggtgctgct gtccaaccgc acgtcgggct gctcgtggct cttccagccg 180
cgcgggcgccg ccgccagtcc caccttctc ctatacctct cccaaaacaa gcccaaggcg 240
gccgagggggc tggacacca gcggttctcg ggcaagaggt tgggggacac cttcgtcctc 300
accctgagcg acttccgccg agagaacgag ggctactatt tctgctcggc cctgagcaac 360
tccatcatgt acttcagcca cttcgtgccg gtcttctcgc cagcgaagcc caccacgacg 420
ccagcggcgc gaccaccaac accggcgccc accatcgcgt cgcagcccct gtccctgcgc 480
ccagaggcgt gccggccagc ggcggggggc gcagtgcaca cgagggggct ggacttcgcc 540
tgtgatatct acatctgggc gcccttggcc gggacttggt gggtccttct cctgtcactg 600
gttatcacc tttactgcaa ccacaggaac cgaagacgtg tttgcaaatg tccccggcct 660
gtggtcaaat cgggagacaa gccagcctt tcggcgagat acgtcggttc aagagctaaa 720
agaagtggta gtggtgcccc tgtga 745

```

&lt;210&gt; 49

&lt;211&gt; 205

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; 人工序列(Artificial Sequence)

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; 重组体

&lt;400&gt; 49

Gln Lys Glu Val Glu Gln Asn Ser Gly Pro Leu Ser Val Pro Glu Gly

1                    5                    10                    15  
 Ala Ile Ala Ser Leu Asn Cys Thr Tyr Ser Asp Arg Gly Ser Gln Ala  
                           20                    25                    30  
 Phe Phe Trp Tyr Arg Gln Tyr Ser Gly Lys Ser Pro Glu Leu Ile Met  
                           35                    40                    45  
 Ser Ile Tyr Ser Asn Gly Asp Lys Glu Asp Gly Arg Phe Thr Ala Gln  
                           50                    55                    60  
 Leu Asn Lys Ala Ser Gln Tyr Val Ser Leu Leu Ile Arg Asp Ser Gln  
 65                    70                    75                    80  
 Pro Ser Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala Val Asn Ser Gln Ser Gly  
                           85                    90                    95  
 Tyr Ala Leu Asn Phe Gly Lys Gly Thr Ser Leu Leu Val Thr Pro His  
                           100                    105                    110  
 Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser  
                           115                    120                    125  
 Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn  
                           130                    135                    140  
 Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val  
 145                    150                    155                    160  
 Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp  
                           165                    170                    175  
 Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile  
                           180                    185                    190  
 Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser  
                           195                    200                    205  
 <210> 50  
 <211> 242  
 <212> PRT  
 <213> 人工序列(Artificial Sequence)  
 <220>  
 <223> 重组体  
 <400> 50  
 Asp Ser Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Ile Thr Ala Thr Gly  
 1                    5                    10                    15  
 Gln Arg Val Thr Leu Arg Cys Ser Pro Arg Ser Gly Asp Leu Ser Val  
                           20                    25                    30  
 Tyr Trp Tyr Gln Gln Ser Leu Asp Gln Gly Leu Gln Phe Leu Ile Gln  
                           35                    40                    45  
 Tyr Tyr Asn Gly Glu Glu Arg Ala Lys Gly Asn Ile Leu Glu Arg Phe

50	55	60
Ser Ala Gln Gln Phe Pro Asp Leu His Ser Glu Leu Asn Leu Ser Ser		
65	70	75
Leu Glu Leu Gly Asp Ser Ala Leu Tyr Phe Cys Ala Ser Ser Leu Gly		
	85	90
Gly Glu Ser Glu Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Thr		
	100	105
Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro		
	115	120
Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu		
130	135	140
Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn		
145	150	155
Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys		
	165	170
Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu		
	180	185
Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys		
	195	200
Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp		
210	215	220
Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg		
225	230	235
240		
Ala Asp		
<210> 51		
<211> 609		
<212> PRT		
<213> 智人		
<400> 51		
Met Lys Trp Val Glu Ser Ile Phe Leu Ile Phe Leu Leu Asn Phe Thr		
1	5	10
Glu Ser Arg Thr Leu His Arg Asn Glu Tyr Gly Ile Ala Ser Ile Leu		
	20	25
Asp Ser Tyr Gln Cys Thr Ala Glu Ile Ser Leu Ala Asp Leu Ala Thr		
	35	40
Ile Phe Phe Ala Gln Phe Val Gln Glu Ala Thr Tyr Lys Glu Val Ser		
50	55	60
Lys Met Val Lys Asp Ala Leu Thr Ala Ile Glu Lys Pro Thr Gly Asp		
65	70	75
		80

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

385	390	395	400
Leu Gln Lys Tyr Ile	Gln Glu Ser Gln Ala	Leu Ala Lys Arg Ser	Cys
	405	410	415
Gly Leu Phe Gln Lys	Leu Gly Glu Tyr Tyr	Leu Gln Asn Ala Phe	Leu
	420	425	430
Val Ala Tyr Thr Lys	Lys Ala Pro Gln Leu	Thr Ser Ser Glu Leu	Met
	435	440	445
Ala Ile Thr Arg Lys	Met Ala Ala Thr Ala	Ala Thr Cys Cys Gln	Leu
	450	455	460
Ser Glu Asp Lys Leu	Leu Ala Cys Gly Glu	Gly Ala Ala Asp Ile	Ile
465	470	475	480
Ile Gly His Leu Cys	Ile Arg His Glu Met	Thr Pro Val Asn Pro	Gly
	485	490	495
Val Gly Gln Cys Cys	Thr Ser Ser Tyr Ala	Asn Arg Arg Pro Cys	Phe
	500	505	510
Ser Ser Leu Val Val	Asp Glu Thr Tyr Val	Pro Pro Ala Phe Ser	Asp
	515	520	525
Asp Lys Phe Ile Phe	His Lys Asp Leu Cys	Gln Ala Gln Gly Val	Ala
	530	535	540
Leu Gln Thr Met Lys	Gln Glu Phe Leu Ile	Asn Leu Val Lys Gln	Lys
545	550	555	560
Pro Gln Ile Thr Glu	Glu Gln Leu Glu Ala	Val Ile Ala Asp Phe	Ser
	565	570	575
Gly Leu Leu Glu Lys	Cys Cys Gln Gly Gln	Glu Gln Glu Val Cys	Phe
	580	585	590
Ala Glu Glu Gly Gln	Lys Leu Ile Ser Lys	Thr Arg Ala Ala Leu	Gly
	595	600	605
Val			

亲本AFP TCR TRAV12-2\*02/TRAJ41\*01/TRAC  $\alpha$ 链细胞外氨基酸序列  
(SEQ ID NO: 2)

```

          10          20
          *          *
Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D

    30          40          50
    *          *          *
R G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M S I Y S N G

          60          70          80
          *          *          *
D K E D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P

          90          100
          *          *
S D S A T Y L C A V N S D S G Y A L N F G K G T S L L

    110          120          130
    *          *          *
V T P H I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L

          140          150          160
          *          *          *
F T D F D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K T V L D

          170          180
          *          *
M R S M D F K S N S A V A W S N K S D F A C A N A F N

    190          200
    *          *
N S I I P E D T F F P S P E S S

```

图1

**亲本AFP TCR TRBV9\*01/TRBD2/TRBJ2-7\*01/TRBC2  $\beta$ 链细胞外氨基酸序列  
(SEQ ID NO: 3)**

```

          10          20
          *          *
D S G V T Q T P K H L I T A T G Q R V T L R C S P R S

    30          40          50
    *          *          *
G D L S V Y W Y Q Q S L D Q G L Q F L I Q Y Y N G E E

          60          70          80
          *          *          *
R A K G N I L E R F S A Q Q F P D L H S E L N L S S L

          90          100
          *          *
E L G D S A L Y F C A S S L G G E S E Q Y F G P G T R

    110          120          130
    *          *          *
L T V T E D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H

          140          150          160
          *          *          *
T Q K A T L V C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K

          170          180
          *          *
E V H S G V S T D P Q P L K E Q P A L N D S R Y C L S

    190          200          210
    *          *          *
S R L R V S A T F W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S

    220          230          240
    *          *          *
E N D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D

```

图2

参考TCR α链——亲本AFP特异性TCR α链细胞外氨基酸序列，用半胱氨酸（粗体和下划线）替换了T159（即TRAC的T48）（SEQ ID NO: 4）

```

          10          20
          *          *
Q K E V E Q N S G P L S V P E G A I A S L N C T Y S D

    30          40          50
    *          *          *
R G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L I M S I Y S N G

          60          70          80
          *          *          *
D K E D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q P

          90          100
          *          *
S D S A T Y L C A V N S D S G Y A L N F G K G T S L L

    110          120          130
    *          *          *
V T P H I Q N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L

          140          150          160
          *          *          *
F T D F D S Q T N V S Q S K D S D V Y I T D K C V L D

          170          180
          *          *
M R S M D F K S N S A V A W S N K S D F A C A N A F N

    190          200
    *          *
N S I I P E D T F F P S P E S S

```

图3

参考TCR β链——亲本AFP特异性TCR β链细胞外氨基酸序列，用半胱氨酸（粗体和下划线）替换了S168（即TRBC2的S57），并且用A187替换了C187以及用D201替换了N201（SEQ ID NO: 5）

```

          10          20
          *          *
D S G V T Q T P K H L I T A T G Q R V T L R C S P R S
          30          40          50
          *          *          *
G D L S V Y W Y Q Q S L D Q G L Q F L I Q Y Y N G E E
          60          70          80
          *          *          *
R A K G N I L E R F S A Q Q F P D L H S E L N L S S L
          90          100
          *          *
E L G D S A L Y F C A S S L G G E S E Q Y F G P G T R
          110          120          130
          *          *          *
L T V T E D L K N V F P P E V A V F E P S E A E I S H
          140          150          160
          *          *          *
T Q K A T L V C L A T G F Y P D H V E L S W W V N G K
          170          180
          *          *
E V H S G V C T D P Q P L K E Q P A L N D S R Y A L S
          190          200          210
          *          *          *
S R L R V S A T F W Q D P R N H F R C Q V Q F Y G L S
          220          230          240
          *          *          *
E N D E W T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D

```

图4

**α链氨基酸序列 (SEQ ID NO: 6-20)****ADB 327 (SEQ ID No: 6)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSOAFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDS  
ATYLCVNSDSSGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
KNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

**ADB 329 (SEQ ID No: 7)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSOAFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSA  
TYLCVNSDSSGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

**ADB 330 (SEQ ID No: 8)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSOAFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSA  
TYLCVNSDSSGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

**ADB 331 (SEQ ID No: 9)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSOAFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDS  
ATYLCVNSDSSGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
KNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

**ADB 328 (SEQ ID No: 10)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSOAFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSA  
TYLCVNSDSSGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

**ADB 352 (SEQ ID No: 11)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSOAFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSA  
TYLCVNSDSSGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

**ADB 350 (SEQ ID No: 12)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSOAFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSA  
TYLCVNSDSSGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

**ADB 332 (SEQ ID No: 13)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSOAFFWYRQYSGKSPELIMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDS  
ATYLCVNSDSSGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
KNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

图5

**ADB 351 (SEQ ID No: 14)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSA  
TYLCAVNSQSGVALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

**ADB 349 (SEQ ID No: 15)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQSFFWYRQYSGKSPELMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSA  
TYLCAVNSQNGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSSDVYITDKTVLDMRSMDF  
KNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

**ADB 353 (SEQ ID No: 16)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSFSFFWYRQYSGKSPELMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSA  
TYLCAVNSDSGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

**ADB 326 (SEQ ID No: 17)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSYSFFWYRQYSGKSPELMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSA  
TYLCAVNSDSGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

**ADB 333 (SEQ ID No: 18)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSYSFFWYRQYSGKSPELMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSA  
TYLCAVNSDSYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

**ADB 334 (SEQ ID No: 19)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSYSFFWYRQYSGKSPELMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSA  
TYLCAVNSDSGVALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

**ADB 335 (SEQ ID No: 20)**

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSYSFFWYRQYSGKSPELMSIYSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLIRDSQPSDSA  
TYLCAVNSQSGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSSDVYITDKTVLDMRSMDFK  
SNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

图5续

**参考TCR  $\alpha$ 链DNA序列 (SEQ ID NO: 21)**

caaaaagaagttgagcagaattctggaccacctcagtggtccagagggagccattgcctctctcaactgcacttac  
agtgaccgaggttcccagtccttcttctggtagacagacaatattctgggaaaagccctgagttgataatgtccata  
tactccaatggtgacaaaagaagatggaaggtttacagcacagctcaataaaagccagccagtatgtttctctgctc  
atcagagactcccagcccagtgattcagccacctacctctgtgcccgtgaatagtgattccgggtatgcactcaac  
ttcggcaaaggcacctcgtgttgggtcacacccccatatccagaaccctgaccctgccgtgtaccagctgagagac  
tctaagtcgagtgacaagtcgtctgtcctattcaccgattttgattctcaacaaatgtgtcacaagtaaggat  
tctgatgtgtatatcacagacaaa **tgt**gtgctagacatgaggtctatggacttcaagagcaacagtgctgtggcc  
tggagcaacaaatctgactttgcatgtgcaaacgccttcaacaacagcattattccagaagacaccttcttcccc  
agcccagaaagtcc

**参考TCR  $\beta$ 链DNA序列 (SEQ ID NO: 22)**

gattctggagtcacacaaacccccaaagcacctgatcacagcaactggacagcgagtgacgctgagatgctccct  
aggtctggagacctctctgtgtactggtaccaacagagcctggaccagggcctccagttcctcattcagtattat  
aatggagaagagagagcaaaaggaaacattcttgaacgattctccgcacaacagttccctgacttgcaactctgaa  
ctaaacctgagctctctggagctgggggactcagctttgtatttctgtgccagcagcctcgggggggaatctgag  
cagtacttcgggcccgggaccaggtcacgggtcacagaggacctgaaaaacgtgttccccccgaggtcgctgtg  
tttgagccatcagaagcagagatctcccacacccaaaaggccacactgggtgtgcctggccaccggtttctacccc  
gaccacgtggagctgagctggtgggtgaatgggaaggaggtgcacagtggggtc **tgc**acagaccccagcccctc  
aaggagcagcccgcctcaatgactccagatacgtctctgagcagccgcctgagggctctcggccaccttctggcag  
gacccccgaaccacttccgctgtcaagtccagttctacgggctctcggagaatgacgagtggaaccaggatagg  
gcaaaccctcaccagatcgtcagcgcaggcctggggtagagcagac

图6



**具有猪捷申病毒-1 2A序列（粗体和下划线）的亲本AFP TCR  $\alpha$ 链-2A- $\beta$ 链氨基酸序列  
(SEQ ID NO: 24)**

```

      10          20          30
      *          *          *
M M K S L R V L L V I L W L Q L S W V W S Q Q K E V E Q N S G P L S
      40          50          60
      *          *          *
V P E G A I A S L N C T Y S D R G S Q S F F W Y R Q Y S G K S P E L
      70          80          90          100
      *          *          *          *
I M S I Y S N G D K E D G R F T A Q L N K A S Q Y V S L L I R D S Q
      110         120         130
      *          *          *
P S D S A T Y L C A V N S D S G Y A L N F G K G T S L L V T P H I Q
      140         150         160         170
      *          *          *          *
N P D P A V Y Q L R D S K S S D K S V C L F T D F D S Q T N V S Q S
      180         190         200
      *          *          *
K D S D V Y I T D K T V L D M R S M D F K S N S A V A W S N K S D F
      210         220         230
      *          *          *
A C A N A F N N S I I P E D T F F P S P E S S C D V K L V E K S F E
      240         250         260         270
      *          *          *          *
T D T N L N F Q N L S V I G F R I L L L K V A G F N L L M T L R L W
      280         290         300
      *          *          *
S S G S R A K R S G S G A T N F S L L K Q A G D V E E N P G P R M G
      310         320         330         340
      *          *          *          *
F R L L C C V A F C L L G A G P V D S G V T Q T P K H L I T A T G Q
      350         360         370
      *          *          *
R V T L R C S P R S G D L S V Y W Y Q Q S L D Q G L Q F L I Q Y Y N

```

图8

```

          380          390          400
          *          *          *
G E E R A K G N I L E R F S A Q Q F P D L H S E L N L S S L E L G D
410          420          430          440
          *          *          *
S A L Y F C A S S L G G E S E Q Y F G P G T R L T V T E D L K N V F
          450          460          470
          *          *          *
P P E V A V F E P S E A E I S H T Q K A T L V C L A T G F Y P D H V
          480          490          500          510
          *          *          *          *
E L S W W V N G K E V H S G V S T D P Q P L K E Q P A L N D S R Y C
          520          530          540
          *          *          *
L S S R L R V S A T F W Q N P R N H F R C Q V Q F Y G L S E N D E W
          550          560          570
          *          *          *
T Q D R A K P V T Q I V S A E A W G R A D C G F T S E S Y Q Q G V L
580          590          600          610
          *          *          *          *
S A T I L Y E I L L G K A T L Y A V L V S A L V L M A M V K R K D S

R G

```

图8续

AFP TCR引物和变体链

gaattccata tgcaaaaaga agttgaacaa aattctggac ccctc (PCR引物), SEQ ID NO:25  
ttgtcagtcg acttagagtc tctcagctgg tacacg (PCR引物), SEQ ID NO:26  
gaattccata tggattctgg agttacacaa accccaaagc acctg (PCR引物), SEQ ID NO:27  
tagaaaccgg tggccaggca caccagtgtg gc (PCR引物), SEQ ID NO:28  
DRGSQS ( $\alpha$ CDR1), SEQ ID NO:29  
IYSNGD ( $\alpha$ CDR2), SEQ ID NO:30  
AVNSDSGYALNF ( $\alpha$ CDR3), SEQ ID NO:31  
SGDLS ( $\beta$ CDR1), SEQ ID NO:32  
YNGEE ( $\beta$ CDR2), SEQ ID NO:33  
ASSLGGSEYQ ( $\beta$ CDR3), SEQ ID NO:34  
DRGSQA ( $\alpha$ CDR1), SEQ ID NO:35  
AVNSDSSYALNF ( $\alpha$ CDR2), SEQ ID NO:36  
AVNSDSGVALNF ( $\alpha$ CDR2), SEQ ID NO:37  
AVNSQSGYALNF ( $\alpha$ CDR2), SEQ ID NO: 38  
AVNSQSGYSLNF ( $\alpha$ CDR2), SEQ ID NO: 39  
AVNSQNGYALNF ( $\alpha$ CDR2), SEQ ID NO: 40  
DRGSFS ( $\alpha$ CDR1), SEQ ID NO: 41  
DRGSYS ( $\alpha$ CDR1), SEQ ID NO: 42  
AVNSQSSYALNF ( $\alpha$ CDR2), SEQ ID NO: 43

图9

VLLSNPTSG, CD8 $\alpha$  CDR1, SEQ ID NO: 44

YLSQNKPK, CD8 $\alpha$  CDR2, SEQ ID NO: 45

LSNSIM, CD8 $\alpha$  CDR3, SEQ ID NO: 46

MALPVTALLLPLALLLHAARPSQFRVSPLDRTWNLGETVELKCVLLSNPTSGCSWLFQPRGAAASPTFLLYLSQNK  
PKAAEGLDTRFRSGKRLGDTFVLTLSDFRRENEGYFCSALNSIMYFSHFVPVFLPAKPTTTPAPRPPTPAPTASQ  
 PLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDIYIWAPLAGTCGVLLSLVITLYCNHRNRRRVCKCPRPVVKS GDKP SLSAR  
 YV, (CD8 $\alpha$ ), CDR粗体下划线, 信号序列斜体下划线, SEQ ID NO: 47

ATGGCCTTACCAGTGACCGCCTTGCTCCTGCCGCTGGCCTTGCTGCTCCACGCCGCCAGGCCGAGCCAGTTCC  
 GGGTGTGCGCGCTGGATCGGACCTGGAACCTGGGCGAGACAGTGGAGCTGAAGTGCCAGGTGCTGCTGTCC  
 AACCCGACGTCGGGCTGCTCGTGGCTCTTCCAGCCGCGCGGCCGCCAGTCCCACCTTCTCTATACT  
 CTCCAAAACAAGCCCAAGGCGGCCGAGGGGCTGGACACCCAGCGGTTCTCGGGCAAGAGGTTGGGGGACA  
 CCTTCGCTCTACCCTGAGCGACTCCGCCGAGAGAACGAGGGCTACTATTTCTGCTCGGCCCTGAGCAACTCC  
 ATCATGTACTTCAGCCACTTCGTGCCGGTCTTCTGCCAGCGAAGCCACCACGACGCCAGCGCCGCGACCAC  
 CAACACCGGCGCCACCATCGCGTCGCAGCCCTGTCCCTGCGCCAGAGGCGTGCCGGCCAGCGGCGGGGG  
 GCGCAGTGCACACGAGGGGGCTGGACTTCGCTGTGATATCTACATCTGGGCGCCCTTGGCCGGGACTTGTG  
 GGGTCTTCTCTGCTACTGTTATCACCTTTACTGCAACCACAGGAACCGAAGACGTGTTTGCAAATGTCCC  
 CGGCTGTGGTCAAATCGGGAGACAAGCCAGCCTTTCGGCGAGATACGTCGGTTCAAGAGCTAAAAGAAGT  
 GGTAGTGGTGCCCTGTGA, SEQ ID NO: 48; (CD8 $\alpha$ ) 核酸序列

图10

变体AFP TCR (AFP TRAV12-2\*02/TRAJ41\*01/TRAC  $\alpha$ 链细胞外氨基酸序列  
(SEQ ID NO: 49)

QKEVEQNSGPLSVPEGAIASLNCTYSDRGSQAFFWYRQYSGKSPELIMSIYNSNGDKEDGRFTAQLNKASQYVSLLR  
 DSQPSDSATYLCAVNSQSGYALNFGKGTSLLVTPHIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQKSDSV  
 YITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESS

变体AFP TCR TRBV9\*01/TRBD2/TRBJ2-7\*01/TRBC2  $\beta$ 链细胞外氨基酸序列  
(SEQ ID NO: 50)

DSGVTQTPKHLITATGQRVTLRCSPRSGDLSVYWYQQSLDQGLQFLIQYNGEERAKGNILERFSAQQFPDLHSEL  
 NLSSLELGDSALYFCASSLGGESEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVEL  
 SWWVNGKEVHSGVSTDPQLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKP  
 VTQIVSAEAWGRAD

图11

**SEQ ID NO: 51**人类甲胎蛋白

MKWVESIFLI FLLNFTESRT LHRNEYGIAS ILDSYQCTAE ISLADLATIF  
FAQFVQEATY KEVSKMVKDA LTAIEKPTGD EQSSGLENQ LPAFLEELCH  
EKEILEKYGH SDCCSQSEEG RHNCFLAHKK PTPASIPLFQ VPEPVSCEA  
YEEDRET**FMN KFIYEI**ARRH PFLYAPTILL WAARYDKIIP SCCKAENAVE  
CFQTKAATVT KELRESSLLN QHACAVMKNF GTRTFQAITV TKLSQKFTKV  
NFTEIQKLV L DVAHVHEHCC RGDVLDCLQD GEKIMSYICS QQDTLSNKIT  
ECCKLTTLER GQCIIHAEND EKPEGLSPNL NRFLGDRDFN QFSSGEKNIF  
LASFVHEYSR RHPQLAVSVI LRVAKGYQEL LEKCFQTENP LECQDKGEEE  
LQKYIQESQA LAKRSCGLFQ KLGEYYLQNA FLVAYTKKAP QLTSELMAI  
TRKMAATAAT CCQLSEDKLL ACGEGAADII IGHLCIRHEM TPVNPVGVC  
CTSSYANRRP CFSSLVDET YVPPAFSDDK FIFHKDLCQA QGVALQTMKQ  
EFLINLVKQK PQITEEQLEA VIADFSGLLE KCCQGQEQEV CFAEEGQKLI  
SKTRAALGV

图12

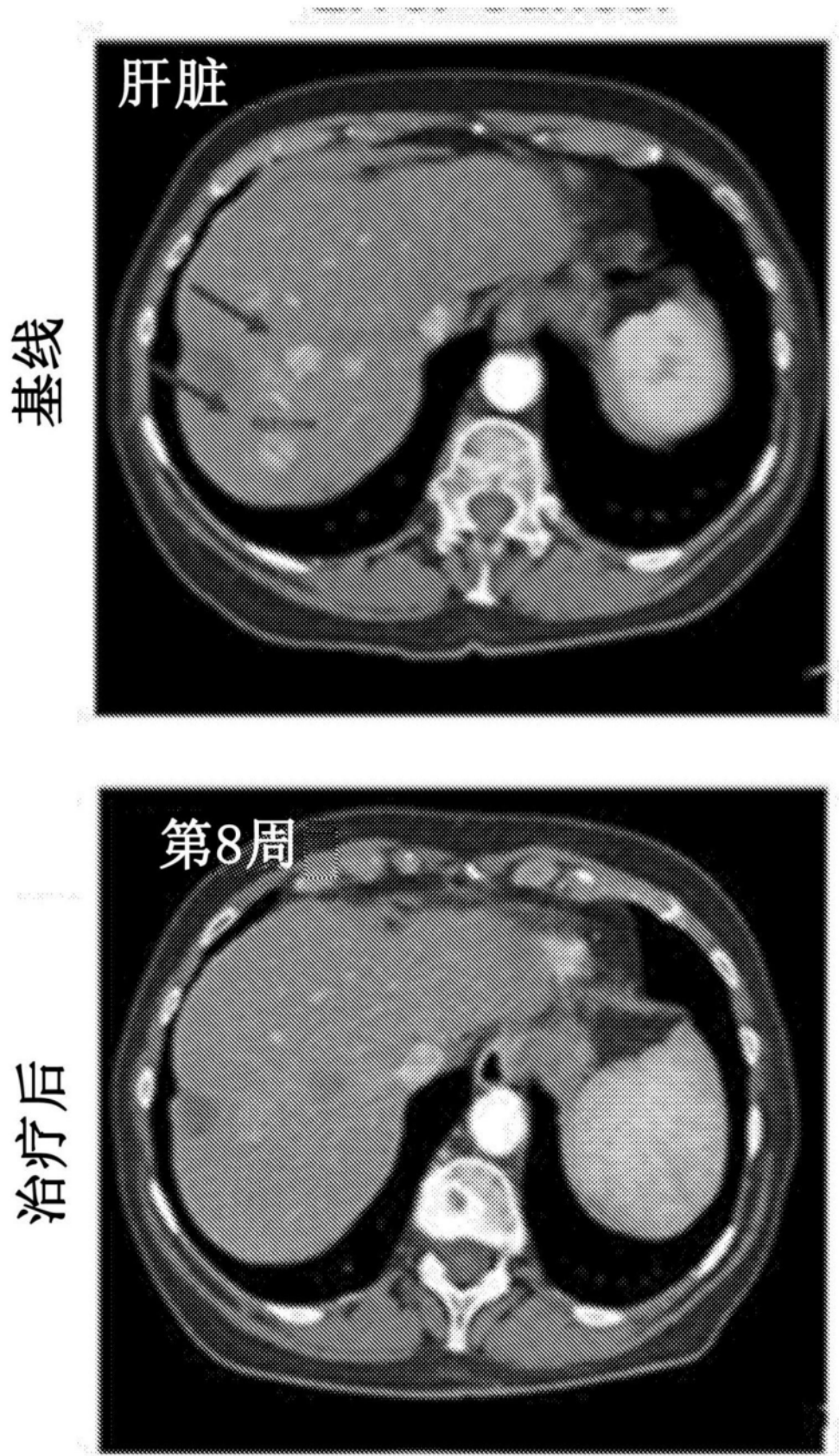


图13

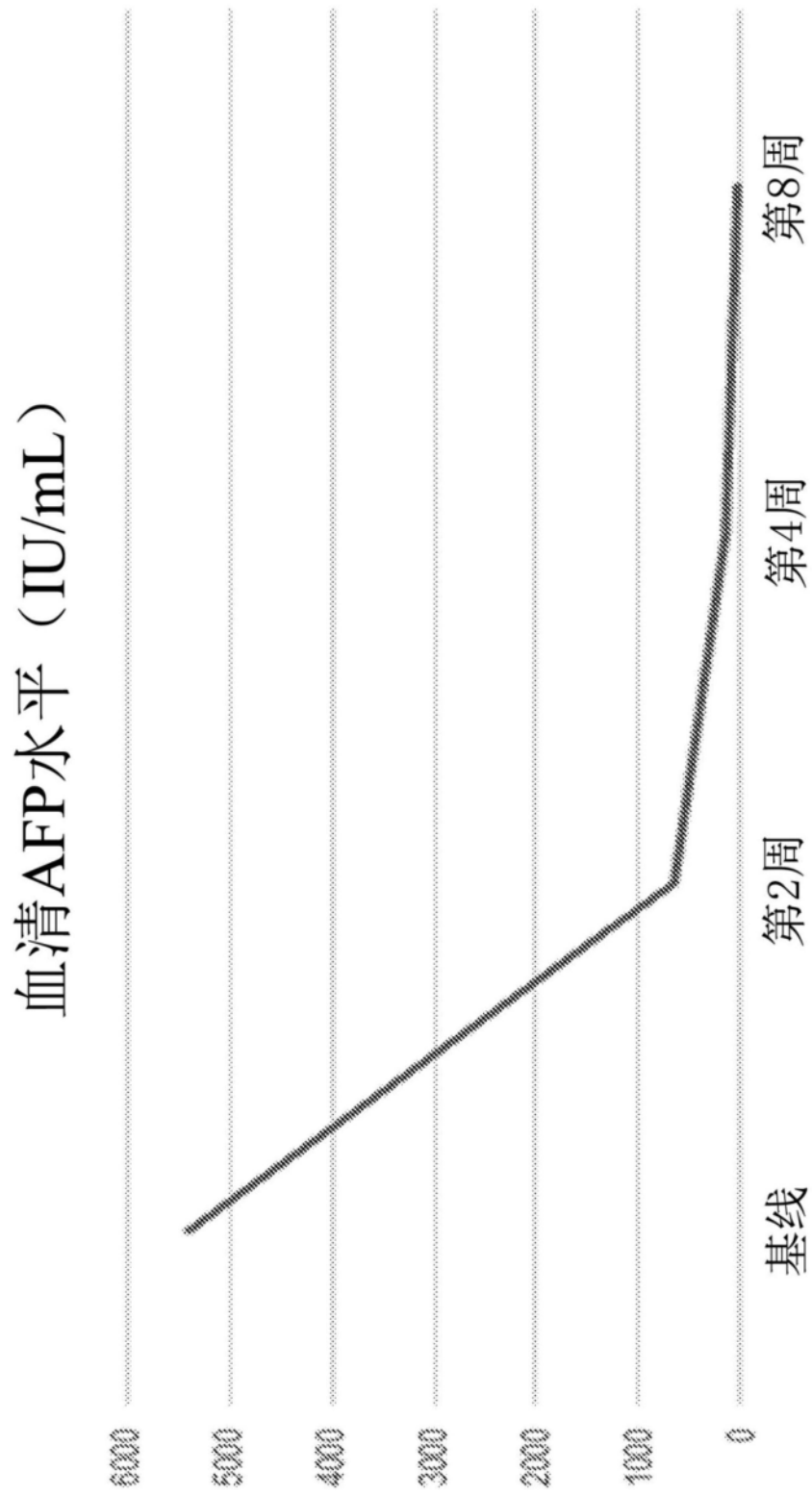


图14

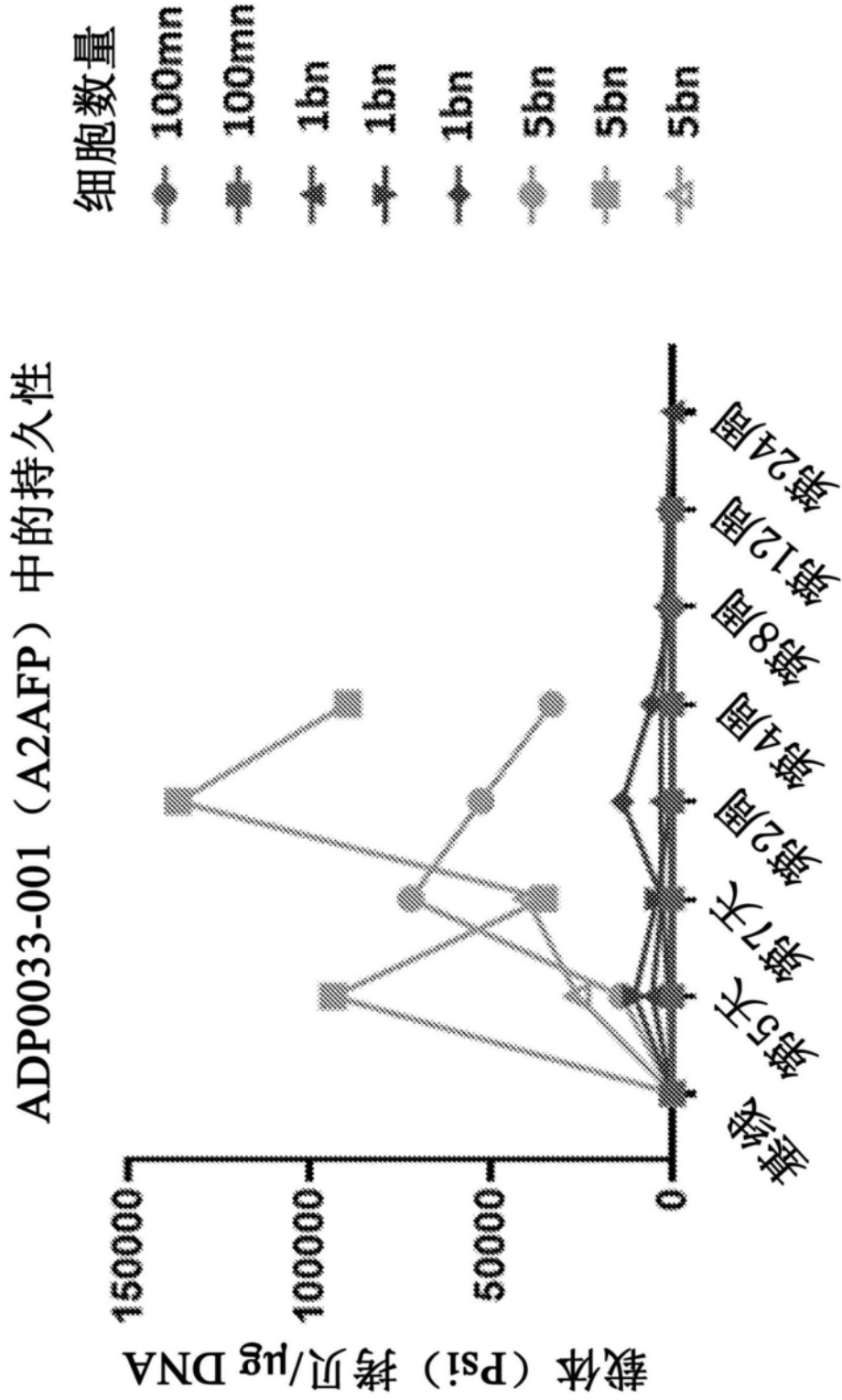


图15

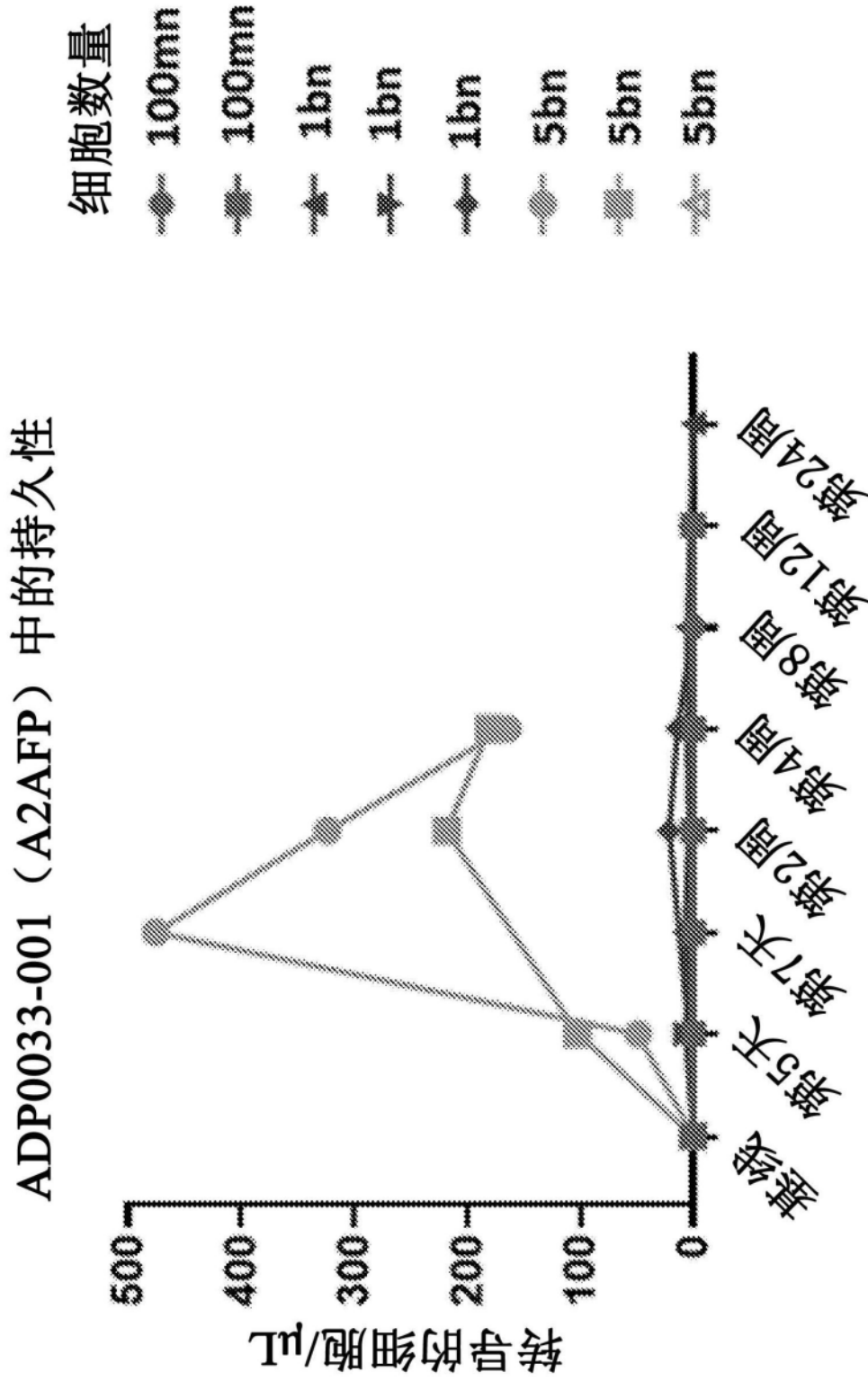


图16