



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公開本

(11)公開編號：TW 202241937 A

(43)公開日：中華民國 111 (2022) 年 11 月 01 日

(21)申請案號：110147984

(22)申請日：中華民國 110 (2021) 年 12 月 21 日

(51)Int. Cl.：

*C07K14/725 (2006.01)**C12N5/0783 (2010.01)**C12N15/90 (2006.01)**A61K35/17 (2015.01)**A61K39/00 (2006.01)**A61P35/00 (2006.01)**G01N33/68 (2006.01)*

(30)優先權：2020/12/22

美國

63/129,480

2021/04/02

美國

63/170,196

(71)申請人：荷蘭商新基因治療公司 (荷蘭) NEOGENE THERAPEUTICS B.V. (NL)

荷蘭

(72)發明人：黎奈曼 卡斯汀 LINNEMANN, CARSTEN (DE)；奎曼 湯瑪士 KUILMAN,

THOMAS (NL)；班斗 蓋文 M BENDLE, GAVIN M. (GB)；凡 赫斯特 傑羅

恩 W J VAN HEIJST, JEROEN W.J. (NL)；孔祥俊 KONG, XIANGJUN (CN)；

艾格孟 羅克 約瑟弗斯 EGGERMONT, LOEK JOSEPHUS (NL)

(74)代理人：陳長文

申請實體審查：無 申請專利範圍項數：66 項 圖式數：27 共 121 頁

(54)名稱

用於追蹤基因工程細胞的肽標記

(57)摘要

為了可控制注射之基因工程細胞，有幫助的是該等基因工程細胞表現可用於在未經修飾之細胞池中偵測此類細胞的標記。一些實施例係關於包含 TCR 恆定域及外源性胺基酸變異之經標記蛋白，該外源性胺基酸變異包含可偵測且可鑑別之序列在該 TCR 恆定域內。其他實施例係關於與 TCR 鏈連接之抗體抗原決定基。該等經標記蛋白及該等抗體抗原決定基均可用於追蹤基因工程細胞。

To allow control over injected genetically engineered cells, it is helpful that the genetically engineered cells express a marker that can be used to detect such cells among a pool of unmodified cells. Some embodiments relate to a marked protein comprising a TCR constant domain and an exogenous amino acid variation that comprises a sequence that is detectable and identifiable within the TCR constant domain. Other embodiments relate to an antibody epitope that is attached to a TCR chain. Both the marked proteins and the antibody epitopes can be used to track genetically engineered cells.

指定代表圖：

TCR恆定域抗原決定基圖。



【圖1】



【發明摘要】

【中文發明名稱】

用於追蹤基因工程細胞的肽標記

【英文發明名稱】

PEPTIDE MARKERS TO TRACK GENETICALLY ENGINEERED
CELLS

【中文】

為了可控制注射之基因工程細胞，有幫助的是該等基因工程細胞表現可用於在未經修飾之細胞池中偵測此類細胞的標記。一些實施例係關於包含 TCR 恆定域及外源性胺基酸變異之經標記蛋白，該外源性胺基酸變異包含可偵測且可鑑別之序列在該 TCR 恆定域內。其他實施例係關於與 TCR 鏈連接之抗體抗原決定基。該等經標記蛋白及該等抗體抗原決定基均可用於追蹤基因工程細胞。

【英文】

To allow control over injected genetically engineered cells, it is helpful that the genetically engineered cells express a marker that can be used to detect such cells among a pool of unmodified cells. Some embodiments relate to a marked protein comprising a TCR constant domain and an exogenous amino acid variation that comprises a sequence that is detectable and identifiable within the TCR constant domain. Other embodiments relate to an antibody epitope that is attached to a TCR chain. Both the marked proteins and the antibody epitopes can be used to track genetically engineered cells.

【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】

用於追蹤基因工程細胞的肽標記

【英文發明名稱】

PEPTIDE MARKERS TO TRACK GENETICALLY ENGINEERED
CELLS

【技術領域】

【先前技術】

【0001】 細胞療法為如下療法，其中將活細胞注入、移植或植入患者中以便實現醫學效應，例如藉由在免疫療法過程中移植能夠經由細胞介導之免疫性對抗癌細胞的 T 細胞，或移植幹細胞以使病變組織再生。

【發明內容】

【0002】 本文描述之一些實施例係關於包含 TCR 恆定域及外源性胺基酸變異之經標記蛋白，其中外源性胺基酸變異包含 TCR 恆定域內可偵測且可鑑別之序列。

【0003】 在一些實施例中，經標記蛋白可用於偵測、分離或清除基因工程細胞。經標記蛋白或蛋白標記可充當標記；可藉由發現標記來偵測、分離或清除任何含有經標記蛋白之細胞。經標記蛋白可包含抗原決定基肽，其可由適合的抗體鑑別。

【0004】 本文描述之一些實施例係關於用於偵測、分離或清除已藉由引入治療性 TCR 基因進行修飾之基因工程 T 細胞的經標記蛋白，其中經標記蛋白來源於鼠類 TCR C β 域且藉由人類 TCR C β 2 域內存在之胺基酸的突變引入至人類 TCR C β 2 域中。

【0005】 在一些實施例中，提供經標記蛋白以用於偵測、分離或清除用於癌症治療的經新穎 TCR 基因修飾的細胞，該經標記蛋白包含本文所提供之實施例中之任一者的經標記蛋白。

【0006】 一些實施例係關於一種套組，其用於偵測、分離或耗盡具有以上實施例中之任一者之經標記蛋白的基因工程細胞，該套組包含識別經標記蛋白之抗體或結合劑。

【0007】 一些實施例係關於用於將一或多個有效負載靶向遞送至表現此類經標記蛋白之基因工程細胞的經標記蛋白，其包含本文所描述之實施例中之任一者的經標記蛋白。

【0008】 一些實施例係關於一種方法，其用於將一或多個有效負載靶向遞送至表現經標記蛋白之基因工程細胞。該方法包括 a)獲得包含一或多個有效負載及結合劑之結合物，其中結合劑特異性結合於經標記蛋白，及 b)使基因工程細胞與結合物接觸。

【0009】 一些實施例係關於可插入或構成 TCR 鏈之部分的抗體抗原決定基。在一些實施例中，抗原決定基可用於偵測表現此類抗體抗原決定基之基因工程細胞，其中抗體抗原決定基連接至 TCR 鏈或嵌合抗原受體。在一些實施例中，抗體抗原決定基包含 2A 肽序列、HA.11 抗原決定基標籤、FLAG 抗原決定基標籤、Myc 抗原決定基標籤或 V5 抗原決定基標籤。在一些實施例中，將抗體抗原決定基插入至 TCR 鏈之恆定域而非 TCR 之可變域中。在一些實施例中，藉由在 TCR 鏈之一或多個位置中進行胺基酸交換而非藉由向 TCR 鏈添加額外外源性胺基酸來引入抗體抗原決定基。

【0010】 一些實施例係關於用於偵測已藉由引入治療性 TCR 基因進行修飾之基因工程 T 細胞的抗體抗原決定基，其包含以上實施例中之任一

者的抗體抗原決定基。

【0011】 一些實施例係關於用於偵測用於癌症治療之經新穎 TCR 或 CAR 基因修飾的細胞的抗體抗原決定基，其包含以上實施例中之任一者的抗體抗原決定基。

【0012】 一些實施例係關於一種套組，其用於偵測表現以上實施例中之任一者之抗體抗原決定基的基因工程細胞。

【0013】 一些實施例係關於一種基因構築體，其包含能夠表現 2A 肽序列或與其至少 90%一致之序列的核苷酸序列，其中構築體經組態以用於自單一開放閱讀框架表現多種蛋白，且其中核苷酸序列不使基因構築體之尺寸增加超過 25 個胺基酸。如本文中所使用，在相關肽之情形中「基因」表示編碼肽序列之核酸序列；其不表示除彼序列以外之任何序列。

【0014】 一些實施例係關於表現如前述實施例中之任一者之經標記蛋白的基因工程細胞。

【0015】 本發明之此等及其他特徵、態樣及優點將參考以下實施方式及隨附申請專利範圍而變得更好理解。

【圖式簡單說明】

【0016】 圖 1. TCR 恆定域抗原決定基之圖。

【0017】 圖 2A 展示抗體抗原決定基之圖，其中抗體抗原決定基連接至 TCR 鏈之 C 端。

【0018】 圖 2B 展示抗體抗原決定基之圖，其中抗體抗原決定基連接至 TCR 鏈之 N 端。

【0019】 圖 2C 展示抗體抗原決定基之圖，其中抗體抗原決定基插入至 TCR 鏈中。

【0020】圖 2D 展示抗體抗原決定基之圖，其中抗體抗原決定基用於連接 TCR α 及 TCR β 鏈；可轉換 TCR α 及 TCR β 鏈之位置。

【0021】圖 3 展示使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1 1G4 TCR 之人類初級 T 細胞的 FACS 分析。資料表明，當使用全鼠類 Trbc2 序列時，外源多腺苷酸信號適用於 TCR 表現，且表現全鼠類 Trbc2 序列之細胞可由 H57 抗體識別。

【0022】圖 4 展示使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1 1G4 TCR 之人類初級 T 細胞的 FACS 分析。資料表明，將來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 10 個胺基酸殘基以及 FG 環併入人類 TRBC2 序列足以實現 TCR 表現及 H57 抗體識別。

【0023】圖 5 展示使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1 1G4 TCR 之人類初級 T 細胞的 FACS 分析。資料表明，來自鼠類 Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環為實現 H57 抗體識別所必需的。

【0024】圖 6 展示使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1 1G4 TCR 之人類初級 T 細胞的 FACS 分析。資料表明，將來自鼠類 Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環併入人類 TRBC2 序列足以實現 TCR 表現及 H57 抗體識別。

【0025】圖 7 展示使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1 1G4 TCR 之人類初級 T 細胞的 FACS 分析。資料表明，可使用抗 2A 肽抗體偵測已經工程改造以表現含有 T2A 肽序列之 NY-ESO-1 1G4 TCR 的人類初級 T 細胞。

【0026】圖 8 展示使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因

嵌入 NY-ESO-1 1G4 TCR 之人類初級 T 細胞的 FACS 分析。資料表明，可使用抗 2A 肽抗體偵測已經工程改造以表現含有 T2A 肽序列之 NY-ESO-1 1G4 TCR 之人類初級 T 細胞，且此 2A 肽染色與 TCR V β 13.1 染色相關。

【0027】圖 9 展示已經反轉錄轉導以表現 CD19 CAR 構築體之人類初級 T 細胞的 FACS 分析。資料表明，可使用抗 2A 肽抗體偵測已經工程改造以表現含有 2A 肽序列之 CD19 CAR 構築體之人類初級 T 細胞，且此 2A 肽染色與在相同構築體(Ly6G)中存在之轉導標記蛋白之染色相關。

【0028】圖 10 展示用於產生 2A 肽抗體 3H4 之免疫原序列(SEQ ID NO: 1)。

【0029】圖 11 展示 T2A 肽序列(SEQ ID NO: 2)。

【0030】圖 12 展示 P2A 肽序列(SEQ ID NO: 3)。

【0031】圖 13 展示含有可由 H57 抗體偵測之鼠類 TCR 抗原決定基之人類 TCR C β 2 域之序列(SEQ ID NO: 4)。

【0032】圖 14 展示連接至可由 3H4 抗體偵測之 T2A 肽抗原決定基之人類 TCR C β 2 域之序列(SEQ ID NO: 5)。

【0033】圖 15 展示 T2A 或 P2A 肽序列(SEQ ID NO: 6)之片段。

【0034】圖 16 展示 E2A 或 F2A 肽序列(SEQ ID NO: 7)之片段。

【0035】圖 17 展示人類 TCR C β 2 域之序列(SEQ ID NO: 8)。

【0036】圖 18 展示在無抗體(H57、H57-IL2 或 H57-IL2v)情況下預培育之後用經標記 H57 抗體染色之 huTRBC2-Mur6 1G4 TCR Jurkat 細胞的 FACS 直方圖，其中染色減少反映預培育抗體或融合蛋白的結合。

【0037】圖 19 展示在無抗體(H57、H57-IL2 或 H57-IL2v)情況下預培育之後用經標記 H57 抗體染色之 huTRBC2-Mur6 1G4 TCR 初級 T 細胞

的 FACS 直方圖及競爭濃度曲線，其中染色減少反映預培育抗體或融合蛋白的結合。

【0038】圖 20 展示用導向至 IL2 之經標記抗體染色之 huTRBC2-Mur6 1G4 TCR 初級 T 細胞的 FACS 直方圖以及結合濃度曲線。

【0039】圖 21 展示如藉由 CD25 及 CD69 表現所量測之回應於 IL2、H57-IL2 或 H57-IL2v 融合蛋白的刺激反應 FACS 標繪圖。

【0040】圖 22A 及 22B 展示在 IL2、H57-IL2 或 H57-IL2v 融合蛋白之濃度範圍內的 CD25 及 CD69 表現反應。

【0041】圖 23 展示 FACS 直方圖,其展現如藉由 cell trace violet 染料所量測之回應於 IL2、H57-IL2 或 H57-IL2v 融合蛋白的增殖增加。

【0042】圖 24 展示如藉由 cell trace violet 染料所量測之在 IL2、H57-IL2 或 H57-IL2v 融合蛋白之濃度範圍內的增殖增加。

【0043】圖 25 展示 muTRBC2、huTRBC1-Mur6 及 huTRBC2-Mur6 1G4 表現細胞之 H57 及結合於人類 TCR β 恆定域之抗體之結合的 FACS 標繪圖。

【0044】圖 26A 至 26D 展示表現 muTRBC2、huTRBC2 及 huTRBC2-Mur6 1G4 TCR 之初級 T 細胞中 IFN- γ 及 IL2 的增加。圖 26A (IFN- γ)及圖 26C (IL2)展示裝載至靶細胞上之 NY-ESO 肽之濃度範圍的濃度反應。圖 26B (IFN- γ)及 26D (IL2)展示在最高肽裝載濃度之個別實驗中表現標記之細胞百分比的點陣圖。

【0045】圖 27A 展示在與表現 T 細胞之 muTRBC2、huTRBC2 及 huTRBC2-Mur6 1G4 TCR 共培養期間靶細胞數目的時程。圖 27B 展示在最遲時間點(72 小時)之個別實驗中剩餘相對細胞數目的點陣圖。

【實施方式】

參考任何優先權申請案之併入

【0046】 有關隨本申請案一起提交的申請案資料表中標識國外或國內優先權主張的任何及所有申請案依據 37 CFR 1.57 以引用的方式併入本文中。

序列表之引用

【0047】 本申請案正與序列表一起以電子形式申請。序列表以於 2021 年 12 月 20 日創建之命名為 SeqList_NTBV016TW 的檔案形式提供，其大小為 47,142 位元組。電子形式之序列表中的資訊以全文引用之方式併入本文中。

【0048】 在以上發明內容部分及以下實施方式部分及申請專利範圍中，參考本發明之特定特徵。應理解在本說明書中，本發明之揭示內容包括此類特定特徵之所有可能組合。例如，當在本發明之特定態樣或實施例或特定申請專利範圍的情形中揭示特定特徵時，彼特徵亦可在可能之程度上與本發明之其他特定態樣及實施例組合，及/或在本發明之其他特定態樣及實施例之情形中使用，且一般而言在本發明中使用。

【0049】 細胞療法包括其中注射細胞或以其他方式移植細胞至患者中的療法。基因工程 T 細胞為一種此類材料。為對照注射基因工程 T 細胞，基因工程 T 細胞表現可用於偵測未經修飾之細胞池中之此類 T 細胞的標記係適用的。理想地，此類標記亦可用於分離在製造期間經成功修飾之 T 細胞，或一旦向患者投與，其可用於追蹤或清除彼等 T 細胞。此外，此類標記應為非免疫原性且應形成治療性基因構築體之天然部分。例如，此類標記可為多肽，其可形成抗體可結合之抗原決定基。

【0050】 本文描述之一些實施例係關於可用於偵測、分離或耗盡基因工程細胞的經標記蛋白。經標記蛋白或蛋白標記可充當標記；可藉由發現標記來偵測、分離或清除含有經標記蛋白之任何細胞。在一些實施例中，經標記蛋白包含 TCR 恆定域及外源性胺基酸變異，其中該外源性胺基酸變異包含可在 TCR 恆定域內偵測及鑑別之序列。

【0051】 一些實施例係關於用於將一或多個有效負載靶向遞送至表現此類經標記蛋白之基因工程細胞的經標記蛋白，其包含本文所描述之實施例中之任一者的經標記蛋白。

【0052】 一些實施例係關於可插入或構成 TCR 鏈之部分的抗體抗原決定基。在一些實施例中，抗原決定基可用於偵測表現此類抗體抗原決定基之基因工程細胞，其中抗體抗原決定基連接至 TCR 鏈或嵌合抗原受體。

定義

【0053】 在本說明書全文中，詞語「包含」或諸如「包含 (comprises/comprising)」之變化形式應理解為暗示包括所述要素、整數或步驟，或要素、整數或步驟之群組，但不排除任何其他要素、整數或步驟，或任何其他要素、整數或步驟之群組。

【0054】 提供以下術語及方法之解釋以更好地描述本發明且在本發明之實踐中引導一般技術者。除非上下文另外明確規定，否則單數形式「一 (a/an)」及「該(the)」係指一或多個。例如，術語「包含核酸分子」包括單個或複數個核酸分子且視為等效於片語「包含至少一個核酸分子」。除非上下文另外明確指示，否則術語「或」係指所述替代要素之單個要素或兩個或更多個要素之組合。如本文中所使用，「包含」意謂「包括」。因此，「包含 A 或 B」意謂「包括 A、B，或 A 及 B」而不排除額外要素。除非另外

說明，否則當本發明定義可不同於其他可能的定義時，以本文所提供之定義為準。

【0055】 除非另外解釋，否則本文所使用之所有技術及科學術語具有與本發明所屬領域之一般技術者通常所理解相同的含義。本文中提及之所有 HUGO 基因命名委員會(HUGO Gene Nomenclature Committee, HGNC)識別符(ID)均以全文引用之方式併入本文中。儘管可在本發明之實踐或測試中使用類似或等效於本文所描述之方法及材料，但下文描述適合的方法及材料。材料、方法及實例僅為說明性的且並不意欲為限制性的。

【0056】 「T 細胞受體」或「TCR」表示在 T 細胞或 T 淋巴細胞之表面上存在的分子，該分子識別作為肽與主要組織相容性複合體(MHC)分子結合的抗原結合。TCR 由兩種不同的蛋白鏈構成(亦即，其為異二聚體)。在人體之 95% T 細胞中，TCR 由 α (α)鏈及 β (β)鏈組成(分別由 TRA 及 TRB 編碼)，而在 5% T 細胞中，TCR 由 γ 及 δ (γ/δ)鏈組成(分別由 TRG 及 TRD 編碼)。此比率在個體發生及患病狀態(諸如白血病)期間變化。其在各物種之間亦不同。各 TCR 鏈由兩個細胞外域構成：可變(V)區及恆定(C)區。恆定區接近細胞膜，之後為跨膜區及短細胞質尾，而可變區結合至肽/MHC 複合體。TCR α 及 TCR β 鏈之可變域具有三個高變互補決定區(CDR)，表示為 CDR1、CDR2 及 CDR3。在一些實施例中，CDR3 為主要抗原識別區。在一些實施例中，TCR α 鏈基因包含 V 及 J，且 TCR β 鏈基因包含促進 TCR 多樣性之 V、D 及 J 基因區段。TCR 恆定域由短連接序列組成，其中半胱胺酸殘基形成二硫鍵，其在兩條鏈之間形成連接。

【0057】 術語「治療性 TCR 基因」可指 TCR α 與 TCR β 鏈之特定組合，其介導所要功能性，例如能夠有助於宿主之免疫系統與疾病對抗。治

療性 TCR 基因可選自藉由噬菌體、酵母或 T 細胞呈現系統而表現為重組 TCR 庫的活體外突變 TCR 鏈。治療性 TCR 基因可為自體的或同種異體的。

【0058】 術語「癌症」表示已經歷具有分化喪失、生長速率增加、周圍組織侵入之特徵性退行發育且能夠轉移的惡性贅瘤。術語「癌症」應視為包括以在個體體內不可控制之細胞生長為特徵的疾病。在一些實施例中，可互換使用術語「癌症」及「腫瘤」。在一些實施例中，術語「腫瘤」係指良性或非惡性生長。

【0059】 如本文所用，術語「新抗原」係指來源於腫瘤特異性基因組突變之抗原。例如，新抗原可因非同義之單一核苷酸突變而由腫瘤樣本中之突變蛋白的表現產生，或因誘發性框移突變而由替代開放閱讀框架的表現產生。因此，新抗原可與病理性病況相關聯。在一些實施例中，「突變蛋白」係指包含至少一個胺基酸的蛋白，該胺基酸不同於典型胺基酸序列之相同位置處的胺基酸。在一些實施例中，相對於典型胺基酸序列，突變蛋白包含插入、刪除、取代、包括由閱讀框架偏移所產生之胺基酸或其任何組合。

【0060】 「抗體」表示多肽，其至少包括特異性識別及結合抗原之抗原決定基的輕鏈或重鏈免疫球蛋白可變區。在一些實施例中，抗體由重鏈及輕鏈構成，其中之每一者具有可變區，稱為可變重鏈(V_H)區及可變輕鏈(V_L)區。總之，V_H 區及 V_L 區負責結合由抗體識別之抗原。術語抗體包括完整免疫球蛋白以及其變體及部分(諸如 Fab'片段、F(ab)'₂ 片段)，及來源於完整免疫球蛋白之任何其他分子。

【0061】 「基因工程細胞」為使用生物技術而使其基因組成變化之細胞。此類變化包括在物種邊界內及跨物種邊界轉移基因以產生改良或新穎

生物體。藉由使用重組 DNA 方法分離及複製所關注之遺傳物質或藉由人工合成 DNA 來獲得新穎 DNA。

【0062】「基因工程 T 細胞」為使用生物技術而具有其基因組成變化之 T 細胞。

【0063】 抗原決定基肽、抗原決定基蛋白及抗體抗原決定基在本文中可互換使用。關於某些特定命名之抗原決定基，名稱亦可用於替代具有詞語抗原決定基之詞語或片語。對於指示為「mur6」之抗原決定基，名稱可按需要在上下文中指 huTRBC1-Mur6 或 huTRBC2-Mur6。

與經標記蛋白相關的各種實施例

【0064】 本文描述之一些實施例係關於可用於偵測、分離或耗盡基因工程細胞的經標記蛋白。經標記蛋白或蛋白標記可充當標記；可藉由發現標記來偵測、分離或清除任何含有經標記蛋白之細胞。經標記蛋白可包含抗原決定基肽，其可由適合的抗體鑑別。在一些實施例中，經標記蛋白可用於刺激細胞。在一些實施例中，將經標記蛋白引入至 T 細胞中以允許偵測、分離或清除基因工程 T 細胞。在一些實施例中，將經標記蛋白引入至 T 細胞中以允許刺激經工程改造之 T 細胞。在一些實施例中，將經標記蛋白引入至經工程改造之 T 細胞中以便實現對遞送組分之『處理』，該等組分包括但不限於細胞介素、核酸及小分子。在一些實施例中，經標記蛋白不用於刺激。

【0065】 一些實施例的圖展示於圖 1 中。在一些實施例中，展示於圖 1 中之 TCR 恆定域可為 TCR α 或 TCR β 恆定域。可使用全長或僅部分 TCR 恆定域。

【0066】 在一些實施例中，經標記蛋白包含 TCR 恆定域及外源性胺

基酸變異，其中該外源性胺基酸變異包含可在 TCR 恆定域內偵測及鑑別之序列。在一些實施例中，將胺基酸變異引入至 TCR 恆定域而非 TCR 可變域中以保持 TCR 特異性及靈敏度。在一些實施例中，將抗體抗原決定基插入至 TCR 鏈之恆定域而非 TCR 之可變域中。在一些實施例中，藉由在 TCR 鏈之一或多個位置中進行胺基酸交換而非藉由向 TCR 鏈添加額外外源性胺基酸來引入抗體抗原決定基。

【0067】 可偵測及可鑑別意謂能夠藉由分子生物學技術或一些其他相關技術發現或鑑別。例如，經標記蛋白為可偵測及可鑑別的，若其可結合至特異性抗體，則藉由包括但不限於流式細胞分析技術、IHC、免疫螢光顯微法、西方墨點法及 ELISA 之標準分子生物學技術偵測及鑑別。在一些實施例中，經標記蛋白表現於細胞表面上，因此可獲得細胞外抗體結合。

【0068】 外源性胺基酸變異係指未天然存在於 TCR 恆定域之物種中的胺基酸序列。外源性胺基酸變異可為來自另一物種之胺基酸序列或人工序列。此外，其可為連續或非連續胺基酸序列。例如在一些實施例中，TCR 恆定域來自一個物種及外源性胺基酸變異來自另一個物種。在一些實施例中，TCR 恆定域來自人類及外源性胺基酸變異來自非人類物種。在一些實施例中，非人類物種為小鼠。

【0069】 外源性胺基酸變異可來源於使 TCR 恆定域之某些胺基酸突變。例如，人類 TCR 恆定域之某些胺基酸可經突變，使得人類 TCR 恆定域之胺基酸序列段已變成鼠類 TCR 序列。以此方式，可將鼠類抗原決定基引入至人類 TCR 恆定域中產生經標記蛋白，而經標記蛋白的胺基酸總數與天然人類 TCR 恆定蛋白的胺基酸總數相同。因此，與天然人類 TCR 恆定域相比，此方法之一個優點為其不增加經標記蛋白之尺寸。另外，將經標

記蛋白併入至 TCR β 恆定域中，因此其具有與 TCR 本身相同的穩定性及表現。此外，自鼠類 TCR 恆定域引入選擇性胺基酸而非使用完整鼠類 TCR 恆定域可降低標記蛋白之免疫原性。在一些實施例中，突變包含 10 個胺基酸突變。在一些實施例中，突變包含 6 個胺基酸突變。在一些實施例中，僅將突變引入至兩個 TCR 恆定域中之一者中。

【0070】 存在可將外源性胺基酸變異引入至 TCR 恆定域中之其他方式。例如，可將第一物種之 TCR 恆定域的胺基酸序列段插入至具有相同胺基酸數目之第二物種之 TCR 恆定域內的序列中，且置換該序列以產生經標記蛋白。與第二物種之天然人類 TCR 恆定域相比，此方法亦不增加經標記蛋白之尺寸。

【0071】 在一些實施例中，TCR 恆定域包含由人類 T 細胞受體 β 恆定 2 (*TRBC2*) 基因編碼之序列。在一些實施例中，外源性胺基酸變異包含鼠類 TCR β 鏈恆定區(TCR C β 域)之序列。在一些實施例中，外源性胺基酸變異包含以下 10 個胺基酸突變中之一或多者：K4R、F7T、Y37F、N106E、E108K、T110P、Q111E、D112G、R113S、A114P。在一些實施例中，外源性胺基酸變異包括此等突變中之 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個。

【0072】 為便於在單細胞水準區分基因工程細胞與未經修飾之細胞，抗體試劑適用於偵測經工程改造之細胞特有之蛋白標記。公開的研究已表明，雜交鼠化 TCR(其中人類 TCR 可變域連接至小鼠 TCR 恆定域)為功能性的且可使用抗小鼠 TCR C β 抗體 H57 偵測(Cohen 等人, *Cancer Res* 2006 年)。如本文所用，「H57」可指保留本文所描述之選擇性結合特性且至少具有 H57 之可變區的任何抗體或其抗原結合片段。此抗體不結合於人類 TCR C β 域，且因此可唯一地鑑別表現鼠化 TCR 的經工程改造之 T 細

胞。此類完全 TCR 恆定域鼠化之缺點為其可增加所引入之 TCR 基因的免疫原性(Davis 等人, Clin Cancer Res 2010 年), 且其不允許治療性 TCR 基因框內外顯子基因嵌入(knock-in)至人類 TCR α 或 TCR β 恆定基因座中。為克服此等限制, 在一些實施例中, 產生「最小化」之含鼠類抗原決定基 TCR C β 域, 其中在人類 *TRBC2* 基因序列中調換 10 個胺基酸(K4R、F7T、Y37F、N106E、E108K、T110P、Q111E、D112G、R113S、A114P, 其中根據 Ensembl genome browser. Gene: TRBC2 (ENSG00000211772)編號)。在一些實施例中, 此等殘基之編號係參考 SEQ ID NO: 8 內之編號排列。因此, 提及「如 SEQ ID NO: 8 內所編號」表示 SEQ ID NO: 8 內之胺基酸位置編號系統, 而非序列本身。在此等 10 個胺基酸中, K4 及 F7 為 TCR C β A 股之部分, Y37 為 TCR C β B 股之部分, 且 N106-A114 為 TCR C β FG 環之部分(Sasada 等人, J Exp Med 2002 年)。在一些實施例中, 產生「最小化」之含鼠類抗原決定基 TCR C β 域(「huTRBC2-Mur6」), 其中在人類 *TRBC2* 基因序列中調換 6 個胺基酸(K4R、E108K、T110P、Q111E、D112G、R113S)。此等含鼠類抗原決定基 TCR β 鏈可與完全人類 TCR α 鏈有效配對且可在細胞表面藉由 H57 抗體偵測, 此允許偵測、分離及清除經 TCR 修飾之 T 細胞。此外, 此等含鼠類抗原決定基 TCR β 鏈與人類 TCR α 或 TCR β 恆定基因座中治療性 TCR 基因之框內外顯子基因嵌入相容。

【0073】 在一些實施例中, 外源性胺基酸變異可由抗體、奈米抗體、Fab 片段或 DARPin 偵測及鑑別。奈米抗體(亦稱為單域抗體)為由單一單體可變抗體域組成之抗體片段; 如全抗體, 其能夠選擇性結合於特異性抗原。DARPin (經設計錨蛋白重複蛋白之首字母縮寫)為通常展現高特異性及高親和力之靶蛋白結合的基因工程抗體模擬蛋白; DARPin 來源於天然

存在之錨蛋白，其為一種在自然界中介導高親和力蛋白-蛋白相互作用之蛋白類別。在一些實施例中，外源性胺基酸變異包含抗體抗原決定基，其結合於某些特異性抗體且可由此類抗體偵測及鑑別。抗原決定基可為連續或非連續序列。在一些實施例中，TRBC2 中之位置 4 及位置 108 至 113 為鼠類源。根據一些實施例用經標記蛋白偵測經 TCR 修飾之 T 細胞係基於可藉由流式細胞分析技術偵測之抗體染色。

【0074】 在一些實施例中，外源性胺基酸變異可由抗小鼠 TCR C β 抗體 H57 偵測及鑑別。H57 特異性結合於小鼠 TCR C β 域且不結合於人類 TCR C β 域。當將可由 H57 偵測之鼠類抗原決定基引入至人類 TCR C β 域中時，所得經標記蛋白可區別於具有天然人類 TCR C β 域之蛋白。可以類似方式使用其他物種之 TCR α 或 TCR β 恆定域(分別為 TRAC 及 TRBC)中所存在的任何抗體抗原決定基域，諸如可由小鼠抗大鼠 TCR $\alpha\beta$ 抗體 R73 偵測之抗體抗原決定基。

【0075】 在一些實施例中，人類 TRAC 或 TRBC 中之胺基酸靶向突變可用於產生可產生抗體的人工抗體抗原決定基。

【0076】 在一些實施例中，提供經標記蛋白。其可用於偵測、分離或清除表現此類經標記蛋白之基因工程細胞，該經標記蛋白包含如任何前述實施例之經標記蛋白。在一些實施例中，基因工程細胞包含基因工程 T 細胞。在一些實施例中，基因工程 T 細胞包含已藉由引入治療性 TCR 基因進行修飾之 T 細胞。術語「治療性 TCR 基因」可指 TCR α 與 TCR β 鏈之特定組合，其介導所要功能性，例如能夠有助於宿主之免疫系統與疾病對抗。

【0077】 基於當前可獲得的用於偵測經 TCR 修飾之 T 細胞之技術的方法具有各種缺陷。通常，經 TCR 修飾之 T 細胞中的 TCR 蛋白表現藉由

MHC 多聚體或 TCR V 域特異性抗體偵測(Altman 等人 Science 2006 年；Faint 等人 J Immunol Methods 1999 年)。另外，TCR C β 域特異性抗體已用作泛 $\alpha\beta$ TCR 抗體(純系 IP26；Schober 等人 Nat Biomed Eng 2019 年)，或偵測含有人類 TRBC1 域之 TCR(純系 JOVI-1；Maciocia 等人 Nat Med 2017 年)或鼠類 Trbc1/2 域(純系 H57；Mall 等人 Cancer Res 2016 年)。然而，需要針對各 TCR 特異性特定產生 MHC 多聚體，其取決於 HLA-對偶基因限制而不可供用於某些 TCR；TCR V 域特異性抗體僅可供用於某些 TCR V 域；若經 TCR 修飾之 T 細胞存在於採用相同 TCR V 域或 TCR C β 域之其他 T 細胞當中的池中，則不可使用 TCR V 域特異性抗體及 TCR C β 域特異性抗體。此外，歸因於大型鼠類蛋白序列之可能免疫原性，使用全鼠類 TCR 恆定域係不合需要的；此外，不能將基於全鼠類 TCR 恆定域之治療性 TCR 基因構築體框內整合於人類 TCR α 或 TCR β 恆定基因座中且需要共遞送高效表現的外源多腺苷酸信號。因此，當採用位點特異性基因嵌入方法時，將增加全鼠類 TCR 恆定域所需之基因模板的尺寸，可能對基因遞送效率造成不利影響。

【0078】 類似地，基於當前可獲得的用於分離經 TCR 修飾之 T 細胞之技術的方法具有各種缺陷。此類方法採用任何基於抗體之分離方法(例如，採用流式細胞分析技術或基於磁珠之分離)。經 TCR 修飾之 T 細胞的分離最常藉由基於 MHC 多聚體之試劑進行(Knabel 等人 Nat Med 2002 年)。如上文所論述，尤其需要產生針對各 TCR 特異性之 MHC 多聚體，其取決於 HLA-對偶基因限制而不可供用於某些 TCR。其他分離方法包括：

- 使用置於 TCR 抗原結合域中之抗體抗原決定基(例如，由 Kieback 等人 PNAS 2008 描述)。可假定添加或修飾胺基酸會干擾 TCR 抗原之精細

特異性及 TCR 靈敏度，因為其可更改結合域之結構。因此，此概念需要研究各個別 TCR 之可行性且將可能影響一些 TCR 之抗原結合。

- 使用 TCR V 域或人類 TRBC1-特異性抗體。亦如上文所論述，此類試劑僅可供用於某些 TCR V 域，且若經 TCR 修飾之 T 細胞存在於利用相同 TCR V 域或人類 TRBC1 之其他 T 細胞當中的池中，則不可使用此類試劑。

- 使用與治療性 TCR 基因結合表現之細胞表面標記蛋白，例如截斷 LNGFR 或 EGFR 蛋白之共表現。然而，此類細胞表面標記之納入使轉基因尺寸增加，此可削弱基因工程改造及後續轉基因表現之效率以及增強經工程改造之 T 細胞的免疫原性。

【0079】 另外，基於當前可獲得的用於清除經 TCR 修飾之 T 細胞之技術的方法具有各種缺陷。已描述許多針對過繼性 T 細胞療法之『安全開關』，其中該過繼性 T 細胞療法包括 TCR 及 CAR 療法。所描述之系統包括：

- 使用置於 TCR 抗原結合域中之抗體抗原決定基(例如，由 Kieback 等人 PNAS 2008 年描述)。此概念需要針對各個別 TCR 進行測試且將可能影響部分 TCR 之抗原結合。

- 使用額外轉基因，諸如單純疱疹病毒(Herpes Simplex Virus) TK (Bonini 等人 Science 1997 年；Ciceri 等人 Lancet Oncol 2009 年)或誘導性 Caspase-9 (Straathof 等人 Blood 2005 年；Di Stasi 等人 N Engl J Med 2011 年)，其可在活體內選擇性活化。然而，此類標記之包涵物使需要遞送至細胞中之轉基因的尺寸增加，其可削弱基因工程改造及後續轉基因表現之效率。

【0080】 相比於當前可用技術，本文所提供的一些實施例可提供以下優點中的一或多者：

1. 免疫原性降低：一些實施例將有限數目之胺基酸變化引入至人類 TRBC 域中。相比於人類 TRBC2 基因，如 Cohen 等人 Cancer Res 2006 所描述之完全鼠類 *Trbc2* 基因含有 33 個外來胺基酸。相比之下，如一些實施例中所描述之含鼠類抗原決定基 *TRBC2* 基因僅含有 10 個或更少的外來胺基酸，諸如 9、8、7、6、5、4、3 或 2 個非人類而為鼠類的胺基酸。

2. 對於所有人類 TCR 之廣泛及通用的效用：不同於諸如 TCR V 域特異性抗體、MHC 多聚體或 TCR 構架修飾之替代技術，本文描述之一些實施例可用於所有獨立於其 TCR V 域用途、MHC-限制及抗原特異性的 TCR。

3. 高特異性偵測：即使在缺少內源性 TCR 鏈之基因剔除(knock-out)的情況下，一些實施例允許經 TCR 修飾之 T 細胞的高特異性偵測。諸如 TCR V 域特異性抗體及人類 *TRBC1*-特異性抗體之替代技術可與相當大的內源性 TCR 鏈部分特異性反應，從而防止經 TCR 修飾之 T 細胞的準確偵測及特異性分離或清除。

4. 允許人類 TCR 基因座中治療性 TCR 基因之框內外顯子基因嵌入：例如，治療性 TCR 構築體的 $TCR\alpha$ 基因座基因嵌入(採用如 Schober 等人 (Nat Biomed Eng 2019 年)所描述之完全鼠化 *Trbc* 基因)需要共遞送完全鼠化 *Trac* 基因及用於外源性轉錄終止之牛類生長激素 poly(A)序列。相比之下，如一些實施例中所描述之採用含鼠類抗原決定基 *TRBC2* 基因之 $TCR\beta$ 鏈可與完全人類 $TCR\alpha$ 鏈有效配對且因此與框內外顯子 $TCR\alpha$ 基因座基因嵌入及內源性轉錄終止相容。此意謂治療性基因構築體之尺寸減少約 500 bp，此增加基因工程改造方法之效率。

5. 治療性 TCR 基因卡匣之尺寸無實質性增加：一些實施例係基於人類 TCR 恆定域中之所選胺基酸突變成其鼠類對應物。用於偵測、分離及/或清除經 TCR 修飾之 T 細胞的替代技術包括使用額外蛋白(例如截斷 EGFR、截斷 LNGFR、HSV-TK 及誘導性 Caspase-9)。由此，所遞送轉基因之尺寸增加，其可削弱基因工程改造及後續轉基因表現之效率。此外，在轉基因中之額外細胞表面表現蛋白的納入可增加經工程改造之 T 細胞的免疫原性。

【0081】 在一些實施例中，已藉由引入治療性 TCR 基因進行修飾之 T 細胞係用於癌症治療。在一些實施例中，癌症為固態腫瘤。治療性 TCR 基因可選自藉由噬菌體、酵母或 T 細胞呈現系統表現為重組 TCR 庫的活體外突變 TCR 鏈。治療性 TCR 基因亦可指來自個別患者基底上之腫瘤活體組織切片的新抗原特異性 TCR 基因。在其鑑別之後，隨後經由基因工程改造將此類新抗原 TCR 基因引入至患者 T 細胞中，藉此重導向 T 細胞之抗原特異性朝向腫瘤新抗原。最後，基因工程 T 細胞經由靜脈內輸注投與回至患者以治療彼等癌症。此等實施例可應用於符合經工程改造之過繼性 T 細胞療法條件的所有癌症。

【0082】 在一些實施例中，為了在治療性 TCR 基因構築體中製作經標記蛋白，將鼠類抗原決定基引入至人類 TCR C β 域中以允許藉由抗小鼠 TCR C β 抗體 H57 偵測基因工程 T 細胞中所引入的 TCR。H57 為首先描述於 Kubo 等人, J Immunol 1989 中之抗體。在一些實施例中，使用 H57-597。H57-597 為導向至 TCR β 鏈 C 區之抗原決定基的倉鼠 mAb。H57-597 抗體不與負載 γ/δ TCR 之 T 細胞交叉反應。固定或可溶之 H57-597 抗體可活化負載 α/β TCR 之 T 細胞。本文描述之一些實施例係關於用於偵

測、分離或清除已藉由引入治療性 TCR 基因進行修飾之基因工程 T 細胞的經標記蛋白，其中經標記蛋白來源於鼠類 TCR C β 域且藉由人類 TCR C β 2 域內存在之胺基酸的突變引入至人類 TCR C β 2 域中。

【0083】 在一些實施例中，提供經標記蛋白以用於偵測、分離或清除用於癌症治療的經新穎 TCR 基因修飾之細胞，該經標記蛋白包含本文所提供之實施例中之任一者的經標記蛋白。

【0084】 一些實施例係關於一種套組，其用於偵測、分離或耗盡具有以上實施例中之任一者之經標記蛋白的基因工程細胞，該套組包含識別經標記蛋白之抗體或結合劑。在一些實施例中，套組包括連接至 H57 抗體之磁珠，其可用於分離或清除表現含鼠類抗原決定基 TCR β 鏈之 T 細胞。在一些實施例中，套組包括用於偵測組織中之基因工程細胞的染色劑。在一些實施例中，基因工程細胞包含 T 細胞。在一些實施例中，T 細胞已藉由引入治療性 TCR 基因來修飾。在一些實施例中，已藉由引入治療性 TCR 基因進行修飾之 T 細胞係用於癌症治療。

與用於靶向遞送之經標記蛋白相關的各種實施例

【0085】 一些實施例係關於經標記蛋白，其用於將一或多個有效負載靶向遞送至表現此類經標記蛋白之基因工程細胞，其包含本文所描述之實施例中之任一者的經標記蛋白。

【0086】 在一些實施例中，一或多個有效負載之遞送係藉由與抗體、抗體模擬蛋白或任何其他抗原結合骨架結合來達成。在一些實施例中，一或多個有效負載之遞送係藉由與 H57 抗體結合來達成。

【0087】 在一些實施例中，遞送之有效負載為蛋白、小分子、核酸、脂質體或奈米粒子。在一些實施例中，有效負載為雙特異性或三特異性抗

體。

【0088】 在一些實施例中，遞送之有效負載為細胞介素。在一些實施例中，遞送之有效負載係選自以下之群：IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 及 TNF- α 。在一些實施例中，細胞介素之序列經修飾以調節與其天然受體分子之相互作用。

【0089】 在一些實施例中，有效負載為 T 細胞表現之受體分子的促效劑或拮抗劑。在一些實施例中，促效劑結合至 CD27、CD28、CD137 或 CD278。在一些實施例中，拮抗劑結合至 TGF- β 受體、PD-1、CTLA-4、Vista、類固醇受體，或 A₁-、A_{2A}-、A_{2B}-或 A₃-腺苷受體。

【0090】 在一些實施例中，有效負載為調節 T 細胞之活化、分化、增殖、存活或效應功能的小分子。在一些實施例中，小分子抑制 TGF- β 受體、PD-1、CTLA-4、Vista、類固醇受體或 A₁-、A_{2A}-、A_{2B}-或 A₃-腺苷受體之信號傳導。

【0091】 在一些實施例中，有效負載為調節 T 細胞之活化、分化、增殖、存活或效應功能的核酸。在一些實施例中，核酸包含 miRNA、shRNA 或 siRNA。

【0092】 一些實施例係關於一種用於將一或多個有效負載靶向遞送至表現經標記蛋白之基因工程細胞的方法。該方法包括 a)獲得包含一或多個有效負載及結合劑之結合物，其中該結合劑特異性結合於該經標記蛋白，及 b)使基因工程細胞與該結合物接觸。

【0093】 在一些實施例中，結合劑為抗體、抗體模擬蛋白或任何其他抗原結合骨架。

【0094】 在一些實施例中，一或多個有效負載為蛋白、小分子、核酸、脂質體或奈米粒子。

【0095】 如本文中所瞭解，基於當前可獲得的用於將有效負載靶向遞送至經工程改造之 T 細胞之技術的方法可具有各種缺陷。大部分方法使用結合存在於細胞表面上之內源性標記(例如 CD3 ϵ 或 PD-1)的抗體靶向小鼠 T 細胞或未經工程改造之人類 T 細胞。一些研究描述使用與螢光親脂性示蹤劑染料 DiD 標記之聚乙二醇化脂質體結合的抗 Thy1.1 F(ab')₂ 片段，從而將螢光脂質體靶向至過繼性轉移小鼠 T 細胞(Zheng 等人, J Control Release, 2013)。另一研究描述使用與負載有 TGF β R1 抑制劑 SB525334 之聚乙二醇化脂質體結合的抗 Thy1.1 F(ab')₂ 片段，從而將 TGF β 受體抑制靶向至過繼性轉移小鼠 T 細胞(Zheng 等人, ACS Nano, 2017)。另一研究描述使用與負載有 TGF β R1 抑制劑 SD-208 之聚乙二醇化 PLGA 基奈米粒子結合的抗 PD-1 F(ab')₂ 片段，將 TGF β 受體抑制靶向至小鼠 T 細胞(Schmid 等人, Nat Commun, 2017)。另一研究描述使用與負載有兩個 DNA 質體之奈米粒子結合的抗 CD3 ϵ F(ab')₂ 片段將 CAR DNA 構築體靶向至小鼠 T 細胞，該等 DNA 質體中，一個編碼藉由 piggyBac 反向重複序列側接之 CD19 CAR 基因且一個編碼高度活化之 piggyBac iPB7 轉座酶基因(Smith 等人, Nature Nanotech, 2017 年)。另一研究描述使用與負載有 mRNA 編碼 Foxo1_{3A} 變體轉錄因子之奈米粒子結合的抗 CD3 ϵ 抗體，將轉錄因子 mRNA 靶向至人類 T 細胞(Moffett, Nat Commun, 2017)。另一研究描述使用與負載有 TGF β R1 抑制劑 SB525334 之兩親媒性金奈米粒子結合的抗 CD8 α VHH 奈米抗體，將 TGF β 受體抑制靶向至小鼠 T 細胞(Yang 等人, Biomater Sci, 2019)。然而，此等技術不提供將有效負載靶向遞送至

過繼性 T 細胞療法中所使用之經工程改造之人類 T 細胞的解決方案。

【0096】一些技術允許使用與已經工程改造以結合於 IL-2R $\beta\gamma$ 而非 IL-2R α 之突變型 IL-2 多肽(IL2v)融合的抗 PD-1 抗體，從而將 IL-2 細胞介素活性靶向至人類 T 細胞及 NK 細胞(WO/2018/184964, 2018)。其他研究描述使用與已經工程改造從而對小鼠細胞之活性比對 WT 小鼠 IFN- α 之活性低約 100 倍之突變型人類 IFN- α 融合的抗 CD8 α 抗體，將 I 型干擾素細胞介素活性靶向至小鼠 T 細胞及 cDC1 DC (Huyghe 等人, EMBO Mol Med, 2020)。另一研究描述使用與已經工程改造以使活性比游離 WT IL-21 低>1000 倍之突變型 IL-21 多肽融合的抗 PD-1 抗體，將 IL-21 細胞介素活性靶向至人類 T 細胞(Shen 等人, Front Immunol, 2020)。然而，此等技術不提供將細胞介素活性靶向遞送至過繼性 T 細胞療法中所使用之經工程改造之人類 T 細胞的解決方案。

【0097】一些研究使用與所引入之截斷 HER2 標記基因結合的 DARPin，靶向經工程改造之人類 CAR T 細胞。此涉及使用與 Neo-2/15 融合之抗 HER2 DARPin G3、已經工程改造以結合至 IL-2R $\beta\gamma$ 而非結合至 IL-2R α 的 IL-2 及 IL-15 模擬物，將 IL-2 及 IL-15 細胞介素活性靶向至表現作為轉導標記基因之截斷 HER2 的人類 CAR T 細胞(Leung 等人, AACR 2020 Abstract #2222, 2020)。然而，此不提供將細胞介素活性靶向遞送至過繼性 T 細胞療法中所使用之經工程改造之人類 T 細胞的解決方案，其中除治療性 TCR 或 CAR 基因以外，不共遞送額外標記基因。

【0098】本文描述之一些實施例可克服一或多種上文所描述之缺陷。本文所描述之各種實施例靶向經工程改造之人類 T 細胞而無需引入額外標記基因，因此不必增加治療性基因卡匣之尺寸，此使基因編輯效率最

大。

【0099】 在一些實施例中，TCR C β 域鼠類抗原決定基實施例區分自身與上文所描述之實施例之意義在於一個實施例可靶向經工程改造之人類 T 細胞而無需引入額外標記基因，因此其並非必需增加治療性基因卡匣之尺寸，此對基因編輯效率有幫助。

與 2A 肽抗原決定基相關之各種實施例

【0100】 一些實施例係關於可插入或構成 TCR 鏈之部分的抗體抗原決定基。在一些實施例中，抗原決定基可用於偵測表現此類抗體抗原決定基之基因工程細胞，其中抗體抗原決定基連接至 TCR 鏈或嵌合抗原受體。在一些實施例中，基因工程細胞包含編碼包含抗體抗原決定基之肽的核苷酸構築體。在一些實施例中，基因工程細胞之偵測係基於可藉由流式細胞分析技術偵測之抗體染色。抗體可特異性結合及識別抗體抗原決定基。

【0101】 在一些實施例中，如圖 2A-2D 中所示，抗體抗原決定基連接至可為恆定鏈或可變鏈之 TCR 鏈的 C 端或 N 端。在其他實施例中，將抗體抗原決定基插入至 TCR 鏈中。在一些實施例中，抗體抗原決定基用於連接 TCR α 及 TCR β 鏈。在一些實施例中，抗體抗原決定基之位置視 TCR 鏈之表現次序而定。一些實施例可包括編碼含有抗體抗原決定基序列之蛋白的除 TCR 以外之基因。實例包括融合至第二轉基因，例如以調節 T 細胞功能之嵌合抗原受體(CAR)轉基因。一些實施例可包括超過一個抗體抗原決定基。一些實施例可具有 2、3、4、5、6、7、8、9 或 10 個抗體抗原決定基，其中抗體抗原決定基可相同或不同。任何抗體抗原決定基可用於此等實施例中，只要存在可特異性偵測抗原決定基之抗體即可。在一些實施例中，所用抗體與流式細胞分析技術中之用途相容。在一些實施例中，抗

體抗原決定基連接至 TCR 恆定域之 C 端且因此位於細胞內，藉此由於抗體抗原決定基不便於抗體介導之免疫反應而降低免疫原性。在一些實施例中，抗體抗原決定基連接至 TCR 恆定域以避免干擾 TCR 特異性及靈敏度。

【0102】 在一些實施例中，基因工程細胞包含 T 細胞。在一些實施例中，T 細胞已藉由引入治療性 TCR 或 CAR 基因來修飾。在一些實施例中，已藉由引入治療性 TCR 或 CAR 基因進行修飾之 T 細胞係用於癌症治療。術語「治療性 TCR 基因」可指 TCR α 與 TCR β 鏈之特定組合，其介導所要功能性，例如能夠有助於宿主之免疫系統與疾病對抗。

【0103】 在一些實施例中，抗體抗原決定基包含 2A 肽序列、HA.11 抗原決定基標籤、FLAG 抗原決定基標籤、Myc 抗原決定基標籤或 V5 抗原決定基標籤。此等抗原決定基標籤可使用與流式細胞分析技術相容之抗體進行特異性偵測。在一些實施例中，抗體抗原決定基包含肽，該肽包含至多與 2A 肽相同數目之胺基酸的肽。熟習此項技術者應理解，只要包含至多與 2A 肽所包含之胺基酸數目相同的胺基酸，任何抗原決定基標籤可用於製作抗體抗原決定基。

【0104】 2A 肽或 2A 自裂解肽為一類 18 至 22 個 aa-長肽，其來源於病毒。2A 肽家族之四個成員常用於生命科學研究中。其為 P2A、T2A、E2A 或 F2A。P2A 來源於豬捷申病毒(teschovirus)-1 2A；T2A 來源於明脈扁刺蛾(thosea asigna)病毒 2A；E2A 來源於馬鼻炎(equine rhinitis) A 病毒；F2A 來源於口蹄疫(foot-and-mouth disease)病毒 18。

【0105】 在一些實施例中，2A 肽可為 P2A、T2A、E2A 或 F2A。在一些實施例中，2A 肽用於雙重目的：首先其允許連接兩個蛋白序列之表現；且其次其允許偵測兩個蛋白序列中之至少一者。如本文所用，當「基因」

用於涉及編碼肽中之一者(諸如 2A 肽)時，其表示編碼肽(例如 2A 肽)之核苷酸序列。其並不意謂表示天然存在之基因排列，而係作為編碼相關肽之核酸序列的簡寫。

【0106】 在一些實施例中，抗體抗原決定基包含 2A 肽序列片段或與其至少 90%一致之序列，其中 2A 肽序列不為完全 2A 序列。

【0107】 在一些實施例中，肽序列包含序列 SEQ ID NO: 1 (CGDVEENPG)。在一些實施例中，肽序列包含序列 SEQ ID NO: 6 (GDVEENPG)。在一些實施例中，肽序列包含序列 SEQ ID NO: 7 (GDVESNPG)。在一些實施例中，肽序列包含與 SEQ ID NO: 1 至少 75% 一致之序列。

【0108】 在一些實施例中，抗體抗原決定基可由單株抗 2A 肽抗體 3H4 鑑別。3H4 為最近由 Novus Biologicals 研發之抗體。其可用於西方墨點法(Yu 等人 *Viruses* 2020)、免疫沈澱法及免疫細胞化學/免疫螢光法。

【0109】 一些實施例係關於用於偵測已藉由引入治療性 TCR 基因進行修飾之基因工程 T 細胞的抗體抗原決定基，其包含以上實施例中之任一者的抗體抗原決定基。

【0110】 一些實施例係關於用於偵測用於癌症治療之經新穎 TCR 或 CAR 基因修飾之細胞的抗體抗原決定基，其包含以上實施例中之任一者的抗體抗原決定基。

【0111】 一些實施例係關於一種套組，其用於偵測表現以上實施例中之任一者之抗體抗原決定基的基因工程細胞。在一些實施例中，基因工程細胞包含 T 細胞。在一些實施例中，T 細胞已藉由引入治療性 TCR 基因來修飾。在一些實施例中，已藉由引入治療性 TCR 基因進行修飾之 T 細胞

係用於癌症治療。在一些實施例中，套組包括特異性結合於抗體抗原決定基之抗體或結合劑。在一些實施例中，抗體或結合劑可包括螢光標記或可偵測標記。

【0112】 一些實施例係關於一種基因構築體，其包含能夠表現 2A 肽序列或與其至少 90%一致之序列的基因，其中構築體經組態以用於自單一開放閱讀框架表現多種蛋白，且其中基因不會使基因構築體之尺寸增加超過 25 個胺基酸。

【0113】 在一些實施例中，2A 肽序列包含 2A 肽序列片段或與其至少 90%一致之序列。2A 肽序列不為完全 2A 序列。在一些實施例中，2A 肽序列包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 6 之序列或與 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 6 至少 75%一致之序列。(SEQ ID NO: 2=EGRGSLLTCGDVEPGP；SEQ ID NO: 3=ATNFSLLKQAGDVEPGP；SEQ ID NO: 6=GDVEENPG)。

【0114】 在使用基因工程 T 細胞之細胞療法中，必須重導向此類 T 細胞之抗原特異性。為重導向 T 細胞之抗原特異性，應引入外源 TCR α 及 TCR β 鏈序列兩者。因此，為了使基因工程改造效率最大化，治療性 TCR 基因構築體應促進兩種 TCR 基因之同步表現。實現此目的之一種方式為藉由使用 2A 自裂解肽序列，其允許兩種蛋白以等莫耳比自單一開放閱讀框架共表現(Ryan 及 Drew. EMBO J 1994)。值得注意的是，與基於 IRES 之 TCR 轉基因相比，基於 2A 肽之 TCR 轉基因顯示增加之表現及功能性(Leisegang 等人 J Mol Med 2008)，其可能歸因於所引入 TCR 鏈之增強配對。

【0115】 在一些實施例中，在治療性 TCR 基因構築體中，TCR α 及

TCR β 鏈使用共價連接至 TCR C α 或 TCR C β 域(視表現次序而定)之介入抗原決定基(例如標記(marker 或 label))序列，諸如 2A 肽序列共表現。因為 2A 肽序列通常不存在於哺乳動物細胞中，所以此類肽可充當追蹤基因工程 T 細胞之蛋白標記。為區別經工程改造之 T 細胞與未經修飾之 T 細胞，可使用可在單細胞位階上偵測之經工程改造之 T 細胞的抗體試劑。已產生基於流式細胞分析技術之染色程序，其中可使用單株抗 2A 肽抗體 3H4 偵測治療性 TCR 基因。因為 2A 肽標記共價連接至 TCR β 鏈之細胞內域，所以重要的係在膜滲透細胞中進行此染色程序。此等 2A 肽連接之 TCR β 鏈允許使用 3H4 抗體高效偵測經 TCR 修飾之 T 細胞，其中極少背景信號源自野生型 T 細胞。此外，此等 2A 肽連接之 TCR β 鏈與治療性 TCR 基因至人類 TCR 基因座中之框內外顯子基因嵌入相容。

【0116】 相比於當前可用技術，根據本文所描述之各種實施例之用於偵測、分離或清除經 TCR 修飾之 T 細胞的基於抗體抗原決定基的蛋白標記提供以下優點：(a)不會使治療性基因構築體之尺寸增加超過 25 個胺基酸，(b)具有極小免疫原性，(c)可用於每一治療性 TCR 基因，而無需視 TCR 之抗原特異性最佳化，及(d)與完全人類 TCR 恆定域之用途相容。由於其細胞內位置，此標記適合於偵測(但不分離或清除)經工程改造以表現治療性 TCR 之 T 細胞。

【0117】 更特定言之，對於包含 2A 肽抗原決定基之抗體抗原決定基，在一些實施例中，一些當前可用技術之優點可包括以下中之一或多者：

1. 免疫原性降低：與諸如完全鼠類 TCR 恆定域之替代技術相比，本發明引入有限數目之胺基酸變化。值得注意的是，儘管 2A 肽序列來源於病毒，但其似乎不誘發免疫活性個體中之免疫反應(Arber 等人, Gene Ther

2013)。

2. 所有人類 TCR 之廣泛及通用的效用：可用於每一治療性 TCR 基因，而無需視 TCR 之抗原特異性最佳化。

3. 高特異性偵測，細節可見於實例 3 及 4。

4. 允許治療性 TCR 基因框內外顯子基因嵌入至人類 TCR 基因座中。

5. 避免顯著增加治療性 TCR 基因卡匣：因為 2A 肽較小，所以添加 2A 肽實質上不會改變轉基因之尺寸。此為重要的，因為較大轉基因在基因遞送期間通常導致整合效率較低及 DNA 毒性較高。

【0118】 一些實施例係關於表現如前述實施例中之任一者之經標記蛋白的基因工程細胞。一些實施例係關於表現如前述實施例中之任一者之抗體抗原決定基的基因工程細胞。一些實施例係關於含有如前述實施例中之任一者之基因構築體的基因工程細胞。

【0119】 經標記蛋白或抗體抗原決定基可引入至任何適合的細胞中。適合的細胞包括但不限於哺乳動物細胞、昆蟲細胞、酵母及細菌。在一些實施例中，適合的載體包括病毒、酵母、細菌及噬菌體。儘管本發明為簡單起見而全文使用術語「細胞」，但本文中預期本文「細胞」之所有此類揭示內容不僅包括各種形式之 T 細胞(諸如永生化 T 細胞)、酵母及細菌，而且可更一般地與任何載體(包括病毒及噬菌體)一起使用。因此，本發明關於如本文所用之「細胞」(參見可引入組合庫之細胞)可包括真核細胞、原核細胞，且表示其中亦可採用病毒及噬菌體作為載體之選擇。細胞可為細胞株、永生化細胞或初級細胞。在一些實施例中，細胞為人類細胞，或來源於人類細胞。在一些實施例中，細胞群體包含永生化 T 細胞或初級 T 細胞。在一些實施例中，細胞經工程改造，例如經基因修飾以藉由細胞減少或消

除功能特性之內源或背景表現。在一些實施例中，細胞經工程改造，例如經基因修飾以增強細胞在引入經標記之蛋白或抗體抗原決定基時呈現功能特性的能力。在一些實施例中，細胞經工程改造，例如經基因修飾以促進培養中之群體的生長及/或維持。在一些實施例中，群體之細胞不包含賦予細胞至少一種功能特性之內源多肽。在一些實施例中，細胞經基因修飾以引入或增強或消除或減少 CD4、CD8 及 CD28 中之一或多者的表現。在一些實施例中，經基因修飾之細胞為 T 細胞。

【0120】 支持本文所描述之各種實施例的一些資料示於圖 3-9 中。在此等及其他實施例中，表 1 中所列之序列可為適用的。圖 10-17 亦描繪來自下表之各種序列。

表 1：

序列描述	序列	SEQ ID NO:
用於產生 2A 肽抗體之免疫原	CGDVEENPG	1
T2A 肽序列	EGRGSLTCDGVEENPGP	2
P2A 肽序列	ATNFSLLKQAGDVEENPGP	3
含有可由 H57 抗體偵測之鼠類 TCR 抗原決定基的人類 TCR Cβ2 域	XDLRNVFPPKVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFYP DHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRCQVQFYGLSENDK WPEGSAKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKRKDSRG	4
連接可由 3H4 抗體偵測之 T2A 肽抗原決定基的人類 TCR Cβ2 域	XDLKNVFPPKVAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFY PDHVELSWWVNGKEVHS GVSTDPQPLKEQPALNDS RYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDE WTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSESYQQGV LSATILYEILLGKATLYAVL VSALVLMAMVKRKDSRG GSGEGRGSLTCDGVEEN	5

	PGP	
T2A 或 P2A 肽序列之片段	GDVEENPG	6
E2A 或 F2A 肽序列之片段	GDVESNPG	7
人類 TCR Cβ2 域[UniProt A0A5B9]	XDLKNVFPK VAVFEPSE AEISHTQKATLVCLATGFY PDHVELSWWVNGKEVHS GVSTDPQPLKEQPALNDS RYCLSSRLRVSATFWQNP RNHFRCQVQFYGLSENDE WTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSESYQQGV LSATILYEILLGKATLYAVL VSALVLMAMVKRKDSRG	8
E2A 肽	QCTNYALLKLAGDVESNP GP	9
F2A 肽	VKQTLNFDLLKLAGDVES NPGP	10
人類 TCR Cβ1 [UniProt P01850]	XDLNKVFPPEVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFP DHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRFCQVQFYGLSENDE WTQDRAKPVTQIVSAEA WGRADCGFTSVSYQQGV LSATILYEILLGKATLYAVL VSALVLMAMVKRKDF	11
鼠類 Trbc1	XDLRNVTPPKVSLFEP SKAEIANKQKATLVCLARGF FPDHVELSWWVNGKEVH SGVSTDPQAYKESNYSYC LSSRLRVSATFWHNPRNH FRCQVQFHGLSEEDKWPE GSPKPVTQNISAEAWGRA DCGITSASYQQGVLSATIL YEILLGKATLYAVLVSTLV VMAMVRNR	12
鼠類 Trbc2	XDLRNVTPPKVSLFEP SKAEIANKQKATLVCLARGF FPDHVELSWWVNGKEVH SGVSTDPQAYKESNYSYC LSSRLRVSATFWHNPRNH FRCQVQFHGLSEEDKWPE GSPKPVTQNISAEAWGRA DCGITSASYHQGVLSATIL YEILLGKATLYAVLVSGLV LMAMVKKKNS	13
huTRBC1-muFG	EDLNKVPPEVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFP DHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR	14

	YCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRQCQVQFYGLSEEDK WPEGSPKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSVSYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKKRDF	
huTRBC2-muABFG (「mur10」)	EDLRNVTPPKVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFP DHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRQCQVQFYGLSEEDK WPEGSPKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKKRDSRG	15
huTRBC2-muABFG R4K	EDLKNVTPPKVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFP DHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRQCQVQFYGLSEEDK WPEGSPKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKKRDSRG	16
huTRBC2-muABFG T7F	EDLRNVFPPKVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFP DHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRQCQVQFYGLSEEDK WPEGSPKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKKRDSRG	17
huTRBC2-muABFG F37Y	EDLRNVTPPKVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFYP DHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRQCQVQFYGLSEEDK WPEGSPKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKKRDSRG	18
huTRBC2-muABFG E106N	EDLRNVTPPKVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFP DHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPR	19

	NHFRQCQVQFYGLSENDK WPEGSPKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKKRSDSRG	
huTRBC2-muABFG K108E	EDLRNVTPPKVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFP DHVELSWVWNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRQCQVQFYGLSEEDK WPEGSPKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKKRSDSRG	20
huTRBC2-muABFG P110T	EDLRNVTPPKVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFP DHVELSWVWNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRQCQVQFYGLSEEDK WTEGSPKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKKRSDSRG	21
huTRBC2-muABFG E111Q	EDLRNVTPPKVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFP DHVELSWVWNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRQCQVQFYGLSEEDK WPQGSPKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKKRSDSRG	22
huTRBC2-muABFG G112D	EDLRNVTPPKVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFP DHVELSWVWNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRQCQVQFYGLSEEDK WPEDSPKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVKKRSDSRG	23
huTRBC2-muABFG S113R	EDLRNVTPPKVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFP DHVELSWVWNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRQCQVQFYGLSEEDK	24

	WPEGRPKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVVRKDSRG	
huTRBC2-muABFG P114A	EDLRNVTTPPKVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFFP DHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRCQVQFYGLSEEDK WPEGSAKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVVRKDSRG	25
huTRBC2-mu7	EDLRNVTTPPKVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFYP DHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRCQVQFYGLSENDK WPEGSAKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVVRKDSRG	26
huTRBC2-mu6	EDLRNVFPPKVAVFEPSEA EISHTQKATLVCLATGFYP DHVELSWWVNGKEVHSG VSTDPQPLKEQPALNDSR YCLSSRLRVSATFWQNPR NHFRCQVQFYGLSENDK WPEGSAKPVTQIVSAEAW GRADCGFTSESYQQGVLS ATILYEILLGKATLYAVLVS ALVLMAMVVRKDSRG	27
1G4 α 鏈(全長)	MKSLRVLLVILWLQLSWV WSQKQEVTTQIPAALSVE GENLVLNCSFTDSAIYNL QWFRQDPGKGLTSLLLIQ SSQREQTSGRNLASLDKS SGRSTLYIAASQPGDSATY LCAVRPLYGGSYIPTFGRG TSLIVHPYIQNPDPVYQL RDSKSSDKSVCLFTDFDS QTNVSQSKDSDVYITDKT VLDMRSMDFKSNSAVAW SNKSDFACANAFNNSIPE DTFFPSPESSCDVKLVEKS FETDTNLFQNLVIGFRI LLKLVAGFNLLMTLRLWS S	28
1G4 β 鏈(具有 TRBC2 恆定	MSIGLLCCAALSLLWAGP	29

域之全長)	VNAGVTQTPKFQVLKTG QSMTLQCAQDMNHEYMS WYRQDPGMGLRLIHYSV GAGITDQGEVPNGYNVSR STTEDFPLRLLSAAPSQTS VYFCASSYVGNTGELFFG EGSRLTVLEDLKNVFPPK VAVFEPSEAEISHTQKATL VCLATGFYPDHVELSWW VNGKEVHSGVSTDPQPLK EQPALNDSRYCLSSRLRVS ATFWQNPRNHFRQCQVQF YGLSENDEWTQDRAKPV TQIVSAEAWGRADCGFTS ESYQQGVLSATILYEILLG KATLYAVLVSAVLVLMAMV KRKDSRG	
1G4 α 可變區	MKSLRVLLVILWLQLSWV WSQKQEVTTQIPAALSVPE GENLVLNCSFTDSAIYNL QWFRQDPGKGLTSLLLIQ SSQREQTSGRNLASLDKS SGRSTLYIAASQPGDSATY LCAVRPLYGGSYIPTFGRG TSLIVHP	30
1G4 β 可變區	MSIGLLCCAALSLLWAGP VNAGVTQTPKFQVLKTG QSMTLQCAQDMNHEYMS WYRQDPGMGLRLIHYSV GAGITDQGEVPNGYNVSR STTEDFPLRLLSAAPSQTS VYFCASSYVGNTGELFFG EGSRLTVL	31
H57 VH	EVYLVESGGDLVQPGSSL KVSCAASGFTFSDFWMY WVRQAPGKGLEWVGRIK NIPNNYATEYADSVRGRFT ISRDDSRNSIYLQMNRLR VDDTAIYYCTRAGRFDHF DYWGQGTMVTVSS	32
H57 VL	YELIQSSASVTVGETVKI TCSGDQLPKNFAYWFQQ KSDKNILLIYMDNKRPS GIPERFSGSTSGTTATLTIS GAQPEDEAAYYCLSSYGD NNDLVFGSGTQLTVL	33
IL2v	APASSSTKKTQLQLEHLL DLQMILNGINNYKNPKLT RMLTAKFAMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNGA QSKNFHLRPRDLISNINVI	34

	VLELKGSETTFMCEYADE TATIVEFLNRWITFAQSIIS TLT	
天然 IL2 [UniProt P60568]	APTSSSTKKTQLQLEHLLL DLQMILNGINNYKNPKLT RMLTFKFYMPKKATELKH LQCLEEELKPLEEVLNLA QSKNFHLRPRDLISNINVI VLELKGSETTFMCEYADE TATIVEFLNRWITFCQSIIS TLT	35
(G4S)3 連接子	GGGGSGGGGSGGGGS	36
FLAG 抗原決定基	DYKDDDDDK	37
Myc 抗原決定基	EQKLISEEDL	38
HA.11 抗原決定基	YPYDVPDYA	39
V5 抗原決定基	GKPIPNPLLGLDST	40

【0121】 圖 3 展示使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入(knock-in) NY-ESO-1 1G4 TCR 之人類初級 T 細胞的 FACS 分析。huTRBC1，完全人類 TRBC1 序列；muTrbc2，無多腺苷酸(polyA)信號之完全鼠類 Trbc2 序列；muTrbc2-BGHPA，具有 BGH 多腺苷酸信號之完全鼠類 Trbc2 序列；huTRBC1-muFG，併入鼠類 Trbc2 FG 環(經預測之 H57 結合抗原決定基；Wang 等人, EMBO J 1998)之人類 TRBC1 序列。人類初級 CD3⁺ T 細胞用抗 CD3/CD28 珠粒選擇且活化 2 天，且隨後用 TRAC RNP 及修復模板電穿孔以導引 TCR 基因嵌入。電穿孔後 5 天，採集細胞且藉由與 APC 抗小鼠 TCR Cβ 鏈抗體(純系 H57-597，目錄號# 109212，BioLegend)及 PE-Cy7 抗人類 TCR Vβ13.1 抗體(純系 H131，目錄號# 362406，BioLegend)共染色來分析。資料顯示，當使用完全鼠類 Trbc2 序列時，多腺苷酸信號適用於 TCR 表現，且表現完全鼠類 Trbc2 序列之細胞可由 H57 抗體識別。然而，將鼠類 Trbc2 FG 環併入人類 TRBC1 序列中，雖然能夠實現 TCR 表現，但並不足以實現 H57 抗體識別。

【0122】 圖 4 展示使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1 1G4 TCR 之人類初級 T 細胞的 FACS 分析。huTRBC1，

完全人類 TRBC1 序列；muTrbc2-BGHPA，具有 BGH 多腺苷酸信號之完全鼠類 Trbc2 序列；huTRBC2-muABFG，併入鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 10 個胺基酸殘基以及 FG 環(經預測之 H57 結合抗原決定基；Wang 等人, EMBO J 1998 年及 Sasada 等人, J Exp Med 2002)之人類 TRBC2 序列。人類初級 CD3⁺ T 細胞用抗 CD3/CD28 珠粒選擇且活化 2 天，且隨後用 TRAC RNP 及修復模板電穿孔以導引 TCR 基因嵌入。電穿孔後 5 天，採集細胞且藉由用 APC 抗小鼠 TCR C β 鏈抗體(純系 H57-597，目錄號# 109212，BioLegend)及 PE-Cy7 抗人類 TCR V β 13.1 抗體(純系 H131，目錄號# 362406，BioLegend)共染色來分析。資料顯示，將來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 10 個胺基酸殘基以及 FG 環併入人類 TRBC2 序列中足以實現 TCR 表現及 H57 抗體識別(胺基酸突變為 K4R、F7T、Y37F、N106E、E108K、T110P、Q111E、D112G、R113S、A114P)。

【0123】 圖 5 展示使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1 1G4 TCR 之人類初級 T 細胞的 FACS 分析。huTRBC2，完全人類 TRBC2 序列；huTRBC2-muABFG，具有來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 10 個胺基酸殘基以及 FG 環(經預測之 H57 結合抗原決定基)之併入的人類 TRBC2 序列；muABFG R4K，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(R4K)以定位(map)最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG T7F，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(T7F)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG F37Y，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(F37Y)以定位最小 H57 結合

抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG E106N，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(E106N)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG K108E，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(K108E)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG P110T，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(P110T)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG E111Q，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(E111Q)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG G112D，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(G112D)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG S113R，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(S113R)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG P114A，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(P114A)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列。選擇人類初級 CD3⁺ T 細胞且用抗 CD3/CD28 珠粒活化 2 天，且隨後用 TRAC RNP 及修復模板電穿孔以導引 TCR 基因嵌入。電穿孔 5 天後，採集細胞且藉由用 APC 抗小鼠 TCR C β 鏈抗體(純系 H57-597，目錄號# 109212，BioLegend)及 PE-Cy7 抗人類 TCR V β 13.1 抗體(純系 H131，目錄號# 362406，BioLegend)共染色來分析。資料顯示，來自鼠類

Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環為實現 H57 抗體識別所必需的(胺基酸為 R4、K108、P110、E111、G112 及 S113)。

【0124】圖 6 展示使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1 1G4 TCR 之人類初級 T 細胞的 FACS 分析。huTRBC2，完全人類 TRBC2 序列；huTRBC2-mu10，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 10 個胺基酸殘基以及 FG 環(經預測之 H57 結合抗原決定基)的人類 TRBC2 序列；huTRBC2-mu6，併入來自鼠類 Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環(經識別之最小 H57 結合抗原決定基)的人類 TRBC2 序列；huTRBC2-mu7，併入來自鼠類 Trbc2 A 股之 7 個胺基酸殘基以及 FG 環(經識別之最小 H57 結合抗原決定基+ T7)的人類 TRBC2 序列。選擇人類初級 CD3⁺ T 細胞且用抗 CD3/CD28 珠粒活化 2 天，且隨後用 TRAC RNP 及修復模板電穿孔以導引 TCR 基因嵌入。電穿孔 6 天後，採集細胞且藉由用 APC 抗小鼠 TCR C β 鏈抗體(純系 H57-597，目錄號# 109212，BioLegend)及 PE-Cy7 抗人類 TCR V β 13.1 抗體(純系 H131，目錄號# 362406，BioLegend)共染色來分析。資料顯示，將來自鼠類 Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環併入人類 TRBC2 序列足以實現 TCR 表現及 H57 抗體識別(胺基酸突變為 K4R、E108K、T110P、Q111E、D112G、R113S)。

【0125】圖 7 展示使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1 1G4 TCR 之人類初級 T 細胞的 FACS 分析。模擬電穿孔，細胞未經電穿孔；TRAC RNP，細胞僅用 TRAC RNP 電穿孔；TRAC RNP +環形修復模板，細胞用 TRAC RNP 及環形修復模板電穿孔；TRAC RNP +線性修復模板，細胞用 TRAC RNP 及線性修復模板電穿孔。選擇人類初級 CD3⁺ T 細胞且用抗 CD3/CD28 珠粒活化 2 天，且隨後用 TRAC RNP 及

修復模板電穿孔以導引 TCR 基因嵌入。電穿孔 10 天後，採集細胞、滲透且藉由用非結合小鼠抗 2A 肽抗體(純系 3H4，目錄號# NBP2-59627，Novus Biologicals)及 BV421 大鼠抗小鼠 IgG1 抗體(純系 A85-1，目錄號# 562580，BD Biosciences)染色來進行 FACS 分析。所有染色均在 BD 滲透/洗滌緩衝液(1x)中進行。資料表明，可使用抗 2A 肽抗體偵測已經工程改造以表現含有 T2A 肽序列之 NY-ESO-1 1G4 TCR 的人類初級 T 細胞。

【0126】 圖 8 展示使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1 1G4 TCR 之人類初級 T 細胞的 FACS 分析。模擬電穿孔，細胞未經電穿孔；TRAC RNP，細胞僅用 TRAC RNP 電穿孔；TRAC RNP + 環形修復模板，細胞用 TRAC RNP 及環形修復模板電穿孔；TRAC RNP + 線性修復模板，細胞用 TRAC RNP 及線性修復模板電穿孔。選擇人類初級 CD3⁺ T 細胞且用抗 CD3/CD28 珠粒活化 2 天，且隨後用 TRAC RNP 及修復模板電穿孔以導引 TCR 基因嵌入。電穿孔 11 天後，採集細胞、滲透且藉由用非結合小鼠抗 2A 肽抗體(純系 3H4，目錄號# NBP2-59627，Novus Biologicals)、BV421 大鼠抗小鼠 IgG1 抗體(純系 A85-1，目錄號# 562580，BD Biosciences)及 PE-Cy7 抗人類 TCR V β 13.1 抗體(純系 H131，目錄號# 362406，BioLegend)染色來進行 FACS 分析。所有染色均在 BD 滲透/洗滌緩衝液(1x)中進行。資料表明，可使用抗 2A 肽抗體偵測已經工程改造以表現含有 T2A 肽序列之 NY-ESO-1 1G4 TCR 的人類初級 T 細胞，且此 2A 肽染色與 TCR V β 13.1 染色相關。

【0127】 圖 9 展示已經反轉錄轉導以表現 CD19 CAR 構築體之人類初級 T 細胞的 FACS 分析。模擬轉導，細胞未經轉導；Ly6G-Puro，細胞用含有 Ly6G-P2A-Puro 構築體之反轉錄病毒轉導；1st Gen CAR-Ly6G-

Puro，細胞用含有 1st Gen CD19 CAR-T2A-Ly6G-P2A-Puro 構築體之反轉錄病毒轉導；2nd Gen CAR-Ly6G-Puro，細胞用含有 2nd Gen CD19 CAR-T2A-Ly6G-P2A-Puro 構築體之反轉錄病毒轉導。選擇人類初級 CD3⁺ T 細胞且用抗 CD3/CD28 珠粒活化 2 天，且隨後用如上文所指示之反轉錄病毒感染。轉導 14 天後，採集細胞、滲透且藉由用非結合小鼠抗 2A 肽抗體(純系 3H4，目錄號# NBP2-59627，Novus Biologicals)、BV421 大鼠抗小鼠 IgG1 抗體(純系 A85-1，目錄號# 562580，BD Biosciences)及 PE/Dazzle 594 抗 Ly6G 抗體(純系 1A8，目錄號# 127647，BioLegend)染色來進行 FACS 分析。所有染色均在 BD 滲透/洗滌緩衝液(1x)中進行。資料表明，可使用抗 2A 肽抗體偵測已經工程改造以表現含有 2A 肽序列之 CD19 CAR 構築體的人類初級 T 細胞，且此 2A 肽染色與在相同構築體(Ly6G)中存在之轉導標記蛋白之染色相關。

【0128】 當在本文中提及包含兩個或更多個所定義步驟的方法時，所定義步驟可以任何次序進行或同時進行(除其中上下文不包括該可能性之外)，且方法可包括在所定義步驟中之任一者之前、在所定義步驟中之兩者之間或在所有所定義步驟之後(除其中上下文不包括該可能性之外)進行的一或多個其他步驟。

【0129】 在一些實施例中，涵蓋以下配置中之任一者：

1. 一種經標記蛋白，其包含：

TCR 恆定域；及

外源性胺基酸變異，其包含 TCR 恆定域內可偵測且可鑑別之序列。

2. 如配置 1 之經標記蛋白，其中 TCR 恆定域包含 TCR α 或 TCR β 恆定域。

3. 如配置 1 之經標記蛋白，其中外源性胺基酸變異包含 TCR 恆定域之序列的突變，視情況其中經標記蛋白包含 huTRBC1-mur6 或 huTRBC2-mur6。
4. 如配置 1 之經標記蛋白，其中 TCR 恆定域來自一種物質及外源性胺基酸變異來自另一種物質。
5. 如配置 4 之經標記蛋白，其中 TCR 恆定域來自人類及外源性胺基酸變異來自非人類物種。
6. 如配置 5 之經標記蛋白，其中非人類物種為小鼠。
7. 如配置 3 之經標記蛋白，其中 TCR 恆定域包含由人類 *TRBC2* 基因編碼之序列。
8. 如配置 3 之經標記蛋白，其中外源性胺基酸變異包含鼠類 TCR C β 域之序列。
9. 如配置 3 之經標記蛋白，其中突變包含 10 個胺基酸突變。
10. 如配置 9 之經標記蛋白，其中突變形成非連續序列。
11. 如配置 9 之經標記蛋白，其中如根據 SEQ ID NO: 8 編號系統編號，10 個胺基酸突變為 K4R、F7T、Y37F、N106E、E108K、T110P、Q111E、D112G、R113S、A114P。
12. 如配置 3 之經標記蛋白，其中突變包含 6 個胺基酸突變。
13. 如配置 12 之經標記蛋白，其中 6 個胺基酸突變為 K4R、E108K、T110P、Q111E、D112G、R113S，視情況其中經標記蛋白包含 SEQ ID NO: 27。
14. 如配置 1 之經標記蛋白，其中外源性胺基酸變異可由抗體、奈米抗體、Fab 片段或 DARPin 偵測及鑑別。

15. 如配置 1 之經標記蛋白，其中外源性胺基酸變異可由抗小鼠 TCR C β 抗體 H57-597 偵測及鑑別。

16. 一種經標記蛋白，其用於偵測、分離或清除表現此類經標記蛋白之基因工程細胞，該經標記蛋白包含如配置 1 至 15 中任一者之經標記蛋白。

17. 如配置 16 之經標記蛋白，其中基因工程細胞包含基因工程 T 細胞。

18. 如配置 17 之經標記蛋白，其中基因工程 T 細胞包含已藉由引入治療性 TCR 基因進行修飾之 T 細胞。

19. 如配置 18 之經標記蛋白，其中已藉由引入治療性 TCR 基因進行修飾之 T 細胞係用於癌症治療。

20. 一種經標記蛋白，其用於偵測、分離或清除已藉由引入治療性 TCR 基因進行修飾之基因工程 T 細胞，其中經標記蛋白來源於鼠類 TCR C β 域且藉由人類 TCR C β 2 域內存在之胺基酸的突變而引入至人類 TCR C β 2 域中。

21. 一種經標記蛋白，其用於偵測、分離或清除用於癌症治療的經新穎 TCR 基因修飾的細胞，該經標記蛋白包含如配置 1 至 20 中任一者之經標記蛋白。

22. 一種套組，其用於偵測、分離或清除具有如配置 1 至 21 中任一者之經標記蛋白的基因工程細胞，該套組包含識別經標記蛋白之抗體。

23. 如配置 22 之套組，其中基因工程細胞包含 T 細胞。

24. 如配置 23 之套組，其中 T 細胞已藉由引入治療性 TCR 基因來修飾。

25. 如配置 24 之套組，其中已藉由引入治療性 TCR 基因進行修飾之 T 細胞係用於癌症治療。

26. 一種經標記蛋白，其用於將一或多個有效負載靶向遞送至表現此類經標記蛋白之基因工程細胞，該經標記蛋白包含如配置 1 至 15 中任一者之經標記蛋白。

27. 如配置 26 之經標記蛋白，其中一或多個有效負載之遞送藉由與抗體、抗體模擬蛋白或任何其他抗原結合骨架結合來達成。

28. 如配置 27 之經標記蛋白，其中抗體為抗小鼠 TCR C β 抗體 H57-597。

29. 如配置 26 之經標記蛋白，其中一或多個有效負載為蛋白、小分子、核酸、脂質體或奈米粒子。

30. 如配置 26 之經標記蛋白，其中遞送之有效負載為細胞介素。

31. 如配置 30 之經標記蛋白，其中細胞介素係選自以下之群：IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 及 TNF- α 。

32. 如配置 30 之經標記蛋白，其中細胞介素在其序列中經修飾以調節與其天然受體分子之相互作用。

33. 如配置 30 之經標記蛋白，其中細胞介素為由 T 細胞表現之受體分子的促效劑或拮抗劑。

34. 如配置 26 之經標記蛋白，其中有效負載為由 T 細胞表現之受體分子的促效劑或拮抗劑。

35. 如配置 34 之經標記蛋白，其中促效劑結合至 CD27、CD28、CD137 或 CD278。

36. 如配置 34 之經標記蛋白，其中拮抗劑結合至 TGF- β 受體、PD-1、CTLA-4、Vista、類固醇受體或 A₁-、A_{2A}-、A_{2B}-或 A₃-腺苷受體。

37. 如配置 26 之經標記蛋白，其中有效負載為調節 T 細胞之活化、分化、增殖、存活或效應功能的小分子。

38. 如配置 37 之經標記蛋白，其中小分子抑制 TGF- β 受體、PD-1、CTLA-4、Vista、類固醇受體或 A₁-、A_{2A}-、A_{2B}-或 A₃-腺苷受體之信號傳導。

39. 如配置 26 之經標記蛋白，其中有效負載為調節 T 細胞活化、分化、增殖、存活或效應功能的核酸。

40. 如配置 39 之經標記蛋白，其中核酸為 miRNA、shRNA 或 siRNA。

41. 如配置 26 之經標記蛋白，其中有效負載為雙特異性或三特異性抗體。

42. 一種用於將一或多個有效負載靶向遞送至表現經標記蛋白之基因工程細胞的方法，該方法包含：

獲得包含一或多個有效負載及結合劑之結合物，其中結合劑特異性結合於經標記蛋白，及

使基因工程細胞與結合物接觸。

43. 如配置 42 之方法，其中結合劑為抗體、抗體模擬蛋白或任何其他抗原結合骨架。

44. 如配置 42 之方法，其中一或多個有效負載為蛋白、小分子、核酸、脂質體或奈米粒子。

45. 一種抗體抗原決定基，其用於偵測表現此類抗體抗原決定基之基因工程細胞，其中抗體抗原決定基連接至 TCR 鏈或嵌合抗原受體(CAR)。

46. 如配置 45 之抗體抗原決定基，其中抗體抗原決定基連接至 TCR 鏈之 C 端或 N 端，或連接至 CAR 之 C 端或 N 端。

47. 如配置 45 之抗體抗原決定基，其中抗體抗原決定基插入至 TCR 鏈或 CAR 中。

48. 如配置 45 之抗體抗原決定基，其中基因工程細胞包含 T 細胞。

49. 如配置 48 之抗體抗原決定基，其中 T 細胞已藉由引入治療性 TCR 或 CAR 基因來修飾。

50. 如配置 49 之抗體抗原決定基，其中已藉由引入治療性 TCR 或 CAR 基因進行修飾之 T 細胞係用於癌症治療。

51. 如配置 45 之抗體抗原決定基，其中抗體抗原決定基用於連接 $TCR\alpha$ 及 $TCR\beta$ 鏈或用於連接 CAR 與由另一基因編碼之蛋白。

52. 如配置 45 之抗體抗原決定基，其包含 2A 肽序列、HA.11 抗原決定基標籤、FLAG 抗原決定基標籤、Myc 抗原決定基標籤、V5 抗原決定基標籤或包含至多與 2A 肽相同數目之胺基酸的肽。

53. 如配置 52 之抗體抗原決定基，其中 2A 肽可為 P2A、T2A、E2A 或 F2A。

54. 如配置 45 之抗體抗原決定基，其包含：2A 肽序列片段或與其至少 90%一致之序列，其中 2A 肽序列不為完全 2A 序列。

55. 如配置 54 之抗體抗原決定基，其中肽序列包含 SEQ ID NO: 1 (CGDVEENPG)或與其至少 75%一致之序列。

56. 如配置 54 或 55 之抗體抗原決定基，其中抗體抗原決定基可由單株抗 2A 肽抗體 3H4 鑑別。

57. 一種抗體抗原決定基，其用於偵測已藉由引入治療性 TCR 基因進

行修飾之基因工程 T 細胞，其包含如配置 45 至 56 中任一者之抗體抗原決定基。

58. 一種抗體抗原決定基，其用於偵測用於癌症治療的經新穎 TCR 或 CAR 基因修飾之細胞，其包含如配置 45 至 56 中任一者之抗體抗原決定基。

59. 一種用於偵測基因工程細胞之套組，其包含如配置 45 至 56 中任一者之抗體抗原決定基。

60. 如配置 59 之套組，其中基因工程細胞包含 T 細胞。

61. 如配置 60 之套組，其中 T 細胞已藉由引入治療性 TCR 基因來修飾。

62. 如配置 61 之套組，其中已藉由引入治療性 TCR 基因進行修飾之 T 細胞係用於癌症治療。

63. 一種基因構築體，其包含：能夠表現 2A 肽序列或與其至少 90% 一致之序列的核苷酸序列，其中構築體經組態以用於自單一開放閱讀框架表現多種蛋白，且其中核苷酸序列不會使基因構築體之尺寸增加超過 25 個胺基酸。

64. 如配置 63 之基因構築體，其中 2A 肽序列包含 2A 肽序列片段或與其至少 90% 一致之序列，其中 2A 肽序列不為完全 2A 序列。

65. 如配置 64 之基因構築體，其中 2A 肽序列包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 6 之序列或與 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 6 至少 75% 一致之序列。(SEQ ID NO: 2=EGRGSLLTCGDVEPGP；SEQ ID NO: 3=ATNFSLLKQAGDVEPGP；SEQ ID NO: 6=GDVEENPG)。

66. 一種基因工程細胞，其包含配置 1 至 15 中之任一者之經標記蛋白、或配置 53 至 55 中之任一者之抗體抗原決定基、或配置 63 至 65 中之任一者之基因構築體。

實例 1

【0130】 此實例表明，將自鼠類 *Trbc2* A 及 B 股之 10 個胺基酸殘基以及 FG 環併入人類 TRBC2 序列足以實現 TCR 表現及 H57 抗體識別。

【0131】 對使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處處基因嵌入 NY-ESO-1 1G4 TCR 的人類初級 T 細胞進行 FACS 分析。選擇人類初級 CD3⁺ T 細胞且用抗 CD3/CD28 珠粒活化 2 天，且隨後用 TRAC RNP 及修復模板電穿孔以導引 TCR 基因嵌入。電穿孔 5 天後，採集細胞且藉由用 APC 抗小鼠 TCR C β 鏈抗體(純系 H57-597，目錄號# 109212，BioLegend)及 PE-Cy7 抗人類 TCR V β 13.1 抗體(純系 H131，目錄號# 362406，BioLegend)共染色來分析。隨後進行 FACS 分析。

【0132】 結果示於圖 3 中：huTRBC1，完全人類 TRBC1 序列；mu*Trbc2*，無多腺苷酸信號之完全鼠類 *Trbc2* 序列；mu*Trbc2*-BGHpA，具有 BGH 多腺苷酸信號之完全鼠類 *Trbc2* 序列；huTRBC1-muFG，具有鼠類 *Trbc2* FG 環之併入的人類 TRBC1 序列。

【0133】 資料表明，當使用完全鼠類 *Trbc2* 序列時，多腺苷酸信號適用於 TCR 表現，且表現完全鼠類 *Trbc2* 序列之細胞可由 H57 抗體識別。然而，將鼠類 *Trbc2* FG 環併入人類 TRBC1 序列中，雖然能夠實現 TCR 表現，但並不足以實現 H57 抗體識別。

【0134】 接著，對來自鼠類 *Trbc2* A 及 B 股之 10 個胺基酸殘基以及 FG 環至人類 TRBC2 序列中之併入進行測試。類似地，選擇人類初級 CD3⁺

T 細胞且用抗 CD3/CD28 珠粒活化 2 天，且隨後用 TRAC RNP 及修復模板電穿孔以導引 TCR 基因嵌入。電穿孔 5 天後，採集細胞且藉由用 APC 抗小鼠 TCR C β 鏈抗體(純系 H57-597，目錄號# 109212，BioLegend)及 PE-Cy7 抗人類 TCR V β 13.1 抗體(純系 H131，目錄號# 362406，BioLegend)共染色來分析。隨後進行 FACS 分析。

【0135】 結果示於圖 4 中：huTRBC1，完全人類 TRBC1 序列；muTrbc2-BGHPA，具有 BGH 多腺苷酸信號之完全鼠類 Trbc2 序列；huTRBC2-muABFG，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 10 個胺基酸殘基以及 FG 環的人類 TRBC2 序列。

【0136】 資料顯示，將來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 10 個胺基酸殘基以及 FG 環併入人類 TRBC2 序列足以實現 TCR 表現及 H57 抗體識別(胺基酸突變為 K4R、F7T、Y37F、N106E、E108K、T110P、Q111E、D112G、R113S、A114P)。

實例 2

【0137】 此實例表明，將來自鼠類 Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環併入人類 TRBC2 序列足以實現 TCR 表現及 H57 抗體識別。

【0138】 對使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1 1G4 TCR 的人類初級 T 細胞進行 FACS 分析。選擇人類初級 CD3⁺ T 細胞且用抗 CD3/CD28 珠粒活化 2 天，且隨後用 TRAC RNP 及修復模板電穿孔以導引 TCR 基因嵌入。電穿孔 5 天後，採集細胞且藉由用 APC 抗小鼠 TCR C β 鏈抗體(純系 H57-597，目錄號# 109212，BioLegend)及 PE-Cy7 抗人類 TCR V β 13.1 抗體(純系 H131，目錄號# 362406，BioLegend)共染色來分析。隨後進行 FACS 分析。

【0139】結果示於圖 5 中：huTRBC2，完全人類 TRBC2 序列；huTRBC2-muABFG，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 10 個胺基酸殘基以及 FG 環(經預測之 H57 結合抗原決定基)的人類 TRBC2 序列；muABFG R4K，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(R4K)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG T7F，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(T7F)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG F37Y，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(F37Y)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG E106N，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(E106N)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG K108E，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(K108E)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG P110T，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(P110T)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG E111Q，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(E111Q)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG G112D，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(G112D)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG S113R，併

入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(S113R)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列；muABFG P114A，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 9 個胺基酸殘基以及 FG 環以及 1 個恢復回人類對應物(P114A)以定位最小 H57 結合抗原決定基之胺基酸殘基的人類 TRBC2 序列。資料顯示，來自鼠類 Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環為實現 H57 抗體識別所必需的(胺基酸為 R4、K108、P110、E111、G112 及 S113)。

【0140】接著，選擇人類初級 CD3⁺ T 細胞且用抗 CD3/CD28 珠粒活化 2 天，且隨後用 TRAC RNP 及修復模板電穿孔以導引 TCR 基因嵌入。電穿孔 6 天後，採集細胞且藉由用 APC 抗小鼠 TCR C β 鏈抗體(純系 H57-597，目錄號# 109212，BioLegend)及 PE-Cy7 抗人類 TCR V β 13.1 抗體(純系 H131，目錄號# 362406，BioLegend)共染色來分析。隨後進行 FACS 分析。

【0141】結果示於圖 6 中：huTRBC2，完全人類 TRBC2 序列；huTRBC2-mu10，併入來自鼠類 Trbc2 A 及 B 股之 10 個胺基酸殘基以及 FG 環(經預測之 H57 結合抗原決定基)的人類 TRBC2 序列；huTRBC2-mu6，併入來自鼠類 Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環(經識別之最小 H57 結合抗原決定基)的人類 TRBC2 序列；huTRBC2-mu7，併入來自鼠類 Trbc2 A 股之 7 個胺基酸殘基以及 FG 環(經識別之最小 H57 結合抗原決定基+ T7)的人類 TRBC2 序列。資料顯示，將來自鼠類 Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環併入人類 TRBC2 序列足以實現 TCR 表現及 H57 抗體識別(胺基酸突變為 K4R、E108K、T110P、Q111E、D112G、R113S)。

實例 3

【0142】 此實例表明，可使用抗 2A 肽抗體偵測已經工程改造以表現含有 T2A 肽序列之 NY-ESO-1 1G4 TCR 的人類初級 T 細胞。

【0143】 對使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1 1G4 TCR 的人類初級 T 細胞進行 FACS 分析。選擇人類初級 CD3⁺ T 細胞且用抗 CD3/CD28 珠粒活化 2 天，且隨後用 TRAC RNP 及修復模板電穿孔以導引 TCR 基因嵌入。電穿孔 10 天後，採集細胞、滲透且藉由用非結合小鼠抗 2A 肽抗體(純系 3H4，目錄號# NBP2-59627，Novus Biologicals)及 BV421 大鼠抗小鼠 IgG1 抗體(純系 A85-1，目錄號# 562580，BD Biosciences)染色來進行 FACS 分析。所有染色均在 BD 滲透/洗滌緩衝液(1x)中進行。隨後進行 FACS 分析。

【0144】 結果示於圖 7 中：模擬電穿孔，細胞未經電穿孔；TRAC RNP，細胞僅用 TRAC RNP 電穿孔；TRAC RNP+環形修復模板，細胞用 TRAC RNP 及環形修復模板電穿孔；TRAC RNP+線性修復模板，細胞用 TRAC RNP 及線性修復模板電穿孔。資料表明，可使用抗 2A 肽抗體偵測已經工程改造以表現含有 T2A 肽序列之 NY-ESO-1 1G4 TCR 的人類初級 T 細胞。

實例 4

【0145】 此實例表明，可使用抗 2A 肽抗體偵測已經工程改造以表現含有 T2A 肽序列之 NY-ESO-1 1G4 TCR 的人類初級 T 細胞，且此 2A 肽染色與 TCR V β 13.1 染色相關。

【0146】 對使用各種修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1 1G4 TCR 的人類初級 T 細胞進行 FACS 分析。選擇人類初級 CD3⁺ T 細胞且用抗 CD3/CD28 珠粒活化 2 天，且隨後用 TRAC RNP 及修

復模板電穿孔以導引 TCR 基因嵌入。電穿孔 11 天後，採集細胞、滲透且藉由用非結合小鼠抗 2A 肽抗體(純系 3H4，目錄號# NBP2-59627，Novus Biologicals)、BV421 大鼠抗小鼠 IgG1 抗體(純系 A85-1，目錄號# 562580，BD Biosciences)及 PE-Cy7 抗人類 TCR V β 13.1 抗體(純系 H131，目錄號# 362406，BioLegend)染色來進行 FACS 分析。所有染色均在 BD 滲透/洗滌緩衝液(1x)中進行。隨後進行 FACS 分析。

【0147】 結果示於圖 8 中：模擬電穿孔，細胞未經電穿孔；TRAC RNP，細胞僅用 TRAC RNP 電穿孔；TRAC RNP+環形修復模板，細胞用 TRAC RNP 及環形修復模板電穿孔；TRAC RNP+線性修復模板，細胞用 TRAC RNP 及線性修復模板電穿孔。資料表明，可使用抗 2A 肽抗體偵測已經工程改造以表現含有 T2A 肽序列之 NY-ESO-1 1G4 TCR 的人類初級 T 細胞，且此 2A 肽染色與 TCR V β 13.1 染色相關。

實例 5

【0148】 此實例表明，可使用抗 2A 肽抗體偵測已經工程改造以表現含有 2A 肽序列之 CD19 CAR 構築體的人類初級 T 細胞，且此 2A 肽染色與在相同構築體(Ly6G)中存在之轉導標記蛋白之染色相關。

【0149】 藉由已經反轉錄轉導以表現 CD19 CAR 構築體的人類初級 T 細胞進行 FACS 分析。選擇人類初級 CD3⁺ T 細胞且用抗 CD3/CD28 珠粒活化 2 天，且隨後用如上文所指示之反轉錄病毒感染。轉導 14 天後，採集細胞、滲透且藉由用非結合小鼠抗 2A 肽抗體(純系 3H4，目錄號# NBP2-59627，Novus Biologicals)、BV421 大鼠抗小鼠 IgG1 抗體(純系 A85-1，目錄號# 562580，BD Biosciences)及 PE/Dazzle 594 抗 Ly6G 抗體(純系 1A8，目錄號# 127647，BioLegend)染色來進行 FACS 分析。所有染色均

在 BD 滲透/洗滌緩衝液(1x)中進行。隨後進行 FACS 分析。

【0150】 結果示於圖 9 中：模擬轉導，細胞未經轉導；Ly6G-Puro，細胞用含有 Ly6G-P2A-Puro 構築體之反轉錄病毒轉導；1st Gen CAR-Ly6G-Puro，細胞用含有 1st Gen CD19 CAR-T2A-Ly6G-P2A-Puro 構築體之反轉錄病毒轉導；2nd Gen CAR-Ly6G-Puro，細胞用含有 2nd Gen CD19 CAR-T2A-Ly6G-P2A-Puro 構築體之反轉錄病毒轉導。資料表明，可使用抗 2A 肽抗體偵測已經工程改造以表現含有 2A 肽序列之 CD19 CAR 構築體的人類初級 T 細胞，且此 2A 肽染色與在相同構築體(Ly6G)中存在之轉導標記蛋白之染色相關。

實例 6

【0151】 此實例展示可用於將一或多個有效負載靶向遞送至表現此類經標記蛋白之基因工程細胞的經標記蛋白。一或多個有效負載之遞送係藉由與 H57 抗體結合來達成。

【0152】 IL2v 在其 N 端融合於 H57 IgG Fc 域之 C 端，視情況經 (G4S)₃ 連接子肽融合。Fc 域包含一或多個胺基酸取代以減少與 Fc 受體之結合。取代為 L234A、L235A 及 P329G (LALAPG，基於人類 IgG1 Fc 域)。

【0153】 對經工程改造以表現人類 TRBC2-Mur6 1G4 TCR 之 TCR 基因剔除 CD8hi Jurkat 細胞進行 FACS 分析。在內源性 TRAC 基因座處對具有 huTRBC2-Mur6 1G4 TCR 基因嵌入的人類初級 T 細胞進行 FACS 分析。將 huTRBC2-mur6-表現細胞與各種濃度之 H57 抗體或與 H57-IL2 或 H57-IL2v 免疫細胞介素一起預培育 30 分鐘。隨後，細胞係藉由用 APC 抗小鼠 TCR-C β 抗體(純系 H57-597，目錄號# 553174，BD Biosciences)及 FITC 抗人類 IL2 抗體(純系 5344.111，目錄號# 340448，BD Biosciences)

染色來進行 FACS 分析。在含有 2% FBS 之 PBS 中進行染色。

【0154】圖 18 展示 20 ng/mL 之 H57，以及 H57-IL2 及 H57-IL2v 阻斷 huTRBC2-Mur6 1G4 Jurkat 細胞上之 APC 抗小鼠 TCR-C β 抗體的 huTRBC2-Mur6 結合。圖 19 表明 H57，以及 H57-IL2 及 H57-IL2v 阻斷人類初級 huTRBC2-Mur6 1G4 TCR T 細胞上之 APC 抗小鼠 TCR-C β 抗體的 huTRBC2-Mur6 結合。如圖 20 中所示，與 H57-IL2 或 H57-IL2v 一起培育之 huTRBC2-Mur6 1G4 T 細胞用 FITC 抗人類 IL2 抗體顯示強染色，表明 IL2 存在於此等細胞之表面上。在不表現 Mur6 抗原決定基之人類初級 huTRBC2 1G4 T 細胞上培育 H57-IL2 及 H57-IL2v 會引起 IL2 染色，表明 Mur6 藉由免疫細胞介素特異性靶向 IL2。總之，此等資料展示 Mur6 抗原決定基可用於藉由 H57-IL2 及 H57-IL2 抗體-細胞介素融合蛋白來介導靶向細胞介素遞送至表現 huTRBC2-Mur6 恆定域之 1G4 TCR 工程改造之細胞。

實例 7

【0155】此實例評估 H57-IL2v 結合物對 T 細胞增殖之活體外刺激能力。

【0156】將來自實例 6 之 H57-IL2v 結合物添加至已經 PHA 預活化之經 CFSE 標記的初級人類 T 細胞中隔夜，其後將額外培養細胞 4 天。不相關抗體-IL2v 結合物將用作對照。4 天後，將藉由使用流式細胞分析技術量測 CFSE 稀釋度以及 T 細胞上之 CD25 上調來評估 H57-IL2v 結合物對 T 細胞增殖之刺激能力。

【0157】在使用 CFSE 之替代方案的實驗中，將來自實例 6 之 H57-IL2 及 H57-IL2v 結合物添加至在內源性 TRAC 基因座處具有 huTRBC2

1G4 TCR 或 huTRBC2-Mur6 1G4 TCR 之基因嵌入的經 Celltrace Violet(CTV)染料標記的初級人類 T 細胞中，其後培養細胞 4 天。非靶向重組 IL2 用作對照。1 天後，藉由量測 T 細胞活化標記 CD69 及 CD25 之表現來評估 H57-IL2 及 H57-IL2v 結合物的刺激能力。藉由用 PE 抗人類 CD69 抗體(純系 FN50，目錄號# 557050，BD Biosciences)及 BV711 抗人類 CD25 抗體(純系 2A3，目錄號# 563159，BD Biosciences)共染色進行 FACS 分析。培養 4 天後，藉由使用流式細胞分析技術量測 T 細胞之 CTV 稀釋度及細胞計數來評估 H57-IL2 及 H57-IL2v 結合物對 T 細胞增殖的刺激能力。在含有 2% FBS 之 PBS 中進行所有染色。

【0158】圖 21 描繪點陣圖，其展示在 huTRBC2 1G4 TCR 或 huTRBC2-Mur6 1G4 TCR 之基因嵌入的情況下在初級人類 T 細胞上培育 1 nM IL2、H57-IL2 及 H57-IL2v 持續 1 天後，T 細胞活化標記 CD69 及 CD25 之表現。圖 22A 及 22B 中之曲線展示在(免疫)細胞介素濃度範圍內表現 CD69 之 T 細胞百分比(圖 22A)及 CD25 高 T 細胞百分比(圖 22B)。此等結果表明 H57-IL2 及 H57-IL2v 結合物強烈且特異性刺激表現 huTRBC2-Mur6 1G4 TCR 之 T 細胞。

【0159】在圖 23 中，直方圖展示在 huTRBC2 1G4 TCR 或 huTRBC2-Mur6 1G4 TCR 之基因嵌入的情況下在初級人類 T 細胞上培育 1 nM 之 IL2、H57-IL2 及 H57-IL2v 持續 4 天後，T 細胞之 CTV 稀釋度。此外，如在(免疫)細胞介素濃度範圍內根據 $MFI_{\text{未劃分}}/MFI_{\text{所有細胞}}$ 之 2 log 計算，圖 24 展示來源於 CTV FACS 量測的平均增殖循環。此等結果表明藉由 H57-IL2 及 H57-IL2v 靶向 mur6 特異性促進表現 huTRBC2-Mur6 1G4 TCR 之 T 細胞上的 T 細胞增殖。總之，此等關於 1G4 TCR 工程改造之 T 細胞上之 Mur6

抗原決定基的資料允許使用 H57-IL2 及 H57-IL2v 免疫細胞介素靶向特異性細胞介素，藉此誘導抗原決定基特異性 T 細胞刺激。

實例 8

【0160】 此實例表明 H57-IL2v 結合物如何影響活體內腫瘤生長及腫瘤中之 T 細胞積聚。

【0161】 在此使用 NSG 小鼠。NSG 小鼠(NOD 重症聯合免疫缺陷 γ 小鼠(NOD scid gamma mouse))為攜帶 NOD 品系之免疫缺陷實驗室小鼠品牌，由 Jackson 實驗室研發及銷售。NSG 小鼠將皮下植入 NY-ESO-1+A375 黑素瘤細胞，其後 NSG 小鼠將接收表現 NY-ESO-1 TCR 之初級人類 T 細胞。其後，小鼠將每週接收注射 H57-IL2v 結合物或媒劑對照。隨後，隨時間推移量測對腫瘤生長及腫瘤中之 T 細胞積聚的作用。

實例 9

【0162】 此實例顯示，將來自鼠類 Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環併入人類 TRBC1 或 TRBC2 序列中足以實現 TCR 表現及 H57 抗體識別。

【0163】 對使用各種 DNA 修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1-特異性 1G4 TCR 的人類初級 T 細胞進行 FACS 分析。選擇來自 3 名健康供體(BC45、BC46 及 BC48)的人類初級 CD3+ T 細胞且用抗 CD3/CD28 珠粒(目錄號# 40203D, ThermoFisher Scientific)活化 2 天，且隨後用 TRAC RNP 及 DNA 修復模板電穿孔以導引 TCR 基因嵌入，以及用 TRBC RNP 以導引內源性 TCR β 鏈基因剔除。電穿孔 5 天後，採集 1G4 TCR 工程改造之 T 細胞且藉由用 PE 抗小鼠 TCR C β 鏈抗體(純系 H57-597, 目錄號# 553172, BD Biosciences)及 Brilliant Violet 421 抗人類 TCR

C β 抗體(純系 IP26，目錄號# 306722，BioLegend)共染色來進行 FACS 分析。

【0164】 結果示於圖 25 中：muTrbc2 描繪具有完全鼠類 Trbc2 恆定域序列之 1G4 TCR；huTRBC1-Mur6 描繪具有併入來自鼠類 Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環(經識別之最小 H57 結合抗原決定基)之人類 TRBC1 恆定域序列的 1G4 TCR；huTRBC2-Mur6 描繪具有併入來自鼠類 Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環(經識別之最小 H57 結合抗原決定基)之人類 TRBC2 恆定域序列的 1G4 TCR。資料表明，將來自鼠類 Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環併入人類 TRBC1 或 TRBC2 序列足以能夠實現 TCR 表現及 H57 抗體識別(胺基酸突變分別為 huTRBC1-Mur6 之 N4R、E108K、T110P、Q111E、D112G、R113S 及 huTRBC2-Mur6 之 K4R、E108K、T110P、Q111E、D112G、R113S)。

實例 10

【0165】 此實例展示如藉由 T 細胞介素產生所量測，將來自鼠類 Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環併入人類 TRBC2 序列中不會干擾 TCR 功能。

【0166】 使用各種 DNA 修復模板對在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1-特異性 1G4 TCR 的人類初級 T 細胞進行 FACS 分析。選擇來自 3 名健康供體(BC20、BC93 及 BC97)的人類初級 CD3⁺ T 細胞且用抗 CD3/CD28 珠粒(目錄號# 40203D，ThermoFisher Scientific)活化 2 天，且隨後用 TRAC RNP 及 DNA 修復模板電穿孔以導引 TCR 基因嵌入，以及用 TRBC RNP 以導引內源性 TCR β 鏈基因剔除。電穿孔 12 天後，採集 1G4 TCR 工程改造之 T 細胞且與已負載有 10¹ 至 10⁷ pg/mL 範圍內之各

種濃度之 NY-ESO-1 肽(SLLMWQC)的 JY 靶細胞共培養。共培養 4 小時後，添加 GolgiPlug 蛋白輸送抑制劑(目錄號# 555028，BD Biosciences)及再共培養細胞 16 小時。隨後，採集細胞、滲透且藉由用 PE 抗人類 IFN- γ 抗體(純系 25723.11，目錄號# 340452，BD Biosciences)及 FITC 抗人類 IL-2 抗體(純系 5344.111，目錄號# 340448，BD Biosciences)共染色來進行 FACS 分析。所有染色均在 BD 滲透/洗滌緩衝液(1x；目錄號# 555028，BD Biosciences)中進行。

【0167】 結果示於圖 26A-26D 中：huTRBC2-Mur6 描繪具有併入來自鼠類 *Trbc2* A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環(經鑑別之最小 H57 結合抗原決定基)之人類 TRBC2 恆定域序列的 1G4 TCR；huTRBC2 描繪具有完全人類 TRBC2 恆定域序列的 1G4 TCR；mu*Trbc2* 描繪具有完全鼠類 *Trbc2* 恆定域序列的 1G4 TCR；未電穿孔描繪未經編輯之 T 細胞。圖 26A 展示回應於來自 1 名代表性健康供體(BC93)之 T 細胞之不同肽劑量的 IFN- γ 產量。符號描繪每個肽劑量之 3 個技術複本的幾何平均% IFN- γ + T 細胞；誤差條描繪幾何標準差。圖 26B 展示回應於來自 3 名健康供體之 T 細胞之所測試最高肽劑量(107 pg/mL)的 IFN- γ 產量概述。符號描繪來自 T 細胞供體中之每一者之 3 個技術複本的% IFN- γ + T 細胞；線描繪幾何平均值。圖 26C 展示回應於來自 1 名代表性健康供體(BC97)之 T 細胞之不同肽劑量的 IL-2 產量。符號描繪每個肽劑量之 3 個技術複本的幾何平均% IL-2+ T 細胞；誤差條描繪幾何標準差。圖 26D 展示回應於來自 3 名健康供體之 T 細胞之所測試最高肽劑量(107 pg/mL)的 IL-2 產量概述。符號描繪來自 T 細胞供體中之每一者之 3 個技術複本的% IL-2+ T 細胞；線描繪幾何平均值。總之，此等資料表明表現 huTRBC2-Mur6 恆定域之 1G4 TCR 工程改造的

T 細胞可介導與表現 huTRBC2 或 muTrbc2 恆定域之 1G4 TCR 工程改造的 T 細胞等效的細胞介素產量，說明 Mur6 抗原決定基併入人類 TRBC2 中不會削弱 TCR 功能。

實例 11

【0168】 此實例展示如藉由 T 細胞靶細胞殺傷所量測，將來自鼠類 Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環併入人類 TRBC2 序列中不會干擾 TCR 功能。

【0169】 對使用各種 DNA 修復模板在內源性 TRAC 基因座處基因嵌入 NY-ESO-1-特異性 1G4 TCR 的人類初級 T 細胞進行 IncuCyte 活細胞分析。選擇來自 3 名健康供體(BC20、BC93 及 BC97)的人類初級 CD3+ T 細胞且用抗 CD3/CD28 珠粒(目錄號# 40203D，ThermoFisher Scientific)活化 2 天，且隨後用 TRAC RNP 及 DNA 修復模板電穿孔以導引 TCR 基因嵌入，以及用 TRBC RNP 以導引內源性 TCR β 鏈基因剔除。電穿孔 12 天後，採集 1G4 TCR 工程改造之 T 細胞且在具有 NY-ESO-1+ A375-GFP+ 腫瘤細胞之 IncuCyte S3 活細胞分析系統(Sartorius)內部共培養，其中每 2 小時量化活 GFP+ 腫瘤細胞之數目，總共持續 72 小時。

【0170】 結果示於圖 27A 及 27B 中：huTRBC2-Mur6 描繪具有併入來自鼠類 Trbc2 A 股之 6 個胺基酸殘基以及 FG 環(經鑑別之最小 H57 結合抗原決定基)之人類 TRBC2 恆定域序列的 1G4 TCR；huTRBC2 描繪具有完全人類 TRBC2 恆定域序列的 1G4 TCR；muTrbc2 描繪具有完全鼠類 Trbc2 恆定域序列的 1G4 TCR；未電穿孔描繪未經編輯之 T 細胞。圖 27A 藉由來自 1 名代表性健康供體(BC97)之 T 細胞展示 A375-GFP+ 腫瘤細胞殺傷動力學。符號描繪每個時間點之 3 個技術複本的幾何平均活腫瘤細胞

數目；誤差條描繪幾何標準差。圖 27B 藉由來自 3 名健康供體之 T 細胞展示在最終時間點(72 小時)所測試之相對 A375-GFP+腫瘤細胞殺傷的概述。符號描繪來自 T 細胞供體中之每一者之 3 個技術複本的活腫瘤細胞數目；線描繪幾何平均值。為了計算相對腫瘤細胞數目，將資料根據設定為 100% 的未電穿孔之 T 細胞的幾何平均值標準化。總之，此等資料表明表現 huTRBC2-Mur6 恆定域之 1G4 TCR 工程改造的 T 細胞可介導與表現 huTRBC2 或 muTrbc2 恆定域之 1G4 TCR 工程改造的 T 細胞等效的靶細胞殺傷，說明 Mur6 抗原決定基併入人類 TRBC2 中不會削弱 TCR 功能。

【序列表】

<110> 荷蘭商新基因治療公司(Neogene Therapeutics B.V.)
卡斯汀 黎奈曼(Linnemann、Carsten)
湯瑪士 奎曼(Kuilman、Thomas)
蓋文 M 班斗(Bendle、Gavin M.)
傑羅恩 W J 凡 赫斯特(van Heijst、Jeroen W.J.)
孔祥俊(Kong、Xiangjun)
羅克 約瑟弗斯 艾格孟(Eggermont、Loek Josephus)

<120> 用於追蹤基因工程細胞的肽標記

<130> NTB.016TW

<150> US 63/170196
<151> 2021-04-02

<150> US 63/129480
<151> 2020-12-22

<160> 40

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 1
Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
1 5

<210> 2
<211> 18
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 2
Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
1 5 10 15
Gly Pro

<210> 3
<211> 19
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 3
Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn
1 5 10 15
Pro Gly Pro

<210> 4
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(1)
<223> Xaa爲任何天然胺基酸

<400> 4
Xaa Asp Leu Arg Asn Val Phe Pro Pro Lys 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 Tyr 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 Lys Trp Pro Glu Gly
100 105 110
Ser 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 Glu 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
Ser Arg Gly

<210> 5
<211> 200
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(1)
<223> Xaa爲任何天然胺基酸

<400> 5
Xaa Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Lys 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 Tyr 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 Glu 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
Ser Arg Gly Gly Ser Gly Glu Gly Arg Gly Ser Leu Leu Thr Cys Gly
180 185 190
Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
195 200

<210> 6
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 6
Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
1 5

<210> 7
<211> 8
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 7
Gly Asp Val Glu Ser Asn Pro Gly
1 5

<210> 8
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(1)
<223> Xaa爲任何天然胺基酸

<400> 8
Xaa Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Lys 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 Tyr 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 Glu 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
Ser Arg Gly

<210> 9
<211> 20
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 9
Gln Cys Thr Asn Tyr Ala Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val Glu Ser
1 5 10 15
Asn Pro Gly Pro
20

<210> 10
<211> 22
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 10
Val Lys Gln Thr Leu Asn Phe Asp Leu Leu Lys Leu Ala Gly Asp Val
1 5 10 15
Glu Ser Asn Pro Gly Pro
20

<210> 11
<211> 177
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(1)
<223> Xaa爲任何天然胺基酸

<400> 11
Xaa 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> 171
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(1)
<223> Xaa爲任何天然胺基酸

<400> 12
Xaa Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
1 5 10 15
Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
20 25 30
Ala Arg 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 Ala Tyr Lys
50 55 60
Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
65 70 75 80
Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
85 90 95
His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
100 105 110
Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
115 120 125

Ile Thr Ser Ala Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu
130 135 140
Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser
145 150 155 160
Thr Leu Val Val Met Ala Met Val Arg Asn Arg
165 170

<210> 13
<211> 173
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<220>
<221> VARIANT
<222> (1)...(1)
<223> Xaa爲任何天然胺基酸

<400> 13
Xaa Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ser Leu Phe Glu Pro
1 5 10 15
Ser Lys Ala Glu Ile Ala Asn Lys Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
20 25 30
Ala Arg 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 Ala Tyr Lys
50 55 60
Glu Ser Asn Tyr Ser Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
65 70 75 80
Thr Phe Trp His Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
85 90 95
His Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly Ser Pro Lys Pro
100 105 110
Val Thr Gln Asn Ile Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
115 120 125
Ile Thr Ser Ala Ser Tyr His Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu
130 135 140
Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser
145 150 155 160
Gly Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Lys Lys Asn Ser
165 170

<210> 14
<211> 177
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 14

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 Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly
100 105 110
Ser Pro 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> 15

<211> 179

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 15

Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys 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 Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly
100 105 110

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

<210> 16
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 16
Glu Asp Leu Lys Asn Val Thr Pro Pro Lys 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 Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly
100 105 110
Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
115 120 125
Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu 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
Ser Arg Gly

<210> 17
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 17
Glu Asp Leu Arg Asn Val Phe Pro Pro Lys 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 Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly
100 105 110
Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
115 120 125
Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu 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
Ser Arg Gly

<210> 18
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 18
Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys 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 Tyr 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 Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly
100 105 110
Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg

115120125

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

130135140

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala

145150155160

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp

165170175

Ser Arg Gly

<210> 19

<211> 179

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 19

Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ala Val Phe Glu Pro

151015

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu

202530

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

354045

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys

505560

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu

65707580

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

859095

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Lys Trp Pro Glu Gly

100105110

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

115120125

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

130135140

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala

145150155160

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp

165170175

Ser Arg Gly

<210> 20

<211> 179

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 20
Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys 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 Glu Asp Glu Trp Pro Glu Gly
100 105 110
Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
115 120 125
Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu 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
Ser Arg Gly

<210> 21
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 21
Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys 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 Glu Asp Lys Trp Thr Glu Gly
100 105 110
Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
115 120 125

Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu 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
Ser Arg Gly

<210> 22
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 22
Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys 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 Glu Asp Lys Trp Pro Gln Gly
100 105 110
Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
115 120 125
Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu 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
Ser Arg Gly

<210> 23
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 23

Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys 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 Glu Asp Lys Trp Pro Glu Asp
100 105 110
Ser Pro Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
115 120 125
Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu 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
Ser Arg Gly

<210> 24
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 24
Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys 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 Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly
100 105 110
Arg Pro Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
115 120 125
Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu 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

145150155160

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp

165170175

Ser Arg Gly

<210> 25

<211> 179

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 25

Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys Val Ala Val Phe Glu Pro

151015

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu

202530

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

354045

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys

505560

Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu

65707580

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

859095

Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Glu Asp Lys Trp Pro Glu Gly

100105110

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

115120125

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

130135140

Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala

145150155160

Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp

165170175

Ser Arg Gly

<210> 26

<211> 179

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 26

Glu Asp Leu Arg Asn Val Thr Pro Pro Lys 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 Tyr 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 Lys Trp Pro Glu Gly
100 105 110
Ser 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 Glu 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
Ser Arg Gly

<210> 27
<211> 179
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 27
Glu Asp Leu Arg Asn Val Phe Pro Pro Lys 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 Tyr 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 Lys Trp Pro Glu Gly
100 105 110
Ser 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 Glu 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
Ser Arg Gly

<210> 28
<211> 276
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 28
Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser
1 5 10 15
Trp Val Trp Ser Gln Lys Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu
20 25 30
Ser Val Pro Glu Gly Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp
35 40 45
Ser Ala Ile Tyr Asn Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly
50 55 60
Leu Thr Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser
65 70 75 80
Gly Arg Leu Asn Ala Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu
85 90 95
Tyr Ile Ala Ala Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala
100 105 110
Val Arg Pro Leu Tyr Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly
115 120 125
Thr Ser Leu Ile Val His Pro Tyr Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val
130 135 140
Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe
145 150 155 160
Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp
165 170 175
Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe
180 185 190
Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys
195 200 205
Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro
210 215 220
Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu
225 230 235 240
Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg
245 250 255
Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg
260 265 270
Leu Trp Ser Ser

275

<210> 29
<211> 311
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 29
Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala
1 5 10 15
Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu
20 25 30
Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His
35 40 45
Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu
50 55 60
Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro
65 70 75 80
Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg
85 90 95
Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser
100 105 110
Ser Tyr Val Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg
115 120 125
Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Lys Val Ala
130 135 140
Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
145 150 155 160
Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser
165 170 175
Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro
180 185 190
Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu
195 200 205
Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn
210 215 220
His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
225 230 235 240
Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
245 250 255
Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln
260 265 270
Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala
275 280 285
Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val
290 295 300
Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly

305310

<210> 30
<211> 135
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 30
Met Lys Ser Leu Arg Val Leu Leu Val Ile Leu Trp Leu Gln Leu Ser
151015
Trp Val Trp Ser Gln Lys Gln Glu Val Thr Gln Ile Pro Ala Ala Leu
202530
Ser Val Pro Glu Gly Glu Asn Leu Val Leu Asn Cys Ser Phe Thr Asp
354045
Ser Ala Ile Tyr Asn Leu Gln Trp Phe Arg Gln Asp Pro Gly Lys Gly
505560
Leu Thr Ser Leu Leu Leu Ile Gln Ser Ser Gln Arg Glu Gln Thr Ser
65707580
Gly Arg Leu Asn Ala Ser Leu Asp Lys Ser Ser Gly Arg Ser Thr Leu
859095
Tyr Ile Ala Ala Ser Gln Pro Gly Asp Ser Ala Thr Tyr Leu Cys Ala
100105110
Val Arg Pro Leu Tyr Gly Gly Ser Tyr Ile Pro Thr Phe Gly Arg Gly
115120125
Thr Ser Leu Ile Val His Pro
130135

<210> 31
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 31
Met Ser Ile Gly Leu Leu Cys Cys Ala Ala Leu Ser Leu Leu Trp Ala
151015
Gly Pro Val Asn Ala Gly Val Thr Gln Thr Pro Lys Phe Gln Val Leu
202530
Lys Thr Gly Gln Ser Met Thr Leu Gln Cys Ala Gln Asp Met Asn His
354045
Glu Tyr Met Ser Trp Tyr Arg Gln Asp Pro Gly Met Gly Leu Arg Leu
505560
Ile His Tyr Ser Val Gly Ala Gly Ile Thr Asp Gln Gly Glu Val Pro
65707580
Asn Gly Tyr Asn Val Ser Arg Ser Thr Thr Glu Asp Phe Pro Leu Arg

85 90 95
Leu Leu Ser Ala Ala Pro Ser Gln Thr Ser Val Tyr Phe Cys Ala Ser
100 105 110
Ser Tyr Val Gly Asn Thr Gly Glu Leu Phe Phe Gly Glu Gly Ser Arg
115 120 125
Leu Thr Val Leu
130

<210> 32
<211> 120
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 32
Glu Val Tyr Leu Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Gln Pro Gly Ser
1 5 10 15
Ser Leu Lys Val Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asp Phe
20 25 30
Trp Met Tyr Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Gly Arg Ile Lys Asn Ile Pro Asn Asn Tyr Ala Thr Glu Tyr Ala Asp
50 55 60
Ser Val Arg Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Ser
65 70 75 80
Ile Tyr Leu Gln Met Asn Arg Leu Arg Val Asp Asp Thr Ala Ile Tyr
85 90 95
Tyr Cys Thr Arg Ala Gly Arg Phe Asp His Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 33
<211> 107
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 33
Tyr Glu Leu Ile Gln Pro Ser Ser Ala Ser Val Thr Val Gly Glu Thr
1 5 10 15
Val Lys Ile Thr Cys Ser Gly Asp Gln Leu Pro Lys Asn Phe Ala Tyr
20 25 30
Trp Phe Gln Gln Lys Ser Asp Lys Asn Ile Leu Leu Leu Ile Tyr Met
35 40 45
Asp Asn Lys Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser Thr

50 55 60
Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Gly Ala Gln Pro Glu Asp
65 70 75 80
Glu Ala Ala Tyr Tyr Cys Leu Ser Ser Tyr Gly Asp Asn Asn Asp Leu
85 90 95
Val Phe Gly Ser Gly Thr Gln Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 34
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 34
Ala Pro Ala Ser Ser Ser Thr Lys Lys Thr Gln Leu Gln Leu Glu His
1 5 10 15
Leu Leu Leu Asp Leu Gln Met Ile Leu Asn Gly Ile Asn Asn Tyr Lys
20 25 30
Asn Pro Lys Leu Thr Arg Met Leu Thr Ala Lys Phe Ala Met Pro Lys
35 40 45
Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys
50 55 60
Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Gly Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu
65 70 75 80
Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu
85 90 95
Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala
100 105 110
Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Ala Gln Ser Ile
115 120 125
Ile Ser Thr Leu Thr
130

<210> 35
<211> 133
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

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

354045

Lys Ala Thr Glu Leu Lys His Leu Gln Cys Leu Glu Glu Glu Leu Lys

505560

Pro Leu Glu Glu Val Leu Asn Leu Ala Gln Ser Lys Asn Phe His Leu

65707580

Arg Pro Arg Asp Leu Ile Ser Asn Ile Asn Val Ile Val Leu Glu Leu

859095

Lys Gly Ser Glu Thr Thr Phe Met Cys Glu Tyr Ala Asp Glu Thr Ala

100105110

Thr Ile Val Glu Phe Leu Asn Arg Trp Ile Thr Phe Cys Gln Ser Ile

115120125

Ile Ser Thr Leu Thr

130

<210> 36

<211> 15

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 36

Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser

151015

<210> 37

<211> 8

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 37

Asp Tyr Lys Asp Asp Asp Asp Lys

15

<210> 38

<211> 10

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成多肽

<400> 38

Glu Gln Lys Leu Ile Ser Glu Glu Asp Leu

1510

<210> 39
<211> 9
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 39
Tyr Pro Tyr Asp Val Pro Asp Tyr Ala
1 5

<210> 40
<211> 14
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 合成多肽

<400> 40
Gly Lys Pro Ile Pro Asn Pro Leu Leu Gly Leu Asp Ser Thr
1 5 10

【發明申請專利範圍】

【請求項 1】

一種經標記蛋白，其包含：

TCR 恆定域；及

外源性胺基酸變異，其包含可偵測且可鑑別之序列在該 TCR 恆定域內。

【請求項 2】

如請求項 1 之經標記蛋白，其中該 TCR 恆定域包含 TCR α 或 TCR β 恆定域。

【請求項 3】

如請求項 1 之經標記蛋白，其中該外源性胺基酸變異包含該 TCR 恆定域之序列的突變，視情況其中該經標記蛋白包含 huTRBC1-mur6 或 huTRBC2-mur6。

【請求項 4】

如請求項 1 之經標記蛋白，其中該 TCR 恆定域來自一個物種及該外源性胺基酸變異來自另一個物種。

【請求項 5】

如請求項 4 之經標記蛋白，其中該 TCR 恆定域來自人類及該外源性胺基酸變異來自非人類物種。

【請求項 6】

如請求項 5 之經標記蛋白，其中該非人類物種為小鼠。

【請求項 7】

如請求項 3 之經標記蛋白，其中該 TCR 恆定域包含由人類 TRBC2 基

因編碼之序列。

【請求項 8】

如請求項 3 之經標記蛋白，其中該外源性胺基酸變異包含鼠類 TCR C β 域之序列。

【請求項 9】

如請求項 3 之經標記蛋白，其中該突變包含 10 個胺基酸突變。

【請求項 10】

如請求項 9 之經標記蛋白，其中該突變形成非連續序列。

【請求項 11】

如請求項 9 之經標記蛋白，其中根據 SEQ ID NO: 8 的編號系統編號，10 個胺基酸突變為 K4R、F7T、Y37F、N106E、E108K、T110P、Q111E、D112G、R113S、A114P。

【請求項 12】

如請求項 3 之經標記蛋白，其中該突變包含 6 個胺基酸突變。

【請求項 13】

如請求項 12 之經標記蛋白，其中 6 個胺基酸突變為 K4R、E108K、T110P、Q111E、D112G、R113S，視情況其中該經標記蛋白包含 SEQ ID NO: 27。

【請求項 14】

如請求項 1 之經標記蛋白，其中該外源性胺基酸變異可由抗體、奈米抗體(nanobody)、Fab 片段或 DARPin 偵測及鑑別。

【請求項 15】

如請求項 1 之經標記蛋白，其中該外源性胺基酸變異可由抗小鼠 TCR

C β 抗體 H57-597 偵測及鑑別。

【請求項 16】

一種經標記蛋白，其用於偵測、分離或清除(depletion)表現此類經標記蛋白之基因工程細胞，該經標記蛋白包含如請求項 1 至 15 中任一項之經標記蛋白。

【請求項 17】

如請求項 16 之經標記蛋白，其中該等基因工程細胞包含基因工程 T 細胞。

【請求項 18】

如請求項 17 之經標記蛋白，其中該等基因工程 T 細胞包含已藉由引入治療性 TCR 基因修飾之 T 細胞。

【請求項 19】

如請求項 18 之經標記蛋白，其中已藉由引入治療性 TCR 基因修飾之該等 T 細胞係用於癌症治療。

【請求項 20】

一種經標記蛋白，其用於偵測、分離或清除已藉由引入治療性 TCR 基因修飾之基因工程 T 細胞，其中該經標記蛋白來源於鼠類 TCR C β 域且藉由人類 TCR C β 2 域內存在之胺基酸突變引入至人類 TCR C β 2 域中。

【請求項 21】

一種經標記蛋白，其用於偵測、分離或清除用於癌症治療的經新穎 TCR 基因修飾的細胞，該經標記蛋白包含如請求項 1 至 20 中任一項之經標記蛋白。

【請求項 22】

一種套組，其用於偵測、分離或清除具有如請求項 1 至 21 中任一項之經標記蛋白的基因工程細胞，該套組包含識別該經標記蛋白之抗體。

【請求項 23】

如請求項 22 之套組，其中該等基因工程細胞包含 T 細胞。

【請求項 24】

如請求項 23 之套組，其中該等 T 細胞已藉由引入治療性 TCR 基因修飾。

【請求項 25】

如請求項 24 之套組，其中已藉由引入治療性 TCR 基因修飾之該等 T 細胞係用於癌症治療。

【請求項 26】

一種經標記蛋白，其用於將一或多個有效負載(payload)靶向遞送至表現此類經標記蛋白之基因工程細胞，該經標記蛋白包含如請求項 1 至 15 中任一項之經標記蛋白。

【請求項 27】

如請求項 26 之經標記蛋白，其中一或多個有效負載之遞送係藉由與抗體、抗體模擬蛋白或任何其他抗原結合骨架結合達成。

【請求項 28】

如請求項 27 之經標記蛋白，其中該抗體為抗小鼠 TCR C β 抗體 H57-597。

【請求項 29】

如請求項 26 之經標記蛋白，其中該一或多個有效負載為蛋白、小分子、核酸、脂質體或奈米粒子。

【請求項 30】

如請求項 26 之經標記蛋白，其中該遞送之有效負載為細胞介素。

【請求項 31】

如請求項 30 之經標記蛋白，其中該細胞介素係選自以下之群：IL-1 β 、IL-2、IL-4、IL-6、IL-7、IL-10、IL-12、IL-15、IL-17、IL-18、IL-21、IL-23、IL-27、IFN- α 、IFN- β 、IFN- γ 及 TNF- α 。

【請求項 32】

如請求項 30 之經標記蛋白，其中該細胞介素之序列經修飾以調節與其天然受體分子之相互作用。

【請求項 33】

如請求項 30 之經標記蛋白，其中該細胞介素為 T 細胞表現之受體分子的促效劑或拮抗劑。

【請求項 34】

如請求項 26 之經標記蛋白，其中該有效負載為 T 細胞表現之受體分子的促效劑或拮抗劑。

【請求項 35】

如請求項 34 之經標記蛋白，其中該促效劑結合至 CD27、CD28、CD137 或 CD278。

【請求項 36】

如請求項 34 之經標記蛋白，其中該拮抗劑結合至 TGF- β 受體、PD-1、CTLA-4、Vista、類固醇受體，或 A₁-、A_{2A}-、A_{2B}-或 A₃-腺苷受體。

【請求項 37】

如請求項 26 之經標記蛋白，其中該有效負載為調節 T 細胞之活化、

分化、增殖、存活或效應功能的小分子。

【請求項 38】

如請求項 37 之經標記蛋白，其中該小分子抑制 TGF- β 受體、PD-1、CTLA-4、Vista、類固醇受體或 A₁-、A_{2A}-、A_{2B}-或 A₃-腺苷受體之信號傳導。

【請求項 39】

如請求項 26 之經標記蛋白，其中該有效負載為調節 T 細胞活化、分化、增殖、存活或效應功能的核酸。

【請求項 40】

如請求項 39 之經標記蛋白，其中該核酸為 miRNA、shRNA 或 siRNA。

【請求項 41】

如請求項 26 之經標記蛋白，其中該有效負載為雙特異性或三特異性抗體。

【請求項 42】

一種用於將一或多個有效負載靶向遞送至表現經標記蛋白之基因工程細胞的方法，該方法包含：

獲得包含該一或多個有效負載及結合劑之結合物，其中該結合劑特異性結合於該經標記蛋白，及

使該等基因工程細胞與該結合物接觸。

【請求項 43】

如請求項 42 之方法，其中該結合劑為抗體、抗體模擬蛋白，或任何其他抗原結合骨架。

【請求項 44】

如請求項 42 之方法，其中該一或多個有效負載為蛋白、小分子、核酸、脂質體或奈米粒子。

【請求項 45】

一種抗體抗原決定基，其用於偵測表現此類抗體抗原決定基之基因工程細胞，其中該抗體抗原決定基連接至 TCR 鏈或嵌合抗原受體(CAR)。

【請求項 46】

如請求項 45 之抗體抗原決定基，其中該抗體抗原決定基連接至 TCR 鏈之 C 端或 N 端，或連接至 CAR 之 C 端或 N 端。

【請求項 47】

如請求項 45 之抗體抗原決定基，其中該抗體抗原決定基插入至 TCR 鏈或 CAR 中。

【請求項 48】

如請求項 45 之抗體抗原決定基，其中基因工程細胞包含 T 細胞。

【請求項 49】

如請求項 48 之抗體抗原決定基，其中 T 細胞已藉由引入治療性 TCR 或 CAR 基因修飾。

【請求項 50】

如請求項 49 之抗體抗原決定基，其中已藉由引入治療性 TCR 或 CAR 基因修飾之 T 細胞係用於癌症治療。

【請求項 51】

如請求項 45 之抗體抗原決定基，其中該抗體抗原決定基用於連接 TCR α 及 TCR β 鏈，或用於連接 CAR 與另一基因編碼之蛋白。

【請求項 52】

如請求項 45 之抗體抗原決定基，其包含 2A 肽序列、HA.11 抗原決定基標籤、FLAG 抗原決定基標籤、Myc 抗原決定基標籤、V5 抗原決定基標籤，或包含多至與該 2A 肽相同數目胺基酸的肽。

【請求項 53】

如請求項 52 之抗體抗原決定基，其中該 2A 肽可為 P2A、T2A、E2A 或 F2A。

【請求項 54】

如請求項 45 之抗體抗原決定基，其包含：2A 肽序列片段或與其至少 90%一致之序列，其中該 2A 肽序列不為完全 2A 序列。

【請求項 55】

如請求項 54 之抗體抗原決定基，其中該肽序列包含 SEQ ID NO: 1 (CGDVEENPG)或與其至少 75%一致之序列。

【請求項 56】

如請求項 54 或 55 之抗體抗原決定基，其中該抗體抗原決定基可由單株抗 2A 肽抗體 3H4 鑑別。

【請求項 57】

一種抗體抗原決定基，其用於偵測已藉由引入治療性 TCR 基因修飾之基因工程 T 細胞，該抗體抗原決定基包含如請求項 45 至 56 中任一項之抗體抗原決定基。

【請求項 58】

一種抗體抗原決定基，其用於偵測用於癌症治療的經新穎 TCR 或 CAR 基因修飾之細胞，該抗體抗原決定基包含如請求項 45 至 56 中任一項之抗體抗原決定基。

【請求項 59】

一種用於偵測基因工程細胞之套組，其包含如請求項 45 至 56 中任一項之抗體抗原決定基。

【請求項 60】

如請求項 59 之套組，其中該等基因工程細胞包含 T 細胞。

【請求項 61】

如請求項 60 之套組，其中該等 T 細胞已藉由引入治療性 TCR 基因修飾。

【請求項 62】

如請求項 61 之套組，其中已藉由引入治療性 TCR 基因修飾之該等 T 細胞用於癌症治療。

【請求項 63】

一種基因構築體，其包含：能夠表現 2A 肽序列或與其至少 90%一致之序列的核苷酸序列，其中該構築體經組態以用於自單一開放閱讀框架表現多種蛋白，且其中該核苷酸序列不使該基因構築體之尺寸增加超過 25 個胺基酸。

【請求項 64】

如請求項 63 之基因構築體，其中該 2A 肽序列包含 2A 肽序列片段或與其至少 90%一致之序列，其中該 2A 肽序列不為完全 2A 序列。

【請求項 65】

如請求項 64 之基因構築體，其中該 2A 肽序列包含 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3、SEQ ID NO: 6 之序列或與 SEQ ID NO: 2、SEQ ID NO: 3 或 SEQ ID NO: 6 至少 75%一致之序列(SEQ ID NO: 2 = EGRGSLTTCG

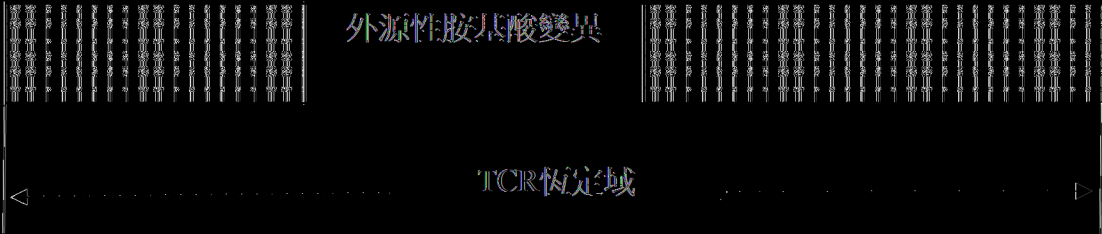
DVEENPGP ; SEQ ID NO: 3 = ATNFSLLKQAGDVEENPGP ; SEQ ID NO: 6 = GDVEENPG)。

【請求項 66】

一種基因工程細胞，其包含如請求項 1 至 15 中任一項之經標記蛋白，或如請求項 53 至 55 中任一項之抗體抗原決定基，或如請求項 63 至 65 中任一項之基因構築體。

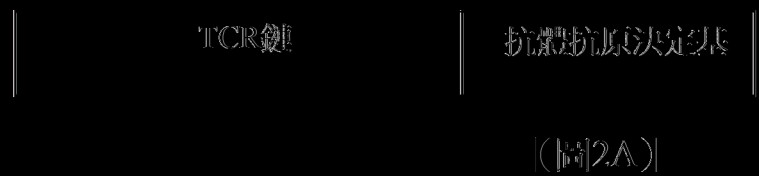
|(發明圖式)|

TCR恆定域抗原決定基圖。



|(圖1)|

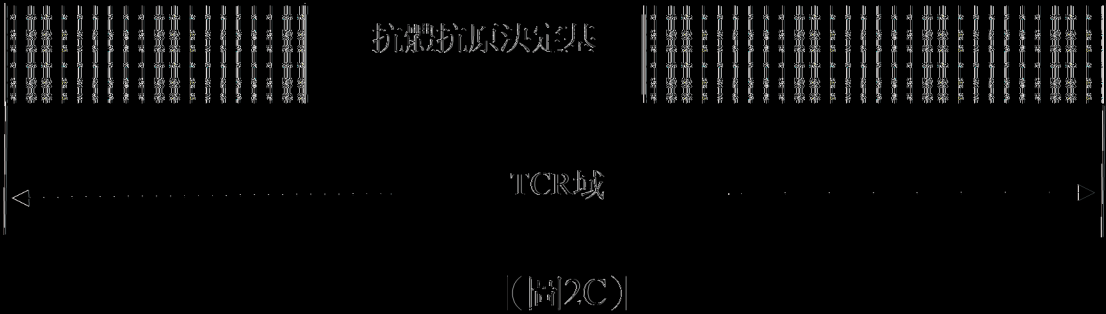
抗體抗原決定基連接至TCR鏈之C端的抗體抗原決定基區。



抗體抗原決定基連接至TCR鏈之N端的抗體抗原決定基區。



抗體抗原決定基插入至TCR鏈中的抗體抗原決定基區。



抗體抗原決定基用於連接TCR α 與TCR β 鏈的抗體抗原決定基區。可交換TCR α 及TCR β 鏈之位置。



10001CR CB (第2057)



100

模反

1-800-333-3333

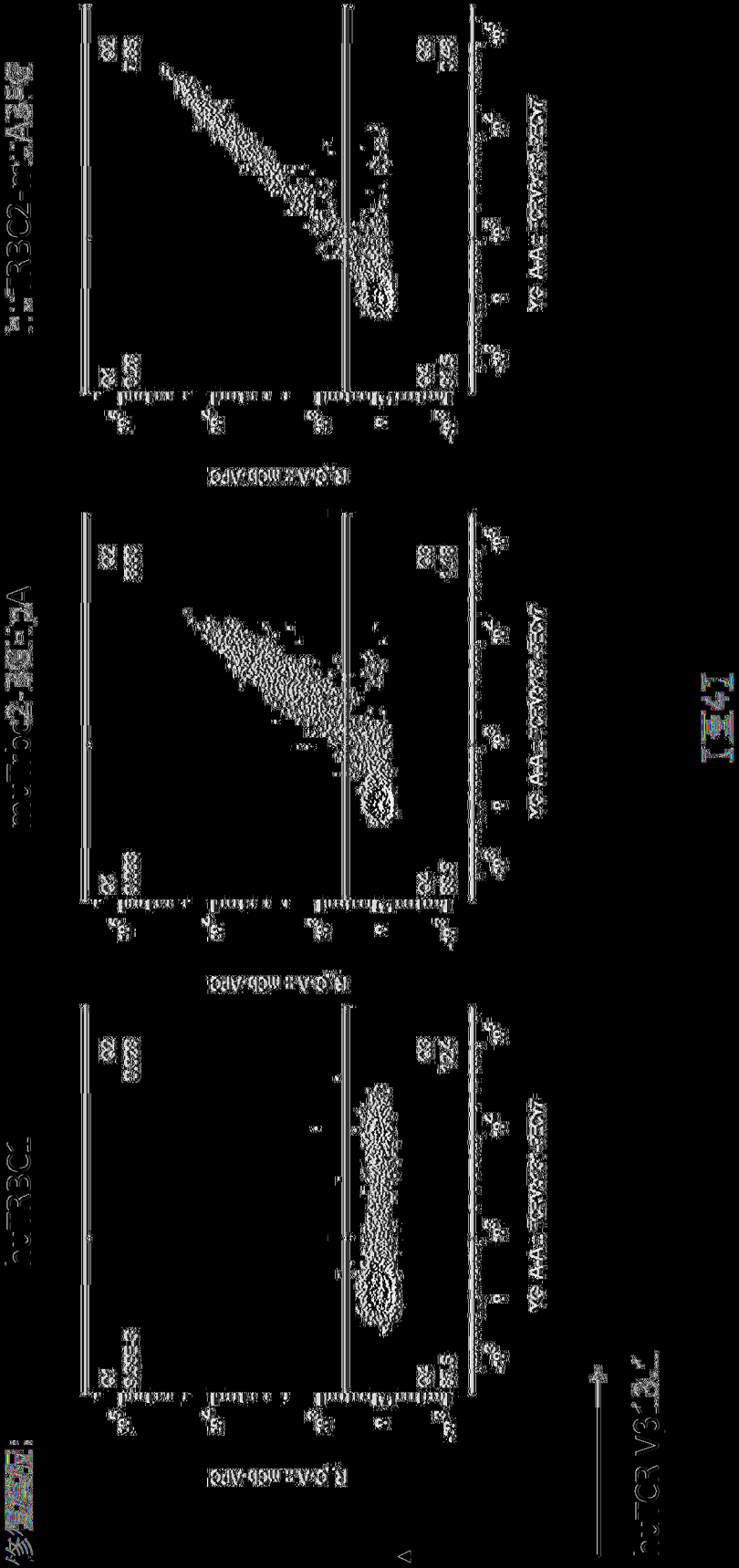
COM-VC AA-For-5-5-57

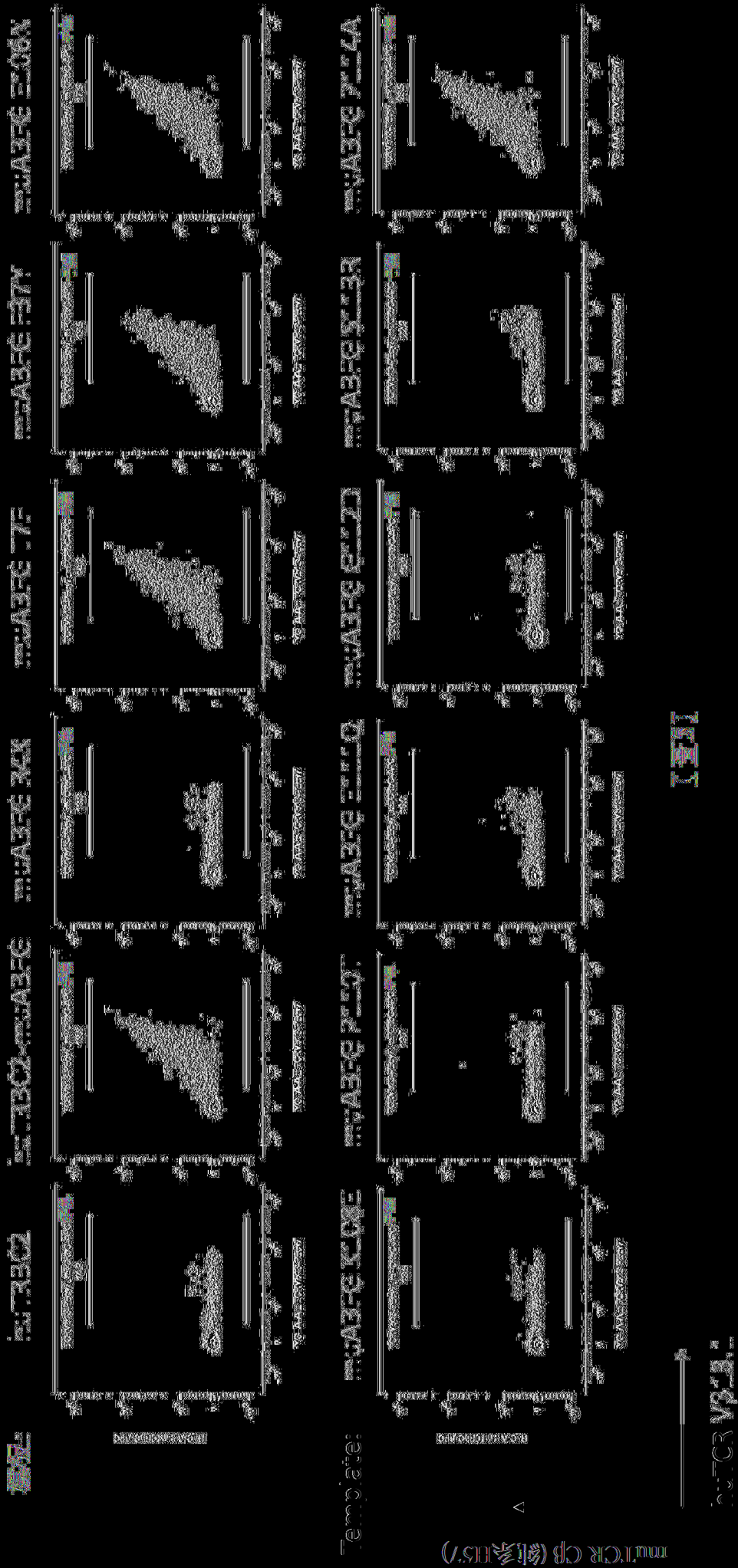
Oxymyrase AA 0335-1347

[illegible]

Compro A4-003-1217

圖 1 係本發明之第一實施例之平面圖





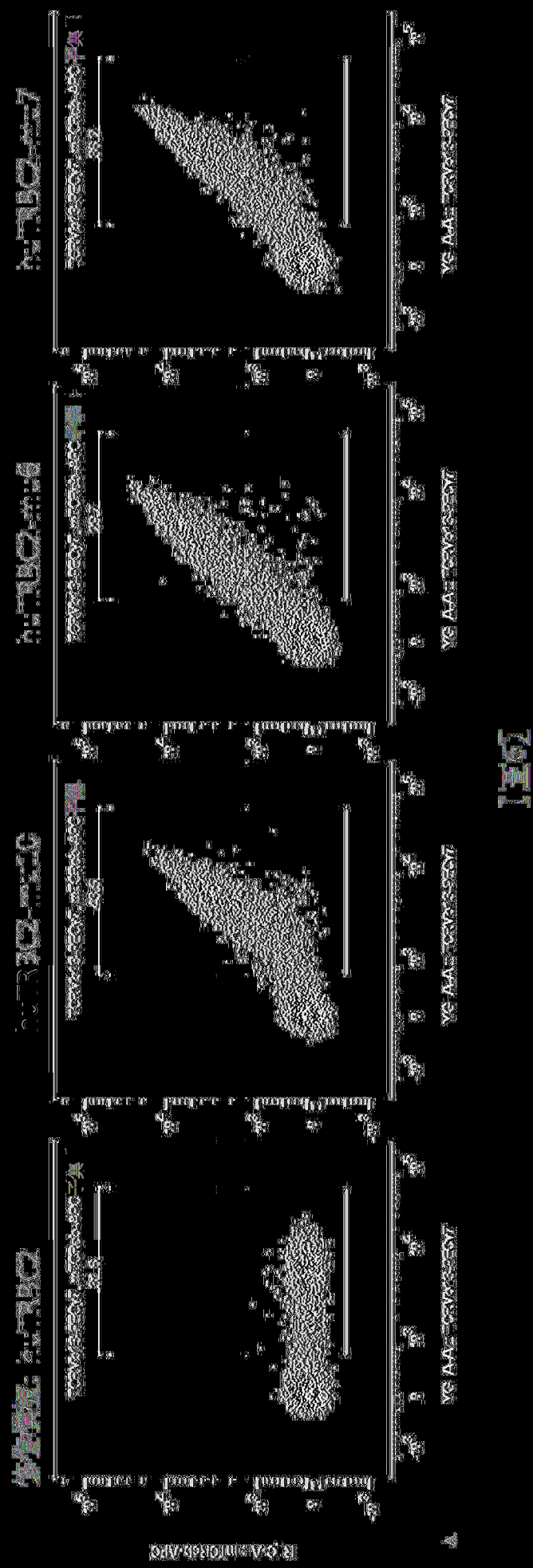
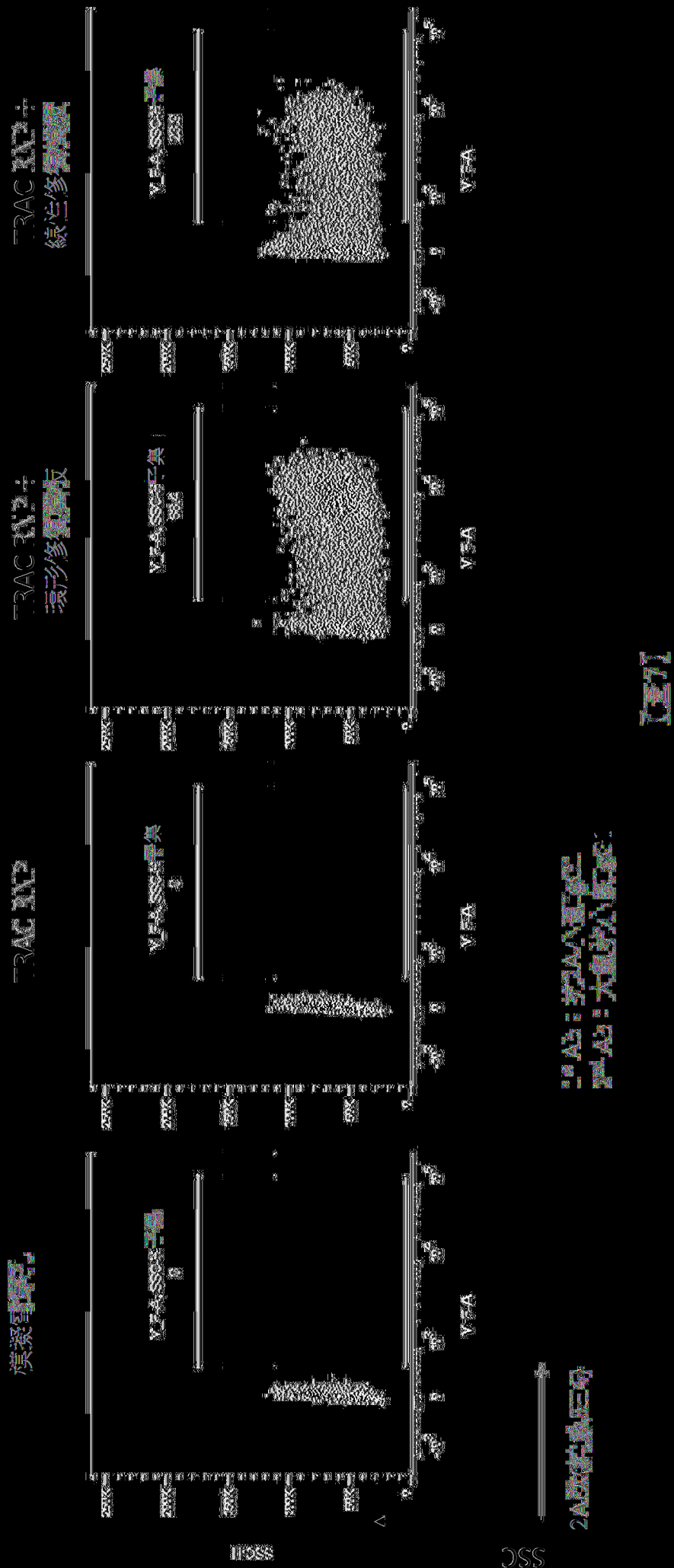
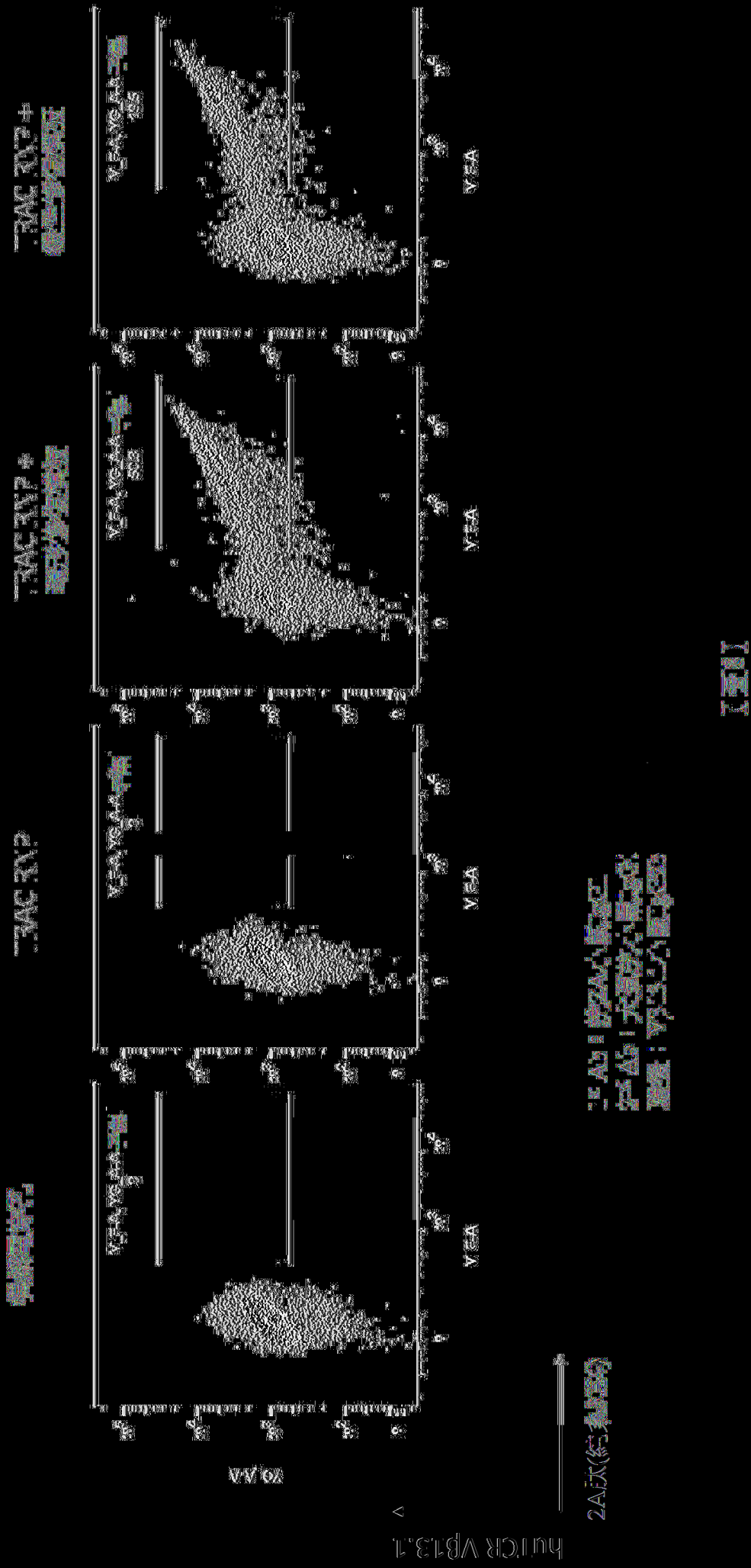


FIG. 1

FIG. 1 (continued)







huicr VB13.1

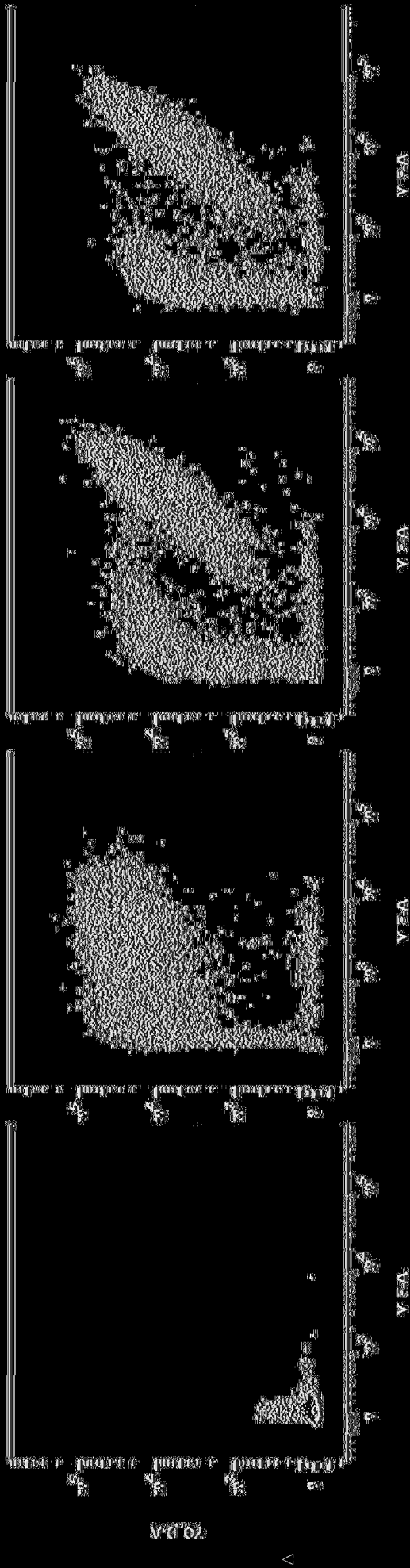
2A 歐 (約 100%)

模擬導

2nd Gen: CAR-YAG-P-170

1st Gen: CAR-YAG-P-170

-YAG-P-170



2A次(終極型)

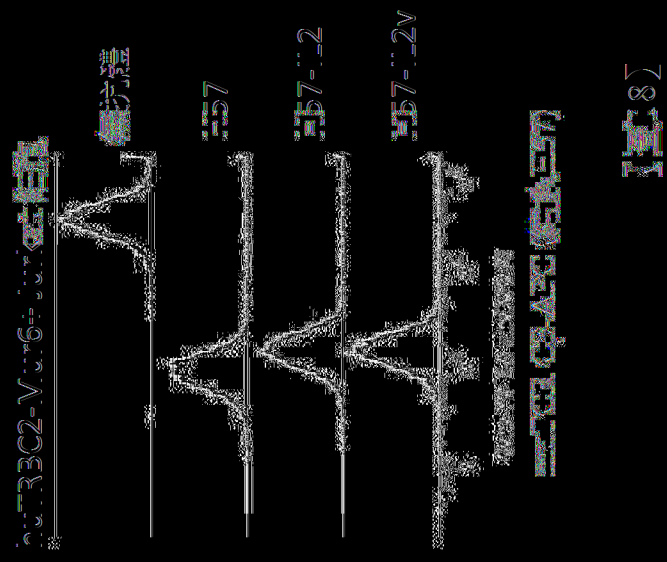
2A次: 終極型
2A次: 大面積心型
2A次: 大面積心型

【圖9】

人類TCR Cβ2域(SEQ ID NO: 8)

XDDLNVEPPKVAVIEPSIEAIESHTQKATLVCLATGIFYPDHVIELSWWVNG
KIVHISGVSTDPQPLKEQPAINDSRYCLSSRLRVSAITFWQNPRNHRCQV
QIFYGLSINDIEWTQDIRAKPVITQIVSAIEAWGRADCGIFTSIESYQQGVLSAII
LYHIIJLGKATLYAVLVSAIYVIMAMVKKKDSRG

[(圖17)]



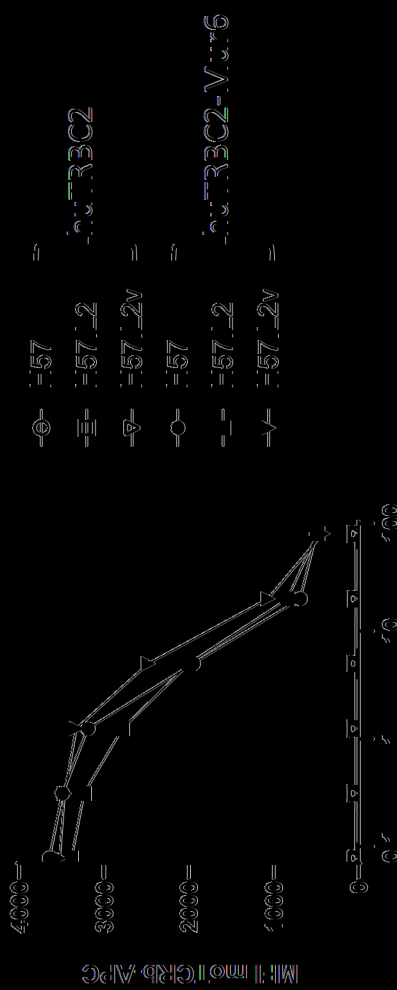
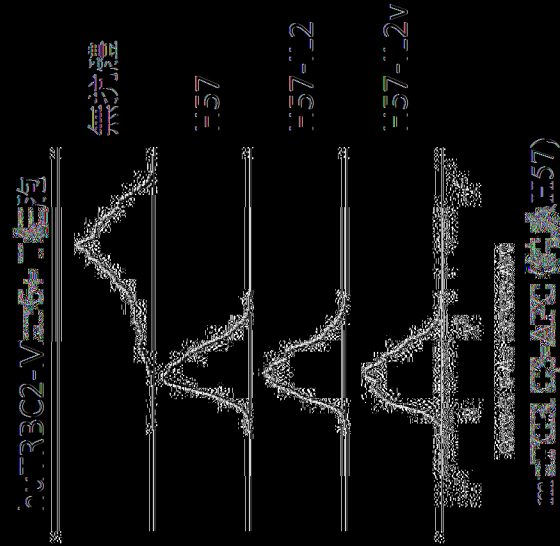
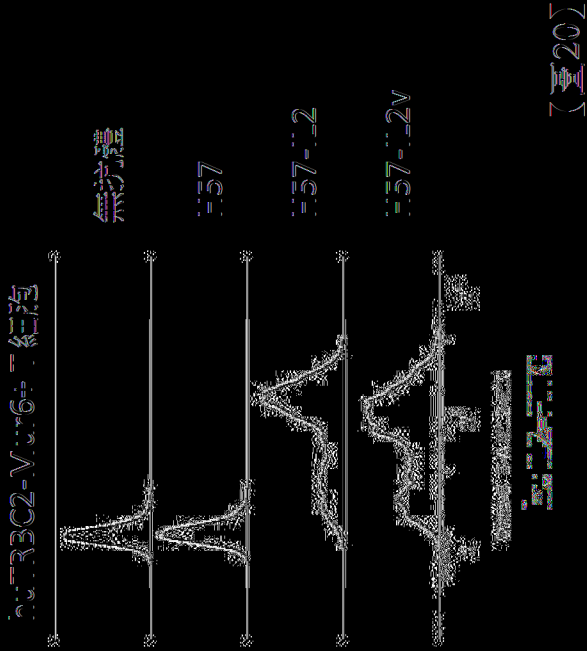
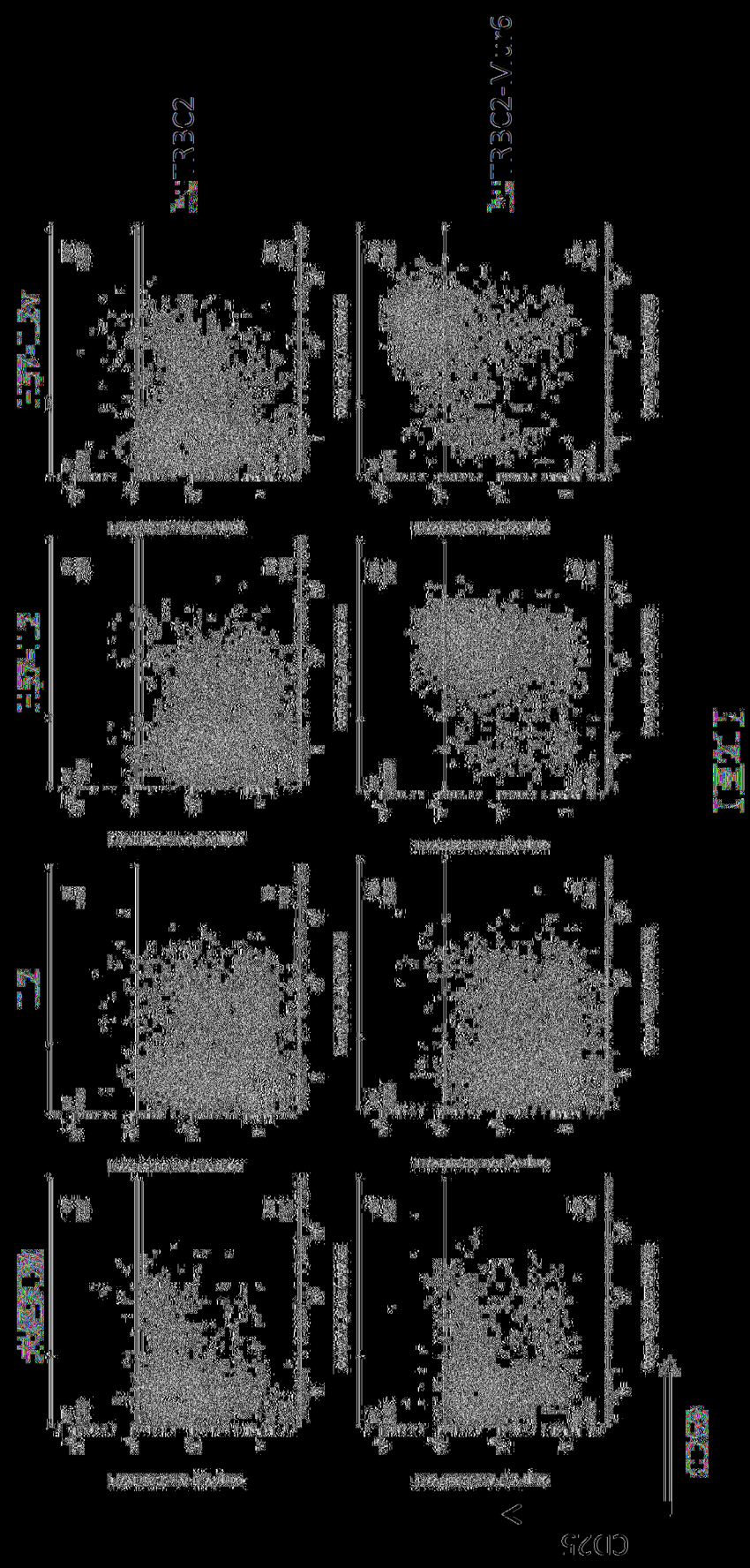
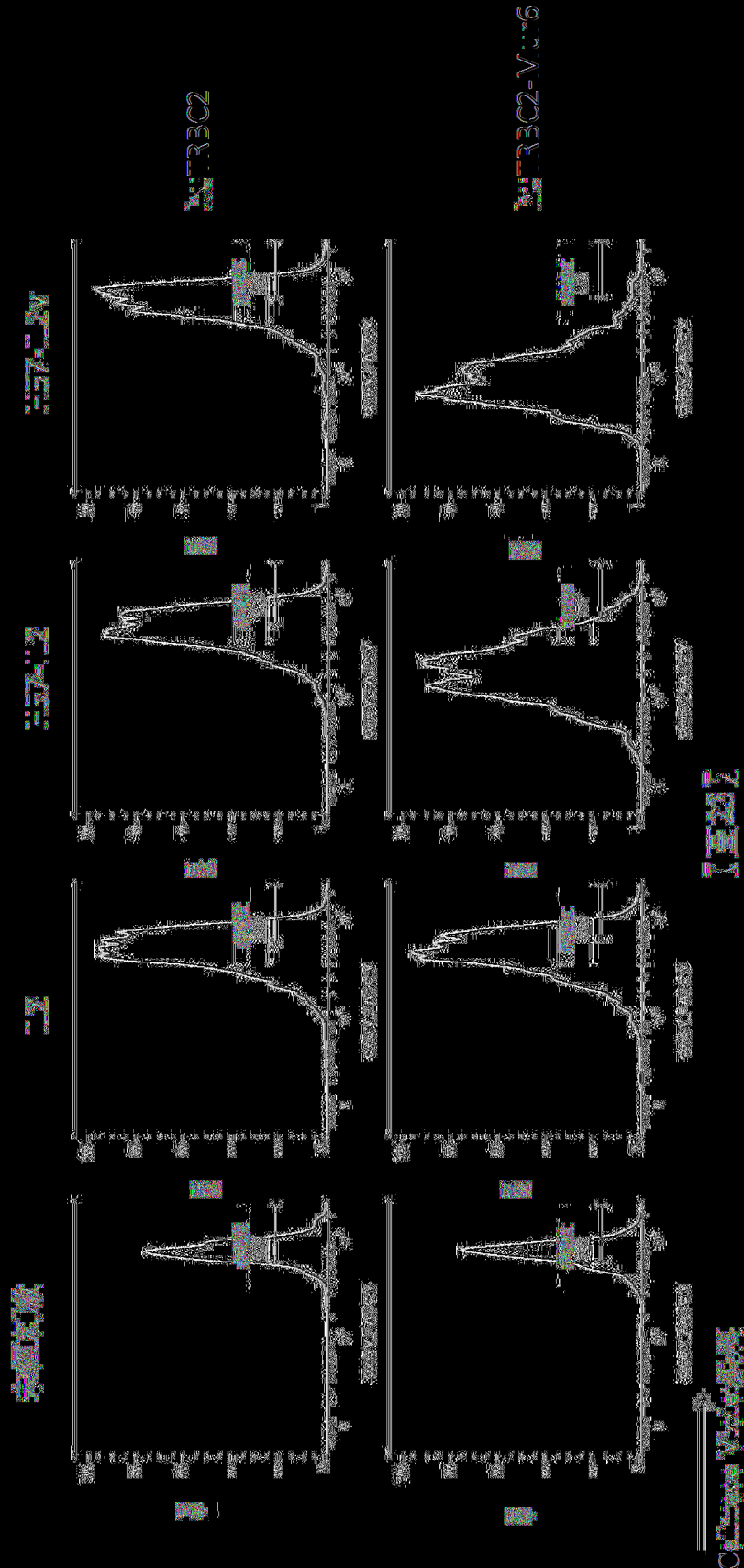
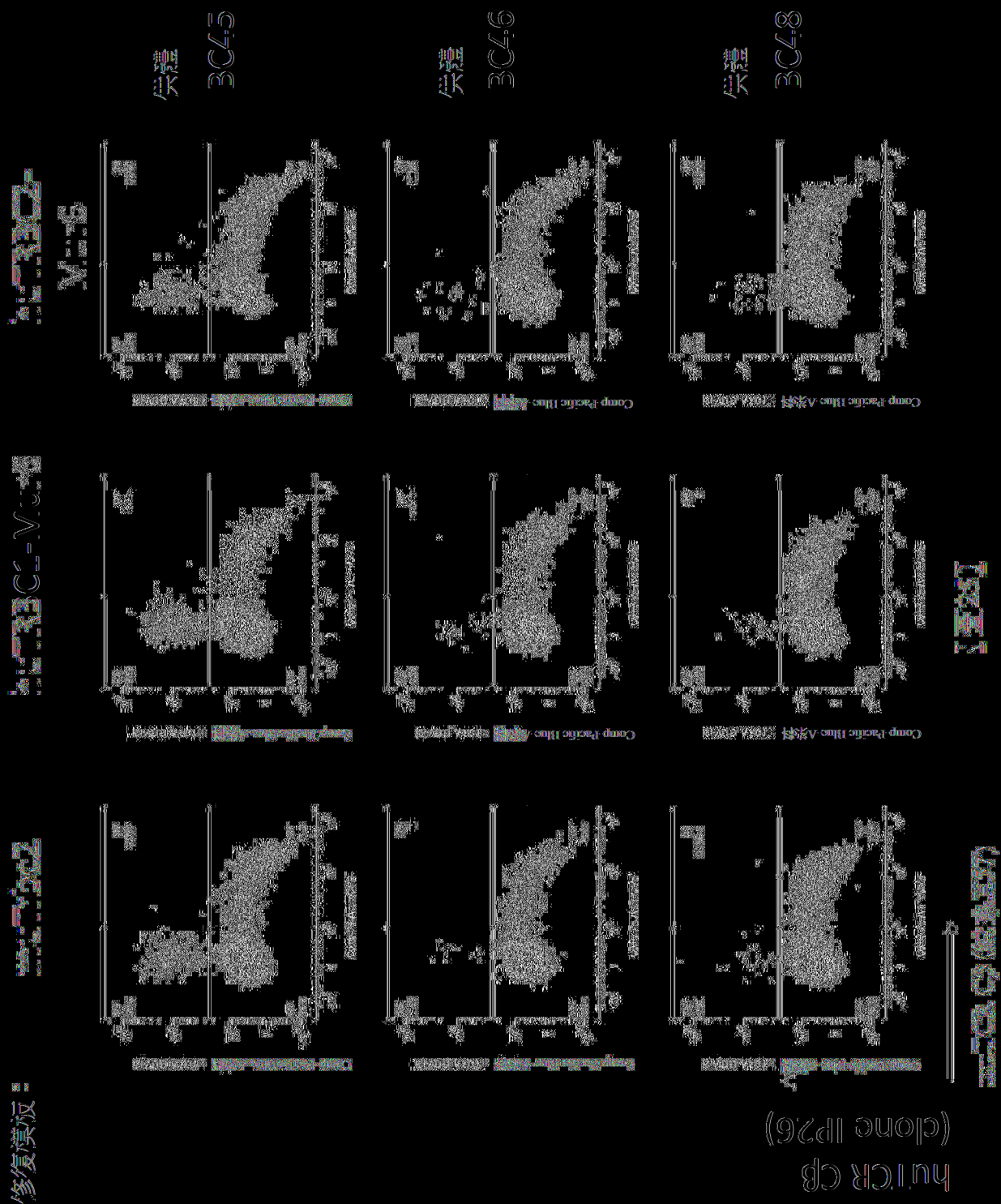


圖 9

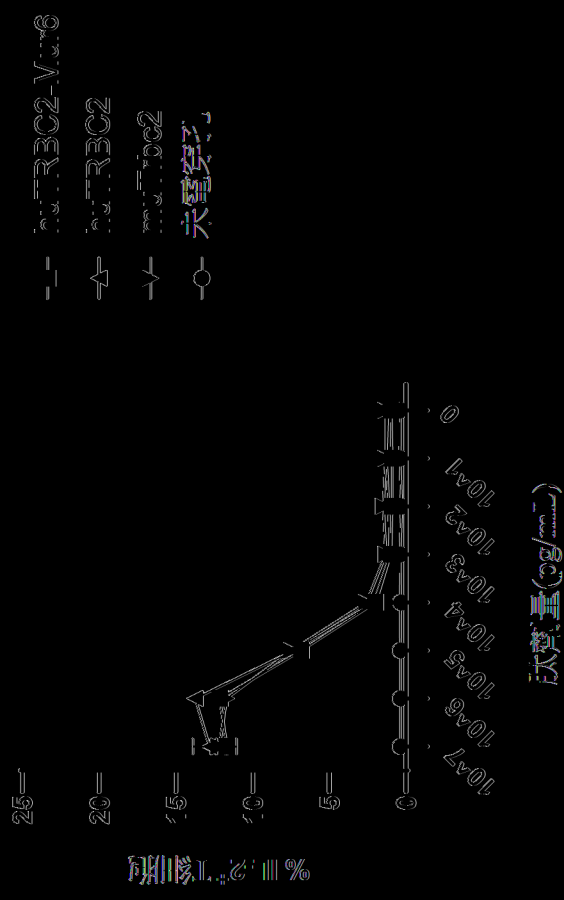






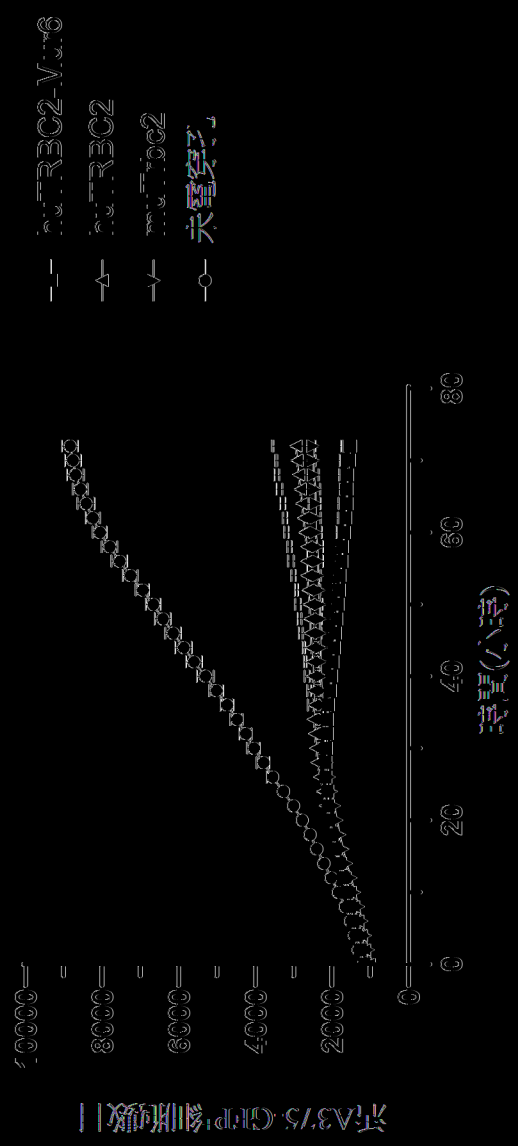


[263]

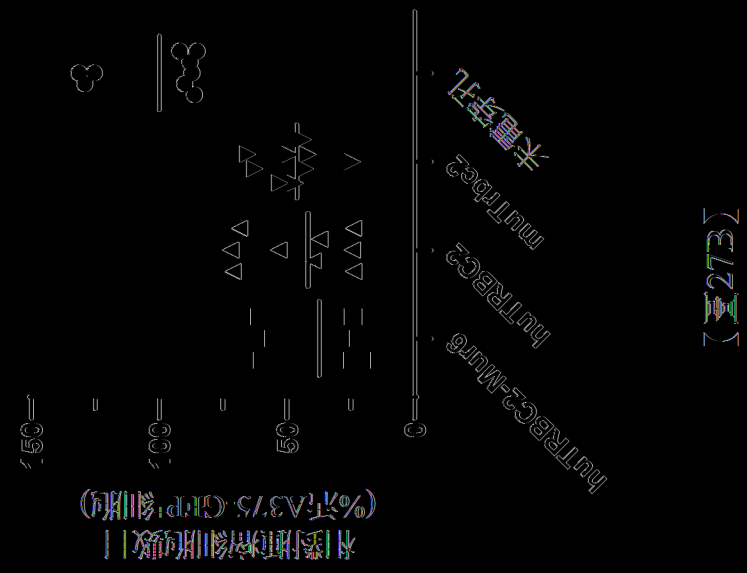


[圖 26C]

[260]



【图27A】



【圖273】