



(21) 申請案號：108143260

(22) 申請日：中華民國 108 (2019) 年 11 月 27 日

(51) Int. Cl. : C07K14/705 (2006.01)

C07K16/08 (2006.01)

C12N5/00 (2006.01)

(30) 優先權：2018/11/27 美國

62/771,653

(71) 申請人：杜克大學 (美國) DUKE UNIVERSITY (US)

美國

(72) 發明人：王 小凡 WANG, XIAO-FAN (US)；亞歷山大 彼得 ALEXANDER, PETER

(US)；李啟靖 LI, QI-JING (CN)；王國萍 WANG, GUOPING (CN)

(74) 代理人：黃瑞賢

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：57 項 圖式數：7 共 78 頁

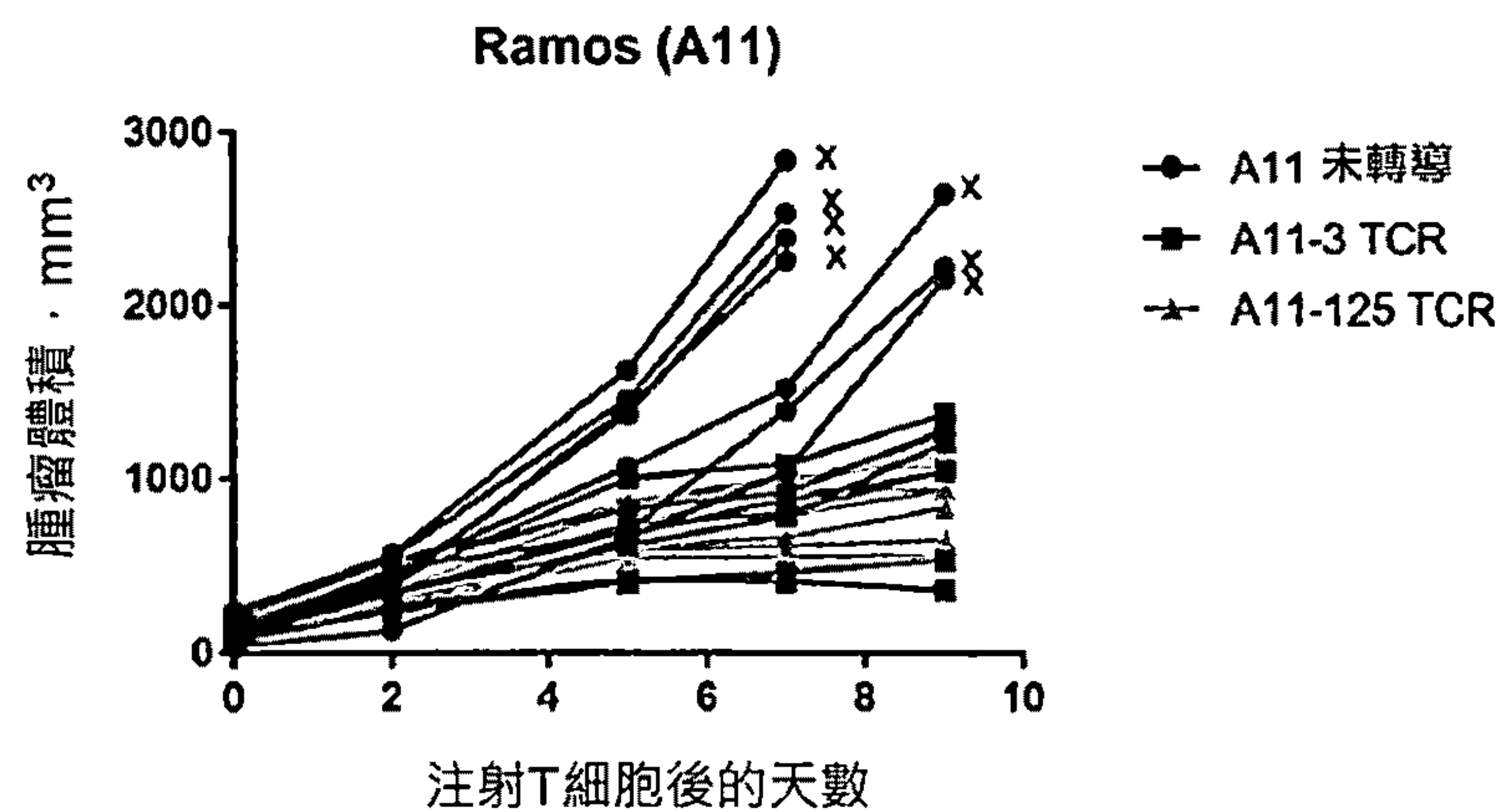
(54) 名稱

一種治療 EBV 相關性癌症之抗 LMP2 TCR-T 細胞療法

(57) 摘要

本發明提供一種包含抗 LMP2 之 TCR-T 細胞族群的組成物用於治療 EBV 相關性癌症，並且提供前述組成物之製備與使用方法。

指定代表圖：



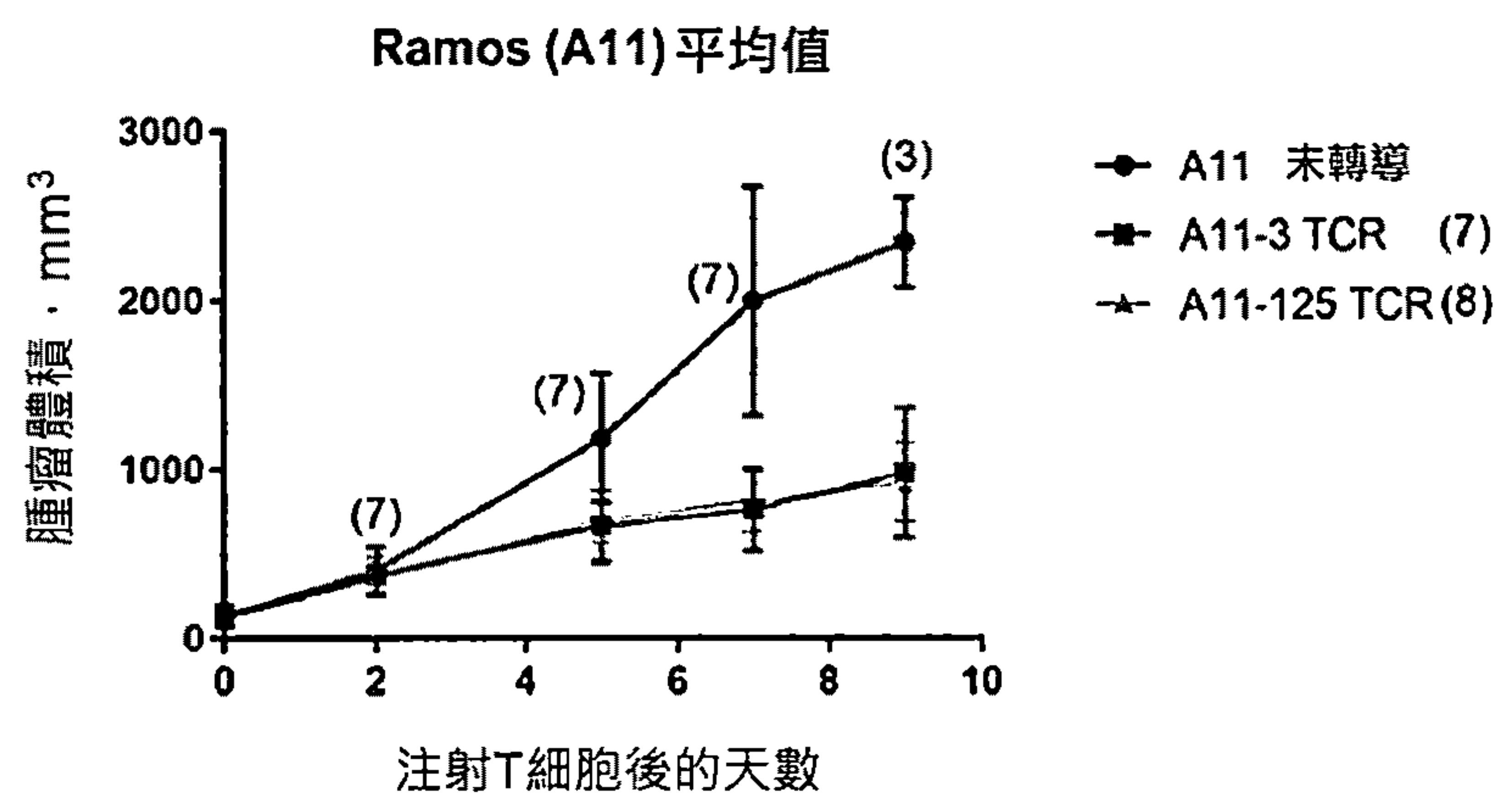


圖 4B

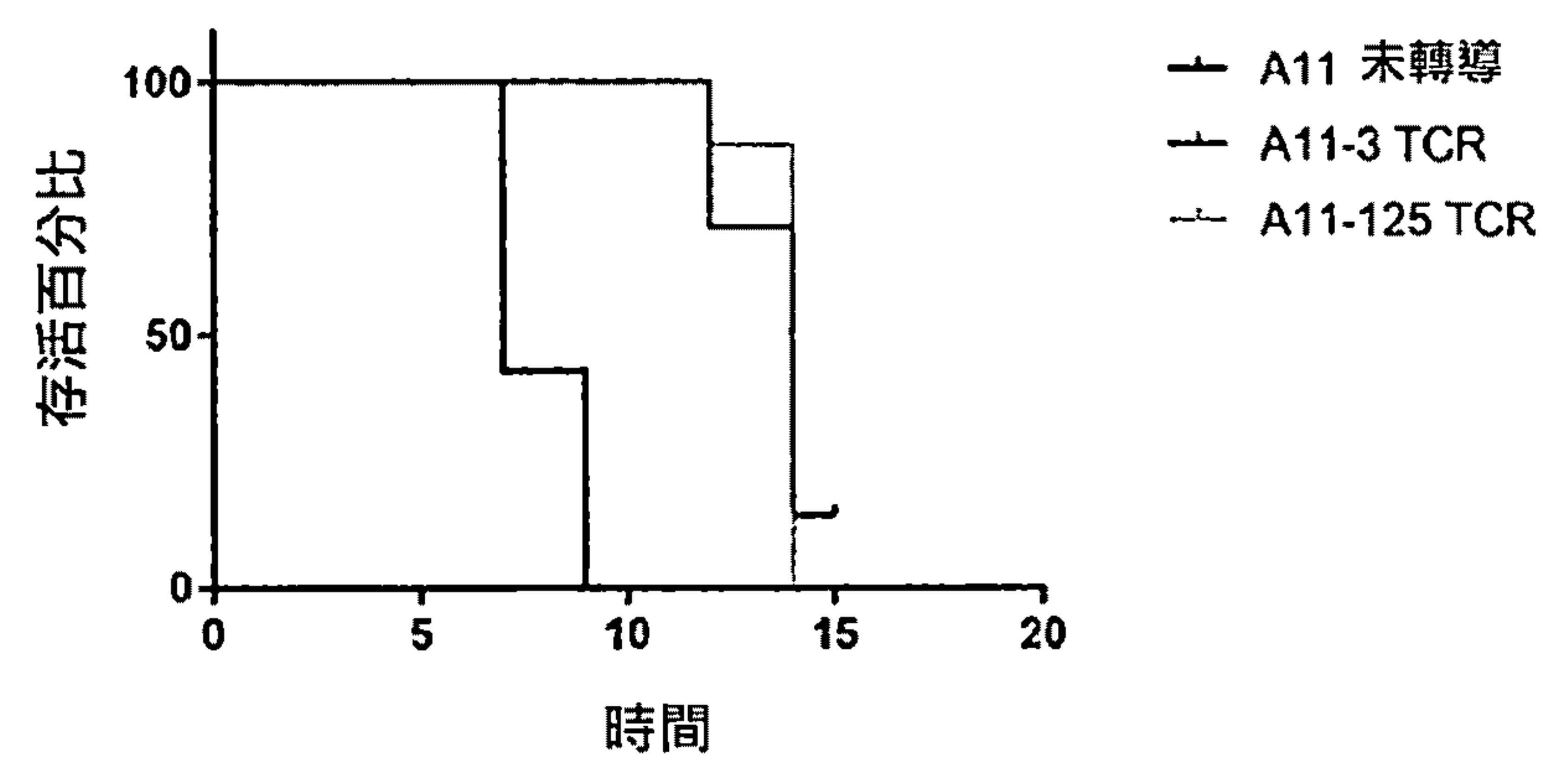


圖 4C

發明摘要

※ 申請案號：

※ 申請日：

※IPC 分類：

【發明名稱】(中文/英文)

一種治療EBV相關性癌症之抗LMP2 TCR-T細胞療法

【中文】

本發明提供一種包含抗 LMP2 之 TCR-T 細胞族群的組成物用於治療 EBV 相關性癌症，並且提供前述組成物之製備與使用方法。

【代表圖】

【本案指定代表圖】：圖4

【本代表圖之符號簡單說明】：無

發明專利說明書

(本說明書格式、順序，請勿任意更動)

【發明名稱】(中文/英文)

一種治療EBV相關性癌症之抗LMP2 TCR-T細胞療法

【技術領域】

【0001】 本發明提供治療癌症之方法。具體而言，本發明提供一種組成物，其包含具有工程 T 細胞受體(TCR)之 T 細胞，且前述 TCR 對潛伏膜蛋白 2(LMP2)具有專一性，並且提供前述組成物之製備與使用方法。本發明亦提供含有標靶 LMP2 抗原之 TCR 的組成物。

【先前技術】

【0002】 T 細胞受體工程化 T 細胞療法係一種過繼性 T 細胞免疫療法，其透過基因修飾 T 細胞以治療癌症。T 細胞受體工程化 T 細胞療法已顯示有希望治療實質固態瘤。鼻咽癌(NPC)係一種實質固態瘤，在中國南方及東南亞高度盛行，對於晚期疾病的治療方案非常少。儘管當前標準療法受限於非專一性毒性，然而 NPC 常與愛潑斯坦-巴爾病毒(Epstein-Barr virus, EBV)的感染相關，使其成為過繼性免疫療法之優異標靶。

【0003】 愛潑斯坦-巴爾病毒(EBV)潛伏膜蛋白 2(LMP2)係愛潑斯坦-巴爾病毒之病毒蛋白。前述 LMP2 抗原係 TCR T 細胞之潛在標靶，因此標靶清除包含 LMP2 抗原之細胞可能具有優異之抗腫瘤特性，並且對正常細胞的毒性有限。

【專利文獻】

【0004】 美國專利 6,080,840

【非專利文獻】

【0005】 Garboczi, D., Ghosh, P., Utz, U., Fan, Q., Biddison, W., & Wiley, D. (1996). Structure of the complex between human T-cell receptor, viral peptide and HLA-A2. *Nature*, 384(6605), 134-141.

【0006】 Garboczi, D., Utz, U., Ghosh, P., Seth, A., Kim, J., VanTienhoven, E., Biddison, W., & Wiley, D. (1996). Assembly, specific binding, and crystallization of a human TCR-alpha-beta with an antigenic Tax peptide from human T lymphotropic virus type 1 and the class I MHC molecule HLA-A2. *J Immunol*, 157(12), 5403-10.

【0007】 Chang, H., Bao, Z., Yao, Y., Tse, A., Goyarts, E., & Madsen, M. et al. (1994). A general method for facilitating heterodimeric pairing between two proteins: application to expression of alpha and beta T-cell receptor extracellular segments. *Proceedings Of The National Academy Of Sciences*, 91(24), 11408-11412.

【0008】 Davodeau, F., Houde, I., Boulot, G., Romagné, F., Necker, A., Canavo, N., Peyrat, M., Hallet, M., Vié, H., Jacques, Y., Mariuzz, R., & Bonneville, M. (1993). Secretion of disulfide-linked human T-cell receptor gamma delta heterodimers. *J Biol Chem*, 268(21): 15455-15460.

【0009】 Golden, A., Khandekar, S., Osburne, M., Kawasaki, E., Reinherz, E., & Grossman, T. (1997). High-level production of a secreted, heterodimeric $\alpha\beta$ murine T-cell receptor in *Escherichia coli*. *Journal Of*

Immunological Methods, 206(1-2), 163-169.

【0010】 Cartellieri, M., Koristka, S., Arndt, C., Feldmann, A., Stamova, S., & von Bonin, M. et al. (2014). A Novel *Ex Vivo* Isolation and Expansion Procedure for Chimeric Antigen Receptor Engrafted Human T Cells. *Plos ONE*, 9(4), e93745.

【0011】 Rosenberg, S., Packard, B., Aebersold, P., Solomon, D., Topalian, S., Toy, S., Simon, P., Lotze, M., Yang, J., Seipp, C., et al. (1988). Use of tumor-infiltrating lymphocytes and interleukin-2 in the immunotherapy of patients with metastatic melanoma. A preliminary report. *New Eng. J. of Med*, 319(25): 1676-80.

【0012】 Remington's Pharmaceutical Sciences, 18th Ed, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990

【0013】 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 21st Ed. Mack Publishing, 2005

【0014】 Maynard, *et al.* (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.

【0015】 Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK.

【0016】 Hardman, *et al.* (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.

【0017】 Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.

【0018】 Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and

Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.

【0019】 Hardman, *et al.* (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.

【0020】 Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.

【0021】 Avis, *et al.* (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY.

【0022】 Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY.

【0023】 Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY.

【0024】 Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.

【發明內容】

【0025】 本發明內容旨在介紹部分概念，其進一步記載於下述實施方式中。此發明內容不旨在鑑別申請標的之關鍵或必要之技術特徵，亦無意作為輔助限定申請標的之範圍的用途。

【發明所欲解決之技術問題】

【0026】 本發明提供一種包含抗 LMP2 之 TCR-T 細胞族群的組成物用於治療 EBV 相關性癌症，並且提供前述組成物之製備與使用方法。

【技術手段】

【0027】 在一態樣中，本發明提供一種 T 細胞族群，其特徵係其包含工程化 T 細胞受體(TCR)，前述工程化 TCR 對應於潛伏膜蛋白 2(LMP2) 抗原而活化 T 細胞。在部分實施型態中，前述工程化 TCR 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:03。在部分實施型態中，前述工程化 TCR 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:09。在部分實施型態中，前述 LMP2 抗原包含 SSCSSCPLSK (SEQ ID NO:01)序列。

【0028】 在部分實施型態中，前述 T 細胞族群包含治療有效量之細胞，且用於治療包含 LMP2 之癌症的受試者。在部分實施型態中，前述受試者表現人類白血球抗原亞型 A11(HLA-A11)。

【0029】 在部分實施型態中，至少一部分前述 T 細胞族群產生或具有潛力產生一或多種細胞激素。在部分實施型態中，前述一或多種細胞激素選自由以下組成之群組：IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、顆粒酶 A、顆粒酶 B、及 GM-CSF。

【0030】 在部分實施型態中，前述癌症選自由以下組成之群組：鼻咽癌(NPC)、淋巴癌、胃癌、肺癌、黑色素瘤、乳癌、前列腺癌、大腸癌、腎細胞癌、卵巢癌、神經母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、及白血病。在部分實施型態中，前述癌症係 EBV 相關性癌症。在部分實施型態中，前述癌症係鼻咽癌(NPC)。在部分實施型態中，前述癌症係淋巴癌。在部分實施型態中，前述癌症係胃癌。

【0031】 在另一態樣中，本發明提供一種醫藥組成物，其特徵係其包含本發明所記載之 T 細胞族群，及醫藥上可接受之載體。在部分實施型

態中，前述醫藥上可接受之載體維持治療有效量之細胞以治療包含 LMP2 的癌症。在部分實施型態中，前述醫藥組成物進一步包含至少一種治療劑。

【0032】 又在另一態樣中，本發明提供一種治療罹患包含 LMP2 之癌症的受試者的方法，其特徵係其包含對前述受試者施用治療有效量之本發明所記載之 T 細胞族群或本發明所記載之醫藥組成物，且前述施用誘導對癌症之抗腫瘤反應。在部分實施型態中，前述癌症選自由以下組成之群組：鼻咽癌(NPC)、淋巴癌、胃癌、肺癌、黑色素瘤、乳癌、前列腺癌、大腸癌、腎細胞癌、卵巢癌、神經母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、及白血病。在部分實施型態中，前述癌症係 EBV 相關性癌症。在部分實施型態中，前述癌症係鼻咽癌(NPC)。在部分實施型態中，前述癌症係淋巴癌。在部分實施型態中，前述癌症係胃癌。在部分實施型態中，前述抗腫瘤反應導致腫瘤體積減少至少 5%、至少 10%、至少 20%、至少 30%、至少 40%、至少 50%、至少 60%、至少 70%、至少 80%、至少 90%、或 100%。

【0033】 在另一態樣中，本發明提供一種分離的核酸，其特徵係其包含編碼工程化 TCR 的多核苷酸，且前述工程化 TCR 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:03。在部分實施型態中，前述多核苷酸包含核酸序列 SEQ ID NO:08。

【0034】 在另一態樣中，本發明提供一種分離的核酸，其特徵係其包含編碼工程化 TCR 的多核苷酸，且前述工程化 TCR 包含胺基酸序列 SEQ ID NO:09。在部分實施型態中，前述多核苷酸包含核酸序列 SEQ ID NO:14。

【0035】 又在另一態樣中，本發明提供一種載體，其特徵係其包含本發明所記載之核酸。在部分實施型態中，前述載體選自由以下組成之群組：質體、黏質體、人工染色體(例如酵母菌人工染色體(YAC)或細菌人工染色體(BAC))、及病毒(例如反轉錄病毒、慢病毒、腺病毒、腺相關病毒(AAV)、及疱疹病毒)。

【0036】 在一態樣中，本發明提供一種製備 T 細胞族群之方法，其特徵係其包含：(1)使用本發明所記載之分離的核酸或載體轉染或轉導分離的 T 細胞；以及(2)轉染或轉導後擴增 T 細胞，其係透過將前述 T 細胞在人工 APCs 呈遞的抗 CD3、抗 CD3/抗 CD28¹、或 LMP 蛋白的存在下培養。在部分實施型態中，前述分離的 T 細胞係從人類分離。在部分實施型態中，前述人類係罹患包含 LMP2 之癌症的受試者。在部分實施型態中，前述罹患包含 LMP2 之癌症的受試者表現人類白血球抗原亞型 A11(HLA-A11)。

【0037】 在另一態樣中，本發明提供一種抑制有需求之病人的包含潛伏膜蛋白 2 (LMP2)抗原之腫瘤生長的方法，其特徵係其包含對前述病人施用治療有效量之包含工程化 T 細胞受體(TCR)的 T 細胞族群，前述工程化 TCR 具有一具有 SEQ ID NO:4 或 SEQ ID NO:10 序列之 TCR α 鏈，及一具有 SEQ ID NO:6 或 SEQ ID NO:12 序列之 TCR β 鏈，且前述方法抑制前述包含 LMP2 抗原之腫瘤的生長。在部分實施型態中，前述腫瘤包含人類白血球抗原亞型 A11(HLA-A11)。在部分實施型態中，前述腫瘤源自 EBV 相關性癌症。在部分實施型態中，前述癌症係鼻咽癌、淋巴癌、或胃癌。

【0038】 在部分實施型態中，前述工程化 TCR 包含 SEQ ID NO: 4 的 TCR α 鏈，以及 SEQ ID NO:6 的 TCR β 鏈。在部分實施型態中，前述 TCR α 鏈包含具有序列 AVVNNNDMRFG (SEQ ID NO:5)的 CDR3 α ，以及前述 TCR β 鏈包含具有序列 ASSPGRWYEQF (SEQ ID NO:7)的 CDR3 β 。

【0039】 在部分實施型態中，前述工程化 TCR 包含 SEQ ID NO:10 的 TCR α 鏈，以及 SEQ ID NO:12 的 TCR β 鏈。在部分實施型態中，前述 TCR α 鏈包含具有序列 AVLNNNDMRFG (SEQ ID NO:11)的 CDR3 α ，以及前述 TCR β 鏈包含具有序列 ASSQGRWYEAF (SEQ ID NO:13)的 CDR3 β 。

【0040】 又在另一態樣中，本發明提供一種工程化 T 細胞受體 (TCR)，其特徵係其包含與 SEQ ID NO:03 所示序列具有至少 90%序列一致性的胺基酸。在部分實施型態中，前述 TCR 包含 SEQ ID NO: 4 的 TCR α 鏈，以及 SEQ ID NO:6 的 TCR β 鏈。在部分實施型態中，前述 TCR α 鏈包含具有序列 AVVNNNDMRFG (SEQ ID NO:5)的 CDR3 α ，以及前述 TCR β 鏈包含具有序列 ASSPGRWYEQF (SEQ ID NO:7)的 CDR3 β 。

【0041】 又在另一態樣中，本發明提供一種工程化 T 細胞受體 (TCR)，其特徵係其包含與 SEQ ID NO:09 所示序列具有至少 90%序列一致性的胺基酸。在部分實施型態中，前述 TCR 包含 SEQ ID NO:10 的 TCR α 鏈，以及 SEQ ID NO:12 的 TCR β 鏈。在部分實施型態中，前述 TCR α 鏈包含具有序列 AVLNNNDMRFG (SEQ ID NO:11)的 CDR3 α ，以及前述 TCR β 鏈包含具有序列 ASSQGRWYEAF (SEQ ID NO:13)的 CDR3 β 。

【0042】 在部分實施型態中，本發明所記載之工程化 TCR 與 LMP2

抗原專一性結合。在部分實施型態中，前述 LMP2 抗原包含 SSCSSCPLSK (SEQ ID NO:1)。

【0043】 在一態樣中，本發明提供一種醫藥組成物，其特徵係其包含表現本發明所記載之工程化 TCR 的 T 細胞族群，以及醫藥上可接受之載體。

【0044】 在另一態樣中，本發明提供一種誘導罹患包含 LMP2 之癌症的受試者的 T 細胞反應的方法，其特徵係其包含對前述受試者施用治療有效量之本發明所記載之包含工程化 TCR 的 T 細胞族群或本發明所記載之醫藥組成物，且前述施用誘導對癌症之抗腫瘤反應。在部分實施型態中，前述癌症選自由以下組成之群組：鼻咽癌(NPC)、淋巴癌、胃癌、肺癌、黑色素瘤、乳癌、前列腺癌、大腸癌、腎細胞癌、卵巢癌、神經母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、及白血病。在部分實施型態中，前述癌症係 EBV 相關性癌症。在部分實施型態中，前述癌症係鼻咽癌(NPC)。在部分實施型態中，前述癌症係淋巴癌。在部分實施型態中，前述癌症係胃癌。

【0045】 本發明另一態樣提供本發明所記載及說明之所有內容。

【發明之效果】

【0046】 TCR T 細胞療法係一種治療方式，透過分離 T 細胞並對其進行修飾，使得修飾的 T 細胞攻擊癌細胞。分離出的 T 細胞被工程化成表現專一性辨識病人癌細胞上 LMP2 之 TCR。大量 TCR T 細胞培養於實驗室，並且通常透過輸注(infusion)給予病人。本發明已透過抗原專一性重新導向 T 細胞實施次世代免疫細胞療法，從而縮短產生可用於免疫療法之 T

細胞族群所需的時間。

【圖式簡單說明】

【0047】 結合圖式，透過以下描述對前述態樣及本發明之其他技術特徵進行說明。

【0048】

【圖 1(A-B)】 流式細胞儀分析之結果，顯示候選 LMP2-A11 TCR 的表現及活性。(A)將候選 TCR 序列選殖至反轉錄病毒載體，並轉導至 Jurkat 細胞，圖中標示 TCRb 陽性細胞的百分比。(B)將圖 1A 之 Jurkat 細胞株與工程化表現 HLA-A11-LMP2 胜肽連接子之 Ramos 淋巴癌細胞共培養。透過測定 CD69 的表現定量活化的 T 細胞。標示 TCR-NPC-A11-03 之 TCR 係 LMP2 專一性。

【圖 2(A-B)】 流式細胞儀分析之結果，顯示候選 LMP2-A11 TCR 的表現及活性。(A) 將候選 TCR 序列選殖至反轉錄病毒載體，並轉導至 Jurkat 細胞，圖中標示 TCRb 陽性細胞的百分比。(B)將圖 1A 之 Jurkat 細胞株與工程化表現 HLA-A11-LMP2 胜肽連接子之 Ramos 淋巴癌細胞共培養。透過測定 CD69 的表現定量活化的 T 細胞。標示 TCR-NPC-A11-125 之 TCR 係 LMP2 專一性。

【圖 3(A-B)】 顯示 LMP2-A11 TCR-T 細胞的體外抗腫瘤活性。工程化表現(A)TCR-NPC-A11-03 或(B)TCR-NPC-A11-125 之 PBMC 與混合的 Ramos 細胞族群共培養，前述 Ramos 細胞族群表現與 HLA-A11 或 HLA-A24 相連之 LMP2 胜肽。競爭性毒殺百分比計算為 $(1-A11:A24) \times 100$ 。

【圖 4(A-C)】顯示 LMP2-A11 TCR-T 細胞的體內抗腫瘤活性。NSG 小鼠皮下接種 Ramos (A11) 淋巴癌細胞(5×10^6)。13 天後，如圖所示透過尾靜脈注射 1×10^7 顆 TCR 陽性 TCR-NPC-A11-03 或 TCR-NPC-A11-125 TCR-T 細胞。監控腫瘤體積，並且以(A)個別小鼠或(B)平均值繪圖。各組動物存活期曲線如圖 C 所示。

【圖 5(A-E)】顯示首例非人類 Ad5f35-LMP1-2 腺病毒載體轉導之 DC 疫苗試驗之(A)示意圖及(B)Kaplan-Meier 存活分析。在 16 名接受治療的晚期 NPC 病人當中，DC 疫苗療法使兩名病人(12.5%)的疾病穩定期超過 18 週，並且一名病人獲得部分緩解。(C-E)顯示對應 EBV 而擴增的 T 細胞療法試驗之(C)示意圖、(D)病人樣本採集流程、及(D)Kaplan-Meier 存活分析。根據本發明一實施型態，此針對晚期 NPC 的第二期臨床試驗中，結合化學療法與過繼性 EBV 專一性 T 細胞免疫療法，可達成 71.4% 的反應率，其中 3 個完全緩解以及 22 個部分緩解。

【圖 6(A-B)】顯示用於分析腫瘤抗原特異性 TCR 之實驗及電腦計算平台的示意圖。(A)經腫瘤抗原刺激增生後，分裝病人的 PBMC 進行直接組庫定序或 TCR 分析。對前述兩組數據集進行模體(Motif)分析，該分析基於其模體相似度將 TCR 無偏差群集。藉此方法，即使 TCR 序列相異，辨識未刺激庫中待測的腫瘤抗原的 TCR，亦可連接至具有已知腫瘤抗原專一性的 TCR。(B)量化腫瘤抗原專一性 TCR 之多樣性及頻率，前述 TCR 源自具有共同的模體之特定群集。透過前述流程以及從 BMS CheckMate 143 試驗收集的縱向樣本，監控以抗 PD-1 或抗 PD-1 加上抗 CTLA4 治療之膠質母細胞瘤病人其 T 細胞選殖擴增的動態。EGFR 表位代表腫瘤相關抗

原，CMV pp65 表位代表外源抗原。

【圖 7(A-D)】顯示 PEPCMV-HLA-A2 專一性 TCR 選殖與 TCR-T 驗證之圖式及流式細胞儀分析結果。進行單一 T 細胞 RNASeq，選殖可辨認 HLA-A2 供體呈遞之 CMVpp65 表位的 TCR。(A)選殖之 TCR α 與 β 鏈的 V 區使用。(B)透過反轉錄病毒轉導產生之人類 TCR-T 細胞。(C) CMVpp65-TCR-T 細胞的抗原專一性活化。左圖，未刺激；右圖，抗原刺激。CD107 作為抗原誘導去顆粒作用的標記，其係為 T 細胞介導細胞溶解的關鍵步驟。(D)A2-P8-036 TCR-T 的抗原專一性毒殺。小鼠 OT-1 轉基因 T 細胞作為正對照組；不具 CMVpp65 胜肽抗原的目標細胞作為負對照組。

【實施方式】

【0049】 為了提升對本發明原理的理解，將提供較佳實施型態作為參考，並使用特定用語描述。然而，應理解其無意限定本發明之範圍，可預期本發明所屬技術領域中具有通常知識者可思及對於本發明所記載之內容進行改變及進一步修改。

【0050】 本發明所使用之冠詞「一」及「一個」係指該冠詞之語法受詞中的一或一個以上(即至少一個)。例如，「一元件」係指至少一個元件，並且可包含一個以上的元件。

【0051】 「大約」用於提供數值範圍端點的彈性，其定值可能「略高」或「略低」於端點，而不影響欲求結果。

【0052】 整份說明書中，除非另有要求，「包含」及「包括」之詞及

其變化(如「包含」、「含有」、「包括」、「具有」)應被理解為暗指所述之組成、特徵、元件，或組成組、特徵組、元件組或步驟組之步驟或群組，惟不排除任何其他整數，或整數組或步驟組之步驟或群組。實施型態敘述「包括」、「包含」或「具有」部分元件，亦預期係「基本上由此等元件組成」及「由此等元件組成」。

【0053】 除非另外指出，否則本發明所述數值範圍僅作為分別代指落入該範圍之各單獨數值之簡寫方法，並且各單獨數值被併入說明書中，就如同其於本發明中所單獨敘述一樣。例如，若濃度範圍記載為1%至50%，則意圖在本說明書中明確列舉諸如2%至40%、10%至30%或1%至3%等數值。此等數值僅為具體意圖之例示，並且所列舉之介於最小值與最大值之間並且包含最小值與最大值之數值的所有可能組合，應被認為在本發明中明確記載。

【0054】 除非另有定義，否則本發明所有技術用語與所屬技術領域中具有通常知識者通常理解之含意相同。

【名詞定義】

【0055】 本發明「治療」、「治療方案」、「療法」、及/或「治療計畫」之用語，係指對應於病人表現或病人可能易感之疾病、失調或生理病症而做出的臨床干預介入。治療之目的包含緩和或預防症狀，減緩或停止疾病、失調或病症之進展或惡化，及/或緩解疾病、失調或病症。

【0056】 「有效量」或「治療有效量」係指該量足以產生有益或期望之生物及/或臨床結果。「有效量」或「治療有效量」可由健康專業人員

技術團隊認定，並且可包含使用成像檢查、生物標記檢查、或額外檢查。關於癌症，施用治療有效量可預防癌症轉移，導致實質固態瘤之大小或質量減少，或抑制癌症之增生或生長，或造成腫瘤壞死。

【0057】 本發明「疾病」之用語，包含但不限於影響部分生物體之結構或功能的任何異常病症及/或失調。其可能係由外部因素(如傳染病)或內部功能異常(如癌症、癌症轉移)等所造成。

【0058】 如所屬技術領域中已知，癌症通常被認為係不受控制之細胞生長。本發明之組成物及方法可被用於治療表現 LMP2 之任何癌症、及前述癌症之任何轉移。實施例包含但不限於鼻咽癌(NPC)、淋巴癌、胃癌、肺癌、黑色素瘤、乳癌、前列腺癌、大腸癌、腎細胞癌、卵巢癌、神經母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、及白血病。在部分實施型態中，前述癌症係鼻咽癌。在部分實施型態中，前述癌症係淋巴癌。在部分實施型態中，前述癌症係胃癌。在部分實施型態中，前述癌症係 EBV 相關性癌症或 EBV 陽性癌症，例如 EBV 陽性霍奇金氏淋巴瘤(Hodgkin's Lymphoma)、EBV 陽性伯基特淋巴瘤(Burkitt Lymphoma)、EBV 陽性鼻咽癌、或 EBV 陽性胃癌。

【0059】 淋巴癌(NPC)係與遺傳及環境因子相關之多因性惡性腫瘤(例如已牽涉到愛潑斯坦-巴爾病毒)。病毒的影響與愛潑斯坦-巴爾病毒之感染相關(EBV；亦稱為人類疱疹病毒第四型)，並且 EBV 係最常見的病毒之一(例如，全美國約 95%的人在 30 至 40 歲時暴露於此病毒之中)。東南亞人特別係廣東華裔人中 NPC 的發病率高，因此顯示遺傳因素強烈影響此疾病進展之感病性。在高發病地區，NPC 聚集於家庭中，此顯示地理及遺傳因素皆可能影響疾病風險。NPC 可透過手術、化學療法、或放射線療法

治療。放射線療法有多種形式，包含三維順形放射治療(3D conformal radiation therapy)、強度調控放射治療(intensity-modulated radiation therapy)、粒子束療法及近距離治療(brachytherapy)，其常用於治療頭頸癌。本發明揭露在未分化之鼻咽癌中表現 EBV 潛伏蛋白有潛力開發為基於免疫的療法。

【0060】 本發明「受試者」及「病人」之用語，在本發明中可互換使用，並且係指人類及非人類動物。本發明「非人類動物」包含所有脊椎動物，如哺乳類動物及非哺乳類動物，例如非人類靈長類動物、綿羊、狗、貓、馬、牛、雞、兩棲類動物、爬蟲類動物等。在部分實施型態中，受試者係疑似患有癌症、患有癌症、或罹患癌症之人類病人。在一實施型態中，前述人類係疑似患有包含 LMP2 之癌症的受試者。在另一實施型態中，前述人類係患有包含 LMP2 之癌症的受試者。又另一實施型態中，前述人類係罹患包含 LMP2 之癌症的受試者。在部分實施型態中，前述受試者係罹患 LMP2 相關癌症之人類。在部分實施型態中，前述受試者係罹患 EBV 相關性癌症之人類。在部分實施型態中，前述病人係陽性 EBV 血清。在部分實施型態中，前述 LMP2 抗原與具有人類白血球抗原亞型 A11(HLA-A11)之 MHC1 類分子複合。

【0061】 本發明「潛伏膜蛋白 2」及「LMP2」之用語，係指 EBV 抗原潛伏膜蛋白 2(LMP2)。在多種 EBV 相關性癌症中會表現 LMP2。在部分實施型態中，前述 LMP2 抗原與具有人類白血球抗原亞型 A11(HLA-A11)之 MHC1 類分子複合。LMP2 可存在兩種異構物(isoform)，LMP2A 或 LMP2B。LMP2A 係具有三個結構域之 EBV 編碼蛋白：(a)N 端細胞質

結構域，其具有 PY 模體(motif)與一 ITAM，前述 PY 模體與含 WW 結構域之 E3 泛素連接酶結合，前述 ITAM 與含 SH2 結構域之蛋白結合；(b)具有 12 個跨膜區段(transmembrane segment)之跨膜結構域，使 LMP2A 位於細胞膜中；以及(c)27 個胺基酸的 C 端結構域，調控 LMP2 蛋白異構物之同源二聚作用(homodimerization)與異源二聚作用(heterodimerization)。不同於 LMP2A，LMP2B 不含細胞質訊息傳遞結構域之 N 端的 1~119 個胺基酸。在部分實施型態中，前述 LMP2 抗原可以係源自胺基酸序列 SEQ ID NO:02 之片段。在部分實施型態中，前述 LMP2 抗原可以係 SSCSSCPLSK (SEQ ID NO:01)。

>sp|P13285|LMP2_EBVB9 潛伏膜蛋白 2

MGSLEMVPMGAGPPSPGGDPDGYDGGNNSQYPSASGSSGNTPTPPNDEERESNEEPP
 PPYEDPYWGNDRHSDYQPLGTQDQSLYLGLQHDGNDGLPPPPYSPRDDSSQHIYEE
 AGRGSMNPVCLPVIVAPYLFWLAAIAASCFTASVSTVVTATGLALSLLLLAAVASSY
 AAAQRKLLTPVTVLTAVVTFFAICLTWRIEDPPFNSELLFALLAAAGGLQGIYVLVML
 VLLILAYRRRWRRLTVCGGIMFLACVLVLIIVDAVLQLSPLLGAVTVVSMTLLLLAFV
 LWLSSPGGLGTLGAALLTLAAALALLASLILGTLNLTTMFLMLLWTLVVLLICSSC
SSCPLSKILLARLFLYALALLLLASALIAGGSILQTNFKSLSSSTEFIPNLFCMLLLI
 VAGILFILAILTEWGSNRTYGPVFMCLGGLLTMVAGAVWLTVMSTLLSAWILTAG
 FLIFLIGFALFGVIRCCRYCCYYCLTLESEERPPTPYRNTV (SEQ ID NO:02)

【0062】 「T 細胞受體」或「TCR」或「工程化 TCR」係指發現於 T 細胞表面的分子，其負責辨認抗原呈遞細胞(APC)表面呈現之抗原。各個 T 細胞皆表現一個獨特的 TCR，其透過基因隨機分配產生，確保 T 細胞可對幾乎任何感染做出反應。TCR 亦可從細胞內部辨認腫瘤特異性蛋白

(抗原)。當腫瘤特異性蛋白(即 LMP2)被分解成片段時，會與主要組織相容性複合體(MHC)一同出現於細胞表面。MHC1 類分子呈現源自細胞內蛋白之胜肽抗原。TCR 可被工程化以辨認腫瘤特異性蛋白片段/MHC 複合體。在部分實施型態中，前述 LMP2 抗原與具有人類白血球抗原亞型 A11(HLA-A11)之 MHC1 類分子複合。TCR 結構由兩種不同蛋白鏈組成，包含 α 鏈以及 β 鏈。在部分實施型態中，相較於天然序列，前述 TCR 可具有一或多個胺基酸替換、剔除、插入、或修飾，只要前述 TCR 在轉染的 T 細胞保持其形成 TCR 的能力並維持辨認 LMP2 抗原之能力，並且參與與免疫相關之細胞激素的訊號傳遞。前述工程化 TCR 較佳亦與呈現相關腫瘤相關胜肽之標靶細胞以高親和力結合，並且選擇性地調控呈遞相關抗原(LMP2)之標靶細胞之毒殺效能。異源二聚體 TCR 蛋白通常由高度易變之 α 鏈與 β 鏈組成，並且表現為與恆定的 CD3 鏈分子形成之複合體的一部分。TCR α 鏈與 β 鏈之可變結構域皆各具有三個高度易變或互補性決定區(CDR)。在一實施型態中，前述 TCR 包含 TCR-NPC-A11-003。在另一實施型態中，前述 TCR 包含 TCR-NPC-A11-125。

TCR A11-003 序列:

TCR A11-003 胺基酸 (SEQ ID NO:03)

MKRILGALLGLLSAQVCCVRGIQVEQSPPDLILQEGANSTLRCNFSDSVNNLQWFHQ
 NPWGQLINLFYIPSGTKQNGRLSATTVATERYSLLYISSSQTTDSGVYFCVVNNND
 MRFGAGTRLTVKPDIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFI
 TDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNACYSSDVPCDATLTEKSFE
 TDMNLFQNL SVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRGSGATNFSLLKQAGDVE
 ENPGPMGCRLCCAVLCLLGAVPIDTEVTQTPKHLVMGMTNKKSLKCEQHMGHRAMY

WYKQKAKKPPPELMFVYSYEKLSINESVPSRFSPECPNSSLNLHLHALQPEDSALYL
CASSPGRWYEQFFGPGTRLTVL

TCR A11-003 可變區 α 鏈氨基酸 (SEQ ID NO:04)

MKRILGALLGLLSAQVCCVRGIQVEQSPPDLILQEGANSTLR CNFSDSVNNLQWFHQ
NPWGQLINLFYIPSGTKQNGRLSATTVATERYSLLYISSSQTTDSGVYFCAVVNNND
MRFGAGTRLTVKP

TCR A11-003 可變區 CDR3 α 鏈氨基酸 (SEQ ID NO:05)

AVVNNNDMRFG

TCR A11-003 可變區 β 鏈氨基酸 (SEQ ID NO:06)

MGCRLCCAVLCLLGAVPIDTEVTQTPKHLVGMTNKKSLKCEQHMGHRAMYWYKQK
AKKPPPELMFVYSYEKLSINESVPSRFSPECPNSSLNLHLHALQPEDSALYLCASSP
GRWYEQFFGPGTRLTVL

TCR A11-003 可變區 CDR3 β 鏈氨基酸 (SEQ ID NO:07)

ASSPGRWYEQF

TCR A11-003 核酸 (SEQ ID NO:08)

ATGAAGAGAATCCTGGGCGCTCTGCTGGGACTGCTGTCTGCTCAAGTGTGCTGTGTG
CGGGGCATCCAGGTGGAACAAAGCCCTCCTGACCTGATCCTGCAAGAGGGCGCCAAT
AGCACCTGCGGTGCAACTTTAGCGACAGCGTGAACAACCTGCAGTGGTTCCACCAG
AATCCTTGGGGCCAGCTGATCAACCTGTTCTACATCCCCAGCGGCACCAAGCAGAAC
GGCAGACTGTCTGCTACCACCGTGGCCACCGAGAGATAACAGCCTGCTGTACATCAGC
AGCAGCCAGACCACAGACAGCGGCGTGTACTTTTGCGCCGTGGTCAACAACAACGAC
ATGAGATTCGGAGCCGGCACCAGACTGACCGTGAAGCCCGATATCCAGAATCCAGAG
CCTGCCGTGTACCAGCTGAAGGACCCTAGAAGCCAGGACAGCACCTGTGCCTGTTC
ACCGACTTCGACAGCCAGATCAACGTGCCCAAGACCATGGAAAGCGGCACCTTCATC

ACCGACAAGACCGTGCTGGACATGAAGGCCATGGACAGCAAGAGCAACGGCGCCATT
 GCCTGGTCCAACCAGACCAGCTTCACATGCCAGGACATCTTCAAAGAGACAAACGCC
 TGCTATCCCAGCAGCGACGTGCCCTGTGATGCCACACTGACCGAGAAGTCCTTCGAG
 ACAGACATGAACCTGAACTTCCAGAACCTGAGCGTGATGGGCCTGCGCATCCTGCTG
 CTTAAAGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCCTGAGACTGTGGTCCAGCAGGGCC
 AAGAGAGGAAGCGGCGCCACAACTTTAGCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGGAA
 GAAAACCCTGGACCTATGGGCTGCAGACTGCTGTGTTGTGCCGTGCTGTGTCTGCTG
 GCGCCGTGCCTATTGACACCGAAGTGACCCAGACACCTAAGCACCTGGTCATGGGC
 ATGACAAACAAGAAAAGCCTGAAGTGCGAGCAGCACATGGGCCACAGAGCCATGTAC
 TGGTACAAGCAGAAGGCCAAGAAACCTCCAGAGCTGATGTTTCGTGTACAGCTACGAG
 AAGCTGAGCATCAACGAGAGCGTGCCAGCAGGTTTCAGCCCTGAGTGTCTAATAGC
 TCCCTGCTGAATCTGCATCTGCACGCCCTGCAGCCTGAGGATTCTGCCCTGTACCTG
 TGTGCCAGCTCTCCCGGACGTTGGTACGAGCAGTTTTTTCGGCCCTGGCACACGGCTG
 ACAGTTCTG

TCR A11-125 序列:

TCR A11-125 氨基酸 (SEQ ID NO:09)

MKRILGALLGLLSAQVCCVRGIQVEQSPPDLILQEGANSTLRCNFSDSVNNLQWFHQ
 NPWGQLINLFYIPSGTKQNGRLSATTVATERYSLLYISSSQTTDSGVYFCAVLNNND
 MRFGAGTRLTVKPDIQNPEPAVYQLKDPRSQDSTLCLFTDFDSQINVPKTMESGTFI
 TDKTVLDMKAMDSKSNGAIAWSNQTSTFCQDIFKETNACYPSSDVPCDATLTEKSFE
 TDMNLNLFQNL SVMGLRILLKLVAGFNLLMTLRLWSSRAKRGSGATNFSLLKQAGDVE
 ENPGPMGCRLLC CAVLCLLGAVPIDTEVTQTPKHLVMGMTNKKSLKCEQHMGRAMY
 WYKQKAKKPELMFVYSYEKLSINESVPSRFSPEC PNSLLNLHLHALQPEDSALYL
 CASSQGRWYEAFFGQGTRLTVV

TCR A11-125 可變區 α 鏈氨基酸 (SEQ ID NO:10)

MKRILGALLGLLSAQVCCVRGIQVEQSPPDLILQEGANSTLRCNFSDSVNNLQWFHQ
 NPWGQLINLFYIPSGTKQNGRLSATTVATERYSLLYISSSQTTDSGVYFCAVLNNND

MRFGAGTRLTVKP

TCR A11-125 可變區 CDR3 α 鏈氨基酸 (SEQ ID NO:11)

AVLNNNDMRFG

TCR A11-125 可變區 β 鏈氨基酸 (SEQ ID NO:12)

MGCRLLC~~CA~~VLC~~LL~~GAVPIDTEVTQTPKHLV~~MG~~MTNKKSLKCEQHMGHRAMYWYKQK
AKKPP~~EL~~MFVYSYEKLSINESVPSRFSPEC~~PNS~~SL~~LN~~LHLHALQPEDSALYLCASSQ
GRWYEAF~~FG~~QGTRLTVV

TCR A11-125 可變區 CDR3 β 鏈氨基酸 (SEQ ID NO:13)

ASSQGRWYEF

TCR A11-125 核酸 (SEQ ID NO:14)

ATGAAGAGAATCCTGGGCGCTCTGCTGGGACTGCTGTCTGCTCAAGTGTGCTGTGTG
CGGGGCATCCAGGTGGAACAGTCTCCACCAGACCTGATCCTGCAAGAGGGCGCCAAT
AGCACCTGCGGTGCAACTTTAGCGACAGCGTGAACAACCTGCAGTGGTTCCACCAG
AATCCTTGGGGCCAGCTGATCAACCTGTTCTACATCCCCAGCGGCACCAAGCAGAAC
GGCAGACTGTCTGCTACCACCGTGGCCACCGAGAGATAACAGCCTGCTGTACATCAGC
AGCAGCCAGACCACAGACAGCGGCGTGTACTTTTGCGCCGTGCTGAACAACAACGAC
ATGAGATTCGGAGCCGGCACCAGACTGACCGTGAAGCCGATATCCAGAATCCAGAG
CCTGCCGTGTACCAGCTGAAGGACCCTAGAAGCCAGGACAGCACCTGTGCCTGTTC
ACCGACTTCGACAGCCAGATCAACGTGCCAAGACCATGGAAAGCGGCACCTTCATC
ACCGACAAGACCGTGCTGGACATGAAGGCCATGGACAGCAAGAGCAACGGCGCCATT
GCCTGGTCCAACCAGACCAGCTTCACATGCCAGGACATCTTCAAAGAGACAAACGCC
TGCTATCCCAGCAGCGACGTGCCCTGTGATGCCACACTGACCGAGAAGTCCTTCGAG
ACAGACATGAACCTGAACTTCCAGAACCTGAGCGTGATGGGCCTGCGCATCCTGCTG
CTTAAAGTGGCCGGCTTCAACCTGCTGATGACCTGAGACTGTGGTCCAGCAGGGCC
AAGAGAGGAAGCGGCGCCACAACTTTAGCCTGCTGAAACAGGCCGGCGACGTGGAA

GAAAACCCTGGACCTATGGGCTGCAGACTGCTGTGTTGTGCCGTGCTGTGTCTGCTG
GGCGCCGTGCCTATTGACACCGAAGTGACCCAGACACCTAAGCACCTGGTCATGGGC
ATGACAAACAAGAAAAGCCTGAAGTGCGAGCAGCACATGGGCCACAGAGCCATGTAC
TGGTACAAGCAGAAGGCCAAGAAACCTCCTGAGCTGATGTTTCGTGTACAGCTACGAG
AAGCTGAGCATCAACGAGAGCGTGCCAGCAGGTTTCAGCCCTGAGTGTCTAATAGC
TCCCTGCTGAATCTGCATCTGCACGCCCTGCAGCCTGAGGATTCTGCCCTGTATCTG
TGCGCCAGCTCTCAAGGACGTTGGTACGAGGCCTTCTTCGGCCAAGGCACAAGGCTG
ACAGTGGTG

【0063】 本發明「TCR-T 細胞」之用語係指透過分子生物學方法篩選、分離及/或表徵之 T 細胞或 T 細胞族群，以表現本發明所記載之工程化 T 細胞受體，使前述 TCR-T 細胞能夠對應於目標抗原而被活化。在部分實施型態中，前述 T 細胞族群包含外周血單個核細胞(PBMC)，PBMC 係具有圓形細胞核之任何外周血細胞。PBMC 可包含淋巴細胞(T 細胞、B 細胞、NK 細胞)、單核細胞、及粒細胞(嗜中性球、嗜鹼性球、及嗜酸性球)。在人類中，PBMC 族群大部分由淋巴細胞構成，單核細胞其次，以及很小一部分的樹突狀細胞。在部分實施型態中，前述 T 細胞族群係分離自 PBMC。在部分實施型態中，可於任何含有 TCR 的細胞上修飾 TCR，前述細胞包含例如輔助 T 細胞、細胞毒性 T 細胞、記憶 T 細胞、調節 T 細胞、自然殺傷 T 細胞、及 $\gamma\delta$ T 細胞。在部分實施型態中，前述 T 細胞受體包含能夠對應 LMP2 抗原而活化的序列。在部分實施型態中，前述 TCR 包含 TCR-NPC-A11-003。在另一實施型態中，前述 TCR 包含 TCR-NPC-A11-125。用於工程化及表現 T 細胞受體的技術，包含產生 TCR 異源二聚體，前述 TCR 異源二聚體包含連接各個亞基的天然雙硫鍵(Garboczi *et al.*, 1996; Garboczi, *et al.*, 1996; Chang *et al.*, 1994; Davodeau *et al.*, 1993; Golden *et al.*, 1997)(美國專利 6,080,840)，但不限於此等技術。

【0064】 本發明「抗原」或「Ag」之用語定義為引起免疫反應之分子。前述免疫反應可能關於產生抗體、或活化專一性免疫機能健全之細胞、或前述兩者。所屬技術領域中具有通常知識者應理解任何大分子，包含幾乎所有蛋白或胜肽，皆可作為抗原。此外，所屬技術領域中具有通常知識者應理解抗原不必僅由基因的全長核苷酸序列編碼。顯而易見地，抗原可透過合成產生或可源自生物樣本。前述生物樣本可包含但不限於組織樣本、腫瘤樣本、細胞或生物流體。在部分實施型態中，前述目標抗原包含 LMP2 蛋白的片段(SEQ ID NO:2)。在部分實施型態中，前述目標抗原包含 SSCSSCPLSK (SEQ ID NO:1)。

【0065】 本發明「專一性結合」或「選擇性結合」之用語，當係指抗體/抗原、TCR/表位、配體/受體、核酸/互補核酸、或其他結合對(例如，細胞激素與細胞激素受體的結合)，表示蛋白存在於異質族群之蛋白或其他生物體之決定性的結合反應。因此，在特定情況下，特定 TCR 或其結合結構域與特定抗原結合，並且不與樣本中存在的其他蛋白大量結合。尤其，本發明所記載之工程化 TCR 選擇性地辨認或結合至較佳僅一個專一性表位(LMP2 抗原)，並且較佳係不會或基本上不會與另一表位產生交叉反應，其中當表位對於一蛋白(LMP2)而言係獨特的，則抗原在辨認建構體(construct)時不會或基本上不會與另一表位及另一蛋白產生交叉反應。專一性結合亦可意指，例如源自抗體、預期方法之抗原結合位之結合化合物、核酸配體、抗體、或結合組成物，與其標的物結合，其結合親和力相較於任何其他結合化合物的親和力，通常至少高於 25%、更通常至少高於 50%、最通常至少高於 100%(2 倍)、普遍至少高於 10 倍、更普遍至少高於

20 倍、並且最普遍至少高於 100 倍。在部分實施型態中，前述工程化 T 細胞受體、或其衍生物或片段，與 LMP2 抗原專一性結合。TCR 之衍生物或片段保留親本分子之抗原結合/辨識能力，特別係其專一性及/或選擇性。CDR3 區的存在可保留此結合功能。

【0066】 「給藥」之用語，當用於人類、靈長類、哺乳動物、哺乳類受試者、動物、獸醫受試者、安慰劑受試者、研究受試者、實驗受試者、細胞、組織、器官、或生物流體，係指但不限於外源性配體、試劑、安慰劑、小分子、藥劑、治療劑、診斷劑、或組成物與受試者、細胞、組織、器官、或生物流體等接觸。「給藥」亦可係指，例如治療、藥物動力學、診斷、研究、安慰劑、及實驗方法。細胞的處理包含試劑與細胞接觸，以及試劑與流體接觸，其中前述流體與細胞接觸。「給藥」亦可包含使用試劑、診斷劑、結合組成物、或另一細胞，對例如細胞，進行體外及離體治療。給藥途徑可包含但不限於靜脈內給藥或輸注技術。輸注技術可包含使用針或導管施用活化的 T 細胞族群。一般而言，輸注係指活化的 T 細胞族群透過靜脈或皮下給藥。在部分實施型態中，前述活化的 T 細胞族群透過全身性給藥施用。在部分實施型態中，前述活化的 T 細胞族群透過靜脈內給藥施用(即靜脈內(IV)注射)。較佳給藥途徑係腹腔內或靜脈內給藥。

【0067】 TCR-T 細胞

【0068】 本發明部分關於，源於 TCR-T 細胞之效應細胞的製備及其於接受者之應用，前述效應細胞能夠對應目標抗原(如 LMP2)而被活化。本發明一態樣提供源於 TCR-T 細胞之效應細胞族群，前述效應細胞族群包

含、由下述組成、或基本上由下述組成：表現 T 細胞受體(TCR)之 T 細胞族群，且前述 TCR 包含能夠對應 LMP2 抗原而進行活化的序列。在一實施型態中，前述 TCR 包含 TCR-NPC-A11-003。在另一實施型態中，前述 TCR 包含 TCR-NPC-A11-125。

【0069】 本發明之方法中使用的 T 細胞可透過所屬技術領域中已知方法分離，包含商業上可得之分離方法。T 細胞的來源包含但不限於外周血、臍帶血、骨髓、或源自其他造血細胞。可採用各種技術分離細胞，從而分離或增加所需的 T 細胞。此外，擴增 T 細胞的方法係所屬技術領域中習知的(參見、例如 Cartellieri *et al.*, 2014)。分離與擴增調節 T 細胞的方法亦可使用市售方法(參見、例如參見、例如 BD Biosciences, San Jose, Calif.; STEMCELL Technologies Inc., Vancouver, Canada; eBioscience, San Diego, Calif.; Invitrogen, Carlsbad, Calif.)。本發明「擴增」之用語係指數量增加，如 T 細胞的數量增加。在一實施型態中，前述 T 細胞可離體擴增，使其相對於最初培養的數量，其數量增加。在另一實施型態中，前述 T 細胞離體擴增，使其相對於培養基中其他類型的細胞，其數量增加。本發明「離體」之用語，係指移出活生物體(例如人)並且在生物體外(例如培養皿、試管、或生物反應器)增殖的細胞。在部分實施型態中，可透過在 IL-2 存在下培養以擴增 T 細胞。在部分實施型態中，可透過在抗 CD3 抗體及/或抗 CD28 抗體的存在下培養以擴增 T 細胞。在部分實施型態中，可透過在 IL-2 存在下培養，並且透過在抗 CD3 抗體及/或抗 CD28 抗體的存在下培養，以擴增 T 細胞。

【0070】 分離細胞的步驟包含但不限於密度梯度離心、與顆粒耦合而改變細胞密度、以包覆有抗體的磁珠進行磁分離、親和層析；連接於單

株抗體(mAb)或用於與單株抗體(mAb)結合之細胞毒性劑，其包含但不限於補體及細胞毒素，以及篩選連接至固體基質之抗體，例如盤或晶片、淘析、流式細胞儀、或任何其他方便的技術。

【0071】 分離的 T 細胞對於受試者而言可以係自體或非自體，其透過本發明所記載之治療方法施用於前述受試者。自體細胞係從受試者分離，並且對前述受試者施用含有工程化 TCR 之 T 細胞族群。在部分實施型態中，自體細胞係從受試者分離，並對前述受試者施用分離及擴增的細胞，前述細胞包含工程化 TCR。在部分實施型態中，前述細胞可透過白細胞分離術獲得，其中將白血球選擇性地自抽出的血液中分離、進行重組、接著再輸血至提供的受試者。選擇性地，可使用非受試者之源自非自體提供者之異體細胞。在非自體提供者的情況下，如所屬領域習知技術，將前述細胞分類並且與人類白血球抗原(HLA)配對，以確認具有合適程度的相容性。在一實施型態中，前述 T 細胞族群與人類白血球抗原 A11(HLA-A11)匹配。對於自體與非自體細胞而言，可選擇性地冷凍保存前述細胞，直到已準備好透過所屬領域習知方法用於基因工程及/或施用於受試者。

【0072】 由於釋放細胞激素係 T 細胞活化及其功效之必要的結果，對於有效之 TCR 基於 T 細胞療法而言，較佳係至少一部分活化之 T 細胞產生一或多種細胞激素，或能夠產生一或多種細胞激素，例如選自由以下組成之群組的一或多種細胞激素：IL-2、TNF- α 、及 IFN- γ 、顆粒酶 A、顆粒酶 B、GM-CSF、IL-1、IL-10、及 IL-1 β 。此外，T 細胞族群中至少一部分的族群表現一或多種表面標誌，其選自由以下組成之群組：CD2、CD3、CD4、CD8、CD28、CTLA4、CD16/CD56、CD18、CD25、CD40

配體(gp39)、CD69、MHC 1 類、MHC 2 類、CD54、LFA-1、及 VLA-4。

【0073】 治療組成物

【0074】 本發明所記載之細胞組成物 T 細胞族群可單獨或與醫藥上可接受之載體組合施用於受試者，其劑量足以誘導合適的抗腫瘤反應。前述反應可包含但不限於專一性免疫反應、非專一性免疫反應、專一及非專一性反應兩者、先天性反應、初級免疫反應、後天免疫、次級免疫反應、記憶性免疫反應、免疫細胞活化、免疫細胞增生、免疫細胞分化、以及表現細胞激素。

【0075】 本發明提供一種在一受試者中產生抗腫瘤免疫反應之方法，其係透過對前述受試者施用治療有效量之 TCR-T 細胞族群。本發明「有效量」之用語係指提供治療或預防效益的量。TCR-T 細胞之有效量可透過醫師根據病人(受試者)在年齡、體重、腫瘤大小、感染或轉移的程度、及病症的個體差異確定。一般而言，一種醫藥組成物，其包含本發明所記載之含有抗 LMP2 之工程化 TCR 的 T 細胞族群，前述醫藥組成物之給藥劑量可以係 10^4 至 10^{11} 顆細胞/kg 體重，較佳係 10^5 至 10^{10} 顆細胞/kg 體重，其包含介於此等範圍之全部整數值。在部分實施型態中，施用前述 T 細胞族群係透過輸注約 2×10^8 顆 TCR-T 細胞。在部分實施型態中，對病人施用每公斤體重約 5×10^6 至約 5×10^7 顆 TCR-T 細胞。亦可以此等劑量施用複數次 T 細胞組成物及 T 細胞族群。前述細胞可透過輸注技術給藥，其為免疫療法中習知技術(參見，如 Rosenberg *et al*, 1988)。醫學領域中具有通常知識者透過監控病人疾病的病徵並且相應地調整治療方案，能夠容易地針對特定病人決定較佳的劑量與治療計畫。

【0076】 在單次投藥施用一劑 T 細胞族群，但不限於一劑，可給予一有效量之細胞組成物，其包含本發明所記載之表現 T 細胞受體的 T 細胞族群。因此，前述投藥可以係 2、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、或更多劑本發明所記載之表現工程化 TCR 之 T 細胞族群。在部分實施型態中，施用 3 劑。如果藥劑之投藥次數大於一次，則投藥的時間間隔可以係 1 分鐘、2 分鐘、3、4、5、6、7、8、9、10、或更多分鐘，間隔約 1 小時、2 小時、3、4、5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24 小時等。前述小時，「約」係指任何時間間隔之增減在 30 分鐘以內。投藥的時間間隔亦可以係 1 天、2 天、3 天、4 天、5 天、6 天、7 天、8 天、9 天、10 天、11 天、12 天、13 天、14 天、15 天、16 天、17 天、18 天、19 天、20 天、21 天或更多，以及前述之任意組合。本發明不限於投藥間隔的時間相同，亦可包含非相等時間間隔的投藥，例如促發(priming)計畫由例如 1 天、4 天、7 天、以及 25 天之投藥所組成。

【0077】 本發明「醫藥上可接受之載體」或「醫藥上可接受之賦形劑」之用語，係指當與包含工程化 TCR 之 T 細胞族群結合，使得前述 T 細胞族群維持生物活性之任何材料。舉例來說，包含但不限於，任何標準醫藥載體，例如磷酸鹽緩衝生理食鹽水、水、乳劑(如油/水乳劑)、基於胺基酸的緩衝液、或碳酸氫鹽緩衝液，以及各種潤濕劑。在部分實施型態中，當投藥於一受試者時，前述載體不產生不良反應、過敏反應、或其他不適反應。在部分實施型態中，含有載體之醫藥組成物不具有熱原及其他對受試者有害的雜質。醫藥上可接受之載體可包含任何及所有溶劑、分散

介質、包衣(coating)、抗菌劑及抗真菌劑、等張及吸收延遲劑等；其使用係所屬技術領域中習知的。可接受之載體、賦形劑或穩定劑對接受者無毒，並且在所用劑量及濃度下較佳係惰性，包含緩衝劑，如磷酸鹽、檸檬酸、或其他有機酸；抗氧化劑，如抗壞血酸；低分子量多肽；蛋白，如血清白蛋白、明膠、或免疫球蛋白；親水性聚合物，如聚乙烯吡咯烷酮；胺基酸，如甘胺酸、麩醯胺酸、天門冬醯胺、精胺酸或離胺酸；單醣、雙醣、及其他碳水化合物，包含葡萄糖、甘露糖、或糊精；螯合劑，如 EDTA；糖醇，如甘露醇或山梨糖醇；成鹽的相對離子，如鈉；及/或非離子界面活性劑，如吐溫(Tween)、普朗尼克(Pluronic)、或聚乙二醇(PEG)。包含此等載體之組成物係透過習知常規方法製備(參見，例如 Remington's Pharmaceutical Sciences, 第 18 版, A. Gennaro, ed., Mack Publishing Co., Easton, Pa., 1990；及 Remington, The Science and Practice of Pharmacy 第 21 版. Mack Publishing, 2005)。前述載體之選擇及用量可取決於給藥方式。

【0078】 針對特定受試者/病人之「有效量」可根據多種因素而變動，例如所治療之病症或癌症、病人整體健康狀態、給藥途徑及劑量、以及副作用的嚴重程度。治療及診斷方法指南係公眾可得知的(參見，如 Maynard, *et al.*, (1996) A Handbook of SOPs for Good Clinical Practice, Interpharm Press, Boca Raton, Fla.; Dent (2001) Good Laboratory and Good Clinical Practice, Urch Publ., London, UK)。由所屬技術領域中具有通常知識者決定施用的細胞數量，部分取決於癌症的程度及嚴重度，以及是否施用轉染的細胞治療既存的癌症或預防癌症。鑒於本發明，所屬技術領域中具有通常知識者將得知包含具有工程化 TCR 之 T 細胞族群之醫藥組成物的

製備方法。

【0079】 本發明表現工程化 TCR 之 T 細胞族群可給藥一劑或多劑，其中每劑包含至少 100 顆細胞/kg 體重；至少 1,000 顆細胞/kg 體重；至少 10,000 顆細胞/kg 體重；至少 100,000 顆細胞/kg 體重；至少 1,000,000 顆細胞/kg 體重；至少 10,000,000 顆細胞/kg 體重；至少 100,000,000 顆細胞/kg 體重；至少 1×10^9 顆細胞/kg 體重；至少 10×10^9 顆細胞/kg 體重；至少 100×10^9 顆細胞/kg 體重；或至少 1×10^{12} 顆細胞/kg 體重。

【0080】 給藥時間表，例如可使用一次/週、兩次/週、三次/週、四次/週、五次/週、六次/週、七次/週、每兩週一次、每三週一次、每四週一次、每五週一次等。給藥時間表包含給藥的總期間，例如一週、兩週、三週、四週、五週、六週、兩個月、三個月、四個月、五個月、六個月、七個月、八個月、九個月、十個月、十一個月、以及長達十二個月或更長。

【0081】 以下提供上述給藥時間表的週期。該週期可以大約，例如每 7 天、每 14 天、每 21 天、每 28 天、每 35 天、每 42 天、每 49 天、每 56 天、每 63 天、每 70 天等重複一次。在週期之間可出現非給藥的間隔，其中前述間隔可以係大約，例如 7 天、14 天、21 天、28 天、35 天、42 天、49 天、56 天、63 天、70 天等。前述「大約」之用語，係指增減 1 天、增減 2 天、增減 3 天、增減 4 天、增減 5 天、增減 6 天、或增減 7 天。

【0082】 本發明之 TCR T 細胞亦可以與一或多種額外的治療劑一起施用。與一額外治療劑共同給藥之方法係所屬領域習知技術(例如 Hardman, *et al.* (eds.) (2001) Goodman and Gilman's The Pharmacological

Basis of Therapeutics, 10th ed., McGraw-Hill, New York, N.Y.; Poole and Peterson (eds.) (2001) Pharmacotherapeutics for Advanced Practice: A Practical Approach, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.; Chabner and Longo (eds.) (2001) Cancer Chemotherapy and Biotherapy, Lippincott, Williams & Wilkins, Phila., Pa.)。舉例來說包含，但不限於，化療劑、放射線、抗癌劑、抗發炎劑、抗感染劑、NSAIDS、止痛劑等。前述額外的治療劑亦可包含不同的 TCR-T 效應族群。作為受試者治療方案之一部分的其他藥劑可以係，例如其他免疫療法、檢查點抑制劑、免疫腫瘤藥物、標靶劑、化學療法、及/或放射線。可以與本發明之組成物組合使用之藥劑/治療方案的例子包含，但不限於，CTLA-4 抑制劑、PD-1 抑制劑、及/或 PD-L1 抑制劑、CSF-1R 抑制劑、TLR 促效劑、納武利尤單抗(nivolumab)、帕博利珠單抗(pembrolizumab)、易普利姆瑪(ipilimumab)、阿特珠單抗(atenzolizumab)、阿崙單抗(alemtuzumab)、阿維單抗(avelumab)、奧法木單抗(ofatumumab)、納武利尤單抗(nivolumab)、帕博利珠單抗(pembrolizumab)、利妥昔單抗(rituximab)、度伐利尤單抗(durvalumab)、細胞激素療法、干擾素、干擾素- α 、介白素、介白素-2、樹突狀細胞療法(如 Sipuleucel-T)、CHOP、環磷醯胺、氟達拉濱、氨甲蝶呤、5-氟尿嘧啶、溫諾平(vinorelbine)、阿黴素、歐洲紫杉醇、博來霉素、達卡巴仁、氮芥(mustine)、甲基苄肼、培尼皮質醇、依託泊苷、順鉑、泛艾黴素、亞葉酸、及奧沙利鉑。本發明之 T 細胞族群組成物可以在額外的治療劑之前施用、與額外的治療劑同時施用、或在額外的治療劑之後施用。

【0083】 共同給藥不必指對一個體在同一時間點給藥，可包含間隔幾小時或甚至幾天、幾週、或更長時間的給藥，只要多種治療劑的給藥係單一治療計劃的結果。前述共同給藥可包含在一或多種額外的治療劑之

前、之後、或同時施用本發明之 TCR-T 細胞族群。前述共同給藥可包含在另一 TCR-T 細胞族群之前、之後或同時施用本發明之 TCR-T 細胞族群。在一例示性治療計劃中，可在多日方案中以初始劑量施用本發明一 TCR-T 細胞族群(如 A11-003)，而在之後的投藥日施用另一 TCR-T 細胞族群(如 A11-125)；或在多日方案中以初始劑量施用前述 TCR-T 細胞(如 A11-125)，而在之後的投藥日施用另一 TCR-T 細胞族群(如 A11-003)。另一方面，A11-003 TCR T 細胞及 A-125 TCR T 細胞可以在多日方案中隔日投藥。此並不代表可能的給藥方案之限定列表。

【0084】 有效量之治療劑將減少或改善癌症之症狀，普遍至少 10%、更普遍至少 20%、最普遍至少 30%、通常至少 40%、更通常至少 50%、最通常至少 60%、經常至少 70%、更經常至少 80%、並且最經常至少 90%、常規至少 95%、更常規至少 99%、並且最常規至少 99.9%。例如，相較於對照組或以其他癌症療法治療之病人、或治療前的相同病人，施用本發明所記載之含有工程化 TCR 之 T 細胞族群，可將腫瘤生長減低約 1%、約 5%、約 5%、約 10%、約 20%、約 30%、約 40%、約 50%、約 60%、約 70%、約 80%、約 90%、或約 100%，時間長達約 1 天、約 2 天、約 3 天、約 4 天、約 5 天、約 6 天、約 1 週、約 2 週、約 3 週、約 4 週、約 1 個月、約 2 個月、約 3 個月、約 4 個月、約 5 個月、約 6 個月、約 1 年、約 2 年、約 5 年、或約 10 年或更長。

【0085】 為了進行保存，可製備治療劑的製劑，其透過與生理上可接受之載體、賦形劑、或穩定劑混合，並形成例如凍乾粉劑、漿劑、水溶液或懸浮劑的劑型(參見，例如 Hardman, *et al.* (2001) Goodman and

Gilman's The Pharmacological Basis of Therapeutics, McGraw-Hill, New York, N.Y.; Gennaro (2000) Remington: The Science and Practice of Pharmacy, Lippincott, Williams, and Wilkins, New York, N.Y.; Avis, *et al.* (eds.) (1993) Pharmaceutical Dosage Forms: Parenteral Medications, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Tablets, Marcel Dekker, NY; Lieberman, *et al.* (eds.) (1990) Pharmaceutical Dosage Forms: Disperse Systems, Marcel Dekker, NY; Weiner and Kotkoskie (2000) Excipient Toxicity and Safety, Marcel Dekker, Inc., New York, N.Y.)。

【0086】 製備方法

【0087】 本發明提供製備本發明所記載之表現工程化 T 細胞受體 (TCR) 之 T 細胞族群的方法，其中包含：(1) 使用本發明所記載之編碼工程化 TCR 的核酸轉染或轉導分離的 T 細胞；以及(2) 轉染或轉導後擴增工程化表現 TCR 之 T 細胞，其係透過在 IL-2 及/或 CD3 與 CD28 抗體的存在下培養以擴增前述 T 細胞。在部分實施型態中，其係透過在 IL-2 存在下培養以擴增前述 T 細胞。在部分實施型態中，其係透過在抗 CD3 抗體的存在下培養以擴增前述 T 細胞。在部分實施型態中，其係透過在抗 CD28 的存在下培養以擴增前述 T 細胞。在部分實施型態中，製備含有工程化 TCR 之 T 細胞族群的方法，歷時約 2 週、約 3 週或約 4 週。在部分實施型態中，製備含有工程化 TCR 之 T 細胞族群的方法，歷時少於 2 週、少於 3 週或少於 4 週。在部分實施型態中，其係透過在 IL-2、抗 CD3 抗體、及抗 CD28 抗體的存在下培養以擴增前述 T 細胞。在部分實施型態中，前述分離的 T 細胞係分離自哺乳類動物。在一實施型態中，前述哺乳類動物係

人類。在部分實施型態中，前述人類係罹患表現來自 EBV 之 LMP2 之癌症的受試者。在該方法的一實施型態中的，前述分離的 T 細胞包含 HLA-A11。

【0088】 將核酸引入 T 細胞的方法包含物理性、生物性及化學性方法。將多核苷酸(例如 DNA 或 RNA)引入宿主細胞之物理性方法，包含磷酸鈣沉澱、脂質轉染、粒子轟擊法、顯微注射、或電穿孔法。可使用商業上可得之方法將核酸引入目標細胞，其包含電穿孔法、或使用脂質轉染之陽離子脂質體介導的轉染、或使用聚合物包膜(encapsulation)、使用胜肽介導轉染、或使用生物彈道粒子遞送系統(例如基因槍)。將核酸引入寄主細胞之生物性方法可包含使用 DNA 及 RNA 載體。病毒載體，特別係反轉錄病毒載體，被廣泛用於將核酸導入人類細胞。其他病毒載體可源自慢病毒、痘病毒、第一型單純胞疹病毒、腺病毒、腺相關病毒。載體的例子有質體、自主複製序列、轉位子。其他例示性載體可包含但不限於質體、噬質體(phagemid)、黏質體、人工染色體(例如酵母菌人工染色體(YAC)、細菌人工染色體(BAC)、或源自 P1 的人工染色體(PAC))、噬菌體(例如 λ 噬菌體或 M13 噬菌體)、及動物病毒。可作為載體之動物病毒的例子可包含但不限於反轉錄病毒(包含慢病毒)、腺病毒、腺相關病毒(AAV)、胞疹病毒(例如單純胞疹病毒)、痘病毒、桿狀病毒、乳突病毒、及乳多泡病毒(如 SV40)。在部分實施型態中，包含 TCR 之載體可以係反轉錄病毒載體。

【0089】 本發明之又另一態樣提供製備源於 TCR-T 細胞之效應細胞族群的方法，前述效應細胞族群包含表現 T 細胞受體(TCR)之活化的 T 細胞族群，前述 TCR 包含能夠對應於 LMP2 抗原而活化之序列，前述方法

包含、由以下組成、或基本上由以下組成：體外接觸一或多種外周血單個核細胞(PBMC)，前述 PBMC 用於治療一或多個患有目標癌症(如 NPC)之病人；使用表現目標抗原(如 LMP2)之樹突狀細胞刺激 T 細胞；分離及表徵此等對應於所述目標抗原之 T 細胞；及擴增 T 細胞族群。在部分實施型態中，前述方法進一步包含對罹患目標癌症之病人施用治療有效量之分離的 T 細胞族群或其醫藥組成物。在部分實施型態中，前述 TCR 包含 TCR-NPC-A11-003 (SEQ ID NO:3)。在另一實施型態中，前述 TCR 包含 TCR-NPC-A11-125 (SEQ ID NO:9)。在部分實施型態中，前述目標癌症之特徵係表現 LMP2。在部分實施型態中，前述癌症選自由以下組成之群組：鼻咽癌(NPC)、胃癌、肺癌、黑色素瘤、乳癌、前列腺癌、大腸癌、腎細胞癌、卵巢癌、神經母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、白血病及淋巴瘤。在一實施型態中，前述癌症包含 NPC。在另一實施型態中，前述癌症包含淋巴瘤。在又另一實施型態中，前述癌症包含胃癌。在部分實施型態中，前述癌症係 EBV 相關性癌症或 EBV 陽性癌症，例如 EBV 陽性霍奇金氏淋巴瘤、EBV 陽性伯基特淋巴瘤、EBV 陽性鼻咽癌、或 EBV 陽性胃癌。

【0090】 使用方法

【0091】 本發明所記載之 TCR-T 效應細胞可用於治療罹患疾病，例如癌症，之受試者。因此，本發明之另一態樣提供，在罹患 LMP2 特徵之癌症的受試者中誘導 T 細胞反應之方法，前述方法包含、由以下組成、或基本上由以下組成：對前述受試者施用治療有效量之本發明所記載之源自 TCR-T 細胞之細胞族群，藉此誘導對應於 LMP2 特徵之癌症的抗腫瘤反應。本發明之又另一態樣包含在一受試者中治療癌症之方法，其包含、由

以下組成、或基本上由以下組成：對前述受試者施用治療有效量之本發明所提供之源自 TCR-T 細胞的族群，藉此治療癌症。

【0092】 本發明之又另一態樣提供本發明所揭露及說明的所有內容。

【0093】 提供以下實施例進行說明，此等實施例並無意限定本發明。

【實施例】

【0094】 實施例 1：兩個新穎的 TCR 序列對應於 LMP2 抗原而活化

【0095】 所獲得之外周血單個核細胞(PBMC)係先前用於治療 NPC 病人，並且被呈遞 EBV 抗原潛伏膜蛋白 2(LMP2)之樹突狀細胞刺激。此導致發現兩個新穎的 T 細胞受體(TCR)序列，其能夠對應於 LMP2 抗原而活化，前述序列係(1)TCR-NPC-A11-003(胺基酸 SEQ ID NO:03；DNA SEQ ID NO:08)(圖 1A-1B)，以及(2)TCR-NPC-A11-125(胺基酸 SEQ ID NO:09；DNA SEQ ID NO:14)(圖 2A-2B)。

【0096】 實施例 2：新穎的 TCR 序列 TCR-NPC-A11-003 及 TCR-NPC-A11-125 毒殺表現 LMP2 抗原之細胞

【0097】 與實施例 1 之 CD69 活化結果相符，TCR-NPC-A11-003 及 TCR-NPC-A11-125 皆可專一性毒殺經工程改造而表現與 HLA-A11 相連之 LMP2 胜肽的淋巴癌細胞，而非與 HLA-A24 相連者(圖 3A-3B)。

【0098】 實施例 3：新穎的 TCR 序列 TCR-NPC-A11-003 及 TCR-

NPC-A11-125 在小鼠中具有體內抗腫瘤活性

【0099】 小鼠異種移植研究顯示兩種 TCR 皆具有針對 LMP2-A11 陽性淋巴癌之體內抗腫瘤功效。將 A11 陽性 Ramos 淋巴癌細胞(5×10^6)皮下接種至 NSG™(NOD SCID gamma 小鼠)。13 天後，透過尾靜脈注射 1×10^7 顆 TCR 陽性 TCR-NPC-A11-003 或 TCR-NPC-A11-125 TCR-T 細胞。在注射 TCR-NPC-A11-003 或 TCR-NPC-A11-125 TCR-T 細胞的小鼠中，其腫瘤體積顯著降低，並且相較於未處理組的小鼠，此等小鼠整體存活期亦顯著增加(圖 4A-4C)。

【0100】 綜合上述，此等發現顯示 LMP2-A11 TCR-T 細胞能夠選擇性地毒殺具有 LMP2 EBV 病毒抗原之細胞的特徵。值得注意地，此兩種 TCR(TCR-NPC-A11-003 及 TCR-NPC-A11-125)皆從 HLA-A11 血清型的病人細胞中鑑定出來。HLA-A11 在東亞特別常見，因此此等 TCR 可用於針對 EBV 相關性 NPC 及淋巴癌(包含霍奇金氏及伯基特)之工程化 TCR-T 細胞療法。此治療方法亦顯著縮短建立 EBV-CTL 療法所需的時窗，因為現在僅需 3 週即可產生病人專一性的 TCR-T 細胞產物。由於之前尚未鑑定出能夠辨認由 HLA-A11 呈遞之 LMP2 抗原的其他 TCR 序列，故此等結果揭露兩種新穎的病毒抗原專一性 TCR，其有希望作為治療至少 EBV 陽性 NPC、胃癌、及淋巴癌之藥劑。

【0101】 實施例 4：分析與選殖系統性 T 細胞受體組庫以改善晚期 EBV 專一性鼻咽癌之治療結果

【0102】 鼻咽癌(NPC)在中國南方及東南亞高度盛行，並且針對晚期疾病的治療方案非常少。儘管當前標準療法受限於非專一性毒性，然而

NPC 常與愛潑斯坦-巴爾病毒(EBV)的感染相關，使其成為過繼性免疫療法之優異標靶。針對第四期 EBV 相關性 NPC，最近第二期臨床試驗報告顯示使用體外擴增的 EBV 專一性細胞毒性 T 淋巴細胞(EBV-CTL)之優異反應率(圖 5A)。儘管這項研究成功，並且目前正使用相同方法進行第三期試驗，但仍然有將近半數的病人對 CTL 治療方案沒有反應，此顯示未知抗藥機制的參與而造成免疫逃脫。此外，產生用於免疫療法之 EBV-CTL 細胞的時間範圍為 8 至 22 週，這令許多晚期 NPC 的病人望之卻步，而使用抗原專一性重新導向 T 細胞進行次世代免疫細胞療法可顯著縮短該時間。

【0103】 接種樹突狀細胞(DC)疫苗係一種癌症免疫療法，其利用 DC 固有的能力將抗原呈遞給 T 細胞。儘管 DC 疫苗的生產通常較 T 細胞療法快速且便宜，然而其可信賴之效力較低，且對於接種 DC 疫苗所引起之臨床反應的分子基礎尚不清楚。在 2007 年一項臨床試驗中，16 名接受治療的晚期 NPC 病人當中，首例非人類 Ad5f35-LMP1-2 腺病毒載體轉導之 DC 疫苗使兩名病人(12.5%)的疾病穩定期超過 18 週，並且一名病人獲得部分緩解(圖 5B)。

【0104】 進行 T 細胞受體(TCR)組庫定序以分析反應者及無反應者之 TCR 多樣性，能夠更加了解抗藥機制，並且引導開發改良的免疫療法以治療 NPC。

【0105】 I. 鑑定對應於免疫療法之分子決定因子

【0106】 a. 透過無偏差分析發現 MPC 預後因子

【0107】 為了發現調控針對 EBV 專一性 DC 疫苗反應性的分子，利用系統性細胞激素/驅化因子/生長因子陣列進行分析。簡言之，從晚期

NPC 病人收集的外周血單個核細胞(PBMC)透過流式細胞儀分離為單獨的免疫細胞族群，其包含單核細胞、巨噬細胞、B 細胞、NK 細胞、及 T 細胞亞群(包含細胞毒性、輔助、記憶、及調節 T 細胞)。分離後，合成 mRNA 及 cDNA，並且進行全面性 qPCR 基因表現分析，各個基因檢測組的分泌蛋白大於 100。前述方法能夠鑑定調控基於 DC 免疫療法之抗性的特定蛋白，在此治療情況下，可合理地標靶或應用於改善未來病人的預後。在離體及小鼠中，使用本發明所記載之 EBV 陽性淋巴癌模型可驗證未知分子在 EBV 驅動的癌症中所扮演的角色。

【0108】 ii. 分析 DC 疫苗治療的晚期 NPC 中反應者及無反應者的 TCR 組庫

【0109】 本發明已開發一種平台/系統，其以高度再現性分析各種人類及小鼠組織的 TCR 組庫。前述系統包含、由或基本上由多重 PCR 系統組成，其允許在 Illumina MiSeq 平台上優先讀取 TCR 序列。前述系統進一步包含被稱為「模體(motif)分析」的新穎生物資訊策略，其鑑定最小的結構決定位，前述結構決定位能夠辨認抗原，從而在免疫療法期間從整體組庫變化中可靠地分析出抗原專一性 T 細胞反應。當目標表位(epitope)的親和力弱或富集度低時，這對於優化 TCR 選殖的機會至關重要。

【0110】 本發明利用前述新穎的系統評估對 EBV 專一性 DC 疫苗有反應(n=3)或無反應(n=13)之晚期 NPC 病人的 PBMC 樣本中的 TCR 組庫。關於此分析，將比較以下內容：

- i) 整體 TCR 多樣性；
- ii) EBV 專一性 T 細胞反應；及

iii)每位病人縱向的腫瘤相關抗原(TAA)專一性 T 細胞反應。

【0111】 再者，比較病人間的組庫相似度以鑑定優勢抗原(如抗 PV 選殖型)反應。進一步地，前述方法包含以下步驟：i)以前述方法進行整體 TCR 多樣性分析，並將提供個別病人 T 細胞選殖之動態變化的全面視圖。ii) 針對 EBV 專一性 T 細胞反應，將 LMP1-2 腺病毒載體轉導之 DC 與自體 T 細胞共培養。分選出對應抗原而擴增的 T 細胞進行 TCR 組庫定序，從而確定抗 EBV T 細胞組庫的廣度與強度。

【0112】 iii)為了評估 TAA 專一性 T 細胞反應，將病人的 DC(來自 PBMC)暴露於代表本發明所探討之 TAA 的胜肽/胜肽庫(如 EGFR、存活素(survivin))。使用對應抗原而擴增的 CD4+及 CD8+ TCR 序列(來自 ii 及 iii)作為訓練數據集，可鑑定 TAA 模體及模體組合。透過雅卡爾相似度(距離)=分析，基於每對 TCR 所計算出的雅卡爾距離，建構網絡並且將 TCR 聚集成群集(圖 6)。透過上述方式，在原始未受刺激的樣本(來自 i)中發現 TCR 的新穎選殖型(寬度)及頻率(深度)。透過量化 TAA 專一性 TCR 的集體頻率，監控治療所引起的抗腫瘤 T 細胞反應。

【0113】 II. 開發分子生物學平台-合乎成本效益的 TCR 選殖作為針對 NPC 的 TCR-T 策略

【0114】 a. EBV 專一性 TCR 選殖

【0115】 使用單一 T 細胞 RNA-Seq 技術作為原理驗證(proof-of-principle)研究，本發明已成功進行巨細胞病毒(cytomegalovirus, CMV)專一性 TCR 的高通量選殖。此等 TCR 透過反轉錄病毒轉導在 PBMC 中表現，並在體外驗證其專一性及細胞毒性(圖 7)。使用相同技術，本發明集

合表現 TCR 的病毒的小型樣本庫(多達 20)，並且利用本發明所記載之 TCR 生產程序製備 EBV 專一性 TCR-T 細胞。由於尚未建立 EBV 陽性 NPC 細胞株，因此使用 EBV 陽性淋巴癌細胞評估 TCR-T 細胞之毒殺效能。體外測試各個 TCR-T 細胞株之毒殺 EBV 陽性 Raji 淋巴癌細胞但不毒殺 EBV 陰性 Ramos 細胞的專一性。任何未通過前述功能性測試的 TCR，將被由 RNA-Seq 鑑定為具有相似特性的新 TCR 所取代。

【0116】 b. 在 EBV 陽性淋巴癌小鼠中確立 TCR-T 細胞療法之安全性

【0117】 以混合的 TCR-T 細胞族群治療人源化 MHC 的小鼠，前述 TCR-T 細胞族群由針對 EBV 表位之 5 個 CD4+ 及 5 個 CD8+ TCR 組成。在此種設計中，利用 CD8+ T 細胞使得 EBV 專一性的 T 細胞快速擴增以及抗腫瘤之細胞溶解活性；並且利用 CD4+ T 細胞增強 CD8+ 記憶 T 細胞之有效分化，從而達到長期保護。正式檢測其毒性及功效以評估此策略之臨床價值。為了排除潛在毒性，進行動物毒性試驗。根據 FDA 指南，使用 3 種劑量等級進行急性與慢性毒性試驗，評估在單一嚙齒動物物種中的組織病理學毒性、致癌性、皮膚毒性、及神經毒性。急性試驗包含靜脈 (IV) 輸注緊接著 2 週的觀察期。慢性試驗由 IV 輸注緊接著 6 個月的觀察期組成。劑量等級轉化成與人體試驗中灌流(perfusion)程序相似之劑量，使其在未來人體試驗可直接轉用。每週監控全血細胞計數、化學、酵素、及自體免疫血清學，並且每日透過體重及神經系統檢查評估小鼠。當小鼠死亡或顯示毒性或神經功能缺陷之明確徵象時，將小鼠進行解剖分析。EBV TCR-T 細胞之安全性在下列所有實驗中均使用相同臨床學、化學、免疫

學、組織病理學、及統計學方法進行監控。

【0118】 c. 在 EBV 陽性淋巴癌小鼠中確立 TCR-T 細胞療法之功效

【0119】 在 NOD/SCID 小鼠中利用腫瘤異種移植模型評估所產生之 EBV TCR-T 策略之功效。皮下移植 1×10^6 顆 EBV 陽性 Raji 細胞，並且每日測量腫瘤大小。接種三週後，將 EBV TCR-T 細胞(CD4+ TCR-T 細胞、CD8+ TCR-T 細胞、或其組合)靜脈輸注至具有腫瘤的小鼠。經 IV 輸注 MTD 或最高可能投予劑量之 2×10^7 顆 EBV 專一性 TCR-T 細胞進行評估後，可延長已建立腫瘤之小鼠的存活期。另外兩個具有腫瘤之隊列，投予對應劑量之轉導 GFP 之對照組 T 細胞或僅單獨的腫瘤。使用 EBV 專一性 TCR-T 細胞成功治療此等腫瘤，基於相同 TCR 選殖原理可引導針對 EBV 陽性癌症之未來臨床試驗的發展。

【0120】 所屬技術領域中具有通常知識者應可理解本發明適用於實現前述目的並獲得所提及之目標與優點，及其中固有的目標與優點。本發明所記載之內容係目前較佳實施型態之代表，係例示性，其並無意限定本發明之範圍。所屬技術領域中具有通常知識者可思及其中之變化與其他用途，將不脫離申請專利範圍所限定之本發明的精神。

【0121】 任何參考文獻包含本說明書引用之任何非專利或專利文獻，並非承認其構成先前技術。特別地，除非另有說明，否則應理解本發明引用之任何文獻，並非承認此等文獻在美國或其他任何國家構成所屬領域通常知識之部分。本發明對於參考文獻之任何討論係陳述其作者之主張，並保留其申請者對於本發明引用之任何文獻之精準性與關聯性提出質疑的權利。除非另有明確指出，否則本發明引用之所有文獻透過引用完全

併入本說明書中。本發明應控制在引用的文獻中其定義及/或記載之間存在任何差異的情況。

【符號說明】

【0122】 無

【序列表】

<110> 杜克大學

<120> 一種治療 EBV 相關性癌症之抗 LMP2 TCR-T 細胞療法

<130> 19-2104-TW

<140> TW 108143260

<141> 2019-11-27

<150> US 62/771,653

<151> 2018-11-27

<160> 14

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> LMP2 抗原

<400> 1

Ser Ser Cys Ser Ser Cys Pro Leu Ser Lys

1 5 10

<210> 2

<211> 497

<212> PRT

<213> 人類皰疹病毒 4

<400> 2

Met Gly Ser Leu Glu Met Val Pro Met Gly Ala Gly Pro Pro Ser Pro

1 5 10 15

Gly Gly Asp Pro Asp Gly Tyr Asp Gly Gly Asn Asn Ser Gln Tyr Pro

20 25 30

Ser Ala Ser Gly Ser Ser Gly Asn Thr Pro Thr Pro Pro Asn Asp Glu

35 40 45

Glu Arg Glu Ser Asn Glu Glu Pro Pro Pro Pro Tyr Glu Asp Pro Tyr

50 55 60

Trp Gly Asn Gly Asp Arg His Ser Asp Tyr Gln Pro Leu Gly Thr Gln

65 70 75 80

Asp Gln Ser Leu Tyr Leu Gly Leu Gln His Asp Gly Asn Asp Gly Leu

85 90 95

Pro Pro Pro Pro Tyr Ser Pro Arg Asp Asp Ser Ser Gln His Ile Tyr

100 105 110

Glu Glu Ala Gly Arg Gly Ser Met Asn Pro Val Cys Leu Pro Val Ile
 115 120 125
 Val Ala Pro Tyr Leu Phe Trp Leu Ala Ala Ile Ala Ala Ser Cys Phe
 130 135 140
 Thr Ala Ser Val Ser Thr Val Val Thr Ala Thr Gly Leu Ala Leu Ser
 145 150 155 160
 Leu Leu Leu Leu Ala Ala Val Ala Ser Ser Tyr Ala Ala Ala Gln Arg
 165 170 175
 Lys Leu Leu Thr Pro Val Thr Val Leu Thr Ala Val Val Thr Phe Phe
 180 185 190
 Ala Ile Cys Leu Thr Trp Arg Ile Glu Asp Pro Pro Phe Asn Ser Leu
 195 200 205
 Leu Phe Ala Leu Leu Ala Ala Ala Gly Gly Leu Gln Gly Ile Tyr Val
 210 215 220
 Leu Val Met Leu Val Leu Leu Ile Leu Ala Tyr Arg Arg Arg Trp Arg
 225 230 235 240
 Arg Leu Thr Val Cys Gly Gly Ile Met Phe Leu Ala Cys Val Leu Val
 245 250 255
 Leu Ile Val Asp Ala Val Leu Gln Leu Ser Pro Leu Leu Gly Ala Val
 260 265 270
 Thr Val Val Ser Met Thr Leu Leu Leu Leu Ala Phe Val Leu Trp Leu
 275 280 285
 Ser Ser Pro Gly Gly Leu Gly Thr Leu Gly Ala Ala Leu Leu Thr Leu
 290 295 300
 Ala Ala Ala Leu Ala Leu Leu Ala Ser Leu Ile Leu Gly Thr Leu Asn
 305 310 315 320

Leu Thr Thr Met Phe Leu Leu Met Leu Leu Trp Thr Leu Val Val Leu

325

330

335

Leu Ile Cys Ser Ser Cys Ser Ser Cys Pro Leu Ser Lys Ile Leu Leu

340

345

350

Ala Arg Leu Phe Leu Tyr Ala Leu Ala Leu Leu Leu Leu Ala Ser Ala

355

360

365

Leu Ile Ala Gly Gly Ser Ile Leu Gln Thr Asn Phe Lys Ser Leu Ser

370

375

380

Ser Thr Glu Phe Ile Pro Asn Leu Phe Cys Met Leu Leu Leu Ile Val

385

390

395

400

Ala Gly Ile Leu Phe Ile Leu Ala Ile Leu Thr Glu Trp Gly Ser Gly

405

410

415

Asn Arg Thr Tyr Gly Pro Val Phe Met Cys Leu Gly Gly Leu Leu Thr

420

425

430

Met Val Ala Gly Ala Val Trp Leu Thr Val Met Ser Asn Thr Leu Leu

435

440

445

Ser Ala Trp Ile Leu Thr Ala Gly Phe Leu Ile Phe Leu Ile Gly Phe

450

455

460

Ala Leu Phe Gly Val Ile Arg Cys Cys Arg Tyr Cys Cys Tyr Tyr Cys

465

470

475

480

Leu Thr Leu Glu Ser Glu Glu Arg Pro Pro Thr Pro Tyr Arg Asn Thr

485

490

495

Val

<210> 3

<211> 421

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TCR A11-003

<400> 3

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

Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn
 145 150 155 160
 Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val
 165 170 175
 Leu Asp Met Lys Ala Met Asp Ser Lys Ser Asn Gly Ala Ile Ala Trp
 180 185 190
 Ser Asn Gln Thr Ser Phe Thr Cys Gln Asp Ile Phe Lys Glu Thr Asn
 195 200 205
 Ala Cys Tyr Pro Ser Ser Asp Val Pro Cys Asp Ala Thr Leu Thr Glu
 210 215 220
 Lys Ser Phe Glu Thr Asp Met Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val
 225 230 235 240
 Met Gly Leu Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu
 245 250 255
 Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala
 260 265 270
 Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
 275 280 285
 Gly Pro Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu
 290 295 300
 Gly Ala Val Pro Ile Asp Thr Glu Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu
 305 310 315 320
 Val Met Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Met
 325 330 335
 Gly His Arg Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Lys Ala Lys Lys Pro Pro
 340 345 350

Glu Leu Met Phe Val Tyr Ser Tyr Glu Lys Leu Ser Ile Asn Glu Ser
 355 360 365

Val Pro Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser Leu Leu Asn
 370 375 380

Leu His Leu His Ala Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys
 385 390 395 400

Ala Ser Ser Pro Gly Arg Trp Tyr Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr
 405 410 415

Arg Leu Thr Val Leu
 420

<210> 4

<211> 127

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TCR A11-003 可變區 α 鏈

<400> 4

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val
 1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile
 20 25 30

Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser

	35		40		45														
	Val	Asn	Asn	Leu	Gln	Trp	Phe	His	Gln	Asn	Pro	Trp	Gly	Gln	Leu	Ile			
	50						55					60							
-	Asn	Leu	Phe	Tyr	Ile	Pro	Ser	Gly	Thr	Lys	Gln	Asn	Gly	Arg	Leu	Ser			
-	65					70					75				80				
-	Ala	Thr	Thr	Val	Ala	Thr	Glu	Arg	Tyr	Ser	Leu	Leu	Tyr	Ile	Ser	Ser			
					85						90				95				
	Ser	Gln	Thr	Thr	Asp	Ser	Gly	Val	Tyr	Phe	Cys	Ala	Val	Val	Asn	Asn			
					100						105				110				
	Asn	Asp	Met	Arg	Phe	Gly	Ala	Gly	Thr	Arg	Leu	Thr	Val	Lys	Pro				
					115						120				125				

<210> 5

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TCR A11-003 可變區 CDR3 α

<400> 5

Ala Val Val Asn Asn Asn Asp Met Arg Phe Gly

1 5 10

<210> 6

<211> 131

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TCR A11-003 可變區 β 鏈

<400> 6

Met Gly Cys Arg Leu Leu Cys Cys Ala Val Leu Cys Leu Leu Gly Ala

1 5 10 15

Val Pro Ile Asp Thr Glu Val Thr Gln Thr Pro Lys His Leu Val Met

20 25 30

Gly Met Thr Asn Lys Lys Ser Leu Lys Cys Glu Gln His Met Gly His

35 40 45

Arg Ala Met Tyr Trp Tyr Lys Gln Lys Ala Lys Lys Pro Pro Glu Leu

50 55 60

Met Phe Val Tyr Ser Tyr Glu Lys Leu Ser Ile Asn Glu Ser Val Pro

65 70 75 80

Ser Arg Phe Ser Pro Glu Cys Pro Asn Ser Ser Leu Leu Asn Leu His

85 90 95

Leu His Ala Leu Gln Pro Glu Asp Ser Ala Leu Tyr Leu Cys Ala Ser

100 105 110

Ser Pro Gly Arg Trp Tyr Glu Gln Phe Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu

115 120 125

Thr Val Leu

130

<210> 7

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TCR A11-003 可變區 CDR3 β

<400> 7

Ala Ser Ser Pro Gly Arg Trp Tyr Glu Gln Phe

1

5

10

<210> 8

<211> 1263

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> TCR A11-003

<400> 8

atgaagagaa tcctgggcgc tctgctggga ctgctgtctg ctcaagtgtg ctgtgtgcgg 60

ggcatccagg tggaacaaag ccctcctgac ctgatcctgc aagagggcgc caatagcacc 120

ctgcggtgca actttagcga cagcgtgaac aacctgcagt ggttccacca gaatccttgg	180
ggccagctga tcaacctggt ctacatcccc agcggcacca agcagaacgg cagactgtct	240
gctaccaccg tggccaccga gagatacagc ctgctgtaca tcagcagcag ccagaccaca	300
gacagcggcg tgtacttttg cgccgtggtc aacaacaacg acatgagatt cggagccggc	360
accagactga ccgtgaagcc cgatatccag aatccagagc ctgccgtgta ccagctgaag	420
gaccctagaa gccaggacag caccctgtgc ctgttcaccg acttegacag ccagatcaac	480
gtgccaaga ccatggaaag cggcaccttc atcaccgaca agaccgtgct ggacatgaag	540
gccatggaca gcaagagcaa cggcgcatt gcctgggtcca accagaccag cttcacatgc	600
caggacatct tcaaagagac aaacgcctgc tatcccagca gcgacgtgcc ctgtgatgcc	660
acactgaccg agaagtcctt cgagacagac atgaacctga acttccagaa cctgagcgtg	720
atgggcctgc gcacctgct gcttaaagtg gccggcttca acctgctgat gaccctgaga	780
ctgtgggtcca gcagggccaa gagaggaagc ggcgccacaa actttagcct gctgaaacag	840
gccggcgacg tggaagaaaa ccttggaact atgggctgca gactgctgtg ttgtgccgtg	900
ctgtgtctgc tgggcgccgt gcctattgac accgaagtga cccagacacc taagcacctg	960
gtcatgggca tgacaaacaa gaaaagcctg aagtgcgagc agcacatggg ccacagagcc	1020
atgtactggt acaagcagaa ggccaagaaa cctccagagc tgatgttctg gtacagctac	1080
gagaagctga gcatcaacga gagcgtgccc agcaggttca gccctgagtg tcctaatagc	1140
tcctgtctga atctgcatct gcacgcctg cagcctgagg attctgcctt gtacctgtgt	1200
gccagctctc ccggacgttg gtacgagcag tttttcggcc ctggcacacg gctgacagtt	1260
ctg	1263

<210> 9

<211> 421

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TCR A11-125

<400> 9

Met Lys Arg Ile Leu Gly Ala Leu Leu Gly Leu Leu Ser Ala Gln Val

1 5 10 15

Cys Cys Val Arg Gly Ile Gln Val Glu Gln Ser Pro Pro Asp Leu Ile

20 25 30

Leu Gln Glu Gly Ala Asn Ser Thr Leu Arg Cys Asn Phe Ser Asp Ser

35 40 45

Val Asn Asn Leu Gln Trp Phe His Gln Asn Pro Trp Gly Gln Leu Ile

50 55 60

Asn Leu Phe Tyr Ile Pro Ser Gly Thr Lys Gln Asn Gly Arg Leu Ser

65 70 75 80

Ala Thr Thr Val Ala Thr Glu Arg Tyr Ser Leu Leu Tyr Ile Ser Ser

85 90 95

Ser Gln Thr Thr Asp Ser Gly Val Tyr Phe Cys Ala Val Leu Asn Asn

100 105 110

Asn Asp Met Arg Phe Gly Ala Gly Thr Arg Leu Thr Val Lys Pro Asp

115 120 125

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

130 135 140

Gln Asp Ser Thr Leu Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Ile Asn

145 150 155 160

Val Pro Lys Thr Met Glu Ser Gly Thr Phe Ile Thr Asp Lys Thr Val

	165		170		175														
Leu	Asp	Met	Lys	Ala	Met	Asp	Ser	Lys	Ser	Asn	Gly	Ala	Ile	Ala	Trp				
	180		185		190														
Ser	Asn	Gln	Thr	Ser	Phe	Thr	Cys	Gln	Asp	Ile	Phe	Lys	Glu	Thr	Asn				
	195		200		205														
Ala	Cys	Tyr	Pro	Ser	Ser	Asp	Val	Pro	Cys	Asp	Ala	Thr	Leu	Thr	Glu				
	210		215		220														
Lys	Ser	Phe	Glu	Thr	Asp	Met	Asn	Leu	Asn	Phe	Gln	Asn	Leu	Ser	Val				
225			230		235														
Met	Gly	Leu	Arg	Ile	Leu	Leu	Leu	Lys	Val	Ala	Gly	Phe	Asn	Leu	Leu				
	245		250		255														
Met	Thr	Leu	Arg	Leu	Trp	Ser	Ser	Arg	Ala	Lys	Arg	Gly	Ser	Gly	Ala				
	260		265		270														
Thr	Asn	Phe	Ser	Leu	Leu	Lys	Gln	Ala	Gly	Asp	Val	Glu	Glu	Asn	Pro				
	275		280		285														
Gly	Pro	Met	Gly	Cys	Arg	Leu	Leu	Cys	Cys	Ala	Val	Leu	Cys	Leu	Leu				
	290		295		300														
Gly	Ala	Val	Pro	Ile	Asp	Thr	Glu	Val	Thr	Gln	Thr	Pro	Lys	His	Leu				
305			310		315														
Val	Met	Gly	Met	Thr	Asn	Lys	Lys	Ser	Leu	Lys	Cys	Glu	Gln	His	Met				
	325		330		335														
Gly	His	Arg	Ala	Met	Tyr	Trp	Tyr	Lys	Gln	Lys	Ala	Lys	Lys	Pro	Pro				
	340		345		350														
Glu	Leu	Met	Phe	Val	Tyr	Ser	Tyr	Glu	Lys	Leu	Ser	Ile	Asn	Glu	Ser				
	355		360		365														
Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Pro	Glu	Cys	Pro	Asn	Ser	Ser	Leu	Leu	Asn				

<220>

<223> TCR A11-125 可變區 β 鏈

<400> 12

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

<210> 13

<211> 11

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> TCR A11-125 可變區 CDR3 β

<400> 13

Ala Ser Ser Gln Gly Arg Trp Tyr Glu Ala Phe

1 5 10

<210> 14

<211> 1263

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> TCR A11-125

<400> 14

atgaagagaa tectgggcgc tetgctggga ctgctgtctg ctcaagtgtg ctgtgtgcgg	60
ggcatccagg tggaacagtc tccaccagac ctgatcctgc aagagggcgc caatagcacc	120
ctgcggtgca acttttagcga cagcgtgaac aacctgcagt ggttccacca gaatccttgg	180
ggccagctga tcaacctggt ctacatcccc agcggcacca agcagaacgg cagactgtct	240
gctaccaccg tggccaccga gagatacagc ctgctgtaca tcagcagcag ccagaccaca	300

gacagcggcg tgtacttttg cgccgtgctg aacaacaacg acatgagatt cggagccggc	360
accagactga ccgtgaagcc cgatatccag aatccagagc ctgccgtgta ccagctgaag	420
gaccctagaa gccaggacag caccctgtgc ctgttcaccg acttcgacag ccagatcaac	480
gtgccaaga ccatggaaag cggcaccttc atcaccgaca agaccgtgct ggacatgaag	540
gccatggaca gcaagagcaa cggcgccatt gcctgggtcca accagaccag cttcacatgc	600
caggacatct tcaaagagac aaacgcctgc tatcccagca gcgacgtgcc ctgtgatgcc	660
aaactgaccg agaagtcctt cgagacagac atgaacctga acttcagaa cctgagcgtg	720
atgggcctgc gcatcctgct gcttaaagtg gccgggtcca acctgctgat gaccctgaga	780
ctgtgggtcca gcagggccaa gagaggaagc ggcgccacaa actttagcct gctgaaacag	840
gccggcgacg tggaagaaaa ccctggacct atgggctgca gactgctgtg ttgtgccgtg	900
ctgtgtctgc tgggcgcctg gcctattgac accgaagtga cccagacacc taagcacctg	960
gtcatgggca tgacaaacaa gaaaagcctg aagtgcgagc agcacatggg ccacagagcc	1020
atgtactggt acaagcagaa ggccaagaaa cctcctgagc tgatgttcgt gtacagctac	1080
gagaagctga gcatcaacga gagcgtgccc agcaggttca gccctgagtg tcctaatagc	1140
tcctgctga atctgcatct gcacgcctg cagcctgagg attctgccct gtatctgtgc	1200
gccagctctc aaggacgttg gtacgaggcc ttcttcggcc aaggcacaag gctgacagtg	1260
gtg	1263

申請專利範圍

1. 一種T細胞族群，其特徵係其包含工程化T細胞受體(TCR)，前述工程化TCR對應於潛伏膜蛋白2(LMP2)抗原而活化T細胞。
2. 如申請專利範圍第1項所記載之T細胞族群，其中，前述工程化TCR包含胺基酸序列SEQ ID NO:03。
3. 如申請專利範圍第1項所記載之T細胞族群，其中，前述工程化TCR包含胺基酸序列SEQ ID NO:09。
4. 如申請專利範圍第1至3項中任一項所記載之T細胞族群，其中，前述LMP2抗原包含SSCSSCPLSK (SEQ ID NO:01)序列。
5. 如申請專利範圍第1至4項中任一項所記載之T細胞族群，其中，前述T細胞族群包含治療有效量之細胞，且用於治療包含LMP2之癌症的受試者。
6. 如申請專利範圍第1至5項中任一項所記載之T細胞族群，其中，前述受試者表現人類白血球抗原亞型A11(HLA-A11)。
7. 如申請專利範圍第1至6項中任一項所記載之T細胞族群，其中，至少一部分前述T細胞族群產生或具有潛力產生一或多種細胞激素。
8. 如申請專利範圍第7項所記載之T細胞族群，其中，前述一或多種細胞激素選自由以下組成之群組：IL-2、IFN- γ 、TNF- α 、顆粒酶A、顆粒酶B、及GM-CSF。
9. 如申請專利範圍第6至8項中任一項所記載之T細胞族群，其中，前述癌症選自由以下組成之群組：鼻咽癌(NPC)、淋巴癌、胃癌、肺癌、黑色

素瘤、乳癌、前列腺癌、大腸癌、腎細胞癌、卵巢癌、神經母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、及白血病。

10.如申請專利範圍第9項所記載之T細胞族群，其中，前述癌症係EBV相關性癌症。

11.如申請專利範圍第9項所記載之T細胞族群，其中，前述癌症係鼻咽癌(NPC)。

12.如申請專利範圍第9項所記載之T細胞族群，其中，前述癌症係淋巴瘤。

13.如申請專利範圍第9項所記載之T細胞族群，其中，前述癌症係胃癌。

14.一種醫藥組成物，其特徵係其包含申請專利範圍第1至13項中任一項所記載之T細胞族群，及醫藥上可接受之載體。

15.如申請專利範圍第14項所記載之醫藥組成物，其中，前述醫藥上可接受之載體維持治療有效量之細胞以治療包含LMP2的癌症。

16.如申請專利範圍第14或15項所記載之醫藥組成物，其中，前述醫藥組成物進一步包含至少一種治療劑。

17.一種治療罹患包含LMP2之癌症的受試者的方法，其特徵係其包含對前述受試者施用治療有效量之申請專利範圍第1至13項中任一項所記載之T細胞族群或申請專利範圍第14至16項中任一項所記載之醫藥組成物，且前述施用誘導對癌症之抗腫瘤反應。

18.如申請專利範圍第17項所記載之方法，其中，前述癌症選自由以下組成之群組：鼻咽癌(NPC)、淋巴瘤、胃癌、肺癌、黑色素瘤、乳癌、前列腺癌、大腸癌、腎細胞癌、卵巢癌、神經母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、及白

血病。

19.如申請專利範圍第18項所記載之方法，其中，前述癌症係EBV相關性癌症。

20.如申請專利範圍第18項所記載之方法，其中，前述癌症係鼻咽癌(NPC)。

21.如申請專利範圍第18項所記載之方法，其中，前述癌症係淋巴癌。

22.如申請專利範圍第18項所記載之方法，其中，前述癌症係胃癌。

23.如申請專利範圍第17至22項中任一項所記載之方法，其中，前述抗腫瘤反應導致腫瘤體積減少至少5%、至少10%、至少20%、至少30%、至少40%、至少50%、至少60%、至少70%、至少80%、至少90%、或100%。

24.一種分離的核酸，其特徵係其包含編碼工程化TCR的多核苷酸，且前述工程化TCR包含胺基酸序列SEQ ID NO:03。

25.如申請專利範圍第24項所記載之分離的核酸，其中，前述多核苷酸包含核酸序列SEQ ID NO:08。

26.一種載體，其特徵係其包含申請專利範圍第25項所記載之核酸。

27.一種分離的核酸，其特徵係其包含編碼工程化TCR的多核苷酸，且前述工程化TCR包含胺基酸序列SEQ ID NO:09。

28.如申請專利範圍第27項所記載之分離的核酸，其中，前述多核苷酸包含核酸序列SEQ ID NO:14。

29.一種載體，其特徵係其包含申請專利範圍第28項所記載之核酸。

30.如申請專利範圍第26或29項所記載之載體，其中，前述載體選自由以下

組成之群組：質體、黏質體、人工染色體(例如酵母菌人工染色體(YAC)或細菌人工染色體(BAC))、及病毒(例如反轉錄病毒、慢病毒、腺病毒、腺相關病毒(AAV)、及疱疹病毒)。

31.一種製備T細胞族群之方法，其特徵係其包含：

(1) 使用申請專利範圍第24或27項所記載之分離的核酸或申請專利範圍第26或29項所記載之載體轉染或轉導分離的T細胞；以及

(2) 轉染或轉導後擴增T細胞，其係透過將前述T細胞在人工APC呈遞的抗CD3、抗CD3/抗CD28、或LMP2蛋白的存在下培養。

32.如申請專利範圍第31項所記載之方法，其中，前述分離的T細胞係從人類分離。

33.如申請專利範圍第32項所記載之方法，其中，前述人類係罹患包含LMP2之癌症的受試者。

34.如申請專利範圍第31至33項中任一項所記載之方法，其中，前述罹患包含LMP2之癌症的受試者表現人類白血球抗原亞型A11(HLA-A11)。

35.一種抑制有需求之病人的包含潛伏膜蛋白2 (LMP2)抗原之腫瘤生長的方法，其特徵係其包含對前述病人施用治療有效量之包含工程化T細胞受體(TCR)的T細胞族群，前述工程化TCR具有一具有SEQ ID NO:4或SEQ ID NO:10序列之TCR α 鏈，及一具有SEQ ID NO:6或SEQ ID NO:12序列之TCR β 鏈，且前述方法抑制前述包含LMP2抗原之腫瘤的生長。

36.如申請專利範圍第35項所記載之方法，其中，前述腫瘤包含人類白血球抗原亞型A11(HLA-A11)。

37.如申請專利範圍第35項所記載之方法，其中，前述腫瘤源自EBV相關性

癌症。

38.如申請專利範圍第35或36項所記載之方法，其中，前述癌症係鼻咽癌、淋巴癌、或胃癌。

39.如申請專利範圍第35至38項中任一項所記載之方法，其中，前述工程化TCR包含SEQ ID NO: 4的TCR α 鏈，以及SEQ ID NO:6的TCR β 鏈。

40.如申請專利範圍第39項所記載之方法，其中，前述TCR α 鏈包含具有序列AVVNNNDMRFG (SEQ ID NO:5)的CDR3 α ，以及前述TCR β 鏈包含具有序列ASSPGRWYEQF (SEQ ID NO:7)的CDR3 β 。

41.如申請專利範圍第35至38項中任一項所記載之方法，其中，前述工程化TCR包含SEQ ID NO:10的TCR α 鏈，以及SEQ ID NO:12的TCR β 鏈。

42.如申請專利範圍第41項所記載之方法，其中，前述TCR α 鏈包含具有序列AVLNNNDMRFG (SEQ ID NO:11)的CDR3 α ，以及前述TCR β 鏈包含具有序列ASSQGRWYEAF (SEQ ID NO:13)的CDR3 β 。

43.一種工程化T細胞受體(TCR)，其特徵係其包含與SEQ ID NO:03所示序列具有至少90%序列一致性的胺基酸。

44.如申請專利範圍第43項所記載之工程化TCR，其中，前述TCR包含SEQ ID NO: 4的TCR α 鏈，以及SEQ ID NO:6的TCR β 鏈。

45.如申請專利範圍第44項所記載之工程化TCR，其中，前述TCR α 鏈包含具有序列AVVNNNDMRFG (SEQ ID NO:5)的CDR3 α ，以及前述TCR β 鏈包含具有序列ASSPGRWYEQF (SEQ ID NO:7)的CDR3 β 。

46.一種工程化T細胞受體(TCR)，其特徵係其包含與SEQ ID NO:09所示序列具有至少90%序列一致性的胺基酸。

- 47.如申請專利範圍第46項所記載之工程化TCR，其中，前述TCR包含SEQ ID NO:10的TCR α 鏈，以及SEQ ID NO:12的TCR β 鏈。
- 48.如申請專利範圍第47項所記載之工程化TCR，其中，前述TCR α 鏈包含具有序列AVLNNNDMRFG (SEQ ID NO:11)的CDR3 α ，以及前述TCR β 鏈包含具有序列ASSQGRWYEAF (SEQ ID NO:13)的CDR3 β 。
- 49.如申請專利範圍第43至48項中任一項所記載之工程化TCR，其中，前述工程化TCR與LMP2抗原專一性結合。
- 50.如申請專利範圍第49項所記載之工程化TCR，其中，前述LMP2抗原包含SSCSSCPLSK (SEQ ID NO:1)。
- 51.一種醫藥組成物，其特徵係其包含表現申請專利範圍第43至50項中任一項所記載之工程化TCR的T細胞族群，以及醫藥上可接受之載體。
- 52.一種誘導罹患包含LMP2之癌症的受試者的T細胞反應的方法，其特徵係其包含對前述受試者施用治療有效量之申請專利範圍第43至50項所記載之包含工程化TCR的T細胞族群或申請專利範圍第51項所記載之醫藥組成物，且前述施用誘導對癌症之抗腫瘤反應。
- 53.如申請專利範圍第52項所記載之方法，其中，前述癌症選自由以下組成之群組：鼻咽癌(NPC)、淋巴癌、胃癌、肺癌、黑色素瘤、乳癌、前列腺癌、大腸癌、腎細胞癌、卵巢癌、神經母細胞瘤、橫紋肌肉瘤、及白血病。
- 54.如申請專利範圍第53項所記載之方法，其中，前述癌症係EBV相關性癌症。
- 55.如申請專利範圍第52項所記載之方法，其中，前述癌症係鼻咽癌

(NPC)。

56.如申請專利範圍第52項所記載之方法，其中，前述癌症係淋巴癌。

57.如申請專利範圍第52項所記載之方法，其中，前述癌症係胃癌。

圖式

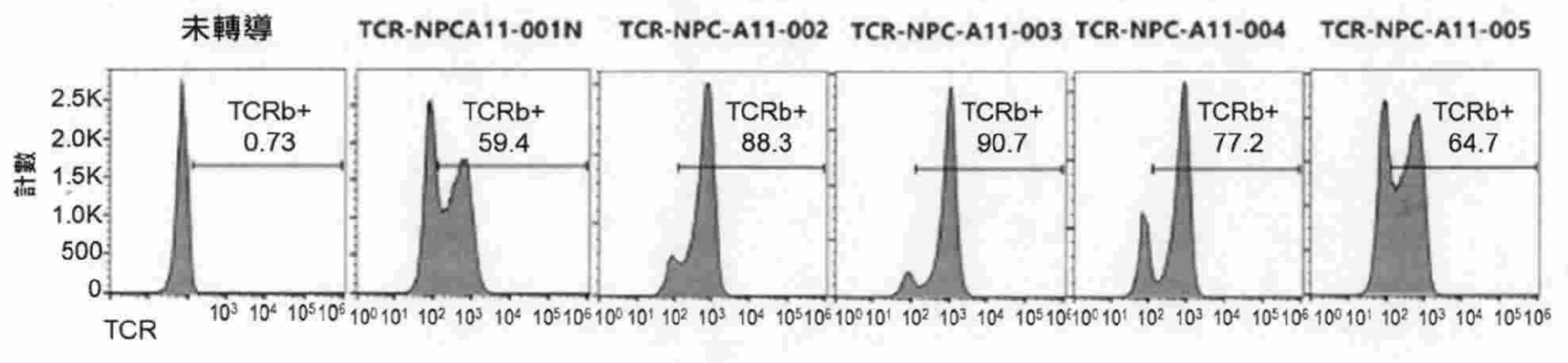


圖 1A

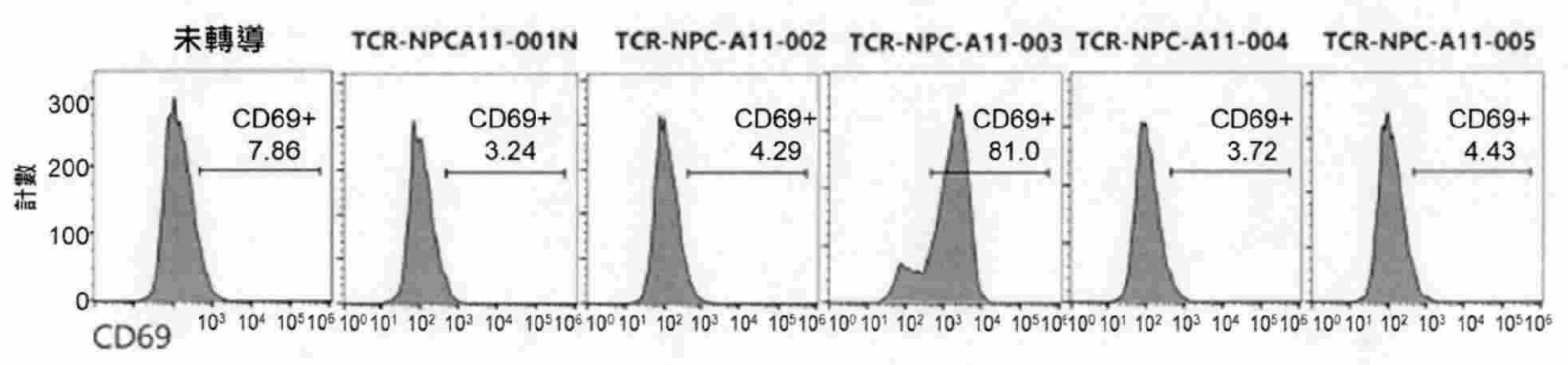


圖 1B

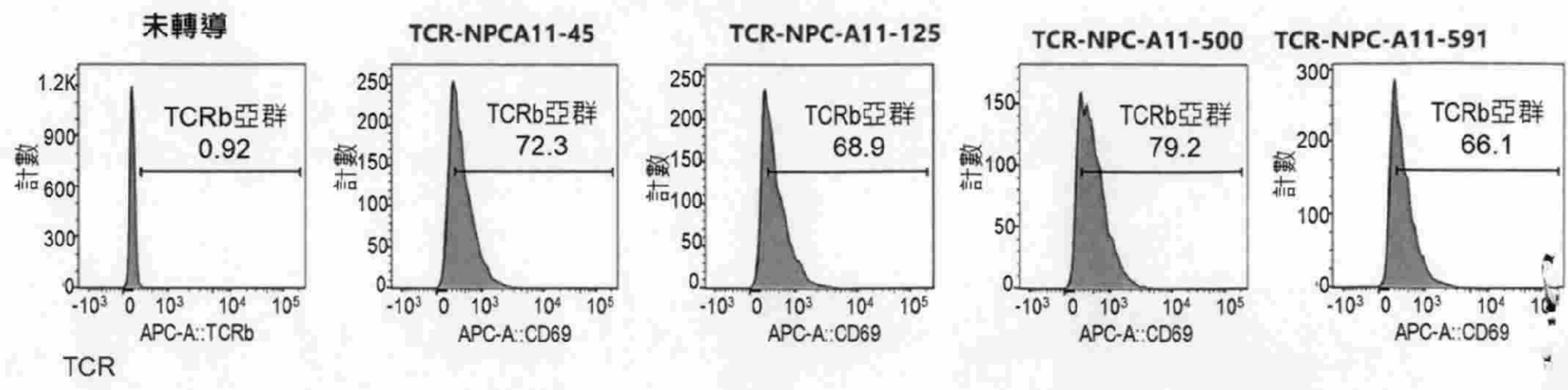


圖 2A

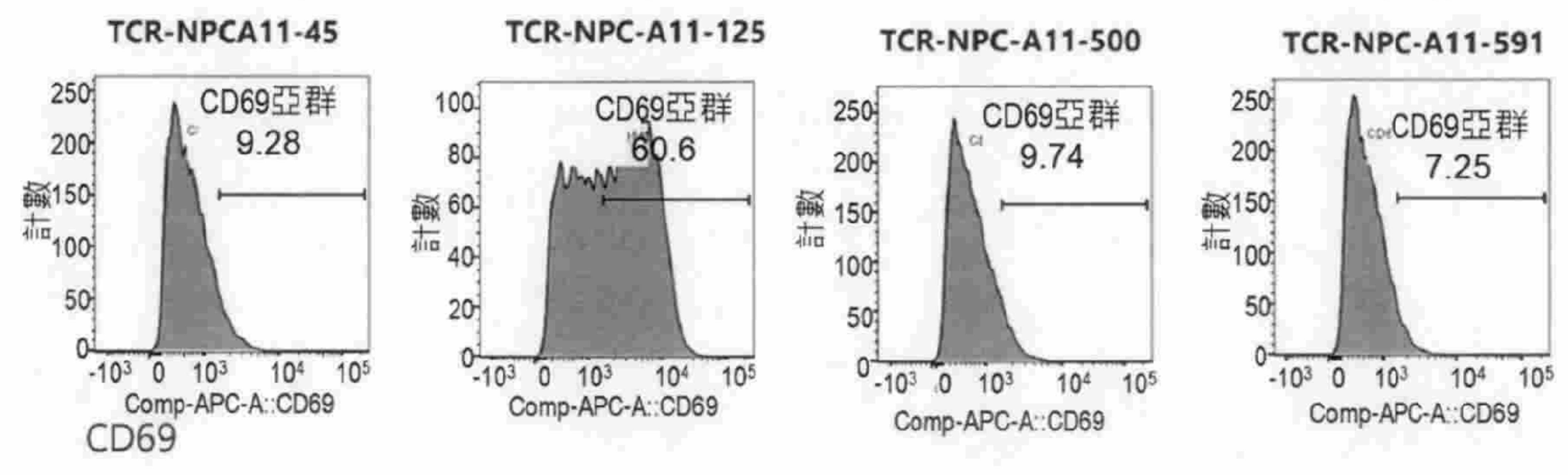


圖 2B

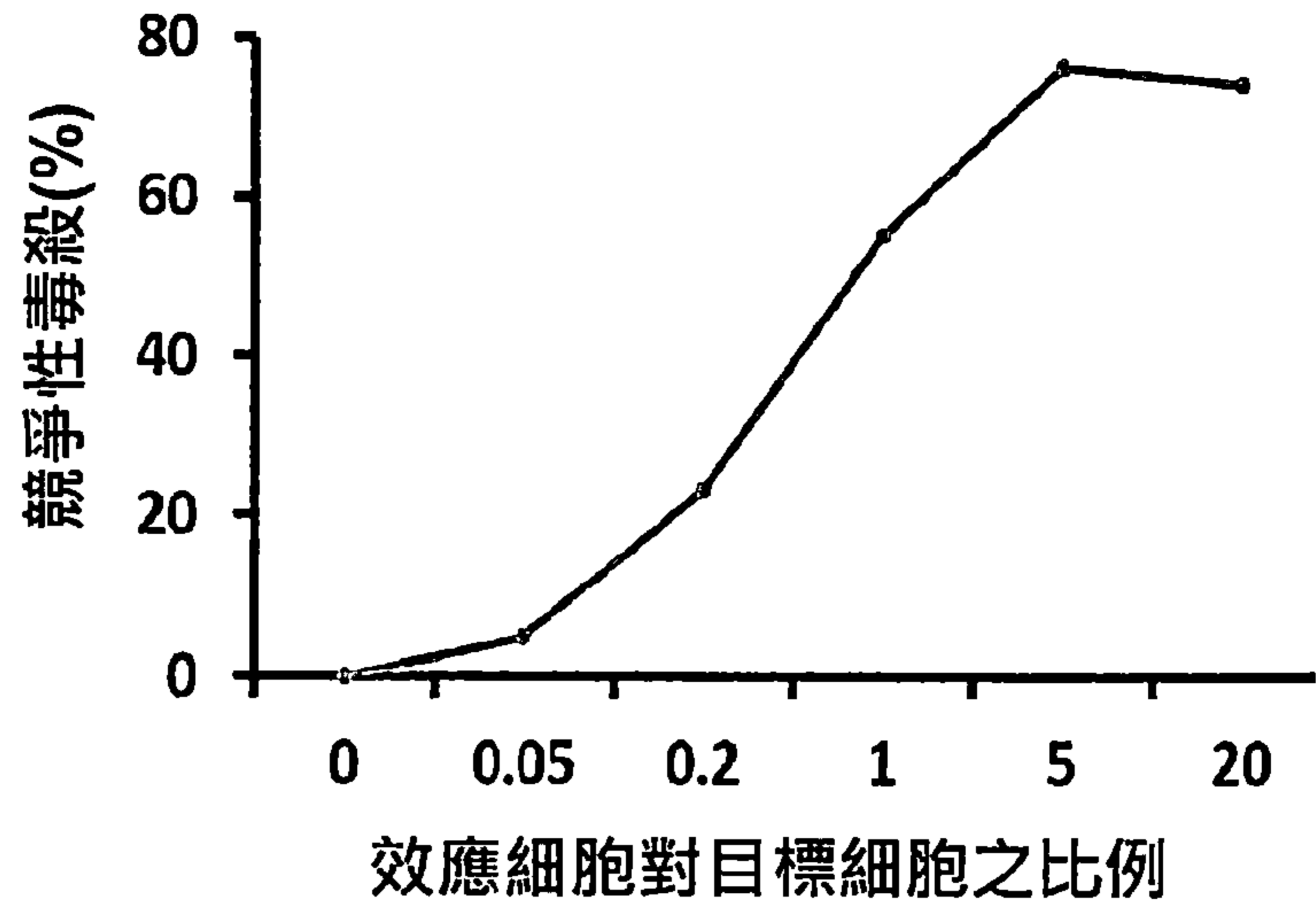


圖 3A

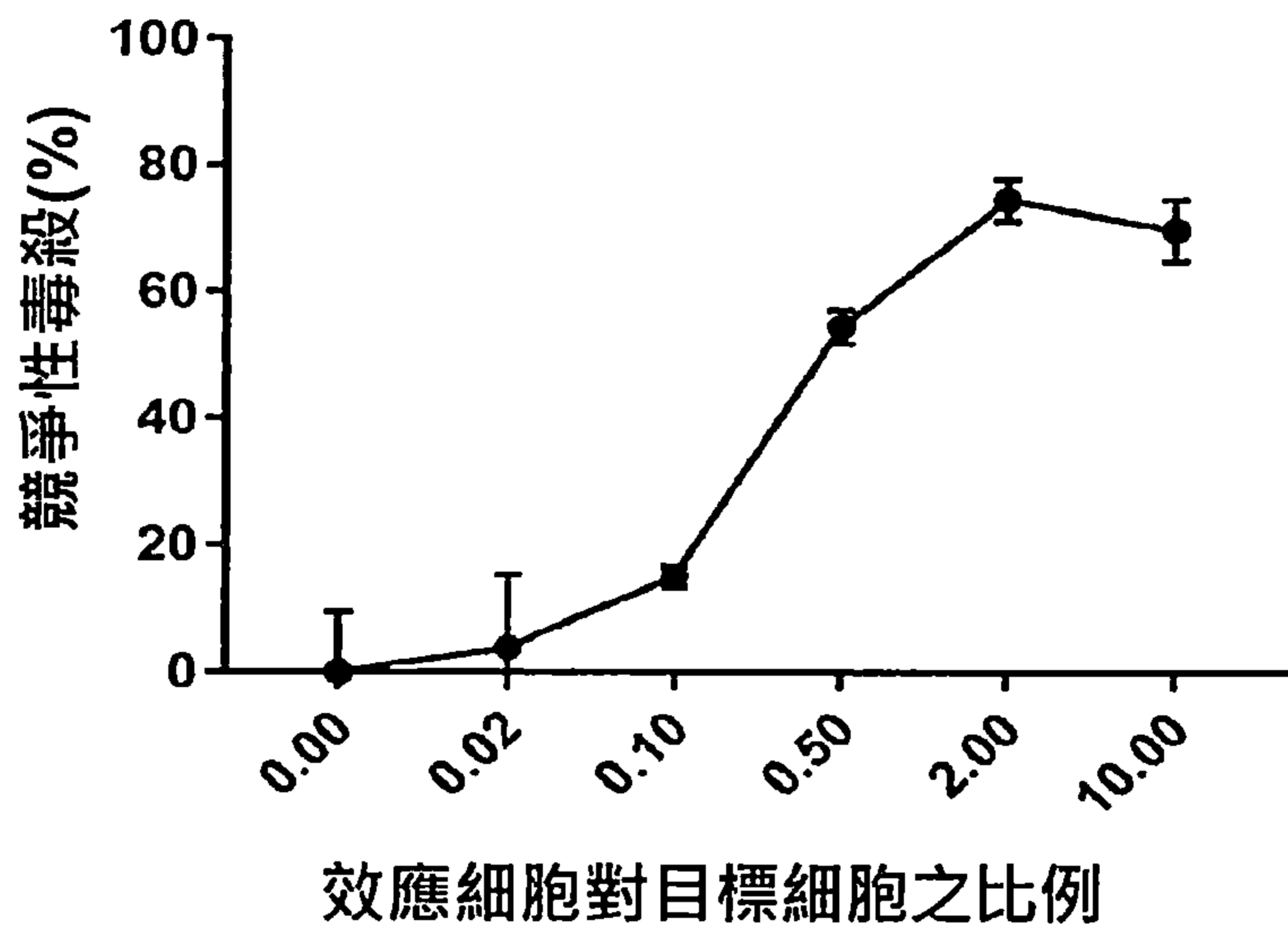


圖 3B

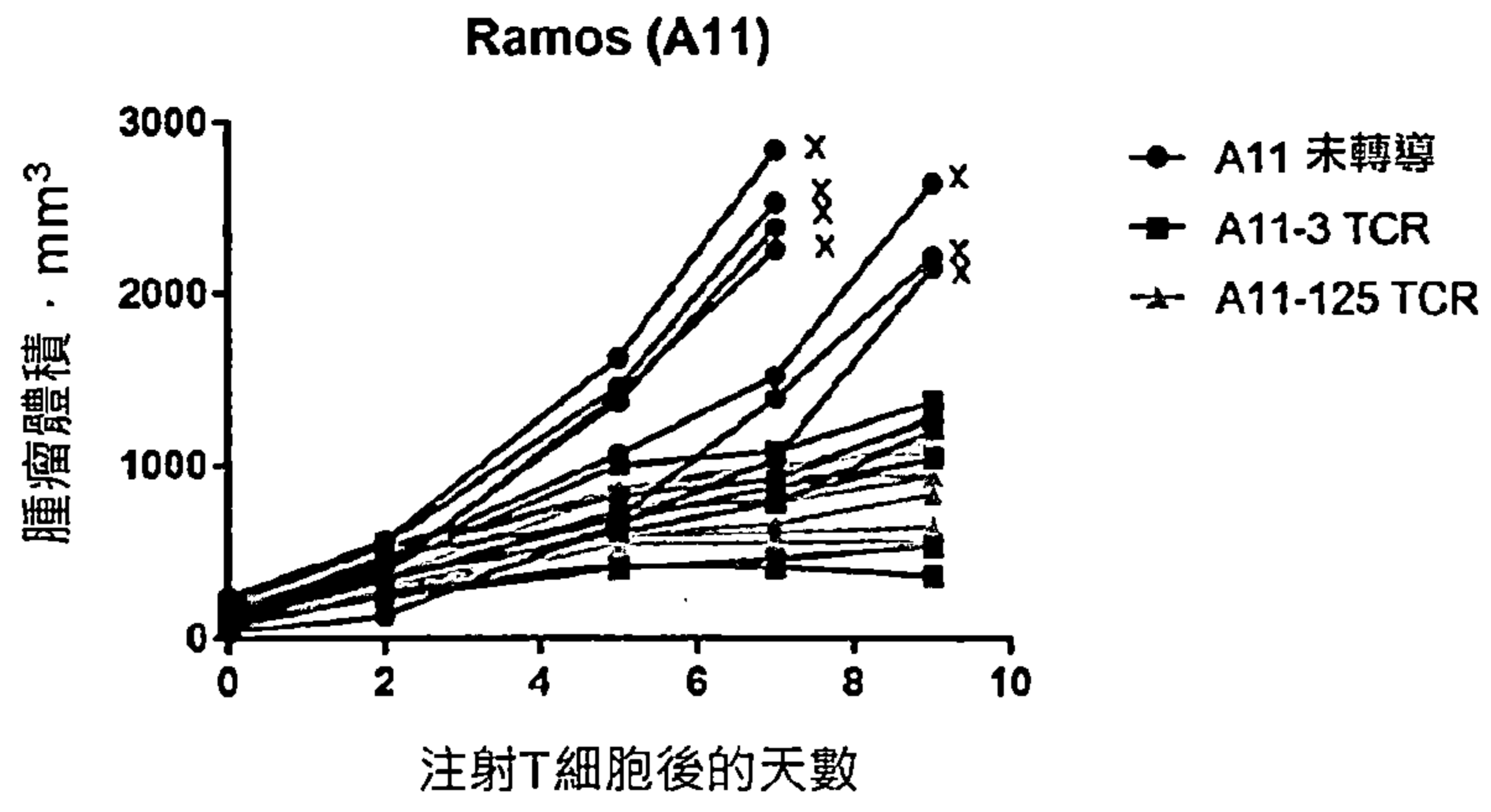


圖 4A

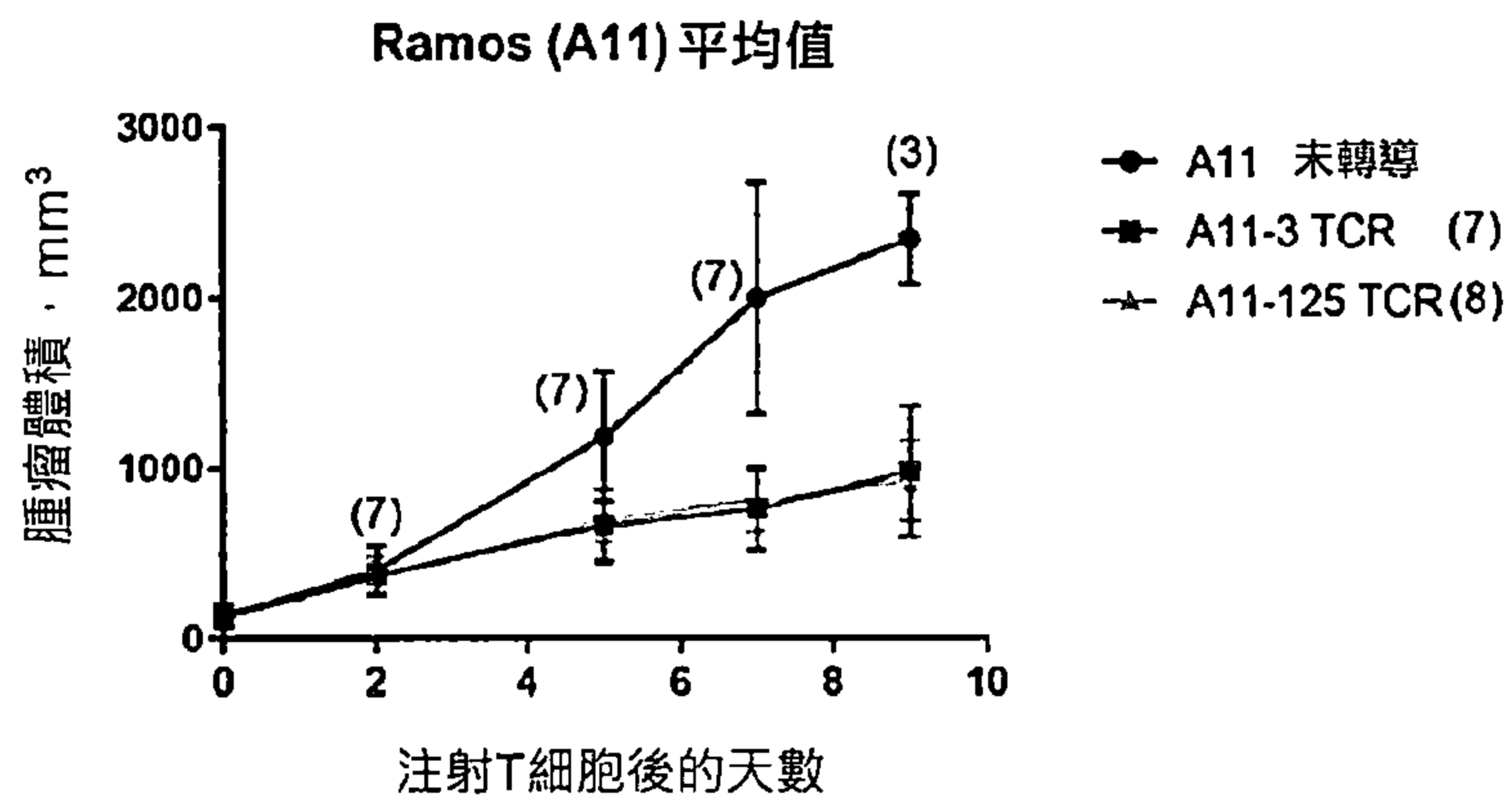


圖 4B

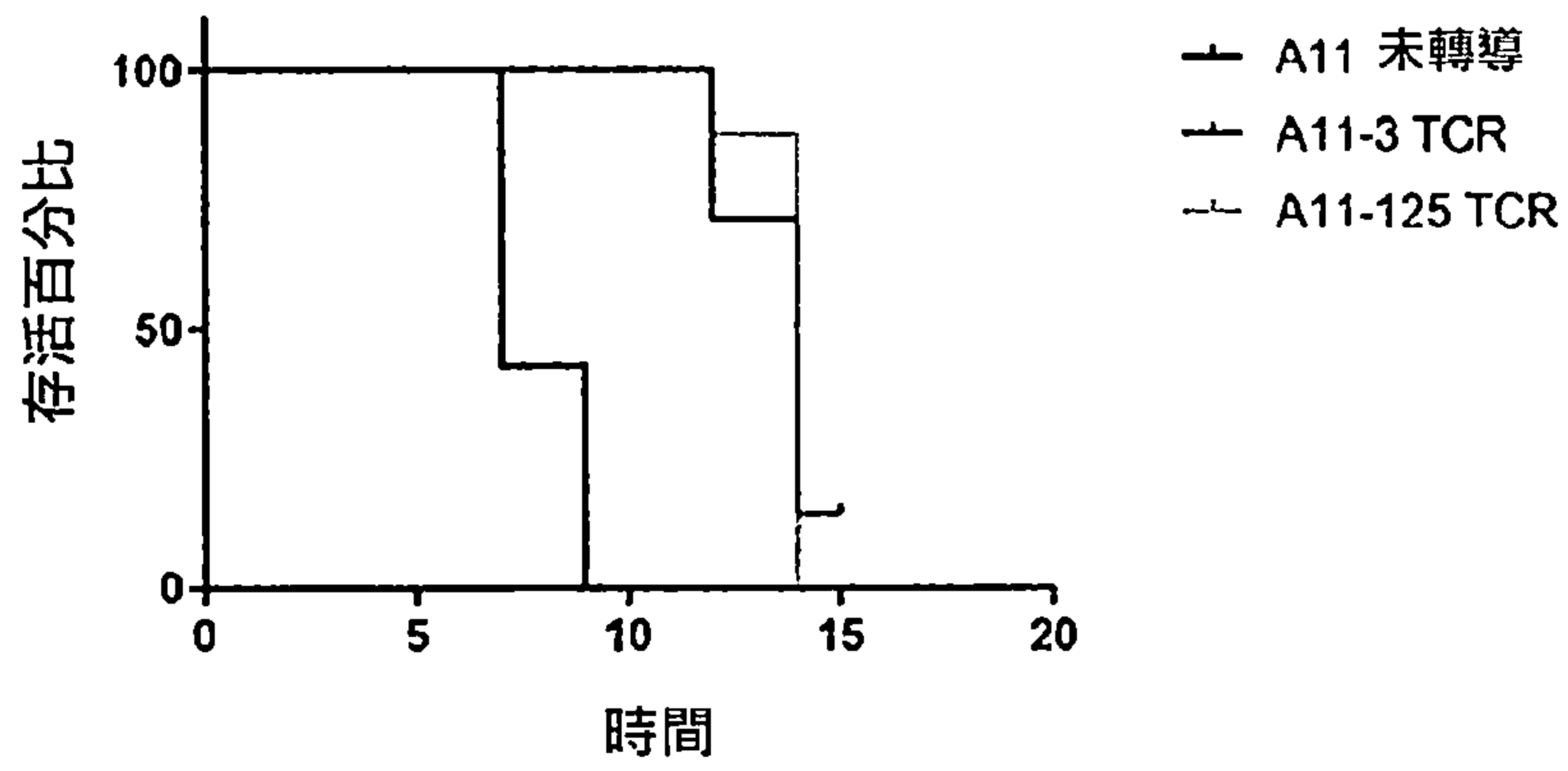


圖 4C

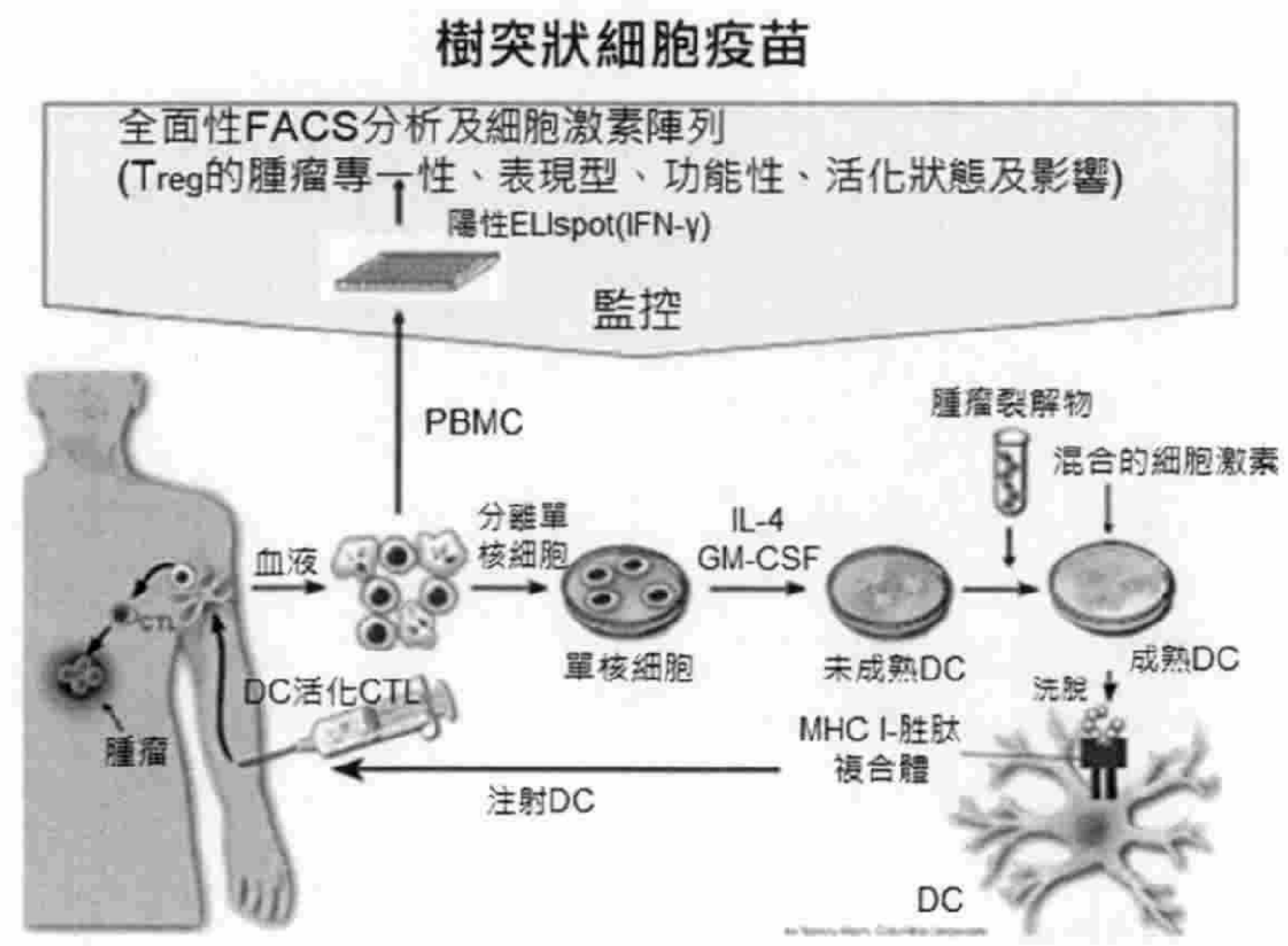


圖 5A

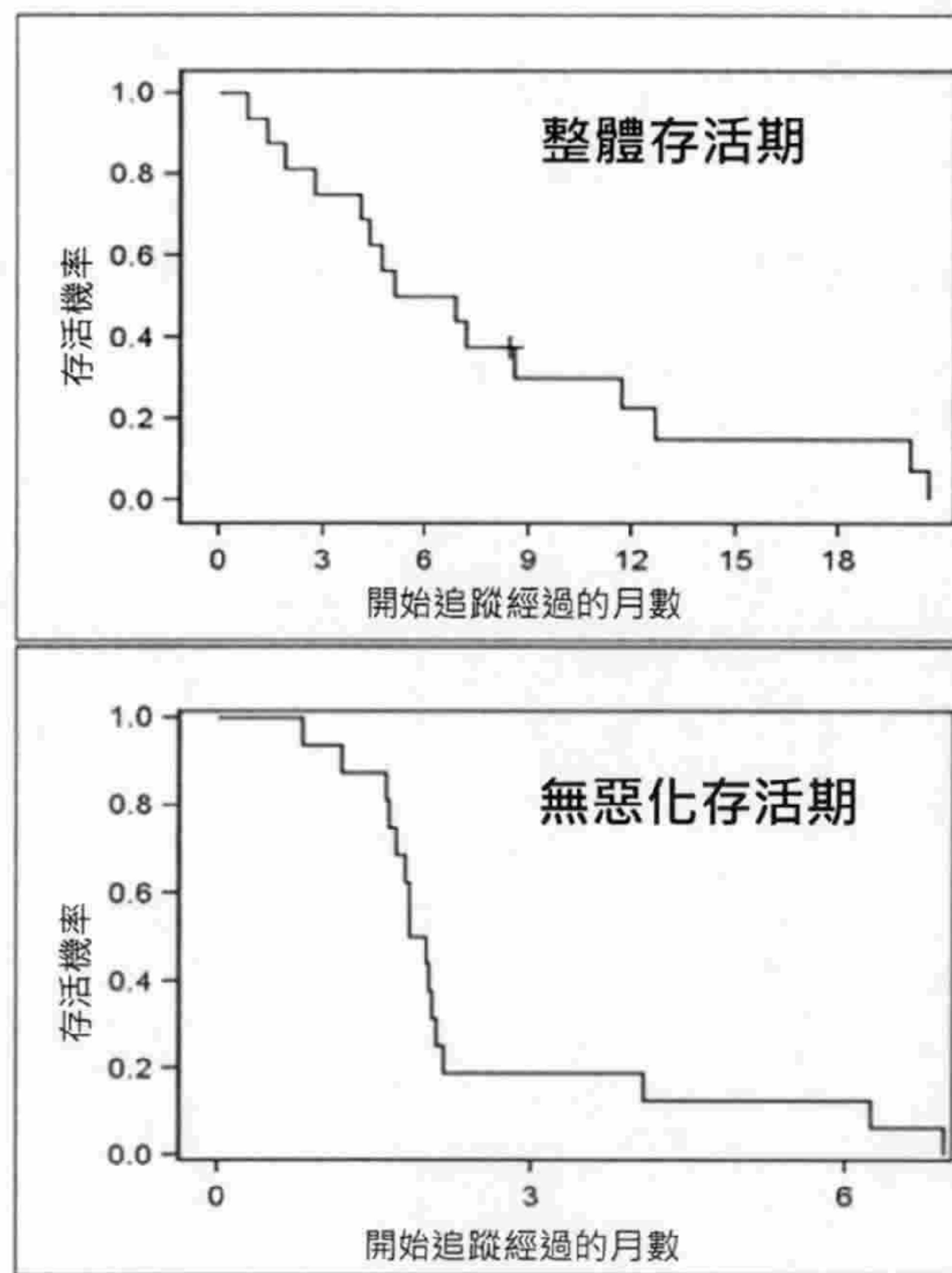


圖 5B

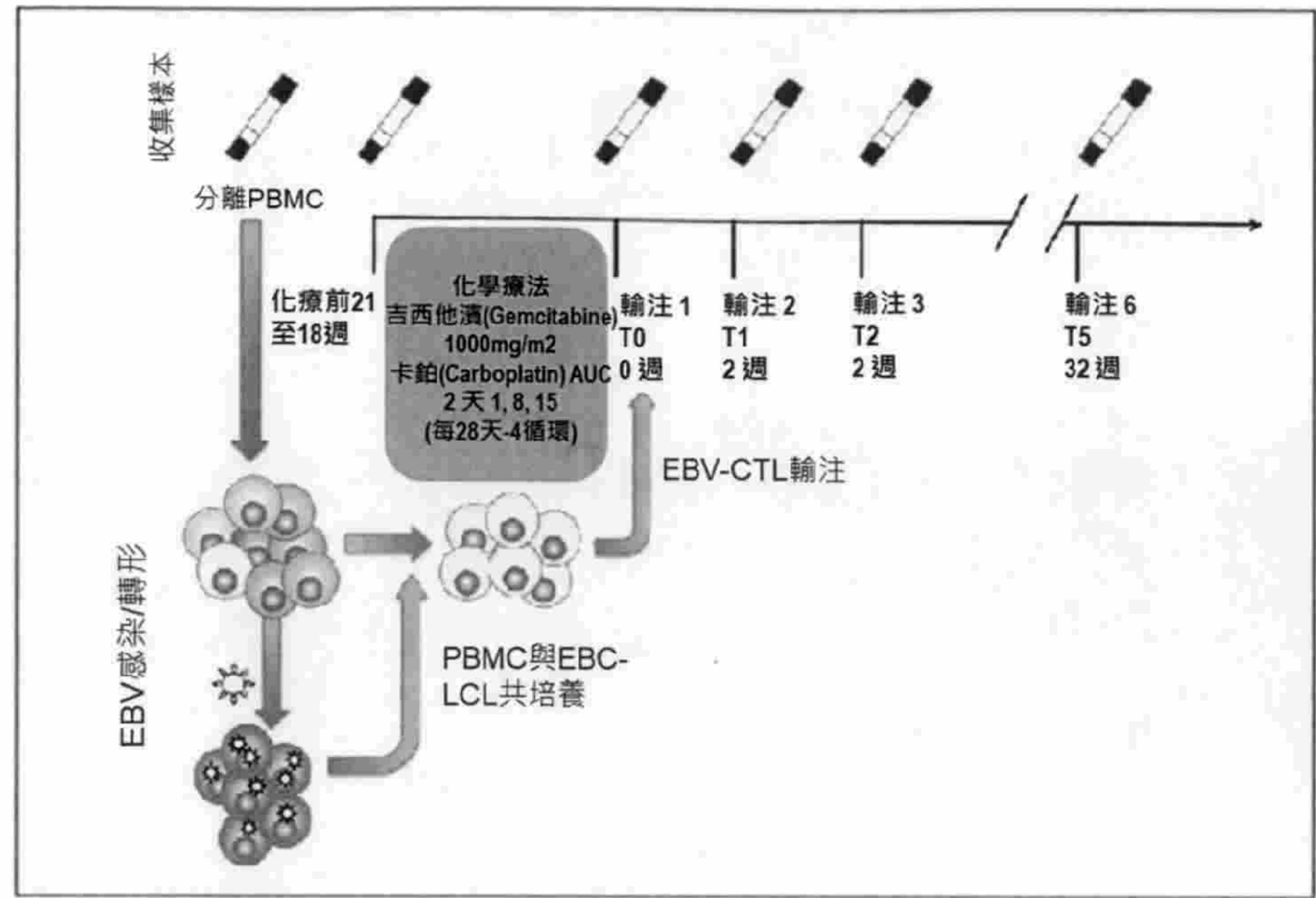


圖 5C

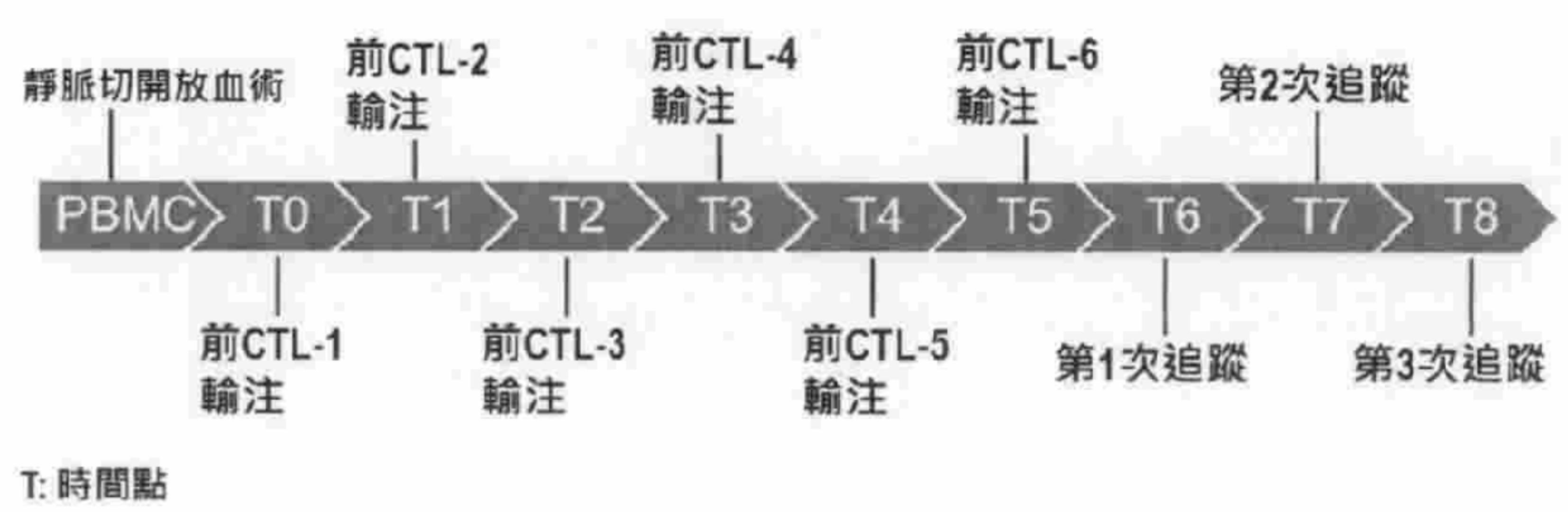


圖 5D

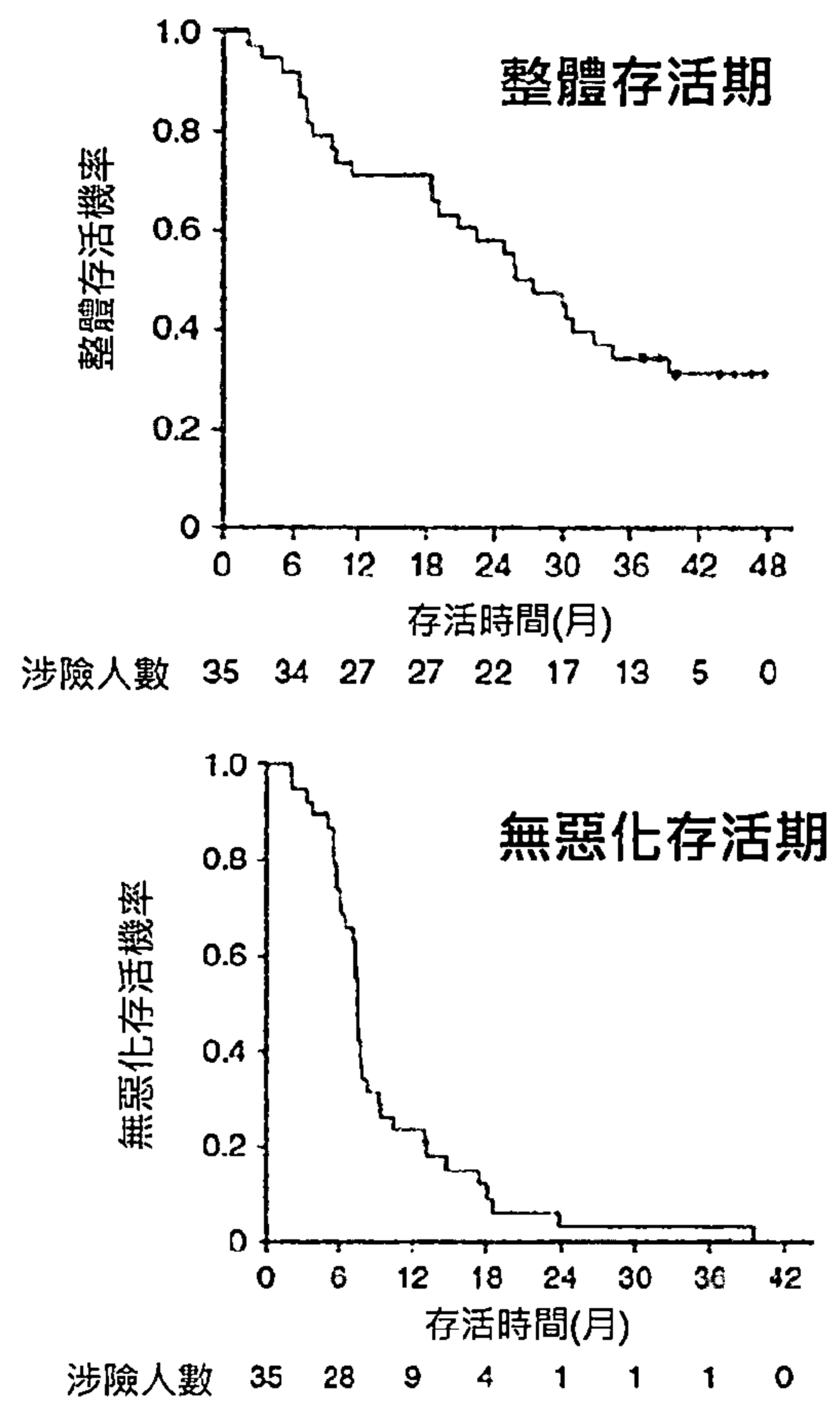


圖 5E

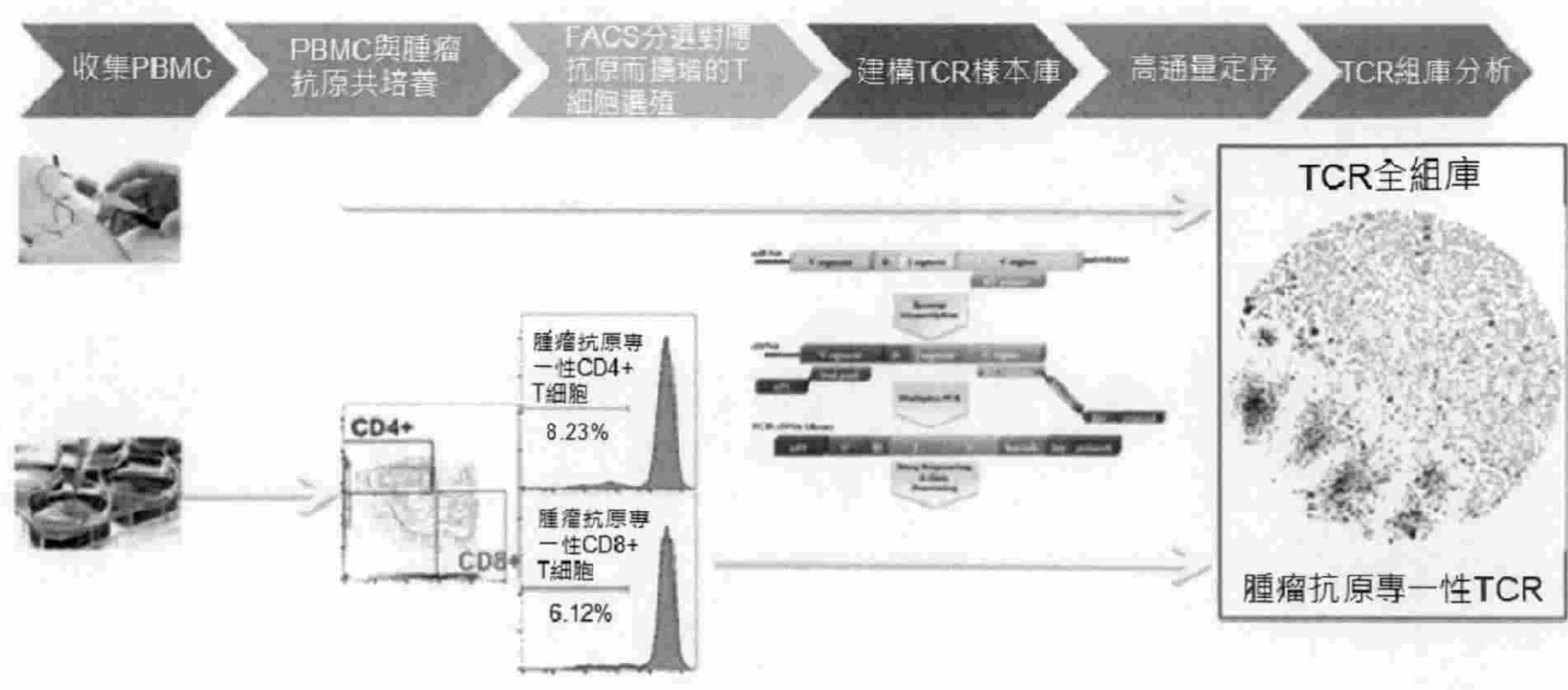


圖 6A

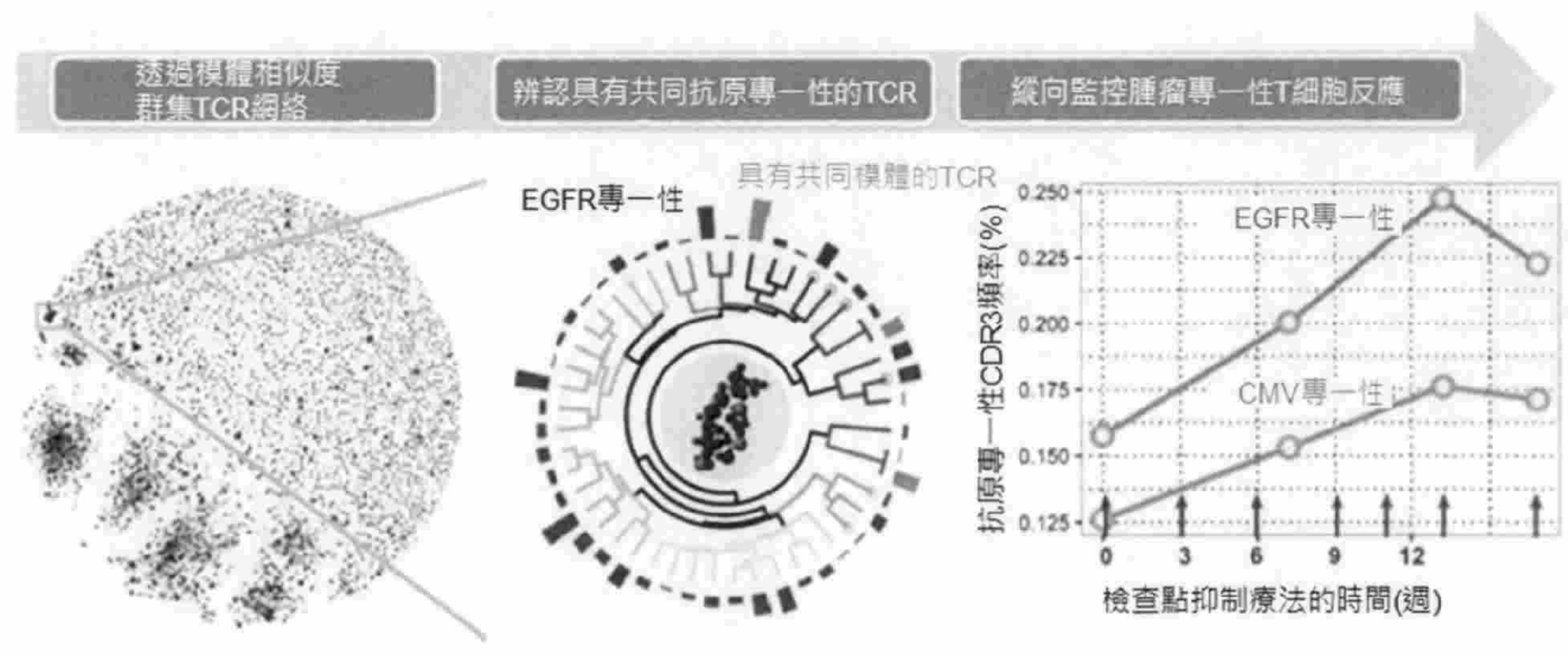


圖 6B

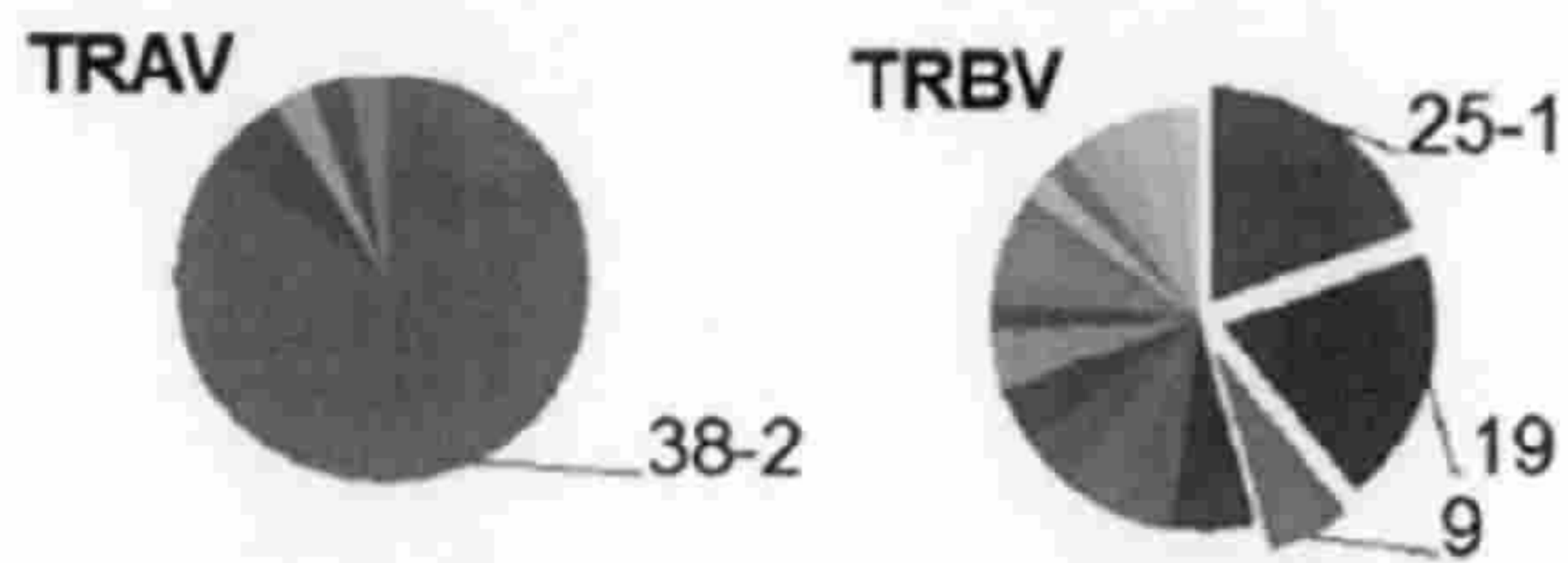


圖 7A

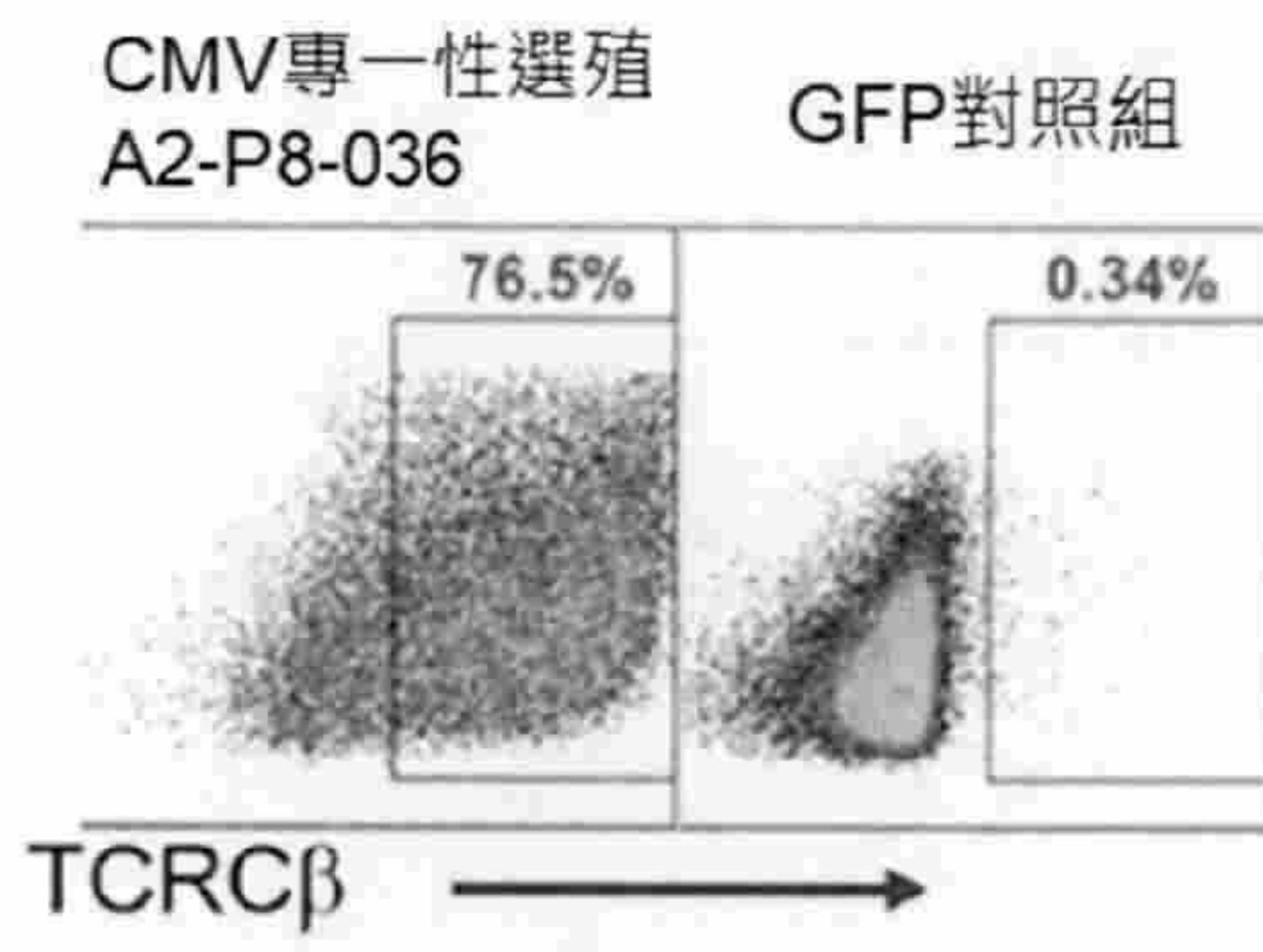


圖 7B

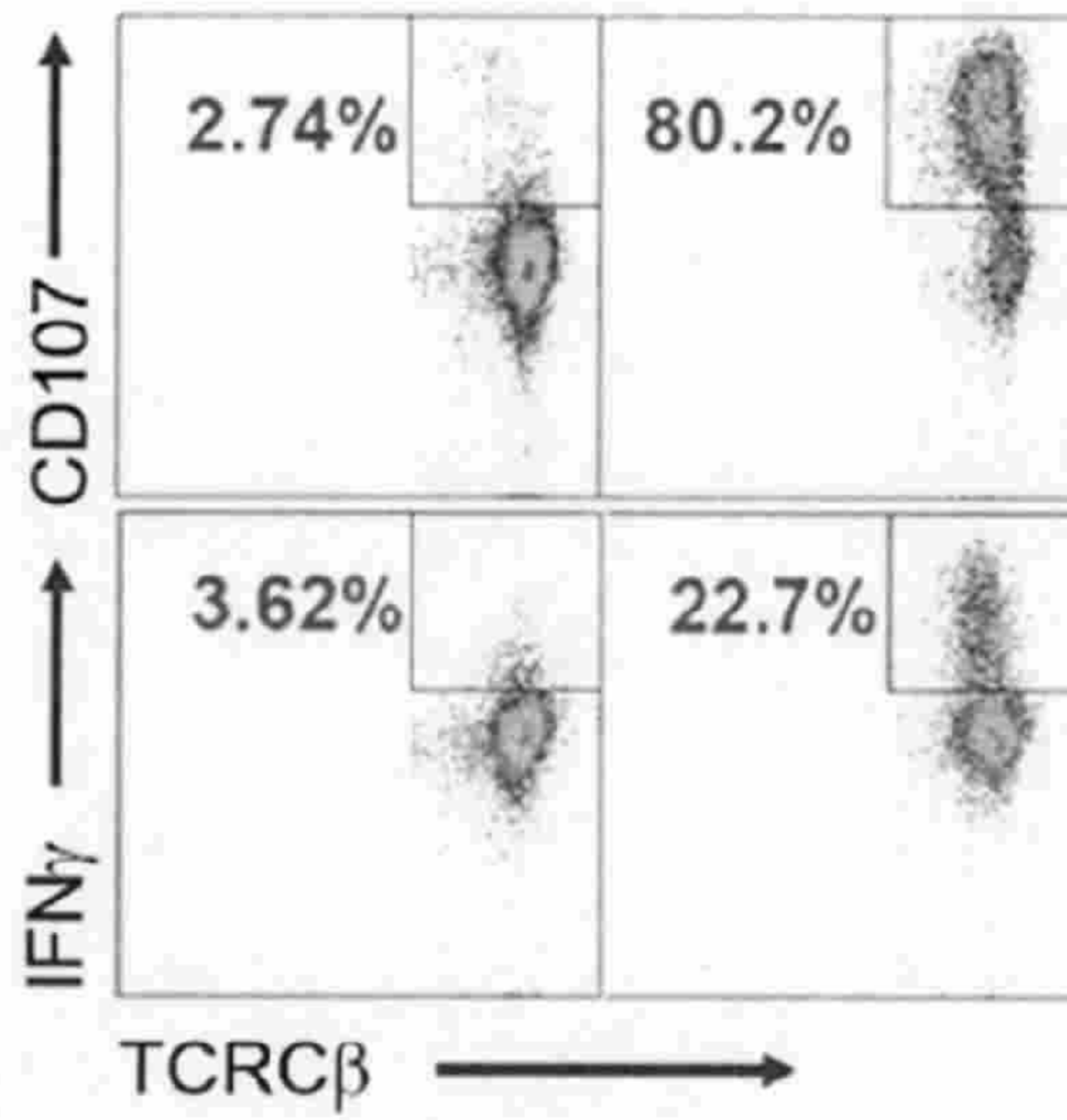


圖 7C

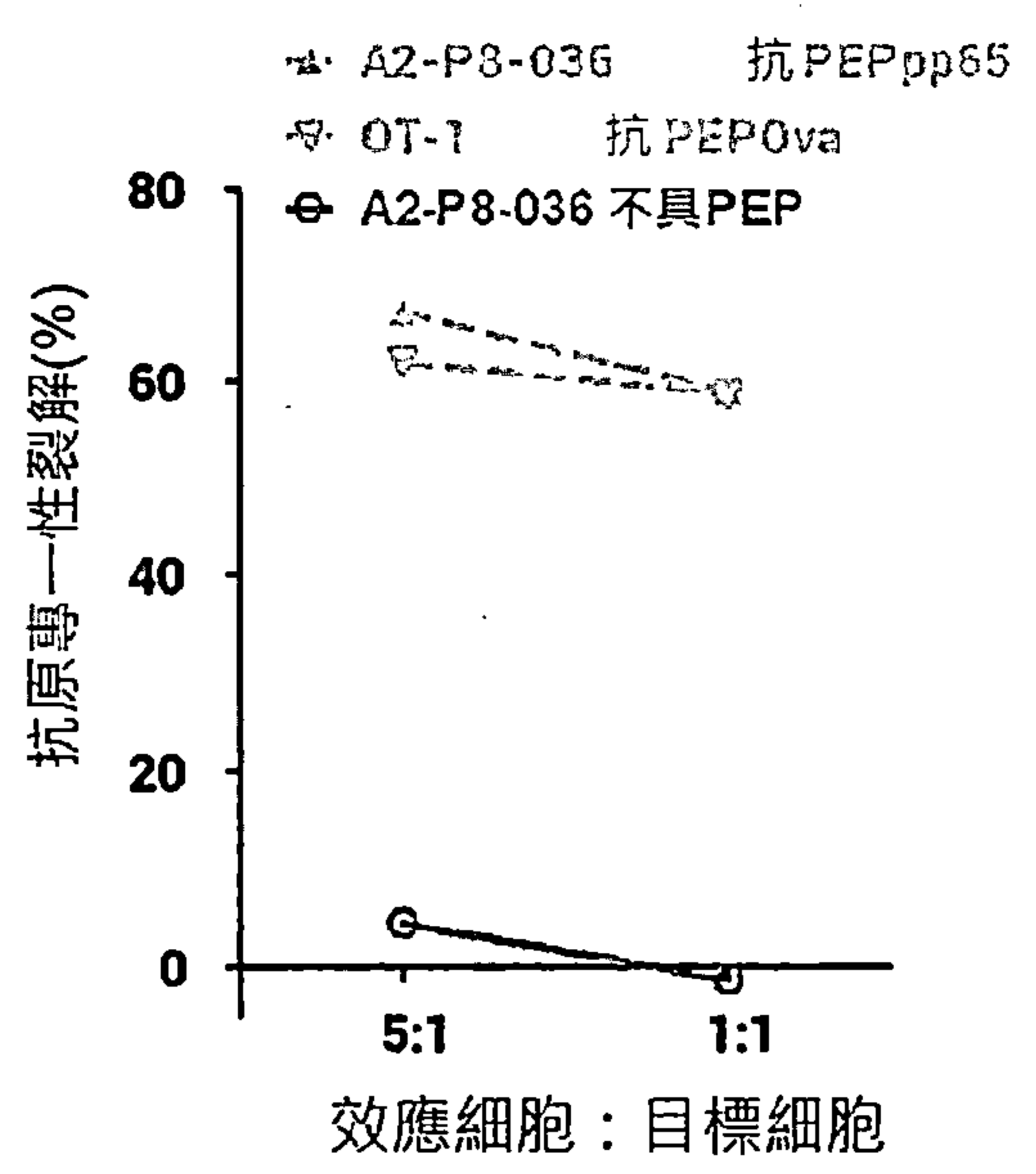


圖 7D