



(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 202521690 A

(43)公開日：中華民國 114 (2025) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：114103778

(22)申請日：中華民國 107 (2018) 年 04 月 26 日

(51)Int. Cl.：

C12N5/0783 (2010.01)

C07K14/705 (2006.01)

C07K16/28 (2006.01)

A61K39/00 (2006.01)

A61P35/00 (2006.01)

(30)優先權：2017/04/26

美國

62/490,576

2017/04/26

美國

62/490,578

2017/04/26

美國

62/490,580

(71)申請人：美商優瑞科生物技術公司(美國) EUREKA THERAPEUTICS, INC. (US)

美國

(72)發明人：劉宏 LIU, HONG (US)；張鵬博 ZHANG, PENGBO (CN)；霍蘭盧卡斯 HORAN,

LUCAS (US)；許奕陽 XU, YIYANG (US)；史丹利賓納茲 K STALEY,

BINNAZ K. (TR)；劉連興 LIU, LIANXING (CN)；雲泓若 YUN, HONGRUO (US)

(74)代理人：陳長文；簡秀如；朱淑尹

申請實體審查：有 申請專利範圍項數：10 項 圖式數：18 共 0 頁

(54)名稱

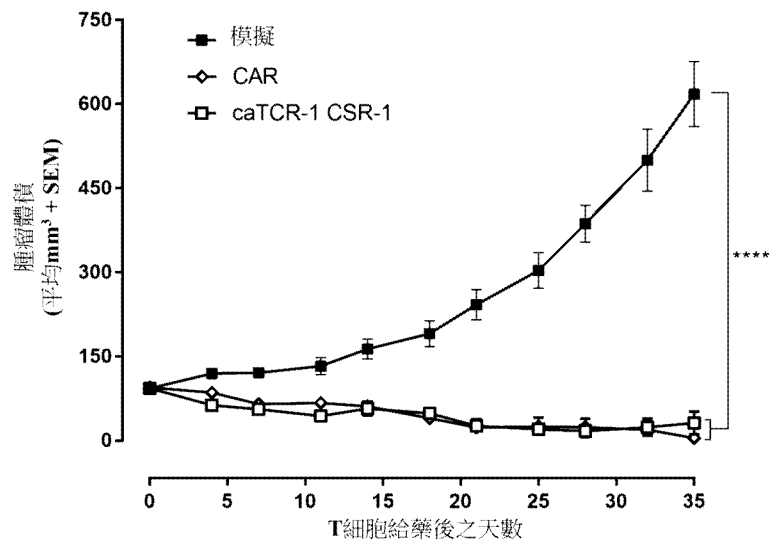
表現嵌合活化受體及嵌合刺激受體之細胞及其用途

(57)摘要

本申請案提供免疫細胞(諸如 T 細胞)，其包含嵌合抗體-T 細胞受體(TCR)構築體(caTCR)及嵌合信號傳導受體(CSR)構築體。該 caTCR 包含特異性結合於靶抗原之抗原結合模組及能夠募集至少一種 TCR 相關信號傳導分子之 T 細胞受體模組(TCRM)，且該 CSR 包含特異性結合於靶配體之配體結合域及能夠提供刺激信號至該免疫細胞之協同刺激信號傳導域。亦提供製造及使用此等細胞之方法。

The present application provides immune cells (such as T cells) comprising a chimeric antibody-T cell receptor (TCR) construct (caTCR) and a chimeric signaling receptor (CSR) construct. The caTCR comprises an antigen-binding module that specifically binds to a target antigen and a T cell receptor module (TCRM) capable of recruiting at least one TCR-associated signaling molecule, and the CSR comprises a ligand-binding domain that specifically binds to a target ligand and a co-stimulatory signaling domain capable of providing a stimulatory signal to the immune cell. Also provided are methods of making and using these cells.

指定代表圖：



【圖18】

## 【發明摘要】

### 【中文發明名稱】

表現嵌合活化受體及嵌合刺激受體之細胞及其用途

### 【英文發明名稱】

CELLS EXPRESSING CHIMERIC ACTIVATING RECEPTORS  
AND CHIMERIC STIMULATING RECEPTORS AND USES THEREOF

### 【中文】

本申請案提供免疫細胞(諸如T細胞)，其包含嵌合抗體-T細胞受體(TCR)構築體(caTCR)及嵌合信號傳導受體(CSR)構築體。該caTCR包含特異性結合於靶抗原之抗原結合模組及能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子之T細胞受體模組(TCRM)，且該CSR包含特異性結合於靶配體之配體結合域及能夠提供刺激信號至該免疫細胞之協同刺激信號傳導域。亦提供製造及使用此等細胞之方法。

### 【英文】

The present application provides immune cells (such as T cells) comprising a chimeric antibody-T cell receptor (TCR) construct (caTCR) and a chimeric signaling receptor (CSR) construct. The caTCR comprises an antigen-binding module that specifically binds to a target antigen and a T cell receptor module (TCRM) capable of recruiting at least one TCR-associated signaling molecule, and the CSR comprises a ligand-binding domain that specifically binds to a target ligand and a co-stimulatory signaling domain capable of providing a stimulatory signal to the immune cell. Also provided are methods of making and using

these cells.

【指定代表圖】

圖18

【代表圖之符號簡單說明】

無



# 【發明說明書】

## 【中文發明名稱】

表現嵌合活化受體及嵌合刺激受體之細胞及其用途

## 【英文發明名稱】

CELLS EXPRESSING CHIMERIC ACTIVATING RECEPTORS  
AND CHIMERIC STIMULATING RECEPTORS AND USES THEREOF

## 【技術領域】

【0001】 本發明係關於免疫細胞(諸如T細胞)，其包含嵌合抗體-T細胞受體(TCR)構築體(caTCR)及嵌合信號傳導受體(CSR)構築體。該caTCR包含特異性結合於靶抗原之抗原結合模組及能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子之T細胞受體模組(TCRM)，且該CSR包含特異性結合於靶配體之配體結合域及能夠提供刺激信號至該免疫細胞之協同刺激信號傳導域。

## 【先前技術】

【0002】 T細胞介導免疫為發展出抗原(Ag)-特異性T淋巴細胞來消除病毒、細菌、寄生蟲感染或惡性細胞的適應過程。其亦可涉及自體抗原之異常識別，導致自體免疫性發炎疾病。T淋巴細胞之Ag特異性係基於T細胞受體(TCR)對由主要組織相容性複合體(MHC)分子於Ag呈遞細胞(APC)上呈遞之獨特抗原肽的識別(Broere等人，*Principles of Immunopharmacology*, 2011)。由於在胸腺中成熟後之發育選擇，各T淋巴細胞於細胞表面上表現獨特的TCR。TCR以兩種形式存在： $\alpha\beta$ 雜二聚體或 $\gamma\delta$ 雜二聚體。T細胞於細胞表面上表現 $\alpha\beta$ 形式或 $\gamma\delta$ 形式之TCR。四條鏈 $\alpha/\beta/\gamma/\delta$ 皆具有由高度多形「免疫球蛋白可變區」樣N端域及「免疫球蛋

白恆定區」樣第二域組成的特徵性胞外結構。此等域各自具有特徵性域內二硫橋鍵。恆定區鄰近細胞膜，其後為連接肽、跨膜區及短胞質尾區。雜二聚TCR之2條鏈之間的共價鍵係由位於短連接肽序列內的半胱胺酸殘基形成，該短連接肽序列橋接胞外恆定域與跨膜區，該半胱胺酸殘基與所配對的TCR鏈半胱胺酸殘基在對應位置形成二硫鍵(The T cell Receptor Factsbook, 2001)。

【0003】  $\alpha\beta$ 及 $\gamma\delta$  TCR與非多形膜結合CD3蛋白結合以形成功能性八聚TCR-CD3複合體，由TCR雜二聚體及三個二聚信號傳導分子CD3 $\delta/\epsilon$ 、CD3 $\gamma/\epsilon$ 及CD3 $\zeta/\zeta$ 或 $\zeta/\eta$ 組成。各次單元之跨膜域中之可電離殘基形成將複合體固定在一起的極性相互作用網。關於T細胞活化，TCR N端可變區識別於靶細胞表面上呈遞之肽/MHC複合體，而CD3蛋白則參與信號轉導(Call等人, *Cell*. 111(7):967-79, 2002；The T cell Receptor Factsbook, 2001)。

【0004】  $\alpha\beta$  TCR亦稱作習知TCR，表現於大部分淋巴細胞上且由糖基化多形 $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈組成。不同的 $\alpha\beta$  TCR可區分嵌入於尺寸及形狀相對恆定的MHC II (大部分表現於APC細胞表面上)及MHC I (表現於所有有核細胞上)分子之表面中的不同肽。 $\gamma\delta$  TCR儘管在結構上類似於 $\alpha\beta$  TCR，但以與MHC呈遞無關的方式識別攜帶碳水化合物、核苷酸或磷光體之抗原(The T cell Receptor Factsbook, 2001；Girardi等人, *J. Invest. Dermatol.* 126(1):25-31, 2006；Hayes等人, *Immunity*. 16(6):827-38, 2002)。

【0005】 在過去的二十年裏，在免疫學及腫瘤生物學方面的根本性進展以及大量腫瘤抗原之鑑別促成了基於細胞之免疫療法領域的顯著進展。在基於細胞之免疫療法領域中，T細胞療法佔據重要位置，其目標為

藉由將自體及離體擴增的T細胞轉移給患者來治療癌症，且已產生了一些值得注意的抗腫瘤反應(Blattman 等人, *Science*. 305(5681):200-5, 2004)。舉例而言，在黑色素瘤患者中，包括龐大的侵襲性腫瘤，在包含肝、肺、軟組織及大腦之多個部位投與經離體擴增的天然存在之腫瘤浸潤性淋巴細胞(TIL)可介導在50-70%範圍內的客觀反應率(Rosenberg 等人, *Nat. Rev. Cancer*. 8(4):299-308, 2008；Dudley ME等人, *J. Clin. Oncol.* 23(10):2346-57, 2005)。

【0006】 TIL療法之普遍應用的主要限制為難以產生具有抗腫瘤潛力的人類T細胞。作為替代方法，可經由T細胞工程改造將外源性高親和力TCR引入患者之正常自體性T細胞中。此等細胞至淋巴缺乏患者中之授受性轉移已顯示可介導諸如黑色素瘤、結腸直腸癌及滑膜肉瘤之癌症的癌症消退(Kunert R等人, *Front. Immunol.* 4:363, 2013)。最新的I期臨床試驗使用針對滑膜肉瘤之抗NY-ESO-1 TCR，報導66%之整體反應率且在一接受T細胞療法之患者中達成完全反應(Robbins PF等人, *Clin. Cancer Res.* 21(5):1019-27, 2015)。

【0007】 TCR工程改造T細胞療法之優勢之一在於其可靶向潛在胞內腫瘤特異性蛋白之整個陣列，該等蛋白質經由MHC呈遞經處理及傳遞至細胞表面。另外，TCR為高度敏感的且可僅由一些抗原肽/MHC分子活化，其又可觸發細胞溶解性T細胞反應，包括細胞介素分泌、T細胞增殖及限定靶細胞之細胞溶解。因此，相較於抗體或小分子療法，經TCR工程改造之T細胞因其以胞內靶抗原之極少複本殺滅靶細胞的能力而特別有價值(Kunert R等人, *Front. Immunol.* 4:363, 2013)。

【0008】 然而，不同於治療性抗體，其多半經由融合瘤或呈現技術

發現，靶特異性TCR之鑑別要求自患者T細胞建立靶肽/MHC特異性TCR純系且篩選出具有最佳靶抗原結合親和力的正確 $\alpha$ - $\beta$ 鏈組合。經常在自患者T細胞選殖TCR之後採用噬菌體/酵母呈現來進一步增強TCR之靶標結合親和力。整個過程要求諸多領域的專業知識且耗時(Kobayashi E等人, *Oncoimmunology*. 3(1):e27258, 2014)。TCR探索過程中之困難極大地阻礙了經TCR工程改造之T細胞療法的普遍應用。其亦受到治療相關之毒性的妨礙，尤其是針對於腫瘤細胞上過度表現且亦表現於健康細胞上之抗原的TCR，或識別脫靶肽/MHC複合體之TCR (Rosenberg SA等人, *Science*. 348(6230):62-8, 2015)。

【0009】近年來已研發出一種不同的方法來使T細胞參與靶向癌症免疫療法。此新方法稱作嵌合抗原受體T細胞療法(CAR-T)。其合併單株抗體之敏銳的靶向特異性與由細胞毒性T細胞提供之強力細胞毒性及長期存留。CAR係由識別細胞表面抗原之胞外域、跨膜區及胞內信號傳導域構成。胞外域由來自單株抗體之重鏈及輕鏈的抗原結合可變區組成，該等可變區融合成單鏈可變片段(scFv)。胞內信號傳導域含有基於免疫受體酪氨酸之活化基元(ITAM)，諸如來自CD3 $\zeta$ 或FcR $\gamma$ 之彼等，及一或多個協同刺激信號傳導域，諸如來自CD28、4-1BB或OX40之彼等(Barrett DM等人, *Annu. Rev. Med.* 65:333-47, 2014；Davila ML等人, *Oncoimmunology*. 1(9):1577-1583, 2012)。移植至T細胞表面上之CAR對靶抗原的結合可觸發與TCR-肽/MHC複合體相互作用無關的T細胞效應功能。因此，具有CAR之T細胞可重定向以攻擊多種細胞，包括不匹配T細胞上之TCR之MHC類型但表現靶細胞表面抗原的彼等細胞。此方法克服了MHC限制性TCR識別的約束且避免了經由抗原呈遞或MHC分子表現障礙所致的腫瘤

逃逸。臨床試驗已顯示CAR-T療法在神經母細胞瘤(Louis CU等人, *Blood*. 118(23):6050-6056, 2011)、B-ALL (Maude, SL等人, *New England Journal of Medicine* 371:16:1507-1517, 2014)、CLL (Brentjens, RJ等人 *Blood* 118:18:4817-4828, 2011)及B細胞淋巴瘤 (Kochenderfer, JN等人 *Blood* 116:20:4099-4102, 2010)中在臨床上具有顯著抗腫瘤活性。在一個研究中,報導用CD19-CAR T療法治療之30位患有B-ALL之患者中90%之完全緩解率(Maude, SL等人, 同前文獻)。

【0010】迄今為止的全部CAR研究皆針對具有高細胞表面表現之腫瘤抗原。為靶向低複本數細胞表面腫瘤抗原及胞內腫瘤抗原,其代表95%之所有已知的腫瘤特異性抗原,需要研發更強力且更有效的經工程改造之細胞療法(Cheever等人, *Clin. Cancer Res.* 15(17):5323-37, 2009)。

【0011】已作出若干嘗試來工程改造具有抗體特異性與T細胞受體效應功能的嵌合受體分子。參見例如Kuwana, Y等人, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 149(3):960-968, 1987; Gross, G等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 86:10024-10028, 1989; Gross, G & Eshhar, Z, *FASEB J.* 6(15):3370-3378, 1992; 及美國專利第7,741,465號。迄今為止,此等嵌合受體中無一者用於臨床使用,且需要針對在人類T細胞中具有改良表現及功能的抗體-TCR嵌合受體的新穎設計。

【0012】本文所提及之所有公開案、專利、專利申請案及公開專利申請案之揭示內容特此以全文引用的方式併入本文中。PCT申請案第PCT/US2016/058305號特此以全文引用的方式併入本文中。

#### 【發明內容】

【0013】本申請案在一個態樣中提供免疫細胞(諸如T細胞),其包含

嵌合抗體-T細胞受體(TCR)構築體(caTCR)及嵌合信號傳導受體(CSR)構築體。該caTCR包含特異性結合於靶抗原之抗原結合模組及能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子之T細胞受體模組(TCRM)，且該CSR包含特異性結合於靶配體之配體結合域及能夠提供刺激信號至該免疫細胞之協同刺激信號傳導域。

【0014】 在一些實施例中，提供一種免疫細胞，該免疫細胞包含：  
a)嵌合抗體-T細胞受體(TCR)構築體(caTCR)，其包含i)特異性結合於靶抗原之抗原結合模組；及ii) T細胞受體模組(TCRM)，其包含含有第一TCR跨膜域(TCR-TM)之第一TCR域(TCRD)及含有第二TCR-TM之第二TCRD，其中TCRM有助於募集至少一種TCR相關信號傳導分子；及b)嵌合信號傳導受體(CSR)，其包含：i)能夠與靶配體結合及相互作用之配體結合模組；ii)跨膜模組；及iii)能夠提供協同刺激信號至免疫細胞之協同刺激免疫細胞信號傳導模組，其中配體結合模組及協同刺激免疫細胞信號傳導模組並非源自同一分子，且其中CSR缺乏功能性原代免疫細胞信號傳導域。

【0015】 在一些實施例中，提供一或多種核酸，其編碼如此處所描述之caTCR及CSR，其中caTCR及CSR各自由經一或多個核酸編碼之一或多個多肽鏈組成。

【0016】 在一些實施例中，提供一或多種核酸，該一或多種核酸編碼：a)嵌合抗體-T細胞受體(TCR)構築體(caTCR)，其包含：i)特異性結合於靶抗原之抗原結合模組；及ii) T細胞受體模組(TCRM)，其包含含有第一TCR跨膜域(TCR-TM)之第一TCR域(TCRD)及含有第二TCR-TM之第二TCRD，其中TCRM有助於募集至少一種TCR相關信號傳導分子，且其

中caTCR由一或多個多肽鏈組成；及b)嵌合信號傳導受體(CSR)，其包含：i)能夠與靶配體結合或相互作用之配體結合模組；ii)跨膜模組；及iii)能夠提供協同刺激信號至免疫細胞之協同刺激免疫細胞信號傳導模組，其中配體結合模組及協同刺激免疫細胞信號傳導模組並非源自同一分子，其中CSR缺乏功能性原代免疫細胞信號傳導域，且其中CSR由一或多個多肽鏈組成。

【0017】 在一些實施例中，提供一或多種載體，其包含如本文所描述之一或多種核酸。

【0018】 在一些實施例中，提供一種組合物，其包含如本文所描述之一或多種核酸或一或多種載體。

【0019】 在一些實施例中，提供一種免疫細胞，其包含如本文所描述之一或多種核酸或一或多種載體。

【0020】 在一些實施例中，提供一種醫藥組合物，其包含如本文所描述之免疫細胞及醫藥學上可接受之載劑。

【0021】 在一些實施例中，提供一種殺滅呈遞靶抗原之靶細胞的方法，其包含使該靶細胞與本文描述之免疫細胞接觸。

【0022】 在一些實施例中，提供一種治療有需要之個體之靶抗原相關疾病的方法，其包含向個體投與有效量之如本文所描述之醫藥組合物。

【0023】 在一些實施例中，提供一種將協同刺激信號提供至包含caTCR或用編碼caTCR之核酸轉導之免疫細胞之方法，其包含將如本文所描述之一或多種核酸或一或多種載體引入至該細胞中。

#### 【圖式簡單說明】

【0024】 圖1展示具有不同抗原結合模組之若干caTCR分子之示意

性表示。

【0025】 圖2展示自殺滅癌細胞株NALM6 (CD19+)之特異性裂解百分比，該殺滅由用單獨的抗CD19 caTCR-1-0、單獨的抗CD19 CSR或抗CD19 caTCR (1-0及1-TM5)+抗CD19 CSR轉導之T細胞介導。

【0026】 圖3展示在由用單獨的抗CD19 caTCR-1-0、單獨的抗CD19 CSR或抗CD19 caTCR (1-0及1-TM5)+抗CD19 CSR轉導之T細胞介導活體外殺滅癌細胞株NALM6之後，上清液中發現之細胞介素(IL-2、GM-CSF、IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ )的濃度。

【0027】 圖4展示用癌細胞株NALM6刺激之後，用單獨的抗CD19 caTCR-1-0、單獨的抗CD19 CSR或抗CD19 caTCR (1-0及1-TM5)+抗CD19 CSR轉導之T細胞中的脫粒活性(如藉由CD107a表現所測定)。

【0028】 圖5展示用癌細胞株BV173或NALM6刺激之後，用單獨的抗CD19 caTCR-1-0或抗CD19 caTCR (1-0及1-TM5)+抗CD19 CSR轉導之T細胞的增殖(如藉由CFSE染料稀釋所測定)。

【0029】 圖6展示自殺滅癌細胞株HepG2 (AFP+/GPC3+)及HepG2-GPC3.ko (AFP+/GPC3-)之特異性裂解百分比，該殺滅由用單獨的抗AFP158/HLA-A\*2:01 caTCR-1-0、單獨的抗GPC3 CSR或抗AFP158/HLA-A\*2:01 caTCR (1-0及1-TM5)+抗GPC3 CSR轉導之T細胞介導。

【0030】 圖7展示由用單獨的抗AFP158/HLA-A\*2:01 caTCR-1-0、單獨的抗GPC3 CSR或抗AFP158/HLA-A\*2:01 caTCR (1-0及1-TM5)+抗GPC3 CSR轉導之T細胞介導活體外殺滅癌細胞株HepG2及HepG2-GPC3.ko之後，上清液中發現之細胞介素(IL-2、GM-CSF、IFN- $\gamma$ 及TNF-



$\alpha$ )的濃度。

【0031】圖8展示用癌細胞株HepG2刺激之後，用單獨的抗AFP158/HLA-A\*2:01 caTCR-1-0、單獨的抗GPC3 CSR或抗AFP158/HLA-A\*2:01 caTCR (1-0及1-TM5)+抗GPC3 CSR轉導之T細胞中的脫粒活性(如藉由CD107a表現所測定)。

【0032】圖9展示用癌細胞株HepG2刺激之後，用單獨的抗AFP158/HLA-A\*2:01 caTCR-1-0、單獨的抗GPC3 CSR或抗AFP158/HLA-A\*2:01 caTCR (1-0及1-TM5)+抗GPC3 CSR轉導之T細胞的增殖(如藉由CFSE染料稀釋所測定)。

【0033】圖10展示自殺滅癌細胞株Raji、BV173、NALM6及Jeko-1(各CD19+/CD20+)之特異性裂解百分比，該殺滅由用抗CD19 caTCR (1-0及1-TM5)+抗CD20 CSR轉導之T細胞介導。

【0034】圖11展示由用單獨的抗CD19 caTCR-1-0或抗CD19 caTCR(1-0及1-TM5)+抗CD20 CSR轉導之T細胞介導活體外殺滅癌細胞株Raji之後，上清液中發現之細胞介素(IL-2、GM-CSF、IFN- $\gamma$ 及TNF- $\alpha$ )的濃度。

【0035】圖12展示用癌細胞株Raji刺激之後，用單獨的抗CD19 caTCR-1-0、單獨的抗CD20 CSR或抗CD19 caTCR (1-0及1-TM5) +抗CD20 CSR轉導之T細胞的脫粒活性(如藉由CD107a表現所測定)。

【0036】圖13A至圖13E展示例示性雙特異性caTCR分子之示意性結構。

【0037】圖14至圖15展示用癌細胞株NALM6刺激之後，表現抗CD19 caTCR-1-0及抗CD19 CSR之T細胞的增殖(如藉由CFSE染料稀釋所

測定)。

【0038】 圖16展示NALM6在皮下小鼠模型中的腫瘤生長，其經模擬處理或單次瘤內注射表現抗CD19 caTCR-1或與抗CD19 CSR-1組合之抗CD19 caTCR-1的T細胞。

【0039】 圖17展示經表現抗CD19 CAR之T細胞或表現抗CD19 caTCR-1及抗CD19 CSR-1兩者之T細胞處理的小鼠中的血清細胞介素含量。將司徒頓氏t測試(student t-test)用於分析兩個組中之血清細胞介素含量的統計顯著性(\*\*P<0.01；\*\*\*P<0.001；\*\*\*\*P<0.0001)。

【0040】 圖18展示HepG2在皮下小鼠模型中的腫瘤生長，其經模擬處理或單次瘤內注射表現抗AFP CAR或與抗GPC3 CSR組合之抗AFP CAR的T細胞。

#### 【實施方式】

#### 【0041】

#### 相關申請案之交叉參考

本申請案主張2017年4月26日提交之美國臨時申請案第62/490,576號、2017年4月26日提交之美國臨時申請案第62/490,578號及2017年4月26日提交之美國臨時申請案第62/490,580號之優先權，該等申請案之內容在此以全文引用之方式併入本文中。

#### 以ASCII正文檔案形式提交序列表

【0042】 以ASCII正文檔案提交之以下內容以全文引用的方式併入本文中：電腦可讀形式(CRF)之序列表(檔案名稱：750042001040SEQLIST.txt，記錄日期：2018年4月24日，大小：107 KB)。

【0043】 本申請案提供免疫細胞(諸如T細胞)，其包含嵌合抗體-T細

胞受體(TCR)構築體(caTCR)及嵌合信號傳導受體(CSR)構築體。該caTCR包含特異性結合於靶抗原之抗原結合模組及能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子之T細胞受體模組(TCRM)。該CSR包含特異性結合於靶配體之配體結合域及能夠將刺激信號提供至免疫細胞之協同刺激免疫細胞信號傳導域，且不包含功能性原代免疫細胞信號傳導序列。靶抗原及靶配體可為表現於細胞表面上之蛋白質或包含肽及MHC蛋白之複合體(在本文中被稱作「pMHC複合體」或「pMHC」)，諸如病變細胞表面上的MHC呈遞疾病相關抗原肽。藉由控制T細胞受體活化的天然存在之機制調節caTCR，且經由CSR之信號傳導能夠增強由caTCR介導之免疫反應。

【0044】吾人已研發出一系列包含caTCR及CSR構築體之新穎T細胞。其展現對攜帶靶標之腫瘤細胞的強細胞毒性，其中相較於僅表現caTCR而無CSR存在之細胞，增加了回應於靶細胞接合之細胞介素表現。此等細胞中含有CSR相較於表現僅caTCR之細胞進一步增強了脫粒、增殖及存活力。

【0045】本申請案因此提供免疫細胞，其包含對靶抗原具有特異性之caTCR及對靶配體具有特異性之CSR，其中該caTCR包含特異性結合於靶抗原之抗原結合模組及能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子之T細胞受體模組(TCRM)，且其中該CSR：a)包含特異性結合於靶配體之配體結合域及能夠將刺激信號提供至免疫細胞之協同刺激免疫細胞信號傳導域，且b)不包含功能性原代免疫細胞信號傳導序列。caTCR可採用抗原結合模組及/或TCRM變化之多種型式中之任一者。舉例而言，該caTCR可具有：抗原結合模組，其包含選自由Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv及scFv組成之群的部分；及TCRM，其包含源自 $\alpha/\beta$ 或 $\gamma/\delta$  TCR之一或多個序列，該一

或多個序列包括跨膜域、連接肽及胞內域中之一或多者中之變異體。參見圖1。在一些實施例中，該抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。該CSR可類似地具有配體結合模組，其包含選自由Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv及scFv組成之群的部分。在一些實施例中，靶抗原與靶配體相同。在一些實施例中，caTCR之抗原結合模組與CSR之配體結合模組相同，或包含賦予抗原特異性之相同序列，諸如CDR或可變域。在一些實施例中，靶抗原與靶配體不同。

【0046】 在其他態樣中，提供：a)一或多個核酸，其編碼caTCR及CSR；b)免疫細胞，其包含一或多個編碼caTCR及CSR之核酸，及c)組合物，其包含免疫細胞，該等免疫細胞包含i)caTCR及CSR或ii)一或多個編碼caTCR及CSR之核酸。該組合物可為醫藥組合物。

【0047】 亦提供製備包含caTCR及CSR之免疫細胞及將其用於治療用途之方法，以及適用於此等方法之套組及製品。另外提供使用包含caTCR及CSR之免疫細胞治療疾病的方法。

## 定義

【0048】 術語「抗體」或「抗體部分」包括全長抗體及其抗原結合片段。全長抗體包含兩個重鏈及兩個輕鏈。輕鏈及重鏈之可變區負責抗原結合。兩種鏈中之可變區一般均含有三個稱作互補決定區(CDR)之高度可變環(輕鏈(LC) CDR包括LC-CDR1、LC-CDR2及LC-CDR3，重鏈(HC) CDR包括HC-CDR1、HC-CDR2及HC-CDR3)。本文所揭示之抗體及抗原結合片段之CDR邊界可藉由Kabat、Chothia或Al-Lazikani慣例(Al-Lazikani 1997；Chothia 1985；Chothia 1987；Chothia 1989；Kabat 1987；Kabat 1991)界定或鑑別。重鏈或輕鏈之三個CDR插入於稱為構架

區(FR)之側接伸長部之間，該等側接伸長部比CDR更高度保守且形成支撐高變環之架構。重鏈及輕鏈之恆定區不參與抗原結合，但展現各種效應功能。抗體基於其重鏈之恆定區之胺基酸序列歸為各種類別。五種主要抗體類別或同型為IgA、IgD、IgE、IgG及IgM，其特徵為分別存在 $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$ 及 $\mu$ 重鏈。若干主要抗體類別分成子類，如IgG1 ( $\gamma$ 1重鏈)、IgG2 ( $\gamma$ 2重鏈)、IgG3 ( $\gamma$ 3重鏈)、IgG4 ( $\gamma$ 4重鏈)、IgA1 ( $\alpha$ 1重鏈)或IgA2 ( $\alpha$ 2重鏈)。

【0049】如本文所用之術語「抗原結合片段」係指抗體片段，其包括例如雙功能抗體、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、Fv片段、二硫鍵穩定的Fv片段(dsFv)、(dsFv)<sub>2</sub>、雙特異性dsFv (dsFv-dsFv')、二硫鍵穩定的雙功能抗體(ds雙功能抗體)、單鏈抗體分子(scFv)、scFv二聚體(二價雙功能抗體)、由包含一或多個CDR之抗體的一部分形成之多特異性抗體、駱駝的單域抗體、奈米抗體、域抗體、二價域抗體、或結合於抗原但不包含完整抗體結構之任何其他抗體片段。抗原結合片段能夠結合於與親本抗體或親本抗體片段(例如親本scFv)所結合相同之抗原。在一些實施例中，抗原結合片段可包含接枝至來自一或多種不同人類抗體之構架區的來自特定人類抗體之一或多種CDR。

【0050】如本文所用，當在等莫耳濃度之第一抗體部分存在下，第一抗體部分抑制第二抗體部分之靶抗原結合至少約50% (諸如至少約以下中之任一者：55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%、95%、98%或99%)時，第一抗體部分與第二抗體部分「競爭」結合於靶抗原，或反之亦然。基於抗體之交叉競爭而將其「裝箱」之高通量方法描述於PCT公開案第WO 03/48731號中。

【0051】如本文所用，術語「特異性結合」或「對.....具有特異性」係指可量測及可再現相互作用，諸如靶標與抗體或抗體部分之間的結合，其在非均質分子(包括生物分子)群體存在下決定靶標之存在。舉例而言，特異性結合於靶標(其可為抗原決定基)之抗體部分為以比其結合於其他靶標更高的親和力、親和性、更容易及/或更長持續時間結合靶標的抗體部分。在一些實施例中，特異性結合於抗原之抗體部分與抗原(例如細胞表面抗原或肽/MHC蛋白複合體)之一或多個抗原決定子，以呈其針對其他靶標之結合親和力至少約10倍的結合親和力反應。

【0052】術語「T細胞受體」或「TCR」係指由T細胞表面上配對的 $\alpha\beta$ 或 $\gamma\delta$ 鏈構成之雜二聚體受體。各 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 及 $\delta$ 鏈由兩個Ig樣域構成：經由互補決定區(CDR)賦予抗原識別之可變域(V)，隨後為藉由連接肽及跨膜(TM)區錨定至細胞膜的恆定域(C)。TM區與CD3信號傳導設備之恆定次單元結合。V域各自具有三個CDR。此等CDR與結合於由主要組織相容性複合體(pMHC)編碼之蛋白質的抗原肽之間的複合體相互作用(Davis及Bjorkman (1988) Nature, 334, 395-402；Davis等人 (1998) Annu Rev Immunol, 16, 523-544；Murphy (2012), xix, 第868頁)。

【0053】術語「TCR相關信號傳導分子」係指具有基於細胞質免疫受體酪胺酸之活化基元(ITAM)的分子，其為TCR-CD3複合體之一部分。TCR相關信號傳導分子包括CD3 $\gamma\epsilon$ 、CD3 $\delta\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$  (亦稱為CD3 $\zeta$ 或CD3 $\zeta\zeta$ )。

【0054】如本文關於表現CD3之細胞所用的「活化」係指已經足夠刺激以誘導CD3信號傳導路徑之下游效應功能(包括但不限於細胞增殖及細胞介素產生)的可偵測提高的細胞之狀態。

【0055】術語「模組」在提及蛋白質之一部分時意謂包括構成蛋白

質之一或多種多肽之結構上及/或功能上相關之部分。舉例而言，二聚體受體之跨膜模組可指受體之每一多肽鏈之跨膜部分。模組亦可指單一多肽鏈之相關部分。舉例而言，單體受體之跨膜模組可指受體之單一多肽鏈之跨膜部分。模組亦可僅包括多肽之單一部分。

【0056】如本文所用之術語「經分離核酸」欲意謂基因組核酸、cDNA或合成來源或其某一組合之核酸，藉助於其來源，「經分離核酸」(1)不與發現「經分離核酸」之自然界中之所有或一部分聚核苷酸結合，(2)可操作地連接於自然界中不與其連接之聚核苷酸，或(3)在自然界中不作為較大序列之部分存在。

【0057】如本文所用，術語「CDR」或「互補決定區」意欲意謂重鏈與輕鏈多肽兩者之可變區內存在的非鄰接抗原組合位點。以下文獻已對此等特定區進行描述：Kabat等人，*J. Biol. Chem.* 252:6609-6616 (1977)；Kabat等人，U.S. Dept. of Health and Human Services, 「Sequences of proteins of immunological interest」 (1991)；Chothia等人，*J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)；Al-Lazikani B.等人，*J. Mol. Biol.*, 273: 927-948 (1997)；MacCallum等人，*J. Mol. Biol.* 262:732-745 (1996)；Abhinandan及Martin, *Mol. Immunol.*, 45: 3832-3839 (2008)；Lefranc M.P.等人，*Dev. Comp. Immunol.*, 27: 55-77 (2003)；以及 Honegger 及Plückthun, *J. Mol. Biol.*, 309:657-670 (2001)，其中當彼此對照比較時，定義包括胺基酸殘基之重疊或子集。儘管如此，使用任一定義來提及抗體或接枝抗體之CDR或其變異體意欲屬於如本文所定義及使用之術語的範疇。涵蓋如上文所引用之參考文獻中之每一者所定義之CDR的胺基酸殘基闡述於下表1中作為比較。CDR預測演算法及介面為此項技術

中已知的，包括(例如)Abhinandan及Martin, *Mol. Immunol.*, 45: 3832-3839 (2008)；Ehrenmann F.等人, *Nucleic Acids Res.*, 38: D301-D307 (2010)；以及Adolf-Bryfogle J.等人, *Nucleic Acids Res.*, 43: D432-D438 (2015)。此段落中所引用之參考文獻內容以其全文引用的方式併入本文中  
以用於本發明中且可能包括於本文的一或多個技術方案中。

表1：CDR定義

|                     | Kabat <sup>1</sup> | Chothia <sup>2</sup> | MacCallum <sup>3</sup> | IMGT <sup>4</sup> | AHo <sup>5</sup> |
|---------------------|--------------------|----------------------|------------------------|-------------------|------------------|
| V <sub>H</sub> CDR1 | 31-35              | 26-32                | 30-35                  | 27-38             | 25-40            |
| V <sub>H</sub> CDR2 | 50-65              | 53-55                | 47-58                  | 56-65             | 58-77            |
| V <sub>H</sub> CDR3 | 95-102             | 96-101               | 93-101                 | 105-117           | 109-137          |
| V <sub>L</sub> CDR1 | 24-34              | 26-32                | 30-36                  | 27-38             | 25-40            |
| V <sub>L</sub> CDR2 | 50-56              | 50-52                | 46-55                  | 56-65             | 58-77            |
| V <sub>L</sub> CDR3 | 89-97              | 91-96                | 89-96                  | 105-117           | 109-137          |

- <sup>1</sup>殘基編號遵循前述Kabat等人之命名法
- <sup>2</sup>殘基編號遵循前述Chothia等人之命名法
- <sup>3</sup>殘基編號遵循前述MacCallum等人之命名法
- <sup>4</sup>殘基編號遵循前述Lefranc等人之命名法
- <sup>5</sup>殘基編號遵循前述Honegger及Plückthun之命名法

【0058】術語「嵌合抗體」係指其中重鏈及/或輕鏈之一部分與源自特定物種或屬於特定抗體類別或子類別之抗體中之對應序列一致或與其同源，而其餘鏈與源自另一物種或屬於另一抗體類別或子類別之抗體中之對應序列一致或與其同源的抗體，以及此類抗體之片段，只要其展現本發明之生物活性即可(參見美國專利第4,816,567號；及Morrison等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984))。

【0059】關於抗體或抗體部分之術語「半合成」意謂抗體或抗體部分具有一或多個天然存在之序列及一或多個非天然存在之(亦即合成)序列。



【0060】關於抗體或抗體部分之術語「全合成」意謂抗體或抗體部分具有固定的天然存在之 $V_H/V_L$ 構架配對，而非重鏈及輕鏈兩者之所有6種CDR之非天然存在之(亦即合成)序列。

【0061】非人類(例如嚙齒動物)抗體之「人類化」形式係含有源自非人類免疫球蛋白之最小序列的嵌合抗體。在極大程度上，人類化抗體為人類免疫球蛋白(接受者抗體)，其中來自接受者的高變區(HVR)之殘基經來自諸如具有期望抗體特異性、親和力及能力之小鼠、大鼠、家兔或非人類靈長類動物之非人類物種(供體抗體)的高變區之殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之 $F_v$ 構架區(FR)殘基經對應非人類殘基置換。此外，人類化抗體可包含在接受者抗體或供者抗體中未發現之殘基。進行此等修飾以進一步改進抗體效能。一般而言，人類化抗體將包含至少一個且通常兩個可變域中的實質上所有可變域，其中所有或實質上所有高變環對應於非人類免疫球蛋白之高變環且所有或實質上所有FR為人類免疫球蛋白序列之FR。人類化抗體視情況亦將包含免疫球蛋白恆定區(Fc)之至少一部分，通常，人類免疫球蛋白之恆定區的至少一部分。關於其他細節，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)。

【0062】「同源」係指兩個多肽之間或兩個核酸分子之間的序列相似性或序列一致性。當兩個比較序列中之一個位置由相同鹼基或胺基酸單體次單元佔據時，例如若兩個DNA分子中之每一者中的一個位置由腺嘌呤佔據，則該等分子在該位置處「同源」。兩個序列之間的「同源性百分比」或「序列一致性百分比」為兩個序列共用之匹配或同源位置之數目除

以所比較位置之數目乘以100之函數，任何保守取代視為序列一致性之一部分。舉例而言，若兩個序列中之10個位置中有6個匹配或同源，則兩個序列為60%同源。舉例而言，DNA序列ATTGCC及TATGGC共用50%同源性。一般而言，當兩個序列經比對以產生最大百分比同源時進行比較。出於測定胺基酸序列一致性百分比目的之比對可以此項技術中之技能範圍內的各種方式達成，例如使用公開可獲得之電腦軟體，諸如BLAST、BLAST-2、ALIGN、Megalign (DNASTAR)或MUSCLE軟體。熟習此項技術者可判定用於量測比對(包括用於達成所比較序列之全長內之最大比對所需的任何演算法)之適當參數。然而，出於本文之目的，使用序列比較電腦程式MUSCLE產生胺基酸序列一致性%值(Edgar, R.C., *Nucleic Acids Research* 32(5):1792-1797, 2004 ; Edgar, R.C., *BMC Bioinformatics* 5(1):113, 2004)。

【0063】 人類IgG Fc區之「C<sub>H</sub>1域」(亦被稱作「H1」域之「C1」域)通常自約胺基酸118延伸至約胺基酸215 (EU編號系統)。

【0064】 除非另外指定，否則「編碼胺基酸序列之核苷酸序列」包括為彼此之簡併型式且編碼相同胺基酸序列之所有核苷酸序列。片語編碼蛋白質或RNA之核苷酸序列亦可包括內含子，其達到編碼蛋白質之核苷酸序列可在一些型式中含有內含子之程度。

【0065】 術語「可操作地連接」係指調節序列與異源核酸序列之間的官能鍵，其導致後者之表現。舉例而言，當第一核酸序列與第二核酸序列處於官能性關係時，第一核酸序列可操作地連接第二核酸序列。舉例而言，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於編碼序列。一般而言，可操作地連接之DNA序列為連續的，且當必需接合兩

個蛋白質編碼區時，在相同閱讀框中。

【0066】術語「誘導性啟動子」係指可藉由添加或移除一或多個特定信號來調節活性的啟動子。舉例而言，誘導性啟動子可在一組特定條件下，例如在活化啟動子及/或緩解啟動子之抑制的誘導劑或條件存在下活化可操作地連接之核酸的轉錄。

【0067】如本文所用，「治療(treatment/treating)」為用於獲得有益或所需結果(包括臨床結果)之方法。出於本發明之目的，有益或所需臨床結果包括(但不限於)以下中的一或多者：緩解疾病所引起之一或多種症狀、減弱疾病程度、穩定疾病(例如預防或延遲疾病惡化)、預防或延遲疾病擴散(例如轉移)、預防或延遲疾病復發、延遲或減緩疾病進展、改善疾病狀態、使得疾病緩解(部分或完全)、減少治療疾病所需的一或多種其他藥物之劑量、延遲疾病進展、增加或改良生活品質、增大體重增加及/或延長存活期。「治療」亦涵蓋減少疾病之病理性結果(諸如癌症之腫瘤體積)。本發明之方法涵蓋此等治療態樣中之任何一或多者。

【0068】術語「復發(recurrence/relapse/relapsed)」係指癌症或疾病在疾病消失之臨床評估之後的恢復。遠端癌轉移或局部復發之診斷可視為復發。

【0069】術語「難治性」或「耐受性」係指不回應於治療之癌症或疾病。

【0070】如本文所揭示之caTCR或包含caTCR之組合物的「有效量」為足以進行具體陳述之目的量。「有效量」可憑經驗及藉由與所陳述目的相關之已知方法判定。

【0071】術語「治療有效量」係指如本文中所揭示之caTCR或包含

caTCR之組合物有效「治療」個別之疾病或病症的量。在癌症之情況下，如本文中所揭示之caTCR或包含caTCR之組合物的治療有效量可降低癌細胞之數目；減小腫瘤尺寸或重量；抑制(亦即在一定程度上減緩且較佳地停止)癌細胞浸潤至周邊器官中；抑制(亦即在一定程度上減緩且較佳地停止)腫瘤癌轉移；在一定程度上抑制腫瘤生長；及/或在一定程度上緩解一或多個與癌症相關之症狀。在如本文所揭示之caTCR或包含caTCR之組合物可預防生長及/或殺滅現有癌細胞之程度上，其可為細胞生長抑制及/或細胞毒性的。在一些實施例中，治療有效量為生長抑制量。在一些實施例中，治療有效量為改良患者之無進展存活期的量。在諸如病毒感染之傳染性疾病之情況下，如本文所揭示之caTCR或包含caTCR之組合物的治療有效量可減少受到病原體感染之細胞的數目；減少源自病原體之抗原的產生或釋放；抑制(亦即在一定程度上減緩且較佳地停止)病原體擴散至未感染細胞中；及/或在一定程度上緩解一或多個與感染相關之症狀。在一些實施例中，治療有效量為延長患者存活期之量。

**【0072】** 如本文所用，「醫藥學上可接受」或「藥理學上相容」意謂不為生物學上或其他方面不適宜之物質，例如，該物質可併入向患者投與之醫藥組合物中而不會引起任何顯著不適宜生物效果或以有害方式與含有其之組合物的任何其他組分相互作用。醫藥學上可接受之載劑或賦形劑較佳滿足毒理學及製造測試之所要求標準及/或包括於美國食品藥物管理局(U.S. Food and Drug administration)制定之非活性成分導引(Inactive Ingredient Guide)中。

**【0073】** 應瞭解，本文所描述之本發明實施例包括「由實施例組成」及/或「基本上由實施例組成」。

【0074】本文中，對「約」一個值或參數之參考包括(及描述)針對該值或參數本身之變化。舉例而言，提及「約X」之描述包括「X」之描述。

【0075】如本文所用，提及「並非」一值或參數一般意指及描述「除」一值或參數「以外」。舉例而言，方法不用於治療X型癌症意謂方法用於治療除X以外的類型之癌症。

【0076】除非上下文另外明確指示，否則如在本文及所附申請專利範圍中所用，單數形式「一(a)」或「一(an)」及「該(the)」包括複數個指示物。

### **caTCR加CSR免疫細胞**

【0077】本發明提供一種免疫細胞(諸如T細胞)，其於其表面上呈遞根據本文所描述之caTCR及CSR中之任一者的caTCR及CSR(此免疫細胞在本文中亦稱作「caTCR加CSR免疫細胞」)。在一些實施例中，免疫細胞包含編碼cabTCR及CSR之核酸，其中cabTCR及CSR由核酸表現且定位於免疫細胞表面。在一些實施例中，免疫細胞為T細胞。在一些實施例中，免疫細胞係選自由以下組成之群：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、自然殺手T細胞及抑制T細胞。在一些實施例中，免疫細胞不表現TCR次單元，caTCR之TCR-TM源自該等TCR次單元。舉例而言，在一些實施例中，免疫細胞為 $\alpha\beta$  T細胞且所引入caTCR之TCR-TM包含源自TCR  $\delta$ 及 $\gamma$ 鏈之序列，或T細胞為 $\gamma\delta$  T細胞且所引入caTCR之TCR-TM包含源自TCR  $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈之序列。在一些實施例中，免疫細胞經修飾以阻斷或減少免疫細胞之內源性TCR次單元中之一或兩者之表現。舉例而言，在一些實施例中，免疫細胞為經修飾以阻斷或減少TCR  $\alpha$ 及/或 $\beta$ 鏈表現的 $\alpha\beta$  T細胞，或者免

疫細胞為經修飾以阻斷或減少TCR  $\gamma$ 及/或 $\delta$ 鏈表現的 $\gamma\delta$  T細胞。用於破壞基因表現之細胞修飾包括此項技術中已知的任何此類技術，包括例如RNA干擾(例如，siRNA、shRNA、miRNA)、基因編輯(例如，基於CRISPR或TALEN之基因剔除)及類似者。

【0078】舉例而言，在一些實施例中，提供一種免疫細胞(諸如T細胞)，其包含編碼根據本文所描述之caTCR中之任一者的caTCR及根據本文所描述之CSR中之任一者的CSR的核酸，其中caTCR及CSR由核酸表現且定位於免疫細胞表面。在一些實施例中，該核酸包含編碼caTCR之第一caTCR多肽鏈的第一caTCR核酸序列、編碼caTCR之第二caTCR多肽鏈的第二caTCR核酸序列及編碼CSR之CSR多肽鏈的CSR核酸序列。在一些實施例中，第一及第二caTCR核酸序列及CSR核酸序列各包含於不同載體中。在一些實施例中，核酸序列中的一些或全部包含於同一載體中。載體可選自例如由哺乳動物表現載體及病毒載體(諸如源自反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒及慢病毒之彼等載體)組成之群。在一些實施例中，將一或多種載體整合於免疫細胞之宿主基因組中。在一些實施例中，第一及第二caTCR核酸序列及CSR核酸序列各自處於不同啟動子的控制下。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部具有相同序列。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部具有不同序列。在一些實施例中，核酸序列中之一些或全部處於單一啟動子的控制下。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部為可誘導性。在一些實施例中，免疫細胞係選自由以下組成之群：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、自然殺手T細胞及抑制T細胞。

【0079】因此，在一些實施例中，提供一種caTCR加CSR免疫細胞(諸如T細胞)，其於其表面上表現根據本文所描述之caTCR中之任一者的

caTCR及根據本文所描述之CSR中之任一者的CSR，其中caTCR加CSR免疫細胞包含：a)編碼caTCR之第一caTCR多肽鏈的第一caTCR核酸序列；b)編碼caTCR之第二caTCR多肽鏈的第二caTCR核酸序列；以及c)編碼CSR之CSR多肽鏈的CSR核酸序列，其中第一及第二caTCR多肽鏈由第一及第二caTCR核酸序列表現以形成caTCR，其中CSR多肽鏈由CSR核酸表現以形成CSR，且其中caTCR及CSR定位於免疫細胞之表面。在一些實施例中，第一caTCR核酸序列包含於第一載體(諸如慢病毒載體)中，第二caTCR核酸序列包含於第二載體(諸如慢病毒載體)中，且CSR核酸序列包含於第三載體(諸如慢病毒載體)中。在一些實施例中，第一及第二caTCR核酸序列及CSR核酸序列中的一些或全部包含於同一載體(諸如慢病毒載體)中。在一些實施例中，第一及第二caTCR核酸序列及CSR核酸序列各自個別地可操作地連接於啟動子。在一些實施例中，核酸序列中之一些或全部處於單一啟動子的控制下。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部具有相同序列。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部具有不同序列。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部為可誘導性。在一些實施例中，載體中的一些或全部為病毒載體(諸如慢病毒載體)。在一些實施例中，免疫細胞不表現TCR次單元，caTCR之TCR-TM源自該等TCR次單元。舉例而言，在一些實施例中，免疫細胞為 $\alpha\beta$  T細胞且所引入caTCR之TCR-TM包含源自TCR  $\delta$ 及 $\gamma$ 鏈之序列，或免疫細胞為 $\gamma\delta$  T細胞且所引入caTCR之TCR-TM包含源自TCR  $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈之序列。在一些實施例中，免疫細胞經修飾以阻斷或減少其內源性TCR次單元中之一或兩者的表現。舉例而言，在一些實施例中，免疫細胞為經修飾以阻斷或減少TCR  $\alpha$ 及/或 $\beta$ 鏈表現的 $\alpha\beta$  T細胞，或者免疫細胞為經修飾以阻斷或減少TCR  $\gamma$ 及/或 $\delta$ 鏈表現的 $\gamma\delta$  T

細胞。在一些實施例中，免疫細胞係選自由以下組成之群：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、自然殺手T細胞及抑制T細胞。在一些實施例中，載體中的一些或全部為整合於免疫細胞之宿主基因組中的病毒載體(諸如慢病毒載體)。

**【0080】** 在一些實施例中，提供一種caTCR加CSR免疫細胞(諸如T細胞)，其於其表面上表現根據本文所描述之caTCR中之任一者的caTCR及根據本文所描述之CSR中之任一者的CSR，其中caTCR加CSR免疫細胞包含：a)第一載體，其包含第一啟動子，該第一啟動子可操作地連接於編碼caTCR之第一caTCR多肽鏈的第一caTCR核酸序列；b)第二載體，其包含第二啟動子，該第二啟動子可操作地連接於編碼caTCR之第二caTCR多肽鏈的第二caTCR核酸序列；以及c)第三載體，其包含第三啟動子，該第三啟動子可操作地連接於編碼CSR之CSR多肽鏈的CSR核酸序列，其中第一及第二caTCR多肽鏈由第一及第二caTCR核酸序列表現以形成caTCR，且CSR多肽鏈由CSR核酸序列表現以形成CSR，且其中caTCR及CSR定位於免疫細胞之表面。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部具有相同序列。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部具有不同序列。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部為可誘導性。在一些實施例中，免疫細胞不表現TCR次單元，caTCR之TCR-TM源自該等TCR次單元。舉例而言，在一些實施例中，免疫細胞為 $\alpha\beta$  T細胞且所引入caTCR之TCR-TM包含源自TCR  $\delta$ 及 $\gamma$ 鏈之序列，或免疫細胞為 $\gamma\delta$  T細胞且所引入caTCR之TCR-TM包含源自TCR  $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈之序列。在一些實施例中，免疫細胞經修飾以阻斷或減少其內源性TCR次單元中之一或兩者的表現。舉例而言，在一些實施例中，免疫細胞為經修飾以阻斷或減少TCR  $\alpha$ 及/或 $\beta$ 鏈表現的 $\alpha\beta$  T細胞，或



者免疫細胞為經修飾以阻斷或減少TCR  $\gamma$ 及/或 $\delta$ 鏈表現的 $\gamma\delta$  T細胞。在一些實施例中，免疫細胞係選自由以下組成之群：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、自然殺手T細胞及抑制T細胞。在一些實施例中，第一及第二載體為整合於免疫細胞之宿主基因組中之病毒載體(諸如慢病毒載體)。

**【0081】** 在一些實施例中，提供一種caTCR加CSR免疫細胞(諸如T細胞)，其於其表面上表現根據本文所描述之caTCR中之任一者的caTCR及根據本文所描述之CSR中之任一者的CSR，其中caTCR加CSR免疫細胞包含：a)第一載體，其包含：i)第一啟動子，該第一啟動子可操作地連接於編碼caTCR之第一caTCR多肽鏈的第一caTCR核酸序列，及ii)第二啟動子，該第二啟動子可操作地連接於編碼caTCR之第二caTCR多肽鏈的第二caTCR核酸序列；以及b)第二載體，其包含第三啟動子，該第三啟動子可操作地連接於編碼CSR之CSR多肽鏈的CSR核酸序列，其中第一及第二caTCR多肽鏈由第一及第二caTCR核酸序列表現以形成caTCR，且CSR多肽鏈由CSR核酸序列表現以形成CSR，且其中caTCR定位於免疫細胞之表面。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部具有相同序列。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部具有不同序列。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部為可誘導性。在一些實施例中，免疫細胞不表現TCR次單元，caTCR之TCR-TM源自該等TCR次單元。舉例而言，在一些實施例中，免疫細胞為 $\alpha\beta$  T細胞且所引入caTCR之TCR-TM包含源自TCR  $\delta$ 及 $\gamma$ 鏈之序列，或免疫細胞為 $\gamma\delta$  T細胞且所引入caTCR之TCR-TM包含源自TCR  $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈之序列。在一些實施例中，免疫細胞經修飾以阻斷或減少其內源性TCR次單元中之一或兩者的表現。舉例而言，在一些實施例中，免疫細胞為經修飾以阻斷或減少TCR  $\alpha$ 及/或 $\beta$ 鏈表現的 $\alpha\beta$  T細胞，或者免疫

細胞為經修飾以阻斷或減少TCR  $\gamma$ 及/或 $\delta$ 鏈表現的 $\gamma\delta$  T細胞。在一些實施例中，免疫細胞係選自由以下組成之群：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、自然殺手T細胞及抑制T細胞。在一些實施例中，第一及第二載體為整合於免疫細胞之宿主基因組中之病毒載體(諸如慢病毒載體)。應瞭解，亦涵蓋交換核酸序列中之任一者，諸如第一或第二caTCR核酸序列與CSR核酸序列交換的實施例。

**【0082】** 在一些實施例中，提供一種caTCR加CSR免疫細胞(諸如T細胞)，其於其表面上表現根據本文所描述之caTCR中之任一者的caTCR及根據本文所描述之CSR中之任一者的CSR，其中caTCR加CSR免疫細胞包含：a)第一載體，其包含：i)編碼caTCR之第一caTCR多肽鏈的第一caTCR核酸序列，及ii)編碼caTCR之第二caTCR多肽鏈的第二caTCR核酸序列，其中第一及第二caTCR核酸序列處於第一啟動子的控制下；以及b)第二載體，其包含第三啟動子，該第三啟動子可操作地連接於編碼CSR之CSR多肽鏈的CSR核酸序列，其中第一及第二caTCR多肽鏈由第一及第二caTCR核酸序列表現以形成caTCR，且CSR多肽鏈由CSR核酸序列表現以形成CSR，且其中caTCR及CSR定位於免疫細胞之表面。在一些實施例中，第一啟動子可操作地連接於第一caTCR核酸序列之5'端，且存在選自由內部核糖體進入位點(IRES)及編碼自裂解2A肽(諸如P2A、T2A、E2A或F2A)之核酸組成之群的核酸連接子以將第一caTCR核酸序列之3'端連接至第二caTCR核酸序列之5'端，其中第一caTCR核酸序列及第二caTCR核酸序列在啟動子控制下轉錄為單一RNA。在一些實施例中，第一啟動子可操作地連接於第二caTCR核酸序列之5'端，且存在選自由內部核糖體進入位點(IRES)及編碼自裂解2A肽(諸如P2A、T2A、E2A或F2A)之核酸組

成之群的核酸連接子以將第二caTCR核酸序列之3'端連接至第一caTCR核酸序列之5'端，其中第一caTCR核酸序列及第二caTCR核酸序列在啟動子控制下轉錄為單一RNA。在一些實施例中，第一及/或第二啟動子具有相同序列。在一些實施例中，第一及/或第二啟動子具有不同序列。在一些實施例中，第一及/或第二啟動子為可誘導性。在一些實施例中，免疫細胞不表現TCR次單元，caTCR之TCR-TM源自該等TCR次單元。舉例而言，在一些實施例中，免疫細胞為 $\alpha\beta$  T細胞且所引入caTCR之TCR-TM包含源自TCR  $\delta$ 及 $\gamma$ 鏈之序列，或免疫細胞為 $\gamma\delta$  T細胞且所引入caTCR之TCR-TM包含源自TCR  $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈之序列。在一些實施例中，免疫細胞經修飾以阻斷或減少其內源性TCR次單元中之一或兩者的表現。舉例而言，在一些實施例中，免疫細胞為經修飾以阻斷或減少TCR  $\alpha$ 及/或 $\beta$ 鏈表現的 $\alpha\beta$  T細胞，或者免疫細胞為經修飾以阻斷或減少TCR  $\gamma$ 及/或 $\delta$ 鏈表現的 $\gamma\delta$  T細胞。在一些實施例中，免疫細胞係選自由以下組成之群：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、自然殺手T細胞及抑制T細胞。在一些實施例中，載體為整合於免疫細胞之宿主基因組中之病毒載體(諸如慢病毒載體)。應瞭解，亦涵蓋交換核酸序列中之任一者，諸如第一或第二caTCR核酸序列與CSR核酸序列交換的實施例。

**【0083】** 在一些實施例中，提供一種caTCR加CSR免疫細胞(諸如T細胞)，其於其表面上表現根據本文所描述之caTCR中之任一者的caTCR及根據本文所描述之CSR中之任一者的CSR，其中caTCR加CSR免疫細胞包含載體，該載體包含a)編碼caTCR之第一caTCR多肽鏈的第一caTCR核酸序列；b)編碼caTCR之第二caTCR多肽鏈的第二caTCR核酸序列；以及c)編碼CSR之CSR多肽鏈的CSR核酸序列，其中第一及第二caTCR核酸序

列以及CSR核酸序列處於單一啟動子的控制下；且其中第一及第二caTCR多肽鏈由第一及第二caTCR核酸序列表現以形成caTCR，且CSR多肽鏈由CSR核酸序列表現以形成CSR，且其中caTCR及CSR定位於免疫細胞之表面。在一些實施例中，啟動子可操作地連接於核酸序列中之一者，該一者藉由個別地選自由內部核糖體進入位點(IRES)及編碼自裂解2A肽(諸如P2A、T2A、E2A或F2A)之核酸組成之群的核酸連接子連接至其他核酸序列，使得第一及第二caTCR核酸序列及CSR核酸序列在啟動子控制下轉錄為單一RNA。在一些實施例中，啟動子為可誘導性。在一些實施例中，免疫細胞不表現TCR次單元，caTCR之TCR-TM源自該等TCR次單元。舉例而言，在一些實施例中，免疫細胞為 $\alpha\beta$  T細胞且所引入caTCR之TCR-TM包含源自TCR  $\delta$ 及 $\gamma$ 鏈之序列，或免疫細胞為 $\gamma\delta$  T細胞且所引入caTCR之TCR-TM包含源自TCR  $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈之序列。在一些實施例中，免疫細胞經修飾以阻斷或減少其內源性TCR次單元中之一或兩者的表現。舉例而言，在一些實施例中，免疫細胞為經修飾以阻斷或減少TCR  $\alpha$ 及/或 $\beta$ 鏈表現的 $\alpha\beta$  T細胞，或者免疫細胞為經修飾以阻斷或減少TCR  $\gamma$ 及/或 $\delta$ 鏈表現的 $\gamma\delta$  T細胞。在一些實施例中，免疫細胞係選自由以下組成之群：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、自然殺手T細胞及抑制T細胞。在一些實施例中，載體為整合於免疫細胞之宿主基因組中之病毒載體(諸如慢病毒載體)。

### 嵌合抗體/T細胞受體(caTCR)構築體

【0084】 在一個態樣中，本文所描述之靶抗原特異性嵌合抗體/T細胞受體(caTCR)特異性結合於靶抗原(諸如細胞表面抗原或肽/MHC複合體)且能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子(諸如CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 、及/或 $\zeta\zeta$ )。在一些實施例中，抗caTCR包含天然存在之TCR域。在一些實施

例中，caTCR包含至少一個非天然存在之TCR域。caTCR包含提供抗原特異性之抗原結合模組及允許CD3募集及信號傳導之T細胞受體模組(TCRM)。抗原結合模組並非天然存在之T細胞受體抗原結合部分。在一些實施例中，抗原結合模組連接於TCRM中之多肽鏈之胺基端。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv(scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。TCRM包含源自一或多個TCR之跨膜域的跨膜模組(TCR-TM)，諸如 $\alpha\beta$ 及/或 $\gamma\delta$  TCR，且視情況進一步包含TCR之連接肽或其片段及/或一或多個TCR胞內域或其片段中的一或兩者。在一些實施例中，TCRM包含兩個多肽鏈，各多肽鏈自胺基端至羧基端包含連接肽、跨膜域及視情況存在之TCR胞內域。在一些實施例中，TCRM包含一或多個非天然存在之TCR域。舉例而言，在一些實施例中，TCRM包含一或兩個非天然存在之TCR跨膜域。非天然存在之TCR域可為天然存在之TCR之對應域，其藉由一或多個胺基酸之取代及/或藉由用來自另一TCR之類似域的一部分置換對應域的一部分而經修飾。caTCR可包含第一多肽鏈及第二多肽鏈，其中第一及第二多肽鏈一起形成抗原結合模組及TCRM。在一些實施例中，第一及第二多肽鏈為分開的多肽鏈，且caTCR為多聚體，諸如二聚體。在一些實施例中，第一及第二多肽鏈諸如藉由肽鏈或藉由另一化學鍵(諸如，二硫鍵)共價連接。在一些實施例中，第一多肽鏈及第二多肽鏈由至少一個二硫鍵連接。在一些實施例中，caTCR進一步包含一或多個T細胞協同刺激信號傳導序列。一或多個協同刺激信號傳導序列可個別地為協同刺激分子之胞內域的全部或一部分，包括例如CD27、CD28、4-1BB(CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴細

胞功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、特異性結合CD83的配體，及其類似物。在一些實施例中，一或多個協同刺激信號傳導序列處於第一TCR-TM與第一TCR胞內域之間及/或第二TCR-TM與第二TCR胞內域之間。在一些實施例中，一或多個協同刺激信號傳導序列處於第一TCRD及/或第二TCRD之羧基端。在一些實施例中，caTCR缺乏T細胞協同刺激信號傳導序列。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，穩定模組位於抗原結合模組與TCRM之間。在一些實施例中，caTCR進一步包含處於任何兩個caTCR模組或域之間的間隔模組。在一些實施例中，間隔模組包含連接兩個caTCR模組或域的一或多個肽連接子。

【0085】 本文所描述之caTCR可具有此部分中描述之一或多個特徵。意欲使本文所描述之caTCR之各組分(例如抗原結合模組、TCRD、TCR-TM、間隔模組、穩定模組、T細胞協同刺激序列及各種連接子等)之特徵中之任一者可彼此組合、與CSR之特徵中之任一者組合及與SSE之特徵中之任一者組合，如同每一組合經個別描述一般。

【0086】 在一些實施例中，抗原結合模組(諸如抗體部分)以下列親和力或 $K_d$ 特異性結合於靶抗原：a)該親和力為其對其他分子之結合親和力之至少約10倍(包括例如至少約10、20、30、40、50、75、100、200、300、400、500、750、1000或更多倍中之任一者)；b)該 $K_d$ 不超過其結合於其他分子之 $K_d$ 的約1/10 (諸如不超過約1/10、1/20、1/30、1/40、1/50、1/75、1/100、1/200、1/300、1/400、1/500、1/750、1/1000或更小中之任一者)。結合親和力可藉由此項技術中已知之方法測定，諸如

ELISA、螢光活化細胞分選(FACS)分析或放射免疫沈澱分析(RIA)。K<sub>d</sub>可藉由此項技術中已知之方法測定，諸如利用例如Biacore儀器之表面電漿子共振 (SPR) 分析，或利用例如Sapidyne 儀器之動力學排除分析 (KinExA)。

【0087】 穩定域之實例包括Fc區；鉸鏈區；C<sub>H</sub>3域；C<sub>H</sub>4域；C<sub>H</sub>1或C<sub>L</sub>域；白胺酸拉鏈域(例如jun/fos白胺酸拉鏈域，參見例如Kostelney等人, *J. Immunol*, 148: 1547-1553, 1992；或酵母菌GCN4白胺酸拉鏈域)；異白胺酸拉鏈域；二聚合細胞表面受體(例如介白素-8受體(IL-8R)或整合素雜二聚體(諸如LFA-1或GPIIIb/IIIa)之二聚合區；分泌性二聚合配體(例如神經生長因子(NGF)、神經營養蛋白-3 (NT-3)、介白素-8(IL-8)、血管內皮生長因子(VEGF)或腦衍生神經營養因子(BDNF)；參見例如Arakawa等人, *J. Biol. Chem.* 269:27833-27839, 1994，及Radziejewski等人, *Biochem.* 32: 1350, 1993)之二聚合區；捲曲螺旋二聚域(參見例如WO2014152878；Fletcher等人, *ACS Synth. Biol.* 1:240-250, 2012；及Thomas等人, *J. Am. Chem. Soc.* 135(13):5161-5166, 2013)；以及多肽，其包含至少一個半胱胺酸殘基(例如約一個、兩個或三個至約十個半胱胺酸殘基)，使得可在該多肽與包含至少一個半胱胺酸殘基之第二多肽之間形成二硫鍵。

【0088】 在一些實施例中，本文所描述之TCRM包含：a)第一T細胞受體域(TCRD)，其包含第一TCR跨膜域(TCR-TM)；及b)第二TCRD，其包含第二TCR-TM，其中TCRM有助於募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，該等TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。在一些實施例中，兩個

TCR-TM均為非天然存在的。在一些實施例中，第一TCR-TM源自T細胞受體(諸如 $\alpha\beta$  TCR或 $\gamma\delta$  TCR)之跨膜域中之一者，且第二TCR-TM源自T細胞受體之另一跨膜域。在一些實施例中，該TCRM相較於包含天然存在之T細胞受體之跨膜域的TCRM可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。TCR相關信號傳導分子的募集可藉由此項技術中已知之方法測定，諸如TCR-CD3複合體表面表現之FACS分析或CD3次單元與caTCR之共免疫沈澱。

【0089】舉例而言，在一些實施例中，本文所描述之TCRM之第一TCR-TM包含TCR  $\alpha$ 鏈(例如GenBank寄存編號：CC173895)之跨膜域或其變異體、基本上由其組成或由其組成；且TCRM之第二TCR-TM包含TCR  $\beta$ 鏈(例如GenBank寄存編號：CC173893)之跨膜域或其變異體、基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，第一TCR-TM包含TCR  $\delta$ 鏈(例如Genbank寄存編號：AAQ57272)之跨膜域或其變異體、基本上由其組成或由其組成；且第二TCR-TM包含TCR  $\gamma$ 鏈(例如Genbank寄存編號：AGE91788)之跨膜域或其變異體、基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，本文所描述之TCRM之第一及第二TCR-TM分別地包含以下跨膜域、基本上由其組成或由其組成：TCR  $\alpha$ 鏈恆定域(例如SEQ ID NO: 1)之跨膜域或其變異體，及TCR  $\beta$ 鏈恆定域(例如SEQ ID NO: 2)之跨膜域或其變異體。在一些實施例中，第一及第二TCR-TM分別包含以下跨膜域、基本上由其組成或由其組成：TCR  $\delta$ 鏈恆定域(例如SEQ ID NO: 3)之跨膜域或其變異體，及TCR  $\gamma$ 鏈恆定域(例如SEQ ID NO: 4)之跨膜域或其變異體。在一些實施例中，第一及第二TCR-TM分別包含SEQ ID NO: 5及6之胺基酸序列或其變異體、基本上由其組成或由其組成。在一些實施例中，



第一及第二TCR-TM分別包含SEQ ID NO: 7及8之胺基酸序列或其變異體、基本上由其組成或由其組成。相較於參考序列，跨膜域之變異體包括(但不限於)具有一或多個胺基酸取代之跨膜域。在一些實施例中，相較於參考序列，變異跨膜域包含不超過5個胺基酸取代。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含在跨膜域之胺基端的第一連接肽及/或第二TCRD進一步包含在跨膜域之胺基端的第二連接肽。在一些實施例中，第一連接肽包含第一TCR-TM所源自之TCR次單元的連接肽中之全部或一部分或其變異體，及/或第二連接肽包含第二TCR-TM所源自之TCR次單元的連接肽中之全部或一部分或其變異體。在一些實施例中，第一及/或第二連接肽分別包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：TCR  $\alpha$  鏈恆定域(例如SEQ ID NO: 1)之連接肽中之全部或一部分或其變異體，及TCR  $\beta$  鏈恆定域(例如SEQ ID NO: 2)之連接肽中之全部或一部分或其變異體。在一些實施例中，第一及/或第二連接肽分別包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 27或28之連接肽中之全部或一部分或其變異體，及SEQ ID NO: 29或30之連接肽中之全部或一部分或其變異體。在一些實施例中，第一及/或第二連接肽分別包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：TCR  $\delta$  鏈恆定域(例如SEQ ID NO: 3)之連接肽中之全部或一部分或其變異體，及TCR  $\gamma$  鏈恆定域(例如SEQ ID NO: 4)之連接肽中之全部或一部分或其變異體。在一些實施例中，第一及/或第二連接肽分別包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 31或32之連接肽中之全部或一部分或其變異體，及SEQ ID NO: 33或34之連接肽中之全部或一部分或其變異體。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含在第一TCR-TM之羧基端的第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含在第二TCR-

TM之羧基端的第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域包含第一TCR-TM所源自之TCR次單元的胞內域中之全部或一部分或其變異體，及/或第二胞內域包含第二TCR-TM所源自之TCR次單元的胞內域中之全部或一部分或其變異體。在一些實施例中，第二TCR胞內域包含SEQ ID NO: 35-36之胺基酸序列中之任一者或其變異體。在一些實施例中，第一TCRD為天然存在之TCR之一個鏈之片段或其變異體，及/或第二TCRD為天然存在之TCR之另一鏈之片段或其變異體。在一些實施例中，TCRD中之至少一者為非天然存在的。在一些實施例中，第一及第二TCRD藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二TCRD藉由第一連接肽中之殘基與第二連接肽中之殘基之間的二硫鍵連接。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM能夠募集CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 中之每一者以形成caTCR-CD3複合體(亦即，促進caTCR-CD3複合體形成)。

**【0090】** 所涵蓋的caTCR構築體包含例如特異性結合於細胞表面抗原之caTCR、特異性結合於細胞表面呈遞肽/MHC複合體之caTCR及特異性結合於細胞表面抗原及細胞表面呈遞肽/MHC複合體兩者之caTCR。

**【0091】** 在一些實施例中，抗原結合模組為選自由以下組成之群之抗體部分：Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗體部分為單特異性的。在一些實施例中，抗體部分為多特異性的。在一些實施例中，抗體部分為雙特異性的。在一些實施例中，抗體部分為串聯scFv、雙功能抗體(Db)、單鏈雙功能抗體(scDb)、雙親和力再靶向(DART)抗體、雙可變域(DVD)抗體、化學交聯的抗體、雜多聚體抗體或雜結合物抗體。在一些實施例中，抗體部分為包含兩個藉由肽連接子連接

之scFv的串聯scFv。在一些實施例中，抗體部分為不直接連接之兩個scFv。在一些實施例中，抗體部分為全人類抗體部分、具有人類抗體構架區半合成抗體部分或人類化抗體部分。

**【0092】** 在一些實施例中，抗原結合模組包含含V<sub>H</sub>抗體域之第一抗原結合域及含V<sub>L</sub>抗體域之第二抗原結合域。在一些實施例中，所有V<sub>H</sub>抗體域及V<sub>L</sub>抗體域CDR均源自同一抗體部分。在一些實施例中，一些V<sub>H</sub>抗體域及V<sub>L</sub>抗體域CDR均源自不同抗體部分。在一些實施例中，V<sub>H</sub>抗體域及/或V<sub>L</sub>抗體域為人類、人類化、嵌合、半合成或全合成抗體域。

**【0093】** 在一些實施例中，抗原結合模組為包含全人類序列及或多個合成區之半合成抗體部分。在一些實施例中，抗原結合模組為包含全人類V<sub>L</sub>及半合成V<sub>H</sub>之半合成抗體部分，其包含全人類FR1、HC-CDR1、FR2、HC-CDR2、FR3及FR4區以及合成HC-CDR3。在一些實施例中，半合成V<sub>H</sub>包含全合成HC-CDR3，其序列長度為約5至約25（諸如約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25中之任一者）個胺基酸。在一些實施例中，半合成V<sub>H</sub>或合成HC-CDR3獲自半合成文庫（諸如半合成人類文庫），該半合成文庫包含全合成HC-CDR3區，其序列長度為約5至約25（諸如約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23、24或25中之任一者）個胺基酸，其中序列中之各胺基酸彼此獨立地隨機選自減去半胱胺酸的標準人類胺基酸。在一些實施例中，合成HC-CDR3之長度為約10至約19（諸如約10、11、12、13、14、15、16、17、18或19中之任一者）個胺基酸。在一些實施例中，抗原結合模組為半合成抗體部分，其包含半合成V<sub>L</sub>及半合成V<sub>H</sub>。在一些實施例中，抗原結合模組為包含具有

固定的人類V<sub>H</sub>/V<sub>L</sub>構架配對的全合成抗體部分，但重鏈及輕鏈之所有6種CDR為隨機合成序列。

【0094】 在一些實施例中，抗原結合模組為包含源自一或多個抗體部分(諸如單株抗體)或包含一或多個胺基酸取代之此類序列之某些變異體的特異性CDR序列的抗體部分。在一些實施例中，變異體序列中之胺基酸取代不實質上降低抗原結合模組結合靶抗原之能力。亦涵蓋實質上改良靶抗原結合親和力或影響一些其他特性(諸如特異性及/或與靶抗原之相關變異體之交叉反應性)的改變。

【0095】 在一些實施例中，穩定模組源自抗體部分。舉例而言，在一些實施例中，穩定模組包含含C<sub>H</sub>1抗體域或其變異體之第一穩定域，及含C<sub>L</sub>抗體域或其變異體之第二穩定域。在另一實施例中，穩定模組包含含C<sub>H</sub>3抗體域或其變異體之第一穩定域，及含C<sub>H</sub>3抗體域或其變異體之第二穩定域。在一些實施例中，穩定模組中所含的抗體重鏈恆定域(例如，C<sub>H</sub>1或C<sub>H</sub>3)源自IgG (例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)、IgA (例如IgA1或IgA2)、IgD、IgM或IgE重鏈，視情況為人類的。在一些實施例中，穩定模組中所含的抗體重鏈恆定域(例如C<sub>H</sub>1或C<sub>H</sub>3)為相較於該抗體重鏈恆定域所源自之序列包含一或多個修飾(例如胺基酸取代、插入及/或缺失)的變異體。在一些實施例中，穩定模組中所含的抗體輕鏈恆定域(C<sub>L</sub>)源自κ或λ輕鏈，視情況為人類的。在一些實施例中，穩定模組中所含的抗體輕鏈恆定域(C<sub>L</sub>)為相較於該抗體輕鏈恆定域所源自之序列包含一或多個修飾(例如胺基酸取代、插入及/或缺失)的變異體。在一些實施例中，第一及/或第二穩定域包含不實質上改變其彼此的結合親和力的一或多個修飾。在一些實施例中，第一及/或第二穩定域包含增加其彼此的結合親和力及/或引入

非天然存在之二硫鍵的一或多個修飾。在一些實施例中，穩定模組包含杵-臼(knob-into-hole)修飾(參見例如Carter P. *J Immunol Methods*. 248:7-15, 2001)。舉例而言，在一些實施例中，穩定模組包含含杵-臼修飾之抗體恆定域區(例如C<sub>H</sub>3域)。在一些實施例中，穩定模組包含藉由靜電轉向經修飾以增強其結合的抗體恆定域區(例如C<sub>H</sub>3域)(參見例如WO2006106905及Gunasekaran K等人. *J Biol Chem*. 285:19637-46, 2010)。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。

【0096】 在一些實施例中，caTCR包含連接於本文所描述之TCRM的本文所描述之抗原結合模組，視情況包括穩定模組。舉例而言，在一些實施例中，caTCR包含連接於TCRD中之一或兩者之N端的抗原結合模組。在一些實施例中，caTCR包含TCRM與抗原結合模組之間的穩定模組。在一些實施例中，caTCR進一步包含任何兩個caTCR模組或域之間的時間隔模組。在一些實施例中，間隔模組包含長度在約5至約70 (諸如約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65或70中之任一者，包括此等數值之間的任何範圍)個胺基酸之間的一或多個肽連接子。在一些實施例中，caTCR進一步包含一或多個輔助胞內域。在一些實施例中，該一或多個輔助胞內域在第一及/或第二TCRD之羧基端。在一些實施例中，該一或多個輔助胞內域在第一TCR-TM與第一TCR胞內域之間，及/或在第二TCR-TM與第二TCR胞內域之間。在一些實施例中，該一或多個輔助胞內域個別地包含TCR協同刺激域。在一些實施例中，TCR協同刺激域包含免疫協同刺激分子(諸如CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴細胞功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、與CD83特異性結合之配體及其類似者)之胞

內域中之全部或一部分。在一些實施例中，TCR協同刺激域包含SEQ ID NO: 51-56中之任一者之胺基酸序列或其變異體之全部或一部分。

【0097】 在一些實施例中，抗原結合模組特異性結合細胞表面抗原。在一些實施例中，細胞表面抗原係選自由蛋白質、碳水化合物及脂質組成之群。在一些實施例中，細胞表面抗原為於病變細胞中表現之疾病相關抗原。在一些實施例中，抗原結合模組特異性結合包含肽與MHC蛋白之複合體。肽/MHC複合體包括例如表面呈遞複合體，其包含源自在病變細胞中表現之疾病相關抗原的肽及MHC蛋白。在一些實施例中，全長疾病相關抗原通常不表現於病變細胞(例如，疾病相關抗原為胞內或分泌蛋白)之表面上。在一些實施例中，疾病為癌症且疾病相關抗原為在癌細胞中表現之腫瘤相關抗原。在一些實施例中，腫瘤相關抗原為癌蛋白。在一些實施例中，癌蛋白為原癌基因之突變結果，且癌蛋白包含含突變之新生抗原決定基。舉例而言，在一些實施例中，抗原結合模組特異性結合細胞表面腫瘤相關抗原(例如包含新生抗原決定基之癌蛋白)。在一些實施例中，抗原結合模組特異性結合包含源自不通常在癌細胞表面上表現之腫瘤相關抗原(例如包含新生抗原決定基之癌蛋白)(例如胞內或分泌腫瘤相關抗原)之肽與MHC蛋白的複合體。在一些實施例中，疾病為病毒感染且疾病相關抗原為在感染細胞中表現之病毒相關抗原。舉例而言，在一些實施例中，抗原結合模組特異性結合細胞表面病毒相關抗原。在一些實施例中，抗原結合模組特異性結合包含源自通常不在病毒感染細胞表面上表現之病毒相關抗原(例如胞內或分泌病毒相關抗原)之肽與MHC蛋白的複合體。在一些實施例中，caTCR構築體以約0.1 pM至約500 nM (諸如約0.1 pM、1.0 pM、10 pM、50 pM、100 pM、500 pM、1 nM、10 nM、50

nM、100 nM或500 nM中之任一者，包括此等數值之間的任何範圍)之間的 $K_d$ 結合靶抗原。

**【0098】** 在一些實施例中，caTCR包含特異性結合於細胞表面抗原之抗原結合模組，其中細胞表面抗原為CD19、CD20、CD22、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPRC5D或FCRL5，包括其變異體或突變體。與例如細胞表面抗原之完全抗原之特異性結合有時被稱作「非MHC限制結合」。

**【0099】** 在一些實施例中，caTCR包含特異性結合於包含肽與MHC蛋白之複合體的抗原結合模組，其中肽源自選自由以下組成之群的蛋白質：WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、組蛋白H3.3及PSA，包括其變異體或突變體。與包含肽與MHC蛋白之複合體的特異性結合有時被稱作「MHC限制結合」。

**【0100】** 在一些實施例中，caTCR包含特異性結合於包含源自疾病相關抗原(諸如腫瘤相關或病毒編碼抗原)之肽與MHC I類蛋白質之複合體的抗原結合模組，其中MHC I類蛋白質為HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F或HLA-G。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-A、HLA-B或HLA-C。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-A。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-B。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-C。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-A01、HLA-A02、HLA-A03、HLA-A09、HLA-A10、HLA-A11、HLA-A19、HLA-A23、HLA-A24、HLA-A25、HLA-A26、HLA-A28、HLA-A29、HLA-A30、HLA-A31、HLA-A32、HLA-A33、HLA-A34、HLA-A36、HLA-A43、HLA-A66、HLA-A68、HLA-A69、HLA-A74或HLA-A80。在一

些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-A02。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-A\*02:01-555中之任一者，諸如HLA-A\*02:01、HLA-A\*02:02、HLA-A\*02:03、HLA-A\*02:04、HLA-A\*02:05、HLA-A\*02:06、HLA-A\*02:07、HLA-A\*02:08、HLA-A\*02:09、HLA-A\*02:10、HLA-A\*02:11、HLA-A\*02:12、HLA-A\*02:13、HLA-A\*02:14、HLA-A\*02:15、HLA-A\*02:16、HLA-A\*02:17、HLA-A\*02:18、HLA-A\*02:19、HLA-A\*02:20、HLA-A\*02:21、HLA-A\*02:22或HLA-A\*02:24。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-A\*02:01。

**【0101】** 在一些實施例中，caTCR包含特異性結合於包含源自疾病相關抗原(諸如腫瘤相關或病毒編碼抗原)之肽與MHC II類蛋白質之複合體的抗原結合模組，其中MHC II類蛋白質為HLA-DP、HLA-DQ或HLA-DR。在一些實施例中，MHC II類蛋白質為HLA-DP。在一些實施例中，MHC II類蛋白質為HLA-DQ。在一些實施例中，MHC II類蛋白質為HLA-DR。

**【0102】** 在一些實施例中，本文所描述之caTCR包含：a)特異性結合於靶抗原之抗原結合模組，及b)包含源自TCR (諸如 $\alpha\beta$ TCR或 $\gamma\delta$ TCR)之跨膜域之第一及第二TCR-TM的TCRM，其中TCRM能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，抗原結合模組連接於TCRM中之一或多個多肽鏈之胺基端。舉例而言，在一些實施例中，TCRM包含兩個多肽鏈，且抗原結合模組連接於TCRM多肽鏈中之一或兩者之胺基端。在一些實施例中，第一及第二TCR-TM為天然存在的。在一些實施例中，該等TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。在一些實施例中，第一及第



二TCR-TM為非天然存在的。在一些實施例中，TCRM進一步包含在TCR-TM之胺基端的TCR之至少一個連接肽或其片段。在一些實施例中，TCRM進一步包含至少一個TCR胞內域，其包含來自在TCR-TM之羧基端的TCR之胞內域的序列。在一些實施例中，TCRM包含源自TCR鏈之片段的TCRD。在一些實施例中，TCRD中之至少一者為非天然存在的。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含在TCR-TM之羧基端的T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR缺乏協同刺激信號傳導序列。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分包含V<sub>H</sub>抗體域及V<sub>L</sub>抗體域。在一些實施例中，抗體部分為人類、人類化、嵌合、半合成或全合成的。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，穩定模組包含連接穩定域之至少一個二硫鍵。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，該TCRM相較於包含T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，caTCR為雜多聚體，諸如雜二聚體。舉例而言，在一些實施例中，caTCR為雜二聚體，其包含含有第一TCRD的第一多肽鏈及含有第二TCRD的第二多肽鏈，其中該抗原結合模組連接於第一及/或第二多肽鏈。在一些實施例

中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

【0103】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自TCR之跨膜域中之一者的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自TCR之另一跨膜域的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，該等TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。在一些實施例中，TCR為 $\alpha\beta$  TCR，且第一及第二TCR-TM源自TCR  $\alpha$ 及 $\beta$ 次單元跨膜域。在一些實施例中，TCR為 $\gamma\delta$  TCR，且第一及第二TCR-TM源自TCR  $\gamma$ 及 $\delta$ 次單元跨膜域。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽包含第一TCR-TM所源自之TCR次單元的連接肽之全部或一部分或其變異體，及/或第二連接肽包含第二TCR-TM所源自之TCR次單元的連接肽之全部或一部分或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域包含來自第一TCR-TM所源自之TCR次單元的胞內域的序列，及/或第二TCR胞內域包含來自第二TCR-TM所源自之TCR次單元的胞內域的序列。在一些實施例中，第一TCRD為第一TCR-TM所源自之TCR次單元的片段，及/或第二TCRD為第二TCR-TM所源自之TCR次單元的片段。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自

CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，該TCRM相較於包含T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

【0104】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自天然存在之 $\alpha\beta$  TCR之跨膜域中之一者的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自天然存在之 $\alpha\beta$  TCR之另一跨膜域的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，該等TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽包含第一TCR-TM所源自之TCR次

單元的連接肽之全部或一部分或其變異體，及/或第二連接肽包含第二TCR-TM所源自之TCR次單元的連接肽之全部或一部分或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域包含來自第一TCR-TM所源自之TCR次單元的胞內域的序列，及/或第二TCR胞內域包含來自第二TCR-TM所源自之TCR次單元的胞內域的序列。在一些實施例中，第一TCRD為第一TCR-TM所源自之TCR次單元的片段，及/或第二TCRD為第二TCR-TM所源自之TCR次單元的片段。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，該TCRM相較於包含天然存在之 $\alpha\beta$  T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

【0105】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自天然存在之 $\gamma\delta$  TCR之跨膜域中之一者的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自天然存在之 $\gamma\delta$  TCR之另一跨膜域的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，該等TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽包含第一TCR-TM所源自之TCR次單元的連接肽之全部或一部分或其變異體，及/或第二連接肽包含第二TCR-TM所源自之TCR次單元的連接肽之全部或一部分或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域包含來自第一TCR-TM所源自之TCR次單元的胞內域的序列，及/或第二TCR胞內域包含來自第二TCR-TM所源自之TCR次單元的胞內域的序列。在一些實施例中，第一TCRD為第一TCR-TM所源自之TCR次單元的片段，及/或第二TCRD為第二TCR-TM所源自之TCR次單元的片段。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一

些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，該TCRM相較於包含天然存在之 $\gamma\delta$  T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

**【0106】** 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 1及SEQ ID NO: 2之胺基酸序列中之一者中所含的跨膜域的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自另一胺基酸序列中所含的跨膜域的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，該等TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 1-4之胺基酸序列中之任一者中所含的連接肽之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 27-34中之任一

者之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 1-4中之任一者中所含的胞內域之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 35或36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 1及2中所含的跨膜域之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

【0107】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 1及SEQ ID

NO: 2之胺基酸序列中之一者中所含的跨膜域的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自另一胺基酸序列中所含的跨膜域的第二TCR-TM，其中TCR-TM中之至少一者相較於該TCR-TM所源自之胺基酸序列包含一或多個(諸如2、3、4、5或更多個)胺基酸取代，且第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，TCR-TM中之每一者相較於其所源自之胺基酸序列彼此獨立地包含一或多個(諸如2、3、4、5或更多個)胺基酸取代。在一些實施例中，第一TCR-TM及/或第二TCR-TM相較於其所源自之胺基酸序列各自彼此獨立地包含不超過5個胺基酸取代。在一些實施例中，TCR-TM中之至少一者相較於其所源自之胺基酸序列包含單一胺基酸取代。在一些實施例中，TCR-TM中之每一者相較於其所源自之胺基酸序列包含單一胺基酸取代。在一些實施例中，第一TCR-TM中的至少一個經取代胺基酸經定位使得其在caTCR中可與第二TCR-TM中的至少一個經取代胺基酸相互作用。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 1-4之胺基酸序列中之任一者中所含的連接肽之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 27-34中之任一者之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 1-4中之



任一者中所含的胞內域之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 35或36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 1及2中所含的跨膜域之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

【0108】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 1及SEQ ID NO: 2之胺基酸序列中之一者中所含的跨膜域的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自另一胺基酸序列中所含的跨膜域的第二TCR-TM，其中TCR-TM中之至少一者包含含有來自SEQ ID NO: 3或4中所含的跨膜域之相連胺基酸中之一部分的嵌合序列，且第一及第二TCRD形成能夠募集

至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，TCR-TM中之每一者彼此獨立地包含含有來自SEQ ID NO: 3或4中所含的跨膜域之相連胺基酸中之一部分的嵌合序列。在一些實施例中，第一TCR-TM及/或第二TCR-TM各自彼此獨立地包含含有來自SEQ ID NO: 3或4中所含的跨膜域之一部分不超過約10 (諸如不超過約9、8、7、6、5或更少)個連續胺基酸的嵌合序列。在一些實施例中，第一或第二TCR-TM中之嵌合序列來自SEQ ID NO: 3中所含的跨膜域，且另一TCR-TM中之嵌合序列來自SEQ ID NO: 4中所含的跨膜域。在一些實施例中，第一TCR-TM中的嵌合序列經定位使得其可與第二TCR-TM中的嵌合序列相互作用。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 1-4之胺基酸序列中之任一者中所含的連接肽之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 27-34中之任一者之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 1-4中之任一者中所含的胞內域之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 35或36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自

CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 1及2中所含的跨膜域之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

【0109】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 3及SEQ ID NO: 4之胺基酸序列中之一者中所含的跨膜域的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自另一胺基酸序列中所含的跨膜域的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，該等TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連

接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 1-4之胺基酸序列中之任一者中所含的連接肽之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 27-34中之任一者之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 1-4中之任一者中所含的胞內域之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 35或36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 3及4中所含的跨膜域之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗原結合模

組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

【0110】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 3及SEQ ID NO: 4之胺基酸序列中之一者中所含的跨膜域的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自另一胺基酸序列中所含的跨膜域的第二TCR-TM，其中TCR-TM中之至少一者相較於其所源自之胺基酸序列包含一或多個(諸如2、3、4、5或更多個)胺基酸取代，且第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，TCR-TM中之每一者相較於其所源自之胺基酸序列彼此獨立地包含一或多個(諸如2、3、4、5或更多個)胺基酸取代。在一些實施例中，第一TCR-TM及/或第二TCR-TM相較於其所源自之胺基酸序列各自彼此獨立地包含不超過5個胺基酸取代。在一些實施例中，TCR-TM中之至少一者相較於其所源自之胺基酸序列包含單一胺基酸取代。在一些實施例中，TCR-TM中之每一者相較於其所源自之胺基酸序列包含單一胺基酸取代。在一些實施例中，第一TCR-TM中的至少一個經取代胺基酸經定位使得其在caTCR中可與第二TCR-TM中的至少一個經取代胺基酸相互作用。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 1-4之胺基酸序列中之任一者中所含的連接肽之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 27-34中之任一者之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫

鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 1-4中之任一者中所含的胞內域之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 35或36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 3及4中所含的跨膜域之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

**【0111】** 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 3及SEQ ID NO: 4之胺基酸序列中之一者中所含的跨膜域的第一TCR-TM；及第二

TCRD，其包含源自另一胺基酸序列中所含的跨膜域的第二TCR-TM，其中TCR-TM中之至少一者包含含有來自SEQ ID NO: 1或2中所含的跨膜域之相連胺基酸中之一部分的嵌合序列，且第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，TCR-TM中之每一者彼此獨立地包含含有來自SEQ ID NO: 1或2中所含的跨膜域之相連胺基酸中之一部分的嵌合序列。在一些實施例中，第一TCR-TM及/或第二TCR-TM各自彼此獨立地包含含有來自SEQ ID NO: 1或2中所含的跨膜域之一部分不超過約10（諸如不超過約9、8、7、6、5或更少）個連續胺基酸的嵌合序列。在一些實施例中，第一或第二TCR-TM中之嵌合序列來自SEQ ID NO: 1中所含的跨膜域，且另一TCR-TM中之嵌合序列來自SEQ ID NO: 2中所含的跨膜域。在一些實施例中，第一TCR-TM中的嵌合序列經定位使得其可與第二TCR-TM中的嵌合序列相互作用。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 1-4之胺基酸序列中之任一者中所含的連接肽之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 27-34中之任一者之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 1-4中之任一者中所含的胞內域之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例

中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 35或36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 3及4中所含的跨膜域之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

**【0112】** 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6之胺基酸序列中之一者的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自另一胺基酸序列的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，該等TCR-TM



中之至少一者為非天然存在的。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 27-34中之任一者之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 35或36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 5及6之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

**【0113】** 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗

原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6之胺基酸序列中之一者的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自另一胺基酸序列的第二TCR-TM，其中TCR-TM中之至少一者相較於其所源自之胺基酸序列包含一或多個(諸如2、3、4、5或更多個)胺基酸取代，且第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，TCR-TM中之每一者相較於其所源自之胺基酸序列彼此獨立地包含一或多個(諸如2、3、4、5或更多個)胺基酸取代。在一些實施例中，第一TCR-TM及/或第二TCR-TM相較於其所源自之胺基酸序列各自彼此獨立地包含不超過5個胺基酸取代。在一些實施例中，TCR-TM中之至少一者相較於其所源自之胺基酸序列包含單一胺基酸取代。在一些實施例中，TCR-TM中之每一者相較於其所源自之胺基酸序列包含單一胺基酸取代。在一些實施例中，第一TCR-TM中的至少一個經取代胺基酸經定位使得其在caTCR中可與第二TCR-TM中的至少一個經取代胺基酸相互作用。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 27-34中之任一者之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 35或36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導

序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta$  $\epsilon$ 、CD3 $\gamma$  $\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 5及6之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv(scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

【0114】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 5及SEQ ID NO: 6之胺基酸序列中之一者的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自另一胺基酸序列的第二TCR-TM，其中TCR-TM中之至少一者包含含有來自SEQ ID NO: 7或8之相連胺基酸中之一部分的嵌合序列，且第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，TCR-TM中之每一者彼此獨立地包含包含有來自SEQ ID NO: 7或8之相連胺基酸中之一部分的嵌合序列。在一些

實施例中，第一TCR-TM及/或第二TCR-TM各自彼此獨立地包含含有來自SEQ ID NO: 7或8之一部分不超過約10 (諸如不超過約9、8、7、6、5或更少)個連續胺基酸的嵌合序列。在一些實施例中，第一或第二TCR-TM中的嵌合序列來自SEQ ID NO: 7，且另一TCR-TM中的嵌合序列來自SEQ ID NO: 8。在一些實施例中，第一TCR-TM中的嵌合序列經定位使得其可與第二TCR-TM中的嵌合序列相互作用。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 27-34中之任一者之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 35或36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 5及6之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施

例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv(scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

**【0115】** 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO: 8之胺基酸序列中之一者的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自另一胺基酸序列的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，該等TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 27-34中之任一者之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 35或36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第

二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 7及8之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

【0116】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO: 8之胺基酸序列中之一者的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自另一胺基酸序列的第二TCR-TM，其中TCR-TM中之至少一者相較於其所源自之胺基酸序列包含一或多個(諸如2、3、4、5或更多個)胺基酸取代，且第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，TCR-TM中之每一者相較於其所源自之胺基酸序列彼此獨立地包含一或多個(諸如2、3、4、5或更多個)胺基酸取代。在一些實施例中，第一TCR-TM及/或第二TCR-TM相較於其所源自之胺基酸序列各自彼此獨立地包含不超過5個胺基酸取代。在一些實施例中，TCR-TM中之至少一者相較於其所源自之胺基酸序列包

含單一胺基酸取代。在一些實施例中，TCR-TM中之每一者相較於其所源自之胺基酸序列包含單一胺基酸取代。在一些實施例中，第一TCR-TM中的至少一個經取代胺基酸經定位使得其在caTCR中可與第二TCR-TM中的至少一個經取代胺基酸相互作用。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 27-34中之任一者之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 35或36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 7及8之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部

分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv(scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

【0117】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 7及SEQ ID NO: 8之胺基酸序列中之一者的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自另一胺基酸序列的第二TCR-TM，其中TCR-TM中之至少一者包含含有來自SEQ ID NO: 5或6之相連胺基酸中之一部分的嵌合序列，且第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，TCR-TM中之每一者彼此獨立地包含包含含有來自SEQ ID NO: 5或6之相連胺基酸中之一部分的嵌合序列。在一些實施例中，第一TCR-TM及/或第二TCR-TM各自彼此獨立地包含含有來自SEQ ID NO: 5或6之一部分不超過約10 (諸如不超過約9、8、7、6、5或更少)個連續胺基酸的嵌合序列。在一些實施例中，第一或第二TCR-TM中的嵌合序列來自SEQ ID NO: 5，且另一TCR-TM中的嵌合序列來自SEQ ID NO: 6。在一些實施例中，第一TCR-TM中的嵌合序列經定位使得其可與第二TCR-TM中的嵌合序列相互作用。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽及第二連接肽各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 27-34中之任一者之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含



第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域及第二TCR胞內域各自彼此獨立地包含SEQ ID NO: 35或36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 7及8之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv(scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(諸如雙特異性的)。

【0118】 不同態樣更詳細地論述於下文各部分中。

#### *TCR-TM變異體*

【0119】 在一些實施例中，caTCR之TCR-TM源自T細胞受體，其中TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。源自T細胞受體的非天然存在之TCR-TM包括來自T細胞受體之跨膜域，其已藉由取代一或多個胺基酸來修飾。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸係經疏

水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸鄰近(在一級序列上或空間上) TCRM中參與結合CD3之胺基酸。舉例而言，在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸與TCRM中參與結合CD3之胺基酸間隔不超過3 (諸如0、1、2或3)個胺基酸。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸與TCRM中參與結合CD3之胺基酸間隔不超過約15 (諸如不超過約14、12、10、8、6、4、2或1中之任一者)埃。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。

【0120】舉例而言，在一些實施例中，源自T細胞受體之非天然存在之TCR-TM包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：藉由一或多個胺基酸殘基之取代修飾之 $\alpha$ 、 $\beta$ 、 $\gamma$ 或 $\delta$  TCR次單元的跨膜域。在一些實施例中，TCR次單元之跨膜域藉由不超過5個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中，TCR次單元之跨膜域藉由單一胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。

【0121】因此，在一些實施例中，源自本文所描述之T細胞受體之非天然存在之TCR-TM包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：包含SEQ ID NO: 1中所含的跨膜域(例如SEQ ID NO: 5)的胺基酸序列的 $\alpha$  TCR次單元的跨膜域，該跨膜域藉由一或多個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中， $\alpha$  TCR次單元之跨膜域藉由SEQ ID NO: 1中所含的跨膜域中之不超過5個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中， $\alpha$  TCR次單

元之跨膜域藉由SEQ ID NO: 1中所含的跨膜域中之單一胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。

**【0122】** 在一些實施例中，源自本文所描述之T細胞受體之非天然存在之TCR-TM包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：包含SEQ ID NO: 5之胺基酸序列的之 $\alpha$  TCR次單元的跨膜域，該跨膜域藉由一或多個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中， $\alpha$  TCR次單元之跨膜域藉由SEQ ID NO: 5中之不超過5個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中， $\alpha$  TCR次單元之跨膜域藉由SEQ ID NO: 5中之單一胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。

**【0123】** 在一些實施例中，源自本文所描述之T細胞受體之非天然存在之TCR-TM包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：包含SEQ ID NO: 2中所含的跨膜域(例如SEQ ID NO: 6)之胺基酸序列的 $\beta$  TCR次單元的跨膜域，該跨膜域藉由一或多個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中， $\beta$  TCR次單元之跨膜域藉由SEQ ID NO: 2中所含的跨膜域中之不超過5個胺基酸殘基取代修飾。在一些實施例中， $\beta$  TCR次單元之跨膜域

藉由SEQ ID NO: 2中所含的跨膜域中之單一胺基酸殘基取代修飾。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。

【0124】 在一些實施例中，源自本文所描述之T細胞受體之非天然存在之TCR-TM包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：包含SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的 $\beta$  TCR次單元的跨膜域，該跨膜域藉由一或多個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中， $\beta$  TCR次單元之跨膜域藉由SEQ ID NO: 6中之不超過5個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中， $\beta$  TCR次單元之跨膜域藉由SEQ ID NO: 6中之單一胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。

【0125】 在一些實施例中，源自本文所描述之T細胞受體之非天然存在之TCR-TM包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：包含SEQ ID NO: 3中所含的跨膜域(例如SEQ ID NO: 7)之胺基酸序列的 $\beta$  TCR次單元的跨膜域，該跨膜域藉由一或多個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中， $\delta$  TCR次單元之跨膜域藉由SEQ ID NO: 3中之不超過5個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中， $\delta$  TCR次單元之跨膜域藉由SEQ ID

NO: 3中之單一胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。

【0126】 在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 3中所含的跨膜域(例如SEQ ID NO: 7)之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 7中之以下之胺基酸中的一或多個取代(諸如經更具疏水性的殘基取代)經修飾：L4、M6、V12、N15、F245及L25。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 3中所含的跨膜域之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 7中之V12及N15之胺基酸中的取代(諸如用更具疏水性的殘基取代)修飾。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 3中所含的跨膜域之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 7中之以下取代之一或多個取代修飾：L4C、M6V、V12F、N15S、F245S及L25S。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 3中所含的跨膜域之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 7中之V12F及N15S取代之取代修飾。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 9-13中之任一者之胺基酸序列。

【0127】 在一些實施例中，源自本文所描述之T細胞受體的非天然存在之TCR-TM包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的 $\delta$  TCR次單元的跨膜域，其藉由一或多個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中， $\delta$  TCR次單元之跨膜域藉由SEQ ID

NO: 7中之不超過5個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中， $\delta$  TCR次單元之跨膜域藉由SEQ ID NO: 7中之單一胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。

【0128】 在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 7中之以下胺基酸之胺基酸中之一或多個取代(諸如用更具疏水性的殘基取代)修飾：L4、M6、V12、N15、F245及L25。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 7中之V12及N15之胺基酸中之取代(諸如用更具疏水性的殘基取代)修飾。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 7中之以下取代之一或多個取代修飾：L4C、M6V、V12F、N15S、F245S及L25S。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 7之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 7中之V12F及N15S之取代修飾。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 9-13中之任一者之胺基酸序列。

【0129】 在一些實施例中，源自本文所描述之T細胞受體的非天然存在之TCR-TM包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：包含SEQ ID NO: 4中所含的跨膜域(例如SEQ ID NO: 8)之胺基酸序列的 $\gamma$  TCR次單元的跨膜域，其藉由一或多個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中，

$\gamma$  TCR次單元之跨膜域藉由SEQ ID NO: 4中所含的跨膜域中之不超過5個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中， $\gamma$  TCR次單元之跨膜域藉由SEQ ID NO: 4中所含的跨膜域中之單一胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。

**【0130】** 在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 4中所含的跨膜域(例如SEQ ID NO: 8)之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 8中之以下胺基酸之胺基酸中之一或多個取代(諸如用更具疏水性的殘基取代)修飾：Y1、Y2、M3、L5、L8、V12、V13、F15、A16、I18、C19、C20及C21。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 4中所含的跨膜域之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 8中之Y2、M3、A16及I18之胺基酸中之取代(諸如用更具疏水性的殘基取代)修飾。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 4中所含的跨膜域之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 8中之L8、V12及F15之胺基酸中之取代(諸如用更具疏水性的殘基取代)修飾。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 4中所含的跨膜域之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 8中之以下取代之一或多個取代修飾：Y1Q、Y2L、Y2I、M3V、M3I、L5C、L8F、V12F、V13Y、F15S、A16V、A16I、I18V、I18L、C19M、C20M及C21G。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 4中所含的跨膜域之胺基

酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 8中之Y2L、M3V、A16V及I18V取代之取代修飾。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 4中所含的跨膜域之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 8中之Y2I、M3I、A16I及I18L取代之取代修飾。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 4中所含的跨膜域之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 8中之L8F、V12F及F15S取代之取代修飾。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 14-26中之任一者之胺基酸序列。

【0131】 在一些實施例中，源自本文所描述之T細胞受體的非天然存在之TCR-TM包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的 $\gamma$  TCR次單元的跨膜域，其藉由一或多個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中， $\gamma$  TCR次單元之跨膜域藉由SEQ ID NO: 8中之不超過5個胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中， $\gamma$  TCR次單元之跨膜域藉由SEQ ID NO: 8中之單一胺基酸殘基之取代修飾。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸係經疏水性比對應未經取代殘基更高之殘基取代。在一些實施例中，至少一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。在一些實施例中，每一個經取代胺基酸鄰近TCRM中參與結合CD3之胺基酸。

【0132】 在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 8中之以下胺基酸之胺基酸中之一或多個取代(諸如用更具疏水性的殘基取代)修飾：Y1、Y2、M3、L5、L8、V12、V13、F15、A16、I18、C19、C20及C21。在一些實施例



中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 8中之Y2、M3、A16及I18之胺基酸中之取代(諸如用更具疏水性的殘基取代)修飾。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 8中之L8、V12及F15之胺基酸中之取代(諸如用更具疏水性的殘基取代)修飾。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 8中之以下取代之一或多個取代修飾：Y1Q、Y2L、Y2I、M3V、M3I、L5C、L8F、V12F、V13Y、F15S、A16V、A16I、I18V、I18L、C19M、C20M及C21G。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 8中之Y2L、M3V、A16V及I18V取代之取代修飾。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 8中之Y2I、M3I、A16I及I18L取代之取代修飾。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 8之胺基酸序列，其藉由對應於SEQ ID NO: 8中之L8F、V12F及F15S取代之取代修飾。在一些實施例中，非天然存在之TCR-TM包含SEQ ID NO: 14-26中之任一者之胺基酸序列。

**【0133】** 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含含有SEQ ID NO: 7及9-13之胺基酸序列中之任一者、基本上由其組成或由其組成的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含含有SEQ ID NO: 8及14-26中之任一者之胺基酸序列、基本上由其組成或由其組成的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗原結合模組，

其特異性結合於靶抗原，其中抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，該等TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。在一些實施例中，第一TCR-TM及第二TCR-TM係根據表2中所列之caTCR中之任一者選擇。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽包含SEQ ID NO: 31或32之胺基酸序列或其變異體，及/或第二連接肽包含SEQ ID NO: 33或34之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第二TCR胞內域包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 7及8之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、

(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。

表2

| caTCR ID | 第一TCR-TM<br>(δ次單元)                           | 第二TCR-TM<br>(γ次單元)                              |
|----------|----------------------------------------------|-------------------------------------------------|
| TM0      | VLGLRMLFAKTAVVNFLLTAKLFFL<br>(SEQ ID NO: 7)  | YYMYLLLLLKSVVYFAITCCLL<br>(SEQ ID NO: 8)        |
| TM1      | VLGLRMLFAKTAVVNFLLTAKLFSL<br>(SEQ ID NO: 9)  | YYMYLLLLLKSVVYFAITCCLL<br>(SEQ ID NO: 8)        |
| TM2      | VLGLRMLFAKTAVVNFLLTAKLFFL<br>(SEQ ID NO: 7)  | YYMYLLLLLKSVYYFAITCCLLRRTAF<br>(SEQ ID NO: 14)  |
| TM3      | VLGLRMLFAKTAVVNFLLTAKLFFL<br>(SEQ ID NO: 7)  | YYMYLLLLLKSVVYFAITCGLLRRTAF<br>(SEQ ID NO: 15)  |
| TM4      | VLGLRMLFAKTAVVNFLLTAKLFFL<br>(SEQ ID NO: 7)  | YLVYLLLLLKSVVYFVIVTCCLLRRTAF<br>(SEQ ID NO: 16) |
| TM5      | VLGLRVLFAKTAVVNFLLTAKLFFL<br>(SEQ ID NO: 10) | YLVYLLLLLKSVVYFVIVTCCLLRRTAF<br>(SEQ ID NO: 16) |
| TM6      | VLGLRMLFAKTAVVNFLLTAKLFFL<br>(SEQ ID NO: 7)  | YLMYLLLLLKSVVYFAITCCLLRRTAF<br>(SEQ ID NO: 17)  |
| TM7      | VLGLRMLFAKTAVVNFLLTAKLFFL<br>(SEQ ID NO: 7)  | YYVYLLLLLKSVVYFAITCCLLRRTAF<br>(SEQ ID NO: 18)  |
| TM8      | VLGLRMLFAKTAVVNFLLTAKLFFL<br>(SEQ ID NO: 7)  | YYMYLLLLLKSVVYFVIITCCLLRRTAF<br>(SEQ ID NO: 19) |
| TM9      | VLGLRMLFAKTAVVNFLLTAKLFFL<br>(SEQ ID NO: 7)  | YYMYLLLLLKSVVYFAIVTCCLLRRTAF<br>(SEQ ID NO: 20) |
| TM10     | VLGLRMLFAKTAVVNFLLTAKLFFL<br>(SEQ ID NO: 7)  | YYIYLLLLLKSVVYFAITCCLLRRTAF<br>(SEQ ID NO: 21)  |
| TM11     | VLGLRMLFAKTAVVNFLLTAKLFFL<br>(SEQ ID NO: 7)  | YIIYLLLLLKSVVYFIITCCLLRRTAF<br>(SEQ ID NO: 22)  |
| TM12     | VLGCRMLFAKTAVVNFLLTAKLFFL<br>(SEQ ID NO: 11) | YYMYCLLLLKSVVYFAITCCLLRRTAF<br>(SEQ ID NO: 23)  |
| TM13     | VLGLRMLFAKTFAVSFLLTAKLFFL<br>(SEQ ID NO: 12) | YYMYLLLFLKSFVYSAITCCLLRRTAF<br>(SEQ ID NO: 24)  |
| TM14     | VLGLRMLFAKTAVVNFLLTAKLFFL<br>(SEQ ID NO: 7)  | YYMYLLLLLKSVVYFAITMCLLRRTAF<br>(SEQ ID NO: 25)  |
| TM15     | VLGLRMLFAKTAVVNFLLTAKLFFS<br>(SEQ ID NO: 13) | QYMYLLLLLKSVVYFAITCCLLRRTAF<br>(SEQ ID NO: 26)  |

抗原結合模組

【0134】 在一些實施例中，根據本文所描述之caTCR中之任一者，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分選自由以下組成之群：Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv及單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，當抗體部分為包含第一抗體部分鏈及第二抗體部分鏈之多聚體時，caTCR包含連

接於第一或第二抗體部分鏈之第一TCRD及連接於另一抗體部分鏈之第二TCRD。在一些實施例中，抗體部分特異性結合細胞表面抗原，包括(但不限於)CD19、CD20、CD22、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPRC5D及FCRL5，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，抗體部分特異性地結合肽/MHC複合體，其中肽源自蛋白質，包括(但不限於)WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、組蛋白H3.3及PSA，包括其變異體或突變體。

【0135】 在一些實施例中，根據本文所描述之caTCR中之任一者，抗原結合模組為包含C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>域之抗體部分。在一些實施例中，C<sub>H</sub>1域源自IgG (例如IgG1、IgG2、IgG3或IgG4)重鏈，視情況為人類的。在一些實施例中，C<sub>H</sub>1域為相較於其所源自之序列包含一或多個修飾(例如胺基酸取代、插入及/或缺失)之變異體。在一些實施例中，C<sub>H</sub>1域包含SEQ ID NO: 37-47中之任一者之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，C<sub>H</sub>1域包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，C<sub>L</sub>域源自κ或λ輕鏈，視情況為人類的。在一些實施例中，C<sub>L</sub>域為相較於其所源自之序列包含一或多個修飾(例如胺基酸取代、插入及/或缺失)之變異體。在一些實施例中，C<sub>L</sub>域包含SEQ ID NO: 48之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，C<sub>H</sub>1及/或C<sub>L</sub>域包含實質上不改變其彼此的結合親和力的一或多個修飾。在一些實施例中，C<sub>H</sub>1及/或C<sub>L</sub>域包含增加其彼此的結合親和力及/或引入非天然存在之二硫鍵的一或多個修飾。

【0136】 在一些實施例中，根據本文所描述之caTCR中之任一者包含特異性結合於靶抗原之抗體部分，該抗體部分包含對靶抗原具有特異性之抗體部分的CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)。在一些實施例中，抗體部分

包含對CD19具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2017066136A2)。在一些實施例中，抗體部分包含對CD19具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (例如，V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及/或V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 59之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；或其中所含之CDR)。在一些實施例中，抗體部分包含對CD20具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (例如，V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 60之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及/或V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 61之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；或其中所含之CDR)。在一些實施例中，抗體部分包含對CD22具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如2018年3月30日提交之USSN 62/650,955，其內容以全文引用之方式併入本文中)。在一些實施例中，抗體部分包含對CD22具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (例如，V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 101之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及/或V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 102之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；或其中所含之CDR)。在一些實施例中，抗體部分包含對GPC3具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如2017年4月26日提交之USSN 62/490,586，其內容以全文引用之方式併入本文中)。在一些實施例中，抗體部分包含對GPC3具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (例如V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 64之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由胺基酸序列組成；及/

或V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 65之胺基酸序列、基本上由胺基酸序列組成或由胺基酸序列組成；或其中所含之CDR)。在一些實施例中，抗體部分包含對ROR1具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/187220及WO2016/187216)。在一些實施例中，抗體部分包含對ROR2具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/142768)。在一些實施例中，抗體部分包含對BCMA具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/090327及WO2016/090320)。在一些實施例中，抗體部分包含對GPRC5D具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/090329及WO2016/090312)。在一些實施例中，抗體部分包含對FCRL5具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/090337)。在一些實施例中，抗體部分包含對WT-1具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2012/135854、WO2015/070078及WO2015/070061)。在一些實施例中，抗體部分包含對AFP具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/161390)。在一些實施例中，抗體部分包含對HPV16-E7具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/182957)。在一些實施例中，抗體部分包含對NY-ESO-1具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/210365)。在一些實施例中，抗體部分包含對PRAME具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/191246)。在一些實施例中，抗體部分包含對EBV-LMP2A具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如

WO2016/201124)。在一些實施例中，抗體部分包含對KRAS具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/154047)。在一些實施例中，抗體部分包含對PSA具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2017/015634)。在一些實施例中，抗體部分為Fab，其包含：一個Fab鏈，其包含V<sub>H</sub>域及C<sub>H</sub>1域；及另一Fab鏈，其包含V<sub>L</sub>域及C<sub>L</sub>域。在一些實施例中，C<sub>H</sub>1域包含SEQ ID NO: 37-47中之任一者之胺基酸序列，及/或C<sub>L</sub>域包含SEQ ID NO: 48之胺基酸序列。在一些實施例中，C<sub>H</sub>1域包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列、基本上由其組成或由其組成，且C<sub>L</sub>域包含SEQ ID NO: 48之胺基酸序列、基本上由其組成或由其組成。

#### *caTCR* 構築體

【0137】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含源自TCR之跨膜域中之一者的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自TCR之另一跨膜域的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗體部分，其特異性結合於靶抗原，其中抗體部分連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，抗體部分選自由以下組成之群：Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv及單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗體部分特異性結合細胞表面抗原，包括(但不限於)CD19、CD20、CD22、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPC5D及FCRL5，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，抗體部分特異性地結合肽/MHC複合體，其中肽源自蛋白質，包括(但不限於) WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、組蛋白H3.3及PSA，

包括其變異體或突變體。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，穩定模組位於TCRM與抗體部分之間。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，該等TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。

【0138】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含含有SEQ ID NO: 7及9-13之胺基酸序列中之任一者、基本上由其組成或由其組成的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含含有SEQ ID NO: 8及14-26中之任一者之胺基酸序列、基本上由其組成或由其組成的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗體部分，其特異性結合於靶抗原，其中抗體部分連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，第一TCR-TM及第二TCR-TM係根據表2中所列之caTCR中之任一者選擇。在一些實施例中，抗體部分選自由以下組成之群：Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv及單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗體部分特異性結合細胞表面抗原，包括(但不限於)CD19、CD20、CD22、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPRC5D及FCRL5，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，抗體部分特異性地結合肽/MHC複合體，其中肽源自蛋白質，包括(但不限於) WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、組蛋白H3.3及PSA，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽包含SEQ ID NO: 31或32之胺基酸序列或其變異



體，及/或第二連接肽包含SEQ ID NO: 33或34之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第二TCR胞內域包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 7及8之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，該等TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。

【0139】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含第二TCR-TM，其中第一及第二TCR-TM分別包含以下、基本上由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 7及8、9及8、7及14、7及15、7及16、10及16、7及17、7及18、7及19、7及20、7及21、7及22、11及23、12及24、7及25或13及26之胺基酸序列，且其中第一及第二

TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗體部分，其特異性結合於靶抗原，其中抗體部分連接於第一及/或第二TCRD。舉例而言，在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，該caTCR包含：a)第一TCRD，其包含含有SEQ ID NO: 7之胺基酸序列、基本上由其組成或由其組成的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含含有SEQ ID NO: 8之胺基酸序列、基本上由其組成或由其組成的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)抗體部分，其特異性結合於靶抗原，其中抗體部分連接於第一及/或第二TCRD。在一些實施例中，抗體部分選自由以下組成之群：Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv及單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗體部分特異性結合細胞表面抗原，包括(但不限於)CD19、CD20、CD22、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPC5D及FCRL5，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，抗體部分特異性地結合肽/MHC複合體，其中肽源自蛋白質，包括(但不限於) WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、組蛋白H3.3及PSA，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽包含SEQ ID NO: 31或32之胺基酸序列或其變異體，及/或第二連接肽包含SEQ ID NO: 33或34之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第二TCR胞內域包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含

至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 7及8之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。

**【0140】** 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，其包含：a)第一多肽鏈，其包含含有第一Fab鏈之第一抗原結合域，該第一Fab鏈連接於包含源自TCR之跨膜域中之一者的第一TCR-TM的第一TCRD；及b)第二多肽鏈，其包含含有第二Fab鏈之第二抗原結合域，該第二Fab鏈連接於包含源自TCR之另一跨膜域的第二TCR-TM的第二TCRD，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM，且其中第一及第二Fab鏈形成特異性結合靶抗原的Fab樣抗原結合模組。在一些實施例中，a)第一Fab鏈包含V<sub>H</sub>及C<sub>H1</sub>抗體域，且第二Fab鏈包含V<sub>L</sub>及C<sub>L</sub>抗體域；或b)第一Fab鏈包含V<sub>L</sub>及C<sub>L</sub>抗體域，且第二Fab鏈包含V<sub>H</sub>及C<sub>H1</sub>抗體域。舉例而言，在一些實施例中，caTCR包含：a)第一多肽鏈，其包含連接於第一TCRD、包含V<sub>H</sub>及C<sub>H1</sub>抗體域的第一Fab鏈；及b)第二Fab鏈，其連接於第二TCRD、包含V<sub>L</sub>及C<sub>L</sub>抗體域。在一些實施例中，caTCR包含：a)第一Fab鏈，其連接於第一TCRD、包含

V<sub>L</sub>及C<sub>L</sub>抗體域；及b)第二Fab鏈，其連接於第二TCRD、包含V<sub>H</sub>及C<sub>H1</sub>抗體域。在一些實施例中，在TCRD中之一或兩者與其連接之Fab鏈之間存在肽連接子。在一些實施例中，在C<sub>H1</sub>域中之殘基與C<sub>L</sub>域中之殘基之間存在二硫鍵。在一些實施例中，C<sub>H1</sub>及/或C<sub>L</sub>域包含增加Fab鏈彼此之結合親和力的一或多個修飾。在一些實施例中，交換C<sub>H1</sub>及C<sub>L</sub>域，使得Fab鏈中之一者包含V<sub>H</sub>及C<sub>L</sub>抗體域，且另一Fab鏈包含V<sub>L</sub>及C<sub>H1</sub>抗體域。在一些實施例中，Fab樣抗原結合模組特異性結合細胞表面抗原，包括(但不限於)CD19、CD20、CD22、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPC5D及FCRL5，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，Fab樣抗原結合模組特異性結合肽/MHC複合體，其中肽源自蛋白質，包括(但不限於)WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、組蛋白H3.3及PSA，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一或第二穩定域位於第一TCRD與其連接的Fab鏈之間，且另一穩定域位於第二TCRD與其連接的Fab鏈之間。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。

**【0141】** 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，其包含：a)第一多肽鏈，其包含含有第一Fab鏈的第一抗原結合域，該第一Fab鏈連接於包含含有SEQ ID NO: 7及9-13之胺基酸序列中之任一者、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成的第一TCR-TM的第一TCRD；及b)第二多肽鏈，其包含含有第二Fab鏈的第二抗原結合

域，該第二Fab鏈連接於包含含有SEQ ID NO: 8及14-26中之任一者之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成的第二TCR-TM的第二TCRD，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM，且其中第一及第二Fab鏈形成特異性結合靶抗原的Fab樣抗原結合模組。在一些實施例中，第一TCR-TM及第二TCR-TM係根據表2中所列之caTCR中之任一者選擇。在一些實施例中，

a)第一Fab鏈包含V<sub>H</sub>及C<sub>H1</sub>抗體域，且第二Fab鏈包含V<sub>L</sub>及C<sub>L</sub>抗體域；或

b)第一Fab鏈包含V<sub>L</sub>及C<sub>L</sub>抗體域，且第二Fab鏈包含V<sub>H</sub>及C<sub>H1</sub>抗體域。在一些實施例中，C<sub>H1</sub>域包含SEQ ID NO: 37-47中之任一者之胺基酸序列，及/或C<sub>L</sub>域包含SEQ ID NO: 48之胺基酸序列。在一些實施例中，C<sub>H1</sub>域包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成，且C<sub>L</sub>域包含SEQ ID NO: 48之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，Fab樣抗原結合模組特異性結合細胞表面抗原，包括(但不限於)CD19、CD20、CD22、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPC5D及FCRL5，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，Fab樣抗原結合模組特異性結合肽/MHC複合體，其中肽源自蛋白質，包括(但不限於) WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、組蛋白H3.3及PSA，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽包含SEQ ID NO: 31或32之胺基酸序列或其變異體，及/或第二連接肽包含SEQ ID NO: 33或34之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵

連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第二TCR胞內域包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 7及8之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。

【0142】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，其包含：a)第一多肽鏈，其包含含有第一Fab鏈的第一抗原結合域，該第一Fab鏈連接於包含第一TCR-TM的第一TCRD；及b)第二多肽鏈，其包含含有第二Fab鏈的第二抗原結合域，該第二Fab鏈連接於包含第二TCR-TM的第二TCRD，其中第一及第二TCR-TM分別包含以下胺基酸序列、基本上由以下組成或由以下組成：SEQ ID NO: 7及8、9及8、7及14、7及15、7及16、10及16、7及17、7及18、7及19、7及20、7及21、7及22、11及23、12及24、7及25或13及26，其中第一及第二TCRD形成能

夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM，且其中第一及第二Fab鏈形成特異性結合靶抗原的Fab樣抗原結合模組。在一些實施例中，a)第一Fab鏈包含V<sub>H</sub>及C<sub>H1</sub>抗體域，且第二Fab鏈包含V<sub>L</sub>及C<sub>L</sub>抗體域；或b)第一Fab鏈包含V<sub>L</sub>及C<sub>L</sub>抗體域，且第二Fab鏈包含V<sub>H</sub>及C<sub>H1</sub>抗體域。在一些實施例中，C<sub>H1</sub>域包含SEQ ID NO: 37-47中之任一者之胺基酸序列，及/或C<sub>L</sub>域包含SEQ ID NO: 48之胺基酸序列。在一些實施例中，C<sub>H1</sub>域包含SEQ ID NO: 37之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成，且C<sub>L</sub>域包含SEQ ID NO: 48之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，Fab樣抗原結合模組特異性結合細胞表面抗原，包括(但不限於)CD19、CD20、CD22、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPC5D及FCRL5，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，Fab樣抗原結合模組特異性結合肽/MHC複合體，其中肽源自蛋白質，包括(但不限於) WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、組蛋白H3.3及PSA，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽包含SEQ ID NO: 31或32之胺基酸序列或其變異體，及/或第二連接肽包含SEQ ID NO: 33或34之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第二TCR胞內域包含SEQ ID NO: 36之胺基酸序列或其變異體。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸

如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM相較於包含具有SEQ ID NO: 7及8之序列之T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。

【0143】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，其包含a)第一TCRD，其包含衍生自天然存在之TCR之跨膜域中之一者之第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含衍生自天然存在之TCR之另一跨膜域之第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM，且其中第一及/或第二TCR-TM為非天然存在的；及b) Fab'，其特異性結合於靶抗原，其中Fab'包含含有V<sub>H</sub>、C<sub>H1</sub>及部分鉸鏈抗體域的第一Fab'鏈，及含有V<sub>L</sub>及C<sub>L</sub>抗體域的第二Fab'鏈，且其中第一Fab'鏈連接於第一或第二TCRD，且第二Fab'鏈連接於另一TCRD。在一些實施例中，在TCRD中之一或兩者與其連接之Fab'鏈之間存在肽連接子。在一些實施例中，在C<sub>H1</sub>域中之殘基與C<sub>L</sub>域中之殘基之間存在二硫鍵。在一些實施例中，C<sub>H1</sub>及/或C<sub>L</sub>域包含增加Fab'鏈彼此之結合親和力的一或多個修飾。在一些實施例中，交換C<sub>H1</sub>及C<sub>L</sub>域，使得第一Fab'鏈包含V<sub>H</sub>、C<sub>L</sub>及部分鉸鏈抗體域，且第二Fab'鏈包含V<sub>L</sub>及C<sub>H1</sub>域。在一些實施例中，Fab'特異性地結合細胞表面抗原，包括(但不限於)CD19、



CD20、CD22、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPC5D及FCRL5，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，Fab'特異性地結合肽/MHC複合體，其中肽源自蛋白質，包括(但不限於)WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、組蛋白H3.3及PSA，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一或第二穩定域位於第一TCRD與其連接的Fab'鏈之間，且另一穩定域位於第二TCRD與其連接的Fab'鏈之間。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。

【0144】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，其包含：a)第一TCRD，其包含源自TCR之跨膜域中之一之第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自TCR之其他跨膜域的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b) (Fab')<sub>2</sub>，其特異性結合於靶抗原，其中(Fab')<sub>2</sub>包含：第一及第二(Fab')<sub>2</sub>鏈，其包含V<sub>H</sub>、C<sub>H</sub>1及部分鉸鏈抗體域；及第三及第四(Fab')<sub>2</sub>鏈，其包含V<sub>L</sub>及C<sub>L</sub>抗體域，且其中第一(Fab')<sub>2</sub>鏈連接於第一或第二TCRD，且第二(Fab')<sub>2</sub>鏈連接於另一TCRD。在一些實施例中，在TCRD中之一或兩者與其連接之(Fab')<sub>2</sub>鏈之間存在肽連接子。在一些實施例中，在C<sub>H</sub>1域中之殘基與C<sub>L</sub>域中之殘基之間存在二硫鍵。在一些實施例中，C<sub>H</sub>1及/或C<sub>L</sub>域包含增加(Fab')<sub>2</sub>鏈彼此之結合親和力的一或多個修飾。在一些實施例中，交換C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>域，使得第一及第二(Fab')<sub>2</sub>鏈包含

V<sub>H</sub>、C<sub>L</sub>及部分鉸鏈抗體域，且第三及第四(Fab')<sub>2</sub>鏈包含V<sub>L</sub>及C<sub>H</sub>1域。在一些實施例中，(Fab')<sub>2</sub>特異性結合細胞表面抗原，包括(但不限於)CD19、CD20、CD22、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPRC5D及FCRL5，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，(Fab')<sub>2</sub>特異性結合肽/MHC複合體，其中肽源自蛋白質，包括(但不限於)WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、組蛋白H3.3及PSA，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一或第二穩定域位於第一TCRD與其連接的(Fab')<sub>2</sub>鏈之間，且另一穩定域位於第二TCRD與其連接的(Fab')<sub>2</sub>鏈之間。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。

【0145】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，其包含：a)第一TCRD，其包含源自TCR之跨膜域中之一者的第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自TCR之其他跨膜域的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b) Fv，其特異性結合於靶抗原，其中Fv包含含有V<sub>H</sub>抗體域的第一Fv鏈及含V<sub>L</sub>抗體域的第二Fv鏈，且其中第一Fv鏈連接於第一或第二TCRD且第二Fv鏈連接於另一TCRD。在一些實施例中，在TCRD中之一或兩者與其連接之Fv鏈之間存在肽連接子。在一些實施例中，Fv特異性結合細胞表面抗原，包括(但不限於)CD19、CD20、CD22、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPRC5D及FCRL5，包括其變異體或

突變體。在一些實施例中，Fv特異性結合肽/MHC複合體，其中肽源自蛋白質，包括(但不限於)WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、組蛋白H3.3及PSA，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一或第二穩定域位於第一TCRD與其連接的Fv鏈之間，且另一穩定域位於第二TCRD與其連接的Fv鏈之間。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。

【0146】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性結合靶抗原，其包含：a)第一TCRD，其包含源自TCR之跨膜域中之一者之第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自TCR之另一跨膜域之第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)第一scFv，其特異性地結合於靶抗原，其中第一scFv包含V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>抗體域，且其中第一scFv連接於第一或第二TCRD。在一些實施例中，caTCR進一步包含連接於第一scFv或連接於未連接於第一scFv之TCRD的第二抗原結合模組。在一些實施例中，第二抗原結合模組特異性地結合於靶抗原。在一些實施例中，第二抗原結合模組特異性地結合於不同於靶抗原之抗原。在一些實施例中，第二抗原結合模組為第二scFv。在一些實施例中，在第一scFv與其連接的TCRD之間或在第二抗原結合模組與其連接的scFv或TCRD之間存在肽連接子。在一些實施例中，scFv特異性地結合細胞表面抗原，其包括(但不限於) CD19、CD20、CD22、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPC5D及FCRL5，包括其變

異體或突變體。在一些實施例中，scFv特異性地結合肽/MHC複合體，其中肽源自蛋白質，該蛋白質包括(但不限於) WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、組蛋白H3.3及PSA，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一或第二穩定域位於第一scFv與其連接的TCRD之間，且另一穩定域連接於第二TCRD。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。

【0147】 在一些實施例中，本文所描述之caTCR特異性地結合靶抗原，其包含a)第一TCRD，其包含源自TCR之跨膜域中之一者之第一TCR-TM；及第二TCRD，其包含源自TCR之另一跨膜域之第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子的TCRM；及b)第一scFv，其特異性地結合於靶抗原及第二scFv，其中第一及第二scFv包含V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>抗體域，且其中第一scFv連接於第一或第二TCRD且第二scFv連接於另一TCRD。在一些實施例中，第二TCRD特異性地結合於靶抗原。在一些實施例中，第二scFv包含第一scFv之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，第二scFv特異性地結合於不同於靶抗原之抗原。在一些實施例中，第一及/或第二scFv單獨特異性地結合細胞表面抗原，其包括(但不限於)CD19、CD20、CD22、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPC5D及FCRL5，包括其變異體及突變體。在一些實施例中，第一及/或第二scFv單獨特異性地結合肽/MHC複合體，其中肽源自蛋白質，包括

(但不限於) WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、組蛋白H3.3及PSA，包括其變異體或突變體。

在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一或第二穩定域位於第一scFv與其連接的TCRD之間，且另一穩定域位於第二scFv與其連接的TCRD之間。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。

### 多特異性caTCR

【0148】 在一些實施例中，caTCR為特異性地結合於兩個或多於兩個(例如2、3、4或更多個)不同靶抗原或抗原決定基之多特異性caTCR。在一些實施例中，多特異性caTCR特異性地結合於兩個或多於兩個(例如2、3、4或更多個)不同靶抗原。在一些實施例中，多特異性caTCR特異性地結合於相同靶抗原上之兩個或多於兩個(例如2、3、4或更多個)不同抗原決定基。在一些實施例中，多特異性caTCR包含用於各抗原或抗原決定基之抗原結合模組。在一些實施例中，多特異性caTCR包含用於至少一個抗原或抗原決定基之超過兩個抗原結合模組。在一些實施例中，多特異性caTCR包含多特異性抗原結合模組，其包含各自特異性地結合於抗原或抗原決定基之兩個或多於兩個(例如2、3、4或更多個)抗原結合域。在一些實施例中，多特異性caTCR為雙特異性的。在一些實施例中，多特異性caTCR為三特異性的。

【0149】 多特異性分子為對於至少兩種不同抗原或抗原決定基具有結合特異性的分子(例如雙特異性抗體對兩種抗原或抗原決定基具有結合

特異性)。亦涵蓋具有超過兩個價及/或特異性之多特異性caTCR。已描述雙特異性抗體，例如參見 Brinkmann U. 及 Kontermann R.E. (2017) *MABS*, 9(2), 182-212。可製備三特異性抗體，參見Tutt等人*J. Immunol.* 147: 60 (1991)。應瞭解，熟習此項技術者可選擇此項技術中已知之單獨多特異性分子之適當特徵以形成多特異性caTCR。

【0150】 在一些實施例中，caTCR (在本文中亦稱為「多特異性caTCR」)包含：a)多特異性(例如雙特異性)抗原結合模組，其包含特異性地結合於第一靶抗原之第一抗原結合域及特異性地結合於第二靶抗原之第二抗原結合域；及b) TCRM，其包含含有第一TCR-TM之第一TCRD (TCRD1)及含有第二TCR-TM之第二TCRD (TCRD2)；其中TCRM有助於募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽包含第一TCR-TM所源自之TCR次單元的連接肽之全部或一部分或其變異體，及/或第二連接肽包含第二TCR-TM所源自之TCR次單元的連接肽之全部或一部分或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域包含來自第一TCR-TM所源自之TCR次單元的胞內域的序列，及/或第二TCR胞內域包含來自第二TCR-TM所源自之TCR次單元的胞內域的序列。在一些實施例中，第一TCRD為第一TCR-TM所源自之TCR次單元的片段，及/或第二TCRD為第二TCR-TM所源自之TCR次單元的片段。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自

CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中第一及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體部分，諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域，或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，該TCRM相較於包含天然存在之 $\alpha\beta$  T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，第一TCR-TM及第二TCR-TM兩者為天然存在的。在一些實施例中，TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。在一些實施例中，第一TCR-TM與該第一TCR-TM所源自之跨膜域相比包含至多5個胺基酸取代(例如單一胺基酸取代)，及/或第二TCR-TM與該第二TCR-TM所源自之跨膜域相比包含至多5個胺基酸取代(例如單一胺基酸取代)。在一些實施例中，該第一TCR-TM中之經取代胺基酸鄰近該第二TCR-TM中之經取代胺基酸。在一些實施例中，一或多個經取代胺基酸鄰近該第一或第二TCR-TM中參與結合於CD3的胺基酸。在一些實施例中，一或多個(例如每一)經取代胺基酸之疏水性比其對應的未經取代之胺基酸大。在一些實施例中，第一TCR-TM包含SEQ ID NO: 7及9-13中之任一者之胺基酸序列，且其中第二TCR-TM包含SEQ ID NO: 8及14-26中之任一者之胺基酸序列。

**【0151】** 雙特異性caTCR之例示性結構經展示於圖13A至圖13E

中，其中靶抗原為CD19及CD22，但熟習此項技術者將容易理解，可使用相同結構格式來製備靶向其他靶抗原或抗原決定基之雙特異性caTCR。

【0152】舉例而言，源自DVD IgG之雙可變域(DVD) (參見DiGiammarino等人，mAbs 3(5): 487-494)可用作caTCR中之雙特異性抗原結合模組(圖13A)。用於融合外可變域及內可變域之各種連接子已經開發且最佳化以用於DVD-Ig，其可適用於構築具有DVD模組之雙特異性caTCR。然而，DVD模組中之可變域堆疊方法可影響內可變域之摺疊及靶結合親和力。兩種可變域之間的連接子及兩種可變域之次序可影響caTCR之功效。

【0153】在一些實施例中，caTCR包含：a)多特異性(例如雙特異性)抗原結合模組，其包含特異性地結合於第一靶抗原之Fv及特異性地結合於第二靶抗原之Fab；及b) TCRM，其包含含有第一TCR-TM之第一TCRD (TCRD1)及含有第二TCR-TM之第二TCRD (TCRD2)；其中TCRM有助於募集至少一種TCR相關信號傳導分子。

【0154】在一些實施例中，caTCR包含：(i)包含N端至C端之第一多肽鏈： $V_{H1}$ - $L1$ - $V_{H2}$ - $C_{H1}$ -TCRD1；及包含N端至C端之第二多肽鏈： $V_{L1}$ - $L2$ - $V_{L2}$ - $C_L$ -TCRD2；(ii)包含N端至C端之第一多肽鏈： $V_{H1}$ - $L1$ - $V_{L2}$ - $C_L$ -TCRD1；及包含N端至C端之第二多肽鏈： $V_{L1}$ - $L2$ - $V_{H2}$ - $C_{H1}$ -TCRD2；(iii)包含N端至C端之第一多肽鏈： $V_{L1}$ - $L1$ - $V_{H2}$ - $C_{H1}$ -TCRD1；及包含N端至C端之第二多肽鏈： $V_{H1}$ - $L2$ - $V_{L2}$ - $C_L$ -TCRD2；或(iv)包含N端至C端之第一多肽鏈： $V_{L1}$ - $L1$ - $V_{L2}$ - $C_L$ -TCRD1；及包含N端至C端之第二多肽鏈： $V_{H1}$ - $L2$ - $V_{H2}$ - $C_{H1}$ -TCRD2，其中 $V_{H1}$ 及 $V_{L1}$ 形成特異性地結合於第一靶抗原之第一抗原結合域，且 $V_{H2}$ 及 $V_{L2}$ 形成特異性地結合於第二



靶抗原之第二抗原結合域，其中TCRD1及TCRD2形成有助於募集至少一種TCR相關信號傳導分子之TCRM，且其中L1及L2為肽連接子。在一些實施例中，L1及/或L2為約5至約50個(例如約5-10、約10-15或約15-30個)胺基酸長。在一些實施例中，L1及L2具有相同長度。在一些實施例中，L1及L2具有相同胺基酸序列。在一些實施例中，L1及L2具有不同長度。在一些實施例中，L1及L2具有不同胺基酸序列。例示性雙特異性caTCR經展示於圖13A中。

【0155】 源自CODV-IgG之交叉雙可變域(CODV) (參見Steinmetz等人；mAbs (2016), 8(5): 867-878)可用作caTCR中之雙特異性抗原結合模組(圖13B)。CODV允許各Fv有相對無障礙抗原結合位點。用於融合重鏈及輕鏈可變區之各種連接子已經開發且最佳化以用於CODV-Ig，其可適用於構築具有CODV模組之雙特異性caTCR。然而，CODV模組之適當摺疊可受到挑戰，且用於CODV模組中之長連接子可為免疫原性之潛在來源且易受蛋白質裂解影響。

【0156】 在一些實施例中，caTCR包含：a)多特異性(例如雙特異性)抗原結合模組，其包含特異性地結合於第一靶抗原之第一Fv及特異性地結合於第二靶抗原之第二Fv；及b) TCRM，其包含含有第一TCR-TM之第一TCRD (TCRD1)，及含有第二TCR-TM之第二TCRD (TCRD2)；其中TCRM有助於募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，caTCR進一步包含C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>。

【0157】 在一些實施例中，caTCR包含：(i)包含N端至C端之第一多肽鏈：V<sub>H</sub>1-L1-V<sub>H</sub>2-C<sub>H</sub>1-TCRD1，及包含N端至C端之第二多肽鏈：V<sub>L</sub>2-L2-V<sub>L</sub>1-C<sub>L</sub>-TCRD2；或(ii)包含N端至C端之第一多肽鏈：V<sub>L</sub>1-L1-

$V_L2-C_L-TCRD1$ ，及包含N端至C端之第二多肽鏈： $V_H2-L2-V_H1-C_H1-TCRD2$ ，其中 $V_H1$ 及 $V_L1$ 形成特異性地結合於第一靶抗原之第一抗原結合域，且 $V_H2$ 及 $V_L2$ 形成特異性地結合於第二靶抗原之第二抗原結合域，其中 $TCRD1$ 及 $TCRD2$ 形成有助於募集至少一種TCR相關信號傳導分子之TCRM，且其中 $L1$ 及 $L2$ 為肽連接子。在一些實施例中， $L1$ 及/或 $L2$ 為約5至約50個(例如約5-20、約15-30或約30-50個)胺基酸長。在一些實施例中， $L1$ 及 $L2$ 具有相同長度。在一些實施例中， $L1$ 及 $L2$ 具有相同胺基酸序列。在一些實施例中， $L1$ 及 $L2$ 具有不同長度。在一些實施例中， $L1$ 及 $L2$ 具有不同胺基酸序列。例示性雙特異性caTCR經展示於圖13B中。

【0158】 源自scFv融合蛋白之雙特異性抗原結合模組(諸如Chen等人，mAbs 8(4): 761-774中所描述之彼等者)可用於雙特異性caTCR中(圖13C)。具有類似融合格式之雙特異性抗體之表現已展現此格式之適當摺疊及穩定性。用於將scFv融合至恆定域之各種連接子已經開發且最佳化以用於此等雙特異性抗體，其可適用於構築具有類似scFv融合域之雙特異性caTCR。然而，scFv之間的位阻可危害scFv與其靶抗原之結合。

【0159】 在一些實施例中，caTCR包含：a)多特異性(例如雙特異性)抗原結合模組，其包含特異性地結合於第一靶抗原之第一scFv及特異性地結合於第二靶抗原之第二scFv；及b) TCRM，其包含含有第一TCR-TM之第一TCRD (TCRD1)及含有第二TCR-TM之第二TCRD (TCRD2)；其中TCRM有助於募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，caTCR進一步包含 $C_H1$ 及 $C_L$ 。

【0160】 在一些實施例中，caTCR包含：(i)包含N端至C端之第一多肽鏈： $scFv1-L1-C_H1-TCRD1$ ，及包含N端至C端之第二多肽鏈：

scFv2-L2-C<sub>L</sub>-TCRD2；或(ii)包含N端至C端之第一多肽鏈：scFv2-L1-C<sub>H</sub>1-TCRD1，及包含N端至C端之第二多肽鏈：scFv1-L2-C<sub>L</sub>-TCRD2，其中scFv1特異性結合於第一靶抗原且scFv2特異性地結合於第二靶抗原，其中TCRD1及TCRD2形成有助於募集至少一種TCR相關信號傳導分子之TCRM，且L1及L2為肽連接子。在一些實施例中，L1及/或L2為約5至約50個(例如約5-10、約10-15或約15-30個)胺基酸長。在一些實施例中，L1及L2具有相同長度。在一些實施例中，L1及L2具有相同胺基酸序列。在一些實施例中，L1及L2具有不同長度。在一些實施例中，L1及L2具有不同胺基酸序列。例示性雙特異性caTCR經展示於圖13C中。

**【0161】** 源自IgG-scFv雙特異性抗體或Fab-scFv-Fc雙特異性抗體之雙特異性抗原結合模組可用於雙特異性caTCR中。在一種格式(圖13D)中，scFv連接於Fab之V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>，其使scFv有較大可撓性且因此使Fab更多地接近其靶抗原。然而，scFv-Fab模組可具有穩定性問題。在第二格式(圖13E)中，Fab融合至第一TCRD且scFv融合至第二TCRD。

**【0162】** 在一些實施例中，caTCR包含：a)多特異性(例如雙特異性)抗原結合模組，其包含特異性地結合於第一靶抗原之scFv及特異性地結合於第二靶抗原之Fab；及b) TCRM，其包含含有第一TCR-TM之第一TCRD (TCRD1)及含有第二TCR-TM之第二TCRD (TCRD2)；其中TCRM有助於募集至少一種TCR相關信號傳導分子。

**【0163】** 在一些實施例中，caTCR包含：(i)包含N端至C端之第一多肽鏈：scFv-L1-V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-TCRD1，及包含N端至C端之第二多肽鏈：V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-TCRD2；或(ii)包含N端至C端之第一多肽鏈：V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-TCRD1，及包含N端至C端之第二多肽鏈：scFv-L2-V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-TCRD2；其中scFv特異性地

結合於第一靶抗原，且V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>形成特異性地結合於第二靶抗原之第二抗原結合域，其中TCRD1及TCRD2形成有助於募集至少一種TCR相關信號傳導分子之TCRM，且其中L1及L2為肽連接子。在一些實施例中，L1及/或L2為約5至約50個(例如約5-10、約10-15或約15-30個)胺基酸長。例示性雙特異性caTCR經展示於圖13D中。

【0164】 在一些實施例中，caTCR包含：(i)含有N端至C端之第一多肽鏈：V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-L1-TCRD1、含有N端至C端之第二多肽鏈：V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1，及含有N端至C端之第三多肽鏈：scFv-L2-TCRD2；(ii)含有N端至C端之第一多肽鏈：V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-L1-TCRD1、含有N端至C端之第二多肽鏈：V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>，及含有N端至C端之第三多肽鏈：scFv-L2-TCRD2；(iii)含有N端至C端之第一多肽鏈：scFv-L1-TCRD1、含有N端至C端之第二多肽鏈：V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1，及含有N端至C端之第三多肽鏈：V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>-L2-TCRD2；或(iv)含有N端至C端之第一多肽鏈：scFv-L1-TCRD1、含有N端至C端之第二多肽鏈：V<sub>L</sub>-C<sub>L</sub>，及含有N端至C端之第三多肽鏈：V<sub>H</sub>-C<sub>H</sub>1-L2-TCRD2；其中scFv特異性地結合於第一靶抗原，且V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>形成特異性地結合於第二靶抗原之第二抗原結合域，其中TCRD1及TCRD2形成有助於募集至少一種TCR相關信號傳導分子之TCRM，且其中L1及L2為肽連接子。在一些實施例中，L1及/或L2為約5至約50個(例如約5-10、約10-15或約15-30個)胺基酸長。例示性雙特異性caTCR經展示於圖13E中。scFv與TCRD之間的肽連接子之長度及Fab與TCRD之間的肽連接子之長度可經最佳化，係因為其可影響scFv及Fab與其靶抗原之可接近性。

【0165】 多特異性caTCR之多特異性抗原結合模組可特異性地結合於靶抗原或抗原決定基之任何合適組合。在一些實施例中，多特異性抗原

結合模組特異性地結合於至少一個細胞表面抗原。在一些實施例中，至少一個細胞表面抗原係選自由以下組成之群：CD19、CD20、CD22、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPRC5D及FCRL5，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，多特異性抗原結合模組特異性地結合於至少一個肽/MHC複合體。在一些實施例中，至少一個肽/MHC複合體包含源自蛋白質之肽，該蛋白質選自由以下組成之群：WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、組蛋白H3.3及PSA，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，多特異性抗原結合模組特異性地結合於第一細胞表面抗原及第二細胞表面抗原。在一些實施例中，多特異性抗原結合模組特異性地結合於CD19及CD22。在一些實施例中，多特異性抗原結合模組特異性地結合於CD19及CD20。在一些實施例中，多特異性抗原結合模組特異性地結合於第一肽/MHC複合體及第二肽/MHC複合體。在一些實施例中，多特異性抗原結合模組特異性地結合細胞表面抗原及肽/MHC複合體。

### **嵌合協同刺激受體(CSR)構築體**

【0166】 本文所描述之配體特異性嵌合協同刺激受體(CSR)特異性地結合於靶配體(諸如細胞表面抗原或肽/MHC複合體)，且能夠在靶配體結合之後刺激表面上的功能性表現該CSR的免疫細胞。CSR包含提供配體結合特異性的配體結合模組、跨膜模組及允許刺激免疫細胞的協同刺激免疫細胞信號傳導模組。CSR缺乏功能性原代免疫細胞信號傳導序列。在一些實施例中，CSR缺乏任何原代免疫細胞信號傳導序列。在一些實施例中，CSR包含含有配體結合模組、跨膜模組及協同刺激信號傳導模組的單一多肽鏈。在一些實施例中，CSR包含第一多肽鏈及第二多肽鏈，其中該

第一與第二多肽鏈一起形成配體結合模組、跨膜模組及協同刺激信號傳導模組。在一些實施例中，第一及第二多肽鏈為分開的多肽鏈，且CSR為多聚體，諸如二聚體。在一些實施例中，第一與第二多肽鏈共價連接，諸如藉由肽鍵或藉由另一種化學鍵(諸如二硫鍵)連接。在一些實施例中，第一多肽鏈與第二多肽鏈藉由至少一個二硫鍵連接。在一些實施例中，CSR在caTCR加CSR免疫細胞中的表現為可誘導性。在一些實施例中，在經由caTCR之信號傳導後，CSR在caTCR加CSR免疫細胞中的表現為可誘導性。

**【0167】** 用於本發明之CSR之協同刺激免疫細胞信號傳導域之實例包括T細胞受體(TCR)之協同受體的細胞質序列，以及此等序列之任何衍生物或變異體及具有相同功能性能力之任何合成序列，該T細胞受體可與caTCR相配合起作用以在caTCR參與後引發信號轉導。

**【0168】** 在一些情形下，經由單獨的TCR產生之信號不足以完全活化T細胞且亦需要次級或協同刺激信號。因此，在一些實施例中，T細胞活化係藉由兩種不同類別之胞內信號傳導序列介導：經由TCR引發抗原依賴性一級活化之彼等序列(在本文中被稱作「原代T細胞信號傳導序列」)；及以抗原非依賴性方式起作用以提供次級或協同刺激信號之彼等序列(在本文中被稱作「協同刺激T細胞信號傳導序列」)。

**【0169】** 以刺激方式起作用之原代免疫細胞信號傳導序列可含有信號傳導基元，其被稱為基於免疫受體酪胺酸之活化基元或ITAM。含ITAM之原代免疫細胞信號傳導序列之實例包括衍生自TCR $\zeta$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b及CD66d之彼等序列。「功能性」原代免疫細胞信號傳導序列為在可操作地耦接於

適當受體時能夠轉導免疫細胞活化信號的序列。可包含原代免疫細胞信號傳導序列之片段或變異體之「非功能性」原代免疫細胞信號傳導序列不能轉導免疫細胞活化信號。本文所描述之CSR缺乏功能性原代免疫細胞信號傳導序列，諸如包含ITAM之功能性信號傳導序列。在一些實施例中，CSR缺乏任何原代免疫細胞信號傳導序列。

【0170】 協同刺激免疫細胞信號傳導序列可為協同刺激分子之胞內域的一部分，該協同刺激分子包括(例如) CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、PD-1、ICOS、淋巴細胞功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、與CD83特異性結合的配體，及其類似物。

【0171】 在一些實施例中，靶配體為細胞表面抗原。在一些實施例中，靶配體為肽/MHC複合體。在一些實施例中，靶配體與表現於相同免疫細胞中之caTCR之靶抗原相同。在一些實施例中，靶配體與表現於相同免疫細胞中之caTCR之靶抗原不同。在一些實施例中，靶配體為呈遞靶抗原之細胞之表面上所呈遞之分子。舉例而言，在一些實施例中，caTCR之靶抗原為癌細胞上所呈遞之癌症相關抗原，且靶配體為表現於癌細胞之表面上之遍在分子，諸如整合素。在一些實施例中，靶配體為疾病相關配體。在一些實施例中，靶配體為癌症相關配體。在一些實施例中，癌症相關配體為例如CD19、CD20、CD22、CD47、IL4、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPRC5D或FCRL5。在一些實施例中，癌症相關配體為肽/MHC複合體，其包含源自包括WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A及PSA之蛋白質的肽。在一些實施例中，靶配體為病毒相關配體。在一些實施例中，靶配體為免疫檢查點分子。在一些

實施例中，免疫檢查點分子包括PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、ICOSL、B7-H3、B7-H4、HVEM、4-1BBL、OX40L、CD70、CD40及GAL9。在一些實施例中，靶配體為細胞凋亡分子。在一些實施例中，細胞凋亡分子包括FasL、FasR、TNFR1及TNFR2。

**【0172】** 在一些實施例中，配體結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗體部分特異性地結合細胞表面抗原，該細胞表面抗原包括(但不限於) CD19、CD20、CD22、CD47、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPRC5D及FCRL5。在一些實施例中，抗體部分特異性地結合肽/MHC複合體，其中肽源自蛋白質，該蛋白質包括(但不限於) WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A及PSA。在一些實施例中，抗體部分包含對CD19具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2017066136A2)。在一些實施例中，抗體部分包含對CD19具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (例如，V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及/或V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 59之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；或其中所含之CDR)。在一些實施例中，抗體部分包含對CD20具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (例如，V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 60之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及/或V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 61之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；或其中所含之CDR)。在一些實施例中，抗體部分包含對CD22具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見



例如2018年3月30日申請之USSN 62/650,955)。在一些實施例中，抗體部分包含對CD22具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(例如，V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 101之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及/或V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 102之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；或其中所含之CDR)。在一些實施例中，抗體部分包含對GPC3具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(參見例如2017年4月26日申請之USSN 62/490,586)。在一些實施例中，抗體部分包含對GPC3具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(例如，V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 64之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及/或V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 65之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；或其中所含之CDR)。在一些實施例中，抗體部分包含對ROR1具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(參見例如WO2016/187220及WO2016/187216)。在一些實施例中，抗體部分包含對ROR2具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(參見例如WO2016/142768)。在一些實施例中，抗體部分包含對BCMA具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(參見例如WO2016/090327及WO2016/090320)。在一些實施例中，抗體部分包含對GPC5D具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(參見例如WO2016/090329及WO2016/090312)。在一些實施例中，抗體部分包含對FCRL5具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(參見例如WO2016/090337)。在一些實施例中，抗體部分包含對WT-1具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(參見例如

WO2012/135854、WO2015/070078及WO2015/070061)。在一些實施例中，抗體部分包含對AFP具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(參見例如WO2016/161390)。在一些實施例中，抗體部分包含對HPV16-E7具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(參見例如WO2016/182957)。在一些實施例中，抗體部分包含對NY-ESO-1具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(參見例如WO2016/210365)。在一些實施例中，抗體部分包含對PRAME具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(參見例如WO2016/191246)。在一些實施例中，抗體部分包含對EBV-LMP2A具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(參見例如WO2016/201124)。在一些實施例中，抗體部分包含對KRAS具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(參見例如WO2016/154047)。在一些實施例中，抗體部分包含對PSA具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(參見例如WO2017/015634)。

【0173】 在一些實施例中，配體結合模組為(或衍生自)用於靶配體之受體之胞外域的全部或一部分。在一些實施例中，受體包括例如FasR、TNFR1、TNFR2、PD-1、CD28、CTLA-4、ICOS、BTLA、KIR、LAG-3、4-1BB、OX40、CD27及TIM-3。

【0174】 在一些實施例中，跨膜模組包含一或多個跨膜域，其衍生自例如CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154。

【0175】 在一些實施例中，協同刺激信號傳導模組包含免疫細胞協

同刺激分子之胞內域之全部或一部分、基本上由其組成或由其組成，該免疫細胞協同刺激分子包括(例如) CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴細胞功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、與CD83特異性結合的配體，及其類似物。在一些實施例中，協同刺激信號傳導分子包含CD28之片段，其包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列。在一些實施例中，協同刺激信號傳導分子包含CD28之片段，其包含SEQ ID NO: 52之胺基酸序列。在一些實施例中，協同刺激信號傳導分子包含4-1BB之片段，其包含SEQ ID NO: 53之胺基酸序列。在一些實施例中，協同刺激信號傳導分子包含4-1BB之片段，其包含SEQ ID NO: 54之胺基酸序列。在一些實施例中，協同刺激信號傳導分子包含CD8之片段，其包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列。在一些實施例中，協同刺激信號傳導分子包含OX40之片段，其包含SEQ ID NO: 55之胺基酸序列。在一些實施例中，協同刺激信號傳導分子包含OX40之片段，其包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列。在一些實施例中，協同刺激信號傳導分子包含CD27之片段，其包含SEQ ID NO: 86或87之胺基酸序列。在一些實施例中，協同刺激信號傳導分子包含CD30之片段，其包含SEQ ID NO: 88或89之胺基酸序列。

【0176】 在一些實施例中，CSR進一步包含在配體結合模組、跨膜模組及協同刺激信號傳導模組中之任一者之間的間隔模組。在一些實施例中，間隔模組包含連接兩個CSR模組之一或多個肽連接子。在一些實施例中，間隔模組包含長度在約5至約70個胺基酸之間(諸如約5、10、15、20、25、30、35、40、45、50、55、60、65或70中之任一者，包括此等數值之間的任何範圍)的一或多個肽連接子。

【0177】 在一些實施例中，配體結合模組(諸如抗體部分)以下列各者特異性地結合於靶抗原：a)為其對其他分子之結合親和力之至少約10倍(包括例如至少約10、20、30、40、50、75、100、200、300、400、500、750、1000或更大倍之任一者)的親和力；或b)不超過其用於結合於其他分子之 $K_d$ 的約1/10(諸如不超過約1/10、1/20、1/30、1/40、1/50、1/75、1/100、1/200、1/300、1/400、1/500、1/750、1/1000或更小中之任一者)的 $K_d$ 。結合親和力可藉由此項技術中已知之方法測定，諸如ELISA、螢光活化細胞分選(FACS)分析或放射免疫沈澱分析(RIA)。 $K_d$ 可藉由此項技術中已知之方法測定，諸如利用例如Biacore儀器之表面電漿子共振(SPR)檢定，或利用例如Sapidyne儀器之動力學排除分析(KinExA)。

【0178】 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性地結合於靶配體(諸如細胞表面抗原或肽/MHC複合體)，其包含：a)靶配體結合域(LBD)；b)跨膜域；及c)協同刺激信號傳導域，其中CSR能夠在靶配體結合之後刺激表面上的功能性表現該CSR的免疫細胞。在一些實施例中，靶配體為細胞表面抗原。在一些實施例中，靶配體為肽/MHC複合體。在一些實施例中，靶配體與表現於相同免疫細胞中之 $\alpha$ TCR之靶抗原相同。在一些實施例中，靶配體與表現於相同免疫細胞中之 $\alpha$ TCR之靶抗原不同。在一些實施例中，靶配體為疾病相關配體。在一些實施例中，靶配體為癌症相關配體。在一些實施例中，癌症相關配體為例如CD19、CD20、CD22、CD47、IL4、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPC5D或FCRL5。在一些實施例中，癌症相關配體為肽/MHC複合體，其包含源自包括WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A及

PSA之蛋白質的肽。在一些實施例中，靶配體為病毒相關配體。在一些實施例中，靶配體為免疫檢查點分子。在一些實施例中，免疫檢查點分子包括PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、ICOSL、B7-H3、B7-H4、HVEM、4-1BBL、OX40L、CD70、CD40及GAL9。在一些實施例中，靶配體為細胞凋亡分子。在一些實施例中，細胞凋亡分子包括FasL、FasR、TNFR1及TNFR2。在一些實施例中，配體結合域為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，配體結合域為(或衍生自)用於靶配體之受體之胞外域的全部或一部分。在一些實施例中，受體包括例如FasR、TNFR1、TNFR2、PD-1、CD28、CTLA-4、ICOS、BTLA、KIR、LAG-3、4-1BB、OX40、CD27及TIM-3。在一些實施例中，跨膜域包含衍生自跨膜蛋白之跨膜域，該跨膜蛋白包括(例如) CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154。在一些實施例中，CSR包含跨膜蛋白之片段(fTMP)，其中fTMP包含CSR跨膜域。在一些實施例中，協同刺激信號傳導域包含免疫細胞協同刺激分子之胞內域之全部或一部分、基本上由其組成或由其組成，該免疫細胞協同刺激分子包括(例如) CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴細胞功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、與CD83特異性結合的配體，及其類似物。在一些實施例中，CSR包含免疫細胞協同刺激分子之片段(fCSM)，其中fCSM包含CSR跨膜域及CSR協同刺激信號傳導域。在一些實施例中，CSR進一步包含在配體結合域、跨膜域及協同刺激信號傳導域中之任一者之間的間隔域。在一些實施例中，間隔域包含連接兩個

CSR域之肽連接子。

【0179】 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性結合於靶配體，其包含：a)靶配體結合域；b)跨膜域；及c)協同刺激信號傳導域，其中靶配體為細胞表面抗原，且其中CSR能夠在靶配體結合之後刺激表面上的功能性表現該CSR的免疫細胞。在一些實施例中，靶配體與表現於相同免疫細胞中之 $\alpha$ TCR之靶抗原相同。在一些實施例中，靶配體與表現於相同免疫細胞中之 $\alpha$ TCR之靶抗原不同。在一些實施例中，靶配體為疾病相關配體。在一些實施例中，靶配體為癌症相關配體。在一些實施例中，癌症相關配體為例如CD19、CD20、CD22、CD47、IL4、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPC5D或FCRL5。在一些實施例中，靶配體為病毒相關配體。在一些實施例中，靶配體為免疫檢查點分子。在一些實施例中，免疫檢查點分子包括PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、ICOSL、B7-H3、B7-H4、HVEM、4-1BBL、OX40L、CD70、CD40及GAL9。在一些實施例中，靶配體為細胞凋亡分子。在一些實施例中，細胞凋亡分子包括FasL、FasR、TNFR1及TNFR2。在一些實施例中，配體結合域為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv(scFv)。在一些實施例中，配體結合域為(或源自)用於靶配體之受體之胞外域的全部或一部分。在一些實施例中，受體包括例如FasR、TNFR1、TNFR2、PD-1、CD28、CTLA-4、ICOS、BTLA、KIR、LAG-3、4-1BB、OX40、CD27及TIM-3。在一些實施例中，跨膜域包含源自跨膜蛋白之跨膜域，該跨膜蛋白包括(例如) CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154。在一些實施例中，CSR包含跨

膜蛋白之片段(fTMP)，其中fTMP包含CSR跨膜域。在一些實施例中，協同刺激信號傳導域包含免疫細胞協同刺激分子之胞內域之全部或一部分，基本上由其組成或由其組成，該免疫細胞協同刺激分子包括(例如) CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴細胞功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、與CD83特異性結合的配體，及其類似物。在一些實施例中，CSR包含免疫細胞協同刺激分子之片段(fCSM)，其中fCSM包含CSR跨膜域及CSR協同刺激信號傳導域。在一些實施例中，CSR進一步包含在配體結合域、跨膜域及協同刺激信號傳導域中之任一者之間的間隔域。在一些實施例中，間隔域包含連接兩個CSR域之肽連接子。

【0180】 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性結合於靶配體，其包含：a)靶配體結合域；b)跨膜域；及c)協同刺激信號傳導域，其中靶配體為肽/MHC複合體，且其中CSR能夠在靶配體結合之後刺激表面上的功能性表現該CSR的免疫細胞。在一些實施例中，靶配體與表現於相同免疫細胞中之 $\alpha$ TCR之靶抗原相同。在一些實施例中，靶配體與表現於相同免疫細胞中之 $\alpha$ TCR之靶抗原不同。在一些實施例中，靶配體為疾病相關配體。在一些實施例中，靶配體為癌症相關配體。在一些實施例中，癌症相關配體為肽/MHC複合體，其包含源自包括WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A及PSA之蛋白質的肽。在一些實施例中，靶配體為病毒相關配體。在一些實施例中，配體結合域為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv(scFv)。在一些實施例中，跨膜域包含源自跨膜蛋白之跨膜域，該跨膜蛋白包括(例如) CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、

CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154。在一些實施例中，CSR包含跨膜蛋白之片段(fTMP)，其中fTMP包含CSR跨膜域。在一些實施例中，協同刺激信號傳導域包含免疫細胞協同刺激分子之胞內域之全部或一部分、基本上由其組成或由其組成，該免疫細胞協同刺激分子包括(例如) CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴細胞功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、與CD83特異性結合的配體，及其類似物。在一些實施例中，CSR包含免疫細胞協同刺激分子之片段(fCSM)，其中fCSM包含CSR跨膜域及CSR協同刺激信號傳導域。在一些實施例中，CSR進一步包含在配體結合域、跨膜域及協同刺激信號傳導域中之任一者之間的間隔域。在一些實施例中，間隔域包含連接兩個CSR域之肽連接子。

【0181】 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性結合於靶配體(諸如細胞表面抗原或肽/MHC複合體)，其包含：a)靶配體結合域；b)跨膜域；及c)協同刺激信號傳導域，其中配體結合域為抗體部分，且其中CSR能夠在靶配體結合之後刺激表面上的功能性表現該CSR的免疫細胞。在一些實施例中，靶配體為細胞表面抗原。在一些實施例中，靶配體為肽/MHC複合體。在一些實施例中，靶配體與表現於相同免疫細胞中之caTCR之靶抗原相同。在一些實施例中，靶配體與表現於相同免疫細胞中之caTCR之靶抗原不同。在一些實施例中，靶配體為疾病相關配體。在一些實施例中，靶配體為癌症相關配體。在一些實施例中，癌症相關配體為例如CD19、CD20、CD22、CD47、IL4、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPC5D或FCRL5。在一些實施例中，癌症相關配體為肽/MHC



複合體，其包含源自包括 WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A 及 PSA 之蛋白質的肽。在一些實施例中，靶配體為病毒相關配體。在一些實施例中，靶配體為免疫檢查點分子。在一些實施例中，免疫檢查點分子包括 PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、ICOSL、B7-H3、B7-H4、HVEM、4-1BBL、OX40L、CD70、CD40 及 GAL9。在一些實施例中，靶配體為細胞凋亡分子。在一些實施例中，細胞凋亡分子包括 FasL、FasR、TNFR1 及 TNFR2。在一些實施例中，抗體部分為 Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv 或單鏈 Fv (scFv)。在一些實施例中，跨膜域包含源自跨膜蛋白之跨膜域，該跨膜蛋白包括(例如) CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137 或 CD154。在一些實施例中，CSR 包含跨膜蛋白之片段(fTMP)，其中 fTMP 包含 CSR 跨膜域。在一些實施例中，協同刺激信號傳導域包含免疫細胞協同刺激分子之胞內域之全部或一部分、基本上由其組成或由其組成，該免疫細胞協同刺激分子包括(例如) CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴細胞功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、與 CD83 特異性結合的配體，及其類似物。在一些實施例中，CSR 包含免疫細胞協同刺激分子之片段(fCSM)，其中 fCSM 包含 CSR 跨膜域及 CSR 協同刺激信號傳導域。在一些實施例中，CSR 進一步包含在配體結合域、跨膜域及協同刺激信號傳導域中之任一者之間的間隔域。在一些實施例中，間隔域包含連接兩個 CSR 域之肽連接子。在一些實施例中，根據表 3 中所列之 CSR 中之任一者選擇 CSR 域。

表3

| CSR ID | LBD後之間隔子<br>(SEQ ID NO) | fTMP<br>(SEQ ID NO) | fCSM<br>(SEQ ID NO) | 全CSR域<br>(無LBD；SEQ ID NO) |
|--------|-------------------------|---------------------|---------------------|---------------------------|
| 1      | 103                     | -                   | 51                  | 90                        |
| 2      | 104                     | 57                  | 54                  | 91                        |
| 3      | 104                     | -                   | 53                  | 92                        |
| 4      | 104                     | 57                  | 87                  | 93                        |
| 5      | 104                     | -                   | 86                  | 94                        |
| 6      | 104                     | 57                  | 89                  | 95                        |
| 7      | 104                     | -                   | 88                  | 96                        |
| 8      | 104                     | 57                  | 56                  | 97                        |
| 9      | 104                     | -                   | 55                  | 98                        |

【0182】 在一些實施例中，CSR包含CD28之fCSM。在一些實施例中，CSR包含：a)靶配體結合域；b) CD8跨膜域，其包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列；及c) CD28之片段，其包含SEQ ID NO: 52之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR包含：a)靶配體結合域；及b) CD28之片段，其包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR包含：靶配體結合域及包含SEQ ID NO: 90之胺基酸序列之CSR域。

【0183】 在一些實施例中，CSR包含4-1BB之fCSM。在一些實施例中，CSR包含：a)靶配體結合域；b) CD8跨膜域，其包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列；及c) 4-1BB之片段，其包含SEQ ID NO: 54之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR包含：a)靶配體結合域；及b) 4-1BB之片段，其包含SEQ ID NO: 53之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR包含：靶配體結合域及包含SEQ ID NO: 91或92之胺基酸序列之CSR域。

【0184】 在一些實施例中，CSR包含CD27之fCSM。在一些實施例中，CSR包含：a)靶配體結合域；b) CD8跨膜域，其包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列；及c) CD27之片段，其包含SEQ ID NO: 87之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR包含：a)靶配體結合域；及b) CD27之片段，其包含SEQ ID NO: 86之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR包含：靶配

體結合域及包含SEQ ID NO: 93或94之胺基酸序列之CSR域。

【0185】 在一些實施例中，CSR包含CD30之fCSM。在一些實施例中，CSR包含：a)靶配體結合域；b)CD8跨膜域，其包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列；及c) CD30之片段，其包含SEQ ID NO: 89之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR包含：a)靶配體結合域；及b)CD30之片段，其包含SEQ ID NO: 88之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR包含：靶配體結合域及包含SEQ ID NO: 95或96之胺基酸序列之CSR域。

【0186】 在一些實施例中，CSR包含OX40之fCSM。在一些實施例中，CSR包含：a)靶配體結合域；b) CD8跨膜域，其包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列；及c) OX40之片段，其包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR包含：a)靶配體結合域；及b) OX40之片段，其包含SEQ ID NO: 55之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR包含：靶配體結合域及包含SEQ ID NO: 97或98之胺基酸序列之CSR域。

【0187】 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性地結合於靶配體(諸如細胞表面抗原或肽/MHC複合體)，其包含：a)靶配體結合域；b)跨膜域；及c)協同刺激信號傳導域，其中配體結合域為(或衍生自)用於靶配體之受體之胞外域的全部或一部分，且其中CSR能夠在靶配體結合之後刺激表面上的功能性表現該CSR的免疫細胞。在一些實施例中，靶配體為細胞表面抗原。在一些實施例中，靶配體與表現於相同免疫細胞中之caTCR之靶抗原相同。在一些實施例中，靶配體與表現於相同免疫細胞中之caTCR之靶抗原不同。在一些實施例中，靶配體為疾病相關配體。在一些實施例中，靶配體為癌症相關配體。在一些實施例中，癌症相關配體為例如CD19、CD20、CD22、CD47、IL4、GPC-3、ROR1、ROR2、

BCMA、GPRC5D或FCRL5。在一些實施例中，靶配體為免疫檢查點分子。在一些實施例中，免疫檢查點分子包括PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、ICOSL、B7-H3、B7-H4、HVEM、4-1BBL、OX40L、CD70、CD40及GAL9。在一些實施例中，靶配體為細胞凋亡分子。在一些實施例中，細胞凋亡分子包括FasL、FasR、TNFR1及TNFR2。在一些實施例中，靶配體受體包括例如FasR、TNFR1、TNFR2、PD-1、CD28、CTLA-4、ICOS、BTLA、KIR、LAG-3、4-1BB、OX40、CD27及TIM-3。在一些實施例中，跨膜域包含衍生自例如CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154之跨膜域。在一些實施例中，協同刺激信號傳導域包含免疫細胞協同刺激分子之胞內域之全部或一部分、基本上由其組成或由其組成，該免疫細胞協同刺激分子包括(例如) CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴細胞功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、LIGHT、NKG2C、B7-H3、與CD83特異性結合的配體，及其類似物。在一些實施例中，CSR進一步包含在配體結合域、跨膜域及協同刺激信號傳導域中之任一者之間的時間域。在一些實施例中，間隔域包含連接兩個CSR域之肽連接子。

**【0188】** 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性地結合於CD19，該CSR包含：a) scFv，其包含具有SEQ ID NO: 58之胺基酸序列之V<sub>H</sub>域及具有SEQ ID NO: 59之胺基酸序列之V<sub>L</sub>域；b) CD28之片段，其包含SEQ ID NO: 51或52之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，scFv自胺基端至羧基端包含V<sub>L</sub>域、包含SEQ ID NO: 76之胺基酸序列之肽連接子及V<sub>H</sub>域。在一些實施例

中，scFv包含SEQ ID NO: 77之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，CD28之片段包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR包含SEQ ID NO: 90之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR自胺基端至羧基端包含scFv、包含SEQ ID NO: 103之肽連接子及CD28之片段。在一些實施例中，CSR包含SEQ ID NO: 80之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。

【0189】 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性地結合於CD20，該CSR包含：a) scFv，其包含具有SEQ ID NO: 60之胺基酸序列之V<sub>H</sub>域及具有SEQ ID NO: 61之胺基酸序列之V<sub>L</sub>域；及b) CD28之片段，其包含SEQ ID NO: 51或52之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，scFv自胺基端至羧基端包含V<sub>L</sub>域、包含SEQ ID NO: 76之胺基酸序列之肽連接子及V<sub>H</sub>域。在一些實施例中，scFv包含SEQ ID NO: 78之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，CD28之片段包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR自胺基端至羧基端包含scFv、包含SEQ ID NO: 103之肽連接子及CD28之片段。在一些實施例中，CSR包含SEQ ID NO: 81之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。

【0190】 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性地結合於GPC3，該CSR包含：a) scFv，其包含具有SEQ ID NO: 64之胺基酸序列之V<sub>H</sub>域及具有SEQ ID NO: 65之胺基酸序列之V<sub>L</sub>域；b) CD28之片段，其包含SEQ ID NO: 51或52之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由

該胺基酸序列組成。在一些實施例中，scFv自胺基端至羧基端包含V<sub>L</sub>域、包含SEQ ID NO: 76之胺基酸序列之肽連接子及V<sub>H</sub>域。在一些實施例中，scFv包含SEQ ID NO: 79之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，CD28之片段包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR自胺基端至羧基端包含scFv、包含SEQ ID NO: 103之肽連接子及CD28之片段。在一些實施例中，CSR包含SEQ ID NO: 82之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。

**【0191】** 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性結合於CD20，該CSR包含：a) scFv，其包含具有SEQ ID NO: 60之胺基酸序列的V<sub>H</sub>域及具有SEQ ID NO: 61之胺基酸序列的V<sub>L</sub>域；及b) CD28之片段，其包含SEQ ID NO: 51或52之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，scFv自胺基端至羧基端包含V<sub>L</sub>域、包含SEQ ID NO: 76之胺基酸序列之肽連接子及V<sub>H</sub>域。在一些實施例中，scFv包含SEQ ID NO: 78之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，CD28之片段包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR自胺基端至羧基端包含scFv、包含SEQ ID NO: 103之肽連接子及CD28之片段。在一些實施例中，CSR包含SEQ ID NO: 81之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。

**【0192】** 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性地結合於CD19，該CSR包含：a) scFv，其包含具有SEQ ID NO: 58之胺基酸序列之V<sub>H</sub>域及具有SEQ ID NO: 59之胺基酸序列之V<sub>L</sub>域；b) 4-1BB之片段，其

包含SEQ ID NO: 53或54之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，scFv自胺基端至羧基端包含V<sub>L</sub>域、包含SEQ ID NO: 76之胺基酸序列之肽連接子及V<sub>H</sub>域。在一些實施例中，4-1BB之片段包含SEQ ID NO: 53之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR自胺基端至羧基端包含scFv、包含SEQ ID NO: 104之肽連接子及4-1BB之片段。

**【0193】** 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性結合於CD19，該CSR包含：a) scFv，其包含具有SEQ ID NO: 58之胺基酸序列的V<sub>H</sub>域及具有SEQ ID NO: 59之胺基酸序列的V<sub>L</sub>域；b) CD8之片段，其包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及c) 4-1BB之片段，其包含SEQ ID NO: 54之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，scFv自胺基端至羧基端包含V<sub>L</sub>域、包含SEQ ID NO: 76之胺基酸序列之肽連接子及V<sub>H</sub>域。在一些實施例中，CSR自胺基端至羧基端包含scFv、包含SEQ ID NO: 104之肽連接子、CD8之片段及4-1BB之片段。

**【0194】** 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性結合於CD19，該CSR包含：a) scFv，其包含具有SEQ ID NO: 58之胺基酸序列的V<sub>H</sub>域及具有SEQ ID NO: 59之胺基酸序列的V<sub>L</sub>域；b) CD8之片段，其包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及c) OX40之片段，其包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，scFv自胺基端至羧基端包含V<sub>L</sub>域、包含SEQ ID NO: 76之胺基酸序列之肽連接子及V<sub>H</sub>域。在一些實施例中，CSR自胺基端至羧基端包含

scFv、包含SEQ ID NO: 104之肽連接子、CD8之片段及OX40之片段。

【0195】 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性結合於CD19，該CSR包含：a) scFv，其包含具有SEQ ID NO: 58之胺基酸序列的V<sub>H</sub>域及具有SEQ ID NO: 59之胺基酸序列的V<sub>L</sub>域；及b) OX40之片段，其包含SEQ ID NO: 56或57之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，scFv自胺基端至羧基端包含V<sub>L</sub>域、包含SEQ ID NO: 76之胺基酸序列之肽連接子及V<sub>H</sub>域。在一些實施例中，OX40之片段包含SEQ ID NO: 56之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR自胺基端至羧基端包含scFv、包含SEQ ID NO: 104之肽連接子及OX40之片段。

【0196】 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性結合於CD19，該CSR包含：a) scFv，其包含具有SEQ ID NO: 58之胺基酸序列的V<sub>H</sub>域及具有SEQ ID NO: 59之胺基酸序列的V<sub>L</sub>域；b) CD8之片段，其包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及c) CD27之片段，其包含SEQ ID NO: 87之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，scFv自胺基端至羧基端包含V<sub>L</sub>域、包含SEQ ID NO: 76之胺基酸序列之肽連接子及V<sub>H</sub>域。在一些實施例中，CSR自胺基端至羧基端包含scFv、包含SEQ ID NO: 104之肽連接子、CD8之片段及CD27之片段。

【0197】 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性結合於CD19，該CSR包含：a) scFv，其包含具有SEQ ID NO: 58之胺基酸序列的V<sub>H</sub>域及具有SEQ ID NO: 59之胺基酸序列的V<sub>L</sub>域；及b) CD27之片段，其包含SEQ ID NO: 86或87之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或



由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，scFv自胺基端至羧基端包含V<sub>L</sub>域、包含SEQ ID NO: 76之胺基酸序列之肽連接子及V<sub>H</sub>域。在一些實施例中，CD27之片段包含SEQ ID NO: 86之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR自胺基端至羧基端包含scFv、包含SEQ ID NO: 104之肽連接子及CD27之片段。

【0198】 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性結合於CD19，該CSR包含：a) scFv，其包含具有SEQ ID NO: 58之胺基酸序列的V<sub>H</sub>域及具有SEQ ID NO: 59之胺基酸序列的V<sub>L</sub>域；b) CD8之片段，其包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及c) CD30之片段，其包含SEQ ID NO: 89之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，scFv自胺基端至羧基端包含V<sub>L</sub>域、包含SEQ ID NO: 76之胺基酸序列之肽連接子及V<sub>H</sub>域。在一些實施例中，CSR自胺基端至羧基端包含scFv、包含SEQ ID NO: 104之肽連接子、CD8之片段及CD30之片段。

【0199】 在一些實施例中，本文所描述之CSR特異性結合於CD19，該CSR包含：a) scFv，其包含具有SEQ ID NO: 58之胺基酸序列的V<sub>H</sub>域及具有SEQ ID NO: 59之胺基酸序列的V<sub>L</sub>域；及b) CD30之片段，其包含SEQ ID NO: 88或89之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，scFv自胺基端至羧基端包含V<sub>L</sub>域、包含SEQ ID NO: 76之胺基酸序列之肽連接子及V<sub>H</sub>域。在一些實施例中，CD30之片段包含SEQ ID NO: 88之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR自胺基端至羧基端包含scFv、包含SEQ ID NO: 104之肽連接子及CD30之片段。

【0200】 在一些實施例中，CSR在caTCR加CSR免疫細胞中的表現為可誘導性。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞包含編碼CSR之核酸序列，其可操作地連接於誘導性啟動子，包括本文所描述之誘導性啟動子中之任一者。在一些實施例中，在經由caTCR之信號傳導後，CSR在caTCR加CSR免疫細胞中的表現為可誘導性。在一些此類實施例中，caTCR加CSR免疫細胞包含編碼CSR之核酸序列，其回應於經由caTCR之信號傳導而可操作地連接於啟動子或調節元件。在一些實施例中，編碼CSR之核酸序列可操作地連接於活化T細胞(NFAT)衍生之啟動子之核因子。在一些實施例中，NFAT衍生之啟動子為NFAT衍生之最小啟動子(參見例如 Durand, D 等人, *Molec. Cell. Biol.* 8, 1715-1724 (1988) ; Clipstone, NA 、 Crabtree, GR. *Nature.* 1992 357(6380): 695-7 ; Chmielewski, M.等人. *Cancer research* 71.17 (2011): 5697-5706 ; 及 Zhang, L.等人. *Molecular therapy* 19.4 (2011): 751-759)。在一些實施例中，NFAT衍生之啟動子包含SEQ ID NO: 85之核苷酸序列。在一些實施例中，編碼CSR之核酸序列可操作地連接於IL-2啟動子。

### 分泌性次級效應子(SSE)構築體

【0201】 在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞(諸如T細胞)能夠分泌分泌性次級效應子(SSE)。此類免疫細胞在本文中被稱作「caTCR加CSR及SSE免疫細胞」。SSE增強藉由SSE經功能性表現於其中及自其分泌之caTCR加CSR及SSE免疫細胞介導之免疫反應。在一些實施例中，SSE能夠將其他免疫細胞(諸如旁觀者T細胞或NK細胞)重定向於靶疾病細胞(諸如靶癌細胞)。在一些實施例中，SSE為靶向免疫細胞(諸如T細胞或NK細胞)及疾病細胞(諸如癌細胞)之多特異性抗體(諸如雙特異性抗體)。在一

些實施例中，SSE保護caTCR加CSR及SSE免疫細胞免受免疫抑制環境(諸如免疫抑制腫瘤環境)影響。在一些實施例中，SSE提供caTCR加CSR及SSE免疫細胞上之刺激受體之自分泌活化。在一些實施例中，SSE為外源性生長因子或刺激細胞介素。在一些實施例中，SSE在caTCR加CSR及SSE免疫細胞中的表現為可誘導性。在一些實施例中，在經由caTCR之信號傳導後，SSE在caTCR加CSR及SSE免疫細胞中的表現為可誘導性。

**【0202】** 在一些實施例中，SSE為靶向T細胞及疾病細胞之多特異性抗體(諸如雙特異性抗體)。在一些實施例中，SSE包含特異性地結合於T細胞之表面抗原之抗體部分。在一些實施例中，T細胞表面抗原為CD。在一些實施例中，SSE包含特異性地結合於疾病相關抗原(諸如癌症相關抗原)之抗體部分。在一些實施例中，疾病相關抗原為疾病細胞(諸如癌細胞)之表面抗原。在一些實施例中，疾病相關抗原為磷脂肌醇蛋白聚醣-3 (GPC3)、CD47、黏蛋白-16 (MUC16)、CD19、CD20、CD22、EpCAM、EGFR、HER2、CEA、PSMA、AFP、PSA、BCMA、FCRL5、NY-ESO、HPV16或FoxP3，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，SSE為選自由以下組成之群的多特異性抗體：串聯scFv、雙功能抗體(Db)、單鏈雙功能抗體(scDb)、雙親和力再靶向(DART)抗體及雙可變域(DVD)抗體。在一些實施例中，SSE為雙特異性抗體。在一些實施例中，SSE為串聯scFv，其包含靶向T細胞表面抗原之第一scFv及靶向疾病相關抗原之第二scFv。

**【0203】** 在一些實施例中，SSE為串聯scFv，其包含靶向CD3之第一scFv及靶向疾病相關抗原之第二scFv。在一些實施例中，疾病相關抗原為GPC3、CD47、MUC16、CD19、CD20、CD22、EpCAM、EGFR、

HER2、CEA、PSMA、AFP、PSA、BCMA、FCRL5、NY-ESO、HPV16或FoxP3，包括其變異體或突變體。

【0204】 在一些實施例中，SSE為串聯scFv，其包含靶向CD3之第一scFv及靶向GPC3之第二scFv。在一些實施例中，第二scFv包含：V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 64之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 65之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，V<sub>H</sub>域處於V<sub>L</sub>域之胺基端。在一些實施例中，V<sub>L</sub>域處於V<sub>H</sub>域之胺基端。在一些實施例中，第二scFv包含SEQ ID NO: 79之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。在一些實施例中，第一scFv處於第二scFv之胺基端。在一些實施例中，第二scFv處於第一scFv之胺基端。在一些實施例中，SSE包含SEQ ID NO: 105之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成。

【0205】 在一些實施例中，SSE為串聯scFv，其包含靶向CD3之第一scFv及靶向CD47之第二scFv。在一些實施例中，SSE為串聯scFv，其包含靶向CD3之第一scFv及靶向MUC16之第二scFv。

【0206】 在一些實施例中，SSE為靶向NK細胞及疾病相關抗原(諸如癌症相關抗原)之多特異性抗體(諸如雙特異性抗體)。在一些實施例中，SSE包含特異性地結合於NK細胞之表面抗原之抗體部分。在一些實施例中，NK細胞表面抗原為CD16a。在一些實施例中，SSE包含特異性地結合於疾病相關抗原(諸如癌症相關抗原)之抗體部分。在一些實施例中，疾病相關抗原為疾病細胞(諸如癌細胞)之表面抗原。在一些實施例中，疾病相關抗原為GPC3、CD47、MUC16、CD19、CD20、CD22、

EpCAM、EGFR、HER2、CEA、PSMA、AFP、PSA、BCMA、FCRL5、NY-ESO、HPV16或FoxP3，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，SSE為選自由以下組成之群的多特異性抗體：串聯scFv、雙功能抗體(Db)、單鏈雙功能抗體(scDb)、雙親和力再靶向(DART)抗體及雙可變域(DVD)抗體。在一些實施例中，SSE為雙特異性抗體。在一些實施例中，SSE為串聯scFv，其包含靶向NK細胞表面抗原之第一scFv及靶向疾病相關抗原之第二scFv。

【0207】 在一些實施例中，SSE為串聯scFv，其包含靶向CD16a之第一scFv及靶向疾病相關抗原之第二scFv。在一些實施例中，疾病相關抗原為GPC3、CD47、MUC16、CD19、CD20、CD22、EpCAM、EGFR、HER2、CEA、PSMA、AFP、PSA、BCMA、FCRL5、NY-ESO、HPV16或FoxP3，包括其變異體或突變體。

【0208】 在一些實施例中，SSE為串聯scFv，其包含靶向CD16a之第一scFv及靶向GPC3之第二scFv。在一些實施例中，SSE為串聯scFv，其包含靶向CD16a之第一scFv及靶向CD47之第二scFv。在一些實施例中，SSE為串聯scFv，其包含靶向CD16a之第一scFv及靶向MUC16之第二scFv。

【0209】 在一些實施例中，本文所描述之SSE包含特異性地結合於疾病相關抗原之抗體部分，其中該抗體部分包含對疾病相關抗原具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)。在一些實施例中，抗體部分包含對CD19具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(參見例如WO2017066136A2)。在一些實施例中，抗體部分包含對CD19具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域)(例如，V<sub>H</sub>域，其包

含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及/或V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 59之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；或其中所含之CDR)。在一些實施例中，抗體部分包含對CD20具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (例如，V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 60之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及/或V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 61之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；或其中所含之CDR)。在一些實施例中，抗體部分包含對CD22具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如2018年3月30日提交之USSN 62/650,955，其內容以全文引用之方式併入本文中)。在一些實施例中，抗體部分包含對CD22具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (例如，V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 101之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及/或V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 102之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；或其中所含之CDR)。在一些實施例中，抗體部分包含對GPC3具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如2017年4月26日提交之USSN 62/490,586，其內容以全文引用之方式併入本文中)。在一些實施例中，抗體部分包含對GPC3具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (例如，V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 64之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及/或V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 65之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；或其中所含之CDR)。在一些實施例中，抗體部分包含對ROR1具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>

域) (參見例如WO2016/187220及WO2016/187216)。在一些實施例中，抗體部分包含對ROR2具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/142768)。在一些實施例中，抗體部分包含對BCMA具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/090327及WO2016/090320)。在一些實施例中，抗體部分包含對GPC5D具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/090329及WO2016/090312)。在一些實施例中，抗體部分包含對FCRL5具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/090337)。在一些實施例中，抗體部分包含對WT-1具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2012/135854、WO2015/070078及WO2015/070061)。在一些實施例中，抗體部分包含對AFP具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/161390)。在一些實施例中，抗體部分包含對HPV16-E7具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/182957)。在一些實施例中，抗體部分包含對NY-ESO-1具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/210365)。在一些實施例中，抗體部分包含對PRAME具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/191246)。在一些實施例中，抗體部分包含對EBV-LMP2A具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/201124)。在一些實施例中，抗體部分包含對KRAS具有特異性之抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/154047)。在一些實施例中，抗體部分包含對PSA具有特異性之抗體部分之CDR或可

變域( $V_H$ 及/或 $V_L$ 域) (參見例如WO2017/015634)。在一些實施例中，抗體部分為scFv。在一些實施例中，SSE為串聯scFv，其包含：a)特異性地結合於T細胞(諸如CD3)或NK細胞(諸如CD16a)之表面抗原之第一scFv；及b)抗體部分，其中該抗體部分為第二scFv。在一些實施例中，SSE包含藉由肽連接子連接之第一及第二scFv。在一些實施例中，第一scFv處於第二scFv之胺基端。在一些實施例中，第二scFv處於第一scFv之胺基端。

【0210】 在一些實施例中，SSE為靶向一或多種可溶免疫抑制劑之多特異性抗體(諸如雙特異性抗體)。此類SSE可充當捕獲劑以自其靶標螯合可溶免疫抑制劑，從而減少其免疫抑制效應。在一些實施例中，SSE包含特異性地結合於一或多種可溶免疫抑制劑之一或多種抗體部分。在一些實施例中，免疫抑制劑為免疫抑制細胞介素。在一些實施例中，免疫抑制細胞介素包括TGF- $\beta$ 家族成員(諸如TGF- $\beta$  1至4)、IL-4及IL-10，包括其變異體或突變體。在一些實施例中，SSE為選自由以下組成之群的多特異性抗體：串聯scFv、雙功能抗體(Db)、單鏈雙功能抗體(scDb)、雙親和力再靶向(DART)抗體及雙可變域(DVD)抗體。在一些實施例中，SSE為雙特異性抗體。舉例而言，在一些實施例中，SSE為串聯scFv，其包含靶向第一免疫抑制細胞介素(諸如TGF $\beta$ )之第一cFv及靶向第二免疫抑制細胞介素(諸如IL-4)之第二scFv。

【0211】 在一些實施例中，SSE為靶向免疫檢查點分子之抗體部分。在一些實施例中，SSE為抑制性免疫檢查點分子之拮抗劑。在一些實施例中，抑制性免疫檢查點分子係選自由以下組成之群：PD-1、PD-L1、CTLA-4、HVEM、BTLA、KIR、LAG-3、TIM-3及A2aR。在一些實施例中，SSE為刺激性免疫檢查點分子之促效劑。在一些實施例中，刺激性



免疫檢查點分子係選自由以下組成之群：CD28、ICOS、4-1BB、OX40、CD27及CD40。在一些實施例中，抗體部分為全長抗體、Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，抗體部分為scFv。

【0212】 在一些實施例中，SSE為靶向PD-1之拮抗性抗體部分。在一些實施例中，抗體部分包含對PD-1具有特異性之拮抗性抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (參見例如WO2016/210129)。在一些實施例中，拮抗性抗體部分為全長抗體、Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，拮抗性抗體部分為scFv。

【0213】 在一些實施例中，SSE為靶向CD47之拮抗性抗體部分。在一些實施例中，拮抗性抗體部分包含對CD47具有特異性之拮抗性抗體部分之CDR或可變域(V<sub>H</sub>及/或V<sub>L</sub>域) (例如，V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 66之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；及/或V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 67之胺基酸序列、基本上由該胺基酸序列組成或由該胺基酸序列組成；或其中所含之CDR)。在一些實施例中，拮抗性抗體部分為全長抗體、Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，拮抗性抗體部分為scFv。

【0214】 在一些實施例中，SSE包含抗體部分，其以下列各者結合於靶抗原：a)為其對其他分子之結合親和力之至少約10倍(包括例如至少約10、20、30、40、50、75、100、200、300、400、500、750、1000或更大倍中之任一者)的親和力；或b)不超過其用於結合於其他分子之K<sub>d</sub>的約1/10 (諸如不超過約1/10、1/20、1/30、1/40、1/50、1/75、1/100、1/200、1/300、1/400、1/500、1/750、1/1000或更小中之任一者)的K<sub>d</sub>。

結合親和力可藉由此項技術中已知之方法測定，諸如ELISA、螢光活化細胞分選(FACS)分析或放射免疫沈澱分析(RIA)。K<sub>d</sub>可藉由此項技術中已知之方法測定，諸如利用例如Biacore儀器之表面電漿子共振(SPR)分析，或利用例如Sapidyne儀器之動力學排除分析(KinExA)。

【0215】 在一些實施例中，SSE為特異性地結合免疫抑制受體之配體之可溶分子。在一些實施例中，SSE包含源自免疫抑制受體之胞外域之配體結合域。在一些實施例中，配體結合域為受體之胞外域之一部分。在一些實施例中，免疫抑制受體係選自由以下組成之群：FasR、TNFR1、TNFR2、SIRP $\alpha$ 、PD-1、CD28、CTLA-4、ICOS、BTLA、KIR、LAG-3、4-1BB、OX40、CD27、CD40及TIM-3。

【0216】 在一些實施例中，SSE為特異性地結合於免疫抑制受體且拮抗免疫抑制受體之可溶分子。在一些實施例中，SSE包含源自免疫抑制受體之配體之胞外域的受體結合域。在一些實施例中，受體結合域為配體之胞外域之一部分。在一些實施例中，配體係選自由以下組成之群：FasL、PD-L1、PD-L2、CD47、CD80、CD86、ICOSL、HVEM、4-1BBL、OX40L、CD70、CD40L及GAL9。

【0217】 在一些實施例中，SSE為外源性刺激細胞介素。本文所描述之外源性細胞介素為自外源性基因表現之細胞介素。在一些實施例中，外源性刺激細胞介素為IL-12家族成員。在一些實施例中，IL-12家族成員為IL-12、IL-23、IL-27或IL-35。在一些實施例中，外源性刺激細胞介素為IL-2、IL-15、IL-18或IL-21。在一些實施例中，外源性刺激細胞介素能夠提供caTCR加CSR及SSE免疫細胞上之細胞介素之受體的自分泌活化。

【0218】 在一些實施例中，SSE在caTCR加CSR及SSE免疫細胞中的表現為可誘導性。在一些實施例中，caTCR加CSR及SSE免疫細胞包含編碼SSE之核酸序列，其可操作地連接於誘導性啟動子，包括本文所描述之誘導性啟動子中之任一者。在一些實施例中，在經由caTCR之信號傳導後，SSE在caTCR加CSR及SSE免疫細胞中的表現為可誘導性。在一些此類實施例中，caTCR加CSR及SSE免疫細胞包含編碼SSE之核酸序列，其回應於經由caTCR之信號傳導而可操作地連接於啟動子或調節元件。在一些實施例中，編碼SSE之核酸序列可操作地連接於活化T細胞(NFAT)衍生之啟動子之核因子。在一些實施例中，NFAT衍生之啟動子為NFAT衍生之最小啟動子(參見例如Durand, D等人, *Molec. Cell. Biol.* 8, 1715-1724 (1988)；Clipstone, NA、Crabtree, GR. *Nature.* 1992 357(6380): 695-7；Chmielewski, M.等人. *Cancer research* 71.17 (2011): 5697-5706；及Zhang, L.等人. *Molecular therapy* 19.4 (2011): 751-759)。在一些實施例中，NFAT衍生之啟動子包含SEQ ID NO: 85之核苷酸序列。在一些實施例中，編碼SSE之核酸序列可操作地連接於IL-2啟動子。

## 核酸

【0219】 亦涵蓋編碼本文所描述之caTCR、CSR及/或SSE之核酸分子。在一些實施例中，根據本文所描述之caTCR、CSR及SSE中之任一者，提供一種編碼caTCR、CSR及/或SSE之核酸(一組核酸)。

【0220】 本發明亦提供其中插入有本發明之核酸的載體。

【0221】 簡言之，藉由編碼caTCR及/或CSR及/或SSE之核酸表現本文所描述之caTCR及/或CSR及/或SSE可藉由以下達成：將核酸插入至適當表現載體中，使得核酸可操作地連接於5'及3'調節元件，包括(例如)啟

動子(例如淋巴細胞特異性啟動子)及3'非轉譯區(UTR)。載體可適合於在真核宿主細胞中複製及整合。典型的選殖及表現載體含有轉錄及轉譯終止子、起始序列及適用於調節所要核酸序列表現之啟動子。

【0222】 本發明之核酸亦可用於使用標準基因傳遞方案的核酸免疫接種及基因療法。基因傳遞方法為此項技術中已知的。參見例如美國專利第5,399,346號、第5,580,859號、第5,589,466號，其以全文引用的方式併入本文中。在一些實施例中，本發明提供基因療法載體。

【0223】 核酸可選殖至許多類型的載體中。舉例而言，核酸可選殖至包括(但不限於)質體、噬菌粒、噬菌體衍生物、動物病毒及黏質體之載體中。尤其受關注之載體包括表現載體、複製載體、探針產生載體及定序載體。

【0224】 此外，表現載體可以病毒載體形式提供給細胞。病毒載體技術為此項技術中熟知的且描述於例如Sambrook等人(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)及其他病毒學及分子生物學手冊中。適用作載體之病毒包括(但不限於)反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒及慢病毒。大體而言，適合的載體含有在至少一種生物體中起作用的複製起點、啟動子序列、適宜限制性核酸內切酶位點及一或多個可選標記物(參見例如 WO 01/96584；WO 01/29058；及美國專利第6,326,193號)。

【0225】 已開發出多種基於病毒之系統用於將基因轉移至哺乳動物細胞中。舉例而言，反轉錄病毒提供基因傳遞系統之適宜平台。所選基因可插入載體中且使用此項技術中已知之技術封裝於反轉錄病毒粒子中。接著可分離重組型病毒且活體內或離體傳遞至個體之細胞中。多種反轉錄病

毒系統為此項技術中已知的。在一些實施例中，使用腺病毒載體。多種腺病毒載體為此項技術中已知的。在一些實施例中，使用慢病毒載體。源自反轉錄病毒(諸如慢病毒)之載體為達成長期基因轉移之適合工具，因為其允許轉殖基因之長期穩定整合及其在子細胞中之傳播。慢病毒載體具有優於源自致癌反轉錄病毒(諸如鼠類白血病病毒)之載體的額外優勢，因為其可轉導非增殖性細胞，諸如肝細胞。其亦具有低免疫原性之額外優勢。

【0226】 額外啟動子元件(例如，強化子)調節轉錄起始頻率。通常，此等元件定位於起始位點上游30-110 bp區中，但多個啟動子最近已展示含有亦位於起始位點下游之功能元件。啟動子元件之間間距通常為靈活的，使得當元件相對於彼此倒置或移動時時保留啟動子功能。在胸苷激酶(tk)啟動子中，啟動子元件之間間距在活性開始下降之前可增加至相隔50 bp。

【0227】 適合啟動子之一個實例為即刻早期巨細胞病毒(CMV)啟動子序列。此啟動子序列為能夠驅使任何與其可操作地連接之聚核苷酸序列之高表現量的強組成性啟動子序列。適合啟動子之另一實例為延伸生長因子-1 $\alpha$  (EF-1 $\alpha$ )。然而，亦可使用其他組成性啟動子序列，包括(但不限於)猴病毒40 (SV40)早期啟動子、小鼠乳房腫瘤病毒(MMTV)、人類免疫缺乏病毒(HIV)長末端重複序列(LTR)啟動子、MoMuLV啟動子、禽類白血病病毒啟動子、EB病毒即刻早期啟動子、勞斯肉瘤病毒啟動子，以及人類基因啟動子，諸如(但不限於)肌動蛋白啟動子、肌球蛋白啟動子、血紅蛋白啟動子及肌酸激酶啟動子。

【0228】 此外，本發明應不限於組成性啟動子之使用。亦涵蓋誘導性啟動子作為本發明之一部分。誘導性啟動子之使用提供分子開關，該分

子開關能夠在需要此類表現時打開其可操作地連接之聚核苷酸序列之表現或在不需要表現時關閉表現。用於真核細胞中之例示性誘導性啟動子系統包括(但不限於)激素調節元件(參見例如Mader, S.及White, J. H. (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5603-5607)、合成配體調節元件(參見例如Spencer, D. M.等人, 1993) Science 262: 1019-1024)及電離輻射調節元件(參見例如Manome, Y.等人(1993) Biochemistry 32: 10607-10613 ; Datta, R.等人(1992) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 89: 1014-10153)。用於活體外或活體內哺乳動物系統中之其他例示性誘導性啟動子系統評述於Gingrich等人(1998) Annual Rev. Neurosci 21:377-405中。

【0229】 用於本發明之例示性誘導性啟動子系統為Tet系統。此類系統係基於Gossen等人(1993)所描述之Tet系統。在一例示性實施例中，所關注的聚核苷酸處於包含一或多個Tet操縱基因(TetO)位點之啟動子控制下。處於非活性狀態時，Tet抑制子(TetR)將結合至TetO位點且抑制自啟動子轉錄。處於活性狀態時，例如在諸如四環素(Tc)、無水四環素、多西環素(Dox)或其活性類似物之誘導劑存在下，誘導劑促使TetR自TetO釋放，從而允許轉錄發生。多西環素為四環素抗生素家族之成員，化學名稱為 1- 二甲胺基 -2,4a,5,7,12- 五 羥 基 -11- 甲 基 -4,6- 二 側 氧 基 -1,4a,11,11a,12,12a-六氫并四苯-3-甲醯胺。

【0230】 在一個實施例中，TetR的密碼子經最佳化以便表現於哺乳動物細胞(例如鼠類或人類細胞)中。由於遺傳密碼之簡併，所以大部分胺基酸係由超過一個密碼子編碼，從而允許指定核酸之核苷酸序列有實質性變化，但由核酸編碼之胺基酸序列無任何改變。然而，許多生物體顯示出密碼子使用之差異，其亦被稱作「密碼子偏倚」(亦即，指定胺基酸之特

定密碼子之使用的偏倚)。密碼子偏倚常常與特定密碼子之tRNA的主要種類之存在相關，其又可提高mRNA之轉譯效率。因此，可經由密碼子最佳化來調整源自特定生物體(例如原核生物)之編碼序列，以改良在不同生物體(例如真核生物)中之表現。

【0231】 Tet系統之其他特定變化形式包括以下「Tet關」及「Tet開」系統。在Tet關系統中，轉錄在Tc或Dox存在下為不活躍的。在彼系統中，四環素控制的轉活化蛋白(tTA)調節在四環素反應性啟動子元件(TRE)之轉錄控制下的靶核酸之表現，tTA係由與來自單純疱疹病毒之VP16的強轉活化域融合之TetR構成。TRE係由與啟動子(通常為源自人類巨細胞病毒(hCMV)即刻早期啟動子之最小啟動子序列)融合之TetO序列多聯體組成。在不存在Tc或Dox的情況下，tTA結合至TRE且活化靶基因之轉錄。在Tc或Dox存在下，tTA不能結合至TRE，且來自靶基因之表現仍不活躍。

【0232】 反之，在Tet開系統中，轉錄在Tc或Dox存在下為活躍的。Tet開系統係基於反向四環素控制的轉活化劑rtTA。如同tTA一樣，rtTA亦為由TetR抑制因子及VP16轉活化域構成之融合蛋白。然而，TetR DNA結合部分中之四個胺基酸改變使得rtTA之結合特徵改變，使得其僅可在Dox存在下識別標靶轉殖基因之TRE中之tetO序列。因此，在Tet開系統中，TRE調節之靶基因之轉錄僅在Dox存在下受到rtTA刺激。

【0233】 另一誘導性啟動子系統為來自大腸桿菌(*E. coli*)之lac抑制因子系統。(參見Brown等人，Cell 49:603-612 (1987))。lac抑制因子系統藉由調節可操作地連接於包含lac操縱基因(lacO)之啟動子的所關注聚核苷酸之轉錄來起作用。lac抑制因子(lacR)結合於LacO，從而防止所關注

聚核苷酸之轉錄。所關注聚核苷酸之表現係由適合誘導劑誘導，例如異丙基- $\beta$ -D-硫代嘔喃半乳糖苷(IPTG)。

【0234】 用於本發明之另一例示性誘導性啟動子系統為活化T細胞之核因子(NFAT)系統。NFAT轉錄因子家族為T細胞活化之重要調節因子。NFAT反應元件發現於例如IL-2啟動子中(參見例如Durand, D.等人, *Molec. Cell. Biol.* 8, 1715-1724 (1988) ; Clipstone, NA, Crabtree, GR. *Nature*. 1992 357(6380): 695-7 ; Chmielewski, M.等人, *Cancer research* 71.17 (2011): 5697-5706 ; 及 Zhang, L. 等人, *Molecular therapy* 19.4 (2011): 751-759)。在一些實施例中，本文所描述之誘導性啟動子包含一或多個(諸如2、3、4、5、6或更多個) NFAT反應元件。在一些實施例中，誘導性啟動子包含6個例如包含SEQ ID NO: 83之核苷酸序列的NFAT反應元件。在一些實施例中，本文所描述之誘導性啟動子包含一或多個(諸如2、3、4、5、6或更多個) NFAT反應元件，該等反應元件連接於最小啟動子(諸如最小TA啟動子)。在一些實施例中，最小TA啟動子包含SEQ ID NO: 84之核苷酸序列。在一些實施例中，誘導性啟動子包含SEQ ID NO: 85之核苷酸序列。

【0235】 為了評定多肽或其部分之表現，待引入細胞中之表現載體亦可含有可選標記基因或報導基因或兩者以有助於自設法經病毒載體轉染或感染之細胞群體鑑別及選擇表現細胞。在其他態樣中，可選標記物可攜載於獨立DNA段上且用於共轉染程序。可選標記物及報導基因皆可側接適當調節序列以使能夠在宿主細胞中表現。有用可選標記物包括例如耐抗生素基因，諸如neo及其類似物。

【0236】 報導基因用於識別潛在經轉染細胞及評估調節序列之功



能。大體而言，報導基因為接受者生物體或組織中不存在或表現且編碼表現藉由一些可易於偵測之特性(例如，酶促活性)體現之多肽的基因。在DNA已引入接受者細胞中之後的適合時間分析報導基因之表現。適合報導基因可包括編碼螢光素酶、 $\beta$ -半乳糖、氯黴素乙醯基轉移酶、分泌鹼性磷酸酯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)。適合表現系統為熟知的且可使用已知技術製備或商購獲得。大體而言，具有展示報導基因最高表現量之最小5'側接區的構築體經鑑別為啟動子。此類啟動子區可連接於報導基因且用於評估調節啟動子驅動之轉錄能力的試劑。

【0237】 在一些實施例中，提供編碼根據本文所描述之caTCR、CSR及SSE中之任一者之caTCR及/或CSR的核酸。在一些實施例中，核酸包含一或多種編碼caTCR之所有多肽鏈的核酸序列。在一些實施例中，核酸包含一或多種編碼CSR之所有多肽鏈的核酸序列。在一些實施例中，核酸包含一或多種編碼caTCR及CSR之所有多肽鏈的核酸序列。在一些實施例中，一或多種核酸序列中之每一者包含於單獨載體中。在一些實施例中，至少一些核酸序列包含於同一載體中。在一些實施例中，所有核酸序列包含於同一載體中。載體可選自例如由哺乳動物表現載體及病毒載體(諸如源自反轉錄病毒、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒及慢病毒之彼等載體)組成之群。

【0238】 舉例而言，在一些實施例中，caTCR為二聚體，其包含第一caTCR多肽鏈及第二caTCR多肽鏈；且CSR為單體，其包含單一CSR多肽鏈；且核酸包含編碼第一caTCR多肽鏈之第一核酸序列、編碼第二caTCR鏈之第二核酸及編碼CSR多肽鏈之第三核酸序列。在一些實施例

中，第一核酸序列包含於第一載體中，第二核酸序列包含於第二載體中，且第三核酸序列包含於第三載體中。在一些實施例中，第一及第二核酸序列包含於第一載體中，且第三核酸序列包含於第二載體中。在一些實施例中，第一及第三核酸序列包含於第一載體中，且第二核酸序列包含於第二載體中。在一些實施例中，第二及第三核酸序列包含於第一載體中，且第一核酸序列包含於第二載體中。在一些實施例中，第一、第二及第三核酸序列包含於同一載體中。在一些實施例中，第一核酸序列處於第一啟動子控制下，第二核酸序列處於第二啟動子控制下，且第三核酸序列處於第三啟動子控制下。在一些實施例中，第一、第二及第三啟動子中之一些或全部具有相同序列。在一些實施例中，第一、第二及第三啟動子中之一些或全部具有不同序列。在一些實施例中，第一、第二及第三核酸序列中之一些或全部在多順反子載體中、處於單一啟動子控制下以單一轉錄物形式表現。參見例如Kim、JH等人，PLoS One6(4):e18556, 2011。在一些實施例中，啟動子中之一或多者為可誘導性。在一些實施例中，編碼CSR多肽鏈之第三核酸序列可操作地連接於誘導性啟動子。在一些實施例中，誘導性啟動子包含回應於免疫細胞活化之一或多個元件，諸如NFAT反應元件。

【0239】 在一些實施例中，第一、第二及第三核酸序列中之一些或全部在宿主細胞(諸如T細胞)中具有相似(諸如實質上或約相同)的表現量。在一些實施例中，第一、第二及第三核酸序列中之一些在宿主細胞(諸如T細胞)中具有相差至少約兩倍(諸如至少約2、3、4、5或更多倍中之任一者)的表現量。可以mRNA或蛋白質含量測定表現。mRNA之表現量可藉由使用各種熟知方法量測自核酸轉錄之mRNA的量來測定，該等方法

包括北方墨點法、定量RT-PCR、微陣列分析及其類似者。蛋白質表現量可藉由已知方法量測，包括免疫細胞化學染色、酶聯免疫吸附分析(ELISA)、西方墨點分析、發光分析、質譜、高效液相層析、高壓液相層析-串聯質譜及其類似者。

【0240】應理解，可調適及組合本文所描述之實施例之特徵，以涵蓋包含任何數目的核酸序列的實施例，例如其中編碼caTCR及/或CSR及/或SSE的核酸包含五個或多於五個核酸序列(例如其中caTCR及SSE各自包含2個或多於2個不同多肽鏈)。

【0241】因此，在一些實施例中，提供一種編碼以下之核酸：a)二聚體caTCR，其包含根據本文所描述之caTCR中之任一者之第一caTCR多肽鏈及第二caTCR多肽鏈，該核酸包含i)編碼第一caTCR多肽鏈的第一caTCR核酸序列，及ii)編碼第二caTCR多肽鏈的第二caTCR核酸序列；及b)單體CSR，其包含根據本文所描述之CSR中之任一者之單一CSR多肽鏈，該核酸進一步包含編碼CSR多肽鏈的CSR核酸序列。在一些實施例中，第一caTCR核酸序列包含於第一載體(諸如慢病毒載體)中，第二caTCR核酸序列包含於第二載體(諸如慢病毒載體)中，且CSR核酸序列包含於第三載體(諸如慢病毒載體)中。在一些實施例中，第一及第二caTCR核酸序列及CSR核酸序列中的一些或全部包含於同一載體(諸如慢病毒載體)中。在一些實施例中，第一及第二caTCR核酸序列及CSR核酸序列各自個別地可操作地連接於啟動子。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部具有相同序列。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部具有不同序列。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部為可誘導性。在一些實施例中，CSR核酸序列可操作地連接於誘導性啟動子。在一些實施例中，誘導

性啟動子包含回應於免疫細胞活化之一或多個元件。在一些實施例中，CSR核酸序列可操作地連接於NFAT衍生的啟動子。在一些實施例中，載體中的一些或全部為病毒載體(諸如慢病毒載體)。

【0242】 在一些實施例中，提供：a)第一載體(諸如慢病毒載體)，其包含編碼二聚體caTCR之核酸，該二聚體caTCR包含根據本文所描述之caTCR中之任一者的第一caTCR多肽鏈及第二caTCR多肽鏈，該核酸包含i)可操作地連接於編碼第一caTCR多肽鏈的第一caTCR核酸序列的第一啟動子；及ii)可操作地連接於編碼第二caTCR多肽鏈的第二caTCR核酸序列的第二啟動子；及b)第二載體(諸如慢病毒載體)，其包含編碼單體CSR之核酸，該單體CSR包含根據本文所描述之CSR中之任一者的CSR多肽鏈，該核酸包含可操作地連接於編碼CSR多肽鏈的CSR核酸序列的第三啟動子。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部具有相同序列。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部具有不同序列。在一些實施例中，啟動子中的一些或全部為可誘導性。在一些實施例中，第一及/或第二載體為病毒載體(諸如慢病毒載體)。

【0243】 在一些實施例中，提供：a)第一載體(諸如慢病毒載體)，其包含編碼二聚體caTCR之核酸，該二聚體caTCR包含根據本文所描述之caTCR中之任一者的第一caTCR多肽鏈及第二caTCR多肽鏈，該核酸包含i)編碼第一caTCR多肽鏈的第一caTCR核酸序列；及ii)編碼第二caTCR多肽鏈的caTCR核酸序列，其中第一及第二caTCR核酸序列處於第一啟動子控制下；及b)第二載體(諸如慢病毒載體)，其包含編碼單體CSR之核酸，該單體CSR包含根據本文所描述之CSR中之任一者的CSR多肽鏈，該核酸包含可操作地連接於編碼CSR多肽鏈的CSR核酸序列的第二啟動子。在一

些實施例中，第一啟動子可操作地連接於第一caTCR核酸序列之5'端，且存在選自由內部核糖體進入位點(IRES)及編碼自裂解2A肽(諸如P2A、T2A、E2A或F2A)之核酸組成之群的核酸連接子，該核酸連接子將第一caTCR核酸序列之3'端連接於第二caTCR核酸序列之5'端，其中第一caTCR核酸序列及第二caTCR核酸序列在第一啟動子控制下轉錄為單一RNA。在一些實施例中，第一啟動子可操作地連接於第二caTCR核酸序列之5'端，且存在選自由內部核糖體進入位點(IRES)及編碼自裂解2A肽(諸如P2A、T2A、E2A或F2A)之核酸組成之群的核酸連接子，該核酸連接子將第二caTCR核酸序列之3'端連接於第一caTCR核酸序列之5'端，其中第一caTCR核酸序列及第二caTCR核酸序列在第一啟動子控制下轉錄為單一RNA。在一些實施例中，第一及/或第二啟動子為可誘導性。在一些實施例中，第一及/或第二載體為病毒載體(諸如慢病毒載體)。應瞭解，亦涵蓋交換核酸序列中之任一者，諸如第一或第二caTCR核酸序列與CSR核酸序列交換的實施例。

【0244】 在一些實施例中，提供一種載體(諸如病毒載體，例如慢病毒載體)，其包含：a)編碼二聚體caTCR之核酸，該二聚體caTCR包含根據本文所描述之caTCR中之任一者的第一caTCR多肽鏈及第二caTCR多肽鏈，該核酸包含i)編碼第一caTCR多肽鏈的第一caTCR核酸序列；及ii)編碼第二caTCR多肽鏈的第二caTCR核酸序列；及b)編碼單體CSR之核酸，該單體CSR包含根據本文所描述之CSR中之任一者的CSR多肽鏈，該核酸包含編碼CSR多肽鏈的CSR核酸序列，其中第一及第二caTCR核酸序列處於第一啟動子控制下，且其中CSR核酸序列處於第二啟動子控制下。在一些實施例中，第一啟動子可操作地連接於caTCR核酸序列中之一者，該

caTCR核酸序列藉由選自由內部核糖體進入位點(IRES)及編碼自裂解2A肽(諸如P2A、T2A、E2A或F2A)之核酸組成之群的核酸連接子連接於另一caTCR核酸序列，使得第一及第二caTCR核酸序列在第一啟動子控制下轉錄為單一RNA。在一些實施例中，第一及/或第二啟動子為可誘導性。在一些實施例中，第二啟動子為誘導性啟動子。在一些實施例中，誘導性啟動子包含回應於免疫細胞活化之一或多個元件。在一些實施例中，第二啟動子為NFAT衍生的啟動子。在一些實施例中，NFAT衍生的啟動子包含SEQ ID NO: 85之核苷酸序列。在一些實施例中，載體為病毒載體(諸如慢病毒載體)。

【0245】 在一些實施例中，提供一種載體(諸如慢病毒載體)，其包含：a)編碼二聚體caTCR之核酸，該二聚體caTCR包含根據本文所描述之caTCR中之任一者的第一caTCR多肽鏈及第二caTCR多肽鏈，該核酸包含i)編碼第一caTCR多肽鏈的第一caTCR核酸序列；及ii)編碼第二caTCR多肽鏈的第二caTCR核酸序列；及b)編碼單體CSR之核酸，該單體CSR包含根據本文所描述之CSR中之任一者的CSR多肽鏈，該核酸包含編碼CSR多肽鏈的CSR核酸序列，其中第一及第二caTCR核酸序列及CSR核酸序列處於單一啟動子控制下。在一些實施例中，啟動子可操作地連接於核酸序列中之一者，該核酸序列藉由個別地選自由內部核糖體進入位點(IRES)及編碼自裂解2A肽(諸如P2A、T2A、E2A或F2A)之核酸組成之群的核酸連接子連接於其他核酸序列，使得第一及第二核酸序列及CSR核酸序列在啟動子控制下轉錄為單一RNA。在一些實施例中，啟動子為誘導型啟動子。在一些實施例中，載體為病毒載體(諸如慢病毒載體)。

【0246】 向細胞中引入及表現基因之方法為此項技術中已知。在表

現載體之上下文中，載體可易於藉由此項技術中之任何方法引入至宿主細胞中，例如哺乳動物、細菌、酵母或昆蟲細胞。舉例而言，表現載體可藉由物理、化學或生物方式轉移至宿主細胞中。

【0247】 用於將聚核苷酸引入至宿主細胞中之物理方法包括磷酸鈣沈澱、脂質體轉染、粒子轟擊、顯微注射、電穿孔及其類似方法。用於製造包含載體及/或外源性核酸之細胞的方法為此項技術中熟知的。參見例如Sambrook等人(2001, *Molecular Cloning: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory, New York)。在一些實施例中，藉由磷酸鈣轉染進行將聚核苷酸引入至宿主細胞中。

【0248】 將所關注的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。病毒載體及尤其反轉錄病毒載體已成為最廣泛用於將基因插入至哺乳動物(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、1型單純疱疹病毒、腺病毒及腺相關病毒及其類似者。參見例如美國專利第5,350,674號及第5,585,362號。

【0249】 將聚核苷酸引入宿主細胞中之化學方式包括膠態分散系統，諸如大分子複合物、奈米囊劑、微球、珠粒及基於脂質之系統，包括水包油乳液、微胞、混合微胞及脂質體。用作活體外及活體內傳遞媒劑之一例示性膠態系統為脂質體(例如，人工膜泡)。

【0250】 在利用非病毒傳遞系統之情況下，例示性傳遞媒劑為脂質體。預期使用脂質調配物將核酸引入至宿主細胞(活體外、離體或活體內)。在另一態樣中，核酸可與脂質相關聯。與脂質相關聯之核酸可囊封於脂質體之水性內部中，穿插於脂質體之脂質雙層內，經由與脂質體及寡核苷酸相關聯之連接分子附接至脂質體，包覆於脂質體中，與脂質體複

合，分散於含有脂質之溶液中，與脂質混合，與脂質組合，以懸浮液形式含於脂質中，含有微胞或與微胞複合，或以其他方式與脂質相關聯。與組合物相關聯之脂質、脂質/DNA或脂質/表現載體不限於溶液中之任何特定結構。舉例而言，其可存在於雙層結構中，以微胞形式存在或具有「塌陷」結構。其亦可簡單地穿插於溶液中，可能形成尺寸或形狀上不均勻的聚集体。脂質為可為天然存在之脂質或合成脂質的脂肪物質。舉例而言，脂質包括細胞質中天然存在之脂肪滴以及含有長鏈脂族烴及其衍生物之化合物類別(諸如脂肪酸、醇、胺、胺基醇及醛)。

【0251】 不管用於將外源性核酸引入宿主細胞或以其他方式使細胞暴露於本發明之抑制劑的方法，為了確認宿主細胞中重組DNA序列之存在，可進行多種分析。此類分析包括例如熟習此項技術者熟知之「分子生物」分析，諸如南方及北方墨點法、RT-PCR及PCR；「生物化學」分析，諸如偵測特定肽之存在或不存在，例如藉由免疫學方式(ELISA及西方墨點法)或藉由本文所描述之分析來識別在本發明之範疇內的試劑。

### **caTCR、CSR及SSE之製備**

【0252】 在一些實施例中，根據本文所描述之包含抗體部分之caTCR、CSR及SSE中之任一者，抗體部分(例如Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或scFv)包含源自單株抗體的序列。在一些實施例中，抗體部分包含來自單株抗體的V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>域，或其變異體。在一些實施例中，抗體部分進一步包含來自單株抗體的C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>域，或其變異體。單株抗體可例如使用融合瘤方法製備，諸如由Kohler及Milstein, *Nature*, 256:495 (1975)及Sergeeva等人, *Blood*, 117(16):4262-4272所描述之彼等方法。

【0253】 在融合瘤方法中，倉鼠、小鼠或其他適當宿主動物通常用



免疫劑免疫以產生淋巴細胞，其產生或能夠產生將特異性結合於免疫劑之抗體。或者，淋巴細胞可在活體外免疫。免疫劑可包括多肽或所關注蛋白質之融合蛋白，或包含至少兩種分子之複合體，諸如包含肽及MHC蛋白之複合體。大體而言，若需要人類來源之細胞，則使用末梢血液淋巴細胞(「PBL」)；或若需要非人類哺乳動物來源，則使用脾細胞或淋巴結細胞。淋巴細胞接著使用適合融合劑(諸如聚乙二醇)經永生化細胞株融合以形成融合瘤細胞。參見例如Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice* (New York: Academic Press, 1986)，第59-103頁。永生化細胞株通常為經轉化哺乳動物細胞，特定言之，嚙齒動物、牛類及人類來源之骨髓瘤細胞。通常，採用大鼠或小鼠骨髓瘤細胞株。融合瘤細胞可在較佳含有一或多種抑制未融合、永生化細胞之生長或存活之物質的適合培養基中培養。舉例而言，若親本細胞缺乏酶次黃嘌呤-鳥嘌呤磷酸核糖基轉移酶(HGPRT或HPRT)，則用於融合瘤之培養基通常將包括次黃嘌呤、胺基蝶呤及胸苷(「HAT培養基」)，其阻止缺乏HGPRT之細胞生長。

【0254】 在一些實施例中，永生化細胞株有效融合，藉由所選產抗體細胞支援抗體之穩定高水準表現且對於諸如HAT培養基之培養基敏感。在一些實施例中，永生化細胞株為鼠類骨髓瘤細胞株，其可例如獲自Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California 及 American Type Culture Collection, Manassas, Virginia。已描述用於產生人類單株抗體之人類骨髓瘤及小鼠-人類雜骨髓瘤細胞株。Kozbor, *J. Immunol.*, 133:3001 (1984)；Brodeur 等人 *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications* (Marcel Dekker, Inc.: New York, 1987) 第51-63頁。

【0255】 接著可分析培養融合瘤細胞之培養基中針對該多肽之單株抗體的存在。可藉由免疫沈澱或藉由活體外結合分析(諸如放射免疫分析(RIA)或酶聯免疫吸附分析(ELISA))測定由融合瘤細胞產生之單株抗體的結合特異性。該等技術及分析法係此項技術中已知的。單株抗體之結合親和力可例如藉由Munson及Pollard, *Anal. Biochem.*, 107:220 (1980)之史卡查分析測定。

【0256】 在鑑別所需融合瘤細胞之後，純系可藉由限制稀釋程序次選殖且藉由標準方法生長。前述編碼。適用於此目的之培養基包括例如達爾伯克改良型伊格爾培養基(Dulbecco's Modified Eagle's Medium)及RPMI-1640培養基。或者，融合瘤細胞可以腹水形式活體內生長於哺乳動物中。

【0257】 次純系所分泌之單株抗體可藉由習知免疫球蛋白純化程序(諸如蛋白A-瓊脂糖、羥磷灰石層析、凝膠電泳、透析或親和層析)自培養基或腹水液分離或純化。

【0258】 在一些實施例中，根據本文所描述之包含抗體部分之caTCR、CSR及SSE中之任一者，抗體部分包含來自選自抗體部分庫(諸如呈遞scFv或Fab片段的噬菌體庫)之純系的序列。純系可藉由篩選組合庫中具有所需一或多種活性之抗體片段來鑑別。舉例而言，此項技術中已知多種方法用於產生噬菌體呈現庫及針對具有所需結合特徵之抗體篩選此類庫。此類方法評述於例如Hoogenboom等人，*Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人編，Human Press, Totowa, N.J., 2001)中，且進一步描述於例如McCafferty等人，*Nature* 348:552-554；Clackson等人，*Nature* 352: 624-628 (1991)；Marks等人，*J. Mol. Biol.*

222: 581-597 (1992) ; Marks及Bradbury, *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo編, Human Press, Totowa, N.J., 2003) ; Sidhu等人, *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004) ; Lee等人, *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004) ; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004) ; 及 Lee 等人, *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132(2004)中。

【0259】 在某些噬菌體呈現方法中， $V_H$ 及 $V_L$ 基因之譜系分別藉由聚合酶鏈反應(PCR)選殖且在噬菌體庫中隨機重組，其接著可如Winter等人, *Ann. Rev. Immunol.* 12:433-455 (1994)中所描述，針對抗原結合噬菌體進行篩選。噬菌體通常以單鏈Fv (scFv)片段或Fab片段形式呈現抗體片段。來自經免疫來源之庫向免疫原提供高親和力抗體而無需構築融合瘤。或者，可選殖(例如自人類)原生譜系以提供針對廣泛範圍之非自體抗原以及自體抗原之單一抗體來源而無需任何免疫接種，如Griffiths等人, *EMBO J.* 12: 725-734 (1993)所描述。最後，亦可以合成方式如下製備原生庫：自幹細胞選殖未重排V基因區段，且使用含有隨機序列之PCR引子編碼CDR3高度可變區及實現活體外重排，如Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388 (1992)所描述。描述人類抗體噬菌體庫之專利公開案包括例如：美國專利第5,750,373號及美國專利公開案第2005/0079574號、第2005/0119455號、第2005/0266000號、第2007/0117126號、第2007/0160598號、第2007/0237764號、第2007/0292936號及第2009/0002360號。

【0260】 可使用噬菌體呈現以篩選對靶抗原(諸如肽/MHC I/II級複合體或細胞表面抗原)具有特異性之抗體庫來製備抗體部分。庫可為具有

至少 $1 \times 10^9$  (諸如至少約 $1 \times 10^9$ 、 $2.5 \times 10^9$ 、 $5 \times 10^9$ 、 $7.5 \times 10^9$ 、 $1 \times 10^{10}$ 、 $2.5 \times 10^{10}$ 、 $5 \times 10^{10}$ 、 $7.5 \times 10^{10}$ 或 $1 \times 10^{11}$ 中的任一者)個獨特人類抗體片段之多樣性之人類scFv噬菌體呈現庫。在一些實施例中，庫為原生人類庫，其由來自健康供者之人類PMBC及脾提取之DNA構築，包含所有人類重鏈及輕鏈亞家族。在一些實施例中，庫為原生人類庫，該庫由分離自患有各種疾病之患者(諸如患有自體免疫疾病之患者、癌症患者及患有感染性疾病之患者)之PBMC提取的DNA構築。在一些實施例中，庫為半合成人類庫，其中重鏈CDR3為完全隨機化的，所有胺基酸(除半胱胺酸之外)同等地可能存在於任何指定位置(參見例如Hoet, R.M.等人, *Nat. Biotechnol.* 23(3):344-348, 2005)。在一些實施例中，半合成人類庫之重鏈CDR3之長度為約5至約24 (諸如約5、6、7、8、9、10、11、12、13、14、15、16、17、18、19、20、21、22、23或24中的任一者)個胺基酸。在一些實施例中，庫為全合成噬菌體呈現庫。在一些實施例中，庫為非人類噬菌體呈現庫。

【0261】可藉由以下來選擇以高親和力結合於靶抗原之噬菌體純系：噬菌體與靶抗原迭代結合，該靶抗原經結合於固體擔體(諸如用於溶液淘選(solution panning)之珠粒或用於細胞淘選(cell panning)之哺乳動物細胞)，隨後移除非結合噬菌體及溶離特異性結合之噬菌體。在溶液淘選之一個實例中，靶抗原可經生物素標記以固定至固體擔體。經生物素標記之靶抗原與噬菌體庫及固體擔體(諸如抗生蛋白鏈菌素結合之Dynabeads M-280)混合，且接著分離靶抗原-噬菌體-珠粒複合體。結合噬菌體純系接著經溶離且用於感染適當宿主細胞，諸如大腸桿菌XL1-Blue，用於表現及純化。在細胞淘選之實例中，負載有AFP肽之T2細胞(TAP缺陷、HLA-

A\*02:01<sup>+</sup>淋巴母細胞細胞株)與噬菌體庫混合，其後收集細胞，且經結合純系經溶離且用以感染適當宿主細胞(用於表現及純化)。可藉由溶液淘選、細胞淘選或兩者之組合進行多輪(諸如約2、3、4、5、6或更大中之任一者)淘選，以富集特異性結合於靶抗原的噬菌體純系。可藉由此項技術中已知之任何方法(包括例如ELISA及FACS)測試所富集之噬菌體純系對靶抗原的特異性結合。

### 人類及人類化抗體部分

【0262】 caTCR、CSR及SSE抗體部分可為人類或經人類化。人類化形式之非人類(例如鼠類)抗體部分為嵌合免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其片段(諸如Fv、Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub>、scFv或抗體之其他抗原結合子序列)，通常含有源自非人類免疫球蛋白之最小序列。人類化抗體部分包括人類免疫球蛋白、免疫球蛋白鏈或其片段(接受者抗體)，其中來自接受者之CDR的殘基經來自具有所需特異性、親和力及能力之非人類物種(供者抗體)(諸如小鼠、大鼠或兔)之CDR的殘基置換。在一些情況下，人類免疫球蛋白之Fv構架殘基經對應非人類殘基置換。人類化抗體部分亦可包含既未在接受者抗體部分中、亦未在所輸入之CDR或構架序列中發現的殘基。大體而言，人類化抗體部分可包含至少一個且通常兩個可變域之實質上全部，其中CDR區之全部或實質上全部對應於非人類免疫球蛋白之彼等區，且FR區之全部或實質上全部為人類免疫球蛋白共同序列之彼等區。參見例如Jones等人，*Nature*, 321: 522-525 (1986)；Riechmann等人，*Nature*, 332: 323-329 (1988)；Presta, *Curr. Op. Struct. Biol.*, 2:593-596 (1992)。

【0263】 大體而言，人類化抗體部分中已引入來自非人類來源的一

或多個胺基酸殘基。此等非人類胺基酸殘基往往稱為「輸入」殘基，其通常來自「輸入」可變域。根據一些實施例，基本上可遵循Winter及同事之方法進行人類化(Jones等人, *Nature*, 321: 522-525 (1986) ; Riechmann等人, *Nature*, 332: 323-327 (1988) ; Verhoeyen等人, *Science*, 239: 1534-1536 (1988))，其係由啮齒動物CDR或CDR序列取代人類抗體之對應序列。因此，此類「人類化」抗體部分為抗體部分(美國專利第4,816,567號)，其中實質上少於完整人類可變域已經被來自非人類物種之對應序列取代。實際上，人類化抗體部分通常為一些CDR殘基及可能一些FR殘基被來自啮齒動物抗體中類似位點的殘基取代之人類抗體部分。

【0264】另一種人類化方案，可產生人類抗體部分。舉例而言，現可能產生基因轉殖動物(例如小鼠)，其在免疫接種後能夠在不產生內源性免疫球蛋白的情況下產生完整的人類抗體譜系。舉例而言，已描述嵌合及生殖系突變小鼠中之抗體重鏈接合區(JH)基因的同型接合缺失導致完全抑制內源性抗體產生。將人類生殖系免疫球蛋白基因陣列轉移至此類生殖系突變小鼠中將導致在抗原攻擊時產生人類抗體。參見例如Jakobovits等人, *PNAS USA*, 90:2551 (1993) ; Jakobovits等人, *Nature*, 362:255-258 (1993) ; Bruggemann等人, *Year in Immunol.*, 7:33 (1993) ; 美國專利第5,545,806號、第5,569,825號、第5,591,669號；第5,545,807號；及WO 97/17852。或者，可藉由將人類免疫球蛋白基因座引入基因動轉殖物(例如內源性免疫球蛋白基因已部分或完全不活化的小鼠)來製備人類抗體。在攻擊之後，觀察人類抗體產生，其在所有方面與在人類中所見極其類似，包括基因重排、組合及抗體譜系。此方法描述於例如美國專利第5,545,807號；第5,545,806號；第5,569,825號；第5,625,126號；第

5,633,425號；及第5,661,016號，及Marks等人, *Bio/Technology*, 10: 779-783 (1992)；Lonberg等人, *Nature*, 368: 856-859 (1994)；Morrison, *Nature*, 368: 812-813 (1994)；Fishwild等人, *Nature Biotechnology*, 14: 845-851 (1996)；Neuberger, *Nature Biotechnology*, 14: 826 (1996)；Lonberg及Huszar, *Intern. Rev. Immunol.*, 13: 65-93 (1995)中。

【0265】人類抗體亦可由活體外活化的B細胞產生(參見美國專利5,567,610及5,229,275)或藉由使用此項技術中已知之各種技術(包括噬菌體呈現庫)產生。Hoogenboom及Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991)；Marks等人, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991)。Cole等人及Boerner等人之技術亦可用於製備人類單株抗體。Cole等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第77頁 (1985)及Boerner等人, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991)。

### 其他變異體

【0266】在一些實施例中，涵蓋本文所提供之抗原結合模組之胺基酸序列變異體。舉例而言，可能需要改良抗原結合模組之結合親和力及/或其他生物特性。可藉由引入適當修飾至編碼抗原結合模組之核苷酸序列或藉由肽合成來製備抗原結合模組之胺基酸序列變異體。此類修飾包括例如抗原結合模組之胺基酸序列內的殘基缺失及/或插入及/或取代。可製造缺失、插入及取代之任一組合以獲得最終構築體，其限制條件為最終構築體具有所需特徵，例如抗原結合。

【0267】在一些實施例中，提供具有一或多個胺基酸置換之抗原結合模組變異體。用於取代性突變誘發之所關注位點包括抗體部分之HVR及FR。胺基酸置換可經引入至所關注之抗原結合模組中，且針對所需活

性進行篩選之產物例如保持/改良抗原結合或減少免疫原性。

【0268】 保守取代經展示於下表4中。

表4：保守取代

| 原始殘基    | 例示性取代                         | 較佳取代 |
|---------|-------------------------------|------|
| Ala (A) | Val; Leu; Ile                 | Val  |
| Arg (R) | Lys; Gln; Asn                 | Lys  |
| Asn (N) | Gln; His; Asp, Lys; Arg       | Gln  |
| Asp (D) | Glu; Asn                      | Glu  |
| Cys (C) | Ser; Ala                      | Ser  |
| Gln (Q) | Asn; Glu                      | Asn  |
| Glu (E) | Asp; Gln                      | Asp  |
| Gly (G) | Ala                           | Ala  |
| His (H) | Asn; Gln; Lys; Arg            | Arg  |
| Ile (I) | Leu; Val; Met; Ala; Phe; 正白胺酸 | Leu  |
| Leu (L) | 正白胺酸; Ile; Val; Met; Ala; Phe | Ile  |
| Lys (K) | Arg; Gln; Asn                 | Arg  |
| Met (M) | Leu; Phe; Ile                 | Leu  |
| Phe (F) | Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr  | Tyr  |
| Pro (P) | Ala                           | Ala  |
| Ser (S) | Thr                           | Thr  |
| Thr (T) | Val; Ser                      | Ser  |
| Trp (W) | Tyr; Phe                      | Tyr  |
| Tyr (Y) | Trp; Phe; Thr; Ser            | Phe  |
| Val (V) | Ile; Leu; Met; Phe; Ala; 正白胺酸 | Leu  |

【0269】 胺基酸可根據常見側鏈特性分組為不同類別：

- a.疏水性：正白胺酸、Met、Ala、Val、Leu、Ile；
- b.中性親水性：Cys、Ser、Thr、Asn、Gln；
- c.酸性：Asp、Glu；
- d.鹼性：His、Lys、Arg；
- e.影響鏈定向之殘基：Gly、Pro；
- f.芳族：Trp、Tyr、Phe。

【0270】 非保守取代必然伴有此等類別中之一者之一員與另一類別之一員的交換。



【0271】 例示性取代型變異體為親和力成熟抗體部分，其可例如使用基於噬菌體呈現之親和力成熟技術便利地產生。簡言之，使一或多個CDR殘基突變且在噬菌體上呈現變異抗體部分且針對特定生物活性(例如結合親和力)篩選。改變(例如取代)可在HVR中進行以例如改良抗體部分親和力。此類改變可在HVR「熱點」(亦即由在體細胞成熟過程期間經歷高頻率突變之密碼子所編碼之殘基(參見例如Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196 (2008))，及/或特異性決定殘基(SDR)中進行，其中測試所得變異體V<sub>H</sub>或V<sub>L</sub>之結合親和力。藉由構築二級庫及自二級庫再選擇來達成親和力成熟已描述於例如Hoogenboom等人之*Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien等人編, Human Press, Totowa, NJ, (2001))中。

【0272】 在親和力成熟之一些實施例中，藉由多種方法(例如易錯PCR、鏈改組或寡核苷酸定向突變誘發)中之任一種將多樣性引入為了成熟所選之可變基因中。隨後產生二級庫。接著篩選庫以鑑別具有所需親和力之任何抗體部分變異體。引入多樣性之另一方法涉及HVR引導途徑，其中將若干HVR殘基(例如一次4-6個殘基)隨機分組。可例如使用丙胺酸掃描突變誘發或建立模型來特異性鑑別參與抗原結合之HVR殘基。尤其通常靶向CDR-H3及CDR-L3。

【0273】 在一些實施例中，取代、插入或缺失可出現於一或多個HVR內，只要此類改變實質上不降低抗體部分結合抗原之能力。舉例而言，可在HVR中進行不實質上降低結合親和力之保守改變(例如，如本文所提供之保守取代)。此類改變可位於HVR「熱點」或SDR外部。在上文所提供之變異V<sub>H</sub>及V<sub>L</sub>序列之一些實施例中，各HVR未改變或含有不超過

一個、兩個或三個胺基酸取代。

【0274】一種適用於鑑別突變誘發可靶向之抗原結合模組之殘基或區的方法稱為「丙胺酸掃描突變誘發」，如Cunningham及Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085所描述。在此方法中，鑑別殘基或一組目標殘基(例如帶電殘基，諸如arg、asp、his、lys及glu)且經中性或帶負電胺基酸(例如丙胺酸或聚丙胺酸)置換以判定抗原結合模組與抗原之相互作用是否受到影響。可在對初始取代展現功能敏感性之胺基酸位置處引入其他取代。或者或另外，可測定抗原-抗原結合模組複合體之晶體結構以鑑別抗原結合模組與抗原之間的接觸點。此類接觸殘基及鄰近殘基可作為取代候選物之靶標或排除在取代候選物之外。可篩選變異體以判定其是否含有所需特性。

【0275】胺基酸序列插入包括長度在一個殘基至含有一百個或多於一百個殘基之多肽範圍內的胺基端及/或羧基端融合，以及單個或多個胺基酸殘基之序列內插入。末端插入之實例包括具有N端甲硫胺醯基殘基之抗原結合模組。抗原結合模組之其他插入變異體包括抗原結合模組之N或C端與增加抗原結合模組之血清半衰期的酶(例如對於ADEPT)或多肽的融合。

## 衍生物

【0276】在一些實施例中，根據本文所描述之caTCR中之任一者的caTCR及/或根據本文所描述之CSR中之任一者的CSR及/或根據本文所描述之SSE中之任一者的SSE可進一步經修飾為含有此項技術中已知且易於獲得之額外非蛋白性部分。適合於衍生caTCR及/或CSR及/或SSE之部分包括(但不限於)水溶性聚合物。水溶性聚合物之非限制性實例包括(但不

限於)聚乙二醇(PEG)、乙二醇/丙二醇共聚物、羧甲基纖維素、聚葡萄糖、聚乙烯醇、聚乙烯吡咯啉酮、聚-1,3-二氧雜環戊烷、聚-1,3,6-三噁烷、乙烯/順丁烯二酸酐共聚物、聚胺基酸(均聚物或無規共聚物)及聚葡萄糖或聚(N-乙烯吡咯啉酮)聚乙二醇、聚丙二醇均聚物、聚氧化丙烯/氧化乙烯共聚物、聚氧乙基化多元醇(例如甘油)、聚乙烯醇及其混合物。聚乙二醇丙醛因其於水中之穩定性而可在製造中具有優勢。聚合物可具有任何分子量，且可為分支鏈或未分支的。附接至caTCR及/或CSR及/或SSE之聚合物之數目可變化，且若附接超過一個聚合物，則其可為相同或不同分子。大體而言，用於衍生之聚合物之數目及/或類型可基於包括但不限於以下之考量來判定：待改良之caTCR及/或CSR及/或SSE之特定特性或功能，而不管caTCR及/或CSR及/或SSE衍生物是否將用於經限定條件下之療法等。

**【0277】** 在一些實施例中，提供caTCR及/或CSR及/或SSE與可藉由暴露於輻射而選擇性加熱之非蛋白性部分之結合物。在一些實施例中，非蛋白質部分為碳奈米管(Kam等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605 (2005))。輻射可具有任何波長，且包括(但不限於)不損害普通細胞但將非蛋白質部分加熱至殺滅caTCR及/或CSR及/或SSE-非蛋白性部分近側之細胞之溫度的波長。

#### caTCR加CSR免疫細胞之製備

**【0278】** 在一個態樣中，本發明提供表現根據本文所描述之實施例中之任一者之caTCR及CSR的免疫細胞(諸如淋巴細胞，例如T細胞)。本文提供製備表現caTCR及CSR之免疫細胞(諸如T細胞) (caTCR加CSR免疫細胞，諸如caTCR加CSR T細胞)的例示性方法。

【0279】 在一些實施例中，可藉由將編碼caTCR（諸如本文所描述之caTCR中之任一者）及CSR（諸如本文所描述之CSR中之任一者）之一或多個核酸（包括例如慢病毒載體）引入至免疫細胞中來產生caTCR加CSR免疫細胞（諸如caTCR加CSR T細胞），該caTCR特異性結合於靶抗原（諸如疾病相關抗原），該CSR特異性結合於靶配體。將一或多個核酸引入至免疫細胞中可使用此項技術中已知之技術實現，諸如本文針對核酸所描述之彼等技術。在一些實施例中，本發明之caTCR加CSR免疫細胞（諸如caTCR加CSR T細胞）能夠在活體內複製，產生可促成與靶抗原之表現相關之疾病（諸如癌症或病毒感染）之持續控制的長期存留。

【0280】 在一些實施例中，本發明係關於使用淋巴細胞輸注投與表現根據本文所描述之caTCR中之任一者的特異性結合於靶抗原之caTCR及根據本文所描述之CSR中之任一者的特異性結合於靶配體之CSR的經基因修飾之T細胞，以用於治療患有與靶抗原之表現相關之疾病及/或病症（在本文中亦被稱作「靶抗原-陽性」或「TA-陽性」疾病或病症）或有罹患該疾病及/或病症風險的患者，該疾病及/或病症包括（例如）癌症或病毒感染。在一些實施例中，在治療中使用自體淋巴細胞輸注。自需要治療之患者收集自體PBMC且使用本文所描述及此項技術中已知之方法活化及擴增T細胞，且隨後將其輸注回患者體內。

【0281】 在一些實施例中，提供一種表現根據本文所描述之caTCR中之任一者的特異性結合於靶抗原的caTCR及根據本文所描述之CSR中之任一者的特異性結合於靶配體的CSR的T細胞（在本文中亦被稱作「caTCR加CSR T細胞」）。本發明之caTCR加CSR T細胞可經歷穩固的活體內T細胞擴增且可建立以高含量在血液及骨髓中存留較長時間的靶抗原特異性記

憶細胞。在一些實施例中，輸注至患者體內的本發明之caTCR加CSR T細胞可活體內消除患有靶抗原相關疾病之患者內呈遞靶抗原之細胞，諸如呈遞靶抗原之癌症或病毒感染細胞。在一些實施例中，輸注至患者體內的本發明之caTCR加CSR T細胞可活體內消除患有難以用至少一種習知療法治療之靶抗原相關疾病的患者內呈遞靶抗原之細胞，諸如呈遞靶抗原之癌症或病毒感染細胞。

【0282】 在T細胞擴增及基因修飾之前，T細胞來源獲自個體。T細胞可獲自許多來源，包括末梢血液單核細胞、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、肋膜積液、脾組織及腫瘤。在本發明之一些實施例中，可使用任何數目的此項技術中可用之T細胞株。在本發明之一些實施例中，T細胞可獲自使用任何數目的熟習此項技術者已知之技術(諸如FICOLL™分離)自個體收集之血液單元。在一些實施例中，藉由清除術獲得來自個體之循環血液的細胞。清除術產物通常含有淋巴細胞，包括T細胞、單核細胞、粒細胞、B細胞、其他成核白血球、紅血球及血小板。在一些實施例中，藉由清除術收集之細胞可經洗滌以移除血漿部分且將細胞置於適當緩衝液或培養基中以用於後續處理步驟。在一些實施例中，細胞用磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)洗滌。在一些實施例中，洗滌溶液缺乏鈣且可能缺乏鎂或可能缺乏許多(若並非全部)二價陽離子。如一般技術者將易於瞭解，洗滌步驟可藉由熟習此項技術者已知之方法實現，諸如藉由根據製造商說明書使用半自動「流通」離心機(例如，Cobe 2991細胞處理器、Baxter CytoMate或Haemonetics細胞保存器5)。洗滌之後，可將細胞再懸浮於多種生物相容性緩衝液中，諸如無Ca<sup>2+</sup>、無Mg<sup>2+</sup>之PBS、PlasmaLyte A或其他具有或不具有緩衝液之生理鹽水溶液。

或者，可移除清除術樣本之非所要組分且細胞直接再懸浮於培養基中。

【0283】 在一些實施例中，藉由溶解紅血球及例如藉由經 PERCOLL™ 梯度離心或藉由逆流離心淘析耗盡單核細胞而自末梢血液淋巴細胞分離 T 細胞。T 細胞之特異性亞群(諸如 CD3<sup>+</sup>、CD28<sup>+</sup>、CD4<sup>+</sup>、CD8<sup>+</sup>、CD45RA<sup>+</sup> 及 CD45RO<sup>+</sup> T 細胞)可藉由正選擇或負向選擇技術進一步分離。舉例而言，在一些實施例中，藉由用抗 CD3/抗 CD28 (亦即 3×28) 結合之珠粒(諸如 DYNABEADS® M-450 CD3/CD28 T)培育足夠用於所需 T 細胞之正選擇的時間來分離 T 細胞。在一些實施例中，時間為約 30 分鐘。在一些實施例中，時間在 30 分鐘至 36 小時或更長(包括此等數值之間的所有範圍)的範圍內。在一些實施例中，時間為至少 1、2、3、4、5 或 6 小時。在一些實施例中，時間為 10 至 24 小時。在一些實施例中，培育時間為 24 小時。為了自患有白血病之患者分離 T 細胞，使用較長培育時間(諸如 24 小時)可提高細胞產量。在相較於其他細胞類型存在極少 T 細胞的任何情況下可使用較長培育時間分離 T 細胞，諸如自腫瘤組織或免疫功能不全個體分離腫瘤浸潤淋巴細胞(TIL)。此外，使用較長培育時間可提高捕捉 CD8<sup>+</sup> T 細胞之效率。因此，藉由僅縮短或延長允許 T 細胞結合至 CD3/CD28 珠粒之時間及/或藉由增加或減小珠粒與 T 細胞的比率，可關於或針對培養起始或方法期間之其他時間點優先選擇 T 細胞亞群。另外，藉由增加或減小珠粒或其他表面上抗 CD3 及/或抗 CD28 抗體之比率，對於或針對在培養起始時或在其他所要時間點可優先選擇 T 細胞之亞群。熟習此項技術者將認識到本發明之上下文中亦可使用多個選擇回合。在一些實施例中，可能需要進行選擇程序且在活化及擴增過程中使用「未經選擇之」細胞。「未經選擇之」細胞亦可進行其他選擇回合。

【0284】藉由負向選擇富集T細胞群體可使用針對負向選擇之細胞所獨特之表面標記的抗體之組合來實現。一種方法為經負磁性免疫黏附或流動式細胞量測術分選及/或選擇細胞，該負磁性免疫黏附或流動式細胞量測術使用針對負向選擇細胞上存在之細胞表面標記物之單株抗體混合物。舉例而言，為了藉由負向選擇富集CD4<sup>+</sup>細胞，單株抗體混合液通常包括CD 14、CD20、CD11b、CD 16、HLA-DR及CD8之抗體。在一些實施例中，可能需要富集或正選擇調節T細胞，其通常表現CD4<sup>+</sup>、CD25<sup>+</sup>、CD62L<sup>hi</sup>、GITR<sup>+</sup>及FoxP3<sup>+</sup>。或者，在一些實施例中，T調節細胞藉由抗CD25結合珠粒或其他類似選擇方法耗盡。

【0285】為了藉由正向或負向選擇分離出所需細胞群體，可改變細胞濃度及表面(例如粒子，諸如珠粒)。在一些實施例中，可能需要顯著減小珠粒及細胞混合在一起之體積(亦即增加細胞濃度)，以確保細胞及珠粒之最大接觸。舉例而言，在一些實施例中，使用約20億個細胞/毫升之濃度。在一些實施例中，使用約10億個細胞/毫升之濃度。在一些實施例中，使用大於約100,000,000個細胞/毫升。在一些實施例中，使用約10,000,000、15,000,000、20,000,000、25,000,000、30,000,000、35,000,000、40,000,000、45,000,000或50,000,000個細胞/毫升中的任一者之細胞濃度。在一些實施例中，使用約75,000,000、80,000,000、85,000,000、90,000,000、95,000,000或100,000,000個細胞/毫升中的任一者之細胞濃度。在一些實施例中，使用約125,000,000或約150,000,000個細胞/毫升之濃度。使用高濃度可導致增加之細胞產量、細胞活化及細胞擴增。此外，使用高細胞濃度允許更有效捕獲可弱表現所關注之靶抗原的細胞(諸如CD28-陰性T細胞)或自其中存在許多腫瘤細胞之樣本(亦即，

白血病血液、腫瘤組織等)更有效捕獲該等細胞。此類細胞群體可具有治療價值且將需要獲得。舉例而言，使用高細胞濃度允許更有效選擇通常具有較弱CD28表現之CD8<sup>+</sup> T細胞。

【0286】 在本發明之一些實施例中，T細胞直接獲自治療之後的患者。就此而言，已觀測到在某些癌症治療之後，特定言之使用破壞免疫系統之藥物治療之後，在患者通常將自治療恢復的時間期間治療之後不久，獲得之T細胞品質可最佳或其離體擴增之能力得到改良。同樣，在使用本文所描述之方法離體操縱之後，此等細胞之增強移植及活體內擴增可呈較佳狀態。因此，本發明之上下文內涵蓋在此恢復階段期間收集血細胞(包括T細胞)、樹突狀細胞或造血譜系之其他細胞。此外，在一些實施例中，移動(例如用GM-CSF移動)及調節方案可用於建立個體內之條件，其中尤其在治療之後的制定時間窗期間宜再增殖、再循環、再生及/或擴增特定細胞類型。說明性細胞類型包括T細胞、B細胞、樹突狀細胞及免疫系統之其他細胞。

【0287】 無論在基因修飾T細胞以表現合乎需要的 $\alpha$ TCR、CSR及視情況存在之SSE之前抑或之後，大體可使用例如以下中所描述之方法來活化或擴增T細胞：美國專利號第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號及美國專利申請公開案第20060121005號。

【0288】 大體而言，本發明之T細胞藉由使與其連接之表面與刺激CD3/TCR複合體相關信號之試劑及刺激T細胞表面上之協同刺激分子之配



體接觸而擴增。特定言之，T細胞群體可諸如藉由與抗CD3抗體或其抗原結合片段，或固定於表面上之抗CD2抗體接觸，或藉由同與鈣離子載體結合之蛋白激酶C活化劑(例如苔蘚蟲素)接觸而刺激。為了協同刺激T細胞表面上之輔助分子，使用結合輔助分子之配體。舉例而言，T細胞群體可與抗CD3抗體及抗CD28抗體在適於刺激T細胞增殖之條件下接觸。為了刺激CD4<sup>+</sup> T細胞或CD8<sup>+</sup> T細胞之增殖，抗CD3抗體及抗CD28抗體。抗CD28抗體之實例包括9.3、B-T3、XR-CD28 (Diacclone, Besançon, France)，可如此項技術中通常已知之其他方法使用(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)。

## 基因修飾

【0289】 在一些實施例中，本發明之caTCR加CSR免疫細胞(諸如caTCR加CSR T細胞)係藉由用編碼如本文所描述之caTCR及如本文中所描述之CSR的一或多種病毒載體轉導免疫細胞(諸如藉由本文所描述之方法製備的T細胞)而產生。病毒載體傳遞系統包括DNA及RNA病毒，其在傳遞至免疫細胞之後具有游離或整合基因組。為了評述基因療法程序，參見Anderson, *Science* 256:808-813 (1992)；Nabel及Feigner, *TIBTECH* 11 :211 - 217 (1993)；Mitani及Caskey, *TIBTECH* 11 :162-166 (1993)；Dillon, *TIBTECH* 11 : 167-175 (1993)；Miller, *Nature* 357:455-460 (1992)；Van Brunt, *Biotechnology* 6(10): 1149-1 154 (1988)；Vigne, *Restorative Neurology and Neuroscience* 8:35-36 (1995)；Kremer及Perricaudet, *British Medical Bulletin* 51(1):31-44 (1995)；及Yu等人, *Gene Therapy* 1 :13-26 (1994)。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細

胞包含整合至caTCR加CSR免疫細胞基因組中的一或多個載體。在一些實施例中，該一或多個病毒載體為慢病毒載體。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞為包含整合至其基因組中之慢病毒載體的caTCR加CSR T細胞。

【0290】 在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞為經修飾以阻斷或減少其內源性TCR鏈中之一者或兩者之表現的T細胞。舉例而言，在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞為經修飾以阻斷或減少TCR  $\alpha$ 及/或 $\beta$ 鏈之表現的 $\alpha\beta$  T細胞，或者caTCR加CSR免疫細胞為經修飾以阻斷或減少TCR  $\gamma$ 及/或 $\delta$ 鏈之表現的 $\gamma\delta$  T細胞。用於破壞基因表現之細胞修飾包括此項技術中已知的任何此類技術，包括例如RNA干擾(例如，siRNA、shRNA、miRNA)、基因編輯(例如，基於CRISPR或TALEN之基因剔除)及其類似者。

【0291】 在一些實施例中，使用CRISPR/Cas系統產生T細胞之內源性TCR鏈中之一者或兩者之表現減少的caTCR加CSR T細胞。為了評述基因編輯之CRISPR/Cas系統，參見例如Jian W及Marraffini LA, *Annu. Rev. Microbiol.* 69, 2015；Hsu PD等人, *Cell*, 157(6):1262-1278, 2014；及O'Connell MR 等人, *Nature* 第516卷:第263-266頁, 2014。在一些實施例中，使用基於TALEN之基因組編輯產生T細胞之內源性TCR鏈中之一者或兩者之表現減少的caTCR加CSR T細胞。

## 富集

【0292】 在一些實施例中，提供一種在異質性細胞群體中富集根據本文所描述之caTCR加CSR免疫細胞中之任一者的caTCR加CSR免疫細胞的方法。

【0293】可藉由正選擇技術富集特異性結合於靶抗原及靶配體之caTCR加CSR免疫細胞(諸如caTCR加CSR T細胞)的特異性亞群。舉例而言，在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞(諸如caTCR加CSR T細胞)藉由與靶抗原結合之珠粒及/或靶配體結合之珠粒一起培育足以正選擇所需caTCR加CSR免疫細胞之時間來進行富集。在一些實施例中，時間為約30分鐘。在一些實施例中，時間在30分鐘至36小時或更長(包括此等數值之間的所有範圍)的範圍內。在一些實施例中，時間為至少1、2、3、4、5或6小時。在一些實施例中，時間為10至24小時。在一些實施例中，培育時間為24小時。關於在異質性細胞群體中分離含量低之caTCR加CSR免疫細胞時，使用較長培育時間(諸如24小時)可提高細胞產量。在相較於其他細胞類型，caTCR加CSR免疫細胞之含量較少之任何情形下，可使用較長培育時間分離caTCR加CSR免疫細胞。熟習此項技術者咸了解本發明內容中亦可選擇使用多個回合。

【0294】為了藉由正選擇來分離所需caTCR加CSR免疫細胞群體，可以變化細胞濃度及表面(例如，粒子，諸如珠粒)。在一些實施例中，可能需要顯著減小珠粒及細胞混合在一起之體積(亦即增加細胞濃度)，以確保細胞及珠粒之最大接觸。舉例而言，在一些實施例中，使用約20億個細胞/毫升之濃度。在一些實施例中，使用約10億個細胞/毫升之濃度。在一些實施例中，使用大於約100,000,000個細胞/毫升。在一些實施例中，使用約10,000,000、15,000,000、20,000,000、25,000,000、30,000,000、35,000,000、40,000,000、45,000,000或50,000,000個細胞/毫升中的任一者之細胞濃度。在一些實施例中，使用約75,000,000、80,000,000、85,000,000、90,000,000、95,000,000或100,000,000個細胞/毫升中的任

一者之細胞濃度。在一些實施例中，使用約125,000,000或約150,000,000個細胞/毫升之濃度。使用高濃度之結果可以提高細胞產量、細胞活化及細胞擴增。此外，使用高細胞濃度可以更有效捕捉可能弱表現caTCR及/或CSR之caTCR加CSR免疫細胞。

**【0295】** 在有些本文所描述之任何此類實施例中，富集之結果為caTCR加CSR免疫細胞之耗竭程度最小或實質上無耗竭。舉例而言，在一些實施例中，富集之結果為caTCR加CSR免疫細胞之耗竭少於約50%（諸如少於約45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%中之任一者）。免疫細胞耗竭可藉由此項技術中已知之任何方式測定，包括本文所描述之任何方式。

**【0296】** 在有些本文所描述之任何此類實施例中，富集之結果為caTCR加CSR免疫細胞之終末分化程度最小或實質上無終末分化。舉例而言，在一些實施例中，富集之結果為少於約50%（諸如少於約45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%中之任一者）的caTCR加CSR免疫細胞發生終末分化。免疫細胞分化可藉由此項技術中已知之任何方式測定，包括本文所描述之任何方式。

**【0297】** 在有些本文所描述之任何此類實施例中，富集之結果為caTCR加CSR免疫細胞上之caTCR及/或CSR之內化程度最小或實質上無內化。舉例而言，在一些實施例中，富集之結果為caTCR加CSR免疫細胞上小於約50%（諸如小於約45%、40%、35%、30%、25%、20%、15%、10%或5%中之任一者）的caTCR及/或CSR發生內化。caTCR加CSR免疫細胞上之caTCR及/或CSR之內化可藉由此項技術中已知之任何方式測定，包括本文所描述之任何方式。

【0298】 在有些本文所描述之任何此類實施例中，富集之結果為caTCR加CSR免疫細胞之增殖增加。舉例而言，在一些實施例中，富集之結果為caTCR加CSR免疫細胞之數目在富集後的至少約10%（諸如約20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、100%、200%、300%、400%、500%、1000%或更大中之至少一者)的增加。

【0299】 因此，在一些實施例中，提供一種在異質性細胞群體中富集表現特異性結合於靶抗原之caTCR及特異性結合於靶配體之CSR的caTCR加CSR免疫細胞的方法，其包含：a)使異質性細胞群體與包含靶抗原或其中所含之一或多個抗原決定基的第一分子及/或包含靶配體或其中所含之一或多個抗原決定基的第二分子接觸，形成包含caTCR加CSR免疫細胞結合於第一分子的複合體及/或包含caTCR加CSR免疫細胞結合於第二分子的複合體；及b)自異質性細胞群體分離複合體，從而產生caTCR加CSR免疫細胞富集的細胞群體。在一些實施例中，第一及/或第二分子經個別地固定至固體支撐體。在一些實施例中，固體擔體為微粒(諸如珠粒)。在一些實施例中，固體擔體為表面(諸如孔的底部)。在一些實施例中，第一及/或第二分子個別地經標籤標記。在一些實施例中，標籤為螢光分子、親和力標籤或磁性標籤。在一些實施例中，該方法進一步包含自第一及/或第二分子溶離caTCR加CSR免疫細胞及回收溶離液。

## 庫篩選

【0300】 在一些實施例中，為分離對靶抗原具有特異性之候選caTCR構築體，caTCR庫(例如表現編碼複數個caTCR之核酸庫的細胞)可暴露於包含靶抗原或其中所含之一或多個抗原決定基之捕獲分子，接著分離特異性結合捕獲分子之庫之親和力成員。在一些實施例中，將捕獲分子

固定於固體擔體上。在一些實施例中，擔體可為珠粒表面、微量滴定盤、免疫管或此項技術中已知適用於此類目的的任何材料。在一些實施例中，在溶液中發生與經標記捕獲分子(例如經生物素標記之捕獲分子)的相互作用。在一些實施例中，該程序涉及一或多個用於移除非特異性且非反應性庫成員的洗滌步驟(淘選)。在一些實施例中，為了純化溶液中之複合體，藉由固定或藉由離心收集複合體。在一些實施例中，在可溶性經生物素標記之捕獲分子上捕獲親和力成員，隨後將親和力複合體(親和力成員及捕獲分子)固定於抗生蛋白鏈菌素珠粒上。在一些實施例中，固體擔體為珠粒。在一些實施例中，珠粒包括例如磁性珠粒(例如來自 Bangs Laboratories, Polysciences inc., Dynal Biotech, Miltenyi Biotech or Quantum Magnetic)、非磁性珠粒(例如Pierce and Upstate technology)、單分散珠粒(例如 Dynal Biotech and Microparticle GmbH)及多分散珠粒(例如Chemagen)。磁性珠粒之使用在文獻中已有詳盡描述(Uhlen, M等人(1994) Advances in Biomagnetic Separation, BioTechniques press, Westborough, MA)。在一些實施例中，藉由正選擇純化親和力成員。在一些實施例中，藉由負選擇純化親和力成員以移除不合需要之庫成員。在一些實施例中，藉由正及負選擇步驟純化親和力成員。

【0301】 在一些實施例中，為分離對靶配體具有特異性之候選CSR構築體，CSR庫(例如表現編碼複數個CSR之核酸庫的細胞)可暴露於包含靶配體或其中所含之一或多個抗原決定基之捕獲分子，接著分離特異性結合捕獲分子之庫之親和力成員。在一些實施例中，將捕獲分子固定於固體擔體上。在一些實施例中，擔體可為珠粒表面、微量滴定盤、免疫管或此項技術中已知適用於此類目的的任何材料。在一些實施例中，在溶液中發

生與經標記捕獲分子(例如經生物素標記之捕獲分子)的相互作用。在一些實施例中，該程序涉及一或多個用於移除非特異性且非反應性庫成員的洗滌步驟(淘選)。在一些實施例中，為了純化溶液中之複合體，藉由固定或藉由離心收集複合體。在一些實施例中，在可溶性經生物素標記之捕獲分子上捕獲親和力成員，隨後將親和力複合體(親和力成員及捕獲分子)固定於抗生蛋白鏈菌素珠粒上。在一些實施例中，固體擔體為珠粒。在一些實施例中，珠粒包括例如磁性珠粒(例如來自 Bangs Laboratories, Polysciences inc., Dynal Biotech, Miltenyi Biotech or Quantum Magnetic)、非磁性珠粒(例如Pierce and Upstate technology)、單分散珠粒(例如 Dynal Biotech and Microparticle GmbH)及多分散珠粒(例如 Chemagen)。在一些實施例中，藉由正選擇純化親和力成員。在一些實施例中，藉由負選擇純化親和力成員以移除不合需要之庫成員。在一些實施例中，藉由正及負選擇步驟純化親和力成員。

【0302】大體而言，用於製備庫構築體之技術將基於已知的基因工程技術。就此而言，將編碼庫中待表現之 $\alpha$ TCR或CSR的核酸序列併入至適合於待使用類型之表現系統的表現載體中。用於在諸如CD3+細胞之細胞中呈現的適當表現載體在此項技術中為熟知的且有描述。舉例而言，在一些實施例中，表現載體為病毒載體，諸如慢病毒載體。

【0303】在一些實施例中，提供一種核酸庫，其包含編碼複數個根據本文所描述之實施例中之任一者的 $\alpha$ TCR的序列。在一些實施例中，核酸庫包含編碼複數個 $\alpha$ TCR之病毒載體。在一些實施例中，病毒載體為慢病毒載體。

【0304】在一些實施例中，提供一種核酸庫，其包含編碼根據本文

所描述之實施例中之任一者的複數個CSR的序列。在一些實施例中，核酸庫包含編碼複數個CSR之病毒載體。在一些實施例中，病毒載體為慢病毒載體。

【0305】 在一些實施例中，提供一種針對編碼對靶抗原具有特異性之caTCR之序列而篩選根據本文所描述之實施例中之任一者的核酸庫的方法，其包含：a)引入核酸庫至複數個細胞中，使得caTCR表現於複數個細胞上之表面上；b)用包含靶抗原或其中所含之一或多個抗原決定基的捕獲分子培育複數個細胞；c)收集結合於捕獲分子之細胞；及d)自步驟c)中所收集之細胞分離編碼caTCR之序列，由此鑑別對靶抗原具有特異性之caTCR。在一些實施例中，該方法進一步包含一或多個洗滌步驟。在一些實施例中，一或多個洗滌步驟係在步驟b)與c)之間進行。在一些實施例中，複數個細胞為複數個CD3<sup>+</sup>細胞。在一些實施例中，將捕獲分子固定於固體擔體上。在一些實施例中，固體擔體為珠粒。在一些實施例中，收集結合於捕獲分子之細胞包含自結合於固體擔體之捕獲配體溶離細胞及收集溶離液。在一些實施例中，捕獲分子經標籤標記。在一些實施例中，標籤為螢光分子、親和力標籤或磁性標籤。在一些實施例中，收集結合於捕獲分子之細胞包含分離包含該等細胞及經標記配體的複合體。在一些實施例中，自複合體解離該等細胞。

【0306】 在一些實施例中，提供一種針對編碼對靶配體具有特異性之CSR之序列而篩選根據本文所描述之實施例中之任一者的核酸庫的方法，其包含：a)引入核酸庫至複數個細胞中，使得CSR表現於複數個細胞之表面上；b)用包含靶配體或其中所含之一或多個抗原決定基的捕獲分子培育複數個細胞；c)收集結合於捕獲分子之細胞；及d)自步驟c)中所收集



之細胞分離編碼CSR之序列，由此鑑別對靶配體具有特異性之CSR。在一些實施例中，該方法進一步包含一或多個洗滌步驟。在一些實施例中，一或多個洗滌步驟係在步驟b)與c)之間進行。在一些實施例中，複數個細胞為複數個CD3<sup>+</sup>細胞。在一些實施例中，將捕獲分子固定於固體擔體上。在一些實施例中，固體擔體為珠粒。在一些實施例中，收集結合於捕獲分子之細胞包含自結合於固體擔體之捕獲配體溶離細胞及收集溶離液。在一些實施例中，捕獲分子經標籤標記。在一些實施例中，標籤為螢光分子、親和力標籤或磁性標籤。在一些實施例中，收集結合於捕獲分子之細胞包含分離包含該等細胞及經標記配體的複合體。在一些實施例中，自複合體解離該等細胞。

## MHC蛋白

【0307】 MHC I類蛋白質為兩種主要類別之主要組織相容複合體(MHC)分子中的一者(另一者為MHC II類)且發現於身體之幾乎每一成核細胞上。其功能為向T細胞呈現細胞內之蛋白質片段；健康細胞將忽略，而含有外來的或突變的蛋白質之細胞將受到免疫系統攻擊。由於MHC I類蛋白質呈遞源自胞溶質蛋白質之肽，MHC I類呈遞路徑通常稱作胞溶質或內源性路徑。I類MHC分子結合主要由蛋白酶體降解胞溶質蛋白質產生的肽。MHC I:肽複合體接著插入至細胞之質膜中。肽結合於I類MHC分子之胞外部分。因此，I類MHC之功能為向細胞毒性T細胞(CTL)呈現胞內蛋白。然而，I類MHC亦可在稱為交叉呈遞之方法中呈遞產生自外源蛋白質之肽。

【0308】 MHC I類蛋白質由兩個多肽鏈組成： $\alpha$ 及 $\beta$ 2-微球蛋白( $\beta$ 2M)。兩條鏈經由 $\beta$ 2M與 $\alpha$ 3域之相互作用非共價連接。僅 $\alpha$ 鏈為多形的

且由HLA基因編碼，而 $\beta 2M$ 次單元並非多形的且由 $\beta$ -2微球蛋白基因編碼。 $\alpha 3$ 域為跨越質膜且與T細胞之CD8共受體相互作用。 $\alpha 3$ -CD8相互作用將MHC I分子保持在適當的位置，而細胞毒性T細胞表面上之T細胞受體(TCR)結合其 $\alpha 1$ - $\alpha 2$ 雜二聚體配體，且檢查偶合肽之抗原性。 $\alpha 1$ 及 $\alpha 2$ 域摺疊而構成凹槽，用於肽結合。MHC I類蛋白質結合長度為8-10個胺基酸之肽。

【0309】 MHC II類分子為通常僅發現於抗原呈遞細胞上之分子家族，抗原呈遞細胞諸如樹突狀細胞、單核吞噬細胞、一些內皮細胞、胸腺上皮細胞及B細胞。由II類肽呈遞之抗原源自胞外蛋白(並非如同I類中之胞溶質蛋白質)；因此，MHC II類依賴性抗原呈遞路徑稱作胞吞或外源性路徑。MHC II類分子之負載藉由吞噬作用發生；胞外蛋白遭胞吞，在溶酶體中消化，且所得抗原決定基肽片段負載至MHC II類分子上，其隨後遷移至細胞表面。

【0310】 如同MHC I類分子一樣，II類分子亦為雜二聚體，但在此情況下由兩個均質肽組成： $\alpha$ 及 $\beta$ 鏈。子名稱 $\alpha 1$ 、 $\alpha 2$ 等係指HLA基因內之單獨域；各域通常由該基因內之不同外顯子編碼，且一些基因具有編碼前導序列、跨膜序列等之其他域。因為MHC II類分子之抗原結合凹槽在兩個末端均打開而I類分子上之對應凹槽在各末端關閉，所以由MHC II類分子呈遞之抗原更長，長度一般介於15個與24個胺基酸殘基之間。

【0311】 人類白血球抗原(HLA)基因為MHC基因之人類型式。人體中之三種主要MHC I類蛋白質為HLA-A、HLA-B及HLA-C，而3種次要MHC I類蛋白質為HLA-E、HLA-F及HLA-G。人體中參與抗原呈遞之三種主要MHC II類蛋白質為HLA-DP、HLDA-DQ及HLA-DR，而其他

MHC II類蛋白質HLA-DM及HLA-DO則參與抗原之內部處理及負載。HLA-A位列人體中具有最快演進編碼序列之基因中。截至2013年12月，存在2432種編碼1740種活性蛋白質及117種無效蛋白質之已知HLA-A對偶基因。HLA-A基因位於染色體6之短臂上且編碼HLA-A之較大 $\alpha$ 鏈成分。HLA-A  $\alpha$ -鏈之變化對於HLA功能至關重要。此變化促進群體中之基因多樣性。由於各HLA對於某些結構之肽具有不同親和力，所以較多種HLA意謂較多種抗原『呈遞』於細胞表面上，提高群體子組將對任何指定外來侵入物具抗性之可能性。此降低單一病原體具有消滅整個人類群體之能力的可能性。各個體可表現至多兩種類型之HLA-A，分別來自其親本。一些個體將自親本繼承相同HLA-A，減少其個體HLA多樣性；然而，大多數個體將接受HLA-A之兩種不同複本。所有HLA組遵循此相同模式。換言之，個體可僅表現2432種已知HLA-A對偶基因中之一者或兩者。

**【0312】** 所有對偶基因接受至少四種數位分類，例如HLA-A\*02:12。A表示對偶基因所屬的HLA基因。存在許多HLA-A對偶基因，使得藉由血清型之分類使分類簡化。下一對數字指示此分配。舉例而言，HLA-A\*02:02、HLA-A\*02:04及HLA-A\*02:324全部為A2血清型之成員(藉由\*02字首指示)。此組為造成HLA相容性之主要因素。此後的所有數字無法藉由血清分型測定且經由基因定序指示。第二組數字指示產生何種HLA蛋白。此等以發現順序指定且截至2013年12月，存在456種不同的已知HLA-A02蛋白(指定名稱HLA-A\*02:01至HLA-A\*02:456)。可能的最短HLA名稱包括此等細節中之兩者。超出其的各擴展表示可或可不改變蛋白質之核苷酸變化。

**【0313】** 在一些實施例中，Fab樣抗原結合模組特異性結合於包含

來源於疾病相關抗原(諸如腫瘤相關或病毒編碼抗原)之肽及MHC I類蛋白質的複合體，其中MHC I類蛋白質為HLA-A、HLA-B、HLA-C、HLA-E、HLA-F或HLA-G。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-A、HLA-B或HLA-C。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-A。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-B。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-C。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-A01、HLA-A02、HLA-A03、HLA-A09、HLA-A10、HLA-A11、HLA-A19、HLA-A23、HLA-A24、HLA-A25、HLA-A26、HLA-A28、HLA-A29、HLA-A30、HLA-A31、HLA-A32、HLA-A33、HLA-A34、HLA-A36、HLA-A43、HLA-A66、HLA-A68、HLA-A69、HLA-A74或HLA-A80。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-A02。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-A\*02:01-555中的任一者，諸如HLA-A\*02:01、HLA-A\*02:02、HLA-A\*02:03、HLA-A\*02:04、HLA-A\*02:05、HLA-A\*02:06、HLA-A\*02:07、HLA-A\*02:08、HLA-A\*02:09、HLA-A\*02:10、HLA-A\*02:11、HLA-A\*02:12、HLA-A\*02:13、HLA-A\*02:14、HLA-A\*02:15、HLA-A\*02:16、HLA-A\*02:17、HLA-A\*02:18、HLA-A\*02:19、HLA-A\*02:20、HLA-A\*02:21、HLA-A\*02:22或HLA-A\*02:24。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-A\*02:01。所有高加索人(Caucasian)中有39-46%的人表現HLA-A\*02:01且因此表示適合選擇MHC I類蛋白質用於本發明。

**【0314】** 在一些實施例中，Fab樣抗原結合模組特異性結合於包含來源於疾病相關抗原(諸如腫瘤相關或病毒編碼抗原)之肽及MHC II類蛋白的複合體，其中MHC II類蛋白為HLA-DP、HLA-DQ或HLA-DR。在一

些實施例中，MHC II類蛋白為HLA-DP。在一些實施例中，MHC II類蛋白為HLA-DQ。在一些實施例中，MHC II類蛋白為HLA-DR。

【0315】適用於產生Fab樣抗原結合模組之肽可例如基於蛋白酶體及免疫蛋白酶體之HLA（諸如HLA-A\*02:01）結合基元及裂解位點的存在、使用熟習此項技術者已知之電腦預測模型來確定。關於預測MHC結合位點，此類模型包括(但不限於) ProPred1（更詳細地描述於Singh及Raghava, *ProPred: prediction of HLA-DR binding sites. BIOINFORMATICS* 17(12):1236-1237, 2001 中)及 SYFPEITHI（參見Schuler等人 *SYFPEITHI, Database for Searching and T-Cell Epitope Prediction. Immunoinformatics Methods in Molecular Biology*, 第409卷(1): 75-93, 2007)。

【0316】一旦鑑別出適當肽，即可根據熟習此項技術者熟知之方案完成肽合成。本發明之肽由於其相對較小尺寸而可根據習知肽合成技術直接在溶液中或固體擔體上合成。各種自動合成器為可商購的且可根據已知方案使用。在溶液相中合成肽已變為大規模生產合成肽之公認程序且因此為製備本發明之肽之適合替代方法(參見例如Solid Phase Peptide Synthesis, John Morrow Stewart及Martin等人 *Application of Almez-mediated Amidation Reactions to Solution Phase Peptide Synthesis*, Tetrahedron Letters 第39卷, 第1517-1520頁, 1998)。

## 醫藥組合物

【0317】本文亦提供caTCR加CSR免疫細胞組合物(諸如在本文中亦被稱作調配物之醫藥組合物)，其包含免疫細胞(諸如T細胞)，該免疫細胞在其表面上呈遞根據本文所描述之caTCR中之任一者的caTCR及根據本文

所描述之CSR中之任一者的CSR。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞組合物為醫藥組合物。

【0318】該組合物可包含：均質細胞群體，其包含相同細胞類型之caTCR加CSR免疫細胞及表現相同caTCR及CSR，或異質細胞群體，其包含含有不同類型之caTCR加CSR免疫細胞之複數個caTCR加CSR免疫細胞群體，表現不同caTCR及/或表現不同CSR。該組合物可進一步包含不為caTCR加CSR免疫細胞的細胞。

【0319】因此，在一些實施例中，提供一種caTCR加CSR免疫細胞組合物，其包含相同細胞類型之caTCR加CSR免疫細胞(諸如caTCR加CSR T細胞)之均質細胞群體及表現相同caTCR及CSR。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞為T細胞。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞係選自由以下組成之群：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、自然殺手T細胞及抑制T細胞。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞組合物為醫藥組合物。

【0320】在一些實施例中，提供一種caTCR加CSR免疫細胞組合物，其包含異質細胞群體，該異質細胞群體包含含有不同細胞類型之caTCR加CSR免疫細胞之複數個caTCR加CSR免疫細胞群體，表現不同caTCR及/或表現不同CSR。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞為T細胞。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體彼此獨立地為選自由以下組成之群的細胞類型：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、自然殺手T細胞及抑制T細胞。在一些實施例中，組合物中之全部caTCR加CSR免疫細胞為相同細胞類型(例如全部caTCR加CSR免疫細胞為細胞毒性T細胞)。在一些實施例中，至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體具有不同於其他

caTCR加CSR免疫細胞群體之細胞類型(例如，一個caTCR加CSR免疫細胞群體由細胞毒性T細胞組成，且另一caTCR加CSR免疫細胞群體由天然殺手T細胞組成)。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現相同caTCR。在一些實施例中，至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的caTCR。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的caTCR。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於相同靶抗原之caTCR。在一些實施例中，至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的靶抗原之caTCR (例如，一個caTCR加CSR免疫細胞群體特異性結合於pMHC複合體且另一caTCR加CSR免疫細胞群體特異性結合於細胞表面受體)。在一些實施例中，在至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於不同靶抗原之caTCR的情況下，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於與相同疾病或病症相關之靶抗原(例如，各靶抗原與諸如乳癌之癌症相關)的caTCR。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現相同CSR。在一些實施例中，至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的CSR。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的CSR。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於相同靶配體之CSR。在一些實施例中，至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的靶配體之CSR (例如，一個caTCR加CSR免疫細胞群體特異性結合於pMHC複合體且另一caTCR加CSR免疫細胞群體特異性結合於細胞表面受體)。在一些實施例

中，在至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於不同靶配體之CSR的情況下，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於與相同疾病或病症相關之靶配體(例如，各靶配體與諸如乳癌之癌症相關)的CSR。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞組合物為醫藥組合物。

【0321】 因此，在一些實施例中，提供一種caTCR加CSR免疫細胞組合物，其包含複數個根據本文所描述之實施例中之任一者的caTCR加CSR免疫細胞群體，其中組合物中之所有caTCR加CSR免疫細胞具有相同細胞類型(例如，所有caTCR加CSR免疫細胞為細胞毒性T細胞)，且其中各caTCR加CSR免疫細胞群體表現不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的caTCR。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞為T細胞。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞係選自由以下組成之群：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、自然殺手T細胞及抑制T細胞。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於相同靶抗原之caTCR。在一些實施例中，至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的靶抗原之caTCR (例如，一個caTCR加CSR免疫細胞群體特異性結合於pMHC複合體且另一caTCR加CSR免疫細胞群體特異性結合於細胞表面受體)。在一些實施例中，在至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於不同靶抗原之caTCR的情況下，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於與相同疾病或病症相關之靶抗原(例如，各靶抗原與諸如乳癌之癌症相關)的caTCR。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞組合物為醫藥組合物。

【0322】 在一些實施例中，提供一種caTCR加CSR免疫細胞組合物，其包含複數個根據本文所描述之實施例中之任一者的caTCR加CSR免



疫細胞群體，其中組合物中之所有caTCR加CSR免疫細胞具有相同細胞類型(例如，所有caTCR加CSR免疫細胞為細胞毒性T細胞)，且其中各caTCR加CSR免疫細胞群體表現不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的caTCR。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞為T細胞。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞係選自由以下組成之群：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、自然殺手T細胞及抑制T細胞。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於相同靶配體之CSR。在一些實施例中，至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的靶配體之CSR(例如，一個caTCR加CSR免疫細胞群體特異性結合於pMHC複合體且另一caTCR加CSR免疫細胞群體特異性結合於細胞表面受體)。在一些實施例中，在至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於不同靶配體之CSR的情況下，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於與相同疾病或病症相關之靶配體(例如，各靶配體與諸如乳癌之癌症相關)的CSR。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞組合物為醫藥組合物。

【0323】 在一些實施例中，提供一種組合物，其包含複數個根據本文所描述之實施例中之任一者的caTCR加CSR免疫細胞群體，其中至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體具有不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的細胞類型。在一些實施例中，所有caTCR加CSR免疫細胞群體具有不同細胞類型。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞為T細胞。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體彼此獨立地為選自由以下組成之群的細胞類型：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、自然殺手T細胞及抑制T細胞。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現相同caTCR。在

一些實施例中，至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的caTCR。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的caTCR。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於相同靶抗原之caTCR。在一些實施例中，至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的靶抗原之caTCR（例如，一個caTCR加CSR免疫細胞群體特異性結合於pMHC複合體且另一caTCR加CSR免疫細胞群體特異性結合於細胞表面受體）。在一些實施例中，在至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於不同靶抗原之caTCR的情況下，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於與相同疾病或病症相關之靶抗原（例如，各靶抗原與諸如乳癌之癌症相關）的caTCR。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現相同CSR。在一些實施例中，至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的CSR。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的CSR。在一些實施例中，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於相同靶配體之CSR。在一些實施例中，至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於不同於其他caTCR加CSR免疫細胞群體的靶配體之CSR（例如，一個caTCR加CSR免疫細胞群體特異性結合於pMHC複合體且另一caTCR加CSR免疫細胞群體特異性結合於細胞表面受體）。在一些實施例中，在至少一個caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於不同靶配體之CSR的情況下，各caTCR加CSR免疫細胞群體表現特異性結合於與相同疾病或病症相關之靶配體（例如，各靶配體與諸如乳癌之癌症相關）的CSR。在一些

實施例中，caTCR加CSR免疫細胞組合物為醫藥組合物。

【0324】 在組合物製備期間的各個時刻，可能需要或者宜低溫保存細胞。術語「冷凍 (frozen/freezing)」及「低溫保存 (cryopreserved/cryopreserving)」可互換使用。冷凍包括冷凍乾燥。

【0325】 如一般技術者所理解，冷凍細胞可具破壞性(參見Mazur, P., 1977, Cryobiology 14:251-272)，但存在大量可供防止此類破壞用之程序。舉例而言，可藉由(a)使用低溫保護劑、(b)控制冷凍速率及/或(c)在可使降解反應降到最低的足夠低的溫度下儲存來避免破壞。例示性低溫保護劑包括二甲亞砜(DMSO) (Lovelock及Bishop, 1959, Nature 183:1394-1395; Ashwood-Smith, 1961, Nature 190:1204-1205)、甘油、聚乙烯吡咯啉酮(Rinfret, 1960, Ann. N.Y. Acad. Sci. 85:576)、聚乙二醇(Sloviter及Ravdin, 1962, Nature 196:548)、白蛋白、聚葡萄糖、蔗糖、乙二醇、i-赤藻糖醇、D-核糖醇、D-甘露糖醇(Rowe等人, 1962, Fed. Proc. 21 :157)、D-山梨糖醇、i-肌醇、D-乳糖、氯化膽鹼(Bender等人, 1960, J. Appl. Physiol. 15:520)、胺基酸(Phan The Tran及Bender, 1960, Exp. Cell Res. 20:651)、甲醇、乙醯胺、甘油單乙酸酯(Lovelock, 1954, Biochem. J. 56:265)及無機鹽(Phan The Tran及Bender, 1960, Proc. Soc. Exp. Biol. Med. 104:388; Phan The Tran及Bender, 1961, Radiobiology, Proceedings of the Third Australian Conference on Radiobiology, Ilbery編, Butterworth, London, 第59頁)。在特定實施例中，可使用DMSO。添加血漿(例如，至20-25%之濃度)可強化DMSO之保護作用。在添加DMSO之後，細胞可保持在0℃下直至冷凍，因為1%之DMSO濃度在高於4℃之溫度下可具有毒性。

【0326】 在細胞之低溫保存中，緩慢控制的冷卻速率可為關鍵的且不同低溫保護劑(Rapatz等人, 1968, *Cryobiology* 5(1): 18-25)及不同細胞類型具有不同的最佳冷卻速率(關於冷卻速度對幹細胞之存活率及對於其移植潛能的影響，參見例如Rowe及Rinfret, 1962, *Blood* 20:636；Rowe, 1966, *Cryobiology* 3(1):12-18；Lewis等人, 1967, *Transfusion* 7(1):17-32；及Mazur, 1970, *Science* 168:939-949)。水變成冰之融化階段的熱量應該極少。冷卻程序可藉由使用例如可程式化冷凍裝置或甲醇浴液程序進行。可程式化冷凍設備允許測定最佳冷卻速率且促成標準可再現冷卻。

【0327】 在特定實施例中，經DMSO處理之細胞可於冰上預先冷卻且轉移至含有經冷藏之甲醇的托盤中，其又置放於機械製冷機(例如，Harris或Revco)中於-80℃下。甲醇浴液及樣本之熱電偶量測指示1℃至3℃/分鐘之冷卻速率可為較佳的。在至少兩個小時之後，樣本可達到-80℃之溫度且可直接置放於液氮(-196℃)中。

【0328】 在徹底冷凍之後，細胞可迅速轉移至長期低溫儲存容器中。在一較佳實施例中，樣本可低溫儲存於液氮(-196℃)或蒸氣(-1℃)中。高效液氮冰箱之可用性有助於此類儲存。

【0329】 關於操控、低溫保存及長期儲存細胞之其他考慮因素及程序可見於以下例示性參考文獻中：美國專利第4,199,022號、第3,753,357號及第4,559,298號；Gorin, 1986, *Clinics In Haematology* 15(1):19-48；Bone-Marrow Conservation, Culture and Transplantation, Proceedings of a Panel, Moscow, 1968年7月22-26日，International Atomic Energy Agency, Vienna, 第107-186頁；Livesey及Linner, 1987, *Nature* 327:255；Linner等人, 1986, *J. Histochem. Cytochem.* 34(9):1 123-1

135 ; Simione, 1992, J. Parenter. Sci. Technol. 46(6):226-32 。

【0330】 在低溫保存之後，可解凍冷凍細胞以根據一般技術者已知之方法使用。冷凍細胞較佳快速解凍且在解凍後立刻冷藏。在特定實施例中，含有冷凍細胞之小瓶可浸入溫水浴中直至其頸部；平緩旋轉將確保細胞懸浮液隨著解凍發生混合且提高自溫水至內部冰塊的熱傳遞。一旦冰完全融化，即可立刻將小瓶置放於冰上。

【0331】 在特定實施例中，可在解凍期間使用防止細胞凝集的方法。例示性方法包括：在冷凍之前及/或之後添加脫氧核糖核酸酶(Spitzer 等人, 1980, Cancer 45:3075-3085)、低分子量聚葡萄糖及檸檬酸鹽、羥乙基澱粉(Stiff等人, 1983, Cryobiology 20:17-24)等。[0162]如一般技術者所理解，若使用對人類有毒的低溫保護劑，則其應在治療用途之前移除。DMSO無嚴重毒性。

【0332】 例示性載劑及細胞投與模式描述於美國專利公開案第 2010/0183564 號第 14-15 頁。其他醫藥載劑描述於 Remington: The Science and Practice of Pharmacy, 第21版, David B. Troy編, Lippicott Williams & Wilkins (2005)中。

【0333】 在特定實施例中，細胞可自培養基收集，且洗滌並於載劑中濃縮至治療有效量。例示性載劑包括鹽水、緩衝鹽水、生理鹽水、水、漢克氏溶液(Hanks' solution)、林格氏溶液(Ringer's solution)、Nonnosol-R (Abbott Labs)、Plasma-Lyte A(R) (Baxter Laboratories, Inc., Morton Grove, IL)、甘油、乙醇及其組合。

【0334】 在特定實施例中，載劑可補充有人血清白蛋白(HSA)或其他人類血清組分或胎牛血清。在特定實施例中，輸注載劑包括含5% HAS

或右旋糖之緩衝鹽水。其他等張劑包括多羟基糖醇，包括三元醇或高級糖醇，諸如甘油、赤藻糖醇、阿拉伯糖醇、木糖醇、山梨糖醇或甘露糖醇。

【0335】載劑可包括緩衝劑，諸如檸檬酸鹽緩衝劑、丁二酸鹽緩衝劑、酒石酸鹽緩衝劑、反丁烯二酸鹽緩衝劑、葡糖酸鹽緩衝劑、草酸鹽緩衝劑、乳酸鹽緩衝劑、乙酸鹽緩衝劑、磷酸鹽緩衝劑、組胺酸緩衝劑及/或三甲胺鹽。

【0336】穩定劑係指寬泛的一類賦形劑，其功能範圍可介於增積劑至有助於防止細胞黏附於容器壁上的添加劑之間。典型的穩定劑可包括多羟基糖醇；胺基酸，諸如精胺酸、離胺酸、甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、組胺酸、丙胺酸、鳥胺酸、L-白胺酸、2-苯丙胺酸、麩胺酸及蘇胺酸；有機糖或糖醇，諸如乳糖、海藻糖、水蘇糖、甘露糖醇、山梨糖醇、木糖醇、核糖醇、肌肉肌醇、半乳糖醇、甘油及環醇，諸如肌醇；PEG；胺基酸聚合物；含硫還原劑，諸如脲、麩胱甘肽、硫辛酸、巯乙酸鈉、硫代甘油、 $\alpha$ -單硫代甘油及硫代硫酸鈉；低分子量多肽(亦即， $<10$ 個殘基)；蛋白質，諸如HSA、牛血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白；親水性聚合物，諸如聚乙烯吡咯啶酮；單醣，諸如木糖、甘露糖、果糖及葡萄糖；雙醣，諸如乳糖、麥芽糖及蔗糖；三醣，諸如棉子糖；及多醣，諸如聚葡萄糖。

【0337】在需要時或在有利時，組合物可包括諸如利多卡因(lidocaine)之局部麻醉劑以減輕注射部位之疼痛。

【0338】例示性防腐劑包括苯酚、苯甲醇、間甲酚、對羟基苯甲酸甲酯、對羟基苯甲酸丙酯、氯化十八烷基二甲基苯甲銨、鹵化苯甲烴銨、氯化六羟基季銨、對羟基苯甲酸烷基酯(諸如對羟基苯甲酸甲酯或丙酯)、兒

茶酚、間苯二酚、環己醇及3-戊醇。

【0339】組合物內之細胞的治療有效量可為大於 $10^2$ 個細胞、大於 $10^3$ 個細胞、大於 $10^4$ 個細胞、大於 $10^5$ 個細胞、大於 $10^6$ 個細胞、大於 $10^7$ 個細胞、大於 $10^8$ 個細胞、大於 $10^9$ 個細胞、大於 $10^{10}$ 個細胞或大於 $10^{11}$ 個細胞。

【0340】在本文所揭示之組合物及調配物中，細胞之體積一般為一公升或更小、500 ml或更小、250 ml或更小、或100 ml或更小。因此，所投與之細胞密度通常為大於 $10^4$ 個細胞/毫升、 $10^7$ 個細胞/毫升或 $10^8$ 個細胞/毫升。

【0341】本文亦提供核酸組合物(諸如醫藥組合物，在本文中亦稱作調配物)，其包含編碼本文所描述之caTCR及/或CSR及/或SSE的核酸中之任一者。在一些實施例中，核酸組合物為醫藥組合物。在一些實施例中，核酸組合物進一步包含以下中之任一者：等張劑、賦形劑、稀釋劑、增稠劑、穩定劑、緩衝劑及/或防腐劑；及/或含水媒劑，諸如純化水、糖水溶液、緩衝溶液、生理鹽水、聚合物水溶液或不含核糖核酸酶之水。待添加之此等添加劑及含水媒劑的量可根據核酸組合物之使用形式適當地選擇。

【0342】本文所揭示之組合物及調配物可經製備用於藉由例如注射、輸注、灌注或灌洗投與。組合物及調配物可進一步經調配用於骨髓、靜脈內、皮內、動脈內、結節內、淋巴管內、腹膜內、病灶內、前列腺內、陰道內、直腸內、局部、鞘內、瘤內、肌肉內、囊泡內及/或皮下注射。

【0343】用於活體內投與之調配物必須為無菌的。此藉由例如經由無菌過濾膜過濾容易地實現。

## 使用caTCR加CSR免疫細胞之治療方法

【0344】 本發明之caTCR加CSR免疫細胞可向個體(例如，諸如人類之哺乳動物)投與，以治療與靶抗原(TA)表現相關之疾病及/或病症(在本文中亦稱作「靶抗原陽性」或「TA陽性」疾病或病症)，包括(例如)癌症及傳染性疾病(諸如病毒感染)。因此，本申請案在一些實施例中提供一種用於治療個體之靶抗原陽性疾病(諸如癌症或病毒感染)的方法，其包含向個體投與有效量之組合物(諸如醫藥組合物)，該組合物包含根據本文所描述之實施例中之任一者的caTCR加CSR免疫細胞。在一些實施例中，癌症係選自例如由以下組成之群：腎上腺皮質癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管癌、結腸直腸癌、食道癌、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、肝細胞癌、頭頸癌、腎癌、白血病、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、間皮瘤、多發性骨髓瘤、胰臟癌、嗜鉻細胞瘤、漿細胞瘤、神經母細胞瘤、卵巢癌、前列腺癌、肉瘤、胃癌、子宮癌及甲狀腺癌。在一些實施例中，病毒感染係由選自由例如以下組成之群的病毒引起的：巨細胞病毒(CMV)、EB病毒(EBV)、B型肝炎病毒(HBV)、卡波西氏肉瘤相關疱疹病毒(KSHV)、人類乳頭狀瘤病毒(HPV)、傳染性軟疣病毒(MCV)、人類T細胞白血病病毒1(HTLV-1)、HIV (人類免疫缺乏病毒)及C型肝炎病毒(HCV)。

【0345】 舉例而言，在一些實施例中，提供一種治療有需要之個體之靶抗原相關疾病(諸如癌症或病毒感染)的方法，其包含向該個體投與有效量之組合物，該組合物包含免疫細胞(諸如T細胞或自然殺手細胞)，該等免疫細胞於其表面上呈遞以下各者：a) caTCR，該caTCR包含i)第一TCRD，其包含源自TCR之跨膜域中之一者的第一TCR-TM，及第二TCRD，其包含源自TCR之另一跨膜域之第二TCR-TM，其中第一及第二



TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子之TCRM，及ii)特異性結合於靶抗原之抗原結合模組，其中該抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD；及b)嵌合信號傳導受體(CSR)，其包含i)特異性結合於靶配體之配體結合域、ii)跨膜域，及iii)能夠提供協同刺激信號至免疫細胞之胞內信號傳導域。在一些實施例中，兩個TCR-TM均為天然存在的。在一些實施例中，該等TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。在一些實施例中，TCR為 $\alpha\beta$  TCR，且第一及第二TCR-TM源自TCR  $\alpha$ 及 $\beta$ 次單元跨膜域。在一些實施例中，TCR為 $\gamma\delta$  TCR，且第一及第二TCR-TM源自TCR  $\gamma$ 及 $\delta$ 次單元跨膜域。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR連接肽或其片段，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR連接肽或其片段。在一些實施例中，第一連接肽包含第一TCR-TM所源自之TCR次單元的連接肽之全部或一部分或其變異體，及/或第二連接肽包含第二TCR-TM所源自之TCR次單元的連接肽之全部或一部分或其變異體。在一些實施例中，第一及第二連接肽藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一TCRD進一步包含第一TCR胞內域，及/或第二TCRD進一步包含第二TCR胞內域。在一些實施例中，第一TCR胞內域包含來自第一TCR-TM所源自之TCR次單元的胞內域的序列，及/或第二TCR胞內域包含來自第二TCR-TM所源自之TCR次單元的胞內域的序列。在一些實施例中，第一TCRD為第一TCR-TM所源自之TCR次單元的片段，及/或第二TCRD為第二TCR-TM所源自之TCR次單元的片段。在一些實施例中，caTCR進一步包含至少一個輔助胞內域，其包含T細胞協同刺激信號傳導序列(諸如來自CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30或CD40)。在一些實施例中，caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中該等第一

及第二穩定域彼此具有使該caTCR穩定的結合親和力。在一些實施例中，第一及第二穩定域藉由二硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二穩定域包含抗體域(諸如C<sub>H</sub>1及C<sub>L</sub>抗體域)或其變異體。在一些實施例中，TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群的TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，該TCRM相較於包含T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。在一些實施例中，TCRM促進caTCR-CD3複合體形成。在一些實施例中，任何兩個caTCR模組或域之間存在間隔模組。在一些實施例中，抗原結合模組為抗體部分。在一些實施例中，抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv(scFv)。在一些實施例中，抗原結合模組為多特異性的(例如，雙特異性的)。在一些實施例中，靶抗原為細胞表面抗原。在一些實施例中，細胞表面抗原係選自由蛋白質、碳水化合物及脂質組成之群。在一些實施例中，細胞表面抗原為疾病相關抗原，諸如腫瘤相關或病毒編碼抗原。在一些實施例中，細胞表面抗原為CD19、ROR1、ROR2、BCMA、GPCR5D或FCRL5。在一些實施例中，靶抗原為表面呈遞肽/MHC複合體。在一些實施例中，肽/MHC複合體包含源自疾病相關抗原(諸如腫瘤相關或病毒編碼抗原)之肽及MHC蛋白。在一些實施例中，肽/MHC複合體包含肽及MHC蛋白，其中該肽源自選自由WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A及PSA組成之群的蛋白質。在一些實施例中，MHC蛋白為MHC I類蛋白質。在一些實施例中，MHC I類蛋白質為HLA-A。在一些實施例中，HLA-A為HLA-A02。在一些實施例中，HLA-A02為HLA-A\*02:01。在一些實施例中，CSR之靶配體為細胞表面抗原。在一些實施例中，靶配體為肽/MHC複合體。在一些實施例中，CSR之靶配

體與caTCR之靶抗原相同。在一些實施例中，靶配體與靶抗原不同。在一些實施例中，靶配體為疾病相關配體。在一些實施例中，靶配體為癌症相關配體。在一些實施例中，癌症相關配體為例如CD19、CD20、CD22、CD47、IL4、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPRC5D或FCRL5。在一些實施例中，癌症相關配體為肽/MHC複合體，其包含源自包括WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A及PSA之蛋白質的肽。在一些實施例中，靶配體為病毒相關配體。在一些實施例中，靶配體為免疫檢查點分子。在一些實施例中，免疫檢查點分子包括PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、ICOSL、B7-H3、B7-H4、HVEM、4-1BBL、OX40L、CD70、CD40及GAL9。在一些實施例中，靶配體為細胞凋亡分子。在一些實施例中，細胞凋亡分子包括FasL、FasR、TNFR1及TNFR2。在一些實施例中，配體結合域為抗體部分。在一些實施例中，配體結合域抗體部分為Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或單鏈Fv (scFv)。在一些實施例中，配體結合域為(或源自)靶配體之受體之胞外域的全部或一部分。在一些實施例中，受體包括例如FasR、TNFR1、TNFR2、PD-1、CD28、CTLA-4、ICOS、BTLA、KIR、LAG-3、4-1BB、OX40、CD27及TIM-3。在一些實施例中，CSR之跨膜域包含源自例如CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154之跨膜域。在一些實施例中，CSR之協同刺激信號傳導域包含免疫細胞協同刺激分子之胞內域之全部或一部分、基本上由其組成或由其組成，該免疫細胞協同刺激分子包括(例如) CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40、CD30、CD40、ICOS、淋巴細胞功能相關抗原-1 (LFA-1)、CD2、CD7、

LIGHT、NKG2C、B7-H3、與CD83特異性結合的配體，及其類似物。在一些實施例中，CSR進一步包含在配體結合域、跨膜域及協同刺激信號傳導域中之任一者之間的間隔域。在一些實施例中，間隔域包含連接兩個CSR域之肽連接子。在一些實施例中，免疫細胞為 $\gamma\delta$  T細胞。在一些實施例中，免疫細胞為經修飾以阻斷或減少TCR  $\alpha$ 及/或 $\beta$ 鏈之表現的 $\alpha\beta$  T細胞。在一些實施例中，免疫細胞係選自由以下組成之群：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、自然殺手T細胞及抑制T細胞。

【0346】 在一些實施例中，提供一種治療有需要之個體之靶抗原相關疾病(諸如癌症或病毒感染)的方法，其包含向該個體投與有效量之組合物，該組合物包含免疫細胞(諸如T細胞或自然殺手細胞)，該等免疫細胞於其表面上呈遞以下各者：a)特異性結合靶抗原之caTCR，該caTCR包含i)第一TCRD，其包含源自天然存在之 $\alpha\beta$  TCR之跨膜域中之一者的第一TCR-TM，及第二TCRD，其包含源自天然存在之 $\alpha\beta$  TCR之另一跨膜域之第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子之TCRM，及ii)特異性結合於靶抗原之抗原結合模組，其中該抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD；及b)嵌合信號傳導受體(CSR)，其包含i)特異性結合於靶配體之配體結合域、ii)跨膜域，及iii)能夠提供協同刺激信號至免疫細胞之胞內信號傳導域。

【0347】 在一些實施例中，提供一種治療有需要之個體之靶抗原相關疾病(諸如癌症或病毒感染)的方法，其包含向該個體投與有效量之組合物，該組合物包含免疫細胞(諸如T細胞或自然殺手細胞)，該等免疫細胞於其表面上呈遞以下各者：a)特異性結合靶抗原之caTCR，該caTCR包含i)第一TCRD，其包含源自天然存在之 $\gamma\delta$  TCR之跨膜域中之一者的第一

TCR-TM，及第二TCRD，其包含源自天然存在之 $\gamma\delta$  TCR之另一跨膜域之第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子之TCRM，及ii)特異性結合於靶抗原之抗原結合模組，其中該抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD；及b)嵌合信號傳導受體(CSR)，其包含i)特異性結合於靶配體之配體結合域、ii)跨膜域，及iii)能夠提供協同刺激信號至免疫細胞之胞內信號傳導域。

【0348】 在一些實施例中，提供一種治療有需要之個體之靶抗原相關疾病(諸如癌症或病毒感染)的方法，其包含向該個體投與有效量之組合物，該組合物包含免疫細胞(諸如T細胞或自然殺手細胞)，該等免疫細胞於其表面上呈遞以下各者：a)特異性結合靶抗原之caTCR，該caTCR包含i)第一TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 5之胺基酸序列的第一TCR-TM，及第二TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 6之胺基酸序列的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子之TCRM，及b)特異性結合於靶抗原之抗原結合模組，其中該抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD；及b)嵌合信號傳導受體(CSR)，其包含i)特異性結合於靶配體之配體結合域、ii)跨膜域，及iii)能夠提供協同刺激信號至免疫細胞之胞內信號傳導域。在一些實施例中，第一TCR-TM中之至少一者相較於其所源自之胺基酸序列包含一或多個(諸如2、3、4、5或更多個)胺基酸取代。在一些實施例中，各TCR-TM相較於其所源自之胺基酸序列彼此獨立地包含一或多個(諸如2、3、4、5或更多個)胺基酸取代。在一些實施例中，第一TCR-TM及/或第二TCR-TM相較於其所源自之胺基酸序列各自彼此獨立地包含不超過5個胺基酸取代。在一些實施例中，TCR-TM中之至少一者相較於其所源自之胺基酸序列包含單一胺基酸取

代。在一些實施例中，各TCR-TM相較於其所源自之胺基酸序列包含單一胺基酸取代。在一些實施例中，第一TCR-TM中的至少一個經取代胺基酸經定位使得其在caTCR中可與第二TCR-TM中的至少一個經取代胺基酸相互作用。

【0349】 在一些實施例中，提供一種治療有需要之個體之靶抗原相關疾病(諸如癌症或病毒感染)的方法，其包含向該個體投與有效量之組合物，該組合物包含免疫細胞(諸如T細胞或自然殺手細胞)，該等免疫細胞於其表面上呈遞以下各者：a)特異性結合靶抗原之caTCR，該caTCR包含i)第一TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 7之胺基酸序列的第一TCR-TM，及第二TCRD，其包含源自SEQ ID NO: 8之胺基酸序列的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子之TCRM，及b)特異性結合於靶抗原之抗原結合模組，其中該抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD；及b)嵌合信號傳導受體(CSR)，其包含i)特異性結合於靶配體之配體結合域、ii)跨膜域，及iii)能夠提供協同刺激信號至免疫細胞之胞內信號傳導域。在一些實施例中，第一TCR-TM中之至少一者相較於其所源自之胺基酸序列包含一或多個(諸如2、3、4、5或更多個)胺基酸取代。在一些實施例中，各TCR-TM相較於其所源自之胺基酸序列彼此獨立地包含一或多個(諸如2、3、4、5或更多個)胺基酸取代。在一些實施例中，第一TCR-TM及/或第二TCR-TM相較於其所源自之胺基酸序列各自彼此獨立地包含不超過5個胺基酸取代。在一些實施例中，TCR-TM中之至少一者相較於其所源自之胺基酸序列包含單一胺基酸取代。在一些實施例中，各TCR-TM相較於其所源自之胺基酸序列包含單一胺基酸取代。在一些實施例中，第一TCR-TM中的至少一個經取代胺基酸

經定位使得其在caTCR中可與第二TCR-TM中的至少一個經取代胺基酸相互作用。在一些實施例中，第一TCR-TM及第二TCR-TM係根據表2中所列之caTCR中之任一者選擇。在一些實施例中，CSR域係根據表3中所列之CSR中之任一者選擇。

**【0350】** 在一些實施例中，提供一種治療有需要之個體之靶抗原相關疾病(諸如癌症或病毒感染)的方法，其包含向該個體投與有效量之組合物，該組合物包含免疫細胞(諸如T細胞或自然殺手細胞)，該等免疫細胞於其表面上呈遞以下各者：a)特異性結合靶抗原之caTCR，該caTCR包含：i)第一TCRD，其包含具有SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的第一TCR-TM，及第二TCRD，其包含具有SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子之TCRM，及b)特異性結合於靶抗原之抗原結合模組，其中該抗原結合模組連接於第一及/或第二TCRD；及b)嵌合信號傳導受體(CSR)，其包含i)特異性結合於靶配體之配體結合域、ii)跨膜域，及iii)免疫細胞協同刺激分子片段(fCSM)，其包含能夠提供協同刺激信號至免疫細胞之胞內信號傳導域，其中該協同刺激分子片段包含SEQ ID NO: 51-56及86-89中之任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR跨膜域源自CD8。在一些實施例中，CSR包含跨膜蛋白片段(fTMP)，其中該跨膜蛋白片段包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR包含在配體結合域之後的間隔肽。在一些實施例中，間隔肽包含SEQ ID NO: 103或104之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR域係根據表3中所列之CSR中之任一者選擇。在一些實施例中，靶抗原為CD19。在一些實施例中，靶配體為CD19。在一些實施例中，caTCR抗原結合模組為Fab樣抗原結合部分，其

包含含有SEQ ID NO: 58之胺基酸序列之V<sub>H</sub>域及含有SEQ ID NO: 59之胺基酸序列之V<sub>L</sub>域。在一些實施例中，靶抗原為CD19且靶配體為CD19。在一些實施例中，CSR配體結合域為包含SEQ ID NO: 77之胺基酸序列的scFv。在一些實施例中，靶抗原為CD19且靶配體為CD20。在一些實施例中，CSR配體結合域為包含SEQ ID NO: 78之胺基酸序列之scFv。在一些實施例中，靶抗原為AFP肽/MHC複合體(例如AFP158/HLA-A02複合體)且靶配體為GPC3。在一些實施例中，caTCR抗原結合模組為Fab樣抗原結合部分，其包含含有SEQ ID NO: 62之胺基酸序列之V<sub>H</sub>域及含有SEQ ID NO: 63之胺基酸序列之V<sub>L</sub>域。在一些實施例中，CSR配體結合域為包含SEQ ID NO: 79之胺基酸序列之scFv。

**【0351】** 在一些實施例中，提供一種治療有需要之個體之CD19相關疾病(諸如癌症)的方法，其包含向該個體投與有效量之組合物，該組合物包含免疫細胞(諸如T細胞或自然殺手細胞)，該等免疫細胞於其表面上呈遞以下各者：a)特異性結合CD19之caTCR，該caTCR包含i)第一TCRD，其包含具有SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的第一TCR-TM，及第二TCRD，其包含具有SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子之TCRM；及ii) Fab樣抗原結合模組，其包含第一Fab鏈，該第一Fab鏈包含含有SEQ ID NO: 58之胺基酸序列之V<sub>H</sub>域，及第二Fab鏈，該第二Fab鏈包含含有SEQ ID NO: 59之胺基酸序列之V<sub>L</sub>域，其中第一Fab鏈連接於第一及第二TCRD中之一者，且第二Fab鏈連接於另一TCRD；及b)嵌合信號傳導受體(CSR)，其包含i)特異性結合於CD19之scFv，該scFv包含含有SEQ ID NO: 58之胺基酸序列之V<sub>H</sub>域及含有SEQ ID NO: 59之胺基酸序列



之V<sub>L</sub>域；ii)跨膜域，及iii)免疫細胞協同刺激分子片段(fCSM)，其包含能夠提供協同刺激信號至免疫細胞之胞內信號傳導域，其中協同刺激分子片段包含SEQ ID NO: 51-56及86-89中之任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR跨膜域源自CD8。在一些實施例中，CSR包含跨膜蛋白片段(fTMP)，其中該跨膜蛋白片段包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR包含在配體結合域之後的間隔肽。在一些實施例中，間隔肽包含SEQ ID NO: 103或104之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR域係根據表3中所列之CSR中之任一者選擇。在一些實施例中，CSR配體結合域為包含SEQ ID NO: 77之胺基酸序列的scFv。在一些實施例中，CD19相關疾病為白血病，例如急性淋巴母細胞白血病(ALL)。

**【0352】** 在一些實施例中，提供一種治療有需要之個體之CD19/CD20相關疾病(諸如癌症)的方法，其包含向該個體投與有效量之組合物，該組合物包含免疫細胞(諸如T細胞或自然殺手細胞)，該等免疫細胞於其表面上呈遞以下各者：a)特異性結合CD19之caTCR，該caTCR包含i)第一TCRD，其包含具有SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的第一TCR-TM，及第二TCRD，其包含具有SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子之TCRM；及ii) Fab樣抗原結合模組，其包含第一Fab鏈，該第一Fab鏈包含含有SEQ ID NO: 58之胺基酸序列之V<sub>H</sub>域，及第二Fab鏈，該第二Fab鏈包含含有SEQ ID NO: 59之胺基酸序列之V<sub>L</sub>域，其中第一Fab鏈連接於第一及第二TCRD中之一者，且第二Fab鏈連接於另一TCRD；及b)嵌合信號傳導受體(CSR)，其包含i)特異性結合於CD20之scFv，該scFv包含含有SEQ ID NO: 60之胺基酸序列之V<sub>H</sub>域及含有SEQ ID NO: 61之胺

基酸序列之V<sub>L</sub>域；ii)跨膜域，及iii)免疫細胞協同刺激分子片段(fCSM)，其包含能夠提供協同刺激信號至免疫細胞之胞內信號傳導域，其中協同刺激分子片段包含SEQ ID NO: 51-56及86-89中之任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR跨膜域源自CD8。在一些實施例中，CSR包含跨膜蛋白片段(fTMP)，其中該跨膜蛋白片段包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR包含在配體結合域之後的間隔肽。在一些實施例中，間隔肽包含SEQ ID NO: 103或104之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR域係根據表3中所列之CSR中之任一者選擇。在一些實施例中，CSR配體結合域為包含SEQ ID NO: 81之胺基酸序列的scFv。

【0353】 在一些實施例中，提供一種治療有需要之個體之AFP/GPC3相關疾病(諸如癌症，例如肝癌)的方法，其包含向該個體投與有效量之組合物，該組合物包含免疫細胞(諸如T細胞或自然殺手細胞)，該等免疫細胞於其表面上呈遞以下各者：a)特異性結合AFP肽/MHC複合體(例如AFP158/HLA-A02複合體)之caTCR，該caTCR包含i)第一TCRD，其包含具有SEQ ID NO: 10之胺基酸序列的第一TCR-TM，及第二TCRD，其包含具有SEQ ID NO: 16之胺基酸序列的第二TCR-TM，其中第一及第二TCRD形成能夠募集至少一種TCR相關信號傳導分子之TCRM；及ii) Fab樣抗原結合模組，其包含第一Fab鏈，該第一Fab鏈包含含有SEQ ID NO: 62之胺基酸序列之V<sub>H</sub>域，及第二Fab鏈，該第二Fab鏈包含含有SEQ ID NO: 63之胺基酸序列之V<sub>L</sub>域，其中第一Fab鏈連接於第一及第二TCRD中之一者，且第二Fab鏈連接於另一TCRD；及b)嵌合信號傳導受體(CSR)，其包含i)特異性結合GPC3之scFv，該scFv包含含有SEQ ID NO: 64之胺基酸序列之V<sub>H</sub>域及含有SEQ ID NO: 65之胺基酸序列之V<sub>L</sub>

域；ii)跨膜域，及iii)免疫細胞協同刺激分子片段(fCSM)，其包含能夠提供協同刺激信號至免疫細胞之胞內信號傳導域，其中協同刺激分子片段包含SEQ ID NO: 51-56及86-89中之任一者之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR跨膜域源自CD8。在一些實施例中，CSR包含跨膜蛋白片段(fTMP)，其中該跨膜蛋白片段包含SEQ ID NO: 57之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR包含在配體結合域之後的間隔肽。在一些實施例中，間隔肽包含SEQ ID NO: 103或104之胺基酸序列。在一些實施例中，CSR域係根據表3中所列之CSR中之任一者選擇。在一些實施例中，CSR配體結合域為包含SEQ ID NO: 82之胺基酸序列的scFv。

【0354】亦涵蓋治療有需要之個體之靶抗原相關疾病的方法，其包含向該個體投與包含表現不同caTCR及/或不同CSR之複數個免疫細胞的組合物。因此，在一些實施例中，根據如本文所描述之用於治療個體之靶抗原相關疾病的方法中之任一者，該組合物為如本文所描述之異質caTCR加CSR免疫細胞組合物。

【0355】在一些實施例中，個體為哺乳動物(例如，人類、非人靈長類、大鼠、小鼠、母牛、馬、豬、綿羊、山羊、狗、貓等)。在一些實施例中，個體為人類。在一些實施例中，個體為臨床患者、臨床試驗志願者、實驗動物等。在一些實施例中，個體年齡小於約60歲(包括例如年齡小於約50、40、30、25、20、15或10歲中的任一者)。在一些實施例中，個體年齡大於約60歲(包括例如年齡大於約70、80、90或100歲中的任一者)。在一些實施例中，個體經診斷患有或在環境或遺傳學上易患本文所描述之疾病或病症中之一或多者(諸如癌症或病毒感染)。在一些實施例中，個體具有與一或多種本文所描述之疾病或病症相關之一或多種風險因

素。

【0356】 在一些實施例中，本發明之caTCR加CSR免疫細胞組合物與第二、第三或第四試劑(包括例如抗腫瘤劑、生長抑制劑、細胞毒性劑或化學治療劑)組合投與以治療涉及靶抗原表現之疾病或病症。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞組合物與細胞介素(諸如IL-2)組合投與。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞組合物與增加MHC蛋白之表現及/或增強MHC蛋白對肽之表面呈遞的試劑組合投與。在一些實施例中，試劑包括例如IFN受體促效劑、Hsp90抑制劑、p53表現增強劑及化學治療劑。在一些實施例中，試劑為IFN受體促效劑，包括例如IFN $\gamma$ 、IFN $\beta$ 及IFN $\alpha$ 。在一些實施例中，試劑為Hsp90抑制劑，包括例如坦螺旋黴素(tanespimycin) (17-AAG)、阿螺旋黴素(alvespimycin) (17-DMAG)、瑞他黴素(retaspimycin) (IPI-504)、IPI-493、CNF2024/BIIB021、MPC-3100、Debio 0932 (CUDC-305)、PU-H71、Ganetespib (STA-9090)、NVP-AUY922(VER-52269)、HSP990、KW-2478、AT13387、SNX-5422、DS-2248及XL888。在一些實施例中，試劑為p53表現增強劑，包括例如5-氟尿嘧啶及Nutlin-3。在一些實施例中，試劑為化學治療劑，包括例如拓朴替康(topotecan)、依託泊苷(etoposide)、順鉑(cisplatin)、太平洋紫杉醇及長春鹼。

【0357】 在一些實施例中，提供一種治療有需要之個體的靶抗原陽性疾病的方法，其包含向個體與細胞介素(諸如IL-2)組合投與根據本文所描述之實施例中之任一者的caTCR加CSR免疫細胞組合物。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞組合物與細胞介素同時投與。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞組合物及細胞介素依序投與。

【0358】 在一些實施例中，提供一種治療有需要之個體的靶抗原陽性疾病的方法，其中表現靶抗原之細胞通常並不呈遞或以相對低水準呈遞包含靶抗原及MHC I類蛋白質之複合體於其表面上，該方法包含向個體與一試劑組合投與根據本文所描述之實施例中之任一者的caTCR加CSR免疫細胞組合物，該試劑增加MHC I類蛋白質之表現及/或增強MHC I類蛋白質對靶抗原之表面呈遞。在一些實施例中，試劑包括例如IFN受體促效劑、Hsp90抑制劑、p53表現增強劑及化學治療劑。在一些實施例中，試劑為IFN受體促效劑，包括例如IFN $\gamma$ 、IFN $\beta$ 及IFN $\alpha$ 。在一些實施例中，試劑為Hsp90抑制劑，包括例如坦螺旋黴素(17-AAG)、阿螺旋黴素(17-DMAG)、瑞他黴素(IPI-504)、IPI-493、CNF2024/BIIB021、MPC-3100、Debio 0932 (CUDC-305)、PU-H71、Ganetespib (STA-9090)、NVP-AUY922 (VER-52269)、HSP990、KW-2478、AT13387、SNX-5422、DS-2248及XL888。在一些實施例中，試劑為p53表現增強劑，包括例如5-氟尿嘧啶及nutlin-3。在一些實施例中，試劑為化學治療劑，包括例如拓朴替康、依託泊苷、順鉑、太平洋紫杉醇及長春鹼。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞組合物與試劑同時投與。在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞組合物及試劑依序投與。

【0359】 在一些實施例中，提供一種治療有需要之個體的靶抗原相關疾病(諸如癌症或病毒感染)的方法，其包含向個體投與有效量之組合物，該組合物包含編碼根據本文所描述之實施例中之任一者的caTCR及CSR之核酸。基因傳遞方法為此項技術中已知的。參見例如美國專利第5,399,346號、第5,580,859號、第5,589,466號，其以全文引用的方式併入本文中。

【0360】 癌症治療可例如藉由腫瘤消退、腫瘤重量或尺寸收縮、進展時間、存活持續時間、無進展存活期、總反應率、反應持續時間、生活品質、蛋白質表現及/或活性來評估。可使用確定療法功效之方法，包括例如經由放射成像量測反應。

【0361】 在一些實施例中，治療功效以腫瘤生長抑制百分比(TGI%)形式量測，其使用方程式 $100-(T/C \times 100)$ 計算，其中T為經治療腫瘤之平均相對腫瘤體積，且C為未治療腫瘤之平均相對腫瘤體積。在一些實施例中，%TGI為約10%、約20%、約30%、約40%、約50%、約60%、約70%、約80%、約90%、約91%、約92%、約93%、約94%、約95%或超過95%。

【0362】 病毒感染治療可例如藉由病毒負荷、存活持續時間、生活品質、蛋白質表現及/或活性來評估。

## 疾病

【0363】 在一些實施例中，caTCR加CSR免疫細胞可適用於治療與靶抗原相關之癌症。可使用本文所描述之方法中之任一者治療之癌症包括非血管化，或基本上尚未血管化之腫瘤，以及血管化腫瘤。癌症可包含非實體腫瘤((諸如血液腫瘤，例如白血病及淋巴瘤)或可包含實體腫瘤。待用本發明之caTCR加CSR免疫細胞處理之癌症的類型包括(但不限於)癌瘤、母細胞瘤及肉瘤，以及某些白血病或淋巴惡性病、良性與惡性腫瘤及例如肉瘤、癌瘤與黑色素瘤之惡性病。成人腫瘤/癌症及兒科腫瘤/癌症亦包括在內。

【0364】 血液癌為血液或骨髓之癌症。血液(或血性)癌之實例包括白血病，包括急性白血病(諸如急性淋巴球性白血病、急性骨髓細胞性白

血病、急性骨髓性白血病及骨髓母細胞性、前髓細胞性、骨髓單核細胞性、單核細胞性及紅白血病)、慢性白血病(諸如慢性骨髓細胞性(粒細胞性)白血病、慢性骨髓性白血病及慢性淋巴球性白血病)、真性紅血球增多症、淋巴瘤、霍奇金氏病(Hodgkin's disease)、非霍奇金氏淋巴瘤(頑固性及高級形式)、多發性骨髓瘤、漿細胞瘤、瓦爾登斯特倫氏巨球蛋白血症(Waldenstrom's macroglobulinemia)、重鏈病、骨髓發育不良症候群、毛細胞白血病及骨髓發育不良。

【0365】 實體腫瘤為通常不含有囊腫或液體區域之異常組織塊體。實體腫瘤可為良性或惡性的。不同類型的實體腫瘤關於形成其之細胞類型命名(諸如肉瘤、癌瘤及淋巴瘤)。諸如肉瘤及癌瘤之實體腫瘤之實例包括腎上腺皮質癌、膽管癌、纖維肉瘤、黏液肉瘤、脂肉瘤、軟骨肉瘤、骨肉瘤及其他肉瘤、滑膜瘤、間皮瘤、尤文氏腫瘤、平滑肌肉瘤、橫紋肌肉瘤、結腸癌、胃癌、淋巴惡性腫瘤、胰臟癌、乳癌、肺癌、卵巢癌、前列腺癌、肝細胞癌、鱗狀細胞癌、基底細胞癌、腺癌、汗腺癌、甲狀腺癌(例如，甲狀腺髓質癌及乳頭狀甲狀腺癌)、嗜鉻細胞瘤、皮脂腺癌、乳頭狀癌、乳頭狀腺癌、髓質癌、支氣管癌、腎細胞癌、肝癌、膽管癌、絨膜癌、威耳姆士瘤、子宮頸癌(例如，子宮頸癌瘤及侵襲前子宮頸發育不良)、結腸直腸癌、肛門、肛管或肛腸癌、陰道癌、外陰癌(例如，鱗狀細胞癌、上皮內癌、腺癌及纖維肉瘤)、陰莖癌、口咽癌、食道癌、頭癌(例如，鱗狀細胞癌)、頸癌(例如，鱗狀細胞癌)、睪丸癌(例如，精細胞癌、畸胎瘤、胚胎性癌、畸胎上皮癌、絨膜癌、肉瘤、萊迪希氏細胞瘤、纖維瘤、纖維腺瘤、腺瘤樣腫瘤及脂肪瘤)、膀胱癌、腎癌、黑素瘤、子宮癌(例如，子宮內膜癌)、尿道上皮癌(例如，鱗狀細胞癌、移行細胞癌、腺

癌、輸尿管癌及膀胱癌)、以及CNS腫瘤(諸如神經膠質瘤(諸如腦幹神經膠質瘤及混合神經膠質瘤)、神經膠母細胞瘤(亦稱為多形性神經膠母細胞瘤)、星形細胞瘤、CNS淋巴瘤、胚細胞瘤、神經管胚細胞瘤、神經鞘瘤、顱咽管瘤、室管膜瘤、松果體瘤、血管母細胞瘤、聽神經瘤、少突神經膠質瘤、腦膜瘤、神經母細胞瘤、視網膜母細胞瘤及腦轉移瘤)。

【0366】 癌症治療可例如藉由腫瘤消退、腫瘤重量或尺寸收縮、進展時間、存活持續時間、無進展存活期、總反應率、反應持續時間、生活品質、蛋白質表現及/或活性來評估。可使用確定療法功效之方法，包括例如經由放射成像量測反應。

【0367】 在其他實施例中，caTCR加CSR免疫細胞可適用於藉由靶向病原體相關(諸如病毒編碼)抗原治療傳染性疾病。待預防或治療之感染例如可能係由病毒、細菌、原蟲或寄生蟲引起的。靶抗原可為病原性蛋白質、多肽或肽，其造成由病原體引起之疾病，或能夠在受到病原體感染之宿主中誘導免疫反應。可由caTCR加CSR免疫細胞靶向之病原性抗原包括(但不限於)源自以下之抗原：鮑氏不動桿菌(*Acinetobacter baumannii*)、邊蟲屬(*Anaplasma* genus)、嗜吞噬細胞無形體(*Anaplasma phagocytophilum*)、巴西鉤蟲(*Ancylostoma braziliense*)、十二指腸鉤蟲(*Ancylostoma duodenale*)、溶血隱秘桿菌(*Arcanobacterium haemolyticum*)、人蛔蟲(*Ascaris lumbricoides*)、麴菌屬(*Aspergillus* genus)、星狀病毒科(*Astroviridae*)、巴貝西蟲屬(*Babesia* genus)、炭疽芽孢桿菌(*Bacillus anthracis*)、蠟樣芽孢桿菌(*Bacillus cereus*)、幹瑟勒巴通氏菌(*Bartonella henselae*)、BK病毒、人芽囊原蟲(*Blastocystis hominis*)、皮炎芽生菌(*Blastomyces dermatitidis*)、百日咳博德特氏菌



(*Bordetella pertussis*)、伯氏疏螺旋體(*Borrelia burgdorferi*)、螺旋體屬(*Borrelia* genus)、螺旋體(*Borrelia* spp)、布魯氏菌屬(*Brucella* genus)、馬來血絲蟲(*Brugia malayi*)、布尼亞病毒科(*Bunyaviridae* family)、洋蔥伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia cepacia*)及其他伯克霍爾德菌物種、鼻疽伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia mallei*)、類鼻疽伯克霍爾德氏菌(*Burkholderia pseudomallei*)、杯狀病毒科(*Caliciviridae* family)、曲桿菌屬(*Campylobacter* genus)、白色念珠菌(*Candida albicans*)、念珠菌屬(*Candida* spp)、沙眼披衣菌(*Chlamydia trachomatis*)、肺炎性披衣菌(*Chlamydophila pneumoniae*)、鸚鵡熱披衣菌(*Chlamydophila psittaci*)、CJD朊病毒、華支睾吸蟲(*Clonorchis sinensis*)、肉毒梭菌(*Clostridium botulinum*)、艱難梭菌(*Clostridium difficile*)、產氣莢膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、產氣莢膜梭菌(*Clostridium perfringens*)、梭菌屬(*Clostridium* spp)、破傷風梭菌(*Clostridium tetani*)、粗球菌屬(*Coccidioides* spp)、冠狀病毒(*coronaviruses*)、白喉棒狀桿菌(*Corynebacterium diphtheriae*)、貝氏考克斯菌(*Coxiella burnetii*)、克里米亞-剛果出血熱病毒、新型隱球菌(*Cryptococcus neoformans*)、隱孢子蟲屬(*Cryptosporidium* genus)、巨細胞病毒(CMV)、登革病毒(DEN-1、DEN-2、DEN-3及DEN-4)、脆雙核阿米巴(*Dientamoeba fragilis*)、埃博拉病毒(EBOV)、胞蟲屬、查菲艾利希體(*Ehrlichia chaffeensis*)、尤溫艾利希氏體(*Ehrlichia ewingii*)、艾利希體屬(*Ehrlichia* genus)、溶組織內阿米巴(*Entamoeba histolytica*)、腸球菌屬(*Enterococcus* genus)、腸病毒(*Enterovirus* genus)、腸病毒(*Enteroviruses*) (主要為科沙奇A病毒及腸病毒71 (EV71))、表皮癬菌屬(*Epidermophyton* spp)、EB病毒(Epstein-Barr

Virus；EBV)、大腸桿菌O157：H7、大腸桿菌O111及大腸桿菌O104：H4、肝片吸蟲(*Fasciola hepatica*)及巨大肝蛭(*Fasciola gigantica*)、FFI朊病毒、絲蟲總科(*Filarioidea* superfamily)、黃病毒屬(*Flaviviruses*)、土倫病法蘭西斯氏菌(*Francisella tularensis*)、梭桿菌屬(*Fusobacterium* genus)、白地絲黴菌、藍氏賈第鞭毛蟲(*Giardia intestinalis*)、頷口蟲屬(*Gnathostoma* spp)、GSS朊病毒、瓜納里托病毒(*Guanarito virus*)、杜氏嗜血桿菌(*Haemophilus ducreyi*)、流感嗜血桿菌(*Haemophilus influenzae*)、幽門螺桿菌(*Helicobacter pylori*)、亨尼帕病毒(亨德拉病毒尼帕病毒)、A型肝炎病毒、B型肝炎病毒(HBV)、C型肝炎病毒(HCV)、D型肝炎病毒、E型肝炎病毒、單純疱疹病毒1及2(HSV-1及HSV-2)、荚膜組織胞漿菌(*Histoplasma capsulatum*)、HIV (人類免疫缺乏病毒)、威尼克外瓶黴(*Hortaea werneckii*)、人類博卡病毒(HBoV)、人類疱疹病毒6(HHV-6)及人類疱疹病毒7 (HHV-7)、人類間質肺炎病毒(hMPV)、人類乳頭狀瘤病毒(HPV)、人類副流行性感冒病毒(HPIV)、人類T細胞白血病毒1 (HTLV-1)、日本腦炎病毒、JC病毒、胡寧病毒(*Junin virus*)、卡波西氏肉瘤相關疱疹病毒(Kaposi's Sarcoma associated herpesvirus；KSHV)、金格桿菌(*Kingella kingae*)、肉芽腫克雷伯氏菌(*Klebsiella granulomatis*)、庫魯氏朊病毒(Kuru prion)、拉沙病毒(*Lassa virus*)、嗜肺性退伍軍人桿菌(*Legionella pneumophila*)、利什曼原蟲屬(*Leishmania* genus)、鉤端螺旋體屬(*Leptospira* genus)、單核球增多性李氏菌(*Listeria monocytogenes*)、淋巴球性脈絡叢腦膜炎病毒(Lymphocytic choriomeningitis virus；LCMV)、馬丘波病毒(*Machupo virus*)、馬拉色氏黴菌屬(*Malassezia* spp)、馬爾堡病毒(*Marburg virus*)、麻疹病毒、橫

川後殖吸蟲 (*Metagonimus yokagawai*)、微孢子蟲門 (*Microsporidia* phylum)、傳染性軟疣病毒(MCV)、腮腺炎病毒、麻風分支桿菌及彌漫型麻風分枝桿菌、結核分支桿菌、潰瘍分枝桿菌、肺炎黴漿菌、變形纖毛蟲 (*Naegleria fowleri*)、美洲鉤蟲 (*Necator americanus*)、淋病雙球菌 (*Neisseria gonorrhoeae*)、腦膜炎雙球菌(*Neisseria meningitidis*)、星形土壤絲菌(*Nocardia asteroides*)、諾卡菌屬(*Nocardia* spp)、人蟠尾絲蟲 (*Onchocerca volvulus*)、恙蟲病立克次體(*Orientia tsutsugamushi*)、正黏液病毒科(流感)、巴西副球孢子菌(*Paracoccidioides brasiliensis*)、並殖吸蟲屬(*Paragonimus* spp)、衛氏並殖吸蟲(*Paragonimus westermani*)、細小病毒B19(*Parvovirus B19*)、巴斯德菌屬(*Pasteurella* genus)、瘧原蟲屬 (*Plasmodium* genus)、傑氏肺囊蟲(*Pneumocystis jirovecii*)、脊髓灰白質炎病毒 (*Poliovirus*)、狂犬病病毒 (*Rabies virus*)、呼吸道融合病毒 (RSV)、鼻病毒 (*Rhinovirus/rhinoviruses*)、痘立克次體 (*Rickettsia akari*)、立克次體屬 (*Rickettsia* genus)、普氏立克次體 (*Rickettsia prowazekii*)、立克次氏立克次體(*Rickettsia rickettsii*)、傷寒立克次體 (*Rickettsia typhi*)、東非瑞夫特河谷羊熱病病毒、輪狀病毒(*Rotavirus*)、德國麻疹病毒(*Rubella virus*)、薩比亞病毒(*Sabia virus*)、沙門氏菌屬 (*Salmonella* genus)、疥癬(*Sarcoptes scabiei*)、SARS冠狀病毒、住血吸蟲屬(*Schistosoma* genus)、志賀桿菌屬(*Shigella* genus)、辛諾柏病毒(*Sin Nombre virus*)、漢坦病毒 (*Hantavirus*)、申克孢子絲菌 (*Sporothrix schenckii*)、葡萄球菌屬 (*Staphylococcus* genus)、葡萄球菌屬 (*Staphylococcus* genus)、無乳鏈球菌(*Streptococcus agalactiae*)、肺炎鏈球菌 (*Streptococcus pneumoniae*)、化膿性鏈球菌 (*Streptococcus*

pyogenes)、腸類圓線蟲(Strongyloides stercoralis)、絛蟲屬(Taenia genus)、有鉤絛蟲(Taenia solium)、蜱傳腦炎病毒(Tick-borne encephalitis virus; TBEV)、犬蛔蟲(Toxocara canis)或貓蛔蟲(Toxocara cati)、弓蟲(Toxoplasma gondii)、梅毒螺旋體(Treponema pallidum)、旋毛蟲(Trichinella spiralis)、陰道毛滴蟲(Trichomonas vaginalis)、發癬菌屬(Trichophyton spp)、鞭蟲(Trichuris trichiura)、布氏錐蟲(Trypanosoma brucei)、克氏錐蟲(Trypanosoma cruzi)、解脲支原體(Ureaplasma urealyticum)、水痘帶狀疱疹病毒(Varicella zoster virus; VZV)、主天花病毒或次天花病毒、vCJD朊病毒、委內瑞拉馬腦炎病毒(Venezuelan equine encephalitis virus)、霍亂弧菌(Vibrio cholerae)、西尼羅河病毒(West Nile virus)、西部馬腦炎病毒(Western equine encephalitis virus)、潘氏絲狀蟲(Wuchereria bancrofti)、黃熱病病毒(Yellow fever virus)、小腸結腸炎耶爾森氏菌(Yersinia enterocolitica)、鼠疫耶爾森菌(Yersinia pestis)及假結核耶爾森菌(Yersinia pseudotuberculosis)。

【0368】 在一些實施例中，使用caTCR加CSR免疫細胞治療致癌傳染性疾病，諸如由致癌病毒造成之感染。致癌病毒包括(但不限於)CMV、EBV、HBV、KSHV、HPV、MCV、HTLV-1、HIV-1及HCV。caTCR之靶抗原可為病毒癌蛋白，包括(但不限於)Tax、E7、E6/E7、E6、HBx、EBNA蛋白(例如，EBNA3 A、EBNA3 C及EBNA 2)、v-週期素、LANA1、LANA2、LMP-1、k-bZIP、RTA、KSHV K8及其片段。參見Ahuja, Richa等人, *Curr. Sci.*, 2014。

## 製品及套組

【0369】 在本發明之一些實施例中，提供一種製品，其含有適用於治療靶抗原陽性疾病之材料，該靶抗原陽性疾病諸如癌症(例如腎上腺皮質癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管癌、結腸直腸癌、食道癌、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、肝細胞癌、頭頸癌、腎癌、白血病、肺癌、淋巴瘤、黑素瘤、間皮瘤、多發性骨髓瘤、胰臟癌、嗜鉻細胞瘤、漿細胞瘤、神經母細胞瘤、卵巢癌、前列腺癌、肉瘤、胃癌、子宮癌或甲狀腺癌)或病毒感染(例如由CMV、EBV、HBV、KSHV、HPV、MCV、HTLV-1、HIV-1或HCV造成之感染)。製品可包含容器及在容器上或容器隨附之標籤或藥品說明書。適合的容器包括例如瓶子、小瓶、注射器等。容器可由各種材料形成，諸如玻璃或塑膠。一般而言，容器容納對於治療本文所描述之疾病或病症有效之組合物，且可具有無菌接取口(例如容器可為靜脈內溶液袋或具有可由皮下注射針刺穿之塞子的小瓶)。組合物中的至少一種活性劑為於其表面上呈遞本發明之caTCR及CSR的免疫細胞。標籤或藥品說明書指示該組合物用於治療特定病狀。標籤或藥品說明書將進一步包含關於向患者投與caTCR加CSR免疫細胞組合物之說明。亦涵蓋包含本文所描述之組合療法的製品及套組。

【0370】 藥品說明書係指市售治療產品封裝中通常所包括之含有關於適應症、使用、劑量、投與、與此類治療產品之使用有關之禁忌及/或警告之資訊的說明。在一些實施例中，藥品說明書指示，該組合物用於治療靶抗原陽性癌症(諸如腎上腺皮質癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管癌、結腸直腸癌、食道癌、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、肝細胞癌、頭頸癌、腎癌、白血病、肺癌、淋巴瘤、黑素瘤、間皮瘤、多發性骨髓瘤、胰臟癌、嗜鉻細胞瘤、漿細胞瘤、神經母細胞瘤、卵巢癌、前列腺癌、肉

瘤、胃癌、子宮癌或甲狀腺癌)。在其他實施例中，藥品說明書指示，該組合物用於治療靶抗原陽性病毒感染(例如由CMV、EBV、HBV、KSHV、HPV、MCV、HTLV-1、HIV-1或HCV造成之感染)。

【0371】 另外，製品可進一步包含第二容器，其包含醫藥學上可接受之緩衝液，諸如抑菌性注射用水(BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、林格氏溶液及右旋糖溶液。其可進一步包括就商業及使用者觀點而言所需之其他物質，包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針及注射器。

【0372】 亦提供適用於視情況與製品組合用於各種用途，例如用於治療本文所描述之靶抗原陽性疾病或病症的套組。本發明之套組包括包含caTCR加CSR免疫細胞組合物(或單位劑型及/或製品)之一或多個容器，及在一些實施例中進一步包含另一試劑(諸如本文所描述之試劑)及/或根據本文所描述之方法中之任一者使用的說明書。套組可進一步包含選擇適合於治療之個體的說明。本發明套組中供應之說明為通常在標籤或藥品說明書(例如，套組中包括之紙片)上之書面說明，但機器可讀說明(例如，磁性或光學儲存盤上載有的說明)亦為可接受的。

【0373】 舉例而言，在一些實施例中，套組包含一種組合物，該組合物包含於其表面上呈遞caTCR及CSR之免疫細胞。在一些實施例中，套組包含：a)包含於其表面上呈遞caTCR及CSR之免疫細胞的組合物，及b)有效量之至少一種其他試劑，其中其他試劑增加MHC蛋白之表現及/或增強MHC蛋白對肽之表面呈遞(例如，IFN $\gamma$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\alpha$ 或Hsp90抑制劑)。在一些實施例中，套組包含：a)包含於其表面上呈遞caTCR及CSR之免疫細胞的組合物，及b)關於向個體投與caTCR加CSR免疫細胞組合物以治療靶抗原陽性疾病(諸如癌症或病毒感染)的說明。在一些實施例中，

套組包含：a)包含於其表面上呈遞caTCR及CSR之免疫細胞的組合物，b)有效量之至少一種其他試劑，其中其他試劑增加MHC蛋白之表現及/或增強MHC蛋白對肽之表面呈遞(例如，IFN $\gamma$ 、IFN $\beta$ 、IFN $\alpha$ 或Hsp90抑制劑)，及c)關於向個體投與caTCR加CSR免疫細胞組合物及其他試劑以治療靶抗原陽性疾病(諸如癌症或病毒感染)的說明。caTCR加CSR免疫細胞組合物及其他試劑可存在於單獨的容器中或單一容器中。舉例而言，套組可包含一種獨特組合物或兩種或多於兩種組合物，其中一種組合物包含caTCR加CSR免疫細胞且另一組合物包含其他試劑。

**【0374】** 在一些實施例中，套組包含：a)包含caTCR及CSR之一或多種組合物，及b)關於組合caTCR及CSR與免疫細胞(諸如源自個體之免疫細胞，例如T細胞或自然殺手細胞)以形成包含於其表面呈遞caTCR及CSR之免疫細胞的組合物及向個體投與caTCR加CSR免疫細胞組合物以治療靶抗原陽性疾病(諸如癌症或病毒感染)的說明。在一些實施例中，套組包含：a)包含caTCR及CSR之一或多種組合物，及b)免疫細胞(諸如細胞毒性細胞)。在一些實施例中，套組包含：a)包含caTCR及CSR之一或多種組合物，b)免疫細胞(諸如細胞毒性細胞)，及c)關於組合caTCR及CSR與免疫細胞以形成包含於其表面上呈遞caTCR及CSR之免疫細胞的組合物及向個體投與caTCR加CSR免疫細胞組合物以治療靶抗原陽性疾病(諸如癌症或病毒感染)的說明。

**【0375】** 在一些實施例中，套組包含編碼caTCR及CSR的一種核酸(或一組核酸)。在一些實施例中，套組包含：a)編碼caTCR及CSR之核酸(或一組核酸)，及b)表現核酸(或一組核酸)之宿主細胞(諸如免疫細胞)。在一些實施例中，套組包含：a)編碼caTCR及CSR之核酸(或一組核酸)，

及b)關於以下的說明：i)於宿主細胞(諸如免疫細胞，例如T細胞)中表現caTCR及CSR、ii)製備包含表現caTCR及CSR之宿主細胞的組合物及iii)向個體投與包含表現caTCR及CSR之宿主細胞的組合物以治療靶抗原陽性疾病(諸如癌症或病毒感染)。在一些實施例中，宿主細胞源自個體。在一些實施例中，套組包含：a)編碼caTCR及CSR之核酸(或一組核酸)，b)表現核酸(或一組核酸)之宿主細胞(諸如免疫細胞)，及c)關於i)於宿主細胞中表現caTCR及CSR、ii)製備包含表現caTCR及CSR之宿主細胞的組合物及iii)向個體投與包含表現caTCR及CSR之宿主細胞的組合物以治療靶抗原陽性疾病(諸如癌症或病毒感染)的說明。

【0376】 本發明之套組係在適合的包裝中。適合的包裝包括(但不限於)小瓶、瓶子、罐、可撓性包裝(例如密封Mylar或塑膠袋)及其類似物。套組可視情況提供諸如緩衝劑之額外組分及說明性資訊。本申請案因此亦提供製品，其包括小瓶(諸如密封小瓶)、瓶子、罐、可撓性包裝及其類似物。

【0377】 與caTCR加CSR免疫細胞組合物之使用相關的說明大體上包括關於所期望治療之劑量、給藥時程及投與途徑之資訊。容器可為單位劑量、散裝(例如，多劑量包裝)或次單位劑量。舉例而言，可提供如下套組，該套組含有足夠劑量之如本文所揭示之caTCR加CSR免疫細胞組合物以向個體提供延長時間(諸如一週、8天、9天、10天、11天、12天、13天、2週、3週、4週、6週、8週、3個月、4個月、5個月、7個月、8個月、9個月或更長時間中之任一者)之有效治療。套組亦可包括多個單位劑量之caTCR及CSR，及醫藥組合物以及使用說明且以對於在藥房(例如醫院藥房及配藥房)中儲存及使用而言足夠之量包裝。



【0378】 熟習此項技術者將認識到，在本發明之範疇及精神內，若干實施例為可能的。現將參照下列非限制性實例來更詳細地描述本發明。以下實例進一步說明本發明，但當然不應解釋為以任何方式限制其範疇。

### 例示性實施例

【0379】 實施例1.在一個實施例中，提供一種免疫細胞，其包含：

a)嵌合抗體-T細胞受體(TCR)構築體(caTCR)，其包含：

i)特異性結合於靶抗原之抗原結合模組；及

ii) T細胞受體模組(TCRM)，其包含含有第一TCR跨膜域(TCR-TM)之第一TCR域(TCRD)及含有第二TCR-TM之第二TCRD，其中該TCRM有助於募集至少一種TCR相關信號傳導分子；及

b)嵌合信號傳導受體(CSR)，其包含：

i)能夠與靶配體結合或相互作用之配體結合模組；

ii)跨膜模組；及

iii)能夠提供協同刺激信號至該免疫細胞之協同刺激免疫細胞信號傳導模組，

其中該配體結合模組及該協同刺激免疫細胞信號傳導模組並非源自同一分子，且其中該CSR缺乏功能性原代免疫細胞信號傳導域。

【0380】 實施例2.如實施例1之免疫細胞，其中該CSR缺乏任何原代免疫細胞信號傳導序列。

【0381】 實施例3.如實施例1或2之免疫細胞，其中該靶抗原為細胞表面抗原。

【0382】 實施例4.如實施例3之免疫細胞，其中該細胞表面抗原係選自由蛋白質、碳水化合物及脂質組成之群。

【0383】 實施例5.如實施例4之免疫細胞，其中細胞表面抗原係選自由以下組成之群：CD19、ROR1、ROR2、BCMA、GPC5D及FCRL5。

【0384】 實施例6.如實施例1或2之免疫細胞，其中靶抗原為包含肽及主要組織相容性複合體(MHC)蛋白之複合體。

【0385】 實施例7.如實施例6之免疫細胞，其中肽源自選自由以下組成之群之蛋白質：WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A及PSA。

【0386】 實施例8.如實施例1至7中任一項之免疫細胞，其中該第一TCR-TM源自第一T細胞受體的跨膜域中之一者，且該第二TCR-TM源自第一T細胞受體的另一跨膜域。

【0387】 實施例9.如實施例8之免疫細胞，其中TCR-TM中之至少一者為非天然存在的。

【0388】 實施例10.如實施例9之免疫細胞，其中該TCRM相較於包含第一T細胞受體跨膜域的TCRM，可以更增強募集至少一種TCR相關信號傳導分子。

【0389】 實施例11.如實施例8至10中任一項之免疫細胞，其中第一TCR-TM相較於其所源自之跨膜域包含至多5個胺基酸取代，及/或第二TCR-TM相較於其所源自之跨膜域包含至多5個胺基酸取代。

【0390】 實施例12.如實施例11之免疫細胞，其中該第一TCR-TM包含單一胺基酸取代及/或該第二TCR-TM包含單一胺基酸取代。

【0391】 實施例13.如實施例8至12中任一項之免疫細胞，其中該第一T細胞受體為 $\gamma/\delta$  T細胞受體。

【0392】 實施例14.如實施例8至12中任一項之免疫細胞，其中該第

一T細胞受體為 $\alpha/\beta$  T細胞受體。

【0393】 實施例15.如實施例1至14中任一項之免疫細胞，其中抗原結合模組為選自由以下組成之群的抗體部分：Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv及單鏈Fv (scFv)。

【0394】 實施例16.如實施例15之免疫細胞，其中抗原結合模組包含V<sub>H</sub>域及V<sub>L</sub>域，且其中V<sub>H</sub>域連接於TCRD中之一者之胺基端且V<sub>L</sub>域連接於另一TCRD之胺基端。

【0395】 實施例17.如實施例16之免疫細胞，其中V<sub>H</sub>域經由C<sub>H</sub>1域連接於TCRD中之一者且V<sub>L</sub>域經由C<sub>L</sub>域連接於另一TCRD。

【0396】 實施例18.如實施例15之免疫細胞，其中caTCR進一步包含至少一個額外抗原結合模組。

【0397】 實施例19.如實施例18之免疫細胞，其中該至少一個額外抗原結合模組為抗體部分。

【0398】 實施例20.如實施例18或19之免疫細胞，其中caTCR為多特異性的。

【0399】 實施例21.如實施例15至20中任一項之免疫細胞，其中該抗原結合模組包含融合於TCRD中之一者之胺基端的scFv。

【0400】 實施例22.如實施例21之免疫細胞，其中caTCR包含融合於第一TCRD之胺基端之第一scFv及融合於第二TCRD之胺基端之第二scFv。

【0401】 實施例23.如實施例22之免疫細胞，其中第一scFv結合於不同於第二scFv之靶標。

【0402】 實施例24.如實施例1至23中任一項之免疫細胞，其中該

caTCR為雜二聚體，其包含含有第一TCRD之第一多肽鏈及含有第二TCRD之第二多肽鏈，且其中抗原結合模組連接於第一及第二TCRD中之一或兩者之胺基端。

【0403】實施例25.如實施例1至24中任一項之免疫細胞，其中該caTCR進一步包含穩定模組，該穩定模組包含第一穩定域及第二穩定域，其中該第一穩定域及該第二穩定域彼此具有使caTCR穩定的結合親和力。

【0404】實施例26.如實施例25之免疫細胞，其中該穩定模組係選自由以下組成之群： $C_H1-C_L$ 模組、 $C_H2-C_H2$ 模組、 $C_H3-C_H3$ 模組及 $C_H4-C_H4$ 模組。

【0405】實施例27.如實施例25或26之免疫細胞，其中第一與第二穩定域之間存在共價鍵。

【0406】實施例28.如實施例27之免疫細胞，其中該共價鍵為二硫鍵。

【0407】實施例29.如實施例25至28中任一項之免疫細胞，其中該穩定模組位於抗原結合模組與TCRM之間。

【0408】實施例30.如實施例25至29中任一項之免疫細胞，其中該caTCR為雜二聚體，其包含：

a)第一多肽鏈，其包含融合於第一TCRD之胺基端之第一穩定域，及第二多肽鏈，其包含融合於第二TCRD之胺基端之第二穩定域，且其中抗原結合模組融合於第一及第二穩定域中之一或兩者的胺基端。

【0409】實施例31.如實施例1至30中任一項之免疫細胞，其中caTCR以約0.1 pM至約500 nM之平衡解離常數(Kd)結合於靶抗原。

【0410】實施例32.如實施例1至31中任一項之免疫細胞，其中TCR

相關信號傳導分子係選自由CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群。

【0411】 實施例33.如實施例1至32中任一項之免疫細胞，其中靶抗原與靶配體相同。

【0412】 實施例34.如實施例1至32中任一項之免疫細胞，其中靶抗原與靶配體不同。

【0413】 實施例35.如實施例34之免疫細胞，其中靶配體為表現於呈遞靶抗原之細胞之表面上的配體。

【0414】 實施例36.如實施例1至35中任一項之免疫細胞，其中靶配體為疾病相關配體。

【0415】 實施例37.如實施例36之免疫細胞，其中靶配體為癌症相關配體。

【0416】 實施例38.如實施例37之免疫細胞，其中癌症相關配體係選自由以下組成之群：CD19、CD20、CD22、CD47、IL4、GPC-3、ROR1、ROR2、BCMA、GPRC5D及FCRL5。

【0417】 實施例39.如實施例37之免疫細胞，其中癌症相關配體為肽/MHC複合體，其包含源自蛋白質之肽，該蛋白質選自由以下組成之群：WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A及PSA。

【0418】 實施例40.如實施例36之免疫細胞，其中靶配體為病毒相關配體。

【0419】 實施例41.如實施例1至35中任一項之免疫細胞，其中靶配體為免疫調節分子。

【0420】 實施例42.如實施例41之免疫細胞，其中免疫調節分子為

免疫抑制受體，且CSR為免疫抑制受體之拮抗劑。

【0421】 實施例43.如實施例41之免疫細胞，其中免疫調節分子為免疫刺激受體，且CSR為免疫刺激受體之促效劑。

【0422】 實施例44.如實施例41之免疫細胞，其中靶配體為免疫檢查點分子。

【0423】 實施例45.如實施例44之免疫細胞，其中免疫檢查點分子係選自由以下組成之群：PD-L1、PD-L2、CD80、CD86、ICOSL、B7-H3、B7-H4、HVEM、4-1BBL、OX40L、CD70、CD40及GAL9。

【0424】 實施例46.如實施例41之免疫細胞，其中靶配體為抑制性細胞介素。

【0425】 實施例47.如實施例1至35中任一項之免疫細胞，其中靶配體為細胞凋亡分子。

【0426】 實施例48.如實施例47之免疫細胞，其中細胞凋亡分子係選自由以下組成之群：FasL、FasR、TNFR1及TNFR2。

【0427】 實施例49.如實施例1至48中任一項之免疫細胞，其中該配體結合模組為抗體部分。

【0428】 實施例50.如實施例49之免疫細胞，其中CSR之抗體部分係選自由以下組成之群：Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv及單鏈Fv (scFv)。

【0429】 實施例51.如實施例50之免疫細胞，其中CSR之抗體部分為scFv。

【0430】 實施例52.如實施例1至48中任一項之免疫細胞，其中配體結合模組源自受體之胞外域。

【0431】 實施例53.如實施例52之免疫細胞，其中受體係選自由以

下組成之群：FasR、TNFR1、TNFR2、PD-1、CD28、CTLA-4、ICOS、BTLA、KIR、LAG-3、4-1BB、OX40、CD27、TIM-3、IL-10R、IL-6R及IL-4R。

【0432】實施例54.如實施例1至53中任一項之免疫細胞，其中CSR之跨膜模組包含源自以下之跨膜域：CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154。

【0433】實施例55.如實施例1至54中任一項之免疫細胞，其中該協同刺激免疫細胞信號傳導模組源自TCR之協同刺激受體之胞內域。

【0434】實施例56.如實施例55之免疫細胞，其中該協同刺激受體係選自由以下組成之群：CD28、4-1BB、OX40、ICOS、CD27及CD40。

【0435】實施例57.如實施例1至56中任一項之免疫細胞，其中CSR之表現為可誘導性。

【0436】實施例58.如實施例57之免疫細胞，其中在活化免疫細胞後，CSR之表現為可誘導性。

【0437】實施例59.如實施例1至32中任一項之免疫細胞，其中caTCR之抗原結合模組包含結合於CD19之抗體部分，其中CSR之配體結合模組包含結合於CD19之scFv，且其中跨膜模組及協同刺激免疫細胞信號傳導模組均源自CD28。

【0438】實施例60.如實施例59之免疫細胞，其中結合於CD19之抗體部分包含：V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列，及V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 59之胺基酸序列，其中結合於CD19之scFv包含：V<sub>H</sub>

域，其包含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列，及V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 59之胺基酸序列，且其中CSR包含CD28之片段，其包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列。

【0439】 實施例61.如實施例60之免疫細胞，其中caTCR包含兩個多肽鏈，其包含SEQ ID NO: 72及73或SEQ ID NO: 74及75之胺基酸序列，及/或其中CSR包含SEQ ID NO: 80之胺基酸序列。

【0440】 實施例62.如實施例1至32中任一項之免疫細胞，其中caTCR之抗原結合模組包含結合於AFP之抗體部分，其中CSR之配體結合模組包含結合於GPC3之scFv，且其中跨膜模組及協同刺激免疫細胞信號傳導模組均源自CD28。

【0441】 實施例63.如實施例62之免疫細胞，其中結合於AFP之抗體部分包含：V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 62之胺基酸序列，及V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 63之胺基酸序列，其中結合於GPC3之scFv包含：V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 64之胺基酸序列，及V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 65之胺基酸序列，且其中CSR包含CD28之片段，其包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列。

【0442】 實施例64.如實施例63之免疫細胞，其中caTCR包含兩個多肽鏈，其包含SEQ ID NO: 68及69或SEQ ID NO: 70及71之胺基酸序列，及/或其中CSR包含SEQ ID NO: 82之胺基酸序列。

【0443】 實施例65.如實施例1至32中任一項之免疫細胞，其中caTCR之抗原結合模組包含結合於CD19之抗體部分，其中CSR之配體結合模組包含結合於CD20之scFv，且其中跨膜模組及協同刺激免疫細胞信號傳導模組均源自CD28。



【0444】 實施例66.如實施例65之免疫細胞，其中結合於CD19之抗體部分包含：V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 58之胺基酸序列，及V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 59之胺基酸序列，其中結合於CD20之scFv包含：V<sub>H</sub>域，其包含SEQ ID NO: 60之胺基酸序列，及V<sub>L</sub>域，其包含SEQ ID NO: 61之胺基酸序列，且其中CSR包含CD28之片段，其包含SEQ ID NO: 51之胺基酸序列。

【0445】 實施例67.如實施例66之免疫細胞，其中caTCR包含兩個多肽鏈，其包含SEQ ID NO: 72及73或SEQ ID NO: 74及75之胺基酸序列，及/或其中CSR包含SEQ ID NO: 81之胺基酸序列。

【0446】 實施例68.在一個實施例中，提供一或多種核酸，其編碼如實施例1至67中任一項之caTCR及CSR，其中caTCR及CSR各自由經該一或多個核酸編碼之多肽鏈組成。

【0447】 實施例69.在一個實施例中，提供一或多種核酸，其編碼：

a)嵌合抗體-T細胞受體(TCR)構築體(caTCR)，其包含：

i)特異性結合於靶抗原之抗原結合模組；及

ii) T細胞受體模組(TCRM)，其包含含有第一TCR跨膜域(TCR-TM)之第一TCR域(TCRD)及含有第二TCR-TM之第二TCRD，其中該TCRM有助於募集至少一種TCR相關信號傳導分子，且其中caTCR由一或多個多肽鏈組成；及

b)嵌合信號傳導受體(CSR)，其包含：

i)能夠與靶配體結合或相互作用之配體結合模組；

ii)跨膜模組；及

iii)能夠提供協同刺激信號至該免疫細胞之協同刺激免疫細胞信號傳

導模組，其中該配體結合模組及該協同刺激免疫細胞信號傳導模組並非源自同一分子，其中該CSR缺乏功能性原代免疫細胞信號傳導域，且其中CSR由一或多個多肽鏈組成。

【0448】 實施例70.如實施例68或69之一或多種核酸，其中caTCR及CSR經編碼於相同核酸分子上。

【0449】 實施例71.如實施例68或69之一或多種核酸，其中caTCR及CSR經編碼於不同核酸分子上。

【0450】 實施例72.如實施例68至71中任一項之一或多種核酸，其包含編碼可操作地連接於誘導性啟動子之CSR的核苷酸序列。

【0451】 實施例73.如實施例72之一或多種核酸，其中在活化免疫細胞後，該誘導性啟動子為可誘導性。

【0452】 實施例74.如實施例72之一或多種核酸，其中該誘導性啟動子為活化T細胞(NFAT)衍生之啟動子的核因子。

【0453】 實施例75.在一個實施例中，提供一或多種載體，其包含如實施例68至74中任一項之一或多種核酸。

【0454】 實施例76.如實施例75之一或多種載體，其中該等載體中之至少一者包含編碼caTCR之核酸序列且至少一個其他載體包含編碼CSR之核酸序列。

【0455】 實施例77.如實施例75之一或多種載體，其包含單一載體，該單一載體包含一或多種核酸。

【0456】 實施例78.在一個實施例中，提供一種組合物，其包含如實施例68至74中任一項之一或多種核酸或如實施例75至77中任一項之一或多種載體。

【0457】 實施例79.在一個實施例中，提供一種免疫細胞，其包含如實施例68至74中任一項之一或多種核酸或如實施例75至77中任一項之一或多種載體。

【0458】 實施例80.如實施例79之免疫細胞，其中該免疫細胞進一步包含由如實施例68至74中任一項之一或多種核酸或如實施例75至77中任一項之一或多種載體表現的caTCR。

【0459】 實施例81.如實施例79或80之免疫細胞，其中該免疫細胞進一步包含由如實施例68至74中任一項之一或多種核酸或如實施例75至77中任一項之一或多種載體表現的CSR。

【0460】 實施例82.如實施例1至67及79至81中任一項之免疫細胞，其中該免疫細胞係選自由以下組成之群：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、自然殺手T細胞及抑制T細胞。

【0461】 實施例83.如實施例1至67及79至82中任一項之免疫細胞，其中

a)該caTCR為雜二聚體，其包含含有第一TCRD的第一多肽鏈及含有第二TCRD的第二多肽鏈，且其中該抗原結合模組包含連接於TCRD中之一或兩者之胺基端的一或兩個多肽鏈，及

b) CSR包含單一多肽鏈，該免疫細胞包含：

i)編碼caTCR之第一多肽鏈之第一核酸序列；

ii)編碼caTCR之第二多肽鏈之第二核酸序列；及

iii)編碼CSR之第三核酸序列。

【0462】 實施例84.如實施例83之免疫細胞，其包含：

a)第一載體，其包含處於第一啟動子控制下之第一核酸序列；

- b)第二載體，其包含處於第二啟動子控制下之第二核酸序列；及
- c)第三載體，其包含處於第三啟動子控制下之第三核酸序列。

【0463】 實施例85.如實施例83之免疫細胞，其包含：

- a)第一載體，其包含：
  - i)處於第一啟動子控制下之第一核酸序列；及
  - ii)處於第二啟動子控制下之第二核酸序列；及
- b)第二載體，其包含處於第三啟動子控制下之第三核酸序列。

【0464】 實施例86.如實施例83之免疫細胞，其包含載體，該載體包含：

- a)處於第一啟動子控制下之第一核酸序列；
- b)處於第二啟動子控制下之第二核酸序列；及
- c)處於第三啟動子控制下之第三核酸序列。

【0465】 實施例87.如實施例84至86中任一項之免疫細胞，其中第一啟動子及/或第二啟動子為組成性活性啟動子。

【0466】 實施例88.如實施例84至87中任一項之免疫細胞，其中第三啟動子為誘導性啟動子。

【0467】 實施例89.如實施例83之免疫細胞，其包含：

- a)第一載體，其包含處於單一第一啟動子控制下之第一核酸序列及第二核酸序列；及
- b)第二載體，其包含處於第二啟動子控制下之第三核酸序列。

【0468】 實施例90.如實施例83之免疫細胞，其包含載體，該載體包含：

- a)處於單一第一啟動子控制下之第一核酸序列及第二核酸序列；及

b)處於第二啟動子控制下之第三核酸序列。

【0469】 實施例91.如實施例89或90之免疫細胞，其中該第一啟動子為組成性活性啟動子。

【0470】 實施例92.如實施例89至91中任一項之免疫細胞，其中該第二啟動子為誘導性啟動子。

【0471】 實施例93.如實施例88或92之免疫細胞，其中在活化免疫細胞後，該誘導性啟動子為可誘導性。

【0472】 實施例94.如實施例88或92之免疫細胞，其中該誘導性啟動子為NFAT衍生之啟動子。

【0473】 實施例95.如實施例83之免疫細胞，其包含載體，該載體包含全部處於單一啟動子控制下之第一核酸序列、第二核酸序列及第三核酸序列。

【0474】 實施例96.如實施例84至95中任一項之免疫細胞，其中該等載體整合於免疫細胞基因組中。

【0475】 實施例97.在一個實施例中，提供一種醫藥組合物，其包含如實施例1至67及79至96中任一項之免疫細胞及醫藥學上可接受之載劑。

【0476】 實施例98.在一個實施例中，提供一種殺滅呈遞靶抗原之靶細胞(或治療靶抗原相關疾病)之方法，其包含使靶細胞與如實施例1至67及79至96中任一項之免疫細胞接觸。

【0477】 實施例99.如實施例98之方法，其中接觸係在活體內進行。

【0478】 實施例100.如實施例98之方法，其中接觸係在活體外進行。

【0479】 實施例101.在一個實施例中，提供一種治療有需要之個體之靶抗原相關疾病之方法，其包含向個體投與有效量之如實施例97之醫藥組合物。

【0480】 實施例102.如實施例101之方法，其中該靶抗原相關疾病為癌症。

【0481】 實施例103.如實施例102之方法，其中該癌症係選自由以下組成之群：腎上腺皮質癌、膀胱癌、乳癌、子宮頸癌、膽管癌、結腸直腸癌、食道癌、神經膠母細胞瘤、神經膠質瘤、肝細胞癌、頭頸癌、腎癌、白血病、肺癌、淋巴瘤、黑色素瘤、間皮瘤、多發性骨髓瘤、胰臟癌、嗜鉻細胞瘤、漿細胞瘤、神經母細胞瘤、卵巢癌、前列腺癌、肉瘤、胃癌、子宮癌及甲狀腺癌。

【0482】 實施例104.如實施例101之方法，其中該靶抗原相關疾病為病毒感染。

【0483】 實施例105.如實施例104之方法，其中該病毒感染係由選自由以下組成之群的病毒引起的：巨細胞病毒(CMV)、EB病毒(EBV)、B型肝炎病毒(HBV)、卡波西氏肉瘤相關疱疹病毒(KSHV)、人類乳頭狀瘤病毒(HPV)、傳染性軟疣病毒(MCV)、人類T細胞白血病毒1 (HTLV-1)、人類免疫缺乏病毒(HIV)及C型肝炎病毒(HCV)。

【0484】 實施例106.如實施例101至105中任一項之方法，其中該免疫細胞為個體的自體免疫細胞。

【0485】 實施例107.在一個實施例中，提供一種將協同刺激信號提供至包含caTCR或經編碼caTCR之核酸轉導之免疫細胞的方法，其包含將如實施例68至74中任一項之一或多種核酸或如實施例75至77中任一項之

一或多種載體引入至該細胞。

## 實例

### 材料及方法

#### 細胞樣本、細胞株及抗體

【0486】自美國菌種保存中心(American Type Culture Collection)獲得細胞株HepG2 (ATCC HB-8065 ; HLA-A2+ , AFP<sup>+</sup>)、SK-HEP-1 (ATCC HTB-52 ; HLA-A2+ , AFP<sup>-</sup>)、Raji (ATCC CCL-86 ; CD19<sup>+</sup>)、CA46 (ATCC CRL-1648 ; CD19<sup>+</sup>)、Jurkat (ATCC CRL-2899 , CD19<sup>-</sup>)、J.RT3-T3.5 (ATCC TIB-153)、Jeko-1 (ATCC CRL-3006 ; CD19<sup>+</sup>)、THP-1 (ATCC TIB-202 , CD19<sup>-</sup>)、Daudi (ATCC CCL-213 ; CD19<sup>+</sup>)、HeLa (ATCC CCL-2)、MDA-MB-231 (ATCC HTB-26)及MCF-7 (ATCC HTB-22)。Jurkat為源自T細胞白血病之人類T淋巴細胞細胞株。J.RT3-T3.5為源自Jurkat細胞的缺乏T細胞受體β鏈之突變株。Raji為表現CD19之伯基特淋巴瘤(Burkitt lymphoma)細胞株。藉由CRISPR技術產生Raji-CD19基因剔除(Raji-CD19KO)株。設計三個不同的指導序列用於靶向Raji細胞中之CD19。自Origene購得CRISPR-Cas9載體且將各指導序列單獨地選殖至pCas-Guide載體中。在電穿孔三天後，藉由流動式細胞測量術評估藉由各指導序列達成之基因剔除之效率且選擇最佳CD19基因剔除合併物以藉由限制稀釋法進行純系選擇。所選擇之純系經定序確認為完全CD19基因剔除。所有細胞株係在補充有10% FBS及2 mM麩醯胺酸之RPMI 1640或DMEM中於37°C /5% CO<sub>2</sub>下培養。

【0487】購買以下各者：針對結合至FITC或APC之人類HLA-A02 (純系BB7.2)之單株Ab及其結合至FITC或APC之同型對照小鼠IgG 2b；針

對人類或小鼠CD3、人類T細胞受體各種次單元、3×Flag標籤、HA標籤的抗體；與PE或FITC結合之山羊F(ab)2抗人類IgG；及螢光結合之山羊F(ab')2抗小鼠Ig (Invitrogen)。Eureka Therapeutics內部研發且生產了針對AFP158/HLA-A\*02:01特異性抗體之抗個體基因型抗體。使用BD FACSCanto II收集流動式細胞測量術資料且使用FlowJo套裝軟體分析。

【0488】 所有肽均為購買的且由Elim Biopharma合成。肽之純度>90%。將肽溶解於DMSO中或以10 mg/mL於鹽水中稀釋且在-80℃下冷凍。藉由使肽與重組HLA-A\*02:01及β-2微球蛋白(β2M)再摺疊，產生生物素標記單鏈AFP158/HLA-A\*02:01及對照肽/HLA-A\*02:01複合單體。經由連接於HLA-A\*02:01胞外域(ECD)之C端末端的BSP肽藉由BirA酶來生物素標記單體。將螢光標記抗生蛋白鏈菌素與生物素標記肽/HLA-A\*02:01複合單體混合，形成螢光標記肽/HLA-A\*02:01四聚體。

【0489】 例如藉由用編碼嵌合構築體之載體轉染293T細胞，產生含有人類CD19特異性或AFP158/HLA-A\*02:01特異性CAR或abTCR的慢病毒。在用CD3/CD28珠粒(Dynabeads®, Invitrogen)刺激一天之後，在100 U/ml介白素-2 (IL-2)存在下，使用原代人類T細胞進行轉導。向塗有Retronectin (Takara)之6孔培養盤中之T細胞塗覆經濃縮之慢病毒，持續96小時。使用分別含有PE結合之抗生蛋白鏈菌素或抗myc抗體的生物素標記AFP158/HLA-A\*02:01四聚體(「AFP158四聚體」)，藉由流動式細胞測量術評定抗AFP及抗CD19嵌合構築體之轉導效率。在第5天及其後每3至4天重複流動式細胞測量術分析。

【0490】 用一個或兩個編碼caTCR構築體之兩個次單元之載體轉導細胞株。轉導五天後，使用抗HA (抗HA標籤抗體，ChIP級，Abcam)或



抗Flag抗體(在兔中產生之抗Flag抗體，Sigma)，產生細胞裂解產物用於西方墨點法。

【0491】藉由Cyttox 96非放射性LDH細胞毒性分析(Promega)分析腫瘤細胞毒性。使用 EasySep 人類 T 細胞分離套組 (StemCell Technologies)，由PBMC富集之全血製備CD3<sup>+</sup> T細胞，其不利地耗竭CD14、CD16、CD19、CD20、CD36、CD56、CD66b、CD123、血型糖蛋白A表現細胞。藉由CD3/CD28戴諾珠粒(Invitrogen)，根據製造商方案活化及擴增人類T細胞。在具有10% FBS加上100 U/ml IL-2之RPMI1640培養基中培養及維持經活化之T細胞(ATC)，且在第7至14天使用。經活化之T細胞(免疫細胞)與靶細胞以各種效靶比(effector-to-target ratio) (例如，2.5:1或5:1)共培養16小時且分析細胞毒性。

### 實例1.嵌合抗體-T細胞受體(caTCR)設計

【0492】涵蓋各種嵌合抗體-T細胞受體(caTCR)設計，且於圖1中展示六個不同之實例(caTCR-1、caTCR-2、caTCR-3、caTCR-4、caTCR-5及caTCR-6)。在此等設計中，各種抗體部分(Fab、Fab'、(Fab')<sub>2</sub>、Fv或scFv)融合於缺乏可變域及恆定域且包括其連接肽(在恆定域後之區)、其跨膜域或其變異體及任何胞內域的全部或部分之T細胞受體 $\alpha/\beta$ 鏈或 $\gamma/\delta$ 鏈的胺基端，以形成可表現於T細胞之表面上的caTCR雜二聚體。在原生TCR中，V $\alpha$ /V $\beta$ 或V $\delta$ /V $\gamma$ 域形成TCR之抗原結合域。吾人之設計以各種抗體部分置換V $\alpha$ -C $\alpha$ /V $\beta$ -C $\beta$ 或V $\delta$ -C $\delta$ /V $\gamma$ -C $\gamma$ 區，且引入至少一個變異TCR跨膜域，因此賦予抗體對構築體之結合特異性，及使得該構築體相較於僅具有天然存在之TCR跨膜域之TCR或相關構築體在TCR複合體中募集輔助分子(諸如CD3 $\delta\epsilon$ 、CD3 $\gamma\epsilon$ 及CD3 $\zeta\zeta$ )的能力增強。caTCR構築體如下命名：

caTCR-[設計#]-[變異體位置][#]。設計#1對應於具有Fab抗體部分之caTCR，設計#2對應於具有Fab'抗體部分之caTCR，設計#3對應於具有(Fab')<sub>2</sub>抗體部分之caTCR，設計#4對應於具有Fv抗體部分之caTCR，設計#5對應於具有單一scFv抗體部分之caTCR，且設計#6對應於具有兩個scFv抗體部分之caTCR(參見圖1)。無變異體位置及#0(例如，caTCR-1-0)對應於具有天然存在之TCR域之構築體，且# $\geq 1$ 對應於在變異體位置中具有特異性變異體之caTCR(例如，caTCR-1-TM1對應於一個跨膜域變異體，caTCR-1-EC1對應於一個胞外域變異體；參見表2)。

**【0493】** 在 caTCR-1 (IgV<sub>H</sub>-IgC<sub>H1</sub>-TCR $\delta$ /IgV<sub>L</sub>-IgC<sub>L</sub>-TCR $\gamma$ ) 設計中，抗體重鏈之可變域及第一恆定域(IgV<sub>H</sub>-IgC<sub>H1</sub>)置換TCR $\delta$ 鏈中直至一位置之胺基端部分，該位置毗鄰TCR $\delta$ 鏈之胞外域中在V $\delta$ -C $\delta$ 區後的連接肽或在該連接肽內，視情況地，其中TCR $\delta$ 鏈之跨膜域諸如藉由一或多個胺基酸之取代修飾。對應抗體輕鏈之可變域及恆定域(IgV<sub>L</sub>-IgC<sub>L</sub>)置換TCR $\gamma$ 鏈中直至一位置之胺基端部分，該位置毗鄰TCR $\gamma$ 鏈之胞外域中之V $\gamma$ -C $\gamma$ 區後的連接肽或在該連接肽內，視情況地，其中TCR $\gamma$ 鏈之跨膜域諸如藉由一或多個胺基酸之取代修飾。

**【0494】** 在caTCR-1之一個實施例中，一個鏈包括抗AFP158/HLA-A\*02:01抗體之IgV<sub>H</sub>域(SEQ ID NO: 62)，該IgV<sub>H</sub>域融合於IgC<sub>H1</sub>域(SEQ ID NO: 37-47中之任一者)，該IgC<sub>H1</sub>域融合於TCR $\delta$ 鏈之羧基端部分，該羧基端部分包括跨膜域及TCR $\delta$ 鏈之連接肽之全部或部分，且另一鏈包括抗AFP158/HLA-A\*02:01抗體之IgV<sub>L</sub>域(SEQ ID NO: 63)，該IgV<sub>L</sub>域融合於IgC<sub>L</sub>域(SEQ ID NO: 48)，該IgC<sub>L</sub>域融合於TCR $\gamma$ 鏈之羧基端部分，該羧基端部分包括跨膜域及TCR $\gamma$ 鏈之連接肽之全部或部分。在一些實施例

中，兩個TCR跨膜域均為天然存在的。在一些實施例中，TCR跨膜域中之至少一者為非天然存在之變異體，其包含一或多個胺基酸取代。在一些實施例中，TCR $\delta$ 鏈之羧基端部分包括具有SEQ ID NO: 31或32之胺基酸序列的连接肽。在一些實施例中，TCR $\delta$ 鏈之羧基端部分包括具有SEQ ID NO: 7及9-13中之任一者之胺基酸序列的跨膜域。在一些實施例中，TCR $\gamma$ 鏈之羧基端部分包括具有SEQ ID NO: 33或34之胺基酸序列的连接肽。在一些實施例中，TCR $\gamma$ 鏈之羧基端部分包括具有SEQ ID NO: 8及14-26中之任一者之胺基酸序列的跨膜域。

**【0495】** 在caTCR-2 (IgV<sub>H</sub>-IgC<sub>H1</sub>-鉸鏈-TCR $\delta$ /IgV<sub>L</sub>-IgC<sub>L</sub>-連接子-TCR $\gamma$ )設計中，抗體重鏈之可變域、第一恆定域及鉸鏈(IgV<sub>H</sub>-IgC<sub>H1</sub>-鉸鏈)置換TCR $\delta$ 鏈中直至一位置之胺基端部分，該位置毗鄰TCR $\delta$ 鏈之胞外域中在V $\delta$ -C $\delta$ 區後的连接肽或在該连接肽內，視情況地，其中TCR $\delta$ 鏈之跨膜域諸如藉由一或多個胺基酸之取代修飾。融合於連接子(IgV<sub>L</sub>-IgC<sub>L</sub>-連接子)的對應抗體輕鏈之可變域及恆定域置換TCR $\gamma$ 鏈中直至一位置之胺基端部分，該位置毗鄰TCR $\gamma$ 鏈之胞外域中在V $\gamma$ -C $\gamma$ 區後的连接肽或在該连接肽內，視情況地，其中TCR $\gamma$ 鏈之跨膜域諸如藉由一或多個胺基酸之取代修飾。

**【0496】** 在caTCR-3 (IgV<sub>H</sub>-IgC<sub>H1</sub>-鉸鏈-TCR $\delta$ /IgV<sub>H</sub>-IgC<sub>H1</sub>-鉸鏈-TCR $\gamma$  + IgV<sub>L</sub>-IgC<sub>L</sub>)設計中，抗體重鏈之可變域、第一恆定域及鉸鏈(IgV<sub>H</sub>-IgC<sub>H1</sub>-鉸鏈)置換TCR $\delta$ 鏈中直至一位置之胺基端部分，該位置毗鄰TCR $\delta$ 鏈之胞外域中在V $\delta$ -C $\delta$ 區後的连接肽或在該连接肽內，視情況地，其中TCR $\delta$ 鏈之跨膜域諸如藉由一或多個胺基酸之取代修飾。抗體重鏈之可變域、第一恆定域及鉸鏈(IgV<sub>H</sub>-IgC<sub>H1</sub>-鉸鏈)置換TCR $\gamma$ 鏈中直至一位置

之胺基端部分，該位置毗鄰TCR $\gamma$ 鏈之胞外域中在V $\gamma$ -C $\gamma$ 區後的連接肽或在該連接肽內，視情況地，其中TCR $\gamma$ 鏈之跨膜域諸如藉由一或多個胺基酸之取代修飾。對應抗體輕鏈之可變域及恆定域(IgV<sub>L</sub>-IgC<sub>L</sub>)與IgV<sub>H</sub>-IgC<sub>H1</sub>域結合。

**【0497】** 在caTCR-4 (IgV<sub>H</sub>-TCR $\delta$ /IgV<sub>L</sub>-TCR $\gamma$ )設計中，抗體重鏈之可變域(IgV<sub>H</sub>)置換TCR $\delta$ 鏈中直至一位置之胺基端部分，該位置毗鄰TCR $\delta$ 鏈之胞外域中在V $\delta$ -C $\delta$ 區後的連接肽或在該連接肽內，視情況地，其中TCR $\delta$ 鏈之跨膜域諸如藉由一或多個胺基酸之取代修飾。對應抗體輕鏈之可變域(IgV<sub>L</sub>)置換TCR $\gamma$ 鏈中直至一位置之胺基端部分，該位置毗鄰TCR $\gamma$ 鏈之胞外域中在V $\gamma$ -C $\gamma$ 區後的連接肽或在該連接肽內，視情況地，其中TCR $\gamma$ 鏈之跨膜域諸如藉由一或多個胺基酸之取代修飾。

**【0498】** 在caTCR-5 (IgV<sub>H</sub>-IgV<sub>L</sub>-TCR $\delta$ /TCR $\gamma$ )設計中，融合於對應抗體輕鏈之可變域的抗體重鏈之可變域(IgV<sub>H</sub>-IgV<sub>L</sub>或IgV<sub>L</sub>-IgV<sub>H</sub>)置換TCR $\delta$ 鏈中直至一位置之胺基端部分，該位置毗鄰TCR $\delta$ 鏈之胞外域中在V $\delta$ -C $\delta$ 區後的連接肽或在該連接肽內，視情況地，其中TCR $\delta$ 鏈之跨膜域諸如藉由一或多個胺基酸之取代修飾。TCR $\gamma$ 鏈中直至一位置之胺基端部分缺失，該位置毗鄰TCR $\gamma$ 鏈之胞外域中在V $\gamma$ -C $\gamma$ 區後的連接肽或在該連接肽內，視情況地，其中TCR $\gamma$ 鏈之跨膜域諸如藉由一或多個胺基酸之取代修飾。

**【0499】** 在caTCR-6 (IgV<sub>H</sub>-IgV<sub>L</sub>-TCR $\delta$ /IgV<sub>H</sub>-IgV<sub>L</sub>-TCR $\gamma$ )設計中，融合於對應抗體輕鏈之可變域的抗體重鏈之可變域(IgV<sub>H</sub>-IgV<sub>L</sub>或IgV<sub>L</sub>-IgV<sub>H</sub>)置換TCR $\delta$ 鏈中直至一位置之胺基端部分，該位置毗鄰TCR $\delta$ 鏈之胞外域中在V $\delta$ -C $\delta$ 區後的連接肽或在該連接肽內，視情況地，其中TCR $\delta$ 鏈

之跨膜域諸如藉由一或多個胺基酸之取代修飾。融合於對應抗體輕鏈之可變域的抗體重鏈之可變域(IgV<sub>H</sub>-IgV<sub>L</sub>或IgV<sub>L</sub>-IgV<sub>H</sub>)置換TCR $\gamma$ 鏈中直至一位置之胺基端部分，該位置毗鄰TCR $\gamma$ 鏈之胞外域中在V $\gamma$ -C $\gamma$ 區後的連接肽或在該連接肽內，視情況地，其中TCR $\gamma$ 鏈之跨膜域諸如藉由一或多個胺基酸之取代修飾。

**實例2：經抗CD19 caTCR-1及抗CD19嵌合刺激受體轉導之T細胞的構築及表徵**

**【0500】** 編碼抗CD19結合部分(SEQ ID NO: 58及59)之核酸片段係用於生成包含CD28跨膜及胞內信號傳導序列(SEQ ID NO: 51)之嵌合協同刺激受體(CSR；在本文中亦稱作「CSR1」)及caTCR-1構築體(caTCR-1-0或caTCR-1-TM5)兩者。僅用CSR，僅用caTCR-1-0，用caTCR-1-0結合CSR或caTCR-1-TM5結合CSR轉導原代T細胞。藉由細胞表面染色測定轉導效率，且所有caTCR-1 T細胞藉由與模擬T細胞混合而匹配大致40%之受體陽性。

*活體外殺滅*

**【0501】** 將CD80/86陰性NALM6細胞(表現CD19之白血病細胞)用作靶細胞，以用於以2.5:1之效靶比進行T細胞刺激。培育16小時後，使用Cyttox 96非放射性細胞毒性分析(Promega)量測特異性T細胞溶解。

**【0502】** 用抗CD19-caTCR-1-0或抗CD19-caTCR-1-TM5表現抗CD19-CSR產生能夠在活體外裂解NALM6腫瘤細胞之完全功能性細胞毒性T細胞(圖2)。因為僅表現caTCR-1-0之T細胞及表現caTCR-1 (caTCR-1-0或caTCR-1-TM5)及CSR兩者之彼等T細胞均能夠裂解幾乎100%的NALM6靶細胞，故在兩種類型之T細胞之間未觀測到經殺滅靶細胞之數

目之顯著差異。

細胞介素分泌

【0503】 釋放至活體外殺滅反應之上清液中之細胞介素的濃度係藉由Bioplex200 (Luminex)、使用Bio-plex Pro人類細胞介素8-plex套組(BioRad)量測。表現CSR結合caTCR之T細胞(CSR-陽性及caTCR-陽性T細胞)相較於表現單獨ca-TCR-1-0的T細胞釋放更多細胞毒性細胞介素(圖3)。

胞內細胞介素表現

【0504】 在分泌抑制劑佈雷菲爾德菌素A (BFA)存在下，以1:2之E:T比率用靶細胞刺激T細胞4小時。T細胞被滲透且使用細胞介素特異性抗體偵測回應於腫瘤刺激而表現的細胞介素。使用流動式細胞測量術測定細胞介素與陽性細胞的百分比。CSR-陽性及caTCR-陽性T細胞相較於僅表現ca-TCR-1-0的T細胞表現更多胞內細胞介素(表5)。

表5

| CD8+ T細胞中的胞內TNFα表現  |      |       |        |
|---------------------|------|-------|--------|
| 陽性%                 | Raji | NALM6 | 單獨的T細胞 |
| CSR                 | 0.58 | 0.44  | 0.04   |
| caTCR-1-0           | 24.3 | 20.1  | 0.04   |
| caTCR-1-0+CSR       | 28.7 | 28.2  | 0.07   |
| caTCR-1-TM5+CSR     | 29   | 31.5  | 0.04   |
| CD8+ T細胞中的胞內IL-2表現  |      |       |        |
| 陽性%                 | Raji | NALM6 | 單獨的T細胞 |
| CSR                 | 0.97 | 0.71  | 0.49   |
| caTCR-1-0           | 8.5  | 4.36  | 0.61   |
| caTCR-1-0+CSR       | 12.5 | 8.2   | 0.53   |
| caTCR-1-TM5+CSR     | 10.6 | 8.2   | 0.65   |
| CD8+ T細胞中的胞內IFN-γ表現 |      |       |        |

| 陽性%             | Raji | NALM6 | 單獨的T細胞 |
|-----------------|------|-------|--------|
| CSR             | 1.43 | 2.28  | 0.17   |
| caTCR-1-0       | 18.2 | 15.5  | 0.78   |
| caTCR-1-0+CSR   | 21.8 | 18.8  | 1.72   |
| caTCR-1-TM5+CSR | 18.5 | 16.4  | 0.51   |

【0505】 總之，該等結果表明添加CSR增加caTCRT細胞之敏感性及反應性。CSR-caTCR雙陽性T細胞中所表現及所釋放的細胞介素之量增加表明caTCR-1與CSR之協同刺激提高了T細胞之細胞毒性潛力。

脫粒

【0506】 T細胞裂解腫瘤細胞之主要機構係藉由產生釋放至靶細胞中之細胞毒性分子之分泌性顆粒。CD107a可用作脫粒活性之標記物且增加之CD107a表現與細胞毒性T細胞功能之增加相關。

【0507】 將T細胞與螢光結合之抗CD107a混合且在內吞抑制劑莫能菌素存在下以1:2之E:T比率用靶細胞刺激4小時。在T細胞表面上偵測到的CD107a的量係藉由抗原識別誘導之細胞毒性脫粒之程度的直接度量。caTCR T細胞上之CSR接合增加T細胞脫粒，進一步證明CSR使治療性T細胞具有更多的針對所預期腫瘤細胞之反應性(圖4)。

增殖

【0508】 在治療癌症時，經基因修飾之T細胞之增殖及存留對於授受性T細胞轉移療法之成功至關重要。為分析CSR對T細胞增殖及持續性之效應，吾人用胞內染料CFSE標記T細胞，且在T細胞用腫瘤細胞刺激而分裂時觀測到染料之稀釋。吾人亦能夠藉由對在指定日剩餘之CFSE-陽性細胞之數目計數來量測T細胞之存留。

【0509】 將各別T細胞在血清中饑餓隔夜且使用CellTrace CFSE (Thermo Fisher C34554)經CFSE標記。以2:1之E:T比率培育100,000個T

細胞且當T細胞在指定日分裂時，使用流動式細胞測量術觀測CFSE染料之連續稀釋。藉由FAC對T細胞之總數目計數。

【0510】 CFSE稀釋在CSR刺激下增大，表明此等T細胞具有較高的增殖潛力(圖5)。重要的係，細胞數目亦增加，意謂該等細胞不僅增殖較佳，而且其存留亦得以維持(表6)。

表6

| 接合後存留之T細胞的# |       |            |              |       |            |              |
|-------------|-------|------------|--------------|-------|------------|--------------|
|             | BV173 |            |              | NALM6 |            |              |
|             | -0    | -0<br>+CSR | -TM5<br>+CSR | -0    | -0<br>+CSR | -TM5<br>+CSR |
| 第3天         | 10354 | 28847      | 38830        | 6591  | 17260      | 32331        |
| 第5天         | 2945  | 16049      | 26551        | 1240  | 2988       | 8620         |
| 第7天         | 253   | 2135       | 5985         | 329   | 158        | 684          |

【0511】 該等結果展示，吾人能夠用表現靶配體及靶抗原兩者之腫瘤細胞同時刺激CSR及caTCR兩者，且CSR與caTCR之協同刺激增強caTCR T細胞之細胞毒性、增殖潛力及存留。此等為將使用授受性轉移來增加基於caTCR之療法之治療潛力的所有特徵。

實例3.經抗AFP caTCR-1及抗GPC3 CSR轉導之T細胞的構築及表徵

【0512】 使用編碼抗AFP結合部分(SEQ ID NO: 62及63)之核酸片段生成caTCR-1構築體(caTCR-1-0或caTCR-1-TM5)。使用編碼抗GPC3結合部分(SEQ ID NO: 64及65)之核酸片段生成包含CD28跨膜及胞內信號傳導序列(SEQ ID NO: 51)的CSR (亦即CSR1)。

活體外殺滅

【0513】 將HEPG2細胞(表現AFP及GPC3之人類肝癌細胞)及HEPG2-GPC3.KO細胞(其中靶向基因剔除GPC3基因之HEPG2細胞)用作



靶細胞，以用於以2.5:1之效靶比進行T細胞刺激。培育16小時後，使用Cyttox 96非放射性細胞毒性分析(Promega)量測特異性T細胞溶解。

【0514】用抗AFP-caTCR-1-0或抗AFP-caTCR-1-TM5表現抗GPC3-CSR產生能夠在活體外裂解HEPG2細胞之完全功能性細胞毒性T細胞(圖6)。僅表現caTCR-1-0之T細胞的特異性殺滅(約15%)比表現caTCR-1 (caTCR-1-0或caTCR-1-TM5)與CSR兩者之T細胞(約55%至約65%之間)少得多。相比之下，當使用HEPG2-GPC3.KO靶細胞時(圖6)，對於表現caTCR與CSR兩者之T細胞而言，特異性殺滅減小至約10%，表明CSR與其靶配體的接合引起細胞毒性增加。

#### 細胞介素分泌

【0515】釋放至活體外殺滅實驗之上清液中之細胞介素的濃度係藉由Bioplex200 (Luminex)、使用Bio-plex Pro人類細胞介素8-plex套組(BioRad)量測。對於表現caTCR靶抗原與CSR靶配體兩者的HEPG2靶細胞而言，CSR-陽性及caTCR-陽性T細胞相較於僅表現ca-TCR-1-0之T細胞釋放更多細胞毒性細胞介素(圖7)。相比之下，對於缺乏CSR靶配體之HEPG2-GPC3.KO靶細胞而言，僅表現ca-TCR-1-0之T細胞或表現caTCR與CSR兩者之T細胞之間的差異很小或無差異(圖7)。

#### 胞內細胞介素表現

【0516】在分泌抑制劑佈雷菲爾德菌素A (BFA)存在下，以1:2之E:T比率用靶細胞(HEPG2)刺激T細胞4小時。T細胞被滲透且使用細胞介素特異性抗體偵測回應於腫瘤刺激而表現的細胞介素。使用流動式細胞測量術測定細胞介素與陽性細胞的百分比。CSR-陽性及caTCR-陽性T細胞相較於僅表現ca-TCR-1-0的T細胞表現更多胞內細胞介素(表7)。

表7

| CD8+ T細胞中的胞內TNF $\alpha$ 表現 |       |        |
|-----------------------------|-------|--------|
| 陽性%                         | HEPG2 | 單獨的T細胞 |
| CSR                         | 0.3   | 0.2    |
| caTCR-1-0                   | 14.7  | 0.1    |
| caTCR-1-0+CSR               | 17.0  | 0.1    |
| caTCR-1-TM5+CSR             | 15.7  | 0.1    |

| CD4+ T細胞中的胞內IL-2表現 |       |        |
|--------------------|-------|--------|
| 陽性%                | HEPG2 | 單獨的T細胞 |
| CSR                | 0.1   | 0.04   |
| caTCR-1-0          | 8.2   | 0.11   |
| caTCR-1-0+CSR      | 9.8   | 0.05   |
| caTCR-1-TM5+CSR    | 11.2  | 0.03   |

| CD8+ T細胞中的胞內IFN $\gamma$ 表現 |       |        |
|-----------------------------|-------|--------|
| 陽性%                         | HEPG2 | 單獨的T細胞 |
| CSR                         | 0.2   | 0.08   |
| caTCR-1-0                   | 3.1   | 0.2    |
| caTCR-1-0+CSR               | 4.5   | 0.1    |
| caTCR-1-TM5+CSR             | 5.1   | 0.06   |

【0517】 總之，該等結果表明，添加CSR增加了具有不同caTCR靶抗原及CSR靶配體之caTCR加CSR T細胞的敏感性及反應性。此等CSR-caTCR雙陽性T細胞中所表現及所釋放的細胞介素之量增加進一步證明caTCR-1與CSR之協同刺激提高了T細胞之細胞毒性潛力。

脫粒

【0518】 將T細胞與螢光結合之抗CD107a混合且在內吞抑制劑莫能菌素存在下以1:2之E:T比率用HEPG2靶細胞刺激4小時。caTCR T細胞上之CSR接合增加T細胞脫粒，進一步證明CSR使治療性T細胞具有更多的

針對所預期腫瘤細胞之反應性(圖8)。

增殖

【0519】 將T細胞用胞內染料CFSE標記，且量測在指定日剩餘的CFSE陽性細胞之染料稀釋及數目。

【0520】 將各別T細胞在血清中饑餓隔夜且使用CellTrace CFSE (Thermo Fisher C34554)經CFSE標記。以2:1之E:T比率培育100,000個T細胞且當T細胞在指定日分裂時，使用流動式細胞測量術觀測CFSE染料之連續稀釋。藉由FAC對T細胞之總數目計數。

【0521】 CFSE稀釋在CSR刺激下增大，表明此等T細胞具有較高的增殖潛力(圖9)。重要的係，細胞數目亦增加，意謂該等細胞不僅增殖較佳，而且其存留亦得以維持(表8)。

表8

| 與HEPG2接合之後存留的T細胞之# |        |        |       |
|--------------------|--------|--------|-------|
|                    | 第3天    | 第5天    | 第7天   |
| CSR                | 7,147  | 4,519  | 3,055 |
| caTCR1-0           | 5,674  | 4,362  | 3,372 |
| caTCR1-0 +CSR      | 31,422 | 18,689 | 8,833 |
| caTCR-1-TM5 +CSR   | 28,874 | 21,978 | 9,471 |

【0522】 該等結果展示，吾人能夠用配體陽性腫瘤細胞同時刺激CSR及caTCR兩者，且CSR與caTCR之協同刺激增強caTCR T細胞之細胞毒性、增殖潛力及存留。此等為將使用授受性轉移來增加基於caTCR之療法之治療潛力的所有特徵。

實例4.經抗CD19 caTCR-1及抗CD20 CSR轉導之T細胞的構築及表徵

【0523】 使用編碼抗CD20結合部分(SEQ ID NO: 60及61)之核酸片段生成抗CD20 CSR (亦即「CSR1」)，其包含CD28跨膜及胞內信號傳導

序列(SEQ ID NO: 51)，表現於同一載體上，該載體表現使用抗CD19結合部分(SEQ ID NO: 58及59)生成之抗CD19 caTCR-1-0或caTCR-1-TM5。

#### 活體外殺滅

【0524】將Raji、BV173、NALM6及Jeko-1細胞(表現CD19及CD20之細胞株)用作靶細胞，以用於以2.5:1之效靶比進行T細胞殺滅。培育16小時後，使用Cyttox 96非放射性細胞毒性分析(Promega)量測特異性T細胞溶解。

【0525】用抗CD19-caTCR-1-0或抗CD19-caTCR-1-TM5表現抗CD20-CSR產生能夠在活體外裂解多種CD19-陽性、CD20-陽性腫瘤細胞之完全功能性細胞毒性T細胞(圖10)。

#### 細胞介素分泌

【0526】釋放至Raji活體外殺滅實驗之上清液中之細胞介素的濃度係藉由Bioplex200 (Luminex)、使用Bio-plex Pro人類細胞介素8-plex套組(BioRad)量測。CSR-陽性及caTCR-陽性T細胞相較於僅表現ca-TCR-1-0的T細胞釋放更多GM-CSF、IFN $\gamma$ 及TNF $\alpha$  (表11)。

#### 脫粒

【0527】將T細胞與螢光結合之抗CD107a混合且在內吞抑制劑莫能菌素存在下以1:2之E:T比率用Raji靶細胞刺激4小時。caTCR T細胞上之CSR接合增加T細胞脫粒，進一步證明CSR使治療性T細胞具有更多的針對所預期腫瘤細胞之反應性(圖12)。

【0528】實例2至4展示，CSR為可與各種抗原靶向部分組合使用以增加表現caTCR之T細胞對於廣泛範圍之病變細胞的治療潛力的模組化分子。

## 實例5：經抗CD19 caTCR-1及抗CD19嵌合刺激受體變異體轉導之T細胞的構築及表徵

【0529】 使用編碼抗CD19結合部分(SEQ ID NO: 58及59)之核酸片段生成嵌合協同刺激受體(CSR)及caTCR-1-0構築體(在此實例中稱作「caTCR-1」)兩者。藉由將抗CD19結合部分融合於CSR序列製備不同CSR。CSR1包含CD28跨膜及胞內信號傳導序列(SEQ ID NO: 90)。CSR2包含CD8跨膜序列及4-1BB胞內信號傳導序列(SEQ ID NO: 91)。CSR3包含4-1BB跨膜及胞內信號傳導序列(SEQ ID NO: 92)。CSR4包含CD8跨膜序列及CD27胞內信號傳導序列(SEQ ID NO: 93)。CSR5包含CD27跨膜及胞內信號傳導序列(SEQ ID NO: 94)。CSR6包含CD8跨膜序列及CD30胞內信號傳導序列(SEQ ID NO: 95)。CSR7包含CD30跨膜及胞內信號傳導序列(SEQ ID NO: 96)。CSR8包含CD8跨膜序列及OX40胞內信號傳導序列(SEQ ID NO: 97)。CSR9包含OX40跨膜及胞內信號傳導序列(SEQ ID NO: 98)。

【0530】 僅用抗CD19 CSR或用抗CD19 caTCR-1結合抗CD19 CSR轉導原代T細胞。藉由細胞表面染色測定轉導效率，且所有caTCR轉導之T細胞藉由與模擬T細胞混合而匹配大致40%之受體陽性。

### 僅表現抗CD19 CSR之T細胞

#### 活體外殺滅

【0531】 將Raji或NALM6細胞用作靶細胞，以用於以2.5:1之效靶比進行T細胞刺激。培育16小時後，使用Cytotoxicity 96非放射性細胞毒性分析(Promega)量測特異性T細胞溶解。僅表現抗CD19 CSR-6、CSR-7、CSR-8或CSR-9之T細胞並不會導致經殺滅靶細胞之數目相較於未經轉導之模擬

T細胞升高(資料未示出)。

細胞介素分泌

【0532】 釋放至活體外殺滅反應之上清液中之細胞介素的濃度係藉由Bioplex200 (Luminex)、使用Bio-plex Pro人類細胞介素8-plex套組(BioRad)量測。僅表現抗CD19 CSR-6、CSR-7、CSR-8或CSR-9之T細胞在用Raji或NALM6培育時並不會釋放大量IFN $\gamma$  (資料未示出)。

表現抗CD19 caTCR-1及抗CD19 CSR之T細胞

【0533】 在兩個不同批次之實驗中，將表現抗CD19 caTCR-1及抗CD19 CSR之各別T細胞在血清中饑餓隔夜且使用CellTrace CFSE (Thermo Fisher C34554)經CFSE標記。以2:1之E:T比率用NALM6培育T細胞且當T細胞在指定日分裂時，使用流動式細胞測量術觀測CFSE染料之連續稀釋。藉由FAC對T細胞之總數目計數。使用自第二供體獲得之原代T細胞反覆此等實驗。觀測到類似結果(資料未示出)。

【0534】 觀測表現抗CD19 caTCR-1及抗CD19 CSR兩者之所有T細胞的CFSE稀釋，表明此等T細胞之高增殖潛力(圖14至15)。另外，表現抗CD19 caTCR-1及抗CD19 CSR兩者之T細胞展示經10天時間之顯著存留(表9)。在對照實驗中，僅表現抗CD19 CSR-1至抗CD19 CSR-5中之任一者的T細胞並未展示增殖潛力或存留隨時間增加(資料未示出)。

表9

| 與NALM6接合之後存留的T細胞之# |                 |                 |                 |                 |                 |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                    | caTCR-1 + CSR-1 | caTCR-1 + CSR-2 | caTCR-1 + CSR-3 | caTCR-1 + CSR-4 | caTCR-1 + CSR-5 |
| 第3天                | 144622          | 171874          | 128353          | 158852          | 173153          |
| 第5天                | 307957          | 196842          | 126643          | 237138          | 275630          |
| 第7天                | 187440          | 184933          | 75822           | 163892          | 168092          |
| 第10天               | 88562           | 114640          | 36480           | 111527          | 118921          |

| 與NALM6接合之後存留的T細胞之# |                 |                 |                 |                 |                 |
|--------------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|-----------------|
|                    | caTCR-1 + CSR-1 | caTCR-1 + CSR-6 | caTCR-1 + CSR-7 | caTCR-1 + CSR-8 | caTCR-1 + CSR-9 |
| 第3天                | 206073          | 234073          | 202600          | 264248          | 240125          |
| 第5天                | 89685           | 243962          | 226587          | 264685          | 225515          |
| 第7天                | 111523          | 186479          | 187614          | 175982          | 150052          |
| 第10天               | 141112          | 285946          | 278322          | 274536          | 228298          |

**實例6：經抗CD19 caTCR-1及抗CD19 CSR轉導之T細胞的活體內功效研究**

【0535】 在人類CD19+ NALM-6 pre-B急性淋巴母細胞白血病(ALL)模型中測試表現抗CD19 caTCR-1及抗CD19 CSR-1兩者之T細胞之活體內抗腫瘤活性。將表現螢光素酶之NALM-6細胞經靜脈內(i.v.)植入至NOD SCID  $\gamma$  (NSG)免疫功能不全小鼠中，且藉由量測腫瘤衍生之生物發光評定腫瘤負荷。腫瘤植入後第六天，基於全生物發光通量將小鼠隨機分組為處理組：(1)  $5 \times 10^6$ 個未經轉導之供體匹配(模擬) T細胞的i.v.注入；(2)僅表現抗CD19 caTCR-1之 $2 \times 10^6$ 個T細胞(「caTCR-1 T細胞」)的i.v.注入；及(3)表現抗CD19 caTCR-1及抗CD19 CSR-1兩者之 $2 \times 10^6$ 個T細胞(「caTCR-1 CSR-1 T細胞」； $n$ =每組6隻小鼠)的i.v.注入。T細胞輸注對小鼠造成的健康影響係藉由監測其全身外觀、體重及不良反應之其他臨床徵象(包括體溫降低、呼吸困難及後肢麻痺/虛弱)來評估。

【0536】 如圖16中所示，雖然caTCR-1 T細胞及caTCR-1 CSR-1 T細胞處理導致腫瘤生長抑制，但caTCR-1 CSR-1 T細胞展示相較於caTCR-1 T細胞之抗腫瘤活性增強。所有經caTCR-1 T細胞治療及經caTCR-1 CSR-1 T細胞處理之小鼠在研究持續時間內均展現正常步態、姿勢及活動/反應。此外，經caTCR-1 T細胞治療及經caTCR-1 CSR-1 T細胞處理之小鼠的體重在研究期間無損失。大體上，所治療小鼠缺乏可觀測到的異常參數證明caTCR-1 CSR-1 T細胞療法安全。

【0537】 為測定細胞介素活體內釋放量，在向帶有NALM-6腫瘤之小鼠投與抗CD19 CAR-T細胞或caTCR-1 CSR-1 T細胞之後24小時分析關鍵細胞介素，包括與臨床細胞介素釋放症候群有關之細胞介素。藉由Luminex Magpix技術，使用BioRad Bio-Plex套組定量細胞介素含量。如圖17中所示，經caTCR-1 CSR-1 T細胞處理之小鼠的細胞介素釋放量相比經CAR-T處理之小鼠顯著較低。

#### 實例7：經抗AFP caTCR-1及抗GPC3 CSR轉導之T細胞的活體內功效研究

【0538】 在所建立之人類AFP<sup>+</sup>/HLA-A2<sup>+</sup> Hep G2肝癌異種移植模型中測試表現抗AFP caTCR-1與抗GPC3 CSR-1兩者之T細胞的活體內抗腫瘤活性(構築體資訊參見實例3)。將Hep G2細胞皮下(s.c.)植入SCID-Beige小鼠之右側腹上。當腫瘤達到 $\sim 100\text{mm}^3$ 時，小鼠經瘤內(i.t.)注入有：(1)  $5 \times 10^6$ 個未經轉導之供體匹配(模擬) T細胞；(2)表現包含相同抗AFP結合部分(SEQ ID NO: 62及63)之抗AFP CAR的 $2 \times 10^6$ 個T細胞；或(3)表現抗AFP caTCR-1及抗GPC3 CSR-1之 $2 \times 10^6$ 個T細胞( $n$ =每組6隻小鼠)。T細胞輸注對小鼠造成的健康影響係藉由監測其全身外觀、體重及不良反應之其他臨床徵象(包括體溫降低、呼吸困難及後肢麻痺/虛弱)來評估。

【0539】 如圖18中所示，抗AFP CAR T細胞治療與抗AFP caTCR-1/抗GPC3 CSR-1 T細胞治療均引起深刻且顯著(\*\*\*\* $P < 0.0001$ ；鄧尼特氏多重比較檢驗(Dunnett's multiple comparison test))的腫瘤生長抑制。所有經抗AFP CAR-T處理之小鼠及經抗AFP caTCR-1/抗GPC3 CSR-1 T細胞處理之小鼠在研究持續時間期間均展現正常的步態、姿勢及活動/反應。另外，經抗AFP CAR-T處理之小鼠及經抗AFP caTCR-1/抗GPC3



CSR-1 T細胞處理之小鼠的體重在研究期間無損失。大體上，所治療小鼠缺乏可觀測到的異常參數證明抗AFP caTCR-1/抗GPC3 CSR-1 T細胞療法安全。

序列表

| SEQ ID NO | 描述                        | 序列                                                                                                                                                                                                |
|-----------|---------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1         | TCRα恆定域                   | PNIQNPDPVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYI<br>TDKTVLDMRSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDTFF<br>PSPSSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLVIGFRILLKLVAGFNLLM<br>TLRLWSS                                            |
| 2         | TCRβ恆定域                   | EDLNKVFPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFFPDHVELSW<br>WVNGKEVHSGVSTDPQPLKEQPALNDSRYCLSSRLRVSATFWQ<br>NPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRADC<br>GFTSVSYQQGVLSATILYEILLGKATLYAVLVSAVLMMAMVKRKD<br>F |
| 3         | TCRδ恆定域                   | SQPHTKPSVFVMKNGTNVACLVKEFYPKDIRINLVSSKKITEFDP<br>AIVISPSGKYNAVKLKGYEDSNSVTCSVQHDNKT VHSTDFEVKT<br>DSTDHV KPKETENTKQPSK SCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGL<br>RMLFAKT VAVNFLTAKLFFL                          |
| 4         | TCRγ恆定域                   | DKQLDADVSPKPTIFLPSIAETKLQKAGTYLCLLEKFFPDVIKIH<br>WQEKKSNTILGSQEGNTMKTNDTYMKFSWLTVPKSLDKEHRC<br>IVRHENNKNGVDQEIIFFPIKTDVITMDPKDNCSKDANDTLLQL<br>TNTSAYMYLLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAFCCNGEKS           |
| 5         | TCRα跨膜域                   | ILLLKVAGFNLLMTLRLWSS                                                                                                                                                                              |
| 6         | TCRβ跨膜域                   | TILYEILLGKATLYAVLVSAVL                                                                                                                                                                            |
| 7         | TCRδ跨膜域                   | VLGLRMLFAKT VAVNFLTAKLFFL                                                                                                                                                                         |
| 8         | TCRγ跨膜域(與 uniprot相同)      | YYMYLLLLLLKSVVYFAIITCCLL                                                                                                                                                                          |
| 9         | TCRδ跨膜域F24S               | VLGLRMLFAKT VAVNFLTAKLFSL                                                                                                                                                                         |
| 10        | TCRδ跨膜域M6V                | VLGLRVLFAKT VAVNFLTAKLFFL                                                                                                                                                                         |
| 11        | TCRδ跨膜域L4C                | VLGCRMLFAKT VAVNFLTAKLFFL                                                                                                                                                                         |
| 12        | TCRδ跨膜域 V12F、N15S         | VLGLRMLFAKTFAVSFLTAKLFFL                                                                                                                                                                          |
| 13        | TCRδ跨膜域L25S               | VLGLRMLFAKT VAVNFLTAKLFFS                                                                                                                                                                         |
| 14        | TCRγ跨膜域V13Y               | YYMYLLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF                                                                                                                                                                     |
| 15        | TCRγ跨膜域C21G               | YYMYLLLLLLKSVVYFAIITCGLLRRTAF                                                                                                                                                                     |
| 16        | TCRγ跨膜域 Y2L、M3V、A16V、I18V | YLVYLLLLLLKSVVYFVIITCCLLRRTAF                                                                                                                                                                     |
| 17        | TCRγ跨膜域Y2L                | YLMYLLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF                                                                                                                                                                     |
| 18        | TCRγ跨膜域M3V                | YYVYLLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF                                                                                                                                                                     |
| 19        | TCRγ跨膜域A16V               | YYMYLLLLLLKSVVYFVIITCCLLRRTAF                                                                                                                                                                     |
| 20        | TCRγ跨膜域I18V               | YYMYLLLLLLKSVVYFAIVTCCLLRRTAF                                                                                                                                                                     |

|    |                                         |                                                                                                                                                                           |
|----|-----------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 21 | TCR $\gamma$ 跨膜域M3I                     | YYIYLLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF                                                                                                                                             |
| 22 | TCR $\gamma$ 跨膜域Y2I、M3I、A16I、I18L       | YIIYLLLLLLKSVVYFIILTCCLLRRTAF                                                                                                                                             |
| 23 | TCR $\gamma$ 跨膜域L5C                     | YYMYCLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF                                                                                                                                             |
| 24 | TCR $\gamma$ 跨 膜 域<br>L8F 、 V12F 、 F15S | YYMYLLLFLKSFVYSAIITCCLLRRTAF                                                                                                                                              |
| 25 | TCR $\gamma$ 跨膜域C19M                    | YYMYLLLLLLKSVVYFAIIT <u>M</u> CCLLRRTAF                                                                                                                                   |
| 26 | TCR $\gamma$ 跨膜域Y1Q                     | <u>Q</u> YMYLLLLLLKSVVYFAIITCCLLRRTAF                                                                                                                                     |
| 27 | TCR $\alpha$ 連接肽                        | ESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIGFR                                                                                                                                             |
| 28 | TCR $\alpha$ 連接肽MD                      | IPEDTFFPSPESSCDVKLVEKSFETDTNLFQNLSVIGFR                                                                                                                                   |
| 29 | TCR $\beta$ 連接肽                         | ADCGFTSVSYQQGVLSA                                                                                                                                                         |
| 30 | TCR $\beta$ 連接肽MD                       | GRADCGFTSVSYQQGVLSA                                                                                                                                                       |
| 31 | TCR $\delta$ 連接肽                        | DHVKPKETENTKQPSKSCHKPKAIVHTEKVNMMSLTVLGLR                                                                                                                                 |
| 32 | TCR $\delta$ 連接肽MD                      | EVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSCHKPKAIVHTEKVNMMSLT<br>VLGLR                                                                                                                      |
| 33 | TCR $\gamma$ 連接肽                        | MDPKDNCSKDANDTLLLQLTNTSA                                                                                                                                                  |
| 34 | TCR $\gamma$ 連接肽MD                      | PIKTDVITMDPKDNCSKDANDTLLLQLTNTSA                                                                                                                                          |
| 35 | TCR $\beta$ 胞內域                         | MAMVKRKDF                                                                                                                                                                 |
| 36 | TCR $\gamma$ 胞內域                        | RRTAFCCNGEKS                                                                                                                                                              |
| 37 | IgG1 C <sub>H</sub> 1                   | ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG<br>ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS<br>NTKVDKRVEPKSC                                                           |
| 38 | IgG2-0C C <sub>H</sub> 1                | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA<br>LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPS<br>NTKVDKTVERK                                                            |
| 39 | IgG2-1C C <sub>H</sub> 1                | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA<br>LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPS<br>NTKVDKTVERKC                                                           |
| 40 | IgG2-2C C <sub>H</sub> 1                | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA<br>LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSNFGTQTYTCNVDPHKPS<br>NTKVDKTVERKCC                                                          |
| 41 | IgG3 C <sub>H</sub> 1                   | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG<br>ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVNHKP<br>SNTKVDKRVELKTP                                                           |
| 42 | IgG4 C <sub>H</sub> 1                   | ASTKGPSVFPLAPCSRSTSESTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA<br>LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYTCNVDPHKPS<br>NTKVDKRVESKYG                                                          |
| 43 | IgA1 C <sub>H</sub> 1                   | ASPTSPKVFPLSLCSTQPDGNVVIACLVQGFFPQEPLSVTWSESG<br>QGV TARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCLAGKSVTCHVKH<br>YTNPSQDVTVP CPVPSTPPTSPSTPPTSPSPS                                       |
| 44 | IgA2 C <sub>H</sub> 1                   | ASPTSPKVFPLSLDSTPQDGNVVVACLVQGFFPQEPLSVTWSESG<br>QNV TARNFPPSQDASGDLYTTSSQLTLPATQCPDGKSVTCHVKH<br>YTNPSQDVTVP CPVPPPPP                                                    |
| 45 | IgD C <sub>H</sub> 1                    | APTKAPDVFPIISGCRHPKDNPSVVLACLITGYHPTSVTVTWYM<br>GTQSQPQRTFPEIQRRDSYYMTSSQLSTPLQQWRQGEYKCVVQ<br>HTASKSKKEIFRWPEPKAQASSVPTAQPAEGSLAKATTAPATT<br>RNTGRGGEEKKKEKEKEEQEERETKTP |

|    |                                    |                                                                                                                                                 |
|----|------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| 46 | IgE C <sub>H</sub> 1               | ASTQSPSVFPLTRCCKNIPSNATSVTLGCLATGYFPEPVMVTWDT<br>GSLNGTTMTLPATTLTSLGHYATISLLTVSGAWAKQMFTCRVAHT<br>PSSTDWVDNKTFS                                 |
| 47 | IgM C <sub>H</sub> 1               | GSASAPTLFPLVSCENSPSDTSSVAVGCLAQDFLPDSITLSWKYK<br>NNSDISSTRGFPSVLRGGKYAATSQVLLPSKDVMMQGTDEHVVCK<br>VQHPNGNKEKNVPLP                               |
| 48 | IgC <sub>L</sub> 域                 | GQPKANPTVTLFPPSSEELQANKATLVCLISDFYPGAVTVAWKAD<br>GSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQV<br>THEGSTVEKTVAPTECS                              |
| 49 | CD28之片段                            | IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFWVLV<br>VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPT<br>RKHYQPYAPPRDFAAYRS                               |
| 50 | CD3-ζ之片段                           | RVKFSRSADAPAYQQGQNQLYNELNLGRREEYDVLDKRRGRDP<br>EMGGKPRRKNPQEGLYNELQKDKMAEAYSEIGMKGERRRGKG<br>HDGLYQGLSTATKDTYDALHMQALPPR                        |
| 51 | CD28 協同刺激片<br>段1                   | IEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFWVLV<br>VGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPT<br>RKHYQPYAPPRDFAAYRS                               |
| 52 | CD28 協同刺激片<br>段2                   | RSKRSRLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS                                                                                                        |
| 53 | 4-1BB 協同刺激片<br>段1                  | PADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLLFFLTR<br>FSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGC<br>EL                                           |
| 54 | 4-1BB 協同刺激片<br>段2                  | KRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEEEEGGCEL                                                                                                      |
| 55 | OX40 協同刺激片<br>段1                   | DPPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPVEVPGGRAV<br>AAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFR<br>TPIQEEQADAHSTLAKI                            |
| 56 | OX40 協同刺激片<br>段2                   | ALYLLRRDQRLPPDAHKPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI                                                                                                      |
| 57 | CD8 TM片段                           | TTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLDFACDI<br>YIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYC                                                                       |
| 58 | 抗 CD19 抗 體 之<br>IgV <sub>H</sub> 域 | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGK<br>GLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKA<br>SDTAMYYCARQVWGWQGGMYPRSNWWYNLDSWGQGTLVTV<br>SS |
| 59 | 抗 CD19 抗 體 之<br>IgV <sub>L</sub> 域 | LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPV<br>LVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV<br>WDSSSDYVVFGGGTKLTVLG                           |
| 60 | 抗 CD20 抗 體 之<br>IgV <sub>H</sub> 域 | QVQLQQPGAELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPG<br>RGLEWIGAIYPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSL<br>TSEDSAVYYCARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSS               |
| 61 | 抗 CD20 抗 體 之<br>IgV <sub>L</sub> 域 | QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHWFFQQKPGSSPKP<br>WIYATSNLASGVVPRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQW<br>TSNPPTFGGGTKLEIKR                            |
| 62 | 抗AFP抗體之IgV <sub>H</sub><br>域       | EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSFNYYWITWVRQMSSG<br>GLEWMGRIDPGDSYTTYNPSFQGHVTISIDKSTNTAYLHWNSLK<br>ASDTAMYYCARYYVSLVDIWGQGTLVTVSS                   |
| 63 | 抗AFP抗體之IgV <sub>L</sub><br>域       | QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK<br>APKLMIIDVNNRPSEVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY                                                    |

|    |                                            |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                        |
|----|--------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                                            | YCSSYTTGSRAVFGGGTKLTVL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 64 | 抗 GPC3 抗 體 之<br>IgV <sub>H</sub> 域         | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK<br>GLEWVSVIYSGGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCARTSYLNHGDYWGQGTLVTVSS                                                                                                                                                                                                          |
| 65 | 抗 GPC3 抗 體 之<br>IgV <sub>L</sub> 域         | QSVLTQPPSVSAAPGQRTVISCSTGTRSNIGSDYVSWYQHLPGTAP<br>KLLVYGDNLRPSGIPDRFSASKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCG<br>TWDYTLNGVVFGGGTKLTVLG                                                                                                                                                                                                               |
| 66 | 抗CD47之IgV <sub>H</sub> 域                   | QVQLQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGYTFTNYYVFWVRQARGQ<br>RLEWIGDINPVNGDTNFKNEKFKNRVTISADKSISTAYLQWSSLKA<br>SDTAMYYCARGGYTMDYWGQGTLVTVSS                                                                                                                                                                                                           |
| 67 | 抗CD47之IgV <sub>L</sub> 域                   | DIVMTQTPLSLPVTTPGEPASISCRSSQSLVHSNGNTYLHWYQQKP<br>GKAPKLLIYKVSYRFSGVDPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGV<br>YYCSQNTHTVPRTEFGQGTKVEIKR                                                                                                                                                                                                          |
| 68 | 抗 AFP158/HLA-<br>A*02:01-caTCR-1-<br>0 δ   | EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSPNYWITWVRQMSSG<br>GLEWMGRIDPGDSYTTYNPSTFQGHVTISIDKSTNTAYLHWNSLK<br>ASDTAMYYCARYYVSLVDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS<br>SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ<br>SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC<br>EVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSKCHKPKAIVHTEKVNMMSLT<br>VLGLRMLFAKTAVAVNFLTAKLFFL              |
| 69 | 抗 AFP158/HLA-<br>A*02:01-caTCR-1-<br>0 γ   | QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK<br>APKLMYDVNNRPSEVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY<br>YCSSYTTGSRAVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANK<br>ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYA<br>ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSPKTDV<br>ITMDPKDNCCKDANDTLLLQLTNTSAYMYLLLLLKSVVYFAIT<br>CCLLRRTAFCCNGEKS                        |
| 70 | 抗 AFP158/HLA-<br>A*02:01-caTCR-1-<br>TM5 δ | EVQLVQSGAEVKKPGESLTISCKASGYSPNYWITWVRQMSSG<br>GLEWMGRIDPGDSYTTYNPSTFQGHVTISIDKSTNTAYLHWNSLK<br>ASDTAMYYCARYYVSLVDIWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPS<br>SKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQ<br>SSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSC<br>EVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSKCHKPKAIVHTEKVNMMSLT<br>VLGLRVLFAKTAVAVNFLTAKLFFL              |
| 71 | 抗 AFP158/HLA-<br>A*02:01-caTCR-1-<br>TM5 γ | QSVLTQPASVSGSPGQSITISCTGTSSDVGGYNYVSWYQQHPGK<br>APKLMYDVNNRPSEVSNRFSGSKSGNTASLTISGLQAEDEADY<br>YCSSYTTGSRAVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANK<br>ATLVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYA<br>ASSYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSPKTDV<br>ITMDPKDNCCKDANDTLLLQLTNTSAYLVYLLLLLKSVVYFVIV<br>TCCLLRRTAFCCNGEKS                      |
| 72 | 抗 CD19-caTCR-1-<br>0 δ                     | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGK<br>GLEWMGIYPGDS TRYSPSFQGGVTISADKSISTAYLQWSSLKA<br>SDTAMYYCARQVWG WQGGMYPRSNWWYNMDSWGQGTLVT<br>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN<br>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH<br>KPSNTKVDKRVEPKSCEVKTDSTDHVKPKETENTKQPSKSKCHKP<br>KAIVHTEKVNMMSLTVLGLRMLFAKTAVAVNFLTAKLFFL |
| 73 | 抗 CD19-caTCR-1-<br>0 γ                     | LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPV<br>LVVYDDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV<br>WDSSEYVVFGGGTKLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKAT                                                                                                                                                                                           |

|    |                          |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |
|----|--------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |                          | LVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAAS<br>SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSPIKTDVIT<br>MDPKDNCSDKDANDTLLLQLTNTSAYYMYLLLLLLKSVVYFAIITC<br>CLLRRTAFCCNGEKS                                                                                                                                                                                                                                                        |
| 74 | 抗 CD19-caTCR-1-<br>TM5 δ | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGK<br>GLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKA<br>SDTAMYYCARQVWGWQGGMYPRSNWWYNMDSWGQGT LVT<br>VSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWN<br>SGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPSSSLGTQTYICNVNH<br>KPSNTKVDKRVEPKSCEVKT DSTDHVKPKETENTKQPSK SCHKP<br>KAIVHTEKVNMMSLTVLGLRVLFAKT VAVN FLLTAKLFFL                                                                               |
| 75 | 抗 CD19-caTCR-1-<br>TM5 γ | LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPV<br>LVVYDDSNRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV<br>WDSSEYVVFGGGT KLTVLGQPKANPTVTLFPPSSEELQANKAT<br>LVCLISDFYPGAVTVAWKADGSPVKAGVETTKPSKQSNNKYAAS<br>SYLSLTPEQWKSHRSYSCQVTHEGSTVEKTVAPTECSPIKTDVIT<br>MDPKDNCSDKDANDTLLLQLTNTSAYLVYLLLLLLKSVVYFVIVTC<br>CLLRRTAFCCNGEKS                                                                                                       |
| 76 | scFv連接子                  | SRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 77 | 抗CD19 scFv               | LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPV<br>LVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV<br>WDSSSDYVVFGGGT KLTVLGSRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAE<br>VQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKG<br>LEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKAS<br>DTAMYYCARQVWGWQGGMYPRSNWWYNLDSWGQGT LVTVS<br>S                                                                                                                          |
| 78 | 抗CD20 scFv               | QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKP<br>WIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQW<br>TSNPPTFGGGTKLEIKRSRGGGGSGGGGSGGGGSLEQVQLQQPG<br>AELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAI<br>YPGNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY<br>CARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSS                                                                                                                                              |
| 79 | 抗GPC3 #37 scFv           | QSVLTQPPSVSAAPGQRVTISCSGTRSNIGSDYVSWYQHLPGTAP<br>KLLVYGDNL RPSGIPDRFSASKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCG<br>TWDYTLNGVVFGGGT KLTVLGSRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA<br>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK<br>GLEWVSVIYSGGSSTYYADSVKGRFTISRDN SKNTLYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCARTSYLNHG DYWGQGT LVTVSS                                                                                                                                       |
| 80 | 抗CD19 CSR                | LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPV<br>LVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV<br>WDSSSDYVVFGGGT KLTVLGSRGGGGSGGGGSGGGGSLEMAE<br>VQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGKG<br>LEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGQVTISADKSISTAYLQWSSLKAS<br>DTAMYYCARQVWGWQGGMYPRSNWWYNLDSWGQGT LVTVS<br>SAAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSP LFPGPSKPFW<br>VLVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVR SKRSRL LHSDYMNMTPRR<br>PGPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS |
| 81 | 抗CD20 CSR                | QIVLSQSPAILSASPGEKVTMTCRASSSVSYIHW FQQKPGSSPKP<br>WIYATSNLASGVPVRFSGSGSGTSYSLTISRVEAEDAATYYCQQW<br>TSNPPTFGGGTKLEIKRSRGGGGSGGGGSGGGGSLEQVQLQQPG<br>AELVKPGASVKMSCKASGYTFTSYNMHWVKQTPGRGLEWIGAI                                                                                                                                                                                                                            |

|    |              |                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          |
|----|--------------|----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|    |              | YPGNNGDTSYNQKFKGKATLTADKSSSTAYMQLSSLTSEDSAVYY<br>CARSTYYGGDWYFNVWGAGTTVTVSSAAAIEVMYPPPYLDNE<br>KSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFWVLVVVGGVLACYSLLV<br>TVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAPPRDF<br>AAYRS                                                                                                                                                                                                     |
| 82 | 抗GPC3 CSR    | QSVLTQPPSVSAAPGQRTVISCSTGTRSNIGSDYVSWYQHLPGTAP<br>KLLVYGDNLRPSGIPDRFSASKSGTSATLGITGLQTGDEADYYCG<br>TWDYTLNGVVFGGGTKLTVLGSRGGGGSGGGGSGGGGSLEMA<br>QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYAMSWVRQAPGK<br>GLEWVSVIYSGGSSTYYADSVKGRFTISRDNKNTLYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCARTSYLNHGDYWGQGTLLVTVSSAAAIEVMYPPPY<br>LDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSKPFWVLVVVGGVLACY<br>SLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMTPRRPGPTRKHYPYAP<br>PRDFAAYRS |
| 83 | 6NFAT反應元件    | GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAAC<br>TGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATACAG<br>AAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAG<br>GAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTT<br>CATACAGAAGGCGT                                                                                                                                                                                                       |
| 84 | TA啟動子        | GCCGCCCGACTGCATCTGCGTGTTCCAATTCGCCAATGACAA<br>GACGCTGGGCGGGGTTTGTGTGCATCATAGAACTAAAGACATGC<br>AAATATATTTCTTCCGGGGACACCGCCAGCAAACGCGAGCAA<br>CGGGCCACGGGGATGAAGCAG                                                                                                                                                                                                                                        |
| 85 | NFAT 衍生之啟動子  | GGAGGAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAAC<br>TGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATACAG<br>AAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAG<br>GAAAACTGTTTCATACAGAAGGCGTGGAGGAAAAACTGTTT<br>CATACAGAAGGCGTCTCGAGGCCGCCCGACTGCATCTGCGT<br>GTTCCAATTCGCCAATGACAAGACGCTGGGCGGGGTTTGTGT<br>CATCATAGAACTAAAGACATGCAAATATATTTCTTCCGGGGAC<br>ACCGCCAGCAAACGCGAGCAACGGGCCACGGGGATGAAGCA<br>G                             |
| 86 | CD27 協同刺激片段1 | PTHLPYVSEMLEARTAGHMQTLADFRQLPARTLSTHWPPQRS<br>SLC<br>SSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPV<br>EPAEP<br>CRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP                                                                                                                                                                                                                                                                 |
| 87 | CD27 協同刺激片段2 | QRRKYRSNKGESPVPAEP<br>CRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPAC<br>SP                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                  |
| 88 | CD30 協同刺激片段1 | APPLGTQPD CNPTPENGEAPASTSPTQSLLVDSQASKTLPI<br>PTSAP<br>VALSSTGKPVLDAGPVLFWVILVLVVVVGSSAFLCHRRACR<br>KR<br>IRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEP<br>VAEE<br>RGLMSQPLMETCHSVGAAYLESPLQDASPAGGPSSPRDLPE<br>PR<br>VSTEHTNKNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPA<br>EPELE<br>EELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPT<br>AASG<br>K                                                                           |
| 89 | CD30 協同刺激片段2 | HRRACRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLR<br>SGAS<br>VTEPVAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESPLQDASPAGGP<br>SS<br>PRDLPEPRVSTEHTNKNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPE<br>GRGLA<br>GPAEPELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEE<br>EGKED<br>PLPTAASGK                                                                                                                                                                             |
| 90 | CSR1         | AAAIEVMYPPPYLDNEKSNGTIIHVKGKHLCPSPLPFGPSK<br>PFWV<br>LVVVGGVLACYSLLVTVAFIIFWVRSKRSRLLHSDYMNMT<br>PRRP                                                                                                                                                                                                                                                                                                    |

|     |                                    |                                                                                                                                                                                                                                                                                                         |
|-----|------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|
|     |                                    | GPTRKHYQPYAPPRDFAAYRS                                                                                                                                                                                                                                                                                   |
| 91  | CSR2                               | AAATGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD<br>FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCKRGRKKLLYIFKQPFMRP<br>VQTTQEEDGCSCRFPEEEEEGGCEL                                                                                                                                                                           |
| 92  | CSR3                               | AAATGPADLSPGASSVTPPAPAREPGHSPQIISFFLALTSTALLFLL<br>FFLTLRFSVVKRGRKKLLYIFKQPFMRPVQTTQEEDGCSCRFPEE<br>EEGGCEL                                                                                                                                                                                             |
| 93  | CSR4                               | AAATGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD<br>FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCQRRKYRSNKGESPV<br>EPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP                                                                                                                                                                         |
| 94  | CSR5                               | AAATGPTHLPYVSEMLEARAGHMQLADFRQLPARTLSTHWPP<br>QRS LCSSDFIRILVIFSGMFLVFTLAGALFLHQRRKYRSNKGESPV<br>EPAEPCRYSCPREEEGSTIPIQEDYRKPEPACSP                                                                                                                                                                     |
| 95  | CSR6                               | AAATGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD<br>FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCHRRACRKRIQKLHLCY<br>PVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEPVAEERGLMSQPLM<br>ETCHSVGAAYLESPLQDASPAGGPSSPRDLPEPRVSTEHTNNKI<br>EKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAEPELEEELEADHTPH<br>YPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPTAASGK                |
| 96  | CSR7                               | AAATGAPPLGTQPCDNPTPENGEAPASTSPTQSLLVDSQASKTLPI<br>PTSAPVALSSTGKPVLDAGPVLFVILVLVVVGSSAFLCHHRA<br>CRKRIRQKLHLCYPVQTSQPKLELVDSRPRRSSTQLRSGASVTEP<br>VAEERGLMSQPLMETCHSVGAAYLESPLQDASPAGGPSSPRDL<br>PEPRVSTEHTNNKIEKIYIMKADTVIVGTVKAELPEGRGLAGPAE<br>PELEEELEADHTPHYPEQETEPPLGSCSDVMLSVEEEGKEDPLPT<br>AASGK |
| 97  | CSR8                               | AAATGTTTPAPRPPTPAPTIASQPLSLRPEACRPAAGGAVHTRGLD<br>FACDIYIWAPLAGTCGVLLLSLVITLYCALYLLRRDQRLPPDAH<br>KPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI                                                                                                                                                                            |
| 98  | CSR9                               | AAATGDRDPATQPQETQGPPARPITVQPTEAWPRTSQGPSTRPV<br>EVPGGRAVAAILGLGLVLGLLGPLAILLALYLLRRDQRLPPDAH<br>KPPGGGSFRTPIQEEQADAHSTLAKI                                                                                                                                                                              |
| 99  | 抗 CD19 抗 體 之<br>IgV <sub>H</sub> 域 | EVQLVQSGAEVKKPGESLKISCKGSGYSFTSYWIGWVRQMPGK<br>GLEWMGIIYPGDS DTRYSPSFQGGVTIADKSISTAYLQWSSLKAS<br>DTAMYYCARQVWGWQGGMYPRSNWWYNLDSWGQGT LVTVS<br>S                                                                                                                                                         |
| 100 | 抗 CD19 抗 體 之<br>IgV <sub>L</sub> 域 | LPVLTQPPSVSVAPGKTARITCGGNNIGSKSVHWYQQKPGQAPV<br>LVVYDDSDRPSGIPERFSGSNSGNTATLTISRVEAGDEADYYCQV<br>WDSSSDYVVFGGGT KLTVL                                                                                                                                                                                   |
| 101 | 抗 CD22 抗 體 之<br>IgV <sub>H</sub> 域 | QVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSNYAMSWVRQAPGK<br>GLEWVSSISGSGGSTYYADSVKGRFTISRDTSKNTLYLQMNSLR<br>AEDTAVYYCARYGSAAWMDSWGQGT LVTVSS                                                                                                                                                                         |
| 102 | 抗 CD22 抗 體 之<br>IgV <sub>L</sub> 域 | DIQLTQSPSSLSTSVGDRVITITCQASHDIRNYLNWYQQKPGKAPN<br>LLIYAASNLTGVPSRFSGRGSGTDFTLTISSLQPEDIATYYCQY<br>DGLPLTFGQGTRLEIKR                                                                                                                                                                                     |
| 103 | 肽連接子                               | AAA                                                                                                                                                                                                                                                                                                     |
| 104 | 肽連接子                               | AAATG                                                                                                                                                                                                                                                                                                   |

【序列表】

<110> 美商優瑞科生物技術公司(EUREKA THERAPEUTICS, INC.)

<120> 表現嵌合活化受體及嵌合刺激受體之細胞及其用途

<130> 75004-20010.40

<140>

<141>

<150> US 62/490,580

<151> 2017-04-26

<150> US 62/490,578

<151> 2017-04-26

<150> US 62/490,576

<151> 2017-04-26

<160> 105

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 142

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 1

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 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> 2  
<211> 177  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 2  
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> 3  
<211> 153  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 3  
Ser Gln Pro His Thr Lys Pro Ser Val Phe Val Met Lys Asn Gly Thr  
1 5 10 15

Asn Val Ala Cys Leu Val Lys Glu Phe Tyr Pro Lys Asp Ile Arg Ile  
20 25 30  
Asn Leu Val Ser Ser Lys Lys Ile Thr Glu Phe Asp Pro Ala Ile Val  
35 40 45  
Ile Ser Pro Ser Gly Lys Tyr Asn Ala Val Lys Leu Gly Lys Tyr Glu  
50 55 60  
Asp Ser Asn Ser Val Thr Cys Ser Val Gln His Asp Asn Lys Thr Val  
65 70 75 80  
His Ser Thr Asp Phe Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr Asp His Val Lys  
85 90 95  
Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser Cys His Lys  
100 105 110  
Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr  
115 120 125  
Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe  
130 135 140  
Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu  
145 150

<210> 4  
<211> 173  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 4  
Asp Lys Gln Leu Asp Ala Asp Val Ser Pro Lys Pro Thr Ile Phe Leu  
1 5 10 15  
Pro Ser Ile Ala Glu Thr Lys Leu Gln Lys Ala Gly Thr Tyr Leu Cys  
20 25 30  
Leu Leu Glu Lys Phe Phe Pro Asp Val Ile Lys Ile His Trp Gln Glu  
35 40 45  
Lys Lys Ser Asn Thr Ile Leu Gly Ser Gln Glu Gly Asn Thr Met Lys  
50 55 60  
Thr Asn Asp Thr Tyr Met Lys Phe Ser Trp Leu Thr Val Pro Glu Lys  
65 70 75 80  
Ser Leu Asp Lys Glu His Arg Cys Ile Val Arg His Glu Asn Asn Lys  
85 90 95  
Asn Gly Val Asp Gln Glu Ile Ile Phe Pro Pro Ile Lys Thr Asp Val  
100 105 110  
Ile Thr Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr  
115 120 125  
Leu Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu  
130 135 140  
Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala Ile Ile Thr Cys Cys Leu  
145 150 155 160  
Leu Arg Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser

165170

<210> 5  
<211> 20  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 5  
Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg  
151015  
Leu Trp Ser Ser  
20

<210> 6  
<211> 23  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 6  
Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val  
151015  
Leu Val Ser Ala Leu Val Leu  
20

<210> 7  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 7  
Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe  
151015  
Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu  
2025

<210> 8  
<211> 23

<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 8  
Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala  
1 5 10 15  
Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu  
20

<210> 9  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 9  
Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe  
1 5 10 15  
Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Ser Leu  
20 25

<210> 10  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 10  
Val Leu Gly Leu Arg Val Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe  
1 5 10 15  
Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu  
20 25

<210> 11  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 11  
Val Leu Gly Cys Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe  
1 5 10 15  
Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu  
20 25

<210> 12  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 12  
Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Phe Ala Val Ser Phe  
1 5 10 15  
Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu  
20 25

<210> 13  
<211> 25  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 13  
Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val Asn Phe  
1 5 10 15  
Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Ser  
20 25

<210> 14  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 14  
Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Tyr Tyr Phe Ala  
1 5 10 15  
Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe

20

25

<210> 15  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 15  
Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala  
1 5 10 15  
Ile Ile Thr Cys Gly Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe  
20 25

<210> 16  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 16  
Tyr Leu Val Tyr Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Val  
1 5 10 15  
Ile Val Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe  
20 25

<210> 17  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 17  
Tyr Leu Met Tyr Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala  
1 5 10 15  
Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe  
20 25

<210> 18  
<211> 28

<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 18  
Tyr Tyr Val Tyr Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala  
1 5 10 15  
Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe  
20 25

<210> 19  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 19  
Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Val  
1 5 10 15  
Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe  
20 25

<210> 20  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 20  
Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala  
1 5 10 15  
Ile Val Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe  
20 25

<210> 21  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 21  
Tyr Tyr Ile Tyr Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala  
1 5 10 15  
Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe  
20 25

<210> 22  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 22  
Tyr Ile Ile Tyr Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ile  
1 5 10 15  
Ile Leu Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe  
20 25

<210> 23  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 23  
Tyr Tyr Met Tyr Cys Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala  
1 5 10 15  
Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe  
20 25

<210> 24  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 24  
Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Phe Leu Lys Ser Phe Val Tyr Ser Ala  
1 5 10 15  
Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe



2025

<210> 25  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 25  
Tyr Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala  
15  
Ile Ile Thr Met Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe  
2025

<210> 26  
<211> 28  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 26  
Gln Tyr Met Tyr Leu Leu Leu Leu Lys Ser Val Val Tyr Phe Ala  
15  
Ile Ile Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr Ala Phe  
2025

<210> 27  
<211> 30  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 27  
Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp  
15  
Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg  
202530

<210> 28  
<211> 40

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 28  
Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val  
1 5 10 15  
Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln  
20 25 30  
Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg  
35 40

<210> 29  
<211> 17  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 29  
Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser  
1 5 10 15  
Ala

<210> 30  
<211> 19  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 30  
Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Val Ser Tyr Gln Gln Gly Val  
1 5 10 15  
Leu Ser Ala

<210> 31  
<211> 41  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 31  
Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys  
1 5 10 15  
Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn Met  
20 25 30  
Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg  
35 40

<210> 32  
<211> 48  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 32  
Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu  
1 5 10 15  
Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val  
20 25 30  
His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg  
35 40 45

<210> 33  
<211> 24  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 33  
Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu  
1 5 10 15  
Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala  
20

<210> 34  
<211> 32  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 34  
Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile Thr Met Asp Pro Lys Asp Asn Cys Ser  
1 5 10 15  
Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu Leu Gln Leu Thr Asn Thr Ser Ala  
20 25 30

<210> 35  
<211> 9  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 35  
Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Phe  
1 5

<210> 36  
<211> 12  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 36  
Arg Arg Thr Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser  
1 5 10

<210> 37  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 37  
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys  
1 5 10 15  
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30  
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

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

<210> 38  
<211> 99  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 38  
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15  
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30  
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45  
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Ser Leu Ser  
50 55 60  
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Asn Phe Gly Thr Gln Thr Tyr Thr  
65 70 75 80  
Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Thr Val  
85 90 95  
Glu Arg Lys

<210> 39  
<211> 100  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 39  
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15  
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30  
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

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

<210> 40  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

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

<210> 41  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 41  
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15  
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30  
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45

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

<210> 42  
<211> 101  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 42  
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg  
1 5 10 15  
Ser Thr Ser Glu Ser Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr  
20 25 30  
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser  
35 40 45  
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Ser Leu Ser  
50 55 60  
Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Lys Thr Tyr Thr  
65 70 75 80  
Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val  
85 90 95  
Glu Ser Lys Tyr Gly  
100

<210> 43  
<211> 119  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 43  
Asp Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Cys Ser Thr Gln Pro  
1 5 10 15  
Asp Gly Asn Val Val Ile Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe Pro Gln  
20 25 30  
Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Gly Val Thr Ala  
35 40 45

Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Thr Thr  
50 55 60  
Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Leu Ala Gly Lys Ser  
65 70 75 80  
Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp Val Thr  
85 90 95  
Val Pro Cys Pro Val Pro Ser Thr Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser Thr  
100 105 110  
Pro Pro Thr Pro Ser Pro Ser  
115

<210> 44  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 44  
Asp Thr Ser Pro Lys Val Phe Pro Leu Ser Leu Asp Ser Thr Pro Gln  
1 5 10 15  
Asp Gly Asn Val Val Val Ala Cys Leu Val Gln Gly Phe Phe Pro Gln  
20 25 30  
Glu Pro Leu Ser Val Thr Trp Ser Glu Ser Gly Gln Asn Val Thr Ala  
35 40 45  
Arg Asn Phe Pro Pro Ser Gln Asp Ala Ser Gly Asp Leu Tyr Thr Thr  
50 55 60  
Ser Ser Gln Leu Thr Leu Pro Ala Thr Gln Cys Pro Asp Gly Lys Ser  
65 70 75 80  
Val Thr Cys His Val Lys His Tyr Thr Asn Pro Ser Gln Asp Val Thr  
85 90 95  
Val Pro Cys Pro Val Pro Pro Pro Pro Pro  
100 105

<210> 45  
<211> 159  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 45  
Ala Pro Thr Lys Ala Pro Asp Val Phe Pro Ile Ile Ser Gly Cys Arg  
1 5 10 15  
His Pro Lys Asp Asn Ser Pro Val Val Leu Ala Cys Leu Ile Thr Gly  
20 25 30



Tyr His Pro Thr Ser Val Thr Val Thr Trp Tyr Met Gly Thr Gln Ser  
35 40 45  
Gln Pro Gln Arg Thr Phe Pro Glu Ile Gln Arg Arg Asp Ser Tyr Tyr  
50 55 60  
Met Thr Ser Ser Gln Leu Ser Thr Pro Leu Gln Gln Trp Arg Gln Gly  
65 70 75 80  
Glu Tyr Lys Cys Val Val Gln His Thr Ala Ser Lys Ser Lys Lys Glu  
85 90 95  
Ile Phe Arg Trp Pro Glu Ser Pro Lys Ala Gln Ala Ser Ser Val Pro  
100 105 110  
Thr Ala Gln Pro Gln Ala Glu Gly Ser Leu Ala Lys Ala Thr Thr Ala  
115 120 125  
Pro Ala Thr Thr Arg Asn Thr Gly Arg Gly Gly Glu Glu Lys Lys Lys  
130 135 140  
Glu Lys Glu Lys Glu Glu Gln Glu Glu Arg Glu Thr Lys Thr Pro  
145 150 155

<210> 46  
<211> 103  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 46  
Ala Ser Thr Gln Ser Pro Ser Val Phe Pro Leu Thr Arg Cys Cys Lys  
1 5 10 15  
Asn Ile Pro Ser Asn Ala Thr Ser Val Thr Leu Gly Cys Leu Ala Thr  
20 25 30  
Gly Tyr Phe Pro Glu Pro Val Met Val Thr Trp Asp Thr Gly Ser Leu  
35 40 45  
Asn Gly Thr Thr Met Thr Leu Pro Ala Thr Thr Leu Thr Leu Ser Gly  
50 55 60  
His Tyr Ala Thr Ile Ser Leu Leu Thr Val Ser Gly Ala Trp Ala Lys  
65 70 75 80  
Gln Met Phe Thr Cys Arg Val Ala His Thr Pro Ser Ser Thr Asp Trp  
85 90 95  
Val Asp Asn Lys Thr Phe Ser  
100

<210> 47  
<211> 104  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 47  
Gly Ser Ala Ser Ala Pro Thr Leu Phe Pro Leu Val Ser Cys Glu Asn  
1 5 10 15  
Ser Pro Ser Asp Thr Ser Ser Val Ala Val Gly Cys Leu Ala Gln Asp  
20 25 30  
Phe Leu Pro Asp Ser Ile Thr Leu Ser Trp Lys Tyr Lys Asn Asn Ser  
35 40 45  
Asp Ile Ser Ser Thr Arg Gly Phe Pro Ser Val Leu Arg Gly Gly Lys  
50 55 60  
Tyr Ala Ala Thr Ser Gln Val Leu Leu Pro Ser Lys Asp Val Met Gln  
65 70 75 80  
Gly Thr Asp Glu His Val Val Cys Lys Val Gln His Pro Asn Gly Asn  
85 90 95  
Lys Glu Lys Asn Val Pro Leu Pro  
100

<210> 48  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 48  
Gly Gln Pro Lys Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser  
1 5 10 15  
Glu Glu Leu Gln Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp  
20 25 30  
Phe Tyr Pro Gly Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro  
35 40 45  
Val Lys Ala Gly Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn  
50 55 60  
Lys Tyr Ala Ala Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys  
65 70 75 80  
Ser His Arg Ser Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val  
85 90 95  
Glu Lys Thr Val Ala Pro Thr Glu Cys Ser  
100 105

<210> 49  
<211> 105  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 49  
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn  
1 5 10 15  
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu  
20 25 30  
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly  
35 40 45  
Val Leu Ala Cys Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val  
50 55 60  
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr  
65 70 75 80  
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro  
85 90 95  
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
100 105

<210> 50  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

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

<210> 51  
<211> 105  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 51  
Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn  
1 5 10 15  
Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu  
20 25 30  
Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly  
35 40 45  
Val Leu Ala Cys Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val  
50 55 60  
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr  
65 70 75 80  
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro  
85 90 95  
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
100 105

<210> 52  
<211> 41  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 52  
Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr  
1 5 10 15  
Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro  
20 25 30  
Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser  
35 40

<210> 53  
<211> 94  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 53  
Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val Thr Pro Pro Ala Pro  
1 5 10 15  
Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile Ser Phe Phe Leu Ala  
20 25 30  
Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe Phe Leu Thr Leu Arg  
35 40 45

Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys  
50 55 60  
Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys  
65 70 75 80  
Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
85 90

<210> 54  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 54  
Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met  
1 5 10 15  
Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe  
20 25 30  
Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly Cys Glu Leu  
35 40

<210> 55  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

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

<210> 56  
<211> 42  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 56  
Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln Arg Leu Pro Pro Asp Ala His  
1 5 10 15  
Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln  
20 25 30  
Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys Ile  
35 40

<210> 57  
<211> 69  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 57  
Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro Ala Pro Thr Ile Ala  
1 5 10 15  
Ser Gln Pro Leu Ser Leu Arg Pro Glu Ala Cys Arg Pro Ala Ala Gly  
20 25 30  
Gly Ala Val His Thr Arg Gly Leu Asp Phe Ala Cys Asp Ile Tyr Ile  
35 40 45  
Trp Ala Pro Leu Ala Gly Thr Cys Gly Val Leu Leu Leu Ser Leu Val  
50 55 60  
Ile Thr Leu Tyr Cys  
65

<210> 58  
<211> 130  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 58  
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15  
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

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

<210> 59  
<211> 109  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 59  
Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
1 5 10 15  
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
20 25 30  
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
35 40 45  
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60  
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Tyr  
85 90 95  
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly  
100 105

<210> 60  
<211> 121  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

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

<210> 61  
<211> 105  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 61  
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Asp Gly Glu Lys  
1 5 10 15  
Val Thr Met Thr Cys Arg Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Ile His Trp  
20 25 30  
Phe Gln Gln Lys Pro Gly Ser Ser Pro Lys Pro Trp Ile Tyr Ala Thr  
35 40 45  
Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro Val Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser  
50 55 60  
Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala  
65 70 75 80  
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly  
85 90 95  
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 62  
<211> 117  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>



<223> 合成構築體

<400> 62

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

<210> 63

<211> 110

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 63

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

<210> 64

<211> 118

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 64

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

<210> 65

<211> 111

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 65

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

<210> 66

<211> 112

<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 66  
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Gln  
1 5 10 15  
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr  
20 25 30  
Tyr Val Phe Trp Val Arg Gln Arg Gln Arg Leu Glu Trp Ile Gly Asp  
35 40 45  
Ile Asn Pro Val Asn Gly Asp Thr Asn Phe Asn Glu Lys Phe Lys Asn  
50 55 60  
Arg Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr Leu Gln  
65 70 75 80  
Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys Arg Gly  
85 90 95  
Tyr Thr Met Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
100 105 110

<210> 67  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 67  
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly  
1 5 10 15  
Glu Pro 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 Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala  
35 40 45  
Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Tyr 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 Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Asn  
85 90 95  
Thr His Val Pro Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys  
100 105 110  
Arg

<210> 68  
<211> 286  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 68  
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15  
Ser Leu Thr Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ser Phe Pro Asn Tyr  
20 25 30  
Trp Ile Thr Trp Val Arg Gln Met Ser Gly Gly Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Arg Ile Asp Pro Gly Asp Ser Tyr Thr Thr Tyr Asn Pro Ser Phe  
50 55 60  
Gln Gly His Val Thr Ile Ser Ile Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr  
65 70 75 80  
Leu His Trp Asn Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Tyr Tyr Val Ser Leu Val Asp Ile Trp Gly Gln Gly Thr Leu  
100 105 110  
Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu  
115 120 125  
Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys  
130 135 140  
Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser  
145 150 155 160  
Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser  
165 170 175  
Ser Gly Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly  
180 185 190  
Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys  
195 200 205  
Val Asp Lys Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Glu Val Lys Thr Asp Ser  
210 215 220  
Thr Asp His Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser  
225 230 235 240  
Lys Ser Cys His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn  
245 250 255  
Met Met Ser Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg Met Leu Phe Ala Lys Thr  
260 265 270  
Val Ala Val Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu  
275 280 285

<210> 69  
<211> 283  
<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 69

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

<210> 70

<211> 286

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 70

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

<210> 71

<211> 283

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 71

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

<210> 72  
<211> 299  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 72  
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15  
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr

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

<210> 73  
<211> 281  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 73  
Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
1 5 10 15  
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
20 25 30



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

<210> 74  
<211> 299  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 74  
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15  
Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr Ser Tyr  
20 25 30  
Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met  
35 40 45  
Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro Ser Phe

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 50                                                              | 55  | 60  |
| Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr Ala Tyr |     |     |
| 65                                                              | 70  | 75  |
| Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys |     | 80  |
| 85                                                              | 90  | 95  |
| Ala Arg Gln Val Trp Gly Trp Gln Gly Gly Met Tyr Pro Arg Ser Asn |     |     |
| 100                                                             | 105 | 110 |
| Trp Trp Tyr Asn Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val |     |     |
| 115                                                             | 120 | 125 |
| Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser |     |     |
| 130                                                             | 135 | 140 |
| Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys |     |     |
| 145                                                             | 150 | 155 |
| Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu |     |     |
| 165                                                             | 170 | 175 |
| Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Ser |     |     |
| 180                                                             | 185 | 190 |
| Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr |     |     |
| 195                                                             | 200 | 205 |
| Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys |     |     |
| 210                                                             | 215 | 220 |
| Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Glu Val Lys Thr Asp Ser Thr Asp His |     |     |
| 225                                                             | 230 | 235 |
| Val Lys Pro Lys Glu Thr Glu Asn Thr Lys Gln Pro Ser Lys Ser Cys |     |     |
| 245                                                             | 250 | 255 |
| His Lys Pro Lys Ala Ile Val His Thr Glu Lys Val Asn Met Met Ser |     |     |
| 260                                                             | 265 | 270 |
| Leu Thr Val Leu Gly Leu Arg Val Leu Phe Ala Lys Thr Val Ala Val |     |     |
| 275                                                             | 280 | 285 |
| Asn Phe Leu Leu Thr Ala Lys Leu Phe Phe Leu                     |     |     |
| 290                                                             | 295 |     |

<210> 75

<211> 281

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 75

|                                                                 |    |    |
|-----------------------------------------------------------------|----|----|
| Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys |    |    |
| 1                                                               | 5  | 10 |
| Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val |    |    |
| 20                                                              | 25 | 30 |
| His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr |    |    |
| 35                                                              | 40 | 45 |
| Asp Asp Ser Asn Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser |    |    |
| 50                                                              | 55 | 60 |

Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Glu Tyr  
85 90 95  
Val Val Phe Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gln Pro Lys  
100 105 110  
Ala Asn Pro Thr Val Thr Leu Phe Pro Pro Ser Ser Glu Glu Leu Gln  
115 120 125  
Ala Asn Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ile Ser Asp Phe Tyr Pro Gly  
130 135 140  
Ala Val Thr Val Ala Trp Lys Ala Asp Gly Ser Pro Val Lys Ala Gly  
145 150 155 160  
Val Glu Thr Thr Lys Pro Ser Lys Gln Ser Asn Asn Lys Tyr Ala Ala  
165 170 175  
Ser Ser Tyr Leu Ser Leu Thr Pro Glu Gln Trp Lys Ser His Arg Ser  
180 185 190  
Tyr Ser Cys Gln Val Thr His Glu Gly Ser Thr Val Glu Lys Thr Val  
195 200 205  
Ala Pro Thr Glu Cys Ser Pro Ile Lys Thr Asp Val Ile Thr Met Asp  
210 215 220  
Pro Lys Asp Asn Cys Ser Lys Asp Ala Asn Asp Thr Leu Leu Leu Gln  
225 230 235 240  
Leu Thr Asn Thr Ser Ala Tyr Leu Val Tyr Leu Leu Leu Leu Lys  
245 250 255  
Ser Val Val Tyr Phe Val Ile Val Thr Cys Cys Leu Leu Arg Arg Thr  
260 265 270  
Ala Phe Cys Cys Asn Gly Glu Lys Ser  
275 280

<210> 76  
<211> 21  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 76  
Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
1 5 10 15  
Ser Leu Glu Met Ala  
20

<210> 77  
<211> 260  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 77  
Leu Pro Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Lys  
1 5 10 15  
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Gly Gly Asn Asn Ile Gly Ser Lys Ser Val  
20 25 30  
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Val Leu Val Val Tyr  
35 40 45  
Asp Asp Ser Asp Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser  
50 55 60  
Asn Ser Gly Asn Thr Ala Thr Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Gly  
65 70 75 80  
Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Val Trp Asp Ser Ser Ser Asp Tyr  
85 90 95  
Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser Arg Gly  
100 105 110  
Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu  
115 120 125  
Met Ala Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro  
130 135 140  
Gly Glu Ser Leu Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser Gly Tyr Ser Phe Thr  
145 150 155 160  
Ser Tyr Trp Ile Gly Trp Val Arg Gln Met Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
165 170 175  
Trp Met Gly Ile Ile Tyr Pro Gly Asp Ser Asp Thr Arg Tyr Ser Pro  
180 185 190  
Ser Phe Gln Gly Gln Val Thr Ile Ser Ala Asp Lys Ser Ile Ser Thr  
195 200 205  
Ala Tyr Leu Gln Trp Ser Ser Leu Lys Ala Ser Asp Thr Ala Met Tyr  
210 215 220  
Tyr Cys Ala Arg Gln Val Trp Gly Trp Gln Gly Gly Met Tyr Pro Arg  
225 230 235 240  
Ser Asn Trp Trp Tyr Asn Leu Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val  
245 250 255  
Thr Val Ser Ser  
260

<210> 78  
<211> 245  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 78  
Gln Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ala Ile Leu Ser Asp Gly Glu Lys

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

<210> 79  
<211> 250  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

|                                                                 |
|-----------------------------------------------------------------|
| <400> 79                                                        |
| Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln |
| 1 5 10 15                                                       |
| Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asp |
| 20 25 30                                                        |
| Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu |
| 35 40 45                                                        |
| Val Tyr Gly Asp Asn Leu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser |
| 50 55 60                                                        |

Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln  
65 70 75 80  
Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Tyr Thr Leu  
85 90 95  
Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser  
100 105 110  
Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
115 120 125  
Leu Glu Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val  
130 135 140  
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
145 150 155 160  
Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
165 170 175  
Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr  
180 185 190  
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys  
195 200 205  
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
210 215 220  
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Ser Tyr Leu Asn His Gly Asp Tyr Trp  
225 230 235 240  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser  
245 250

<210> 80  
<211> 368  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

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

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

<210> 81

<211> 353

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 81

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Gln | Ile | Val | Leu | Ser | Gln | Ser | Pro | Ala | Ile | Leu | Ser | Asp | Gly | Glu | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     | 10  |     |     |     | 15  |     |     |     |
| Val | Thr | Met | Thr | Cys | Arg | Ala | Ser | Ser | Ser | Val | Ser | Tyr | Ile | His | Trp |
| 20  |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |     |     |     |     |
| Phe | Gln | Gln | Lys | Pro | Gly | Ser | Ser | Pro | Lys | Pro | Trp | Ile | Tyr | Ala | Thr |
| 35  |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |     |     |
| Ser | Asn | Leu | Ala | Ser | Gly | Val | Pro | Val | Arg | Phe | Ser | Gly | Ser | Gly | Ser |
| 50  |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |     |

Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Ala  
65 70 75 80  
Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Thr Ser Asn Pro Pro Thr Phe Gly  
85 90 95  
Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Ser Arg Gly Gly Gly Gly Ser  
100 105 110  
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Leu Glu Gln Val Gln Leu  
115 120 125  
Gln Gln Pro Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala Ser Val Lys Met  
130 135 140  
Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Asn Met His Trp  
145 150 155 160  
Val Lys Gln Thr Pro Gly Arg Gly Leu Glu Trp Ile Gly Ala Ile Tyr  
165 170 175  
Pro Gly Asn Gly Asp Thr Ser Tyr Asn Gln Lys Phe Lys Gly Lys Ala  
180 185 190  
Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser  
195 200 205  
Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Ser Thr  
210 215 220  
Tyr Tyr Gly Gly Asp Trp Tyr Phe Asn Val Trp Gly Ala Gly Thr Thr  
225 230 235 240  
Val Thr Val Ser Ser Ala Ala Ala Ile Glu Val Met Tyr Pro Pro Pro  
245 250 255  
Tyr Leu Asp Asn Glu Lys Ser Asn Gly Thr Ile Ile His Val Lys Gly  
260 265 270  
Lys His Leu Cys Pro Ser Pro Leu Phe Pro Gly Pro Ser Lys Pro Phe  
275 280 285  
Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Leu Leu Val Thr  
290 295 300  
Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu  
305 310 315 320  
His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg  
325 330 335  
Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg  
340 345 350  
Ser

<210> 82  
<211> 358  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 82  
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln



|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|--|--|
| 1   | 5   |     |     |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |  |  |
| Arg | Val | Thr | Ile | Ser | Cys | Ser | Gly | Thr | Arg | Ser | Asn | Ile | Gly | Ser | Asp |  |  |
| 20  |     |     |     | 25  |     |     |     | 30  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Tyr | Val | Ser | Trp | Tyr | Gln | His | Leu | Pro | Gly | Thr | Ala | Pro | Lys | Leu | Leu |  |  |
| 35  |     |     |     | 40  |     |     |     | 45  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Val | Tyr | Gly | Asp | Asn | Leu | Arg | Pro | Ser | Gly | Ile | Pro | Asp | Arg | Phe | Ser |  |  |
| 50  |     |     |     | 55  |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Ala | Ser | Lys | Ser | Gly | Thr | Ser | Ala | Thr | Leu | Gly | Ile | Thr | Gly | Leu | Gln |  |  |
| 65  |     |     |     | 70  |     |     |     | 75  |     |     |     | 80  |     |     |     |  |  |
| Thr | Gly | Asp | Glu | Ala | Asp | Tyr | Tyr | Cys | Gly | Thr | Trp | Asp | Tyr | Thr | Leu |  |  |
| 85  |     |     |     | 90  |     |     |     | 95  |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Asn | Gly | Val | Val | Phe | Gly | Gly | Gly | Thr | Lys | Leu | Thr | Val | Leu | Gly | Ser |  |  |
| 100 |     |     |     | 105 |     |     |     | 110 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Arg | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser | Gly | Gly | Gly | Gly | Ser |  |  |
| 115 |     |     |     | 120 |     |     |     | 125 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Leu | Glu | Met | Ala | Gln | Val | Gln | Leu | Val | Glu | Ser | Gly | Gly | Gly | Leu | Val |  |  |
| 130 |     |     |     | 135 |     |     |     | 140 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Gln | Pro | Gly | Gly | Ser | Leu | Arg | Leu | Ser | Cys | Ala | Ala | Ser | Gly | Phe | Thr |  |  |
| 145 |     |     |     | 150 |     |     |     | 155 |     |     |     | 160 |     |     |     |  |  |
| Phe | Ser | Ser | Tyr | Ala | Met | Ser | Trp | Val | Arg | Gln | Ala | Pro | Gly | Lys | Gly |  |  |
| 165 |     |     |     | 170 |     |     |     | 175 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Leu | Glu | Trp | Val | Ser | Val | Ile | Tyr | Ser | Gly | Gly | Ser | Ser | Thr | Tyr | Tyr |  |  |
| 180 |     |     |     | 185 |     |     |     | 190 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Ala | Asp | Ser | Val | Lys | Gly | Arg | Phe | Thr | Ile | Ser | Arg | Asp | Asn | Ser | Lys |  |  |
| 195 |     |     |     | 200 |     |     |     | 205 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Asn | Thr | Leu | Tyr | Leu | Gln | Met | Asn | Ser | Leu | Arg | Ala | Glu | Asp | Thr | Ala |  |  |
| 210 |     |     |     | 215 |     |     |     | 220 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Val | Tyr | Tyr | Cys | Ala | Arg | Thr | Ser | Tyr | Leu | Asn | His | Gly | Asp | Tyr | Trp |  |  |
| 225 |     |     |     | 230 |     |     |     | 235 |     |     |     | 240 |     |     |     |  |  |
| Gly | Gln | Gly | Thr | Leu | Val | Thr | Val | Ser | Ser | Ala | Ala | Ala | Ile | Glu | Val |  |  |
| 245 |     |     |     | 250 |     |     |     | 255 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Met | Tyr | Pro | Pro | Pro | Tyr | Leu | Asp | Asn | Glu | Lys | Ser | Asn | Gly | Thr | Ile |  |  |
| 260 |     |     |     | 265 |     |     |     | 270 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Ile | His | Val | Lys | Gly | Lys | His | Leu | Cys | Pro | Ser | Pro | Leu | Phe | Pro | Gly |  |  |
| 275 |     |     |     | 280 |     |     |     | 285 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Pro | Ser | Lys | Pro | Phe | Trp | Val | Leu | Val | Val | Val | Gly | Gly | Val | Leu | Ala |  |  |
| 290 |     |     |     | 295 |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Cys | Leu | Leu | Val | Thr | Val | Ala | Phe | Ile | Ile | Phe | Trp | Val | Arg | Ser | Lys |  |  |
| 305 |     |     |     | 310 |     |     |     | 315 |     |     |     | 320 |     |     |     |  |  |
| Arg | Ser | Arg | Leu | Leu | His | Ser | Asp | Tyr | Met | Asn | Met | Thr | Pro | Arg | Arg |  |  |
| 325 |     |     |     | 330 |     |     |     | 335 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Pro | Gly | Pro | Thr | Arg | Lys | His | Tyr | Gln | Pro | Tyr | Ala | Pro | Pro | Arg | Asp |  |  |
| 340 |     |     |     | 345 |     |     |     | 350 |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| Phe | Ala | Ala | Tyr | Arg | Ser |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |
| 355 |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |  |  |

<210> 83  
<211> 180  
<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 83

ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 60  
ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 120  
ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 180

<210> 84

<211> 149

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 84

gccgccccga ctgcatctgc gtgtttcaat tcgccaatga caagacgctg ggcggggttt 60  
gtgtcatcat agaactaaag acatgcaaat atattttcttc cggggacacc gccagcaaac 120  
gcgagcaacg ggccacgggg atgaagcag 149

<210> 85

<211> 335

<212> DNA

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 85

ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 60  
ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 120  
ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt ggaggaaaaa ctgtttcata cagaaggcgt 180  
ctcgaggccg ccccgactgc atctgcgtgt tccaattcgc caatgacaag acgctgggcg 240  
gggtttgtgt catcatagaa ctaaagacat gcaaataat ttcttcggg gacaccgcca 300  
gcaaacgcga gcaacgggcc acgggatga agcag 335

<210> 86

<211> 119

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 86

Pro Thr His Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu Glu Ala Arg Thr Ala

15

10

5

1

Gly His Met Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln Leu Pro Ala Arg Thr

30

25

20

Leu Ser Thr His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu Cys Ser Ser Asp Phe

45

40

35

Ile Arg Ile Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe Leu Val Phe Thr Leu

60

55

50

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

80

75

70

65

Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro

95

90

85

Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys

110

105

100

Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro

115

<210> 87  
<211> 48  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

15

10

5

1

Gln Arg Arg Lys Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro

30

25

20

Ala Glu Pro Cys Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr

45

40

35

Ile Pro Ile Gln Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro

<210> 88  
<211> 264  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

15

10

5

1

Ala Pro Pro Leu Gly Thr Gln Pro Asp Cys Asn Pro Thr Pro Glu Asn

30

25

20

Gly Glu Ala Pro Ala Ser Thr Ser Pro Thr Gln Ser Leu Leu Val Asp

45

40

35

Ser Gln Ala Ser Lys Thr Leu Pro Ile Pro Thr Ser Ala Pro Val Ser

60

55

50

Ser Thr Gly Lys Pro Val Leu Asp Ala Gly Pro Val Leu Phe Trp Val

50 55 60  
Ile Leu Val Leu Val Val Val Val Gly Ser Ser Ala Phe Leu Leu Cys  
65 70 75 80  
His Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile Arg Gln Lys Leu His Leu Cys  
85 90 95  
Tyr Pro Val Gln Thr Ser Gln Pro Lys Leu Glu Leu Val Asp Ser Arg  
100 105 110  
Pro Arg Arg Ser Ser Thr Gln Leu Arg Ser Gly Ala Ser Val Thr Glu  
115 120 125  
Pro Val Ala Glu Glu Arg Gly Leu Met Ser Gln Pro Leu Met Cys His  
130 135 140  
Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Asp Ala  
145 150 155 160  
Gly Gly Pro Ser Ser Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg Val Ser Thr  
165 170 175  
Glu His Thr Asn Asn Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met Lys Ala Asp  
180 185 190  
Thr Val Ile Val Gly Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu Gly Arg Gly  
195 200 205  
Leu Ala Gly Pro Ala Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu Glu Ala Asp  
210 215 220  
His Thr Pro His Tyr Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro Leu Gly Ser  
225 230 235 240  
Cys Ser Asp Val Met Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys Glu Asp Pro  
245 250 255  
Leu Pro Thr Ala Ala Ser Gly Lys  
260

<210> 89  
<211> 184  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 89  
His Arg Arg Ala Cys Arg Lys Arg Ile Arg Gln Lys Leu His Leu Cys  
1 5 10 15  
Tyr Pro Val Gln Thr Ser Gln Pro Lys Leu Glu Leu Val Asp Ser Arg  
20 25 30  
Pro Arg Arg Ser Ser Thr Gln Leu Arg Ser Gly Ala Ser Val Thr Glu  
35 40 45  
Pro Val Ala Glu Glu Arg Gly Leu Met Ser Gln Pro Leu Met Cys His  
50 55 60  
Ser Val Gly Ala Ala Tyr Leu Glu Ser Leu Pro Leu Gln Asp Asp Ala  
65 70 75 80  
Gly Gly Pro Ser Ser Pro Arg Asp Leu Pro Glu Pro Arg Val Ser Thr  
85 90 95

Glu His Thr Asn Asn Lys Ile Glu Lys Ile Tyr Ile Met Lys Ala Asp  
100 105 110  
Thr Val Ile Val Gly Thr Val Lys Ala Glu Leu Pro Glu Gly Arg Gly  
115 120 125  
Leu Ala Gly Pro Ala Glu Pro Glu Leu Glu Glu Glu Leu Glu Ala Asp  
130 135 140  
His Thr Pro His Tyr Pro Glu Gln Glu Thr Glu Pro Pro Leu Gly Ser  
145 150 155 160  
Cys Ser Asp Val Met Leu Ser Val Glu Glu Glu Gly Lys Glu Asp Pro  
165 170 175  
Leu Pro Thr Ala Ala Ser Gly Lys  
180

<210> 90  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

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

<210> 91  
<211> 116  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 91  
Ala Ala Ala Thr Gly Thr Thr Thr Pro Ala Pro Arg Pro Pro Thr Pro  
1 5 10 15

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

<210> 92  
<211> 99  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 92  
Ala Ala Ala Thr Gly Pro Ala Asp Leu Ser Pro Gly Ala Ser Ser Val  
1 5 10 15  
Thr Pro Pro Ala Pro Ala Arg Glu Pro Gly His Ser Pro Gln Ile Ile  
20 25 30  
Ser Phe Phe Leu Ala Leu Thr Ser Thr Ala Leu Leu Phe Leu Leu Phe  
35 40 45  
Phe Leu Thr Leu Arg Phe Ser Val Val Lys Arg Gly Arg Lys Lys Leu  
50 55 60  
Leu Tyr Ile Phe Lys Gln Pro Phe Met Arg Pro Val Gln Thr Thr Gln  
65 70 75 80  
Glu Glu Asp Gly Cys Ser Cys Arg Phe Pro Glu Glu Glu Glu Gly Gly  
85 90 95  
Cys Glu Leu

<210> 93  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 93

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

<210> 94  
<211> 124  
<212> PRT  
<213> 人工序列  
  
<220>  
<223> 合成構築體

<400> 94  
Ala Ala Ala Thr Gly Pro Thr His Leu Pro Tyr Val Ser Glu Met Leu  
1 5 10 15  
Glu Ala Arg Thr Ala Gly His Met Gln Thr Leu Ala Asp Phe Arg Gln  
20 25 30  
Leu Pro Ala Arg Thr Leu Ser Thr His Trp Pro Pro Gln Arg Ser Leu  
35 40 45  
Cys Ser Ser Asp Phe Ile Arg Ile Leu Val Ile Phe Ser Gly Met Phe  
50 55 60  
Leu Val Phe Thr Leu Ala Gly Ala Leu Phe Leu His Gln Arg Arg Lys  
65 70 75 80  
Tyr Arg Ser Asn Lys Gly Glu Ser Pro Val Glu Pro Ala Glu Pro Cys  
85 90 95  
Arg Tyr Ser Cys Pro Arg Glu Glu Glu Gly Ser Thr Ile Pro Ile Gln  
100 105 110  
Glu Asp Tyr Arg Lys Pro Glu Pro Ala Cys Ser Pro  
115 120

<210> 95  
<211> 258  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 95

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

<210> 96

<211> 269

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 96

Ala Ala Ala Thr Gly Ala Pro Pro Leu Gly Thr Gln Pro Asp Cys Asn



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

<210> 97

<211> 116

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 合成構築體

<400> 97

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Ala | Ala | Ala | Thr | Gly | Thr | Thr | Thr | Pro | Ala | Pro | Arg | Pro | Pro | Thr | Pro |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     |     | 15  |     |
| Ala | Pro | Thr | Ile | Ala | Ser | Gln | Pro | Leu | Ser | Leu | Arg | Pro | Glu | Ala | Cys |
|     |     | 20  |     |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |
| Arg | Pro | Ala | Ala | Gly | Gly | Ala | Val | His | Thr | Arg | Gly | Leu | Asp | Phe | Ala |
|     |     | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     |     | 45  |     |     |

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

<210> 98  
<211> 113  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 98  
Ala Ala Ala Thr Gly Asp Arg Asp Pro Pro Ala Thr Gln Pro Gln Glu  
1 5 10 15  
Thr Gln Gly Pro Pro Ala Arg Pro Ile Thr Val Gln Pro Thr Glu Ala  
20 25 30  
Trp Pro Arg Thr Ser Gln Gly Pro Ser Trp Val Glu Val Pro Gly Gly  
35 40 45  
Arg Ala Val Ala Ala Ile Leu Gly Leu Gly Leu Val Leu Gly Leu Leu  
50 55 60  
Gly Pro Leu Ala Ile Leu Leu Ala Leu Tyr Leu Leu Arg Arg Asp Gln  
65 70 75 80  
Arg Leu Pro Pro Asp Ala His Lys Pro Pro Gly Gly Gly Ser Phe Arg  
85 90 95  
Thr Pro Ile Gln Glu Glu Gln Ala Asp Ala His Ser Thr Leu Ala Lys  
100 105 110  
Ile

<210> 99  
<211> 129  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 99  
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Glu  
1 5 10 15

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

<210> 100  
<211> 108  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

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

<210> 101  
<211> 118  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 101  
Gln 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 Phe Thr Phe Ser Asn Tyr  
20 25 30  
Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val  
35 40 45  
Ser Ser Ile Ser Gly Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Ala Asp Ser Val  
50 55 60  
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Thr Ser Lys Asn Thr Leu Tyr  
65 70 75 80  
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys  
85 90 95  
Ala Arg Tyr Gly Ser Ala Ala Trp Met Asp Ser Trp Gly Gln Gly Thr  
100 105 110  
Leu Val Thr Val Ser Ser  
115

<210> 102  
<211> 106  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 102  
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Thr Ser Val Gly  
1 5 10 15  
Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser His Asp Ile Arg Asn Tyr  
20 25 30  
Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Asn Leu Leu Ile  
35 40 45  
Tyr Ala Asn Leu Gln Thr Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Arg Gly  
50 55 60  
Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp  
65 70 75 80  
Ile Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Gly Leu Pro Leu Thr Phe  
85 90 95  
Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys Arg  
100 105

<210> 103  
<211> 3  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 103  
Ala Ala Ala  
1

<210> 104  
<211> 5  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 104  
Ala Ala Ala Thr Gly  
1 5

<210> 105  
<211> 500  
<212> PRT  
<213> 人工序列

<220>  
<223> 合成構築體

<400> 105  
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Ala Ala Pro Gly Gln  
1 5 10 15  
Arg Val Thr Ile Ser Cys Ser Gly Thr Arg Ser Asn Ile Gly Ser Asp  
20 25 30  
Tyr Val Ser Trp Tyr Gln His Leu Pro Gly Thr Ala Pro Lys Leu Leu  
35 40 45  
Val Tyr Gly Asp Asn Leu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser  
50 55 60  
Ala Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Thr Leu Gly Ile Thr Gly Leu Gln  
65 70 75 80  
Thr Gly Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gly Thr Trp Asp Tyr Thr Leu  
85 90 95  
Asn Gly Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Ser  
100 105 110  
Arg Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser  
115 120 125  
Leu Glu Met Ala Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val  
130 135 140  
Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr  
145 150 155 160

Phe Ser Ser Tyr Ala Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly  
165 170 175  
Leu Glu Trp Val Ser Val Ile Tyr Ser Gly Gly Ser Ser Thr Tyr Tyr  
180 185 190  
Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys  
195 200 205  
Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala  
210 215 220  
Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Thr Ser Tyr Leu Asn His Gly Asp Tyr Trp  
225 230 235 240  
Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Thr Ser Gly Gly Gly Gly  
245 250 255  
Ser Asp Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly  
260 265 270  
Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Arg  
275 280 285  
Tyr Thr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp  
290 295 300  
Ile Gly Tyr Ile Asn Pro Ser Arg Gly Tyr Thr Asn Tyr Ala Asp Ser  
305 310 315 320  
Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Thr Thr Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala  
325 330 335  
Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr  
340 345 350  
Cys Ala Arg Tyr Tyr Asp Asp His Tyr Cys Leu Asp Tyr Trp Gly Gln  
355 360 365  
Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Glu Gly Thr Ser Thr Gly Ser  
370 375 380  
Gly Gly Ser Gly Gly Ser Gly Gly Ala Asp Asp Ile Val Leu Thr Gln  
385 390 395 400  
Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser  
405 410 415  
Cys Arg Ala Ser Gln Ser Val Ser Tyr Met Asn Trp Tyr Gln Gln Lys  
420 425 430  
Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp Ile Tyr Asp Thr Ser Lys Val Ala  
435 440 445  
Ser Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr  
450 455 460  
Ser Leu Thr Ile Asn Ser Leu Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr  
465 470 475 480  
Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys  
485 490 495  
Val Glu Ile Lys  
500

## 【發明申請專利範圍】

### 【請求項1】

一種T細胞，其包含：

a) 嵌合抗體-T細胞受體(TCR)構築體(caTCR)，其包含：

i) 抗原結合模組，其特異性結合於靶抗原，其中該抗原結合模組包含抗體或其抗原結合片段，且其中該靶抗原為包含肽及主要組織相容性複合體(MHC)蛋白的靶抗原複合體；

ii) 穩定模組，其包含第一穩定域及第二穩定域，其選自由以下組成之群： $C_H1-C_L$ 模組、 $C_H2-C_H2$ 模組、 $C_H3-C_H3$ 模組、 $C_H4-C_H4$ 模組、 $C\alpha-C\beta$ 模組及 $C\gamma-C\delta$ 模組；及

ii) TCR模組(TCRM)，其中該TCRM包含：包含第一TCR跨膜域(TCR-TM)之第一TCR域(TCRD)及包含第二TCR-TM之第二TCRD，其中：

(1) 該第一TCR-TM源自 $TCR\alpha$ 之跨膜域且該第二TCR-TM源自 $TCR\beta$ 之跨膜域；

(2) 該第一TCR-TM源自 $TCR\beta$ 之跨膜域且該第二TCR-TM源自 $TCR\alpha$ 之跨膜域；

(3) 該第一TCR-TM源自 $TCR\gamma$ 之跨膜域且該第二TCR-TM源自 $TCR\delta$ 之跨膜域；或

(4) 該第一TCR-TM源自 $TCR\delta$ 之跨膜域且該第二TCR-TM源自 $TCR\gamma$ 之跨膜域；

其中該抗原結合模組融合於該穩定模組之N端，且該穩定模組融合於該TCRM之N端；

其中該TCRM能夠募集至少一種選自由CD3 $\gamma\epsilon$ 、CD3 $\delta\epsilon$ 及 $\zeta\zeta$ 組成之群之TCR相關信號傳導分子；及

其中該caTCR缺乏源自TCR $\zeta$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d之功能性原代免疫細胞信號傳導域；及

b)嵌合信號傳導受體(CSR)，其包含：

i) 配體結合模組，其能夠與靶配體結合或相互作用，其中該配體結合模組包含抗體或其抗原結合片段或為源自受體之胞外域；

ii) 跨膜模組；及

iii) 協同刺激免疫細胞信號傳導模組，其能夠提供協同刺激信號(co-stimulatory signal)至該T細胞，其中該協同刺激免疫細胞信號傳導模組源自TCR之協同刺激受體(co-stimulatory receptor)之胞內域；

其中該配體結合模組及該協同刺激免疫細胞信號傳導模組並非源自同一分子；且

其中該CSR缺乏源自TCR $\zeta$ 、FcR $\gamma$ 、FcR $\beta$ 、CD3 $\gamma$ 、CD3 $\delta$ 、CD3 $\epsilon$ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b或CD66d之功能性原代免疫細胞信號傳導域。

## 【請求項2】

如請求項1之T細胞，其中：

(a) 該caTCR之抗原結合模組為多特異性；及/或

(d) 該靶抗原複合體中之肽係選自由以下組成之群：WT-1、AFP、HPV16-E7、NY-ESO-1、PRAME、EBV-LMP2A、HIV-1、KRAS、組蛋



白H3.3及PSA。

**【請求項3】**

如請求項1之T細胞，其中該caTCR之該靶抗原與該CSR之該靶配體不同。

**【請求項4】**

如請求項1之T細胞，其中該CSR之該靶配體為：

- (a) 疾病相關配體；
- (b) 免疫調節分子；或
- (c) 細胞凋亡分子。

**【請求項5】**

如請求項1之T細胞，其中：

- (a) 該CSR之該跨膜模組包含源自CD28、CD3 $\epsilon$ 、CD3 $\zeta$ 、CD45、CD4、CD5、CD8、CD9、CD16、CD22、CD33、CD37、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154的跨膜域；
- (b) 該協同刺激受體係選自由CD28、4-1BB、OX40、ICOS、CD27、CD30及CD40組成之群；及/或
- (c) 該CSR之表現為可誘導性。

**【請求項6】**

如請求項1之T細胞，其中該T細胞係選自由以下組成之群：細胞毒性T細胞、輔助T細胞、自然殺手T細胞及抑制T細胞。

**【請求項7】**

一或多種核酸，該核酸編碼如請求項1至6中任一項之caTCR及/或CSR，其中該caTCR及/或CSR各自由該一或多種核酸所編碼的一或多個

多肽鏈組成。

**【請求項8】**

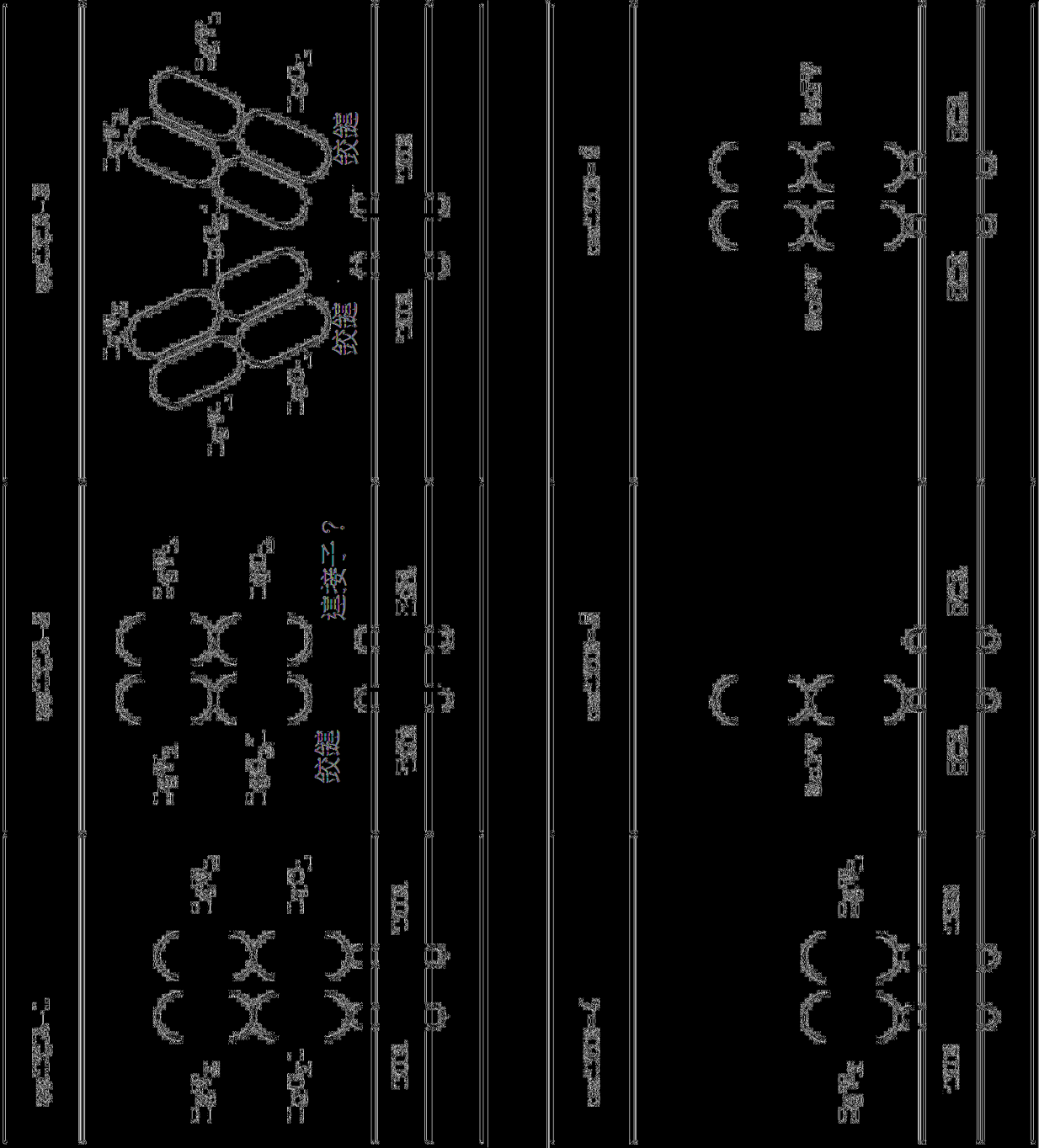
一種醫藥組合物，其包含如請求項1至6中任一項之T細胞及醫藥學上可接受之載劑。

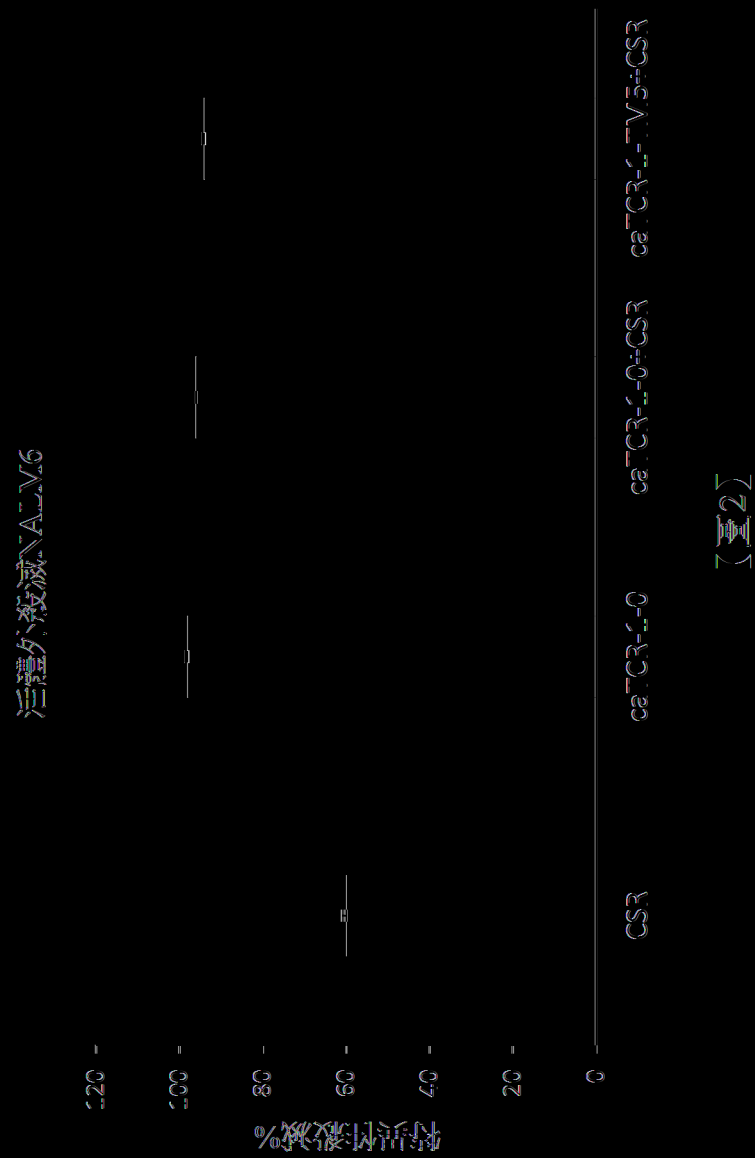
**【請求項9】**

一種如請求項8之醫藥組合物之用途，其用於製備治療有需要之個體之癌症或感染性疾病的藥物，其中該癌症或該感染性疾病係與靶抗原之表現相關，且其中該caTCR特異性結合於該靶抗原。

**【請求項10】**

一種活體外殺滅呈遞靶抗原之靶細胞的方法，其包含使該靶細胞與如請求項1至6中任一項之T細胞在活體外接觸，其中該caTCR特異性結合於該靶抗原。





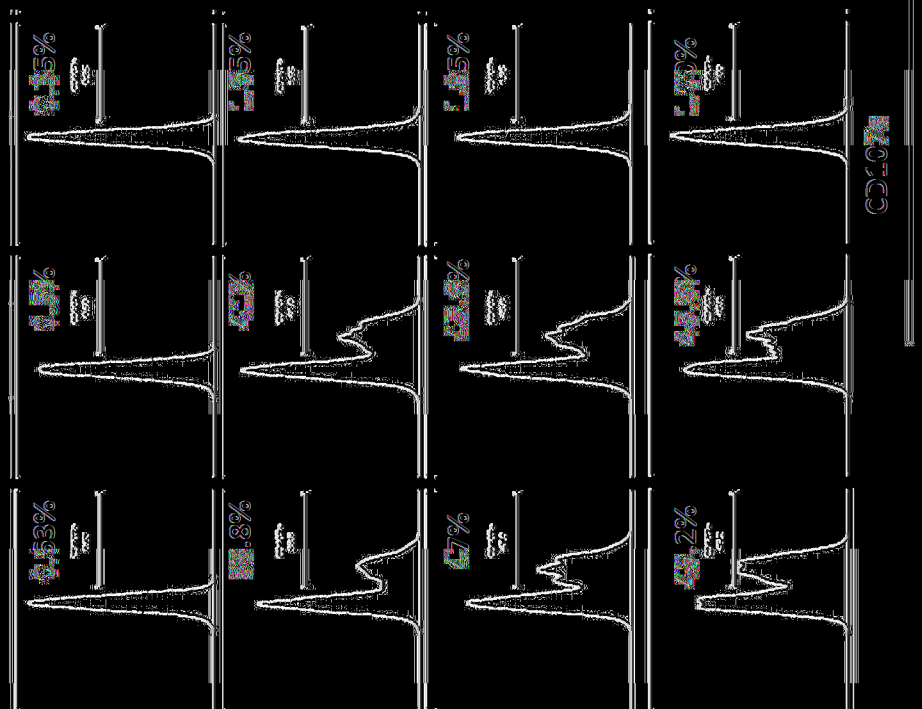


粉粒三

三

三

三



CS3

ca. CR-0

ca. CR-0

CS3

ca. CR-0

CS3

三

CS3

圖 2 說明

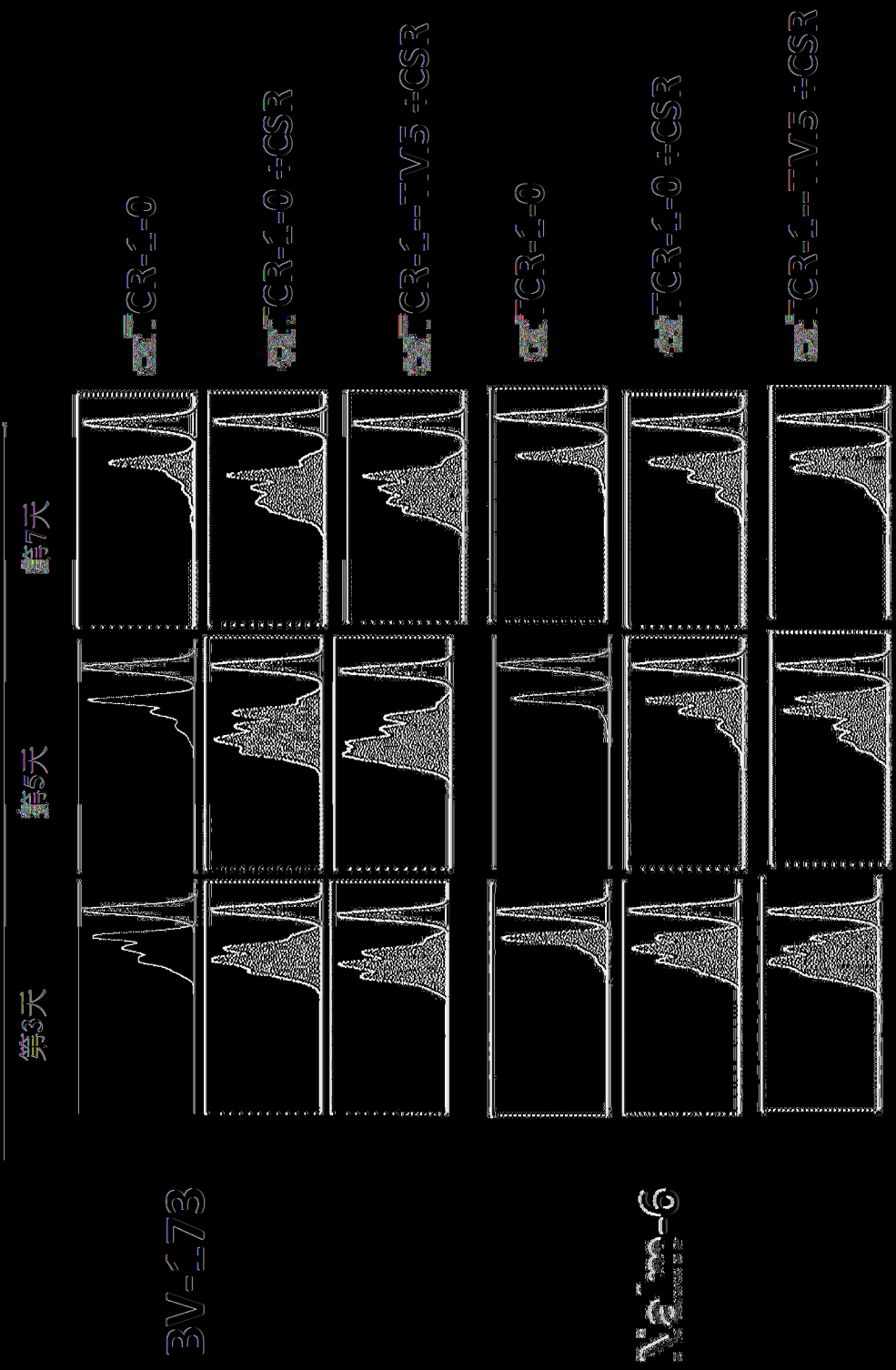
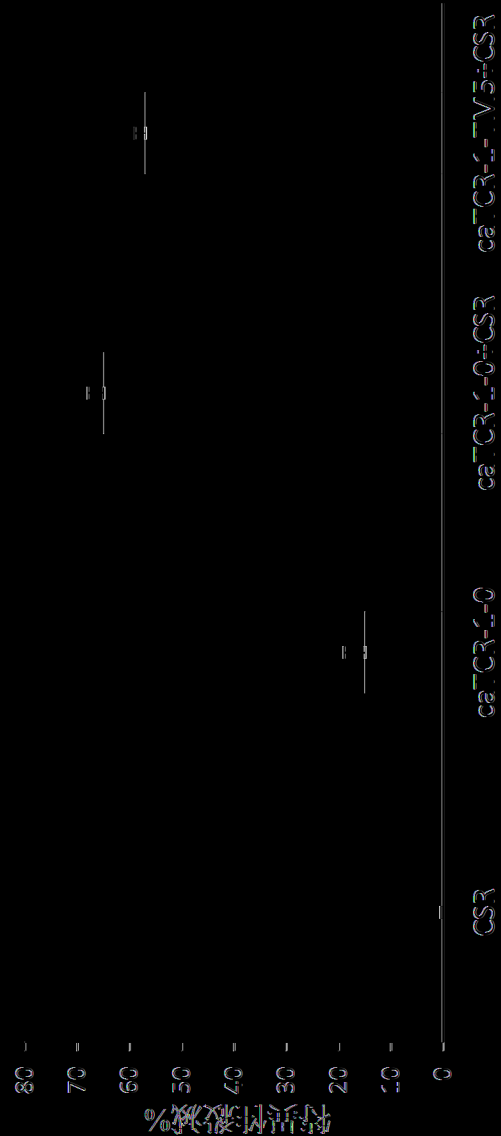
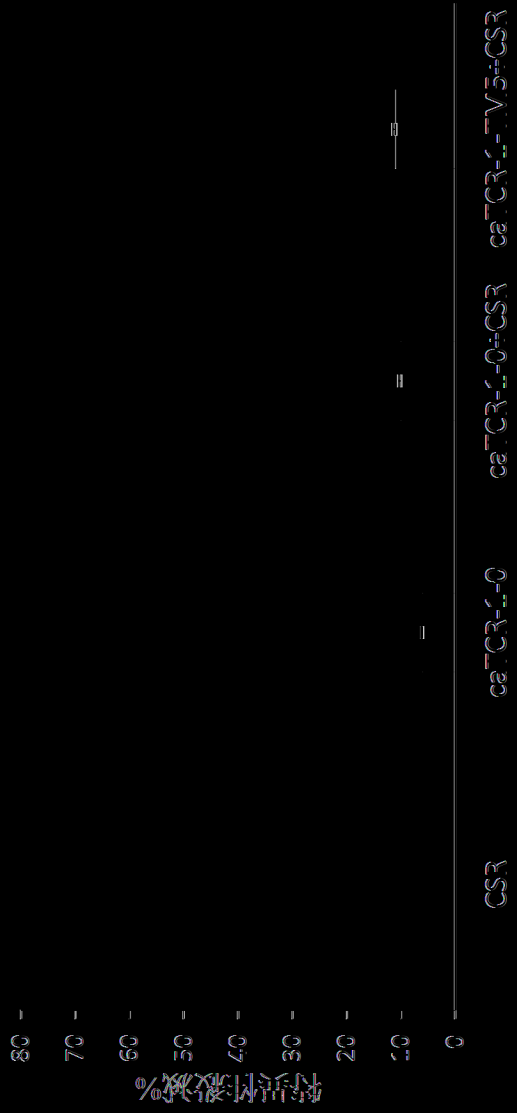


圖 3 說明

图體外殺滅E2G2



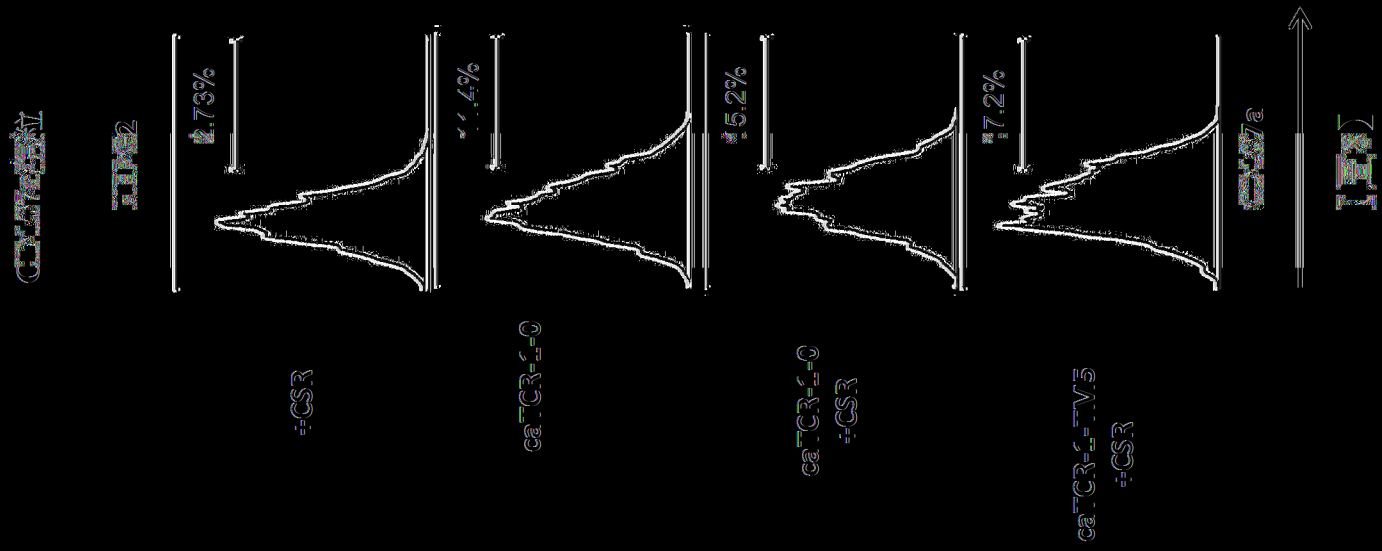
图體外殺滅E2G2-C2C3&0。



[ 圖 6 ]





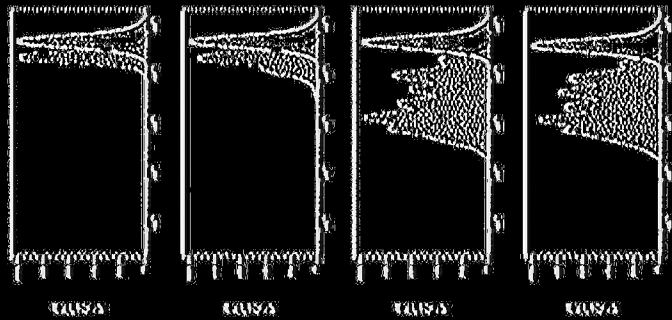


發明說明書

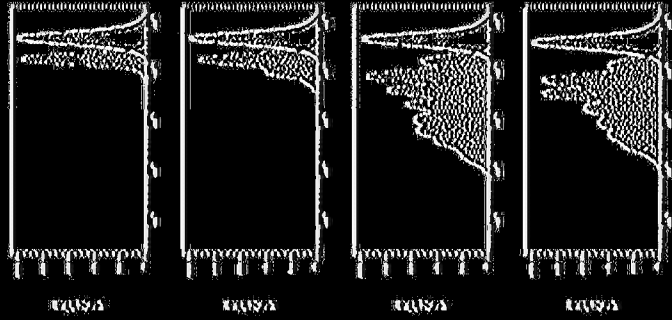
第3天



第4天



第7天

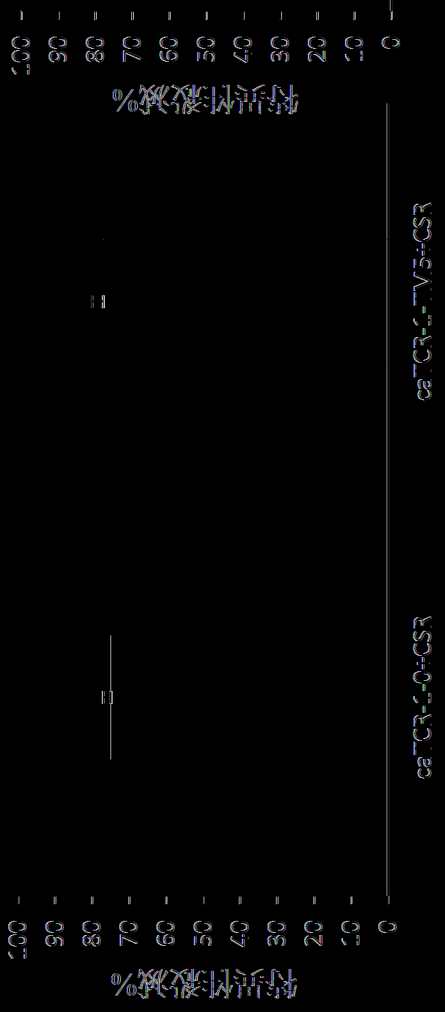


發明說明書

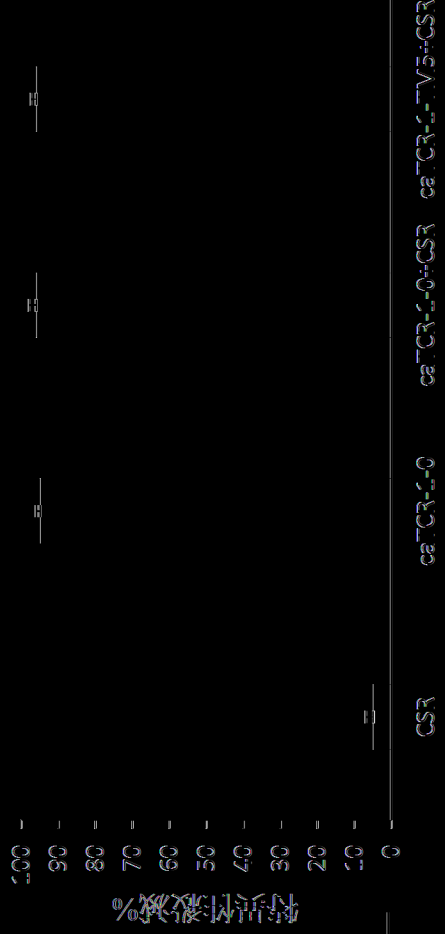
發明說明書

caTCR-0=caTCR-  
caCD20=CSR

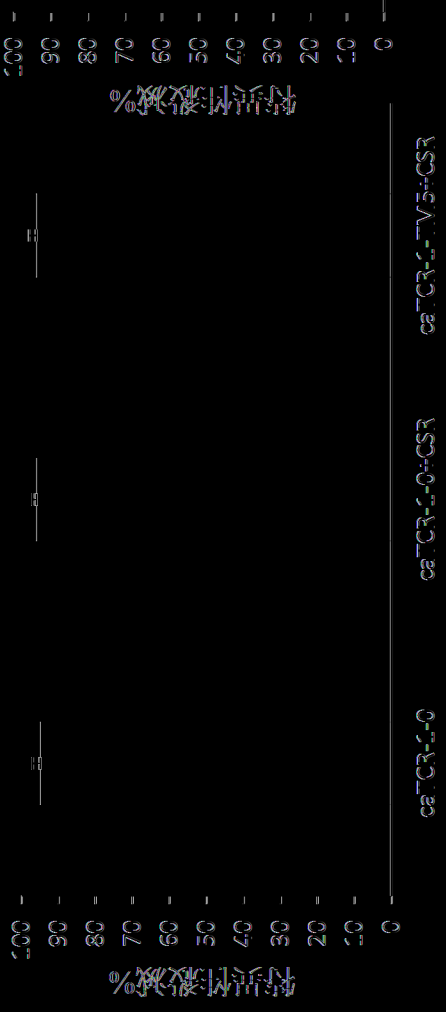
三體外殺滅Ag



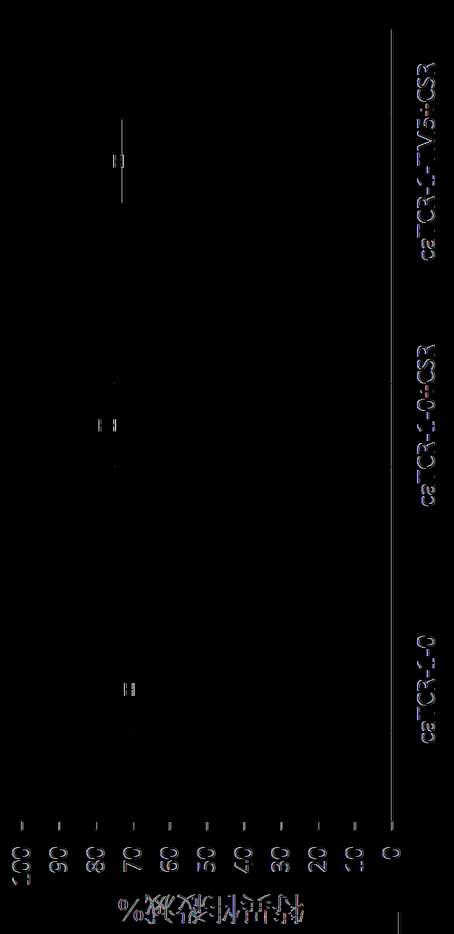
三體外殺滅3V.73



三體外殺滅AV.6



三體外殺滅e6.60



三體外殺滅



圖 10

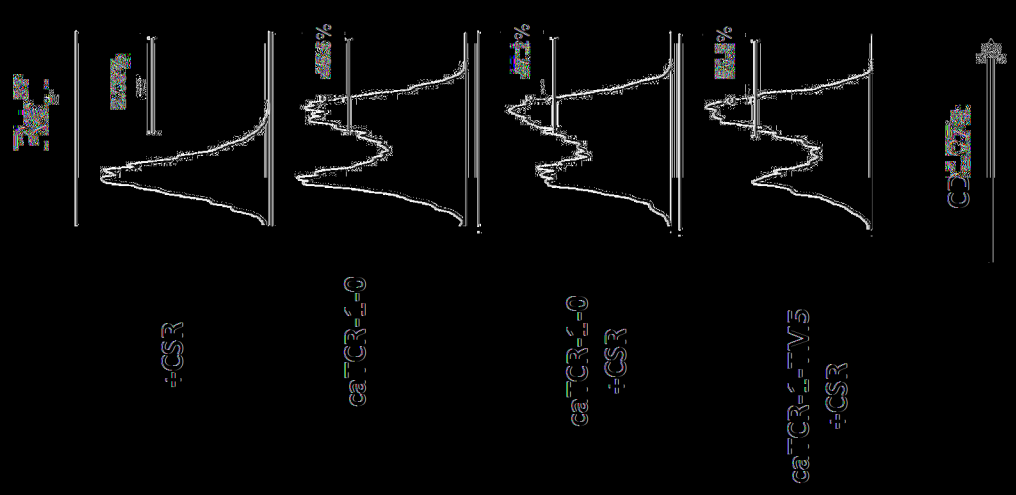


圖 11







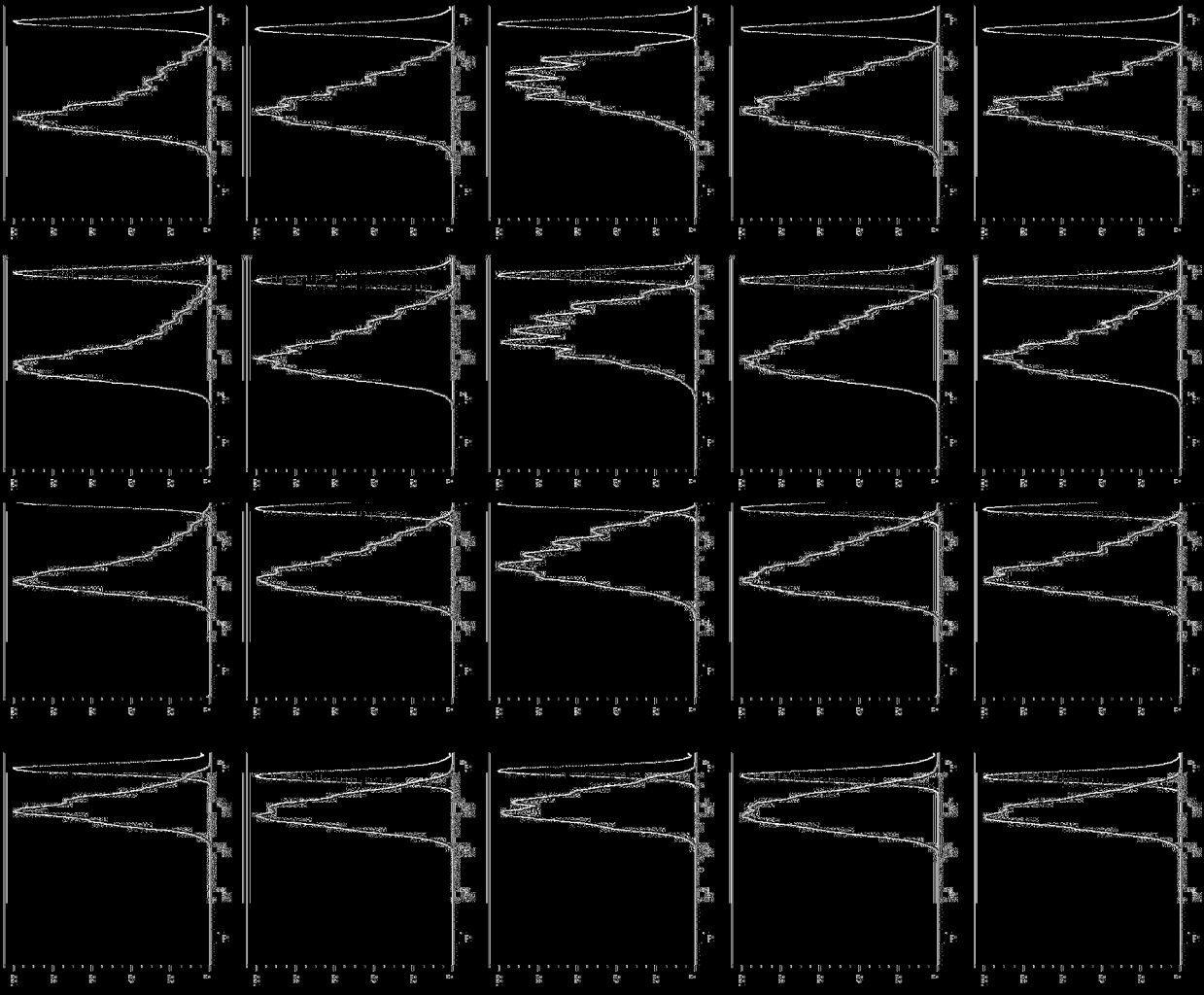


第3天

第4天

第5天

第6天



CSR

ca.CSR=1 ÷ CSR=1

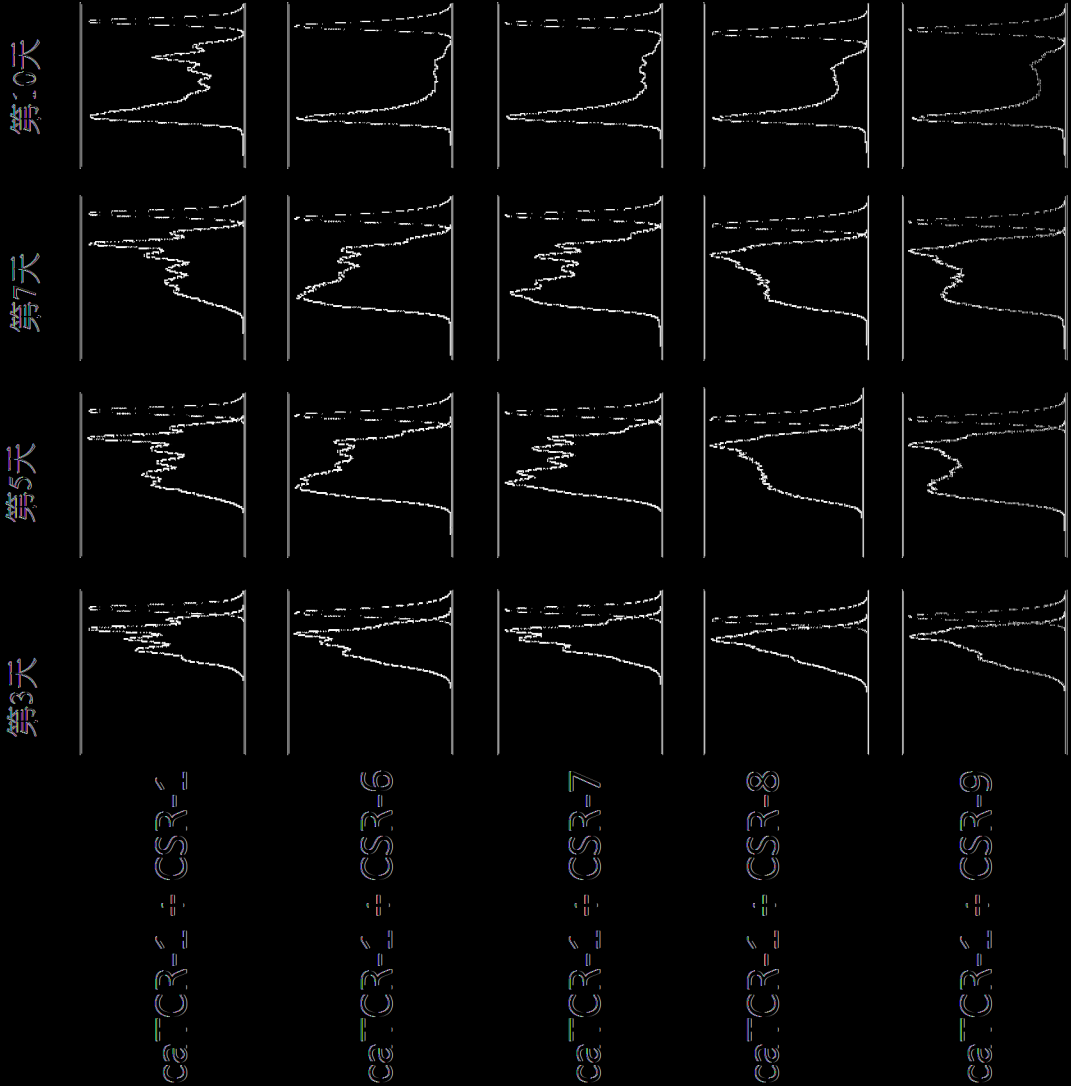
ca.CSR=2 ÷ CSR=2

ca.CSR=3 ÷ CSR=3

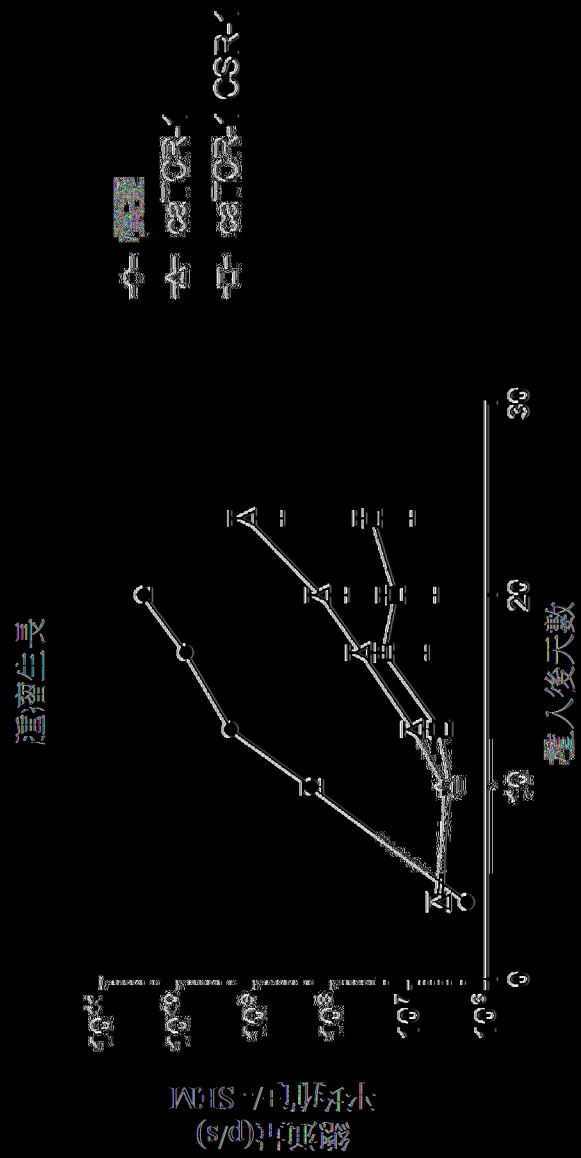
ca.CSR=4 ÷ CSR=4

ca.CSR=5 ÷ CSR=5

CPSD 共振



[圖 15]



(圖16)



