



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202039545 A

(43)公開日：中華民國 109 (2020) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：108144761

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 12 月 06 日

(51)Int. Cl. : C07K14/725 (2006.01)

A61K35/17 (2015.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2018/12/06 美國

62/776,012

(71)申請人：大陸商廣東天科雅生物醫藥科技有限公司 (中國大陸) GUANGDONG TCRCURE
BIOPHARMA TECHNOLOGY CO., LTD. (CN)

中國大陸

(72)發明人：李思 LI, SI (CN)；王 品 WANG, PIN (US)；拜森 保羅 BRYSON, PAUL (US)；
亞歷山大 彼得 ALEXANDER, PETER (US)；陳銳 CHEN, RUI (CN)

(74)代理人：劉法正；尹重君

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：37 項 圖式數：26 共 125 頁

(54)名稱

靶向腫瘤抗原、TGF- β 、和免疫檢查點的組合型TCR-T細胞療法

(57)摘要

本公開針對基因工程化 TCR-T 細胞來識別腫瘤抗原並同時分泌阻斷免疫檢查點分子和 TGF β 的結合蛋白。這些工程化 T 細胞表現出更強抗腫瘤應答和降低的 T 細胞耗竭。其中，本公開提供針對 HPV-或 EBV-陽性癌症等的免疫療法。

The present disclosure is directed towards genetically engineered TCR-T cells to recognize tumor antigens and simultaneously secrete a binding protein that blocks an immune checkpoint molecule and TGF β . These engineered T cells demonstrate stronger antitumor response and reduced T cell exhaustion. The present disclosure provides immunotherapy against HPV- or EBV-positive cancers, among others.



202039545

【發明摘要】

【中文發明名稱】

靶向腫瘤抗原、TGF- β 、和免疫檢查點的組合型TCR-T細胞療法

【英文發明名稱】

COMBINATIONAL TCR-T CELL THERAPY TARGETING TUMOR ANTIGENS, TGF-B, AND IMMUNE CHECKPOINTS

【中文】

本公開針對基因工程化TCR-T細胞來識別腫瘤抗原並同時分泌阻斷免疫檢查點分子和TGF β 的結合蛋白。這些工程化T細胞表現出更強抗腫瘤應答和降低的T細胞耗竭。其中，本公開提供針對HPV-或EBV-陽性癌症等的免疫療法。

【英文】

The present disclosure is directed towards genetically engineered TCR-T cells to recognize tumor antigens and simultaneously secrete a binding protein that blocks an immune checkpoint molecule and TGF β . These engineered T cells demonstrate stronger antitumor response and reduced T cell exhaustion. The present disclosure provides immunotherapy against HPV- or EBV-positive cancers, among others.

【指定代表圖】 (無)

【代表圖之符號簡單說明】
(無)

【特徵化學式】
(無)

【發明說明書】

【中文發明名稱】

靶向腫瘤抗原、TGF-β、和免疫檢查點的組合型TCR-T細胞療法

【英文發明名稱】

COMBINATIONAL TCR-T CELL THERAPY TARGETING TUMOR ANTIGENS, TGF-B, AND IMMUNE CHECKPOINTS

【技術領域】

優先權聲明

【0001】 本申請要求2018年12月6日提交的美國臨時申請No. 62/776,012的權益。前述文獻的完整內容通過引用的方式結合在此。

發明領域

【0002】 本公開大體上涉及工程化細胞及其組合物，具體地，含有基因工程化T細胞受體(TCR)、TGF-β受體(例如，TGF-β trap)和檢查點抑制劑(CPI)的T細胞。本文還公開了使用組合物來治療癌症的方法。

【先前技術】

發明背景

【0003】 在擴增感染的B細胞中，Epstein-Barr病毒(EBV)安裝基因表達程序，即"生長"或"潛伏III期(latency III)"程序。該類型的潛伏在體外EBV誘導的淋巴樣幹細胞系(LCL)中、在移植後淋巴組織增生性疾病(Brink AA, 1997, J Clin Pathol 50: 911–918.)中、以及在原發性和持續性EBV感染期間在淋巴器官中的EBV感染的B細胞中發現，在此該程序被認為通過感染細胞的增殖而導致EBV負載的放大(Young LS, 2004, Nat Rev Cancer 4: 757–768; Hochberg D, 2004, Proc Natl Acad Sci U S A 101: 239–244)。幾種免疫原性EBV抗原、潛伏膜蛋白(LMP1、LMP2A、LMP2B)和Epstein-Barr核抗原(EBNA1、-2、-3A、-3B、-3C、-LP)在潛

伏III期EBV感染的B細胞中表達。在患有鼻咽癌(Mutirangura等人, Clin Cancer Res. 4: 665-9 (1998) ; Lo等人, Cancer Res. 59: 1188-91 (1999))、某些淋巴瘤(Lei等人, Br J Haematol. 111:239-46 (2000) ; Gallagher等人, Int J Cancer. 84: 442-8 (1999) ; Dronet等人, J Med Viral. 57: 383-9 (1999))、乳腺癌(Bonnet, M.等人, J. Natl. Cancer Inst., 91: 1376-1381 (1999))、和肝細胞癌(Sugawara, Y.等人, Virology, 256: 196-202 (1999))的患者中發現Epstein-Barr病毒(EBV) DNA。

【0004】 作為癌症的免疫療法的一種形式的過繼細胞轉移(ACT)，已證明在治療惡性血液病和惡性黑色素瘤方面取得顯著成功。ACT的一種形式，使用表達嵌合抗原受體(CAR)的基因修飾的T細胞來特異性靶向例如CD19或GD2等腫瘤-相關-抗原(TAA)，已在治療例如B細胞惡性腫瘤等疾病的臨床試驗中顯示出令人鼓舞的結果。

【0005】 儘管有記錄表明CAR-T細胞療法在患有惡性血液病的患者中的成功，在實體瘤中僅觀察到些微反應。這些可以部分地歸因於免疫抑制性腫瘤微環境的建立。這樣的環境涉及由T細胞中的、與腫瘤細胞中其同源配體反應的抑制性受體(IR)的表達的增加所介導的幾種固有抑制途徑的上調(Ping Y,等人, Protein Cell 2018, 9(3):254–266)。另外，不同于天然存在的T細胞受體(TCR)，CAR可直接地和選擇性地以主要獨立于組織相容性類別(MHC)的方式識別細胞表面TAA。TAA的高密度可影響CAR-T細胞的實體瘤穿透。然而，由於癌細胞表面缺少靶向MHC依賴性抗原，具有模仿天然TCR的基因工程化TCR的T細胞可比CAR-T細胞更深地穿透。TCR可在MHC的情況下識別細胞內或細胞外抗原。當設計TCR以靶向腫瘤時，選擇靶向細胞內腫瘤抗原可為有利的。(Fesnak AD,等人 Nat Rev Cancer. 2016 Aug 23 ; 16(9): 566–581.)

【0006】 迄今為止，已在T細胞中表徵了幾種IR，例如CTLA-4、T細胞Ig黏蛋白-3 (TIM-3)、淋巴細胞活化基因3 (LAG-3)、和程序性死亡-1 (PD-1)。這些

分子在慢性疾病和癌症中在T細胞的持續活化後上調，並且它們促進T細胞功能障礙和耗竭，因此導致腫瘤免疫監視逃逸。與其他IR不同，PD-1在T細胞活化後不久被上調，這反過來通過與其兩個配體：PD-L1或PD-L2的一者相互作用來抑制T細胞效應子功能。PD-L1在T細胞、B細胞、巨噬細胞、和樹突細胞(DC)表面為組成型表達。其也在各種實體瘤中顯示出大量表達。與此相反，PD-L1在正常組織中的表達是檢測不到的。由於其在免疫抑制中的關鍵作用，PD-1是近期研究的重點，旨在中和其對T細胞的負面作用並增強抗腫瘤應答。臨床研究已表明PD-1阻斷顯著介導結腸直腸癌、腎癌和肺癌及黑色素瘤中的腫瘤消退。(Chae YK, 等人, J Immunother Cancer. 2018 ; 6: 39 ; Le DT, 等人 N Engl J Med 2015 ; 372: 2509–20。)

【0007】 TGF β 配體及其受體均已作為治療靶而被廣泛研究。存在三種配體同種型，TGF β 1、2和3，其全部作為同源二聚體(homodimer)存在。也存在三種TGF β 受體(TGF β R)，其被稱為TGF β R I、II和III型(López-Casillas等人, J. Cell Biol. 1994 ; 124:557-68)。TGF β RI是信號傳導鏈並且不結合配體。TGF β RII以高親和性結合配體TGF β 1和3，但不結合TGF β 2。TGF β RII/TGF β 複合物招募TGF β RI來形成信號傳導複合物(Won等人, Cancer Res. 1999: 59:1273-7)。TGF β RIII是結合至其信號傳導受體的TGF β 的陽性調節因子並且以高親和性結合全部3種TGF β 同種型。在細胞表面上，TGF β /TGF β RIII複合物結合TGF β RII，然後招募TGF β RI，其取代TGF β RIII來形成信號傳導複合物。

【0008】 儘管3種不同的TGF β 同種型全部通過相同受體發出信號，它們已知在體內具有差異表達模式和非重疊功能。3種不同的TGF β 同種型敲除小鼠具有不同的表型，表明許多非補償的功能(Bujak等人, Cardiovasc Res. 2007: 74: 184-95)。因此，分別考慮到TGF β 1和TGF β 2在腫瘤微環境和心臟生理學中的主要作用，中和TGF β 1但不中和TGF β 2的治療劑通過在不損害抗腫瘤活性的情況下

最小化心臟毒性來提供最佳治療指數。

【0009】 儘管迄今為止，免疫檢查點抑制劑的臨床活動前景廣闊，通過提高治療功效或降低毒性的一者或兩者來增加治療指數仍是抗癌免疫療法的發展中的主要目標。

【發明內容】

發明概要

【0010】 本公開提供工程化T細胞，其包括：編碼抗LMP2 TCR的核酸，其中抗LMP2 TCR是與腫瘤中LMP2特異性結合的基因工程化T細胞受體(TCR)。

【0011】 在本發明的一方面中，抗LMP2 TCR包括分別地以下基序序列：氨基酸SEQ ID NO:1的 α 鏈CDR1 (位置27-32)、CDR2 (位置50-56)、CDR3 (位置90-101)和氨基酸SEQ ID NO:2的 β 鏈CDR1 (位置27-31)、CDR2 (位置49-54)、CDR3 (位置92-106)。在另一個實施方案中，抗LMP2 TCR包括SEQ ID NO:1的 α 鏈可變結構域和SEQ ID NO:2的 β 鏈可變結構域。在更多的實施方案中，編碼基因工程化TCR的核酸包括SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4中記載的序列。

【0012】 在本發明的另一方面中，所述抗LMP2 TCR包括分別地氨基酸SEQ ID NO:5的 α 鏈CDR1 (位置25-30)、CDR2 (位置48-54)、CDR3 (位置89-100)和氨基酸SEQ ID NO:6的 β 鏈CDR1 (位置25-29)、CDR2 (位置47-52)、CDR3 (位置91-103)。在更多實施方案中，所述抗LMP2 TCR包括SEQ ID NO:5的 α 鏈可變結構域和SEQ ID NO:6的 β 鏈可變結構域。在優選實施方案中，編碼基因工程化TCR的核酸包括SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8中記載的序列。

【0013】 在本發明的另一方面中，所述抗LMP2 TCR包括分別地氨基酸SEQ ID NO:9的 α 鏈CDR1 (位置32-37)、CDR2 (位置55-61)、CDR3 (位置96-108)和氨基酸SEQ ID NO:10的 β 鏈CDR1 (位置25-29)、CDR2 (位置47-52)、CDR3 (位置90-105)。在更多實施方案中，所述抗LMP2 TCR包括SEQ ID NO:9的 α 鏈可變結構域和SEQ ID NO:10的 β 鏈可變結構域。在優選實施方案中，編碼基因工程化TCR的核酸包括SEQ ID NO:9和SEQ ID NO:10中記載的序列。

構域和SEQ ID NO:10的 β 鏈可變結構域。在優選實施方案中，編碼基因工程化TCR的核酸包括SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12中記載的序列。

【0014】 在本發明的另一方面中，抗LMP2 TCR為組成型表達。

【0015】 在本發明的另一方面中，所述工程化T細胞進一步包括降低腫瘤中抑制性受體的功能或表達的抑制性蛋白。

【0016】 在一些實施方案中，所述抑制性蛋白為免疫檢查點抑制劑。

【0017】 在一些實施方案中，所述抑制性蛋白阻斷程序性細胞死亡蛋白1(PD-1)，其中所述蛋白為單鏈抗體(scFv)。在優選實施方案中，所述抑制性蛋白為組成型表達。

【0018】 在本發明的一方面中，提供了含有上文提及的工程化T細胞和藥學上可接受的運載體(carrier)的藥物組合物。並且，提供了一種治療癌症的方法，所述方法包括向有需要的受試者施用治療有效量的藥物組合物，其中所述癌症為鼻咽癌、霍奇金氏淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、或胃癌。

【0019】 在一些實施方案中，所述方法進一步包括向受試者施用治療有效量的包括化學療法或放射療法的現有療法。在一些實施方案中，所述細胞和現有療法順序或同時施用。

【0020】 本發明還提供了一種工程化T細胞，其包括：核酸，其編碼(a)與腫瘤中抗原特異性結合的基因工程化T細胞受體；(b)降低腫瘤中免疫檢查點的功能或表達的抑制性蛋白；和(c)與轉化生長因子 β (TGF- β)家族的成員結合的蛋白。這些工程化T細胞表現出降低的T細胞耗竭；因此它們具有誘導更強抗腫瘤應答的能力。靶向的轉化生長因子 β (TGF- β)可以是TGF- β 1、2或3。

【0021】 在本發明的一方面中，所述免疫檢查點包括PD1、PD-L1和CTLA-4中的一種或多種。在一些實施方案中，所述抑制性蛋白阻斷程序性細胞死亡蛋白1 (PD-1)，其中所述蛋白為單鏈抗體(scFv)。

【0022】 在本發明的一方面中，所述腫瘤抗原為人乳頭瘤病毒(HPV)或 Epstein-Barr病毒(EBV)抗原。在一些實施方案中，所述基因工程化T細胞受體為抗LMP2 TCR。在一些實施方案中，所述抗LMP2 TCR含有選自由SEQ ID NO:1、5或9組成的組的 α 鏈可變結構域和選自由SEQ ID NO:2、6或10組成的組的 β 鏈可變結構域。在一些實施方案中，編碼抗LMP2 TCR的核酸含有SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4。在一些實施方案中，編碼抗LMP2 TCR的核酸含有SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8。在一些實施方案中，編碼抗LMP2 TCR的核酸含有SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12。在一些實施方案中，所述基因工程化T細胞受體為抗E6或抗E7 TCR。

【0023】 在本發明的另一方面中，所述基因工程化TCR為組成型表達。

【0024】 在本發明的另一方面中，靶向轉化生長因子 β 家族的成員的結合蛋白包含人TGF β RII的片段。在一些實施方案中，所述結合蛋白包含TGF β RII的胞外結構域(ECD)(SEQ ID NO: 13)。

【0025】 在本發明的一方面中，所述抑制性蛋白和/或TGF β 結合蛋白為組成型表達。

【0026】 本發明進一步提供含有上文提及的核酸的載體，其包括(a)編碼與腫瘤中的抗原特異性結合的基因工程化T細胞受體的核酸；(b)編碼降低腫瘤中免疫檢查點的功能或表達的抑制性蛋白的核酸；和(c)編碼與轉化生長因子 β (TGF- β)家族的成員結合的蛋白的核酸，其中所述載體優選逆轉錄病毒載體。

【0027】 在本發明的一方面中，提供含有上文提及的工程化T細胞和藥學上可接受的運載體的藥物組合物。並且，提供一種治療癌症的方法，所述方法包括向有需要的受試者施用治療有效量的藥物組合物，其中所述癌症主要為病毒相關的惡性腫瘤。

【0028】 在一些實施方案中，所述癌症為HPV或EBV陽性癌症。在一些實施方案中，EBV相關癌症可為但不限於鼻咽癌、霍奇金氏淋巴瘤、伯基特氏淋

巴瘤、或胃癌。在一些實施方案中，HPV相關癌症可為但不限於子宮頸、肛門、口咽、或生殖器官癌。

【0029】 在本發明的一方面中，所述腫瘤為病毒相關的腫瘤或與病毒致癌基因相關的腫瘤。

【0030】 在一些實施方案中，所述方法進一步包括向受試者施用治療有效量的包括化學療法或放射療法的現有療法。在一些實施方案中，所述細胞和現有療法順序或同時施用。

【0031】 在本發明的另一方面中，一種產生基因工程化T細胞的方法，其包括引入含有3種轉基因的載體(vector)：(1)與腫瘤中的抗原特異性結合的基因工程化T細胞受體的 α 鏈，(2)同一TCR的 β 鏈，和(3)用GS接頭連接的新型免疫檢查點抑制劑(ICD)的重鏈和輕鏈的可變區，其通過可變重鏈的C-末端處的柔性接頭肽融合至TCR β RII的胞外結構域的配體結合序列，其中所述載體包括但不限於逆轉錄病毒載體。在更多實施方案中，3種轉基因由2A序列連接。在一些實施方案中，基因工程化TCR進一步包括信號肽序列。

【0032】 在一方面中，本公開涉及T細胞受體(TCR)或其抗原結合片段，其包括含有可變 α (Va)區的 α 鏈和含有可變 β (Vb)區的 β 鏈。

【0033】 在一些實施方案中，本文提供TCR或抗原結合片段：

(1)Va區，其包括分別含有SEQ ID NO:1的互補決定區1 (CDR1)、互補決定區2 (CDR2)、和互補決定區3 (CDR3)的CDR1、CDR2、和CDR3，和Vb區，其包括分別含有SEQ ID NO:2的CDR1、CDR2、和CDR3的CDR1、CDR2、和CDR3；

(2)Va區，其包括分別含有SEQ ID NO:5的CDR1、CDR2、和CDR3的CDR1、CDR2、和CDR3，和Vb區，其包括分別含有SEQ ID NO:6的CDR1、CDR2、和CDR3的CDR1、CDR2、和CDR3；或

(3)Va區，其包括分別含有SEQ ID NO:9的CDR1、CDR2、和CDR3的CDR1、

CDR2、和CDR3，和Vb區，其包括分別含有SEQ ID NO:10的CDR1、CDR2、和CDR3的CDR1、CDR2、和CDR3。

【0034】 在一些實施方案中，本文提供TCR或抗原結合片段：

(1)Va區，其包括分別含有SEQ ID NO:17-19的氨基酸的CDR1、CDR2、和CDR3，和Vb區，其包括分別含有SEQ ID NO:20-22的氨基酸的CDR1、CDR2、和CDR3；

(2)Va區，其包括分別含有SEQ ID NO:23-25的氨基酸的CDR1、CDR2、和CDR3，和Vb區，其包括分別含有SEQ ID NO:26-28的氨基酸的CDR1、CDR2、和CDR3；或

(3)Va區，其包括分別含有SEQ ID NO:29-31的氨基酸的CDR1、CDR2、和CDR3，和Vb區，其包括分別含有位置25-29處的氨基酸、SEQ ID NO:32-34的氨基酸的CDR1、CDR2、和CD3。

【0035】 在一些實施方案中，本文提供TCR或抗原結合片段：

Va區，其包括SEQ ID NOs:1、5、或9任意者中記載的氨基酸序列、或與其具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列；和

Vb區，其包括SEQ ID NOs:2、6、或10任意者中記載的氨基酸序列、或與其具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列。

【0036】 在一些實施方案中，本文提供TCR或抗原結合片段，所述TCR或其抗原結合片段結合或識別LMP2的肽表位(LLWTLVVLL)(SEQ ID NO: 16)。

【0037】 在一些實施方案中，本文提供TCR或抗原結合片段，當在T細胞表面表達時，所述TCR或其抗原結合片段針對靶癌細胞刺激細胞毒活性，任選地
在一些實施方案中，所述靶癌細胞含有EBV DNA序列或表達LMP2。

【0038】 在一方面中，本公開涉及含有編碼本文所述TCR或其抗原結合片段的核酸的載體。

【0039】 在一些實施方案中，所述載體為表達載體、病毒載體、逆轉錄病毒載體、或慢病毒載體。

【0040】 在一方面中，本公開涉及含有本文所述載體的工程化細胞。

【0041】 在一方面中，本公開涉及含有本文所述TCR或其抗原結合片段的工程化細胞。

【0042】 在一些實施方案中，所述TCR或其抗原結合片段與細胞異源。

【0043】 在一些實施方案中，所述工程化細胞為細胞系。在一些實施方案中，所述工程化細胞為獲得自受試者(例如，人受試者)的原代細胞。在一些實施方案中，所述工程化細胞為T細胞。在一些實施方案中，所述T細胞為CD8+。在一些實施方案中，所述T細胞為CD4+。

【0044】 在一方面中，本公開涉及產生工程化細胞的方法，其包括體外或離體地將本文所述載體引入至細胞中。

【0045】 在一些實施方案中，所述載體為病毒載體並且通過轉導進行引入。

【0046】 在一方面中，本公開涉及治療疾病或病症的方法，其包括向患有EBV相關的疾病或病症的受試者施用本文所述的工程化細胞。

【0047】 在一些實施方案中，所述EBV相關的疾病或病症為癌症。

【0048】 在一方面中，本公開涉及治療受試者中腫瘤的方法，所述方法包括向有需要的受試者施用：(a)工程化T細胞，其包括：編碼與腫瘤中的抗原特異性結合的TCR或其抗原結合片段的核酸；和(b)與轉化生長因子 β 家族(TGF- β)的成員結合的檢查點抑制劑或蛋白的一者或兩者。

【0049】 在一方面，本公開涉及治療受試者中腫瘤的方法，所述方法包括向有需要的受試者施用：工程化T細胞，其包括：核酸，其編碼(a)與腫瘤中的抗

原特異性結合的TCR或其抗原結合片段；和(b)靶向檢查點抑制劑和轉化生長因子 β 家族(TGF- β)的成員的雙功能trap蛋白。

【0050】 在一些實施方案中，所述腫瘤為EBV誘導的腫瘤或HPV誘導的腫瘤。

【0051】 除非另外定義，本文所用的全部技術和科學術語具有與本發明所屬技術領域常規技術人員通常所理解的相同的意義。本文描述用於本發明的方法和材料；另外，也可以使用本領域公知的合適的方法和材料。所述材料、方法、和實施例僅為說明性的而不意於限制。本文提及的所有出版物、專利申請、專利、序列、資料庫條目、和其他參考文獻，其全部內容通過引用結合在此。在發生衝突的情況下，本說明書，包括定義，將占主導。

【0052】 本发明的其他特徵和優點將從以下詳細描述和附圖、以及從權利要求書中顯而易見。

【圖式簡單說明】

【0053】 參考附圖說明示例性實施方案。其旨在將本文所公開的實施方案和附圖視為說明性的而非限制性的。

【0054】 圖1A是顯示MP71逆轉錄病毒載體構建體的示意圖。P2A編碼2A自裂解肽；Va編碼人抗LMP2 TCR的 α 鏈的可變區；Vb編碼人抗LMP2 TCR的 β 鏈；Ca編碼TCR α 鏈的恒定區；Cb編碼TCR β 鏈的恒定區；HGH\SS和HGH\SS\2為信號肽(分別為SEQ ID NO: 14和15)。 Ψ 表示病毒RNA上的包裝序列。

【0055】 圖1B是顯示MP71逆轉錄病毒載體構建體的示意圖。P2A和T2A編碼2A自裂解肽；Va編碼基因工程化人TCR的 α 鏈的可變區；Vb編碼基因工程化人TCR的 β 鏈；Ca編碼TCR α 鏈的恒定區；Cb編碼TCR β 鏈的恒定區；HGH\SS和HGH\SS\2為信號肽(分別為SEQ ID NO: 14和15)；ICI-ScFv編碼由GS接頭連接的免疫檢查點抑制劑(ICI)的重鏈和輕鏈的可變區；TGF β RII編碼TGF β RII的胞外

結構域的配體結合序列；接頭是可變重鏈的C-末端處的柔性接頭肽。

【0056】 圖2A顯示L201 TCR的 α 鏈可變結構域氨基酸序列。

【0057】 圖2B顯示L201 TCR的 β 鏈可變結構域氨基酸序列。

【0058】 圖3A顯示編碼L201 TCR α 鏈可變結構域的DNA序列。

【0059】 圖3B顯示編碼L201 TCR β 鏈可變結構域的DNA序列。

【0060】 圖4A顯示L202 TCR的 α 鏈可變結構域氨基酸序列。

【0061】 圖4B顯示L202 TCR的 β 鏈可變結構域氨基酸序列。

【0062】 圖5A顯示編碼L202 TCR α 鏈可變結構域的DNA序列。

【0063】 圖5B顯示編碼L202 TCR β 鏈可變結構域的DNA序列。

【0064】 圖6A顯示L203 TCR的 α 鏈可變結構域氨基酸序列。

【0065】 圖6B顯示L203 TCR的 β 鏈可變結構域氨基酸序列。

【0066】 圖7A顯示編碼L203 TCR α 鏈可變結構域的DNA序列。

【0067】 圖7B顯示編碼L203 TCR β 鏈可變結構域的DNA序列。

【0068】 圖8顯示HGH\SS信號肽的氨基酸序列和HGH\SS\2信號肽的氨基酸序列。

【0069】 圖9是一組顯示用L201、L202和L203構建體轉導的人T細胞的TCR表達的流式細胞術結果的圖，其中同時染色CD3、CD4和CD8並且使用可行的CD3+淋巴細胞門控策略(viable CD3+ lymphocyte gating strategy)。NT是非轉導對照。TCR表達由小鼠TCR β 染色來表示。

【0070】 圖10是一組顯示抗原特異性刺激的TCR-T細胞的流式細胞術結果的圖，其中染色CD3、CD8和細胞內IFN- γ 。L201、L202和L203構建體用於轉導細胞。NT為非轉導對照。

【0071】 圖11A是顯示含有抗LMP2 TCR L201的TCR-T細胞的活化曲線的圖。TCR-T細胞與EBV肽脈衝的(peptide-pulsed) APC以1:1效靶比

(effector-to-target ratio)共培養，並且通過流式細胞術測量表達細胞內IFN- γ 的T細胞的百分比(Y-軸)。確定半最大有效濃度(EC50)。

【0072】 圖11B是顯示含有抗LMP2 TCR L202的TCR-T細胞的活化曲線的圖。所述TCR-T細胞與EBV肽脈衝的APC以1:1效靶比共培養，並且通過流式細胞術測量表達細胞內IFN- γ 的T細胞的百分比(Y-軸)。確定半最大有效濃度(EC50)。

【0073】 圖11C是顯示含有抗LMP2 TCR L203的TCR-T細胞的活化曲線的圖。所述TCR-T細胞與EBV肽脈衝的APC以1:1效靶比共培養，並且通過流式細胞術測量表達細胞內IFN- γ 的T細胞的百分比(Y-軸)。確定半最大有效濃度(EC50)。

【0074】 圖12是顯示抗原特異性刺激下的TCR-T細胞的長期IFN- γ 產生的長條圖。將人T細胞轉導以表達L201 TCR (TCR轉導的)或未轉導(作為陰性對照)，與EBV肽脈衝的APC以1:0、1:1或3:1效靶(E:T)比共培養，並且使用人IFN- γ ELISA試劑盒來測量IFN- γ 產生。

【0075】 圖13A是顯示由L201 TCR-T細胞對靶細胞的特異性殺傷百分比的長條圖。EBV肽脈衝的APC與L201 TCR-T細胞以1:1或3:1效靶比共培養，並且通過測量APC的細胞死亡來確定TCR-T細胞的細胞毒性。轉導人T細胞來表達L201 TCR (TCR轉導的)或未轉導(作為陰性對照)。

【0076】 圖13B是顯示L202 TCR-T細胞對靶細胞的特異性殺傷百分比和E:T比的關係的圖。靶和非靶細胞(以1:1比混合)與L202 TCR-T細胞以指定效靶比共培養，並且通過測量靶細胞的細胞凋亡來確定TCR-T細胞的細胞毒性。

【0077】 圖14是一組顯示用E6、E6. α PD1-TGF β RII、E6. α PDL1-TGF β RII、E6.HAC-TGF β RII或E6. α gp120-TGF β RII構建體轉導的人T細胞的TCR表達的流式細胞術結果的圖，其中同時染色CD3、CD4和CD8，並且使用可行CD3+淋巴

細胞門控策略。NT為非轉導對照。通過小鼠TCR β 染色來表示TCR表達。通過將矩形盒中的信號除以總信號來定義TCR百分比。E6是指抗E6 TCR。 α PD1-TGF β RII是指融合蛋白，其中人TGF β RII (TGF β Trap)的胞外結構域連接至抗PD-1單鏈Fv (scFV)的C-末端。 α PDL1-TGF β RII是指融合蛋白，其中TGF β Trap連接至抗PD-L1 scFV的C-末端。HAC-TGF β RII是指融合蛋白，其中TGF β Trap連接至稱為HAC的PD-L1-結合蛋白的C-末端。 α gp120-TGF β RII是指融合蛋白對照，其中TGF β Trap連接至抗gp120 scFV的C-末端。

【0078】圖15A是顯示在抗原特異性刺激下表達細胞內IFN- γ 的TCR-T細胞的百分比(Y-軸)的長條圖。NT是非轉導對照。使用表達E6、E6. α PD1-TGF β RII、E6. α PDL1-TGF β RII、E6.HAC-TGF β RII或E6. α gp120-TGF β RII TCR的TCR-T細胞。肽脈衝的A562-A2細胞與TCR-T細胞以1:1效靶比共培養，並且通過流式細胞術測量表達細胞內IFN- γ 的TCR-T細胞的百分比(Y-軸)。

【0079】圖15B是顯示轉導以表達E6、E6. α PD1-TGF β RII、E6. α PDL1-TGF β RII、E6.HAC-TGF β RII或E6. α gp120-TGF β RII TCR的TCR-T細胞的IFN- γ 產生水準的長條圖。NT為非轉導對照。Ca Ski E6/E7細胞與TCR-T細胞以1:0、1:1或3:1效靶比共培養，並且使用人IFN- γ ELISA試劑盒來測量上清液中的IFN- γ 產生。

【0080】圖16是顯示轉導以表達E6、E6. α PD1-TGF β RII、E6. α PDL1-TGF β RII、E6.HAC-TGF β RII或E6. α gp120-TGF β RII TCR的TCR-T細胞對靶細胞的特異性殺傷百分比的長條圖。NT為非轉導對照。Ca Ski腫瘤細胞與TCR-T細胞以1:1效靶比共培養，並且通過測量靶細胞的細胞死亡來確定TCR-T細胞的細胞毒性。

【0081】圖17是一組顯示分泌的scFv-TGF β RII對TGF β 的結合曲線的圖。由轉導以表達E6、E6. α PD1-TGF β RII、E6. α PDL1-TGF β RII、E6.HAC-TGF β RII或

E6. α gp120-TGF β RII TCR的293T細胞產生所述分泌的scFv-TGF β RII。通過ELISA確定結合活性。

【0082】 圖18是顯示人Ca Ski細胞中的TGF β 表達的長條圖。CM為培養基。

【0083】 圖19是顯示抗原特異性刺激下的TCR-T細胞增殖的長條圖。通過羧基螢光素琥珀醯亞胺酯(CFSE)陰性群來確定增殖。NT為非轉導對照。轉導TCR-T細胞來表達E6、E6. α PD1-TGF β RII、E6. α PDL1-TGF β RII、E6.HAC-TGF β RII或E6. α gp120-TGF β RII TCR。

【0084】 圖 20 是一組顯示用 LMP2. α PD1-TGF β RII、LMP2. α PDL1-TGF β RII、LMP2.HAC-TGF β RII或LMP2. α gp120-TGF β RII TCR構建體轉導的人細胞中的TCR表達的流式細胞術結果的圖。

【0085】 圖21是一組顯示抗原特異性刺激的TCR-T細胞的流式細胞術結果的圖，其中染色CD3、CD8和細胞內IFN- γ 。L201-PD1trap (L201. α PD1-TGF β RII)、L201-PDL1trap (L201. α PDL1-TGF β RII)、L201-HACtrap (L201.HAC-TGF β RII)、和L201-gp210trap (L201. α gp120-TGF β RII)是用於轉導細胞的構建體。NT為非轉導對照。

【0086】 圖22A是顯示抗原特異性刺激下的表達細胞內IFN- γ 的TCR-T細胞的百分比(Y-軸)的長條圖。NT為非轉導對照。使用表達L201-PD1trap (L201. α PD1-TGF β RII)、L201-PDL1trap (L201. α PDL1-TGF β RII)、L201-HACtrap (L201.HAC-TGF β RII)、或L201-gp210trap (L201. α gp120-TGF β RII) TCR的TCR-T細胞。肽脈衝的A562-A2細胞與TCR-T細胞以1:1效靶比共培養，並且通過流式細胞術測量表達細胞內IFN- γ 的TCR-T細胞的百分比(Y-軸)。

【0087】 圖22B是顯示轉導以表達L201-PD1trap (L201. α PD1-TGF β RII)、L201-PDL1trap (L201. α PDL1-TGF β RII)、L201-HACtrap (L201.HAC-TGF β RII)、或L201-gp210trap (L201. α gp120-TGF β RII) TCR的TCR-T細胞的IFN- γ 產生水準的

長條圖。NT為非轉導對照。Ca Ski E6/E7細胞與TCR-T細胞以1:0、1:2、1:1或3:1效靶比共培養，並且使用人IFN- γ ELISA試劑盒測量上清液中的IFN- γ 產生。

【0088】圖23是顯示L201-trap TCR-T細胞對靶細胞的特異性殺傷百分比和E:T比的關係的圖。靶細胞與轉導以表達L201-PD1trap (L201. α PD1-TGF β R2)、L201-PDL1trap (L201. α PDL1-TGF β R2)、L201-HACtrap (L201.HAC-TGF β R2)、或L201-gp210trap (L201. α gp120-TGF β R2) TCR的TCR-T細胞以指定的效靶(E:T)比共培養，並且通過測量靶細胞的細胞死亡來確定TCR-T細胞的細胞毒性。

【0089】圖24A是顯示在用L202 TCR-T細胞或未轉導細胞處理後，小鼠中個體黑色素瘤腫瘤體積的圖。

【0090】圖24B是顯示在用L202 TCR-T細胞或未轉導細胞處理後，小鼠中平均黑色素瘤腫瘤體積的圖。

【0091】圖24C是顯示指定組中的動物的腫瘤體積倍數變化(第20天/第0天)的圖。

【0092】圖24D是顯示在L202 TCR-T細胞或未轉導細胞施用後，在指定天數的平均動物重量的圖。

【0093】圖25顯示3種T細胞受體的CDR序列。

【0094】圖26提供本公開中描述的序列。

【實施方式】

較佳實施例之詳細說明

【0095】結合系統、組成、和方法來描述和說明以下實施方案及其方面，所述系統、組成、和方法意在示例和說明，並不意在限制範圍。

定義

【0096】如本文所使用的術語“包括”或“包含”是指有利於實施方案的組合物、方法、及其各自的組分(一種或多種)，也可包含未指定的元素，無論有用與

否。通常本領域技術人員應理解的是，本文中所使用的術語通常旨在作為“開放”術語(例如，術語“包括”應解釋為“包括但不限於”，術語“具有”應解釋為“具有至少”，術語“含有”應解釋為“含有但不限於”等)。

【0097】 除非另外指出，否則在描述本申請的特定實施方案的上下文中(特別是在權利要求的上下文中)使用的術語“一”和“一個”和“所述”以及類似說法可被解釋為涵蓋單數和複數兩者。本文中列舉的數值的範圍僅旨在用作分別指代落入該範圍的各個單獨值的簡寫方法。除非在本文中另外指出，各個單獨值如在本文中單獨引用一樣併入說明書。除非在本文中另外指出或上下文明顯矛盾，否則本文所述的全部方法可以任何合適的順序進行。關於本文特定實施方案提供的任何和全部實施例、或示例性語言(例如，“諸如”)的使用僅旨在更好地說明本申請而不造成另外要求的本申請的範圍的限制。縮寫“e.g.”衍生自拉丁文的例如，並且在本文中用於表示非限定性實例。因此，縮寫“e.g.”與術語“例如”同義。說明書中的任何語言不應被解釋為表示對本申請的實施非要求的要素。

【0098】 如本文所使用的，術語“約”是指例如量、時間段等的可測值，並且包括從該指定值 $\pm 20\%$ 、 $\pm 10\%$ 、 $\pm 5\%$ 、 $\pm 1\%$ 、 $\pm 0.5\%$ 或 $\pm 0.1\%$ 的變數。

【0099】 如本文所使用的，術語“抗體”是指完整的免疫球蛋白或具有在本文中被稱為“Fc片段”或“Fc結構域”的Fc (可結晶片段)區或Fc區的FcRn結合片段的單克隆或多克隆抗原結合片段。抗原結合片段可通過重組DNA技術或通過完整抗體的酶促或化學裂解來產生。抗原結合片段包括，尤其，Fab、Fab'、F(ab')₂、Fv、dAb、和互補決定區(CDR)片段、單鏈抗體(scFv)、單結構域抗體、嵌合抗體、雙體抗體(diabodies)和含有足以賦予多肽特異性抗原結合的免疫球蛋白的至少一部分的多肽。Fc結構域包括有助於兩類或三類抗體的兩條重鏈的部分。Fc結構域可通過重組DNA技術或通過完整抗體的酶促(例如，木瓜蛋白酶裂解)或化學裂解來產生。

【0100】 本文使用的術語“抗體片段”是指包括完整抗體的僅一部分的蛋白質片段，通常包括完整抗體的抗原結合位點，並因此保留結合抗原的能力。本定義包括的抗體片段的實例包括：(i) Fab片段，其具有VL、CL、VH和CH1結構域；(ii) Fab'片段，其中Fab片段在CH1結構域的C-末端具有一個或多個半胱氨酸殘基；(iii) Fd片段，其具有VH和CH1結構域；(iv) Fd'片段，其具有VH和CH1結構域並且在CH1結構域的C-末端具有一個或多個半胱氨酸殘基；(v) Fv片段，其具有抗體的單臂的VL和VH結構域；(vi) dAb片段(Ward等人, Nature 341, 544-546 (1989))，其由VH結構域組成；(vii) 分離的CDR區；(viii) F(ab')₂片段，其為含有由鉸鏈區處的二硫橋連接的兩個Fab'片段的二價片段；(ix) 單鏈抗體分子(例如，單鏈Fv；scFv)(Bird等人, Science 242:423-426 (1988)；和Huston等人, PNAS (USA) 85:5879-5883 (1988))；(x)具有兩個抗原結合位點的“雙體抗體”，其包括與同一多肽鏈中輕鏈可變結構域(VL)連接的重鏈可變結構域(VH)(參見，例如，EP 404,097；WO 93/11161；和Hollinger等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993))；(xi)“線性抗體”，其包括與互補輕鏈多肽一起形成一對抗原結合區的一對串聯Fd段(VH-CH1-VH-CH1)(Zapata等人 Protein Eng. 8(10):1057-1062 (1995)；和U.S. Pat. No. 5,641,870)。

【0101】 本文所使用的“單鏈可變片段”、“單鏈抗體可變片段”或“scFv”抗體指的是含有由接頭肽連接的僅重(VH)鏈和輕(VL)鏈的可變區的抗體的形式。scFv可作為單鏈多肽表達。scFv保留其衍生自的完整抗體的特異性。輕鏈和重鏈可為任何順序，例如VH-接頭-VL或VL-接頭-VH，只要保留scFv對靶抗原的特異性即可。

【0102】 術語“結合蛋白”是指天然蛋白結合結構域(例如細胞因子、細胞因子受體)、抗體片段(例如Fab、scFv、雙體抗體、可變結構域衍生結合子(variable domain derived binder)、VHH納米抗體)、替代支架衍生蛋白質結合結構域(例如

Fn3變體、錨蛋白重複變體、centyrin變體、高親和性多聚體、親合體)或任何識別特異性抗原的蛋白。

【0103】如本文所使用的，術語“抗原”是指如果由MHC分子呈遞，則可被抗體或T細胞受體(TCR)結合的分子。如本文所使用的，“抗原”也包括由T細胞受體識別的T細胞表位。該識別導致T細胞以及其後例如T細胞的增殖、細胞因子分泌等的效應子機制的活化。抗原還可被免疫系統識別和/或可以誘導體液免疫應答和/或細胞免疫應答，導致B淋巴細胞和/或T淋巴細胞的活化。

【0104】如本文所使用的，術語“HPV抗原”是指衍生自人乳頭瘤病毒(HPV)的多肽分子，優選地，其中所述HPV選自HPV1、HPV2、HPV3、HPV4、HPV6、HPV10、HPV11、HPV16、HPV18、HPV26、HPV27、HPV28、HPV29、HPV30、HPV31、HPV33、HPV34、HPV35、HPV39、HPV40、HPV41、HPV42、HPV43、HPV45、HPV49、HPV51、HPV52、HPV54、HPV55、HPV56、HPV57、HPV58、HPV59、HPV68、HPV69。更優選地，所述HPV選自高風險HPV，例如，HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV56、HPV58、HPV59、HPV68、HPV69。在一些實施方案中，所述HPV多肽分子選自E6和E7。

【0105】如本文所使用的，術語“EBV抗原”是指衍生自Epstein-Barr病毒(EBV)的多肽分子。EBV抗原包括但不限於潛伏膜蛋白(LMP1、LMP2A、和LMP2B)以及Epstein-Barr核抗原(EBNA1、-2、-3A、-3B、-3C、-LP)。

【0106】如本文所使用的，術語“外周血細胞亞型”是指通常在外周血中發現的細胞類型，包括但不限於嗜酸性粒細胞、中性粒細胞、T細胞、單核細胞、K細胞、粒細胞、和B細胞。

【0107】如本文所使用的，術語“T細胞”包括CD4+ T細胞和CD8+ T細胞。術語T細胞也包括T輔助1型T細胞和T輔助2型T細胞。T細胞表達識別靶細胞表面

上特異性抗原部分的細胞表面受體。細胞表面受體可為野生型或重組T細胞受體(TCR)、嵌合抗原受體(CAR)、或可以識別與靶細胞相關的抗原部分的任何其他表面受體。通常，TCR具有兩種蛋白鏈(α -和 β -鏈)，其結合由某些細胞表面的MHC蛋白呈遞的特異性肽。在靶細胞表面表達MHC分子的背景下，TCR識別肽。TCR還識別直接在癌細胞表面上呈遞的癌抗原。

【0108】 本文所使用的“基因修飾的細胞”、“重定向細胞”、“工程化細胞”、“基因工程化細胞”或“修飾的細胞”是指表達基因工程化抗原受體和檢查點抑制劑的細胞。在一些實施方案中，基因修飾的細胞包括編碼基因工程化TCR的載體和編碼一種或多種檢查點抑制劑的載體。在一些實施方案中，基因修飾的細胞包括編碼基因工程化TCR和一種或多種檢查點抑制劑的載體。在一個實施方案中，基因修飾的細胞為T淋巴細胞(T細胞)。在一個實施方案中，基因修飾的細胞為自然殺傷(NK)細胞。

【0109】 如本文所使用的，術語“基因工程化”或“基因修飾的”是指細胞的核酸序列的修飾，包括但不限於刪除編碼或非編碼區或其部分、或插入編碼區或其部分。

【0110】 如本文所使用的，術語“載體”、“克隆載體”或“表達載體”是指一種運載體(vehicle)，通過其可將多核苷酸序列(例如，外源基因)引入至宿主細胞中，以便轉化宿主並促進引入的序列的表達(例如轉錄和翻譯)。載體包括質粒、噬菌體、病毒等。載體的最普遍的類型是“質粒”，其是指閉合的環狀雙鏈DNA環，其中可連接含有目標基因的另外的DNA段。載體的另一種類型為病毒載體，其中將待運輸的核酸構建體連接至病毒基因組中。病毒載體可在它們被引入的宿主細胞中自主複製、或可將它們自身整合至宿主細胞的基因組中，從而與宿主基因組一起複製。此外，某些載體可指導與其可操作連接的基因的表達。這樣的載體在本文中稱為“重組表達載體”或簡稱為“表達載體”。應注意的是，本發

明旨在包括具有同等功能的其他形式的表達載體，例如病毒載體(例如，複製缺陷逆轉錄病毒、腺病毒和腺相關病毒)。

【0111】如本文所使用的，術語“逆轉錄病毒載體”或“重組逆轉錄病毒載體”是指核酸構建體，其攜帶、並且在某些實施方案中、可以指導目標核酸分子的表達。逆轉錄病毒以RNA形式存在於其病毒莢膜(viral capsule)中，並且當其在宿主細胞中複製時立即形成雙鏈DNA。類似地，逆轉錄病毒載體以RNA和雙鏈DNA形式存在，兩者形式都包括在術語“逆轉錄病毒載體”和“重組逆轉錄病毒載體”中。術語“逆轉錄病毒載體”和“重組逆轉錄病毒載體”也包括含有重組DNA片段的DNA形式和含有重組RNA片段的RNA形式。載體可包括至少一個轉錄啟動子/增強子、或控制基因表達的其他元件。這樣的載體還可包括包裝信號(packaging signal)、長末端重複序列(LTR)或其部分、和適合於所使用的逆轉錄病毒的正鏈和負鏈引物結合位點(如果逆轉錄病毒載體中尚不存在這些)。任選地，載體還可包括指導多腺苷酸化的信號，可選標記例如氨苄青黴素抗性、新黴素抗性、TK、潮黴素抗性、腐草黴素抗性、組氨醇抗性、或DHFR，以及一個或多個限制性位點和翻譯終止序列。舉例來說，這樣的載體可包括5' LTR、前導序列、tRNA結合位點、包裝信號、第二鏈DNA合成的起點、3' LTR或其部分。

【0112】如本文所使用的，“接頭”(L)或“接頭結構域”或“接頭區”是指約1至100氨基酸長度的寡-或多肽區，其將本發明的TCR的任何結構域/區域連接在一起。接頭可由如甘氨酸和絲氨酸等柔性殘基組成，使得相鄰蛋白結構域相對於彼此自由移動。當期望確保兩個相鄰結構域彼此不發生空間干擾時，可以使用更長的接頭。接頭可以是可切割的或非可切割的。可切割接頭的實例包括2A接頭(例如T2A)、2A樣接頭或其功能等同物或其組合。在一些實施方案中，接頭包括匹克納病毒2A樣接頭、豬捷申病毒的CHYSEL序列(P2A)、明脈扁刺蛾病毒(T2A)或其組合、變體和功能等同物。在其他實施方案中，接頭序列可包括

Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly(2A)-Pro(2B)基序，導致2A甘氨酸和2B脯氨酸之間的裂解。其他接頭對於本領域技術人員而言是顯而易見的，並且可以與本發明的替代實施方案結合使用。

【0113】術語“藥物製劑”是指其形式允許其含有的有效成分的生物活性為有效的、並且其不含有對被施用該製劑的受試者為不可接受的毒性的其他組分的製劑。

【0114】“藥學上可接受的運載體”是指藥物製劑中有效成分以外的成分，其對受試者無毒。藥學上可接受的運載體包括但不限於緩衝劑、賦形劑、穩定劑、或防腐劑。

【0115】如本文所使用的，“受試者”為哺乳動物，例如人或其他動物，並且通常為人。在一些實施方案中，對其施用細胞、細胞群、或組合物的例如患者等的受試者為哺乳動物，通常為靈長目動物，例如人類。在一些實施方案中，靈長目動物為猴或者猿。受試者可為雄性或雌性並且可以是任何合適的年齡，包括嬰兒(infant)、少年、青年、成年、和老年受試者。在一些實施方案中，受試者為非靈長目哺乳動物，例如齧齒動物。

【0116】術語“對照”是指適合於提供與試驗樣品中的表達產物的比較的任何參考標準。

【0117】如本文所使用的，術語“抑制”是指例如特定活動、功能、或相互作用中的任何降低。例如，如果例如蛋白質的功能和/或一個蛋白與另一個蛋白的結合等的生物功能與例如類似野生型狀態或不存在施加的試劑的狀態的對照等參考狀態相比為降低的，則其被抑制。例如，與PD-1蛋白未與試劑接觸時相比，如果結合、信號傳導、和其他免疫作用由於與例如抗PD-1抗體等試劑接觸而降低，則PD-1蛋白與其一個或多個例如PD-L1和/或PD-L2等配體的結合、和/或產生的PD-1信號傳導和免疫作用受到抑制或缺乏。這樣的抑制或缺乏可以例

如通過在特定時間和/或位置施加試劑、或可以是組成性的例如通過連續施用來誘導。這樣的抑制或缺乏也可以是部分的或完全的(例如，與例如類似野生型狀態的對照等參考狀態相比，基本上無可測量的活性)。基本上完全抑制或缺乏被稱為阻斷。

【0118】 如本文所使用的，“病況”和“疾病病況”可包括癌症、腫瘤或傳染病。在示例性實施方案中，病況可包括但決不限於任何形式的惡性贅生性細胞增殖性病症或疾病。在示例性實施方案中，病況包括腎癌、黑色素瘤、前列腺癌、乳腺癌、成膠質細胞瘤、肺癌、結腸癌、或膀胱癌的任何一種或多種。

【0119】 “癌症”和“癌的”是指或描述哺乳動物中的生理狀況，其通常表徵為未調節的細胞生長。術語“癌症”是指包括所有類型的癌生長或致癌過程、轉移性組織或惡性轉化的細胞、組織、或器官，不考慮組織病理學類型或侵入階段。實體瘤的實例包括各種器官系統的惡性腫瘤，例如，肉瘤、腺瘤、和癌，例如影響肝、肺、乳腺、淋巴、胃腸道(例如，結腸)、泌尿生殖道(例如，腎、泌尿上皮細胞)、前列腺和咽的那些。腺癌包括惡性腫瘤，例如大部分的結腸癌、直腸癌、腎細胞癌、肝癌、肺的非小細胞癌、小腸癌和食道癌。在一個實施方案中，癌為惡性腫瘤，例如晚期黑色素瘤。還可使用本發明的方法和組合物治療或預防上述癌症的轉移性病灶。可被治療的其他癌症的實例包括骨癌、胰腺癌、皮膚癌、頭或頸癌、皮膚或眼內惡性黑色素瘤、子宮癌、卵巢癌、直腸癌、肛區癌、胃癌、睪丸癌、子宮癌、輸卵管癌、子宮內膜癌、宮頸癌、陰道癌、女陰癌、霍奇金氏病、非霍奇金氏淋巴瘤、食道癌、小腸癌、內分泌系統癌、甲狀腺癌、甲狀旁腺癌、腎上腺癌、軟組織肉瘤、尿道癌、陰莖癌、慢性或急性白血病包括急性骨髓性白血病、慢性骨髓性白血病、急性淋巴細胞白血病、慢性淋巴細胞白血病、兒童期實體瘤、淋巴細胞性淋巴瘤、膀胱癌、腎或輸尿管癌、腎盂癌、中樞神經系統(CNS)贅生物、原發CNS淋巴瘤、腫瘤血管生成、脊

柱軸腫瘤、腦幹神經膠質瘤、腦垂體腺瘤、卡波西氏肉瘤、表皮樣癌、鱗狀細胞癌、T細胞淋巴瘤、環境誘導的癌症包括由石棉誘導的那些、和所述癌的組合。可使用本文所述的抗體分子來影響例如表達PD-L1的轉移性癌(Iwai等人(2005) Int. Immunol. 17:133-144)等轉移性癌的治療。

【0120】 如本文所使用的，術語“治療”、“療法”、“處理”、或“改善”是指目的是逆轉、減輕、改善、抑制、減慢或停止與疾病或病症相關的狀況的發展或嚴重性的治療療法。術語“治療”包括減少或減輕例如癌症等病況、疾病或病症的至少一種不利效果或症狀。如果一個或多個症狀或臨床標誌物被降低，則治療通常為“有效的”。可選地，如果疾病的進展被減小或停止，則治療為“有效的”。即，“治療”不僅包括症狀或標誌物的改善，還包括停止至少減慢在沒有治療的情況下預期到的症狀的進展或惡化。有益或理想的臨床結果包括但不限於一種或多種症狀的緩和、疾病程度的減輕、疾病的穩定(即不惡化)狀態、疾病進展的延遲或減慢、疾病狀態的改善或緩和、以及緩解(無論是部分的或全部的)，無論是可檢測的或不可檢測的。疾病的術語“治療”還包括減輕疾病的症狀或副作用(包括姑息療法)。在一些實施方案中，癌症的治療包括減小腫瘤體積、降低癌細胞數量、抑制癌細胞轉移、增加預期壽命、降低癌細胞增殖、降低癌細胞存活率、或改善與癌病況相關的各種生理狀況。

【0121】 如本文所使用的，“延遲疾病的發展”是指推遲、阻礙、減慢、阻滯、穩定、抑制和/或延緩疾病(例如癌症)的發展。該延遲可以是不同的時間長度，取決於疾病的歷史和/或待治療的個體。對於本領域技術人員顯而易見的是，實際上，充分或顯著的延遲可以包括預防，因為該個體不會發展該疾病。例如，晚期癌症，如轉移的發展，可被延遲。

【0122】 如本文所使用的，“預防”包括提供針對可能易患疾病但尚未診斷患有疾病的受試者中的疾病的發生或復發的預防。在一些實施方案中，提供的

細胞和組合物用於延遲疾病的發展或減慢疾病的進展。

【0123】 如本文所使用的，“抑制”功能或活性是指，當與除了目標狀態或參數以外的其他相同狀態比較時、或可選地與另一狀態相比時，降低功能或活性。例如，與不存在抑制腫瘤生長的細胞下的腫瘤的生長速率相比，抑制腫瘤生長的細胞降低腫瘤的生長速率。

【0124】 在施用情況中，例如藥物製劑、細胞、或組合物等試劑的“有效量”是指在以劑量/數量在所需的時間段中有效實現例如治療或預防結果等期望結果的量。

【0125】 例如藥物製劑或細胞等試劑的“治療有效量”是指在以劑量在所需的時間段中有效實現例如疾病、病況、或病症的治療、和/或治療的藥代動力學或藥效動力學效果等期望的治療結果的量。治療有效量可根據例如疾病狀態、年齡、性別、和受試者的重量、以及待施用的細胞群等因素來變化。在一些實施方案中，提供的方法包括以例如治療有效量等有效量施用細胞和/或組合物。

【0126】 “預防有效量”是指在以劑量在所需時間段中有效實現期望的預防結果的量。通常但未必，由於受試者在患病前或患病的早期階段使用預防劑量，預防有效量將小於治療有效量。在較低腫瘤負荷的情況下，預防有效量在某些方面將高於治療有效量。

【0127】 根據本文所述的各種實施方案，本發明提供工程化細胞和含有所述工程化細胞的組合物/製劑。本發明還提供製造所述工程化細胞的方法或工藝，其可用於治療患有病理性疾病或病況的患者。

【0128】 此外，根據本文所述的各種實施方案，本發明提供含有適合於基因修飾細胞的核酸構建體的重組載體，其可用於治療病理性疾病或病況。

【0129】 此外，根據本文所述的各種實施方案，本發明提供含有適合於基因修飾細胞的核酸構建體的工程化細胞，其可用於治療病理性疾病或病況，其

中所述核酸編碼：**(a)**與抗原特異性結合的基因工程化抗原受體；和**(b)**減少或能夠實現降低腫瘤靶的表達的抑制性蛋白。在各種實施方案中，細胞表達基因工程化抗原受體和抑制性蛋白。在各種實施方案中，抑制性蛋白為組成型表達。

【0130】 在用提供的細胞、組合物、方法和用途治療的疾病、病況、和病症中有腫瘤，其包括實體瘤、血液病惡性腫瘤、和黑色素瘤，和傳染性疾病，例如由病毒或其他病原體傳染，例如HPV、HIV、HCV、HBV、EBV、HTLV-1、CMV、腺病毒、BK多瘤病毒、HHV-8、MCV或其他病原體，以及寄生蟲病。在一些實施方案中，疾病或病況為腫瘤、癌、惡性腫瘤、贅生物、或其他增殖性疾病或病症。這樣的疾病包括但不限於白血病、淋巴瘤，例如，慢性淋巴細胞白血病(CLL)、急性-淋巴細胞白血病(ALL)、非-霍奇金氏淋巴瘤、急性骨髓白血病、多發性骨髓瘤、難治型濾泡性淋巴瘤、套細胞淋巴瘤、惰性B細胞淋巴瘤、B細胞惡性腫瘤、子宮頸、結腸、肺、肝、乳腺、前列腺、卵巢、皮膚的癌症、黑色素瘤、骨、和腦癌、卵巢癌、上皮癌、腎細胞癌、胰腺癌、霍奇金氏淋巴瘤、宮頸癌、結腸直腸癌、成膠質細胞瘤、神經母細胞瘤、尤文氏肉瘤、成神經管細胞瘤、骨肉瘤、滑膜肉瘤、和/或間皮瘤。

T細胞受體和結合分子

【0131】 本公開提供T細胞受體(TCR)或其抗原結合片段。在一些實施方案中，“T細胞受體”或“TCR”是含有可變a(或 α)和b(或 β)鏈(也分別稱為TCR α 和TCR β)或可變g(或 γ)和d(或 δ)鏈(也分別稱為TCR γ 和TCR δ)、或其抗原結合部分的分子，並且其可特異性結合例如結合至MHC分子的肽抗原或肽表位等的抗原。在一些實施方案中，TCR為ab形式。通常，以 $\alpha\beta$ 和 $\gamma\delta$ 形式存在的TCR通常結構上相似，但表達它們的T細胞可具有不同的解剖學位置或功能。通常，TCR被發現在T細胞(或T淋巴細胞)的表面，在那裡其通常負責識別例如結合至主要組織相容性複合物(MHC)分子的肽等的抗原。

【0132】 在一些實施方案中，TCR為完整或全長TCR，例如含有 α 鏈和 β 鏈的TCR。在一些實施方案中，TCR為小於全長TCR的抗原結合部分，但其結合與MHC分子結合的特異性肽，例如結合至MHC-肽複合物。在某些情況下，TCR的抗原結合部分或片段可含有全長或完整TCR的結構域的僅一部分，但仍可以結合肽表位，例如完整TCR結合的MHC-肽複合物。在某些情況下，抗原結合部分含有TCR的可變結構域，例如TCR的可變 α (Va)鏈和可變 β (Vb)鏈、或足以形成用於結合特異性MHC-肽複合物的結合位點的其抗原結合片段。

【0133】 TCR的可變結構域含有互補決定區(CDR)，其通常主要有助於抗原識別以及肽、MHC和/或MHC-肽複合物的結合能力和特異性。在一些實施方案中，TCR的CDR或其組合形成給定TCR分子的抗原結合位點的全部或幾乎全部。TCR鏈的可變區中的各種CDR通常由框架區(FR)分隔，與CDR相比，框架區通常在TCR分子間表現較小的可變性(例如，參見Jores等人, Proc. Nat'l Acad. Sci. U.S.A. 87:9138, 1990；Chothia等人, EMBO J. 7:3745, 1988；還參見Lefranc等人, Dev. Comp. Immunol. 27:55, 2003)。在一些實施方案中，CDR3是負責抗原結合或特異性的主要CDR，或是用於抗原識別、和/或用於與肽-MHC複合物的處理的肽部分相互作用的給定TCR可變區中的三個CDR中最重要。在某些情況下， α 鏈的CDR1可與特定抗原肽的N-末端部分相互作用。在某些情況下， β 鏈的CDR1可與肽的C-末端部分相互作用。在某些情況下，CDR2最強力有助於與MHC-肽複合物的MHC部分的相互作用或識別MHC-肽複合物的MHC部分，或是負責這些的主要CDR。

【0134】 在一些實施方案中，TCR的 α -鏈和/或 β -鏈還可含有恒定結構域、跨膜結構域和/或短胞質尾區(例如，參見Janeway等人, Immunobiology: The Immune System in Health and Disease,第3版, Current Biology Publications, p.4:33, 1997)。在一些方面中，TCR的各個鏈(例如 α 或 β)可具有1個N-末端免疫球蛋白可

變結構域、1個免疫球蛋白恒定結構域、跨膜區、和位於C-末端的短胞質尾區。在一些實施方案中，TCR例如通過胞質尾區與參與介導信號轉導的CD3複合物的不變蛋白相關聯。在一些情況下，結構允許TCR與例如CD3及其亞單元等其他分子相關聯。例如，含有帶跨膜區的恒定結構域的TCR可以將蛋白質錨定在細胞膜中並且與CD3信號傳導裝置或複合物的不變亞單元相關聯。CD3信號傳導亞單元的細胞內尾(例如CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 和CD3 ζ 鏈)含有一個或多個基於免疫受體酪氨酸的活化基序或ITAM，並且通常涉及TCR複合物的信號傳導能力。

【0135】 確定或識別TCR的各種結構域或區域在本領域技術人員的水準內。在一些情況下，結構域或區域的確切位點可根據特定結構或同源建模或用於描述特定結構域的其他特徵而變化。應理解的是，對氨基酸的引用，包括對於描述TCR的結構域組織的以SEQ ID NO記載的特定序列的引用，是為了說明的目的而不意在限制所提供的實施方案的範圍。在一些情況下，特定結構域(例如可變或恒定)可以是更長或更短的幾個氨基酸(例如1個、2個、3個或4個)。在一些方面中，TCR的殘基是已知的或可以根據國際免疫遺傳學資訊系統(International Immunogenetics Information System)(IMGT)編碼系統(例如，參見www.imgt.org；還參見，Lefranc等人(2003) Developmental and Comparative Immunology, 27(1);55-77；和The T Cell Factsbook第2版, Lefranc and LeFranc Academic Press 2001)來識別。

【0136】 在一些實施方案中，TCR的 α 鏈和 β 鏈各自進一步含有恒定結構域。在一些實施方案中， α 鏈恒定結構域(C α)和 β 鏈恒定結構域(C β)單獨地為哺乳動物，例如人或鼠恒定結構域。在一些實施方案中，恒定結構域鄰近細胞膜。例如，在一些情況下，TCR的細胞外部分由含有2個膜-近端恒定結構域和2個膜-遠端可變結構域的2個鏈形成，其中可變結構域各自含有CDR。

【0137】 在一些方面，本文提供的是含有人恒定區的TCR，例如含有人Ca

區的 α 鏈和含有人Cb的 β 鏈。在一些實施方案中，提供的TCR完全為人的。提供的TCR中有例如完全人TCR等的含有人恒定區的TCR，例如當在人細胞中表達時，例如原代人T細胞等人T細胞，其表達和/或活性不受或基本上不受內源人TCR的存在的影響。

【0138】 在一些實施方案中，與在其中降低或消除內源TCR的表達的類似人細胞中的相同TCR的表達水準、功能活性和/或抗腫瘤活性相比，當由含有或表達內源人TCR的例如人T細胞等的人細胞表達時，工程化TCR以相似或改善的水準在細胞表面上表達，表現相似或更大功能活性(例如細胞溶解活性)和/或表現相似或更大的抗腫瘤活性。在一些實例中，本文所述的工程化TCR當在人T細胞中表達時，以在降低或消除其內源TCR表達的相似人T細胞中表達時的相同TCR的表達水準的至少或至少約80%、85%、90%、95%、100%、105%、110%、115%或120%的水準在細胞表面表達。

【0139】 在一些實施方案中，Ca和Cb結構域各自為人的。在一些實施方案中，Ca由TRAC基因(IMG T命名法)編碼或為其變體。在一些實施方案中，Ca的變體含有至少1個非天然半胱氨酸的替換，例如本文所述的任何替換。

【0140】 在一些實施方案中，TCR可為例如通過1個或多個二硫鍵等連接的2個鏈a和b的異二聚體。在一些實施方案中，TCR的恒定結構域可含有短連接序列，其中半胱氨酸殘基形成二硫鍵，從而連接TCR的2個鏈。在一些實施方案中，TCR可在a和b鏈的每個中含有另外的半胱氨酸殘基，使得TCR在恒定結構域中含有2個二硫鍵。在一些實施方案中，各個恒定和可變結構域含有由半胱氨酸殘基形成的二硫鍵。

【0141】 在一些實施方案中，TCR包括本文所述的CDR、Va和/或Vb和恒定區序列。

【0142】 在一些實施方案中，TCR為全長TCR。在一些實施方案中，TCR

為抗原結合部分。在一些實施方案中，TCR為二聚TCR (dTTCR)。在一些實施方案中，dTTCR含有第一多肽，其中與所提供的TCR α 鏈可變區序列相對應的序列融合至與TCR α 鏈恒定區胞外序列相對應的序列的N末端，以及第二多肽，其中與所提供的TCR β 鏈可變區序列相對應的序列融合至與TCR β 鏈恒定區胞外序列相對應的序列的N末端，第一多肽和第二多肽由二硫鍵連接。

【0143】 在一些實施方案中，TCR可為細胞結合的或可溶形式。在一些實施方案中，TCR以細胞結合的形式在細胞的表面上表達。

【0144】 在一些實施方案中，TCR為單鏈TCR (scTCR)。scTCR是含有可結合至MHC-肽複合物的 α 鏈和 β 鏈的單氨基酸鏈。通常，scTCR可使用本領域技術人員公知的方法產生，例如，參見WO 96/13593、WO 96/18105、W099/18129、WO 04/033685、W02006/037960、WO2011/044186；U.S.專利No. 7,569,664；其各自的全部內容通過引用結合在此。

【0145】 本文提供結合分子，例如結合或識別與抗原(例如，癌症抗原)相關的肽表位的那些。在一些實施方案中，在MHC分子的背景下，抗原可以是在癌細胞表面表達的肽表位和/或由Epstein-Barr病毒(EBV)或人乳頭瘤病毒(HPV)感染的細胞。這樣的結合分子包括表現對結合或識別此類肽表位的抗原特異性的T細胞受體(TCR)及其抗原結合片段以及抗體及其抗原結合片段。在一些實施方案中還提供編碼結合分子的核酸分子、含有結合分子的工程化細胞、涉及施用這類結合分子、工程化細胞或組合物的治療的組合物和方法。在一些方面中，表達例如TCR或抗原結合片段等的所提供的結合分子的工程化細胞對例如癌細胞或由EBV感染的細胞等表達肽表位的靶細胞表現細胞毒活性。

【0146】 在一些方面中，本公開提供包括TCR或其抗原結合片段或例如其抗體片段等抗體的結合分子，和例如含有1個以上例如嵌合受體(TCR樣CAR)等的前述的嵌合分子等的蛋白，和/或表達TCR或CAR的工程化細胞，結合至衍生

自EBV的肽表位。在一些實施方案中，結合分子為抗LMP2結合分子。

【0147】 在一些方面中，結合分子識別或結合MHC分子、例如MHC I類分子中的表位。在一些方面中，MHC I類分子是人白血球抗原(HLA)-A2分子，包括其任何一種或多種亞型，例如HLA-A*0201、*0202、*0203、*0206、或*0207。在一些情況中，不同群體之間的亞型頻率可以是不同的。例如，在一些實施方案中，HLA-A2陽性高加索人群超過95%為HLA-A*0201，然而在中國人群中，該頻率被報告為約23% HLA-A*0201、45% HLA-A*0207、8% HLA-A*0206和23% HLA-A*0203。在一些實施方案中，MHC分子為HLA-A*0201。在一些實施方案中，本公開提供結合EBV-LMP2/HLA-A02複合物的TCR或其抗原結合片段。

【0148】 在一些實施方案中，例如TCR或其抗原結合片段或者抗體或其抗原結合片段等結合分子是分離的或純化的或是重組的。在特定實施方案中，任何所提供的結合分子，例如TCR或其抗原結合片段或者抗體或其抗原結合片段，是重組的。在一些方面，結合分子例如TCR或其抗原結合片段或者抗體或其抗原結合片段是人的。在一些實施方案中，結合分子是單克隆的。在一些方面中，結合分子是單鏈。在其他實施方案中，結合分子含有2個鏈。在一些實施方案中，結合分子例如TCR或其抗原結合片段或者抗體或其抗原結合片段在細胞表面表達。

【0149】 在一些實施方案中，Va區包括在SEQ ID NOs: 1、5、或9的任意者中記載的氨基酸序列、或與其具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些實施方案中，Vb區包括在SEQ ID NOs: 2、6、或10任意者中記載的氨基酸序列、或與其具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些實施方案中，Va區包括1個或多個本文所述的Va CDR序列。在一些實施方案中，Vb區包括1個或多個本文所述

的Vb CDR序列。

【0150】 本公開還提供本文所述的TCR a和/或b鏈。在一些實施方案中，a鏈包括SEQ ID NOs: 35、37、或39任意者中記載的氨基酸序列、或與其具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些實施方案中，b鏈包括SEQ ID NOs: 36、38、或40任意者中記載的氨基酸序列、或與其具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的氨基酸序列。在一些實施方案中，a鏈包括1個或多個本文所述的Va CDR序列。在一些實施方案中，b鏈包括1個或多個本文所述的Vb CDR序列。

Epstein-Barr病毒感染和癌症

【0151】 Epstein Barr病毒(EBV)是最先識別致癌的病毒之一。EBV在通過其與CD21和MHC II類的相互作用來感染B細胞中是極其有效的。EBV還可感染或保留在上皮細胞中。世界上幾乎所有的成人都已接觸過EBV。在沒有免疫妥協(immune compromise)的情況中，幼時的初次暴露會導致由細胞免疫應答控制的自限性疾病。公知存在針對Epstein Barr病毒(EBV)和EBV相關疾病的免疫防禦。宿主針對病毒蛋白產生的抗原特異性T細胞對病毒非常有效。然而，EBV可持續留存在上皮或B細胞中而不被完全消除。宿主的免疫狀態的任何改變可導致重活化並且根據免疫妥協的程度，該重活化可導致惡性腫瘤。

【0152】 EBV涉及實體器官和造血細胞移植(HSCT)，在那裡T細胞的數量降低或缺乏可導致帶有EBV的B細胞的無限增殖。這樣的不受控的擴增可導致移植後淋巴組織增生性疾病(PTLD)，其是最常見的移植後惡性腫瘤。該綜合征的頻率和強度在各個患者以及對其T細胞群的免疫抑制的效果中變化。EBV還涉及其他惡性腫瘤。幾項研究已將EBV牽連至各種上皮和淋巴惡性腫瘤的發病機理中。例如，公知霍奇金(Glaser,等人"Epstein-Barr virus-associated Hodgkin's disease:

epidemiologic characteristics in international data." International journal of cancer 70.4 (1997): 375-382)和非霍奇金淋巴瘤涉及EBV。EBV和鼻咽癌之間也存在明顯的因果關係(NPC；Raab-Traub "Nasopharyngeal carcinoma: an evolving role for the Epstein-Barr virus." Epstein Barr Virus Volume 1. Springer, Cham, 2015. 339-363.)。患有霍奇金淋巴瘤和NPC的患者的腫瘤樣本表達包括潛伏膜蛋白2 (LMP2)的EBV衍生蛋白。在40%的EBV相關的胃癌中也發現了LMP-2。由於其是非自身的並且是針對EBV的細胞免疫應答的主要靶，它們代表了免疫療法的理想靶。

【0153】 與EBV相關的LMP2(+)人惡性腫瘤的列表包括伯基特氏淋巴瘤、免疫抑制淋巴瘤、擴散型大B-細胞淋巴瘤、與慢性炎症相關的擴散型大B-細胞淋巴瘤、淋巴瘤樣肉芽腫病、漿母細胞性淋巴瘤、原發滲出性淋巴瘤、移植後淋巴增生性障礙、鼻咽癌、胃腺癌、淋巴上皮瘤相關癌、和免疫缺陷相關平滑肌肉瘤。這些病症記載於例如WO/2019/213416 A1；Thompson等人, "Epstein-Barr virus and cancer." Clinical Cancer Research 10.3 (2004): 803-821，其全部內容通過引用結合在此。

【0154】 靜息B細胞的EBV感染/轉化產生潛伏性成淋巴細胞瘤系(Latent Lymphoblastoma Line)(LCL)。LCL存在於潛伏複製中並且以附加體形式攜帶病毒基因的多個拷貝。它們表達許多稱為潛伏蛋白的病毒基因產物，其根據潛伏期階段而變化。總共描述了10種潛伏蛋白：6種Epstein病毒核抗原(EBNA 1、2、3A、3B、3C和LP)、3種潛伏膜蛋白(LMP 1、2A和2B)和BARF1。當表達EBNA1、EBNA2、EBNA3、LMP1、LMP2和BARF1時，初始EBV感染活化B細胞並且誘導潛伏期III。這些蛋白記載於例如Bollard,等人, "T-cell therapy in the treatment of post-transplant lymphoproliferative disease." Nature reviews Clinical oncology 9.9 (2012): 510中，其全部內容通過引用結合在此。

【0155】 本公開提供治療EBV感染和/或EBV誘導的疾病和病症的方法。

工程化細胞

【0156】 本公開提供含有本文所述的TCR或其抗原結合片段、或其他類似抗原-結合分子的工程化細胞(例如，T細胞)。這些工程化細胞可用于治療本文所述的各種病症或疾病(例如，病毒感染、癌症、病毒誘導的病症)。

【0157】 在各種實施方案中，工程化的細胞獲得自包括但不限於動物和人。在各種實施方案中，工程化的細胞為血細胞，其包括但不限於白血球、淋巴細胞或任何其他合適的血細胞類型。優選地，細胞為外周血細胞。更優選地，細胞為T細胞、B細胞或NK細胞。

【0158】 在另一個實施方案中，細胞為T細胞。用於本發明的T細胞的實例包括但不限於：通過分離自患者(一個或多個)的T細胞(例如，腫瘤浸潤的淋巴細胞)的體外培養來得到的細胞；通過用病毒載體轉導分離自患者(一個或多個)外周血的T細胞來得到的TCR基因修飾的T細胞；和CAR轉導的T細胞。優選地，T細胞為TCR基因修飾的T細胞。

【0159】 在本發明的一個實施方案中，細胞為NK細胞。

【0160】 在一些實施方案中，工程化細胞的製備包括一個或多個培養和/或製備步驟。用於結合分子的引入的細胞，例如TCR，可分離自樣品，例如生物樣品，如獲得自或衍生自受試者的生物樣品。在一些實施方案中，分離細胞的受試者是患有疾病或病況或需要細胞治療或待施用細胞治療的受試者。在一些實施方案中，受試者是需要特定治療干預的人，例如其中分離、處理、和/或工程化細胞的過繼性細胞療法。

【0161】 在一些實施方案中，分離方法包括基於細胞中表達或存在一種或多種特定分子的各種細胞類型的分離，例如表面標誌物，如表面蛋白、細胞內標誌物、或核酸。在一些實施方案中，可以使用任何公知的基於這類標誌物的分離方法。在一些實施方案中，分離是基於親和性或免疫親和性的分離。例如，

在一些方面中，分離包括基於細胞的一種或多種標誌物(通常是細胞表面標誌物)的表達或表達水準的細胞和細胞群的分離，例如，通過用與這類標誌物特異性結合的抗體或結合同伴培養，通常接著進行清洗步驟、並將已結合抗體或結合同伴的細胞與未結合抗體或結合同伴的那些細胞分離。

【0162】 這樣的分離步驟可基於陽性選擇，其中保留已結合試劑的細胞以備進一步使用，和/或陰性選擇，其中保留未結合抗體或結合同伴的細胞。在一些實例中，保留兩部分以備進一步使用。在一些方面中，陰性選擇可為特別有用的，其中無可特異性識別異源群體中的細胞類型的抗體，使得分離最好是基於除目標群體以外的其他細胞表達的標誌物來進行。

【0163】 還提供用於表達結合分子和用於產生表達這類結合分子的基因工程化細胞的方法、核酸、組合物、和試劑盒。基因工程通常涉及將編碼例如TCR、CAR、例如TCR-樣CAR、多肽、融合蛋白等的治療分子的核酸引入至細胞中，例如通過逆轉錄病毒轉導、轉染或轉化。在一些實施方案中，基因轉移是通過以下來完成的：首先刺激細胞，例如通過將其與誘導例如增殖、存活、和/或活化等應答的刺激物相組合，例如通過細胞因子或活化標誌物的表達所測量的，接著進行活化的細胞的轉導，並且在培養中擴增至足以臨床應用的數量。

【0164】 在一些實施方案中，使用例如衍生自猿猴病毒40 (SV40)、腺病毒、腺相關病毒(AAV)的載體等重組傳染病毒顆粒將重組核酸轉移至細胞中。在一些實施方案中，使用例如 γ -逆轉錄病毒載體等的重組慢病毒載體或逆轉錄病毒載體將重組核酸轉移至T細胞中。在一些實施方案中，逆轉錄病毒載體具有長末端重複序列(LTR)，例如，衍生自Moloney小鼠白血病病毒(MoMLV)、骨髓增殖性肉瘤病毒(MPSV)、小鼠胚胎幹細胞病毒(MESV)、小鼠幹細胞病毒(MSCV)、或脾病灶形成性病毒(SFFV)的逆轉錄病毒載體。大多數逆轉錄病毒載體衍生自鼠逆轉錄病毒。在一些實施方案中，逆轉錄病毒包括衍生自任何鳥類或哺乳動

物細胞源的那些。逆轉錄病毒通常為雙嗜性的，意味著它們可以感染數個物種的宿主細胞，包括人類。在一些實施方案中，載體為慢病毒載體。在一些實施方案中，通過電穿孔法將重組核酸轉移至T細胞中。在一些實施方案中，通過轉座將重組核酸轉移至T細胞中。在免疫細胞中引入和表達基因材料的其他方法包括磷酸鈣轉染法、原生質體融合法、陽離子脂質體介導的轉染；鎢粒子促進的微粒轟擊法和磷酸鋇DNA共沉澱法。這些方法的大部分在例如WO2019195486等中描述，其全部內容通過引用結合在此。

重組載體

【0165】 任何載體或載體類型可用于將基因材料遞送至細胞。這些載體包括但不限於質粒載體、病毒載體、BAC、YAC、和HAC。相應地，病毒載體可包括但不限於重組逆轉錄病毒載體、重組慢病毒載體、重組腺病毒載體、泡沫病毒載體、重組腺相關病毒(AAV)載體、雜合載體、和質粒轉座子(例如睡美人轉座子系統)或基於整合酶的載體系統。可與本發明的替代實施方案一起使用的其他載體對於本領域技術人員是顯而易見的。

【0166】 在另一個實施方案中，使用的載體是重組逆轉錄病毒載體。病毒載體可在病毒載體製造用特異性培養基中生長。根據本文所述的實施方案，可使用用於生長病毒載體的任何合適的生長培養基和/或補充劑。

基因工程化的抗原受體

【0167】 基因工程化的抗原受體包括但不限於T細胞受體(TCR)、殺手細胞免疫球蛋白樣受體家族(KIR)、C型凝集素受體家族、白細胞免疫球蛋白樣受體家族(LILR)、1型細胞因子受體、2型細胞因子受體家族、腫瘤壞死因子家族、TGFβ受體家族、趨化因子受體、和IgSF。

【0168】 在本發明的一個實施方案中，由核酸構建體編碼的基因工程化的抗原受體包括基因工程化NK細胞受體。在一些實施方案中，NK細胞受體包括殺

手細胞免疫球蛋白樣受體家族(KIR)。在可選實施方案中，NK細胞受體包括C型凝集素受體家族。

【0169】 在其他實施方案中，由核酸構建體編碼的基因工程化抗原受體包括基因工程化T細胞受體(TCR)。在一個實施方案中，表達TCR的T細胞是 $\alpha\beta$ -T細胞。在可選實施方案中，表達TCR的T細胞是 $\gamma\delta$ -T細胞。

靶向的抗原

【0170】 在一些實施方案中，與疾病或病症相關的抗原選自由以下組成的組：由HPV、HIV、HCV、HBV、EBV、HTLV-1、CMV、腺病毒、BK多瘤病毒、HHV-8、MCV或其他病原體表達的分子，孤兒酪氨酸激酶受體ROR1，tEGFR，Her2，L1-CAM，CD19，CD20，CD22，間皮素，CEA，和乙型肝炎表面抗原，葉酸受體抗體，CD23，CD24，CD30，CD33，CD38，CD44，EGFR，EGP-2，EGP-4，EPHa2，ErbB2, 3或4，FBP，胎兒乙醯膽鹼受體，GD2，GD3，HMW-MAA，IL-22R- α ，IL-13R- α 2，kdr， κ 輕鏈，Lewis Y，L1-細胞粘附分子，MAGE-A1，間皮素，MUC1，MUC16，PSCA，NKG2D配體，NY-ESO-1，MART-1，gp100，癌胚胎抗原，ROR1，TAG72，VEGF-R2，癌胚抗原(CEA)，前列腺特異抗原，PSMA，Her2/neu，雌激素受體，孕酮受體，ephrinB2，CD123，CS-1，c-Met，GD-2，和MAGE A3和/或生物素化的分子。

【0171】 基因工程化抗原受體結合來自人乳頭瘤病毒(HPV)的抗原。HPV的亞型選自但不限於：HPV1、HPV2、HPV3、HPV4、HPV6、HPV10、HPV11、HPV16、HPV18、HPV26、HPV27、HPV28、HPV29、HPV30、HPV31、HPV33、HPV34、HPV35、HPV39、HPV40、HPV41、HPV42、HPV43、HPV45、HPV49、HPV51、HPV52、HPV54、HPV55、HPV56、HPV57、HPV58、HPV59、HPV68、HPV69。在一些實施方案中，由基因工程化抗原受體靶向的HPV的亞型選自至少一種高風險HPV，例如但不限於HPV16、HPV18、HPV31、HPV33、HPV35、

HPV39、HPV45、HPV51、HPV52、HPV56、HPV58、HPV59、HPV68、HPV69。

【0172】 在一些實施方案中，HPV抗原包括但不限於E1、E2、E3、E4、E6和E7、L1和L2蛋白。在另一個實施方案中，抗原為E6抗原。在仍另一個實施方案中，抗原為E7抗原。在另一個實施方案中，抗原為HPV16 E6抗原。

【0173】 在其他實施方案中，基因工程化抗原受體結合來自EBV的抗原。EBV抗原選自但不限於：潛伏膜蛋白(LMP1、LMP2A、LMP2B)和Epstein-Barr核抗原(EBNA1、-2、-3A、-3B、-3C、-LP)。

【0174】 因此，治療的疾病或病況是傳染性疾病或病況，例如但不限於病毒性、逆轉錄病毒性、細菌性、和原生動物性感染、免疫缺陷、人乳頭瘤病毒(HPV)、巨細胞病毒(CMV)、Epstein-Barr病毒(EBV)、腺病毒、BK多瘤病毒。在一些實施方案中，疾病或病況是病毒相關的惡性腫瘤，例如但不限於HPV、HCV、EBV、HIV、HHV-8、HTLV-1、和MCV。優選地，用於由所提供的組合物、細胞、方法和用途治療的病毒相關的惡性腫瘤為HPV或EBV相關的癌症。此外，所提供的組合物、細胞、和方法可用於由HPV或EBV相關的癌症導致的實體瘤的治療。具體地，所述疾病或病況包括HPV相關的癌症包括但不限於子宮頸、口咽、肛門、肛管、肛門直腸、陰道、女陰、和陰莖的癌症。所述疾病或病況包括HPV相關的頭頸癌、HPV相關的子宮頸癌。具體地，疾病或病況還包括EBV相關的癌症，例如，鼻咽癌、淋巴癌、乳腺癌和肝細胞癌。

檢查點抑制劑

【0175】 在各種實施方案中，工程化細胞表達至少一種檢查點抑制劑(CPI)。由本發明的工程化細胞表達的抑制性蛋白或CPI抑制或阻斷免疫檢查點，其中所述免疫檢查點包括PD-1、PD-L1、PD-L2、2B4 (CD244)、4-1BB、A2aR、B7.1、B7.2、B7-H2、B7-H3、B7-H4、B7-H6、BTLA、嗜乳脂蛋白、CD160、CD48、CTLA4、GITR、gp49B、HHLA2、HVEM、ICOS、ILT-2、ILT-4、KIR

家族受體、LAG-3、OX-40、PIR-B、SIRP α (CD47)、TFM-4、TIGIT、TIM-1、TIM-3、TIM-4、VISTA及其組合。

【0176】 在一些實施方案中，抑制性蛋白阻斷PD-1或PD-L1。在各種實施方案中，抑制性蛋白包括抗PD-1 scFv。抑制性蛋白可導致PD-1或PD-L1的表達降低和/或抑制群體中的T細胞中的PD-1或PD-L1的上調和/或物理上阻礙PD-1/PD-L1複合物的形成以及其後的信號轉導。在一個實施方案中，抑制性蛋白阻斷PD-1。

核酸構建體

【0177】 參考圖1A，根據各種優選的實施方案，核酸構建體包括兩個序列，其中所述兩個序列包括：(a)抗LMP2 TCR的 α 鏈的可變區融合至小鼠TCR α 鏈的恒定區，確定為“*aLMP-2_Va-Ca*”，其中*aLMP-2_Va*對應於抗LMP2 TCR的 α 鏈的可變區，*Ca*對應於小鼠TCR α 鏈的恒定區；(b)同一抗LMP2 TCR的 β 鏈的可變區融合至小鼠TCR β 鏈的恒定區，確定為“*aLMP-2_Vb-Cb*”，其中*aLMP-2_Vb*對應於同一人抗LMP2 TCR的 β 鏈的可變區，*Cb*對應於小鼠TCR β 鏈的恒定區。在一個實施方案中，核酸構建體進一步包括編碼信號肽的序列。

【0178】 參考圖1B，根據各種實施方案，核酸構建體包括三個序列，其中所述三個序列包括：(a)人TCR的 α 鏈的可變區融合至小鼠TCR α 鏈的恒定區，確定為“*Va-Ca*”，其中*Va*對應於人TCR的 α 鏈的可變區，*Ca*對應於小鼠TCR α 鏈的恒定區；(b)同一人TCR的 β 鏈的可變區融合至小鼠TCR β 鏈的恒定區，確定為“*Vb-Cb*”，其中*Vb*對應於同一人TCR的 β 鏈的可變區，*Cb*對應於小鼠TCR β 鏈的恒定區；和(c)由GS接頭連接的免疫檢查點抑制劑(ICI)的重鏈和輕鏈的可變區，通過重鏈的可變區的C末端處的柔性接頭肽融合至TCR β RII的胞外結構域的配體結合序列。在優選實施方案中，核酸構建體進一步包括編碼信號肽的序列。在一些實施方案中，人TCR是抗LMP2 TCR。在一些其他實施方案中，人TCR是

抗E-6 TCR。在一些實施方案中，免疫檢查點抑制劑是抗PD-1抗體。TCR的可變區可連接至信號肽序列。

【0179】 核酸構建體可進一步包括可以幫助和/或實現構建體的轉染、轉導、整合、複製、轉錄、翻譯、表達和/或穩定的其他序列。在優選的實施方案中，核酸構建體包括連接上述序列(a)、(b)和/或(c)的P2A和/或T2A序列。

【0180】 本公開還提供編碼本文所述的TCR a和/或b鏈的核酸。在一些實施方案中，編碼a鏈的核酸包括SEQ ID Nos：41、43、或45任意者中記載的序列、或與其具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的核酸序列。在一些實施方案，編碼b鏈的核酸包括SEQ ID Nos：42、44、或46任意者中記載的序列、或與其具有至少80%、85%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、或99%序列同一性的序列。在一些實施方案中，a鏈包括一個或多個如本文所述的Va CDR序列。在一些實施方案中，b鏈包括一個或多個如本文所述的Vb CDR序列。

工程化細胞的製備方法

【0181】 本發明還提供用於病理學疾病或病況的工程化細胞的製造和使用的方法或工藝。所述方法包括以下步驟：(I)從患者血液分離T細胞；(II)用含有編碼基因工程化抗原受體和抑制性蛋白的核酸構建體的病毒載體轉導群體T細胞；(III)體外擴增轉導的細胞；和(IV)將擴增的細胞輸注至患者中，在此工程化T細胞將尋找並破壞抗原陽性腫瘤細胞。在一些實施方案中，這些工程化T細胞將阻斷PD-1/PD-L1免疫抑制並且增強抗腫瘤免疫應答。

【0182】 所述方法進一步包括：在步驟(II)之前，用含有本發明的核酸構建體的病毒載體轉染T細胞。

【0183】 可以通過使用任何標準方法，例如磷酸鈣法、電穿孔法、脂質體介導的轉移、顯微注射、基因槍粒子遞送系統(biolistic particle delivery system)、

或任何技術人員公知的方法來實現T細胞的轉染。在一些實施方案中，T細胞的轉染是使用磷酸鈣法來進行的。

【0184】 根據本文所述的各種實施方案，本發明提供針對腫瘤、特別是EBV和HPV相關癌症的免疫療法。工程化T細胞識別腫瘤相關HPV/EBV抗原並同時分泌阻斷程序性細胞死亡蛋白1 (PD-1)和TGFβ的單鏈抗體(scFv)融合蛋白。這些工程化T細胞表現更強的抗腫瘤應答和降低的T細胞耗竭。

【0185】 已在實驗中發現，用本發明PD-1檢查點阻斷更有效，因為(1)抗PD-1藥物遞送位於腫瘤部位並且(2)抗PD-1單鏈抗體比現存抗體更強力結合。此外，因為抗PD-1藥物遞送位於腫瘤部位，降低由於非特異性炎症導致的毒性。與現有替代品相比，本發明提供改善T細胞活化和/或防止T細胞耗竭的抗LMP2 TCR和抗PD-1的組合。

【0186】 此外，本發明提供產生個人化抗腫瘤免疫療法的方法。抗LMP2+/抗PD-1工程化T細胞可產生自患者血液。然後將這些工程化T細胞作為細胞治療產品回輸至患者中。該產品可用於患有EBV LMP2相關腫瘤的任何患者，包括但不限於鼻咽癌、霍奇金氏淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、胃癌等。

變體&修飾

【0187】 可以修飾例如TCR或其抗原結合片段等的結合分子。在某些實施方案中，與例如TCR等本文所述的結合分子的序列相比，例如TCR或其抗原結合片段等的結合分子包括一種或多種氨基酸變體，例如取代、缺失、插入、和/或突變。示例性變體包括設計成改善結合分子的結合親和力和/或其他生物特性的那些。結合分子的氨基酸序列變體可通過將適合的修飾引入至編碼結合分子的核苷酸序列中、或通過肽合成來製備。這樣的修飾包括，例如結合分子的氨基酸序列中的殘基的缺失、和/或插入和/或取代。可以進行缺失、插入、和取代的任何組合以獲得最終構建體，條件是最終構建體具有所期望的特徵，例如抗原

結合。

【0188】 在一些實施方案中，例如TCR等親本結合分子的CDR中的一個或多個殘基被取代。在一些實施方案中，進行取代以將序列或序列中的位置恢復至種系序列，例如在種系(例如，人種系)中發現的結合分子序列，例如來降低免疫原性的可能性，例如在對人受試者施用時。

【0189】 本公開還提供抗體或其抗原結合片段，其含有關於TCR如上述的任何一個或多個CDR。在一些實施方案中，抗體或抗原結合片段包括在 α 鏈中含有CDR1、CDR2和/或CDR3以及在 β 鏈中含有CDR1、CDR2和/或CDR3的可變重鏈和輕鏈。

【0190】 在一些實施方案中，抗體的重鏈和輕鏈可以是全長或可以是抗原結合部分(Fab、F(ab')₂、Fv或單鏈Fv片段(scFv))。在其他實施方案中，抗體重鏈恒定區選自例如IgG1、IgG2、IgG3、IgG4、IgM、IgA1、IgA2、IgD、和IgE，特別地選自例如IgG1、IgG2、IgG3、和IgG4，更特別地IgG1 (例如，人IgG1)。在一些實施方案中，抗體輕鏈恒定區選自例如 κ 或 λ ，特別地 κ 。抗原結合片段是指完整抗體以外的其他分子，其包括結合至完整抗體所結合的抗原的完整抗體的一部分。抗原結合片段的實例包括但不限於Fv、Fab、Fab'、Fab'-SH、F(ab')₂；雙體抗體；線性抗體；可變重鏈(VH)區、單鏈抗體分子例如scFv和單域VH單抗體；和形成自抗體片段的多特異性抗體。在特定實施方案中，抗體為含有可變重鏈區和/或可變輕鏈區的單鏈抗體片段，例如scFv。單域抗體是含有抗體的重鏈可變區的全部或一部分或輕鏈可變區的全部或一部分的抗體片段。在某些實施方案中，單域抗體是人單域抗體。

【0191】 在一些實施方案中，抗體或其抗原結合部分在細胞上作為例如抗原受體等重組受體的部分來表達。抗原受體中有功能性非TCR抗原受體，例如嵌合抗原受體(CAR)。通常，含有在MHC分子的背景下表現出針對肽的TCR樣

特異性的抗體或抗原結合片段的CAR也可以稱為TCR樣CAR。因此，例如EBV結合分子等提供的結合分子中有抗原受體，例如包括例如TCR樣抗體等提供的抗體之一的那些。在一些實施方案中，抗原受體和其他嵌合受體特異性結合LMP2的一個區域或表位，例如TCR樣抗體。抗原受體中有功能性非TCR抗原受體，例如嵌合抗原受體(CAR)。還提供表達CAR的細胞並且將其用於過繼性細胞療法，例如與HPV或EBV表達相關的疾病或病症的治療。

【0192】 當在MHC分子的背景下展示或呈遞時，含有非TCR分子的TCR樣CAR表現T細胞受體特異性，例如針對T細胞表位或肽表位。在一些實施方案中，TCR樣CAR可含有抗體或其抗原結合部分，例如TCR樣抗體，例如本文所述的。在一些實施方案中，在MHC分子的背景下，抗體或其抗體結合部分針對特異性肽表位是反應性的，其中抗體或抗體片段可將MHC分子背景下的特異性肽與單獨MHC分子、單獨的特異性肽、和在一些情況下與MHC分子背景下的不相關肽區分開。在一些實施方案中，抗體或其抗原結合部分可表現比T細胞受體更高的結合親和力。

【0193】 示例性抗原受體，包括CAR，和用於工程化並將這樣的受體引入至細胞的方法，包括例如在美國專利申請公開號US2002/131960、US2013/287748、US2013/0149337、U.S. 6,451,995、U.S. 7,446,190、U.S. 8,252,592中所述的那些；其每一者的全部內容通過引用結合在此。

【0194】 在一些實施方案中，CAR通常包括細胞外抗原(或配體)結合結構域，包括對MHC分子背景下的肽為特異性的抗體或其抗原結合片段，連接至一個或多個細胞內信號傳導成分，在一些方面通過接頭和/或跨膜結構域(一個或多個)。在一些實施方案中，這樣的分子通常可以模擬或近似通過例如TCR等天然抗原受體的信號，並且任選地通過這類受體與共刺激受體組合的信號。

【0195】 在一些實施方案中，CAR通常在其細胞外部分包括一個或多個抗

原結合分子，例如一個或多個抗原結合片段、結構域、或部分、或一個或多個抗體可變結構域、和/或抗體分子。在一些實施方案中，CAR包括抗體分子的一個或多個抗原結合部分，例如衍生自單克隆抗體(mAb)的可變重(VH)鏈和可變輕(VL)鏈的單鏈抗體片段(scFv)。在一些實施方案中，CAR包括TCR樣抗體，例如特異性識別MHC分子背景下的細胞表面上呈遞的肽表位。

雙功能Trap融合蛋白

【0196】 本公開還提供雙功能trap融合蛋白。靶向免疫檢查點(例如PD-1或PD-L1)的單克隆抗體是這些試劑的主要類型。PD-1受體在活化的T細胞和自然殺傷(NK)細胞上表達。在與其配體PD-L1和PD-L2相互作用後，其通常在抗原呈遞細胞上表達，PD-1通過抑制T細胞和NK細胞成熟、增殖、和效應子功能來調節免疫應答。

【0197】 除了免疫檢查點的表達，腫瘤微環境包含其他免疫抑制分子。特別感興趣的是細胞因子TGFβ，其在癌症中具有多種功能。在腫瘤發展的早期，TGFβ防止腫瘤細胞的增殖並且促進分化和細胞凋亡。然後，在腫瘤進展期間，由於TGFβ受體表達的喪失或下游信號傳導元件的突變，出現腫瘤TGFβ不敏感。然後，TGFβ通過其對血管新生、上皮-至-間充質轉換(EMT)的誘導、以及免疫抑制的影響，促進腫瘤進展。腫瘤上的高TGFβ血清水準和TGFβ受體(TGFβR)表達的喪失與不良預後相關。TGFβ靶向療法顯示有限的臨床活性。

【0198】 在一些方面，本公開提供可靶向免疫檢查點和TGFβ負調節途徑的雙功能trap蛋白。在一些實施方案中，雙功能trap蛋白靶向PD-1和TGFβ。在一些實施方案中，雙功能trap蛋白靶向PD-L1和TGFβ。在一些實施方案中，雙功能融合蛋白設計成阻斷PD-L1並且隔離TGFβ。基於人IgG1單克隆抗體(mAb) avelumab，M7824 (MSB0011395C)包括連接至人抗PD-L1 scFv的C-末端的人TGFβ受體II (TGFβRII)的胞外結構域。在一些實施方案中，雙功能trap蛋白包括

連接至人抗PD-1 scFv的C-末端的人TGFβ受體II (TGFβRII)的胞外結構域。

【0199】 在例如Knudson,等人"M7824, a novel bifunctional anti-PD-L1/TGFβ Trap fusion protein, promotes anti-tumor efficacy as monotherapy and in combination with vaccine." Oncoimmunology 7.5 (2018): e1426519中描述了這些雙功能trap融合蛋白，其全部內容通過引用結合在此。

【0200】 本公開提供通過使用如本文所述的TCR或抗原結合分子與一種或多種雙功能trap融合蛋白的組合來治療如本文所述的各種病症(例如，癌症)的方法。在一些實施方案中，用表達如本文所述的TCR或抗原結合分子的細胞和一種或多種雙功能trap融合蛋白來治療受試者。

組合物、製劑和施用方法

【0201】 本公開提供含有通過所公開的方法製備的工程化T細胞及其群體的組合物(包括藥物和治療組合物)。還提供方法，例如向例如患者等受試者施用工程化T細胞和其組合物的治療方法。

A. 組合物和製劑

【0202】 提供含有用於施用的工程化T細胞的組合物，包括藥物組合物和製劑，例如含有用於以給定劑量或其部分施用的細胞數的單位劑型組合物。藥物組合物和製劑可包括一種或多種任選的藥學上可接受的運載體或賦形劑。在一些實施方案中，組合物包括至少一種其他治療劑。

【0203】 在一些實施方案中，運載體的選擇部分地由特定細胞(例如，T細胞或NK細胞)和/或由施用方法決定。因此，存在多種合適的製劑。例如，藥物組合物可含有防腐劑。合適的防腐劑可包括，例如，尼泊金甲酯、尼泊金丙酯、苯甲酸鈉、和苯扎氯銨。在一些實施方案中，使用兩種以上的防腐劑的混合物。防腐劑或其混合物通常以總組合物的按重量計約0.0001%至約2%的量存在。載體在例如Remington's Pharmaceutical Sciences 第16版, Osol, A.編 (1980)中描述。藥

學上可接受的載體在採用的劑量和濃度下對於接受者為無毒的，並且包括但不限於：緩衝液例如磷酸鹽、檸檬酸鹽、和其他有機酸；抗氧化劑包括抗壞血酸和甲硫氨酸；防腐劑(例如十八烷基二甲基苄基氯化銨；氯化六甲銨；苯扎氯銨；苄索氯銨；苯酚、丁醇或苯甲醇；尼泊金烷基酯類例如尼泊金甲酯或尼泊金丙酯；鄰苯二酚；間苯二酚；環己醇；3-戊醇；和間甲酚)；低分子量(小於約10個殘基)多肽；蛋白質，例如血清白蛋白、明膠、或免疫球蛋白；親水性聚合物例如聚乙烯吡咯烷酮；氨基酸例如甘氨酸、穀氨醯胺、天冬醯胺、組氨酸、精氨酸、或賴氨酸；單糖類、二糖類和其他碳水化合物類，包括葡萄糖、甘露糖、或糊精；螯合劑例如EDTA；糖類例如蔗糖、甘露醇、海藻糖或山梨醇；成鹽反離子(counter-ion)例如鈉；金屬複合物(例如Zn-蛋白複合物)；和/或非離子型表面活性劑例如聚乙二醇(PEG)。

【0204】 用於本發明的合適的緩衝劑包括，例如檸檬酸、檸檬酸鈉、磷酸、磷酸鉀、和各種其他酸類和鹽類。在一些實施方案中，使用兩種以上的緩衝劑的混合物。緩衝劑或其混合物通常以總組合物的按重量計約0.001%至約4%的量存在。已知製備可施用的藥物組合物的方法。示例性方法在例如Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott Williams & Wilkins；第21版(2005年5月1日)中更詳細地描述。

【0205】 製劑可包括水性溶液。製劑或組合物還可包括超過一種用於待用工程化T細胞治療的特定適應症、疾病、或病況的有效成分，優選具有與細胞互補的活性的那些，其中各自的活性不會對彼此有不利的影響。這樣的有效成分合適地以對於期望目的有效的量組合存在。因此，在一些實施方案中，藥物組合物可進一步包括其他藥物活性劑或藥物，例如化療劑，例如門冬醯胺酶、白消安、卡鉑、順鉑、柔紅黴素、阿黴素、氟脲嘧啶、吉西他濱、羥基脲、甲氨蝶呤、紫杉醇、利妥昔單抗、長春鹼、和/或長春新鹼。

【0206】 在一些實施方案中，藥物組合物含有有效治療或預防疾病或病症的量、例如治療有效量或預防有效量的細胞。在一些實施方案中，治療或預防功效通過定期地評價治療的受試者來監測。期望的劑量可以通過細胞的單次濃給藥(bolus administration)、通過細胞的多次濃給藥、或通過細胞的連續輸注給藥來遞送。

【0207】 可以使用標準給藥技術、製劑、和/或設備來施用細胞和組合物。細胞的施用可以是自體的或異種的。例如，免疫應答T細胞或祖細胞可獲得自一個受試者，並施用至同一受試者或者在根據本文所述各種實施方案將其基因修飾後施用至不同的、相容的受試者。外周血衍生的免疫應答T細胞或其後代(例如，在體內、離體或在體外衍生的)可通過局部注射來施用，包括導管給藥、系統性注射、局部注射、靜脈內注射、或腸胃外給藥。通常，當施用治療組合物(例如，含有基因修飾的免疫應答細胞)時，其通常配製成單位劑量可注射形式(unit dosage injectable form)(溶液、懸浮液、乳劑)。

【0208】 本文所公開的製劑包括用於口服、靜脈內、腹膜內、皮下、肺的、經皮的、肌肉內、鼻內、頰部、舌下、或栓劑給藥。在一些實施方案中，細胞群為腸胃外給藥。如本文所使用的，術語“腸胃外”包括靜脈內、肌肉內、皮下、直腸、陰道、和腹膜內給藥。在一些實施方案中，使用通過靜脈內、腹膜內、或皮下注射的外周系統遞送來向受試者施用細胞。

【0209】 在一些實施方案中，組合物作為無菌液體製劑提供，例如等滲水性溶液、懸浮液、乳劑、分散劑、或粘性組合物，其在某些方面可被緩衝至所選的pH。液體製劑通常比凝膠、其他粘性組合物、和固體組合物更容易製備。另外，液體組合物略微更便於施用，特別是通過注射施用。另一方面，粘性組合物可配製成在合適的粘度範圍內來提供與特定組織更長的接觸期。液體或粘性組合物可包括運載體，其可以是含有例如水、鹽水(saline)、磷酸鹽緩衝鹽水、

多元醇(例如，甘油、丙二醇、液體聚乙二醇)及其合適的混合物等的溶劑或分散介質。

【0210】 無菌可注射溶液可通過將細胞摻入溶劑中來製備，例如將細胞與合適的載體、稀釋劑、或賦形劑如無菌水、生理鹽水、葡萄糖、或右旋糖等混合。取決於施用途徑和所需的製備方法，組合物可包括佐劑物質如潤濕劑、分散劑、或乳化劑(例如甲基纖維素)、pH緩衝劑、膠凝或增粘添加劑、防腐劑、調味劑(flavoring agent)、和/或著色劑。在某些方面可以參考標準文本來製備合適的製劑。

【0211】 可以添加增強組合物穩定性和無菌性的各種添加劑，包括抗微生物防腐劑、抗氧化劑、螯合劑、和緩衝液。可以通過各種抗細菌和抗真菌劑例如尼泊金酯類、氯丁醇、苯酚、和山梨酸來確保防止微生物的活動。可以通過使用例如單硬脂酸鋁和明膠等延遲吸收的試劑以帶來延長的可注射藥物形式的吸收。

【0212】 用於體內施用的製劑通常是無菌的。無菌性可以例如通過由無菌過濾膜過濾來容易地實現。

B. 工程化T細胞在過繼性細胞療法中的施用方法和用途

【0213】 提供細胞、群體、和組合物的施用方法以及這類細胞、群體、和組合物在治療或預防包括癌症的疾病、病況、和病症中的用途。在一些實施方案中，本文所述方法可降低發展如本文所述的疾病、病況、和病症的風險。

【0214】 在一些實施方案中，向患有待用例如通過過繼性細胞療法(例如過繼性T細胞療法)等治療的特定疾病或病況的受試者或患者施用如本文所述的細胞、群體、和組合物。在一些實施方案中，向受試者例如患有疾病或病況或處於疾病或病況風險的受試者施用通過所提供的方法製備的細胞和組合物，例如工程化組合物以及培養和/或其他工藝步驟後的停產(end-of-production)組合物。

在一些方面中，所述方法從而例如通過減小在表達由工程化T細胞識別的抗原的癌症中的腫瘤負荷來治療疾病或病況，例如減輕疾病或病況的一種或多種症狀。

【0215】 公知用於過繼性細胞療法的施用方法，並且可與所提供的方法和組合物結合使用。例如，過繼性T細胞治療方法記載於例如，Gruenberg等人的美國專利申請公開號2003/0170238；Rosenberg的美國專利號4,690,915；Rosenberg (2011) Nat Rev Clin Oncol. 8(10):577-85)。參見，例如，Themeli等人(2013) Nat Biotechnol. 31(10): 928-933；Tsukahara等人(2013) Biochem Biophys Res Commun 438(1): 84-9；Davila等人(2013) PLoS ONE 8(4): e61338。

【0216】 在一些實施方案中，通過自體轉移來進行例如過繼性T細胞療法等細胞療法，其中從接受細胞療法的受試者中、或從源自這樣的受試者的樣品中分離和/或另外製備T細胞。因此，在一些方面，細胞衍生自需要治療的受試者例如患者，並且將所述細胞在分離和處理後施用至同一受試者。

【0217】 在一些實施方案中，通過異體轉移來進行例如過繼性T細胞療法等細胞療法，其中從接受或最終接受細胞療法的受試者以外的受試者、例如第一受試者、中分離和/或另外製備T細胞。在這樣的實施方案中，然後將所述細胞施用至相同物種的不同受試者，例如第二受試者。在一些實施方案中，第一和第二受試者為基因上同一的(genetically identical)。在一些實施方案中，第一和第二受試者為基因上相似的。在一些實施方案中，第二受試者表達與第一受試者相同的HLA類或超類型(supertype)。

【0218】 在一些實施方案中，在施用細胞或含有細胞的組合物之前，用靶向例如腫瘤等疾病或病況的治療劑治療受試者。在一些方面，受試者對其他治療劑為難治性(refractory)或非應答性的。在一些實施方案中，受試者患有持久性或復發性疾病，例如，在用另一種治療性干預治療後，包括化療、放射、和/或造血幹細胞移植(HSCT)，例如同種異體HSCT。在一些實施方案中，所述施用有

效地治療受試者，儘管受試者對另一種療法產生抵抗力。

【0219】 在一些實施方案中，受試者對其他治療劑為應答性的，並且用所述治療劑的治療降低疾病負擔。在一些方面，受試者最初對治療劑為應答性的，但隨著時間的推移表現出疾病或病況的復發。在一些實施方案中，受試者不復發。在一些這樣的實施方案中，受試者確定為具有復發風險，例如處於復發的高風險，並且因此預防性地施用細胞例如來降低復發的可能性或預防復發。在一些實施方案中，受試者尚未接受用另一種治療劑的在先治療。

【0220】 在一些實施方案中，以期望的劑量施用細胞，其在一些方面包括細胞或細胞類型(一種或多種)的期望劑量或數量和/或細胞類型的期望比。因此，在一些實施方案中，細胞的劑量是基於細胞的總數(或數量每kg體重)和個體群體或亞型的期望比，例如CD4+對CD8+的比。在一些實施方案中，細胞的劑量是基於個體群體中的細胞或個體細胞類型的期望總數(或數量每kg體重)。在一些實施方案中，劑量是基於以下特徵的組合，例如期望的總細胞數、期望比、以及期望的個體群體中的細胞總數。

【0221】 在一些實施方案中，可以等於或在例如T細胞的期望劑量等的總細胞的期望劑量的容許差異內施用例如CD8+和CD4+ T細胞等細胞的群體或亞型。在一些實施方案中，期望劑量是細胞的期望數量、或對其施用細胞的受試者的每單位體重的細胞期望數量，例如，細胞/kg。在一些實施方案中，期望劑量等於或大於細胞最小數量或每單位體重的細胞最小數量。在一些實施方案中，在總細胞中，以期望劑量施用，個體群體或亞型以等於或接近期望輸出比(output ratio)(例如CD4+對CD8+的比)存在，例如在這樣的比的某些容許差異或誤差內。

【0222】 在一些實施方案中，以等於或在細胞的一個或多個個體群體或亞型的期望劑量(例如CD4+細胞的期望劑量和/或CD8+細胞的期望劑量)的容許差

異內施用細胞。在一些實施方案中，期望劑量是亞型或群體的細胞的期望數量、或向其施用細胞的受試者的每單位體重的這類細胞的期望數量，例如，細胞/kg。在一些實施方案中，期望劑量等於或大於群體或亞型的細胞的最小數量、或每單位體重的群體或亞型的細胞的最小數量。

【0223】 因此，在一些實施方案中，劑量是基於總細胞的期望固定劑量和期望比、和/或基於一種或多種(例如，每一個)個體亞型或亞群的期望固定劑量。因此，在一些實施方案中，劑量是基於T細胞的期望固定劑量或最小劑量以及CD4+與CD8+細胞的期望比、和/或是基於CD4+和/或CD8+細胞的期望固定劑量或最小劑量。

【0224】 在某些實施方案中，細胞或細胞的亞型的個體群體在以下範圍內向受試者施用：約1百萬至約1000億細胞，例如1百萬至約500億細胞(例如，約5百萬細胞、約2500萬細胞、約5億細胞、約10億細胞、約50億細胞、約200億細胞、約300億細胞、約400億細胞、或由前述值的任兩者定義的範圍)，例如約1千萬至約1000億細胞(例如，約2千萬細胞、約3千萬細胞、約4千萬細胞、約6千萬細胞、約7千萬細胞、約8千萬細胞、約9千萬細胞、約100億細胞、約250億細胞、約500億細胞、約750億細胞、約900億細胞、或由前述值的任兩者定義的範圍)，並且在一些情況下為1億細胞至約500億細胞(例如，約1.2億細胞、約2.5億細胞、約3.5億細胞、約4.5億細胞、約6.5億細胞、約8億細胞、約9億細胞、約30億細胞、約300億細胞、或約450億細胞)或這些範圍之間的任何值。

【0225】 在一些實施方案中，總細胞的劑量和/或細胞的個別亞群的劑量在等於或約約 10^4 和等於或約 10^9 細胞/千克(kg)體重之間，例如在 10^5 和 10^6 細胞/kg體重之間，例如，至少或至少約或等於或約 1×10^5 細胞/kg、 1.5×10^5 細胞/kg、 2×10^5 細胞/kg、或 1×10^6 細胞/kg體重。例如，在一些實施方案中，以等於以下或在以下的一定誤差範圍內施用細胞：在等於或約 10^4 和等於或約 10^9 T細胞/千克(kg)體

重之間，例如在 10^5 和 10^6 T細胞/kg體重之間，例如，至少或至少約或等於或約 1×10^5 T細胞/kg、 1.5×10^5 T細胞/kg、 2×10^5 T細胞/kg、或 1×10^6 T細胞/kg體重。

【0226】 在一些實施方案中，以等於以下或在以下的一定誤差範圍內施用細胞：在等於或約 10^4 和等於或約 10^9 CD4+和/或CD8+細胞/千克(kg)體重之間，例如在 10^5 和 10^6 CD4+和/或CD8+細胞/kg體重之間，例如，至少或至少約或等於或約 1×10^5 CD4+和/或CD8+細胞/kg、 1.5×10^5 CD4+和/或CD8+細胞/kg、 2×10^5 CD4+和/或CD8+細胞/kg、或 1×10^6 CD4+和/或CD8+細胞/kg體重。

【0227】 在一些實施方案中，以等於以下或在以下的一定誤差範圍內施用細胞：大於、和/或至少約 1×10^6 、約 2.5×10^6 、約 5×10^6 、約 7.5×10^6 、或約 9×10^6 CD4+細胞，和/或至少約 1×10^6 、約 2.5×10^6 、約 5×10^6 、約 7.5×10^6 、或約 9×10^6 T細胞。在一些實施方案中，以等於以下或在以下的一定誤差範圍內施用細胞：約 10^8 和 10^{12} 之間或約 10^{10} 和 10^{11} T細胞之間、約 10^8 和 10^{12} 之間或約 10^{10} 和 10^{11} CD4+細胞之間、和/或約 10^8 和 10^{12} 之間或約 10^{10} 和 10^{11} CD8+細胞之間。

【0228】 在一些實施方案中，以等於或在多種細胞群體或亞型、例如CD4+和CD8+細胞或亞型的期望輸出比的容許範圍內施用細胞。在一些方面，期望比可以是特定比或可以是比例範圍。例如，在一些實施方案中，期望比(例如，CD4+對CD8+細胞的比)在等於或約5:1和等於或約5:1之間(或大於約1:5和小於約5:1)、或在等於或約1:3和等於或約3:1之間(或大於約1:3和小於約3:1)，例如在等於或約2:1和等於或約1:5之間(或大於約1:5和小於約2:1)，例如等於或約5:1、4.5:1、4:1、3.5:1、3:1、2.5:1、2:1、1.9:1、1.8:1、1.7:1、1.6:1、1.5:1、1.4:1、1.3:1、1.2:1、1.1:1、1:1、1:1.1、1:1.2、1:1.3、1:1.4、1:1.5、1:1.6、1:1.7、1:1.8、1:1.9、1:2、1:2.5、1:3、1:3.5、1:4、1:4.5、或1:5。在一些方面，容許差異在期望比的約1%、約2%、約3%、約4%、約5%、約10%、約15%、約20%、約25%、約30%、約35%、約40%、約45%、約50%內，包括這些範圍之間的任何值。

【0229】對於疾病的預防或治療，適當的劑量可取決於待治療的疾病類型、細胞或重組受體的類型、疾病的嚴重程度和進程、是否以預防或治療目的施用細胞、先前的治療、受試者的臨床史以及對細胞的應答、以及主治醫師的判斷。在一些實施方案中，一次或在一系列的治療中向受試者適當地施用組合物和細胞。

【0230】可以通過任何合適的手段來施用本文所述的細胞，例如，通過濃輸注，通過注射，例如，靜脈內或皮下注射、眼內注射、眼周注射、視網膜下注射、玻璃體內注射、經中隔(trans-septal)注射、鞏膜下注射、脈絡膜內注射、前眼房注射、結膜下注射(subconjunctival injection)、結膜下注射(subconjunctival injection)、筋膜下注射(sub-Tenon's injection)、眼球後注射、球周注射、或後近鞏膜遞送(posterior juxtasceral delivery)。在一些實施方案中，它們通過以下方式遞送：腸胃外、肺內、和鼻內，並且如果需要局部治療，則病灶內施用。腸胃外輸注包括肌肉內、靜脈內、動脈內、腹膜內、或皮下施用。在一些實施方案中，通過細胞的單次濃給藥來施用給定劑量。在一些實施方案中，通過細胞的多次濃給藥來施用，例如在不超過3天的時間段中，或通過細胞的連續輸注給藥。

【0231】在一些實施方案中，細胞作為組合治療的一部分來施用，例如與另一種治療干預同時或以任何次序順序施用，例如抗體或工程化細胞或受體或藥劑，例如細胞毒性劑或治療劑。在一些實施方案中，細胞與一種或多種其他治療劑共施用或連同另一種治療干預同時或以任何次序順序施用。在一些情況下，細胞與另一種療法以足夠接近的時間共施用使得細胞群體增強一種或多種其他治療劑的效果，反之亦然。在一些實施方案中，在一種或多種其他治療劑之前施用細胞。在一些實施方案中，在一種或多種其他治療劑之後施用細胞。在一些實施方案中，例如，一種或多種其他藥劑包括例如IL-2等細胞因子，例如來增強持久性。在一些實施方案中，方法包括化療劑的施用。

【0232】 在施用細胞之後，在一些實施方案中，測量工程化細胞群的生物活性，例如通過許多已知方法中的任意者。評價的參數包括工程化T細胞與抗原的特異性結合，在體內例如通過成像、或離體例如通過ELISA或流式細胞術。在某些實施方案中，可以使用任何本領域已知的合適的方法來測量工程化細胞破壞靶細胞的能力，例如Kochenderfer等人, J. Immunotherapy, 32(7): 689-702 (2009)、和Herman等人 J. Immunological Methods, 285(1): 25-40 (2004)中所描述的細胞毒性試驗。在某些實施方案中，通過分析一種或多種細胞因子例如CD107a、IFN γ 、IL-2、和TNF的表達和/或分泌來測量細胞的生物活性。在一些方面，通過分析臨床結果如腫瘤負荷或負載的減少來測量生物活性。

【0233】 在某些實施方案中，以許多方式進一步修飾工程化細胞，使得它們的治療或預防功效增加。例如，可將由群體表達的工程化CAR或TCR與靶部分直接地或通過接頭間接地綴合。將例如CAR或TCR等化合物綴合至靶部分的實踐是本領域已知的。參見，例如，Wadwa等人, J. Drug Targeting 3: 111 (1995)、和美國專利號5,087,616。

C. 給藥計畫或方案

【0234】 在一些實施方案中，提供重複劑量方法，其中給出第一劑量的細胞接著一個或多個第二連續劑量。當在過繼性療法中向受試者施用時，細胞的多個劑量的時機和大小設計成增加表達TCR的工程化T細胞的功效和/或活性和/或功能。在一些實施方案中，重複給藥降低當例如PD-1和/或PD-L1等抑制性免疫分子在表達TCR的工程化T細胞中上調時可發生的下調或抑制活性。所述方法涉及施用第一劑量，通常接著一個或多個連續劑量，並在不同劑量之間具有特定時間段。

【0235】 在過繼性細胞療法的情況中，給定“劑量”的施用涵蓋將給定量或數量的細胞作為單個組合物施用和/或單次不間斷施用，例如作為單次注射或連

續輸注，並且還包括在不超過3天的指定時間段內，將給定量或數量的細胞作為以多個單獨的組合物或輸注來提供的分次劑量的施用。因此，在一些情況下，第一或連續劑量是在單個時間點給予或開始的、指定數量的細胞的單次或連續施用。然而，在一些情況下，第一或連續劑量在不超過3天的時間段中以多次注射或輸注來施用，例如一次一天持續3天或持續2天、或在一天內多次輸注。

【0236】 因此，在一些方面，第一劑量的細胞以單一藥物組合物施用。在一些實施方案中，連續劑量的細胞以單一藥物組合物施用。

【0237】 在一些實施方案中，第一劑量的細胞以多種組合物施用，這些組合物共同包含第一劑量的細胞。在一些實施方案中，連續劑量的細胞以多種組合物施用，這些組合物共同包含連續劑量的細胞。在一些方面，其他連續劑量可在不超過3天的時間段內以多種組合物施用。

【0238】 術語“分次劑量”是指分開的劑量，使得其在1天以上的時間內施用。這類劑量包含在本發明中並且被視為單劑量。

【0239】 因此，在一些方面，第一劑量和/或連續劑量(一個或多個)可作為分次劑量施用。例如，在一些實施方案中，劑量可在2天內或3天內向受試者施用。用於分次給藥的示例性方法包括在第1天施用劑量的25%並且第2天施用劑量的剩餘75%。在其他實施方案中，可在第1天施用第一劑量的33%並在第2天施用剩餘的67%。在一些方面，在第1天施用劑量的10%、在第2天施用劑量的30%、並在第3天施用劑量的60%。在一些實施方案中，分次劑量不延續超過3天。

【0240】 參考前述劑量，例如第一劑量，術語“連續劑量”是指在先前的例如第一劑量之後向相同受試者施用的劑量，且其間未向受試者施用任何中間劑量。然而，該術語不包括包含在單個分次劑量中的一系列輸注或注射中的第二、第三、和/或以此類推的注射或輸注。因此，除非特別另外指出，在1、2或3天時間段內的第二輸注不被認為是此處所用的“連續”劑量。同樣地，分次劑量內的多

個劑量的系列中的第二、第三等也不被認為是“連續”劑量的含義背景中的“中間”劑量。因此，除非特別另外指出，在第一或先前劑量的開始之後、在大於3天的特定時間段內施用的劑量被認為是“連續”劑量，甚至是受試者在第一劑量開始後接著接受了第二或其後的細胞的注射或輸注，只要第二或其後的注射或輸注在第一或先前劑量開始後的3天內發生。

【0241】 因此，除非另外特別指出，相同細胞在長達3天的時間段內的多次施用被視為是單劑量，並且細胞在初次施用後3天內的施用不被視為是連續施用，並且也不被視為為了確定第二劑量是否與第一劑量“連續”的中間劑量。

【0242】 在一些實施方案中，給出多個連續劑量，在一些方面使用與關於第一劑量和第一連續劑量之間的時機的那些時機指南相同的時機指南，例如第一和多個連續劑量的施用，各個連續劑量在施用第一劑量後、在其中抑制性免疫分子如PD-1和/或PD-L1在受試者的細胞中上調的時間段內給予。以經驗為主地確定何時提供連續劑量，例如通過評價來自外周血或其他體液的表達抗原的例如表達TCR的細胞中的PD-1和/或PD-L1的水準，在本領域技術人員的水準之內。

【0243】 在一些實施方案中，第一劑量和第一連續劑量、或第一和多個連續劑量之間的時機是使得各個連續劑量在以下時間段內給予的：大於約5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天、16天、17天、18天、19天、20天、21天、22天、23天、24天、25天、26天、27天、28或更多。在一些實施方案中，連續劑量在第一或緊接著先前的劑量的施用後小於約28天的時間段內給予。其他多個其他連續劑量(一個或多個)也稱為後續劑量(subsequent dose)或後續連續劑量(subsequent consecutive dose)。

【0244】 細胞的第一和/或一個或多個連續劑量的大小通常設計成提供改善的功效和/或降低的毒性風險。在一些方面，第一劑量或任何連續劑量的劑量

的量和大小是如上所述的任何劑量或量。在一些實施方案中，第一劑量或任何連續劑量中的細胞數在約 0.5×10^6 細胞/kg受試者體重和 5×10^6 細胞/kg之間，在約 0.75×10^6 細胞/kg和 3×10^6 細胞/kg之間或約 1×10^6 細胞/kg和 2×10^6 細胞/kg之間，包含兩端點。

【0245】 如本文所使用的，“第一劑量”是用於描述給定劑量的時機早於連續或後續劑量的施用。該術語不一定意味著受試者之前從未接受過一定劑量的細胞療法、或者甚至受試者之前未接受過一定劑量的相同細胞或表達相同重組受體或靶向相同抗原的細胞。

【0246】 在一些實施方案中，由連續劑量中的細胞表達的例如TCR等受體含有至少一種免疫反應性表位作為由第一劑量的細胞表達的例如TCR等受體。在一些實施方案中，由以連續劑量施用的細胞表達的例如TCR等受體與由第一劑量表達的例如TCR等受體為相同的、或與由以第一劑量施用的細胞表達的例如TCR等受體為實質上相同的。

【0247】 由以各種劑量向受試者施用的細胞表達的例如TCR等受體通常識別或特異性結合在待治療的疾病或病況或其細胞中表達、與其相關、和/或對其為特異性的分子。在與例如抗原等分子特異性結合後，受體通常遞送例如ITAM轉導的信號等的免疫刺激信號至細胞中，從而促進靶向疾病或病況的免疫應答。例如，在一些實施方案中，第一劑量中的細胞表達特異性結合所表達的抗原的TCR。

實施例

【0248】 以下實施例不旨在限制本發明的權利要求的範圍，但意在作為某些實施方案的示例。對於本領域技術人員存在的示例性方法中的任何變化旨在落入本發明的範圍內。

【0249】 通常與包括Epstein Barr病毒(EBV)和人乳頭瘤病毒(HPC)等病毒

感染相關的癌症是過繼性免疫療法的優異靶。在此，我們鑒定可以反應EBV的潛伏膜蛋白2 (LMP2)抗原而活化的新型T細胞受體(TCR)序列(TCR-L201；圖10和11)。與這些干擾素 γ (IFN γ)活化結果相一致，表達TCR-L201的T細胞可以特異性殺死經工程化來表達與HLA-A2連接的LMP2肽的癌症細胞(圖13A)。由於HLA-A2是最常見的人類血清型之一，L201 TCR用於針對EBV-相關的NPC以及包括霍奇金氏和伯基特氏的淋巴瘤的工程化TCR-T細胞療法。

構建體設計

【0250】 對於LMP2 TCR-T細胞，使用標準分子生物技術產生含有2個編碼區的MP71逆轉錄病毒載體構建體：(1)人抗LMP2 TCR的 α 鏈的可變區融合至小鼠TCR α 鏈的恒定區；(2)相同人抗LMP2 TCR的 β 鏈的可變區融合至小鼠TCR β 鏈的恒定區。(圖1A)

【0251】 對於TCR-ICI-TGF β TRAP TCR-T細胞，使用標準分子生物技術產生含有3個編碼區的MP71逆轉錄病毒載體構建體：(1)人特異性TCR的 α 鏈的可變區融合至小鼠TCR α 鏈的恒定區；(2)相同人TCR的 β 鏈的可變區融合至小鼠TCR β 鏈的恒定區；(3) 由GS接頭連接的免疫檢查點抑制劑(ICI)的重鏈和輕鏈的可變區，其通過可變重鏈的C末端處的柔性接頭肽融合至TCR β RII的胞外結構域的配體結合序列。抗gp120-TCR β RII抗體用作非特異性scFv-TCR β RII對照。(圖1B)

細胞系和培養基

【0252】 HEK-293T、Ca Ski、和K562購自ATCC。來自匿名供體的外周血單核細胞(PBMC)購自Hemacare。通過用過表達人HLA-A2單鏈的載體對K562細胞進行慢病毒轉導來製備K562-A2細胞。通過用過表達人E6和E7的載體對Ca Ski細胞進行逆轉錄病毒轉導來製備Ca Ski E6/E7細胞。通過用過表達LLW表位-接頭-HLA-A2或CLG表位-接頭-HLA-A2的載體進行逆轉錄病毒轉導來製備A375-pHLA (LLW)和A375-pHLA (CLG)細胞。在DMEM + 10% FBS、RPMI + 10%

FBS、或X-Vivo + 5%人血清A/B中培養細胞。

逆轉錄病毒載體產生

【0253】 使用標準磷酸鈣沉澱方案對HEK-293T細胞進行暫態轉染來製備逆轉錄病毒載體。第48小時收穫病毒上清液並用於轉導T細胞。T細胞轉導和擴增。在逆轉錄病毒轉導前，通過用T細胞活化珠(activator bead)和人IL-2培養來活化PBMC 2天。對於轉導，通過在32°C下以2,000g離心2小時，將新鮮收集的逆轉錄病毒上清液旋轉-上樣(spin-loaded)至包被有15mg RetroNectin 每/孔(Clontech Laboratories)的、非組織培養處理的24孔板中。將活化的PBMC上樣至板中並在32°C下以600g旋轉30分鐘。在37°C和5% CO₂下培養T細胞。每兩天補充一次培養基。

TCR染色

【0254】 所有的抗體購自Biolegend。通過對小鼠TCR β 鏈進行抗體染色接著進行流式細胞術，在轉染後72小時檢測重組TCR的表達。同時進行CD3、CD4、和CD8染色。使用可行的CD3+淋巴細胞門控策略。NT = 非轉導對照。

【0255】 用L201、L202和L203 TCR的構建體轉導原代人T細胞。結果：(圖9)抗LMP2 TCR在人T細胞中強烈表達。

【0256】 用E6、E6- α PD1-TGF β RII、E6- α PDL1-TGF β RII、E6-HAC-TGF β RII或E6- α gp120-TGF β RII TCR的構建體轉導原代人T細胞。結果：(圖14)抗E6 TCR在含有原始抗E6 TCR、E6- α PD1-TGF β RII、E6- α PDL1-TGF β RII、E6-HAC-TGF β RII和E6- α gp120-TGF β RII TCR構建體的T細胞中強烈表達。

【0257】 用 LMP2- α PD1-TGF β RII、LMP2- α PDL1-TGF β RII、LMP2-HAC-TGF β RII或LMP2- α gp120-TGF β RII TCR的構建體轉導原代人T細胞。結果：(圖20)抗LMP2 TCR在含有原始抗LMP2 TCR、LMP2- α PD1-TGF β RII、LMP2- α PDL1-TGF β RII、LMP2-HAC-TGF β RII和LMP2- α gp120-TGF β RII TCR構

建體的T細胞中強烈表達。

體外TCR-T IFN β 產生

【0258】 如所指示的，將TCR-T細胞與不同類型的靶細胞以各種效靶比共培養。通過流式細胞術或根據製造商的說明書使用人IFN- γ ELISA試劑盒來分別地測量細胞內或分泌的IFN- γ 表達。

【0259】 將具有抗LMP2 TCR的TCR-T細胞與EBV肽脈衝的APC以1:1效靶比共培養過夜。結果：(圖10和11A-11C)。含有抗LMP2 TCR的TCR-T細胞可由靶細胞特異性啟動，如通過細胞內IFN- γ 表達來測量的。全部三種抗LMP2 TCR顯示亞微摩爾EC50。

【0260】 將L201 TCR-T細胞與EBV肽脈衝的APC以1:0、1:1、和3:1效靶比共培養48小時。結果：(圖12)TCR-T細胞可由靶細胞活化。更高的E:T比使得TCR-T細胞產生更多IFN- γ 。

【0261】 抗原特異性刺激下，分泌的ICI-TGF β RII trap對TCR-T細胞的IFN γ 產生的效果。(a)將TCR-T細胞與肽脈衝的K562-A2細胞以1:1效靶比共培養過夜。然後收集細胞並通過流式細胞術測量細胞內IFN- γ 表達。(圖15A)(b)將TCR-T細胞與Ca Ski E6/E7細胞以1:0、1:2、1:1、和3:1效靶比共培養72小時(圖15B)。然後收集上清液並根據製造商的說明書使用人IFN- γ ELISA試劑盒來測量IFN- γ 產生。結果：(圖15B)含有E6 TCR的TCR-T細胞可由靶細胞活化，如通過IFN- γ 表達所測量的。由肽脈衝的APC或E6+靶細胞(Ca Ski E6/E7)所刺激的，E6- α PD1-TGF β RII、E6- α PDL1-TGF β RII、E6-HAC-TGF β RII或E6- α gp120-TGF β RII TCR-T細胞具有比單獨E6更高的IFN- γ 表達。與對照E6- α gp120-TGF β RII TCR-T細胞相比，E6- α PD1-TGF β RII、E6- α PDL1-TGF β RII、E6-HAC-TGF β RII TCR-T細胞在抗原特異性刺激下產生更高的IFN- γ 水準。

【0262】 將 LMP2- α PD1-TGF β RII 、 LMP2- α PDL1-TGF β RII 、

LMP2-HAC-TGF β RII 或LMP2- α gp120-TGF β RII TCR-T細胞與LMP2-LLW肽脈衝的APC以1:1效靶比共培養過夜。結果：(圖21) 含有LMP2 TCR的TCR-T細胞可由靶細胞活化，如通過IFN- γ 表達所測量的。由肽脈衝的APC所刺激的，單獨LMP2、LMP2- α PD1-TGF β RII 、 LMP2- α PDL1-TGF β RII 、 LMP2-HAC-TGF β RII 和LMP2- α gp120-TGF β RII TCR-T細胞具有高IFN- γ 表達。

特異性細胞裂解(細胞毒性)

【0263】 對於LMP2 TCR-T細胞殺傷分析，用CFSE預染色EBV肽脈衝的APC (K562-A2)，然後與未轉導的或TCR轉導的T細胞以1:1、和3:1效靶比共培養過夜。通過Annexin V/7-AAD染色來測量T細胞針對靶細胞的細胞毒性。對於A375細胞殺傷，用CFSE和Celltrace Violet分別地標記靶(A375-pHLA(LLW))和非靶(A375-pHLA(CLG))細胞，並且以1:1比例混合。然後將混合的細胞與L202 TCR-T細胞以各種效應子-對-靶細胞比共培養過夜。通過靶細胞對非靶細胞的比來測量T細胞針對靶細胞的細胞毒性。

【0264】 L201 TCR-T細胞或L202 TCR-T細胞針對靶細胞的細胞毒性。(a) 用CFSE預染色EBV肽APC，然後與L201 TCR-T細胞以1:1和3:1效靶比共培養過夜。通過Annexin V/7-AAD染色測量T細胞針對靶細胞的細胞毒性。結果：(圖13A) L201抗LMP2 TCR-T細胞以特異性方式殺死靶細胞。在更高E:T比的情況下，TCR-T細胞具有更高殺傷能力。

【0265】 (b)用CFSE和Celltrace Violet分別地標記靶(A375-pHLA(LLW))和非靶(A375-pHLA(CLG))細胞，並且以1:1比例混合。然後將混合的細胞與L202 TCR-T細胞以指定的效應子-對-靶細胞比共培養過夜。結果：(圖13B) L202抗LMP2 TCR-T細胞以特異性方式殺死靶細胞。在更高E:T比的情況下，TCR-T細胞具有更高殺傷能力。

【0266】 各種抗LMP2 TCR-T細胞對靶細胞的特異性殺傷。用CFSE預染色

LMP2-LLW肽脈衝的APC，然後與TCR-T細胞以多種效靶比共培養過夜。通過Annexin V/7-AAD染色測量T細胞針對LMP2-LLW肽衝擊的APC的細胞毒性。結果：(圖23)全部LMP2 TCR-T細胞以特異性方式殺死LMP2+靶細胞(Ca Ski)。對照LMP2. α gp120-TGF β RII TCR-T細胞比其他LMP2 TCR-T細胞更弱地殺死靶細胞。因此，LMP2- α PD1-TGF β RII、LMP2- α PDL1-TGF β RII、LMP2-HAC-TGF β RII TCR-T細胞具有比LMP2- α gp120-TGF β RII TCR-T細胞更高的殺傷能力。

【0267】 對於E6-ICI-TGF β TRAP T細胞殺傷分析，用CFSE預染色Ca Ski腫瘤細胞，然後與E6、E6. α PD1-TGF β RII、E6. α PDL1-TGF β RII、E6.HAC-TGF β RII或E6. α gp120-TGF β RII TCR-T細胞以1:1效靶比共培養過夜。通過Annexin V/7-AAD染色測量T細胞針對Ca Ski7的細胞毒性。

【0268】 結果：(圖16)全部E6 TCR-T細胞以特異性方式殺死E6+靶細胞(Ca Ski)。E6. α gp120-TGF β RII TCR-T殺死靶細胞的效率與單獨E6一樣，並且E6. α PDL1-TGF β RII、E6.HAC-TGF β RII TCR-T細胞具有比E6. α gp120-TGF β RII TCR-T細胞更高的殺傷能力。

【0269】 分泌的scFv-TGF β RII對TGF β 的結合活性。向包被有scFv-TGF β RII的板添加重組人TGF β 1，其通過生物素化抗TGF β 1和HRP-Avidin檢測到。

【0270】 結果：(圖17)由E6. α PD1-TGF β RII、E6. α PDL1-TGF β RII、E6.HAC-TGF β RII或E6. α gp120-TGF β RII TCR轉染的293T細胞產生的分泌的scFv-TGF β RII以相似的親和力結合至重組人TGF β 1。

【0271】 TGF β 表達。根據製造商的說明書使用人TGF β ELISA試劑盒來測量E6+靶細胞(Ca Ski)中分泌的TGF β 。

【0272】 結果：(圖18) E6+靶細胞(Ca Ski)可產生並分泌TGF β 至上清液中。

【0273】 體外TCR-T細胞增殖。用CFSE預染色E6、E6. α PD1-TGF β RII、E6. α PDL1-TGF β RII、E6.HAC-TGF β RII或E6. α gp120-TGF β RII TCR-T細胞。然後

將染色的T細胞與Ca Ski細胞共培養72小時，通過流式細胞術測量CFSE的強度。非轉導的(NT) T細胞用作對照。

【0274】 結果：(圖19)暴露於E6+靶細胞刺激全部E6 TCR-T細胞增殖，另一種活化措施。E6. α PDL1-TGF β RII TCR-T比其他試驗的TCR-T細胞更快的增殖。

L202 TCR-T細胞的體內抗腫瘤功效

【0275】 方法：對6-8周齡雌性NSG小鼠在右側(right flank)皮下接種 5.0×10^6 A375-pep-HLA-A2黑色素瘤細胞。9天后即研究第0天，基於腫瘤體積將動物分組，其中各組具有 35 mm^3 的平均腫瘤體積。在研究第0天，對動物靜脈注射 10×10^6 TCR+ L202細胞或未轉導的細胞。7天后即研究第6天重複這些注射。

【0276】 在指定天數測量腫瘤體積並且將其單獨地(圖24A)或作為各組的平均值(圖24B)繪圖。計算腫瘤倍數變化(圖24C)並以(第20天的腫瘤體積)/(第0天的腫瘤體積)繪圖。動物體重變化計算為基於第0天的初始動物體重的百分比(圖24D)。這些結果共同表明L202 TCR-T細胞的強力抗腫瘤功效，且無明顯毒性的證據。

假設方法(Prophetic Method)

【0277】 對6-8周齡雌性NSG小鼠在右側(right flank)皮下接種 5.0×10^6 A375-pep-HLA-A2黑色素瘤細胞。在9天后即研究第0天，基於腫瘤體積將動物分組，其中各組具有 35 mm^3 的平均腫瘤體積。在研究第0天，對動物靜脈注射 1×10^6 未轉導的細胞或由以下構建體轉導的TCR-T細胞：1) L202；2) L202-PD1；3) L202-TGF β RII；4) L202-PD1-TGF β RII。在7天后即研究第6天重複這些注射。每2天測量腫瘤體積和動物重量直至第20天，其為試驗終止的時間。

【0278】 與完全消除A375腫瘤的 10×10^6 L202細胞相比(圖24B)，我們預期用 10×10^6 L202細胞適當地抑制體內腫瘤生長。基於PD1驅動A375黑色素瘤的生長的已知能力(引用PMID：26359984)，與L202單獨相比，我們預期抗PD1的添

加在小鼠腫瘤負荷中產生更強的減少(組2vs.組1)。通過檢測具有或不具有抗PD1的TGFβ拮抗作用來確定進一步的累加或協同效果(組4和組3分別地對組1和組2)。總之，我們期望這些實驗來提供原理論證，將TCR-T細胞療法與免疫檢查點抑制和/或TGFβ阻斷聯合提供數量上更大的抗腫瘤功效，從而促進更小給藥方案的使用。

【0279】 本文所引用的所有參考文獻將其全部內容通過引入結合在此。除非另外定義，本文所使用的技術和科學術語具有如本發明所屬領域的普通技術人員所理解的相同含義。Allen 等人, *Remington: The Science and Practice of Pharmacy* 第22版, Pharmaceutical Press (September 15, 2012)；Hornyak 等人, *Introduction to Nanoscience and Nanotechnology*, CRC Press (2008)；Singleton和Sainsbury, *Dictionary of Microbiology and Molecular Biology* 第3版, 修訂版, J. Wiley & Sons (New York, NY 2006)；Smith, *March's Advanced Organic Chemistry Reactions, Mechanisms and Structure* 第7版, J. Wiley & Sons (New York, NY 2013)；Singleton, *Dictionary of DNA and Genome Technology* 第3版, Wiley-Blackwell (November 28, 2012)；和Green和Sambrook, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 第4版, Cold Spring Harbor Laboratory Press (Cold Spring Harbor, NY 2012)，為本領域技術人員提供本申請中所用的許多術語的通用指南。對於如何製備抗體的參考文獻，參見Greenfield, *Antibodies A Laboratory Manual* 第2版, Cold Spring Harbor Press (Cold Spring Harbor NY, 2013)；Köhler和Milstein, *Derivation of specific antibody-producing tissue culture and tumor lines by cell fusion*, Eur. J. Immunol. 1976 Jul, 6(7):511-9；Queen和Selick, *Humanized immunoglobulins*, U. S. Patent No. 5,585,089 (1996 Dec)；和Riechmann等人, *Reshaping human antibodies for therapy*, Nature 1988 Mar 24, 332(6162):323-7。

【0280】 本領域技術人員將認識到類似于或等同于本文所述的那些的許多

方法和材料，其將用於本發明的實踐。與附圖相結合，本發明的其他特徵和優點將從以下詳細描述中顯而易見，所述附圖通過例示的方式說明了本發明的實施方案的各種特徵。實際上，本發明決不被限制於所述的方法和材料。為了方便起見，此處收集說明書、實施例和所附權利要求中本文所採用的某些術語。本發明的組合物不限於本文所公開的示例性序列的變體，而包括與本文所公開的示例性序列具有至少90%、至少95%和至少99%同一性的那些。

【0281】 除非另外說明或在上下文中暗示，以下術語和短語包括以下提供的含義。除非另外明確說明或從上下文中顯而易見的，以下術語和短語不排除所述術語或短語在其所屬領域中所獲得的含義。提供定義來幫助描述特定實施方案，而不旨在限制權利要求的發明，因為發明的範圍僅由權利要求書限制。除非另外定義，本文使用的全部技術和科學術語具有與本發明所述領域普通技術人員所通常理解的含義。

【0282】 本文所有出版物以如同各個單獨的出版物或專利申請被具體地且單獨地通過引用併入那樣的相同程度通過引用結合在此。以下描述包括可有助於理解本發明的資訊。不承認本文提供的任何資訊是現有技術或與目前申請專利範圍保護的發明有關，或任何明確或隱含引用的出版物是現有技術。

序列表

<110> 大陸商廣東天科雅生物醫藥科技有限公司 (GUANGDONG TCRCURE BIOPHARMA TECHNOLOGY CO., LTD.)

<120> 靶向腫瘤抗原、TGF-β、和免疫檢查點的組合型TCR-T細胞療法

<140> TW 108144761

<141> 2019-12-6

<150> US 62/776,012

<151> 2018-12-06

<160> 46

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 來自人類的

<400> 1

Asp Gln Gln Val Lys Gln Asn Ser Pro Ser Leu Ser Val Gln Glu Gly
1 5 10 15

Arg Ile Ser Ile Leu Asn Cys Asp Tyr Thr Asn Ser Met Phe Asp Tyr
20 25 30

Phe Leu Trp Tyr Lys Lys Tyr Pro Ala Glu Gly Pro Thr Phe Leu Ile
35 40 45

Ser Ile Ser Ser Ile Lys Asp Lys Asn Glu Asp Gly Arg Phe Thr Val
50 55 60

Phe Leu Asn Lys Ser Ala Lys His Leu Ser Leu His Ile Val Pro Ser
65 70 75 80

Gln Pro Gly Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Pro Pro Pro Ser
85 90 95

Gly Asn Gln Phe Tyr Phe Gly Thr Gly Thr Ser Leu Thr Val Ile Pro
100 105 110

<210> 2
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 2

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met
20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe
35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr
50 55 60

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

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Thr Arg
85 90 95

Leu Ala Gly Ala Gln Arg Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
100 105 110

Leu Thr Val Leu
115

<210> 3
<211> 336
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 來自人類的DNA

<400> 3

gatcagcagg ttaaacaaaa tagcccgtea ctttcagttc aagaaggacg catctccata	60
ctcaactgcg attacacgaa ctctatgttt gattactttc tttggtacaa gaagtaccca	120
gcagagggtc cgactttcct tatctccata agcagtatca aagataagaa cgaagacggt	180
cggttcacag tgttccttaa caaaagcgca aagcacttgt ctctgcacat tgtgccgtcc	240
caacccggcg actcagcagt gtacttctgc gccgcacccc caccctccgg taatcaattt	300
tacttcggta cggggacgtc tctcactggt ataccc	336

<210> 4

<211> 348

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 來自人類的DNA

<400> 4

gacgtgaagg tcactcagtc ttcacggtat cttgttaagc gcactggcga aaaagttttt	60
ctggagtg tg tccaggacat ggatcacgaa aatatgtttt ggtatcgcca agaccctggg	120
ctgggtctca gactgattta ctttagctac gacgttaaaa tgaaggaaaa gggtgatatt	180
cctgaagggt atagtgtttc acgcgagaag aaagagcgg tctcactgat cettgagtca	240
gcctccacta accaaacatc catgtacctt tgcgcatcta gtacaaggct cgcgggcgct	300
caacgggata cccaatattt cggtcggggc acgcggttga ccgtcctg	348

<210> 5

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 來自人類的

<400> 5

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile
35 40 45

Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Ser Ile Pro Ser Gly Tyr
85 90 95

Asn Lys Leu Ile Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Ala Val His Pro
100 105 110

<210> 6
<211> 113
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 6

Gly Val Ala Gln Ser Pro Arg Tyr Lys Ile Ile Glu Lys Arg Gln Ser
1 5 10 15

Val Ala Phe Trp Cys Asn Pro Ile Ser Gly His Ala Thr Leu Tyr Trp
20 25 30

Tyr Gln Gln Ile Leu Gly Gln Gly Pro Lys Leu Leu Ile Gln Phe Gln
35 40 45

Asn Asn Gly Val Val Asp Asp Ser Gln Leu Pro Lys Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Ala Glu Arg Leu Lys Gly Val Asp Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ala
65 70 75 80

Lys Leu Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Gly Leu
85 90 95

Ala Gly Glu Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val
100 105 110

Leu

<210> 7
<211> 333
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的DNA

<400> 7
gaggacgtag aacaatctct tttctctct gtcgcgagg gagattcctc tgtaatcaat 60

tgtacttaca ccgatagcag ctcaacgtac ctctactggt ataagcagga gcccggcgca 120

ggcttgcaac ttctgactta tatatttagc aatatggata tgaacaaga ccaacgattg 180

acagtgcttc tgaacaagaa agacaagcac ctttctcttc gcattgcgga caccagaca 240

ggggactcag caatttatTT ttgcgctgaa agcattccct ctggatacaa taagttgata 300

tttggagcgg ggaccaggct ggcggtccat cca 333

<210> 8
<211> 339
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的DNA

<400> 8
ggtgtggcac aatcecccag gtacaagatc atcgagaaaa ggcagtcctg cgcgttttgg 60

tgtaatccaa tatctggaca tgccacactt tactggtatc aacagatact gggtcagggg 120

ccgaagctgc ttatacagtt tcaaaacaat ggcgtggtcg atgacagtca gcttcccaaa 180

gacagatttt ctgcagagag actgaagggg gtggatagta ccttgaaaat acaaccggcg 240

aaactcgaag acagtgctgt ctacctttgc gcttcctcac tcggattggc tggagaggac 300

acacaatact ttgggtccagg aaccagactc acggttctg 339

<210> 9
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 9

Gln Gln Lys Asn Asp Asp Gln Gln Val Lys Gln Asn Ser Pro Ser Leu
1 5 10 15

Ser Val Gln Glu Gly Arg Ile Ser Ile Leu Asn Cys Asp Tyr Thr Asn
20 25 30

Ser Met Phe Asp Tyr Phe Leu Trp Tyr Lys Lys Tyr Pro Ala Glu Gly
35 40 45

Pro Thr Phe Leu Ile Ser Ile Ser Ser Ile Lys Asp Lys Asn Glu Asp
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Val Phe Leu Asn Lys Ser Ala Lys His Leu Ser Leu
65 70 75 80

His Ile Val Pro Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Ala Lys Leu Pro Gln Ala Ala Gly Asn Lys Leu Thr Phe Gly Gly Gly

100105110

Thr Arg Val Leu Val Lys Pro
115

<210> 10
<211> 115
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 10

Met Val Ile Gln Asn Pro Arg Tyr Gln Val Thr Gln Phe Gly Lys Pro
1510515

Val Thr Leu Ser Cys Ser Gln Thr Leu Asn His Asn Val Met Tyr Trp
202530

Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Gln Ala Pro Lys Leu Leu Phe His Tyr Tyr
354045

Asp Lys Asp Phe Asn Asn Glu Ala Asp Thr Pro Asp Asn Phe Gln Ser
505560

Arg Arg Pro Asn Thr Ser Phe Cys Phe Leu Asp Ile Arg Ser Pro Gly
65707580

Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Leu Cys Ala Thr Ser Ser Ser Ile Ala
859095

Gly Asp Thr Arg Asn Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
100105110

Thr Val Leu
115

<210> 11

<211> 357
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的DNA

<400> 11
caacagaaga atgacgatca acaagtaaag caaaacagcc cctctctttc agtacaagaa 60

ggacgcatct ctatacttaa ctgcgactat acaaatagca tgtttgacta cttcctgtgg 120

tacaaaaaat atccagcaga gggtecccacc ttccttatca gcataagtag cattaaagac 180

aaaaatgaag acggtagggt cacagtcttc ctcaataaaa gcgctaaaca tctctcactc 240

catattgtac cgtcccaacc tggtgacagt gcggtatatt tttgcgcagc caaacttcct 300

caggcggctg ggaataaact gacgtttggc ggcgggacga gggtcctggg aaaaccc 357

<210> 12
<211> 345
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的DNA

<400> 12
atggttatcc aaaaccecaag ataccagggt acgcagttcg gcaagccagt aacactttca 60

tgttctcaaa ccttgaatca caatgtcatg tactggtatc aacaaaagtc aagccaggcc 120

ccaaaacttc tctttcacta ttacgataaa gacttcaaca atgaggccga tacccecgac 180

aactttcaga gtaggaggcc caacacaagt ttttgtttct tggacatccg ctcacccgga 240

cttggcgatg cggcgatgta tctctgtgcg acatcaagta gtatagcggg ggatacgcgg 300

aacaacgaac aattttttgg tectggaacc aggettacgg tattg 345

<210> 13
<211> 137
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13

202039545

Thr Ile Pro Pro His Val Gln Lys Ser Val Asn Asn Asp Met Ile Val
1 5 10 15

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

Asp Val Arg Phe Ser Thr Cys Asp Asn Gln Lys Ser Cys Met Ser Asn
35 40 45

Cys Ser Ile Thr Ser Ile Cys Glu Lys Pro Gln Glu Val Cys Val Ala
50 55 60

Val Trp Arg Lys Asn Asp Glu Asn Ile Thr Leu Glu Thr Val Cys His
65 70 75 80

Asp Pro Lys Leu Pro Tyr His Asp Phe Ile Leu Glu Asp Ala Ala Ser
85 90 95

Pro Lys Cys Ile Met Lys Glu Lys Lys Lys Pro Gly Glu Thr Phe Phe
100 105 110

Met Cys Ser Cys Ser Ser Asp Glu Cys Asn Asp Asn Ile Ile Phe Ser
115 120 125

Glu Glu Tyr Asn Thr Ser Asn Pro Asp
130 135

<210>	14
<211>	26
<212>	PRT
<213>	人工序列

<220>
<223> 信號

<400> 14

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Trp Leu Gln Glu Ala Ser Ala
20 25

<210> 15
<211> 26
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 信號

<400> 15

Met Ala Thr Gly Ser Arg Thr Ser Leu Leu Leu Ala Phe Gly Leu Leu
1 5 10 15

Cys Leu Pro Cys Leu Gln Glu Gly Ser Ala
20 25

<210> 16
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 表位

<400> 16

Leu Leu Trp Thr Leu Val Val Leu Leu
1 5

<210> 17
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 17

Asn Ser Met Phe Asp Tyr
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 18

Ile Ser Ser Ile Lys Asp Lys
1 5

<210> 19
<211> 12
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 19

Cys Ala Ala Pro Pro Pro Ser Gly Asn Gln Phe Tyr
1 5 10

<210> 20
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 20

Met Asp His Glu Asn
1 5

<210> 21
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 21

Ser Tyr Asp Val Lys Met
1 5

<210> 22

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 來自人類的

<400> 22

Ala Ser Ser Thr Arg Leu Ala Gly Ala Gln Arg Asp Thr Gln Tyr
1 5 10 15

<210> 23

<211> 6

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 來自人類的

<400> 23

Asp Ser Ser Ser Thr Tyr
1 5

<210> 24

<211> 7

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 來自人類的

<400> 24

Ile Phe Ser Asn Met Asp Met
1 5

<210> 25

<211> 12

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 25

Ala Glu Ser Ile Pro Ser Gly Tyr Asn Lys Leu Ile
1 5 10

<210> 26
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 26

Ser Gly His Ala Thr
1 5

<210> 27
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 27

Phe Gln Asn Asn Gly Val
1 5

<210> 28
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 28

Ala Ser Ser Leu Gly Leu Ala Gly Glu Asp Thr Gln Tyr
1 5 10

<210> 29
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 29

Asn Ser Met Phe Asp Tyr
1 5

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 30

Ile Ser Ser Ile Lys Asp Lys
1 5

<210> 31
<211> 13
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 31

Ala Ala Lys Leu Pro Gln Ala Ala Gly Asn Lys Leu Thr
1 5 10

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 32

Leu Asn His Asn Val
1 5

<210> 33
<211> 6
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 33

Tyr Tyr Asp Lys Asp Phe
1 5

<210> 34
<211> 16
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類的

<400> 34

Ala Thr Ser Ser Ser Ile Ala Gly Asp Thr Arg Asn Asn Glu Gln Phe
1 5 10 15

<210> 35
<211> 249
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類/小鼠的

<400> 35

Asp Gln Gln Val Lys Gln Asn Ser Pro Ser Leu Ser Val Gln Glu Gly
1 5 10 15

Arg Ile Ser Ile Leu Asn Cys Asp Tyr Thr Asn Ser Met Phe Asp Tyr
20 25 30

Phe Leu Trp Tyr Lys Lys Tyr Pro Ala Glu Gly Pro Thr Phe Leu Ile
35 40 45

Ser Ile Ser Ser Ile Lys Asp Lys Asn Glu Asp Gly Arg Phe Thr Val
50 55 60

Phe Leu Asn Lys Ser Ala Lys His Leu Ser Leu His Ile Val Pro Ser
65 70 75 80

Gln Pro Gly Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Ala Pro Pro Pro Ser
85 90 95

Gly Asn Gln Phe Tyr Phe Gly Thr Gly Thr Ser Leu Thr Val Ile Pro
100 105 110

Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg
115 120 125

Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile
130 135 140

Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr
145 150 155 160

Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala
165 170 175

Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr
180 185 190

Asn Ala Cys Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr
195 200 205

Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser
210 215 220

Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu
225 230 235 240

Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
245

<210> 36
<211> 289
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類/小鼠的

<400> 36

Asp Val Lys Val Thr Gln Ser Ser Arg Tyr Leu Val Lys Arg Thr Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Phe Leu Glu Cys Val Gln Asp Met Asp His Glu Asn Met
20 25 30

Phe Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Leu Gly Leu Arg Leu Ile Tyr Phe
35 40 45

Ser Tyr Asp Val Lys Met Lys Glu Lys Gly Asp Ile Pro Glu Gly Tyr
50 55 60

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

Ala Ser Thr Asn Gln Thr Ser Met Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Thr Arg
85 90 95

Leu Ala Gly Ala Gln Arg Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
100 105 110

Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser
115 120 125

Leu Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr
130 135 140

Leu Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser
145 150 155 160

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro
165 170 175

Gln Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
180 185 190

Arg Val Cys Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
195 200 205

Gln Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly
210 215 220

Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
225 230 235 240

Ala Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
245 250 255

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
260 265 270

Val Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn
275 280 285

Ser

<210> 37
<211> 248

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類/小鼠的

<400> 37

Glu Asp Val Glu Gln Ser Leu Phe Leu Ser Val Arg Glu Gly Asp Ser
1 5 10 15

Ser Val Ile Asn Cys Thr Tyr Thr Asp Ser Ser Ser Thr Tyr Leu Tyr
20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Glu Pro Gly Ala Gly Leu Gln Leu Leu Thr Tyr Ile
35 40 45

Phe Ser Asn Met Asp Met Lys Gln Asp Gln Arg Leu Thr Val Leu Leu
50 55 60

Asn Lys Lys Asp Lys His Leu Ser Leu Arg Ile Ala Asp Thr Gln Thr
65 70 75 80

Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Phe Cys Ala Glu Ser Ile Pro Ser Gly Tyr
85 90 95

Asn Lys Leu Ile Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Ala Val His Pro Asp
100 105 110

Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser
115 120 125

Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn
130 135 140

Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val
145 150 155 160

Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp
165 170 175

Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn
180 185 190

Ala Cys Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu
195 200 205

Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val
210 215 220

Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu
225 230 235 240

Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
245

<210> 38
<211> 286
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類/小鼠的

<400> 38

Gly Val Ala Gln Ser Pro Arg Tyr Lys Ile Ile Glu Lys Arg Gln Ser
1 5 10 15

Val Ala Phe Trp Cys Asn Pro Ile Ser Gly His Ala Thr Leu Tyr Trp
20 25 30

Tyr Gln Gln Ile Leu Gly Gln Gly Pro Lys Leu Leu Ile Gln Phe Gln
35 40 45

Asn Asn Gly Val Val Asp Asp Ser Gln Leu Pro Lys Asp Arg Phe Ser
50 55 60

Ala Glu Arg Leu Lys Gly Val Asp Ser Thr Leu Lys Ile Gln Pro Ala
65 70 75 80

Lys Leu Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Gly Leu
85 90 95

Ala Gly Glu Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val
100 105 110

Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu
115 120 125

Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys
130 135 140

Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val
145 150 155 160

Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Ala Tyr
165 170 175

Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Cys
180 185 190

Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln
195 200 205

Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys
210 215 220

Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys
225 230 235 240

Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile
245 250 255

Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val
260 265 270

Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
275 280 285

<210> 39
<211> 256
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類/小鼠的

<400> 39

Gln Gln Lys Asn Asp Asp Gln Gln Val Lys Gln Asn Ser Pro Ser Leu
1 5 10 15

Ser Val Gln Glu Gly Arg Ile Ser Ile Leu Asn Cys Asp Tyr Thr Asn
20 25 30

Ser Met Phe Asp Tyr Phe Leu Trp Tyr Lys Lys Tyr Pro Ala Glu Gly
35 40 45

Pro Thr Phe Leu Ile Ser Ile Ser Ser Ile Lys Asp Lys Asn Glu Asp
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Val Phe Leu Asn Lys Ser Ala Lys His Leu Ser Leu
65 70 75 80

His Ile Val Pro Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
85 90 95

Ala Lys Leu Pro Gln Ala Ala Gly Asn Lys Leu Thr Phe Gly Gly Gly
100 105 110

Thr Arg Val Leu Val Lys Pro Asp Ile Gln Asn Pro Glu Pro Ala Val
115 120 125

Tyr Gln Leu Lys Asp Pro Arg Ser Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe
130 135 140

Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly
145 150 155 160

Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser
165 170 175

Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys
180 185 190

Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn Ala Cys Tyr Pro Ser Ser Asp Val
195 200 205

Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn
210 215 220

Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu
225 230 235 240

Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
245 250 255

<210> 40
<211> 288
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類/小鼠的

<400> 40

Met Val Ile Gln Asn Pro Arg Tyr Gln Val Thr Gln Phe Gly Lys Pro
1 5 10 15

Val Thr Leu Ser Cys Ser Gln Thr Leu Asn His Asn Val Met Tyr Trp
20 25 30

Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Gln Ala Pro Lys Leu Leu Phe His Tyr Tyr
35 40 45

Asp Lys Asp Phe Asn Asn Glu Ala Asp Thr Pro Asp Asn Phe Gln Ser
50 55 60

Arg Arg Pro Asn Thr Ser Phe Cys Phe Leu Asp Ile Arg Ser Pro Gly
65 70 75 80

Leu Gly Asp Ala Ala Met Tyr Leu Cys Ala Thr Ser Ser Ser Ile Ala
85 90 95

Gly Asp Thr Arg Asn Asn Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu
100 105 110

Thr Val Leu Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu
115 120 125

Phe Glu Pro Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu
130 135 140

Val Cys Leu Ala Arg Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp
145 150 155 160

Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln
165 170 175

Ala Tyr Lys Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg
180 185 190

Val Cys Ala Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln
195 200 205

Val Gln Phe His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser
210 215 220

Pro Lys Pro Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala
225 230 235 240

Asp Cys Gly Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala
245 250 255

Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val
260 265 270

Leu Val Ser Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asn Ser
275 280 285

<210> 41
<211> 747
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類/小鼠的DNA

<400> 41
gatcagcagg ttaaacaaaa tagcccgtea ctttcagttc aagaaggacg catctccata 60

ctcaactgcg attacacgaa ctctatgttt gattactttc tttggtacaa gaagtaccca 120

gcagagggtc cgactttcct tatctccata agcagtatca aagataagaa cgaagacggt 180

cggttcacag tgttccttaa caaaagcgca aagcacttgt ctctgcacat tgtgccgtcc 240

caacccggcg actcagcagt gtactttctgc gccgcacccc caccctccgg taatcaattt 300

tacttcggta cggggacgtc tctcactgtt atacccgaca tccagaatcc agagccagcc 360

gtgtaccagc tgaaggacce taggagccag gactctacce tctgcctgtt caccgacttc 420

gacagccaga tcaacgtgcc caagacaatg gagagcggca ctttcatcac cgacaagacc 480

gtgctggaca tgaaggctat ggacagcaag agcaacggag ccatcgcttg gagcaaccag 540

accagettca cttgccagga catcttcaag gagaccaacg cttgctacce ctctagegac 600

gtgccttgcg acgccacact gacagagaag agcttcgaga ccgacatgaa cctgaacttc 660

cagaacctga gcgtgatggg cctgagaatc ctgctgctga aggtggccgg attcaacctg 720

ctgatgacce tgaggctgtg gtcttcc 747

<210> 42
<211> 867
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>

<223> 來自人類/小鼠的DNA

<400> 42

gacgtgaagg tcactcagtc ttcacggtat cttgtttaage gcactggcga aaaagttttt	60
ctggagtgtg tccaggacat ggatcacgaa aatatgtttt ggtatcgcca agaccctggg	120
ctgggtctca gactgattta ctttagctac gacgttaaaa tgaaggaaaa gggtgatatt	180
cctgaagggt atagtgtttc acgcgagaag aaagagcggg tctcactgat ccttgagtca	240
gcctccacta accaaacatc catgtacctt tgcgcacctg gtacaaggct cgcgggcgct	300
caacgggata cccaatatTT cggtcggggc acgcggttga ccgtcctgga ggacctacgt	360
aacgtgaccc ctcccaagggt gtccctgttc gagcctagca aggccgagat cgccaacaag	420
cagaaggcca cactcgtctg cctggctaga ggcttcttcc cagaccacgt ggagctgtct	480
tgggtgggtga acggcaagga ggtgcactca ggagtgtcta ccgacctca ggcctacaag	540
gagagcaact acagctactg cctgtcctcc agactcaggg tctgcgccac cttttggcac	600
aaccctcgga accacttccg ctgtcaggtc cagtccacg gcctgtccga ggaagacaag	660
tggccagagg gctctcctaa gccagtgaca cagaacatca gcgccgaggc ttggggaaga	720
gccgattgcg gaatcaccag cgctctttac cagcagggag tgctgtcagc taccatcctg	780
tacgagatcc tgctgggcaa ggccacactg tacgcagtgc tgggtgtccac tctggtcgtg	840
atggctatgg tgaagcggaa gaacagc	867

<210> 43

<211> 744

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 來自人類/小鼠的DNA

<400> 43

gaggacgtag aacaatctct ttttctctct gtccgcgagg gagattcctc tgtaatcaat	60
tgtacttaca ccgatagcag ctcaacgtac ctctactggg ataagcagga gcccggcgca	120
ggcttgcaac ttctgactta tataatttagc aatatggata tgaacaaga ccaacgattg	180

acagtgttctgaacaagaaagacaagcacctttctcttcgcattgcgga	cacccagaca	240
ggggactcagcaatttatcttgcgtgaaagcattccctctggatacaa	taagttgata	300
tttggagcggggaccaggctggcggtccatccagacatccagaatccaga	gccagccgtg	360
taccagctgaaggaccctaggagccaggactctaccctctgcctgttcac	cgacttcgac	420
agccagatcaacgtgcccagacaatggagagcggcaccttcatcaccga	caagaccgtg	480
ctggacatgaaggtatggacagcaagagcaacggagcca	tcgcttggagcaaccagacc	540
agcttcacttgccaggacatcttcaaggagaccaacgcctgctaccctc	tagcgacgtg	600
ccttgcgacgccacactgacagagaagagcttcgagaccg	acatgaacctgaacttcag	660
aacctgagcgtgatgggcctgagaatcctgctgctgaagg	tggccggattcaacctgctg	720
atgaccctgaggctgtggctcttc		744

- <210> 44
- <211> 858
- <212> DNA
- <213> 人工序列

- <220>
- <223> 來自人類/小鼠的DNA

<400> 44	
ggtgtggcac aatccccag gtacaagatc atcgagaaaa ggcagtcctg cgcgttttgg	60
tgtaatccaa tatctggaca tgccacactt tactggatc aacagatact gggtcagggg	120
ccgaagctgc ttatacagtt tcaaaacaat ggcgtggtcg atgacagtca gcttcccaaa	180
gacagatttt ctgcagagag actgaagggg gtggatagta ccttgaaaat acaaccggcg	240
aaactcgaag acagtgtgt ctacctttgc gcttcctcac tcggattggc tggagaggac	300
acacaatact ttgggtccagg aaccagactc acggttctgg aggacctacg taacgtgacc	360
cctcccaagg tgtccctgtt cgagcctagc aaggccgaga tcgccaacaa gcagaaggcc	420
acactcgtct gcctggctag aggccttctc ccagaccacg tggagctgtc ttgggtgggtg	480
aacggcaagg aggtgcactc aggagtgtct accgaccctc aggcctacaa ggagagcaac	540
tacagctact gcctgtcctc cagactcagg gtctgcgcca ctttttggca caaccctcgg	600

aaccacttcc gctgtcaggt ccagttccac ggcctgtccg aggaagacaa gtggccagag	660
ggctctccta agccagtgac acagaacatc agcgccgagg cttggggaag agccgattgc	720
ggaatcacca gcgcctctta ccagcaggga gtgctgtcag ctaccatect gtacgagatc	780
ctgctgggca aggccacact gtacgcagtg ctggtgtcca ctctggtcgt gatggctatg	840
gtgaagcgga agaacagc	858

<210> 45
<211> 768
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類/小鼠的DNA

<400> 45	
caacagaaga atgacgatca acaagtaaag caaaacagcc cctctctttc agtacaagaa	60
ggacgcatct ctatacttaa ctgcgactat acaaatagca tgtttgacta cttcctgtgg	120
tacaaaaaat atccagcaga gggteccacc ttccttatca gcataagtag cattaaagac	180
aaaaatgaag acggtaggtt cacagtcttc ctcaataaaa gcgctaaaca tctctcactc	240
catattgtac cgtcccaacc tggtgacagt gcggtatatt tttgcgcagc caaacttcct	300
caggcggctg ggaataaact gacgtttggc ggcgggacga gggtcctggg aaaacccgac	360
atccagaatc cagagccagc cgtgtaccag ctgaaggacc ctaggagcca ggactctacc	420
ctctgcctgt tcaccgactt cgacagccag atcaacgtgc ccaagacaat ggagagcggc	480
accttcatca ccgacaagac cgtgctggac atgaaggcta tggacagcaa gagcaacgga	540
gccatcgctt ggagcaacca gaccagcttc acttgccagg acatcttcaa ggagaccaac	600
gcttgctacc cctctagcga cgtgccttgc gacgccacac tgacagagaa gagcttcgag	660
accgacatga acctgaactt ccagaacctg agcgtgatgg gcctgagaat cctgctgctg	720
aaggtggccg gattcaacct gctgatgacc ctgaggctgt ggtcttcc	768

<210> 46
<211> 864

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<223> 來自人類/小鼠的DNA

<400> 46	
atggttatcc aaaacccaag ataccagggtt acgcagttcg gcaagccagt aacactttca	60
tgttctcaaa ccttgaatca caatgtcatg tactgggtatc aacaaaagtc aagccaggcc	120
ccaaaacttc tctttcacta ttacgataaa gacttcaaca atgaggccga tacccecgac	180
aactttcaga gtaggaggcc caacacaagt ttttgtttct tggacatccg ctcacccgga	240
cttggcgatg cggcgatgta tctctgtgcg acatcaagta gtatagcggg ggatacgcgg	300
aacaacgaac aattttttgg tcctggaacc aggcttacgg tattggagga cctacgtaac	360
gtgacccttc ccaaggtgtc cctgttcgag cctagcaagg ccgagatcgc caacaagcag	420
aaggccacac tcgtctgcct ggctagaggc ttcttccag accacgtgga gctgtcttgg	480
tgggtgaacg gcaaggaggt gcactcagga gtgtctaccg accctcaggc ctacaaggag	540
agcaactaca gctactgcct gtctccaga ctcagggtct gcgccacctt ttggcacaac	600
cctcggaacc acttccgctg tcaggtcag ttccacggcc tgtccgagga agacaagtgg	660
ccagagggct ctcctaagcc agtgacacag aacatcagcg ccgaggcttg gggaagagcc	720
gattgcggaa tcaccagcgc ctcttaccag cagggagtgc tgtcagctac catcctgtac	780
gagatcctgc tgggcaaggc cacactgtac gcagtgctgg tgtccactct ggtcgtgatg	840
gctatggtga agcggaagaa cagc	864

【發明申請專利範圍】

【請求項1】 一種工程化T細胞，其包括：

編碼抗LMP2 TCR的核酸，其中抗LMP2 TCR包括與腫瘤中LMP2特異性結合的基因工程化T細胞受體。

【請求項2】 如請求項1所述的工程化T細胞，其中所述抗LMP2 TCR包括分別地氨基酸SEQ ID NO:1的 α 鏈CDR1 (位置27-32)、CDR2 (位置50-56)、CDR3 (位置90-101)和氨基酸SEQ ID NO:2的 β 鏈CDR1 (位置27-31)、CDR2 (位置49-54)、CDR3 (位置92-106)。

【請求項3】 如請求項1所述的工程化T細胞，其中所述抗LMP2 TCR包括含有SEQ ID NO:1的 α 鏈可變結構域和含有SEQ ID NO:2的 β 鏈可變結構域。

【請求項4】 如請求項1所述的工程化T細胞，其中所述核酸包括SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4。

【請求項5】 如請求項1所述的工程化T細胞，其中所述抗LMP2 TCR包括氨基酸SEQ ID NO:5的 α 鏈各自的CDR1 (位置25-30)、CDR2 (位置48-54)、CDR3 (位置89-100)和氨基酸SEQ ID NO:6的 β 鏈各自的CDR1 (位置25-29)、CDR2 (位置47-52)、CDR3 (位置91-103)。

【請求項6】 如請求項1所述的工程化T細胞，其中所述抗LMP2 TCR包括含有SEQ ID NO:5的 α 鏈可變結構域和含有SEQ ID NO:6的 β 鏈可變結構域。

【請求項7】 如請求項1所述的工程化T細胞，其中所述核酸包括SEQ ID NO:7和SEQ ID NO:8。

【請求項8】 如請求項1所述的工程化T細胞，其中所述抗LMP2 TCR包括分別地氨基酸SEQ ID NO:9的 α 鏈CDR1 (位置32-37)、CDR2 (位置55-61)、CDR3 (位置96-108)和氨基酸SEQ ID NO:10的 β 鏈CDR1 (位置25-29)、CDR2 (位置47-52)、CDR3 (位置90-105)。

【請求項9】 如**請求項1**所述的工程化T細胞，其中所述抗LMP2 TCR包括含有SEQ ID NO:9的 α 鏈可變結構域和含有SEQ ID NO:10的 β 鏈可變結構域。

【請求項10】 如**請求項1**所述的工程化T細胞，其中所述核酸包括SEQ ID NO:11和SEQ ID NO:12。

【請求項11】 如**請求項1**所述的工程化T細胞，其中所述抗LMP2 TCR為組成型表達。

【請求項12】 如**請求項1**所述的工程化T細胞，其進一步包括降低腫瘤中抑制性受體的功能或表達的抑制性蛋白。

【請求項13】 如**請求項12**所述的工程化T細胞，其中所述抑制性蛋白為免疫檢查點抑制劑。

【請求項14】 一種藥物組合物，其包括如請求項1-13中任一項所述的工程化T細胞和藥學上可接受的運載體。

【請求項15】 一種治療癌症的方法，其包括向有需要的受試者施用治療有效量的如**請求項14**所述的細胞。

【請求項16】 如**請求項15**所述的方法，其中所述癌症為鼻咽癌、霍奇金氏淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、或胃癌。

【請求項17】 如**請求項16**所述的方法，其進一步包括向所述受試者施用治療有效量的包括化學療法或放射療法的現有療法。

【請求項18】 如**請求項17**所述的方法，其中所述細胞和所述現有療法順序或同時施用。

【請求項19】 一種工程化T細胞，其包括：
核酸，其編碼(a)與腫瘤中抗原特異性結合的基因工程化T細胞受體；
(b)降低腫瘤中免疫檢查點的功能或表達的抑制性蛋白；和
(c)與轉化生長因子 β 家族(TGF- β)的成員結合的蛋白。

【請求項20】如**請求項19**所述的工程化T細胞，其中所述免疫檢查點包括PD1、PD-L1和CTLA-4中的一種或多種。

【請求項21】如**請求項19**所述的工程化T細胞，其中所述腫瘤中的抗原包括人乳頭瘤病毒(HPV)或Epstein-Barr病毒(EBV)抗原。

【請求項22】如**請求項21**所述的工程化T細胞，其中所述基因工程化T細胞受體是抗LMP2 TCR。

【請求項23】如**請求項21**所述的工程化T細胞，其中所述基因工程化T細胞受體為抗E6 TCR。

【請求項24】如**請求項19-23**中任一項所述的工程化T細胞，其中所述結合蛋白包括TGFβRII的胞外結構域。

【請求項25】如**請求項22**所述的工程化T細胞，其中所述抗LMP2 TCR包括SEQ ID NO:1的α鏈可變結構域和SEQ ID NO:2的β鏈可變結構域。

【請求項26】如**請求項22**所述的工程化T細胞，其中編碼所述基因工程化抗原受體的核酸包括SEQ ID NO:3和SEQ ID NO:4。

【請求項27】如**請求項19-26**中任一項所述的工程化T細胞，其中所述基因工程化TCR為組成型表達。

【請求項28】如**請求項27**所述的工程化T細胞，其中靶向TGF-β的所述結合蛋白為組成型表達。

【請求項29】一種載體，其包括如**請求項19**所述的核酸。

【請求項30】如**請求項29**所述的載體，其中所述載體為逆轉錄病毒載體。

【請求項31】一種藥物組合物，其包括如**請求項19-28**中任一項所述的工程化T細胞和藥學上可接受的運載體。

【請求項32】一種治療癌症的方法，其包括向有需要的受試者施用治療有效量的如**請求項31**所述的細胞。

【請求項33】如**請求項32**所述的方法，其中所述癌症為鼻咽癌、霍奇金氏淋巴瘤、伯基特氏淋巴瘤、或胃癌。

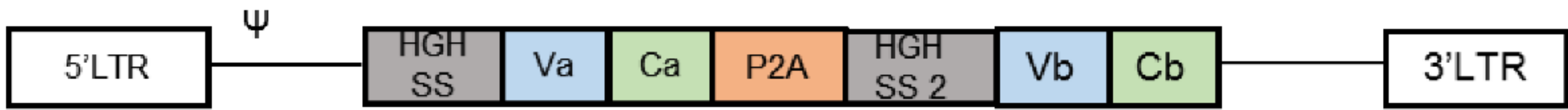
【請求項34】如**請求項32**所述的方法，其中所述癌症為子宮頸、肛門、口腔、或生殖器官癌。

【請求項35】如**請求項33-34**中任一項所述的方法，其進一步包括向所述受試者施用治療有效量的包括化學療法或放射療法的現有療法。

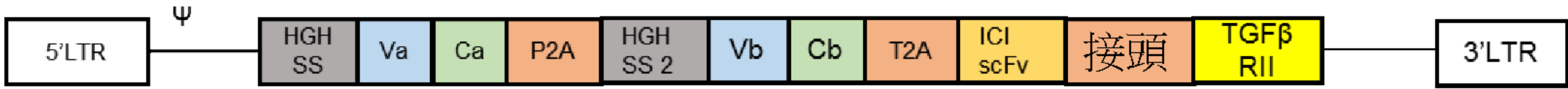
【請求項36】如**請求項35**所述的方法，其中所述細胞和所述現有療法順序或同時施用。

【請求項37】如**請求項19-28**中任一項所述的工程化T細胞，其中所述腫瘤為病毒相關的腫瘤。

【發明圖式】



【圖1A】



【圖1B】

DQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGR
FTVFLNKSAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAAPPPSGNQFYFGTGTSLTVIP

(SEQ ID No: 1)

【圖2A】

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKG
DIPEGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSTRLAGAQRDTQYFGPGTRLTVL

(SEQ ID No: 2)

【圖2B】

gatcagcagggttaaacaataagcccgtcactttcagttcaagaaggacgcatctccatactcaactgcgattacacgaactctatgtttgattactttct
ttggtacaagaagtacccagcagaggggtccgactttccttatctccataagcagtatcaaagataagaacgaagacggtcggttcacagtgttccttaa
caaaagcgcgaagcacttgtctctgcacattgtgccgtcccaacccggcgactcagcagtgacttctgcgccgcacccccaccctccggtaatcaattt
tacttcggtacggggacgtctctcactgttatacc

(SEQ ID No: 3)

【圖3A】

gacgtgaaggtcactcagtccttcacggatatcttgtaagcgactggcgaaaaagttttctggagtggtccaggacatggatcacgaaaatatgtttg
gtatcgccaagaccctgggctgggtctcagactgattacttttagctacgacgttaaaatgaaggaaaagggtgatattcctgaagggtatagtgtttca
cgcgagaagaagagcggttctcactgatccttgagtcagcctccactaaccaacatccatgtacctttgcgcacatctagtacaaggctcgcgggcgct
caacgggataccaatatttcggtccgggcacgcggttgaccgtcctg

(SEQ ID No: 4)

【圖3B】

EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRL
TVLLNKKDKHLSLRIADTQTGDSAIYFCAESIPSGYNKLIFGAGTRLAVHP

(SEQ ID No: 5)

【圖4A】

GVAQSPRYKII EKQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFNNGVVDDSQLP
KDRFSAERLKGVDSTLKIQPAKLEDSAVYLCASSLGLAGEDTQYFGPGTRLTVL

(SEQ ID No: 6)

【圖4B】

gaggacgtagaacaatctcttttctctctgtccgcgagggagattcctctgtaatcaattgtacttacaccgatagcagctcaacgtacctctactggtat
aagcaggagcccggcgcaggcttgcaacttctgacttatatatttagcaatatggatatgaaacaagaccaacgattgacagtgcttctgaacaagaa
agacaagcacctttctcttcgcatcgcggacacccagacaggggactcagcaatttattttgcgctgaaagcattccctctggatacaataagttgatat
ttggagcggggaccaggctggcgggtccatcca

(SEQ ID No: 7)

【圖5A】

ggtgtggcacaatccccagggtacaagatcatcgagaaaaggcagtcgcgtcttgggtgtaatccaatatctggacatgccacactttactggtatc
aacagatactgggtcaggggccgaagctgcttatacagtttcaaaacaatggcgtggctgatgacagtcagcttcccaaagacagattttctgcagag
agactgaaggggggtggatagtagcttgaaaataacaaccggcgaaactcgaagacagtgctgtctacctttgcgcttcctcactcggattggctggaga
ggacacacaatactttggtccaggaaccagactcacggttctg

(SEQ ID No: 8)

【圖5B】

QQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDK
NEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAAKLPQAAGNKLTFGGGTRVLVKP

(SEQ ID No: 9)

【圖6A】

MVIQNPRYQVTQFGKPVTLSQSQTLNHNVMYWYQQKSSQAPKLLFHYYDKDFNNEAD
TPDNFQSRRPNTSFCFLDIRSPGLGDAAMYLCATSSSIAGDTRNNEQFFGPGTRTLTVL

(SEQ ID No: 10)

【圖6B】

caacagaagaatgacgatcaacaagtaaagcaaaacagcccctctctttcagtacaagaaggacgcatctctatacttaactgcgactatacaaata
gcatgtttgactacttcctgtggtacaaaaatatccagcagaggggtcccaccttccttatcagcataagtagcattaaagacaaaaatgaagacggta
ggttcacagtcttcctcaataaaagcgctaaacatctctcactccatattgtaccgtcccaacctggtgacagtgcggtatattttgcgcagccaaactt
cctcaggcggctgggaataaaactgacgttggcgggcgggacgagggctctggtaaaacct

(SEQ ID No: 11)

【圖7A】

atggttatccaaaaccaagataccaggttacgcagttcggcaagccagtaaacactttcatgttctcaaaccttgaatcacaatgtcatgtactggtatc
aacaaaagtcaagccaggccccaaaacttctctttcactattacgataaagacttcaacaatgaggccgataccccgacaacttcagagtaggagg
cccaacacaagttttgttcttgacatccgctcaccggacttggcgatgcggcgatgtatctctgtgcgacatcaagtagtatagcgggggatacgc
ggaacaacgaacaatttttggctcctggaaccaggcttacggtattg

(SEQ ID No: 12)

【圖7B】

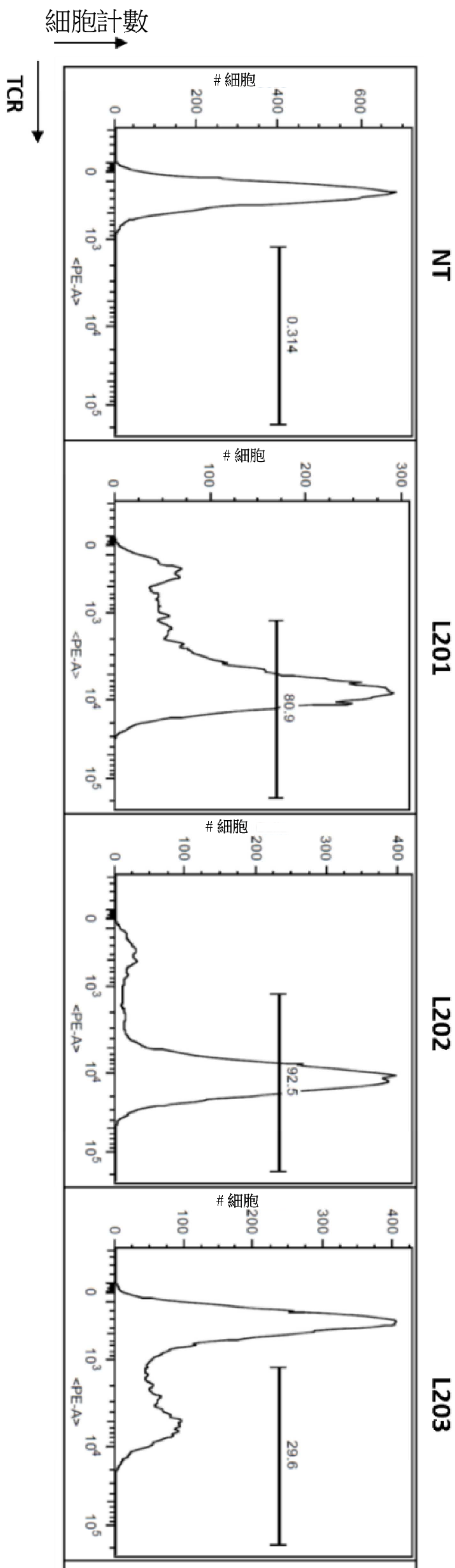
MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEASA

(SEQ ID No: 14)

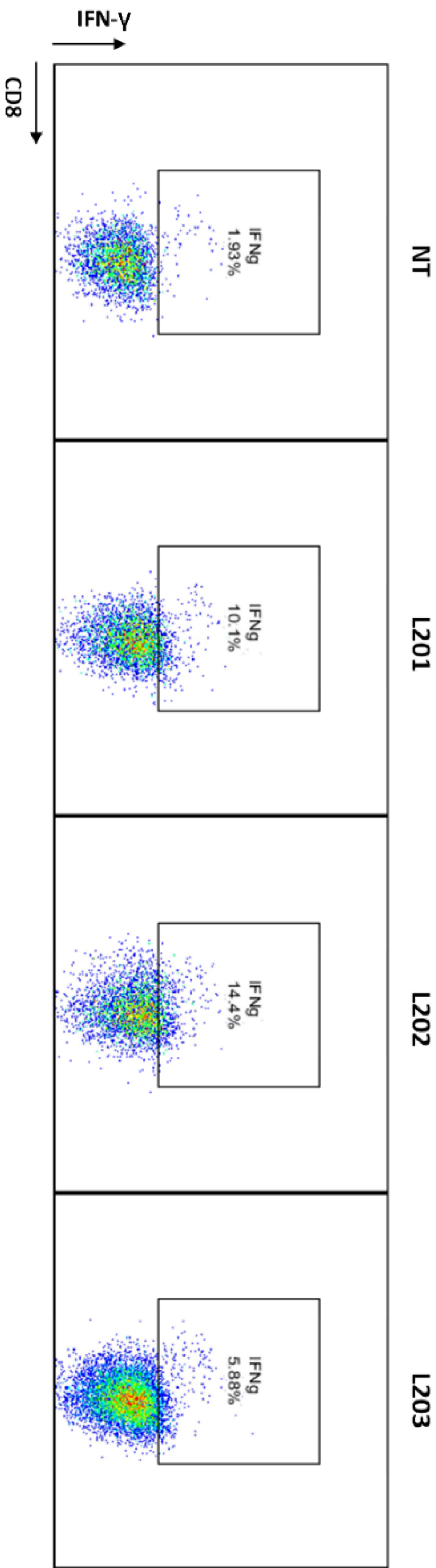
MATGSRTSLLLAFGLLCLPCLQEGSA|

(SEQ ID No: 15)

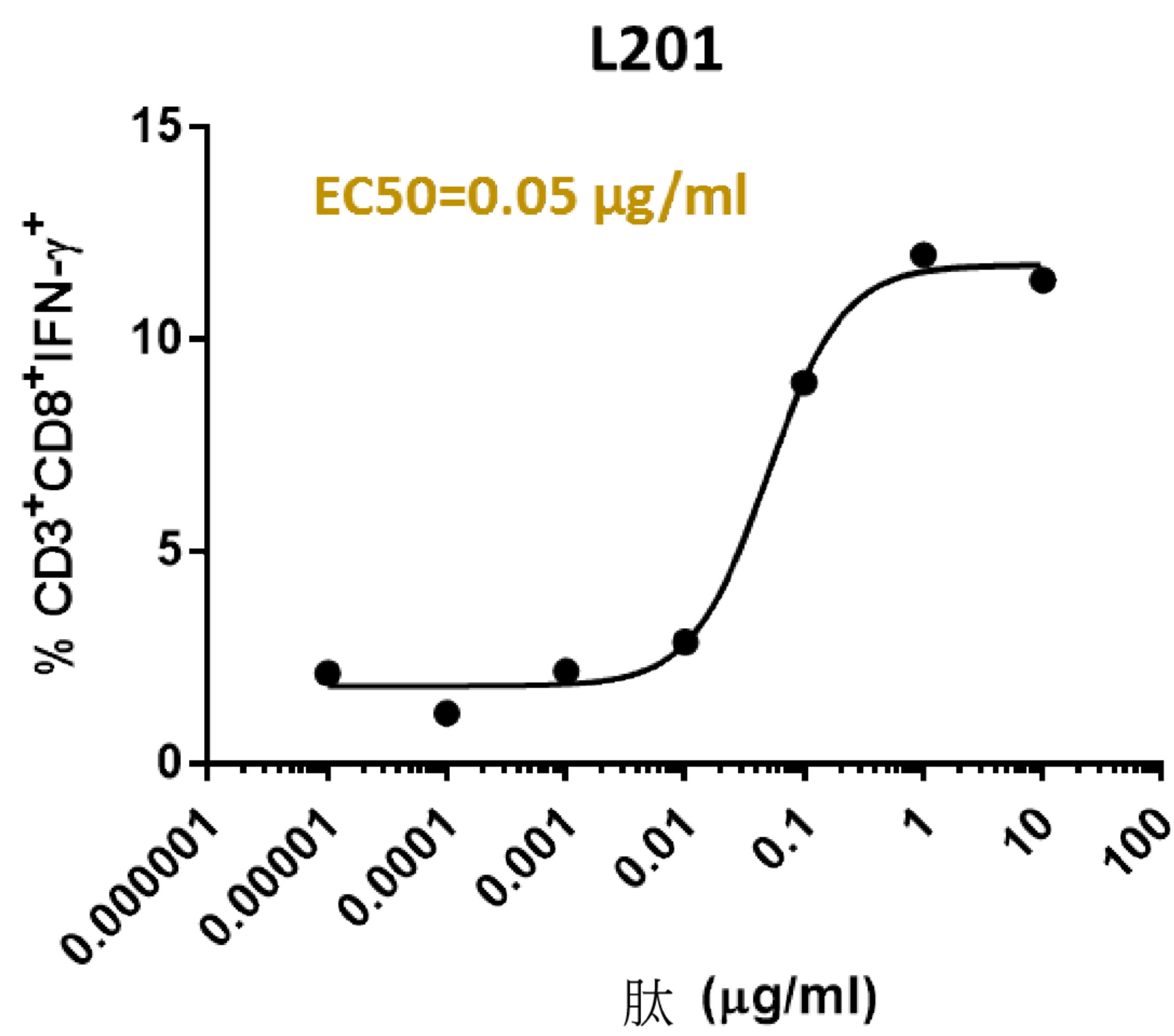
【圖8】



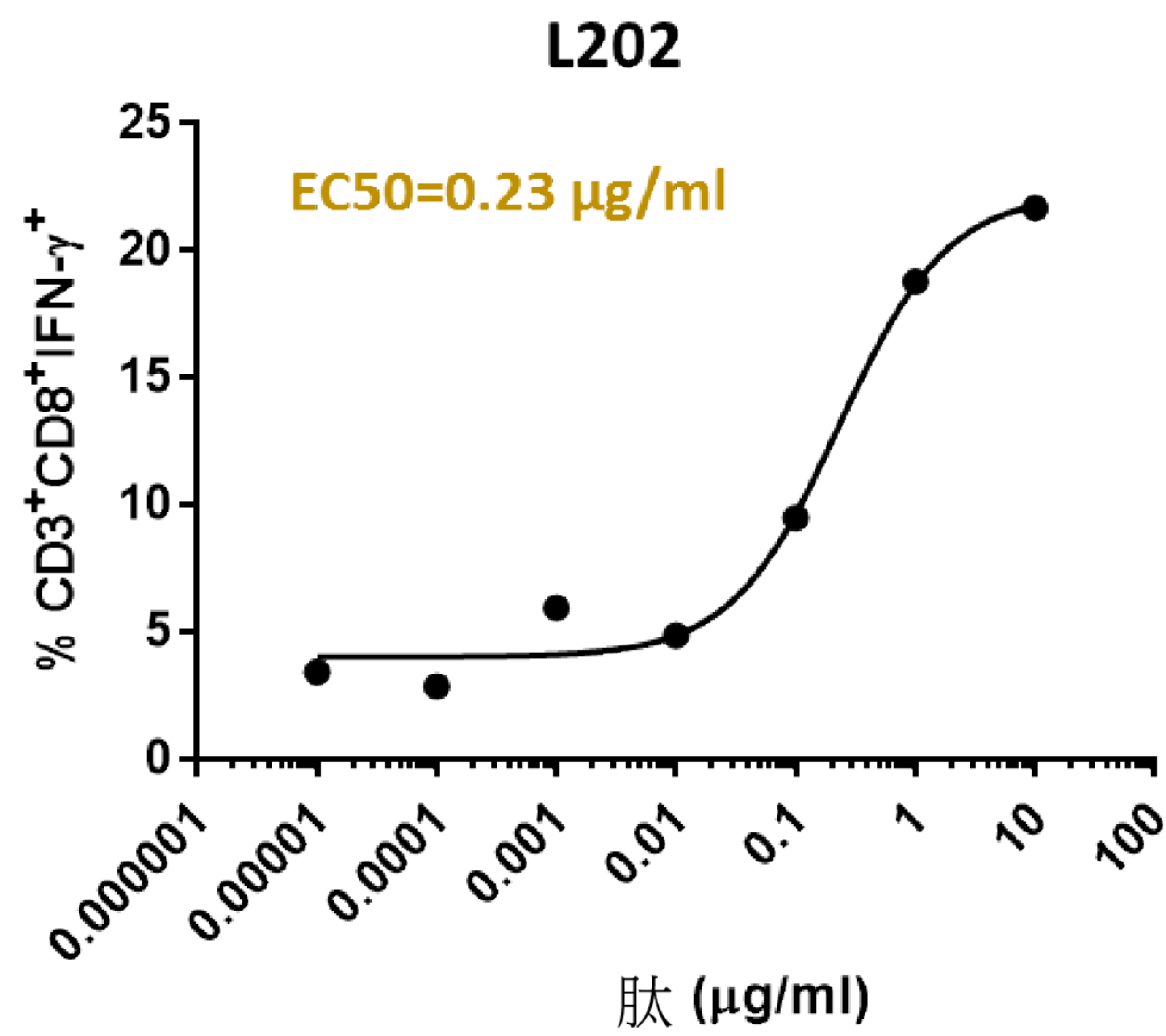
【圖9】



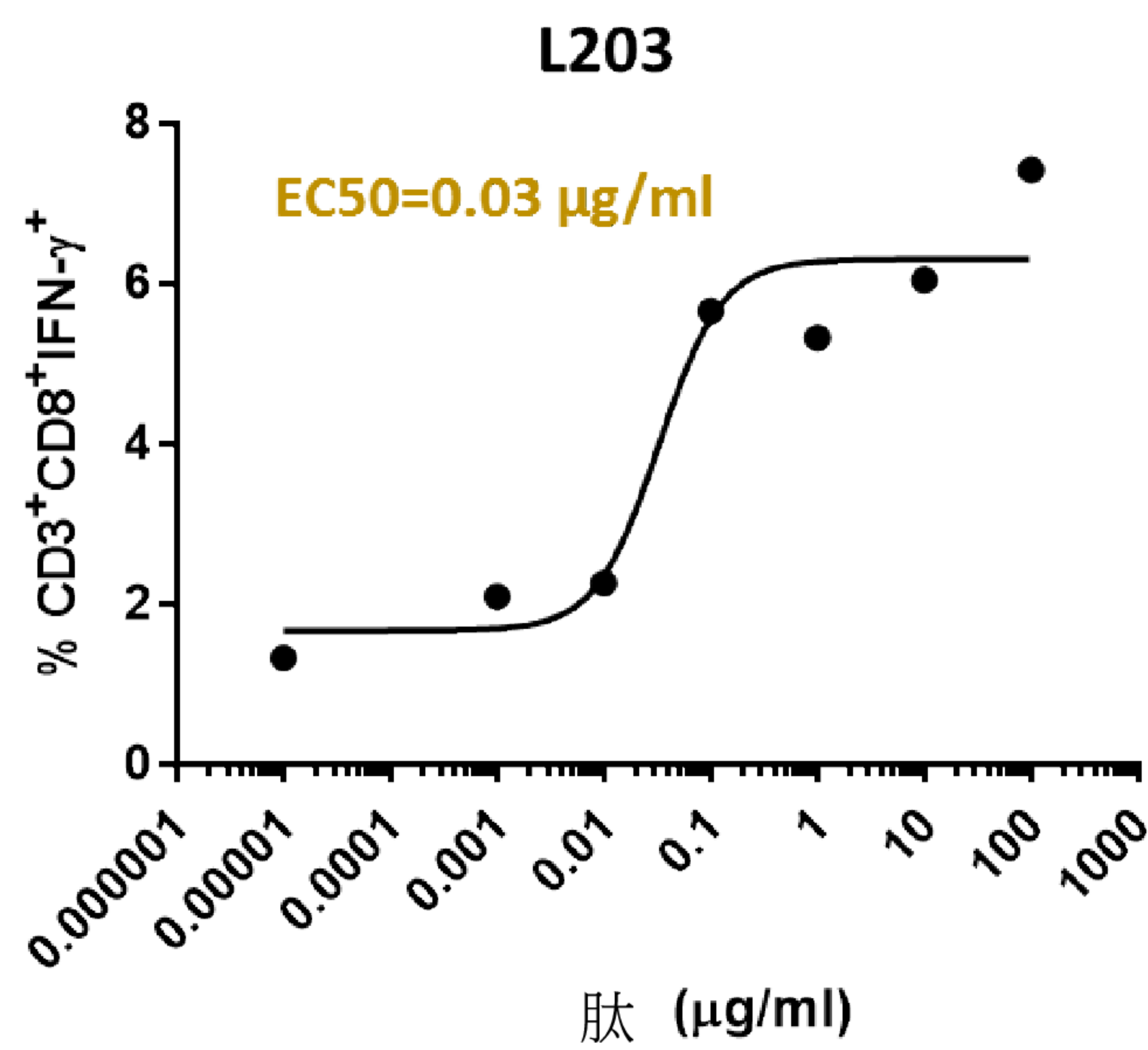
【圖10】



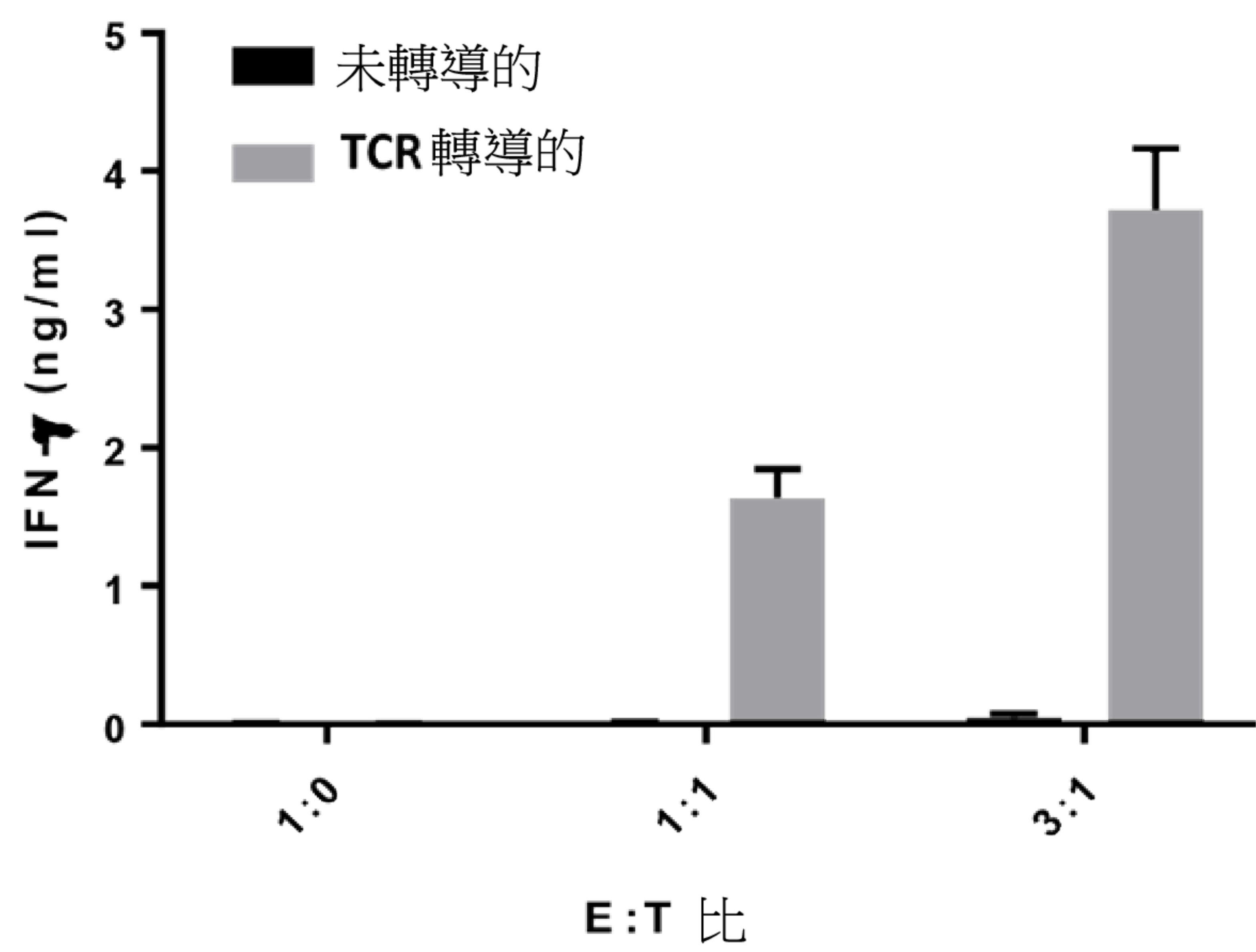
【圖11A】



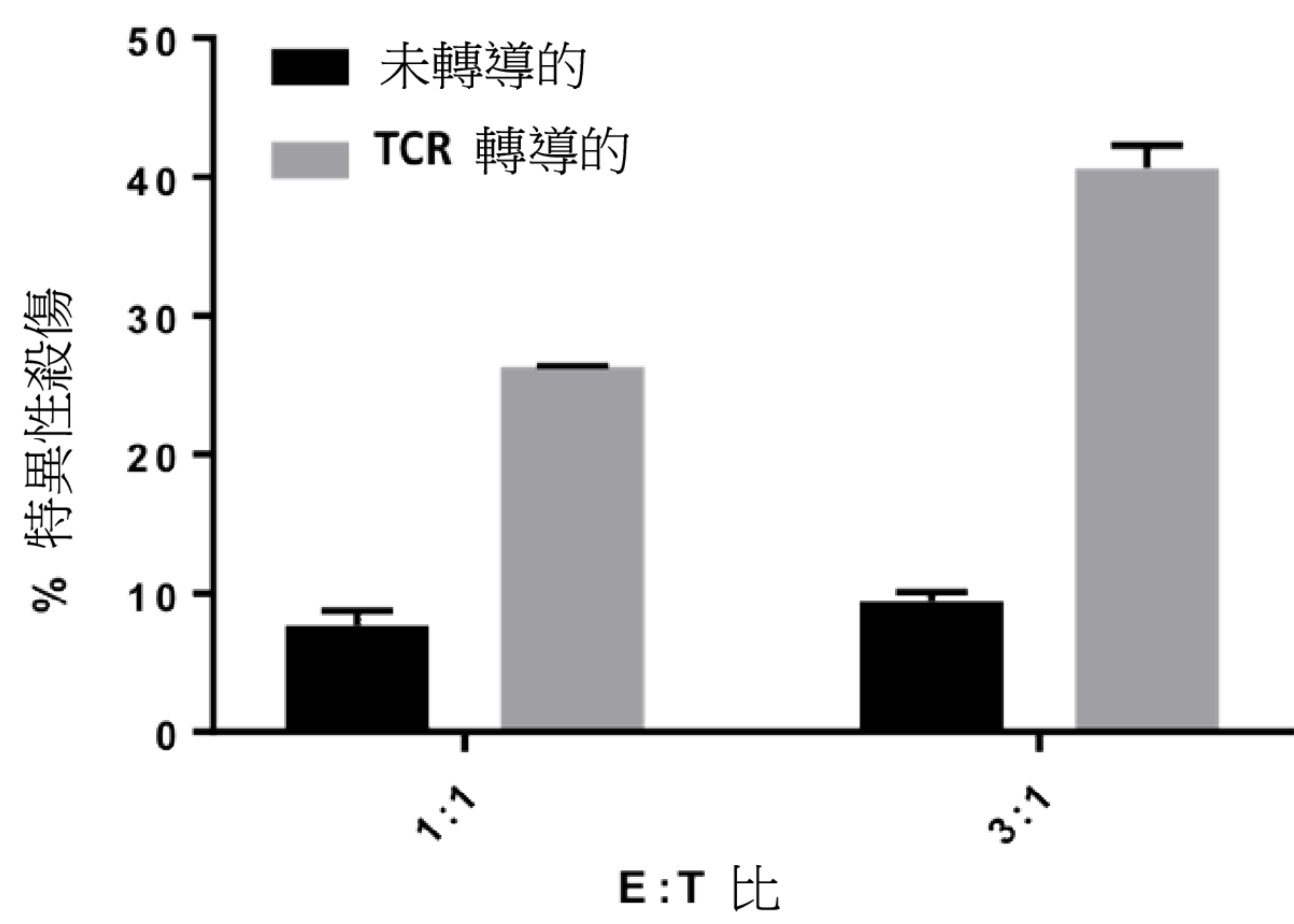
【圖11B】



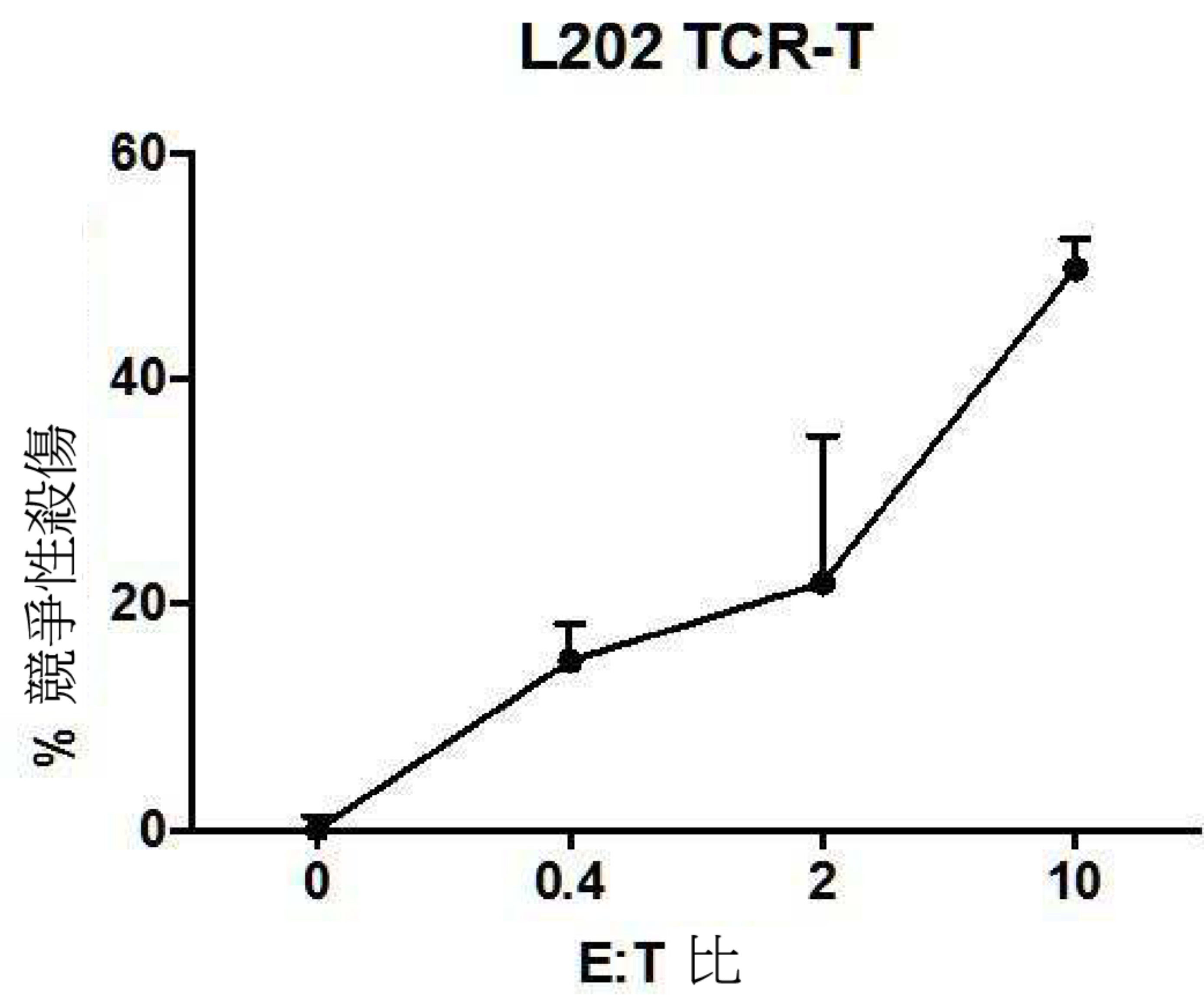
【圖11C】



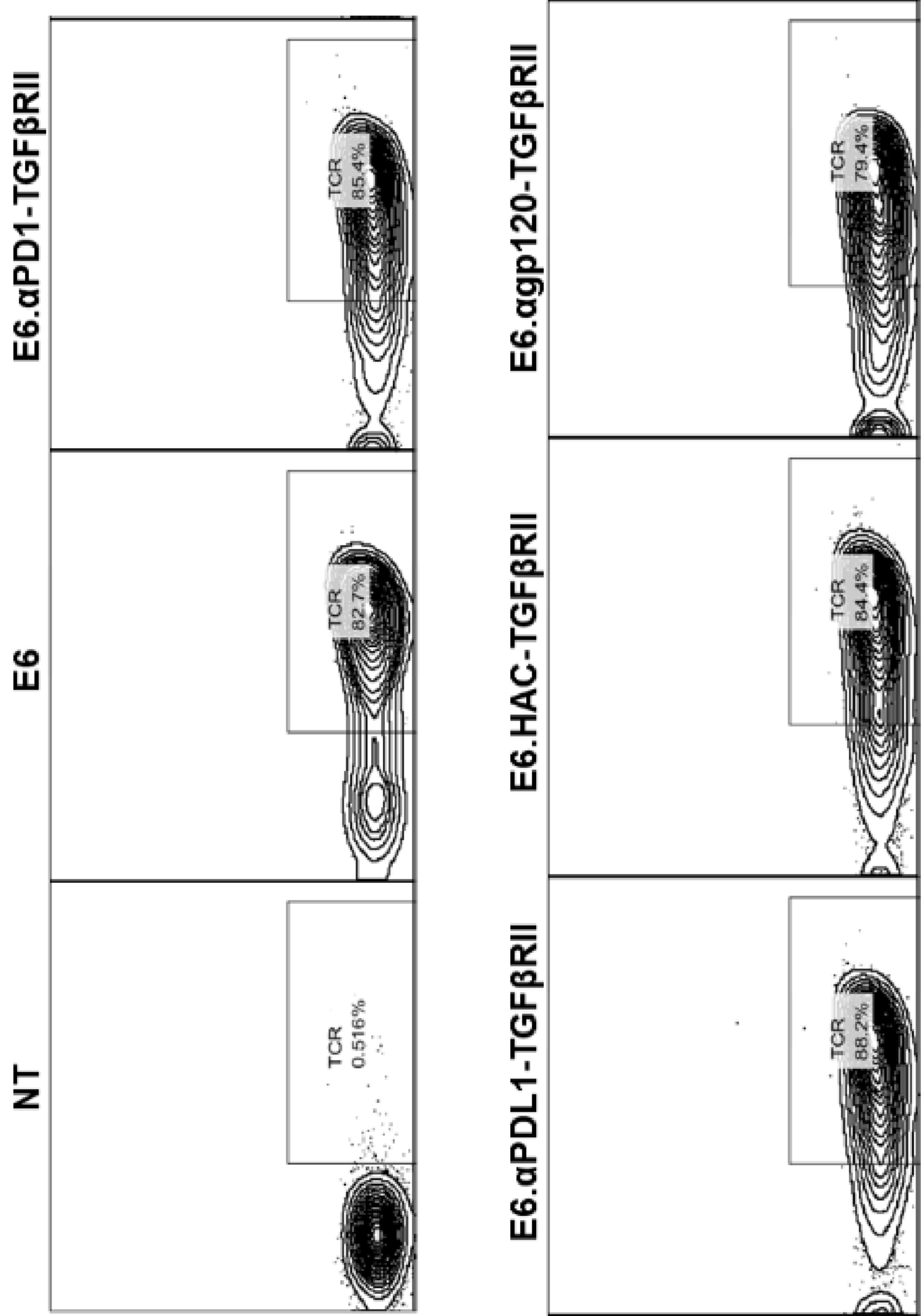
【圖12】



【圖13A】

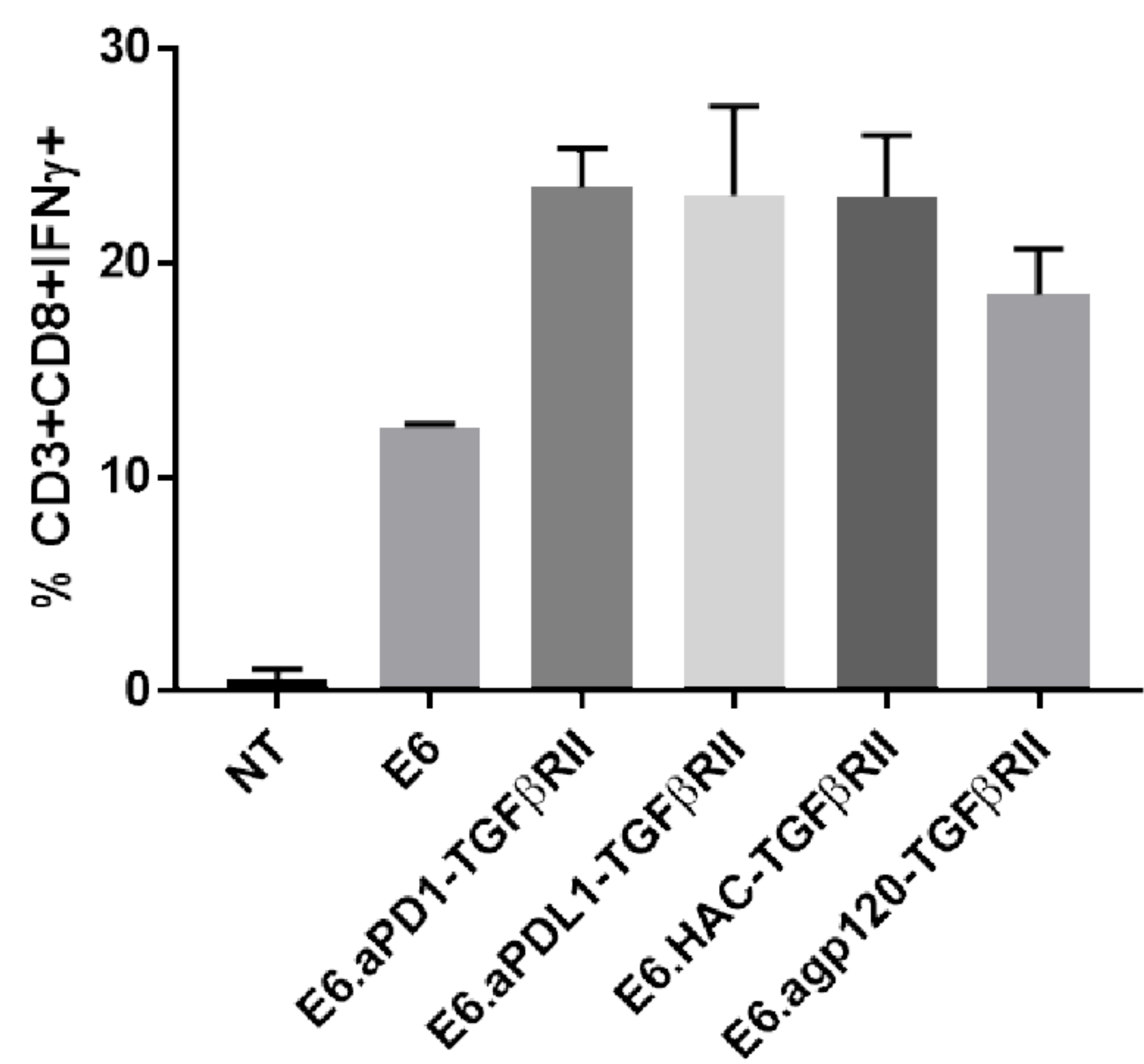


【圖13B】



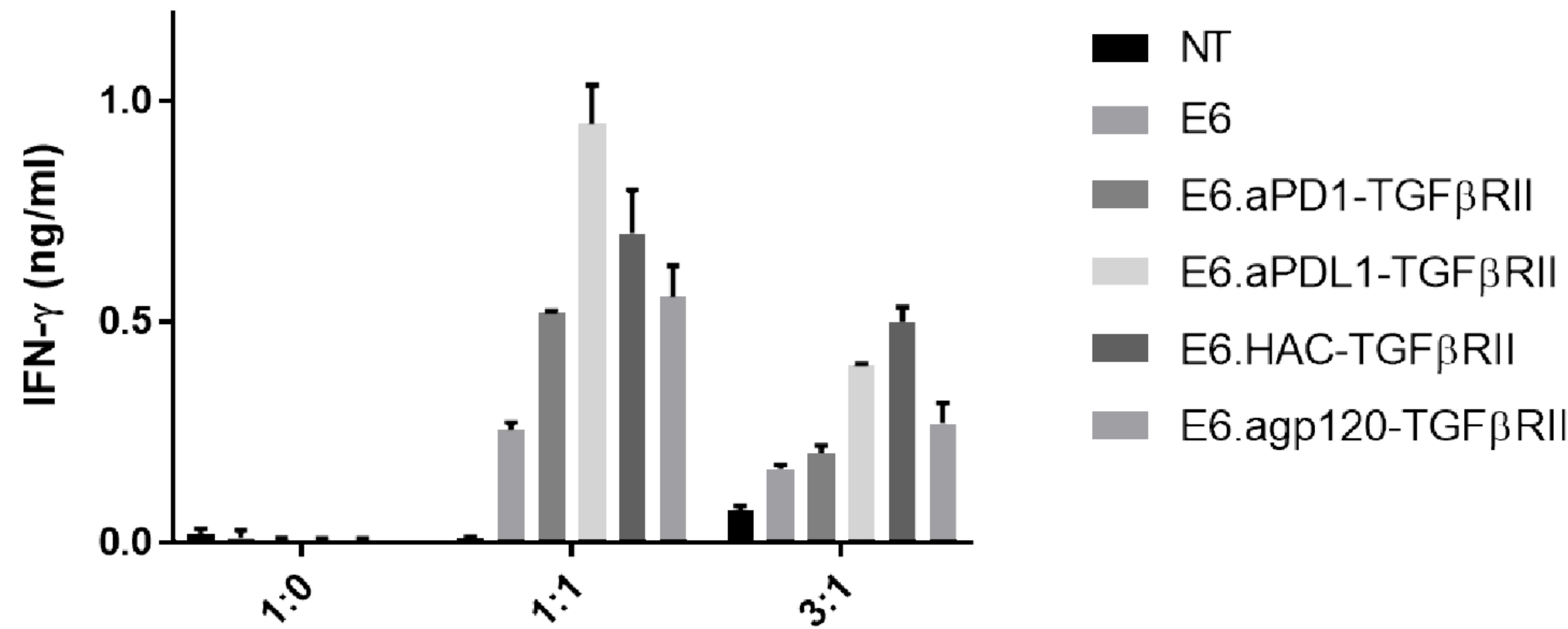
【圖14】

與肽脈衝的K562-A2共培養的細胞內
IFN- γ 表達(O/N)

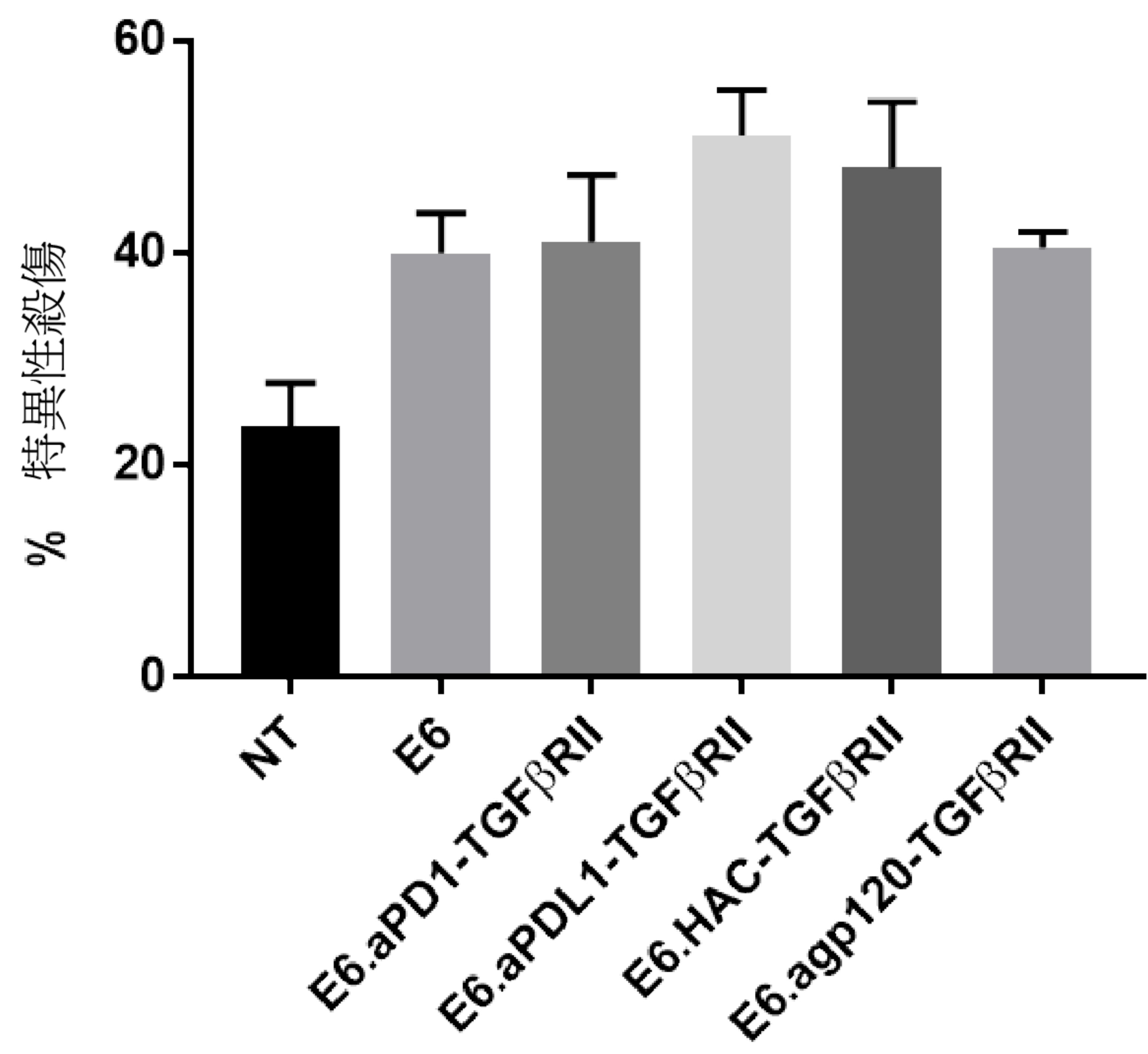


【圖15A】

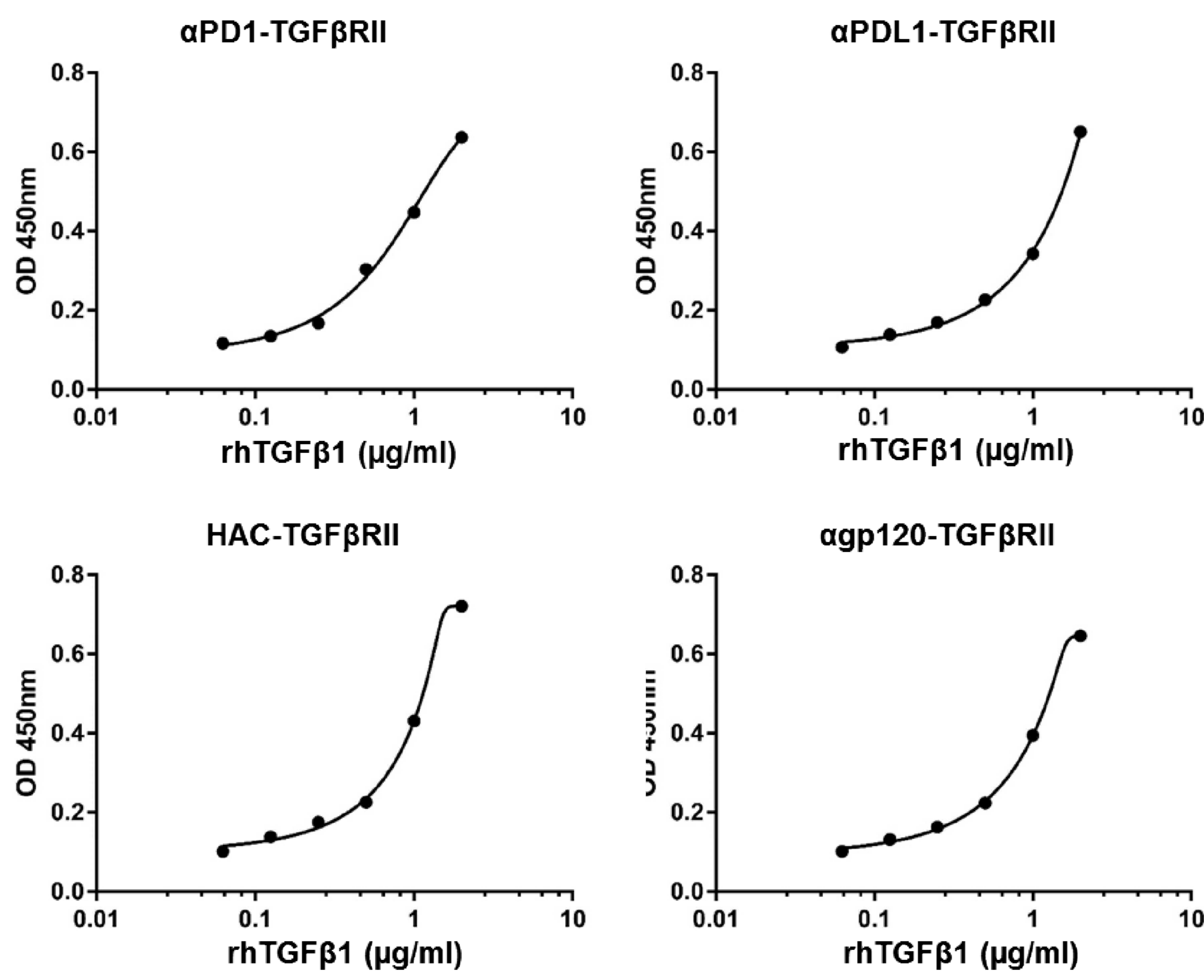
與Ca Ski E6/E7共培養的
IFN- γ 分泌(72小時)



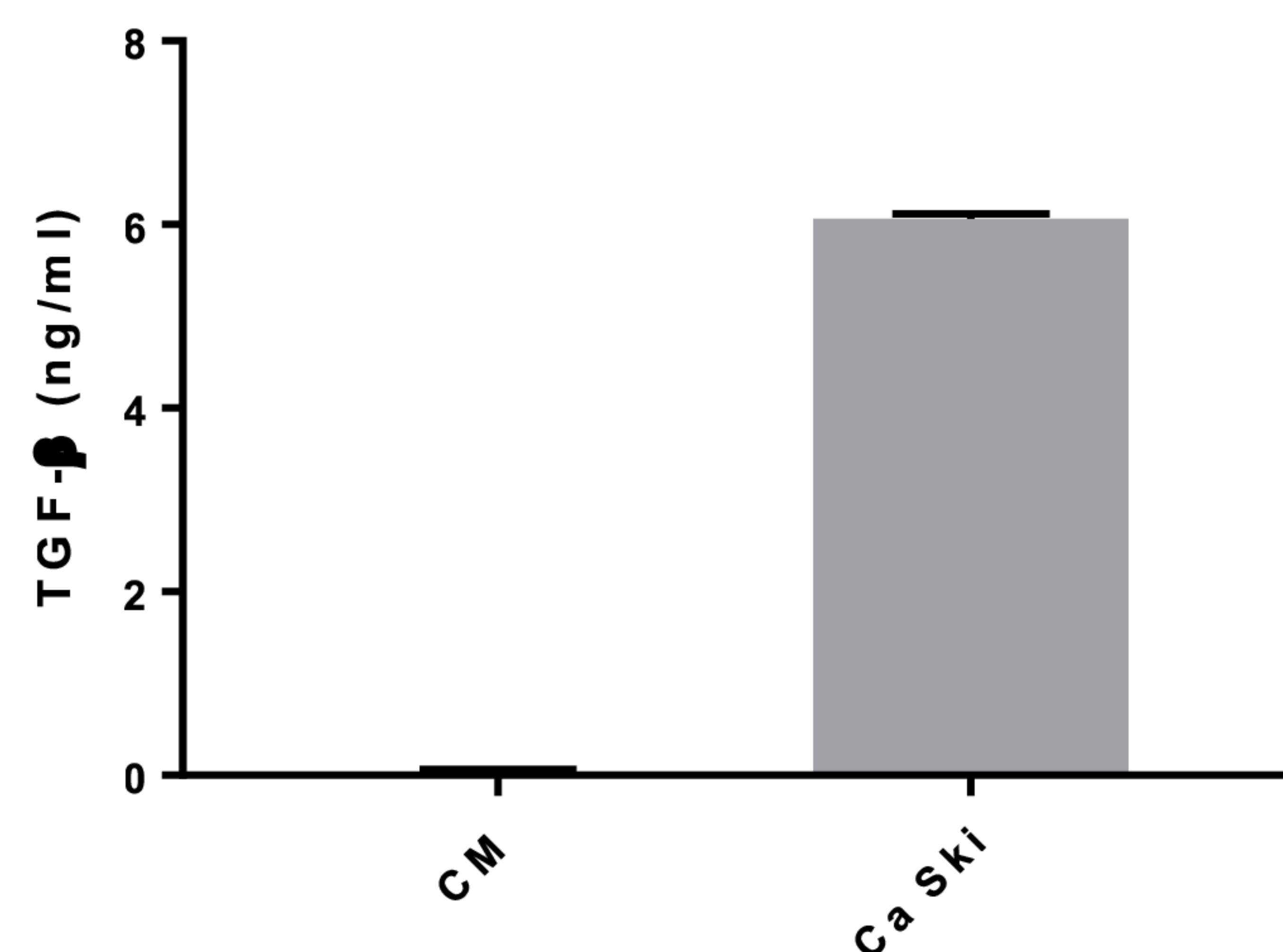
【圖15B】



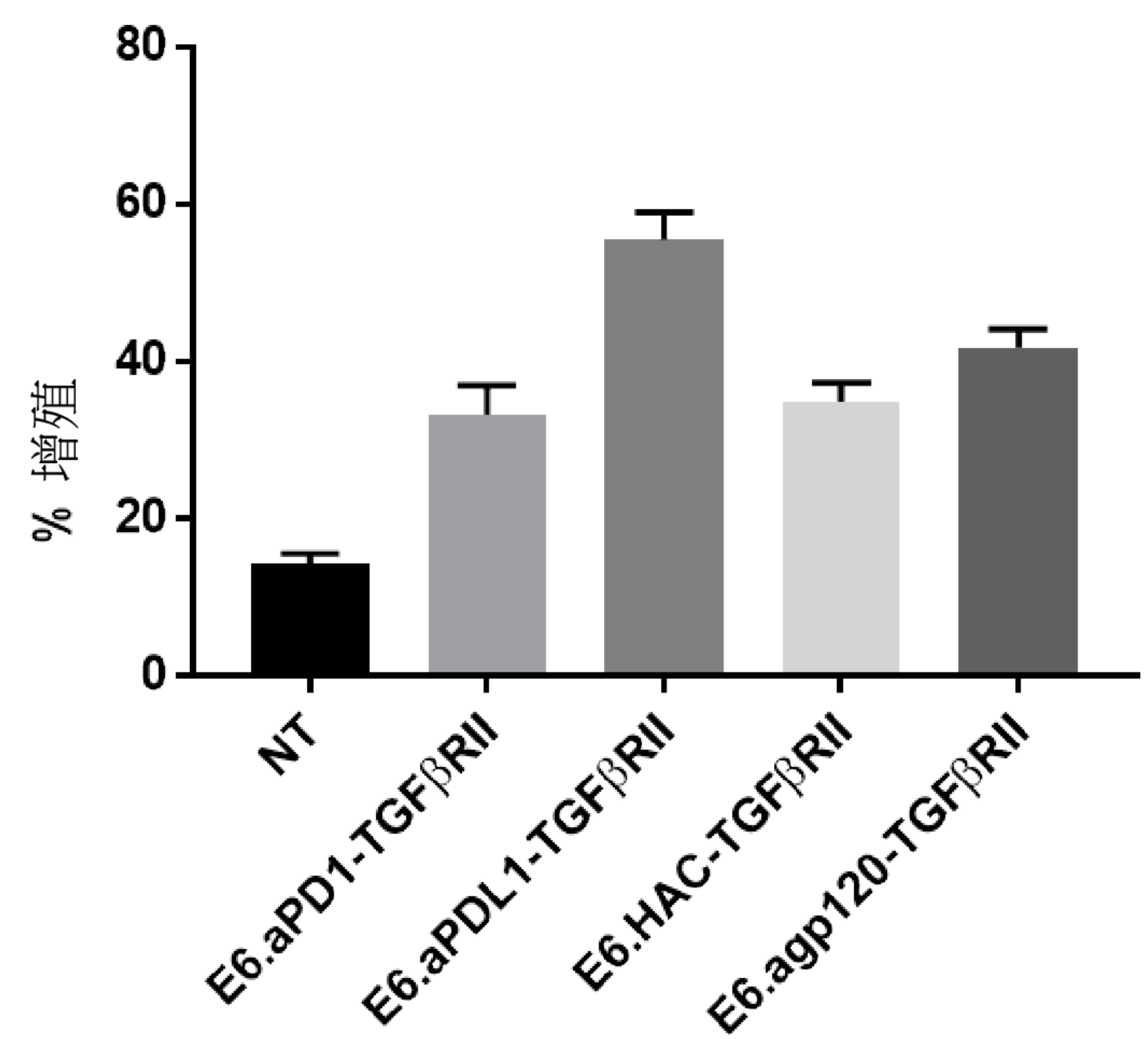
【圖16】



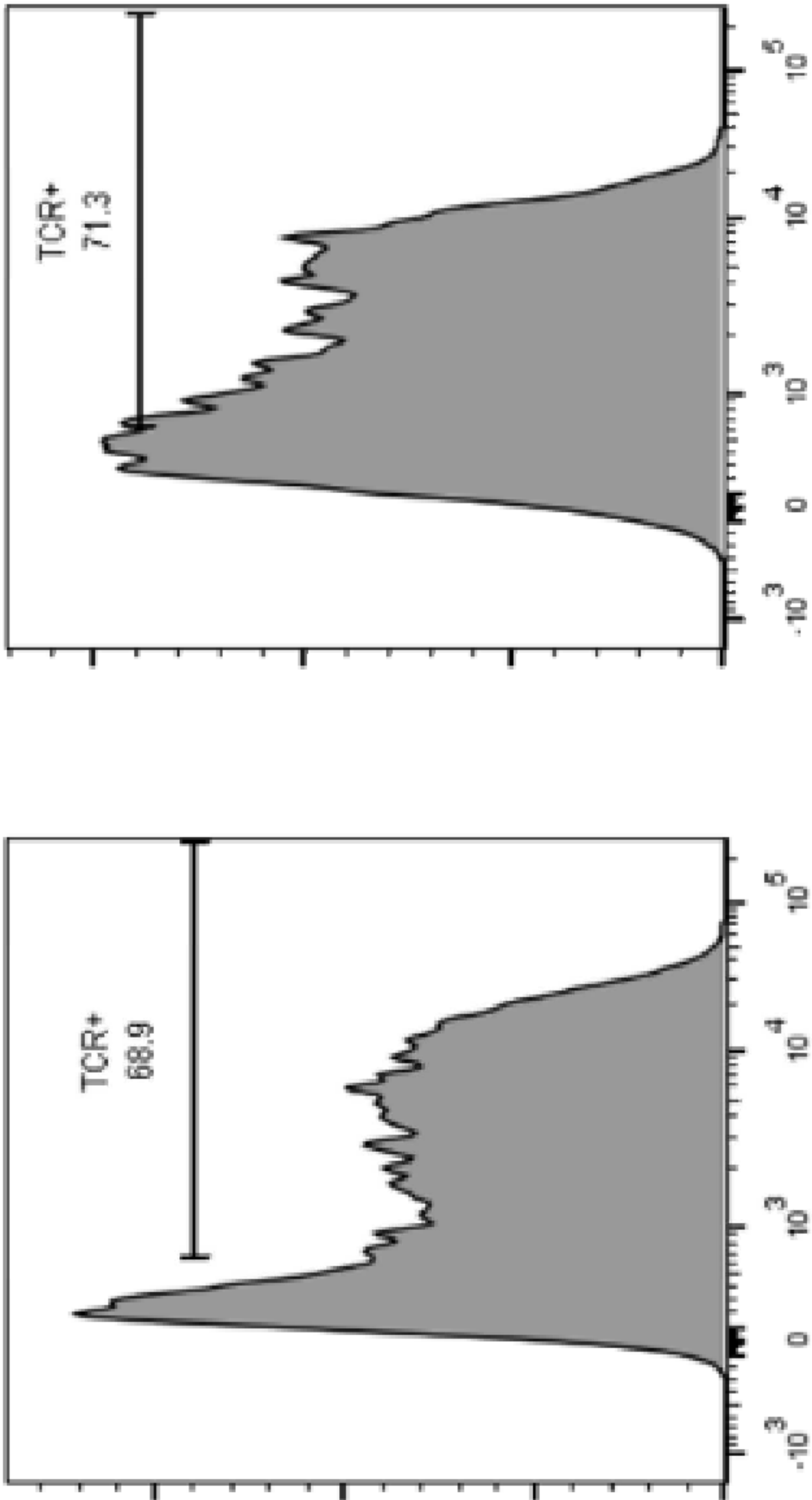
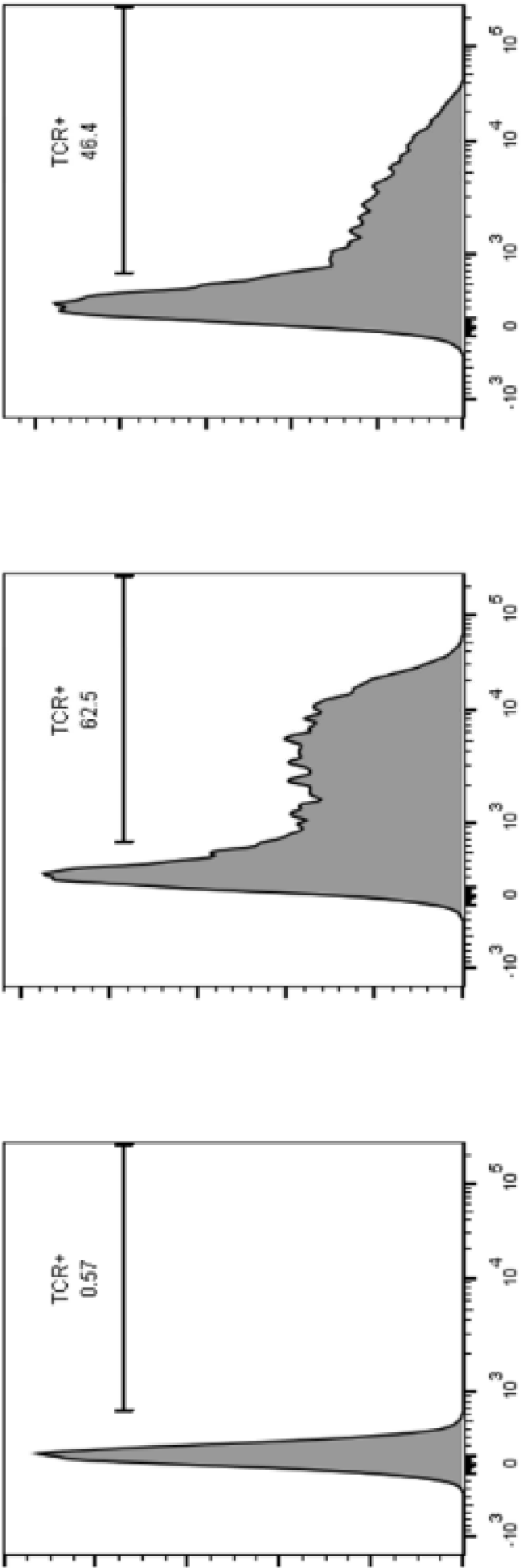
【圖17】



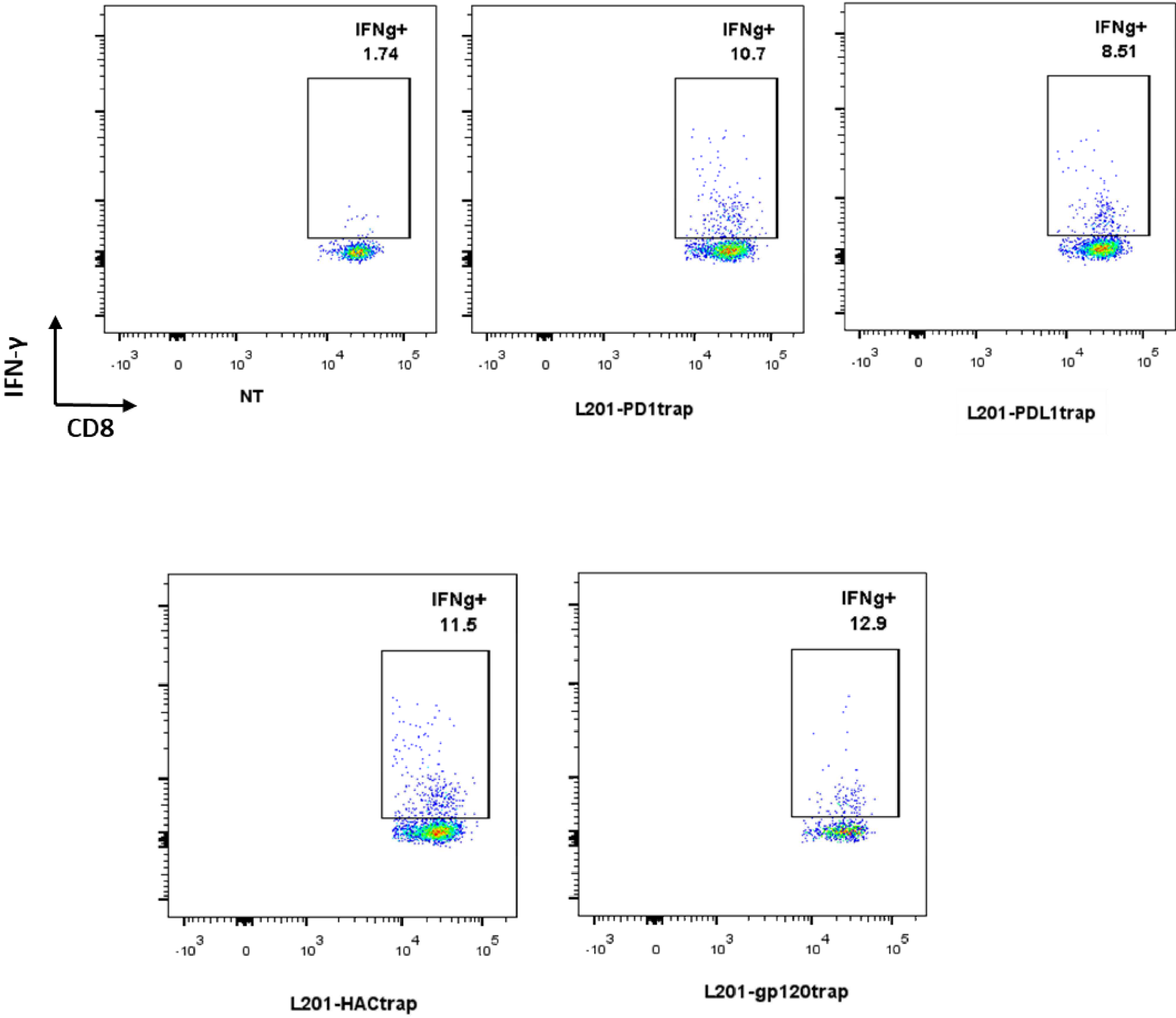
【圖18】



【圖19】

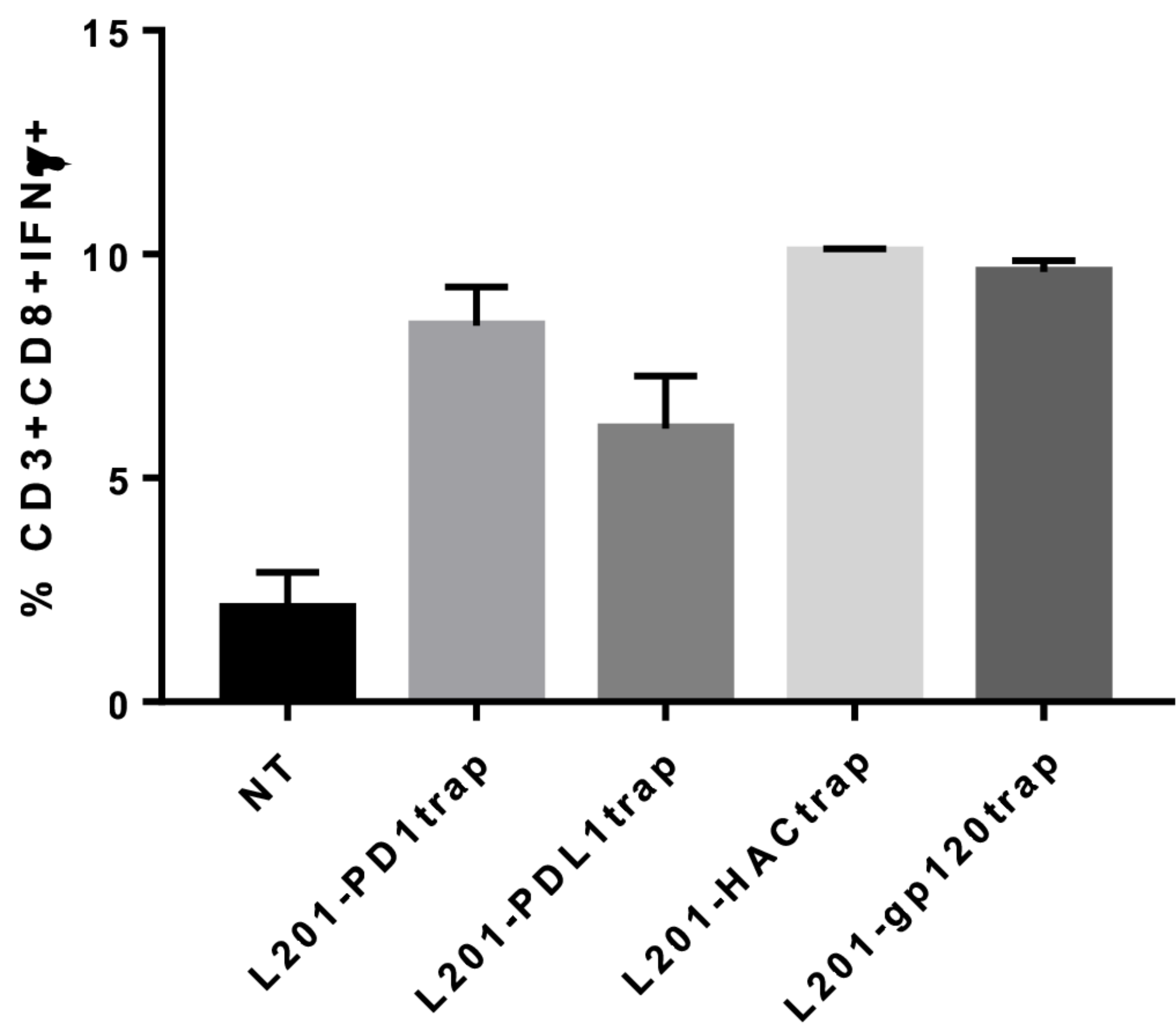


【圖20】



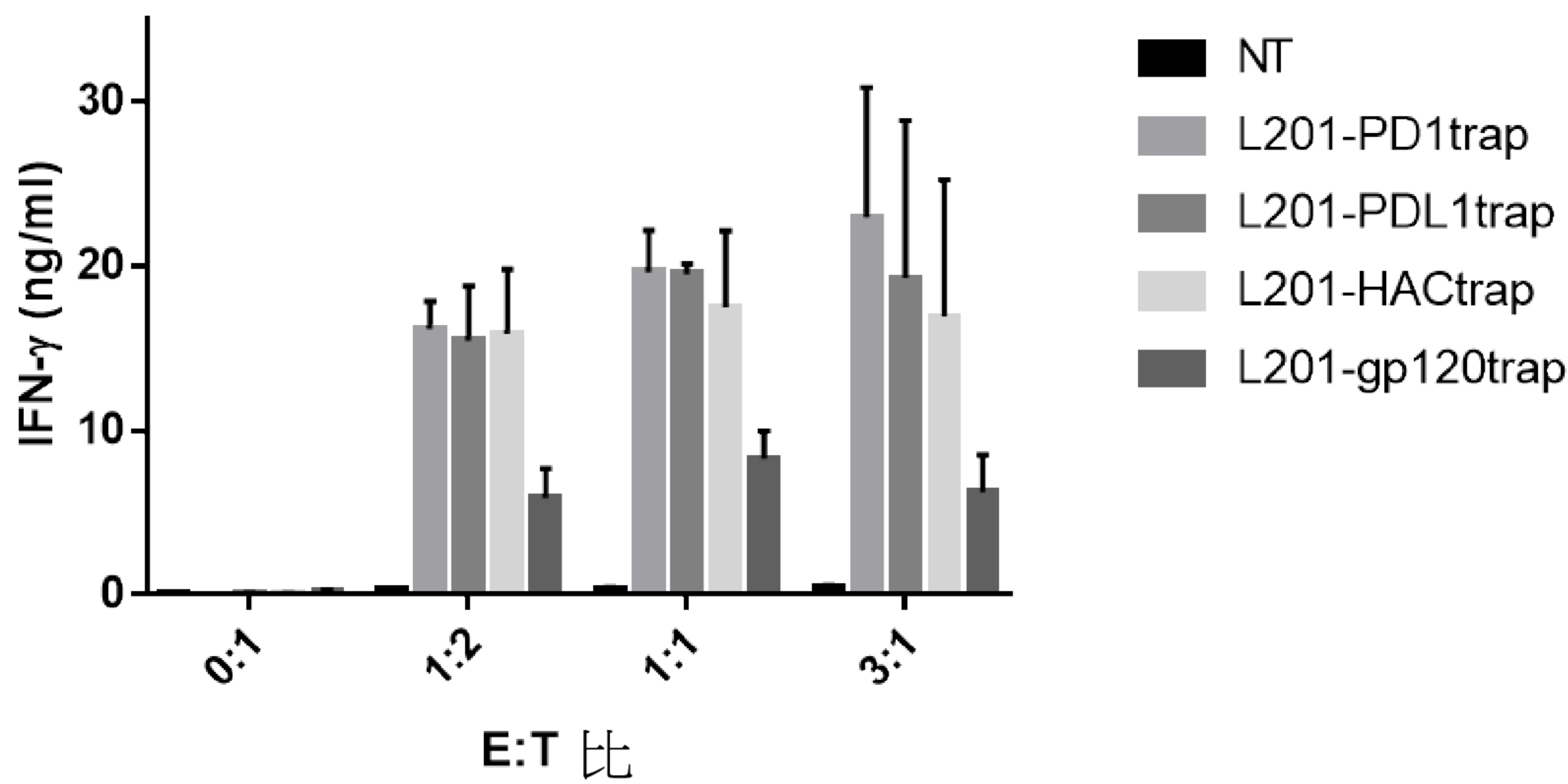
【圖21】

與肽脈衝的K562-A2共培養的細胞內
IFN- γ 表達(O/N)

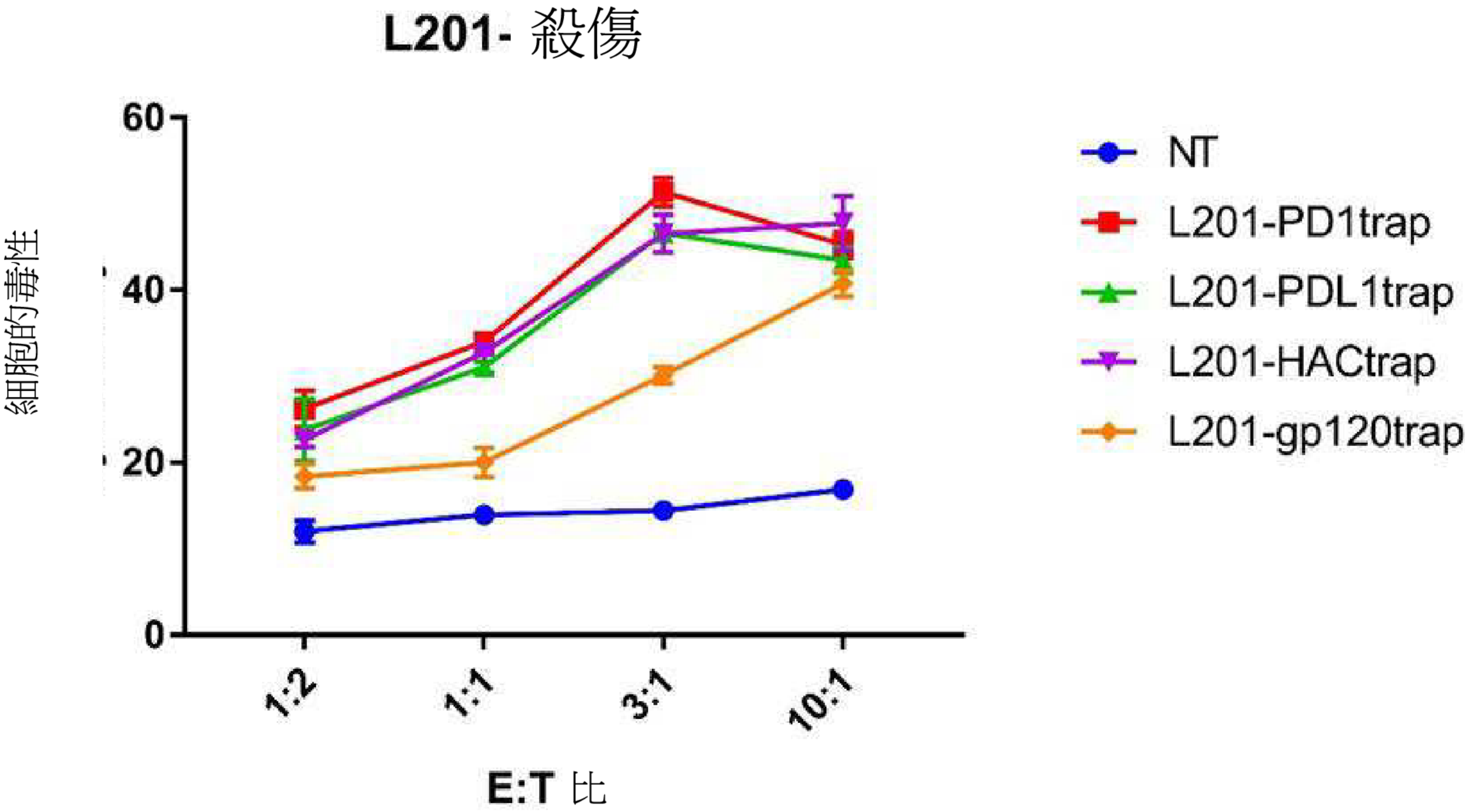


【圖22A】

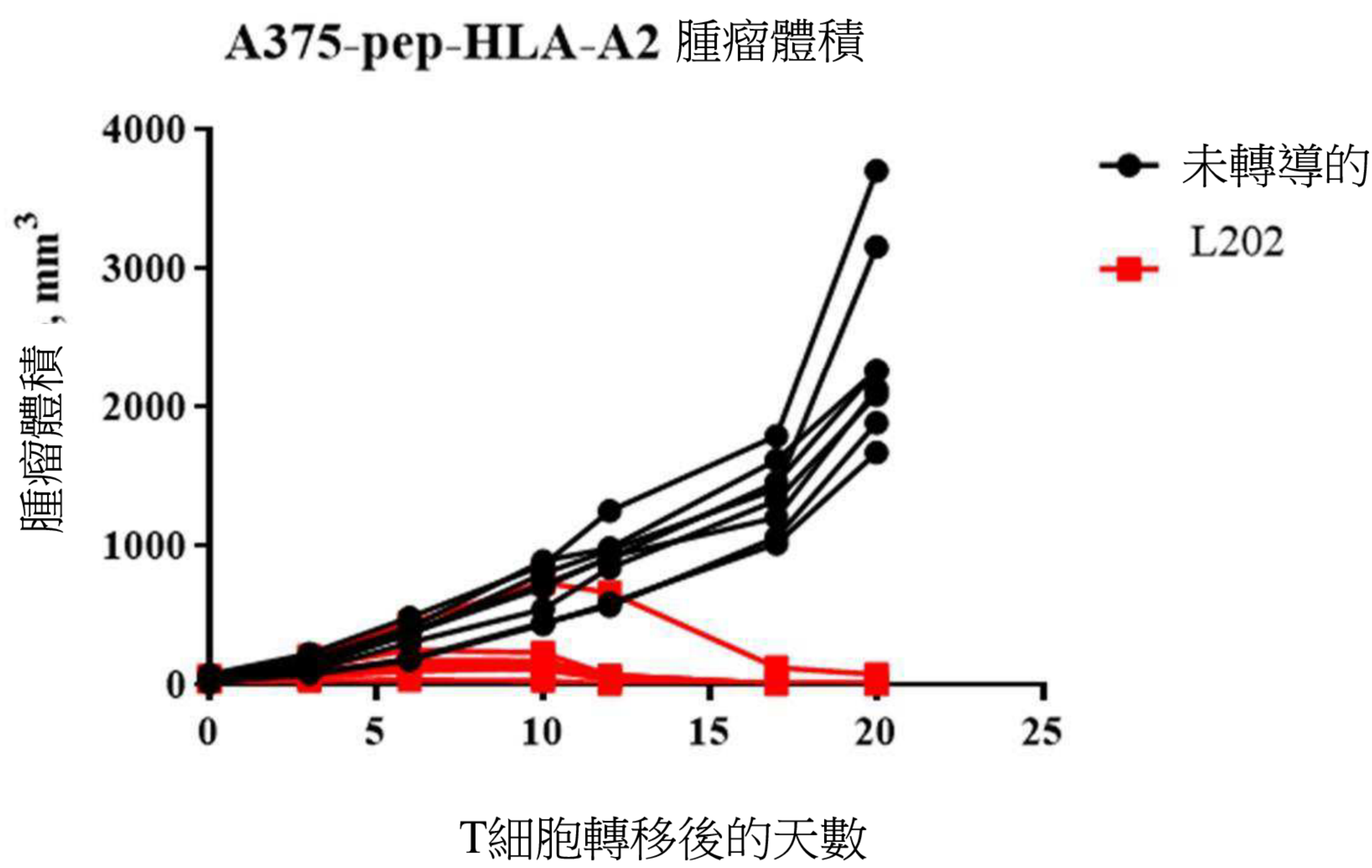
有/沒有肽脈衝的K562-A2細胞的L201-trap TCR-T細胞的
IFN- γ 分泌(72小時)



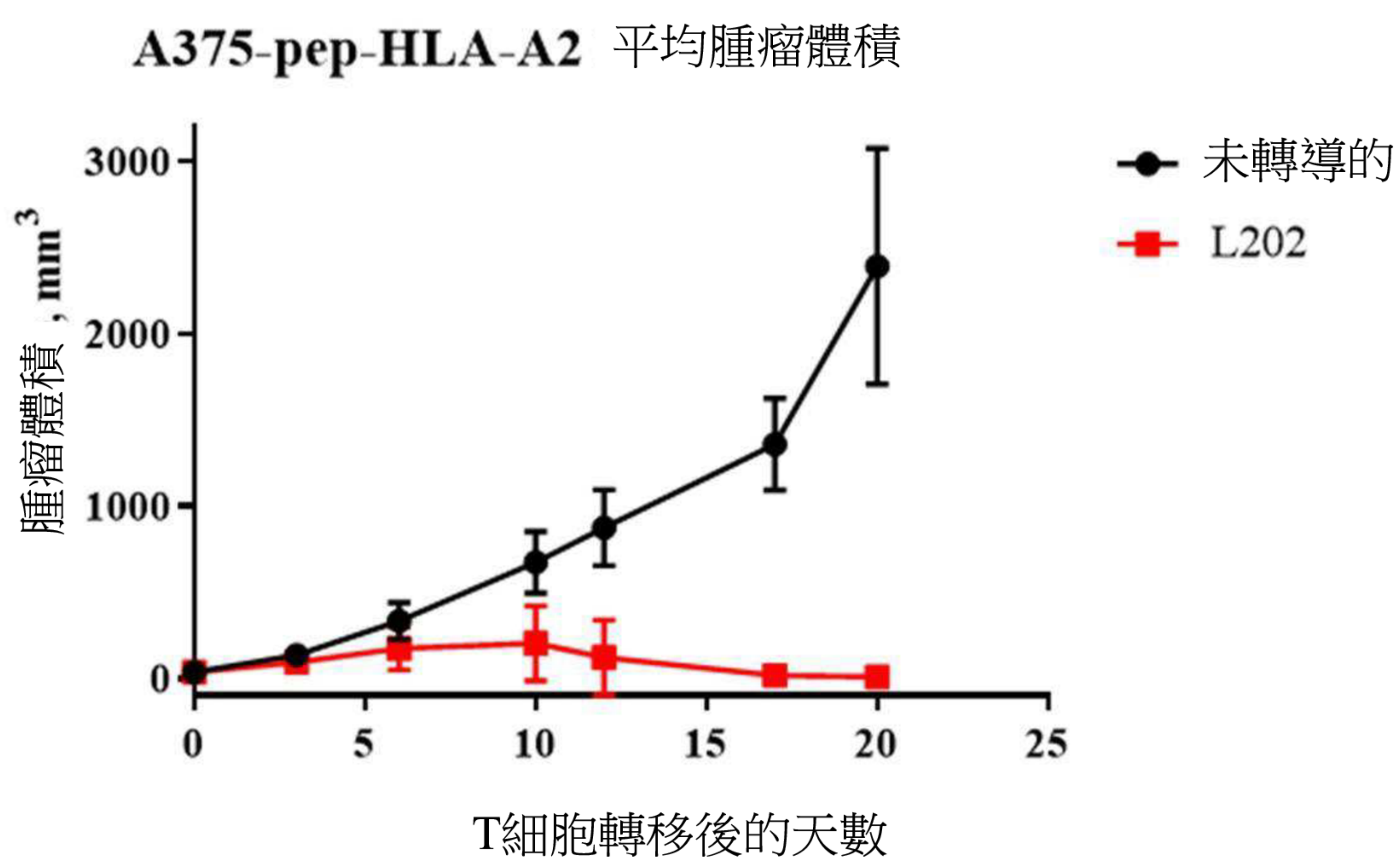
【圖22B】



【圖23】

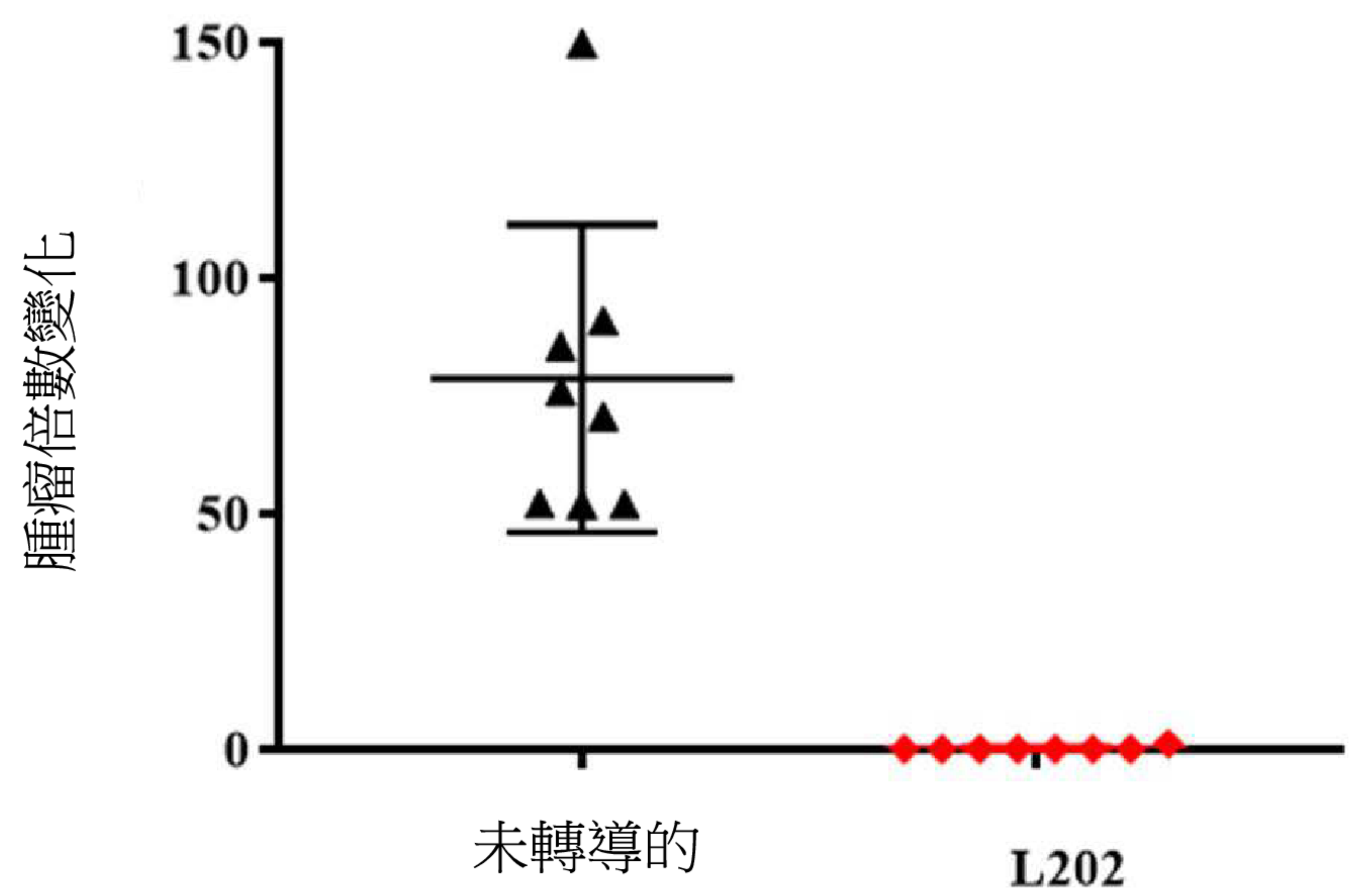


【圖24A】



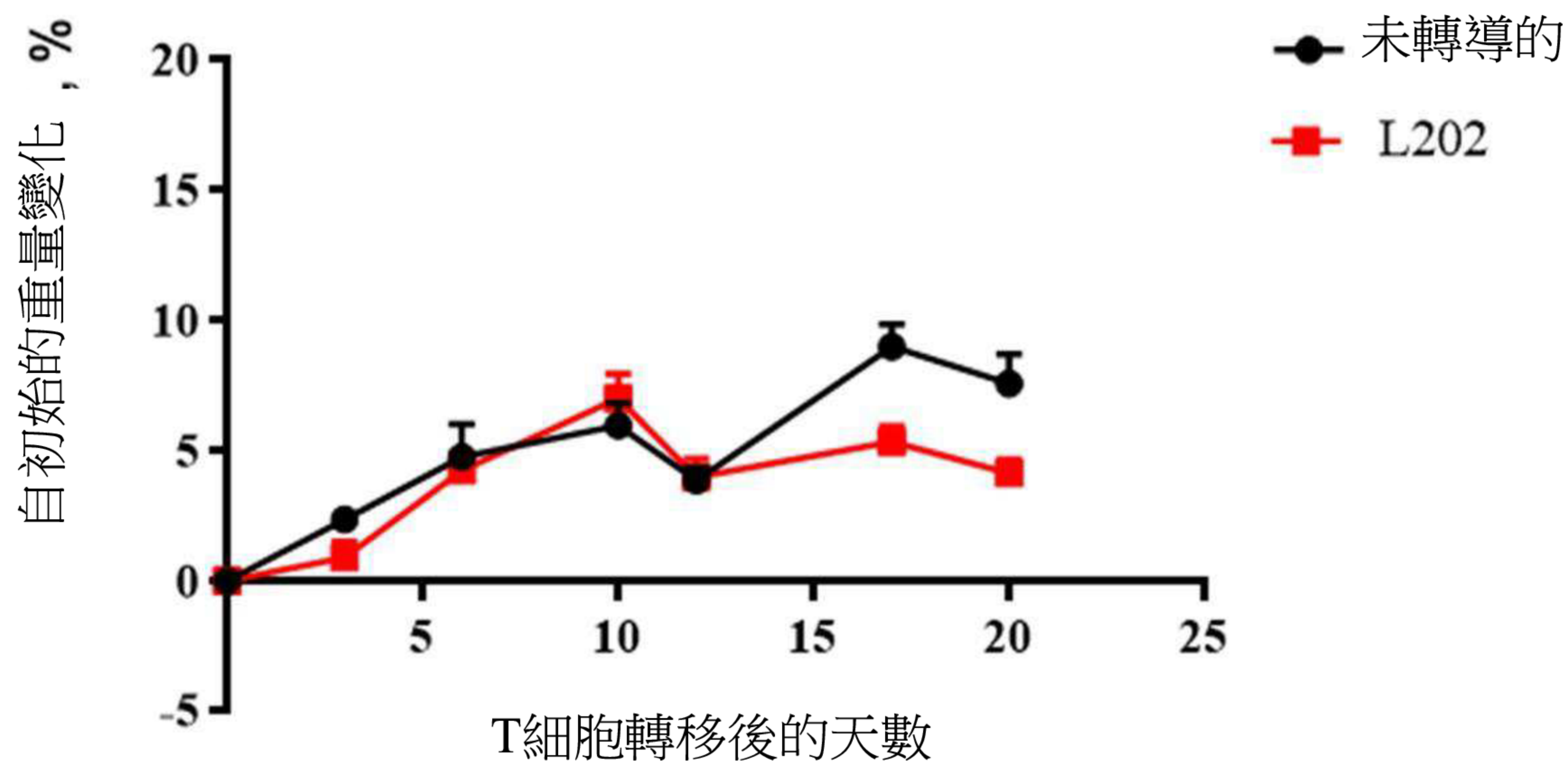
【圖24B】

LMP2 TCR (HLA-A2) 體內功效



【圖24C】

LMP2-TCR-T (HLA-A2) 體內毒性



【圖24D】

	CDR1 α	SEQ ID	CDR2 α	SEQ ID	CDR3 α	SEQ ID	CDR1 β	SEQ ID	CDR2 β	SEQ ID	CDR3 β	SEQ ID
L201	NSMFDY	17	ISSIKDK	18	CAAPPPSGNQFY	19	MDHEN	20	SYDVKM	21	ASSTRLAGAQRDTQY	22
L202	DSSSTY	23	IFSNMDM	24	AESIPSGYNKLI	25	SGHAT	26	FQNNGV	27	ASSLGLAGEDTQY	28
L203	NSMFDY	29	ISSIKDK	30	AAKLQAAGNKLT	31	LNHNV	32	YYDKDF	33	ATSSSIAGDTRNNEQF	34

【圖25】

DQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQP
GDSAVYFCAAPPSGNQFYFGTGTSLTVIP

(SEQ ID No: 1)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGD IPEGYSVSREKKERFSLILE
SASTNQTSMYLCASSTRLAGAQRDTQYFGPGTRLTVL

(SEQ ID No: 2)

gatcagcaggttaaacaaaatagcccgtcactttcagttcaagaaggacgcatctccatactcaactgcgattacacgaactctatgtttgattactttc
tttggtacaagaagtacccagcagaggggtccgactttccttatctccataagcagtatcaaagataagaacgaagacggtcggttcacagtgttcctta
acaaaagcgcaaagcacttgtctctgcacattgtgccgtcccaacccggcgactcagcagtgtagttctgcgccgcacccccaccctccgtaataat
tttacttcggtacggggacgtctctcactgttatacc

(SEQ ID No: 3)

gacgtgaaggtcactcagtccttcacggtatcttgtaagcgcactggcgaaaaagttttctggagtgtgtccaggacatggatcacgaaaatatgttt
ggtatcgccaagaccctgggctgggtctcagactgatttactttagctacgacgttaaaatgaaggaaaagggatattcctgaagggtatagtgtt
cacgcgagaagaaagagcggttctcactgatccttgagtcagcctccactaaccaaacatccatgtacctttgcgcatctagtacaaggctcgcgggc
gtcaacgggatacccaatatctcggtccgggcacgcggttgaccgtcctg

(SEQ ID No: 4)

EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFS NMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQT
GDSAIYFCAESIPSGYNKLIFGAGTRLAVHP

(SEQ ID No: 5)

GVAQSPRYKII EKRSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQP
AKLEDSAVYLCASSLGLAGEDTQYFGPGTRLTVL

(SEQ ID No: 6)

gaggacgtagaacaatctctttttctctctgtccgcgaggagattcctctgtaatcaattgtacttacaccgatagcagctcaacgtacctctactggta
taagcaggagcccggcgcaggcttgcaacttctgacttatatatatttagcaatatggatatgaaacaagaccaacgattgacagtgcttctgaacaaga

aagacaagcacctttctcttcgattgcggacacccagacaggggactcagcaatttatTTTTgcgctgaaagcattccctctggatacaataagttgat
atttgagcggggaccaggctggcgggtccatcca

(SEQ ID No: 7)

ggtgtggcacaatccccaggtacaagatcatcgagaaaaggcagtcctgcgcttttggtgtaatccaatatctggacatgccacactttactggtat
caacagatactgggtcaggggccgaagctgcttatacagtttcaaaacaatggcgtggtcgatgacagtcagcttcccaaagacagattttctgcaga
gagactgaaggggggtggatagtagcttgaaaatacaaccggcgaaactcgaagacagtgctgtctacctttgcgcttcctcactcggattggctggag
aggacacacaatactttggtccaggaaccagactcacggttctg

(SEQ ID No: 8)

QQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSL
HIVPSQPGDSAVYFCAAKLPQAAGNKLTFGGGTRVLVKP

(SEQ ID No: 9)

MVIQNPRYQVTQFGKPVTLSCSQTLNHNVMYWYQQKSSQAPKLLFHYYDKDFNNEADTPDNFQSRRPNTSFCFLDIR
SPGLGDAAMYLCATSSSIAGDTRNNEQFFGPGTRLTVL

(SEQ ID No: 10)

caacagaagaatgacgatcaacaagtaaagcaaaacagcccctctctttcagtacaagaaggacgcatctctatacttaactgcgactatacaaata
gcatgtttgactacttcctgtggtacaaaaaatatccagcagagggtcccaccttccttatcagcataagtagcattaaagacaaaaatgaagacggt
aggttcacagtcttcctcaataaaagcgctaaacatctctcactccatattgtaccgtcccaacctggtgacagtgcggtatatTTTTgcgcagccaaac
ttcctcaggcggctgggaataaaactgacgtttggcggcgggacgagggctctggtaaaaccc

(SEQ ID No: 11)

atggttatccaaaaccaagataccaggttacgcagttcggcaagccagtaaacactttcatgttctcaaaccttgaatcacaatgtcatgtactggtatc
aacaaaagtcaagccaggccccaaaacttctctttcactattacgataaagacttcaacaatgaggccgataccccgacaactttcagagtaggag
gcccaacacaagttttgtttcttgacatccgctcacccggaacttggcgatgcggcgatgtatctctgtgcgacatcaagtagtatagcggggggatacg
cggaacaacgaacaatttttggtcctggaaccagggttacggtattg

(SEQ ID No: 12)

ECD of TGFβRII amino acid sequence:

TIPPHVQKSVNNDMIVTDNNGAVKFPQLCKFCDVRFSTCDNQKSCMSNCSITSICEKPQE
VCVAVWRKNDENITLETVCHDPKLPYHDFILED AASPKCIMKEKKKPGETFFMCSCSSD

ECNDNIIFSEEYNTSNPD

(SEQ ID NO:13)

MATGSRTSLLLAFGLLCLPWLQEASA

(SEQ ID No: 14)

MATGSRTSLLLAFGLLCLPCLQEGSA

(SEQ ID No: 15)

LMP2 表位

LLWTLVVLL (SEQ ID NO: 16)

L201 的全長 a 鏈的氨基酸序列

DQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKSAKHLSLHIVPSQP
GDSAVYFCAAPPPSGNQFYFGTGTSLTVIP**DIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVL**
DMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNACYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLKLVAGFNL
LMTLRLWSS

(SEQ ID NO: 35)

L201 的全長 b 鏈的氨基酸序列

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDMDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSYDVKMKEKGDIPGYSVSREKKERFSLILE
SASTNQTSMYLCASSTRLAGAQRDTQYFGPGTRLTV**LEDLRNVTPPKVSLFEPСКАEIANKQKATLVCLARGFFPDHVEL**
SWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVCATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQNISA
EAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS

(SEQ ID NO: 36)

L202 的全長 a 鏈的氨基酸序列

EDVEQSLFLSVREGDSSVINCTYTDSSSTYLYWYKQEPGAGLQLLTYIFSNMDMKQDQRLTVLLNKKDKHLSLRIADTQT
GDSAIYFCAESIPSGYNKLIFGAGTRLAVHP**DIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCCLFTDFDSQINVPKTMESGTFITDKTVL**
DMKAMDSKSNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNACYPSSDVPCDATLTEKSFETDMNLNFQNLSVMGLRILLKLVAGFNL
LMTLRLWSS

(SEQ ID NO: 37)

L202 的全長 b 鏈的氨基酸序列

GVAQSPRYKIIKRQSVAFWCNPISGHATLYWYQQILGQGPKLLIQFQNNGVVDDSQLPKDRFSAERLKGVDSTLKIQP
AKLEDSAVYLCASSLGLAGEDTQYFGPGTRLTVLEDLRNVT**PPKVS**LFEP**SKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVELSWW**
VNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVCATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQ**NISAEAWG**
RADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS

(SEQ ID NO: 38)

L203 的全長 a 鏈的氨基酸序列

QQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNKS**AKHLSL**
HIVPSQPGDSAVYFCAAKLPQAAGNKLTFGGGTRVLVKP**DIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMES**
GTFITDKTVLDMKAMDSK**SNGAIAWSNQTSFTCQDIFKETNACYPSSDVPCDATLTEKSFETDMN**LN**FQNL**SVMGLRI
LLLKVAGFNLLMTLRLWSS

(SEQ ID NO: 39)

L203 的全長 b 鏈的氨基酸序列

MVIQNPRYQVTQFGKPVTLSCSQTLNHNVMYWYQQKSSQAPKLLFHYYDKDFNNEADTPDNFQSRPNTSFCFLDIR
SPGLGDAAMYLCATSSSIAGDTRNNEQFFGPTRLTVLEDLRNVT**PPKVS**LFEP**SKAEIANKQKATLVCLARGFFPDHVE**
LSWWVNGKEVHSGVSTDPQAYKESNYSYCLSSRLRVCATFWHNPRNHFRCQVQFHGLSEEDKWPEGSPKPVTQ**NIS**
AEAWGRADCGITSASYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSTLVVMAMVKRKNS

(SEQ ID NO: 40)

L201 的全長 a 鏈的核酸序列

GATCAGCAGGTTAAACAAAATAGCCCGTCACTTTCAGTTCAAGAAGGACGCATCTCCATACTCAACTGCGATTACA
CGAACTCTATGTTTGATTACTTTCTTTGGTACAAGAAGTACCCAGCAGAGGGTCCGACTTTCCTTATCTCCATAAGC
AGTATCAAAGATAAGAACGAAGACGGTCGGTTCACAGTGTTCTTAACAAAAGCGCAAAGCACTTGTCTCTGCAC
ATTGTGCCGTCCCAACCCGGCGACTCAGCAGTGTA

CTTCTGCGCCGCACCCCCACCCTCCGGTAATCAATTTTACTT
CGGTACGGGGACGTCTCTCACTGTTATACCCgacatccagaatccagagccagccgtgtaccagctgaaggaccctaggagccaggac
tctaccctctgcctgttcaccgacttcgacagccagatcaacgtgccaagacaatggagagcggcaccttc

atcaccgacaagaccgtgctggacatgaaggctatggacagcaagagcaacggagccatcgcttgga

gaaccagaccgcttcacttgccaggacatcttcaaggagaccaacgcttgctaccctctagcgacgtgccttgcgacgccacactgacagagaagagcttcgagaccgacatgaac

ctgaac

ttccagaa

ctgagcgtgatgggcctga

aatcctgctgctgaaggtggccggattcaac

ctgctgatgaccctgaggctgtggtcttcc

(SEQ ID NO: 41)

L201 的全長 b 鏈的核酸序列

GACGTGAAGGTCACTCAGTCTTCACGGTATCTTGTTAAGCGCACTGGCGAAAAAGTTTTCTGGAGTGTGTCCAGG
ACATGGATCACGAAAATATGTTTTGGTATCGCCAAGACCCTGGGCTGGGTCTCAGACTGATTTACTTTAGCTACGA
CGTTAAAATGAAGGAAAAGGGTGATATTCCTGAAGGGTATAGTGTTTCACGCGAGAAGAAAGAGCGGTTCTCACT
GATCCTTGAGTCAGCCTCCACTAACCAACATCCATGTACCTTTGCGCATCTAGTACAAGGCTCGCGGGCGCTCAA
CGGGATACCCAATATTTTCGGTCCGGGCACGCGGTTGACCGTCCTGgaggacctacgtaacgtgacccctccaaggtgtccctgt
tcgagcctagcaaggccgagatcgccaacaagcagaaggccacactcgtctgcctggctagaggcttcttcccagaccacgtggagctgtcttggtgg
gtgaacggcaaggaggtgcactcaggagtgtctaccgacccctcaggcctacaaggagagcaactacagctactgcctgtcctccagactcagggtct
gcgccacctttggcacaaccctcggaaccacttccgctgtcaggtccagttccacggcctgtccgaggaagacaagtggccagagggctctcctaag
ccagtgcacagacaatcagcgccgaggcttggggaagagccgattgcggaatcaccagcgctcttaccagcagggagtgtgtcagctaccatcc
tgtacgagatcctgtctgggcaaggccacactgtacgcagtgtggtgtccactctggctgatggctatggtgaagcggaagaacagc

(SEQ ID NO: 42)

L202 的全長 a 鏈的核酸序列

GAGGACGTAGAACAATCTCTTTTTCTCTGTCCGCGAGGGAGATTCCTCTGTAATCAATTGTACTTACACCGATAG
CAGCTCAACGTACCTCTACTGGTATAAGCAGGAGCCCGGCGCAGGCTTGCAACTTCTGACTTATATATTAGCAAT
ATGGATATGAAACAAGACCAACGATTGACAGTGCTTCTGAACAAGAAAGACAAGCACCTTTCTCTTCGATTGCGG
ACACCCAGACAGGGGACTCAGCAATTTATTTTTGCGCTGAAAGCATTCCCTCTGGATACAATAAGTTGATATTTGG
AGCGGGGACCAGGCTGGCGGTCCATCCAgacatccagaatccagagccagccgtgtaccagctgaaggaccctaggagccaggactct
accctctgcctgttcaccgacttcgacagccagatcaacgtgccaagacaatggagagcggcaccttcaccgacaagaccgtgtggacatga
aggctatggacagcaagagcaacggagccatcgcttggagcaaccagaccagcttcacttgccaggacatctcaaggagaccaacgcttgctaccc
ctctagcgacgtgccttgcgacgccacactgacagagaagagcttcgagaccgacatgaacctgaacttcagaacctgagcgtgatgggcctgaga
atcctgtgtgaaggtggccgattcaacctgtgatgacctgaggctgtggtcttcc

(SEQ ID NO: 43)

L202 的全長 b 鏈的核酸序列

GGTGTGGCACAATCCCCCAGGTACAAGATCATCGAGAAAAGGCAGTCCGTCGCGTTTTGGTGTAATCCAATATCT
GGACATGCCACACTTTACTGGTATCAACAGATACTGGGTGAGGGGCCGAAGCTGCTTATACAGTTTCAAACAATG
GCGTGGTCGATGACAGTCAGCTTCCCAAAGACAGATTTTCTGCAGAGAGACTGAAGGGGGTGGATAGTACCTTGA
AAATACAACCGGCGAAACTCGAAGACAGTGCTGTCTACCTTTGCGCTTCCTCACTCGGATTGGCTGGAGAGGACA
CACAATACTTTGGTCCAGGAACCAGACTCACGGTTCTGgaggacctacgtaacgtgacccctccaaggtgtccctgttcgagcctag
caaggccgagatcgccaacaagcagaaggccacactcgtctgcctggctagaggcttcttcccagaccacgtggagctgtcttggtgggtgaacggc
aaggaggtgcactcaggagtgtctaccgaccctcaggcctacaaggagagcaactacagctactgcctgtcctccagactcagggtctgcgccacctt
ttggcacaaccctcggaaccacttccgctgtcaggtccagttccacggcctgtccgaggaagacaagtggccagagggctctcctaagccagtgcac
agaacatcagcgccgaggcttggggaagagccgattgcggaatcaccagcgctcttaccagcagggagtgtgtcagctaccatcctgtacgagat
cctgtctgggcaaggccacactgtacgcagtgtggtgtccactctggctgatggctatggtgaagcggaagaacagc

(SEQ ID NO: 44)

L203 的全長 a 鏈的核酸序列

CAACAGAAGAATGACGATCAACAAGTAAAGCAAAACAGCCCCTCTCTTTCAGTACAAGAAGGACGCATCTCTATAC
TTAACTGCGACTATACAAATAGCATGTTTGACTACTTCCTGTGGTACAAAAAATATCCAGCAGAGGGTCCCACCTTC
CTTATCAGCATAAGTAGCATTAAAGACAAAAATGAAGACGGTAGGTTACAGTCTTCCTCAATAAAAGCGCTAAAC
ATCTCTCACTCCATATTGTACCGTCCCAACCTGGTGACAGTGCGGTATATTTTTGCGCAGCCAAACTTCCTCAGGCG
GCTGGGAATAAACTGACGTTTGGCGGCGGGACGAGGGTCCTGGTAAAACCCgacatccagaatccagagccagccgtgtac
cagctgaaggaccctaggagccaggactctaccctctgcctgttcaccgacttcgacagccagatcaacgtgcccagacaatggagagcggcacct
tcatcaccgacaagaccgtgctggacatgaaggctatggacagcaagagcaacggagccatcgcttgagcaaccagaccagcttcacttgccagg
acatcttcaaggagaccaacgcttgctaccctctagcgacgtgccttgcgacgccacactgacagagaagagcttcgagaccgacatgaacctgaa
cttccagaacctgagcgtgatgggcctgagaatcctgctgctgaagggtggccggattcaacctgctgatgacctgaggctgtggtcttcc

(SEQ ID NO: 45)

L203 的全長 b 鏈的核酸序列

ATGGTTATCCAAAACCCAAGATACCAGGTTACGCAGTTCGGCAAGCCAGTAACACTTTTCATGTTCTCAAACCTTGA
ATCACAATGTCATGTACTGGTATCAACAAAAGTCAAGCCAGGCCCCAAAACCTTCTCTTTCCTATTACGATAAAGAC
TTCAACAATGAGGCCGATACCCCCGACAACCTTTCAGAGTAGGAGGCCCAACACAAGTTTTTGTCTTGGACATCC
GCTCACCCGGACTTGGCGATGCGGCGATGTATCTCTGTGCGACATCAAGTAGTATAGCGGGGGATACGCGGAACA
ACGAACAATTTTTTGGTCCTGGAACCAGGCTTACGGTATTGgaggacctacgtaacgtgacctcccaagggtgtccctgttcgagc
ctagcaaggccgagatcgccaacaagcagaaggccacactcgtctgcctggctagaggcttcttccagaccacgtggagctgtcttggtgggtgaac
ggcaaggaggtgcactcaggagtgtctaccgacctcaggcctacaaggagagcaactacagctactgcctgtcctccagactcagggtctgcgcca
ccttttggcacaacctcggaaccacttccgctgtcaggtccagttccacggcctgtccgaggaagacaagtggccagagggctctcctaagccagt
acacagaacatcagcgccgaggcttggggaagagccgattgcggaatcaccagcgcttaccagcagggagtgtgtcagctaccatcctgtacg
agatcctgctgggcaaggccacactgtacgcagtgctggtgtccactctggctgtgatggctatggtgaagcggaagaacagc

(SEQ ID NO: 46)

【圖26】