



(19)中華民國智慧財產局

(12)發明說明書公告本

(11)證書號數：TW I843716 B

(45)公告日：中華民國 113 (2024) 年 06 月 01 日

(21)申請案號：108106754

(22)申請日：中華民國 108 (2019) 年 02 月 27 日

(51)Int. Cl. : C07K16/28 (2006.01)

A61K39/00 (2006.01)

C07K14/725 (2006.01)

(30)優先權：2018/02/27 英國

1803178.1

(71)申請人：挪威奧斯陸大學醫院 H F (挪威) OSLO UNIVERSITETSSYKEHUS HF (NO)
挪威(72)發明人：高德納克 葛斯塔夫 GAUDERNACK, GUSTAV (NO)；克法爾荷姆 剛納
KVALHEIM, GUNNAR (NO)；殷德柏格 艾爾斯 馬里特 INDERBERG, ELSE
MARIT (NO)；瓦爾奇利 賽巴斯汀 WALCHLI, SEBASTIEN (CH)

(74)代理人：陳長文

(56)參考文獻：

WO 2017207814A1

審查人員：吳卓翰

申請專利範圍項數：20 項 圖式數：10 共 187 頁

(54)名稱

hTERT 特異性結合分子

(57)摘要

本發明提供一種核酸分子，其編碼在由 II 類主要組織相容性複合體(MHC)呈現 hTERT 肽時能夠結合該肽之特異性結合分子，該 hTERT 肽包含 SEQ ID NO: 1 中所闡述之胺基酸序列，其中該特異性結合分子包含含有 T 細胞受體(TCR)之 α 鏈之可變區的第一多肽及含有 β 鏈之可變區的第二多肽，且其中：

(a) α 鏈之該可變區包含 CDR 序列 CDR1、CDR2 及 CDR3，該等 CDR 序列分別包含 SEQ ID NO: 2、3 及 4 中所闡述之胺基酸序列；及

(b) β 鏈之該可變區包含 CDR 序列 CDR1、CDR2 及 CDR3，該等 CDR 序列分別包含 SEQ ID NO: 5、6 及 7 中所闡述之序列。

亦提供包含此類核酸分子之重組構築體、載體及宿主細胞，與由此類核酸分子編碼之特異性結合分子。

本發明在治療癌症中具有效用。

The present invention provides a nucleic acid molecule encoding a specific binding molecule capable of binding an hTERT peptide comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 1 when the peptide is presented by a Class II Major Histocompatibility Complex (MHC), wherein the specific binding molecule comprises a first polypeptide comprising a variable region of an α -chain and a second polypeptide comprising a variable region of a β -chain of a T-cell receptor (TCR), and wherein:

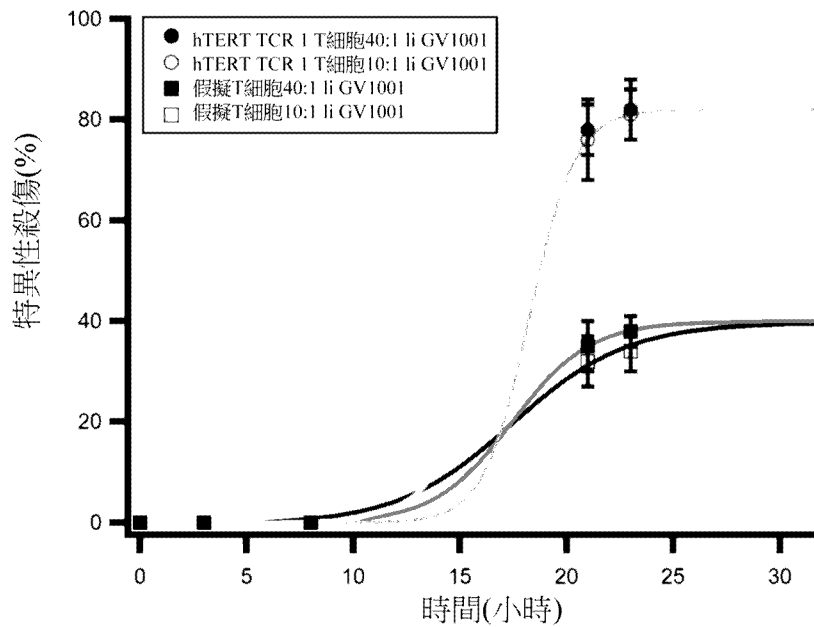
(a) the variable region of an α -chain comprises CDR sequences CDR1, CDR2 and CDR3 which respectively comprise the amino acid sequences set forth in SEQ ID NOs: 2, 3 and 4; and

(b) the variable region of a β -chain comprises CDR sequences CDR1, CDR2 and CDR3 which respectively comprise the sequences set forth in SEQ ID NOs: 5, 6 and 7.

Recombinant constructs, vectors and host cells comprising such nucleic acid molecules are also provided, as are specific binding molecules encoded by such nucleic acid molecules.

The present invention has utility in the treatment of cancer.

指定代表圖：



【圖4】



I843716

【發明摘要】

【中文發明名稱】

hTERT特異性結合分子

【英文發明名稱】

SPECIFIC BINDING MOLECULES FOR hTERT

【中文】

本發明提供一種核酸分子，其編碼在由II類主要組織相容性複合體(MHC)呈現hTERT肽時能夠結合該肽之特異性結合分子，該hTERT肽包含SEQ ID NO: 1中所闡述之胺基酸序列，其中該特異性結合分子包含含有T細胞受體(TCR)之 α 鏈之可變區的第一多肽及含有 β 鏈之可變區的第二多肽，且其中：

(a) α 鏈之該可變區包含CDR序列CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別包含SEQ ID NO: 2、3及4中所闡述之胺基酸序列；及

(b) β 鏈之該可變區包含CDR序列CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別包含SEQ ID NO: 5、6及7中所闡述之序列。

亦提供包含此類核酸分子之重組構築體、載體及宿主細胞，與由此類核酸分子編碼之特異性結合分子。

本發明在治療癌症中具有效用。

【英文】

The present invention provides a nucleic acid molecule encoding a specific binding molecule capable of binding an hTERT peptide comprising the amino acid sequence set forth in SEQ ID NO: 1 when the peptide is presented by a Class II Major Histocompatibility Complex

(MHC), wherein the specific binding molecule comprises a first polypeptide comprising a variable region of an α -chain and a second polypeptide comprising a variable region of a β -chain of a T-cell receptor (TCR), and wherein:

(a) the variable region of an α -chain comprises CDR sequences CDR1, CDR2 and CDR3 which respectively comprise the amino acid sequences set forth in SEQ ID NOs: 2, 3 and 4; and

(b) the variable region of a β -chain comprises CDR sequences CDR1, CDR2 and CDR3 which respectively comprise the sequences set forth in SEQ ID NOs: 5, 6 and 7.

Recombinant constructs, vectors and host cells comprising such nucleic acid molecules are also provided, as are specific binding molecules encoded by such nucleic acid molecules.

The present invention has utility in the treatment of cancer.

【指定代表圖】

圖4

【代表圖之符號簡單說明】

無

【發明說明書】

【中文發明名稱】

hTERT特異性結合分子

【英文發明名稱】

SPECIFIC BINDING MOLECULES FOR hTERT

【技術領域】

【0001】 本發明是針對識別人類端粒酶逆轉錄酶(hTERT)之特異性結合分子。本文提供編碼此類特異性結合分子之核酸分子、包含此類核酸分子之重組構築體及載體，及包含此類核酸分子、重組構築體及載體之宿主細胞。本文還提供識別hTERT之特異性結合分子。

【先前技術】

【0002】 與人體內之大部分健康細胞相比，癌細胞具有變得永生的可能，且因此具有無限分裂(亦即分裂無限次數)的可能。體內之大部分健康細胞僅能夠分裂有限及限定次數(此數目稱為Hayflick極限)。

【0003】 癌細胞無限分裂之能力通常與端粒酶之表現相關。端粒為位於染色體末端處之重複DNA元件(在脊椎動物(包括人類)中，端粒重複元件具有序列TTAGGG)。由於DNA複製之機制，在細胞分裂期間每一次複製染色體，染色體之末端不重複，引起丟失多個端粒重複序列且使端粒縮短。在大部分健康細胞中，重複端粒縮短最終使得不能進一步細胞分裂(此一般發生在40-60次細胞分裂之後)。一旦不能進一步分裂，細胞變得衰老。

【0004】 端粒酶向染色體之末端添加額外端粒重複序列，從而將端粒延長。因此，端粒酶表現使得細胞進行無限分裂。端粒酶為一種核糖核

蛋白，其在人體內包含兩個人類端粒酶逆轉錄酶(hTERT)次單元及兩個端粒酶RNA組分(TERC)次單元。TERC包含端粒重複元件(亦即CCCUGA)之互補序列，其由hTERT作用於在染色體末端處合成額外端粒重複序列之模板。因此，端粒酶表現可逆轉端粒縮短，且可呈現細胞永生，亦即能夠繼續無限分裂。

【0005】 端粒酶在所有癌細胞類型之大部分中表現，且因此構成癌症療法的通用及誘人靶標。先前及目前靶向端粒酶之疫苗接種試驗已顯示在患者中建立針對此抗原之免疫反應的臨床益處。然而，成功的疫苗接種視發起針對該抗原之反應的功能性免疫系統而定。後期癌症患者通常展示減弱的免疫功能，意謂疫苗接種可能缺乏功效。授受細胞療法(ACT)已顯示藉由對患者輸注設計成攻擊癌細胞之T細胞來克服此限制的可能。因此，T細胞可藉由再靶向其來設計。再靶向之T細胞可藉由修飾T細胞使得其表現識別與待治療之疾病相關之特定抗原之外源性TCR來達成。因此，T細胞受體(TCR)轉移代表一種用於ACT中產生癌症特異性T細胞的重要策略。

【0006】 本申請案之發明人已鑑別出一種識別hTERT之TCR，且可有利地用於癌症療法，特定言之ACT中。所討論之TCR來源於自疫苗接種有hTERT衍生肽GV1001之胰臟癌患者分離之CD4⁺ T細胞(亦即T-輔助細胞)(Kyte, *Expert Opin Investig Drugs* 18(5): 687-694, 2009)，該hTERT衍生肽具有SEQ ID NO: 52中所闡述之序列，該序列對應於hTERT之胺基酸611-626，如Bernhardt, S.L.等人 (*Br. J. Cancer*. 95(11): 1474-82, 2006)中公開之研究的一部分。hTERT之全長胺基酸序列闡述於SEQ ID NO: 51中。所討論之胰臟癌患者存活顯著長於基於初始預後所預期的存

活，且長於同一研究中之其他患者，表明表現此TCR之T細胞(在本文中稱作hTERT-TCR-1)的治療潛能。在II類HLA分子HLA-DP4之情況下，TCR識別其hTERT抗原。HLA-DP4為最常表現之HLA-DP類型，其中其兩個最常見子類型(HLA-DP401及HLA-DP402)中之至少一者由75%之高加索人個體表現，對應於約50%之歐洲人、80%之北美人及60%之南美人及印第安人(Castelli等人, *Journal of Immunology* 169(12): 6928-6934, 2002)。已發現大致85-90%之人類癌症表現端粒酶(Shay及Wright, *Semin Cancer Biol* 21(6): 349-353, 2011)。鑒於很大比例之表現hTERT的癌症及很大比例之表現HLA-DP4的群體，使用本文中揭示之TCR在癌症療法中係廣泛適用的。

【0007】 已揭示多種識別hTERT之TCR，且推薦用於癌症療法中(參見WO 2016/147145、WO 2006/125962及Miyazaki等人, *Blood* 121: 4894-4901, 2013)。然而，先前揭示之TCR在I類MHC分子之情況下識別hTERT衍生肽。在特異性結合分子中，本文中所揭示之特異性結合分子為針對由II類MHC分子呈現之hTERT衍生肽具有特異性，特定言之針對由HLA-DP4呈現之hTERT衍生肽具有特異性的全人類TCR。此等TCR可能已經對患者中之臨床效果做出貢獻，亦即表明在人類中無嚴重毒性的功效。在療法中使用此類TCR可產生在使用識別I類MHC之TCR時不能看見的T-輔助免疫反應，且因此可提供相對於已知hTERT識別TCR增強的免疫反應。此外，已發現當前揭示之TCR用於療法中尤其順從：發現第三方CD4⁺及CD8⁺ T細胞在表現所揭示之TCR後成功地再引導識別裝載有GV1001 hTERT肽之抗原呈現細胞，表明CD4⁺輔受體獨立性及高的肽親和力(參見實例)。在靶標識別後，亦發現再引導T細胞分泌與有效抗腫瘤

免疫反應相關之T-輔助1型細胞介素，諸如TNF- α 、IFN- γ 及IL-2，且發現其展示靶細胞殺傷。

【發明內容】

【0008】 因此，本文中所揭示之TCR可用於癌症治療，且提供編碼該TCR之核酸。亦可基於所揭示之TCR之結合序列，合成其他特異性結合分子。舉例而言，近年來已研發出呈「可溶性TCR」形式之靶向部分，其缺乏天然TCR之跨膜域，且可用於將貨物，例如藥物分子或諸如此類遞送至靶細胞(在本發明中，靶細胞為表現hTERT之細胞)。可溶性TCR描述於Walseng等人 (*PLoS ONE* 10(4): e0119559, 2015)中。本文提供多種特異性結合分子，及基於所揭示之TCR之結合序列，編碼特異性結合分子的核酸分子。此等包括可溶性TCR及如下文所論述之其他特異性結合分子。

【0009】 在一第一態樣中，本文提供一種核酸分子，其編碼針對hTERT之特異性結合分子之可變區，其中該可變區為在由II類主要組織相容性複合體(MHC)呈現肽時能夠結合該肽的T細胞受體(TCR)分子的 α 鏈的可變區或 β 鏈的可變區，該肽包含SEQ ID NO: 1中所闡述的序列，且其中：

(a) α 鏈之該可變區包含CDR序列CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別包含(或在一特定實施例中，由以下組成) SEQ ID NO: 2、3及4中所闡述之胺基酸序列；及

(b) β 鏈之該可變區包含CDR序列CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別包含(或在一特定實施例中，由以下組成) SEQ ID NO: 5、6及7中所闡述之序列。

【0010】 在一特定實施例中，本發明提供一種核酸分子，其編碼在

由II類主要組織相容性複合體(MHC)呈現hTERT肽時能夠結合該肽之特異性結合分子，該hTERT肽包含SEQ ID NO: 1中所闡述之胺基酸序列，其中該特異性結合分子包含含有T細胞受體(TCR)之 α 鏈之可變區的第一多肽及含有 β 鏈之可變區的第二多肽，且其中：

(a) α 鏈之該可變區包含CDR序列CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別包含(或在一特定實施例中，由以下組成) SEQ ID NO: 2、3及4中所闡述之胺基酸序列；及

(b) β 鏈之該可變區包含CDR序列CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別包含(或在一特定實施例中，由以下組成) SEQ ID NO: 5、6及7中所闡述之序列。

【0011】 在另一態樣中，本文提供一種核酸分子，其編碼針對hTERT之特異性結合分子之可變區，其中該可變區為在由II類主要組織相容性複合體(MHC)呈現肽時能夠結合該肽之T細胞受體(TCR)分子之 α 鏈的可變區或 β 鏈的可變區，該肽包含SEQ ID NO: 1中所闡述之序列，且其中：

(a) α 鏈之該可變區包含CDR序列CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別包含(或在一特定實施例中，由以下組成) SEQ ID NO: 2、3及4中所闡述之胺基酸序列，或相對於SEQ ID NO: 2、3及4具有1、2或3個修飾(例如，胺基酸取代，特定言之胺基酸殘基之保守取代)之胺基酸序列；及

(b) β 鏈之該可變區包含CDR序列CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別包含(或在一特定實施例中，由以下組成) SEQ ID NO: 5、6及7中所闡述之序列，或相對於SEQ ID NO: 5、6及7具有1、2或3個修飾(例

如，胺基酸取代，特定言之胺基酸殘基之保守取代)之胺基酸序列，

【0012】 在另一態樣中，本文提供一種重組構築體，其包含與異源核酸序列連接之如上文所定義的核酸分子，視情況其中該異源核酸序列為表現控制序列。

【0013】 在另一態樣中，本文提供一種載體，其包含如上文所定義之核酸分子或如上文所定義之重組構築體。

【0014】 在另一態樣中，本文提供一種宿主細胞，其包含如上文所定義之核酸分子、如上文所定義之重組構築體或如上文所定義之載體，其中該特異性結合分子對於該細胞為異源的。

【0015】 在另一態樣中，本文提供一種特異性結合分子，其能夠在由II類主要組織相容性複合體(MHC)呈現肽時結合該肽，該肽包含SEQ ID NO: 1中所闡述之序列，該特異性結合分子包含：

(i)第一多肽，其包含TCR之 α 鏈之可變區，該可變區包含CDR序列 CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別包含(或在一特定實施例中，由以下組成) SEQ ID NO: 2、3及4中所闡述之胺基酸序列；及

(ii)第二多肽，其包含TCR之 β 鏈之可變區，該可變區包含CDR序列 CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別包含(或在一特定實施例中，由以下組成) SEQ ID NO: 5、6及7中所闡述之胺基酸序列。

【0016】 在另一態樣中，本文提供一種組合物，其包含：

(i)如上文所定義之宿主細胞，其中該宿主細胞為免疫效應細胞，且該核酸分子、構築體或載體編碼特異性結合分子，當由免疫效應細胞表現時，該特異性結合分子位於該細胞之表面上；或

(ii)如上文所定義之特異性結合分子；

及至少一種生理學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑。

【0017】 在另一態樣中，本文提供一種產生如上文所定義之宿主細胞之方法，該方法包含將如上文所定義之核酸分子、如上文所定義之重組構築體或如上文所定義之載體，引入至不編碼特異性結合分子之細胞中，該特異性結合分子包含如上文所定義之 α 鏈之可變區或如上文所定義之 β 鏈之可變區。

【0018】 在另一態樣中，本文提供一種如上文所定義之宿主細胞，其中該宿主細胞為免疫效應細胞，且該核酸分子、構築體或載體編碼當由免疫效應細胞表現時位於該細胞之表面上的特異性結合分子、如上文所定義的特異性結合分子或如上文所定義的組合物，該等特異性結合分子或組合物用於療法中。

【0019】 在另一態樣中，本文提供一種如上文所定義之宿主細胞，其中該宿主細胞為免疫效應細胞，且核酸分子、構築體或載體編碼當由免疫效應細胞表現時位於該細胞之表面上的特異性結合分子、如上文所定義的特異性結合分子或如上文所定義的組合物，該等特異性結合分子或組合物用於治療癌症。

【0020】 在一相關態樣中，本文提供一種治療方法，其包含向個體投與如上文所定義之宿主細胞，其中該宿主細胞為免疫效應細胞，且核酸分子、構築體或載體編碼當由免疫效應細胞表現時位於該細胞之表面上的特異性結合分子、如上文所定義的特異性結合分子或如上文所定義的組合物。

【0021】 在另一相關態樣中，本文提供一種如上文所定義之宿主細胞之用途，其中該宿主細胞為免疫效應細胞，且核酸分子、構築體或載體

編碼當由免疫效應細胞表現時位於該細胞之表面上的特異性結合分子、如上文所定義的特異性結合分子或如上文所定義的組合物，其用於製造用於治療癌症的藥物。

【0022】 在另一態樣中，本發明提供一種套組，其包含如上文所定義之第一載體及第二載體，該第一載體包含編碼包含如上文所定義之 α 鏈之可變區的第一多肽的核酸分子，且該第二載體編碼包含如上文所定義之 β 鏈之可變區的第二多肽。

【圖式簡單說明】

【0023】 可根據下文之非限制性實例及參考附圖，來更完全理解本發明，其中：

圖1顯示腹水中識別自體癌細胞之初始表現hTERT-TCR-1之T細胞純系。將純系與空載抗原呈現細胞(亦即，不具有所添加之外源性肽之抗原呈現細胞(APC))、裝載有GV1001肽之APC及含有表現hTERT之癌細胞的自體腹水一起培育。藉由量測T細胞增殖來分析靶標識別；增殖表明靶標識別。誤差杠指示一個標準差。

圖2顯示在用編碼TCR之載體轉導之後，TCR陰性Jurkat T細胞表現hTERT-TCR-1。當表現功能性TCR時，Jurkat T細胞變為CD3⁺；CD3染色表明成功表現hTERT-TCR-1。

圖3顯示表現hTERT-TCR-1之初代T細胞識別裝載有GV1001肽之靶細胞。將T細胞與靶細胞一起培育，且基於細胞介素產生來判定T細胞對靶細胞之識別。表明CD4⁺及CD8⁺ T細胞兩者之識別。A部分顯示在用各種靶細胞刺激之後，產生IFN γ 及/或TNF α 之CD4⁺ (左側)及CD8⁺ (右側) T細胞的比例。B部分呈現呈不同格式之相同資料，表明在用裝載有定義

濃度之GV1001肽之靶細胞刺激之後，產生細胞介素之CD4+及CD8+ T細胞的總比例。誤差杠指示一個標準差。

圖4顯示可特異性殺死黑素瘤靶細胞(ESTDAB-039，DP4+ hTERT+)之表現hTERT-TCR-1的初代T細胞，而對照(假擬轉染的)T細胞針對該黑素瘤細胞無活性。誤差杠指示一個標準差。指示效應子:靶標比率。

圖5顯示極少hTERT-TCR-1抗原決定基之鑑別。EBV-LCL (埃-巴二氏病毒(Epstein-Barr virus)轉化的類淋巴母細胞細胞株)細胞用作APC，且裝載有hTERT肽。該肽由其在hTERT內之序列位置(x軸)定義，且基於T細胞增殖而判定靶標識別。誤差杠指示一個標準差。

圖6顯示在小鼠中之異種移植研究之結果。對小鼠注射用反轉錄病毒載體SW1000進行工程改造以表現hTERT-TCR-1抗原(GV1001)、螢火蟲螢光素酶及EGFP的ESTDAB-039腫瘤細胞。SW1000編碼單一開放閱讀框內之此等三個基因，其結構及胺基酸序列(SEQ ID NO: 68)顯示於A部分中。B部分為顯示異種移植實驗之時間線的示意圖。時間線顯示當對小鼠注射時及當將其成像時研究之天數。如所示，在實驗開始時，對小鼠注射經SW1000工程改造之ESTDAB-039腫瘤細胞。在所顯示之點處(自「T細胞注射」指向時間線之箭頭)，對小鼠注射表現hTERT-TCR-1之T細胞，且在所顯示之點處(自「IVIS」指向時間線之箭頭)將其在IVIS活體內成像系統中成像。

C部分顯示實驗結果。基於在所指示天(在經SW1000工程改造的ESTDAB-039細胞注射之後)時總生物發光，藉由IVIS來量測腫瘤負荷。將注射有用hTERT-TCR-1轉染之T細胞之小鼠的腫瘤負荷與假擬轉染的T細胞的腫瘤負荷進行比較。

圖7顯示，hTERT-TCR-1 T細胞促進特異性腫瘤細胞凋亡。A部分顯示藉由與兩種不同腫瘤細胞株共培養之效應T細胞之生物發光(BLI)分析所獲得的裂解動力學，該等細胞株已用li-hTERT (Granta-519及HLA-DP04+ EBV-LCL)進行穩定地轉導。資料表示四個重複之平均值±標準差(SD)。對於9.5小時時間點計算統計資料。B部分顯示磷脂結合蛋白(Annexin) V+細胞(亦即凋亡細胞)在效應T細胞與患者腹水細胞共培養之後的密度。資料表示十二個重複之平均值±SD。對於10小時時間點計算統計資料。

圖8顯示活體內之hTERT-TCR-1 T細胞對照腫瘤負荷。對NSG小鼠腹膜內(i.p.)移植GFP/Luc+ ESTDAB-1000腫瘤，且在腫瘤接種3天之後，將小鼠隨機分組且接受i.p.注射假擬T細胞、經hTERT-TCR-1轉導的T細胞或培養基(每組n=10)，總共4次注射。此實驗時間線顯示於A部分中。

B部分顯示自接種ESTDAB-1000且用假擬或經hTERT-TCR-1轉導的T細胞處理的小鼠的IVIS獲得的螢光影像。

C部分顯示B部分中顯示之小鼠之Kaplan-Meier存活曲線。藉由Mantel-Cox (對數秩)測試來分析存活曲線。資料表示平均值±SD。

圖9顯示，hTERT-TCR-1 T細胞並不會對骨髓進行反應。以10:1之效應子:靶標比率(E:T)，將健康供體骨髓先驅細胞與經hTERT-TCR-1轉導的T細胞或假擬轉染T細胞共培養6小時。隨後，將細胞塗鋪在半固體甲基纖維素先驅細胞培養物中14天，且對紅色(CFU-E)、白色(CFU-GM)及混合(CFU-GEMM)群落之存在評分。對於各三個條柱組，左側條柱表示CFU-E群落，中間條柱CFU-GM群落及右側條柱CFU-GEMM群落。資料表示三個重複之平均值±SD。

圖10顯示，表現hTERT-TCR-1之T細胞並不顯示針對自一組30個供體分離之PBMC的同種異體反應性。將經hTERT-TCR-1轉導的T細胞或未經轉導的T細胞與PBMC一起，以1:5之E:T比率培育。對照包括具有滴定濃度之hTERT肽之T細胞與HLA-DPB1*0401 PBMC的培育。在於37°C下培育隔夜之後，藉由ELISPOT來量測IFN γ 釋放。該圖顯示平均IFN γ 釋放，且誤差杠表示SD。

【實施方式】

【0024】 T細胞為形成脊椎動物之後天性免疫系統之基本部分的淋巴球，且在細胞介導的免疫中起主要作用。T細胞可藉由在其細胞膜中存在T細胞受體(TCR)而區別於其他淋巴球，諸如B細胞及自然殺手(NK)細胞。存在多種不同T細胞子類型，包括T-輔助細胞、細胞毒性T細胞、記憶T細胞等。

【0025】 TCR為由T細胞表現之蛋白質複合物，當進行表現時，其錨定至細胞膜，且因此位於T細胞表面上。大部分TCR為包含 α 鏈及 β 鏈之雜二聚體，該 α 鏈及 β 鏈兩者均由可變區及恆定區組成。可變區位於鏈之N端部分處，且完全為胞外的；恆定區位於鏈之C端部分處，且包含胞外域、跨膜域及短的細胞質域。編碼及合成呈未成熟形式、具有N端信號(或前導)序列的TCR鏈。當合成其時，此序列位於 α -TCR鏈或 β -TCR鏈之可變區的N端。在將鏈插入至細胞膜中後，自TCR鏈裂解掉信號序列，且因此前導序列不存在於位於細胞表面處之成熟TCR的鏈中。

【0026】 TCR之 α 及 β 鏈之可變區可形成能夠特異性結合靶抗原之結構。TCR抗原為蛋白質，且由TCR結合之特異性抗原部分稱為T細胞抗原決定基。T細胞抗原決定基為短的抗原片段，一般長度在8與25個胺基酸

之間的肽。由主要組織相容性複合體(MHC)，將相關抗原片段呈現至TCR。在結合抗原後，TCR可激活信號轉導途徑，該信號轉導途徑激活T細胞起始免疫反應。

【0027】 α 或 β 鏈之可變區包含三個高變互補決定區(CDR)，稱為CDR1、CDR2及CDR3。CDR1為最N端CDR，CDR3為最C端CDR，且CDR2位於CDR1與CDR3之間。係CDR與靶標抗原決定基/MHC複合物直接相互作用，且因此測定TCR之特異性，其中在測定TCR特異性中，CDR3為最重要的CDR。TCR鏈之可變區之並不形成CDR的部分被稱為構架區。TCR可變區含有四個此類構架區。構架區1 (FR1)為CDR1之N端；構架區2 (FR2)連接CDR1與CDR2；構架區3 (FR3)連接CDR2與CDR3；構架區4 (FR4)連接CDR3與TCR鏈之恆定區。構架區之序列在不同TCR分子之間變化，但構架區序列比CDR之彼等具有較少變化。構架區形成CDR之骨架，使得其空間排列適合於靶標結合。因此，構架區之序列對於TCR功能為重要的，此係由於其決定TCR鏈之可變區的整體結構。此結構必須保持CDR在正確取向及其相對位置上以結合靶抗原。然而，如上文所指出，係CDR序列(亦即與TCR結合之靶標)決定TCR之特異性。

【0028】 如上所指出，TCR可識別抗原決定基/MHC複合物。存在兩類MHC：I類及II類。I類MHC由所有有核細胞表現；II類MHC僅由專職抗原呈現細胞(APC)，諸如樹突狀細胞表現。所有MHC之功能係呈現短肽區段，以用於由T細胞識別。I類MHC呈現來自表現該I類MHC之細胞內的肽片段，且一般由 $CD8^+$ T細胞(細胞毒性T細胞)識別。若 $CD8^+$ T細胞識別由I類MHC呈現之作為抗原的肽，則T細胞觸發其上表現I類MHC之細胞的細胞凋亡。II類MHC一般呈現來自己由表現該II類MHC之APC內吞之

蛋白質的肽片段，且一般由CD4⁺ T細胞(輔助T細胞)識別。若原生CD4⁺ T細胞識別由II類MHC呈現之作為抗原的肽，則該T細胞將增殖。其子細胞將分化為效應、記憶及調節性T細胞，其一起藉由免疫系統之其他組分介導免疫反應。

【0029】 在人體內，MHC複合物包含人類白血球抗原(HLA)。每一個人類具有3種主要I類MHC HLA基因(*HLA-A*、*HLA-B*及*HLA-C*)及6種主要II類MHC HLA基因(*HLA-DPA1*、*HLA-DPB1*、*HLA-DQA1*、*HLA-DQB1*、*HLA-DRA*及*HLA-DRB1*)。當TCR結合MHC-抗原複合物時，抗原及MHC蛋白兩者藉由TCR接觸，意謂TCR識別特異性MHC-抗原複合物而不是僅抗原。TCR與MHC之此相互作用被認為係經由CDR2，且意謂TCR僅在其與特異性HLA蛋白複合時識別抗原，一種稱為MHC限制性之特徵。HLA基因為高度多形性的，意謂不同個體傾向於攜帶不同HLA等位基因，且特異性TCR將不會在所有個體中起作用(僅在攜帶TCR受限於其之適當HLA等位基因之彼等個體中起作用)。

【0030】 II類MHC為包含兩個均質肽(α 鏈及 β 鏈)之雜二聚體。在每一個II類MHC中， α 鏈由「A」編碼，且 β 鏈由「B」基因編碼，因此在HLA-DP II類MHC中， α 鏈由*HLA-DPA1*基因編碼，且 β 鏈由*HLA-DPB1*基因編碼。如上所指出，本文中所揭示之TCR在HLA-DP4之情況下識別其hTERT抗原決定基。*HLA-DP4*為*HLA-DPA1*及*HLA-DPB1*等位基因。如上所指出，兩種最常見HLA-DP4 II類MHC分子為HLA-DP401及HLA-DP402。HLA-DP401分子包含 α 鏈HLA-DPA1*0103及 β 鏈HLA-DPB1*0401。HLA-DP402分子包含 α 鏈HLA-DPA1*0103及 β 鏈HLA-DPB1*0402。因此，唯一差異係在 β 鏈等位基因中；HLA-DPB1*0401及

HLA-DPB1*0402彼此相差僅3個胺基酸殘基。

【0031】 如上文所論述，本文提供之核酸分子及特異性結合分子係基於自接受針對hTERT之疫苗接種且現在已緩解之癌症患者分離的TCR分子。如所詳述，對患者疫苗接種肽GV1001，該肽具有SEQ ID NO: 52中所闡述之序列。發現，由所分離之TCR識別之極小抗原決定基為SEQ ID NO: 1中所闡述之序列。SEQ ID NO: 1之胺基酸序列對應於hTERT胺基酸615-626 (亦即SEQ ID NO: 52之胺基酸5-16)。如上所指出，所分離之TCR在HLA-DP4之情況下，亦即當由HLA-DP4 II類MHC呈現其靶標抗原決定基時，識別該靶標抗原決定基。

【0032】 hTERT-TCR-1為 $\alpha\beta$ TCR (亦即其為包含 α 鏈及 β 鏈之雜二聚體)。hTERT-TCR-1之 α 鏈包含可變區，其中CDR1 (其可被稱作V α CDR1)由SEQ ID NO: 2中所闡述之胺基酸序列組成，CDR2 (其可被稱作V α CDR2)由SEQ ID NO: 3中所闡述之胺基酸序列組成，且CDR3 (其可被稱作V α CDR3)由SEQ ID NO: 4中所闡述之胺基酸序列組成。hTERT-TCR-1之 β 鏈包含可變區，其中CDR1 (其可被稱作V β CDR1)由SEQ ID NO: 5中所闡述之胺基酸序列組成，CDR2 (其可被稱作V β CDR2)由SEQ ID NO: 6中所闡述之胺基酸序列組成，且CDR3 (其可被稱作V β CDR3)由SEQ ID NO: 7中所闡述之胺基酸序列組成。

【0033】 本文提供之核酸分子編碼針對hTERT之特異性結合分子(亦即識別hTERT抗原決定基之特異性結合分子)之可變區。如本文所定義之「特異性結合分子」為與特定分子特異性搭配物結合之分子。較佳地，特異性結合分子在生理條件(亦即在宿主動物體(特定言之人類身體)內發現之條件)下結合其搭配物。特定言之，特異性結合分子可在人類腫瘤內

發現之條件下結合其搭配物。生理學條件可例如為例如在35-39°C範圍內之溫度及pH 6-8。由本文所定義之特異性結合分子結合之分子搭配物為肽-II類MHC複合物，其中由II類MHC呈現之肽為hTERT蛋白之片段(亦即SEQ ID NO: 51之片段)。

【0034】 本文提供之核酸分子編碼在由II類MHC呈現肽時能夠結合該肽之TCR分子之 α 鏈的可變區及/或 β 鏈的可變區，該肽包含SEQ ID NO: 1中所闡述之序列。 α 鏈之此種可變區較佳包含CDR序列V α CDR1、V α CDR2及V α CDR3，該等CDR序列分別包含或具有(亦即由以下組成)SEQ ID NO: 2、3及4中所闡述之胺基酸序列； β 鏈之此種可變區較佳包含CDR序列V β CDR1、V β CDR2及V β CDR3，該等CDR序列分別包含或具有(亦即由以下組成)SEQ ID NO: 5、6及7中所闡述之序列。

【0035】 如上所指出，在某些態樣中，V α CDR中之一或多者或中之每一者可替代性地相對於SEQ ID NO: 2、3及4中所闡述之胺基酸序列進行修飾，亦即V α CDR1可包含SEQ ID NO: 2之經修飾版本的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成，V α CDR2可包含SEQ ID NO: 3之經修飾版本的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成，及/或V α CDR3可包含SEQ ID NO: 4之經修飾版本的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成。類似地，V β CDR可相對於SEQ ID NO: 5、6及7中所闡述之胺基酸序列進行修飾，亦即V β CDR1可包含SEQ ID NO: 5之經修飾版本的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成，V β CDR2可包含SEQ ID NO: 6之經修飾版本的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成，及/或V β CDR3可包含SEQ ID NO: 7之經修飾版本的胺基酸序列或由該胺基酸序列組成。

【0036】 如本文所定義之SEQ ID NO: 2、3、4、5、6或7之經修飾

版本分別相對於SEQ ID NO: 2、3、4、5、6或7包含一個、兩個或三個修飾。較佳地，SEQ ID NO: 2、3、4、5、6或7之經修飾版本分別相對於SEQ ID NO: 2、3、4、5、6或7包含一個或兩個修飾，最佳地僅單個修飾。在一特定實施例中，V α CDR1包含SEQ ID NO: 2之經修飾版本或由其組成；在另一實施例中，V α CDR2包含SEQ ID NO: 3之經修飾版本或由其組成；在另一實施例中，V α CDR3包含SEQ ID NO: 4之經修飾版本或由其組成；在另一實施例中，V β CDR1包含SEQ ID NO: 5之經修飾版本或由其組成；在另一實施例中，V β CDR2包含SEQ ID NO: 6之經修飾版本或由其組成；在另一實施例中，V β CDR3包含SEQ ID NO: 7之經修飾版本或由其組成。

【0037】 在此情況下，修飾意謂胺基酸殘基之取代、添加或缺失。較佳地，修飾為胺基酸取代。當CDR序列藉由取代特定胺基酸殘基進行修飾時，取代可為保守胺基酸取代。如本文所用，術語「保守胺基酸取代」係指其中用具有類似側鏈之另一胺基酸殘基替換一個胺基酸殘基之胺基酸取代。具有類似側鏈之胺基酸傾向於具有類似性質，且因此可預期對於多肽之結構或功能為重要的胺基酸的保守取代，對於多肽結構/功能，比在相同位置處的非保守胺基酸取代影響小。已在此項技術中定義具有類似側鏈之胺基酸殘基的家族，包括鹼性側鏈(例如離胺酸、精胺酸、組胺酸)、酸性側鏈(例如天冬胺酸、麩胺酸)、不帶電極性側鏈(例如天冬醯胺、麩醯胺酸、絲胺酸、蘇胺酸、酪胺酸)、非極性側鏈(例如甘胺酸、半胱胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸、異白胺酸、脯胺酸、苯丙胺酸、甲硫胺酸、色胺酸)及芳族側鏈(例如酪胺酸、苯丙胺酸、色胺酸、組胺酸)。因此，保守胺基酸取代可視為其中特定胺基酸殘基用同一家族之不同胺基酸

殘基取代之取代。然而，CDR序列中之胺基酸殘基之取代亦可為非保守取代，其中一個胺基酸殘基用具有屬於不同家族之側鏈的另一胺基酸殘基取代。

【0038】 可在較長多肽鏈之情況下，編碼由核酸分子編碼之TCR鏈之可變區。舉例而言，例如在如下文所描述之TCR鏈或特異性結合分子之情況下，可變區可經編碼具有C端恆定區。

【0039】 由本文提供之核酸分子編碼之TCR鏈之可變區，可為在由HLA-DP4 II類MHC呈現肽時能夠結合該肽之TCR分子的 α 或 β 鏈的可變區，該肽包含SEQ ID NO: 1中所闡述的序列。

【0040】 在一較佳實施例中，本文提供之核酸分子編碼在由II類MHC，特定言之HLA-DP4 II類MHC呈現肽時能夠結合該肽的特異性結合分子，該肽包含SEQ ID NO: 1中所闡述的序列。特異性結合分子包含如上文所定義之 α 鏈之可變區(亦即包含CDR序列V α CDR1、V α CDR2及V α CDR3，其分別包含SEQ ID NO: 2、3及4中所闡述之胺基酸序列或由其組成)及如上文所定義之 β 鏈之可變區(亦即包含CDR序列V β CDR1、V β CDR2及V β CDR3，其分別包含SEQ ID NO: 5、6及7中所闡述之序列或由其組成)。

【0041】 如上文所指出，TCR鏈之可變區包含將CDR序列分開之構架區。因此， α 鏈之可變區包含將CDR分開且如上文所詳述分佈之構架區V α FR1至V α FR4，且 β 鏈之可變區包含將CDR分開且如上文所詳述分佈之V β FR1至V β FR4。因此，V α FR1位於 α 鏈之可變區之N端(V α CDR1之N端)處；V α FR2位於V α CDR1與V α CDR2之間；V α FR3位於V α CDR2與V α CDR3之間；且V α FR4位於V α CDR3之C端處。相對應地，V β FR1位於

β 鏈之可變區之N端(V β CDR1之N端)處；V β FR2位於V β CDR1與V β CDR2之間；V β FR3位於V β CDR2與V β CDR3之間；且V β FR4位於V β CDR3之C端處。

【0042】 所編碼之特異性結合分子可包含含有 α 鏈之可變區的第一多肽及含有 β 鏈之可變區的第二多肽。在特異性結合分子中，第一及第二多肽結合，換言之，第一及第二多肽形成複合物。第一多肽之 α 鏈之可變區與第二多肽之 β 鏈之可變區一起形成抗原結合位點，該抗原結合位點位於在 α 鏈之可變區與 β 鏈之可變區之間的界面處且包含CDR序列。

【0043】 第一多肽及第二多肽可在所編碼之特異性結合分子內進行共價連接。舉例而言，第一多肽及第二多肽可位於單一多肽鏈(亦即藉由肽鏈連接之胺基酸直鏈)內。在此情況下，第一多肽可經編碼在第二多肽之N端，或第二多肽可經編碼在第一多肽之N端。第一及第二多肽可由連接子分開，或可直接彼此連接。「直接連接」意謂，第一多肽之C端胺基酸與第二多肽之N端胺基酸(或反之亦然)在多肽鏈之一級結構(亦即胺基酸序列)內相鄰。

【0044】 替代地，第一多肽及第二多肽可構成共價連接之單獨多肽鏈。在此實施例中，任何共價鍵可將第一多肽鏈與第二多肽鏈連接，例如該等鏈可藉由形成於半胱胺酸殘基之間的一或多個二硫鍵及/或藉由形成於側鏈胺基與側鏈羧基之間的一或多個異肽鏈連接。

【0045】 在另一實施例中，第一多肽及第二多肽藉由非共價相互作用，例如藉由一或多個氫鍵及/或一或多個離子鍵結合。第一及第二多肽可經由一或多個鹽橋(鹽橋形成於帶電荷胺基酸基團之間，且包含氫鍵鍵合及離子鍵合兩者)或藉由疏水相互作用結合。任何形式之相互作用可介

導第一與第二多肽之間的結合。

【0046】 即使第一及第二多肽在特異性結合分子內構成單獨多肽鏈，但特異性結合分子仍可編碼為單一多肽鏈。如下文所論述，第一及第二多肽可編碼為其中可裂解連接子將兩條多肽分開的單鏈。連接子之裂解引起肽分開，且允許成熟特異性結合分子由單獨多肽鏈形成。

【0047】 α 鏈之可變區可對應於hTERT-TCR-1之 α 鏈之可變區或其變體。hTERT-TCR-1之 α 鏈之可變區具有SEQ ID NO: 9中所闡述之序列。因此，特異性結合分子可包含含有SEQ ID NO: 9中所闡述之胺基酸序列或由其組成之 α 鏈的可變區或其變體。根據本發明，「變體」序列為衍生自指定序列(例如天然序列)且相對於指定序列進行修飾之序列。如本文所定義之變體可相對於衍生其之序列進行一或多個胺基酸(或在核酸序列之情況下，核苷酸)之取代、添加或缺失修飾。SEQ ID NO: 9之變體為與SEQ ID NO: 9具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。

【0048】 β 鏈之可變區可對應於hTERT-TCR-1之 β 鏈之可變區，或可為其變體。hTERT-TCR-1之 β 鏈之可變區具有SEQ ID NO: 11中所闡述之序列。因此，特異性結合分子可包含含有SEQ ID NO: 11中所闡述之胺基酸序列或由其組成之 β 鏈的可變區或其變體。SEQ ID NO: 11之變體為與SEQ ID NO: 11具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。

【0049】 在一特定實施例中，核酸分子編碼特異性結合分子，該特異性結合分子包含：第一多肽，其包含含有SEQ ID NO: 9中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成之 α 鏈

的可變區；及第二多肽，其包含含有SEQ ID NO: 11中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成之 β 鏈的可變區。

【0050】 在另一特定實施例中，核酸分子編碼特異性結合分子，該特異性結合分子包含：第一多肽，其包含含有SEQ ID NO: 8中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成之 α 鏈的可變區；及第二多肽，其包含含有SEQ ID NO: 10中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成之 β 鏈的可變區。

【0051】 在一特定實施例中，特異性結合分子包含：第一多肽，其包含含有SEQ ID NO: 8中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成之 α 鏈的可變區；及第二多肽，其包含含有SEQ ID NO: 10中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成之 β 鏈的可變區。

【0052】 因此如可看出，較佳的是，本文中所揭示之核酸分子包含與 β 鏈之全長可變區配對之 α 鏈之全長可變區。

【0053】 當本文中所揭示之核酸分子編碼如上文所詳述之第一多肽(其包含 α 鏈之可變區)及第二多肽(其包含 β 鏈之可變區)時，第一多肽及第二多肽可分開地進行編碼。換言之，核酸分子可包含編碼第一多肽之第一基因及編碼第二多肽之第二基因。當第一及第二多肽分開進行編碼時，各自分開地轉錄為單獨mRNA分子，且分開進行轉譯，產生分散多肽鏈。

【0054】 然而，較佳的是，特異性結合分子經編碼為胺基酸單鏈，其中第一多肽與第二多肽係連接在一起的(亦即編碼為包含第一多肽及第

二多肽兩者之胺基酸單鏈)。此種鏈由轉錄為編碼第一及第二多肽兩者之單一mRNA之單一基因編碼。在單鏈中，第一多肽可位於第二多肽之N端，或第二多肽可位於第一多肽之N端。

【0055】 如上所指出，即使第一及第二多肽經編碼為單鏈，但其仍可在形成特異性結合分子之前分開。在此情境下，藉由將第一多肽及第二多肽編碼為單鏈，有可能確保當特異性結合分子由所提供之核酸分子表現時，產生等量的第一及第二多肽。將第一及第二多肽編碼為單鏈亦確保，合成非常接近於彼此之第一多肽及第二多肽，從而增加兩個多肽彼此形成功能性複合物的機會。因此，將第一及第二多肽編碼為單鏈是有利的。

【0056】 在一特定實施例中，第一及第二多肽經編碼為藉由連接子將其連接的單鏈。如本文所用，術語「連接子」係指位於單一多肽鏈內之第一與第二多肽之間，將第一多肽與第二多肽連接的胺基酸序列。連接子在特異性結合分子中不起功能性作用，亦即連接子在抗原結合或信號轉導中不起作用，其不具有效應功能且不是特異性結合分子之結構完整性所必需的。特異性結合分子可經編碼為按以下次序自N端至C端包含以下的單鏈：(i)第一多肽；(ii)連接子；及(iii)第二多肽。替代地，特異性結合分子可經編碼為按以下次序自N端至C端包含以下的單鏈：(i)第二多肽；(ii)連接子；及(iii)第一多肽。

【0057】 連接子可具有任何合適的胺基酸序列。合適的連接子為此項技術中已知的。連接子可具有任何合適的長度，例如其可為1-30個胺基酸長，或更佳1-25或1-20個胺基酸長。連接子可為可裂解的，允許第一及第二多肽分開。若第一及第二多肽不能分開，則兩條鏈可能不能夠呈現由 α 及 β 鏈之可變區形成抗原結合位點所需的正確構形。熟習此項技術者能夠

選擇適當的连接子。连接子可包含蛋白酶裂解位點，以允許特異性轉譯後裂解连接子，且因此將第一及第二多肽分開。適當的蛋白酶裂解位點為熟習此項技術者所熟知，且包括凝血酶、因子Xa、腸激酶、人類鼻病毒(HRV) 3C及菸草蝕刻病毒(TEV)裂解位點。

【0058】 在一較佳實施例中，连接子為自我剪接的。自我剪接连接子能夠催化其自身裂解，因此將第一及第二多肽分開而無需有效裂解步驟。發生自我剪接反應無需刺激或誘導。裂解反應可將连接子自單鏈特異性結合分子完全切除；替代地连接子或连接子之一部分可仍與所得單獨多肽鏈中之一或兩者連接。藉由连接子催化之自我剪接反應可在轉譯後發生(亦即其可為自催化蛋白質水解反應)，或其可在轉譯時發生。轉譯時剪接可藉由防止在连接子內或在连接子與其任一側上之多肽鏈中之一者之間形成肽鍵而發生。

【0059】 較佳的自我剪接连接子為衍生自小核糖核酸病毒自我裂解2A肽之一者。2A肽為大致20-25個胺基酸長，且以保守序列基元Asp-Val/Ile-Glu-X-Asn-Pro-Gly-Pro (SEQ ID NO: 53)結束。2A肽藉由防止在连接子內之倒數第二位中之保守甘胺酸殘基與C端脯胺酸殘基之間形成肽鍵而進行轉譯時自我剪接，有效地引起蛋白質在此等兩個胺基酸之間的裂解。在裂解之後，2A肽(除C端脯胺酸之外)仍與上游蛋白質之C端連接；最末脯胺酸殘基仍與下游蛋白質之N端連接。2A肽描述於Lewis等人, 2015 (*J Neurosci Methods* 256: 22-29)中。

【0060】 2A肽衍生之连接子之由其較佳序列呈現於SEQ ID NO: 18中，且因此自我剪接连接子可為包含SEQ ID NO: 18中所闡述之胺基酸序列或由其組成的2A肽。然而，保守C端2A序列基元(SEQ ID NO: 53)上游

之肽之序列可在不顯著丟失自我剪接活性之情況下變化，且因此連接子可為SEQ ID NO: 18之功能變體(亦即，保持自我剪接活性之SEQ ID NO: 18之序列變體)，該功能變體包含與SEQ ID NO: 18具有至少50%、55%、60%、65%、70%、75%、80%、85%、90%或95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成，其限制條件為連接子以上文所描述之保守序列基元(亦即SEQ ID NO: 53之序列基元)結束。特定言之，SEQ ID NO: 18之功能性自我剪接變體可展現至少70%、75%、80%、85%、90%、95%、100%、105%或110%之SEQ ID NO: 18之肽的自我剪接活性。多個功能性2A序列與可對原生2A序列進行以增強其自我剪接活性之某些修飾揭示於Wang等人, 2015 (*Scientific Reports* 5: 文章編號16273)中。

【0061】 如上文所詳述，本文中所揭示之核酸分子較佳地編碼包含含有 α 鏈之可變區的第一多肽及含有 β 鏈之可變區的第二多肽的特異性結合分子。

【0062】 較佳地，第一多肽進一步包含 α 鏈之恆定區，且第二多肽進一步包含 β 鏈之恆定區。在第一多肽中， α 鏈之恆定區在 α 鏈之可變區之C端；在第二多肽中， β 鏈之恆定區在 β 鏈之可變區之C端。較佳地，在每一條鏈中，恆定區緊靠可變區之C端，亦即藉由肽鍵，可變區之C端胺基酸與恆定區之N端胺基酸連接，且在可變區與恆定區之間不存在連接子。

【0063】 如上文所論述，TCR鏈天然地包含N端可變區及C端恆定區。全長恆定區包含N端胞外域、跨膜域及C端胞內域。恆定區在任何給定物種中之相同同型之所有TCR鏈中為相同(亦即恆定)的，例如每一條人類TCR α 鏈具有相同恆定區。人類TCR α 鏈恆定區具有SEQ ID NO: 12中所闡述之胺基酸序列。在SEQ ID NO: 12中，胺基酸1-117構成胞外域，

胺基酸118-137構成跨膜域，且胺基酸138-142構成胞內域。存在由人類 β 鏈恆定區之序列界定之兩種人類 β 鏈子類型：子類型1及子類型2。hTERT-TCR-1 β 鏈為子類型2。人類 β 鏈子類型2恆定區具有SEQ ID NO: 13中所闡述之胺基酸序列。在SEQ ID NO: 13中，胺基酸1-145構成胞外域，胺基酸146-168構成跨膜域，且胺基酸169-179構成胞內域。

【0064】 第一多肽可包含 α 鏈之全長恆定區或 α 鏈之截短恆定區。特定言之， α 鏈之截短恆定區可在其C端處經截短。舉例而言， α 鏈之恆定區可經截短，以使得其不含有跨膜域。 α 鏈之恆定區之使其不包含跨膜域之截短，使得 α 鏈之恆定區可溶。

【0065】 類似地，第二多肽可包含 β 鏈之全長恆定區或 β 鏈之截短恆定區。特定言之， β 鏈之截短恆定區可在其C端處經截短。舉例而言， β 鏈之恆定區可經截短，以使得其不含有跨膜域。 β 鏈之恆定區之使其不包含跨膜域之截短，使得 β 鏈之恆定區可溶。

【0066】 在一特定實施例中，特異性結合分子包含含有 α 鏈之全長恆定區的第一多肽及含有 β 鏈之全長恆定區的第二多肽，亦即全長恆定區可為配對的。在另一實施例中，特異性結合分子包含含有 α 鏈之截短恆定區的第一多肽及含有 β 鏈之截短恆定區的第二多肽，亦即截短恆定區可為配對的。然而，全長恆定區可仍與截短恆定區配對，亦即 α 鏈之全長恆定區可與 β 鏈之截短恆定區配對，或 α 鏈之截短恆定區可與 β 鏈一全長恆定區配對。

【0067】 在本發明之一特定實施例中，所提供之核酸分子編碼TCR分子，當由免疫效應細胞表現時，該TCR分子位於細胞表面上。換言之，當由諸如T細胞之免疫細胞表現TCR分子時，TCR分子位於細胞之質膜。

TCR分子具有天然 $\alpha\beta$ TCR分子之結構，亦即其包含 α 鏈(對應於第一多肽)及 β 鏈(對應於第二多肽)。 α 及 β 鏈之恆定區均為全長的，意謂其各自包含跨膜域。 α 及 β 鏈之恆定區之跨膜域將TCR錨定至細胞膜。當在免疫效應細胞中表現時，TCR為功能性的，且在靶標識別後，經由此項技術中已知之信號傳導路徑活化免疫細胞效應子功能性。

【0068】 如本文中所提及，「免疫效應細胞」意謂在活化時能夠執行效應功能(例如細胞毒性靶細胞殺傷、細胞介素釋放等)且能夠表現功能性TCR之任何免疫細胞。「功能性TCR」意謂能夠在靶標識別後起始免疫效應功能之TCR。在下文進一步論述免疫效應細胞，但如可看出，如本文所用，術語「免疫效應細胞」基本上意謂可表現TCR及相關信號傳導轉導蛋白質(及視情況輔受體)，以使得當所表現之TCR位於細胞表面上時，且在靶標識別後能夠激活細胞執行其效應功能的細胞。因此如本文所用，術語「免疫效應細胞」不併入免疫系統之所有細胞，而實際上僅具有以上特徵之彼等細胞。

【0069】 如上所指出，當由免疫效應細胞表現時位於細胞表面上之TCR分子，包含呈TCR α 鏈的第一多肽及呈TCR β 鏈的第二多肽。在一實施例中， α 鏈之恆定區包含SEQ ID NO: 12中所闡述之胺基酸序列或SEQ ID NO: 12之變體或由其組成。SEQ ID NO: 12之變體為與SEQ ID NO: 12具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列。在此實施例中， β 鏈之恆定區包含SEQ ID NO: 13中所闡述之胺基酸序列或SEQ ID NO: 13之變體或由其組成。SEQ ID NO: 13之變體為與SEQ ID NO: 13具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列。

【0070】 因此，在本發明之一特定實施例中，本文提供一種核酸分子，其編碼當由免疫效應細胞表現時位於細胞表面上之TCR分子，且其中第一多肽為包含含有SEQ ID NO: 12中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列的恆定區的 α 鏈；及第二多肽為包含含有SEQ ID NO: 13中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列的恆定區的 β 鏈。

【0071】 如上文所描述，編碼及合成呈未成熟形式，包含N端前導序列的TCR鏈。N端前導序列位於TCR鏈之N端處，且一般約20-25個胺基酸長，但可比此長度長或短。在將TCR鏈插入至膜中後，前導序列裂解，留下成熟TCR鏈在細胞表面上。成熟TCR鏈僅包含可變區及恆定區。hTERT-TCR-1之成熟 α 鏈可由SEQ ID NO: 38中所闡述之胺基酸序列表示，其由具有SEQ ID NO: 9之可變區及具有SEQ ID NO: 12之恆定區組成。hTERT-TCR-1之成熟 β 鏈可由SEQ ID NO: 40中所闡述之胺基酸序列表示，其由具有SEQ ID NO: 11之可變區及具有SEQ ID NO: 13之恆定區組成。

【0072】 核酸分子可編碼包含含有SEQ ID NO: 38或其變體中所闡述之胺基酸序列之 α 鏈的TCR。SEQ ID NO: 38之變體為與SEQ ID NO: 38具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。

【0073】 核酸分子可編碼包含含有SEQ ID NO: 40或其變體中所闡述之胺基酸序列之 β 鏈的TCR。SEQ ID NO: 40之變體為與SEQ ID NO: 40具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。

【0074】 特定言之，核酸分子可編碼TCR，該TCR包含： α 鏈，其包含SEQ ID NO: 38中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列；及 β 鏈，其包含SEQ ID NO: 40中所闡述之胺基酸序列一與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。

【0075】 如上所指出，所編碼之特異性結合分子可包含 α 及 β 鏈之N端截短可變區。成熟 α 鏈由具有SEQ ID NO: 8之截短可變區組成，且具有SEQ ID NO: 12之 α 鏈恆定區可由SEQ ID NO: 37中所闡述之胺基酸序列表示。成熟 β 鏈由具有SEQ ID NO: 10之截短可變區組成，且具有SEQ ID NO: 13之 β 鏈恆定區可由SEQ ID NO: 39中所闡述之胺基酸序列表示。

【0076】 因此，核酸分子可編碼包含含有SEQ ID NO: 37或其變體中所闡述之胺基酸序列之 α 鏈的TCR。SEQ ID NO: 37之變體為與SEQ ID NO: 37具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。

【0077】 核酸分子亦可編碼包含含有SEQ ID NO: 39或其變體中所闡述之胺基酸序列之 β 鏈的TCR。SEQ ID NO: 39之變體為與SEQ ID NO: 39具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。

【0078】 特定言之，核酸分子可編碼TCR，該TCR包含： α 鏈，其包含SEQ ID NO: 37中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列；及 β 鏈，其包含SEQ ID NO: 39中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。

【0079】 hTERT-TCR-1 α 鏈之前導序列具有SEQ ID NO: 31中所闡述之胺基酸序列，且hTERT-TCR-1 β 鏈之前導序列具有SEQ ID NO: 32中

所闡述之胺基酸序列。咸信，TCR鏈前導序列很大程度上可互換，因此由核酸分子編碼之TCR之鏈可包含任何已知TCR前導序列。所編碼TCR之鏈可包含其原生前導序列，亦即TCR之 α 鏈可包含SEQ ID NO: 31或其變體或由其組成，且 β 鏈可包含SEQ ID NO: 32或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成。SEQ ID NO: 31之變體為與SEQ ID NO: 31具有至少70%、75%、80%、85%、90%或95%序列一致性之胺基酸序列；SEQ ID NO: 32之變體為與SEQ ID NO: 32具有至少70%、75%、80%、85%、90%、95%序列一致性之胺基酸序列。

【0080】 hTERT-TCR-1之 α 鏈具有SEQ ID NO: 15中所闡述之胺基酸序列。hTERT-TCR-1之 α 鏈按以下次序自N端至C端由以下組成：具有SEQ ID NO: 31之前導序列、具有SEQ ID NO: 9之可變區及具有SEQ ID NO: 12之恆定區。在一特定實施例中，所編碼TCR分子包含 α 鏈，該 α 鏈包含SEQ ID NO: 15或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成。SEQ ID NO: 15之變體為與SEQ ID NO: 15具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。

【0081】 hTERT-TCR-1之 β 鏈具有SEQ ID NO: 17中所闡述之胺基酸序列。hTERT-TCR-1之 β 鏈按以下次序自N端至C端由以下組成：具有SEQ ID NO: 32之前導序列、具有SEQ ID NO: 11之可變區及具有SEQ ID NO: 13之恆定區。在一特定實施例中，所編碼TCR分子包含 β 鏈，該 β 鏈包含SEQ ID NO: 17或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成。SEQ ID NO: 17之變體為與SEQ ID NO: 17具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。

【0082】 在本發明之一特定實施例中，本文提供一種核酸分子，其

編碼TCR分子，該TCR分子包含： α 鏈，其包含SEQ ID NO: 15中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成；及 β 鏈，其包含SEQ ID NO: 17中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成。

【0083】 如上文所詳述，在本發明之某些實施例中，所編碼特異性結合分子包含N端截短可變區。如上文所闡述，hTERT-TCR-1 α 鏈之截短型可變區具有SEQ ID NO: 8中所闡述之序列，且hTERT-TCR-1 β 鏈之截短型可變區具有SEQ ID NO: 10中所闡述之序列。

【0084】 按以下次序自N端至C端由具有SEQ ID NO: 31之前導序列、具有SEQ ID NO: 8之截短可變區及具有SEQ ID NO: 12之恆定區組成之TCR α 鏈，具有SEQ ID NO: 14中所闡述之胺基酸序列。所編碼TCR分子可包含 α 鏈，該 α 鏈包含SEQ ID NO: 14或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成。SEQ ID NO: 14之變體為與SEQ ID NO: 14具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。

【0085】 按以下次序自N端至C端由具有SEQ ID NO: 32之前導序列、具有SEQ ID NO: 10之截短可變區及具有SEQ ID NO: 13之恆定區組成的TCR β 鏈，具有SEQ ID NO: 16中所闡述之胺基酸序列。所編碼TCR分子可包含 β 鏈，該 β 鏈包含SEQ ID NO: 16或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成。SEQ ID NO: 16之變體為與SEQ ID NO: 16具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。

【0086】 在一實施例中，本文提供一種核酸分子，其編碼TCR分

子，該TCR分子包含： α 鏈，其包含SEQ ID NO: 14中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成；及 β 鏈，其包含SEQ ID NO: 16中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成。

【0087】 在一特定實施例中，本文提供之核酸分子編碼hTERT-TCR-1，換言之，具有 α 鏈(對應於第一多肽)及 β 鏈(對應於第二多肽)之特异性結合分子，該 α 鏈包含SEQ ID NO: 15中所闡述之胺基酸序列或由其組成，該 β 鏈包含SEQ ID NO: 17中所闡述之胺基酸序列或由其組成。

【0088】 在本發明之另一實施例中，本文提供一種核酸分子，其編碼TCR分子，該TCR分子包含： α 鏈，其包含SEQ ID NO: 37或38中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列N端的前導序列；及 β 鏈，其包含SEQ ID NO: 39或40中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列N端的前導序列。在此類實施例中， α 鏈中之前導序列可為除SEQ ID NO: 31或其變體以外之前導序列，且在 β 鏈中，前導序列可為除SEQ ID NO: 32或其變體以外之前導序列。

【0089】 由本文中所揭示之核酸分子編碼之TCR分子可經編碼為單鏈TCR (scTCR)。在scTCR中， α 鏈及 β 鏈經編碼為單一多肽鏈。 α 及 β 鏈可由連接子連接。連接子及scTCR之 α 及 β 鏈可如上文所描述。

【0090】 較佳地， α 及 β 鏈由自我剪接型2A連接子連接。在一特定實施例中，本文中所揭示之核酸分子編碼scTCR，該scTCR包含經由2A連接子與hTERT-TCR-1 β 鏈連接之hTERT-TCR-1 α 鏈。在此種scTCR中，hTERT-TCR-1 α 鏈可位於多肽鏈之N端處，且hTERT-TCR-1 β 鏈位於C端處；或hTERT-TCR-1 α 鏈可位於多肽鏈之C端處，且hTERT-TCR-1 β 鏈

位於N端處。此種scTCR之胺基酸序列闡述於SEQ ID NO: 20中。SEQ ID NO: 20自N端至C端由以下組成：具有SEQ ID NO: 15之hTERT-TCR-1 α 鏈、具有SEQ ID NO: 18之2A肽及具有SEQ ID NO: 17之hTERT-TCR-1 β 鏈。本文中所揭示之核酸分子可編碼包含SEQ ID NO: 20或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成的scTCR。SEQ ID NO: 20之變體具有與SEQ ID NO: 20具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所闡述。

【0091】 替代地，由本文中所揭示之核酸分子編碼之scTCR可包含具有如上文所論述之N端截短可變區之 α 及 β 鏈。此種scTCR之胺基酸序列闡述於SEQ ID NO: 19中，其自N端至C端由以下組成：具有SEQ ID NO: 14之經修飾的hTERT-TCR-1 α 鏈、具有SEQ ID NO: 18之2A肽及具有SEQ ID NO: 16之經修飾的hTERT-TCR-1 β 鏈。本文中所揭示之核酸分子可編碼包含SEQ ID NO: 19或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成的scTCR。SEQ ID NO: 19之變體具有與SEQ ID NO: 19具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所闡述。

【0092】 如上文所詳述，2A肽進行在其C端脯胺酸殘基與倒數第二個甘胺酸殘基之間的轉譯時裂解。因此，2A連接子之末端脯胺酸形成下游多肽之N端殘基，而2A連接子之所有其他殘基形成上游多肽之C端。因此編碼在如上文所詳述之scTCR內之TCR鏈，當表現時，將包含衍生自2A肽之殘餘殘基。2A肽之末端脯胺酸殘基將位於編碼在2A肽下游之TCR鏈之N端處，亦即位於相關TCR鏈之前導序列之N端處。由於前導序列在將TCR鏈插入至膜中期間裂解，所以2A肽之末端脯胺酸殘基將不存在於

成熟、錨定膜的TCR中。然而，2A肽之所有其他殘基將位於編碼在scTCR中之2A肽上游之TCR鏈之C端處。此等殘基將不會在TCR成熟期間移除，且因此將存在於成熟、錨定膜的TCR中。因此，藉由本文中所揭示之核酸分子編碼為scTCR之成熟TCR可包含在其C端處含有殘餘2A肽殘基之 α 或 β 鏈。

【0093】 如上文所詳述，本文中所揭示之核酸分子編碼可包含第一多肽及第二多肽之特異性結合分子，該第一多肽及該第二多肽分別包含 α 鏈之可變區及 α 鏈之恆定區，與 β 鏈之可變區及 β 鏈之恆定區。如上文所詳述， α 鏈之恆定區及 β 鏈之恆定區可為全長或截短的。特異性結合分子(其中 α 及 β 鏈之恆定區為全長的)為TCR (換言之，膜結合TCR，諸如在自然界中發現之TCR)且在上文論述。

【0094】 本文提供之核酸分子可編碼包含含有 α 鏈之截短恆定區之第一多肽的特異性結合分子。特定言之， α 鏈之恆定區可在其C端處經截短，使得缺失跨膜域及胞內域，使得恆定區可溶。 α 鏈之截短恆定區較佳地為截短型人類TCR α 鏈恆定區。 α 鏈之特定截短恆定區呈現於SEQ ID NO: 29中。SEQ ID NO: 29中所闡述之胺基酸序列對應於人類TCR α 鏈恆定區之胺基酸1至96，亦即SEQ ID NO: 12之胺基酸1至96。缺失來自SEQ ID NO: 12之胺基酸97至142，產生SEQ ID NO: 29。

【0095】 本文提供之核酸分子可類似地編碼包含含有 β 鏈之截短恆定區之第二多肽的特異性結合分子。特定言之， β 鏈之恆定區可在其C端處經截短，使得缺失跨膜域及胞內域，使得恆定區可溶。 β 鏈之截短恆定區較佳地為截短型人類TCR β 鏈恆定區，最佳地截短型人類 β 鏈子類型2恆定區(如上文所詳述，hTERT-TCR-1包含具有子類型2恆定區之 β 鏈)。 β 鏈

之特定截短恆定區呈現於SEQ ID NO: 30中。SEQ ID NO: 30中所闡述之胺基酸序列對應於人類TCR β 鏈子類型2恆定區之胺基酸1至132，亦即SEQ ID NO: 13之胺基酸1至132。缺失來自SEQ ID NO: 13之胺基酸133至179，產生SEQ ID NO: 30。

【0096】 在原生 $\alpha\beta$ TCR中， α 鏈及 β 鏈藉由形成在存在於兩條鏈之恆定區中之半胱胺酸殘基之間的二硫鍵共價連接。如上文所詳述之恆定區之截短，可引起丟失負責由恆定區中之一或兩者形成鏈間二硫鍵的半胱胺酸殘基。為了使所編碼特異性結合分子之第一多肽及第二多肽在各自包含TCR鏈之截短恆定區時結合(由於可為特異性結合分子起作用所需的)，可將一或多個額外半胱胺酸殘基引入至 α 鏈之截短恆定區及 β 鏈之截短恆定區中。二硫鍵可形成在引入至 α 及 β 鏈之截短恆定區中，連接第一多肽與第二多肽之適當位置的半胱胺酸殘基之間。

【0097】 若將額外半胱胺酸殘基引入至 α 鏈及 β 鏈之截短恆定區中，以使得能夠在特異性結合分子之第一與第二多肽鏈之間形成二硫鍵，則重要的是在適當位置處引入半胱胺酸殘基。所引入之半胱胺酸殘基應引入在使得二硫鍵之形成引起形成功能性複合物之位置處，其中可變區相對於彼此正確地定位及定向，例如如由Boulter, J.M.等人 (*Protein Eng. Des. Sel.* 16(9): 707-711, 2003)所揭示。可藉由例如TCR鏈結構之分析及/或藉由試錯法，使用下文論述及實例中所闡述之用於鑑別功能性特異性結合分子之技術，來鑑別用於引入半胱胺酸殘基的適當位置。

【0098】 可藉由插入(添加半胱胺酸殘基在兩個現有胺基酸之間)，或藉由取代(用半胱胺酸殘基取代現有非半胱胺酸殘基)，將半胱胺酸殘基引入至 α 或 β 鏈之截短恆定區中之任何合適的位置處。舉例而言，可藉由用

半胱胺酸殘基取代位置49處之蘇胺酸殘基，將半胱胺酸殘基引入至具有SEQ ID NO: 29之 α 鏈的截短恆定區中。含有此Thr49Cys取代但無另外變化之經修飾型SEQ ID NO: 29，具有SEQ ID NO: 21中所闡述之胺基酸序列。相對應地，可藉由用半胱胺酸殘基取代位置57處之絲胺酸殘基，將半胱胺酸殘基引入至具有SEQ ID NO: 30之 β 鏈之截短恆定區中。含有此Ser57Cys取代之經修飾型SEQ ID NO: 30，具有SEQ ID NO: 22中所闡述之胺基酸序列。

【0099】 在一特定實施例中，核酸分子編碼特異性結合分子，該特異性結合分子包含：第一多肽，其包含如上文所描述之 α 鏈的可變區，及包含SEQ ID NO: 21或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成之 α 鏈的恆定區；及第二多肽，其包含如上文所描述之 β 鏈的可變區，及包含SEQ ID NO: 22或其變體或由其組成之 β 鏈的恆定區。SEQ ID NO: 21之變體為與SEQ ID NO: 21具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列；SEQ ID NO: 22之變體為與SEQ ID NO: 22具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列。

【0100】 較佳地，SEQ ID NO: 21之變體在位置49或對應於SEQ ID NO: 21之位置49之位置處具有上文所描述之半胱胺酸殘基。對應於SEQ ID NO: 21之位置49之位置可藉由序列比對來鑑別。當將所關注之胺基酸序列與SEQ ID NO: 21 (參考序列)比對時，將所關注之序列之與SEQ ID NO: 21之位置49所比對的胺基酸位置，定義為在所關注之序列內對應於SEQ ID NO: 21之位置49的位置。可使用任何適合的方法來進行序列比對，例如電腦程式，諸如EMBOSS Needle或EMBOSS stretcher (均為Rice, P. 等人, *Trends Genet.* 16(6): 276-277, 2000)可用於成對序列比

對，而Clustal Omega (Sievers, F. 等人, *Mol. Syst. Biol.* 7:539, 2011)或 MUSCLE (Edgar, R.C., *Nucleic Acids Res.* 32(5):1792-1797, 2004)可用於多序列比對。此類電腦程式可與以下一起使用：標準輸入參數，例如標準Clustal Omega參數：矩陣Gonnet，空隙開放罰分為6，空隙擴展罰分為1；或標準EMBOSS Needle參數：BLOSUM62矩陣，間隙開放罰分為10，空隙擴展罰分為0.5。可替代地使用任何其他合適的參數。

【0101】 較佳地，SEQ ID NO: 22之變體在位置57或對應於SEQ ID NO: 22之位置57之位置處具有上文所描述之半胱胺酸殘基。可鑑別對應於給定參考序列中之特定位置之所關注之序列的胺基酸位置的方法，在上文論述。

【0102】 包含具有SEQ ID NO: 21中所闡述之胺基酸序列之 α 鏈之恆定區之如上文所描述的第一多肽，與包含具有SEQ ID NO: 22中所闡述之胺基酸序列之 β 鏈之恆定區，形成共價複合物。上文所論述，經由在引入至 α 及 β 鏈之恆定區中之半胱胺酸殘基之間之二硫鍵，形成共價鍵。所形成之共價複合物為功能性特異性結合分子。

【0103】 第一多肽，其包含hTERT-TCR-1 α 鏈之可變區(其具有SEQ ID NO: 9中所闡述之胺基酸序列)及具有SEQ ID NO: 21中闡述之胺基酸序列之 α 鏈之恆定區，具有SEQ ID NO: 42中所闡述之胺基酸序列。所編碼之特異性結合分子可包含含有SEQ ID NO: 42或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成的第一多肽。SEQ ID NO: 42之變體具有與SEQ ID NO: 42具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。較佳地，SEQ ID NO: 42之變體在 α 鏈之恆定區之位置49或對應於 α 鏈之恆定區之位置49之位置處包

含上文所描述的半胱胺酸殘基。

【0104】 第二多肽，其包含hTERT-TCR-1 β 鏈之可變區(其具有SEQ ID NO: 11中所闡述之胺基酸序列)及具有SEQ ID NO: 22中闡述之胺基酸序列之 β 鏈之恆定區，具有SEQ ID NO: 44中所闡述之胺基酸序列。所編碼特異性結合分子可包含含有SEQ ID NO: 44或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成的第二多肽。SEQ ID NO: 44之變體具有與SEQ ID NO: 44具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。較佳地，SEQ ID NO: 44之變體在 β 鏈之恆定區之位置57或對應於 β 鏈之恆定區之位置57之位置處，包含上文所描述的半胱胺酸殘基。

【0105】 在一特定實施例中，本文提供之核酸分子編碼特異性結合分子，該特異性結合分子包含：第一多肽，其包含SEQ ID NO: 42中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成；及第二多肽，其包含SEQ ID NO: 44中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成。

【0106】 第一多肽，其包含具有SEQ ID NO: 8之hTERT-TCR-1 α 鏈之截短可變區及具有SEQ ID NO: 21之 α 鏈之恆定區，具有SEQ ID NO: 41中所闡述的胺基酸序列。所編碼之特異性結合分子可包含含有SEQ ID NO: 41或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成的第一多肽。SEQ ID NO: 41之變體具有與SEQ ID NO: 41具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。較佳地，SEQ ID NO: 41之變體在 α 鏈之恆定區之位置49或對應於 α 鏈之恆定區之位置49之位置處，包含上文所描述的半胱胺酸殘基。

【0107】 第二多肽，其包含具有SEQ ID NO: 10之hTERT-TCR-1 β 鏈之經修飾可變區及具有SEQ ID NO: 22之 β 鏈之恆定區，具有SEQ ID NO: 43中所闡述的胺基酸序列。所編碼特異性結合分子可包含含有SEQ ID NO: 43或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成的第二多肽。SEQ ID NO:43之變體具有與SEQ ID NO:43具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。較佳地，SEQ ID NO: 43之變體在 β 鏈之恆定區之位置57或對應於 β 鏈之恆定區之位置57之位置處，包含上文所描述的半胱胺酸殘基。

【0108】 在一特定實施例中，本文提供之核酸分子編碼特異性結合分子，該特異性結合分子包含：第一多肽，其包含SEQ ID NO: 41中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成；及第二多肽，其包含SEQ ID NO: 43中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成。

【0109】 第一及第二多肽經編碼具有前導序列，其靶向用於自生產其之細胞輸出的多肽(亦即其用作信號序列)。如上文所論述，TCR鏈前導序列很大程度上可互換，且因此對於熟習此項技術者而言，合適前導序列之選擇為簡單的。在一特定實施例中，第一多肽包含hTERT-TCR-1 α 鏈或其變體之前導序列(亦即SEQ ID NO: 31或其變體之前導序列)，且第二多肽包含hTERT-TCR-1 α 鏈或其變體之前導序列(亦即SEQ ID NO: 32或其變體之前導序列)。

【0110】 在其N端處進一步包含SEQ ID NO: 31之前導序列之具有SEQ ID NO: 41之第一多肽，具有SEQ ID NO: 23中所闡述之胺基酸序列。在其N端處進一步包含SEQ ID NO: 31之前導序列之具有SEQ ID NO:

42之第一多肽，具有SEQ ID NO: 24中所闡述之胺基酸序列。

【0111】 在其N端處進一步包含SEQ ID NO: 32之前導序列之具有SEQ ID NO: 43之第二多肽，具有SEQ ID NO: 25中所闡述之胺基酸序列。在其N端處進一步包含SEQ ID NO: 32之前導序列之具有SEQ ID NO: 44之第二多肽，具有SEQ ID NO: 26中所闡述之胺基酸序列。

【0112】 因此，第一多肽可包含以下或由以下組成：SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 24或SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 24之變體(亦即分別與SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 24具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列)中所闡述之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。較佳地，SEQ ID NO: 23或SEQ ID NO: 24之變體在 α 鏈之恆定區之位置49或對應於 α 鏈之恆定區之位置49之位置處，包含上文所描述之半胱胺酸殘基。

【0113】 因此，第二多肽可包含以下或由以下組成：SEQ ID NO: 25或SEQ ID NO: 26或SEQ ID NO: 25或SEQ ID NO: 26之變體(亦即分別與SEQ ID NO: 25或SEQ ID NO: 26具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列)中所闡述之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。較佳地，SEQ ID NO: 25或SEQ ID NO: 26之變體在 β 鏈之恆定區之位置57或對應於 β 鏈之恆定區之位置57之位置處，包含上文所描述之半胱胺酸殘基。

【0114】 在一特定實施例中，本文中所揭示之核酸分子編碼特異性結合分子，該特異性結合分子包含：第一多肽，其包含SEQ ID NO: 23中所闡述之胺基酸序列或與SEQ ID NO: 23具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成；及第二多肽，其包含SEQ ID NO: 25中所闡述之胺基

酸序列或與SEQ ID NO: 25具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成。

【0115】 在另一實施例中，本文中所揭示之核酸分子編碼特異性結合分子，該特異性結合分子包含：第一多肽，其包含SEQ ID NO: 24中所闡述之胺基酸序列或與SEQ ID NO: 24具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成；及第二多肽，其包含SEQ ID NO: 26中所闡述之胺基酸序列或與SEQ ID NO: 26具有至少95%序列一致性之胺基酸序列或由其組成。

【0116】 如上所指出，已進行C端截短以移除跨膜域之 α 鏈或 β 鏈之恆定區為可溶的。因此，包含含有此種經截短 α 鏈之第一多肽及含有此種經截短 β 鏈之第二多肽的特異性結合分子可為可溶的。術語「可溶」在本文中用以表示水可溶的物種，特定言之關於蛋白質而言，表示缺乏膜嵌入域或跨膜域之蛋白質。

【0117】 因此，核酸分子可編碼可溶特異性結合分子，該可溶特異性結合分子包含：如上文所描述之第一多肽，其包含 α 鏈之經截短可溶性恆定區；及如上文所描述之第二多肽，其包含 β 鏈之經截短可溶的恆定區。特異性結合分子可為可溶性TCR。

【0118】 可溶性TCR (sTCR)包含存在於原生TCR中之 α 及 β 鏈之可變區、及恆定區之胞外域，但缺乏恆定區之跨膜域及細胞質域。可溶性TCR可由任何細胞表現，且為分泌性的。可溶性TCR詳細描述於Walseng等人 (2015), *PLoS ONE* 10(4): e0119559中。因此可看出，可溶性TCR包含經截短TCR α 鏈(對應於第一多肽)及經截短 β 鏈(對應於第二多肽)。

【0119】 可溶性TCR之基本態樣為，將成熟TCR之經截短 α 與 β 鏈連

接。若其不連接，則鏈將在溶液中分散開，且TCR將效果不佳(即使有的話)。鏈可經共價或非共價連接。經截短 α 鏈與 β 鏈可藉由其進行共價連接之較佳方法為藉由一或多個二硫鍵。此等二硫鍵可形成在存在於原生TCR鏈序列中之半胱胺酸殘基之間，但在一較佳實施例中，TCR鏈包含如上文所描述已插入一或多個額外半胱胺酸殘基之截短恆定區。

【0120】 可溶性TCR之 α 鏈與 β 鏈可藉由其進行連接之替代方法為藉由非共價相互作用。在一特定實施例中，白胺酸拉鏈用來將鏈非共價連接。在此實施例中，經截短 α 鏈及經截短 β 鏈兩者均在其截短恆定區之C端處包含白胺酸拉鏈域(亦即，經截短 α 鏈在其C端處包含白胺酸拉鏈域，且經截短 β 鏈亦在其C端處包含白胺酸拉鏈域)。白胺酸拉鏈及其序列為此項技術中熟知的，且在例如Busch及Sassone-Corsi (1990), Trends Genet 6: 36-40中綜述。在一些實施例中，共價及非共價兩個方法均可用於將可溶性TCR之 α 鏈及 β 鏈連接，例如 α 鏈及 β 鏈可均為經半胱胺酸修飾的以使得能夠形成二硫鍵，且包括白胺酸拉鏈域。

【0121】 因此，當所編碼特異性結合分子為可溶性TCR時，第一多肽及第二多肽可各自包含C端白胺酸拉鏈域。經截短 α 鏈及 β 鏈可如上文所描述。然而，如上所指出，若多肽鏈包含C端白胺酸拉鏈，則其不必引入額外半胱胺酸殘基來允許二硫鍵形成。因此， α 鏈之恆定區可包含SEQ ID NO: 29或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成。SEQ ID NO: 29之變體為與SEQ ID NO: 29具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列。 β 鏈之恆定區可包含SEQ ID NO: 30或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成。SEQ ID NO: 30之變體為與SEQ ID NO: 30具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列。

【0122】 在一特定實施例中，所編碼可溶性TCR包含含有SEQ ID NO: 54或其變體中所闡述之胺基酸序列的經截短 α 鏈；及含有SEQ ID NO: 56或其變體中所闡述之胺基酸序列的經截短 β 鏈。SEQ ID NO: 54為經截短 α 鏈之序列，該經截短 α 鏈由具有SEQ ID NO: 8之N端經截短可變區及具有SEQ ID NO: 29之C端經截短恆定區組成。SEQ ID NO: 56為經截短 β 鏈之序列，該經截短 β 鏈由具有SEQ ID NO: 10之N端經截短可變區及具有SEQ ID NO: 30之C端經截短恆定區組成。SEQ ID NO: 54之變體為與SEQ ID NO: 54具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。SEQ ID NO: 56之變體為與SEQ ID NO: 56具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。

【0123】 在另一實施例中，所編碼可溶性TCR包含：含有SEQ ID NO: 55或其變體中所闡述之胺基酸序列的經截短 α 鏈；及含有SEQ ID NO: 57或其變體中所闡述之胺基酸序列的經截短 β 鏈。SEQ ID NO: 55為經截短 α 鏈之序列，該經截短 α 鏈由具有SEQ ID NO: 9之可變區及具有SEQ ID NO: 29之C端經截短恆定區組成。SEQ ID NO: 57為經截短 β 鏈之序列，該經截短 β 鏈由具有SEQ ID NO: 10之可變區及具有SEQ ID NO: 30之C端經截短恆定區組成。SEQ ID NO: 55之變體為與SEQ ID NO: 55具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。SEQ ID NO: 57之變體為與SEQ ID NO: 57具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。

【0124】 具有SEQ ID NO: 54及55或其變體之經截短 α 鏈經編碼具

有前導序列。前導序列可為SEQ ID NO: 31之 α 鏈前導序列。具有SEQ ID NO: 56及57或其變體之經截短 β 鏈亦經編碼具有前導序列。前導序列可為SEQ ID NO: 32之 β 鏈前導序列。

【0125】 可將可溶性TCR編碼為單鏈可溶性TCR。較佳地，當將可溶性TCR編碼為單鏈時，藉由連接子，諸如SEQ ID NO: 18之2A連接子，將經截短 α 鏈及經截短 β 鏈連接。

【0126】 單鏈可溶性TCR可包含與具有SEQ ID NO: 25之經截短 β 鏈連接之具有SEQ ID NO: 23之經截短 α 鏈或由其組成。如上文所詳述，經截短 α 鏈可位於單鏈可溶性TCR之N端處，或經截短 β 鏈可位於單鏈可溶性TCR之N端處。在一特定實施例中，單鏈可溶性TCR包含SEQ ID NO: 27或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成。SEQ ID NO: 27按以下次序自N端至C端由以下組成：具有SEQ ID NO: 23之經截短 α 鏈、具有SEQ ID NO: 18之2A肽及具有SEQ ID NO: 25之經截短 β 鏈。SEQ ID NO: 27之變體為與SEQ ID NO: 27具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。

【0127】 替代地，單鏈可溶性TCR可包含與具有SEQ ID NO: 26之經截短 β 鏈連接之具有SEQ ID NO: 24之經截短 α 鏈或由其組成。在一特定實施例中，單鏈可溶性TCR包含SEQ ID NO: 28或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成。SEQ ID NO: 28按以下次序自N端至C端由以下組成：具有SEQ ID NO: 24之經截短 α 鏈、具有SEQ ID NO: 18之2A肽及具有SEQ ID NO: 26之經截短 β 鏈。SEQ ID NO: 28之變體為與SEQ ID NO: 28具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。

【0128】 如上文所詳述，具有SEQ ID NO: 23-26之經截短TCR鏈包含已引入至其恆定區中之半胱胺酸殘基。較佳地，SEQ ID NO: 27或SEQ ID NO: 28之變體包含在 α 鏈之恆定區之位置49、或對應於 α 鏈之恆定區之位置49之位置處的上文所描述的半胱胺酸殘基，及在 β 鏈之恆定區之位置57、或對應於 β 鏈之恆定區之位置57之位置處的上文所描述的半胱胺酸殘基。在經編碼為具有SEQ ID NO: 27或28之單鏈可溶性TCR之可溶性TCR中，藉由在所引入半胱胺酸殘基之間之二硫鍵，將多肽鏈連接。

【0129】 可溶性TCR之至少一條鏈可經編碼具有親和標記，該親和標記可用於可溶性TCR合成後之其純化中。此種標記可為熟習此項技術者已知之任何合適的標記，例如FLAG標記、His標記、HA標記、Strep標記、S標記、Myc標記、麩胱甘肽S轉移酶(GST)、麥芽糖結合蛋白(MBP)等。標記較佳地位於 α 或 β 鏈之C端處。因此，可溶性TCR可經編碼從而在其 α 及/或 β 鏈中，較佳地在鏈之C端處包含純化標記。可溶性TCR鏈可經編碼在主鏈序列(亦即可變區、經截短恆定區及(若存在)白胺酸拉鏈域)與純化標記之間具有連接子及/或蛋白酶裂解位點。適當的蛋白酶裂解位點為熟習此項技術者所熟知，且包括凝血酶、因子Xa、腸激酶、人類鼻病毒(HRV) 3C及菸草蝕刻病毒(TEV)裂解位點。替代地，標記可直接與經截短 α 或 β 鏈之C端連接。

【0130】 在另一實施例中，所提供之核酸分子編碼如上文所描述之特異性結合分子，該特異性結合分子包含含有 α 鏈之經截短恆定區的第一多肽及含有 β 鏈之經截短恆定區的第二多肽，其中該特異性結合分子為TCR-CAR。

【0131】 CAR為嵌合抗原受體。如熟習此項技術者所知，CAR通常

包含衍生自在抗原結合後與信號傳導尾部融合之抗體的單鏈Fv域(scFv)，轉導跨越細胞膜兩端的信號以活化免疫效應細胞(例如T細胞或NK細胞)的效應功能。CAR可在免疫療法，特定言之癌症免疫療法中，用於再引導免疫效應細胞針對所關注之靶標。CAR及其治療性用途描述於Maude等人(Blood, 第125(26)卷, 4017-4023, 2015)中。CAR免疫療法已在多個試驗中證實成功，但受到可用靶標之廣度限制。TCR-CAR係基於與標準CAR相同的理論基礎，但標準CAR之scFv用「可溶性TCR」取代。此得到一種具有CAR之功能性潛能但具有TCR之受質廣度(亦即其可針對由細胞蛋白質降解產生之任何肽)的構築體。TCR-CAR描述於Walseng等人(Scientific Reports 7: 10713, 2017)中。

【0132】 由所揭示之核酸分子編碼之TCR-CAR包含如上文所描述的第一多肽(亦即包含 α 鏈之可變區及 α 鏈之C端經截短恆定區)及如上文所描述的第二多肽(亦即包含 β 鏈可變區及 β 鏈之C端經截短恆定區)。在TCR-CAR中，第一多肽或第二多肽進一步包含跨膜域及一或多個胞內信號傳導域。跨膜域及胞內信號傳導域一起構成CAR信號傳導尾部。

【0133】 TCR-CAR可由免疫效應細胞，特定言之T細胞或NK細胞表現，以識別靶抗原-MHC複合物，且因此活化免疫效應細胞之效應功能。當由免疫效應細胞表現時，TCR-CAR位於膜(其為跨膜蛋白)處。TCR鏈之可變區及經截短恆定區為胞外的，且胞內信號傳導域為胞內的。

【0134】 如上所指出，在TCR-CAR中，第一多肽或第二多肽包含CAR信號傳導尾部。換言之，CAR信號傳導尾部與兩個多肽中之一者或另一者連接。CAR-TCR僅包含單一CAR信號傳導尾部，亦即CAR信號傳導尾部未與兩條多肽連接。CAR信號傳導尾部位於第一或第二多肽之C

端、TCR鏈之經截短恆定區之C端處。因此，第一或第二多肽按N端至C端次序包含：TCR鏈之可變區、TCR鏈之C端經截短恆定區及CAR信號傳導尾部。CAR信號傳導尾部可位於第一多肽鏈之C端處，或CAR信號傳導尾部可位於第二多肽鏈之C端處。

【0135】 CAR論述於WO 2017/118745 (其以引用之方式併入本文中)中，包括可包括於CAR中之合適的跨膜域及胞內信號傳導域。相同教示適用於TCR-CAR。跨膜域可基於或衍生自任何跨膜蛋白之跨膜域。通常其可為或可衍生自來自以下之跨膜域：CD8 α 、CD28、CD4、CD3 ζ 、CD45、CD9、CD16、CD22、CD33、CD64、CD80、CD86、CD134、CD137或CD154，較佳地來自人類的該蛋白質。在一個實施例中，跨膜域可為或可衍生自來自CD8 α 、CD28、CD4或CD3 ζ ，較佳地來自人類CD28、CD4或CD3 ζ 之跨膜域。在另一實施例中，跨膜域可為合成的，在此情況下，其將主要包含疏水性殘基，諸如白胺酸及纈胺酸。跨膜域可為人類TCR α 鏈恆定區或人類TCR β 鏈恆定區之跨膜域。

【0136】 在一較佳實施例中，跨膜域為人類CD28之跨膜域，其具有SEQ ID NO: 45或其變體之胺基酸序列。SEQ ID NO: 45之變體具有與SEQ ID NO: 45具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列。

【0137】 術語「胞內信號傳導域」在本文中係指CAR信號傳導尾部之一部分，該部分參與將有效TCR-CAR與靶抗原-MHC複合物結合之訊息轉導至表現TCR-CAR之免疫效應細胞的內部中，以引起效應細胞起作用，例如活化、細胞介素產生、增殖及/或細胞毒活性，包括向TCR-CAR結合的靶細胞釋放細胞毒性因子，或抗原與胞外CAR域結合所引起其他細

胞反應。術語「效應功能」係指細胞之專業化功能。T細胞之效應功能例如可為細胞溶解活性或輔助活性，包括分泌細胞介素。因此，術語「胞內信號傳導域」係指轉導效應功能信號且引導細胞執行專業化功能之蛋白質域。儘管可採用整個天然胞內信號傳導域，但在許多情況下，不必使用如在自然界中發現之整個域。至於使用胞內信號傳導域之截短部分的程度，此種截短部分可用於替代整個域，只要其轉導效應功能信號即可。術語胞內信號傳導域意欲包括足以轉導效應功能信號之胞內信號傳導域之任何截短部分。胞內信號傳導域亦稱為「信號轉導域」，且通常衍生自人類CD3 ζ 或FcR γ 鏈之部分。

【0138】 另外，為了使或為了加強免疫效應細胞之完全活化，TCR-CAR可具備二級或共刺激域。因此，胞內信號傳導域可起始抗原依賴性的一級活化(亦即可為一級細胞質信號傳導序列)，且共刺激域可以抗原非依賴性方式起作用以提供二級或共刺激信號(二級細胞質信號傳導序列)。一級細胞質信號傳導序列可調節一級活化，包括以抑制性方式。以共刺激方式起作用之一級細胞質信號傳導序列可含有信號傳導基元，該信號傳導基元被稱為基於免疫受體酪胺酸之活化基元或ITAM。

【0139】 可用於本發明中之含ITAM之一級細胞質信號傳導序列之實施例包括衍生自以下的彼等：TCR ζ 、FcR γ 、FcR β 、CD3 γ 、CD3 δ 、CD3 ϵ 、CD5、CD22、CD79a、CD79b及CD66d。在某些具體實施例中，胞內信號傳導域係衍生自CD3 ζ 或FcR γ ，較佳地人類CD3 ζ 或FcR γ 。

【0140】 在較佳的代表性實施例中，胞內信號傳導域為具有SEQ ID NO: 46或其變體中闡述之胺基酸序列之人類CD3 ζ 域。SEQ ID NO: 46之變體具有與SEQ ID NO: 46具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列

一致性之胺基酸序列。

【0141】術語「共刺激信號傳導域」或「共刺激域」係指CAR中包含共刺激分子之胞內域的部分。共刺激分子為細胞表面分子而非抗原受體或Fc受體，該等細胞表面分子提供在與抗原結合後，免疫效應細胞(例如T細胞)之有效活化及功能所需之第二信號。此類共刺激分子之實施例包括CD27、CD28、4-1BB (CD137)、OX40 (CD134)、CD30、CD40、PD-1、ICOS (CD278)、LFA-1、CD2、CD7、LIGHT、NKD2C、B7-H2及特異性結合CD83之配體，更特定言之此類分子之胞內域。較佳地，分子為人類的。因此，儘管例示性或較佳的共刺激域係衍生自4-1BB、CD28或OX40 (CD134)，但涵蓋其他共刺激域以與本文所描述之TCR-CAR一起使用。共刺激域可單獨或組合地(亦即可包括一或多個共刺激域)使用。包括一或多個共刺激信號傳導域可增強表現TCR-CAR之免疫效應細胞的功效及擴增。

【0142】在一實施例中，共刺激域可為或可包括具有SEQ ID NO. 58或其變體之胺基酸序列之人類CD28的胞內域。SEQ ID NO: 58之變體具有與SEQ ID NO: 58具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列。

【0143】胞內信號傳導域及共刺激信號傳導域可按任何次序與跨膜域之羧基端串聯連接。在一特定實施例中，CAR信號傳導尾部按以下次序自N端至C端包含：CD28跨膜域(或其變體)、CD28胞內域(或其變體)及CD3 ζ 胞內域(或其變體)。此種CAR信號傳導尾部(包含前述域之非變體序列)具有SEQ ID NO: 59中所闡述之胺基酸序列。

【0144】在TCR-CAR中，第一及第二多肽較佳地共價連接。兩條

多肽可藉由二硫鍵進行共價連接。特定言之，第一及第二多肽可各自包含已引入一或多個半胱胺酸殘基之經截短TCR鏈恆定區，如上文所論述。

【0145】 在一特定實施例中，TCR-CAR包含含有SEQ ID NO: 42或其變體中所闡述之胺基酸序列的第一多肽；及含有SEQ ID NO: 48或其變體中所闡述之胺基酸序列的第二多肽。SEQ ID NO: 48自N端至C端由以下組成：具有SEQ ID NO: 11之 β 鏈之可變區、具有SEQ ID NO: 22之 β 鏈之經截短恆定區、具有SEQ ID NO: 45之CD28跨膜域、具有SEQ ID NO: 58之CD28胞內信號傳導域及具有SEQ ID NO: 46之CD3 ζ 胞內信號傳導域。SEQ ID NO: 48之變體具有與SEQ ID NO: 48具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。較佳地，SEQ ID NO: 48之變體在 β 鏈之恆定區之位置57或對應於 β 鏈之恆定區之位置57之位置處，包含上文所描述的半胱胺酸殘基。

【0146】 在另一實施例中，TCR-CAR包含含有SEQ ID NO: 47或其變體中所闡述之胺基酸序列的第一多肽；及含有SEQ ID NO: 44或其變體中所闡述之胺基酸序列的第二多肽。SEQ ID NO: 47自N端至C端由以下組成：具有SEQ ID NO: 9之 α 鏈之可變區、具有SEQ ID NO: 21之 α 鏈之經截短恆定區、具有SEQ ID NO: 45之CD28跨膜域、具有SEQ ID NO: 58之CD28胞內信號傳導域及具有SEQ ID NO: 46之CD3 ζ 胞內信號傳導域。SEQ ID NO: 47之變體具有與SEQ ID NO: 47具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。較佳地，SEQ ID NO: 47之變體在 α 鏈之恆定區之位置49或對應於 α 鏈之恆定區之位置49之位置處，包含上文所描述的半胱胺酸殘基。

【0147】 第一及第二多肽兩者均經編碼具有N端前導序列。第一多

肽之前導序列可為SEQ ID NO: 31或其變體之 α 鏈之前導序列，且第二多肽之前導序列可為SEQ ID NO: 32或其變體之 β 鏈之前導序列。

【0148】 特定言之，第一多肽可由如上文所定義之胺基酸序列與SEQ ID NO: 31之N端前導序列組成，且第二多肽可由如上文所定義之胺基酸序列與SEQ ID NO: 32之N端前導序列組成。由SEQ ID NO: 47中所闡述之胺基酸序列與SEQ ID NO: 31之前導序列組成的TCR-CAR第一多肽的胺基酸序列闡述於SEQ ID NO: 60中；由SEQ ID NO: 48中所闡述之胺基酸序列與SEQ ID NO: 32之前導序列組成的TCR-CAR第二多肽的胺基酸序列闡述於SEQ ID NO: 61中。

【0149】 在其他實施例中，前導序列可為除SEQ ID NO: 31或32或其變體以外之前導序列，如上文所論述。

【0150】 可將TCR-CAR編碼為單鏈。如上文所描述，第一多肽可位於單鏈之N端處，或第二多肽可位於單鏈之N端處。第一及第二多肽可藉由連接子連接，如上文所描述。較佳地，第一及第二多肽藉由2A連接子，諸如具有SEQ ID NO: 18中所闡述之胺基酸序列之彼連接子連接。

【0151】 在特定實施例中，將TCR-CAR編碼為包含SEQ ID NO: 49或SEQ ID NO: 50、或SEQ ID NO: 49或SEQ ID NO: 50之變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成的單鏈。SEQ ID NO: 49或SEQ ID NO: 50之變體具有與SEQ ID NO: 49或SEQ ID NO: 50具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為CDR序列如上文所定義。較佳地，SEQ ID NO: 49或SEQ ID NO: 50之變體包含：在 α 鏈之恆定區之位置49或對應於 α 鏈之恆定區之位置49之位置處之上文所描述的半胱胺酸殘基；及在 β 鏈之恆定區之位置57或對應於 β 鏈之恆定區之位置57

之位置處之上文所描述的半胱胺酸殘基。

【0152】 SEQ ID NO: 49自N端至C端由具有SEQ ID NO: 60之第一多肽、具有SEQ ID NO: 18之2A肽及具有SEQ ID NO: 26之第二多肽組成。SEQ ID NO: 50自N端至C端由具有SEQ ID NO: 24之第一多肽、具有SEQ ID NO: 18之2A肽及具有SEQ ID NO: 61之第二多肽組成。

【0153】 在另一實施例中，核酸分子編碼如上文所描述之特異性結合分子，該特異性結合分子包含含有 α 鏈之經截短恆定區的第一多肽；及含有 β 鏈之經截短區域的第二多肽，其中特異性結合分子為TCR-抗體構築體。

【0154】 TCR-抗體構築體為包含如上文所描述之可溶性第一多肽及可溶性第二多肽的蛋白質，該等多肽中之一者與抗體之Fc區連接。第一及第二多肽為連接的，較佳地共價連接的。第一及第二多肽之共價連接可經由一或多個二硫鍵來達成。為此目的，可將一或多個半胱胺酸殘基引入至第一及第二多肽之經截短TCR鏈恆定區中，如上文所論述。

【0155】 TCR-抗體構築體在靶細胞上結合抗原-MHC複合物，如上文詳述。TCR-抗體構築體之Fc區由Fc受體結合。Fc受體由多種人類免疫效應細胞，包括B細胞、NK細胞、樹突狀細胞、巨噬細胞等表現。藉由TCR抗體構築體將此類細胞募集至靶細胞可起始細胞毒性細胞對靶細胞殺傷及針對靶細胞之較寬免疫反應。

【0156】 TCR-抗體構築體可包含兩個抗原結合位點。如熟習此項技術者所知，抗體包含兩條重鏈及兩條輕鏈。兩條重鏈包含三個恆定域(C_{H1} 至 C_{H3})。 C_{H1} 及 C_{H2} 域由可撓性鉸鏈區分開。在抗體中，兩條重鏈藉由形成於位於鉸鏈區內之半胱胺酸殘基之間的二硫鍵而共價連接。抗體重鏈之

Fc區包含C_H2及C_H3域，且亦可包含鉸鏈域。在其中Fc區包含鉸鏈域之TCR-抗體構築體中，包含抗體Fc區之多肽將經由鉸鏈域中之共價鍵而二聚化。因此TCR-抗體構築體可為二聚體特異性結合分子，包含兩條第一多肽及兩條第二多肽，及因此兩個抗原結合位點。

【0157】 抗體Fc區可與第一多肽或第二多肽連接。Fc區位於指定多肽之C端，經截短TCR恆定區之C端處。

【0158】 Fc區在抗體同型(及實際上同型類別)之間不同。「不同」意謂Fc區具有不同序列。Fc區亦在物種之間不同。因此舉例而言，給定人類抗體同型(例如IgG1)之Fc區具有與不同物種之IgG1抗體(例如鼠類IgG1抗體)之Fc區不同的序列。人類IgG1 Fc區亦具有與不同同型之人類抗體(例如人類IgA抗體)及相同同型之不同類別(例如人類IgG2抗體)之人類抗體的Fc區不同的序列。由本文揭示之核酸分子編碼之TCR-抗體構築體之Fc區較佳地為人類Fc區，亦即人類抗體之Fc區。Fc區最佳地為人類IgG抗體，例如人類IgG1、IgG2、IgG3或IgG4抗體之Fc區。人類IgG1重鏈恆定區具有UniProt寄存編號P01857；人類IgG2重鏈恆定區具有UniProt寄存編號P01859；人類IgG3重鏈恆定區具有UniProt寄存編號P01860；人類IgG4重鏈恆定區具有UniProt寄存編號P01861。每一條UniProt條目含有恆定區內之每一個域的位置詳情，呈現容易地衍生自UniProt條目之Fc區的序列。

【0159】 TCR-抗體構築體之每一條鏈經編碼具有N端前導序列。N端前導序列可如上文所論述。亦可將第一及第二多肽編碼為由連接子，較佳地自我剪接連接子分開的單鏈，如上文所詳述。

【0160】 出於構築體純化之目的，TCR-抗體構築體之第一或第二多

肽可經編碼具有C端親和標記。此類親和標籤在上文論述。

【0161】 如上文所詳述，本文中所揭示之核酸分子可編碼特異性結合分子，該特異性結合分子包含含有 α 鏈之可變區的第一多肽及含有 β 鏈之可變區的第二多肽，其中將特異性結合分子編碼為包含與第二多肽連接的第一多肽的單鏈。在特定此種實施例中，由本文揭示之核酸分子編碼之特異性結合分子為嵌合TCR。

【0162】 嵌合TCR類似於TCR-CAR，且描述於WO 2000/031239中。嵌合TCR包含單鏈TCR可變區(scFv-TCR)、跨膜域及一或多個胞內信號傳導域。跨膜域及胞內信號傳導域構成CAR信號傳導尾部，對應於TCR-CAR中使用之彼CAR信號傳導尾部。嵌合TCR可等效於TCR-CAR使用，亦即其可在免疫效應細胞中表現以再引導細胞針對靶抗原。

【0163】 scFv-TCR包含如上文所描述之 α 鏈之可變區及如上文所描述之 β 鏈之可變區。嵌合TCR之信號傳導尾部可如上文關於TCR-CAR所定義。嵌合TCR按N端至C端次序包含：scFv-TCR、跨膜域及一或多個胞內信號傳導域。

【0164】 在scFv-TCR中， α 鏈之可變區可藉由連接子而與 β 鏈之可變區連接。在此情況下，連接子不為自我剪接的。較佳地，其不含有蛋白酶裂解位點或任何其他裂解位點。適當連接子為熟習此項技術者所已知。例示性連接子為G₄S連接子。G₄S連接子包含四個甘胺酸殘基隨後絲胺酸殘基之重複單元(亦即序列基元Gly-Gly-Gly-Gly-Ser (SEQ ID NO:67)之重複序列)。熟習此項技術者能夠選擇具有適當數目之重複，例如3或4個重複的G₄S連接子。在scFv-TCR中， α 鏈之可變區可位於 β 鏈之可變區的N端，或 β 鏈之可變區可位於 α 鏈之可變區的N端。scFv-TCR較佳地經編碼

具有單一N端前導序列，其將嵌合TCR引導至細胞膜。

【0165】 嵌合TCR可進一步包含 α 鏈之恆定區或 β 鏈之恆定區。TCR鏈之恆定區位於scFv-TCR與跨膜域之間，亦即scFv-TCR之C端及跨膜域之N端。TCR鏈之恆定區為如上文所描述C端截短的，且因此不包含跨膜域或胞內域。經截短恆定區可為 α 鏈之經截短恆定區，且特定言之可包含SEQ ID NO: 29或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成。經截短恆定區可為 β 鏈之經截短恆定區，且特定言之可包含SEQ ID NO: 30或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成。若嵌合TCR包含TCR鏈之恆定區，則其較佳包含僅TCR鏈之單一恆定區，亦即 α 鏈之恆定區或 β 鏈之恆定區，而非 α 鏈之恆定區及 β 鏈之恆定區。

【0166】 hTERT-TCR-1 α 鏈之核苷酸序列闡述於SEQ ID NO: 62中，且hTERT-TCR-1 β 鏈之核苷酸序列闡述於SEQ ID NO: 63中。基於本文提供之資訊，鑑別編碼TCR鏈之不同部分之原生DNA序列內之區，對於熟習此項技術者而言將為簡單的。2A自我剪接肽之核苷酸序列闡述於SEQ ID NO: 64中。然而，一般熟習此項技術者應瞭解，由於基因密碼之簡併，除原生序列以外，有許多種可編碼各個別如本文所描述之特異性結合分子的核苷酸序列。

【0167】 本文中所揭示之核酸分子可為經分離之核酸分子，且可包括DNA (包括cDNA)或RNA、或DNA或RNA之化學衍生物，包括具有放射性同位素或化學加合物(諸如螢光團、發色團或生物素(「標記」))的分子。因此，核酸可包含經修飾的核苷酸。該等修飾包括鹼基修飾，諸如溴尿苷；核糖修飾，諸如阿拉伯糖苷及2',3'-二去氧核糖；及核苷酸間鍵聯修飾，諸如硫代磷酸酯、二硫代磷酸酯、硒代磷酸酯、二硒代磷酸酯、苯

胺硫代磷酸酯、苯胺磷酸酯及磷醯胺酸酯。術語「核酸分子」具體地包括單鏈及雙鏈形式之DNA及RNA。如本文所用，「分離」意謂所討論之物種為任何溶液或提供其之諸如此類的形式的主要組分(亦即大部分組分)。

【0168】 用於構築如本文所定義之核苷酸序列及用於修飾核苷酸序列以向各種特異性結合分子序列之胺基酸序列中引入變化之方法為此項技術中所熟知，例如可採用誘變方法，諸如位點特異性誘變。用於製備編碼特異性結合分子之核酸分子的方法包括例如習知的聚合酶鏈式反應(PCR)選殖技術。

【0169】 舉例而言，可將核酸分子選殖至通用選殖載體，諸如pENTR (Gateway)、pUC19、pBR322、pBluescript載體(Stratagene Inc.)或來自Invitrogen Inc之pCR TOPO[®]中。隨後，可將攜帶編碼特異性結合分子之核酸分子之所得核酸構築體(重組型載體)次選殖至用於例如在哺乳動物細胞中表現蛋白質之表現載體或病毒載體中。此可用於製備特異性結合分子，或用於在免疫效應細胞，例如人類T細胞或細胞株或其他人類免疫效應細胞中表現。此外，可將核酸引入至用於生產編碼特異性結合分子之mRNA的mRNA表現載體中。隨後，可將mRNA轉移至免疫效應細胞中。

【0170】 用於分離核酸分子之方法亦此項技術中熟知。舉例而言，可使用合適的套組來分離DNA。可使用Miniprep或Maxiprep套組，根據製造商之說明書，自細菌分離質體DNA。此類套組獲自例如Qiagen (德國)。可使用例如QIAamp DNA小型套組(Qiagen)或DNeasy套組(Qiagen)，根據製造商之說明書，自真核或原核細胞提取基因組DNA。替代地，可使用酚-氯仿提取之傳統方法來自所關注之細胞分離DNA。此類

傳統方法為此項技術中所熟知。

【0171】 如上文所詳述，本文提供之核酸分子可包含本發明之特異性結合分子序列之變體。當核酸分子編碼包含如上文所定義之「變體」之特異性結合分子時，變體為功能變體。如本文所定義之「功能變體」為如上文所詳述，相對於原生或所定義之參考序列經修飾，但其保持參考序列之功能，亦即修飾不破壞特異性結合分子之功能性的序列。

【0172】 因此，舉例而言，TCR鏈之可變區之變體保持原生TCR鏈結合靶抗原之能力，且包含該變體可變區之特異性結合分子能夠結合靶抗原且活化下游信號傳導路徑。類似地，TCR鏈之恆定區之變體不抑制包含變體恆定區之特異性結合分子結合靶標且活化下游信號傳導路徑的能力。2A自我剪接肽之變體在上文論述。跨膜域及胞內信號傳導域之變體保留原生域之活性及基本結構特徵，例如不抑制與信號傳導搭配物的相互作用等。

【0173】 可藉由測試包含變體序列之特異性結合分子相對於另外當量之包含對應原生序列之特異性結合分子的活性，來測試變體之功能性。如上所指出，功能變體序列保持對應未經修飾序列之功能。功能變體序列可保留對應未經修飾序列之活性的至少60%，較佳地未經修飾序列之活性的至少65、70、75、80、85、90、95或100%。可藉由本領域中已知的任何方法來分析特異性結合分子功能性。此類方法為熟習此項技術者所已知，且呈現於下文實例中。舉例而言，可藉由使用例如表面電漿子共振或熱波動分析，分析分子與其靶標之結合，來測試可溶性特異性結合分子的活性。可藉由測試非可溶性特異性結合分子活化表現其之細胞效應功能的能力，來分析其活性。可在例如功能性分析中測試此類特異性結合分子，

其中量測回應於暴露於抗原之細胞介素釋放或靶細胞殺傷。此類分析呈現於下文實例中。

【0174】 變體序列係根據其與參考序列之序列一致性來定義。可藉由任何便利方法來評定序列一致性。然而，對於測定序列之間的序列一致性程度，使得成對序列比對或多序列比對之電腦程式為適用的，例如如上文所論述，EMBOSS Needle或EMBOSS stretcher可用於成對序列比對，而Clustal Omega或MUSCLE可用於多序列比對，但可使用任何其他適當的程式。無論比對是成對比對還是多序列比對，必須全局(亦即跨越參考序列之全部)而不是局部進行。用於序列比對中之合適的參數在上文論述。

【0175】 在另一態樣中，本發明提供一種重組構築體，其包含與異源核酸序列連接之本文所描述的核酸分子。如本文所用，「異源」意謂不是天然地與本文所描述之核酸分子連接之核酸序列，亦即其在自然界中不與本文所描述之核酸分子連接。在構築體中，本文所描述之核酸分子可側接限制位點(亦即由一或多個限制酶識別之核苷酸序列)，以使得能夠容易選殖本發明之核酸分子。「重組」構築體為使用重組技術，例如分子選殖合成之核酸構築體。

【0176】 如本文所用，關於構築體之術語「連接」，可能僅意謂核酸分子直接與異源核酸序列連接。在一較佳實施例中，在重組構築體中，本文揭示之核酸分子以可操作方式與異源表現控制序列連接(亦即，較佳地，術語「連接」意謂「可操作地連接」)。

【0177】 術語「表現控制序列」係指位於編碼序列上游(5'非編碼序列)、內或下游(3'非編碼序列)，且其影響相關編碼序列之轉錄、RNA加工

或穩定性或轉譯(亦即，其影響所編碼特異性結合分子之表現之任何態樣)的核苷酸序列。如本文所定義之表現控制序列特定言之係指順式調節元件。表現控制序列包括啟動子、啟動子元件(諸如TATA盒或B識別元件)、操縱子、增強子、轉譯前導序列、終止子序列及諸如此類。如本文所用，術語「啟動子」係指能夠控制編碼序列或RNA之表現的核苷酸序列。合適的實例在下文提供。一般而言，編碼序列位於啟動子序列之3'端。啟動子可全部來源於天然基因或由來源於自然界中發現之不同啟動子之不同元件構成或甚至包含合成的核苷酸區段。將進一步認識到，由於在大多數情況下，調節序列之精確邊界尚未完全界定，所以不同長度之核酸片段可具有相同調節活性。

【0178】 在構築體中，本文中所揭示之核酸分子可以可操作方式與一或多個異源表現控制序列連接。本文揭示之核酸分子通常以可操作方式與至少一啟動子連接。合適的啟動子序列包括：巨細胞病毒(CMV)啟動子，特定言之人類CMV (HCMV)啟動子；PGK啟動子；EF1a啟動子；組成性猴病毒40 (SV40)早期啟動子；小鼠乳腺腫瘤病毒(MMTV)啟動子；HIV LTR啟動子；MoMuLV啟動子；禽類白血病毒啟動子；EBV即刻早期啟動子；及勞斯(Rous)肉瘤病毒啟動子。亦可使用人類基因啟動子，包括(但不限於)肌蛋白啟動子、肌凝蛋白啟動子、血紅素啟動子及肌酸激酶啟動子。在某些實施例中，可使用誘導性啟動子。此等提供能夠啟動或關閉核酸分子之表現的分子開關。誘導性啟動子之實例包括(但不限於)金屬硫蛋白啟動子、糖皮質激素啟動子、孕酮啟動子或四環素啟動子。熟習此項技術者能夠視例如待在其中表現其之細胞類型及表現之目的而定，來選擇合適的啟動子用於驅動所編碼特異性結合分子之表現。

【0179】 術語「可操作地連接」係指單一核酸片段上之兩個或更多個核酸分子結合，使得一者之功能受另一者影響。舉例而言，在啟動子能夠影響編碼序列之表現時，該啟動子可操作地與該編碼序列連接(亦即編碼序列在該啟動子之轉錄控制下)。編碼序列可操作地與有義或反義取向的調節序列連接。

【0180】 用於製備如本文所提供之構築體之方法為此項技術中所熟知，例如習知的聚合酶鏈式反應(PCR)選殖技術可如所描述用於合成本文中所揭示之核酸分子，可使用已知方法，例如選殖，使用限制酶或Gibson組裝，將該核酸分子插入至合適的構築體(例如含有異源表現控制序列之彼等構築體)中。

【0181】 在另一態樣中，本發明提供一種載體，其包含本文所描述之核酸分子或重組構築體。如本文所用，術語「載體」係指可將本發明之核酸分子或構築體引入(例如共價插入)至其中之媒劑，藉由該媒劑，可表現由所揭示之核酸分子編碼的特異性結合分子及/或選殖核酸分子/構築體。因此，載體可為選殖載體或表現載體。

【0182】 可使用此項技術中已知之任何合適的方法來將本發明之核酸分子或構築體插入至載體中，例如(但不限於)，載體及核酸分子可使用適當限制酶消化，且隨後可與具有匹配黏性末端之核酸分子連接，或視需要可使用鈍末端選殖將經消化核酸分子連接至經消化載體中。

【0183】 載體之實施例包括質體、自主複製序列及轉位元件。額外例示性載體包括(但不限於)：噬菌粒；黏質體；人工染色體，諸如酵母人工染色體(YAC)、細菌人工染色體(BAC)或P1源性人工染色體(PAC)；噬菌體，諸如 λ 噬菌體或M13噬菌體；及動物病毒，特定言之人類病毒(亦即

病毒載體)。適用作載體之動物病毒類別之實施例包括(但不限於)：反轉錄病毒(包括慢病毒)、腺病毒、腺相關病毒、疱疹病毒(例如單純疱疹病毒)、痘病毒、桿狀病毒、乳突狀瘤病毒及乳多泡病毒(例如SV40)。表現載體之實施例為：用於在哺乳動物細胞中表現的pCl-neo載體(Promega)；及用於在哺乳動物細胞中慢病毒介導的基因轉移及表現的pLenti4/V5-DEST™及pLenti6/V5-DEST™。

【0184】載體可為細菌或原核載體(亦即，用於在細菌或原核細胞中例如選殖或表現之載體)或真核載體(亦即，用於哺乳動物細胞中之載體)，特定言之哺乳動物載體。可在通用選殖載體，特定言之細菌選殖載體，例如大腸桿菌(*Escherichia coli*)選殖載體中生產本發明之核酸分子或構築體，或可將本發明之核酸分子或構築體引入至該通用選殖載體中。通常，選殖載體為細菌質體，特定言之大腸桿菌(*E. coli*)質體。此類選殖載體之實施例包括pUC19 (獲自例如New England Biolabs(NEB)，美國)、pBR322 (亦獲自NEB)、pBluescript載體(Agilent，美國)及來自Thermo Fisher Scientific之pCR TOPO®載體，例如pCR2.1-TOPO。

【0185】可將本發明之核酸分子或構築體次選殖至用於表現本發明之特異性結合分子之表現載體(特定言之哺乳動物表現載體)中。表現載體可含有多種表現控制序列。

【0186】表現載體應具有必需的5'上游及3'下游調節元件，諸如啟動子序列(上文在本發明之構築體之上下文中論述)，包括TATA盒、在轉譯起始位點處之Kozak序列及用於信號轉錄終止之3' UTR AATAAA聚腺苷酸化信號序列，以用於在其個別宿主細胞中有效基因轉錄及轉譯。此外，表現載體可含有5'及3'非轉譯的調節序列，該等調節序列用作可促進

或增強核酸分子之有效轉錄之增強子序列。

【0187】 除控管轉錄及轉譯之控制序列以外，載體可含有提供其他功能，包括例如載體複製、可選擇標記等之額外核酸序列。尤其適合於細菌宿主細胞之選擇之可選擇標記之實施例包括抗生素抗性基因，諸如胺苄青黴素(ampicillin)抗性基因(例如 β -內醯胺酶)、卡那黴素(kanamycin)抗性基因或氯黴素(chloramphenicol)抗性基因(例如氯黴素乙醯轉移酶)。尤其適用於哺乳動物宿主細胞之可選擇標記包括潮黴素-B磷酸轉移酶基因(hph) (其賦予對潮黴素B之抗性)、來自Tn5之胺基糖苷磷酸轉移酶基因(neo或aph) (其編碼對抗生素G418之抗性)、二氫葉酸還原酶(DHFR)基因、腺苷脫胺酶基因(ADA)及多抗藥性(MDR)基因。此類可選擇標記允許活體外選擇攜帶載體之細胞。

【0188】 載體可包含使得攜帶載體之免疫效應細胞活體內易受負選擇影響之標記。包括此種標記允許在已投與攜帶該載體之免疫效應細胞之個體(例如使用授受細胞療法治療之患者)中選擇性破壞此類細胞。當例如患者經歷治療之嚴重副作用時，此可為重要的。陰性可選表型可由賦予對所投與藥劑(例如化合物)之敏感性之基因的插入而產生。陰性可選擇基因為此項技術中已知的，且尤其包括以下：單純疱疹病毒I型胸苷激酶(HSV-I TK)基因(Wigler等人, Cell 11 (1):223-232, 1977)，其賦予更昔洛韋(ganciclovir)敏感性；及細菌胞嘧啶脫胺酶，其賦予5-氟胞嘧啶敏感性(Mullen等人, Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 89:33-37 (1992))。因此，本文中所揭示之載體可包含此種基因。替代地，載體可包含編碼使得能夠使用抗體靶向攜帶該載體之免疫效應細胞之非天然膜蛋白的基因。用於陽性及/或負選擇之合適標記為熟習此項技術者已知的，且可由熟習此項技術者

選擇。

【0189】 在一實施例中，載體包含用於正選擇之標記及用於負選擇之標記兩者。較佳地，將陽性可選標記及陰性可選元件連接，使得丟失陰性可選元件亦必然伴有丟失陽性可選標記。甚至更佳地，將陽性及陰性可選標記融合，使得丟失一者強制性地造成丟失另一者。產生賦予上文所描述之所需陽性及負選擇特徵兩者之表現產物多肽之融合聚核苷酸的實例為潮黴素磷酸轉移酶-胸苷激酶融合基因(HyTK)。此基因之表現產生賦予用於活體外正選擇之潮黴素B抗性及用於活體內負選擇之更昔洛韋敏感性的多肽。(參見Lupton S. D.等人Mol. and Cell. Biology 11:3374-3378, 1991。)

【0190】 在某些實施例中，病毒載體為較佳的。病毒載體可衍生自反轉錄病毒，特定言之慢病毒或泡沫病毒(spumavirus/foamyvirus)。如本文所用，術語「病毒載體」係指攜帶本文中所揭示之核酸分子或構築體，且能夠將核酸分子/構築體遞送至靶細胞的病毒源性顆粒。病毒載體可含有替代非必需病毒基因之本發明之核酸分子，或除原生病毒基因以外，病毒載體可含有本發明之核酸分子。載體可以用於在活體外或離體將DNA、RNA或其他核酸轉移至細胞中的目的。

【0191】 此項技術中已知多種病毒載體形式，且可根據本發明教示來使用任何合適的病毒載體，包括單鏈及雙鏈兩者的RNA病毒載體及DNA病毒載體。單鏈病毒載體可為正義或反義病毒載體。在某些實施例中，病毒載體為反轉錄病毒載體(亦即衍生自反轉錄病毒之病毒載體)，特定言之慢病毒載體(亦即衍生自慢病毒之病毒載體)。反轉錄病毒為單鏈正義RNA病毒，其將其基因組整合至經感染宿主細胞之基因組中。慢病毒

為引起緩慢發展疾病之一群(或種屬)反轉錄病毒。包括在此群內之病毒包括HIV (人類免疫缺乏病毒；包括1型HIV及2型HIV)。因為反轉錄病毒基因組整合至經感染細胞之基因組中，如本文所描述之反轉錄病毒載體可用於穩定地轉導靶細胞，亦即永久性更改靶細胞之基因構成。

【0192】 病毒載體可為自身滅活載體或複製缺陷型載體。複製缺陷型載體為此項技術中已知的。可藉由例如對病毒基因組之3'LTR增強子-啟動子區(稱為U3區)之防止第一輪病毒複製後之病毒轉錄的修飾(例如缺失或取代)，來獲得複製缺陷型反轉錄病毒。因此，載體能夠感染且隨後整合至宿主基因組中僅一次，且不能進一步傳代。

【0193】 用於本文中之反轉錄病毒載體可衍生自任何已知反轉錄病毒，例如C型反轉錄病毒，諸如Moloney鼠類肉瘤病毒(M-MSV)、Harvey鼠類肉瘤病毒(Ha-MuSV)、小鼠乳腺腫瘤病毒(MMTV)、長臂猿白血病毒(GaLV)、貓白血病毒(FLV)、泡沫病毒、弗蘭德(Friend)病毒、鼠類幹細胞病毒(MSCV)及勞斯肉瘤病毒(RSV)；人類T細胞白血病毒，諸如HTLV-1及HTLV-2；及反轉錄病毒之慢病毒家族，諸如人類免疫缺乏病毒HIV-1及HIV-2、猿猴免疫缺乏病毒(SIV)、貓免疫缺乏病毒(FIV)、馬免疫缺乏病毒(EIV)及其他反轉錄病毒類別。

【0194】 反轉錄病毒封裝細胞株(通常哺乳動物細胞株)可用於產生病毒載體，其隨後可用於轉導T細胞。藉由用攜帶病毒顆粒組裝之必需基因之一或多個載體(例如質體)轉染，封裝細胞株可用於產生病毒載體。熟習此項技術者能夠產生病毒載體而無需特定指導。說明性病毒載體描述於以下中：WO 2002/087341、WO 2002/083080、WO 2002/082908、WO 2004/000220及WO 2004/054512。用於產生反轉錄病毒載體之例示性質

體為pMP71，如Wälchli等人2011中所描述。其他適合質體包括pBABE、pWZL、pMCs-CAG、pMXs-CMV、pMXs-EF1 α 、pMXs-IRES、pMXs-SR α 及pMYs-IRES。

【0195】 mRNA載體為包含上文所描述之核酸分子或構築體之正義mRNA鏈。mRNA載體為可轉譯mRNA鏈，其在遞送至靶細胞後，可結合核糖體且起始所編碼蛋白質之合成。mRNA載體為有利的，此係由於其不需要進入細胞核或轉錄以起始其所編碼蛋白質之產生，但可實際上直接結合細胞質核糖體且起始轉譯。因此，用mRNA載體轉染靶細胞，可用於快速產生所編碼特異性結合分子。RNA僅具有有限半衰期，此係由於其固有不穩定性，且因此mRNA載體可用於瞬時轉染靶細胞。

【0196】 mRNA載體包含用於轉譯之基本元件，例如用於核糖體識別之5' 7-甲基鳥苷酸帽及聚腺苷酸化尾部。可使用細胞系統，根據此項技術中已知之方法，由mRNA表現載體產生mRNA載體。合適的mRNA表現載體包括pCIP102 (Sæbøe-Larssen等人, 2002, *J. Immunol. Methods* 259: 191-203)及pCIP120-G (Wälchli等人, 2011, *PLoS ONE* 6(11): e27930)。替代地，可使用無細胞系統，例如藉由活體外轉錄，生產mRNA載體。此類系統為此項技術中熟知的，需要包含待轉錄之基因及合適啟動子之DNA模板，且利用RNA聚合酶，一般噬菌體RNA聚合酶。用於執行活體外轉錄之套組可自獲得例如Thermo Fisher Scientific (例如MEGAscript™ SP6轉錄套組)。

【0197】 在另一態樣中，本發明提供一種宿主細胞，其包含如上文所描述之核酸分子、構築體或載體。所編碼特異性結合分子對於宿主細胞為異源的。換言之，所編碼特異性結合分子不天然地(亦即在自然界中)由

宿主細胞表現。此種宿主細胞可為任何合適的宿主細胞，包括選殖宿主細胞、生產宿主細胞或免疫效應細胞。宿主細胞可來源於任何物種，且實際上適於其功能之任何生命域(domain of life)。舉例而言，宿主細胞可為原核(例如細菌)或真核(例如哺乳動物)細胞。

【0198】 可使用此項技術中已知之任何適當技術，將核酸分子、構築體或載體引入至宿主細胞中。用於將核酸分子、構築體或載體引入至原核細胞中之適當技術包括轉化、轉導及接合(conjugation)。轉化係指藉由直接吸收DNA而對感受態細菌進行基因改變。轉導係指使用噬菌體感染細菌以便引入所關注之DNA。接合係指遺傳物質在直接接觸之細菌細胞之間之直接轉移。用於執行此等程序之方法為此項技術中熟知的。

【0199】 藉由轉染，將核酸分子、構築體或載體引入至真核生物細胞中。術語「轉染」係指藉由其將外源核酸分子引入至宿主真核(特定言之動物)細胞中之方法。轉染可藉由此項技術中多種之已知方法實現，包括(但不限於)磷酸鈣-DNA共沈澱、DEAE-聚葡萄糖介導之轉染、凝聚胺介導之轉染、電穿孔、顯微注射、脂質體融合、脂質體轉染、原生質體融合、轉導及基因槍。轉導係指使用病毒載體藉助於病毒感染靶細胞來遞送核酸分子。

【0200】 可將核酸分子、構築體或載體整合於宿主細胞該基因組中，或將其維持在染色體外。可將核酸暫時維持在宿主細胞中，或可為穩定的。

【0201】 特定言之，原核細胞可用作上文所描述之核酸分子、構築體或載體的選殖宿主。用作選殖宿主之合適的原核細胞包括(但不限於)真細菌，諸如革蘭氏陰性或革蘭氏陽性生物體，例如腸桿菌科(諸如埃希氏

桿菌屬(*Escherichia*)，特定言之大腸桿菌)及桿菌(諸如枯草桿菌(*B. subtilis*))。替代地，選殖宿主可為真核生物細胞，諸如真菌細胞，例如甲醇酵母(*Pichia pastoris*)或酵母細胞，或甚至更高級的真核生物細胞，諸如哺乳動物細胞。熟習此項技術者能夠選擇合適的選殖宿主而無需特定指導。合適的選殖宿主可市售獲得，例如感受態大腸桿菌細胞可獲自NEB (NEB 5- α)及Thermo Fisher Scientific (One Shot™ TOP10)。替代地，選殖宿主可使用熟習此項技術者已知之技術經由培養來獲得。

【0202】 在一特定實施例中，宿主細胞為免疫效應細胞，且核酸分子、構築體或載體編碼包含跨膜域之特異性結合分子(例如，其可為全長TCR、TCR-CAR或嵌合TCR)。免疫效應細胞在上文定義。如所描述，代表性免疫效應細胞包括T細胞，特定言之細胞毒性T細胞(CTL；CD8+ T細胞)及輔助T細胞(HTL；CD4+ T細胞)及NK細胞。T細胞之其他群體亦適用於本文，例如初始T細胞及記憶T細胞。其他免疫效應細胞包括NKT細胞、嗜中性白血球及巨噬細胞。

【0203】 如本文所用，術語「免疫效應細胞」不僅包括成熟或完全分化的免疫效應細胞，且亦包括其前體(或先驅)細胞，包括幹細胞(更特定言之造血幹細胞HSC)或衍生自HSC之細胞。因此，免疫效應細胞可為衍生自HSC含於CD34+細胞群體內之細胞，該CD34+細胞群體來源於造血組織，例如來源於骨髓、臍帶血或血液(例如可動性周邊血液)，在向個體投與該細胞後分化為成熟免疫效應細胞，或可經誘導以活體內或活體外分化為免疫效應細胞。

【0204】 免疫效應細胞較佳地在其表面上表現所編碼特異性結合分子。所編碼特異性結合分子之「表現」意謂，將基因，亦即編碼特異性結

合分子之核苷酸序列，轉錄且轉譯以便產生所編碼特異性結合分子。核酸分子之表現可為組成性或誘導性的，其視用於驅動該基因之表現的啟動子而定。對於熟習此項技術者而言，在宿主細胞中表現基因為簡單的，但可能需要將表現條件最佳化。此完全在熟習此項技術者之能力內。當免疫效應細胞在其表面上表現所編碼特異性結合分子時，特異性結合分子為活性的。在其表面上表現所編碼特異性結合分子之免疫效應細胞，可使用例如流式細胞測量術來鑑別及分離。

【0205】 T細胞及NK細胞代表較佳的宿主免疫效應細胞。T細胞可為任何T細胞。其可為細胞毒性T細胞(CD8⁺ T細胞)、輔助T細胞(CD4⁺ T細胞)、初始T細胞、記憶T細胞或任何其他類型的T細胞。較佳地，T細胞為CD4⁺或 CD8⁺ T細胞。如本文所定義，本發明之T細胞亦可為未成熟的T細胞，諸如CD4⁻/CD8⁻細胞或CD4⁺/CD8⁺細胞、或T細胞之先驅細胞。

【0206】 術語「NK細胞」係指大型顆粒淋巴球，為衍生自不天然地包含抗原特異性受體(例如T細胞受體或B細胞受體)之常見淋巴細胞性先驅細胞的細胞毒性淋巴細胞。天然存在的NK細胞之特徵可在於，當藉由抗CD3 ϵ 或抗CD3 δ 抗體及抗CD56抗體分析時的其CD3⁻、CD56⁺表型。因此，如本文所用，該術語包括任何已知NK細胞或任何NK樣細胞或具有NK細胞特徵之任何細胞。因此，可使用初代NK細胞，或在一替代實施例中，可使用先前已分離且培養之此項技術中已知的NK細胞。因此，可使用NK細胞株。已知多種不同NK細胞且報導於文獻中，且可使用此等中之任一者，或細胞株可例如藉由病毒轉化由初代NK細胞來製備(Vogel等人 2014, Leukemia 28:192-195)。合適的NK細胞包括(但決不限於) NK-92、NK-YS、NK-YT、MOTN-1、NKL、KHYG-1、HANK-1及NKG細胞

株。特定言之，細胞可為NK-92細胞(Gong等人 1994, *Leukemia* 8:652-658)或其變體。已製備出多種不同的初始NK-92細胞變體，且進行描述或為可獲得的，包括為非免疫原性之NK-92變體。可使用任何此類變體，且其包括於術語「NK-92」中。亦可使用其他細胞株之變體。

【0207】 WO 2016/116601描述可如何在NK細胞中功能上表現TCR。如其中所詳述，當TCR與CD3鏈共表現時，可尤其在NK細胞中功能上表現TCR。

【0208】 如本文中所揭示之免疫效應細胞較佳地為人類的。此種免疫效應細胞可來源於任何人類個體。較佳地，當免疫效應細胞係用於醫療用途時，其為自體免疫效應細胞；亦即其來源於待治療之患者，此確保組織相容及非免疫原性，意謂一旦進行基因修飾，其將不誘導來自患者的免疫反應。當免疫效應細胞為用於醫療用途之非自體細胞(亦即其為自除患者以外之個體獲得之供體細胞)時，較佳的是，其為非免疫原性的，使得在向個體投與時，其不產生影響、干擾或防止在療法中使用該等細胞的免疫反應。因此，如本文中所揭示之宿主免疫效應細胞可為離體細胞。其可替代地或亦為活體外細胞。

【0209】 若非自體免疫效應細胞對於患者為HLA匹配的，亦即其表現相同HLA等位基因，則其可為天然非免疫原性的。非自體免疫效應細胞(包括對於患者不為HLA匹配且因此將為免疫原性的彼等免疫效應細胞；及對於患者為HLA匹配且可不為免疫原性的彼等免疫效應細胞)，可經修飾以消除MHC分子之表現，或在其表面處僅微弱表現MHC分子。替代地，此類細胞可經修飾以表現非功能性MHC分子。

【0210】 涵蓋破壞功能性MHC分子之表現之任何方法。因此，此可

包括基因剔除MHC複合物之分子或減少其之基因表現，及/或其可包括防止適當運輸至細胞表面及/或在細胞表面處正確表現MHC分子或全複合物的修飾。

【0211】 特定言之，在本發明之免疫效應細胞表面處之一或多個功能性MHC I類蛋白質之表現可被破壞。在一個實施例中，免疫效應細胞可為HLA陰性之人類細胞，諸如其中一或多個HLA分子(例如，HLA I類MHC複合物之分子)之表現被破壞(例如基因剔除)的細胞。

【0212】 在一較佳實施例中，I類MHC表現之破壞可藉由基因剔除編碼 β_2 -微球蛋白(β_2 -m) (一種成熟I類MHC複合物之組分)之基因來進行。 β_2 -m之表現可經由以下來消除：對 β_2 -m基因之定向破壞，例如藉由 β_2 -m啟動子之定點誘變(以使啟動子失活)，或在編碼 β_2 -m蛋白之基因內引入防止 β_2 -m蛋白之表現的滅活突變，例如在該基因內之框移突變或提前「終止」密碼子。替代地，定點誘變可用於產生不能在細胞表面處形成活性MHC蛋白之非功能性 β_2 -m蛋白。以此方式， β_2 -m蛋白質或MHC可保留在胞內，或可存在於細胞表面處但為非功能性的。

【0213】 替代地，在向個體投與之前，免疫效應細胞可經照射。不希望受理論所束縛，認為，照射細胞導致該等細胞僅瞬時存在於個體中，因此減少個體的免疫系統建立針對該等細胞之免疫反應的可用時間。儘管此類細胞可在其細胞表面處表現功能性MHC分子，但其亦可視為非免疫原性的。照射可為來自任何源之 α 、 β 或 γ 輻射，或可為X射線輻射或紫外光。5-10 Gy之輻射劑量可足以消除增殖，然而其他合適輻射劑量可為1-10、2-10、3-10、4-10、6-10、7-10、8-10或9-10 Gy，或更高劑量，諸如11、12、13、14、15或20 Gy。替代地，細胞可經修飾以表現「自殺基

因」，該自殺基因允許細胞被誘導性地殺死或防止回應於外部刺激而複製。

【0214】 因此，藉由降低其增殖能力或強度，即藉由降低其增殖性強度，根據本發明之免疫效應細胞可經修飾為非免疫原性的。

【0215】 本發明之宿主免疫效應細胞亦可經受以其他方式進行之修飾，例如以更改或修飾細胞功能或行為之其他態樣，及/或以表現其他蛋白質。舉例而言，細胞可經修飾以表現用以靶向或改良細胞對於體內之特定組織或位置之定位的歸巢受體或定位受體。

【0216】 可藉由轉染靶標T細胞或NK細胞來獲得包含如本文所描述之核酸分子、構築體或載體的T細胞或NK細胞。待轉染之T細胞或NK細胞可衍生自現有細胞株，如上文所描述。替代地，待轉染之T細胞或NK細胞可分離自個體(其可為待治療之患者或供體)。在一實施例中，T細胞或NK細胞係分離自個體，且藉由引入核酸分子而無進一步活體外操作來進行修飾。隨後，可直接向患者投與此類細胞。在其他實施例中，在經修飾以表現特異性結合分子之前及/或之後，T細胞或NK細胞首先經活化，且進行刺激以活體外增殖(此類增殖活化及刺激可被稱作擴增)。可使用WO 2014/037422中所描述之方法來擴增及活化NK細胞。

【0217】 T細胞可獲自許多來源，包括周邊血液單核細胞(PBMC)、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。在某些實施例中，T細胞可獲自使用熟習此項技術者已知之任何數目之技術(諸如FICOLL™分離)自個體收集之血液單元。在一個實施例中，藉由血球分離術獲得來自個體之循環血液的細胞。血球分離術產物通常含有淋巴球，包括T細胞、單核球、粒細胞、B細

胞、其他有核白血球、紅血球及血小板。在一個實施例中，藉由血球分離術收集之細胞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。在本發明之實施例中，用PBS洗滌細胞。在一替代實施例中，洗滌溶液缺乏鈣及/或鎂，或可能缺乏許多(若並非全部)二價陽離子。如一般熟習此項技術者將理解，可藉由此項技術者已知之方法，諸如藉由使用半自動流通式離心機(例如，Cobe 2991細胞處理器、Baxter CytoMate或類似物)來實現洗滌步驟。在洗滌之後，可將細胞再懸浮於多種生物相容性緩衝液或其他具有或不具有緩衝液之生理鹽水溶液中。在某些實施例中，可移除血球分離樣本之非所需組分，且將細胞直接再懸浮於培養基中。

【0218】 在某些實施例中，自PBMC分離T細胞。自白血球層分離PBMC，該白血球層係藉由對全血之密度梯度離心，例如經由LYMPHOPREP™梯度、PERCOLL™梯度或FICOLL™梯度之離心獲得。可藉由消耗單核球，例如藉由使用CD14DYNABEADS®，自PBMC分離T細胞。在一些實施例中，可在密度梯度離心之前，將紅血球裂解。

【0219】 可(若須要)藉由陽性或負選擇技術，來進一步分離T細胞之特定亞群，諸如CD28⁺、CD4⁺、CD8⁺、CD45RA⁺或CD45RO⁺ T細胞。舉例而言，藉由負選擇增濃T細胞群體可使用針對負選擇之細胞所特有之表面標記的抗體之組合來實現。用於本文中之一種方法為經由負磁性免疫黏附或流式細胞測量術分選及/或選擇細胞，該負磁性免疫黏附或流式細胞測量術使用針對負選擇細胞上存在之細胞表面標記之單株抗體混合物。舉例而言，為了藉由負選擇增濃CD4⁺細胞，單株抗體混合物典型地包括針對CD14、CD20、CD11b、CD16、HLA-DR及CD8之抗體。流式細胞

測量術及細胞分選亦可用於分離用於本發明之所關注之細胞群體。

【0220】 在某些實施例中，在基因修飾及/或擴增之前或之後，可將細胞毒性T細胞及輔助T細胞兩者分選為初始、記憶及效應T細胞亞群。可藉由使用如上文所描述之標準方法來獲得CD8⁺或CD4⁺ T細胞。在一些實施例中，CD8⁺及/或CD4⁺T細胞藉由鑑別與該等類型之T細胞中之各者相關之細胞表面抗原而進一步分選為初始、中樞記憶及效應細胞。記憶T細胞可存在於周邊血液T細胞之CD62L⁺及CD62L⁻子集兩者中。在用抗CD8/抗CD4及抗CD62L抗體染色之後，可將T細胞分選為CD62L⁻/CD8⁺、CD62L⁺/CD8⁺、CD62L⁻/CD4⁺及CD62L⁺/CD4⁺部分。中樞記憶T細胞(TCM)之表現型標記可包括表現CD45RO、CD62L、CCR7、CD28、CD3及CD127，且缺乏表現顆粒酶B。TCM可為CD45RO⁺/CD62L⁺/CD8⁺或CD45RO⁺/CD62L⁺/CD4⁺ T細胞。效應T細胞對於CD62L、CCR7、CD28及CD127表現可為陰性的，且對於顆粒酶B及穿孔蛋白表現為陽性的。初始CD8⁺或CD4⁺ T細胞之特徵可在於，表現初始T細胞之表現型標記，包括CD62L、CCR7、CD28、CD3、CD127及CD45RA。

【0221】 經分離之免疫效應細胞可在分離之後進行修飾，或其可在進行修飾之前進行活體外活化及擴增(或在先驅細胞之情況下，分化)。在一實施例中，細胞藉由引入核酸分子、構築體或載體而經修飾，且隨後活體外活化及擴增。在另一實施例中，細胞經活體外活化及擴增，隨後藉由引入核酸分子、構築體或載體而進行修飾。用於活化及擴增T細胞之方法為此項技術中已知的，且描述於例如US 6,905,874、US 6,867,041、US 6,797,514及WO 2012/079000中。一般而言，此類方法包括，在補充有適當細胞介素(諸如IL-2)之培養基中，使PBMC或經分離之T細胞與刺激性

藥劑及共刺激藥劑(諸如抗CD3及抗CD28抗體)接觸，該等藥劑一般與珠粒或其他表面連接(例如，呈CD3/CD28 DYNABEADS®形式)。與抗CD3及抗CD28抗體兩者連接之珠粒用作抗原呈現細胞(APC)替代物。在其他實施例中，可用飼養細胞及適當抗體及細胞介素，使用諸如描述於US 6,040,177、US 5,827,642及WO 2012/129514中之彼等方法，活化及刺激T細胞以進行增殖。

【0222】 在一個實施例中，用如上文所描述之核酸分子、構築體或載體轉染T細胞。在另一實施例中，用如上文所描述之核酸分子、構築體或載體轉染CD34⁺細胞。在某些實施例中，在投與至個體(一般最初自其分離出細胞之個體)中後，經修飾的(亦即轉染) CD34⁺細胞活體內分化為成熟的免疫效應細胞。在另一實施例中，可在轉染之前或之後，根據此項技術中已知之方法，用以下細胞介素中之一或多者活體外刺激CD34⁺細胞：Flt-3配體(FL)、幹細胞因子(SF)、巨核細胞生長及分化因子(TPO)、IL-3及IL-6。

【0223】 可使用此項技術中已知之標準方法，自與T細胞相同的來源獲得NK細胞。

【0224】 在一特定實施例中，宿主細胞為生產宿主，且核酸分子、重組構築體或載體編碼如上文所描述之可溶性特異性結合分子，例如可溶性TCR或TCR-抗體構築體。生產宿主細胞為適用於蛋白質生產之任何細胞。適當的生產宿主為此項技術中已知的。生產宿主可為原核生物，例如對於真核蛋白質生產進行最佳化之大腸桿菌菌株，諸如Rosetta菌株。較佳地，生產宿主為真核生物細胞，例如真菌細胞，諸如酵母細胞，例如甲醇酵母。最佳地，生產宿主為哺乳動物細胞。哺乳動物細胞可為人類細胞

或非人類細胞。當使用非人類哺乳動物細胞時，較佳地對細胞進行人類蛋白質表現最佳化。合適的哺乳動物細胞包括Cos細胞(例如COS-7細胞)、HEK293細胞及CHO細胞，但可使用合適的細胞株或細胞類型。在此項技術中常用CHO (中國倉鼠卵巢)細胞來用於蛋白質生產，且可根據本發明使用該等CHO細胞。在一特定實施例中，用攜帶DHFR基因，在細胞中恢復DHFR功能之載體，轉染缺乏DHFR (二氫葉酸還原酶)基因之CHO細胞。隨後，藉由在缺乏胸苷(其為合成DHFR所需的)之培養基培養中來選擇經轉染的細胞。當非人類細胞用作生產宿主時，可對編碼特異性結合分子之基因進行在所選擇宿主中表現之密碼子最佳化。

【0225】 在本發明之另一態樣中，提供產生如上文所定義之宿主細胞之方法。該方法包含將如本文所定義之核酸分子、重組構築體或載體引入至不編碼如上文所定義之特異性結合分子之細胞(亦即，不編碼如由本發明之核酸分子編碼之特異性結合分子的細胞)中。

【0226】 將核酸分子、重組構築體或載體引入至其中之細胞可為如上文所描述之任何細胞。舉例而言，細胞可適用作選殖宿主或生產宿主，或可為能夠功能上表現膜結合特異性結合分子之免疫效應細胞。此類細胞在上文描述。較佳地，細胞為人類T細胞或NK細胞。用於將核酸分子引入至細胞中之方法亦在上文描述。

【0227】 不編碼如上文所定義之特異性結合分子之細胞可容易地由熟習此項技術者鑑別出。非哺乳動物細胞將不編碼此種特異性結合分子，除非經修飾以進行此。類似地，不為免疫效應細胞之哺乳動物細胞將不編碼此種特異性結合分子，除非經修飾以進行此。在關於特定細胞或細胞株是否編碼此種特異性結合分子不確定之情況下，可對細胞或細胞株之基因

組進行定序。一般而言，除自其中分離出hTERT-TCR-1之CD4+ T細胞之外，將預期無細胞或細胞株編碼此種特異性結合分子。

【0228】 在本發明之另一態樣中，提供一種特異性結合分子，該特異性結合分子能夠在藉由II類MHC呈現hTERT肽時結合該肽，該肽包含SEQ ID NO: 1中所闡述之序列，且該特異性結合分子包含：

(i)第一多肽，其包含TCR之 α 鏈之可變區，該可變區包含CDR序列CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別具有SEQ ID NO: 2、3及4中所闡述之胺基酸序列；及

(ii)第二多肽，其包含TCR之 β 鏈之可變區，該可變區包含CDR序列CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別具有SEQ ID NO: 5、6及7中所闡述之序列。

【0229】 特異性結合分子為可溶的。換言之，特異性結合分子之第一及第二多肽均不包含跨膜域。較佳地，本文提供之特異性結合分子如上文關於由本發明之核酸分子編碼之可溶性特異性結合分子所描述

【0230】 特異性結合分子之第一及第二多肽為連接的。第一及第二多肽可位於單一胺基酸鏈內，但較佳地構成單獨胺基酸鏈。當多肽構成單獨胺基酸鏈時，其可藉由任何合適的方法連接。合適的方法在上文描述，且包括共價鍵聯(例如二硫鍵)及可由白胺酸拉鏈之使用驅動之非共價鍵聯(例如疏水相互作用)。

【0231】 可藉由此項技術中已知之任何方法來合成特異性結合分子。特定言之，可使用蛋白質表現系統，諸如細胞表現系統，使用原核(例如細菌)細胞或真核(例如酵母菌、真菌、昆蟲或哺乳動物)細胞，來合成特異性結合分子。可在生產特異性結合分子中使用之細胞在上文論述。

替代性蛋白質表現系統為無細胞活體外表現系統，其中活體外將編碼特異性結合分子之DNA序列轉錄為mRNA，且將mRNA轉譯為蛋白質。無細胞表現系統套組為廣泛可獲得的，且可購自例如ThermoFisher Scientific (美國)。替代地，可在非生物系統中化學合成特異性結合分子。液相合成或固相合成可用於產生可形成特異性結合分子或可包含於該特異性結合分子內之多肽。熟習此項技術者可容易地使用此項技術中常見之適當方法來產生特異性結合分子。

【0232】 在合成之後，使用此項技術中已知之技術，來分離及純化特異性結合分子。特定言之，可使用宿主真核生物細胞來生產特異性結合分子。可表現特異性結合分子，使得第一及第二多肽各自包含引導多肽輸出之前導序列。前導序列在上文論述。因此，將特異性結合分子自生產細胞輸出至培養基中。隨後，例如藉由離心，將培養基與生產細胞分離。隨後，可純化特異性結合分子。舉例而言，可表現特異性結合分子，使得其包含用於親和層析之標記。合適的標記在上文描述，且為此項技術中熟知的。若蛋白酶裂解位點存在於標記與成熟特異性結合分子之間，則標記可在純化特異性結合分子之後使用適當蛋白酶來裂解。合適的蛋白酶為此項技術中已知的，且在上文描述。親和層析之方法為此項技術中熟知的。若特異性結合分子為TCR-抗體構築體，則可使用特異性結合抗體(例如蛋白G、蛋白A或蛋白A/G)之Fc域之藥劑，來純化特異性結合分子。

【0233】 若在宿主細胞中生產特異性結合分子，但不包括前導序列使得不自宿主細胞分泌出第一及第二多肽，則可藉由收穫及裂解生產該分子之宿主細胞來收集特異性結合分子。熟習此項技術之個體可容易地執行此任務。宿主細胞可藉由離心來收穫，且藉由例如超聲處理、弗氏壓碎

(French Press)、使用蛋白質提取試劑(例如BugBuster®, EMD Millipore (美國))之化學裂解或如由例如AbCam (英國)或Sigma-Aldrich(美國)製造之哺乳動物細胞裂解套組來將其裂解。其後,可使用此項技術中已知之方法,例如離心,來分離裂解物之可溶性級分,且如上文所描述純化特異性結合分子。

【0234】 若需要,可將特異性結合分子多聚化以形成多聚體。此類多聚體形成本發明之態樣。舉例而言,可藉由將特異性結合分子與奈米珠粒(例如磁性奈米珠粒)結合進行多聚化。用於此類結合之方法為此項技術中所熟知。在另一實施例中,特異性結合分子可經生物素標記,且與抗生蛋白鏈菌素結合,產生四聚體特異性結合分子複合物。為了對特異性結合分子進行生物素標記,多肽鏈中之一者應表現為在其C端處具有BirA序列(SEQ ID NO: 65)。隨後,可使用大腸桿菌BirA (生物素接合酶)對特異性結合分子在BirA序列處進行生物素標記。一旦已生物素標記,可將特異性結合分子與抗生蛋白鏈菌素一起培育,產生四聚體。

【0235】 在一特定實施例中,特異性結合分子包含含有如上文所定義之 α 鏈之可變區及如上文所定義之 β 鏈之可變區的第一多肽。特定言之, α 鏈之可變區可包含或由以下組成:SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 9、或SEQ ID NO: 8或SEQ ID NO: 9之變體中所闡述之胺基酸序列。特定言之, β 鏈之可變區可包含或由以下組成:SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 11、或SEQ ID NO: 10或SEQ ID NO: 11之變體中所闡述之胺基酸序列。較佳地,具有SEQ ID NO: 9之全長 α 鏈可變區與具有SEQ ID NO: 11之全長 β 鏈可變區配對。在特異性結合分子之此及其他實施例中,序列變體如上文關於編碼核酸分子所定義。

【0236】 第一多肽可進一步包含 α 鏈之恆定區，且第二多肽包含 β 鏈之恆定區。如上文所描述，TCR鏈之恆定區可藉由C端截短而呈現可溶性，該C端截短導致移除鏈之跨膜域。此類恆定區在上文描述。特定言之， α 鏈之恆定區可包含SEQ ID NO: 21或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成。特定言之， β 鏈之恆定區可包含SEQ ID NO: 22或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成。如上文所描述，此等胺基酸序列之恆定區包含半胱胺酸殘基，在該等半胱胺酸殘基之間可形成二硫鍵，以將第一及第二多肽連接。

【0237】 在另一實施例中， α 鏈之恆定區包含SEQ ID NO: 29或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成；及/或 β 鏈之恆定區包含SEQ ID NO: 30或其變體中所闡述之胺基酸序列或由其組成。

【0238】 第一多肽可包含或由以下組成：SEQ ID NO: 41或SEQ ID NO: 42、或SEQ ID NO: 41或SEQ ID NO: 42之變體中所闡述之胺基酸序列。第二多肽可包含或由以下組成：SEQ ID NO: 43或SEQ ID NO: 44、或SEQ ID NO: 43或SEQ ID NO: 44之變體中所闡述之胺基酸序列。較佳地，具有SEQ ID NO: 42之包含 α 鏈之全長可變區的第一多肽，與具有SEQ ID NO: 44之包含 β 鏈之全長可變區的第二多肽配對。

【0239】 在一特定實施例中，特異性結合分子為可溶性TCR。如上文所詳述，可將可溶性TCR編碼為單鏈，且特定言之，2A連接子(諸如具有SEQ ID NO: 18中所闡述之胺基酸序列之彼連接子)可用於將第一及第二多肽連接。如上文所詳述，在自我剪接2A連接子之後，除C端胺基酸之外之全部保留在由初始單鏈之N端形成之多肽的C端處。SEQ ID NO: 18之此區段對應於SEQ ID NO: 18之胺基酸1-25，闡述於SEQ ID NO: 66中

之序列。

【0240】 在其C端處具有SEQ ID NO: 66之胺基酸序列之SEQ ID NO: 41之胺基酸序列，闡述於SEQ ID NO: 33中。在其C端處具有SEQ ID NO: 66之胺基酸序列之SEQ ID NO: 42之胺基酸序列，闡述於SEQ ID NO: 34中。在其C端處具有SEQ ID NO: 66之胺基酸序列之SEQ ID NO: 43之胺基酸序列，闡述於SEQ ID NO: 35中。在其C端處具有SEQ ID NO: 66之胺基酸序列之SEQ ID NO: 44之胺基酸序列，闡述於SEQ ID NO: 36中。

【0241】 因此，在一實施例中，可溶性TCR包含由以下組成之第一多肽：SEQ ID NO: 33或SEQ ID NO: 34、或SEQ ID NO: 33或SEQ ID NO: 34之變體中所闡述之胺基酸序列。SEQ ID NO: 33或SEQ ID NO: 34之變體為分別與SEQ ID NO: 33或SEQ ID NO: 34具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為V α CDR序列如上文所定義。

【0242】 在一實施例中，可溶性TCR包含由以下組成之第二多肽：SEQ ID NO: 35或SEQ ID NO: 36、或SEQ ID NO: 35或SEQ ID NO: 36之變體中所闡述之胺基酸序列。SEQ ID NO: 35或SEQ ID NO: 36之變體為分別與SEQ ID NO: 35或SEQ ID NO: 36具有至少95%、96%、97%、98%或99%序列一致性之胺基酸序列，其限制條件為V β CDR序列如上文所定義。

【0243】 可溶性TCR可與治療性或診斷劑、或包含或含有治療性或診斷劑之載劑連接或結合。治療劑為用於療法中之藥劑。療法意謂治療或預防疾病。特定言之，治療劑可為適用於治療贅生性病狀，特定言之癌症

的藥劑。

【0244】 治療劑可為藥物分子，例如殺死靶細胞之毒素。合適的毒素為單獨形式不能進入、殺死或者破壞人類細胞，但當經由所結合分子由人類細胞吸收時能夠發揮其毒性效果的毒素。因此，此種毒素將僅由結合可溶性TCR之細胞吸收，且對於將可溶性TCR吸收至其中之細胞發揮其靶向效果。毒素可為任何已知的適當細胞毒性物種，亦即其可為任何合適的細胞毒素。如本文所用，「細胞毒素」意謂抑制細胞之生長及/或存活力之任何毒素。生長包括靶細胞(亦即其進入至其中之細胞)之分裂。因此，毒素可為減少細胞之存活力或存活期或對於細胞之存活力或存活期具有負面影響的任何毒素，且特定言之，包括誘導靶細胞死亡的任何毒素，例如可誘導靶細胞之細胞凋亡或壞死的毒素。

【0245】 此種毒素可為缺乏靶向域之肽毒素。舉例而言，其可一天然地缺乏靶向域之肽毒素，或其可為相對於其原生形式經修飾以移除其靶向域之肽毒素。此類毒素之實施例包括沙泊寧(saporin)及白樹素(gelonin)，其為與例如蓖麻毒素(ricin)相同家族之核糖體滅活蛋白質(RIP)，但其不能穿過細胞之質膜。類似地，可使用病原體之細胞毒素之酶促域(亦即催化域)，諸如細菌細胞毒素之酶促域，例如白喉毒素、綠膿桿菌外毒素A(*Pseudomonas exotoxin A*)或梭菌細胞毒素之酶促域，例如索氏梭菌(*Clostridium sordellii*)之TcsL。

【0246】 可將可溶性TCR編碼為融合蛋白，其中毒素位於第一或第二多肽之C端處。替代地，可使用此項技術中已知之任何適合之方法，將毒素與可溶性TCR結合。舉例而言，可對可溶性TCR分子在其第一或第二多肽上進行生物素標記，且使用上文所描述之技術，與結合抗生蛋白鏈菌

素之毒素(或反之亦然)結合。其他合適方法為熟習此項技術者已知。

【0247】 治療劑可為任何其他適用的治療劑，例如化療劑，或任何其他抗癌劑(例如免疫治療劑、檢查點抑制劑或任何抗癌抗體)、或抗病毒藥劑或諸如此類。

【0248】 診斷劑為適用於診斷性目的之藥劑。特定言之，此種藥劑可為示蹤劑或標記，亦即可進行偵測一邊以便追蹤其傳遞通過人體的藥劑。特定言之，示蹤劑或標記可由掃描，例如PET掃描或CT掃描偵測。許多示蹤劑及標記為此項技術中已知的，包括放射性標記。可根據本發明使用任何合適的示蹤劑或標記，包括常見放射性同位素 ^{11}C 、 ^{13}N 、 ^{15}O 、 ^{18}F 、 ^{99}Tc 及 ^{123}I 與 ^{125}I 。可使用任何合適的標記基團，諸如為此項技術中已知的標記基團，將診斷劑與可溶性TCR結合。舉例而言，可使用放射性標記的生物素，將可溶性TCR進行放射性標記。

【0249】 可將可溶性TCR與包含或含有治療劑或診斷劑之載劑結合。醫藥載劑為此項技術中已知的。特定言之，適合載劑之實施例包括微胞及脂質體。如熟習此項技術者所知，微胞為界面活性劑(例如脂肪酸)於水性液體中之聚集體，在水性液體中，界面活性劑之親水性頭基形成聚集體之表面，且疏水性尾基形成核心。脂質體為由脂質雙層圍繞水性核心形成之球形小泡。治療劑或診斷劑可位於微胞或脂質體之核心內。

【0250】 可使用此項技術中已知之任何方法來合成脂質體及微胞。用於脂質體合成及藥物負載之合適方法描述於例如Akbarzadeh等人, *Nanoscale Res Lett* 8(1): 102, 2013中。可使用此項技術中已知之方法來將脂質體及微胞與可溶性TCR分子結合，例如Reulen等人, *Bioconjug Chem* 18(2): 590-596, 2007；或Kung及Redemann, *Biochim Biophys*

Acta 862(2): 435-439, 1986中教示之方法。

【0251】 可在療法中使用與治療劑或包含治療劑之載劑結合之可溶性TCR。可在活體內診斷方法中使用與診斷劑或包含診斷劑之載劑結合之可溶性TCR。

【0252】 在另一實施例中，特異性結合分子為TCR-抗體構築體。TCR-抗體構築體包含如上文所描述之第一多肽及第二多肽，其中之一者進一步包含抗體之Fc域。抗體之Fc域較佳地如上文所描述。

【0253】 在另一態樣中，本發明提供一種組合物，其包含如本文所提供之特異性結合分子或如本文所提供之宿主免疫效應細胞及至少一種醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑。可根據醫藥技術中已知之技術及程序，以任何便利方式來調配組合物。如本文所用，術語「醫藥學上可接受」係指與組合物之其他成分相容以及對於接受者生理學上可接受的成分。組合物之性質及載劑或賦形劑材料、劑量等可根據選擇及所需投與途徑、治療目的等，以常規方式選擇。

【0254】 醫藥組合物可經製備用於藉由任何合適的方式向個體投與。此類投與可為例如經口、直腸、經鼻、局部、陰道或非經腸投與。如本文所用，經口投與包括頰內及舌下投與。如本文所用，局部投與包括經皮投與。如本文所定義，非經腸投與包括皮下、肌肉內、靜脈內、腹膜內及皮內投與。

【0255】 如本文中所示之醫藥組合物包括：液體溶液或糖漿；固體組合物，諸如粉劑、顆粒、錠劑或膠囊；乳膏；軟膏及此項技術中常用之任何其他組合物型式。用於此類組合物中之合適的醫藥學上可接受之稀釋劑、載劑及賦形劑為此項技術中所熟知。

【0256】舉例而言，合適的賦形劑包括乳糖、玉米澱粉或其衍生物、硬脂酸或其鹽、植物油、蠟、脂肪及多元醇。適合載劑或稀釋劑包括羧甲基纖維素(CMC)、甲基纖維素、羥基丙基甲基纖維素(HPMC)、右旋糖、海藻糖、脂質體、聚乙烯醇、藥用級澱粉、甘露醇、乳糖、硬脂酸鎂、糖精鈉、滑石、纖維素、葡萄糖、蔗糖(及其他糖)、碳酸鎂、明膠、油、醇、清潔劑及乳化劑(諸如聚山梨醇酯)。亦可使用穩定劑、潤濕劑、乳化劑、甜味劑等。

【0257】液體醫藥組合物(無論其為溶液、懸浮液還是其他類似形式)可包括以下中之一或多者：無菌稀釋液，諸如注射用水，鹽水溶液(較佳地生理鹽水溶液、林格氏溶液(Ringer's solution)、等張氯化鈉)，不揮發性油(諸如合成的單甘油酯或二甘油酯，其可用作溶劑或懸浮培養基)，聚乙二醇，甘油，丙二醇或其他溶劑；抗細菌劑，諸如苯甲醇或對羥基苯甲酸甲酯；抗氧化劑，諸如抗壞血酸或亞硫酸氫鈉；螯合劑，諸如EDTA；緩衝液，諸如乙酸鹽、檸檬酸鹽或磷酸鹽；及用於調整張力之藥劑，諸如氯化鈉或右旋糖。可將非經腸製劑封裝於由玻璃或塑膠製成之安瓿、拋棄式注射器或多劑量小瓶中。可注射醫藥組合物較佳為無菌的。

【0258】在另一態樣中，本發明提供一種如本文所提供之宿主免疫效應細胞、一種如本文所提供之特異性結合分子或如本文所提供之組合物，其用於療法中。如本文所用，「療法」意謂治療任何醫學病狀。此類治療可為防治性(亦即預防性)、治癒性(或意欲治癒之治療)或姑息性(亦即經設計僅僅限制、緩解或改良病狀之症狀之治療)的。療法係用於治療人類個體。

【0259】在一較佳實施例中，使用宿主免疫效應細胞或包含宿主免

疫效應細胞之組合物之療法為授受性轉移療法(替代地稱為過繼細胞轉移授受性細胞轉移)。可使用已知技術進行授受性轉移療法。在一實施例中，免疫效應細胞如下調配：首先自細胞培養基中收穫細胞，且隨後在適合於以治療有效量投與的培養基及容器系統(醫藥學上可接受之載劑)中洗滌及濃縮細胞。合適的輸注培養基可為任何等張性培養基調配物，典型地為標準生理鹽水，例如Normosol R (Abbott)或Plasma-Lyte A (Baxter)，且亦可使用5%右旋糖水溶液或林格氏乳酸鹽(Ringer's lactate)。輸注培養基可補充有人類血清白蛋白。

【0260】 組合物中之治療有效量之細胞為至少2個細胞(例如，至少1個CD8⁺中樞記憶T細胞及至少1個CD4⁺輔助T細胞子集)，或更通常大於10²個細胞及最多10⁶個、最多且包括10⁸或10⁹個細胞，且可為多於10¹⁰個細胞。細胞數目視組合物預定的最終用途及其中包括的細胞類型而定。對於本文提供之用途，細胞一般呈以下之體積：一公升或更少、500 ml或更少、甚至250 ml或100 ml或更少。因此，所需細胞之密度通常大於10⁶個細胞/毫升，且一般大於10⁷個細胞/毫升，一般10⁸個細胞/毫升或更大。免疫細胞之臨床上相關數目可分為多次輸注，其累積等於或超過10⁵、10⁶、10⁷、10⁸、10⁹、10¹⁰、10¹¹或10¹²個細胞。舉例而言，可以24或48小時之間隔，或每3、4、5、6或7天，向患者投與2、3、4、5、6或更多次單獨灌注。輸注亦可以每週一次、每兩星期一次或每月一次間隔、或6週或2、3、4、5或6個月之間隔間隔開。可每年一次投與輸注，亦為有可能的。在本發明之一些態樣中，由於再引導所有輸注細胞針對特定靶抗原(即具有SEQ ID NO: 1之序列之hTERT肽)，所以可投與在10⁶個/公斤(10⁶-10⁸個/患者)範圍內之較低數目之細胞。細胞組合物可以此等範圍內之劑量多

次投與。若需要，治療亦可包括投與有絲分裂原(例如，PHA)或淋巴介質、細胞介素及/或趨化介素(例如，IFN- γ 、IL-2、IL-12、TNF- α 、IL-18及TNF- β 、GM-CSF、IL-4、IL-13、Flt3-L、RANTES、MIP1 α 等)，以增強免疫反應之誘導。

【0261】 可單獨或呈與稀釋劑及/或與其他組分(諸如IL-2或其他細胞介素或細胞群體)組合之醫藥組合物形式，投與本文提供之免疫效應細胞，該等免疫效應細胞如上文所描述表現膜結合特異性結合分子(例如TCR)。此類醫藥組合物在上文描述。

【0262】 在使用如本文所提供之特異性結合分子之療法中，可以常規方式，根據選擇及所需投與途徑、治療目的等來選擇劑量等。同樣，劑量可視患者之特徵(例如年齡、身材及病狀)及患者疾病之類型及嚴重程度而定。可藉由臨床試驗來測定適當劑量。便利地，可以每天一次、每週一次或每月一次劑量，或中頻劑量，向個體提供特異性結合分子，例如可每2、3、4、5或6天、每2、3、4、5或6週、每2、3、4、5或6個月、每年或每半年地提供劑量。熟習的臨床醫師將能夠基於如上文所概述之所有相關因素計算對於患者之適當劑量。

【0263】 藉由投與如本文所提供之免疫效應細胞而在個體中誘導之免疫反應可包括：由細胞毒性T細胞或NK細胞(該等細胞毒性T細胞或NK細胞能夠殺死靶細胞(亦即，表現具有SEQ ID NO: 1之hTERT肽之腫瘤細胞))、調節性T細胞及輔助T細胞介導之細胞免疫反應；及體液免疫反應，其主要由能夠活化B細胞且因此產生抗體反應之輔助T細胞介導。

【0264】 向個體投與攜帶如本文所描述之藥物分子(例如毒素)之可溶性TCR，引起靶細胞吸收可溶性TCR/藥物分子結合物，從而引起向靶

細胞直接投與藥物分子。若藥物分子為毒素，則此引起選擇性殺傷靶細胞。投與如本文所描述之TCR-抗體構築體，引起TCR-抗體構築體與靶細胞結合，及起始免疫系統之表現Fc受體之細胞(例如，B細胞、NK細胞、巨噬細胞等)針對靶細胞的免疫反應。

【0265】 可在活體內診斷方法中替代地使用如本文所提供之特異性結合分子。適當方法為熟習的醫師所已知，且包括在掃描患者中使用與示蹤劑或諸如此類(例如放射性標記)結合的特異性結合分子。

【0266】 在一特定實施例中，本發明提供一種如本文所提供之宿主免疫效應細胞、如本文所提供之特異性結合分子或如本文所提供之組合物，其用於治療癌症。癌症在本文中廣義地定義為包括任何贅生性病狀，無論是惡性、癌前還是非惡性的。然而一般而言，其可為惡性病狀。包括實體及非實體腫瘤兩者，且術語「癌細胞」可視為與「腫瘤細胞」同義。可靜脈內向個體投與宿主免疫效應細胞、特異性結合分子及/或組合物。替代地，可經由腫瘤內注射，將細胞、特異性結合分子及/或組合物直接投與至腫瘤中。

【0267】 待治療之癌症較佳地為表現hTERT (換言之，構成癌症，表現hTERT之細胞)的癌症。可藉由例如活檢樣本之分析來鑑別癌症是否表現hTERT。固體或液體樣本可藉由標準活檢程序來獲得，且藉由組織學，例如免疫組織化學，使用用於鑑別hTERT表現之抗hTERT抗體來進行分析。其他免疫方法可用於鑑別hTERT表現，例如對活檢樣本之西方墨點法。hTERT表現可藉由mRNA分析，例如qPCR或RNA-Seq來鑑別。

【0268】 癌症可為任何癌症，儘管如上文所指出其較佳地表現hTERT。在特定實施例中，癌症為胰臟癌、結腸癌或肺癌。胰臟癌包括胰

腺癌、胰臟神經內分泌腫瘤、胰臟腺泡細胞癌瘤、胰胚細胞瘤及位於胰臟內之任何其他癌症類型。肺癌包括小細胞肺癌及非小細胞肺癌，諸如肺之大細胞癌瘤及鱗狀細胞癌。

【0269】 在一相關態樣中，本發明提供一種治療方法，其包含向個體投與如本文所提供之宿主免疫效應細胞、如本文所提供之特異性結合分子或如本文所提供之組合物。較佳地，以治療有效量向個體投宿主免疫效應細胞、特異性結合分子或組合物。「治療有效量」意謂足以顯示對於個體之病狀之益處的量。量是否足以顯示對於個體之病狀之益處，可由個體他/她自己或醫師測定。較佳地，治療之方法係用於癌症，如上文所描述。

【0270】 在另一相關態樣中，本發明提供一種如本文所提供之宿主免疫效應細胞或如本文所提供之特異性結合分子之用途，其用於製造用於治療癌症的藥物。癌症可如上文所定義。

【0271】 在另一態樣中，本發明提供一種套組，其包含第一載體及第二載體。第一載體包含編碼如上文所定義之第一多肽的核苷酸序列，且第二載體包含編碼如上文所定義之第二多肽的核苷酸序列。如上文所詳述，第一多肽包含 α 鏈之可變區，該可變區包含CDR序列CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別具有SEQ ID NO: 2、3及4中所闡述之胺基酸序列；及第二多肽包含 β 鏈之可變區，該可變區包含CDR序列CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別具有SEQ ID NO: 5、6及7中所闡述之序列。可變區及恆定區序列及前導序列在上文描述，與可由第一及第二多肽形成之特異性結合分子。在一特定實施例中，第一載體編碼TCR之 α 鏈，且第二載體編碼TCR之 β 鏈。在另一特定實施例中，第一載體編碼可溶性TCR之C端經截短 α 鏈，且第二載體編碼可溶性TCR之C端經截短 β

鏈。

【0272】 可將第一及第二載體共引入至宿主細胞中，以共表達第一及第二多肽，且因此表現特異性結合分子。合適的載體及宿主細胞在上文描述，與產生載體且將載體引入至細胞中之方法。如上所指出，載體可包含可選標記，使得已吸收載體之細胞可被正選擇。在一較佳實施例中，第一載體及第二載體各自含有可選標記。第一及第二載體之標記較佳地為不同的，使得已吸收兩種載體之細胞可相對於僅已吸收兩種載體中之一者(或未吸收載體)之細胞而經選擇。合適的可選標記在上文論述。

【0273】 兩種載體可提供於單一容器(亦即呈兩種載體之混合物)或單獨容器中。載體可呈水溶液(例如，於水或合適的緩衝液(諸如TE緩衝液)中)形式提供，或可呈凍乾形式提供。

【0274】

實例

【0275】

方法

【0276】

細胞株、培養基及試劑

自來自健康供體之血液分離T細胞。藉由轉化來自如先前所描述之HLA-A2+供體之B細胞，產生用作靶細胞之埃-巴二氏病毒(Epstein Barr Virus)轉化的類淋巴母細胞細胞株(EBV-LCL) (Gjertsen等人, *Int. J. Cancer* 72: 784-790, 1997)。黑素瘤細胞株ESTDAB-039由Graham Pawelec (德國圖賓根大學(University of Tübingen))饋贈。J76細胞由Mirjam Heemskerk (荷蘭萊頓大學(Leiden University))饋贈。在補充有慶

大黴素及10%熱滅活FCS (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific) 之RPMI-1640 (Gibco, Thermo Fisher Scientific, USA)中, 培養細胞株。除非另外說明, 否則所有T細胞均在補充有以下之CellGro DC培養基 (CellGenix GmbH, Germany)中生長: 5%熱滅活人類合併血清(PAN-Biotech GmbH, Germany)、10 mM N-乙醯半胱胺酸(Mucomyst 200 mg/ml, AstraZeneca AS, UK)、0.01 M HEPES (Life Technologies, Thermo Fisher Scientific)、健大黴素0.05 mg/ml (Garamycin, Schering-Plough Europe, Belgium)及100 U/ml IL-2 (Chiron, USA), 該培養基在下文表示為完全培養基。

【0277】

用於量測增殖之³H-胸苷併入分析(圖1及圖5)

藉由在96孔盤中, 以 0.5×10^5 個細胞/孔接種T細胞於補充有HEPES緩衝液、N-乙醯基半胱胺酸及健大黴素之CellGro DC培養基(CellGenix GmbH, Germany)中, 來測定肽特異性增殖反應。分別以3000拉德或10000拉德照射用於防止增殖之自體抗原呈現細胞(APC) (自體周邊血液單核細胞(PBMC)或EBV-LCL中之任一者), 經洗滌, 且以 0.5×10^5 個細胞/孔接種。測試所有條件, 重複三次: T細胞及僅經照射之APC (包括為對照)、T細胞及具有GV1001肽(圖1)或帶有指示胺基酸序列之經截短肽(圖5)之經照射之APC, 以10-25 μ M肽, 得到200微升/孔之總體積。亦測試T細胞之針對自患者腹水分離之自體癌細胞的反應性(圖1)。在第2天, 使細胞經受³H-胸苷(20微升/孔, 總共0.037 MBq/孔)隔夜(在16-20小時之間)。增殖顯示為平均計數/分鐘(cpm)。

【0278】

靶向hTERT之TCR之活體外mRNA轉錄

在來自GV1001肽疫苗接種之胰臟癌患者之T細胞純系中，鑑別端粒酶(hTERT)-特異性、HLA-DP4限制性的TCR(Bernhardt, S.L.等人, 見上文)，且命名為hTERT-TCR-1。基本上如先前所描述進行活體外mRNA合成(Almåsbak, H.等人, *Cytotherapy* 13(5): 629-640, 2011)。抗反轉帽類似物(Trilink Biotechnologies Inc., San Diego, CA, USA)用於對RNA加帽。藉由瓊脂糖凝膠電泳及Nanodrop (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA, USA)來評定mRNA。

【0279】

人類T細胞之活體外擴增

使用適用於GMP生產T細胞，採用戴諾珠粒(Dynabead) CD3/CD28來擴增來自健康供體的T細胞，基本上如先前所描述(Almåsbak H.等人, 見上文)。簡言之，PBMC藉由密度梯度離心而自白血球層分離出，且與戴諾珠粒(Dynabeads® *ClinExVivo*™ CD3/CD28, 由DynaLabs提供, Thermo Fisher Scientific)，以3:1比率，在具有100 U/ml重組人介白素-2 (IL-2) (Proleukin, Prometheus Laboratories, USA)之完全CellGro DC培養基中培養10天。將細胞冷凍，且在轉染之前解凍等分試樣並靜置於完全培養基中。

【0280】

J76 Jurkat細胞及所擴增T細胞之電穿孔

洗滌所擴增T細胞兩次，且將其再懸浮於CellGro DC培養基(CellGenix GmbH)中，且再懸浮至 70×10^6 個細胞/ml。將mRNA與在100 µg/ml下之細胞懸浮液混合，且使用BTX 830方波電穿孔器(BTX

Technologies Inc., Hawthorne, NY, USA), 在4 mm間隙光析管中在500 V及2 ms下電穿孔。緊接地在轉染之後, 將T細胞轉移至在37°C下5% CO₂中之完全培養基隔夜, 以使得TCR表現。相同方案用於電穿孔J76 Jurkat 細胞。

【0281】

活體外功能性分析、抗體及流式細胞測量術(圖2及圖3)

對於僅胞外染色, 在於RT下染色20 min之前, 在由含有2% FCS之磷酸鹽緩衝鹽水(PBS)組成之染色緩衝液(SB)中洗滌細胞。隨後, 在SB中洗滌細胞, 且將其固定於含有1%多聚甲醛之SB中。

【0282】來自hTERT蛋白(hTERT序列, GenBank寄存編號: AB085628)之肽GV1001 (EARPALLTSRLRFIPK (SEQ ID NO:52)由 ProImmune Ltd, UK提供。對於胞內染色, 以2:1之效應子:靶標(E:T)比率, 且在存在推薦濃度下之BD GolgiPlug及BD Golgistop之情況下, 用在指示濃度下之負載有GV1001肽或173個胺基酸(563-735)重組hTERT蛋白片段(GenScript, USA)之APC, 刺激T細胞6小時。使用PerFix-nc套組, 根據製造商之說明書(Beckman Coulter Inc, USA), 對細胞進行胞外及胞內染色。使用以下抗體: CD3-APC、CD4-BV421 (BioLegend)、CD8-PE-Cy7、IFN- γ -FITC、TNF- α -PE (BD Biosciences, USA)。抗體係購自eBioscience, USA, 其中所標註的除外。在BD FACSCanto10流式細胞儀上獲得細胞, 且使用FlowJo軟體(Treestar Inc., Ashland, OR, USA)來分析資料。

【0283】

基於生物發光之細胞毒性分析(圖4及圖7)

對表現螢光素酶之腫瘤細胞進行計數，且以 3×10^5 個細胞/毫升之濃度將其再懸浮。對細胞給予Xenolight D-螢光素鉀鹽(75 $\mu\text{g/ml}$; Perkin Elmer)，且一式三份以100微升細胞/孔，將其置放於96孔白色圓底培養盤中。以所指示之E:T比率，添加效應T細胞。為了測定自發性及最大殺傷，分別對孔接種僅靶細胞或含靶細胞之1% Triton™ X-100 (Sigma-Aldrich)。將細胞靜置於37°C下，且在所指示時間點處，用光度計(VICTOR多標記讀板儀)量測生物發光(BLI)為相對光單位(RLU)。未與任何效應細胞一起培育之靶細胞用於測定各時間點之基線自發死亡RLU。對三個重複孔求平均，且使用以下方程計算裂解百分比：特異性裂解% = $100 \times (\text{自發細胞死亡RLU}-\text{樣本RLU})/(\text{自發死亡RLU}-\text{最大殺傷RLU})$ 。對於每一點集合擬合S型曲線(無Hill方程)(使用Igor Pro 6.36或8.1)，作為眼睛之引導，其中標準差作為加權因子，基準保持為0，且最大裂解保持在低於100。

【0284】

小鼠異種移植研究(圖6及圖8)

根據經批准之機構動物護理方案，在室內培育NOD.Cg-Prkdc^{scid} Il2rg^{tm1Wjl}/SzJ (NSG)小鼠，且維持在無病原體條件下。對6-8週齡小鼠腹膜內(i.p.)注射 $1-1.5 \times 10^6$ 個ESTDAB-039腫瘤細胞。用反轉錄病毒載體SW1000工程改造ESTDAB-039細胞，以表現與螢火蟲螢光素酶(用於活體內分析)及EGFP (用於偵測經轉染細胞及分選其)組合之hTERT-TCR-1抗原(用於TCR測試)。構築體之結構顯示於圖6A中；其由含有為了負載MHCI (Wälchli等人, *Eur. J. Immunol.* 44: 774-784, 2014)及MHCII (Mensali等人, 製備手稿)分子之CLIP肽替換之恆定鏈(CD74)的編碼序列

組成。用於替換CLIP序列之肽為GV1001 (SEQ ID NO: 52)。在CLIP區之兩端處使用獨特限制位點打開載體之後且使用寡核苷酸融合方法，引入此序列。隨後，在藉由PCR移除其天然終止密碼子之後，經由小核糖核酸病毒2A核糖體跳躍序列，將恆定鏈與螢光素酶-GFP模組融合。螢光素酶-GFP模組係自初始構築體提取(Löw等人, *BMC Biotechnol.* 20:81, 2010)，且對於藉由使用PCR添加獨特限制位點與恆定鏈-2A片段之融合物呈現相容性，隨後將其次選殖至pENTR載體(Invitrogen)中。對完全構築體進行序列驗證，且最終將其次選殖至pMP71反轉錄病毒載體中。抗原構築體被稱作li-hTERT。

【0285】完全融合蛋白之序列闡述於SEQ ID NO: 68中且在圖6A中提供，其中指示所關注之不同區。反轉錄病毒顆粒如Wälchli等人(*PLoS One*, 6(11): e27930, 2011)中所描繪來生產，且用於轉導ESTDAB-039細胞。基於其GFP表現來分選細胞，且擴增純GFP陽性群體並儲存。在將此等細胞注射至動物中之前，檢查hTERT-TCR-1再引導T細胞針對此等細胞的反應性。

【0286】藉由生物發光成像，使用Xenogen光譜系統及Living Image v3.2軟體，來監測腫瘤生長。對經麻醉小鼠i.p.注射150 mg/kg體重之D-螢光素(Caliper Life Sciences, Hopkinton, MA)。在螢光素注射之後10分鐘，將動物成像。如所指示，i.p.注射 $8-10 \times 10^6$ 個hTERT-TCR-1 mRNA電穿孔之T細胞(圖6)或 10^7 個經hTERT-TCR-1轉導的T細胞(圖8)、或 10^7 個假擬轉染的T細胞作為對照。顯示兩個實驗之動物注射之時間線的示意圖顯示於圖6B及圖8B中。

【0287】

用於T細胞轉導之反轉錄病毒顆粒生產

將 1.2×10^6 個HEK293T細胞(Cellbiolabs, US)塗鋪在6 cm培養盤中。使用具有DNA之混合物之X-treme-GENE 9轉染試劑(Roche)進行轉染，該DNA之混合物包括等莫耳比的反轉錄病毒封裝載體及hTERT-TCR-1表現載體。在24小時之後，用含1% HyClone FCS之DMEM替換培養基，且將細胞轉移至32°C培育箱。在培育24 h及48 h之後，收穫上清液。

【0288】

所擴增T細胞之反轉錄病毒轉導

在塗覆有 1×10^6 個細胞/毫升之CD3及CD28的24孔盤中，培育PBMC 2天。在用PBS洗滌且用補充有0.1% FBS之PBS溶液阻斷30分鐘之前，在室溫下用50 $\mu\text{g}/\text{mL}$ 重組人纖維蛋白片段(RetroNectin)塗覆24孔盤3小時。隨後，將1 mL病毒溶液置於每一孔中，隨後在其頂上放置在 0.3×10^5 個細胞/毫升濃度下之500 μL 活化T細胞。隨後，在受控氛圍(37°C，5% CO_2)下培育培養盤30分鐘，密封，且接著在放回培育箱60分鐘之前，在32°C下以 $750 \times g$ 快速離心。

【0289】 第二天，在收集細胞之前，重複相同spinoculation步驟，快速離心，洗滌且在檢查TCR之表現之前再懸浮於完全X-Vivo 15培養基中2天，且使用上文所描述之程序擴增細胞。

【0290】

基於磷脂結合蛋白V之細胞毒性分析(圖7)

在受控氛圍(37°C，5% CO_2)下，在96孔平底培養盤，200 μL 完全RPMI 1640培養基中，培育 10^4 個腫瘤細胞(患者腹水細胞) 24小時。第二天，以 $100 \times g$ 離心培養盤1 min，且丟棄100 μL 上清液。向每一孔添加50

μL 之稀釋於完全RPMI 1640中之1:200 IncuCyte磷脂結合蛋白V紅(Essen Biosciences, UK)溶液，且隨後在 37°C 、5% CO_2 下培育培養盤15 min。

【0291】 將先前洗滌且再懸浮於完全RPMI 1640培養基中之效應細胞(經hTERT-TCR-1轉導或經電穿孔的初代T細胞或患者T細胞純系，或假擬轉染T細胞)，以 5×10^4 個細胞/毫升($100 \mu\text{L}$ /孔)之最終濃度，引入至每一孔中。隨後，將培養盤放入具有以下設定之IncuCyte S3活細胞分析系統(Essen Biosciences, UK)中：12影像/天，4影像/孔，2通道(相及紅色)，12孔/條件。使用IncuCyte軟體，進行細胞毒性之分析。隨後，提取度量，且使用Igor Pro 8.1 (Wavemetrics, USA)校正。在假擬影像上計算背景，且自所有其他條件連續地減去。

【0292】

在群落形成單位(CFU)分析中針對骨髓之測試(圖9)

將健康HLA-DP04+供體骨髓($n=4$ ，總共)先驅細胞與經hTERT-TCR-1轉導的T細胞或假擬轉染T細胞一起，以10:1之E:T，共培養6小時。隨後，將細胞塗鋪在半固體甲基纖維素先驅細胞培養物中14天，且對紅色(CFU-E，亦即紅血球)、白色(CFU-GM，亦即粒細胞及單核球)及混合(CFU-GEMM，亦即粒細胞、紅血球、單核球及巨核細胞)群落之存在進行評分。資料表示三個重複之平均值 \pm SD。

【0293】

同種異體反應性研究(圖10)

如上文所描述，自30個供體分離PBMC。將經hTERT-TCR-1轉導的T細胞或未經轉導的對照與PBMC一起，以1:5之效應子:靶標比率(10000:50000)培育。對照包括將具有滴定濃度之hTERT肽GV1001 (10

μM ， $1\ \mu\text{M}$ 及 $100\ \mu\text{M}$)之T細胞與HLA-DPB1*0401 PBMC一起培育，及在不存在hTERT肽GV1001之情況下，T細胞與HLA-DPB1*0401 PBMC一起培育。在 37°C 下培育分析物隔夜，且藉由ELISpot (R&D Systems, US)，根據製造商之方案來量測IFN γ 釋放。杠表示平均值，且誤差杠為SD (n=3)。

【0294】

統計分析

用平均值及標準差來描述連續資料。除非另外陳述，否則使用多變數雙向Student t測試來獲得所有統計資料。Mantel-Haenszel測試用作存活曲線之對數秩估計器。* $p < 0.05$ ，** $p < 0.01$ ，*** $p < 0.001$ 。使用R軟體進行所有統計分析。

【0295】

結果

【0296】

hTERT-TCR-1由T細胞功能性表現

為了確認在轉染T細胞之後表現hTERT-TCR-1，轉染Jurkat T細胞，且偵測hTERT-TCR-1之表現。基於表面CD3表現而判定成功hTERT-TCR-1表現。僅當共表現TCR時，CD3表現於Jurkat細胞表面上。Jurkat T細胞用hTERT-TCR-1轉染或假擬轉染，用結合別藻藍蛋白之抗CD3抗體染色，且藉由流式細胞測量術分析。如圖2中所示，經轉染T細胞用抗CD3抗體染色，而假擬轉染T細胞未被染色，表明成功表現TCR。

【0297】 為了確認活體外TCR功能性，將經轉染以表現hTERT-TCR-1之T細胞與具有GV1001肽之抗原呈現細胞(APC)或來自腹水之自體

癌細胞一起培育；亦將相同T細胞與不具有任何外源性肽之APC一起培育，作為對照。基於增殖，量測T細胞活化。藉由³H-胸苷併入分析，來分析增殖。與APC及GV1001肽一起培育之T細胞增殖比對照T細胞(圖1)多四倍，表明表現hTERT-TCR-1 TCR之T細胞藉由暴露於呈現GV1001肽之APC而活化。

【0298】 亦將表現hTERT-TCR-1之T細胞與負載有一系列濃度之GV1001肽之APC一起培育。亦測試未負載APC，作為對照。如圖3中所示，刺激用hTERT-TCR-1轉染之CD4⁺及CD8⁺ T細胞兩者，以回應於負載有GV1001之APC產生細胞介素IFN γ 及/或TNF α (圖3A)。如圖3B中所示，對於負載有增加濃度之GV1001之APC的反應，對於CD4⁺及CD8⁺ T細胞兩者而言，快速平穩；CD8⁺ T細胞比CD4⁺ T細胞活化更高比例。此表明，刺激表現hTERT-TCR-1 CD4⁺及CD8⁺ T細胞兩者，以在識別hTERT-TCR-1抗原GV1001 (當由APC呈現時)後產生細胞介素。

【0299】 為了測試表現hTERT-TCR-1之T細胞的靶細胞殺傷，將經轉染T細胞與hTERT⁺、HLA-DP4⁺黑素瘤細胞(ESTDAB-039細胞株)，以兩個不同的效應子:靶標比率一起培育(如圖4中所示)。亦將假擬轉染T細胞與相同黑素瘤細胞株一起培育，作為對照。基於生物發光，量測靶細胞殺傷。如圖4中所示，用hTERT-TCR-1轉染之T細胞展示如同假擬轉染T細胞所展示之特異性靶細胞殺傷水準的大致兩倍。此表明，hTERT-TCR-1 TCR能夠活化T細胞以殺死表現抗原(hTERT)之靶細胞。

【0300】 為了鑑別由hTERT-TCR-1識別之極少抗原決定基，將表現hTERT-TCR-1之T細胞與APC及GV1001 (作為陽性對照)、不具有外源性肽之APC (作為陰性對照)及APC與多種位於GV1001之較短肽一起培育。

GV1001對應於hTERT之胺基酸611-626；發現，GV1001之4個N端胺基酸不為肽識別所必需的(移除此等殘基並不影響T細胞活化)，但自GV1001之N端移除另外胺基酸，或自GV1001之C端移除任何胺基酸，阻止肽由hTERT-TCR-1識別(圖5)。因此，將最小序列抗原決定基定義為GV1001之胺基酸5-16，對應於hTERT之胺基酸615-626。

【0301】

表現hTERT-TCR-1之T細胞活體內降低腫瘤負荷

如圖6A中所示，產生一種構築體，其在單一ORF中共表現經修飾的MHC II恆定鏈及螢光素酶-GFP融合蛋白。藉由用GV1001替換CLIP (II類相關恆定鏈肽)序列，來修飾MHC II恆定鏈。將經GV1001修飾的恆定鏈編碼在ORF之N端，隨後螢光素酶-GFP融合蛋白。經修飾GV1001的恆定鏈與螢光素酶-GFP融合物由自我裂解2A連接子隔開。在螢光素酶-GFP融合蛋白內，螢火蟲螢光素酶位於N端處，GFP位於C端處，由肌鈣蛋白-C連接子隔開。此為高度可撓性序列，防止螢火蟲螢光素酶或GFP之活性被其他所破壞。

【0302】對小鼠注射用SW1000構築體轉染之ESTDAB-039腫瘤細胞。因此，此等呈現GV1001肽，且可容易地藉由生物發光量測來測定腫瘤負荷。在對小鼠注射腫瘤細胞兩天之後，對其注射第一T細胞輸注，該等T細胞已用hTERT-TCR-1轉染或假擬轉染。在接下來兩週時程內，向小鼠給予另外六次T細胞輸注，且在規則時間點處量測腫瘤負荷。如圖6C中所示，投與用hTERT-TCR-1轉染之T細胞之小鼠到第23天平均展示，比投與假擬轉染T細胞之小鼠低許多的腫瘤負荷，表明活體內表現hTERT-TCR-1之T細胞可顯著地減緩hTERT+癌症之進展，指示TCR之強力治療

性潛能。

【0303】

hTERT-TCR-1 T細胞識別且特異性殺死腫瘤細胞

使用生物發光(BLI)細胞毒性分析來評價表現hTERT-TCR-1之T細胞裂解抗原陽性靶標的能力(圖7A)。在此等研究中，在存在HLA-DP04+ B細胞淋巴瘤(Granta-519)或用促效劑li-hTERT穩定轉導的埃-巴二氏病毒轉化的類淋巴母細胞細胞株(EBV-LCL)之情況下，培育經hTERT-TCR-1 TCR mRNA電穿孔或轉導的T細胞以及假擬轉染T細胞。相較於假擬對照，經轉導及電穿孔的表現hTERT-TCR-1之T細胞兩者均能夠殺死絕大部分的兩種靶細胞(圖7A)。

【0304】 另外，經由磷脂結合蛋白V即時分析，評價hTERT-TCR-1 T細胞之細胞毒性能力。將經hTERT-TCR-1轉導或電穿孔的供體T細胞、初始患者T細胞純系(自其中提取TCR)及假擬轉染T細胞，與自胰臟癌患者(初始TCR來源於其)之腹膜提取之腹水細胞一起共培養。相較於假擬對照，hTERT-TCR-1 T細胞顯示腹水細胞裂解，表明天然存在的抗原由TCR識別(圖7B)。

【0305】

hTERT-TCR-1 T細胞改良黑素瘤攜帶小鼠之存活期

對NSG小鼠腹膜內(i.p.)注射黑素瘤癌細胞株ESTDAB-1000，用li-hTERT穩定地轉導。在確認腫瘤移植之後(在第3天)，將小鼠隨機分組，且每隔一天i.p.注射 10^7 個效應細胞4次(圖8A)。用經hTERT-TCR-1轉導的細胞處理相較於假擬轉染T細胞顯著地降低腫瘤負荷(圖8B)，且極大地增加所處理小鼠的存活期(圖8C)。

【0306】

hTERT-TCR-1 T細胞並不針對骨髓起反應

由於據報導血液幹細胞表現端粒酶但相較於其他細胞類型呈現相對較低之MHC II類水準，所以評價表現hTERT-TCR-1之T細胞針對此區室之可能反應性。此係藉由探測骨髓先驅細胞在存在hTERT-TCR-1 T細胞之情況下之群落形成能力來研究。群落形成單位分析用於表明，HLA-DP04+骨髓樣本中之骨髓及紅血球群落形成，不受以10:1之效應子:靶標(E:T)比率與表現hTERT-TCR-1之T細胞一起共培養的影響(圖9，例示性供體)。此等觀測表明，hTERT-特異性TCR再引導的T細胞對於來自骨髓之自體幹細胞不為細胞毒性(4個供體顯示類似結果)。

【0307】

表現hTERT-TCR-1之T細胞並不顯示針對PBMC組之同種異體反應性

大部分人類TCR僅有效地識別及結合負載有肽之特異性自身HLA分子。小比例(小於10%)之TCR具有識別非自身HLA分子之能力。此現象被稱為「同種異體反應性」。在評價同種異體反應性反應之可能之研究中，將表現hTERT-TCR-1之T細胞暴露於包涵群體中之大部分(>90%)之HLA類型之一系列MHC I類及MHC II類分型的周邊血液單核細胞(PBMC)中(圖10)。在暴露之後，根據暴露於PBMC是否引起活化(藉由胞內細胞介素產生來測定)，來評定T細胞靶向識別。資料顯示，經hTERT-TCR-1轉導的T細胞並不識別此組PBMC，且因此並不表明同種異體反應性。作為陽性對照，當暴露於負載至HLA-DPB1*0401 PBMC上之特異性肽時，表現hTERT-TCR-1之T細胞顯示為起作用，其中敏感性下至至少100 nM肽之濃度。

【序列表】

<110> 挪威奧斯陸大學醫院HF(OSLO UNIVERSITETSSYKEHUS HF)

<120> hTERT特異性結合分子

<130> 27.18.134386/01

<140> TW 108106754

<141> 2018-02-27

<150> GB 1803178.1

<151> 2018-02-27

<160> 68

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 12

<212> PRT

<213> 智人

<400> 1

Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
1 5 10

<210> 2

<211> 7

<212> PRT

<213> 智人

<400> 2

Thr Ser Asp Gln Ser Tyr Gly
1 5

<210> 3

<211> 8

<212> PRT

<213> 智人

<400> 3

Gln Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn
1 5

<210> 4

<211> 15

<212> PRT

<213> 智人

<400> 4

Cys Ala Met Arg Glu Ile Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe
1 5 10 15

<210> 5

<211> 5

<212> PRT

<213> 智人

<400> 5

Ser Gly His Thr Ala
1 5

<210> 6
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 6

Phe Gln Gly Asn Ser Ala
 1 5

<210> 7
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 7

Cys Ala Ser Ser Leu Gly Gly Gly Asp His Thr Asp Thr Gln Tyr Phe
 1 5 10 15

<210> 8
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 8

Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe Val Gln Glu Lys Glu Ala Val
 1 5 10 15

Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Asp Gln Ser Tyr Gly Leu Phe
 20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln
 35 40 45

Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn
 50 55 60

Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln
 65 70 75 80

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

Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg
 100 105 110

<210> 9
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 9

Ala Gln Lys Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe Val Gln Glu Lys
 1 5 10 15

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

<210> 10
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 10

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

<210> 11
 <211> 116
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 11

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

<210> 12
 <211> 142
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 12

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> 13
 <211> 179
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 13
 Glu Asp Leu Lys Asn 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 Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 35 40 45
 Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
 50 55 60
 Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
 65 70 75 80
 Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
 85 90 95
 Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
 100 105 110
 Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
 115 120 125
 Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
 130 135 140
 Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
 145 150 155 160
 Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
 165 170 175
 Ser Arg Gly

<210> 14
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 具有經截短可變區之全長hTERT-TCR-1 α 鏈。

<400> 14

Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu
 1 5 10 15

Gly Pro Gly Ile Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe Val Gln Glu
 20 25 30

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

Tyr Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu Met Ile Phe
 50 55 60

Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr Glu Gly Arg
 65 70 75 80

Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn Leu Val Ile
 85 90 95

Ser Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Ala Met Arg
 100 105 110

Glu Ile Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg
 115 120 125

Leu Ser Ile Arg Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln
 130 135 140

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
 145 150 155 160

Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
 165 170 175

Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
 180 185 190

Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
 195 200 205

Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro
 210 215 220

Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
 225 230 235 240
 Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu
 245 250 255
 Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp
 260 265 270
 Ser Ser
 <210> 15
 <211> 277
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 15
 Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu
 1 5 10 15
 Gly Pro Gly Ile Ala Gln Lys Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe
 20 25 30
 Val Gln Glu Lys Glu Ala Val Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser
 35 40 45
 Asp Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu
 50 55 60
 Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr
 65 70 75 80
 Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn
 85 90 95
 Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Ala Met Arg Glu Ile Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser
 115 120 125
 Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala
 130 135 140
 Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu
 145 150 155 160
 Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp
 180 185 190

Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala
 195 200 205

Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe
 210 215 220

Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe
 225 230 235 240

Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe
 245 250 255

Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu
 260 265 270

Arg Leu Trp Ser Ser
 275

<210> 16
 <211> 311
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 具有經截短可變區之全長hTERT-TCR-I β鏈

<400> 16

Met Gly Thr Arg Leu Leu Phe Trp Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Asp His Thr Val Ser Gln Ser Pro Ser Asn Lys Val Thr Glu Lys Gly
 20 25 30

Lys Asp Val Glu Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His Thr Ala Leu
 35 40 45

Tyr Trp Tyr Arg Gln Ser Leu Gly Gln Gly Leu Glu Phe Leu Ile Tyr
 50 55 60

Phe Gln Gly Asn Ser Ala Pro Asp Lys Ser Gly Leu Pro Ser Asp Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Ala Glu Arg Thr Gly Gly Ser Val Ser Thr Leu Thr Ile Gln
 85 90 95

Arg Thr Gln Gln Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu
 100 105 110

Gly Gly Gly Asp His Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
 115 120 125

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

<210> 17
 <211> 314
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 17

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

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

Leu Ile Tyr Phe Gln Gly Asn Ser Ala Pro Asp Lys Ser Gly Leu Pro
 65 70 75 80

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

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

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

Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro
 130 135 140

Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln
 145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val
 165 170 175

Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser
 180 185 190

Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg
 195 200 205

Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn
 210 215 220

Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu
 225 230 235 240

Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val
 245 250 255

Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser
 260 265 270

Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu
 275 280 285

Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met
 290 295 300

Ala Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
 305 310

<210> 18
 <211> 26
 <212> PRT
 <213> 小核糖核酸病毒
 <400> 18

Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln
 1 5 10 15

Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro
 20 25

<210> 19
 <211> 611
 <212> PRT
 <213> 人H序列

<220>
 <223> 具有經截短可變區之hTERT-TCR-1 scTCR

<400> 19

Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu
 1 5 10 15

Gly Pro Gly Ile Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe Val Gln Glu
 20 25 30

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

Tyr Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu Met Ile Phe
 50 55 60

Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr Glu Gly Arg
 65 70 75 80

Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn Leu Val Ile
 85 90 95

Ser Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Ala Met Arg
 100 105 110

Glu Ile Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg
 115 120 125

Leu Ser Ile Arg Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln
 130 135 140

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
 145 150 155 160

Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
 165 170 175

Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
 180 185 190
 Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
 195 200 205
 Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro
 210 215 220
 Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp
 225 230 235 240
 Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe Arg Ile Leu
 245 250 255
 Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu Arg Leu Trp
 260 265 270
 Ser Ser Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu
 275 280 285
 Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Thr Arg
 290 295 300
 Leu Leu Phe Trp Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala Asp His Thr Val
 305 310 315 320
 Ser Gln Ser Pro Ser Asn Lys Val Thr Glu Lys Gly Lys Asp Val Glu
 325 330 335
 Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His Thr Ala Leu Tyr Trp Tyr Arg
 340 345 350
 Gln Ser Leu Gly Gln Gly Leu Glu Phe Leu Ile Tyr Phe Gln Gly Asn
 355 360 365
 Ser Ala Pro Asp Lys Ser Gly Leu Pro Ser Asp Arg Phe Ser Ala Glu
 370 375 380
 Arg Thr Gly Gly Ser Val Ser Thr Leu Thr Ile Gln Arg Thr Gln Gln
 385 390 395 400
 Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Gly Gly Gly Asp
 405 410 415
 His Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu
 420 425 430
 Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro
 435 440 445

Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu
 450 455 460
 Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 465 470 475 480
 Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
 485 490 495
 Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
 500 505 510
 Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
 515 520 525
 Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
 530 535 540
 Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
 545 550 555 560
 Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln Gly Val Leu Ser
 565 570 575
 Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala Thr Leu Tyr Ala
 580 585 590
 Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val Lys Arg Lys Asp
 595 600 605
 Ser Arg Gly
 610

<210> 20
 <211> 617
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> hTERT-TCR-1 sCTCR
 <400> 20

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

Asp Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu
 50 55 60
 Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr
 65 70 75 80
 Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn
 85 90 95
 Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Ala Met Arg Glu Ile Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser
 115 120 125
 Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala
 130 135 140
 Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu
 145 150 155 160
 Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp
 180 185 190
 Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala
 195 200 205
 Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe
 210 215 220
 Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe
 225 230 235 240
 Glu Thr Asp Thr Asn Leu Asn Phe Gln Asn Leu Ser Val Ile Gly Phe
 245 250 255
 Arg Ile Leu Leu Leu Lys Val Ala Gly Phe Asn Leu Leu Met Thr Leu
 260 265 270
 Arg Leu Trp Ser Ser Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe
 275 280 285
 Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly Pro Met
 290 295 300
 Gly Thr Arg Leu Leu Phe Trp Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala Asp
 305 310 315 320

His Thr Gly Ala Gly Val Ser Gln Ser Pro Ser Asn Lys Val Thr Glu
 325 330 335
 Lys Gly Lys Asp Val Glu Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His Thr
 340 345 350
 Ala Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ser Leu Gly Gln Gly Leu Glu Phe Leu
 355 360 365
 Ile Tyr Phe Gln Gly Asn Ser Ala Pro Asp Lys Ser Gly Leu Pro Ser
 370 375 380
 Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Thr Gly Gly Ser Val Ser Thr Leu Thr
 385 390 395 400
 Ile Gln Arg Thr Gln Gln Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser
 405 410 415
 Ser Leu Gly Gly Gly Asp His Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly
 420 425 430 435
 Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu
 435 440 445
 Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys
 450 455 460
 Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu
 465 470 475 480
 Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr
 485 490 495
 Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr
 500 505 510
 Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro
 515 520 525
 Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn
 530 535 540
 Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser
 545 550 555 560
 Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr
 565 570 575
 Gln Gln Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly
 580 585 590

Lys Ala Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala
595 600 605

Met Val Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
610 615

<210> 21
<211> 96
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 含有半胱氨酸取代之可溶性經截短人類α鏈恆定區。

<400> 21

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

Cys 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

<210> 22
<211> 132
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> 含有半胱氨酸取代之可溶性經截短人類β鏈恆定區。

<400> 22

Glu Asp Leu Lys Asn 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 Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
35 40 45

Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys 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
 130

<210> 23
 <211> 228
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 具有經截短可變區及經截短恒定區含有半胱胺酸取代之可溶性 hTERT-TCR-1 α 鏈

<400> 23

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

Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp
 145 150 155 160
 Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr
 165 170 175
 Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser
 180 185 190
 Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn
 195 200 205
 Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro
 210 215 220
 Glu Ser Ser Cys
 225
 <210> 24
 <211> 231
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 具有全長可變區及經截短恆定區含有半胱氨酸取代之可溶性 hTERT-TCR-1 α鏈
 <400> 24
 Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu
 1 5 10 15
 Gly Pro Gly Ile Ala Gln Lys Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe
 20 25 30
 Val Gln Glu Lys Glu Ala Val Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser
 35 40 45
 Asp Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu
 50 55 60
 Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr
 65 70 75 80
 Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn
 85 90 95
 Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Ala Met Arg Glu Ile Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser
 115 120 125

Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala
 130 135 140

Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu
 145 150 155 160

Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp
 180 185 190

Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala
 195 200 205

Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe
 210 215 220

Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys
 225 230

<210> 25
 <211> 264
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 具有經截短可變區及經截短恒定區含有半胱胺酸取代之可溶性 ITERT-TCR-1 β鏈

<400> 25

Met Gly Thr Arg Leu Leu Phe Trp Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Asp His Thr Val Ser Gln Ser Pro Ser Asn Lys Val Thr Glu Lys Gly
 20 25 30

Lys Asp Val Glu Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His Thr Ala Leu
 35 40 45

Tyr Trp Tyr Arg Gln Ser Leu Gly Gln Gly Leu Glu Phe Leu Ile Tyr
 50 55 60

Phe Gln Gly Asn Ser Ala Pro Asp Lys Ser Gly Leu Pro Ser Asp Arg
 65 70 75 80

Phe Ser Ala Glu Arg Thr Gly Gly Ser Val Ser Thr Leu Thr Ile Gln
 85 90 95

Arg Thr Gln Gln Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu
 100 105 110

Gly Gly Gly Asp His Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg

Ser Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Thr Gly Gly Ser Val Ser Thr Leu
 85 90 95
 Thr Ile Gln Arg Thr Gln Gln Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala
 100 105 110
 Ser Ser Leu Gly Gly Gly Asp His Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro
 115 120 125
 Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro
 130 135 140
 Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln
 145 150 155 160
 Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val
 165 170 175
 Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys
 180 185 190
 Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg
 195 200 205
 Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn
 210 215 220
 Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu
 225 230 235 240
 Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val
 245 250 255
 Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
 260 265

<210> 27
 <211> 518
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 具有經截短可變區之可溶性 hTERT-TCR-I scTCR ~

<400> 27

Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu
 1 5 10 15
 Gly Pro Gly Ile Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe Val Gln Glu
 20 25 30

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

Tyr Arg Gln Ser Leu Gly Gln Gly Leu Glu Phe Leu Ile Tyr Phe Gln
 305 310 315 320
 Gly Asn Ser Ala Pro Asp Lys Ser Gly Leu Pro Ser Asp Arg Phe Ser
 325 330 335
 Ala Glu Arg Thr Gly Gly Ser Val Ser Thr Leu Thr Ile Gln Arg Thr
 340 345 350
 Gln Gln Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Gly Gly
 355 360 365
 Gly Asp His Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr
 370 375 380
 Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe
 385 390 395 400
 Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val
 405 410 415
 Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp
 420 425 430
 Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro
 435 440 445
 Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser
 450 455 460
 Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe
 465 470 475 480
 Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr
 485 490 495
 Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp
 500 505 510
 Gly Arg Ala Asp Cys Gly
 515

<210> 28
 <211> 524
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 具有全長可變區之可溶性 hTERT-TCR-I scTCR
 <400> 28

Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu
 1 5 10 15

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

Thr Glu Lys Gly Lys Asp Val Glu Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly
 290 295 300
 His Thr Ala Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ser Leu Gly Gln Gly Leu Glu
 305 310 315 320
 Phe Leu Ile Tyr Phe Gln Gly Asn Ser Ala Pro Asp Lys Ser Gly Leu
 325 330 335
 Pro Ser Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Thr Gly Gly Ser Val Ser Thr
 340 345 350
 Leu Thr Ile Gln Arg Thr Gln Gln Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys
 355 360 365
 Ala Ser Ser Leu Gly Gly Gly Asp His Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly
 370 375 380
 Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro
 385 390 395 400
 Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr
 405 410 415
 Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His
 420 425 430
 Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val
 435 440 445
 Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser
 450 455 460
 Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln
 465 470 475 480
 Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser
 485 490 495
 Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile
 500 505 510
 Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
 515

<210> 29
 <211> 96
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 29

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
 <210> 30
 <211> 132
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 30
 Glu Asp Leu Lys Asn 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 Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn
 35 40 45
 Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys
 50 55 60
 Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu
 65 70 75 80
 Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys
 85 90 95
 Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp
 100 105 110
 Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg
 115 120 125
 Ala Asp Cys Gly
 130

<210> 31
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 31

Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu
 1 5 10 15

Gly Pro Gly Ile
 20

<210> 32
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 32

Met Gly Thr Arg Leu Leu Phe Trp Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala
 1 5 10 15

Asp His Thr

<210> 33
 <211> 233
 <212> PRT
 <213> 人H序列

<220>
 <223> 具有經截短可變區、經半胱胺酸取代之恆定區及C端之
 殘餘2A胺基酸之成熟可溶性 hTERT-TCR-1 α 鏈。

<400> 33

Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe Val Gln Glu Lys Glu Ala Val
 1 5 10 15

Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Asp Gln Ser Tyr Gly Leu Phe
 20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln
 35 40 45

Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn
 50 55 60

Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln
 65 70 75 80

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

Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg
 100 105 110

Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser
 115 120 125
 Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
 130 135 140
 Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
 145 150 155 160
 Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val
 165 170 175
 Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn
 180 185 190
 Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys
 195 200 205
 Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln
 210 215 220
 Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
 225 230

<210> 34
 <211> 236
 <212> PRT
 <213> 人自序列

<220>
 <223> 具有全長可變區、經半胱胺酸取代之恆定區及C端之
 殘餘2A胺基酸之成熟可溶性 hTERT-TCR-1 α 鏈。

<400> 34

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

Ile Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu
 100 105 110

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

Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe
 130 135 140

Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile
 145 150 155 160

Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn
 165 170 175

Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala
 180 190

Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu
 195 200 205

Ser Ser Cys Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu
 210 215 220

Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
 225 230 235

<210> 35
 <211> 270
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 具有經截短可變區、經半胱胺酸取代之恆定區及C端之
 殘餘2A胺基酸之成熟可溶性 hTERT-TCR-1 β鏈。

<400> 35

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

Glu Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His Thr Ala Leu Tyr Trp Tyr
 20 25 30

Arg Gln Ser Leu Gly Gln Gly Leu Glu Phe Leu Ile Tyr Phe Gln Gly
 35 40 45

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

Glu Arg Thr Gly Gly Ser Val Ser Thr Leu Thr Ile Gln Arg Thr Gln
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln
 210 215 220

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

Arg Ala Asp Cys Gly Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe
 245 250 255

Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
 260 265 270

<210> 36
 <211> 273
 <212> PRT
 <213> 人口序列

<220>
 <223> 具有全長可變區、經半胱胺酸取代之恆定區及C端之殘餘
 2A胺基酸之成熟可溶性 hTERT-TCR-1 β鏈。

<400> 36

Gly Ala Gly Val Ser Gln Ser Pro Ser Asn Lys Val Thr Glu Lys Gly
 1 5 10 15

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

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

Gly

<210> 37
 <211> 254

<212> PRT
 <213> 智人

<400> 37

Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe Val Gln Glu Lys Glu Ala Val
 1 5 10 15

Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Asp Gln Ser Tyr Gly Leu Phe
 20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln
 35 40 45

Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn
 50 55 60

Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln
 65 70 75 80

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

Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg
 100 105 110

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

Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
 130 135 140

Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
 145 150 155 160

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

Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn
 180 185 190

Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys
 195 200 205

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

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

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

<210> 38
 <211> 257
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 38

Ala Gln Lys Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe Val Gln Glu Lys
 1 5 10 15

Glu Ala Val Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Asp Gln Ser Tyr
 20 25 30

Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu Met Ile Phe Leu
 35 40 45

Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr Glu Gly Arg Tyr
 50 55 60

Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn Leu Val Ile Ser
 65 70 75 80

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

Ile Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu
 100 105 110

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

Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe
 130 135 140

Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile
 145 150 155 160

Thr Asp Lys Thr Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn
 165 170 175

Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala
 180 185 190

Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu
 195 200 205

Ser Ser Cys Asp Val Lys Leu Val Glu Lys Ser Phe Glu Thr Asp Thr
 210 215 220

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

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

Ser

<210> 39
 <211> 292
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 39

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

Glu Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His Thr Ala Leu Tyr Trp Tyr
 20 25 30

Arg Gln Ser Leu Gly Gln Gly Leu Glu Phe Leu Ile Tyr Phe Gln Gly
 35 40 45

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

Glu Arg Thr Gly Gly Ser Val Ser Thr Leu Thr Ile Gln Arg Thr Gln
 65 70 75 80

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

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

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

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

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

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

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

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

cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln

Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Ser Thr Asp Pro
 165 170 175
 Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu
 180 185 190
 Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn
 195 200 205
 His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
 210 215 220
 Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
 225 230 235 240
 Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Thr Ser Glu Ser Tyr Gln Gln
 245 250 255
 Gly Val Leu Ser Ala Thr Ile Leu Tyr Glu Ile Leu Leu Gly Lys Ala
 260 265 270
 Thr Leu Tyr Ala Val Leu Val Ser Ala Leu Val Leu Met Ala Met Val
 275 280 285
 Lys Arg Lys Asp Ser Arg Gly
 290 295

<210> 41
 <211> 208
 <212> PRT
 <213> 人H序列

<220>
 <223> 具有經截短可變區及經半胱胺酸取代之恆定區之成熟
 可溶性 hTERT-TCR-I α 鏈
 <400> 41

Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe Val Gln Glu Lys Glu Ala Val
 1 5 10 15
 Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Asp Gln Ser Tyr Gly Leu Phe
 20 25 30
 Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln
 35 40 45
 Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn
 50 55 60
 Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln
 65 70 75 80

Ile Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu
 100 105 110
 Ser Ile Arg Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu
 115 120 125
 Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe
 130 135 140
 Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile
 145 150 155 160
 Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn
 165 170 175
 Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala
 180 185 190
 Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu
 195 200 205
 Ser Ser Cys
 210

<210> 43
 <211> 245
 <212> PRT
 <213> 人H序列
 <220>
 <223> 具有經截短可變區及經半胱胺酸取代之固定區之成熟可溶性 hTERT-TCR-1 β鏈。

<400> 43
 Val Ser Gln Ser Pro Ser Asn Lys Val Thr Glu Lys Gly Lys Asp Val
 1 5 10 15
 Glu Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His Thr Ala Leu Tyr Trp Tyr
 20 25 30
 Arg Gln Ser Leu Gly Gln Gly Leu Glu Phe Leu Ile Tyr Phe Gln Gly
 35 40 45
 Asn Ser Ala Pro Asp Lys Ser Gly Leu Pro Ser Asp Arg Phe Ser Ala
 50 55 60
 Glu Arg Thr Gly Gly Ser Val Ser Thr Leu Thr Ile Gln Arg Thr Gln
 65 70 75 80
 Gln Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Gly Gly Gly
 85 90 95
 Asp His Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val

100 105 110
 Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu
 115 120 125
 Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys
 130 135 140
 Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val
 145 150 155 160
 Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu
 165 170 175
 Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg
 180 185 190
 Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg
 195 200 205
 Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln
 210 215 220
 Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly
 225 230 235 240
 Arg Ala Asp Cys Gly
 245

<210> 44

<211> 248

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有全長可變區及經半胱胺酸取代之固定區之成熟可溶性 hTERT-TCR-1 β鏈。

<400> 44

Gly Ala Gly Val Ser Gln Ser Pro Ser Asn Lys Val Thr Glu Lys Gly
 1 5 10 15
 Lys Asp Val Glu Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His Thr Ala Leu
 20 25 30
 Tyr Trp Tyr Arg Gln Ser Leu Gly Gln Gly Leu Glu Phe Leu Ile Tyr
 35 40 45
 Phe Gln Gly Asn Ser Ala Pro Asp Lys Ser Gly Leu Pro Ser Asp Arg
 50 55 60
 Phe Ser Ala Glu Arg Thr Gly Gly Ser Val Ser Thr Leu Thr Ile Gln
 65 70 75 80

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 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 50 55 60
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 65 70 75 80
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 85 90 95
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 100 105 110
 <210> 47
 <211> 391
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 具有全長可變區、經半胱胺酸取代之固定區及CD28-CD3C尾部
 之成熟可溶性 hTERT-TCR-1 α 鏈
 <400> 47
 Ala Gln Lys Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe Val Gln Glu Lys
 1 5 10 15
 Glu Ala Val Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Asp Gln Ser Tyr
 20 25 30
 Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu Met Ile Phe Leu
 35 40 45
 Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr Glu Gly Arg Tyr
 50 55 60
 Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn Leu Val Ile Ser
 65 70 75 80
 Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys Ala Met Arg Glu
 85 90 95
 Ile Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu
 100 105 110

Ser Ile Arg Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala Val Tyr Gln Leu
 115 125
 Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe
 130 135 140
 Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile
 145 150 155 160
 Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp Phe Lys Ser Asn
 165 170 175
 Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala
 180 185 190
 Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu
 195 200 205
 Ser Ser Cys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys
 210 215 220
 Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser
 225 230 235 240
 Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg
 245 250 255
 Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg
 260 265 270
 Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp
 275 280 285
 Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn
 290 295 300
 Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg
 305 310 315 320
 Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly
 325 330 335
 Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu
 340 345 350
 Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu
 355 360 365
 Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His
 370 375 380

Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
385 390

<210> 48
<211> 428
<212> PRT
<213> 人口序列

<220>
<223> 具有全長可變區、經半胱胺酸取代之恆定區及CD28-CD3C尾部
之成熟可溶性 hTERT-TCR-I β鏈。

<400> 48

Gly Ala Gly Val Ser Gln Ser Pro Ser Asn Lys Val Thr Glu Lys Gly
1 5 10 15

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

Tyr Trp Tyr Arg Gln Ser Leu Gly Gln Gly Leu Glu Phe Leu Ile Tyr
35 40 45

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

Phe Ser Ala Glu Arg Thr Gly Gly Ser Val Ser Thr Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80

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

Gly Gly Gly Asp His Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
100 105 110

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

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
130 135 140

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

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

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

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn
195 200 205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
 210 215 220
 Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu
 225 230 235 240
 Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly
 245 250 255
 Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile
 260 265 270
 Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met
 275 280 285
 Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro
 290 295 300
 Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe
 305 310 315 320
 Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu
 325 330 335
 Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp
 340 345 350
 Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys
 355 360 365
 Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala
 370 375 380
 Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys
 385 390 395 400
 Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr
 405 410 415
 Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 420 425

<210> 49
 <211> 704
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> α鏈上具有CD28-CD3ε尾部之hTERT-TCR-I scTCR-CAR

<400> 49

Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu
 1 5 10 15

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

Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
 290 295 300
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 305 310 315 320
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 325 330 335
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 340 345 350
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 355 360 365
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 370 375 380
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 385 390 395 400
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg Arg Ala Lys Arg Gly
 405 410 415
 Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu
 420 425 430
 Glu Asn Pro Gly Pro Met Gly Thr Arg Leu Leu Phe Trp Val Ala Phe
 435 440 445
 Cys Leu Leu Gly Ala Asp His Thr Gly Ala Gly Val Ser Gln Ser Pro
 450 455 460
 Ser Asn Lys Val Thr Glu Lys Gly Lys Asp Val Glu Leu Arg Cys Asp
 465 470 475 480
 Pro Ile Ser Gly His Thr Ala Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ser Leu Gly
 485 490 495
 Gln Gly Leu Glu Phe Leu Ile Tyr Phe Gln Gly Asn Ser Ala Pro Asp
 500 505 510
 Lys Ser Gly Leu Pro Ser Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Thr Gly Gly
 515 520 525
 Ser Val Ser Thr Leu Thr Ile Gln Arg Thr Gln Gln Glu Asp Ser Ala
 530 535 540
 Val Tyr Leu Cys Ala Ser Ser Leu Gly Gly Gly Asp His Thr Asp Thr
 545 550 555 560

Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys
 565 570 575
 Asn Val Phe Pro Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu
 580 585 590
 Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe
 595 600 605
 Tyr Pro Asp His Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val
 610 615 620
 His Ser Gly Val Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala
 625 630 635 640
 Leu Asn Asp Ser Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala
 645 650 655
 Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe
 660 665 670
 Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro
 675 680 685
 Val Thr Gln Ile Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
 690 695 700

<210> 50
 <211> 704
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> β鏈上具有CD28-CD3C尾部之hTERT-TCR-1 scTCR-CAR

<400> 50

Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu
 1 5 10 15
 Gly Pro Gly Ile Ala Gln Lys Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe
 20 25 30
 Val Gln Glu Lys Glu Ala Val Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser
 35 40 45
 Asp Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu
 50 55 60
 Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr
 65 70 75 80

Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn
 85 90 95
 Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
 100 105
 Ala Met Arg Glu Ile Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser
 115 120 125
 Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala
 130 135 140
 Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu
 145 150 155
 Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp
 180 185 190
 Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala
 195 200 205
 Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe
 210 220
 Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr
 225 230 235 240
 Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
 245 250 255
 Pro Met Gly Thr Arg Leu Leu Phe Trp Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly
 260 265 270
 Ala Asp His Thr Gly Ala Gly Val Ser Gln Ser Pro Ser Asn Lys Val
 275 280 285
 Thr Glu Lys Gly Lys Asp Val Glu Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly
 290 295 300
 His Thr Ala Leu Tyr Trp Tyr Arg Gln Ser Leu Gly Gln Gly Leu Glu
 305 310 315 320
 Phe Leu Ile Tyr Phe Gln Gly Asn Ser Ala Pro Asp Lys Ser Gly Leu
 325 330 335
 Pro Ser Asp Arg Phe Ser Ala Glu Arg Thr Gly Gly Ser Val Ser Thr
 340 345 350

Leu Thr Ile Gln Arg Thr Gln Gln Glu Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys
 355 360 365
 Ala Ser Ser Leu Gly Gly Gly Asp His Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly
 370 375
 Pro Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro
 385 390 395 400
 Pro Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr
 405 410 415
 Gln Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His
 420 425 430
 Val Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val
 435 440 445
 Cys Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser
 450 455 460
 Arg Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln
 465 470 475 480
 Asn Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser
 485 490 495
 Glu Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile
 500 505 510
 Val Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Trp Val Leu
 515 520 525
 Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val
 530 535 540
 Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His
 545 550 555 560
 Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys
 565 570 575
 His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser
 580 585 590
 Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly
 595 600 605
 Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr
 610 615 620

Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys
 625 630 635 640
 Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys
 645 650 655
 Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg
 660 665 670
 Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala
 675 680 685
 Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 690 695 700
 <210> 51
 <211> 1132
 <212> PRT
 <213> 智人
 <400> 51
 Met Pro Arg Ala Pro Arg Cys Arg Ala Val Arg Ser Leu Leu Arg Ser
 1 5 10 15
 His Tyr Arg Glu Val Leu Pro Leu Ala Thr Phe Val Arg Arg Leu Gly
 20 25 30
 Pro Gln Gly Trp Arg Leu Val Gln Arg Gly Asp Pro Ala Ala Phe Arg
 35 40 45
 Ala Leu Val Ala Gln Cys Leu Val Cys Val Pro Trp Asp Ala Arg Pro
 50 55 60
 Pro Pro Ala Ala Pro Ser Phe Arg Gln Val Ser Cys Leu Lys Glu Leu
 65 70 75 80
 Val Ala Arg Val Leu Gln Arg Leu Cys Glu Arg Gly Ala Lys Asn Val
 85 90 95
 Leu Ala Phe Gly Phe Ala Leu Leu Asp Gly Ala Arg Gly Gly Pro Pro
 100 105 110
 Glu Ala Phe Thr Thr Ser Val Arg Ser Tyr Leu Pro Asn Thr Val Thr
 115 120 125
 Asp Ala Leu Arg Gly Ser Gly Ala Trp Gly Leu Leu Leu Arg Arg Val
 130 135 140
 Gly Asp Asp Val Leu Val His Leu Leu Ala Arg Cys Ala Leu Phe Val
 145 150 155 160
 Leu Val Ala Pro Ser Cys Ala Tyr Gln Val Cys Gly Pro Pro Leu Tyr

165 170 175
 Gln Leu Gly Ala Ala Thr Gln Ala Arg Pro Pro Pro His Ala Ser Gly
 180 185 190
 Pro Arg Arg Arg Leu Gly Cys Glu Arg Ala Trp Asn His Ser Val Arg
 195 200 205
 Glu Ala Gly Val Pro Leu Gly Leu Pro Ala Pro Gly Ala Arg Arg Arg
 210 215 220
 Gly Gly Ser Ala Ser Arg Ser Leu Pro Leu Pro Lys Arg Pro Arg Arg
 225 230 235 240
 Gly Ala Ala Pro Glu Pro Glu Arg Thr Pro Val Gly Gln Gly Ser Trp
 245 250 255
 Ala His Pro Gly Arg Thr Arg Gly Pro Ser Asp Arg Gly Phe Cys Val
 260 265 270
 Val Ser Pro Ala Arg Pro Ala Glu Glu Ala Thr Ser Leu Glu Gly Ala
 275 280 285
 Leu Ser Gly Thr Arg His Ser His Pro Ser Val Gly Arg Gln His His
 290 295 300
 Ala Gly Pro Pro Ser Thr Ser Arg Pro Pro Arg Pro Trp Asp Thr Pro
 305 310 315 320
 Cys Pro Pro Val Tyr Ala Glu Thr Lys His Phe Leu Tyr Ser Ser Gly
 325 330 335
 Asp Lys Glu Gln Leu Arg Pro Ser Phe Leu Leu Ser Ser Leu Arg Pro
 340 345 350
 Ser Leu Thr Gly Ala Arg Arg Leu Val Glu Thr Ile Phe Leu Gly Ser
 355 360 365
 Arg Pro Trp Met Pro Gly Thr Pro Arg Arg Leu Pro Arg Leu Pro Gln
 370 375 380
 Arg Tyr Trp Gln Met Arg Pro Leu Phe Leu Glu Leu Leu Gly Asn His
 385 390 395 400
 Ala Gln Cys Pro Tyr Gly Val Leu Leu Lys Thr His Cys Pro Leu Arg
 405 410 415
 Ala Ala Val Thr Pro Ala Ala Gly Val Cys Ala Arg Glu Lys Pro Gln
 420 425 430
 Gly Ser Val Ala Ala Pro Glu Glu Glu Asp Thr Asp Pro Arg Arg Leu

980 985 990
 Ser Leu Gln Thr Val Cys Thr Asn Ile Tyr Lys Ile Leu Leu Leu Gln
 995 1000 1005
 Ala Tyr Arg Phe His Ala Cys Val Leu Gln Leu Pro Phe His Gln
 1010 1015 1020
 Gln Val Trp Lys Asn Pro Thr Phe Phe Leu Arg Val Ile Ser Asp
 1025 1030 1035
 Thr Ala Ser Leu Cys Tyr Ser Ile Leu Lys Ala Lys Asn Ala Gly
 1040 1045 1050
 Met Ser Leu Gly Ala Lys Gly Ala Ala Gly Pro Leu Pro Ser Glu
 1055 1060 1065
 Ala Val Gln Trp Leu Cys His Gln Ala Phe Leu Leu Lys Leu Thr
 1070 1075 1080
 Arg His Arg Val Thr Tyr Val Pro Leu Leu Gly Ser Leu Arg Thr
 1085 1090 1095
 Ala Gln Thr Gln Leu Ser Arg Lys Leu Pro Gly Thr Thr Leu Thr
 1100 1105 1110
 Ala Leu Glu Ala Ala Ala Asn Pro Ala Leu Pro Ser Asp Phe Lys
 1115 1120 1125
 Thr Ile Leu Asp
 1130

<210> 52
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> 智人

<400> 52

Glu Ala Arg Pro Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys
 1 5 10 15

<210> 53
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> 小核糖核酸病毒

<220>
 <221> X
 <222> (2)..(2)
 <223> 羧胺酸或異白胺酸

<220>
 <221> X
 <222> (4)..(4)

<223> 任何胺基酸

<400> 53

Asp Xaa Glu Xaa Asn Pro Gly Pro
1 5

<210> 54

<211> 208

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有經截短可變區之成熟可溶性 hTERT-TCR-I α 鏈

<400> 54

Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe Val Gln Glu Lys Glu Ala Val
1 5 10 15

Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser Asp Gln Ser Tyr Gly Leu Phe
20 25 30

Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln
35 40 45

Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn
50 55 60

Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln
65 70 75 80

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

Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg
100 105 110

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

Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln
130 135 140

Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys
145 150 155 160

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

Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn
180 185 190

Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys

<212> PRT

<213> 人H序列

<220>

<223> 具有經截短可變區之成熟可溶性 hTERT-TCR-1 β鏈。

<400> 56

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

Arg Ala Asp Cys Gly
245

<210> 57
<211> 248
<212> PRT
<213> 智人

<400> 57

Gly Ala Gly Val Ser Gln Ser Pro Ser Asn Lys Val Thr Glu Lys Gly
1 5 10 15

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

Tyr Trp Tyr Arg Gln Ser Leu Gly Gln Gly Leu Glu Phe Leu Ile Tyr
35 40 45

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

Phe Ser Ala Glu Arg Thr Gly Gly Ser Val Ser Thr Leu Thr Ile Gln
65 70 75 80

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

Gly Gly Gly Asp His Thr Asp Thr Gln Tyr Phe Gly Pro Gly Thr Arg
100 105 110

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

Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln Lys Ala Thr
130 135 140

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

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

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

Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn Pro Arg Asn
195 200 205

His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu Asn Asp Glu
210 215 220

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

Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly
245

<210> 58
<211> 41
<212> PRT
<213> 智人

<400> 58

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> 59
<211> 180
<212> PRT
<213> 人工序列

<220>
<223> CD28跨膜域-CD28胞内域-CD3ζ胞内域CAR信号传导尾部

<400> 59

Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu
1 5 10 15

Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser
20 25 30

Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly
35 40 45

Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala
50 55 60

Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala
65 70 75 80

Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg
85 90 95

Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu
100 105 110

Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn
115 120 125

Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met
 130 135 140
 Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly
 145 150 155 160
 Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala
 165 170 175
 Leu Pro Pro Arg
 180
 <210> 60
 <211> 411
 <212> PRT
 <213> 人工序列
 <220>
 <223> 具有全長可變區、經半胱胺酸取代之固定區及CD28-CD3ε尾部
 以及前導序列之成熟可溶性 hTERT-TCR-1 α鏈
 <400> 60
 Met Ser Leu Ser Ser Leu Leu Lys Val Val Thr Ala Ser Leu Trp Leu
 1 5 10 15
 Gly Pro Gly Ile Ala Gln Lys Ile Thr Gln Thr Gln Pro Gly Met Phe
 20 25 30
 Val Gln Glu Lys Glu Ala Val Thr Leu Asp Cys Thr Tyr Asp Thr Ser
 35 40 45
 Asp Gln Ser Tyr Gly Leu Phe Trp Tyr Lys Gln Pro Ser Ser Gly Glu
 50 55 60
 Met Ile Phe Leu Ile Tyr Gln Gly Ser Tyr Asp Glu Gln Asn Ala Thr
 65 70 75 80
 Glu Gly Arg Tyr Ser Leu Asn Phe Gln Lys Ala Arg Lys Ser Ala Asn
 85 90 95
 Leu Val Ile Ser Ala Ser Gln Leu Gly Asp Ser Ala Met Tyr Phe Cys
 100 105 110
 Ala Met Arg Glu Ile Tyr Ser Ser Ala Ser Lys Ile Ile Phe Gly Ser
 115 120 125
 Gly Thr Arg Leu Ser Ile Arg Pro Asn Ile Gln Asn Pro Asp Pro Ala
 130 135 140
 Val Tyr Gln Leu Arg Asp Ser Lys Ser Ser Asp Lys Ser Val Cys Leu
 145 150 155 160

Phe Thr Asp Phe Asp Ser Gln Thr Asn Val Ser Gln Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Asp Val Tyr Ile Thr Asp Lys Cys Val Leu Asp Met Arg Ser Met Asp
 180 185 190
 Phe Lys Ser Asn Ser Ala Val Ala Trp Ser Asn Lys Ser Asp Phe Ala
 195 200 205
 Cys Ala Asn Ala Phe Asn Asn Ser Ile Ile Pro Glu Asp Thr Phe Phe
 210 215 220
 Pro Ser Pro Glu Ser Ser Cys Phe Trp Val Leu Val Val Val Gly Gly
 225 230 235
 Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala Phe Ile Ile Phe
 245 250 255
 Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser Asp Tyr Met Asn
 260 265 270
 Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His Tyr Gln Pro Tyr
 275 280 285
 Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg Val Lys Phe Ser
 290 295 300
 Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln Asn Gln Leu Tyr
 305 310 315 320
 Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp Val Leu Asp Lys
 325 330 335
 Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro Arg Arg Lys Asn
 340 345 350
 Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp Lys Met Ala Glu
 355 360 365
 Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg Arg Gly Lys Gly
 370 375 380
 His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr Lys Asp Thr Tyr
 385 390 395 400
 Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 405 410

<210> 61
 <211> 447

<212> PRT

<213> 人工序列

<220>

<223> 具有全長可變區、經半胱胺酸取代之恆定區及CD28-CD3ε尾部
以及前導序列之成熟可溶性 hTERT-TCR-1 β鏈。

<400> 61

Met Gly Thr Arg Leu Leu Phe Trp Val Ala Phe Cys Leu Leu Gly Ala
1 5 10 15

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

Glu Lys Gly Lys Asp Val Glu Leu Arg Cys Asp Pro Ile Ser Gly His
35 40 45

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

Leu Ile Tyr Phe Gln Gly Asn Ser Ala Pro Asp Lys Ser Gly Leu Pro
65 70 75 80

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

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

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

Gly Thr Arg Leu Thr Val Leu Glu Asp Leu Lys Asn Val Phe Pro Pro
130 135 140

Glu Val Ala Val Phe Glu Pro Ser Glu Ala Glu Ile Ser His Thr Gln
145 150 155 160

Lys Ala Thr Leu Val Cys Leu Ala Thr Gly Phe Tyr Pro Asp His Val
165 170 175

Glu Leu Ser Trp Trp Val Asn Gly Lys Glu Val His Ser Gly Val Cys
180 185 190

Thr Asp Pro Gln Pro Leu Lys Glu Gln Pro Ala Leu Asn Asp Ser Arg
195 200 205

Tyr Cys Leu Ser Ser Arg Leu Arg Val Ser Ala Thr Phe Trp Gln Asn
210 215 220

Pro Arg Asn His Phe Arg Cys Gln Val Gln Phe Tyr Gly Leu Ser Glu
225 230 235 240

Asn Asp Glu Trp Thr Gln Asp Arg Ala Lys Pro Val Thr Gln Ile Val
 245 250 255
 Ser Ala Glu Ala Trp Gly Arg Ala Asp Cys Gly Phe Trp Val Leu Val
 260 265 270
 Val Val Gly Gly Val Leu Ala Cys Tyr Ser Leu Leu Val Thr Val Ala
 275 280 285
 Phe Ile Ile Phe Trp Val Arg Ser Lys Arg Ser Arg Leu Leu His Ser
 290 295 300
 Asp Tyr Met Asn Met Thr Pro Arg Arg Pro Gly Pro Thr Arg Lys His
 305 310 315
 Tyr Gln Pro Tyr Ala Pro Pro Arg Asp Phe Ala Ala Tyr Arg Ser Arg
 320 325 330 335
 Val Lys Phe Ser Arg Ser Ala Asp Ala Pro Ala Tyr Gln Gln Gly Gln
 340 345 350
 Asn Gln Leu Tyr Asn Glu Leu Asn Leu Gly Arg Arg Glu Glu Tyr Asp
 355 360 365
 Val Leu Asp Lys Arg Arg Gly Arg Asp Pro Glu Met Gly Gly Lys Pro
 370 375 380
 Arg Arg Lys Asn Pro Gln Glu Gly Leu Tyr Asn Glu Leu Gln Lys Asp
 385 390 395 400
 Lys Met Ala Glu Ala Tyr Ser Glu Ile Gly Met Lys Gly Glu Arg Arg
 405 410 415
 Arg Gly Lys Gly His Asp Gly Leu Tyr Gln Gly Leu Ser Thr Ala Thr
 420 425 430
 Lys Asp Thr Tyr Asp Ala Leu His Met Gln Ala Leu Pro Pro Arg
 435 440 445

<210> 62
 <211> 834
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 62
 atgtcacttt ctagcctgct gaaggtggtc acagcttcac tgtggctagg acctggcatt 60
 gccagaaga taactcaaac ccaaccagga atgttcgtgc aggaaaagga ggctgtgact 120
 ctggactgca catatgacac cagtgatcaa agttatggtc tattctggta caagcagccc 180
 agcagtgggg aaatgatttt tcttatttat caggggtctt atgacgagca aaatgcaaca 240

gaaggtcgct actcattgaa tttccagaag gcaagaaaat ccgccaacct tgatcatctcc 300
 gcttcacaac tgggggactc agcaatgtat ttctgtgcaa tgagagagat ctacagcagt 360
 gcttccaaga taatctttgg atcagggacc agactcagca tccggccaaa tatccagaac 420
 cctgaccctg ccgtgtacca gctgagagac tctaaatcca gtgacaagtc tgtctgccta 480
 ttcaccgatt ttgattctca aacaaatgtg tcacaaagta aggattctga tgtgtatatac 540
 acagacaaaa ctgtgctaga catgaggtct atggacttca agagcaacag tgctgtggcc 600
 tggagcaaca aatctgactt tgcatgtgca aacgccttca acaacagcat tattccagaa 660
 gacaccttct tccccagccc agaaagtcc tgtgatgtca agctggtcga gaaaagcttt 720
 gaaacagata cgaacctaaa ctttcaaac ctgtcagtga ttgggttccg aatcctctc 780
 ctgaaagtgg ccgggtttaa tctgctcatg acgctgcggc tgtggtccag ctag 834

<210> 63
 <211> 834
 <212> DNA
 <213> 智人

<400> 63
 atgtcacttt ctagcctgct gaaggtggtc acagcttcac tgtggctagg acctggcatt 60
 gccagaaga taactcaaac ccaaccagga atgttcgtgc aggaaaagga ggctgtgact 120
 ctggactgca catatgacac cagtgatcaa agttatggtc tattctggta caagcagccc 180
 agcagtgggg aaatgatitit tcttatttat caggggtctt atgacgagca aaatgcaaca 240
 gaaggtcgct actcattgaa tttccagaag gcaagaaaat ccgccaacct tgatcatctcc 300
 gcttcacaac tgggggactc agcaatgtat ttctgtgcaa tgagagagat ctacagcagt 360
 gcttccaaga taatctttgg atcagggacc agactcagca tccggccaaa tatccagaac 420
 cctgaccctg ccgtgtacca gctgagagac tctaaatcca gtgacaagtc tgtctgccta 480
 ttcaccgatt ttgattctca aacaaatgtg tcacaaagta aggattctga tgtgtatatac 540
 acagacaaaa ctgtgctaga catgaggtct atggacttca agagcaacag tgctgtggcc 600
 tggagcaaca aatctgactt tgcatgtgca aacgccttca acaacagcat tattccagaa 660
 gacaccttct tccccagccc agaaagtcc tgtgatgtca agctggtcga gaaaagcttt 720
 gaaacagata cgaacctaaa ctttcaaac ctgtcagtga ttgggttccg aatcctctc 780
 ctgaaagtgg ccgggtttaa tctgctcatg acgctgcggc tgtggtccag ctag 834

<210> 64
 <211> 78
 <212> DNA
 <213> 小核糖核酸病毒

<400> 64
 agagccaaga gaggcagcgg cgccaccaac ttcagcctgc tgaagcaggc cggcgacgtg 60
 gaagagaacc ctggacca 78

<210> 65

<211> 15
 <212> PRT
 <213> 大腸桿菌(Escherichia coli)

<400> 65

Gly Gly Leu Asn Asp Ile Phe Glu Ala Gln Lys Ile Glu Trp His
 1 5 10 15

<210> 66
 <211> 25
 <212> PRT
 <213> 小核糖核酸病毒

<400> 66

Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln
 1 5 10 15

Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro Gly
 20 25

<210> 67
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> G+S 連接子單元

<400> 67

Gly Gly Gly Gly Ser
 1 5

<210> 68
 <211> 1048
 <212> PRT
 <213> 人工序列

<220>
 <223> 68

<400> 68

Met Asp Asp Gln Arg Asp Leu Ile Ser Asn Asn Glu Gln Leu Pro Met
 1 5 10 15

Leu Gly Arg Arg Pro Gly Ala Pro Glu Ser Lys Cys Ser Arg Gly Ala
 20 25 30

Leu Tyr Thr Gly Phe Ser Ile Leu Val Thr Leu Leu Leu Ala Gly Gln
 35 40 45

Ala Thr Thr Ala Tyr Phe Leu Tyr Gln Gln Gln Gly Arg Leu Asp Lys
 50 55 60

Leu Thr Val Thr Ser Gln Asn Leu Gln Leu Glu Asn Leu Arg Met Lys
 65 70 75 80

Leu Pro Lys Pro Pro Lys Pro Val Ser Lys Gly Thr Glu Ala Arg Pro
 85 90 95
 Ala Leu Leu Thr Ser Arg Leu Arg Phe Ile Pro Lys Leu Glu Gln Asn
 100 105 110
 Ala Thr Lys Tyr Gly Asn Met Thr Glu Asp His Val Met His Leu Leu
 115 120 125
 Gln Asn Ala Asp Pro Leu Lys Val Tyr Pro Pro Leu Lys Gly Ser Phe
 130 135 140
 Pro Glu Asn Leu Arg His Leu Lys Asn Thr Met Glu Thr Ile Asp Trp
 145 150 155 160
 Lys Val Phe Glu Ser Trp Met His His Trp Leu Leu Phe Glu Met Ser
 165 170 175
 Arg His Ser Leu Glu Gln Lys Pro Thr Asp Ala Pro Pro Lys Glu Ser
 180 185 190
 Leu Glu Leu Glu Asp Pro Ser Ser Gly Leu Gly Val Thr Lys Gln Asp
 195 200 205
 Leu Gly Pro Val Pro Met Glu Phe Arg Ala Lys Arg Gly Ser Gly Ala
 210 215 220
 Thr Asn Phe Ser Leu Leu Lys Gln Ala Gly Asp Val Glu Glu Asn Pro
 225 230 235 240
 Gly Pro Met Glu Asp Ala Lys Asn Ile Lys Lys Gly Pro Ala Pro Phe
 245 250 255
 Tyr Pro Leu Glu Asp Gly Thr Ala Gly Glu Gln Leu His Lys Ala Met
 260 265 270
 Lys Arg Tyr Ala Leu Val Pro Gly Thr Ile Ala Phe Thr Asp Ala His
 275 280 285
 Ile Glu Val Asp Ile Thr Tyr Ala Glu Tyr Phe Glu Met Ser Val Arg
 290 295 300
 Leu Ala Glu Ala Met Lys Arg Tyr Gly Leu Asn Thr Asn His Arg Ile
 305 310 315 320
 Val Val Cys Ser Glu Asn Ser Leu Gln Phe Phe Met Pro Val Leu Gly
 325 330 335
 Ala Leu Phe Ile Gly Val Ala Val Ala Pro Ala Asn Asp Ile Tyr Asn
 340 345 350

Glu Arg Glu Leu Leu Asn Ser Met Gly Ile Ser Gln Pro Thr Val Val
 355 360 365
 Phe Val Ser Lys Lys Gly Leu Gln Lys Ile Leu Asn Val Gln Lys Lys
 370 375 380
 Leu Pro Ile Ile Gln Lys Ile Ile Ile Met Asp Ser Lys Thr Asp Tyr
 385 390 395 400
 Gln Gly Phe Gln Ser Met Tyr Thr Phe Val Thr Ser His Leu Pro Pro
 405 410 415
 Gly Phe Asn Glu Tyr Asp Phe Val Pro Glu Ser Phe Asp Arg Asp Lys
 420 425 430
 Thr Ile Ala Leu Ile Met Asn Ser Ser Gly Ser Thr Gly Leu Pro Lys
 435 440 445
 Gly Val Ala Leu Pro His Arg Thr Ala Cys Val Arg Phe Ser His Ala
 450 455 460
 Arg Asp Pro Ile Phe Gly Asn Gln Ile Ile Pro Asp Thr Ala Ile Leu
 465 470 475 480
 Ser Val Val Pro Phe His His Gly Phe Gly Met Phe Thr Thr Leu Gly
 485 490 495
 Tyr Leu Ile Cys Gly Phe Arg Val Val Leu Met Tyr Arg Phe Glu Glu
 500 505 510
 Glu Leu Phe Leu Arg Ser Leu Gln Asp Tyr Lys Ile Gln Ser Ala Leu
 515 520 525
 Leu Val Pro Thr Leu Phe Ser Phe Phe Ala Lys Ser Thr Leu Ile Asp
 530 535 540
 Lys Tyr Asp Leu Ser Asn Leu His Glu Ile Ala Ser Gly Gly Ala Pro
 545 550 555 560
 Leu Ser Lys Glu Val Gly Glu Ala Val Ala Lys Arg Phe His Leu Pro
 565 570 575
 Gly Ile Arg Gln Gly Tyr Gly Leu Thr Glu Thr Thr Ser Ala Ile Leu
 580 585 590
 Ile Thr Pro Glu Gly Asp Asp Lys Pro Gly Ala Val Gly Lys Val Val
 595 600 605
 Pro Phe Phe Glu Ala Lys Val Val Asp Leu Asp Thr Gly Lys Thr Leu
 610 615 620

Gly Val Asn Gln Arg Gly Glu Leu Cys Val Arg Gly Pro Met Ile Met
 625 630 635 640
 Ser Gly Tyr Val Asn Asn Pro Glu Ala Thr Asn Ala Leu Ile Asp Lys
 645 650 655
 Asp Gly Trp Leu His Ser Gly Asp Ile Ala Tyr Trp Asp Glu Asp Glu
 660 665 670
 His Phe Phe Ile Val Asp Arg Leu Lys Ser Leu Ile Lys Tyr Lys Gly
 675 680 685
 Tyr Gln Val Ala Pro Ala Glu Leu Glu Ser Ile Leu Leu Gln His Pro
 690 695 700
 Asn Ile Phe Asp Ala Gly Val Ala Gly Leu Pro Asp Asp Ala Gly
 705 710 715 720
 Glu Leu Pro Ala Ala Val Val Val Leu Glu His Gly Lys Thr Met Thr
 725 730 735
 Glu Lys Glu Ile Val Asp Tyr Val Ala Ser Gln Val Thr Thr Ala Lys
 740 745 750
 Lys Leu Arg Gly Gly Val Val Phe Val Asp Glu Val Pro Lys Gly Leu
 755 760 765
 Thr Gly Lys Leu Asp Ala Arg Lys Ile Arg Glu Ile Leu Ile Lys Ala
 770 775 780
 Lys Lys Gly Gly Lys Ile Ala Val Ala Lys Gly Lys Ser Glu Glu Glu
 785 790 795 800
 Leu Ala Asn Cys Phe Arg Ile Pro Pro Leu Val Ser Lys Gly Glu Glu
 805 810 815
 Leu Phe Thr Gly Val Val Pro Ile Leu Val Glu Leu Asp Gly Asp Val
 820 825 830
 Asn Gly His Lys Phe Ser Val Ser Gly Glu Gly Glu Gly Asp Ala Thr
 835 840 845
 Tyr Gly Lys Leu Thr Leu Lys Phe Ile Cys Thr Thr Gly Lys Leu Pro
 850 855 860
 Val Pro Trp Pro Thr Leu Val Thr Thr Leu Thr Tyr Gly Val Gln Cys
 865 870 875 880
 Phe Ser Arg Tyr Pro Asp His Met Lys Gln His Asp Phe Phe Lys Ser
 885 890 895

Ala Met Pro Glu Gly Tyr Val Gln Glu Arg Thr Ile Phe Phe Lys Asp
 900 905 910

Asp Gly Asn Tyr Lys Thr Arg Ala Glu Val Lys Phe Glu Gly Asp Thr
 915 920 925

Leu Val Asn Arg Ile Glu Leu Lys Gly Ile Asp Phe Lys Glu Asp Gly
 930 935 940

Asn Ile Leu Gly His Lys Leu Glu Tyr Asn Tyr Asn Ser His Asn Val
 945 950 955 960

Tyr Ile Met Ala Asp Lys Gln Lys Asn Gly Ile Lys Val Asn Phe Lys
 965 970 975

Ile Arg His Asn Ile Glu Asp Gly Ser Val Gln Leu Ala Asp His Tyr
 980 985 990

Gln Gln Asn Thr Pro Ile Gly Asp Gly Pro Val Leu Leu Pro Asp Asn
 995 1000 1005

His Tyr Leu Ser Thr Gln Ser Ala Leu Ser Lys Asp Pro Asn Glu
 1010 1015 1020

Lys Arg Asp His Met Val Leu Leu Glu Phe Val Thr Ala Ala Gly
 1025 1030 1035

Ile Thr Leu Gly Met Asp Glu Leu Tyr Lys
 1040 1045

【發明申請專利範圍】

【第1項】

一種核酸分子，其編碼在由HLA-DP4 II類主要組織相容性複合體(MHC)呈現hTERT肽時能夠結合該肽之特異性結合分子，該hTERT肽包含SEQ ID NO: 1中所闡述之胺基酸序列，其中該特異性結合分子包含含有T細胞受體(TCR)之 α 鏈之可變區的第一多肽及含有 β 鏈之可變區的第二多肽，且其中：

(a) 該 α 鏈之可變區包含CDR序列CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別包含SEQ ID NO: 2、3及4中所闡述之胺基酸序列；及

(b) 該 β 鏈之可變區包含CDR序列CDR1、CDR2及CDR3，該等CDR序列分別包含SEQ ID NO: 5、6及7中所闡述之序列。

【第2項】

如請求項1之核酸分子，其中該 α 鏈之可變區包含SEQ ID NO: 9中所闡述之胺基酸序列、或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列；及

該 β 鏈之可變區包含SEQ ID NO: 11中所闡述之胺基酸序列、或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列；

視情況其中該特異性結合分子經編碼為包含與該第二多肽連接之該第一多肽的單鏈。

【第3項】

如請求項1或2之核酸分子，其中該第一及第二多肽由自我剪接2A肽連接子連接，該2A肽連接子為包含SEQ ID NO: 18中所闡述之胺基酸序列或與其具有至少80%序列一致性之胺基酸序列。

【第4項】

如請求項1或2之核酸分子，其中該特異性結合分子為TCR分子，當由免疫效應細胞表現時，該TCR分子係位於該細胞之表面上，且其中

該第一多肽包含 α 鏈之該恆定區，該恆定區包含SEQ ID NO: 12中所闡述之胺基酸序列、或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列；及

該第二多肽包含 β 鏈之該恆定區，該恆定區包含SEQ ID NO: 13中所闡述之胺基酸序列、或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。

【第5項】

如請求項4之核酸分子，其中該第一多肽包含SEQ ID NO: 38中所闡述之胺基酸序列、或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列；及

該第二多肽包含SEQ ID NO: 40中所闡述之胺基酸序列、或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。

【第6項】

如請求項5之核酸分子，其中該TCR分子包含含有SEQ ID NO: 15中所闡述之胺基酸序列的第一多肽及含有SEQ ID NO: 17中所闡述之胺基酸序列的第二多肽。

【第7項】

如請求項1或2之核酸分子，其中：

該第一多肽包含 α 鏈之該恆定區，該恆定區包含SEQ ID NO: 21中所闡述之胺基酸序列、或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列；及

該第二多肽包含 β 鏈之該恆定區，該恆定區包含SEQ ID NO: 22中所闡述之胺基酸序列、或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列；

且其中該特異性結合分子為：

(i) 可溶性TCR；

(ii) TCR-CAR，其中該第一多肽或該第二多肽包含跨膜域及胞內信號傳導域；或

(iii) TCR-抗體構築體，其中該第一多肽或該第二多肽進一步包含抗體之Fc域。

【第8項】

如請求項7之核酸分子，其中其中該第一多肽包含SEQ ID NO: 42中所闡述之胺基酸序列、或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列，及該第二多肽包含SEQ ID NO: 44中所闡述之胺基酸序列、或與其具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。

【第9項】

如請求項1或2之核酸分子，其中該特異性結合分子為嵌合TCR，其包含：

(i) scFv-TCR，其包含 α 鏈之該可變區及 β 鏈之該可變區；

(ii) 跨膜域；及

(iii) 胞內信號傳導域。

【第10項】

請求項9之核酸分子，其中：

(i) 該 α 鏈之可變區及該 β 鏈之可變區由連接子連接；及/或

(ii) 該scFv-TCR包含恆定區，該恆定區含有SEQ ID NO: 29或SEQ ID NO: 30中所闡述之胺基酸序列或與SEQ ID NO: 29或SEQ ID NO: 30具有至少95%序列一致性之胺基酸序列。

【第11項】

如請求項10之核酸分子，其中該連接子為G4S連接子。

【第12項】

一種重組構築體，其包含與異源核酸序列連接之如請求項1至11中任一項之核酸分子，視情況其中該異源核酸序列為表現控制序列。

【第13項】

一種載體，其包含如請求項1至11中任一項之核酸分子或如請求項12之重組構築體。

【第14項】

一種套組，其包含第一載體及第二載體，其中該第一載體包含編碼如請求項1、2或4至8中任一項所定義之第一多肽的核酸分子，且該第二載體包含編碼如請求項1、2或4至8中任一項所定義之第二多肽的核酸分子。

【第15項】

一種特異性結合分子，其在由HLA-DP4 II類主要組織相容性複合體(MHC)呈現肽時能夠結合該肽，該肽包含SEQ ID NO: 1中所闡述之序列，該特異性結合分子包含：

- (i) 第一多肽，其包含如請求項1 (a)所定義之 α 鏈之可變區；及
- (ii) 第二多肽，其包含如請求項1 (b)所定義之 β 鏈之可變區。

【第16項】

如請求項15之特異性結合分子，其中該特異性結合分子為：

- (i) 可溶性TCR，其中

該第一多肽包含SEQ ID NO: 41或SEQ ID NO: 42中所闡述之胺基酸序列或與SEQ ID NO: 41或SEQ ID NO: 42具有至少95%序列一致性之胺基酸序列；及

該第二多肽包含SEQ ID NO: 43或SEQ ID NO: 44中所闡述之胺基酸序列或與SEQ ID NO: 43或SEQ ID NO: 44具有至少95%序列一致性之胺基酸序列；

視情況其中該可溶性TCR與治療劑或診斷劑連接或與包含或含有治療劑或診斷劑之載劑連接；或

(ii) TCR-抗體構築體，其中該第一多肽包含SEQ ID NO: 41或SEQ ID NO: 42中所闡述之胺基酸序列或與SEQ ID NO: 41或SEQ ID NO: 42具有至少95%序列一致性之胺基酸序列；

該第二多肽包含SEQ ID NO: 43或SEQ ID NO: 44中所闡述之胺基酸序列或與SEQ ID NO: 43或SEQ ID NO: 44具有至少95%序列一致性之胺基酸序列；及

該第一多肽或該第二多肽包含抗體之Fc域。

【第17項】

一種宿主細胞，其表現如請求項15或16之特異性結合分子，其中該特異性結合分子對於該細胞為異源的。

【第18項】

如請求項17之宿主細胞，其中該細胞為包含以下之免疫效應細胞：

- (i) 如請求項1至11中任一項之核酸分子；
- (ii) 如請求項12之重組構築體；
- (iii) 如請求項13之載體；或
- (iv) 如請求項14之第一及第二載體；

且該免疫效應細胞在其表面上表現該特異性結合分子，該特異性結合分子為如請求項4至6中任一項所定義之TCR、如請求項7或8所定義之

TCR-CAR或如請求項9或10所定義之嵌合TCR。

【第19項】

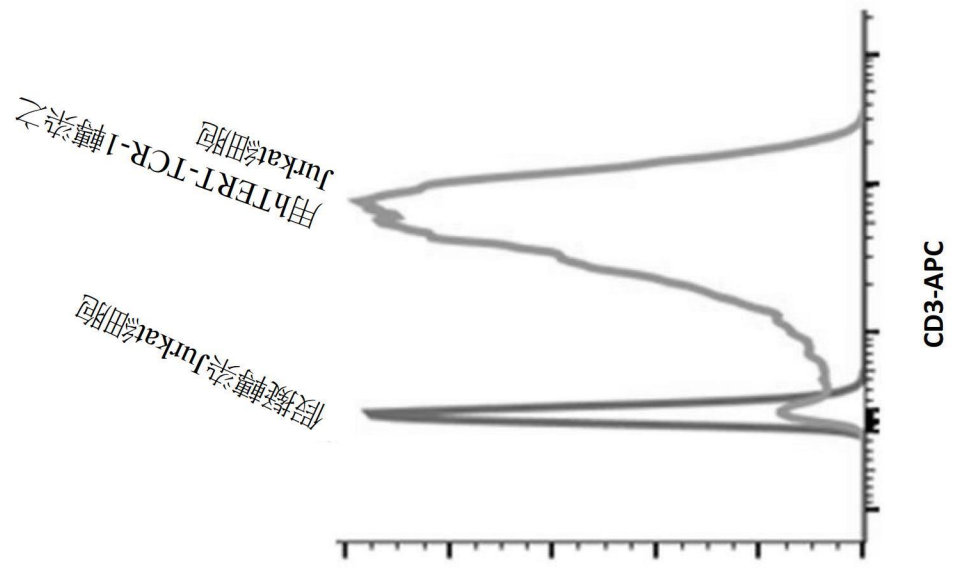
一種組合物，其包含如請求項18之免疫效應細胞或如請求項15或16之特異性結合分子及至少一種生理學上可接受之稀釋劑、載劑或賦形劑。

【第20項】

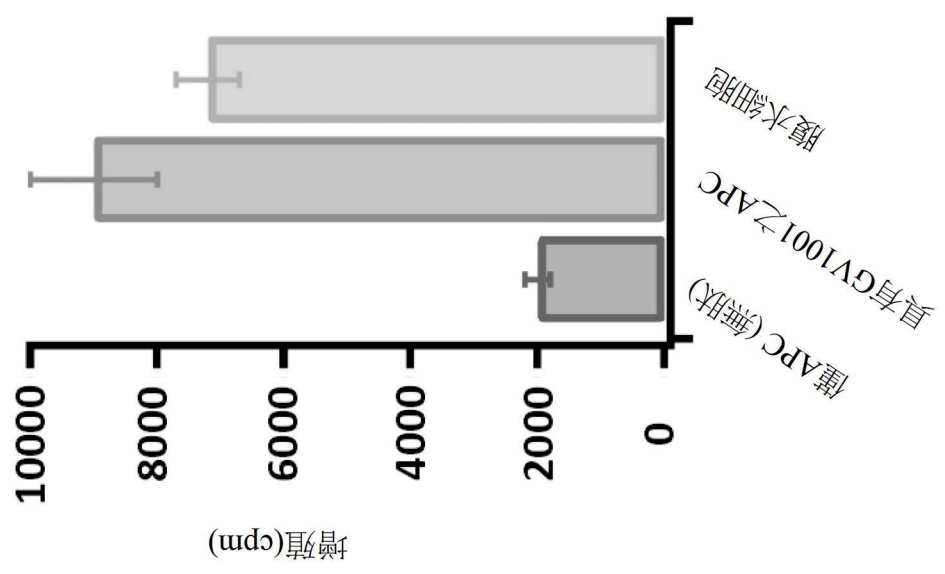
一種如請求項18中所定義之免疫效應細胞、如請求項15或16所定義之特異性結合分子或如請求項19中所定義之組合物之用途，其係用於製備治療表現hTERT癌症之藥物；

視情況其中該癌症為胰臟癌、結腸癌或肺癌。

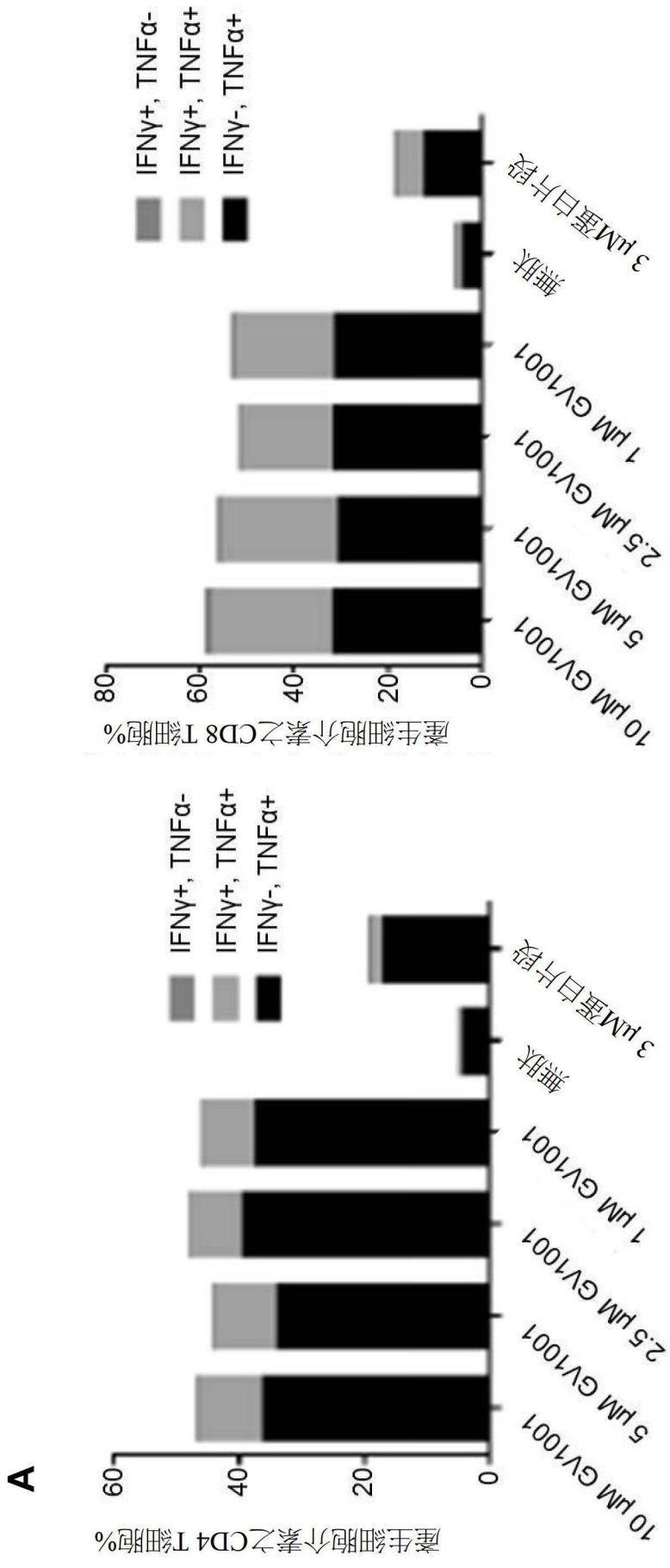
【發明圖式】



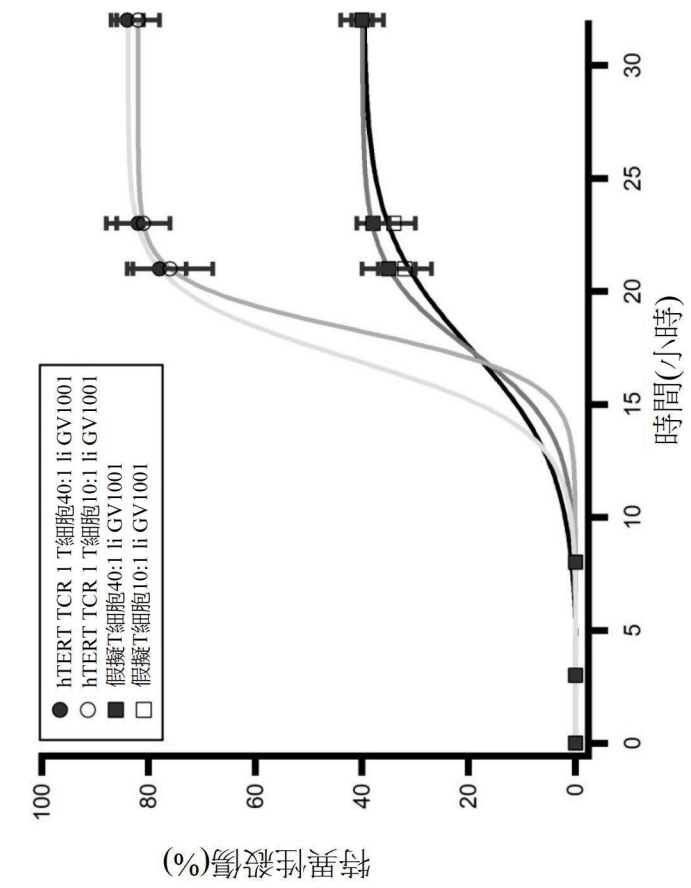
【圖2】



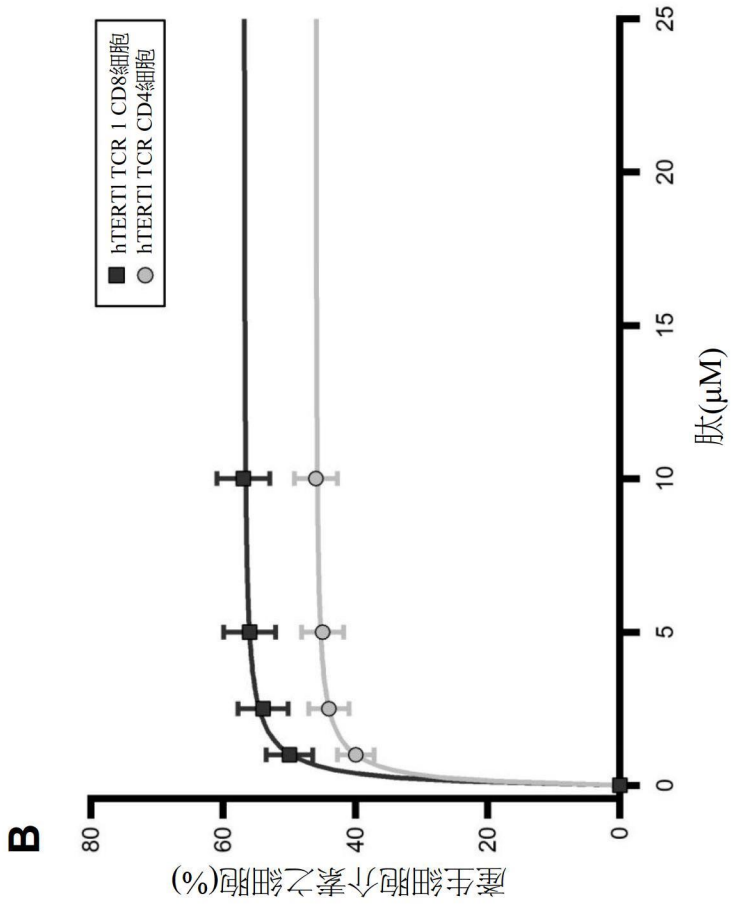
【圖1】



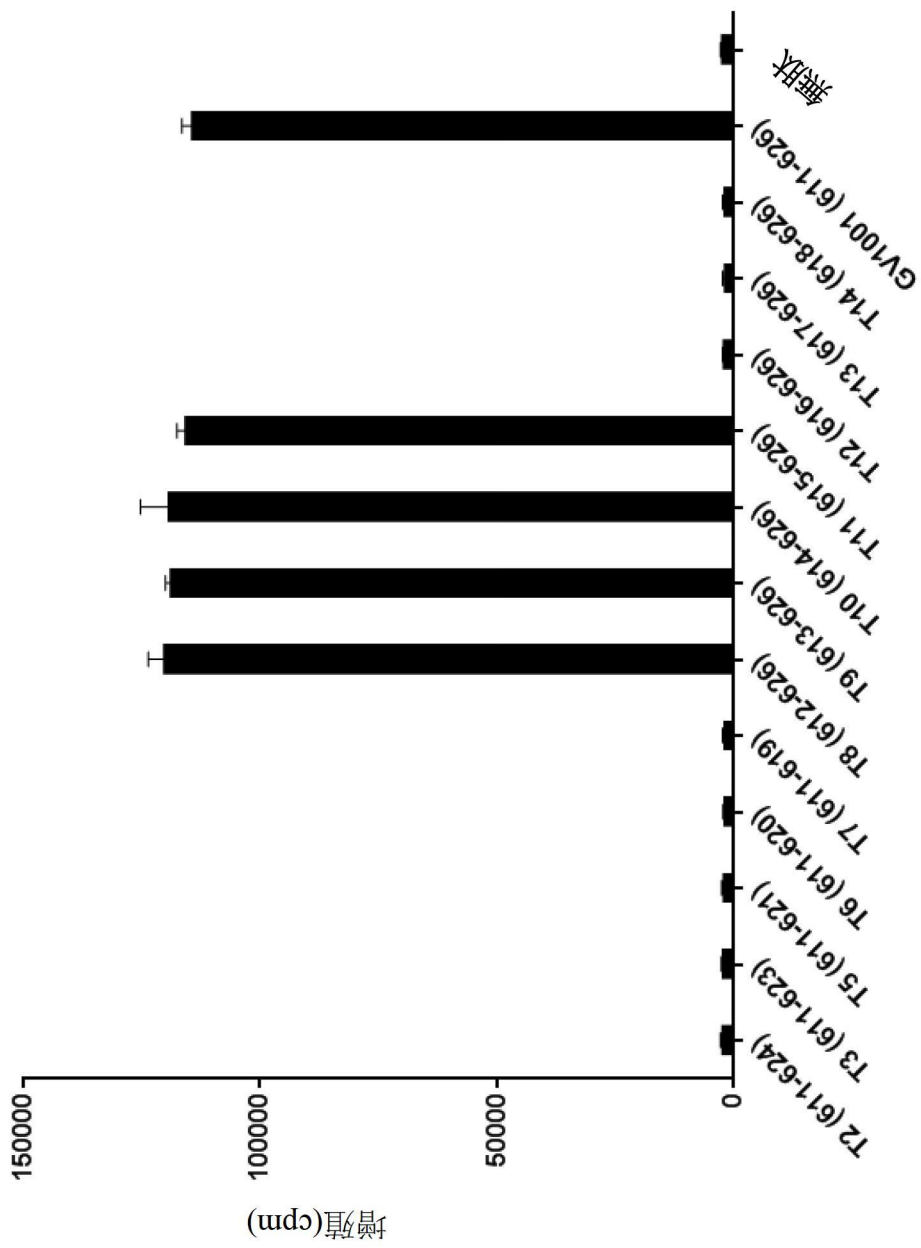
【圖3】



【圖4】



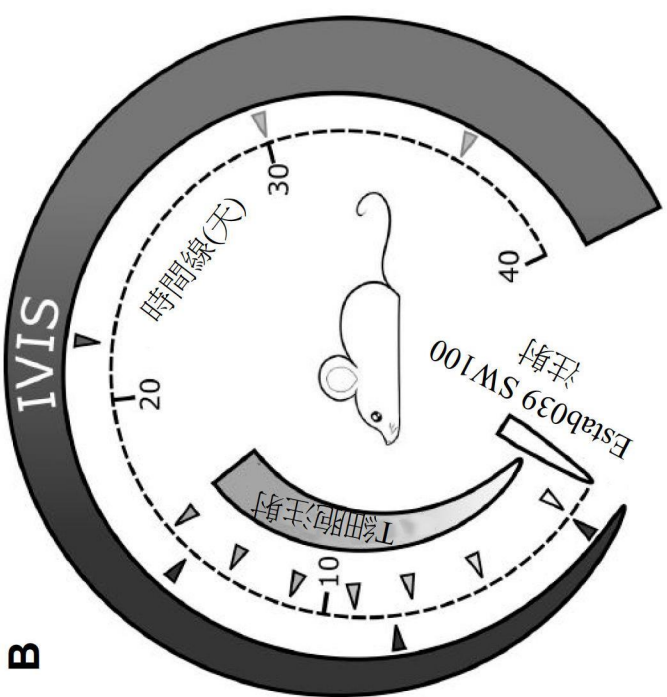
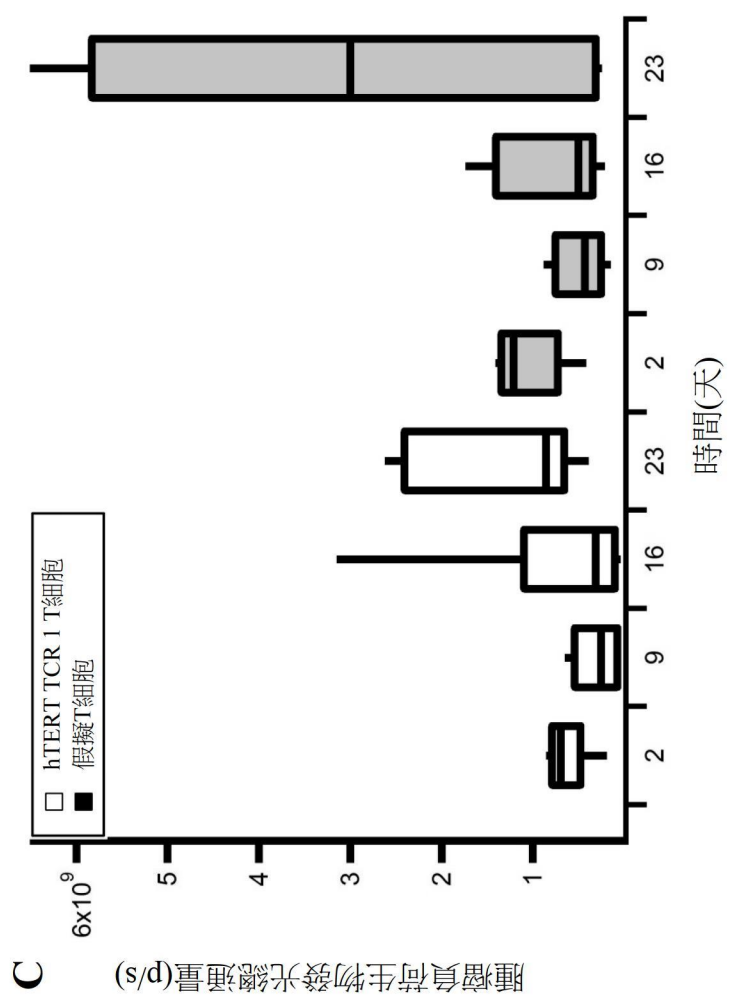
【圖3】(接續)



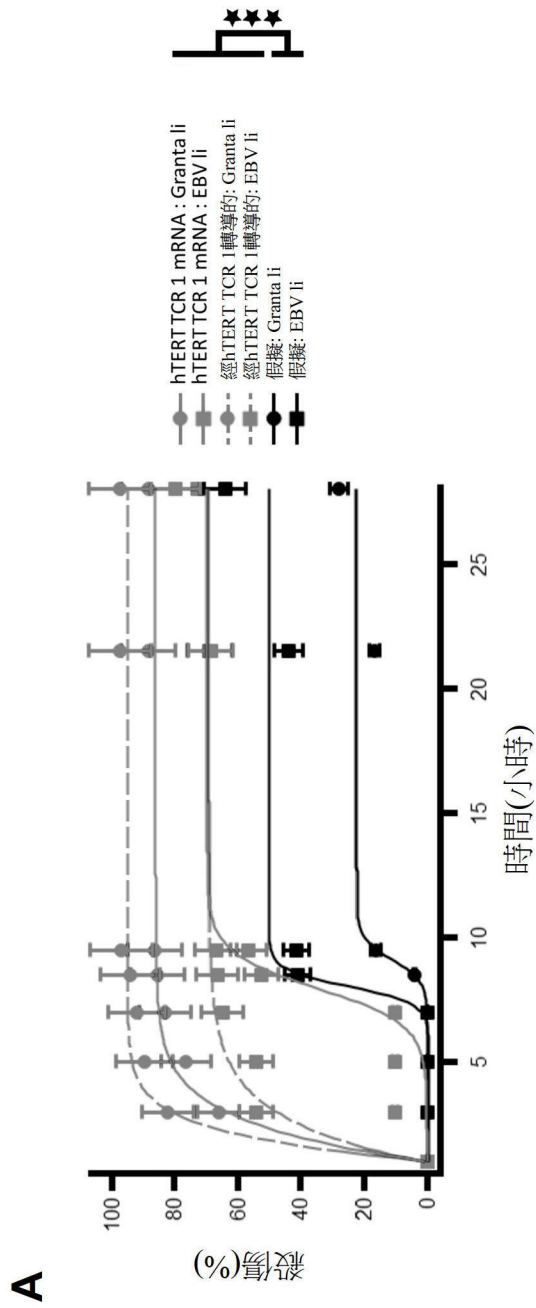
【圖5】



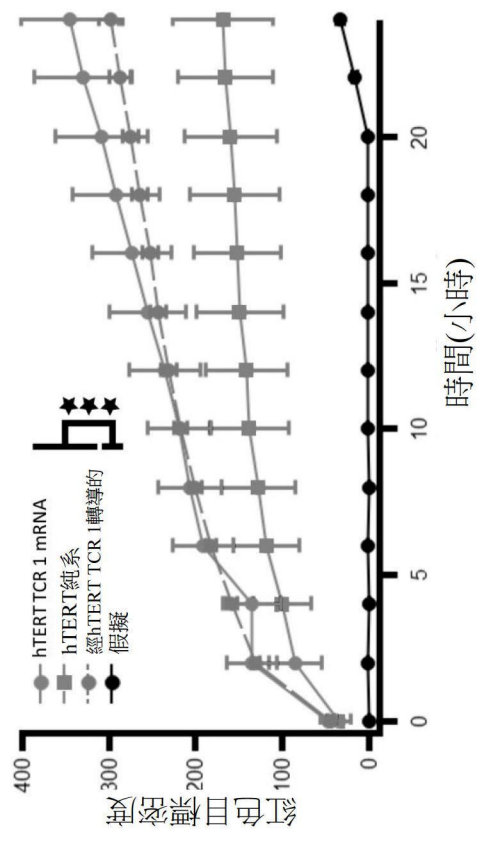
【圖6】



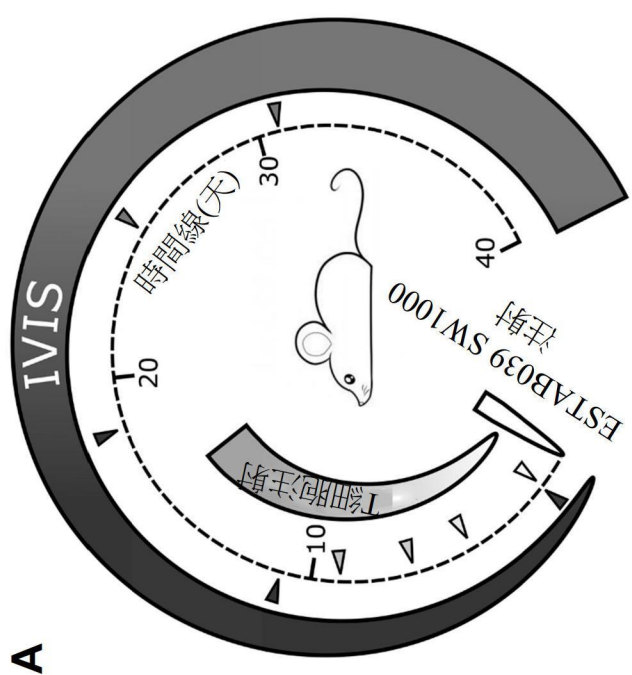
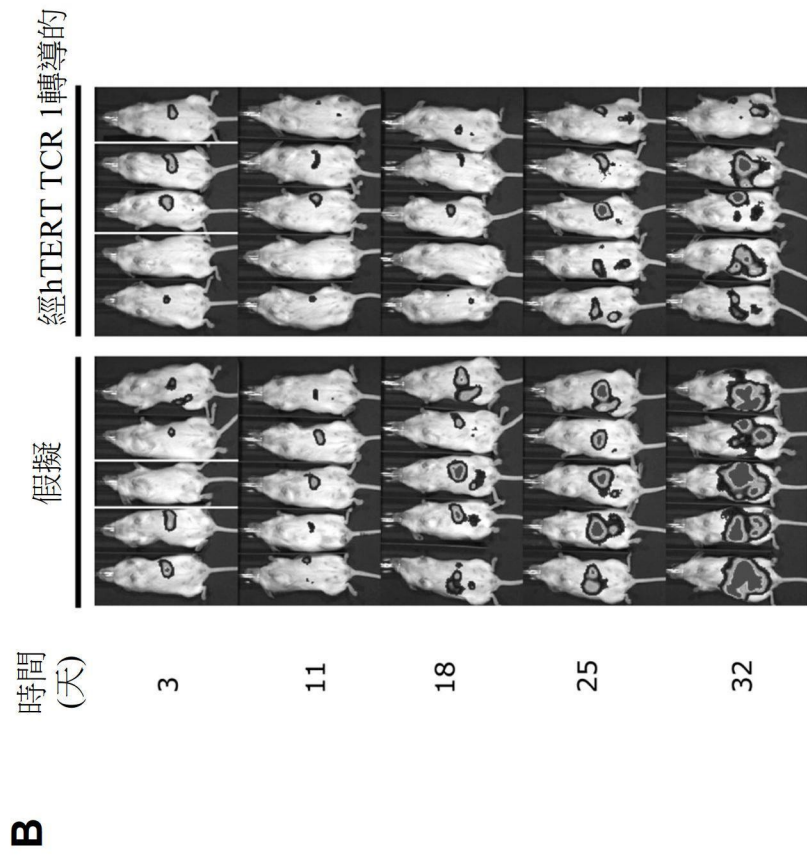
【圖6】(接續)



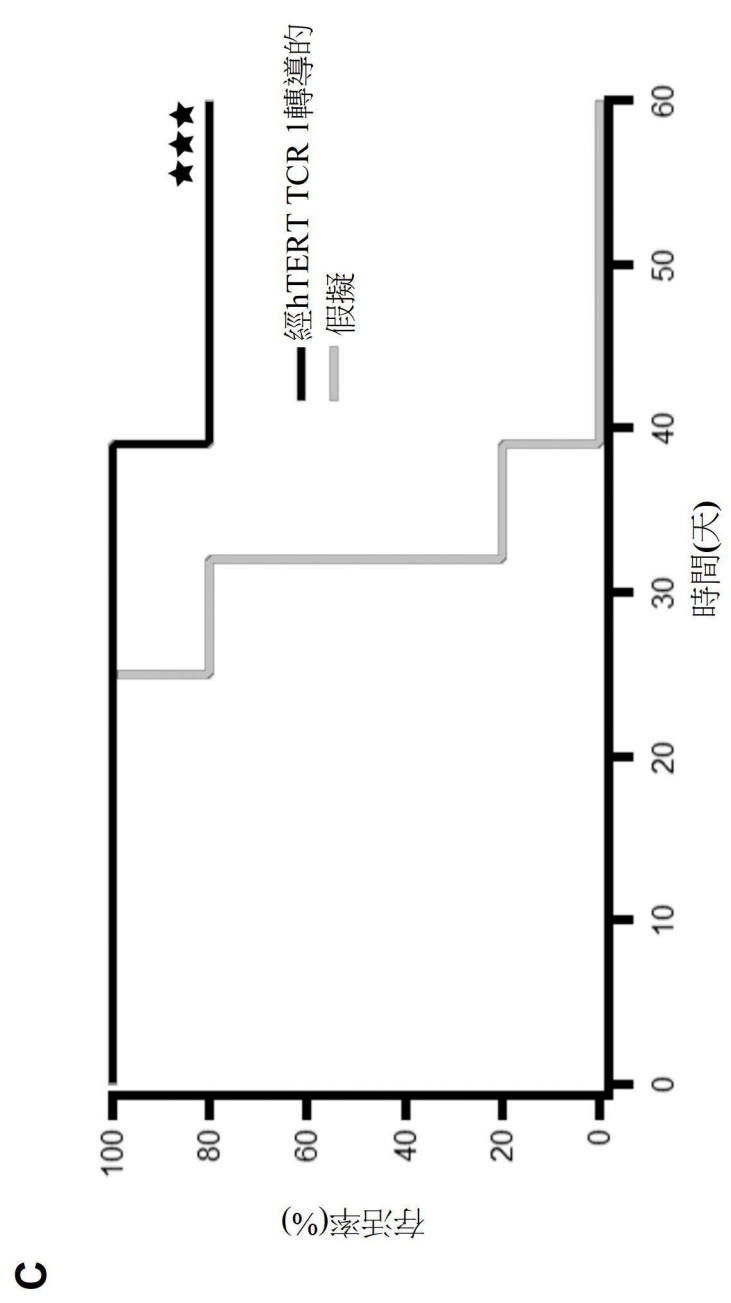
B



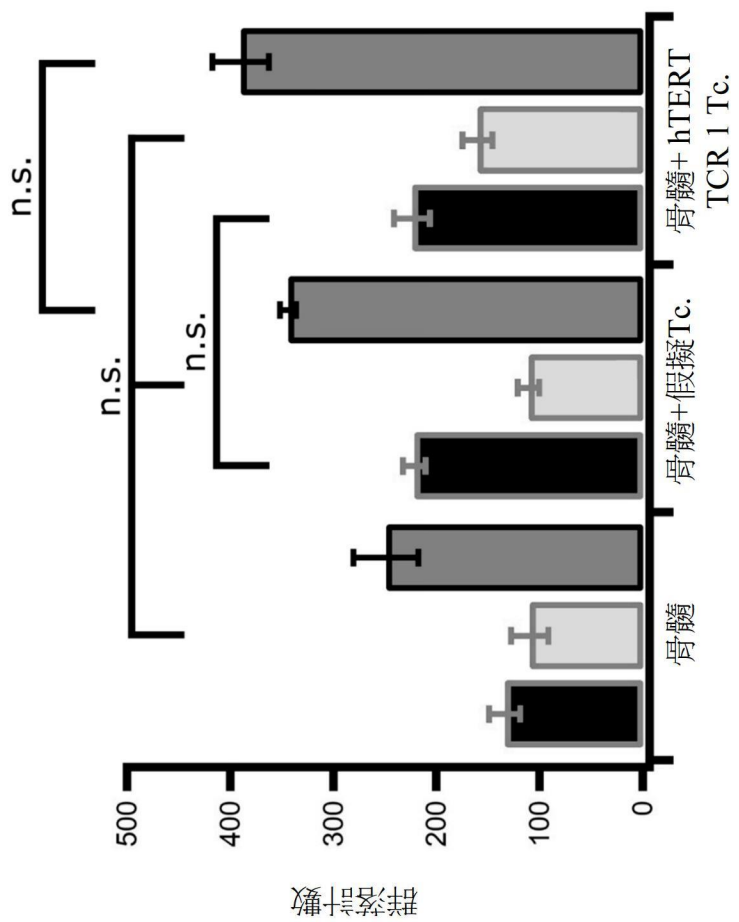
【圖7】



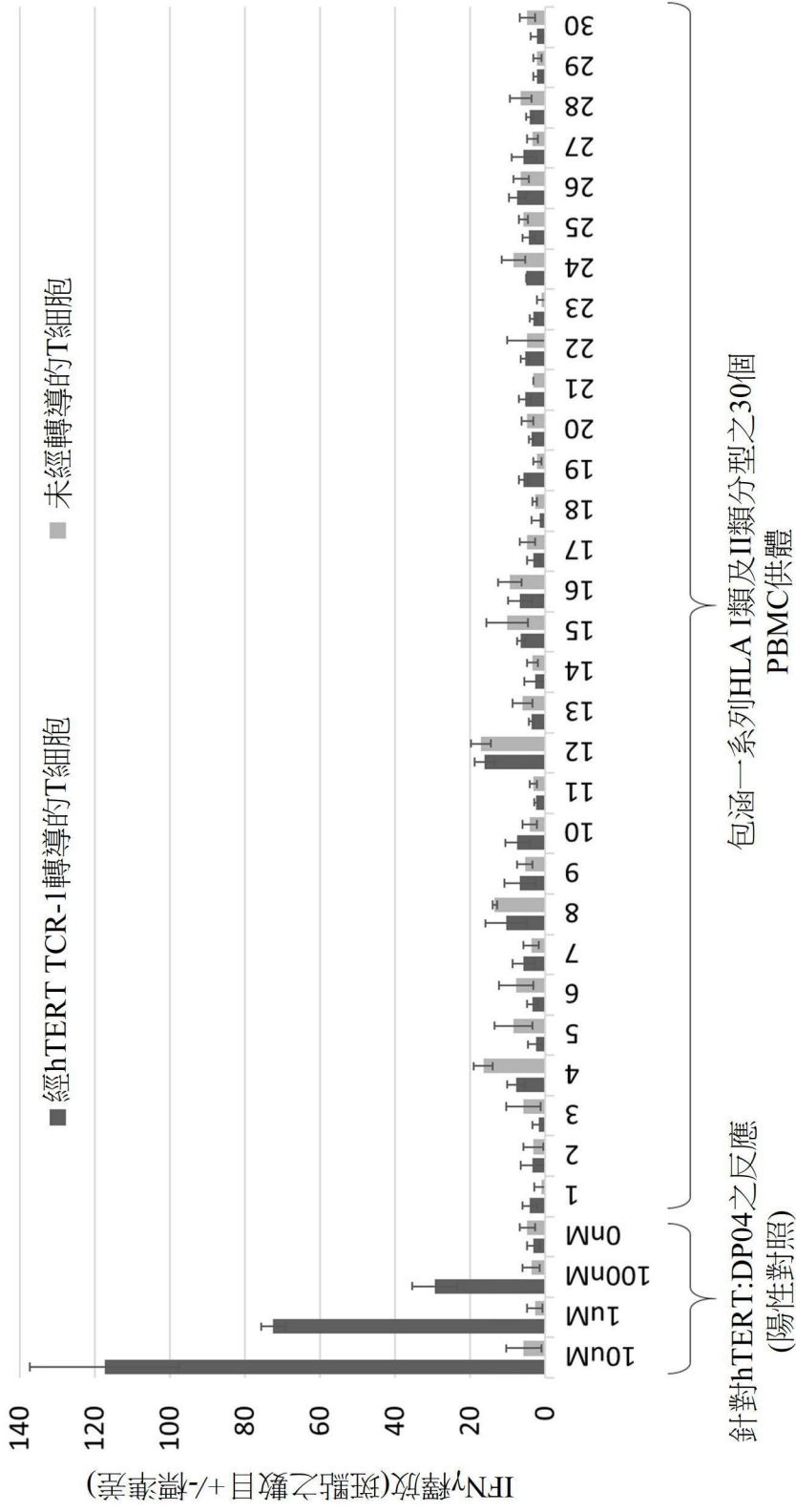
【圖8】



【圖8】(接續)



【圖9】



針對hTERT:DP04之反應 (陽性對照)
 包涵一系列HLA I類及II類分型之30個PBMC供體

【圖10】