



(19) 中華民國智慧財產局

(12) 發明說明書公開本

(11) 公開編號：TW 202417476 A

(43) 公開日：中華民國 113 (2024) 年 05 月 01 日

---

(21) 申請案號：112131020 (22) 申請日：中華民國 112 (2023) 年 08 月 17 日  
(51) Int. Cl. : C07K14/725 (2006.01) C07K16/28 (2006.01)  
A61K39/00 (2006.01) A61P35/00 (2006.01)  
(30) 優先權：2022/08/18 美國 63/399,095  
(71) 申請人：英商英美諾科有限公司 (英國) IMMUNOCORE LIMITED (GB)  
英國  
(72) 發明人：康羅伊 保羅 CONROY, PAUL (IE) ; 哈地 斯蒂芬 HEARTY, STEPHEN (IE) ;  
馬克 洛克 漢 MAK, LOK HANG (DE)  
(74) 代理人：陳長文；朱淑尹；黃裕煦  
申請實體審查：無 申請專利範圍項數：76 項 圖式數：6 共 124 頁

---

(54) 名稱

T 細胞受體及其融合蛋白

(57) 摘要

本揭露提供 T 細胞受體 (TCR) 融合蛋白，以及與其相關的多核苷酸、載體、套組、宿主細胞、醫藥組成物、方法及用途，該 TCR 融合蛋白包含與 GGYDGREHTV (SEQ ID NO:34) HLA-A\*02 複合體結合的 TCR，該 TCR 係與 T 細胞接合域及抗體 Fc 域共價連接，該 T 細胞接合域結合在 T 細胞之細胞表面上表現的蛋白質。

The present disclosure provides T cell receptor (TCR) fusion proteins comprising a TCR that binds to a GGYDGREHTV (SEQ ID NO:34) HLA-A\*02 complex that is covalently linked to a T cell engaging domain that binds a protein expressed on a cell surface of a T cell and an antibody Fc domain, as well as polynucleotides, vectors, kits, host cells, pharmaceutical compositions, methods, and uses related thereto.

指定代表圖：

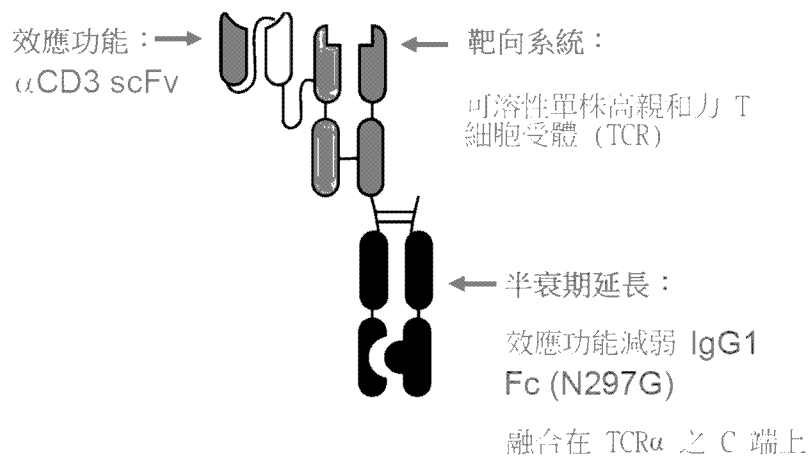


圖 1A

## 【發明摘要】

【中文發明名稱】 T 細胞受體及其融合蛋白

【英文發明名稱】 T CELL RECEPTORS AND FUSION PROTEINS

THEREOF

【中文】本揭露提供 T 細胞受體 (TCR) 融合蛋白，以及與其相關的多核苷酸、載體、套組、宿主細胞、醫藥組成物、方法及用途，該 TCR 融合蛋白包含與 GGYDGREHTV (SEQ ID NO:34) HLA-A\*02 複合體結合的 TCR，該 TCR 係與 T 細胞接合域及抗體 Fc 域共價連接，該 T 細胞接合域結合在 T 細胞之細胞表面上表現的蛋白質。

【英文】The present disclosure provides T cell receptor (TCR) fusion proteins comprising a TCR that binds to a GGYDGREHTV (SEQ ID NO:34) HLA-A\*02 complex that is covalently linked to a T cell engaging domain that binds a protein expressed on a cell surface of a T cell and an antibody Fc domain, as well as polynucleotides, vectors, kits, host cells, pharmaceutical compositions, methods, and uses related thereto.

【指定代表圖】

圖 1A

【代表圖之符號簡單說明】

無

## 【發明說明書】

【中文發明名稱】 T 細胞受體及其融合蛋白

【英文發明名稱】 T CELL RECEPTORS AND FUSION PROTEINS

THEREOF

### 【技術領域】

【0001】 本揭露涉及 T 細胞受體 (TCR) 融合蛋白，以及相關的多核苷酸、載體、套組、宿主細胞、醫藥組成物、方法及用途，該 TCR 融合蛋白包含與 GVYDGREHTV (SEQ ID NO:34) HLA-A\*02 複合體結合的 TCR，該 TCR 係與抗原結合域及抗體 Fc 域共價連接，該抗原結合域結合在 T 細胞之細胞表面上表現的蛋白質。

### 【先前技術】

【0002】 T 細胞受體 (TCR) 係由 CD4+ 及 CD8+ T 細胞自然表現。TCR 旨在辨識在與主要組織相容性複合體 (MHC) 分子 (在人類中，MHC 分子亦稱為人類白血球抗原，或 HLA) 複合的抗原呈遞細胞之表面上顯示的短肽抗原 (Davis, 等人, (1998), Annu Rev Immunol 16: 523-544)。CD8+ T 細胞，亦稱為細胞毒性 T 細胞，具體而言辨識與 MHC I 類結合的肽，且通常負責發現並媒介病態細胞之破壞。CD8+ T 細胞能夠破壞癌細胞以及病毒感染細胞；然而，由於胸腺選擇，自然庫中由癌症特異性 T 細胞表現的 TCR 之親和力通常較低，這意味著癌細胞經常逃過檢測及破壞。旨在促進由 T 細胞進行之癌症辨識的新穎免疫治療方法為有效抗癌治療之開發提供了非常有前景的策略。

【0003】 MAGE A4 屬於種系編碼癌症抗原的 MAGE 家族 (De Plaen, 等人, (1994), Immunogenetics 40(5): 360-369) 並且具有 Uniprot 登錄號 P43358。

已發現此類抗原經常在多種癌症中表現，而其等在正常組織中之表現僅限於成人睪丸及其他免疫豁免部位，包括胎盤。此等基因之癌症特異性使其等成為抗癌治療劑之理想標靶。MAGE A4 的確切功能仍然未知，但據信其在胚胎發育中發揮作用。據報導，MAGE A4 在幾種類型的腫瘤中以高水平表現，包括黑色素瘤、食道癌、頭頸癌、肺癌、乳癌及膀胱癌 (Bergeron, (2009), Int J Cancer 125(6): 1365-1371 ; Cabezon, 等人, (2013), Mol Cell Proteomics 12(2): 381-394 ; Cuffel, 等人, (2011), Int J Cancer 128(11): 2625-2634 ; Forghanifard, 等人, (2011), Cancer Biol Ther 12(3): 191-197 ; Karimi, 等人, (2012), Clin Lung Cancer 13(3): 214-219 ; Svobodova, 等人, (2011), Eur J Cancer 47(3): 460-469)。10-mer 肽 GVYDGREHTV (SEQ ID NO: 34) 對應於全長 MAGE A4 蛋白之胺基酸 230 至 239。該肽與 HLA-A\*02 結合，並且肽-HLA 複合體已顯示刺激細胞毒性 T 細胞，導致 MAGE A4 陽性、HLA-A\*02 陽性腫瘤細胞之細胞溶解 (Duffour, 等人, (1999), Eur J Immunol 29(10): 3329-3337 及 WO2000020445)。因此，GVYDGREHTV (SEQ ID NO:34) HLA-A\*02 複合體為免疫治療干預提供了有用的標靶抗原。

**【0004】** 結合 GVYDGREHTV (SEQ ID NO:34) HLA-A\*02 複合體的可溶性 TCR 及 TCR 融合蛋白描述於例如美國授予前公佈號 US20190092834 及國際公佈號 WO2017175006 中。然而，仍然存在對結合具有有利性質 (自然穩定性、結合親和力、細胞殺傷效力及/或活體內藥物動力學) 的 MAGE A4 肽:HLA 複合體的 TCR 融合蛋白的需求。

**【0005】** 在本文中引用的所有參考文獻，包括專利申請和公開，是藉由引用方式全部併入。

## 【發明內容】

【0006】 在某些態樣，本文提供一種 T 細胞受體 (TCR) 融合蛋白，其包含與 GVYDGREHTV (SEQ ID NO:34) HLA-A\*02 複合體結合的 TCR，其中該 TCR 為與以下共價連接的可溶性 TCR：(1) T 細胞接合域，其結合在 T 細胞之細胞表面上表現的蛋白質，以及 (2) 抗體 Fc 域；其中該 TCR 包含：(a) 包含  $\alpha$  鏈可變區的 TCR  $\alpha$  鏈，其中該  $\alpha$  鏈可變區包含 (i) 含有 VSPFSN (SEQ ID NO:1) 之胺基酸序列的 CDR1、(ii) 含有 LTFSENT (SEQ ID NO:2) 之胺基酸序列的 CDR2、及 (iii) 含有 VVNSAQGLYIPTF (SEQ ID NO:3) 之胺基酸序列的 CDR3；以及 (b) 包含  $\beta$  鏈可變區的 TCR  $\beta$  鏈，其中該  $\beta$  鏈可變區包含 (i) 含有 LDHEN (SEQ ID NO:4) 之胺基酸序列的 CDR1、(ii) 含有 SRFATG (SEQ ID NO:5) 之胺基酸序列的 CDR2、及 (iii) 含有 ASSSDQNSGDPYEQYF (SEQ ID NO:6) 之胺基酸序列的 CDR3；其中該 TCR 在單一 N-連接醮基化位點處經醮基化，其中該 N-連接醮基化位點係在根據 SEQ ID NO:7 編號的  $\alpha$  鏈可變區之殘基 N18 處。

【0007】 在如本文所描述之任何實施例之一些實施例中，TCR 包含在除了殘基 N18 之外的每個潛在 N-醮基化位點處的胺基酸取代。在一些實施例中，TCR 包含在以下處的胺基酸取代：(a) 根據 SEQ ID NO:32 編號的  $\alpha$  鏈可變區之殘基 N24；(b) 根據 SEQ ID NO:10 編號的  $\alpha$  鏈恆定區之殘基 N33、N67 及 N78；(c) 根據 SEQ ID NO:33 編號的  $\beta$  鏈可變區之殘基 N84；以及 (d) 根據 SEQ ID NO:15 編號的  $\beta$  鏈恆定區之殘基 N70。在一些實施例中，胺基酸取代為 N $\rightarrow$ Q。在一些實施例中，TCR 包含下列胺基酸取代：(a) 根據 SEQ ID NO:32 編號的  $\alpha$  鏈可變區中的 N24Q；(b) 根據 SEQ ID NO:10 編號的  $\alpha$  鏈恆定區中的 N33Q、N67Q 及 N78Q；(c) 根據 SEQ ID NO:33 編號的  $\beta$  鏈可變區中的 N84Q；以及 (d) 根據 SEQ ID NO:15 編號的  $\beta$  鏈恆定區中的 N70Q。

【0008】在如本文所描述之任何實施例之一些實施例中，TCR 在  $\alpha$  鏈恆定區及/或  $\beta$  鏈恆定區中包含一個或多個經工程化半胱胺酸殘基以在  $\alpha$  鏈與  $\beta$  鏈之間形成非天然雙硫鍵。在一些實施例中，TCR 包含在根據 SEQ ID NO:15 編號的  $\beta$  鏈恆定區之位置 57 處的半胱胺酸殘基。

【0009】在如本文所描述之任何實施例之一些實施例中， $\alpha$  鏈可變區包含與 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。在一些實施例中， $\beta$  鏈可變區包含與 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。在一些實施例中， $\alpha$  鏈可變區包含 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列，且  $\beta$  鏈可變區包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。在一些實施例中，TCR  $\alpha$  鏈進一步包含  $\alpha$  鏈恆定區，且其中該  $\alpha$  鏈恆定區包含與 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，TCR  $\beta$  鏈進一步包含  $\beta$  鏈恆定區，且其中該  $\beta$  鏈恆定區包含與 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，TCR  $\alpha$  鏈進一步包含含有 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列的  $\alpha$  鏈恆定區，且 TCR  $\beta$  鏈進一步包含含有 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列的  $\beta$  鏈恆定區。在一些實施例中， $\alpha$  鏈包含與 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。在一些實施例中， $\beta$  鏈包含與 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列具

有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。在一些實施例中， $\alpha$  鏈包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列，且  $\beta$  鏈包含 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列。

**【0010】** 在如本文所描述之任何實施例之一些實施例中，抗體 Fc 域為人 Fc 域。在一些實施例中，抗體 Fc 域為人 IgG1、人 IgG2 或人 IgG4 Fc 域。在一些實施例中，抗體 Fc 域包含減弱 Fc 域之效應功能的一個或多個突變。在一些實施例中，抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含在根據 EU 索引編號的殘基 N297 處的突變。在一些實施例中，抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含根據 EU 索引編號的 N297G 取代。在一些實施例中，抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含在根據 EU 索引編號的殘基 E233、L234、L235 及/或 G236 處的一個或多個突變。在一些實施例中，抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含根據 EU 索引編號的取代 N297G、E233P、L234V、L235A 及在 G236 處的缺失。在一些實施例中，抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含在根據 EU 索引編號的殘基 L234、L235 及 P329 處的一個或多個突變。在一些實施例中，抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含根據 EU 索引編號的取代 L234A、L235A 及 P329G。在一些實施例中，抗體 Fc 域係經由鉸鏈序列與 TCR 融合。在一些實施例中，鉸鏈序列包含 DKTHTCPP (SEQ ID NO:31) 或 DKTHTCPPC (SEQ ID NO:36) 之胺基酸序列。在一些實施例中，TCR 融合蛋白進一步包含第二抗體 Fc 域，其中該第二抗體 Fc 域係經由以下與第一抗體 Fc 域締合：(1) 一個或多個共價鍵結；及/或 (2) 在促進異源二聚化的抗體 Fc 域中之一者或兩者上的一個或多個胺基酸取代。

**【0011】** 在一些實施例中，第一及第二抗體 Fc 域均包含抗體 CH2 及 CH3 域。在一些實施例中，第一抗體 Fc 域係經由第一鉸鏈序列與 TCR 融合，且第二鉸鏈序列係與第二抗體 Fc 域之 N 端連接。在一些實施例中，第一鉸鏈



序列及第二鉸鏈序列係經由在第一鉸鏈序列與第二鉸鏈序列之間的一個或多個鏈間雙硫鍵連接。在一些實施例中，第一鉸鏈序列及第二鉸鏈序列均包含 DKTHTCPP (SEQ ID NO:31) 或 DKTHTCPPC (SEQ ID NO:36) 之胺基酸序列。在一些實施例中，第一及第二抗體 Fc 域中之一者包含一個或多個杵形成突變且第一及第二抗體 Fc 域中之另一者包含一個或多個臼形成突變以促進抗體 Fc 域之異源二聚化。在一些實施例中，根據 EU 索引編號，第一及第二抗體 Fc 域中之一者包含 T366W 取代，且第一及第二抗體 Fc 域中之另一者包含 T366S、L368A、Y407V 取代。在一些實施例中，第一及第二抗體 Fc 域中之一者包含 SEQ ID NO:27 之胺基酸序列，且第一及第二抗體 Fc 域中之另一者包含 SEQ ID NO:26 之胺基酸序列。在一些實施例中，與 TCR 共價連接的第一抗體 Fc 域包含 SEQ ID NO:27 之胺基酸序列，且第二抗體 Fc 域包含 SEQ ID NO:26 之胺基酸序列。

**【0012】** 在如本文所描述之任何實施例之一些實施例中，T 細胞接合域結合在 T 細胞之細胞表面上表現的人 CD3。在一些實施例中，T 細胞接合域包含抗體抗原結合域。在一些實施例中，T 細胞接合域 (例如，抗體抗原結合域) 為單鏈可變片段 (scFv)。在一些實施例中，scFv 包含 SEQ ID NO: 17 之胺基酸序列。在一些實施例中，scFv 包含 SEQ ID NO: 35 之胺基酸序列。在一些實施例中，T 細胞接合域係經由連接子與 TCR 共價連接。在一些實施例中，連接子包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO:18 至 SEQ ID NO:25。在一些實施例中，T 細胞接合域之 C 端係與 TCR  $\beta$  鏈可變域之 N 端共價連接。在一些實施例中，T 細胞接合域之 C 端係經由連接子與 TCR  $\beta$  鏈可變域之 N 端共價連接。在一些實施例中，連接子包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO:18 至 SEQ ID NO:25。在一些實施例中，抗體 Fc 域之 N 端係與 TCR  $\alpha$  鏈恆定域之 C 端共價連接。在一些實施例中，抗體 Fc 域之 N 端

係經由鉸鏈序列與 TCR  $\alpha$  鏈恆定域之 C 端共價連接。在一些實施例中，TCR 融合包含三個多肽，該等三個多肽包含：(a) 第一多肽，其從 N 端到 C 端包含：TCR  $\alpha$  鏈可變區、 $\alpha$  鏈恆定區、第一鉸鏈序列及第一抗體 Fc 域；(b) 第二多肽，其從 N 端到 C 端包含：結合在 T 細胞之細胞表面上表現的人 CD3 之單鏈可變片段 (scFv)、連接子、 $\beta$  鏈可變區及  $\beta$  鏈恆定區；以及 (c) 第三多肽，其從 N 端到 C 端包含：第二鉸鏈序列及第二抗體 Fc 域。在一些實施例中，第一及第二多肽係經由在  $\alpha$  鏈恆定區與  $\beta$  鏈恆定區之間的一個或多個雙硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第三多肽係經由以下連接：(1) 在第一鉸鏈序列與第二鉸鏈序列之間的一個或多個鏈間雙硫鍵；及/或 (2) 在抗體 Fc 域上的一個或多個對應的杵形成及臼形成突變。在一些實施例中，第一多肽包含 SEQ ID NO:29 之胺基酸序列，其中第二多肽包含 SEQ ID NO:30 之胺基酸序列，且其中第三多肽包含 SEQ ID NO:28 之胺基酸序列。

**【0013】** 在其他態樣，本文提供一種 T 細胞受體 (TCR) 融合蛋白，其包含含有 SEQ ID NO:29 之胺基酸序列的第一多肽、含有 SEQ ID NO:30 之胺基酸序列的第二多肽及含有 SEQ ID NO:28 之胺基酸序列的第三多肽。

**【0014】** 在其他態樣，本文提供了編碼如上述實施例中之任一者之 TCR 融合蛋白的多核苷酸。本文進一步提供一種多核苷酸之套組，其包含編碼如上述實施例中之任一者之第一多肽的第一多核苷酸、編碼如上述實施例中之任一者之第二多肽的第二多核苷酸、以及編碼如上述實施例中之任一者之第三多肽的第三多核苷酸。在其他態樣，本文提供包含如上述實施例中之任一者之一種或多種多核苷酸的載體。本文進一步提供一種載體之套組，其包含編碼如上述實施例中之任一者之第一多肽的第一載體、編碼如上述實施例中之任一者之第二多肽的第二載體、以及編碼如上述實施例中之任一者之第三多肽的第三載體。在一些實施例中，一個或多個載體為一個或多個表現載體。

【0015】 在其他態樣，本文提供宿主細胞，其包含如上述實施例中之任一者之一個或多個多核苷酸、多核苷酸之套組、一個或多個載體或載體之套組。在一些實施例中，宿主細胞為哺乳動物細胞。在一些實施例中，哺乳動物細胞為中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞。

【0016】 在其他態樣，本文提供生產 TCR 融合蛋白之方法，其包含在適合生產 TCR 融合蛋白之條件下培養如上述實施例中之任一者之宿主細胞。在一些實施例中，該方法進一步包含自宿主細胞回收 TCR 融合蛋白。本文進一步提供藉由如上述實施例中之任一者之方法生產的 TCR 融合蛋白。

【0017】 在其他態樣，本文提供醫藥組成物，其包含如上述實施例中之任一者之 TCR 融合蛋白以及醫藥上可接受之載劑。

【0018】 在其他態樣，本文提供治療癌症之方法，其包含向個體投予有效量之如上述實施例中之任一者之 TCR 融合蛋白或如上述實施例中之任一者之醫藥組成物。本文進一步提供如上述實施例中之任一者之 TCR 融合蛋白，其用於醫藥中，較佳地在人類個體中。本文進一步提供如上述實施例中之任一者之 TCR 融合蛋白，其用於治療癌症，較佳地在人類個體中。本文進一步提供如上述實施例中之任一者之 TCR 融合蛋白在治療癌症之藥物之製造中的用途。

【0019】 在如本文所描述之任何實施例之一些實施例中，個體為人類。在一些實施例中，個體患有表現 MAGE-A4 之癌症。在一些實施例中，個體屬於 HLA-A\*02 亞型。在一些實施例中，TCR 融合蛋白或組成物係經靜脈內或藉由腫瘤內注射投予。在一些實施例中，方法進一步包含向個體投予第二抗癌劑。

【0020】 應理解，可組合本文所描述之各種具體實例的一種、一些或所有特性以形成本發明之其他具體實例。本發明之此等及其他態樣對於熟習此項

技術者將變得顯而易見。本發明之此等及其他具體實例藉由下文之實施方式進一步描述。

### 【圖式簡單說明】

#### 【0021】

**圖 1A 及圖 1B** 示出根據一些實施例的 T 細胞受體 (TCR)-抗 CD3 融合分子之示意圖。在**圖 1A** 所示的實例中，效應功能係由與 TCR  $\beta$  鏈之 N 端融合的抗 CD3 單鏈可變片段 (scFv) 提供，靶向係由可溶性單株高親和力 TCR 提供，且活體內半衰期延長係至少部分地由與 TCR  $\alpha$  鏈之 C 端融合的抗體 Fc 域 (在此情況下，具有 N297G 突變的人 IgG1 Fc 域) 提供。**圖 1B** 示出更詳細的特徵，包括提供 Fc 異源二聚化的杵入臼 (KIH) 突變 (在此實例中，一條鏈上為 T366W，另一條鏈上為 T366S/L368A/Y407V)、鉸鏈區中的雙硫鍵、TCR  $\alpha$  與  $\beta$  鏈之間的經工程化雙硫鍵、TCR 恆定區 (分別位於  $\alpha$  及  $\beta$  鏈上的  $C\alpha$  及  $C\beta$ ) 及 TCR 可變區 (分別位於  $\alpha$  及  $\beta$  鏈上的  $V\alpha$  及  $V\beta$ )。

**圖 2A 及圖 2B** 展示 TCR 鏈之 N-糖基化。**圖 2A** 示出 TCR 上所有 7 個 N-糖基化位點的示意圖 (左)，以及各 N-糖基化位點之佔有率 (右)。**圖 2B** 示出在各個糖基化位點處具有取代突變 (例如，N $\rightarrow$ Q) 組的變異體 TCR，從而產生無糖基化 (左) 或單糖基化 (右) TCR。箭頭指示單個剩餘的 N-糖基化位點。

**圖 2C 及圖 2D** 展示去糖基化對 TCR-抗 CD3 融合分子產率之影響。**圖 2C** 示出從 TCR 可變區去除 N-糖基化位點 (使用 N $\rightarrow$ Q 取代) 導致產率之顯著降低，而從 TCR 恆定區去除 N-糖基化位點不影響產率。**圖 2D** 示出保留  $\alpha$  鏈可變區之殘基 N18 處的 N-糖基化係提升產率的最關鍵位點。

**圖 3A 至圖 3E** 示出 TCR-抗 CD3 融合分子之活體內藥物動力學性質。**圖 3A** 示出如所示具有或不具有 Fc 域的各種形式的 TCR-抗 CD3 融合分子之活體內藥物

動力學性質。圖 3B 示出 SCID 小鼠模型中具有所示 Fc 形式的 N297G 對照、無糖基化或單糖基化 TCR-抗 CD3 融合分子隨時間的血清濃度。圖 3C 及圖 3D 示出 SCID 小鼠模型中圖 3B 中所示的單糖基化或無糖基化 (分別) TCR-抗 CD3 融合分子隨時間的血清濃度。圖 3E 示出以所指示劑量水準投予的圖 3B 中所示的無糖基化或單糖基化 TCR-抗 CD3 融合分子之半衰期及清除率。

圖 4A 至圖 4D 示出無糖基化或單糖基化 TCR-抗 CD3 融合分子之效力及選擇性。圖 4A 示出各細胞系之名稱及類型、各細胞系之 MAGE-A4 之平均拷貝數及 mRNA 表現、各細胞系之 HLA-A2 表現、以及用單糖基化 (「單糖」) 或無糖基化 (無糖) TCR-抗 CD3 融合分子治療後觀察到的針對細胞殺傷或 IFN $\gamma$  釋放的 EC50。\*\*表示資料係從 3 個不同 PBMC 供體計算出的平均值。圖 4B 至圖 4D 示出用無糖基化或單糖基化 TCR-抗 CD3 融合分子在效應細胞之存在下治療的 NCI-H1755 (圖 4B)、SCaBER (圖 4C) 或 NCI-H441 (圖 4D) 細胞系隨時間的 % 細胞溶解。圖 4B 至圖 4D 中所述之值係指觀察到引起殺傷回應的 TCR-抗 CD3 融合分子之最低濃度。

圖 5A 至圖 5C 示出 Fc 融合時的效力損失，其係藉由使用變異體抗 CD3 scFv 而部分地抵消。圖 5A 及圖 5B 示出由不具有 Fc 的 TCR-抗 CD3 融合分子、具有 Fc 的 TCR-抗 CD3 融合分子以及具有 Fc 及變異體抗 CD3 scFv 的 TCR-抗 CD3 融合分子媒介的針對 NCI-H1755 (圖 5A) 或 A375 (圖 5B) 細胞系的細胞殺傷之效力。圖 5C 示出針對 MAGE-A4 + NCI-H1755 細胞與 MAGE-A4-MEL202A2B2M 細胞的細胞殺傷之效力，表明了中靶活性與脫靶活性之間的窗口。

圖 6A 及圖 6B 示出檢查 TCR-抗 CD3 融合分子的活體外安全性測定之結果。圖 6A 示出相對於一組正常細胞系測試單糖基化 TCR-抗 CD3 融合分子之結果，示出了針對正常細胞沒有可檢測的反應性。圖 6B 示出相對於不具有 Fc 域或變異

體 scFv 的相同分子測試具有變異體抗 CD3 scFv 及 Fc 域的 TCR-抗 CD3 融合分子的結果，表明了針對中靶及脫靶細胞的治療窗口得到保持。

### 【實施方式】

#### 相關申請的交叉引用

【0022】本申請主張 2022 年 8 月 18 日申請的美國臨時申請序列第 63/399,095 號的優先權權益，其內容藉由引用方式全文併入本文。

#### 電子序列表之引用

【0023】電子序列表 (146392054140seqlist.xml；大小：35723 位元組；以及創建日期：2023 年 7 月 24 日)的內容藉由引用方式全文併入本文。

### I. 一般技術

【0024】本文所述或引用之技術和程序為本領域中的技術人員一般眾所周知並通常使用習用方法來實施的，例如，以下文獻中所述之得到廣泛應用的方法：Sambrook 等人，*Molecular Cloning: A Laboratory Manual* 3d edition (2001) Cold Spring Harbor Laboratory Press，Cold Spring Harbor，N.Y.；*Current Protocols in Molecular Biology* (F.M.Ausubel 等人主編 (2003))；叢書 *Methods in Enzymology* (Academic Press, Inc.)：PCR 2: A Practical Approach (M.J. MacPherson, B.D. Hames 和 G.R.Taylor 主編 (1995))，Harlow 和 Lane 主編 (1988) *Antibodies, A Laboratory Manual*，及 *Animal Cell Culture* (R.I.Freshney 主編 (1987))；*Oligonucleotide Synthesis* (M.J.Gait 主編 1984)；*Methods in Molecular Biology*, Humana Press; *Cell Biology: A Laboratory Notebook* (J.E.Cellis 主編，1998) Academic Press；*Animal Cell Culture* (R.I.Freshney 主編，1987)；*Introduction to Cell and Tissue Culture* (J.P. Mather 和 P.E.Roberts，1998) Plenum Press；*Cell and Tissue Culture: Laboratory Procedures* (A. Doyle，J.B.Griffiths 和

D.G.Newell 主編，1993-8) J. Wiley and Sons；*Handbook of Experimental Immunology* (D.M.Weir 和 C.C.Blackwell 主編)；*Gene Transfer Vectors for Mammalian Cells* (J.M.Miller 和 M.P. Calos 主編，1987)；*PCR: The Polymerase Chain Reaction* (Mullis 等人主編，1994)；*Current Protocols in Immunology* (J.E.Coligan 等人主編，1991)；*Short Protocols in Molecular Biology* (Wiley and Sons, 1999)；*Immunobiology* (C.A.Janeway 和 P. Travers，1997)；*Antibodies* (P. Finch，1997)；*Antibodies: A Practical Approach* (D. Catty. 主編，IRL Press，1988-1989)；*Monoclonal Antibodies: A Practical Approach* (P. Shepherd 和 C. Dean 主編，Oxford University Press，2000)；*Using Antibodies: A Laboratory Manual* (E. Harlow 和 D. Lane (Cold Spring Harbor Laboratory Press，1999)；*The Antibodies* (M. Zanetti 和 J. D. Capra 主編，Harwood Academic Publishers，1995)；及 *Cancer: Principles and Practice of Oncology* (V.T.DeVita 等人主編，J.B.Lippincott Company，1993)。

## II. 定義

【0025】本文定義之 TCR 序列係參考 IMGT 命名法進行描述，該 IMGT 命名法對於 TCR 領域的工作人員來說眾所周知且容易理解。例如，參見：LeFranc 及 LeFranc, (2001). 「T cell Receptor Factsbook」，Academic Press; Lefranc, (2011), Cold Spring Harb Protoc 2011 (6): 595-603; Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol 附錄 1: 附錄 100；以及 Lefranc, (2003), Leukemia 17(1): 260-266。簡而言之，TCR 由兩條經二硫鍵連接的鏈組成。一般而言，認為各條鏈 ( $\alpha$  及  $\beta$ ) 具有兩個域，亦即可變域及恆定域。短結合區連接可變域及恆定域，且通常視為  $\alpha$  可變區之一部分。另外地， $\beta$  鏈通常含有在結合區旁邊的短多樣性區，該短多樣性區亦通常視為  $\beta$  可變區之一部分。

【0026】各條鏈之可變域位於 N 端，且包含嵌入框架序列中的三個互補決定區 (CDR)。CDR 包含用於肽-MHC 結合的辨識位點。存在對  $\alpha$  鏈可變 (Va) 區編碼的若干基因及對  $\beta$  鏈可變 (V $\beta$ ) 區編碼的若干基因，它們藉由其框架、CDR1 及 CDR2 序列以及藉由部分定義的 CDR3 序列來區分。Va 及 V $\beta$  基因在 IMGT 命名法中分別藉由前綴 TRAV 及 TRBV 來指代 (Folch 及 Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(1): 42-54 ; Scaviner 及 Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 83-96 ; LeFranc 及 LeFranc, (2001), 「T cell Receptor Factsbook」, Academic Press)。同樣，對於  $\alpha$  鏈及  $\beta$  鏈，分別存在若干結合基因或 J 基因，稱為 TRAJ 或 TRBJ，且對於  $\beta$  鏈，存在稱為 TRBD 的多樣性或 D 基因 (Folch 及 Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 107-114 ; Scaviner 及 Lefranc, (2000), Exp Clin Immunogenet 17(2): 97-106 ; LeFranc 及 LeFranc, (2001), 「T cell Receptor Factsbook」, Academic Press)。T 細胞受體鏈之巨大多樣性緣自各種 V、J 及 D 基因之間的組合重排，該等 V、J 及 D 基因包括等位基因變異體及結合多樣性 (Arstila 等人，(1999), Science 286(5441): 958-961 ; Robins 等人，(2009), Blood 114(19): 4099-4107)。TCR  $\alpha$  及  $\beta$  鏈之恆定區或 C 區分別稱為 TRAC 及 TRBC (Lefranc, (2001), Curr Protoc Immunol 附錄 1: 附錄 10)。

【0027】「經工程化 TCR」及「突變體 TCR」在本文中同義使用，以意指具有相對於天然 MAGE A4 TCR 引入的 (特定而言其  $\alpha$  鏈可變域及/或  $\beta$  鏈可變域的) 一個或多個突變的 TCR。一個或多個突變通常提高 TCR 與 GVDGREHTV (SEQ ID NO: 34) HLA-A\*02 複合體的結合親和力，但可以另外地或替代性地賦予其他優點，諸如分離形式之提高的穩定性以及提高的特異性。一個或多個位置處的突變可以另外地或替代性地影響相鄰位置與同源 pMHC 複合體的交互作用，例如藉由實現對交互作用更有利的角度。為了改善



TCR 與 GVDYDGREHTV (SEQ ID NO: 34) HLA-A\*02 複合體的結合，較佳地在 CDR 區之一者或多者內進行突變。

【0028】 本文揭示之任何 TCR 之表型緘默變異體均在本揭露之範圍內。如本文所用，術語「表型緘默變異體」應理解為係指除上述那些之外還併入一個或多個其他胺基酸變化 (包括取代、插入及缺失) 的 TCR，該 TCR 具有與沒有該一個或多個變化的對應 TCR 相似的表型。出於本申請之目的，TCR 表型包含抗原結合親和力 ( $K_D$  及/或結合半衰期) 及抗原特異性。當在相同條件下 (例如於 25°C 及/或在相同 SPR 晶片上) 量測時，表型緘默變異體對於 GVDYDGREHTV (SEQ ID NO: 34) HLA-A\*02 複合體的  $K_D$  及/或結合半衰期可以在沒有該一個或多個變化的對應 TCR 的所測量之  $K_D$  及/或結合半衰期的 50% 以內，或更較佳地在 20% 以內。如熟習此項技術者所知，在不改變與 GVDYDGREHTV (SEQ ID NO: 34) HLA-A\*02 複合體的交互作用之親和力的情況下，可以生產 TCR，其在其可變域中併入了相較於彼等於上文中詳述者之變化。特定而言，此等緘默突變可以併入在已知不直接參與抗原結合的序列之部分 (例如 CDR，或不接觸肽抗原的 CDR 之部分) 內。此等無義變異體 (trivial variant) 包括在本揭露之範圍內。

【0029】 表型緘默變體可以含有一個或多個保留式取代及/或一個或多個容許的取代。容許的及保留式取代可導致對於 GVDYDGREHTV (SEQ ID NO: 34) HLA-A\*02 複合體的  $K_D$  及/或結合半衰期的變化，當在相同條件下 (例如於 25°C 及/或在相同 SPR 晶片處) 測量時，該改變在沒有該一個或多個保留式及/或容許的取代的對應 TCR 的所測量之  $K_D$  及/或結合半衰期的 50% 以內，或更較佳地在 20% 以內，甚至更較佳地在 10% 以內，前提是  $K_D$  的變化不會導致親和力小於 (亦即弱於) 200  $\mu\text{M}$ 。容許的取代意為彼等不落入下文所提供之保留式定義內但在表型上緘默的取代。

【0030】本揭露之 TCR 可以包括一個或多個具有相似胺基酸序列及/或保持相同功能 (亦即，如上所定義係表型緘默的) 的保留式取代。熟習者知道，多種胺基酸具有相似的性質，且因此係「保留式的」。蛋白質、多肽或肽的一種或多種此類胺基酸通常可以由一種或多種其他此類胺基酸取代而不消除該蛋白質、多肽或肽的所需活性。

【0031】因此，胺基酸甘胺酸、丙胺酸、纈胺酸、白胺酸及異白胺酸通常可以相互取代 (具有脂族側鏈之胺基酸)。在此等可能的取代中，較佳地係用甘胺酸及丙胺酸相互取代 (因為其等具有相對較短的側鏈)，及用纈胺酸、白胺酸及異白胺酸相互取代 (因為其等具有較大的疏水性脂族側鏈)。其他通常可以相互取代的胺基酸包括：苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸 (具有芳族側鏈之胺基酸)；離胺酸、精胺酸及組胺酸 (具有鹼性側鏈之胺基酸)；天冬胺酸及麩胺酸 (具有酸性側鏈之胺基酸)；天冬醯胺酸及麩醯胺酸 (具有醯胺側鏈之胺基酸)；以及半胱胺酸及甲硫胺酸 (具有含硫側鏈之胺基酸)。應當理解，本揭露之範圍內的胺基酸取代可以使用天然存在的或非天然存在的胺基酸進行。例如，本文設想丙胺酸上的甲基基團可以經乙基基團替換，及/或可以對肽主鏈進行微小的改變。無論是否使用天然或合成胺基酸，較佳地僅存在 L-胺基酸。

【0032】本領域已知的「同一性」為兩個或更多個多肽序列或兩個或更多個多核苷酸序列之間的關係，如藉由比較該等序列所確定。在本領域中，同一性亦意指多肽或多核苷酸序列之間的序列相關程度，可視情況而定，如藉由此類序列的串之間的匹配所確定。雖然存在多種方法來測量兩個多肽或兩個多核苷酸序列之間的同一性，但通常用於確定同一性的方法經編碼在電腦程式中。確定兩個序列之間的同一性的較佳電腦程式包括但不限於 GCG 程式包 (Devereux, 等人, *Nucleic Acids Research*, 12, 387 (1984))、BLASTP、BLASTN 及 FASTA (Atschul 等人, *J. Molec. Biol.* 215, 403 (1990))。

【0033】 可以使用程式諸如 CLUSTAL 程式來比較胺基酸序列。該程式比較胺基酸序列，並藉由在任一序列中適當插入空位來找到最佳比對。可以計算胺基酸同一性或相似性 (同一性加上胺基酸類型的保留性) 以獲得最佳比對。如 BLASTx 之類的程式將對齊相似序列之最長區段，並為該擬合 (fit) 分配一個值。因此可以進行比較，其中發現了幾個相似區域，每個區域具有不同的得分。在本揭露中考慮了兩種類型的同一性分析。

【0034】 兩個胺基酸序列或兩個核酸序列的百分比同一性藉由比對序列以達到最佳比較目的 (例如，可以在第一序列中引入空位以達到與該序列的最佳比對) 並比較相對應位置處的胺基酸殘基或核苷酸來確定。「最佳比對」為導致最高百分比同一性的兩個序列的比對。同一性百分比由被比較序列中相同胺基酸殘基或核苷酸的數量確定 (亦即，同一性百分比 = 相同位置的數量/位置的總數 x 100)。

【0035】 可以使用本領域技術人員已知的數學演算法來確定兩個序列之間的同一性百分比。比較兩個序列的數學演算法之示例為 Karlin 及 Altschul (1990) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:2264-2268 之算法，按 Karlin 及 Altschul (1993) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:5873-5877 進行修改。Altschul，等人 (1990) J. Mol. Biol. 215:403-410 之 N BLAST 及 XBLAST 程式已經結合了此演算法。可以用 NBLAST 程式進行 BLAST 核苷酸搜尋，得分 = 100，字長 = 12，以獲得與核酸分子同源之核苷酸序列。可以用 XBLAST 程式進行 BLAST 蛋白質搜尋，得分 = 50，字長 = 3，以獲得與用於本揭露的蛋白質分子同源之胺基酸序列。為了獲得比較目的的空位比對，Gapped BLAST 可以如 Altschul 等人 (1997) Nucleic Acids Res. 25:3389-3402 中所述的使用。替代性地，PSI-Blast 可用於執行迭代搜尋，以偵測分子之間的遠距離關係 (Id.)。當使用 BLAST、Gapped BLAST 及 PSI-Blast 程式時，可以使用各個程式 (例如 XBLAST 及

NBLAST) 之默認參數。參見 [www.ncbi.nlm.nih.gov](http://www.ncbi.nlm.nih.gov)。序列比較的數學算法之另一示例為 Myers 及 Miller, CABIOS (1989) 之演算法。作為 CGC 序列比對軟體包之一部分的 ALIGN 程式 (2.0 版) 併入了此演算法。本領域已知的用於序列分析的其他演算法包括如 Torellis 及 Robotti (1994) *Comput. Appl. Biosci.*, 10 :3-5 中所述之 ADVANCE 及 ADAM；以及如 Pearson 及 Lipman (1988) *Proc. Natl. Acad. Sci.* 85:2444-8 中所述之 FASTA。在 FASTA 中，ktup 為一個控制選項，用於設置搜尋之靈敏度及速度。

【0036】 可以使用任何合適的方法，包括但不限於，彼等基於聚合酶連鎖反應 (PCR)、基於限制性酶之選殖或不依賴連接之選殖 (LIC) 程式者，將突變 (包括保留式及耐受性的取代、插入及缺失) 引入所提供之序列中。此等方法在許多標準分子生物學教科書中皆有詳細說明。

【0037】 本揭露之 TCR 可以為  $\alpha\beta$  異二聚體。本揭露之 TCR 可以呈單鏈形式。單鏈形式包括但不限於  $V\alpha$ -L- $V\beta$ 、 $V\beta$ -L- $V\alpha$ 、 $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$ 、 $V\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$  或  $V\alpha$ - $C\alpha$ -L- $V\beta$ - $C\beta$  型之  $\alpha\beta$  TCR 多肽，其中  $V\alpha$  及  $V\beta$  分別為 TCR  $\alpha$  及  $\beta$  可變區， $C\alpha$  及  $C\beta$  分別為 TCR  $\alpha$  及  $\beta$  恆定區，且 L 為連接子序列 (Weidanz 等人，(1998) *J Immunol Methods*. 12 月 1 日; 221 (1-2):59-76；Epel 等人，(2002)，*Cancer Immunol Immunother.* 11 月; 51 (10):565-73；WO 2004/033685；W09918129)。恆定域中之一者或兩者可以係全長的，或者它們可以如上所述經截短，及/或含有突變。由於自然多型性， $\alpha$  鏈胞外恆定可以具有在位置 4 處的天冬醯胺酸 (N) 或離胺酸 (K) 殘基。在某些實施例中，本揭露之單鏈 TCR 可以具有在相應恆定域之殘基之間之所引入之雙硫鍵，如 WO 2004/033685 中所述。單鏈 TCR 進一步描述於下列中：WO2004/033685；W098/39482；WO01/62908；Weidanz 等人 (1998) *J Immunol Methods* 221 (1 -2): 59-76；Hoo

等人 (1992) Proc Natl Acad Sci U S A 89(10): 4759-4763 ; Schodin (1996) Mol Immunol 33(9): 819-829)。

【0038】術語「抗體」包括單株抗體 (包括具有免疫球蛋白 Fc 域的全長抗體)、具有多表位特異性的抗體組成物、多特異性抗體 (例如雙特異性抗體、雙抗體、及單鏈分子)、以及抗體片段 (例如 Fab、F(ab')<sub>2</sub>、及 Fv)。術語「免疫球蛋白」(Ig) 在本文中與「抗體」可互換使用。

【0039】基本 4 鏈抗體單元為異四聚體糖蛋白，由兩條相同的輕 (L) 鏈和兩條相同的重 (H) 鏈組成。IgM 抗體由 5 個基本異四聚體單元以及稱為 J 鏈的其他多肽組成，並且包含 10 個抗原結合位點，而 IgA 抗體則包含 2 至 5 個基本 4 鏈單元，其可與 J 鏈結合而形成多價組合。就 IgG 而言，4 鏈單元通常為約 150,000 道耳頓。每條 L 鏈藉由一個共價雙硫鍵與 H 鏈相連，而兩條 H 鏈則根據 H 鏈的同型不同藉由一個或多個雙硫鍵彼此連接。每條 H 和 L 鏈還具有規則間隔的鏈內二硫鍵。每條 H 鏈在 N 端均具有一個可變域 (V<sub>H</sub>)，然後對於每個  $\alpha$  和  $\gamma$  鏈具有三個恆定域 (C<sub>H</sub>)，並且對於  $\mu$  和  $\epsilon$  同型具有四個 C<sub>H</sub> 結構域。每條 L 鏈在 N 端均具有一個可變域 (V<sub>L</sub>)，然後在其另一端具有一個恆定域。V<sub>L</sub> 與 V<sub>H</sub> 配對，並且 C<sub>L</sub> 與重鏈的第一恆定域 (C<sub>H1</sub>) 配對。據信，特定的胺基酸殘基在輕鏈和重鏈可變域之間形成界面。配對 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 一起形成單個抗原結合位點。有關不同類別抗體的結構和性質，參見例如 *Basic and Clinical Immunology*, 第 8 版，Daniel P. Sties、Abba I. Terr 及 Tristram G. Parslow (編輯), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, 第 71 頁及第 6 章。基於其恆定域之胺基酸序列，來自任何脊椎動物的 L 鏈可歸類為兩種明顯不同的類型中的一種，稱為卡帕 ( $\kappa$ ) 及蘭姆達 ( $\lambda$ )。根據其重鏈恆定域 (CH) 之胺基酸序列，免疫球蛋白可歸類為不同的類別或同型。有五類免疫球蛋白：IgA、IgD、IgE、IgG 和 IgM，其重鏈分別命名為  $\alpha$ 、 $\delta$ 、 $\epsilon$ 、 $\gamma$  和  $\mu$ 。 $\gamma$  和  $\alpha$  類根據 CH 序列和功能的相

對較小差異進一步分為次類，例如，人表現以下次類：IgG1、IgG2A、IgG2B、IgG3、IgG4、IgA1 和 IgA2。

【0040】抗體的「可變區」或「可變域」是指抗體重鏈或輕鏈的胺基末端域。重鏈和輕鏈的可變域可分別稱為「VH」和「VL」。這些結構域通常是抗體中變異性最高之部分(相對於同一類別之其他抗體)，並且包含抗原結合位點。

【0041】術語「可變(variable)」是指可變域的某些片段在抗體之間的序列差異很大的事實。V 結構域介導抗原結合并定義特定抗體對其特定抗原之特異性。但是，變異性並非在可變域之整個範圍內均勻分佈。相反，它集中在輕鏈和重鏈可變域兩者中之三個稱為高度可變區(HVR)的片段中。可變域中保守性較高之部分稱為骨架區(FR)。天然重鏈和輕鏈之可變域各自包含四個FR區域，主要採用 $\beta$ -折疊構型，藉由三個HVR連接，其形成連接 $\beta$ -折疊結構之環並在一些情況下形成 $\beta$ -折疊結構之一部分。每條鏈中之HVR藉由FR區域緊密結合在一起，並與另一條鏈之HVR一起形成抗體之抗原結合位點(參見Kabat 等人，*Sequences of Immunological Interest*，第5版，National Institute of Health，Bethesda，MD (1991))。恆定域不直接參與抗體與抗原之結合，而是展現出多種效應子功能，諸如抗體參與抗體依賴性細胞毒性作用。

【0042】如本文所用，術語「單株抗體」是指從實質上均一的抗體族群中獲得的抗體，即，包含除了可能的天然發生的可能會少量存在突變及/或轉譯後修飾(例如，異構化、醯胺化)以外的相同個別抗體。單株抗體具有高度特異性，其針對單個抗原位點。與通常包括針對不同決定位(抗原決定位)之不同抗體之多株抗體製劑相反，每個單株抗體係針對於抗原上的單一決定位。除特異性以外，單株抗體之優勢在於它們由融合瘤培養物合成，不受其他免疫球蛋白之污染。因此，修飾詞「單株」表示抗體之特徵係獲自實質上同質之抗體群

體，且不應解釋為需要藉由任何特定方法產生抗體。例如，可以藉由多種技術製造根據本揭露所欲使用的單株抗體，該等技術包括例如融合瘤方法（例如，Kohler 及 Milstein, *Nature*, 256:495-97 (1975)；Hongo 等人，*Hybridoma*, 14 (3): 253-260 (1995)；Harlow 等人，*Antibodies: A Laboratory Manual* (Cold Spring Harbor Laboratory Press，第 2 版，1988)；Hammerling 等人，in: *Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas* 563-681 (Elsevier, N.Y，1981))、重組 DNA 方法（參見例如美國第 4,816,567 號專利）、噬菌體展示技術（參見例如，Clackson 等人，*Nature*, 352: 624-628 (1991)；Marks 等人，*J. Mol. Biol.* 222: 581-597 (1992)；Sidhu 等人，*J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310 (2004)；Lee 等人，*J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093 (2004)；Fellouse，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472 (2004)；及 Lee 等人，*J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132 (2004)；及在具有部分或全部人免疫球蛋白基因座或編碼人免疫球蛋白序列之基因的動物中產生人或類人抗體之技術（參見例如 WO 1998/24893；WO 1996/34096；WO 1996/33735；WO 1991/10741；Jakobovits 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 2551 (1993)；Jakobovits 等人，*Nature* 362: 255-258 (1993)；Bruggemann 等人，*Year in Immunol.* 7:33 (1993)；美國第 5,545,807、5,545,806、5,569,825、5,625,126、5,633,425 及 5,661,016 號專利；Marks 等人，*Bio/Technology* 10: 779-783 (1992)；Lonberg 等人，*Nature* 368: 856-859 (1994)；Morrison，*Nature* 368: 812-813 (1994)；Fishwild 等人，*Nature Biotechnol.* 14: 845-851 (1996)；Neuberger，*Nature Biotechnol.* 14: 826 (1996)；及 Lonberg 和 Huszar，*Intern. Rev. Immunol.* 13: 65-93 (1995)。

【0043】術語「裸性抗體 (naked antibody)」是指未與細胞毒性部分或放射性標記共軛的抗體。

【0044】術語「全長抗體」、「完整抗體」或「整個抗體」可互換使用，是指與抗體片段相反，其實質上完整形式的抗體。具體而言，整個抗體包括具有包括 Fc 域的重鏈及輕鏈的抗體。恆定域可以是天然序列恆定域 (例如，人天然序列恆定域) 或其胺基酸序列變異體。在一些情況下，完整抗體可具有一種或多種效應子功能。

【0045】「抗體片段」包含完整抗體的一部分，較佳的是完整抗體的抗原結合及/或可變區。抗體片段的實例包括 Fab、Fab'、F(ab')<sub>2</sub> 及 Fv 片段；雙功能抗體；線性抗體 (參見美國專利 5,641,870，實例 2；Zapata 等人，*Protein Eng.* 8(10): 1057-1062 [1995])；由抗體片段形成的單鏈抗體分子和多特异性抗體。木瓜蛋白酶消化的抗體產生兩個相同的抗原結合片段，稱為「Fab」片段，和一個殘留的「Fc」片段，該名稱反映了容易結晶的能力。Fab 片段由完整 L 鏈及 H 鏈之可變區結構域 (V<sub>H</sub>) 和一條重鏈之第一個恆定域 (C<sub>H1</sub>) 組成。每個 Fab 片段在抗原結合方面是單價的，即，它具有單一抗原結合位點。胃蛋白酶對抗體的處理產生單一大小的 F(ab')<sub>2</sub> 片段，該片段大致對應於兩個具有不同抗原結合活性並且仍能夠交聯抗原的雙硫鍵連接的 Fab 片段。Fab' 片段與 Fab 片段的相同之處在於，在 C<sub>H1</sub> 域的羧基末端具有一些額外的殘基，其包括來自鉸鏈區的一個或多個半胱胺酸。Fab'-SH 為其中恆定域之半胱胺酸殘基攜有游離硫醇基之 Fab' 在本文中的名稱。F(ab')<sub>2</sub> 抗體片段最初是製造為成對的 Fab' 片段，它們之間具有鉸鏈半胱胺酸。抗體片段之其他化學耦聯也是已知的。

【0046】Fc 片段包含藉由二硫鍵連接在一起之兩條 H 鏈的羧基端部。抗體之效應功能係由 Fc 域中的序列決定，該區亦由某些類型的細胞上存在之 Fc 受體 (FcR) 辨識。

【0047】「Fv」是最小的抗體片段，其包含完整的抗原辨識和結合位點。該片段由一個重鏈和一個輕鏈可變區域的二聚體緊密、非共價結合而成。



由這兩個結構域的折疊產生六個高度變異環 (H 和 L 鏈各 3 個環)，這些環形成用於抗原結合之胺基酸殘基，並賦予抗體以抗原結合特異性。但是，即使單個可變域 (或僅包含對抗原具有特異性之三 HVR 的 Fv 的一半) 也具有識別和結合抗原之能力，儘管其親和力低於整個結合位點。

【0048】 「單鏈 Fv」也簡稱為「sFv」或「scFv」，是包含連接到單一多肽鏈中的 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 抗體結構域的抗體片段。優選地，sFv 多肽進一步包含介於 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 結構域之間的多肽連接子，其使 sFv 能夠形成期望之抗原結合結構。關於 sFv 之綜述，參見 Pluckthun 收錄於 *The Pharmacology of Monoclonal Antibodies* 第 113 卷 (Rosenburg 和 Moore 主編，Springer-Verlag，New York，第 269-315 頁，1994) 之文章。

【0049】 本發明的抗體之「功能片段」包含完整抗體之一部分，通常包括完整抗體之抗原結合或可變區或保留或具有經修飾的 FcR 結合能力的抗體的 Fc 域。抗體片段之實例包括線性抗體、單鏈抗體分子及由抗體片段形成的多特異性抗體。

【0050】 術語「雙抗體 (diabody)」是指藉由構建在 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 結構域之間具有短連接子 (約 5-10 個殘基) 的 sFv 片段 (參見前段) 而製備的小抗體片段，使得 V 域的片段的鏈間配對達成，從而產生二價片段，即，具有兩個抗原結合位點的片段。雙特異性雙抗體是兩個「交叉」sFv 片段的異二聚體，其中兩重抗體的 V<sub>H</sub> 和 V<sub>L</sub> 結構域存在於不同的多肽鏈上。雙抗體更詳細描述於例如：EP 404,097；WO 93/11161；Hollinger 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90: 6444-6448 (1993)。

【0051】 本文的單株抗體具體包括「嵌合」抗體 (免疫球蛋白)，其中一部分重鏈及/或輕鏈與衍生自特定物種或屬於特定抗體類別或次類的抗體中的對應序列相同或同源，而鏈的其餘部分與衍生自另一種物種或屬於另一種抗體類別

或次類的抗體以及此類抗體的片段中的相應序列相同或同源，只要它們表現出所需的生物活性 (美國專利號 4,816,567；Morrison 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855 (1984))。本文目標之嵌合抗體包括 PRIMATIZED<sup>®</sup> 抗體，其中，該抗體之抗原結合區源自藉由例如，用目標抗原免疫獼猴而產生之抗體。如本文所用，所用「人源化抗體」為「嵌合抗體」之子集。

【0052】非人 (例如鼠) 抗體的「人源化」形式是含有最少衍生自非人免疫球蛋白的序列的嵌合抗體。於一個實施例中，人源化抗體為人免疫球蛋白 (受體抗體)，其中，受體之 HVR (如下文所定義) 殘基被非人類物種 (供體抗體) 之 HVR 殘基取代，該物種如具有期望之特異性、親和力及/或能力之小鼠、兔或非人靈長類動物。在一些實例中，人免疫球蛋白之骨架 (「FR」) 殘基被對應之非人殘基所取代。此外，人源化抗體可包含不存在於受體抗體或供體抗體中之殘基。可實施這些改造以進一步改善抗體性能，諸如結合親和力。通常，人源化抗體將包含基本上全部至少一個且通常是兩個可變域，其中，全部或基本上全部高度可變環對應於非人免疫球蛋白序列的那些，並且全部或基本上全部 FR 區域之一部分為人免疫球蛋白序列的那些，儘管 FR 區域可包括一個或多個改善抗體性能 (如結合親和力、異構化、免疫原性等) 之一個或多個單個 FR 殘基取代。FR 中這些胺基酸取代是數量在 H 鏈中通常不超過 6 個，並且在 L 鏈中不超過 3 個。人源化抗體還視情況包含免疫球蛋白恆定區 (Fc) 之至少一部分，該恆定區通常為人免疫球蛋白之恆定區。更多詳情參見例如：Jones 等人，*Nature* 321: 522-525 (1986)；Riechmann 等人，*Nature* 332: 323-329 (1988)；及 Presta，*Curr. Op. Struct. Biol.* 2: 593-596 (1992)。另見例如：Vaswani 和 Hamilton，*Ann. Allergy, Asthma & Immunol.* 1: 105-115 (1998)；Harris，*Biochem. Soc. Transactions* 23: 1035-1038 (1995)；Hurle 和 Gross，*Curr. Op. Biotech.* 5: 428-433 (1994)；及美國第 6,982,321 號和第 7,087,409 號專利。

【0053】 「人抗體」這種抗體，其具有胺基酸序列，對應於藉由人所製造及/或使用任何如本文中所揭示用於製造人抗體技術而已製造的抗體的胺基酸序列。人抗體的該定義特定地排除包含非人抗原結合殘基之人源化抗體。人抗體可使用本領域中已知的各種技術（包括噬菌體顯示庫）來生產。

Hoogenboom 和 Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381 (1991); Marks 等人, *J. Mol. Biol.*, 222: 581 (1991)。可用於製備人單株抗體之方法也描述於: Cole 等人, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, 第 77 頁 (1985); Boerner 等人, *J. Immunol.*, 147(1): 86-95 (1991)。另見 van Dijk 和 van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001)。可藉由將抗原授予轉殖基因動物來製備人抗體, 該轉殖基因動物已被改造以對抗原攻擊應答而產生此等抗體, 但其內源基因座已失去功能, 例如, 免疫轉殖基因小鼠 (參見例如, 關於 XENOMOUSE™ 技術之美國專利號 6,075,181 和 6,150,584)。關於藉由人 B 細胞融合瘤技術產生之人抗體, 另見例如 Li 等人, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103: 3557-3562 (2006)。

【0054】 當在本文中使用時, 術語「高度可變區」、「HVR」或「HV」是指抗體可變域的序列高度變異及/或形成結構上定義的環圈的區。一般而言, 抗體包含六個 HVR; 三個在 VH 中 (H1、H2、H3), 及三個在 VL 中 (L1、L2、L3)。在天然抗體中, H3 和 L3 在六個 HVR 中表現出最多的多樣性, 尤其是據信 H3 在賦予抗體優良特異性方面發揮獨特的作用。參見例如: Xu 等人, *Immunity* 13: 37-45 (2000); Johnson 和 Wu, 收錄於: *Methods in Molecular Biology* 248: 1-25 (Lo 主編, Human Press, Totowa, NJ, 2003)。實際上, 在不存在輕鏈的情況下, 僅由重鏈組成的天然駱駝科抗體具有功能和穩定性。參見例如: Hamers-Casterman 等人, *Nature* 363: 446-448 (1993); Sheriff 等人, *Nature Struct. Biol.* 3: 733-736 (1996)。

【0055】 HVR 的許多描述在使用中，並涵蓋於本文中。Kabat 互補決定區 (CDR) 基於序列變異性，且是最常用的 (Kabat 等人，Sequences of Proteins of Immunological Interest, 第 5 版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991))。相反地，Chothia 是指結構環圈的位置 (Chothia 和 Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987))。AbM HVR 表示 Kabat HVR 與 Chothia 結構環之間的折中，且由 Oxford Molecular 之 AbM 抗體模型化軟體使用。

「Contact」HVR 基於對可用複雜晶體結構的分析。這些 HVR 中的各者的殘基如下所示。

環	Kabat	AbM	Chothia	Contact
L1	L24-L34	L24-L34	L26-L32	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L52	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L91-L96	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32	H30-H35B (Kabat 編號)
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35 (Chothia 編號)
H2	H50-H65	H50-H58	H53-H55	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H96-H101	H93-H101

【0056】 HVRs 可包含如下「延長 HVR」：VL 中之 24-36 或 24-34 (L1)、46-56 或 50-56 (L2) 和 89-97 或 89-96 (L3)，及 VH 中之 26-35 (H1)、50-65 或 49-65 (H2) 和 93-102、94-102 或 95-102 (H3)。對於這些定義，可變域殘基根據 Kabat 等人，如上所述的方法進行編號。

【0057】 表現「如 Kabat 所述之可變域殘基編號」或「如 Kabat 所述之胺基酸位置編號」及其變體係指 Kabat 等人，如上所述之用於抗體編譯的重鏈可變域或輕鏈可變域的編號系統。使用該編號系統，實際線性胺基酸序列可包含較少或額外的胺基酸，其對應於可變域的 FR 或 HVR 的縮短或插入。例如，重

鏈可變域可包括 H2 的殘基 52 之後的單個胺基酸插入物 (根據 Kabat 編號之殘基 52a) 及重鏈 FR 殘基 82 之後的插入殘基 (例如, 根據 Kabat 編號之殘基 82a、82b 和 82c 等)。可藉由比對給定抗體之序列同源性區域與「標準」Kabat 編號序列來確定該抗體之殘基的 Kabat 編號。

**【0058】** 「骨架」或「FR」殘基是除本文所定義的 HVR 殘基以外的那些可變域殘基。

**【0059】** 「人共通骨架」或「接受者人骨架 (acceptor human framework)」是代表在人免疫球蛋白 VL 或 VH 骨架序列的選擇中最常見的胺基酸殘基的骨架。通常, 人免疫球蛋白 VL 或 VH 序列的選擇來自可變域序列的次群組。通常, 序列的次組是如下列者之次組: Kabat 等人, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 第 5 版. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)。針對 VL 實例包括如上文 Kabat 等人之次組  $\kappa$  I、 $\kappa$  II、 $\kappa$  III 或  $\kappa$  IV。另外, 對於 VH, 次組可以是次組 I、次組 II、或次組 III, 如上文 Kabat 等人。替代地, 人共通骨架可從上面衍生, 其中特定的殘基, 例如當人骨架序列是基於藉由將一系列各種人骨架序列與供體骨架序列比對出其與供體骨架同源性而選擇時。「衍生自」人免疫球蛋白骨架或人共通骨架的接受者人骨架可包含其相同的胺基酸序列, 或者其可含有預先存在的胺基酸序列變化。在一些實施例中, 預先存在的胺基酸變化的數目是 10 或更少、9 或更少、8 或更少、7 或更少、6 或更少、5 或更少、4 或更少、3 或更少、或 2 或更少。

**【0060】** 在特定位置、例如 Fc 域的「胺基酸修飾」, 係指指定殘基之取代或缺失, 或與指定殘基相鄰的至少一個胺基酸殘基之插入。與指定殘基「相鄰」的插入是指在其一至兩個殘基內插入。插入可以在指定殘基的 N 端或 C 端。本文較佳的胺基酸修飾是取代。

【0061】 「親和力成熟的」抗體是與不具有這些改變的親本抗體相比，在其一個或多個 HVR 中具有一個或多個改變的抗體，其導致抗體對抗原的親和力的改善。在一個實施例中，親和力成熟的抗體對標靶抗原具有奈米莫耳 (nanomolar) 或甚至皮莫耳 (picomolar) 的親和力。親和力成熟的抗體藉由本領域已知的方法產生。例如，Marks 等人，*Bio/Technology* 10:779-783 (1992) 描述藉由 VH 和 VL 域混排 (shuffling) 的親和力成熟。HVR 及/或骨架殘基的隨機誘發突變描述於：Barbas 等人，*Proc Nat. Acad. Sci. USA* 91:3809-3813 (1994)；Schier 等人，*Gene* 169:147-155 (1995)；Yelton 等人，*J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995)；Jackson 等人，*J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995)；及 Hawkins 等人，*J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992)。

【0062】 如本文所用，術語「特異性結合」或「對...具特異性 (specific for)」是指可測量和可再現的交互作用，例如靶標與抗體之間的結合，其決定了在存在異種分子 (包括生物分子) 族群的情況下靶標的存在。例如，與標靶 (可為抗原決定位) 特異性結合之抗體是與該標靶結合之親和力、結合性或容易程度及/或持續時間優於與其他標靶結合之親和力、結合性或容易程度及/或持續時間的抗體。在一個實施例中，抗體結合不相關的靶標之程度小於抗體結合抗原的約 10%，例如藉由放射免疫分析 (RIA) 測定。在某些實施例中，特異性結合於標靶之抗體的解離常數 (Kd) 為  $\leq 1 \mu\text{M}$ 、 $\leq 100 \text{ nM}$ 、 $\leq 10 \text{ nM}$ 、 $\leq 1 \text{ nM}$  或  $\leq 0.1 \text{ nM}$ 。在某些實施例中，抗體特異性結合至不同物種蛋白質中保守的蛋白質上之抗原決定位。於另一個實施例中，特異性結合可包括但不要求專一結合。

【0063】 本文中的術語「Fc 域」用於定義免疫球蛋白重鏈之 C 端區，包括天然序列 Fc 域及變異體 Fc 域。儘管免疫球蛋白重鏈之 Fc 域之邊界可有所變化，但通常將人 IgG 重鏈 Fc 域定義為自 Cys226 或 Pro230 位置之胺基酸殘

基延伸至其羧基末端。例如，在抗體生產或純化過程中，或藉由重組工程化編碼抗體重鏈之核酸，可去除 Fc 域之 C 端離胺酸 (根據 EU 編號系統之殘基 447)。因此，完整抗體之組成物可包含去除所有 K447 殘基之抗體群體、未去除 K447 殘基之抗體群體及具有含及不包含 K447 殘基之抗體混合物之抗體群體。用於本發明之抗體之合適的天然序列 Fc 域包括人 IgG1、IgG2 (IgG2A, IgG2B)、IgG3 及 IgG4。

【0064】 「Fc 受體」或「FcR」描述與抗體之 Fc 域結合的受體。優選 FcR 為天然序列人 FcR。此外，較佳的 FcR 是結合 IgG 抗體 ( $\gamma$ 受體) 並包括 Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII 和 Fc $\gamma$ RIII 次類的受體的 FcR，包括等位基因變異體和這些受體的剪接形式，Fc $\gamma$ RII 受體包括 Fc $\gamma$ RIIA (「活化受體」) 和 Fc $\gamma$ RIIB (「抑制受體」)，它們具有相似的胺基酸序列，主要區別在於其胞質域。活化受體 Fc $\gamma$ RIIA 在其胞質結構域中包含基於免疫受體酪胺酸的活化模體 (ITAM)。抑制受體 Fc $\gamma$ RIIB 在其胞質結構域中包含一個基於免疫受體酪胺酸之抑制模體 (ITIM)。參見 M. Daëron, *Annu. Rev. Immunol.* 15: 203-234 (1997)。FcR 綜述於：Ravetch 和 Kinet, *Annu. Rev. Immunol.* 9: 457-92 (1991)；Capel 等人, *Immunomethods* 4: 25-34 (1994)；及 de Haas 等人, *J. Lab. Clin. Med.* 126: 330-41 (1995)。本文中的術語「FcR」涵蓋其他 FcR，包括未來經鑑定出者。

【0065】 術語「Fc 受體」或「FcR」還包括負責將母體 IgG 轉移至胎兒的新生兒受體 FcRn。Guyer 等人, *J. Immunol.* 117: 587 (1976) 以及 Kim 等人, *J. Immunol.* 24: 249 (1994)。測量與 FcRn 結合的方法是已知的 (參見例如 Ghetie 及 Ward, *Immunol. Today* 18: (12): 592-8 (1997)；Ghetie 等人, *Nature Biotechnology* 15 (7): 637-40 (1997)；Hinton 等人, *J. Biol. Chem.* 279 (8): 6213-6 (2004)；WO 2004/92219 (Hinton 等人)。活體內的 FcRn 結合及人 FcRn 高親和力結合多肽的血清半衰期，可例如在表現人 FcRn 的基因轉殖小鼠或經轉染的

人細胞系、或經施予具有變異體 Fc 域的多肽之靈長類動物中來檢定。WO 2004/42072 (Presta) 描述改善或減少與 FcR 結合的抗體變異體。亦參見例如 Shields 等人, *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604 (2001)。

**【0066】** 如本文所用, 短語「實質上減少」或「實質上不同」表示兩個數值之間的足夠高的差異度 (通常一個與分子相關聯而另一個與參考/比較分子相關聯), 使得熟習本技術領域者認為在由該等值 (例如, Kd 值) 測量的生物學特徵的背景下, 兩個值之間的差異具有統計學顯著性。例如, 根據參考/對比分子之值, 所述兩個值之差異大於約 10%、大於約 20%、大於約 30%、大於約 40% 及/或大於約 50%。

**【0067】** 如本文所用, 術語「實質上相似」或「實質上相同」表示兩個數值之間的足夠高的相似度 (例如一個與本發明之抗體相關聯而另一個與參考/比較抗體相關聯), 使得熟習本技術領域者認為在由該等值 (例如, Kd 值) 測量的生物學特徵的背景下, 兩個值之間的差異小或無生物學及/或統計學顯著性。例如, 根據參考/對比分子之值, 所述兩個值之差異小於約 50%、小於約 40%、小於約 30%、小於約 20% 及/或小於約 10%。

**【0068】** 如本文中所使用的「載體」包括在所採用的劑量和濃度下對暴露於彼之細胞或哺乳動物無毒的藥學上可接受的載體、賦形劑或穩定劑。生理上可接受之載劑通常為 pH 緩衝水溶液。生理上可接受之載劑的實例包括: 緩衝液, 諸如磷酸鹽、檸檬酸鹽及其他有機酸; 抗氧化劑, 包括抗壞血酸; 低分子量 (少於約 10 個殘基) 多肽; 蛋白質, 諸如血清白蛋白、明膠或免疫球蛋白; 親水性聚合物, 諸如聚乙烯吡咯烷酮; 胺基酸, 諸如甘胺酸、麩醯胺酸、天冬醯胺、精胺酸或離胺酸; 單醣、雙醣及其他碳水化合物, 包括葡萄糖、甘露糖或糊精; 螯合劑, 諸如 EDTA; 糖醇, 諸如甘露醇或山梨糖醇; 成鹽抗衡



離子，諸如鈉；及/或非離子界面活性劑，諸如 TWEEN™、聚乙二醇 (PEG) 及 PLURONICS™。

【0069】「包裝插頁」是指習慣上包含在商業藥物包裝中的說明，其含有有關適應症、用法、劑量、施予、禁忌症、其他與包裝產品結合使用的藥物、及/或有關使用此類藥物的警告等的資訊。

【0070】除非上下文另外明確指示，否則如本說明書及所附申請專利範圍中所用，單數形式「一 (a/an)」及「該 (the)」包括複數個指示物。因此，舉例而言，提及「一分子」視情況包括兩個或更多個此類分子之組合及其類似者。

【0071】如本文所使用之術語「約」是指本技術領域的技術人員容易知道的各個值的通常誤差範圍。本文提及「約」值或參數包括(和描述)針對該值或參數本身的實施例。

【0072】應理解，本文所述之本發明之態樣及具體實例包括「包含」態樣及具體實例、「由」態樣及具體實例「組成」及「基本上由」態樣及具體實例「組成」。

### III. T 細胞受體及融合蛋白

【0073】在一個態樣，本文提供 TCR 融合蛋白，其包含與 GVYDGREHTV (SEQ ID NO:34) HLA-A\*02 複合體結合之 TCR。在一些實施例中，TCR 為可溶性 TCR。在一些實施例中，TCR 融合蛋白包含本揭露之 TCR (例如，可溶性單株 TCR)，該 TCR 與 T 細胞接合域及抗體 Fc 域融合或連接 (例如，共價連接)，該 T 細胞接合域結合表現於 T 細胞之細胞表面上的蛋白質。在一些實施例中，TCR 經醮基化，例如在單一 N-連接醮基化位點處。在一些實施例中，N-連接醮基化位點位於例如根據

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCQYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFS

ENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRG  
TSLIVHP (SEQ ID NO:7) 編號的  $\alpha$  鏈可變區之殘基 N18 處。

【0074】 在一些實施例中，TCR 包含含有  $\alpha$  鏈可變區的 TCR  $\alpha$  鏈及含有  $\beta$  鏈可變區的 TCR  $\beta$  鏈。在一些實施例中， $\alpha$  鏈可變區包含：(i) CDR1，其包含 VSPFSN (SEQ ID NO:1) 之胺基酸序列；(ii) CDR2，其包含 LTFSENT (SEQ ID NO:2) 之胺基酸序列；及 (iii) CDR3，其包含 VVNSAQGLYIPTF (SEQ ID NO:3) 之胺基酸序列；且/或  $\beta$  鏈可變區包含：(i) CDR1，其包含 LDHEN (SEQ ID NO:4) 之胺基酸序列；(ii) CDR2，其包含 SRFATG (SEQ ID NO:5) 之胺基酸序列；及 (iii) CDR3，其包含 ASSSDQNSGDPYEYF (SEQ ID NO:6) 之胺基酸序列。

【0075】 如本領域眾所周知的，TCR 可以經歷翻譯後修飾。醣基化為一種此等修飾，其包含寡糖部分與 TCR 鏈中限定胺基酸的共價接附。例如，天冬醯胺酸殘基或絲胺酸/蘇胺酸殘基為用於眾所周知的寡糖接附位置。特定蛋白質之醣基化狀態取決於許多因素，包括蛋白質序列、蛋白質構形及某些酶之可用性。此外，醣基化狀態 (亦即寡醣類型、共價鍵結及接附總數) 可能影響蛋白質功能。因此，在生產重組蛋白時，通常期望控制醣基化。受控醣基化已用於改進基於抗體的治療劑。(Jefferis 等人，(2009) Nat Rev Drug Discov 3 月;8(3):226-34.)。對於本揭露之可溶性 TCR，醣基化可以在活體內藉由使用例如特定細胞係來控制，或在活體外藉由化學修飾來控制。此等修飾係期望的，因為醣基化可以改善藥物動力學、降低免疫原性且更接近地模擬天然人蛋白質 (Sinclair 及 Elliott, (2005) Pharm Sci. 8 月; 94(8):1626-35)。

【0076】 在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白係經醣基化，*例如*，在單一 N-連接醣基化位點處。在一些實施例中，N-連接醣基化位點位於 *例如*根據

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCQYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSEN  
ENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRG  
TSLIVHP (SEQ ID NO:7) 編號的  $\alpha$  鏈可變區之殘基 N18 處。在一些實施例中，本揭露之 TCR 融合蛋白包含 TCR，該 TCR 在單一 N-連接醮基化位點處經醮基化，其中該 N-連接醮基化位點係在根據 SEQ ID NO:7 編號的  $\alpha$  鏈可變區之殘基 N18 處。有利地，本揭露證明與其他醮基化/或無醮基化變異體相比，除了保留肽-MHC 結合之親和力及標靶細胞殺傷之效力之外，具有該單一醮基化位點的 TCR 融合蛋白復具有更好的可製造性 (例如，蛋白質產率、對熱應力及聚集的抗性) 及活體內藥物動力學 (例如，半衰期)。

**【0077】** 在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含在除了殘基 N18 之外的每個潛在 N-醮基化位點處的胺基酸取代。例如，在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含在以下中之一者或多者處的一個或多個胺基酸取代：根據 SEQ ID NO:32 編號的  $\alpha$  鏈可變區之殘基 N24；根據 SEQ ID NO:10 編號的  $\alpha$  鏈恆定區之殘基 N33、N67 及 N78；根據 SEQ ID NO:33 編號的  $\beta$  鏈可變區之殘基 N84；以及根據 SEQ ID NO:15 編號的  $\beta$  鏈恆定區之殘基 N70。在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含在以下全部處之一個或多個胺基酸取代：根據 SEQ ID NO:32 編號的  $\alpha$  鏈可變區之殘基 N24；根據 SEQ ID NO:10 編號的  $\alpha$  鏈恆定區之殘基 N33、N67 及 N78；根據 SEQ ID NO:33 編號的  $\beta$  鏈可變區之殘基 N84；以及根據 SEQ ID NO:15 編號的  $\beta$  鏈恆定區之殘基 N70。

**【0078】** 在一些實施例中，胺基酸取代為天冬醮胺酸至未醮基化的胺基酸。在一些實施例中，胺基酸取代為天冬醮胺酸至麩醮胺酸 (N $\rightarrow$ Q)。

**【0079】** 在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含下列胺基酸取代中之一個或多個：根據 SEQ ID NO:32 編號的  $\alpha$  鏈可變區中的 N24Q；根

據 SEQ ID NO:10 編號的  $\alpha$  鏈恆定區中的 N33Q、N67Q 及 N78Q；根據 SEQ ID NO:33 編號的  $\beta$  鏈可變區中的 N84Q；以及根據 SEQ ID NO:15 編號的  $\beta$  鏈恆定區中的 N70Q。在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含下列胺基酸取代中之全部：根據 SEQ ID NO:32 編號的  $\alpha$  鏈可變區中的 N24Q；根據 SEQ ID NO:10 編號的  $\alpha$  鏈恆定區中的 N33Q、N67Q 及 N78Q；根據 SEQ ID NO:33 編號的  $\beta$  鏈可變區中的 N84Q；以及根據 SEQ ID NO:15 編號的  $\beta$  鏈恆定區中的 N70Q。

**【0080】** 本揭露之  $\alpha$ - $\beta$  異二聚體 TCR 通常包含  $\alpha$  鏈 TRAC 恆定域序列及/或  $\beta$  鏈 TRBC1 或 TRBC2 恆定域序列。 $\alpha$  及  $\beta$  鏈恆定域序列可以藉由截短或取代來修飾，以使 TRAC 之外顯子 2 之 Cys4 與 TRBC1 或 TRBC2 之外顯子 2 之 Cys2 之間的天然雙硫鍵缺失。一個或多個  $\alpha$  及/或  $\beta$  鏈恆定域序列可以藉由用半胱胺酸殘基取代 TRAC 之 Thr 48 及 TRBC1 或 TRBC2 之 Ser 57 來修飾，該等半胱胺酸形成 TCR 之  $\alpha$  與  $\beta$  恆定域之間的雙硫鍵。TRBC1 或 TRBC2 可以另外包括恆定域之位置 75 處的半胱胺酸至丙胺酸突變及恆定域之位置 89 處的天冬醯胺酸至天冬胺酸突變。恆定域可以另外地或替代性地含有相對於天然 TRAC 及/或 TRBC1/2 序列的其他突變、取代或缺失。術語 TRAC 及 TRBC1/2 涵蓋自然多形性變異體，例如 TRAC 之位置 4 處的 N 至 K (Bragado 等人 Int Immunol.1994 年 2 月;6(2):223-30)。

**【0081】** 如對熟習此項技術者將顯而易見的，可以將在其 C 端及/或 N 端處提供的序列截短 1、2、3、4、5 或更多個殘基，而基本上不影響 TCR 之結合特性。所有此等無義變異體均由本揭露涵蓋。

**【0082】** 野生型或不可溶性 TCR 之恆定域可以係全長的，或者可以經截短及/或突變以生產可溶性 TCR。在任一情況下，可以將半胱胺酸取代引入至

TRAC 及 TRBC 區中，使得可以形成非天然鏈間雙硫鍵。WO03020763 中描述了用於放置該等半胱胺酸取代的合適位置。

【0083】 在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含  $\alpha$  鏈恆定區及/或  $\beta$  鏈恆定區中的一個或多個經工程化半胱胺酸殘基以形成  $\alpha$  鏈與  $\beta$  鏈之間的非天然雙硫鍵。在某些實施例中，本揭露之單鏈 TCR 可以具有在相應恆定域之殘基之間所引入之雙硫鍵，如 WO 2004/033685 中所述。單鏈 TCR 進一步描述於下列中：WO2004/033685；W098/39482；WO01/62908；Weidanz 等人 (1998) J Immunol Methods 221 (1 -2): 59-76；Hoo 等人 (1992) Proc Natl Acad Sci U S A 89(10): 4759-4763；Schodin (1996) Mol Immunol 33(9): 819-829)。在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含在根據 SEQ ID NO:15 編號的  $\beta$  鏈恆定區之位置 57 處的半胱胺酸殘基。

【0084】 在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含  $\alpha$  鏈可變區，其包含與

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCQYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSEN  
ENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRG  
TSLIVHP (SEQ ID NO:7) 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含  $\alpha$  鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列。

【0085】 在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含  $\beta$  鏈可變區，其包含與

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLHDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRF  
ATGKEKGDIPGYSVSREKKERFSLILESASTQQTSMYLCASSDQNSGDPYE  
QYFGPGTRLTVT (SEQ ID NO:13) 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至

少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含  $\beta$  鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含： $\alpha$  鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列；及  $\beta$  鏈可變區，其包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。

【0086】 在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含 TCR  $\alpha$  鏈，其包含本揭露之  $\alpha$  鏈可變區以及  $\alpha$  鏈恆定區。在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含  $\alpha$  鏈恆定區，其包含與 YIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITDKCVLDM RSMDFKSNSAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDT(SEQ ID NO:9) 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含  $\alpha$  鏈恆定區，其包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列。

【0087】 在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含 TCR  $\beta$  鏈，其包含本揭露之  $\beta$  鏈可變區以及  $\beta$  鏈恆定區。在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含  $\beta$  鏈恆定區，其包含與 EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEV HSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLS ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD(SEQ ID NO:14) 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含  $\beta$  鏈恆定區，其包含 SEQ ID

NO:14 之胺基酸序列。在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含： $\alpha$  鏈恆定區，其包含 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列；及  $\beta$  鏈恆定區，其包含 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列。

【0088】 在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含： $\alpha$  鏈，其包含含有 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列的  $\alpha$  鏈可變區及含有 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列的  $\alpha$  鏈恆定區；及  $\beta$  鏈，其包含含有 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列的  $\beta$  鏈可變區及含有 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列的  $\beta$  鏈恆定區。

【0089】 在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含  $\alpha$  鏈，其包含與

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCQYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSE  
ENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRG  
TSLIVHPYIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITD  
KCVLDMRSMDFKSNSAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDT(SEQ ID NO:11)

之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含  $\alpha$  鏈，其包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列。

【0090】 在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含  $\beta$  鏈，其包含與

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRF  
ATGKEKGDIPPEGYSVSREKKERFSLILESASTQQTSMYLCASSDQNSGDPYE  
QYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHV  
ELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQDPRN  
HFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD(SEQ ID NO:16) 之

胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含  $\beta$  鏈，其包含 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列。在一些實施例中，本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白包含： $\alpha$  鏈，其包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列；及  $\beta$  鏈，其包含 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列。

【0091】 在一些實施例中，本揭露之 TCR 融合蛋白包含結合表現於 T 細胞之細胞表面上的蛋白質的 T 細胞接合域。在一些實施例中，T 細胞接合域結合表現於 T 細胞之細胞表面上的蛋白質並將 T 細胞募集至表現 GGYDGREHTV (SEQ ID NO:34) HLA-A\*02 複合體的細胞。在一些實施例中，T 細胞接合域結合表現於 T 細胞之細胞表面上的蛋白質並使 T 細胞活化，*例如*，經由與表現於細胞表面上的蛋白質之結合。在一些實施例中，表現於 T 細胞之細胞表面上的蛋白質為細胞表面受體。在一些實施例中，表現於 T 細胞之細胞表面上的蛋白質為人 CD3 多肽。

【0092】 在一些實施例中，T 細胞接合域包含抗體抗原結合域。在一些實施例中，抗體抗原結合域與由 T 細胞表現的細胞表面受體結合。在一些實施例中，抗體抗原結合域與由 T 細胞表現的細胞表面受體結合並引起 T 細胞之活化。在一些實施例中，T 細胞接合域為單鏈可變片段 (scFv) 之一部分或包含 scFv。在一些實施例中，scFv 為抗 CD3 scFv。其他單鏈抗體片段形式係本領域已知的。

【0093】 在一些實施例中，scFv 為 U28 變異體抗 CD3 scFv。在一些實施例中，scFv 包含

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR  
LESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEI



KG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG  
 YSFTGYAMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDKSK  
 NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDS DWYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ  
 ID NO:17) 之胺基酸序列。在一些實施例中，scFv 包含  
 AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR  
 LESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEI  
 KG GGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG  
 YSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKN  
 TAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDS DWYFDVWGQGTLVTVSS (SEQ  
 ID NO:35) 之胺基酸序列。

【0094】 在一些實施例中，結合表現於 T 細胞之細胞表面上的蛋白質的 T 細胞接合域 (例如，scFv) 係經由連接子與 TCR 共價連接。在一些實施例中，連接子為 Gly-Ser 連接子。在一些實施例中，連接子包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO:18 至 SEQ ID NO:25。

【0095】 在一些實施例中，結合表現於 T 細胞之細胞表面上的蛋白質的 T 細胞接合域 (例如，scFv) 之 C 端係經由本揭露之連接子與 TCR  $\beta$  鏈可變域之 N 端共價連接。

【0096】 在一些實施例中，抗體 Fc 域之 N 端係經由鉸鏈序列與 TCR  $\alpha$  鏈恆定域之 C 端共價連接。在一些實施例中，鉸鏈序列包含 DKTHTCPP (SEQ ID NO:31) 或 DKTHTCPPC (SEQ ID NO:36) 之胺基酸序列。

【0097】 在一些實施例中，本揭露之 TCR 融合蛋白包含抗體 Fc 域，例如，人抗體 Fc 域。在一些實施例中，本揭露之 TCR 融合蛋白包含人 IgG1、人 IgG2 或人 IgG4 Fc 域。有利地，本揭露證明，與不具有從大腸桿菌或 CHO 細

胞表現的 Fc 的類似分子相比，發現具有與  $\alpha$  或  $\beta$  鏈融合的 Fc 域的 TCR 融合蛋白具有顯著改善之藥物動力學。

**【0098】** 在一些實施例中，抗體 Fc 域包含減弱 Fc 域之效應功能的一個或多個突變。示例性效應功能包括但不限於補體依賴性細胞毒性 (CDC) 及/或抗體依賴性細胞毒性 (ADCC)。在示例性實施例中，減弱效應功能的修飾為改變 Fc 域之醣基化模式的修飾，*例如*，產生無醣基化 Fc 域的修飾。在示例性實施例中，減弱效應功能的修飾為不改變 Fc 域之醣基化模式的修飾。在某些實施例中，減弱效應功能的修飾減少或消除了與人效應細胞的結合、與一種或多種 Fc 受體的結合、及/或與表現 Fc 受體的細胞的結合。在示例性實施例中，本文所述之 Fc 變異體包含人 IgG1 之 Fc 域中的 N297G 或 N297A 修飾。在一例示性的實施例中，本文所述的 Fc 變異體包含以下修飾：人 IgG1 之 Fc 域中的 L234A、L235A 及 P329G，其導致效應功能減弱。在一些實施例中，抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含在根據 EU 索引編號的殘基 N297 處的突變。例如，在一些實施例中，突變為 N297G 取代。其他合適的突變 (*例如*，在殘基 N297 處) 係熟習此項技術者所已知的。

**【0099】** 在各種實施例中，具有降低的效應功能的 Fc 變異體係指將效應功能 (例如，CDC、ADCC 及/或與 FcR 的結合等活性) 與野生型 Fc 域 (例如，Fc 域沒有具有降低效應功能的突變，儘管它可能具有其他突變) 所實現的效應功能相比降低至少 10%、20%、30%、40%、50%、60%、70%、80%、90%、95%、97%、98%、99% 或更高的 Fc 變異體。在某些實施例中，具有降低的效應功能的 Fc 變異體係指與野生型 Fc 與相比消除所有可檢測的效應功能的 Fc 變異體。用於測量效應功能的測定法是本領域已知的，並在下面描述。

**【0100】** 可實施活體外及/或活體內細胞毒性測定，以確認 CDC 及/或 ADCC 活性之下降/耗竭。例如，可以進行 Fc 受體 (FcR) 結合測定以確保 Fc 域

或融合蛋白缺乏 Fc $\gamma$ R 結合 (因此可能缺乏 ADCC 活性)，但是保留了 FcRn 結合能力。媒介 ADCC 之初代細胞 NK 細胞僅表現 Fc $\gamma$ RIII，而單核細胞則表現 Fc $\gamma$ RI、Fc $\gamma$ RII 及 Fc $\gamma$ RIII。FcR 在造血細胞上之表現匯總於 Ravetch 和 Kinet 的論文 (*Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492 (1991)) 之第 464 頁的表 3 中。用於評估所關注分子之 ADCC 活性的活體外分析方法的非限制性示例描述於以下中：美國專利第 5,500,362 號 (參見，例如 Hellstrom, I. 等人，*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063 (1986)) 及 Hellstrom, I 等人，*Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502 (1985)；5,821,337 (參見 Bruggemann, M. 等人，*J. Exp. Med.* 166:1351-1361 (1987))。替代性地，可以採用非放射性分析方法 (參見，例如：用於流式細胞分析技術的 ACTI™ 非放射性細胞毒性測定 (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA)；及 CytoTox 96® 非放射性細胞毒性測定 (Promega, Madison, WI))。用於此等測定的有用的效應細胞包括外周血單核細胞 (PBMC) 及自然殺手 (NK) 細胞。替代性地或此外，可在活體內評估所關注分子之 ADCC 活性，例如，在動物模型中，諸如 Clynes 等人 *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656 (1998) 中所揭示之動物模型。還可實施 C1q 結合測定以確認該抗體無法結合 C1q 並因此缺乏 CDC 活性。參見，例如，WO 2006/029879 及 WO 2005/100402 中之 C1q 及 C3c 結合 ELISA。為評定補體活化，可以進行 CDC 測定 (參見，例如：Gazzano-Santoro 等人，*J. Immunol. Methods* 202:163 (1996)；Cragg, M.S. 等人，*Blood* 101:1045-1052 (2003)；以及 Cragg, M.S. 及 M.J.Glennie, *Blood* 103:2738-2743 (2004))。亦可以使用此項技術中已知之方法來進行 FcRn 結合及活體內清除率/半衰期測定 (參見，例如，Petkova, S.B. 等人 *Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769 (2006))。在某些實施例中，本文所述之 Fc 變異體包含對 Fc 域的修飾，該等修飾降低效應功能，如 Strohl, *Current Opinion in Biotechnology*, 20:685-691 (2009) 中所述。

【0101】 在一些實施例中，抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含在根據 EU 索引編號的殘基 E233、L234、L235 及/或 G236 處的一個或多個突變。例如，在一些實施例中，抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含根據 EU 索引編號的取代 N297G、E233P、L234V、L235A 及在 G236 處的缺失。

【0102】 在一些實施例中，抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含在根據 EU 索引編號的殘基 L234、L235 及 P329 處的一個或多個突變。例如，在一些實施例中，抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含根據 EU 索引編號的取代 L234A、L235A 及 P329G。

【0103】 在一些實施例中，抗體 Fc 域係經由鉸鏈序列與本揭露之 TCR 融合。在一些實施例中，鉸鏈序列包含 DKTHTCPP (SEQ ID NO:31) 或 DKTHTCPPC (SEQ ID NO:36) 之胺基酸序列。

【0104】 在一些實施例中，本揭露之 TCR 融合蛋白包含兩個抗體 Fc 域。在一些實施例中，兩個抗體 Fc 域中之一者與本揭露之 TCR 融合或連接 (例如，共價連接)。圖 1B 揭示了根據一些實施例之組態，其中兩個抗體 Fc 域中之一者與 TCR  $\alpha$  鏈連接 (例如，經由  $\alpha$  鏈恆定域)。在一些實施例中，兩個抗體 Fc 域係例如經由抗體 Fc 域中之一者或兩者上促進異源二聚化的一個或多個共價鍵結及/或一個或多個胺基酸取代而彼此締合。

【0105】 在一些實施例中，第一抗體 Fc 域係經由第一鉸鏈序列與 TCR 融合，且第二鉸鏈序列係與第二抗體 Fc 域之 N 端連接。在一些實施例中，第一鉸鏈序列及第二鉸鏈序列係經由在第一鉸鏈序列與第二鉸鏈序列之間的一個或多個鏈間雙硫鍵連接。在一些實施例中，第一及第二抗體 Fc 域兩者均進一步包含鉸鏈序列，且第一及第二鉸鏈序列經由第一與第二鉸鏈序列之間的一個或多個鏈間雙硫鍵連接。在一些實施例中，第一鉸鏈序列及第二鉸鏈序列均包含 DKTHTCPP (SEQ ID NO:31) 或 DKTHTCPPC (SEQ ID NO:36) 之胺基酸序

列。在一些實施例中，本揭露之鉸鏈序列為抗體鉸鏈序列，例如來自抗體鉸鏈區的序列。

**【0106】** 在一些實施例中，第一及第二抗體 Fc 域中之一者包含一個或多個杵形成突變且第一及第二抗體 Fc 域中之另一者包含一個或多個對應的臼形成突變以促進抗體 Fc 域之異源二聚化。

**【0107】** 在一些實施例中，兩個抗體 Fc 域之異源二聚化係藉由「杵入臼」工程化來促進。例如，包含抗體 Fc 域的兩個多肽可以在活體外組裝成 TCR 融合蛋白，其中第一抗體 Fc 域包含其 CH3 域中的形成隆突的胺基酸修飾，且第二抗體 Fc 域包含其 CH3 域中的形成腔窩的胺基酸修飾。隆突可定位至腔窩中，從而在組裝后形成 TCR 融合蛋白。

**【0108】** 在該方法中，包含抗體 Fc 域的兩個多肽各自包含界面。一個多肽之界面與另一個多肽上的對應界面交互作用，從而允許兩個多肽進行締合。這些界面可以經工程化使得位於一個多肽之界面中的「杵」或「隆突」(這些術語在本文中可互換使用)與位於另一個多肽之界面中的「臼」或「腔窩」(這些術語在本文中可互換使用)相對應。在一些實施例中，臼的尺寸與杵相同或相似，且經適當地定位，使得當兩個界面交互作用時，一個界面之杵可定位在另一個界面之對應臼中。不受理論之束縛，這被認為可穩定異源多聚體且相對於其他物種(例如同源多聚體)促進異源多聚體之形成。在一些實施例中，該方法可以用於促進兩個不同多肽之異源多聚化，從而促進兩個抗體 Fc 域之締合。

**【0109】** 在一些實施例中，可以藉由用較大的側鏈替換小的胺基酸側鏈來構建杵。在一些實施例中，可以藉由用較小的側鏈替換大的胺基酸側鏈來構建臼。杵或臼可以存在於原始界面中，也可以以合成方式引入。例如，可以藉由以下以合成方式引入杵或臼：改變編碼界面的核酸序列，以用至少一個「輸

入」胺基酸殘基替換至少一個「原始」胺基酸殘基。用於改變核酸序列之方法可以包括此項技術中眾所周知的標準分子生物學技術。各種胺基酸殘基之側鏈體積如下表所示。在一些實施例中，原始殘基具有小的側鏈體積(例如，丙胺酸、天冬醯胺酸、天冬胺酸、甘胺酸、絲胺酸、蘇胺酸或纈胺酸)，且用於形成杵的輸入殘基係自然存在的胺基酸並且可以包括精胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸。在一些實施例中，原始殘基具有大的側鏈體積(例如，精胺酸、苯丙胺酸、酪胺酸及色胺酸)，且用於形成臼的輸入殘基係自然存在的胺基酸並且可以包括丙胺酸、絲胺酸、蘇胺酸及纈胺酸。

**表 B. 胺基酸殘基之性質**

胺基酸	單字母縮語	質量 <sup>a</sup> (道爾頓)	體積 <sup>b</sup> (Å <sup>3</sup> )	可接觸表面積 <sup>c</sup> (Å <sup>2</sup> )
丙胺酸 (Ala)	A	71.08	88.6	115
精胺酸 (Arg)	R	156.20	173.4	225
天冬醯胺酸 (Asn)	N	114.11	117.7	160
天冬胺酸 (Asp)	D	115.09	111.1	150
半胱胺酸 (Cys)	C	103.14	108.5	135
麩醯胺酸 (Gln)	Q	128.14	143.9	180
麩胺酸 (Glu)	E	129.12	138.4	190
甘胺酸 (Gly)	G	57.06	60.1	75
組胺酸 (His)	H	137.15	153.2	195
異白胺酸 (Ile)	I	113.17	166.7	175
白胺酸 (Leu)	L	113.17	166.7	170
離胺酸 (Lys)	K	128.18	168.6	200
甲硫胺酸 (Met)	M	131.21	162.9	185
苯丙胺酸 (Phe)	F	147.18	189.9	210
脯胺酸 (Pro)	P	97.12	122.7	145
絲胺酸 (Ser)	S	87.08	89.0	115
蘇胺酸 (Thr)	T	101.11	116.1	140
色胺酸 (Trp)	W	186.21	227.8	255
酪胺酸 (Tyr)	Y	163.18	193.6	230

胺基酸	單字母縮語	質量 <sup>a</sup> (道爾頓)	體積 <sup>b</sup> (Å <sup>3</sup> )	可接觸表面積 <sup>c</sup> (Å <sup>2</sup> )
纈胺酸 (Val)	V	99.14	140.0	155

<sup>a</sup> 胺基酸之分子量減去水之分子量。值，來自化學與物理手冊，第 43 版，Cleveland，化學橡膠出版社公司，1961 年。

<sup>b</sup> 值，來自 A.A. Zamyatin, Prog. Biophys. Mol. Biol. 24:107-123, 1972。

<sup>c</sup> 值，來自 C. Chothia, J. Mol. Biol. 105:1-14, 1975。可接觸表面積定義於該參考文獻之圖 6 至圖 20 中。

**【0110】** 在一些實施例中，基於異源多聚體之三維結構來識別用於形成杵或臼的原始殘基。此項技術中已知的用於獲得三維結構的技術可以包括 X 射線結晶學及 NMR。在一些實施例中，界面為免疫球蛋白恆定域之 CH3 域。在這些實施例中，人 IgG<sub>1</sub> 之 CH3/CH3 界面涉及位於四個反平行 β 股上的各域上的十六個殘基。不受理論之束縛，突變的殘基較佳地位於兩個中心反平行 β 股上，以最小化杵可能由周圍溶劑而非配偶 CH3 域中的補償臼容納的風險。在一些實施例中，在兩個免疫球蛋白多肽中形成對應的杵及臼的突變對應於下表中提供的一對或多對。

**表 C.** 對應的杵及臼形成突變的示例性集

第一 Fc 之 CH3	第二 Fc 之 CH3
T366Y	Y407T
T366W	Y407A
T366W	T366S:L368A:Y407V
F405A	T394W
Y407T	T366Y
T366Y:F405A	T394W+Y407T
T366W+F405W	T394S+Y407A
F405W+Y407A	T366W+T394S
F405W	T394S

突變由原始殘基表示，後面為使用 Kabat 編號系統的位置，然後為輸入殘基 (所有殘基均以單字母胺基酸代碼給出)。多個突變由冒號分隔。

【0111】 在一些實施例中，抗體 Fc 域包含 CH3 域，該 CH3 域包含上表 C 中列出的一個或多個胺基酸取代。在一些實施例中，TCR 融合蛋白包含第一抗體 Fc 域及第二抗體 Fc 域，該第一抗體 Fc 域包含含有表 C 之左欄所列的一個或多個胺基酸取代的 CH3 域，該第二抗體 Fc 域包含含有表 C 之右欄中列出的一個或多個對應胺基酸取代的 CH3 域。

【0112】 例如，在一些實施例中，根據 EU 索引編號，第一及第二抗體 Fc 域中之一者包含 T366W 取代，且第一及第二抗體 Fc 域中之另一者包含 T366S、L368A、Y407V 取代。

【0113】 在一些實施例中，抗體 Fc 域中之一者包含 SEQ ID NO:27 之胺基酸序列，且抗體 Fc 域中之另一者包含 SEQ ID NO:26 之胺基酸序列。在一些實施例中，第一抗體 Fc 域與 TCR 共價連接並且包含 SEQ ID NO:27 之胺基酸序列，且第二抗體 Fc 域包含 SEQ ID NO:26 之胺基酸序列。

【0114】 在如上所述之 DNA 突變之後，可以使用此項技術中已知的標準重組技術及細胞系統來表現及純化編碼具有一個或多個對應杵或臼形成突變的經修飾抗體 Fc 域的多核苷酸。參見，例如，美國專利號 5,731,168；5,807,706；5,821,333；7,642,228；7,695,936；8,216,805；美國公佈號 2013/0089553；以及 Spiess 等人，Nature Biotechnology 31: 753-758, 2013。對應的帶有杵及臼的、含有抗體 Fc 域的多肽可以表現於共培養物中的宿主細胞中並作為異源多聚體一起純化，或者它們可以表現於單個培養物中、單獨地純化並在活體外組裝。此項技術中已知的允許量測同源多聚體與異源多聚體物種的豐度的標準技術可以包括粒徑排阻層析。在一些實施例中，各經修飾多肽係使用標準重組技術來單獨地表達，且它們可以在活體外組裝在一起。組裝可以例



如藉由以下來實現：純化各經修飾多肽、將它們以等質量混合併一起溫育、還原二硫鍵 (例如，藉由用二硫蘇糖醇處理)、濃縮以及再氧化多肽。所形成之 TCR 融合蛋白可以使用標準技術 (包括陽離子交換層析) 來純化並使用標準技術 (包括粒徑排阻層析) 來量測。對於這些方法之更詳細描述，參見 Speiss 等人，*Nat Biotechnol* 31:753-8, 2013。在一些實施例中，包含經修飾抗體 Fc 域的多肽可以單獨地表現於 CHO 細胞中並使用上述方法在活體外組裝。

**【0115】** 在一些實施例中，本揭露之 TCR 融合蛋白包含：第一多肽，其從 N 端到 C 端包含：TCR  $\alpha$  鏈可變區、 $\alpha$  鏈恆定區、第一鉸鏈序列及第一抗體 Fc 域；第二多肽，其從 N 端到 C 端包含：結合在 T 細胞之細胞表面上表現的人 CD3 之單鏈可變片段 (scFv)、連接子、 $\beta$  鏈可變區及  $\beta$  鏈恆定區；以及第三多肽，其從 N 端到 C 端包含：第二鉸鏈序列及第二抗體 Fc 域。有利地，本揭露證明該 TCR 融合蛋白形式 (參見，例如，圖 1B) 具有所測試形式之最有利之藥物動力學特性及最高的活性 (即，效力及選擇性)。

**【0116】** 在一些實施例中，第一及第二多肽係經由在  $\alpha$  鏈恆定區與  $\beta$  鏈恆定區之間的一個或多個雙硫鍵連接，例如，如本文所述。

**【0117】** 在一些實施例中，第一及第三多肽經由第一與第二鉸鏈序列之間的一個或多個鏈間雙硫鍵及/或抗體 Fc 域上的一個或多個對應的杆形成及臼形成突變而連接。

**【0118】** 在一些實施例中，本揭露之 TCR 融合蛋白包含：含有 SEQ ID NO:29 之胺基酸序列的第一多肽、含有 SEQ ID NO:30 之胺基酸序列的第二多肽及含有 SEQ ID NO:28 之胺基酸序列的第三多肽。

**【0119】** 本文進一步提供編碼本文揭示的任何 TCR 及 TCR 融合蛋白的多核苷酸。例如，在一些實施例中，本揭露提供一種多核苷酸之套組，其包含編碼一個、兩個或三個本揭露之多肽的一個、兩個或三個多核苷酸。在一些實施

例中，本揭露提供一種多核苷酸之套組，其包含：第一多核苷酸，該第一多核苷酸編碼包含 SEQ ID NO:29 之氨基酸序列的第一多肽；第二多核苷酸，該第二多核苷酸編碼包含 SEQ ID NO:30 之氨基酸序列的第二多肽；及第三多核苷酸，該第三多核苷酸編碼包含 SEQ ID NO:28 之氨基酸序列的第三多肽。

**【0120】** 本文進一步提供包含本揭露之任何多核苷酸的載體 (例如，表現載體)。在一些實施例中，本揭露之載體包含編碼本揭露之 TCR 融合蛋白的一個、兩個或三個 (例如，全部) 多肽的多核苷酸。例如，在一些實施例中，載體包含：第一多核苷酸，該第一多核苷酸編碼包含 SEQ ID NO:29 之氨基酸序列的第一多肽；第二多核苷酸，該第二多核苷酸編碼包含 SEQ ID NO:30 之氨基酸序列的第二多肽；及第三多核苷酸，該第三多核苷酸編碼包含 SEQ ID NO:28 之氨基酸序列的第三多肽。在一些實施例中，載體編碼包含 SEQ ID NO:29 之氨基酸序列的第一多肽、包含 SEQ ID NO:30 之氨基酸序列的第二多肽及包含 SEQ ID NO:28 之氨基酸序列的第三多肽。本文進一步提供一種載體 (例如，表現載體) 之套組，其包含：第一載體，該第一載體包含編碼包含 SEQ ID NO:29 之氨基酸序列的第一多肽的第一多核苷酸；第二載體，該第二載體包含編碼包含 SEQ ID NO:30 之氨基酸序列的第二多肽的第二多核苷酸；以及第三載體，該第三載體包含編碼包含 SEQ ID NO:28 之氨基酸序列的第三多肽的第三多核苷酸。

**【0121】** 對於 TCR 融合蛋白之重組生產，將例如如上文所述之編碼 TCR 融合蛋白的核酸分離並插入一個或多個載體中，以在宿主細胞中進一步選殖及/或表現。此等核酸可以使用常規方法 (例如，借由使用能夠與編碼 TCR 融合蛋白之多肽鏈的基因特異性結合的寡核苷酸探針) 輕易地分離並序列化，或藉由重組方法生產，或藉由化學合成獲得。

【0122】 本文進一步提供包含本揭露之任何多核苷酸及/或載體的宿主細胞。用於選殖或表現本揭露之多核苷酸及/或載體的合適宿主細胞係此項技術中已知的。用於表現(醣基化)蛋白質的適合宿主細胞亦來源於多細胞生物(無脊椎動物及脊椎動物)。無脊椎動物細胞之實例包括植物及昆蟲細胞。已鑑定出許多桿狀病毒株，它們可以與昆蟲細胞結合使用，特別是用於轉染草地貪夜蛾(*Spodoptera frugiperda*)細胞。植物細胞培養物亦可以用作宿主。參見例如 US 5,959,177、US 6,040,498、US 6,420,548、US 7,125,978 及 US 6,417,429 (描述了在轉基因植物中生產抗體的 PLANTIBODIESTM 技術)。脊椎動物細胞也可用為宿主。例如，可使用適於在懸浮液中生長的哺乳動物細胞株。可用的哺乳動物宿主細胞株的其他實例包括：由 SV40 (COS-7) 轉化的猴腎 CV1 系；人胚胎腎系(如 Graham, F.L. 等人，*J. Gen Virol.* 36 (1977) 59-74 中所述之 293 或 293T 細胞)；幼地鼠腎細胞 (BHK)；小鼠睪丸支持細胞(如 Mather, J.P.，*Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252 中所述之 TM4 細胞)；猴腎細胞 (CV1)；非洲綠猴腎細胞 (VERO-76)；人宮頸癌細胞 (HELA)；犬腎細胞 (MDCK)；Buffalo 大鼠肝細胞 (BRL 3A)；人肺細胞 (W138)；人肝細胞 (Hep G2)；小鼠乳腺腫瘤細胞 (MMT 060562)；TRI 細胞(如 Mather, J.P. 等人，*Annals N.Y.Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68 所述)；MRC 5 細胞；及 FS4 細胞。其他可用的哺乳動物宿主細胞株包括中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞，包括 DHFR- CHO 細胞 (Urlaub, G. 等人，*Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77 (1980) 4216-4220)；及骨髓瘤細胞株，例如 Y0、NS0 和 Sp2/0。有關某些適用於抗體生產的哺乳動物宿主細胞株的綜述，參見例如：Yazaki, P. 和 Wu, A.M.，*Methods in Molecular Biology*，第 248 卷，Lo, B.K.C. 主編，Humana Press，Totowa，NJ (2004)，第 255-268 頁。在一個態樣中，宿主細胞為真核細胞，例如中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞或淋巴樣細胞(例如，Y0、NS0、Sp20 細胞)。

【0123】 本文進一步提供用於生產本文揭示之任何 TCR 融合蛋白之方法。在一些實施例中，方法包括在適合生產 TCR 融合蛋白的條件下培養本揭露之宿主細胞。在一些實施例中，該方法進一步包含自宿主細胞回收 TCR 融合蛋白。

#### IV. 方法及用途

【0124】 本揭露之某些態樣涉及治療癌症之方法。在一些實施例中，方法包括向個體投予有效量之本揭露之 TCR 融合蛋白或醫藥組成物。在一個實施例中，該個體為人。

【0125】 在一些實施例中，個體患有表現 MAGE-A4 之癌症。

【0126】 例如，癌症或腫瘤可以為乳腺癌、食道癌、胃癌 (例如胃部癌症)、頭及頸癌、肺癌、卵巢癌或膀胱癌。癌症或腫瘤可以表現 MAGE A4，且/或可以為實體瘤。在一些實施例中，癌症或腫瘤為滑膜肉瘤。在一些實施例中，癌症或腫瘤具有鱗狀細胞組織學，亦即，為鱗狀細胞癌或腫瘤。

【0127】 在一些實施例中，個體屬於 HLA-A\*02 亞型。

【0128】 本揭露進一步包含醫藥組成物，其包含本揭露之 TCR 或 TCR 融合蛋白及醫藥上可接受之載劑。為向患者投予，本揭示之 TCR 及 TCR-抗 CD3 融合分子可以與一種或多種醫藥可接受之載劑或賦形劑一起以醫藥組成物提供。根據本揭露的治療或成像 TCR 或細胞通常將作為無菌醫藥組成物之一部分提供，該無菌醫藥組成物將通常包括醫藥上可接受之載劑。該醫藥組成物可以呈任何合適的形式 (取決於將其向患者投予的期望方法)。其可以以單位劑型提供，通常提供在密封容器中並且可以作為套組之一部分提供。此等套組通常 (儘管不一定) 包括使用說明。它可以包括複數個該等單位劑量形式。

【0129】 在一些實施例中，TCR 融合蛋白或醫藥組成物係經靜脈內或藉由腫瘤內注射投予。TCR 融合蛋白或醫藥組成物可以適配於藉由任何合適的途

徑，諸如腸胃外 (包括皮下、肌內或靜脈內)、腸內 (包括口服或直腸)、吸入或鼻內途徑而投予。此類組成物可藉由醫藥領域已知的任何方法，例如藉由在無菌條件下將活性成分與載劑) 或一種或多種賦形劑混合來製備。

**【0130】** 取決於待治療之疾病或疾患、待治療之個體之年齡和狀況等，本揭露之物質之劑量可以在寬限度內變化。本揭露之與抗 CD3 抗體關聯的可溶性 TCR 之合適劑量範圍可以在 25 ng/kg 與 50 µg/kg 之間。醫師將最終判定待使用之合適劑量。

**【0131】** 本揭露之 TCR、醫藥組成物、載體、核酸及細胞可以以基本上純的形式，例如至少 80%、至少 85%、至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 之純度提供。

**【0132】** 在一些實施例中，本揭露之方法進一步包含向個體投予第二抗癌劑。

## V. 套組或製品

**【0133】** 在另一態樣，提供含有可用於治療及/或預防上述疾患之材料的製品。製成品包括容器及容器上或與容器相關的標籤或藥品說明書。合適的容器包括例如瓶、小瓶、注射器、IV 溶液袋等。容器可以由多種材料例如玻璃或塑膠形成。該容器可容納組成物，該組成物本身或與有效治療、預防及/或診斷症狀的另一組成物結合使用，並可能具有無菌入口 (例如，容器可為具有可透過皮下注射針頭穿孔的塞子的靜脈內溶液袋或小管)。組成物中的至少一種活性劑為本發明之抗體。標籤或包裝說明書指示該組成物用於治療所選擇的疾病。此外，該製品可以包含 (a) 其中含有組成物的第一容器，其中組成物包含本揭露之 TCR 融合蛋白；及 (b) 其中含有組成物的第二容器，其中組成物包含另一細胞毒性劑或治療劑。本發明之此態樣中的製成品可以進一步包含指示組成物

可以用於治療具體疾病的包裝說明書。可替代地或另外地，製成品可以進一步包含第二 (或第三) 容器，該容器包含醫藥上可接受之緩衝劑，例如抑菌注射用水 (BWFI)、磷酸鹽緩衝鹽水、Ringer 溶液和葡萄糖溶液。從商業和使用者的角度來看，它可以進一步包含其他材料，其中包括其他緩衝劑、稀釋劑、過濾器、針頭和注射器。

【0134】認為本說明書足以使熟習此項技術者能夠實踐本發明。對於熟習此項技術者而言，根據前文描述，除本文所示及所述之修改之外的本發明之各種修改是明顯的，且該等修改在隨附申請專利範圍之範圍內。本文引用之所有出版物、專利及專利申請出於所有目的以引用之方式整體併入本文。

### 實例

【0135】藉由參照以下實例將更充分地理解本發明。然而，其不應解釋為限制本發明之範圍。應理解的是，如本文中所描述之實例及實施方式僅用於說明目的，且基於所描述之實例及實施方式的各種改型或變型將被建議給此熟習項技術者且將被包括在本申請之精神及範圍內以及所附申請專利範圍之範圍內。

#### **實例1：TCR-抗 CD3 融合分子上的工程糖基化**

【0136】包含與種系癌症抗原 MAGE-A4 特異性、高親和力結合的可溶性 TCR 及與 T 細胞結合的抗體片段 (例如，抗 CD3 scFv) 的融合蛋白已描述為潛在免疫治療劑。參見，例如，WO2017175006。為了提供具有有利性質 (例如，效力及活體內藥物動力學) 的 TCR-抗 CD3 融合分子，進行進一步的工程化。

#### 材料與方法

#### TCR-抗 CD3 融合分子

【0137】單醣基化 TCR-抗 CD3 融合分子包含表現在 CHO 細胞中的三條多肽鏈，對應於 SEQ ID No:28-30。三條多肽鏈包含：(1) 游離 Fc 域，其具有杵突變 (SEQ ID NO:26) 及鉸鏈序列 (SEQ ID NO:31)；(2) 可溶性、單株、高親和力抗 MAGE-A4 TCR  $\alpha$  鏈，其包含含有 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列的  $\alpha$  鏈可變區及含有 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列的  $\alpha$  鏈恆定區，其中具有杵突變的 Fc 域 (SEQ ID NO:27) 經由鉸鏈序列 (SEQ ID NO:31) 與 TCR  $\alpha$  鏈之 C 端連接；以及 (3) 抗 CD3 scFv 變異體，其包含經由連接子 (SEQ ID NO:18) 與 TCR  $\beta$  鏈之 N 端連接的 SEQ ID NO:17 之胺基酸序列，其中該  $\beta$  鏈包含含有 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列的  $\beta$  鏈可變區及含有 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列的  $\beta$  鏈恆定區。與親代抗 CD3 scFv 相比，變異體包含 CDR1 中的 T164A 突變及 FR3 中的 I201F 突變 (根據 SEQ ID NO:17 進行編號)。

【0138】無醣基化 TCR-抗 CD3 融合分子包含與單醣基化形式相同的子成分，不同之處為  $\alpha$  鏈可變區包含 SEQ ID NO:8 之胺基酸序列 (因此全長  $\alpha$  鏈包含 SEQ ID NO:12 之胺基酸序列)。無醣基化形式及單醣基化形式兩者均具有在親代  $\alpha$  鏈恆定區 (SEQ ID NO:10) 之 3 個 N-醣基化位點處的 N $\rightarrow$ Q 取代。無醣基化形式及單醣基化形式兩者均具有在親代  $\beta$  鏈恆定區 (SEQ ID NO:15) 之 N-醣基化位點處的 N $\rightarrow$ Q 取代。

## 藥物動力學

【0139】使用雄性 SCID 小鼠 (N=4)。經由單次靜脈推注以 0.665 mg/kg、0.0665 mg/kg 或 0.00665mg/kg 注射無醣基化或單醣基化 TCR-抗 CD3 融合分子。以 0.665 mg/kg 注射對照 N297G TCR-抗 CD3 融合分子作為對照。所有 TCR-抗 CD3 融合分子以 0.133 mg/mL 提供。注射後 5 分鐘、1 小時、24 小時、7 天、10 天、14 天及 21 天收集系列樣品 (25  $\mu$ L 血液 $\rightarrow$ 10  $\mu$ L 血清)。藉由

電化學發光免疫測定來檢測血清中的樣品，其中對經生物素化的 MAGEA4 肽-HLA 進行捕獲，且用磺基標記的抗 scFv 抗體進行檢測。

### 全局 N 連接多醣組成之分析

【0140】 10 µg 之蛋白質用 8 M HCl 胍以 1:1 體積比變性，並於 95°C 用 100 mM 二硫蘇糖醇還原 10 分鐘。樣品用 100 mM Tris HCl, pH 7.5 稀釋至最終濃度為 2 M 的 HCl 胍，接著於 37°C 用 2 µl 之 PNGase F (P0705S, New England BioLabs) 進行 N 連接去醣基化過夜。去醣基化之後，經由自動採樣器將 150 ng 之各樣品注射至 HPLC 系統 (Agilent 1260) 上。在含有多孔石墨化碳管柱的 PGC 晶片 (G4240-64010, Agilent) 上富集及分離多醣。使用二元泵以 0.5 µl/min 歷經 6 分鐘以 2% 至 32% 溶劑 B 之梯度遞送溶劑 A (99.88% 水、0.1% 甲酸及 0.02% 三氟乙酸) 及溶劑 B (90% 乙腈、9.88% 水、0.1% 甲酸及 0.02% 三氟乙酸)，並保持 1.5 分鐘。然後歷經 0.5 分鐘將溶劑 B 逐步改變為 85%，並保持 1 分鐘以清理管柱。最後，將溶劑 B 逐步改變為 2%，並保持 3 分鐘以重新均衡。

【0141】 使用用於資料採集的下列參數，經由奈噴霧電離進入 Q-TOF 質譜儀 (Agilent 6520)，對經分離之多醣進行在線分析：1.9 kV 噴霧電壓；325°C 氣體溫度；5 l/min 乾燥氣體流量；160 V 碎裂電壓；65 V 撇渣器電壓；750 V oct 1 RF Vpp 電壓；400 至 3,000 m/z 掃描範圍；正極性；使用展動態範圍 (2 GHz) 儀器模式的 MS1 質心資料採集；3 光譜/秒；333.3 ms/光譜；3243 瞬變/光譜；及設置為 0 的 CE。在 Agilent MassHunter 定性分析軟體中針對多醣文庫搜尋所獲取的質譜資料。該軟體演算法利用精確質量與 10 ppm 的質量容差及預期的聚醣鑑定滯留時間的結合。藉由對各所提取之多醣層析圖之 AUC 進行積分，相對於各樣品內所有所識別之 N 連接多醣之總和，對各 N 連接多醣進行無標記定量。



## N-連接糖基化位點標測

【0142】 20 µg 之蛋白質用 8 M HCl 胍以 1:1 的體積比變性，並在 95°C 下用 100 mM 二硫蘇糖醇還原 10 分鐘。樣品用 100 mM Tris HCl, pH 7.5 稀釋至最終濃度為 2 M 的 HCl 胍，接著在 37°C 用 4 µl 之 PNGase F (P0705S, New England BioLabs) 進行 N 連接去糖基化過夜。去糖基化之後，樣品用 40 mM 碘乙醯胺於室溫烷基化 30 分鐘。將樣品分成兩半，以用 0.1 µg 胰蛋白酶 (Promega) 及 0.1 µg 胰凝乳蛋白酶 (Thermo Fisher Scientific) 於 37°C 進行單獨酶消化過夜。用 0.1% TFA 淬滅消化物，並以含有 59.9% 水的 40% 乙腈加 0.1% TFA 洗提步驟對其進行 C18 級尖端清理。清理之後，將肽乾燥並在 50 µl 0.1% TFA 中重構，其中將 1 µl 經由自動採樣器注射至 UPLC 系統 (Waters NanoAcquity) 上，並在加熱至 45°C 的 Acquity M-Class BEH C18 管柱 (0.1 mm × 100 mm, 1.7 µm 樹脂, Waters) 上進行分離。使用二元梯度泵以 1 µl/min 歷經 35 分鐘以 2% 至 25% 溶劑 B 之梯度遞送溶劑 A (97.9% 水、2% 乙腈及 0.1% 甲酸) 及溶劑 B (97.9% 乙腈、2% 水及 0.1% 甲酸)。歷經 2 分鐘將溶劑逐步改變為 50% 溶劑 B，然後保持在 90% 達 6 分鐘以清理管柱。最後，將溶劑逐步改變為 2% 溶劑 B，並保持 7 分鐘以重新均衡。使用用於資料採集的下列參數，經由奈噴霧電離至 Orbitrap Elite 混合離子阱-Orbitrap 質譜儀 (Thermo Fisher Scientific) 中，對經分離的肽進行在線分析：60,000 分辨率；375-1,600 m/z 掃描範圍；正極性；質心模式；1 m/z 隔離寬度，其中活化 Q 為 0.25，且活化時間為 10 ms；CID 活化；且 CE 設定為 35。在數據相關模式下收集資料，其中在 FTMS 中分析前驅離子，並選擇前 15 個最豐富的離子在 ITMS 中進行斷裂及分析。

【0143】 利用下列參數，使用 Byonic 軟體 (Protein Metrics Inc.) 針對蛋白質序列搜尋所獲取的質譜資料：20 ppm 前驅質量容差，其中碎片質量容差為

0.5 Da；對於精胺酸及離胺酸嚴格的特異性，其中針對胰蛋白酶至多 1 個漏切；對於白胺酸、苯丙胺酸、色胺酸及酪胺酸嚴格的特異性，其中針對胰凝乳蛋白酶至多 2 個漏切；對於半胱胺酸固定的脲甲基化；對於甲硫胺酸的可變氧化；以及對於天冬醯胺酸的可變去醯胺化。Byonic 搜尋結果在 Byologic 軟體 (Protein Metrics Inc.) 中進行分析，並以最小 MS2 評分截止值 200 進行過濾。藉由 MS2 肽斷裂確認肽識別。對含有 N 連接位點的去醯胺化肽，藉由在 Thermo Xcalibur Qual Browser 軟體 (Thermo Fisher Scientific) 中對其經提取離子層析圖進行 AUC 積分，相對於其未修飾形式，進行無標記定量。去醯胺化之改變用於對醯基化進行定量。

### 結合親和力

【0144】使用標準 EDC/NHS 固定方案將抗 hIgG1 抗體固定至 Biacore CM5 捕獲晶片上。ImmTAC 分子在 HBS-EP 緩衝液中製備為 1 ug/ml，並捕獲在抗 hIgG1 固定化 CM5 晶片上。隨後，使抗原 (CD3  $\epsilon$   $\delta$  異二聚體 Fc 融合) 以 100 ul/min 之流速流過經 ImmTAC 捕獲的流動池，其中接觸時間為 210 秒，且解離時間為 300 秒。於 37°C 進行 Biacore，且分析物 (人 CD3  $\epsilon$   $\delta$  異二聚體 Fc 融合) 濃度系列為 0、0.5、2.5、12.5、50、150 nM。

### 結果

【0145】圖 1A 及圖 1B 示出 TCR-抗 CD3 融合分子，其包含抗 CD3 scFv、可溶性單株高親和力 TCR 及抗體 Fc 域以延長活體內半衰期。如圖 2A 所示，可溶性單株 TCR 具有當在 CHO 細胞中生產時經 N-醯基化的 7 個位點。發現所有醯基化位點均可去除，而不影響活性或選擇性。選擇無醯基化及單醯基化變異體進行進一步研究 (圖 2B)。在單醯基化變異體中，使用 N→Q 取代從 TCR 恆定區去除所有 N-醯基化位點，且來自可變區的四個 N-醯基化位點中之兩個經突變 ( $\alpha$  鏈可變區上的 N24Q 取代，以及  $\beta$  鏈可變區上的 N84Q 取

代)。無醣基化變異體包含在  $\alpha$  鏈可變區上的其他 N18Q 取代，以去除最終的 N-醣基化位點。

【0146】亦檢查了從可變區及恆定區去除 N-醣基化位點對蛋白質產率的影響。從 TCR 可變區去除 N-醣基化位點對產率具有顯著的負面影響，而從 TCR 恆定區去除 N-醣基化位點不影響產率 (圖 2C)。構建了一系列雙重及單一 N-醣基化位點變異體以檢查從 TCR 可變區去除單一 N-醣基化位點的影響 (圖 2D)。結果表明，隨著醣基化的降低，產率逐漸減小，其中完全無醣基化分子顯示產率的顯著降低。然而，發現保留 N18 殘基處的 N-醣基化可以提供對任何單一位點之產率的最大提升。

【0147】這些 TCR-抗 CD3 融合分子包括抗體 Fc 域，因為發現這可以顯著改善上述 SCID 小鼠模型中的活體內藥物動力學性質。與不具有從大腸桿菌或 CHO 細胞表現的 Fc 的類似分子相比，發現具有與  $\alpha$  或  $\beta$  鏈融合的 Fc 域的形式具有顯著改善之藥物動力學 (圖 3A 及表 A)。針對這些分子的所有 N-醣基化位點均完好無損。圖 1B 所示之形式 (其中 scFv 位於 TCR  $\beta$  鏈之 N 端，且 Fc 位於  $\alpha$  鏈之 C 端) 具有最有利的藥物動力學性質。將 Fc 與  $\alpha$  鏈之 C 端融合亦產生在所測試之各種形式中具有最高活性 (亦即，效力及選擇性) 的分子。選擇此形式進行進一步測試。

表 A. TCR-抗 CD3 融合分子之藥物動力學。

分子	C <sub>max</sub> (ng/mL)	AUC <sub>inf</sub> (hr*ng/mL)	CL (mL/hr/kg)	T <sub>1/2</sub> (hr)
不具有來自大腸桿菌的 Fc	20300	22600	45.2	3.4
不具有來自 CHO 的 Fc	9400	6210	163	4.7
$\beta$ 鏈上的 Fc	15300	61400	1.64	105
$\alpha$ 鏈上的 Fc	15900	72300	1.38	108

【0148】亦以此形式測試了不同的連接子序列。使用不同的連接子序列，在產率上未觀察到差異。此外，具有不同連接子的分子顯示出相當的效力及脫靶活性水準。最後，具有不同連接子的分子在血清中表現出等同的穩定性。這些結果證明連接子序列不影響活性、產率或血清穩定性。

【0149】為了進一步改善藥物動力學，生成相同 TCR-抗 CD3 融合分子之無糖基化及單糖基化變異體 (如圖 2B 所示) 並在 SCID 小鼠模型中針對活體內藥物動力學性質進行測試。如圖 3B 至圖 3E 所示，與無糖基化形式相比，單糖基化變異體顯示出更好的藥物動力學性質，包括更慢的消除、半衰期及清除率。單糖基化形式顯示出顯著較慢的消除 (圖 3B 及圖 3E)，而對應兩種形式而言，藥物動力學在 100 倍劑量範圍內接近線性 (圖 3C 及圖 3D)。因此，與無糖基化形式相比，具有在  $\alpha$  鏈可變區之 N18 處的單一 N-連接糖基化位點的單糖基化形式顯示出改善的半衰期。

【0150】兩種變異體亦均經歷了穩定性測試。對於熱應力測試，將相同 TCR-抗 CD3 融合分子之無糖基化及單糖基化變異體 (如圖 2B 所示) 在 20 mM His-Acetate 及 240 mM 蔗糖 (pH 5.5) 中以 1 mg/mL 曝露於 30°C 熱應力持續 4 週。孵育之後，藉由 SEC，單糖基化形式顯示出單體損失增加 0.8%，而無糖基化形式顯示出單體損失顯著增加 11.3% (vHMW 形式增加 6.1% 且二聚體增加 4.8%)。兩種形式均在所有潛在的去醯胺化/異構化位點處表現出穩定性。

【0151】兩種形式均在 PBS (pH 7.4) 中以 1 mg/mL 經歷 37°C 之熱應力持續 2 週。孵育之後，無糖基化分子顯示出增加 7.3% (vHMW 形式為 4.1%，二聚體為 1.7%)，而單糖基化分子之單體損失僅為 1.4%。兩種形式均在所有潛在的去醯胺化/異構化位點處幾乎沒有改變。

【0152】總之，發現無糖基化及單糖基化形式具有顯著不同的穩定性。這些結果表明，單糖基化形式比無糖基化形式具有更好的熱應力抗性。在

AAPH 氧化測定中，兩種形式均亦在抗 CD3 scFv 上各潛在氧化位點處顯示出穩定性。綜上所述，這些結果表明， $\alpha$  鏈可變域中位置 N18 處的多醣對於預防聚集至關重要，並表明單醣基化形式比無醣基化形式具有更較佳的可製造屬性。

【0153】亦對無醣基化及單醣基化變異體量測了結合親和力。如藉由 BIACORE 所量測，兩種形式均具有經由 TCR 的對 MAGEA4 肽的相似親和力，其中單醣基化變異體具有  $K_D$  0.17 nM，且無醣基化變異體具有  $K_D$  0.18 nM。

【0154】經由 Biacore 量測基於抗 CD3 scFv U28 變異體及原始 UCHT1v9 的無醣基化及單醣基化分子與人 CD3 $\epsilon$  的親和力。兩種基於 U28 的分子均具有與 CD3 $\epsilon$  的相當親和力 (無醣基化為 14 nM  $K_D$ ；單醣基化為 15 nM  $K_D$ )。基於 UCHT1v9 的分子亦具有對 CD3 的相當親和力 (非醣基化為 17 nM  $K_D$ ；單醣基化為 18 nM  $K_D$ )。雖然基於 U28 的分子之均衡親和力與原始基於 UCHT1v9 的分子相似，但抗 CD3 scFv 之特徵在於結合動力學略有不同 (U28 的結合及解離速率快 2 倍)。

【0155】總之，pMHC 結合之親和力不會因醣基化之存在或不存在而改變。

### **實例 2：單醣基化或無醣基化 TCR-抗 CD3 融合分子之效力及選擇性**

【0156】針對標靶細胞殺傷之效力及選擇性，測試實例 1 中描述之無醣基化及單醣基化 TCR-抗 CD3 融合分子。

#### *材料與方法*

#### **細胞殺傷**

【0157】對於圖 4B 至圖 4D 所示，使用 xCELLigence 平台 (Agilent) 進行測定。以 10:1 之效應標靶細胞比率使用效應細胞。使用歸一化細胞指數 (阻抗

量測) 來判定細胞溶解之百分比。在所有情況下，歷經 96 小時每 2 小時以三次量測進行測定。EC50 值源自 72 小時處的細胞溶解百分比曲線。在 PRISM 中進行曲線擬合。

【0158】對於圖 5A 及圖 5B，使用 Opera Phenix 高內涵篩選系統 (Perkin Elmer) 進行測定。以 5:1 之效應標靶細胞比率使用效應細胞，獲得 AUC 值，並在 PRISM 中進行曲線擬合。由曲線計算 EC50 值。

【0159】對於圖 5C，使用人 IFN- $\gamma$  ELISpot 套組 (BD Biosciences) 進行測定。在測定培養基中以  $1 \times 10^6$ /ml 之密度製備標靶細胞，並以每孔 50,000 個細胞、50  $\mu$ l 之體積進行鋪板。將從新鮮供體血液分離的 PBMC 用作效應細胞。以針對抗原陽性細胞 1:1 及針對抗原陰性細胞 0.8:1 的效應標靶細胞比率來使用效應細胞。使用 AEC 顯色劑檢測樣品。使用帶有 Immunospot 軟體的 CTL 分析儀 (Cellular Technology Limited) 來進行點計數。在 PRISM 中進行曲線擬合併計算 EC50 值。

【0160】藉由定量質譜法來測定 MAGEA4 抗原拷貝數。

### 結果

【0161】使用代表一系列標靶 MAGE-A4 抗原表現的多種癌症細胞系。所有細胞系均表現 HLA-A2。針對所有細胞系的細胞溶解的 EC50 值示出於圖 4A 中，並根據在 72 小時時間點獲得的資料進行計算。殺傷曲線及引起殺傷回應的 TCR-抗 CD3 融合分子之最低濃度示出於圖 4B 至圖 4D 中。無醮基化及單醮基化 TCR-抗 CD3 融合分子兩者均表現出低的 pM 細胞殺傷活性及選擇性。例如，對應兩種分子而言，在 TCR-抗 CD3 融合分子濃度為 0.17 pM 時，觀察到針對 NCI-H1755 肺腺癌細胞 (其具有最高的 MAGE-A4 表現) 的細胞殺傷 (圖 4B)。對於兩種分子而言，在 TCR-抗 CD3 融合分子濃度為 14 pM 時，觀察到針對 SCaBER 膀胱尿路上皮癌細胞 (其 MAGE-A4 表現為中間水準) 的細胞殺傷

(圖 4C)。相反，在 TCR-抗 CD3 融合分子濃度為 3 nM 時，觀察到針對 NCI-H441 細胞 (其為 MAGE-A4 陰性但 HLA-A2 陽性) 的細胞殺傷 (圖 4D)，表明選擇性被保留直至 nM 級。因此，殺傷活性與標靶 (pMHC) 拷貝數相關。這些結果表明對應兩種分子而言，效能及選擇性均較高。

【0162】發現如上所述之具有 Fc 融合的 TCR-抗 CD3 融合分子對表現 MAGE-A4 抗原-HLA 複合體的標靶細胞具有降低的細胞殺傷之效力 (圖 5A 及圖 5B)。然而，如圖 3A 所示，期望包括 Fc 域，以便改善活體內藥物動力學。如此，測試了變異體抗 CD3 scFv。如上所指出，該變異體包括 CDR-H1 及 FR3 的點突變。發現使用 Fc 融合體後的效力損失可以藉由使用變異體抗 CD3 scFv 來抵消 (圖 5A 及圖 5B)。針對抗原陽性癌症細胞，具有 Fc 融合及變異體抗 CD3 scFv 的 TCR-抗 CD3 融合分子之細胞殺傷之 EC50 在不具有 Fc 域之分子之 3 至 10 倍之內。

【0163】所有三種分子均顯示出對抗原(-) 細胞的反應性的降低，類似於對抗原(+) 細胞的效力的降低 (圖 5C)。這些結果表明，對於所有所測試之三種 TCR-抗 CD3 融合分子，中靶及脫靶活性之間的窗口得到保持。

### 實例 3：單醣基化 TCR-抗 CD3 融合分子之活體外安全性測試

【0164】對於針對正常細胞系的安全性，在活體外測試實例 1 中描述之單醣基化 TCR-抗 CD3 融合分子。

#### 材料與方法

#### 活體外安全性測試

【0165】為了針對正常細胞進行測試，藉由 ELISpot 測定來測定反應性，以檢測 IFN $\gamma$  及顆粒酶 B 之釋放。記錄檢測到個細胞激素時 TCR-抗 CD3 融合分子之最低濃度。對於同種異體反應性 (即與替代性 HLA 的結合)，針對以下使用 IFN $\gamma$  ELISpot 測定來評定反應性：6 細胞批次組，其涵蓋全球人口中 5 種

最常見的 HLA-A (HLA\*02:01 除外)、4 種 HLA-B 及 6 種 HLA-C。使用促炎性組 1 (人類) 套組 (Meso Scale Discovery) 來進行全血測定，以檢測從三個供體獲得的全血中的 TNF $\alpha$ 、IL-2、IL-6、IL-1 $\beta$ 、IFN $\gamma$ 。以 0.01 與 10 nM 之間的不同濃度施用 TCR-抗 CD3 融合。

### 結果

【0166】在涵蓋高風險組織類型以及已證明對抗 MAGE-A4 TCR 具有反應性的細胞類型的正常細胞系組中對單醣基化 TCR-抗 CD3 融合分子進行測試。使用 IFN $\gamma$  作為讀數，在覆蓋 15 種最常見 HLA 類型的 6 細胞組中沒有觀察到針對正常細胞的可檢測反應性 (圖 6A)。在全血測定中，在低於 nM 濃度下未觀察到細胞激素釋放。總之，在低於 nM 濃度下未檢測到針對正常細胞系的反應性，證明了該活體外測定中的安全性。

【0167】將具有變異體抗 CD3 scFv 的 TCR-抗 CD3 融合分子與不具有 Fc 的 TCR-抗 CD3 融合分子進行比較再次表明，在正常細胞上中靶及脫靶活性之間的效力窗口得到保持 (圖 6B)。這表明具有 Fc 域及變異體抗 CD3 scFv 的 TCR-抗 CD3 融合分子保持與不具有 Fc 融合的形式等同的治療指數。

### 序列

抗 MAGE-A4 TCR V $\alpha$  CDR-1

VSPFSN (SEQ ID NO:1)

抗 MAGE-A4 TCR V $\alpha$  CDR-2

LTFSENT (SEQ ID NO:2)

抗 MAGE-A4 TCR V $\alpha$  CDR-3

VVNSAQGLYIPTF (SEQ ID NO:3)

抗 MAGE-A4 TCR V $\beta$  CDR-1

LDHEN (SEQ ID NO:4)



抗 MAGE-A4 TCR V $\beta$  CDR-2

SRFATG (SEQ ID NO:5)

抗 MAGE-A4 TCR V $\beta$  CDR-3

ASSSDQNSGDPYEQYF (SEQ ID NO:6)

抗 MAGE-A4 TCR  $\alpha$  鏈可變區 (單醣基化形式)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCQYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSE  
ENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRG  
TSLIVHP (SEQ ID NO:7)

抗 MAGE-A4 TCR  $\alpha$  鏈可變區 (無醣基化形式)

ANQVEQSPQSLIILEGKQVTLQCQYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSE  
ENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRG  
TSLIVHP (SEQ ID NO: 8)

抗 MAGE-A4 TCR  $\alpha$  鏈恆定區 (單醣基化或無醣基化形式)

YIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITDKCVLDM  
RSMDFKSNSAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDT (SEQ ID NO: 9)

親代抗 MAGE-A4 TCR  $\alpha$  鏈恆定區 (完全醣基化形式)

YIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKDSDVYITDKCVLDM  
RSMDFKSNSAVAWSNKSDFACANAFNNSIIPEDT (SEQ ID NO:10)

抗 MAGE-A4 TCR  $\alpha$  鏈 (單醣基化形式)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCQYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSE  
ENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRG  
TSLIVHPYIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITD  
KCVLDMRSMDFKSNSAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDT (SEQ ID NO:11)

抗 MAGE-A4 TCR  $\alpha$  鏈 (無醣基化形式)

ANQVEQSPQSLIILEGKQVTLQCQYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTF  
 ENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRG  
 TSLIVHPYIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITD  
 KCVLDMRSMDFKSNSAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDT (SEQ ID NO:12)

抗 MAGE-A4 TCR  $\beta$  鏈可變區 (單醣基化或無醣基化形式)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLHDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRF  
 ATGKEKGDIPPEGYSVSREKKERFSLILESASTQQTSMYLCASSDQNSGDPYE  
 QYFGPGTRLTVT(SEQ ID NO: 13)

抗 MAGE-A4 TCR  $\beta$  鏈恆定區 (單醣基化或無醣基化形式)

EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEV  
 HSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLS  
 ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD(SEQ ID NO: 14)

親代抗 MAGE-A4 TCR  $\beta$  鏈恆定區 (完全醣基化形式)

EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHVELSWWVNGKEV  
 HSGVCTDPQPLKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLS  
 ENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD(SEQ ID NO: 15)

抗 MAGE-A4 TCR  $\beta$  鏈 (單醣基化或無醣基化形式)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLHDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRF  
 ATGKEKGDIPPEGYSVSREKKERFSLILESASTQQTSMYLCASSDQNSGDPYE  
 QYFGPGTRLTVTDLKKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPDHV  
 ELSWWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQDPRN  
 HFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD(SEQ ID NO: 16)

抗 CD3 scFv U28 變異體

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR  
LESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEI  
KGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG  
YSFTGYAMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDKSK  
NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGTLLTVSS (SEQ  
ID NO:17)

連接子

GGGGS (SEQ ID NO:18)

連接子

GGGSG (SEQ ID NO:19)

連接子

GGSGG (SEQ ID NO:20)

連接子

GSGGG (SEQ ID NO:21)

連接子

GSGGGP (SEQ ID NO:22)

連接子

GGEPS (SEQ ID NO:23)

連接子

GGEGGGP (SEQ ID NO:24)

連接子

GGEGGGSEGGGS (SEQ ID NO:25)

具有杵突變的 Fc 域

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
 VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV  
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:26)

具有白突變的 Fc 域

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
 VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPS  
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV  
 MHEALHNHYTQKSLSLSPGK (SEQ ID NO:27)

單糖基化抗 MAGE-A4 TCR-抗 CD3 scFv Fc 融合鏈 1 (具有杵突變的 Fc)

DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV  
 KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCK  
 VSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPS  
 DIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSV  
 MHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO:28)

單糖基化抗 MAGE-A4 TCR-抗 CD3 scFv Fc 融合鏈 2 (TCR  $\alpha$  鏈與具有白突變的  
 Fc 融合)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCQYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTF  
 ENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRG  
 TSLIVHPYIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKDSDVYITD  
 KCVLDMRSMDFKSNSAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTDKTHTCPPCPAP  
 ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEV

HNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKT  
 ISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE  
 NNYKTTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNV FSCSVMHEALHNHYTQK  
 SLSLSPG (SEQ ID NO:29)

單醣基化抗 MAGE-A4 TCR-抗 CD3 scFv Fc 融合鏈 3 (變異體抗 CD3 scFv 與  
 TCR  $\beta$  鏈融合)

AIQMTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR  
 LESGVPSRFSGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEI  
 KGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASG  
 YSFTGYAMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDKSK  
 NTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDS DWYFDVWGQGT LVT VSSGGG  
 GSDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDL DHENMFWYRQDPGLGLRLIYFS  
 RFATGKEKGDIP EGYSVSREKKERFSLILESASTQQTSMYLCASSDQNSGDP  
 YEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVA VFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPD  
 HVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQDP  
 RNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD (SEQ ID NO:30)

鉸鏈序列

DKTHTCPP (SEQ ID NO:31) 或 DKTHTCPPC (SEQ ID NO:36)

抗 MAGE-A4 TCR  $\alpha$  可變鏈 (完全醣基化形式)

ANQVEQSPQSLIILEGKNVTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFS  
 ENTKSNGRYTATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRG  
 TSLIVHP (SEQ ID NO:32)

抗 MAGE-A4 TCR  $\beta$  可變鏈 (完全醣基化形式)

DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLHDHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRF  
ATGKEKGDIPPEGYSVSREKKERFSLILESASTNQTSMYLCASSDQNSGDPYE  
QYFGPGTRLTVT (SEQ ID NO:33)

MAGE-A4 標靶抗原

GVYDGREHTV (SEQ ID NO:34)

抗 CD3 scFv (親代)

AIQMTQSPSSLSASVGDRVITTCRASQDIRNYLNWYQQKPGKAPKLLIYYTSR  
LESGVPSRFSGSGSG  
TDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGG  
GSGGGGSGGGSEVQLV  
ESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKG  
VSTYNQKFKDRFTISVD  
KSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCARSGYYGDSDWYFDVWGQGTLVTVSS  
(SEQ ID NO:35)

```
<?xml version="1.0" encoding="UTF-8"?>
<!DOCTYPE ST26SequenceListing PUBLIC "-//WIPO//DTD Sequence Listing 1.3//EN"
"ST26SequenceListing_V1_3.dtd">
<ST26SequenceListing originalFreeTextLanguageCode="en"
nonEnglishFreeTextLanguageCode="zh" dtdVersion="V1_3" fileName="C258419SEQA.xml"
softwareName="WIPO Sequence" softwareVersion="2.3.0" productionDate="2023-12-
12">
  <ApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>WO</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText></ApplicationNumberText>
    <FilingDate></FilingDate>
  </ApplicationIdentification>
  <ApplicantFileReference>14639-20541.40</ApplicantFileReference>
  <EarliestPriorityApplicationIdentification>
    <IPOfficeCode>US</IPOfficeCode>
    <ApplicationNumberText>63/399,095</ApplicationNumberText>
    <FilingDate>2022-08-18</FilingDate>
  </EarliestPriorityApplicationIdentification>
  <ApplicantName languageCode="zh">英商英美偌科有限公司 (Immunocore
Ltd)</ApplicantName>
  <ApplicantNameLatin>Immunocore Ltd</ApplicantNameLatin>
  <InventionTitle languageCode="en">T CELL RECEPTORS AND FUSION PROTEINS
THEREOF</InventionTitle>
  <InventionTitle languageCode="zh">T 細胞受體及其融合蛋白</InventionTitle>
  <SequenceTotalQuantity>36</SequenceTotalQuantity>
  <SequenceData sequenceIDNumber="1">
    <INSDSeq>
      <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
      <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
      <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
      <INSDSeq_feature-table>
        <INSDFeature>
          <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
          <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
          <INSDFeature_qual>
            <INSDQualifier>
              <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
              <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
            </INSDQualifier>
          </INSDFeature_qual>
        </INSDFeature>
      </INSDSeq_feature-table>
    </INSDSeq>
  </SequenceData>
</ST26SequenceListing>
```

```
<INSDQualifier id="q2">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>VSPFSN</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="2">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q4">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>LTFSENT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="3">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>13</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
```



```
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..13</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q6">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>VVNSAQGLYIPTF</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="4">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q8">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
```

```
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>LDHEN</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 5" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
<INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q10">
<INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
<INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>SRFATG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 6" >
<INSDSeq>
<INSDSeq_length>16</INSDSeq_length>
<INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
<INSDFeature>
<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..16</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
<INSDQualifier>
```

```

    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q12">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ASSSDQNSGDPYEQYF</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="7">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q14">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCQYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNGRY
    TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQLYIPTFGRGTSLIVHP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="8">

```

```

<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q16">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ANQVEQSPQSLI ILEGKQVTLQCQYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRGTSLIVHP</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="9">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>86</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..86</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q18">

```

```

    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>YIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTQVSQSKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKNSA
VAWSQKSDFACANAFQNSI IPEDT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="10">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>86</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..86</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q20">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>YIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFDSQTNVSQSKSDSVYITDKCVLDMRSMDFKNSA
VAWSNKSDFACANAFNNSI IPEDT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="11">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>199</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>

```

```

<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..199</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q22">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCQYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRGTS LIVHPYIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD
SQTQVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSN SAVAWSQKSDFACANAFQNSI IPEDT</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="12">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>199</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..199</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q24">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```

    </INSDQualifier>
  </INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ANQVEQSPQSLIILEGKQVTLQCQYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVNSAQGLYIPTFGRGTSLIVHPYIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD
SQTQVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="13">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>116</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..116</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q26">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRFATGKEKGD IPE
GYSVSREKKERFSLILESASTQQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="14">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>130</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>

```

```

<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..130</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q28">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPHVELSWWWNGKEVHSGVCTDPQP
LKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD</INSDSeq_se
quence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="15">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>130</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..130</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q30">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```



```

    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>EDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYDPHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQP
LKEQPALNDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD</INSDSeq_se
quence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="16">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>246</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..246</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q32">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRFATGKEKGD IPE
GYSVSREKKERFSLILESASTQQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFPPEVAVFEPSEAEISHTQK
ATLVCLATGFYDPHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQDPRNHFRCQVQFYGLSEN
DEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="17">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>253</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>

```

```

<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..253</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q34">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>AIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGAPKLLIYYTSRLESGVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKGGGSGGGGSGGGGSGGGGSGGGSEVQLVESGGGL
VQPGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDT
AVYYCARSGYYGDSWYFDVWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="18">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q36">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GGGGS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="19">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q38">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GGGSG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="20">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>

```

```

<INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
<INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
<INSDFeature_qual>
  <INSDQualifier>
    <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q40">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GGSGG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="21">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q42">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSGGG</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>

```

```
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 22" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>6</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..6</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q44">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GSGGGP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 23" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>5</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..5</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```
</INSDQualifier>
<INSDQualifier id="q46">
  <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
  <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
</INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GGEPS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="24">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>7</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..7</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q48">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>GGEGGGP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="25">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>12</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
```

```
<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..12</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q50">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>GGEGGGSEGGGS</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="26">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>227</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..227</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q52">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
```

```

    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLYSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="27">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>227</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..227</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q54">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSGSSFLVSKLTVDKSRWQQGNVSCSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPGK</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="28">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>226</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>

```



```

<INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
<INSDSeq_feature-table>
  <INSDFeature>
    <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
    <INSDFeature_location>1..226</INSDFeature_location>
    <INSDFeature_qual>
      <INSDQualifier>
        <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
      <INSDQualifier id="q56">
        <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
        <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
      </INSDQualifier>
    </INSDFeature_qual>
  </INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>DKTHTCPPCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQ
VSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLS
LSPG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="29">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>425</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..425</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q58">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>

```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCQYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRGTSLIVHPYIQKPDPAVYQLRDSKSSDKSVCLFTDFD
SQTQVSQSKSDVYITDKCVLDMRSMDFKSNSAVAWSQKSDFACANAFQNSIIPEDTDKHTHTCPPCPAPELLGGPSVFLF
PPKPKDTLMI SRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYGSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKV
SNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTTPVLDSDGS
FFLVSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 30" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>504</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..504</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q60">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>AIQMTQSPSSLSASVGRVITICRASQDIRNYLNWYQQKPKGAPKLLIYYTSRLESGVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGQGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL
VQPGGSLRLSCAASGYSFTGYAMNWVRQAPGKLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTFSVDKSKNTAYLQMNSLRAEDT
AVYYCARSGYYGDSWYFDVWGQGLVTVSSGGGSDVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLHENMFWYRQDPGLGLR
LIYFSRFATGKEKGDIPGYSVSREKKERFSLILESASTQQTSMYLCASSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVTEDLKNVFP
PEVAVFEPSEAEISHTQKATLVCLATGFYPDHVELSWVNGKEVHSGVCTDPQPLKEQPALQDSRYALSSRLRVSATFWQ

```

```
DPRNHFRQCQVQFYGLSENDEWTQDRAKPVTQIVSAEAWGRAD</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 31" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>8</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..8</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q62">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DKTHTCPP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 32" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>113</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..113</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
  <INSDQualifier id="q64">
    <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>ANQVEQSPQSLI ILEGKNVTLQCNYTVSPFSNLRWYKQDTGRGPVSLTILTFSENTKSNGRY
TATLDADTKQSSLHITASQLSDSASYICVVNSAQGLYIPTFGRGTSLIVHP</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 33" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>116</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..116</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q66">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DVKVTQSSRYLVKRTGEKVFLECVQDLHENMFWYRQDPGLGLRLIYFSRFATGKEKGD IPE
GYSVSREKKERFSLI LESASTNQTSMYLCASSSDQNSGDPYEQYFGPGTRLTVT</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 34" >

```

```
<INSDSeq>
  <INSDSeq_length>10</INSDSeq_length>
  <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
  <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
  <INSDSeq_feature-table>
    <INSDFeature>
      <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
      <INSDFeature_location>1..10</INSDFeature_location>
      <INSDFeature_qual>
        <INSDQualifier>
          <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
        <INSDQualifier id="q68">
          <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
          <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
        </INSDQualifier>
      </INSDFeature_qual>
    </INSDFeature>
  </INSDSeq_feature-table>
  <INSDSeq_sequence>GVYDGREHTV</INSDSeq_sequence>
</INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber="35">
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>253</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..253</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q70">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
```

```

    <INSDQualifier_value>synthetic construct</INSDQualifier_value>
  </INSDQualifier>
</INSDFeature_qual>
</INSDFeature>
</INSDSeq_feature-table>
<INSDSeq_sequence>AIQMTQSPSSLSASVGRVTITCRASQDIRNYLNWYQQKPKGKAPKLLIYYTSRLESGVPSRF
SGSGSGTDYTLTISSLQPEDFATYYCQQGNTLPWTFGGGTKVEIKGGGGSGGGGSGGGGSGGGGSEVQLVESGGGL
VQPGGSLRLSCAASGYSFTGYTMNWVRQAPGKGLEWVALINPYKGVSTYNQKFKDRFTISVDKSKNTAYLQMNSLRAEDT
AVYYCARSGYYGDSWYFDVWGQGLVTVSS</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
<SequenceData sequenceIDNumber=" 36" >
  <INSDSeq>
    <INSDSeq_length>9</INSDSeq_length>
    <INSDSeq_moltype>AA</INSDSeq_moltype>
    <INSDSeq_division>PAT</INSDSeq_division>
    <INSDSeq_feature-table>
      <INSDFeature>
        <INSDFeature_key>source</INSDFeature_key>
        <INSDFeature_location>1..9</INSDFeature_location>
        <INSDFeature_qual>
          <INSDQualifier>
            <INSDQualifier_name>mol_type</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>protein</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
          <INSDQualifier id="q72">
            <INSDQualifier_name>organism</INSDQualifier_name>
            <INSDQualifier_value>Synthetic construct</INSDQualifier_value>
          </INSDQualifier>
        </INSDFeature_qual>
      </INSDFeature>
    </INSDSeq_feature-table>
    <INSDSeq_sequence>DKTHTCPPC</INSDSeq_sequence>
  </INSDSeq>
</SequenceData>
</ST26SequenceListing>

```

## 【發明申請專利範圍】

### 【請求項1】

一種 T 細胞受體 (TCR) 融合蛋白，其包含與 GGYDGREHTV (SEQ ID NO:34) HLA-A\*02 複合體結合的 TCR，其中該 TCR 為與以下共價連接的可溶性 TCR：(1) T 細胞接合域，其結合在 T 細胞之細胞表面上表現的蛋白質，以及 (2) 抗體 Fc 域；其中該 TCR 包含：

(a) 包含  $\alpha$  鏈可變區的 TCR  $\alpha$  鏈，其中該  $\alpha$  鏈可變區包含 (i) 含有 VSPFSN (SEQ ID NO:1) 之胺基酸序列的 CDR1、(ii) 含有 LTFSENT (SEQ ID NO:2) 之胺基酸序列的 CDR2、及 (iii) 含有 VVNSAQGLYIPTF (SEQ ID NO:3) 之胺基酸序列的 CDR3；以及

(b) 包含  $\beta$  鏈可變區的 TCR  $\beta$  鏈，其中該  $\beta$  鏈可變區包含 (i) 含有 LDHEN (SEQ ID NO:4) 之胺基酸序列的 CDR1、(ii) 含有 SRFATG (SEQ ID NO:5) 之胺基酸序列的 CDR2、及 (iii) 含有 ASSSDQNSGDPYEQYF (SEQ ID NO:6) 之胺基酸序列的 CDR3；

其中該 TCR 在單一 N-連接醮基化位點處經醮基化，其中該 N-連接醮基化位點係在根據 SEQ ID NO:7 編號的該  $\alpha$  鏈可變區之殘基 N18 處。

### 【請求項2】

如請求項 1 之 TCR 融合蛋白，其中該 TCR 包含在除了殘基 N18 之外的每個潛在 N-醮基化位點處的胺基酸取代。

### 【請求項3】

如請求項 2 之 TCR 融合蛋白，其中該 TCR 包含在以下處的胺基酸取代：

(a) 根據 SEQ ID NO:32 編號的該  $\alpha$  鏈可變區之殘基 N24；

(b) 根據 SEQ ID NO:10 編號的  $\alpha$  鏈恆定區之殘基 N33、N67 及 N78；

(c) 根據 SEQ ID NO:33 編號的該  $\beta$  鏈可變區之殘基 N84；以及

(d) 根據 SEQ ID NO:15 編號的  $\beta$  鏈恆定區之殘基 N70。

**【請求項4】**

如請求項 2 或請求項 3 之 TCR 融合蛋白，其中該等胺基酸取代為 N→Q。

**【請求項5】**

如請求項 4 之 TCR 融合蛋白，其中該 TCR 包含下列胺基酸取代：

(a) 在根據 SEQ ID NO:32 編號的該  $\alpha$  鏈可變區中的 N24Q；

(b) 在根據 SEQ ID NO:10 編號的該  $\alpha$  鏈恆定區中的 N33Q、N67Q 及 N78Q；

(c) 在根據 SEQ ID NO:33 編號的該  $\beta$  鏈可變區中的 N84Q；以及

(d) 在根據 SEQ ID NO:15 編號的該  $\beta$  鏈恆定區中的 N70Q。

**【請求項6】**

如請求項 1 至 5 中任一項之 TCR 融合蛋白，其中該 TCR 在該  $\alpha$  鏈恆定區及/或該  $\beta$  鏈恆定區中包含一個或多個經工程化半胱胺酸殘基以在該  $\alpha$  鏈與該  $\beta$  鏈之間形成非天然雙硫鍵。

**【請求項7】**

如請求項 6 之 TCR 融合蛋白，其中該 TCR 包含在根據 SEQ ID NO:15 編號的該  $\beta$  鏈恆定區之位置 57 處的半胱胺酸殘基。

**【請求項8】**

如請求項 1 之 TCR 融合蛋白，其中該  $\alpha$  鏈可變區包含與 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至



少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。

**【請求項9】**

如請求項 1 或請求項 8 之 TCR 融合蛋白，其中該  $\beta$  鏈可變區包含與 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。

**【請求項10】**

如請求項 1 之 TCR 融合蛋白，其中該  $\alpha$  鏈可變區包含 SEQ ID NO:7 之胺基酸序列，且該  $\beta$  鏈可變區包含 SEQ ID NO:13 之胺基酸序列。

**【請求項11】**

如請求項 1 及 8 至 10 中任一項之 TCR 融合蛋白，其中該 TCR  $\alpha$  鏈進一步包含  $\alpha$  鏈恆定區，且其中該  $\alpha$  鏈恆定區包含與 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。

**【請求項12】**

如請求項 1 及 8 至 11 中任一項之 TCR 融合蛋白，其中該 TCR  $\beta$  鏈進一步包含  $\beta$  鏈恆定區，且其中該  $\beta$  鏈恆定區包含與 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。

**【請求項13】**

如請求項 1 或請求項 10 之 TCR 融合蛋白，其中該 TCR  $\alpha$  鏈進一步

包含含有 SEQ ID NO:9 之胺基酸序列的  $\alpha$  鏈恆定區，且其中該 TCR  $\beta$  鏈進一步包含含有 SEQ ID NO:14 之胺基酸序列的  $\beta$  鏈恆定區。

**【請求項14】**

如請求項 1 之 TCR 融合蛋白，其中該  $\alpha$  鏈包含與 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。

**【請求項15】**

如請求項 1 或請求項 14 之 TCR 融合蛋白，其中該  $\beta$  鏈包含與 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列具有至少 90%、至少 91%、至少 92%、至少 93%、至少 94%、至少 95%、至少 96%、至少 97%、至少 98%、至少 99% 或 100% 同一性的胺基酸序列。

**【請求項16】**

如請求項 1 之 TCR 融合蛋白，其中該  $\alpha$  鏈包含 SEQ ID NO:11 之胺基酸序列，且該  $\beta$  鏈包含 SEQ ID NO:16 之胺基酸序列。

**【請求項17】**

如請求項 1 至 16 中任一項之 TCR 融合蛋白，其中該抗體 Fc 域為人 Fc 域。

**【請求項18】**

如請求項 17 之 TCR 融合蛋白，其中該抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域、人 IgG2 Fc 域或人 IgG4 Fc 域。

**【請求項19】**

如請求項 17 或請求項 18 之 TCR 融合蛋白，其中該抗體 Fc 域包含減弱 (attenuate) 該 Fc 域之效應功能的一個或多個突變。

**【請求項20】**

如請求項 19 之 TCR 融合蛋白，其中該抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含在根據 EU 索引編號的殘基 N297 處的突變。

**【請求項21】**

如請求項 20 之 TCR 融合蛋白，其中該抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含根據 EU 索引編號的 N297G 取代。

**【請求項22】**

如請求項 19 至 21 中任一項之 TCR 融合蛋白，其中該抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含在根據 EU 索引編號的殘基 E233、L234、L235 及 /或 G236 處的一個或多個突變。

**【請求項23】**

如請求項 22 之 TCR 融合蛋白，其中該抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含根據 EU 索引編號的取代 N297G、E233P、L234V、L235A 及在 G236 處的缺失。

**【請求項24】**

如請求項 19 之 TCR 融合蛋白，其中該抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含在根據 EU 索引編號的殘基 L234、L235 及 P329 處的一個或多個突變。

**【請求項25】**

如請求項 24 之 TCR 融合蛋白，其中該抗體 Fc 域為人 IgG1 Fc 域，其包含根據 EU 索引編號的取代 L234A、L235A 及 P329G。

**【請求項26】**

如請求項 1 至 25 中任一項之 TCR 融合蛋白，其中該抗體 Fc 域係經由鉸鏈序列與該 TCR 融合。

**【請求項27】**

如請求項 26 之 TCR 融合蛋白，其中該鉸鏈序列包含 DKTHTCPP (SEQ ID NO:31) 之胺基酸序列。

**【請求項28】**

如請求項 1 至 27 中任一項之 TCR 融合蛋白，其進一步包含第二抗體 Fc 域，其中該第二抗體 Fc 域係經由以下與第一抗體 Fc 域締合：(1) 一個或多個共價鍵結；及/或 (2) 在促進異源二聚化的該等抗體 Fc 域中之一者或兩者上的一個或多個胺基酸取代。

**【請求項29】**

如請求項 28 之 TCR 融合蛋白，其中該第一抗體 Fc 域及該第二抗體 Fc 域兩者皆包含抗體 CH2 域及 CH3 域。

**【請求項30】**

如請求項 28 或請求項 29 之 TCR 融合蛋白，其中該第一抗體 Fc 域係經由第一鉸鏈序列與該 TCR 融合，且其中第二鉸鏈序列係與該第二抗體 Fc 域之 N 端連接。

**【請求項31】**

如請求項 30 之 TCR 融合蛋白，其中該第一鉸鏈序列及該第二鉸鏈序列係經由在該第一鉸鏈序列與該第二鉸鏈序列之間的一個或多個鏈間雙硫鍵連接。

**【請求項32】**

如請求項 30 或請求項 31 之 TCR 融合蛋白，其中該第一鉸鏈序列及該第二鉸鏈序列兩者皆包含 DKTHTCPP (SEQ ID NO:31) 之胺基酸序列。

**【請求項33】**

如請求項 28 至 32 中任一項之 TCR 融合蛋白，其中該第一抗體 Fc

域及該第二抗體 Fc 域中之一者包含一個或多個杵形成 (knob-forming) 突變且該第一抗體 Fc 域及該第二抗體 Fc 域中之另一者包含一個或多個對應的臼形成 (hole-forming) 突變以促進該等抗體 Fc 域之異源二聚化。

**【請求項34】**

如請求項 33 之 TCR 融合蛋白，其中根據 EU 索引編號，該第一抗體 Fc 域及該第二抗體 Fc 域中之一者包含 T366W 取代，且該第一抗體 Fc 域及該第二抗體 Fc 域中之另一者包含 T366S、L368A、Y407V 取代。

**【請求項35】**

如請求項 34 之 TCR 融合蛋白，其中該第一抗體 Fc 域及該第二抗體 Fc 域中之一者包含 SEQ ID NO:27 之胺基酸序列，且該第一抗體 Fc 域及該第二抗體 Fc 域中之另一者包含 SEQ ID NO:26 之胺基酸序列。

**【請求項36】**

如請求項 35 之 TCR 融合蛋白，其中與該 TCR 共價連接的該第一抗體 Fc 域包含 SEQ ID NO:27 之胺基酸序列，且該第二抗體 Fc 域包含 SEQ ID NO:26 之胺基酸序列。

**【請求項37】**

如請求項 1 至 36 中任一項之 TCR 融合蛋白，其中該 T 細胞接合域結合在 T 細胞之該細胞表面上表現的人 CD3。

**【請求項38】**

如請求項 1 至 37 中任一項之 TCR 融合蛋白，其中該 T 細胞接合域包含抗體抗原結合域。

**【請求項39】**

如請求項 1 至 38 中任一項之 TCR 融合蛋白，其中該 T 細胞接合域為單鏈可變片段 (scFv)。

**【請求項40】**

如請求項 39 之 TCR 融合蛋白，其中該 scFv 包含 SEQ ID NO:17 之胺基酸序列。

**【請求項41】**

如請求項 39 之 TCR 融合蛋白，其中該 scFv 包含 SEQ ID NO:35 之胺基酸序列。

**【請求項42】**

如請求項 1 至 41 中任一項之 TCR 融合蛋白，其中該 T 細胞接合域係經由連接子與該 TCR 共價連接。

**【請求項43】**

如請求項 42 之 TCR 融合蛋白，其中該連接子包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO:18 至 SEQ ID NO:25。

**【請求項44】**

如請求項 1 至 43 中任一項之 TCR 融合蛋白，其中該 T 細胞接合域之 C 端係與 TCR  $\beta$  鏈可變域之 N 端共價連接。

**【請求項45】**

如請求項 44 之 TCR 融合蛋白，其中該 T 細胞接合域之 C 端係經由連接子與該 TCR  $\beta$  鏈可變域之 N 端共價連接。

**【請求項46】**

如請求項 45 之 TCR 融合蛋白，其中該連接子包含選自由以下所組成之群組的胺基酸序列：SEQ ID NO:18 至 SEQ ID NO:25。

**【請求項47】**

如請求項 1 至 46 中任一項之 TCR 融合蛋白，其中該抗體 Fc 域之 N 端係與 TCR  $\alpha$  鏈恆定域之 C 端共價連接。

**【請求項48】**

如請求項 47 之 TCR 融合蛋白，其中該抗體 Fc 域之 N 端係經由鉸鏈序列與該 TCR  $\alpha$  鏈恆定域之 C 端共價連接。

**【請求項49】**

如請求項 48 之 TCR 融合蛋白，其中該鉸鏈序列包含 DKTHTCP (SEQ ID NO:31) 之胺基酸序列。

**【請求項50】**

如請求項 1 至 49 中任一項之 TCR 融合蛋白，其中該 TCR 融合蛋白包含三個多肽，該三個多肽包含：

(a) 第一多肽，其從 N 端到 C 端包含：TCR  $\alpha$  鏈可變區、 $\alpha$  鏈恆定區、第一鉸鏈序列及第一抗體 Fc 域；

(b) 第二多肽，其從 N 端到 C 端包含：結合在 T 細胞之該細胞表面上表現的人 CD3 之單鏈可變片段 (scFv)、連接子、該  $\beta$  鏈可變區及  $\beta$  鏈恆定區；以及

(c) 第三多肽，其從 N 端到 C 端包含：第二鉸鏈序列及第二抗體 Fc 域。

**【請求項51】**

如請求項 50 之 TCR 融合蛋白，其中該第一多肽及該第二多肽係經由在該  $\alpha$  鏈恆定區與該  $\beta$  鏈恆定區之間的一個或多個雙硫鍵連接。

**【請求項52】**

如請求項 51 之 TCR 融合蛋白，其中該第一多肽及該第三多肽係經由以下連接：(1) 在該第一鉸鏈序列與該第二鉸鏈序列之間的一個或多個鏈間雙硫鍵；及/或

(2) 在該等抗體 Fc 域上的一個或多個對應的杵形成及臼形成突變。

**【請求項53】**

如請求項 50 至 52 中任一項之 TCR 融合蛋白，其中該第一多肽包含 SEQ ID NO:29 之胺基酸序列，其中該第二多肽包含 SEQ ID NO:30 之胺基酸序列，且其中該第三多肽包含 SEQ ID NO:28 之胺基酸序列。

**【請求項54】**

一種 T 細胞受體 (TCR) 融合蛋白，其包含與 GVDYDGREHTV (SEQ ID NO: 34) HLA-A\*02 複合體結合的 TCR，其中該 TCR 融合蛋白包含含有 SEQ ID NO:29 之胺基酸序列的第一多肽、含有 SEQ ID NO:30 之胺基酸序列的第二多肽及含有 SEQ ID NO:28 之胺基酸序列的第三多肽。

**【請求項55】**

一種多核苷酸，其編碼如請求項 1 至 54 中任一項之 TCR 融合蛋白。

**【請求項56】**

一種編碼如請求項 50 至 54 中任一項之 TCR 融合蛋白的多核苷酸之套組，其中該套組包含編碼該第一多肽的第一多核苷酸、編碼該第二多肽的第二多核苷酸、及編碼該第三多肽的第三多核苷酸。

**【請求項57】**

一種載體，其包含如請求項 55 之多核苷酸。

**【請求項58】**

如請求項 57 之載體，其中該載體為表現載體。

**【請求項59】**

一種編碼如請求項 50 至 54 中任一項之 TCR 融合蛋白的載體之套組，其中該套組包含編碼該第一多肽的第一載體、編碼該第二多肽的第二載體、及編碼該第三多肽的第三載體。

**【請求項60】**



如請求項 59 之套組，其中該等載體為表現載體。

**【請求項61】**

一種宿主細胞，其包含如請求項 55 之多核苷酸、如請求項 56 之多核苷酸的套組、如請求項 57 或請求項 58 之載體、或如請求項 59 或請求項 60 之載體的套組。

**【請求項62】**

如請求項 61 之宿主細胞，其中該宿主細胞為哺乳動物細胞。

**【請求項63】**

如請求項 62 之宿主細胞，其中該哺乳動物細胞為中國倉鼠卵巢 (CHO) 細胞。

**【請求項64】**

一種生產 TCR 融合蛋白之方法，其包含在適合生產該 TCR 融合蛋白之條件下培養如請求項 61 至 63 中任一項之宿主細胞。

**【請求項65】**

如請求項 64 之方法，其進一步包含自該宿主細胞回收該 TCR 融合蛋白。

**【請求項66】**

一種 TCR 融合蛋白，其係藉由如請求項 64 或請求項 65 之方法所生產。

**【請求項67】**

一種醫藥組成物，其包含如請求項 1 至 54 及 66 中任一項之 TCR 融合蛋白及醫藥上可接受之載劑。

**【請求項68】**

一種治療癌症之方法，其包含向個體投予有效量之如請求項 1 至 54

及 66 中任一項之 TCR 融合蛋白或如請求項 67 之醫藥組成物。

**【請求項69】**

如請求項 68 之方法，其中該個體為人類。

**【請求項70】**

如請求項 69 之方法，其中該個體患有表現 MAGE-A4 的癌症。

**【請求項71】**

如請求項 69 或請求項 70 之方法，其中該個體屬於 HLA-A\*02 亞型。

**【請求項72】**

如請求項 68 至 71 中任一項之方法，其中該 TCR 融合蛋白或組成物係經靜脈內或藉由腫瘤內注射投予。

**【請求項73】**

如請求項 68 至 72 中任一項之方法，其進一步包含向該個體投予第二抗癌劑。

**【請求項74】**

如請求項 1 至 54 及 66 中任一項之 TCR 融合蛋白或如請求項 67 之醫藥組成物，其用於醫藥中，較佳在人類個體 (human subject) 中。

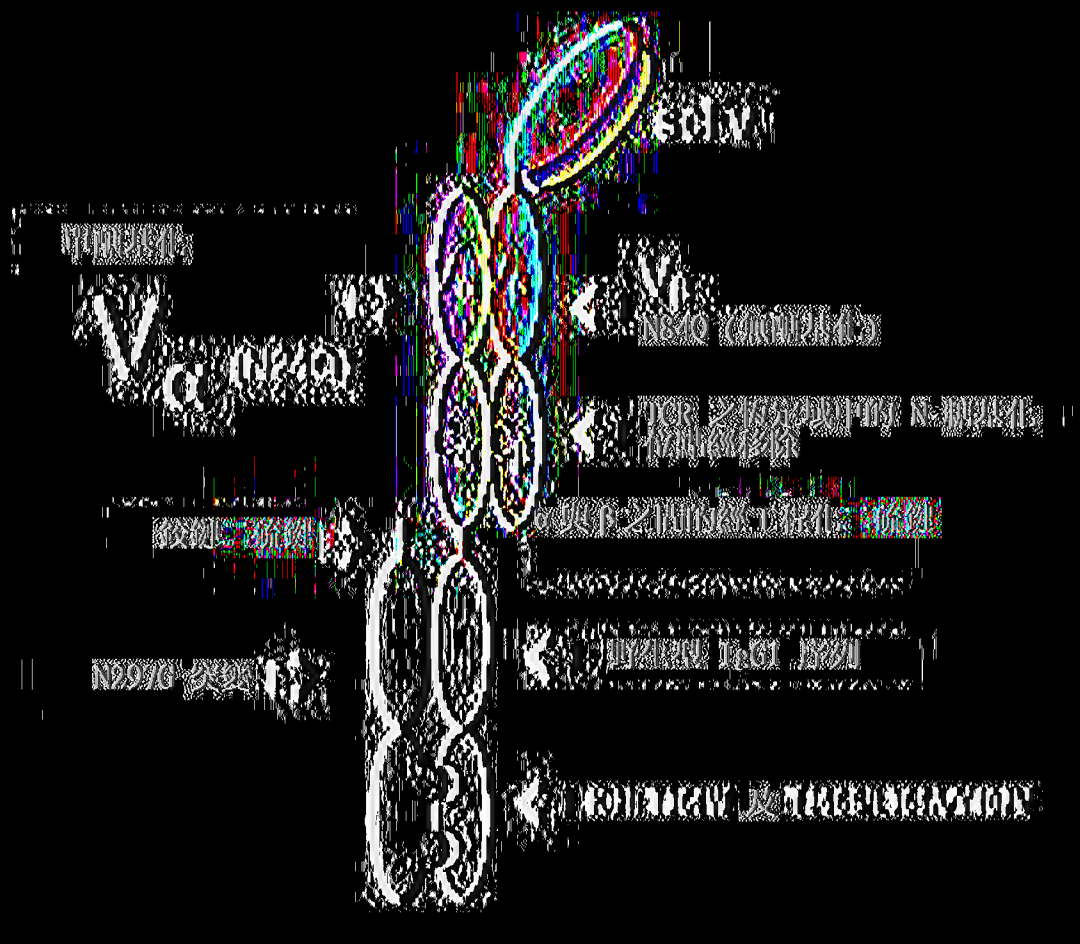
**【請求項75】**

如請求項 1 至 54 及 66 中任一項之 TCR 融合蛋白或如請求項 67 之醫藥組成物，其用於治療癌症，較佳在人類個體中。

**【請求項76】**

如請求項 1 至 54 及 66 中任一項之 TCR 融合蛋白或如請求項 67 之醫藥組成物，其用於製造用於治療癌症的藥物。





113

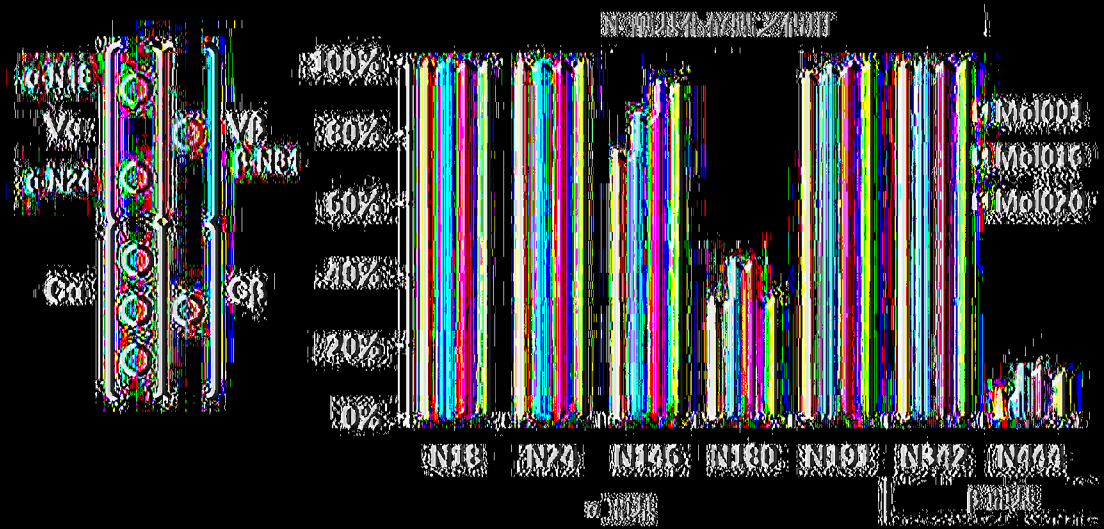


圖 2A

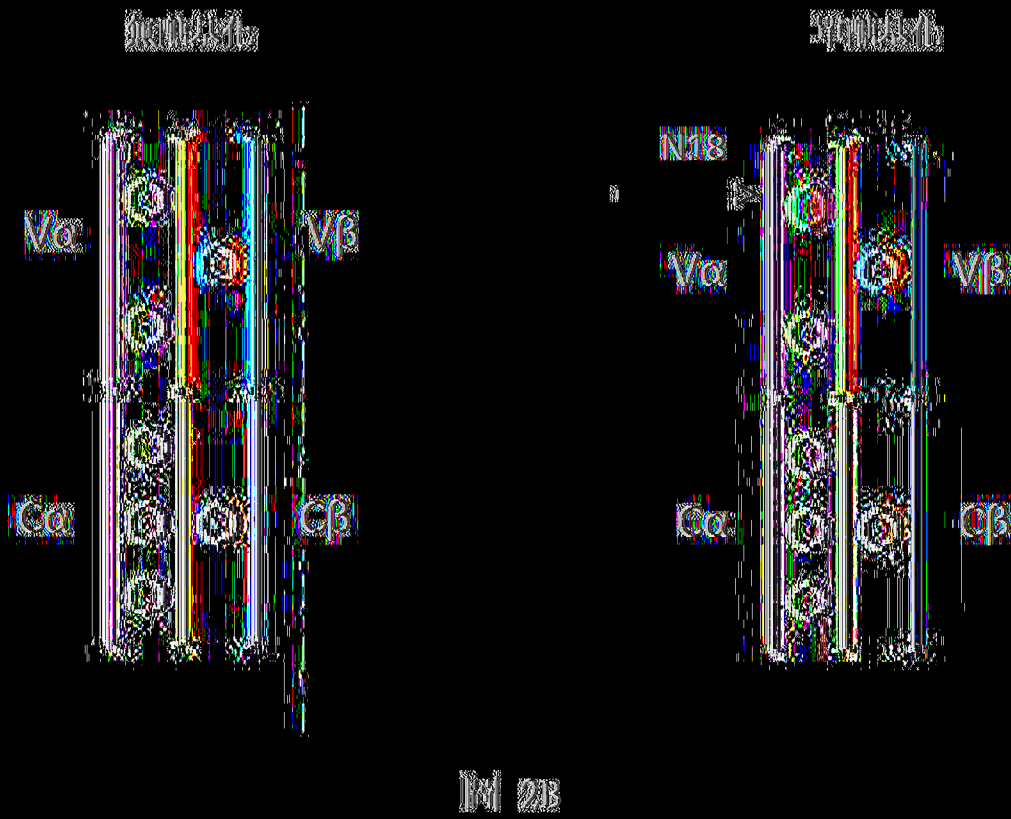


圖 23

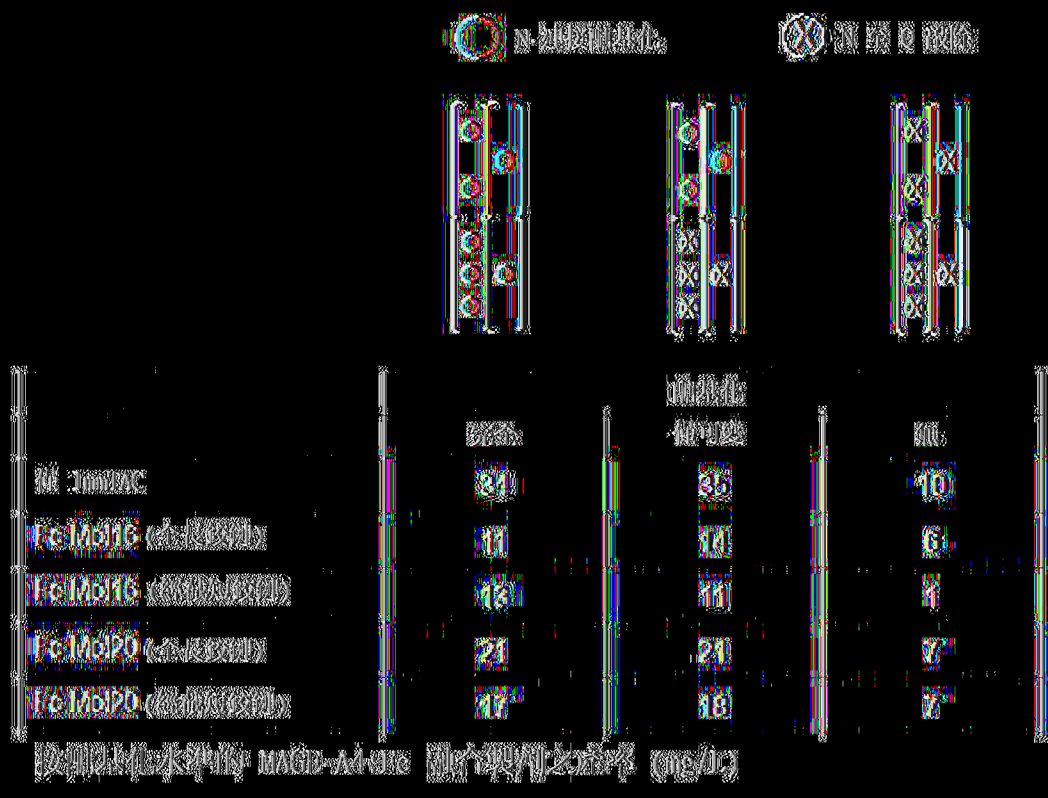


圖 2C

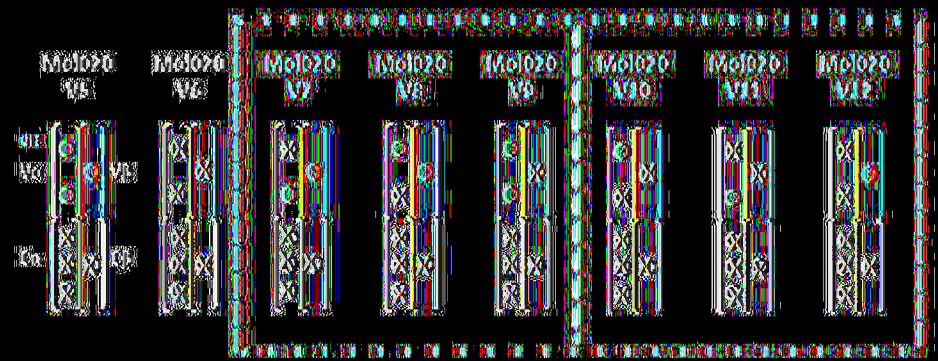
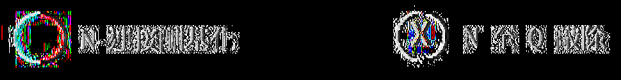


圖 2 顯示本發明之另一實施例之結構圖

厚度	77.5	17.4	56.8	68.7	43.8	47.7	88.1	87.8
----	------	------	------	------	------	------	------	------

圖 2D



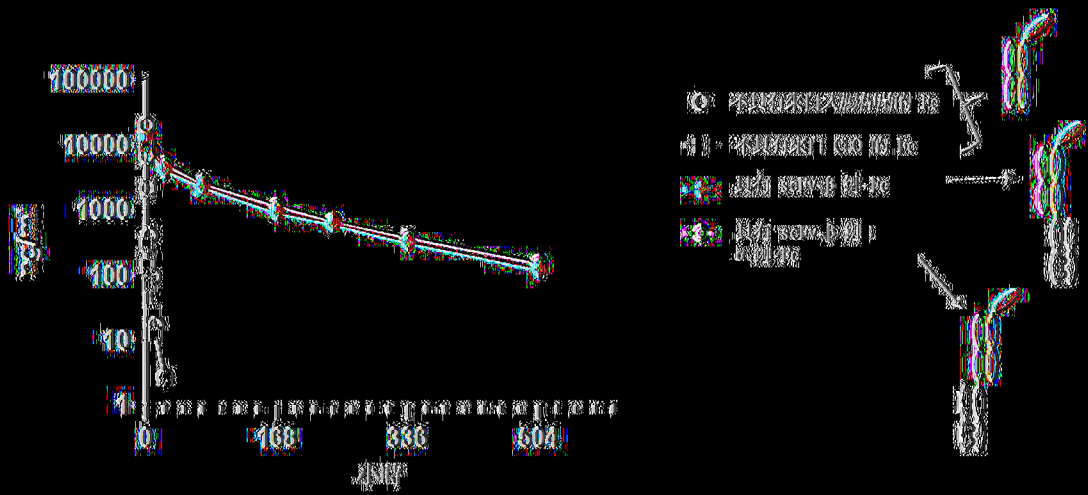


圖 3A

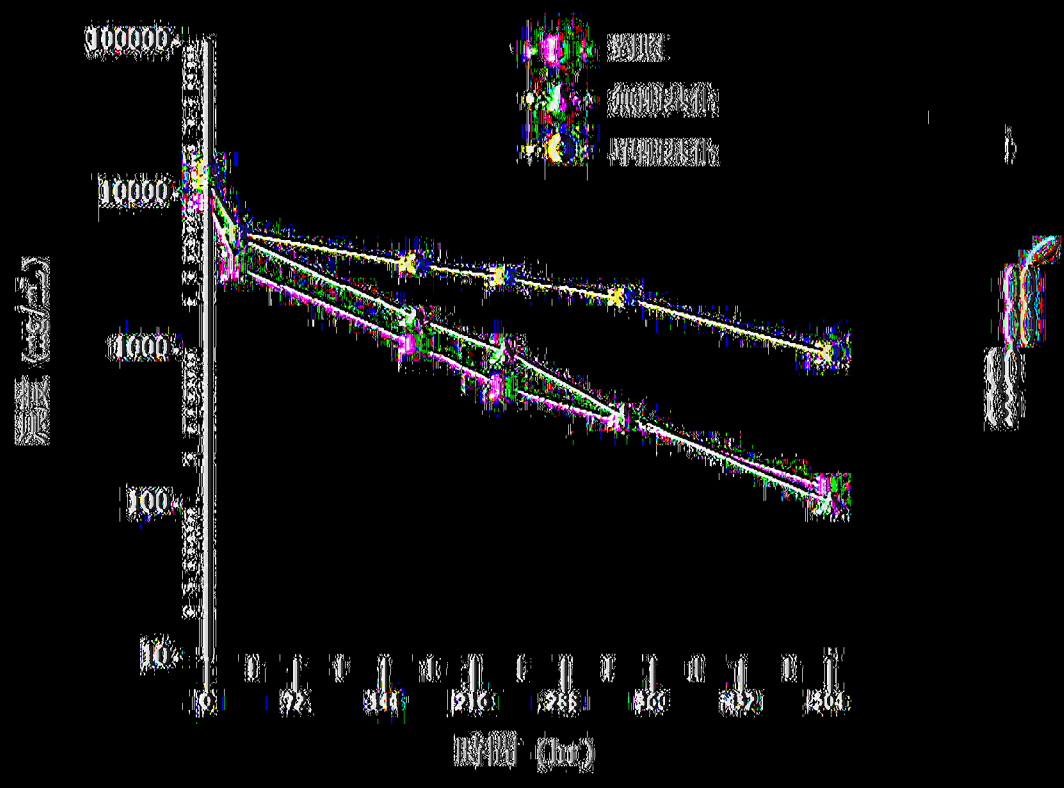


圖 33

### 測試數據圖表

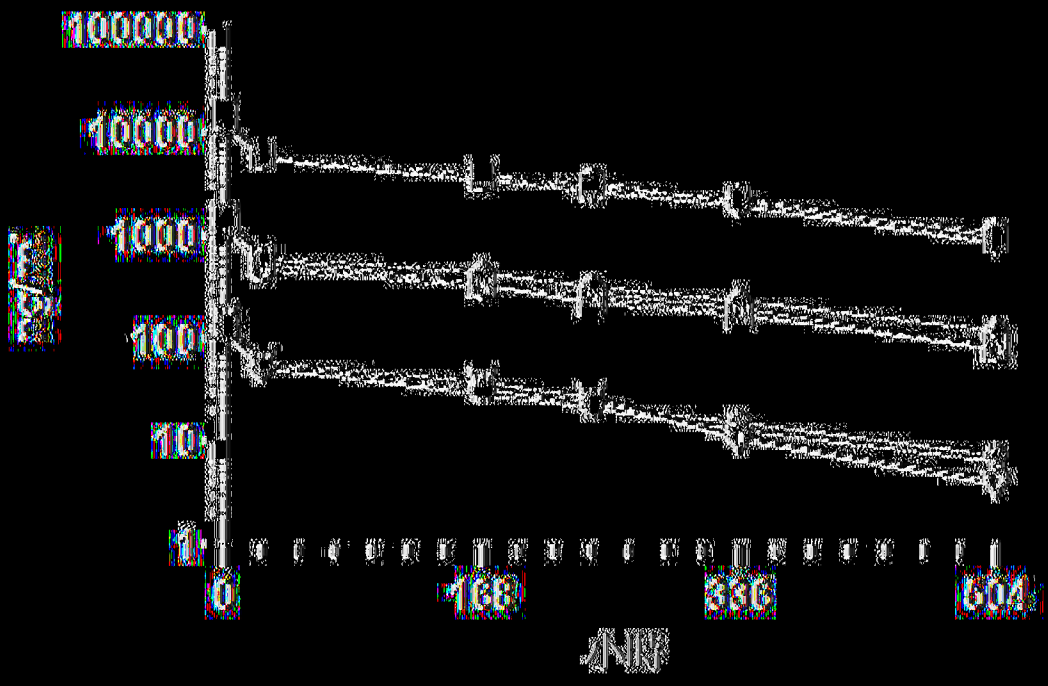
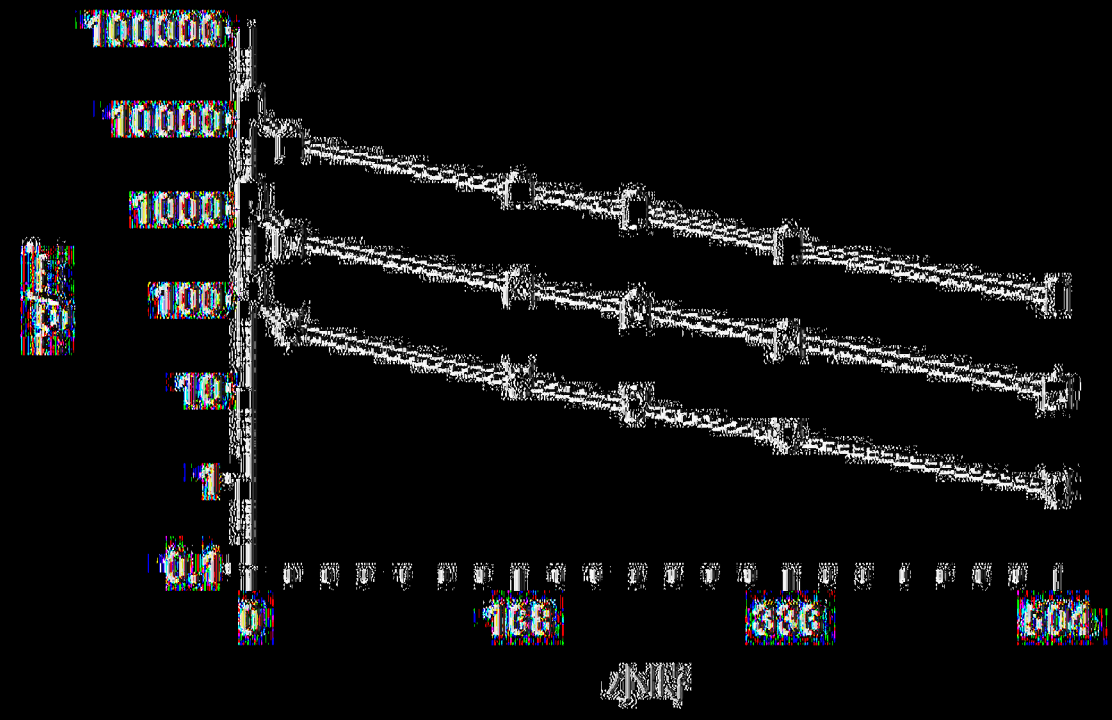


圖 3C

圖 3



(a) 3D

表 10

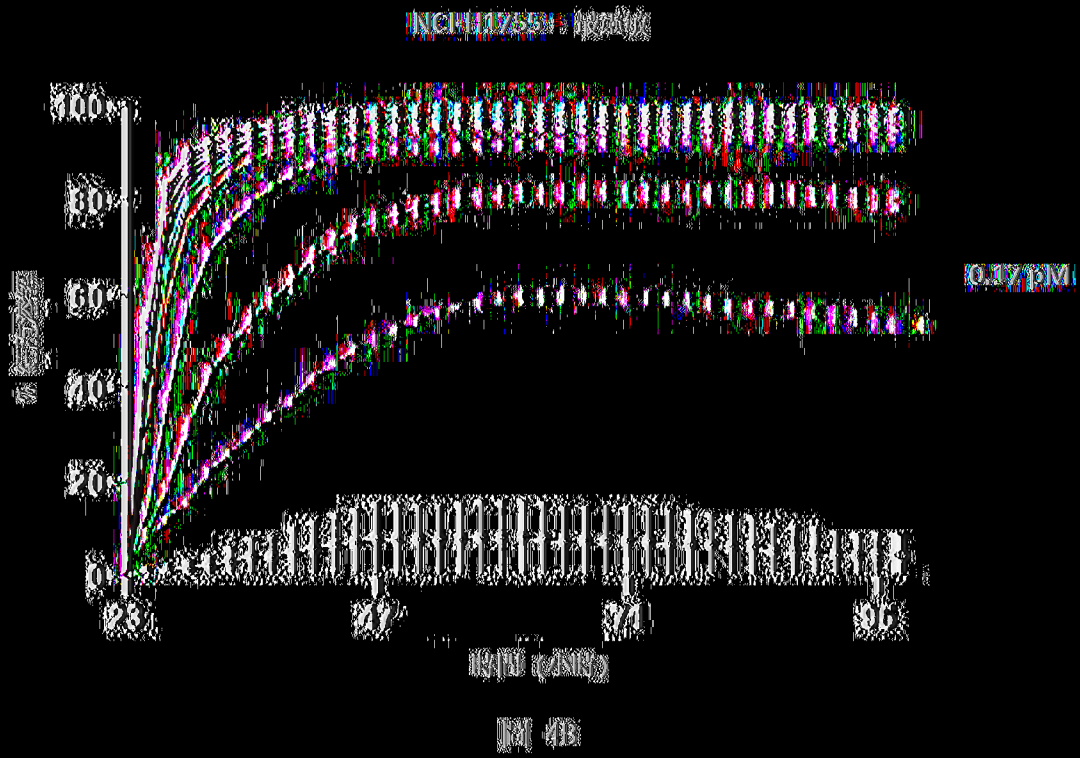
表 11

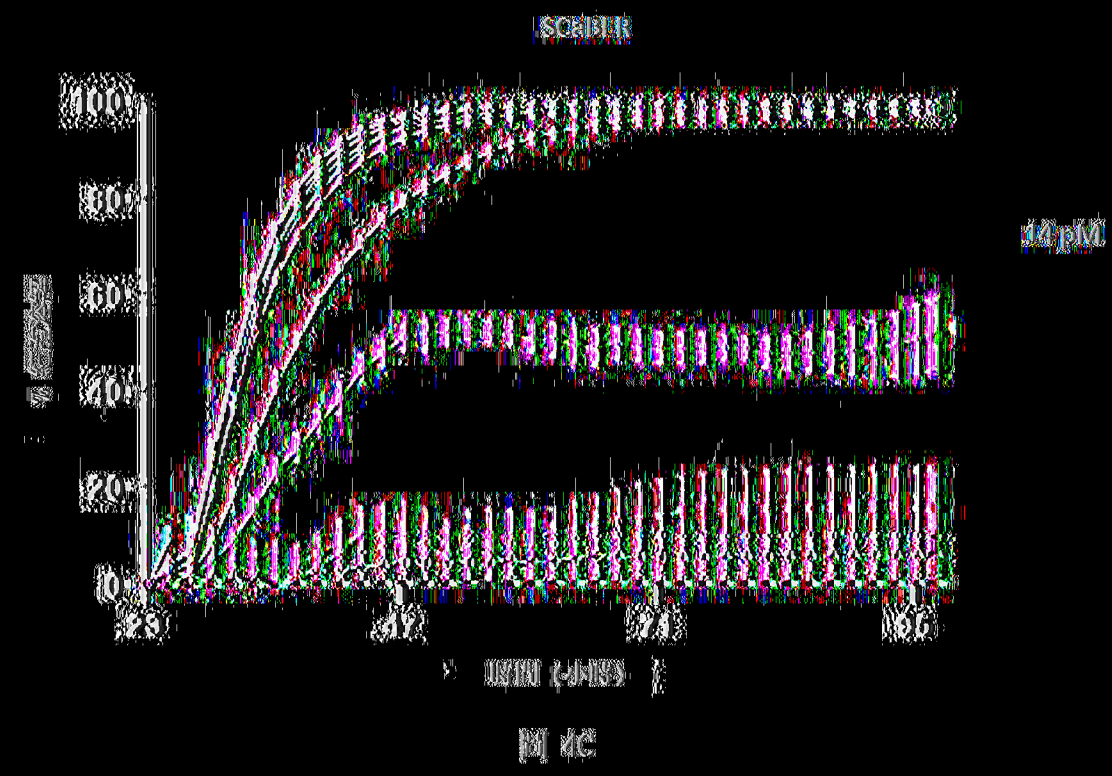
濃度 (μg/Kg)	T1/2	排泄率 (ml/hr/Kg)	T1/2	排泄率 (ml/hr/Kg)
665 μg/Kg	7.2d ± 0.7	0.357 ± 0.016	3.5d ± 1/	0.703 ± 0.062
66.5 μg/Kg	7.1d ± 0.7	0.375 ± 0.018	3.6d ± 1/	0.822 ± 0.096
6.65 μg/Kg	6.5d ± 1.4	0.457 ± 0.025	3.5d ± 1/	0.838 ± 0.085

表 10

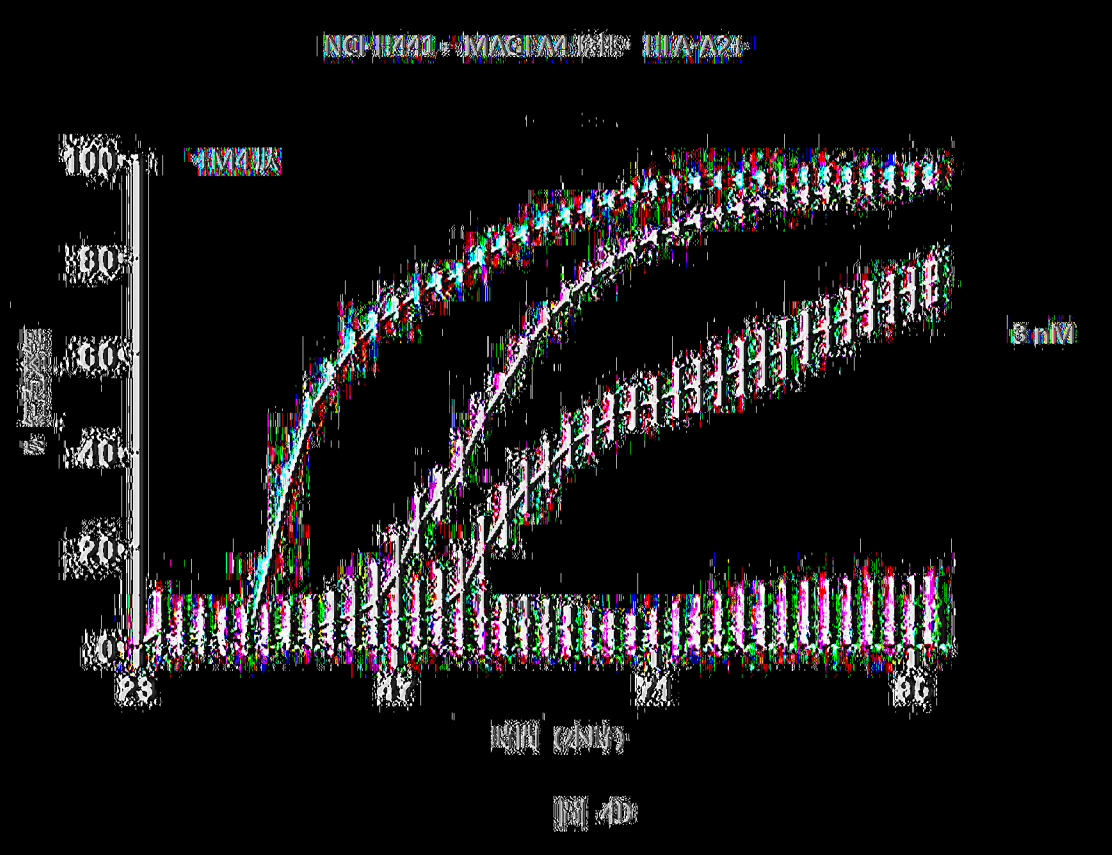
項目	金額	報告書提出時 の金額(百万円)	報告書提出時 の金額(百万円)	報告書提出時 の金額(百万円)	報告書提出時 の金額(百万円)	報告書提出時 の金額(百万円)	報告書提出時 の金額(百万円)
現金	1000000	1000000	1000000	1000000	1000000	1000000	1000000
受取手形	500000	500000	500000	500000	500000	500000	500000
短期有価証券	200000	200000	200000	200000	200000	200000	200000
固定資産	300000	300000	300000	300000	300000	300000	300000
負債	100000	100000	100000	100000	100000	100000	100000
純資産	900000	900000	900000	900000	900000	900000	900000

同様









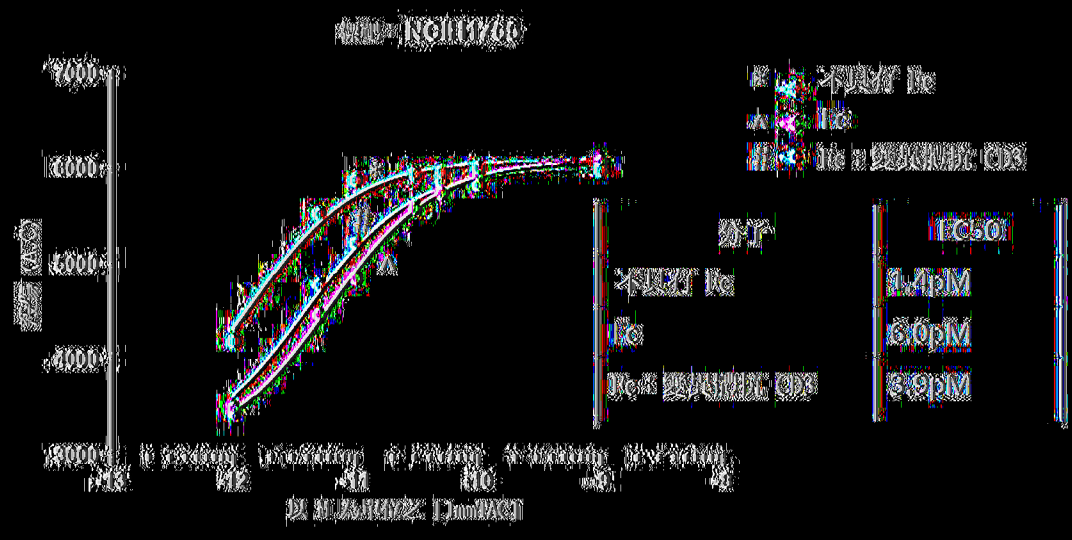
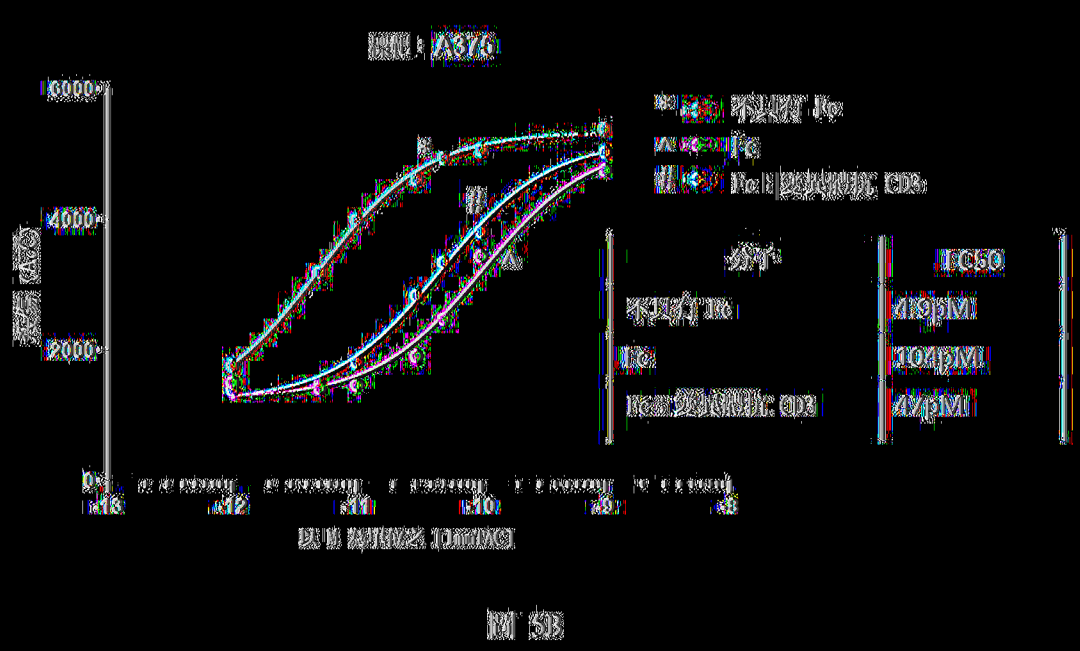


圖 5A



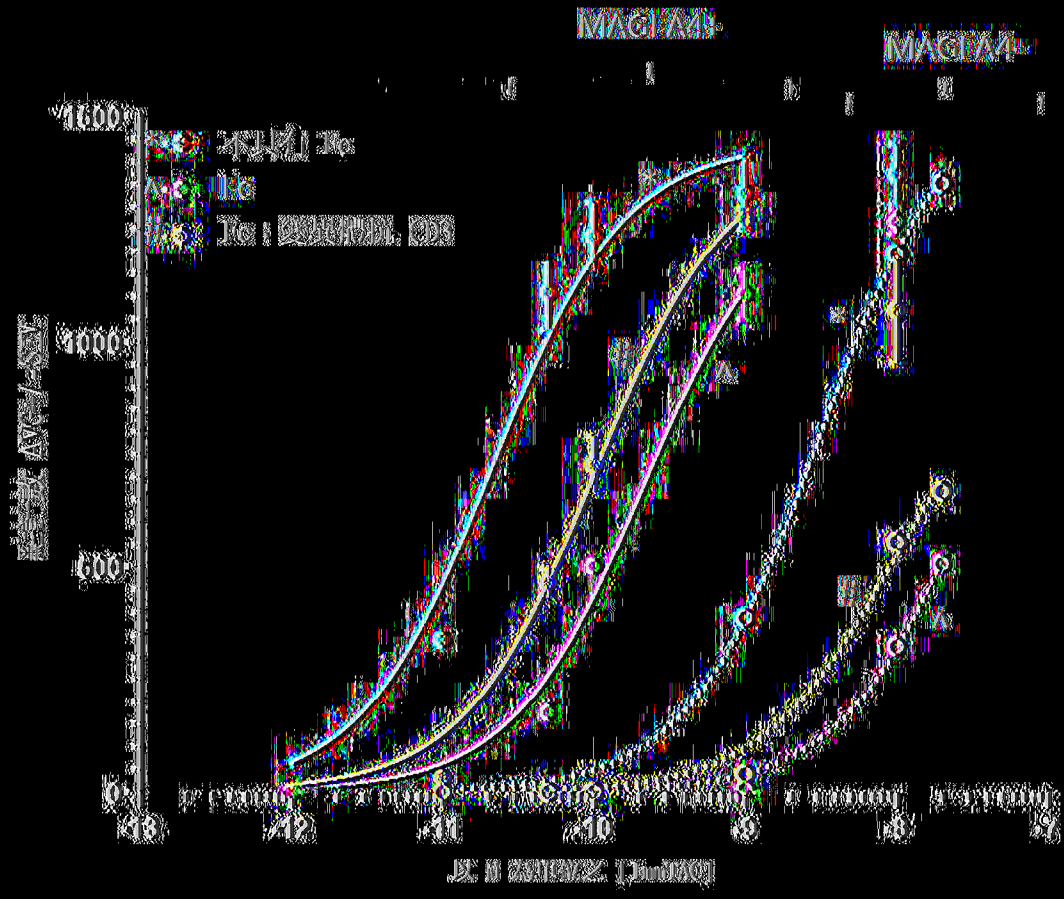


図 50

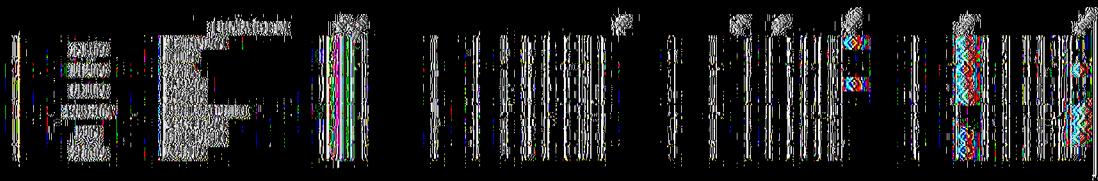


圖 6

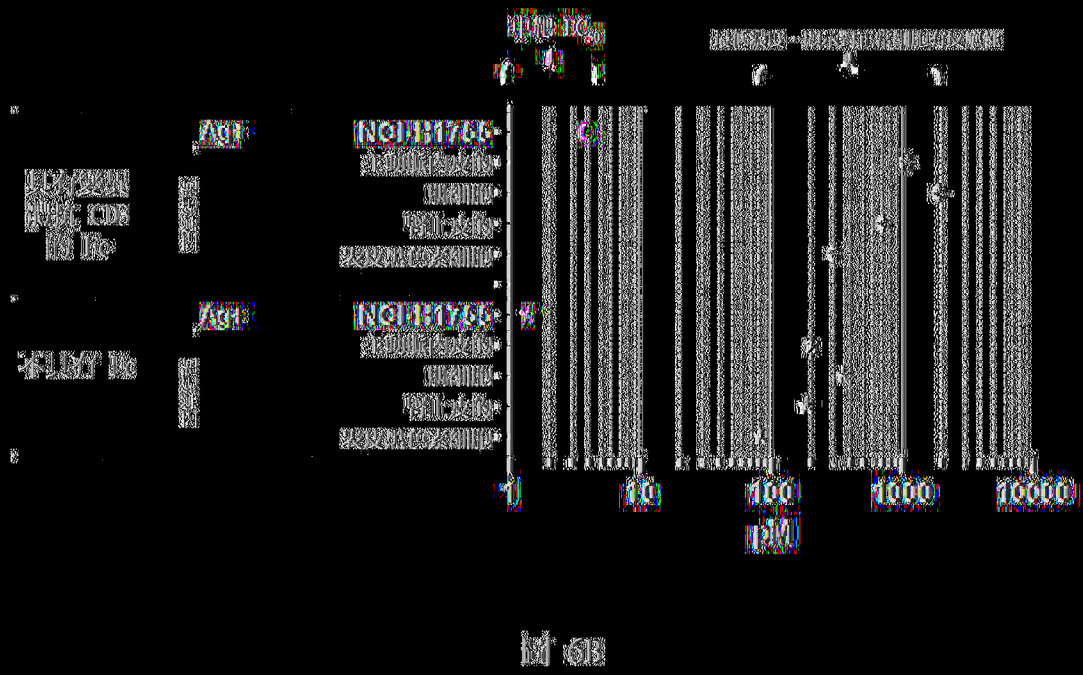


圖 6B