



(21)申請案號：111149290

(22)申請日：中華民國 106 (2017) 年 10 月 11 日

(51)Int. Cl.：

C07K14/725 (2006.01)

C12N5/0783 (2010.01)

C12N15/12 (2006.01)

C12N15/86 (2006.01)

(30)優先權：2016/10/07

美國

62/405,551

2017/05/23

美國

62/510,108

(71)申請人：美商 T C R 2 療法股份有限公司 (美國) TCR2 THERAPEUTICS INC. (US)

美國

(72)發明人：拜奧雷 派崔克 BAEUERLE, PATRICK (DE)；席賽可威茲 葛高瑞

SIECZKIEWICZ, GREGORY (US)；赫夫梅斯特 羅伯特 HOFMEISTER, ROBERT

(DE)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：102 項 圖式數：14 共 287 頁

(54)名稱

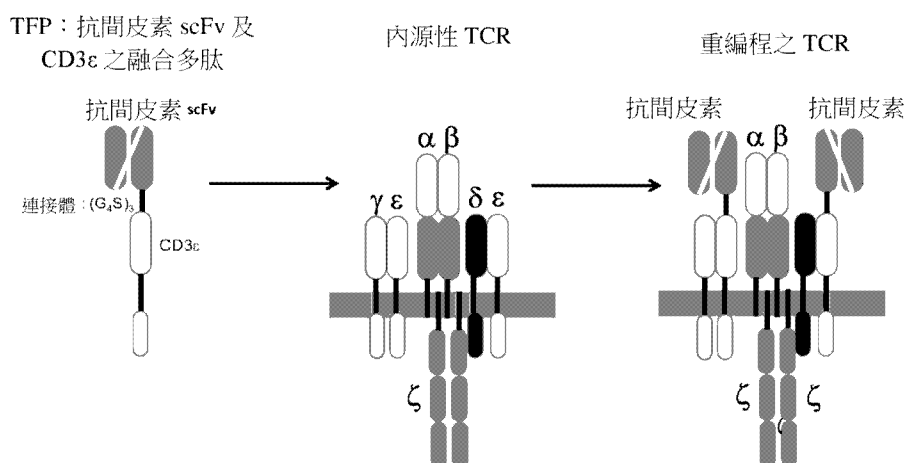
用於使用融合蛋白之 T C R 重編程的組合物及方法

(57)摘要

本文提供 T 細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)、經改造以表現一或多種 TFP 之 T 細胞、及其用於治療疾病(包括癌症)之方法。

Provided herein are T-cell receptor (TCR) fusion proteins (TFPs), T-cells engineered to express one or more TFPs, and methods of use thereof for the treatment of diseases, including cancer.

指定代表圖：



【圖 1】



【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於使用融合蛋白之TCR重編程的組合物及方法

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TCR REPROGRAMMING
USING FUSION PROTEINS

【中文】

本文提供T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)、經改造以表現一或多種TFP之T細胞、及其用於治療疾病(包括癌症)之方法。

【英文】

Provided herein are T-cell receptor (TCR) fusion proteins (TFPs), T-cells engineered to express one or more TFPs, and methods of use thereof for the treatment of diseases, including cancer.

【指定代表圖】

圖1

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

用於使用融合蛋白之TCR重編程的組合物及方法

【英文發明名稱】

COMPOSITIONS AND METHODS FOR TCR REPROGRAMMING
USING FUSION PROTEINS

【技術領域】

【先前技術】

患有晚期實體腫瘤之大多數患者利用標準療法無法治癒。另外，傳統治療選擇通常具有嚴重副作用。已進行多種嘗試使患者之免疫系統排斥癌細胞，方法統稱為癌症免疫療法。然而，若干障礙使得難以達成臨床有效性。儘管已鑑別出數百種所謂的腫瘤抗原，但該等腫瘤抗原通常源於自身且由此可引導癌症免疫療法對抗健康組織，或其免疫原性較差。此外，癌細胞使用多種機制使其自身覺察不出或對抗由癌症免疫療法引起之免疫攻擊之起始及傳播。

使用依賴於將經遺傳改造之T細胞重定向至癌細胞上之適宜細胞表面分子之嵌合抗原受體(CAR)修飾之自體T細胞療法之最新研發顯示在利用免疫系統之動力來治療B細胞惡性病方面之有前景的結果(例如，參見Sadelain等人，Cancer Discovery 3:388-398 (2013))。利用CD-19特異性CAR T細胞(稱為CTL019)之臨床結果已顯示在罹患慢性淋巴球性白血病(CLL)之患者中以及在兒童期急性淋巴胚細胞性白血病(ALL)中建立完全緩解(例如參見Kalos等人，Sci Transl Med 3:95ra73 (2011), Porter等人，NEJM 365:725-733 (2011), Grupp等人，NEJM 368:1509-1518 (2013))。

替代方法係使用針對腫瘤相關肽抗原選擇之T細胞受體(TCR) α 及 β 鏈來遺傳改造自體T細胞。該等TCR鏈將形成完整的TCR複合物且為具有TCR之T細胞提供另一定義特異性。在患有滑膜癌之患者中利用表現NY-ESO-1特異性TCR α 及 β 鏈之經改造自體T細胞獲得鼓舞人心的結果。

除表現CAR或另一TCR之經遺傳修飾之T細胞能在活體外/離體識別並破壞各別靶細胞以外，利用經改造T細胞之成功患者療法需要T細胞能隨時間強有力的活化、擴增、持續，且在復發疾病之情形下激活「記憶」反應。CAR T細胞之高且可管控的臨床效能目前限於BCMA陽性及CD-19陽性B細胞惡性病且限於表現HLA-A2之表現NY-ESO-1-肽之滑膜肉瘤患者。業內顯然需要改良經遺傳改造之T細胞以更廣泛地針對多種人類惡性病。本文闡述TCR亞單元(包括CD3 ϵ 、CD3 γ 及CD3 δ)及具有特異性針對細胞表面抗原之結合域之TCR α 及TCR β 鏈之新穎融合蛋白，其可克服現有方法之限制。本文闡述較CAR可更有效地殺死靶細胞但釋放相當或更低含量之促發炎細胞介素之新穎融合蛋白。該等融合蛋白及其使用方法代表T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)相對於CAR之優點，因為該等細胞介素之升高之含量與過繼性CAR-T療法之劑量限制性毒性相關。

【發明內容】

本文提供T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)、經改造以表現一或多種TFP之T細胞及其用於治療疾病之方法。

在一個態樣中，本文提供編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之經分離重組核酸分子，該TFP包含TCR亞單元及包含抗間皮素結合域之人類或人類化抗體域。

在一個態樣中，本文提供編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之經

分離重組核酸分子，該TFP包含TCR亞單元，該TCR亞單元包含TCR細胞外域之至少一部分及包含CD3 ϵ 之細胞內信號傳導域之刺激域之TCR細胞內域；及包含抗原結合域之人類或人類化抗體域，其中TCR亞單元及抗體域係可操作連接的，且其中TFP在T細胞中表現時納入TCR中。

在一個態樣中，本文提供編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之經分離重組核酸分子，該TFP包含TCR亞單元，該TCR亞單元包含TCR細胞外域之至少一部分及包含CD3 γ 之細胞內信號傳導域之刺激域之TCR細胞內域；及人類或人類化抗體域，其包含抗原結合域，其中TCR亞單元及抗體域係可操作連接的，且其中TFP在T細胞中表現時納入TCR中。

在一個態樣中，本文提供編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之經分離重組核酸分子，該TFP包含TCR亞單元，該TCR亞單元包含TCR細胞外域之至少一部分及包含CD3 δ 之細胞內信號傳導域之刺激域之TCR細胞內域；及包含抗原結合域之人類或人類化抗體域，其中TCR亞單元及抗體域係可操作連接的，且其中TFP在T細胞中表現時納入TCR中。

在一個態樣中，本文提供編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之經分離重組核酸分子，該TFP包含TCR亞單元，該TCR亞單元包含TCR細胞外域之至少一部分及包含TCR α 之細胞內信號傳導域之刺激域之TCR細胞內域；及包含抗原結合域之人類或人類化抗體域，其中TCR亞單元及抗體域係可操作連接的，且其中TFP在T細胞中表現時納入TCR中。

在一個態樣中，本文提供編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之經分離重組核酸分子，該TFP包含TCR亞單元，該TCR亞單元包含TCR細胞外域之至少一部分及包含TCR β 之細胞內信號傳導域之刺激域之TCR細胞內域；及包含抗原結合域之人類或人類化抗體域，其中TCR亞單元及抗體

域係可操作連接的，且其中TFP在T細胞中表現時納入TCR中。

在一個態樣中，本文提供編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之經分離重組核酸分子，該TFP包含TCR亞單元及人類或人類化抗體域，該抗體域包含為抗間皮素結合域之抗原結合域。

在一些情形中，TCR亞單元及抗體域係可操作連接的。在一些情形中，TFP在T細胞中表現時納入TCR中。在一些情形中，所編碼抗原結合域係藉由連接體序列連接至TCR細胞外域。在一些情形中，所編碼連接體序列包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=1$ 至4。在一些情形中，TCR亞單元包含TCR細胞外域。在一些情形中，TCR亞單元包含TCR跨膜域。在一些情形中，TCR亞單元包含TCR細胞內域。在一些情形中，TCR亞單元包含(i) TCR細胞外域、(ii) TCR跨膜域及(iii) TCR細胞內域，其中(i)、(ii)及(iii)中之至少兩者來自同一TCR亞單元。在一些情形中，TCR亞單元包含TCR細胞內域，該TCR細胞內域包含選自以下之刺激域：CD3 ϵ 、CD3 γ 或CD3 δ 之細胞內信號傳導域，或具有至少一個、兩個或三個對其之修飾之胺基酸序列。在一些情形中，TCR亞單元包含細胞內域，該細胞內域包含選自以下之刺激域：4-1BB之功能信號傳導域及/或CD3 ζ 之功能信號傳導域，或其中具有至少一個修飾之胺基酸序列。在一些情形中，人類或人類化抗體域包含抗體片段。在一些情形中，人類或人類化抗體域包含scFv或V_H域。在一些情形中，經分離核酸分子編碼(i)抗間皮素輕鏈結合域胺基酸序列之輕鏈(LC) CDR1、LC CDR2及LC CDR3，該等LC CDR分別與本文提供之抗間皮素輕鏈結合域之輕鏈(LC) CDR1、LC CDR2及LC CDR3具有70%至100%序列一致性，及/或(ii)抗間皮素重鏈結合域胺基酸序列之重鏈(HC) CDR1、HC CDR2及HC CDR3，該等HC CDR分別與本文提供之抗

間皮素重鏈結合域之重鏈(HC) CDR1、HC CDR2及HC CDR3具有70%至100%序列一致性。在一些情形中，經分離核酸分子編碼輕鏈可變區，其中該輕鏈可變區包含具有本文所提供輕鏈可變區之輕鏈可變區胺基酸序列之至少一個但不超過30個修飾之胺基酸序列，或與本文所提供輕鏈可變區之輕鏈可變區胺基酸序列具有95%至99%一致性之序列。在一些情形中，經分離核酸分子編碼重鏈可變區，其中該重鏈可變區包含具有本文所提供重鏈可變區之重鏈可變區胺基酸序列之至少一個但不超過30個修飾之胺基酸序列，或與本文所提供重鏈可變區之重鏈可變區胺基酸序列具有95%至99%一致性之序列。在一些情形中，TFP包括TCR亞單元之細胞外域，該細胞外域包含選自由以下組成之群之蛋白質之細胞外域或其一部分：TCR α 鏈、TCR β 鏈、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元、CD3 δ TCR亞單元、其功能片段及其具有至少一個但不超過20個修飾之胺基酸序列。在一些情形中，所編碼TFP包括跨膜域，該跨膜域包含選自由以下組成之群之蛋白質之跨膜域：TCR α 鏈、TCR β 鏈、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元、CD3 δ TCR亞單元、其功能片段及其具有至少一個但不超過20個修飾之胺基酸序列。在一些情形中，所編碼TFP包括跨膜域，該跨膜域包含選自由以下組成之群之蛋白質之跨膜域：TCR α 鏈、TCR β 鏈、TCR ζ 鏈、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元、CD3 δ TCR亞單元、CD45、CD2、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、其功能片段及其具有至少一個但不超過20個修飾之胺基酸序列。在一些情形中，經分離核酸分子進一步包含編碼共刺激域之序列。在一些情形中，共刺激域係自選自由以下組成之群之蛋白質獲得之功能信號傳導域：

DAP10、DAP12、CD30、LIGHT、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 及 4-1BB (CD137)，及其具有至少一個但不超過20個對其之修飾之胺基酸序列。在一些情形中，經分離核酸分子進一步包含前導序列。在一些情形中，經分離核酸分子係mRNA。

在一些情形中，TFP包括TCR亞單元之基於免疫受體酪胺酸之活化基序(ITAM)，該ITAM包含選自由以下組成之群之蛋白質之ITAM或其一部分：CD3 ζ TCR亞單元、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元、CD3 δ TCR亞單元、TCR ζ 鏈、Fc ϵ 受體1鏈、Fc ϵ 受體2鏈、Fc γ 受體1鏈、Fc γ 受體2a鏈、Fc γ 受體2b1鏈、Fc γ 受體2b2鏈、Fc γ 受體3a鏈、Fc γ 受體3b鏈、Fc β 受體1鏈、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d、其功能片段及其具有至少一個但不超過20個對其之修飾之胺基酸序列。在一些情形中，ITAM替代CD3 γ 、CD3 δ 或CD3 ϵ 之ITAM。在一些情形中，ITAM選自由以下組成之群：CD3 ζ TCR亞單元、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元及CD3 δ TCR亞單元，且替代選自由以下組成之群之不同ITAM：CD3 ζ TCR亞單元、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元及CD3 δ TCR亞單元。

在一些情形中，核酸包含核苷酸類似物。在一些情形中，核苷酸類似物選自由以下組成之群：2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-胺基丙基、2'-去氧、T-去氧-2'-氟、2'-O-胺基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基胺基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基胺基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基胺基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙

醯胺基(2'-O-NMA)修飾、鎖核酸(LNA)、乙烯核酸(ENA)、肽核酸(PNA)、1',5'-脫水己醣醇核酸(HNA)、嗎啉基、甲基膦酸核苷酸、硫醇膦酸核苷酸及2'-氟N3-P5'-亞磷醯胺。

在一個態樣中，本文提供由本文所提供核酸分子編碼之經分離多肽分子。

在一個態樣中，本文提供包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內域之經分離TFP分子。

在一個態樣中，本文提供包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內信號傳導域之經分離TFP分子，其中該TFP分子能與內源性TCR複合物及/或至少一種內源性TCR多肽在功能上相互作用。

在一些實施例中，包含為由核酸編碼之抗間皮素結合域之抗原結合域之人類或人類化抗體域或包含抗間皮素結合域之抗體或表現由核酸編碼之抗間皮素結合域之細胞具有如下親和力值：至多約200 nM、100 nM、75 nM、50 nM、25 nM、20 nM、15 nM、14 nM、13 nM、12 nM、11 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM、0.09 nM、0.08 nM、0.07 nM、0.06 nM、0.05 nM、0.04 nM、0.03 nM、0.02 nM或0.01 nM；及/或至少約100 nM、75 nM、50 nM、25 nM、20 nM、15 nM、14 nM、13 nM、12 nM、11 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM、0.09 nM、0.08 nM、0.07 nM、0.06 nM、0.05

nM、0.04 nM、0.03 nM、0.02 nM或0.01 nM；及/或約200 nM、100 nM、75 nM、50 nM、25 nM、20 nM、15 nM、14 nM、13 nM、12 nM、11 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM、0.09 nM、0.08 nM、0.07 nM、0.06 nM、0.05 nM、0.04 nM、0.03 nM、0.02 nM或0.01 nM。

在一個態樣中，本文提供經分離TFP分子，其包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內信號傳導域，其中該TFP分子能在功能上整合至內源性TCR複合物中。

在一些情形中，經分離TFP分子包含包括人類或人類化抗間皮素結合域之抗體或抗體片段、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內域。在一些情形中，抗間皮素結合域係scFv、V_H域或駱駝科動物V_{HH}域。在一些情形中，抗間皮素結合域包含與以下具有95%至100%一致性之重鏈：本文所提供重鏈之胺基酸序列、其功能片段或其具有至少一個但不超過30個修飾之胺基酸序列。在一些情形中，抗間皮素結合域包含與以下具有95%至100%一致性之輕鏈：本文所提供輕鏈之胺基酸序列、其功能片段或其具有至少一個但不超過30個修飾之胺基酸序列。在一些情形中，經分離TFP分子包含TCR細胞外域，該TCR細胞外域包含選自由以下組成之群之蛋白質之細胞外域或其一部分：TCR α 鏈、TCR β 鏈、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元、CD3 δ TCR亞單元、其功能片段及其具有至少一個但不超過20個修飾之胺基酸序列。在一些情形中，抗間皮素結合域係藉由連接體序列連接至TCR細胞外域。在一些情形中，連接體區包含(G₄S)_n，其中n=1至4。

在一些情形，經分離TFP分子進一步包含編碼共刺激域之序列。在一

些情形中，經分離TFP分子進一步包含編碼細胞內信號傳導域之序列。在一些情形中，經分離TFP分子進一步包含前導序列。

在一個態樣中，本文提供載體包含編碼本文所提供TFP之核酸分子。在一些情形中，載體選自由以下組成之群：DNA、RNA、質體、慢病毒載體、腺病毒載體、勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma viral, RSV)載體或逆轉錄病毒載體。在一些情形中，載體進一步包含啟動子。在一些情形中，載體係活體外轉錄之載體。在一些情形中，載體中之核酸序列進一步包含聚(A)尾。在一些情形中，載體中之核酸序列進一步包含3'UTR。

在一個態樣中，本文提供包含本文所提供載體之細胞。在一些情形中，細胞係人類T細胞。在一些情形中，T細胞係CD8+或CD4+ T細胞。在一些情形中，T細胞係 $\gamma \delta$ T細胞。在一些情形中，T細胞係NK-T細胞。在一些情形中，細胞進一步包含編碼抑制性分子之核酸，該抑制性分子包含第一多肽，該第一多肽包含抑制性分子之至少一部分，與包含來自細胞內信號傳導域之正信號之第二多肽締合。在一些情形中，抑制性分子包含包括PD1之至少一部分之第一多肽及包含共刺激域及初級信號傳導域之第二多肽。

在一個態樣中，本文提供包含至少兩種TFP分子之人類CD8+或CD4+ T細胞，該等TFP分子包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內域，其中該等TFP分子能與人類CD8+或CD4+ T細胞之表面中、表面處及/或表面上之內源性TCR複合物及/或至少一種內源性TCR多肽在功能上相互作用。

在一個態樣中，本文提供蛋白質複合物，其包含：包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內域之TFP分子；及至

少一種內源性TCR複合物。

在一些情形中，TCR包含選自由以下組成之群之蛋白質之細胞外域或其一部分：TCR α 鏈、TCR β 鏈、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元及CD3 δ TCR亞單元。在一些情形中，抗間皮素結合域係藉由連接體序列連接至TCR細胞外域。在一些情形中，連接體區包含(G₄S)_n，其中n=1至4。

在一個態樣中，本文提供人類CD8⁺或CD4⁺ T細胞，其包含至少兩種不同的根據本文所提供之蛋白質複合物之TFP蛋白質。

在一個態樣中，本文提供製備細胞之方法，其包含用本文提供之載體轉導T細胞。

在一個態樣中，本文提供生成RNA改造之細胞之群體之方法，其包含向細胞中引入活體外轉錄之RNA或合成RNA，其中該RNA包含編碼本文所提供TFP分子之核酸。

在一個態樣中，本文提供在哺乳動物中提供抗腫瘤免疫性之方法，其包含向哺乳動物投與有效量之表現本文所提供TFP分子或表現本文所提供多肽分子之細胞。

在一些情形中，細胞係自體T細胞。在一些情形中，細胞係同種異體T細胞。在一些情形中，哺乳動物係人類。

在一個態樣中，本文提供治療患有與間皮素之表現相關之疾病之哺乳動物之方法，其包含向哺乳動物投與有效量之本文所提供TFP分子、本文所提供細胞或本文所提供多肽分子。在一些情形中，與間皮素表現相關之疾病選自由以下組成之群：與間皮素之表現相關之增殖性疾病、癌症、惡性病及非癌症相關適應症。在一些情形中，疾病係選自由以下組成之群

之癌症：間皮瘤、腎細胞癌、胃癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、結腸癌、子宮頸癌、腦癌、肝癌、胰臟癌、甲狀腺癌、膀胱癌、輸尿管癌、腎癌、子宮內膜癌、食道癌、胃癌、胸腺癌、膽管癌及胃癌。

在一些情形中，疾病係癌症。在一些情形中，疾病選自由以下組成之群：間皮瘤、乳頭狀漿液性卵巢腺癌、透明細胞卵巢癌、混合性苗勒管卵巢癌(mixed Mullerian ovarian carcinoma)、子宮內膜樣黏液卵巢癌、惡性胸膜疾病、胰臟腺癌、胰臟導管腺癌、子宮漿液性癌、肺腺癌、肝外膽管癌、胃腺癌、食道腺癌、結腸直腸腺癌、乳房腺癌、與間皮素表現相關之疾病、與間皮素表現相關之疾病、非黏液卵巢癌、侵襲性導管腺癌、肺腺癌、胃/食道腺癌、結腸直腸腺癌、白血病、兒童急性骨髓性白血病、侵襲性胰管內乳頭狀黏液性腫瘤(IPMN)、子宮內膜腺癌、胃/食道腺癌、肺腺癌、乳房腺癌及其組合。

在一些情形中，表現TFP分子之細胞係與增加表現TFP分子之細胞之效能之藥劑組合投與。在一些情形中，與投與有效量之表現抗間皮素嵌合抗原受體(CAR)之T細胞之哺乳動物相比，在哺乳動物中釋放之細胞介素更少。在一些情形中，表現TFP分子之細胞係與改善與投與表現TFP分子之細胞相關之一或多種副作用之藥劑組合投與。在一些情形中，表現TFP分子之細胞係與治療與間皮素相關之疾病之藥劑組合投與。

在一個態樣中，本文所提供經分離核酸分子、本文所提供經分離多肽分子、本文所提供經分離TFP、本文所提供複合物、本文所提供載體或本文所提供細胞用作藥劑。

在一個態樣中，本文提供治療患有與間皮素之表現相關之疾病之哺乳動物之方法，其包含向哺乳動物投與有效量之本文所提供TFP分子、本

文所提供細胞或本文所提供多肽分子，其中與投與有效量之表現抗間皮素嵌合抗原受體(CAR)之T細胞之哺乳動物相比，在哺乳動物中釋放之細胞介素更少。

【圖式簡單說明】

本發明之新穎特徵具體闡述於隨附申請專利範圍中。參考陳述其中利用本發明原理之闡釋性實施例的下列詳細說明及附圖將會更好地瞭解本發明之特徵及優點，在附圖中：

圖1係展示本發明之T細胞受體融合多肽(TFP)之使用之示意性闡釋。實例性TFP含有經由 $(G_4S)_3$ 連接體序列融合之抗間皮素scFv及全長CD3 ϵ 多肽。當藉由T細胞產生或引入T細胞中時，TFP與內源性T細胞受體(TCR)(顯示包括兩種CD3 ϵ 多肽、一種CD3 γ 多肽、一種CD3 δ 多肽、兩種CD3 ζ 多肽、一種TCR α 亞單元及一種TCR β 亞單元，其中水平灰色區段代表質膜)之其他多肽締合以形成重編程之TCR，其中內源性CD3 ϵ 多肽中之一或兩者由TFP取代。

圖2代表展示本發明之經重編程T細胞受體融合多肽(TFP)之實例性變化形式之示意性闡釋。該闡釋表示scFv:TCR-V α 闡釋含有TFP之實例性經重編程TCR，該TFP含有經由 $(G_4S)_3$ 連接體序列融合之抗間皮素scFv及全長TCR-V α 多肽。該闡釋表示scFv:TCR-V α :TCR-V β 闡釋含有多種TFP之實例性經重編程TCR，該等TFP包括i)經由 $(G_4S)_3$ 連接體序列融合之抗間皮素scFv及全長TCR-V α 多肽及ii)經由 $(G_4S)_3$ 連接體序列融合之抗間皮素scFv及全長TCR-V β 多肽。該闡釋表示scFv: Δ TCR-V α :CD3 ϵ 闡釋含有多種TFP之實例性經重編程TCR，該等TFP包括i)經由 $(G_4S)_3$ 連接體序列融合之抗間皮素scFv及經截短(Δ) TCR多肽及ii)經由 $(G_4S)_3$ 連接體序列融合

之抗間皮素scFv及全長CD3ε多肽。該經截短(Δ) TCR多肽藉由刪除Vα而截短。該闡釋表示scFv:ΔTCR-Vα:ΔTCR-Vβ闡釋含有多種TFP之實例性經重編程TCR，該等TFP包括i)經由(G4S)₃連接體序列融合之抗間皮素scFv及經截短(Δ) TCR Vα多肽及ii)經由(G4S)₃連接體序列融合之抗間皮素scFv及經截短(Δ) TCR Vβ多肽。經截短(Δ) TCR多肽係藉由刪除Vβ而截短。

圖3係展示本發明之T細胞受體融合多肽(TFP)之使用之示意性闡釋。實例性TFP含有經由(G4S)₃連接體序列融合之抗間皮素V_H域及全長CD3ε多肽。當藉由T細胞產生或引入T細胞中時，TFP與內源性T細胞受體(TCR) (顯示包括兩種CD3ε多肽、一種CD3γ多肽、一種CD3δ多肽、兩種CD3ζ多肽、一種TCRα亞單元及一種TCRβ亞單元，其中水平灰色區段代表質膜)之其他多肽締合以形成重編程的TCR，其中內源性CD3ε多肽中之一或兩者係由TFP取代。

圖4係展示編碼多種TFP之DNA構築體之一系列示意性闡釋。

圖5A繪示經活化PBMC細胞上TFP之實例性表面表現分析且顯示經MSLN TFP活化且針對CD8 (抗CD8 APCCy7, y軸)及間皮素(「MSLN」) (Zenon® R-藻紅素標記之hMSLN IgG，x軸)進行染色之CD3⁺細胞(抗CD3 APC，門)。自左至右顯示未經轉導或經抗MSLN-CD3ε TFP、抗MSLN-CD28ζ CAR及抗MSLN-41BBζ CAR構築體轉導之細胞。

圖5B繪示經活化PBMC細胞上之TFP之實例性表面表現分析且顯示經內部單一域TFP活化且針對MSLN Fc進行染色且針對GFP進行分析之細胞。頂列顯示(自左至右)未經轉導之細胞及經對照抗MSLN-CD3ε TFP轉導之細胞(「SS1」)。第2-4列分別顯示經加GFP標籤(自左至右)之CD3ε

TFP、CD3 γ TFP、TCR β TFP及CD28 ζ CAR構築體轉導之細胞中之抗MSLN結合物SD1、SD4及SD6。

圖6A係繪示隨時間間皮素(MSLN)陽性HeLa (宮頸腺癌，ATCC® CCL-2™)靶細胞被抗MSLN-TFP構築體殺死之實例性圖形。經活化PBMC係未經處理(1號跡線)、未經轉導(2號跡線)或經空載體轉導(3號跡線)、經抗MSLN-CD3 ϵ TFP轉導(4號跡線)、經抗MSLN-CD28 ζ CAR轉導或經抗MSLN-41BB ζ CAR轉導，且擴增8天，之後與 1×10^4 個MSLN陽性HeLa靶細胞一起培育。

圖6B係繪示隨時間MSLN陰性HeLa (宮頸腺癌，ATCC® CCL-2™)靶細胞被抗MSLN-TFP構築體殺死之實例性圖形。經活化PBMC係未經處理(1號跡線)、未經轉導(2號跡線)或經空載體轉導(3號跡線)、經抗MSLN-CD3 ϵ TFP轉導(4號跡線)、經抗MSLN-CD28 ζ CAR轉導或經抗MSLN-41BB ζ CAR轉導且擴增8天，之後與 1×10^4 個MSLN陽性HeLa靶細胞一起培育。

圖6C顯示使用來自兩種不同的人類供體(頂部及底部)之T細胞在高MSLN表現細胞系(HeLa細胞)中MSLN陽性細胞之殺死。顯示具有內部抗MSLN結合物SD1 (圖7A)、SD4 (中間)及SD6 (右)之TFP T細胞之細胞殺死跡線。經活化PBMC係未經轉導(1號跡線)或經CD3 ϵ TFP (2號跡線)、CD3 γ TFP (3號跡線)、TCR β TFP (4號跡線)或CD28 ζ CAR轉導。指示細胞毒性之經正規化之細胞指數係在即時細胞分析儀(RTCA)分析中測定。

圖7係一系列圖形，顯示抗MSLN CAR T細胞及TFP T細胞針對表現高含量間皮素之靶細胞系(HeLa-Luc^(MSLN^高))之結合活性。顯示試樣中被殺死細胞之%，其中無T細胞(「僅標靶」)、具有空載體轉導(「NT」)、

抗MSLN(陽性對照)或具有內部抗間皮素結合物SD1 (圖7A)、SD4 (圖7B)及SD6 (圖7C)之抗間皮素TFP T細胞，該等抗間皮素TFP T細胞各自呈CD3 ϵ TFP、CD3 γ TFP、TCR β TFP及CD28 ζ CAR之形式。在每一圖形中，黑色槓代表T細胞對靶細胞之1:1比率，且灰色槓代表T細胞對靶細胞之1:5比率。對於另一T細胞供體觀察到類似結果。

圖8係一系列圖形，顯示抗MSLN CAR T細胞及TFP T細胞針對表現低含量間皮素之靶細胞系(PC3-MSLN(^{-/-}))之活性。顯示試樣中被殺死細胞之%，其中無T細胞(「僅標靶」)、具有空載體轉導(「NT」)、抗MSLN(陽性對照，「SS1」)或內部抗間皮素構築體SD1、SD4及SD6，該等構築體呈TFP格式CD3 ϵ (圖8A)、CD3 γ (圖8B)、TCR β (圖8C)及CD28 ζ CAR (圖8D)。在每一圖形中，黑色槓代表T細胞對靶細胞之1:1比率，且灰色槓代表T細胞對靶細胞之1:5比率。對於另一T細胞供體觀察到類似結果。

圖9顯示展示表現抗MSLN CAR及TFP構築體之T細胞在與MSLN+細胞共培養時之活化之FACS分析之結果。如圖9A中自左至右所顯示，T細胞係未經轉導、經空載體轉導、經抗MSLN-CD3 ϵ TFP、抗MSLN-28 ζ CAR或抗MSLN-41BB ζ CAR轉導。與MSLN-細胞一起共培養之細胞顯示於頂列中，且與MSLN+靶細胞一起共培養之彼等顯示於底列中。然後用特異性針對表面活化標記物CD69及CD25或溶細胞性顆粒組分顆粒酶B(GrB)之抗體對細胞進行染色。經抗CD69染色之細胞之數量對應於x軸且經抗CD25染色之彼等對應於y軸。如所顯示，表現抗間皮素CAR及TFP構築體之T細胞係藉由與MSLN+細胞一起培養來活化，如藉由與MSLN-細胞共培養相比升高之CD69及CD25表現量所展示(圖9B)。顯示MSLN-

細胞(白色槓)及MSLN+細胞(黑色槓)中關於每一構築體之CD25+細胞之百分比。在未經轉導之T細胞或經抗MSLN陽性對照結合物轉導之T細胞(「510-SS1-CD3 ϵ 」)中使用K562 MSLN-細胞(圓形)及K562-MSLN+細胞(正方形)進行類似實驗(圖9C)。數據代表CD25+、CD69+及CD25+/CD69+細胞之總和。在圖9D中，顯示在與具有TFP格式CD3 ϵ 、CD3 γ 、TCR β 及CD28 ζ CAR之供體T細胞組合之K562 MSLN-靶細胞(左圖)及K562 MSLN+細胞(右圖)中內部抗MSLN結合物SD1 (正方形)、SD4 (圓形)及SD6 (三角形)之數據。使用來自另一T細胞供體之細胞觀察到類似結果。

圖10顯示展示當與MSLN+細胞一起共培養時表現抗MSLN CAR及TFP構築體之T細胞之活化之FACS分析的結果。利用抗CD3 APC (門)及抗CD8 APCcy7(y軸)針對表面抗原對細胞進行染色，之後進行固定、透化且利用抗顆粒酶B Alexafluor700(x軸)進行染色。如圖10A中自左至右所顯示，T細胞係未經轉導、經空載體轉導、經抗MSLN-CD3 ϵ TFP、抗MSLN-28 ζ CAR或抗MSLN-41BB ζ CAR轉導。與MSLN-細胞一起共培養之細胞顯示於頂列中，且與MSLN+靶細胞一起共培養之彼等顯示於底列中。表現抗間皮素CAR及TFP構築體之CD8 T細胞係藉由與MSLN+細胞一起培養來活化，如藉由與MSLN-細胞一起共培養相比升高之細胞內GrB含量所顯示(圖10B)。顯示在與MSLN-細胞(白色槓)或MSLN+細胞(黑色槓)一起共培養時關於每一構築體之顆粒酶B (「GrB+」)細胞之百分比。

圖11顯示當與過表現MSLN之K562細胞一起共培養時在表現抗MSLN CAR及TFP構築體之去活化T細胞中之細胞介素產生之ELISA分析

的結果。使用過表現BCMA之K562細胞作為陰性對照。24小時後，藉由ELISA分析細胞之IFN- γ (圖11A)及IL-2 (圖11B)表現。在自左至右的每一圖中，T細胞係未經轉導、經空載體轉導、經抗MSLN-CD3 ϵ TFP、抗MSLN-28 ζ CAR或抗MSLN-41BB ζ CAR轉導。與MSLN-細胞一起共培養之細胞係由白色槓表示，且與MSLN+靶細胞一起共培養之彼等係由黑色槓表示。

圖12係一系列圖形，顯示在間皮瘤異種移植物小鼠模型中活體內MSLN特異性sdAb TFP T細胞之效能。用螢光素酶標記之MSTO-211H-FL-MSLN-Luc以 1×10^6 個細胞/小鼠對小鼠進行接種且使腫瘤生長直至腫瘤體積為約300mm³為止，將 1×10^7 個T細胞靜脈內注射至每一動物中。圖12A顯示用T細胞注射後之腫瘤體積，自左至右包括無T細胞對照、SD1 CD3 ϵ -TFP及SD4 CD3 ϵ -TFP。圖12B顯示具有SD1及SD4結合物之CD3 γ -TFP及SD1 CD28 ζ CAR。圖12C-D顯示12A-B之存活小鼠之結果，用腫瘤細胞對該等存活小鼠進行再攻擊以便確定小鼠在不進行另一T細胞注射之情況下是否可維持其抗MSLN免疫性。用MSLN+ (MSTO)或MSLN- (Raji)腫瘤細胞系對已投與SD1 CD3 ϵ -TFP T細胞(12C)及SD1 CD3 γ -TFP T細胞(12D)且先前已清除腫瘤之小鼠進行再接再種。量測腫瘤體積且顯示於x軸上。

圖13顯示來自卵巢癌患者之MSLN-TFP T細胞之產生及功能分析。圖13A係實驗設計之示意圖。圖13B-C顯示患者之SD1 ϵ -TFP T細胞對MSTO-MSLN-Luc腫瘤細胞之活體外殺死。證實MSTO-MSLN-Luc腫瘤細胞(靶細胞)之間皮素表現(13B)；經24小時以5:1、1:1或1:5之E對T (效應物對標靶)比率添加SD1 ϵ -TFP T細胞(效應細胞)及匹配之未經轉導之對

照。藉由SpectraMax® M5 讀板儀(Molecular devices)以相對發光單位(RLU)量測靶細胞之發光。該圖中之每一條線代表3次重複之平均值(13C)。圖13D-L顯示卵巢癌患者之SD1 ϵ -TFP T細胞之細胞介素特徵之量測，該等細胞介素包括IFN γ (13D)、GM-CSF (13E)、顆粒酶A (13F)、顆粒酶B (13G)、IL-2 (13H)、MIP-1 α (13I)、MIP-1 β (13J)、TNF α (13K)及穿孔蛋白(13L)。將MSTO-MSLN-Luc腫瘤細胞(靶細胞)以10000個細胞/孔塗佈於96孔平底板中。經24小時以1:1比率添加SD1 ϵ -TFP T細胞(效應細胞)及匹配的未經轉導之對照。收集細胞上清液並使用Luminex®分析量測細胞介素。

圖14顯示在MSLN-高異種移植瘤小鼠模型中患者源性SD1 CD3 ϵ -TFP T細胞之活體內效能。以 1×10^6 個細胞/小鼠皮下接種MSTO-211H-FL MSLN-Luc細胞。腫瘤注射後10天(腫瘤體積約200-300 mm³)，將 5×10^6 個T細胞靜脈內注射至每一動物中。該圖中之每一條線代表單一動物。顯示來自ND12 (14A)、患者1 (14B)、患者2 (14C)、患者3 (14D)及患者4 (14E)之T細胞之數據。圓形指示經未經轉導之T細胞接種之小鼠中之腫瘤大小；正方形指示經TFP T細胞接種之彼等。

【實施方式】

交叉參考

本申請案主張於2016年10月7日提出申請之美國臨時申請案第62/405,551號及於2017年5月23日提出申請之美國臨時申請案第62/510,108號之權益，該等申請案中之每一者以全文引用方式併入本文中。

以引用方式併入

本說明書中所提及之所有公開案、專利及專利申請案皆以引用方式

併入本文中，其併入程度如同明確地且個別地指示將每一個別公開案、專利或專利申請案以引用方式併入一般。

在一個態樣中，本文闡述編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之經分離核酸分子，該融合蛋白包含TCR亞單元及包含抗間皮素結合域之人類或人類化抗體域。在一些實施例中，TCR亞單元包含TCR細胞外域。在其他實施例中，TCR亞單元包含TCR跨膜域。在其他實施例中，TCR亞單元包含TCR細胞內域。在其他實施例中，TCR亞單元包含(i) TCR細胞外域、(ii) TCR跨膜域及(iii) TCR細胞內域，其中(i)、(ii)及(iii)中之至少兩者來自同一TCR亞單元。在再其他實施例中，TCR亞單元包含TCR細胞內域，該TCR細胞內域包含選自以下之刺激域：CD3 ϵ 、CD3 γ 或CD3 δ 之細胞內信號傳導域，或具有至少一個、兩個或三個對其之修飾之胺基酸序列。在再其他實施例中，TCR亞單元包含細胞內域，該細胞內域包含選自以下之刺激域：4-1BB之功能信號傳導域及/或CD3 ζ 之功能信號傳導域或具有至少一個、兩個或三個對其之修飾之胺基酸序列。

在一些實施例中，經分離核酸分子包含(i)本文所提供之任一抗間皮素輕鏈結合域胺基酸序列之輕鏈(LC) CDR1、LC CDR2及LC CDR3，及/或(ii)本文所提供之任一抗間皮素重鏈結合域胺基酸序列之重鏈(HC) CDR1、HC CDR2及HC CDR3。

在一些實施例中，輕鏈可變區包含具有本文所提供輕鏈可變區之胺基酸序列之至少一個、兩個或三個修飾但不超過30個、20個或10個修飾之胺基酸序列或與本文所提供胺基酸序列具有95%至99%一致性之序列。在其他實施例中，重鏈可變區包含具有本文所提供重鏈可變區之胺基酸序列之至少一個、兩個或三個修飾但不超過30個、20個或10個修飾之胺基

酸序列或與本文所提供胺基酸序列具有95%至99%一致性之序列。

在一些實施例中，TFP包括TCR亞單元之細胞外域，該細胞外域包含選自由以下組成之群之蛋白質之細胞外域或其一部分：T細胞受體之 α 或 β 鏈、CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 或其功能片段或具有至少一個、兩個或三個對其之修飾但不超過20個、10個或5個修飾之胺基酸序列。在其他實施例中，所編碼TFP包括跨膜域，該跨膜域包含選自由以下組成之群之蛋白質之跨膜域：TCR之 α 、 β 鏈或TCR亞單元CD3 ϵ 、CD3 γ 及CD3 δ 或其功能片段或具有至少一個、兩個或三個對其之修飾但不超過20個、10個或5個修飾之胺基酸序列。

在一些實施例中，所編碼TFP包括跨膜域，該跨膜域包含選自由以下組成之群之蛋白質之跨膜域：TCR之 α 、 β 或 ζ 鏈或CD3 ϵ 、CD3 γ 及CD3 δ 、CD45、CD2、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137及CD154或其功能片段，或具有至少一個、兩個或三個對其之修飾但不超過20個、10個或5個修飾之胺基酸序列。

在一些實施例中，所編碼抗間皮素結合域係藉由連接體序列連接至TCR細胞外域。在一些情形中，所編碼連接體序列包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=1$ 至4。在一些情形中，所編碼連接體序列包含長連接體(LL)序列。在一些情形中，所編碼長連接體序列包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=2$ 至4。在一些情形中，所編碼連接體序列包含短連接體(SL)序列。在一些情形中，所編碼短連接體序列包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=1$ 至3。

在一些實施例中，經分離核酸分子進一步包含編碼共刺激域之序列。在一些情形中，共刺激域係自選自由以下組成之群之蛋白質獲得之功

能信號傳導域：DAP10、DAP12、CD30、LIGHT、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278) 及4-1BB (CD137)，或具有至少一個、兩個或三個對其之修飾但不超過20個、10個或5個修飾之胺基酸序列。

在一些實施例中，經分離核酸分子進一步包含前導序列。

本文亦提供由先前所述核酸分子中之任一者編碼之經分離多肽分子。

在另一態樣中，本文亦提供經分離T細胞受體融合蛋白(TFP)分子，其包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內域。在一些實施例中，經分離TFP分子包含包括人類或人類化抗間皮素結合域之抗體或抗體片段、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內域。

在一些實施例中，人類或人類化抗體域包含抗體片段。在一些實施例中，人類或人類化抗體域包含scFv或V_H域。

在一些實施例中，抗間皮素結合域係scFv或V_H域。在其他實施例中，抗間皮素結合域包含以下之輕鏈及重鏈：本文所提供胺基酸序列或其功能片段，或具有本文所提供輕鏈可變區之胺基酸序列之至少一個、兩個或三個修飾但不超過30個、20個或10個修飾之胺基酸序列，或與本文所提供胺基酸序列具有95%至99%一致性之序列。

在一些實施例中，經分離TFP分子包含TCR細胞外域，該TCR細胞外域包含選自由以下組成之群之蛋白質之細胞外域或其一部分：T細胞受體之 α 或 β 鏈、CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 或具有至少一個、兩個或三個對其之修飾但不超過20個、10個或5個修飾之胺基酸序列。

在一些實施例中，抗間皮素結合域係藉由連接體序列連接至TCR細

胞外域。在一些情形中，連接體區包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=1$ 至 4 。在一些情形中，連接體序列包含長連接體(LL)序列。在一些情形中，長連接體序列包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=2$ 至 4 。在一些情形中，連接體序列包含短連接體(SL)序列。在一些情形中，短連接體序列包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=1$ 至 3 。

在一些實施例中，經分離TFP分子進一步包含編碼共刺激域之序列。在其他實施例中，經分離TFP分子進一步包含編碼細胞內信號傳導域之序列。在其他實施例中，經分離TFP分子進一步包含前導序列。

本文亦提供載體，其包含編碼先前所述TFP分子中之任一者之核酸分子。在一些實施例中，載體選自由以下組成之群：DNA、RNA、質體、慢病毒載體、腺病毒載體或逆轉錄病毒載體。在一些實施例中，載體進一步包含啟動子。在一些實施例中，載體係活體外轉錄之載體。在一些實施例中，載體中之核酸序列進一步包含聚(A)尾。在一些實施例中，載體中之核酸序列進一步包含3'UTR。

本文亦提供包含所述載體中之任一者之細胞。在一些實施例中，細胞係人類T細胞。在一些實施例中，細胞係CD8+或CD4+ T細胞。在其他實施例中，細胞進一步包含編碼抑制性分子之核酸，該抑制性分子包含第一多肽，該第一多肽包含抑制性分子之至少一部分，與包含來自細胞內信號傳導域之正信號之第二多肽締合。在一些情形中，抑制性分子包含包括PD1之至少一部分之第一多肽及包含共刺激域及初級信號傳導域之第二多肽。

在另一態樣中，本文提供經分離TFP分子，其包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內信號傳導域，其中該TFP分子能與內源性TCR複合物及/或至少一種內源性TCR多肽在功能上相互作用。

用。

在另一態樣中，本文提供經分離TFP分子，其包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內信號傳導域，其中該TFP分子能在功能上整合至內源性TCR複合物中。

在另一態樣中，本文提供包含至少兩種TFP分子之人類CD8+或CD4+ T細胞，該等TFP分子包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內域，其中該TFP分子能與人類CD8+或CD4+ T細胞之表面中、表面處及/或表面上之內源性TCR複合物及/或至少一種內源性TCR多肽在功能上相互作用。

在另一態樣中，本文提供蛋白質複合物，其包含i)包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內域之TFP分子；及ii)至少一種內源性TCR複合物。

在一些實施例中，TCR包含選自由以下組成之群之蛋白質之細胞外域或其一部分：T細胞受體之 α 或 β 鏈、CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 。在一些實施例中，抗間皮素結合域係藉由連接體序列連接至TCR細胞外域。在一些情形中，連接體區包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=1$ 至4。在一些情形中，連接體序列包含長連接體(LL)序列。在一些情形中，長連接體序列包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=2$ 至4。在一些情形中，連接體序列包含短連接體(SL)序列。在一些情形中，短連接體序列包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=1$ 至3。

本文亦提供人類CD8+或CD4+ T細胞，其包含至少兩種不同的根據所述任一蛋白質複合物之TFP蛋白質。

在另一態樣中，本文提供人類CD8+或CD4+ T細胞之群體，其中該群體之T細胞個別地或共同地包含至少兩種TFP分子，該等TFP分子包含

人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內域，其中該TFP分子能與人類CD8+或CD4+ T細胞之表面中、表面處及/或表面上之內源性TCR複合物及/或至少一種內源性TCR多肽在功能上相互作用。

在另一態樣中，本文提供人類CD8+或CD4+ T細胞之群體，其中該群體之T細胞個別地或共同地包含至少兩種由本文所提供經分離核酸分子編碼之TFP分子。

在另一態樣中，本文提供製備細胞之方法，其包含用所述載體中之任一者轉導T細胞。

在另一態樣中，本文提供生成RNA改造之細胞之群體之方法，其包含將活體外轉錄之RNA或合成RNA引入細胞中，其中該RNA包含編碼所述TFP分子中之任一者之核酸。

在另一態樣中，本文提供在哺乳動物中提供抗腫瘤免疫性之方法，其包含向哺乳動物投與有效量之表現所述TFP分子中之任一者之細胞。在一些實施例中，細胞係自體T細胞。在一些實施例中，細胞係同種異體T細胞。在一些實施例中，哺乳動物係人類。

在另一態樣中，本文提供治療患有與間皮素之表現相關之疾病之哺乳動物之方法，其包含向哺乳動物投與有效量之包含所述TFP分子之細胞。在一些實施例中，與間皮素表現相關之疾病選自增殖性疾病(例如癌症或惡性病或癌前病況，例如胰臟癌、卵巢癌、胃癌、肺癌或子宮內膜癌)或為與間皮素之表現相關之非癌症相關適應症。

在一些實施例中，表現所述TFP分子中之任一者之細胞係與改善與投與表現TFP分子之細胞相關之一或多種副作用之藥劑組合投與。在一些實施例中，表現所述TFP分子中之任一者之細胞係與治療與間皮素相關之疾

病之藥劑組合投與。

本文亦提供所述經分離核酸分子中之任一者、所述經分離多肽分子中之任一者、所述經分離TFP中之任一者、所述蛋白質複合物中之任一者、所述載體中之任一者或所述細胞中之任一者，其係用作藥劑。

定義

除非另有定義，否則本文所用之所有技術及科學術語皆具有與熟習本發明所屬技術者通常所理解的含義相同之含義。

術語「一(a及an)」係指一個或一個以上(亦即，至少一個)該冠詞之文法受詞。舉例而言，「一個元件」意指一個元件或一個以上元件。

如本文所用之「約」可指加或減小於1%或1%、2%、3%、4%、5%、6%、7%、8%、9%、10%、11%、12%、13%、14%、15%、16%、17%、18%、19%、20%、25%、30%或大於30%，此端視情形而定且為熟習此項技術者已知或可知。

如本文說明書中所用，「個體(subject或subjects或individuals)」可包括(但不限於)哺乳動物(例如人類)或非人類哺乳動物，例如，家畜、農場動物或野生動物以及鳥及水生動物。「患者」係罹患疾病、病症或病況或具有發生該疾病、病症或病況之風險或換言之需要本文所提供之組合物及方法之個體。

如本文所用之「治療(treating或treatment)」係指治療或改善疾病或病況成功之任一指標。治療可包括(例如)減輕疾病或病況之一或多種症狀之嚴重性、延遲該一或多種症狀或緩和該疾病或病況之一或多種症狀之嚴重性，或其可包括降低患者經歷疾病、缺陷、病症或不利病況及諸如此類之症狀之頻次。如本文所用之「治療或預防」在本文中有時稱作引起疾病

或病況之某一程度治療或改善之方法，且涵蓋達成該目標之一系列結果，包括(但不限於)病況之完全預防。

如本文所用之「預防」係指患者中之疾病或病況(例如，腫瘤形成)之預防。舉例而言，若具有發生腫瘤或癌症之其他形式之風險之個體係用本發明方法來治療且過後不會發生腫瘤或癌症之其他形式，則該疾病在該個體中已預防至少一定時間段。

如本文所用「治療有效量」係足以為投與組合物之個體提供有益效應或換言之減少有害非有益事件之組合物或其活性組分之量。本文中之「治療有效劑量」意指由於投與其而產生一或多種期望或合意(例如，有益)效應之劑量，該投與在所給時間段內進行一或多次。確切劑量將取決於治療之目的，且可由熟習此項技術者使用已知技術來確定(例如參見 Lieberman, *Pharmaceutical Dosage Forms* (第1-3卷, 1992)；Lloyd, *The Art, Science and Technology of Pharmaceutical Compounding* (1999)；及 Pickar, *Dosage Calculations*(1999))。

如本文所用「T細胞受體(TCR)融合蛋白」或「TFP」包括自包含TCR之多種多肽衍生之重組體多肽，該重組體多肽通常能夠i)結合至靶細胞上之表面抗原並ii)與完整TCR複合物之其他多肽組分相互作用(通常在共同位於T細胞表面中或表面上時)。「TFP T細胞」係已經轉導(例如，根據本文所揭示之方法)且表現TFP(例如，納入天然TCR中)之T細胞。在一些實施例中，T細胞係CD4⁺ T細胞、CD8⁺ T細胞或CD4⁺ / CD8⁺ T細胞。在一些實施例中，TFP T細胞係NK細胞。在一些實施例中，TFP T細胞係 γ - δ T細胞。

如本文所用術語「間皮素」亦稱為MSLN或CAK1抗原或Pre-pro-巨

核細胞強化因子，其係指在人類中由**MSLN**（或巨核細胞強化因子(MPF)）基因編碼之蛋白質。間皮素係存在於正常間皮細胞上且在若干人類腫瘤(包括間皮瘤及卵巢及胰臟腺癌)中過表現之**40 kDa**蛋白質。間皮素基因編碼前體蛋白質，該前體蛋白質經處理以產生間皮素，該間皮素藉由糖磷脂醯肌醇聯結及**31kDa**脫落片段(稱為巨核細胞強化因子(MPF))附接至細胞膜。間皮素可能參與細胞黏著，但其生物功能未知。間皮素係通常存在於內襯胸膜、腹膜及圍心膜之間皮細胞上之腫瘤分化抗原。間皮素係於間皮瘤細胞、卵巢癌細胞、胰臟腺癌細胞及一些鱗狀細胞癌上之可檢測到的抗原決定子(例如，參見 Kojima 等人，J. Biol. Chem. 270:21984-21990(1995)及 Onda 等人，Clin. Cancer Res. 12:4225-4231(2006))。間皮素與CA125/MUC16發生相互作用(例如，參見 Rump 等人，J. Biol. Chem. 279:9190-9198(2004)及 Ma 等人，J. Biol. Chem. 287:33123-33131(2012))。

人類及鼠類胺基酸及核酸序列可參見公共資料庫，例如GenBank、UniProt及Swiss-Prot。舉例而言，人類間皮素之胺基酸序列可參見UniProt/Swiss-Prot登錄號Q13421。人類間皮素多肽規範序列為UniProt登錄號Q13421（或Q13421-1）：
MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLGETGQEAAPL
DGVLANPPNISSLSPRQLLGFPCA EVSGLSTERVRELAVALAQKNVKL
STEQLRCLAHRLSEPPEDLDALPLDLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRIT
KANVDLLPRGAPERQRLLP AALACWGV RGSLLSEADV RALGGLACD
LPGRFVAESA EVLLPRLVSCPGPLDQDQQEAARAALQGGGPPYGPS
TWSVSTMDALRGLLPVLGQPIIRSIPQGIVA AWRQRSSRDPSWRQPER

TILRPRFRREVEKTACPSGKKAREIDESLIFYKKWELEACVDAALLAT
QMDRVNAIPFTYEQLDVLKHKLDELYPQGYPESEVIQHLGYLFLKMSP
EDIRKWNVTSLETLKALLEVNKGHEMSPQAPRRPLPQVATLIDRFVK
GRGQLDKDTLDTLTAIFYPGYLCSSPEELSSVPPSSIWAVRPQDLDTTC
DPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYFVKIQSFLGGAPTEDLKALSQQN
VSMDLATFMKLRTDAVLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRD
WILRQRQDDLDLTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLLGPGP
VLTVLALLLASTLA (SEQ ID NO:15)。

編碼人類間皮素轉錄本變體1之核苷酸序列可參見登錄號NM005823。編碼人類間皮素轉錄本變體2之核苷酸序列可參見登錄號NM013404。編碼人類間皮素轉錄本變體3之核苷酸序列可參見登錄號NM001177355。間皮素表現於間皮瘤細胞、卵巢癌細胞、胰臟腺癌細胞及鱗狀細胞癌上(例如，參見Kojima等人，J. Biol. Chem. 270:21984-21990(1995)及Onda等人，Clin. Cancer Res. 12:4225-4231(2006))。表現間皮素之其他細胞在下文提供於「與間皮素之表現相關之疾病」之定義中。間皮素亦與CA125/MUC16相互作用(例如，參見Rump等人，J. Biol. Chem. 279:9190-9198(2004)及Ma等人，J. Biol. Chem. 287:33123-33131(2012))。在一個實例中，TFP之抗原結合部分識別並結合如在正常或惡性間皮瘤細胞、卵巢癌細胞、胰臟腺癌細胞或鱗狀細胞癌細胞上表現之間皮素蛋白質之細胞外域內之表位。

如本文所用術語「抗體」係指源自與抗原特異性結合之免疫球蛋白分子之蛋白質或多肽序列。抗體可為多株或單株起源之完整免疫球蛋白或其片段且可源自天然來源或重組體來源。

術語「抗體片段」或「抗體結合域」係指抗體或其重組體變體中含有抗原結合域之至少一部分(亦即，完整抗體之抗原決定可變區)，其足以識別標靶(例如抗原及其定義表位)並使抗體片段特異性結合至該標靶。抗體片段之實例包括(但不限於)Fab、Fab'、F(ab')₂及Fv片段、單鏈(sc)Fv(「scFv」)抗體片段、線性抗體、單一域抗體(縮寫為「sdAb」)(V_L或V_H)、駱駝科動物V_{HH}域及自抗體片段形成之多特異性抗體。

術語「scFv」係指包含至少一個包含輕鏈可變區之抗體片段及至少一個包含重鏈可變區之抗體片段的融合蛋白，其中輕鏈及重鏈可變區係經由短撓性多肽連接體以鄰接方式連接，且能夠表現為單一多肽鏈，且其中scFv保留衍生出其之完整抗體之特異性。

關於抗體之「重鏈可變區」或「V_H」(或在單一域抗體(例如，奈米抗體)之情形下，「V_{HH}」)係指重鏈中含有插入在稱為框架區之側接伸展區之間之三個CDR之片段，該等框架區較CDR通常更高度保守且形成支架以支撐CDR。

除非指定，否則本文所用之scFv可具有例如關於多肽之N末端及C末端呈任一順序之V_L及V_H可變區，scFv可包含V_L-連接體-V_H或可包含V_H-連接體-V_L。

包含抗體或其抗體片段之本發明TFP組合物之部分可以眾多種形式存在，其中抗原結合域表現為鄰接多肽鏈之一部分，包括例如單一域抗體片段(sdAb)或重鏈抗體HCAb、源於鼠類之單鏈抗體(scFv)、人類化或人類抗體(Harlow等人，1999，Using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, N.Y.；Harlow等人，1989，Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor, N.Y.；Houston等人，1988，

Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85:5879-5883 ; Bird等人，1988, Science 242:423-426)。在一個態樣中，本發明TFP組合物之抗原結合域包含抗體片段。在另一態樣中，TFP包含包括scFv或sdAb之抗體片段。

術語「抗體重鏈」係指以其天然構象存在於抗體分子中之兩類多肽鏈中之較大者，且該抗體重鏈通常決定抗體所屬之類別。

術語「抗體輕鏈」係指以其天然構象存在於抗體分子中之兩類多肽鏈中之較小者。卡帕(κ)及蘭姆達(λ)輕鏈係指兩種主要的抗體輕鏈同型。

術語「重組抗體」係指使用重組DNA技術生成之抗體，例如由噬菌體或酵母表現系統表現之抗體。該術語亦應理解為意指已藉由合成編碼抗體之DNA分子生成且該DNA分子表現抗體蛋白或指定該抗體之胺基酸序列的抗體，其中DNA或胺基酸序列已利用業內可用且熟知之重組DNA或胺基酸序列技術獲得。

術語「抗原」或「Ag」係指能被抗體特異性結合或以其他方式誘發免疫反應之分子。此免疫反應可涉及抗體產生或特異性免疫勝任細胞之活化或二者皆有。

熟習此項技術者將理解，包括幾乎所有蛋白質或肽在內之任何大分子均可用作抗原。此外，抗原可源自重組或基因體DNA。熟習此項技術者將理解，任何包含編碼誘發免疫反應之蛋白質之核苷酸序列或部分核苷酸序列之DNA因此編碼「抗原」(在該術語用於本文中時)。此外，熟習此項技術者將了解，抗原無需僅由基因之全長核苷酸序列編碼。容易地明瞭，本發明包括(但不限於)一個以上基因之部分核苷酸序列之用途及該等核苷酸序列係以多種組合排列以編碼引發期望免疫反應之多肽。此外，熟

習此項技術者將瞭解抗原完全不必由「基因」編碼。容易地明瞭，抗原可以合成方式生成或可源自生物試樣，或可為除多肽外之大分子。此一生物試樣可包括(但不限於)組織試樣、腫瘤試樣、細胞或含有其他生物組分之流體。

術語「抗腫瘤效應」係指可以多種方式呈現之生物效應，該等方式包括(但不限於)(例如)腫瘤體積減小、腫瘤細胞數減少、轉移數減少、預期壽命增加、腫瘤細胞增殖減少、腫瘤細胞存活率降低或與癌性病況相關之多種生理症狀之改善。「抗腫瘤效應」亦可呈現為本發明之肽、聚核苷酸、細胞及抗體在第一時間預防腫瘤發生之能力。

術語「自體」係指源自同一個體且後來再引入該個體中之任何材料。

術語「同種異體」係指源自與材料欲引入之個體相同之物種之不同動物或不同患者之任何材料。當一或多個基因座處之基因不同時，認為兩個或更多個個體互為同種異體。在一些態樣中，來自同一物種之個體之同種異體材料可在遺傳學上足夠不同以在抗原上相互作用。

術語「異種基因」係指源自不同物種之動物之移植物。

術語「癌症」係指特徵在於異常細胞之快速及不受控生長之疾病。癌細胞可在局部擴散或穿過血流及淋巴系統擴散至身體其他部分。各種癌症之實例闡述於本文中，且包括(但不限於)乳癌、前列腺癌、卵巢癌、子宮頸癌、皮膚癌、胰臟癌、結腸直腸癌、腎癌、肝癌、腦癌、肺癌及諸如此類。

片語「與間皮素之表現相關之疾病」包括(但不限於)與間皮素之表現相關之疾病或與表現間皮素之細胞相關之病況，包括(例如)增殖性疾病，

例如癌症或惡性病或癌前病況。在一個態樣中，癌症係間皮瘤。在一個態樣中，癌症係胰臟癌。在一個態樣中，癌症係卵巢癌。在一個態樣中，癌症係胃癌。在一個態樣中，癌症係肺癌。在一個態樣中，癌症係子宮內膜癌。與間皮素之表現相關之非癌症相關適應症包括(但不限於)例如自體免疫疾病(例如，狼瘡、類風濕性關節炎、結腸炎)、發炎性病症(過敏及氣喘)及移植。

術語「保守序列修飾」係指不顯著影響或改變含有胺基酸序列之抗體或抗體片段之結合特徵的胺基酸修飾。該等保守修飾包括胺基酸取代、添加及缺失。可藉由業內已知之標準技術(例如定點誘變及PCR介導之誘變)將修飾引入本發明抗體或抗體片段中。保守胺基酸取代係其中胺基酸殘基經具有類似側鏈之胺基酸殘基替代者。業內已定義具有類似側鏈之胺基酸殘基之家族。該等家族包括具有鹼性側鏈之胺基酸(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、具有酸性側鏈之胺基酸(例如天冬胺酸、麩胺酸)、具有不帶電極性側鏈之胺基酸(例如甘胺酸、天冬醯胺、麩胺醯胺、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸、色胺酸)、具有非極性側鏈之胺基酸(例如丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸)、具有 β 分枝側鏈之胺基酸(例如蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及具有芳香族側鏈之胺基酸(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。因此，本發明TFP內之一或多個胺基酸殘基可經來自同一側鏈家族之其他胺基酸殘基替代，且可使用本文所述之功能分析來測試經改變TFP。

術語「刺激」係指由刺激域或刺激分子(例如，TCR/CD3複合物)與其同源配體結合藉此介導信號轉導事件(例如(但不限於)經由TCR/CD3複合物之信號轉導)而誘導之初級反應。刺激可介導某些分子之改變之表現

及/或細胞支架結構之重組及諸如此類。

術語「刺激分子」或「刺激域」係指由T細胞表現之分子或其一部分，對於T細胞信號傳導路徑之至少某一態樣其提供以刺激方式調控TCR複合物之初級活化之初級細胞質信號傳導序列。在一個態樣中，初級信號係藉由例如TCR/CD3複合物與加載有肽之MHC分子結合起始，且此可調介T細胞反應，包括(但不限於)增殖、活化、分化及諸如此類。以刺激方式起作用之初級細胞質信號傳導序列(亦稱作「初級信號傳導域」)可含有信號傳導基序，該基序稱為基於免疫受體酪胺酸之活化基序或「ITAM」。本發明中特別使用之含有初級細胞質信號傳導序列之ITAM之實例包括(但不限於)源自TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b、CD278 (亦稱為「ICOS」)及CD66d之彼等。

術語「抗原呈遞細胞」或「APC」係指在其表面上顯示與主要組織相容性複合物(MHC)複合之外源抗原之免疫系統細胞(例如輔助細胞，例如B細胞、樹突狀細胞及諸如此類)。T細胞可使用其T細胞受體(TCR)識別該等複合物。APC處理抗原且將其呈遞至T細胞。

在「細胞內信號傳導域」用於本文中時該術語係指分子之細胞內部分。細胞內信號傳導域生成促進含有TFP之細胞(例如，表現TFP之T細胞)之免疫效應物功能之信號。例如表現TFP之T細胞中免疫效應物功能之實例包括細胞溶解活性及T輔助細胞活性，包括分泌細胞介素。在實施例中，細胞內信號傳導域可包含初級細胞內信號傳導域。實例性初級細胞內信號傳導域包括源自負責主要刺激或抗原依賴性模擬之分子之彼等。在實施例中，細胞內信號傳導域可包含共刺激細胞內域。實例性共刺激細胞內信號傳導域包括源自負責共刺激信號或非抗原依賴性刺激之分子之彼等。

初級細胞內信號傳導域可包含ITAM (「基於免疫受體酪胺酸之活化基序」)。含有初級細胞質信號傳導序列之ITAM之實例包括(但不限於)源自CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b及CD66d DAP10及DAP12之彼等。

術語「共刺激分子」係指在T細胞上與共刺激配體特異性結合、藉此調介T細胞之共刺激反應(例如(但不限於)增殖)之同源結合伴侶。共刺激分子係為有效免疫反應所需要之除抗原受體或其配體外之細胞表面分子。共刺激分子包括(但不限於) 1類MHC分子、BTLA及鐸配體受體，以及DAP10、DAP12、CD30、LIGHT、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)及4-1BB (CD137)。共刺激細胞內信號傳導域可為共刺激分子之細胞內部分。共刺激分子可表示於以下蛋白家族中：TNF受體蛋白、免疫球蛋白樣蛋白、細胞介素受體、整合素、信號傳導淋巴球活化分子(SLAM蛋白)及活化NK細胞受體。該等分子之實例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、GITR、CD30、CD40、ICOS、BAFFR、HVEM、淋巴球功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、SLAMF7、NKp80、CD160、B7-H3及與CD83特異性結合之配體及諸如此類。細胞內信號傳導域可包含衍生出其之分子之整個細胞內部分或整個天然細胞內信號傳導域或其功能片段。術語「4-1BB」係指具有以基因庫登錄號AAA62478.2提供之胺基酸序列或來自非人類物種(例如，小鼠、齧齒類動物、猴、人猿及諸如此類)之等效殘基的TNFR超家族之成員；且「4-1BB共刺激域」係定義為基因庫登錄號AAA62478.2之胺基酸殘基214-255或來自非人類物種(例如，小鼠、齧齒類動物、猴、人猿及諸如此類)之等效殘基。

術語「編碼」係指聚核苷酸中核苷酸之特異性序列(例如基因、cDNA或mRNA)用作合成生物過程中具有所定義核苷酸序列(例如rRNA、tRNA及mRNA)或所定義胺基酸序列之其他聚合物及大分子的模板之固有性質及源自其之生物性質。因此，若對應於基因之mRNA之轉錄及轉譯在細胞或其他生物系統中產生蛋白質，則該基因、cDNA或RNA編碼蛋白質。編碼鏈(與mRNA序列一致且通常提供於序列列表中之核苷酸序列)及非編碼鏈(用作基因或cDNA轉錄之模板)二者均可稱作編碼該基因或cDNA之蛋白質或其他產物。

除非另外指定，否則「編碼胺基酸序列之核苷酸序列」包括互為簡併形式且編碼相同胺基酸序列之所有核苷酸序列。就編碼蛋白質之核苷酸序列可在某一形式中含有一或多個內含子而言，編碼蛋白質或RNA之片語核苷酸序列亦可包括內含子。

術語「有效量」或「治療有效量」在本文中可互換使用，且係指如本文所述可有效地達成特定生物或治療結果之化合物、調配物、材料或組合物之量。

術語「內源」係指來自生物體、細胞、組織或系統或在其內部產生之任何材料。

術語「外源」係指自生物體、細胞、組織或系統引入或在其外部產生之任何材料。

術語「表現」係指由啟動子驅動之特定核苷酸序列之轉錄及/或轉譯。

術語「轉移載體」係指包含經分離核酸且可用於將經分離核酸遞送至細胞內部之物質之組合物。多種載體為業內已知，包括(但不限於)直鏈

聚核苷酸、與離子型或兩親性化合物締合之聚核苷酸、質體及病毒。因此，術語「轉移載體」包括自主複製之質體或病毒。該術語亦應理解為進一步包括有利於核酸轉移至細胞中之非質體及非病毒化合物，例如聚離胺酸化合物、脂質體及諸如此類。病毒轉移載體之實例包括(但不限於)腺病毒載體、腺相關病毒載體、逆轉錄病毒載體、慢病毒載體及諸如此類。

術語「表現載體」係指包含包括可操作地連接至欲表現核苷酸序列之表現控制序列之重組聚核苷酸的載體。表現載體包含用於表現之足夠順式作用元件；用於表現之其他元件可由宿主細胞或在活體外表現系統中供應。表現載體包括所有為業內已知納入重組聚核苷酸之彼等，包括黏粒、質體(例如，裸露或含於脂質體中)及病毒(例如，慢病毒、逆轉錄病毒、腺病毒及腺相關病毒)。

術語「慢病毒」係指逆轉錄病毒科之屬。慢病毒在逆轉錄病毒中之獨特之處在於，能夠感染未分裂細胞；其可將大量遺傳資訊遞送至宿主細胞之DNA中，因此其係基因遞送載體之最有效方法之一。HIV、SIV及FIV係慢病毒之所有實例。

術語「慢病毒載體」係指源自慢病毒基因體之至少一部分之載體，尤其包括如Milone等人，Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009)中所提供之自失活慢病毒載體。可用於臨床中之慢病毒載體之其他實例包括(但不限於)例如來自Oxford BioMedica之LENTIVECTOR™基因遞送技術、來自Lentigen之LENTIMAX™載體系統及諸如此類。慢病毒載體之非臨床類型亦可用且將為熟習此項技術者已知。

術語「同源」或「一致性」係指兩個聚合物分子之間、例如兩個核酸分子(例如兩個DNA分子或兩個RNA分子)之間或兩個多肽分子之間的

亞單位序列一致性。當兩個分子二者中之亞單位位置由相同單體亞單位佔據時；例如若兩個DNA分子中之每一者中之位置由腺嘌呤佔據，則其在該位置處同源或一致。兩條序列之間之同源性係匹配或同源位置數之直接函數；例如若兩條序列中之一半(例如聚合物10個亞單位長度上之5個位置)位置同源，則該兩條序列為50%同源；若90%之位置(例如10個中之9個)匹配或同源，則該兩條序列為90%同源。

非人類(例如鼠類)抗體之「人類化」形式係嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其片段(例如Fv、Fab、Fab'、F(ab')₂或抗體之其他抗原結合子序列)，其含有源自非人類免疫球蛋白之最小序列。在極大程度上，人類化抗體及其抗體片段係人類免疫球蛋白(接受體抗體或抗體片段)，其中來自接受體之互補決定區(CDR)的殘基經來自諸如小鼠、大鼠或兔等非人類物種(供體抗體)之CDR且具有期望特異性、親和力及能力的殘基替代。在一些情況下，人類免疫球蛋白之Fv框架區(FR)殘基由相應非人類殘基代替。此外，人類化抗體/抗體片段可包含在接受體抗體與導入之CDR或框架序列中皆未發現之殘基。該等修飾可進一步完善且最佳化抗體或抗體片段性能。通常，人類化抗體或其抗體片段將包含實質上至少一個且通常兩個可變域中的所有可變域，其中所有或實質上所有CDR區對應於非人類免疫球蛋白之CDR區，且FR區之全部或重要部分為人類免疫球蛋白序列之FR區。人類化抗體或抗體片段亦可包含免疫球蛋白恆定區(Fc) (通常為人類免疫球蛋白恆定區)之至少一部分。其他細節參見Jones等人，Nature 321:522-525, 1986；Riechmann等人，Nature, 332:323-329, 1988；及Presta，Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596, 1992。

「人類」或「全人類」係指免疫球蛋白，例如抗體或抗體片段，其

中整個分子為人類來源或由與抗體或免疫球蛋白之人類形式一致之胺基酸序列組成。

術語「經分離」意指自天然狀態改變或去除。舉例而言，天然存在於活動物中之核酸或肽未「經分離」，但部分或完全地自其天然狀態之共存材料分離之相同核酸或肽為「經分離」。經分離核酸或蛋白質可以實質上純化之形式存在，或可存在於非天然環境(例如宿主細胞)中。

在本發明上下文中使用普遍存在核酸鹼基之以下縮寫。「A」係指腺苷，「C」係指胞嘧啶，「G」係指鳥苷，「T」係指胸苷，且「U」係指尿苷。

術語「可操作地連接」或「轉錄控制」係指調控序列與異源核酸序列之間之功能聯結，以使後者表現。舉例而言，當第一核酸序列與第二核酸序列處於功能關係中時，第一核酸序列與第二核酸序列可操作地連接。例如，若啟動子影響編碼序列之轉錄或表現，則啟動子可操作地連接至編碼序列。可操作地連接之DNA序列可彼此鄰接，且例如在需要連結兩個蛋白質編碼區時處在同一讀框中。

術語免疫原性組合物之「非經腸」投與包括(例如)皮下(s.c.)、靜脈內(i.v.)、肌肉(i.m.)或胸骨內注射、腫瘤內或輸注技術。

術語「核酸」或「聚核苷酸」係指呈單鏈或雙鏈形式之去氧核糖核酸(DNA)或核糖核酸(RNA)及其聚合物。除非明確限制，否則該術語涵蓋含有與參考核酸具有類似結合性質且以類似於天然核苷酸之方式代謝之天然核苷酸已知類似物的核酸。除非另外指示，否則具體核酸序列亦隱含地涵蓋其保守修飾變體(例如，簡併密碼子取代)、對偶基因、直向同源物、SNP及互補序列以及明確指示之序列。特定地，藉由生成其中一或多個所

選(或全部)密碼子之第三位經混合鹼基及/或去氧次黃嘌呤核苷殘基取代的序列可達成簡併密碼子取代(Batzer等人，Nucleic Acid Res.19:5081 (1991)；Ohtsuka等人，J. Biol. Chem. 260:2605-2608 (1985)；及Rossolini等人，Mol. Cell. Probes 8:91-98 (1994))。

術語「肽」、「多肽」及「蛋白質」可互換使用，且係指包括藉由肽鍵共價連接之胺基酸殘基之化合物。蛋白質或肽必須含有至少兩個胺基酸，且對可包含蛋白質或肽序列之胺基酸之最大數量無限制。多肽包括包含兩個或更多個藉由肽鍵彼此接合之胺基酸之任何肽或蛋白質。如本文所用術語係指例如兩條短鏈(其在業內亦通常稱作肽、寡肽及寡聚物)及較長鏈(其在業內通常稱作蛋白質，其具有許多類型)。「多肽」尤其包括(例如)生物活性片段、實質上同源之多肽、寡肽、同源二聚體、異源二聚體、多肽之變體、經修飾多肽、衍生物、類似物、融合蛋白。多肽包括天然肽、重組肽或其組合。

術語「啟動子」係指由細胞之轉錄機構或所引入合成機構識別之起始聚核苷酸序列之特定轉錄所需之DNA序列。

術語「啟動子/調控序列」係指為表現可操作地連接至啟動子/調控序列之基因產物所需之核酸序列。在一些情況下，此序列可為核心啟動子序列，且在其他情況下此序列亦可包括增強子序列及為表現基因產物所需之其他調控元件。啟動子/調控序列可為(例如)以組織特異性方式表現基因產物之序列。

術語「組成型」啟動子係指當與編碼或指定基因產物之聚核苷酸可操作地連接時，在細胞中在細胞之大多數或所有生理條件下產生基因產物之核苷酸序列。

術語「誘導型」啟動子係指當與編碼或指定基因產物之聚核苷酸可操作地連接時，在細胞中實質上僅在對應於啟動子之誘導劑存在於細胞中時產生基因產物之核苷酸序列。

術語「組織特異性」啟動子係指當與由基因編碼或指定之聚核苷酸可操作地連接時，在細胞中實質上僅在細胞係對應於啟動子之組織類型之細胞時產生基因產物的核苷酸序列。

如在scFv背景下使用之術語「連接體」及「撓性多肽連接體」係指將可變重鏈與可變輕鏈區連接在一起之由單獨或以組合使用之胺基酸殘基(例如甘胺酸及/或絲胺酸)組成之肽連接體。在一個實施例中，撓性多肽連接體係Gly/Ser連接體且包含胺基酸序列(Gly-Gly-Gly-Ser)_n，其中n係等於或大於1之正整數。舉例而言，n=1、n=2、n=3、n=4、n=5、n=6、n=7、n=8、n=9及n=10。在一個實施例中，撓性多肽連接體包括(但不限於)(Gly₄Ser)₄或(Gly₄Ser)₃。在另一實施例中，連接體包括(Gly₂Ser)、(GlySer)或(Gly₃Ser)之多個重複單元。WO2012/138475 (以引用方式併入本文中)中所述之連接體亦包括在本發明之範圍內。在一些情形中，連接體序列包含長連接體(LL)序列。在一些情形中，長連接體序列包含(G₄S)_n，其中n=2至4。在一些情形中，連接體序列包含短連接體(SL)序列。在一些情形中，短連接體序列包含(G₄S)_n，其中n=1至3。

如本文所用之5'帽(亦稱為RNA帽、RNA 7-甲基鳥苷帽或RNA m7G帽)係在轉錄起始後不久即添加至真核信使RNA之「前面」或5'端之經修飾鳥嘌呤核苷酸。5'帽係由連接至第一個轉錄核苷酸之端基組成。其存在對於核糖體之識別及RNA酶之保護至關重要。帽添加與轉錄偶合且以共轉錄方式發生，以使其相互影響。轉錄起始後不久，所合成mRNA之5'端

藉由與RNA聚合酶締合之帽合成複合物結合。此酶複合物催化為mRNA加帽所需之化學反應。合成以多步驟生物化學反應進行。加帽部分可經修飾以調節mRNA之功能，例如其穩定性或轉譯效率。

如本文所用之「活體外轉錄RNA」係指已在活體外合成之RNA，較佳mRNA。通常，活體外轉錄RNA係自活體外轉錄載體生成。活體外轉錄載體包含用於生成活體外轉錄RNA之模板。

如本文所用之「聚(A)」係藉由多聚腺苷酸化附接至mRNA之一系列腺苷。在用於瞬時表現之構築體之較佳實施例中，聚A係介於50與5000之間，較佳大於64，更佳大於100，最佳大於300或400。聚(A)序列可經化學或酶促修飾以調節諸如定位、穩定性或轉譯效率等mRNA功能。

如本文所用之「多聚腺苷酸化」係指將多腺苷鹼基部分或其經修飾變體共價聯結至信使RNA分子。在真核生物體中，大部分信使RNA(mRNA)分子在3'端經多腺苷酸化。3'聚(A)尾係經由酶(多腺苷酸聚合酶)之作用添加至前mRNA之長腺嘌呤核苷酸序列(通常數百個)。在高等真核生物中，聚(A)尾係添加至含有特異性序列(多聚腺苷酸化信號)之轉錄本上。聚(A)尾及其結合之蛋白質輔助保護mRNA免於外切酶降解。多聚腺苷酸化對於轉錄終止、mRNA自核之輸出及轉譯亦至關重要。多聚腺苷酸化在核中在DNA轉錄成RNA後立即發生，但此外亦可稍後在細胞質中發生。在轉錄終止後，mRNA鏈經由與RNA聚合酶締合之核酸內切酶複合物之作用裂解。裂解位點之特徵通常在於在裂解位點附近存在鹼基序列AAUAAA。在mRNA裂解後，腺苷殘基係添加至裂解位點處之游離3'端。

如本文所用之「瞬時」係指非整合轉基因經數小時、數天或數週時

段之表現，其中該表現時間段小於基因在宿主細胞中整合至基因體中或含於穩定質體複製子內時表現之時間段。

術語「信號轉導路徑」係指在信號自細胞之一部分傳遞至細胞之另一部分中起作用之多種信號轉導分子之間的生物化學關係。片語「細胞表面受體」包括能夠接收信號且跨越細胞膜傳遞信號之分子及分子複合物。

術語「個體」意欲包括其中可引發免疫反應之活生物體(例如，哺乳動物、人類)。

術語「實質上純化」之細胞係指基本上不含其他細胞類型之細胞。實質上純化之細胞亦指已與在其天然狀態下與其天然締合之其他細胞類型分離之細胞。在一些情況下，實質上純化之細胞群係指同源細胞群。在其他情況下，此術語僅僅指已與在其天然狀態下與其天然締合之細胞分離之細胞。在一些態樣中，細胞係在活體外培養。在其他態樣中，細胞不在活體外培養。

如本文所用之術語「治療(therapeutic)」意指治療(treatment)。治療效應係藉由減輕、阻抑、緩解或消滅疾病狀態來獲得。

如本文所用之術語「預防」意指疾病或疾病狀態之預防或保護性治療。

在本發明上下文中，「腫瘤抗原」或「過度增殖性病症抗原」或「與過度增殖性病症相關之抗原」係指為特定過度增殖性病症所共有之抗原。在某些態樣中，本發明之過度增殖性病症抗原源於癌症，包括(但不限於)原發性或轉移性黑色素瘤、間皮瘤、腎細胞癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、結腸癌、子宮頸癌、腦癌、肝癌、胰臟癌、腎癌、子宮內膜癌及胃癌。

在一些情形中，疾病係選自由以下組成之群之癌症：間皮瘤、乳頭狀漿液性卵巢腺癌、透明細胞卵巢癌、混合性苗勒管卵巢癌、子宮內膜樣黏液卵巢癌、惡性胸膜疾病、胰臟腺癌、胰臟導管腺癌、子宮漿液性癌、肺腺癌、肝外膽管癌、胃腺癌、食道腺癌、結腸直腸腺癌、乳房腺癌、與間皮素表現相關之疾病及其組合。

術語「轉染」或「轉變」或「轉導」係指將外源核酸轉移或引入宿主細胞中之過程。「轉染」或「轉變」或「轉導」之細胞係經外源核酸轉染、轉變或轉導之細胞。該細胞包括原代個體細胞及其子代。

術語「特異性結合」係指識別並結合存在於試樣中之同源結合伴侶(例如，間皮素)但不必須且實質上識別或結合該試樣中之其他分子之抗體、抗體片段或特定配體。

範圍：在本發明通篇中，本發明之多個態樣可以範圍格式呈現。應瞭解，呈範圍格式之闡述僅出於方便及簡潔之目的，且不應理解為對本發明範圍之硬性限制。因此，範圍之闡述應視為特定揭示所有可能的子範圍以及該範圍內之個別數值。舉例而言，範圍(例如1至6)之闡述應視為特定地揭示諸如以下之子範圍：1至3、1至4、1至5、2至4、2至6、3至6等，以及該範圍內之個別數量，例如，1、2、2.7、3、4、5、5.3及6。作為另一個實例，諸如95%至99%一致性之範圍包括具有95%、96%、97%、98%或99%一致性者，且包括諸如96-99%、96-98%、96-97%、97-99%、97-98%及98%至99%一致性之子範圍。此無論範圍之寬度如何皆適用。

闡述

本文提供使用T細胞受體(TCR)融合蛋白治療疾病(例如癌症)之物質

之組合物及使用方法。如本文所用「**T細胞受體(TCR)融合蛋白**」或「**TFP**」包括自包含**TCR**之多種多肽衍生之重組體多肽，該重組體多肽通常能夠i)結合至靶細胞上之表面抗原並ii)與完整**TCR**複合物之其他多肽組分相互作用(通常在共同位於**T**細胞表面中或表面上時)。如本文所提供，與嵌合抗原受體相比，**TFP**提供大量益處。術語「嵌合抗原受體」或另一選擇為「**CAR**」係指包含細胞外抗原結合域之重組體多肽，該細胞外抗原結合域呈scFv、跨膜域及包含衍生自刺激分子之功能信號傳導域之細胞質信號傳導域(在本文中亦稱為「細胞內信號傳導域」)之形式，如下文所定義。通常，**CAR**之中樞細胞內信號傳導域源於發現通常與**TCR**複合物締合之**CD3 ζ** 鏈。**CD3 ζ** 信號傳導域可與一或多種衍生自至少一種共刺激分子(例如**4-1BB** (即，**CD137**)、**CD27**及/或**CD28**)之功能信號傳導域融合。

T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)

本發明涵蓋編碼**TFP**之重組體**DNA**構築體，其中**TFP**包含特異性結合至間皮素(例如，人類間皮素)之抗體片段，其中抗體片段之序列與編碼**TCR**亞單元或其一部分之核酸序列鄰接且在與該核酸序列相同之讀框中。本文所提供之**TFP**能與一或多個內源性(或另一選擇為，一或多個外源性或內源性及外源性之組合) **TCR**亞單元締合以便形成功能**TCR**複合物。

在一個態樣中，本發明**TFP**包含靶特異性結合元件，亦稱作抗原結合域。部分之選擇取決於界定靶細胞表面之靶抗原之類型及數量。舉例而言，抗原結合域可經選擇以識別用作靶細胞上與特定疾病狀態相關之細胞表面標記物之靶抗原。因此，可用作本發明**TFP**中之抗原結合域之靶抗原的細胞表面標記物之實例包括與病毒、細菌及寄生蟲感染、自體免疫疾病及癌性疾病(例如，惡性疾病)相關之彼等。

在一個態樣中，可藉助將特異性結合期望抗原之抗原結合域改造至TFP中使TFP介導之T細胞反應針對所關注抗原。

在一個態樣中，包含抗原結合域之TFP部分包含靶向間皮素之抗原結合域。在一個態樣中，抗原結合域靶向人類間皮素。

抗原結合域可為結合至抗原之任何域，包括(但不限於)單株抗體、多株抗體、重組抗體、人類抗體、人類化抗體及其功能片段，包括(但不限於)單一域抗體，例如重鏈可變域(V_H)、輕鏈可變域(V_L)及駱駝科動物源性奈米抗體之可變域(V_{HH})，及業內已知用作抗原結合域之替代性支架，例如重組纖維連蛋白域、抗運載蛋白(anticalin)、DARPIN及諸如此類。同樣，可使用特異性識別並結合靶抗原之天然或合成配體作為TFP之抗原結合域。在一些情形中，使抗原結合域源自其中最終將使用TFP之同一物種有益。例如，對於人類中之使用，TFP之抗原結合域包含抗體或抗體片段之抗原結合域之人類或人類化殘基可能有益。

因此，在一個態樣中，抗原結合域包含人類化或人類抗體或抗體片段或鼠類抗體或抗體片段。在一個實施例中，人類化或人類抗間皮素結合域包含本文所闡述之人類化或人類抗間皮素結合域之一或多個(例如，所有三個)輕鏈互補決定區1 (LC CDR1)、輕鏈互補決定區2 (LC CDR2)及輕鏈互補決定區3 (LC CDR3)，及/或本文所闡述之人類化或人類抗間皮素結合域之一或多個(例如，所有三個)重鏈互補決定區1 (HC CDR1)、重鏈互補決定區2 (HC CDR2)及重鏈互補決定區3 (HC CDR3)，例如包含一或多個(例如，所有三個) LC CDR及一或多個(例如，所有三個) HC CDR之人類化或人類抗間皮素結合域。在一個實施例中，人類化或人類抗間皮素結合域包含本文所闡述之人類化或人類抗間皮素結合域之一或多個(例

如，所有三個)重鏈互補決定區1 (HC CDR1)、重鏈互補決定區2 (HC CDR2)及重鏈互補決定區3 (HC CDR3)，例如人類化或人類抗間皮素結合域具有兩個可變重鏈區，其各自包含本文所述之HC CDR1、HC CDR2及HC CDR3。在一個實施例中，人類化或人類抗間皮素結合域包含本文所闡述之人類化或人類輕鏈可變區及/或本文所闡述之人類化或人類重鏈可變區。在一個實施例中，人類化或人類抗間皮素結合域包含本文所闡述之人類化重鏈可變區，例如，至少兩個本文所闡述之人類化或人類重鏈可變區。在一個實施例中，抗間皮素結合域係包含本文所提供胺基酸序列之輕鏈及重鏈之scFv。在實施例中，抗間皮素結合域(例如，scFv)包含：輕鏈可變區包含具有本文所提供輕鏈可變區之胺基酸序列之至少一個、兩個或三個修飾(例如，取代)但不超過30個、20個或10個修飾(例如，取代)之胺基酸序列，或與本文所提供胺基酸序列具有95%至99%一致性之序列；及/或重鏈可變區包含具有本文所提供重鏈可變區之胺基酸序列之至少一個、兩個或三個修飾(例如，取代)但不超過30個、20個或10個修飾(例如，取代)之胺基酸序列，或與本文所提供胺基酸序列具有95%至99%一致性之序列。在一個實施例中，人類化或人類抗間皮素結合域係scFv，且包含本文所述胺基酸序列之輕鏈可變區經由連接體(例如，本文所述之連接體)附接至包含本文所述胺基酸序列之重鏈可變區。在一個實施例中，人類化抗間皮素結合域包括(Gly₄-Ser)_n連接體，其中n為1、2、3、4、5或6，較佳地3或4。scFv之輕鏈可變區及重鏈可變區可呈(例如)下列定向中之任一者：輕鏈可變區-連接體-重鏈可變區或重鏈可變區-連接體-輕鏈可變區。在一些情形中，連接體序列包含長連接體(LL)序列。在一些情形中，長連接體序列包含(G₄S)_n，其中n=2至4。在一些情形中，連接體序列

包含短連接體(SL)序列。在一些情形中，短連接體序列包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=1$ 至3。

在一些態樣中，非人類抗體係人類化的，其中抗體之特定序列或區經修飾以增加與在人類中天然產生之抗體或其片段之類似性。在一個態樣中，抗原結合域係人類化的。

人類化抗體可使用業內已知之多種技術產生，包括(但不限於)CDR移植(例如，參見歐洲專利第EP 239,400號；國際公開案第WO 91/09967號；及美國專利第5,225,539號、第5,530,101號及第5,585,089號，其每一者以全文引用方式併入本文中)、鑲飾或表面重修(例如，參見歐洲專利第EP 592,106號及第EP 519,596號；Padlan, 1991, Molecular Immunology, 28(4/5):489-498；Studnicka等人，1994, Protein Engineering, 7(6):805-814；及Roguska等人，1994, PNAS, 91:969-973，其每一者以全文引用方式併入本文中)、鏈改組(例如，參見美國專利第5,565,332號，其以全文引用方式併入本文中)及揭示於以下中之技術：例如，美國專利申請公開案第US2005/0042664號、美國專利申請公開案第US2005/0048617號、美國專利第6,407,213號、美國專利第5,766,886號、國際公開案第WO 9317105號、Tan等人，J. Immunol., 169:1119-25 (2002)、Caldas等人，Protein Eng., 13(5):353-60 (2000)、Morea等人，Methods, 20(3):267-79 (2000)、Baca等人，J. Biol. Chem., 272(16):10678-84 (1997)、Roguska等人，Protein Eng., 9(10):895-904 (1996)、Couto等人，Cancer Res., 55(23 Supp):5973s-5977s (1995)、Couto等人，Cancer Res., 55(8):1717-22 (1995)、Sandhu J S, Gene, 150(2):409-10 (1994)及Pedersen等人，J. Mol. Biol., 235(3):959-73 (1994)，其每一者以全文引用方式併入本文

中。通常，框架區中之框架殘基將經CDR供體抗體之相應殘基取代以改變(例如改良)抗原結合。該等框架取代可藉由業內熟知之方法來鑑別，例如，藉由對CDR及框架殘基之相互作用進行建模以鑑別對於抗原結合重要的框架殘基，及進行序列比較以鑑別特定位置之常見框架殘基(例如，參見Queen等人，美國專利第5,585,089號；及Riechmann等人，1988, *Nature*, 332:323，其以全文引用方式併入本文中)。

人類化抗體或抗體片段中保留一或多個來自非人類來源之胺基酸殘基。該等非人類胺基酸殘基通常稱作「導入」殘基，其通常取自「導入」可變域。如本文所提供，人類化抗體或抗體片段包含一或多個來自非人類免疫球蛋白分子之CDR且其中包含框架之胺基酸殘基完全或幾乎源自人類種系之框架區。人類化抗體或抗體片段之多種技術為業內所熟知且基本上可遵循Winter及同事之方法(Jones等人，*Nature*, 321:522-525 (1986)；Riechmann等人，*Nature*, 332:323-327 (1988)；Verhoeyen等人，*Science*, 239:1534-1536 (1988))藉由用齧齒類動物CDR或CDR序列取代人類抗體之相應序列(亦即，CDR-移植)(EP 239,400；PCT公開案第WO 91/09967號；及美國專利第4,816,567號；第6,331,415號；第5,225,539號；第5,530,101號；第5,585,089號；第6,548,640號，其內容係全文以引用方式併入本文中)來實施。在該等人類化抗體及抗體片段中，實質上少於完整的人類可變域已經非人類物種之相應序列取代。人類化抗體通常為人類抗體，其中一些CDR殘基及可能一些框架(FR)殘基經來自齧齒類動物抗體中類似位點的殘基取代。抗體及抗體片段之人類化亦可藉由以下達成：鑲飾或表面重修(EP 592,106；EP 519,596；Padlan, 1991, *Molecular Immunology*, 28(4/5):489-498；Studnicka等人，*Protein Engineering*,

7(6):805-814 (1994)；及Roguska等人，PNAS, 91:969-973 (1994))或鏈改組(美國專利第5,565,332號)，該等文獻之內容係全文以引用方式併入本文中。

用於製備人類化抗體之人類可變域(輕鏈及重鏈二者)之選擇係用於降低抗原性。根據所謂的「最佳擬合」方法，針對已知人類可變域序列之整個文庫來篩選齧齒類動物抗體之可變域之序列。然後將最接近齧齒類動物之人類序列視為用於人類化抗體之人類框架(FR) (Sims 等人，J. Immunol., 151:2296 (1993)；Chothia 等人，J. Mol. Biol., 196:901 (1987)，該等之內容係以全文引用方式併入本文中)。另一方法使用衍生自輕鏈或重鏈之特定子組之所有人類抗體之共有序列的特定框架。對於若干不同的人類化抗體可使用相同框架(例如，參見Nicholson等人Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997)；Carter等人，Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992)；Presta等人，J. Immunol., 151:2623 (1993)，該等文獻之內容以全文引用方式併入本文中)。在一些實施例中，重鏈可變區之框架區(例如，所有四個框架區)係源自V_H4-4-59種系序列。在一個實施例中，框架區可包含一個、兩個、三個、四個或五個例如來自相應鼠類序列之胺基酸之修飾，例如取代。在一個實施例中，輕鏈可變區之框架區(例如，所有四個框架區)係源自VK3-1.25種系序列。在一個實施例中，框架區可包含一個、兩個、三個、四個或五個例如來自相應鼠類序列之胺基酸之修飾，例如取代。

在一些態樣中，包含抗體片段之本發明TFP組合物之部分經人類化並保留針對靶抗原之高親和力及其他有利生物性質。根據本發明之一態樣，人類化抗體及抗體片段係藉由一種使用親代及人類化序列之三維模型分析

親代序列及各種概念型人類化產物之方法製備。三維免疫球蛋白模型通常市面有售且為熟習此項技術者所熟知。可使用電腦程式，該等電腦程式闡釋並顯示所選候選免疫球蛋白序列之可能三維構象結構。檢查該等顯示可分析殘基在候選免疫球蛋白序列功能中之可能作用，例如分析殘基影響候選免疫球蛋白結合靶抗原之能力。以此方式，可自接受序列及導入序列中選擇並組合FR殘基以達成期望抗體或抗體片段特徵，例如對靶抗原之親和力增加。一般而言，CDR殘基直接且最實質性地參與影響抗原結合。

人類化抗體或抗體片段可保留與原始抗體類似之抗原特異性，例如在本發明中結合人類間皮素之能力。在一些實施例中，人類化抗體或抗體片段可具有改良之結合至人類間皮素之親和力及/或特異性。

在一個態樣中，抗間皮素結合域之特徵在於抗體或抗體片段之特定功能特性或性質。舉例而言，在一個態樣中，包含抗原結合域之本發明TFP組合物之部分特異性結合人類間皮素。在一個態樣中，抗原結合域具有與Nicholson等人Mol. Immun. 34 (16-17): 1157-1165 (1997)中所述之FMC63 scFv相同或相似的與人類間皮素之結合特異性。在一個態樣中，本發明係關於包含抗原結合域之抗體或抗體片段，其中該抗體結合域特異性結合至間皮素蛋白質或其片段，其中該抗體或抗體片段包含包括本文所提供胺基酸序列之可變輕鏈及/或可變重鏈。在某些態樣中，scFv與前導序列鄰接且在前導序列相同之讀框中。

在一個態樣中，抗間皮素結合域係片段，例如單鏈可變片段(scFv)。在一個態樣中，抗間皮素結合域係Fv、Fab、(Fab')₂或雙功能(例如雙特異性)雜交抗體(例如Lanzavecchia等人，Eur. J. Immunol. 17, 105 (1987))。在一個態樣中，本文所揭示之抗體及其片段以野生型或增強之

親和力結合間皮素蛋白。

本文亦提供獲得特異性針對靶抗原(例如間皮素，或本文別處闡述之對於融合部分結合域之標靶之任一靶抗原)之抗體抗原結合域之方法，該方法包含藉由在本文所述之 V_H 域之胺基酸序列中添加、缺失、取代或插入一或多種胺基酸而提供該 V_H 域之胺基酸序列變體之 V_H 域，視情況組合由此提供之 V_H 域與一或多種 V_L 域，及測試該 V_H 域或 V_H/V_L 組合，以鑑別特異性針對所關注靶抗原(例如間皮素)且視情況具有一或多種期望性質之特異結合成員或抗體抗原結合域。

在一些情形中， V_H 域及scFv可根據業內已知之方法來製備(例如，參見Bird等人，(1988) *Science* 242:423-426及Huston等人，(1988) *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85:5879-5883)。scFv分子可藉由使用撓性多肽連接體將 V_H 及 V_L 區連接在一起來產生。scFv分子包含具有最佳化長度及/或胺基酸組成之連接體(例如，Ser-Gly連接體)。連接體長度可極大地影響scFv之可變區摺疊及相互作用之方式。事實上，若採用短多肽連接體(例如，介於5至10個胺基酸之間)，則會防止鏈內摺疊。亦需要鏈間摺疊使兩個可變區一起形成功能表位結合位點。在一些情形中，連接體序列包含長連接體(LL)序列。在一些情形中，長連接體序列包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=2$ 至4。在一些情形中，連接體序列包含短連接體(SL)序列。在一些情形中，短連接體序列包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=1$ 至3。對於連接體定向及大小之實例，參見(例如) Hollinger等人1993 *Proc Natl Acad. Sci. U.S.A.* 90:6444-6448、美國專利第7,695,936號、美國專利申請公開案第20050100543號及第20050175606號及PCT公開案第WO2006/020258號及第WO2007/024715號，所有該等文獻皆以引用方式併入本文中。

scFv在其V_L區與V_H區之間可包含約10、11個、12、13、14、15或大於15個殘基之連接體。連接體序列可包含任一天然胺基酸。在一些實施例中，連接體序列包含胺基酸甘胺酸及絲胺酸。在另一實施例中，連接體序列包含甘胺酸及絲胺酸重複單元之集合(例如(Gly₄Ser)_n)，其中n係等於或大於1之正整數。在一個實施例中，連接體可為(Gly₄Ser)₄或(Gly₄Ser)₃。連接體長度之變化可保持或增強活性，從而在活性研究中產生優異效能。在一些情形中，連接體序列包含長連接體(LL)序列。在一些情形中，長連接體序列包含(G₄S)_n，其中n=2至4。在一些情形中，連接體序列包含短連接體(SL)序列。在一些情形中，短連接體序列包含(G₄S)_n，其中n=1至3。

穩定性及突變

抗間皮素結合域(例如，scFv分子(例如，可溶性scFv))之穩定性可參考習用對照scFv分子或全長抗體之生物物理性質(例如，熱穩定性)來評估。在一個實施例中，在所述分析中與親代scFv相比，人類化或人類scFv具有如下熱穩定性：大於約0.1℃、約0.25℃、約0.5℃、約0.75℃、約1℃、約1.25℃、約1.5℃、約1.75℃、約2℃、約2.5℃、約3℃、約3.5℃、約4℃、約4.5℃、約5℃、約5.5℃、約6℃、約6.5℃、約7℃、約7.5℃、約8℃、約8.5℃、約9℃、約9.5℃、約10℃、約11℃、約12℃、約13℃、約14℃或約15℃。

抗間皮素結合域(例如，scFv)之改良之熱穩定性隨後賦予整個間皮素-TFP構築體，從而改良抗間皮素TFP構築體之治療性質。如與習用抗體相比，抗間皮素結合域(例如，scFv)之熱穩定性可改良至少約2℃或3℃。在一個實施例中，如與習用抗體相比，抗間皮素結合域(例如，scFv)具有1℃改良之熱穩定性。在另一實施例中，如與習用抗體相比，抗間皮素結合

域(例如, scFv)具有2°C改良之熱穩定性。在另一實施例中, 如與習用抗體相比, scFv具有4°C、5°C、6°C、7°C、8°C、9°C、10°C、11°C、12°C、13°C、14°C或15°C改良之熱穩定性。可在(例如)本文所揭示之scFv分子與衍生出scFv V_H及V_L之抗體之scFv分子或Fab片段之間作出比較。熱穩定性可使用業內已知之方法來量測。舉例而言, 在一個實施例中, 可量測T_M。用於量測T_M之方法及測定蛋白質穩定性之其他方法係如下文所述。

scFv之突變(藉助可溶性scFv之人類化或誘變引起)可改變scFv之穩定性且改良scFv及抗間皮素TFP構築體之總體穩定性。使用諸如T_M、溫度變性及溫度聚集等量測將人類化scFv之穩定性與鼠類scFv相比較。在一個實施例中, 抗間皮素結合域(例如, scFv)包含由人類化過程引起之至少一個突變, 使得突變scFv賦予抗間皮素TFP構築體改良之穩定性。在另一實施例中, 抗間皮素結合域(例如, scFv)包含至少1、2、3、4、5、6、7、8、9、10種由人類化過程引起之突變使得突變scFv賦予間皮素-TFP構築體改良之穩定性。

在一個態樣中, TFP之抗原結合域包含與本文所闡述之抗原結合域胺基酸序列同源之胺基酸序列, 且抗原結合域保留本文所闡述之抗間皮素抗體片段之期望功能性質。在一個特定態樣中, 本發明之TFP組合物包含抗體片段。在另一態樣中, 抗體片段包含scFv。

在多個態樣中, TFP之抗原結合域係藉由修飾一或兩個可變區(例如, V_H及/或V_L)內、例如一或多個CDR區內及/或一或多個框架區內之一或多種胺基酸來改造。在一個特定態樣中, 本發明之TFP組合物包含抗體片段。在另一態樣中, 抗體片段包含scFv。

熟習此項技術者將理解，本發明之抗體或抗體片段可進一步經修飾使得其胺基酸序列(例如，自野生型)發生變化但期望活性不發生變化。舉例而言，可對蛋白質作出導致「非必需」胺基酸殘基處之胺基酸取代之其他核苷酸取代。舉例而言，分子中之非必需胺基酸殘基可用來自同一側鏈家族之另一胺基酸殘基來替代。在另一實施例中，胺基酸之串可用在側鏈家族成員之順序及/或組成方面不同之結構類似之串來替代，例如，可作出其中胺基酸殘基係用具有類似側鏈之胺基酸殘基替代之保守取代。

業內已定義具有類似側鏈之胺基酸殘基之家族，包括具有鹼性側鏈之胺基酸(例如，離胺酸、精胺酸、組胺酸)、具有酸性側鏈之胺基酸(例如，天冬胺酸、麩胺酸)、具有不帶電極性側鏈之胺基酸(例如，甘胺酸、天冬醯胺、麩胺醯胺、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸、半胱胺酸)、具有非極性側鏈之胺基酸(例如，丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸)、具有 β 分枝側鏈之胺基酸(例如，蘇胺酸、纈胺酸、異白胺酸)及具有芳香族側鏈之胺基酸(例如，酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。

一致性%在兩條或更多條核酸或多肽序列背景下係指兩條或更多條相同之序列。若在針對最大對應性在對比窗或指定區中進行比較及比對(如使用下列序列對比算法中之一者或藉由手動比對及目視檢查所量測)時兩個序列具有相同胺基酸殘基或核苷酸之指定百分比(亦即在指定區中或在未指定時在整個序列中具有60%一致性、視情況70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%之一致性)，則兩條序列「基本上相同」。

視情況，一致性存在於長度至少為約50個核苷酸(或10個胺基酸)之區中，或更佳地存在於長度為100至500或1000或更多個核苷酸(或20、50、200或更多個胺基酸)之區中。

就序列對比而言，一個序列通常充當與測試序列進行比較之參考序列。在使用序列對比算法時，將測試序列及參考序列輸入電腦中，必要時指定子序列坐標，並指定序列算法程式參數。可使用預設程式參數，或可指定替代參數。然後，序列對比算法將基於程式參數計算測試序列相對於參考序列之序列一致性百分比。用於比較之序列比對方法為業內所熟知。可藉由以下進行比較序列之最佳比對：例如Smith及Waterman, (1970) Adv. Appl. Math. 2:482c之局部同源性算法、Needleman及Wunsch, (1970) J. Mol. Biol. 48:443之同源性比對算法、Pearson及Lipman, (1988) Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA 85:2444之類似性方法探索、電腦化實施該等算法(GAP、BESTFIT、FASTA及TFASTA，Wisconsin Genetics Software Package, Genetics Computer Group, 575 Science Dr., Madison, Wis.)或手動比對及目視檢查(例如，參見Brent等人，(2003) Current Protocols in Molecular Biology)。適於測定序列一致性百分比及序列相似性之算法之兩個實例係BLAST及BLAST 2.0算法，該等算法分別闡述於Altschul等人(1977) Nuc. Acids Res. 25:3389-3402及Altschul等人(1990) J. Mol. Biol. 215:403-410中。用於實施BLAST分析之軟體可經由National Center for Biotechnology Information公開獲得。

在一個態樣中，本發明涵蓋起始抗體或片段(例如，scFv)胺基酸序列之生成功能等效分子之修飾。舉例而言，包含在TFP內之抗間皮素結合域(例如，scFv)之V_H或V_L可經修飾以保留抗間皮素結合域(例如，scFv)之起

始V_H或V_L框架區之至少約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%、99%一致性。本發明涵蓋整個TFP構築體之修飾，例如TFP構築體之各個域之一或多條胺基酸序列之修飾以生成功能等效分子。TFP構築體可經修飾以保留起始TFP構築體之至少約70%、71%、72%、73%、74%、75%、76%、77%、78%、79%、80%、81%、82%、83%、84%、85%、86%、87%、88%、89%、90%、91%、92%、93%、94%、95%、96%、97%、98%或99%一致性。

細胞外域

細胞外域可源自天然或重組來源。倘若來源為天然的，則該域可源自任何蛋白質，但具體而言膜結合或跨膜蛋白。在一個態樣中，細胞外域能與跨膜域締合。本發明中特別使用之細胞外域可至少包括(例如) T細胞受體之 α 鏈、 β 鏈或 ζ 鏈或CD3 ϵ 、CD3 γ 或CD3 δ 或在替代實施例中CD28、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154之細胞外區。

跨膜域

一般而言，TFP序列含有細胞外域及由單一基因體序列編碼之跨膜域。在替代實施例中，TFP可經設計以包含與TFP之細胞外域異源之跨膜域。跨膜域可包括毗鄰跨膜區之一或多個其他胺基酸，例如，與衍生出跨膜之蛋白質之細胞外區締合之一或多個胺基酸(例如，細胞外區之1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個或至多15個胺基酸)及/或與衍生出跨膜蛋白之蛋白質之細胞內區締合之一或多個其他胺基酸(例

如，細胞內區之1個、2個、3個、4個、5個、6個、7個、8個、9個、10個或至多15個胺基酸)。在一個態樣中，跨膜域係與所用TFP之其他域中之一者締合之域。在一些情況下，跨膜域可藉由胺基酸取代選擇或修飾以避免該等域與相同或不同表面膜蛋白之跨膜域結合，例如以最小化與受體複合物之其他成員的相互作用。在一個態樣中，跨膜域能與TFP-T-細胞表面上之另一TFP同二聚化。在不同態樣中，跨膜域之胺基酸序列可經修飾或取代以便最小化與存在於同一TFP中之天然結合伴侶之結合域的相互作用。

跨膜域可源自天然或重組來源。倘若來源為天然的，則該域可源自任一膜結合蛋白或跨膜蛋白。在一個態樣中，每當TFP已結合至標靶時，跨膜域均能夠信號傳導至細胞內域。本發明中特別使用之跨膜域可至少包括(例如)T細胞受體之 α 鏈、 β 鏈或 ζ 鏈、CD28、CD3 ϵ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154之跨膜區。

在一些情形中，跨膜域可經由鉸鏈(例如，來自人類蛋白質之鉸鏈)附接至TFP之細胞外區，例如TFP之抗原結合域。舉例而言，在一個實施例中，鉸鏈可為人類免疫球蛋白(Ig)鉸鏈，例如，IgG4鉸鏈或CD8a鉸鏈。

連接體

視情況，例如長度介於2個與10個胺基酸之間之短寡肽或多肽連接體可在TFP之跨膜域與細胞質區之間形成聯結。甘胺酸-絲胺酸雙聯體提供特別適宜之連接體。舉例而言，在一個態樣中，連接體包含GGGGSGGGGS之胺基酸序列(SEQ ID NO. 53)。在一些實施例中，連接體係由GGTGGCGGAGGTTCTGGAGGTGGAGGTTCC之核苷酸序列

(SEQ ID NO. 54)編碼。

細胞質域

若TFP含有CD3 γ 、 δ 或 ϵ 多肽，則TFP之細胞質域可包括細胞內信號傳導域；TCR α 及TCR β 亞單元通常缺乏信號傳導域。細胞內信號傳導域通常負責活化其中已引入TFP之免疫細胞之至少一種正常效應物功能。術語「效應物功能」係指細胞之特殊功能。例如，T細胞之效應物功能可為細胞溶解活性或輔助活性，包括分泌細胞介素。因此，術語「細胞內信號傳導域」係指轉導效應物功能信號且引導細胞以實施特殊功能之蛋白質部分。儘管通常可採用整個細胞內信號傳導域，但在許多情形下無需使用整條鏈。就使用細胞內信號傳導域之截短部分而言，可使用該截短部分來替代完整鏈，只要其轉導效應物功能信號即可。因此，術語細胞內信號傳導域意欲包括細胞內信號傳導域中足以轉導效應物功能信號之任一截短部分。

用於本發明TFP中之細胞內信號傳導域之實例包括T細胞受體(TCR)及在抗原受體接合後協同起起始信號轉導作用之共受體的細胞質序列，以及該等序列之任何衍生物或變體及具有相同功能性能力之任何重組序列。

已知僅經由TCR生成之信號不足以完全活化天然T細胞，且需要二級及/或共刺激信號。因此，可認為幼稚T細胞活化係藉由兩類不同的細胞質信號傳導序列來調介：經由TCR (初級細胞內信號傳導域)起始抗原依賴性初級活化之彼等，及以非抗原依賴性方式起提供二級或共刺激信號(二級細胞質域，例如共刺激域)作用之彼等。

初級信號傳導域以刺激方式或以抑制方式調控TCR複合物之初次活化。以刺激方式起作用之初級細胞內信號傳導域可含有信號傳導基序，該

等基序稱為基於免疫受體酪胺酸之活化基序(ITAM)。

含有特別用於本發明中之初級細胞內信號傳導域之ITAM之實例包括CD3 ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b及CD66d之彼等。在一個實施例中，本發明TFP包含細胞內信號傳導域，例如CD3- ϵ 之初級信號傳導域。在一個實施例中，初級信號傳導域包含經修飾ITAM域，例如與天然ITAM域相比已改變(例如，增加或降低)之活性之突變ITAM域。在一個實施例中，初級信號傳導域包含經修飾含有ITAM之初級細胞內信號傳導域，例如經最佳化及/或截短的含有ITAM之初級細胞內信號傳導域。在實施例中，初級信號傳導域包含一個、兩個、三個、四個或更多個ITAM基序。

TFP之細胞內信號傳導域可包含CD3- ζ 信號傳導域本身，或其可與可在本發明TFP背景下使用之任何其他期望細胞內信號傳導域組合。例如，TFP之細胞內信號傳導域可包含CD3 ϵ 鏈部分及共刺激信號傳導域。共刺激信號傳導域係指包含共刺激分子之細胞內域之TFP部分。共刺激分子係淋巴球有效因應抗原所需之除抗原受體或其配體外之細胞表面分子。該等分子之實例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、DAP10、DAP12、CD30、CD40、PD1、ICOS、淋巴球功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3，及與CD83特異性結合之配體，及諸如此類。例如已展示，CD27共刺激增強活體外人類TFP-T細胞之擴增、效應物功能及存活，且增加活體內人類T細胞持久性及抗腫瘤活性(Song等人，Blood. 2012; 119(3):696-706)。

本發明TFP之細胞質部分內之細胞內信號傳導序列可以隨機或指定順序彼此連接。視情況，例如長度介於2個與10個胺基酸之間(例如，2個、3

個、4個、5個、6個、7個、8個、9個或10個胺基酸)之短寡肽或多肽連接體可形成細胞內信號傳導序列之間之聯結。

在一個實施例中，可使用甘胺酸-絲胺酸雙聯體作為適宜連接體。在一個實施例中，可使用單一胺基酸(例如，丙胺酸、甘胺酸)作為適宜連接體。

在一個態樣中，本文所述之TFP表現細胞可進一步包含第二TFP，例如，包括例如針對相同標靶(間皮素)或不同標靶(例如，CD123)之不同抗原結合域之第二TFP。在一個實施例中，當TFP表現細胞包含兩個或更多個不同TFP時，不同TFP之抗原結合域可使得抗原結合域不彼此相互作用。舉例而言，表現第一及第二TFP之細胞可具有不與第二TFP之抗原結合域締合之第一TFP之抗原結合域(例如，呈片段形式，例如scFv)，例如第二TFP之抗原結合域為V_{HH}。

在另一態樣中，本文所述之TFP表現細胞可進一步表現另一藥劑，例如增強TFP表現細胞之活性之藥劑。舉例而言，在一個實施例中，藥劑可為抑制抑制性分子之藥劑。在一些實施例中，抑制性分子(例如，PD1)可降低TFP表現細胞引起免疫效應物反應之能力。抑制性分子之實例包括PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4及TGFR β 。在一個實施例中，抑制抑制性分子之藥劑包含與向細胞(例如，本文所述之細胞內信號傳導域)提供正信號之第二多肽締合之第一多肽(例如抑制性分子)。在一個實施例中，該藥劑包含(例如)抑制分子(例如PD1、LAG3、CTLA4、CD160、BTLA、LAIR1、TIM3、2B4及TIGIT)或該等分子中任一者之片段(例如，該等分子中任一者之細胞外域之至少一部分)的第一多肽，及為本文所述之細胞內信號傳

導域(例如，包含共刺激域(例如，4-1BB、CD27或CD28，例如如本文所述)及/或初級信號傳導域(例如，本文所述之CD3 ζ 信號傳導域)的第二多肽。在一個實施例中，藥劑包含PD1或其片段(例如PD1細胞外域之至少一部分)之第一多肽，及本文所述細胞內信號傳導域(例如，本文所述之CD28信號傳導域及/或本文所述之CD3 ζ 信號傳導域)之第二多肽。PD1係抑制性受體之CD28家族之成員，該CD28家族亦包括CD28、CTLA-4、ICOS及BTLA。PD-1係表現於經活化B細胞、T細胞及骨髓細胞上(Agata等人1996 Int. Immunol 8:765-75)。PD1、PD-L1及PD-L2之兩種配體已顯示在結合至PD1時可下調T細胞活化(Freeman等人2000 J Exp Med 192:1027-34；Latchman等人2001 Nat Immunol 2:261-8；Carter等人2002 Eur J Immunol 32:634-43)。PD-L1在人類癌症中較豐富(Dong等人2003 J Mol Med 81:281-7；Blank等人2005 Cancer Immunol. Immunother 54:307-314；Konishi等人2004 Clin Cancer Res 10:5094)。免疫阻抑可藉由抑制PD1與PD-L1之局部相互作用來逆轉。

在一個實施例中，藥劑包含抑制性分子(例如程式化死亡配體1 (PD1))之細胞外域(ECD)，其可融合至跨膜域及視情況細胞內信號傳導域(例如41BB及CD3 ζ) (在本文中亦稱為PD1 TFP)。在一個實施例中，PD1 TFP在與本文所述之抗間皮素TFP組合使用時會改良T細胞之持久性。在一個實施例中，TFP係包含PD 1之細胞外域之PD1 TFP。或者，提供含有特異性結合至程式化死亡配體1 (PD-L1)或程式化死亡配體2 (PD-L2)之抗體或抗體片段(例如scFv)之TFP。

在另一態樣中，本發明提供TFP表現T細胞(例如，TFP-T細胞)群。在一些實施例中，TFP表現T細胞群包含表現不同TFP之細胞之混合物。

舉例而言，在一個實施例中，TFP-T細胞群可包括第一細胞，其表現具有本文所述抗間皮素結合域之TFP；及第二細胞，其表現具有不同抗間皮素結合域(例如，本文所述不同於由第一細胞表現之TFP中之抗間皮素結合域的抗間皮素結合域)之TFP。作為另一個實例，TFP表現細胞群可包括第一細胞，其表現包括抗間皮素結合域(例如，如本文所述)之TFP；及第二細胞，其表現包括針對除間皮素外之標靶(例如，另一腫瘤相關抗原)之抗原結合域的TFP。

在另一態樣中，本發明提供細胞群，其中該群中之至少一個細胞表現具有本文所述抗間皮素域之TFP，及表現另一藥劑(例如，增強TFP表現細胞之活性之藥劑)之第二細胞。舉例而言，在一個實施例中，藥劑可為抑制抑制性分子之藥劑。在一些實施例中，抑制性分子可例如降低TFP表現細胞引起免疫效應物反應之能力。抑制性分子之實例包括PD1、PD-L1、PD-L2、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4及TGFR β 。在一個實施例中，抑制抑制性分子之藥劑包含與向細胞(例如，本文所述之細胞內信號傳導域)提供正信號之第二多肽締合之第一多肽(例如抑制性分子)。

本文揭示用於產生編碼TFP之活體外轉錄RNA之方法。本發明亦包括可直接轉染至細胞中之TFP編碼RNA構築體。生成用於轉染之mRNA之方法可涉及使用專門設計之引子在活體外轉錄(IVT)模板，隨後添加聚A，以產生長度通常為50-2000個鹼基之含有以下各項之構築體：3'及5'未轉譯序列(「UTR」)、5'帽及/或內部核糖體進入位點(IRES)、欲表現之核酸及聚A尾。由此產生之RNA可有效地轉染不同種類之細胞。在一個態樣中，模板包括針對TFP之序列。

在一個態樣中，抗間皮素TFP係由信使RNA (mRNA)編碼。在一個態樣中，將編碼抗間皮素TFP之mRNA引入T細胞中用於產生TFP-T細胞。在一個實施例中，活體外轉錄RNA TFP可以瞬時轉染形式引入細胞。RNA係使用聚合酶鏈式反應(PCR)生成之模板藉由活體外轉錄產生。來自任一來源之所關注DNA可使用適宜引子及RNA聚合酶藉由PCR直接轉化至模板中用於活體外mRNA合成。DNA之來源可為例如基因體DNA、質體DNA、噬菌體DNA、cDNA、合成DNA序列或DNA之任何其他適宜來源。用於活體外轉錄之期望模板係本發明TFP。在一個實施例中，欲用於PCR之DNA含有開放讀框。DNA可來自生物體基因體之天然DNA序列。在一個實施例中，核酸可包括5'及/或3'未轉譯區(UTR)中之一部分或全部。核酸可包括外顯子及內含子。在一個實施例中，欲用於PCR之DNA係人類核酸序列。在另一實施例中，欲用於PCR之DNA係包括5'及3' UTR之人類核酸序列。另一選擇為，DNA可為通常不在天然生物體中表現之人工DNA序列。實例性人工DNA序列係含有基因之連接在一起形成編碼融合蛋白之開放讀框之部分者。DNA之連接在一起之部分可來自單一生物體或一種以上之生物體。

使用PCR來生成用於活體外轉錄用於轉染之mRNA之模板。實施PCR之方法為業內所熟知。用於PCR中之引子經設計以具有與欲用作PCR模板之DNA之區域實質上互補的區域。如本文所用「實質上互補」係指其中引子序列中之大部分或所有鹼基互補、或一或多個鹼基不互補或錯配之核苷酸序列。實質上互補之序列能夠在用於PCR之退火條件下退火或與預期DNA靶雜交。引子可經設計以與DNA模板之任一部分實質上互補。舉例而言，引子可經設計以擴增核酸之通常在細胞中轉錄之部分(開放讀

框)，包括5'及3' UTR。引子亦可經設計以擴增核酸之編碼所關注特定域之部分。在一個實施例中，引子經設計以擴增人類cDNA之編碼區，包括5'及3' UTR之全部或一部分。可用於PCR之引子可藉由業內熟知之合成方法來生成。「正向引子」係含有與在DNA模板上在欲擴增DNA序列上游之核苷酸實質上互補之核苷酸區的引子。本文所用「上游」係指欲擴增DNA序列相對於編碼鏈之位置5。「反向引子」係含有與在欲擴增DNA序列下游之雙鏈DNA模板實質上互補之核苷酸區之引子。本文所用「下游」係指欲擴增DNA序列相對於編碼鏈之位置3'。

可在本文所揭示之方法中使用可用於PCR之任一DNA聚合酶。試劑及聚合酶可自多種來源購得。

亦可使用具有促進穩定性及/或轉譯效率能力之化學結構。RNA較佳具有5'及3' UTR。在一個實施例中，5' UTR之長度介於1個與3,000個核苷酸之間。欲添加至編碼區中之5'及3' UTR序列之長度可藉由不同方法來改變，該等方法包括(但不限於)設計複性至UTR之不同區之PCR引子。使用此方式，熟習此項技術者可改變在轉錄RNA轉染後達成最佳轉譯效率所需之5'及3' UTR長度。

5'及3' UTR可為所關注核酸之天然內源性5'及3' UTR。另一選擇為，可藉由將UTR序列納入正向及反向引子中或藉由模板之任何其他修飾來添加不為所關注核酸內源之UTR序列。可使用不為所關注核酸內源之UTR序列來改變RNA之穩定性及/或轉譯效率。舉例而言，已知3'UTR序列中富含AU之元件可降低mRNA之穩定性。因此，可基於業內熟知之UTR之性質來選擇或設計3' UTR以增加轉錄RNA之穩定性。

在一個實施例中，5' UTR可含有內源核酸之Kozak序列。另一選擇

為，當藉由如上文所述之PCR添加不為所關注核酸內源之5' UTR時，可藉由添加5' UTR序列重新設計共有Kozak序列。Kozak序列可增加一些RNA轉錄本之轉譯效率，但似乎並不為所有RNA能夠有效轉譯所必需。業內已知對許多mRNA之Kozak序列之要求。在其他實施例中，5' UTR可為RNA基因體在細胞中穩定之RNA病毒之5'UTR。在其他實施例中，各種核苷酸類似物可用於3'或5' UTR中以阻礙外切酶降解mRNA。

為能夠在不需要基因選殖的情況下自DNA模板合成RNA，應將轉錄之啟動子附接至欲轉錄序列之DNA模板上游。當將用作RNA聚合酶之啟動子之序列添加至正向引子之5'端時，RNA聚合酶啟動子被納入欲轉錄開放讀框之PCR產物上游中。在一較佳實施例中，啟動子係T7聚合酶啟動子，如本文在別處所述。其他有用啟動子包括(但不限於) T3及SP6 RNA聚合酶啟動子。T7、T3及SP6啟動子之共有核苷酸序列為業內已知。

在較佳實施例中，mRNA在5'端及3'聚(A)尾上皆具有決定細胞中之核糖體結合、mRNA轉譯起始及穩定性之帽。在環形DNA模板(例如質體DNA)上，RNA聚合酶產生不適於在真核細胞中表現之長多聯產物。3' UTR端線性化之質體DNA之轉錄產生正常大小之mRNA，該mRNA即使在轉錄後經多腺苷酸化仍在真核轉染中無效。

在線性DNA模板上，噬菌體T7 RNA聚合酶可使轉錄本之3'端延伸超過模板之最後一個鹼基(Schenborn 及 Mierendorf, Nuc Acids Res., 13:6223-36 (1985) ; Nacheva 及 Berzal-Herranz, Eur. J. Biochem., 270:1485-65 (2003)。

將聚A/T段整合至DNA模板中之習用方法係分子選殖。然而，整合至質體DNA中之聚A/T序列可使質體不穩定，此係自細菌細胞獲得之質體

DNA模板通常經缺失及其他畸變高度污染之原因。此使得選殖程序不僅費力且耗時，且通常使其不可靠。此係在不選殖情況下構築具有聚A/T 3'段之DNA模板之方法高度合意之原因。

轉錄DNA模板之聚A/T區段可藉由以下方式來產生：在PCR期間藉由使用含有聚T尾(例如100 T尾(大小可為50-5000 T))之反向引子(大小可為50-5000 T)，或在PCR後藉助任何其他方法(包括(但不限於) DNA連接或活體外重組)。聚(A)尾亦為RNA提供穩定性且減少其降解。通常，聚(A)尾之長度與轉錄RNA之穩定性呈正相關。在一個實施例中，聚(A)尾在100個與5000個腺苷之間。

RNA之聚(A)尾可在活體外轉錄後利用聚(A)聚合酶(例如大腸桿菌(*E. coli*)聚A聚合酶(E-PAP))進一步延伸。在一個實施例中，將聚(A)尾之長度自100個核苷酸增加至介於300個與400個核苷酸之間使得RNA轉譯效率增加約兩倍。另外，不同化學基團至3'端之附接可增加mRNA穩定性。該附接可含有經修飾/人工核苷酸、適配體及其他化合物。例如，可使用聚(A)聚合酶將ATP類似物納入聚(A)尾中。ATP類似物可進一步增加RNA之穩定性。

5'帽亦為RNA分子提供穩定性。在較佳實施例中，藉由本文所揭示方法產生之RNA包括5'帽。5'帽係使用業內已知及本文所闡述之技術來提供(Cougot等人，*Trends in Biochem. Sci.*, 29:436-444 (2001)；Stepinski等人，*RNA*, 7:1468-95 (2001)；Elango等人，*Biochim. Biophys. Res. Commun.*, 330:958-966 (2005))。

藉由本文所揭示方法產生之RNA亦可含有內部核糖體進入位點(IRES)序列。IRES序列可為起始非帽依賴性核糖體與mRNA之結合且幫

助轉譯起始之任何病毒、染色體或人工設計序列。可包括任何適用於細胞電穿孔之溶質，該等溶質可含有促進細胞滲透及活力之因子，例如糖、肽、脂質、蛋白質、抗氧化劑及表面活性劑。

可利用多種不同方法中之任一者(例如市售方法)將RNA引入靶細胞中，該等方法包括(但不限於)電穿孔(Amaxa Nucleofector-II (Amaxa Biosystems, Cologne, Germany))、(ECM 830 (BTX) (Harvard Instruments, Boston, Mass.)或Gene Pulser II (BioRad, Denver, Colo.)、Multiporator (Eppendorf, Hamburg Germany)、利用脂質轉染之陽離子脂質體介導之轉染、聚合物囊封、肽介導之轉染或生物彈射粒子遞送系統(例如「基因槍」)(例如，參見Nishikawa等人，Hum Gene Ther., 12(8):861-70 (2001)。

編碼TFP之核酸構築體

本發明亦提供編碼一或多種本文所述之TFP構築體之核酸分子。在一個態樣中，核酸分子係以信使RNA轉錄本提供。在一個態樣中，核酸分子係以DNA構築體提供。

編碼期望分子之核酸序列可利用業內已知之重組方法來獲得，例如利用標準技術藉由自表現該基因之細胞篩選文庫、自己知包括該基因之載體衍生出基因或自含有該基因之細胞及組織直接分離來獲得。另一選擇為，所關注基因可以合成方式而非選殖來產生。

本發明亦提供其中插入本發明DNA之載體。源自逆轉錄病毒(例如慢病毒)之載體係達成長期基因轉移之適宜工具，此乃因其容許轉基因長期穩定整合及其在子細胞中繁殖。慢病毒載體較源自致癌逆轉錄病毒(例如鼠類白血病毒)之載體的額外優點在於，其可轉導非增殖細胞(例如肝細胞)。其亦具有低免疫原性之額外優點。

在另一實施例中，包含編碼本發明期望TFP之核酸之載體係腺病毒載體(A5/35)。在另一實施例中，編碼TFP之核酸之表現可利用轉座子(例如睡美人(sleeping beauty)、crisper、CAS9及鋅指核酸酶)來實現(參見June等人2009 Nature Reviews Immunol. 9.10: 704-716，以引用方式併入本文中)。

本發明之表現構築體亦可利用標準基因遞送方案用於核酸免疫及基因療法。用於基因遞送之方法為業內已知(例如，參見美國專利第5,399,346號、第5,580,859號、第5,589,466號，其以全文引用方式併入本文中)。在另一實施例中，本發明提供基因療法載體。

核酸可選殖至多種類型之載體中。舉例而言，核酸可選殖至包括(但不限於)以下各項之載體中：質體、噬菌粒、噬菌體衍生物、動物病毒及黏粒。特別受關注之載體包括表現載體、複製載體、探針生成載體及測序載體。

此外，可向細胞提供呈病毒載體形式之表現載體。病毒載體技術在業內熟知且闡述於(例如) Sambrook等人，2012, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 第1-4卷, Cold Spring Harbor Press, NY)及其他病毒學及分子生物學手冊中。可用作載體之病毒包括(但不限於)逆轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒及慢病毒。一般而言，適宜載體含有在至少一種生物體中發揮功能之複製起點、啟動子序列、便利的限制性核酸內切酶位點及一或多個選擇標記物(例如，WO 01/96584；WO 01/29058；及美國專利第6,326,193號)。

已研發多種基於病毒之系統用於基因轉移至哺乳動物細胞中。舉例而言，逆轉錄病毒為基因遞送系統提供便利平臺。可利用業內已知技術將

所選基因插入載體中且包裝在逆轉錄病毒粒子中。然後可以活體內或離體方式將重組病毒分離並遞送至個體細胞中。多種逆轉錄病毒系統為業內已知。在一些實施例中，使用腺病毒載體。多種腺病毒載體為業內已知。在一個實施例中，使用慢病毒載體。

其他啟動子元件(例如增強子)調控轉錄起始之頻率。通常，該等元件位於起始位點上游之30-110 bp區域中，但已顯示多種啟動子亦含有位於起始位點下游之功能元件。啟動子元件之間之距離通常較靈活，以使得在相對於彼此插入或移動元件時保留啟動子功能。在胸苷激酶(tk)啟動子中，啟動子元件之間之距離可在活性開始下降之前增加至50 bp。端視啟動子，似乎個別元件可協同或獨立地發揮活化轉錄之功能。

能夠在哺乳動物T細胞中表現TFP轉基因之啟動子之實例係EF1a啟動子。天然EF1a啟動子驅動負責將胺基醯基tRNA經酶促遞送至核糖體之延伸因子-1複合物之 α 亞單位的表現。EF1a啟動子已廣泛用於哺乳動物表現質體中且已顯示可有效驅動選殖至慢病毒載體中之轉基因之TFP表現(例如，參見Milone等人，Mol. Ther. 17(8): 1453-1464 (2009))。啟動子之另一個實例係立即早期巨細胞病毒(CMV)啟動子序列。此啟動子序列係能夠驅動與其可操作地連接之任何聚核苷酸序列之高表現量的強組成型啟動子序列。然而，亦可使用其他組成型啟動子序列，包括(但不限於)猿猴病毒40 (SV40)早期啟動子、小鼠乳房腫瘤病毒(MMTV)、人類免疫缺陷病毒(HIV)長末端重複(LTR)啟動子、MoMuLV啟動子、禽類白血病毒啟動子、艾司坦-巴爾病毒(Epstein-Barr virus)立即早期啟動子、勞斯肉瘤病毒啟動子以及人類基因啟動子，例如(但不限於)肌動蛋白啟動子、肌凝蛋白啟動子、延伸因子-1 α 啟動子、血紅素啟動子及肌酸激酶啟動子。此

外，本發明應不限於使用組成型啟動子。亦涵蓋誘導型啟動子作為本發明之一部分。使用誘導型啟動子提供能夠在期望該表現時啟動該可操作地連接之聚核苷酸序列的表現或在不期望該表現時關閉表現之分子開關。誘導型啟動子之實例包括(但不限於)金屬硫蛋白啟動子、糖皮質素啟動子、助孕酮啟動子及四環素調控型啟動子。

為評價TFP多肽或其部分之表現，欲引入細胞中之表現載體亦可含有選擇標記物基因或報導基因或二者，以有利於自欲經由病毒載體轉染或感染所尋求之細胞群鑑別及選擇表現細胞。在其他態樣中，選擇標記物可攜載於DNA之單獨片段上且用於共轉染程序中。選擇標記物及報導基因二者可側接有適當調控序列以使得能夠在宿主細胞中表現。適用之可選標記物包括(例如)抗生素抗性基因，例如neo及諸如此類。

報導基因係用於鑑別潛在轉染之細胞且用於評估調控序列之功能。一般而言，報導基因係不存在於接受體生物體或組織中或不由其表現，且其所編碼多肽之表現會由一些容易檢測之性質(例如酶促活性)呈現的基因。報導基因之表現係在將DNA引入接受體細胞中後在適宜時間分析。適宜報導基因可包括編碼螢光素酶、 β -半乳糖苷酶、氯黴素乙醯基轉移酶、分泌性鹼性磷酸酶之基因或綠色螢光蛋白基因(例如，Ui-Tei等人，2000 FEBS Letters 479: 79-82)。適宜表現系統為人熟知且可利用已知技術製備或以商業方式獲得。一般而言，將顯示報導基因之最高表現量之具有最小5'側接區之構築體鑑別為啟動子。該等啟動子區可連接至報導基因且用於評估藥劑調節啟動子驅動之轉錄之能力。

業內已知將基因引入細胞中且在細胞中表現之方法。在表現載體之背景下，可藉由業內之任何方法將該載體容易地引入宿主細胞(例如哺乳

動物、細菌、酵母或昆蟲細胞)中。例如，可藉由物理、化學或生物方式將表現載體轉移至宿主細胞中。

用於將聚核苷酸引入宿主細胞中之物理方法包括硫酸鈣沈澱、脂質轉染、粒子轟擊、顯微注射、電穿孔及諸如此類。用於產生包含載體及/或外源核酸之細胞之方法為業內所熟知(例如參見Sambrook等人，2012, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, 第1-4卷, Cold Spring Harbor Press, NY)。一種用於將聚核苷酸引入宿主細胞中之方法係磷酸鈣轉染。

用於將所關注聚核苷酸引入宿主細胞中之生物方法包括使用DNA及RNA載體。病毒載體且尤其逆轉錄病毒載體已成為最廣泛用於將基因插入哺乳動物(例如人類)細胞中之方法。其他病毒載體可源自慢病毒、痘病毒、單純疱疹病毒I、腺病毒及腺相關病毒及諸如此類(例如參見美國專利第5,350,674號及第5,585,362號)。

用於將聚核苷酸引入宿主細胞中之化學方式包括膠體分散系統，例如大分子複合物、奈米膠囊、微球體、珠粒及基於脂質之系統，包括水包油乳液、膠束、混合膠束及脂質體。用作活體外及活體內遞送媒劑之實例性膠體系統係脂質體(例如人工膜囊泡)。可獲得目前最佳技術靶向遞送核酸之其他方法，例如使用靶向奈米粒子或其他適宜亞微米大小之遞送系統遞送聚核苷酸。

在利用非病毒遞送系統之情形下，實例性遞送媒劑係脂質體。涵蓋使用脂質調配物將核酸引入宿主細胞中(活體外、離體或活體內)。在另一態樣中，核酸可與脂質締合。與脂質締合之核酸可囊封於脂質體之水性內部，散置在脂質體之脂質雙層內，經由與脂質體及寡核苷酸二者締合之連接分子附接至脂質體，包埋於脂質體中，與脂質體複合，分散在含有脂質

之溶液中，與脂質混合，與脂質組合，以懸浮液形式含於脂質中，含有膠束或與其複合或以其他方式與脂質締合。脂質、脂質/DNA或脂質/表現載體締合之組合物並不限於溶液中之任何特定結構。舉例而言，其可以雙層結構、膠束或「塌陷」結構存在。其亦可簡單地散置於溶液中，可能形成大小或形狀不均勻之聚集物。脂質係可為天然或合成脂質之脂肪物質。舉例而言，脂質包括天然存在於細胞質中之脂肪小滴以及含有長鏈脂肪族烴及其衍生物之化合物類別，例如脂肪酸、醇、胺、胺基醇及醛。

適於使用之脂質可自商業來源獲得。舉例而言，雙十四烷基磷脂醯膽鹼(「DMPC」)可自Sigma, St. Louis, Mo.獲得；磷酸雙十六烷基酯(「DCP」)可自K & K Laboratories (Plainview, N.Y.)獲得；膽固醇(「Choi」)可自Calbiochem-Behring獲得；雙十四烷基磷脂醯甘油(「DMPG」)及其他脂質可自Avanti Polar Lipids, Inc. (Birmingham, Ala.)獲得。脂質於氯仿或氯仿/甲醇中之原液可在約-20℃下儲存。使用氯仿作為唯一溶劑，乃因其較甲醇更易於蒸發。「脂質體」係涵蓋多種藉由生成封閉脂質雙層或聚集物而形成之單一及多層脂質媒劑的一般術語。脂質體之特徵可在於具有磷脂雙層膜及內部水性介質之囊泡狀結構。多層脂質體具有多個藉由水性介質分開之脂質層。其係在磷脂懸浮於過量水溶液中時自發形成。脂質組分在閉合結構形成之前經受自我重排且將水及所溶解溶質包埋在脂質雙層之間(Ghosh等人，1991 Glycobiology 5: 505-10)。然而，亦涵蓋在溶液中具有與正常囊泡狀結構不同之結構之組合物。舉例而言，脂質可呈膠束結構或僅以脂質分子之非均勻聚集物形式存在。亦涵蓋lipofectamine-核酸複合物。

無論將外源核酸引入宿主細胞中所使用之方法抑或以其他方式將細

胞暴露於本發明抑制劑，為確認在宿主細胞中存在重組DNA序列，可實施多種分析。該等分析包括(例如)熟習此項技術者所熟知之「分子生物學」分析，例如南方墨點(Southern blotting)及北方墨點(Northern blotting)、RT-PCR及PCR；「生物化學」分析，例如檢測特定肽之存在或不存在，例如藉由免疫學方式(ELISA及西方墨點)或藉由本文所闡述之分析，以鑑別屬本發明範圍內之藥劑。

本發明進一步提供包含編碼TFP之核酸分子之載體。在一個態樣中，TFP載體可直接轉導至細胞(例如T細胞)中。在一個態樣中，載體係選殖或表現載體，例如包括(但不限於)以下各項之載體：一或多種質體(例如表現質體、選殖載體、微環、微載體、雙微染色體)、逆轉錄病毒及慢病毒載體構築體。在一個態樣中，載體能夠在哺乳動物T細胞中表現TFP構築體。在一個態樣中，哺乳動物T細胞係人類T細胞。

T細胞之來源

在擴增及遺傳修飾之前，自個體獲得T細胞之來源。術語「個體」意欲包括其中可誘發免疫反應之活的生物體(例如哺乳動物)。個體之實例包括人類、狗、貓、小鼠、大鼠及其轉基因物種。T細胞可自多種來源獲得，該等來源包括末梢血單核細胞、骨髓、淋巴結組織、臍帶血、胸腺組織、來自感染位點之組織、腹水、胸膜滲出液、脾組織及腫瘤。在本發明之某些態樣中，可使用任一數量之業內可用之T細胞系。在本發明之某些態樣中，T細胞可自利用任一數量之熟習此項技術者已知之技術(例如Ficoll™分離)自個體收集之一單位血液獲得。在一較佳態樣中，來自個體循環血液之細胞係藉由血球分離獲得。血球分離產物通常含有淋巴球(包括T細胞)、單核球、顆粒球、B細胞、其他有核白血球、紅血球及血小

板。在一個態樣中，藉由血球分離收集之細胞可經洗滌以去除血漿部分，且將細胞置於適當緩衝液或培養基中用於後續處理步驟。在本發明之一個態樣中，用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)洗滌細胞。在替代態樣中，洗滌溶液缺少鈣且可能缺少鎂或可能缺少許多但非所有二價陽離子。在鈣不存在下之初始活化步驟可使得活化放大。如熟習此項技術者將容易地瞭解，洗滌步驟可藉由業內之彼等已知之方法完成，例如根據製造商之說明書藉由利用半自動「無逆流」離心機(例如Cobe 2991細胞處理器、Baxter CytoMate或Haemonetics Cell Saver 5)來完成。洗滌後，可將細胞重懸浮於多種生物相容性緩衝液中，例如不含Ca之PBS、不含Mg之PBS、PlasmaLyte A或其他含或不含緩衝液之鹽水溶液。另一選擇為，可去除血球分離試樣之不期望組分且將細胞直接重懸浮於培養基中。

在一個態樣中，藉由溶解紅血球且清除單核球自末梢血淋巴球分離T細胞，例如藉由PERCOLL™梯度離心或藉由逆流離心淘析來分離。可藉由正向或負向選擇技術進一步分離T細胞之特定亞群體(例如CD3+、CD28+、CD4+、CD8+、CD45RA+及CD45RO+ T細胞)。舉例而言，在一個態樣中，T細胞可藉由與抗-CD3/抗-CD28 (例如，3×28)偶聯之珠粒(例如DYNABEADS™ M-450 CD3/CD28 T)一起培育足以對期望T細胞進行陽性選擇之時間段來分離。在一個態樣中，時間段為約30分鐘。在另一態樣中，時間段在30分鐘至36小時或更長之範圍內及期間之所有整數值。在另一態樣中，時間段為至少1、2、3、4、5或6小時。在再一較佳態樣中，時間段為10至24小時。在一個態樣中，培育時間段為24小時。在與其他細胞類型相比T細胞極少的任何情況下(例如在自腫瘤組織或自免疫受損個體分離腫瘤浸潤淋巴球(TIL)中)，可利用較長培育時間來分離T

細胞。此外，利用較長培育時間可增加捕獲CD8+ T細胞之效率。因此，藉由僅縮短或延長時間，可使T細胞結合至CD3/CD28珠粒，及/或藉由增加或降低珠粒對T細胞之比率(如本文進一步所述)，可在培養起始時或該過程期間之其他時間點優先選擇T細胞亞群。另外，藉由增加或降低珠粒或其他表面上之抗-CD3及/或抗-CD28抗體之比率，可在培養起始時或其他期望時間點優先選擇T細胞亞群。熟習此項技術者可認識到在本發明之背景下亦可使用多輪次選擇。在某些態樣中，在活化及擴增過程中可合意地實施選擇程序及使用「未選擇之」細胞。亦可使「未選擇之」細胞經受其他輪次選擇。

可藉由陰性選擇與針對陰性選擇之細胞所獨有之表面標記物之抗體的組合完成T細胞群之富集。一種方法係經由負磁免疫黏附或流式細胞術之細胞分選及/或選擇，其使用針對存在於陰性選擇細胞上之細胞表面標記物之單株抗體之混合劑。舉例而言，為藉由負向選擇富集CD4+細胞，單株抗體混合劑通常包括針對CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR及CD8之抗體。在某些態樣中，可合意地富集或陽性選擇通常表現CD4+、CD25+、CD62Lhi、GITR+及FoxP3+之調控T細胞。或者，在某些態樣中，T調控細胞係藉由抗CD25偶聯之珠粒或其他類似選擇方法來消耗。

在一個實施例中，可選擇表現以下各項中之一或多者之T細胞群體：IFN- γ 、TNF- α 、IL-17A、IL-2、IL-3、IL-4、GM-CSF、IL-10、IL-13、顆粒酶B及穿孔蛋白或其他適當分子，例如，其他細胞介素。可藉由例如PCT公開案第WO 2013/126712號中所述之方法來確定用於細胞表現之篩選方法。

為藉由陽性或陰性選擇來分離期望細胞群，可改變細胞及表面(例如粒子，例如珠粒)之濃度。在某些態樣中，可期望顯著減小珠粒及細胞混合在一起之體積(例如增加細胞之濃度)，以確保細胞與珠粒之最大接觸。舉例而言，在一個態樣中，使用20億個細胞/ml之濃度。在一個態樣中，使用10億個細胞/ml之濃度。在另一態樣中，使用大於100百萬個細胞/mL。在另一態樣中，使用10百萬、15百萬、20百萬、25百萬、30百萬、35百萬、40百萬、45百萬或50百萬個細胞/mL之細胞濃度。在再一態樣中，使用75百萬、80百萬、85百萬、90百萬、95百萬或100百萬個細胞/mL之細胞濃度。在其他態樣中，可使用125百萬或150百萬個細胞/ml之濃度。利用高濃度可增加細胞產率、細胞活化及細胞擴增。此外，使用高細胞濃度可更有效地捕獲可弱表現所關注靶抗原之細胞，例如CD28陰性T細胞，或來自存在許多腫瘤細胞之試樣(例如白血病血液、腫瘤組織等)。該等細胞群可具有治療價值且將期望獲得。舉例而言，利用高濃度之細胞可更有效地選擇通常具有較弱CD28表現之CD8+ T細胞。

在相關態樣中，可合意地使用較低濃度之細胞。藉由大量稀釋T細胞及表面(例如粒子，例如珠粒)之混合物，最小化粒子與細胞之間之相互作用。此選擇表現大量與粒子結合之期望抗原之細胞。舉例而言，稀釋濃度之CD4+ T細胞較CD8+ T細胞表現更高量之CD28且可更有效地被捕獲。在一個態樣中，所用細胞濃度為 5×10^6 /mL。在其他態樣中，所用濃度可為約 1×10^5 /mL至 1×10^6 /mL及期間之任一整數值。在其他態樣中，可在2°C-10°C下或在室溫下在旋轉器上以不同速度將細胞培育不同時間長度。

亦可在洗滌步驟後冷凍用於刺激之T細胞。不希望受限於理論，冷凍及後續解凍步驟藉由在細胞群中去除顆粒球且在一定程度上去除單核球來

提供更均勻之產物。在去除血漿及血小板之洗滌步驟後，可將細胞懸浮於冷凍溶液中。儘管許多冷凍溶液及參數為業內已知且可用於此背景下，但一種方法涉及利用含有20% DMSO及8%人類血清白蛋白之PBS，或含有10%聚葡萄糖40及5%右旋糖、20%人類血清白蛋白及7.5% DMSO或31.25% Plasmalyte-A、31.25%右旋糖5%、0.45% NaCl、10%聚葡萄糖40及5%右旋糖、20%人類血清白蛋白及7.5% DMSO之培養基或其他含有(例如)羥乙基澱粉及PlasmaLyte A之適宜細胞冷凍培養基，然後以1°C/分鐘之速率將細胞冷凍至-80°C且儲存在液氮儲存罐之氣相中。可使用其他受控冷凍方法以及在-20°C下或液氮中之立即不受控冷凍。在某些態樣中，如本文所述將冷凍保存之細胞解凍且洗滌並在室溫下靜置1小時，然後利用本發明方法進行活化。

本發明亦涵蓋在可能需要如本文所述之擴增細胞之前之一定時間段下自個體收集血液試樣或血球分離產物。因此，可在任一所需時間點下收集欲擴增細胞之來源及期望細胞(例如T細胞)，分離且冷凍，以供後期於T細胞療法中用於任一數量之將受益於T細胞療法之疾病或病況(例如本文所述之彼等)。在一個態樣中，血液試樣或血球分離物係取自一般健康個體。在某些態樣中，血液試樣或血球分離物係取自具有罹患疾病之風險、但尚未罹患疾病之一般健康個體，且分離並冷凍所關注細胞以供後期使用。在某些態樣中，T細胞可在隨後時間擴增、冷凍及使用。在某些態樣中，試樣係在診斷出如本文所述之特定疾病之後不久但在任何治療之前自患者收集。在另一態樣中，細胞係自在任一數量之相關治療模式之前自個體之血液試樣或血球分離物分離，該等治療模式包括(但不限於)使用以下各項之治療：藥劑，例如那他珠單抗(natalizumab)、依法利珠單抗

(efalizumab)、抗病毒劑；化學療法；輻射；免疫抑制劑，例如環孢素(cyclosporin)、硫唑嘌呤(azathioprine)、甲胺蝶呤(methotrexate)、黴酚酸酯(mycophenolate)及FK506；抗體或其他免疫消融劑，例如阿侖珠單抗(alemtuzumab)、抗-CD3抗體、癌得星(cytosan)、氟達拉濱(fludarabine)、環孢素、FK506、雷帕黴素(rapamycin)、黴酚酸(mycophenolic acid)、類固醇、FR901228及輻照。

在本發明之另一態樣中，T細胞係在使個體保留功能性T細胞之治療後直接自患者獲得。就此而言，已觀察到，在某些癌症治療後，特別是在使用損害免疫系統之藥物治療後，在治療後不久在患者通常因治療而恢復之時段期間，所獲得T細胞之品質可能最佳或其離體擴增能力得到改良。同樣，利用本文所述之方法進行離體操縱後，該等細胞可處於增強植入及活體內擴增之較佳狀態。因此，本發明涵蓋在此恢復期期間收集血液細胞，包括T細胞、樹突狀細胞或造血系之其他細胞。此外，在某些態樣中，可使用動員(例如利用GM-CSF之動員)及調理方案在個體中產生其中尤其在療法後的所定義時間窗期間有利於特定細胞類型之再群體化、再循環、再生及/或擴增的條件。闡釋性細胞類型包括T細胞、B細胞、樹突狀細胞及免疫系統之其他細胞。

T細胞之活化及擴增

T細胞通常可使用如以下各項中所闡述之方法來活化及擴增：例如，美國專利第6,352,694號；第6,534,055號；第6,905,680號；第6,692,964號；第5,858,358號；第6,887,466號；第6,905,681號；第7,144,575號；第7,067,318號；第7,172,869號；第7,232,566號；第7,175,843號；第5,883,223號；第6,905,874號；第6,797,514號；第6,867,041號及第

7,572,631號。

通常，本發明之T細胞可藉由與附接有刺激CD3/TCR複合物相關信號之藥劑及刺激T細胞表面上之共刺激分子之配體的表面接觸來擴增。具體而言，T細胞群可如本文所闡述來刺激，例如藉由與固定在表面上之抗-CD3抗體或其抗原結合片段或抗-CD28抗體接觸，或藉由與蛋白激酶C活化劑(例如苔蘚蟲素)以及鈣離子載體接觸來刺激。對於T細胞表面上之輔助分子之共刺激，使用結合輔助分子之配體。舉例而言，可在適於刺激T細胞增殖之條件下使T細胞群與抗-CD3抗體及抗-CD28抗體接觸。為刺激CD4⁺ T細胞或CD8⁺ T細胞之增殖，抗CD3抗體及抗CD28抗體可在業內普遍已知之其他方法中使用(Berg等人，Transplant Proc. 30(8):3975-3977, 1998；Haanen等人，J. Exp. Med. 190(9):1319-1328, 1999；Garland等人，J. Immunol. Meth. 227(1-2):53-63, 1999)。抗CD28抗體之實例包括9.3、B-T3及XR-CD28 (Diacclone, Besancon, France)。

已暴露於多個刺激時間之T細胞可展現不同特徵。舉例而言，典型血液或血球分離之末梢血單核細胞產品具有大於細胞毒性或阻抑劑T細胞群(TC、CD8⁺)之輔助T細胞群(TH、CD4⁺)。T細胞藉助刺激CD3及CD28受體之離體擴增產生在約第8-9天之前主要由TH細胞組成而在約第8-9天之後T細胞群包含愈來愈大的TC細胞群的T細胞群。因此，端視治療之目的，向個體輸注主要包含TH細胞之T細胞群可能有利。類似地，若已分離TC細胞之抗原特異性亞組，則在較大程度上擴增此亞組可能有益。

此外，除CD4及CD8標記物外，其他表型標記物發生顯著變化，但在很大程度上在細胞擴增過程期間可再生。因此，該可再生性使得能針對特定目的來調適經活化T細胞產物。

在構築抗間皮素TFP之後，可立即使用多種分析來評估分子之活性，例如(但不限於)在抗原刺激後擴增T細胞之能力，在不存在再刺激下持續T細胞擴增之能力，及在適當活體外及動物模型中之抗癌活性。下文進一步詳細闡述用於評估抗間皮素TFP之效應之分析。

可使用原代T細胞中TFP表現之西方墨點分析來檢測單體及二聚體之存在(例如，參見Milone等人，Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009))。極簡言之，使表現TFP之T細胞(CD4⁺及CD8⁺ T細胞之1:1混合物)在活體外擴增10天以上，隨後溶解並在還原條件下實施SDS-PAGE。藉由西方墨點法使用針對TCR鏈之抗體檢測TFP。在非還原條件下使用相同T細胞亞組進行SDS-PAGE分析以允許評估共價二聚體形成。

可藉由流式細胞術量測抗原刺激後TFP⁺ T細胞之活體外擴增。舉例而言，用 α CD3/ α CD28及APC刺激CD4⁺及CD8⁺ T細胞之混合物，隨後在欲分析之啟動子控制下用表現GFP之慢病毒載體轉導。實例性啟動子包括CMV IE基因、EF-1 α 、泛素C或磷酸甘油激酶(PGK)啟動子。在CD4⁺及/或CD8⁺ T細胞亞組中培養之第6天藉由流式細胞術評估GFP螢光(例如參見Milone等人，Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009))。另一選擇為，在第0天用 α CD3/ α CD28包覆之磁珠刺激CD4⁺及CD8⁺ T細胞之混合物，並在第1天利用表現TFP以及eGFP之雙順反子慢病毒載體利用2A核糖體跳躍序列用TFP轉導。在洗滌後，用間皮素+ K562細胞(K562-間皮素)、野生型K562細胞(K562野生型)或在抗CD3及抗CD28抗體存在下表表現hCD32及4-1BBL之K562細胞(K562-BBL-3/28)再刺激培養物。每隔一天將外源IL-2以100 IU/ml添加至培養物中。藉由流式細胞術使用基於珠粒之計數來對GFP⁺ T細胞進行計數(例如，參見Milone等人，Molecular

Therapy 17(8): 1453-1464 (2009))。

亦可量測在不存在再刺激下之持續TFP+ T細胞擴增(例如，參見Milone等人，Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009))。簡言之，在第0天用 α CD3/ α CD28 包覆之磁珠刺激並在第1天用所指示之TFP轉導後，在培養第8天時利用Coulter Multisizer III粒子計數器量測平均T細胞體積(fl)。

亦可使用動物模型來量測TFP-T活性，舉例而言，使用人類間皮素特異性TFP+ T細胞來治療免疫缺陷型小鼠之癌症之異種移植物模型(例如，參見Milone等人，Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009))。極簡言之，在建立癌症後，將小鼠隨機化至治療組。將不同數量之經改造T細胞以1:1比率共注射至患有癌症之NOD/SCID/ γ -/-小鼠中。在T細胞注射後之多個時間評估小鼠脾DNA中每一載體之拷貝之數量。以每週間隔評價動物之癌症。在用 α 間皮素- ζ TFP+ T細胞或模擬物轉導之T細胞注射之小鼠中量測末梢血間皮素+癌細胞計數。利用對數秩測試比較各組之存活率曲線。另外，亦可分析NOD/SCID/ γ -/-小鼠中在T細胞注射後4週時之絕對末梢血CD4+及CD8+ T細胞計數。向小鼠注射癌細胞，且3週後注射經改造以藉由編碼連接至eGFP之TFP之雙順反子慢病毒載體表現TFP之T細胞。藉由與模擬物轉導之細胞混合將T細胞正規化至45%-50%輸入GFP+ T細胞，之後注射，並藉由流式細胞術確認。以1週間隔評價動物之癌症。利用對數秩測試比較TFP+ T細胞組之存活率曲線。

可評估劑量依賴性TFP治療反應(例如，參見Milone等人，Molecular Therapy 17(8): 1453-1464 (2009))。舉例而言，在第21天時注射TFP T細胞、等數量之模擬物轉導之T細胞或不注射T細胞之小鼠中建立癌症後35-

70天獲得末梢血。對每一組之小鼠隨機采血以確定末梢血間皮素+癌細胞計數，且然後在第35天及第49天時殺死。在第57天及第70天時評估剩餘動物。

細胞增殖及細胞介素產生之評價先前已闡述於(例如) Milone等人，*Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009)中。簡言之，在微量滴定板中藉由以2:1之最終T細胞:表現間皮素之細胞之比率混合經洗滌T細胞與表現間皮素或CD32及CD137之細胞(KT32-BBL)來實施TFP介導之增殖之評價。在使用前用 γ 輻射輻照表現間皮素之細胞。將抗-CD3 (純系OKT3)及抗-CD28 (純系9.3)單株抗體添加至含有KT32-BBL細胞之培養物中以用作刺激T細胞增殖之陽性對照，此乃因該等信號支持長期CD8+ T細胞離體擴增。在培養物中利用CountBright™螢光珠粒(Invitrogen)及流式細胞術如製造商所述對T細胞進行計數。藉由GFP表現利用經改造具有表現eGFP-2A連接之TFP之慢病毒載體的T細胞鑑別TFP+T細胞。對於不表現GFP之TFP+ T細胞，用生物素化重組間皮素蛋白及二級抗生物素蛋白-PE偶聯物檢測TFP+ T細胞。亦同時用特異性單株抗體(BD Biosciences)檢測T細胞上之CD4+及CD8+表現。根據製造商之說明書利用人類TH1/TH2細胞介素細胞計數珠粒陣列套組(BD Biosciences)，對在再刺激後24小時收集之上清液實施細胞介素量測。利用FACScalibur流式細胞儀評價螢光，且根據製造商之說明書分析數據。

可藉由標準⁵¹Cr-釋放分析評價細胞毒性(例如，參見Milone等人，*Molecular Therapy* 17(8): 1453-1464 (2009))。簡言之，在頻繁攪動下經2小時在37°C下用⁵¹Cr (如NaCrO₄, New England Nuclear)加載靶細胞，在完全RPMI培養基中洗滌兩次並塗佈至微量滴定板中。以效應細胞:靶細胞

(E:T)之不同比率將效應T細胞與孔中完全RPMI中之靶細胞混合。亦製備僅含有培養基(自發釋放, SR)或triton-X 100洗滌劑之1%溶液(總釋放, TR)的其他孔。在37°C下培育4小時後, 收穫每一孔之上清液。然後利用 γ 粒子計數器(Packard Instrument Co., Waltham, Mass.)量測所釋放之 ^{51}Cr 。以至少一式三份實施每一條件, 且利用以下公式計算溶解百分比:

$$\text{溶解}\% = (\text{ER} - \text{SR}) / (\text{TR} - \text{SR})$$
 其中ER代表針對每一實驗條件釋放之平均 ^{51}Cr 。

可使用成像技術來評估TFP在帶有腫瘤之動物模型中之特定輸送及增殖。該等分析已闡述於(例如) Barrett等人, Human Gene Therapy 22:1575-1586 (2011)中。簡言之, 向NOD/SCID/ $\gamma\text{c}^{-/-}$ (NSG)小鼠IV注射癌細胞, 7天後在用TFP構築體電穿孔後4小時注射T細胞。用慢病毒構築體穩定轉染T細胞以表現螢火蟲螢光素酶, 且使小鼠針對生物發光成像。另一選擇為, 可如下量測癌症異種移植模型中單次注射TFP+ T細胞之治療效能及特異性: 向NSG小鼠注射經轉導以穩定表現螢火蟲螢光素酶之癌細胞, 隨後在7天後單次尾靜脈注射經間皮素TFP電穿孔之T細胞。使動物在注射後之不同時間點成像。舉例而言, 可生成在第5天(治療前2天)及第8天(TFP+PBL後24小時)時代表性小鼠中之螢火蟲螢光素酶陽性癌症之光子密度熱圖。

亦可使用其他分析(包括本文實例部分中所述之彼等以及業內已知之彼等)來評估本發明之抗間皮素TFP構築體。

治療應用

間皮素相關之疾病及/或病症

在一個態樣中, 本發明提供治療與間皮素表現相關之疾病之方法。

在一個態樣中，本發明提供治療其中腫瘤之一部分對間皮素呈陰性且腫瘤之一部分對間皮素呈陽性之疾病的方法。舉例而言，本發明TFP可用於治療已針對與升高之間皮素表現相關之疾病經歷治療之個體，其中已針對升高之間皮素含量經歷治療之個體展現與升高之間皮素含量相關之疾病。

在一個態樣中，本發明係關於用於在哺乳動物T細胞中表現之包含可操作地連接至啟動子之抗間皮素TFP的載體。在一個態樣中，本發明提供用於治療表現間皮素之腫瘤之表現間皮素TFP之重組體T細胞，其中表現間皮素TFP之重組體T細胞稱為間皮素TFP-T。在一個態樣中，本發明之間皮素TFP-T能使腫瘤細胞與表現於其表面上之至少一種本發明間皮素TFP接觸使得TFP-T靶向腫瘤細胞並抑制腫瘤生長。

在一個態樣中，本發明係關於抑制表現間皮素之腫瘤細胞之生長的方法，其包含使腫瘤細胞與本發明之間皮素TFP T細胞接觸，使得TFP-T因應抗原而活化且靶向癌細胞，其中抑制腫瘤之生長。

在一個態樣中，本發明係關於治療個體之癌症之方法。該方法包含向個體投與本發明之間皮素TFP T細胞使得該個體之癌症得到治療。可藉由本發明之間皮素TFP T細胞治療之癌症之實例係與間皮素之表現相關之癌症。在一個態樣中，癌症係間皮瘤。在一個態樣中，癌症係胰臟癌。在一個態樣中，癌症係卵巢癌。在一個態樣中，癌症係胃癌。在一個態樣中，癌症係肺癌。在一個態樣中，癌症係子宮內膜癌。在一些實施例中，間皮素TFP療法可與一或多種其他療法組合使用。

本發明包括一種類型之細胞療法，其中T細胞經遺傳修飾以表現TFP並將TFP表現T細胞輸注至有需要之接受體。所輸注細胞能夠殺死接受體中之腫瘤細胞。與抗體療法不同，TFP表現T細胞能夠在活體內複製，從

而產生可引起持續腫瘤控制之長期持久性。在多個態樣中，在將T細胞投與患者之後，投與患者之T細胞或其後代在患者中持續至少1個月、2個月、3個月、4個月、5個月、6個月、7個月、8個月、9個月、10個月、11個月、12個月、13個月、14個月、15個月、16個月、17個月、18個月、19個月、20個月、21個月、22個月、23個月、2年、3年、4年或5年。

本發明亦包括一種類型之細胞療法，其中T細胞經例如活體外轉錄之RNA修飾以瞬時表現TFP並將TFP表現T細胞輸注至有需要之接受體。所輸注細胞能夠殺死接受體中之腫瘤細胞。因此，在多個態樣中，在將T細胞投與患者後，投與患者之T細胞存在短於1個月，例如3週、2週或1週。

不希望受限於任何具體理論，由TFP表現T細胞誘發之抗腫瘤免疫反應可為主動或被動免疫反應，或另一選擇為可歸因於直接對間接免疫反應。在一個態樣中，TFP轉導之T細胞展現特異性促發炎細胞介素分泌及因應表現間皮素抗原之人類癌細胞之強效細胞溶解活性，抵抗可溶性間皮素抑制，介導旁觀者殺死及/或介導現有人類腫瘤之消退。舉例而言，在間皮素表現腫瘤之異質區域內之無抗原腫瘤細胞可能易受先前針對毗鄰抗原陽性癌細胞反應之間皮素重定向T細胞之間接破壞。

在一個態樣中，本發明之人類TFP修飾之T細胞可為用於哺乳動物之離體免疫及/或活體內療法之疫苗類型。在一個態樣中，哺乳動物係人類。

關於離體免疫，在將細胞投與哺乳動物中之前在活體外進行以下各項中之至少一者：i)擴增細胞，ii)將編碼TFP之核酸引入細胞，或iii)冷凍保存細胞。

離體程序為業內所熟知且更全面論述於下文中。簡言之，自哺乳動

物(例如人類)分離細胞，且用表現本文所揭示TFP之載體進行遺傳修飾(亦即活體外轉導或轉染)。可向哺乳動物接受體投與TFP修飾之細胞以提供治療益處。哺乳動物接受體可為人類，且TFP修飾之細胞可對於接受體而言可為自體。另一選擇為，細胞對於接受體而言可為同種異體、同基因或異種基因。

造血幹細胞及祖細胞之離體擴增程序闡述於美國專利第5,199,942號中，該專利以引用方式併入本文中，該程序可應用於本發明之細胞。業內已知其他適宜方法，因此本發明並不限於任何具體的細胞離體擴增方法。簡言之，T細胞之離體培養及擴增可包含：(1)自哺乳動物之末梢血收穫物或骨髓外植體收集CD34+造血幹細胞及祖細胞；及(2)離體擴增該等細胞。除美國專利第5,199,942號中所述之細胞生長因子外，可使用其他因子(例如flt3-L、IL-1、IL-3及c-kit配體)來培養及擴增細胞。

除根據離體免疫利用基於細胞之疫苗外，本發明亦提供用於活體內免疫以在患者中誘發針對抗原之免疫反應之組合物及方法。

通常，如本文所闡述活化及擴增之細胞可用於治療及預防在免疫受損個體中產生之疾病。具體而言，本發明之TFP修飾之T細胞用於治療與間皮素之表現相關之疾病、病症及病況。在某些態樣中，本發明細胞用於治療具有發生與間皮素之表現相關之疾病、病症及病況之風險之患者。因此，本發明提供用於治療或預防與間皮素之表現相關之疾病、病症及病況之方法，其包含向有需要之個體投與治療有效量之本發明之TFP修飾之T細胞。

在一個態樣中，本發明之TFP-T細胞可用於治療增殖性疾病，例如癌症或惡性病或癌前病況。在一個態樣中，癌症係間皮瘤。在一個態樣中，

癌症係胰臟癌。在一個態樣中，癌症係卵巢癌。在一個態樣中，癌症係胃癌。在一個態樣中，癌症係肺癌。在一個態樣中，癌症係子宮內膜癌。另外，與間皮素表現相關之疾病包括(但不限於)例如表現間皮素之非典型及/或非古典癌症、惡性病、癌前病況或增殖性疾病。與間皮素之表現相關之非癌症相關適應症包括(但不限於)例如自體免疫疾病(例如，狼瘡)、發炎性病(過敏及氣喘)及移植。

本發明之TFP修飾之T細胞可單獨投與，或作為醫藥組合物與稀釋劑及/或其他組分(例如IL-2或其他細胞介素或細胞群)組合投與。

本發明亦提供抑制間皮素表現細胞群之增殖或減少該細胞群之方法，該方法包含使包含間皮素表現細胞之細胞群與結合至間皮素表現細胞之本發明抗間皮素TFP-T細胞接觸。在特定態樣中，本發明提供抑制表現間皮素之癌細胞群之增殖或減少該癌細胞群之方法，該方法包含使間皮素表現癌細胞群與結合至間皮素表現細胞之本發明抗間皮素TFP-T細胞接觸。在一個態樣中，本發明提供抑制表現間皮素之癌細胞群之增殖或減少該癌細胞群之方法，該方法包含使間皮素表現癌細胞群與結合至間皮素表現細胞之本發明抗間皮素TFP-T細胞接觸。在某些態樣中，相對於陰性對照，本發明之抗間皮素TFP-T細胞使患有與間皮素表現細胞相關之癌症的個體或動物模型中之細胞及/或癌細胞之數量、數目、量或百分比減少至少25%、至少30%、至少40%、至少50%、至少65%、至少75%、至少85%、至少95%或至少99%。在一個態樣中，個體係人類。

本發明亦提供預防、治療及/或管控與間皮素表現細胞相關之疾病(例如，表現間皮素之癌症)之方法，該等方法包含向有需要之個體投與結合至間皮素表現細胞之本發明抗間皮素TFP-T細胞。在一個態樣中，個體係

人類。與間皮素表現細胞相關之病症之非限制性實例包括自體免疫病症(例如狼瘡)、發炎性病症(例如過敏及氣喘)及癌症(例如胰臟癌、卵巢癌、胃癌、肺癌或子宮內膜癌或表現間皮素之非典型癌症)。

本發明亦提供預防、治療及/或管控與間皮素表現細胞相關之疾病之方法，該等方法包含向有需要之個體投與結合至間皮素表現細胞之本發明抗間皮素TFP-T細胞。在一個態樣中，個體係人類。

本發明提供預防與間皮素表現細胞相關之癌症之復發之方法，該方法包含向有需要之個體投與結合至間皮素表現細胞之本發明之抗間皮素TFP-T細胞。在一個態樣中，該等方法包含與有效量之另一療法組合向有需要之個體投與有效量之結合至間皮素-bmca表現細胞之本文所述抗間皮素TFP-T細胞。

組合療法

本文所闡述之TFP表現細胞可與其他已知藥劑及療法組合使用。如本文所用之「組合」投與意指，在個體患病期間將兩種(或更多種)不同治療遞送至個體，例如在個體已經診斷患有病症之後且在病症治癒或消除之前或已出於其他原因停止治療之前遞送兩種或更多種治療。在一些實施例中，一種治療之遞送仍在開始第二種治療遞送時進行，以使得存在投與重疊。此在本文中有時稱作「同時」或「同步遞送」。在其他實施例中，一種治療在開始遞送另一種治療之前結束遞送。在任一情形之一些實施例中，治療因組合投與而更有效。例如，第二治療更有效，例如使用較少第二治療即可觀察到等效效應，或第二治療在較大程度上減輕症狀，該程度大於在不存在第一治療下投與第二治療時觀察到之程度或使用第一治療觀察到之類似情況。在一些實施例中，遞送使得症狀或與病症相關之其他參

數的減輕程度大於利用在不存在另一種治療的情況下遞送一種治療所觀察到者。兩種治療之效應可為部分地加性、完全地加性或小於加性。遞送可使得當遞送第二治療時仍可檢測到所遞送之第一治療之效應。

在一些實施例中，「至少一種其他治療劑」包括TFP表現細胞。本文亦提供表現多種TFP之T細胞，該等TFP結合至相同或不同的靶抗原或同一靶抗原上之相同或不同表位。本文亦提供其中第一T細胞亞組表現第一TFP且另一T細胞亞組表現另一TFP之T細胞群。

本文所述之TFP表現細胞及至少一種其他治療劑可同時、在相同或分開組合物中或依序投與。對於依序投與而言，可首先投與本文所述之TFP表現細胞，且可其次投與另一藥劑，或可顛倒投與順序。

在其他態樣中，本文所闡述之TFP表現細胞可與以下各項組合用於治療方案中：手術；化學療法；輻射；免疫抑制劑，例如環孢素、硫唑嘌呤、胺甲喋呤、麥考酚酯及FK506；抗體或其他免疫消融劑，例如阿倫單抗(alemtuzumab)、抗CD3抗體或其他抗體療法、癌得星、氟達拉濱、環孢素、FK506、雷帕黴素、黴酚酸、類固醇、FR901228、細胞介素及輻照。本文所闡述之TFP表現細胞亦可與肽疫苗組合使用，該肽疫苗係例如闡述於Izumoto等人2008 J Neurosurg 108:963-971中之肽疫苗。在另一態樣中，本文所闡述之TFP表現細胞亦可與以下各項組合使用：骨髓細胞分化之促進劑(例如，全反式視黃酸)、骨髓源性抑制細胞(MDSC)擴增之抑制劑(例如，c-kit受體之抑制劑或VEGF抑制劑)、MDSC功能之抑制劑(例如，COX2抑制劑或磷酸二酯酶-5抑制劑)或MDSC之治療消除(例如，利用諸如用多柔比星(doxorubicin)及環磷醯胺(cyclophosphamide)治療之化學治療方案)。可防止MDSC擴增之其他治療劑包括胺基-雙膦酸鹽、雙膦

酸鹽、西地那非(sildenafil)及他達拉非(tadalafil)、硝基阿斯匹林(nitroaspirin)、維生素D3及吉西他濱(gemcitabine)。(例如,參見Gabrilovich及Nagaraj, *Nat. Rev. Immunol.*, (2009) v9(3): 162-174)。

在一個實施例中,可向個體投與減輕或改善與投與TFP表現細胞相關之副作用之藥劑。與投與TFP表現細胞相關之副作用包括(但不限於)細胞介素釋放症候群(CRS)及嗜血性淋巴組織細胞增生症(HLH)(亦稱為巨噬細胞活化症候群(MAS))。CRS之症狀包括高熱、噁心、瞬時低血壓、低氧及諸如此類。因此,本文所闡述之方法可包含向個體投與本文所述之TFP表現細胞及進一步投與管控升高量之可溶性因子的藥劑,從而使用TFP表現細胞進行治療。在一個實施例中,在個體中升高之可溶性因子係IFN- γ 、TNF α 、IL-2、IL-6及IL8中之一或多者。因此,經投與以治療此副作用之藥劑可為中和該等可溶性因子中之一或多者之藥劑。該等藥劑包括(但不限於)類固醇、TNF α 之抑制劑及IL-6之抑制劑。TNF α 抑制劑之實例係依那西普(entanercept)。IL-6抑制劑之實例係托珠單抗(tocilizumab, toc)。

在一個實施例中,可向個體投與增強TFP表現細胞之活性之藥劑。舉例而言,在一個實施例中,藥劑可為抑制抑制性分子之藥劑。在一些實施例中,抑制性分子(例如,程式化死亡配體1(PD1))可降低TFP表現細胞引起免疫效應物反應之能力。抑制性分子之實例包括PD1、PD-L1、CTLA4、TIM3、LAG3、VISTA、BTLA、TIGIT、LAIR1、CD160、2B4及TGFR β 。抑制性分子之抑制(例如藉由在DNA、RNA或蛋白質層面抑制)可最佳化TFP表現細胞性能。在實施例中,可使用抑制性核酸(例如,抑制性核酸,例如,dsRNA,例如,siRNA或shRNA)來抑制TFP表

現細胞中之抑制性分子之表現。在實施例中，抑制劑係shRNA。在實施例中，抑制性分子係在TFP表現細胞內被抑制。在該等實施例中，抑制抑制性分子之表現之dsRNA分子係連接至編碼TFP之組分(例如，所有組分)之核酸。在一個實施例中，抑制性信號之抑制劑可為(例如)結合至抑制性分子之抗體或抗體片段。舉例而言，藥劑可為結合至PD1、PD-L1、PD-L2或CTLA4之抗體或抗體片段(例如，伊匹單抗(ipilimumab，亦稱作MDX-010及MDX-101，且以Yervoy™出售；Bristol-Myers Squibb；曲美木單抗(tremelimumab (自Pfizer購得之IgG2單株抗體，之前稱為替西木單抗(ticilimumab)、CP-675,206))。在實施例中，藥劑係結合至TIM3之抗體或抗體片段。在實施例中，藥劑係結合至LAG3之抗體或抗體片段。

在一些實施例中，經由慢病毒(例如，特異性靶向CD4+或CD8+ T細胞之慢病毒)在活體內改變(例如，藉由基因轉移)之T細胞。(例如，參見Zhou等人，J. Immunol. (2015) 195:2493-2501)。

在一些實施例中，增強TFP表現細胞之活性之藥劑可為例如包含第一域及第二域之融合蛋白，其中第一域係抑制性分子或其片段，且第二域係與正信號相關之多肽，例如包含如本文所述之細胞內信號傳導域之多肽。在一些實施例中，與正信號相關之多肽可包括CD28、CD27、ICOS之共刺激域，例如CD28、CD27及/或ICOS之細胞內信號傳導域，及/或例如本文所述之例如CD3ζ之初級信號傳導域。在一個實施例中，融合蛋白係由表現TFP之相同細胞表現。在另一實施例中，融合蛋白係由不表現抗間皮素TFP之細胞(例如，T細胞)表現。

在一些實施例中，包含為由核酸編碼之抗間皮素結合域之抗原結合域之人類或人類化抗體域、或包含抗間皮素結合域之抗體、或表現由核酸

編碼之抗間皮素結合域之細胞具有如下親和力值：至多約200 nM、100 nM、75 nM、50 nM、25 nM、20 nM、15 nM、14 nM、13 nM、12 nM、11 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM、0.09 nM、0.08 nM、0.07 nM、0.06 nM、0.05 nM、0.04 nM、0.03 nM、0.02 nM或0.01 nM；及/或至少約100 nM、75 nM、50 nM、25 nM、20 nM、15 nM、14 nM、13 nM、12 nM、11 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM、0.09 nM、0.08 nM、0.07 nM、0.06 nM、0.05 nM、0.04 nM、0.03 nM、0.02 nM或0.01 nM；及/或約200 nM、100 nM、75 nM、50 nM、25 nM、20 nM、15 nM、14 nM、13 nM、12 nM、11 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM、0.09 nM、0.08 nM、0.07 nM、0.06 nM、0.05 nM、0.04 nM、0.03 nM、0.02 nM或0.01 nM。

醫藥組合物

本發明之醫藥組合物可包含TFP表現細胞(例如複數個如本文所述之TFP表現細胞)與一或多種醫藥上或生理上可接受之載劑、稀釋劑或賦形劑之組合。該等組合物可包含緩衝液，例如中性緩衝鹽水、磷酸鹽緩衝鹽水及諸如此類；碳水化合物，例如葡萄糖、甘露糖、蔗糖或聚葡萄糖、甘露醇；蛋白質；多肽或胺基酸，例如甘胺酸；抗氧化劑；螯合劑，例如EDTA或麩胱甘肽；佐劑(例如，氫氧化鋁)；及防腐劑。在一個態樣中，

本發明組合物經調配以供靜脈內投與。

本發明之醫藥組合物可以適用於欲治療(或預防)疾病之方式投與。投與之量及頻率將由諸如患者之病況以及患者疾病之類型及嚴重程度等要素來確定，但適宜劑量可藉由臨床試驗來確定。

在一個實施例中，醫藥組合物實質上不含、例如無可檢測量之例如選自由以下組成之群之污染物：內毒素、黴漿菌(*mycoplasma*)、複製勝任慢病毒(RCL)、p24、VSV-G核酸、HIV gag、殘餘抗-CD3/抗-CD28包覆之珠粒、小鼠抗體、所彙集之人類血清、牛血清白蛋白、牛血清、培養基組分、載體封裝細胞或質體組分、細菌及真菌。在一個實施例中，細菌係選自由以下組成之群中之至少一者：糞產鹼菌(*Alcaligenes faecalis*)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、大腸桿菌(*Escherichia coli*)、流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenza*)、腦膜炎奈瑟球菌(*Neisseria meningitides*)、綠膿桿菌(*Pseudomonas aeruginosa*)、金黃色葡萄球菌(*Staphylococcus aureus*)、肺炎鏈球菌(*Streptococcus pneumonia*)及A群釀膿鏈球菌(*Streptococcus pyogenes* group A)。

當指示「免疫有效量」、「抗腫瘤有效量」、「腫瘤抑制有效量」或「治療量」時，欲投與之本發明組合物之精確量可由醫師根據患者(個體)之年齡、體重、腫瘤大小、感染或轉移程度及病況之個體差異來確定。通常可陳述，包含本文所述T細胞之醫藥組合物可以 10^4 至 10^9 個細胞/kg體重、在一些情況下 10^5 至 10^6 個細胞/kg體重(包括彼等範圍內之所有整數值)之劑量來投與。T細胞組合物亦可以該等劑量投與多次。該等細胞可藉由利用免疫療法中通常已知之輸注技術來投與(例如，參見Rosenberg等人，*New Eng. J. of Med.* 319:1676, 1988)。

在某些態樣中，可期望向個體投與經活化T細胞，且然後隨後再抽取血液(或實施血球分離)，根據本發明活化來自其之T細胞，且向患者再輸注該等經活化及擴增之T細胞。此過程可每隔數週實施多次。在某些態樣中，可自10 cc至400 cc之所抽血液活化T細胞。在某些態樣中，可自20 cc、30 cc、40 cc、50 cc、60 cc、70 cc、80 cc、90 cc或100 cc之所抽血液活化T細胞。

個別組合物之投與可以任何便利方式實施，包括氣溶膠吸入、注射、攝取、輸液、植入或移植。本文所述之組合物可以下列方式投與患者：經動脈、皮下、皮內、腫瘤內、鼻內、髓內、肌內、靜脈內(i.v.)注射或腹膜內。在一個態樣中，本發明之T細胞組合物係藉由皮內或皮下注射投與患者。在一個態樣中，本發明之T細胞組合物係藉由i.v.注射投與。T細胞之組合物可直接注射至腫瘤、淋巴結或感染位點中。

在特定實例性態樣中，個體可經歷白血球分離，其中以離體方式收集、富集或清除白血球以選擇及/或分離所關注細胞(例如T細胞)。該等T細胞分離物可藉由業內已知之方法來擴增及處理，使得可引入本發明之一或多種TFP構築物，由此產生本發明之TFP表現T細胞。隨後可使有需要之個體經歷使用高劑量化學療法隨後進行末梢血幹細胞移植之標準治療。在某些態樣中，移植後或同時，個體接受本發明之經擴增TFP T細胞之輸注。在另一態樣中，擴增細胞係在手術之前或之後投與。

欲投與患者之上述治療之劑量將隨所治療病況之精確性質及治療之接受體而變化。用於人類投與之劑量之放大可根據業內接受之實踐來實施。例如，對於成年患者而言，阿侖珠單抗之劑量通常將在1 mg至約100 mg之範圍內，通常每天投與且持續1天與30天之間之時段。較佳每日劑量

為1 mg/天至10 mg/天，但在一些情況下可使用高達40 mg/天之較大劑量(闡述於美國專利第6,120,766號中)。

在一個實施例中，例如利用活體外轉錄將TFP引入T細胞中，且個體(例如人類)接受本發明TFP T細胞之初始投與及本發明TFP T細胞之一或多次後續投與，其中一或多次後續投與係在先前投與後短於15天(例如14天、13天、12天、11天、10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天、3天或2天)時投與。在一個實施例中，向個體(例如，人類)每週投與本發明TFP T細胞之一次以上的投與，例如每週投與本發明TFP T細胞之2次、3次或4次投與。在一個實施例中，個體(例如，人類個體)每週接受TFP T細胞之一次以上的投與(例如，每週2次、3次或4次投與)(在本文中亦稱作週期)，最後一週不進行TFP T細胞投與，且然後向個體投與TFP T細胞之一或多次額外投與(例如，每週TFP T細胞之一次以上的投與)。在另一實施例中，個體(例如人類個體)接受一個以上的TFP T細胞週期，且每一週期之間之時間小於10天、9天、8天、7天、6天、5天、4天或3天。在一個實施例中，TFP T細胞係以每隔一天每週3次投與來投與。在一個實施例中，將本發明之TFP T細胞投與持續至少兩週、三週、四週、五週、六週、七週、八週或更多個週。

在一個態樣中，間皮素TFP T細胞係利用慢病毒病毒載體(例如慢病毒)來生成。以此方式生成之TFP-T細胞將具有穩定的TFP表現。

在一個態樣中，在轉導之後TFP T細胞瞬時表現TFP載體達4天、5天、6天、7天、8天、9天、10天、11天、12天、13天、14天、15天。TFP之瞬時表現可藉由RNA TFP載體遞送來實現。在一個態樣中，TFP RNA係藉由電穿孔轉導至T細胞中。

在多次治療後可在利用瞬時表現TFP T細胞(具體而言使用帶有鼠類 scFv之TFP T細胞)治療之患者中出現之潛在問題係過敏性反應。

不受限於此理論，據信此一過敏性反應可能係由發生體液抗TFP反應(即具有抗IgE同型之抗TFP抗體)之患者引起。人們認為當在暴露於抗原時存在10天至14天中斷時，患者之產生抗體之細胞經歷自IgG同型(不會引起過敏性反應)至IgE同型之類別切換。

若患者在瞬時TFP療法過程期間具有生成抗TFP抗體反應之高風險(例如藉由RNA轉導生成之彼等)，則TFP T細胞輸注中斷不應持續超過10天至14天。

實例

藉由參考以下實驗實例進一步詳細闡述本發明。除非另有說明，否則該等實例係僅出於闡釋目的而提供，且並非意欲具有限制性。因此，本發明決不應理解為限制以下實例，而應理解為涵蓋因本文所提供之教示而變得明瞭之任何及所有變化形式。未加進一步闡述，人們認為，熟習此項技術者可使用前文闡述及以下闡釋性實例來製備及利用本發明化合物並實踐所主張之方法。以下工作實例明確指出本發明之各個態樣，且不應理解為以任何方式限制本發明之其餘部分。

實例1：TFP構築體

藉由將藉由編碼短連接體(SL)：AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:2) 或 長 連 接 體 (LL)：AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:3)之DNA序列連接至CD3或TCR DNA片段之抗間皮素scFv DNA片段在XbaI及EcoR1位點選殖至p510載體((System Biosciences (SBI))中來改造抗間皮素TFP

構築體。

所生成之抗間皮素TFP構築體為p510_抗間皮素_LL_TCR α (抗間皮素 scFv – 長連接體-人類全長T細胞受體 α 鏈)、p510_抗間皮素_LL_TCR α C (抗間皮素 scFv – 長連接體-人類T細胞受體 α 恆定域鏈)、p510_抗間皮素_LL_TCR β (抗間皮素 scFv – 長連接體-人類全長T細胞受體 β 鏈)、p510_抗間皮素_LL_TCR β C (抗間皮素 scFv – 長連接體-人類T細胞受體 β 恆定域鏈)、p510_抗間皮素_LL_CD3 γ (抗間皮素 scFv – 長連接體-人類CD3 γ 鏈)、p510_抗間皮素_LL_CD3 δ (抗間皮素 scFv – 長連接體-人類CD3 δ 鏈)、p510_抗間皮素_LL_CD3 ϵ (抗間皮素 scFv – 長連接體-人類CD3 ϵ 鏈)、p510_抗間皮素_SL_TCR β (抗間皮素 scFv – 短連接體-人類全長T細胞受體 β 鏈)、p510_抗間皮素_SL_CD3 γ (抗間皮素 scFv – 短連接體-人類CD3 γ 鏈)、p510_抗間皮素_SL_CD3 δ (抗間皮素 scFv – 短連接體-人類CD3 δ 鏈)、p510_抗間皮素_SL_CD3 ϵ (抗間皮素 scFv – 短連接體-人類CD3 ϵ 鏈)。

藉由將編碼抗間皮素、部分CD28細胞外域、CD28跨膜域、CD28細胞內域及CD3 ζ 之合成DNA在XbaI及EcoR1位點選殖至p510載體中生成抗間皮素CAR構築體(p510_抗間皮素_28 ζ)。

實例2：抗體序列

抗體序列之生成

人類間皮素多肽規範序列為UniProt登錄號Q13421 (或Q13421-1)。本文提供能特異性結合至人類間皮素多肽之抗體多肽及其片段或域。抗間皮素抗體可使用各種各樣的技術來生成(例如，參見(Nicholson等人，1997)。倘若使用鼠類抗間皮素抗體作為起始材料，則對於臨床環境而言

期望人類化鼠類抗間皮素抗體，其中小鼠特異性殘基在接受T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)治療(亦即，利用經TFP.間皮素構築體轉導之T細胞治療)之個體中可誘導人類-抗小鼠抗原(HAMA)反應。人類化係藉由將鼠類抗間皮素抗體之CDR區移植至適當人類種系受體框架上(視情況包括對CDR及/或框架區之其他修飾)來實現。如本文所提供，抗體及抗體片段殘基編號遵循Kabat (Kabat E. A.等人，1991；Chothia等人，1987)。

***scFv*之生成**

使用人類或人類化抗間皮素IgG來生成TFP構築體之scFv序列。獲得編碼人類或人類化V_L及V_H域之DNA序列，且視情況最佳化構築體之密碼子以在來自智人(*Homo sapiens*)之細胞中表現。其中V_L及V_H域在scFv中出現之順序可變(即，V_L-V_H或V_H-V_L定向)，且「G4S」或「G4S」亞單元(G4S)₃之三個拷貝連接可變域以產生scFv域。抗間皮素scFv質體構築體可具有可選Flag、His或其他親和標籤，且經電穿孔至HEK293或其他適宜人類或哺乳動物細胞系中且經純化。驗證分析包括藉由FACS之結合分析、使用Proteon之動力學分析及間皮素表現細胞之染色。

實例性抗間皮素V_L及V_H域、CDR及編碼其之核苷酸序列可為闡述於以下各項中之彼等：美國專利第9,272,002號；第8,206,710號；第9,023,351號；第7,081,518號；第8,911,732號；第9,115,197號及第9,416,190號；及美國專利公開案第20090047211號。其他實例性抗間皮素V_L及V_H域、CDR及分別編碼其之核苷酸序列可為下列單株抗體之彼等：大鼠抗間皮素抗體420411、大鼠抗間皮素抗體420404、小鼠抗間皮素抗體MN-1、小鼠抗間皮素抗體MB-G10、小鼠抗間皮素抗體ABIN233753、兔抗間皮素抗體FQS3796(3)、兔抗間皮素抗體TQ85、小

鼠抗間皮素抗體TA307799、大鼠抗間皮素抗體295D、大鼠抗間皮素抗體B35、小鼠抗間皮素抗體5G157、小鼠抗間皮素抗體129588、兔抗間皮素抗體11C187、小鼠抗間皮素抗體5B2、兔抗間皮素抗體SP74、兔抗間皮素抗體D4X7M、小鼠抗間皮素抗體C-2、小鼠抗間皮素抗體C-3、小鼠抗間皮素抗體G-1、小鼠抗間皮素抗體G-4、小鼠抗間皮素抗體K1、小鼠抗間皮素抗體B-3、小鼠抗間皮素抗體200-301-A87、小鼠抗間皮素抗體200-301-A88、兔抗間皮素抗體EPR2685(2)、兔抗間皮素抗體EPR4509或兔抗間皮素抗體PPI-2e(IHC)。

在一些實施例中，使用單一域(V_{HH})結合物，例如SEQ ID NOS 58、59及55中所述之彼等(分別SD1、SD4及SD6)。

TCR亞單元之來源

人類T細胞受體(TCR)複合物之亞單元皆含有細胞外域、跨膜域及細胞內域。人類TCR複合物含有CD3-ε多肽、CD3-γ多肽、CD3-δ多肽、CD3-ζ多肽、TCRα鏈多肽及TCRβ鏈多肽。人類CD3-ε多肽規範序列係Uniprot登錄號P07766。人類CD3-γ多肽規範序列係Uniprot登錄號P09693。人類CD3-δ多肽規範序列係Uniprot登錄號P043234。人類CD3-ζ多肽規範序列係Uniprot登錄號P20963。人類TCRα鏈規範序列係Uniprot登錄號Q6ISU1。人類TCRβ鏈C區規範序列係Uniprot登錄號P01850，人類TCRβ鏈V區序列係P04435。

人 類 CD3-ε 多 肽 規 範 序 列 為 :
MQSGTHWRVLGLCLLSVGWVGQDGNEEMGGITQTPYKVSISGTTVI
LTCPPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNIGSDEDHLSLKEFSELEQSG
YYVCYPRGSKPEDANFYLYLRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICIT

GGLLLL VYYWSKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNP
DYEPiRKGQRDLYSGLNQRRi (SEQ ID NO:4)。

人 類 CD3- γ 多 肽 規 範 序 列 為 ：

MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQEDGSVLLTCD
AEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNLGSNAKDPRGM YQCKGSQN
KSKPLQVYYRMCQNCIELNAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQD
GVRQSRASDKQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN (SEQ
ID NO:5)。

人 類 CD3- δ 多 肽 規 範 序 列 為 ：

MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELED RVFVNCNTSITWVEGTVG
TLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIYKDKESTVQVHYRMCQSC
VELDPATVAGIIVTDVIATLLLALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLR
NDQVYQPLRDRDDAQYSHLGGNWARNKS (SEQ ID NO:6)。

人 類 CD3- ζ 多 肽 規 範 序 列 為 ：

MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGILFIYGVILTAL
FLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDPE
MGGKPQRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDG
LYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR (SEQ ID NO:7)。

人 類 TCR α 鏈 規 範 序 列 為 ：

MAGTWLLLLLALGCPALPTGVGGTPFPSLAPPIMLLVDGKQQMVVV
CLVLDVAPPGLDSPIWFSAGNGSALDAFTYGPSPATDGTWTNLAHLS
LPSEELASWEPLVCHTGPGAEGHSRSTQPMHLSGEASTARTCPQEPLR
GTPGGALWLGVLRLLLFKLLLFDLLLTCSCLCDPAGPLPSPATTTRLR

ALGSHRLHPATETGGREATSSPRPQPRDRRWGDTTPPGRKPGSPVWGE
GSYLSSYPTCPAQAWCSRSALRAPSSSLGAFFAGDLPPPLQAGAA
(SEQ ID NO:8)。

人 類 TCR α 鏈 C 區 規 範 序 列 為 ：
PNIQNPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDK
TVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFFPSPESSC
DVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
(SEQ ID NO:9)。

人 類 TCR α 鏈 V 區 CTL-L17 規 範 序 列 為 ：
MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPSLSVQEGRISI
LNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLISSIKDKNEDGRFTVFLNK
SAKHLSLHIVPSQPGDSAVYFCAAKGAGTASKLTFGTGTRLQVTL
(SEQ ID NO:10)。

人 類 TCR β 鏈 C 區 規 範 序 列 為 ：
EDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSWWVN
GKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQNPRNHFR
CQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQG
VLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMMAMVKRKDF (SEQ ID
NO:11)。

人 類 TCR β 鏈 V 區 CTL-L17 規 範 序 列 為 ：
MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQNPRHNITKRGQNVTFRCDPIS
EHNRLYWYRQTLGQGPEFLTYFQNEAQLEKSRLLSDRFSAERP KGSF
STLEIQRTEQGDSAMYLCASSLAGLNQPQHFGDGTRLSIL (SEQ ID

NO:12)。

人類 TCR β 鏈 V 區 YT35 規範序列為：
MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQEVTLRCKPISG
HNSLFWYRQTMMRGLELLIYFNNNVPIDDSGMPEDRFS AKMPNASF
STLKIQPSEPRDSAVYFCASSFSTCSANYGYTFGSGTRLTVV (SEQ ID
NO:13)。

自TCR域及scFv生成TFP

使用連接體序列(例如G₄S、(G₄S)₂、(G₄S)₃或(G₄S)₄)將間皮素scFv重組連接至CD3- ϵ 或其他TCR亞單元(參見1C)。利用多種連接體及scFv構形。使用TCR α 及TCR β 鏈來生成呈全長多肽或僅其恆定域形式之TFP。TCR α 及TCR β 鏈之任一可變序列容許製備TFP。

TFP表現載體

提供包括以下之表現載體：啟動子(巨細胞病毒(CMV)增強子-啟動子)、使得能夠分泌之信號序列、多聚腺苷酸化信號及轉錄終止子(牛生長激素(BGH)基因)、容許游離型複製及在原核生物中複製之元件(例如SV40起點及ColE1或業內已知之其他)及容許選擇之元件(胺苄青黴素(ampicillin)抗性基因及吉歐黴素(zeocin)標記物)。

較佳地，將TFP編碼核酸構築體選殖至慢病毒表現載體中，並基於TFP.間皮素轉導之T細胞(「間皮素.TFP」或「間皮素.TFP T細胞」或「TFP.間皮素」或「TFP.間皮素T細胞」)因應間皮素+靶細胞之效應物T細胞反應之數量及品質來驗證表現。效應T細胞反應包括(但不限於)細胞擴增、增殖、倍增、細胞介素產生及靶細胞溶解或細胞溶解活性(即，去粒)。

使用TFP.間皮素慢病毒轉移載體產生包裝至VSV-G假型慢病毒粒子中之基因體材料。將慢病毒轉移載體DNA與VSV-G之三種包裝組分gag/pol及rev以及Lipofectamine®試劑混合以將其一起轉染至HEK-293(胚腎，ATCC® CRL-1573™)細胞中。24小時及48小時後，收集培養基，過濾並藉由超速離心濃縮。將所得病毒製劑儲存在-80℃下。藉由在Sup-T1 (T細胞淋巴母細胞性淋巴瘤，ATCC® CRL-1942™)細胞上滴定來測定轉導單元之數量。重定向之TFP.間皮素T細胞係藉由以下方式產生：用(例如)抗CD3抗CD28珠粒將新鮮幼稚T細胞活化24 hr，且然後添加適當數量之轉導單元以獲得轉導T細胞之期望百分比。容許該等經修飾之T細胞擴增直至其變得靜止且大小減小，此時將其冷凍保存以供稍後分析。利用Coulter Multisizer™ III量測細胞數及大小。在冷凍保存之前，藉由流式細胞術分析確定所轉導細胞(在細胞表面上表現TFP.間皮素)之百分比及該表現之相對螢光強度。根據直方圖，可藉由比較轉導百分比與其相對螢光強度來檢查TFP之相對表現量。

在一些實施例中，藉由T細胞轉導利用多種病毒載體引入多種TFP。

評估人類化TFP重定向之T細胞之細胞溶解活性、增殖能力及細胞介素分泌

使用業內已知之分析來測定TFP.間皮素T細胞產生細胞表面表現之TFP及殺死標靶腫瘤細胞、增殖及分泌細胞介素之功能能力。

用人類介白素-2 (IL-2)處理人類末梢血單核細胞(PBMC，例如，來自幼稚T細胞係藉由針對T細胞、CD4+及CD8+淋巴球進行負向選擇獲得之正常血球分離之供體的血液)，然後例如在37℃、5% CO₂下在10% RPMI中用抗CD3x抗CD28珠粒活化，之後用TFP編碼慢病毒載體轉導。

例如藉由抗FLAG抗體或抗鼠類可變域抗體使用流式細胞術分析來證實細胞表面TFP之存在。使用ELISA或其他分析量測細胞介素(例如，IFN- γ)產生。

實例3：在人類ALL小鼠模型中之人類TFP T細胞效能

可使原代人類ALL細胞在免疫受損小鼠(例如，NSG或NOD)中生長而無需對其進行活體外培養。同樣，所培養人類ALL細胞系可在該等小鼠中誘導白血病。可使用具有ALL之小鼠來測試人類TFP.間皮素T細胞在(例如)模型HALLX5447中之效能。此模型中之讀出值係在靜脈內(i.v.)輸注ALL細胞之後在不存在及存在i.v.投與之人類TFP.間皮素T細胞下之小鼠之存活率。

實例4：多樣性TFP多肽之展示及多樣性人類化TFP重定向之T細胞之使用

本文所提供之TFP多肽能與內源性TCR亞單元多肽在功能上締合以形成功能TCR複合物。此處，使用慢病毒載體中之多種TFP來轉導T細胞以便產生功能性的多樣性重組體TCR複合物。舉例而言，提供含義以下之T細胞：i)第一TFP，其具有細胞外域、跨膜域及來自CD3- δ 多肽之細胞內域及間皮素特異性scFv抗體片段，及ii)第二TFP，其具有細胞外域、跨膜域及來自CD3- γ 多肽之細胞內域及間皮素特異性抗體片段。第一TFP及第二TFP能彼此且與內源性TCR亞單元多肽相互作用，藉此形成功能TCR複合物。

該等多樣性人類化TFP.間皮素T細胞之使用可在液體及實體腫瘤中展示，如上文實例2及3中所提供。

實例5：經TFP轉導之T細胞之製備

慢病毒產生

如下製備編碼適當構築體之慢病毒屬。將 5×10^6 個HEK-293FT細胞接種至100 mm培養皿中並使其達到70-90%鋪滿過夜。在0.5 mL無血清之DMEM或Opti-MEM® I培養基中稀釋2.5 µg所示DNA質體及20 µL Lentivirus Packaging Mix (ALSTEM, 目錄號VP100)並輕輕混合。在另一管中, 在0.5 mL無血清之DMEM或Opti-MEM® I培養基中稀釋30 µL NanoFect® 轉染試劑(ALSTEM, 目錄號NF100)並輕輕混合。然後將NanoFect/DMEM及DNA/DMEM溶液混合在一起並渦旋10-15秒, 之後DMEM-質體-NanoFect混合物在室溫培育15分鐘。將來自先前步驟之完全轉染複合物逐滴添加至細胞板中並搖晃以將轉染複合物均勻分散於板中。然後將板在37°C在增濕5% CO₂培育器中培育過夜。第二天, 用10 mL新鮮培養基替代上清液並補充20 µL ViralBoost (500×, ALSTEM, 目錄號VB100)。然後將板在37°C再培育24小時。然後將含有慢病毒之上清液收集至50 mL無菌加蓋的錐形離心管中並置於冰上。在4°C以3000 rpm離心15分鐘之後, 用0.45 µm低蛋白質結合性無菌過濾器過濾澄清上清液且隨後藉由在4°C以25,000 rpm (Beckmann, L8-70M)超速離心1.5小時來分離病毒。去除沉澱物並再懸浮於DMEM培養基中並藉由定量RT-PCR使用Lenti-X qRT-PCR Titration套組(Clontech; 目錄號631235)確立慢病毒濃度/效價。用DNaseI處理去除任何殘餘質體DNA。病毒儲備製備物立即用於感染或經等分並儲存在-80°C供以後使用。

PBMC分離

自全血或膚色血球層(buffy coat)製備末梢血單核細胞(PBMCs)。在10 mL肝素真空採血管中收集全血且立即處理或在4°C儲存過夜。將約10

mL 抗凝全血與無菌磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)緩衝液在50 mL錐形離心管(PBS, pH 7.4, 無 Ca^{2+} / Mg^{2+})中混合達到20 mL之總體積。然後將20 mL此血液/PBS混合物輕輕覆蓋至15 mL之Ficoll-Paque® PLUS (GE Healthcare, 17-1440-03)之表面上, 之後在室溫不施加制動下以400g離心30-40 min。

膚色血球層係購自Research Blood Components (Boston, MA)。藉由添加15 mL Ficoll-Paque® (GE Health Care)製備LeucoSep®管(Greiner bio-one)並以1000g離心1分鐘。膚色血球層在PBS (pH 7.4, 無 Ca^{2+} 或 Mg^{2+})中1:3稀釋。將經稀釋膚色血球層轉移至Leucosep管且在不施加制動下以1000g離心15分鐘。小心去除在經稀釋血漿/聚蔗糖(ficoll)界面觀察到之含PBMCs細胞層以最小化聚蔗糖之污染。然後用40 mL PBS將PBMCs洗三次且藉由在室溫以200g離心10分鐘去除殘餘聚蔗糖、血小板及血漿蛋白質。然後用血球計計數細胞。用CAR-T培養基(AIM V-AlbuMAX® (BSA) (Life Technologies), 具有5% AB血清及1.25 $\mu\text{g/mL}$ 兩性黴素B (amphotericin B) (Gemini Bioproducts, Woodland, CA)、100 U/mL青黴素 (penicillin) 及100 $\mu\text{g/mL}$ 鏈黴素 (streptomycin))將經洗滌PBMC洗一次。或者, 將經洗滌PBMC轉移至絕緣小瓶並在 -80°C 冷凍24小時, 之後在液氮中儲存供以後使用。

T細胞活化

用抗人類CD28及CD3抗體偶聯之磁性珠粒將自全血或膚色血球層製備之PBMC刺激24小時, 之後進行病毒轉導。在具有5% AB血清及1.25 $\mu\text{g/mL}$ 兩性黴素B (Gemini Bioproducts)、100 U/mL青黴素及100 $\mu\text{g/mL}$ 鏈黴素且沒有huIL-2之CAR-T培養基(AIM V-AlbuMAX (BSA) (Life

Technologies)中將剛剛分離之PBMC洗滌一次，之後以 1×10^6 個細胞/mL之最終濃度再懸浮於具有300 IU/mL人類IL-2（來自1000×儲備液；Invitrogen)之CAR-T培養基中。若PBMC先前已經冷凍，則使其解凍並在存在10% FBS、100 U/mL青黴素及100 μ g/mL鏈黴素下以 1×10^7 個細胞/mL再懸浮於9 mL預加溫(37°C)之cDMEM培養基(Life Technologies)中，之後在CAR-T培養基中洗滌一次，以 1×10^6 個細胞/mL再懸浮於CAR-T培養基中，並添加IL-2，如上文所闡述。

在活化之前，使用磁性架用1 mL無菌1×PBS (pH 7.4)將抗人類CD28及CD3抗體偶聯之磁性珠粒(購自(例如) Invitrogen, Life Technologies)洗滌三次以使自溶液分離珠粒，之後再懸浮於具有300 IU/mL人類IL-2之CAR-T培養基中，至 4×10^7 個珠粒/mL之最終濃度。然後藉由將25 μ L (1×10^6 個珠粒)珠粒轉移至1 mL PBMC以1:1珠粒對細胞比率混合PBMC及珠粒。然後將期望數量之等份試樣分配至12孔低附接或未處理細胞培養板之單一孔，且在37°C及5% CO₂下培育24小時，之後進行病毒轉導。

T細胞轉導/轉染及擴增

在活化PBMC之後，將細胞在37°C、5% CO₂下培育48小時。使慢病毒在冰上解凍並將每毫升培養基 5×10^6 個慢病毒以及2 μ L TransPlus™ (Alstem)(1:500之最終稀釋度)添加至 1×10^6 個細胞之每一孔中。將細胞再培育24小時，之後重複添加病毒。或者，使慢病毒在冰上解凍並在存在5 μ g/mL聚凝胺(Sigma)下以5 MOI或50 MOI添加各別病毒。在室溫下將細胞以100g旋轉孵育100分鐘。然後使細胞在繼續存在300 IU/mL人類IL-2下生長6-14天之時段(總培育時間取決於所需CAR-T細胞之最終數目)。每2-3天分析細胞濃度，其中在該時間添加培養基以將細胞懸浮液維持為

1×10^6 個細胞/mL。

在一些情形中，用活體外轉錄之(IVT) mRNA對經活化PBMC進行電穿孔。在一個實施例中，在存在300 IU/ml重組體人類IL-2 (R&D Systems) (可使用來自Milyeni Pharmaceuticals之其他刺激試劑(例如TransAct T Cell Reagent))下用Dynabeads® (ThermoFisher)以1:1比率將人類PBMC刺激3天。在電穿孔之前去除珠粒。洗滌細胞並以 2.5×10^7 個細胞/mL之濃度再懸浮於OPTI-MEM培養基(ThermoFisher)中。將200 μ L細胞懸浮液(5×10^6 個細胞)轉移至2 mm gap Electroporation Cuvettes Plus™ (Harvard Apparatus BTX)並在冰上預冷凍。將10 μ g IVT TFP mRNA添加至細胞懸浮液中。然後使用ECM830 Electro Square Wave Porator (Harvard Apparatus BTX)以200 V對mRNA/細胞混合物進行電穿孔達20毫秒。在電穿孔之後立即將細胞轉移至新鮮細胞培養培養基(AIM V AlbuMAX (BSA)(無血清培養基)+ 5%人類AB血清+ 300 IU/ml IL-2)並在37°C下培育。

藉由細胞染色驗證TFP表現

在慢病毒轉導或mRNA電穿孔之後，藉由流式細胞術使用抗小鼠Fab抗體證實抗間皮素TFP之表現以檢測鼠類抗間皮素scFv。將T細胞在3 mL染色緩衝液(PBS, 4% BSA)中洗滌三次並以 1×10^6 個細胞/孔再懸浮於PBS中。對於死細胞排除而言，在冰上將細胞與LIVE/DEAD® Fixable Aqua Dead Cell Stain (Invitrogen)一起培育30分鐘。用PBS將細胞洗滌兩次並再懸浮於50 μ L染色緩衝液中。為阻斷Fc受體，將1 μ L 1:100稀釋之正常山羊IgG (BD Bioscience)添加至每一管中並在冰中培育10分鐘。將1.0 mL FACS緩衝液添加至每一管中，充分混合，並藉由以300g離心5 min使

細胞沈澱。藉由Zenon® R-藻紅素標記之人類MSLN IgG1 Fc或人類IgG1同型對照檢測scFv TFP之表面表現。將1 µg抗體添加至各別試樣中並在冰上培育30分鐘。然後將細胞洗滌兩次，且使用抗CD3 APC (純系，UCHT1)、抗CD4-Pacific blue (純系RPA-T4)、抗-CD8 APCCy7(純系SK1) (來自BD bioscience) 針對表面標記物進行染色。使用LSRFortessa™ X20 (BD Biosciences)實施流式細胞術且使用FACS diva軟體獲取數據且利用FlowJo® (Treestar, Inc. Ashland, OR)進行分析。

實例性結果顯示於圖5A中，該圖顯示針對CD8 (抗CD8 APCCy7，y軸)及間皮素(「MSLN」) (Zenon® R-藻紅素標記之hMSLN IgG，x軸)染色之經活化PBMC細胞之表面表現分析。自左至右顯示未經轉導或經抗MSLN-CD3 ϵ 、抗MSLN-CD28 ζ 及抗MSLN-41BB ζ 構築體轉導之細胞。CD8+、MSLN+細胞之比例顯示於每一圖之右上角中。

圖5B顯示經包含內部單一域(「SD」)間皮素結合物之TFP構築體轉導且針對MSLN及GFP染色之經活化PBMC細胞之類似結果。頂列顯示(自左至右)未經轉導之細胞及經陽性對照抗MSLN-CD3 ϵ TFP轉導之細胞(「SS1」)。第2-4列分別顯示在經加GFP標籤之(自左至右) CD3 ϵ TFP、CD3 γ TFP、TCR β TFP及CD28 ζ CAR構築體轉導之細胞中之抗MSLN結合物SD1、SD4及SD6。GFP+、MSLN+細胞之比例顯示於每一圖之右上角中。

實例6：藉由流式細胞術進行之細胞毒性分析

用螢光染料羧基螢光素二乙酸琥珀醯亞胺基酯(CFSE)標記對於間皮素為陽性或陰性之靶細胞。將該等靶細胞與未經轉導、經對照CAR-T構築體轉導或經TFP轉導之效應物T細胞混合。在所指示培育時段之後，藉

由流式細胞術測定每一效應物/靶細胞培養物中相對於活的CFSE標記之靶細胞及陰性對照靶細胞，死細胞之百分比。相對於僅含靶細胞之孔計算每一T細胞陽性靶細胞培養物中靶細胞之存活百分比。

藉由在共培育效應物及靶細胞之後使用流式細胞術比較沒有或具有效應物T細胞之靶細胞中之存活靶細胞之數目來量測效應物T細胞之細胞毒性活性。在利用間皮素TFP或CAR-T細胞之實驗中，靶細胞為間皮素陽性細胞，而用作陰性對照之細胞為間皮素陰性細胞。

將靶細胞洗滌一次，並以 1×10^6 個細胞/mL再懸浮於PBS中。添加 $0.03 \mu\text{M}$ 濃度之螢光染料羧基螢光素二乙酸琥珀醯亞胺基酯(CFSE)(ThermoFisher)至細胞懸浮液中，並將細胞在室溫下培育20分鐘。添加至5倍反應體積之細胞懸浮液完全細胞培養培養基(RPMI-1640 + 10% HI-FBS)中來終止標記反應，並將細胞在室溫下再培育2分鐘。細胞經過離心沈澱，並以 2×10^5 個細胞/mL再懸浮於細胞毒性培養基(無酚紅RPMI1640(Invitrogen)加5% AB血清(Gemini Bioproducts))中。取 $50 \mu\text{L}$ CFSE標記之靶細胞懸浮液(等同10,000個細胞)添加至96孔U型底板(Corning)之每一孔中。

由經抗間皮素TFP構築體轉導之效應物T細胞連同未經轉導之T細胞(作為陰性對照)一起洗滌，並以 2×10^6 個細胞/mL或 1×10^6 個細胞/mL懸浮於細胞毒性培養基中。將 $50 \mu\text{L}$ 效應物T細胞懸浮液(等同100,000個或50,000個細胞)添加至已塗佈之靶細胞中，分別達到10:1或5:1之效應物對標靶比率，總體積為 $100 \mu\text{L}$ 。然後混合培養物、旋轉沉降(spun down)並在 37°C 及5% CO_2 下培育4小時。在此培育之後，依製造商之建議，立即將7AAD (7-胺基放線菌素D (7-aminoactinomycin D)) (BioLegend)添加至

所培養細胞中，且利用BD LSRFortessa™ X-20 (BD Biosciences)進行流式細胞計測定。使用FlowJo®軟體(TreeStar, Inc.)進行流式細胞計測定數據之分析。

由具有效應物T細胞及靶細胞之試樣中活的靶細胞(CFSE+7-AAD-)數目除以僅具有靶細胞之試樣中活的(CFSE+7-AAD-)細胞數目，計算靶細胞之存活百分比。效應細胞之細胞毒性係計算為靶細胞之殺死百分比=100% -細胞之存活百分比。

當與未經轉導或經非間皮素特異性CAR對照物轉導之T細胞相比時，經抗MSLN 28ζ CAR構築體轉導之T細胞可證實針對間皮素表現細胞之細胞毒性。然而，經抗間皮素-CD3ε轉導之T細胞所誘導針對標靶之細胞毒性比抗間皮素CAR對照物更有效。抗間皮素-CD3γ TFP所介導的穩健細胞毒性亦大於抗間皮素-CAR在介於5:1與10:1間之效應物:標靶比率下所觀察到者。在抗間皮素-TCRα及抗間皮素-TCRβ TFP之情況下可觀察到一些細胞毒性。在以替代之鉸鏈區構築抗間皮素TFP之情況下，亦可獲得類似結果。再次，抗間皮素-CD3ε或抗間皮素-CD3γ TFP轉導之T細胞針對間皮素表現靶細胞之細胞毒性可能大於抗間皮素-CAR轉導之T細胞。

經過編碼特異性針對間皮素之TFP之mRNA進行電穿孔之T細胞亦證實針對間皮素表現細胞之穩健細胞毒性。儘管在對照物或抗間皮素TFP構築體之情況下未觀察到顯著殺死間皮素陰性細胞，但在經抗間皮素-CD3ε SL或抗間皮素-CD3γ SL TFP轉導之T細胞之情況下，可觀察到依間皮素特異性殺死間皮素表現細胞。

實例8：藉由即時細胞毒性分析測定細胞毒性

在即時細胞毒性分析(RTCA)格式中，抗間皮素TFP亦可展示優於抗

間皮素CAR之細胞毒性。RTCA分析即時量測專門96孔板之每一孔中之黏附靶細胞單層之電阻抗且以稱為細胞指數之值呈現最終讀數。細胞指數變化指示由共培育之T細胞效應物殺死靶細胞而引起之靶細胞單層破壞。因此，效應物T細胞之細胞毒性可評估為具有靶細胞及效應物T細胞二者之孔之細胞指數與具有單獨靶細胞之孔之細胞指數相比的變化。

在DMEM、10% FBS、1% 抗生素-抗黴菌(Antimycotic) (Life Technologies)中培養黏附靶細胞。為製備RTCA，將例如50 μ L DMEM培養基添加至E板(ACEA Biosciences, Inc，目錄號：JL-10-156010-1A)之適當孔中。然後將板置於RTCA MP儀器(ACEA Biosciences, Inc.)中並將適當板佈局及分析時間表輸入RTCA 2.0軟體中，如製造商之手冊中所闡述。每15分鐘實施基線量測，實施100次量測。然後將於100 μ L體積中之 1×10^4 個靶細胞添加至每一分析孔中並使細胞沉降15分鐘。將板返回至閱讀器並恢復讀數。

第二天，洗滌效應物T細胞並再懸浮於細胞毒性培養基(無酚紅RPMI1640 (Invitrogen)加5% AB血清(Gemini Bioproducts；100-318))中。然後自儀器去除板並將懸浮於細胞毒性培養基(無酚紅RPMI1640 + 5% AB血清)中之效應物T細胞以100,000個細胞或50,000個細胞添加至每一孔中以達到分別10:1或5:1之效應物對標靶比率。然後將板放回儀器中。每2分鐘實施量測且實施100次量測，且然後每15分鐘實施量測且實施1,000次量測。

在RTCA分析中，在經抗間皮素-28 ζ CAR轉導之T細胞轉導之T細胞之情況下可觀察到間皮素轉導之細胞之殺死，如與單獨細胞或與經對照CAR構築體轉導之T細胞共培育之細胞相比，在添加效應細胞之後細胞指

數之時間依賴性降低所展示。然而，藉由抗間皮素-CD3 ϵ TFP表現T細胞之靶細胞殺死可能較在抗間皮素CAR之情況下所觀察到者更深且更快。舉例而言，在添加經抗間皮素-CD3 ϵ TFP轉導之T細胞之4小時內，間皮素表現靶細胞之殺死可能基本上完全。在經包含其他CD3及TCR構築體之多種TFP構築體轉導之T細胞情況下可觀察到極少殺死或沒有殺死。在構築有替代鉸鏈區之抗間皮素TFP之情況下可獲得類似結果。抗間皮素-CD3 ϵ 或抗間皮素-CD3 γ TFP轉導之T細胞針對間皮素轉導之靶細胞之細胞毒性可能大於抗間皮素-CAR轉導之T細胞。

TFP轉導之T細胞之細胞毒性活性關於用於轉導之病毒之量(MOI)可能具有劑量依賴性。在增加抗間皮素-CD3 ϵ TFP慢病毒之MOI、進一步強化TFP轉導與細胞毒性活性間之關係之情況下，可觀察到增加之間皮素陽性細胞殺死。

RTCA分析之實例性結果顯示於圖6中。藉由將藉由編碼連接體：GGGGSGGGGSGGGGSLE (SEQ ID NO:1)之DNA序列連接至CD3 ϵ DNA片段之抗MSLN scFv DNA片段在XbaI及EcoRI位點選殖至p510載體(來自SBI)中來改造抗MSLN TFP構築體。生成之抗MSLN TFP構築體為p510_antiMSLN_SS1_CD3 ϵ (抗MSLN SS1 scFv - 連接體-人類CD3 ϵ 鏈)。

自pCMV6_XL4_間皮素(Origene)PCR擴增全長間皮素(NM_005823)並經由Gibson重組反應將其選殖至XbaI及EcoRI限制性消化之p527a (pCDH-EF1-MCS-T2A-Puro) (SBI)中。

RTCA之靶細胞為間皮素陽性HeLa細胞(宮頸腺癌，ATCC® CCL-2™)且間皮素陰性PC-3細胞(前列腺腺癌，ATCC® CRL-1435™)用作陰性

對照。在具有10% FBS及1%抗生素-抗黴菌(Life Technologies)之DMEM中培養黏附靶細胞。

測定指示細胞毒性之經正規化之細胞指數。經活化PBMC係未經處理的(1號跡線)、未經轉導的(2號跡線)或經空載體(3號跡線)轉導、經抗MSLN TFP (「抗MSLN-CD3 ϵ TRuC」, 4號跡線)轉導、經具有CD28 ζ (5號跡線)或41BB ζ (6號跡線)信號傳導域之抗MSLN CAR(分別為「抗MSLN-28 ζ CAR」及「抗MSLN-41BB ζ CAR」)轉導。

如圖6A中所顯示, 與陰性對照相比, 抗MSLN TFP轉導之T細胞可有效殺死標靶MSLN陽性HeLa細胞。相比之下, 構築體中之任一者均不能有效殺死MSLN陰性PC-3細胞(圖6B)。

使用具有單一域抗間皮素結合物之內部TFP構築體實施類似實驗。圖6C顯示使用來自兩種不同人類供體(頂部及底部)之T細胞之高靶密度細胞系(HeLa-(MSLN^高))中MSLN陽性細胞之殺死。顯示具有抗MSLN結合物SD1 (左)、SD4 (中間)及SD6 (右)之TFP T細胞之細胞殺死跡線。經活化PBMC係未經轉導(1號跡線)或經CD3 ϵ TFP轉導(2號跡線)、經CD3 γ TFP轉導(3號跡線)、經TCR β TFP轉導(4號跡線)或經CD28 ζ CAR轉導(5號跡線)。指示細胞毒性之經正規化之細胞指數係在即時細胞分析儀(RTCA)分析中測定。如該圖中所顯示, 所有T細胞(未經轉導的除外)皆能殺死癌細胞。

實例7：在具有高或低標靶密度之細胞中之基於螢光素酶之細胞毒性分析

基於螢光素酶之細胞毒性分析(「Luc-Cyto」分析)藉由在共培養之後直接量測殘餘活靶細胞中之螢光素酶酶促活性來評價TFP T及CAR T細胞之細胞毒性。Luc-Cyto分析中所使用之高標靶密度細胞為HeLa-MSLN^高

細胞且所使用之低標靶密度細胞為表現低含量間皮素之PC3細胞(PC3-MSLN^低)，每一者均穩定地轉導以表現螢火蟲螢光素酶。藉由GeneArt® (Thermo Fisher®)合成編碼螢火蟲螢光素酶之DNA並將其插入單一啟動子慢病毒載體pCDH527A-1 (System Bioscience)之多個選殖位點中。

攜帶螢火蟲螢光素酶之慢病毒係如上文所闡述來包裝。然後用攜帶慢病毒之螢火蟲螢光素酶構築體將HeLa-MSLN^高或PC3-MSLN^低細胞轉導24小時且然後用嘌呤黴素(puromycin) (5 µg/mL)來選擇。藉由利用Bright-Glo™ Luciferase Assay System (Promega)量測細胞中之螢光素酶酶促活性來證實HeLa-luc-MSLN^高-及PC3-luc-MSLN^低-螢光素酶細胞之生成。

用空表現載體(「NT」)或下列TFP或CAR轉導來自兩種不同人類供體之單獨群體：抗MSLN (陽性對照，「SS1」，親和力11nM)、抗MSLN-SD1 (親和力25nM)、抗MSLN-SD4 (親和力6nM)或抗MSLN SD6 (親和力0.59nM)，其每一者呈CD3ε TFP、CD3γ TFP、TCRβ TFP及CD28ζ CAR之格式。用HeLa- MSLN^高(圖7)或PC3-MSLN^低(圖8)培育經轉導T細胞之兩個群體。

將靶細胞以5000個細胞/孔塗佈於96孔板中。將TFP T、CAR T或對照細胞以1:1 (黑色槓)或1:5 (灰色槓)之效應物對標靶比率添加至靶細胞中。然後將細胞混合物在37°C及5 % CO₂下培養24小時，之後藉由Bright-Glo® Luciferase Assay System量測活靶細胞中之螢光素酶酶促活性。將細胞旋轉成沈澱物並再懸浮於含有螢光素酶受質之培養基中。藉由細胞溶解釋放螢光素酶，因此，較高的螢光素酶活性對應於較大的細胞死亡百分比。

使用表現高含量MSLN之細胞之結果顯示於圖7中。顯示試樣中被殺死細胞之%，其中無T細胞(「僅標靶」)、具有空載體轉導(「NT」)、抗MSLN(陽性對照,「SS1」)或具有內部抗間皮素結合物SD1 (圖7A)、SD4 (圖7B)及SD6 (圖7C)之抗間皮素TFP T細胞，該等抗間皮素TFP T細胞各自呈CD3 ϵ TFP、CD3 γ TFP、TCR β TFP及CD28 ζ CAR之格式。在每一圖形中，黑色槓代表T細胞對靶細胞之1:1比率，且灰色槓代表T細胞對靶細胞之1:5比率。如在該圖中可看出，所有TFP-T細胞、CAR-T細胞及陽性對照SS1皆可有效殺死MSLN。

圖8係一系列圖形，顯示抗MSLN CAR T細胞及TFP T細胞針對表現低含量間皮素之靶細胞系(PC3-MSLN^低)之活性。顯示試樣中被殺死細胞之%，其中無T細胞(「僅標靶」)、具有空載體轉導(「NT」)、抗MSLN(陽性對照,「SS1」)或抗間皮素構築體SD1、SD4及SD6，該等構築體呈TFP格式CD3 ϵ (圖8A)、CD3 γ (圖8B)、TCR β (圖8C)及CD28 ζ CAR (圖8D)。在每一圖形中，黑色槓代表T細胞對靶細胞之1:1比率，且灰色槓代表T細胞對靶細胞之1:5比率。對於另一T細胞供體觀察到類似結果。

如圖中所顯示，如所預計，T細胞對靶細胞之1:1比率引起最高程度之靶細胞殺死。另外，在表現高含量MSLN之細胞中所有TFP T及CAR T細胞皆顯示類似活性。

實例8：藉由FACS量測T細胞之活化

使用MSLN+及MSLN- K562細胞實施表現抗MSLN CAR及TFP構築體之T細胞之活化，且顯示於圖9中。如上所述，用50 MOI LV將經活化PBMC轉導連續兩天並加以擴增。轉導後第8天，在細胞毒性培養基(無酚

紅RPMI1640 (Invitrogen)加5% AB血清(Gemini Bioproducts ; 100-318))中利用靶細胞(過表現MSLN之K562細胞)以1:1之E:T比率(0.2×10^6 個每一細胞類型)建立PBMC之共培養物。使用過表現BCMA之K562細胞作為陰性對照。在開始共培養後24小時，收穫細胞，用PBS洗滌三次並在冰上用Live/Dead Aqua染色30 min。為阻斷Fc受體，添加人類Fc阻斷劑(BD)並在室溫下培育10分鐘。隨後用抗CD3 APC (純系，UCHT1)、抗CD8 APCcy7(純系SK1)、抗CD69-Alexa Fluor® 700 (純系FN50) (來自BD Biosciences)及抗CD25-PE (純系BC96, eBioscience)對細胞進行染色。將細胞洗滌兩次並藉由BD LSRII-Fortessa分析。如上文使用FlowJo®分析軟體(Tree star, Inc.)分析數據。

如圖9A中自左至右所顯示，T細胞係未經轉導、經空載體轉導、經抗MSLN-CD3 ϵ TFP、抗MSLN-28 ζ CAR或抗MSLN-41BB ζ CAR轉導。與MSLN-細胞一起共培養之細胞顯示於頂列中，且與MSLN+靶細胞一起共培養之彼等顯示於底列中。然後用特異性針對表面活化標記物CD69及CD25之抗體對細胞進行染色。經抗CD69染色之細胞之數量對應於x軸且經抗CD25染色之彼等對應於y軸。如所顯示，表現抗間皮素CAR及TFP構築體之T細胞係藉由與MSLN+細胞一起培養來活化，如藉由與MSLN-細胞之共培養相比升高之CD69及CD25表現量所展示(圖9B)。顯示MSLN-細胞(白色槓)及MSLN+細胞(黑色槓)中關於每一構築體之CD25+細胞之百分比。

在未經轉導之T細胞或經抗MSLN陽性對照結合物轉導之T細胞(「510-SS1-CD3 ϵ 」)中使用K562 MSLN-細胞(圖9C, 圓形)及K562-MSLN+細胞(圖9C, 正方形)進行類似實驗。數據代表CD25+、CD69+及

CD25+/CD69+細胞之總和。在圖9D中，顯示在與具有TFP格式CD3 ϵ 、CD3 γ 、TCR β 及CD28 ζ CAR之供體T細胞組合之K562 MSLN-靶細胞(左圖)及K562 MSLN+細胞(右圖)中內部抗MSLN結合物SD1 (正方形)、SD4 (圓形)及SD6 (三角形)之數據。使用來自另一T細胞供體之細胞觀察到類似結果。

藉由分析顆粒酶B產生類似地評價T細胞之活化。如上所述培養並擴增T細胞，且根據製造商之套組說明書(Gemini Bioproducts；100-318)進行顆粒酶B之細胞內染色。收穫細胞，用PBS洗滌三次並用人類Fc阻斷劑阻斷 10 min。在4℃下利用抗CD3 APC (純系，UCHT1)及抗CD8 APCcy7(純系SK1)針對表面抗原將細胞染色30 min。然後在4℃下用固定/滲透化溶液(BD Cytotfix/Cytoperm固定/滲透化套組目錄號554714)將細胞固定 20 min，隨後用BD Perm/Wash緩衝液洗滌。隨後用抗顆粒酶B Alexafluor700 (純系GB11)對細胞進行染色，用BD Perm/Wash緩衝液洗滌兩次並再懸浮於FACS緩衝液中。在BD LSRII-Fortessa上獲取數據並使用FlowJo® (Tree star Inc.)加以分析。

如圖10A中自左至右所顯示，T細胞係未經轉導、經空載體轉導、經抗MSLN-CD3 ϵ TFP、抗MSLN-28 ζ CAR或抗MSLN-41BB ζ CAR轉導。與MSLN-細胞一起共培養之細胞顯示於頂列中，且與MSLN+靶細胞一起共培養之彼等顯示於底列中。用抗GrB染色之細胞之數量對應於x軸且用抗CD8染色之彼等對應於y軸。如所顯示，表現抗間皮素CAR及TFP構築體之T細胞係藉由與MSLN+細胞而非MSLN-細胞一起培養來活化。該等結果再次顯示於圖10B中，其中顯示間皮素陰性(「MSLN-」，白色槓)及間皮素陽性(「MSLN+」，黑色槓)細胞中關於每一構築體之GrB+細胞之百

分比。該等數據展示MSLN表現細胞能特異性活化T細胞。

實例9：藉由ELISA之IL-2及IFN- γ 分泌

與具有同源抗原之細胞之識別相關之效應物T細胞活化及增殖之另一量度係效應物細胞介素(例如介白素-2 (IL-2)及干擾素- γ (IFN- γ))之產生。

如產品插頁中所闡述實施人類IL-2 (目錄號EH2IL2, Thermo Scientific)及IFN- γ 目錄號KHC4012, Invitrogen)之ELISA分析。在一個實例中，將50 μ L重構之標準品或試樣一式兩份添加至96孔板之每一孔中，隨後添加50 μ L生物素化抗體試劑。藉由將板輕輕拍打若干次來混合試樣。然後將50 μ L標準稀釋劑添加至不含標準品或試樣之所有孔中並用黏著板蓋小心密封板，之後在室溫(20-25°C)下培育3小時。然後去除板蓋，倒空板內容物，且用洗滌緩衝液填充每一孔。將此洗滌程序重複總共3次且將板印漬至紙巾或其他吸收性材料上。將100 μ L製備之鏈黴抗生物素蛋白(Streptavidin)-HRP溶液添加至每一孔中並附接新的板蓋，之後在室溫下培育30分鐘。再次去除板蓋，棄去板內容物，並將100 μ L TMB受質溶液添加至每一孔中。使反應物在室溫下在黑暗中顯影30分鐘，此後將100 μ L終止溶液添加至每一孔中。評估板。在終止反應30分鐘內在設定450 nm及550 nm之ELISA讀板儀上量測吸光度。自450 nm值扣除550 nm值並相對於自IL-2標準曲線獲得之值計算未知試樣中之IL-2量。

或者，使用 Human Cytokine Magnetic Buffer Reagent Kit(Invitrogen, LHB0001M) 與 Human IL-2 Magnetic Bead Kit (Invitrogen, LHC0021M)及Human IFN- γ Magnetic Bead Kit (Invitrogen, LHC4031M)實施2-Plex分析。簡言之，將25 μ L人類IL-2及IFN- γ 抗體珠粒添加至96孔板之每一孔中並使用下列指南洗滌：用200 μ L 1 $\times$ 洗滌溶液

洗滌兩次，使板與磁性96孔板式分離器(Invitrogen, A14179)接觸，使珠粒沉降1分鐘並傾析液體。然後，將50 μ L培育緩衝液添加至具有100 μ L重構標準品(一式兩份)或50 μ L試樣(來自細胞毒性分析之上清液)及50 μ L分析稀釋劑(一式三份，總體積為150 μ L)之板之每一孔中。在室溫下在黑暗中利用具有3 mm軌域半徑之定軌振盪器以600 rpm將試樣混合2小時。遵循相同洗滌指南洗滌板並將100 μ L人類IL-2及IFN- γ 生物素化檢測器抗體添加至每一孔中。在室溫下在黑暗中利用具有3 mm軌域半徑之定軌振盪器將試樣以600 rpm混合1小時。遵循相同洗滌指南洗滌板並將100 μ L鏈黴抗生物素蛋白-R-藻紅素添加至每一孔中。在室溫下在黑暗中利用具有3 mm軌域半徑之定軌振盪器將試樣以600 rpm混合30分鐘。使用相同洗滌指南將板洗滌3次且在傾析液體之後將試樣再懸浮於150 μ L 1 $\times$ 洗滌溶液中。利用具有3 mm軌域半徑之定軌振盪器將試樣以600 rpm混合3分鐘且在4 $^{\circ}$ C下儲存過夜。之後，遵循相同洗滌指南洗滌板並將試樣再懸浮於150 μ L 1 $\times$ 洗滌溶液中。

使用MAGPIX System (Luminex)及xPONENT軟體讀取板。使用MILLIPLEX Analyst軟體實施數據分析，此提供標準曲線及細胞介素濃度。

相對於未經轉導或對照CAR轉導之T細胞，當與內源性表現間皮素之細胞或間皮素轉導之細胞一起共培養時，經抗間皮素TFP轉導之T細胞可產生更高含量之IL-2及IFN- γ 。相比之下，與間皮素陰性細胞或未經轉導之細胞一起共培養自TFP轉導之T細胞可引起極少細胞介素釋放或沒有細胞介素釋放。與先前細胞毒性數據一致，在與具有間皮素之靶細胞一起共培養時構築有替代鉸鏈區之抗間皮素TFP可生成類似結果。

與先前細胞毒性數據一致，抗間皮素-CD3 ϵ 及抗間皮素-CD3 γ 可關於TFP構築體產生最高的IL-2及IFN- γ 含量。然而，經抗間皮素-CD3 ϵ 及抗間皮素-CD3 γ TFP轉導之T細胞之細胞介素產生可能與表現抗間皮素-28 ζ CAR之T細胞相當，但TFP展示遠遠更高的靶細胞殺死程度。與CAR相比TFP可更有效地殺死靶細胞但釋放相當或更低含量之促發炎細胞介素之可能性代表TFP相對於CAR之潛在優點，乃因該等細胞介素之升高之含量與過繼CAR-T療法之劑量限制性毒性相關。

實例性結果顯示於圖11中。如上所述，用50 MOI慢病毒將經活化PBMC轉導連續兩天並加以擴增。轉導後第8天，在細胞毒性培養基(無酚紅RPMI1640 (Invitrogen)加5% AB血清(Gemini Bioproducts ; 100-318)中利用靶細胞(過表現MSLN之K562細胞)以1:1之E:T比率(0.2×10^6 個每一細胞類型)建立PBMC之共培養物。使用過表現BCMA之K562細胞作為陰性對照。24小時後，如上所述藉由ELISA分析細胞之IFN- γ (圖11A)及IL-2 (圖11B)表現。在自左至右之每一圖中，T細胞為未經轉導、經空載體轉導、經抗MSLN-CD3 ϵ TFP、抗MSLN-28 ζ CAR或抗MSLN-41BB ζ CAR轉導。與MSLN-細胞一起共培養之細胞係由白色槓表示，且與MSLN+靶細胞一起共培養之彼等係由黑色槓表示。如在圖中可看出，表現抗間皮素CAR及TFP構築體之T細胞係藉由與MSLN+細胞而非MSLN-細胞一起共培養來活化(如藉由IFN- γ 及IL-2產生所證實)，進一步展示MSLN表現細胞能特異性活化T細胞。

實例10：藉由流式細胞術之CD107a暴露

T細胞活化之另一分析係CD107a之表面表現，該CD107a為位於休眠細胞中之細胞質細胞溶解顆粒之膜中之溶酶體相關膜蛋白(亦稱為LAMP-

1)。作為細胞溶解活性之必要條件之效應物T細胞之去粒使得CD107a在活化誘導之顆粒胞吐作用之後移動至細胞表面。因此，除細胞介素產生以外，CD107a暴露提供T細胞活化之另一量度，其與細胞毒性密切相關。

分開洗滌標靶及效應細胞並將其再懸浮於細胞毒性培養基(RPMI+5%人類AB血清+ 1%抗生素抗黴菌)中。該分析係藉由在U型底96孔板(Corning)中在100 μ L最終體積中在存在0.5 μ L/孔之PE/Cy7標記之抗人類CD107a (LAMP-1)抗體(純系H4A3, BD Biosciences)下合併 2×10^5 個效應物細胞與 2×10^5 個靶細胞來實施。然後將培養物在37°C、5% CO₂下培育1小時。在此培育後立即將10 μ L分泌抑制劑莫能菌素(monensin)(1000 $\times$ 溶液，BD GolgiStop™)之1:10稀釋物小心添加至每一孔中而不擾亂細胞。然後將板在37°C、5% CO₂下再培育2.5小時。在此培育後，用APC抗人類CD3抗體(純系UCHT1, BD Biosciences)、PerCP/Cy5.5抗人類CD8抗體(純系SK1, BD Biosciences)及Pacific Blue抗人類CD4抗體(純系RPA-T4, BD Biosciences)對細胞進行染色且然後在37°C、5% CO₂下培育30分鐘。然後用FACS緩衝液將細胞洗滌2次並再懸浮於100 μ L FACS緩衝液及100ul IC固定緩衝液中，之後進行分析。

藉由流式細胞術檢測T細胞之表面上CD107a之暴露。流式細胞術係利用LSRFortessa™ X20 (BD Biosciences)來實施且流式細胞術數據之分析係使用FlowJo軟體(Treestar, Inc. Ashland, OR)來實施。針對每一效應物/靶細胞培養物測定CD3門內為CD107 +ve之CD8+效應細胞之百分比。

與先前細胞毒性及細胞介素數據一致，相對於與間皮素陰性靶細胞一起培育之效應物，與經抗間皮素-28 ζ CAR轉導之效應物T細胞一起共培養之間皮素表現靶細胞可誘導表面CD107a表現之增加。相比之下，在相

同條件下，抗間皮素-CD3 ϵ LL或抗間皮素-CD3 γ LL TFP表現效應物可展現CD107a表現之5倍至7倍誘導。在與具有間皮素之靶細胞共培養時構築有替代鉸鏈區之抗間皮素TFP可生成類似結果。

實例11：活體內小鼠效能研究

為評價經抗間皮素TFP轉導之效應物T細胞達成活體內抗腫瘤反應之能力，將經抗間皮素-28 ζ CAR、抗間皮素-CD3 ϵ LL TFP或抗間皮素-CD3 γ LL TFP轉導之效應物T細胞過繼性轉移至先前已用間皮素+人類癌細胞系接種之NOD/SCID/IL-2R $\gamma^{-/-}$ (NSG-JAX)小鼠中。

自傑克遜實驗室(Jackson Laboratory) (庫藏編號005557)獲得在開始研究前至少6週齡之雌性NOD/SCID/IL-2R $\gamma^{-/-}$ (NSG-JAX)小鼠並在實驗使用前將其馴化3天。將用於接種之人類間皮素表現細胞系維持在對數期培養物中，之後收穫並用台盼藍(trypan blue)計數以測定活細胞計數。在腫瘤攻擊當天，將細胞以300g離心5分鐘並以 $0.5-1 \times 10^6$ 個細胞/100 μ L再懸浮於預加溫之無菌PBS中。製備未經轉導或經抗間皮素-28 ζ CAR、抗間皮素-CD3 ϵ LL TFP或抗CD3 γ LL TFP構築體轉導之用於過繼性轉移之T細胞。在研究之第0天，用 $0.5-1 \times 10^6$ 個間皮素表現細胞靜脈內攻擊10隻動物/實驗組。3天後，將 5×10^6 個效應物T細胞之群體在100 μ L無菌PBS中靜脈內轉移至每一動物。每日記錄動物之詳細臨床觀察結果直至安樂死為止。每週對所有動物進行體重量測直至死亡或安樂死為止。在測試及對照物品之過繼性轉移之後35天對所有動物實施安樂死。在研究期間出現垂死的任何動物均由研究負責人與獸醫師磋商決定實施安樂死。

相對於未經轉導之T細胞，經抗間皮素-28 ζ CAR、抗間皮素-CD3 ϵ LL TFP或抗間皮素-CD3 γ LL TFP轉導之T細胞之過繼性轉移可延長具有

間皮素表現細胞系腫瘤之小鼠之存活，且可指示抗間皮素CAR-及TFP-轉導之T細胞能在該等小鼠模型中介導靶細胞殺死以及相應的增加之存活。總之，該等數據可指示，TFP代表用於改造嵌合受體之替代平臺，其展示在活體外及活體內具有優於第一代CAR的抗原特異性殺死。

實例12：活體內實體腫瘤異種移植小鼠模型中之人類TFP T細胞治療

在具有源自人類間皮素表現ALL、CLL、NHL或MSTO人類細胞系之皮下實體腫瘤之免疫受損小鼠模型中亦可測試利用人類TFP.間皮素T細胞之治療之效能。可藉由腫瘤大小之測徑器量測或藉由遵循由GFP表現腫瘤細胞發射之綠色螢光蛋白(GFP)信號之強度來評價因應人類TFP.間皮素T細胞治療之腫瘤縮小。

可使原代人類實體腫瘤細胞生長於免疫受損之小鼠而無需對其進行活體外培養。實例性實體癌細胞包括(例如)在癌症基因體圖譜(TCGA)及/或廣泛癌細胞系百科全書(CCLE，參見Barretina等人，Nature 483:603 (2012))中提供之實體腫瘤細胞系。實例性實體癌細胞包括自間皮瘤、腎細胞癌、胃癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、結腸癌、子宮頸癌、腦癌、肝癌、胰臟癌、腎癌、子宮內膜癌或胃癌分離之原代腫瘤細胞。在一些實施例中，欲治療之癌症選自由以下組成之群：間皮瘤、乳頭狀漿液性卵巢腺癌、透明細胞卵巢癌、混合性苗勒管卵巢癌、子宮內膜樣黏液卵巢癌、胰臟腺癌、胰臟導管腺癌、子宮漿液性癌、肺腺癌、肝外膽管癌、胃腺癌、食道腺癌、結腸直腸腺癌及乳房腺癌。該等小鼠可用於在人類腫瘤異種移植模型中測試TFP.間皮素T細胞之效能(例如，參見Morton等人，Nat. Protoc. 2:247 (2007))。在皮下植入或注射 1×10^6 個至 1×10^7 個原代細胞(於EC基質材料中之膠原酶處理之大塊腫瘤懸浮液)或腫瘤片段(於

EC基質材料中之原發性腫瘤片段)之後，使腫瘤生長至200-500 mm³，之後開始治療。

如上文所闡述實施一種該實驗以在間皮瘤異種移植小鼠模型中測試活體內MSLN特異性單一域抗體(sdAb)活性之效能。利用Matrigel®以1:1比率以 1×10^6 個細胞/小鼠皮下接種螢光素酶標記之MSTO-211H-FL-MSLN-Luc。每週兩次藉由測徑器量測來監測腫瘤體積。腫瘤注射後14天，當腫瘤體積為約300mm³時，將 1×10^7 個T細胞靜脈內注射至每一動物中。所使用之T細胞包括經CD3 ϵ -SD1 TFP、CD3 γ -SD1 TFP、CD3 ϵ -SD4 TFP、CD3 γ -SD4 TFP、CD28 ζ SD1 CAR及CD28 ζ SD1 CAR轉導之彼等。使用一組未注射T細胞之小鼠作為陰性對照。

結果顯示於圖12A中。用CD3 ϵ -SD1 TFP及CD3 γ -SD1 TFP T細胞注射之小鼠顯示最大且最快的腫瘤體積減小，但除了無T細胞對照外注射任何T細胞之小鼠在注射T細胞之後顯示腫瘤體積減小。

藉由再攻擊間皮瘤異種移植小鼠模型中之存活小鼠在活體內測試SD1 ϵ -及 γ -TFP T細胞之持續效能。

用Matrigel® (1:1比率)以 1×10^6 個腫瘤細胞(MSTO 211H FL MSLN Luc)/小鼠對小鼠進行皮下接種。用Raji細胞注射一組小鼠作為陰性對照，且再次用單獨MSTO細胞注射一組小鼠作為陰性對照。一週兩次藉由測徑器量測來監測腫瘤體積。腫瘤注射後14天(當腫瘤體積達到約300 mm³時)，將 1×10^7 個MSTO (MSLN+)或Raji (MSLN-，作為陰性對照)靜脈內注射至每一動物中。結果顯示於圖12B中。該圖中之每一條線代表單一動物。如圖中所顯示，先前已經抗MSLN TFP T細胞處理之小鼠能再次減小腫瘤體積或消滅腫瘤，指示最初注射之T細胞持續存在於小鼠中或小

鼠發生抗MSLN記憶反應。相反，用Raji (MSLN-)細胞再攻擊之小鼠不能控制Raji腫瘤之生長，由此闡釋TFP T細胞反應之特異性。

實例13.在MSLN腫瘤異種移植小鼠模型中患者源性MSLN ϵ -TFP T細胞之活體內效能

使用來自卵巢癌患者之SD1 ϵ -TFP T細胞來測試SD1 ϵ -TFP T細胞針對間皮素表現腫瘤細胞(MSTO-MSLN-Luc)之活體外及活體內抗腫瘤效能。

如上所述製備慢病毒。

自卵巢癌患者之全血製備CD4⁺及CD8⁺ T細胞

如下自卵巢癌患者之全血純化CD4⁺及CD8⁺ T細胞(示意性概述顯示於圖13A中)。收集40-50 mL卵巢癌患者之肝素化全血且由Conversant Bio (Huntsville, Alabama)運送過夜。用等體積之PBS稀釋血液並在50 mL錐形管中在15 mL Ficoll-Paque® (GE healthcare，目錄號：17-5442-02)上方對35 mL經稀釋全血小心分層。然後在RT下在無制動器之旋翼式轉子(swinging bucket rotor)中以800 $\times g$ 將其離心20 min。抽出上層，留下在中間相未被擾亂之單核細胞層(淋巴球、單核球及血小板)。將單核細胞層轉移至新的50 mL錐形管，添加30 mL PBS並在RT下以300 $\times g$ 離心10 min。將1-2 mL ACK溶解緩衝液(ThermoFisher，目錄號：A1049201)添加至沉澱物中，充分混合，且在RT下培育2 min，添加20 mL PBS，在RT下以300 $\times g$ 離心10 min。將細胞糰粒再懸浮於10 mL冰冷MAC緩衝液中並經由Cellometer Auto 2000對細胞進行計數。使用Miltenyi人類CD4/8微珠(目錄號：130-045-101；130-045-201)根據製造商之說明書分離CD4⁺及CD8⁺ T細胞。

如上所述產生TFP T細胞，且藉由FACS測定轉導。在靶細胞(MSLN^高細胞系MSTO-211H-FL MSLN (自親代MSTO-211H、ATCC、CRL-2081在內部生成))上證實間皮素表現，且在與螢光素酶分析相同的日期藉由流式細胞術在SD1 ϵ -TFP T細胞上證實MSLN-Fc表現。在R10培養基中製備螢光素酶標記之靶細胞(MSTO-211H-FL MSLN-Luc或MSLN-細胞系C30-Luc (A2780, Sigma))之單一懸浮液。將於100 μ L中之 1×10^4 個靶細胞添加至96孔平底板中。如所指示在100 μ L中以不同的效應物對標靶比率(E:T)添加TFP T細胞。

基於FACS之轉導效率及T細胞活化測定

使TFP T細胞解凍，脫珠粒(debeaded)(若在Dynabeads+IL-2條件下進行離體擴增)，洗滌，且然後再懸浮於無細胞介素之T細胞培養培養基中。添加期望數量之T細胞(於100 μ L中)以達到分別5:1、1:1及1:5之效應物對標靶比率。對於每一類型之T細胞以測試比率製備三個重複。然後將細胞在37°C及5% CO₂下培養24小時。在24小時之共培養之後，以300 $\times g$ 將板離心2分鐘以使細胞沈澱下來。小心移除每一孔之100 μ L培養上清液用於Luminex分析。將100 μ L來自Bright-Glo™ Luciferase Assay System之分析緩衝液(Promega，編號E2650)添加至每一孔中。藉由輕輕上下移液來混合每一孔中之內容物。使細胞試劑混合物在室溫下在黑暗中保持3分鐘用於完全溶解細胞。將每一孔之200 μ L細胞溶解物轉移至Greiner-One白色壁96孔板。藉由SpectraMax M5讀板儀(Molecular devices)以相對發光單位(RLU)量測發光。

藉由下文所列示之公式計算腫瘤溶解之百分比(%)：

發光(腫瘤+ T細胞)

腫瘤溶解% = 100* [1 - -----]

發光(腫瘤)

Luminex®分析

如先前所闡述收穫腫瘤-T細胞共培養物之上清液並儲存在-80℃下。使用Millipore Luminex套組(HCD8MAG-15K)根據製造商之說明書檢測細胞介素特徵。在不進行任何稀釋之情況下塗佈上清液並使用Magpix xMAP®技術量測讀數。

皮下間皮瘤異種移植小鼠模型及活體內評價

在此研究中使用雌性6週齡NSG小鼠(NOD.Cg-Prkdc^{scid}Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ，目錄號：005557, Jackson Laboratories)。在與該研究相同之條件下將動物馴化最短3天。將MSTO-211H-FLMSLN-Luc細胞以1 × 10⁶個細胞/100 μL之濃度懸浮於無菌PBS中。然後將PBS細胞懸浮液與冰冷Matrigel®以1:1混合，每一小鼠之最終注射體積為200 μL。在冰上保持所得PBS/ Matrigel®細胞懸浮液直至在小鼠之背部後肋部進行皮下投與為止。利用測徑器量測以腫瘤體積監測腫瘤生長。腫瘤之體積計算為：

腫瘤體積 = ½ (長度×寬度²)

腫瘤細胞注射後10天，根據腫瘤體積(200mm³至300 mm³)對動物實施隨機化並將其分成10個組以接受來自不同患者之SD1 ε-TFP T細胞之注射(每組小鼠之數目端視在注射當天回收之SD1 ε-TFP T細胞之數目而變化)。將T細胞注射日視為研究之第0天。在無菌PBS中以5 × 10⁶個細胞/100 μL之濃度製備T細胞。然後經由尾靜脈將細胞懸浮液靜脈內注射至小鼠中。

來自卵巢癌患者之SD1 ϵ -TFP T細胞之離體擴增

用編碼具有靶向MSLN之SD1結合物之TFP之CD3 ϵ 格式的慢病毒製備MSLN特異性sdAb TFP T細胞。在利用Dynabeads®+IL-2製備之細胞中，與第0天相比，在第10天藉由活細胞計數測定之擴增倍數在8.58倍至28.2倍(17.8 +/- 3.3)之範圍內，且在利用TransAct® + IL-7/15製備之細胞中，與第0天相比，該擴增倍數在10倍至33.6倍(22.9 +/- 5.0)之範圍內。在擴增之第10天藉由針對CD4⁺及CD8⁺群體上GFP及MSLN-Fc之存在進行表面染色來測定SD1 ϵ -TFP T細胞之轉導效率。在利用Dynabeads+IL-2製備之細胞中轉導效率在28.6%至52.1% (40.9 +/- 4.0%)之範圍內，且在用TransAct+IL-7/15製備之細胞中轉導效率在5.7%至46.9% (26.8 +/- 6.3%)之範圍內；在Dynabeads+IL-2條件與TransAct+IL-7/15條件之間在擴增倍數及轉導效率方面未顯示顯著差異。每個細胞之載體拷貝數與轉導效率一致，其中在Dynabeads+IL-2或TransAct+IL7/15條件中每個細胞之拷貝數為約1至2，患者1除外，其每個細胞具有0.38個載體拷貝數。

來自卵巢癌患者之SD1 ϵ -TFP T細胞之活體外抗腫瘤活性

使用螢光素酶報導基因腫瘤細胞溶解分析測試來自卵巢癌患者之SD1 ϵ -TFP T細胞之活體外效能。在分析當天在MSTO-211H-FLMSLN-Luc細胞系上證實間皮素表現(圖13B)；所有SD1 ϵ -TFP T細胞皆顯示不同程度之腫瘤殺死。對於患者1、2、4及5觀察到穩健腫瘤細胞溶解(75%至97%)。MSLN ϵ -TFP T細胞在與MSTO-211H-FLMSLN-Luc (MSLN高表現者)以5:1之效應物對標靶比率共培養時，在5:1之效應物對標靶比率下患者3顯示約35%之腫瘤溶解，在1:1之效應物對標靶比率下4/5的患者(患者1、2、4及5)顯示平均50%之腫瘤溶解，即使在1:5之效應物對標靶比率

下2/5的患者(患者4及5)顯示約50%之腫瘤溶解。所有T細胞皆顯示快速的腫瘤細胞殺死。當與間皮素陰性細胞系C30-Luc一起共培養時，對於所有MSLN ϵ -TFP™ T細胞皆未觀察到腫瘤溶解(圖13C)。使用人類CD8 Luminex®面板分析五名患者之MSLN ϵ -TFP之細胞介素特徵，與未經轉導之T細胞相比，在MSLN ϵ -TFP™ T細胞中，諸如IFN- γ 、GM-CSF、顆粒酶-A/B、IL-2、MIP- α/β 、TNF- α 及穿孔蛋白等細胞溶解細胞介素顯著增加(圖13D-L)。

在表現MSLN之腫瘤小鼠異種移植模型中MSLN ϵ -TFP T細胞之活體內效能

使用MSTO-211H-FLMSLN-Luc來建立皮下異種移植之表現間皮素之腫瘤小鼠模型。一週兩次量測腫瘤體積。在腫瘤注射後第10天，平均值腫瘤體積達到200-300 mm³，且使來自一個正常供體(ND12, 圖14A)及患者1-4 (圖14B-E)之第10天擴增之MSLN ϵ -TFP T細胞解凍並證實轉導效率。對每一小鼠i.v.注射5 ×10⁶個MSLN ϵ -TFP T細胞或匹配之未經轉導之T細胞，且此後監測腫瘤體積。截止至T細胞注射後第20天，3/4的患者(患者1、2及4)之MSLN ϵ -TFP T細胞顯示完全腫瘤清除。維持腫瘤清除直至第40天為止。5/6的小鼠接受來自患者3之MSLN ϵ -TFP T細胞，其顯示部分保護。自所有四名接受來自ND12之MSLN ϵ -TFP T細胞之患者，一名患者顯示完全腫瘤清除，兩名患者顯示部分腫瘤清除。

尾注

儘管已在本文中顯示並闡述了本發明之較佳實施例，但熟習此項技術者將顯而易見，該等實施例僅作為實例來提供。熟習此項技術者現將構想出多種變化形式、改變形式及取代形式，此並不背離本發明。應瞭解，

可在實踐本發明中採用本文所闡述之本發明實施例之各種替代。以下申請專利範圍意欲界定本發明範圍並由此覆蓋該等申請專利範圍及其等效形式範圍內之方法及結構。

附錄A：序列概述

SEQ ID NO.	名稱	序列
1	短連接體1	GGGGSGGGGSGGGGSLE
2	短連接體2	AAAGGGGSGGGGSGGGGSLE
3	長連接體	AAAIEVMYPPPYLGGGGSGGGGSGGGGSLE
4	人類CD3-ε	MQSGTHWRVLGLCLLSVG VWGQDGNEEMGGITQTPY KVSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGDEDDKNI GSDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLY LRARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLL VYYW SKNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPPVPNP YEPIRKGQRDLYSGLNQRR
5	人類CD3-γ	MEQGKGLAVLILAIILLQGTLAQSIKGNHLVKVYDYQE DGSVLLTCDAEAKNITWFKDGKMIGFLTEDKKKWNL GSNAKDPRGMYQCKGSQNKSKPLQVYYRMCQNCIEL NAATISGFLFAEIVSIFVLAVGVYFIAGQDGVQRASD KQTLLPNDQLYQPLKDREDDQYSHLQGNQLRRN
6	人類CD3-δ	MEHSTFLSGLVLATLLSQVSPFKIPIEELED RVFVNCNTS ITWVEGTVGTLLSDITRLDLGKRILDPRGIYRCNGTDIY KDKESTVQVHYRMCQSCVELDPATVAGIIVTDVIATLL LALGVFCFAGHETGRLSGAADTQALLRNDQVYQPLRD RDDAQYSHLGGNWARNKS
7	人類CD3-ζ	MKWKALFTAAILQAQLPITEAQSFGLLDPKLCYLLDGI LFIYGVILTALFLRVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNL GRREEYDVLDKRRGRDPEMGGKPQRRKNPQEGLYNE LQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKGHDGLYQGLSTAT

		KDTYDALHMQALPPR
57	人類TCRα 鏈	MAGTWLLLLLALGCPALPTGVGGTPFPSLAPPIMLLVD GKQQMVVVCLVLDVAPPGLDSPIWFSAGNGSALDAFT YGPSPATDGTWTNLAHLSLPSEELASWEPLVCHTGP GAEGHSRSTQPMHLSGEASTARTCPQEPLRGTPGGALWL GVLRLLLFKLLLFDLLLTCSCLCDPAGPLPSPATTTRLR ALGSHRLHPATETGGREATSSPRPQPRDRRWGDTPPGR KPGSPVWGEGSYLSSYPTCPAQAWCSRSALRAPSSSLG AFFAGDLPPPLQAGA
9	人類TCRα 鏈C區	PNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQS KDSDEVYITDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACA NAFNNSIIPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLNFQ NLSVIGFRILLKLVAGFNLLMTLRLWSS
10	人類TCRα 鏈V區CTL- L17	MAMLLGASVLILWLQPDWVNSQQKNDDQQVKQNSPS LSVQEGRISILNCDYTNSMFDYFLWYKKYPAEGPTFLIS ISSIKDKNEDGRFTVFLNKS AKHLSLHIVPSQPGDSAVY FCAAKGAGTASKLTFGTGTRLQVTL
11	人類TCRβ 鏈C區	EDLNKVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPD HVELSWWVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYC LSSRLRVSATFWQNPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQD RAKPVTQIVSAEAWGRADCGFTSVSYQQGVLSATILYE ILLGKATLYAVLVSAVLMLMAMVKRKDF
12	人類TCRβ 鏈V區CTL- L17	MGTSLLCWMALCLLGADHADTGVSQNPRHNITKRGQ NVTFRCDPISEHNRLYWYRQTLGQGPEFLTYFQNEAQL EKSRLLSDRFSAERP KGSFSTLEIQRTEQGDSAMYLCA SSLAGLNQPQHFGDGTRLSIL
13	人類TCRβ 鏈V區YT35	MDSWTFCCVSLCILVAKHTDAGVIQSPRHEVTEMGQE VTLRCKPISGHNSLFWYRQTM MRGLELLIYFNNNVPID DSGMPEDRFS AKMPNASFSTLKIQPSEPRDSAVYFCAS SFSTCSANYGYTFGSGTRLTVV
14	MSLN DNA Seq.	acgcgtgtagtcttatgcaatactctttagtcttgaacatggtaacgatgagtagcaa catgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagtaaggtgg

	tacgatacgtgccttatttaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaacca ctgaattgccgcattgcagagatattgtatttaagtgcctagctcgatacaataaacggg tctctctgggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactaggaacccact gcttaagcctcaataaagcttgccctgagtgcctcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgt gactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaatctctagcagt ggcgcccgaaacagggacctgaaagcgaaagggaaccagagctctctcgacgcag gactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgagggcgggcgactggtgagt acgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgt cagtattaagcggggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccagg gggaaagaaaaaatataaattaaaacatatagtatgggcaagcaggagctagaacg attcgcagttaatcctggcctgtagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggac agctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagta gcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaagacaccaaggaagctttag acaagatagaggaagagcaaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggcca ctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatata aatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggaagagaa gagtgggtgcagagagaaaaaagagcagtggggaataggagctttgtccttgggttctt gggagcagcaggaagcactatgggcgcagcctcaatgacgctgacggtacaggcc agacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgagggtattgaggc gcaacagcatctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaat cctggctgtggaaagatacctaaggaatcaacagctcctggggatttgggggttgcctg gaaaactcattgcaccactgctgtgccttggaatgctagtggagtaataaatctctgg aacagattggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacac aagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaa gaattattggaattagataaatgggcaagtttggtgaattggttaacataacaaattggc tgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttggtagggttaagaatagttttg ctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagacca cctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaaatagaagaagaaggtgg agagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcggtta acttttaaaagaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtaga cataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaattcaaaa ttttatcgatactagtattatgcccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtac
--	---

		atctacgtattagtcacgctattacatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggc gtggatagcggtttgactcacggggattccaagtctccacccattgacgtcaatggg a gtttgttttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtaacaactccgccccat tgacgcaaattgggcggtaggcgtgtacggtgggaggtttatataagcagagctcgtt agtgaaccgtcagatcgcttgagacgccatccacgctgttttgacctccatagaaga ttctagagccgccaccatgcttctcctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccaca cccagcattcctcctgateccagacattcagcaggtccagctccagcagctctggccct gaactcgaaaaacctggcgctagcgtgaaaatttctgtaaagcctccggctactctttt actggctacacaatgaattgggtgaaacagtctcacggcaaattccctgaatggatcg gactcatcacaccctacaatggcgcttcttctacaaccagaaattccggggcaaggc aacactcactgtggacaaatcatcctctaccgctacatggatctgctctccctcacatc tgaggactccgctgtctacttttgtgcccaggaggatacgacggacgaggattcgatt actggggacagggaacaactgtgaccgtgtctagtggcgggcggaggagtgaggg cggaggatcttctggcgggggatccgatattgaactcacacagtctcccgcctatcatgt ctgcttctcccggcgagaaagtgactatgacttgctctgcttcttctgtgtcctacatg cactggtaccagcagaaatctggcacatcccctaacgggtggatctacgatactagca aactggcatccggcgtgcctgggcgattctctggctctggctctggcaactcttactctc tcacaatctcatctgtcgaggctgaggacgatgccacatactactgtcagcagtggtct aaacacccactcacattcggcgctggcactaaactggaaataaaagcggccgcaggt ggcgggcggttctggtggcgggcggttctggtggcgggcggttctctcgaggatggtaat gaagaaatgggtggtattacacagacaccatataaagtctccatctctggaaccacagt aatattgacatgccctcagtatcctggatctgaaatactatggcaacacaatgataaaaa cataggcggtgatgaggatgataaaaacataggcagtgatgaggatcacctgtcactg aaggaattttcagaattggagcaaagtgggtattatgtctgctaccccagaggaagcaa accagaagatgcgaacttttctctacctgagggcaagagtgtgtgagaactgcatg gagatggatgtgatgtcggtggccacaattgtcatagtggacatctgcatcactgggg gcttgctgctgctggttactactggagcaagaatagaaaggccaaggccaagcctgt gacacgaggagcgggtgctggcggcaggcaaaggggacaaaacaaggagaggc caccacctgttcccaaccagactatgagccatccggaaaggccagcgggacctgt attctggcctgaatcagagacgcatctgataagaattcgatccgcggccgcgaaggat ctcgatcgtccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgeccacagtccccg
--	--	---

		agaagtggggggaggggtcggcaattgaacgggtgcctagagaaggtggcgcg ggtaaactgggaaagtgatgtcgtgtactggctccgccttttcccagggtggggga gaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgaacgggttgccgcc agaacacagctgaagcttcgaggggctcgcattctctcttcacgcgccgccgcct acctgaggccgccatccacgccggttgagtcgcgttctgccgcctcccgcctgtggtg cctcctgaactgcgtccgccgtctaggttaagttaaagctcaggtcgagaccgggcctt tgtccggcgctcccttgagcctacctagactcagccggtctccacgctttgcctgac cctgcttgctcaactctacgtctttgtttcgtttctgttctgcgccgttacagatccaagct gtgaccggcgccctacgctagatgaccgagtacaagcccacggtgcgcctcgccacc cgcgacgacgtccccagggccgtacgcaccctcgccgccgcgttcgccgactaccc cgccacgcgccacaccgtcgatccggaccgccacatcgagcgggtcaccgagctg caagaactcttcctcgcgcgtcgggctcgacatcggaaggtgtgggtcgcgac gacggcgccgcggtggcgggtctgaccacgccggagagcgtcgaagcgggggc ggtgttcgccgagatcgggccgcgatggccgagttgagcgggtcccggtggccg cgagcaacagatggaaggcctcctggcgccgcaccggcccaaggagcccgct ggttcctggccaccgtcggcgctcgcgccaccaccagggaagggtctgggcagc gccgtcgtgctccccggagtggaggcgccgagcgcgccggggtgccgccttcc tgagacctcgcgccccgcaacctcccccttctacgagcggctcggcttcaccgtca ccgccgacgtcgaggtgcccgaaggaccgcgcacctggtgcatgaccgcaagcc cggtgcctgagtcgacaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtat tcttaactatgttgcctcttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgt attgcttcccgtatggcttcatcttctcctcctgtataaatcctggtgctgtctctttatga ggagttgtggcccgttgctcaggcaacgtggcggtgtgcaactgtgtttgctgacgca acccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgcttc ccctccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcccgctgctggacag gggctcggctgttgggcaactgacaattccgtggtgttgctggggaaatcatcgtccttc cttggtgctcgcctgtgttgccacctggattctgcgcgggacgtccttctgctacgtcc cttcggccctcaatccagcggaccttcttcccgcggcctgctgccggctctgcggcc tcttcgcgtcttcgccttcgcctcagacgagtcggatctcccttggggcgcctcccc gcctggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaa agaaaaggggggactggaagggctaattcactcccaacgaaaataagatctgctttt gcttgactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaacta
--	--	--

	gggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccctgagtgctcaagtagtggtgc ccgtctgttggtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaa atctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagttattataacttgcaaagaaatga atatcagagagtgagaggaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaat agcatcacaaatttcacaaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaa ctcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatcccgcccctaactccgcccagttc cgcccattctccgcccctatggctgactaatttttttattatgcagaggccgaggccgc ctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggcctagacttttg cagagacggcccaaattcgtaatcatggctatagctgttctctgtgtgaaattgttatccg ctcacaattccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctgggggtgcc taatgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgtttccagtcggga aacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcgccaacgcgcggggagaggcggtttg cgtattggcgctcttccgcttcctcgtcactgactcgctgcgctcggtcggttcggctg cggcgagcggtatcagctcactcaaaggcggtatacggttatccacagaatcaggg gataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaaggccagcaaaaaggccaggaaccgta aaaaggccgcgttgctggcgtttttccataggctccgccccctgacgagcatcacia aaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccagg cgtttccccctggaagctccctcgtgcgctctcctgttccgaccctgccgcttacggat acctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggt atctcagttcggtgtaggtcggtcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccgtt cagcccgaccgctgcgccttatccgtaactatcgtcttgagtccaacccgtaagac acgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatg taggcggtgctacagagttcttgaagtggcctaactacggctacactagaaggac agtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctc ttgatccggcaaaaccaccgctggtagcgggtggtttttgtttgcaagcagcagat tacgcgcagaaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacgggggtctgacg ctcagtggaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatct tcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaatcaatctaaagtatatatagtaaa cttggctctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctattt cgttcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcctt accatctggccccagtgctgcaatgataccgcgagaccacgctcaccggctccaga tttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggctcctgcaa
--	---

		ctttatccgcctccatccagtcctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgcc agttaatagtttgcgcaacggtgttgccattgctacaggcatcggtgtcacgctcgtc gtttggtatggcttcattcagctccggttcccaacgatcaaggcgagttacatgatcccc catgttggtgcaaaaaagcggtagctccttcggtcctccgatcgtgtcagaagtaagtt ggccgcagtggtatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgcc tccgtaagatgctttctgtgactgggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgt tgccggcgaccgagttgctcttgccggcgtaatacgggataataccgcgccacata gcagaactttaaaagtgtcatcattggaaaacgttcttcggggcgaaaactctcaagg atcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccactcgtgcaccaactgatcttca gcatcttttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaatgccgc aaaaaagggaataaggggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcttttcaata ttattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaa aaataaacaatataggggttccgcgcacattccccgaaaagtgccacctgacgtctaa gaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgatcacgaggcccttctgc tcgcgcgttctcgggtgatgacggtgaaaacctctgacacatgcagctcccgagacggt cacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgctcag cgggtgttgccgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtact gagagtgcaccatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaataccg catcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttggaagggcgatcgggtgcg ggcctcttcgctattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagt tgggtaacgccagggttttcccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaag ctg
15	MSLN胺基 酸序列：人 類間皮素序 列(UniProt 登錄號 Q13421)	MALPTARPLLGSCGTPALGSLLFLLFSLGWVQPSRTLA GETGQEAAPLDGVLANPPNISSLSPRQLLGFP CAEVSG LSTERVRELAVALAQKNVKLSTEQLRCLAHRLSEPPED LDALPLDLLLFLNPDAFSGPQACTRFFSRITKANVDLLP RGAPERQRLLP AALACWGV RGSLLSEADV RALGGLAC DLPGRFVAESA EVLLPRLVSC PGPLDQDQ QEAA RAAL QGGGPPY GPPSTWSV STMDALRGL LPVLGQPI IRSIPQG IVA AWRQRSS RDPSWRQ PERTILR PRFRRE VEKTAC PSG KKAREID ESLIFY KKWELE ACVDA ALLATQ MDRV NAI PFTYE QLDVL KHKLDE LYPQ GYPE SVIQ HLGYL FLKMS

		PEDIRKWNVTSLETLKALLEVNKGHEMSPQVATLIDRF VKGRGQLDKDTLDTLTAFYPGYLCSLSPEELSSVPPSSI WAVRPQDLDTCDPRQLDVLYPKARLAFQNMNGSEYF VKIQSFLGGAPTEDLKALSQQNVSMDLATFMKLRTDA VLPLTVAEVQKLLGPHVEGLKAEERHRPVRDWILRQR QDDLDTLGLGLQGGIPNGYLVLDLSMQEALSGTPCLL GPGPVLTVLALLASTLA
16	p510_抗 MSLN_SS1 _CD3ε DNA	acgcgtgtagtcttatgcaatactctgtagtcttgcaacatggtaacgatgagttagcaa catgccttacaaggagagaaaaagcaccgtgcatgccgattggtggaagtaaggtgg tacgatcgtgccttattaggaaggcaacagacgggtctgacatggattggacgaacca ctgaattgccgcattgcagagatattgtatttaagtgcctagctcgatacaataaacggg tctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaactagggaacccact gcttaagcctcaataaagcttgccctgagtgcctcaagtagtgtgtgcccgtctgttgtgt gactctggtaactagagatccctcagacccttttagtcagtggtgaaaaatctctagcagt ggcgcccgaacagggacctgaaagcgaaagggaaccagagctctctcgacgcag gactcggcttgctgaagcgcgcacggcaagaggcgagggcgggcgactggtgagt acgccaaaaattttgactagcggaggctagaaggagagagatgggtgcgagagcgt cagtattaagcgggggagaattagatcgcgatgggaaaaaattcggttaaggccagg gggaaagaaaaaatataaattaaaacatatagtatgggcaagcaggagctagaacg attcgcagttaatcctggcctgttagaaacatcagaaggctgtagacaaatactgggac agctacaaccatcccttcagacaggatcagaagaacttagatcattatataatacagta gcaaccctctattgtgtgcatcaaaggatagagataaaaagacaccaaggaagcttttag acaagatagaggaagagcaaaaacaaaagtaagaccaccgcacagcaagcggcca ctgatcttcagacctggaggaggagatatgagggacaattggagaagtgaattatata aatataaagtagtaaaaattgaaccattaggagtagcaccaccaaggcaaagagaa gagtgggtgcagagagaaaaaagagcagtgggaataggagctttgttccttggttctt gggagcagcaggaagcactatgggcgcagcctcaatgacgctgacggtacaggcc agacaattattgtctggtatagtgcagcagcagaacaatttgctgagggctattgaggc gcaacagcatctgttgcaactcacagtctggggcatcaagcagctccaggcaagaat cctggctgtggaaagatacctaaaggatcaacagctcctggggatttggggttgctctg gaaaactcattgcaccactgctgtgccttggaatgctagtggagtaataaatctctgg aacagattggaatcacacgacctggatggagtgggacagagaaattaacaattacac

		aagcttaatacactccttaattgaagaatcgcaaaaccagcaagaaaagaatgaacaa gaattattggaattagataaatgggcaagtttggtgaattggttaacataacaaattggc tgtggtatataaaattattcataatgatagtaggaggcttgtaggtttaagaatagttttg ctgtactttctatagtgaatagagttaggcagggatattcaccattatcgtttcagacca cctcccaaccccgaggggacccgacaggcccgaaggaatagaagaagaaggtgg agagagagacagagacagatccattcgattagtgaacggatctcgacggtatcggtta acttttaaagaaaaggggggattggggggtacagtgcaggggaaagaatagtaga cataatagcaacagacatacaaaactaaagaattacaaaaacaaattacaaaattcaaaa ttttatcgatactagtattatgccagtacatgaccttatgggactttcctacttggcagtac atctacgtattagtcacgctattaccatggtgatgcggttttggcagtacatcaatgggc gtggatagcggtttgactcacgggggatttccaagtctccacccattgacgtcaatggg agtttgtttggcaccaaaatcaacgggactttccaaaatgtcgtacaactccgcccc ttgacgcaaattgggcggtaggcgtgtacgggtgggaggtttatataagcagagctcgtt agtgaaccgtcagatcgctggagacgccatccacgctgtttgacctcatagaaga ttctagagccgccaccatgcttctctggtgacaagccttctgctctgtgagttaccaca cccagcattcctcctgatccagacattcagcagggtccagctccagcagcttgccct gaactcgaaaaacctggcgctagcgtgaaaatttctgtaaagcctccggctactctttt actggctacacaatgaattgggtgaaacagtctcacggcaaattccctcgaatggatcg gactcatcacaccctacaatggcgctcttctctacaaccagaaattccggggcaaggc aacactcactgtggacaaatcatcctctaccgcctacatggatctgctctccctcacatc tgaggactccgctgtctacttttggtcccaggaggatacgcaggacgaggattcgatt actggggacagggaacaactgtgaccgtgtctagtggcgggcgaggaggaggagg cggaggatcttctggcgggggatccgatattgaactcacacagtctcccgtatcatgt ctgcttctcccggcgagaaagtgactatgacttgctctgcttctctctgtgtcctacatg cactggtaccagcagaaatctggcacatcccctaacggtggatctacgatactagca aactggcatccggcgctgcctgggcgattcttggtcttggtctggcaactcttactctc tcacaatctcatctgtcgaggctgaggacgatgccacatactactgtcagcagtggtct aaacacccactcacattcggcgctggcactaaactggaaataaaagcgggccgcaggt ggcggcggttctggtggcgggcggttctggtggcgggggttctctcgaggatggtaat gaagaaatgggtggtattacacagacaccatataaagtctccatctctggaaccacagt aatattgacatgccctcagtatcctggatctgaaatactatggcaacacaatgataaaaa cataggcggtgatgaggatgataaaaacataggcagtgatgaggatcacctgtcactg
--	--	--

	aaggaattttcagaattggagcaaagtggttattatgtctgctaccccagaggaagcaa accagaagatgcgaacttttatctctacctgagggcaagagtgtgtgagaactgcatg gagatggatgtgatgtcggtagccacaattgtcatagtggacatctgcatcactgggg gcttgctgctgctggttactactggagcaagaatagaaaggccaaggccaagcctgt gacacgaggagcgggtgctggcggcaggcaaaaggggacaaaacaaggagaggc caccacctgttcccaaccagactatgagcccatccggaaggccagcgggacctgt attctggcctgaatcagagacgcatctgataagaattcgatccgcggccgcgaaggat ctgcgatcgtccggtgcccgtcagtgggcagagcgcacatcgcacacagtccccg agaagttggggggaggggtcggcaattgaacgggtgcctagagaaggtggcgcg ggtaaacagggaagtgtgtcgtgtactggctccgcttttcccgagggtggggga gaaccgtatataagtgcagtagtcgccgtgaacgttcttttcgcaacgggttgccgcc agaacacagctgaagcttcgaggggctcgcacatctctccttcacgcgcccgcgcct acctgaggccgcatccacgcccgttgagtcgcgttctgccgctcccgctgtggtg cctcctgaactgctccgctctaggttaagttaaagctcaggtcgagaccgggcctt tgtccggcgctcccttgagcctacctagactcagccggtctccacgctttgcctgac cctgcttgctcaactctacgtctttgtttcgtttctgttctgcgccgttacagatccaagct gtgaccggcgccctacgctagatgaccgagtacaagcccacgggtgcgcctcgcacc cgcgacgacgtccccagggccgtacgcaccctcgcgcgcggttcgccgactaccc cgccacgcgccacaccgtcgatccggaccgccacatcgagcgggtcaccgagctg caagaactcttcctcgcgcgctcgggctcgacatcggcaaggtgtgggtcgcggac gacggcgccgcggtggcggtctgaccacgcccggagagcgtcgaagcgggggc gggtgttcgccgagatcgcccgcgcatggccgagttgagcgggtcccggtggccg cgcagcaacagatggaaggcctcctggcgccgcaccggcccaaggagcccgcgt ggttcctggccaccgtcggcgtctcgcgcgaccaccagggaagggtctgggcagc gccgtcgtgctccccggagtggaggcgccgagcgcgccggggtgccgccttcc tgagacctccgcgccccgcaacctcccccttctacgagcgggtcggcttcaccgtea ccgccgacgtcgaggtgcccgaaggaccgcgcacctgggtgcatgaccgcaagcc cggtgcctgagtcgacaatcaacctctggattacaaaattgtgaaagattgactggtat tcttaactatgttgccttttacgctatgtggatacgtgctttaatgcctttgtatcatgt attgcttcccgtatggctttcattttctcctccttgataaatcctggtgctgtctttatga ggagttgtggcccgtgtcaggcaacgtggcgtgggtgtgactgtgtttgctgacgca acccccactggttggggcattgccaccacctgtcagctcctttccgggactttcgcttcc
--	---

	ccccccctattgccacggcggaactcatcgccgcctgccttgcctgctggacag gggctcggctgttgggcactgacaattccgtggtgtgtcggggaaatcatcgctcttc cttggctgctgcctgtgttggcacctggattctgcgcgggacgtccttctgtacgtcc cttcggccctcaatccagcggaccttccctccgcggcctgtgccggctctgcggcc tcttcgcgtcttcgccttcgccctcagacgagtcggatctcccttggggccgctcccc gcctggtacctttaagaccaatgacttacaaggcagctgtagatcttagccactttttaa agaaaaggggggactggaagggttaattcactcccaacgaaaataagatctgctttt gcttgactgggtctctctggttagaccagatctgagcctgggagctctctggctaacta gggaaccactgcttaagcctcaataaagcttgccctgagtgctcaagtagtgtgtgc ccgtctgtgtgtgactctggttaactagagatccctcagacccttttagtcagtgtgaaa atctctagcagtagtagttcatgtcatcttattattcagttataactgcaaagaaatga atatcagagagtgagaggaactgtttattgcagcttataatggttacaaataaagcaat agcatcacaaattcacaaataaagcattttttcactgcattctagttgtggtttgtccaaa ctcatcaatgtatcttatcatgtctggctctagctatcccggcccctaactccgcccagttc cgcccattctccgccccatggctgactaatttttttattatgcagaggccgaggccgc ctcggcctctgagctattccagaagtagtgaggaggctttttggaggccctagacttttg cagagacggcccaaattcgtaatcatggtcatagctgttccctgtgtgaaattgttatccg ctcacaaattccacacaacatacagagccggaagcataaagtgtaaagcctggggtgcc taatgagtgagctaactcacattaattgcgttgcgctcactgcccgccttccagtcggga aacctgtcgtgccagctgcattaatgaatcggccaacgcgcggggagaggcggtttg cgtattgggcgctcttccgcttcctcgtcactgactcgtcgcctcggtcgttcggctg cggcgagcgggtatcagctcactcaaaggcggttaatacggttatccacagaatcaggg gataacgcaggaaagaacatgtgagcaaaaggccagcaaaaggccaggaaccgta aaaaggccgcgttgctggcggtttttccataggtccgccccctgacgagcatcacia aaatcgacgctcaagtcagaggtggcgaaacccgacaggactataaagataaccagg cgtttccccctggaagctccctcgtgcgtctcctgttccgaccctgccgcttaccggat acctgtccgcctttctcccttcgggaagcgtggcgctttctcatagctcacgctgtaggt atctcagttcggtgtaggtcgttcgctccaagctgggctgtgtgcacgaacccccggt cagcccgaccgctgcgccttatccggtaactatcgtcttgagtccaacccggtaagac acgacttatcgccactggcagcagccactggtaacaggattagcagagcgaggtatg taggcggtgctacagagttcttgaagtgggtggcctaactacggctacactagaaggac agtatttggtatctgcgctctgctgaagccagttaccttcggaaaaagagttggtagctc
--	--

		ttgatccggcaaacaaccaccgctggtagcgggtgtttttgtttgcaagcagcagat tacgcgcagaaaaaaggatctcaagaagatcctttgatctttctacgggggtctgacg ctcagtggaaacgaaaactcacgttaagggattttggtcatgagattatcaaaaaggatct tcacctagatccttttaaattaaaaatgaagttttaaataatctaaagtatatatgagtaa cttggtctgacagttaccaatgcttaatcagtgaggcacctatctcagcgatctgtctattt cggtcatccatagttgcctgactccccgtcgtgtagataactacgatacgggagggcctt accatctggccccagtgtgcaatgataccgcgagaccacgctcaccgggtccaga tttatcagcaataaaccagccagccggaagggccgagcgcagaagtggcctgcaa ctttatccgctccatccagtctattaattgttgccgggaagctagagtaagtagttcgcc agttaatagtttgcgcaacgttgtgccattgctacaggcatcgtggtgtcacgctcgtc gtttggtatggcttcattcagctccggttccaacgatcaaggcgagttacatgatcccc catgttggtgcaaaaaagcgggttagctccttcggtcctccgatcgtgtcagaagtaagtt ggccgcagtgttatcactcatggttatggcagcactgcataattctcttactgtcatgcc tccgtaagatgctttctgtgactggtgagtactcaaccaagtcattctgagaatagtgt tgccggcgaccgagttgctcttgcggcgctcaatacgggataataccgcgccacata gcagaactttaaaagtgtcatcattggaacggttcttcggggcgaaaactctcaagg atcttaccgctgttgagatccagttcgatgtaaccctcgtgcacccaactgatcttca gcatctttactttcaccagcgtttctgggtgagcaaaaacaggaaggcaaaatgccgc aaaaaagggaataagggcgacacggaaatgttgaatactcatactcttcttttcaata ttattgaagcatttatcagggttattgtctcatgagcggatacatatttgaatgtatttagaa aaataaacaatataggggttccgcgcacatttccccgaaaagtgccacctgacgtctaa gaaaccattattatcatgacattaacctataaaaataggcgatcacgaggcccttctcgtc tcgcgcgtttcgggtgatgacgggtgaaaacctctgacacatgcagctcccggagacgg cacagcttgtctgtaagcggatgccgggagcagacaagcccgtcagggcgcgtcag cgggtgttgccgggtgtcggggctggcttaactatgcggcatcagagcagattgtact gagagtgcacatatgcggtgtgaaataccgcacagatgcgtaaggagaaaaataccg catcaggcgccattcgccattcaggctgcgcaactgttggaagggcgatcgggtgcg ggcctcttcgtattacgccagctggcgaaagggggatgtgctgcaaggcgattaagt tgggtaacgccagggtttccagtcacgacgttgtaaaacgacggccagtgccaaag ctg
17	p510_抗 MSLN_SS1	MLLLVTSLLLCELPHPAFLLIPDIQQVQLQQSGPELEKP GASVKISCKASGYSFTGYTMNWVKQSHGKSLEWIGLI

	_CD3ε胺基酸	TPYNGASSYNQKFRGKATLTVDKSSSTAYMDLLSLTSE DSAVYFCARGGYDGRGFDYWGGQTTVTVSSGGGGSG GGGSSGGGSDIELTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVS YMHYQQKSGTSPKRWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSG NSYSLTISSVEAEDDATYYCQQWSKHPLTFGAGTKLEI KAAAGGGGSGGGGSGGGGSLEDGNEEMGGITQTPYK VSISGTTVILTCPQYPGSEILWQHNDKNIGGEDDDKNIG SDEDHLSLKEFSELEQSGYYVCYPRGSKPEDANFYLYL RARVCENCMEMDVMSVATIVIVDICITGGLLLLVIYYWS KNRKAKAKPVTRGAGAGGRQRGQNKERPPVPNPDY EPIRKGQRDLYSGLNQRR*
18	抗MSLN輕鏈胺基酸 (MHC1445L C.1)	DVVMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYL HWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKITRVEAEDLGVFFCSQSTHVPFTFGSGGTKLEIK
19	抗MSLN輕鏈DNA (MHC1445L C.1)	gatgttgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtccttgagatcaagcctcc atctcttgcatctagtcagagcctgtacacagtaatggaaacacctattacattggt acctgcagaagccaggccagtcctcaaagctcctgatctacaaagttccaaccgattt tctgggtcccagacaggttcagtggcagtgatcagggactgatttcacactcaaga tcaccagagtggaggctgaggatctgggagtttttctgctctcaaagtacacatgttc cattcacgttcggctcggggacaaagttggaaataaaa
20	抗MSLN重鏈胺基酸 (MHC1445 HC.1)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFFDYEMHW VKQTPVHGLEWIG AIDPEIDGTAYNQKFKGKAILTADK SSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTDYYGSSYWFVDVWG TGTTVTVSS
21	抗MSLN重鏈DNA (MHC1445 HC.1)	caggttcaactgcagcagtcctggggctgagctggtaggcctggggcttcagtgacg ctgtcctgcaaggcttcgggctacacatttttgactatgaaatgcactgggtgaagcag acacctgtgcatggcctggaatggattggagctattgatcctgaaattgatggtagtcc tacaatcagaagttcaagggaaggccatactgactgcagacaaatcctccagcaca gcctacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgccgtctattactgtacaga ttactacggtagtagctactggtacttcgatgtctggggcacagggaaccacgggcacc gtctcctc

22	抗MSLN輕 鏈胺基酸 (MHC1446L C.1)	DVMMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSNGNTYL HWFLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF TLKISRVEAEDLGVIYFCSQTTHVPLTFGAGTKLELK
23	抗MSLN輕 鏈DNA (MHC1446L C.1)	gatgttatgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtcttgagatcaagcctcc atctcttgcatcttagtcagagcctgtacacagtaatggaaacacctattacattggt tcctgcagaagccaggccagtctcaaagctcctgatctacaaagttccaaccgatttt ctgggggtcccagacaggttcagtggcagtggatcaggacagatttcacactcaagat cagcagagtggaggctgaggatctgggagttatttctgctctcaaactacacatgttcc gctcacgttcgggtgctgggaccaagctggagctgaaa
24	抗MSLN重 鏈胺基酸 (MHC1446 HC.3)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHW VKQTPVHGLEWIGAIIDPEIAGTAYNQKFKGKAILTADK SSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCSRYGGNYLYYFDYWG QGTTTLTVSS
25	抗MSLN重 鏈DNA (MHC1446 HC.3)	caggttcaactgcagcagtctggggctgagctgggtgaggcctggggcttcagtgcg ctgtcctgcaaggcttcgggctacacttttactgactatgaaatgcactgggtgaagca gacacctgtccatggcctggaatggattggagctattgatcctgaaattgctggtactgc ctacaatcagaagtcaagggaaggccatactgactgcagacaaatcctccagcac agcctacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgccgtctattactgttcaa gatacgggtgtaactacctttactactttgactactggggccaaggcaccactctcaca gtctcctca
26	抗MSLN輕 鏈胺基酸 (MHC1447L C.5)	DVLMTQIPLSLPVSLGDQASISCRSSQNIVYSNGNTYLE WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDF LKISRVEAEDLGVIYCFQGSHPVPTFGSGTKLEIK
27	抗MSLN輕 鏈DNA (MHC1447L C.5)	gatgttttgatgacccaaattccactctccctgcctgtcagtcttgagatcaagcctcca tctcttgcatcttagtcagaacattgtgtatagtaatggaaacacctatttagagtggta cctgcagaaaccaggccagtctcaaagctcctgatctacaaagttccaaccgatttt ctgggggtcccagacaggttcagtggcagtggatcaggacagatttcacactcaagat cagcagagtggaggctgaggatctgggagttattactgcttcaagggttcacatgttcc attcacgttcgggtcggggacaaagttggaaataaaa
28	抗MSLN重	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHW

	鏈胺基酸 (MHC1447 HC.5)	VKQTPVHGLEWIGAIDPEIGGSAYNQKFKGRAILTADK SSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTGYDGYFWFAYWGQG TLVTVSS
29	抗MSLN重 鏈DNA (MHC1447 HC.5)	caggttcaactgcagcagtcggtgggctgagctggtgaggcctggggcttcagtgacg ctgtcctgcaaggcttcgggctacacatttactgactatgaaatgcactgggtgaagca gacacctgtgcatggcctggaatggattggagctattgactcctgaaattggtggttctgc ctacaatcagaagttcaagggcagggccatattgactgcagacaaatcctccagcaca gcctacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgccgtctattattgtacggg ctatgatggttacttttggttgcttactggggccaagggactctggctactgtctcttca
30	抗MSLN輕 鏈胺基酸 (MHC1448L C.4)	ENVLTQSPAIMSASPGEKVTMTCSASSSVSYMHYQQ KSSTSPKLWIYDTSKLASGVPGRFSGSGSGNSYSLTIS MEAEDVATYYCFQGSgyPLTFGSGTKLEIK
31	抗MSLN輕 鏈DNA (MHC1448L C.4)	gaaaatgttctcaccagtcctccagcaatcatgtccgcatctccaggggaaaagggtca ccatgacctgcagtgcagctcaagtgttaagtacatgcactggtaccagcagaagtc aagcacctccccaaactctggatttatgacacatccaaactggcttctggagtcagg gtcgttcagtggtgagtggtctggaactcttactctcagcatcagcagcatggag gctgaagatgttgccacttattactgtttcaggggagtggttaccactcacgttcggc tcggggacaaagttggaaataaaa
32	抗MSLN重 鏈胺基酸 (MHC1448 HC.3)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFTDYEMHW VKQTPVHGLEWIGGIDPETGGTAYNQKFKGKAILTADK SSSTAYMELRSLTSEDSAVYYCTSYYGSRVFWGTGTTV TVSS
33	抗MSLN重 鏈DNA (MHC1448 HC.3)	caggttcaactgcagcagtcgtgggctgagctggtgaggcctggggcttcagtgacg ctgtcctgcaaggcttcgggctacacatttactgactatgaaatgcactgggtgaaaca gacacctgtgcatggcctggaatggattggaggtattgactcctgaaactggtggtactg cctacaatcagaagttcaagggttaaggccatactgactgcagacaaatcctccagcac agcctacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgccgtctattactgtacaa gttactatggttagtagtcttctggggcacagggaccacgggtcacctgtctctca
34	抗MSLN輕 鏈胺基酸 (MHC1449L)	QIVLSQSPAILSAPGEKVTMTCRASSSVSYMHYQQ KPGSSPKPWIYATSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISV EAEDAATYYCQQWSSNPPTLTFGAGTKLELK

	C.3)	
35	抗MSLN輕 鏈DNA (MHC1449L C.3)	caaattgttctctcccagtcctccagcaatcctgtctgcatttccaggggagaaggtcact atgacttgcagggccagctcaagtgttaagttacatgcactgggtaccagcagaagcca ggatcctccccc aaacctggatttatgccacatccaacctggcttctggagtcctgtct cgcttcagtggtcagtggtctgggacctcttactctctcacaatcagcagtggtggaggc tgaagatgctgccacttattactgccagcagtggtgagtagtaacccacccacgctcacgt tcggtgctgggaccaagctggagctgaaa
36	抗MSLN重 鏈胺基酸 (MHC1449 HC.3)	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTSYGISWV KQRTGQGLEWIGEIYPRSGNTYYNESFKGKVTLTADKS SGTAYMELRSLTSEDSAVYFCARWGSYGSPPFYYGMD YWGQGTSVTVSS
37	抗MSLN重 鏈DNA (MHC1449 HC.3)	caggttcagctgcagcagtcctggagctgagctggcgaggcctggggcttcagtgaag ctgtcctgcaaggcttctggctacaccttcacaagctatggtataagctgggtgaagca gaggactggacagggccttgagtggattggagagattatcctagaagtggtaatactt actacaatgagagcttcaagggaaggtcacactgaccgcagacaaatcttcggca cagcgtacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgcggtctatttctgtgca agatggggctcctacggtagtcccccttttactatggtatggactactgggggtcaagg aacctcagtcaccgtctcctca
38	抗MSLN輕 鏈胺基酸 (MHC1450L C.3)	DVLMTQTPLSLPVSLGNQASISCRSSQSIVHSSGSTYLE WYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFT LKISRVEAEDLGVYYCFQGSHVPYTFGGGTKLEIK
39	抗MSLN輕 鏈DNA (MHC1450L C.3)	gatgttttgatgacccaaactccactctccctgcctgtcagtccttgaaatcaagcctcc atctcttgcatctagtcagagcattgtacatagtagtggaagcacctatttagaatggt acctgcagaaaccaggccagtcctcaaagctcctgatctacaaagttccaaccgattt tctgggggtcccagacaggttcagtggtcagtggtcagggacagatttcacactcaaga tcagcagagtggtggctgaggatctgggagtttattactgcttcaagggtcacatgttc catacacgttcggaggggggaccaagctggaaataaaa
40	抗MSLN重 鏈胺基酸 (MHC1450 HC.5)	QVQLQQSGAELARPGTSVKVSCASGYTFTSYGISWV KQRIGQGLEWIGEIHPRSGNSYYNEKIRGKATLTADKSS STAYMELRSLISED SAVYFCARLITTVVANYYYAMDYWG QGTSVTVSS

41	抗MSLN重 鏈DNA (MHC1450 HC.5)	caggttcagctgcagcagctctggagctgagctggcgaggcctgggacttcagtgaag gtgtcctgcaaggcttctggctataccttcacaagttatggtataagctgggtgaagcag agaattggacagggccttgagtggattggagagattcatcctagaagtggtaatagtta ctataatgagaagatcaggggcaaggccacactgactgcagacaaatcctccagcac agcgtacatggagctccgcagcctgatatctgaggactctgcggtctatttctgtgcaa ggctgattactacggtagttgctaattactatgctatggactactgggggtcaaggaacct cagtcaccgtctcctca
42	抗MSLN輕 鏈胺基酸 (MHC1451L C.1)	DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLLNSRTRKNY LAWYQQKPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFTGSGSGT DFTLTISSVQAEDLAVYYCKQSYNLVTFGAGTKLELK
43	抗MSLN輕 鏈DNA (MHC1451L C.1)	gacattgtgatgtcacagtctccatcctccctggctgtgtcagcaggagagaaggctcac tatgagctgcaatccagtcagagtctgtcaacagtagaaccgaaagaactacttg gcttgggtaccagcagaaaccagggcagctctcctaaactgctgatctactgggcatcca ctaggggaatctggggtcctgatcgcttcacaggcagtgatctgggacagatttcaact ctcaccatcagcagtggtgcaggctgaagacctggcagtttattactgcaaacaatcttat aatctgggtcacgttcgggtgctgggaccaagctggagctgaaa
44	抗MSLN重 鏈胺基酸 (MHC1451 HC.2)	QVQLQQSGAELVRPGASVTLSCKASGYTFFDYEMHW VKQTPVHGLEWIG AIDPEIDGTAYNQKFKGKAILTADK SSSTAYMELRSLTSEDS AVYYCTDY YGSSYWFYFDVWG TGTTVTVSS
45	抗MSLN重 鏈DNA (MHC1451 HC.2)	caggttcaactgcagcagctctggggctgagctgggtgaggcctggggcttcagtgacg ctgtcctgcaaggcttcgggctacacatttttgactatgaaatgcactgggtgaagcag acacctgtgcatggcctggaatggattggagctattgatcctgaaattgatggtactgcc tacaatcagaagttcaagggaaggccatactgactgcagacaaatcctccagcaca gcctacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgccgtctattactgtacaga ttactacggtagtagctactgggtacttcgatgtctggggcacagggaccacgggtcacc gtctctc
46	抗MSLN輕 鏈胺基酸 (MHC1452L C.1)	QIVLTQSPAIMSASPGEKVTISCSASSSVSYMYWYQQK PGSSPKPWIYRTSNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTISSM EAEDAATYYCQQYHSYPLTFGAGTKLELK

47	抗MSLN輕 鏈DNA (MHC1452L C.1)	caaattgttctcaccagctctccagcaatcatgtctgcatctccaggggagaaggtcac catatcctgcagtgccagctcaagtgttaagttacatgtactggtaccagcagaagcca ggatcctcccccaaaccctggatttatcgacatccaacctggcttctggagtcctgt cgcttcagtggcagtggtctgggacctcttactctctcacaatcagcagcatggagg ctgaagatgctgccacttattactgccagcagtatcatagttaccactcacgttcggtg ctgggaccaagctggagctgaaa
48	抗MSLN輕 鏈胺基酸 (MHC1452L C.6)	QIVLTQSPAIMASPGERVMTCSASSSVSSSYLYWYQ QKSGSSPKLWIYSISNLASGVPARFSGSGSGTSYSLTINS MEAEDAATYYCQQWSSNPQLTFGAGTKLELK
49	抗MSLN輕 鏈DNA (MHC1452L C.6)	caaattgttctcaccagctctccagcaatcatgtctgcatctcctggggaacgggtcac catgacctgcagtgccagctcaagtgttaagttccagctacttgtactggtaccagcaga agtcaggatcctccccaaaactctggattatagcatatccaacctggcttctggagtcc cagctcgcttcagtggcagtggtctgggacctcttactctctcacaatcaacagcatg gaggctgaagatgctgccacttattactgccagcagtgagtagtaaccacagctca cgttcggtgctgggaccaagctggagctgaaa
56	抗MSLN重 鏈胺基酸 (MHC1452 HC.2)	QVQLKQSGAELVKPGASVKISCKASGYTFTDYYINWV KQRPGQGLEWIGKIGPGSGSTYYNEKFKGKATLTADKS SSTAYMQLSSLTSEDSAVYFCARTGYVVGYYAMDYWG QGTSVTVSS
50	抗MSLN重 鏈DNA (MHC1452 HC.2)	cagggtccagctgaagcagctctggagctgagctggtgaagcctggggcttcagtgaag atatcctgcaaggcttctggctacaccttactgactactatataaactgggtgaagcag aggcctggacagggccttgagtggattggaaagattggtcctggaagtggtagtactt actacaatgagaagttcaagggaaggccacactgactgcagacaaatcctccagca cagcctacatgcagctcagcagcctgacatctgaggactctgcagctctatttctgtgca agaactgggttactacgttggttactatgctatggactactgggggtcaaggaaacctcagtc accgtctctca
51	抗MSLN重 鏈胺基酸 (MHC1452 HC.4)	QVQLQQSGAELARPGASVKLSCKASGYTFTIYGISWV KQRTGQGLEWIGEIYPRSDNTYYNEKFKGKATLTADKS SSTAYMELRSLTSEDSAVYFCARWYSFYAMDYWGQGT SVTVSS
52	抗MSLN重	cagggtcagctgcagcagctctggagctgagctggcgaggcctggggcttcagtgaag

	鏈DNA (MHC1452 HC.4)	ctgtcctgcaaggcttctggctacaccttcacaatctatggtataagctgggtgaaacag agaactggacagggccttgagtggattggagagattatcctagaagtgataatactta ctacaatgagaagttcaagggcaaggccacactgactgcagacaaatcctccagcac agcgtacatggagctccgcagcctgacatctgaggactctgcggctctatttctgtgcaa gatggtactcgttctatgctatggactactgggggtcaaggaacctcagtcaccgtctcct ca
58	單一域抗 MSLN結合 物1 (SD1)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGGDWSANFMYW YRQAPGKQRELVARISGRGVVDYVESVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAVASYWGQGTLVTVSS
59	單一域抗 MSLN結合 物4 (SD4)	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGSTSSINTMYWY RQAPGKERELVAFISSGGSTNVRDSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNTYIPYGGTLHDFW GQGTLVTVSS
55	單一域抗 MSLN結合 物6 (SD6)	QVQLVESGGGVVQAGGSLRLSCAASGSTFSIRAMRWY RQAPGTERDLVAVIYGSSTYYADAVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCNADTIGTARDYWGQ GTLVTVSS

【序列表】

<110> 美商TCR2療法股份有限公司 (TCR2 THERAPEUTICS INC.)

<120> 用於使用融合蛋白之TCR重編程的組合物及方法

<140> TW
<141> 2017-10-11

<150> 62/510,108
<151> 2017-05-23

<150> 62/405,551
<151> 2016-10-07

<160> 72

<170> PatentIn 版本 3.5

<210> 1
<211> 17
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成肽"

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

Glu

<210> 2
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成肽"

<400> 2
Ala Ala Ala Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1 5 10 15

Gly Ser Leu Glu
20

<210> 3
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 3
Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Gly Gly Gly
1 5 10 15

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu
20 25 30

<210> 4
<211> 207
<212> PRT
<213> 智人

<400> 4
Met Gln Ser Gly Thr His Trp Arg Val Leu Gly Leu Cys Leu Leu Ser
1 5 10 15

Val Gly Val Trp Gly Gln Asp Gly Asn Glu Glu Met Gly Gly Ile Thr
20 25 30

Gln Thr Pro Tyr Lys Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr
35 40 45

Cys Pro Gln Tyr Pro Gly Ser Glu Ile Leu Trp Gln His Asn Asp Lys
50 55 60

Asn Ile Gly Gly Asp Glu Asp Asp Lys Asn Ile Gly Ser Asp Glu Asp
65 70 75 80

His Leu Ser Leu Lys Glu Phe Ser Glu Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr
85 90 95

Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu
100 105 110

Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn Cys Met Glu Met Asp Val Met
115 120 125

Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu
130 135 140

Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys
145 150 155 160

Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn
165 170 175

Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg
180 185 190

Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly Leu Asn Gln Arg Arg Ile
195 200 205

<210> 5
<211> 182
<212> PRT
<213> 智人

<400> 5
Met Glu Gln Gly Lys Gly Leu Ala Val Leu Ile Leu Ala Ile Ile Leu
1 5 10 15

Leu Gln Gly Thr Leu Ala Gln Ser Ile Lys Gly Asn His Leu Val Lys
20 25 30

Val Tyr Asp Tyr Gln Glu Asp Gly Ser Val Leu Leu Thr Cys Asp Ala
35 40 45

Glu Ala Lys Asn Ile Thr Trp Phe Lys Asp Gly Lys Met Ile Gly Phe
50 55 60

Leu Thr Glu Asp Lys Lys Lys Trp Asn Leu Gly Ser Asn Ala Lys Asp
65 70 75 80

Pro Arg Gly Met Tyr Gln Cys Lys Gly Ser Gln Asn Lys Ser Lys Pro
85 90 95

Leu Gln Val Tyr Tyr Arg Met Cys Gln Asn Cys Ile Glu Leu Asn Ala
100 105 110

Ala Thr Ile Ser Gly Phe Leu Phe Ala Glu Ile Val Ser Ile Phe Val
115 120 125

Leu Ala Val Gly Val Tyr Phe Ile Ala Gly Gln Asp Gly Val Arg Gln
130 135 140

Ser Arg Ala Ser Asp Lys Gln Thr Leu Leu Pro Asn Asp Gln Leu Tyr
145 150 155 160

Gln Pro Leu Lys Asp Arg Glu Asp Asp Gln Tyr Ser His Leu Gln Gly
165 170 175

Asn Gln Leu Arg Arg Asn
180

<210> 6
<211> 172
<212> PRT
<213> 智人

<400> 6
Met Glu His Ser Thr Phe Leu Ser Gly Leu Val Leu Ala Thr Leu Leu
1 5 10 15

Ser Gln Val Ser Pro Phe Lys Ile Pro Ile Glu Glu Leu Glu Asp Arg
20 25 30

Val Phe Val Asn Cys Asn Thr Ser Ile Thr Trp Val Glu Gly Thr Val
35 40 45

Gly Thr Leu Leu Ser Asp Ile Thr Arg Leu Asp Leu Gly Lys Arg Ile
50 55 60

Leu Asp Pro Arg Gly Ile Tyr Arg Cys Asn Gly Thr Asp Ile Tyr Lys
65 70 75 80

Asp Lys Glu Ser Thr Val Gln Val His Tyr Arg Met Cys Gln Ser Cys
85 90 95

Val Glu Leu Asp Pro Ala Thr Val Ala Gly Ile Ile Val Thr Asp Val
100 105 110

Ile Ala Thr Leu Leu Leu Ala Leu Gly Val Phe Cys Phe Ala Gly His
115 120 125

Glu Thr Gly Arg Leu Ser Gly Ala Ala Asp Thr Gln Ala Leu Leu Arg
130 135 140

Asn Asp Gln Val Tyr Gln Pro Leu Arg Asp Arg Asp Asp Ala Gln Tyr
145 150 155 160

Ser His Leu Gly Gly Asn Trp Ala Arg Asn Lys Ser
165 170

<210> 7
<211> 164
<212> PRT
<213> 智人

<400> 7
Met Lys Trp Lys Ala Leu Phe Thr Ala Ala Ile Leu Gln Ala Gln Leu
1 5 10 15

Pro Ile Thr Glu Ala Gln Ser Phe Gly Leu Leu Asp Pro Lys Leu Cys
20 25 30

Tyr Leu Leu Asp Gly Ile Leu Phe Ile Tyr Gly Val Ile Leu Thr Ala
35 40 45

Leu Phe Leu Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr
50 55 60

Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg
65 70 75 80

Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met
85 90 95

Gly Gly Lys Pro Gln Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
100 105 110

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
115 120 125

Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
130 135 140

Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
145 150 155 160

Leu Pro Pro Arg

<210> 8
<211> 281
<212> PRT
<213> 智人

<400> 8
Met Ala Gly Thr Trp Leu Leu Leu Leu Leu Ala Leu Gly Cys Pro Ala
1 5 10 15

Leu Pro Thr Gly Val Gly Gly Thr Pro Phe Pro Ser Leu Ala Pro Pro
20 25 30

Ile	Met	Leu	Leu	Val	Asp	Gly	Lys	Gln	Gln	Met	Val	Val	Val	Cys	Leu
		35					40					45			
Val	Leu	Asp	Val	Ala	Pro	Pro	Gly	Leu	Asp	Ser	Pro	Ile	Trp	Phe	Ser
	50					55					60				
Ala	Gly	Asn	Gly	Ser	Ala	Leu	Asp	Ala	Phe	Thr	Tyr	Gly	Pro	Ser	Pro
65					70					75					80
Ala	Thr	Asp	Gly	Thr	Trp	Thr	Asn	Leu	Ala	His	Leu	Ser	Leu	Pro	Ser
				85					90					95	
Glu	Glu	Leu	Ala	Ser	Trp	Glu	Pro	Leu	Val	Cys	His	Thr	Gly	Pro	Gly
			100					105					110		
Ala	Glu	Gly	His	Ser	Arg	Ser	Thr	Gln	Pro	Met	His	Leu	Ser	Gly	Glu
		115						120				125			
Ala	Ser	Thr	Ala	Arg	Thr	Cys	Pro	Gln	Glu	Pro	Leu	Arg	Gly	Thr	Pro
	130					135					140				
Gly	Gly	Ala	Leu	Trp	Leu	Gly	Val	Leu	Arg	Leu	Leu	Leu	Phe	Lys	Leu
145					150					155					160
Leu	Leu	Phe	Asp	Leu	Leu	Leu	Thr	Cys	Ser	Cys	Leu	Cys	Asp	Pro	Ala
			165						170					175	
Gly	Pro	Leu	Pro	Ser	Pro	Ala	Thr	Thr	Thr	Arg	Leu	Arg	Ala	Leu	Gly
		180						185					190		
Ser	His	Arg	Leu	His	Pro	Ala	Thr	Glu	Thr	Gly	Gly	Arg	Glu	Ala	Thr
		195						200				205			
Ser	Ser	Pro	Arg	Pro	Gln	Pro	Arg	Asp	Arg	Arg	Trp	Gly	Asp	Thr	Pro
	210					215					220				
Pro	Gly	Arg	Lys	Pro	Gly	Ser	Pro	Val	Trp	Gly	Glu	Gly	Ser	Tyr	Leu

225 230 235 240

Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Ala
245 250 255

Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser Leu Gly Ala Phe Phe Ala Gly Asp Leu
260 265 270

Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly Ala Ala
275 280

<210> 9
<211> 142
<212> PRT
<213> 智人

<400> 9
Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser
1 5 10 15

Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
20 25 30

Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
35 40 45

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

Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn
65 70 75 80

Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys
85 90 95

Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn
100 105 110

Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val

115

120

125

Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp Ser Ser
130 135 140

<210> 10
<211> 139
<212> PRT
<213> 智人

<400> 10
Met Ala Met Leu Leu Gly Ala Ser Val Leu Ile Leu Trp Leu Gln Pro
1 5 10 15

Asp Trp Val Asn Ser Gln Gln Lys Asn Asp Asp Gln Gln Val Lys Gln
20 25 30

Asn Ser Pro Ser Leu Ser Val Gln Glu Gly Arg Ile Ser Ile Leu Asn
35 40 45

Cys Asp Tyr Thr Asn Ser Met Phe Asp Tyr Phe Leu Trp Tyr Lys Lys
50 55 60

Tyr Pro Ala Glu Gly Pro Thr Phe Leu Ile Ser Ile Ser Ser Ile Lys
65 70 75 80

Asp Lys Asn Glu Asp Gly Arg Phe Thr Val Phe Leu Asn Lys Ser Ala
85 90 95

Lys His Leu Ser Leu His Ile Val Pro Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala
100 105 110

Val Tyr Phe Cys Ala Ala Lys Gly Ala Gly Thr Ala Ser Lys Leu Thr
115 120 125

Phe Gly Thr Gly Thr Arg Leu Gln Val Thr Leu
130 135

<210> 11

<211> 177
<212> PRT
<213> 智人

<400> 11
Glu Asp Leu Asn Lys Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
1 5 10 15

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 20 25 30

Ala Thr Gly Phe Phe Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
 50 55 60

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
65 70 75 80

Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
 85 90 95

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
 100 105 110

Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
 115 120 125

Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
 130 135 140

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
145 150 155 160

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
 165 170 175

Phe

<210> 12
<211> 133
<212> PRT
<213> 智人

<400> 12
Met Gly Thr Ser Leu Leu Cys Trp Met Ala Leu Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

Asp His Ala Asp Thr Gly Val Ser Gln Asn Pro Arg His Asn Ile Thr
20 25 30

Lys Arg Gly Gln Asn Val Thr Phe Arg Cys Asp Pro Ile Ser Glu His
35 40 45

Asn Arg Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Thr Leu Gly Gln Gly Pro Glu Phe
50 55 60

Leu Thr Tyr Phe Gln Asn Glu Ala Gln Leu Glu Lys Ser Arg Leu Leu
65 70 75 80

Ser Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Pro Lys Gly Ser Phe Ser Thr Leu
85 90 95

Glu Ile Gln Arg Thr Glu Gln Gly Asp Ser Ala Met Tyr Leu Cys Ala
100 105 110

Ser Ser Leu Ala Gly Leu Asn Gln Pro Gln His Phe Gly Asp Gly Thr
115 120 125

Arg Leu Ser Ile Leu
130

<210> 13
<211> 135
<212> PRT
<213> 智人

<400> 13
Met Asp Ser Trp Thr Phe Cys Cys Val Ser Leu Cys Ile Leu Val Ala
1 5 10 15

Lys His Thr Asp Ala Gly Val Ile Gln Ser Pro Arg His Glu Val Thr
20 25 30

Glu Met Gly Gln Glu Val Thr Leu Arg Cys Lys Pro Ile Ser Gly His
35 40 45

Asn Ser Leu Phe Trp Tyr Arg Gln Thr Met Met Arg Gly Leu Glu Leu
50 55 60

Leu Ile Tyr Phe Asn Asn Asn Val Pro Ile Asp Asp Ser Gly Met Pro
65 70 75 80

Glu Asp Arg Phe Ser Ala Lys Met Pro Asn Ala Ser Phe Ser Thr Leu
85 90 95

Lys Ile Gln Pro Ser Glu Pro Arg Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala
100 105 110

Ser Ser Phe Ser Thr Cys Ser Ala Asn Tyr Gly Tyr Thr Phe Gly Ser
115 120 125

Gly Thr Arg Leu Thr Val Val
130 135

<210> 14
<211> 8791
<212> DNA
<213> 智人

<400> 14
acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gctttgcaac atggtaacga tgagtttagca 60

acatgcctta caaggagaga aaaagcaccg tgcattgccga ttggtggaag taaggtagta 120

cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggtctgaca tggattggac gaaccactga 180

attgccgcac tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc 240

tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta	300
agcctcaata aagcttgcct tgagtgttc aagtagtgtg tgcccgtctg ttgtgtgact	360
ctggtaacta gagatccctc agacctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg	420
cccgaacagg gacctgaaag cgaaaggga accagagctc tctcgacgca ggactcggct	480
tgtctgaagcg cgcacggcaa gaggcgagg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt	540
gactagcggg ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag	600
aattagatcg cgatgggaaa aaattcggtt aaggccaggg ggaaagaaaa aatataaatt	660
aaaacatata gtatgggcaa gcagggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt	720
agaaacatca gaaggctgta gacaaatct gggacagcta caaccatccc ttcagacagg	780
atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcatcaaag	840
gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag	900
taagaccacc gcacagcaag cgccactga tcttcagacc tggaggagga gatatgaggg	960
acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag	1020
caccaccaa ggcaaagaga agagtgtgtc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag	1080
ctttgttctt tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgagcc tcaatgacgc	1140
tgacggtaca ggccagacaa ttattgtctg gtatagtgtc gcagcagaac aatttgctga	1200
gggtatttga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc	1260
aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg	1320
gttgctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata	1380
aatctctgga acagattgga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa	1440
ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga	1500
acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgttg aattggttta acataacaaa	1560
ttggctgttg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat	1620
agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcgtt	1680
tcagaccac cteccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg	1740

tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt	1800
aactttttaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtgcg ggggaaagaa tagtagacat	1860
aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt	1920
atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ccttatggga ctctctact tggcagtaca	1980
tctacgtatt agtcacgcct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc	2040
gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga	2100
gtttgttttg gcacaaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat	2160
tgacgcaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggagggtta tataagcaga gctcgtttag	2220
tgaaccgtca gatcgccctg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagattct	2280
agagccgcca ccatgcttct cctggtgaca agcctctgc tctgtgagtt accacacca	2340
gcattcctcc tgatcccaga cattcagcag gtccagctcc agcagtctgg ccctgaactc	2400
gaaaaacctg gcgctagcgt gaaaatttcc tgtaaagcct ccggctactc ttttactggc	2460
tacacaatga attgggtgaa acagtctcac ggcaaatccc tcgaatggat cggactcatc	2520
acaccctaca atggcgccctc ttctacaac cagaaattcc ggggcaaggc aacactcact	2580
gtggacaaat catctctac cgcctacatg gatctgctct cctcacatc tgaggactcc	2640
gctgtctact tttgtgcccg aggaggatac gacggacgag gattcgatta ctggggacag	2700
ggaacaactg tgaccgtgtc tagtggcggc ggagggagtg gaggcggagg atcttctggc	2760
gggggatccg atattgaact cacacagtct cccgctatca tgtctgcttc tcccggcgag	2820
aaagtgacta tgacttgctc tgcttctct tctgtgtcct acatgactg gtaccagcag	2880
aaatctggca catcccctaa acggtggatc tacgatacta gcaaacctggc atccggcgtg	2940
cctgggcgat tctctggctc tggtctggc aactcttact ctctcacaat ctcatctgc	3000
gaggctgagg acgatgccac atactactgt cagcagtggc ctaaacaccc actcacatc	3060
ggcgttgga ctaaacctgga aataaaagcg gccgcaggtg gcggcggttc tggcggcg	3120
ggttctggcg gcggcggttc tctcgaggat ggtaatgaag aaatgggtgg tattacacag	3180
acaccatata aagtctccat ctctggaacc acagtaatat tgacatgcc tcagtatcct	3240

ggatctgaaa tactatggca acacaatgat aaaaacatag gcggtgatga ggatgataaa	3300
aacataggca gtgatgagga tcacctgtca ctgaaggaa tttcagaatt ggagcaaagt	3360
ggttattatg tctgttacct cagaggaagc aaaccagaag atgcgaactt ttatctctac	3420
ctgagggcaa gagtgtgtga gaactgcatg gagatggatg tgatgtcggg gccacaatt	3480
gtcatagtgg acatctgcat cactgggggc ttgtctgtgc tggtttacta ctggagcaag	3540
aatagaaagg ccaaggccaa gcctgtgaca cgaggagcgg gtgctggcgg caggcaaagg	3600
ggacaaaaca aggagaggcc accacctgtt cccaaccag actatgagcc catccgaaa	3660
ggccagcggg acctgtattc tggcctgaat cagagacgca tctgataaga attcgatccg	3720
cggccgcgaa ggatctgcga tcgctccggg gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc	3780
acagtccccg agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa cgggtgccta gagaagggtg	3840
cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gcctttttcc cgagggtggg	3900
ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc ttttcgcaa cgggtttgcc	3960
gccagaacac agctgaagct tcgaggggct cgcattcttc cttcacgcgc ccgccgccct	4020
acctgaggcc gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc cgcctccgc ctgtggtgcc	4080
tcctgaactg cgtccgccgt ctaggtaagt ttaaagctca ggtcgagacc gggcctttgt	4140
ccggcgctcc cttggagcct acctagactc agccggctct ccacgctttg cctgacctg	4200
cttgcctaac tctacgtctt tgtttcgtt tctgttctgc gccgttacag atccaagctg	4260
tgaccggcgc ctacgtaga tgaccgagta caagcccacg gtgcgcctcg ccacccgcga	4320
cgacgtcccc agggccgtac gcacctcgc cggcgcttc gccactacc ccgccacgcg	4380
ccacaccgtc gatccggacc gccacatcga gcgggtcacc gagctgcaag aactcttct	4440
cacgcgcgtc gggctcgaca tcggcaagggt gtgggtcgcg gacgacggcg ccgcggtggc	4500
ggtctggacc acgccggaga gcgtcgaagc gggggcggtg ttcgccgaga tcggcccgcg	4560
catggccgag ttgagcgggt cccggctggc cgcgcagcaa cagatggaag gcctcctggc	4620
gccgcaccgg cccaaggagc ccgcgtgggt cctggccacc gtcggcgtct cggccgacca	4680
ccagggcaag ggtctgggca gcgccgtcgt gtcccccga gtggaggcgg ccgagcgcgc	4740

cggggtgccc gccttcctgg agacctccgc gccccgcaac ctccccctct acgagcggct	4800
cggtttcacc gtcaccgccg acgtcgaggt gcccgaagga ccgcgcacct ggtgcatgac	4860
ccgcaagccc ggtgcctgag tcgacaatca acctctggat tacaaaattt gtgaaagatt	4920
gactgggtatt cttaactatg ttgctccttt tacgctatgt ggatacgtg ctttaatgcc	4980
tttgtatcat gctattgctt cccgtatggc ttctatttc tctccttgt ataaatcctg	5040
gttgctgtct ctttatgagg agttgtggcc cgttgtcagg caacgtggcg tgggtgacac	5100
tgtgtttgct gacgcaacct ccactggttg gggcattgcc accacctgtc agctccttc	5160
cgggactttc gctttccccc tccctattgc cacggcggaa ctcatcgccg cctgccttgc	5220
ccgtctgtgg acaggggctc ggctgttggg cactgacaat tccgtgggtg tgtcggggaa	5280
atcatcgtec ttcccttggc tgcctgcctg tgttgccacc tggattctgc gcgggacgtc	5340
cttctgtac gtcccttcgg cctcaatcc agcggacctt cctcccgcg gcctgctgcc	5400
ggctctgcgg cctcttcgc gtcttcgct tcgccctcag acgagtcgga tctcccttg	5460
ggccgcctcc ccgcctggta cctttaagac caatgacit caaggcagct gtagatctta	5520
gccacttttt aaaagaaaag gggggactgg aagggtctaat tctctccaa cgaaaataag	5580
atctgctttt tgcttgtaact gggctctctt ggttagacca gatctgagcc tgggagctct	5640
ctggctaact agggaaacca ctgcttaagc ctcaataaag ctgacctga gtgcttcaag	5700
tagtgtgtgc ccgtctgttg tgtgactctg gtaactagag atccctcaga ccttttagt	5760
cagtgtggaa aatctctagc agtagtagtt catgtcatct tattattcag tatttataac	5820
ttgcaaagaa atgaatatca gagagtgaga ggaacttggt tattgcagct tataatggtt	5880
acaaataaag caatagcatc acaaatttca caaataaagc attttttca ctgcattcta	5940
gttgtggttt gtccaaactc atcaatgtat ctatcatgt ctggctctag ctatcccgc	6000
cctaactccg ccagttccg cccattctcc gcccctggc tgactaattt tttttatita	6060
tgcagaggcc gagggcgct cgccctctga gtattccag aagtagtgag gaggttttt	6120
tggaggccta gacttttgca gagacggccc aaattcgtaa tcatggtcac agctgtttcc	6180
tgtgtgaaat tgttatccgc tcacaattcc acacaacata cgagccggaa gcataaagt	6240

taaagcctgg ggtgcctaata gagtgaagcta actcacatta attgcgtttgc gctcactgcc	6300
cgctttccag tgggaaacc tgcgtgccca gctgcattaa tgaatcggcc aacgcgcggg	6360
gagaggcggg ttgcgtattg ggcgcctctc cgcttccctc ctcactgact cgctgcgctc	6420
ggtcgttcgg ctgcggcgag cgggtatcagc tactcaaag gcggtataac ggttatccac	6480
agaatcaggg gataacgcag gaaagaacat gtgagcaaaa ggccagcaaa aggccaggaa	6540
ccgtaaaaag gccgcgtttgc tggcgttttt ccataggctc cccccctg acgagcatca	6600
caaaaatcga cgctcaagtc agaggctggcg aaacccgaca ggactataaa gataccaggc	6660
gtttccccc tgaagctccc tgcgtgcctc tctgtttccg accctgccgc ttaccggata	6720
cctgtccgcc ttttccctt cgggaagcgt ggcgctttct catagctcac gctgtaggta	6780
tctcagttcg gtgtaggctc ttcgtccaa gctgggctgt gtgcacgaac cccccgtca	6840
gcccgaccgc tgcgccttat ccggtacta tgccttgag tccaaccgg taagacacga	6900
cttatcgcca ctggcagcag ccactggtaa caggattagc agagcgaggc atgtaggcgg	6960
tgctacagag ttcttgaagt ggtggcctaa ctacggctac actagaagga cagtatttgg	7020
tatctgcgt ctgctgaagc cagttacctt cggaaaaaga gttggtagct cttgatccgg	7080
caaacaaacc accgctggta gcggtggttt ttttgtttgc aagcagcaga ttacgcgcag	7140
aaaaaaagga tctcaagaag atcctttgat cttttctacg gggcttgacg ctcaagtggaa	7200
cgaaaactca cgttaaggga ttttggctat gagattatca aaaaggatct tcacctagat	7260
ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc	7320
tgacagttac caatgcttaa tcagtgggc acctatctca gcgatctgtc tatttcgttc	7380
atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc	7440
tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga ccacgcctca ccgctccag atttatcagc	7500
aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt taccgcctc	7560
catccagtct attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatatgtt	7620
gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgtcgtcgt ttggtatggc	7680
ttcattcagc tccggtccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa	7740

aaaagcggtt agctcccttcg gtcctccgat cgttgtcaga agtaagttag ccgcagtgtt	7800
atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg	7860
cttttctgtg actgggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc	7920
gagttgctct tgcgcggcgt caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa	7980
agtgtcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgtgtt	8040
gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt	8100
caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa aggggaataag	8160
ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact ctcccttttt caatattatt gaagcattta	8220
tcagggttat tgtctcatga gcggatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat	8280
aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat	8340
catgacatta acctataaaa ataggcgtat caccgaggccc ttctgtctcg cgcgtttcgg	8400
tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gtcctccggag acggtcacag cttgtctgta	8460
agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca gggcgcgctca gcgggtgttg gcgggtgtcg	8520
gggctggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg	8580
tgaaataccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac aggcgccatt cgccattcag	8640
gctgcgcaac tgttgggaag ggcgatcggg gcggggcctct tcgtattac gccagctggc	8700
gaaaggggga tgtgtctgca ggcgattaag ttgggtaacg ccagggtttt ccagtcacg	8760
acgttgtaaa acgacggcca gtgccaagct g	8791

<210> 15
<211> 622
<212> PRT
<213> 智人

<400> 15															
Met	Ala	Leu	Pro	Thr	Ala	Arg	Pro	Leu	Leu	Gly	Ser	Cys	Gly	Thr	Pro
1				5					10					15	
Ala	Leu	Gly	Ser	Leu	Leu	Phe	Leu	Leu	Phe	Ser	Leu	Gly	Trp	Val	Gln
			20					25					30		

Pro Ser Arg Thr Leu Ala Gly Glu Thr Gly Gln Glu Ala Ala Pro Leu
35 40 45

Asp Gly Val Leu Ala Asn Pro Pro Asn Ile Ser Ser Leu Ser Pro Arg
50 55 60

Gln Leu Leu Gly Phe Pro Cys Ala Glu Val Ser Gly Leu Ser Thr Glu
65 70 75 80

Arg Val Arg Glu Leu Ala Val Ala Leu Ala Gln Lys Asn Val Lys Leu
85 90 95

Ser Thr Glu Gln Leu Arg Cys Leu Ala His Arg Leu Ser Glu Pro Pro
100 105 110

Glu Asp Leu Asp Ala Leu Pro Leu Asp Leu Leu Leu Phe Leu Asn Pro
115 120 125

Asp Ala Phe Ser Gly Pro Gln Ala Cys Thr Arg Phe Phe Ser Arg Ile
130 135 140

Thr Lys Ala Asn Val Asp Leu Leu Pro Arg Gly Ala Pro Glu Arg Gln
145 150 155 160

Arg Leu Leu Pro Ala Ala Leu Ala Cys Trp Gly Val Arg Gly Ser Leu
165 170 175

Leu Ser Glu Ala Asp Val Arg Ala Leu Gly Gly Leu Ala Cys Asp Leu
180 185 190

Pro Gly Arg Phe Val Ala Glu Ser Ala Glu Val Leu Leu Pro Arg Leu
195 200 205

Val Ser Cys Pro Gly Pro Leu Asp Gln Asp Gln Gln Glu Ala Ala Arg
210 215 220

Ala	Ala	Leu	Gln	Gly	Gly	Gly	Pro	Pro	Tyr	Gly	Pro	Pro	Ser	Thr	Trp
225					230					235					240
Ser	Val	Ser	Thr	Met	Asp	Ala	Leu	Arg	Gly	Leu	Leu	Pro	Val	Leu	Gly
			245						250					255	
Gln	Pro	Ile	Ile	Arg	Ser	Ile	Pro	Gln	Gly	Ile	Val	Ala	Ala	Trp	Arg
		260						265						270	
Gln	Arg	Ser	Ser	Arg	Asp	Pro	Ser	Trp	Arg	Gln	Pro	Glu	Arg	Thr	Ile
		275						280					285		
Leu	Arg	Pro	Arg	Phe	Arg	Arg	Glu	Val	Glu	Lys	Thr	Ala	Cys	Pro	Ser
		290					295					300			
Gly	Lys	Lys	Ala	Arg	Glu	Ile	Asp	Glu	Ser	Leu	Ile	Phe	Tyr	Lys	Lys
305					310					315					320
Trp	Glu	Leu	Glu	Ala	Cys	Val	Asp	Ala	Ala	Leu	Leu	Ala	Thr	Gln	Met
				325						330				335	
Asp	Arg	Val	Asn	Ala	Ile	Pro	Phe	Thr	Tyr	Glu	Gln	Leu	Asp	Val	Leu
			340						345					350	
Lys	His	Lys	Leu	Asp	Glu	Leu	Tyr	Pro	Gln	Gly	Tyr	Pro	Glu	Ser	Val
		355						360					365		
Ile	Gln	His	Leu	Gly	Tyr	Leu	Phe	Leu	Lys	Met	Ser	Pro	Glu	Asp	Ile
	370						375					380			
Arg	Lys	Trp	Asn	Val	Thr	Ser	Leu	Glu	Thr	Leu	Lys	Ala	Leu	Leu	Glu
385						390					395				400
Val	Asn	Lys	Gly	His	Glu	Met	Ser	Pro	Gln	Val	Ala	Thr	Leu	Ile	Asp
			405							410				415	
Arg	Phe	Val	Lys	Gly	Arg	Gly	Gln	Leu	Asp	Lys	Asp	Thr	Leu	Asp	Thr
			420						425					430	

Leu Thr Ala Phe Tyr Pro Gly Tyr Leu Cys Ser Leu Ser Pro Glu Glu
435 440 445

Leu Ser Ser Val Pro Pro Ser Ser Ile Trp Ala Val Arg Pro Gln Asp
450 455 460

Leu Asp Thr Cys Asp Pro Arg Gln Leu Asp Val Leu Tyr Pro Lys Ala
465 470 475 480

Arg Leu Ala Phe Gln Asn Met Asn Gly Ser Glu Tyr Phe Val Lys Ile
485 490 495

Gln Ser Phe Leu Gly Gly Ala Pro Thr Glu Asp Leu Lys Ala Leu Ser
500 505 510

Gln Gln Asn Val Ser Met Asp Leu Ala Thr Phe Met Lys Leu Arg Thr
515 520 525

Asp Ala Val Leu Pro Leu Thr Val Ala Glu Val Gln Lys Leu Leu Gly
530 535 540

Pro His Val Glu Gly Leu Lys Ala Glu Glu Arg His Arg Pro Val Arg
545 550 555 560

Asp Trp Ile Leu Arg Gln Arg Gln Asp Asp Leu Asp Thr Leu Gly Leu
565 570 575

Gly Leu Gln Gly Gly Ile Pro Asn Gly Tyr Leu Val Leu Asp Leu Ser
580 585 590

Met Gln Glu Ala Leu Ser Gly Thr Pro Cys Leu Leu Gly Pro Gly Pro
595 600 605

Val Leu Thr Val Leu Ala Leu Leu Leu Ala Ser Thr Leu Ala
610 615 620

<210> 16
<211> 8791
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 16	
acgcgtgtag tcttatgcaa tactcttgta gtcttgcaac atggtaacga tgagttagca	60
acatgcctta caaggagaga aaaagcaccg tgcatgccga ttggtggaag taaggtagta	120
cgatcgtgcc ttattaggaa ggcaacagac gggctctgaca tggattggac gaaccactga	180
attgccgcat tgcagagata ttgtatttaa gtgcctagct cgatacaata aacgggtctc	240
tctggttaga ccagatctga gcctgggagc tctctggcta actagggaac ccactgctta	300
agcctcaata aagcttgccct tgagtgcctc aagtagtggtg tgcccgtctg ttgtgtgact	360
ctggtaacta gagatccctc agaccctttt agtcagtgtg gaaaatctct agcagtggcg	420
cccgaaacagg gacctgaaag cgaaagggaa accagagctc tctcgacgca ggactcggct	480
tgctgaagcg cgcacggcaa gaggcgaggg gcggcgactg gtgagtacgc caaaaatttt	540
gactagcggg ggctagaagg agagagatgg gtgcgagagc gtcagtatta agcgggggag	600
aattagatcg cgatgggaaa aaattcggtt aaggccaggg ggaagaaaa aatataaatt	660
aaaacatata gtatgggcaa gcagggagct agaacgattc gcagttaatc ctggcctgtt	720
agaaacatca gaaggtgta gacaaact gggacagcta caaccatccc ttcagacagg	780
atcagaagaa cttagatcat tatataatac agtagcaacc ctctattgtg tgcacaaag	840
gatagagata aaagacacca aggaagcttt agacaagata gaggaagagc aaaacaaaag	900
taagaccacc gcacagcaag cggccactga tcttcagacc tgaggaggga gatatgaggg	960
acaattggag aagtgaatta tataaatata aagtagtaaa aattgaacca ttaggagtag	1020
caccaccaa ggcaaagaga agagtgtgtc agagagaaaa aagagcagtg ggaataggag	1080
ctttgttcct tgggttcttg ggagcagcag gaagcactat gggcgcagcc tcaatgacgc	1140
tgacggtaca ggcagacaa ttattgtctg gtatagtga gcagcagaac aatttgctga	1200

gggctattga ggcgcaacag catctgttgc aactcacagt ctggggcatc aagcagctcc	1260
aggcaagaat cctggctgtg gaaagatacc taaaggatca acagctcctg gggatttggg	1320
gttgcctctgg aaaactcatt tgcaccactg ctgtgccttg gaatgctagt tggagtaata	1380
aatctcttga acagatttga atcacacgac ctggatggag tgggacagag aaattaacaa	1440
ttacacaagc ttaatacact ccttaattga agaatcgcaa aaccagcaag aaaagaatga	1500
acaagaatta ttggaattag ataaatgggc aagtttgttg aattggttta acataacaaa	1560
ttggctgttg tatataaaat tattcataat gatagtagga ggcttggtag gtttaagaat	1620
agtttttgct gtactttcta tagtgaatag agttaggcag ggatattcac cattatcgtt	1680
tcagaccac ctcccaaccc cgaggggacc cgacaggccc gaaggaatag aagaagaagg	1740
tggagagaga gacagagaca gatccattcg attagtgaac ggatctcgac ggtatcggtt	1800
aacttttaaa agaaaagggg ggattggggg gtacagtgcg ggggaaagaa tagtagacat	1860
aatagcaaca gacatacaaa ctaaagaatt acaaaaacaa attacaaaat tcaaaatttt	1920
atcgatacta gtattatgcc cagtacatga ccttatggga ctttctact tggcagtaca	1980
tctacgtatt agtcatcgct attaccatgg tgatgcggtt ttggcagtac atcaatgggc	2040
gtggatagcg gtttgactca cggggatttc caagtctcca cccattgac gtcaatggga	2100
gtttgttttg gcacaaaat caacgggact ttccaaaatg tcgtaacaac tccgccccat	2160
tgacycaaat gggcggtagg cgtgtacggt gggaggttta tataagcaga gctcgtttag	2220
tgaaccgtca gatcgcttg agacgccatc cacgctgttt tgacctccat agaagattct	2280
agagccgcc ccatgcttct cctggtgaca agccttctgc tctgtgagtt accacacca	2340
gcattctctc tgatcccaga cattcagcag gtccagctcc agcagtctgg ccctgaactc	2400
gaaaaacctg gcgctagcgt gaaaatttcc tglaaagcct ccggctactc ttttactggc	2460
tacacaatga attgggtgaa acagtctcac ggc aaatccc tcgaatggat cggactcatc	2520
acaccctaca atggcgctc ttcctacaac cagaaattcc ggggcaaggc aacactcact	2580
gtggacaaat catcctctac cgcctacatg gatctgctct ccctcacatc tgaggactcc	2640
gctgtctact tttgtgccg aggaggatac gacggacgag gattcgatta ctggggacag	2700

ggaacaactg tgaccgtgtc tagtggcggc ggagggagtg gaggcggagg atcttctggc	2760
gggggatccg atattgaact cacacagtct cccgctatca tgtctgcttc tcccggcgag	2820
aaagtgacta tgacttgctc tgcttcctct tctgtgtcct acatgcactg gtaccagcag	2880
aaatctggca catcccctaa acggtggatc tacgatacta gcaaactggc atccggcgtg	2940
cctgggcgat tctctggctc tggctctggc aactcttact ctctcacaat ctcatctgtc	3000
gaggctgagg acgatgccac atactactgt cagcagtggg ctaaacaccc actcacattc	3060
ggcgttgga ctaaactgga aataaaaagc gccgcaggtg gcggcggttc tggcggcggc	3120
ggttctgggt gcggcggttc tctcgaggat ggtaatgaag aaatgggtgg tattacacag	3180
acaccatata aagtctccat ctctggaacc acagtaatat tgacatgcc tcagtatcct	3240
ggatctgaaa tactatggca acacaatgat aaaaacatag gcggtgatga ggatgataaa	3300
aacataggca gtgatgagga tcacctgtca ctgaaggaa tttcagaatt ggagcaaagt	3360
ggttattatg tctgtaccc cagaggaagc aaaccagaag atgcgaactt ttatctctac	3420
ctgagggcaa gagtggtga gaactgcatg gagatggatg tgatgtcggg ggccacaatt	3480
gtcatagtgg acatctgcat cactgggggc ttgctgctgc tggtttacta ctggagcaag	3540
aatagaaagg ccaaggccaa gcctgtgaca cgaggagcgg gtgctggcgg caggcaaagg	3600
ggacaaaaca aggagaggcc accacctgtt cccaaccag actatgagcc catccgaaa	3660
ggccagcggg acctgtattc tggcctgaat cagagacgca tctgataaga attcgatccg	3720
cggccgcgaa ggatctgcga tcgtccggg gcccgtcagt gggcagagcg cacatcgccc	3780
acagtccccg agaagttggg gggaggggtc ggcaattgaa cgggtgccta gagaagggtg	3840
cgcggggtaa actgggaaag tgatgtcgtg tactggctcc gccittttcc cgagggtggg	3900
ggagaaccgt atataagtgc agtagtcgcc gtgaacgttc ttttcgcaa cgggtttgcc	3960
gccagaacac agctgaagct tcgaggggct cgcattcttc cttcacgcgc ccgccgcc	4020
acctgaggcc gccatccacg ccggttgagt cgcgttctgc cgcctccgc ctgtggtgcc	4080
tcctgaactg cgtccgccgt ctaggtaagt ttaaagctca ggtcgagacc gggcctttgt	4140
ccggcgctcc cttggagcct acctagactc agccggctct ccacgctttg cctgaccctg	4200

cttgc tcaac tctacgtctt tgtttcgttt tctgttctgc gccgttacag atccaagctg	4260
tgaccggcgc ctacgctaga tgaccgagta caagcccacg gtgcgcctcg ccaccgcga	4320
cgacgtcccc agggccgtac gcacctcgc cgcgcgttc gccgactacc ccgccacgcg	4380
ccacaccgtc gatccggacc gccacatcga gcgggtcacc gagctgcaag aactcttct	4440
cacgcgcgtc gggctcgaca tcggcaaggt gtgggtcgcg gacgacggcg ccgcggtggc	4500
ggtctggacc acgccggaga gcgtcgagc gggggcggtg ttcccgaga tcggcccgcg	4560
catggccgag ttgagcgtt cccggctggc cgcgcagcaa cagatggaag gcctcctggc	4620
gccgcaccgg cccaaggagc ccgcgtggtt cctggccacc gtcggcgtct cggccgacca	4680
ccagggcaag ggtctgggca gcgccgtcgt gctccccgga gtggaggcgg ccgagcgcgc	4740
cggggtgccc gccttcttg agacctccgc gccccgcaac ctccccctt acgagcggct	4800
cggcttcacc gtcaccgcc acgtcgaggt gccgaaggga ccgcgcacct ggtgcatgac	4860
ccgaagccc ggtgcctgag tcgacaatca acctctggat tacaaaattt gtgaaagatt	4920
gactggtatt cttaactatg ttgctccttt tacgctatgt ggatacgtg ctttaatgcc	4980
tttgtatcat gctattgctt cccgtatggc ttctatttc tctccttgt ataaatctg	5040
gttgctgtct ctttatgagg agttgtggcc cgttgtcagg caacgtggcg tgggtgac	5100
tgtgtttgct gacgcaaccc ccactggtg gggcattgcc accacctgtc agtcctttc	5160
cgggactttc gctttcccc tccctattgc cacggcggaa ctcatcgccg cctgccttgc	5220
ccgtgctgg acaggggctc ggctgttggg cactgacaat tccgtggtgt tgtcggggaa	5280
atcatcgcc tttccttggc tgctcgctg tgttgccacc tggattctgc gcgggacgtc	5340
cttctgtac gtcccttcgg cctcaatcc agcggacctt cctccccgcg gcctgctgcc	5400
ggctctgcgg cctcttcgc gtcttcgcct tcgccctcag acgagtcgga tctcccttg	5460
ggccgcctcc ccgctggta cctttaagac caatgactta caaggcagct gtagatctta	5520
gccacttttt aaaagaaaag gggggactgg aagggctaatt tcactcccaa cgaaaataag	5580
atctgctttt tgcttgact gggctctctt ggttagacca gatctgagcc tgggagctct	5640
ctggctaact agggaacca ctgcttaagc ctcaataaag cttgccttga gtgcttcaag	5700

tagtgtgtgc ccgctctgtt	tgtgactctg gtaactagag	atccctcaga cccttttagt	5760
cagtgtggaa aatctctagc	agtagtagtt catgtcatct	tattattcag tatttataac	5820
ttgcaaagaa atgaatatca	gagagtgaga ggaacttggt	tattgcagct tataatgggt	5880
acaaataaag caatagcatc	acaaatttca caaataaagc	atTTTTTtca ctgcattcta	5940
gttgtgtgtt gtccaaactc	atcaatgtat ctatcatgt	ctggctctag ctatcccgcc	6000
cctaactccg ccagttccg	cccattctcc gccccatggc	tgactaattt tttttattta	6060
tgcaagggcc gagggcgct	cggcctctga gctattccag	aagtagtgag gaggcTTTT	6120
tggaggccta gacttttgca	gagacggccc aaattcgtaa	tcatggtcac agctgtttcc	6180
tgtgtgaaat tgttatccgc	tcacaattcc acacaacata	cgagccggaa gcataaagt	6240
taaagcctgg ggtgccta	aat gagtgagcta actcacatta	attgcgttgc gctcactgcc	6300
cgctttccag tcgggaaacc	tgtcgtgccg gctgcattaa	tgaatcggcc aacgcgcggg	6360
gagaggcgggt ttgcgtattg	ggcgcctctc cgcttctctg	ctcactgact cgctgcgctc	6420
ggtcgttcgg ctgcggcgag	cggtatcagc tcaactcaaa	gcggtataac ggttatccac	6480
agaatcaggg gataacgcag	gaaagaacat gtgagcaaaa	ggccagcaaa aggccaggaa	6540
ccgtaaaaag gccgcgttgc	tggcgTTTTT ccataggctc	cgccccctg acgagcatca	6600
caaaaatcga cgctcaagtc	agagggtggcg aaacccgaca	ggactataaa gataccaggc	6660
gtttccccct ggaagctccc	tcgtgcgctc tctgttccg	accctgccgc ttaccggata	6720
cctgtccgcc tttctccctt	cgggaagcgt ggcgcTTTT	catagctcac gctgtaggta	6780
tctcagttcg gtgtaggtcg	ttcgtccaa gctgggctgt	gtgcacgaac cccccgttca	6840
gcccgaccgc tgcgccttat	ccggttaacta tcgtcttgag	tccaacccgg taagacacga	6900
cttatcgcca ctggcagcag	ccactggtaa caggattagc	agagcgaggt atgtaggcgg	6960
tgctacagag ttcttgaagt	ggtggcctaa ctacggctac	actagaagga cagtatttgg	7020
tatctgcgct ctgctgaagc	cagttacctt cggaaaaaga	gttggtagct cttgatccgg	7080
caaacaaacc accgctggta	gcggtggttt ttttgtttgc	aagcagcaga ttacgcgcag	7140
aaaaaaagga tctcaagaag	atcctttgat cttttctacg	gggtctgacg ctcagtgga	7200

cgaaaactca cgtaaaggga ttttggtcac gagattatca aaaaggatct tcacctagat	7260
ccttttaaat taaaaatgaa gttttaaatc aatctaaagt atatatgagt aaacttggtc	7320
tgacagttac caatgcttaa tcagtgaggc acctatctca gcgactctgc tatttcgttc	7380
atccatagtt gcctgactcc ccgtcgtgta gataactacg atacgggagg gcttaccatc	7440
tggccccagt gctgcaatga taccgcgaga cccacgctca ccggctccag atttatcagc	7500
aataaaccag ccagccggaa gggccgagcg cagaagtggc cctgcaactt tatccgcctc	7560
catccagtct attaatgtt gccgggaagc tagagtaagt agttcgccag ttaatagttt	7620
gcgcaacgtt gttgccattg ctacaggcat cgtggtgtca cgctcgtcgt ttggtatggc	7680
ttcattcagc tccggtccc aacgatcaag gcgagttaca tgatcccca tgttgtgcaa	7740
aaaagcgtt agctccttcg gtccctccgat cgttgtcaga agtaagttag ccgcagtgtt	7800
atcactcatg gttatggcag cactgcataa ttctcttact gtcatgccat ccgtaagatg	7860
cTTTTctgtg actggtgagt actcaaccaa gtcattctga gaatagtgtg tgcggcgacc	7920
gagttgtctt tgccccgct caatacggga taataccgcg ccacatagca gaactttaaa	7980
agtgtcatc attggaaaac gttcttcggg gcgaaaactc tcaaggatct taccgtgtt	8040
gagatccagt tcgatgtaac ccactcgtgc acccaactga tcttcagcat cttttacttt	8100
caccagcgtt tctgggtgag caaaaacagg aaggcaaaat gccgcaaaaa agggaataag	8160
ggcgacacgg aaatgttgaa tactcatact ctcccttttt caatattatt gaagcattta	8220
tcagggttat tgtctcatga gcgatacat atttgaatgt atttagaaaa ataaacaaat	8280
aggggttccg cgcacatttc cccgaaaagt gccacctgac gtctaagaaa ccattattat	8340
catgacatta acctataaaa ataggcgtat cacgaggccc ttctgtctcg cgcgtttcgg	8400
tgatgacggt gaaaacctct gacacatgca gctcccggag acggtcacag cttgtctgta	8460
agcggatgcc gggagcagac aagcccgtca gggcgcgtca gcgggtgttg gcgggtgtcg	8520
gggctggctt aactatgcgg catcagagca gattgtactg agagtgcacc atatgcggtg	8580
tgaataaccg cacagatgcg taaggagaaa ataccgcac aggcgccatt cgccattcag	8640
gctgcgcaac tgttgggaag ggcgatcggc gcgggcctct tcgctattac gccagctggc	8700

gaaaggggga

tgtgctgcaa

ggcgattaag

ttgggtaacg

ccagggtttt

cccagtcacg

8760

acgttgtaaa

acgacggcca

gtgccaagct

g

8791

<210> 17

<211> 470

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 17

Met Leu Leu Leu Val Thr Ser Leu Leu Leu Cys Glu Leu Pro His Pro

1 5 10 15

Ala Phe Leu Leu Ile Pro Asp Ile Gln Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser

20 25 30

Gly Pro Glu Leu Glu Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys

35 40 45

Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Gly Tyr Thr Met Asn Trp Val Lys Gln

50 55 60

Ser His Gly Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly Leu Ile Thr Pro Tyr Asn

65 70 75 80

Gly Ala Ser Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr

85 90 95

Val Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Asp Leu Leu Ser Leu Thr

100 105 110

Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys Ala Arg Gly Gly Tyr Asp Gly

115 120 125

Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

130 135 140

111149290

表單編號 A0101

第28頁 · 共72頁(序列表)

1112070859-0

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

340 345 350

Leu Glu Gln Ser Gly Tyr Tyr Val Cys Tyr Pro Arg Gly Ser Lys Pro
355 360 365

Glu Asp Ala Asn Phe Tyr Leu Tyr Leu Arg Ala Arg Val Cys Glu Asn
370 375 380

Cys Met Glu Met Asp Val Met Ser Val Ala Thr Ile Val Ile Val Asp
385 390 395 400

Ile Cys Ile Thr Gly Gly Leu Leu Leu Leu Val Tyr Tyr Trp Ser Lys
405 410 415

Asn Arg Lys Ala Lys Ala Lys Pro Val Thr Arg Gly Ala Gly Ala Gly
420 425 430

Gly Arg Gln Arg Gly Gln Asn Lys Glu Arg Pro Pro Pro Val Pro Asn
435 440 445

Pro Asp Tyr Glu Pro Ile Arg Lys Gly Gln Arg Asp Leu Tyr Ser Gly
450 455 460

Leu Asn Gln Arg Arg Ile
465 470

<210> 18
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 18
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

202530

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
354045

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
505560

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65707580

Thr Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Phe Phe Cys Ser Gln Ser
859095

Thr His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100105110

<210> 19
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 19
gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta tttacattgg 120

tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgtatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga ctgatttcac actcaagatc 240

accagagtgg aggctgagga tctgggagtt tttttctgct ctcaaagtac acatgttcca 300

ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa 336

<210> 20
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 20
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Phe Asp Tyr
 20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Glu Ile Asp Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

Thr Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21
<211> 359
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 21
caggttcaac tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60

tcttgcaagg cttcgggcta cacatttttt gactatgaaa tgcactgggt gaagcagaca 120

cctgtgcatg gcctggaatg gattggagct attgatcctg aaattgatgg tactgcctac 180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtac agattactac 300

ggtagtagct actggtactt cgatgtctgg ggcacaggga ccacggtcac cgtctcctc 359

<210> 22

<211> 112

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 22

Asp Val Met Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly

1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser

20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Phe Cys Ser Gln Thr

85 90 95

Thr His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys

100 105 110

<210> 23

<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 23
gatgttatga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagccttgta cacagtaatg gaaacaccta ttacattgg 120

ttctctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaactac acatgttccg 300

ctcacgttcg gtgctggggac caagctggag ctgaaa 336

<210> 24
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 24
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Glu Ile Ala Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Ser Arg Tyr Gly Gly Asn Tyr Leu Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 25
<211> 360
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 25
caggttcaac tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60

tcctgcaagg cttcgggcta cacttttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagaca 120

cctgtccatg gcctggaatg gattggagct attgatcctg aaattgctgg tactgcctac 180

aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgttc aagatacggc 300

ggtaactacc ttactacttt tgactactgg ggccaaggca ccactctcac agtctcctca 360

<210> 26
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 26
Asp Val Leu Met Thr Gln Ile Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Asn Ile Val Tyr Ser
20 25 30

Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 27
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 27
gatgttttga tgacccaaat tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaga tcaagcctcc 60

atctctttgca gatctagtca gaacattgtg tatagtaatg gaaacaccta tttagagtgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctgggggcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaagggtc acatgttcca 300

ttcacgttcg gctcggggac aaagttggaa ataaaa 336

<210> 28
<211> 118

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 28
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Ala Ile Asp Pro Glu Ile Gly Gly Ser Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Gly Tyr Asp Gly Tyr Phe Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 29
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 29

caggttcaac tgcagcagtc cggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60

tcctgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaagcagaca 120

cctgtgcatg gcctggaatg gattggagct attgatcctg aaattggtgg ttctgcctac 180

aatcagaagt tcaagggcag ggccatattg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attattgtac gggctatgat 300

ggttactttt ggtttgctta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc ttca 354

<210> 30
<211> 106
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 30
Glu Asn Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Ser Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 31
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 31
gaaaaatgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtccgcat ctccagggga aaaggtcacc 60

atgacctgca gtgctagctc aagtgttaagt tacatgcact ggtaccagca gaagtcaagc 120

acctccccc aactctggat ttatgacaca tccaaactgg ctctctggagt cccaggtcgc 180

ttcagtgcca gtgggtcttg aaactcttac tctctcacga tcagcagcat ggaggctgaa 240

gatgttgcca cttattactg ttttcagggg agtgggtacc cactcacgtt cggctcgggg 300

acaaagttgg aaataaaa 318

<210> 32
<211> 116
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 32
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Gly Ile Asp Pro Glu Thr Gly Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Ser Tyr Tyr Gly Ser Arg Val Phe Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 348
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 33
caggttcaac tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg 60

tcttgcaagg cttcgggcta cacatttact gactatgaaa tgcactgggt gaaacagaca 120

cctgtgcatg gcctggaatg gattggaggt attgatcctg aaactggtgg tactgcctac 180

aatcagaagt tcaagggtaa ggccatactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtac aagttactat 300

ggtagtagag tcttctgggg cacagggacc acggtcaccg tctcctca 348

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

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 34
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Ala Phe Pro Gly

1	5	10	15
Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met	20	25	30
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr	35	40	45
Ala Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser	50	55	60
Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Val Glu Ala Glu	65	70	75
			80
Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr	85	90	95
Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys	100	105	
<210> 35			
<211> 324			
<212> DNA			
<213> 人工序列			
<220>			
<221> 來源			
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"			
<400> 35			
caaattgttc tctccagtc tccagcaatc ctgtctgcat ttccagggga gaaggtcact			60
atgacttgca gggccagctc aagtgtaaat tacatgcact ggtaccagca gaagccagga			120
tctccccca aacctggat ttatgccaca tccaacctgg ctcttgagat ccctgctgc			180
ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagcagtgt ggaggctgaa			240
gatgctgcca cttattactg ccagcagtgg agtagtaacc caccacgct cacgttcggt			300
gctgggacca agctggagct gaaa			324

<210> 36
<211> 124
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 36
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Arg Ser Gly Asn Thr Tyr Tyr Asn Glu Ser Phe
50 55 60

Lys Gly Lys Val Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Gly Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Gly Ser Tyr Gly Ser Pro Pro Phe Tyr Tyr Gly Met Asp
100 105 110

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 37
<211> 372
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 37
caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ctggggcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca agctatggta taagctgggt gaagcagagg 120

actggacagg gccttgagtg gattggagag atttacccta gaagtggtaa tacttactac 180

aatgagagct tcaaggggcaa ggtcacactg accgcagaca aatcttccgg cacagcgtac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagatggggc 300

tcctacggta gtccccctt ttactatggg atggactact ggggtcaagg aacctcagtc 360

accgtctcct ca 372

<210> 38
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 38
Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

Asn Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser
20 25 30

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

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
85 90 95

Ser His Val Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 39
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 39
gatgttttga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttggaaa tcaagcctcc 60

atctcttgca gatctagtca gagcattgta catagtagtg gaagcaccta tttagaatgg 120

tacctgcaga aaccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt 180

tctgggggcc cagacaggtt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc 240

agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tattactgct ttcaaggctc acatgttcca 300

tacacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaa 336

<210> 40
<211> 123
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 40
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Thr
1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Ile Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

Gly Glu Ile His Pro Arg Ser Gly Asn Ser Tyr Tyr Asn Glu Lys Ile
50 55 60

Arg Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Ile Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Leu Ile Thr Thr Val Val Ala Asn Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 41
<211> 369
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 41
caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ctgggacttc agtgaaggtg 60

tcctgcaagg cttctggcta taccttcaca agttatggta taagctgggt gaagcagaga 120

attggacagg gccttgagtg gattggagag attcatccta gaagtggtaa tagttactat 180

aatgagaaga tcaggggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcgtac 240

atggagctcc gcagcctgat atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aaggctgatt 300

actacggtag ttgctaatta ctatgctatg gactactggg gtcaaggaac ctcagtcacc 360

gtctcctca 369

<210> 42
<211> 112
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 42
Asp Ile Val Met Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Ala Gly
1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser
 20 25 30

Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln
 35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

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

Ser Tyr Asn Leu Val Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 43
<211> 336
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 43
gacattgtga tgtcacagtc tccatcctcc ctggctgtgt cagcaggaga gaaggtcact 60

atgagctgca aatccagtcg gagtctgctc aacagtagaa cccgaaagaa ctacttgget 120

tggtaaccagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tctactgggc atccactagg 180

gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240

atcagcagtg tgcaggctga agacctggca gtttattact gcaaacaatc ttataatctg300

gtcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa336

<210> 44

<211> 120

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 44

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala

151015

Ser Val Thr Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Phe Asp Tyr

202530

Glu Met His Trp Val Lys Gln Thr Pro Val His Gly Leu Glu Trp Ile

354045

Gly Ala Ile Asp Pro Glu Ile Asp Gly Thr Ala Tyr Asn Gln Lys Phe

505560

Lys Gly Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr

65707580

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

859095

Thr Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Tyr Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Thr

100105110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser

115120

<210> 45

<211> 359

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 45

caggttcaac tgcagcagtc tggggctgag ctggtgaggc ctggggcttc agtgacgctg	60
tcctgcaagg cttcgggcta cacatttttt gactatgaaa tgcactgggt gaagcagaca	120
cctgtgcatg gcctggaatg gattggagct attgatcctg aaattgatgg tactgcctac	180
aatcagaagt tcaagggcaa ggccatactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac	240
atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgccgtct attactgtac agattactac	300
ggtagtagct actggtactt cgatgtctgg ggcacaggga ccacggtcac cgtctcctc	359

<210> 46

<211> 106

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 46

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

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr His Ser Tyr Pro Leu Thr
85 90 95

Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 47
<211> 318
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 47
caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctccagggga gaaggtcacc 60

atatcctgca gtgccagctc aagtgtaatg tacatgtact ggtaccagca gaagccagga 120

tcctccccc aacctggat ttatgcaca tccaacctgg ctcttgagat ccctgctcgc 180

ttcagtggca gtgggtctgg gacctcttac tctctcaca tcagcagcat ggaggctgaa 240

gatgctgcca cttattactg ccagcagtat catagttacc cactcacgtt cggtgctggg 300

accaagctgg agctgaaa 318

<210> 48
<211> 109
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 48
Gln Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ile Met Ser Ala Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Ser Ser
20 25 30

Tyr Leu Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Ser Ser Pro Lys Leu Trp
35 40 45

Ile Tyr Ser Ile Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser
50 55 60

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Asn Ser Met Glu
65 70 75 80

Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro
85 90 95

Gln Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105

<210> 49
<211> 327
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 49
caaattgttc tcaccagtc tccagcaatc atgtctgcat ctctgggga acgggtcacc 60

atgacctgca gtgccagctc aagtgttaagt tccagctact tgtactggta ccagcagaag 120

tcaggatcct ccccaaaact ctggatttat agcatatcca acctggcttc tggagtccca 180

gctcgcttca gtggcagtgg gtctgggacc tcttactctc tcacaatcaa cagcatggag 240

gctgaagatg ctgccactta ttactgccag cagtggagta gtaaccaca gtcacgttc 300

ggtgctggga ccaagctgga gctgaaa 327

<210> 50
<211> 363
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源

<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 50
caggtcacgc tgaagcagtc tggagctgag ctggtgaagc ctggggcttc agtgaagata 60

tcctgcaagg cttctggcta caccctcact gactactata taaactgggt gaagcagagg 120

cctggacagg gccttgagtg gattggaaag attggtcctg gaagtggtag tacttactac 180

aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcctac 240

atgcagctca gcagcctgac atctgaggac tctgcagtct atttctgtgc aagaactggt 300

tactacgttg gttactatgc tatggactac tggggtcaag gaacctcagt caccgtctcc 360

tca 363

<210> 51
<211> 118
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 51
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ile Tyr
20 25 30

Gly Ile Ser Trp Val Lys Gln Arg Thr Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

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

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Glu Leu Arg Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ala Arg Trp Tyr Ser Phe Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 52
<211> 354
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 52
caggttcagc tgcagcagtc tggagctgag ctggcgaggc ctggggcttc agtgaagctg 60

tcctgcaagg cttctggcta caccttcaca atctatggta taagctgggt gaaacagaga 120

actggacagg gccttgagtg gattggagag atttattccta gaagtgataa tacttactac 180

aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgcagaca aatcctccag cacagcgtac 240

atggagctcc gcagcctgac atctgaggac tctgcggtct atttctgtgc aagatggtac 300

tcgttctatg ctatggacta ctgggggtcaa ggaacctcag tcaccgtctc ctca 354

<210> 53
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成肽"

<400> 53
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 54
<211> 30
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註記="人工序列之描述：合成寡核苷酸"

<400> 54

ggtggcggag gttctggagg tggaggttcc 30

<210> 55

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<221> 來源

<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 55

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Phe Ser Ile Arg
20 25 30

Ala Met Arg Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Thr Glu Arg Asp Leu Val
35 40 45

Ala Val Ile Tyr Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ala Val Lys Gly
50 55 60

Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
65 70 75 80

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Asn Ala
85 90 95

Asp Thr Ile Gly Thr Ala Arg Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
100 105 110

Thr Val Ser Ser
115

<210> 56
<211> 121
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 56
Gln Val Gln Leu Lys Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30

Tyr Ile Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45

Gly Lys Ile Gly Pro Gly Ser Gly Ser Thr Tyr Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys
 85 90 95

Ala Arg Thr Gly Tyr Tyr Val Gly Tyr Tyr Ala Met Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 57
<211> 280
<212> PRT
<213> 智人

<400> 57

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

Ser Ser Pro Arg Pro Gln Pro Arg Asp Arg Arg Trp Gly Asp Thr Pro
210 215 220

Pro Gly Arg Lys Pro Gly Ser Pro Val Trp Gly Glu Gly Ser Tyr Leu
225 230 235 240

Ser Ser Tyr Pro Thr Cys Pro Ala Gln Ala Trp Cys Ser Arg Ser Ala
245 250 255

Leu Arg Ala Pro Ser Ser Ser Leu Gly Ala Phe Phe Ala Gly Asp Leu
260 265 270

Pro Pro Pro Leu Gln Ala Gly Ala
275 280

<210> 58
<211> 111
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 58
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Gly Asp Trp Ser Ala Asn
20 25 30

Phe Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gln Arg Glu Leu Val
35 40 45

Ala Arg Ile Ser Gly Arg Gly Val Val Asp Tyr Val Glu Ser Val Lys
50 55 60

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Val Ala Ser Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 59
<211> 119
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<400> 59
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Ser Thr Ser Ser Ile Asn
20 25 30

Thr Met Tyr Trp Tyr Arg Gln Ala Pro Gly Lys Glu Arg Glu Leu Val
35 40 45

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

Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
65 70 75 80

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

Thr Tyr Ile Pro Tyr Gly Gly Thr Leu His Asp Phe Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 60
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成肽"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(20)
<223> /註記="此序列可能包含 1-4個 'Gly Gly Gly Gly Ser'重複單元"

<400> 60
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 61
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成肽"

<400> 61
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 62
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成肽"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(20)
<223> /註記="此序列可能包含 2-4個 'Gly Gly Gly Gly Ser'重複單元"

<400> 62
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 63
<211> 15
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成肽"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(15)
<223> /註記="此序列可能包含 1-3 個 'Gly Gly Gly Gly Ser'重複單元"

<400> 63
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10 15

<210> 64
<211> 4
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成肽"

<400> 64
Gly Gly Gly Ser
1

<210> 65
<211> 20

<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成肽"

<400> 65
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser
 20

<210> 66
<211> 5000
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(5000)
<223> /註記="此序列可能包含 50-5000 個核苷酸"

<220>
<221> 來源
<223> /註記="關於取代及較佳實施例之詳細描述，請參送件之說明書"

<400> 66	
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	120
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	180
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	240
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	300
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	360
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	420

aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	480
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	540
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	600
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	660
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	720
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	780
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	840
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	900
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	960
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1020
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1080
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1140
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1200
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1260
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1320
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1380
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1440
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1500
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1560
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1620
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1680
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1740
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1800
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1860
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1920

aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1980
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2040
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2100
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2160
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2220
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2280
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2340
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2400
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2460
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2520
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2580
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2640
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2700
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2760
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2820
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2880
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2940
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3000
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3060
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3120
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3180
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3240
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3300
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3360
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3420

aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3480
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3540
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3600
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3660
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3720
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3780
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3840
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3900
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3960
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4020
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4080
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4140
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4200
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4260
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4320
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4380
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4440
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4500
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4560
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4620
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4680
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4740
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4800
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4860
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4920

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa 4980

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa 5000

<210> 67
<211> 30
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成多肽"

<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (1)..(30)
<223> /註記="此序列可能包含 1-6 個 “Gly Gly Gly Gly Ser” 重複單元"

<220>
<221> 來源
<223> /註記="關於取代及較佳實施例之詳細描述，請參送件之說明書"

<400> 67
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly
1 5 10 15

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
20 25 30

<210> 68
<211> 100
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<400> 68
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 60

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt 100

<210> 69
<211> 5000

<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(5000)
<223> /註記="此序列可能包含 50-5000 個核苷酸"

<400> 69	
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	60
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	120
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	180
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	240
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	300
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	360
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	420
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	480
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	540
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	600
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	660
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	720
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	780
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	840
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	900
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	960
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1020
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	1080

tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1140
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1200
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1260
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1320
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1380
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1440
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1500
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1560
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1620
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1680
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1740
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1800
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1860
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1920
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	1980
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2040
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2100
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2160
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2220
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2280
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2340
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2400
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2460
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2520
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2580

tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2640
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2700
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2760
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2820
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2880
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	2940
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3000
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3060
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3120
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3180
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3240
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3300
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3360
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3420
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3480
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3540
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3600
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3660
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3720
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3780
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3840
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3900
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	3960
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4020
tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	tttttttttt	4080

tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4140
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4200
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4260
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4320
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4380
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4440
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4500
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4560
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4620
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4680
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4740
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4800
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4860
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4920
tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt tttttttttt	4980
tttttttttt tttttttttt	5000

<210> 70
<211> 5000
<212> DNA
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成聚核苷酸"

<220>
<221> misc_feature
<222> (1)..(5000)
<223> /註記="此序列可能包含 100-5000 個核苷酸"

<400> 70 aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	60
--	----

aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	120
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	180
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	240
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	300
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	360
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	420
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	480
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	540
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	600
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	660
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	720
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	780
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	840
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	900
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	960
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1020
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1080
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1140
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1200
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1260
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1320
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1380
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1440
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1500
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1560

aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1620
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1680
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1740
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1800
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1860
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1920
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	1980
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2040
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2100
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2160
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2220
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2280
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2340
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2400
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2460
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2520
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2580
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2640
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2700
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2760
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2820
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2880
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	2940
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3000
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3060

aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3120
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3180
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3240
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3300
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3360
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3420
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3480
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3540
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3600
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3660
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3720
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3780
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3840
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3900
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	3960
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4020
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4080
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4140
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4200
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4260
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4320
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4380
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4440
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4500
aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	aaaaaaaa	4560

aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4620
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4680
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4740
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4800
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4860
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4920
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa aaaaaaaaaa	4980
aaaaaaaaa aaaaaaaaaa	5000

<210> 71
<211> 5
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成肽"

<400> 71
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<221> 來源
<223> /註記="人工序列之描述：合成肽"

<400> 72
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之經分離重組核酸分子，
該TFP包含

- (a) TCR亞單元，其包含
 - (i) TCR細胞外域之至少一部分，及
 - (ii) TCR細胞內域，其包含CD3 ϵ 之細胞內信號傳導域之刺激域；及
 - (b) 人類或人類化抗體域，其包含抗間皮素結合域之抗原結合域；
- 其中該TCR亞單元及該抗體域係可操作地連接，且
其中該TFP在T細胞中表現時納入TCR中。

【請求項2】

一種編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之經分離重組核酸分子，
該TFP包含

- (a) TCR亞單元，其包含
 - (i) TCR細胞外域之至少一部分，及
 - (ii) TCR細胞內域，其包含CD3 ϵ 之細胞內信號傳導域之刺激域；及
 - (b) 人類或人類化抗體域，其包含抗間皮素結合域之抗原結合域；
- 其中該TCR亞單元及該抗體域係可操作地連接，且
其中該TFP在T細胞中表現時納入TCR中。

【請求項3】

一種編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之經分離重組核酸分子，
該TFP包含

- (a) TCR亞單元，其包含

- (i) TCR細胞外域之至少一部分，及
 - (ii) TCR細胞內域，其包含CD3 γ 之細胞內信號傳導域之刺激域；及
 - (b) 人類或人類化抗體域，其包含抗間皮素結合域之抗原結合域；
- 其中該TCR亞單元及該抗體域係可操作地連接，且
其中該TFP在T細胞中表現時納入TCR中。

【請求項4】

一種編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之經分離重組核酸分子，
該TFP包含

- (a) TCR亞單元，其包含
 - (i) TCR細胞外域之至少一部分，及
 - (ii) TCR細胞內域，其包含CD3 δ 之細胞內信號傳導域之刺激域；及
 - (b) 人類或人類化抗體域，其包含抗間皮素結合域之抗原結合域；
- 其中該TCR亞單元及該抗體域係可操作地連接，且
其中該TFP在T細胞中表現時納入TCR中。

【請求項5】

一種編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之經分離重組核酸分子，
該TFP包含

- (a) TCR亞單元，其包含
 - (i) TCR細胞外域之至少一部分，及
 - (ii) TCR細胞內域，其包含TCR α 之細胞內信號傳導域之刺激域；及
 - (b) 人類或人類化抗體域，其包含抗間皮素結合域之抗原結合域；
- 其中該TCR亞單元及該抗體域係可操作地連接，且
其中該TFP在T細胞中表現時納入TCR中。

【請求項6】

一種編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之經分離重組核酸分子，
該TFP包含

(a) TCR亞單元，其包含

(i) TCR細胞外域之至少一部分，及

(ii) TCR細胞內域，其包含TCR β 之細胞內信號傳導域之刺激域；及

(b) 人類或人類化抗體域，其包含抗間皮素結合域之抗原結合域；

其中該TCR亞單元及該抗體域係可操作地連接，且

其中該TFP在T細胞中表現時納入TCR中。

【請求項7】

一種編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之經分離重組核酸分子，
該TFP包含TCR亞單元及包含抗間皮素結合域之抗原結合域之人類或人類
化抗體域。

【請求項8】

如請求項7之經分離核酸分子，其中該TCR亞單元及該抗體域係可操
作地連接。

【請求項9】

如請求項7或8之經分離核酸分子，其中該TFP在T細胞中表現時納入
TCR中。

【請求項10】

如請求項1至9中任一項之經分離核酸分子，其中該編碼之抗原結合
域係藉由連接體序列連接至該TCR細胞外域。

【請求項11】

如請求項10之經分離核酸分子，其中該編碼之連接體序列包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=1$ 至4。

【請求項12】

如請求項1至11中任一項之經分離核酸分子，其中該TCR亞單元包含TCR細胞外域。

【請求項13】

如請求項1至12中任一項之經分離核酸分子，其中該TCR亞單元包含TCR跨膜域。

【請求項14】

如請求項1至13中任一項之經分離核酸分子，其中該TCR亞單元包含TCR細胞內域。

【請求項15】

如請求項1至14中任一項之經分離核酸分子，其中該TCR亞單元包含(i) TCR細胞外域、(ii) TCR跨膜域及(iii) TCR細胞內域，其中(i)、(ii)及(iii)中之至少兩者來自同一TCR亞單元。

【請求項16】

如請求項1至15中任一項之經分離核酸分子，其中該TCR亞單元包含TCR細胞內域，該TCR細胞內域包含選自以下之刺激域：CD3 ϵ 、CD3 γ 或CD3 δ 之細胞內信號傳導域或其中具有至少一個修飾之胺基酸序列。

【請求項17】

如請求項1至16中任一項之經分離核酸分子，其中該TCR亞單元包含細胞內域，該細胞內域包含選自以下之刺激域：4-1BB之功能信號傳導域及/或CD3 ζ 之功能信號傳導域或其中具有至少一個修飾之胺基酸序列。

【請求項18】

如請求項1至17中任一項之經分離核酸分子，其中該人類或人類化抗體域包含抗體片段。

【請求項19】

如請求項1至18中任一項之經分離核酸分子，其中該人類或人類化抗體域包含scFv或V_H域。

【請求項20】

如請求項1至19中任一項之經分離核酸分子，其中該人類或人類化抗體域包含sdAb或V_{HH}域。

【請求項21】

如請求項1至20中任一項之經分離核酸分子，其編碼(i)抗間皮素輕鏈結合域胺基酸序列之輕鏈(LC) CDR1、LC CDR2及LC CDR3，分別與本文所提供抗間皮素輕鏈結合域之輕鏈(LC) CDR1、LC CDR2及LC CDR3具有70%至100%序列一致性，及/或(ii)抗間皮素重鏈結合域胺基酸序列之重鏈(HC) CDR1、HC CDR2及HC CDR3，分別與本文所提供抗間皮素重鏈結合域之重鏈(HC) CDR1、HC CDR2及HC CDR3具有70%至100%序列一致性。

【請求項22】

如請求項1至21中任一項之經分離核酸分子，其編碼輕鏈可變區，其中該輕鏈可變區包含具有本文所提供輕鏈可變區之輕鏈可變區胺基酸序列之至少一個但不超過30個修飾之胺基酸序列，或與本文所提供輕鏈可變區之輕鏈可變區胺基酸序列具有95%至99%一致性之序列。

【請求項23】

如請求項1至22中任一項之經分離核酸分子，其編碼重鏈可變區，其中該重鏈可變區包含具有本文所提供重鏈可變區之重鏈可變區胺基酸序列之至少一個但不超過30個修飾之胺基酸序列，或與本文所提供重鏈可變區之重鏈可變區胺基酸序列具有95%至99%一致性之序列。

【請求項24】

如請求項1至23中任一項之經分離核酸分子，其編碼重鏈可變區，其中該重鏈可變區包含具有本文所提供重鏈可變區之重鏈可變區胺基酸序列之至少一個但不超過30個修飾之胺基酸序列，或與本文所提供V_{HH}區之單一域抗體胺基酸序列具有95%至99%一致性之序列。

【請求項25】

如請求項24之經分離核酸分子，其中該V_{HH}區之序列述於本文所提供之序列中。

【請求項26】

如請求項1至23中任一項之經分離核酸分子，其中該TFP包括TCR亞單元之細胞外域，該細胞外域包含選自由以下組成之群之蛋白質之細胞外域或其一部分：TCR α 鏈、TCR β 鏈、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元、CD3 δ TCR亞單元、其功能片段及其具有至少一個但不超過20個修飾之胺基酸序列。

【請求項27】

如請求項1至26中任一項之經分離核酸分子，其中所編碼TFP包括跨膜域，該跨膜域包含選自由以下組成之群之蛋白質之跨膜域：TCR α 鏈、TCR β 鏈、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元、CD3 δ TCR亞單元、其功能片段及其具有至少一個但不超過20個修飾之胺基酸序列。

【請求項28】

如請求項1至27中任一項之經分離核酸分子，其中所編碼TFP包括跨膜域，該跨膜域包含選自由以下組成之群之蛋白質之跨膜域：TCR α 鏈、TCR β 鏈、TCR ζ 鏈、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元、CD3 δ TCR亞單元、CD45、CD2、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD28、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137、CD154、其功能片段、及其具有至少一個但不超過20個修飾之胺基酸序列。

【請求項29】

如請求項1至28中任一項之經分離核酸分子，其進一步包含編碼共刺激域之序列。

【請求項30】

如請求項29之經分離核酸分子，其中該共刺激域係自選自由以下組成之群之蛋白質獲得之功能信號傳導域：DAP10、DAP12、CD30、LIGHT、OX40、CD2、CD27、CD28、CDS、ICAM-1、LFA-1 (CD11a/CD18)、ICOS (CD278)及4-1BB (CD137)及其具有至少一個但不超過20個修飾之胺基酸序列。

【請求項31】

如請求項1至30中任一項之經分離核酸分子，其中該至少一個但不超過20個修飾包含介導細胞信號傳導之胺基酸之修飾或因應配體結合至該TFP而磷酸化之胺基酸之修飾。

【請求項32】

如請求項1至31中任一項之經分離核酸分子，其中該經分離核酸分子

為mRNA。

【請求項33】

如請求項1至32中任一項之經分離核酸分子，其中該TFP包括TCR亞單元之基於免疫受體酪胺酸之活化基序(ITAM)，該ITAM包含選自由以下組成之群之蛋白質之ITAM或其一部分：CD3 ζ TCR亞單元、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元、CD3 δ TCR亞單元、TCR ζ 鏈、Fc ϵ 受體1鏈、Fc ϵ 受體2鏈、Fc γ 受體1鏈、Fc γ 受體2a鏈、Fc γ 受體2b1鏈、Fc γ 受體2b2鏈、Fc γ 受體3a鏈、Fc γ 受體3b鏈、Fc β 受體1鏈、TYROBP (DAP12)、CD5、CD16a、CD16b、CD22、CD23、CD32、CD64、CD79a、CD79b、CD89、CD278、CD66d、其功能片段及其具有至少一個但不超過20個修飾之胺基酸序列。

【請求項34】

如請求項33之經分離核酸分子，其中該ITAM置換CD3 γ 、CD3 δ 或CD3 ϵ 之ITAM。

【請求項35】

如請求項33之經分離核酸分子，其中該ITAM係選自由以下組成之群：CD3 ζ TCR亞單元、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元及CD3 δ TCR亞單元，且置換選自由以下組成之群之不同ITAM：CD3 ζ TCR亞單元、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元及CD3 δ TCR亞單元。

【請求項36】

如請求項1至35中任一項之經分離核酸分子，其中該核酸包含核苷酸類似物。

【請求項37】

如請求項36之經分離核酸分子，其中該核苷酸類似物選自由以下組成之群：2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-胺基丙基、2'-去氧、T-去氧-2'-氟、2'-O-胺基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基胺基乙基(2'-O-DMAOE)、2'-O-二甲基胺基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基胺基乙氧基乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙醯胺基(2'-O-NMA)修飾、鎖核酸(LNA)、乙烯核酸(ENA)、肽核酸(PNA)、1',5'-脫水己醣醇核酸(HNA)、嗎啉基、甲基磷酸酯核苷酸、硫醇磷酸酯核苷酸及2'-氟N3-P5'-亞磷醯胺(phosphoramidite)。

【請求項38】

如請求項1至37中任一項之經分離核酸分子，其進一步包含前導序列。

【請求項39】

如請求項1至38中任一項之經分離核酸分子，其中包含由該核酸編碼之抗間皮素結合域之抗原結合域之該人類或人類化抗體域、或包含該抗間皮素結合域之抗體、或表現由該核酸編碼之抗間皮素結合域之細胞具有親和力值至多約200 nM、100 nM、75 nM、50 nM、25 nM、20 nM、15 nM、14 nM、13 nM、12 nM、11 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM、0.09 nM、0.08 nM、0.07 nM、0.06 nM、0.05 nM、0.04 nM、0.03 nM、0.02 nM或0.01 nM；及/或至少約100 nM、75 nM、50 nM、25 nM、20 nM、15 nM、14 nM、13 nM、12 nM、11 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6

nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM、0.09 nM、0.08 nM、0.07 nM、0.06 nM、0.05 nM、0.04 nM、0.03 nM、0.02 nM或0.01 nM；及/或約200 nM、100 nM、75 nM、50 nM、25 nM、20 nM、15 nM、14 nM、13 nM、12 nM、11 nM、10 nM、9 nM、8 nM、7 nM、6 nM、5 nM、4 nM、3 nM、2 nM、1 nM、0.9 nM、0.8 nM、0.7 nM、0.6 nM、0.5 nM、0.4 nM、0.3 nM、0.2 nM、0.1 nM、0.09 nM、0.08 nM、0.07 nM、0.06 nM、0.05 nM、0.04 nM、0.03 nM、0.02 nM或0.01 nM。

【請求項40】

一種經分離多肽分子，其係由如請求項1至39中任一項之核酸分子編碼。

【請求項41】

一種經分離重組TFP分子，其包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內域。

【請求項42】

一種經分離重組TFP分子，其包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內信號傳導域，其中該TFP分子能與內源性TCR複合物及/或至少一種內源性TCR多肽在功能上相互作用。

【請求項43】

一種經分離重組TFP分子，其包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內信號傳導域，其中該TFP分子能在功能上整合至內源性TCR複合物中。

【請求項44】

如請求項41之經分離TFP分子，其包含包括人類或人類化抗間皮素結合域之抗體或抗體片段、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內域。

【請求項45】

如請求項41至44中任一項之經分離TFP分子，其中該抗間皮素結合域係scFv或V_H域。

【請求項46】

如請求項41至45中任一項之經分離TFP分子，其中該抗間皮素結合域包含與以下具有95%至100%一致性之重鏈：本文所提供抗間皮素輕鏈之胺基酸序列、其功能片段或其具有至少一個但不超過30個修飾之胺基酸序列。

【請求項47】

如請求項41至46中任一項之經分離TFP分子，其中該抗間皮素結合域包含與以下具有95%至100%一致性之輕鏈：本文所提供抗間皮素重鏈之胺基酸序列、其功能片段或其具有至少一個但不超過30個修飾之胺基酸序列。

【請求項48】

如請求項41至47中任一項之經分離TFP分子，其包含TCR細胞外域，該TCR細胞外域包含選自由以下組成之群之蛋白質之細胞外域或其一部分：TCR α 鏈、TCR β 鏈、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元、CD3 δ TCR亞單元、其功能片段及其具有至少一個但不超過20個修飾之胺基酸序列。

【請求項49】

如請求項41至48中任一項之經分離TFP分子，其中該TCR包含選自

由以下組成之群之蛋白質之細胞外域或其一部分：T細胞受體之 α 或 β 鏈、CD3 δ 、CD3 ϵ 或CD3 γ 。

【請求項50】

如請求項41至49中任一項之經分離TFP分子，其中該抗間皮素結合域係藉由連接體序列連接至該TCR細胞外域。

【請求項51】

如請求項50之經分離TFP分子，其中該連接體區包含 $(G_4S)_n$ ，其中 $n=1$ 至4。

【請求項52】

如請求項41至51中任一項之經分離TFP分子，其進一步包含編碼共刺激域之序列。

【請求項53】

如請求項41至52中任一項之經分離TFP分子，其進一步包含編碼細胞內信號傳導域之序列。

【請求項54】

如請求項41至53中任一項之經分離TFP分子，其進一步包含前導序列。

【請求項55】

一種核酸，其包含編碼如請求項41至54中任一項之TFP之序列。

【請求項56】

如請求項55之核酸，其中該核酸係選自由DNA及RNA組成之群。

【請求項57】

如請求項55或56之核酸，其中該核酸係mRNA。

【請求項58】

如請求項55至57中任一項之核酸，其中該核酸包含核苷酸類似物。

【請求項59】

如請求項58之核酸，其中該核苷酸類似物係選自由以下組成之群：
2'-O-甲基、2'-O-甲氧基乙基(2'-O-MOE)、2'-O-胺基丙基、2'-去氧、T-
去氧-2'-氟、2'-O-胺基丙基(2'-O-AP)、2'-O-二甲基胺基乙基(2'-O-
DMAOE)、2'-O-二甲基胺基丙基(2'-O-DMAP)、T-O-二甲基胺基乙氧基
乙基(2'-O-DMAEOE)、2'-O-N-甲基乙醯胺基(2'-O-NMA)修飾、鎖核酸
(LNA)、乙烯核酸(ENA)、肽核酸(PNA)、1',5'-脫水己醣醇核酸(HNA)、
嗎啉基、甲基膦酸酯核苷酸、硫醇膦酸酯核苷酸及2'-氟N3-P5'-亞磷醯
胺。

【請求項60】

如請求項55至59中任一項之核酸，其進一步包含啟動子。

【請求項61】

如請求項55至60中任一項之核酸，其中該核酸係活體外轉錄之核
酸。

【請求項62】

如請求項55至61中任一項之核酸，其中該核酸進一步包含編碼聚(A)
尾之序列。

【請求項63】

如請求項55至62中任一項之核酸，其中該核酸進一步包含3'UTR序
列。

【請求項64】

一種載體，其包含編碼如請求項41至54中任一項之TFP之核酸分子。

【請求項65】

如請求項64之載體，其中該載體係選自由以下組成之群：DNA、RNA、質體、慢病毒載體、腺病毒載體、勞斯肉瘤病毒(Rous sarcoma viral，RSV)載體或反轉錄病毒載體。

【請求項66】

如請求項64或65之載體，其進一步包含啟動子。

【請求項67】

如請求項64至66中任一項之載體，其中該載體係活體外轉錄之載體。

【請求項68】

如請求項64至67中任一項之載體，其中該載體中之核酸序列進一步包含聚(A)尾。

【請求項69】

如請求項64至68中任一項之載體，其中該載體中之核酸序列進一步包含3'UTR。

【請求項70】

一種細胞，其包含如請求項1至39中任一項之經分離核酸分子、如請求項40之多肽分子、如請求項41至54中任一項之TFP分子、如請求項55至63中任一項之核酸、如請求項64至69中任一項之載體。

【請求項71】

如請求項70之細胞，其中該細胞係人類T細胞。

【請求項72】

如請求項71之細胞，其中該T細胞係CD8+或CD4+ T細胞。

【請求項73】

如請求項71之細胞，其中該T細胞係 γ - δ T細胞。

【請求項74】

如請求項71之細胞，其中該T細胞係NKT細胞。

【請求項75】

如請求項70至73中任一項之細胞，其進一步包含編碼抑制性分子之核酸，該抑制性分子包含第一多肽，該第一多肽包含抑制性分子之至少一部分，與包含來自細胞內信號傳導域之正信號之第二多肽締合。

【請求項76】

如請求項75之細胞，其中該抑制性分子包含包括PD1之至少一部分之第一多肽及包含共刺激域及初級(primary)信號傳導域之第二多肽。

【請求項77】

一種人類CD8+或CD4+ T細胞，其包含至少兩種TFP分子，該等TFP分子包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內域，其中該TFP分子能與該人類CD8+或CD4+ T細胞之表面中、表面處及/或表面上之內源性TCR複合物及/或至少一種內源性TCR多肽在功能上相互作用。

【請求項78】

一種蛋白質複合物，其包含：

i) TFP分子，其包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內域；及

ii)至少一種內源性TCR亞單元或內源性TCR複合物。

【請求項79】

如請求項78之蛋白質複合物，其中該TCR包含選自由以下組成之群之蛋白質之細胞外域或其一部分：TCR α 鏈、TCR β 鏈、CD3 ϵ TCR亞單元、CD3 γ TCR亞單元及CD3 δ TCR亞單元。

【請求項80】

如請求項78或79之蛋白質複合物，其中該抗間皮素結合域係藉由連接體序列連接至該TCR細胞外域。

【請求項81】

如請求項80之蛋白質複合物，其中該連接體區包含(G₄S)_n，其中n=1至4。

【請求項82】

一種蛋白質複合物，其包含

- (a) 由如請求項1至39中任一項之經分離核酸分子編碼之TFP，及
- (b) 至少一種內源性TCR亞單元或內源性TCR複合物。

【請求項83】

一種人類CD8+或CD4+ T細胞，其包含至少兩種不同的如請求項78至82中任一項之蛋白質複合物之TFP蛋白質。

【請求項84】

一種人類CD8+或CD4+ T細胞，其包含至少兩種不同的由如請求項1至39中任一項之經分離核酸分子編碼之TFP分子。

【請求項85】

一種人類CD8+或CD4+ T細胞之群體，其中該群體之T細胞個別地或

共同地包含至少兩種TFP分子，該等TFP分子包含人類或人類化抗間皮素結合域、TCR細胞外域、跨膜域及細胞內域，其中該TFP分子能與該人類CD8+或CD4+ T細胞之表面中、表面處及/或表面上之內源性TCR複合物及/或至少一種內源性TCR多肽在功能上相互作用。

【請求項86】

一種人類CD8+或CD4+ T細胞之群體，其中該群體之T細胞個別地或共同地包含至少兩種由如請求項1至39中任一項之經分離核酸分子編碼之TFP分子。

【請求項87】

一種製備細胞之方法，其包含用如請求項1至39中任一項之經分離核酸分子、如請求項55至63中任一項之核酸或如請求項64至69中任一項之載體轉導T細胞。

【請求項88】

一種生成RNA改造之細胞群體之方法，其包含將活體外轉錄之RNA或合成RNA引入細胞中，其中該RNA包含編碼如請求項41至54中任一項之TFP分子之核酸。

【請求項89】

一種在哺乳動物中提供抗腫瘤免疫性之方法，其包含向該哺乳動物投與有效量之如請求項1至39中任一項之經分離核酸分子、如請求項40之多肽分子、表現如請求項40之多肽分子之細胞、如請求項41至54中任一項之TFP分子、如請求項55至63中任一項之核酸、如請求項64至69中任一項之載體或如請求項70至77及83至87中任一項之細胞。

【請求項90】

如請求項89之方法，其中該細胞係自體T細胞。

【請求項91】

如請求項89之方法，其中該細胞係同種異體T細胞。

【請求項92】

如請求項89至91中任一項之方法，其中該哺乳動物係人類。

【請求項93】

一種治療患有與間皮素之表現相關疾病之哺乳動物之方法，其包含向該哺乳動物投與有效量之如請求項1至39中任一項之經分離核酸分子、如請求項40之多肽分子、表現如請求項40之多肽分子之細胞、如請求項41至54中任一項之TFP分子、如請求項55至63中任一項之核酸、如請求項64至69中任一項之載體或如請求項70至77及83至86中任一項之細胞。

【請求項94】

如請求項93之方法，其中該與間皮素表現相關之疾病係選自由以下組成之群：與間皮素之表現相關之增殖性疾病、癌症、惡性病及非癌症相關適應症。

【請求項95】

如請求項93之方法，其中該疾病係選自由以下組成之群之癌症：間皮瘤、腎細胞癌、胃癌(stomach cancer)、乳癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、結腸癌、子宮頸癌、腦癌、肝癌、胰臟癌、甲狀腺癌、膀胱癌、輸尿管癌、腎癌、子宮內膜癌、食道癌、胃癌(gastric cancer)、胸腺癌、膽管癌及胃癌。

【請求項96】

如請求項93之方法，其中該疾病係選自由以下組成之群之癌症：間

皮瘤、乳頭狀漿液性卵巢腺癌、透明細胞卵巢癌、混合性苗勒管卵巢癌 (mixed Mullerian ovarian carcinoma)、子宮內膜樣黏液卵巢癌、胰臟腺癌、胰臟導管腺癌、子宮漿液性癌、肺腺癌、肝外膽管癌、胃腺癌、食道腺癌、結腸直腸腺癌、乳房腺癌，與間皮素表現相關之疾病及其組合。

【請求項97】

如請求項93之方法，其中表現TFP分子之細胞係與提高表現TFP分子之細胞效能之藥劑組合投與。

【請求項98】

如請求項93至97中任一項之方法，其中與投與有效量之表現抗間皮素嵌合抗原受體(CAR)之T細胞之哺乳動物相比，在該哺乳動物中釋放較少細胞介素。

【請求項99】

如請求項93至98中任一項之方法，其中表現TFP分子之細胞係與改善投與表現TFP分子之細胞時相關之一或多種副作用之藥劑組合投與。

【請求項100】

如請求項93至99中任一項之方法，其中表現TFP分子之細胞係與治療與間皮素相關疾病之藥劑組合投與。

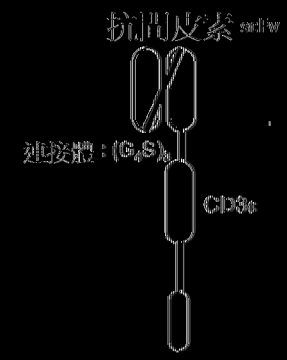
【請求項101】

如請求項1至39中任一項之經分離核酸分子、如請求項40之經分離多肽分子、表現如請求項40之多肽分子之細胞、如請求項41至54中任一項之經分離TFP、如請求項55至63中任一項之核酸、如請求項64至69中任一項之載體、如請求項78至82中任一項之複合物或如請求項70至77及83至86中任一項之細胞，其用作藥劑。

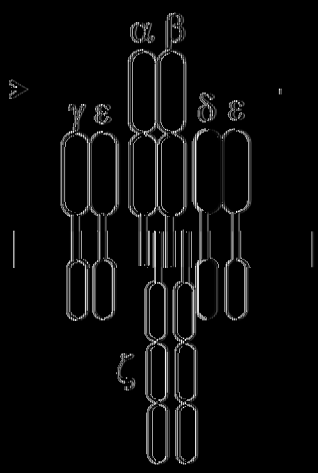
【請求項102】

一種治療患有與間皮素之表現相關疾病之哺乳動物之方法，其包含向該哺乳動物投與有效量之如請求項1至39中任一項之經分離核酸分子、如請求項40之多肽分子、表現如請求項40之多肽分子之細胞、如請求項41至54中任一項之TFP分子、如請求項55至63中任一項之核酸、如請求項64至69中任一項之載體或如請求項70至77及83至86中任一項之細胞，其中與投與有效量之表現抗間皮素嵌合抗原受體(CAR)之T細胞之哺乳動物相比，在該哺乳動物中釋放較少細胞介素。

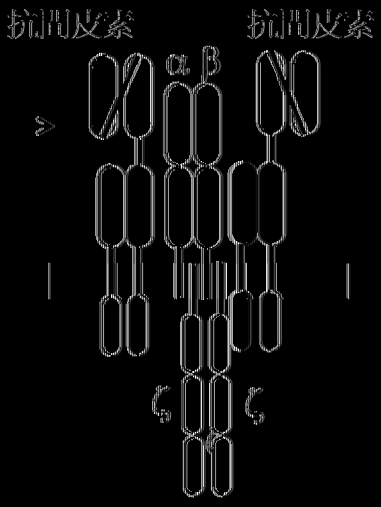
TEP：抗間皮素 scFv 及 CD3 ϵ 之融合多肽



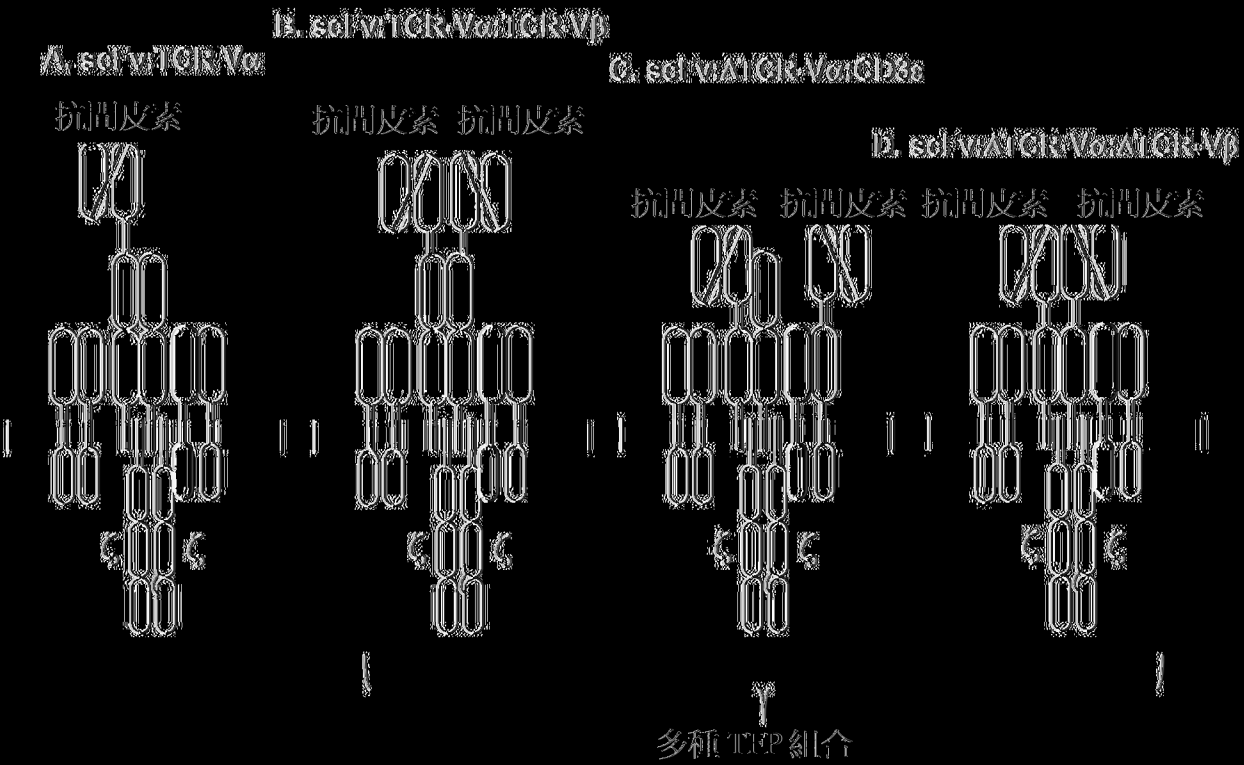
內源性 TCR



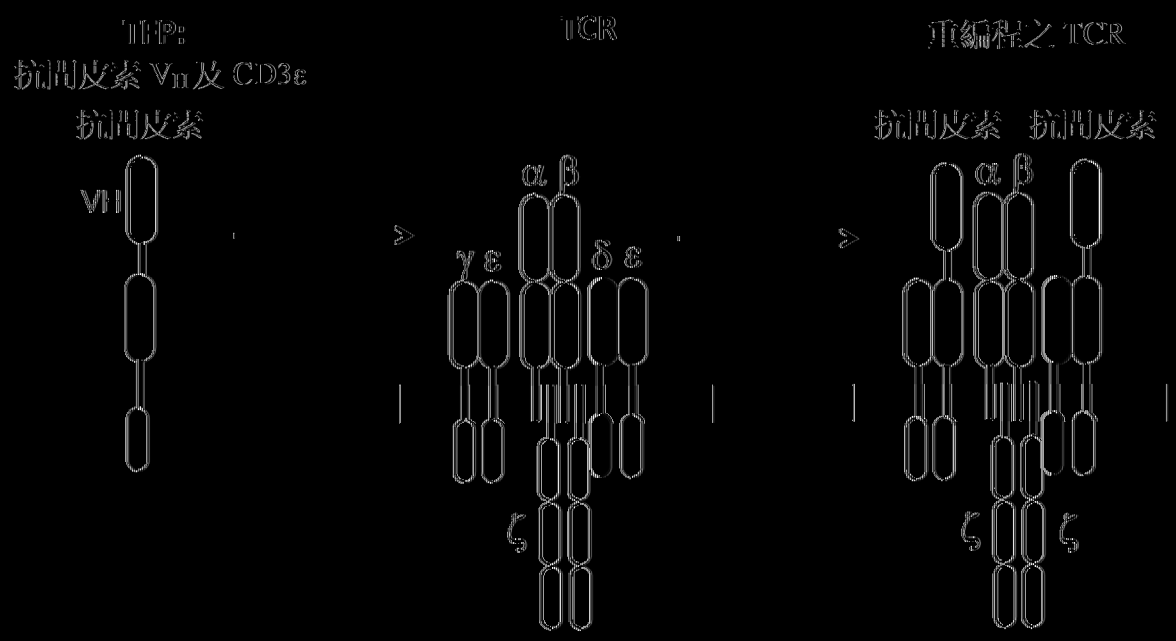
重編程之 TCR



|(圖 1)|



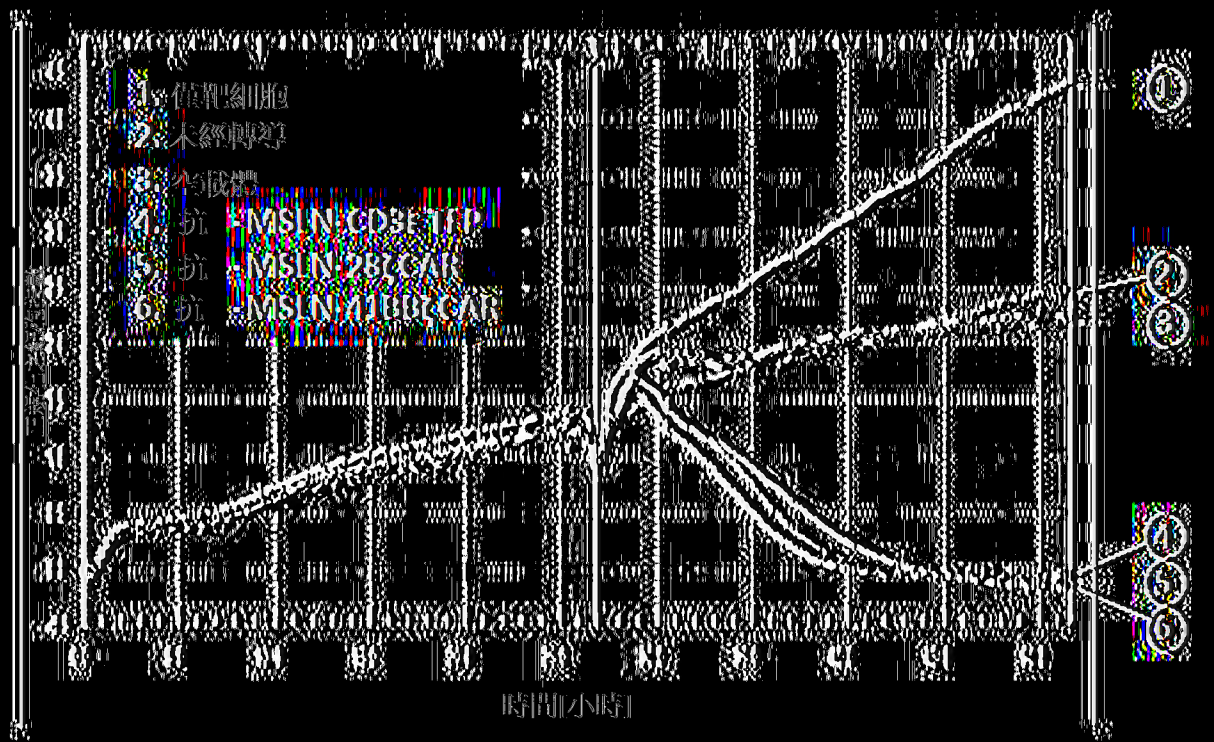
[(圖 2)]



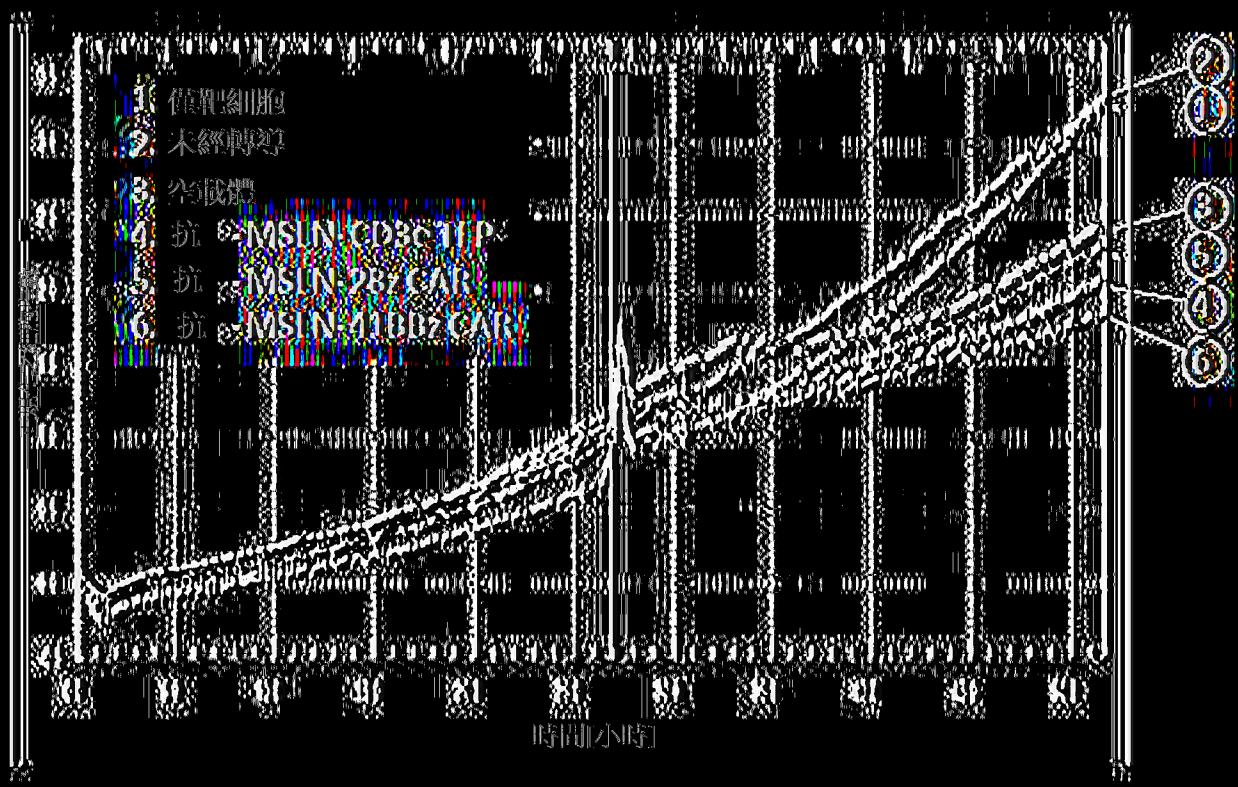
|(圖 3)|



[圖 5A]

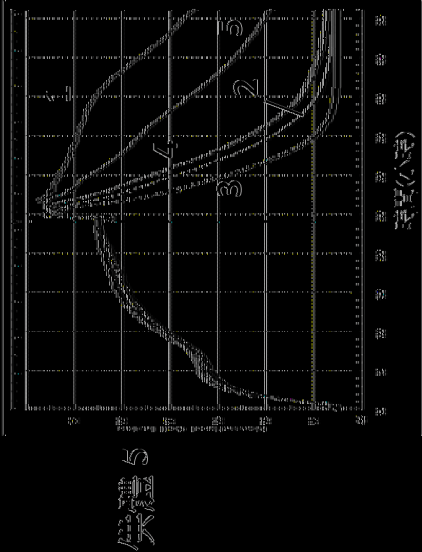


(圖 6A)

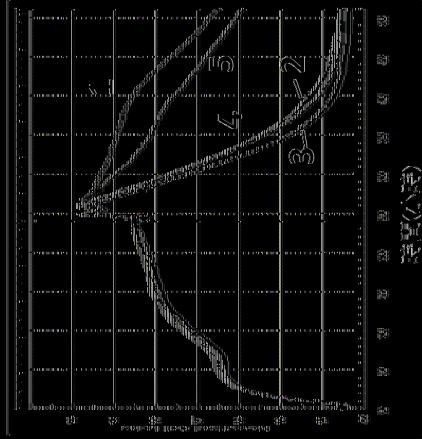


[(圖) 6B]

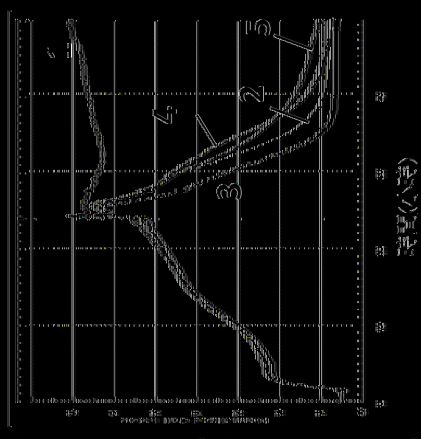
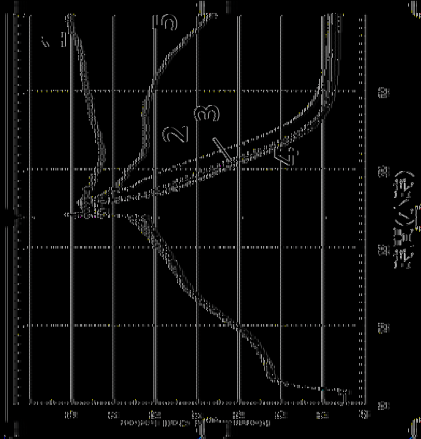
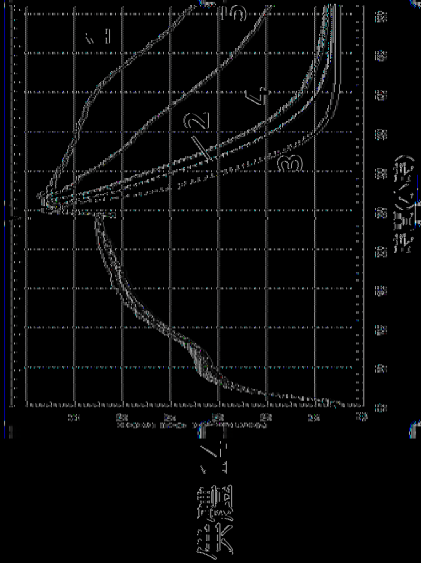
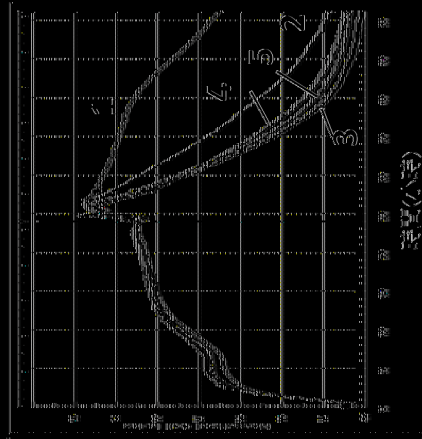
SD1 (25mV)



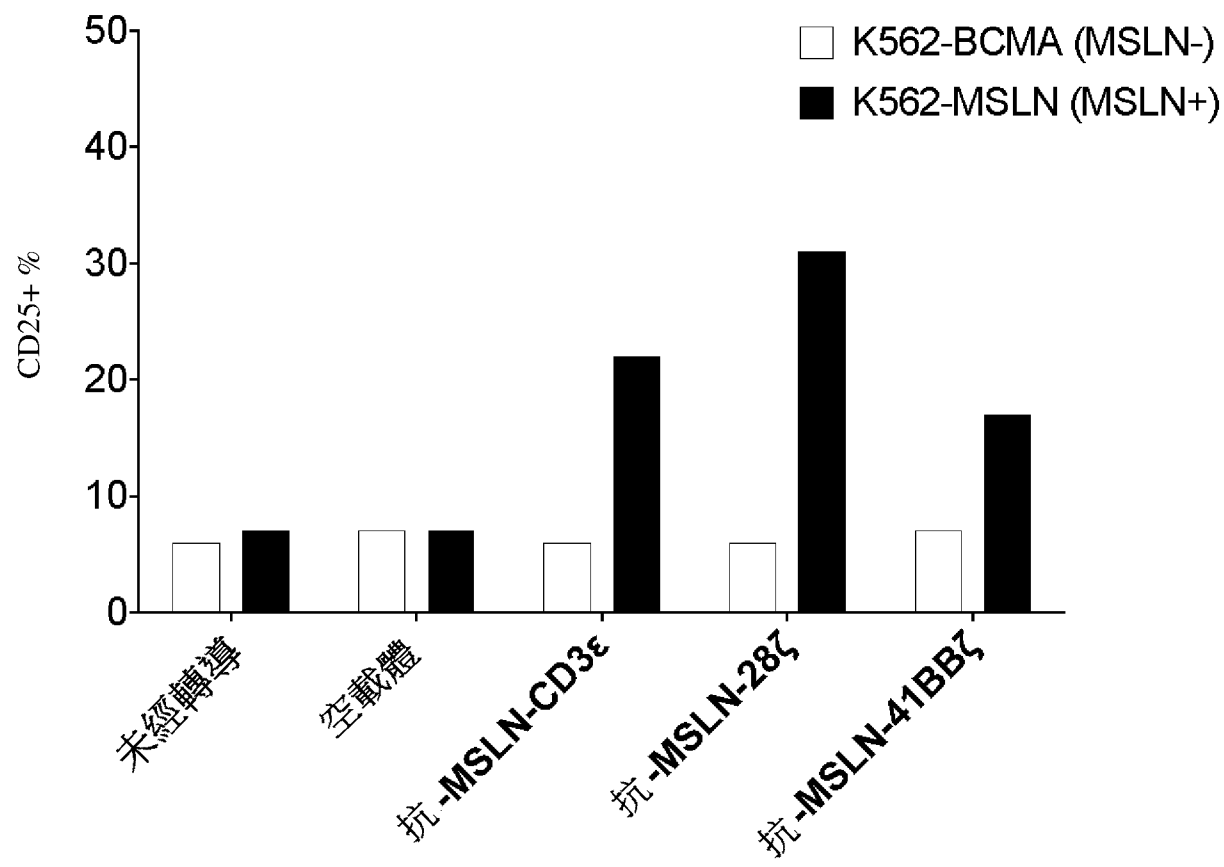
SD4 (6mV)



SD6 (0.59mV)



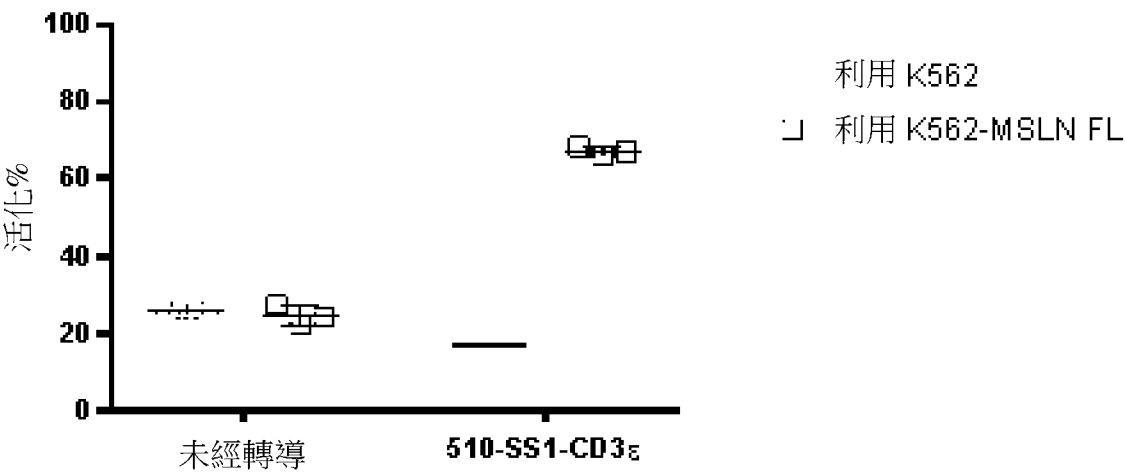
[圖 6C]



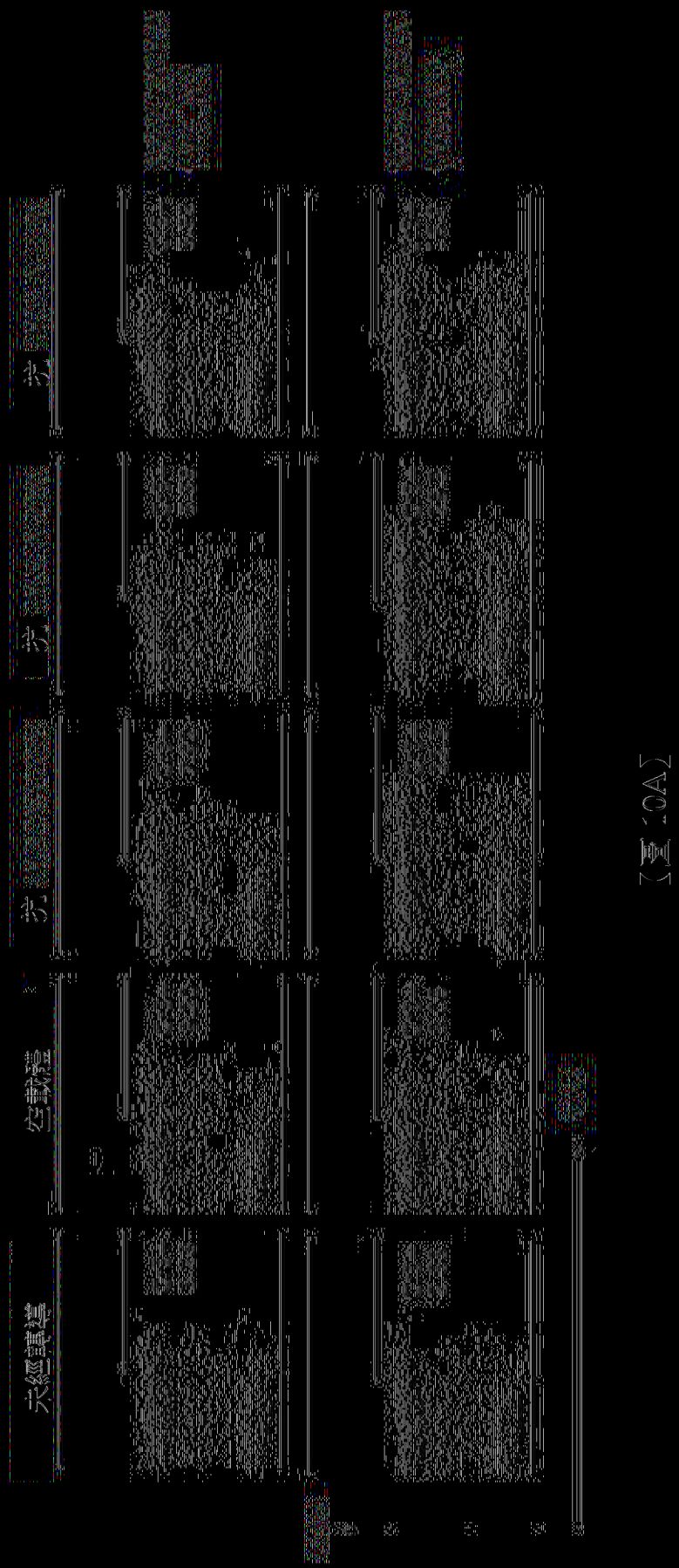
【圖 9B】

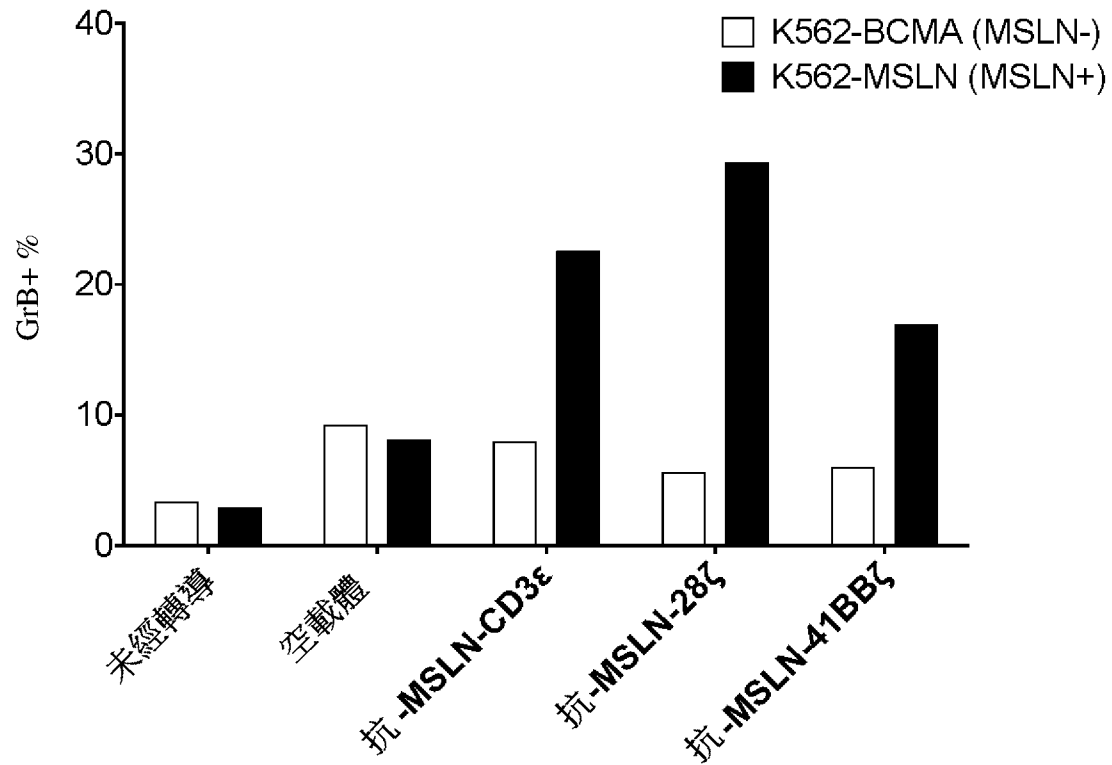
活化%：CD25+、CD69+及 CD25+CD69+細胞之總和

供體 14

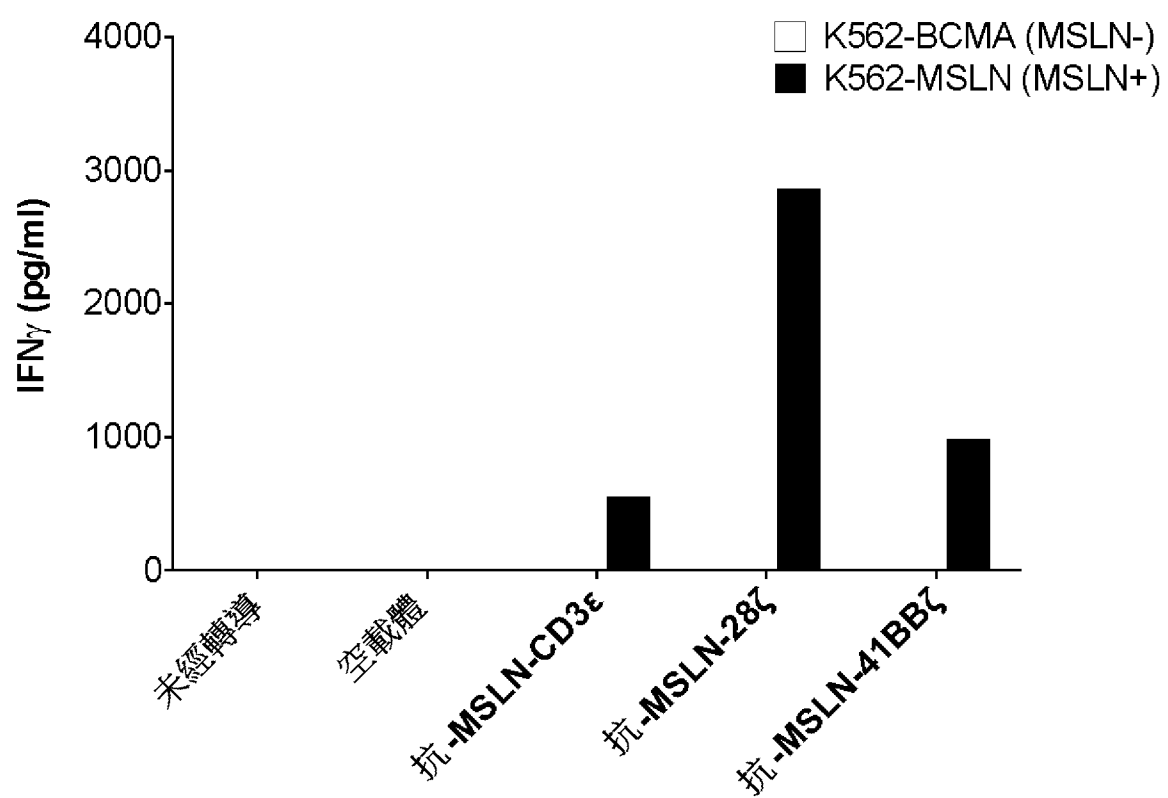


【圖 9C】

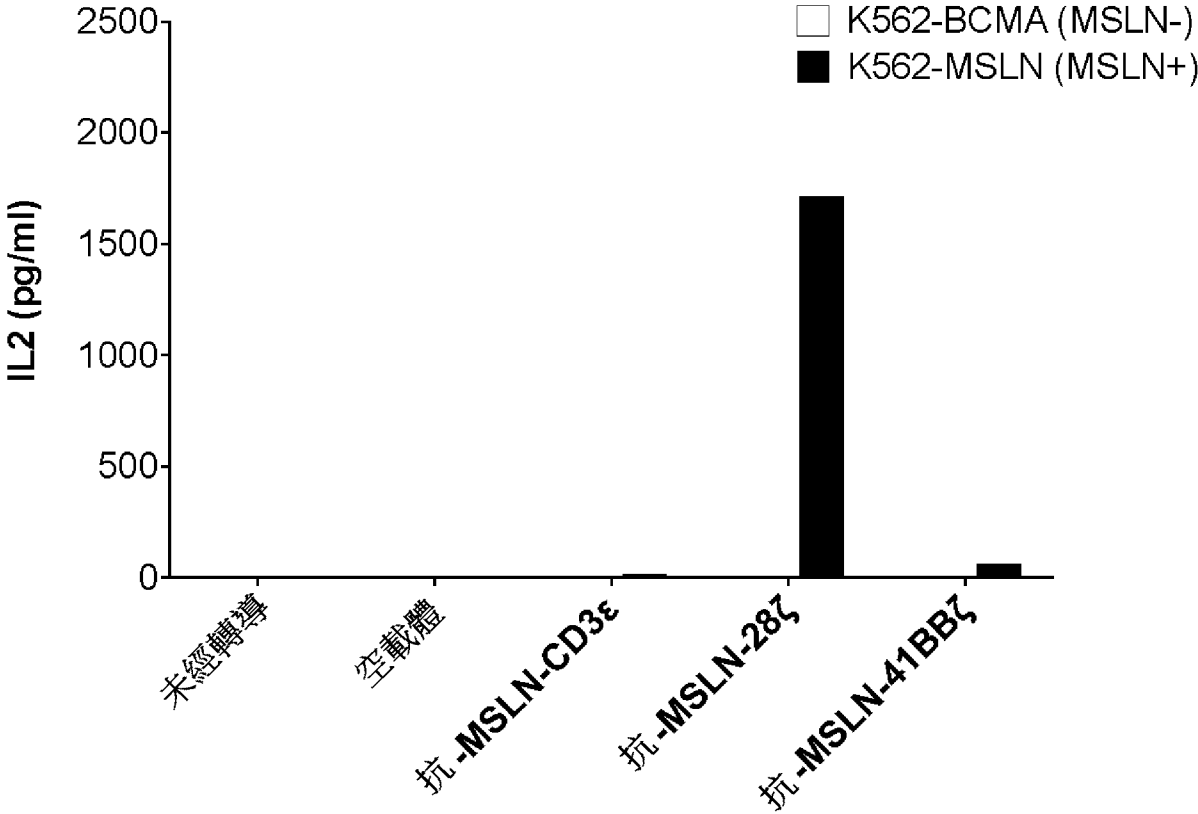




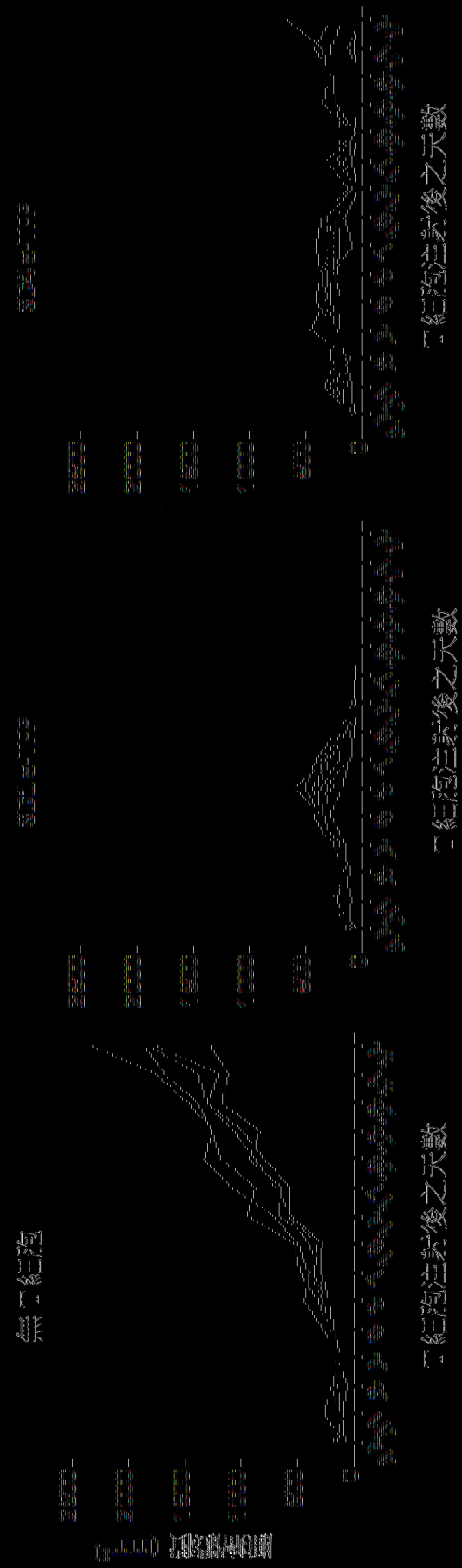
【圖 10B】



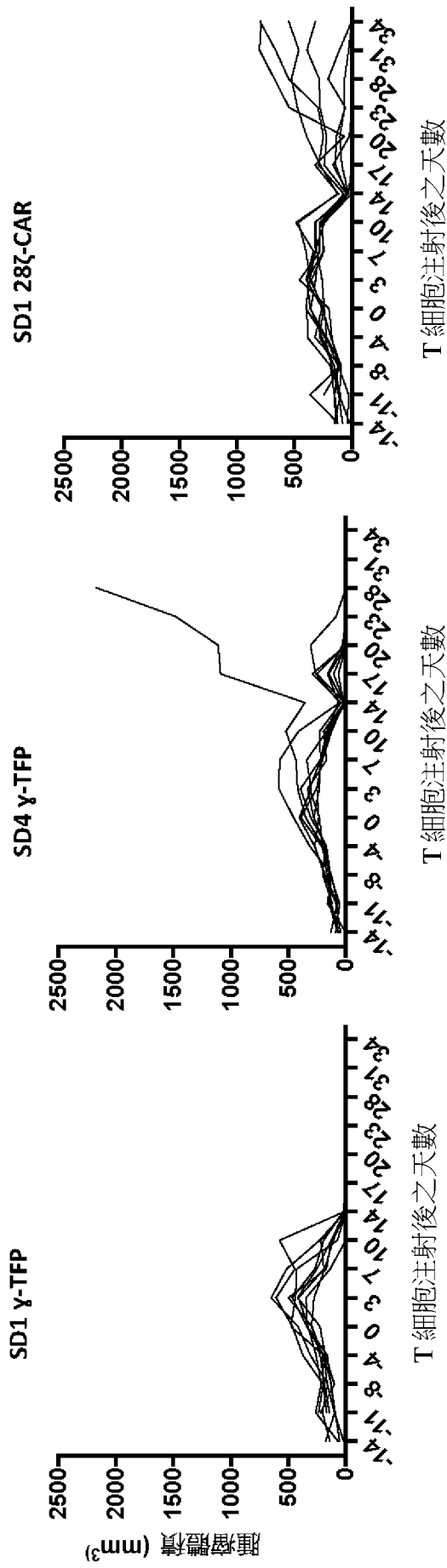
【圖 11A】



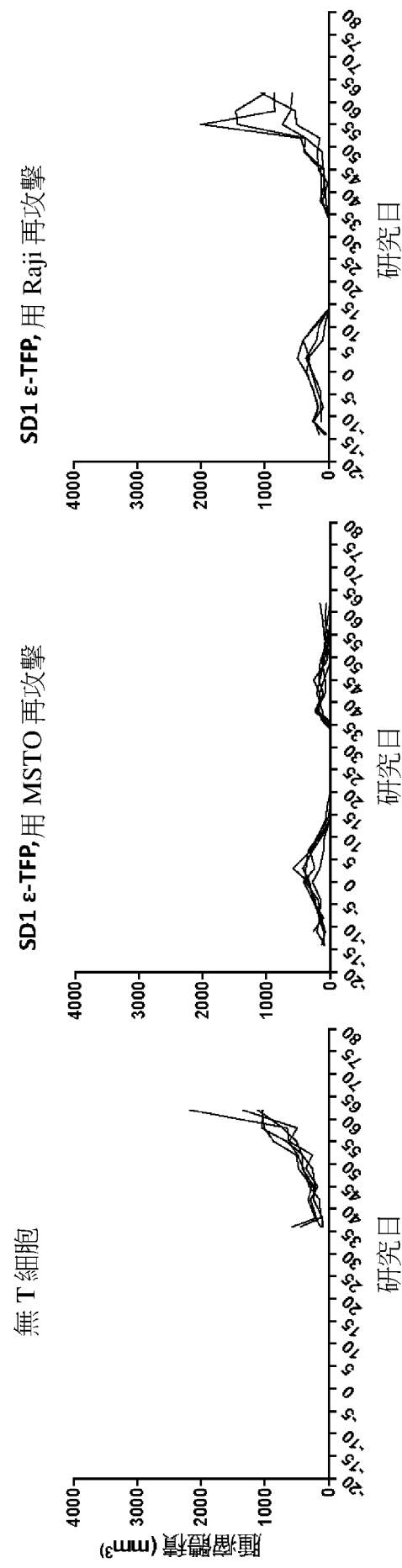
【圖 11B】



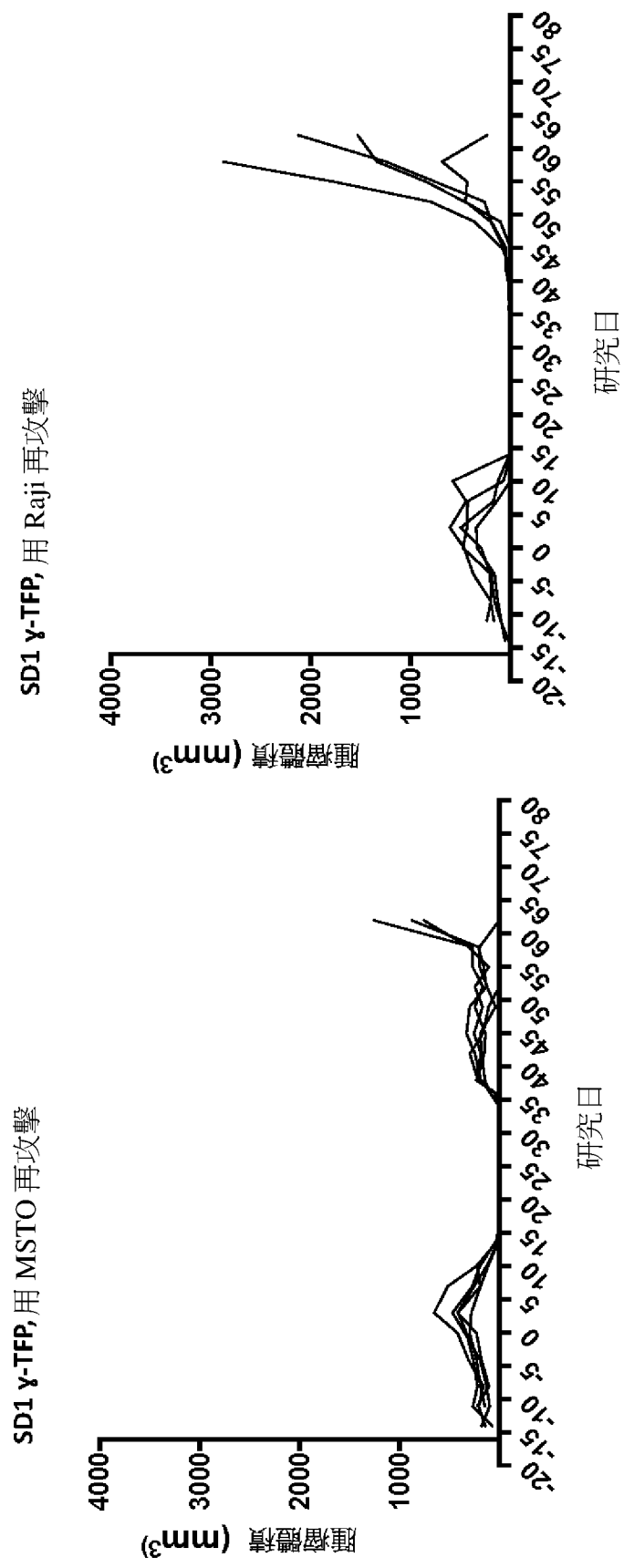
[圖 12A]



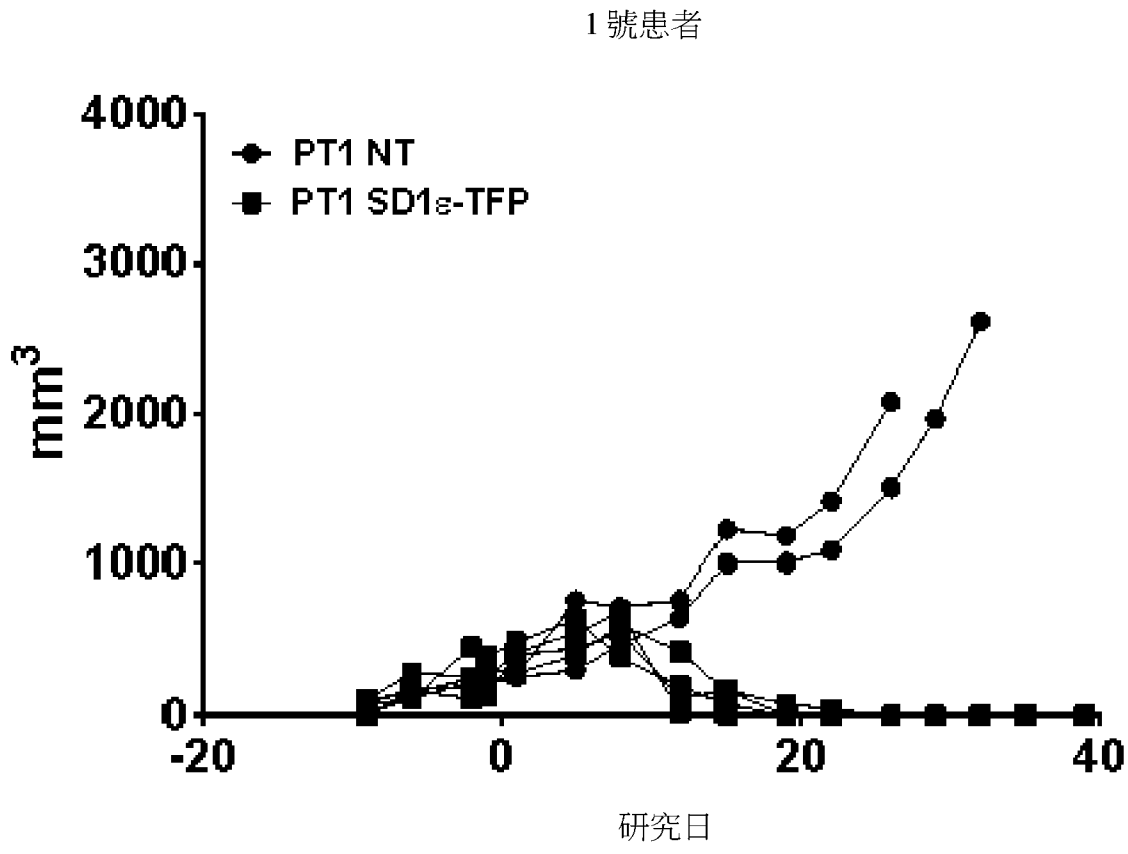
【圖 12B】



【圖 12C】



【圖 12D】



【圖 14B】

【發明申請專利範圍】

【請求項1】

一種編碼T細胞受體(TCR)融合蛋白(TFP)之重組核酸分子，該TFP包含

(a) TCR亞單元，其包含

(i) 細胞外域，

(ii) 跨膜域，及

(iii) TCR細胞內域，其包含來自CD3 ϵ 、CD3 δ 或CD3 γ 之細胞內信號傳導域之刺激域；及

(b) 人類或人類化scFv或sdAb，其包含抗間皮素結合域；

其中該TCR亞單元及該抗間皮素結合域係可操作地連接，其中該TFP不包含功能性CD3 ζ 細胞內域，且

其中該TFP在T細胞中表現時與TCR在功能上相互作用。

【請求項2】

如請求項1之重組核酸分子，其中該抗間皮素結合域係藉由連接體序列連接至該TCR亞單元之細胞外域。

【請求項3】

如請求項2之重組核酸分子，其中該連接體序列包含(G₄S)_n，其中n=1至4。

【請求項4】

如請求項1之重組核酸分子，其中該抗間皮素結合域包含V_{HH}域，該V_{HH}域包含與SEQ ID NO: 58具有70至100%序列一致性或與SEQ ID NO: 59具有70至100%序列一致性之序列。

【請求項5】

如請求項1之重組核酸分子，其中該抗間皮素結合域包含SEQ ID NO: 58或SEQ ID NO: 59之重鏈(HC) CDR1、HC CDR2及HC CDR3，其中該等CDR序列係藉由Kabat編號決定。

【請求項6】

如請求項1之重組核酸分子，其中該細胞外域為TCR細胞外域。

【請求項7】

如請求項6之重組核酸分子，其中該TCR細胞外域為全長TCR細胞外域。

【請求項8】

如請求項1之重組核酸分子，其中該TCR細胞內域包含CD3 ϵ 或CD3 γ 之細胞內信號傳導域。

【請求項9】

如請求項8之重組核酸分子，其中該TCR細胞內域包含CD3 ϵ 。

【請求項10】

如請求項1之重組核酸分子，其中該TCR亞單元包含(i) TCR細胞外域、(ii) TCR跨膜域及(iii) TCR細胞內域，其中(i)、(ii)及(iii)中之至少兩者來自同一TCR亞單元。

【請求項11】

如請求項10之重組核酸分子，其中該同一TCR亞單元為CD3 γ 或CD3 ϵ 。

【請求項12】

如請求項10之重組核酸分子，其中(i)、(ii)及(iii)來自CD3 ϵ 。

【請求項13】

如請求項12之重組核酸分子，其中該抗間皮素結合域包含SEQ ID NO: 58或SEQ ID NO: 59之重鏈(HC) CDR1、HC CDR2及HC CDR3，其中該等CDR序列係藉由Kabat編號決定。

【請求項14】

如請求項1之重組核酸分子，其中該重組核酸分子為病毒載體或慢病毒載體。

【請求項15】

一種重組TFP分子，其包含人類或人類化抗間皮素結合域、細胞外域、跨膜域及包含來自CD3 ϵ 、CD3 δ 或CD3 γ 之細胞內信號傳導域之刺激域之細胞內域，其中該重組TFP分子不包含功能性CD3 ζ 細胞內域，且其中該TFP分子在T細胞中表現時係整合至功能性TCR中。

【請求項16】

如請求項15之重組TFP分子，其中該抗間皮素結合域包含V_{HH}域，該V_{HH}域包含與SEQ ID NO: 58具有70至100%序列一致性或與SEQ ID NO: 59具有70至100%序列一致性之序列。

【請求項17】

如請求項15之重組TFP分子，其中該細胞外域為TCR細胞外域。

【請求項18】

如請求項17之重組TFP分子，其中該TCR細胞外域為全長TCR細胞外域。

【請求項19】

一種人類細胞，其包含如請求項1至14中任一項之重組核酸分子或如

請求項15至18中任一項之重組TFP分子。

【請求項20】

如請求項19之人類細胞，其中該人類細胞係：相較於不含有該TFP之T細胞，視情況對表現間皮素之細胞展現提高之細胞毒性之T細胞；CD8⁺ T細胞；CD4⁺ T細胞；CD4⁺ CD8⁺ T細胞； γ - δ T細胞； α - β T細胞；或NKT細胞。

【請求項21】

如請求項20之人類細胞，其中在表現間皮素之細胞存在下由該T細胞產生之IL-2或IFN γ 係增加；或其中該T細胞相較於包含編碼嵌合抗原受體(CAR)之核酸之CD8⁺或CD4⁺ T細胞具有更高或更有效率之細胞毒性活性，該CAR包含(a) 該抗間皮素結合域，其可操作地連接(b) CD28細胞外域之至少一部分、(c) CD28跨膜域、(d) CD28細胞內域之至少一部分及(e) CD3 ζ 細胞內域。

【請求項22】

一種包含細胞之組合物之用途，該細胞包含如請求項1至14中任一項之重組核酸分子或如請求項15至18中任一項之重組TFP分子，其係用於製備治療與間皮素之表現相關疾病之藥物，該疾病係選自癌症、間皮瘤、腎細胞癌、胃癌(stomach cancer)、乳癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、結腸癌、子宮頸癌、腦癌、肝癌、胰臟癌、甲狀腺癌、膀胱癌、輸尿管癌、腎癌、子宮內膜癌、食道癌、胃癌(gastric cancer)、胸腺癌、膽管癌及其等之轉移。

【請求項23】

如請求項22之用途，其中該細胞係自體T細胞或同種異體T細胞。